

ヒト細胞における紫外線誘発DNA損傷結合タンパクの分離とその解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16023

氏名	若杉光生
生年月日	
本籍	石川県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第180号
学位授与の日付	平成8年3月25日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	ヒト細胞における紫外線誘発 DNA 損傷結合タンパクの分離とその解析 (Isolation and characterization of a UV-damaged-DNA binding protein in human cells)
論文審査委員	(主査) 二階堂 修 (副査) 大熊勝治, 山下克美 大場義樹, 鈴木文男

学位論文要旨

UV-damage-specific binding proteins are considered to play important roles in early responses of cells irradiated with UV, including damage recognition in DNA repair process. I have surveyed the nuclear and cytoplasmic proteins that bind selectively to UV-irradiated DNA. I purified one of the binding factors from nuclear extracts to homogeneity, which was designated NF-10 (the 10th fraction of nuclear extract on heparin chromatography). Its molecular weight is ~40 kDa and it exists in all xeroderma pigmentosum complementation group cell lines. The experiments using photolyases specific for cyclobutane pyrimidine dimer and (6-4) photoproduct demonstrated that the NF-10 protein binds to UV-DNA through (6-4) photoproduct.

The indirect immunofluorescence and immunoblotting experiments using monoclonal antibody raised against the purified NF-10 protein revealed that UV-irradiation induced NF-10 protein in cell nucleus. Furthermore, the immunodepletion of NF-10 protein from cell extracts by anti-NF-10 antibody decreased the *in vitro* repair activity, whereas the addition of NF-10 protein recovered its activity.

The partial peptide sequences of NF-10 protein were revealed to be almost identical to human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD). Human GAPD obtained commercially was shown to bind to UV-damaged DNA preferentially. The purified NF-10 protein was found to possess the GAPD activity in glycolysis. These results indicated the GAPD may play a function in nucleotide excision repair as well as in glycolysis, probably in the damage recognition process.

除去修復は、生体内において太陽光中に含まれる紫外線による損傷のみならず、環境中に含まれる環境変異源物質による損傷をも直す比較的应用性の高い修復系であり、全ての生物に存在する普遍的

な機構である。この除去修復機構の遺伝情報維持機能としての重要性は、その機構を欠損した色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum ; XP) の患者が高発癌性であることから示唆される。この除去修復の分子機構を明らかにするために、色素性乾皮症患者の修復欠損を相補する遺伝子・タンパクの単離が試みられてきた。研究の結果、色素性乾皮症患者の欠損を相補する遺伝子のほぼ全部がクローニングされ、それらの遺伝子から作成したリコンビナントタンパクや精製したタンパクを用い、*in vitro* による除去修復反応の再構成が試みられた。その結果、損傷 DNA 鎖切断までの反応で17種類、修復合成から再結合までの反応を含めると約30種類以上ものポリペプチドが最低限必要であることが明らかになった。しかし、その修復反応効率が *in vivo* における反応と比較して極めて低いことから、他の除去修復関連タンパクが、*in vivo* において修復反応を促進している可能性がある。特に、除去修復反応において DNA 損傷の認識の過程が律速段階と考えられるので、再構成反応系に含まれていない DNA 損傷結合タンパクが、*in vivo* において修復反応を促進している可能性が考えられる。現在までの研究により DNA 損傷認識過程には、XPA, RPA, 及び UV-DDB が関与しているといわれているが、どのタンパクも除去修復の基質となる全ての DNA 損傷に結合性を示さないことなど、その詳細な役割に関しては明らかではないのが現状である。本研究では、紫外線照射したオリゴヌクレオチドをプローブにした Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を用いて、紫外線照射 DNA に結合するタンパクを検索し、そのタンパクの性格付けを行った。

HeLa 細胞から Dignam の方法により調製した核抽出液及び細胞質抽出液をヘパリンクロマトグラフィーで分画し、各フラクションについて DNA 損傷結合活性を調べた。その結果、核抽出液に3種、細胞質抽出液に1種の紫外線照射 DNA に結合するタンパクを検出した。これらのタンパクは全て紫外線未照射よりも、紫外線照射 DNA により高い親和性をもつことがわかった。

次にこれらの因子の精製を試みた。核抽出液をヘパリンカラムで分画した際に10番目のフラクションに溶出されてくる因子 (以下 NF-10 と略する) の精製を進めたところ、分子量約 40kDa のペプチドが DNA 損傷結合活性を担っていることが明らかになった。NF-10 タンパクの結合する DNA 損傷を明らかにするため、各種の紫外線線量を照射したプローブへの NF-10 タンパクの結合動態を、紫外線によって誘発される主な DNA 損傷 (シクロブタン型ピリミジン二量体, (6-4) 光産物) に対するモノクローナル抗体の結合動態と比較した。その結果、NF-10 タンパクの結合動態は (6-4) 光産物を認識する抗体と類似していた。シクロブタン型ピリミジン二量体, (6-4) 光産物に対して特異的に作用する光回復酵素によって各損傷を修復したオリゴヌクレオチドに対する NF-10 タンパクの反応性を検討した。結果、シクロブタン型ピリミジン二量体に対する光回復酵素処理により、NF-10 タンパクの結合は変化はしなかったが、(6-4) 光産物に対する光回復酵素処理により、その結合は大きく低下した。従って、NF-10 タンパクは、紫外線照射によって生成する DNA 損傷のうち (6-4) 光産物に結合すると考えられる。

次にこのタンパクの機能を調べるため、精製 NF-10 タンパクを免疫原として、NF-10 タンパクを特異的に認識するモノクローナル抗体を作成した。XP の A から G の全ての相補性群及びバリエーションの細胞から核抽出液を調製し、ウェスタンブロットングを行ったところ、全ての XP 細胞核抽出液において NF-10 タンパクが検出された。既知の DNA 損傷結合因子である XPA 及び UV-DDB タンパクの欠損した XP 細胞においても NF-10 タンパクが存在したことから、今回精製した NF-10 タンパクは、既知の XPA, UV-DDB とは異なる新しい DNA 損傷結合因子であることが示唆された。

細胞内で NF-10 タンパクがどのように分布しているか検討するため、細胞を抗 NF-10 抗体を用いて蛍光染色を行った。その結果、大部分は細胞質に FITC の発色が観察されたが、核にも FITC の発色が観察された。従って NF-10 タンパクは、核と細胞質の両方に存在することが明らかになった。

次いで NF-10 の細胞内分布が紫外線照射により変化するか否かを検討した。正常細胞 (WI38VA13), XP-A 群細胞 (XP12ROSV) に 20 J/m^2 , 5 J/m^2 の紫外線を照射し、48時間培養した後の細胞を染色したところ、紫外線未照射細胞と比較して紫外線照射細胞に、核での FITC の発色が増加した細胞が

多く観察された。この変化を定量的に観察するため、紫外線照射後、正常細胞より核抽出液を調製し、ウェスタンブロッティングにより解析した。まず各種線量の紫外線を照射した細胞の核抽出液における NF-10 タンパクの量的な変化を解析したところ、線量依存的に NF-10 タンパク量は増加し、 10 J/m^2 照射により最高値に達した。一方、 10 J/m^2 の紫外線照射後、経時的に NF-10 タンパクの量の変化について調べたところ、反応時間に依存して照射後48時間まで増加した。また、全細胞抽出液での NF-10 タンパク量の変化を調べたところ、核抽出液を用いた場合に比べるとその量的な変化は少なかった。従って、紫外線照射により、NF-10 タンパクは細胞質から核に移行する可能性が示唆された。

NF-10 タンパクが除去修復に関与しているかどうかを検討するために、Wood らにより樹立された試験管内修復系を用いて検討した。抗 NF-10 抗体による免疫沈降法で NF-10 タンパクを除去した細胞抽出液を用いた際の修復合成量は、抗体を添加せずに同処理を行った場合の60%まで低下した。また、この NF-10 タンパクを除去した細胞抽出液に精製 NF-10 タンパクを添加することにより、抗体を添加せずに同処理を行った細胞抽出液とほぼ同じレベルまで修復合成量が回復した。従って、この NF-10 タンパクは除去修復に関与する新しい DNA 損傷結合因子であると考えられる。

NF-10 タンパクの構造遺伝子をクローニングするため、部分的アミノ酸配列を決定した。精製 NF-10 タンパクをリジルエンドペプチダーゼにより部分消化し、逆相 HPLC によりペプチド断片を分離後、ペプチドシーケンサーにより部分的アミノ酸配列を決定した。得られたペプチド断片のアミノ酸配列は、解糖系を構成する glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD) とほぼ同じであった。次に購入したヒト赤血球由来の GAPD と精製した NF-10 タンパクとの比較を行った。精製した NF-10 タンパクと GAPD は SDS-PAGE 上でもほぼ同じ位置に泳動され、ウェスタンブロッティングにおいて、抗 NF-10 抗体と抗 GAPD 抗体は、NF-10、GAPD の両方に対して反応した。また、GAPD の紫外線照射した DNA に対する結合性を検討したところ、未照射よりも紫外線照射した DNA に対してより多く結合し、線量を変化させたときの結合は、精製 NF-10 タンパクのそれに近似していた。精製 NF-10 タンパクの GAPD 活性を検討したところ、ヒトの GAPD タンパクと同様な活性を示した。従って今回精製した NF-10 タンパクと GAPD はほぼ同一の分子であると考えられる。また、解糖系において GAPD が機能する時の補酵素である NAD^+ を添加すると NF-10 タンパクの DNA 損傷に対する結合が阻害されたことから、 NAD^+ の結合部位を介して紫外線照射 DNA に対して結合していることが示唆された。

以上の結果より、GAPD は、通常の細胞質における解糖系の酵素としての役割の他に、紫外線照射後の生体防御反応として、核内において除去修復、中でも DNA 損傷の認識の段階に関与している可能性が示唆された。

学位論文の審査結果の要旨

本論文の審査は、各審査員が提出された論文の内容につき慎重な審査を行い、かつ申請者と面接した結果、並びに平成8年2月6日開催の口頭発表の内容を踏まえて、同日開催の論文審査委員会で行われ、以下の通り判定した。

本研究論文は、紫外線照射した DNA に対し特異的に結合する因子 (NF-10) を精製し、紫外線によって誘起させる DNA 損傷のうち (6-4) 光産物に結合することを明らかにした。この因子の特性を解析するため、精製タンパクを免疫原としてモノクローナル抗体を作成し、色素性乾皮症の全ての相補性群及びバリエーションの細胞にも NF-10 タンパクが存在することを示した。また、間接蛍光抗体法により細胞内分布を解析し、核と細胞質両方に存在すること、並びにその細胞内分布が紫外線照射により変化することを見いだした。ついで定量的ウェスタンブロッティングにより NF-10 タンパクが紫外線照射により核に誘導されることを明らかにした。また、抗体を利用して免疫沈降法により NF-10 タンパクを除去した試験管内修復合成系では修復効率が著しく低下することから、NF-10 タンパクが除去修復過程に関与することを明らかにした。

また、精製した NF-10 タンパクの部分的アミノ酸配列の決定及び標品との比較を行い、精製 NF-10 タンパクは解糖系を構成する Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD) とほぼ同一であることを示した。以上の結果は、GAPD が本来の細胞質における解糖系の機能以外に、核において除去修復に関与していることを示唆するものである。

以上の知見は、除去修復機構における DNA 損傷の認識過程を理解する上で重要であり、GAPD の多機能性を示した点で評価される。以上の観点から本論文は博士論文に値すると委員会で結論した。