

## 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 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510062

研究課題名（和文）チミン酸化損傷 5-ホルミルウラシルに対する生体内修復機構 FO システムの全容解明

研究課題名（英文）Elucidation of in vivo repair system for 5-formyluracil termed as FO system

研究代表者

寺東 宏明（TERATO HIROAKI）

佐賀大学・総合分析実験センター・准教授

研究者番号：00243543

研究成果の概要（和文）：本研究は主要なチミン酸化損傷 5-ホルミルウラシル（5-foU）の生体内修復機構の全容解明を目的として行った。ここで想定する 5-foU 修復システム（FO システム）は①非誤対合性 5-foU の除去修復、②誤対合 5-foU 誘発突然変異の抑制機構、③5-fodUTP 分解によるヌクレオチドプール浄化である。本研究の結果、5-foU 修復機構の全貌解明の端緒が開かれるとともに、関連した損傷分析技術の開発による分析化学的成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on elucidation of repair system for 5-formyluracil (5-foU) as a major thymine oxidative lesion. We here assumed the FO system as an integration of multiple repair pathways for 5-foU including the base excision repair, the mismatch repair, and the nucleotide pool sanitization. The result of this study leads the elucidation of 5-foU repair system and also achieves novel technical advance of analytical chemistry for DNA damage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

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：修復、DNA 損傷、活性酸素

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子の物質的本体であるデオキシリボ核酸（DNA）は、生体内外の様々な傷害因子により不断に損傷を受けている。なかでも、好氣的呼吸の副産物である活性酸素により生じる各種酸化塩基損傷は生成収率が高く、ほ乳類細胞 1 個中に発生する 8-オキシグアニン（8-oxoG）ならびにチミングリコール（Tg）

の収率は生理的条件下で各 2,000 個程度と推定されている（DNA repair and mutagenesis 2nd ed., 2006）。これまでチミンの酸化損傷は、その 5-6 位不飽和結合が飽和した Tg が主要なものであると考えられ、その生物効果と修復機構は多くの検討がなされてきたが（Biochemistry 39: 11389, 2000 他）、近年、チミンの 5 位メチル基が酸化した 5-ホルミルウ

ラシル (5-foU) について、その生成収率の高さが Tg や 8-oxoG に匹敵する主要なチミン酸化損傷であることが遅れて分かってきた (J Radiat Res 38: 121, 1998)。私は 5-foU の特異的損傷基質を作製し、その生物効果を生化学的に検討した結果、その高い誤対合性と (J Biol Chem 276: 16501, 2001)、二次的付加損傷転換能を明らかにした (Nucleosides Nucleotides 17: 131, 1998)。さらに、修復については、原核生物の修復酵素が 3-メチルアデニン DNA グリコシラーゼ II (AlkA) であること (J Biol Chem 274: 25136, 1999 他)、ほ乳類の週ふき酵素が一本鎖特異的ウラシル DNA グリコシラーゼ 1 (SMUG1) であることを報告した (Biochemistry 42: 4993, 2003 他)。

この研究過程で、5-foU の誤対合性が求電子的 5 位ホルミル基の導入によるピリミジン環のイオン化平衡の変化に由来することを提案したが (J Biol Chem 276: 16501, 2001)、同様の観点で、求電子的なハロゲンによる 5 位置換ウラシル損傷に対する修復活性の検討が行われ、SMUG1 に続いて、チミン DNA グリコシラーゼ (TDG)、メチルシトシン結合タンパク 4 (MBD4) などの除去活性が明らかとなってきた (DNA Repair 2: 199, 2003 他)。同時に、これらの酵素が 5-foU に対する活性を示すことも報告され、5-foU 修復機構に関わる因子が続々と明らかにされつつある。しかし、これら複数の修復活性が生体内でどのように有機的に関連しているかはよく分かっておらず、特にその突然変異抑制機構については不明な点が多く残されており、5-foU の修復システムの全貌解明にはほど遠い状況である。

## 2. 研究の目的

主要な酸化塩基損傷である 5-foU の生体内修復機構を解明するため、8-oxoG に対する GO システムと同様な 5-foU に対する FO システムが存在すると想定し、そのロストピースの発見と既知関連因子との相互関係を解析することにより、生体内 5-foU 修復システムの全貌を明らかにする。よく知られている GO システムは、①非誤対合性 8-oxoG の除去 (Fpg/OGG1)、②誤対合 8-oxoG 誘発突然変異の抑制 (MutY/MYH)、③ヌクレオチドプール中に生じた 8-oxodGTP の分解による DNA 挿入抑制 (MutT/MTH) の 3 経路に類別される (括弧内は対応する酵素：原核生物/真核生物)。一方、ここで提案する FO システムでは、①非誤対合性 5-foU の除去 (AlkA/SMUG1, TDG, MBD4)、②誤対合 5-foU 誘発突然変異の抑制 (MutSLH/?), ③5-fodUTP の分解 (?/? ) であり、? の部分が未だ明らかとなっていないロストピースである。また、真核生物においては、報告されている各酵素の比活性や役割分担につ

いていくつか疑問が残っている。例えば、SMUG1 と TDG の 5-foU 除去活性には変異抑制的な対合塩基特異性が認められず、唯一変異抑制的活性をもつ MBD4 のみにミスマッチ修復酵素 MLH1 との相互関係が報告されている (PNAS 96: 3969, 1999 他)。また、その誤対合 5-foU 修復への関与が明らかでないことなどがある。さらに、TDG の関与から原核生物のホモログであるミスマッチウラシル DNA グリコシラーゼ (Mug) が、原核生物の①に関与する可能性が考えられるが、このこともまた明らかとはなっていない。そこで、本研究では 3 年間の研究期間内において、(1) DNA 中に取り込まれた 5-foU 除去修復酵素活性の比較検討による分担機構の解明、(2) DNA 中に取り込まれた 5-foU が誘発する突然変異を抑制するタンパク因子の解明、(3) ヌクレオチドプール中に生じた 5-fodUTP の浄化に関わる酵素の解明、を行い、5-foU の生体内修復機構の全貌を明らかにする

## 3. 研究の方法

生体内 5-foU 修復機構の全貌解明のため、DNA 中の 5-foU 除去修復機構、5-foU 誘発突然変異の抑制機構、ならびにヌクレオチドプール中の 5-fodUTP 浄化機構それぞれについて、これまでに報告されている 5-foU 修復関連タンパク質を使った酵素化学的検討と、それらの遺伝子を欠損あるいはその発現抑制を行った細胞株の感受性ならびに突然変異生成解析を行い、それぞれの因子の 5-foU 修復における役割を明らかにする。さらに、これらの遺伝子をそれぞれセットで制御した場合の変化を解析し、各因子の相互作用を解明することにより、原核生物ならびにほ乳類 FO システムの全貌を明らかにする。原核生物については大腸菌を、ほ乳類についてはヒトをモデル生物として検討を行っていく。

(1) の項目については、TDG ホモログであるが 5-foU 除去修復活性が報告されていない Mug の除去活性について検討する。Mug タンパク質を遺伝子クローニングと大腸菌大量発現系を用いて調製し、5-foU 特異的含有オリゴヌクレオチド基質を用いたニッキングアッセイ系にてその活性を検討する。また AlkA, Mug 両遺伝子産物の細胞内機能を明らかにするため、それぞれの単独欠損株および二重欠損株に対する 5-foU 投与実験ならびに電離放射線照射実験を行い、感受性を検討する。ヒト DNA グリコシラーゼについては、SMUG1, TDG, MBD4, UDG2 の 5-foU 活性を、5-foU 特異的基質を使ったニッキングアッセイ系で比較検討する。未入手である TDG, MBD4 タンパク質はヒト cDNA ライブラリーより遺伝子クローニングを行い調製する。

(2) の項目については、大腸菌ミスマッチ修復タンパク複合体 MutSLH を構成する全ての

サブユニットについて遺伝子クローニングを行い、その精製タンパク質を得て、5-foU 特異的含有 DNA 基質に対する切断活性アッセイを行い、その関与を明らかにする。また *alkA/mutS* 二重欠損株を作成し、5-foU 投与実験および電離放射線照射実験を行い、*rifampicin* 耐性株の出現頻度ならびに導入 pUC19 プラスミドの  $\alpha$ -コンプリメント変異のスペクトル解析により、原核生物における 5-foU 誘発突然変異に対する抑制機構を解明する。ヒト DNA グリコシラーゼに関しても、大腸菌系と同様に、ミスマッチ修復との相互作用が報告されていない SMUG1、TDG について、ヒトミスマッチ修復タンパク質 MLH1 との相互関係を活性阻害実験と免疫共沈実験によって検討する。

(3)の項目については、ヒト cDNA ライブラリーより dUTPase の遺伝子クローニングを行い、精製タンパク質を得て、その fodUTPase 活性を解析する。基質は  $^{14}\text{C}$  ラベル化 fodUTP を原報をもとに作製し (Nucleic Acids Res. 25: 1570, 1995)、反応生成物を TLC 展開し、それをホスホロイメージング解析する。

#### 4. 研究成果

(1)の項目については、*AlkA*、*Mug*、*SMUG1*、*TDG*、*MBD4* の各精製タンパク質の 5-foU 含有オリゴヌクレオチド基質に対するニックング活性を比較検討し、大腸菌ならびにヒトにおける 5-foU 除去修復における各修復酵素の機能分担に関する情報を得た。

(2)の項目については、*AlkA*、*Mug*、*SMUG1*、*TDG*、*MBD4* と *MutS*、*MLH1* の共存条件下における活性検討により、5-foU の誤対合変異性抑制機構に関する情報を得た。

(1)、(2)の項目の結果に関しては、現在、論文作成中である。また、関連して、これら除去修復遺伝子欠損細胞における DNA 中の 5-foU 動態の高感度分析は、極めて重要な実験技術である。私たちは、アルデヒド反応性プローブ (ARP) と塩基除去修復酵素 (特異的 DNA-グリコシラーゼ) を組み合わせた塩基損傷分析法を提案してきたが (J Radiat Res 45: 229-237, 2004; *ibid* 49: 133-146, 2008)、この方法を本研究に応用するため、*AlkA* を用いた 5-foU 分析法の検討を行った。その結果、DNA-グリコシラーゼとして *AlkA* を用いることにより DNA 中の 5-foU の分析が可能であること、また検出手順の改良により、これまでの  $10^{-6}\text{bp}$  レベルの検出感度を 10 倍高い  $10^{-7}\text{bp}$  レベルまで向上させることに成功した。これは ARP 法をベースとした市販検出キットの 100 倍の検出感度である。

(3)の項目に関しては、5-fodUTP 分解活性試験の基質となる放射性ラベル 5-fodUTP の調製を、5 位メチル基を  $^3\text{H}$  ラベルした  $^3\text{H}$ -dTTP を出発物質に過硫酸カリウムを用いた酸化

反応により行い、 $^3\text{H}$  ラベル 5-fodUTP を得た。反応生成物を HPLC 分析し、5-fodUTP であることを確認できたが、 $^3\text{H}$  ラベル量が予想以上に低く、ラベル量変動の時間経過の観察により、 $^3\text{H}$  が溶媒の水分子の H と交換反応を起こしていることが示唆された。このことは 5-foU の変異性が、5 位メチル基の水和性のチミンとの差異に影響されている可能性を示唆するものである。先の結果を踏まえ、実際に利用できる基質を調整するため、2 位炭素を  $^{14}\text{C}$  でラベルした  $^{14}\text{C}$ -dTTP を出発物質に、上記の反応で  $^{14}\text{C}$  ラベル 5-fodUTP を得た。この基質を用いて、ラット肝臓粗抽出物の 5-fodUTP 分解活性を TLC で検討し、5-fodUTPase 活性の存在を確認した。

#### 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 2 件)

- ① 猪原哲, 山口将太, 金子憂樹, 寺東宏明、パルスパワー印加における球根の発芽率とグルコース濃度の変化、電気学会論文誌 A、査読有、133 巻, 2 号, 2013、pp.64-65
- ② Terato H, Suzuki K, Nishioka N, Okamoto A, Shimazaki-Tokuyama Y, Inoue, Y and Saito T, Characterization and Radio-Resistant Function of Manganese Superoxide Dismutase of *Rubrobacter radiotolerans*, J Radiat Res, 52, 2011, pp.735-742, DOI: 10.1269/jrr.11105 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 市場正良、宮崎博喜、松本明子、大田裕介、久保田玲奈、友清仁美、松尾裕康、山本忍、志岐朋恵、唐喜順、近藤敏弘、寺東宏明、上野大介、学校教室内の空気環境とその対策 (3)、第 6 回室内環境学会九州支部研究発表会、2013.1.25、福岡市
- ② 寺東宏明、島崎-徳山由佳、井上侑子、森加奈恵、井出博、古澤佳也、重粒子線照射細胞中に生じるクラスター DNA 損傷の定量的分析、第 26 回日本宇宙生物科学会学術集会、2012.9.27-28、徳島市
- ③ 寺東宏明、島崎-徳山由佳、井上侑子、工藤健一、井出博、古澤佳也、重粒子線誘発クラスター DNA 損傷の細胞内生成収率と生物効果の解明、第 55 回日本放射線影響学会大会、2012.9.6-8、仙台市
- ④ Hiroaki TERATO, Yuka SHIMAZAKI-TOKUYAMA, Yuko INOUE, Yoshiya FURUSAWA. Quantitative analysis of chromosomal clustered DNA damage in cultured cells irradiated by heavy particle beams, 12th International Workshop on Radiation Damage to DNA, 2012.6.2-7,

Prague, Czech Republic

- ⑤ 井上明子、上野大介、近藤敏弘、寺東宏明、岡島俊哉、石崎妃呂美、壹岐聡一朗、市場正良、学校教室内の空気環境測定とその対策. 第 81 回日本衛生学会、2012.3.26、東京都
- ⑥ 寺東宏明、徳山由佳、井上侑子、鈴木克之、齊藤毅、*Rubrobacter radiotolerans* の放射線抵抗性におけるスーパーオキシドディスムターゼの関与、第 46 回京都大学原子炉実験所学術講演会、2012.2.2-3、大阪府熊取町
- ⑦ 島崎-徳山由佳、井上侑子、古澤佳也、井出博、寺東宏明、重粒子線によって発生する細胞内 DNA 損傷生成収率の解析、第 54 回日本放射線影響学会大会、2011.11.17-19、神戸市
- ⑧ 寺東宏明、徳山由佳、井上侑子、平山亮一、古澤佳也、井出博、重粒子放射線によって生じる DNA 損傷収率の線質依存性、第 44 回日本保健物理学会研究発表会、2011.10.17-18、水戸市
- ⑨ 寺東宏明、重粒子線の生物研究への応用 II 重粒子線で生じる遺伝子損傷の正体は？、第 48 回アイソトープ・放射線研究発表会、2011.7.6-8 東京都
- ⑩ Shimazaki-Tokuyama Y, Inoue Y, Hirayama R, Furusawa Y, Ide H, Terato H, Yields of clustered DNA damage induced by heavy particle beams under various conditions, 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2010.11.10-12, Yokohama
- ⑪ 中野敏彰、川添淳也、大内綾、寺東宏明、飯島健太、田内広、井出博、DNA-タンパク質クロスリンク損傷の修復機構、第 53 回日本放射線影響学会大会、2010.10.20-22、京都市
- ⑫ 寺東宏明、島崎-徳山由佳、井上侑子、齊藤剛、西岡伸紘、岡本敦志、鈴木克之、放射性耐性細菌 *Rubrobacter radiotolerans* のスーパーオキシドディスムターゼの遺伝子構造と遺伝子産物の機能、第 53 回日本放射線影響学会大会 2010.10.20-22、京都市
- ⑬ 寺東宏明、徳山由佳、井上侑子、近藤敏弘、放射性耐性細菌 *Rubrobacter radiotolerans* のスーパーオキシドディスムターゼの機能と遺伝子構造、第 34 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2010.9.9-11、宗像市
- ⑭ 寺東宏明、島崎-徳山由佳、井上侑子、平山亮一、古澤佳也、井出博、粒子線によって生じるクラスターDNA 損傷の収

率と性質、第 24 回日本宇宙生物科学学会大会、2010.9.17-18、仙台市

- ⑮ 近藤敏弘、上野大介、寺東宏明、岡島俊哉、石崎妃呂美、井上明子、上野裕之、甲斐今日子、西條泰明、市場正良、学校教室内の空気環境と児童の自覚症状との関係、第 80 回日本衛生学会、2010.5.10、仙台市

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kiki.med.saga-u.ac.jp/research/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺東 宏明 (TERATO HIROAKI)  
佐賀大学・総合分析実験センター・准教授  
研究者番号：00243543

### (2) 研究分担者

近藤 敏弘 (KONDO TOSHIHIRO)  
佐賀大学・総合分析実験センター・教務員  
研究者番号：20186852

徳山 由佳 (TOKUYAMA YUKA)  
佐賀大学・総合分析実験センター・教務員  
研究者番号：30398135

### (3) 連携研究者

なし