

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12348

研究課題名(和文) 損傷乗り越えDNA合成を介したアクリルアミド誘発突然変異の分子機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism of acrylamide-induced mutagenesis via translesion synthesis

研究代表者

赤木 純一 (Akagi, Jun-ichi)

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官

研究者番号：60512556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒト細胞においてアクリルアミド誘発突然変異に寄与するDNAポリメラーゼを明らかにするため、Pol β 、Pol γ 、Pol δ 、およびREV1のノックアウト細胞を作出し、アクリルアミドの活性代謝物であるグリシドアミドN7位dG付加体(GA7dG)の安定化アナログ(GA7dfG)における部位特異的突然変異頻度を測定した。その結果、GA7dGにより誘発される点突然変異の少なくとも一部にはPol β およびREV1を介した損傷乗り越えDNA合成が関与し、これらによりGA7dG部位におけるG:C > A:T および G:C > C:G点突然変異が誘発されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アクリルアミドは食品の加熱調理により非意図的に生成する遺伝毒性発がん性物質である。本研究ではアクリルアミド曝露により生じる主要なDNA損傷であるGA7dGによる点突然変異に、損傷乗り越え型DNAポリメラーゼであるPol β およびREV1が直接寄与することを見出した。これらの知見はアクリルアミドによる突然変異誘発のメカニズムに新たな知見を与えるものであり、食品中の変異原に起因する継続的な変異負荷の理解に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We generated knockout cells for Pol β , Pol γ , Pol δ , and REV1 to identify the DNA polymerases that contribute to acrylamide-induced mutations in human cells. The site-specific mutation assay using the stable analogue of N7-dG adduct of glycidamide (GA7dG), the active metabolite of acrylamide revealed that Pol β and REV1 partially contribute to the GA7dG-induced mutations via translesion DNA synthesis, which induce G:C > A:T and G:C > C:G point mutations at the lesion.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：アクリルアミド グリシドアミド 損傷乗り越えDNA合成 突然変異 遺伝毒性

1. 研究開始当初の背景

アクリルアミドは国際がん研究機関発がん性分類において 2A (人に対しておそらく発がん性がある) に分類される遺伝毒性発がん性物質である。アクリルアミドは炭水化物を多く含む食品を高温で加熱することにより非意図的に生成され、ポテトチップス、フライドポテト、ほうじ茶、コーヒー、米菓、インスタント麺などの加工食品に含まれているだけでなく、パンのトーストや野菜炒めなど家庭内調理によっても生成することから食品安全上の重要な課題となっている。

アクリルアミドは生体内で CYP2E1 によりエポキシ体である GA に代謝され、主にデオキシグアノシン (dG) の N7 位付加体 (GA⁷dG) を形成する。dG の N7 位付加体は脱塩基反応を起こしやすいことから、その結果生じる脱塩基部位がアクリルアミド誘発突然変異を誘発すると考えられてきた (図 1)。

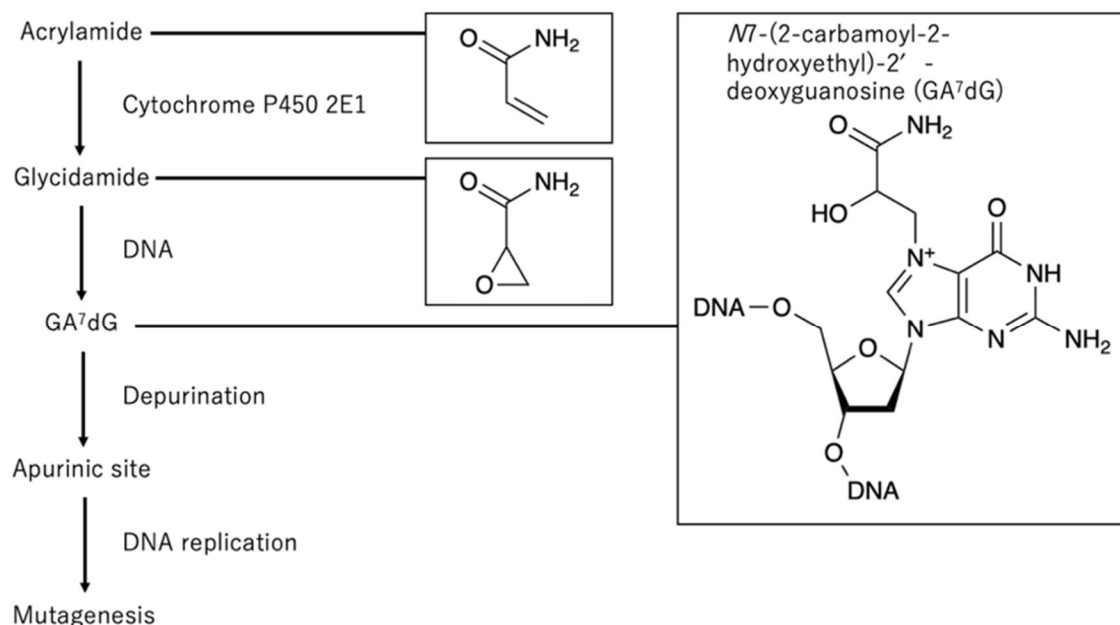


図 1. 従来想定されていたアクリルアミド誘発突然変異機序。

しかし、脱塩基部位は内因性に多く生じる DNA 損傷の一つであり、細胞は脱塩基部位に対する効率の良い修復系を備えている。ゲノム DNA には 10^6 ヌクレオチド当たり 8—30 個と推定される高いレベルの脱塩基部位が定常的に存在している一方、アクリルアミドや GA の曝露により脱塩基部位が増加するという証拠は得られていない。またゲノム DNA 中の GA⁷dG はマウスへのアクリルアミド投与後少なくとも 24 時間は持続して存在しており、反復投与による蓄積性も見られている。従って、GA⁷dG の脱プリン反応に由来する脱塩基部位が GA の変異原性の主要な原因であることには疑問が持たれる。かつて dG の N7 位付加体はワトソン-クリック塩基対形成を阻害しないことから変異を誘発しないと考えられてきたが、近年は dG の N7 位付加体が突然変異原性を有する DNA 損傷であるという証拠が多く得られている。これらの知見から、アクリルアミド誘発突然変異の分子機序として、GA⁷dG 自身が DNA 複製を阻害し突然変異を誘発する可能性が考えられた。GA の *in vivo* および *in vitro* での変異原性はこれまでにレポーター遺伝子変異アッセイ、全エクソームシーケンス解析、および全ゲノムシーケンス解析によって報告されているが、これらのアッセイでは検出された変異が残存する GA 付加体由来か脱塩基部位由来かを区別することができない。特定の付加体がどのような変異を誘発するかを調べるためには、特定の部位に合成オリゴヌクレオチドを組み込んだ鋳型 DNA を用いた複製アッセイが不可欠であるが、GA⁷dG は上述の通り脱塩基しやすいため、これまでに GA⁷dG の化学合成は行われていなかった。我々は 2'-デオキシアラビノフラノースの 2'位の水素をフッ素で置換することで GA⁷dG の安定化アナログ (GA⁷dfG) を作成し、この付加体がヒト細胞で DNA 複製阻害と点突然変異を誘発することを見出した。このように DNA 損傷により複製が阻害されたとき、それを乗り越えて DNA 複製を継続する機構の一つが TLS である。哺乳類細胞は Polη (イータ)、Polι (イオタ)、Polκ (カッパ)、Polζ (ゼータ)、REV1 など複数の TLS ポリメラーゼ (TLS 活性を持つ DNA ポリメラーゼ) を持っており、それぞれ乗り越えられる損傷の種類や取り込む塩基の選択性が異なっている。TLS では損傷塩基を鋳型として DNA 複製を行うために通常の DNA 複製と比べて誤った塩基を取り込む頻度がきわめて高く、点突然変異の多くに寄与していると考えられている。そのため、突然変異誘発機序の解明にはどの TLS ポリメラーゼが GA 付加体の乗り越えに関与し、どの塩基を取り込むかを明らかにすることが重要である。

2. 研究の目的

本研究ではアクリルアミド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変異原性に焦点を当て、「どの TLS ポリメラーゼがヒト細胞内で GA⁷dfG に対する TLS を担い、アクリルアミド誘発突然変異に寄与するか」を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

3-1. シャトルベクターを用いた細胞内 TLS アッセイ

GA⁷dfG の安定化誘導体である GA⁷dfG を特定の位置に持つオリゴ DNA を片側の鎖（以下、修飾鎖）に組み込んだヒト細胞内で複製可能なシャトルベクターを、ゲノム編集により作出した TLS ポリメラーゼ (Polη、Polι、Polκ、REV1) 欠損細胞にトランスフェクションした。48 時間培養して細胞内で複製させた後、複製産物を回収した。複製産物で大腸菌を形質転換し、GA⁷dfG 導入部位周辺配列をコロニー PCR で増幅した。各クローン由来の増幅産物を SmaI 処理して非修飾鎖由来複製産物を切断し、アガロースゲル電気泳動により修飾鎖と非修飾鎖由来産物を識別した。GA⁷dfG 鎖の複製効率、dfG 鎖における修飾鎖由来複製産物割合を 100% として算出した。突然変異頻度および変異スペクトラムは、修飾鎖の PCR 産物を直接シーケンスして解析した (図 2)。

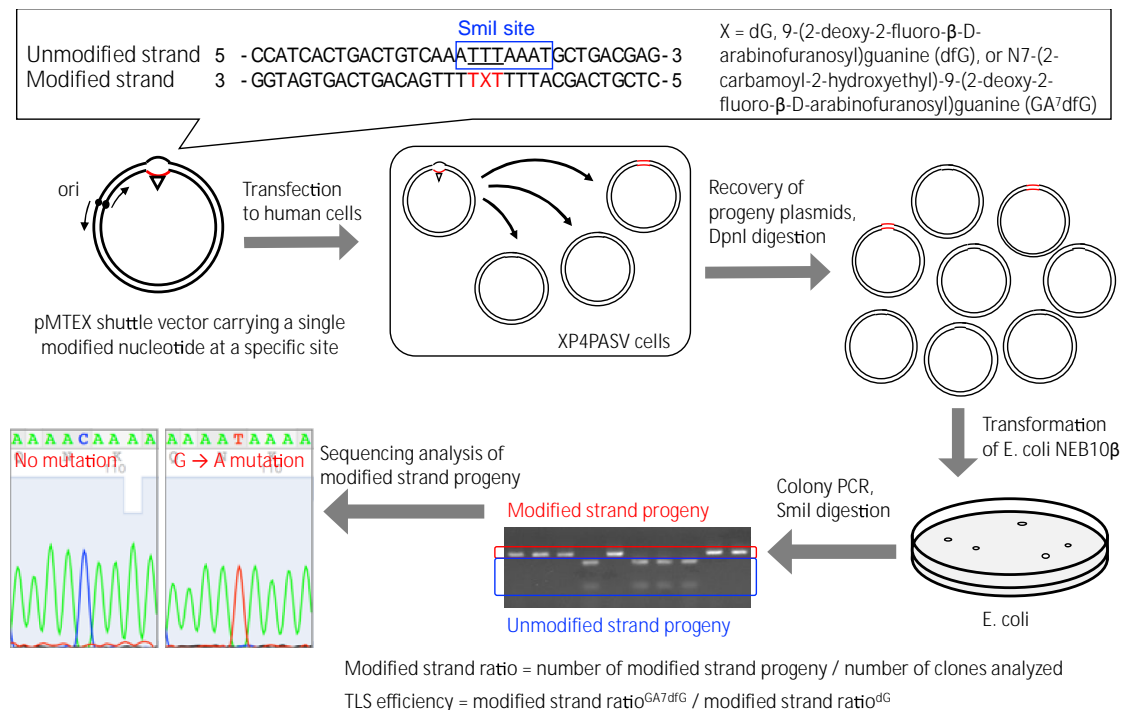


図 2. シャトルベクターを用いた細胞内 TLS アッセイの概略図。

3-2. Polκ タンパク質を用いた単一ヌクレオチドの取り込みアッセイ

GA⁷dfG を 5' 末端から 16 塩基目に持つ 30 塩基長のオリゴ DNA に ³²P で放射標識した 15 塩基長のプライマー DNA をアニールさせ、Polκ とデオキシヌクレオチド三リン酸 (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) を加えて反応させ、GA⁷dfG に対する各ヌクレオチドの取り込み効率を比較した。

4. 研究成果

4-1. シャトルベクターを用いた細胞内 TLS アッセイ

シャトルベクター上の GA⁷dfG が除去されないように、グローバルゲノムヌクレオチド除去修復機構が欠損した XP4PASV 細胞をベースとして、ゲノム編集により主要な TLS ポリメラーゼ (Polη、Polι、Polκ、REV1) の両アレル欠失 (KO) 細胞を作出した。いずれの細胞も親細胞株である XP4PASV と比べて GA⁷dfG 鎖の複製頻度には有意な差は見られなかったが (図 3A) Polκ KO および REV1 KO 細胞では、GA⁷dfG の変異頻度が約半分程度に低下していた (図 3B)。変異スペクトラム解析では、いずれの細胞でも GA⁷dfG に対する T および G の誤重合の低下が見られたことから、Polκ と REV1 は GA⁷dfG に対する T および G の取り込みと、その結果として生じる G:C>A:T、G:C>C:G 変異に協調して寄与していることが示唆された (図 3C)。

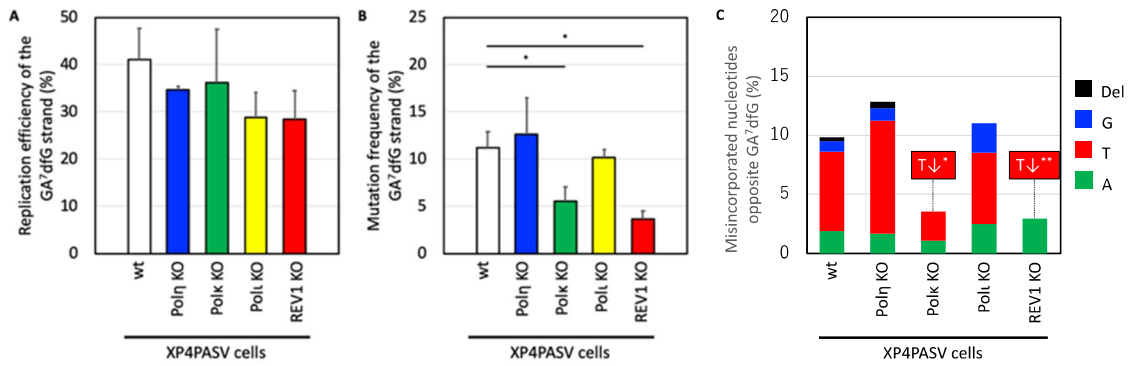


図 3. TLS ポリメラーゼ欠損細胞を用いた GA⁷dfG の細胞内 TLS アッセイ。A. GA⁷dfG 鎖の複製効率。B. GA⁷dfG 鎖の変異頻度。C. GA⁷dfG 導入部位の変異スペクトラム。

4-2. Polk タンパク質を用いた単一ヌクレオチドの取り込みアッセイ

Polk が GA⁷dfG に対して塩基を重合する”インサーター”として働くことが示唆されたことから、Polk が GA⁷dfG に対する誤った塩基の取り込み活性を有するかどうか、精製 Polk タンパク質とプライマー-テンプレート型基質を用いて単一ヌクレオチドの取り込みアッセイを行ったところ、GA 付加体に対しては正しい塩基である dCTP の取り込み効率が圧倒的に高かったものの、dTTP および dGTP の弱い取り込みが見られたことから、Polk が GA⁷dfG に対してこれらの誤ったヌクレオチドを重合する活性を持つことが示された (図 4)。

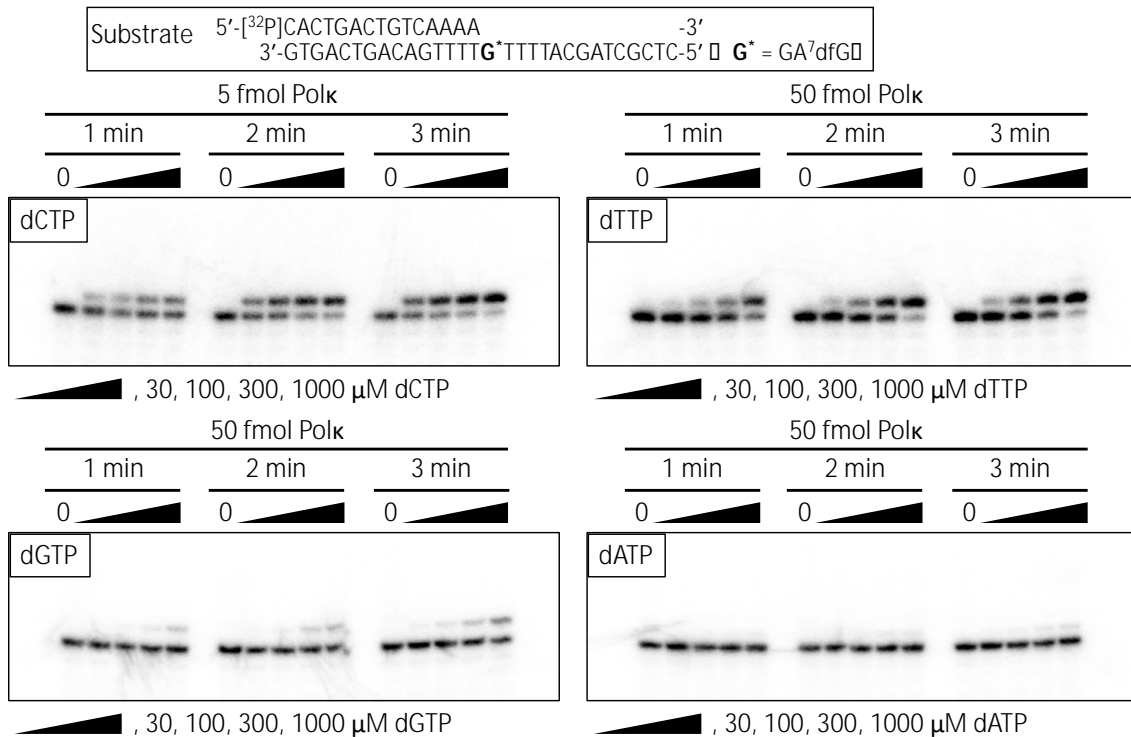


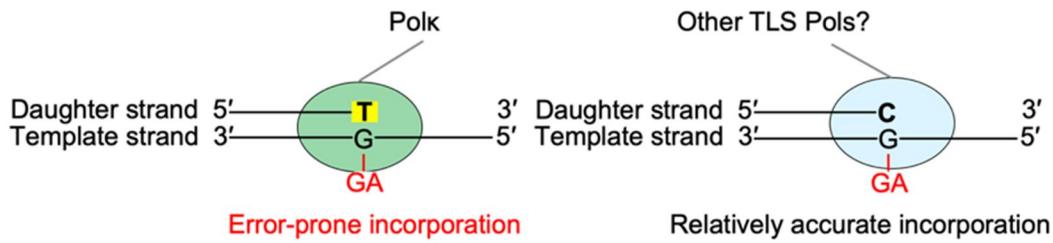
図 4. Pol による GA⁷dfG に対する単一ヌクレオチドの取り込み活性。

4-3. 結論

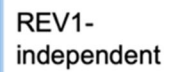
細胞内 TLS アッセイにおいて、REV1 KO および Polk KO 細胞では GA⁷dfG 部位における点突然変異頻度が低下したことから、これらの TLS ポリメラーゼが GA⁷dfG 誘発突然変異に寄与することが示された。REV1 は他の DNA ポリメラーゼとは異なり、鋳型塩基に関わらず dCTP を特異的に取り込むデオキシシチジルトランスフェラーゼ活性を有しており、GA⁷dfG に対して直接塩基を取り込む”インサーター”として働いた場合には突然変異を抑制すると考えられる。したがって、GA⁷dfG 誘発点突然変異における REV1 の役割はその非触媒的機能に依存することが予想された。REV1 は TLS ポリメラーゼである Polη、Poli、Polk および Polζ と相互作用し、TLS ポリメラーゼ間のスイッチングに寄与しているため、Polk が GA⁷dfG に対して誤りがちな”インサーター”として働き、REV1 が Polk から次のステップを担う”エクステンダー”へのスイッチングに関与しているのではないかと考えられた (図 5)。単一ヌクレオチド取り込みアッセイでは、

Polk は GA⁷dfG に対して主に正しいヌクレオチドである dCTP を取り込む活性が見られた一方で、誤ったヌクレオチドである dTTP および dGTP を取り込む弱い活性を有しており、細胞内 TLS アッセイで見られた GA⁷dfG:C > A:T および GA⁷dfG:C > C:G 点突然変異に寄与していること

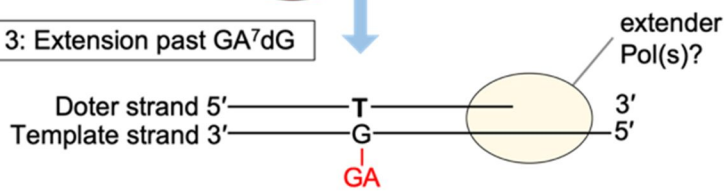
Step 1: Nucleotides incorporation opposite GA⁷dG



Step 2: Polymerases switching



Step 3: Extension past GA⁷dG



Error-free bypass

Induction of point mutation at the site of GA⁷dG

が示された。

図 5. GA⁷dG による突然変異誘発機序の作業仮説。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akagi J, Hashimoto K, Suzuki K, Yokoi M, de Wind N, Iwai S, Ohmori H, Moriya M, Hanaoka F	4. 巻 87
2. 論文標題 Effect of sequence context on Pol δ -dependent error-prone extension past (6-4) photoproducts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 102771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dnarep.2019.102771	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤木純一, 横井雅幸, Young-Man Cho, 岩井成憲, 花岡文雄, 菅澤薫, 小川久美子
2. 発表標題 グリシドアミドN7位デオキシグアノシン付加体による点突然変異に寄与する損傷乗り越え型DNAポリメラーゼの解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木純一, 横井雅幸, Young-Man Cho, 岩井成憲, 花岡文雄, 菅澤薫, 小川久美子
2. 発表標題 損傷乗り越え型DNAポリメラーゼPol δ とREV1はグリシドアミドN7位デオキシグアノシン付加体による点突然変異に寄与する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤木純一, 横井雅幸, 曹永晚, 岩井成憲, 花岡文雄, 菅澤薫, 小川久美子
2. 発表標題 鋳型鎖上の2'-デオキシグアノシンN 7位グリシドアミド付加体はヒト細胞においてDNA複製を阻害し点突然変異を誘発する
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤木純一, 横井雅幸, Young-Man Cho, 岩井成憲, 花岡文雄, 菅澤薫, 小川久美子
2. 発表標題 N7-グリシドアミドdG付加体により誘発されるDNA複製阻害と変異原性の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤木純一, 横井雅幸, Young-Man Cho, 岩井成憲, 花岡文雄, 菅澤薫, 小川久美子
2. 発表標題 アクリルアミドの活性代謝物であるグリシドアミドのデオキシグアノシンN7位付加体はDNA複製阻害と点突然変異を誘発する
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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	横井 雅幸 (Yokoi Masayuki) (00322701)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授 (14501)	

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
---------	---------