

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

我々の細胞の DNA は、活性酸素等の内的要因に加え、環境中の紫外線（太陽光）や電離放射線（天然放射性核種）、変異原物質など外的要因によっても日常的に傷つけられているが、DNA 損傷の種類に応じた多様な DNA 修復機構によって修復される。当研究室では、その中のヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) 機構のメカニズム解明に取り組んでおり、近年は BioID (proximity-dependent biotin identification) 法を導入して、DNA 損傷部位に集まる NER 関連タンパク質を同定することが可能になった。本研究では、この解析システムと質量分析による網羅的解析を組み合わせ、NER の分子メカニズムを明らかにすることを目指している。今年度は、これまでの解析結果の再現性を確認するとともに、このアプローチを他の DNA 修復系にも発展可能か検討することを目的とした。

[1-2] 研究の方法・経過

XPF-TurboID 安定発現細胞株に UV-C 紫外線を照射または化合物を添加し、2 時間または 4 時間ビオチン存在下で培養後、Guanidine-TCEP buffer を用いて細胞溶解液を調製し、先端酵素学研究所においてトリプシン消化、タマジンビーズによるビオチン標識ペプチドの単離、ならびに質量分析が行なわれた。データ解析では、コントロールサンプルに対する紫外線照射／化合物処理サンプルの Abundance ratio が 1.5 以上のものを紫外線／化合物に依存したビオチン標識と判断した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

紫外線照射によって生じるシクロブタン型ピリミジンダイマーや 6-4 光産物は NER の代表的基質であるが、ベンゾ[a]ピレンの代謝活性化体である BPDE (benzo[a]pyrene diolepoxide) で生じる嵩高い塩基付加体も NER の基質として知られている。一方、抗がん剤のマイトマイシン C は主に DNA 鎖間架橋損傷を誘発し、これらは NER ではなく DNA 鎖間架橋修復 (DNA interstrand crosslink repair: ICLR) 機構で修復される。興味深いことに、NER 必須因子である ERCC1-XPF エンドヌクレアーゼを欠損した細胞は、紫外線や BPDE のみならず、マイトマイシン C にも著しい高感受性を示し、ERCC1-XPF は ICLR においても機能することが知られている。

そこで、今年度は XPF-TurboID 安定発現細胞株を用いて、紫外線照射後にビオチン化されるタンパク質の再現性を確認するとともに、新たに BPDE 及びマイトマイシン C で処理したサンプルでも解析を行った。その結果、紫外線照射サンプルでは、過去の結果と同様に TFIIH 複合体の p62 及び XPB サブユニットのみが顕著に検出され、XPB 分解誘導剤のスピロラクトンの前処理により著しく抑制された。また、BPDE 処理サンプルでは、紫外線照射サンプルと同様の結果を示し、BPDE の塩基付加体が NER で修復されるこれまでの知見と一致する結果になった。一方、マイトマイシン C 処理サンプルにおいては p62 や XPB の顕著な検出は見られず、この化合物が DNA 鎖間架橋損傷を主に誘発することと矛盾しなかった。しかし、これまで知られている ICLR 関連因子で顕著に検出されたものはな

く、今後さらに条件を変えて再検討する必要がある。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究は、NER の分子メカニズム解明を目指してスタートしたが、昨年度の解析で良好な結果が得られて研究が進展したことから、ERCC1-XPF が NER と ICLR の両方で働くことを利用して、ICLR のメカニズム解析にも応用可能か検討した。今年度実施した 1 回の実験ではさらに条件検討が必要との結果になったが、XPF-TurboID 安定発現細胞株に処理する化合物 (BPDE vs マイトマイシン C) を変えるだけで異なる DNA 修復機構のメカニズム解析が可能になるとすれば、波及効果は非常に大きい。また、XPF-TurboID 安定発現細胞株にとどまらず、各種 DNA 修復機構の主要因子に TurboID を融合した安定発現細胞株を作製することで、この解析システムのさらなる発展性が期待でき、当該分野に大きく貢献できるものと考えられる。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表
なし

[3-2] 学会発表

1. 井上峻希、松谷知則、戸澤 景、杉浦純矢、杉浦成一郎、内藤麻央、小迫英尊、赤堀 稜、若杉光生、松永 司. BioID 法を利用したヒトヌクレオチド除去修復機構のメカニズム解析. 日本薬学会第 144 回年会 (横浜) 2024 年 3 月 29 - 31 日.
2. 杉浦成一郎、柳生知輝、上田将信、松浦顕教、赤堀 稜、若杉光生、松永 司. DNA 修復因子 ERCC1 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 23 回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォラム 2024 (金沢) 2024 年 9 月 6 - 7 日.
3. 井上峻希、松谷知則、赤堀 稜、若杉光生、松永 司. BioID 法を利用したヒトヌクレオチド除去修復反応の中間複合体解析. 日本薬学会北陸支部第 136 回例会 (金沢) 2024 年 11 月 10 日.
4. 松永 司、高橋悠太、井上峻希、杉浦成一郎、赤堀 稜、若杉光生. BioID 法を用いた新しいコンセプトの遺伝毒性試験法開発の試み. 第 47 回日本分子生物学会年会 (福岡) 2024 年 11 月 27 - 29 日.
5. 赤堀 稜、井上峻希、内藤麻央、松谷知則、小

迫英尊、若杉光生、松永 司. BioID 法によるヌクレオチド除去修復中間体の単離とメカニズム解析. 第 47 回日本分子生物学会年会 (福岡) 2024 年 11 月 27 - 29 日.

[3-3] 成果資料等
なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今後の予定としては、昨年度実施した TurboID-XPA 及び TurboID-XPC の安定発現細胞株を用いた解析結果、並びに今年度の XPF-TurboID 安定発現細胞株を用いた解析結果、さらには本学で行なっている複合体解析の結果を合わせて研究成果をまとめるべく、必要となる確認実験を行うとともに、XPF-TurboID 安定発現細胞株とマイトマイシン C を利用した ICLR 解析の条件検討も行い、応用性についても確認していきたい。