

平成 22 年 5 月 6 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390114
 研究課題名（和文）マウスを用いたDNAおよび遊離ヌクレオチドの品質管理機構欠損の分子病態解析
 研究課題名（英文）Molecular and pathobiological analysis of defects in quality control systems for DNA and free nucleotides by using mouse models

研究代表者
 土本 大介（TSUCHIMOTO DAISUKE）
 九州大学・生体防御医学研究所・助教
 研究者番号：70363348

研究成果の概要（和文）：遺伝子欠損マウス個体および細胞を用い、DNA修復酵素やヌクレオチドプール浄化酵素が、免疫細胞の機能、発がん抑制、ハンチントン舞踏病モデルでの神経細胞損傷および保護、個体発生（特に心臓形成）、酸化ストレス時の細胞保護機構および細胞死誘導機構、において果たす役割を明らかにした。また新規スクリーニングシステムを確立し、ヌクレオチドプール浄化酵素 RS21-C6 と NUDT16 を発見、解析した。

研究成果の概要（英文）：We have revealed various roles of DNA repair enzymes or nucleotide pool sanitizing enzymes in immune cells, tumor suppression, suppression or induction of neural cell death in Huntington disease, development, and cell death induction and suppression under oxidative stress. We also identified and analyzed novel nucleotide pool sanitizing enzymes, RS21-C6 and NUDT16.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6500000	1950000	8450000
2008年度	3700000	1110000	4810000
2009年度	4200000	1260000	5460000
年度			
年度			
総計	14400000	4320000	18720000

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：動物

1. 研究開始当初の背景

我々は、それまでにヒトを始めとする哺乳動物において、老化の過程や臓器虚血等の病的状態で酸化ストレスが亢進すると核とミトコンドリア両方のヌクレオチドプールおよびゲノムDNAに核酸の酸化損傷が蓄積する事を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

酸化に代表される核酸（遊離ヌクレオチド、ゲノムDNA、RNA）の損傷が哺乳動物の生物機能のおよぼす影響とその防御機構を核酸品質機構関連遺伝子改変マウスおよび同マウス由来細胞を用いて明らかにしていく。

3. 研究の方法

（1）細胞レベルでは各々のオルガネラにおける核酸品質管理機構を欠損、または部

分的に欠損した細胞を作成し、その影響の違いを解析する。

(2) 核酸酸化損傷の修復・排除酵素の欠損あるいは過剰発現マウスを用い、移植腫瘍ではない内因性の発がん、がん増殖に対する核酸の酸化損傷蓄積の影響を調べる。

(3) 損傷ヌクレオチドのうちITPとXTP、ならび2-OH-ATPと8-oxo-GTPについて細胞内への導入により細胞機能への影響を解明する。

(4) 損傷ヌクレオチド結合タンパク質をマウス胸腺抽出液より網羅的に探索、解明する。

4. 研究成果

方法(1)に関連して、ミトコンドリアゲノムと核ゲノムに蓄積した酸化損傷が各々異なる経路の細胞死を誘導し、各々防御機構を備えることを明らかにした(市川ら、岡らの各々の論文)。

方法(2)に関連して、MUTYH 欠損マウスを用い、自然および酸化ストレス誘導性発がんの抑制にMUTYHが関わっていることを示し、ヒト家族性大腸腺腫症モデルマウスを樹立した(坂本らの論文)。OGG1 欠損マウスを用い、紫外線照射により酸化核酸8-oxo-guanineがDNA中に生じることとその除去にOGG1が関与していることを明らかにした(国定らの論文)。ITPA 欠損マウスを用い、脱アミノ化プリン三リン酸分解酵素ITPAを欠損するマウス個体が発育遅延と心臓形成異常を伴い、生後2週間までに死亡することを明らかにした。酸化プリンヌクレオチド分解酵素MTH1 欠損マウスがハンチントン舞踏病モデルに対し抵抗性を示すことを明らかにした(De Luca Gらの論文)。

酸化核酸に対する排除、修復酵素MTH1,OGG1,MUTYHの各々、あるいは二重欠損マウスを用いて、ハンチントン舞踏病モデルにおける神経細胞脱落にこれらの酵素が抑制/促進の両方向に関わることを明らかにした(盛ら、投稿準備中)。

方法(3)に関連して、2-OH-ATPを導入された細胞においてp38MAPKの活性化とそれに伴う細胞増殖抑制および細胞死が誘導されることを明らかにした(太田ら、投稿準備中)。

方法(4)に関連して、網羅的探索によりハロゲン化デオキシシトシン三リン酸分解酵素RS21-C6および(デオキシ)イノシン三リン酸分解酵素NUDT16を新規酵素として同定し、NUDT16については既知の酵素ITPAとともに非負荷条件下で生じるイノシンヌクレオチドによる細胞障害を抑制していることを明らかにした(野中ら、アボルハッサニら、および猪山らの各々の論文)

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12件)

(1) Iyama T, Abolhassani N, Tsuchimoto D (責任著者), Nonaka M, Nakabeppu Y, NUDT16 is a (deoxy)inosine diphosphatase, and its deficiency induces accumulation of single strand breaks in nuclear DNA with growth arrest, *Nucleic Acids Res.* 2010 Apr 12.

[Epub ahead of print] (査読有)

(2) Abolhassani N, Iyama T, Tsuchimoto D (共同責任著者), Sakumi K, Ohno M, Behmanesh M, Nakabeppu Y (共同責任著者), NUDT16 and ITPA play a dual protective role in maintaining chromosome stability and cell growth by eliminating dIDP/IDP and dITP/ITP from nucleotide pools in mammals, *Nucleic Acids Res.* 2010 Jan 15. [Epub ahead of print] (査読有)

(3) Behmanesh M, Sakumi K, Abolhassani N, Toyokuni S, Oka S, Ohnishi YN, Tsuchimoto D, Nakabeppu Y (責任著者), ITPase-deficient mice show growth retardation and die before weaning, *Cell Death Differ.* 2009 (10):1315-22. (査読有)

(4) Sabouri Z, Okazaki IM, Shinkura R, Begum N, Nagaoka H, Tsuchimoto D, Nakabeppu Y, Honjo T.. Apex2 is required for efficient somatic hypermutation but not for class switch recombination of immunoglobulin genes., *Int Immunol.* 2009 (8):947-55. (査読有)

(5) Nonaka M, Tsuchimoto D (責任著者), Sakumi K, Nakabeppu Y, Mouse RS21-C6 is a mammalian 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase, preferring 5-iodocytosine. *FEBS J.* 2009 276(6):1654-66. (査読有)

(6) De Luca G, Russo MT, Degan P, Tiveron

C, Zijno A, Meccia E, Ventura I, Mattei E, Nakabeppu Y, Crescenzi M, Peponi R, Pèzzola A, Popoli P, Bignami M. A role for oxidized DNA precursors in Huntington's disease-like striatal neurodegeneration., *PLoS Genet.* 2008 Nov;4(11):e1000266. (査読有)

(7) Dan Y, Ohta Y, Tsuchimoto D, Ohno M, Ide Y, Sami M, Kanda T, Sakumi K, Nakabeppu Y (責任著者). Altered gene expression profiles and higher frequency of spontaneous DNA strand breaks in APEX2-null thymus., *DNA Repair (Amst).* 2008 Sep 1;7(9):1437-54. (査読有)

(8) Oka S, Ohno M, Tsuchimoto D, Sakumi K, Furuichi M, Nakabeppu Y (責任著者). Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs., *EMBO J.* 2008 Jan 23; 27(2): 421-32. (査読有)

(9) Ichikawa J, Tsuchimoto D, Oka S, Ohno M, Furuichi M, Sakumi K, Nakabeppu Y (責任著者). Oxidation of mitochondrial deoxynucleotide pools by exposure to sodium nitroprusside induces cell death. *DNA Repair (Amst).* 2008 Mar 1; 7(3): 418-30. (査読有)

(10) Guikema JE, Linehan EK, Tsuchimoto D, Nakabeppu Y, Strauss PR, Stavnezer J, Schrader CE., APE1- and APE2-dependent DNA breaks in immunoglobulin class switch recombination., *J Exp Med.* 2007 Nov 26; 204(12): 3017-26. (査読有)

(11) Kunisada M, Kumimoto H, Ishizaki K, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nishigori C., Narrow-band UVB induces more carcinogenic skin tumors than broad-band UVB through

the formation of cyclobutane pyrimidine dimer., *J Invest Dermatol.* 2007 Dec;127(12):2865-71. (査読有)

(12) Sakamoto K, Tominaga Y, Yamauchi K, Nakatsu Y, Sakumi K, Yoshiyama K, Egashira A, Kura S, Yao T, Tsuneyoshi M, Maki H, Nakabeppu Y (共同責任著者), Tsuzuki T., MUTYH-null mice are susceptible to spontaneous and oxidative stress induced intestinal tumorigenesis., *Cancer Res.* 2007 Jul 15;67(14):6599-604. (査読有)

[学会発表](計11件)

(1) Teruaki Iyama, Daisuke Tsuchimoto, Nona Abolhassani, Yusaku Nakabeppu, Human NUDT16 Is a Novel Nucleotide Pool Sanitizing Enzyme Hydrolyzing (Deoxy)inosine Diphosphate to (Deoxy)inosine Monophosphate. The 49th annual meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA, 2009.12.7 Poster session #1327/B485

(2) Daisuke Tsuchimoto, Teruaki Iyama, Nona Abolhassani, Yusaku Nakabeppu Human NUDT16 is a novel nucleotide pool sanitizing enzyme hydrolyzing (deoxy)inosine diphosphate to (deoxy)inosine monophosphate., 2009年 第32回日本分子生物学会年会(神奈川県横浜市パシフィコ横浜、12月9-12日、2日目ポスター発表 2P-0170)

(3) Nona Abolhassani, Teruaki Iyama, Daisuke Tsuchimoto, Kunihiro Sakumi, Mizuki Ohno, Behmanesh Mehrdad, Yusaku Nakabeppu An increased expression of NUDT16 with IDP/dIDP hydrolyzing activity in

immortalized ITPA-null mouse embryonic fibroblasts suppressed ITPA-deficient phenotypes., 2009年 第32回日本分子生物学会年会(神奈川県横浜市パシフィコ横浜、12月9-12日、4日目ポスター発表 4P-0467)

(4) 土本大介、猪山輝昭、アボルハッサニ・ノナ、中別府雄作、ヒトNUDT16は(デオキシ)イノシンリン酸を(デオキシ)イノシンーリン酸に加水分解する新規ヌクレオチドプール浄化酵素である、2009年 第20回DNA複製・組換え・修復ワークショップ(滋賀県彦根市琵琶湖コンファレンスセンター、11月1-3日、1日目口演)

(5) Daisuke Tsuchimoto, Eiji Iwama, Teruaki Iyama, Yusaku Nakabeppu, Identification of the full-length form of Prune2, a neuroblastoma-related protein., 2009年 第32回日本神経科学大会(愛知県名古屋市名古屋国際会議場、9月16-18日、1日目ポスター発表 P1-m19)

(6) アボルハッサニ・ノナ、作見邦彦、大野みずき、土本大介、ベーマネッシュ・メールドート、中別府雄作、Novel pathway for hydrolysis of inosine nucleotides detected in immortalized ITPA-null mouse embryo fibroblasts、2008年第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会(12月9日~12日) 神戸 1P-0666 (12月9日)

(7) 岡素雅子、大野みずき、土本大介、作見邦彦、中別府雄作
核とミトコンドリアゲノムへの8-oxoguanineの同時蓄積によって起動されるプログラム細胞死

2008年第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会(12月9日~12日) 神戸 2P-0522 (12月10日)

(8) 土本大介、吉田菜桜子、中別府雄作
新規損傷ヌクレオチド浄化酵素ITPBP2の同定

と機能解析

2008年第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会(12月9日~12日) 神戸 4P-0674 (12月12日)

(9) 太田詠子、土本大介、大野みずき、作見邦彦、中別府雄作

哺乳動物細胞における2-OH-ATPの生物学的影響

2008年第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会(12月9日~12日) 神戸 4P-0681 (12月12日)

(10) 野中麻里、土本大介、太田詠子、作見邦彦、中別府雄作、ITP結合タンパク質ITPBP1の生化学的特性の解析、2007年第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会(12月11日~15日) 横浜 3P-0444(12月13日)

(11) 市川淳二、土本大介、岡素雅子、大野みずき、作見邦彦、中別府雄作、Nitric oxide induces cell death through oxidation of mitochondrial deoxynucleotide pools.、2007年第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会(12月11日~15日) 横浜 4W10-11 (12月14日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/nfg/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

土本大介 (Tsuchimoto Daisuke)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：70363348

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中別府雄作 (Nakabeppu Yusaku)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30180350