

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K00566

研究課題名(和文) 突然変異生成におけるDNA構造位相と転写・修復・クロマチン構造変換の共役

研究課題名(英文) Analysis of mutagenesis relating to DNA topology, transcription and DNA repair

研究代表者

堀端 克良 (Horibata, Katsuyoshi)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・室長

研究者番号：40402995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：突然変異とDNA複製には密接な相関関係があり、神経系などの細胞分裂がほとんど起きないサイレントな組織ではDNA複製の頻度も少なく突然変異は生じにくいとされているが、実際にはサイレントな組織・細胞でも突然変異や癌が生じる。サイレントな組織・細胞での突然変異発生メカニズムとして、“転写に関連した突然変異生成”に着目し、それを解析するための新たな突然変異解析系を開発した。これを用いた解析の結果、ドキシサイクリン誘導により標的遺伝子カセット上に転写装置を通過させることで、転写非誘導時と比較して突然変異体頻度が5倍程度上昇することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

突然変異とDNA複製には密接な正の相関関係があるとされており、これまではDNA複製の頻度が低い、あるいは細胞分裂活性が低い状態での突然変異生成についての研究は、酵母を用いたごくわずかであった。今回、“転写に関連した突然変異生成”を解析する新規実験系を確立したことで、これまで不明であった遺伝子発現過程によって生じる突然変異生成のメカニズムを解明することにつながり、さらには神経系などの細胞分裂がほとんど起きないサイレントな組織での突然変異生成や発癌過程メカニズムの解明につながる。

研究成果の概要(英文)：It is well known that mutagenesis is correlated positively to DNA replication, therefore, mutation(s) are rarely or hardly occurred in terminally differentiated and non-dividing silent cells e.g. neural cells in brain. However, cancer and mutations are actually induced in these silent tissues. Besides DNA replication, transcription which is the main molecular mechanism of gene expression system is the cellular function acting to DNA directly. To know the details of mutagenesis in these silent conditions, we here developed a new test system for analyzing “transcription-associated mutagenesis” in higher eukaryotes. Using this test system, we observed that highly-induced transcription by the addition of doxycycline resulted in five-times higher mutant frequency comparing to the negative control group.

研究分野：遺伝毒性学

キーワード：転写 突然変異 DNA修復 遺伝毒性

## 1. 研究開始当初の背景

DNA は、日光紫外線、放射線、化学物質などの外的な要因、また生体の活動によって生じる活性酸素などの内的な要因により常に損傷を受けている。加えて、転写や DNA 複製などの DNA 代謝に関わる DNA topoisomerase I (TOP1) などのタンパク質の影響も考慮しなければならない。

DNA 複製、DNA 修復、転写、クロマチン構造変換および免疫グロブリンクラススイッチなどと、TOP1 そのものおよび TOP1-DNA 間共有結合体 (TOP1-cc) "修復機構などは密接に相関し、これらは"転写に関連した突然変異生成" (transcription-associated mutagenesis; TAM) においても重要な役割を果たしていると考えられるが、どのようなメカニズムでそれぞれが相関しているのか、各 DNA 修復系に TOP1 が直接的に必要であるのか、また、TOP1-cc の修復機構に各 DNA 修復因子がどのように必要であるのか、そしてこれらが免疫系の多様性や TAM とどのように相関しているのか、など全く明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

TOP1 の分子制御機構の破綻は TOP1 自身が内的 DNA 損傷となり、転写に負の影響を与えることで神経症状を示す遺伝性疾患の原因となる。TOP1 は FACT などのヒストンシャペロン、転写制御因子および DNA 修復因子などと相互作用する。FACT と TOP1 の相互作用は、activation-induced cytidine deaminase (AID) による免疫グロブリンのクラススイッチにおける DNA 鎖切断や体細胞超突然変異において重要な役割を果たす。大規模な癌解析では、発癌過程において AID とそのファミリーが突然変異の誘発に関与していることが示されている。また、酵母では高頻度の転写により TOP1 を介して突然変異が誘発される。これらのことから、TAM において TOP1 を介した突然変異の発生と抑制の複雑な相関関係が存在すると予想されるが、その詳細は不明である。この詳細を明らかにするために、突然変異検出のための標的遺伝子カセット上での転写を自在に制御した実験系を樹立し、DNA 修復系、クロマチン制御、免疫突然変異誘発系、TOP1 と TAM の相関を明らかにする。

## 3. 研究の方法

TOP1 と TOP1 相互作用因子をノックダウン法などで発現調整することで、相互の物理的・機能的相関を明らかにする。また、従来用いられている *gpt* アッセイを応用し、Tet-On Expression System を用いて「転写を自在に制御した状況下における突然変異を解析する試験系」を樹立し、TAM によって生じる突然変異の背景データを得る。樹立した実験系を用いて、それぞれの因子の発現調整条件下において、DNA 損傷誘導時の TAM による突然変異の発生と抑制の相互機能を明らかにする。

## 4. 研究成果

ヒト培養細胞株を用いて TOP1 相互作用因子を siRNA により発現抑制(ノックダウン)および過剰発現した条件下において、細胞生物学的な解析を実施した。その結果、TOP1、PARP1 および FACT(SPT16)などの発現抑制条件をより詳細に決定することができた。

「転写を自在に制御した状況下における突然変異を解析する試験系」のためのファージ DNA コンストラクトを樹立した(図1)。このシステムでは Tet-On Expression System を用いて、突然変異解析のための大腸菌標的遺伝子 *gpt* カセット上を転写装置が通過するように、DOX 依存的な転写発現誘導を行う。DOX 依存的な転写発現誘導には、リバーステロサイクリン制御性トランス活性化因子(rtTA)が必要となる。rtTA を発現する CHO 細胞

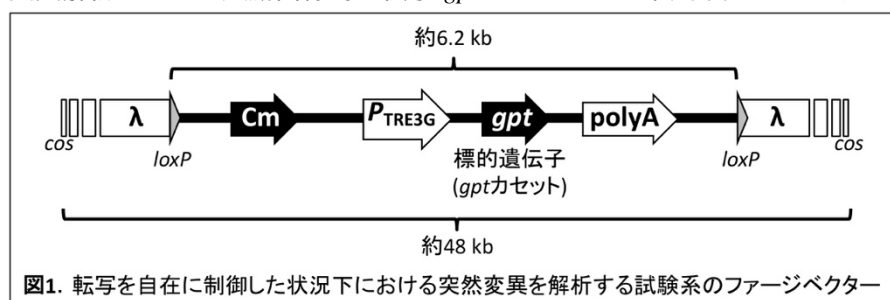


図1. 転写を自在に制御した状況下における突然変異を解析する試験系のファージベクター

商業ベースで入手できる。そこで、作成したファージ DNA コンストラクトを、rtTA を発現する CHO 細胞および 293 細胞にリポフェクション、リン酸カルシウム法、またはエレクトロポレーション法を用いてトランスフェクトし、安定にファージ DNA コンストラクトが導入された細胞株の作成を試みた。その結果、CHO 細胞には完全長のファージ DNA コンストラクトが導入されたが、293 細胞に導入されたファージ DNA コンストラクトは断片化していることが判明した。そこで、rtTA を発現し、かつ DOX により転写が誘導できることを確認したヒト線維芽細胞株 (Tet/ FS3hTERT) を独自に樹立してこれにファージ DNA コンストラクトの導入を同様の方法で試みたが、安定にファージ DNA コンストラクトが導入されたヒト細胞株を得ることができなかった。これらのことから、ファージ DNA コンストラクトが長大であるため、従来の方法ではヒト細胞に導入することが困難であると考えられた。

安定にファージ DNA コンストラクトが導入された CHO 細胞を用いて TAM の解析を実施した。DOX 誘導により *gpt* カセット上に転写装置を通過させることで、転写非誘導時と比較して突然変異体頻度が 5 倍程度上昇することを明らかにした。加えて、DNA 損傷誘導時にはさらに

な転写発現誘導を行う。DOX 依存的な転写発現誘導には、リバーステロサイクリン制御性トランス活性化因子(rtTA)が必要となる。rtTA を発現する CHO 細胞および 293 細胞は

転写誘導によって非誘導時と比較して突然変異体頻度が大幅に上昇することを明らかにした。他方、先に決定した TOP1 相互作用因子の発現調整はヒトのタンパク質を標的としたものであったので、ハムスター由来の CHO 細胞には適応できなかった。今回の成果で、作成したファージ DNA コンストラクトは「転写を自在に制御した状況下における突然変異を解析する試験系」として非常に有効であることが明らかになったが、今後の課題としては、TAM における各因子の相関関係を詳細に解析するために、TOP1 や相互作用因子の発現調整が可能なヒトやマウスの細胞株の樹立が必須である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chikura S, Kimoto T, Itoh S, Sanada H, Muto S, Horibata K	4. 巻 43
2. 論文標題 Standard protocol for the PIGRET assay, a high-throughput reticulocyte Pig-a assay with an immunomagnetic separation, used in the interlaboratory trial organized by the Mammalian Mutagenicity Study Group of the Japanese Environmental Mutagen and Genome Society	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41021-021-00181-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama K, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M	4. 巻 43
2. 論文標題 Development of a new quantitative structure-activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop auto-Modeller	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41021-021-00182-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chen R, You X, Cao Y, Masumura K, Ando T, Hamada S, Horibata K, Wan J, Xi J, Zhang X, Honma M, Luan Y	4. 巻 36
2. 論文標題 Benchmark dose analysis of multiple genotoxicity endpoints in gpt delta mice exposed to aristolochic acid I	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 87-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mutage/geaa034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kirkland D, Uno Y, Luijten M, Beevers C, van Benthem J, Burlinson B, Dertinger S, Douglas GR, Hamada S, Horibata K, Lovell DP, Manjanatha M, Martus HJ, Mei N, Morita T, Ohyama W, Williams A.	4. 巻 847
2. 論文標題 In vivo genotoxicity testing strategies: Report from the 7th International workshop on genotoxicity testing (IWGT).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mutation Research	6. 最初と最後の頁 403035
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mrgentox.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Horibata K, Sekimoto M, Sugiyama KI.	4. 巻 41
2. 論文標題 Comprehensive framework between environment and genomic stability: the open symposium of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) in 2019.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-019-0132-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shemansky JM, McDaniel LP, Klimas C, Dertinger SD, Dobrovolsky VN, Kimoto T, Horibata K, Polli JE, Heflich RH.	4. 巻 60(8)
2. 論文標題 Pig-a gene mutation database.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental and Molecular Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 759-762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/em.22298.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Chikura S, Kimoto T, Itoh S, Sanada H, Muto S, Horibata K	4. 巻 41
2. 論文標題 Standard protocol for the total red blood cell Pig-a assay used in the interlaboratory trial organized by the Mammalian Mutagenicity Study Group of the Japanese Environmental Mutagen Society.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-019-0121-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件(うち招待講演 2件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 堀端克良, 曹易懿, 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, 本間正充
2. 発表標題 高等真核生物での遺伝情報発現に付随する突然変異誘発機構解析系の開発
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Horibata K, Takasawa H, Taquahashi Y, Yokota S, Hamada S, Honma M
2. 発表標題 In Vivo Genotoxicity Assessment Of Multi-Wall Carbon Nanotubes Using Lung Micronucleus Assay
3. 学会等名 Environmental Mutagenesis and Genomics Society 51st Virtual Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Honma M, Yasui M, Sugiyama K, Masumura K, Horibata K, Yamada M
2. 発表標題 Genotoxicity assessment of food flavoring substances used in Japan.
3. 学会等名 The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Horibata K, Takasawa H, Taquahashi Y, Yokota S, Hamada S, Honma M.
2. 発表標題 In vivo genotoxicity assessment of multi-wall carbon nanotubes using lung micronucleus assay.
3. 学会等名 The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀端克良
2. 発表標題 Pig-a 試験
3. 学会等名 哺乳動物試験研究会(MMS研究会)第74回定例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀端克良
2. 発表標題 Pig-a アッセイの標準化に関する研究:バリデーション研究の推進とヒトへの適用
3. 学会等名 日本環境変異原学会第47回大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀端克良
2. 発表標題 Pig-a アッセイ
3. 学会等名 哺乳動物試験研究会 第73回定例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀端克良
2. 発表標題 Pig-a 試験
3. 学会等名 哺乳動物試験研究会 第72回定例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀端克良
2. 発表標題 Pig-a / PIG-A遺伝子変異試験によるヒトを含めたin vivo遺伝毒性モニタリング
3. 学会等名 平成30年度 日本環境変異原学会 公開シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀端克良
2. 発表標題 Pig-a試験
3. 学会等名 哺乳動物試験研究会 第70回定例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takasawa H, Hamada S, Taquahashi Y, Horibata K, Nakagawa M, Honma M
2. 発表標題 In vivo genotoxicity assessment of multi-wall carbon nanotubes using in vivo / in vitro lung micronucleus assay in mice
3. 学会等名 Environmental Mutagen Society 48th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Horibata K, Honma M
2. 発表標題 Evaluation of the genotoxicity of Acrylamide by in vivo Pig-a gene mutation assay
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀端克良
2. 発表標題 Pig-a アッセイ
3. 学会等名 哺乳動物試験研究会 第71回定例会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 堀端克良, 鶴飼明子, 小縣昭夫, 中江大, 安藤弘, 久保喜一, 長澤明道, 湯澤勝廣, 本間正充
2. 発表標題 F344 gpt delta ratsを用いた多層カーボンナノチューブ単回気管内投与によるin vivo遺伝毒性評価
3. 学会等名 日本環境変異原学会第46回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高沢博修, 志賀野美幸, 高橋祐次, 田中亜矢子, 中舘記代子, 堀端克良, 安永勝昭, 中川宗洋, 濱田修一, 本間正充
2. 発表標題 In vivo-in vitro マウス肺小核試験を用いたカーボンナノチューブの in vivo 遺伝毒性評価
3. 学会等名 日本環境変異原学会第46回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Horibata K, Ukai A, Honma M
2. 発表標題 Mice Mutagenicity on the Next Generation and Effect on the Differences of Both Age and Sex Detected by the Pig-A Assay
3. 学会等名 THE 12TH INTERNATIONAL CONFERENCE & 5TH ASIAN CONGRESS ON ENVIRONMENTAL MUTAGENS (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	増村 健一  (Masumura Kenichi)  (40291116)	国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・室長    (82601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 雅巳  (Yamada Masami)  (80230481)	防衛大学校（総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群）・応用科学群・教授    (82723)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関