

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550033

研究課題名(和文) 損傷のタイプに応じて修復を亢進させる損傷特異的人工エンドヌクレアーゼの開発

研究課題名(英文) Construction of DNA damage-specific endonuclease using monoclonal antibody against DNA damage

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗 CPD モノクローナル抗体をベースに、CPD 特異的エンドヌクレアーゼの作製に成功した。この CPD 特異的エンドヌクレアーゼを U2OS 細胞で発現させると、紫外線抵抗性を示した。この細胞について、紫外線照射後経時的に CPD 量を ELISA で定量したところ、紫外線照射後速やかに CPD が修復され始め、24時間後にはコントロールに比べ有意に CPD が修復されていた。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in producing CPD specific endonuclease based on an anti-CPD monoclonal antibody. U2OS expressing this endonuclease got UV resistant. Moreover, time course quantification of CPDs by ELISA after UV irradiation revealed that U2OS expressing the endonuclease removed CPDs more quickly and efficiently compared with control U2OS.

研究分野：分子生物学

キーワード：修復 DNA 損傷 シグナル型タンパク質 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。

またエストロゲン補充療法で使われるプレマリンは、体内で代謝された結果 4-OHEN ができるが、長期服用するとこれが DNA 付加体を形成し、乳がんをはじめとする様々ながんの発症頻度を上昇させることが示唆されている。

いずれの損傷もヌクレオチド除去修復 (NER) により修復されるが、NER を人為的に亢進させることは非常に困難である。

2. 研究の目的

ヌクレオチド除去修復は 30 種類もの蛋白が協調して働くが、最初に DNA 損傷を認識し、損傷を持つ側の DNA 鎖にニックを入れる過程が非常に重要である。

そこで我々がこれまで作製した DNA 損傷に対するモノクロナール抗体をベースに損傷特異的人工エンドヌクレアーゼを構築し、これが NER の初期過程を効率化することで DNA 修復を飛躍的に亢進するか調べ、治療への応用を探る。

3. 研究の方法

(1) 損傷特異的エンドヌクレアーゼの構築

(2) MTS アッセイによる細胞生存率の測定

修復が正常なヒト骨髄由来 U2OS 細胞及び修復欠損の色素性乾皮症 A 群患者由来 XP-A 細胞を 24 穴プレートに培養し、紫外線照射後 4 日後の生存率を MTS アッセイで測定した。対照群を 100% とした時の細胞生存率を計算した。

(3) DNA 損傷の修復測定

U2OS または XP-A 細胞を 10cm dish で培養し、紫外線照射を行った。照射後、修復のために種々の時間培養し、細胞を回収。その細胞から DNA を抽出し、CPD 特異抗体を用いた酵素標識免疫法 (ELISA 法) で CPD を測定し、修復動態を調べた。

4. 研究成果

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) Nukuzuma, S., Nakamichi, K., Kameoka, M., Sugiura, S., Nukuzuma, C., Tasaki, T., Takegami, T. (2016) Suppressive effect of topoisomerase Inhibitors on JC polyomavirus propagation in human neuroblastoma cells.

Microbiol Immunol 60, 253-260

査読有、DOI : 10.1111/1348-0421.12372

(2) Nukuzuma, S., Sugiura, S., Nakamichi, K., Kameoka, M., Nukuzuma, C., Tasaki, T., Takegami, T. (2015) Replication of IMR-32-adapted JC virus clones in human embryonic kidney cells.

Microbiol Immunol 59, 238-242

査読有、DOI : 10.1111/1348-0421.12243

(3) Iwamoto, T. Brooks, P. J. Nishiwaki, T. Nishimura, K., Kobayashi, N., Sugiura, S., Mori, T. (2014) 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 90, 829-836

査読有、DOI : 10.1111/php.12239

(4) Nukuzuma, S., Nakamichi, K., Kameoka, M., Sugiura, S., Nukuzuma, C., Tasaki, T., Takegami, T. (2014) TNF- stimulates efficient JC virus replication in neuroblastoma cells. *J Medical Virology* 86, 2026-2032

査読有、DOI : 10.1002/jmv.23886

〔学会発表〕(計 7件)

(1) S. Nukuzuma, S. Sugiura, K. Nakamichi, M. Kameoka, C. Nukuzuma, T. Tasaki, T. Takegami. : Replication of IMR-32-adapted JC virus clones in human embryonic kidney cells The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, November 22-24, 2015, Fukuoka

(2) 奴久妻聡一、亀岡正典、中道一生、杉浦重樹、奴久妻智代子、田崎隆史、竹上勉 TNF- は神経芽細胞腫で JC ウイルスの DNA 複製を促進する 第 80 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会、2015 年 7 月 17 日、東京

(3) T. Mori, T. Iwamoto, P.J. Brooks, N. Kobayashi, and S. Sugiura : Quantitative detection of oxidative DNA damage 8,5'-cyclo-2'- deoxyadenosine using an immunoassay with a novel monoclonal antibody 15th International Congress of Radiation Research, May 25-29, 2015, Kyoto

(4) 奴久妻聡一、亀岡正典、中道一生、杉浦重樹、奴久妻智代子、田崎隆史、竹上勉 ヒト神経芽細胞腫での TNF- による JC ウイルス DNA 複製の促進 第 62 回日本ウイルス学会 2014 年 11 月 10-12 日、横浜

(5) 森 俊雄、岩本顕聡、小林信彦、杉浦重樹 : 新規モノクローナル抗体を用いた酸化的 DNA 損傷サイクロプリンの定量測定と可視化、日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 1-3 日、鹿児島

(6) T. Iwamoto, P.J. Brooks, N. Kobayashi, S. Sugiura and T. Mori: Quantitative and in situ detection of oxidatively generated DNA damage 8,5'-cyclo-2'- deoxyadenosine using an immunoassay with a novel monoclonal antibody, 16th International Congress on Photobiology, September 8-12, 2014, Cordoba, Argentina

(7) 岩本顕聡、P.J. Brooks、小林信彦、杉浦重樹、森 俊雄 : 新規モノクローナル抗体を用いた酸化的 DNA 損傷サイクロプリンの定量測定と可視化、第 36 回日本光医学・光生物学学会、2014 年 7 月 25-26 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