

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成30年 4月 18日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 千葉大学大学院理学研究院 生物学研究部門
 職 名 特任助教
 研究代表者名 佐々 彰

下記のとおり平成29年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号: 291002)

1. 共同利用研究 課題名	高エネルギーリン酸化合物が引き起こすゲノム不安定性とその修復機構			
2. 共同利用研究 目的	高エネルギーリン酸化合物(リボヌクレオチド)のゲノムへの蓄積は、深刻な神経変性疾患の発症と関連すると考えられる。本研究では、ヒト細胞内でのリボヌクレオチドの突然変異誘発能及び修復機構を明らかにし、疾患発症の原因解明の糸口とする。			
3. 共同利用研究 期間	平成29年 4月 1日 ~ 平成30年 3月 31日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者)	千葉大学大学院 理学研究院生物学研究部門	特任助教	研究の統括及び実験の遂行	
(分担研究者)				
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	ゲノム機能制御研究分野	氏 名	菅澤 薫

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同利用研究計画

リボヌクレオチドを一分子含むシャトルベクターを、ヒトBリンパ芽球細胞 TK6 及びその変異体(XPA、POLH、または XPA/POLH ダブル欠損細胞株)に導入する。その後細胞内で複製されたシャトルベクターを抽出して DNA シーケンシングを行い、ベクター上でリボヌクレオチドが引き起こす突然変異を解析する。

具体的には、デオキシグアノシン(dG)または 8-オキシデオキシグアノシン(8-oxo-dG)を対照として、リボヌクレオチドであるリボグアノシン(rG)または 8-オキシリボグアノシン(8-oxo-rG)をそれぞれ組み込んだシャトルベクターを細胞内で複製させ、複製されたベクターについて、共同利用機器の DNA シーケンサーABI3130xlを用いて配列を読み取る。細胞株間で突然変異スペクトラムを比較するためには、大量のサンプルのシーケンス解析を行う必要がある。そのため、短時間で安価に複数のサンプルを解析が可能な ABI3130xlを使用する利点は大きい。

そして、得られた結果をもとに受け入れ研究者と議論を行い、今後の展望を検討する。

7. 共同利用研究の成果

野生型または XPA 及び POLH 欠損細胞株を用いて、リボヌクレオチドであるリボグアノシン (rG) またはその酸化損傷体の 8-オキシリボグアノシン (8-oxo-rG) が引き起こす突然変異の頻度を求めた。その結果、8-oxo-rG の突然変異頻度は、XPA 及び POLH 欠損株において野生型と比べて増加した。さらに DNA シーケンシングによって 8-oxo-rG の突然変異スペクトラムを解析した結果、XPA 及び POLH 欠損株においては、野生型ではあまり起こらなかった G→T 塩基置換や、数十～数百塩基に及ぶ欠失変異が増加する傾向が見られた。このことから、XPA 及び POLH が、細胞内でリボヌクレオチドの変異抑制に関与することを見出した。シーケンス解析を行うことができたサンプル数が十分ではないため、引き続きより多くのサンプルにおいて解析を進める必要がある。

興味深いことに、野生型、XPA、POLH 欠損株のいずれにおいても、rG は同等の頻度で百塩基以上の大きな領域が欠失するような突然変異を引き起こすことが明らかになった。この特異な突然変異がどのようなメカニズムで生じるのかは未だ不明だが、酵母を用いた先行研究では、トポイソメラーゼがリボヌクレオチドに架橋結合することによって突然変異が起きると報告されており (Williams et al., 2016)、ヒトでも類似の機構によって突然変異が誘発されるのかもしれない。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

国際学会発表

1. Sassa, A., Yasui, M., Sasanuma, H., Takeda, S., Sugasawa, K., Honma, M., Ura, K. Effect of ribonucleotide backbone on mutagenic potential and repair mechanism of 7,8-dihydro-8-oxoguanine, The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry. Tokyo, Japan. 平成 29 年 11 月

国内学会発表

1. 佐々 彰, 安井 学, 笹沼 博之, 武田 俊一, 菅澤 薫, 本間 正充, 浦 聖恵, リボヌクレオチドが引き起こすゲノム不安定性とその抑制機構、第 35 回染色体ワークショップ・第 16 回核ダイナミクス研究会、名古屋、平成 29 年 12 月
2. 佐々 彰, 安井 学, 笹沼 博之, 武田 俊一, 菅澤 薫, 本間 正充, 浦 聖恵, DNA 中のリボヌクレオチドが引き起こす突然変異とその抑制機構、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、平成 29 年 12 月
3. 佐々 彰, 安井 学, 笹沼 博之, 武田 俊一, 菅澤 薫, 本間 正充, 浦 聖恵, リボヌクレオチドが誘発する突然変異の抑制における DNA 修復機構の役割、日本環境変異原学会第 46 回大会、東京、平成 29 年 11 月

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

該当なし