

研究題目 BioID 法を利用したヌクレオチド除去修復機構の解析

研究組織

研究代表者：松永 司（金沢大学医薬保健研究域薬学系）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：若杉 光生（金沢大学医薬保健研究域薬学系）

研究分担者：赤堀 稜（金沢大学医薬保健研究域薬学系）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) は、ゲノム安定性や発がん抑制に重要な DNA 修復機構の一つであり、多くのタンパク質 (NER コア因子) が順に集積・離散することで段階的に反応が進行するが、これらの過程は翻訳後修飾や補助因子によって高度に調節されており、未だ全容解明には至っていない。本研究では、BioID (proximity-dependent biotin identification) 法を利用して、DNA 損傷部位に集積するタンパク質とその翻訳後修飾を詳細に解析し、NER の分子メカニズム解明に繋げることを目的とした。

具体的には、当研究室で樹立済みの、NER コア因子 (XPA、XPC、XPF) と大腸菌由来ビオチンリガーゼ高活性変異体 (TurboID) との融合タンパク質の安定発現細胞株を用い、紫外線照射後にビオチン標識されるタンパク質を MS 解析で網羅的に同定する。

[1-2] 研究の方法・経過

3 種類の安定発現細胞株に UV-C 紫外線を照射し、2 時間ビオチン処理を行なった後、Guanidine-TCEP buffer で細胞溶解液を調製し、トリプシン消化後にビオチン標識ペプチドをタマジンビーズで単離して MS 解析を行なった。各々 2 回ずつ解析を行い、再現的に検出されたタンパク質のうち、紫外線未照射サンプルに対する紫外線照射サンプルの Abundance ratio が 1.5 以上のものを紫外線依存的なビオチン標識と設定した。また、NER コア因子の一つである TFIIH の XPB サブユニットをプロテアソーム依存的に分解させ、NER を阻害するスピロラク

トン进行处理したサンプルについても同様の解析を行なった。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

今回、TurboID に融合させた XPA、XPC、XPF は、NER の多段階過程において部分的にオーバーラップするものの異なるステップで機能し、実際、今回の MS 解析で紫外線依存的に検出された NER コア因子は 3 つの安定発現細胞株で異なるパターンを示した。NER の初期過程で損傷認識を担う XPC と TurboID の融合タンパク質では、損傷認識で補助的に働く DDB2 など 4 つの NER コア因子が検出され、中期過程で足場タンパク質として機能する XPA と TurboID の融合タンパク質では XPC、TFIIH のサブユニット、XPG など 8 つの NER コア因子が検出された一方、後期過程で働くエンドヌクレアーゼの XPF と TurboID の融合タンパク質では、TFIIH の 2 つのサブユニットのみが検出された。その中で、p62 サブユニットは、3 つの細胞株すべてで検出されており、中央領域の複数のリジン残基で共通にビオチン標識されることがわかった。

次に、TurboID-XPA 安定発現細胞株において、スピロラクトン进行处理して XPB を分解させた後、同様に解析したところ、コントロール細胞で検出される 8 つの NER コア因子の Abundance ratio がすべて著しく減少し、紫外線依存性を示さなくなったことから、本解析で検出した紫外線依存的なビオチン標識は NER 反応にも依存することが確認できた。

また、TurboID-XPC 安定発現細胞株の XPA 遺伝子をノックアウトして同様の解析を行なっ

たところ、TFIIH の CAK サブユニットの紫外線依存的検出が増加し、逆に RPA70 は減少したことから、NER 過程で生じる CAK サブユニットのコア TFIIH からの解離、及び RPA の損傷部位へのリクルートには XPA が必要と考えられる。さらに、興味深いことに、NER の後期段階で損傷 DNA 鎖の切断を担う XPG エンドヌクレアーゼは、XPA ノックアウト細胞でも影響なく検出されたことから、XPG は XPA より前、あるいは独立して DNA 損傷部位にリクルートされることが示唆された。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究では、NER のメカニズムに関するいくつかの新しい知見が得ることができ、このアプローチは NER の多段階過程の詳細な解析に非常に有用であることがわかった。

また、今回の解析において、再現的に紫外線依存性を示したタンパク質の中に、NER コア因子以外のタンパク質も含まれており、新規 NER 関連因子の候補として現在、解析を行なっている。その一つは、局所紫外線照射後に DNA 損傷部位に集積する様子が観察されており、今後の解析からその役割が明らかにされて未知の NER 関連因子の同定に発展すれば、よりいっそう波及効果は大きい。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

1. Negishi T, Xing F, Koike R, Iwasaki M, Wakasugi M, Matsunaga T. UVA causes specific mutagenic DNA damage through ROS production, rather than CPD formation, in *Drosophila* larvae. *Mutat Res* 2023; 887: Article 503616.

[3-2] 学会発表

1. 松谷知則、戸澤 景、杉浦純矢、杉浦成一郎、小迫英尊、赤堀 稜、若杉光生、松永 司. BioID 法を利用したヌクレオチド除去修復機構解析技術の開発. 第 22 回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィオーラム 2023 (2023 年 9 月 8 - 9 日)

2. Kushii Y, Nishiki Y, Yamagishi M, Sugita E, Matsunaga T, Wakasugi M. The impact of secondary DNA damage caused by incomplete NER on UV-induced mutagenesis and genome stability. 第 66 回日本放射線影響学会 (2023 年 11 月 6 - 8 日)

3. 西木裕香、杉田恵理歌、田中秀樹、松永 司、若杉光生. 休止期のヌクレオチド除去修復反応に起因する ssDNA 領域の修復機構の解析. 日本薬学会北陸支部第 135 回例会 (2023 年 11 月 26 日)

4. 松永 司、松谷知則、井上峻希、内藤麻央、中島花奈、杉浦成一郎、赤堀 稜、若杉光生、小迫英尊. BioID 法を利用したヌクレオチド除去修復機構のメカニズム解析. 第 46 回日本分子生物学会年会 (2023 年 12 月 6 - 8 日)

5. 若林有輝、赤堀 稜、若杉光生、松永 司. DDB1-Cul4 associated factor 7 (DCAF7) による ERCC1-XPF の安定性調節メカニズムの解析. 第 46 回日本分子生物学会年会 (2023 年 12 月 6 - 8 日)

6. 杉浦成一郎、柳生知輝、上田将信、松浦顕教、松永 司. DNA 修復因子 ERCC1-XPF を分解誘導する低分子化合物の作用メカニズムの解析. 第 46 回日本分子生物学会年会 (2023 年 12 月 6 - 8 日)

【4】今後の課題等

次年度の共同利用研究では、今回得た知見を NER コア因子の分解誘導剤、阻害剤、siRNA 等を活用してより詳細に解析する一方で、クロマチン上の DNA 損傷部位に形成される NER 中間複合体を、ビオチン標識タンパク質を bait として丸ごと単離し、構成因子 (NER コア因子及び新規 NER 関連因子) や翻訳後修飾状態を調べることも試みる。予備実験では、今回ビオチン標識が検出できなかった TFIIH サブユニットや他の NER コア因子も紫外線依存的に検出されており、良好な結果が期待される。