

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04265

研究課題名(和文)ヌクレオチド除去修復機構解明に向けたケミカルアプローチ

研究課題名(英文)Chemical approaches to understand the complex mechanism of 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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヌクレオチド除去修復(nucleotide excision repair; NER)の高次なメカニズムの解明に向けて、ケミカルバイオロジーを利用した2つのアプローチを行った。まず、これまでに見出した3種のNER阻害化合物の作用機序を解析し、ERCC1分解誘導剤についてはポリユビキチン化に至るメカニズムを中心に解析し、パツリンとシコニンに関してはXPCとTFIIHのp62サブユニットとの相互作用の増強が関連する可能性を示唆した。また、NERの中間複合体の単離と構成因子の解析を目指して、新たに近位依存性ビオチン標識法を導入し、NER因子と未知因子のビオチン標識と単離に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでに同定した複数のNER阻害化合物の作用機序を概ね明らかにし、今後のNER研究で有用なツールになることを示すとともに、新たに導入したBioID法が画期的なNER解析技術となることを示した学術的意義は大きい。特に、両者を組み合わせることで、複雑な多段階NER反応のステップごとの中間複合体を単離・解析することができ、それらの情報をつなぎ合わせることでNERの動的メカニズムの理解につながる発展性はインパクトがあり、本研究成果の社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)： To understand the complex mechanism of human nucleotide excision repair (NER), we have employed two types of chemical biology approaches. First of all, we have analyzed the molecular mechanism underlying the poly-ubiquitination reaction induced by a small-molecule ERCC1 degrader. We also revealed that other kinds of small-molecule NER inhibitor enhance the physical interaction between XPC and p62 subunit of TFIIH. Furthermore, we have successfully introduced a proximity-dependent biotin identification (BioID) method to isolate and analyze the intermediate protein-complexes at various steps of NER. Using this approach, we have identified some of known NER factors as well as novel proteins possibly involved in NER.

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 ケミカルバイオロジー 阻害剤 タンパク質分解誘導剤 近位依存性ビオチン標識法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

紫外線や化学物質で誘発される DNA 損傷は、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) 機構で修復され、発がんの抑制に重要な役割を担っている。NER 反応は多段階のステップから成り、ヒトでは「DNA 損傷の認識から DNA 損傷の除去まで」の初期過程で、XPC-RAD23B-CETN2、TFIIH、XPA、RPA、ERCC1-XPF、XPG の 6 つの因子が必須であり、各々の基本的な役割は概ね理解されている。しかし、これらの因子が段階的かつ協調的に働く詳細な仕組みはまだ未解明であり、近年は翻訳後修飾 (リン酸化・ユビキチン化・SUMO 化・ポリ ADP リボシル化等) による調節や新しい NER 関連因子の報告もされているが、まだ断片的な知見が多く、統合的な理解には至っていない。

我々は、様々な分野で威力を発揮しているケミカルバイオロジーを利用したアプローチからヒト細胞内の NER 反応を解明するプロジェクトを立ち上げ、最初に細胞内の NER 効率を評価するセルベースドアッセイ系 (M-CINUP) を開発して (Nishinaga et al., 2012)、公的化合物ライブラリーから NER 阻害物質を探索・同定してきた。その一つは、理化学研究所・NPDepo に由来する低分子化合物 (以後「A6」と呼ぶ) であり、ERCC1-XPF (主に ERCC1) をプロテアソーム依存的に分解誘導して NER を阻害すること、またこの反応に関わるいくつかの因子を明らかにした。また、別のグループが同時期に、アルドステロン拮抗性カリウム保持利尿薬・スピロノラクトンが、TFIIH のサブユニットである XPB をプロテアソーム依存的に分解誘導して NER を阻害することを報告し (Alekseev et al., 2014) 我々はそのメカニズムも並行して解析し、A6 による ERCC1 分解誘導の流れと類似していることを明らかにした (Ueda et al., 2019)。しかし、これらの化合物のターゲットや正確な反応メカニズムはまだ不明であった。一方、本学がん進展制御研究所の天然化合物ライブラリーのスクリーニングから 2 種類の新しい NER 阻害化合物 (パツリンとシコニン) を見出し、いずれの化合物も、NER の初期反応である DNA 損傷認識の周辺で何らかの異常を引き起こしている可能性が示唆されていたが、その詳細は全く不明であった。

さらに、我々は近年、DNA の塩基対間にインターカレートして UVA 照射に伴って DNA に付加体を形成する angelicin (psoralen 類縁体) と、クリック反応に必要なアルキンまたはシクロオクテンを、リンカーでつないだ構造を有する DNA 損傷プローブを作製し、NER の過程で DNA 損傷付近に集まるタンパク質を複合体のまま単離するアプローチも新たにスタートさせた。

## 2. 研究の目的

以上の背景の中、本研究では、2 つのケミカルバイオロジーのアプローチを駆使して、細胞内の複雑な NER 反応とその調節機構の解明に貢献することを目的とした。1 つ目は、フォワードケミカルジェノミクスのアプローチであり、我々が同定した 3 種の NER 阻害化合物の作用機序を早期に解明して、NER 因子の調節機構に関する新規知見に期待するとともに、これらを NER メカニズムの解析ツールとして利用できるようにすることを目指す。2 つ目は、最近我々が新たに開発した「DNA 損傷プローブ」を利用して、DNA 損傷付近に集まる NER 関連因子をトラップできる実験系を確立し、MS 解析を用いて既知 NER 因子の翻訳後修飾や新規 NER 関連因子の同定することを目指す。ここに、1 つ目の NER 阻害化合物を組み合わせれば、NER の多段階反応をステップごとに切り分けて中間複合体を単離することが可能であり、メカニズム解明の急速な進展が期待できる。

## 3. 研究の方法

NER 阻害剤の作用機序解析には、ユビキチンアッセイ、GFP-Trap アッセイ、インビトロ結合アッセイ、siRNA によるノックダウン法等を用いた。また、「DNA 損傷プローブ」を利用したアプローチを断念した後に導入した BioID 法では、ピオチンリガーゼ BirA を改変した TurboID を使用し、NER 必須因子の XPA 及び XPC との融合タンパク質が NER において機能的であることを確認した上で、安定発現細胞株を樹立した。

## 4. 研究成果

本研究では、NER の高次なメカニズム解明に向けて、ケミカルバイオロジーを利用した 2 つのアプローチから研究を進め、以下の成果を得た。

(1) フォワードケミカルジェノミクスを利用した NER メカニズムの解析

先行する低分子化合物 A6 の ERCC1 分解誘導メカニズムに関して、まず A6 処理後に ERCC1 のポリユビキチン化体が生じることを明らかにし、一方で XPF のポリユビキチン化体はほとんど検出されないことがわかった。また、この ERCC1 のポリユビキチン化は、E3 リガーゼ SCF の活性化に必要な NEDD 化の阻害剤 MLN4924 の処理や、以前に同定した F-box タンパクの siRNA によるノックダウンで顕著に抑制されることを明らかにした。また、ERCC1-EGFP 融合タンパク質の安定発現細胞株を用いて、A6 処理後に GFP-Trap により CUL1 や特定の F-box タンパクが共沈降することを見出した。以上の結果より、低分子化合物 A6 は ERCC1-XPF と F-box タンパクとの相互作用を促し、ERCC1 のポリユビキチン化を誘導することが示唆された。

一方、新規の NER 阻害化合物であるパツリンとシコニンに関しては、TFIIH の DNA 損傷部位へのリクルートが阻害されることから、DDB2、XPC、TFIIH サブユニットへの影響を調べたところ、各々の細胞内レベルには大きな変化は見られなかったが、DDB2 と XPC のバンドシフトが見られ、何らかの修飾が起きている可能性が示唆された。また、XPC と TFIIH サブユニットとの相互作用を詳しく調べたところ、XPC と p62 の相互作用が増強していることが明らかになり、変異体を用いた解析から両者の相互作用に重要な XPC の酸性領域 (acidic string) を介していることがわかった。以上の結果より、化合物処理で引き起こされる XPC の質的变化が p62 との相互作用を増強し、このことが TFIIH の XPC との相互作用もしくは損傷 DNA への結合に支障をきたすというモデルが考えられた。

## (2) NER 中間複合体の単離を可能にする「DNA 損傷プローブ」及び「BioID 法」を利用した実験系の開発

当初は、UVA 照射依存的に DNA に付加体を形成する angelicin (psoralen 類縁体) と、クリック反応に必要なアルキンまたはシクロオクチンをリンカーでつないだ「DNA 損傷プローブ」を用いて、DNA 損傷付近に形成される NER 中間複合体の単離を試みたが、難航したため断念し、途中からバックアップとして並行的に進めていた近位依存性ビオチン標識法 (BioID 法) を利用した実験系に切り替え、TurboID-XPA または TurboID-XPC の融合タンパク質を安定発現する細胞株を樹立した。これらの細胞株に紫外線を照射後、ビオチン添加して標識されるタンパク質をウエスタンブロットングで調べたところ、いずれにおいても THIIH のサブユニットが再現的に検出され、このビオチン化は XPB の ATPase 阻害剤 triptolide や分解誘導剤スピロラクトンの処理で著しく減少したことから、NER に依存した反応であることがわかった。また、逆に ERCC1 分解誘導剤の A6 を処理すると THIIH サブユニットのビオチン化は増加することから、NER 中間複合体の蓄積が示唆された。さらに、単離した複合体について MS 解析を行なったところ、ウエスタンブロットングの結果を確認できたことに加え、これまで NER への関与が知られていない複数のタンパク質が検出され、現在解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akahori, R., Takamori, C., Wakasugi, M. and Matsunaga, T.	4. 巻 27
2. 論文標題 Mapping of the regions implicated in nuclear localization of multi-functional DNA repair endonuclease XPF-ERCC1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 356-367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12932	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakasai, R., Wakasugi, M., Matsui, T., Sunatani, Y., Saijo, M., Matsunaga, T. and Iwabuchi, K.	4. 巻 113
2. 論文標題 Camptothecin compromises transcription recovery and cell survival against cisplatin and ultraviolet irradiation regardless of transcription-coupled nucleotide excision repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dnarep.2022.103318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawai, H., Yagyu, F., Terada, A., Matsunaga, T. and Inobe, M.	4. 巻 -
2. 論文標題 CD28 confers CD4+ T cells with resistance to cyclosporin A and tacrolimus but to different degrees	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asian Pac. J. Allergy Immunol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12932/AP-270820-0949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saha, L. K., Wakasugi, M., Akter, S., Prasad, R., Wilson, S. H., Shimizu, N., Sasanuma, H., Huang, S. -Y. N., Agama, K., Pommier, Y., Matsunaga, T., Hirota, K., Iwai, S., Nakazawa, Y., Ogi, T. and Takeda, S.	4. 巻 117
2. 論文標題 Topoisomerase I-driven repair of UV-induced damage in NER deficient cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	6. 最初と最後の頁 14412-14420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1920165117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda, M., Matsuura, K., Kawai, H., Wakasugi, M. and Matsunaga, T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Spirocholactone induced XPB degradation depends on CDK7 kinase and SCFFBXL18 E3 ligase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 284-296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuda, M., Ogawa, S., Ooka, M., Kobayashi, K., Hirota, K., Wakasugi, M., Matsunaga, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., Chikuma, S., Sasanuma, H., Debatisse, M., Doherty, A.J., Fuchs, R.P. and Takeda, S.	4. 巻 14
2. 論文標題 PDIP38/PoIDIP2 controls the DNA damage tolerance pathways by increasing the relative usage of translesion DNA synthesis over template switching	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0213383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0213383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawara, H., Akahori, R., Wakasugi, M., Sancar, A. and Matsunaga, T.	4. 巻 519
2. 論文標題 DCAF7 is required for maintaining the cellular levels of ERCC1-XPF and nucleotide excision repair	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 204-210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 逆井 良、若杉光生、松井 理、砂谷優実、西條將文、松永 司、岩淵邦芳
2. 発表標題 カンプトテシンは、TC-NERとは独立して、DNA損傷後の転写の回復を阻害し、シスプラチンや紫外線に対する殺細胞効果を増強する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤堀 稜、高森千枝、若杉光生、松永 司
2. 発表標題 DNA修復因子XPFの細胞内局在に影響を及ぼす新たな要因
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤堀 稜、高森千枝、若杉光生、松永 司
2. 発表標題 XPFの細胞内局在性に影響を及ぼす要因の解析
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若杉光生、武井莉紗、宮口裕子、山岸三恵、田中秀樹、杉田恵理歌、石井利実、松永 司
2. 発表標題 休止期のNERギャップ中間体から生じるDSBの生成と修復機構の解析
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若杉光生、宮口裕子、田中秀樹、武田莉紗、杉田恵理歌、山岸三恵、石井利実、松永 司
2. 発表標題 紫外線誘発細胞死を防ぐ休止期固有のDNA損傷応答反応
3. 学会等名 第64回日本放射線影響学会・ワークショップ「紫外線誘発DNA損傷修復の包括的理解へ向けて」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永 司、若杉光生
2. 発表標題 スピロラクトンで誘導されるXPB分解のメカニズム
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松永 司、上田将信、松浦顕教、柳生知輝、小田桐周平、河合秀彦、若杉光生
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第25回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤堀 稜、川原弘明、若杉光生、Aziz Sancar、松永 司
2. 発表標題 ERCC1-XPFの新規相互作用因子DCAF7の機能解析
3. 学会等名 第25回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠 拓真、松永 司、若杉光生
2. 発表標題 休止期のNER依存的な二次的DNA損傷に対する応答反応におけるCAF-1の関与
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 若杉光生、宮口裕子、田中秀樹、武田莉紗、楠 拓真、杉田恵理歌、山岸三恵、石井利実、松永 司
2. 発表標題 休止期のNERギャップ中間体で生じるExo1プロセッシングとDSB生成の生物影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会・ワークショップ「多様なDNA損傷応答機構のトランスアクション - ゲノム不安定性の病態解明と治療応用 - 」
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>金沢大学 医薬保健研究域・薬学系 遺伝情報制御学研究室  <a href="http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~iden/">http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~iden/</a>          松永研究室   遺伝情報制御学  <a href="http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~iden/index.html">http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~iden/index.html</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	若杉 光生  (WAKASUGI Mitsuo)  (80345595)	金沢大学・薬学系・准教授   (13301)	
研究分担者	後藤 享子  (GOTO Kyoko)  (50180245)	金沢大学・薬学系・准教授   (13301)	
研究分担者	猪部 学  (INOBE Manabu)  (10312414)	国際医療福祉大学・福岡薬学部・教授   (32206)	削除：2021年3月31日



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松浦 顕教  (MATSUURA Kenkyo)  (50836096)	金沢大学・薬学系・博士研究員    (13301)	削除：2019年8月28日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関