

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K16195

研究課題名(和文)高エネルギーリン酸化合物が引き起こすゲノム不安定性に関する研究

研究課題名(英文)Genome instability induced by high-energy phosphate compounds

研究代表者

佐々 彰(Sassa, Akira)

千葉大学・大学院理学研究院・特任助教

研究者番号：10738347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高エネルギーリン酸化合物(リボヌクレオチド)はエネルギー産生の基質やRNA前駆体として生体に必須である一方、しばしばDNA複製中にゲノムに取り込まれる。リボヌクレオチドのDNAへの取り込みと蓄積はゲノム不安定化を引き起こし、重篤な疾患発症の引き金になると考えられる。本研究では、DNAに取り込まれたリボヌクレオチドが引き起こす突然変異とその抑制機構を明らかにすることを目的とした。その結果、ヒト細胞においてDNA中のリボヌクレオチドはDNAの広い領域を欠損させるような深刻な突然変異を引き起こし得る事、そしてリボヌクレオチドに対する変異抑制に働く代替修復機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボヌクレオチドのゲノムへの蓄積は、重度心身障害をもたらすAicardi-Goutieres症候群(AGS)の発症や細胞のがん化と深く関連していると考えられる。DNAに取り込まれたリボヌクレオチドが誘発するゲノム不安定化とその抑制因子を明らかにすることで、疾患の発症メカニズムならびに生物の新たなゲノム制御機構の解明につながる。

研究成果の概要(英文)：Ribonucleotides are essential for cellular metabolism and energy production. On the other hand, ribonucleotides are often incorporated into the genome by DNA polymerases in mammalian cells. The aberrant accumulation of ribonucleotides in the genome causes cellular abnormalities. In this study, we have clarified the mutagenic potential of a ribonucleotide incorporated into DNA and possible alternate repair pathways to suppress the mutagenic effect of an embedded ribonucleotide in human cells.

研究分野：化学物質影響関連

キーワード：DNA修復 リボヌクレオチド 損傷乗り越えDNA合成 ゲノム不安定性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA ポリメラーゼは、DNA 複製中にしばしばリボヌクレオチドを基質として DNA 中に取り込むことがある。我々は研究開始当初に、傷ついた損傷型リボヌクレオチドもまた DNA ポリメラーゼによって効率良く DNA に取り込まれることを突き止めた。DNA 中のリボヌクレオチドは通常、リボヌクレオチド除去修復 (RER) によって除去される。一方で DNA に取り込まれた損傷型リボヌクレオチドは、損傷のないものと比べて修復され難くより高い突然変異誘発能を持つと予想された。当初リボヌクレオチドが引き起こすゲノム不安定化のメカニズムは主に酵母を用いて研究が行われており、ヒト細胞での知見は殆どなかった。また損傷型リボヌクレオチドにおける修復および突然変異誘発に関する報告はなく、損傷型リボヌクレオチドがゲノムに及ぼす影響は不明であった。そこでリボヌクレオチドのモデル基質としてリボグアノシン (rG) およびその損傷型 8-オキシリボグアノシン (8-oxo-rG) を用いて、それらが引き起こすゲノム不安定化の分子機構を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

鋳型 DNA 中の rG および 8-oxo-rG が引き起こす DNA 複製エラーを同定する。

塩基除去修復 (BER) および RER による rG および 8-oxo-rG の修復能を解析する。

ヒト細胞内において DNA 中の rG および 8-oxo-rG が引き起こす突然変異とその抑制機構を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) rG または 8-oxo-rG を 1 分子含むオリゴ DNA に、5'末端を Alexa546 で蛍光標識したプライマーをアニールしたものを鋳型として、ヒト由来 DNA ポリメラーゼ (Pol) である Pol α 、Pol κ 、Pol η を加えて試験管内で DNA 合成反応を行った。合成された反応産物はポリアクリルアミドゲルで展開し、8-oxo-rG における突然変異誘発頻度とスペクトラムを解析した。
- (2) rG または 8-oxo-rG を 1 分子含む、5'末端を Cy3 で標識した二本鎖 DNA を基質として、BER に関わる DNA 修復酵素 OGG1、AP エンドヌクレアーゼ (APE1)、または RER に関与する RNase H2 を DNA と混合して試験管内で修復反応を行った。反応産物をポリアクリルアミドゲルで解析し、反応速度を測定した。
- (3) ヒト B リンパ球 TK6 細胞株に対して、*supF* レポーター遺伝子上に rG または 8-oxo-rG を 1 分子含むシャトルベクターを導入して 2 日間培養し、増幅されたベクターを抽出したのちに *supF* 上で生じた突然変異頻度およびスペクトラムを同定した。さらに、TK6 の Pol η ならびにヌクレオチド除去修復 (XPA) 欠損株を用いて同様の実験を行い、それぞれの因子の突然変異抑制への関与を解析した。

4. 研究成果

- (1) ヒト Pol α 、Pol κ 及び Pol η による DNA 合成反応において、鋳型 DNA 上の rG または 8-oxo-rG が及ぼす影響を解析した。その結果、Pol α は鋳型上の rG を効率よく乗り越えて DNA 合成を行ったが、8-oxo-rG によって DNA 伸長活性が強く阻害された。Pol κ の DNA 合成は、rG 及び 8-oxo-rG の手前で強く阻害された。一方、Pol η はどちらのリボヌクレオチドも非常に効率よく乗り越えて DNA の合成を行った。また、Pol α は 8-oxo-rG を乗り越える際に誤ったヌクレオチドである dAMP を取り込んだのに対して、Pol κ 及び Pol η は正しいヌクレオチドである dCMP を取り込む傾向にあった。このことから、解析に用いた Pol の中でも特に Pol η は鋳型 DNA 上のリボヌクレオチドを効率よく、かつ複製エラーを起こすことなく乗り越えて DNA 合成を行うことが示唆された。
- (2) 二本鎖 DNA 中に 1 分子含まれる rG または 8-oxo-rG を基質として、OGG1、APE1、および RNase H2 の除去修復活性を測定した。OGG1 は 8-oxo-rG を含む DNA に対して特異的に結合する性質を有していたものの、OGG1 ならびに APE1 は rG および 8-oxo-rG に対して全く活性を示さなかった。また RNase H2 については、8-oxo-rG に対する切断活性は rG と比べて顕著に低かった。以上から、BER ならびに RER は、8-oxo-rG のような損傷型リボヌクレオチドに対して有効な修復経路ではないと考えられる。
- (3) rG または 8-oxo-rG を 1 分子含む *supF* シャトルベクターを TK6 野生株、Pol η 欠損株、または XPA 欠損株に導入し、細胞内で複製された DNA について *supF* 上に生じた突然変異頻度とスペクトラムを同定した。その結果、野生株において rG はコントロールとして用いた dG

と比べて約 4 倍、8-oxo-rG は約 2 倍高い突然変異頻度を示した。興味深いことに、rG による突然変異の大半が *supF* の配列を広くわたって欠損させるような変異 (large deletion) だった一方で、8-oxo-rG は主に一塩基置換を引き起こした。また、Pol η および XPA 欠損株では、野生株と比べて 8-oxo-rG が引き起こす突然変異頻度が有意に上昇し、特に Pol η 欠損株では large deletion を伴う変異の割合が顕著に増加した。一方、どの細胞株においても rG による突然変異頻度に差は無かった。以上から、DNA に取り込まれたリボヌクレオチドは 1 分子であっても重篤な突然変異を引き起こし得ること、そして RER が修復できないような損傷型リボヌクレオチドに対しては Pol η やヌクレオチド除去修復が代替機構として突然変異の抑制を担うことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sassa Akira, Tada Haruto, Takeishi Ayuna, Harada Kaho, Suzuki Megumi, Tsuda Masataka, Sasanuma Hiroyuki, Takeda Shunichi, Sugasawa Kaoru, Yasui Manabu, Honma Masamitsu, Ura Kiyoe	4. 巻 9
2. 論文標題 Processing of a single ribonucleotide embedded into DNA by human nucleotide excision repair and DNA polymerase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-50421-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sassa Akira, Fukuda Takayuki, Ukai Akiko, Nakamura Maki, Takabe Michihito, Takamura-Enya Takeji, Honma Masamitsu, Yasui Manabu	4. 巻 41
2. 論文標題 Comparative study of cytotoxic effects induced by environmental genotoxins using XPC- and CSB-deficient human lymphoblastoid TK6 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41021-019-0130-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sassa Akira, Yasui Manabu, Honma Masamitsu	4. 巻 41
2. 論文標題 Current perspectives on mechanisms of ribonucleotide incorporation and processing in mammalian DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41021-019-0118-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yasui Manabu, Muto Shigeharu, Sassa Akira	4. 巻 40
2. 論文標題 Challenges of young scientists at the cutting-edge of genotoxicity research: the open symposium of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS), 2018	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41021-018-0111-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kanemaru Y, Suzuki T, Sassa A, Matsumoto K, Adachi N, Honma M, Numazawa S, Nohmi T.	4. 巻 39
2. 論文標題 DNA polymerase kappa protects human cells against MMC-induced genotoxicity through error-free translesion DNA synthesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-016-0067-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sassa A, Caglayan M, Beard WA, Wilson SH, Nohmi T, Honma M, Yasui M.	4. 巻 291
2. 論文標題 Impact of Ribonucleotide Backbone on Translesion Synthesis and Repair of 7,8-Dihydro-8-oxoguanine	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 24314-24323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M116.738732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sassa A, Kanemaru Y, Kamoshita N, Honma M, Yasui M.	4. 巻 38
2. 論文標題 Mutagenic consequences of cytosine alterations site-specifically embedded in the human genome	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-016-0045-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計31件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Akira Sassa
2. 発表標題 Mechanistic basis for genome instability induced by non-canonical nucleotide accumulation in human cells
3. 学会等名 2019 International Conference for Leading and Young Medical Scientists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Akira Sassa, Haruto Tada, Ayuna Takeishi, Kaho Harada, Kazuma Nakatani, Masataka Tsuda, Hiroyuki Sasanuma, Shunichi Takeda, Kaoru Sugasawa, Manabu Yasui, Masamitsu Honma, Kiyoe Ura
2 . 発表標題 Alternate processing pathways of a single ribonucleotide incorporated into DNA and its consequences in human cells
3 . 学会等名 The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Ayuna Takeishi, Manabu Yasui, Hiroyuki Sasanuma, Shunichi Takeda, Kaoru Sugasawa, Masamitsu Honma, Kiyoe Ura, Akira Sassa
2 . 発表標題 Mechanistic insight of unique mutations caused by a ribonucleotide embedded into DNA
3 . 学会等名 The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Weiyang LIU, Manabu YASUI, Akira SASSA, Yiyi CAO, Jing XI, Xinyue YOU, Masamitsu HONMA, Yang LUAN
2 . 発表標題 FTO's roles in DNA damage response and underlying mechanism
3 . 学会等名 The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Ai SUZUKI, Akira SASSA, Manabu YASUI, Masamitsu HONMA
2 . 発表標題 Comparison analysis of backbones between 8-oxoG added DNA and intact DNA enclosed with water molecules by using an accelerated quantum chemical calculation
3 . 学会等名 The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 小池 望実、佐々 彰、安田 武嗣、浦 聖恵
2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素NSD2 の酵素学的機能解析
3. 学会等名 第37 回 染色体ワークショップ 第18 回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦 聖恵、佐々 彰、東條 あかり、原田 佳歩、安井 学、本間 正充
2. 発表標題 ゲノム恒常性維持におけるヒストンメチル化酵素NSD2の役割
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々 彰
2. 発表標題 DNAとRNA -僅かな構造の違いが引き起こすゲノム不安定性-
3. 学会等名 日本環境変異原学会平成30年度公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々 彰、安井 学、竹石 歩奈、原田 佳歩、鈴木 慈、津田 雅貴、笹沼 博之、武田 俊一、菅澤 薫、本間 正充、浦 聖恵
2. 発表標題 リボスクレオチドが誘発する奇異突然変異とその防御機構
3. 学会等名 日本遺伝学会第90回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹石 歩奈、安井 学、笹沼 博之、武田 俊一、菅澤 薫、本間 正充、浦 聖恵、佐々 彰
2. 発表標題 DNA 中のリボヌクレオチドが引き起こす特異な突然変異とその誘発機構の解析
3. 学会等名 日本環境変異原学会第47回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ai Suzuki, Masayuki Miyano, Ryuji Miura, Akira Sassa, Manabu Yasui, Masamitsu Honma
2. 発表標題 Quantum Chemical Inspection on the DNA Backbone Bias caused by 8oxoG
3. 学会等名 The 15th International Conference on Flow Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東條あかり、佐々 彰、安井 学、本間正充、浦 聖恵
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復におけるヒストンメチル化酵素NSD2の機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東條 あかり、佐々 彰、安井 学、本間 正充、浦 聖恵
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復におけるヒストンメチル化酵素NSD2の機能解析
3. 学会等名 日本環境変異原学会第47回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田 佳歩、佐々 彰、鈴木 慈、前田 亮、足立 典隆、浦 聖恵
2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素NSD2のDNA損傷修復への関与の解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田 佳歩、佐々 彰、竹内 心、足立 典隆、浦 聖恵
2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素NSD2とDNA 損傷修復
3. 学会等名 日本環境変異原学会第47回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内 心、原田 佳歩、佐々 彰、浦 聖恵
2. 発表標題 酸化ストレス応答におけるNSD2の機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田沼 寛章、佐々 彰、齋藤 都暁、浦 聖恵
2. 発表標題 ゲノム編集に適したハエ培養細胞株の探索およびクローン化方法の確立
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々 彰, 安井 学, 笹沼 博之, 武田 俊一, 菅澤 薫, 本間 正充, 浦 聖恵
2. 発表標題 リボヌクレオチドが引き起こすゲノム不安定性とその抑制機構
3. 学会等名 第35回染色体ワークショップ・第16回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々 彰, 安井 学, 笹沼 博之, 武田 俊一, 菅澤 薫, 本間 正充, 浦 聖恵
2. 発表標題 DNA中のリボヌクレオチドが引き起こす突然変異とその抑制機構
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々 彰, 安井 学, 笹沼 博之, 武田 俊一, 菅澤 薫, 本間 正充, 浦 聖恵
2. 発表標題 リボヌクレオチドが誘発する突然変異の抑制におけるDNA修復機構の役割
3. 学会等名 日本環境変異原学会第46回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村 真生, 鵜飼 明子, 佐々 彰, 高部 道仁, 福田 隆之, 高村 岳樹, 本間 正充, 安井 学
2. 発表標題 TK6及び変異株を用いたヌクレオチド除去修復機構におけるゲノム全体修復と転写共役修復を 区別する方法の開発
3. 学会等名 日本環境変異原学会第46回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福田 隆之, 中村 真生, 佐藤 亮佑, 藤原 聖, 佐々 彰, 鷓飼 明子, 武田 俊一, 安井 学, 本間 正充
2. 発表標題 TK6及びそのDNA修復遺伝子破壊変異体を用いた高感度遺伝毒性試験法の開発
3. 学会等名 日本環境変異原学会第46回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原田 佳歩, 鈴木 慈, 佐々 彰, 浦 聖恵
2. 発表標題 DNA 損傷薬剤を用いたヒストンメチル化酵素 NSD2 の機能解析
3. 学会等名 日本環境変異原学会第46回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sassa A, Yasui M, Sasanuma H, Takeda S, Sugasawa K, Honma M, Ura K
2. 発表標題 Effect of ribonucleotide backbone on mutagenic potential and repair mechanism of 7,8-dihydro-8-oxoguanine
3. 学会等名 The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sassa A, Caglayan M, Rodriguez Y, Beard WA, Wilson SH, Nohmi T, Honma M, Yasui M, Ura K
2. 発表標題 Effect of Sugar Backbone on Translesion Synthesis, Repair, and Mutagenic Potential of 7,8-Dihydro-8-oxoguanine
3. 学会等名 Environmental Mutagenesis & Genomics Society 48th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々 彰, 安井 学, 本間 正充, 浦 聖恵
2. 発表標題 ヒト細胞DNA中のリボヌクレオチドが引き起こすゲノム不安定性の解析
3. 学会等名 第11回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々 彰, Melike Caglayan, William A. Beard, Samuel H. Wilson, 能美 健彦, 本間 正充, 安井 学
2. 発表標題 DNA中の酸化リボヌクレオチドにおける損傷乗り越えDNA合成と修復
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 佐々 彰, Melike Caglayan, William A. Beard, Samuel H. Wilson, 能美 健彦, 本間 正充, 安井 学
2. 発表標題 DNA中の酸化リボヌクレオチドがDNA複製及び修復機構に及ぼす影響
3. 学会等名 日本環境変異原学会第45回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 佐々 彰
2. 発表標題 DNA中の酸化リボヌクレオチドに対する損傷乗り越えDNA合成機構
3. 学会等名 変異機構研究会第29回夏の学校
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鈴木 愛, Patrick Bonnaud, 佐々 彰, 安井 学, 宮本 明, 本間正充
2. 発表標題 8oxoG付加数の異なるDNAに対する修復タンパクhOGG1の高速化量子分子動力学法による親和性評価
3. 学会等名 日本環境変異原学会第45回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ai Suzuki, Patrick Bonnaud, Akira Sassa, Manabu Yasui, Akira Miyamoto, Masamitsu Honma
2. 発表標題 Theoretical Comparison of the Conformational Affinity between hOGG1 DNA Repair Protein and DNA holding different Numbers of 8-oxoG
3. 学会等名 Chem-Bio Informatics Annual Meeting 2016
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----