

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：32425

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670064

研究課題名(和文) UV損傷の再検討—DNA中ピリミジン塩基の光水和反応について

研究課題名(英文) Analysis of photohydration of pyrimidines in DNA and RNA

研究代表者

根岸 和雄 (Negishi, Kazuo)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70116490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ピリミジン環が紫外線を吸収すると、5,6位二重結合に付加が起きる。その最も有名な例は、ピリミジン2量体であるが、塩基周囲に最も多く存在する水も効率良く水和反応を引き起こす。DNAの紫外線照射に起こる水和反応を、モデルとしてシトシンを含む合成オリゴヌクレオチドを用いて、シトシン5位の重水素交換で検出できる可能性が示された。また、希薄なリン酸緩衝液中でデオキシチジンに紫外線照射を行った後、種々の濃度のリン酸緩衝液中で処理する実験により、リン酸イオン分子が関与し、水の脱離を触媒することがわかった。これは、DNA中で自身のリン酸分子が水を取り除くことを触媒する可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：It is well known that pyrimidines are readily hydrated upon irradiation by UV. However, its significance in UV toxicity and mutagenicity is still unclear. Among DNA components, cytosines are photohydrated efficiently, while thymine is relatively resistant to the hydration. Because this reaction is reversible and hydrated cytosines are unstable, it is not easy to measure levels of hydration in DNA. We have tried to estimate the hydration by using hydrogen-exchange at 5-position of cytosine. As a model compound, oligonucleotides containing deoxycytidine was employed to study the hydrogen-deuterium exchange. The UV-irradiated sample is dissolved with H₂O, and analyzed. We found that the deuterium exchange can be monitored by MALDI-TOF MS as well as NMR measurement. The MS measurement is much easier than NMR, and suitable for multiple analyses. Another aspect is an effect of cellular components on the photohydration. Phosphate can catalyze dehydration from deoxycytidine hydrate.

研究分野：分子生物学

キーワード：UV TOF-MS 重水素置換 DNA RNA

1. 研究開始当初の背景

DNA は、遺伝物資として遺伝子情報の安定な伝達と進化に寄与している。DNA は化石の中からも情報を持った形で取り出せるほど極めて安定な分子であるが、反応性に富む部分、いわばアキレス腱もいくつか持っている。その1つはDNAを形成する2種の塩基の1つであるピリミジン塩基の5,6位であり、この部位は付加反応を起こし易い。紫外線の場合、ピリミジン2量体の形成が有名であり、これは2分子の2重結合同士の付加反応である。しかし、それ以外にも、この2重結合への水の付加も効率よく起きる。デオキシシチジン (dC) の 10 mM Tris-HCl, pH 8 溶液を、高さ 50 cm の 15W 殺菌灯で 30 分照射するという簡単な実験でも、極めて効率よく、図 2 に示す光水和物の生成(Boorstein, R.J, et al. Biochemistry 29, 10455-10460,1990) が起きる。しかし、この水和物がどの程度複製阻害や変異誘導作用があるか、DNA どのくらい生成しているのか。よくわかっていない。また、ヌクレオチドでは反応がずっと遅い。このことから、核酸中のリン酸基に水を脱離する触媒作用、すなわち自己修復作用があるのではないかと考えた。そこで、以上の2点、光水和物の障害作用と核酸の自己修復作用を追求する。

2. 研究の目的

核酸は紫外部に強い吸収を持つ結果、地上に生きる生物にとって紫外線は最も危険な外的要因のひとつとなっている。紫外線による損傷としては隣接したピリミジン同士が結合したピリミジン2量体と6-4光産物がよく知られており、これがすべての様に考えられてきた。しかし、その他にもいくつかの生成物が知られている。その一つが水和物の形成である。ピリミジンヌクレオチドは紫外線照射により効率よく水和反応を起こし、水和物となる。この反応は古くから知られている反応であるが、十分な解析が行われてこなかった。特にDNA中でどの程度起きているのか

という問題とヌクレオチドレベルできた生成物の生体への影響の解析がほとんど行われてこなかった。そこで、DNA中での水和反応とモノマーレベルの生成物の反応とその影響について検討する。さらに、紫外線の遺伝作用をさらに広く調べるため、UVAの作用をショウジョウバエを用いて調べる実験も行った。

3. 研究の方法

- 1) 重水素交換反応速度分析条件を決定する。dC、またはdCを含むオリゴヌクレオチドを重水中で紫外線照射したのち、水に溶かし、TOF-MSで分析した。
- 2) 紫外線照射したUTPを市販のRNA合成系に加え、生成物をゲル電気泳動で分析した。
- 3) デオキシシチジンはUV吸収を有するが、水付加体は260 nm付近の吸収がほぼ0となる。このことを利用し、まず、希薄なリン酸緩衝液中でUV照射を行い、ほぼ100%水付加体となったサンプルを用意する。次にこれを種々の濃度のリン酸溶液で希釈し、時間をおいて、反応液のUV吸収を測定することにより、水分子の脱離を測定する。
- 4) 野生株、または変異株のショウジョウバエ幼虫に紫外線を照射したのち、羽化した成虫の翅毛の変異スポットの種類と数を測定する。

4. 研究成果

- 1) UV照射したdC溶液を乾燥後再度重水に溶かし、測定に用いた。NMR分析の結果、47%の5位水素が重水素に置換していることが示された。また、同じサンプルをMALDI-TOFMSで分析すると、54%の置換があったという結果が得られた。以上より、シトシンの光水和が効率よく重水素置換を引き起こすこととこの置換反応がNMRばかりでなく、より簡便で少量のサンプルで測定可能なMALDI-TOFMSで測定可能であることが示された。
- 2) デオキシシチジン (dC) を含む1本鎖オ

リゴヌクレオチド及び2本鎖オリゴヌクレオチドにおける dC の光水付加反応について実験を行った。可逆的に水が脱離するため、DNA を分解し、水付加物を単離して同定することは困難である。そこで、重水中で反応を行い、dC 5 位の重水素置換を指標とする検出法を試みている。オリゴヌクレオチドの重水溶液に殺菌灯で紫外線を照射し、照射後に酵素処理を施し、ヌクレオシドとした。これを MALDI-TOF-MS を用いて解析を行った。紫外線照射前の1本鎖及び2本鎖オリゴヌクレオチド由来ヌクレオシド混合物では、dC に相当する m/z 228 にピークが検出される。照射後には、見かけ上このピークが減少し、重水素置換により分子量が1増加したと思われる、 m/z 229 のピークが検出されるようになった。この結果はポリヌクレオチド中 dC の光水和反応を5位重水素化を指標として推定できる可能性を示している。

3) rUTP に紫外吸収が消失するまで紫外線照射を行って、水付加 rUTP を調製し、RNA 合成系に添加する実験を行った。4種類の鳥リン酸のうち、UTP と水付加 rUTP と完全に入れ替えたところ、RNA 合成は全く起こらなかった。水付加 rUTP を種々の割合で混合し、RNA 合成反応を行った。その結果、異常な泳動度を示す生成物の生成が観察された。これは、水付加体が RNA 合成になんらかの影響を与えることを示唆している。さらに、生成物を分解後、HPLC で分析すると不明な成分が含まれていることがわかった。

4) リン酸緩衝液中でシチジン水付加物から UV 吸収が回復する速度を測定した。その結果、濃いリン酸にとかせば溶かすほど、より速く吸収が回復することがわかった。リン酸濃度と水脱離の速度をプロットすると直線関係にあることが示された。このことから、一分子のリン酸イオンが関与して、脱離を触媒していることが示された。

5) VA 領域の紫外線は主として酸化傷害を誘起すると言われている。UVA の酸化的損傷作用をショウジョウバエを用いて解析した。す

なわち、UVA 領域紫外線照射による変異誘導を野生株ならびに酸化傷害感受性株 (ショウジョウバエ) と比較した。また、ショウジョウバエの各種変異株に光照射し、変異誘導、致死作用に対する波長依存性を検討した。LED-UVA を用いて高線量 UVA による傷害とスペクトログラフによる分光紫外線による傷害との比較を行うため、ショウジョウバエの DNA 傷害修復欠損株ならびに酸化傷害感受性株を用い突然変異検出した。また、DNA 鎖切断の有無を調べた。LED-UVA 照射により、野生株で観察されない線量で、ショウジョウバエ尿酸欠損株において体細胞突然変異が観察された。UVA 照射直後から、ヒストン H2AvD (H2AX ショウジョウバエホモログ) のリン酸化が顕著に増加することから、DNA 二本鎖切断が誘導されていることが示唆された。310 nm UVB 照射においても、ヒストンリン酸化は観察されたが、野生株と尿酸欠損株において大きな差が見られなかった。UVB との反応性の違いから、UVA の変異誘導には尿酸で防御されるような酸化傷害が関わっていると考えられる。

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4件)

1) Uchiyama, T., Koike, R., Yuma, Y., Okamoto, K., Arimoto-Kobayashi, S., Suzuki, T., Negishi, T., Somatic-cell mutation induced by short exposures to cigarette smoke in urate-null, oxidative stress-sensitive *Drosophila*, *Mutagenesis* 31, 9 - 15 (2015) (査読あり)

2) Michio Kimura, Tomoko Eto, Nobuo Izimo, Yutaka Mizushima, Sustained neutrophilic effects of a novel G-CSF preparation: Protein-Zinc, 日本薬科大学教育紀要、2巻、p. 53 - 63 (査読なし)

3) 木島大貴、早津彦哉、綿矢有佑、木村道夫、

根岸和雄、重亜硫酸イオンによる5-メチル
デオキシチジン脱アミノ反応におよぼす重
水の影響について。Bisulfite sequencing 法
改良の試み。日本薬科大学教育紀要、1, 88 -
92 (2015) (査読なし)

4) Xing Fang, Naohiko Ide, Sho-ichi
Higashi, Yasuhiro Kamei, Tatsushi
Toyooka, Yuko Ibuki, Kazuaki Kasai,
Keinosuke Okamoto, Sakae
Arimoto-Kobayashi, Tomoe Negishi,
Somatic cell mutations caused by 365 nm
LED-UVA due to double-strand breaks
through oxidative damage, Photochem.
Photobiol., 13, 1338 - 1346 (2014) (査読あ
り)

〔学会発表〕(計4件)

1) 根岸友恵、樊星、鈴木利典、亀井保博、
伊吹裕子、LED-UVA により誘導される DNA
障害、第 37 回日本光医学・光生物学会、2015
年 7 月 17 日 - 7 月 18 日 (宮崎)

2) Tomoe Negishi, Fang Xing, Manami
Iwasaki, Ysuhiro Kamei, Yuko Ibuki,
Tsukasa Matsunaga, DNA damage induced
by 365 nm-UV irradiation. 7th Asia and
Oceania Conference on Photobiology, 2015.
11. 15 - 11. 18 (Taipei, Taiwan)

3) 千原彬美、押元志帆、中岡聡子、木村道夫、
根岸和雄、シトシンの光水酸化について—ジ
ピリミジン以外の UV 損傷の重要性を考える、
日本環境変異原学会第 42 回大会、2013. 11.
29 - 11. 30 (岡山)

4) 根岸和雄、中岡聡子、河野健吾、和田一幸、
日本薬学会第 134 年会、2014. 3. 27 - 3. 30
(熊本)

1. 〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

根岸 和雄 (NEGISHI KAZUO)
日本薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：70116490

(2)研究分担者

木村 道夫 (KIMURA MICHIO)
日本薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：50349578

根岸 友恵 (NEGISHI TOMOE)
岡山大学・医歯薬総合研究科・准教授
研究者番号：80116491

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()