様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007 〜 2009
課題番号：19310034
研究課題名（和文） M期の染色体を安定に維持する機構の破綻とその生物影響の研究

研究課題名（英文） The collapse of the mechanisms which stably maintain M phase chromosome and its biological effect

研究代表者
山本 和生 （YAMAMOTO KAZUO）
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：20093536

研究成果の概要（和文）：

細胞周期の過程において，染色体が正確に複製分配され，安定に次世代細胞に受け継がれて行くことは，生物にとって最も基本的な性質である。染色体分配システムを正確にコントロールすることは，発生や個体の維持，生命の維持の礎となっている。体細胞に生じた染色体分配システム異常ががんや老化の原因となると予想される。染色体分配の異常は結果として，倍数体や異数体などの染色体構成の異常を導く。分配に関わる多くの遺伝子の突然変異も，倍数体や異数体を生じる。異数性を誘導する化学物質の一部は，塩基変化を伴う突然変異は誘発しないのに，マウスやラットにがんを誘発する。これらの物質のいくつかについて,その作用標的はG2/M境界での細胞周期の進行を調節する機構であることまたその過程では，MAPKとATM/ATRのどちらかの経路を活性化してシグナルが伝達されることを明らかにした。これらの過程にはDNA損傷は全く関与しない。ヒト培養細胞でも分裂酵母の場合でも係わる経路は基本的に同じであり，真核生物で共通の機構が働いていることが明らかとなった。本研究は更に，発がんや老化の機構について新しいモデルの提案につながった。

研究成果の概要（英文）：

Ortho-phenyl phenol (OPP) and its hepatic metabolite, phenyl hydroquinone (PHQ), are broad-spectrum fungicides and antibacterial agents. OPP and PHQ tested negative in an Ames system and positive with respect to the formation of tumors in the urinary bladder in rats when administered in diet, showing attributes of a non-genotoxic carcinogen. It has also been demonstrated that OPP and PHQ do not bind or cleave DNA *in vivo* or *in vitro*, rather dose-dependent protein binding in OPP-treated rats was observed. OPP and PHQ, however, generate chromosomal aberrations including aneuploidy. Thus, the steps by which non-genotoxic carcinogens exert their effects need to be elucidated. In this study, we used an assay of loss of heterozygosity (LOH) in *Saccharomyces cerevisiae* and cultured human cells to determine the biological effects of OPP and PHQ. LOH was found to be induced by OPP and PHQ because of a functional chromosome loss: aneuploidy. PHQ bound to and interfered with the depolymerization of tubulin *in vitro*. We further demonstrate that PHQ can arrest the cell cycle at the G2/M transition as a result of the stabilization of Swe1 (Wee1 homolog), probably leading to inactivation of the Cdc28 (Cdk1/Cdc2 homolog). Furthermore, Hog1 (p38 MAPK homolog) was robustly phosphorylated by PHQ, which can stabilize Swe1. On the other hand, Chk1 and Rad53 were not phosphorylated by PHQ, indicating that Mec1/Tel1 DNA damage checkpoint was not functional. Mutation of *swe1* and *hog1* abolished the PHQ-induced arrest at the G2/M transition and became resistant to PHQ lethality and aneuploidy formation. These results suggest that PHQ-induced G2/M

transition checkpoint which is activated by the Hog1-Swe1 pathway plays a role in the formation of aneuploidy. We argue that OPP and PHQ activate MAPK pathway arrested cell cycle at G2/M transition and caused aneuploidy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総　計	16.000,000	4,800,000	20,800,000

研究分野：複合新領域
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：放射線生物影響・染色体構成

１．研究開始当初の背景

細胞周期の過程において，染色体が正確に複製分配され，安定に次世代細胞に受け継がれて行くことは，生物にとって最も基本的な性質である。染色体分配システムを正確にコントロールすることは，発生や個体の維持，生命の維持の礎となっている。体細胞に生じた染色体分配システム異常ががんや老化の原因となると予想される。奇形や遺伝病は人類が抱える重要な課題であるが，その原因の一部は発生過程での染色体分配システム異常に基づく（例えば，Down syndrome や Kleinfelter syndrome)。

染色体分配の異常は結果として，倍数体や異数体などの染色体構成の異常を導く。通常はM期チェックポイントが働き，これらの異常は感知され修復やアポトーシスによって処理される。他方，S期での修復を逃れたDNA損傷は，M期で染色体構成異常を誘発する事が予想される。分配に関わる多くの遺伝子の突然変異も，倍数体や異数体を生じる。異数性を誘導する化学物質（aneugen）の一部は，塩基変化を伴う突然変異は誘発しないのに，マウスやラットにがんを誘発する。これらの物質のいくつかについて，その作用標的はタンパク質（とりわけチューブリンなどの分裂装置タンパク質）であることを我々は明らかにした。

酵母の場合，野生株では1×10^{-5}の頻度で自然異数性が観察されるが，組み換え遺伝子rad52の欠損株では4×10^{-3}，損傷乗り越え複製酵素遺伝子rev3とrad52の二重変異株では，2.5×10^{-2}の自然異数性生成頻度となる。この結果は，自然DNA損傷も異数性形成に関わり，stallした複製フォークを回避する機構も，異数性を阻止するためにも機能していることを示唆している。事実，x-線やニトロソグアニジンなどのDNA複製を止める処理でも異数性を誘発する。一方，DNA intercalation試薬である9-aminoacridineは，フレームシフト突然変異は誘発するが，染色体の異数性は誘導しない。DNA損傷の有無だけでなく損傷の性質が染色体構成を不安定にする原因であることを示唆する。

２．研究の目的

本研究の目的は，ヒト培養細胞と出芽酵母を用い，真核生物の染色体構成を 2n として正しく保つ仕組みの破綻が，どのような経緯で生じるのか，破綻を回避するのはいかなる機構か，破綻した場合の生物影響はいかなるものかを明らかにすることである。以下の研究テーマを解明することで，染色体分配という視点から見た生命観を構築したい。

３．研究の方法

(1)酵母loss of heterozygosity (LOH)を利用した染色体構成異常誘導物質スクリーニング

酵母のCAN1遺伝子について(+/-)から(-/-)の変化（loss of heterozygosity; LOH）を指標として，Ames試験陰性で発がん試験陽性の環境変異現物質が，染色体喪失陽性となるかどうかを明らかにする。

(2)Ames試験陰性，染色体喪失陽性の化学物質の作用機構の研究

Ames試験陰性化学物質としては，OPPの代謝物質phenyl hydroquinone (PHQ)及びベンゼンの代謝物質hydroquinone (HQ)を用い，PHQ，HQの細胞周期への作用（フローサイトメーター観察），mitotic indexへの影響，アポトーシスの有無，核型変化の有無等を観察する。ヒ

トp53欠損細胞及び，ATM/ATRやp38MAPK遺伝子をRNAiでknockdownした細胞を用いて，PHQやHQ等によるM期arrest，染色体喪失生成がP53に依存したものか，ATM/ATRに依存したものか，p38依存性か等を調べる。PHQ，HQ処理で，ヒト細胞内のp53やMAPK等のシグナル変化をwestern blotting及びフローサイトメーターで調べる。HQ，HQ処理による中心体数の変化をp53，AT/ATR，p38等の変異株で観察する。

(3)DNA複製arrestと異数性の形成

酵母組み換え遺伝子rad52の変異株，損傷乗り越え複製酵素 Rev3 の変異株及び rev3 と rad52 の二重変異株を用いて，自然突然変異に占める異数性の生成機構を明らかにする。酵母の組み換えに関わるsgs1，mgs1，mre11，の変異株と，損傷乗り越え複製酵素遺伝子変異，rev3，rad30 の各種組み合わせの二重変異株を用い，異数性頻度が高い組み合わせがあるかどうか，その機構は如何なるものであるかを明らかにする。これらの株で，フローサイトメーターによる細胞周期を観察し，細胞周期タンパク質の増減をwestern blottingで明らかにする。

４．研究成果

(1)Ames 試験陰性化学物質 OPP や PHQ は酵母で異数性を特異的に誘導する。

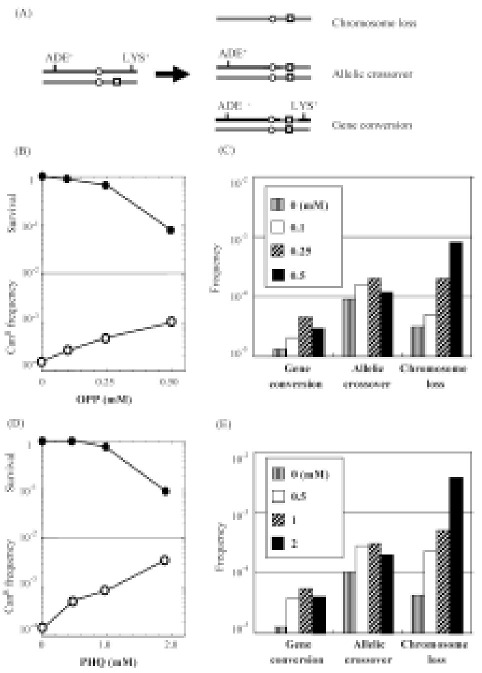

図1；OPP(B，C)でもPHQ(D，E)も，異数性を特異的に誘発する。A実験系。

OPP でも PHQ でも，塩基置換型突然変異の誘発は観察されなかった。他方，二倍体酵母を用いた異数性アッセイ系(A)を用いて調べると，染色体喪失(異数性)が特異的に上昇し，組換えは観察されない。これらの結果は，先ず，OPP や PHQ には，DNA 損傷誘発力がない（少ない）こと，その結果，塩基置換型突然変異や組換えの誘発は見られない。しかしながら，異数性の誘発力のあることを示している。

(2)PHQ はヒト培養細胞でも異数性を誘導する

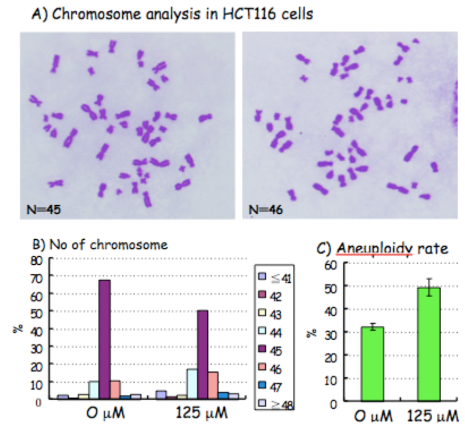

図2；PHQによるヒト培養細胞での異数性の誘発。核型解析(A)を基に，125μM PHQ処理で，N＝45の染色体を持つ細胞の割合が70%から50%程度に低下した(B)。従って，異数性誘発割合は，30%から50%に上昇した(C)。

HCT116ヒト培養細胞をPHQ処理すると，異数性の割合が，50%に上昇した。PHQによる異数性の誘発は，従って酵母に特別のことではなくて真核生物に一般の作用である。

(3)PHQ は出芽酵母の bud 形成を阻害する（G2/M境界で細胞周期を止める）

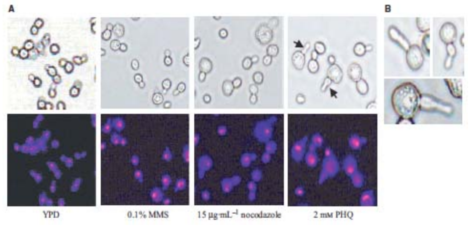

図3；PHQは正常培地(YPD)やMMS処理とは違って，細胞分裂の形が異常になる（A矢印;elongated bud)。Bはその拡大図。

PHQ 処理すると，酵母の形態は異常となる。

これは，細胞分裂に際して，アクチンの集合が異常になり，その悪影響を回避するために，細胞周期の進行を G2/M の境界で停止する。DNA 損傷を作る MMS や M 期の分裂に係わる紡錘糸と反応するノコダゾールの場合は，形態の異常は観察されない。以上の結果より，PHQ は G2/M 境界で細胞周期の進行を止めることがわかる。

(4)elongated bud 形成に係わる遺伝子 swe1 の欠損株は，異数性を形成しない。

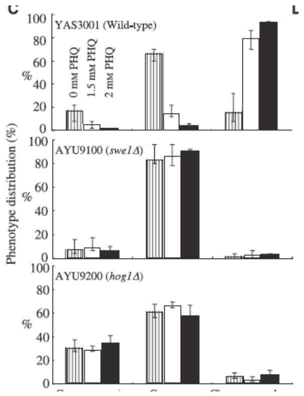

図 4；swe1 欠損株（中段）及び hog1 欠損株（下段）では，PHQ 2 mM 処理でも異数性は増加しない。

Elongated bud の形成は，swe1 遺伝子の機能に依存し,酵母 MAPK 経路 hog1 の下流にある。そこで，swe1 及び hog1 欠損酵母を作成したところ，どちらの場合も PHQ 誘発の異数性の形成は観察されなかった。従って，PHQ は，Hog1-Swe1 経路の活性化とその結果としての G2/M 境界での細胞周期の停止により異数性を形成することが明らかとなった。

(5)ヒト培養細胞では，ATM/ATR 経路に依存して異数性が形成される。

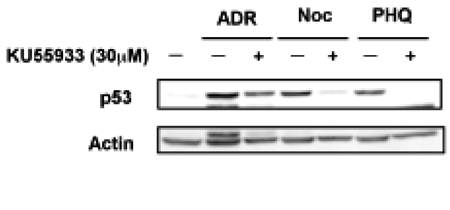

図 5；PHQ による p53 の活性化は，KU55933(ATM 阻害剤)があると抑制される。

OPP や PHQ は DNA 損傷を作らないし，損傷に係わるシグナル系を活性化しない。しかしながら，ヒト HCT116 細胞では，DNA 損傷シグナルのセンサーである ATM/ATR に依存して PHQ は p53 を活性化し，細胞周期を G2/M 境界で止め，その結果，中心体の増幅と染色体異数性を誘発する。PHQ は p53 欠損株では，異数性も中心体の増幅も誘発しない。すなわち，PHQ は DNA 損傷にとは別の経路から ATM/ATR を活性化し，結果として異数性を誘導するという結論になる。

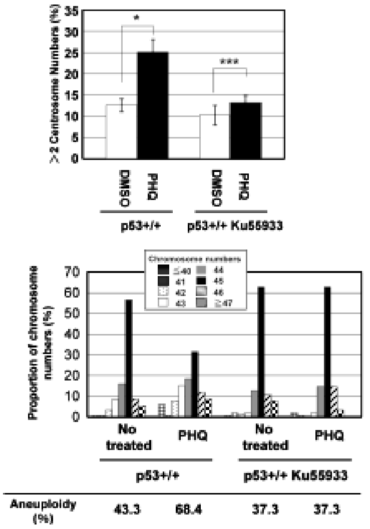

図 6；中心体増幅（上図），異数性（下図）の PHQ による誘発は，KU55933 処理で阻害される。

KU55933 は，ATK kinase の阻害剤である。PHQ 単独処理では,p53 の活性化が見られ(図 5)，それに依存して細胞周期の G2/M 境界での遅延が見られる。PHQ と KU55933 がある場合には，先ず p53 の活性化が見られず，中心体増幅も異数性も観察されなかった(図 6)。

(6)非変異発がん剤として知られているベンゼンの代謝物ヒドロキノン(HQ)でも，Swe1-Hog1 依存性の異数性の誘発がある。

HQ についても，出芽酵母とヒト HCT116 細胞で,同様の実験をしたところ,基本的には PHQ と同様の結果が得られた。非変異発がん物質について，共通の機構があると考えることができる。

(7)異数性による発がん機構の概説

本研究では，PHQ や HQ が特異的に異数性を誘発することを明らかにした。その機構としては，G2/M 境界で細胞周期が停止（ないしは遅延）することで異数性が生じることがわかっ

た。G2/M期での細胞周期の停止は，従来細胞の危機を回避するための生理的に意味のある機構であると考えられてきた。本研究で明らかにしたことは，細胞周期の停止は，異数性というむしろ細胞に危機的状況を呼び起こすと言うことになる。この矛盾については，今後のさらなる研究が必要である。異数性は発がんといかなる接点があるのであろうか？細胞分裂の結果，染色体が減少すると，例えばがん抑制遺伝子について，ハプロ不全の状態となり，がん抑制遺伝子産物の量は理想量の半分となって，徐々にガン傾向が高まると考えることができる。PHQは塩基置換のような突然変異は誘発しないが，異数性を誘発することで結果として発がん作用が生じるのであろう。

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24件）

① Kazuhiro Suetomi, Mai Mochizuki, Shiori Suzuki, Hiroaki Yamamoto and Kazuo Yamamoto (2010) Effects of *Saccharomyces cerevisiae tel1*, *mec1*, and *mre11* mutations on spontaneous and methylmethane sulfonate-induced genome instability. Gene and Genetic Systems, 査読あり, in press

② Asako Okafuji, Till Biskup, Kenichi Hitomi, Elizabeth D. Getzoff, Gebhard Kaiser, Alfred Batschauer, Adelbert Bacher, Jun Hidema, Mika Teranishi, Kazuo Yamamoto, Erik Schleicher, Stefan Weber (2010) Light-induced Activation of Class II Cyclobutane Pyrimidine Dimer Photolyases. DNA Repair, 査読あり, in press

③ Takeki Shiga, Hiroyuki Suzuki, Ayumi Yamamoto, Hiroaki Yamamoto and Kazuo Yamamoto (2010) Benzene metabolite, hydroquinone induces Hog1-dependent stress response signaling and causes aneuploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Radiation Research, 査読あり, in press

④ Masaru Imai, Ryo Matsuno, Jun-ichiro Komura, Tetsuya Ono and Kazuo Yamamoto (2009) Induction of mitotic delay, apoptosis and aneuploidy in human cells by phenyl hydroquinone, an Ames test-negative carcinogen. Gene and Genetic Systems, 査読あり, 84, 73-79.

⑤ Qiu-Mei Zhang-Akiyama, Hironobu Morinaga, Masahiro Kikuchi, Shin-Ichiro Yonekura, Hiroshi Sugiyama, Kazuo Yamamoto and Shuji Yonei (2009) KsgA, a 16S rRNA adenine methyltransferase, has a novel DNA glycosylase/AP lyase activity to prevent mutations in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Research, 査読あり, 37, 2116-2125

⑥ AMH Salem, Toshiaki Nakano, Nagisa Matoba, Tomohiro Tsuboi, Hiroaki Terato, Kazuo Yamamoto, Masami Yamada, Takehiko Nohmi and Hiroshi Ide (2009) Genetic analysis of repair and damage tolerance mechanisms for DNA-protein crosslinks in *Escherichia coli,* Journal of Bacteriology, 査読あり, 191, 5657-5668

⑦ Tetsuya Suzuki, Kazuo Yamamoto, Hideyoshi Harashima and Hiroyuuki Kamiya (2008) Base excision repair enzyme endonuclease III suppresses mutagenesis caused by 8-hydroxy-dGTP. DNA Repair, 査読あり, 7, 88-94

⑧ Ayumi Yamamoto, Tanbir Najrana, Tokuhisa Hirouchi, Mika Teranishi, Jun Hidema, Hiroshi Morioka and KazuoYamamoto (2008) Temperature-Sensitive Photoreactivation of Cyclobutane Thymine Dimer in Soybean. Journal of Radiation Research, 査読あり, 49, 189-196.

⑨ Mika Teranishi, Kentaro Nakamura, Hiroshi Morioka, Kazuo Yamamoto and Jun Hidema (2008) The native cyclobutane pyrimidine dimer photolyase of rice is phosphorylated. Plant Physiology, 査読あり, 146, 1941-1951

⑩ Yamamoto R, Akiyama M, Ide H, Yamamoto K, Matsuyama S, Kubo K. (2008) A novel monofunctional DNA glycosylase activity against thymine glycol in mouse cell nuclei. Journal of Radiation Research, 査読あり, 49, 249-259.

⑪ Hironobu Ikehata, Kazuaki Kawai, Ko Sakatsume, Liangcheng Wang, Masaru Imai, Shoichi Higashi, Yoshinori Ohsumi, Osamu Nikaido, Kazuo Yamamoto, Hiroshi Kasai, Kotaro Hieda and Tetsuya Ono (2008) UVA1 genotoxicity is mediated not by oxidative damage but by cyclobutane pyrimidine dimers in normal mouse skin. J Invest Dermatol., 査読あり, 128, 2289-2296.

⑫ Nobuya Nakamura, Hironobu Morinaga, Masahiro Kikuchi, Shin-Ichiro Yonekura, Naoaki Ishii, Kazuo Yamamoto, Shuji Yonei and Qiu-Mei Zhang (2008) Cloning and characterization of uracil-DNA glycosylase and the biological consequences of the loss of its function in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

Mutagenesis, 査読あり, 23, 407-413.

⑬ Lalla Rajaa Rhenimi, Nagla Fathi Abu-Nasr, Kazuo Yamamoto (2008) 1-nitropyrene efficiently induces mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Radiation Research, 査読あり, 49, 615-622.

⑭ Ayumi Yamamoto, Tatsuo Nunoshiba, Keiko Umezu, Takemi Enomoto and Kazuo Yamamoto (2008) Phenyl hydroquinone, Ames test-negative carcinogen, induces Hog1-dependent stress response signaling; implication for aneuploidy development in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Journal, 査読あり, 275, 5733-5744.

⑮ Takashi Nakatsuka, Katia Sanae Haruta, Chetsadaporn Pitaksutheepong, Yoshiko Abe, Yuko Kakizaki, Kazuo Yamamoto, Norimoto Shimada, Saburo Yamamura and Masahiro Nishihara (2008) Identification and characterization of R2R3-MYB and bHLH transcription factors regulating anthocyanin biosynthesis in gentian flowers. Plant and Cell Physiology, 査読あり, 49, 1818-1829.

⑯ Tatsuo Nunoshiba, Eri Watanabe, Teruhisa Takahashi, Yasukazu Daigaku, Satoko Ishikawa, Masataka Mochizuki, Ayako Ui, Takemi Enomoto and Kazuo Yamamoto (2007) Ames test-negative carcinogen, *ortho*-phenyl phenol, binds tubulin and causes aneuploidy in budding yeast. Mutation Research, 査読あり, 617, 90-97.

⑰ Kingo Endo, Yasukazu Daigaku, Yu-ichiro Tago and Kazuo Yamamoto (2007) Error-free *RAD52* pathway and error-prone *REV3* pathway determines spontaneous mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene and Genetic Systems, 査読あり, 82, 35-42.

⑱ Jun Hidema, Taku Taguchi, Taichi Ono, Mika Teranishi, Kazuo Yamamoto, Tadashi Kumagai (2007) Increase in CPD photolyase activity functions effectively for preventing ultraviolet-B-caused growth inhibition. Plant Journal, 査読あり, 50, 70-79

⑲ Ayako Ui, Masayuki Seki, Hideaki Ogiwara, Mong Sing Lei, Kazuo Yamamoto, Shusuke Tada, Takemi Enomoto (2007) Activation of a novel pathway involving Mms1 and Rad59 in *sgs1* cells. Biochem. Biphys. Res. Commun., 査読あり, 356, 1031-1037

⑳ Masaru Imai, Yu-ichiro Tago, Makoto Ihara, Masakado Kawata and Kazuo Yamamoto (2007) The Role of 5’→3’ exonuclease and Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I in base mismatch repair. Molecular Genetics and Genomics, 査読あり, 278, 211-220

㉑ Niranjan Acharya, Nagla Fathi Abu-Nasr, Genta Kawaguchi, Masaru Imai and Kazuo Yamamoto (2007) Frameshift mutations produced by 9-aminoacridine in wild-type, *uvrA* and *recA* strains of *Escherichia coli*; Specificity within a hotspot. Journal of Radiation Research, 査読あり, 48, 361-368.

㉒ Mika Hori, Chieko Ishiguro, Noriko Nakagawa, Tatsuo Nunoshiba, Seiki Kuramitsu, Kazuo Yamamoto, Hiroshi Kasai, Hideyoshi Harashima, Hiroyuki Kamiya (2007) UvrA and UvrB enhances mutations induced by oxidized deoxyribonucleotides. DNA Repair, 査読あり, 6, 1786-1793

㉓ Ayumi Yamamoto, Tokuhisa Hirouchi, Tamiki Mori, Mika Teranishi, Jun Hidema, Hiroshi Morioka, Tadashi Kumagai and Kazuo Yamamoto (2007) Biochemical and biological properties of DNA photolyases derived from ultraviolet sensitive rice-cultivars. Gene and Genetic Systems, 査読あり, 82, 311-319

㉔ Yonekura S, Nakamura N, Doi T, Sugiyama H, Yamamoto K, Yonei S, and Zhang QM. (2007) Recombinant *Schizosaccharomyces pombe* Nth1 protein exhibits DNA glycosylase activities for 8-oxo-7,8-dihydroguanine and thymine residues oxidized in the methyl group. Journal of Radiation Research, 査読あり, 8, 417-424.

〔学会発表〕(計０件)

６．研究組織

(1)研究代表者

山本　和生 (YAMAMOTO KAZUO)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：20093536