

DNA修復反応の蛍光による検出と解析



研究ノート

岩井 成憲*

Detection and analysis of DNA repair reactions by fluorescence

Key Words : DNA damage, DNA repair, Fluorescence

1. はじめに

DNAは生物の遺伝を司る重要な生体分子であるが、化学的に見ると有機化合物の一種であり細胞内において種々の化学反応を受ける。複製や転写も化学反応ではあるが、内的要因（活性酸素種など）や外的要因（紫外線や電離放射線、発がん物質など）によって起こる本来は予定されていない化学反応は「DNA損傷」と呼ばれ、正常な遺伝情報の伝播を妨げる。特に核酸塩基の部分に化学反応が起こると、その化学構造の変化は塩基対形成能に影響して突然変異を引き起こすため、細胞死やがん化といった生物にとって重大な危機につながる。しかし、あらゆる生物は損傷したDNAを修復するいくつかの機構を有しており、通常は遺伝情報の恒常性が維持されている。その中で、塩基の酸化やアルキル化あるいはアミノ基の加水分解といった比較的小さな化学構造の変化は、「塩基除去修復」という経路によって修復される(1)。この修復系では、損傷塩基と糖をつなぐグリコシド結合を加水分解するDNAグリコシラーゼあるいはグリコシド結合を切断した後に β -または β, δ -脱離反応により鎖切断を起こすDNAグリコシラーゼ/APリナーゼにより損傷塩基が認識・除去され、その後、図1のように複数の酵素により正常な塩基をもつヌクレオチドに置き換えられる。筆者は、チミングリコールと呼ばれる酸化損傷塩基

とそれを基質とするエンドヌクレアーゼIIIという酵素を通じて、塩基除去修復にかかわってきた。

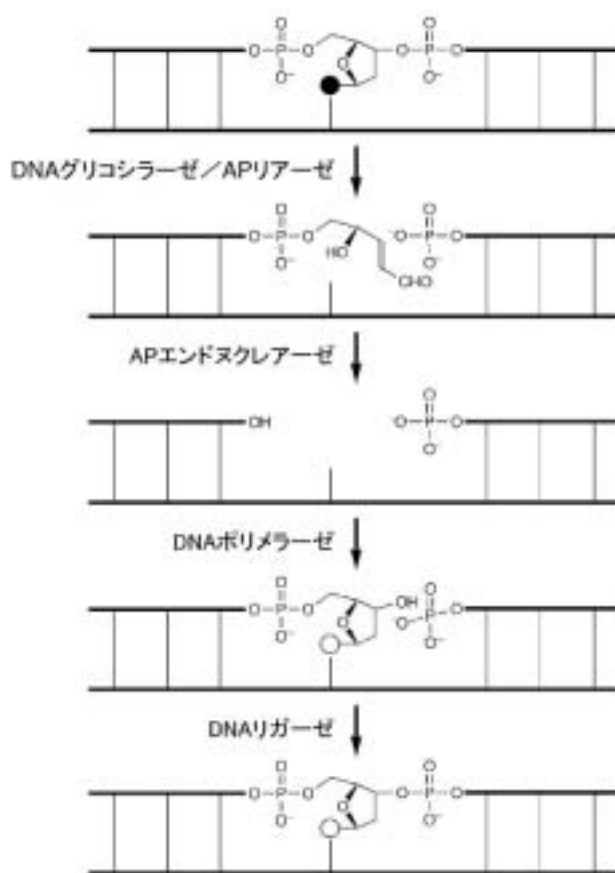


図1 塩基除去修復の機構
●は損傷塩基、○は正常塩基を示す。



* Shigenori IWAI

1960年3月生

大阪大学大学院 薬学研究科 薬品化学
専攻 博士前期課程 (1984年)現在、大阪大学大学院 基礎工学研究科
物質創成専攻 機能物質化学領域 教授
薬学博士 生物有機化学

TEL : 06-6850-6250

FAX : 06-6850-6240

E-mail : iwai@chem.es.osaka-u.ac.jp

2. チミングリコールを有するDNAの化学合成

前述のとおりDNAも有機分子であるので、DNAの断片であるオリゴデオキシリボヌクレオチドは化学的に合成することが可能であり、現在ではフォスフォアミダイト法による固相合成が一般的に用いられている。この方法は、3'位で固相担体に結合したヌクレオチドに対して5'水酸基の脱保護とオリゴ

ヌクレオチド構築ブロックであるヌクレオシド 3'-フォスフォアミダイトの結合を繰り返すことにより、3'末端から 5'末端の方向に 1ヌクレオチドずつ鎖を伸ばすというものである。損傷塩基を有するオリゴヌクレオチドも、基本的に同じ方法で合成することができる(2)。例えば紫外線損傷について、ワシントン大学の Taylor らはシクロブタンピリミジンダイマー(3)、筆者らはピリミジン(6-4)ピリミドン光産物(4)の構築ブロックの合成とそのオリゴヌクレオチドへの導入を報告している。

チミングリコールは、電離放射線への被曝や好気的代謝により生じるヒドロキシルラジカルがチミンと反応した酸化損傷塩基であり、突然変異を起こす頻度は低いが DNA 複製を阻害する。この損傷塩基には 4つの異性体が存在するが、水溶液中では N1と C6の間での開閉環により 6位が異性化するため、単離できるのは 5*R*と 5*S*の2種類のシス-トランス混合物である(図2)。チミングリコールの異性体のうち 5*R*,6*S*体は化学構造が(6-4)光産物の 5'側塩基とよく似ており、チミングリコールと(6-4)光産物はいずれもアルカリに不安定であるという共通の性質をもつ。そこで、(6-4)光産物の構築ブロックの合成とそのオリゴヌクレオチドへの挿入(4)に成功していた筆者は、チミングリコールについても同様の合成が可能であると考えた。保護したチミジンをピリジン中で四酸化オスミウムと反応させると 5*R*,6*S*と 5*S*,6*R*のチミングリコールが 6:1の比で得られたので、5*R*,6*S*体を単離してフォスフォアミダイト構築ブロックとし、(5*R*)-チミングリコールを有するオリゴヌクレオチドの合成を行った(5,6)。また、同じ原料に対して Sharpless 不

斉ジヒドロキシル化反応を行なうと 5*R*,6*S*と 5*S*,6*R*の生成比が 1:2 となり、(5*S*)-チミングリコールの構築ブロックを得ることができた(7)。

3. エンドヌクレアーゼ III の基質認識

エンドヌクレアーゼ III は、酸化されたピリミジン塩基を認識して塩基除去修復を開始する DNA グリコシラーゼ / AP リアーゼである。酵素 - DNA 複合体の結晶構造が解かれているが(8)、複合体中で損傷塩基が失われていたため基質認識機構はいまだ明らかではない。上述のように (5*R*)-および (5*S*)-チミングリコールのそれぞれを有するオリゴヌクレオチドを別々に合成することが可能になったので、広島大学の井出博教授と共同でこの酵素の基質特異性を調べた(9)。各オリゴヌクレオチドを ^{32}P で標識したのち相補鎖と 2本鎖を形成させて酵素反応を行い、ゲル電気泳動により分析したところ、大腸菌エンドヌクレアーゼ III は (5*S*)-チミングリコールを有する DNA を 5*R*異性体より効率的に切断し、この酵素のホモログであるヒト NTH1 は圧倒的に 5*R*体を好むという結果が得られた。このようなチミングリコールの立体特異性は同様の基質特異性をもつ大腸菌エンドヌクレアーゼ VIII とヒト NEIL1 にも見られたが、これら二つの酵素はいずれも (5*R*)-チミングリコールを有する DNA をより効率的に切断した。

4. 大腸菌エンドヌクレアーゼ III および

ヒト NTH1 の反応の蛍光による検出と解析

前述のように、修復酵素の研究にはポリヌクレオチドキナーゼと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ により ^{32}P で標識した基質が用いられ、酵素反応は、ゲル電気泳動により生成物を分離した後、生成物の放射線を検出・定量することにより解析されてきた。しかし、この方法は操作が面倒である上に放射性同位元素の使用における規制や危険性もあるため、酵素反応を蛍光によって検出・定量することを試みた(10)。そのためのプローブとして、モレキュラービーコン(11)で使用された蛍光色素とクエンチャーを両末端に付けたヘアピン型オリゴヌクレオチドを設計・合成した(図3)。このプローブは反応温度(37℃)においてヘアピン構造を形成するため蛍光を発しないが、DNA グリコシラーゼ / AP リアーゼにより鎖切断を受けると蛍光色素が付いた断片は塩基対数が少な

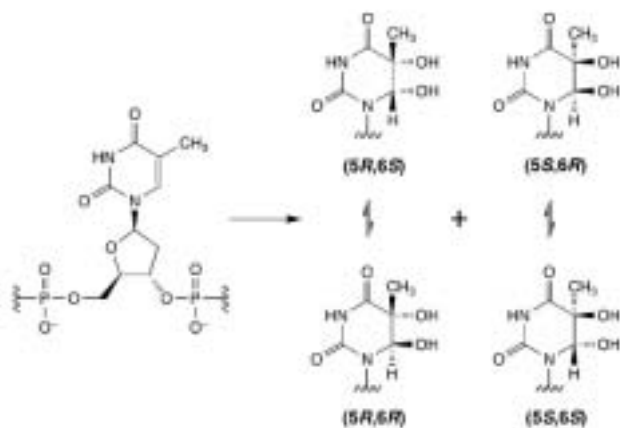


図2 チミングリコールの異性体

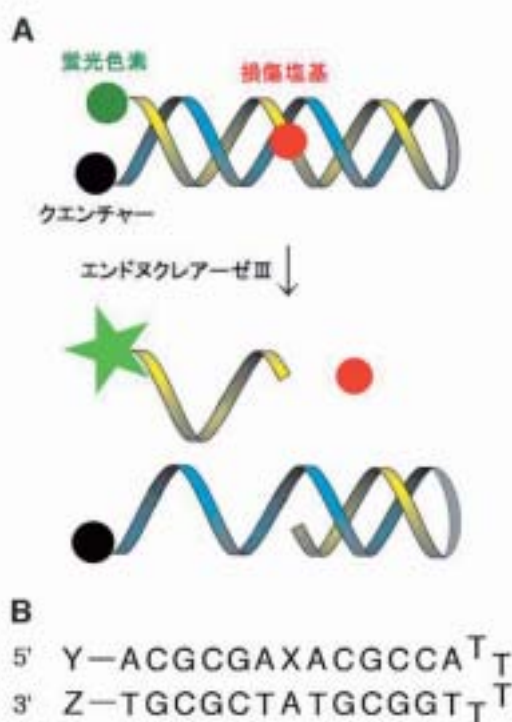


図3 エンドヌクレアーゼⅢの反応を解析するための蛍光プローブ(A)とその塩基配列(B)
X, Y, Zは表1に記載されている。

くなって解離し、蛍光が検出されることを期待した。損傷として(5*R*)-, (5*S*)-チミングリコールと5,6-ジヒドロチミンを用い、違った蛍光色素を付けることにより各基質に対する反応を異なる波長で検出できるようにした(表1)。なお、井出教授らの以前の研究により、5,6-ジヒドロチミンは大腸菌エンドヌクレアーゼⅢにはほとんど認識されないがマウスNTH1の基質となることが報告されている(12)。合成したプローブのうちFI-RTgとCy3-STgは大腸菌エンドヌクレアーゼⅢで切断されることをゲル電気泳動で確認した上で、酵素量を変えて30分間反応させた後、蛍光強度を測定することにより図4

の結果が得られた(蛍光色素の種類によって違いが生じないことは同じ損傷塩基をもつFI-STgとCy3-STgを用いて確認した)。また、酵素量を一定にして基質濃度ごとに時間を変えて蛍光強度を測定することにより反応速度を求めると速度論的パラメーターを算出することができ、以前の研究(13)と同様の結果が得られた。

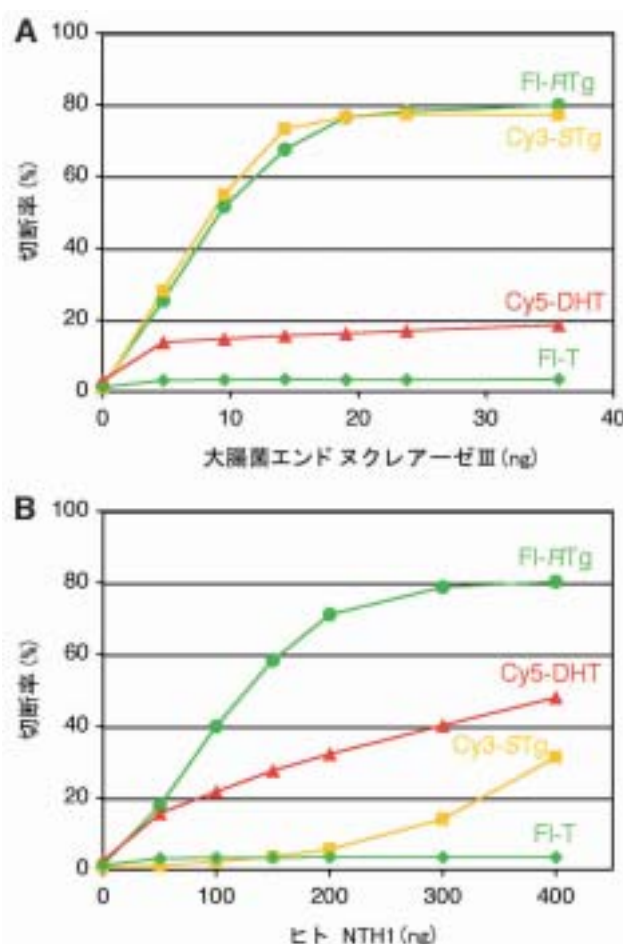


図4 大腸菌エンドヌクレアーゼⅢ(A)およびヒトNTH1(B)による表1の各プローブの切断

表1 大腸菌エンドヌクレアーゼⅢおよびヒトNTH1の反応解析に用いた蛍光プローブ

プローブ名	塩基 (X)	蛍光色素 (Y)	クエンチャー (Z)	励起波長 (nm)	発光波長 (nm)
FI-RTg	(5 <i>R</i>)-チミングリコール	フルオレセイン	Dabcyl	494	520
Cy3-STg	(5 <i>S</i>)-チミングリコール	Cy3	BHQ2	547	563
Cy5-DHT	5,6-ジヒドロチミン	Cy5	BHQ2	646	662
FI-T	チミン	フルオレセイン	Dabcyl	494	520

表2 細胞抽出液および細胞での実験に使用したプローブ

プローブ名	配列 ^a
FI-Tg-PO	フルオレセイン-d(<u>GCGCGA</u> -(5R) <u>Tg-ACGCCGCCCCCGGCGTATCGCGC</u>)
FI-Tg-PS	フルオレセイン-d(<u>GCGCGA</u> -(5R) <u>Tg-ACGCCGCCCCCGGCGTATCGCGC</u>)
FI-Tg-PS-Dab1	フルオレセイン-d(<u>GCGCGA</u> -(5R) <u>Tg-ACGCCGCCCCCGGCGTATCGCGC</u>)-DabcyI
FI-Tg-PS-Dab2	フルオレセイン-d(<u>GCGCGA</u> -(5R) <u>Tg-ACGCCGCCCCCGGCGTATCGCGC</u>)-DabcyI
FI-T-PS-Dab	フルオレセイン-d(<u>GCGCGA</u> -T- <u>ACGCCGCCCCCGGCGTATCGCGC</u>)-DabcyI

^a 下線とイタリック文字はそれぞれ2本鎖部分と3'-フォスフォロチオエートを示す。

5. ヒト細胞中での塩基除去修復反応の検出

合成したプローブの細胞中での安定性を調べるために FI-RTg から DabcyI を除いた FI-Tg-PO (表2) を HeLa 細胞の抽出液と混ぜて 37 でインキュベートしたのちゲル電気泳動で分析すると、このプローブの非特異的な分解によるバンドが検出された。そこで、複合体の結晶構造 (8) から基質認識に必要であると考えられる部分以外のリン酸ジエステルをヌクレアーゼ耐性があるフォスフォロチオエートに変えた FI-Tg-PS を合成して同様の実験を行うと、塩基除去修復酵素 (おそらく NTH1 と AP エンドヌクレアーゼ) による鎖切断の生成物と考えられるバンドのみが得られた。次に、これにクエンチャーである DabcyI を付けた FI-Tg-PS-Dab1 を用いると、このプローブの泳動度に近い位置に消光していないバンドが検出され、DabcyI のリンカー (フルオレセイン側のリンカーと化学構造が異なる) 中のリン酸ジエステルがヌクレアーゼにより加水分解された可能性が示唆された。この問題はリンカー中のリン酸ジエステルもフォスフォロチオエートに変えることにより解決され、そのような設計の FI-Tg-PS-Dab2 を HeLa 細胞抽出液と反応させると期待される断片のバンドのみが検出された。以上の結果から FI-Tg-PS-Dab2 は細胞中での塩基除去修復反応の検出に使用できると考え、これを Lipofectamine 2000 により HeLa 細胞に導入し 37 で培養して蛍光顕微鏡で観察した。その結果、5 時間後には各細胞の核の部分に蛍光がはっきりと観察され、損傷を含まない FI-T-PS-Dab を導入した細胞とは明らかな違いが見られた (図5)。

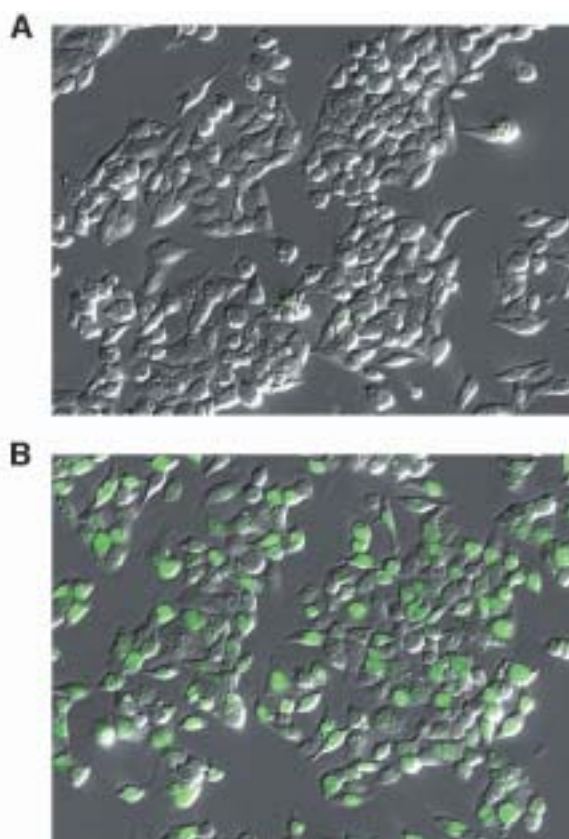


図5 ヒト細胞中での塩基除去修復反応の検出
表2の FI-T-PS-Dab (A) および FI-Tg-PS-Dab2 (B) をトランスフェクトして5時間後に蛍光顕微鏡により観察した。巻頭カラー図参照。

6. おわりに

化学合成が可能と考えられる損傷 DNA はそのほとんど全てについて既に構築ブロックの合成とオリゴヌクレオチドへの挿入が報告されており (2), この分野の研究はほぼ終了したと思われる。次の段階としては合成した DNA に機能を付加して生物学や

医学の研究に応用することが重要であると考え、本研究を実施した。得られた塩基除去修復の蛍光プローブは、分子細胞生物学のツールとしての使用が期待される。

参考文献

1. Hegde, M. L., Hazra, T. K., and Mitra, S. (2008) *Cell Res.* 18, 27 - 47
2. Iwai, S. (2006) *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 25, 561 - 582
3. Taylor, J.-S., Brockie, I. R., and O Day, C. L. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 6735 - 6742
4. Iwai, S., Shimizu, M., Kamiya, H., and Ohtsuka, E. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7642 - 7643
5. Iwai, S. (2000) *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 3874 - 3876
6. Iwai, S. (2001) *Chem. Eur. J.* 7, 4343 - 4351
7. Shimizu, T., Manabe, K., Yoshikawa, S., Kawasaki, Y., and Iwai, S. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34, 313 - 321
8. Fromme, J. C. and Verdine, G. L. (2003) *EMBO J.* 22, 3461 - 3471
9. Katafuchi, A., Nakano, T., Masaoka, A., Terato, H., Iwai, S., Hanaoka, F., and Ide, H. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 14464 - 14471
10. Matsumoto, N., Toga, T., Hayashi, R., Sugawara, K., Katayanagi, K., Ide, H., Kuraoka, I., and Iwai, S. (2010) *Nucleic Acids Res.* 38, 印刷中
11. Piatek, A. S., Tyagi, S., Pol, A. C., Telenti, A., Miller, L. P., Kramer, F. R., and Alland, D. (1998) *Nature Biotechnol.* 16, 359 - 363
12. Asagoshi, K., Odawara, H., Nakano, H., Miyano, T., Terato, H., Ohyama, Y., Seki, S., and Ide, H. (2000) *Biochemistry* 39, 11389 - 11398
13. Doi, Y., Katafuchi, A., Fujiwara, Y., Hitomi, K., Tainer, J. A., Ide, H., and Iwai, S. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34, 1540 - 1551

