

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

遺伝毒性のAOP開発

研究分担者 堀端 克良

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部 室長

研究要旨

発がん性（遺伝毒性）の AOP への組み込みを想定し、遺伝毒性初期応答反応の早期検出システムの構築を試みた。遺伝毒性初期応答反応の検出にはクロマチン免疫沈降法（Chromatin immunoprecipitation; ChIP）を応用し、定量的 PCR を用いた DNA 損傷応答の分子生物学的解析を実施した。昨年度に実施した RPA194、 γ H2AX、または Ku80 を ChIP の標的タンパク質とした解析結果から、本手法が DNA 上で直接的に生じている DNA 損傷応答を定量・定性的かつ早期に検出できることが示されており、加えて、今年度は LIG4 を ChIP の標的タンパク質とした解析を行った。また、ChIP に適用できる抗体にはポリクローナル抗体の市販品が多いが、将来性を見据え、市販のモノクローナル抗体を用いた ChIP の適用性を検証した。これらの結果から、LIG4 は DNA 損傷依存的に RPA194、 γ H2AX、または Ku80 の局在と類似した DNA 上の分布を示すことを明らかにした。また、DNA 損傷応答に関わるタンパク質の内、6 種の市販モノクローナル抗体の適用性を確認した結果、全てが不適合であることが明らかになった。

A. 研究目的

化学物質の生体曝露から遺伝毒性発現（遺伝毒性 AOP）に至る流れを全体的に捉えると、図 1 で示す経路で示すことができる。すなわち、化学物質に曝露後、場合によっては代謝を経たのちに DNA 上に付加体や DNA 損傷が形成される。それに対し、DNA 修復や DNA 複製などの損傷応答を経由することで、最終的に突然変異、DNA 鎖切断または染色体異常といったエンドポイントとしての遺伝毒性が発現する。したがって、遺伝毒性の発現結果そのものを検出する従来の一般的な遺伝毒性試験法では、結果を得るためにこれらの遺伝毒性発現サイクルが完了するまでの時間を要する。言い換えれば、バクテリアを用いる試

験では遺伝毒性発現サイクルが短いために短期間で試験が終了するが、トランスジェニック変異試験のような試験ではより長い期間を要する。

その一方で、これらの遺伝毒性発現の基本的な概念は、バクテリア、培養細胞、高等生物で普遍的であり、また一般的に曝露から損傷応答反応が生じる期間は遺伝毒性発現期間と比べて非常に短時間である。すなわち、この流れをタイミングよく効率的に捉えることで化学物質の遺伝毒性を短期間で検出することができる。そのためには特に、DNA 付加体や DNA 損傷そのものはそれ自体が最終的に遺伝毒性に結びつかないことがあるため、遺伝毒性に直接結びつく細胞内の応答反応を直接捉える

必要がある。以上を踏まえ、本研究では、発がん性の AOP への組み込みを想定し、遺伝毒性初期応答反応の早期検出システムを構築することを研究目的とする。

B. 研究方法

遺伝毒性初期応答反応の早期検出システムを構築するため、クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP) および定量的 PCR を用いた DNA 損傷応答の分子生物学的解析を実施した。なお、一般的なコーディング DNA 領域と比べて、リボソーム DNA (ribosomal DNA; rDNA) は 1 細胞あたりヒトでは数百コピーから成るクラスターを形成しており、また、DNA 代謝反応である転写のメカニズムについての知見も豊富であることから、rDNA を ChIP および定量的 PCR を利用した DNA 損傷応答解析の標的領域としている。

DNA 損傷の定量化が可能な紫外線 DNA 損傷を誘導した Flp-In 293 細胞を用いて、DNA 二本鎖切断修復の非相同末端結合経路中において二本鎖切断を結合する ATP 依存性 DNA リガーゼとして知られる LIG4 を標的としたポリクローナル抗体を用いた ChIP を実施し、LIG4 が局在する DNA 画分を調製した。加えて、ポリクローナル抗体は市販の在庫量に限りがあるため、将来にわたる利用可能性を見据え、モノクローナル抗体を用いた ChIP の適用性を検証した。モノクローナル抗体は、昨年ポリクローナル抗体で標的とした RPA194、 γ H2AX を認識するモノクローナル抗体に加えて、DNA 損傷応答や DNA 修復に関与することが知られる REV1、CSB、XPA、MSH2 および LIG4 を標的とするモノクローナル抗体をそれぞれ使用した。

これらの抗体を用いて ChIP により得られた DNA 画分を鋳型 DNA とし、rDNA unit

を転写領域および非転写領域を含む領域に分けてそれらを標的とした 9 つのプライマーセット (H1~H42.9、図 2A) を用いた定量的 PCR により、DNA 損傷誘導時における各標的タンパク質の rDNA 上での位置的相対量変化を解析することで、DNA 上で直接的に生じている DNA 損傷応答の定量・定性的検出を実施した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

遺伝毒性初期応答反応の早期検出システム構築に用いた rDNA unit 上のプライマーセット H1~H42.9 の内、H1~H13 は転写領域、H18~H42.9 は非転写領域を検出することができる。DNA 損傷を誘発しない条件において、ポリクローナル LIG4 抗体の共沈 DNA 中には rDNA unit 全領域の H1~H42.9 が均一に存在しているが、紫外線 DNA 損傷誘発時におけるポリクローナル LIG4 抗体の LIG4 共沈 DNA 中には H1~H42 がさらに多く存在し、その中でも特に H18 および H27 の DNA 領域が多く存在することが示された (図 2B)。

モノクローナル抗体 (RPA194、 γ H2AX、REV1、CSB、XPA、MSH2 および LIG4) を用いた ChIP については、全ての抗体共沈物中から DNA を検出することができず、また、定量的 PCR においても全く DNA が検出されなかった。

D. 考察

ポリクローナル LIG4 抗体を用いた ChIP および rDNA unit 領域の定量的 PCR の結果から、LIG4 は通常時には rDNA 領域に満遍なく存在している一方で、DNA 損傷誘導時には rDNA の非転写領域の上流

H18 および H27 に偏って局在することが示された。昨年度に実施した γ H2AX および Ku80 の ChIP 解析結果から、 γ H2AX および Ku80 は通常時には rDNA 領域にはわずかにしか存在せず、DNA 損傷誘導時に強く rDNA 領域に局在すること、特に、これらの局在は rDNA の非転写領域の上流 H18 および H27 に偏っており、この DNA 領域において γ H2AX および Ku80 が修復に関わるような DNA 損傷である DNA 鎖切断が生じていることを示唆する結果を得ている (図 2C と D)。LIG4 は DNA 二本鎖切断を結合することが知られており、今回の結果との高い相関性が明らかになった。

モノクローナル抗体を用いた ChIP では共沈 DNA そのものが得られなかった。これらの結果は、これらのモノクローナル抗体が ChIP に全く不適であることを示している。これらの抗体は全て特定の企業が販売しているものであり、ポリクローナル抗体の在庫量に限りがある問題を踏まえると、ChIP に最適なモノクローナル抗体を得るため、他社のモノクローナル抗体を用いた再解析が必要であると考ええる。

E. 結論

発がん性の AOP への組み込みを想定した遺伝毒性初期応答反応の早期検出システム構築の研究では、RPA194、 γ H2AX、Ku80 および LIG4 を標的とした ChIP および rDNA 領域の定量的 PCR を利用した DNA 損傷応答の解析結果から、本手法が DNA 上で直接的に生じている DNA 損傷応答を定量・定性的かつ早期に検出できることが示された。また、ChIP に用いる抗体をアレンジすることで解析の標的タンパク質を自在に設定することができるため、汎用性が高く、この試験法の発がん性・遺伝毒性 AOP 開発に対する高い有効性を示す

ことができると考えられる一方で、ポリクローナル抗体の在庫量に限りがある問題を踏まえると、ChIP に最適なモノクローナル抗体を探索して見つけ出すのは必須である。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Grúz P, Yasui M, Ukai A, Horibata K, Honma M, Sugiyama KI. Potent mutagenicity of an azide, 3-azido-1,2-propanediol, in human TK6 cells. *Mutation Research* 876–877, 50347531, 2022
2. Iso T, Natsume M, Murata Y, Shigeta Y, Hirose N, Umano T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama KI, Matsumoto M, Hirose A. Absence of *in vivo* mutagenicity of 4,4'-oxybis(benzenesulfonohydrazide) in liver and glandular stomach of MutaTM Mouse. *Fundamental Toxicological Sciences* 9(2), 31-36, 2022
3. Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K. Genotoxicity assessment of food-flavoring chemicals used in Japan. *Toxicology Reports* 9, 1008-1012, 2022
4. Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S. In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. *Genes and Environment* 44, 24, 2022
5. Murata Y, Natsume M, Takako I, Shigeta Y, Hirose N, Umano T, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K, Hirose A, Matsumoto M: In vivo mutagenicity assessment of styrene in MutaMouse liver and lung. *Genes and Environment*. in press, 2023

F-2 学会発表

1. 磯貴子, 村田康允, 重田善之, 広瀬望, 馬野高昭, 堀端克良, 増村健一, 杉山圭一, 松本真理子, 広瀬明彦. Evaluation of the in vivo mutagenicity of Carbendazim. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30. 札幌)
2. 村田康允, 磯貴子, 重田義之, 広瀬望, 馬野高昭, 堀端克良, 増村健一, 杉山圭一, 松本真理子, 広瀬明彦. The gene mutation test of styrene using the transgenic mouse. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30. 札幌)
3. Horibata K, Sugiyama KI. Detection of Genotoxic Reactions Through Directly Analyzing DNA Damage Responses on Chromatin Fraction. 13th International Conference on Environmental Mutagens and 53rd Annual Meeting of The Environmental Mutagenesis and Genomics Society (2022.8.27. Ottawa, Canada)
4. Gruz P, Yasui M, Ukai A, Horibata K, Honma M, Sugiyama KI. Potent mutagenicity of azidoglycerol in human TK6 cells. 7th Asian Conference on Environmental Mutagens and the 19th Conference of Chinese Environmental Mutagen Society (2022.11.5. Qingdao, China & On line)
5. 堀端克良, 木本崇文. Pig-a アッセイ. 哺乳動物試験研究会 第 81 回定例会 (2022.11.14. 広島)
6. 堀端克良, 杉山圭一. クロマチン分画上の DNA 損傷応答解析による遺伝毒性反応の検出. 日本環境変異原ゲノム学会第 51 回大会 (2022.11.15. 広島)

7. グルーズ ピーター, 清水雅富, 台蔵彩子, 川田憲一, 山田雅巳, 本間正充, 堀端克良, 杉山圭一. Dietary lipids as a source of etheno-DNA damage. 日本環境変異原ゲノム学会第 51 回大会 (2022.11.15. 広島)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

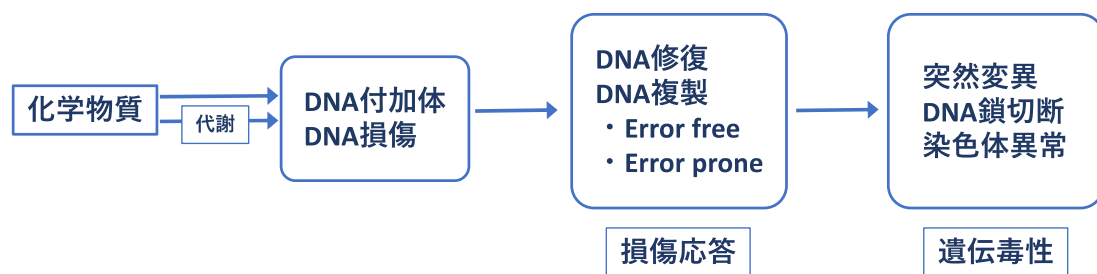
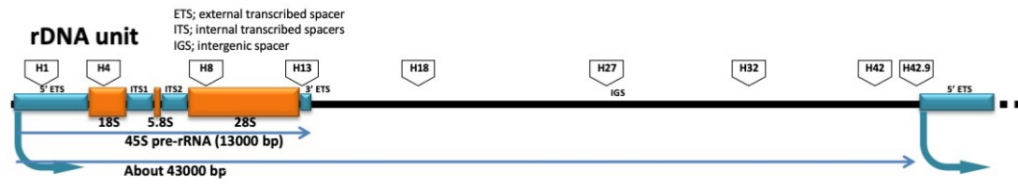


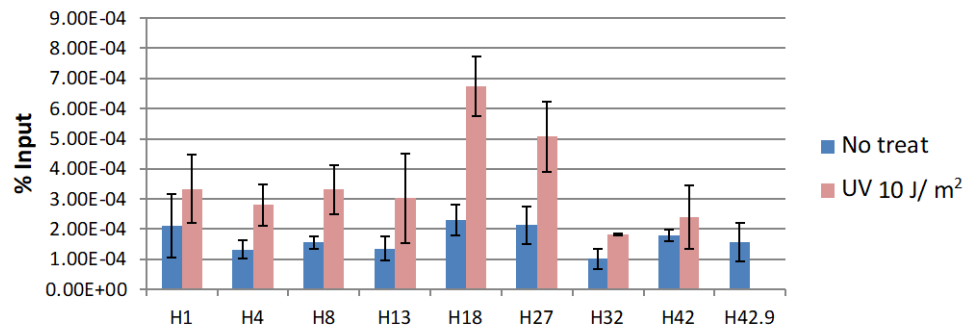
図 1. 化学物質の曝露から遺伝毒性発現まで

A



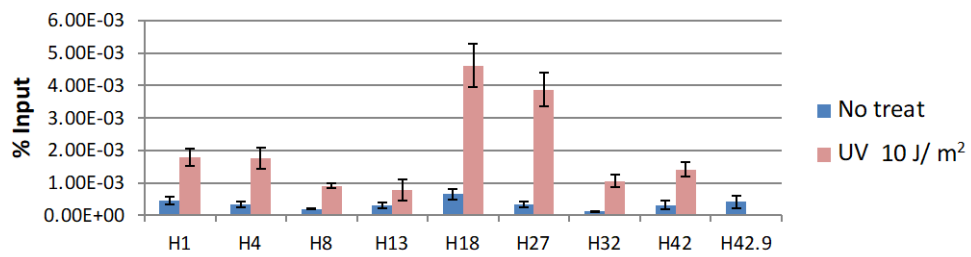
B

DNA Ligase IV



C

H2A.X



D

Ku80

