

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5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。昨年度までに実施した RPA194、 γ H2AX、Ku80 および LIG4 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いる。一方で、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 の適用性を検証する必要がある。これらを踏まえて、今年度は γ H2AX、ATM、MRE11 および BRCA1 に対するモノクローナル抗体を用いた ChIP 解析を実施した。その結果、ここで使用したモノクローナル抗 γ H2AX 抗体による結果はポリクローナル抗 γ H2AX 抗体の結果と同様になること、そして、ATM は γ H2AX、Ku80 および LIG4 と類似した DNA 上の分布を示すことを明らかにした。また、今回の実験条件では MRE11 と BRCA1 は通常時は rDNA 上にあるが、紫外線照射後に DNA から解離することを明らかにした。

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たと、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身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した。

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。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、加えて、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た。また、これまでは在庫が限られるポリクローナル抗体を使用していたが、将来的な試験系の維持を見据え、モノクローナル抗体を検討した。

各 DNA 修復および DNA 損傷応答タンパク質を認識する市販の 21 種類のモノクローナル抗体を入手し、これらを用いて紫外線 DNA 損傷を誘導した Flp-In 293 細胞での ChIP を実施し、各抗体の DNA 沈降量を調査し、ChIP に適用可能なモノクローナル抗体として、抗 γ H2AX 抗体、抗 ATM 抗体、抗 MRE11 抗体および抗 BRCA1 抗体に絞りこんだ。その後、これらの抗体を用いて、 γ H2AX、ATM、MRE11 および BRCA1 が局在する DNA 画分を調製した。この

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 8 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これらのタンパク質の 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・定性的検出を試みた。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

抗 γ H2AX 抗体を用いた ChIP により共沈する rDNA 比率 (%Input) は紫外線照射により増大した (図 2B)。特に、H18 および H27 の DNA 領域で高い %Input 値を示した。同様に、抗 ATM 抗体で共沈する rDNA の %Input 値は紫外線照射により増大し、特に、H18 および H27 の DNA 領域が高い %Input 値を示した (図 2C)。一方で、抗 MRE11 抗体および抗 BRCA1 抗体で共沈する rDNA の %Input 値については、紫外線の照射と未照射に関わらず rDNA 上の局在に大きな差は見られなかったが、紫外線照射により rDNA 上で全体的に %Input 値が顕著に減少した (図 3A および B)。

D. 考察

モノクローナル抗体を用いた γ H2AX を標的とした ChIP および rDNA unit 領域の定量的 PCR の結果から、以前のポリクローナル抗 γ H2AX 抗体で得られた結果と同様に、モノクローナル抗 γ H2AX 抗体においても γ H2AX は紫外線 DNA 損傷誘導時には rDNA の非転写領域の上流 H18 および H27 に偏って局在変化することが明らかになり、同じタンパク質を標的とする異なる

抗体を用いても再現性が得られることが示された。また、ATMについては紫外線照射により特に H18 および H27 に局在が偏ることを明らかにした。ATM は H2AX のリン酸化に関与することが知られており、紫外線照射後の H18 および H27 への γ H2AX と ATM の局在はそれらの機能的にも非常に相関性が高い。また昨年度までに二本鎖 DNA 切断の修復に関わる Ku80 や LIG4 も紫外線照射により H18 および H27 へ局在することを明らかにしており、これらの結果は二本鎖 DNA 切断に対する DNA 損傷応答が特にこの領域で起こっていることを示唆する。

今回の結果から、MRE11 と BRCA1 は通常時は rDNA 領域上に存在するが、紫外線照射後に DNA 領域上から解離することが明らかになった。MRE11 は二本鎖 DNA 切断修復に関与することが知られているものの、同じく二本鎖 DNA 切断修復に関与する ATM、 γ H2AX、Ku80 および LIG4 で見られた rDNA 上の特異的な局在変化との相関は見られなかった。今回の結果からはその原因は不明ではあるが、MRE11 が構成する MRN 複合体は BRCA1 と複合体を形成することが知られており、BRCA1 も紫外線照射後に DNA 領域上から解離することからも、今回の結果は、MRE11 と BRCA1 については、ATM、 γ H2AX、Ku80 および LIG4 が関与する rDNA 上での DNA 損傷応答とは別の、例えばゲノム全体での DNA 損傷応答等に関与した結果であるのかもしれない。

E. 健康危険情報

特になし

F. 結論

これまでのポリクローナル抗体を用いた RPA194、 γ H2AX、Ku80 および LIG4 を標的とした解析と、今回のモノクローナル抗体を用いた ATM および γ H2AX を標的とした解析結果から、ChIP および rDNA 領域の定量的 PCR を利用した DNA 損傷応答の解析手法により 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、MRE11 と BRCA1 の DNA 損傷応答反応は上記のタンパク質群とは異なる挙動を示すことを明らかにした。これらを踏まえると、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。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Murata Y, Natsume M, Takako I, Shigeta Y, Hirose N, Umamo 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*. 45:12, 2023
2. Murata Y, Suzuki K, Shigeta Y, Iso T, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Sugiyama KI, Hirose A, Masumura K, Matsumoto M. In vivo mutagenicity assessment of orally treated tert-butyl hydroperoxide in the liver and glandular stomach of MutaMouse. *Genes and Environment*. 45:29, 2023
3. Iso T, Suzuki K, Murata Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Sugiyama KI, Hirose A, Masumura K, Matsumoto M. Lack of in

- vivo mutagenicity of carbendazim in the liver and glandular stomach of MutaMice. *Genes and Environment*. 46:7, 2024
4. Beal MA, Chen G, Dearfield KL, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Long AS, Lovell D, Parsons BL, Pfuhrer SP, Wills J, Zeller A, Johnson G, White PA. Interpretation of In Vitro Concentration-Response Data for Risk Assessment and Regulatory Decision-making: Report from 2022 IWGT Quantitative Analysis Expert Working Group Meeting. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. Version of Record online: 01 February 2024
 5. Parsons BL, Beal MA, Dearfield KL, Douglas GR, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Kenyon M, Long AS, Lovell D, Lynch AM, Myers MB, Pfuhrer S, Vespa A, Zeller A, Johnson G, White PA. Severity of Effect Considerations Regarding the Use of Mutation as a Toxicological Endpoint for Risk Assessment: A Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Environmental and Molecular Mutagenesis*. in press
- G-2 学会発表
1. Beal BA, Chen G, Dearfield KL, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, K. Horibata K, Long AS, Lovell D, Parsons BL, Pfuhrer S, Wills J, Zeller A, Johnson G, White PA. The interpretation of in vitro dose-response data for risk assessment and regulatory decision-making. 51st European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EEMGS) & 27th Spanish Environmental Mutagenesis and Genomics Society (SEMA) meeting (2023.5.15. Málaga, Spain)
 2. 堀端克良. Quantitative analysis of genotoxicity data. 哺乳動物試験研究会第82回定例会 (2023.6.9. 東京)
 3. 磯貴子, 村田康允, 広瀬望, 馬野高昭, 重田善之, 長谷川彩由香, 堀端克良, 六鹿元雄, 杉山圭一, 広瀬明彦, 増村健一, 松本真理子. Evaluation of the in vivo mutagenicity of azodicarbonamide. 第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19. 横浜)
 4. 村田康允, 重田義之, 磯貴子, 馬野高昭, 広瀬望, 長谷川彩由香, 堀端克良, 杉山圭一, 広瀬明彦, 増村健一, 松本真理子. In vivo mutagenicity assessment of orally treated tert-butyl hydroperoxide in Muta Mouse liver and glandular stomach. 第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19. 横浜)
 5. Murata Y, Matsumoto M, Iso T, Shigeta Y, Hasegawa S, Umamo T, Hirose N, Horibata K, Sugiyama KI, Inoue K, Hirose A, Masumura K. In vivo mutagenicity assessment and derivation of reference dose of styrene. EUROTOX 2023 (2023.9.10. Ljubljana, Slovenia)
 6. Horibata K, Sugiyama KI. Detection of genotoxic reactions through direct analysis of DNA damage responses on chromatin fraction. 第82回日本癌学会学術総会 (2023.9.21. 横浜)
 7. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一. クロマチン分画でのDNA損傷応答解析による遺伝毒性反応の検出. 日本放射線影響学会第66回大会 (2023.11.7. 東京)
 8. 堀端克良. 遺伝毒性のプラクティカルな評価方法と適用性. 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会 (2023.11.11. 福岡)
 9. 佐々木沙耶, 杉山圭一, 堀端克良. クロマチン分画上のDNA損傷応答解析によ

- るアルキル化剤誘発遺伝毒性反応の検出. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 (2023.11.12. 福岡)
10. グルーズピーター, 山田雅巳, 本間正充, 堀端克良, 杉山圭一. Construction of new Ames tester strain deficient in the AlkB demethylase. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 (2023.11.12. 福岡)
11. 三浦康義, 松村一史, 福島俊朗, 杉山圭一, 堀端克良, 加藤雅之, 菅野拓也, 羽倉昌志. BMS 共同研究, 弱変異原性物質に対する感受性の比較 ; TA97,TA97a vs TA1537 及び WP2uvrA/pKM101 vs WP2uvrA. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 (2023.11.12. 福岡)
12. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一. Detection of genotoxic reactions by directly analyzing DNA damage responses on chromatin fraction. 日本薬学会第 144 年会 (2024.3.30. 横浜)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
- H-1. 特許取得
なし
- H-2. 実用新案登録
なし
- H-3. その他
なし

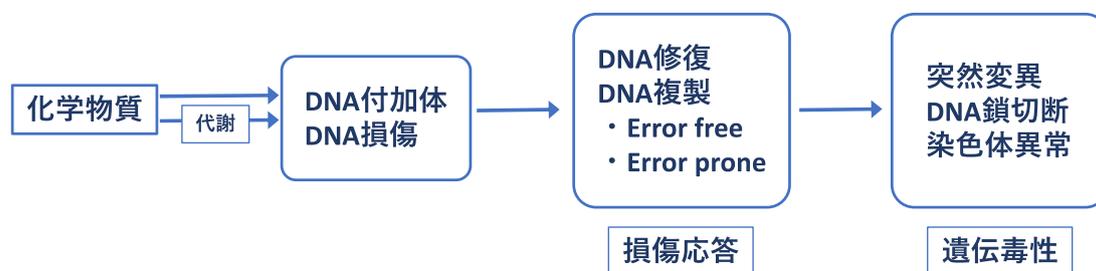


図 1. 化学物質の曝露から遺伝毒性発現まで

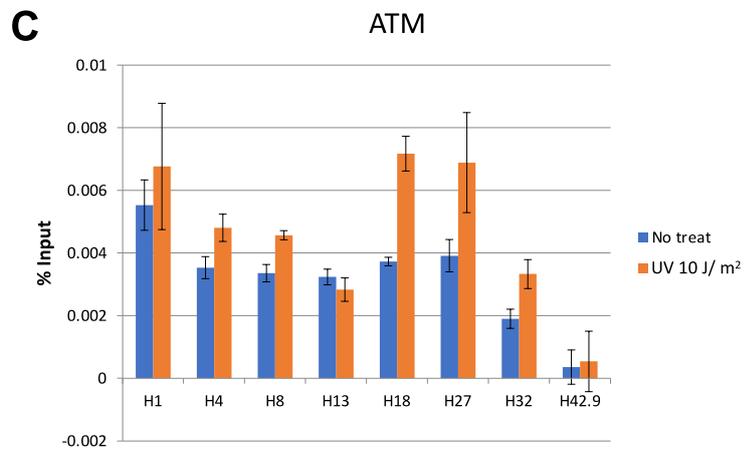
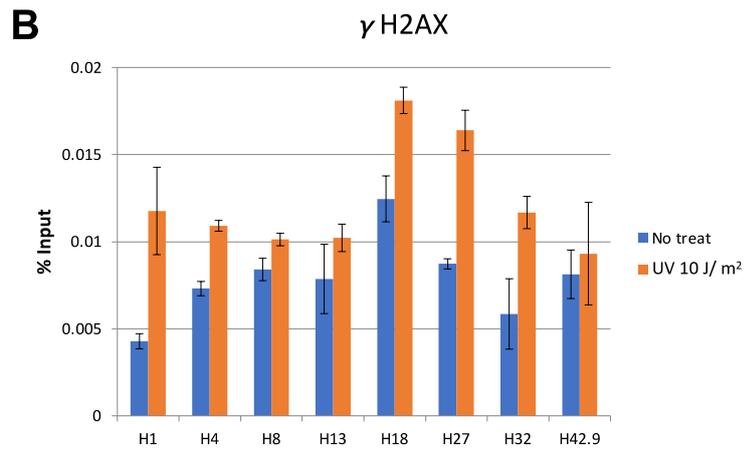
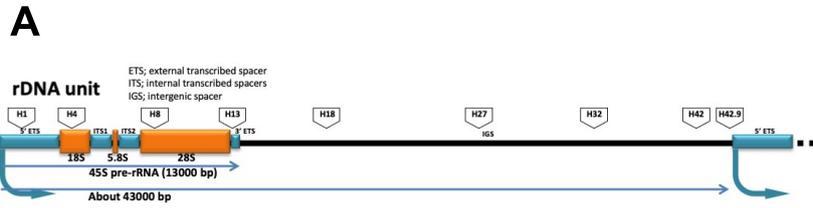


図2. モノクローナル抗 γ H2AX 抗体および抗ATM抗体を用いたクロマチン免疫沈降法によるDNA損傷応答解析

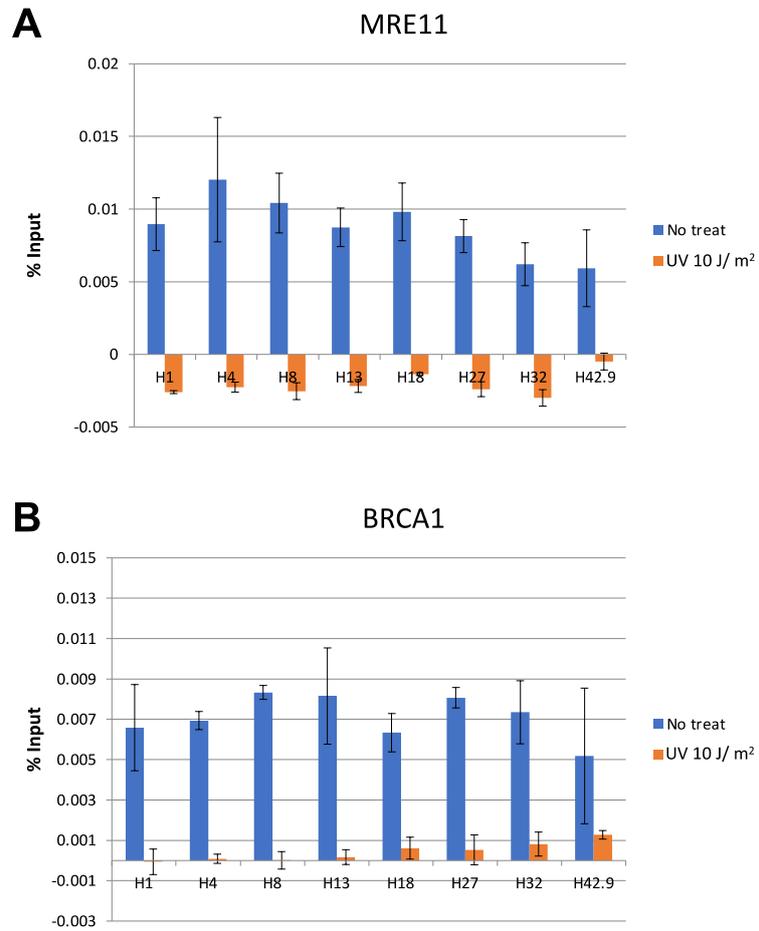


図3. モノクローナル抗MRE11抗体および抗BRCA1抗体を用いたクロマチン免疫沈降法によるDNA損傷応答解析