

- 19) K. Masumura, T. Nohmi, Inserted position of lambda EG10 transgene on *gpt* delta transgenic mouse genome, The 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38<sup>th</sup> JEMS) (2009. 11)
- 20) AM. Salem, T. Nakano, M. Takuwa, H. Terato, K. Yamamoto, M. Yamada, T. Nohmi and H. Ide, Repair and damage tolerance mechanisms for DNA-protein crosslinks in *Escherichia coli*, The 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society (2009. 11)
- 21) A. Katafuchi, A. Sassa, P. Gruz H. Fujimoto, C. Masutani, F. Hanaoka and T. Nohmi, The activity of 8-oxo-dGTP incorporation of human DNA polymerase  $\eta$  and  $\kappa$ , The 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society (2009. 11)
- 22) N. Niimi, S. Iizumi, N. Adachi, H. Koyama and T. Nohmi, Roles of DNA polymerase kappa in UV- and chemically-induced mutagenesis in human cells, The 32<sup>nd</sup> Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan. (2009. 12)
- 23) T. Nohmi, Development and validation of *in vivo* genotoxicity assay using transgenic animals, Special lecture I, The 26<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology (2010. 2)
- 24) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, T. Tanaka and T. Nohmi, Chemopreventive effects of capsaicin and silymarin in F344 *gpt* delta transgenic rat, The 26<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology (2010. 2)
- 25) 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)
- 26) 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)
- 27) 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)
- 28) 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)
- 29) 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)
- 30) 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)

- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) T. Nohmi, K. Masumura, P Gruz, N. Toyoda-Hokaiwado, M. Takamune, N. Niimi, T. Suzuki, Y. Kanemaru, M. Yasui, M. Yamada, M. Honma, N. Adachi and A. Nishikawa, Genotoxic thresholds: identification of mutations *in vivo* and mechanistic studies *in vitro*, 2nd International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds, Tokyo, November 23, 2011.
- 35) Yamamoto, Y. Sakamoto, K. Masumura, M. Honma and T. Nohmi, Critical roles of mismatch repair proteins in modulation of genotoxicity of gamma-irradiation in human cells by pretreatments with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine at low doses, 14th International Congress of Radiation Research, Warszawa, Poland August 28 - September 1, 2011.
- 36) 張 雪, 堀端克良, 西條将文, 石上智愛, 鵜飼明子, 菅野新一郎, Neilan, E. G., 田原栄俊, 本間正充, 能美健彦, 安井 明, 田中亀代次, 転写と共役したDNA修復機構を欠損する紫外線高感受性症候群の原因遺伝子の同定, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
- 37) 西條将文, 張 雪, 堀端克良, 石上智愛, 鵜飼明子, 菅野新一郎, 田原栄俊, Neilan, E. G., 本間正充, 能美健彦, 安井 明, 田中亀代次, 転写と共役したDNA修復機構においてUVSSAとUSP7は協調的にCSBを安定化する, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
- 38) 鈴木哲矢, 兼丸祐紀, 豊田 (外岩戸) 尚美, 増村健一, ピーター・グルーズ, 足立典隆, 本間正充, 能美健彦, 酸化的損傷を持つDNAを乗り越える際の損傷乗り越えDNAポリメラーゼの役割, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
- 39) 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, 次世代シーケンサーを用いた大腸菌ミューテーター株のゲノムに蓄積する突然変異の解析, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
- 40) 安井学, 佐々彰, 鴨下渚, 松田知成, 太田敏博, 能美健彦, 本間正充, 8-クロログアニンDNA付加体を含むオリゴマーの構築とその誤塩基対形成機構に関する研究, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 41) 須井哉, 川上久美子, 奥富弘子, 山田雅巳, 能美健彦, ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討7, 日本

- 環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 42) 高木久宜, 野崎祐次, 河田昭彦, 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, F344系 *gpt delta* ラットの6ヶ月飼育試験による背景データの取得, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 43) 増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 能美健彦, *gpt delta* マウスの加齢に伴う点突然変異および欠失変異の蓄積, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 44) 堀端克良, 鶴飼明子, 木本崇文, 鈴木哲矢, 鴨下渚, 能美健彦, 本間正充, Pig-a アッセイとトランスジェニック突然変異試験の組合せに関する研究, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 45) 内村有邦, 日高裕子, 増村健一, 能美健彦, 三浦郁生, 若菜茂晴, 八木健, マウスをモデルとした、高頻度に発生する生殖系列突然変異が次世代以降の個体に与える影響の解析, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 46) 青木康展, 松本理, 能美健彦, 大気汚染物質による *gpt delta* マウス肺中の突然変異とヒト肺がん組織中 p53 遺伝子の突然変異の比較, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 47) 鈴木哲矢, Petr Grúz, 足立典隆, 本間正充, 能美健彦, 忠実度ないし活性を低下させたDNAポリメラーゼ $\epsilon$ を発現するヒト細胞株の樹立と遺伝毒性物質に対する感受性, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 48) 兼丸祐紀, 鈴木哲矢, 新見直子, Petr Grúz, 松元郷六, 足立典隆, 本間正充, 能美健彦, DNAポリメラーゼ $\kappa$ 遺伝子改変ヒト細胞を用いた遺伝毒性物質に対する感受性の検討, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 49) 本山茂記, 竹入章, 和田直子, 寺下浩一, 三島雅之, 新見直子, Petr Grúz, 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦, MitomycinCによるDNA二本鎖切断の誘発に対するDNA polymerase  $\kappa$ の役割, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 50) 堀端克良, 増村健一, 能美健彦, 本間正充, *gpt delta* トランスジェニックマウス由来初代培養肝細胞を用いることで薬物代謝活性を考慮した *in vitro* 遺伝毒性試験, 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
- 51) 金美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 井上智紀, 石井雄二, 能美健彦, 西川秋佳, 梅村隆志, F344 *gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験法によるメチルオイケノールの *in vivo* 遺伝毒性の検索, 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
- 52) 増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 高木久宜, 能美健彦, *gpt delta* マウスの肝臓及び精巣に蓄積する加齢に伴う点突然変異及び欠失変異の解析, 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
- 53) 大波冴子, 曹永晚, 豊田武士, 堀端克良, 本間正充, 能美健彦, 西川秋佳, 小川久美子, Glycidolと3-MCPD及びこれらのエステル化合物における Pig-A 遺伝子突然変異試験と小核試験を用いた *in vivo* 遺伝毒性学的検討, 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
- 54) 鈴木裕太, 木島綾希, 日比大介, 金美蘭, 石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳, Estragoleのラットにおける発がん性および遺伝毒性の検討, 第38回日本トキシコロジー学会学術年会, 横浜 (2011, 7)
- 55) 金美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 木島綾希, 石井雄二, 能美健彦, 西川秋佳, 梅村隆志, Safrole, piperonyl butoxideまたはestragoleで処理したF344ラットの肝臓における遺伝子発現プロファイルの比較, 第38回日本トキシコロジー学会学術年会, 横浜 (2011, 7)

- 56) 小山直己, 安井学, 木村葵, 高見成昭,  
鈴木拓也, 増村健一, 能美健彦, 増田  
修一, 木苗直秀, 松田知成, 今井俊夫,  
本間正充, *gpt delta* トランスジェニ  
ックラットを用いたライフステージ  
(週齢) を考慮したアクリルアミドの  
遺伝毒性評価, 第 38 回 日本トキシコ  
ロジー学会 学術年会, 横浜 (2011, 7)

G. 知的所有権の取得状況

なし

平成 22-23 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の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 分子の遺伝的影響

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

ヒトは様々な生体防御機構を備えているため、非常に低用量な発癌物質は、発癌リスクを上昇させないと信じられている。本研究では、それよりも極めて低い用量の暴露（極低用量暴露）による遺伝毒性を調べるために、1分子のDNA付加体（8-オキシグアニン）をヒトリンパ球細胞株のゲノム内に導入させ、その細胞に与えられる遺伝的影響を解析した。8-オキシグアニンは、遺伝子変異や老化に関与するとされる代表的な酸化DNA損傷である。解析した結果、1分子の8-オキシグアニンは、G:C → T:A (9.0%) と G:C → C:G (2.7%) の一塩基置換、一塩基欠失 (3.4%)、およびその他 (2.2%) を含むポイントミューテーションを 17.3% の頻度で誘発することが分かった。以上のように、わずか1分子であっても、DNA付加体は突然変異を引き起こすが明らかとなった。この結果は、遺伝毒性発癌物質には閾値が無い（突然変異誘発性）という従来からの考え方をサポートしている。ここで注意すべきことは、本実験系は、遺伝毒性発癌物質がゲノムDNAに反応する前段階（代謝など）で解毒、除去される過程を考慮していないため、それをそのまま解釈することはできないことである。しかしながら、本研究は遺伝毒性発癌物質がたとえ極低用量暴露であっても、突然変異が誘発する可能性は否定できないということを提言できる。

キーワード: DNA付加体, 8-オキシグアニン, 低用量暴露, 遺伝毒性発癌物質

#### A. 研究目的

ヒトは、様々な生体防御機構を備えており、非常に低用量な発癌物質は、発癌リスクを上昇させないと信じられている。逆に、わずか1分子のDNA損傷(DNA付加体やDNA鎖切断)であっても、理論的に突然変異をもたらし、その変異を固定化させ、それは細胞から細胞へと伝播させる可能性があ

るという考え方もある(福島ら、環境変異原研究 27, 75-79)。しかし、残念ながら1分子のDNA損傷が、どれくらい遺伝子変異や発癌に寄与しているかを実験的に解析する術を我々は持っていない。

そこで本分担研究者は、最近、1分子のDNA付加体 8-オキシグアニン(8-Oxo-Gua)を部位特異的に TSCER122 細胞株(ヒトリ

ンパ球細胞 TK6 由来) のチミジンキナーゼ遺伝子 (*TK*) 領域に導入させ、その DNA 付加体の遺伝的影響を解析する実験系を確立した。さらに、その手法は 1 分子だけでなく、数個の DNA 付加体を近接した部位に配置させることが可能であることから、低用量暴露よりもさらに低い極低用量暴露モデル系として利用している。

本研究は、これまで実験不可能であった 1 分子の 8-Oxo-Gua 付加体をヒトの *TK* 遺伝子 (イントロン 4) に導入し、その突然変異誘発頻度とスペクトラムを科学的に明らかにすることである。

## B. 研究方法

### 1) ヒト培養細胞を用いる極低用量暴露モデルの実験系

TSCER122 細胞 (*TK*<sup>-/-</sup>) は、TK6 細胞から *TK* 遺伝子のエクソン 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 (図 1)。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 (エクソン 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、エクソン 5 と DNA 付加体が同時にゲノム内に入る。その時、細胞は *TK*<sup>-/-</sup> から *TK*<sup>+/-</sup> 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。

そのターゲティングの実験操作は、5 x 10<sup>6</sup> cells/100 μL に調製した TSCER122 細胞に、pCBASce 50 μg と pYTK15<sup>0xo</sup> (あるいは pYTK15) 2 μg を同時にトランスフェクション (Amaxa 社製 Cell Line Nucleofactor kit) し、75 cm<sup>2</sup> の培養フラスコで 3 日間培養 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) した。

次に、その細胞を 5 x 10<sup>3</sup> 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、TK 復帰細胞のクローン (*TK*<sup>+/-</sup>) を回収した。その後、各ゲノム DNA を DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、8-Oxo-Gua 部位だった周辺のシーケンスを行った。

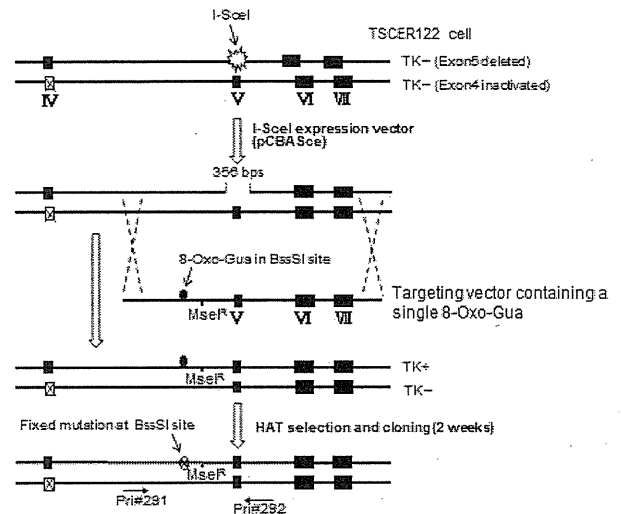


図 1. ヒトリンパ球細胞を用いる極低用量暴露モデルの概略

### 2) 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

8-Oxo-Gua を部位特異的に 1 つ含むターゲティングベクター pYTK15<sup>0xo</sup> は、荒川らの方法 (Arakawa, T. *et al*, *Anal. Biochem.* 416, 211-217) を一部改変し作製した。8-Oxo-Gua 部位の代わりに正常塩基 Gua を入れたコントロールのターゲティングベクター pYTK15 も同様の方法で作製した。

### 3) MYH 過剰発現 TSCER122 の構築

*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*/*SaII* 制限酵素処理し、pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega) の *EcoRI*/*SaII* 部位に導入した。*XmnI* 処理で直鎖状にした pCI-MYH β 3 (10

$\mu\text{g}$ ) を TSCER122 細胞 ( $5 \times 10^6$ ) に形質転換 (Amasa 社製 Cell Line Nucleofactor kit) し、 $37^\circ\text{C}$  で 48 時間培養した。次に、G418 を  $1.2 \text{ mg/mL}$  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) 極低用量暴露モデル系の再現性

本モデル実験系から得られるデータの再現性を確かめるために、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誘発頻度およびスペクトラムを比較した (図 1)。その導入部位は、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。その両部位をシーケンスした結果、それぞれの 8-Oxo-Gua は同じ G:C  $\rightarrow$  T:A トランスバージョンを優先的に引き起こした。一方、正常塩基の Gua を導入したときは、ほとんど突然変異誘発は起きなかった。つまり、8-Oxo-Gua の導入場所が異なっても類似の突然変異誘発頻度とスペクトラムを示すことが分かり、実験の再現性を確認することができた。

### 2) MYH 過剰発現型と野生型 TSCER122 の比較

pYTK15<sup>oxo</sup> の 8-Oxo-Gua は、細胞にトランスフェクションされてからゲノムにインテグレーションされるまでに、DNA 修復酵素で除去修復される可能性がある。そこで、ゲノム内で 8-Oxo-Gua 部位が DNA 複製されたことを証明する方法として、8-Oxo-Gua:Ade ミスペアを修復除去する MYH 酵素を過剰発現させた TSCER122 細胞を利用した。その結果、その野生型よりも、MYH 過剰発現型の細胞を用いた時の方が、8-Oxo-Gua の突然変異誘発頻度が 2.2 倍減少した。これは、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 修復酵素が除去修復し、結果として 8-Oxo-Gua の突然変異誘発頻度を減少させたと考えられる。よって、ターゲティングベクター上の 8-Oxo-Gua は、正常にゲノムにインテグレートされ、DNA 複製を受けたと判断できた。

### 3) 1 分子の 8-Oxo-Gua によって誘発する突然変異誘発頻度とスペクトラム

8-Oxo-Gua がインテグレートされた細胞のゲノムを 668 サンプル回収し、すべてについてシーケンスを行った。その結果、668 細胞中 526 から正常塩基 Gua (79 %) が検出されたが、60 から G:C  $\rightarrow$  T:A (9.0 %), 18 から G:C  $\rightarrow$  C:G (2.7 %) の一塩基変異も多く観察された (表 1)。また、23 細胞から一塩基欠失 (3.4 %) も高頻度に検出された。その他 (2.2 %) として、一塩基挿入や G:C  $\rightarrow$  A:T 塩基置換も低頻度で見つかった。つまり、1 分子の 8-Oxo-Gua は、17.3 % の頻度でポイントミューテーションを誘発することが分かった。一方、コントロールとして pYTK15 を導入した時は、ポイントミューテーションはほとんど検出されなかった。

生きた細胞のゲノム内において、1 分子の 8-Oxo-Gua の運命を追跡できる極低用量暴露モデル系を構築することができた。そして、わずか 1 分子であっても、8-Oxo-Gua は 17.3 % の頻度でポイントミューテーションを引き起こすが分かった。この結果は、遺伝毒性発癌物質には閾値が無い (突然変異誘発性) という従来からの考え方をサポートしている。ここで注意すべきことは、本モデル系は、遺伝毒性発癌物質がゲノム DNA に反応する前段階 (代謝など) による解毒、除去等を考慮していないため、それをそのまま解釈することはできないことである。しかしながら、本実験によって遺伝毒性発癌物質はたとえ極低用量暴露であっても、突然変異が誘発する可能性は否定できないということを提言できる。

表 1. 1 分子の 8-Oxo-Gua によって誘発する突然変異誘発スペクトラムと頻度

Sequence	Mutation	Ctrl (Gua)		8-Oxo-Gua	
		Number	%	Number	%
Wild-type 5'-agc ctcgtg gga					
Base-change in BssSI <sup>R</sup> site					
5'-agc ctcTtg gga	G → T			60	9.0
5'-agc ctcCtg gga	G → C			18	2.7
5'-agc ctcAtg gga	G → A			5	0.7
5'-agc ctcAtg gga	one-base del.			23	3.4
5'-agc ctcGtg gga	C Ins	2	0.3	5	0.7
5'-agc ctcTgtg gga	T Ins(5')			1	0.1
5'-agc ctcGItg gga	T Ins(3')	1	0.2	3	0.4
5'-agc ctcGtg gga	G Ins			2	0.3
Subtotal of Point mutation		3	0.5	117	17.3
Large deletions (>2bp)				3	0.4
Other base changes		22	3.8	18	2.7
Not Detectable		3	0.5	4	0.6
Total BssSI <sup>R</sup> fragments		28		142	

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yasui, M., Koyama, N., Koizumi, T., Senda-Murata, K., Takashima, Y., Hayashi, M., Sugimoto, K., and Honma, M.; Live cell imaging of micronucleus formation and development. *Mutat. Res.* 692, 12-18 (2010)
- 2) Koyama, N., Yasui, M., Oda, Y., Suzuki, S., Satoh, T., Suzuki, T., Matsuda, T., Masuda, S., Kinae, N., and Honma, M.; Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 11-19 (2011)
- 3) Sassa, A., Niimi, N., Fujimoto, H., Katafuchi, A., Grúz, P., Yasui, M., Gupta, R.C., Johnson, F., Ohta, T., and Nohmi, T.; 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)
- 4) Sassa, A., Ohta, T., Nohmi, T., Honma, M., and Yasui, M.; Mutational specificities of brominated DNA adducts catalyzed by human DNA

polymerases. *J. Mol. Biol.* 406, 679-686 (2011).

- 5) Hakulinen, P., Yamamoto, A., Koyama, N., Kumita, W., Yasui, M., and Honma, M.; Induction of TK mutations in human lymphoblastoid TK6 cells by the rat carcinogen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX). *Mutat. Res.* 725, 43-49 (2011).

### 2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) Sassa, A., Kamoshita, N., Ohta, T., Nohmi, T., Honma, M., and Yasui, M.; A rapid system for the biochemical preparation of oligodeoxynucleotides containing a single DNA adduct. The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (2010. 11)
- 4) 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 回日本分子生物学学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010. 12)
- 5) Sassa, A., Ohta, T., Nohmi, T., Honma, M., and Yasui, M.; Miscoding events during DNA synthesis past brominated DNA adducts. The 2nd Asian Conference of Environmental Mutagen (2010. 12)
- 6) Yasui, M., Sassa, A., Ohta, T., Nohmi, T., and Honma, M.; 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)

- 7) Yasui, M., Sassa, A., Kamoshita, N., Matsuda, T., Ohta, T., Nohmi, T., and Honma, M.; Miscoding events during DNA synthesis past 8-chloroguanine DNA adduct. 日本環境変異原学会第 40 回大会 (2011. 11)
- 8) Yasui, M., Kamoshita, N., and Honma, M.; Tracking a single DNA adduct in targeted mutagenesis. 第 34 回日本分子生物学会 (2011. 12)

E. 知的所有権の取得状況  
特になし

平成 21-23 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の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

研究分担者：山田 雅巳 国立医薬品食品衛生研究所 室長

### 研究要旨

化学物質が突然変異を起こす要因のひとつである DNA ポリメラーゼの働きについて解析した。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継時的に解析し、スペクトラム変化、変異の分布、蓄積等をまとめた。

キーワード；DNA ポリメラーゼ、次世代シーケンサー、ゲノム配列解析

#### A. 研究目的

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。一方で、ヒトを含む生物では、さまざまな生体防御機構により突然変異の誘発が抑制されていると考えられる。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。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：以下 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、逆に突然変異を積極的に起こす場合（誤りがちな TLS）があることがわかっている。

突然変異検出用レポーター遺伝子を導入したトランスジェニック (TG) マウスは、遺伝毒性物質の作用と生体防御機構の関与について分子レベルで解析できる点で有用性が高い。本研究では、新規 TG マウス試験系を検討するに当たり、化学物質が突然変異を起こす要因のひとつである損

傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼの働きについて検討した。また、次世代シーケンサーを用いてゲノム DNA 中の遺伝子突然変異を直接検出する手法の実用性を検討するため、バクテリアのミューテーター株（DNA 修復機構を欠損した株 2 種類と、誤りがちな TLS に働く DNA ポリメラーゼを高発現する株）についてゲノム DNA 塩基配列の網羅的解析を行った。さらに数ヶ月間継続して培養したバクテリアの全ゲノムに蓄積した突然変異を検出し、変異スペクトラムを分析した。

#### B. 研究方法

##### 1. 平成 21 年度

突然変異誘発における DNA 修復能の影響に関して、*Salmonella typhimurium* TA1535 を親株として、DNA 修復能欠損株 YG3001 と YG3206、およびそれら 3 株に pKM101 が導入された TA100、YG3008、YG3216 の合計 6 菌株を用いて実験を行った。YG3001 と YG3008 は 8-oxo グアニン DNA グリコシラーゼを欠損し、YG3206 と YG3216 はエンドヌクレアーゼ III および VIII を欠損している。また、pKM101 は損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼである DNA polR1 をコードしている。これら 6 菌

株を用いて、2-ニトロフルオレン(2-NF)、グリオキサール(Gx)、ケトキサール(Kx)、メチルグリオキサール(MGx)の遺伝毒性をAmes試験によって評価した。

Ames試験の概要を以下に示す：試験菌株の一夜培養液にはニュートリエントブロス培地(5 mL)を用いた。被験物質は、ケミカルを滅菌蒸留水(ただし2-NFについてはDMSO)により段階希釈して調製した。最小培地および軟寒天培地の組成はガイドラインの規定に従った。

Ames試験の手順：各濃度の被験物質溶液0.1 mL、試験菌株の一夜培養液0.1 mL、Na-Kりん酸緩衝液0.5 mLを試験管内で混合し、37°Cの湯浴で20分間緩やかに振とう後、2 mLの軟寒天を加えて最小培地にまき広げた。プレートは逆さにし37°Cのインキュベーターで48時間培養後、復帰変異コロニー数を計測した。

## 2. 平成22年度

次世代シーケンサーを用いた遺伝子突然変異の直接検出法に関しては、*Escherichia coli* AB1157(野生株)、YG6156(*mutT*欠損変異株； $\Delta T$ )、YG2250(*mutM/mutY*二重欠損変異株； $\Delta MY$ )、AB1157/pYG782(*dinB*高発現株；+B)の4菌株を使用した。各菌株の単一コロニーから一夜培養液を調製し、ゲノムDNAを抽出精製した。Illumina社のGenome Analyzer(GA II x)を用いてシーケンシングを行い、塩基配列データを取得した。参照配列および野生株との比較から、各菌株にユニークな変異箇所を検索した。

ゲノムDNAの調製方法：遠心分離した沈渣をTE 5,670  $\mu$ Lに懸濁し、SDS溶液(10%)を300  $\mu$ L、proteinase K溶液(20 mg/mL)を30  $\mu$ L加えてよく混ぜ、37°Cで1時間処理した。次に、NaCl溶液(5M)を1 mL加えてよく混和し、さらに臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)溶液(10%CTAB/0.7M NaCl)を800  $\mu$ L加えて混和し、65°Cで10分処理した。クロロホルム/イソアミルアルコール混合液(24:1)を7.5 mL加えて夾雑物を抽出した。遠心分離した上清をフェノクロ処理して、遠心上

清に含まれるDNAを4.5 mLの2-プロパノールで沈殿させた。沈渣をエタノール(75%)で洗って、乾燥させたのちTE溶液に懸濁し、RNaseA溶液を加えて37°Cで1時間反応、残っているRNAを分解した。RNaseAをフェノクロで除去し、エタノール沈殿により精製ゲノムDNAを得た。

シーケンズデータからの変異解析方法は次の手順で実施した。

### (1) ベースコール

クラスターごとに選出された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

シーケンズ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定める作業

### (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

## 3. 平成23年度

DNA修復能欠損株における突然変異の蓄積を解析するため、YG2250を用いて、LB培地10 mLに一夜培養液20  $\mu$ Lを1日1回植え継ぎながら継代し、培養1週間後、1ヶ月後、3ヶ月後の菌液からゲノムDNAを調製した。また、リファンピシンアッセイを毎週1回行い、各時点における変異頻度を測定した。イルミナ社のHiSeq2000を用いてシーケンシングを行った。各検体の変異候補箇所を抽出し、変異の蓄積等を解析した。サンプルDNAは次のような培養条件の下、1週間後、4週間後、8週間後、12週間後に調製した。

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4個を選んで

それぞれを LB 培地 10 mL に接種し、24 時間培養する。その培養液の 20  $\mu$ L を新しい LB 培地 10 mL に接種する。これを 24 時間ごとに繰り返し、12 週間継代培養した。1 週間に 1 度培地にカナマイシンとテトラサイクリンを添加し、雑菌の増殖を防いだ。

ゲノム DNA は、コロニーを培地に接種してから、1 週間後、4 週間後、8 週間後、12 週間後に 10 mL の培養液を 4 本にまとめて集菌し、前年度と同様の手法で調製した。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、1 週間後、4 週間後、8 週間後、12 週間後それぞれ、197.8  $\mu$ g、311.0  $\mu$ g、101.2  $\mu$ g、151.8  $\mu$ g であった。

Hiseq2000 用ライブラリー調製は、Illumina 社、TruSeq DNA Sample Prep Kit を用いて、Kit 添付の標準プロトコールに従い、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生成した DNA を PCR で増幅した。データ取得方法は、ペアエンド解析、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 100 塩基 x 2、総取得データ量は 4 サンプルで 20 ギガ (2 x 10<sup>10</sup>) 塩基以上。シーケンズデータからの変異解析方法は前年度と同様である。

#### (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. 平成 21 年度

2-NF、Gx、Kx の 3 物質については、pKM101 を持たない TA1535、YG3001、YG3206 の 3 株において突然変異を誘発しなかった。一方、pKM101 を持つ 3 株に対しては、溶媒対照の数倍から 50 倍の復帰変異コロニー数を示した。MGx についても pKM101 を持たない 3 株においては突然変異を誘発し

なかったが、pKM101 を持つ 3 株については、DNA 修復系に依存した復帰変異株数を示した。修復系をもつ TA1535 株では溶媒対照の 75 倍であったのに対して、修復系を欠損した YG3001 と YG3206 に対しては溶媒対照の 10 倍前後であった。

#### 2. 平成 22 年度

大腸菌ゲノム DNA の網羅的変異解析においては、同じ野生株から作製したミューテーター株 3 種 ( $\Delta T$ 、 $\Delta MY$ 、+B) それぞれに特異的な変異を抽出した (表 1)。 $\Delta T$  では、検出された 15 個の変異の半数が A:T 塩基対の変化であり、*mutT* 欠損の特徴である A:T から C:G への変異が 40% (6/15) だった。 $\Delta MY$  では、24 個の変異のうち 18 個が G:C から T:A への変異であり、*mutM/mutY* 欠損の特徴を反映していた。一方、+B には 13 個の変異が見つかったが特徴的なスペクトラムは見られず、*dinB* 高発現に伴い増加が予想された 1 塩基のフレームシフト変異は見つからなかった。このことは、フレームシフト変異によって遺伝子機能が失われるため変異細胞が生存できないことを示唆しているかもしれない。

表 1 ミューテーター株の変異スペクトラム

	$\Delta T$	$\Delta MY$	+B
<b>塩基置換</b>			
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	
<b>挿入/欠失</b>			
+C	1		
+G	2		+G 4
		+GG 1	+TG 1
			+TC 1
+TCTC	1	+TCCC 1	
+GGGG	1		
-AAAAAA	1	-AT 1	-AATTAG 1
		-ATTT 1	AAGGTT 1
total	15	24	13

#### 3. 平成 23 年度

$\Delta MY$  株について、1~3 ヶ月間継代培養した菌液から DNA を調製して変異解析を行い、突然変異の蓄積について検討した (表 2)。YG2250 が培養開始時点で持っていたと考えられる変異も削除したところ、4 検体全部で 88 か所に変異が確認された。1、4、8、12 週目のそれぞれで見つかった変異の数は、順に 34、41、51、50 個で、

増加傾向にあった。

表2 YG2250 で見つかった変異のスペクトラム

	1 週間	4 週間	8 週間	12 週間
<b>塩基置換</b>				
GC to AT	3	4	5	3
GC to CG	1	0	0	1
GC to TA	8	18	21	25
AT to CG	1	2	1	1
AT to GC	1	0	0	2
AT to TA	1	1	1	0
<b>挿入</b>				
1 bp	16	16	15	16
+A	2	0	0	2
+C	1	4	4	4
+G	12	12	10	9
+T	1	0	2	1
≥2 bp	1	0	2	2
<b>欠失</b>				
1 bp	0	0	0	0
≥2 bp	2	0	5	0
total	34	41	51	50

変異スペクトラムは、検体間で共通の突然変異を1個と計数して、4検体全部で88個の変異が見つかり、そのうち塩基置換は47個だった。G:C塩基対からの変異が41個と大半を占めた。最も多かったのはG:CからT:Aへのトランスバージョン(34個)で、塩基置換の70%を占めた。残りの41個は挿入または欠失で、挿入は34個のうち29個が1塩基(うち80%がGまたはC)の挿入であるのに対して、欠失は7個全部が2塩基以上の欠失であった。

突然変異のスペクトラムの推移をみると、塩基置換は継時的に増加する傾向にあったが、挿入/欠失は1週間後も12週間後も変わらなかった。増えている塩基置換はGCからTAへの変化で、これは菌株の性質を反映していた。挿入は1塩基が、欠失はそれよりも長いものが9割以上を占めた。

変異の蓄積という観点から見た場合、1週目で生じた変異が12週目まで観察され

ている数は12個、4週目からのものは7個、8週目からのものは7個だった。

変異の分布の特徴としては、遺伝子の中にある変異が80%を占め(88個中70個)。そのうちミスセンス変異とナンセンス変異の割合は同等だった。い複数の変異が見つかった遺伝子が7個あった。2塩基以上の挿入/欠失は1検体のみに観察されたものであり、その後継続して観察されるものではなかった。

培養期間中に毎週1回リファンピシンアッセイを行った結果、徐々に高くなるが(2-3、6-8、9-12週)、ある程度高くなる一旦下がる傾向が見られた(図1、2、5、9週目)。突然変異の頻度と見つかった変異の数には相関はないと思われる。(図1)。

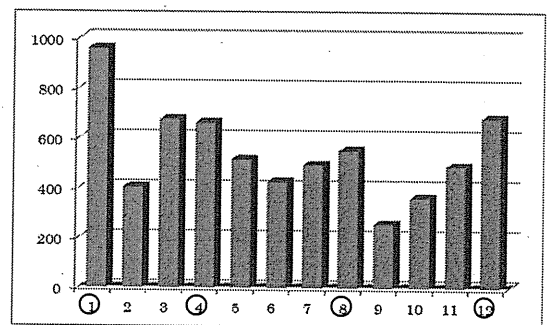


図1 変異頻度の推移

横軸は植え継ぎ期間(単位は週)、縦軸は生菌数当たりのリファンピシン耐性コロニーの数(x 10<sup>-8</sup>)を示す。○は検体を調製した週。

#### D. 考察

##### 1. 平成21年度

DNAポリメラーゼの性質が化学物質の遺伝毒性の性質を左右することが示唆された。

##### 2. 平成22年度

用いたミューテーター株は、*lacZ*の復帰突然変異において、 $2 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$ の頻度であることが報告されている。それに比して今回検出された突然変異の数が少ない理由については、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考えられた。

##### 3. 平成23年度

大腸菌は1日でおよそ50回分裂するので、1か月で1500回、3か月で4500回分裂する計算になる。その間の突然変異頻度の推移としては、塩基置換が多く、次いで1塩基の挿入が多かった。塩基置換は継代により増える傾向にあったが、1塩基挿入は1週間後も3か月後も変わらなかった。

レポーター遺伝子を用いた突然変異検出法の特徴は、回収したレポーター遺伝子の変異を表現型によって選択できること、他、宿主内で発現しない外来DNAに起こった変異を検出することから、化学物質が誘発する突然変異の蓄積を選択圧の影響を受けずに中立的に反映できる点にある。一方、ゲノム配列の変化を直接検索する手法は、がん等の疾病や生体機能に突然変異がどのように関与するのかを議論することが可能となる反面、変異クローンの単離が容易なバクテリアと異なり、ヒトへの応用には克服すべき技術的課題が多い。しかしながら、シーケンシング技術の急速な進歩に伴い、全エクソン領域(約50メガ塩基対)あるいは全ゲノム(3ギガ塩基対)の解析コストは著しく低下している。本研究結果より、ゲノム配列解析による変異検出法によって、突然変異の頻度、種類、分布等より多くの有用な情報が得られる可能性が示唆された。

#### E. 結論

1. DNAポリメラーゼの性質が化学物質の遺伝毒性の性質を左右することから、評価にあたっては、DNAポリメラーゼの性質を十分に調べ、その遺伝毒性に及ぼす影響を考慮することが必要である。

2. 今後のシーケンサーの機能向上を考慮すれば、レポーター遺伝子を使った変異頻度及び変異スペクトラムの解析よりも、全ゲノム配列を調べて、変異の頻度、スペクトラムに加え、変異の分布まで調べる方法でより多くの有用な情報が得られる可能性が示唆されたといえる。

#### F. 健康危機情報

省略

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamada, M., Matsui, K., Katafuchi, A., Takamune, M., Nohmi, T., Development of tester strains deficient in Nth/Nei DNA glycosylases to selectively detect the mutagenicity of oxidized DNA pyrimidines, *Genes & Environ.*, 31, 69-79 (2009)

##### 2. 学会発表

- 1) 山田雅巳、増村健一、能美健彦、次世代シーケンサーを用いた大腸菌ミューテーター株のゲノムに蓄積する突然変異の解析、第34回日本分子生物学会年会(2011.12)
- 2) 山田雅巳、酸化ヌクレオチドの取り込みによる突然変異に関与するDNAポリメラーゼ、日本環境変異原学会第40回大会、シンポジウム1(2011.11)
- 3) 須井哉、川上久美子、奥富弘子、山田雅巳、能美健彦、ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討7、日本環境変異原学会第40回大会(2011.11)
- 4) 堀妃佐子、下吉里実、藤居亙、増村健一、山田雅巳、F344系統*gpt delta*ラットを用いた突然変異試験と末梢血小核試験の統合法の検討、日本環境変異原学会第40回大会(2011.11)
- 5) 高木久宜、野崎祐次、河田昭彦、山田雅巳、増村健一、能美健彦、F344系*gpt delta*ラットの6ヶ月飼育試験による背景データの取得、日本環境変異原学会第40回大会(2011.11)
- 6) 本山茂記、竹入章、和田直子、寺社下浩一、三島雅之、新見直子、Petr Grúz、増村健一、山田雅巳、能美健彦、MitomycinCによるDNA二本鎖切断の誘発に対するDNA polymerase  $\kappa$ の役割、日本環境変異原学会第40回大会(2011.11)
- 7) 須井 哉、川上久美子、桜井徳子、奥富弘子、太田 亮、山田雅巳、能美健彦、ハイ・スループット微生物遺伝毒

性試験法の検討6, 日本環境変異原学会第39回大会(2010.11)

- 8) 本山茂記、竹入章、和田直子、寺社下浩一、三島雅之、新見直子、ピーター・グルーズ、増村健一、山田雅巳、能美健彦、DNA polymerase  $\kappa$  遺伝子ノックイン *gpt delta* マウスにおいて mitomycin C によって骨髄に誘発された変異の解析、日本環境変異原学会第39回大会(2010.11)
- 9) 山田雅巳、高宗万希子、能美健彦、香料成分カプサイシンによる変異原性修飾効果について、日本環境変異原学会第39回大会(2010.11)
- 10) M. Yamada, K. Matsui, M. Takamune, A. Katafuchi, T. Nohmi, Sensitive detection of oxidative damages using BER-deficient Ames tester strains, European Environmental Mutagen Society 2010, (2010.9)
- 11) ピーター・グルーズ、山田雅巳、高宗万希子、能美健彦、ヒト DNA ポリメラーゼ  $\eta$  をコードする大腸菌 *umuDC* 欠損株における紫外線による誘発突然変異の検出、日本環境変異原学会第38回大会(2009.11)

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し

平成 21-23 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の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：食品中変異原のDNA損傷の測定と、修復メカニズムの解明

分担研究者： 松田知成 京都大学工学研究科 准教授

### 研究要旨

曝露マーカーである DNA 損傷と突然変異を関連付けるため以下 3 つの検討を行った。①DNA 損傷結合タンパクのプロテオーム解析：DNA 損傷を含むオリゴヌクレオチドをベイトとして、特異的に結合する核抽出物中のタンパク質を SILAC 法を用いて検出する方法を開発した。G:T ミスマッチをベイトとして検討したところ、既存のミスマッチ修復酵素が検出され、本方法の有用性を確認した。②ミスマッチ修復タンパク MLH1 の複合体解析：FLAG-HA タグをつけない MLH1 を HeLa S3 細胞に安定発現させ、MLH1 の複合体を精製し、その構成タンパク質を同定した。その結果、DNA 修復、細胞周期、アポトーシス、染色体安定性に関与するタンパク質が同定された。

③ 次世代 DNA シーケンサーを用いた新しい遺伝毒性試験に関する考察：

SMRT™(Single Molecule Real Time)DNA シーケンサーを用いて、任意の生物の任意の遺伝子に生じた低頻度の体細胞突然変異を検出する方法について考察した。

キーワード：DNA 修復、プロテオーム、次世代シーケンサー

#### A. 研究目的

化学物質の遺伝毒性評価法において、DNA 損傷は感度の良いマーカーであるが、それが突然変異や発がんとのように関連しているかについては、はっきりしたことは言えない。DNA 損傷から突然変異が生じる確率は、DNA 修復、損傷乗り越え複製、そしてアポトーシスなどにより影響を受ける。主要な DNA 損傷について、これらの影響を一つ一つ調べていくのは、時間がかかるが大切なことである。

本研究では、まず、DNA 損傷に対してどの DNA 修復酵素が働いているかをプロテオーム技術で推定する方法について検討した。

次に、食品中に存在するアルキル化剤

が誘発するアポトーシスにはミスマッチ修復が必要であることがわかっているがこのメカニズムはよくわかっていない。そこで、この謎の解明の手掛かりを見つめるため、ミスマッチ修復酵素 MLH1 と相互作用するタンパク質のプロテオーム解析を行った。

最後に、次世代 DNA シーケンサーを用いた新しい突然変異解析方法についても考察を行った。

#### B. 研究方法

①DNA 損傷結合タンパクのプロテオーム解析

損傷を含む DNA をベイトとして、それに結合するタンパク質を濃縮し、プロテオ-



ム解析で DNA 損傷特異的に結合するタンパク質を同定する方法を開発した。今回は、系の確立のため G:T ミスマッチを一か所含むオリゴヌクレオチド (60mer) をベイトとして実験を行った。A549 細胞をリジンとアルギニンの安定同位体を含む培地で培養し SILAC ラベルし、ラベルした細胞、ラベルしていない細胞からそれぞれ核抽出物を調製した。G:T ミスマッチを一か所含む 60mer の 2 本鎖オリゴヌクレオチドと、ミスマッチを含まないオリゴヌクレオチドを調製し、ダイナビーズにそれぞれ固定し、SILAC ラベルした核抽出物はミスマッチ DNA と反応させ、SILAC ラベルしていない核抽出物はコントロール DNA と反応させた。上記の反応を終えたコントロール DNA およびミスマッチ DNA を混ぜ合わせ、結合しているタンパク質を SDS-PAGE で分離した。ゲルをいくつかの領域に切り分け、ゲル内トリプシン消化を行った。消化物は脱塩した後、ナノ HPLC-Q-TOF/MS を用いてプロテオーム解析を行った。

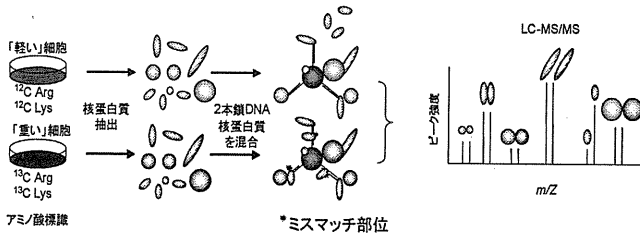


図1 SILACによるミスマッチDNA結合タンパク質同定の戦略

## ②ミスマッチ修復タンパク MLH1 の複合体解析

組換えレトロウイルスを用いて、N 末端に FLAG-HA タグをつないだ MLH1 を HeLa S3 細胞に安定発現させた。この細胞を 0.9 mM MNU に 24 時間曝露した後、アガロースビーズに結合した抗 FLAG M2 抗体を用いて、核、細胞質の抽出物から、MLH1 複合体を免疫沈降し、FLAG ペプチドで溶出した。SDS-PAGE で MLH1 複合体の構成タンパク質を分離し、バンドごとに切り出した。ゲル内トリプシン消化後、生成したペプチド断片を C18 StageTip を用いて、脱塩、濃縮し、nanoLC-ESI-Q-Tof 型質量分析計を用いて、MS/MS スペクトルを測定した。得ら

れたデータを Mascot、及び Human MS International Protein index protein sequence database version 3.53 を用いて、解析し、タンパク質を同定した。

## ③次世代 DNA シーケンサーを用いた新しい遺伝毒性試験に関する考察

最新の DNA シーケンサーに関する文献を調査し、DNA シーケンサーを利用した新しい突然変異検出系の原理と解決すべき問題点について整理した。

## C. 研究結果

### ①DNA 損傷結合タンパク質の解析

コントロール DNA またはミスマッチ DNA に結合したタンパク質は 77 種類同定された。図 2 に SILAC ラベルしたタンパク (Heavy; H) とラベルしていないタンパク (Light; L) のシグナル比をプロットした。ミスマッチ DNA は SILAC ラベルしたタンパクと反応させたので、H/L 比が高いものほど特異的にミスマッチと結合している可能性が高い。

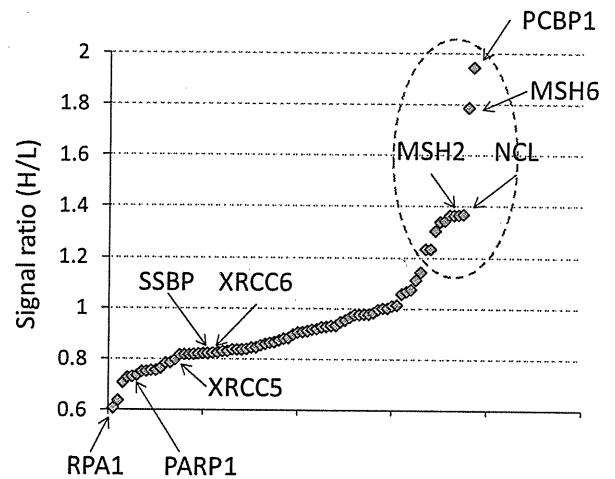


図2 同定されたタンパク質の H/L 比

図 2 において、高い H/L 比を示したタンパク質の中には、ミスマッチ修復タンパク質である MSH6 や MSH2 が検出された。そのほかにも機能がよくわからない PCBP1 (Poly(rC)-binding protein 1) や NCL といったタンパク質が同定された。図 2 で

H/L比が0.7-1.1のものは非特異的にDNAに結合するタンパク質であると考えられる。この領域ではXRCCやPARP1、SSBP (single strand binding protein) などが同定された。

## ②ミスマッチ修復タンパク MLH1 の複合体解析

プロテオーム解析の結果、核内のMLH1複合体からは、BRCA1やFANCD2、MSH2、MSH6などのDNA修復酵素が多数同定された。一方、細胞質内のMLH1複合体からは、Cdc2やCDK2、PA2G4などの細胞周期に関わるタンパク質、BAXやCASP9、NFκB2などのアポトーシスに関わるタンパク質が多数同定された。AP2B1やCLTCなどの小胞輸送に関わるタンパク質は、核、細胞質内共に多数同定されたが、NuMAやRae1、TPX2のような染色体の安定性に関わるタンパク質は、MNU暴露時に限って同定された。

表1 MLH1複合体に同定されたタンパク質

Role	Nuclear	Cytoplasm
DNA repair	MSH2, PMS2, BRCA1, FANCD2, MSH6	PMS2, MSH6
Cell cycle	CCAR1	CDKN2A, PA2G4, BUB1B, CCNB1, Cdc2, CDK2, CDK4, CDK6, APC, MAD2L1, PCNA
apoptosis	API5	API5, BAX, PAWR, CASP2, CASP9, NFκB2, BCL2L2
Vesicular transport	CLTC, CLTCL1, AP1B1, AP2A1, AP2A2, AP2B1, AP2S1, AP2M1	CLTCL1, AP2B1, COPA, COPB2, COPE, SEC31A, SEC24C, AP2A1 ...
chromosomal stability	NUMA, TPX2	CENPM, Ndc80, Rae1

## ③次世代DNAシーケンサーを用いた新しい遺伝毒性試験に関する考察

米国PACIFIC BIOSCIENCES社のSMRT™(Single Molecule Real Time)DNAシーケンサーを用いて、任意の生物の任意の遺伝子に生じた低頻度の体細胞突然変異を検出する方法について考察した。DNA精製後、目的の遺伝子を濃縮、環状にするテンプレート作成法を考案した。詳しくは論文 (Genes and Environment, 32, 21-21, 2010) にまとめた。

## D. 考察

①DNA損傷結合タンパクのプロテオーム解析では、MSH6やMSH2など、ミスマッチ修復特異的なタンパク質を同定することができ、実験系がうまく働いていることが明らかとなった。今後はミスマッチの代わりに様々なDNA損傷を入れて、特異的に結合するタンパク質を同定し、修復メカニズムの解明を試みる。

②MLH1の複合体解析では、MNUの曝露によりDNA損傷が起こると、MLH1の一部は、核から細胞質に移行し、細胞周期やアポトーシスに関連する多様な複合体を形成するということである。もしかしたら、MLH1がDNA損傷を感知し、細胞質にその情報を伝える伝令役を担っているのかもしれない。今後は、より詳細な解析を行いDNA損傷によるアポトーシス誘発のメカニズムを明らかにしてゆく。今後、DNA損傷によるアポトーシス経路の解明がすすめば、閾値形成におけるアポトーシスの役割がわかってくると思われる。

③最後に、次世代DNAシーケンサーを用いる方法は、今後コストが下がれば、主要な変異原性試験になると思われる。SMRTシーケンサーは今年度中盤から利用可能になってきており、本研究で構築した方法論の検証を今後行う予定である。

## E. 結論

以上本研究では、曝露マーカーとしてのDNA損傷と突然変異を関連付けるため、①DNA損傷結合タンパク質をSILAC法で同定する方法、②DNA損傷(アルキル化損傷)によるアポトーシス誘導のメカニズムを解明するための、複合体プロテオーム法、③突然変異をDNAシーケンサーで直接同定する手法、などについて検討してきた。今後、これらの方法を発展させることにより、DNA損傷と突然変異の関連がより明らかになり、ひいては高度な遺伝毒性評価に寄与できると考えている。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sugimura, H., Tao, H., Suzuki, M., Mori, H., Tsuboi, M., Matsuura, S., Goto, M., Shinmura, K., Ozawa, T., Tanioka, F., Sato, N., Matsushima, Y., Kageyama, S., Funai, K., Chou, P. H., and Matsuda, T. (2011) Genetic susceptibility to lung cancer, *Front Biosci (Schol Ed)* 3, 1463-1477.
- 2) Shinmura, K., Goto, M., Suzuki, M., Tao, H., Yamada, H., Igarashi, H., Matsuura, S., Maeda, M., Konno, H., Matsuda, T., and Sugimura, H. (2011) Reduced expression of MUTYH with suppressive activity against mutations caused by 8-hydroxyguanine is a novel predictor of a poor prognosis in human gastric cancer, *J Pathol* 225, 414-423.
- 3) Matsuda, S., Matsui, S., Shimizu, Y., and Matsuda, T. (2011) Genotoxicity of colloidal fullerene c(60), *Environ Sci Technol* 45, 4133-4138.
- 4) Koyama, N., Yasui, M., Kimura, A., Takami, S., Suzuki, T., Masumura, K., Nohmi, T., Masuda, S., Kinoshita, N., Matsuda, T., Imai, T., and Honma, M. (2011) Acrylamide genotoxicity in young versus adult gpt delta male rats, *Mutagenesis* 26, 545-549.
- 5) Kato, K., Yamamura, E., Kawanishi, M., Yagi, T., Matsuda, T., Sugiyama, A., and Uno, Y. (2011) Application of the DNA adductome approach to assess the DNA-damaging capability of in vitro micronucleus test-positive compounds, *Mutat Res* 721, 21-26.
- 6) Takemura, H., Nagayoshi, H., Matsuda, T., Sakakibara, H., Morita, M., Matsui, A., Ohura, T., and Shimoi, K. (2010) Inhibitory effects of chrysoeriol on DNA adduct formation with benzo[a]pyrene in MCF-7 breast cancer cells, *Toxicology* 274, 42-48.
- 7) Oyama, T., Nagayoshi, H., Matsuda, T., Oka, M., Isse, T., Yu, H. S., Pham, T. T., Tanaka, M., Kagawa, N., Kaneko, K., and Kawamoto, T. (2010) Effects of acetaldehyde inhalation in mitochondrial aldehyde dehydrogenase deficient mice (Aldh2<sup>-/-</sup>), *Front Biosci (Elite Ed)* 2, 1344-1354.
- 8) Matsuda, T. (2010) Anticipated Mutation Assay Using Single-molecule Real-time (SMRT TM) Sequencing Technology, *Genes and Environment* 32, 21-24.
- 9) Kawai, K., Chou, P. H., Matsuda, T., Inoue, M., Aaltonen, K., Savela, K., Takahashi, Y., Nakamura, H., Kimura, T., Watanabe, T., Sawa, R., Dobashi, K., Li, Y. S., and Kasai, H. (2010) DNA modifications by the omega-3 lipid peroxidation-derived mutagen 4-oxo-2-hexenal in vitro and their analysis in mouse and human DNA, *Chem Res Toxicol* 23, 630-636.
- 10) Chou, P. H., Kageyama, S., Matsuda, S., Kanemoto, K., Sasada, Y., Oka, M., Shinmura, K., Mori, H., Kawai, K., Kasai, H., Sugimura, H., and Matsuda, T. (2010) Detection of lipid peroxidation-induced DNA adducts caused by 4-oxo-2(E)-nonenal and 4-oxo-2(E)-hexenal in human autopsy tissues, *Chem Res Toxicol* 23, 1442-1448.
- 11) Nagayoshi, H., Matsumoto, A., Nishi, R., Kawamoto, T., Ichiba, M., and Matsuda, T. (2009) Increased formation of gastric N(2)-ethylidene-2'-deoxyguanosine

DNA adducts in aldehyde dehydrogenase-2 knockout mice treated with ethanol, *Mutat Res* 673, 74-77.

## 2. 学会発表

### 国内学会

- 1) 竹内 智規, 松田 俊, 足立 淳, 服部 友美, 井倉 正枝, 井倉 毅, 松田 知成. (2011) BN/SDS-PAGEを用いたMLH1複合体の解析, In 日本環境変異原学会 (JEMS) 第40回大会, p 136, 東京.
- 2) 宋 明芬, 李 云善, 河井 一明, 松田 知成, 葛西 宏. (2011) フリーラジカル機構を介した発がんプロモーター cumene hydroperoxide によるマウス皮膚 DNA のメチル化, In 第70回日本癌学会学術総会, p 477, 名古屋.
- 3) 石野 孔祐, 加藤 竜也, 松田 知成, 戸塚 ゆ加里, 中釜 斉. (2011) ナノマテリアルによりマウス肺に誘発される DNA 付加体の網羅的解析, In 日本環境変異原学会 (JEMS) 第40回大会, p 95, 東京.
- 4) 新村 和也, 五十嵐 久喜, 後藤 正憲, 陶 弘, 山田 英孝, 松浦 駿, 松田 知成, 小川 博, 梶村 春彦. (2011) ヒト肺癌における脱アミノ化酵素 AID の異常発現と変異誘導性, In 第70回日本癌学会学術総会, p 480, 名古屋.
- 5) 松田 俊, 足立 淳, 井原 賢, 田沼 延公, 島 礼, 井倉 正枝, 井倉 毅, 松田 知成. (2011) ピルビン酸キナーゼ PKM2 とダイオキシシン受容体 AhR の相互作用の機能解明, In 日本環境変異原学会 (JEMS) 第40回大会, p 143, 東京.
- 6) 小山 倫浩, 余 旭勝, 辻 真弓, 田中 政幸, 松田 知成, 浦本 秀隆, 田中 文啓, 川本 俊弘. (2011) エタノール摂取によるアルデヒド脱水素酵素 2 ノックアウトマウスの体重変動と生存率, In 第70回日本癌学会学術総会, p 158, 名古屋.
- 7) 加藤 杏子, 山田 勉也, 武藤 重治, 山村 英二, 松田 知成, 杉山 明男. (2011) ラットを用いた骨髄小核試験における DNA アダクトーム解析, In 日本環境変異原学会 (JEMS) 第40回大会, p 96, 東京.
- 8) 安井 学, 佐々 彰, 鴨下 渚, 松田 知成, 太田 敏博, 能美 健彦, 本間 正充. (2011) 8-クロログアニン DNA 付加体を含むオリゴマーの構築とその誤塩基対形成機構に関する研究, In 日本環境変異原学会 (JEMS) 第40回大会, p 93, 東京.
- 9) 堀 貴美子, 武藤 学, 松田 知成, 湯河 良之, Hori Kimiko, Muto Manabu, Mastuda Tomonari, Yukawa Yoshiyuki. (2010) アセトアルデヒド由来 DNA アダクトの安定性に関する検討, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪
- 10) 湯河 良之, 堀 貴美子, 江副 康正, 宮本 心一, 武藤 学, 松田 知成, 千葉 勉. (2010) Aldh2 欠損および p53 欠損とアセトアルデヒド由来 DNA アダクト形成との関連性の検討, In 第69回日本癌学会学術総会, 大阪
- 11) 石野 孔祐, 加藤 竜也, 増田 修一, 松田 知成, 杉村 隆, 若林 敬二, 戸塚 ゆ加里. (2010) ナノマテリアルにより誘発される DNA 付加体の解析, In 日本環境変異原学会 (JEMS) 第39回大会, つくば.
- 12) 松田 知成. (2010) 質量分析器、次世代 DNA シーケンサーの変異原研究への応用可能性, In 日本環境変異原学会 (JEMS) 第39回大会, つくば.
- 13) 松田 俊, 足立 淳, 井原 賢, 井倉 正枝, 井倉 毅, 松田 知成. (2010) 芳香族炭化水素受容体 (AhR) 複合体のプロテオーム解析, In 日本環境変異原学会 (JEMS) 第39回大会, つくば.
- 14) 小山 倫浩, 田中 政幸, 永吉 春奈, 松田 知成, 川本 俊弘. (2010) アセトアルデヒド吸入曝露によるアルデヒド脱水素酵素 2 ノックアウトマウス臓器の N2-ethylidene-dG による DNA 付加体, 第69回日本癌学会学術