

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究

**分担研究課題名：同じDNA鎖に近接する2分子の8-オキソグアニンDNA付加体に対する
ヌクレオチド除去修復の関与**

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

本研究では、ヒトリンパ芽球細胞 TSCER122(TK6 細胞から樹立)のゲノム内に DNA 損傷の導入場所、分子数、そして化学構造がすべて既知の条件で、その損傷の DNA 修復および遺伝的影響を *in vivo* で追跡できる実験系を用いて、8-オキソ-7、8-ジヒドロ-2'-デオキシグアニン付加体 (8-oxodG) の突然変異誘発能を調べた。その DNA 付加体は、例えば食品添加物で利用されている臭素酸カリウム等からも容易に形成する酸化的 DNA 損傷である。これまでの研究で、2分子の 8-oxodG を同じゲノム DNA 鎖内に近接して配置させると、修復効率の上昇が示唆された。この現象には、ヌクレオチド除去修復やロングパッチの塩基除去修復等が関与すると予想された。そこで本年度は、まず XPA 欠損細胞を構築し、それらがヌクレオチド除去修復によって修復されるかどうかを調べた。実験の結果、1分子の 8-oxodG 付加体に対しては、XPA 欠損細胞およびその野生型細胞で得られる突然変異誘発頻度は同程度 (約 8.3~8.5%) だった。一方、2分子を同一 DNA 鎖に近接して配置させると、突然変異誘発頻度は野生型細胞で $7.4 \pm 0.59\%$ だったが、XPA 欠損細胞を用いると $12 \pm 1.6\%$ へ有意に上昇した。つまり、同じ DNA 鎖内に近接する2分子の付加体は、通常の塩基除去修復だけでなく、ヌクレオチド除去修復機構によっても修復されていることが分かった。

キーワード:DNA 付加体、8-オキソグアニン、ヌクレオチド除去修復

A . 研究目的

最近、我々はヒトリンパ芽球細胞 TSCER122 (TK6 細胞から樹立) のゲノム内に DNA 付加体の導入場所、分子数、そして化学構造がすべて既知の条件で、その付加体の DNA 修復および遺伝的影響を *in vivo* で追跡できる実験系を構築した (Yasui M *et al.*, *DNA Repair* **15**, 11-20 (2014))。その系に酸化的 DNA 損傷である 8-オキソ-7、8-ジヒドロ-2'-デオキシグアニン付加体

(8-oxodG) を1分子だけ導入して調べれば、DNA に酸化損傷を形成させる化学物質 (例えば、食品添加物の臭素酸カリウム等 (Murata M *et al.*, *Chem Res Toxicol* **14**, 678-685 (2001))) や放射線 (例えば、電離放射線等 (Ward JF *Int J Radiat Biol* **66**, 427-432 (1994))) の低用量による暴露の影響評価に利用できるのではないかと考えている。なぜなら、低用量域における微弱な遺伝毒性の影響シグナルは、細胞毒性など他の要因による

影響に埋没し区別できないこと、そして測定系の検出限界以下であること等の理由から、低用量暴露で形成した 8-oxodG 損傷 1 分子だけの遺伝的影響を調べることは、これまで困難だったからである。

これまでの研究によって、2 分子の 8-oxodG を同じ DNA 鎖で近接して配置させると、修復効率の上昇が示唆された。本研究では、まず野生型 TSCER122 細胞に同じ DNA 鎖に近接させた 2 分子の 8-oxodG を導入して調べ、1 分子および DNA 両鎖の 2 分子 (前年度に実施) と比較すること、次に、ヌクレオチド除去修復に關与する XPA 欠損細胞を構築し、同じ DNA 鎖の 8-oxodG 2 分子で起きる突然変異誘発頻度を調べる。

B . 研究方法

1 . 細胞培養

ヒトリンパ芽球細胞 TSCER122 は、TK6 細胞株を由来とする細胞である (Honma, M. *et al*, *Environ. Mol. Mutagenesis* **42**, 288-298 (2003)、Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* **15**, 11-20 (2014))。細胞は、10%馬血清 (JRH Bioscience) 、200 µg/mL ビルビン酸ナトリウム (和光純薬工業 (株)) 、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン (ナカライテスク (株)) を含む RPMI 培地 (ナカライテスク (株)) で培養した (37 度、5% CO₂)。

2 . XPA 欠損細胞の構築

1) Zinc Finger Nuclease による XPA 欠損細胞の取得

XPA 遺伝子を破壊するための Zinc Finger Nuclease (ZFN) は、シグマアルドリッチから購入した。ZFN の設計およびバリデーションについてもシグマアルドリッチによって行われた。なおターゲットサイトは次の配列である ;

5'CAGGCCCGGCTGGCTGCCGgccccTACTCGGCGACGGCGGCT. ZFN mRNA (2 µg) を 100 µL の Nucleofector solution V (ロンザジャパン (株)) に溶解し、ヌクレオフェクター-I を用いて

TSCER122 細胞 (5 x 10⁶) をトランスフェクションした。その細胞を 24 時間後に 1.6 cells/mL の濃度で 96 穴マイクロプレートで培養 (37 度、7~10 日間) した。そのクローニング後、ゲノム DNA を抽出し、プライマー

(5'-AGCTAGGTCCTCGGAGTGG-3'および 5'-GGACAGGACGCTTTGACAAG-3') を用いて PCR を実施した。シーケンス解析することにより、ZFN ターゲットサイト周辺の欠損配列を調べた。

2) ウェスタンブロッティング

対数増殖期の細胞から得られた全細胞抽出物を 10% SDS ポリアクリアミドゲルで電気泳動した。その後、タンパク質を PVDF 膜 (Immobilon-P、メルクミリポア) に移行させ、5%スキムミルクでブロッキングし、抗 XPA モノクローナル抗体 (ab2352、アブカム (株)) あるいは抗 チューブリンモノクローナル抗体 (ab7291、アブカム (株)) と共に 18 時間反応させた。0.05% Tween20 を含む PBS で膜を洗浄後、抗マウス IgG ホースラディッシュペルオキシダーゼ (GE ヘルスケア バイオサイエンス (株)) と反応させ、化学発光によりタンパク質を検出した。イメージャーは、ImageQuant LAS4000 mini (GE ヘルスケア バイオサイエンス (株)) を使用した。

3) UV 照射

細胞をフェノールレッドを含まない RPMI 培地 (ナカライテスク (株)) で洗浄、再懸濁した。ペトリ皿 (35 mm x 100 mm) に細胞 (2.5 x 10⁶) を 5mL 培地で調整し、2.7 W/m² の UV 殺菌ランプを用いて UVC (254nm) を照射した。UV ライトの測定は、UV-light meter (Lutron) を用いた。照射後、その細胞を 1.6 cells/mL の濃度で 96 穴マイクロプレートで培養し、細胞生存度 (%) を計算した。

3 . 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 - / -) は、TK6 細胞から

チミジンキナーゼ遺伝子 (*TK*) のエキソン 5 を欠き、その欠失部位の上流に I-SceI 認識配列 18 bp (5'-ATTACCTGTTATCCCTA) を 1 つ持っている。その配列は、本来のヒトゲノムに無いため、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を導入すれば、相同組み換えにより、エキソン 5 と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 (つまり付加体が導入された細胞だけ) を回収することができ、後のシーケンス解析等に供することが可能である (図 1)。

4. 8-oxodG 付加体を部位特異的に含むターゲティングベクターの構築

8-oxodG 付加体を含むターゲティングベクターは、荒川らの方法 (Arakawa T *et al*, *Anal Biochem* **416**, 211-217 (2011)) に従って作製した。1 分子および 2 分子の 8-oxodG は、*TK* のイントロン 4 に位置する BssSI 認識配列 (5'-CTCGTG / CACGAG-3' ; 下線部が導入部位) の片側鎖の dG 部位に導入した (1 分子 ; pvIT^{8oxodG}-TS、2 分子 ; pvIT^{2x8oxodG}-TS)。双方とも、導入された DNA 鎖は *TK* の転写鎖側である。8-oxodG の代わりに正常塩基 dG のコントロールターゲティングベクター (pvIT^{dG}) も同様の方法で作製した。

5. トランスフェクションと DNA 解析

細胞ゲノムへの導入は、Lonza 社製 Cell Line Nucleofector の手法に従っておこなった。5 x 10⁶ cells/100 μL に調整した TSCER122 細胞に、pCBASce 50 μg と pvIT^{2x8oxodG} ターゲティングベクター 2 μg を同時にトランスフェクションし、75 cm² の培養フラスコで 3 日間培養 (37 °C、5 % CO₂) した。次に、その細胞を 1 ~ 5 x 10³ cells/mL

に調整し、HAT 試薬を添加後、96 穴プレートでさらに 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-oxodG 部位だった周辺のシーケンスを行い、その突然変異誘発スペクトルおよび頻度を決定した。解析する配列は、付加体を導入する制限酵素サイト 6 bp (5'-CTCGTG / CACGAG-3') とその前後の配列 3 bp の合計 12 bp の範囲とした。一塩基変異 (single point mutation) とは、付加体の導入部位で起きる一塩基置換、一塩基欠失 (⁻¹)、そして一塩基挿入を示し、タンデム変異 (tandem mutation) とは、付加体導入部位と他の部位が同時に塩基変異を起こしていたことを示す。また、その他 (Others) とは付加体導入部位以外に一つあるいは複数の塩基変異があったことを示す (表 1)。

C. 研究結果

1. XPA 遺伝子破壊細胞の分離

ZFN mRNA のトランスフェクション後に得られたクローンから約 20 細胞をランダムに選んでジェノタイピングした結果、ほぼすべての細胞から両アリルともにターゲットサイトの配列 *XPA*^{-/-} が欠損していることが分かった。非常に高効率、そして部位特異的に遺伝子破壊させることが可能であることが分かった。それらのクローンについて、さらにウェスタンブロッティング解析したところ、XPA タンパク質の発現の有無が確認できたため、発現の無いクローンをスクリーニングした (図 2A)。

2. XPA 欠損細胞の UV 感受性

得られた幾つかの XPA 欠損細胞 *XPA*^{-/-} の候補クローンについて、UV に対する細胞生存度を調べた。図 2B で示したように、野生型 TSCER122 細胞と比較して、低用量域で UV に対して高感受性を示す XPA 欠損細胞 (以後、XPA KO と呼ぶ) を取得することができた。

3. XPA 欠損細胞を用いた 8-oxodG 2 分子による

突然変異誘発能頻度およびスペクトラム

pvIT^{2x8oxodG-TS} を TSCER122 および XPA KO ヘトランスフェクション後、付加体が導入されたクローン細胞（それぞれ 649、703）について、シーケンス解析した結果を表 1 に示す（4 度の独立した実験の合計）。8-oxodG 導入部位に塩基変異があったのは、33（5.1%）、45（6.4%）であり、どちらも G・C → T・A トランスバージョンが最も高かった。一塩基変異の誘発頻度では、TSCER122 と XPA KO に大きな差がなかったが、タンデム変異に関しては、XPA KO（3.1%）は TSCER122（1.2%）よりも約 2.5 倍多く誘発していることが分かった。また、導入部位以外の塩基で起きる変異（Others）についても、XPA KO が TSCER122 よりも約 2 倍高かった。総じて、XPA KO によって誘発する突然変異誘発頻度（12%）は、TSCER122 のそれ（7.4%）よりも有意に上昇していることが明らかとなった（図 3B）。

陰性対象実験として、1 分子の 8-oxodG に対しては、TSCER122 および XPA KO のどちらを用いても、それらの突然変異誘発頻度（2 度の独立した実験結果）は、変化が無かった（図 3A、表 1）。

4. 野生型 TSCER122 を用いた 8-oxodG 1 分子および 2 分子の突然変異誘発頻度

野生型の細胞から得られる 1 分子と 2 分子の突然変異誘発頻度は、それぞれ 8.3 と 7.4% であり、付加体の分子数が 2 倍になっても変異頻度はほぼ同じと考えられた（図 3）。

D. 考 察

前年度までに、1、2、4 分子の 8-oxodG によって誘発される突然変異誘発頻度を解析（複数分子は DNA 両鎖に配置）し、付加体の分子数と変異頻度の関係性について調べた。1 分子と 2 分子の変異頻度の間には、比例関係があったが、2 分子と 4 分子の間にはそれが無かった。その 2 分子は、各 DNA 鎖に 1 分子ずつ、つまり DNA 両鎖に 2 分子を近接（5'-CTCGTG/CACGAG-3'；下線部が導入部位）させて変異頻度を解析してお

り、本報告書の 2 分子とは配置が異なる。DNA 両鎖の 2 分子による変異スペクトラムは、2 つの付加体が両鎖の近傍に導入されないと発生しないような特徴的なもので、両鎖の付加体導入部位の間に一塩基欠失と一塩基挿入が非常に高頻度で検出された（5'-CTCNGTG/CACNGAG-3'；N が欠失あるいは挿入の部位）。その 2 分子の全変異頻度は 20% 以上にも達した。それに対し、本年度に実施した同じ DNA 鎖内の 2 分子による変異頻度は、わずか 7.4% にとどまり、それは 1 分子の頻度（8.3%）とほぼ同じであった（図 3）。つまり、前年度で考察したとおり、同じ DNA 鎖に複数の DNA 損傷がある場合、ヌクレオチド除去修復あるいはロングパッチ除去修復等によって、効率良く除去されるため、付加体の分子数が多くなっても変異頻度の上昇が抑えられるためであると推測できる。次に、これを証明するために、ヌクレオチド除去修復に關与する XPA 欠損細胞 XPA KO を構築し、同じ DNA 鎖内の 8-oxodG 2 分子で起きる突然変異誘発頻度を調べた。その結果、XPA KO 細胞を用いたときの方が、野生型 TSCER122 細胞のときよりも有意に突然変異誘発頻度を上昇させた（図 3B）。これらのデータから、やはり同じ DNA 鎖にある複数の付加体は同時に除去修復されるため、付加体の分子数と突然変異誘発頻度には、比例関係がないことを実験的に明らかにした。

図 3A に示したように、双方の細胞から得られた 8-oxodG 1 分子の突然変異誘発頻度には差が無い。これは、酸化的 DNA 損傷である 8-oxodG は、8-オキシグアニングリコシラーゼ等が関与する塩基除去修復機構によって修復されるからと考えられる（Liu M, *et al. Current Genomics* **10**, 250-258 (2009)）。しかしながら、8-oxodG がもう 1 分子増えただけで（計 2 分子にクラスター化）、その塩基除去修復機構だけでなく、ヌクレオチド除去修復機構が加わり、DNA 修復をより増強させていることが本研究によって明らかになった。他の研究チームにおいても、放射線のクラスター DNA 損傷の一つである AP-site が、ヌクレオチ

ド除去修復機構によって修復されるという報告がある (Torres-Ramos, CA *et al.*, *Mol Cell Biol* **20**, 3522-3528 (2000))。以上のことから、バルキ- DNA 付加体に対して働くとしてきたヌクレオチド除去修復は、クラスターDNA 損傷など DNA の片側鎖に広範な損傷が形成した場合に働く機構であると考えられる。

E. 結論

DNA 付加体の分子数と突然変異誘発頻度の関係性を調べるために、同じ DNA 鎖内に配置させた 2 分子の 8-oxodG が引き起こす突然変異誘発頻度を XPA 欠損細胞を用いて明らかにした。その結果、XPA 欠損細胞で起きる突然変異誘発頻度は、野生型細胞のそれよりも有意に上昇した。このことから、同じ DNA 鎖の 2 分子の付加体は、通常の塩基除去修復だけでなく、ヌクレオチド除去修復機構によっても修復されていることが分かった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasui M, Kamoshita N, Nishimura T, Honma M; Mechanism of induction of binucleated cells by multiwalled carbon nanotubes as revealed by live-cell imaging analysis. *Genes and Environment*, 印刷中.(2015)

2. 学会発表

- 1) 佐々彰, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充, 安井学; ゲノムの特定部位に配置させたクラスターDNA 損傷の数的遺伝毒性影響. 日本放射線影響学会第 57 回大会, 鹿児島市 (2014 年 10 月)
- 2) 安井学, ; 部位特異的にゲノム内に導入した DNA 付加体の遺伝的影響. 第 43 回日本環境変異原学会, 東京 (2014 年 11 月)

- 3) 佐々彰, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充, 安井学; ゲノムに導入させた酸化的クラスター DNA 損傷の数的遺伝毒性影響. 第 43 回日本環境変異原学会, 東京 (2014 年 11 月)
- 4) 長野聖也, 東垣由夏, 佐々彰, 川西優喜, 安井学, 高村岳樹, 八木孝司; DNA 塩基損傷 1 分子を部位特異的にもつプラスミドの作製とヒト細胞における TLS 解析. 第 43 回日本環境変異原学会, 東京 (2014 年 11 月)
- 5) Honma M, Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T; Tracing the fate of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. 4th Asian Conference on Environmental Mutagens. Kolkata, India (2014 年 12 月)

H. 知的所有権の取得状況

なし

表1 .XPA 欠損および野生型細胞を用いた 1 分子および 2 分子の 8-oxodG で起きる突然変異誘発スペクトラムと頻度

Table 1. Mutation spectra induced by integration of pVT^{8oxodG} and pVT^{2x8oxodG}

Targeting vector	Cell	TK revertants analyzed	DNA adducts-integrated revertants	No mutation	Single point mutation at 8-oxoG					Tandem mutations	Others	Total mutation	ND
					T	C	A	Δ ¹	Ins.				
pVT ^{8oxodG}	TSCER122	461	422 (100%)	384 (91%)	15 (3.6%)	5 (1.2%)	1 (0.24%)	3 (0.71%)	0 (0%)	2 (0.47%)	9 (2.1%)	35 (8.3%)	3
	XPA KO	538	472 (100%)	430 (91%)	12 (2.5%)	11 (2.3%)	3 (0.64%)	1 (0.21%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (2.5%)	39 (8.3%)	3
pVT ^{2x8oxodG}	TSCER122	713	649 (100%)	597 (92%)	19 (2.9%)	11 (1.7%)	2 (0.31%)	0 (0%)	1 (0.15%)	8 (1.2%)	7 (1.1%)	48 (7.4%)	4
	XPA KO	816	703 (100%)	614 (87%)	31 (4.4%)	6 (0.85%)	5 (0.71%)	2 (0.28%)	1 (0.14%)	22 (3.1%)	19 (2.7%)	86 (12%)	3

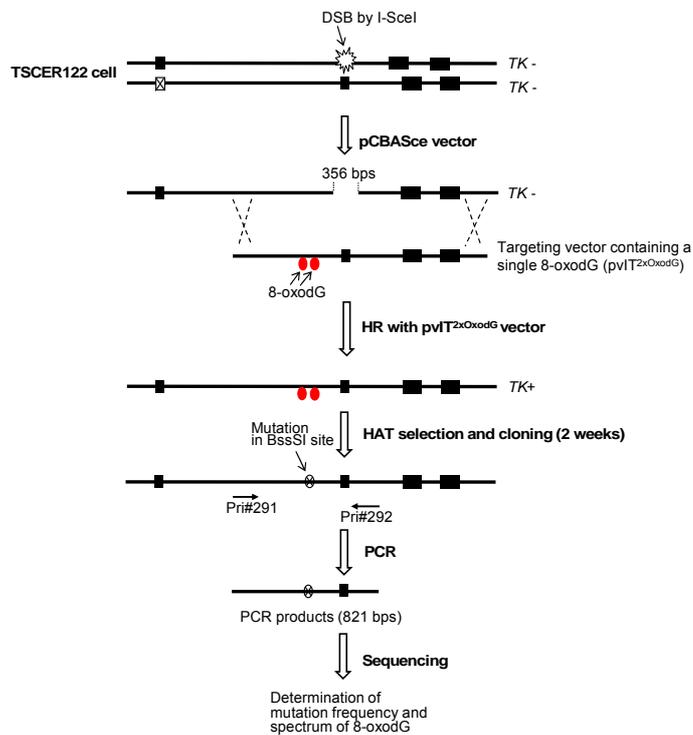


図1. ヒト培養細胞を用いる極低用量暴露モデルの実験系の概要

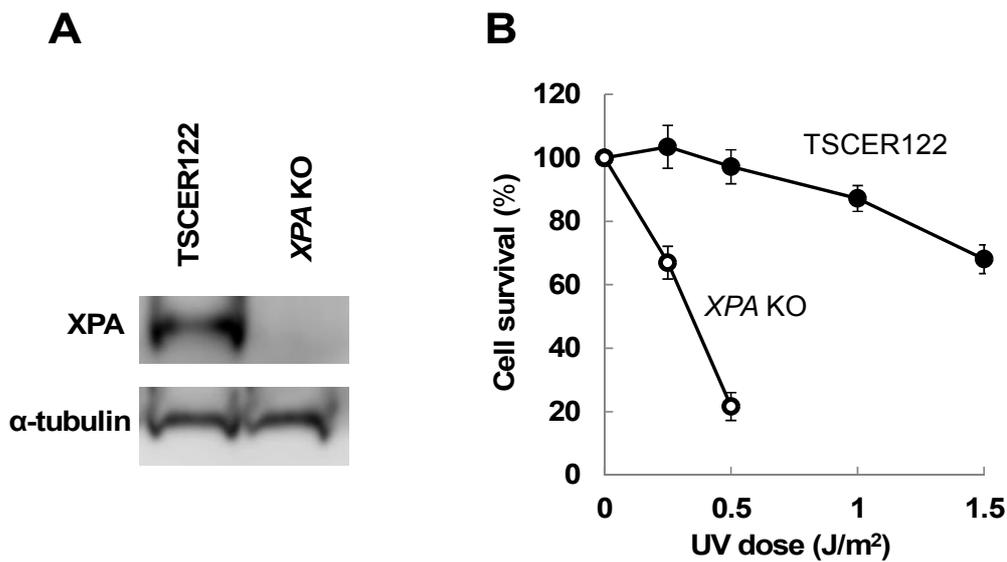


図2. XPA欠損細胞の構築

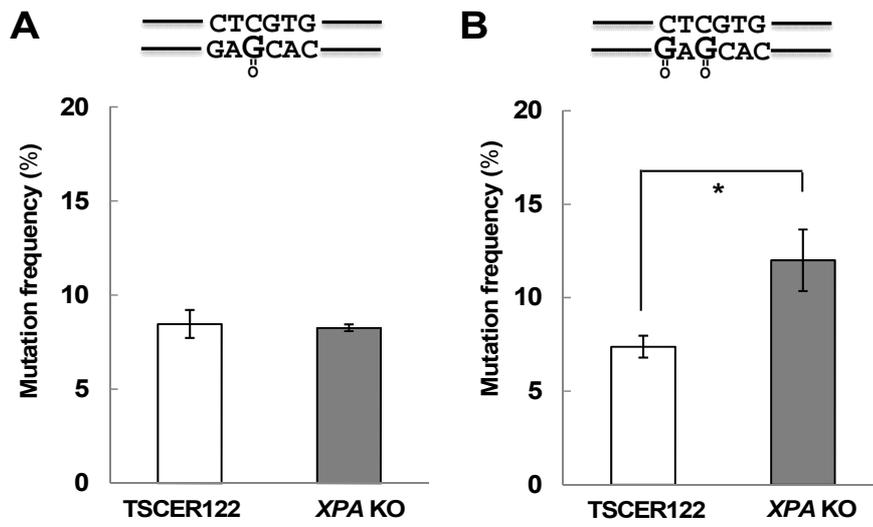


図3. 1分子および2分子の8-oxodG部位で起きる突然変異誘発頻度の比較