

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24年5月30日現在

機関番号：14303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750154

研究課題名（和文） 変異原性核酸認識モチーフの開発と遺伝子の網羅的解析への応用

研究課題名（英文） Development of the recognition motif of DNA oxidation and its application to comprehensive analysis of DNA mutation.

研究代表者

小堀 哲生 (KOBORI AKIO)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：00397605

研究成果の概要（和文）：

様々な要因によりDNA配列中に蓄積されていく突然変異は、癌や生物個体の加齢の原因となることが報告されている。そのため、突然変異発生のメカニズムの解明、及び抑制方法に関する研究は極めて重要な課題である。そこで我々は、「DNA突然変異の要因である変異原性核酸の特異的認識モチーフの開発及びその応用」を本課題の目的として研究を行った。

研究成果の概要（英文）：

This project was consisted of two major parts.

Part 1: To elucidate the effects of 8-oxo-7,8-dihydroguanine on nucleotide diversity, we constructed of 8-oxoG motif using small organic molecules. Part 2: Probing the requirements for catalysis in 8-oxoG repair enzymes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：核酸合成化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：酸化損傷塩基、DNA、変異原性

1. 研究開始当初の背景

核酸塩基は、活性酸素種や、排気ガスやタバコの煙に含まれる化学物質、放射線、紫外

線、また自らの細胞中で産生された代謝産物など、様々な変異原と反応することにより、変異原性核酸へと変化する。この変異原性核

酸は、細胞の複製段階において生物の設計図である DNA 配列を変化させるため、生物個体に重大な影響をもたらすと考えられている。変異原性核酸のうち 8-オキシグアノシン (8oxoG) は、国内・海外の様々な研究機関によって最も広範囲に研究されている変異原性核酸であり、その生成は疾病、特に癌に深く関係があることが報告されている。また最近では、人間の寿命と遺伝子の突然変異の蓄積量とが深く関係していることも報告されており、その原因である変異原性核酸の生成に関する網羅的研究の必要性が強くうたわれている。しかしながら、DNA 二重鎖中で生成する変異原性核酸を測定する方法は、ほとんど報告されていない。唯一の報告は蛍光抗体染色法を使用した 8oxoG を認識する方法であるが、変異を加えた抗体自体を入手することが困難であり汎用性に欠ける方法である。DNA 二重鎖中ではなく、尿中の 8oxoG を定量する方法はいくつか報告されているが、この方法では突然変異遺伝子の網羅的解析や、遺伝子治療への応用は期待できない。また、DNA 鎖中に存在する 8oxoG 以外の変異原性核酸については、定量法自体が確立していないためまだほとんど手付かずの状態である。そこで我々は、変異原性核酸の生成様式を明らかにし、遺伝子変異や疾患との関りを解析するために、遺伝子中に生じた変異原性核酸を DNA 二重鎖のままの状態に網羅的に解析する技術を提案する。また、変異原性核酸に関する様々な研究に応用するために、酵素や抗体に頼らない安価で安定的に供給することのできる変異原性核酸認識システムの開発を行う。

2. 研究の目的

様々な要因により DNA 配列中に蓄積されてい

く突然変異は、癌や生物個体の加齢の原因となることが報告されている。そのため、突然変異発生のメカニズムの解明、及び抑制方法に関する研究は極めて重要な課題である。そこで我々は、「DNA 突然変異の要因である変異原性核酸の特異的認識モチーフの開発及びその応用」を本課題の目的とする。この認識モチーフは、変異原性核酸の網羅的解析を可能にするだけでなく、抗がん剤開発にも応用することができ、人類の QOL の向上に多大な貢献ができる。

3. 研究の方法

本課題は、以下に示す三本の柱から構成されている。

●変異原性核酸認識モチーフの構築

第一段階として、最も高頻度で遺伝子中に存在する変異原性核酸である 8oxoG の認識モチーフの構築を行い、我々の提案している変異原性核酸認識モチーフの有用性を示す。第二段階として、2-ヒドロキシアデノシン (20HA)、5-ヒドロキシシチジン (50HC) の認識モチーフの構築を行い、変異原性核酸認識モチーフの汎用性を示す。

●染色体上の変異原性核酸 (8oxoG) のマッピング

本研究期間においては、変異原性核酸の中で最重要である 8oxoG について取り扱う。まず、蛍光修飾した 8oxoG 認識分子による単一細胞レベルでの 8oxoG イメージング法を確立する。次に、複数のボランティアから採取した細胞を用いて染色体上の 8oxoG のマッピングを行い、染色体上に 8oxoG がどのような分布をしているかを定量化する。さらに、最新のゲノムデータベースと比較することにより、突然変異や一塩基多型の分布と 8oxoG の生成にどのような相関があるかを明らかにする。

●変異原性核酸修復

本研究期間においては、変異原性核酸の中で最重要である 8oxoG について取り扱う。変異原性核酸認識分子に、様々な機能性分子を共有結合を介して結合させることにより、二重鎖中の変異原性核酸を選択的に除去することのできる人工酵素の開発を行う。

4. 研究成果

様々な要因によりDNA配列中に蓄積されていく突然変異は、癌や生物個体の加齢の原因となることが報告されている。そのため、突然変異発生のメカニズムの解明、及び抑制方法に関する研究は極めて重要な課題である。そこで我々は、「DNA突然変異の要因である変異原性核酸の特異的認識モチーフの開発及びその応用」を本課題の目的とするして研究を行った。本研究期間では、変異原性核酸の中で最も出現頻度の高い8-オキソグアニン(8oxoG)を標的核酸として、二種類の実験を行った。

最初の実験では、8oxoGを認識する有機小分子を網羅的に探索するために、8oxoGを鎖中に含むDNA二重鎖を金膜上に固定化したSPRセンサーチップを数種類作成し、センサー表面に結合する有機小分子のスクリーニングを行った。8oxoGを一塩基バルジ構造中に含むDNA二重鎖を固定化したSPRセンサーチップを用いて、スクリーニングを行った結果、2,6-ジアミノピリジン誘導体がグアニン塩基と8-オキソグアニン塩基を効率よく識別することを見出した。

二番目の実験では、酵素が8-オキソデオキシグアノシンを認識する際の認識モチーフを調べることを目標として実験を行った。この研究は、カリフォルニア大学デービス校の

David 教授のグループ、スタンフォード大学の Kool 教授のグループと我々のグループの共同研究により行われた。様々な8-オキソデオキシグアノシンミミックを用いて、酵素の認識に必要な部位の同定を行ったところ、人のもつ8-オキソデオキシグアノシン切断酵素と、大腸菌のもつ8-オキソデオキシグアノシン切断酵素では、ことなつたモチーフで8-オキソデオキシグアノシンを認識していることを明らかとした。また、8oxoGの正確な認識には、水素結合部位を認識するだけでなく、塩基を上下から挟み込むように認識することも重要であることが明らかとなった。

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4件)

1. P. L. McKibbin, A. Kobori, Y. Taniguchi, E. T. Kool, S. S. David

Surprising Repair Activities of Nonpolar Analogs of 8-oxoG Expose Features of Recognition and Catalysis by Base Excision Repair Glycosylases.

Journal of The American Chemical Society, 2012, 134, 1653-1661.

DOI: 10.1021/ja208510m 査読有

2. Waki R., Yamayoshi A., Kobori A., Murakami A.

Development of a system to sensitively and specifically visualize-fos mRNA in living cells using bispyrene-modified RNA probes.

Chemical Communications, 2011, 47, 4204-4206.

DOI: 10.1039/c0cc04639f 査読有

3. Waki R., Yamayoshi A., Kobori A., Murakami A.

Real-time Imaging of RNA Expression in Living Cells Using Bispyrene-modified RNA Probes.

Chemistry letters, 2011, 40, 1247-1248.

<http://dx.doi.org/10.1246/cl.2011.1247>

査読有

4. Higuchi M., Yamayoshi A., Kato K., Kobori A., Wake N., Murakami A.

Specific regulation of point-mutated K-ras-immortalized cell proliferation by a photo-dynamic antisense strategy.

Oligonucleotides, 2010, 20, 37-44.

doi:10.1089/oli.2008.0173 査読有

[学会発表] (計 25 件)

1. 日本化学会第92春季年会、発表：松山洋平
RISC機能の制御を目指した光架橋性アンチ
センス核酸の設計指針

2012年3月27日、慶應義塾大学（横浜市）

2. 日本化学会第92春季年会、発表：小堀哲生
M位にソラレン誘導体を導入したデオキシシ
チジンを含む新規光応答性核酸の合成とそ
の機能評価

2012年3月27日、慶應義塾大学（横浜市）

3. 日本化学会第92春季年会、発表：小堀哲生
2-フェニルフランを導入したDNAオリゴマー
によるエテノシトシン形成反応の開発と一
塩基多型診断への応用

2012年3月27日、慶應義塾大学（横浜市）

4. 第34回日本分子生物学会年会、発表：松山

洋平；RISC機能の制御を目指した光架橋性ア
ンチセンス核酸の設計指針

2011年12月16日、パシフィコ横浜

5. 第5回バイオ関連化学シンポジウム、発表：
小堀哲生；光分解性保護基を導入した架橋性
核酸の開発と機能評価

2011年9月13日、つくば国際会議場（茨城
県）

6. 38th ISNAC、発表：R. Waki ;Whole mount
in situ hybridization detection of mRNAs
in the *Drosophila* embryos using
bispyrene-conjugated RNA probes

2011年9月9日、北海道大学

7. Sixth Cambridge Symposium on Nucleic
Acids Chemistry and Biology、発表：A.

Yamayoshi; Development of novel
peptide-oligonucleotide conjugates for
regulation of small RNA function

September 5, 2011、Queen's
college(Cambridge、UK)

8. アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポ
ジウム 2011、発表：小堀哲生；核酸塩基部
にソラレン誘導体を有する新規光架橋性ア
ンチセンス核酸の合成と架橋特性の評価

2011年9月1日、大阪大学（大阪府吹田市）

9. アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポ
ジウム 2011、発表：小堀哲生；光分解性保護
基を導入した機能性核酸の架橋特性の評価

2011年9月1日、大阪大学（大阪府吹田市）

10. アンチセンス・遺伝子・デリバリーシン
ポジウム 2011、発表：脇玲子；蛍光標識 RNA
プローブを用いた生細胞内 RNA の発現プロフ

アイリング

2011年9月1日、大阪大学（大阪府吹田市）

11. アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011、発表：松山洋平；RISC機能の制御を目指した光架橋性アンチセンス核酸の開発、発表：小堀哲生

2011年9月1日、大阪大学（大阪府吹田市）

12. 第40回医用高分子シンポジウム、発表：山吉麻子；ユビキチンリガーゼ活性を利用した病因タンパク質の新規細胞内分解システムの開発

2011年7月26日、関西大学（大阪府吹田市）

13. 第21回バイオ・高分子シンポジウム、発表：松山洋平；機能性核酸を用いたRISC機能の光制御

2011年7月25日、関西大学（大阪府吹田市）

14. 第21回バイオ・高分子シンポジウム、発表：小堀哲生；光応答性核酸を用いた相補鎖捕捉反応の開発

2011年7月25日、関西大学（大阪府吹田市）

15. 第57回高分子研究発表会、発表：小堀哲生；光分解性保護基により活性を制御できる機能性核酸の合成と架橋特性の評価

2011年7月15日、兵庫県民会館（兵庫県神戸市）

16. 第57回高分子研究発表会、発表：小堀哲生；ロメフロキサシンを導入したオリゴ核酸合成と、相補鎖酸化反応への応用

2011年7月15日、兵庫県民会館（兵庫県神戸市）

17. 日本ケミカルバイオロジー学会、発表：

小堀哲生；4-フルオロインドール誘導体を用いたDNA修復酵素の基質認識特性の解明

2011年5月23-25日、東京工業大学大岡山（東京）

18. International roundtable on nucleosides, nucleotides and nucleic acids. 、発表：A. Kobori；Interstrand photo-crosslinking using psoralen-incorporated oligodeoxyribonucleotides
2010年8月29日、France

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cis.kit.ac.jp/~antisen/seijo.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小堀 哲生 (KOBORI AKIO)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：00397605

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：