

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25281017

研究課題名(和文)ケミカルバイオロジーを利用したヒトヌクレオチド除去修復機構の解析

研究課題名(英文)Application of chemical biology to a mechanistic study of human nucleotide excision repair

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまでにヒト細胞のヌクレオチド除去修復反応を阻害する低分子化合物を発見し、ERCC1-XPFのプロテアソーム依存的分解誘導が原因であることを明らかにしている。本研究では、この分解誘導の詳細なメカニズムを明らかにすべく、この反応に関わる因子の同定を試み、2種のポリコピキチン化関連因子を同定した。また、100種以上の構造類縁体を用いて活性を比較し、構造活性相関を明らかにした。一方、新たな化合物ライブラリーを用いたスクリーニングも実施したが、上記化合物と同レベルの高い阻害活性を示す化合物は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We recently identified a small-molecule inhibitor (NERi) of nucleotide excision repair in human cells, which induces proteasomal degradation of one of core NER factors, ERCC1-XPF. In this study, we have tried to uncover the detailed mechanism underlying the loss of ERCC1-XPF heterodimer after NERi treatment. We have finally identified two cellular proteins possibly involved in the proteasomal degradation of ERCC1-XPF. We have also determined a structure-activity relationship of NERi by comparing the activity of more than 100 derivatives. On the other hand, we could find no further compounds showing comparably high NER-inhibition activity with NERi after screening of another public chemical library.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ケミカルバイオロジー 化合物ライブラリー スクリーニング ヌクレオチド除去修復 阻害剤 低分子化合物

1. 研究開始当初の背景

ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) は、紫外線で生じる二量体型ピリミジン損傷、ベンゾ[a]ピレン等のかさ高い化学物質の塩基付加体、一部の酸化型塩基損傷など、幅広いDNA損傷を対象とする普遍的なDNA修復機構である。このNERを先天的に欠損すると、高発がん性の色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum) や、重篤な身体的・精神的異常を特徴とするコケイン症候群 (Cockayne syndrome)、硫黄欠乏性毛髪発育異常症 (trichothiodystrophy) 等の遺伝疾患を発症し、NER因子が発がん抑制をはじめ様々な生体機能で重要な役割を果たしていることがわかる。

NER反応のキーステップである損傷認識から損傷DNA切断までの初期過程で、XPC-RAD23B-CETN2、TFIIH、XPA、RPA、XPF-ERCC1、XPGの6つのコンポーネント(20種のポリペプチド)が必須であることが試験管内再構成実験で明らかにされているもの(文献)、複雑系の細胞内ではさらに多種多様な因子が関わりと予想される。実際にヒストンリモデリング因子の関与、アセチル化・モノユビキチン化等のヒストン修飾の関与、NER因子の転写レベルでの発現調節、リン酸化・ユビキチン化等の翻訳後修飾を介した調節等が報告されている。しかし、いずれもまだ断片的で、細胞内NER反応の全容解明には程遠いのが現状である。

このような背景のなか、我々はヒト細胞内のNER反応(初期過程)の効率を簡便・迅速に評価できるセルベースドアッセイ系を開発し (microplate-formatted cell-based immunoassay for NER of UV photoproducts; M-CINUP)(特許第5817054号)(文献)、NER反応に影響を及ぼす低分子化合物の探索を開始した。これらの化合物は、細胞内の標的因子を特定することで新規NER関連因子の発見につながり、またその阻害機序の解明によって未知のNER関連反応を明らかにできると期待される。実際に、理化学研究所・NPDepoのパイロットライブラリー(376化合物)をスクリーニングした結果、ヒト細胞のNER反応を阻害する化合物A6(仮称NERiKU001)を見出し、コア因子ERCC1-XPFの細胞内レベルをプロテアソーム依存的に顕著に低下させることを明らかにした。しかし、その細胞内ターゲットや詳細な分解誘導メカニズムはまだ不明であった。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえて、本研究ではケミカルバイオロジーのアプローチを活用して、細胞内のNER反応に関与する未知因子や関連反応を明らかにし、NERの全容解明に寄与することを目的とした。具体的には、1) 規模の大きい新たな化合物ライブラリーを用いてさらなるNER阻害物質の探索を行い、先行するNERiKU001と同様にNER阻害機序の解明を

行う、2) NERiKU001のNER阻害機序を明らかにするために、細胞内標的因子、およびERCC1-XPFの分解過程で働くポリユビキチン化関連因子を同定し、分解誘導メカニズムを明らかにする、ことを目指した。

3. 研究の方法

新たなNER阻害化合物の探索については、東京大学・創薬オープンイノベーションセンター(現・創薬機構)のコアライブラリーの提供を受け、M-CINUPを用いてスクリーニングを行った。

NERiKU001の細胞内標的因子の解析には、この化合物あるいはその誘導体を結合させたビーズを作製し、細胞粗抽出液と反応させて結合分画を電気泳動後、特異的なバンドを切り出して質量分析により解析した(MS解析)。また、ポリユビキチン化関連因子の同定は、広島大学原爆放射線医科学研究所との共同研究のもとsiRNAライブラリーを使用した行った。

4. 研究成果

1) 新規NER阻害物質の探索と同定

東大創薬オープンイノベーションセンター(現・創薬機構)のコアライブラリー9,600化合物のスクリーニングを完了し、13種類のヒット化合物を得た。二次スクリーニングで絞り込みを行い、購入または合成によりまとまった量を手に入れたものについては、信頼性のより高いELISA系で再評価を行った。その結果、いくつかは弱いNER阻害活性を示したが、NERiKU001と同レベルの活性を示すものは見出せなかった。

2) NER阻害物質NERiKU001の解析

ERCC1-XPFの分解誘導に関与する因子の同定

細胞内標的因子の特定のため、化合物ビーズに結合したタンパク質をMS解析したところ、複数の候補因子を得た。siRNAによるノックダウンでERCC1-XPFの細胞内レベルやNERiKU001処理後の分解誘導への影響を調べたが、顕著な変動はみられず、真の標的因子ではないと判断した。一方、ERCC1-XPFのポリユビキチン化関連因子をsiRNAライブラリーを用いて探索した結果、2種類の候補因子が同定された。さらに、ERCC1-XPFの細胞内レベルとNERiKU001処理後の分解誘導を詳しく調べたところ、どちらの因子のノックダウンもERCC1-XPFの細胞内レベルに大きな影響を与えないものの、NERiKU001による分解誘導を顕著に抑制することがわかった。したがって、これらの因子がNERiKU001のNER阻害メカニズムに深く関わっていると考えられ、現在、詳細な解析を行っている。

化合物の構造活性相関解析と最適化

これまでに入手した100種類以上の構造類縁体のNER阻害活性をもとに、そこから絞り込んだ化合物についてERCC1-XPF分解誘導活

性と細胞毒性を比較し、構造活性相関を検討した。その結果、NERiKU001 が示す細胞毒性は ERCC1-XPF 分解誘導活性と独立した事象であることがわかり、各々の活性に重要な構造部分を同定し、高活性・低毒性の構造類縁体を得ることに成功した。一方、当初予定していた NERiKU001 と細胞内標的因子のドッキング解析を通じた化合物の最適化は、標的因子が特定できなかったため実現できなかった。

スピロラクトンによる XPB 分解誘導との比較

文献 では、スピロラクトンが XPB を分解誘導することが報告されており、この反応系と NERiKU001 による ERCC1 分解誘導系を詳細に比較検討した。その結果、両化合物による NER 因子の分解誘導は各因子に特異的であり、その動態はスピロラクトンによる XPB 分解の方が速やかでより長く持続することがわかった。また、両化合物を中濃度域で併用すると、各々の単独時より強い阻害活性を示すことが明らかになった。以上の結果より、複数の NER 因子で細胞内レベルを調節する仕組みが存在することがわかり、両化合物はこの仕組みの解明や NER のメカニズム解析に有用であることが示された。

<引用文献>

Mu, D., Park, C.-H, Matsunaga, T., Hsu, D.S., Reardon, J.T. and Sancar, A. (1995). Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system., *J. Biol. Chem.* 270, 2415-2418.

Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M.K., Vilpo, J.A., Moncollin, V., Podust, V.N., Protić, M., Hübscher, U., Egly, J.M. and Wood, R.D. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components., *Cell* 24, 859-868.

Nishinaga, M., Kurata, R., Onishi, K., Kuriyama, K., Wakasugi, M. and Matsunaga, T. (2012). Establishment of a microplate-formatted cell-based immunoassay for rapid analysis of nucleotide excision repair ability in human primary cells., *Photochem. Photobiol.* 88, 356-362.

Alekseev, S., Ayadi, M., Brino, L., Egly, J.M., Larsen, A.K. and Coin, F. (2014). A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIIH and the chemosensitization of tumor cells to platinum., *Chem. Biol.* 20, 398-407.

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 7 件)

Nakagawa-Goto, K., Oda, A., Hamel, E., Ohkoshi, E., Bastow, K.F., Lee, K.H. and Goto, M. (2015). Development of a novel class of tubulin inhibitor from desmosdumotin B with a hydroxylated bicyclic B-ring., *J. Med. Chem.* 58, 2378-2389. (査読有)
DOI: 10.1021/jm501859j

Wakasugi, M., Sasaki, T., Matsumoto, M., Nagaoka, M., Inoue, K., Inobe, M., Horibata, K., Tanaka, K. and Matsunaga, T. (2014). Nucleotide excision repair-dependent DNA double-strand break formation and ATM signaling activation in mammalian quiescent cells., *J. Biol. Chem.* 289, 28730-28737. (査読有)
DOI: 10.1074/jbc.M114.589747

Enkhtuya, R., Sato, T., Wakasugi, M., Tuvshintugs, B., Miyata, H., Sakurai, T., Matsunaga, T. and Yoshioka, K. (2014). The scaffold protein JLP plays a key role in regulating ultraviolet B-induced apoptosis in mice., *Genes Cells* 19, 350-358. (査読有)
DOI: 10.1111/gtc.12135

Zhao, X., Nogawa, A., Matsunaga, T., Takegami, T., Nakagawa, H. and Ishigaki, Y. (2014). Proteasome inhibitors and knockdown of SMG1 cause accumulation of Upf1 and Upf2 in human cells., *Int. J. Oncol.* 44, 222-228. (査読有)
DOI: 10.3892/ijo.2013.2149

Kitamura, M., Kawasaki, F., Ogawa, K., Nakanishi, S., Tanaka, H., Yamada, K. and Kunishima, M. (2014). Role of Linkers in Tertiary Amines that Mediate or Catalyze 1,3,5-Triazine-based Amide-forming Reactions., *J. Org. Chem.* 79: 3709-3714. (査読有)
DOI: 10.1021/jo500376m

Mishima, T., Toda, S., Ando, Y., Matsunaga, T. and Inobe, M. (2014). Rapid proliferation of activated lymph node CD4+ T Cells is achieved by eliminating gap phases in cell cycle progression., *Cell. Mol. Biol. Lett.* 19, 638-648. (査読有)
DOI: 10.2478/s11658-014-0219-z

[学会発表](計 9 件)

松永 司、長田裕之、遠藤良夫：ヌクレ

オチド除去修復を阻害する低分子化合物のがん化学療法増強剤としての可能性、第19回日本がん分子標的治療学会学術集会、平成27年6月10-12日、松山全日空ホテル(松山)

Nishinaga, M., Miyazaki, K., Takamori, C., Ohzawa, T., Wakasugi, M., Saito, T., Osada, H. and Matsunaga, T.: A small molecule inhibitor of nucleotide excision repair from chemical library screening using a newly developed cell-based immunoassay, The 15th International Congress of Radiation Research (第15回国際放射線研究会議) 平成27年5月25-29日、国立京都国際会館(京都)

高森千枝、宮崎幸太郎、西永真理、大澤琢郎、若杉光生、松永司: DNA修復因子ERCC1-XPFの安定性と細胞内局在性を決定する要因の解析、日本薬学会第135年会、平成27年3月25-28日、兵庫医療大学(神戸)

松永司、斎藤臣雄、長田裕之、遠藤良夫: シスプラチン抵抗性関連因子ERCC1を分解誘導する新規低分子化合物の同定、第18回日本がん分子標的治療学会学術集会、平成26年6月25-27日、TKPガーデンシティ仙台(仙台)

西永真理、宮崎幸太郎、福島直紀、高森千枝、若杉光生、斎藤臣雄、長田裕之、松永司: ヌクレオチド除去修復を阻害する低分子化合物の作用機序に関する解析、第36回日本分子生物学会年会、平成25年12月3-6日、神戸ポートアイランド(神戸)

松永司(招待講演): 新開発セルベースドアッセイ系を利用したヌクレオチド除去修復研究の新展開、日本環境変異原学会第42回大会・シンポジウム「光遺伝毒性」、平成25年11月29-30日、岡山コンベンションセンター(岡山)

松永司、長田裕之、若杉光生: 癌細胞のシスプラチン感受性を増感させるヌクレオチド除去修復阻害剤の作用機序、第72回日本癌学会学術総会、平成25年10月3-5日、パシフィコ横浜(横浜)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称: DNA損傷修復能力の簡便・迅速な検査

方法

発明者: 松永 司、西山千晶
権利者: 国立大学法人金沢大学
種類: 特許
番号: 特許第5817054号
出願年月日: 2010年7月7日
取得年月日: 2015年10月9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

猪部 学 (INOBE, Manabu)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号: 10312414

若杉 光生 (WAKASUGI, Mitsuo)
金沢大学・薬学系・助教
研究者番号: 80345595

国嶋 崇隆 (KUNISHIMA, Munetaka)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号: 10214975

後藤 享子 (GOTO, Kyoko)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号: 70634179

小田 彰史 (ODA, Akifumi)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号: 50433511

(3) 連携研究者

なし