

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780286
 研究課題名（和文） AP エンドヌクレアーゼを介したミトコンドリア DNA 修復はがん病態に寄与するか？
 研究課題名（英文） Is mitochondrial DNA repair mediated by AP endonuclease involved in the pathophysiology of cancer?
 研究代表者
 山盛 徹 (YAMAMORI TOHRU)
 北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
 研究者番号：00512675

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア DNA 修復に重要であることが予想されるミトコンドリア型 AP エンドヌクレアーゼ (mtAPE) の実体と機能を明らかにすることを目的に本研究を行った。本研究では、AP endonuclease 1 (APE1) の局在を検討し、ミトコンドリアに APE1 は局在しないことが明らかとなった。また、酵素活性試験の結果、ミトコンドリア分画においてわずかな AP エンドヌクレアーゼ活性と明瞭な AP リアーゼ活性が検出された。さらに、この AP リアーゼのは分子量 30-40kD 程度のタンパク質であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial AP endonuclease (mtAPE), which is unidentified at present, is assumed to be important for mitochondrial DNA repair. This study was aimed to elucidate the identity and function of mtAPE. In this study, we examined the subcellular localization of AP endonuclease 1, which is one of mtAPE candidates, and observed no APE1 distribution in pure mitochondrial fraction. The enzymatic activity tests revealed that there was some AP endonuclease activity and substantial AP lyase activity in pure mitochondrial fraction. Furthermore, we also found that the molecular weight of this AP lyase was between 30 and 40 kD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学／基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ミトコンドリア、DNA 修復、AP エンドヌクレアーゼ、がん

1. 研究開始当初の背景

ペットとして飼育されている犬や猫において、がんは人と同様、その死因の大きな部分を占めている。がんは加齢による罹患リスクの上昇が極めて大きい疾患であり、犬におけるがんの平均罹患率は 5 歳で約 5% であるのに対し、10 歳では約 15% と 3 倍に上昇する。一方、近年ペットの長寿化は著しく、その寿命は約 10 年で大幅に伸びている。このペットの長寿化の流れは、飼養管理状態の改善が進んでいる現状を考えるとますます加速することが予測される。このことは、今後

さらにがん罹患するペットが増加し、これまで以上に獣医療におけるがんの重要性が高まるものと見込まれることから、がんの発生および病態を制御する因子の解明は獣医学的に重要な課題である。

加齢によりミトコンドリアに由来する活性酸素種 (ROS) 産生は増大し、それに伴ってミトコンドリア DNA (mtDNA) 損傷も増加することが知られている。この加齢に伴う mtDNA 損傷が、糖尿病、神経変性疾患、心不全等のさまざまな加齢性疾患の発症に寄与していることが現在明らかにされつつある。加齢性

疾患の一つであるがんについても、がん組織で ROS 産生と mtDNA 損傷が増加することが報告され、がん細胞の生存と増殖を亢進するなど、がん病態との関連が示唆されているものの、その繋がりについてはいまだ解明されていない。

2. 研究の目的

核 DNA に対する損傷と同様に、細胞は mtDNA の損傷を修復する機構を持つ。ROS による傷害を受けた核 DNA は、“塩基除去修復”と呼ばれるメカニズムにより損傷が修復される。mtDNA 損傷が主に ROS によるものであることから、mtDNA 修復では塩基除去修復が主要な役割を果たしていると推察される。現在のところ、ミトコンドリアにおいて塩基除去修復が機能していることは明らかであるものの、その詳細について未解明の問題が数多く存在する。その一つとして、塩基除去修復過程に不可欠な酵素の一つである AP エンドヌクレアーゼについては、ミトコンドリア抽出液中でその酵素活性が検出されているものの、その実体は現在でも未確定であり、本分野の研究を妨げる一因となっていることが挙げられる。そこで申請者は、『ミトコンドリア型 AP エンドヌクレアーゼ (mtAPE) を介した mtDNA 損傷の修復が、がん病態に影響を与える』という仮説を立て、本研究によりこの検証を行う。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリアにおける核型 AP エンドヌクレアーゼの局在の検討

5~10 週齢の SD ラットから肝臓を採取した後、組織片を Potter 型ホモジナイザーにて処理することにより肝ホモジネートを得た。ここから常法の遠心分画法により、細胞質および粗ミトコンドリア分画を得た。さらに高純度のミトコンドリアを得るため、Percoll を用いた比重遠心法により純ミトコンドリア分画と mitochondria-associated membrane (MAM) 分画とに分離し、それぞれの分画を回収した。得られた各分画からウエスタンブロット用のサンプルを調製し、抗 APE1 抗体 (Santa Cruz) を用いたウエスタンブロットを行うことにより、各分画における APE1 の分布を解析した。

(2) ミトコンドリア分画における AP 部位切断酵素活性の評価

酵素活性測定試験の基質として使用するため、5' 端から 7 番目の位置にウラシルを含む 30 塩基のオリゴヌクレオチドならびにそれに相補的なオリゴヌクレオチドを合成、アニーリングを行い二本鎖オリゴヌクレオチドを調製した。ウラシルを含むオリゴヌクレオチドは、予めその 5' 端を

carboxyfluorescein (FAM) で蛍光標識した。酵素活性測定試験に際しては、まず、調製したオリゴヌクレオチドを *E. coli* Uracil-DNA Glycosylase (UDG) と反応させることにより、ウラシルを加水分解し脱塩基部位 (AP 部位) を作出した。この反応液に対し、組換え APE1、Endonuclease III (Nth)、Endonuclease VIII あるいはミトコンドリア抽出液を加えた後一定時間反応させた。反応後、反応液をアクリルアミド/尿素/TBE ゲルにて電気泳動し、ゲル中の標識オリゴヌクレオチドに由来する蛍光を画像解析システム Typhoon FLA 9500 (GE) を用いて検出した。AP エンドヌクレアーゼ活性を測定する際の反応は、50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 1 mM DTT, pH 7.9 の条件で行い、AP リアーゼ活性の測定は、20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8 の条件で行った。

(3) 未知ミトコンドリア AP リアーゼの同定

未知ミトコンドリア AP リアーゼの同定のため、NaBH₄ トラッピング法を利用した。具体的には、(2) で記載した UDG 処理した蛍光標識二本鎖オリゴヌクレオチドとミトコンドリア抽出液を混合し、一定時間反応後に 50 mM NaBH₄ を加えることで AP 部位に結合したタンパク質を共有結合させ、タンパク質-DNA 複合体を形成させた。この複合体を含む反応液を 1 次元あるいは 2 次元電気泳動に供し、ゲル中のタンパク質-DNA 複合体に由来する蛍光を画像解析システム Typhoon FLA 9500 を用いて検出した。さらに、解析後のゲルを銀染色によって染色し、得られたタンパク質のスポットのパターンと蛍光解析の結果を比較した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアにおける核型 AP エンドヌクレアーゼの局在の検討

AP エンドヌクレアーゼ活性を持つ酵素は細胞内に複数存在するものの、これまでの研究により核内 AP エンドヌクレアーゼ活性は 90% 以上が AP endonuclease1 (APE1) と呼ばれる酵素に由来するものであるが明らかになっている。これを受けて、申請者は mtAPE の第一の候補はミトコンドリアに移動した APE1 タンパク質であると考え、この仮説について検証を行った。具体的には、ラット肝臓からミトコンドリアを単離し、このミトコンドリア分画において APE1 が検出可能かどうかをウエスタンブロット法により検討した。この際、ミトコンドリア単離法を改良し、以前から一般的に用いられている遠心分画法に加え Percoll を用いた比重遠心法を行うことにより、ミトコンドリア分画とミトコンドリアに結合した小胞体膜である

mitochondria-associated membrane (MAM) 分画とに分けることに成功し、これまでより高純度のミトコンドリア分画を得ることが可能となった。分画後の各フラクションにおける APE1 の分布をウエスタンブロット法により検出した結果、肝ホモジネート、細胞質、粗ミトコンドリア分画には APE1 の存在が確認されたものの、純ミトコンドリア分画では検出されなかった (図 1)。この結果から、粗ミトコンドリア分画で検出された APE1 は、MAM 分画すなわち小胞体に存在する APE1 を検出したものであり、ミトコンドリア自体には APE1 は存在していないことが示唆された。これは、ミトコンドリアにおける APE1 の存在を示唆したこれまでの報告とは異なる新規の知見となった。

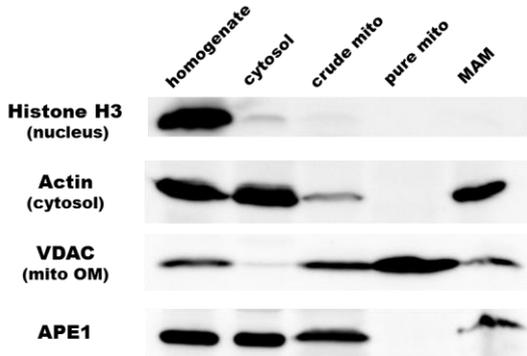


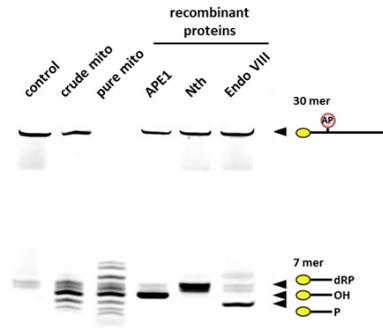
図1: ラット肝臓における APE1 の局在

(2) ミトコンドリア分画における AP 部位切断酵素活性の評価

次に、上記によってミトコンドリア分画中に AP エンドヌクレアーゼ活性が存在するかどうかについて、*in vitro* での AP 部位切断試験を行った。その結果、粗ミトコンドリア分画と純ミトコンドリア分画の双方で AP エンドヌクレアーゼ活性が認められた (図 2)。この際、他の酵素 (エキソヌクレアーゼ) の混入のため目的サイズの DNA 断片以外の DNA 断片も検出されたが、少なくとも AP エンドヌクレアーゼ活性が両ミトコンドリア分画に存在することは確認できた。また、ここで見られた AP エンドヌクレアーゼ活性が粗ミトコンドリア分画と純ミトコンドリア分画ではほぼ同程度であった一方で、(1) では粗ミトコンドリア分画と純ミトコンドリア分画に存在する APE1 レベルは約 55 倍の差があった。このことは、ミトコンドリア内に AP エンドヌクレアーゼは存在するものの、それは

APE1 以外の酵素であることを示唆していると考えられた。さらに、AP 部位の 3' 側を切断する酵素である AP リアーゼのミトコンドリア分画中の活性について検討を行ったところ、両分画において明瞭な \cdot elimination 反応による AP リアーゼ活性が検出され、ミトコンドリアに局在する AP リアーゼの存在が示唆された (図 2)。その活性は粗ミトコンドリア分画に比べ純ミトコンドリア分画では顕著に減弱していた。これは、ミトコンドリア精製過程における酵素量の減弱によるものと考えられた。

AP エンドヌクレアーゼ活性



AP リアーゼ活性

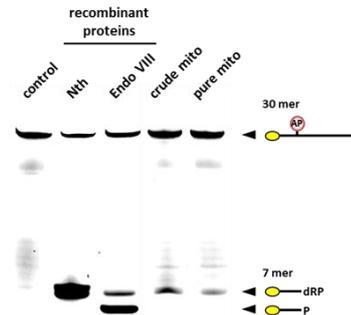
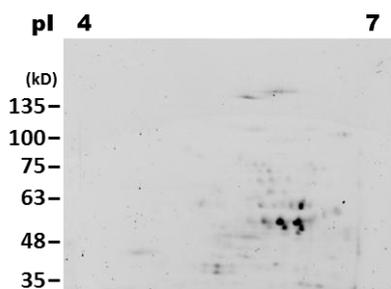


図2: 各ミトコンドリア分画における AP 部位切断酵素活性

(3) 未知ミトコンドリア AP リアーゼの同定

上記において検出されたミトコンドリア AP リアーゼの実体を明らかにするため、 NaBH_4 トラッピング法を用いて本 AP リアーゼを基質 DNA に共有結合させ、このタンパク質-DNA 複合体について一次元/二次元電気泳動を用いて検出を試みた。その結果、本 AP リアーゼは分子量 30-40kD のタンパク質であることが見出され (図 3)、そのタンパク質は銀染色で検出可能であった。現在、質量分析法を用いて本酵素の同定を進めている。

- NaBH₄



+ NaBH₄

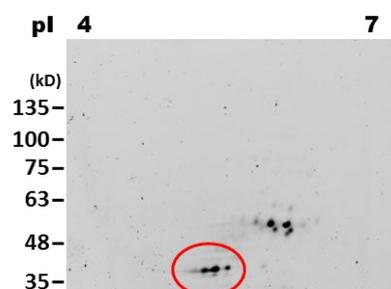


図3: NaBH₄トラッピング法を用いたタンパク質-DNA複合体の検出

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6件)

1. Yasui H, Asanuma T, Kino J, Yamamori T, Meike S, Nagane M, Kubota N, Kuwabara M, Inanami O. The prospective application of a hypoxic radiosensitizer, doranidazole to rat intracranial glioblastoma with blood brain barrier disruption. *BMC Cancer* 2013;13:106. (査読あり)
2. Eitaki M, Yamamori T, Meike S, Yasui H, Inanami O. Vincristine Enhances Amoeboid-like Motility via GEF-H1/RhoA/ROCK/Myosin Light Chain Signaling in MKN45 Cells. *BMC Cancer* 2012;12:469. (査読あり)

<http://hdl.handle.net/2115/50942>

3. Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, Inanami O. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic Biol Med* 2012;53(2):260-70. (査読あり)
<http://hdl.handle.net/2115/49902>
 4. Meike S, Yamamori T, Yasui H, Eitaki M, Matsuda A, Morimatsu M, Fukushima M, Yamasaki Y, Inanami O. A nucleoside anticancer drug, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (TAS106), sensitizes cells to radiation by suppressing BRCA2 expression. *Mol Cancer* 2011;10(1):92. (査読あり)
<http://hdl.handle.net/2115/46978>
 5. Meike S, Yamamori T, Yasui H, Eitaki M, Matsuda A, Inanami O. 8-Aminoadenosine Enhances Radiation-induced Cell Death in Human Lung Carcinoma A549 Cells. *J Radiat Res (Tokyo)* 2011;52(4):456-63. (査読あり)
<http://hdl.handle.net/2115/46979>
 6. Yamanaka K, Saito Y, Yamamori T, Urano Y, Noguchi N. 24(S)-hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *J Biol Chem* 2011;286(28):24666-73. (査読あり)
- [学会発表] (計38件)
1. 山盛徹、笹川朋哉、永根大幹、永瀧正人、中村吉就、安井博宣、稲波修 放射線照射

による細胞内ミトコンドリア含量の変動を引き起こすメカニズムの解析 日本ミトコンドリア学会第12回年会 2012年12月20日 筑波大学(茨城県)

2. Tohru Yamamori, Hironobu Yasui, Masayuki Yamazumi, Yusuke Wada, Hideo Nakamura, Osamu Inanami Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. The 16th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research 2012年9月6日 Imperial College London (United Kingdom)
3. 山盛徹、稲田桂、女池俊介、永瀧正人、安井博宣、稲波修 ミトコンドリアに由来する酸化ストレス傷害に対するリジン脱アセチル化酵素の寄与とその役割 第65回日本酸化ストレス学会学術集会 2012年6月8日 あわぎんホール徳島県郷土文化会館(徳島県)
4. 山盛徹、安井博宣、稲波修 放射線により引き起こされるミトコンドリア由来ROS産生のメカニズム 日本放射線影響学会第54回大会 2011年11月17日 神戸商工会議所会館(兵庫県)
5. 山盛徹、松下明子、女池俊介、永瀧正人、安井博宣、稲波修 p66shcはHSP72との相互作用を介して細胞の放射線感受性を調節する 第84回日本生化学会 2011年9月24日 国立京都国際会館(京都府)
6. 山盛徹、松下明子、女池俊介、永瀧正人、安井博宣、稲波修 p66shc CH2ドメインを介したタンパク質相互作用が細胞の放射線感受性に与える影響 第152回日本

獣医学会学術集会 2011年9月20日 大阪府大中百舌鳥キャンパス(大阪府)

7. Tohru Yamamori, Hironobu Yasui, Masayuki Yamazumi, Yoshinari Nakamura, Hideo Nakamura, Osamu Inanami Ionizing radiation stimulates mitochondrial electron transport chain activity and increases mitochondrial content. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia 2011年9月2日 鹿児島県市民文化ホール(鹿児島県)
8. 山盛徹、安井博宣、山住雅之、中村吉就、中村秀夫、桑原幹典、稲波修 X線照射により引き起こされるミトコンドリア由来活性酸素種生成メカニズムの解析 第64回日本酸化ストレス学会学術集会 2011年7月2日 ルスツリゾートホテル&コンベンション(北海道)

[図書](計0件)

[産業財産権]

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山盛 徹 (YAMAMORI TOHRU)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号: 00512675