

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510068

研究課題名(和文) 休止期においてNER依存的に活性化するDNA損傷応答機構の解析

研究課題名(英文) The study of the DNA damage response elicited by NER-provoked secondary damage in mammalian quiescent cells

研究代表者

若杉 光生 (Wakasugi, Mitsuo)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：80345595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：休止期のヌクレオチド除去修復に依存して活性化するシグナル伝達経路に着目し、その初期シグナルと生物学的意義の解明を目的として実験を行なった。その結果、その活性化はヌクレオチド除去修復の反応中間体を介して生じる2種類の二次的なDNA損傷に起因しており、致死的な作用が強い二本鎖切断が生じることを明らかにした。また、電離放射線感受性として知られる毛細血管拡張性小脳失調症患者由来の細胞が、休止期においては紫外線にも高感受性であることを示した。さらに、生体から単離した休止期もしくは休止期様の細胞について検討し、同調した培養細胞で観察されるヌクレオチド除去修復依存的な反応が生じることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to clarify the nucleotide excision repair (NER)-related DNA structure(s) activating the signal transduction pathways and their biological impacts. We found that, under the quiescent condition, DSB (DNA double-strand break) is generated in an NER-dependent manner, in addition to the predicted single-stranded regions. In NER-proficient cells arrested in G0 phase, UV exposure activates ATM signaling pathway, which leads to the accumulation of DSV-related factors. Importantly, A-T cells are more sensitive to UV compared with normal cells when exposed under quiescent but not exponentially growing condition. Finally, we show that the NER-dependent H2AX phosphorylation is also observed in peripheral T lymphocytes and hematopoietic stem cells from mice. These all results suggest that in vivo quiescent cells may suffer from the mixed types of DNA lesions such as ssDNA gaps and DSB after UV or chemical exposure generating NER substrates.

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 DNA損傷応答 ssDNAギャップ DNA二本鎖切断 シグナル伝達 ゲノム安定性

### 1. 研究開始当初の背景

DNA は、紫外線、電離放射線や様々な化学物質により損傷を受けるが、生物は DNA 損傷の蓄積を防いでゲノムの安定性を維持するために、多種多様な DNA 損傷応答システムを備えている。このシステムには、様々な種類の DNA 修復系、細胞周期チェックポイントやアポトーシス等の反応が含まれ、相互に関連しながら損傷の種類や量そして細胞の状態に応じて適切な応答がなされている。その中で中心的な役割を担っているのが PIKK ファミリーに属する ATM 及び ATR、DNA-PKcs であり、細胞内の種々のタンパク質をリン酸化することにより、様々な反応を制御している。ヒストン H2AX はそれらの重要な基質の一つであり、そのリン酸化は主に電離放射線等による DNA 二重鎖切断 (DNA double-strand break; DSB) 生成に伴って生じ、DSB の DNA 損傷応答における初期シグナルとして重要な役割を担っている。また、H2AX はリン酸化以外にもユビキチン化やアセチル化等の様々な修飾を受けることも知られており、それらが引き金となり DNA 損傷近傍のクロマチン構造の変化への関与も示されている。

DSB のマーカーとして知られる H2AX のリン酸化反応であるが、直接 DSB を誘起しない紫外線によってもこの反応が生じる。申請者の属するグループは DNA 複製に依存しない反応に着目し、血清飢餓により G<sub>0</sub> 期に同調したヒト細胞で、紫外線照射後にヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) 依存的に H2AX がリン酸化されることを見出して報告した。さらに詳細な解析を進めたところ、休止期の紫外線による H2AX のリン酸化は既知の ATR 経路だけではなく、それより早期に ATM も寄与する可能性があり、驚くべきことには DSB の生成を示唆する結果も得られていた。従来、紫外線では DNA にゆがみを生じる塩基損傷のみが生成し、生体にとって最も重篤な DSB は S 期以外の時期に生じないと一般的に考えられており、我々も DSB の生成に関しては懐疑的であった。しかしながら、紫外線によって生じた塩基損傷を修復する NER によって性質の異なる二次的な DNA 損傷が生じ、それにより複数の DNA 損傷応答反応が活性化している可能性が高いと考えられたので、その活性化の初期シグナルを明らかにすることを目標に研究を開始した。また、今までの研究は活発に増殖する培養細胞を主に用いており、生体内を視野にいれた研究がほとんどない状況にあった。

### 2. 研究の目的

NER の修復過程の中間体を介するチェックポイントの活性化は、酵母からヒトにおいて保存されており、非常に重要な機構であると考えられる。しかしながら、Exonuclease 1

(Exo1) が作用して広範な一本鎖 DNA 領域が生じることは報告されているが、DSB が生成するという報告はなく、またその生成メカニズムは不明である。本研究は、生体を構成する大部分の細胞と同様な休止期の細胞を用いることで見いだされたヒストン H2AX の修飾反応の解析から得られた新規の実験結果を基盤として、未だ明らかとなっていないシグナリング経路やその意義の解明を目的とする (図 1)。

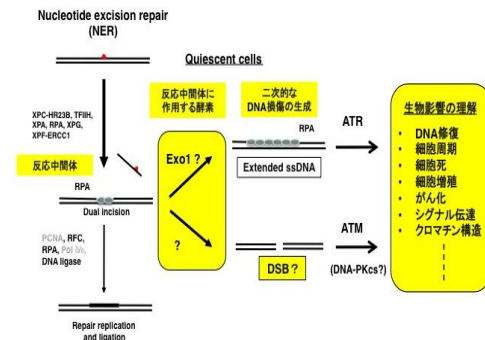


図 1 本研究の着眼点

### 3. 研究の方法

細胞の G<sub>0</sub> 期への同調は、接触阻止と血清飢餓の処理、つまりコンフルエントになるまで培養した後に、血清濃度を 10% から 1% もしくは 0.5% に下げて 3-4 日間培養して行なった。DNA 損傷応答反応の活性化は、各 DNA 損傷応答因子もしくはその基質のリン酸化体に対する特異抗体を用いたウェスタンブロッティングもしくは蛍光免疫染色により評価した。また DSB の検出は、中性条件下のコメットアッセイを用いた。

末梢血リンパ球はマウスリンパ節より採取し、造血幹細胞は、骨髓細胞から lineage 抗原、CD34、c-Kit、Sca-1 を指標としてセルソーターを用いて単離した。

### 4. 研究成果

(1) これまでの研究により、休止期の細胞において、既知の ATR 以外にも、ヌクレオチド除去修復依存的に ATM が活性化していることがわかり、また DSB に応答する種々のタンパク質が紫外線照射部位に集積するという結果も得られ、紫外線により DSB が生じる可能性を示唆する結果が蓄積してきた。そこで、DSB の生成を直接的に示すために、中性条件下でのコメットアッセイを用いて、DSB の検出を試みた。その結果、休止期に同調した正常細胞では、紫外線照射 1 時間でコメットテイルが観察されたのに対し、NER 能を欠損した XP-A 群の細胞ではほとんど見られなかった。また、コメットテイルの長さを定量的に解析しても、2 種類の細胞間で統計的に有意な差があり (図 2)、休止期細胞では NER に依存して DSB が生成することが明らかになった。

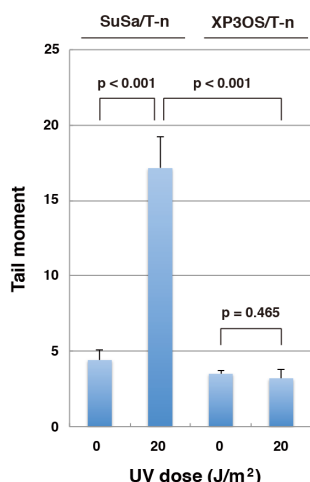


図2 休止期細胞におけるNER 依存的な DSB の生成

次に、この休止期の細胞に特異的な NER 依存的な DSB 生成のメカニズムを明らかにするために、NER の反応中間体である ssDNA ギャップに作用すると考えられる酵素の同定を siRNA によるノックダウン法を用いて試みた。しかしながら、休止期の細胞への導入効率が原因で十分なノックダウンの効率が得られず、はっきりとした結果は得られなかった。今後、レンチウイルス等の利用によりノックダウンの効率を高めた条件で、詳細に検討する必要がある。

(2) 休止期細胞の NER 過程で ssDNA や DSB が生じるということは、初期の DNA 損傷のみならず、これらの二次的 DNA 損傷に対する応答反応も極めて重要になる。そこで DSB に応答して活性化すると考えられる ATM シグナリング経路について、ATM の活性を特異的阻害剤により抑制した時の DSB 関連因子の集積について検討した。その結果、ATM の阻害剤を処理することにより MRE11 の紫外線照射部位への集積が顕著に抑制された。また同様な効果は、ATM を欠損した A-T 細胞に DNA-PKcs の阻害剤を処理した場合にも観察され、MRE11、NBS1 及び 53BP1 の集積が抑制された。そして H2AX のリン酸化反応に及ぼす影響について調べたところ、ATM 阻害剤の添加により H2AX のリン酸化が有意に減少する結果が得られ、既に関与が示されていた ATR だけではなく、ATM も部分的にその反応に寄与していることが明らかになった。さらに紫外線の感受性に与える影響についても検討したところ、休止期に同調した A-T 細胞では紫外線に対する感受性が正常細胞より高くなることが分かった(図3)。従って、ATM シグナリング経路は、休止期の紫外線に対する応答反応において細胞の生存に寄与する重要な役割を果たしていると考えられる。今回の研究で明らかになった DSB 応答因子のリクルートもしくは損傷部位に保持する機能もその一つであるが、その全容を明らかにする必要がある。

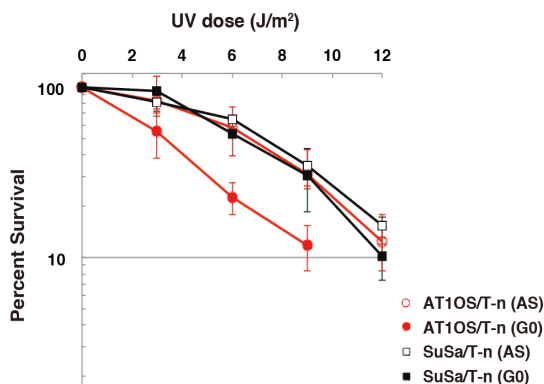


図3 A-T細胞の休止期特異的な紫外線高感受性

(3) 生体内の細胞のほとんどは休止期にいたることが知られており、上記で示した二次的な DNA 損傷が同様に生じているとすれば、これらの細胞にとっては脅威となり得る。実際にマウスの胸腺とリンパ節を採取し、Tリンパ球を分離して紫外線を照射したところ、休止期にあるリンパ節由来Tリンパ球でのみ H2AX のリン酸化が起きることを観察した。NER 能を欠損した XPA ノックアウトマウスから採取したリンパ節由来Tリンパ球ではこの反応が見られないことから、やはり NER に依存していることがわかった(図4)。また完全な休止期ではないが、細胞周期をゆっくり回っている幹細胞に着目し、そのモデルとして造血幹細胞を単離し、紫外線を照射した時の反応性について検討した。その結果、休止期の細胞と同様に、野生型のマウス由来の造血幹細胞では H2AX のリン酸化が生じ、XPA ノックアウトマウス由来のものではそのリン酸化が観察されず、NER 依存的な反応が生じることが分かった。

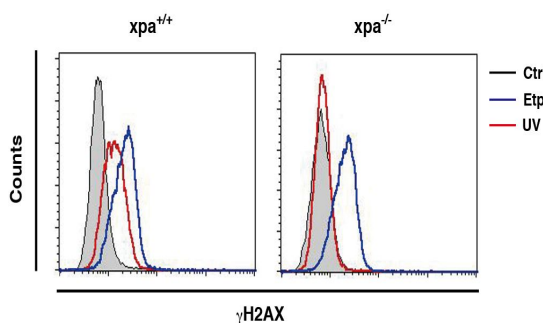


図4 末梢 Tリンパ球における NER 依存的な H2AX のリン酸化反応

これまでの解析から、NER の基質となる DNA 損傷を生成するシスプラチンや N-アセトキシ-2-アセチルアミノフルオレンを休止期細胞に処理した場合にも、NER 依存的な H2AX リン酸化が観察されることを見いだしている。したがって、このような化学物質でも生体内休止期細胞もしくは幹細胞でも同様の反応が生じる可能性があり、今後はマウスにシスプラチン等を投与して、個体レベル

でNERに依存したDSBの生成やATMシグナリング経路を阻害した時の影響等について、より詳細に検討していく必要がある。

#### 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 6件)

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.

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.

Ando, Y., Yasuoka, C., Mishima, T., Ikematsu, T., Uede, T., Matsunaga, T. and Inobe, M. (2014). Concanavalin A-mediated T cell proliferation is regulated by Herpes Virus Entry Mediator costimulatory molecule., *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal*, 50, 313-320. 査読有, doi: 10.1007/s11626-013-9705-2.

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.

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. 査読有, doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01073.x.

[学会発表](計 16件)

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、神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)

Wakasugi, M., Sasaki, T., Nagaoka, M., Matsumoto, M., Inoue, K., Horibata, K., Tanaka, K. and Matsunaga, T. NER-dependent DSB formation activates ATM signaling pathway in mammalian quiescent cells, Keystone Symposia "Genomic instability and DNA repair joint with DNA replication and recombination", 2015.3.1-6, Whistler (Canada).

若杉光生、長岡美由紀、堀田侑希、松永 司 : 生体内の様々な細胞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、日本放射線影響学会第57回大会、平成26年10月1 - 3日、かごしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市)

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、仙台

Honda, M., Nishiyama, C., Inobe, M., Wakasugi, M., Moriwaki, S. and Matsunaga, T. Newly developed immunoassay for evaluating nucleotide excision repair ability using individual peripheral lymphocytes and its possible application to the diagnosis of xeroderma pigmentosum, International Symposium on Xeroderma Pigmentosum and Related Diseases: Disorders of DNA Damage Response –Bench to Bedside–、平成26年3月5 - 7日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

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、神戸ポートピアアイランド (兵庫県・神戸市)

松永 司 : 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 (岡山県・岡山市)

本田愛美、西山千晶、猪部 学、若杉光生、森脇真一、松永 司 : 末梢血リンパ球を用いたヌクレオチド除去修復能診断法の確立とその応用、日本薬学会北陸支部第125回例会、平成25年11月17日、北陸大学薬学部アネックスファーム (石川県・金沢市)



松永 司、西永真理、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（神奈川県・横浜市）

西永真理、若杉光生、斎藤臣雄、長田裕之、  
山田耕平、国嶋崇隆、松永 司：ケミカルラ  
イブラリースクリーニングにより同定した新  
規ヌクレオチド除去修復阻害化合物の解析  
日本薬学会第133年会、平成25年3月28 - 30  
日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

西永真理、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  
低分子化合物の同定とその応用、第35回日本  
分子生物学会年会、平成24年12月11 - 14日、  
福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

若杉光生、鎌田光貴、川口慶晃、松浦顕教、  
松永 司：ヌクレオチド除去修復におけるユ  
ビキチンE3リガーゼコンポーネントとしての  
DDB1の必要性、第35回日本分子生物学会年会、  
平成24年12月11 - 14日、福岡国際会議場（福  
岡県・福岡市）

武井理華、若杉光生、Nicolas Thoma、松永  
司：CuI4/DDB1ユビキチンE3リガーゼ活性に影  
響を及ぼすDDB1の構造的変化、日本薬学会北  
陸支部第124回例会、平成24年11月18日、富山  
大学杉谷キャンパス講義実習棟（富山県・富山  
市）

松永 司、西永真理、長田裕之、若杉光生：  
癌細胞の紫外線及び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開発、  
第71回日本癌学会学術総会、平成24年9月19 -  
21日、ロイトン札幌（北海道・札幌市）

松永 司：ヌクレオチド除去修復能を評価  
するセルベースドアッセイ系の開発とその新  
展開、第34回日本光医学光生物学会・ワーク  
ショップ「DNA損傷とDNA修復」、平成24年7  
月27 - 28日 神戸国際会議場（兵庫県・神戸  
市）

西永真理、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効率に影響  
を及ぼす低分子化合物のスクリーニング、第  
34回日本光医学光生物学会、平成24年7月27 -  
28日、神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

〔図書〕(計 1件)

中山和久監訳 (2013) プロッパ細胞生物  
学 細胞の基本原則を学ぶ、化学同人。

〔産業財産権〕

出願状況 (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：特願 2012-94534

出願年月日：2012年4月18日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔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

若杉 光生 (WAKASUGI MITSUO)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：80345595

(2) 研究分担者

松永 司 (MATSUNAGA TSUKASA)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：60192340

(3) 連携研究者

該当無し