



Split(分割)MutT蛋白質による酸化損傷ヌクレオチドの可視化

紙谷 浩之 大学院医系科学研究科 薬学分野 核酸分析化学 教授

癌化には、遺伝情報の変化である変異の蓄積が大きく関わっていることが知られています。変異の多くはDNAの損傷（化学的修飾）により誘発されますが、化学的修飾はDNAの原料であるヌクレオチドにも生じ、DNAに取り込まれた損傷ヌクレオチドは変異や癌の原因となります。グアニン由来の主要な酸化損傷塩基は8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-G, 8-hydroxy-G) です。大腸菌MutT及びヒトMTH1は8-oxo-Gを持つヌクレオチド(8-oxo-dGTP)を分解する主要な酵素です。一方、癌細胞は活性酸素を多量に産生するため、細胞内に8-oxo-dGTPが蓄積しています。癌細胞がこの毒性を回避するためにはMTH1などによる分解作用が不可欠です。我々は、8-oxo-dGTPの可視化と抗癌剤候補となるMTH1阻害剤のhigh throughput screeningを可能とするシステムの構築を目的として、split (分割) MutTを設計し、その有用性を明らかにしましたので、報告いたします。

まず、立体構造に基づき、MutT蛋白質(8-oxo-dGTP分解能を抑制するためGlu-53をAlaに置換した変異体)を95番目と96番目のアミノ酸の部分で2つに分割しました。その分割断片(Mu95,96tTと命名)に、Ash (assembly helper tag) 及びhAG (humanized Azami-Green) を結合させ、8-oxo-dGTPが結合すると蛍光が点 (focus) として観察されるようにしました。この人工的な蛋白質(Ash-Mu95とhAG-96tT)を発現するヒトの細胞を作製し、8-oxo-dGTP等で細胞を処理すると、予想通りに蛍光輝点が観察されました(図1)。

さらに、細胞内のMTH1をロックダウンした場合や、既知のMTH1阻害剤を細胞に作用させた場合(図2)、酸化剤で細胞を処理した場合にも蛍光輝点が観察されました。

今回、我々が構築したシステムは、DNAやヌクレオチドを酸化する物質等をモニターするためのバイオマーカーとして利用できます。また、前述したように、8-oxo-dGTPは癌細胞にとってtoxicな物質ですので、MTH1などの働きが生存に不可欠であり、今回の8-oxo-dGTP検出システムを使うことにより、抗癌剤候補となるMTH1阻害剤を効率よく見つけることが可能となります。

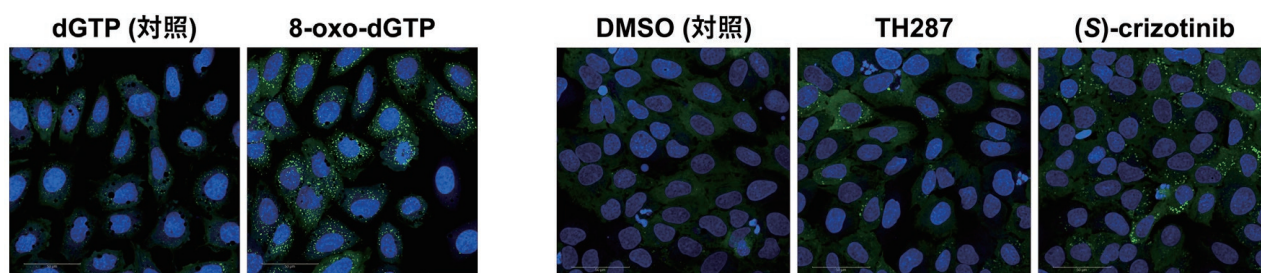


図 1

図 2

[論文情報]

掲載誌: Nucleic Acids Research

論文タイトル: Visualization of oxidized guanine nucleotides accumulation in living cells with split MutT

著者名: Yoshihiro Fujikawa, Hidehiko Kawai, Tetsuya Suzuki, Hiroyuki Kamiya* (*責任著者)

DOI番号: 10.1093/nar/gkae371