The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	DDB2 Complex-Mediated Ubiquitylation around DNA Damage Is Oppositely Regulated by XPC and Ku and Contributes to the Recruitment of XPA
Author(s)	竹立, 新人
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58224
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

【10】

氏　　名	竹　立　新　人（たけ　だち　あら　と）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４１１３　号
学位授与年月日	平成22年5月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学　位　論　文　名	DDB2 Complex-Mediated Ubiquitylation around DNA Damage Is Oppositely Regulated by XPC and Ku and Contributes to the Recruitment of XPA （DDB2ユビキチンリガーゼ複合体を介したDNA損傷周辺蛋白質のユビキチン化はXPC,Kuによって制御され、さらにXPAのリクルートに寄与する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　田中亀代次 （副査） 教　授　野島　　博　　教　授　米田　悦啓

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

UV-damaged-DNA binding protein (UV-DDB)はDDB1, DDB2のサブユニットからなる複合体で、ヌクレオチド除去修復のうちゲノム全体の修復(grobal genome nucletotide excision repair; GG-NER)において、損傷によるDNA構造の変化の認識に関与すると考えられている。またDDB2は色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum; XP) E群(XP-E)の原因遺伝子産物である。UV-DDBはさらにcullin 4A (Cul4A), Roc1とユビキチンリガーゼ(E3)複合体を形成し、この複合体により損傷周辺のヒストンやXPCがユビキチン化されることから、GG-NERの初期過程におけるこのE3複合体の機能について解析した。

〔　方法ならびに成績　〕

1, 変異DDB2の解析

XP-E患者で同定された3種の変異型cDNAをHeLa細胞に導入し、それぞれの形質転換株から変異DDB2を精製してE3複合体形成能とE3活性について調べた。DDB2 に含まれる7つのWD-40リピートモチーフのうち、4番目のWD-40リピートモチーフに変異を持つ変異DDB2(R273H)と、5番目のWD-40リピートモチーフを含むC末端115アミノ酸を欠失する変異DDB2(Δ313-427)ではUV-DDBおよびE3複合体が形成されず、E3活性もほとんど検出されなかった。他方、R273Hと同じく4番目のWD-40リピートモチーフに変異をもつ変異DDB2(K244E)ではUV-DDBおよびE3複合体が形成され、E3活性も検出された。

K244EとGG-NER能低下との関係を明らかにする為、精製したDDB2複合体を用いて損傷DNA結合活性を調べた。その結果、DDB2(K244E)は野生型DDB2に比べて損傷DNA結合活性が低いことがわかった。また紫外線照射した細胞において野生型DDB2複合体がコアヒストンと相互作用するのに対し、DDB2(K244E)複合体ではこの相互作用が検出されず、さらに局所紫外線照射を行った細胞において、DDB2(K244E)の損傷部位への集積が野生型DDB2に比べて顕著に低下していた。また紫外線照射したDNAを用いてモノヌクレオソームを再構成しin vitroで解析を行った結果、DDB2(K244E)複合体がヌクレオソーム中のコアヒストンをユビキチン化できないことがわかった。これらの結果から、ヌクレオソーム中のコアヒストンのユビキチン化には、DDB2複合体の損傷DNA結合活性とE3活性の両方が必要であることが示唆された。

2, 損傷部位におけるDDB2複合体の機能解析

これまでの報告に反して、DDB2複合体によるコアヒストンのユビキチン化はヌクレオソーム構造の安定性に影響を及ぼさなかった。一方、局所紫外線照射を行った細胞においてDDB2とXPAとの共局在が検出され、さらにin vitroの解析から損傷部位におけるDDB2複合体を介したユビキチン化がXPAのリクルートを促進する結果が得られた。これらのことから、DDB2複合体のE3活性が他のNER因子の損傷部位へのリクルートに寄与することが示唆された。

また我々は紫外線照射した細胞においてDDB2複合体と相互作用する因子として新たにKuを同定した。In vitroの解析から、DDB2複合体が損傷部位に結合する際に、E3活性のネガティブレギュレーターであるCOP9 signalosome (CSN)が複合体から解離すること、さらにXPCが損傷部位においてDDB2複合体によりユビキチン化されるだけでなくそのE3活性を促進することがわかった。一方KuはDDB2複合体のE3活性を抑制した。この抑制効果はDDB2の自己ユビキチン化の抑制においてより顕著に検出された。XPC, KuによるE3活性制御のメカニズムとして、これらが損傷部位においてDDB2複合体の安定性に影響を及ぼすことが示唆された。

さらにKuのサブユニットであるKu86をノックダウンした細胞に局所紫外線照射を行ったところ、損傷部位へのDDB2の集積が顕著に抑制された。この結果から、Kuが損傷部位におけるDDB2の過度の自己ユビキチン化を抑制することでDDB2複合体の損傷部位への保持に寄与していることが示唆された。

〔　総　　括　〕

XP-E患者由来の変異DDB2は損傷DNA結合活性とE3活性の一方あるいは両方を欠損していた。またDDB2複合体を介した損傷部位周辺の蛋白質のユビキチン化がCSN, XPC, Kuなどによって制御され、さらにはXPAの損傷部位へのリクルートを促進することがわかった。以上の結果より、DDB2複合体のE3活性がクロマチン構造をとるDNA上の損傷部位において様々に制御され、GG-NER機構に寄与していることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

UV-damaged-DNA binding protein (UV-DDB)はDDB1, DDB2のサブユニットからなる複合体で、ヌクレオチド除去修復のうちゲノム全体の修復(grobal genome nucletotide excision repair; GG-NER)において、損傷によるDNA構造の変化の認識に関与すると考えられている。またDDB2は色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum; XP) E群(XP-E)の原因遺伝子産物である。UV-DDBがユビキチンリガーゼ(E3)複合体の構成因子であることから、申請者らはGG-NERの初期過程におけるこのE3複合体の機能について解析した。XP-E患者由来の変異DDB2の解析から、GG-NER初期過程のプロセシングにDDB2複合体の損傷DNA結合活性及びE3活性の両方が必要であることがわかった。またDDB2複合体を介した損傷部位周辺の蛋白質のユビキチン化がXPC, Kuなどによって制御され、さらにはXPAの損傷部位へのリクルートを促進することが明らかになった。以上の研究をまとめた論文は、Molecular and cellular Biology 誌において掲載予定である。よって学位の授与に値すると考えられる。