The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	C群色素性乾皮症におけるDNA修復異常の分子メカニズムの解析
Author(s)	安田, 源太郎
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46549
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【14】

氏　　名	安　田　源太郎（やすだ　げんたろう）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２０２５２　号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学　位　論　文　名	**C 群色素性乾皮症における DNA 修復異常の分子メカニズムの解析**
論文審査委員	（主査） 教　授　花岡　文雄 （副査） 教　授　前田　正知　　教　授　宇野　公之　　教　授　松田　敏夫

論文内容の要旨

色素性乾皮症（XP）は日光紫外線に対する過敏症状と皮膚がんの発症を特徴とする、常染色体性劣性のヒト遺伝疾患である。XP 原因遺伝子産物の１つである XPC タンパク質は、ゲノム全体を対象としたヌクレオチド除去修復（global genome nucleotide excision repair : GG-NER）における DNA 損傷認識に関与している。多くの XP-C 群患者ではフレームシフト変異やナンセンス変異により、*XPC* の mRNA レベルが著しく低下し、短縮型 XPC タンパク質さえもほとんど発現していないため、GG-NER を欠損することが示されている。一方、患者に由来する *XPC* 遺伝子のアミノ酸置換型点突然変異が現在までに２例報告されているが、その機能異常の詳細については明らかになっていなかった。本研究では、そのような点突然変異の１つで XP13PV 患者から同定された W690S 変異に着目し、この変異が XPC タンパク質の生化学的活性や細胞内動態に与える影響について検討することにより、変異タンパク質の機能異常、さらには GG-NER 反応機構やその破綻のメカニズムを理解することを目的として研究を行った。

XP13PV 患者細胞における *XPC* の mRNA レベルは野生型細胞と同程度であるにもかかわらず、そのタンパク質レベルは野生型よりも低いことが報告されている。XP13PV 患者細胞内において XPC タンパク質レベルが低下している原因を調べるために、ヒト正常線維芽細胞である NB1-RGB と XP13PV 患者由来の細胞をタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド存在下で培養した。その結果、NB1-RGB 細胞の XPC タンパク質はシクロヘキシミド存在下において安定であったのに対して、XP13PV 患者細胞の全長 XPC タンパク質は時間経過とともに顕著な減少を示した。この減少はプロテアソーム阻害剤である MG132 を加えても抑えられなかったが、約 80 kDa 付近に XPC タンパク質の切断断片と思われるバンドが現れ、時間と共に蓄積した。XP13PV 患者細胞において *XPC* 遺伝子のもう一方のアリルはフレームシフト変異を起こしていることから、ここで観察されているのは XPC（W690S）タンパク質であると考えられた。この変異が XPC タンパク質を不安定化することをさらに確かめるため、XP-C 群細胞である XP4PASV を親株とし、FLAG タグを融合した XPC タンパク質（野生型、および W690S 変異体）をほぼ生理的なレベルで安定に発現する細胞株をそれぞれ作製した。これらの形質転換細胞を同様にシクロヘキシミド存在下で培養したところ、野生型 XPC タンパク質と比べて W690S 変異体は著しく不安定であった。さらに、MG132 の添加により XPC（W690S）タンパク質を発現する細胞では、XP13PV 患者細胞と同様に約 80 kDa のバンドが検出された。以上の結果、XPC タンパク質は W690S 変異により、プロテアソームによる分解や、他のプロテアーゼによる切断を介して不安定化し、このことが XP13PV 患者細胞における XPC タンパク質レベルの低下を招いているものと考えられた。

続いて、この変異 XPC 自身の修復活性について調べるため、XPC（W690S）タンパク質がほぼ生理的なレベルで存在している形質転換細胞における（6-4）光産物の修復速度を測定した。その結果、W690S 変異体はたとえタンパク質として発現していても XP-C 群細胞の GG-NER 欠損を相補できないことが示された。そこで、W690S 変異により XPC タンパク質のどのような機能が影響を受けているのかを明らかにするため、まずタンパク質間相互作用について検討した。上記の形質転換細胞の抽出液から FLAG-XPC（W690S）タンパク質を免疫沈降したところ、野生型と同様に HR23B、centrin 2、TFIIH のサブユニットである XPB タンパク質の共沈が確認された。出芽酵母 Rad23p ホモログの１つである HR23B は、XPC タンパク質の安定化に寄与することが示されているが、W690S 変異体の不安定化は Rad23p ホモログとの相互作用が欠損した結果ではないと考えられる。次に、XPC (W690S)-HR23B 複合体を組換えタンパク質として精製し、これと GST タグを融合した centrin 2、UV-DDB（His-DDB1/GST-DDB2 複合体）、および TFIIH のサブユニットである XPB、p62 との相互作用を GST プルダウンアッセイにより検討した。その結果、XPC（W690S）タンパク質は野生型 XPC タンパク質と同様に *in vitro* でこれらすべてのタンパク質と特異的に相互作用することがわかった。これらのことから、W690S 変異は XPC タンパク質のヘテロ三量体形成、および他の NER 因子との既知のタンパク質間相互作用には影響を及ぼさないことが示された。

次に、XPC タンパク質の損傷 DNA 結合能に対する変異の影響を検討した。180 塩基対の非損傷 DNA と（6-4）光産物を一箇所含む DNA をプローブとして、精製した XPC 複合体を用いたゲルシフトアッセイを行った。その結果、野生型 XPC 複合体は損傷 DNA に特異的に結合し、かつ非損傷 DNA にも弱いながら結合したのに対して、変異 XPC 複合体は損傷の有無に関わらず結合活性を示さなかった。さらに、この変異 XPC 複合体は無細胞 NER 反応系においても活性を示さなかったことから、W690S 変異により XPC タンパク質は損傷 DNA 結合能を欠損することによって、NER 活性を失うことが示された。

さらに W690S 変異が XPC タンパク質自身、およびその他の NER 因子の細胞内での挙動にどのような影響をもたらすのかを調べるため、局所紫外線照射による損傷部位へのタンパク質の集積を指標として解析を行った。変異 XPC タンパク質を発現する形質転換細胞に局所紫外線照射した結果、変異 XPC タンパク質は無細胞系で損傷 DNA 結合能を欠損していたにもかかわらず、野生型 XPC タンパク質と同じように損傷部位へ集積することがわかった。さらに、この集積は GG-NER 特異的な損傷 DNA 結合因子であり、XPC タンパク質と物理的に相互作用することが知られている UV-DDB の発現に依存していた。これらのことから、XPC タンパク質の損傷部位への効率よいリクルートにおける UV-DDB の役割が強く示された。

変異 XPC タンパク質は損傷部位へリクルートされるものの、それ以降の GG-NER 反応の過程に何らかの異常があるはずである。そこで、XPC 複合体の損傷部位への結合の後にリクルートされると考えられる XPB、および XPA タンパク質について局所紫外線照射に伴う局在の変化を検討した。その結果、変異 XPC タンパク質を発現する細胞の XPB タンパク質は局所紫外線照射後、損傷部位へ集積したが、XPA タンパク質の集積は観察されなかった。以上の結果から、W690S 変異により DNA 結合活性を欠損した XPC タンパク質は UV-DDB 依存的に損傷部位に集積し、かつタンパク質間相互作用により TFIIH をリクルートすることができるものの、その後の修復過程の異常により XPA タンパク質のリクルート、あるいは XPA タンパク質を含む安定な修復複合体の形成に至らないものと考えられる。

本研究により、わずか１アミノ酸の変化が XPC タンパク質の量的な欠損、および機能的欠損を招き、その結果 GG-NER 機構が破綻することが明らかになった。アミノ酸の置換による XPC タンパク質の失活は他に例が知られていないことから、さらに多くの変異タンパク質を用いて解析を進めることにより、XPC タンパク質の構造活性相関に加えて GG-NER 反応の詳細な分子メカニズムの解明につながることが期待される。

論文審査の結果の要旨

C 群色素性乾皮症の原因遺伝子産物である XPC タンパク質は、ゲノム全体を対象としたヌクレオチド除去修復（GG-NER）における DNA 損傷認識に関わっている。多くの XP-C 群患者ではフレームシフト変異やナンセンス変異により、不完全かつ不安定な XPC タンパク質が発現する結果、GG-NER を欠損する。まれにアミノ酸置換型点突

然変異も見られるが、その解析はほとんどなされていない。本論文ではその一つで XP13PV 患者から同定された W690S 変異に着目し、その変異が XPC タンパク質の生化学的性質や細胞内動態に与える影響を調べることにより、GG-NER の反応機構やその破綻のメカニズムを理解することを目指した。

1）XP13PV 患者細胞における XPC の mRNA レベルは野生型細胞と同程度であるにもかかわらず、そのタンパク質レベルは野生型よりも低いことが報告されている。その原因を調べたところ、本患者細胞の XPC タンパク質は野生型に比べ不安定であることが分かった。

2）この変異 XPC cDNA を XPC タンパク質がヌルの XP-C 細胞にて発現させ、紫外線損傷の修復速度を調べたところ、変異 XPC は GG-NER の欠損を相補出来なかった。

3）変異 XPC は、XPC タンパク質のヘテロ三量体形成および他の NER 因子との既知のタンパク質間相互作用には影響を及ぼさなかった。

4）変異 XPC 複合体は、損傷の有無にかかわらず DNA 結合活性を示さなかった。また無細胞 NER 反応系においても活性を示さなかった。

5）細胞局所に紫外線を照射し、そこへの集積を見たところ、変異 XPC タンパク質は、野生型と同じく損傷局所へ集積した。また変異 XPC を発現する細胞において、TFIIH のサブユニットのひとつである XPB タンパク質は損傷部位に集積したが、XPA タンパク質は集積しなかった。このことは変異 XPC が損傷をきちんと認識することが、XPA タンパク質のリクルートあるいは XPA タンパク質を含む安定な複合体の形成に必須であることを示している。

以上のように、本論文はヌクレオチド除去修復の分子メカニズムに関して新たな知見を明らかにしており、博士（薬学）の学位を授与するに相応しいものと考える。