

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310142

研究課題名（和文） 化学合成DNAセンサーを用いたDNA修復の検出および解析

研究課題名（英文） Detection and analysis of DNA repair using chemically-synthesized DNA sensors

研究代表者

岩井 成憲（IWAI SHIGENORI）

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号：10168544

研究成果の概要（和文）：DNAは外的および内的要因により絶えず傷付いているが、全ての生物はそのような損傷DNAを修復するシステムを備えている。我々はDNA修復反応を蛍光により検出・解析するためのセンサー（専門的にはプローブと呼ばれる）を開発することを目指し、酸化損傷に対して働く塩基除去修復酵素の反応を検出・解析できる蛍光プローブを合成した。これを用いることにより試験管内で修復酵素の基質特異性を調べ、細胞内の修復反応を可視化することに成功した。

研究成果の概要（英文）：DNA is always damaged by exogenous and endogenous factors, but all living organisms have repair systems for damaged DNA. We intended to develop sensors (or technically known as probes) to detect and analyze DNA repair reactions by fluorescence, and synthesized fluorescent probes that would be used for the reactions of base-excision-repair enzymes with oxidatively-damaged DNA. Using these probes, the substrate specificities of the repair enzymes were analyzed *in vitro*, and the cellular repair reactions were successfully visualized.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：DNA損傷、DNA修復、オリゴヌクレオチド、蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の本体であるDNAは生体内で種々の化学反応を受け、化学構造の一部が変化する。このようなDNAの望まれない化学構造の変化はDNA損傷と呼ばれる。DNAに損傷を与える要因は数多くあるが、細胞内に大量に含まれる水による加水分解や生命活動に必要な活性酸素種による酸化などは避ける

ことができない。例えば、酸化により7,8-ジヒドロ-8-オキソグアニンやチミングリコールなどの損傷塩基が生じる。また、太陽光の下で生存する地球上の生物は、紫外線によるDNA損傷も不可避であると言える。紫外線による損傷の中で代表的なものは、隣接するピリミジン塩基に生じるシクロブタンピリミジンダイマーと(6-4)光産物である。損傷に

よる DNA の化学構造の変化は複製時に突然変異を引き起こし、遺伝情報の正常な伝播を妨げるだけでなく、個体にとっては細胞死やがん化の原因となる。しかし、すべての生物は損傷を受けた DNA を修復するシステムを持っており、通常、遺伝情報は完全な状態に保たれる。酸化やアルキル化といった化学構造上の変化が小さい損傷には塩基除去修復 (BER) が働き、損傷塩基が除去されると同時に鎖切断が起こって、狭い範囲でヌクレオチドが埋め戻される。紫外線損傷はヌクレオチド除去修復 (NER) により修復されるが、これは多種のタンパク質複合体により損傷の周囲が約 30 ヌクレオチドにわたって切り取られ、その後 DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼによって埋め戻されるという修復系である。ヒトにおいて修復系の異常と病気との関連が明らかにされており、色素性乾皮症の場合には遺伝的に NER が欠損しているため、太陽光を浴びると皮膚がんを多発することが知られている。DNA 修復の生化学的研究は損傷を有する化学合成オリゴヌクレオチドを用いて行われており、損傷鎖を ^{32}P で標識した後、酵素反応の生成物をゲル電気泳動により分離して放射活性で検出することが一般的であった。

2. 研究の目的

本研究は、損傷 DNA に対して BER あるいは NER が働くと蛍光を発する分子センサーを開発し、試験管内での修復反応の解析や細胞内での DNA 修復能の検出に応用することを目的とした。具体的には、各修復系の基質となる損傷塩基を有する 2 本鎖 DNA の一方の端にモレキュラー・ビーコン (塩基配列を検出するために開発された蛍光プローブ) のように蛍光色素とクエンチャー (消光剤) を付けたものを合成する。試験管内での修復酵素の反応解析にはこの形で使用することが可能であるが、細胞抽出液中や細胞中では核酸断片はヌクレアーゼにより容易に分解されるため、ある程度の部分をフォスフォロチオエートのような非天然型の核酸アナログとして耐性を持たせる必要があると考えた。BER の場合には損傷部分の 1 ヶ所で鎖切断が起こるので 2 本鎖が短くてよい場合、蛍光色素を付けない末端はループとすることにより単一の分子とする。それに対し、NER の基質となるためにはある程度の鎖長が必要であるため、損傷鎖と相補鎖に分けて合成し使用前に 2 本鎖とする。このような分子に対して除去修復による鎖切断が起こると、蛍光色素が付いている末端から切断位置までの部分の塩基対数が少なくなり、反応温度である 37°C で 2 本鎖を形成できなくなると蛍光が観察されることを期待した。

3. 研究の方法

まず、BER 用の蛍光プローブの開発を行う。修復酵素として酸化されたピリミジン塩基を基質とする大腸菌エンドヌクレアーゼ III およびそのヒトホモログである NTH1 を選び、酸化損傷塩基を有し両末端に蛍光色素とクエンチャーを付けたヘアピン型オリゴヌクレオチドを合成する。損傷塩基と蛍光色素の組合せを数種類準備し、それぞれの酵素による鎖切断をゲル電気泳動と蛍光強度変化により調べ、蛍光による酵素反応の検出が可能であることを確認する。その後、酵素濃度変化あるいは時間変化における切断率を求めることにより、各酵素の基質特異性をこれらの蛍光プローブにより解析できるかどうかを調べる。放射線ではなく蛍光による検出でのみ可能な実験、すなわち蛍光プローブの新規用途についても検討する。次に、好熱性細菌のエンドヌクレアーゼ III と DNA の複合体について得られている結晶構造を基にして酵素の結合に必要なリン酸ジエステルを残し、その他の部分をフォスフォロチオエートに置き換えた蛍光プローブを合成する。マイクロインジェクションあるいはトランスフェクション試薬を用いてこれをヒト培養細胞に導入し、細胞内での修復酵素の反応を蛍光で検出できるかどうかを調べる。

NER については、基質として長い 2 本鎖 DNA が必要である。しかし、2 本鎖の末端に蛍光色素とクエンチャーを付けても、切断後にその断片の塩基対数が多ければインキュベーション温度 (37°C) で断片が相補鎖から解離しないため、鎖切断が起こっても蛍光が検出されないと考えられる。そこで、NER の鎖切断反応が起こる最短の基質の長さを求める。そのためには、損傷 (NER が最も効率的に起こる (6-4) 光産物を用いる) の 5' 側および 3' 側の一方の末端を固定し、反対側で長さの異なる 2 本鎖 DNA を調製して細胞抽出液と反応させ、ゲル電気泳動で NER による断片が生じる最短の DNA を見つける。この場合、 ^{32}P で内部標識し、断片はイメージアナライザーを用いてその放射活性により検出する。最短の基質が見つかれば、内部標識を含めて蛍光色素とクエンチャーを付ける位置を検討する。試験管内での NER は効率が低く微量の断片しか得られないため、フォスフォロチオエート修飾がどの程度必要かも同時に検討し、NER を検出するための蛍光プローブとして使用できるかどうかは、試験管内での実験ではなく直接細胞に導入して調べる。また、最短の基質とは言え 100 ヌクレオチド程度の鎖長が必要であると考えられるので、(6-4) 光産物を有する長鎖オリゴヌクレオチドの合成法についても検討する必要がある。

4. 研究成果

(1) 蛍光プローブを用いた試験管内での BER 酵素の反応解析

修復酵素の研究にはポリヌクレオチドキナーゼと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ により ^{32}P で標識した基質が用いられ、酵素反応はゲル電気泳動により生成物を分離した後、生成物の放射線を検出・定量することにより解析されてきた。しかし、この方法は操作が面倒である上に放射性同位元素の使用における規制や危険性もあるため、酵素反応を蛍光によって検出・定量することを試みた。そのためのプローブとして、モレキュラー・ビーコン (Piatek et al. (1998) *Nature Biotechnol.* 16, 359–363) で使用された蛍光色素とクエンチャーを両末端に付けたヘアピン型オリゴヌクレオチドを設計・合成した (図 1)。このプローブは反応温度 (37°C) においてヘアピン構造を形成するため蛍光を発しないが、DNA グリコシラーゼ/AP リアーゼにより鎖切断を受けると蛍光色素が付いた断片は塩基対数が少なくなると解離し、蛍光が検出されることを期待した。損傷として(5*R*)-、(5*S*)-チミングリコール (RTg, STg) と 5,6-ジヒドロチミン (DHT) を用い、違った蛍光色素 (RTg, フルオレセイン (Fl); STg, Cy3; DHT, Cy5) を付けることにより各基質に対する反応を異なる波長で検出できるようにした。なお、DHT は大腸菌のエンドヌクレアーゼ III (EndoIII) にはほとんど認識されないがマウス NTH1 の基質となることが報告されている。合成したプローブのうち Fl-RTg と Cy3-STg が大腸菌 EndoIII で切断されることをゲル電気泳動で確認した上で、酵素として大腸菌 EndoIII とヒト NTH1 を用い、酵素量を変えて 30 分間反応させた後、蛍光強度を測定することにより図 2A, B の結果が得られた。また、酵素量を一定にして基質濃度ごとに時間を変えて蛍光強度を測定することにより反応速度を求めると、速度論的パラメーターを算出することができた。このように、BER 酵素の反応を基質特異性を含めて蛍光により容易、迅速かつ安全に解析できるよ

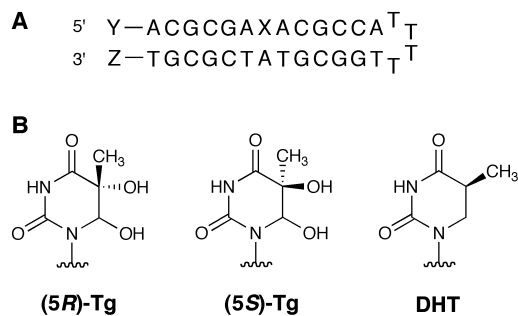


図 1 塩基除去修復反応を解析するための蛍光プローブ (A) と損傷塩基 X の構造 (B) Y は蛍光色素、Z はクエンチャーを示す。

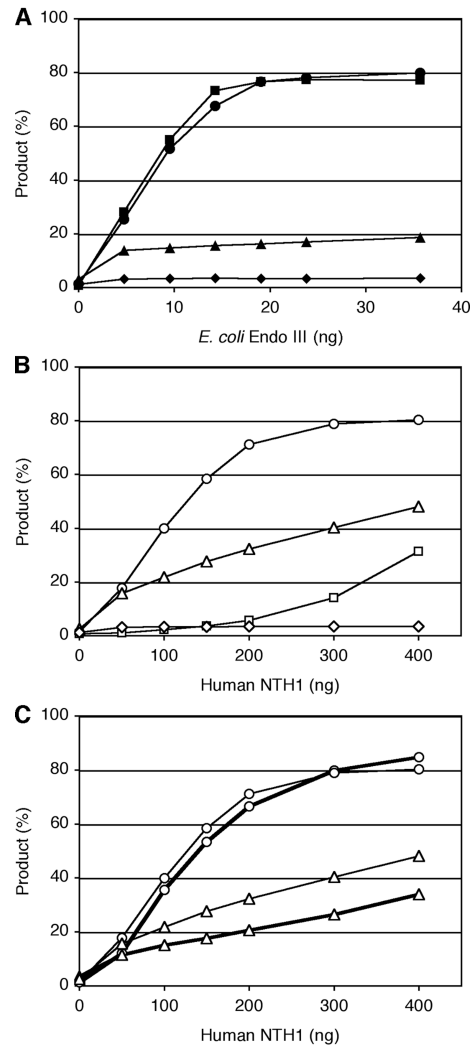


図 2 (A, B) 蛍光測定により定量した Fl-RTg (●, ○), Cy3-STg (■, □), Cy5-DHT (▲, △), Fl-T (◆, ◇) の大腸菌 EndoIII (A) およびヒト NTH1 (B) による切断 (C) Fl-RTg (○) と Cy5-DHT (△) の共存下におけるヒト NTH1 による鎖切断 (太線) 細線は B と同じ。

うになった。また、ヒト NTH1 による切断効率が高かった Fl-RTg と中程度の Cy5-DHT を混合した系では、Fl-RTg に対する反応は Cy5-DHT の存在に影響されなかったのに対し、Cy5-DHT は切断効率が低下した (図 2C)。これは酵素の親和性を反映しており妥当な結果であるが、従来の ^{32}P 標識では少なくとも同一鎖長の基質を用いては解析できなかった複数の基質共存下でのそれぞれの反応を、異なる波長で励起・測定することにより単一の溶液中で解析できることを示した。

(2) 細胞中での BER 反応の検出

蛍光検出の最大の特長は、生きた細胞に適用した場合に酵素反応を細胞中でリアルタイムに観察できる点にある。しかし、DNA の断片は細胞中で非特異的に分解されると

という問題がある。そこで、以前に DNA との複合体の結晶構造が報告されている *Bacillus stearothermophilus* の EndoIII の構造に基づき相互作用のないリン酸ジエステルをヌクレアーゼに耐性を持つフォスフォロチオエートに変えて HeLa 細胞抽出液中での安定性を調べた。その結果、ステムループ部分は安定であったが、クエンチャーのリンカーと 3'末端のヌクレオシドの間のリン酸ジエス

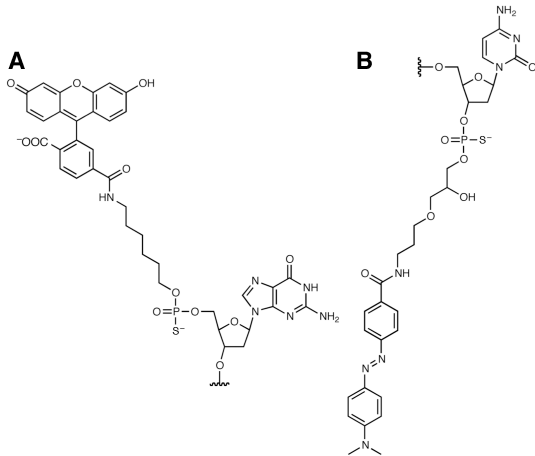


図 3 5' 末端 (A) および 3' 末端 (B) のリンカーの構造 フォスフォロチオエートで示す



図 4 細胞中で塩基除去修復を検出するためのプローブ sはフォスフォロチオエートを表す。

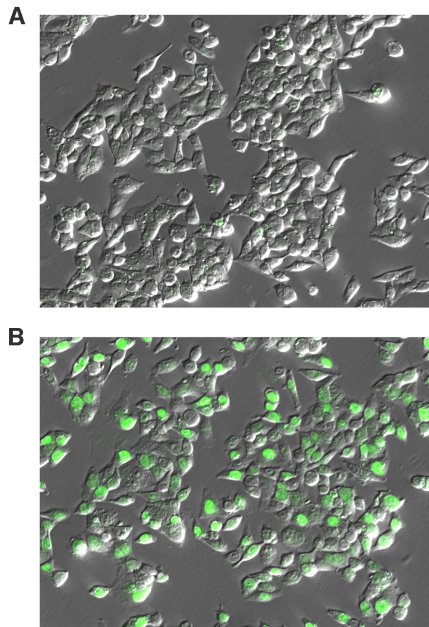


図 5 ヒト細胞中での塩基除去修復反応の検出 損傷のない (A) あるいは Tg を有する (B) プローブをトランスフェクトして 5 時間後に蛍光顕微鏡により観察した。

テルが切断されることがわかった。また、その部分をフォスフォロチオエートにしたものを細胞に導入すると非特異的に蛍光が検出され、蛍光色素のリンカーと 5'末端のヌクレオシドの間のリン酸ジエステルも細胞中で切断されることが示唆された。そのため、これらもフォスフォロチオエートとし (図 3)、最終的に細胞内で安定な蛍光プローブとして図 4 の構造を決定した。X, Y, Z として 5RTg, Fl, Dabcyl を持つものを合成し、同時にネガティブ・コントロールとして X がチミンのものも準備した。これらをリポフェクタミン 2000 により HeLa 細胞に導入し 37°C で培養して蛍光顕微鏡で観察した結果、5 時間後には各細胞の核の部分に蛍光がはっきりと観察され、X がチミンのコントロールを導入した細胞とは明らかな違いが見られた (図 5)。siRNA により NTH1 遺伝子の発現をノックダウンした細胞では発光の遅延が観察されたが、Tg に対する別の修復酵素である NEIL1 が働くため、蛍光が完全に消失するという結果にはならなかった。

(3) 蛍光プローブの導入を確認する方法

上記の研究において発見されたリンカー部のリン酸ジエステルの細胞中での加水分解を、蛍光プローブの細胞への導入を確認するために利用できるのではないかと考えた。すなわち、図 4 の構造で X, Y, Z としてチミン、Cy5, BHQ2 を持ち Y のリンカー部をリン酸ジエステルとした第 2 のプローブを、図 5 の実験で用いた BER 反応を検出するための蛍光プローブと混ぜて細胞に導入した。図 6 に示す結果は、蛍光プローブの細胞への導入を Cy5 で確認した上で細胞中の BER 酵素の反応を Fl で解析できることを意味し、特に細胞で酵素反応が起こらないことを示すために重要である。

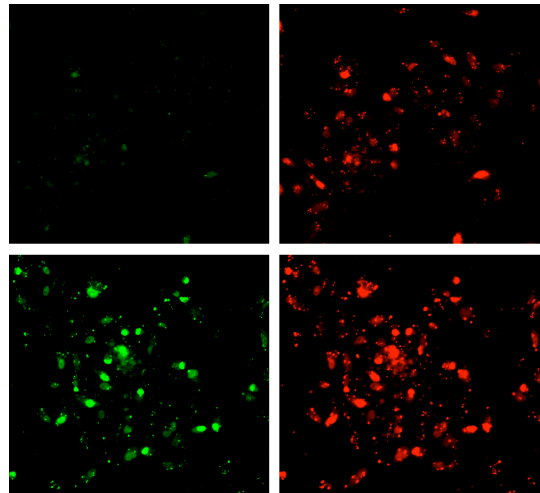


図 6 蛍光プローブの細胞内導入の確認 写真の上下については図 5 と同じ。それぞれ、左はフルオレセイン、右は Cy5 の蛍光を示す。

(4) NER への応用

DNA 修復反応の蛍光検出を紫外線損傷などに対して働く NER の系に応用するためには、基質として長鎖の DNA を合成しなければならないという問題がある。そこでまず、これまでに報告された中で最短の 140 塩基対の基質の合成を行った。いくつかの方法を試した結果、図 7 のように損傷鎖を 3 本、相補鎖を 2 本に分けて合成したオリゴヌクレオチドを、16 ヌクレオチドの添え木を使って DNA リガーゼでつなぎ、それぞれの鎖を精製後に 2 本鎖にするという手順がよいことがわかった。また、NER による鎖切断が効率的に起こる(6-4)光産物を有するオリゴヌクレオチドの化学合成を行ったが、BIT を活性化剤として用いることにより最長で 71 量体を合成することに成功した。

NER の基質となる最小の塩基対数を見つけるために損傷の 5' 側を短くした 100~140 塩基対の DNA を調製し(図 7)、細胞抽出液を用いた鎖切断反応をゲル電気泳動で解析した。その結果、140 塩基対の DNA が効率的な反応が起こる最短の基質であり、130 塩基対では断片の量が減少、120 塩基対以下では鎖切断は検出されなかった。次に損傷の 3' 側についても同様の実験を行ったが、細胞抽出液が失活しており結果を得ることができなかった。もし基質の塩基対数を大幅に減らすことができない場合、2 本鎖の末端に蛍光色素とクエンチャーを付けてもその断片が解離せず蛍光を検出できないため、2 本鎖内部に蛍光色素とクエンチャーを付けた基質を調製した(図 8)。この場合には蛍光色素が NER によって生じる断片内に位置することになり、ヘリカーゼ活性やヌクレアーゼ分解により蛍光が検出されることが期待される。

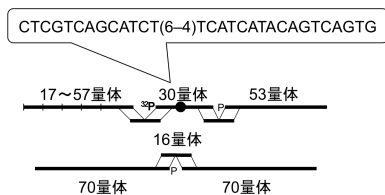


図 7 ヌクレオチド除去修復において損傷の 5' 側で最短の基質を探すための DNA の調製 ● は(6-4)光産物を示す。

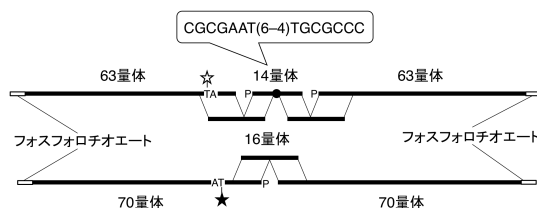


図 8 内部標識したヌクレオチド除去修復用蛍光プローブの調製 ☆は蛍光色素、★はクエンチャーを示す。

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 3 件)

- ① Naoyuki Matsumoto, Tatsuya Toga, Ryosuke Hayashi, Kaoru Sugawara, Katsuo Katayanagi, Hiroshi Ide, Isao Kuraoka, Shigenori Iwai, Fluorescent probes for the analysis of DNA strand scission in base excision repair. *Nucleic Acids Res.*, 査読有, Vol. 38, e101 (2010)
- ② 岩井成憲, DNA 修復反応の蛍光による検出と解析. 生産と技術, 査読無, Vol. 62, 69-73 (2010)
- ③ Naoyuki Matsumoto, Ryosuke Hayashi, Masayuki Himoto, Isao Kuraoka, Sayuri Morita, Fuki Hagiwara, Katsuo Katayanagi, Hiroshi Ide, Shigenori Iwai, Fluorescence detection of the endonuclease III reaction using modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 査読無, No. 53, 213-214 (2009)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Tatsuya Toga, Isao Kuraoka, Kaoru Sugawara, Shigenori Iwai, Fluorescent probes for the detection of base excision repair in cells. Sixth Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology, September 4-7, 2011, University of Cambridge, UK
- ② Shigenori Iwai, Fluorescence detection of the repair of radiation-induced DNA damage using synthetic oligonucleotides. Workshop of Research Laboratory for Quantum Beam Science on "Radiation Effects on DNA", July 26, 2011, Osaka University, Suita, Osaka, Japan
- ③ 梶 達也, 松本直之, 菅澤 薫, 倉岡 功, 岩井成憲, 蛍光による細胞の塩基除去修復能の検出. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9~12 日, 横浜
- ④ Naoyuki Matsumoto, Ryosuke Hayashi, Masayuki Himoto, Isao Kuraoka, Sayuri Morita, Fuki Hagiwara, Katsuo Katayanagi, Hiroshi Ide, Shigenori Iwai, Fluorescence detection of the endonuclease III reaction using modified oligonucleotides. The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 27-October 1, 2009, Takayama, Gifu, Japan
- ⑤ Naoyuki Matsumoto, Ryosuke Hayashi, Isao Kuraoka, Katsuo Katayanagi, Hiroshi Ide, Shigenori Iwai, Fluorescence detection of base-excision-repair reactions using

modified oligonucleotides. Nucleic Acids at
the Chemistry–Biology Interface,
September 7–8, 2009, University of
Manchester, UK

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.chem.es.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 成憲 (IWAI SHIGENORI)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号：10168544

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

倉岡 功 (KURAOKA ISAO)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授

研究者番号：60335396