

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21810022

研究課題名（和文） NERに関する新規因子の探索及び機能解析

研究課題名（英文） Screening for novel factors involved in nucleotide excision repair

研究代表者

中沢 由華 (NAKAZAWA YUKA)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・COE 研究員

研究者番号：00533902

研究成果の概要（和文）：

紫外線によって誘発された DNA 損傷は、ヌクレオチド除去修復機構により修復される。この NER 活性を評価する方法として、修復 DNA 合成量を測定する UDS 法と、RNA 合成の回復を見る RRS 法がある。現在、これらの測定には RI を用いるのが一般的であるが、その手技は非常に煩雑である。そこで、我々は非放射性物質のエチニル化合物を蛍光標識する手法を応用することで、従来の方法と比較して、簡便で迅速に NER の活性を評価でき、NER に欠損のある患者の診断にも応用可能な精度を持つ測定技術を確認した。この測定法を用いて siRNA ライブラリースクリーニングを行い、NER に関する新たな因子の探索を行った。

研究成果の概要（英文）：

Nucleotide excision repair (NER) removes the major UV-photolesions from cellular DNA. Two assays commonly used in measurement of NER activity are 'unscheduled DNA synthesis (UDS)', and 'recovery of RNA synthesis (RRS)'. Reliable methods for these assays involved measurements of incorporation of radio-labeled nucleosides. We have established non-radioactive procedures for determining UDS and RRS levels by incorporation of alkyne-conjugated nucleoside analogues, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and 5-ethynyridine (EU). We assessed the UDS and RRS levels of several fibroblasts derived from NER-deficient patients by this non-radioactive assay system. Our results were in good agreement with those obtained by conventional assays, indicating that the system provides a convenient, but sensitive and accurate assay. We also demonstrated the utility of this technique for a large-scale siRNA-screening to identify novel NER factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1070000	321000	1391000
2010年度	970000	291000	1261000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	2040000	612000	2652000

研究分野：DNA 修復

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

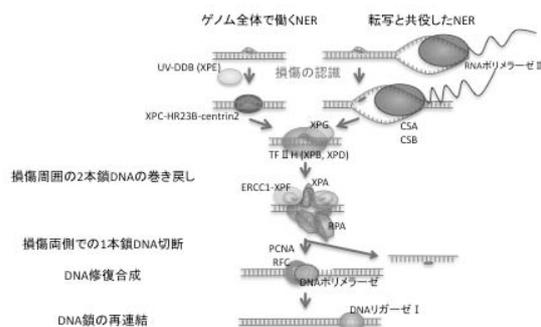
キーワード：DNA 修復、ヌクレオチド除去修復

1. 研究開始当初の背景

ヌクレオチド除去修復 (Nucleotide excision repair: NER) は生物が獲得した DNA 修復機構の中でも最も汎用性が高い修復システムの1つであり、多種多様な DNA 損傷を修復することが出来る。このため微生物から高等生物まで、基本的な分子メカニズムを含めて高度に保存されている。また、ヒトにおいては紫外線によって生じるシクロブタン型ピリミジン 2 量体 (CPD) や 6-4 光産物 (6-4PP) もこの NER により修復される。

NER の欠損は、ヒトでは日光過敏症や皮膚がんを好発する色素性乾皮症 (Xeroderma Pigmentosum: XP)、早発老化症、発達障害及び精神疾患を併発するコケイン症候群 (Cockayne's Syndrome: CS) 等の遺伝性疾患の原因となる。これらの疾患に特徴的な臨床所見は、不正確な DNA 修復がゲノムの不安定化を引き起こすため、あるいは未修復の DNA 損傷が細胞機能の維持に必要な遺伝子の転写を阻害するために生じると考えられている。XP は現在までに少なくとも 8 つの原因遺伝子 (XP-A-G, XP-V) が同定されている。(ただし、XP-V は NER の欠損ではなく損傷乗り越え複製 (Translesion Synthesis: TLS) の欠損である)

NER には、大きく分けて、ゲノム全体で働く NER (Global Genome Repair; GG-NER) と転写と共役した NER (Transcription Coupled Repair; TC-NER) の 2 つの経路がある。



それぞれの活性は DNA 修復合成 (unscheduled DNA synthesis: UDS) 量と RNA 合成のリカバリー (Recovery of RNA Synthesis: RRS) 量を測定する事で評価が可能である。NER は非常に広範な DNA 損傷を修復することで、ゲノムに関わる様々な疾患を防御しており、この機構が正常に機能しなくなることは生物にとって極めて重大な問題となることから、これまでに様々な研究が報告されてきた。しかし、意見の対立した報告も少なくなく、NER のメカニズム及び関連因子について未知の部分が多数残っていることが考えられる。そこで、スクリーニングに

よる関連因子探索がひとつの切り口になると考えられるが、スクリーニングの指標となる修復活性 (UDS 及び RRS) の計測に現行の方法を採用した場合、放射性物質を用いる事による種々の制限や、処理・観察・解析にかかる時間的問題、多検体同時処理の困難さから、これまでスクリーニングは不可能とされてきた。

2. 研究の目的

現在一般的に用いられている修復活性の測定法は、修復パッチへの 3H-チミジンの取り込みをオートラジオグラフィにより計測するものである。この手法は、正確である反面、サンプル処理が煩雑であり、また活性の測定も顕微鏡下で核内に生じた銀粒子の個数を計測するため多検体処理が不可能である。よって、修復活性を指標としたスクリーニングを行う事は不可能であった。しかし、研究代表者の所属する研究室では、UDS を簡便かつ正確に測定する手法を新たに開発した - 特許申請中 - (Limsirichaikul et al. Nucleic Acids Res 2009 37, e31)。この手法は、チミジン誘導体であるエチニルデオキシウリジン (5-ethynyl-2'-deoxyuridine: EdU) を DNA 損傷後に細胞に取り込ませ、アルキル-アザイドカップリング反応により蛍光色素を直接塩基に導入するものである。



この反応は簡便かつ低バックグラウンドで、3H-チミジン法と同程度以上の検出感度・精度であることが確認されている。この新規修復合成活性測定法を、96 ウェルプレート上で In Cell Analyzer を用いて解析できるよう改良し、異なる siRNA を導入した多数の検体を同時に比較検討することで、NER に関わる新たな因子を網羅的に探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) スクリーニングに適した DNA 修復合成活性測定法の確立

Limsirichaikul らが開発した、スライドグラスと顕微鏡を用いた DNA 修復活性測定法 (Limsirichaikul et al. Nucleic Acids Res 2009 37, e31) を、96 ウェルプレートと In Cell Analyzer に応用するため、ウェルあた

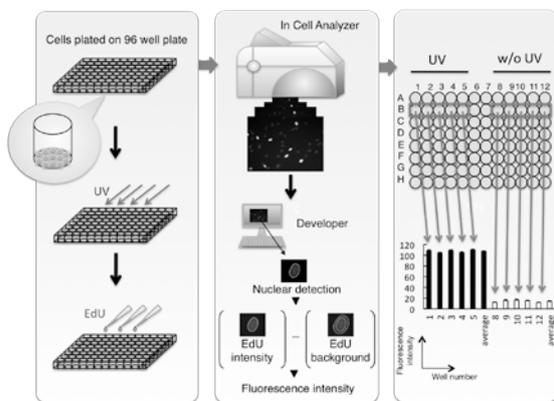
りの細胞密度、EdU の濃度、EdU 取り込み時間、EdU の標識方法 (固定方法やブロッキング方法等)、得られたデータの解析法 (核認識や S 期細胞の除外など In Cell Analyzer 上の設定及び統計処理) 等について、紫外線照射および非照射の正常細胞を用いて検討する。さらに、siRNA の濃度、siRNA の導入時間及びインターバル等についても最適な条件を決定する。

(2) siRNA ライブラリースクリーニングによる修復合成に関与する因子の探索

購入した siRNA をそれぞれ 96 ウェルプレート上で正常細胞に導入し、各タンパク質の発現を抑制する。紫外線照射後、上記 DNA 損傷修復活性測定法により EdU の取り込みと標識を行い、In Cell Analyzer で各ウェルにつき数視野をランダムに観察する。得られた画像は、ウェルごとに集計・解析し、コントロール (擬似的 siRNA を導入したもの) と比較して DNA 修復合成活性に変化のあったものを特定する。この siRNA で抑制されている遺伝子を修復合成に関与する候補因子とする。

4. 研究成果

チミジン誘導体を、と蛍光色素を用いた UDS 測定法を、96 ウェルプレートと In Cell Analyzer に応用し、自動的に修復活性を計測できるよう条件設定とシステム開発を行った。



その結果、わずか 1 日で約 300 サンプルの測定及び解析が可能となった。現在一般的に用いられている放射性同位体の取り込みを指標とする UDS 法は、測定に数週間を要するのに対して、我々の開発した新規 UDS 測定法は比べ物にならないほど短時間で結果が得られるうえ、その検出感度及び定量性は現行の方法に引けを取らない事も証明された。

さらに、EdU の代わりにエチニルウリジン (EU) を細胞に取り込ませることで、RRS を観察する事にも成功した。これら新規 UDS 及び RRS 測定法を併用することで、色素性乾皮症やコケイン症候群患者の診断を、ごく短時間

で正確に行う事が可能となった。また、NER への関与が確認されているタンパク質の siRNA 処理による UDS と RRS の変化量を、新規 UDS 及び RRS 測定法を用いて調べたところ、十分に検出可能である事が確認された。以上の事から、新規 NER 因子のスクリーニングに適した UDS/RRS 測定法が確立されたと考えられる。

この UDS および RRS 測定法を用いて、核酸結合タンパク関連 310 遺伝子をターゲットとした siRNA ライブラリーおよび、ライゲース関連 949 遺伝子をターゲットとした siRNA ライブラリーによるスクリーニングを行ったところ、UDS あるいは RRS 活性に変化をもたらす数十個の因子が特定された。

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 1 件)

中沢由華, S. Yamashita, A. Lehmann, and T. Ogi. A semi-automated non-radioactive system for measuring recovery of RNA synthesis and unscheduled DNA synthesis using ethynyluracil derivatives. *DNA Repair* 9: 506-16 (2010) 査読有り.

[学会発表] (計 3 件)

①中沢由華

「A rapid non-radioactive technique for measurement of nucleotide excision repair (NER) activity in primary human fibroblasts by incorporation of ethynyluracil derivatives」
The 7th 3R International Conference
2010 年 10 月 26 日～30 日
富山

②中沢由華

「A semi-automated non-radioactive system for measuring recovery of RNA synthesis and unscheduled DNA synthesis using ethynyluracil derivatives」
International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010
2010 年 2 月 17 日～20 日
長崎

③中沢由華

「EdU を用いた UDS 測定法と XP 診断への応用」
第 32 回日本分子生物学会年会
2009 年 12 月 9 日～12 日

横浜

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：損傷 DNA 修復物質のスクリーニング方法

発明者：中沢 由華 他 2 名

権利者：長崎大学

種類：日本国特許出願

番号：特願 2009-172521

出願年月日：2009 年 7 月 23 日

国内外の別：国内

米国特許出願(12/656,408)

上記国内特許を米国へ優先権出願

発明者：中沢 由華 他 2 名

権利者：長崎大学

出願年月日：2010 年 1 月 28 日

国内外の別：国外

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中沢 由華 (NAKAZAWA YUKA)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・COE 研究員

研究者番号：00533902

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：