

令和元年6月25日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2018

課題番号：25281022

研究課題名(和文) DNA付加体1分子が関わる遺伝子変異誘発機構の緻密性に関する研究

研究課題名(英文) Site-specific gene mutagenesis involving a single DNA adduct in vivo

研究代表者

安井 学 (Manabu, Yasui)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・室長

研究者番号：50435707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、遺伝子変異誘発機構の緻密性に関するデータを蓄積・再現性を確認し、TATAM系を駆使してその遺伝子機能とDNA付加体1分子が関わる緻密な遺伝子変異誘発との関係性を明らかにした。また、これまで酸化損傷など複数のDNA付加体についてTATAM系で調べた結果、すべてのDNA付加体で突然変異を誘発することを確認し、これまでnon-mutagenicとされてきた付加体であっても、解析する細胞数を増やすことによって低頻度で突然変異を検出できることが分かってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で使用したTATAM系は、社会的にも関心の高い放射線による閾値無し直線(Linear non-threshold; LNT)仮説、および化学物質等の遺伝毒性発がん物質には閾値が無いという議論を実験的に証明するために確立された。閾値の議論は、わずか1分子のDNA付加体であっても突然変異をもたらす、発がんに至る可能性が理論的にあることが発端となっており、それを今までは1分子という極低レベル暴露を動物実験などで実験的に証明が困難であったが、TATAM系はそれを可能にした。なお、本系は通常のDNA損傷で誘導される修復酵素群が正常と異なるため、さらなるデータ蓄積と研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：The study confirmed the data reproducibility on a detailed analysis of site-specific gene mutagenesis using TATAM system and revealed the relationship between gene function and scrupulous gene mutagenesis involving a single DNA adduct. Mutations have been found universally in several types of oxidative DNA adducts, studied in the TATAM system. Moreover, data indicating that even DNA adducts believed to be non-mutagenic cause infrequent mutations have emerged from analyses conducted with increased numbers of cells.

研究分野：分子毒性学

キーワード：DNA付加体 DNA損傷 二本鎖切断 遺伝子変異 1分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、遺伝子ターゲティングを利用して、DNA 付加体 1 分子をヒトリンパ球芽細胞 TSCER122 (TK6 細胞由来) のチミジンキナーゼ遺伝子 (TK) のイントロン 4、あるいはエキソン 5 に部位特異的にゲノム導入させ、その付加体の運命を解析する系 (Tracing DNA adducts by targeted mutagenesis; TATAM) を確立した。その系では、I-SceI 制限酵素による部位特異的な二本鎖切断の相同組換え DNA 修復が、ゲノムの 1 カ所で行われる。その際に、付加体を含むターゲティングベクターが高頻度にゲノムにインテグレートされ、TK の選択培地で付加体が導入された細胞だけを効率良く分離・回収、そして DNA 配列解析等が容易に実施できる (Yasui et al., *DNA Repair* 15, 11-20 (2014))。

TATAM 系は、放射線による閾値無し直線 (Linear non-threshold; LNT) 仮説、および化学物質等の遺伝毒性発がん物質には閾値が無いという議論を実験的に証明するために確立された。つまり、その閾値の議論は、わずか 1 分子の DNA 付加体であっても突然変異をもたらし、発がんに至る可能性が理論的にあることが発端となっており、それを今までは 1 分子という低レベル暴露では実験的な証明が困難であったが、TATAM 系はそれを可能にした。8-オキソグアニン (8Gua) 並びに数種の DNA 付加体 1 分子 (1,N⁶-エセノアデニン (eAde)、キサンチン (Xan)、5-プロモウラシル、5-プロモシトシン、5-メチルシトシン等) をイントロン系に導入して調べたところ、わずか 1 分子の付加体は TK 遺伝子変異を誘発させられることが分かった。次に、8Gua 付加体 1 分子をエキソン系で調べたところ、遺伝子変異を起こしやすい塩基部位とそうでない塩基部位の存在を確認した。つまり、付加体 1 分子をイントロンに導入した時は必ず遺伝子変異が起きるが、エキソンのある部位に導入した時は遺伝子変異が起きない (あるいは低減する) ことが予備実験で観察された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、まず緻密な遺伝子変異誘発機構を示すデータを蓄積・再現性を確認しながら、それに関与すると予想される DNA 修復関連遺伝子を改変させた TSCER122 細胞株を樹立し、TATAM 系を駆使してその遺伝子機能と付加体 1 分子が関わる緻密な遺伝子変異誘発との関係性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 8Gua 付加体 1 分子をイントロンに導入した時は必ず TK 変異が起きるが、エキソンのある部位に導入した時は TK 変異が起きない。この付加体 1 分子が関わる遺伝子変異誘発機構の緻密性を明らかにするために、8Gua 修復酵素の OGG1 遺伝子をノックアウトした TSCER122 細胞を用いて、もし、そのエキソン上の 8Gua が TK 変異を起こすようになれば、その緻密な変異誘発機構に OGG1 が関与していることを証明できる。この再現性を確認するために、他の付加体についても同様の実験を行った (eAde 付加体の修復酵素として POLB 破壊細胞も樹立した)。TK 遺伝子を変異させるエキソン 5 の一塩基変異部位の 3 カ所に、それぞれ 8Gua、eAde、Xan を TSCER122 細胞に導入して調べた。それらはそれぞれ Exsys1 系、Exsys3 系、Exsys7 系と呼んでいる。TSCER122 細胞 (TK^{-/-}) のなかで、Exsys1 は 8Gua がシトシンとだけでなくアデニンと誤塩基対形成し G to T 置換 (G/T) を起こすため TK 遺伝子復帰 (TK^{+/-}) する。Exsys3 では、eAde がチミンとだけでなくシトシンと誤塩基対形成し A to G 置換 (A/G) を起こすため TK 遺伝子復帰する。また、Exsys7 では、Xan がシトシンだけでなくチミンと誤塩基対形成し G to A 置換 (G/A) を起こすため TK 遺伝子復帰することを利用している (図 1)。Exsys 実験ごとに 3 つの 6.1kbp ターゲティングベクター (陽性対照 (WT ベクター)、陰性対照 (Mut ベクター)、そして DNA 付加体 (8Gua、eAde、Xan) を含むベクター) をそれぞれ作製し、I-SceI 発現ベクターとともに TSCER122 細胞に導入した。

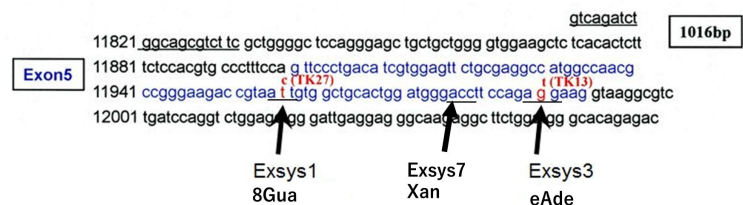


図 1. TK 遺伝子エキソン 5 への DNA 付加体の導入部位

(2) Exsys3 および Exsys7 系に関して、TK 変異を復帰させる陽性対照ターゲティングベクター、および復帰させられない陰性対照ターゲティングベクターの 2 種類の混合割合を規則的に変えて、TSCER122 細胞に形質転換し、コントロールベクター量に対する TK 復帰頻度の検出感度を調べた。使用したベクター量は、陽性対照が 0、0.1、0.2、0.6、2 μg に対して、陰性対照はそれぞれ 2、1.9、1.8、1.4、0 μg を混合し、計 2 μg を細胞に導入した。

(3) 遺伝子変異の緻密性を調べるために、遺伝子座ごとの遺伝子変異誘発機構についても解析した。直接的な相同組み換え修復が起きないとされる X 染色体上の HPRT 遺伝子座、および

相同組み換えが起きる常染色体（17番）上のTK遺伝子座に注目し、それぞれの遺伝子座で起きるDNA二本鎖切断を導入したときの突然変異誘発頻度とスペクトラムを調べ、それらを詳細に比較した。

4. 研究成果

(1) Exsys1、Exsys3、およびExsys7のWTベクターのTK復帰頻度は、Mutベクターのそれよりもそれぞれ約7倍、15倍、10倍上昇した。よって、今回調べたエキソン5の各塩基部位では、Exsys3部位が最もTK遺伝子変異しやすく、検出感度が高いと考えられた。8GuaあるいはeAdeをそれぞれ導入した時、Exsys1およびExsys3で類似の結果が得られ、どちらの付加体ベクターもMutのTK復帰頻度とほぼ同等であった。つまり、付加体を導入してもその部位で一塩基変異を起こしていないこと、あるいは検出感が悪く正確に復帰細胞としてカウントされていない可能性があることが示唆された。すでに報告されているin vitro研究の報告では、8Guaはアデニンと約15%、eAdeはシトシンと約60% (Pandya et al. *Biochemistry* 35, 11487-92 (1996)) の頻度でミスペアするという報告があるが、本実験結果とは一致しなかった。一方、Xan付加体を導入した時は、MutのTK復帰頻度よりも高い復帰頻度（約45%相当）が観察された。すでに報告されているin vitro研究の報告では、Xanはチミンと約50%の頻度でミスペアするという報告があることから、本実験結果とほぼ一致していると考えられた。

引き続き、本研究ではゲノム編集技術を使用することにより、数種類の遺伝子破壊細胞(XPA、OGG1、POLB、XPC、ERCC6)を構築した。そのなかで、POLB欠損細胞を用いてExsys3を実施した結果を図2に示した。野生株ではWTベクターのTK復帰頻度は、Mutベクターのそれよりも約15倍上昇したが、POLB欠損細胞では約3倍程度に減少した。Exsys3部位にeAde付加体を導入すると、明らかにTK復帰頻度が上昇し、eAdeはおよそ30%の変異頻度を示した。つまり、強い誤塩基対形成能を有するeAde付加体は、野生株ではTK復帰させられないが、POLB欠損株ではTK復帰することから、POLBタンパク質がeAde付加体のDNA修復に関わっていることはもちろんのこと、遺伝子変異が起きにくい機構にPOLBが関与していることも本実験によって明らかとなった。しかしながら、本実験系はExsys3部位にeAde以外のDNA付加体を導入することができず、部位(DNA配列)特異的なのか、あるいは付加体特異的なのかを比較することが不可能であることがデメリットである。

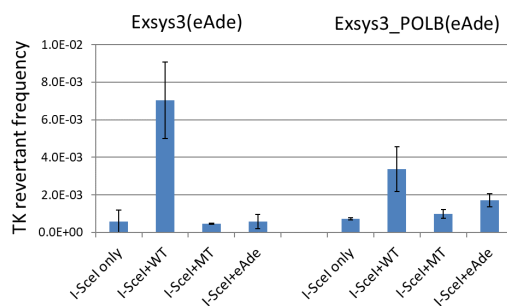


図2. POLB欠損細胞を用いたExsys3系の結果

(2) Exsys3およびExsys7系の基礎データを得るために、TK変異を復帰させる陽性対照ターゲティングベクター、および復帰させられない陰性対照ターゲティングベクターの2種類の混合割合を規則的に変えて、TSCER122細胞に形質転換し、コントロールベクター量に対するTK復帰頻度の検出感度を調べた。その結果、Exsys3およびExsys7の双方とも、陽性対照ベクターの量に依存して、TK復帰頻度は上昇し、ほぼ直線性を示した。最小の陽性対照ベクター0.1 μg (約5%の変異頻度に相当)の時は、TK復帰頻度が陰性対照ベクター1.9 μgのシグナルに埋没する傾向にあり、明確に差が得られないように見受けられた。これは、弱い誤塩基対形成能を有するDNA付加体の場合、その変異頻度が5%程度では検出できない可能性を示唆した。本研究で使用した比較的強い誤塩基対形成能を有するeAde付加体はおそらくExsys3で検出できると考えられる。

(3) 本研究において、ゲノムの特定部位に二本鎖切断を形成させることができるI-SceI制限酵素の認識配列をHPRT遺伝子のイントロン2にノックインさせたTSceHPRT細胞を構築した。HPRT遺伝子の発現解析およびサザンブロッティング等により、TSceHPRT細胞の基礎データを取得した。その細胞内にI-SceI発現ベクターを形質転換させ、HPRT座の二本鎖切断の突然変異誘発頻度とスペクトラムを解析したところ、TK座の二本鎖切断よりも塩基欠失による遺伝子変異頻度が高く、特徴的な変異が観察された。得られた突然変異プロファイルは、両遺伝子座ともに塩基変異はほとんど観察されず、欠失変異が占めていた。TK座の欠失変異を持つクローン細胞はわずか0.9%であったが、HPRT座のそれは7.4%もあり、それは二本鎖切断部位の近傍18 bp内(I-SceI制限酵素の認識配列)で起きる欠失変異が多いことが原因であった。また、HPRT座だけで200 bpsを超える大きな欠失(0.7%)が誘発することが分かった。二本鎖切断が1ヶ所あるだけで、X染色体上のHPRT座は、TK座よりも約8倍高く遺伝子変異が

起きることが分かった。なお本実験で使用された条件は、I-SceI 制限酵素による人工的に起こした二本鎖切断を利用しているため、通常の生理的条件下で起きる二本鎖切断による DNA 修復タンパク質等の誘導とは異なる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- (1) Sassa A, Yasui M, Honma M. (2019) Current perspectives on mechanisms of ribonucleotide incorporation and processing in mammalian DNA. *Genes and Environment* 41:3. doi: 10.1186/s41021-019-0118-7. 査読有
- (2) Sassa A, Kanemaru Y, Kamoshita N, Honma M, Yasui M. (2016) Mutagenic consequences of cytosine alterations site-specifically embedded in the human genome. *Genes and Environment* 38:17. DOI: 10.1186/s41021-016-0045-9. 4. 査読有
- (3) Sassa A, Kamoshita N, Kanemaru Y, Honma M, Yasui M. (2015) Xeroderma Pigmentosum Group A Suppresses Mutagenesis Caused by Clustered Oxidative DNA Adducts in the Human Genome. *PLoS ONE* 10(11), e0142218. DOI: 10.1371/journal.pone.0142218 査読有
- (4) Yasui M, Kamoshita N, Nishimura T, Honma M (2015) Mechanism of induction of binucleated cells by multiwalled carbon nanotubes as revealed by live-cell imaging analysis. *Genes and Environment*, 37, 6. DOI: 10.1186/s41021-015-0003-y 査読有
- (5) Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T, Honma M. (2014) Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair* 15, 11-20. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.01.003 査読有
- (6) Sassa A, Kamoshita N, Matsuda T, Kuraoka I, Ohta T, Nohmi T, Honma M, Yasui M. (2013) Miscoding properties of 8-chloro-2'-deoxyguanosine, a hypochlorous acid-induced DNA adduct, catalyzed by human DNA polymerases. *Mutagenesis* 28(1), 81-88. 査読有

〔学会発表〕(計32件)

- (1) 佐々彰, 安井学, 竹石歩奈, 原田佳歩, 鈴木 慈, 津田雅貴, 笹沼博之, 武田俊一, 菅澤 薫, 本間正充, 浦 聖恵: リボヌクレオチドが誘発する奇異突然変異とその防御機構 (Mutagenic consequences and tolerance mechanisms of a ribonucleotide embedded into DNA). 日本遺伝学会第90回大会 (2018)
- (2) 竹石歩奈, 安井学, 笹沼博之, 武田俊一, 菅澤 薫, 本間正充, 浦 聖恵, 佐々彰: DNA 中のリボヌクレオチドが引き起こす特異な突然変異とその誘発機構の解析. 日本環境変異原学会第47回大会 (2018)
- (3) Ai Suzuki, Masayuki Miyano, Ryuji Miura, Akira Sassa, Manabu Yasui and Masamitsu Honma: Quantum Chemical Inspection on the DNA Backbone Bias caused by 8oxoG. The 15th International Conference on Flow Dynamics (2018)
- (4) Yasui M, Sassa A, Ukai A, Honma M: Trial for establishment of a locus-specific mutation assay system. 12th International Conference and 5th Asian Congress on Environmental Mutagens (2017)
- (5) Fukuda T, Nakamura M, Fujiwara S Sasa A, Takeda S, Yasui M, Honma M: Development of High-Sensitive TK Gene Mutation Assay for Detection of Ames-Positive Compounds by Using DNA Repair Deficient TK6 Mutant. 12th International Conference and 5th Asian Congress on Environmental Mutagens (2017)
- (6) Sassa A, Yasui M, Sasanuma H, Takeda S, Sugawara K, Honma M, Ura K: Effect of ribonucleotide backbone on mutagenic potential and repair mechanism of 7,8-dihydro-8-oxoguanine. The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry. (2017)
- (7) 佐々彰, 安井学, 笹沼博之, 武田俊一, 菅澤薫, 本間正充, 浦聖恵: DNA 中のリボヌクレオチドが引き起こす突然変異とその抑制機構. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (2017)
- (8) 佐々彰, 安井学, 笹沼博之, 武田俊一, 菅澤薫, 本間正充, 浦聖恵: リボヌクレオチドが引き起こすゲノム不安定性とその抑制機構. 第35回染色体ワークショップ・第16回核ダイナミクス研究会 (2017)
- (9) 佐々彰, 安井学, 本間正充, 浦聖恵: ヒト細胞 DNA 中のリボヌクレオチドが引き起こすゲノム不安定性の解析. 第11回日本エピジェネティクス研究会年会 (2017)
- (10) Sassa A, Çağlayan M, Rodriguez Y, Beard WA, Wilson SH, Nohmi T, Honma M, Yasui M, Ura K: Effect of Sugar Backbone on Translesion Synthesis, Repair, and Mutagenic Potential of 7,8-Dihydro-8-oxoguanine. Environmental Mutagenesis & Genomics Society 48th Annual Meeting (2017)
- (11) 中村真生, 鶴飼明子, 佐々彰, 高部道仁, 福田隆之, 高村岳樹, 本間正充, 安井学: TK6 及び変異株を用いたヌクレオチド除去修復機構におけるゲノム全体修復と転写共役修復を区別する方法の開発. 日本環境変異原学会第46回大会 (2017)
- (12) 佐々彰, 安井学, 笹沼博之, 武田俊一, 菅澤薫, 本間正充, 浦聖恵: リボヌクレオチドが誘発する突然変異の抑制における DNA 修復機構の役割. 日本環境変異原学会第46回大会 (2017)
- (13) 福田隆之, 中村真生, 佐藤亮佑, 藤原聖, 佐々彰, 鶴飼明子, 武田俊一, 安井学, 本間正

- 充:TK6 及びその DNA 修復遺伝子破壊変異体を用いた高感度遺伝毒性試験法の開発. 日本環境変異原学会第 46 回大会 (2017)
- (14) Honma M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T, Sasa A, Yasui M; Tracing the fate of site-specifically introduced oxidative DNA damage in the human genome. 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA (2016)
- (15) 佐々彰, Caglayan M, Beard WA, Wilson SH, 能美健彦, 本間正充, 安井学; DNA 中の酸化リボヌクレオチドが DNA 複製および修復機構に及ぼす影響. 第 45 回日本環境変異原学会 (2016)
- (16) 鈴木愛, Bonnaud P, 佐々彰, 安井学, 宮本明, 本間正充; 8-oxoG 付加数の異なる DNA に対する修復タンパク hOGG1 の高速化量子分子動力学法による親和性評価. 第 45 回日本環境変異原学会 (2016)
- (17) 安井学, 佐々彰, 鴨下渚, 本間正充; DNA 損傷 1 分子の部位特異的なゲノム導入とその遺伝的影響の解析. 宇宙生物科学会 (2015)
- (18) 佐々彰, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充, 安井学; ヒトリンパ球細胞のゲノムに導入したシトシン修飾体の潜在的な突然変異誘発能. 第 44 回日本環境変異原学会 (2015)
- (19) 佐々彰, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充, 安井学; ヌクレオチド除去修復は酸化的クラスターDNA 損傷によって誘発される突然変異を抑制する. 第 44 回日本環境変異原学会, 福岡 (2015) ポスター賞受賞
- (20) Sassa A, Kamoshita N, Kanemaru Y, Honma M, Yasui M.; Effect of nucleotide excision repair deficiency on mutagenesis induced by clustered 7,8-dihydro-8-oxoguanine in human cells. Zing conference: Genomic Integrity 2015. Cairns, Australia (2015)
- (21) Honma M, Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T; Demonstration of non-threshold of 8-oxoG inducing gene mutation by targeted mutagenesis. 43rd European Environmental Mutagen Society annual meeting, Lancaster, UK (2014)
- (22) 佐々彰, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充, 安井学; ゲノムの特定部位に配置させたクラスターDNA 損傷の数的遺伝毒性影響. 日本放射線影響学会第 57 回大会 (2014)
- (23) 長野聖也, 東垣由夏, 佐々彰, 川西優喜, 安井学, 高村岳樹, 八木孝司; DNA 塩基損傷 1 分子を部位特異的にもつプラスミドの作製とヒト細胞における TLS 解析. 第 43 回日本環境変異原学会 (2014)
- (24) 佐々彰, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充, 安井学; ゲノムに導入させた酸化的クラスターDNA 損傷の数的遺伝毒性影響. 第 43 回日本環境変異原学会 (2014)
- (25) 安井学; 部位特異的にゲノム内に導入した DNA 付加体の遺伝的影響. 第 43 回日本環境変異原学会 (2014)
- (26) Honma M, Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T; Tracing the fate of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. 4th Asian Conference on Environmental Mutagens. Kolkata, India (2014)
- (27) Manabu Yasui, Yuki Kanemaru, Nagisa Kamoshita, Akira Sassa, and Masamitsu Honma; Mutation analysis of site-specific brominated DNA adducts located in the genome of human lymphoblastoid cells. Mammalian DNA Repair in Gordon Research Conferences, Ventura, CA (2013)
- (28) 鈴木哲也, 安井学, 鴨下渚, 鷓飼明子, 本間正充; A role of BLM helicase on double strand break repair. 第 44 回米国環境変異原学会 (2013)
- (29) 安井学, 鴨下渚, 本間正充; DNA 付加体 1 分子による遺伝子変異誘発性. 日本放射線影響学会第 56 回大会 (2013)
- (30) 安井学, 鴨下渚, 本間正充; 遺伝毒性には閾値が無いことの証明. 日本リスク研究学会第 26 回年次大会 学術講演論文集 Vol.26 (2013)
- (31) 安井学, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充; DNA 付加体による突然変異誘発頻度はゼロにはならない. 日本環境変異原学会第 42 回大会 (2013)
- (32) 安井学; DNA 付加体を部位特異的に含む DNA オリゴマーの生化学的構築とその突然変異誘発機構の解析. 平成 25 年度日本環境変異原学会 AA-2 (2013). 研究奨励賞講演

〔その他〕

ホームページ等

本研究で構築した遺伝子破壊細胞は、国衛研や京都大学などで組織された TK6 細胞ミュータントコンソーシアム (<http://www.nihs.go.jp/dgm/tk6.html>) で世界中に分与され、共同研究に用いられている。

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 佐々 彰

ローマ字氏名: Akira Sassa

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: 大学院理学研究院

職名：特任助教
研究者番号(8桁): 10738347

(2)研究協力者
研究協力者氏名：本間 正充
ローマ字氏名：Masamitsu Honma