

平成 23年 2月 28日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20770082  
 研究課題名（和文） ユビキチン修飾による DNA 損傷認識因子 XPC の機能調節機構の  
 構造的基盤  
 研究課題名（英文） Structural basis of the ubiquitination dependent modulation of XPC  
 DNA repair protein.  
 研究代表者 真板 綾子 (Maita Ayako)  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究科・助教  
 研究者番号：60415106

## 研究成果の概要（和文）：

XPC タンパク質は、ヌクレオチド除去修復(NER)において、損傷 DNA の構造異常を特異的に認識する。XPC は修復時に活性化されるユビキチンリガーゼ (Cln4A 複合体) によりユビキチン化される。このユビキチン修飾が、XPC 複合体の DNA 損傷認識を促進することが明らかにされているが、その後の修復反応において、どのような役割を果しているのかは殆どわかっていない。そこで本研究では、ユビキチン修飾による XPC の DNA 損傷認識の調節機構を、生化学的および構造生物学的解析を通じて、解明することを目指した。生化学的解析では、XPC タンパク質のユビキチン化がおこる領域を明らかにした。一方、構造生物学的解析では、XPC タンパク質とユビキチンリガーゼの相互作用解析を目指し、XPC の様々な領域の大量発現系の構築を試みたが、発現量や精製過程で沈殿する等の問題点により構造研究に適した大量発現系の構築を行うことはできなかった。

## 研究成果の概要（英文）：

XPC protein specifically recognizes a certain secondary structure of the damaged DNA during the NER (Nucleotide excision repair). The ubiquitin ligase (E3) complex (cullin 4A, DDB1, DDB2 and Roc1) stimulated its activity by UV damage catalyzes ubiquitination of XPC. The ubiquitin modification of XPC promotes the DNA damage recognition by itself. However, the role of the ubiquitin modification of XPC in the NER pathway is not clear. In this study, I have attempted to elucidate the regulation of DNA damage recognition through ubiquitination of XPC using biochemical and structural analysis. Biochemical approaches was taken to identify main region of ubiquitination in XPC. On the other hand, I have tried to prepare expression constructs of several regions of XPC for the purpose of structural analysis. However, I did not succeed in preparing expression constructs for structural analysis of XPC because of low level of protein expression and protein precipitation during purification.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学

キーワード：分子認識及び相互作用

### 1. 研究開始当初の背景

ヌクレオチド除去修復(NER)は、紫外線・化学物質などにより誘起され二本鎖 DNA に歪みを与える塩基損傷を修復する、生体維持に必須な機構である。ヌクレオチド除去修復は、損傷を含む約 30 ヌクレオチドを切り出した後に、生じたギャップを DNA ポリメラーゼで埋め、最後に DNA リガーゼにより連結するというステップで行われる。NER 機構の異常は、高発癌性の色素性乾皮症(XP)の原因となり、7 種類の原因遺伝産物がこの修復機構に関わっている。特に、XP-C 群の原因遺伝子産物 XPC を含む複合体(XPC-HR23B-centrin 2 ヘテロ三量体)は修復反応の開始に関わる重要な因子で、DNA 二本鎖の構造異常を特異的に認識する(Sugasawa et al., 1998)。最近になって、新たに XP-E 群の原因遺伝子産物 DDB2 を含むユビキチンリガーゼ(Cu14 複合体)が、XPC 複合体との相互作用を介して損傷認識を促進し、その過程にユビキチン修飾が重要な役割を果たすことが報告された(Sugasawa et al., 2005)。DDB2 は XPC を認識するための基質認識サブユニットとして機能し、XPC 複合体を損傷部位にリクルートするのに重要な役割を果たす。また、DDB2 のユビキチン修飾は、XPC 複合体を損傷近傍ヘリクルートした後の Cu14 複合体を損傷部位から解離する役割を果たす。しかし、XPC のユビキチン修飾がどのような役割を果たすのか、その後の NER 機構にどのような影響を与えるかに関する知見は得られていない。また、立体構造の知見に関しては、ごく最近になって、XPC の出芽酵母オルソログ Rad4 を含む複合体と損傷 DNA の複合体結晶構造が報告され、N 末端側の 310 残基からなる  $\alpha/\beta$  ドメインと、C 末端側の 50~90 残基からなる長い  $\beta$  ヘアピン構造を持つ三つの  $\alpha/\beta$  ドメインで、損傷部位近傍の 11 塩基対と損傷部位の 4 塩基を認識し、二重らせん内側にある損傷部位をフリップアウトさせることが明らかにされた(Min et al., 2007)。しかし、DDB2 は哺乳類にしかみつからないため、XPC とユビキチンリガーゼ Cu14 複合体との相互作用に関しては依然として明らかになっていない。

#### 参考文献

Sugasawa, K. et al. Mol. Cell (1998) 2 223-232

Sugasawa, K. et al. Cell (2005) 121 387-400  
Min, H. J. et al. Nature (2007) 499 262-263

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ユビキチン修飾による XPC 複合体の DNA 損傷認識の調節機構を、生化学的および構造生物学的解析を通じて明らかにすることである。特に、XPC と DNA 損傷の修復時において活性化されるユビキチンリガーゼ(Cu14 複合体)の相互作用に着目し、相互作用解析や複合体構造解析を通じて、XPC とユビキチンリガーゼの相互作用様式及び複合体形成機構を解明することである。以下に、具体的な目的を述べる。

- (1) XPC の DDB2 結合領域と DDB2 の複合体構造解析
- (2) XPC のユビキチン化サイトの同定

(1) の構造生物学的解析から、XPC と DDB2 の原子レベルでの相互作用様式及び複合体形成機構を解明し、DDB2 との相互作用領域、出芽酵母オルソログ Rad4 を含む複合体と損傷 DNA の複合体結晶構造(Min et al., 2007)から示唆される XPC の損傷部位認識領域と比較することにより、いかにして DDB2 が XPC 複合体を損傷部位にリクルートしているかを明らかにする。さらに、(2) で同定するユビキチン化サイトより、XPC のユビキチン化の意義を推察する。また、最近報告された Cu14 複合体のアダプター蛋白質 DDB1 との結合において DDB2 と競合するウィルス V 蛋白質と、DDB2 を除く Cu14 複合体(DDB1-Cu14A-Roc1)の結晶構造(Angers et al., 2006)と、(1) で明らかにする XPC と DDB2 の複合体構造から、いかにして Cu14 複合体が XPC をユビキチン修飾しているかを推察する。全体をとおして、XPC のユビキチン修飾による損傷認識の調節機構を明らかにする。

#### 参考文献

Angers, S. et al. Nature (2006) 443 590-593

### 3. 研究の方法

- (1) XPC とユビキチンリガーゼの基質サブユニット DDB2 の相互作用解析

① XPC は分子量 125 kDa からなる高分子量蛋白質であるため、全長を用いた構造解析は技術的に極めて困難であることが予想される。そこで、DDB2 との相互作用領域を同定することを試みた。具体的には、二次構造予測を基にしてデザインした XPC の欠失変異体を含む複合体 (XPC-hHR23B) と DDB1-DDB2 複合体の、昆虫細胞の共発現系を利用した共免疫沈降実験を行った。

② XPC と損傷 DNA の相互作用を強める役割を果たす centrin2 の認識領域と、出芽酵母オルソログ Rad4 を含む複合体と損傷 DNA との複合体結晶構造 (Min et al., 2007) から予想される損傷 DNA の認識領域を含む XPC のコンストラクトを作成し、発現・精製の検討を行った。

#### (2) XPC のユビキチン化サイトの同定

① FLAG タグに融合した XPC を昆虫細胞で発現させ、精製中に大腸菌で大量発現・精製した hHR23B を混合し、XPC-hHR23B 複合体を精製した。試験管内での XPC-hHR23B 複合体のユビキチン化反応を行った (Sugasawa et al., 2005) 後に、アフィニティー精製により反応液中から XPC-hHR23B を単離し、質量分析の試料とした。

② 上記の質量分析による解析が、試料の性質上、極めて困難であったため、後述する方法で XPC のユビキチン化サイトの同定を試みた。XPC は、一次配列による二次構造予測より、主に三つの領域 (N 末端側 (1-326)、中央領域 (327-531)、C 末端側 (532-940)) にわけることができる。そこで、XPC の N 末端側と中央領域の境界及び中央領域と C 末端側との境界にプロテアーゼ切断サイトを入れたコンストラクトを作成した。この変異体を用いて、試験管内でのユビキチン化を行った後に、プロテアーゼで切断することにより、どの領域にユビキチン化がおこるのかを解析した。この解析の結果から、4-(2) で後述するような XPC 変異体を作成し、試験管内でのユビキチン化反応を行い、ユビキチン化がどの程度おさえられているか調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) XPC とユビキチンリガーゼの基質サブユニット DDB2 の相互作用解析

まず始めに、昆虫細胞の共発現系を利用した共免疫沈降実験による XPC の DDB2 相互作用領域の同定を目指した。様々な XPC の欠失変異体を用いて相互作用解析を行ったが、DDB2 相互作用領域を絞り込むことができなかった。これは、DDB2 との相互作用領域があ

る領域に限定されておらず、広範囲にわたっているためと考えられる。したがって、DDB2 の相互作用領域を含み構造解析に適した領域の探索は、困難であることがわかった。そこで次に、XPC と DDB2 の相互作用と並んで重要である、XPC 複合体と損傷 DNA の相互作用に着目し、相互作用解析を試みた。損傷 DNA の認識は XPC のみで行われるが、XPC 複合体の構成因子の一つである centrin2 がその認識を促進することが明らかにされているため、XPC-centrin2 と損傷 DNA の複合体の構造研究を目指した。既に報告されている XPC の出芽酵母オルソログ Rad4 を含む複合体と損傷 DNA との複合体結晶構造 (Min et al., 2007) を参考にして、centrin2 及び損傷 DNA の認識領域を含む XPC のコンストラクトを作成した。いくつかのタグ融合タンパクとしての発現・大腸菌ホストの検討・誘導条件の検討を行った。大腸菌のコールドショック発現系を用いた場合においてのみ発現がみられたが、精製過程において目的タンパク質が沈殿してしまい、解析するに至らなかった。コンストラクトの最適化も試みたが、改善されなかった。

##### (2) XPC のユビキチン化サイトの同定

まず始めに、昆虫細胞発現系を用いて精製した XPC 全長を *in vitro* でユビキチン化し、質量分析による XPC のユビキチン化サイトの同定を試みたが、蛋白質の性質の悪さから解析が困難であった。そこで、XPC の N 末ドメインと中央領域の境界及び中央領域と C 末ドメインとの境界にプロテアーゼ切断サイトを入れたコンストラクトを用いて、全長でユビキチン化を行った後にプロテアーゼで切断することにより、どの領域にユビキチン化がおこるのかを解析した。その結果、主に中央領域でユビキチン化がおこることがわかった。また、N 末端側にもユビキチン化される領域があることが推察された。そこで、中央領域にある全てリジン残基にアルギニン残基に置換し、さらに N 末端側 (1-117) を欠損させた変異体を作成し、*in vitro* でユビキチン化を行ったところ、大方ユビキチン化がおさえられた。XPC のユビキチン化される部位は、特定の立体構造を持たない領域に多く存在することがわかった。ただし、これらの領域以外にもユビキチン化される部位が三箇所あるため、残りの修飾部位を探索している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔図書〕(計1件)

白川昌宏・大野(真板)綾子、他 共立出版  
「入門 構造生物学 -放射光 X 線と中性子  
で最新の生命現象を読み解く-」加藤龍一編  
集 87-102 ページ 2010 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

真板 綾子 (Maita Ayako)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号：60415106