

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12319

研究課題名(和文)NER中間体がもたらす新たなDNA損傷生成とその防御応答の解析

研究課題名(英文)The mechanism of NER-dependent secondary DNA damage formation and the crucial roles of the accompanying DNA damage responses in quiescent cells

研究代表者

若杉 光生 (Waksugi, 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム安定性の維持に重要なヌクレオチド除去修復(nucleotide excision repair; NER)は、休止期ではその後期過程が完了しない場合がある。それが原因で二次的なDNA損傷が生じるが、その生成機構や修復系、そして生物学的意義は不明である。本研究では、二次的DNA損傷のうち二本鎖切断(DNA double-strand break; DSB)には非相同末端結合が機能し、細胞死を抑制することを明らかにした。また、二次的DNA損傷がゲノム不安定性を誘発する結果を得た。そして、NER反応中間体にヌクレアーゼが作用することでDSBが生成し、複数のヌクレアーゼが関与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、S期以外の時期では最も重篤なDSBは生じないことが定説であった。一方で我々の実験結果は、休止期の細胞では紫外線によってもDSBが生成することを示していたが、そのメカニズムが不明であった。本研究においてその生成に関与するヌクレアーゼを同定し、そのメカニズムの一端を明らかにすることができた。また、「DNA損傷に対する防御機構であるDNA修復系が、その基質となる損傷をよりリスクの高いものに変換する」という生体特有の反応が遺伝的不安定性を引き起こす要因となりうることを示し、その修復系が重要な役割を果たしていることを実証した。

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 non-homologous end joining (NHEJ) in the repair of DNA double-strand break (DSB), one of the secondary DNA damages. We found that NHEJ indeed plays an important role in NER-dependent DSB repair and protects UV-induced cell death in quiescent cells. In addition, we also showed that the secondary DNA damage causes the mutations and chromosome aberrations. Furthermore, we revealed that at least two endonucleases are required for the activation of ATM as well as DNA-PKcs in the response to NER-dependent DSB. Several endonucleases may act on ssDNA gap intermediates for producing DSBs.

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 DNA二本鎖切断 ssDNAギャップ

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生体内で起きる反応に着目し、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) (図 1)。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、S 期以外の時期では最も重篤な DSB は生じないことが定説であった。一方で我々の実験結果は、休止期の細胞では紫外線によっても DSB が生成することを示していたが、そのメカニズムが不明であり、解明が必要であった。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った。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。

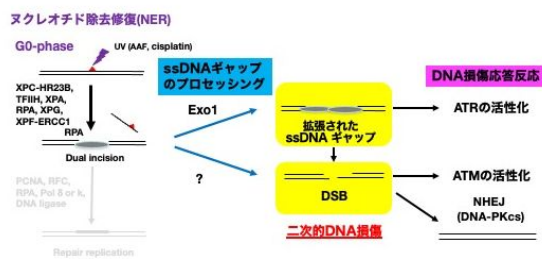


図 1. 休止期の不完全な NER 反応に伴う DNA 損傷応答反応のモデル

2. 研究の目的

本研究は、休止期の NER に依存して生じる二次的な損傷の生成機構と NER 中間体のプロセッシングの生物学的意義の解明を目的とする。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) の生成機構に着目し、DSB の生成に関与するヌクレアーゼを同定して、その酵素活性の制御や欠損による生物影響を解析する。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すとともに、その破綻による影響を解析することにより生物学的意義を明らかにする。これは我々が独自に見出した実験結果を基盤とし、未だ明らかとなっていない初期シグナルの生成機構やその生物学的意義の解明を目指したものである。本研究で着目している反応は、ヌクレオチド除去修復の基質となる広範な DNA 損傷によって誘起されるだけでなく、生体から単離した分化細胞や幹細胞においても観察されるという結果も得ており、本研究で注目している反応の真の役割が注目される。

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もしくはノックアウトにはレンチウイルス系による shRNA もしくは CRISPR/Cas9 システムを用い、薬剤選択により目的の細胞株を単離した。二次的 DNA 損傷の突然変異に及ぼす影響の検討には、HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transferase) アッセイを用いた。G0 期に同調した正常ヒト由来培養細胞あるいは二次的 DNA 損傷応答関連因子のノックアウト (or ノックダウン) 細胞に紫外線を照射し、変異固定のために継代培養した後、6-thioguanine を含む選択培地でコロニーを形成させることにより HPRT 突然変異の発生頻度を算出した。

4. 研究成果

(1)細胞内に生じた DSB は、主に相同組み換えと非相同末端結合(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、初期もしくは後期過程で働く Ku70 と XRCC4 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 及び XRCC4 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。そしてコロニー形成法により紫外線感受性を調べてみると、XRCC4 のノックダウンにより紫外線感受性が明らかに増加した(図 2)。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。

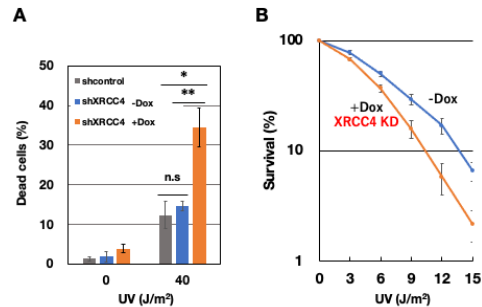


図 2. XRCC4 ノックダウンによる紫外線誘発細胞死と紫外線感受性の増加

(2)二次的 DNA 損傷のゲノム安定性に及ぼす影響を明らかにするために、HPRT の活性を指標にした突然変異アッセイ系を導入して検討を行った。G0 期に同調した正常細胞に紫外線を照射すると、紫外線照射に依存して突然変異率の増加が観察された。それに対し、二次的 DNA 損傷のうち ssDNA の拡張に関わる Exo1 のノックアウト細胞では突然変異率の増加が全くみられず、拡張された ssDNA が突然変異誘発の原因になっていることが示唆された(図 3)。また、染色体異常についても検討したところ、DSB の修復に関わる XRCC4 をノックダウンすると、染色体異常の頻度が正常細胞と比べて顕著に増加する結果も得られた。したがって、休止期の不完全な NER 反応に伴って生じる二次的 DNA 損傷は遺伝的不安定性を誘発する原因となっていると考えられる。遺伝的不安定性誘発の原因として損傷乗り越え合成(TLS)ポリメラーゼの関与を考え、その反応に必要な PCNA のユビキチン化修飾について検討を行ったところ、Rad18 依存的に PCNA のユビキチン化体が発見された。また興味深いことには、Exo1 のノックアウト細胞では、ユビキチン化体が発見されなかった。つまり、Exo1 による ssDNA の拡張が Rad18 によるユビキチン化反応のトリガーとなっていることが示唆された。

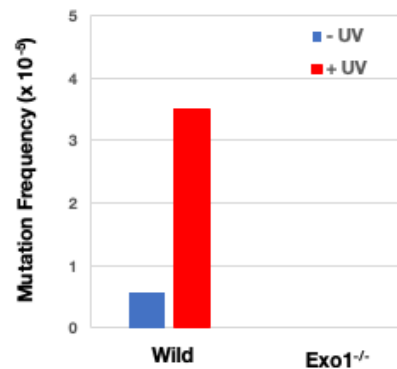


図 3. Exo1 ノックアウトの紫外線誘発突然変異率に与える影響

(3)休止期細胞における DSB 生成が ssDNA ギャップ中間体にヌクレアーゼが働いて生じる可能性を考え、増殖細胞で複製フォークに作用し DSB を形成することが報告されている Mus81 という構造特異的エンドヌクレアーゼに着目した。標的配列の異なる shRNA を用いて 2 種類のノックダウン細胞を作製し、休止期に同調して紫外線照射後の ATM シグナリング経路の活性化をその指標となる Ser1981 のリン酸化体に対する特異抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析したところ、コントロール細胞と比べて ATM シグナリング経路の活性化が有意に抑制されることが分かった(図 4A)。一方で、主に ATR キナーゼが担う紫外線による H2AX の Ser139 のリン酸化反応、また、NER を介さずに DSB を誘起するエトポシド処理した場合には、ATM 経路の活性化は影響を受けなかった。さらに、NER 依存的な DSB 生成に伴って働く NHEJ の初期因子である DNA-

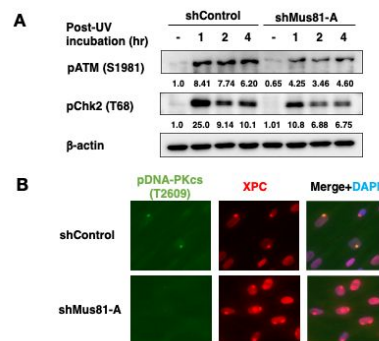


図 4. Mus81 のノックダウンが ATM/Chk2 シグナリング経路と DNA-PKcs の活性化に及ぼす影響

PKcs の活性型リン酸化体(pThr2609)シグナルを蛍光免疫染色により観察したところ、ノックダウン細胞ではほとんどシグナルが検出されず、DNA 損傷部位への集積もほとんど見られないことが分かった(図 4B)。興味深いことに、ノックダウンによる生存への影響をコロニー形成法で評価したところ、ノックダウン細胞はエトポシドに対してコントロール細胞と同程度の感受性を示したが、紫外線に対してはより抵抗性を示すことも明らかになった。

次にノックダウンでは残存するタンパク質の寄与を排除することができないので、標的配列の異なる guide RNA (gRNA) を用いて 2 種類のノックアウト細胞を作製し、上記と同様に表現型解析を行った。その結果、ノックダウン細胞とほぼ同じ表現型を示したものの、それはノックダウン時よりもマイルドで、完全に欠損した場合には他のヌクレアーゼが代替として機能する可能性が示唆された。同様な現象が複製フォークの解析でも報告されていたので、そのヌクレアーゼの関与をノックダウン系により検討したところ、NER 依存的な DSB の生成に関与することが判明した。したがって、NER 反応の中間体には複数のヌクレアーゼが働き、DSB を生成していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Saha Liton Kumar, Wakasugi Mitsuo, Akter Salma, Prasad Rajendra, Wilson Samuel H., Shimizu Naoto, Sasanuma Hiroyuki, Huang Shar-yin Naomi, Agama Keli, Pommier Yves, Matsunaga Tsukasa, Hirota Kouji, Iwai Shigenori, Nakazawa Yuka, Ogi Tomoo, Takeda Shunichi	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 Proceedings of the National Academy of Sciences	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 Kawai, H., Yagyu, F., Terada, A. et al.	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 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 SCF(FBXL18) 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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	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 Sakasai Ryo, Wakasugi Mitsuo, Matsui Tadashi, Sunatani Yumi, Saijo Masafumi, Matsunaga Tsukasa, Iwabuchi Kuniyoshi	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 ~ 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 Akahori Ryo, Takamori Chie, Wakasugi Mitsuo, Matsunaga Tsukasa	4. 巻 27
2. 論文標題 Mapping of the regions implicated in nuclear localization of multi functional <scp>DNA</scp> repair endonuclease <scp>XPF ERCC1</scp>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 若杉光生, 松永司	4. 巻 73
2. 論文標題 ヌクレオチド除去修復反応の翻訳後修飾による高次調節	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 105-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

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 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 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 Kusunoki, T., Matsunaga, T., and Wakasugi, M.
2. 発表標題 Impairments of the responses to NER-dependent secondary DNA damage by depletion of histone chaperone CAF-1 in quiescent human cells
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

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（招待講演）
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 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 柳生知輝、宮崎幸太郎、松浦顕教、若杉光生、松永 司
2. 発表標題 低分子化合物によるDNA修復因子ERCC1の分解誘導メカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
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 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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大西武雄 監修 / 松本英樹 総編集 / 甲斐倫明・宮川清・柿沼志津子・西村恭昌・近藤隆 編	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 304
3. 書名 放射線医学の事典 放射線および紫外線・電磁波・超音波	

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学医薬保健研究域薬学系 遺伝情報制御学研究室Webページ
http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~iden/

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	松永 司 (Matsunaga Tsukasa) (60192340)	金沢大学・薬学系・教授 (13301)	

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
---------	---------