

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340025

研究課題名(和文)酸化ストレスにより形成されるMUTYH/MutS 複合体の機能解析

研究課題名(英文)Analyses of oxidative stress-dependent formation of MUTYH/MutSalpha complex

研究代表者

中津 可道 (NAKATSU, Yoshimichi)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：00207820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスに依存して形成されるMUTYH複合体をイムノプロット法で解析した結果、MSH2, MSH6, PCNA以外に新たにDNA polymerase およびMLH1を検出した。MUTYHとMSH2の相互作用は8-oxo-dGua投与された細胞でも観察され、この複合体の形成には8-oxoGが関与していることが示唆された。酸化ストレスを負荷された細胞では一過性のPCNAのモノユビキチン化が起こるが、この複合体中のPCNAはユビキチン化を受けていない。リンチ症候群で見出されるMSH2変異体およびあるDNA polymerase 変異体はMUTYHと酸化ストレス依存複合体形成をしない。

研究成果の概要(英文)：We observed an oxidative stress-dependent complex formation of MUTYH and mismatch repair factors. Using anti-FLAG antibody, we purified the complex from FLAG-tagged MUTYH expressing human cells. Western blot analyses revealed that the complex contained DNA polymerase and MLH 1 in addition to MSH 2, MSH 6, and PCNA. The interaction between MUTYH and MSH2 was also observed in the 8-oxo-dGua administered cells, suggesting that 8-oxoG is involved in the formation of this complex. In cells loaded with oxidative stress, transient mono-ubiquitination of PCNA occurs, but PCNA in this complex has not undergone ubiquitination. Certain MSH2 mutants found in Lynch syndrome and a DNA polymerase mutant do not form the oxidative stress-dependent complexes with MUTYH. These results suggested that DNA polymerase as well as MSH2 might be involved in molecular mechanisms underlying oxidative stress induced cell-death.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミスマッチ修復 細胞死 DNA損傷 8-オキソグアニン

1. 研究開始当初の背景

酸素を含む大気中で生活している生物の体内では通常の代謝活動によって種々の活性酸素種が生じ、それらは DNA やヌクレオチドを酸化する。様々な酸化 DNA 損傷の中で、グアニン塩基の酸化体 8-オキソグアニン (8-oxoG) はシトシンと同程度にアデニンとも対合できるので突然変異の原因となる。この 8-oxoG によるゲノム不安定性に対処するために生物は種々の酵素系を持っている。ヒトでは、OGG1 と MUTYH が DNA 中の 8-oxoG に起因する突然変異を抑制し、MTH1 がヌクレオチドプール中に生じた 8-oxo-dGTP を分解することで、DNA 複製の際に 8-oxoG が DNA へ取り込まれるのを防いでいる。酸化ストレスは大腸菌の自然突然変異の主な原因であることが明らかにされているが (Sakai et al, 2006)、我々も酸化 DNA 損傷の修復に関わるこれらの遺伝子の欠損がマウスの自然突然変異と自然発がんの頻度を上昇させることを明らかにしてきた (Tszuzuki et al, 2001, Egashira et al, 2002, Sakamoto et al, 2007)。

最近、我々は酸化ストレスに起因する突然変異頻度の上昇と、発がん変異頻度の上昇は必ずしも一致せず、酸化ストレスによる能動的な細胞死がもう一つの大きなファクターとして関与していることを示唆する研究結果を得ている。すなわち、酸化 DNA 損傷を修復する各種 DNA 修復酵素を欠損したマウスを用いた酸化剤誘発突然変異・発がん実験の結果、MTH1 や OGG1 の欠損は突然変異を上昇させるが、発がん頻度はあまり上昇させないのに対し、MUTYH やミスマッチ修復因子 MSH2 の欠損は突然変異および発がんの頻度を劇的に上昇させる。MSH2 が欠損した細胞や MUTYH の発現が低下した細胞は酸化ストレス誘発細胞死に抵抗性を示すことが明らかにされている。(DeWeese et al. 1998, Oka et al. 2008)。ヒトにおいては、ミスマッチ修復因子 MSH2 の変異は大腸がん (HNPCC) をはじめとして様々な癌を多発するリンチ症候群の原因となる。また、最近になり MUTYH がヒトの遺伝性大腸がんの原因遺伝子として同定された。ミスマッチ修復因子と MUTYH は共に DNA 修復反応と細胞死誘導に関わっているが、これまでの我々の研究で、突然変異の抑制よりはむしろ DNA 損傷による細胞死の誘導の方が消化管発がん抑制に大きく寄与していることが明らかになっている。これらの結果は、MSH2 や MUTYH が制御している細胞死の誘導は、自然発がんを抑制する重要な細胞機能であることを示している。両者の DNA 修復反応に関する解析は大きな進展が見られているのに対し、細胞死誘導反応の研究は幾つかの関与する因子が報告されている段階に止まっているのが現状である。

活性酸素種による DNA 傷害は生物が地球上で生きていく上で避けられないリスクであり、酸化ストレスによる能動的な細胞死の解明は、加齢と共に発症が上昇する発がんや神

経変性疾患の予防法を研究する上で重要である。また、最近ミスマッチ修復因子と同様に、MUTYH が酸化ストレスのみならずアルキル化損傷に対する応答にも関与することを示唆する結果が発表されており、ミスマッチ修復因子と MUTYH の細胞死誘導における機能を明らかにすることは、高等生物がもつ環境ストレスに対する普遍的な応答機構を分子レベルで解き明かすことに繋がると考えられる。

2. 研究の目的

ミスマッチ修復因子 MSH2 は MSH6 および MSH3 とヘテロ 2 量体を形成して、DNA 中の様々な塩基ミスペアを認識する。また、MUTYH は DNA 修復酵素で、複製の際に鋳型鎖の 8-oxoG に対して取り込まれたアデニンを除去し、G:C → T:A 変異を抑制している。MUTYH は他の DNA 修復関連タンパク質と相互作用する。中でもミスマッチ修復因子 MSH6 や Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) との相互作用は、修復の際に DNA の鋳型鎖と新生鎖を区別する上で重要ではないかと想像されているが、*in vitro* 酵素反応系を用いた研究では、これらの相互作用が MUTYH の DNA 修復能に影響を与えることを示す証拠は得られていない。我々は、MUTYH と MutS α (MSH2:MSH6 ヘテロ 2 量体) および PCNA との複合体が酸化剤臭素酸カリウムで処理された細胞で特異的に形成されることを見出した。この複合体は酸化剤処理後約 20 時間以降で顕著に形成され、DNA 修復複合体とは異なりクロマチンと強固には結合していない。酸化ストレス誘発細胞死に関わる 2 つの因子 (MUTYH と MutS α) が、酸化ストレスにより複合体を形成することから、この複合体形成は酸化ストレスにより誘導される細胞死に密接に関与していることが考えられる。本研究では酸化ストレスによって誘導される細胞死の分子機構を明らかにするために、MUTYH/MutS α /PCNA 複合体形成の分子機序解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) 酸化ストレス誘発細胞死誘導時の MUTYH タンパク質複合体の解析

MUTYH は MutS α の構成因子 MSH6, Ape1, PCNA と直接することが報告されている。Ape1 との相互作用は DNA 修復能を増強するが、MMR タンパク質や PCNA との相互作用は、MUTYH の DNA 修復能に影響を与えない。MUTYH と複合体を形成する MMR タンパク質と PCNA はアルキル化剤による細胞死誘導時に相互作用が増強されることが明らかになっている。さらに、MUTYH は DNA 損傷応答に重要な働きをする Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) 複合体とも相互作用することが報告されている。従って、MUTYH はこれらの相互作用を介して細胞死誘導に重要な働きをしていることが考えられる。酸化ストレスを負荷された細胞における、これらの因子との相互作用を検討するため

に、Flag-MUTYH を安定に発現する細胞株を実験材料に用い、酸化ストレス負荷により形成される複合体を抗 Flag 抗体による免疫沈降法により単離する。上記因子を含む損傷応答関連因子の抗体を用いたイムノブロット法により単離した複合体の解析を行う。

2) 酸化ストレス誘発時のMUTYHとMutS α およびPCNAの相互作用の解析

MUTYHのPCNA結合領域に含まれる524番目のセリン(S524)がリン酸化されることが報告された。酸化ストレス負荷とS524のリン酸化との関連は不明であるが、PCNAとの相互作用に影響することが考えられる。酸化ストレスにより形成される複合体に含まれているMUTYHのリン酸化状態を解析する。また、酸化ストレス誘発MUTYH/MutS α /PCNA複合体形成の詳細について検討する。

3) 変異体を用いた、MUTYH/MutSa/PCNA複合体形成と酸化DNA損傷による突然変異抑制(DNA修復)と細胞死誘導への影響の検討

1)、2)の解析を通じて複合体形成に影響する因子およびそれらの変異体を作製して、酸化ストレス誘発細胞死や突然変異誘発に関して解析する。また、他の環境ストレスであるアルキル化剤に対する応答についても同様な解析を行う。

4. 研究成果

1) 細胞死誘導時のMUTYHタンパク質複合体の解析

KBrO₃処理したFlag-MUTYH安定発現HEK293細胞より、酸化ストレスにより形成される複合体を抗Flag抗体による免疫沈降法により単離し、MUTYHと複合体を形成するタンパク質群をイムノブロット法で検討した。その結果、MSH2、MSH6、PCNA以外に新たにDNA polymerase δ およびMLH1が複合体に含まれることを明らかにした。しかし、抗Rad9抗体、抗Rad1抗体あるいは抗Hus1抗体を用いてイムノブロット法で検討したが、9-1-1複合体との相互作用は確認できなかった。細胞抽出液の調整法やDNA損傷の条件を検討して解析を行ったが、他の研究者により報告されているようなMUTYHと9-1-1複合体との相互作用は確認できなかった。MNU処理したFlag-MUTYH安定発現HEK293細胞よりアルキル化DNA損傷により形成される複合体を抗Flag抗体による免疫沈降法により単離し、MUTYHと複合体を形成するタンパク質群をイムノブロット法で検討した。その結果、MSH2、MSH6、PCNA、MLH1は複合体を形成したがMUTYHおよび9-1-1との相互作用は確認できなかった。

2) 酸化ストレス誘発時のMUTYHとMutS α およびPCNAの相互作用の解析

KBrO₃処理による細胞への酸化ストレスの付与では、8-oxoG以外にも多くのDNA損傷が誘導される。複合体形成と8-oxoGとの相関を解析するために、8-oxo-guanosine(8-oxo-dGua)投与実験を行った。MUTYHとMSH2の相互作用は

8-oxo-dGua投与された細胞でも観察され、投与後0.5~3時間で時間の経過とともに複合体は増加し、24時間後には0.5時間後と同レベルまで減少していた。これらの結果は、複合体の形成に8-oxoGが関与していることを示唆する。

50mM KBrO₃で1時間処理すると、処理後0.5時間で一過性の強いMUTYHとPCNAの相互作用が観察された。酸化ストレスを負荷された細胞では処理後0.5~3時間に一過性のPCNAのモノユビキチン化(mUb-PCNA)が起こることが報告されているが、この処理ではPCNAのユビキチン化は検出されなかった。報告されている条件(1mM H₂O₂処理1時間)でFLAG-MUTYHを発現させた細胞を処理し、同様に細胞抽出液を調整して解析したが、H₂O₂処理によるmUb-PCNAの顕著な生成は認められなかった。

MUTYHのPCNA結合領域に含まれる524番目のセリン(S524)がリン酸化されることが報告されているが、これまでに我々の実験系では酸化ストレス負荷によるMUTYHのリン酸化は観察できていない。

3) 変異体を用いた、MUTYH/MutSa/PCNA複合体形成と酸化DNA損傷による突然変異抑制(DNA修復)と細胞死誘導への影響の検討

リンチ症候群で見出されるMSH2変異体を持つヒト細胞をCRISPR/Cas9を用いて作製した。この細胞では自然突然変異率が上昇しており、アルキル化剤による細胞死の誘導が起きない。この細胞にF-MUTYHを発現させて50 mM KBrO₃および0.2mM H₂O₂処理後、MUTYHとMutS α との相互作用を検討した。その結果、変異体細胞では、酸化ストレスによるMUTYHとMutS α との相互作用は確認できなかった。面白いことに、作製したMSH2変異体の1つでは未処理でもmUb-PCNAの生成が亢進していた。野生型細胞と異なり、H₂O₂処理ではこの細胞のmUb-PCNAは増加しなかった。これらの結果は、この変異体MSH2の特性と酸化ストレスによるPCNAのユビキチン化との関連を示唆する。

1) で酸化ストレス負荷された細胞内ではMUTYHとDNA polymerase δ と相互作用することを見出したが、CRISPR/Cas9を用いて作製したDNA polymerase δ 変異体はMUTYHとは相互作用しないことを見出した。DNA polymerase δ と酸化ストレス負荷による細胞死誘導との関連は、今後の課題である。

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. Yamamoto H, Ishimura M, Ochiai M, Takada H, Kusuvara K, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Mitani K, Hara T. BTK gene targeting by homologous recombination using a helper-dependent adenovirus/adenovirus-associated virus

- hybrid vector. *Gene Ther.* 2015 Aug 17. doi: 10.1038/gt.2015.91. [査読有]
2. Kubokura N, Takahashi-Yanaga F, Arioka M, Yoshihara T, Igawa K, Tomooka K, Morimoto S, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Nakabeppu Y, Matsumoto T, Kitazono T, Sasaguri T. Differentiation-inducing factor-3 inhibits intestinal tumor growth in vitro and in vivo. *J Pharmacol Sci.* 2015 Apr;127(4):446-455. doi:10.1016/j.jp hs.2015.03.005. [査読有]
 3. Kanao R, Yokoi M, Ohkumo T, Sakurai Y, Dotsu K, Kura S, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Masutani C, Hanaoka F. UV-induced mutations in epidermal cells of mice defective in DNA polymerase η and/or ι . *DNA Repair (Amst).* 2015 May;29:139-146. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.006. [査読有]
 4. Kyuragi R, Matsumoto T, Harada Y, Saito S, Onimaru M, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Nomura M, Yonemitsu Y, Maehara Y. BubR1 insufficiency inhibits neointimal hyperplasia through impaired vascular smooth muscle cell proliferation in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Feb;35(2):341-347. doi:10.1161/ATVBA HA.114.304737. [査読有]
 5. Isoda T, Nakatsu Y, Yamauchi K, Piao J, Yao T, Honda H, Nakabeppu Y, Tsuzuki T. Abnormality in Wnt signaling is causatively associated with oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in MUTYH-null mice. *Int J Biol Sci.* 2014 Aug 23;10(8):940-947. doi: 10.7150/ijbs.9241. eCollection 2014. [査読有]
 6. Takahashi-Yanaga F, Yoshihara T, Jingushi K, Igawa K, Tomooka K, Watanabe Y, Morimoto S, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Nakabeppu Y, Sasaguri T. DIF-1 inhibits tumor growth in vivo reducing phosphorylation of GSK-3 β and expressions of cyclin D1 and TCF7L2 in cancer model mice. *Biochem Pharmacol.* 2014 Jun 1;89(3):340-348. doi: 10.1016/j.bcp.2014.03.006. [査読有]
- [学会発表] (計 19 件)
1. ヒト細胞由来ミスマッチ修復遺伝子変異体の作製とその解析、林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、釣本敏樹、續輝久日本分子生物学会第 39 回年会、横浜 [2016 年 12 月 3 日]
 2. Establishment of DNA polymerase δ R506H mutants in MSH2-null HeLa MR cell using CRISPR/Cas9 genome editing system, Song, Y., Hidaka, K., Nakatsu, Y., Oda, S., Hayashida, G., Fujikane, R., Hidaka, M., Tsuzuki, T. 日本分子生物学会第 39 回年会、横浜 [12 月 3 日]
 3. Mutyh 欠損マウスにおける酸化ストレスによる消化管腫瘍発生頻度上昇と特異的体細胞変異シグニチャーの解析、鷹野典子、大野みずき、中津可道、中別府雄作、續輝久、第 39 回日本分子生物学会年会、横浜 [2016 年 12 月 2 日]
 4. Development of assay systems to characterize the variants of mismatch repair factor MSH2 found in Lynch syndrome, Hayashida, G., Nakatsu, Y., Hidaka, K., Fujikane, R., Hidaka, M., Tsurimoto, T., Tsuzuki, T., The 10th International 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, Matsue [2016 年 11 月 14]
 5. Characterization of mismatch repair factor MSH2 variants found in Lynch syndrome, 林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、釣本敏樹、續輝久、日本放射線影響学会第 59 回大会、広島 [2016 年 10 月 27 日]
 6. ヒト細胞を用いたミスマッチ修復因子 MSH2 の変異体の解析、林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、續輝久第 75 回日本癌学会学術総会、横浜 [2016 年 10 月 7 日]
 7. 酸化ストレスによる消化管腫瘍発生頻度上昇と特異的体細胞変異シグニチャー: Mutyh 欠損マウスを用いた解析、大野みずき、鷹野典子、中津可道、中別府雄作、續輝久、第 75 回日本癌学会学術総会、横浜 [2016 年 10 月 7 日]
 8. CRISPR/Cas9 を用いたヒト細胞のミスマッチ修復因子への変異導入、林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、釣本敏樹、續輝久、日本遺伝学会第 88 回大会、三島 [2016 年 9 月 9 日]
 9. 林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、釣本敏樹、續輝久、ミスマッチ修復因子 MSH2 発現系の確立と変異体の解析、日本分子生物学会第 38 回年会・日本生化学会第 88 回大会合同大会、神戸 [2015 年 12 月 2 日]
 10. Mutyh欠損マウスを用いた酸化ストレス誘発突然変異と発がんの解析、鷹野典子、大野みずき、佐々木史子、山内一己、中別府雄作、中津可道、續輝久、日本分子生物学会第38回年会・日本生化学会第88回大会合同大会、神戸 [12月2日]
 11. 酸化ストレス誘発マウス小腸発がん実験から見えてきたこと、中津可道、シンポジウム:酸化ストレスによる生物影響、

- 日本環境変異原学会第44回大会、福岡
[11月28日]
12. MUTYH 欠損マウスを用いた酸化ストレス誘発消化管がんと体細胞突然変異の解析, 鷹野典子, 大野みずき, 佐々木史子, 中別府雄作, 日高京子, 中津可道, 續輝久, 日本環境変異原学会第44回大会, 福岡 [2015年11月27日]
 13. 酸化ストレス誘発消化管発がん突然変異の抑制における MUTYH の役割, 大野みずき, 鷹野典子, 中津可道, 中別府雄作, 續輝久, 第74回日本癌学会学術総会, 名古屋 [2015年10月8日]
 14. Oxidative stress-induced tumorigenesis: Lesson from the experiments with DNA repair-deficient mice, Tsuzuki, T., Ohno, M., Takano, N., Taguchi, K., Nakabeppu, Y., Nakatsu, Y., 15th International Congress of Radiation Research; Advances in Understanding the Biological Consequences by Environmental Stressors, Kyoto [2015年5月26日]
 15. Mismatch Repair Deficient Mice Show Susceptibility to Oxidative Stress-induced Intestinal Carcinogenesis, Nakatsu, Y., Piao, J., Hashizume, T., Ohno, M., Taguchi, K., Tsuzuki, T. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto [5月26日]
 16. Oxidative stress-induced intestinal tumors in *Mutyh*-deficient mice treated with low doses of potassium bromate, Tsuzuki, T., Ohno, M., Takano, N., Taguchi, K., Nakabeppu, Y., Aoki, Y., Nohmi, T., Nakatsu, Y., 4th Asian Conference on Environmental Mutagen, Kolkata, India [2014年12月10日] (招待)
 17. *Mutyh* 遺伝子欠損マウスを用いた酸化ストレス誘発消化管がんの解析, 大野みずき, 鷹野典子, 佐々木史子, 田口健一, 中別府雄作, 青木康展, 能美健彦, 中津可道, 續輝久, 日本環境変異原学会第43回大会, 東京 [2014年12月5日]
 18. *Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析, 鷹野典子, 大野みずき, 稲葉洋平, 志村勉, 櫻田尚樹, 中別府雄作, 中津可道, 續輝久, 日本環境変異原学会第43回大会, 東京 [2014年12月5日]
 19. 低用量臭素酸カリウムの飲水投与により *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの消化管で誘発された突然変異並びに発がんの解析, 大野みずき, 鷹野典子, 中津可道, 中別府雄作, 續輝久, 第73回日本癌学会学術総会, 横浜 [2014年9月27日]

[図書] (計 1 件)

1. 續輝久, 大野みずき, 中津可道 (Ⅲ-2-(6))酸化 DNA 損傷と大腸発癌, 日本臨牀 (増刊号) 最新臨床大腸癌学 基礎研究から臨床応用へ株式会社 日本臨牀社, 総ページ数 715 (分担: pp. 141-146) (2015) .

[その他]

ホームページ等

<https://biophys.wp.med.kyushu-u.ac.jp>

(九州大学・大学院医学研究院・基礎放射線医学分野)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中津 可道 (NAKATSU, Yoshimichi)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 00207820

(2) 研究協力者

林田 元気 (HAYASHIDA, Genki)

九州大学・システム生命学府・博士後期課程

宋 穎霞 (SONG, Yingxia)

九州大学・医学系学府・医科学修士課程