

DNA中の酸化損傷塩基の高感度検出を可能にする人工ヌクレオチドの開発

菊川, 誉也

<https://hdl.handle.net/2324/1931851>

出版情報：九州大学, 2017, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏名	菊川 誉也
論文名	DNA中の酸化損傷塩基の高感度検出を可能にする人工ヌクレオチドの開発
論文調査委員	主査 九州大学 教授 佐々木 茂貴 副査 九州大学 教授 平井 剛 副査 九州大学 准教授 谷口 陽祐 副査 九州大学 准教授 麻生 真理子

論文審査の結果の要旨

核酸塩基は紫外線や活性酸素種により損傷を受ける。中でもグアノシン (dG) の8位が酸化される8-オキソグアノシン (8-oxo-dG) は酸化損傷塩基の代表例である (図1)。8-oxo-dGはシチジン (dC) のみならず一般的な核酸塩基と異なる *syn*-配座 (図2) に配向しアデノシン (dA) と塩基対を形成することで、複製の段階でGC塩基対からTA塩基対へのトランスポージョン変異を誘導する。そのためDNA中の8-oxo-dGの発生量は有用な酸化ストレスマーカーであり、その発生位置は疾患との関連性が示唆されている。8-oxo-dG配列選択的な検出が可能となれば、疾患の早期発見や新たな治療法の開発につながり、酸化損傷塩基を指標とした新しい診断技術、創薬研究へ展開できる。しかしながら既存の8-oxo-dG検出方法では、その塩基配列選択的な発生位置の検出には至っていない。その主な原因としてDNA中に発生する1つの8-oxo-dGを高感度に検出することが難しいことが挙げられる。そこで本研究ではDNA中の8-oxo-dG発生位置と疾患の関連性を明らかにすることを目指し、高感度検出法の開発を目指した人工ヌクレオチドの開発を行うことにした。

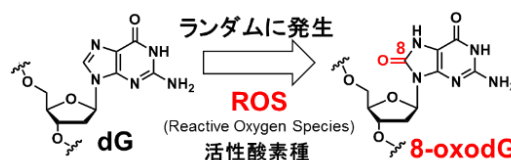


図1 酸化損傷塩基 8-oxo-dG の発生

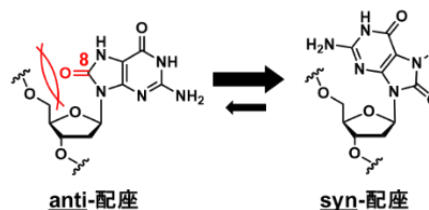


図2 DNA中の 8-oxo-dG の性質

当研究室ではDNA中の 8-oxo-dG の性質に着目し、dAを基本骨格として8-oxo-dGと多点型水素結合が可能な人工核酸 (Adap: Adenosine-1,3-diazaphenoxazine) の開発に成功している。そこで菊川氏は、ヌクレオチドの一つであるトリリン酸体 (dAdapTP) へ誘導し、DNAポリメラーゼ (Klenow Fragment) によるプライマー鎖の一塩基伸長反応をゲルシフトアッセイにより評価することでDNA中の8-oxo-dGの検出を検討した。伸長したプライマー鎖は移動度が遅いバンドとして観察される。ゲルの結果より鋳型鎖のXの位置の8-oxo-dG (°G) に対して伸長反応が進行しGに対しては伸長反応が進行しなかった。このことはdAdapTPがポリメラーゼの基質となり8-oxo-dGの相補的な塩基として認識されたことを示している (図3)。この一塩基伸長反応を繰り返すことによるPCR様増幅反応に展開したが、増幅反応を20cycle進行させた結果、非選択的な増幅反応も観測された (図4)。さらに、種々の酵素を用いて伸長反応の検討を行ったが選択性の改善が見られなかったため、新規 Adap 誘導体を設計、合成し、選択性の改善を検討することにした。

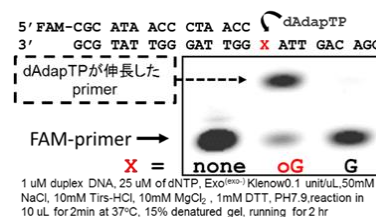
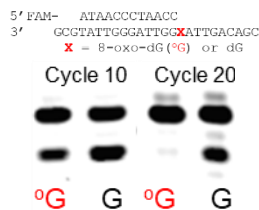


図3 dAdapTPの一塩基伸長反応

続いて菊川氏は、8-oxo-dG 塩基選択性の向上を目的とした新規 Adap 誘導体を合成した。核酸塩基の窒素原子を炭素原子に置き換えた誘導体は、酵素による取り込みの正確性に大きく影響を与える。そこで、Adap の基本骨格である dA の 6 位の NH を CH₂ に変換したプリン骨格を有する Pdap (Purine-1,3-diazaphenoxazine) を設計し合成し、トリリン酸体である dPdapTP へ誘導した (図 5)。Klenow Fragment を用いた一塩基伸長反応で塩基選択性を確認したところ、dAdapTP より取り込み効率の低下が確認されたが、8-oxo-dG と dG との認識の選択性は向上した。



Exo⁻ Klenow 0.1 unit/μL, 25 μM of dAdapTP, 1 μM duplex DNA, Reaction in 10 μL for cycle 1-10, 15% denatured gel, running for 2 hr

図 4 PCR 様増幅反応の結果

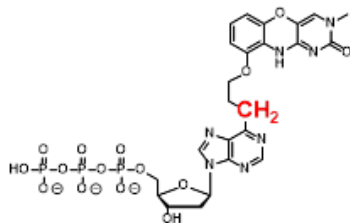


図 5 dPdapTP の構造

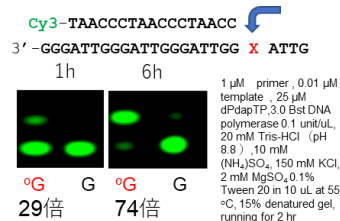


図 6 dPdapTP の °G と dG の増

さらに増幅反応に適用可能なポリメラーゼを種々検討した中で、*Bst* DNA polymerase により興味深い知見を得た。100 nmol の鋳型鎖に対して 100 等量のプライマー鎖と dPdapTP を用い 55°C にて反応を行った結果、時間経過とともに 8-oxo-dG を含む鋳型鎖においてのみプライマー鎖が増幅されていることが観測され、6 時間後では 74 倍まで増幅された (図 6)。この選択的な増幅反応の詳細は明らかにできていないが、dAdapTP では選択性の減少や Klenow Fragment の場合では増幅反応が起きていないため、dPdapTP と *Bst* DNA polymerase の組み合わせが重要であることを発見した。

最後に菊川氏はより生体に近い条件における 8-oxo-dG の検出を検討した。生体中の組織では一部の細胞の DNA のみ酸化損傷を受けるため、その他多くの細胞には損傷塩基が存在しない。そのため、サンプリングした際に dG を含む過剰の DNA 存在下で損傷を受けた 8-oxo-dG を含む DNA を検出しなければならない。dPdapTP と *Bst* DNA polymerase で dG 鎖、8-oxo-dG 鎖混合条件で増幅反応を検討したが、dG の鎖のみの場合でも僅かな増幅反応が確認された。そこで、dG と塩基対を形成する 2',3'-dideoxycytidine を primer 鎖の末端に組み込んだ鎖を primer 鎖と共存させることにより dPdapTP の鋳型鎖の dG への望まぬ酵素による取り込みが阻害できると考えた。この反応を 12 時間 37°C にて増幅反応を検討した結果、dG 鎖に対して 1000 分の 1 の oxo-dG 鎖を 370 倍に増幅し、特異的な検出に成功した (図 7)。

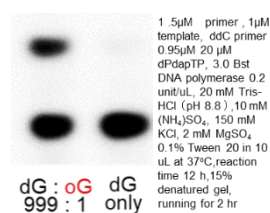


図 7 dG 鎖共存下における oxo-dG の選択的検出

以上の結果より、菊川氏は 8-oxo-dG 配列選択的な検出法の開発を目的とし、人工ヌクレオチドと DNA 合成酵素を用いた新たな検出法の開発を検討した。その結果、一塩基伸長反応を用いて 8-oxo-dG の検出に成功した。さらに一塩基伸長反応を繰り返した遺伝子増幅を行い 1 μM の DNA に含まれる 1 nM の 8-oxo-dG の検出に成功した。以上のように本研究では、酸化損傷塩基を標的とした新規検出法の開発に繋がる結果であり、博士(創薬科学)の学位に値すると認める。