

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550032

研究課題名(和文) DNA損傷による遠隔作用変異：新規な遺伝子変異誘発機構の解明

研究課題名(英文) Action-at-a-distance mutations induced by 8-oxoguanine

研究代表者

紙谷 浩之 (Kamiya, Hiroyuki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号：10204629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：WRN及びDNA pol β ノックダウンの8-oxo-dGTP誘発変異への影響：WRN及びDNA pol β が、8-oxo-dGTPが誘発する変異に対しては促進的に作用することを明らかとした。

WRNとDNA pol β のダブルノックダウン：WRNとDNA pol β のシングルノックダウン及びダブルノックダウンを行うと、いずれの場合も対照細胞に比較して、変異誘発能の上昇が観察された。遠隔作用変異に関しては、ダブルノックダウン細胞とWRNノックダウン細胞が同程度であったことから、WRNとDNA pol β が遠隔作用変異を抑制する同一経路上にある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Effects of WRN- and DNA pol β -knockdowns on mutations induced by 8-oxo-dGTP: It was suggested that WRN and DNA pol β promote mutations induced by 8-oxo-dGTP in the nucleotide pool.

Double knockdown of WRN and DNA pol β : The frequency of mutations induced by 8-oxoG was increased when WRN and/or DNA pol β were knocked-down. Action-at-a-distance mutations were induced in similar levels in the double- and single-knockdown cells, suggesting that the two proteins might be located in the same pathway that suppresses the action-at-a-distance mutations.

研究分野：DNA損傷

キーワード：DNA損傷 8-oxoG 遠隔作用変異

1. 研究開始当初の背景

癌易罹患性早老症の1種である Werner(ウエルナーまたはワーナー)症候群の原因遺伝子は、DNA ヘリカーゼの1種である WRN をコードしている。研究代表者は、この WRN をノックダウンしたヒト細胞に、代表的な酸化損傷塩基である 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-hydroxyguanine, 8-oxoG):C 塩基対を1箇所に含む複製型プラスミド DNA を導入すると、8-oxoG に特徴的な G T 変異が誘発されるだけでなく、非標的部位の G:C 塩基対にも塩基置換変異が誘発されるのを見出した(遠隔作用変異の誘発)。また、損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ(pol)の1種である DNA pol λ をノックダウンしたヒト細胞においても同様に 8-oxoG:C 対により、遠隔作用変異が誘発されるという結果が得られた。

2. 研究の目的

遠隔作用変異の機序は不明であるが、従来には知られていなかった新規な変異機構であると推定された。WRN ノックダウン、DNA pol λ ノックダウンの両者が遠隔作用変異を誘発した実験的事実は、この両者が同一経路で遠隔作用変異を抑制している可能性を示唆する。そこで、WRN と DNA pol λ のダブルノックダウンを行い、遠隔作用変異への影響を調べる。また、WRN と DNA pol λ の相互作用が予想されたので、8-oxoG:A 対による変異誘発に対する WRN ノックダウン、DNA pol λ ノックダウンの影響を調べ、類似の影響が観察されるかを調べる。

3. 研究の方法

8-oxoG を含むオリゴデオキシリボヌクレオチド(*supF* 遺伝子の一部の配列を有する)を *supF* 遺伝子を含む環状一本鎖 DNA にハイブリダイズさせた後に、T4 DNA ポリメラーゼと T4 DNA リガーゼを用いて環状二本鎖 DNA とすることで、8-oxoG:A 対または 8-oxoG:C 対を含む複製型プラスミド DNA を調製した。

ヒト U2OS 細胞にカチオン性脂質(Lipofectamine 2000)を用いて siRNA を導入し、WRN と DNA pol λ のノックダウンを行った。

WRN と DNA pol λ のノックダウンは、ウエスタンブロッティングにより確認した。

変異誘発能は、ノックダウン細胞に 8-oxoG:A 対または 8-oxoG:C 対を含むプラスミド DNA をカチオン性脂質(Lipofectamine)を用いて導入し、48 時間後に複製されたプラスミド DNA を回収して

指示大腸菌 KS40/pOF105 を形質転換して求めた。*supF* 遺伝子に変異が導入されるとナリジクス酸及びストレプトマイシン耐性になるため、両抗生物質を含む寒天培地(選択寒天培地)に播種することにより選択した。選択寒天培地上に生じたコロニー数を、両抗生物質を含まないタイター寒天培地上に生じたコロニー数で除することにより、変異頻度を算出した。選択寒天培地に生じたコロニーの一部のプラスミド DNA の配列を解析することにより、標的部位及び非標的部位における変異を解析した。

Cas9 発現プラスミドと guide RNA 発現プラスミドの共導入、または、Cas9 発現プラスミドと合成 guide RNA を共導入により、WRN ノックアウト細胞の樹立を試みた。

4. 研究成果

(1) WRN ノックダウンの 8-oxoG:A 対誘発変異への影響

8-oxoG の変異誘発経路には2種類がある。1つは、DNA 中のグアニン塩基が直接酸化される経路であり、この経路に対する WRN ノックダウンの効果が観察されている。もう1つの経路は、ヌクレオチドプール中の dGTP が酸化されて生じる 8-oxo-dGTP が鋳型 DNA 中のアデニン塩基に対して取り込まれる経路である。そこで、後者の経路に対する WRN ノックダウンの効果を調べた。ウエスタンブロットにより WRN 蛋白質の減少を確認し、変異経路の中間体である 8-oxoG:A 対を有するプラスミドを調製して WRN ノックダウン細胞に導入したところ、変異頻度が有意に低下した。従って、WRN が、8-oxo-dGTP が誘発する変異に対しては促進的に作用することを明らかとした。

(2) DNA pol λ ノックダウンの 8-oxoG:A 対誘発変異への影響

上記の実験と同様に、DNA pol λ をノックダウンした細胞に対して、8-oxoG:A 対を有するプラスミド(ウエスタンブロットにより DNA pol λ の減少を確認した)を導入したところ、変異頻度が有意に低下した。従って、DNA pol λ も 8-oxo-dGTP が誘発する変異に対しては促進的に作用することを明らかとした。また、この結果から、WRN と DNA pol λ の関連が強く示唆された。

(3) WRN と DNA pol λ のダブルノックダウン

WRN と DNA pol λ のダブルノックダウンを行うために、両遺伝子に対する siRNA を導入してウエスタンブロットにより蛋白質量の減少を調べた。その結果、シングルノックダウンの条件に比較してノックダウン効率が減少している(標的蛋白質が残存している)画像が得られた。WRN と DNA pol λ の

シングルノックダウン及びダブルノックダウン細胞に、8-oxoG:C 対を有するプラスミドを導入した。その結果、いずれの場合も対照細胞に比較して、変異誘発能の上昇が観察された。ノックダウン効率が異なるため単純比較はできないが、変異体率はダブルノックダウン細胞 > WRN ノックダウン細胞 > DNA pol λ ノックダウン細胞 > 対照細胞の序列であった。また、遠隔作用変異に関しては、ダブルノックダウン細胞と WRN ノックダウン細胞が同程度であったことから、WRN と DNA pol λ が遠隔作用変異を抑制する同一経路上にある可能性が示唆された。一方、8-oxoG T 変異に関してはダブルノックダウンにより相加的な変異率上昇が観察されたことから、この変異に関しては両者は別経路で抑制している可能性が示唆された。

(4) WRN ノックアウト細胞樹立の試み

Cas9 の実験系を用いて WRN を欠損させた U2OS 細胞を作製することを試みた。まず、Cas9 発現プラスミドと guide RNA 発現プラスミドの共導入を行った。しかし、WRN ノックアウト細胞は得られなかった。次に、guide RNA として鎖長 60 の合成 RNA を 4 種類作製し、試験管内での標的 DNA 切断を調べたところ、全ての場合に切断が観察された。しかし、Cas9 発現プラスミドと合成 guide RNA を共導入したが、WRN ノックアウト細胞は得られなかった。

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 3 件)

1. H. Kamiya, M. Kurokawa, T. Makino, M. Kobayashi, and I. Matsuoka: Induction of action-at-a-distance mutagenesis by 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA pol λ -knockdown cells. *Genes Environment* **37**, in press (査読有り)

2. H. Kamiya, D. Yamazaki, E. Nakamura, T. Makino, M. Kobayashi, I. Matsuoka and H. Harashima: Action-at-a-distance mutagenesis induced by oxidized guanine in Werner syndrome protein-reduced human cells. *Chem. Res. Toxicol.* **28** (#4), 621-628 (2015 年 4 月) doi: 10.1021/tx500418m (査読有り)

3. H. Kamiya and M. Kurokawa: DNA polymerase λ promotes mutagenesis induced by 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-hydroxyguanine) paired with adenine. *Genes Environment* **35** (#4), 105-109 (2013 年 11 月) doi: org/10.3123/jemsge.2013.002

(査読有り)

[学会発表](計 11 件)

1. 紙谷浩之 (招待講演): 核酸を用いる発癌・制癌研究: DNA 損傷による変異機構の解明と遺伝子治療用核酸の設計. 日本分析化学会中国四国支部 広島地区分析技術研究会 (2015 年 3 月 18 日、東広島)

2. 紙谷浩之 (招待講演): 遺伝子変異と損傷核酸. 日本化学会中国四国支部 愛媛地区化学講演会 (2014 年 12 月 24 日、松山)

3. 紙谷浩之, 中村恵里, 牧野哲明, 小林三和子, 松岡一郎: 8-ヒドロキシグアニン: アデニン対が誘発する変異は Werner 症候群責任遺伝子産物により促進される. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014 年 12 月 4 日、東京)

4. 牧野哲明, 黒川正大, 小林三和子, 松岡一郎, 紙谷浩之: WRN、DNA pol λ ノックダウン細胞における 8-ヒドロキシグアニンの変異誘発. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25 日、横浜)

5. 紙谷浩之: Werner 症候群責任遺伝子産物はアデニンと対合している 8-ヒドロキシグアニンの変異誘発を促進する. 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014 年 9 月 27 日、横浜)

6. 紙谷浩之 (招待講演): DNA 損傷が誘発する発癌機構の解明と遺伝子治療用核酸の設計. 日本分析化学会第 63 年会 (2014 年 9 月 18 日、東広島)

7. 牧野哲明, 黒川正大, 小林三和子, 松岡一郎, 紙谷浩之: 酸化 DNA 損傷による変異誘発と WRN、DNA polymerase λ . 第 55 回日本生化学会中国・四国支部例会 (2014 年 6 月 7 日、松山)

8. 牧野哲明, 黒川正大, 小林三和子, 松岡一郎, 紙谷浩之: DNA polymerase λ ノックダウン細胞における 8-ヒドロキシグアニンの変異誘発. 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月 3 日、神戸)

9. 紙谷浩之, 黒川正大: 8-ヒドロキシグアニン: アデニン対が誘発する変異は DNA ポリメラーゼ λ により促進される. 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月 3 日、神戸)

10. 牧野哲明, 黒川正大, 小林三和子, 松岡一郎, 紙谷浩之: 酸化的 DNA 損傷による変異誘発と DNA polymerase λ . 日本環境変異原学会第 42 回大会 (2013 年 11 月 29 日、岡

山)

11. 紙谷浩之: DNAポリメラーゼ λ はアデニンと対合している 8-ヒドロキシグアニンの変異誘発を促進する. 第 72 回日本癌学会学術総会 (2013 年 10 月 3 日、横浜)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紙谷 浩之 (KAMIYA, Hiroyuki)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号: 10204629

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし