

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究

分担研究課題名：食品添加物における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

分担研究者： 續 輝久 九州大学大学院医学研究院基礎医学部門
生体制御学講座 基礎放射線医学（分子遺伝学）分野 教授

研究要旨

Mutyh 遺伝子欠損マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん実験系を確立して、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するために、0.1%および0.2%臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行い、*Mutyh* 遺伝子産物が酸化剤の遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献していることを示唆する結果を得た。また、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん・突然変異誘発の実験系は、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討する上で、有用な試験系であることが示された。

キーワード： 臭素酸カリウム、*Mutyh* 遺伝子、*rpsL* トランスジェニックマウス

A. 研究目的

遺伝毒性物質の作用には一般に閾値がないとされており、どのように微量であってもヒトに対してリスクを示すと考えられている。このため遺伝毒性を示す発がん物質には ADI (Acceptable Daily Intake) が設定されず、食品添加物等に発がん性が認められた場合、その発生機序に遺伝毒性が関与するかは、行政上重要な問題になっている。だが、ヒトにはさまざまな生体防御機能 (DNA 修復、解毒代謝、損傷乗り越え DNA 合成、アポトーシスなど) が備わっており、ある限度 (閾値) 以下の作用は、事実上無毒化される可能性が考えられる。

生命にとって必須の酸素は、エネルギー

産生系で利用される際に活性酸素種の生成を伴い、遺伝情報を司る DNA、RNA 並びにそれらの前駆体を酸化する。これら内在性の酸素ストレスに加え、環境中の放射線や遺伝毒性を示すある種の化学物質、さらには感染に伴う炎症によっても活性酸素種が生じている。活性酸素種は生体高分子を酸化し、発がんや老化を引き起こす。様々な酸化的損傷の中で、核酸のグアニン塩基の酸化体 8-オキシグアニン (8-oxoG) は遺伝情報保持及び伝達に異常を引き起こす点で最も重要である。8-oxoG はシトシンと同程度にアデニンとも対合できるので、DNA 中の 8-oxoG は突然変異の原因となる。8-oxoG による突然変異生成に対処するために生物は

種々の酵素系を持っている。ヒトでは、OGG1がDNA中の8-oxoGを取り除き、MUTYHが8-oxoGに対して取り込まれたアデニンを除去する。またMTH1はヌクレオチドプール中に生じた8-oxo-dGTPを分解し、DNA複製の際に8-oxoGがDNAへ取り込まれるのを防いでいる。我々はこれらの酵素の遺伝子を欠損したマウスを樹立し、これらのマウスでは自然発がんが上昇していることを示し、酸化DNA損傷が自然発がんの要因であることを明らかにしてきた。さらに *Mut* 遺伝子欠損マウスに酸化剤である臭素酸カリウムを経口投与し、その突然変異誘導・発がん感受性を野生型と比較することにより、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するための試験系の樹立を試みた。

本年度は、この実験系を用いて遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するための予備実験として、低用量臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った。

B. 研究方法

2) *Mut* 遺伝子欠損マウスの飼養

C57BL6/Jの遺伝的背景を持つ *Mut* 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体同士の掛け合わせにより *Mut* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。マウスの飼養については、九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則並びに動物実験規則に従って実施した。

3) 臭素酸カリウム溶液の投与

臭素酸カリウム (Sigma) を純水に溶解し、0.1%および0.2%溶液を調製後濾過滅菌し、マウスの飲料水とした。投与方法としては、発がん解析には16週間の自由飲水で行い、消費量については週一回モニターした。

4) 発がん実験

マウスを安楽死させた後、腸管を摘出して10%ホルマリンを用いて固定した。その後、固定液を70%エタノールに置換えて、腸粘膜を実体顕微鏡下で観察し、腫瘍の形成を確認した。検出した腫瘍から病理切片を作製し、病理解析を行った。

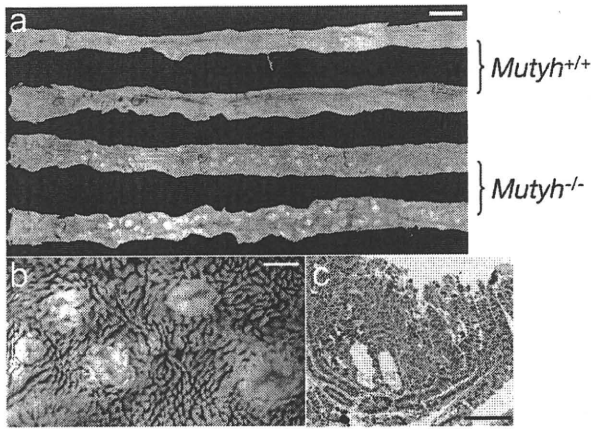
5) 統計的手法

すべての測定値について平均値と標準偏差を求めた。

C. 研究結果

臭素酸カリウム誘発消化管発がん

これまでの *Mut* 遺伝子欠損マウスを用いた0.2%臭素酸カリウム溶液を16週間連続飲水投与した誘発消化管発がん実験では、*Mut* 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸で多数の上皮性腫瘍の発生を認めた(第1図)。臭素酸カリウムを投与した野生型マウス雌9匹および *Mut* 遺伝子欠損マウス雌8匹に生じた1個体当たりの平均腫瘍数はそれぞれ 1.0 ± 0.7 , 51.0 ± 28.4 であった。今回、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するための予備実験として、従来から用いてきた用量である0.2%、およびより低用量の0.1%臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った。0.2%臭素酸カリウムを投与した *Mut* 遺伝子欠損マウス4匹に生じた1個体当たりの平均腫瘍数は 60.8 ± 35.0 で、前回行った大規模な投与実験の結果 (51.0 ± 28.4) と同程度の腫瘍発生頻度であった。一方、0.1%臭素酸カリウムを投与された *Mut* 遺伝子欠損マウス4匹の小腸には、1個体当たり平均 9.0 ± 8.3 の腫瘍が発生していた(表1、図2)。



第1図 臭素酸カリウム誘発小腸腫瘍
(代表的な病理像)

表1 Mutyh 欠損マウスにおける臭素酸カリウム誘発小腸腫瘍の発生頻度

Mutyh mice (ID /sex)	KBrO3 (%)	Number of tumors in small intestine	
35 (♂)	0.1	7	mean ± SD 9.0 ± 8.3
36 (♂)	0.1	6	
37 (♀)	0.1	21	
40 (♀)	0.1	2	
42 (♀)	0.2	105	mean ± SD 60.8 ± 35.0
44 (♀)	0.2	23	
46 (♀)	0.2	69	
47 (♀)	0.2	46	

D. 考察

遺伝毒性物質の作用には閾値がないとされるため、遺伝毒性に基づく発がん作用が検出された場合には、食品添加物等にはADIが設定されない。しかし、福島昭治博士(現、日本バイオアッセイ研究センター所長)らの系統的な研究により、遺伝毒性発がん物質であっても「事実上の閾値」(それ以下では有意な発がん頻度の上昇が見られない用量)のあることが示唆されている(Carcinogenesis, 26, 1835-1845, 2005)。ヒトにはさまざまな生体防御機構(DNA修復、解毒代謝、誤りのない損傷乗り越えDNA合成、アポトーシス等)が存在し、これらが遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し「事実上の閾値」を形成する可能性が考えられる。本研究では、酸化DNA損傷に起因する突然変異を抑制する *Mutyh* 遺伝子を欠損したマウスを用い、パンの製造過程でも使用

され酸化ストレスを負荷することが知られている食品添加物、臭素酸カリウムを投与する実験を行い、DNA修復が遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献する可能性について検討するための試験系の樹立をめざしている。

0.2%臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウスでは野生型に比べて小腸での発がん頻度は1個体当たり 60.8 ± 35.0 で、約60倍上昇していた。一方、0.1%臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの平均腫瘍発生頻度は1個体当たり 9.0 ± 8.3 で、0.2%臭素酸カリウム投与群と比較すると、約6.7分の1に減少していた。最近の研究で、MUTYHはDNA修復以外に酸化DNA損傷に起因する細胞死誘導に関与することが示されている(Oka et al, EMBO J, 2008)。突然変異の蓄積を防ぐDNA修復は発がん抑制に大きく寄与する。一方、DNA損傷に起因する細胞死誘導能も個体における突然変異体(前がん細胞)の出現を防ぐことから、この機構も発がん抑制に大きく関わっていると考えられる。酸化DNA損傷による突然変異率上昇と細胞死誘導が臭素酸カリウム濃度の一次関数であると仮定するならば、MUTYH欠損による酸化ストレス誘発発がんの発生頻度は臭素酸カリウム濃度の二次関数になることが期待され、他の因子1つが関与するならば三次関数になる(図2)。今回の限られたマウスを用いた実験結果では、他の発がんに影響する因子の存在に関して議論することはできないが、*Mutyh* 遺伝子産物が酸化剤の遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献している可能性を示している。今後、使用マウスの数を増やして、複数の低用量臭素酸カリウムを投与することにより、発がん解析を行っていく必要がある。

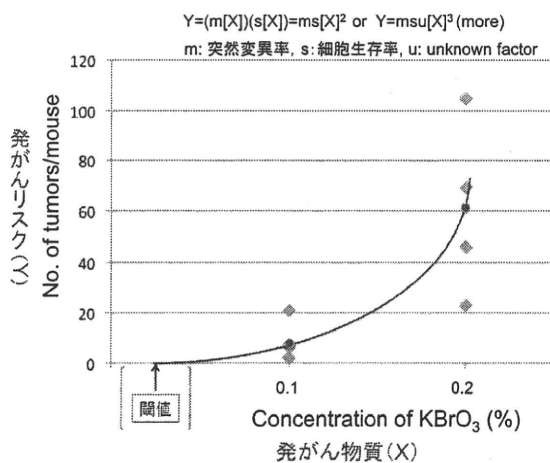


図2 臭素酸カリウム濃度と *Mut*yh 欠損マウス小腸での腫瘍発生頻度

E. 結論

*Mut*yh 遺伝子マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん実験系は、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討する上で有用な試験系であると考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

[学術雑誌]

- 23) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu and Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice. *Health Physics* (in press) [査読有]
- 24) N. Sagata, A. Iwaki, T. Aramaki, K. Takao, S. Kura, T. Tsuzuki, R. Kawakami, I. Ito, T. Kitamura, H. Sugiyama, T. Miyakawa, and Y. Fukumaki, Comprehensive behavioral study of GluR4 knockout mice: implication in cognitive function.

Genes, Brain Behavior, 9: 899-909, 2010. [査読有]

- 25) T. Nakamura, S. Meshitsuka, S. Kitagawa, N. Abe, J. Yamada, T. Ishino, H. Nakano, T. Tsuzuki, T. Doi, Y. Kobayashi, S. Fujii, M. Sekiguchi and Y. Yamagata, Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base. *J. Biol. Chem.*, 285: 444-452, 2010. [査読有]

- 26) H. Kamiya M. Uchiyam, J.-S. Piao, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki and H. Harashima, Targeted sequence alteration of a chromosomal locus in mouse liver. *Inter. J. Pharmaceutics*, 387: 180-183, 2010. [査読有]

[図書]

- 1) T. Tsuzuki, T. Isoda, J. Piao, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestines of DNA repair-deficient mice, *International Proceedings: The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund "DNA Repair and Cancers"* Eds. S. Nishimura, L. A. Loeb, M. Masutani, H. Nakagama, T. Sekiya, Princess Takamatsu Cancer Research Fund, 2010.
- 2) 江頭明典、前原喜彦、續輝久, DNA修復異常と発がんモデル pp. 82-99, 「完全版 マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック」 秋山徹・奥山隆平・河府和義編, 羊土社 2011.

学会発表

- 1) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K.

- Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu,
Prevention of Oxidative Mutagenesis
by DNA Repair Enzymes: Implication in
Human Cancer, 2nd Asian Conference on
Environmental Mutagens (ACEM):
Harmonize Gene & Environment,
Pattaya, Thailand, 2010.12.17.
- 2) 大野みずき, 作見邦彦, 續輝久, 中別
府雄作, 8-oxoguanine は DNA 鎖切断を
誘発することで減数分裂期の相同染色
体組換え頻度を上昇させる, 日本生化学
学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生
物学会年会合同大会, 神戸, 2010. 12. 8.
- 3) 中西恵美, 大野みずき, 中津可道, 續
輝久, 腸管と精巣における放射線誘発
DNA 損傷とその修復機構の解析, 日本生
化学学会第 82 回大会・第 33 回日本分子
生物学会年会合同大会, 神戸,
2010. 12. 7.
- 4) 大野みずき, 中西恵美, 作見邦彦, 古
市正人, 中別府雄作, 續輝久, 酸化損
傷 DNA が生殖細胞ゲノムに及ぼす影響,
日本環境変異学会第 39 回大会, 茨城,
2010. 11. 16.
- 5) 大野みずき, 中西恵美, 中津可道, 續
輝久, 低 LET 放射線による核酸の損傷
とその修復機構: 腸管と精巣における
解析, 日本放射線影響学会第 53 回大会,
京都, 2010. 10. 20.
- 6) 高橋富美, 吉原達也, 中津可道, 續輝
久, 中別府雄作, 笹栗俊之, 酸化スト
レス誘発小腸腫瘍に対する
Differentiation-inducing factor-1 の
抗腫瘍効果, 第 69 回日本癌学会学術総
会, 大阪, 2010. 9. 22.
- 7) 日高真純, 高木康光, Teik-How Lim,
中津可道, 續輝久, 佐野しおり, 坂上
竜資, 関口睦夫, 哺乳類細胞のゲノム
安定性と細胞死, 日本遺伝学会第 82 回
大会, 札幌, 2010. 9. 20.
- 8) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K.
Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu,
Oxidative stress-induced
tumorigenesis in the small intestine
of various types of DNA
repair-deficient mice, Workshop:
Biological effects of low-level
exposure to ionizing radiation,
health risks and clinical
consequences, Richland, WA, USA,
2010. 5. 5.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

研究課題名:食品添加物等における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

分担研究課題名:培養細胞を用いた遺伝毒性研究

分担研究者: 能美健彦 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

DNA 損傷部位の乗り越えに関わるトランスリージョン合成(TLS)型 DNA ポリメラーゼは遺伝毒性からの防御に関わる因子のひとつであり、その欠損や不活化は環境中の変異原物質に高い感受性を示すことが予想される。本研究では、TLS 合成ポリメラーゼのひとつであるポリメラーゼ κ (Pol κ) を欠損した Pol κ ノックアウト細胞を樹立し、遺伝毒性物質に対する致死感受性を調べた。Pol κ の欠損は、過酸化水素に対する致死感受性を増加した。しかしながら、ベンツピレン、マイトマイシン C および紫外線に対する致死感受性には影響を与えなかった。今後は臭素酸カリウムなどの食品添加物の致死感受性を検討すると共に、変異原性も合わせて検討し、遺伝毒性物質を高感度に検出しうる有用な試験系の確立に努めていく。

キーワード:TLS 型 DNA ポリメラーゼ、ポリメラーゼ κ ノックアウト

A. 研究目的

一般に発がん性物質は、その作用に遺伝毒性(突然変異や染色体異常)が関与する遺伝毒性発がん物質と、それ以外のメカニズムによって発がんを促進する非遺伝毒性発がん物質に分類される。非遺伝毒性発がん物質については、閾値の存在が認められ、一日許容摂取量(ADI)は無毒性量(NOAEL)に基づいて設定される。これに対して遺伝毒性発がん物質の場合には、どのように低量量であってもヒトに発がんリスクを負わせるものと考えられ、閾値は存在しないと考えられている。したがって、発がん作用に遺伝毒性が関与していることが明らかになると ADI は設定されず、食品添加物等については、事実上、禁止の措置が執ら

れる。

だがヒトはさまざまな生体防御機能(代謝的不活化、DNA 修復、誤りのないトランスリージョン DNA 合成(TLS)、アポトーシス等)を有しており、低用量の遺伝毒性物質であれば、その作用を不活化、減弱させ、自然突然変異のレベルにまで低減させ、「事実上の閾値」を形成する可能性が考えられる。本研究では、TLS に係わる DNA ポリメラーゼ κ を不活化したヒト細胞を樹立し、その遺伝毒性物質に対する感受性を精査することで、遺伝毒性物質に対する閾値形成の機構を明らかにすることを目的とする。

遺伝毒性試験は、化学物質が細胞 DNA の構造・機能に影響を与え、その結果、DNA 損

傷、突然変異や染色体異常を引き起こす性質(遺伝毒性)を検出する試験法である。遺伝毒性のうち塩基置換変異やフレームシフト変異などの点突然変異は、損傷特異的なDNAポリメラーゼ(Pol)がDNA損傷(付加体)を乗り越える際に損傷部位の向かい側に誤った塩基を挿入したり、損傷部位を飛ばしたりしてDNA合成が行われたときに生じると考えられている。この損傷部位を乗り越えて進むDNA合成は、TLSと呼ばれている。TLSは複製Polが損傷DNAにより複製を停止した部位で機能し、複製フォークの進行停止に伴うDNA鎖の切断や染色体異常の誘発を防止する役割をはたし、DNA修復機構とともに染色体の恒常性維持に必要不可欠な生物機能である。ヒト細胞には14種類以上のPolが存在するが、その中でもYファミリーに属する4種類のPol(κ 、 η 、 ι 、REV1)はTLSにおいて中心的な役割を果たしていると考えられている。

我々は、これまでにヒトPol κ 遺伝子(*POLK*)を単離・精製し、ヒトPol κ (hPol κ)が(1)鋳型DNA鎖上のベンツピレンジオールエポキシド(BPDE)付加体を乗り越えてDNA合成を続けること、(2)鋳型鎖のBPDEの向かい側には正しい塩基(シトシン)を挿入する機会が多いこと、(3)hPol κ はBPDEの向かい側にシトシンが対合する鋳型プライマー鎖に強く結合することを明らかにした。

今年度は、hPol κ の活性中心が存在するエクソンを欠失させたノックアウト(KO)細胞株を樹立し、表現型解析と細胞毒性試験を行った。その結果、Pol κ KO株は過酸化水素(H₂O₂)の致死作用に対して高い感受性を示すことが明らかになり、Pol κ によるTLSが酸化ストレスに基づく細胞死に対する防御機構として重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

B. 研究方法

1) 培養条件

培地はRPMI1640培地を用いた。これに

非働化処理(56度で30分間処理)したウシ血清(50 μ g/mlカナマイシン添加)を10%添加し、 β -メルカプトエタノールを0.00036%になるよう加えた。培養はCO₂インキュベーターにて37度、5%濃度のCO₂条件下で行った。

2) Pol κ ノックアウト細胞の樹立

Pol κ ノックアウト(KO)細胞樹立のため、*POLK*遺伝子のエクソン6を除くようなターゲティングベクターを作製した(図1)。作製したターゲティングベクターはエレクトロポレーションにより、ヒトプレB細胞由来のnalm-6細胞へトランスフェクションし、ハイグロマイシン耐性(hyg^r)、ピューロマイシン耐性(puro^r)により、導入遺伝子が染色体上に組み込まれた株をスクリーニングした。相同組換えを介さずにベクターDNAが挿入した細胞は、ジフテリア毒素感受性を指標にして除いた。

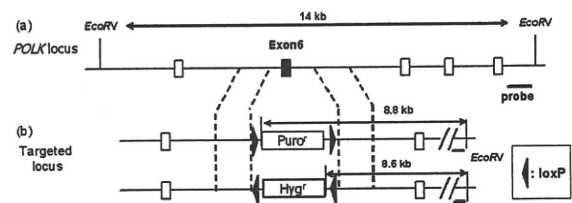


図1 KO細胞樹立用ターゲティングベクター (a) *POLK*のゲノム構造 (b) KO細胞樹立用ターゲティングベクターの構造

3) 薬剤処理による細胞毒性試験

細胞毒性試験には、過酸化水素(H₂O₂)、ベンツピレン(BP)、マイトマイシンC(MMC)、紫外線(UV-C)を用いた。各培養細胞液5ml(5 × 10⁵ cells/ml)にH₂O₂は0、10、20、30 μ M、BPは0、0.8、1.6、2.4 μ g/ml、MMCは0、0.1、0.2、0.4 μ g/mlになるよう添加した。また、BPは代謝活性化が必要なため、ラットの肝9,000 x g上清(S9)とco-factorを添加した(S9 mix)。UV-Cは0、

4、8、10、12、15 J/m² となるように照射した。薬剤処理時間は H₂O₂ は 1 時間、BP と MMC はインキュベーター内で軽く振湯しつつ 4 時間処理した。培養後、細胞は薬剤を含まない培地で洗い、薬剤を除去した。生存率は平板効率から求めた。平板効率算出のために、細胞は適当な濃度に希釈し、96 ウェルプレートに播種し、培養した。約 17 日間培養して、コロニーが形成されていない well 数を計測した。細胞の平板効率はポアソン分布に基づき算出した。

4) 統計的手法

すべての測定値について平均値と標準偏差を求め、統計的な有意差は Student's *t*-test により評価した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いたヒト細胞は株化細胞であり、倫理問題は生じないと考える。

C. 研究結果

1) KO 細胞の選別と確認

薬剤耐性を示した細胞由来のゲノム DNA を *EcoRV* で切断し、Southern blot 法によりハイブリダイズするバンドの大きさが 8.6 kb (*hyg^r*) あるいは 8.8 kb (*puro^r*) になっているものを選択した (図 2a)。Cre 組換え酵素遺伝子により薬剤耐性遺伝子を除き KO 細胞とした。KO 細胞から Pol κ が発現していないことを Western blot 法にて確認した (図 2b)。

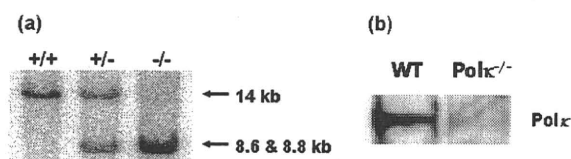


図 2 (a) hPol κ KO 細胞のサザン解析 +/+, *POLK* 野生型細胞; +/-, ヘテロ細胞; -/-, KO 細胞 サザン解析は、ゲノム DNA を *EcoRV* で切断後、図 1 に示す probe を用いて行った (b) ウェスタン解析 WT, 野生型細胞; -/-, KO 細胞 hPol κ 精製標品に対するポリクローナル抗体を用いた

2) 化学物質に対する感受性

H₂O₂ に対して、野生型および KO 株は 30 μM の用量で生存率が顕著に低下した。また、KO 株では野生型と比べ有意に生存率の低下が見られた。BP、MMC に対して、二株は用量依存的な生存率の低下が見られたが、二株の間に感受性の差は見られなかった。また、UVC 照射に対しても二株は照射量依存的な生存率の低下が見られたが、二株の間に感受性の差は見られなかった。

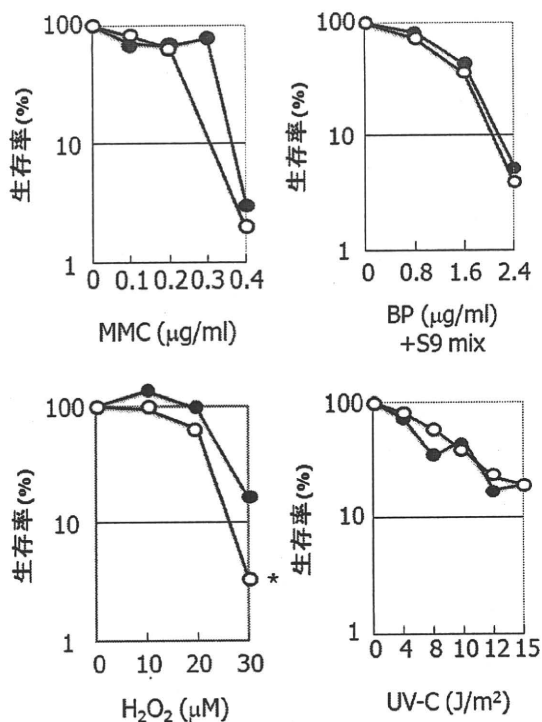


図3 野生型と KO 細胞株の MMC、BP (+S9 mix)、H₂O₂ および UV-C に対する致死感受性の比較 (●), 野生型細胞; (○), KO 細胞

D. 考察

今回、化学物質に対する致死および変異感受性について比較を行い、H₂O₂において野生型と比較して KO 細胞株では生存率が有意に低下していた。in vitro の実験において hPol κ は酸化損傷であるチミングリコールに対して乗越え DNA 合成を行うことが報告されている。KO 細胞株では H₂O₂ 暴露により生じたチミングリコールをはじめとする酸化損傷を乗り越えることができず、野生型と比較し、有意に生存率が低下した可能性が考えられる。

Nalm-6 細胞は、ミスマッチ修復が欠損しており、自然突然変異頻度が高いことが知られている。我々は、この細胞にミスマッチ修復タンパク質を再発現し、自然突然変異頻度を低下させることに成功した。今後、この細胞を用いて、突然変異試験、in vitro 小核試験、などを行い、野生型株と KO 細胞の性質を比較し

ていく予定である。また、臭素酸カリウムなどの H₂O₂ 以外の DNA 酸化剤を用いて同様に致死感受性を調べていく予定である。

E. 結論

作製した hPol κ KO 細胞株と野生型株を用いて、薬剤処理による生存率と突然変異頻度を調べた。H₂O₂ では KO 株は野生型株と比べ有意に生存率の低下がみられた。今後、DNA を酸化する他の薬剤でも同様の試験を行う。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Horibata, M. Saijo, M.N. Bay, L. Lan, I. Kuraoka, P.J. Brooks, M. Honma, T. Nohmi, A. Yasui and K. Tanaka, Mutant Cockayne syndrome group B protein inhibits repair of DNA topoisomerase I-DNA covalent complex, *Genes to Cells*, 16, 101-114 (2011)
- 2) A. Sassaa, N. Niimi, H. Fujimoto, A. Katafuchi, P. Grúz, M. Yasui, R. C. Gupta, F. Johnson, T. Ohta and T. Nohmi, Phenylalanine 171 is a molecular brake for translesion synthesis across benzo[a]pyrene-guanine adducts by human DNA polymerase kappa, *Mutat. Res.*, 718, 10-17 (2011)
- 3) M. Hori, S. Yonekura, T. Nohmi, P. Gruz, H. Sugiyama, S. Yonei and Q.-M. Zhang-Akiyama, Error-prone translesion DNA synthesis by Escherichia coli DNA polymerase IV (DinB) on templates containing

- 1,2-dihydro-2-oxoadenine, J. Nucleic Acids, in press.
- 4) M. Tasaki, T. Umemura, Y. Suzuki, D. Hibi, T. Inoue, T. Okamura, Y. Ishii, S. Maruyama, T. Nohmi and A. Nishikawa, Oxidative DNA damage and reporter gene mutation in the livers of *gpt* delta rats given non-genotoxic hepatocarcinogens with cytochrome P450-inducible potency, *Cancer Sci.*, 101, 2525-2530 (2010)
- 5) A. Sheh, C.W. Lee, K. Masumura, B.H. Rickman, T. Nohmi, G. N. Wogan, J.G. Fox and D.B. Schauer, Mutagenic potency of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of mice is determined by sex and duration of infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, 15217-15222 (2010)
- 32) K. Masumura, Y. Sakamoto, M. Ikeda, Y. Asami, T. Tsukamoto, H. Ikehata, Y. Kuroiwa, T. Umemura, A. Nishikawa, M. Tatematsu, T. Ono and T. Nohmi, Antigenotoxic effects of p53 on spontaneous and UVB-induced deletions in the epidermis of *gpt* delta transgenic mice, *Environ. Mol. Mutagen.*, 52, 244-252 (2011)
- 6) J.H.Y. Wong, J.A. Brown, Z. Suo, P. Blum, T. Nohmi and H. Ling, Dynamic bypass of a major cisplatin-DNA adduct revealed in structural, kinetic and in vivo studies, *EMBO J.*, 29, 2059-2069 (2010)
- 7) T. Okamura, Y. Ishii, Y. Suzuki, T. Inoue, M. Tasaki, Y. Kodama, T. Nohmi, K. Mitsumori, T. Umemura and A. Nishikawa, Effects of co-treatment of dextran sulfate sodium and MeIQx on genotoxicity and possible carcinogenicity in the colon of p53-deficient mice, *J. Toxicol. Sci.* 35, 731-741 (2010)
- 8) T. Okamura, Y. Ishii, Y. Suzuki, T. Inoue, M. Tasaki, Y. Kodama, T. Nohmi, K. Mitsumori, T. Umemura and A. Nishikawa, Enhancing effects of carbon tetrachloride on in vivo mutagenicity in the liver of mice fed 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), *J. Toxicol. Sci.*, 35, 709-720 (2010)
- 9) N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi, Integration of in vivo genotoxicity and short-term carcinogenicity assays using F344 *gpt* delta transgenic rats: in vivo mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene structural isomers, *Toxicol. Sci.*, 114, 71-78 (2010)
- 10) A. Katafuchi, A. Sassa, N. Niimi, P. Gruz, H. Fujimoto, C. Masutani, F. Hanaoka, T. Ohta and T. Nohmi, Critical amino acids in human DNA polymerases eta and kappa involved in erroneous incorporation of oxidized nucleotides, *Nucleic Acids Res.*, 38, 859-867 (2010)
- 11) N. Okudaira, F. Uehara, K. Fujikawa, N. Kagawa, A. Ootsuyama, T. Norimura, K. Saeki, T. Nohmi, K. Masumura, T. Matsumoto, Y. Oghiso, K. Tanaka, K. Ichinohe, S. Nakamura, S. Tanaka and T. Ono, Radiation dose-rate effect on mutation induction in spleen and liver of *gpt* delta mice, *Radiat. Res.*,

173, 138-147 (2010)

- 12) V. Thybaud, J. T. Macgregor, L. Muller, R. Crebelli, K. Dearfield, G. Douglas, P. B. Farmer, E. Gocke, M. Hayashi, D. P. Lovell, W. K. Lutz, D. Marzin, M. Moore, T. Nohmi, D. H. Phillips and J. Van Benthem, Strategies in case of positive in vivo results in genotoxicity testing, *Mutat. Res.*, in press.
 - 13) T. Nohmi and M. Bignami, Nucleotide pool damage and its biological consequences, *Mutat. Res.*, 703, 1-1 (2010)
 - 14) A. Katafuchi and T. Nohmi, DNA polymerases involved in the incorporation of oxidized nucleotides into DNA: the efficiency and template base preference, *Mutat. Res.*, 703, 24-31 (2010)
2. 学会発表
- 1) T. Nohmi, Transgenic in vivo genotoxicity assays: current status of *gpt* delta transgenic mice and rats, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
 - 2) H. Sato, D. Nakajima, S. Kageyama, Y. Sakashita, R. Yanagisawa, K. Masumura, T. Nohmi and Y. Aoki, in vivo mutagenicity of ambient air in the lungs of *gpt* delta transgenic mice; a case study in Tsukuba city, Japan, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
 - 3) Y. Totsuka, T. Kato, S. Matsuda, D. Nakae, Y. Tada, T. Nohmi, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Ichinose, T. Sugimura and K. Wakabayashi, Genotoxicity induced by nanoparticles, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
 - 4) M. Yamada, M. Takamune, A. Katafuchi and T. Nohmi, Novel Salmonella strains for Ames test that can detect pyrimidine damage in DNA, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
 - 5) A. Sassa, T. Ohta, T. Nohmi, M. Honma and M. Yasui, Miscoding events during DNA synthesis past brominated DNA adducts, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
 - 6) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, M. Takamune, M. Yamada, T. Tanaka and T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin on mutagenesis and carcinogenesis in *gpt* delta transgenic rats, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
 - 7) A. Sassa, N. Niimi, H. Fujimoto, A. Katafuchi, P. Gruz, M. Yasui, R. C. Gupta, F. Johnson, T. Ohta and T. Nohmi, Phenylalanine 171 as a molecular brake for dCMP incorporation opposite benzo[a]pyrene-guanine adducts by human DNA polymerase kappa, The 7th 3R symposium, Toyama, Japan, October 26-30, 2010.
 - 8) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, M. Takamune,

M. Yamada, T. Ohta and T. Nohmi,
Chemopreventive effects of silymarin,
a plant constituent, against the
carcinogenicity of
dimethylhydrazine plus dextran
sodium sulfate in the colon of *gpt*
delta transgenic rats, The 10th
International Conference on
Mechanisms of Antimutagenesis and
Anticarcinogenesis (ICMAA), Guaruja,
Brazil, September 26-29, 2010.

- 9) T. Nohmi, *gpt* delta transgenic mouse
and rat for in vivo genotoxicity
assays, The 2nd Westlake Conference-
Translational Medicine, Hangzhou,
Zhejiang, China, June 24-26, 2010.

H. 知的所有権の取得状況

なし

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

分担研究課題名：DNA付加体 1 分子のゲノム導入法の確立

分担研究者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

遺伝毒性発癌物質のなかには、わずか 1 分子の DNA 損傷（DNA 付加体）が、突然変異をもたらす変異を固定化させ、それは細胞から細胞へ伝播すると考えられている。しかし、それは推定であり、DNA 付加体 1 分子がどのような運命を辿るのかを証明した報告は無い。それを実験的に確かめるために、我々は、8-オキシグアニン（8-Oxo-Gua）1 分子をヒトリンパ球細胞株 TSCER122 のチミジンキナーゼ遺伝子のイントロン 4 に導入させる実験系を確立した。しかしながら、本実験系の再現性や信憑性に関する基礎データを十分に持っていない。よって本研究では、次の 2 つの実験によって、8-Oxo-Gua がゲノムに導入されたことを示すデータを蓄積する。ひとつは、イントロン 4 内の異なる 2 カ所の塩基部位に 8-Oxo-Gua を導入して得られる突然変異スペクトラムと頻度を比較した。その結果、両部位ともほぼ同じ突然変異誘発能を示すことから、この実験系に再現性があることを確認した。もうひとつは、MutY human homologue 修復酵素を過剰発現させた TSCER122 を用いて、ターゲティングベクター上の 8-Oxo-Gua・Cyt ペアがゲノム内で DNA 複製されたことを示すデータを取得した。つまり、本実験系によって DNA 付加体 8-Oxo-Gua を生きた細胞のゲノム内に導入できることが分かった。

キーワード：DNA 付加体，8-オキシグアニン，閾値，遺伝毒性発癌物質

A. 研究目的

DNA 損傷を介する遺伝毒性発癌物質には閾値が無いと考えられている。その理由として、わずか 1 分子であっても DNA 損傷（DNA 付加体や DNA 鎖切断）は、突然変異をもたらす変異を固定化させ、それは細胞から細胞へ、そして個体から個体へと伝播

する不可逆的な性質を持つためである（福島ら，環境変異原研究 27, 75-79, 2005）。

我々の研究室では、それを実験的に確かめるために、8-オキシグアニン（8-Oxo-Gua）1 分子を含むターゲティングベクターを作製することからはじめ、ヒトリンパ球細胞株 TK6 を改変させた TSCER122

細胞株を用いて、チミジンキナーゼ遺伝子 (*TK*) のイントロン 4 の特定部位に 8-Oxo-Gua を導入させる実験系を確立した。予備実験として、8-Oxo-Gua を導入し数回の細胞分裂の後、その 8-Oxo-Gua があつた部位についてシーケンスしたところ、G・C → T・A の塩基置換が優位に検出された。この結果は、暫定的であり、実験系の再現性や信憑性については未検討である。また、8-Oxo-Gua が生きた細胞のゲノム内に入り DNA 複製されたことを示す証拠は無い。

そこで本年度の研究では、イントロン 4 内の異なる 2 カ所の塩基部位に 8-Oxo-Gua を導入して得られる突然変異スペクトラムと頻度を比較する。また、MutY human homologue (MYH) 修復酵素を過剰発現させた細胞を構築し、それを用いてターゲティングベクター上の 8-Oxo-Gua・Cyt ペアがゲノム内で DNA 複製されているかどうかを明らかにする。

B. 研究方法

6) ターゲティングミュータジェネシス

本研究の基礎は、研究協力者の本間正充博士が作製したヒト TK6 細胞由来の TSCER122 細胞株 (Honma, M. *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen* 42, 288-298) である。まず、TK6 細胞を使う利点は、TK 遺伝子をヘテロ (*TK*+/-; エキソン 4 に一塩基変異を持つ) で有するため、薬剤耐性を指標としたフォワード (*TK*+/- → *TK*-/-) およびリバース (*TK*-/- → *TK*+/-) 遺伝子突然変異系として利用できることである。その選択薬剤として、前者はトリフルオロチミジン (TFT)、後者はハイポキサンチン、アミノプテリン、チミジンの混合物 (HAT) 試薬が用いられる。つまり、TFT 添加で *TK*-/-、HAT 添加で *TK*+/- の細胞だけが生き残るため、セレクションが容易である。

次に、TSCER122 細胞 (*TK*-/-) は、TK6 細胞から TK 遺伝子のエキソン 5 を欠き、その欠失部位から 100 bp 上流に I-SceI 認識配列 18 bp (5' ATT ACC CTG TTA TCC CTA) を 1 つ持っている。その配列は、本来のヒトゲノムには無いため、その培養細胞に I-SceI を発現させるベクター (pCBASCE) を導入すれば、I-SceI 酵素の切断により、ゲノムの 1 ヶ所だけに二本鎖切断 (DSB) を形成させることができる。その I-SceI 切断部位では、DNA 修復されやすくなっているため、そこに相同配列を持ち、且つ DNA 付加体を含むターゲティングベクター (エキソン 5 を含む *TK* 遺伝子の一部) を導入すれば、相同組み換えにより、エキソン 5 と DNA 付加体が同時にゲノム内に入る。その時、細胞は *TK*-/- → *TK*+/- になるため、HAT セレクションによって *TK*+ 復帰細胞だけ (つまり DNA 付加体が導入された細胞だけ) を後に回収することができる。

7) 8-Oxo-Gua を部位特異的に含むターゲティングベクターの構築

本研究では、代表的な酸化的 DNA 付加体である 8-Oxo-Gua を 1 つ含むターゲティングベクターを作製した。その手法として、北海道医療大学 荒川俊哉博士らが確立した PCR を基礎とする 5-メチルシトシンを含む修飾ベクターの作製法を参考にした。未発表の方法のため、簡単に説明する。TK 遺伝子配列の一部を有する pTK15 プラスミド (Honma, M. *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen* 42, 288-298) を用意し、欲しい DNA 配列の 5' 末端から 8-Oxo-Gua 修飾プライマー領域の前方までを PCR する組とその後方までを PCR する組、そして、3' 末端からも同様の PCR を行い、計 4 組の PCR 産物を用意した。引き続き、ビオチン-アビジン反応を利用して、それぞれの一本鎖 DNA を分離した後、

それらをアニーリングさせライゲーションを行うことにより直鎖状二本鎖プラスミド (pYTK15^{0xo}) を作製した。これと同様の方法で、正常塩基 Gua が入ったコントロールターゲットベクター (pYTK) も用意した。

細胞のターゲティングについて、 5×10^6 cells/100 μ L に調整した TSCER122 細胞に、pCBASCE 50 μ g と pYTK15^{0xo} (あるいは pYTK) 2 μ g を同時にトランスフェクション (Amasa 社製 Cell Line Nucleofactor kit) し、75 cm² の培養フラスコで 3 日間培養 (37°C, 5% CO₂) した。その間、I-SceI 酵素の切断によって、ゲノムの 1ヶ所に DSB が生じ、相同組換えによって、pYTK15^{0xo} に含まれるエキソン 5 と 8-0xo-Gua がゲノムに同時に入るため、TK 遺伝子が復帰する。次に、その細胞を 5×10^3 cells/mL に調整し、HAT 試薬を添加後、96 穴プレート上 (1000 cells/well) でさらに 2 週間培養することによって、復帰細胞のクローン (TK+/-) を回収した。その後、各クローンのゲノム DNA を抽出し、8-0xo-Gua 部位だった周辺のシーケンスを行い、8-0xo-Gua の突然変異誘発スペクトルおよび頻度を決定した。

8) MYH 修復酵素を過剰発現させた

TSCER122 細胞の構築

8-0xo-Gua がゲノム内で DNA 複製されていることを示すデータを得るために、MYH 修復酵素を過剰発現させた TSCER122 細胞を作製した。この修復酵素は、8-0xo-Gua が Ade とミスペアリングしている状態を認識し、Ade 部分を除去することによって、突然変異頻度を低減させる機能を有する。本研究のターゲティングベクターは、8-0xo-Gua・Cyt ペアの状態で細胞に導入されるため、DNA 複製で 8-0xo-Gua・Ade ミスペアが形成したとき、MYH 過剰発現型の細胞では、その突然変異頻度の低減化が予想

できる。つまり、MYH 過剰発現型およびその野生型で得られる突然変異誘発頻度を比較することにより、8-0xo-Gua がゲノム内で DNA 複製されることを示すデータを取得する。

MYH 過剰発現 TSCER122 の構築について、MYH 遺伝子領域を TK6 細胞のトータル RNA から逆転写した cDNA をテンプレートとして、PCR を行い取得した。その際、次のプライマーを利用した；5' TGG GAA TTC GCC ACC ATG AGG AAG CCA CG, 5' TTT CAG TCG ACT CAC TGG GCT GCA CTG TT。その PCR 生成物を EcoRI/SalI 制限酵素処理し、pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega) の EcoRI/SalI 部位に導入した。XmnI 処理で直鎖状にした pCI-MYH β 3 (10 μ g) を TSCER122 細胞 (5×10^6) に形質転換 (Amasa 社製 Cell Line Nucleofactor kit) し、37°C で 48 時間培養した。次に、G418 を 1.2 mg/mL になるように添加した後、96 穴プレートでさらに約 2 週間培養した。G418 抵抗性を示すクローンについて、MYH の発現量をウェスタンブロットによって確認した。最も発現量の高い細胞を MYH 過剰発現型の TSCER122 として用いた。

C. 研究結果

1) 本実験系の再現性

8-0xo-Gua の導入部位は、TK 遺伝子のエキソン 5 から上流の 68 番目、131 番目の Gua 部位の 2カ所である。その周辺の塩基配列は、前者が 5' -TTCGCTG-、後者が 5' -CTCGTGG-である (下線部に 8-0xo-Gua を導入)。

エキソン 5 から 68 番目の Gua 部位に 8-0xo-Gua を導入した場合、33 細胞中 27 から正常塩基 Cyt (82%) が塩基対形成していたが、5 細胞から Ade (15%)、1 細胞から Thy (3%) の誤塩基対形成が検出された。

一方、8-Oxo-Gua ではなく、無修飾の Gua (コントロール) を導入した場合は、22 細胞のうち、すべてが Cyt と塩基対形成していた。

次に、131 番目の Gua 部位に 8-Oxo-Gua を導入した場合、334 細胞中 263 から正常塩基 Cyt (79 %), 30 から Ade (9 %), 11 から一塩基欠失 (3 %) が検出され、その他 (9 %) の塩基置換も低頻度で見つかった。

2) MYH 過剰発現型と野生型 TSCER122 の比較

MYH 過剰発現させた TSCER122 細胞の MYH 発現量を調べた結果、その野生型よりも 2.1 倍増加していた (図 1)。この細胞を用いて、先で述べた 8-Oxo-Gua 修飾ターゲットベクター pYTK15^{oxo} を導入して調べた。

その結果、野生型は 12.7 % (71 細胞中 9 つ)、MYH 過剰発現型は 5.7 % (70 細胞中 4 つ) の頻度で塩基置換が検出された。つまり、MYH 過剰発現細胞から得られた 8-Oxo-Gua の突然変異頻度は、その野生型で得られるそれよりも 2.2 倍減少した。一方、コントロールベクター pYTK15 を導入した場合は、両型も塩基置換が全く検出されなかった。

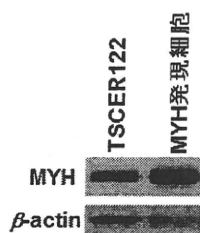


図 1. MYH 過剰発現細胞の構築

D. 考 察

TK 遺伝子のイントロン 4 内の 2 カ所の

Gua 部位について 8-Oxo-Gua を導入し、そこで起こる突然変異頻度およびスペクトラムを調べた。その結果、両方の部位とも主に G・C → T・A トランスマージョンを誘発させることが分かった。しかしながら、突然変異頻度が、一方は 15 % で、もう一方は 9 % でわずかに前者の頻度が高くなった。そのわずかに異なる原因として、ひとつは DNA 付加体が引き起こす突然変異頻度とスペクトルは、DNA の塩基配列に依存して変化することが知られており、本実験でも異なる塩基配列中に 8-Oxo-Gua を導入して解析していること。もうひとつは、後者の実験のサンプリング数が多く、“その他”の変異スペクトルが低頻度で複数検出されており、結果的にメジャーなスペクトルの頻度が下がったためと考えられる。以上のことから、両部位における G・C → T・A トランスマージョンの発生頻度は、ほぼ一致していると判定した。

MYH 過剰発現細胞を利用して 8-Oxo-Gua の突然変異頻度を解析したところ、その野生型の細胞を用いた時よりも 2.2 倍減少した。これは、ターゲットベクター上の 8-Oxo-Gua・Cyt ペアが、DNA 複製された際に、8-Oxo-Gua が Ade とミスペアリングした部位を MYH 修復酵素が修復し、結果として 8-Oxo-Gua の突然変異頻度を減少させた結果である。よって、本実験によりターゲットベクター上の 8-Oxo-Gua は、正常にゲノムにインテグレートされ、DNA 複製を受けたと考えられる。

E. 結 論

本実験系を用いれば、1 分子の 8-Oxo-Gua を生きた細胞のゲノム内に導入できることが分かった。この実験系は、DNA 損傷を 1 分子で取り扱えるため、低用量域

における暴露モデルとしても利用できるかもしれない。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 33) M. Yasui, N. Koyama, T. Koizumi, K. Senda-Murata, Y. Takashima, M. Hayashi, K. Sugimoto, and M. Honma, Live cell imaging of micronucleus formation and development. *Mutat. Res.* 692, 12-18 (2010)
- 34) N. Koyama, M. Yasui, Y. Oda, S. Suzuki, T. Satoh, T. Suzuki, T. Matsuda, S. Masuda, N. Kinae, and M. Honma, Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 11-19 (2011)
- 35) A. Sassa, N. Niimi, H. Fujimoto, A. Katafuchi, P. Grúz, M. Yasui, R. C. Gupta, F. Johnson, T. Ohta, and T. Nohmi, Phenylalanine 171 is a molecular brake for translesion synthesis across benzo[a]pyrene-guanine adducts by human DNA polymerase kappa. *Mutat. Res.* 718, 10-17 (2011)
- 28) 佐々 彰, 太田敏博, 能美健彦, 本間正充, 安井 学; 臭素化 DNA 付加体の誤塩基対形成機構. 日本環境変異原学会第 39 回大会 (2010. 11)
- 29) A. Sassa, N. Kamoshita, T. Ohta, T. Nohmi, M. Honma, and M. Yasui; A rapid system for the biochemical preparation of oligodeoxynucleotides containing a single DNA adduct. The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (2010. 11)
- 30) 本間正充, 安井 学, 堀端克良, 鈴木哲矢, 谷田貝文夫; DNA 二本鎖切断修復に対する低線量放射線等の環境ストレスの影響. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (2010. 12)
- 31) A. Sassa, T. Ohta, T. Nohmi, M. Honma, and M. Yasui; Miscoding events during DNA synthesis past brominated DNA adducts. The 2nd Asian Conference of Environmental Mutagen (2010. 12)
- 32) M. Yasui, A. Sassa, T. Ohta, T. Nohmi, and M. Honma; Miscoding properties of brominated DNA adducts catalyzed by human DNA polymerases. UKEMS / Dutch EMS-sponsored Workshop on Biomarker of Exposure and Oxidative DNA Damage (2011. 3)

2. 学会発表

- 27) 安井 学, 佐々 彰, 鴨下 渚, 太田敏博, 松田知成, 能美健彦, 本間正充; DNA 付加体を含む修飾 DNA オリゴマーの生化学的構築法の最適化. 日本環境変異原学会第 39 回大会 (2010. 11)

H. 知的所有権の取得状況

特になし

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

分担研究課題名：遺伝毒性発がん物質評価のための新規TGマウス作製用ベクターの構築

分担研究者： 山田 雅巳 国立医薬品食品衛生研究所 室長

研究要旨

ゲノム DNA 配列に生じる変化を変異頻度が高いバクテリアについて解析し、スペクトラム変化、変異の分布等をまとめた。

キーワード； 次世代シーケンサー、ゲノム配列解析、ミューテーター

A. 研究目的

国内外で起こるさまざまな事象を通じて、食品の安全性が国民に注目されるようになった。合法的に食品に添加されている化学物質のほかに、調理の過程で変異原物質が生じるという事象も注目され、安全性の評価について従来どおりの手法を再検討するべきときが来ている。

化学物質が DNA と反応して付加体を作り、それがもとで DNA の複製が誤った形で行われると突然変異が生じる。ヒトを含む生物では、さまざまな生体防御機構により化学物質が突然変異を起こさないようにしている。まず、解毒代謝は、化学物質が DNA と反応する前に働いて、反応性を低くする。解毒されなかった化学物質が DNA と反応して付加体ができたとしても、複製の鋳型になる前に修復系がそれを取り除けば突然変異には至らない。さらに、取り除かれなかった付加体が複製の鋳型になった場合でも、特別な DNA ポリメラーゼがエラーフリーに損傷を乗り越えれば、やはり、突然変異は起こらない（エラーフリーのトランスリジョン DNA 合成 (TLS)）。しかしながら、DNA

ポリメラーゼは損傷を乗り越える際に、むしろ突然変異を積極的に起こす場合（誤りがちな TLS）もあることがわかっている。

今年度は、次世代シーケンサーを用いてバクテリアの全ゲノムを解析することで、ミューテーター株は、野生株と比較して、どの程度、またどのような種類の突然変異をゲノム上のどの位置に蓄積しているのかを調べることにした。ミューテーター株としては、上述した修復機構を欠損した株と、誤りがちな TLS に働く DNA ポリメラーゼを高発現する株を用いた。

B. 研究方法

9) 使用した菌株及び参照配列

菌株は *Escherichia coli* AB1157（野生株；WT）、YG6156 (*mutT* 欠損変異株； ΔT)、YG2250 (*mutM/mutY* 二重欠損変異株； ΔMY)、AB1157/pYG782 (*dinB* 高発現株；+B) を使用した。参照配列は、NCBI より取得した *E. coli* K12 subsrt. W3110 uid58567 を使用した。

10) 使用したシーケンサー

1 稼動あたりの読み取りデータ量が

多いため既存ゲノムの変異解析、遺伝子発現解析に適する機種である、illumina 社、Genome Analyzer (GA II x) を使用した。

11) サンプル DNA の調製方法

菌株のストックを LB プレートに広げて、単一コロニーを得、そのうち 1 個を選んで LB 培地 10 mL に接種し、一夜培養液からゲノム DNA を調製した。遠心分離で集めた菌のペレットを浸透圧の変化とアルカリ SDS による処理で溶菌させ、pH を中性に戻してから再び遠心分離し、上清に 2-プロパノールを加えて DNA を沈殿させた。その DNA を TE バッファーに溶かして塩化リチウムを加えることで RNA を沈殿させて、遠心分離により得た上清に再び 2-プロパノールを加えて DNA を沈殿させ、TE 溶液に RNase を加えて残った RNA を分解した。その後、ポリエチレングリコールと NaCl の混合液により DNA を精製し、フェノール等で処理して蛋白質と PEG を除き、エタノール沈殿で最終的に精製ゲノム DNA を得た。さらに、Nanodrop 分光光度計、Invitrogen 社の Qubit Fluorometer とアガロースゲル電気泳動で濃度と品質を確認した。ゲノム DNA 量は、WT が 22.5 μ g、 Δ T が 3.6 μ g、 Δ MY が 27 μ g、+B が 25 μ g であった。

12) GAIIx 解析用ライブラリー調製

Illumina 社、GA II 用 DNA Sample Prep Kit を用いて、ゲノム DNA を断片化して、アダプターライゲーションを行い、アガロースゲル電気泳動で断片を切り出して DNA を精製した。その際、Kit の使用説明書の中の PCR Free Protocol を採用した。

13) GAIIx によるデータ取得方法

解析方法は、gDNA ペアエンド法、

解析スケールは 1 レーン当たり 4 サンプルで 1 レーン、読み取り塩基長は 1 リードで 75 塩基 x 2、総取得データ量は 1 サンプル当たり 3 ギガ (3×10^9) 塩基以上である。

14) シークエンスデータからの変異解析方法

出力されたリードデータより、次の手順で変異解析を実施した。

(1) ベースコール

クラスターごとに算出された A、T、G、C の 4 つのシグナルのうち、もっとも大きなシグナル地を持つ塩基を選出する作業

(2) QV フィルタリング

計算式を使って蛍光強度の低いクラスターをデータから排除する作業

(3) 参照配列へのマッピング

シークエンスが決定した断片の配列が、参照配列のどの部分に当たるかを決める作業

(4) 変異候補箇所の抽出・リスト作成 参照配列と違っている配列を探す作業

(5) 変異候補箇所へのアノテーション情報付加

変異箇所を含む遺伝子名、アミノ酸変化の有無等の情報を追加する作業

(倫理面への配慮)

本研究はバクテリアの DNA 塩基配列の決定とそのデータ解析なので配慮の対象ではない。

C. 研究結果

1) 突然変異の数

用いたシークエンスの手法は、参照配列との比較をするため、野生株の配列も参照配列とは同じではない。また、今回のシークエンスに用いたミューテーター株はいず

れも、同じ野生株から作製したものであることから、4株に共通した変異が158か所見つかった。これらは蓄積した変異には数えなかった。

4つの配列を比較して、ミューテーター株それぞれに特異的な(他には見られない)変異を抽出したところ、 ΔT で15個、 ΔMY で24個、+Bで13個であった。

2) 変異スペクトラム

表1に示すように、 ΔT では15個の変異の半数がAT塩基対の変化であり、中でもA:TからC:Gへの変異頻度が40% (6/15)だった他に特徴はなかった。さらに、 ΔMY では24個の4分の3に当たる18個がG:CからT:Aへのトランバージョンであった。一方、+Bには特徴的なスペクトラムは見られなかった。また、全体として挿入にはGC塩基対が多く、欠失にはAT塩基対が多く含まれる傾向にあった。

表1 ミューテーター株の変異スペクトラム

	ΔT	ΔMY	+B
塩基置換			
AT to CG	6	1	2
AT to GC	2/1	0	0
AT to TA	0/1	0	0
GC to AT	1	0	2
GC to TA	0	18	2
GC to CG	0	1	
挿入/欠失			
+C	1		
+G	2		4
		+GG	1
		+TG	1
		+TC	1
+TCTC	1	+TCCC	1
+GGGG	1		
-AAAAA	1	-AT	1
		-AATTAG	1
		AAGGTT	1
		-ATTT	1
total	15	24	13

3) 変異の分布の特徴

ΔT について、遺伝子の中に変異が見つかったものは15個中11個であり、そのうち塩基置換を伴うものが7個で、ほとんど(5-6個)がアミノ酸の変化するミスセンス変異であった。変異が1種類に確定しないものがあるため、ナンセンス変異は1個もしくは2個である。

ΔMY の場合、遺伝子の中に変異が見つかったものは24個中19個であり、そのうち塩基置換を伴うものが17個で、ほとんどがミスセンス変異であった。変異が1種類に確定しないものがあるため、ナンセンス変異は0個もしくは1個である。

+Bの場合、遺伝子の中に変異が見つかったものは13個中5個であり、そのうち塩基置換を伴うものは2個、いずれもミスセンス変異であった。

D. 考察

本研究で用いたミューテーター株は高い変異頻度を示すもので *lacZ* の復帰突然変異でスペクトラム別に変異頻度を調べた場合、 ΔT ではA:TからC:Gへの変異が 1×10^{-3} 、 ΔMY ではG:CからT:Aへの変異が約 2×10^{-5} 、+BではGが6個続く配列から1個欠失するフレームシフトが約 2×10^{-4} の頻度であることが報告されている。大腸菌のゲノムサイズは約5メガ塩基対であるので、それに比して、今回検出された突然変異の数が少ないことについては、これらの株が作製後すぐに凍結保存されており、ミューテーターの性質を持つてからの継代数が少ないことがあげられる。それぞれの継代数に差があり、また正確には調べられていないため、今回得られた、15、24、13個という数字についての大小を比較することは意味がないと考える。できれば次年度は、それぞれについて1ヶ月継代した後にDNAを調製してシーケンサーにかけることを検討したい。30分に1回分裂する大腸菌の場合、1日で約50回分裂するので1ヶ月ではおよそ1500回分裂する計算になる。

次に変異スペクトラムについては、 ΔMY 株で75%がG:CからT:Aのトランバージョンであり、この株が高い頻度を示すスペクトラムと一致した。一方、 ΔT 株の特徴であるA:T