

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30日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510060

研究課題名（和文）

ミトコンドリア RNA ポリメラーゼ転写反応における酸化 DNA 損傷の影響

研究課題名（英文）

Effects of DNA lesions on the transcription reaction of mitochondrial RNA polymerase

研究代表者

倉岡 功 (Kuraoka Isao)

大阪大学大学院・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：60335396

研究成果の概要（和文）：

細胞内のエネルギーを生産するミトコンドリアにおいて、その大量な酸素消費から多くの活性酸素が生じ、ミトコンドリア DNA に多くの酸化 DNA 損傷を導くことが容易に想像できる。細胞はこの損傷の多いミトコンドリアにおいてどのように転写反応を進めるのだろうか？

酸化 DNA 損傷を含む DNA テンプレートに対して、プライマー-RNA を対形成させ複合体を形成した後、ミトコンドリア RNA ポリメラーゼにより RNA 合成を観察した。その結果、ミトコンドリア RNA ポリメラーゼは、酸化 DNA 損傷を乗り越えることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Mitochondrial RNA polymerase (mtRNAP) catalyzes the synthesis of essential transcripts in mitochondria where reactive oxidative (ROS) species are generated as byproducts. The occurrence of RNA synthesis by mtRNAP at oxidative DNA lesions remains unknown. Purified mtRNAP and a complex of RNA primer/DNA template containing a single DNA lesion were used for *in vitro* RNA synthesis assays. We show that mtRNAP bypassed the oxidative DNA lesion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：環境解析学

キーワード：ミトコンドリア、RNA ポリメラーゼ、酸化 DNA 損傷

1. 研究開始当初の背景

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 DNA

を維持しなければならない。しかし DNA は放射線、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絶えず損傷を受けている。これらの DNA 損傷は、細胞死や突然変異を誘発し、ひいては老化・がん化等の原因になる。ヒトを含めた全ての生物はこれらの DNA 損傷を修復することのできる多様な DNA 修復機構をもっている。

ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) は、紫外線、化学発がん剤などによって生じる多様な DNA 損傷を除去することのできる重要な DNA 修復機構である。NER に異常をもつヒト遺伝性疾患として、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP)、コケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS) がある。XP 患者は露光部分に皮膚炎症状を示し、正常人の数千倍の頻度で皮膚癌を発症する。CS 患者はがんを発症しないが、種々の精神神経異常、身体発育不全や早期老化症状を呈する。この CS 患者細胞では NER の中でも転写機構とカップリングして DNA 損傷の認識が行われる「転写と共役した NER」(transcription-coupled nucleotide excision repair: TC-NER) を選択的に欠損する。この TC-NER 経路には一つの中心的モデルが存在する。1) RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) が、鋳型領域に生じた DNA 損傷に出会う。2) RNAPII はこの損傷で転写反応を一時停止する。3) RNAPII の停止が一つのシグナルとなってそれぞれの損傷にあった修復蛋白質をリクルートし損傷を修復する。4) また修復できない場合この停止が細胞死のシグナルになるというものである。ただし、これらのシナリオはすべて細胞核で作られたモデルである。

ミトコンドリアがアポトーシス (細胞死) の中心的な役割を行なっていることが知られているにもかかわらず、いまのところミトコンドリアにおいて DNA 修復機構に

関しては幾つか報告があるものの、転写反応における損傷の挙動および転写依存的な DNA 修復に関する報告はない。

2. 研究の目的

ミトコンドリア障害から生じる多くの疾患が報告され、ミトコンドリア代謝は核における生体反応同様に重要性であることが示唆されている。また細胞死という事象についてもミトコンドリアが重要な働きをしていることは十分知られている。にもかかわらずミトコンドリアが DNA 損傷を受けた場合どのような機構が機能しているかはほとんどわかっていない。核において転写機構が修復のシグナルまた細胞死のシグナルとなることを考慮すると、ミトコンドリアの転写反応における酸化 DNA 損傷の影響を調べることは、その分子機構を理解することのみならず、ミトコンドリア病および老化などの研究に大きく貢献できる。それ故「ミトコンドリア RNA ポリメラーゼ転写反応における酸化 DNA 損傷の影響」という研究目的を行った。

3. 研究の方法

ミトコンドリアの RNA ポリメラーゼは、1 2 3 0 アミノ酸からなる単一ポリペプチドとして単離されている。同定された蛋白質の cDNA をクローニングし、その遺伝子産物は組換え蛋白質として昆虫細胞を用いて精製された。RNA ポリメラーゼの転写伸長反応を阻害する DNA 損傷として、酸化 DNA 損傷として 8-オキシグアニン (8-oxoG)、チミングリコール (Tg) および 2-ヒドロキシシアデニン (2-OH A) を用いた。これらの損傷を含むオリゴヌクレオチドを得ており、この損傷オリゴヌクレオチドを部位特異的にもつプラスミド DNA を

作成する。さらに、RNA ポリメラーゼがこのプラスミド DNA を転写伸長反応の基質とプライマーRNA を対形成させ複合体を形成した後、精製したミトコンドリア RNA ポリメラーゼにより RNA 合成を観察した。

4. 研究成果

ミトコンドリア RNA ポリメラーゼは、8-オキソグアニン、チミングリコールを乗り越えることがわかった。さらにそれぞれの損傷において変異の導入はほとんど観察されなかった。一方塩基脱離部位および紫外線損傷により生じるピリミジンダイマー、6-4 光産物においては、ミトコンドリア RNA ポリメラーゼの転写の停止が観察された。

ミトコンドリア RNA ポリメラーゼは生体内で生じる DNA 損傷により対応しているのかもしれない。

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 14 件)

- ①Hashiguchi K, Ozaki M, Kuraoka I, Saitoh H. Establishment of a human cell line stably overexpressing mouse Nip45 and characterization of Nip45 subcellular localization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 430:72-72.
- ②Kamakura N, Yamamoto J, Brooks PJ, Iwai S, Kuraoka I. Effects of 5',8-cyclodeoxyadenosine triphosphates on DNA synthesis. *Chem Res Toxicol.* 2012 25:2718-2724
- ③Sassa A, Kamoshita N, Matsuda T, Ishii Y, Kuraoka I, Nohmi T, Ohta T, Honma M, Yasui M. Miscoding properties of 8-chloro-2'-deoxyguanosine, a hypochlorous acid-induced DNA adduct, catalysed by huma-

n DNA polymerases. *Mutagenesis* 2013 28: 81-88

④Nakanishi N, Fukuoh A, Kang D, Iwai S, Kuraoka I. Effects of DNA lesions on the transcription reaction of mitochondrial RNA polymerase: implications for bypass RNA synthesis on oxidative DNA lesions. *Mutagenesis* 2013 28:117-123

⑤Punchihewa C, Inoue A, Hishiki A, Fujikawa Y, Connelly M, Evison B, Shao Y, Heath R, Kuraoka I, Rodrigues P, Hashimoto H, Kawanishi M, Sato M, Yagi T, Fujii N. Identification of small molecule proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibitor that disrupts interactions with PIP-box proteins and inhibits DNA replication. *J Biol Chem* 2012 287:14289-14300

⑥Tan LJ, Saijo M, Kuraoka I, Narita T, Takahata C, Iwai S, Tanaka K. Xeroderma pigmentosum group F protein binds to Eg5 and is required for proper mitosis: implications for XP-F and XFE. *Genes Cells* 2012 17:173-185.

⑦Kuraoka I. When and Where Polymerases Encounter DNA lesions. *Genes and Environment* 2012 34:58-62

⑧Morita Y, Iwai S, Kuraoka I. A method for detecting genetic toxicity using the RNA synthesis response to DNA damage. *J Toxicol Sci.* 2011 36:515-521.

⑨Horibata K, Saijo M, Bay MN, Lan L, Kuraoka I, Brooks PJ, Honma M, Nohmi T, Yasui A, Tanaka K. Mutant Cockayne syndrome group B protein inhibits repair of DNA topoisomerase I-DNA covalent complex. *Genes Cells* 2011 16:101-114.

⑩Kashiwagi S, Kuraoka I, Fujiwara Y, Hitomi K, Cheng QJ, Fuss, JO, Shin, DS, Ma

sutani C, Tainer, JA, Hanaoka F, Iwai S. Characterization of a Y-family DNA polymerase eta from the eukaryotic thermophile *Alvinella pompejana*. *J.Nucleic Acids* 2010 Article ID 701472

⑪ Ito S, Tan LJ, Andoh D, Narita T, Seki M, Hirano Y, Narita K, Kuraoka I, Hirao Y, Tanaka K. MMXD, a TFIIH-independent XPD-MMS19 protein complex involved in chromosome segregation. *Mol Cell*. 2010 39:632-40.10.

⑫ Hasegawa M, Iwai S, Kuraoka I. A non-isotopic assay uses bromouridine and RNA synthesis to detect DNA damage responses. *Mutat Res*. 2010 699:62-66

⑬ Matsumoto N, Toga T, Hayashi R, Sugawara K, Katayanagi K, Ide H, Kuraoka I, Iwai S. (2010) Fluorescent probes for the analysis of DNA strand scission in base excision repair. *Nucleic Acids Res*. 2010 38:e101

⑭ Chijiwa S, Masutani C, Hanaoka F, Iwai S, Kuraoka I. (2010) Polymerization by DNA polymerase eta is blocked by cis-diamminedichloroplatinum(II) 1,3-d(GpTpG) crosslink: Implications for cytotoxic effects in nucleotide excision repair-negative tumor cells. *Carcinogenesis* 2010 31:388-393

[学会発表] (計9件)

① 倉岡 功, RNA合成阻害を用いた non R I-DNA 損傷検出系、第69回日本癌学会学術総会、2010.9.22, 大阪

② 倉岡 功, A cis-Diamminedichloroplatinum (II) 1,3-d(GpTpG) crosslinks blocks polymerization by DNA polymerase h、第37回国際核酸科学シンポジウム、2010,11,10、横浜

③ 倉岡 功, 損傷 DNA を鋳型にした RNA 伸長反応と変異の分子メカニズム、第39回日本環境変異原学会 (招待講演)、2010.11.16、筑波

④ 倉岡 功, An Assay for Genetic Toxicity using Transcription-Response to Damaged DN

A、2nd Asian Conference on Environmental Mutagens、2010.12.16、Pataya, Thailand

⑤ 森田陽子、岩井成憲、倉岡功、ヒト FLJ 35220 タンパク質の機能解析、日本環境変異原学会第40回大会、2011.11.21、東京

⑥ 倉岡 功, Effects of oxidative DNA lesions on transcription by mitochondria RNA polymerase、第34回大会日本分子生物学会年会(招待講演)、2011.12.14、横浜

⑦ Isao Kuraoka, New function of human endonuclease V, US-JAPAN DNA repair meeting, 2012.4.12, VIRGINIA, USA

⑧ Isao Kuraoka, New function of a structure-specific nuclease human endonuclease V, EMBO workshop Structure-specific nucleases in DNA replication & repair, 2012.9.18, Cote D'Azur, France

⑨ 倉岡 功, ミトコンドリア RNA ポリメラーゼ転写反応における酸化 DNA 損傷の影響、日本放射線影響学会、2012.9.7, 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉岡 功 (KURAOKA ISAO)

大阪大学大学院・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：60335396

(3) 連携研究者

岩井 成憲 (IWAI SHIGENORI)

大阪大学大学院・基礎工学研究科・教授

研究者番号：10168544