

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dG-C8-PhIPに関わるヌクレオチド除去修復機構に関する基礎的
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

研究要旨

バルキー-DNA 付加体 dG-C8-PhIP 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 PhIP が、代謝活性化後に DNA と反応することによって形成する。一般的に、バルキー-DNA 付加体は、ヌクレオチド除去修復機構（NER）によって DNA から除去されることが知られているが、ほとんどの付加体は、NER 機構に存在するグローバルゲノム NER（GG-NER）、あるいは転写共役型 NER（TC-NER）のどちらで修復されるかは全く不明であり、HCA の発がん作用機序を理解するうえで大きな障害となっている。本研究では、GG-NER および TC-NER に必須の遺伝子である *XPC* および *ERCC6* を、それぞれ改変した細胞を用いて、ゲノム導入された dG-C8-PhIP 付加体の突然変異誘発能を解析することを目的とする。ヒトリンパ芽球細胞株 TSCER122 のゲノム内に dG-C8-PhIP 付加体を導入し、その部位で起きる突然変異誘発頻度とスペクトラムを調べた結果、164 細胞中に 6 つの細胞で dG-C8-PhIP のゲノム導入部位周辺の塩基変異（4.2%）が検出され、また、2 つの細胞からは大きな欠失（1.4%）が観察された（合計 5.6%）。一方、dG-C8-PhIP 付加体を導入しないコントロール実験（dG-C8-PhIP 部位に正常塩基 dG を導入）で得られる自然突然変異頻度は 1.7% であることから、dG-C8-PhIP 付加体は、その自然突然変異頻度よりも約 3 倍高く塩基置換や大きな欠失を誘発させることが分かった。次に、これと同様の実験を *XPC*、*ERCC6* の遺伝子改変細胞を用いて調べたが、dG-C8-PhIP 付加体の突然変異頻度はそれぞれ 2.4%、0.6% であった。これらの変異頻度は、自然突然変異頻度とほぼ同じであるため、これらの遺伝子が dG-C8-PhIP 付加体の DNA 修復に関与していないこと、あるいは TATAM 解析がバルキー付加体に適用できない可能性があることが予想された。

キーワード:バルキー-DNA 付加体,ヌクレオチド除去修復,遺伝子改変細胞

A. 研究目的

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）の一つである 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine（PhIP）は、生体内で代謝活性化、そして DNA と反応し、

N-(deoxyguanosin-8-yl)-PhIP（dG-C8-PhIP）バルキー-DNA 付加体を形成させる（図 1）。事実、PhIP は実験動物の大腸や小腸など様々な臓器にがんを高頻度に形成させるという報告が数多くある。その発がん機構に、dG-C8-PhIP バルキー

DNA 付加体が強く関与していると考えられる。

バルキーDNA 付加体は、ヌクレオチド除去修復機構 (NER) によって DNA から除去されることがよく知られている。NER は、大きく分けてグローバルゲノム NER (GG-NER) と転写共役型 NER (TC-NER) の 2 種類がある。しかし、バルキーDNA 付加体のほとんどは、その GG-NER か TC-NER のどちらに進むかは全く不明であり、HCA の発がん作用機序を理解するうえで大きな障害となっている。

本研究では、dG-C8-PhIP 付加体が GG-NER と TC-NER のどちらの経路で DNA 修復されるかを明らかにすることを目的として、GG-NER の XPC 遺伝子 (XPC タンパク質)、TC-NER の ERCC6 遺伝子 (CSB タンパク質) が、その修復経路の必須遺伝子であることから、それらのノックアウト (KO)、あるいはノックイン (KI) した改変細胞を用いて、後述する TATAM 解析を行う。

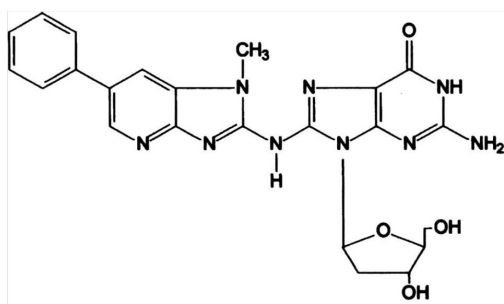


図 1 . dG-C8-PhIP バルキーDNA 付加体の構造

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))。XPC KO TSCER122 細胞は、その開始コドン部位を CRISPR/Cas9 系によって欠失配列を有し、UV 照射に高感受性を有する。ERCC6 の TSCER122 改変細胞は、ERCC6 (CSB) を欠損する患者において、エキソン 5 で検出される変異 (K337*) を有するノックイン (KI) 細胞 (Troelstra *et al*, *Cell* **71**, 939-953 (1992)) であ

り、UV 照射に対して高感受性を示す。細胞は、10% 馬血清 (JRH Bioscience), 200 µg/mL ピ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 . PhIP に対する相対細胞生存率の測定

PhIP (和光純薬工業(株), CAS NO. 105650-23-5) を DMSO (ナカライテスク(株)) で溶解後、表 1 のように S9mix (オリエンタル酵母工業(株)) の存在下において、対数増殖期にある細胞に暴露し、4 時間振盪培養した (用量設定試験; 最終濃度 0, 2.5, 5, 7.5 µg/mL, 本試験; 最終濃度 0, 1, 2, 3 µg/mL) (Duc *et al*, *Mutat. Res.* **486**, 155-164 (2001))。処理後、遠心分離 (1000 rpm, 5 分間) し、上清を除去後、無血清培地で細胞を洗浄した。再度、遠心分離 (1000 rpm, 5 分間) し、上清を除去後、10% 血清を含む培地で細胞を分散させ細胞濃度を測定した。細胞濃度を 8 cells/mL に希釈し、約 1.6 cell/ウェルの濃度で 96 ウェルマイクロプレートで 2 週間培養した。

表 1 . PhIP の暴露処理

細胞液 (約 1×10 ⁶ cells/mL)	5 mL
RPMI-0 (無血清培地)	3.3 mL
S9 mix	1.5 mL
被験液 (PhIP)	0.2 mL
処理容量	10 mL

細胞のコロニー形成率である Cloning efficiency (CE) は、ポアソン分布の式に従い、式 1 を用いて算出した。EW は、コロニーを含まないウェル数であり、TW は総ウェル数である。N は、1 ウェル当たりの平均細胞数 (本実験では N = 1.6) である。

$$CE = -\ln(EW / TW) / N \quad \dots (式 1)$$

また、暴露処理中の細胞毒性が強い場合など、

細胞消失があるため、次の計算式(式2)でCEを補正した。“処理終了時の細胞数”は、前述のPhIPの暴露処理(表1)において処理終了時の遠心分離後に得られた細胞数である。“処理開始時の細胞数”は、本研究では 5×10^6 cells(表1)である。

補正CE = CE × 処理終了時の細胞数 / 処理開始時の細胞数
・・・(式2)

被験物質で処理された培養の細胞相対生存率RS(%)は、次の式3で計算した。陰性対照(DMSO)の生存率を100%と定義した。なお、各細胞から得られた相対細胞生存率の有意差検定はDunnett法で行った。

RS(%) = 処理培養の補正CE / 溶媒対照の補正CE × 100
・・・(式3)

3. dG-C8-PhIP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dG-C8-PhIP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PhIP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dG-C8-PhIPを1分子含むDNAオリゴマーは、高村岳樹教授(神奈川工科大学)から分与して頂いた(Takamura-Enya T. *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 770-778 (2006))。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

dG-C8-PhIP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。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、それぞれ的一本鎖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^{PhIP})を作製した(Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* **15**, 11-20 (2014))。

4. 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18bp(5'-ATTACCCTGT TATCCCTA)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(MseI制限酵素に耐性を持つ配列MseI^Rの有無で区別できる)。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。この方法をTATAM(Tracing DNA adducts in targeted mutagenesis)実験系といい、図2に概要を示した。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。 5×10^6 cells/100 μ Lに調整したTSCER122細胞に、pCBASce 50 μ gとpvIT^{PhIP}ターゲティングベクター1 μ g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℃, 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、dG-C8-PhIP 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周辺 (BssSI 制限酵素の認識配列) について、塩基の変異や欠失などを解析した (5'-CTCGTG / CACGAG-3', 下線部 dG に dG-C8-PhIP を導入)。

回収されたゲノム DNA について、シーケンスを行い、MseI 制限酵素に耐性を持つ配列が導入されているクローン (MseI^R) と耐性を持たないクローン (MseI^S) に分けてカウントした。dG-C8-PhIP を導入した部位をシーケンスで調べ、そこで配列を読めれば Mutation へ分類、読めないサンプルに関しては、さらに BssSI 制限酵素で反応させ、切断できなかったものを Mutation へ分類 (引き続きシーケンスも実施)、切断できたものを No mutation に分類した (表 2 ~ 4)。一方、PCR できない、あるいはアガロースチェック時にシグナルが弱い場合を ND とした。また、シーケンスで読めなかったサンプルを Seq.ND とした。表 2 ~ 4 の網掛部分は、Mutation に分類されたサンプルについてまとめた。なお、網掛の元の配列 CACGAG の真ん中の C は、dG-C8-PhIP 付加体の対面に相当し、Target site となる。突然変異誘発頻度 (MF) は、式 4 のように計算し、MseI^R 配列が導入されたクローンの数を 100% とした (図 2, 表 5 参照)。

MF (%) = Mutation の数 / MseI^R 配列が導入されたクローンの数 × 100 . . . (式 4)

C . 研究結果

1 . 代謝活性化された PhIP に対する細胞毒性

基礎データとして、PhIP に対する TSCER122 細胞、XPC KO 細胞、および ERCC6 KI 細胞の RS の測定を行った。図 3 に示したように、最高

用量の 3 μg/mL で処理した時に、野生株の TSCER122 細胞に対して、XPC KO 細胞と ERCC6 KI 細胞の両方が、有意に RS の減少が確認された (** : P<0.01)。つまり、PhIP が代謝活性化されることで形成する DNA 損傷群は、GG-NER と TC-NER の両方、特に、XPC KO 細胞の方がより高い感受性 (2, 3 μg/mL の 2 つの用量で有意差) を示したことから、PhIP の DNA 損傷は主に GG-NER によって修復除去されていることが分かった。

2 . TATAM 解析によるゲノム導入効率

TSCER122 細胞、XPC KO 細胞、ERCC6 KI 細胞の 3 種類の細胞ゲノムに、それぞれ dG-C8-PhIP バルキー DNA 付加体を導入し、そこで起きる突然変異誘発頻度およびスペクトラムを調べた (表 2 ~ 4)。96 クローンごとに 2 回の実験 (Exp.1 および Exp.2) を実施した。図 2 のとおり、付加体を含むターゲティングベクターが導入された場合は、MseI^R 配列がゲノムに目印として残るため、それをカウントすることで付加体のゲノムへの導入効率が分かる。TSCER122 細胞、XPC KO 細胞、ERCC6 KI 細胞のゲノムへの導入効率は、それぞれ 86.6, 90.9, 96.5 % (表 2 ~ 4 の Targeted Freq) であり、野生株と変異株の差はなく、類似の値だった。

3 . 遺伝子改変細胞を用いる TATAM 解析の結果

野生株である TSCER122 細胞に dG-C8-PhIP を導入し調べた結果、表 2 と表 5 のとおり、164 細胞中に 6 つの細胞で dG-C8-PhIP のゲノム導入部位周辺の塩基変異 (4.2%) が検出され、その 6 つのうちの一つがグアニンからアデニンへの塩基変異だった。また、2 つの細胞からは大きな欠失 (1.4%) が観察された (合計 5.6%)。一方、dG-C8-PhIP 付加体を導入しないコントロール実験 (dG-C8-PhIP 部位に正常塩基 dG を導入) で得られる自然突然変異頻度は 1.7% (Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* 15, 11-20 (2014)) であるため、dG-C8-PhIP によって突然変異誘発頻度が約 3 倍

増加したことが分かった。

一方、*XPC* KO 細胞、および *ERCC6* KI 細胞のゲノムに dG-C8-PhIP 付加体を導入して同様の実験を行ったが、*XPC* KO 細胞では 186 細胞中に 4 つの細胞で塩基変異と一塩基欠失 (2.4%)、また、*ERCC6* KI 細胞では 172 細胞中にわずか 1 細胞(塩基変異と一塩基欠失を同時に誘発;0.6%)しか検出されなかった(表 3、表 4)。

D. 考 察

S9 mix 存在下で PhIP に対する TSCER122 細胞、*XPC* KO 細胞、および *ERCC6* KI 細胞の RS の測定を行ったところ、両方の変異体細胞が有意に感受性を示した(図 3)。この結果は、PhIP によって形成する DNA 損傷(DNA 鎖切断や欠失も含む)が複数あり、*XPC* だけでなく、*CSB*(*ERCC6* 遺伝子プロダクト)の両方のタンパク質が関与して修復されていることを示唆する。しかしながら、現在、PhIP の DNA 付加体として同定されているのは、dG-C8-PhIP の 1 つだけである(その N2 位付加の dG-N2-PhIP も形成すると推測されているが同定はされていない)。すなわち、例えば dG-C8-PhIP は GG-NER、dG-N2-PhIP は TC-NER が関与するなど、DNA 付加体一つ一つに対して DNA 修復機構が異なるはずである。PhIP は多種多様な DNA 損傷、および DNA 付加体を形成していると考えられるが、本研究の TATAM 解析では DNA 損傷という混合物ではなく、dG-C8-PhIP 付加体という一つの化学構造物を調べることによって、GG-NER か TC-NER のどちらで修復されているかを明らかにできることが大きなメリットである。

すでに同定されているほとんどのバルキー DNA 付加体は、GG-NER か TC-NER のどちらに進むかは全く不明であり、もし *XPC* と *ERCC6* の改変細胞で TATAM 解析をすれば、その野生株を使用した時よりも、高頻度に突然変異誘発頻度を得られ、GG-NER か TC-NER のどちらで修復されるかを明確にできる。しかしながら、dG-C8-PhIP 付加体を *XPC* KO 細胞、および

ERCC6 KI 細胞のゲノムに導入して調べたが、表 5 に示した通り野生株の突然変異誘発頻度よりも低い結果が得られた。この結果は、図 3 で示した *XPC* KO 細胞、および *ERCC6* KI 細胞の両方の変異体細胞が PhIP に対して感受性を示した結果と相反する。さらに、研究結果の 2 で述べたとおり、dG-C8-PhIP 付加体を含むターゲティングベクターの導入効率が、野生株と変異株で類似の値を示すことから、付加体が各細胞のゲノムに同じような効率で導入されていると考えられた。以上のことから、これら *XPC* と *ERCC6* の遺伝子が dG-C8-PhIP 付加体の DNA 修復に関与しておらず、NER 以外の DNA 修復機構が働いていること、あるいは TATAM 解析がバルキー付加体に適用できない可能性があることが予想できた。

dG-C8-PhIP 付加体の突然変異スペクトラムについては、主にグアニン→チミン、グアニン→アデニンの塩基置換が誘発されやすく、一塩基欠失や付加体部位周辺の塩基置換も誘発することが報告されている(Shibutani, S. *et al.*, *J. Bio. Chem.* 274, 27433-27438 (1999))。また、PhIP を投与させた動物の大腸や前立腺の DNA からグアニン→チミン、グアニン→アデニンの塩基置換の突然変異スペクトラムが得られている(Lynch, AM. *et al.*, *Mutagenesis* 13, 601-605 (1998), Yang, H. *et al.*, *Mutagenesis* 18, 195-200 (2003))。本研究においても、野生株 TSCER122 に dG-C8-PhIP 付加体を導入した時に、グアニン→アデニンの塩基置換を観察することができたが、高頻度には得られることはなかった(表 2)。

E. 結 論

TSCER122 細胞のゲノムに導入された dG-C8-PhIP 付加体は、その自然突然変異頻度(合計 1.7%)よりも約 3 倍高く塩基置換や大きな欠失(合計 5.6%)を誘発させることが分かった。これと同様の実験を *XPC*、*ERCC6* の改変細胞を用いて調べたが、dG-C8-PhIP 付加体の突然変異誘発頻度は、その自然突然変異頻度とほぼ同じであった。従って、これらの遺伝子が dG-C8-PhIP

付加体の DNA 修復に関与しておらず NER 以外の DNA 修復機構が働いていること，あるいは TATAM 解析がバルキー付加体に適用できない可能性があることが予想された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 中村真生，鵜飼明子，佐々彰，高部道仁，福田隆之，高村岳樹，本間正充，安井学；TK6 及び変異株を用いたヌクレオチド除去修復機構におけるゲノム全体修復と転写共役修復を区別する方法の開発．日本環境変異原学会第 46 回大会，東京（2017 年 11 月）

H. 知的所有権の取得状況

なし

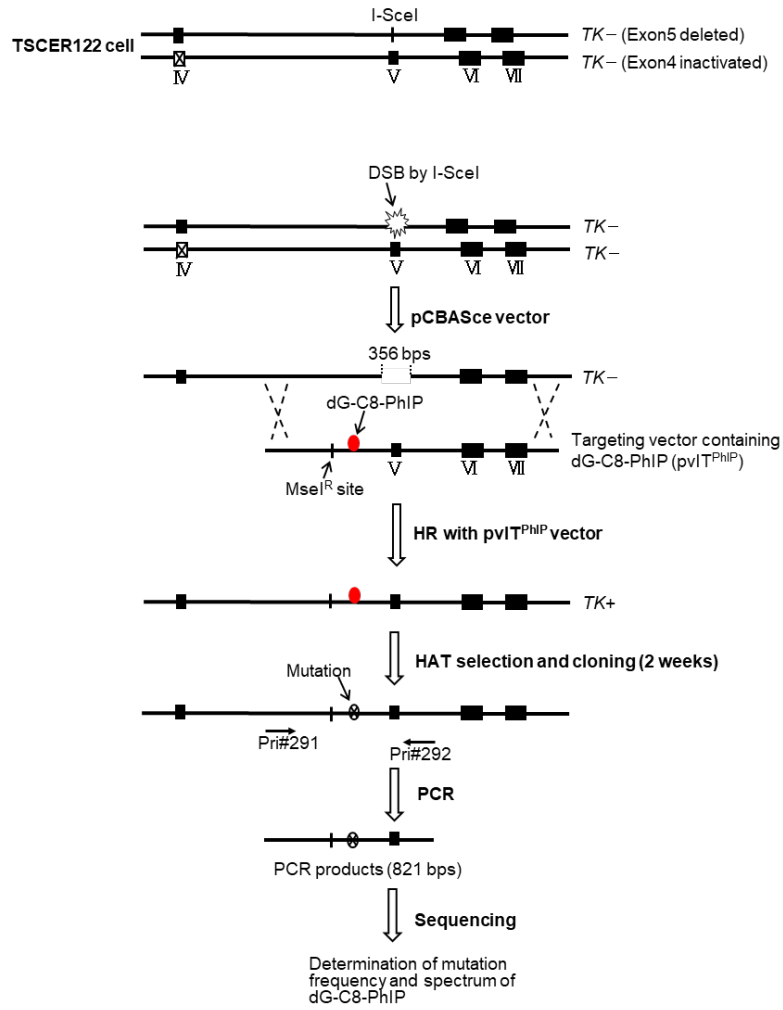


図 2 . TATAM 実験系の概要

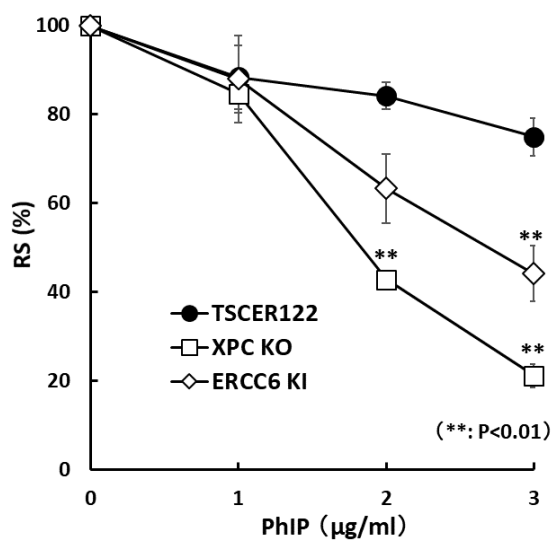


図 3 . S9 mix 存在下の PhIP に対する各細胞の相対細胞生存率

表2. dG-C8-PhIPをTSCER122細胞のゲノムに導入したTATAM解析

TSCER122(野生株)				元の配列CACGAG	判定
Exp.1	Exp.2	Subtotal			
Mutation	5	3	8	1. CACAGG	Non-targeted
No mutation	70	64	134	2. CACGCG	Non-targeted
ND	0	0	0	3. CTGAG	Non-targeted
Msel ^S	13	9	22	4. CAGAG	Non-targeted
Seq.ND	8	20	28	5. CACGAC	Non-targeted
total	96	96		6. CACGGG	Non-targeted
			Total analyzed	7. 導入部位を含むLarge deletion	Large Del
			Total targeted(Msel ^R)	8. 導入部位を含むLarge deletion	Large Del
			Targeted Freq(%)	Δ; One-base deletion	
MF(%)	6.7	4.5	Ave. MF(%)	5.6	

表3. dG-C8-PhIPをXPC KO細胞のゲノムに導入したTATAM解析

XPC KO				元の配列CACGAG	判定
Exp.1	Exp.2	Subtotal			
Mutation	2	2	4	1. CACAAG	Non-targeted
No mutation	83	82	165	2. CACGAA	Non-targeted
ND	0	0	0	3. CACGAG	Non-targeted
Msel ^S	8	9	17	4. CATGAG	targeted
Seq.ND	3	3	6	Δ; One-base deletion	
Total	96	96			
			Total analyzed	186	
			Total targeted(Msel ^R)	169	
			Targeted Freq(%)	90.9	
MF(%)	2.4	2.4	Ave. MF(%)	2.4	

表4. dG-C8-PhIPをERCC6 KI細胞のゲノムに導入したTATAM解析

ERCC6 KI				元の配列CACGAG	判定
Exp.1	Exp.2	Subtotal			
Mutation	0	1	1	1. CACCG	Non-targeted & Multi
No mutation	86	77	163	One-base deletionがあるがどこで起きたか不明	
ND	2	0	2		
Msel ^S	4	2	6		
Seq.ND	4	16	20		
Total	96	96			
			Total analyzed	172	
			Total targeted(Msel ^R)	166	
			Targeted Freq(%)	96.5	
MF(%)	0.0	1.3	Ave. MF(%)	0.6	

表5. dG-C8-PhIPを遺伝子破壊細胞のゲノムに導入したTATAM解析の比較

Mutation spectrum	TSCER122(野生株)		XPC KO		ERCC6 KI	
	Number	頻度 (%)	Number	頻度 (%)	Number	頻度 (%)
C G	0		0		0	
C T	0		1	0.6	0	
C A	0		0		0	
Large Del	2	1.4	0		0	
Targeted Multi	0		0		0	
Non-targeted & Multi	0		0		1	0.6
Non-targeted	6	4.2	3	1.8	0	
No mutation	134	94.4	165	97.6	163	98.2
ND	0	0.0	0	0.0	2	1.2
Total targeted (MseI ^R)	142	100	169	100	166	100