

哺乳類ヌクレオチド除去修復に関わる蛋白質間相互作用の解析

渡 邊 江理子 (指導教員 松影昭夫)

C 群色素性乾皮症 (XP-C 群) の責任遺伝子産物である XPC 蛋白質は、細胞内において HR23B 及び centrin2 とヘテロ三量体 (XPC複合体) を形成し、ヌクレオチド除去修復 (NER) における DNA 損傷認識に関わっている。その後、基本転写因子の 1 つである TFIIF が有するヘリカーゼ活性により損傷周囲の二本鎖 DNA が一本鎖状態に巻き戻されることが構造特異的エンドヌクレアーゼによる損傷鎖切断に重要であると考えられている。しかし、XPC 複合体による損傷認識後の反応機構の詳細は未だ明らかになっていない。本研究では、XPC 蛋白質と他の NER 因子との蛋白質間相互作用に注目し、生化学的な解析を中心に行った。

①XPC 蛋白質と TFIIF との相互作用の解析

TFIIF は 9 つのサブユニットから成る蛋白質複合体であり、その中で XPB 蛋白質及び p62 が XPC 蛋白質との相互作用に関与することが示唆されている。XPC 複合体による損傷認識後の詳細な反応機構を明らかにする目的で、XPC 蛋白質と TFIIF との相互作用についての解析を行った。XPC 蛋白質における XPB 蛋白質もしくは p62 の結合部位を特定するために、3 種類の XPC 欠失変異体を FLAG 融合蛋白質として発現するバキュロウイルスを作成した (図 1)。これらのウイルスを感染させた昆虫細胞抽出液から、抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-XPC を免疫沈降した。その後、別にバキュロウイルスを用いて発現させた GST-XPB, または GST-p62 を添加し、結合した GST 融合蛋白質をイムノブロットングにより検出した。その結果、XPB 蛋白質よりも p62 の方が XPC と強く相互作用すること、また XPC 蛋白質の N 末端近傍に p62 との相互作用部位が存在することが明らかになった (図 2)。

②点突然変異 XPC 蛋白質の性状解析

現在までに報告されている XPC 遺伝子の突然変異の大部分はナンセンス変異かフレームシフト変異であり、それらについて C 末端を欠失した XPC 蛋白質の発現がイムノブロット等で確認された例はない。一方、アミノ酸置換型の点突然変異がこれまでに二例 (P334H, および W690S) 報告されているが (図 1), 蛋白質レベルでのこれらの変異 XPC 蛋白質の機能解析は未だなされていない。これらの点突然変異が XPC 蛋白質の損傷認識活性のほか、他の修復因子との蛋白質間相互作用に影響を与えている可能性を検討するため、点突然変異 XPC 蛋白質の生化学的な性状解析を行った。上記 2 種類の点突然変異 XPC 蛋白質を FLAG 融合蛋白質として発現するバキュロウイルスを作成し、昆虫細胞における発現及び精製を行った。これらの点突然変異 XPC 蛋白質を、それぞれ大腸菌で発現・精製した hHR23B, および centrin2 と混合した後、抗 FLAG 抗体によって免疫沈降したところ、これらの点突然変異はヘテロ 3 量体形成に影響を与えないことがわかった。一方、無細胞 NER 反応系では、centrin2 を除く XPC-HR23B 複合体で十分な NER 活性を有することから、点突然変異 XPC 蛋白質と hHR23B のヘテロ 2 量体の再構成と精製を行い、XP-C 群細胞の粗抽出液を用いた無細胞 NER 反応における活性を調べた。その結果、これらの点突然変異は、無細胞系における NER 反応そのものには顕著な影響を及ぼさないことが示された。このことから、これらの点突然変異 XPC 蛋白質は DNA 損傷に対する結合や NER に必須な蛋白質因子との相互作用に異常を持つ可能性は低いと考えられる。

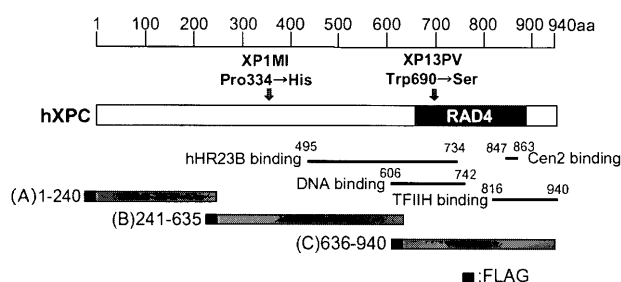


図1 XPCの欠失変異体と点突然変異

(A) 欠失変異XPCとXPBの結合 (B) 欠失変異XPCとp62の結合

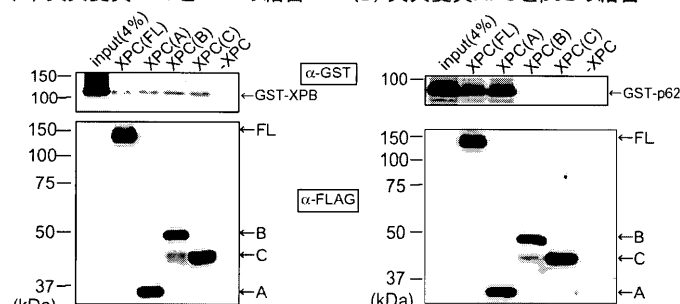


図2 XPCにおけるXPB及びp62の結合