

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法に関する研究

分担研究課題名：バルキーDNA付加体の遺伝子変異誘発に関する基礎的研究

研究分担者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 主任研究官

研究要旨

本研究では、ヒトリンパ芽球細胞のゲノム内に DNA 損傷を部位特異的に導入し、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 TATAM 実験系を用いている。その 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あるため、得られた結果の因果関係が明確である。これまでに、数種類の酸化 DNA 損傷（8-オキシ-7,8-ジヒドロ-2'-デオキシグアノシン付加体など）について、ゲノム導入し、それらの遺伝子変異誘発機構を調べることができた。しかしながら、酸化 DNA 損傷の分子サイズは小さいものが多く、例えば、食品中（焼け焦げに含まれるヘテロサイクリックアミン類など）に含まれる発がん性物質の DNA 損傷には、サイズの大きい、いわゆるバルキーDNA付加体が存在する。本年度は、バルキー付加体を TATAM 実験系で調べることが目的として、市販で購入可能で、すぐに実験することができるシクロブタンピリミジンダイマー（CPD）をバルキー付加体のモデルとして選択し、その突然変異誘発頻度とスペクトラムを調べた。その結果、コントロール（CPD 部位がチミン-チミンになっている）のターゲティングベクターをゲノム導入して調べた時は、突然変異誘発がまったく観察されなかった。一方、CPD のベクターをゲノム導入すると、CPD 部位でタンデムな塩基欠失が主に起きた。よって、バルキーDNA付加体も TATAM 系に適用できることが分かった。

キーワード:バルキーDNA付加体, シクロブタンピリミジンダイマー

A . 研究目的

ヒトの発がんの原因として、従来から食品が重要な因子であると言われている。食品中には、原材料の成分、加熱・調理中に生成される物質、食品添加物、そして原材料等に微量に含まれる残留農薬や動物用医薬品、さらにプラスチック容器等の溶出物なども含まれていると考えられる。つまり、毎日の食餌の中に発がん性物質が存在していることは否定できない。

食品中の発がん性物質として最も注目され、研究が進んでいるものは、魚肉類の焼け焦げに含

まれるヘテロサイクリックアミン類（HCA）である。HCA は、DNA と反応し DNA 付加体を形成させ、発がんに至らせる遺伝毒性発がん物質に分類される。事実、焼け焦げに含まれる発がん性を示す物質として、PhIP, MeIQ, Trp-P-1 などの HCA が同定されており、それらはラットなどの実験動物の臓器にがんを高頻度に形成させることが知られている。その発がん機構に、HCA の DNA 付加体が強く関与していると考えられる。

本研究では、ヒトリンパ芽球細胞のゲノム内に DNA 損傷を部位特異的に導入し、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 TATAM 実験系を用いている。その 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あるため、得られた結果の因果関係が明確である (Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* **15**, 11-20 (2014))。これまでに、数種類の酸化 DNA 損傷(8-オキソ-7,8-ジヒドロ-2'-デオキシグアノシン付加体など)について、ゲノム導入し、それらの遺伝子変異誘発機構を調べることができた。しかしながら、酸化 DNA 損傷の分子サイズは、小さいものが多く、HCA の DNA 損傷のようにサイズの大きい、いわゆるバルキー DNA 付加体についてはまだ調べていない。

よって本研究では、そのバルキー付加体として、すぐに市販で購入可能な *cis-syn* thymine-thymine cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) を 1 つ含んだターゲティングベクターを構築することから始め、それを TATAM 系でゲノムの特定部位に導入し、その CPD が引き起こす突然変異誘発頻度とスペクトラムを解析した。なお、HCA のバルキー付加体については、現在、本班の分担研究者によって化学的に合成され、予定通り進行すれば、次年度に HCA のバルキー付加体を TATAM 解析する。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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% CO_2)。

2 .CPD を部位特異的に含むターゲティングベクターの構築

代表的なバルキー付加体である CPD 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 (Arakawa, T. *et al.*, *Anal. Biochem.* **416**, 211-217(2011)) を参考にし、それをさらに改良した方法によって CPD を含むターゲティングベクターを構築した (Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* **15**, 11-20 (2014))。

部位特異的に CPD を 1 分子含む DNA オリゴマーは、(株)日本バイオサービスから購入した。その他、ビオチン修飾やリン酸化、そして無修飾の DNA オリゴマーは、(株)シグマジェノシスから購入した。チミジンキナーゼ遺伝子 (TK) 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、TK の相同的な配列を含む 5'末端から CPD 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'末端から同様の PCR を行い、計 4 組の PCR 産物を用意した。各 PCR 生成物の一方の 5'末端 DNA には、ビオチン付加が施してあり、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 (ビオチン付加の無い DNA 鎖) 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 (pvIT^{CPD}) を作製した。これと同様の方法で、正常塩基 5'-TT が入ったコントロールターゲティングベクター (pvIT) も用意した。

3 . ヒト培養細胞を用いる TATAM 実験系の概要

TSCER122 細胞 (TK - / -) は、TK6 細胞から 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'-ATTACCCTGTTATCCCTA) 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、エクソン 5 と付加体が同時にゲノム内に入る。その時、細胞は TK^{-/-} から 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）。

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 × 10⁶ cells/100 μL に調整した TSCER122 細胞に、pCBASce 50 μg と pvIT^{CPD} ターゲティングベクター 1 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 × 10³ cells/mL に調整し、HAT 試薬を添加後、96 穴マイクロプレートでさらに 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、CPD 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、付加体を導入した部位とその前後 4 塩基について、塩基の変異や欠失などを解析した（5'-TTAATTCTCC / GGAGAATTAA-3'）。実験回数は 1 回（1 トランスフェクション）である。

C . 研究結果

コントロール（CPD 部位が TT になっている）のターゲティングベクター-pvIT、および CPD を含むターゲティングベクター-pcIT^{CPD} をそれぞれ TSCER122 細胞に導入し、TK 復帰頻度を調べたところ、どちらも 10⁻³ オーダーで類似の値であった。これは、CPD がゲノムにインテグレートされる際に、おそらく影響がないものと推測できた。

バルキー-DNA 付加体のモデルとして、CPD 付加体を TATAM 実験系に供し、CPD によって引き起こされる突然変異誘発頻度とスペクトラムを調べた（表 1）。合計 228 復帰クローンについてシーケンスを行い、そのうち 204 クローンが

CPD を含むターゲティングベクターと相同組み換えによって、CPD がゲノムに導入された。その約 92%（187 クローン）が、もとの DNA 配列に修復され、残りの 17 クローンから塩基変異が観察された。最も優位に検出された塩基変異は、CPD 部位にタンデムの塩基欠失（5'-TTAAΔΔCTCC）が 11 クローン検出（5.4%, 11/204）された。残りの 6 クローンのうち、2 つは 5'-TTAAΔΔCTCC となっていたが、その他の 4 つは、それぞれ異なる変異スペクトラムを示した（表 1）。なお CPD を含まないコントロールベクター-pvIT をゲノム導入した時は、対象となる DNA 配列（5'-TTAATTCTCC）に塩基変異が起きないことを確認した。

D . 考 察

CPD は、紫外線照射によって形成する代表的な DNA 付加体の一つであり、すでにその突然変異誘発頻度とスペクトラムが調べられている（Gentil, A. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **24**, 1837-1840(1996)）。その論文では COS7 細胞が用いられ、CPD 部位で 5'-TT の 3'側の T→C と T→A の塩基変異（それぞれ 5'-TC, 5'-TA）がどちらも約 2%以下の頻度で検出されただけで、その他の変異は無かった。一方、本研究で得られた CPD の変異スペクトラムは、タンデム塩基欠失（5'-ΔΔ）が最も多く検出されたため、Gentil らの結果と異なることが分かった。その原因として予想できることは、本研究ではゲノムの染色体上に CPD を導入して調べているのに対して、Gentil らは CPD をプラスミドに導入してエピソーマルな条件で調べていることである。また、使用された細胞種が異なることも原因として挙げられる。

一方、CPD の突然変異誘発頻度のトータルは、本研究は 8.3%、前述の Gentil らは 2.4%であり、CPD の突然変異誘発頻度が数%しか起きないという点では一致している。それは、CPD に対して DNA ポリメラーゼ η (POLH) が、正確に乗り越え DNA 合成をするからであると考えられる。もし、POLH 欠損細胞を用いた時、CPD はどのような

突然変異誘発頻度とスペクトラムを示すだろうか？。この疑問に対して、すでに Hendel らによって報告されている (Hendel, A. *et al.*, *DNA repair* **7**, 1636-1646(2008))。POLH が欠損している XPV 患者の組織から株化された繊維芽細胞 (POLH -/-) を用いて、CPD で起こる突然変異誘発頻度とスペクトラムを調べた。その結果、POLH +/+ 細胞の塩基変異頻度より POLH -/- 細胞のそれは、統計的に有意に上昇し、その変異スペクトラムは塩基置換による変異が優位であり、塩基欠失はほぼ無かった。つまり、それらの変異スペクトラムは、CPD 部位のタンデム塩基欠失が優位となった本研究の変異スペクトラムと異なることが分かった (表 1)。その原因として、Hendel らは CPD をプラスミドに導入してエピソーマルな条件で繊維芽細胞を用いて調べており、本研究で使用している実験系とは異なることが予想されるが、現状では、なぜ本研究の変異スペクトルが既報と一致しないのか原因は分からない。これを明らかにするには、まず TSCER122 細胞の POLH 発現レベルを調べることで、そして、CPD の DNA 修復に関連する遺伝子の破壊細胞を構築して、TATAM 実験を繰り返し行うことによって、CPD の DNA 修復機構を調べる必要があると考えられる。

E. 結論

バルキーDNA 付加体を TATAM 実験系で調べることを目的として、バルキー付加体の中から CPD の DNA 付加体をモデル物質として選択し、その突然変異誘発頻度とスペクトラムを調べた。CPD 部位で起きる突然変異誘発スペクトラムに関して、本研究ではタンデムの塩基欠失が優位に検出された。よって、バルキーDNA 付加体も TATAM 系に適用できることが分かった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sassa A, Kamoshita N, Kanemaru Y, Honma M, Yasui M. (2015) Xeroderma Pigmentosum Group A Suppresses Mutagenesis Caused by Clustered Oxidative DNA Adducts in the Human Genome. *PLOS ONE* **10**(11), e0142218 (2015).

2. 学会発表

- 1) 安井学, 佐々彰, 鴨下渚, 本間正充; DNA 損傷 1 分子の部位特異的なゲノム導入とその遺伝的影響の解析. 宇宙生物学会, 東京 (2015 年 9 月)
- 2) 佐々彰, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充, 安井学; ヒトリンパ球細胞のゲノムに導入したシトシン修飾体の潜在的な突然変異誘発能. 第 44 回日本環境変異原学会, 福岡 (2015 年 11 月)
- 3) 佐々彰, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充, 安井学; ヌクレオチド除去修復は酸化的クラスターDNA 損傷によって誘発される突然変異を抑制する. 第 44 回日本環境変異原学会, 福岡 (2015 年 11 月)
- 4) Honma M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T, Sasa A, Yasui M; Tracing the fate of site-specifically introduced oxidative dna damage in the human genome. 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA, メルボルン (2016 年 3 月)

H. 知的所有権の取得状況

なし

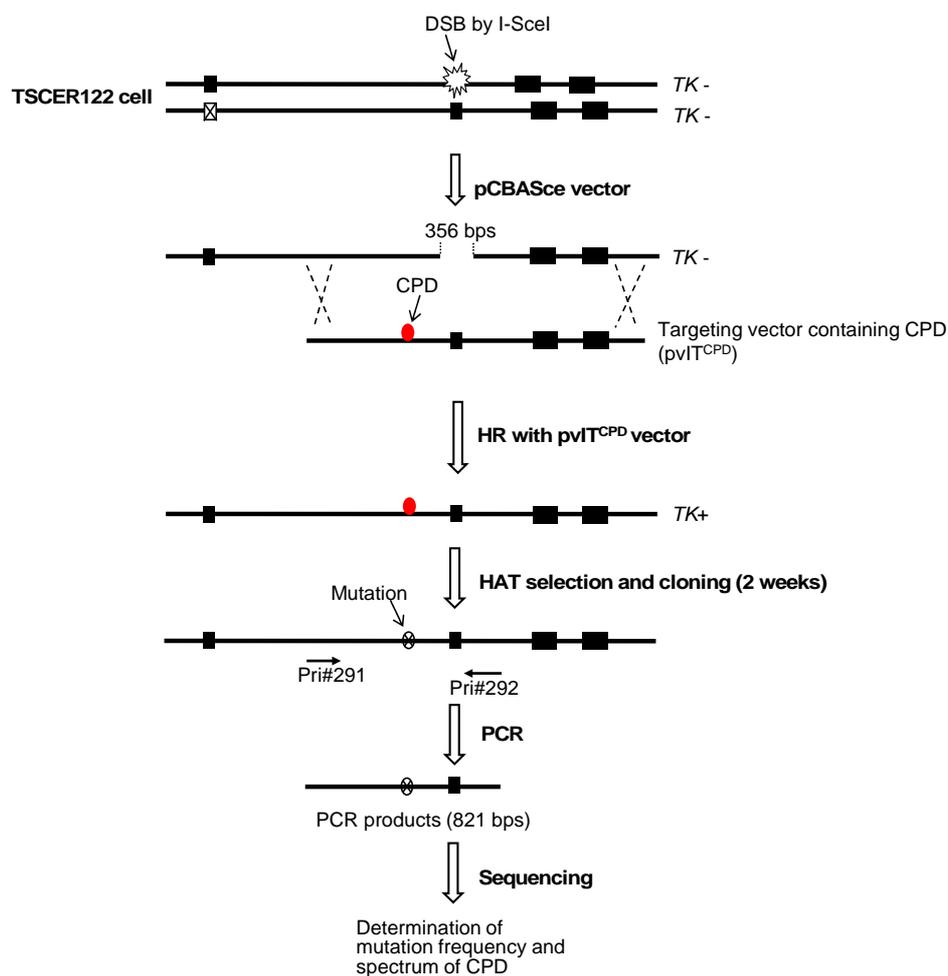


図 1 . TATAM 実験系の概要

Table 1. Mutation spectra induced by integration of pVT^{CPD}

Targeting vector	ID number of 96-well microplate	TK revertants analyzed	CPD-integrated revertants	No mutation	Targeted and non-targeted mutation at CPD site ^a		Total mutation	ND ^b
					Original seq.	Number		
pVT ^{CPD}	1	77	69	68	5' TTAAT <u>TC</u> TCC		11	3
					5' TTAA Δ CTCC	1		
					5' TTAA Δ CTCC	7		
					5' TTAA Δ CTCC	2		
					5' TTAATGCTCC	1		
	5' TTA Δ TTCTCC	1						
	3	77	67	62	5' TTAA Δ CTCC	3	5	1
5' TTAA Δ CTCC					1			
5' TTCTTTCTCC					1			
Total		228	204 (100%)	187 (91.7%)		17(8.3%)	7	

^aUnderline indicates CPD site and Δ indicates one-base deletion. ^bNot detected.

