

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5 月 19日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501014

 研究課題名（和文）p53によるDNA修復遺伝子MUTYHの発現制御と細胞死における役割の解明
 研究課題名（英文）Regulation of MUTYH expression by p53 plays a critical role in cell death

研究代表者

岡 素雅子（OKA SUGAKO）

九州大学・生体防御医学研究所・特任助教

研究者番号：80467894

研究成果の概要（和文）：MUTYHは主要な酸化塩基8-オキソグアニンに誤対合するアデニンを除去するDNA修復酵素であり、MUTYH遺伝子の欠損は常染色体劣性遺伝性の大腸腺腫症の原因となることが報告されています。我々はこれまでに、核あるいはミトコンドリアDNAに蓄積した8-オキソグアニンがMUTYHに依存して2つの独立した細胞死を誘導することを報告しています。本研究において、我々はMUTYHの発現が転写因子p53により制御されることを見だし、MUTYH遺伝子上に機能的なp53応答配列部位を同定しました。このことは、MUTYHが酸化ストレス環境下で細胞死を誘導することにより、p53による発がん抑制のメディエータとして機能することを示唆しています。

研究成果の概要（英文）：MUTYH, adenine DNA glycosylase excises adenine inserted opposite 8-oxoguanine (8-oxoG), a major form of spontaneous oxidative DNA damage, and whose deficiency is known to cause MUTYH-associated familial adenomatous polyposis. We have shown that accumulation of 8-oxoG in nuclear and mitochondrial DNA independently triggers two distinct MUTYH-dependent cell death programs. In the present study, we found that expression of MUTYH is regulated by p53 and identified functional p53-binding site in *MUTYH* gene. These results suggest that MUTYH is a potential mediator of p53 tumor suppression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：シグナル伝達と遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

細胞DNAの酸化損傷は突然変異やプログラム細胞死を引き起こし、前者は発がんの、後者は神経変性疾患の原因になると考えられています。我々はこれまでに、核あるいはミ

トコンドリアDNAに主要な酸化塩基8-オキソグアニンが蓄積するとMUTYH酵素による修復過程でDNAが一本鎖切断に切断され、核とミトコンドリアで2つの異なる細胞死が起きることを発見しました。各々の経路はポリ

(ADP-リボース)ポリメラーゼ (PARP)あるいはカルパインに依存しています。MUTYHは8-オキシグアニンに誤対合するアデニンを除去するDNA修復酵素であり、MUTYH遺伝子は、生殖細胞系列にAPC変異をもたない常染色体劣性遺伝性の大腸腺腫症の原因遺伝子として報告されています。以上から、MUTYHは突然変異の抑制のみならず細胞死を誘導することで、障害された細胞を排除して発がんを抑制していると考えられます。

2. 研究の目的

p53は細胞周期や細胞死等のシグナルの転写を制御することにより、がん抑制因子として働いています。本研究では、p53が劣性遺伝性大腸腺腫症の原因遺伝子MUTYHの転写を促進することにより、細胞死を誘導して発がんを抑制するメカニズムを明らかにします。

3. 研究の方法

(1) p53欠損および野生型のヒトがん細胞株を用いて、MUTYHのmRNA、蛋白質レベルの発現を比較します。p53野生型細胞株においてp53を抑制、あるいはp53欠損細胞株にp53を発現することにより、MUTYHのmRNA、蛋白質レベルの発現がどのように変化するかを解析します。

(2) クロマチン免疫沈降およびルシフェラーゼアッセイを用いてMUTYH遺伝子上におけるp53の機能的な応答部位を同定します。

(3) p53がMUTYHの上流で細胞死シグナルを制御する事を明らかにするために、p53野生型細胞株を用いてp53あるいはMUTYH、そしてその両方の抑制が酸化ストレス感受性に及ぼす影響を検討します。ヒトがん細胞株において酸化ストレス下でp53、MUTYH依存性に起きる細胞死が、核あるいはミトコンドリアDNAの酸化障害が引き起こす2つの細胞死経路のいずれによるものかをPARP、カルパイン経路に注目して解析します。

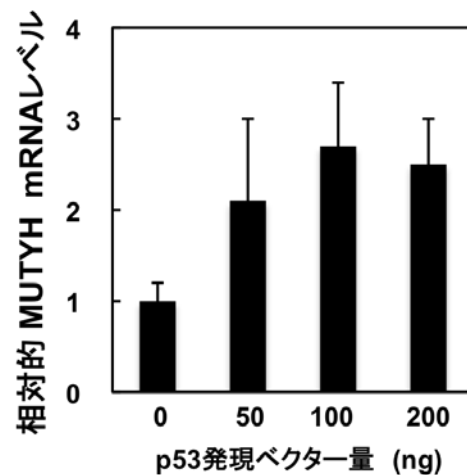
4. 研究成果

(1) p53がmRNA、蛋白質レベルでMUTYH発現を制御することを明らかにしました。

p53野生型のヒト大腸がん細胞株HCT116細胞と比較し、p53欠損のヒト非小細胞肺がん株H1299細胞ではMUTYHのmRNA、蛋白質レベルの発現がともに低下していました。p53欠損H1299細胞にp53発現ベクターを導入すると、ベクター量依存性に著明なMUTYH mRNAレベルの発現上昇が観察されました(図1)。

さらにp53野生型がん細胞株と比較して、様々なp53変異を持つがん細胞株においてMUTYHの蛋白質レベルの発現が低下していることを明らかにしました。

図1 H1299細胞におけるp53発現ベクター導入によるMUTYH mRNAレベルの増加



(2) MUTYH遺伝子上に2カ所の機能性p53応答配列を同定しました。

HCT116細胞はミスマッチ修復酵素MLH1発現が欠損しており、この欠損がp53発現の安定性に影響する可能性が国外の報告から示唆されたために、p53野生型HCT116およびMLH1を発現しているHCT116+Chr3細胞を用いてクロマチン免疫沈降を行いました。MUTYH遺伝子上に5カ所のp53応答配列の候補を同定しました。次に各々の候補p53応答配列を含むプロモーター・レポーター・コンストラクトを作成し、p53欠損H1299細胞あるいは野生型HCT116、HCT116+Chr3細胞に導入、ルシフェラーゼアッセイを用いて配列の機能性を解析しました。結果、2カ所の候補p53応答配列を持つベクターを導入したp53野生型HCT116、HCT116+Chr3細胞において、著明なルシフェラーゼ活性の増加が見られたことから、機能性p53応答配列を同定しました。さらに同定したp53応答配列の一部に変異をもつコンストラクトの導入においてはルシフェラーゼ活性増加が観察されなかったことから、2カ所のp53応答配列の特異性を確認しています。

(3) p53の転写制御によるMUTYH依存性細胞死経路を明らかにしました。

HCT116、HCT116+Chr3細胞を用いてp53阻害剤あるいはMUTYH siRNAが酸化ストレス暴露後の細胞死に及ぼす影響を検討しました。p53あるいはMUTYHの抑制はそれぞれ同程度に細胞死を抑制しますが、p53阻害剤存在下におけるMUTYHノックダウンで細胞死抑制効果は増強されず、各々単独の場合と同程度の効果が観察されました。以上の結果は、酸化ストレス状況下において、MUTYHがp53の制御下で細胞死を誘導することを示唆しています。

次に、我々が報告した核あるいはミトコンドリア DNA に蓄積した酸化障害が引き起こす2つの細胞死経路を、PARP およびカルパインの阻害剤を用いて検討しました。HCT116、HCT116+Chr3 細胞において、PARP 阻害剤のみが酸化ストレス暴露後の細胞死抑制効果を示しました。さらに p53 阻害剤存在下で PARP 阻害剤による細胞死抑制効果の増強が見られなかったことから、p53 は PARP の上流シグナルとして細胞死誘導を制御していることが示唆されます。

以上により、酸化ストレス下のヒト大腸がん細胞株においては、核 DNA の酸化障害が引き起こす PARP 依存性細胞死経路が主に起動されることを明らかにしました。

これまでに代表的な癌抑制遺伝子である p53 遺伝子の変異が、多くのがんで報告されています。我々の(1)-(3)の結果に加え、DNA 中に蓄積した 8-オキソグアニンを切り出す修復酵素 OGG1 もまた、p53 の制御を受けることが報告されています。p53 機能欠損の結果 OGG1 が蛋白質レベルで低下すると DNA 中の酸化障害が除去されずに蓄積します。しかし同時に MUTYH も抑制されるため、障害された細胞は細胞死による排除を受けられず生き残ってしまいます。DNA 酸化障害の蓄積は変異を引き起こし、最終的にがん化を引き起こすと考えられます。

(1)-(3)の結果は現在論文として発表を準備しています。

(4) がん幹細胞における DNA 酸化塩基修復酵素群の役割を解析しています。

様々ながん研究において、治療への抵抗性、がんの転移や再発に重要な役割をもつがん幹細胞に関する研究が進んでいます。がん幹細胞に特異的な性質を見いだすことにより、がん組織に対する効率的な治療と正常組織への副作用軽減に寄与することができます。抗がん剤の作用機序の多くは、酸化ストレスを増加させることによりがん細胞の増殖を抑制、死滅させるものですが、がん幹細胞はこれらの治療に抵抗性を示すことが報告されています。我々はがん幹細胞において、酸化ストレスに対する防御機構である DNA 酸化塩基修復酵素群に注目し研究しています。

ある種の大腸がん細胞株において CD133 はがん幹細胞のマーカーとして用いられています。我々は p53 野生型 HCT116 細胞において、CD133 陰性細胞と比較し、CD133 陽性細胞ではミトコンドリア DNA における 8-オキソグアニン蓄積のレベルが低いことを見いだしました。さらに CD133 陽性細胞では、ミトコンドリア型の OGG1 の発現レベルが高いことを明らかにしました。分裂速度が遅いがん幹細胞においては、あまり複製しない核 DNA よりも複製の盛んなミトコンドリア DNA

中で酸化障害が蓄積しやすいと考えられず、OGG1 はがん幹細胞のミトコンドリア DNA 中における酸化障害を抑制することで、がん幹細胞の生存維持に働いていることが示唆されます。

現在、DNA の材料の供給源であるヌクレオチドプールに蓄積した 8-oxo-dGTP を除去する酵素 MTH1 と MUTYH のミトコンドリアにおける発現を継続して解析しています。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- (1) Sheng Z, Oka S, Tsuchimoto D, Abolhassani N, Nomaru H, Sakumi K, Yamada H, Nakabeppu Y: 8-Oxoguanine causes neurodegeneration during Mutyh-mediated DNA base excision repair. *J Clin Invest*, 122, 12, 4344-4361, 2012 査読有
- (2) Murakami Y, Ikeda Y, Yoshida N, Notomi S, Hisatomi T, Oka S, De Luca G, Yonemitsu Y, Bignami M, Nakabeppu Y, Ishibashi T : MutT Homolog-1 Attenuates Oxidative DNA Damage and Delays Photoreceptor Cell Death in Inherited Retinal Degeneration. *Am J Pathol*. 2012 Oct;181(4):1378-86. 査読有
- (3) S Oka and Y Nakabeppu: A DNA glycosylase encoded by *MUTYH* functions as a molecular switch for programmed cell death under oxidative stress to suppress tumorigenesis. *Cancer Science* 2011.02(4). 677-682. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01869.x 査読有
- (4) Sarah A. Martin, Nuala McCabe, Michelle Mullarkey, Robert Cummins, Darren J. Burgess, Y Nakabeppu, S Oka, Elaine Kay, Christopher J. Lord and Alan Ashworth :DNA Polymerases as Potential Therapeutic Targets for Cancers Deficient in the DNA Mismatch Repair Proteins MSH2 or MLH1 *Cancer Cell*, 17, 235-245, 201. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Sugako Oka, Julio Leon, Daisuke Tsuchimoto, Kunihiro Sakumi, Yusaku Nakabeppu MUTYH is a potential mediator of p53 tumor suppression 第 35 回日本がん疫学分子疫学学会 2012, 7, 5
- (2) Sugako Oka, Julio Leon, Yusaku Nakabeppu: MUTYH is a potential

mediator of p53 tumor suppression 第
34 回日本分子生物学会 2011,12,14 横
浜

- (3) Sugako Oka, Julio Leon, Kunihiko Sakumi, Daisuke Tsuchimoto, Yusaku Nakabeppu: MUTYH is a potential mediator of p53 tumor suppression 日本環境変異原学会第40回大会 (シンポジウム) 2011,11,21 東京
- (4) Sugako Oka, Yusaku Nakabeppu: MUTYH-initiated base excision repair triggers two distinct cell death pathways by monitoring 8-oxoguanine in nuclear and mitochondrial DNAs in nuclear and mitochondrial DNAs Keystone Symposia Stem Cells, Cancer and Metastasis 2011,03,08 Keystone, CO, USA
- (5) 岡素雅子、レオン フリオ、中別府雄作:MUTYH は p53 による発がん抑制のメディエーターである 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 2010,12,09 神戸
- (6) Sugako Oka, Julio Leon, Yusaku Nakabeppu: MUTYH-initiated base excision repair triggers two distinct cell death pathways by monitoring 8-oxoguanine in nuclear and mitochondrial DNAs 国際3R会議 2010,10,27 富山
- (7) Sugako Oka, Yusaku Nakabeppu: MUTYH is a potential mediator of p53 tumor suppression 第69回日本癌学会 2010 9.22 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡素雅子 (OKA SUGAKO)
九州大学・生体防御医学研究所・
特任助教
研究者番号：80467894

(2) 研究分担者

中別府雄作 (NAKABEPPU YUSAKU)
九州大学・生体防御医学研究所・
教授
研究者番号：30180350