

ヒト細胞におけるヌクレオチド除去修復のバックアップ機構に関する研究

著者	松永 司
著者別表示	Matsunaga Tsukasa
雑誌名	平成16(2004)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	2003-2004
ページ	9p.
発行年	2005-05
URL	http://doi.org/10.24517/00051086



ヒト細胞におけるヌクレオチド除去修復の
バックアップ機構に関する研究

(研究課題番号：15310036)

平成 15 年度～平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (B) (2))

研究成果報告書

平成 17 年 5 月

研究代表者：松永 司

(金沢大学大学院自然科学研究科薬学系・生命科学専攻
遺伝情報学講座・遺伝情報制御学研究室)

金沢大学附属図書館



0500-04117-2

はしがき

この報告書は、平成 15 年度から平成 16 年度の 2 年間にわたり、日本学術振興会より科学研究費補助金（基盤研究 (B) (2)）の交付を受けて実施した研究課題「ヒト細胞におけるヌクレオチド除去修復のバックアップ機構に関する研究」の成果をまとめたものである。

紫外線誘発 DNA 損傷の検出系が最初に報告されたのは 1960 年代のことであるが、以後様々な方法が開発されてきた中で、最も簡便で高感度な免疫学的検出系が今日の主流となっている。この検出系で不可欠なシクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) や (6-4) 光産物 (6-4PP) を特異的に認識する抗体として、我々がこれまでに作製したモノクローナル抗体が世界的に多く利用されている。実際の検出には、酵素標識免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)、スロットブロット法、蛍光免疫染色法など様々な方法が用いられているが、定量性では ELISA 法が最も優れている。しかし、これまでの ELISA 法では 254 nm 紫外線 1 - 2 J/m² 分の損傷を検出するのが限界であり、修復動態の解析には正常細胞の 70 - 80% を死滅させる 10 J/m² の紫外線を照射しなければならない問題があった。近年、この検出系の高感度化に成功し、0.1 J/m² で生成される CPD や 6-4PP を検出でき、1 J/m² の紫外線照射後の修復動態が解析可能になった。本研究課題で注目しているヌクレオチド除去修復のバックアップ機構は、このような生物学的な条件での解析から初めて見出されたものである。

ヌクレオチド除去修復はすべての生物で見られる普遍的な修復機構であるが、多くの原核生物や、出芽酵母、ショウジョウバエ、ラットカンガルーなどの真核生物は CPD の光回復酵素も有し、種によっては 6-4PP の光回復酵素も保有している。また、分裂酵母やアカパンカビでは CPD や 6-4PP の 5' 側に切断を入れる UVDE を介した修復系も知られているが、ヒト細胞ではどちらの酵素の存在も明らかになっていない。本研究では、ヒト細胞における CPD や 6-4PP の新規修復機構について解析を行い、その実体を明らかにすることを目的とした。

ここにその研究成果を報告するとともに、過去 2 年間に発表された代表的な研究論文の別刷をまとめた。ご協力いただいた諸氏に深く感謝するとともに、日本学術振興会に心より感謝を申し上げたい。

平成 17 年 5 月

松永 司

研究課題

ヒト細胞におけるヌクレオチド除去修復のバックアップ機構に関する研究
(研究課題番号：15310036)

研究組織

研究代表者：松永 司（金沢大学自然科学研究科・遺伝情報制御学・教授）

研究分担者：石垣靖人（金沢大学自然科学研究科・遺伝情報制御学・助手）

研究分担者：若杉光生（金沢大学自然科学研究科・遺伝情報制御学・助手）

（平成16年度のみ）

研究分担者：山下克美（金沢大学自然科学研究科・遺伝情報制御学・助教授）

交付決定額（配分額）

（単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	6,800	0	6,800
平成16年度	5,000	0	5,000
総計	11,800	0	11,800

研究発表

(1) 学会誌等

1. Fu, D., Wakasugi, M., Ishigaki, Y., Nikaido, O. and Matsunaga, T., cDNA cloning of the chicken DDB1 gene encoding the p127 subunit of damaged DNA-binding protein. *Gene Genet. Syst.* **78**, 169-177, 2003.
2. Hirouchi, T., Nakajima, S., Najrana, T., Tanaka, M., Matsunaga, T., Hidema, J., Teranishi, M., Fujino, T., Kumagai, T. and Yamamoto, K., A gene for a Class II DNA photolyase from *Oryza sativa*: cloning of the cDNA by dilution-amplification., *Mol. Gen. Genomics* **269**, 508-516, 2003.
3. Sakamoto, A., Lan, V. T. T., Hase, Y., Shikazono, N., Matsunaga, T. and Tanaka, A., Disruption of the *AtREV3* gene causes hypersensitivity to ultraviolet B light and γ -rays in *Arabidopsis*: implication of the presence of a translesion synthesis mechanism in plants., *Plant Cell* **15**, 2042-2057, 2003.
4. Lan, L., Rabeya, R. M., Hayashi, T., Nakajima, S., Kanno, S., Takao, M., Matsunaga, T., Yoshino, M., Ichikawa, M., te Riele, H., Tsuchiya, S., Tanaka, K. and Yasui, A., Functional and physical interactions between ERCC1 and MSH2 for resistance to cis-platinum in mammalian cells., *DNA Repair* **3**, 135-143, 2004.
5. Uchida, S., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Yoshida, M., Ishizaka, Y. and Yamashita, K., Nuclear export signal in CDC25B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 226-232, 2004.
6. Shiomi, N., Kito, S., Oyama, M., Matsunaga, T., Harada, Y.-N., Ikawa, M., Okabe, M. and Shiomi, T., Identification of the XPG region that causes the onset of Cockayne syndrome by using Xpg mutant mice generated by the cDNA-mediated knock-in method., *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3712-3719, 2004.
7. Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y. and Yamashita K., Binding of 14-3-3 β but not 14-3-3 σ controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B., *J. Cell Sci.* **117**, 3011-3020, 2004.
8. Oyama, M., Wakasugi, M., Hama, T., Hashidume, H., Iwakami, Y., Imai, R., Hoshino, S., Morioka, H., Ishigaki, Y., Nikaido, O. and Matsunaga, T., Human NTH1 physically interacts with p53 and proliferating cell nuclear antigen., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 183-191, 2004.
9. Mori, M., Yoshida, K., Ishigaki, Y., Matsunaga, T., Nikaido, O., Kameda, K. and Kondo, T., UV-B protective effect of a polyacylated anthocyanin, HBA, in flower petals of the

blue morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue., Bioorg. Med. Chem. 13, 2015-2020, 2005.

10. Tanaka, M., Narumi, I., Funayama, T., Kikuchi, M., Watanabe, H., Matsunaga, T., Nikaido, O. and Yamamoto, K., Characterization of pathways dependent on the *uvrA1*, or *uvrA2* gene product for ultraviolet resistance in *Deinococcus radiodurans*., J. Bacteriol., *in press*.
11. 若杉光生、松永司：DNA 損傷センサー因子 DDB の機能解析、放射線生物研究、39、301 - 313, 2004.

(2) 口頭発表

1. 松永 司、松本 恵、深瀬優子、山田佐紀、安田美奈子、若杉光生：紫外線誘発 DNA 傷害に対する初期細胞応答、Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2003、平成 15 年 2 月 24 - 26 日、淡路島。
2. 松本 恵、長谷川瑞穂、松永 司：紫外線照射後の DNA 損傷依存的・S 期非依存的な H2AX のリン酸化、Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2003、平成 15 年 2 月 24 - 26 日、淡路島。
3. 松永 司、若杉光生：DNA 損傷結合因子 DDB のヌクレオチド除去修復促進作用、第 62 回日本癌学会総会、平成 15 年 9 月 25 - 27 日、名古屋。
4. 松本 恵、松永 司：紫外線誘発 DNA 損傷によるヒストン H2AX のリン酸化、第 62 回日本癌学会総会、平成 15 年 9 月 25 - 27 日、名古屋。
5. Wakasugi, M., Kawashima, H., Fukase, Y., Morioka, H., Linn, S., Sancar, A., Matsunaga, T., Physical and functional interaction between DDB and XPA in nucleotide excision repair, 4th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, 2003.11.9 - 13, Awaji, Japan.
6. Matsumoto, M., Yasui, A., Matsunaga, T., Phosphorylation of histone H2AX induced by UV irradiation, 4th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, 2003.11.9 - 13, Awaji, Japan.
7. 松永 司：損傷 DNA 結合因子 DDB の機能と調節、第 26 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「DNA 損傷応答の分子メカニズム」、平成 15 年 12 月 10 - 13 日、神戸。
8. 石垣靖人、近藤貴志、二階堂修、松永 司：劣性遺伝疾患色素性乾皮症における原因遺伝子 mRNA の分解とその意義、日本薬学会第 124 年会、平成 16 年 3 月 29 - 31 日、大阪。
9. Matsunaga, T., Possible roles of DDB1 and DDB2 in NER and others, 2nd US-Japan DNA Repair Meeting, 2004.6.4 - 8, Hawaii, USA.

10. 長沢 敦、沢田俊朗、山田佐紀、若杉光生、松永 司：DDB1 高発現による細胞増殖抑制の機構解析、日本薬学会北陸支部第 111 回例会、平成 16 年 12 月 5 日、金沢。
11. 長尾章弘、近藤貴志、石垣靖人、松永 司：shRNA 発現ベクターによる遺伝子ノックダウン法の検討、日本薬学会北陸支部第 111 回例会、平成 16 年 12 月 5 日、金沢。
12. 若杉光生、長沢 敦、平井佑佳、山田佐紀、今井里佳、沢田俊朗、松永 司：DDB1 の細胞内局在と新機能、第 27 回日本分子生物学会年会、平成 16 年 12 月 8 - 11 日、神戸。
13. 濱 隆志、尾山将樹、若杉光生、森岡弘志、松永 司：ヒト NTH1 と XPG および p53 との相互作用と活性調節、第 27 回日本分子生物学会年会、平成 16 年 12 月 8 - 11 日、神戸。
14. 松永 司、長沢 敦、平井佑佳、山田佐紀、今井里佳、沢田俊朗、若杉光生：DDB1 の新規の細胞内局在と過剰発現による細胞増殖抑制、Workshop on DNA Repair and Mutagenesis 2005、平成 17 年 1 月 24 - 26 日、京都。
15. 長尾章弘、近藤貴志、石垣靖人、松永 司：高効率で安定的なノックダウンを目指した shRNA 発現ベクターの検討、日本薬学会第 125 年会、平成 17 年 3 月 29 - 31 日、東京。

研究成果

(1) 背景と目的

色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum; XP) は常染色体性劣性遺伝疾患であり、太陽光線に高過敏症を示し、太陽光露光部で健常人の数千～数万倍の頻度で皮膚癌を発症する。XP はA群からG群 (XP-A～XP-G) までの7つの相補性群と1つのバリエーション群 (XP-V) に分類されるが、XP-A～XP-Gは紫外線誘発 DNA 損傷に対するヌクレオチド除去修復機構に先天的な異常がある。中でも XP-A と XP-G は紫外線感受性が高く、ヌクレオチド除去修復を完全欠損している例が多い。実際に、当研究室で開発された酵素標識免疫測定法 (ELISA) を用いて、 10 J/m^2 の紫外線を照射された XP12BE (XP-A)、あるいは XP2BI (XP-G) 細胞におけるシクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) と (6-4) 光産物 (6-4PP) の修復能を調べたところ、24 時間まで修復は全く見られなかった。

一方、これまでの解析に使用してきた 10 J/m^2 という紫外線線量は、健常人由来細胞で 70 - 80% 程度、XP 患者由来細胞で 100% を死滅させる線量に相当し、死にゆく細胞集団の修復動態を見ていることになる。最近、我々は ELISA の検出試薬を *o*-フェニレンジアミンから化学発光試薬である SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce 社) に変えることで 10 - 20 倍の検出感度を得ることに成功し、 0.1 J/m^2 の紫外線を照射した細胞の CPD や 6-4PP を検出することが可能になった。すなわち、健常人由来細胞の 90% 以上、また XP-A 細胞でも 30% 程度が生存できる 1 J/m^2 という生物学的な線量域で修復動態が解析できるようになった。そこで、先の 2 種類の XP 細胞を用いて 1 J/m^2 照射後の両損傷の修復動態を調べたところ、驚くべきことにゲノム中の 6-4PP 量が時間に依存して減少し、24 時間で 40 - 50%、72 時間で 70 - 80% が消失することを見出した。一方、CPD については、どちらの細胞でもわずかに消失する傾向は見られたが、6-4PP ほど顕著ではなかった。以上の結果より、ヒト細胞はヌクレオチド除去修復をバックアップする未知の修復機構を有する可能性が示され、主に 6-4PP の除去に働いていることが示唆された。本研究では、この修復機構の存在をさらに検証するとともに、そのメカニズムについて知見を得ることを目的とした。

(2) 研究成果と考察

まず危惧されたことは、使用した XP 細胞に弱いながら NER 活性が残っている可能性である。そこで、臨床症状と紫外線感受性がより重篤な XPEMB-1 (XP-A)、および XPCS2LV (XP-G/CS) 細胞を用いて解析を行った。その結果、先に調べた 2 種類の XP 細胞とほぼ同様の修復動態を示し、またウエスタンブロッティングで責任因子

が検出されないことも確認できた。さらに、xpa および xpg のノックアウトマウス由来細胞をそれぞれ田中亀代次博士（阪大・院・生命機能）、塩見忠博博士（放射線医学総合研究所）より供与を受け、同様に解析した結果、やはり 6-4PP の消失が観察され（48 時間で 40 - 60%）、さらに CPD についても程度は低いものの有意な消失が認められた（48 時間で 20 - 30%）。ノックアウトマウス由来細胞はターゲティングにより各々の因子の産生が完全に破壊されていることから、NER の残存活性の可能性を否定できたと考えている。

次の問題としては、我々が使用している ELISA 法は、単位 DNA 重量当たりの損傷量として結果が得られるため、紫外線照射後に DNA 複製が起きると DNA 量の増加により DNA 損傷が希釈され、全く修復が起こらなくても DNA 損傷が減少したように見える点である。特に、1 J/m² という低線量紫外線では細胞周期のチェックポイントも顕著でないことから、この希釈効果の可能性が懸念され、細胞をコンフルエントにして G₀/G₁ に保持した状態で実験を行ってきた。この点をさらに慎重に検討するため、対数増殖期と G₀/G₁ 期のそれぞれの状態で xpa および xpg ノックアウトマウス由来細胞の修復動態を比較した。その結果、各時間における CPD や 6-4PP の残存量は予想どおり対数増殖期の方が少なかったが、その差は G₀/G₁ 期で除去される DNA 損傷量に比べると一部に過ぎなかった。また、希釈効果のみを見ているとすれば 6-4PP と CPD は同じ割合で減少するはずであるが、24 時間経過後の残存率は明らかに 6-4PP の方が低く、希釈効果では説明できないと結論づけた。

さらに、最近、CPD の検出感度をさらに向上させることに成功し、0.1 J/m²（XP-A 細胞でもほぼ 100% 生存可）、あるいは 0.4 J/m²（XP-A 細胞で約 80% 生存可）を照射後の修復動態を調べることが可能になった。そこで、XP2BI 細胞（XP-G）を用いて経時的に CPD の残存量を測定したところ、24 時間でそれぞれ約 30% と約 20% 減少していることがわかった。1 J/m² 照射時でも僅かながら減少する傾向は見られていたが、線量を下げることにより明確になったものと考えられる。したがって、ヒトのバックアップ機構も CPD に作用しうることが示唆された。

以上の結果をまとめると、我々が見出した低線量域における XP 細胞の修復活性は、ヌクレオチド除去修復の残存活性ではなく何らかのバックアップ機構によるものと結論づけられた。また、①この機構はヒトのみならずマウスにも存在すること、②修復効率は NER と同様に CPD より 6-4PP の方が効率的であること、③NER に比べると修復効率が低いこと、④この経路に少なくとも XPA および XPG は関与しないことが明らかとなった。

このバックアップ修復系は NER 系に比べて修復効率がかなり低く、NER 能を正常にもつ健常人由来細胞で CPD や 6-4PP の修復にどの程度寄与しているかは不明である。しかし、我々の体は常に太陽光紫外線に曝されているため、培養細胞とは異なり

その刺激によってこの修復系が亢進されている可能性もあり得る。実際、電離放射線や酸化剤などで誘発されるチミングリコールについて、生存に全く影響を与えない γ 線線量域での超高感度定量系が開発され、それをを用いた解析からヒト細胞に適応応答が存在することが示された (Le *et al.*, 1998)。つまり、ヒト細胞に0.25 Gyの γ 線をあらかじめ照射しておく、その後2 Gyを照射した時にチミングリコールの修復効率が有意に亢進することが報告された。そこで、XP2BI (XP-G)、およびXPCS2LV (XP-G)細胞に0.1 J/m²、あるいは0.2 J/m²の紫外線を前照射し、12、24、36時間のインターバルをおいて1 J/m²を照射した。その結果、0.2 J/m²を前照射した際に約10 - 20%修復の亢進が見られ、適応応答が存在する可能性が示唆された。今後、さらに条件を変えながら検討していく予定である。

(3) まとめと今後の展望

今回の研究成果より、NERを完全欠損した哺乳類細胞において6-4PPやCPDを低い効率ながら修復できる機構があることが明らかになった。この修復系の分子的な解明には至らなかったが、早急にこの機構に関わる因子や遺伝子を同定し、分子メカニズムを明らかにしたいと考えている。さらに、ノックアウトやノックダウンの手法を用いて、紫外線感受性やDNA修復能に及ぼす影響、ならびに個体での紫外線(UVB)発がん性を調べることにより、この修復系の生物学的な役割を評価する予定である。また、未知の紫外線感受性遺伝疾患との関係を探ることも重要な課題であり、今後これらの点を1つずつ解き明かしていきたい。