

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15118

研究課題名(和文) 哺乳類細胞に潜在する未知DNA修復反応の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of a novel DNA repair reaction in mammalian cells

研究代表者

松永 司 (MATSUNAGA, Tsukasa)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：60192340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、哺乳類細胞における紫外線誘発DNA損傷に対する修復機構として、ヌクレオチド除去修復以外の反応が存在する可能性を見出し、本研究ではその反応メカニズムを詳細に解析した。その結果、この反応にはヌクレオチド除去修復の初期過程で働く損傷認識因子XPCが必須であり、別の損傷認識因子であるDDBは必要ないことがわかった。一方、DDBが正常に存在する場合は、プロテアソーム活性もこの反応に必要なが、DDB2ノックダウン下では必要ないことから、DNA損傷がDDBによって認識されたときはCu14-DDB1 E3リガーゼによるユビキチン化と分解反応が必要と推測された。

研究成果の概要(英文)：We recently showed that mammalian cells slowly remove UV-induced 6-4 photoproducts from their genome under the nucleotide excision repair (NER)-defective condition. In this study, we have tried to uncover the mechanism of the NER-independent reaction in human cells. We have found that the non-canonical repair reaction requires XPC, but not DDB, both of which are well-known NER factors involved in a damage recognition step. We further found that a proteasomal activity is also required for this reaction only when NER-deficient cells have functional DDB, suggesting the implication of proteasomal degradation mediated by Cu14-DDB1 E3 ligase.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ヌクレオチド除去修復 紫外線 DNA損傷 色素性乾皮症

### 1. 研究開始当初の背景

紫外線で誘発される DNA 損傷は、シクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) と 6-4 光産物 (6-4PP) が代表的であり、光化学反応により隣接するピリミジン間で二量体が形成され、突然変異や細胞死の原因となる。海中から地上に進出した生物は、太陽光紫外線の降り注ぐ環境下で生存するために、これらを修復する多様な仕組みを構築してきた。その代表的なものにヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) 機構があり、大腸菌からヒトに至るすべての生物種に存在する。一部の生物種では、可視光のエネルギーを利用した photolyase による光回復系、PD-DNA glycosylase を介した塩基除去修復系、UVDE を介した除去修復系が存在するが、ヒトにおいては NER が紫外線誘発 DNA 損傷の唯一の DNA 修復系と考えられている。実際に、NER に先天的異常をもち、顕著な紫外線感受性と太陽露光部での皮膚癌発症を特徴とする遺伝疾患・色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum; XP) の患者由来細胞では、CPD や 6-4PP の修復がほとんど見られない。

最近我々は、従来のアッセイ系では検出不可能だった極低線量紫外線で生じる CPD や 6-4PP を検出を可能にする超高感度アッセイ系を開発し、休止期に同調した XP 患者由来細胞で  $1 \text{ J/m}^2$  または  $4 \text{ J/m}^2$  照射後の 6-4PP がゲノムから徐々に消失することを見出した。この修復現象には線量依存性があり、従来から用いられる  $10 \text{ J/m}^2$  の紫外線照射後では観察されない。この現象はこれまでの常識からは予想外であり、NER 因子を欠損したノックアウトマウス由来 MEF でも同様の現象が確認できたことから、この現象の実体を早急に解明する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、この修復反応に関わる因子を同定し、この反応メカニズムを解明するとともに、NER との関係性や細胞がん化防御機構としての役割について考察することを目的とした。特に、これまでの解析から、この反応への関与が示唆されている NER の初期過程で働く損傷認識因子 XPC および DDB、ユビキチン・プロテアソーム系、がん抑制遺伝子 p53 に注目して詳細な解析を行った。

### 3. 研究の方法

NER を欠損している細胞として、XPA 遺伝子に先天的変異をもち XP-A 患者由来線維芽細胞の XP30S/T-n および TIKY を用いた。極低線量紫外線照射後の 6-4PP の修復動態は、我々が開発した SEDUP 法を用いて解析した。また、XPC、DDB2、p53 の関与の検討では siRNA によるノックダウン法を用い、プロテアソームや PIKK の関与の解析には各種阻害剤を用いた。

### 4. 研究成果

NER 反応は多段階過程からなり、まず損傷認識因子が DNA 損傷に結合した後、多くの因子が順にリクルートされ、損傷の両側を切断して約 30nt の断片として除去し、DNA ポリメラーゼとリガーゼによるギャップの埋め合わせにより完了する。正常 XPA を欠損した XP-A 患者由来細胞では、DNA 損傷認識過程は正常に働くと考えられるため、その過程で働く XPC と DDB の関与について検討した。siRNA を用いて XPC をノックダウンしたところ、NER 非依存的な修復反応は見られなくなり、DDB の構成因子である DDB1 や DDB2 のノックダウンでは影響が見られなかったことから、この反応には XPC が関与することがわかった。また、この XPC は NER 非依存的修復反応が見られる時間帯に分解され、この分解は DDB2 ノックダウン下では見られないことから、Cul4-DDB1 E3 リガーゼ複合体に依存することが示唆された。この NER 非依存的修復反応は、プロテアソーム阻害剤 MG-132 で完全に抑制されることがわかっており、6-4PP が DDB によって認識された場合は、Cul4-DDB1 E3 リガーゼ複合体による XPC および DDB2 の分解が起きると考えられる。一方、DDB2 欠損下で起きる NER 非依存的修復反応は MG-132 処理により抑制されないため、6-4PP が XPC 複合体によって直接認識された場合には分解反応は起こらず、ここから何らかの機構によって 6-4PP の除去が起きると推測された。

次に、XPC と DDB2 の発現調節に制御するがん抑制遺伝子産物 p53 の関与について検討した。まず、極低線量紫外線照射後の p53 の Ser15 リン酸化を特異抗体で検出したところ、NER 非依存的修復反応が見られる時間帯に顕著なリン酸化が観察された。また、このリン酸化は NER が正常なヒト細胞では見られず、また MG-132 の処理によって完全に抑制されることを明らかにした。そこで、p53 のリン酸化反応が何に起因するのかを推測する目的で、DNA 損傷応答ネットワークで重要な 3 種類の PIKK に対する阻害剤の影響を調べたところ、ATM と ATR の関与が示唆された。次に、このリン酸化反応が NER 非依存的修復反応の下流に位置するのか調べるために、XPC をノックダウンして p53 のリン酸化を観察したが、顕著な影響は見られず、むしろ早くなる傾向が見られた。逆に、p53 をノックダウンして NER 非依存的修復反応を調べたが、正常に観察され、p53 のリン酸化反応が今回の修復現象の上流とは考えにくく、下流反応が独立した反応である可能性が示唆された。

以上の成果により、我々が見出した NER 非依存的な修復反応は、NER の損傷認識因子である XPC を必要とすることが明らかになり、NER と独立した未知の修復機構というよりも、NER 過程が正常に進まない時のバックアップ的応答と捉えられる。しかしながら、「NER 欠損 = 6-4PP 修復不能」という概念の再考を促すインパクトをもち、色素性乾皮症患者の

QOL を考える上でも非常に重要である。今後の展望としては、この反応に XPC 以外の NER 因子も関わるのか詳細に検討するほか、このバックアップ反応が error free か error prone かは不明であり、NER との二重欠損細胞株を作製し、紫外線感受性や突然変異誘発性を比較してこの反応の生物学的意義を明らかにする必要がある。

#### 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)

##### [雑誌論文](計2件)

Sakasai, R., Isono, M., Wakasugi, M., Hashimoto, M., Sunatani, Y., Matsui, T., Shibata, A., Matsunaga, T. and Iwabuchi, K. (2017). Aquarius is required for proper CtIP expression and homologous recombination repair., *Sci. Rep.*, 7 (1), 13808. (査読有)

DOI: 10.1038/s41598-017-13695-4

Mishima, T., Fukaya, S., Toda, S., Ando, Y., Matsunaga, T. and Inobe, M. (2017). Rapid G0/1 transition and cell cycle progression in CD8<sup>+</sup> T Cells compared to CD4<sup>+</sup> T Cells following in vitro stimulation., *Microbiol. Immunol.*, 61, 168-175. (査読有)

DOI: 10.1111/1348-0421.12479

##### [学会発表](計14件)

松永 司 (招待講演): ERCC1-XPF を標的とした DNA 修復阻害剤の作用メカニズムと癌治療への応用、日本薬学会第 138 回年会・シンポジウム「DNA 損傷(応答)研究最前線-創薬・治療戦略の可能性を探る-」, 平成 30 年 3 月 26 - 28 日(金沢)

上田将信、小田桐周平、西永真理、若杉光生、松永 司: 低分子化合物による NER 因子分解誘導のメカニズム解析、日本薬学会第 138 回年会、平成 30 年 3 月 26 - 28 日(金沢)

赤堀 稜、高森千枝、小田桐周平、若杉光生、松永 司: XPF-ERCC1 ヘテロダイマーの細胞内局在性を決定する要因の解析、日本薬学会第 138 回年会、平成 30 年 3 月 26 - 28 日(金沢)

松永 司 (招待講演): DNA 修復因子を不安定化する低分子化合物の作用機序とその応用、大阪国際がんセンター研究所 OICI セミナーシリーズ 118、平成 29 年 9 月 21 日(大阪)

松永 司 (招待講演): ケミカルバイオロジーを利用したヌクレオチド除去修復研

究とその応用、日本環境変異原学会第 46 回大会・シンポジウム「DNA 損傷による変異とその防御」、平成 29 年 11 月 6 - 7 日(東京)

上田将信、小田桐周平、西永真理、若杉光生、松永 司: 低分子化合物で誘導される NER 因子分解反応のメカニズム解析、第 16 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2017(日本薬学会・生物系薬学部会主催)、平成 29 年 9 月 9 - 10 日(札幌)

若杉光生、田中秀樹、宮口裕子、石井利実、松永 司: 休止期の NER 依存的な DNA 損傷応答における Exo1 の関与、日本放射線影響学会第 60 回大会、平成 29 年 10 月 25 - 28 日(千葉)

若杉光生、田中秀樹、宮口裕子、石井利実、松永 司: 休止期細胞で生じる NER ギャップ中間体の Exo1 によるプロセッシング、第 40 回日本分子生物学会年会(2017 年度生命科学系学会合同年次大会)、平成 29 年 12 月 6 - 9 日(神戸)

松永 司 (招待講演): 新しい紫外線 DNA 損傷解析系とケミカルバイオロジーを利用したヌクレオチド除去修復研究、日本放射線影響学会第 59 回大会・ワークショップ「UV 損傷モノクローナル抗体 25 年: 紫外線生物影響研究の今昔」、平成 28 年 10 月 26 - 28 日(広島)

堀田侑希、若杉光生、善岡克次、田中亀代次、松永 司: マウス皮膚におけるヌクレオチド除去修復に依存した二次的 DNA 損傷の生成と応答反応、日本放射線影響学会第 59 回大会、平成 28 年 10 月 26 - 28 日(広島)

小田桐周平、三島観知、若杉光生、上田将信、川原弘明、西永真理、河合秀彦、長田裕之、松永 司: NER 阻害化合物 A6 の ERCC1-XPF 分解誘導メカニズムの解析、第 39 回日本分子生物学会年会、平成 28 年 11 月 30 - 12 月 2 日(横浜)

岩崎真波、須田愛子、本田愛美、若杉光生、松永 司: ヌクレオチド除去修復欠損細胞で見られる紫外線誘発 DNA 損傷の消失、第 39 回日本分子生物学会年会、平成 28 年 11 月 30 - 12 月 2 日(横浜)

上田将信、大澤琢郎、小田桐周平、福島直紀、西永真理、若杉光生、松永 司: DNA 修復因子の細胞内安定性を制御する機構の解析、日本薬学会第 137 回年会、平成 29 年 3 月 25 - 27 日(仙台)

田中秀樹、石井利実、若杉光生、松永

司：NER 依存的な二次的 DNA 損傷生成における EX01 の関与の検討、日本薬学会第 137 回年会、平成 29 年 3 月 25 - 27 日（仙台）

〔図書〕（計 1 件）

日本光生物学協会 光と生命の事典編集委員会編、朝倉書店、光と生命の事典（2016）436 頁

〔産業財産権〕

取得状況（計 1 件）

名称：ヌクレオチド除去修復阻害剤、抗腫瘍剤および紫外線治療の増強剤

発明者：松永 司、西永真理、斎藤臣雄、長田裕之

権利者：国立大学法人金沢大学

種類：特許

番号：特許第 6004422 号

取得年月日：平成 28 年 9 月 16 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~iden/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松永 司 (MATSUNAGA, Tsukasa)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：60192340

### (2) 研究分担者

若杉 光生 (WAKASUGI, Mitsuo)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：80345595

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし