

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19710059  
 研究課題名（和文）ヒトリンパ球細胞TK6のゲノム内に導入させたDNA付加体の突然変異誘発機構  
 研究課題名（英文）Mutation mechanism of a single DNA adduct embedded in human genome of TK6 cells.  
 研究代表者  
 安井 学（YASUI MANABU）  
 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 研究員  
 研究者番号：50435707

## 研究成果の概要：

本研究の目的は、ヒトTK6細胞のゲノム内で引き起こされる様々なDNA付加体の突然変異誘発能を解析できる実験系を確立することである。そのために、まず代表的なDNA付加体である8-オキシグアニンを1つ含むターゲティングベクターの合成系を確立した。次に、それを特別な手法でTK6細胞のゲノム内に部位特異的に導入させ、DNA修復・複製させた後、そのゲノム内において8-オキシグアニンが起こした突然変異誘発パターンと頻度を解析することに成功した。現在、それらの実験系とデータの信憑性や再現性について調べている。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	0	1,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

## 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：DNA 損傷，DNA 付加体，8-オキシグアニン，活性酸素，一酸化窒素，突然変異誘発，化学発癌，炎症性発癌

## 1. 研究開始当初の背景

DNA付加体は、DNA鎖切断と同様に重要なDNA損傷のうちの一つであり、DNA塩基に化学物質などが反応することで生成するDNA塩基の類似体（analogue）である。例えば、酸化了的DNA損傷の8-オキシグアニン（8-Oxo-Gua）は、活性酸素種がグアニンに反応したDNA付加体である。この8-Oxo-Guaは、DNA複製や修復時に正常塩基対のシトシン（Cyt）とではなく、アデニン（Ade）と誤って塩基

対を形成するため、結果的にグアニンからチミン（Gua → Thy）の一塩基置換を誘発させる（Shibutani, S. et al., *Nature* **349**, 431-434; Kamiya, H. et al., *Cancer Res.* **52**, 3483-3485）。このようにDNA付加体のほとんどは、一塩基変異（一塩基置換および欠失）を誘発させるため、ヒトの癌組織で観察されるp53やK-ras遺伝子のホットスポット（IARCデータベース<http://www-p53.iarc.fr/index.html>）に深く関与していると考えられる。

先に挙げた活性酸素種のように生体内にある様々な発癌性物質が、DNAと反応するため、常に多種多様なDNA付加体がヒトゲノム上に存在することが分かっている (Kana ly, R.A. et al., *Antioxid. Redox Signal* **8**, 993-1001)。その化学構造や形成量は未知な部分が多いが、代表的な例として、8-Oxo-Guaは約1000個 / cell, エセノシトシン (脂質過酸化物のDNA付加体) および $O^6$ -メチルグアニン (内因性ニトロソアミンのDNA付加体) は約200個 / cellが、一日ごとに形成すると見積もられている (Kunkel, T.A., *Trends in Genetic s* **15**, 93)。これら既知のDNA付加体のほとんどは、突然変異誘発能を持ち、それぞれ固有の突然変異スペクトルを示す。さらに、DNA修復されにくく、長期間ゲノムに残るDNA付加体も存在する (Kriek, E., *Cancer Res.* **32**, 2042-2048; Yasui, M., et al., *Biochemistr y* **43**, 15005-15013)。つまり、DNA付加体の形成スピードに対してDNA修復が追いついておらず、DNA付加体をゲノム内から一掃させることは不可能である。従って、ヒトはDNA付加体によって引き起こされる遺伝子変異の脅威から、決して逃れることはできない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、恒常的に存在するDNA付加体量に対して、わずか1分子のDNA付加体が「ゲノム内」で突然変異誘発能を有するかどうかを調べるために、DNA付加体を1つ含むターゲティングベクターを作製することから始め、ゲノム内におけるDNA付加体の突然変異誘発スペクトルや頻度を解析することを目的とする。すなわち、ゲノムターゲティングミュータジェネシスの手法による新しいDNA付加体の解析系を確立する。研究対象は、炎症部位で観察される8-Oxo-Gua, Xanthine (Guaと一酸化窒素の反応で形成する) のDNA付加体とする。

## 3. 研究の方法

### (1)ターゲティングミュータジェネシスの概要

本研究の基礎は、研究協力者の本間正充博士が作製したヒトTK6細胞由来のTSCER122細胞株 (Honma, M. et al., *Environ. Mol. Mutagen* **42**, 288-298) である。まず、TK6細胞を使う利点を述べると、チミジンキナーゼ遺伝子 (TK) をヘテロ (TK +/- ; エキソン4に一塩基変異を持つ) で有するため、薬剤耐性を指標としたフォワード (TK +/- TK -/-) およびリバース (TK -/- TK +/-) 遺伝子突然変異系として利用できることである。その選択薬剤として、前者はトリフルオロチミジン (TFT), 後者はハイポキサンチン, アミノプテリン, チミジンの混合物

(HAT) が使用される。つまり、TFT添加でTK -/-, HAT添加でTK +/- の細胞だけが生き残るため、セクションが容易である。

次に、TSCER122細胞 (TK -/-) は、TK6細胞からTK遺伝子のエキソン5を欠き、その欠失部位から100 bp上流にI-SceI認識配列18 bp (<sup>5</sup>ATTACCCTGTTATCCCTA) を1つ持っている (図1)。その18 bp配列は、本来のヒトゲノム配列には無いため、その培養細胞にI-SceIを発現させるベクター (pCBAISCEI) を導入すれば、I-SceI酵素の切断により、ゲノムの1ヶ所だけに二本鎖切断 (DSB) を形成させることができる。そのI-SceI切断部位では、DNA修復されやすくなっているため、そこに相同配列 (エキソン5を含むTK遺伝子の一部) を持ち、且つDNA付加体を含むターゲティングベクターを導入すれば、相同組み換えにより、エキソン5とDNA付加体が同時にゲノム内に入る。その時、細胞はTK -/- TK +/- になるため、HATセクションによってTK+復帰細胞だけ (つまりDNA付加体が導入された細胞だけ) を後に回収することができる。

### (2)実験方法

ここで必要になってくるのは、DNA付加体を部位特異的に導入させられるターゲティングベクターの作製系である。本研究では、代表的な酸化的DNA付加体である8-Oxo-Guaを1つ含むターゲティングベクターの合成を試みた。その手法として、1つは8-Oxo-Guaを含むプライマーを用いるサイトダイレクトミュータジェネシスによる合成系 (Moggs, J.G. et al., *Nucleic Acids Res.* **25**, 480-490), もう一つは、北海道医療大学荒川俊哉博士が確立したPCRとライゲーションを組み合わせた修飾ベクターの作製法 (荒川ら未報告), 以上の二方法を応用して、その合成系の確立を試みた。

前者の方法は、環状一本鎖プラスミドに8-Oxo-Guaを含むプライマー (Sigma Genosys) をアニーリングさせ、サーマルサイクルによってプライマー伸長反応を行い、最後にライゲーションを施すことにより閉環状二本鎖プラスミドを作製した。後者は、取得したいDNA配列を有するプラスミドを用意し、欲しいDNA配列の5'末端から8-Oxo-Gua修飾プライマー領域の前方までをPCRする組とその後方までをPCRする組、そして、3'末端からも同様のPCRを行い、計4組のPCR産物を用意した。引き続き、特別な手法を用いて、それぞれを一本鎖DNAの状態にした後、アニーリングさせライゲーションを行うことにより直鎖状二本鎖プラスミドを作製した。

8-Oxo-Guaを1つ含んだターゲティングベクターを作製した後の実験方法を以下に示

す。5 x 10<sup>6</sup> cells/100 μL に調整した TSCER122 細胞に、pCBAISCEI 50 μg と pTK15<sup>Oxo</sup> (8-Oxo-Gua 修飾ターゲティングベクター) 2 μg を同時にトランスフェクション (Amasa 社製 Cell Line Nucleofactor kit) し、75 cm<sup>2</sup> の培養フラスコで培養 (37 °C, 5%CO<sub>2</sub>) した。その間、I-SceI 酵素の切断によって、ゲノムの 1ヶ所に DSB が生じ、相同組換えによって、pTK15<sup>Oxo</sup> 内にあるエキソン 5 と 8-Oxo-Gua がゲノムに同時に入るため、TK<sup>-/-</sup> → TK<sup>+/-</sup> となる。その 3 日後、細胞を 1 x 10<sup>4</sup> cells/mL に調整し、HAT 試薬を添加した後、96 穴プレート上 (2000 cells/well) でさらに 2 週間培養することによって、復帰細胞のクローン (TK<sup>+/-</sup>) を回収した。その後、各クローンのゲノム DNA を抽出し、8-Oxo-Gua 部位だった周辺のシーケンスを行い、目印配列 (図 2) が陽性 (相同組み換えが 8-Oxo-Gua ベクター間で行われたことを示す) のものに関して、ゲノム内における 8-Oxo-Gua の突然変異誘発能 (スペクトルおよび頻度) のデータとして採用した。

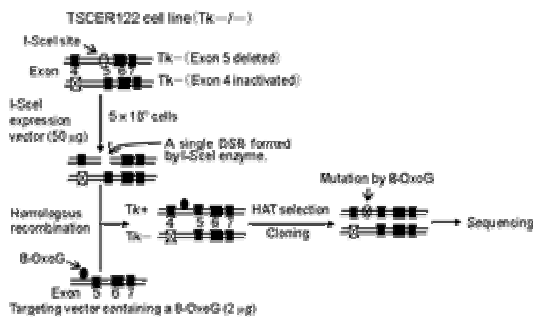


図 1 . 本実験系の概要

#### 4 . 研究成果

##### (1) 部位特異的に 8-Oxo-Gua を含ませたターゲティングベクターの合成系の確立

8-Oxo-Gua を 1 つ含んだターゲティングベクターを作製するために、8-Oxo-Gua を含むプライマーでサイトダイレクトミュータジェネシスによる合成法、および PCR とライゲーションを組み合わせた修飾ベクターの合成法の二方法について実施した。

前者の方法は、環状一本鎖プラスミドの取得、サーマルサイクルの条件、ライゲーション効率の設定など、何段階ものステップがあり、操作が煩雑でありながら、最終目的物を期待通りの収率で得られなかった。一方、後者は、通常の PCR による条件検討を行うだけで、必要な DNA 配列の全長断片を取得でき、最後のライゲーション反応も効率良く行うことが出来た。またこの系は、8-Oxo-Gua だけでなく他の DNA 付加体も容易に挿入させることが可能である。さらに、前者のサイトダイレクトミュータジェネシスによる合成

系と異なり、二本鎖 DNA の両鎖に自由に DNA 付加体を複数挿入させることができる。つまり、本研究によって、8-Oxo-Gua を部位特異的に含ませたターゲティングベクター (6.1 kbp) を効率よく合成できる系を確立した。なお、この合成系の詳細は、現段階において非公開とする。

##### (2) 8-Oxo-Gua はゲノム内に導入されたか？

次に、8-Oxo-Gua を 1 つ含んだターゲティングベクターをゲノム内に導入した後、TK<sup>+</sup> となって復帰してきた細胞のゲノム DNA を解析することによって、8-Oxo-Gua が本当にゲノム内に入っているかどうかを調べた。あらかじめ 8-Oxo-Gua ベクターには 8-Oxo-Gua 導入部位の 11 bp 上流 (イントロン) に目印配列として、T → A 塩基置換を意図的に施してある (図 2)。もし、8-Oxo-Gua ベクターを用いて、DSB 部位で相同組み換えが起こったのであれば、その目印配列が検出されるはずである。すなわち、その目印配列 Ade を持つクローンには、8-Oxo-Gua がゲノムに導入されたことを示す証拠となる。59 復帰細胞のゲノム DNA を抽出し、シーケンス解析した結果、そのうちの 26 復帰細胞 (45%) が野生型 (Thy) で、33 復帰細胞 (56%) が塩基置換型 (Ade) で検出された。つまり、I-SceI で形成した DSB 部位で起こる相同組み換えは、8-Oxo-Gua ベクター間で行われていることが明らかとなった。また、その頻度は、アレル間で行われる相同組み換えとほぼ同じであることが分かった。すなわち、8-Oxo-Gua はゲノム内に導入されていることが確認できた。

##### (3) ゲノム内における 8-Oxo-Gua の突然変異誘発能

次に、その目印配列が陽性だった 33 復帰細胞について、8-Oxo-Gua 部位の突然変異誘発能を調べた (図 3)。最初にコントロールとして、8-Oxo-Gua を含ませていない無修飾のターゲティングベクターを導入した場合は、22 復帰細胞のすべてにおいて、8-Oxo-Gua の対面に Cyt (100%) が塩基対形成されていた。一方、8-Oxo-Gua を含むターゲティングベクターを導入すると、33 復帰細胞中 27 が正常塩基 Cyt (82%) が検出されたが、5 細胞から Ade (15%)、1 細胞から Thy (3%) が検出された。つまり、ゲノム内の 8-Oxo-Gua は、突然変異誘発を起こす DNA 付加体であることが分かった。

以上、まとめると本来ゲノム上に存在する 8-Oxo-Gua は、わずか一つであっても約 18% の頻度で突然変異 (主に G・C → T・A トランスバージョン) を誘発させることが明らかとなった。しかしながら、この突然変異誘発頻度は非常に高いため、実験条件の検討や再現

性について今後確かめる必要があると考えている。

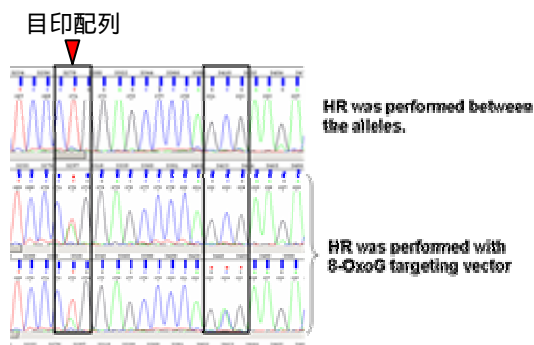


図2 . 目印配列による 8-Oxo-Gua 導入の確認

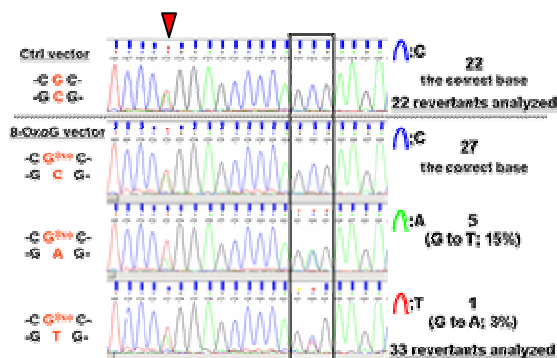


図3 . 8-Oxo-Gua 部位対面のシーケンス結果

## 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2件)

- (1) Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi, T., Hayashi, M., and Honma, M.; Miscoding properties of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA Adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases., *Journal of Molecular Biology.* **377**, 1015-1023, 2008, 査読有り
- (2) Yasui, M., Suzuki, N., Liu, X., Okamoto, Y., Kim, S.Y., Laxmi, Y.R., and Shibutani, S.; Mechanism of translesion synthesis past an equine estrogen-DNA adduct by Y-family DNA polymerases., *Journal of Molecular Biology.* **371**, 1151-1162, 2007, 査読有り

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 安井学, 本間正充: ヒトリンパ球細胞の

ゲノム内に導入させた 8-オキソグアニン 1 分子の突然変異誘発能. 日本環境変異原学会第 37 回大会, 那覇市 (Dec. 2008)

- (2) 安井学, 鈴木奈緒美, 澁谷真也, 本間正充: 一酸化窒素によって形成する DNA 付加体の誤塩基対形成メカニズム. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 神戸市 (Dec. 2008)
- (3) Yasui, M., Suzuki, N., Liu, X., Okamoto, Y., Kim, S.Y., Laxmi, Y.R., and Shibutani, S.: Mechanism of translesion synthesis past an equine estrogen-DNA adduct by Y-family DNA polymerases. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜市 (Dec. 2007)
- (4) Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi, T., Hayashi, M., and Honma, M.: Translesion synthesis past 2'-deoxyinosine, a major nitric oxide-induced DNA adduct, by human DNA polymerase  $\eta$  and  $\kappa$ . 1st ACEM/36th JEMS , 北九州市 (Nov. 2007)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

安井 学 (YASUI MANABU)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・研究員

研究者番号: 50435707

