

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04273

研究課題名(和文) クラスターDNA損傷の構造変化および修復機構の解明

研究課題名(英文) Structural changes and repair mechanisms of clustered DNA damage

研究代表者

倉岡 功 (Kuraoka, Isao)

福岡大学・理学部・教授

研究者番号：60335396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：放射線は、ゲノムDNAの非常に狭い空間的に複数個密集するクラスターDNA損傷を生じる。このDNA損傷と比べて、その損傷の密集性から非常に修復され難く、最終的に修復困難なDNA二本鎖切断を導き、遺伝子の欠失や挿入、転座、そして発がんに関与すると考えられている。本研究では、人工的にクラスターDNA損傷を化学的に作製し、細胞内でのクラスターDNA損傷の構造変化を生化学的および細胞学的に解析を行なった。その結果、少なくとも我々の実験系においては、予測と反して一般的なDNA修復酵素および細胞抽出液において、クラスターDNA損傷は修復困難なDNA二本鎖切断を生み出さないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線による発がんの危険性は一般に広く知られていますが、その分子機構についてはまだ多くの謎があります。今回の放射線により生じるクラスターDNA損傷の解析では、その修復機構についての理解が進むことで、放射線による発がんの分子機構に貢献することが期待されました。興味深いことに、今回の我々の解析結果によると、従来想定されていたように、クラスターDNA損傷は容易に変異を引き起こす可能性は否定されました。むしろ、細胞内の酵素反応が複雑な修復機構の中でより確実に正しく修復する可能性が示唆されています。これらの結果は、将来的に放射線による発がんについての理解を確かなものにする可以考虑されます。

研究成果の概要(英文)：Radiation produces clustered DNA damage, a very narrow, spatially dense plurality in genomic DNA. Compared to a common DNA damage induced by radiation, the dense nature of the clustered DNA damage makes it very difficult to repair, ultimately leading to DNA double-strand breaks that are difficult to repair and are thought to be involved in gene deletions, insertions, translocations, and carcinogenesis. In this study, we chemically produced clustered DNA damage in DNA substrates artificially and analyzed the DNA repairs by observing structural changes of clustered DNA damage in cells biochemically and cytologically. We found that, at least in our experimental system, clustered DNA damage does not produce DNA double-strand breaks that are difficult to repair in common DNA repair enzymes and cell extracts, contrary to predictions.

研究分野：放射線生物学

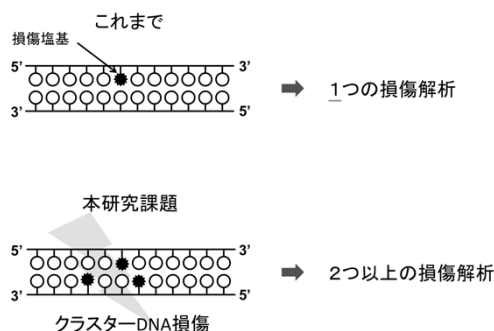
キーワード：放射線発がん クラスターDNA損傷 DNA修復 変異

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA は遺伝情報を担う重要な物質であり、生命が正常に営まれるためには安定に維持されなければならない。しかし放射線、紫外線、化学物質などの外的要因、および細胞の代謝過程で発生する活性酸素などの内的要因により DNA は絶えず損傷を受けている。これらの DNA 損傷は、ヒトにおいて老化・がん化等の原因になる。しかしその一方で生物はこれらの損傷を修復して遺伝情報を維持することのできる DNA 修復機構をもっている。

DNA 修復機構には、非常に多様な仕組みと経路が存在する。例えば、その DNA 損傷が塩基に生じた小さなものであれば、塩基除去修復 (BER) 機構がその損傷を含む塩基を取り除く。また一方その損傷が大きなものであれば、ヌクレオチド除去修復 (NER) 機構が、その損傷を含むヌクレオチドを取り除く。また、損傷が転写反応を阻害するようなものであれば、転写機構を担う RNA ポリメラーゼが DNA 損傷の認識を行い「転写と共役した修復」の経路が損傷を取り除く。

細胞内で生じている DNA 損傷には、上記よりもさらに様々な化学反応によって複雑な損傷が生じていると考えられる。現在明らかになっている DNA 損傷において、放射線が生じるクラスター DNA 損傷は、2 本 DNA 鎖切断を誘発する損傷としてよく知られ、一つの領域に様々な DNA 損傷 (右図) がクラスター化(集積)して存在するという複雑な損傷構造を形成している。また生じた損傷が BER 機構で修復されるもの NER 機構により修復されるものそれぞれが混在していた場合も生体内に生じる可能性のあるクラスター損傷としては存在するはずである。このような複雑な DNA 損傷はどのように修復されることになるのか多くの疑問が挙げられる。



放射線は直接的な作用あるいは間接的な作用により様々な DNA 損傷を引き起こす。しかしその中でも致死的な作用がもっとも高いものは、このクラスター DNA 損傷であるという報告がある。この損傷は 2 本鎖 DNA の回転内に複数の DNA 損傷が存在する場合と定義されている。この損傷は、修復されにくく遺伝子の欠失や転座、複雑な染色体再配列を引き起こしている。そこには多くの DNA 修復因子が関わり、染色体切断が生じている。これらの研究は、主に高線エネルギー付与 (LET) 放射線をヒト細胞に照射することで行われた細胞学的解析により確認されている。また、8-オキシグアニンと DNA 鎖切断を組み合わせクラスター損傷とし、大腸菌変異株を用いての変異解析している例があり、その修復の複雑さ、解析の複雑さが想定されていた。

2. 研究の目的

放射線により生じる DNA 損傷は、ゲノム DNA の非常に狭い空間的に複数個密集することがある。このように生じた DNA 損傷の「かたまり」(クラスター DNA 損傷) は、一般環境中に生じる DNA 損傷と比べて、その損傷の密集性から非常に修復され難いと予測されている。また、細胞生物学の実験結果より、このクラスター DNA 損傷は、さまざまな DNA 修復機構を導き、その修復機構によって、最終的に DNA 鎖の切断、特に二本鎖切断を導くとされている。これらの損傷の最終形態としての変異は、遺伝子の欠失や挿入さらには転座となり、そしてヒトの放射線発がんに関与することが考えられている。

本研究ではこれまでの細胞生物学的手法とは異なり、クラスター損傷を有する DNA 基質を、生化学的手法を用いて作製することによって、この損傷の運命を生化学的に解析することを目指した。DNA の損傷の挙動を解析するために、ヒト細胞抽出液を用いた無細胞系で実験を行い、直接的に DNA 修復、切断および変異を解析し、クラスター DNA 損傷によって生じる生物影響の分子機構を明らかにするものである。

また、本研究の最終目標としては、放射線で生じたクラスター DNA 損傷の構造変化および修復機構を解析し、ヒトにおける放射線生物影響の新しい理解を生み出すことである。

3. 研究の方法

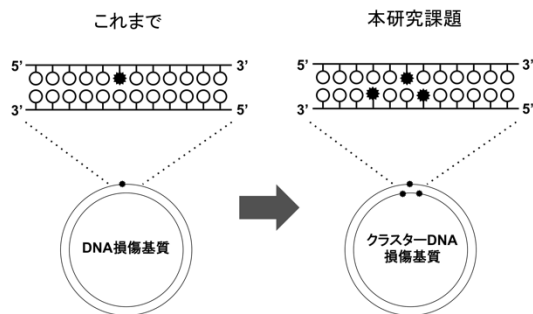
この「クラスター DNA 損傷によって生じる生物影響の分子機構」を明らかにするためには、クラスター DNA 損傷を便宜上再定義し、この損傷を人工的に作製する必要があると考えた。これまでの研究では、損傷を人工的に作製し、一つ一つの DNA 損傷に関してその修復機構を解析していた。例えば、通常 DNA 損傷ならば一つのオリゴヌクレオチドの中に 1 つの DNA 損傷を

含む DNA 損傷の基質を作製し、細胞の抽出液によって DNA 修復活性を測定していた。

しかしながら本研究では、DNA 損傷をクラスターDNA 損傷として2本鎖 DNA 上に配置し、少なくとも2つ以上の DNA 損傷を同時に観察することを行う。このために新規の DNA 損傷導入法を構築することとした（右図）。

またこれらのプラスミドは生化学的解析用のものと細胞学的解析用のものの2種類を作製し、特に細胞学的解析用の DNA 修復基質は蛍光タンパク質のバイシストロニック発現ベクターを用いて、その遺伝子上に DNA 損傷を配置することで DNA 修復をモニターできるように設計した。DNA 損傷としては、放射線により生じる活性酸素を想定し、活性酸素で生じる DNA 損傷として、BER 機構で修復する酸化 DNA 損傷 8-オキシグアニンおよび NER 機構で修復するサイクロプリンを用いることとした。

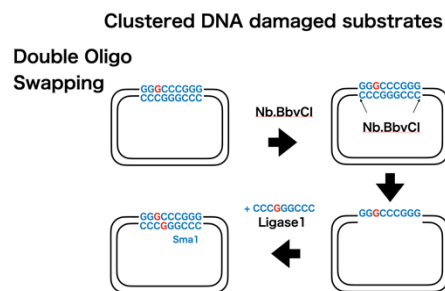
調整されたクラスターDNA 損傷基質を用いて、調整したヒト細胞抽出液を用いて、2本鎖 DNA 切断機構の解析を行う。もしこれらの基質によって DNA 切断が観察されるとすると、クラスターDNA 損傷基質は、アガロースゲル上で特異的な DNA 切断が観察できると予測される。また、8-オキシグアニンに関しては既にオキシグアニン切断酵素 OGG1 がその損傷を切断することが明らかになっているので、これを用いて解析を行った。また、生細胞において DNA 修復が観察できるように設計した。この DNA 修復モニター基質は、クラスターDNA 損傷の修復を観察するものとして、二本鎖切断を観察しうる、最終的には非同末端結合（NHEJ）機構を観察できるものを作成することとした。



4. 研究成果

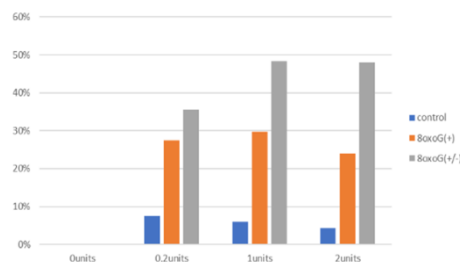
4-1. クラスターDNA 損傷の調整法の確立

私たちが独自に開発した **oligo swapping** 法を応用し、**Double oligo swapping** 法を開発した。これにより、プラスミドのプラス鎖およびマイナス鎖に 8-オキシグアニンを部位特異的に挿入することができ、クラスターDNA 損傷の基質を調整することが可能となった。この方法を用いるとこれまで困難であったクラスターDNA 損傷を解析する、すなわち修復中間産物である DNA 二本鎖切断を観察できることが期待された（右図）。



4-2. 精製タンパク質を用いた損傷解析

まず8-オキシグアニンをクラスターDNA 損傷として有する DNA 基質を用いて、これらの DNA 損傷を切断する BER 酵素との切断反応を観察した。実際には、損傷を有しない DNA 基質（コントロール）、損傷を一つ有するシングル DNA 損傷およびクラスターDNA 損傷を、ヒト OGG1 と反応させ、電気泳動で解析した。その結果、予測通りコントロールではその切断はほとんど観察されなかったが、シングル DNA 損傷においては明らかな DNA 一本鎖切断を観察することができた。しかしながら、クラスターDNA 損傷においては、予測されていた DNA 二本鎖切断を全く観察されなかった。さらに大腸菌において8-オキシグアニンを認識し、切断できるパピールDNA グリコシラーゼを用いたが、こちらの結果も同じものであった。これに加えてウラシル、AP 部位を用いても、それぞれの BER の修復酵素と反応し、同様の解析を行なったが、予測されていた DNA 二本鎖切断を観察することはできなかった。



4-3. 細胞抽出液による解析

精製タンパク質においては、他のタンパク質との相互作用を観察できない可能性を考え、細胞抽出液を用いて解析することにした。この細胞抽出液は、NER 機構解析に使用されており、細胞のすべてのタンパク質を有していると考えられている。そこで我々は HeLa 細胞抽出液を調整し、クラスターDNA 損傷を有する DNA 基質と反応させた。しかしながら、これらの細胞抽出液においても DNA 二本鎖切断を観察することはできなかった。

4-4. 生細胞による解析

そこで我々は、細胞内でクラスターDNA 損傷の解析ができないか検討することにした。クラスターDNA 損傷は最終的には DNA 二本鎖切断し、NHEJ 機構により変異を導入し、修復することが考えられる。そこで我々は NHEJ 機構をモニターできるベクターを作製した。その結果、DNA 二本鎖切断を有している場合のみ、有益に、このベクターによって、生きた細胞で DNA 二本鎖切断の NHEJ 機構の動態を観察できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Endo M, Kim JI, Shioi NA, Iwai S, Kuraoka I.	4. 巻 10
2. 論文標題 Arabidopsis thaliana endonuclease V is a ribonuclease specific for inosine-containing single-stranded RNA.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Open Biol.	6. 最初と最後の頁 210148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsob.210148.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sonohara Y, Takatsuka R, Masutani C, Iwai S, Kuraoka I.	4. 巻 43
2. 論文標題 Acetaldehyde induces NER repairable mutagenic DNA lesions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 52-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgab087.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuruta H, Sonohara Y, Tohashi K, Aoki Shioi N, Iwai S, Kuraoka I.	4. 巻 42
2. 論文標題 Effects of acetaldehyde-induced DNA lesions on DNA metabolism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Environ	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41021-019-0142-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Araujo SJ, Kuraoka I.	4. 巻 9
2. 論文標題 Nucleotide excision repair genes shaping embryonic development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Open Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsob.190166.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Wu J, Samara NL, Kuraoka I, Yang W.	4. 巻 76
2. 論文標題 Evolution of Inosine-Specific Endonuclease V from Bacterial DNase to Eukaryotic RNase.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cell.	6. 最初と最後の頁 44-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.06.046.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 倉岡 功
2. 発表標題 紫外線損傷誘発型のDNA二本鎖切断修復機構のモデル
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉岡 功
2. 発表標題 「オートクチュールな変異データの切り方」(BRCA1&2 データベース解析)
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 四ヶ所 亮輔, 堤 陸, 松原 一樹, 倉岡 功, 塩井(青木)成留実
2. 発表標題 クサリヘビ科およびコブラ科のヘビ毒由来のエンドヌクレアーゼ活性の性質比較
3. 学会等名 日本環境変異原学会 (JEMS) 第49回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松原 一樹 , 倉岡 功
2. 発表標題 T7endonuclease1の損傷特異的 DNA 切断活性
3. 学会等名 日本環境変異原学会 (JEMS) 第49回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉岡 功
2. 発表標題 ヒト細胞におけるエンドヌクレアーゼ V の機能とその役割
3. 学会等名 日本環境変異原学会 (JEMS) 第49回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩井(青木)成留実 , 倉岡 功
2. 発表標題 アルデヒドおよびホルムアルデヒドの生体分子に与える影響
3. 学会等名 日本環境変異原学会 (JEMS) 第49回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	竹立 新人 (Takedachi Arato) (20846505)	福岡大学・理学部・助教 (37111)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	塩井 成留実 (青木成留実) (Shioi Narumi) (50510187)	福岡大学・理学部・助教 (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関