

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25281018

研究課題名(和文)トポイソメラーゼ阻害剤により生じたDNA損傷の修復機構の解明

研究課題名(英文)Alternative DNA repair pathways of DNA damage induced by topoisomerase inhibitor

研究代表者

倉岡 功 (Kuraoka, Isao)

大阪大学・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：60335396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：トポイソメラーゼ阻害剤は、有望な抗がん剤として広く使用されている。この阻害剤は細胞の成長に必須の酵素トポイソメラーゼの働きを阻害することでDNA損傷を導き、細胞を死に至らしめると考えられている。

本研究の目的は、このトポイソメラーゼ阻害剤により生じる損傷を修復するヒトのDNA修復機構を解析することであった。その機構を詳細に調べた結果、我々は新規の修復機構を発見することができた。

研究成果の概要(英文)：Human topoisomerase inhibitors are effective against a broad spectrum of tumors. They induce DNA damage leading cell death by the inhibition of enzymatic topoisomerase reaction specifically.

Here, we studied the repair mechanism of topoisomerase-induced DNA damage in human cells. We found that ERCC1-XPF and RPA participates in DNA repair of the Top1-DNA damage complex and that FEN1 participates in repair of the 5'-phosphotyrosyl terminus of DNA single-strand breaks. Our data provided insights into the DNA repair mechanisms in tumor cells.

研究分野：放射線・化学物質影響科学

キーワード：トポイソメラーゼ阻害剤 癌 DNA修復

1. 研究開始当初の背景

トポイソメラーゼ I(Top1)は、細胞内の DNA のねじれの解消を担う酵素であり、DNA を切断し、ねじれを解消したのち、再び再結合を行う活性をもつ。トポイソメラーゼ阻害剤の内一つカンプトテシン(CPT)は、Top1 に結合し、Top1-DNA 複合体を形成したのち、この再結合活性を阻害する。生じた Top1-1 本鎖 DNA 切断複合体はプロテアソームによって分解され、最終的に 3' 側にチロシンを含んだオリゴヌクレオチドにまで処理される。この生じた 3' -チロシン付加 1 本鎖 DNA 切断は、DNA 損傷となり、細胞を致死に導く。また、トポイソメラーゼ II(Top2)も、同様な活性を持ち、阻害剤エトポシド(ETP)により、Top2-DNA 複合体を形成することが知られる。しかしながら、この複合体は、CPT の場合と同様にプロテアソームによって分解されるが、Top1 とは異なり、3' 側ではなく、5' -チロシン付加 1 本鎖 DNA 切断を導き、そしてこれも CPT と同様に DNA 損傷として細胞を致死に導く。

現在、このようなトポイソメラーゼ阻害による致死効果は、抗がん剤および抗生物質に利用されている。しかしながら、がん細胞などはトポイソメラーゼ阻害剤に次第に抵抗性を持つようになることが知られており、耐性と修復との関連これらの損傷も細胞レベルで修復されることが示唆されている¹⁻²。現在これらの DNA 修復は DNA 組換え修復機構および Tyrosyl DNA Phosphodiesterase (TDP)により、修復されるという報告がある³。その一方で、様々な生物種を用いた遺伝学的な解析により、多岐にわたる DNA 修復タンパク質がこの損傷の修復に必要であることが示唆されている。

2. 研究の目的

我々は、これまでに抗がん剤シスプラチンにより生じた DNA 損傷の修復を解析し、この損傷にはヌクレオチド除去修復および損傷乗り越え修復合成が関与していることを明らかにした。さらにこの修復機構には、生じた損傷によって別の経路である組換え修復が関与することが示されていた。また、よく研究されている紫外線により生じる DNA 損傷の場合にも、基本的にはヌクレオチド除去修復で修復されるとあるものの、実際には損傷乗り越え修復合成および組換え修復機構が関与していることが知られている。これらの事実は、生じる DNA 損傷には従来とは異なる幾つもの修復機構が複雑に関与していることを示唆している。上記したように、トポイソメ

ラーゼ阻害剤には細胞死に至るまでに、1)トポイソメラーゼ再結合の阻害、2)プロテアソームによるトポイソメラーゼの分解、3)チロシン付加 1 本鎖 DNA 切断まで様々な段階があり、予想されているものより複雑な修復機構が必要になると想像される。しかしながら、これまで詳細については解明されていない部分が多い。これは生化学的解析が困難であったというのが原因と考えられる。応募者の目的は、これらの分子機構を明確にするため生化学的解析が可能な無細胞系の修復システムを確立し、トポイソメラーゼ阻害剤により生じた DNA 損傷がどのように修復されるのかその分子機構を明らかにすることであった。

3. 研究の方法

トポイソメラーゼ阻害剤は、それぞれトポイソメラーゼ I 型の阻害剤カンプトテシン、またトポイソメラーゼ II 型の阻害剤エトポシドなどが存在する。さらにそれぞれのトポイソメラーゼが DNA の切断末端の 3' および 5' にチロシンを付加することになる。応募者は、この 2 つのタイプのチロシンが付加したオリゴヌクレオチドを用いて、それぞれの損傷基質を作製し、切断する酵素を探索した。またさらにその酵素が機能する修復系関連タンパク質を精製し、どのようなタンパク質が修復産物が検出できるかを生化学的に解析した。

4. 研究成果

チロシン付加 1 本鎖 DNA 切断を有する DNA 基質の作製

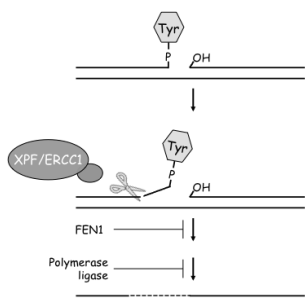
トポイソメラーゼ阻害剤は、それぞれトポイソメラーゼ I 型の阻害剤カンプトテシン、またトポイソメラーゼ II 型の阻害剤エトポシドなどが存在する。さらにそれぞれのトポイソメラーゼが DNA の切断末端の 3' および 5' にチロシンを付加することになる。

この 2 つのタイプのチロシンが付加したオリゴヌクレオチドを用いて、損傷基質を作製することを試みた。

しかしながら、十分な収量を確保することができなかった。

そこでチロシン付加された DNA を切断することができるかと予想され、かつ遺伝学的な解析により関与が示唆されているタンパク質を用いることとした。これらの因子は、既知の 3' Flap エンドヌクレアーゼおよび 5' Flap エンドヌクレアーゼが含まれる。これらのタンパク質を用いて切断様式を解析する。現在候補として考えられるエンドヌクレアーゼは、3' Flap エンドヌクレアーゼとして色素性乾皮症グループ F 群タンパク質複合体(XPF-ERCC1)、また 5' Flap エンドヌ

クレーゼとして色素性乾皮症グループ G 群タンパク質 XPG、Flap endonuclease 1 (Fen1), SLX1-SLX4 スクレナーゼなどが考えられる。これらの組換えタンパク質を調整し、それぞれの基質において切断活性を解析した。その結果、ERCC1-XPF 複合体がカンプトテシンにより生じるトポイソメラーゼ I 型 DNA 損傷の修復に関与し、さらにヌクレオチド除去修復タンパク質群と共存した時に修復合成が観察できることを見出した。



ERCC1-XPF の新機能

さらにこれに加えて FEN1 が、エトポシドにより生じるトポイソメラーゼ II 型の DNA 損傷のうち一本差切断を導くものの修復に関与し、塩基除去修復タンパク質群共存した時に修復合成が観察できることを見出した。これらの修復機能は、従来考えられてきた修復様式と異なる新規の修復様式であると考えられる。

引用文献

- ① Pommier Y. *Nat Rev Cancer*. 2006,
- ② Nitiss JL. *Nat Rev Cancer*. 2009
- ③ Chijiwa S. *Carcinogenesis*. 2010

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 17 件)

- ① FEN1 participates in repair of the 5'-phosphotyrosyl terminus of DNA single-strand breaks. Kametani Y, Takahata C, Narita T, Tanaka K, Iwai S, Kuraoka I *Carcinogenesis* 37(1) 56-62 2016 年 DOI : 10.1093/carcin/bgv159
- ② Bisnaphthalimidopropyl diaminodicyclohexylmethane induces DNA damage and repair instability in

triple negative breast cancer cells via p21 expression. Barron GA, Goua M, Kuraoka I, Bermano G, Iwai S, Kong Thoo Lin P *Chemico-biological interactions* 242 307-315 2015 年 DOI : 10.1016/j.cbi.2015.10.017

- ③ Diversity of Endonuclease V: From DNA Repair to RNA Editing. Kuraoka I *Biomolecules* 5(4) 2194-2206 2015 年 10.3390/biom5042194
- ④ Epigenetic modifications in DNA could mimic oxidative DNA damage: A double-edged sword. Ito S, Kuraoka I *DNA repair* 32 52-57 2015 年 DOI : 10.1016/j.dnarep.2015.04.013
- ⑤ Repair synthesis step involving ERCC1-XPF participates in DNA repair of the Top1-DNA damage complex. Takahata C, Masuda Y, Takedachi A, Tanaka K, Iwai S, Kuraoka I *Carcinogenesis* 36(8) 841-851 2015 年 DOI : 10.1093/carcin/bgv078
- ⑥ An in vitro method for detecting genetic toxicity based on inhibition of RNA synthesis by DNA lesions. Sonohara Y, Iwai S, Kuraoka I *Genes and Environment* 37:8 2015 年 DOI : 10.1186/s41021-015-0014-8
- ⑦ The SLX4 complex is a SUMO E3 ligase that impacts on replication stress outcome and genome stability. Guervilly JH, Takedachi A, Naim V, Scaglione S, Chawhan C, Lovera Y, Despras E, Kuraoka I, Kannouche P, Rosselli F, Gaillard PH *Molecular cell* 57(1) 123-137 2015 年 DOI : 10.1016/j.molcel.2014.11.014
- ⑧ Frequencies of mutagenic translesion DNA synthesis over cisplatin-guanine intra-strand crosslinks in lacZ

- plasmids propagated in human cells. Fujikawa Y, Kawanishi M, Kuraoka I, Yagi T Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis 770 23-28 2014年 DOI : 10.1016/j.mrgentox.2014.05.006
- ⑨ Fluorescence detection of cellular nucleotide excision repair of damaged DNA. Toga T, Kuraoka I, Watanabe S, Nakano E, Takeuchi S, Nishigori C, Sugawara K, Iwai S Scientific reports 4 5578 2014年 DOI : 10.1038/srep05578
- ⑩ Guanine-5-carboxylcytosine base pairs mimic mismatches during DNA replication. Shibutani T, Ito S, Toda M, Kanao R, Collins LB, Shibata M, Urabe M, Koseki H, Masuda Y, Swenberg JA, Masutani C, Hanaoka F, Iwai S, Kuraoka I Scientific reports 4 5220 2014年 DOI : 10.1038/srep05220
- ⑪ An RNA synthesis inhibition assay for detecting toxic substances using click chemistry. Kametani Y, Iwai S, Kuraoka I The Journal of toxicological sciences 39(2) 293-299 2014年
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/39/2/39_293/_article
- ⑫ A transfection reporter for the prevention of false-negative results in molecular beacon experiments. Toga T, Kuraoka I, Yasui A, Iwai S Analytical biochemistry 440(1) 9-11 2013年 DOI : 10.1016/j.ab.2013.04.027
- ⑬ Strand breakage of a (6-4) photoproduct-containing DNA at neutral pH and its repair by the ERCC1-XPF protein complex. Arichi N, Yamamoto J, Takahata C, Sano E, Masuda Y, Kuraoka I, Iwai S Organic & biomolecular chemistry 11(21) 3526-3534 2013年 DOI : 10.1039/c3ob00012e
- ⑭ Effects of DNA lesions on the transcription reaction of mitochondrial RNA polymerase: implications for bypass RNA synthesis on oxidative DNA lesions. Nakanishi N, Fukuoh A, Kang D, Iwai S, Kuraoka I Mutagenesis 28(1) 117-123 2013年 DOI : 10.1093/mutage/ges060
- ⑮ Miscoding properties of 8-chloro-2'-deoxyguanosine, a hypochlorous acid-induced DNA adduct, catalysed by human DNA polymerases. Sassa A, Kamoshita N, Matsuda T, Ishii Y, Kuraoka I, Nohmi T, Ohta T, Honma M, Yasui M Mutagenesis 28(1) 81-88 2013年 DOI : 10.1093/mutage/ges056
- ⑯ Establishment of a human cell line stably overexpressing mouse Nip45 and characterization of Nip45 subcellular localization. Hashiguchi K, Ozaki M, Kuraoka I, Saitoh H Biochemical and biophysical research communications 430(1) 72-77 2013年 DOI : 10.1016/j.bbrc.2012.11.020
- ⑰ Human endonuclease V is a ribonuclease specific for inosine-containing RNA. Morita Y, Shibutani T, Nakanishi N, Nishikura K, Iwai S, Kuraoka I Nature communications 4 2273 2013年 DOI : 10.1038/ncomms3273

[学会発表] (計 21 件)

- ① Kuraoka I Function of Human

- Endonuclease V: From DNA to RNA The Gordon Research Conference DNA damage, Mutation & Cancer 2016年3月14日 ベンニュラ(米国)
- ② 倉岡功 ヒトエンドヌクレアーゼ V は RNA 修復に関与する。日本分子生物学会第38大会 2015年12月4日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- ③ 倉岡功 メチルシトシンの酸化体における DNA 障害 日本環境変異原学会第44大会 2015年11月28日 九州大学(福岡県福岡市)
- ④ KIM Jungin, 岩井成憲, 倉岡功 ヒトエンドヌクレアーゼ V の機能的解析 第44回日本環境変異原学会大会 九州大学(福岡県福岡市)
- ⑤ 園原由依菜, 岩井成憲, 倉岡功 RNA 合成阻害に基づいた in vitro における DNA 損傷検出法の構築 第44回日本環境変異原学会大会 九州大学(福岡県福岡市)
- ⑥ 黒田真未, 岩井成憲, 倉岡功, 岡田賢治 Human EEPD1 の細胞内局在の解析 第44回日本環境変異原学会大会 九州大学(福岡県福岡市)
- ⑦ Kuraoka I A NER synthesis step involving ERCC1-XPF participates in DNA repair of the TOPI-DNA complex Structure-Specific Endonucleases in Genome Stability Meeting 2015年11月5日 ブルノ(チェコ共和国)
- ⑧ 倉岡功 ヒト DNA エンドヌクレアーゼ V は、イノシンを含む RNA を切断するリボヌクレアーゼである。日本遺伝学会第87大会 東北大学(宮城県仙台市)
- ⑨ Kuraoka I A nucleotide excision repair synthesis step involving ERCC1-XPF endonuclease participates in repair of the topoisomerase I-DNA complex Zing Conferences - Genomic Integrity 2015年8月5日 ケアンズ(オーストラリア)
- ⑩ KIM Jungin, 岩井成憲, 倉岡功 ヒト Endonuclease V におけるイノシン化 RNA 切断活性の機能解析 日本 RNA 学会第15回年会 2015年7月15日 ホテルライフオーソ札幌(北海道札幌市)
- ⑪ Kuraoka I Epigenetic DNA modification 5-carboxylcytosine forms G·T mismatch mimicking-base pairs and induces an apoptosis via MMR 4th Asian Conference on Environmental Mutagens 2014年12月12日 コルカタ(インド)
- ⑫ 倉岡功、渋谷 敏博、岩井成憲 メチルシトシン酸化誘導体が導く複製機構の障害 日本環境変異原学会第43回大会 2014年12月5日 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区)
- ⑬ 岡田賢治, 岩井成憲, 倉岡功 Human EEPD1 はヌクレアーゼ活性を有する日本環境変異原学会第43回大会 2014年12月5日 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区)
- ⑭ 松田雪恵, 岩井成憲, 倉岡功 イノシンを含む RNA の新たな検出方法の確立 日本環境変異原学会第43回大会 2014年12月5日 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区)
- ⑮ 倉岡功 5-メチルシトシンとその酸化誘導体における複製システムの統合的理解 第87回日本生化学会大会 2014年10月15日 京都国際会議場(京都府京都市)
- ⑯ 倉岡功 5-メチルシトシンの酸化誘導体における複製システムの障害 日本放射線影響学会第57回大会 2014年10月3日 かがしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)
- ⑰ 倉岡功 ヒト Endonuclease V は iRNA 切断酵素である 日本 RNA 学会第14回年会 2014年6月23日 ウィンクあいち(愛知県名古屋)
- ⑱ Kuraoka I FLJ 35220 protein, a human homolog of DNA endonuclease V, is a ribonuclease specific for inosine-containing RNA International Symposium on XP & Related Diseases 2014年3月5日 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)
- ⑲ 渋谷敏博, 岩井成憲, 倉岡功 ヒトのエンドヌクレアーゼ V はイノシンを含む RNA に特異的なリボヌクレアーゼである 日本分子生物学会第36大会 2013年12月4日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- ⑳ 松田雪恵, 岩井成憲, 倉岡功 高度好熱菌由来のエンドヌクレアーゼ V(EndoV) の機能解析 日本環境変異原学会第42回大会 2013年10月30日
- 21 亀谷有希子, 岩井成憲, 倉岡功 Click chemistry を用いた転写反応系を用いた DNA 損傷検出法の構築 日本環境変異原学会第42回大会 2013年10月30日
- [その他]
- ① 倉岡功 2015年ノーベル賞を読み解く 化学賞 DNA 修復機構の発見 遺伝情報を安定に維持するためのしくみ 化学70(12) 12-17 201
- ② 倉岡功 修復機能の多様化 生産と技術 67(4) 81-84 20

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉岡 功 (Kuraoka Isao)
 大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授
 研究者番号：60335396

(3) 連携研究者

岩井 成憲 (Iwai, Shigenori)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号：10168544