

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

2020年 4月 16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2019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、ゲノム不安定化を引き起こし細胞のがん化や神経変性疾患の原因になると考えられるが、そのメカニズムは明らかになっていない。本研究では、リボヌクレオチドが引き起こす突然変異とその誘発・抑制の分子機構を明らかにし、疾患発症の原因解明の糸口とする。		
3. 共同利用研究 期間	2019年7月1日 ~ 2020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。

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。本年度では特に、ヌクレオチド除去修復（NER）、そしてトポイソメラーゼ 1-DNA 複合体の解消に関わる TDP1 の機能に着目し、それらの突然変異抑制及び誘発への関与を解析する。

7. 共同利用研究の成果

①リボヌクレオチドが引き起こす突然変異の「抑制」機構

DNA に取り込まれたリボヌクレオチドの除去修復は、リボヌクレオチド除去修復（RER）が担う。一方で、RER は酸化などの損傷が生じたリボヌクレオチドに対しては修復活性を示さないことを我々は明らかにしている（Sassa et al., 2016）。さらに本研究において、NER に必須の因子である XPA を欠損したヒト B リンパ芽球細胞株では、DNA 中の酸化リボヌクレオチド（8-oxo-rG）が引き起こす突然変異頻度が上昇することを見出した。つまり、NER がリボヌクレオチドの代替修復経路としての機能を有することが予想された。そこで本年度は、試験管内における NER 再構成実験を行い、NER が DNA 中のリボヌクレオチドを除去修復する活性を有するかを解析した。rG または 8-oxo-rG を一分子含み放射性同位元素 P32 で標識した二本鎖環状 DNA を基質として、精製したヒト NER タンパク質を混合して活性を測定した所、特に 8-oxo-rG に対して切断活性が認められた。以上から、ヒトにおいては NER がリボヌクレオチドに対する代替修復経路として機能し得ることが示唆された。

②リボヌクレオチドが引き起こす突然変異の「誘発」機構

DNA に取り込まれたリボヌクレオチドはリボヌクレオチド除去修復（RER）によって除去される。一方で RER が不活性化した細胞では、トポイソメラーゼ1（Top1）によって誤りがちな修復が行われると考えられる。その場合には Top1 がリボヌクレオチドを切断する過程で Top1-DNA 複合体（Top1cc）が形成され、その後何らかの過程を経て突然変異が生じると予想される。そこで Top1cc の解消に関わる酵素 TDP1 を欠損した細胞株にリボグアノシン（rG）を部位特異的に含むシャトルベクターを導入し、ベクター上で生じる突然変異の頻度とスペクトラムを同定した。その結果 TDP1 欠損株では、rG が引き起こす突然変異頻度が野生型と比べて減少した。特に、塩基の欠失を伴う変異の割合が低下したことから、リボヌクレオチドによる突然変異の誘発には TDP1 の機能が介在することが示唆された。

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. **Sassa, A.**, Tada, H., Takeishi, A., Harada, H., Nakatani, K., Tsuda, M., Sasanuma, H., Takeda, S., **Sugasawa, K.**, Yasui, M., Honma, M., Ura, K. Alternate processing pathways of a single ribonucleotide incorporated into DNA and its consequences in human cells. The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (ACEM/JEMS 2019). Tokyo, Japan. 11/2019
2. Takeishi, A., Yasui, M., Sasanuma, H., Takeda, S., **Sugasawa, K.**, Honma, M., Ura, K., **Sassa, A.** Mechanistic insight of unique mutations caused by a ribonucleotide embedded into DNA. The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (ACEM/JEMS 2019). Tokyo, Japan. 11/2019

研究論文

1. **Sassa, A.**, Tada, H., Takeishi, A., Harada, K., Suzuki, M., Tsuda, M., Sasanuma, H., Takeda, S., **Sugasawa, K.**, Yasui, M., Honma, M., Ura, K. (2019). Processing of a single ribonucleotide embedded into DNA by human nucleotide excision repair and DNA polymerase η . *Scientific Reports*, 26, 13910.

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。

受賞

1. ACEM/JEMS 2019 ベストプレゼンテーション賞、Takeishi, A., Yasui, M., Sasanuma, H., Takeda, S., **Sugasawa, K.**, Honma, M., Ura, K., **Sassa, A.** Mechanistic insight of unique mutations caused by a ribonucleotide embedded into DNA. 11/2019