

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19510056

研究課題名（和文） 放射線や活性酸素で生じる塩基損傷の修復酵素の同定と突然変異抑制における役割の解析

研究課題名（英文） Identification and characterization of the roles in mutation prevention of repair enzymes for oxidative base damage in DNA caused by ionizing radiation and reactive oxygen species

研究代表者

秋山（張） 秋梅（ZHANG-AKIYAMA QIU-MEI）

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：00260604

研究成果の概要：

放射線や活性酸素は DNA に多様な損傷を引き起こす。生じる塩基酸化体、チミングリコール、5-ホルミルウラシルや 8-オキソグアニンは突然変異を誘発する損傷である。生物は、これらの損傷を DNA から除去することで突然変異を抑制する防御システムを備えている。本研究では、分裂酵母、線虫、大腸菌での塩基酸化体を DNA から除去する新規の DNA グリコシラーゼを同定し、それらの酵素が自然および酸化ストレスで誘発される突然変異を抑制することを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：電離放射線、活性酸素、酸化的塩基損傷、塩基除去修復、突然変異、DNA グリコシラーゼ、線虫、KsgA

1. 研究開始当初の背景

放射線や活性酸素が DNA に反応すると強い酸化反応をひき起こす。その結果、鎖切断を起し、チミングリコール (Tg)、8-オキソグアニン(8-oxoG)、5-ホルミルウラシル (5-foU) などの多様な塩基酸化体を生成し、これらが細胞死、突然変異や発癌を起こすと考えられている。塩基の酸化的損傷はお

もに塩基除去修復によって修復される。塩基除去修復では、損傷塩基を特異的に認識して DNA から除去する DNA グリコシラーゼ (DNA glycosylase)、生じた AP サイトでニックを入れる AP エンドヌクレアーゼ (あるいは AP リアーゼ) (AP endonuclease, AP lyase) が順序よく働く。塩基損傷の修復は、突然変異だけでなく細胞のがん化の抑制に

も関連している。塩基除去修復の研究では、その基質特異性、細胞内での生物学的機能やバックアップシステムなどはまだ十分に解明されていない。AP エンドヌクレアーゼや Pol- β の欠損は致死的であるが、DNA グリコシラーゼを単独で欠損させた個体や細胞では致死的になるとか、高い突然変異頻度を示すような形質は観察されていない。我々は、その理由として、DNA グリコシラーゼはより幅広い基質（酸化的塩基損傷）特異性をもつか、同じ酸化的塩基を認識する複数のバックアップ酵素が存在するためと考えている。未同定の DNA グリコシラーゼが存在するはずで、そのために、まずそれらの DNA グリコシラーゼを同定することが重要である。その上で、一つの特定の種類の塩基損傷を修復しうる DNA グリコシラーゼの全てを欠損させた細胞を作成し、自然あるいは酸化ストレスを負荷した状態での突然変異への影響を解明することが重要であると考えた。大腸菌、酵母、ヒト細胞がおもな対象であるが、本研究では線虫 *C. elegans* やホヤも扱う。これらの生物では、胚発生の段階での DNA グリコシラーゼの本質的な役割解明が期待できるが、DNA グリコシラーゼのほとんどが未同定であるので、それらの同定と構造・機能の解析を行うことがまず必要である。放射線や活性酸素は DNA にさまざまな種類の塩基損傷を同時に生じるため、個々の塩基損傷の生物作用および修復機構を個別に検討するシステムと技術が必要である。そこで、申請者は、いくつかの主な塩基酸化体を任意の部位に挿入したオリゴヌクレオチド (oligonucleotide) の化学合成法を開発してきた。その結果、Tg、8-oxoG、5-foU、2-ヒドロキシアデニン (2-ohA)、5-ヒドロキシメチルウラシル (5-hmU) などの突然変異スペクトルの解析やこれら

の塩基損傷を修復する DNA グリコシラーゼの同定に成功した。

2. 研究の目的

(1) すでに同定されている大腸菌、酵母、ヒト細胞の DNA グリコシラーゼ (MutM、Nth、Nei、Ogg1、Nth および Nei のホモログ) が認識する塩基損傷を詳細に検討し、それらの基質特異性のオーバーラップとその幅広さを明らかにし、その構造的特徴を明らかにする。(2) 次のような3種類の方法を用いて塩基除去修復に関わる新規のタンパク質を検索する。方法-① 細胞の粗抽出液 (crude extract) を調整し、目的の損傷塩基を持つオリゴヌクレオチドに特異的に結合あるいは切断するタンパク質を検索する。方法-② 大腸菌の DNA グリコシラーゼ欠損株の自然突然変異を相補するクローンを c-DNA ライブラリーから検索する。方法-③ すでに公表されているデータベースを活用し、DNA グリコシラーゼのアミノ酸配列を入力してホモログを検索する。本研究では、これらのタンパク質を精製し、その基質特異性、活性ドメインや結晶構造を明らかにする。(3) 上記の DNA グリコシラーゼを欠損する細胞を分離、あるいは、RNAi などの方法で遺伝子発現を抑制した細胞を分離して、それらの細胞の突然変異頻度や活性酸素に対する感受性などの性質を解析する。また、これらの酵素が高発現している細胞を分離し、突然変異への影響とともに放射線感受性などへの影響を解析する。(4) 生物の胚発生、個体発生や老化において塩基の酸化は不断に起こり、それらは塩基除去修復によって防御されていること、発生段階におけるそれらの修復酵素の発現の制御について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 酸化的塩基損傷を挿入したオリゴヌクレオチドの化学合成は、申請者らがこれまでに行ってきた方法による。得られたオリゴヌクレオチドを高速液体クロマトで合成の成功および収量を確かめる。得られたオリゴヌクレオチドと相補的な鎖を合成し、これらと結合させて二重鎖の基質オリゴヌクレオチドを調整する。(2) 大腸菌、酵母 (*S. cerevisiae*, *S. pombe*)、線虫 (*C. elegans*)、カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) および培養ヒト細胞 (多くの場合 HeLa S 細胞) から粗抽出液を調整し、5-foU、5-hmU、8-oxoG、2-ohA、uracil、AP サイトなどを含む二重鎖オリゴヌクレオチドに対する酵素活性を測定する。この段階で酵素活性が検出できれば、FPLC カラムクロマトグラフィによるタンパク質の精製を行う。申請者の研究室ではこれらの研究をルーチンに行っている。次に、DNA ニッキング法によって、それらの酵素の基質特異性、基質へのアプローチなどをさらに詳細に検討する。さらに多くの酸化的塩基損傷を含む基質は、京都大学大学院理学研究科化学専攻・杉山研究室、オックスフォード大学の Dianov 研究室と共同で合成する。これらのタンパク質を精製し、アミノ酸配列の解析を行う。同じく、ヒト細胞から調製した抽出液から、この方法で AP リアーゼ活性を内在する DNA グリコシラーゼの同定と精製を行う。申請者らは、5-foU を含むオリゴヌクレオチドを基質にして、大腸菌 *mutM nth nei* 変異株から得た抽出液と反応させ、前述のトラッピング法で DNA グリコシラーゼ活性をもつタンパク質を検索したところ、強い活性をもつ一種のタンパク質を同定した。このタンパク質を FPLC で精製し、アミノ酸配列を決めた。この配列の検索から目的のタンパク質は大腸菌の KsgA であることが分かった。

さらに、精製した KsgA には同じ性質をもつことも明らかになった。本研究では、KsgA が、①どのような塩基損傷を認識するのか、②その反応キネティクスと反応機構、③活性中心のドメインと反応に必須のアミノ鎖の決定、④大腸菌の他に HeLa 細胞や酵母で同じタンパク質が同定できるかどうかについて詳しく検討する。(3) *C. elegans* の DNA グリコシラーゼの同定。この研究は次の二つの方法論を用いて行う。① *C. elegans* の c-DNA ライブラリーを検索し、Ogg1、Nth、Nei などのホモログを検索する。候補クローンを大腸菌 *mutM nth nei* 変異株の中で高発現させ、タンパク質を分離、精製して、その生化学的性質を検討する。② *C. elegans* c-DNA ライブラリーのクローンを大腸菌 *mutM nth nei* 変異株などに導入し、この変異株の高頻度での自然突然変異を抑制 (相補) するクローンを選択する。さらに、このクローンの遺伝子の産生するタンパク質を精製し、DNA グリコシラーゼとしての性質を詳しく検討する。(4) 本研究で同定した修復遺伝子の突然変異抑制の機能。同定した cDNA を大腸菌の種々の DNA 修復欠損株 (例えば GC→CG トランスバージョンを検出できる株の *mutM*、*nth*、*nei*、*ung*、*mutY* などとこれらの二重、三重変異株) に導入し、どのようなタイプの突然変異が相補されるのかを定量化する。

4. 研究成果

(1) 分裂酵母の SpNth1 による 8-oxoG および酸化ピリミジン損傷に対する塩基除去修復を解析した。SpNth1 は Tg に加えて 5-foU に対しても DNA グリコシラーゼの活性を示した。SpNth1 の 8-oxoG:G に対する活性は比較的強く、大腸菌 Nth には無い 8-oxoG:C に対する活性も低レベルながら検出

できた。大腸菌 *nth nei* 欠損株で SpNth1 を発現させると、この二重変異株での自然突然変異および活性酸素高感受性を回復させた。(2) 線虫 *C. elegans* のウラシル DN A グリコシラーゼ (CeUng-1) をカラムクロマトで精製した。CeUng-1 は PBS2 フェージ由来の Ung 特異的阻害剤である Ugi によって活性が阻害された。線虫の *ung-1* 遺伝子の突然変異体の欠損の影響を調べた。発生、成長段階の異常、寿命の短縮、突然変異頻度の上昇を観察したが、*ung-1* 変異の影響は現れなかった。(3) 5-foU を含む二重鎖オリゴヌクレオチドを作成し、大腸菌の抽出液と NaBH₄ 存在下で反応させて、シッフ塩基を形成して基質に共有結合するタンパク質の同定を試みた。5-foU/C の塩基対を含むオリゴヌクレオチドに反応するタンパク質をカラムクロマトで精製した。このタンパク質のN末端のアミノ酸配列を決定して、この配列を使って既知のタンパク質を検索したところ、大腸菌の KsgA (RNA メチル化酵素) と同一であることを見いだした。クローニングした *ksgA* 遺伝子を発現させた大腸菌から精製した KsgA は予想通り 5-foU/C を認識する DNA グリコシラーゼ活性を示した。その除去する基質は 5-foU ではなく、その向かい側にあるシトシンであった。さらに、この酵素を欠損する *ksgA* 変異株では自然突然変異頻度が増大し、活性酸素増産剤に対する感受性が高くなることが分かった。(4) *C. elegans* のエンドヌクレアーゼ III (Nth) ホモログの同定とその構造・機能の解析に成功した。この Ce Nth は大腸菌やヒトの Nth のアミノ酸配列との高い相同性を持っており、基質特異性もほとんど一致している。N末端のアミノ酸配列が活性に必要不可欠であり、その機構は Nth の基質認識に必須の 4Fe-4S クラ

スターに関連していることが分かった。この DNA グリコシラーゼを欠損する *C. elegans* を分離して、寿命 (life-span) および活性酸素に対する感受性を検討したところ、野生株N2の性質とほとんど同じであった。これらの事実は、*C. elegans* では Nth の他に酸化ピリミジンを認識する DNA グリコシラーゼの存在を示唆している。そこで、CeNth を欠損する *C. elegans* の粗抽出液を用いて、Tg を含むオリゴヌクレオチドを切断する酵素活性を調べたところ、少なくとも1つの DNA グリコシラーゼ様活性を検出できた。現在、この活性を持つタンパク質の同定を行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

- ①Morinaga, H., S. Yonekura, N. Nakamura, H. Sugiyama, S. Yonei and Q-M. Zhang-Akiyama (2009) Purification and characterization of *Caenorhabditis elegans* NTH, a homolog of human endonuclease III: essential role of N-terminal region. *DNA Repair*, 査読有, in press.
- ② Zhang-Akiyama, Q-M., H. Morinaga, M. Kikuchi, S. Yonekura, H. Sugiyama, K. Yamamoto and S. Yonei (2009) KsgA, a 16S rRNA adenine methyltransferase, has a novel DNA glycosylase/AP lyase activity to prevent mutations in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 査読有, in press.
- ③Yonekura, S., N. Nakamura, S. Yonei and Q-M. Zhang-Akiyama (2009) Generation, biological consequences and repair mechanisms of cytosine deamination in DNA. *J. Radiat. Res.*, 査読有, 50, 19-26.
- ④Takao, M., Y. Oohata, K. Kitadokoro, K. Koba-yashi, S. Iwai, A. Yasui, S. Yonei, Q-M. Zhang (2009) Human Nei-like protein NEIL3 has

AP lyase activity specific for single-stranded DNA and confers oxidative stress resistance in *Escherichia coli* mutant. *Genes to Cells*, 査読有, 14, 261-270.

⑤ Nakamura, N., H. Morinaga, M. Kikuchi, S. Yonekura, N. Ishii, K. Yamamoto, S. Yonei and Q-M. Zhang (2008) 23. *Mutagenesis*, 査読有, 23, 407-413.

⑥ Wang, L.-L. and Q-M. Zhang (2008) Primary research of human anti-oxidant gene *GLRX2* and *TXN1*. *J. Biol.*, 査読有, 25, 17-20.

⑦ Yonekura, S., N. Nakamura, T. Doi, H. Sugiyama, K. Yamamoto, S. Yonei and Q-M. Zhang (2007) Recombinant *Schizosaccharomyces pombe* Nth1 protein exhibits DNA glycosylase activities for 8-oxo-7,8-dihydro-guanine and thymine residues oxidized in the methyl group. *J. Radiat. Res.*, 査読有, 48, 417-424.

⑧ Chan, K., S. Houlbrook, Q-M. Zhang, M. Harrison, L. D. Hickson and G. L. Dianov (2007) Overexpression of DNA polymerase β results in an increased rate of frameshift mutations during base excision repair. *Mutagenesis*, 査読有, 31, 1-6.

⑨ 中村允耶、米倉慎一郎、森永浩伸、米井脩治、張 秋梅 (2007) シトシン脱アミノ化の生物作用とその修復の機構. 放射線生物研究, 査読無, 42, 132-146.

[学会発表] (計 20 件)

① Q-M. Zhang, Hironobu Morinaga, Shin-Ichiro Yonekura, Naoaki Ishii and Shuji Yonei. KsgA, a rRNA methyltransferase, has a novel DNA glycosylase/AP lyase activity that removes cytosine paired with oxidative damage of thymine. 10th International Workshop Radiation Damage to DNA. 2008.6.8-12, Fukushima.

② 秋山(張)秋梅、細木彩夏、松井亜子、橋口

一成、野村崇治、近藤 隆. 活性酸素防御酵素の高発現による放射線応答の変動. 日本放射線影響学会第51回大会. 2008.11.19-21, 北九州.

③ 細木彩夏、橋口一成、近藤 隆、野村崇治、米井脩治、秋山(張)秋梅. 抗酸化酵素の高発現による放射線や活性酸素に対する細胞応答の変動. 日本放射線影響学会第51回大会. 2008.11.19-21, 北九州.

④ 森永浩伸、米倉慎一郎、中村允耶、杉山 弘、米井脩治、秋山(張)秋梅. 線虫 *C. elegans* における NTH 遺伝子の同定と解析. 日本放射線影響学会第51回大会. 2008.11.19-21, 北九州.

⑤ 松井亜子、橋口一成、近藤 隆、野村崇治、米井脩治、秋山(張)秋梅. 活性酸素防御酵素の高発現と細胞の放射線応答の変動. 日本放射線影響学会第51回大会. 2008.11.19-21, 北九州.

⑥ 秋山秋梅、中村允耶、森永浩伸、菊地政弘、石井直明. 線虫 *C. elegans* におけるウラシル DNA グリコシラーゼ CeUng-1 の性質と遺伝子欠損の影響. 日本遺伝学会第80回大会. 2008.9.3-5, 名古屋.

⑦ 橋口一成、浅井翔太、米井脩治、秋山(張)秋梅. 真核生物 OXR1 タンパク質の機能解析. 日本分子生物学会第31回大会-日本生化学会第81回大会合同大会. 2008.12.9-12, 神戸.

⑧ 森永浩伸、米倉慎一郎、米井脩治、石井直明、秋山(張)秋梅. 線虫 *C. elegans* の Nth1 ホモログの同定と構造機能の解析. 日本分子生物学会第31回大会-日本生化学会第81回大会合同大会. 2008.12.9-12, 神戸.

⑨ S. Asai and Q-M. Zhang-Akiyama. The role of the *C. elegans* OXR1 homolog in protection against oxidative stress. The 2nd International Symposium of the Biodiversity Global COE Project. 2008.11.21~22, Kyoto.

⑩ H. Morinaga, N. Nakamura, S-I. Yonekura, H.

Sugiyama, S. Yonei and Q-M. Zhang-Akiyama. Identification and characterization of NTH homolog in *C. elegans*. The 2nd International Symposium of the Biodiversity Global COE Project. 2008.11.21~22, Kyoto.

⑪ A. Matsui and Q-M. Zhang-Akiyama. Correlation of cellular radiosensitivity and radiation responses with the levels of thioredoxin in HeLa cells. The 2nd International Symposium of the Biodiversity Global COE Project. 2008.11.21-22, Kyoto.

⑫ A. Hosoki and Q-M. Zhang-Akiyama. Modulation of cellular effects of ionizing radiation and reactive oxygen species by overexpression of antioxidant enzymes in human cells. The 2nd International Symposium of the Biodiversity Global COE Project. 2008.11.21-22, Kyoto.

⑬ Y. Sanada and Q-M. Zhang-Akiyama. Search for MutT functional homolog in *C. elegans*. The 2nd International Symposium of the Biodiversity Global COE Project. 2008.11.21-22, Kyoto.

⑭ M. Kikuchi, Shin-Ichiro Yonekura and Q-M. Zhang. Comparative Analysis of Structure and Functions of MutT Homologs. The 1st International Symposium of the Biodiversity Global COE Project. 2008.3.19~20, Kyoto.

⑮ Shin-Ichiro Yonekura and Q-M. Zhang. Biological Diversity of Oxidative Stress Response. The 1st International Symposium of the Biodiversity Global COE Project. 2008.3.19-20, Kyoto.

⑯ 菊地政弘、米倉慎一郎、中村允耶、米井脩治、張 秋梅. 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) における MutT ホモログの解析. 日本分子生物学会第30回大会-日本生化学会第80回大会合同大会. 2007.12.11-15, 横浜.

⑰ 米倉慎一郎、米井脩治、張 秋梅. スーパーオキシドによって誘導される *ydbK* 遺伝

子のプロモーターと機能. 日本分子生物学会第30回大会-日本生化学会第80回大会合同大会. 2007.12.11-15, 横浜.

⑱ 張 秋梅, 中島恭子, L-L. Wang, 蓮池史画, 立花 章, 野村崇治, 米倉慎一郎, 米井脩治. 抗酸化酵素の高発現によるヒト細胞での放射線感受性の変動. 日本放射線影響学会第50回大会. 2007.11.14-17, 千葉.

⑲ 菊地政弘, 米倉慎一郎, 中村允耶, 米井脩治, 張 秋梅. 線虫 *Caenorhabditis elegans* およびホヤ *Ciona intestinalis* における MutT ホモログの同定と解析. 日本放射線影響学会第50回大会. 2007.11.14-17, 千葉.

⑳ 米倉慎一郎、米井脩治、張 秋梅. スーパーオキシド誘導性 *ydbK* 遺伝子のプロモーターと YdbK タンパク質の抗酸化機能. 日本放射線影響学会第 50 回大会. 2007.11.14-17, 千葉.

〔図書〕 (計 1 件)

① Hashiguchi, K. and Q-M. Zhang-Akiyama (2009) Establishment of human cell lines lacking mitochondrial DNA. In *Methods in Molecular Biology. Mitochondria DNA: Methods and Protocols*, 2nd Edition (Stuart JA, ed), Humana Press (New Jersey), in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 (張) 秋梅 (ZHANG-AKIYAMA
QIU-MEI)

京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号： 00260604