

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04278

研究課題名（和文）損傷塩基が誘発する遠隔作用変異：損傷部位から離れた塩基に生じる変異の生成機構

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

研究代表者

紙谷 浩之（KAMIYA, Hiroyuki）

広島大学・医系科学研究科（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が誘発する遠隔作用変異（DNA損傷から離れた位置に生じる変異）の性質を調べた。その結果、遠隔作用変異は8-hydroxyguanineの上流（5'-側）に生じやすいことと5'-NGA-3'配列（N = A/G/C/T）のGに生じやすいことを見出した。また、遠隔作用変異に対してWRN蛋白質が抑制的に、OGG1とAPOBEC3Bが促進的に作用することを見出した。

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、活性酸素により生ずる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、遠隔作用変異の誘発に8-hydroxyguanineの主要な修復酵素であるOGG1が関与していること（この現象を「OGG1パラドックス」と命名）、及び、癌の変異の主要な原因とされるAPOBEC3と、同じく癌の変異の主要な原因とされる8-hydroxyguanine（酸化的DNA損傷）がリンクしている可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）： We examined properties of action-at-a-distance mutations (untargeted mutations found at positions apart from a DNA lesion) induced by 8-hydroxyguanine. The mutations were found to be predominantly induced on the 5'-side of the lesion and detected at the G bases of 5'-NGA-3' sequence (N = A/G/C/T). Moreover, the WRN protein (the product of the Werner syndrome-responsible gene) seemed to suppress the mutations while OGG1 (the major repair protein for 8-hydroxyguanine) and APOBEC3B (one of the APOBEC-family cytosine deaminases) seemed to enhance the mutations.

研究分野：生物系薬学、分子生物学、DNA損傷学

キーワード：DNA損傷 8-hydroxyguanine 遠隔作用変異 APOBEC3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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、優先異性体は 8-oxo-7,8-dihydroguanine) は、C のみならず A と塩基対を形成することから、8-OH-Gua が生じた部位に主として G:C→T:A 変異を誘発することが広く知られていた。さらに、研究代表者は、Werner 症候群の責任遺伝子産物 WRN 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、(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 (100 塩基以上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。

一方、8-OH-Gua の代わりに、*O*⁶-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。

2. 研究の目的

本研究では、8-OH-Gua による遠隔作用変異の生成機構を明らかとすることを目的とした。また、その一環として、8-OH-Gua の修復時の中間体となる abasic site の化学的に安定な analogue 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

ヒト細胞として 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、OGG1、APOBEC3B、APE1 に対する siRNA を導入した。

supF 遺伝子配列を含む一本鎖環状 DNA を鋳型とし、化学合成した 8-OH-Gua、abasic site analogue 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* 遺伝子近傍の上流/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 RF01 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) 遠隔作用変異が生じている *supF* 遺伝子変異体の効率的選択法の確立

本研究では、レポーター遺伝子として *supF* 遺伝子を用いたが、従来の大腸菌株では、*supF* 遺伝子変異体の選択培地に野生型の遺伝子を持つ菌が生えることを完全には排除できなかった。しかし、新規の大腸菌株 (RF01 株) を作製することにより、遠隔作用変異が生じている *supF* 遺伝子変異体を効率的に選択する方法を確立することに成功した。

(2) DNA 損傷を有するプラスミド DNA の構築法の改良

部位特異的に 8-OH-Gua、abasic site analogue を有するプラスミド DNA 及びその対照プラスミド DNA (損傷位置に G を含む) を構築する際は、一本鎖環状ファージミド DNA を調製し、8-OH-Gua/abasic site analogue/G を含むオリゴデオキシリボヌクレオチドをハイブリダイズさせた後、DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼを用いる。従来は T4 DNA ポリメラーゼと T4 DNA リガーゼを用いていたが、Phusion DNA ポリメラーゼ及び *Taq* DNA リガーゼに変更した。その結果、対照 (G) プラスミドの *supF* 遺伝子変異体率が低下し、遠隔作用変異の検出が容易になった。

(3) 遠隔作用変異の分布

以前の研究により、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ことを見出した。本研究では、遠隔作用変異が 8-OH-Gua の上流 (5'-側) に生じるのか、あるいは、下流 (3'-側) に生じるのかを調べるために、

8-OH-Gua を *supF* 遺伝子近傍の上流と下流に導入し、変異体率への影響を調べた (8-OH-Gua を *supF* 遺伝子のセンス鎖に相当する鎖に導入した)。その結果、8-OH-Gua を *supF* 遺伝子の下流に導入した場合の方が、上流に導入した場合よりも変異体率が高くなることを見出した。したがって、遠隔作用変異は主として 8-OH-Gua の上流 (5'-側) に生じることを明らかにした。

(4) 遠隔作用変異のシグネチャー

以前に、遠隔作用変異は G:C 対 (特に 8-OH-Gua を導入した鎖由来の鎖の G) に多く生じることを明らかにしている。本研究で、遠隔作用変異の隣接塩基を調べたところ、いずれの場合も 5'-NGA-3' 配列 (N=A/G/C/T) に選択的であった。また、この変異シグネチャーに基づくと、遠隔作用変異にはシトシンデアミナーゼ APOBEC3 が関与している可能性が浮上した。

(5) WRN 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

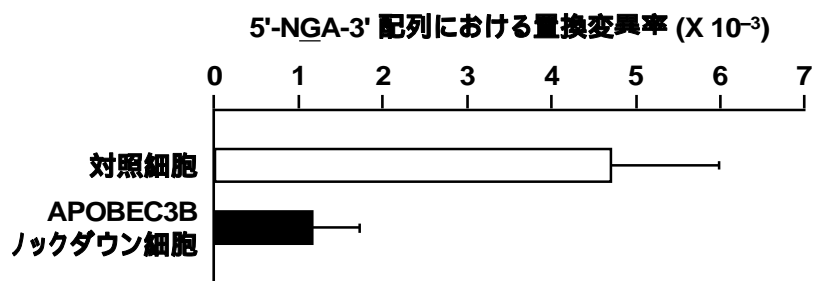
supF 遺伝子下流に 8-OH-Gua を導入したプラスミド (以前の研究では *supF* 遺伝子内部に導入) を対照ヒト U2OS 細胞及び WRN ノックダウン U2OS 細胞にトランスフェクションしたところ、8-OH-Gua によって 5'-NGA-3' 配列の G に遠隔作用変異が誘発され、WRN ノックダウンにより、それが増強されることを明らかにした。

(6) WRN をノックダウンさせたヒト細胞における 8-OH-Gua による遠隔作用変異誘発と DNA 修復酵素 OGG1 との関連

WRN と修復酵素 OGG1 をダブルノックダウンさせた U2OS 細胞における遠隔作用変異を調べたところ、修復酵素をノックダウンしたにも関わらず、遠隔作用変異が減少した。これは、OGG1 が開始する塩基除去修復プロセスが、遠隔作用変異誘発に寄与している可能性を示す結果である。「OGG1 パラドックス」と命名した。

(7) シトシンデアミナーゼをノックダウンさせたヒト細胞における 8-OH-Gua による遠隔作用変異誘発

シトシンデアミナーゼ APOBEC3 の 7 種類の分子種のうち、ヒト U2OS 細胞における発現量を mRNA レベルで調べ、APOBEC3B を標的に設定した。また、APOBEC3B が核に局在していることや多くの腫瘍における変異誘発の原因と推定されていることから、この設定は妥当であると判断した。APOBEC3B に対する特異的 siRNA を設計し、U2OS 細胞に導入した。ノックダウン細胞に 8-OH-Gua を含むプラスミド DNA を導入したところ、遠隔作用変異頻度は大幅に減少した。従って、遠隔作用変異 (5'-NGA-3' 配列中の G における変異) のほとんどを APOBEC3B が誘発していることが明らかとなった。



(8) Abasic site analogue による遠隔作用変異誘発

8-OH-Gua の修復時の中間体となる abasic site の安定な analogue を用い、遠隔作用変異が誘発されるかを詳細に調べた。その結果、8-OH-Gua と同様に、遠隔作用変異が 5'-NGA-3' 配列に生じることを明らかにした。

(9) Abasic site analogue による遠隔作用変異誘発と DNA 修復酵素 APE1 との関係

OGG1 が 8-OH-Gua に作用すると abasic site が中間体として生じ、それに対して DNA 修復酵素 APE1 が作用することにより遠隔作用変異が誘発される可能性がある。そこで、APE1 ノックダウンが abasic site による遠隔作用変異誘発に対する影響を明らかにするため、上記と同様に abasic site analogue を用い、APE1 ノックダウン細胞に導入した。しかし、予想外にも、ノックダウン効果は観察されず、少なくとも abasic site analogue によって 5'-NGA-3' 配列に生じる遠隔作用変異誘発に対し、APE1 の役割は限定的である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suzuki Tetsuya, Zaima Yudai, Fujikawa Yoshihiro, Fukushima Ruriko, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 111
2. 論文標題 Paradoxical role of the major DNA repair protein, OGG1, in action-at-a-distance mutation induction by 8-oxo-7,8-dihydroguanine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103276 ~ 103276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2022.103276	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 Suzuki Tetsuya, Masuda Hiroshi, Mori Madoka, Ito Rikako, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 36
2. 論文標題 Action-at-a-distance mutations at 5'-GpA-3' sites induced by oxidised guanine in WRN-knockdown cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 349 ~ 357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mutage/geab027	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 Takeishi Ayuna, Kogashi Hiroyuki, Odagiri Mizuki, Sasanuma Hiroyuki, Takeda Shunichi, Yasui Manabu, Honma Masamitsu, Suzuki Tetsuya, Kamiya Hiroyuki, Sugasawa Kaoru, Ura Kiyoe, Sassa Akira	4. 巻 15
2. 論文標題 Tyrosyl-DNA phosphodiesterases are involved in mutagenic events at a ribonucleotide embedded into DNA in human cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0244790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0244790	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 Suzuki Tetsuya, Katayama Yuri, Komatsu Yasuo, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 46
2. 論文標題 Similar frequency and signature of untargeted substitutions induced by abasic site analog under reduced human APE1 conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 283 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.46.283	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 Fukushima Ruriko, Suzuki Tetsuya, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 42
2. 論文標題 New indicator Escherichia coli strain for rapid and accurate detection of supF mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-020-00167-x	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 Suzuki Tetsuya, Katayama Yuri, Komatsu Yasuo, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 34
2. 論文標題 Large deletions and untargeted substitutions induced by abasic site analog on leading versus lagging strand templates in human cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 421-429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mutage/gez034	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 Kamiya Hiroyuki	4. 巻 42
2. 論文標題 High-throughput analysis of DNA repair in microplates towards identification of inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-020-00153-3	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 -

〔学会発表〕 計23件(うち招待講演 4件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 鈴木哲矢, 福島瑠里子, 紙谷浩之
2. 発表標題 8-Oxo-7,8-dihydroguanineを起点とした遠隔作用変異誘発におけるAPOBEC3の関与
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 紙谷浩之
2. 発表標題 損傷部位から離れた位置に生じる変異（遠隔作用変異）の発見と人工ヌクレアーゼを用いない遺伝子編集
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第11回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木哲矢，福島瑠里子，紙谷浩之
2. 発表標題 7,8-Dihydro-8-oxoguanineによる遠隔作用変異誘発の方向性
3. 学会等名 第60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
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安井聖晴，鈴木哲矢，紙谷浩之
2. 発表標題 DNA中に取り込まれたriboguanosineによる遠隔作用変異誘発の解析
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉原竜誠，河合秀彦，紙谷浩之
2. 発表標題 NGSと低線量率放射線環境を用いた遠隔作用変異の分子機構解析
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海老駿吾, 河合秀彦, 紙谷浩之
2. 発表標題 NGSと低線量率放射線環境を用いた遠隔作用変異の分子機構解析
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福島瑠里子, 鈴木哲矢, 紙谷浩之
2. 発表標題 8-Oxo-7,8-dihydroguanineにより誘発される遠隔作用変異へのAPOBEC3シトシンデアミナーゼの関与
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木哲矢, 紙谷浩之
2. 発表標題 8-Oxo-7,8-dihydroguanineによる遠隔作用変異誘発におけるCpGメチル化の影響
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤川芳宏, 福島瑠里子, 財間悠大, 鈴木哲矢, 紙谷浩之
2. 発表標題 8-Oxo-7,8-dihydroguanineによる遠隔作用変異誘発へのOGG1とWRNのダブルノックダウンの影響 (第2報)
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 紙谷浩之, 鈴木哲矢
2. 発表標題 WRN-OGG1ダブルノックダウン細胞において8-ヒドロキシグアニンが誘発する遠隔作用変異
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 紙谷浩之
2. 発表標題 遺伝子配列改変・発現減少による変異・修復研究と人工ヌクレアーゼを用いないゲノム編集法の開発
3. 学会等名 令和3年度 日本環境変異原ゲノム学会公開シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 紙谷浩之, 鈴木哲矢
2. 発表標題 8-ヒドロキシグアニンが誘発する遠隔作用変異・長鎖欠失変異へのOGG1ノックダウンの影響
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福島瑠里子, 鈴木哲矢, 紙谷浩之
2. 発表標題 supF遺伝子変異解析における有用な新規大腸菌株の作製
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 財間悠大、鈴木哲矢、河合秀彦、紙谷浩之
2. 発表標題 8-Oxo-7,8-dihydroguanine (8-hydroxyguanine) による遠隔作用変異誘発へのOGG1とWRNのダブルノックダウンの影響
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 益田裕司、鈴木哲矢、紙谷浩之
2. 発表標題 WRN、pol のノックダウンと8-hydroxyguanineによる遠隔作用変異誘発
3. 学会等名 第59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
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田翔吾、鈴木哲矢、河合秀彦、紙谷浩之
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いたsupF遺伝子変異解析系の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福島瑠里子、鈴木哲矢、河合秀彦、紙谷浩之
2. 発表標題 変異シグネチャー解析による8-hydroxyguanineにより誘発される遠隔作用変異誘発機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 紙谷浩之
2. 発表標題 DNA損傷による遠隔作用変異誘発と人工ヌクレアーゼを用いないゲノム編集法の開発
3. 学会等名 日本環境変異原学会 変異機構研究会「第32回夏の学校」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紙谷浩之, 鈴木哲矢
2. 発表標題 DNA複製リーディング鎖およびラギング鎖の脱塩基部位誘発変異への影響
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Suzuki, Y. Katayama, H. Kamiya
2. 発表標題 Abasic site analog in lagging strand template induces mutations more frequently than that in leading strand template
3. 学会等名 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Zaima, T. Suzuki, H. Kamiya
2. 発表標題 OGG1-knockdown increases large deletions but decreases untargeted substitutions induced by 8-oxo-7,8-dihydroguanine
3. 学会等名 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紙谷浩之
2. 発表標題 損傷DNAおよびその前駆体を用いる変異の誘発および抑制機構の解明
3. 学会等名 日本環境変異原学会第48回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島瑠里子, 鈴木哲矢, 河合秀彦, 紙谷浩之
2. 発表標題 supF遺伝子変異解析のための新規大腸菌株の作製
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
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	河合 秀彦 (KAWAI Hidehiko) (30379846)	広島大学・医系科学研究科(薬)・准教授 (15401)	
研究分担者	鈴木 哲矢 (SUZUKI Tetsuya) (20573950)	広島大学・医系科学研究科(薬)・助教 (15401)	
研究分担者	小松 康雄 (KOMATSU Yasuo) (30271670)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・副研究部門長 (82626)	

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
---------	---------