

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510069

研究課題名(和文) オキサゾロン連続クラスター損傷に関する突然変異および修復反応の解析

研究課題名(英文) Study on the oxazolone-oxazolone cluster damage

研究代表者

喜納 克仁(Kino, Katsuhito)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：70360534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)： 研究期間を通じていろいろ試行錯誤した結果、Ozを含む6merと13mer、11merと相補鎖30merを混合した状態でライゲーションを行い、目的の30merを合成することに成功した。このOz連続配列を含む30merオリゴマーを用いて、DNAポリメラーゼ や 、クレノーフラグメントでプライマー伸長解析を行い、さらに乗り越え修復と関連するDNAポリメラーゼ 、 、 、REV1でプライマー伸長解析を行った。

研究成果の概要(英文)： In this research, the 6mer oligomer containing Oz was ligated with 13mer and 11mer oligomers and the complimentary 30mer oligomer, and then the 30mer oligomer containing OzOz was prepared. Using DNA polymerase alpha, beta, zeta, eta, kappa, Klenow fragment or REV1, primer elongation was performed.

研究分野：生物有機化学

キーワード：酸化 クラスター損傷 DNAポリメラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

DNAは生物の遺伝情報を担う分子であり、細胞が正常にその機能を果たすためにはDNAが正確に複製され、また安定に保存されることが必要になる。しかし実際には、我々が日常的に浴びる太陽光や活性酸素、代謝産物によってDNAは容易に損傷する。例えば、放射線の照射により、特定のDNA部位に二重鎖切断や塩基損傷を複数もつクラスター損傷を生成することが明らかとなっている[Nikjooら. *Int J Radiat Biol* 1997, 71, 467; *Radiat Res* 2001, 156, 577]。また、UVCやUVBの照射では、チミンダイマーが生成する。二重鎖切断やチミンダイマーは、元のDNAに比べて大きく構造を変化させるものであり、DNA・RNAポリメラーゼの滑走のひっかかりの原因と成りえるので、複製や転写が止まりやすくなる。この結果、細胞分裂が止まったり、生存に必要な蛋白質を正常に作れなくなったりするわけであり、高エネルギー光である放射線やUVC、UVBにより生成するDNA損傷は、生死を左右するような重篤なものと言えるだろう。

一方、低エネルギー光であるUVAや可視光の照射や、代謝により生成する活性酸素との反応により、グアニンの酸化損傷が生成する。グアニン酸化損傷はグアニン1塩基の変化であり、環境変異原物質による付加体でない限り、DNAの構造を大きく変えるものではない。そのため、ポリメラーゼがひっかかり、一見全長の蛋白質が合成されたり、遺伝子も全長複製される。しかしながら、DNA塩基は酸化を受ける前と後で、塩基対をつくる相手と同じでない場合、1塩基の変化(点突然変異)をひきおこす。しかし、この1塩基の変化程度では蛋白質の活性をあまり変えないことが多いので、そのまま細胞は生存し続ける。ところが、そのような点突然変異ががん遺伝子やがん抑制遺伝子において、何回か独立に起こり、最終的に元の制御蛋白質の活性を大きく変化させてしまった場合、もはや元の正常遺伝子配列には戻すことはできず、その細胞は制御を失いがん細胞へ変化してゆくと考えられる。こういった観点から、高エネルギー光で生成する二重鎖切断やチミンダイマーが細胞の生死を左右する重篤な損傷である一方、低エネルギー光で生成するグアニン酸化損傷は点突然変異の積み重ねによるがんや老化などの緩慢な効果を引き起こす損傷であるといえる[喜納ら. *放射線生物研究* 2010, 45, 268]。

代表的なグアニン酸化損傷として、8オキソグアニン(8oxoG)があげられるが、この損傷はさらに酸化を受けて、オキサゾロン(Oz)などを生成する[Kinoら. *Bioorg Med Chem Lett* 2010, 20, 3818等]。Ozは生体内から実際に検出されているため[Matterら. *Nucleic Acids Res* 2006, 34, 5449]、8oxoGだけではなく、生体内ではOzの影響も無視できないと申請者は考える。その考えのもとOzに関

する真核生物における突然変異能と修復反応について解析した結果、Ozは基本的にGCトランスポージョンを引き起こすグアニン酸化損傷であること[Kinoら. *ChemBioChem* 2009, 10, 2613]、hNEIL1やhNTH1で8oxoGよりも効率よく修復されることが明らかとなった。これらの結果だけから判断すると、Ozは8oxoGに比べて速やかに修復されるため、8oxoGに比べると生体に対してそれほど重篤な作用を及ぼしていないと言える。

ところで、ras遺伝子のコドン12での点突然変異は、がん細胞でのホットスポットである。コドン12の配列はGGCであり、グアニン連続サイトが存在する。また、細胞の寿命を左右するテロメア配列はTTAGGGの繰り返しであり、グアニン連続サイトである。これらの配列で、低エネルギー酸化反応が完全に完結すると、一つのグアニンが8oxoGやOzに変化するだけでは留まらず、最終的にOzOzおよびOzOzOzクラスター損傷が生成するだろう。実は助成期間前のP1ヌクレアーゼの実験において、Ozの認識能はOzの前駆体であるイミダゾロン(Iz)や8oxoGよりも低下するという結果を得ている。当然Ozが連続すると酵素の認識能はより低下するはずである。こうしてOz連続クラスター損傷は、生体に対して重篤な作用を及ぼすと予想できる。

## 2. 研究の目的

グアニン連続配列が酸化されて生成するOz連続クラスター損傷について、解析を行うためのオリゴマーを調製する。このOz連続配列を含むオリゴマーを用いて、DNAポリメラーゼによるプライマー伸長解析を行う。

## 3. 研究の方法

[実験 1. Oz連続配列を含むオリゴマーDNAの調製]

過去に報告されている方法を参考に[Ikedaら. *J Am Chem Soc* 1999, 121, 10836]、Ozに変化させたいところのみに8メトキシグアニン(8meoG)を埋め込んだDNAオリゴマーを受託合成で研究期間開始時に入手した。8meoGはグアニンよりも酸化されやすく、選択的にOzを生成させることができる。なお、現在では8meoGのアミダイトは製造中止になってしまい、8meoG入りのオリゴマーが研究に必要なときは8meoGのアミダイトを合成する必要がある、実際に研究期間後半ではそのようにした。

30merのオリゴマーの合成については、DNA合成機で一気に作成する方法と、8meoGが入った6merのオリゴマーを合成機で作ったのちに13merオリゴマー、11merオリゴマーと相補鎖30merオリゴマーとを用いてライゲーション法で作成した。

[実験 2. Oz 連続配列に対する伸長反応の解析]

実験 1 で合成したオリゴマーと蛍光ラベルしたプライマーをアニーリングし、ここに dNTP と真核生物 DNA ポリメラーゼ、クレノーフラグメント、REV1 を加え、OzOz を乗り越えて全長まで伸長する効率を明らかにした。なお、蛍光ラベルしたプライマーおよび DNA ポリメラーゼ、クレノーフラグメント、yREV1 は購入した。DNA ポリメラーゼ、hREV1<sup>341-829</sup> は当研究室で調製した。

#### 4. 研究成果

[実験 1. Oz 連続配列を含むオリゴマー DNA の調製]

研究期間後期において 8meoG のアミダイトが販売停止になったので、研究室において調製した。具体的には、過去に報告されている方法を参考に [Ikeda ら. J Am Chem Soc 1999, 121, 10836]、2'-deoxyguanosine を N-プロモスクシンイミドでプロモ化し、その後、ナトリウムメトキシドで 8 位をメトキシ化する。その後、アミノ基を保護し、さらに 5'-水酸基をジメトキシトリチルクロライドで保護した。その後アミダイト化して、DNA 合成機で 8meoG 入りの DNA オリゴマーを合成した。リボフラビン存在下で光反応し、その後熱加水分解で Oz に変換した。

当初は 30mer のオリゴマーを合成したが、精製に用いる HPLC は当時精製に成功していたもの [Kino ら. ChemBioChem 2009, 10, 2613] から更新されており、精製がうまくいかなかった。そこで、8meoG 入りの 6mer のオリゴマーを合成し、前述した光反応で Oz 入り 6mer オリゴマーを合成した。さらに、酵素でリン酸化した。13mer オリゴマー、11mer オリゴマーと相補鎖 30mer オリゴマーとを混合し、DNA リガーゼで 30mer オリゴマーを調製した。

ライゲーション法において、ここで報告したオリゴマーのセット以外のもも実験したが、一番効率が良かったものが今回記載したセットである。

なお、DNA 合成機が研究期間内に 2 回連続故障し、その原因特定と修理のための時間が予想以上にかかったことをここに特記しておく。

[実験 2. Oz 連続配列に対する伸長反応の解析]

実験 1 で合成したオリゴマーと蛍光ラベルしたプライマーをアニーリングし、ここに dNTP と真核生物 DNA ポリメラーゼ、クレノーフラグメント、REV1 を加え、OzOz を乗り越えて全長まで伸長する効率を明らかにした。

クレノーフラグメントやヒト DNA ポリメラーゼはコントロールの GG 連続配列

については当然全長まで伸長したが、OzOz 連続配列においては同条件では乗り越え伸長しなかった。OzOz 連続配列での伸長効率は Oz が 1 つ入ったもの [Kino ら. ChemBioChem 2009, 10, 2613] に対してより伸長効率が悪かったことから、予測どおりの結果となった。

酵母 DNA ポリメラーゼはコントロールの GG 連続配列については当然全長まで伸長したが、同条件で OzOz 連続配列においても効率が少し落ちるものの、全長まで伸長した。OzOz 連続配列での伸長効率は Oz が 1 つ入ったもの [Suzuki M & Kino K ら Chem. Res. Toxicol. 2015, in press] に対して少しだけ効率が悪かったことから、予測どおりの結果となった。取り込まれた塩基の種類については、G や A が挿入されたものがより乗り越えており、Oz が 1 つ入ったものと傾向が似ていた。

ヒト DNA ポリメラーゼはコントロールの GG 連続配列については当然全長まで伸長したが、同条件で OzOz 連続配列において伸長したものの、効率はかなり悪かった。OzOz 連続配列での伸長効率は Oz が 1 つ入ったもの [Kino ら. Nucleic Acids Symp. Ser. 2004, 48, 171] に対してより伸長効率が悪かったことから、予測どおりの結果となった。

ヒト DNA ポリメラーゼはコントロールの GG 連続配列については当然全長まで伸長したが、同条件で OzOz 連続配列においてはまったく伸長しなかった。OzOz 連続配列での伸長効率は Oz が 1 つ入ったもの [Suzuki M & Kino K ら Chem. Res. Toxicol. 2015, in press] に対して伸長しなかったことから、予測どおりの結果となった。

ヒト REV1<sup>341-829</sup> や酵母 REV1 は、コントロールの GG 連続配列についてはシトシンを挿入して伸長が止まった。一方、同条件で OzOz 連続配列においては、コントロールと同じようにシトシンを挿入したが、コントロールよりも効率が悪かった。

以上より、DNA ポリメラーゼの種類によらず、OzOz 連続配列は Oz 1 つのものに比べて、伸長効率が悪いことが判明した。これまで、DNA ポリメラーゼによる伸長が止まりやすい損傷にチミンダイマーなどが知られているが、今回の研究結果から、伸長が止まりにくい損傷でも連続すると、伸長が止まりやすいという予測どおりの事実が判明した。これにより、GG 連続配列で生成する OzOz 連続クラスター損傷は細胞内で致命的な効果を及ぼす可能性がある。6-4 チミンダイマーのように、ヌクレオチド除去修復機構のターゲットになる可能性があり、今後、塩基除去修復酵素の活性やヌクレオチド除去修復反応の解析を実施する必要がある。

#### 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 25 件)

\* is the corresponding author.

- 1) Suzuki M., Kino K.\*, Kawada T., Morikawa M., Kobayashi T., Miyazawa H. "Analysis of nucleotide insertion opposite 2,2,4-triamino-5(2H)-oxazolone by eukaryotic B- and Y-family DNA polymerases" Chem. Res. Toxicol. 2015, in press (査読有)
- 2) Morikawa M., Kino K.\*, Oyoshi T., Suzuki M., Kobayashi T., Miyazawa H. "Calculation of the HOMO localization of Tetrahymena and Oxytricha telomeric quadruplex DNA" Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015, in press (査読有)
- 3) Kiriyama, Y., Ozaki, A., Kino, K., Nochi, H.\* "Effects of CCCP on the expression of GABARAPL2 in C6 glioma cells." Integr. Mol. Med., 2015, 2(3), 177-180. (査読有)
- 4) Kiriyama, Y., Kino, K.\*, Nochi, H.\* "Autophagy and amino acids with their metabolites." Integr. Food Nutr. Metab., 2015, 2(2), 151-155. (査読有)
- 5) Kobayashi, T., Suzuki, M., Morikawa, M., Kino, K., Tanuma, S., Miyazawa, H.\* "Transcriptional Regulation of Tal2 Gene by All-trans Retinoic Acid (atRA) in P19 Cells." Biol. Pharm. Bull., 2015, 38, 248-256. (査読有)
- 6) Suzuki M., Kino K.\*, Morikawa M., Kobayashi T., Miyazawa H. "Calculating distortions of short DNA duplexes with base pairing between an oxidatively damaged guanine and a guanine." Molecules, 2014, 19(8), 11030-11044. (査読有)
- 7) Morikawa M., Kino K.\*, Senda T., Suzuki M., Kobayashi T., Miyazawa H. "Formation of a flavin-linked peptide." Molecules, 2014, 19(7), 9552-9561. (査読有)
- 8) Morikawa M., Kino K.\*, Asada E., Katagiri K., Mori-Yasumoto K., Suzuki M., Kobayashi T., Miyazawa H. "N'-[2-(7,8-Dimethyl-2,4-dioxo-3,4-dihydrobenzo[g]pteridin-10(2H)-yl)ethylidene]-4-nitrobenzohydrazide." Molbank, 2014, 2014(4), M836. (査読有)
- 9) Kobayashi T., Komori R., Ishida K., Kino K., Tanuma S.-I., Miyazawa H.\* "Tal2 expression is induced by all-trans retinoic acid in P19 cells prior to

acquisition of neural fate." Scientific Reports, 2014, 4, 4935. (査読有)

- 10) Suzuki, M., Ohtsuki, K., Kino, K.\*, Kobayashi, T., Morikawa, M., Kobayashi, T., Miyazawa, H. "Effects of stability of base pairs containing an oxazolone on DNA elongation." J Nucleic Acids., 2014, 2014, 178350. (査読有)
- 11) Suzuki M., Kawada T., Morikawa M., Kobayashi T., Miyazawa H., Kino K.\* "Analysis of nucleobases incorporated opposite an oxidative guanine damage by human REV1" Photomed. Photobiol., 2014, 36, 39-40. (査読無)
- 12) Morikawa M., Kino K.\*, Oyoshi T., Suzuki M., Kobayashi T., Miyazawa H. "Direct analysis of guanine oxidation products in double-stranded DNA and proposed guanine oxidation pathways in single-stranded, double-stranded or quadruplex DNA." Biomolecules, 2014, 4, 140-159. (査読有)
- 13) Morikawa M., Kino K.\*, Oyoshi T., Suzuki M., Kobayashi T., Miyazawa H. "Product analysis of photooxidation in isolated quadruplex DNA; 8-oxo-7,8-dihydroguanine and its oxidation product at 3'-G are formed instead of 2,5-diamino-4H-imidazol-4-one." RSC Adv, 2013, 3, 25694-25697. (査読有)
- 14) Suzuki, M., Ohtsuki, K., Morikawa, M., Watanabe, T., Kobayashi, T., Miyazawa, H., Kino, K.\* "The stability of an oxidative guanine damages pairing with guanine in DNA polymerases." Photomed. Photobiol., 2013, 35, 17-18. (査読無)
- 15) Morikawa, M., Oyoshi, T., Suzuki, M., Kobayashi, T., Miyazawa, H., Kino, K.\* "The oxidation of single-strand, double-strand, or quadruplex DNA by UVA radiation with riboflavin." Photomed. Photobiol., 2013, 35, 19-20. (査読無)
- 16) Komori R., Kobayashi T., Matsuo H., Kino K., Miyazawa H. "Csn3 Gene Is Regulated by All-Trans Retinoic Acid during Neural Differentiation in Mouse P19 Cells." PLOS ONE, 2013, 8(4), e61938. (査読有)
- 17) Kino K.\*, Takao M., Miyazawa H., Hanaoka F.\* "A DNA oligomer containing 2,2,4-triamino-5(2H)-oxazolone is

incised by human NEIL1 and NTH1." Mutat. Res. 2012, 734 (1-2), 73-77. (査読有)

18) 喜納克仁\*「香川県の化学系生涯学習 (Lifelong learning lectures in area of chemistry in Kagawa.)」化学と教育 2012, 60(5), 233. (査読有)

19) 鈴木雅代、喜納克仁\*、宮澤宏「グアニン酸化損傷に対する DNA ポリメラーゼの塩基選択性 (Selectivity of bases incorporated opposite oxidative guanine damages by DNA polymerases.)」放射線生物研究 2012, 47 (2), 137-164. (査読有)

20) Suzuki M., Kino K.\*, Morikawa M., Kobayashi T., Komori R., Miyazawa H. "Calculation of the stabilization energies of oxidatively damaged guanine base pairs with guanine." Molecules 2012, 17, 6705-6715. (査読有)

21) Kino K.\*, Suzuki M., Morikawa M., Miyazawa H. "Studies of guanine oxidation products." Photomed. Photobiol. 2012, 34, 3-4. (査読無)

22) Suzuki M., Izumi T., Ohtsuki K., Kobayashi T., Komori R., Miyazawa H., Kino K.\* "Analysis of translesion synthesis past an oxidative guanine damage by DNA polymerase." Photomed. Photobiol. 2012, 34, 69-70. (査読無)

23) Morikawa M., Oyoshi T., Kobayashi T., Komori R., Miyazawa H., Kino K.\* "Formation of quadruplex DNA affects photooxidation of guanine by UVA." Photomed. Photobiol. 2012, 34, 71-72. (査読無)

24) Takahama K.#, Kino K.#, Arai S., Kurokawa R., Oyoshi T. "Identification of Ewing's sarcoma protein as a G-quadruplex DNA- and RNA-binding protein" FEBS J., 2011, 278, 988-998. #These authors contributed equally to this work. (査読有)

25) Kino, K.\*, Suzuki, M., Morikawa, M., Kobayashi, T., Komori, R., Miyazawa, H. "Analysis of nucleobases incorporated opposite an oxidative guanine damage by DNA polymerase delta." Photomed. Photobiol. 2011, 33, 31-32. (査読無)

〔学会発表〕(計 69件)

以下、国内学会で first もしくは国際学会のもののみ7件抜粋

1) Suzuki M., Asada E., Kino K., Watanabe T., Morikawa M., Kobayashi T., Miyazawa H. "The calculated stability of DNA duplexes containing DNA damages pairing with guanine." ISNAC 2013, 2013年11月、Yokohama (Japan)

2) 喜納克仁「ビタミンとDNA損傷4」新世代の生物有機化学研究会 2013(第9回) 2013年6月、仙台

3) Suzuki M., Watanabe T., Ohtsuki K., Izumi T., Kobayashi T., Komori R., Miyazawa H., Kino K. "Nucleotide incorporation opposite an oxidative guanine damage by DNA polymerase iota." ISNAC 2012、2012年11月、Nogoya (Japan)

4) 喜納克仁「グアニン酸化損傷に関する研究」第34回日本光医学・光生物学会 2012年7月、神戸 [奨励賞講演]

5) Suzuki M., Morikawa M., Kobayashi T., Komori R., Miyazawa H., Kino K. (2011) "Analysis of nucleobases incorporated opposite an oxidative DNA damage by DNA polymerase delta." The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2011), 2011年11月、Sapporo (Japan)

6) 喜納克仁、鈴木雅代、森川雅行、小林隆信、小森理絵、宮澤宏「DNAポリメラーゼによるグアニン酸化損傷に対する塩基の取り込み解析」第33回日本光医学・光生物学会 2011年7月、大阪

7) 喜納克仁「ビタミンとDNA損傷3」新世代の生物有機化学研究会 2011(第7回) 2011年7月、京都

〔図書〕(計 2件)

\* is the corresponding author.

1) Morikawa M., Kino K.\*, Suzuki M., Kobayashi T., Komori R., Miyazawa H. "Oxidation of 8-oxoguanine with iodine and proposed mechanisms." Iodine: Characteristics, Sources and Health Implications, Nova Science Publishers, 2012, pp.121-133.

2) Kino K.\*, Kobayashi T., Komori, R., Miyazawa, H. "Chapter 7: Science education through research." Sci. Edu. Rapidly Changing World, Nova Science Publishers, 2011, pp.125-136.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

受賞 1件

1) 第33回日本光医学・光生物学会 奨励賞

ホームページ

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph04/index.htm>

l

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜納 克仁 (KATSUHITO KINO)

徳島文理大学・香川薬学部・准教授

研究者番号：70360534

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

大吉 崇文 (TAKANORI OYOSHI)

静岡大学・理学部・講師

研究者番号：80406529