

令和 5 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：2019～2022

課題番号：19K12349

研究課題名（和文）DNAポリメラーゼ（ゼータ）の変異生成・抑制における損傷特異性

研究課題名（英文）Specificity of DNA lesion by the DNA Polymerase zeta

研究代表者

石井 雄二（Ishii, Yuji）

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・室長

研究者番号：70544881

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、様々なDNA損傷に対するDNAポリメラーゼゼータ（Pol ζ ）の働きを明らかにするため、Rev31 L2610M gpt deltaマウスとgpt deltaマウスに異なるDNA損傷を引き起こす3つの腎発がん物質を投与し、Pol ζ の複製忠実度の低下が遺伝子変異に及ぼす影響を検索した。その結果、Pol ζ はルビアジンが誘発するグアニンの損傷によるミスマッチ末端からの伸長反応と、グアニンとアデニンの損傷のTLSに寄与することが示唆された。一方、臭素酸カリウムやオクラトキシンAが誘発する突然変異に遺伝子型間の差は見られず、酸化的DNA損傷やDNA二重鎖切断にPol ζ は作用しないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに明らかにしてきたベンゾ[a]ピレンが引き起こすDNA損傷に対するPol ζ の働きに加えて、本研究結果ではルビアジンの突然変異誘発にもPol ζ が寄与することが明らかとなり、Pol ζ が様々な環境化学物質の突然変異誘発に寄与していることが示唆された。一方で、酸化的DNA損傷や欠失変異の誘発には寄与していないことも明らかとなり、Pol ζ の作用の損傷特異性について、その一端を示す情報が得られた。これらの結果はPol ζ の変異生成と抑制の分子機構解明の足掛かりになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, to elucidate the function of DNA polymerase zeta (Pol ζ) in response to various DNA damages, we examined the effects of reduced replication fidelity of Polzeta on gene mutations using gpt delta and Rev31 L2610M gpt delta (Rev31) mice. These mice were treated with three renal carcinogens and kidneys were subjected to reporter gene assays. The results suggested that Pol ζ contributes to the extension reaction from mismatched ends caused by rubiadin-induced damage to adenine bases and to the trans-lesion synthesis (TLS) of guanine and adenine base damage. On the other hand, no differences in gene mutations induced by potassium bromate or ochratoxin A were observed between genotypes, suggesting that Pol ζ does not act on oxidative DNA damage or DNA double-strand breaks.

研究分野：化学発癌

キーワード：DNAポリメラーゼゼータ DNA損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトは様々な環境化学物質に暴露されており、その中には DNA を傷害する物質が含まれている。それ故、遺伝情報を保持する DNA はそれらによって日常的に損傷を受けており、それに対して細胞は様々な修復機構を備えることで、正確な遺伝情報を維持している。しかしながら、DNA 複製中に生じた損傷を修復するシステムは存在せず、複製型 DNA ポリメラーゼは複製中に DNA 損傷があると停止してしまうことから、細胞はいくつかの方法で複製停止を回避する。その一つが Y-family DNA ポリメラーゼによって行われる損傷乗り越え複製 (TLS) である。これらのポリメラーゼは損傷部位の向かいにしばしば誤った塩基を挿入することから、突然変異誘発の一因と考えられている。しかし、これらポリメラーゼによる TLS は損傷塩基の向いに塩基を挿入すると複製は停止し、形成されたミスマッチ末端から数塩基にわたる伸長 (mismatch extension) は B-family ポリメラーゼの一つであるポリメラーゼゼータ (Pol ζ) が行っていることが酵母における研究で明らかになった。その後、複製型 DNA ポリメラーゼによる複製が完成すると、細胞死は回避され、生き残った細胞には突然変異が固定されることから、Pol ζ は変異の生成か否かを決定づけている重要なポリメラーゼと考えられている。

Pol ζ は触媒サブユニットである Rev3 と補助サブユニットである Rev7 からなるヘテロダイマーで、Rev3 の分子量が比較的小さい酵母 (173kDa) では、上述したようにミスマッチ末端からの伸長反応を行うことが報告された。一方、哺乳類の Rev3 はアミノ酸残基 3130 の単一ポリペプチド鎖からなる分子量約 353kDa の大きなタンパク質で、その活性を維持した状態での単離精製が困難であることから、その機能の詳細は明らかになっていない。また、ポリメラーゼの生物学的機能を明らかにする上で *in vivo* 試験系での研究が重要であるが、Rev3 遺伝子の欠損は耐性致死となることから欠損マウスを用いた研究はこれまで困難であった。これに対し、申請者は遺伝子改変によって Pol ζ の複製忠実度を低下させた Rev3^{L2610M} *gpt delta* マウスを用いることで、Pol ζ がベンゾ[a]ピレン (BaP) の突然変異誘発過程において mismatch extension だけでなく、複製忠実度の高い TLS に寄与していることを明らかにし、変異の生成だけでなく抑制にも重要な役割を担っていることを見出してきた¹⁾。

2. 研究の目的

BaP は主に DNA 中のグアニン塩基と反応し、嵩高い DNA 付加体を形成する。一方、環境化学物質の中には、異なる塩基と優先的に反応し、異なるパターンの突然変異を誘発するもの、酸化的 DNA 損傷や DNA 二重鎖切断等を引き起こすものがあるが、これらの DNA 損傷に対する Pol ζ の働きは未だ明らかになっていない。本研究では、Rev3^{L2610M} *gpt delta* マウスと *gpt delta* マウスに、異なる DNA 損傷を引き起こす 3 つの腎発がん物質を投与し、各 DNA 損傷に対する Pol ζ の関与の有無を検索し、*in vivo* において Pol ζ がどのような DNA 損傷に対し、どのように働くかを明らかにすることで、Pol ζ の変異生成・抑制の分子機構解明の足掛かりをつかむ。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

Rev3^{L2610M} *gpt delta* マウスは、Rev3 のエクソン 24 にある L2610 をメチオニンに置換したマウスを作出した後、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* マウスとの交配によって作出された。本マウスでは、レポーター遺伝子 (*gpt* 及び *red/gam*) 上に生じた変異を *gpt* assay 及び Spi- assay により解析できることから、Pol ζ の遺伝子改変による複製忠実度の低下が突然変異に及ぼす影響をこれらの assay で評価した。

(2) ルビアジン (Rub) の投与

Rub はげっ歯類において腎発がん性を有するアカネ色素の構成成分の一つで、アントラキノン骨格を有する。本物質は代謝活性化後、DNA と共有結合して嵩高い DNA 付加体を形成し、アデニン塩基の損傷を起点とした A:T-T:A transversion を特徴とする突然変異を引き起こす²⁻⁵⁾。Rev3^{L2610M} *gpt delta* マウスと *gpt delta* マウスに Rub を 100、200 又は 400 ppm の濃度で粉餌に混じて 28 日間投与し、3 日間休薬後に剖検し、腎臓を採材した。また、高用量暴露時の影響を評価するための追加試験として、Rev3^{L2610M} *gpt delta* マウスと *gpt delta* マウスに Rub を 40、200 又は 1000 mg/kg 体重の用量で 3 日間強制経口投与し、28 日目に剖検し、腎臓を採材した。

(3) 臭素酸カリウム (KBrO₃) の投与

KBrO₃ は活性酸素種を生成し、酸化的 DNA 損傷を引き起こす腎発がん物質である。マウスでは腎臓において 8-hydroxydeoxyguanosine 形成に由来する G:C-T:A transversion や一塩基欠失を特徴とする突然変異を引き起こす⁶⁻⁷⁾。Rev3^{L2610M} *gpt delta* マウスと *gpt delta* マウスに KBrO₃ を 750、1500 又は 3000 ppm の濃度で 28 日間飲水投与し、3 日間休薬後に剖検し、腎臓を採材した。

(4) オクラトキシン A (OTA) 投与

OTA は *A. ochraceus* 及び *P. verrucosum* 等の菌によって産生されるカビ毒で、げっ歯類において腎臓がん性を有する。マウスでは一塩基欠失を特徴とする欠失変異頻度の増加を引き起こす⁸⁻¹⁰⁾。Rev31 L2610M *gpt delta* マウスと *gpt delta* マウスに OTA を 1.25、2.5 又は 5.0 mg/kg 体重の用量で 28 日間強制経口投与し、3 日間休薬後に剖検し、腎臓を採材した。

(5) レポーター遺伝子突然変異試験

gpt assay では *in vitro* パッケージングにより腎臓のゲノム DNA から回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 株に感染させ、6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。また、ファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率をかけて回収した総ファージ数(あるいは回収した総トランスジーン数)を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 遺伝子変異体頻度を算出した。また、6-TG と Cm に耐性となったコロニーについては、*gpt* 遺伝子の塩基配列解析を行い、変異部位を同定した。Spi assay による欠失変異の検出では、ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2)株) に感染させ、Spi プラークの候補については、さらに他の P2 溶原菌 (大腸菌 WL95 株) に感染させ、*red/gam* 遺伝子機能が不活化した真の Spi プラークを検出した。また、パッケージング反応後の懸濁液を希釈した後に P2 ファージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。真の Spi プラーク数を回収した総プラーク数で除して Spi 変異体頻度を算出した。

4. 研究成果

Rub を Rev31 L2610M *gpt delta* マウスと *gpt delta* マウスに 28 日間混餌投与し、腎臓のレポーター遺伝子突然変異解析を行った結果、100 ppm 群から両遺伝子型で *gpt* 変異体頻度の有意な上昇が認められ、用量依存的に増加した(図1)。しかしながら、*gpt* 変異体頻度の上昇に遺伝子型間の差は見られなかった。一方、得られた *gpt* 変異体の変異スペクトラム解析を行った結果、Rev31 L2610M *gpt delta* マウスでは *gpt delta* マウスに比して G:C-T:A transversion 及び G:C-C:G transition の頻度が減少したのに対し、連続した又は数塩基にまたがった 2~3 塩基で変異が生じる特徴的な complex 変異が多数検出され、その頻度は *gpt delta* マウスに比べ 2 倍上昇した(図2)。Pol ζ の複製忠実度低下により生じたこれらの変化は、G:C-T:A transversion 及び G:C-C:G transition の形成に Pol ζ が寄与することを示唆するものと考えられた。

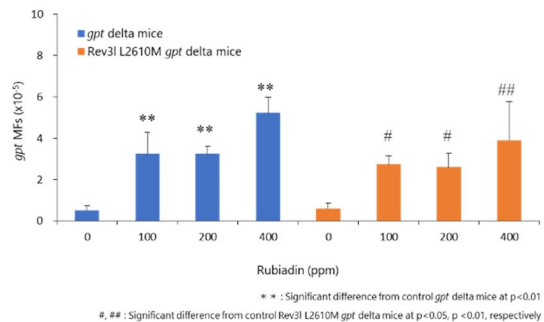


図1 Rub28日間投与 + 3日後の*gpt*変異体頻度の比較

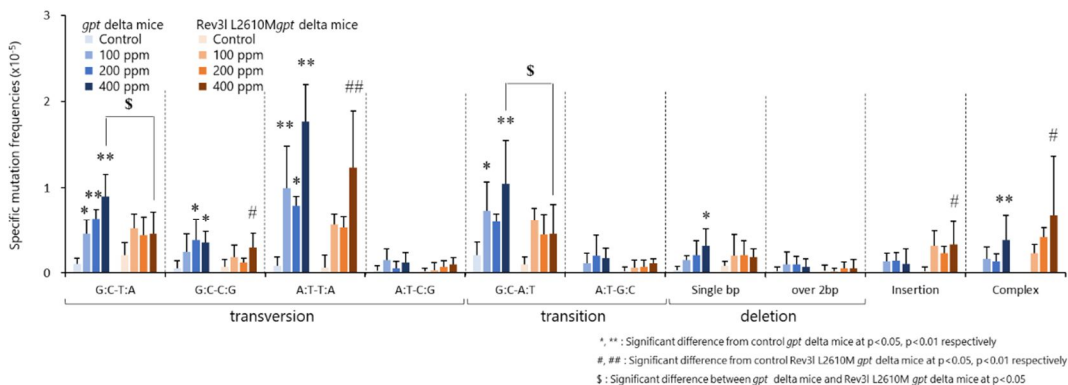


図2 Rub28日間投与 + 3日後の変異スペクトラムの比較

さらに、変異スペクトラム解析において検出された complex 変異の 3'(33%)又は 5'末端(48%)の多くがグアニン又はシトシン塩基であったことから(表1) Pol ζ は Rub によって生じるグアニン塩基の損傷に生じたミスマッチ末端からの伸長反応を行っている可能性が示唆された。これらの結果は BaP の結果とも一致していた。一方、*gpt* 変異体頻度に遺伝子型間の差がみられなかったことは、本実験条件下において Pol ζ が Rub 誘発 DNA 損傷の TLS に寄与していないことを示唆するものと考えられた。

表1 Rub28日間投与+3日後に認められたComplex変異の詳細

gpt delta mice			Rev3l L2610M gpt delta mice			gpt delta mice			Rev3l L2610M gpt delta mice		
Position	Wild type	Mutation	Position	Wild type	Mutation	Position	Wild type	Mutation	Position	Wild type	Mutation
70	GATG	GTAG	225	ACGCGCAG	A_CGCIG	15	ACAT	AATT	434	C_GTCC_C	CGGTCCIC
329	TCA	GAA	370	TGA	TIIA	144	GTGA	GAAA	109	CGGT	CAIT
132	TAC	TIIC	264	ATGA	AGAA	91	AGG	ATAG	6	GGGA	G_GGA
419	GATAT	GCTGT	149	CTGGG	C_ATG	125	CGGGT	CAGGIT	171	C_GTTTGTAT	CGTITGTAT
400	CTGGA	CGAAA	319	AGCGCAC	A_GCTC	335	ATCTTCGCAAAAC	ACCTTCGCAAAAC	135	AC_TGG	ACCTAG
212	CTTAA	CAT_A	164	GTCG	GAA	48	CACGT	CACAT	281	GGTG	GAA
417	GGGA	GATA	430	GTA	GAAA	438	C_CCG_C	CGCGIC	299	AITC	AAAC
343	AAAA	A_TA	110	CGTGG	CTTIG	153	G_TAT	GATIT			
5	GCGA	GATA	287	ACTGC	ATITC	351	CTGG	C_AG			
332	ACCA	AAGA	319	AGCGCAC	A_GCTC	343	AAA_C	ATATC			
109	CCGT	CAIT	415	GTTG	G_AG	413	CCGT	CGIT			
416	TGG	TIIG	95	AITATTGCCGTAAGC	AATATTGCCGTAAGC	188	TACGA	TIATA			
114	GCGG	GATG	113	GGCG	GAA	400	CTGGA	CGAGAA			

過去に実施した BaP を用いた研究では、Pol ζ は大量の DNA 損傷が生じ、他の Pol の働きが飽和した場合に TLS を行うことが示唆されていることから、高用量の Rub を暴露した場合の影響についても検討を行った。Rub を Rev3l L2610M *gpt delta* マウスと *gpt delta* マウスに 3 日間強制経口投与し、28 日後に採取した腎臓のレポーター遺伝子突然変異解析を行った。その結果、*gpt* 変異体頻度は中間用量群から有意に上昇し、Rev3l L2610M *gpt delta* マウスではより高い変異体頻度を示した(図3)。*gpt* 変異体の変異スペクトラム解析を行った結果、*gpt delta* マウスでは G:C-T:A、G:C-C:G 及び A:T-T:A transversion の有意な増加が認められた(図4)。Rev3l L2610M *gpt delta* マウスでは、*gpt delta* マウスに比して、G:C-T:A 及び A:T-T:A transversion、G:C-A:T transition、一塩基欠失の頻度の上昇傾向が観察された。これらの結果は Rub が誘発するグアニン及びアデニン塩基の損傷に対して、Pol ζ が TLS を行う可能性を示唆するものと考えられた。

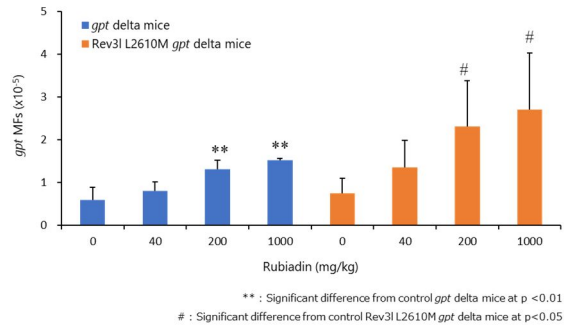


図3 Rub3日間投与+28日後のgpt変異体頻度の比較

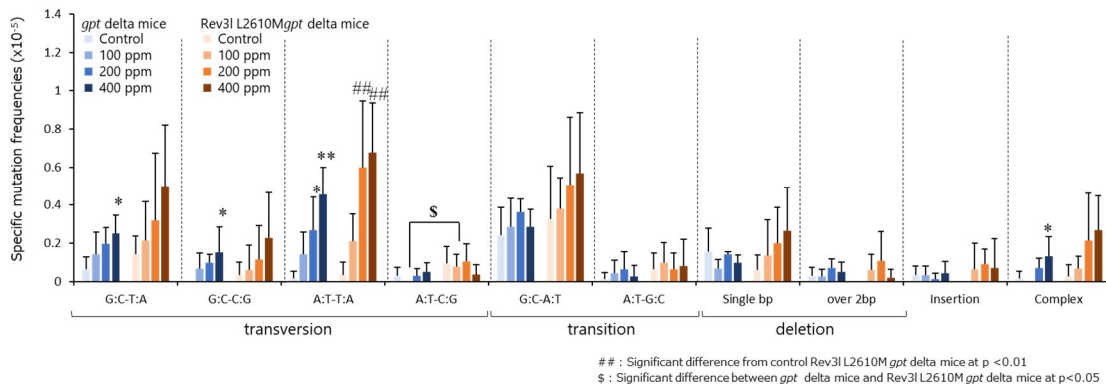


図4 Rub3日間投与+28日後の変異スペクトラムの比較

また、変異スペクトラム解析においてルビアジンに特徴的な連続した2塩基又は1塩基を挟んだ2塩基の変異からなる complex 変異も両遺伝子型で認められた(表2)。

以上の結果は、Pol ζ が通常時にはグアニン塩基に生じたミスマッチ末端からの伸長反応を行い、TLSに必要な他のPolが不足した場合にはグアニンやアデニン塩基の損傷に対して複製忠実度の高いTLSを行うことを示唆するものと考えられ、BaPの結果とも一致していた。

一方、KBrO₃ 及び OTA が誘発する点突然変異頻度又は欠失変異頻度において遺伝子型間の差は認められず、変異スペクトラムにおいても変化はみられなかった。これらの結果から、Pol ζ は酸化的 DNA 損傷や DNA 二重鎖切断の複製過程には寄与しないと考えられ、ルビアジンのような高い DNA 損傷を誘発する化学物質の変異の誘発と抑制に寄与しているものと考えられた。

表2 Rub3日間投与+28日後に認められたComplex変異の詳細

gpt delta mice			Rev3l L2610M gpt delta mice		
Position	Wild type	Mutation	Position	Wild type	Mutation
211	GCTTAA	G_TTIA	261	TIG_A	TAGAA
15	ACAT	AACT	404	AITGA	AATAA
280	CGGT	CAAT	162	ATGIC	AAGAC
47	A_CGTAA	ACCTTIA	212	C_TTAAAGT	CITTAATIT
261	TIGA	TAIA	284	GGTACT	GIAAT
108	GCCGT	GICAT	206	G_CG	GITIG
162	ATGIC	AAGGC	25	CTGG	C_AG
390	CGCA	CIIA	405	TIGA	TGIA
291	G_TTGC	GIITAC	116	GGTCT	GITIT
59	GCAAG	GAAIG	396	ATACCTGGAT	AGACCTGIIIT
			137	CTGG	CGG
			408	AACA	ATIA
			103	CGTA	CTAA

<引用文献>

- 1 . Ishii Y. et al., The role of DNA polymerase ζ in benzo[a]pyrene-induced mutagenesis in the mouse lung. *Mutagenesis*, (2021) 36, 155-164.
- 2 . Ishii Y. et al., Effects of inhibition of hepatic sulfotransferase activity on renal genotoxicity induced by lucidin-3-O-primeveroside. *J. Appl. Toxicol.* (2019) 129, 144-152.
- 3 . Ishii Y. et al., Combined application of comprehensive analysis for DNA modification and reporter gene mutation assay to evaluate kidneys of *gpt* delta rats given madder color or its constituents. *Anal Bioanal Chem.* (2014) 406, 2467-2475.
- 4 . Ishii Y. et al., Determination of lucidin-specific DNA adducts by liquid chromatography with tandem mass spectrometry in the livers and kidneys of rats given lucidin-3-O-primeveroside. (2012) 25, 1112-1118.
- 5 . Ishii Y. et al., Chemical structure determination of DNA bases modified by active metabolites of Lucidin-3-O-primeveroside. *Chem. Res. Toxicol.* (2010) 23, 134-141.
- 6 . Umemura T., et al., Possible participation of oxidative stress in causation of cell proliferation and in vivo mutagenicity in kidneys of *gpt* delta rats treated with potassium bromate. *Toxicology* (2009) 257, 46-52.
- 7 . Umemura T., et al., In vivo mutagenicity and initiation following oxidative DNA lesion in the kidneys of rats given potassium bromate. *Cancer Sci.*, (2006) 97, 829-835.
- 8 . Kuroda K., et al., Role of p53 in the progression from Ochratoxin A-induced DNA damage to gene mutations in the kidneys of mice. *Toxicol. Sci.*, (2015) 144, 65-76.
- 9 . Kuroda K., et al., Ochratoxin A induces DNA double-strand breaks and large deletion mutations in the carcinogenic target site of *gpt* delta rats. *Mutagenesis*. (2014) 29, 27-36.
- 10 . Hibi D., et al., Effects of p53 knockout on ochratoxin A-induced genotoxicity in p53-deficient *gpt* delta mice. *Toxicology* (2013) 304, 92-99.

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuji Ishii, Shinji Takasu, Petr Gruz, Kenichi Masumura, Kumiko Ogawa, Takehiko Nohmi, Takashi Umemura	4. 巻 36
2. 論文標題 The role of DNA polymerase in benzo[a]pyrene-induced mutagenesis in the mouse lung	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 155-164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mutage/geab007	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 並木萌香, 高須伸二, 能美健彦, 小川久美子
2. 発表標題 腎発がん物質rubiadinのグアニンDNA付加体に対するDNA Polymerase の選択的作用
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回記念大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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