

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：32606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14953

研究課題名(和文) 哺乳類のDNA損傷応答因子欠損細胞を用いた迅速かつ高感度な遺伝毒性検出法の研究

研究課題名(英文) Study on rapid and hypersensitive screening of chemical genotoxin using mammalian cells defective for DNA damage-response factors

研究代表者

花岡 文雄 (HANAOKA, Fumio)

学習院大学・理学部・研究員

研究者番号：50012670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類のDNA損傷応答因子欠損細胞を用いて、化学物質の遺伝毒性を迅速、簡便かつ高感度に検出する試験法の確立を目指し、損傷乗り越え合成(translesion synthesis: TLS)型DNAポリメラーゼ(Pol  $\eta$ 、Pol  $\iota$ 、Pol  $\kappa$ )三重欠損マウスより作出した胚性線維芽細胞(MEF)を用いて、被験物質に対する生存率を野生型マウス由来のMEFと比較した。その結果、本手法が様々な化学物質の哺乳類細胞に対する遺伝毒性の評価に役立つことが判明した。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a rapid, simple and hypersensitive method of screening various genotoxic compounds for mammalian cells, we compared sensitivities to various compounds among mouse embryonic fibroblasts derived from wild-type (WT) and knock-out mice lacking one of three Y-family TLS DNA polymerases (Pol  $\eta$ , Pol  $\iota$ , and Pol  $\kappa$ ) or all of them (TKO). We found that TKO cells exhibited the highest sensitivities to most of the tested genotoxins, but not to the non-genotoxins. Furthermore, we found that ratios of half-maximal inhibitory concentration of WT and TKO cells would be nice markers to quantitatively evaluate the hypersensitivity of TKO cells to different chemicals.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム DNA損傷 損傷乗り越え合成 損傷応答 遺伝毒性 スクリーニング系 マウス胚性線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

発がん性は、化学物質の慢性曝露による影響の中でも特に懸念すべきハザードである。化学発がんには、化学物質が直接遺伝子 DNA を傷害することによる遺伝毒性と、増殖刺激作用などによる非遺伝毒性という二つの機序が存在するが、遺伝毒性については閾値がないとの前提でリスク評価がなされるため、慢性曝露のリスクを考慮する上で、遺伝毒性の有無を判定することは重要な意味を持つ。

遺伝毒性試験としては、現在、エームズ試験に代表される突然変異誘発試験、哺乳類細胞を用いる小核試験や姉妹染色分体交換試験・染色体異常試験、そして DNA 損傷性に基づくコメットアッセイ、不定期 DNA 合成アッセイなどの「*in vitro* 試験」、トランスジェニック動物を用いる突然変異試験や精原細胞を用いる染色体異常試験などの「*in vivo* 試験」が主に用いられている。これらの遺伝毒性試験ではゲノム上の変異や染色体異常を検出する方法が主に用いられているが、細胞が変異原に曝されても突然変異や染色体異常が生じる確率は低く、半数以上の細胞が死滅するような条件でも生じる変異の頻度は  $10^{-6} \sim 10^{-4}$  程度であることが多い。すなわち、1つの変異や染色体異常が生じるまでにははるかに多くの DNA 損傷が生じ、それらを修復しきれなかった結果として死んでいく細胞の中でごく一部の細胞に突然変異や異常染色体が生じたものを検出していると考えられる。

遺伝情報を担う DNA の損傷は転写や複製といった細胞の生存と増殖に必須な代謝活動を阻害し、個体レベルではがん化・老化を引き起こす原因となるため、大腸菌からヒトに至るまで、あらゆる生物は DNA の損傷から遺伝情報を守るための機構を備えている。細胞が DNA 損傷を検知すると細胞周期チェックポイントが活性化して細胞周期が停止し、様々な DNA 修復機構によって損傷の除去を試みる。しかしすべての損傷が効率よく除去されるわけではなく、細胞が DNA 損傷を有したまま S 期 (DNA 複製期) に進行してしまい、鋳型鎖上の損傷が複製装置の進行を阻害してしまう。そこで鋳型鎖上に損傷があっても複製を完了できる複製後修復 (post-replication repair: PRR) の機構が存在する。PRR には相同組換え等により損傷のない相補鎖を鋳型として用いる経路と、特殊な DNA ポリメラーゼにより損傷を乗り越えて複製を継続する経路が存在し、後者は損傷乗り越え合成 (TLS) と呼ばれている。これらの機構が破綻すると、細胞は変異原に対して極めて脆弱となり、それは一義的に変異原に対する感受性の亢進という表現型で現れる。哺乳類細胞では、相同的組換え活性が低いため、PRR は主に TLS によって行われる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、上記のようなこれまでの

遺伝毒性試験の欠点を補う迅速かつ簡易な高感度検出法の確立を目指す。そのためには非常に稀な現象を捉えるのではなく、細胞集団の多数で起きる現象を検出する。具体的には変異原に対して極めて高い感受性を示す TLS ポリメラーゼ (Pol<sub>I</sub>、Pol<sub>II</sub>、Pol<sub>III</sub>) 三重欠損マウスより作出した胚性線維芽細胞 (MEF) を用いて、細胞生存率を指標とする。

## 3. 研究の方法

実験条件の最適化と化合物の濃度設定方法を検討するため、エームズ試験、小核試験、染色体異常試験等により遺伝毒性物質であることが明らかで、かつ代謝活性化を必要としない化合物 (メタンスルホン酸メチル、シスプラチン等) と、それらの試験で陰性であり、非遺伝毒性物質とされる化合物 (NaCl、エタノール、クロロホルム等) に対する野生型 (WT) 細胞と Pol<sub>I</sub>/Pol<sub>II</sub>/Pol<sub>III</sub> 三重欠損 (triple knockout、以下 TKO) 細胞の感受性を、ミトコンドリア活性を指標とする MTS アッセイにより測定する。

## 4. 研究成果

アルキル化剤であるメタンスルホン酸メチル、DNA 架橋剤であるマイトマイシン C およびシスプラチン、酸化剤である臭素酸カリウム、一本鎖切断を誘発するカンプトテシンなどといった様々な作用機序の遺伝毒性物質に対する WT 細胞と Pol<sub>I</sub>、Pol<sub>II</sub>、Pol<sub>III</sub> それぞれの単独欠損細胞、および TKO 細胞の感受性を比較したところ、いずれの化合物に対しても TKO 細胞は最も高い感受性を示した。

そこで上記の化合物に加え遺伝毒性の有無が既知の医薬品、食品添加物、または環境・食品汚染物質に対する WT 細胞と TKO 細胞の感受性の比 (IC<sub>50</sub>WT/IC<sub>50</sub>TKO) を測定したところ、11 種類中 10 種類の遺伝毒性物質で TKO 細胞は WT 細胞に比べて有意に高い感受性を示し、IC<sub>50</sub>WT/IC<sub>50</sub>TKO が 2.0 以上を判定基準とした場合の感度は 90.9%であった。一方で、塩化アンモニウムなど 6 種類の非遺伝毒性物質に対して TKO 細胞は WT 細胞と同程度の感受性を示し、IC<sub>50</sub>WT/IC<sub>50</sub>TKO はいずれも 2.0 以下であった。またメタンスルホン酸メチルで処理した TKO 細胞ではユビキチン化 PCNA および  $\gamma$ -H2AX の蓄積が WT 細胞より亢進していたが、塩化アンモニウム処理ではいずれの細胞でもそれらの蓄積は見られなかった。これらの結果から TKO 細胞は様々な機序の遺伝毒性物質に高感受性を示し、新規遺伝毒性スクリーニング系に有用であると考えられる。

次に代謝活性化を必要とする遺伝毒性物質であるシクロフォスファミド (CP) およびベンゾ[a]ピレン (BaP) に対する感受性を比較したところ、TKO 細胞は CP に対してラット肝ミクロソーム画分 (S9 mix) 存在下で WT 細胞に比べて 3.3 倍高い感受性を示し、S9

mix 非存在下ではどちらの細胞も全く感受性を示さなかった。一方で BaP に対しては、WT 細胞は CP の場合と同様に S9 mix 存在下でのみ感受性を示したのに対し、TKO 細胞は S9 mix 存在下よりも非存在下でさらに高い感受性を示した。そこでどの TLS ポリメラーゼの欠損が非代謝 BaP に対する感受性に寄与しているか調べたところ、Pol 欠損および Pol 欠損細胞で非代謝 BaP に対する高感受性が見られた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

1. Yasuda T., Kagawa W., Ogi T., Kato T., Suzuki T., Dohmae N., Takizawa K., Nakazawa Y., Genet M. D., Saotome M., Hama M., Konishi T., Nakajima N., Hazawa M., Tomita M., Koike M., Noshiro K., Tomiyama K., Obara C., Gotoh T., Ui A., Fujimori A., Nakayama F., Hanaoka F., Sugasawa K., Okayasu R., Jeggo P A., Tajima K. (2018) Novel function of HATs and HDACs in homologous recombination through acetylation of human RAD52 at double-strand break sites. **PLoS Genetics** 14, e1007277. doi: 10.1371/journal.pgen.1007277
2. Akagi J., Yokoi M., Cho Y. M., Toyoda T., Ohmori H., Hanaoka F., Ogawa K. (2018) Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases  $\delta$  and  $\epsilon$  to various genotoxic compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening. **DNA Repair** 61, 76-85. doi: 10.1016/j.dnarep.2017.11.006
3. Izumi M., Mizuno T., Yanagi K., Sugimura K., Okumura K., Imamoto N., Abe T., Hanaoka F. (2017) The Mcm2-7-interacting domain of human mini-chromosome maintenance 10 (Mcm10) protein is important for stable chromatin association and origin firing. **J. Biol. Chem.** 292, 13008-13021. doi: 10.1074/jbc.M117.779371
4. Yokoi M., Hanaoka F. (2017) Two mammalian homologs of yeast Rad23, HR23A and HR23B, as multifunctional proteins. **Gene** 597, 1-9. doi: 10.1016/j.gene.2016.10.027
5. Takahashi S., Motooka S., Kawasaki S., Kurita H., Mizuno T., Matsuura SI., Hanaoka F., Mizuno A., Oshige M., Katsura S. (2017) Direct single-molecule observations of DNA unwinding by SV40 large tumor antigen under a negative DNA supercoil state. **J. Biol. Struct. Dyn.** 5, 1-13. doi: 10.1080/07391102.2016.1269689
6. Kino K., Sugasawa K., Miyazawa H., Hanaoka F. (2016) 2,2,4-Triamino-5(2H)-oxazolone is a weak substrate for nucleotide excision repair. **J. Pharm. Negative Results** 7, 42-45. doi: 10.4103/0976-9234.177068
7. Kanao R., Yokoi M., Ohkumo T., Sakurai Y., Dotsu K., Kura S., Nakatsu Y., Tsuzuki T., Masutani C., Hanaoka F. (2015) UV-induced mutations in epidermal cells of mice defective in DNA polymerase  $\delta$  and/or  $\epsilon$ . **DNA Repair (Amst)** 29, 139-146. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.006.
8. Akita M., Tak YS., Shimura T., Matsumoto S., Okuda-Shimizu Y., Shimizu Y., Nishi R., Saitoh H., Iwai S., Mori T., Ikura T., Sakai W., Hanaoka F., Sugasawa K. (2015) SUMOylation of xeroderma pigmentosum group C protein regulates DNA damage recognition during nucleotide excision repair. **Sci. Rep.** 5, 10984. doi: 10.1038/srep10984
9. Uchiyama M., Terunuma J., Hanaoka F. (2015) The protein level of Rev1, a TLS polymerase in fission yeast, is strictly regulated during the cell cycle and after DNA damage. **PLoS One** 10, e0130000. doi: 10.1371/journal.pone.0130000
10. Masuda Y., Kanao R., Kaji K., Ohmori H., Hanaoka F., Masutani C. (2015) Different types of interaction between PCNA and PIP boxes contribute to distinct cellular functions of Y-family DNA polymerases. **Nucleic Acids Res.** 43, 7898-7910. doi: 10.1093/nar/gkv712
11. Kashiwaba S., Kanao R., Masuda Y., Kusumoto-Matsuo R., Hanaoka F., Masutani C. (2015) USP7 is a suppressor of PCNA ubiquitination and oxidative-stress-induced mutagenesis in human cells. **Cell Rep.** 13, 2072-2080. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.014

[学会発表](計 12 件)

1. Hanaoka F. My CV: From our studies on XP-C to XP-V. 6th US-Japan DNA Repair Meeting (招待講演)(国際学会)(2017年5月17-21日、Berkeley, CA, 米国)
2. 横井雅幸、菅澤薫、花岡文雄 シスプラチン処理した細胞においてヒト DNA ポリメラーゼ  $\delta$  の働きに寄与するクロマチン構造変換因子. 第 76 回日本癌学会学術総会(2017年9月28-30日、横浜)
3. Hanaoka F. TLS polymerases and

- mutagenesis. ICEM-ACEM 2017 Satellite Symposium on DNA Repair (招待講演)(国際学会)(2017年11月20-21日、神戸)
4. 横井雅幸、鹿谷有由希、菅澤薫、花岡文雄 シスプラチン誘発 DNA 鎖内架橋の乗り越え合成に関わるヒストン修飾酵素とクロマチン構造変換因子の探索. 第24回DNA複製・組換え・修復ワークショップ(2017年11月27-29日、長良川)
  5. 泉雅子、水野武、柳憲一郎、杉村和人、奥村克純、今本尚子、阿部知子、花岡文雄 ヒトMCM10のMCM2-7相互作用ドメインの同定. 第24回DNA複製・組換え・修復ワークショップ(2017年11月27-29日、長良川)
  6. Sakurai Y., Yokoi M., Hanaoka F. Cancer and translesion synthesis polymerases. 2016 Cold Spring Harbor Asia Conference - DNA Metabolism, Genomic Stability and Diseases (招待講演)(国際学会)(2016年6月13-17日、蘇州、中国)
  7. Hanaoka F., Yokoi M., Masutani C., Yang W. Mutant analyses of human DNA polymerase eta based on high-resolution crystal structures of the protein-DNA-dNTP complex. 4th International Meeting on DNA Polymerases(招待講演)(国際学会)(2016年10月4-8日、Biarritz, France)
  8. Hanaoka F. Forty years of DNA damage tolerance. 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015)(招待講演)(国際学会)(2015年5月25-29日、京都)
  9. Uchiyama M., Terunuma J., Hanaoka F. Regulation of the protein level of Rev1 in fission yeast. Genomic Integrity, ZING Conference 2015 (招待講演)(国際学会)(2015年8月1-5日、Cairns, Australia)
  10. Osakabe A., Tachiwana H., Kagawa W., Horikoshi N., Matsumoto S., Yamamoto J., Hanaoka F., Sugasawa K., Iwai S., Kurumizaka H. Structural and biochemical analyses for accommodation and recognition of UV-damaged bases within nucleosome. 「クロマチン動構造」国際シンポジウム(国際学会)(2015年8月23-26日、淡路島)
  11. 花岡文雄 私のDNA修復研究: XPCからXPVへ. 新学術領域研究「ゲノム普遍的制御」終了シンポジウム:ゲノム安定性の機構と生命の維持 - 進化、癌化、老化の理解のために(招待講演)(2015年8月29-30日、京都)
  12. 花岡文雄 総括 BMB2015 ワークショップ「放射線生物影響の課題に挑む分子生物学研究の力」(招待講演)(2015年12月1-4日、神戸)

(図書)(計1件)

1. Hanaoka F., Sugasawa K. edited (2016) DNA Replication, Recombination, and Repair - Molecular Mechanisms and Pathology. **Springer Japan** 555 pages. Doi 10.1007/978-4-431-55873-6

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

花岡 文雄 (HANAOKA, Fumio)  
学習院大学・理学部・客員研究員  
研究者番号: 50012670