

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870867

研究課題名(和文) DNA構造位相変換制御と修復・転写・クロマチン構造変換のカップリング

研究課題名(英文) Analysis of DNA topology, transcription and DNA repair

研究代表者

堀端 克良 (Horibata, Katsuyoshi)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・主任研究官

研究者番号：40402995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNAトポロジ変換機構で中心的な役割を担う因子の1つであるDNA topoisomerase I (TOP1)のタンパク質複合体・相互作用因子を同定し、TOP1および関連する因子の分子制御機構およびTOP1を介するDNA損傷と修復の分子メカニズムを分子生物学的な研究手法を用いて解析し、その詳細を明らかにした。加えて、TOP1相互作用因子群の標的遺伝子上での局在変化を解析し、その詳細を明らかにした。また、上記解析に加えて、新規突然変異試験法の導入を試みた。

研究成果の概要(英文)：DNA topoisomerase I (TOP1) is an essential enzyme involved in resolving the torsional stress associated with DNA replication and transcription. TOP1 have a deleterious effect on cells in these processes. In the event(s), when the final re-ligation step of the reaction cycle is prevented, the covalent TOP1-DNA intermediate becomes a toxic DNA lesion, called TOP1-DNA covalent complex (TOP1-cc). The molecular mechanisms of repair of TOP1-cc seem to be complicated with DNA replication, transcription, recombination and protein degradation. However, detailed mechanisms are not clear. Here we purified and analyzed TOP1 protein complexes to know molecular mechanisms of repair of TOP1-cc, TOP1 itself and interaction proteins. Additionally, we analyzed the localization of TOP1 on the target gene.

研究分野：遺伝毒性学

キーワード：転写 topoisomerase DNA修復

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

1. 研究開始当初の背景

DNA複製、二本鎖DNA切断修復、転写、転写と共役したヌクレオチド除去修復および突然変異・染色体不安定性などと、DNA topoisomerase I (TOP1) そのものおよび"TOP1-DNA 間共有結合体 (TOP1-cc)" 修復機構は密接に関連すると考えられるが、どのようなメカニズムで相関しているのか、各DNA修復系にTOP1が直接的に必要なのか、また、TOP1-ccの修復機構に各DNA修復因子がどのように必要であるかなど全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

DNAトポロジ-変換機構で中心的な役割を担う因子の1つであるTOP1およびTOP1タンパク質複合体・相互作用因子がどのような分子制御機構にもとづいて細胞内で機能しているのか、そして、TOP1を介在するDNA損傷と修復の分子メカニズムを分子生物学的な研究手法を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

TOP1相互作用因子を発現抑制した条件下、および各DNA損傷誘導時の「各因子の物理的相互作用」を明らかにする。TOP1タンパク質複合体・相互作用因子、特にTOP1、PARP1およびFACT(SPT16)の機能的な相関関係を解析し、DNA損傷と修復に関わる複合的影響を明らかにする。これらに加えて、新規突然変異試験法の導入を試みる。以上の研究を総合的に進めることで、DNA損傷時におけるTOP1相互作用因子の物理的および機能的相関関係を明らかにする。

4. 研究成果

TOP1相互作用因子をsiRNAやshRNAにより発現抑制(ノックダウン)および過剰発現した条件下において、細胞生物学的な解析を実施した。特に上記、ノックダウンの至適条件を特に念入りに決定した。その結果、TOP1、PARP1およびFACT(SPT16)などの発現抑制条件を決定することができた。

HAやFLAGなどのエピトープタグを付加した数種類のTOP1相互作用因子の発現コンストラクトおよび発現細胞を作成し、その相互作用の詳細を解析し、相関関係を明らかにした。その結果、TOP1とPARP1などの物理的な相関関係を明らかにした。

TOP1相互作用因子群を認識する抗体を使用したクロマチン免疫沈降法およびリアルタイムPCR法を実施し、標的遺伝子、特にrDNA遺伝子上での各因子の局在変化を解析し、その詳細を明らかにした。その結果、転写装置とTOP1および関連因子の多くがそれぞれ共役した局在変化を示すことを明らかにした。

上記解析に加えて、遺伝子変異をより詳細に解析するための新規突然変異試験法の導入を試み、成功した。これらを元に、転写を介在する突然変異誘発機構解析のための新規解析手法を設計した。

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 11 件)

- (1) Horibata K, Ukai A, Ogata A, Nakae D, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Yuzawa K, Honma M. Absence of in vivo mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal instillation study using F344 gpt delta rats. *Genes and Environment*, 39:4, 2017. 査読有
DOI: 10.1186/s41021-016-0065-5
- (2) Horibata K, Ukai A, Ishikawa S, Sugano A, Honma M. Monitoring genotoxicity in patients receiving chemotherapy for cancer: application of the PIG-A assay. *Mutation Research*, 808:20-6, 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.mrgentox.2016.08.002
- (3) Cao Y, Yang L, Feng N, Shi O, Xi J, You X, Yin C, Yang H, Horibata K, Honma M, Qian B, Weng W, Luan Y. A population study using the human erythrocyte PIG-A assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 57(8):605-14, 2016. 査読有
DOI: 10.1002/em.22040
- (4) Horibata K, Ukai A, Honma M. Evaluation of mutagenicity of acrylamide using RBC Pig-a and PIGRET assays by single peroral dose in rats. *Mutation Research*, 811:54-9, 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.12.005
- (5) Kimoto T, Horibata K, Miura D, Chikura S, Okada Y, Ukai A, Itoh S, Nakayama S, Sanada H, Koyama N, Muto S, Uno Y, Yamamoto M, Suzuki Y, Fukuda T, Goto K, Wada K, Kyoya T, Shigano M, Takasawa H, Hamada S, Adachi H, Uematsu Y, Tsutsumi E, Horii H, Kikuzuki

- R, Ogiwara Y, Yoshida I, Maeda A, Narumi K, Fujiishi Y, Morita T, Yamada M, Honma M. The PIGRET assay, a method for measuring Pig-a gene mutation in reticulocytes, is reliable as a short-term in vivo genotoxicity test: Summary of the MMS/JEMS-collaborative study across 16 laboratories using 24 chemicals. *Mutation Research*, 811:3-15, 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.mrgentox.2016.10.003
- (6) Johnson GE, Yamamoto M, Suzuki Y, Adachi H, Kyoya T, Takasawa H, Horibata K, Tsutsumi E, Wada K, Kikuzuki R, Yoshida I, Kimoto T, Maeda A, Narumi K. Measuring reproducibility of dose response data for the Pig-a assay using covariate benchmark dose analysis. *Mutation Research*, 811:135-9, 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.mrgentox.2016.04.004
- (7) Horibata K, Kono S, Ishigami C, Zhang X, Aizawa M, Kako Y, Ishii T, Kosaki R, Saijo M, Tanaka K. Constructive rescue of TFIIH instability by an alternative isoform of XPD derived from a mutated XPD allele in mild but not severe XP-D/CS. *Journal of Human Genetics*, 60:259-65, 2015. 査読有
DOI: 10.1038/jhg.2015.18
- (8) Gollapudi BB, Lynch AM, Heflich RH, Dertinger SD, Dobrovolsky VN, Froetschl R, Horibata K, Kenyon MO, Kimoto T, Lovell DP, Stankowski LF Jr, White PA, Witt KL, Tanir JY. The in vivo Pig-a assay: A report of the International Workshop On Genotoxicity Testing (IWGT) Workgroup. *Mutation Research*, 783:23-35, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.mrgentox.2014.09.007
- (9) Horibata K, Ukai A, Honma M. Evaluation of Rats' In Vivo Genotoxicity Induced by N-ethyl-N-nitrosourea in the RBC Pig-a, PIGRET, and gpt Assays. *Genes and Environment*, 36(4):199-202, 2014. 査読有
DOI: 10.3123/jemsge.2014.023
- (10) Wakasugi M, Sasaki T, Matsumoto M, Nagaoka M, Inoue K, Inobe M, Horibata K, Tanaka K, Matsunaga T. Nucleotide Excision Repair-dependent DNA Double-strand Break Formation and ATM Signaling Activation in Mammalian Quiescent Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 289(41):28730-7, 2014. 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M114.589747
- (11) Onami S, Cho YM, Toyoda T, Horibata K, Ishii Y, Umemura T, Honma M, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K. Absence of in vivo genotoxicity of 3-monochloropropane-1,2-diol and associated fatty acid esters in a 4-week comprehensive toxicity study using F344 gpt delta rats. *Mutagenesis*, 29(4):295-302, 2014. 査読有
DOI: 10.1093/mutage/geu018

〔学会発表〕(計 23 件)

- (1) 堀端克良. Pig-a 試験. 哺乳動物試験研究会 第 70 回定例会. 2017
- (2) Takasawa H, Hamada S, Taquahashi Y, Horibata K, Nakagawa M, Honma M. In vivo genotoxicity assessment of multi-wall carbon nanotubes using in vivo / in vitro lung micronucleus assay in mice. Environmental Mutagen Society 48th Annual Meeting. 2017
- (3) Horibata K, Honma M. Evaluation of the genotoxicity of Acrylamide by in vivo Pig-a gene mutation assay. 第 76 回日本癌学会学術総会. 2017
- (4) 堀端克良. Pig-a アッセイ. 哺乳動物試験研究会 第 71 回定例会. 2017
- (5) 堀端克良, 鶴飼明子, 小縣昭夫, 中江大, 安藤弘, 久保喜一, 長澤明道, 湯澤勝廣, 本間正充. F344 gpt delta rats を用いた多層カーボンナノチューブ単回気管内投与による in vivo 遺伝毒性評価. 日本環境変異原学会第 46 回大会. 2017
- (6) 高沢博修, 志賀野美幸, 高橋祐次, 田中亜矢子, 中館記代子, 堀端克良, 安永勝昭, 中川宗洋, 濱田修一, 本間正充. In vivo-in vitro マウス肺小核試験を用いたカーボンナノチューブの in vivo 遺伝毒性評価. 日本環境変異原学会第 46 回大会. 2017
- (7) Horibata K, Ukai A, Honma M. Mice Mutagenicity on the Next Generation and Effect

- on the Differences of Both Age and Sex Detected by the Pig-A Assay. THE 12TH INTERNATIONAL CONFERENCE & 5TH ASIAN CONGRESS ON ENVIRONMENTAL MUTAGENS. 2017
- (8) 堀端克良. Pig-a 試験. 哺乳動物試験研究会 第 68 回定例会. 2016
 - (9) Luan Y, Cao Y, Feng N, Shi O, Horibata K, Honma M. Human Erythrocyte PIG-A Assay in 218 General Subjects. Environmental Mutagen Society 47th Annual Meeting . 2016
 - (10) Horibata K, Honma M. Genotoxicity on the next generation and effect on the differences of both age and sex detected by the Pig-a assay. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016
 - (11) 堀端克良. Pig-a アッセイ. 哺乳動物試験研究会 第 69 回定例会. 2016
 - (12) Horibata K, Ukai A, Honma M. Mice mutagenicity on the next generation and effect on the differences of both age and sex detected by the Pig-a assay. 日本環境変異原学会第 45 回大会. 2016
 - (13) Cao Y, Luan Y, Horibata K, Honma M. A population study using the human erythrocyte PIG-A assay. 日本環境変異原学会第 45 回大会. 2016
 - (14) 堀端克良. 共同研究報告 I: Pig-a アッセイ. 哺乳動物試験研究会 第 66 回定例会. 2015
 - (15) Horibata K, Yamada M, Ukai A, Kimoto T, Chikura S, Miura D, Itoh S, Muto S, Uno Y, Sanada H, Takashima R, Shigano M, Takasawa H, Hamada S, Yamamoto M, Hori H, Tsutsumi E, Wada K, Maeda A, Kikuzuki R, Ogiwara Y, Kyoya T, Adachi H, Uematsu Y, Yoshida I, Narumi K, Fujiishi Y, Fukuda T, Suzuki Y, Goto K, Morita T, Honma M. Interlaboratory Trial of the PIGRET Assay As a Short-term Genotoxicity Test: Collaborative Study by Mammalian Mutagenicity Study (MMS) Group of Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) . Environmental Mutagen Society 46th Annual Meeting. 2015
 - (16) 堀端克良. Pig-a アッセイ. 哺乳動物試験研究会 第 67 回定例会. 2015
 - (17) 堀端克良, 山田雅巳, 鶴飼明子, 木本崇文, 千藏さつき, 三浦大志郎, 伊東悟, 武藤重治, 宇野芳文, 真田尚和, 高島理恵, 志賀野美幸, 高沢博修, 濱田修一, 山本美佳, 堀妃佐子, 堤絵梨, 和田邦生, 前田晃央, 菊月隆太, 荻原庸介, 京谷恭弘, 足立秀樹, 上松泰明, 吉田唯真, 成見香瑞範, 藤石洋平, 福田隆之, 鈴木裕太, 後藤玄, 森田健, 本間正充. Pig-a/PIGRET アッセイの短期試験としての有用性: MMS 共同研究報告. 日本環境変異原学会第 44 回大会. 2015
 - (18) 堀端克良. 共同研究報告 I: Pig-a assay 進捗状況報告. 哺乳動物試験研究会 第 64 回定例会. 2014
 - (19) Horibata K, Honma M. ESTABLISHMENT OF HUMAN PIG-A ASSAY AND APPLICATION TO GENOTOXICITY MONITORING OF CANCER CHEMOTHERAPEUTIC PATIENTS. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014
 - (20) 堀端克良, 鶴飼明子, 石川恵生, 菅野絢子, 木本崇文, 本間正充. マウス、ラットおよびヒト由来のごく微量末梢血を用いて解析可能な Pig-a/ PIG-A in vivo 突然変異試験法 . 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014
 - (21) 堀端克良. 共同研究報告 I: Pig-a assay 進捗状況報告. 哺乳動物試験研究会 第 65 回定例

会. 2014

- (22) 堀端克良, 鵜飼明子, 本間正充. MMS/Pig-a 共同研究: アクリルアミドの遺伝毒性評価. 日本環境変異原学会第 43 回大会. 2014
- (23) 山田雅巳, 堀端克良, 鵜飼明子, 木本崇文, 千藏さつき, 伊東悟, 武藤重治, 宇野芳文, 真田尚和, 高島理恵, 志賀野美幸, 高沢博修, 濱田修一, 山本美佳, 堀妃佐子, 堤絵梨, 和田邦生, 前田晃央, 小坂瑞樹, 木村葵, 菊月隆太, 荻原庸介, 京谷恭弘, 足立秀樹, 上松泰明, 吉田唯真, 成見香瑞範, 福田隆之, 鈴木裕太, 後藤玄, 森田健, 本間正充. Pig-a/PIGRET アッセイに関する短期試験への有用性: MMS 共同研究報告. 日本環境変異原学会第 43 回大会. 2014

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀端 克良 (HORIBATA, Katsuyoshi)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・主任研究官

研究者番号: 40402995