

令和元年5月21日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02956

研究課題名(和文) 遠隔作用変異の生成・抑制の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of action-at-a-distance mutations

研究代表者

紙谷 浩之 (KAMIYA, Hiroyuki)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・教授

研究者番号：10204629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)： DNA損傷8-hydroxyguanineをsupF遺伝子(変異が生じたことを示す遺伝子)中ではなく下流に導入して、遠隔作用変異(DNA損傷から離れた位置に生じる変異)を検出できるシステムを開発した。その結果、WRN蛋白質を減少させることにより、遠隔作用変異(離れた位置における塩基置換変異)が上昇する傾向を見出した。

別のDNA損傷であるabasic siteに関してもアッセイを行った。その結果、8-hydroxyguanineが誘発する遠隔作用変異と類似の変異及び別種の遠隔作用変異(長鎖欠失変異)が誘発されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、WRN蛋白質(欠損すると癌易罹患性のある早老症であるWerner症候群が発症する)が減少すると、活性酸素により生じるDNA損傷である8-hydroxyguanineにより遠隔作用変異が誘発されることが改めて示された。また、様々な原因で生じるabasic siteにより、別種の遠隔作用変異が誘発されることも示すことができ、DNAの損傷が従来考えられてきた以上に大きな影響をもたらすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： We established a system to detect action-at-a-distance mutations (untargeted mutations found at positions apart from a DNA lesion) by incorporating the DNA lesion of interest at a downstream position of the supF gene (a reporter gene for mutations). An oxidatively damaged base, 8-hydroxyguanine, was examined using this system and found to induce the action-at-a-distance mutations (base substitution mutations in this case) frequently when the WRN protein was reduced.

We also examined another kind of DNA lesion, an abasic site. We found that it induced the action-at-a-distance mutations observed in the 8-hydroxyguanine experiments and a different type of action-at-a-distance mutations (large deletions).

研究分野：生物系薬学、分子生物学

キーワード：DNA損傷 遠隔作用変異

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

代表的な酸化損傷塩基として知られる 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua) は、C のみならず A と塩基対を形成することから、8-OH-Gua が生じた部位に G:C→T:A 変異を誘発することが知られていた。しかし、研究代表者は、Werner 症候群の責任遺伝子産物 WRN や DNA 損傷の乗り越え合成に関与する特殊な DNA ポリメラーゼ (pol) の 1 種である DNA pol  $\lambda$  をノックダウンしたヒト細胞に 8-OH-Gua を部位特異的に含む複製型プラスミドを導入した際には、(1) 8-OH-Gua 部位における G:C→T:A 変異は対照細胞での G:C→T:A 変異と同程度であるものの、(2) 8-OH-Gua 部位から離れた部位（数十塩基も離れた部位も含まれる）における塩基置換変異（非標的部位における置換変異）が上昇していることを明らかとした。研究代表者は、このような変異を「遠隔作用変異」と命名した。

## 2. 研究の目的

本研究では、新規な変異である遠隔作用変異の生成機構を明らかとするとともに、WRN や DNA pol  $\lambda$  の役割を明らかとし、遠隔作用変異の抑制機構を解明することを目的とした。また、他の DNA 損傷によっても同様な変異が生じるかを調べることも目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト U2OS 細胞を用いた。ノックダウン細胞を用いた実験では、Lipofectamine 2000 試薬を用いて WRN、DNA pol  $\lambda$ 、OGG1、APE1 に対する siRNA を導入した。ノックアウト細胞は CRISPR-Cas9 を用いて作製した。

*supF* 遺伝子配列を含む一本鎖 DNA を鋳型とし、化学合成した 8-OH-Gua、abasic site analogue、*O*-methylguanine を含むオリゴデオキシリボヌクレオチドをプライマーとして、試験管内 DNA 合成反応・連結反応・アデニンメチル化反応により、DNA 損傷を *supF* 遺伝子内または *supF* 遺伝子近傍の下流に導入したプラスミド DNA を作製した。

プラスミド DNA のヒト細胞への導入には Lipofectamine 試薬を用いた。導入してから 48 時間後に細胞からプラスミド DNA を回収し、*Dpn* I 処理により複製されていない DNA を分解した後、指示大腸菌に導入して *supF* 変異体を選択した。*supF* 変異体数を基に変異率を算出した。

*supF* 変異体に含まれるプラスミドの塩基配列を解析し、変異の内訳（変異スペクトル）を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 新規遠隔作用変異検出システムの構築

本研究課題においては、遠隔作用変異を感度良く検出できるように、バックグラウンド変異が低いシステムを用いることが望ましい。そこで、*supF* 遺伝子の代わりに様々なレポーター遺伝子 (*rpsL*、*lacZ $\alpha$*  等) を挿入したプラスミドを構築しアッセイを行って、遠隔作用変異を感度良く検出できるレポータープラスミドシステムの選択を試みた。しかし、バックグラウンド変異がいずれも *supF* 遺伝子よりも高かったため、それらの使用を断念した。

一方、DNA 損傷を *supF* 遺伝子中ではなく、*supF* 遺伝子近傍の下流に導入することにより、遠隔作用変異を検出できるシステムを新たに開発した。以降の実験の多くは本システムを用いることとした。

### (2) WRN や DNA pol $\lambda$ を欠損させたヒト細胞の作製

人工ヌクレアーゼを用いてゲノム編集を行う際に donor 核酸としてプラスミド DNA やオリゴデオキシリボヌクレオチドが用いられているが、それよりも長鎖一本鎖 DNA や tailed duplex が有効であることを見出した。さらに、人工ヌクレアーゼ CRISPR-Cas9 を用いて、WRN や DNA pol  $\lambda$  をノックアウトしたヒト U2OS 細胞や、ダブルノックアウト細胞を作製した。しかし、作製したノックアウト細胞に、8-OH-Gua プラスミドを導入し、遠隔作用変異の誘発を観察したところ、ノックアウト細胞は増殖速度が遅く、アッセイには向いていない可能性が示されたので、再び、ノックダウン細胞を用いることとした。

### (3) WRN や DNA pol $\lambda$ をノックダウンさせたヒト細胞における遠隔作用変異誘発

WRN をノックダウンさせたヒト細胞に、(1) で述べた新たな新規レポーター遺伝子アッセイシステム (8-OH-Gua を *supF* 遺伝子中ではなく、*supF* 遺伝子近傍の下流に導入することにより、遠隔作用変異を選択的に検出できるシステム) を用いて、8-OH-Gua による遠隔作用変異誘発を調べた。その結果、WRN をノックダウンすることにより、*supF* 遺伝子中の塩基置換変異が上昇する傾向が観察された (図 1)。しかし、DNA pol  $\lambda$  をノックダウンしても必ずしも同様の傾向

は観察されず、位置効果がある可能性が示唆された。

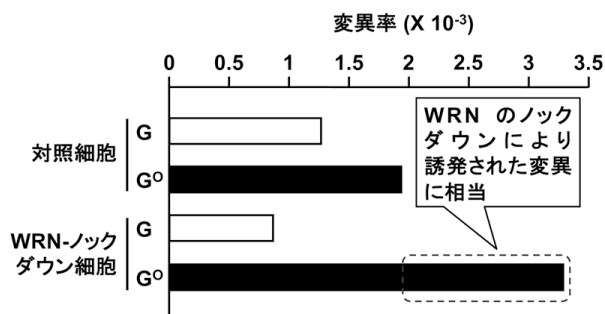


図1 WRN ノックダウン細胞において 8-OH-Gua が誘発した遠隔作用変異. G<sup>0</sup> = 8-OH-Gua

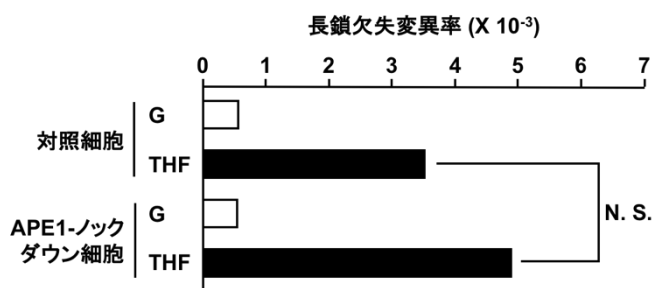
(4) 8-OH-Gua による遠隔作用変異誘発と DNA 修復酵素との関連

8-OH-Gua に対する主要な修復酵素として知られる OGG1 をノックダウンした細胞に、8-OH-Gua を *supF* 遺伝子近傍の下流に導入したプラスミドをトランスフェクションした。その結果、OGG1 ノックダウンによって *supF* 変異体率に大きな変化はなかった。しかし、変異スペクトルを調べたところ、ノックダウンによって塩基置換変異が減少する一方で欠失変異が上昇することを明らかにした。

(5) Abasic site analogue による遠隔作用変異誘発

8-OH-Gua の代わりに、別の DNA 損傷である abasic site (実験には tetrahydrofuran 型の analogue を使用) をプラスミド DNA に導入してアッセイを行った。その結果、8-OH-Gua が誘発する遠隔作用変異と類似の変異 (G:C 塩基対における塩基置換変異) 及び別種の遠隔作用変異 (長鎖欠失変異) が誘発されることを見出した。

Abasic site analogue による欠失変異の生じるメカニズムを明らかにするために、abasic site analogue の主要な修復経路に関わっている酵素 APE1 をノックダウンし、abasic site analogue を *supF* 遺伝子近傍の下流に導入したプラスミドをトランスフェクションした。しかし、APE1 ノックダウンによって *supF* 変異体率にも変異スペクトルにも大きな変化はなかった。そのため、APE1 によって生じるニックが欠失変異の原因である可能性は低いことが明らかとなった (図2)。



N. S.: 有意差なし

図2 U2OS 細胞において 8-OH-Gua が誘発した遠隔作用変異. THF = abasic site analogue

(6) 他の DNA 損傷による変異誘発

8-OH-Gua の代わりに、*O*<sup>6</sup>-methylguanine (メチル化剤によって生じる代表的な DNA 損傷) を用いて同様にアッセイを行い、遠隔作用変異が誘発されるか否かを観察したが、遠隔作用変異の誘発はほとんど検出されず、全ての損傷で遠隔作用変異が誘発されるわけではないことを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① T. Suzuki, Y. Katayama, Y. Komatsu and H. Kamiya\*: Analysis of large deletion mutations induced by abasic site analog in human cells. *Genes Environment* **40**, 24 (8 pages) (2018 年 10 月) doi: 10.1186/s41021-018-0110-7 査読有
- ② H. Kamiya\*, T. Makino, T. Suzuki, M. Kobayashi, I. Matsuoka: Mutations induced by

- 8-oxo-7,8-dihydroguanine in WRN<sup>-</sup> and DNA polymerase  $\lambda$ -double knockdown cells. *Mutagenesis* 33 (#4), 301-310 (2018年10月) doi: 10.1093/mutage/gey024 査読有
- ③ T. Suzuki, Y. Kuramoto and H. Kamiya\*: Reduction of Werner syndrome protein enhances G:C→A:T transition by *O*-methylguanine in human cells. *Chem. Res. Toxicol.* 31 (#5), 319-324 (2018年5月) doi: 10.1021/acs.chemrestox.8b00009 査読有
- ④ T. Suzuki, T. Imada, Y. Komatsu and H. Kamiya\*: Comparison of DNA fragments as donor DNAs upon sequence conversion of cleaved target DNA. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 36 (#6), 428-434 (2017年6月) doi: 10.1080/15257770.2017.1310385 査読有
- ⑤ T. Suzuki and H. Kamiya\*: Mutations induced by 8-hydroxyguanine (8-oxo-7,8-dihydroguanine), a representative oxidized base, in mammalian cells. *Genes Environment* 39, 2 (6 pages) (2016年12月) doi: 10.1186/s41021-016-0051-y 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 片山友里, 鈴木哲矢, 小松康雄, 紙谷浩之: Abasic siteによる欠失変異の誘発へのAPE1ノックダウンの影響. 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (2018年11月10日、米子)
- ② H. Kamiya, Y. Katayama, T. Suzuki, and Y. Komatsu: Large deletion mutations induced by abasic site analog in human cells. The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (2018年11月8日、京都)
- ③ 鈴木哲矢, 片山友里, 小松康雄, 紙谷浩之: ヒト細胞における脱塩塩基部位アナログによる large deletion の誘発. 日本環境変異原学会第47回大会 (2018年11月1日、京都)
- ④ 紙谷浩之, 片山友里, 鈴木哲矢: DNA修復酵素APE1ノックダウンの脱塩塩基部位誘発欠失変異への影響. 第77回日本癌学会学術総会 (2018年9月27日、大阪)
- ⑤ 井藤莉佳子, 森まどか, 鈴木哲矢, 紙谷浩之: 8-Hydroxyguanineによる遠隔作用変異を選択的に検出するアッセイ系の構築. 日本薬学会第138年会 (2018年3月27日、金沢)
- ⑥ 紙谷浩之 (招待講演): DNA損傷による変異誘発と相同組換えを利用するゲノム編集用核酸の開発. 日本薬学会第138年会 (2018年3月27日、金沢)
- ⑦ 倉本佳枝, 鈴木哲矢, 紙谷浩之: WRNは、*O*-メチルグアニンが誘発する変異を抑制する. 第40回日本分子生物学会年会 (2017年度生命科学系学会合同年次大会) (2017年12月8日、神戸)
- ⑧ H. Kamiya, Y. Katayama, T. Suzuki, and Y. Komatsu: Large deletion mutations induced by an abasic site analogue in human cells. 12th International Conference and 5th Asian Congress on Environmental Mutagens (2017年11月13日、Incheon, Korea)
- ⑨ 鈴木哲矢, 倉本佳枝, 紙谷浩之: WRNによる*O*-メチルグアニンが誘発する変異の抑制. 日本環境変異原学会第46回大会 (2017年11月6日、東京)
- ⑩ 紙谷浩之 (招待講演): DNA損傷による変異とその防御. 日本環境変異原学会第46回大会 (2017年11月6日、東京)
- ⑪ 森まどか, 鈴木哲矢, 紙谷浩之: 遠隔作用変異の抑制に関わる遺伝子のノックアウト細胞作製. 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (2017年10月21日、徳島)
- ⑫ 紙谷浩之, 片山友里, 鈴木哲矢: ヒト細胞において脱塩塩基部位が誘発する欠失変異. 第76回日本癌学会学術総会 (2017年9月29日、横浜)
- ⑬ 鈴木哲矢, 今田貴士, 小松康雄, 紙谷浩之: 標的DNAに切断を導入する配列変換におけるdonor核酸の比較. 日本ゲノム編集学会第2回大会 (2017年6月29日、豊中)
- ⑭ 紙谷浩之, 牧野哲明, 森まどか, 鈴木哲矢: 酸化的損傷塩基8-ヒドロキシグアニンが誘発する遠隔作用変異. 日本放射線影響学会第59回大会 (2016年10月27日、広島)
- ⑮ 紙谷浩之, 森まどか, 鈴木哲矢: Werner syndrome proteinノックアウト細胞において8-ヒドロキシグアニンが誘発する変異. 第75回日本癌学会学術総会 (2016年10月8日、横浜)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 鈴木 哲矢

ローマ字氏名: SUZUKI, Tetsuya

所属研究機関名: 広島大学

部局名：大学院 医歯薬保健学研究科（薬）

職名：助教

研究者番号（8桁）：20573950

研究分担者氏名：小松 康雄

ローマ字氏名：KOMATSU, Yasuo

所属研究機関名：国立研究開発法人 産業技術総合研究所

部局名：生命工学領域

職名：研究グループ付

研究者番号（8桁）：30271670