

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 31 年 4 月 15 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30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 DNA への蓄積は、ゲノム不安定化及び深刻な神経変性疾患やがんの発症に関連すると考えられるが、それらの因果関係は明らかになっていない。本研究では、ヒト細胞における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 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 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) 佐々 彰	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	シグナル統合経路研究部門 ゲノム機能制御研究分野	氏 名	菅澤 薫

※ 次の6~9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6~9の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:291002)

6. 共同利用研究計画

本研究では、ヒト細胞内で DNA に取り込まれたリボヌクレオチドの突然変異誘発能、及びその修復（変異抑制）機構を明らかにする。特に、リボヌクレオチドが引き起こす突然変異の抑制機構について、ヌクレオチド除去修復に関与する XPA、及び損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ POLH に着目して解析を行う。

具体的には、リボヌクレオチドのモデル基質としてリボグアノシン (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ヒト B リンパ芽球細胞 TK6 及びその XPA、POLH 欠損株に導入し、細胞内で複製されたベクターについて、突然変異誘発頻度の測定及び DNA シーケンサーを用いた突然変異スペクトラムの同定を行う。

7. 共同利用研究の成果

野生型または XPA、POLH、及び TDP1 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。

第一に、8-oxo-rG の突然変異頻度は野生型と比べて XPA 及び POLH 欠損株において有意に増加した。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所、特に POLH 欠損株において数十～数百塩基に及ぶ欠失変異が増加した。つまり、XPA が関与するヌクレオチド除去修復 (NER) が 8-oxo-rG の修復を担う可能性があること、さらに POLH による損傷乗り越え DNA 合成が細胞内で 8-oxo-rG による欠失変異の抑制に関与することが示唆された。現在は in vitro における NER 再構成実験によって、NER がリボヌクレオチドに対して除去修復活性を示すかどうか解析を進めている。

第二に、野生型において rG は 8-oxo-rG よりもむしろ高い頻度で欠失頻度を引き起こした。興味深い点として、欠失変異のほとんどは rG の挿入部位から 5' 上流方向にかけて生じていた。既存の研究では、細胞内のトポイソメラーゼ I (TOP1) が DNA 中のリボヌクレオチドを切断する活性を持ち、その際 5' 切断末端に DNA-タンパク質複合体 (TOP1cc) が形成されることが示唆されている。おそらく TOP1cc を介して DNA 二本鎖切断が形成され、その修復過程で今回観察された様な欠失変異が誘発されると考えられる。

以上より、DNA 中のリボヌクレオチドは大きなゲノム領域を欠失させる様な突然変異を引き起こし得る事、そして XPA 及び POLH がその様な変異の一部を抑制する役割を担う事が示唆された。

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。)

学会発表

1. 竹石 歩奈, 安井 学, 笹沼 博之, 武田 俊一, 菅澤 薫, 本間 正充, 浦 聖恵, 佐々 彰, DNA 中のリボヌクレオチドが引き起こす特異な突然変異とその誘発機構の解析、日本環境変異原学会第 47 回大会、京都、11/2018
2. 佐々 彰, 安井 学, 竹石 歩奈, 原田 佳歩, 鈴木 慈, 津田 雅貴, 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奇異突然変異とその防御機構、日本遺伝学会第 90 回大会、奈良、09/2018

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。

競争的資金の獲得

1. 基盤研究(C)、リボヌクレオチドが引き起こす重篤なゲノム不安定化の分子機構、2019 年度-2021 年度、研究代表者: 佐々 彰、直接経費: 3,400 千円 間接経費: 1,020 千円