

氏名	ただ まさよし
学位	他田正義
学位記番号	博士(医学)
学位授与の日付	新大院博(医)第175号
学位授与の要件	平成19年 3月22日
博士論文名	学位規則第4条第1項該当
	DNA 損傷 3'末端に対する aprataxin の修復機能
論文審査委員	主査 教授 西澤正豊
	副査 教授 木南 凌
	副査 教授 五十嵐道弘

## 博士論文の要旨

### 【背景と目的】

眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早期発症型失調症は、本邦における劣性遺伝性脊髄小脳変性症の約半数を占める重要な病型である。病因蛋白 aprataxin は、核酸分子の加水分解反応を触媒する histidine triad (HIT) モチーフを有する核蛋白で、DNA 単鎖切断損傷修復 (single-strand break repair: SSBR) の足場蛋白である X-ray repair cross-complementing group 1 protein (XRCC1) と結合することから、DNA の加水分解反応を触媒することにより SSBR において何らかの役割を担っていると想定される。

DNA 単鎖切断損傷 (single-strand breaks: SSBs) とは、二本鎖 DNA の一方鎖の切断損傷である。糖鎖損傷や塩基損傷により生じる SSBs は、その発生過程で糖鎖切断により、3'-末端にリン酸基、ホスホグリコール酸 (phosphoglycolate: PG) 基、または不飽和アルデヒド ( $\alpha, \beta$ -unsaturated aldehyde: UA) 基などの修飾基 (3'-ブロック) が生じる。SSBR の初期過程で、これら 3'-ブロックが除去され水酸基に変換されると、その後の修復反応、すなわち、DNA polymerase による DNA 合成と ligase によるニックの連結が可能となる。これまで、SSBR において 3'-ブロックを除去する酵素として、apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) と 5'-polynucleotide kinase 3'-phosphatase (PNKP) が知られていた。しかし、APE1 はリン酸基、PG 基、UA 基の全てを加水分解できるものの極端に活性が低いこと、PNKP は活性は強いもののリン酸基しか加水分解できないことから、3'-ブロックの除去に関わる別な酵素が存在すると考えられてきた。

一方、生理的に生じる SSBs として、topoisomerase I (TOP1) 介在性 SSBs が知られる。転写や複製の際に切断部 3'-末端に phosphotyrosine 基を介して共有結合した TOP1 は、プロテアソーム系により 3'-phosphotyrosine (3'-Y) 残基まで分解され、tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) による 3'-Y 残基から 3'-リン酸基への変換、引き続き、PNKP による 3'-リン酸基から 3'-水酸基への変換という一連のプロセッシングを受けて除去される。3'-TOP1 や 3'-Y 基、3'-リン酸基も、速やかに除去されない場合、3'-ブロックとなりうる。

本研究では、SSBR における損傷 3'-末端のプロセッシングに aprataxin が関与しているか否かを明らかにするために、組み換えヒト aprataxin 蛋白を作製し、3'-末端に種々の修飾基を伴う DNA を基質として酵素学的検討を行った。

### 【材料と方法】

蛋白の準備: His-tag 融合全長型ヒト aprataxin 蛋白をバキュロウイルス-蛋白産生系で作製し、金属親和性およびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。また、全長型、断片型および全長型変異体 (P206L, V263G) の各組み替え蛋白を大腸菌-蛋白産生系で作製し、GST 親和性クロマトグラフィーで精製した。

酵素学的検討: FITC 蛍光標識した合成 DNA 基質と各精製蛋白を 37°C で 60-90 分間反応させ、反応産物を 7 M 尿素含有 20% 変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、蛍光検出器で検出し分析した。

### 【結果】

最初に、DNA 3'-末端に種々の修飾基 (リン酸基, PG 基, UA 基, または Y 基) を伴う一本鎖 DNA を基質として、バキュロウイルス-蛋白産生系で作製した全長型 aprataxin の酵素活性を調べた。その結果、全長型 aprataxin は、3'-リン酸基と 3'-PG 基を加水分解して除去する活性、すなわち、DNA 3'-phosphatase 活性および 3'-PG hydrolase 活性を示した。

次に、酵素活性部位を明らかにするために、全長型 aprataxin, 短長型, FHA 断片, 疾患関連変異体が大腸菌-蛋白産生系で作製し、各蛋白の酵素活性を比較した。両活性とも、全長型で高く、短長型にも認められ、一方、FHA 断片や疾患関連変異体にはほとんど認めなかった。この結果から、両活性の発揮には HIT モチーフを含む C 末領域が必要であり、かつ疾患関連変異体は両活性を失うことが示された。

Aprataxin の DNA 3'-phosphatase 活性と 3'-PG hydrolase 活性が DNA 修復に利用可能であることを確認するために、3'-ブロックの SSBs を伴う二本鎖 DNA を基質として、aprataxin, DNA polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ), Ligase III $\alpha$  (Lig3) による修復能を調べた。その結果、全長型 aprataxin は Pol  $\beta$  と Lig3 の共存下で、3'-リン酸基または 3'-PG の SSBs を伴う二本鎖 DNA を修復することができた。

### 【結論】

本研究では、異なる 2 つの蛋白産生系で作製した組み換えヒト aprataxin 蛋白を用いて酵素学的検討を行い、(1) 全長型 aprataxin が DNA 3'-phosphatase 活性および 3'-PG hydrolase 活性を有すること、(2) DNA polymerase と ligase の共存下で 3'-ブロックを伴う SSBs を修復可能であること、さらに、(3) 疾患関連変異体ではこの 3'-ブロック除去活性が失われることを明らかにした。これらの結果は、aprataxin が 3'-ブロックの除去活性を通して SSBR において直接的な役割を果たしていること、また、3'-ブロックを伴う SSBs が修復されずに蓄積することが本症の病態に深く関係していることを示唆している。

今後、aprataxin の欠損により 3'-ブロックを伴う SSBs が細胞内で蓄積することを証明するとともに、SSBs の蓄積がいかんにして選択的神経細胞死を来すのか、その分子病態を明らかにする必要がある。

(論文審査の要旨)

眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早期発症型失調症 (EAOH/AOA1) の病因蛋白質 aprataxin (APTX) は、1本鎖DNAの切断損傷を修復する足場蛋白である XRCC1 と結合することなどから、1本鎖DNAの損傷修復に関与すると想定されている。1本鎖DNAの切断損傷では、糖鎖切断の3'末端にリン酸基、あるいはホスホグリコール酸 (PG) 基、また塩基切断の3'末端に不飽和アルデヒド基が結合して、3'ブロックが形成されることがあり、DNA修復のためには、これら3'末端の修飾基は水酸基に置換される必要がある。

申請者は組み換えヒト全長型APTXを精製し、合成基質を用いることにより、APTXがDNA 3'末端のリン酸基およびPG基を加水分解して除去できること、DNAポリメラーゼとリガーゼの存在下でリン酸基およびPG基による3'ブロックを伴う1本鎖DNAの切断損傷を修復できること、さらに、EAOH/AOA1から同定された疾患関連変異体ではこの活性が失われていることを明らかにした。

以上の結果から本研究は、APTXが1本鎖DNAの切断損傷において生じる損傷部3'末端のプロセッシングに関与し、さらに、1本鎖DNAの切断損傷が修復されずに蓄積することがEAOH/AOA1の病態に深く関与している可能性を示した点に、学位論文としての価値を認めた。