

# 低分子化合物によるDNA修復因子分解誘導のメカニズム解析

|         |   |
|---------|---|
| 著者      | 上田 将信   |
| 著者別表示   | Ueda Masanobu   |
| 雑誌名     | 博士論文要旨Abstractおよび要約Outline  |
| 学位授与番号  | 13301甲第4896号  |
| 学位名     | 博士(薬学)  |
| 学位授与年月日 | 2019-03-22  |
| URL     | <a href="http://hdl.handle.net/2297/00058899">http://hdl.handle.net/2297/00058899</a> |

|         |                                |
|---------|--------------------------------|
| 氏名      | 上田 将信                          |
| 学位の種類   | 博士(薬学)                         |
| 学位記番号   | 医薬保博甲 256 号                    |
| 学位授与の日付 | 平成 31 年 3 月 22 日               |
| 学位授与の要件 | 課程博士(学位規則第 4 条第 1 項)           |
| 学位授与の題目 | 低分子化合物による DNA 修復因子分解誘導のメカニズム解析 |

|        |    |           |
|--------|----|-----------|
| 論文審査委員 | 主査 | 松永 司      |
|        | 副査 | 吉田 栄人     |
|        | 副査 | 後藤(中川) 享子 |
|        | 副査 | 倉石 貴透     |
|        | 副査 | 若杉 光生     |

# 学位論文要旨

低分子化合物による DNA 修復因子分解誘導の

メカニズム解析

Mechanistic analysis of small molecule-induced degradation of  
DNA repair factors

医薬保健学総合研究科 博士課程 薬学専攻  
遺伝情報制御学研究室  
上田 将信

Nucleotide excision repair (NER) is one of major DNA repair pathways and protects cells from deleterious biological effects (e.g. cell death, mutation and neoplastic transformation) caused by DNA damage. NER removes a variety of helix-distorting DNA lesions; UV-induced 6-4 pyrimidine-pyrimidone photoproducts as well as cyclobutane pyrimidine dimers and bulky base adducts. We have identified a small molecule named A6 that induces the degradation of ERCC1-XPF, a structure-specific endonuclease essential for NER. In the meantime, Alekseev *et al.* reported that spironolactone, an anti-aldosterone drug induces the degradation of XPB in TFIIH complex. These degradation mechanisms depend on the ubiquitin-proteasome system, but detailed mechanisms were unclear. In this study, I have tried to uncover the mechanism underlying the chemical-induced ERCC1 and XPB destabilization. I found that CDK7 kinase and SCF<sup>FBXL18</sup> E3 ubiquitin ligase are required for spironolactone-induced XPB degradation and the Ser90 residue of XPB is essential for this process. In case of A6-induced ERCC1 degradation, I revealed that FBXO11 interacts with ERCC1 as well as XPF, but not their heterodimer. I also mapped FBXO11-interacting domain of XPF and XPF Ser805 that may partially enhance A6-induced ERCC1 destabilization.

## 目的

細胞内に存在する DNA は遺伝情報を担う重要な物質であるが、紫外線や活性酸素、電離放射線、化学物質、DNA 複製エラー等によって日常的に損傷を受けている。これらの損傷が修復されずに放置されると細胞死やがん化などが引き起こされるため、細胞は様々な損傷に対応した複数の DNA 修復機構を備えている。その中でヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) は、日常生活において最も身近な太陽光中の紫外線により、DNA 鎖上で隣り合う 2 つのピリミジンが光反応することで生成される (6-4) 光産物やシクロブタン型ピリミジンダイマーを主に修復する。また、ベンゾ[a]ピレンやアフラトキシン B1、4-ニトロキノリン-1-オキシド、DNA 傷害性抗がん剤のシスプラチンなどによるかさ高い塩基付加体も修復でき、対象となる DNA 損傷のスペクトルが広いのが特徴である。

NERには、転写と共役した経路 (transcription-coupled NER: TC-NER) と全ゲノムを対象とした経路 (global genome NER: GG-NER) の2つのサブ修復経路が存在し、損傷の認識方法が異なる (Fig. 1)。TC-NERでは、転写反応の鋳型となるDNA鎖が損傷を受けた際にRNAポリメラーゼIIの停止が起こり、その部位にNER因子が集積する。一方で、GG-NERはDNA損傷がUV-DDB複合体やXPC複合体によって認識され、その部位に他のNER因子が集積する。その後の反応は両経路で共通であり、TFIIH複合体による損傷付近のDNA鎖を巻き戻し、生じた一本鎖DNAにRPAやXPAが結合することでバブル状のDNA鎖が形成され、構造特異的エンドヌクレアーゼであるERCC1-XPFとXPGがリクルートされて、それぞれがDNA損傷の5'側および3'側を切断することによって、損傷を含む約28塩基のオリゴヌクレオチドが除去される。生じた一本鎖DNAギャップは、DNAポリメラーゼがPCNA、RFCと協調してDNA合成を行なって埋め、DNAリガーゼによる親鎖との結合によって修復が完了する。GG-NERの基本反応は、モデル損傷DNAと精製タンパク質を用いて試験管内で再構成されており、30種以上のポリペプチドが必須であることが分かっている。しかし、細胞内で起きるNER反応はさらに複雑で、効率的なNERの進行に様々な補助的因子が機能していることが分かっている。

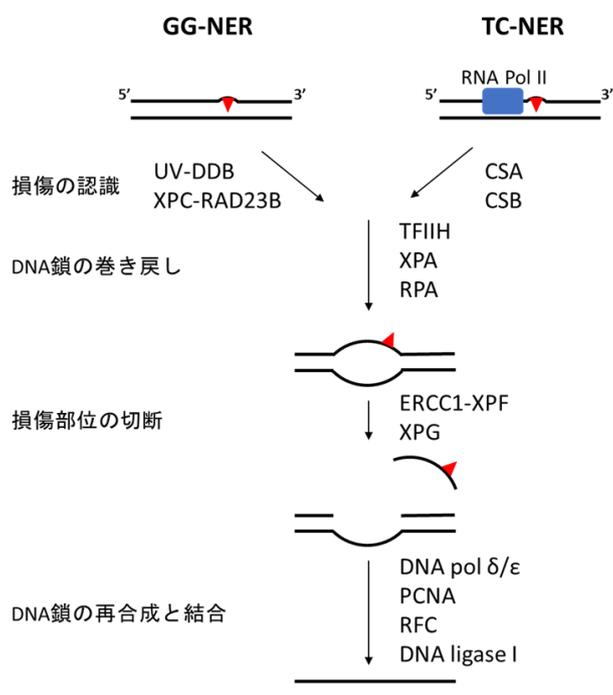


Figure 1 試験管内における NER 反応機構

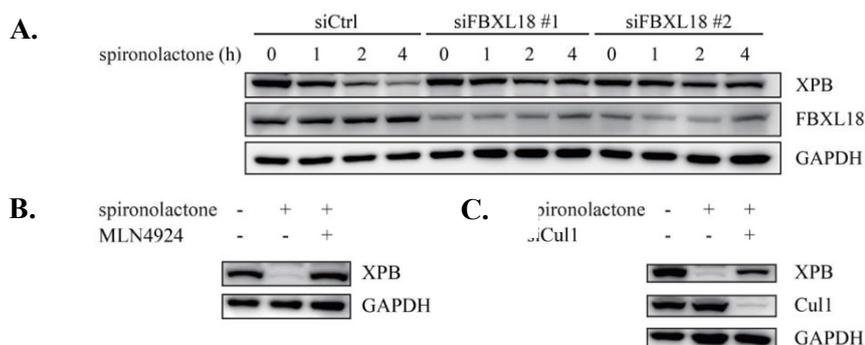
当研究室では、化合物ライブラリーをスクリーニングして NER を阻害する化合物を見つけ、その作用メカニズムを解析することで未知の修復反応や因子を同定するアプローチを行なっている。これまでに、理化学研究所・天然化合物バンク (NPDepo) のパイロットライブラリー 376 化合物のスクリーニングをもとにして NPD13405 (以降、A6 と呼ぶ) を発見し、プロテアソーム依存的に ERCC1 を分解誘導することが NER 阻害の原因であることを明らかにした。一方、2014 年に Alekseev らは Prestwick Chemical Library の 1200 化合物を対象に NER 阻害活性のスクリーニングを行ない、抗アルドステロン剤でカリウム保持性利尿薬であるスピロノラクトンが、TFIIH 複合体に含まれる XPB をユビキチン-プロテアソーム系で分解することで、細胞内 NER 反応を阻害することを明らかにした (Alekseev *et al.*, 2014)。

本研究では、未だ詳しいメカニズム解析が行なわれていないスピロノラクトンによる XPB 分解メカニズムの解明を試みるとともに、当研究室で進められてきた A6 による ERCC1 分解メカニズムの全容解明を目指して解析を行なった。

## 結果

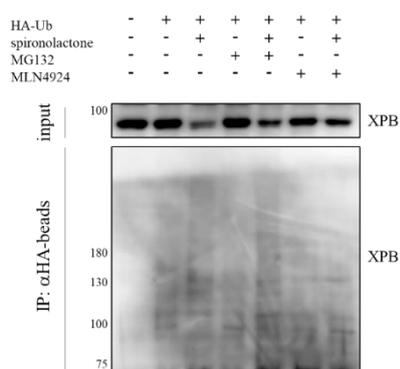
### ①スピロノラクトンによる XPB 分解誘導メカニズムの解析

まず、siRNA ライブラリーを用いて、スピロノラクトンによる XPB 分解に関わる E3 ユビキチンリガーゼ関連タンパク質の同定を試みた結果、およそ 70 種類存在する F-box タンパク質の一つである FBXL18 がヒットした。FBXL18 は、Cul1 や Skp1、Rbx1 と共に SCF<sup>FBXL18</sup> E3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成することが知られており、FBXL18 に対する 2 種類の siRNA のほか、Cul1 に対する siRNA、およびこの複合体の E3 リガーゼ活性を抑制する MLN4924 を処理することで、いずれもスピロノラクトンによる XPB 分解を顕著に抑制することを明らかにした (Fig. 2)。また、XPB および FBXL18 の発現コンストラクトを一過的に細胞に発現させて免疫沈降を行なったところ、両者の相互作用が検出された。

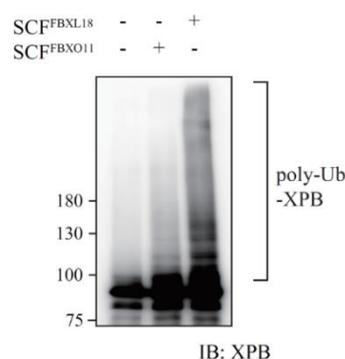


**Figure 2** スピロノラクトンによる XPB 分解誘導における SCF<sup>FBXL18</sup> 複合体の関与

次に、スピロノラクトン処理時に SCF<sup>FBXL18</sup> 複合体依存的に XPB のポリユビキチン化が生じているか、*in vivo* ユビキチン化アッセイを用いて調べたところ、スピロノラクトン処理したサンプルで XPB のポリユビキチン化体と思われる高分子のバンドが複数検出され、プロテアソーム阻害剤の MG132 を処理したサンプルでさらに顕著になった (Fig. 3)。一方、スピロノラクトンとともに MLN4924 を処理したサンプルでは、高分子領域のバンドは検出されず、このポリユビキチン化が SCF<sup>FBXL18</sup> 複合体によって行なわれていると考えられた。次に、精製した SCF<sup>FBXL18</sup> 複合体または SCF<sup>FBXO11</sup> 複合体と Flag-XPB を UBE1、UbcH3、Ubc5c、ATP、ユビキチン、ユビキチンアルデヒドと混合して、*in vitro* ユビキチン化アッセイを行なったところ、SCF<sup>FBXL18</sup> 複合体を添加したサンプルでポリユビキチン化された XPB のシグナルが強く検出され (Fig. 4)、XPB は SCF<sup>FBXL18</sup> 複合体によって直接的にユビキチン化されることが分かった。

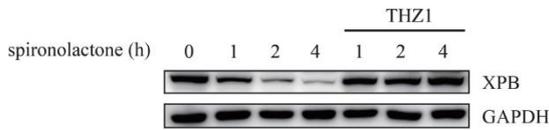


**Figure 3** *in vivo* ユビキチン化アッセイによるユビキチン化 XPB の検出

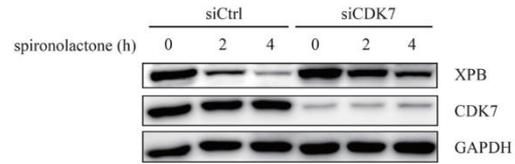


**Figure 4** *in vitro* ユビキチン化アッセイによるユビキチン化 XPB の検出

F-box タンパク質の基質認識の一つに、リン酸化もしくは脱リン酸化を介したものが知られており、SCF<sup>FBXL18</sup> 複合体の別の基質でもその報告があるため、スピロノラクトンで誘導される XPB 分解にもリン酸化反応が関与する可能性がある。XPB が含まれる TFIIH 複合体には CDK7 を含む CAK サブコンプレックスが存在しており、この CDK7 のキナーゼ活性の関与について検討した。スピロノラクトン処理時に、CDK7 特異的阻害剤の THZ1 を併用したところ、XPB の分解が顕著に抑制され (Fig. 5)、また siRNA を用いて CDK7 をノックダウンした細胞でも同様に XPB の分解が抑制されたことから (Fig. 6)、CDK7 のキナーゼ活性がスピロノラクトンによる XPB 分解に必要であることが分かった。

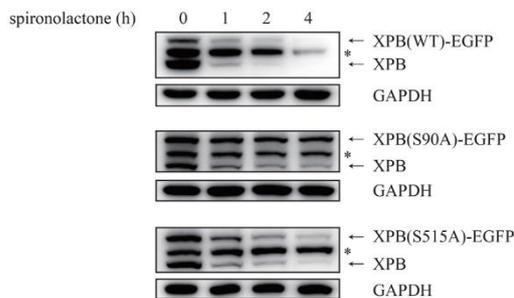


**Figure 5** THZ1 によるスピロノラクトン誘導 XPB 分解の阻害



**Figure 6** CDK7 のノックダウンによるスピロノラクトン誘導 XPB 分解の阻害

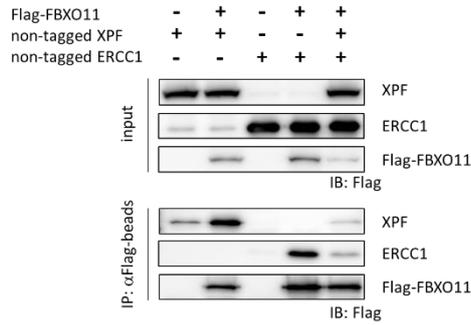
そこで、CDK7 による予想リン酸化部位 (Ser90-Pro と Ser515-Pro) のセリン残基をアラニン残基に置換した XPB-EGFP を安定発現する細胞を樹立し、スピロノラクトンによる分解への影響を調べた。その結果、XPB(S515A)-EGFP は内在と同様にスピロノラクトンによる分解を受けたのに対し、XPB(S90A)-EGFP は著しい分解抵抗性を示し (Fig. 7)、XPB の Ser90 はこの反応に重要な役割を担っていることを示唆された。



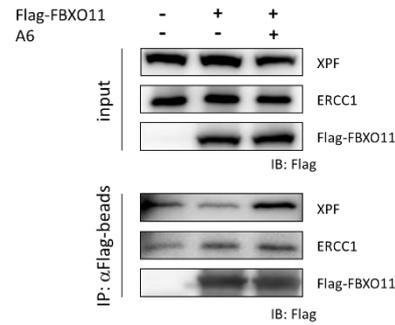
**Figure 7** 変異型 XPB-EGFP のスピロノラクトンによる分解誘導

## ②A6 による ERCC1 分解誘導メカニズムの解析

当研究室におけるこれまでの解析から、A6 による ERCC1 の分解誘導に SCF<sup>FBXO11</sup> 複合体が関わることを示されており、まず基質受容体である FBXO11 が ERCC1 あるいは XPF と相互作用するか免疫沈降法を用いて検討した。様々な組み合わせで一過性発現させたところ、ERCC1 も XPF も各単独発現時には Flag-FBXO11 と共沈降したが、XPF と ERCC1 を同時に発現させた際にはほとんど共沈降せず (Fig. 8)、FBXO11 はモノマー状態の XPF や ERCC1 には結合できるが、ヘテロダイマー形成時には相互作用できないと考えられた。次に、Flag-FBXO11 を細胞に一過性発現させて内在の ERCC1 または XPF との相互作用を調べた結果、ERCC1 は A6 の有無で共沈降される量に変化はなかったが、XPF は A6 を処理した際に共沈降される量が増え (Fig. 9)、A6 依存的な FBXO11 と XPF との相互作用が示唆された。そこで、5 種類の XPF 欠失体発現コンストラクトを作製して、FBXO11 との相互作用領域を検討したところ、ERCC1 相互作用領域とオーバーラップする C 末端 825-916 領域であることが分かった。

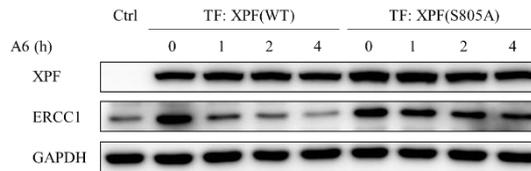


**Figure 8** ERCC1-XPF ヘテロダイマーと FBXO11 との相互作用



**Figure 9** 内在 ERCC1-XPF と FBXO11 との相互作用

FBXO11 は、FBXL18 と同様に F-box タンパク質の一つであり、基質認識にリン酸化または脱リン酸化による調節が報告されている。一方、当研究室におけるこれまでの解析で、A6 による ERCC1 の分解は Alsterpaullone 処理や CDK5 のノックダウンによって部分的に抑制されることが示されているため、XPF におけるリン酸化の関与について検討した。CDK5 による XPF の予想リン酸化部位は、Thr219-Pro、Ser521-Pro、Thr719-Pro、Ser805-Pro の 4 か所であるが、これらの SA 変異体を用いて解析したところ XPF(S805A) を発現させた細胞でのみ ERCC1 の分解が部分的に抑制され (Fig. 10)、この部位のリン酸化が FBXO11 との相互作用を増強させる可能性が示唆された。

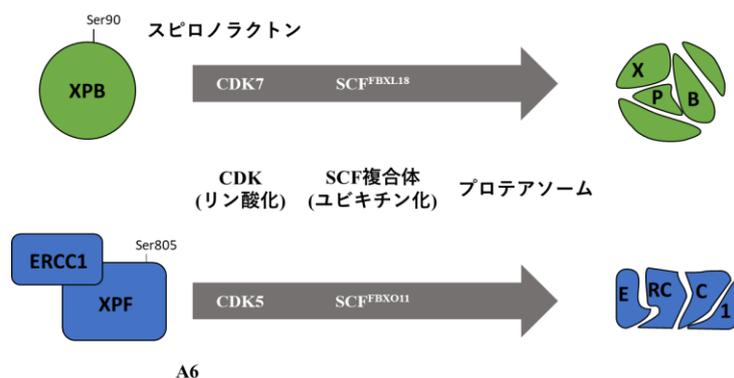


**Figure 10** XPF(S805A) 存在下における ERCC1 の A6 による分解誘導の抑制

次に、A6 が細胞内で直接作用する標的タンパク質の同定するために、DARTS 法 (Drug affinity responsive target stability) を用いて検討した結果、A6 の存在によって ERCC1 のプロテアーゼ分解が抑制されることが分かり、また各種欠失型 ERCC1 を用いた解析で、ERCC1 の 216-260 の領域に A6 が結合している可能性が示唆された。

## 考察

本研究では、A6 とスピロラクトンによる ERCC1 および XPB の分解メカニズムの解析を行ない、多くの知見を得た。それをもとに、これまで得られている知見とも併せてモデルにすると Fig. 11 のようになる。両機構ともに CDK、SCF 複合体、プロテアソームが関与し、極めて類似したメカニズムであることが分かった。



**Figure 11** A6 とスピロラクトンによる NER 因子の分解メカニズムの類似性

ERCC1 も XPB も DNA に作用する機能を持つため、細胞内に過剰に存在すると非損傷 DNA に対して悪影響を与える恐れがあり、通常はこれを抑制するためにこれらの分解システムが働いている可能性もある。NER 阻害化合物のメカニズム解析の残された課題が明らかになり、複雑な細胞内 NER 反応の全容解明の一助となることを期待する。

## 引用文献

Alekseev, S., Ayadi, M., Brino, L., Egly, J. M., Larsen, A. K., & Coin, F. (2014). A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIIH and the chemosensitization of tumor cells to platinum. *Chemistry & Biology*, 21(3), 398–407. <https://doi:10.1016/j.chembiol.2013.12.014>

# 審査結果の要旨

上田将信氏から提出された学位論文について、5名の審査委員による査読後、2019年2月7日に口頭発表会が行われ、同日の最終審査委員会で審議した結果、以下のとおり判定した。

DNA修復機構の一つであるヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) のメカニズム解明に向けて、化合物ライブラリーから NER 阻害化合物を見つけ、その作用機序の解析からアプローチする研究が最近注目されている。上田氏が所属する研究室では、NER 因子の ERCC1 を分解誘導して NER を阻害する化合物 (A6) を見つけ、また別のグループは抗アルドステロン剤のスπιロノラクトンが NER 因子と基本転写因子の二重機能を持つ TFIID 複合体の XPB サブユニットを分解融合することを報告した。上田氏は、この 2 つの化合物誘導 NER 因子分解メカニズムの解明に併行して取り組み、特に全く不明だった後者の XPB 分解誘導反応について、CDK7 キナーゼの関与、重要な役割を持つ XPB 上のセリン残基、ポリユビキチン化にかかわる E3 リガーゼを明らかにし、その反応モデルを提唱した。さらに、A6 による ERCC1 の分解誘導メカニズムの解明にも寄与し、この 2 つの化合物誘導分解系が非常に類似していることを明らかにした。

本研究は、2種類の低分子化合物で誘導される異なる NER 因子の分解メカニズムの解明に大きく貢献し、NER 因子の細胞内レベル調節に関わる仕組みが存在する可能性を示唆したものと評価され、博士 (薬学) の学位に値すると判定した。