

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651052

研究課題名(和文) 損傷認識を人為的に促進し紫外線DNA損傷修復を飛躍的に高める手法の開発

研究課題名(英文) Approaches to enhance a repair ability of UV induced DNA damage by promotion of DNA damage-recognition

研究代表者

杉浦 重樹 (SUGIURA, Shigeki)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40179130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：核へ移行し、結合することでシクロブタン型ダイマー(CPD)の歪みを大きくする低分子の抗CPD抗体を構築するため、抗CPDモノクローナル抗体産生細胞よりクローニングした重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)に加えSV40の核移行シグナル(NLS)を使いscFvを作製した。しかし構築したscFvのCPDに対する結合能は、本来のIgG抗体より大幅に低下していた。そこでNLSを持つFabを作製したところ、CPDを特異的に認識することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) is one of the major types of DNA damage induced by solar UV and is repaired exclusively by a nucleotide excision repair system (NER) in humans. The efficiency of NER mostly depends on helix-distortion of DNA lesion. Therefore, increasing the helix-distortion by CPDs may enhance NER efficiency. We cloned VH and VL genes of anti-CPDs antibody and constructed a single-chain Fv (ScFv) containing C-terminal SV40 nuclear localization signal. The binding affinity of the ScFv for CPDs was significantly lower than that of original IgG. Then we constructed a Fab containing C-terminal SV40 NLS. It effectively bound to CPDs.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：修復 DNA 損傷 シクロブタン型ダイマーモノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

紫外線照射により DNA のピリミジン塩基が連続した箇所には 3 種類の主要なピリミジン二量体を形成するが、中でも CPD (シクロブタン型ピリミジンダイマー) の形成量が多く、修復効率が悪いことが分かっている。ヒトにおいては、唯一の修復機構であるヌクレオチド除去修復 (NER) により CPD は修復される。

損傷名	シクロブタン型 ピリミジン二量体 (CPD)	6-4 型二量体 (6-4PP)	Dewar 型二量体 (DewPP)
構造式			
ひずみ	小さい	大きい	大きい
形成量	多い	少ない	少ない
NER による 修復速度	遅い	速い	速い

このように紫外線 DNA 損傷修復のメカニズムについては、詳細が明らかになってきているが、修復そのものを人為的に亢進させることは非常に困難である。

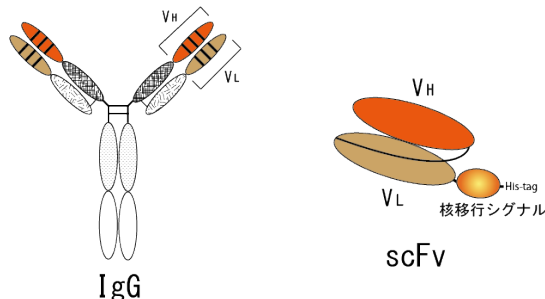
これまでヌクレオチド除去修復 (NER) を効率よくさせるため、修復に関与する蛋白を増やす試みがされてきたが、未だ有効な例は知られていない。

2. 研究の目的

紫外線による DNA 損傷を修復する NER の修復速度は、DNA に形成した歪みの程度に依存することが知られている。

従って形成量が一番多い上に、歪みが小さいため修復効率が悪い DNA 損傷 CPD が最大の問題となる。

そこで「CPD に特異的に結合するモノクローナル抗体」の scFv を細胞内に導入し、人工的に歪みを大きくすることで、NER による損傷修復効率を高めることが可能か検討した。



3. 研究の方法

(1)scFv の構築

抗 CPD モノクローナル抗体産生ミエローマ細胞よりクローニングした重鎖可変領域

(VH) 及び軽鎖可変領域 (VL) をペプチドリンカーでつなぎ、さらに VL の C 末に SV40 の核移行シグナル (NLS) 続いて His-tag を付加した scFv を作製した。ペプチドリンカーとしては古典的な (GGGGS)₃ 及び [(GGGGS)(GGRAS)(GGGGS)]₂ の 2 種類を使用した。

(2)scFv の精製 (大腸菌発現系)

scFv を pET-22b(+) に組み込み大腸菌 BL21(DE3) で大量発現させた後、ペリプラズム画分を回収した。不溶化したペリプラズム画分を 6M 塩酸グアニジンで可溶化後、ニッケルカラムで精製した。

(3)不溶化した蛋白の巻き戻し

封入体を 6M 塩酸グアニジンで可溶化し、いったんメルカプトエタノールで還元した後に酸化型グルタチオンや L-Arg 存在下塩酸グアニジンを段階透析することで巻き戻しと S-S 結合形成を行った。

(4)Fab 発現系の構築

抗 CPD モノクローナル抗体産生ミエローマ細胞より VH-CH1 及び VL-CL をクローニングし、さらに C 末に NLS 及び His-tag を各々融合させた VH-CH1-NLS-His-tag 及び VL-CL-NLS-His-tag を構築した。

Fab の精製

分泌型である抗体発現用ベクター pFUSEss-CH1g-mG2A 及び pFUSE2ss-CL1g-mk に VH-CH1-NLS-His-tag 及び VL-CL-NLS-His-tag を各々組み込み、ミエローマ細胞に co-transfection して Fab 産生細胞株を樹立した。

紫外線感受性検定

エピゾーマル型ベクター pEBMulti-Ble 及び pEBMulti-Bsd に VH-CH1-NLS-His-tag 及び VL-CL-NLS-His-tag を各々組み込み、ヒト骨髄腫細胞 U2OS に co-transfection して Fab 発現細胞株を樹立した。

(5)CPD に対する結合能の測定

紫外線照射した DNA に対する ELISA アッセイで検定した。scFv については抗 His-tag 抗体を 2 次抗体に用いてアッセイした。

4. 研究成果

scFv を大腸菌で大量発現させたところ、多くのケースで見られるように封入体を形成し、不溶化した。そこで 6M 塩酸グアニジンで可溶化し、いったんメルカプトエタノールで還元した後に酸化型グルタチオンや L-Arg 存在下塩酸グアニジンを段階透析することで巻き戻しと S-S 結合形成を行い

精製することが出来た。

本研究で用いた抗 CPD 抗体は CPD に対する特異性が高く、世界で広く使われているものである。これを scFv にするにあたり、まずペプチドリンカーに古典的な (GGGGS)₃ を用いて svFv 化したところ、CPD に対する特異性は低下していた。

そこでペプチドリンカーを、IL-6 受容体阻害抗体を svFv する際に使われた (GGGGS)₂(GGRAS)(GGGGS)₂ に換えてみたが、CPD に対する特異性は同様に低下していた。

本来歪みの小さな CPD について、その歪みを人工的に大きくするには、CPD に特異的で結合能が強い低分子の抗体を用いる必要がある。しかし scFv にすることで特異性が低下したことから、次ぎに Fab の利用を試みた。

VH-CH1-NLS-His-tag 及び VL-CL-NLS-His-tag を各々分泌型である抗体発現用ベクターに組み込んだものをミエローマ細胞に co-transfection し、抗 CPD Fab 抗体産生細胞の樹立を試みた。その結果不安定ながら、抗 CPD Fab 抗体産生細胞を得ることが出来た。この Fab が CPD を特異的に認識することを、抗 His 抗体を 2 次抗体に使った ELISA アッセイで確認することができた。

次ぎにこの Fab が CPD の歪みを大きくし、NER による損傷修復効率を高めるか調べるため、VH-CH1-NLS-His-tag 及び VL-CL-NLS-His-tag をエピゾーマル型ベクター pEBMulti-Ble 及び pEBMulti-Bsd に各々組み込んだものをヒト骨髄腫細胞 U2OS に co-transfection し、Fab 発現細胞を樹立した。

本報告書作成時点では、上述したところまでで時間切れとなり、Fab による効果を調べるまでに至らなかった。今後の課題として、抗 CPD Fab を発現する U2OS 細胞について紫外線修復能がコントロール細胞に比べて亢進しているか調べる必要がある。その結果 Fab の効果が認められた場合には、抗 CPD Fab 産生ミエローマより精製した Fab を他の細胞やマウスに投与し、紫外線による損傷修復を亢進させるか検討したい。

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 4 件)

(1)Iwamoto, T., Brooks, P. J., Nishiwaki, T., Nishimura, K., Kobayashi, N., Sugiura,

S., and Mori, T. "Quantitative and *in situ* detection of oxidatively generated DNA damage 8,5'-Cyclo-2' deoxyadenosine using an immunoassay with a novel monoclonal antibody." *Photochem. Photobiol.*, (2014) 査読有 DOI:10.1111/php.12239

(2)Nukuzuma, S., Nakamichi, K., Kameoka, M., Sugiura, S., Nukuzuma, C., Tasaki, T., and Takegami, T. "THF-alpha stimulates efficient JC virus replication in neuroblastoma cells." *J. Med. Virol.*, (2014) 査読有、DOI:10.1002/jmv.23886

(3)Nukuzuma, S., Kameoka, M., Sugiura, S., Nakamichi, K., Nukuzuma, C., and Takegami, T. "Suppressive effect on PARP-1 inhibitor on JC virus replication *in vitro*." *J. Med. Virol.*, 85, 132-137, (2013) 査読有、DOI:10.1002/jmv23443

(4)Nukuzuma, S., Kameoka, M., Sugiura, S., Nakamichi, K., Nukuzuma, C., Miyoshi, I., and Takegami, T. "Exogenous human immunodeficiency virus-1 protein, Tat, enhances replication of JC virus efficiently in neuroblastoma cell lines." 84, 555-561, (2012) 査読有、DOI:10.1002/jmv.23239

[学会発表](計 3 件)

(1)Iwamoto, T., Brooks, P. J., Kobayashi, N., Sugiura, S., and Mori, T.: Quantitative and *in situ* detection of oxidatively generated DNA damage 8,5'-Cyclo-2' deoxyadenosine using an immunoassay with a novel monoclonal antibody. International symposium on xeroderma pigmentosum and related diseases: Disorders of DNA damage response-Bench to bedside-, 2014, March 5-7, Kobe

(2)奴久妻 聡一、亀岡 正典、杉浦 重樹、中道 一生、奴久妻 智代子、田崎 隆史、竹上 勉 : PARP-1 阻害剤の *in vitro* におけるウイルス増殖抑制効果について、日本ウイルス学会、2013 年 11 月 10 日~12 日、神戸

(3)奴久妻 聡一、亀岡 正典、杉浦 重樹、中道 一生、奴久妻 智代子、竹上 勉 : HIV-1 Tat による神経芽細胞腫での JC ウイルス増殖促進、日本ウイルス学会、2012 年 11 月 13~15 日、大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉浦 重樹 (SUGIURA, Shigeki)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40179130

(2)研究分担者

森 俊雄 (MORI, Toshio)
奈良県立医科大学・医学部・研究教授
研究者番号：10115280