

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00534

研究課題名(和文) 休止期のヌクレオチド除去修復により生じる二次的DNA損傷とゲノム恒常性維持機構

研究課題名(英文) Analysis of secondary DNA damage elicited by nucleotide excision repair and the genome maintenance mechanism in mammalian quiescent cells

研究代表者

若杉 光生 (WAKASUGI, MITSUO)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：80345595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：紫外線による塩基損傷がヌクレオチド除去修復(NER)により二次的なDNA損傷に変換されるメカニズムの解明を目指すとともに、生体内での二次的DNA損傷の生成について検討した。その結果、Exo1がNER反応のssDNAギャップ中間体を拡大していることが明らかとなり、ATR経路を活性化することがわかった。また、Exo1がDSBに対するシグナリング経路にも影響を与えることや、細胞死の防御に寄与することを見出した。そしてマウス皮膚組織における諸反応について解析を行い、表皮の基底細胞層においてNER依存的なDNA損傷応答反応が起きることを示し、生体内でも二次的DNA損傷が生成することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In quiescent cells, nucleotide excision repair (NER) process generates multiple types of secondary DNA damage. However, the mechanism of secondary DNA damage formation and their biological meanings are unclear. In this study, we have examined the possible involvement of exonuclease 1 (Exo1) in the processing of ssDNA gap intermediate during NER. We found that Exo1 plays an important role in the processing of NER-induced ssDNA gap intermediates and protects UV-induced cell death in quiescent cells. In addition, we could detect several NER-dependent DNA damage responses in mouse skin, such as H2AX phosphorylation and ATM activation, indicating that NER-dependent formation of secondary DNA damage indeed occurs in vivo as well.

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 二次的DNA損傷 ssDNAギャップ DNA二本鎖切断

### 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、ATR、そして 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 による DNA 損傷応答において重要な役割を担っている。

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、接触阻止と血清飢餓により G0 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報告した (Matsumoto et al., 2007)。さらに、このリン酸化には 2 種類の二次的な DNA 損傷に対応する PIKK キナーゼが寄与しており、一本鎖 DNA 領域の蓄積による ATR を介したものと、DSB の生成による ATM (もしくは DNA-PKcs) を介したものが存在することを明らかにした (Wakasugi et al., 2014)。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考えられてきた。しかしながら、我々の実験結果は、紫外線によって生じた塩基損傷を修復する NER を介して二次的に DSB が生じることを示しており、それによる重篤な影響を防ぐための DNA 損傷応答経路の存在や既知の経路とのクロストークも予想された。

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、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、紫外線により生じた二量体型の塩基損傷がどのように DSB に変換されるのかは不明である。また生体内の反応を考えると、休止期の細胞における DNA 損傷応答反応も重要なことは明白であり、これまでもその重要性は指摘されてきたが、増殖期とは異なる現象が断片的に報告されているのみで、その意義に関しては十分な解析がされておらず、分子的な理解には程遠い状況にあった。

### 2. 研究の目的

我々は、ヒストン H2AX がヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) に依存してリン酸化されるという発見を端緒とし、休止期の培養細胞では、NER 依存的に複数の DNA 損傷応答機構が活性化することを明らかにしてきた (図 1)。その活性化は NER の反応中間体を介して生じる 2 種類の二次的な DNA 損傷に起因するが、本研究ではその二次的な損傷の生成機構とそれにより活性化する DNA 損傷応答の生物学的意義の解明を目的とした。特に、生体にとって重篤な作用をもつ二本鎖切断 (DNA double-strand break; DSB) がどのように生じるかは不明であり、DSB の生成に関わるヌクレアーゼを同定し、その酵素活性の制御や欠損による生物影響を明らかにすることを試みた。また、培養細胞で見いだした新規の DNA 損傷応答反応が生体内でも起きることを示し、その生物学的意義の解明を目指した。

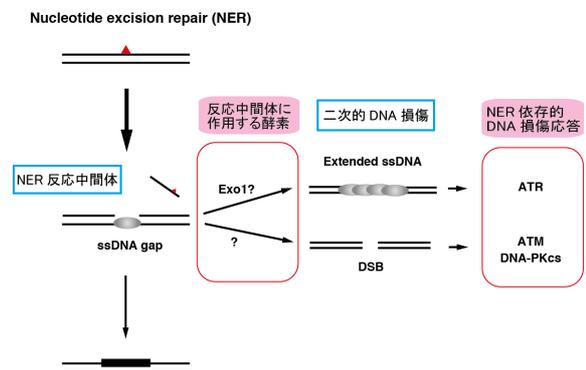


図 1 休止期の NER 依存的な DNA 損傷応答機構のモデル

### 3. 研究の方法

細胞の G0 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% 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。また標的タンパク質のノックダウンにはレンチウイルス系による shRNA を用い、薬剤選択によりノックダウン細胞株を作製した。

生体内における NER 依存的な DNA 損傷応答反応は、野生型マウスもしくは NER 能を欠損した xpa ノックアウトマウスに UV-B を照射し、各時間経過後に皮膚切片を作製して蛍光免疫染色により解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) これまでの解析から二次的 DNA 損傷への変換に関与することが示唆された Exo1 に着目して解析を行った。まず、蛍光タンパク質と融合した Exo1 を安定発現する細胞を作成して細胞内局在性について検討したとこ

る、NER の切断反応に依存して紫外線損傷部位に集積することがわかった。次に DNA 損傷応答反応について調べてみると、Exo1 を過剰発現した細胞では親株と比較して ATR 及び ATM の共通の基質である H2AX のリン酸化反応が顕著に亢進しており、NER により生じた ssDNA 領域が拡大していることが明らかになった (図 2 右)。一方で DSB に依存して活性化する ATM 経路について調べると、その活性化は抑制されていた。つまり、Exo1 による ssDNA 領域の拡大は ATR シグナリング経路を促進させるが、DSB の生成もしくは ATM シグナリング経路を抑制することがわかった。さらに shRNA により Exo1 をノックダウンした細胞についても検討を行ったところ、紫外線照射後の ssDNA 領域と H2AX のリン酸化が顕著に低下し (図 2 中央)、意外にも ATM シグナリング経路も抑制されることがわかった。つまり、休止期細胞の NER により生じた ssDNA ギャップは Exo1 により拡張され、生じた ssDNA 領域が ATR シグナリング経路を活性化する一方で、一部は DSB にも変換されて ATM 経路の活性化にも寄与する可能性が示唆された。さらに、Exo1 ノックダウン細胞では紫外線照射後の細胞死が顕著に増加しており、細胞死の防御にも寄与することも明らかにした。

一方 DSB への変換に関しては、候補となるヌクレアーゼを絞り込むことはできたが、その確固たる証明には、さらに詳細な検討が必要である。しかし、今回明らかにした ssDNA 領域の拡大に加え、より生物学的効果の大きい DSB に変換するという仕組みが存在することも確かであり、休止期の細胞では NER 中間体がプロセッシングを受けることで、何らかのシグナルを伝えている。今後、一見不合理にも思える二次的 DNA 損傷生成のメカニズムと生物学的意義を明らかにする必要がある。

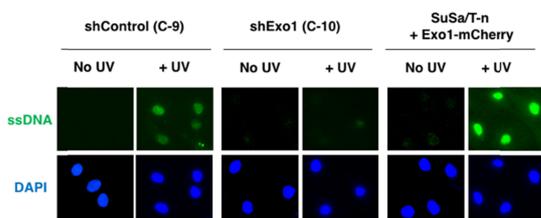
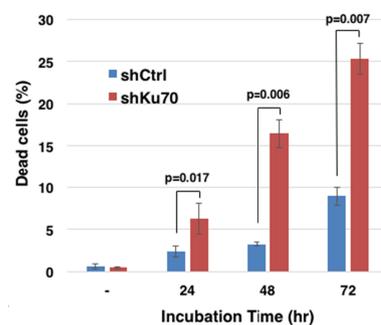


図 2 Exo1 の過剰発現もしくはノックダウンが紫外線照射後の ssDNA 領域の生成に及ぼす影響

(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。これまでに DSB に依存して活性化する ATM 欠損の影響について解析を行ってきたが、DSB に対する修復反応とその欠損の影響は不明であった。細胞内に生じた DSB は、主に相同組み換えと非同末端結合 (non-homologous end joining; NHEJ) により修復される。休止期では G1 期と

同様に姉妹染色分体がないため NHEJ が機能すると考え、必須因子である DNA-PKcs と Ku70 に着目して解析を行った。まず DNA-PKcs の活性化について検討したところ、紫外線を照射した細胞で活性化を示すリン酸化体が検出され、それが紫外線損傷部位に集積することがわかった。次に NHEJ の欠損の影響を明らかにするために、Ku70 を恒常的にノックダウンした細胞株を作製した。Ku70 ノックダウン細胞では、紫外線による H2AX リン酸化のレベルがコントロール細胞と比較して高く、DSB の修復の遅延が示唆された。また、紫外線による細胞死への影響も検討したところ、Ku70 のノックダウンにより死細胞の割合が顕著に増加していた (図 3)。また、このような死細胞の増加は対数増殖期の状態では観察されず、休止期特異的な反応であると考えられる。以上の結果より、NHEJ システムは NER 依存的に生じる DSB の修復に寄与し、休



止期の紫外線に対する防御機構として重要な役割を担っている可能性が示唆された。図 3 Ku70 ノックダウンによる紫外線誘発細胞死の増加

(3) マウスの皮膚組織において NER 依存的な二次的 DNA 損傷が生成しているかを検討するために、野生型マウスと NER 能を完全に欠損した XPA ノックアウトマウスに UV-B 紫外線を照射し、蛍光免疫染色により解析を行った。野生型マウスでは基底層に H2AX のリン酸化が観察され、またその反応は増殖性の指標である Ki-67 抗原には依存していなかった。それに対し、XPA ノックアウトマウスでは H2AX のリン酸化は観察されず、皮膚組織においても NER 依存的な反応が生じていることが明らかになった (図 4)。

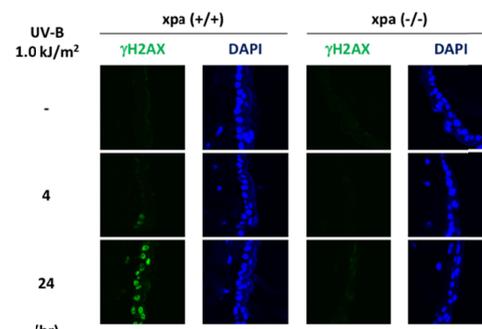


図 4 マウス皮膚における NER 依存的な H2AX のリン酸化反応

さらに、マウスの皮膚組織における ATM シグナリング経路の活性化について検討を行ったところ、UV-B を照射した野生型マウスの基底層の細胞では 4 時間後に強い ATM のリン酸化のシグナルが観察されたが、24 時間後では減衰しており、H2AX のリン酸化反応とは明らかに異なる動態を示した。それに対し、NER 能を完全に欠損した xpa ノックアウトマウスではどの時間においてもそのシグナルはほとんど検出されなかった。したがって、皮膚組織においても ATM のリン酸化が NER 依存的に生じることが明らかとなり、紫外線によって DSB が生じる可能性も示唆された。

したがって、生体内においても、休止期に同調した培養細胞を用いて観察された DNA 損傷応答反応が生じていることを意味しており、この新規の DNA 損傷応答の生物学的意味についてさらに検討する必要がある。

#### 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. *Scientific reports* 7. 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+ T Cells compared to CD4+ T Cells Following in vitro stimulation. *Microbiol. Immunol.* 61(5):168-175. 査読有, DOI:10.1111/1348-0421.12479.

[学会発表](計 17 件)

松永 司: 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」(2018)

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(2018)

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(2018)

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)(2017)

松永 司: 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、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」(2017)

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(2017)

松永 司: 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、OICI セミナーシリーズ 118 大阪国際がんセンター研究所(2017)

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)(2017)

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 EXO1 の関与の検討、日本薬学会第 137 回年会(2017)

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(2017)

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(2016)

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(2016)

松永 司: 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」(2016)

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 (2016)

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  
(2015)

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 (2015)

Wakasugi, M., Sasaki, T., Matsumoto, M.,  
Nagaoka, M., Inoue, K., Inobe, M.,  
Horibata, K., Tanaka, K. and Matsunaga,  
T.: Activation of ATR and ATM signaling  
pathways by NER-dependent secondary  
damage in mammalian quiescent cells,  
The 15th International Congress of  
Radiation  
Research (2015)

〔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 (2016) 光と生命の事典、朝倉書店

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 2 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：2016 年 9 月 16 日  
国内外の別：国内

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

取得年月日：登録日：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

若杉 光生 (WAKASUGI MITSUO)

金沢大学・薬学系・准教授

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

(4) 研究協力者

該当無し