

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17055

研究課題名（和文）対向型塩基損傷に対するDNA修復の検証-炎症性発がんのメカニズムの探求-

研究課題名（英文）In vitro approach of inflammatory carcinogenesis by the elucidation of cellular response to opposing DNA damages.

研究代表者

森脇 隆仁（Moriwaki, Takahito）

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：60734100

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では炎症性発がんのメカニズム解明を目指し、対向型DNA損傷が細胞内でどのように認識され修復されるのかについて検討を行った。対向型DNA損傷に結合活性を示す酵素を探索した結果、特異的に結合するタンパク質の存在を示すバンドが得られた。グリコシラーゼ活性を確認した結果、対向型DNA損傷からはウラシルが積極的に除去されることが分かったが、8-オキシグアニンの除去活性は見られなかった。APリナーゼ活性を観察した結果対向型DNA損傷におけるウラシルの除去はUNGやUDGなどによって行われていることが示唆された。以上のことから、対向型DNA損傷に対して細胞は特異的な修復機構を備えていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりヒトに対向型DNA損傷を認識するタンパク質が存在することが明らかとなり、またその機能の一端が分かった。対向型DNA損傷は炎症性発がんと密接に関連していると予測されるため、このタンパク質を同定し、その機能を明らかにすることは炎症性発がんの理解につながる。全がんの15%は何らかのウイルス感染とそれに伴う炎症が原因であると見積もられている。それゆえ炎症性発がんの理解はがんの罹患リスクそのものの低下に大きく寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated how opposing DNA damage is recognized and repaired in cells to elucidate the mechanism of inflammatory carcinogenesis. A search for enzymes with binding activity to opposing DNA damage yielded a band indicating the presence of a protein that binds specifically to it. Glycosylase activity was confirmed and showed that uracil was actively removed from opposing DNA damage, but no activity for removal of 8-oxoguanine was observed; observation of AP lyase activity by Trapping assay showed that removal of uracil in opposing DNA damage was not dependent on UNG or UDG, suggesting that the removal of uracil in opposing DNA damage is carried out by mono-functional glycosylases such as UNG and UDG. Taken together, these results indicate that cells have specific repair mechanisms for opposing DNA damage.

研究分野：DNA損傷

キーワード：DNA損傷 突然変異 がん 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

生物は太陽光に含まれる紫外線や、生体内の代謝によって産生される活性酸素種などにより常にストレス・ダメージを受け続けている。紫外線や活性酸素種は DNA の化学構造を変化させ (DNA 損傷の生成) 突然変異や転写の異常を引き起こす。生体内で恒常的に産生される DNA 損傷からゲノムを守るために、生物は DNA 修復系を進化させてきた。生体内で生じた DNA 損傷のほとんどは塩基除去修復 (base excision repair; BER)、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER)、ミスマッチ修復 (mismatch repair; MMR)、相同組み換え修復 (homologous recombination repair; HR)、非相同末端結合 (non-homologous end joining; NHEJ)、DNA 鎖間架橋修復 (interstrand cross-linking repair; ICLR) などの DNA 修復系によって適切に修復されることが分かっている。DNA 修復機構は in vitro、in vivo 問わず幅広く研究されてきた。その一方で既存の DNA 修復機構に関する研究は損傷 DNA と正常 DNA の塩基対に対する研究がほとんどであり、同一塩基対内に二つの DNA 損傷が対向して存在する対向型 DNA 損傷については検討されてこなかった。

対向型 DNA 損傷はその性質上 損傷 DNA の除去と DNA の再合成の二点において正確な修復が困難であることが予想される。まず 損傷 DNA の除去における困難について説明する。DNA の塩基部位における酸化やメチル化による DNA 損傷においては BER が主な修復を担っていることが知られている。BER において損傷 DNA の除去は各損傷に応じた DNA グリコシラーゼが担っている。DNA グリコシラーゼの修復活性は損傷 DNA そのものに影響されるが、それだけでなく対向塩基によっても影響を受ける。例えばグアニンの酸化体である 8-オキシグアニンを除去するグリコシラーゼである 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 (OGG1) では、8-オキシグアニンを強く認識し、グアニンそのものにはほとんど活性を示さない。しかし、8-オキシグアニンであっても、シトシンと対合している場合は効率よく除去できる一方で、アデニンと対合している場合はほとんど活性を示さないことが報告されている [1]。こうしたことから、8-オキシグアニンが他の DNA 損傷と対合した場合に OGG1 が効率的に除去できるかは不明である。こうした理由から対向型 DNA 損傷では既存のグリコシラーゼが効率的に損傷 DNA の除去が行えず正確な修復が困難な可能性がある。また損傷 DNA の除去に成功しても、その後に DNA の再合成における困難を乗り越える必要がある。通常の DNA 損傷では損傷を除去したのち、もう片方の正常な DNA をもとに DNA の再合成を行うが、対向型 DNA 損傷においてはもう片方の DNA も損傷を受けているため、除去後の再合成は損傷した DNA をもとにして行わなければならない。このことから対向型 DNA 損傷においては DNA の再合成を正確に行うことが非常に困難であると考えられる。

対向型 DNA 損傷の生物影響を考察するうえで炎症が想定される。炎症部位では突然変異頻度が上昇することが知られている。また、その高い突然変異頻度から炎症は発がんとも密接に関連があることが知られている。Alberto Mantovani らは 2008 年にがんによる死亡のうち 15-20% は感染症や慢性炎症が関係していると見積りを報告している [2]。炎症における高い突然変異頻度を示す原因として現在活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の増加とシチジンデアミナーゼの発現誘導の二つが考えられている。活性酸素種はゲノム中にグアニンの酸化体である 8-オキシグアニンなどの酸化型 DNA 損傷を生成する。シチジンデアミナーゼはシトシンを脱アミノ化し、ウラシルへと変換する酵素である。シチジンデアミナーゼは感染したウイルスのゲノム DNA を破壊するために炎症部位で発現量が上昇するが、発現したシチジンデアミナーゼは細胞のゲノム DNA も攻撃し、ゲノム DNA 中にウラシルを生成することが知られている。グアニンとシトシンはゲノム中では塩基対を形成して存在しているため、8-オキシグアニンとウラシルも同様に塩基対を形成して存在している可能性がある。

以上の理由から対向型 DNA 損傷に対する修復機構は学術的に興味深いテーマであり、炎症性発がんのメカニズムを考察するうえでも重要な意味を持つと期待された。

## 2. 研究の目的

本研究では 8-オキシグアニンとウラシルからなる対向型 DNA 損傷に対する修復機構を解明し、炎症性発がんとの関連を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

対向型 DNA 損傷の修復機構を解明するために、細胞内の修復酵素を生化学的手法によって検出しその機能を解析した。

### 1) DNA 結合活性の検出

Gel mobility shift assay で細胞内に存在する対向型 DNA 損傷を認識するタンパク質を検出した。放射性同位体 (RI) で標識したオリゴヌクレオチドを用いて、正常 DNA (G:C)、ウラシル (G:U)、8-オキシグアニン (8G:C)、対向型 DNA 損傷 (8G:U) の 4 種類の基質 DNA を標識し、ヒト胎児腎細胞 293 (HEK293) 細胞抽核出液と混合し、電気泳動によってタンパク質-DNA 複合体を分離した。RI のシグナルは Imaging plate と Typhoon scanner を用いて可視化した。

## 2) グリコシラーゼ活性の検出

DNA nicking assay で細胞内に存在する対向型 DNA 損傷に対するグリコシラーゼ活性を検出した。RI で標識した 4 種類の基質を細胞抽出液と混合し、37 °C で 15 分間反応させた。反応産物は 8M 尿素を含むアクリルアミドゲルで分離し DNA 断片の大きさを比較した。RI のシグナルは Imaging plate と Typhoon scanner を用いて可視化した。

## 3) AP-Lyase 活性の検出

DNA trapping assay で細胞内に存在する対向型 DNA 損傷に対する AP-Lyase 活性を検出した。RI で標識した 4 種類の基質を細胞抽出液と混合し、100 mM の NaBH<sub>4</sub> 存在下で 37 °C で 60 分間反応させた。反応産物は SDS-アクリルアミドゲルで分離しタンパク質-DNA 複合体を検出した。RI のシグナルは Imaging plate と Typhoon scanner を用いて可視化した。

## 4 . 研究成果

HEK293 核抽出液中に対向型 DNA 損傷を認識するタンパク質があるかどうかを Gel mobility shift assay で探索を行った。その結果、対向型 DNA 損傷に対してはウラシル結合タンパク質と類似したサイズのバンドシフトに加え、対向型 DNA 損傷特異的なバンドシフトが観察された。この対向型 DNA 損傷特異的なバンドは 8-オキシグアニンの基質では競合阻害されなかったが、ウラシルの基質によって競合阻害された。このことから、この認識タンパク質はウラシルに対しても弱いながら基質特異性がある可能性が考えられる。その他の可能性として対向型 DNA 損傷にはウラシルと共通するタンパク質の結合が予想されることから、UNG などのウラシル修復酵素を介して対向型 DNA 損傷に結合していることが予想される。核抽出液内の対向型 DNA 損傷に対するグリコシラーゼ活性を DNA nicking assay で解析した。核抽出液は対向型 DNA 損傷からウラシルを除去する活性が検出されたが、8-オキシグアニンを除去する活性は検出されなかった。グリコシラーゼの AP-Lyase 活性を検出する DNA Trapping assay では特異的なバンドは検出されなかった。こうしたことから対向型 DNA 損傷はウラシルが優先的に除去されるが、この除去は UNG などの mono-functional なグリコシラーゼによって行われることが分かった。その一方で 8-オキシグアニンについては除去する活性は観察されなかったため、対向型 DNA 損傷に対して従来の 8-オキシグアニンを認識するグリコシラーゼが機能できないか、8-オキシグアニンを保護するタンパク質の存在が想定された。現在は質量解析を用いて Gel mobility shift assay で得られた対向型 DNA 損傷を特異的に認識するタンパク質の同定を試みているところである。

## 引用文献

- [1] Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. A Klungland, I Rosewell, S Hollenbach, E Larsen, G Daly, B Epe, E Seeberg, T Lindahl, D E Barnes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 ;96(23):13300-5.
- [2] Cancer-related inflammation. A Mantovani, P Allavena, A Sica, F Balkwill. Nature. 2008;454(7203):436-44.

## 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 6件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takahito Moriwaki, Akari Yoshimura, Yuki Tamari, Hiroyuki Sasanuma, Shunichi Takeda, Masayuki Seki, Keizo Tano	4. 巻 43
2. 論文標題 PRDX1 is essential for the viability and maintenance of reactive oxygen species in chicken DT40.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41021-021-00211-4	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 Akira Yamasaki, Michio Suzuki, Tomoo Funayama, Takahito Moriwaki, Tetsuya Sakashita, Yasuhiko Kobayashi, Qiu-Mei Zhang-Akiyama	4. 巻 22
2. 論文標題 High-Dose Irradiation Inhibits Motility and Induces Autophagy in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 9810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22189810	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 Viktoriiia Sofronova, Rina Iwata, Takuya Moriya, Kiunniai Loskutova, Elizaveta Gurinova, Mairanush Chernova, Anastasia Timofeeva, Anna Shvedova, Filipp Vasilev, Saina Novgorodova, Seigo Terawaki, Takahito Moriwaki, Aitalina Sukhomyasova, Nadezhda Maksimova, Takanobu Otomo	4. 巻 23
2. 論文標題 Hematopoietic Disorders, Renal Impairment and Growth in Mucopolysaccharidosis-Plus Syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5851
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23105851	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 Viktoriiia Sofronova, Yu Fukushima, Mitsuo Masuno, Mami Naka, Miho Nagata, Yasuki Ishihara, Yohei Miyashita, Yoshihiro Asano, Takahito Moriwaki, Rina Iwata, Seigo Terawaki, Yasuko Yamanouchi, Takanobu Otomo	4. 巻 9
2. 論文標題 A novel nonsense variant in ARID1B causing simultaneous RNA decay and exon skipping is associated with Coffin-Siris syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-022-00203-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 該当する

1. 著者名 Toshiaki Nakano, Takahito Moriwaki, Masataka Tsuda, Misa Miyakawa, Yuto Hanaichi, Hiroyuki Sasanuma, Kouji Hirota, Masanobu Kawanishi, Hiroshi Ide, Keizo Tano, Tadayoshi Bessho	4. 巻 35
2. 論文標題 SPRTN and TDP1/TDP2 Independently Suppress 5-Aza-2 -deoxycytidine-Induced Genomic Instability in Human TK6 Cell Line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 2059-2067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.2c00213	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 Viktoriiia Sofronova, Elizaveta Gurinova, Diana Petukhova, Hiroko Fukamatsu, Takenobu Yamamoto, Yumi Aoyama, Polina Golikova, Gavriil Moskvitin, Roza Ivanova, Mira Savvina, Filipp Vasilev, Takahito Moriwaki, Seigo Terawaki, Aitalina Sukhomyasova, Nadezhda Maksimova, Takanobu Otomo	4. 巻 24
2. 論文標題 A Case of Mucopolysaccharidosis II Caused by a Novel Variant with Skin Linear Hyperpigmented Streaks along Blaschko 's Lines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24065647	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 Mahmoud Osman Khalifa, Takahito Moriwaki, Shouhua Zhang, Wei Zhou, Kosei Ito, Tao-Sheng Li	4. 巻 667
2. 論文標題 Negative pressure induces dedifferentiation of hepatocytes via RhoA/ROCK pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 104-110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.05.042	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Sofronova Viktoriiia, Naka Mami, Yu Fukushima, Moriwaki Takahito, Nagata Miho, Ishihara Yasuki, Yonei Ayumi, Asano Yoshihiro, Masuno Mitsuo, Yamanouchi Yasuko, Otomo Takanobu
2. 発表標題 A case of atypical Coffin-Siris syndrome with a novel nonsense mutation in the ARID1B gene.
3. 学会等名 日本人類遺伝学会
4. 発表年 2021年 ~ 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------