

平成22年 6月14日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19710052
 研究課題名（和文） G→C トランスバージョンを引き起こすグアニン酸化損傷の検出法の開発
 研究課題名（英文） Detection of guanine oxidation products which cause G→C transversions.
 研究代表者 喜納 克仁 (KINO KATSUHITO)
 徳島文理大学 香川薬学部 薬科学科 講師
 研究者番号：70360534

研究成果の概要（和文）：

グアニン酸化損傷の一つであるオキサゾロンは G→C トランスバージョンを引き起こす。本研究では、この損傷に結合するアプタマーを見出すことを目的とした。固相に結合した Oz に結合するものは得られたが、フリーの Oz に強く結合する能力は持っていなかった。フリーの Oz に結合するアプタマーを見出すための知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

One of guanine oxidation products, oxazolone, causes G→C transversions. In this research, we intended to find aptamers binding oxazolone. Aptamer binding oxazolone-resin were found but it can bind weakly with free oxazolone. Then some knowledge of finding aptamers binding oxazolone was obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,250,000	480,000	1,730,000
2009年度	350,000	0	350,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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：グアニン酸化損傷、紫外線、G→C トランスバージョン

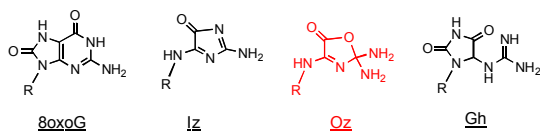
1. 研究開始当初の背景

DNA は化学物質であるために様々な物質・エネルギーと反応し、遺伝情報の変異を引き起こす。この変異が積み重なると最終的に癌や老化を引き起こす。故に、DNA の変異とその修復機構の解明は極めて重要である。突然変異の中でも最も単純な点突然変異は 12 通り存在し、そのうちグアニンからシ

トシンへの変異 (G→C トランスバージョン) のみが最近まで不明であった。以前申請者は大腸菌ポリメラーゼ I を用いて、グアニンの損傷であるイミダゾロン(Iz)が G→C トランスバージョンを引き起こすことを初めて示した。その後同様に大腸菌ポリメラーゼ I を用いた研究により、第 2 候補としてグアニジンヒダントイン(Gh)が提示された。また申請

者は、ヒト DNA ポリメラーゼ η を用いることにより Oz を第3候補として提示した。この3つの損傷についてほ乳類 DNA ポリメラーゼ α 及び β で突然変異能を調べたところ、Oz と Iz は G \rightarrow C トランスバージョンのみを示し、Gh は G \rightarrow C トランスバージョンと G \rightarrow T トランスバージョンを示した。さらに酵母 DNA ポリメラーゼ ϵ により、Oz は G \rightarrow C トランスバージョンを、Gh は G \rightarrow T トランスバージョンを優位に引き起こすことが判明した。また、Oz は様々な修復酵素によって認識・修復されることも明らかとなった。

実は G \rightarrow C トランスバージョンは、紫外線照射下や活性酸素が多く発生する高酸化条件下で G \rightarrow T トランスバージョンと共に検出される点突然変異であり、低酸化条件下ではあまり検出されない。これは Oz が様々な修復酵素により修復されるためであること、Oz が 8 オキソグアニン(8oxoG)のさらなる酸化生成物であることによる。こうして、高酸化条件下では 8oxoG に加え Oz も生体内では重要な挙動を示す可能性があり、Oz の直接的な検出法の開発は急務である。



研究開始時点においては、Oz の検出法としては2つあり、(i)HPLC による定量、(ii)蛍光検出による間接的な定量がある。(i)の HPLC による定量は Oz が低分子のため、生体内の他の低分子と分離が不可能であり、8oxoG のように電気化学的に検出されやすいような特性も持っていない。そのため、生体サンプルからの Oz の定量は実質的には不可能である。(ii)の間接的な定量は、Oz をアルカリ処理しグアニジンを生成させ、NQS という試薬との反応生成物の蛍光を測定するというものである。しかしながら、Oz 以外の DNA 損傷からもグアニジンが生成するので、正確な定量はこの方法では不正確である。

2. 研究の目的

グアニン損傷の一つであるオキサゾロン(Oz)に結合する DNA アプタマーおよび RNA アプタマーを作製することを目的とする。

3. 研究の方法

(a) Oz の固定化

DNA-RNA ハイブリッドダイマー、dG-rU を DNA 合成機上で合成した。その後、リボフラビン存在下、366 nm の紫外線を照射し、dIz-rU

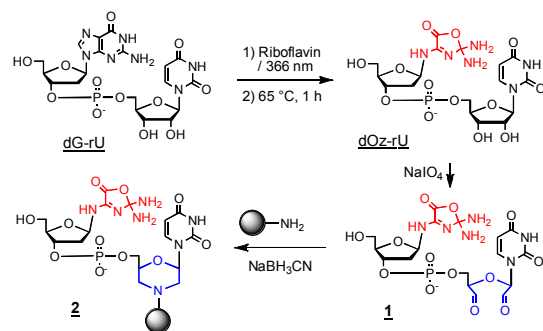
を合成した。その後、65 °C で加水分解し、dOz-rU を生成させ、高速液体クロマトグラフィーで dOz-rU を精製した。単離した dOz-rU に NaIO₄ 処理を施し、アルデヒド基(1)を生成させた。これにアミノ基を有する固相担体と反応させ、固相担体及びキャリア蛋白質上に Oz 骨格を固定した(2)。

(b) DNA アプタマーの構築

45 塩基のランダム配列を含んだ DNA ライブラリーから SELEX 法でアプタマーを選択した。具体的には、(i) DNA ライブラリーから転写によりオリゴマープールを作製、(ii) (a) で作製した固相担体に結合させ、(iii) 担体に結合したライブラリーを溶出、2 本鎖 DNA ライブラリーに戻した。この(i)~(iii)の操作を繰り返し、Oz に結合するアプタマーを選択した。なお、非特異的な結合するものを選択ライブラリーから除外するため、天然ヌクレオシドを固定化した担体と混合し、液相を回収する操作も行った。こうして、Oz に特異的に結合するいくつかのアプタマーを得た。

(c) RNA アプタマーの構築

45 塩基のランダム配列を含んだ DNA ライブラリーから SELEX 法で RNA アプタマーを選択した。具体的には(i) DNA ライブラリーから転写により RNA プールを作製、(ii) (a) で作製した固相担体に結合させ、(iii) 担体に結合した RNA ライブラリーを溶出、RT-PCR 反応により DNA ライブラリーに戻した。この(i)~(iii)の操作を繰り返し、Oz に結合する RNA アプタマーを選択した。なお、非特異的な結合するものを選択ライブラリーから除外するため、天然ヌクレオシドを固定化した担体と混合し、液相を回収する操作も行った。こうして、Oz に特異的に結合する RNA アプタマーを得た。



(c) Oz に対する結合性の解析

Oz を生成させた DNA を別途合成した。(a) や (b) で得られた RNA アプタマーを混合し、ゲルシフトアッセイにより結合定数を算出した。

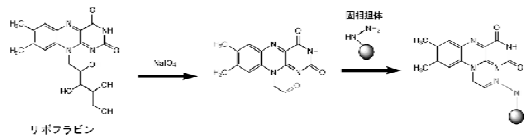
4. 研究成果

(1) dOz-rU 合成の条件検討

dG-rU を 20 μ M、リボフラビン を 75 mM に調製し、さらに Oz は酸性及び塩基性条件で不安定なことを考慮して、ここにリン酸バッファー (pH 7) 10 mM を加えた。光の照射時間は 10 min が最適であった。得られた dIz-rU から加熱分解して、dOz-rU を得ることを検討した。その結果、65 $^{\circ}$ C、2 時間が最適であることが判明した。大量合成のために、dG-rU を 20 μ M を 200 μ M に変更した。

(2) 固相担体と dOz-rU の反応のリボフラビンによるモデル実験

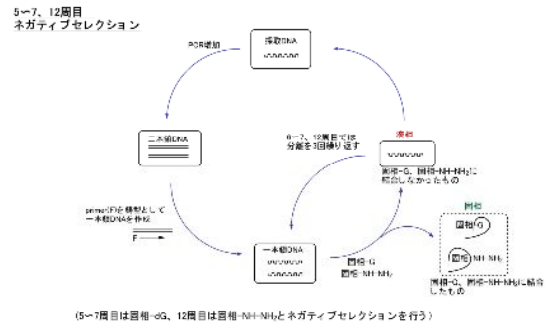
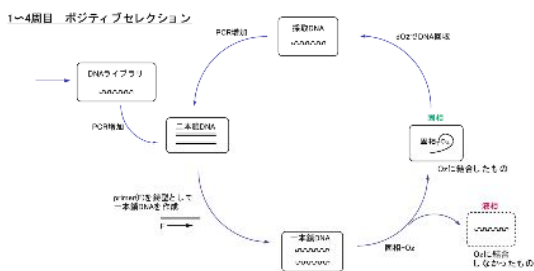
dOz-rU と固相担体の結合の成否を判別することは困難なため、dOz-rU の代わりに、同じくジオールを持ち、かつ目視での判別が可能なりボフラビンを用いてモデル実験を行うこととした。反応条件を検討した結果、NaIO₄ の濃度が 56 μ M、pH 6 が最適であると結論づけた。



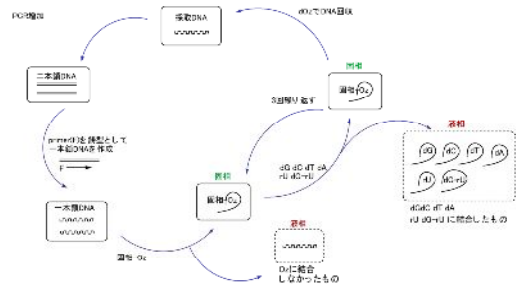
また、この反応条件では Oz が分解されないことも確認できた。よって、この反応条件により、(1) で合成した dOz-rU を固相担体に導入した。

(3) in vitro セレクションによるアプタマーの選別

(2) で調製した dOz-resin を用いて、以下の図のような方法で in vitro セレクションを行い、dOz-resin に結合するアプタマーを得た。なお、DNA ライブラリーとしては、GGGCCAAGCTTCTGCAGAAAAATN₄₅CTCGGGAATTCCTCCTATAGT GAGTCGTATTA の配列を用いた。45 塩基分のランダム配列を用いることで、4⁴⁵ 種類、つまり約 10²⁷ 種類から選択するということになる。



8~11回目 ポジティブネガティブセレクション



こうして得られたものを DNA シークエンサーで配列決定したところ、ランダム配列部分が GAGCGTGCTC GTTTAGTTGC TGTGTGGC CCGCAGTGC CTCCG であるもの 1 種類のみが選択された。

DNA アプタマーとは別に Oz-resin に結合する RNA アプタマーも選択した。DNA アプタマーの選択法に、RNA 転写と逆転写のステップを加えた選択法を行い、ライブラリーは DNA アプタマーと同一のものを用いた。このライブラリーとは別に、TAATACGAC TCACTATAG GGAGGAATT CCCGAGGGG ACGANNTNG TTNNGCGC TTCNGCGTG TGNAACGT CCCATTTTT CTGCAGAAG CTTGGCCC というライブラリーも用いて別途 in vitro セレクションを行った。このライブラリーは、RNA 2006, 12, 567-579 で報告されていた GMP に結合する RNA アプタマーの構造と配列を参考にして 8 カ所のみをランダム化したものである。

こうして得られた DNA アプタマーと RNA アプタマーをそれぞれ ³²P で RI ラベルした。それぞれのラベル化アプタマーを Oz 生成 DNA と混合し、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、得られた DNA および RNA アプタマーは、解離定数が 0.3 μ M 以上であった。Oz-resin で選択してきたにも関わらず、Oz 生成 DNA への結合力の弱さは、得られたアプタマーが Oz だけではなく、resin にも結合していることを示唆している。このため、アプタマーの Oz に結合する際の resin の影響をなるべく排除するため、Oz と resin の間の距離を長くした。こうした工夫にも関わらず現在のところ、Oz への結合力が強いアプタマーは得られていない。現在の集積した知見をも

とに、Ozにより強く結合するアプタマーを選択できる Oz-resin の設計を今後行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1) Kino, K.*, Morikawa, M., Kobayashi, T., Kobayashi T., Komori, R., Sei, Y., Miyazawa, H. "The Oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanine by Iodine" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, in press. 査読有

2) Kino, K.*, Sugawara, K., Mizuno, T., Bando, T., Sugiyama, H., Akita, M., Miyazawa, H., Hanaoka, F. "Eukaryotic DNA polymerases α , β and ϵ incorporate guanine opposite 2,2,4-triamino-5(2H)-oxazolone." *ChemBioChem*, 2009, 10, 2613-2616. 査読有

3) Kino, K.*, Kobayashi, T., Arima, E., Komori, R., Kobayashi T., Miyazawa, H. "Photoirradiation products of flavin derivatives, and the effects of photooxidation on guanine." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, 19, 2070-2074. 査読有

4) Kobayashi, T., Yoshimori, A., Kino, K., Komori, R., Miyazawa, H., Tanuma, S. "A new small molecule that directly inhibits the DNA binding of NF-kB." *Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 5293-5297. 査読有

5) Morikawa, M., Kobayashi, T., Kobayashi, T., Komori, R., Sei, Y., Miyazawa, H., Kino, K.* "The oxidation of 2'-deoxy-8-oxoguanosine by iodine." *Nucleic Acids Sym. Ser.*, 2009, 53, 219-220. 査読無

6) Kino, K.*, Morikawa, M., Kobayashi, T., Kobayashi T., Komori, R., Sei, Y., Miyazawa, H. "A new preparations of guanine photo-oxidation products." *Photomed. Photobiol.*, 2009, 31, 5-6. 査読無

7) Takahama, K., Kino, K., Arai, S., Kurokawa, R., Oyoshi, T. "Identification

of RNA binding specificity for the TET-family proteins." *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 2008, 52, 213-214. 査読無

8) Ikeda S., Kubota T., Kino K., Okamoto A. "Sequence dependence of fluorescence emission and quenching of doubly thiazole orange labeled DNA: effective design of a hybridization-sensitive probe." *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19, 1719-1725. 査読有

9) Takarada T, Imaizumi E, Kino K, Yoshimoto K, Ogasawara S, Kanayama N, Maeda M. "Detection of base pairing of an oxidatively damaged guanine using colloidal stability change of DNA-linked polymer micelles." *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2007, 51, 305-6 査読無

10) Kino K., Miyazawa H., Sugiyama H. "User-friendly synthesis and photoirradiation of a flavin-linked oligomer." *Genes and Environment*, 2007, 29, 23-28. 査読有

[学会発表] (計 25 件)

1) 喜納克仁 (2010) 「オキサゾロンの点突然変異能」日本化学会第90春季年会、3月、近畿大学

2) 森川雅行、小林輝彦、小林隆信、小森理絵、清悦久、宮澤宏、喜納克仁 (2010) 「ヨウ素による8oxoG酸化生成物の分子量測定」日本化学会第90春季年会、3月、近畿大学

3) Morikawa M, Kobayashi T, Kobayashi T, Komori R, Sei Y, Miyazawa H, Kino K. (2009) "The oxidation of 2'-deoxy-8-oxoguanosine by iodine." 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 9-10月、高山

4) Kino K., Kobayashi T., Komori R., Miyazawa H. (2009) "Ab initio calculation of base pairs containing oxazolone." 日本環境変異原学会第38回大会 11月、静岡

5) 喜納克仁、森川雅行、小林輝彦、小森理絵、小林隆信、清悦久、宮澤宏 (2009) 「ヨウ素による8オキソグアニンの酸化反応」第12回ヨウ素学会シンポジウム 10月、千葉大学

6) 喜納克仁、森川雅行、小林輝彦、小森理

絵、小林隆信、清悦久、宮澤宏 (2009) 「グアニン酸化生成物の新規生成反応とその解析」 第31回日本光医学・光生物学会 7月、大阪

7) 小林輝彦、喜納克仁、小林隆信、小森理絵、宮澤宏 (2009) 「ルミフラビンの新しい作成法」 日本化学会第89春季年会、3月、千葉

8) 高濱謙太郎・喜納克仁・内山裕美子・長橋真弓・大吉崇文 (2009) 「核酸結合タンパク質 EWS の DNA 結合性の解析」 日本化学会第89春季年会、3月、千葉

9) 森川雅行、小林輝彦、喜納克仁、小林隆信、小森理絵、宮澤宏 (2009) 「ルミクロームの新しい作成法」 日本薬学会第129年会、3月、京都

10) 小林隆信、吉森篤史、角田綾子、喜納克仁、小森理絵、田沼靖一、宮澤宏 (2009) 「NF- κ B の DNA 結合を阻害する低分子化合物の同定」 日本薬学会第129年会、3月、京都

11) 鈴木雅代、和田彩、実井綾、矢田知見、山内沙也香、小森理絵、小林隆信、喜納克仁、宮澤宏 (2009) 「マウス胚性腫瘍細胞 P19 の神経細胞への分化過程で発現変動する遺伝子の解析」 日本薬学会第129年会、3月、京都

12) Kino K., Kobayashi T., Morikawa M., Komori R., Kobayashi T., Miyazawa H. (2008) "Synthesis and reactivity of vitamin B2 derivatives photooxidizing guanine" 日本環境変異原学会第38回大会 12月、那覇

13) 小森理絵、鈴木雅代、和田彩、徳田佳子、中山智子、小林隆信、喜納克仁、宮澤宏 (2008) マウス胚性腫瘍細胞 P19 の神経分化過程における遺伝子発現解析、日本分子生物学会第31回年会・日本生化学会第81回大会、12月、神戸

14) 小林隆信、吉森篤史、喜納克仁、小森理絵、田沼靖一、宮澤宏 (2008). NF- κ B と DNA の結合を阻害する新規低分子阻害剤の同定 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、12月、神戸

15) 喜納克仁 (2008) 「グアニン酸化損傷の効果の予測」 第11回生命化学研究会 11月、水上 (群馬)

16) 小林輝彦、喜納克仁、小林隆信、小森理絵、宮澤宏 (2008) 「ビタミン B2 からのフラビン誘導体の合成」 第47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 11月、岡山

17) 森川雅行、喜納克仁、千田岳史、小林輝彦、小森理絵、小林隆信、宮澤宏 (2008) 「DNA 酸化損傷に対して特異的に認識する DNA アプタマーの探索」 第47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 11月、岡山

18) 池田修司、久保田健、喜納克仁、岡本晃充 「チアゾールオレンジのエキシトン相互作用を利用した DNA プローブの配列依存的な蛍光特性」 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008年9月

19) 喜納克仁、森川雅行、小林輝彦、小森理絵、小林隆信、宮澤宏 「グアニン酸化損傷を認識する DNA アプタマーの探索」 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008年9月

20) 高濱謙太郎、喜納克仁、内山裕美子、大吉崇文 「核酸結合タンパク質 EWS の DNA 結合性の解析」 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008年9月

21) 喜納克仁 「フラビン誘導体の合成」 新世代の生物有機化学研究会 2008 2008年6月

22) 森川雅行、喜納克仁、小林輝彦、小森理絵、小林隆信、宮澤宏 「DNA 損傷を認識する DNA アプタマーの探索」 日本薬学会第128年会 2008年3月

23) Takarada T, Imaizumi E, Kino K, Yoshimoto K, Ogasawara S, Kanayama N, Maeda M "Detection of base pairing of an oxidatively damaged guanine using colloidal stability change of DNA-linked polymer micelles." 5th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2007 (Tokyo, Japan)

24) 小森理絵、木内郁代、松田島英里、小林隆信、喜納克仁、宮澤宏 「マウス胚性腫瘍細胞 P19 の神経分化にかかわる遺伝子・タンパク質の網羅的探索」 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会 2007年12月

25) 喜納克仁 「グアニン酸化の新規生成経路」 新世代の生物有機化学研究会 2007 2008

7年6月

〔図書〕(計2件)

1) Kino K.*, Sugiyama H, Miyazawa H.
“Chapter X; Molecular basis of guanine
oxidation under UV-A/VIS radiation and
its biological effects.” Prog. DNA
Damage Res., 2008, p271-276.

2) 喜納克仁 「13章 遺伝子損傷の分子
機構」 化学フロンティア ゲノム化学の
最前線—医学、分子生物学への応用と展開
—, 2007, pp99-107.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

研究用ソフトウェア開発 1件

1) Kino, K., Ikeda, S., Okamoto, A. NABiT
SF 2.0

研究論文紹介 2件

1) 喜納克仁、小林輝彦、有馬英治、小森理
絵、小林隆信、宮澤宏「フラビン誘導体の光
分解生物とグアニン光酸化反応」ビタミン、
2010, 84, 59-60.

2) 喜納克仁、宮澤宏、杉山弘 「フラビン
結合オリゴマーの簡易合成法と光反応解析」
ビタミン、2008, 82, 35-37.

依頼講演 2件

1) 喜納克仁 (2009) 「グアニン酸化損傷
の発生、変異、修復」12月、京都大学

2) 喜納克仁 (2008) 「グアニン酸化損傷の
生体内への影響」北陸先端科学技術大学院大
学セミナー 10月、能美(石川)

企画講演 1件

1) 喜納克仁 「DNA 化学反応 —がん・老化

のきっかけ—」第185回 やさしい科学技術
セミナー(主催:JapanPrize) 2008年9月
13日実施

※youtubeでの公開

<http://www.youtube.com/watch?v=gI6CZ33oIkE>

新聞報道 1件

1) 喜納克仁 「最新のDNA研究理解」四国新
聞, 2008, 9月14日, 22.

研究紹介ホームページ

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph04/index.htm>
1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜納 克仁 (KATSUHITO KINO)

徳島文理大学 香川薬学部 薬科学科

研究者番号: 70360534

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者