

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 8 月 23 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790378

研究課題名（和文）

塩基除去修復酵素の変異型の発がんへの関与とエテノアダクトに対する修復活性の検討

研究課題名（英文）

The investigation of the association between variants of the base excision repair (BER) enzymes and carcinogenesis, and the repair activities of BER enzymes against etheno-DNA adducts

研究代表者

後藤 正憲 (GOTO MASANORI)

浜松医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号：00432203

研究成果の概要（和文）：

我々はヒト MUTYH の組み換えタンパク質において高い純度での精製分離に成功し、14 種の変異型タンパク質と野生型タンパク質の修復活性を比較した。いくつかの変異型タンパク質はかなりの活性低下を示したため、MUTYH 関連ポリポーシス発症に寄与していると考えられる。

また、新たな塩基除去修復酵素の基質を検索するため、8 つの酵素を準備し、過酸化脂質由来の DNA 付加体、エテノアダクトを含むオリゴヌクレオチドに対する修復活性を調べた。結果、塩基除去修復酵素 TDG がシトシンあるいはグアニンのエテノアダクトと対合したチミンを除去することを新たに見つけた。

研究成果の概要（英文）：

We successfully prepared highly homogeneous human MUTYH recombinant protein, and compared the repair activity of 14 variant proteins with that of the wild-type protein. Several variant proteins showed striking low activity, and their variants may contribute to the development of MUTYH-associated polyposis.

To search new substrate of base excision repair enzymes, we prepared 8 enzymes, and examined the repair activity against an oligonucleotide containing etheno-DNA adducts, a lipid peroxidation-derived DNA adducts. The base excision repair enzyme, TDG, had activity that is capable of removing thymine mispaired with etheno-DNA adduct of cytosine or guanine.

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	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3100,000	930,000	4030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：8-ヒドロキシグアニン・MUTYH・エテノアダクト・塩基除去修復遺伝子・大腸がん・活性酸素種・過酸化脂質

1. 研究開始当初の背景

活性酸素や過酸化脂質は DNA と結合し、突然変異を誘発することから、様々な臓器においてがんの発症に関与していると考えられる。

酸化した DNA のひとつである 8-ヒドロキシグアニン (8-OHG) はアデニンと結合するため、複製の過程で突然変異を引き起こす。塩基除去修復酵素 OGG1 と MUTYH はそれぞれ 8-OHG とそれと対合したアデニンを DNA 中から除去する働きをもっている。MUTYH の遺伝的変異は大腸でポリポーシスを引き起こし、家族性大腸腺腫症の原因となることが知られているが、報告されている多くの MUTYH 変異型タンパク質の除去活性の検討は十分に行われていない。

また、過酸化脂質は DNA と結合し、DNA 付加体、エテノアダクトを生成する。エテノアダクトであるエテノシトシン (εC) やエテノアデニン (εA) は主に塩基除去修復酵素 TDG と MPG がそれぞれを認識し、除去することが知られている。近年、これらのエテノアダクト以外にもヘプタノエテノシトシン (HeC)、ヘプタノエテノグアニン (HeG)、プタノエテノシトシン (BeC)、プタノエテノグアニン (BeG) のような付加体がヒト組織中で確認されたが、これらのアダクトに対する修復機構はまだよくわかっていない。

2. 研究の目的

活性酸素により損傷を受けたグアニンである 8-OHG や過酸化脂質により生成されるエテノアダクトは突然変異を引き起こすことから、発がんの原因のひとつであると考えられる。本研究は、まだ明らかになっていない塩基除去修復機構と発がんの関連を明確にすることを目的とし、以下の研究を行った。

(1) 家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である MUTYH で、修復活性が検討されていない変異型タンパク質を評価し、発がんとの関与を明らかにする。(2) いくつかのエテノアダクトは塩基除去修復酵素の働きにより除去されることから、塩基除去修復遺伝子はエテノアダクトの損傷塩基に対し重要な役割を担っているものと考えられる。しかし、まだ多くのエテノアダクトはその修復機構が明らかになっていない。そこで、まだ明らかになっていないエテノアダクトと塩基除去修復酵素の関連について調べる。

3. 研究の方法

(1) 変異型 MUTYH タンパク質の修復活性を明らかにするために、以下の実験を行った。①野生型と 14 種の変異型 MUTYH の組み換えタンパク質を発現及び精製し、8-OHG と不対合を形成したアデニンの修復活性を測定し、修復活性が低下している変異型タンパク質を明らかにした。②FLAG タグを含む野生型および変異型 MUTYH の哺乳類発現ベクターを作製し、ヒト細胞株の中で発現させることで変異型 MUTYH タンパク質の局在を調べた。(2) 塩基除去修復酵素のエテノアダクトに対する修復活性を調べるため、以下の実験を行った。①8 種類の人塩基除去修復酵素 OGG1、MUTYH、NTH1、NEIL1、SMUG1、UNG、MPG、TDG の組み換えタンパク質を準備し、DNA グリコシラーゼアッセイにより、εA、εC、HeC、HeG、BeC、BeG を含むオリゴヌクレオチドの修復活性の有無を調べる。②新たな修復活性がみられた遺伝子について発現状態が異なった培養細胞株を準備し、DNA 付加体蓄積量や変異誘発率の違いを比較する。

4. 研究成果

(1) 我々は塩基除去修復酵素 MUTYH2 型(核局在型)の組み換えタンパク質において高い純度での精製分離に成功した。そこで、14 種の変異型タンパク質と野生型タンパク質の修復活性について比較を行った。その結果、野生型に比べ変異型 p.I195V、p.G368D、p.M255V、p.Y151C は弱い、あるいは中程度の活性の低下を示し、p.R154H、p.L360P、p.377L、p.452delE、p.R69X、p.Q310X はネガティブコントロール p.D208N と同様に劇的な活性の低下を示した(表 1)。これらの結果は正確な MUTYH 関連ポリポーシスの評価や MUTYH の修復機構を知る上で有用なものと

表1: 野生型と14種の変異型MUTYHタンパク質の8-ヒドロキシグアニンと対合したアデニンに対する除去修復活性の比較

MUTYH type 2 protein	Type of mutation	Fluorescence in situ hybridization (FISH) per 10 ⁴ cells	Relative % incision
WT		4365, 3647, 3654	100
p.I208N	negative control	2973, 1314, 1393	extremely severely defective
p.Y47E	c.149T>A, missense	1012, 1293, 1914	120.145.20
p.Y151C	c.452A>C, missense	5485, 4779, 2835	45.90.21
p.R154H	c.A61C>A, missense	394, 1581, 2109	extremely severely defective
p.I195V	c.583A>C, missense	1733, 1187, 671	66.910.35
p.M255V	c.763A>C, missense	2446, 1714, 2483	10.790.47
p.R311C	c.941C>T, missense	912, 934, 447	103.013.39
p.A345V	c.1034C>T, missense	2544, 2435, 3064	103.945.43
p.L360P	c.1079C>T, missense	157, 383, 120	extremely severely defective
p.G368D	c.1183C>A, missense	2484, 1244, 2279	15.210.71
p.R377L	c.1190C>T, missense	385, 424, 420	extremely severely defective
p.A520E	c.1353_1355delGGA, frameshift deletion	812, 434, 364	extremely severely defective
p.S407F	c.1446C>T, missense	1099, 954, 794	102.012.31
p.R49X	c.205C>T, missense	429, 5245, 429	extremely severely defective
p.Q310X	c.918C>T, missense	918, 5724, 2771	extremely severely defective

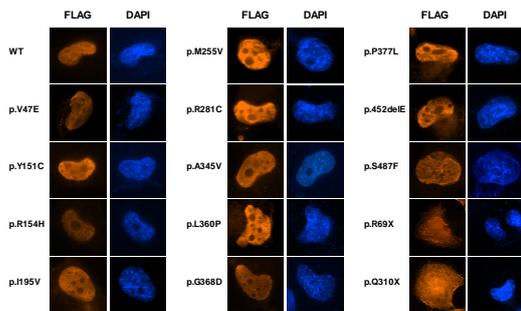


図1: 変異型MUTYH type2 タンパク質の細胞内局在

考えられる (Hum Mutat, 31: E1861-74, 2010)。また我々はこれらの変異型MUTYHタンパク質の局在への影響を調べるため、免疫蛍光染色を行った(図1)。核局在シグナルが欠損している p.R69X と p.Q310X は細胞全体に局在を示し、その他の変異型は野生型と同様に核への局在を示した。(2) 過酸化脂質により生成される DNA 付加体、エテノアダクトの修復機構を明らかにするため、我々は8種のヒト塩基除去修復酵素、OGG1、MUTYH、NTH1、NEIL1、SMUG1、UNG2、MPG、TDG の組み替えタンパク質を準備し、εA、εC、HeC、HeG、BeC、BeG を含むオリゴヌクレオチドの修復活性を調べた。その結果、これまでに報告されている通り、MPG が DNA 中から εA を除去し、SMUG1 と TDG が εC を除去した。さらに、TDG の新たな修復機能として εC、HeC、HeG、BeC、BeG とチミンが不対合を形成した際、チミンを DNA 中から除去する働きをもつことを見つけた(図2)。現在 TDG ノックダウン細胞株とモック細胞株を用いて、上記の付加体を生成するクロロアセトアルデヒド、4-オキシノネナール、4-オキシヘキサナールで処理し、LC-MS/MS を用いて各付加体蓄積量の測定を行っている。

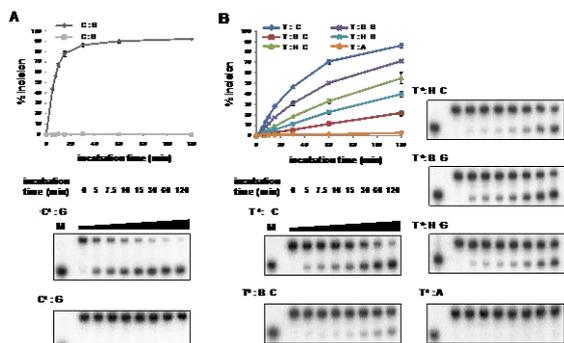


図2: 塩基除去修復酵素TDGによるエテノアダクトを含むオリゴヌクレオチドの修復活性

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 8 件)

1. Matsuda T, Tao H, Goto M, Yamada H, Suzuki M, Wu Y, Xiao N, He Q, Guo W, Cai Z, Kurabe N, Ishino K, Matsushima Y, Shinmura K, Konno H, Maekawa M, Wang Y, Sugimura H: Lipid peroxidation-induced DNA adducts in human gastric mucosa. *Carcinogenesis* 査読有 34: 121-127, 2012. DOI: 10.1093/carcin/bgs327.
2. Shinmura K, Goto M, Tao H, Matsuura S, Matsuda T, Sugimura H: Impaired suppressive activities of human MUTYH variant proteins against oxidative mutagenesis. *World J Gastroenterol* 査読有 18: 6935-6942, 2012. DOI: 10.3748/wjg.v18.i47.6935.
3. Shinmura K, Goto M, Suzuki M, Tao H, Yamada H, Igarashi H, Matsuura S, Maeda M, Konno H, Matsuda T, Sugimura H: Reduced expression of MUTYH with suppressive activity against mutations caused by 8-hydroxyguanine is a novel predictor of a poor prognosis in human gastric cancer. *J Pathol* 査読有 225: 414-423, 2011. DOI: 10.1002/path.2953.
4. Yamada H, Shinmura K, Ito H, Kasami M, Sasaki N, Shima H, Ikeda M, Tao H, Goto M, Ozawa T, Tsuneyoshi T, Tanioka F, Sugimura H: Germline alterations in the CDH1 gene in familial gastric cancer in the Japanese population. *Cancer Sci* 査読有 102: 1782-1788, 2011. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02038.x.
5. Sugimura H, Tao H, Suzuki M, Mori H, Tsuboi M, Matsuura S, Goto M, Shinmura K, Ozawa T, Tanioka F, Sato N, Matsushima Y, Kageyama S, Funai K, Chou PH, Matsuda T: Genetic susceptibility to lung cancer. *Front Biosci (Schol Ed)* 査読有 1: 1463-1477, 2011. DOI: 10.2741/237
6. Shinmura K, Igarashi H, Goto M, Tao H, Yamada H, Matsuura S, Tajima M, Matsuda T, Yamane A, Funai K, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Sugimura H: Aberrant expression and mutation-inducing activity of AID in human lung cancer. *Ann Surg Oncol* 査読有 18: 2084-2092, 2011. DOI: 10.1245/s10434-011-1568-8.
7. Goto M, Shinmura K, Tao H, Tsugane S, Sugimura H: Three novel *NEIL1* promoter polymorphisms in gastric cancer patients. *World J Gastrointest Oncol* 査読有 2: 117-120, 2010. DOI: 10.4251/wjgo.v2.i2.117.
8. Goto M, Shinmura K, Nakabeppu Y, Tao H, Yamada H, Tsuneyoshi T, Sugimura H: Adenine DNA glycosylase activity of 14 human MutY homolog (MUTYH) variant

proteins found in patients with colorectal polyposis and cancer. *Hum Mutat* 査読有 31: E1861-1874, 2010. DOI: 10.1002/humu.21363.

〔学会発表〕 (計 9 件)

1. Yamada H, Shinmura K, Ito H, Kasami H, Sasaki N, Shima H, Tao H, Goto M, Du C, Tsuneyoshi T, Tanioka F, Sugimura H: Germline alterations of the CDH1 gene in familial gastric cancer in the Japanese population. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Sep 19-21, 2012 Sapporo
2. 新村和也、後藤正憲、梶村春彦. 胃癌における MUTYH の 8-hydroxyguanine 誘発変異抑制活性とその発現レベルの予後予測に関する検討. 第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会 2012 年 6 月 7-8 日 徳島
3. 新村和也、後藤正憲、鈴木雅也、陶弘、山田英孝、五十嵐久喜、松浦駿、前田松喜、今野弘之、松田知成、梶村春彦. 胃癌における MUTYH の 8-hydroxyguanine 誘発変異抑制活性とその発現レベルの予後予測に関する検討. 第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月 26-28 日 東京
4. Goto M, Shinmura K, Nakabeppu Y, Tao H, Yamada H, Tsuneyoshi T, Sugimura H: The activity and localization of 14 MUTYH variant proteins found in patients with colorectal polyposis and cancer. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oct 3-5, 2011 Nagoya
5. Shinmura K, Igarashi H, Goto M, Tao H, Yamada H, Matsuura S, Matsuda T, Ogawa H, Sugimura H: Aberrant expression and mutation-inducing activity of AID in human lung cancer. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oct 3-5, 2011 Nagoya
6. 後藤正憲、新村和也、中別府雄作、陶弘、山田英孝、常吉俊宏、梶村春彦. 大腸ポリポーシスと大腸がんの患者で見つかった 14 種の MUTYH 変異型タンパク質の活性と局在の評価. がん予防大会 2011 (第 18 回日本がん予防学会、第 34 回日本がん疫学分子疫学研究会) 2011 年 6 月 20-21 京都
7. 新村和也、五十嵐久喜、後藤正憲、陶弘、山田英孝、松浦駿、小川博、梶村春彦. ヒト肺癌における脱アミノ化酵素 AID の異常発現と変異誘導能. 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 28-30 日 横浜
8. Yamada H, Shinmura K, Mori H, Goto M, Iwaizumi M, Konno H, Kataoka H, Yamada

M, Ozawa T, Tsuneyoshi T, Tanioka F, Sugimura H: Absence of germline mono-allelic promoter hypermethylation of the CDH1 gene in gastric cancer patients. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Sep 22-24, 2010 Osaka

9. Goto M, Shinmura K, Konno H, Sugimura H: Altered expression and the missense polymorphism of the human base excision repair gene NTH1 in gastric cancer. 101th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Apr. 17-Apr. 21, 2010 Washington, DC.

〔図書〕 (計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)
なし

○取得状況 (計 0 件)
なし

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 正憲 (GOTO MASANORI)
浜松医科大学・医学部・特別研究員
研究者番号: 00432203

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし