

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22256

研究課題名（和文）過渡核酸塩基付加体による変異誘発メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of mutagenesis by transient nucleobase adducts

研究代表者

川井 清彦（KAWAI, KIYOHICO）

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50314422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、発がん物質であるアルコールの摂取により過渡的に体内に生じる核酸付加体“N2-ethylidene-G (ethG)”の形成について知見を得ることを目的とした。PacBio社製の次世代シーケンサーRSII+を用いて、核酸の結合・解離過程を1分子追跡することにより、mMオーダーの比較的高濃度のアセトアルデヒド存在下におけるethGの生成の観測に成功した。ethGの生成を詳細に定量的に議論するためには、膨大なデータを適切に処理することが必要であることが浮き彫りになった。過渡的に形成するethGの生成、解離過程のデータ解析法を確立するため、核酸アプタマーの1分子解析を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

百薬の長とよばれ我々の人生を豊にしている一方、国際がん研究機関より、ベンゼンなどと同じ「G1：ヒトに対する発がん性がある」に分類されているアルコールの摂取が体に与える影響を理解することは、人類がアルコールとより上手につき合うことにつながる。我々が行ったハイスループットな1分子観測は、低頻度、かつ、短時間にしか生じない、すなわち、過渡的な準安定生成物の生成・代謝機構を調べる有効なツールとなりうることを示された。一方で、膨大なデータからのデータ抽出が必要でありAI等のデータサイエンス分野との連携が不可欠であることを浮き彫りとした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to gain insight into the formation of N2-ethylidene-G (ethG), a nucleic acid adduct transiently induced in the body by the ingestion of alcohol, a carcinogen. Using PacBio's RSII+ next-generation sequencer, we have successfully observed the formation of ethG in the presence of relatively high concentrations of acetaldehyde on the order of mM by tracking single molecules of the binding and dissociation processes of nucleic acids. The results of this study highlight the need for appropriate processing of large amounts of data in order to discuss the formation of ethG in detail and quantitatively. In order to establish a data analysis method for the formation and dissociation process of transiently formed ethG, single molecule analysis of nucleic acid aptamers was achieved.

研究分野：核酸化学、光化学、生物有機化学

キーワード：DNA 変異原 1分子検出 アルコール

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルコールは、百薬の長とよばれ我々の人生を豊にしている一方、国際がん研究機関より、ベンゼンなどと同じ「G1: ヒトに対する発がん性がある」に分類されている。アルコールの摂取によりその代謝物であるアセトアルデヒドと核酸塩基の1つグアニン(G)が反応することにより、ethG が過渡的に生じる。ethG による変異は、複製の際にグアニン(G)銑型に対して本来取り込まれるべきシトシン(C)以外が取り込まれ遺伝情報が書き換えられることにより引き起こされ、発ガン、老化の原因となっていると考えられている。アルコール摂取による発ガンの影響に関しては長年にわたり膨大な研究がなされているが、ethG は不安定であるため、C,G,T,A どの塩基と安定に結合し、どの塩基に書き換えられてしまう可能性があるのか、分子レベルでは明らかになっていない。ethG の定量や変異原性の議論は、アスコルビン酸等による還元を経て生成する安定な N²-ethyl-dG を用いて行われてきた。N²-ethyl-G は生体内においても生じるがマイナーパスであり、ethG の変異原性についての詳細は明らかになっていない。

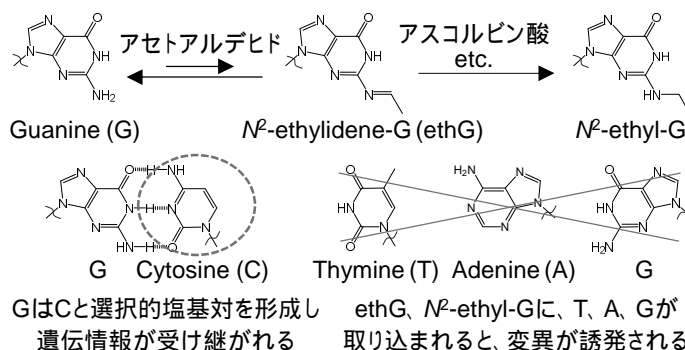


図1. アルコール代謝物であるアセトアルデヒドがGと反応すると、過渡生成物として ethG が生じる。還元剤存在下では、ethG から N²-ethyl-dG が生成する。

2. 研究の目的

本研究では、これまで有効な手法がなく調べることができなかった、過渡的に(短い時間)しか存在しない核酸塩基と分子の反応物 (= 過渡核酸塩基付加体) として、アルコールの摂取により過渡的に体内に生じる核酸付加体“N²-ethylidene-G (ethG)”に注目し、ethG による変異誘発のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

過渡的にしか存在しない分子の挙動を解析するにあたり、1分子測定が有効な手法となりうる。変異原性を正しく評価するためには、生理的条件下での測定が求められるが、飲酒後の血中アセトアルデヒド濃度条件では(ビール 500 mL 2本のアルコール量を酒に強いとされる ALDH2*1/*1 遺伝子型の成人男子が摂取した場合 10 μM 程度: *Alc. Clinic. Exp. Res.* **38** (2014) 1502.) 当然ながら G と ethG 間の平衡は、もっぱら G 側に傾いている。稀にしか現れず、かつ、短い時間しか存在しない ethG の影響について、通常の 1 分子観測法で議論することは極めて難しい。いかにして過渡核酸塩基付加体を同定するかが大きなポイントとなる。研究協力者 Jens

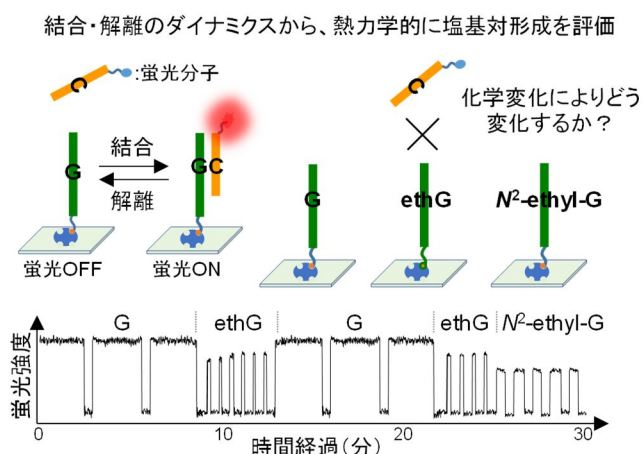


図2. 蛍光分子を結合した DNA と、ガラス基盤に結合した DNA の結合・解離のダイナミクスを、蛍光のゆらぎとして RSII+ を用いて網羅的に測定し、ethG、N²-ethyl-dG の形成を追跡し、その C との塩基対形成について熱力学的に検証する。

Sobek 博士 (スイスチューリッヒ大学) らは、PacBio 社製次世代シーケンサー (RSII+) を用いて、核酸の結合解離過程の網羅的な 1 分子蛍光観測を報告してきた¹⁻³。我々は Jens Sobek の指導のもと、DNA の結合・解離過程ダイナミクスの 1 分子観測により ethG の同定を試みた。

4. 研究成果

研究協力者 Jens Sobek 博士の協力のもと、RSII+を用いたアルデヒド存在下における ethG の生成の観測を行い、高濃度となる 5 mM のアセトアルデヒド存在下で、過渡核酸付加体 ethG の生成を示唆する結果を得た。さらに、還元条件下で本実験を行うと、ethG の生成を経て *N*²-ethyl-dG が生成する過程を観測することに成功した。しかしながら、データに少なくとも、G、ethG、*N*²-ethyl-dG に由来する 3 つの蛍光揺らぎを生じ、かつ、観測中に進行してしまう G の酸化分解化合物の生成も見られた。1 回の測定で得られるデータは 50GB を超え、膨大なデータから注目すべき G、ethG、*N*²-ethyl-dG に関するデータを抽出することは困難を極めた。

過渡的に形成する ethG の生成、解離過程のデータ解析法を検討するため、より簡潔な系を用いて解析法を確立するため、核酸アプタマーの 1 分子解析に取り組んだ。ATP アプタマーを 2 つに分裂した split ATP アプタマーの半分をガラス基板上に固定し、もう半分を蛍光標識した。split ATP アプタマーは ATP 非存在下でも複合体を形成するが、ATP 存在下でより安定な複合体を形成する。RSII+を用いた 1 分子測定を行い、2 成分解析により、各条件における解離速度の測定法を確立し、ATP 存在下では、ATP 非存在下に比べ、解離速度が遅くなる、すなわち、蛍光パルスがより長く観測されることが確認された⁴。これにより、1 分子レベル蛍光観測を、ELSIA などのサンドイッチアッセイに応用できることが示唆された。

我々は、1 分子レベルの蛍光観測による 1 分子分析・診断を目指し、蛍光分子周辺のミクロ環境情報に応じて蛍光点滅 = blinking のパターンが変化することに基づく情報読み出し法を開発してきた (Kinetic Analysis based on the Control of fluorescence Blinking: KACB 法)⁵⁻¹³。今回確立した、ハイスループットな 1 分子蛍光観測と、KACB 法を組み合わせることにより、種々の情報の 1 分子検出へと発展することが期待される。

< 引用文献 >

- 1 J. Sobek, H. Rehrauer, S. Schauer, D. Fischer, A. Patrignani, S. Landgraf, J. Korch, R. Schlapbach, *Methods Appl. Fluoresc.* **2016**, *4*, 015002.
- 2 J. Sobek, M. Schmidt, J. Grossmann, H. Rehrauer, L. Schmidt, R. Schlapbach, *Methods Appl. Fluoresc.* **2020**, *8*, 035010.
- 3 J. Sobek, R. Schlapbach, *Molecules* **2020**, *25*, 5369.
- 4 K. Kawai, M. Fujitsuka, *Chem. Lett.* **2022**, *51*, 139-141.
- 5 K. Kawai, E. Matsutani, A. Maruyama, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15568-15577.
- 6 K. Kawai, T. Koshimo, A. Maruyama, T. Majima, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10478-10481.
- 7 K. Kawai, K. Higashiguchi, A. Maruyama, T. Majima, *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 3590-3594.
- 8 K. Kawai, A. Maruyama, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4861-4864.
- 9 K. Kawai, T. Miyata, N. Shimada, S. Ito, H. Miyasaka, A. Maruyama, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 15329-15333.
- 10 T. Miyata, N. Shimada, A. Maruyama, K. Kawai, *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24*, 6755-6761.
- 11 K. Kawai, A. Maruyama, *Chem. - Eur. J.* **2020**, *26*, 7740-7746.
- 12 K. Kawai, M. Fujitsuka, A. Maruyama, *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 1001-1010.
- 13 J. Xu, L. Xu, S. Fan, A. Maruyama, M. Fujitsuka, K. Kawai, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 12941-12948.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Xu Jie, Tojo Sachiko, Fujitsuka Mamoru, Kawai Kiyohiko	4. 巻 5
2. 論文標題 Dynamics of Single Stranded RNA Looping Probed and Photoregulated by Sulfonated Pyrene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemistrySelect	6. 最初と最後の頁 8002 ~ 8008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/slct.202002231	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 -

1. 著者名 Kawai Kiyohiko, Fujitsuka Mamoru, Maruyama Atsushi	4. 巻 54
2. 論文標題 Single-Molecule Study of Redox Reaction Kinetics by Observing Fluorescence Blinking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Accounts of Chemical Research	6. 最初と最後の頁 1001 ~ 1010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.accounts.0c00754	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 -

1. 著者名 Kawai Kiyohiko, Maruyama Atsushi	4. 巻 26
2. 論文標題 Kinetics of Photoinduced Reactions at the Single Molecule Level: The KACB Method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202000439	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kiyohiko Kawai
2. 発表標題 Single-Molecule Level Monitoring of Nucleic Acids Conformational Changes by Controlling the Fluorescence Blinking
3. 学会等名 -System Figuration European-Japanese Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本核酸化学会、杉本 直己	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 576
3. 書名 核酸科学ハンドブック	

〔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
研究 分担 者	小阪田 泰子 (Osakada Yasuko) (00579245)	大阪大学・産業科学研究所・准教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------