

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2006-2009

課題番号：18201010

研究課題名 (和文) 遺伝毒性物質の閾値形成におけるトランスリージョン DNA 合成の役割に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on roles of translesion DNA synthesis in constitution of thresholds for genotoxic substances

研究代表者 (1) 能美 健彦 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・部長
(2) 30150890

研究分野：遺伝毒性

科研費の分科・細目：環境学・放射線、化学物質影響科学

キーワード：遺伝毒性の閾値、有害化学物質、遺伝子、環境、癌

1. 研究計画の概要

DNA に反応して発がん性を示す遺伝毒性発がん物質の作用には「閾値 (無作用域)」が存在しないとされ、どのように低用量であってもヒトに対してリスクを負わせものと考えられている。だがヒトには各種の生体防御機能が存在し、低用量での遺伝毒性作用を不活化し、事実上の閾値を形成する可能性が考えられる。本研究では、損傷を乗り越えて DNA 合成を行うトランスリージョン (TLS) 型 DNA ポリメラーゼが「遺伝毒性の閾値」形成にはたす役割を明らかにすることを目的とする。

TLS 型 DNA ポリメラーゼは、DNA 損傷部位で進行を停止する複製型 DNA ポリメラーゼに代わって損傷部位での DNA 合成に関与する特殊な DNA ポリメラーゼである。損傷部位で複製が中断されると、DNA 二本鎖切断が生じ染色体異常が生じる。また誤った塩基が損傷部位の向かい側に挿入されると突然変異が誘発される。したがって TLS 型 DNA ポリメラーゼは遺伝毒性の回避に関与しており、その欠損細胞は化学物質などの遺伝毒性に高い感受性を示すことが予想される。

本研究では、TLS 型 DNA ポリメラーゼの一つである DNA ポリメラーゼ κ (以下 Polk と略) の (1) 機能解析を行うとともに、Polk の活性を消失した (2) ヒト細胞株と (3) ノックイン (KI) マウスを樹立し (4) 「遺伝毒性に関する閾値」形成にトランスリージョン DNA 合成がはたす役割について検討する。

2. 研究の進捗状況

(1) ヒト Polk の機能解析：Polk が benzo [a]pyrene diolepoxide- N^2 -deoxyguanine (BPDE- N^2 -dG) を効率良く乗り越えて DNA 合成を

行うこと、この際に BPDE- N^2 -dG 含む鋳型プライマー DNA に強く結合すること、活性中心部に存在するチロシン残基 (Y112) が mismatches 末端 (BPDE- N^2 -dG:dA、鋳型鎖:プライマー) からのプライマー鎖伸長活性に重要な役割をはたすことを明らかにした。

(2) Polk 活性を消失したヒト細胞株の樹立：POLK 遺伝子のエクソン 6 を欠失させたノックアウト (KO) 細胞、および触媒活性を担うアスパラギン酸残基 (D198) とグルタミン酸残基 (E199) を共にアラニンに置換した (D198A, E199A) KI 細胞を、ヒトリンパ芽球細胞 Na1m-6 を用いて樹立した。KO 細胞および KI 細胞は、benzo[a]pyrene が誘発する HPRT 変異に対して野生型株よりも高い感受性を示した。

(3) Polk KI マウスの樹立：ヒト KI 細胞で変異させた DE に対応するマウス Polk の D197 と E198 を共にアラニンに置換した KI マウスを樹立した。さらに変異のレポーター遺伝子を組み込んだ *gpt delta* マウスと交配した。

(4) 遺伝毒性の閾値形成機構：「遺伝毒性発がん物質の閾値に関する国際シンポジウム」を 2008 年 7 月に東京で開催した。海外から 5 名、国内から 16 名を講演者として招へいし、参加者は約 200 名であった。講演集を、日本環境変異原学会の機関誌 Genes and Environment に特集号として刊行した。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

(1) ヒト Polk の機能解析に関する研究は、当初の計画以上に進展し、Polk の mismatches 末端からのプライマー鎖伸長活性に果たす Y112 残基の役割を明らかにした。(2) KO およ

び KI ヒト細胞の研究は、おおむね順調に進展している。(3)KI マウスの作製は、最初に作製したマウス ES 細胞からは KI マウスが得られず、別なクローンの C57BL/6 ES 細胞を用いて KI マウスを作製したため当初の計画よりもやや遅れている。(4)遺伝毒性発がん物質の閾値に関する国際シンポジウムの成果は、欧州環境変異原学会においても取り上げられ、国際的な論議へと広がりを見せている。

4. 今後の研究の推進方策

(1) ヒト Polk の機能解析：BPDE-A²-dG との相互作用に関与すると予想されるフェニルアラニン 171 をアラニンに置換した変異体を作製し、その性状を解析する。(2) Polk KO および KI ヒト細胞株：benzo[a]pyrene を含む各種遺伝毒性発がん物質 (mitomycin C、アルキル化剤等) および紫外線に対する変異感受性を野生型株と比較する。(3) Polk ノックインマウス：ヒト KI 細胞で用いた遺伝毒性発がん物質および紫外線に対する変異感受性を野生型マウスと比較する。特に低用量域における用量効果曲線を比較する。(4) 遺伝毒性の閾値：2009 年 8 月にイタリアで開催される第 10 回国際環境変異原学会において、本研究の成果を発表し、低用量域における「遺伝毒性の閾値」形成におけるトランスリージョン DNA 合成の役割について国際的に論議する。

5. 代表的な研究成果

(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 43 件)

- ① N. Niim, A. Sassa, A. Katafuchi, P. Grúz, H. Fujimoto, R.R. Bonala, F. Johnson, T. Ohta and T. Nohmi, The steric gate amino acid tyrosine 112 is required for efficient mismatched-primer extension by human DNA polymerase κ , *Biochem.*, 48, 4329-4246 (2009)
- ② K. Masumura and T. Nohmi, Spontaneous mutagenesis in rodents: spontaneous gene mutations identified by neutral reporter genes in *gpt* delta transgenic mice and rats, *J. Health Sci.*, 55, 40-49 (2009)

- ③ T. Nohmi, Possible mechanisms of practical thresholds for genotoxicity, *Genes and Environ.*, 30, 108-113 (2008)
- ④ T. Nohmi, Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases, *Ann. Rev. Microbiol.*, 60, 231-253 (2006)

[学会発表] (計 87 件)

- ① T. Nohmi, A crucial role for the steric gate amino acid tyrosine 112 in efficient mismatched-primer extension by human DNA polymerase κ , ASM Conferences, DNA Repair and Mutagenesis, June 1st 2009, Whistler, Canada

[図書] (計 1 件)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称：突然変異検出用トランスジェニックラットとその作製方法およびそれを用いた突然変異試験法

発明者：能美健彦、増村健一、神藤康弘、林宏行

権利者：国立医薬品食品衛生研究所長

種類：特許

番号：第 3 7 9 9 4 4 5 号

取得年月日：平成 1 8 年 5 月 1 2 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ

<http://dgm2alpha.nihs.go.jp/>