

光照射による特定反応誘導可能な新規試験管内生命現象解析ツールの構築とその評価

河 添 好 孝^{*1}金 森 功 吏^{*2}

Establishment and Evaluation of a Novel Tool to Study Life Sciences by Light Irradiation

Yoshitaka KAWASOE^{*1} and Takashi KANAMORI^{*2}

In all organisms, various reactions such as DNA replication and repair are essential for maintaining vital activities. Synthetic oligo-DNA is an essential experimental tool in biological research and has greatly expanded the scope of research. Photo-functional molecules can trigger various reactions, such as the generation of reactive oxygen species. Importantly, that can be induced at any time by light irradiation from outside of a test tube. The application of photo-functional molecules in biological research will allow us to analyze the repair of oxidative damage in the context of chromatin and to identify new DNA-binding factors. In this study, we investigated the use of a photosensitizer in biological research. We prepared plasmid substrates containing a small photosensitizer. Light-induced DNA damages accumulated around the photosensitizer. Using clawed frog egg extracts, we found that these damages were repaired in the extracts, and that damage repair was also induced in the context of chromatin. These results strongly suggest that photo-functional molecules can be applied to biological researches and have great potential to contribute to researches as a new experimental tool.

1. 研究の背景と目的

全ての生物において、遺伝情報物質である DNA の複製、DNA に生じた損傷の修復や、転写・翻訳など、さまざまな反応が生命活動の維持に必須である。生体内で起こる反応は複雑に関連しあっており、ある反応のみに着目するためには、なにかしらの「トリック」を必要とする。合成オリゴ DNA は「トリック」の一つであり、着目する DNA 鎖の特異的な検出や、特定の DNA 損傷の導入など、研究の幅を大きく広げている。このように、合成オリゴ DNA は、現在の生物研究において、なくてはならないと言っても過言ではないほどの重要な実験ツールとなっている。

DNA はその物性上、非常に多くの損傷を受ける。細胞では、損傷に対して適切な修復が行われることで、遺伝情報は常に安定に維持される。修復機構の破綻は、がんや遺伝病に直結するため、損傷修復機構のメカニズムの理解は、生物学の理解を進めるだけではなく、医療分野においても重要な情報となる。例えば、ヒトを含めた好気性生物は酸素を利用して生命活動を行うため、生体分子はその副産物として生じる活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) による酸化を受け続ける。酸化損傷塩基は DNA 複製を介して突然変異を誘発するため、細胞のがん化や、特に神経系において障害を引き起こす。酸化損傷塩基に対する個々の修復過程に関しては多くの知見が得られている⁽¹⁾。しかしながら、細胞内での振る舞いを考えた場合、クロマチン構造の影響を考慮しなければならないが⁽²⁾、既存の実験系ではクロマチンを形成した状態での酸化損傷の修復を詳細に調べるためには困難が伴う。具体的には、予め損傷塩基を含む DNA 基質を細胞抽出液等に加えて修復過程を調べようとする

・従来の解析系



・「反応を切り分ける」解析系

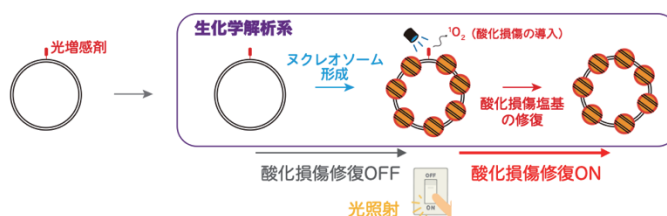


図1 従来のDNA修復機構の解析系における問題点と本研究において構築を目指した「反応を切り分ける」ことが可能な解析系の概要。

2024年3月4日 受理

^{*1}九州大学大学院理学研究院生物科学部門^{*2}東京工業大学生命理工学院

ると、クロマチン形成とDNA修復が同時に起こるため、クロマチン形成後の修復反応に関する生化学的な解析は難しい(図1)。また、クロマチン形成に限らず、時間経過によって刻々と変化する状況下において任意のタイミングで損傷を導入し、修復機構を手軽に再現、解析することは困難であった。

光機能性分子は、光が照射されると蛍光や光増感作用などの光化学反応を起こす分子である。筆者らは光機能性分子として、独自の小型光増感剤(ONBP, 図2a)開発を行っている。光増感剤は光励起されると周囲の酸素($^3\text{O}_2$)を反応性の高い一重項酸素($^1\text{O}_2$)に変換する性質を有しており、この性質を利用し、筆者らは $^1\text{O}_2$ をDNAの局所環境で発生させ、DNA中の核酸塩基を酸化する方法を開発している⁽³⁾。筆者らは、これを生物研究に用いれば、任意のタイミングで解析系にほとんど影響を与えることなく酸化損傷を導入できるのではないかと考えた。そこで、細胞内環境での修復過程を解析する実験系構築のため、図1に示すように、光増感剤修飾プラスミドを合成し、クロマチン形成させた後に光照射する新規実験系を考えた。さらに、光架橋性残基を用いれば任意のタイミングでDNA上のタンパク質を固定化し⁽⁴⁾、修復のダイナミクスを調べることが可能となり、研究の幅がさらに広がる。本研究では、反応の詳細がともに明らかとなっている酸化損傷修復機構と小型光増感剤を対象とし、光機能性分子の生化学解析への応用を目指した。

2. 光増感剤修飾オリゴDNAの合成と評価、光増感剤修飾プラスミドの合成

筆者らの報告⁽³⁾を基に、光増感剤ユニットであるONBP-dUの合成を行い、ユニットを1つ含むGC含量約60%の48 nt オリゴDNAを合成した。

まず、48 bp の二本鎖DNAを用いて光照射を行い、光増感剤ユニット周辺に損傷が導入されるか解析した。光照射後に酸化塩基を含むDNA鎖を切断する処理を行ったのち、アクリルアミドゲル電気泳動を行うと、光増感剤周辺に損傷を導入できていることが示唆された。その後、別途調整したプラスミドDNAへ複数段階の処理を経てオリゴDNAを導入し、最後に、密度勾配遠心法により精製した(図2a)。ア

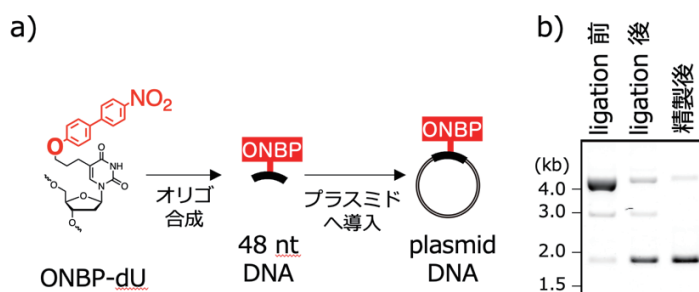


図2 光増感剤修飾を含むプラスミドの合成を行った。

a) プラスミド合成のスキーム。b) プラスミドへの導入処理における途中段階および精製後のアガロースゲル電気泳動結果を示す。

ガロースゲル電気泳動の結果、高純度に目的の光増感剤修飾プラスミドが得られたことがわかった(図2b)。

3. 光照射による損傷導入とツメガエル卵抽出液を用いた修復実験

合成した光増感剤修飾プラスミドを用い、予め光照射によって導入した損傷が、ツメガエル卵抽出液中で修復されるか検証した。ツメガエル卵抽出液は、クロマチン形成やDNA修復反応などの様々な反応を生理的な経路で再現する試験管内解析系である^(5, 6, 7)。生化学系であるため、生命維持に必須因子の除去や試薬の添加が可能であり、多くの反応メカニズムの理解に貢献してきた。修復の追跡には、蛍光ラベルdUTP(Cy5-dUTP)を用いた。光照射によって導入された塩基損傷の修復にはDNA合成反応を伴うことが期待されるため、卵抽出液中で修復反応が起こると、その際に基質に蛍光ラベルdUTPが取り込まれるはずである。そのシグナルをもとに、どこに、どの程度、修復が起きたか明らかにできると考えた(図3a)。光照射後のプラスミドを抽出液で反応させた後、アガロースゲル電気泳動によってDNAを分離し、DNAに含まれるCy5のシグナル値を定量解析した。光照射を行っていないプラスミド(図3b, レーン1)と比較すると、光照射後のプラスミド(図3b, レーン2)では約6倍もCy5のシグナル値が上昇していた。以上の結果から、光照射によって損傷の導入ができ、さらに、ツメガエル卵抽出液を用いて修復反応の解析が可能であることが明らかとなった。

最後に、筆者らは細胞内模倣環境での解析を目指し、光増感剤修飾プラスミドと卵抽出液を予め反応させた後に光照射することで、クロマチンを形成した基質においても光照射に応答した修復が解析できるか検討した。予備的な結果ではあ

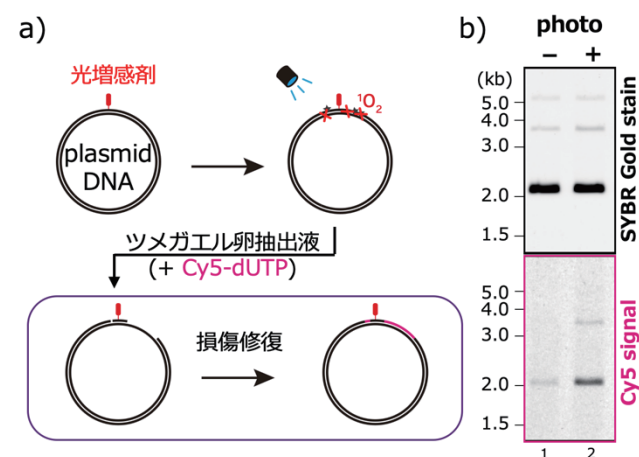


図3 光照射によって生じた損傷は卵抽出液中で修復される。

a) 実験系の概要。b) ゲル電気泳動による評価。光照射によってCy5の蛍光シグナルの大幅な増加が観察された。

るものの、クロマチン上でも光照射によって修復誘導が可能であり、光増感剤と光照射に依存して、基質に蛍光ラベル dUTP の取り込みが観察された。これらの結果から、光機能性分子を生化学に応用することで、クロマチン上での修復など、複雑な反応を詳細に、そして容易に評価できる実験系の構築の基盤ができたと考えている。

4. まとめと今後の展望

今回、光増感剤を例とし、光機能性分子を分子生物学研究へと応用する基盤の構築に成功した。薬剤などの添加は解析系に対して悪影響を与える可能性がある。しかしながら、今回、光照射によって解析系の外部から反応を操作できるようになったことで、可能な限り最適な環境での解析が可能になったと考えている。一方、今回の実験条件においても、長時間の光照射は抽出液の活性に対して悪影響を及ぼした。そのため、今後は解析系に毒性を与えない、より最適な条件を探索する必要があると考えている。

現在、照射する波長に応じて複数の光機能性分子が知られている⁽⁸⁾。例えば、損傷導入に機能する分子に加えて、別波長で励起される光架橋性残基を基質に同時に導入すれば、修復因子の損傷部位へのリクルートについてリアルタイムに解析できる。このように今後本研究の応用が進むことで、反応系自体を操作することなく、複数の反応を外部から操作可能となる、素晴らしい解析系が構築できるのではないかと期待している。

REFERENCES

- 1) A. Sassa *et al.*, *DNA repair*, **93** (2020) 102906.
- 2) M. Ramsom *et al.*, *Cell*, **140** (2010) 183-195.
- 3) T. Kanamori *et al.*, *Sci. Rep.*, **13** (2023) 13.
- 4) H. S. Jeong *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **10** (2015) 1450-1455.
- 5) Y. Kawasoe *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **300** (2024) 105588.
- 6) W. S. Hoogenboom *et al.*, *Dev. Biol.*, **428** (2017) 300-309.
- 7) S. Repmann *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **290** (2015) 9986-9999.
- 8) K. Kozoriz *et al.*, *Acc. Chem. Res.* **56** (2023) 25-36.