

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K11656

研究課題名（和文）ゲノム編集と部位特異的修飾プラスミドを駆使したDNA損傷から変異誘発への詳細解明

研究課題名（英文）Analysis of mechanisms of mutations from DNA damage using genome editing and site-specifically modified plasmids

研究代表者

八木 孝司 (Yagi, Takashi)

大阪公立大学・大学院理学研究科・客員教授

研究者番号：80182301

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：異なる種類のDNA損傷（3-ニトロベンズアントロンおよびシスプラチン）を、どのTLSポリメラーゼが乗り越えるのか、また各ポリメラーゼが損傷乗り越え時に起こす突然変異の頻度と種類をヒトTLSおよびDNA修復欠損細胞を作成して、シャトルベクタープラスミドを用いて明らかにした。3-NBA損傷では、dG-C8-N2-ABA不可体がPol $\beta$ によるerror-proneなTLSに寄与していることが示唆された。シスプラチン損傷では、Pt-GTGクロスリンクがPol $\beta$ によるerror-freeなTLSに寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異なる種類のDNA損傷を、どのTLSポリメラーゼが乗り越えるのか、また各ポリメラーゼが損傷乗り越え時に起こす突然変異の頻度と種類をヒト変異細胞で明らかにすることは、突然変異研究の課題であった。本研究の結果、塩基付加体の代表であるNBA、および鎖内クロスリンクの代表であるCisPtによるDNA損傷をTLSする主たるDNAポリメラーゼが明らかになった。我々の作成した細胞株を用いて、異なる種類のDNA損傷に関わるTLSポリメラーゼを明らかにすることにより、変異原による突然変異の全貌を明らかにできる。そのことは環境変異原による発がんメカニズムの解明に貢献する。

研究成果の概要（英文）：We established human TLS and DNA repair-deficient cells to determine which TLS polymerase bypasses different types of DNA damage (3-nitrobenzanthrone and cisplatin), and elucidated the frequency and types of mutations each polymerase induces during damage bypass using shuttle vector plasmids. For 3-NBA damage, the dG-C8-N2-ABA lesion was suggested to contribute to error-prone TLS by Pol $\beta$ . For cisplatin damage, Pt-GTG cross-links were suggested to contribute to error-free TLS by Pol $\beta$ .

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：環境変異原 DNA損傷 突然変異 損傷乗り越えDNA合成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

化学変異原物質や放射線は DNA に損傷を引き起こす。動物細胞において、DNA 損傷を持ったまま DNA ポリメラーゼ  $\delta$  と  $\epsilon$  が DNA 複製を開始すると、DNA 鎖の伸長が損傷部位で停止し、細胞死となる。しかし多くの動物細胞では、損傷乗り越え DNA 複製 (Translesion DNA Synthesis: TLS) とよばれる機構により、DNA 複製を進めることができる。しかし TLS にはたらく DNA ポリメラーゼ (Pol  $\eta$ 、 $\kappa$ 、 $\iota$  など) の忠実度が低く、複製の際に正常な塩基対合が形成されず、突然変異を生じさせる。DNA 損傷の種類によってはたらく TLS ポリメラーゼの種類は異なるが、損傷の種類とはたらく TLS ポリメラーゼの関係は明らかでない。

### 2. 研究の目的

異なる種類の DNA 損傷を、どの TLS ポリメラーゼが乗り越えるのか、また各ポリメラーゼが損傷乗り越え時に起こす突然変異の頻度と種類をヒト変異細胞で明らかにする。そのためゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9) を A 群色素性乾皮症 (XP-A) 由来細胞に適用して、突然変異誘発を担う 3 種類の損傷乗り越え (TLS) ポリメラーゼ (Pol  $\eta$ 、 $\kappa$ 、 $\iota$ ) 各々を欠損した変異細胞のセットを作製する。これらの細胞は損傷除去修復機構 (NER: Nucleotide Excision Repair) を欠損しているため、DNA 損傷をもったまま DNA 複製が開始し TLS が起こる。一方で我々は、部位特異的に 1 個だけ DNA 損傷を有し、ヒト細胞で TLS を定量的に測定できる LacZ シャトルベクターを開発し、損傷の種類と誘発突然変異の頻度・種類との関係を解明してきた。本申請ではこの独自の 2 つの技術を組み合わせ、これまで不明確であった多様な DNA 損傷が TLS によって突然変異に至る機構の詳細を解明する。

### 3. 研究の方法

3-1. TLS ポリメラーゼ (Pol  $\eta$ 、 $\kappa$ 、 $\iota$ ) 各々を欠損した XP-A 細胞セットの作製: Pol  $\eta$ 、 $\kappa$ 、 $\iota$  各々の標的配列とガイド RNA を連結し、Cas9 を発現するターゲットプラスミドを作製し、XP-A 細胞に導入し抗生物質で選択する。各々のポリメラーゼにつき数クローンを選び、ターゲット付近の塩基配列を決定し、両アレルに変異が入ったクローンを選択する。Pol  $\eta$ 、 $\iota$  は N 末付近の Catalytic domain を、Pol  $\kappa$  は C 末付近の PIP Box を標的とする。

3-2. Pol  $\eta$ 、 $\kappa$ 、 $\iota$  を欠損した XP-A 細胞の変異原感受性と突然変異誘発性: ヌクレオチド除去修復機構に関わる変異原として紫外線 (UV-C)、3-ニトロベンズアントロン (NBA)、シスプラチン (CisPt) を用いる。これらは各々ピリミ

ジンダイマー、グアニンとアデニンの付加体、グアニンのクロスリンクを形成する。Pol  $\eta$ 、 $\kappa$ 、 $\iota$  を欠損した XP-A 細胞の UV-C、NBA、CisPt に対する感受性を比較する。SupF を突然変異標的とするシャトルベクタープラスミドに UV、NBA、CisPt を処理し、Pol  $\eta$ 、 $\kappa$ 、 $\iota$  を各々欠損した XP-A 細胞で複製させたのち、大腸菌に導入し、各細胞で SupF 遺伝子に生じた突然変異率、突然変異の種類を細胞間で比較する。

3-3. TLS ポリメラーゼ欠損 XP-A 細胞と部位特異的損傷シャトルベクターを用いた TLS の解析：LacZ レポーターシャトルベクターは、片方の DNA 鎖の LacZ 配列内に 1 個の損傷をもち、他方の LacZ 配列は 2 塩基の挿入をもち、よってヒト細胞で複製後、大腸菌に導入すると、損傷をもち鎖は X-Gal 存在下で青色コロニーを、損傷のない鎖は白色コロニーを形成する。損傷部位で複製が停止すると青色コロニーの割合が低下し、青色コロニーの全コロニーに対する割合が TLS 率となる。青色コロニーの LacZ の塩基配列を決定し、突然変異の割合と種類を求める。NBA 付加体 3 種類 (NBA の N2-G、C8-G 付加体・N6-A 付加体)、シスプラチンクロスリンク (CisPt の GG クロスリンク・GTG クロスリンク) をもち 15 mer オリゴヌクレオチドを作製する。これら付加体をもつオリゴヌクレオチドを LacZ レポータープラスミドの一本鎖ギャップに挿入し、超遠心分離機で精製する。できたプラスミドを Pol  $\eta$ 、 $\kappa$ 、 $\iota$  を各々欠損した XP-A 細胞に導入し複製させる。欠損細胞間で TLS 率、突然変異率を比較する。

## 4 . 研究成果

4-1. ゲノム編集 (CRISPR/Cas9 法) により、損傷乗越え DNA ポリメラーゼ Pol $\eta$ 、 $\iota$ 、 $\kappa$  各々の標的配列とガイド RNA とを連結し、Cas9 を発現するターゲットプラスミドを作製した。これらを XP-A 細胞に導入し抗生物質 (ハイグロマイシン) 抵抗性クローンを複数選択した。それらのクローンの DNA シーケンス解析および発現解析の結果、Pol $\eta$ 、 $\iota$ 、 $\kappa$  欠損細胞 ( $\Delta$ Pol $\eta$ 、 $\Delta$ Pol $\kappa$ /PIP、 $\Delta$ Pol $\iota$ ) が作製できた。但し Pol  $\kappa$  欠損が致死となることを避けるために、 $\Delta$  Pol $\kappa$  については、C 末付近の PIP Box を標的としたため、一部 truncate したタンパク質が発現している。

これらの細胞の UV-C、シスプラチン (CisPt)、3-ニトロベンズアントロン (NBA) 感受性をコロニー形成法で調べた結果、いずれの変異原に対しても Pol  $\eta$  欠損細胞のみ親株の XP-A 細胞より高感受性であった。その他の欠損細胞は XPA 細胞と同程度の変異原感受性を示した。

4-2. 各細胞 ( $\Delta$ Pol $\eta$ 、 $\Delta$ Pol $\kappa$ /PIP、 $\Delta$ Pol $\iota$ ) に各変異原 UV-C、CisPt、NBA 処理した SupF シャトルベクタープラスミドを導入し、supF 遺伝子に誘発される突然変異の頻度と種類を解析した。

UV-C 損傷が誘発する突然変異は、 $\Delta$ Pol $\kappa$  株において他の細胞株より突然変異頻度が有意に増加した。すなわち Pol  $\kappa$  が UV-C 損傷の error-free な TLS に

関与していることが示唆された。また、全ての細胞株において G:C→A:T が大部分を占めていた。ΔPol $\eta$  株でこの置換の割合が減少したことから、Pol $\eta$  がこの置換の誘発に寄与している可能性が示唆された。

シスプラチン損傷では、ΔPol $\eta$  株において突然変異頻度が有意に増加したため、Pol $\eta$  が error-free な TLS に寄与していることが示唆された。また、全ての細胞株において、突然変異は G:C→T:A が大部分を占めていた。

3-NBA 損傷については、ΔPol $\iota$  において突然変異頻度が有意に減少し、Pol $\iota$  は error-prone な TLS に寄与していることが示唆された。ΔPol $\iota$  では塩基置換の種類に変化が見られなかったが、フレームシフト変異の割合が増加していた。

4-3. LacZ 遺伝子中のグアニンに NBA 付加体を 1 分子もつプラスミドを作製して、各細胞で複製させてから抽出精製し、大腸菌に導入すると、細胞中で TLS が起こったプラスミドから LacZ が発現して大腸菌コロニーの色が付くシャトルベクター系を作製した。

NBA のグアニン付加体は、結合部位が異なる 3 種類がある (dG-N-ABA、dG-C8-N2-ABA) (ABA : NBA の代謝活性体)。それらをを 1 分子もつ LacZ シャトルベクタープラスミドを作製し、各種 DNA ポリメラーゼ欠損株 (ΔPol $\eta$ 、Δ $\kappa$ /PIP、ΔPol $\iota$ ) で複製させた。その結果、dG-C8-N2-ABA が最もシャトルベクターの複製率を低下させ、突然変異頻度を有意に上昇させた。dG-C8-N2-ABA には主に Pol $\eta$  が Error-free TLS に関与することがわかった。

CisPt についても、CisPt 付加体 (Pt-GTG および Pt-GG) を LacZ 遺伝子中のグアニンに 1 分子もつプラスミドを作製して、付加体を有する DNA 鎖に TLS が起こると大腸菌コロニーに青色が付くシャトルベクター系を開発した。これらプラスミドを各 TLS ポリメラーゼを欠損した XPA 細胞で複製させた結果、Pt-GTG では非修飾プラスミドに比べて複製率が有意に低下したが、細胞株間で複製率に有意差はみられなかった。複製したプラスミドの突然変異率は XPA、ΔPol $\eta$ 、Δ $\kappa$ /PIP、ΔPol $\iota$  細胞株において、それぞれ 6、4、0、3% であり、観察された突然変異の種類は G→T へのトランスポージョンであった。一方、Pt-GG では非修飾プラスミドと比べて複製率に有意差はみられず、どの細胞株でも突然変異はみられなかった。

以上の結果、Pt-GTG プラスミドはいずれの細胞株でも複製率が低下したことから、Pt-GTG は DNA 複製を阻害することが示された。また Δ $\kappa$ /PIP 株で突然変異が見られなかったことから、Pt-GTG 誘発突然変異はおもに Pol $\kappa$  が関与していると考えられる。つまり Pol $\kappa$  がはたらかないとき、他の TLS ポリメラーゼがはたらいてエラーフリーな TLS がおこると考えられる。一方、Pt-GG は DNA 複製を阻害せず、エラーフリーに TLS され DNA 複製が継続すると考えられる。

以上の結果、NBA および CisPt による DNA 損傷を TLS する主たる DNA ポリメラーゼが明らかになった。我々の作成した細胞株を用いて、異なる種類の DNA 損傷に関わる TLS ポリメラーゼを明らかにすることによって、変異原に

よる突然変異の全貌を明らかにできる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名	坪平理、植嶋亜衣、久富優太、小田美光 <sup>1</sup> 、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚 ゆ加里、八木 孝司、若林敬二、渡辺 賢二、川西 優喜
2. 発表標題	DNA鎖間架橋修復欠損細胞を用いたコリバクチン産生大腸菌に対する感受性試験
3. 学会等名	変異機構研究会・第33回夏の学校
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	川西 優喜、坪平理、久富優太、植嶋亜衣、下原千昌、小田美光、恒松雄太、佐藤道大、平山 裕一郎、三好 規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚ゆ加里、八木 孝司、若林敬二、渡辺 賢二
2. 発表標題	日本人がん患者から単離したコリバクチン産生大腸菌が示す遺伝毒性
3. 学会等名	日本環境変異原ゲノム学会第51回大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	植嶋亜衣、八木孝司、他13名
2. 発表標題	日本人大腸がん患者の大腸から単離したコリバクチン産生大腸菌が誘発する遺伝毒性機構の解析
3. 学会等名	令和2年度放射線施設共同利用報告書
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	中谷奈央子、福本航大、炬口茜、高村岳樹、八木孝司、川西優喜
2. 発表標題	各種変異原の突然変異誘発におけるTLSポリメラーゼのはたらき
3. 学会等名	第6回アジア環境変異原会議・第48回日本環境変異原学会合同大会（国際学会）
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 中谷奈央子、炬口茜、福本航大、倉岡功、高松岳樹、川西優喜、八木孝司
2. 発表標題 各種変異原による突然変異誘発における各TLSポリメラーゼの働き
3. 学会等名 日本環境変異原学会第47回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中谷奈央子、八木孝司
2. 発表標題 TLSポリメラーゼ欠損細胞株における各種変異原物質の突然変異解析
3. 学会等名 変異機構研究会第31回夏の学校
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 八木孝司	4. 発行年 2022年
2. 出版社 大阪公立大学出版会	5. 総ページ数 128
3. 書名 改訂版 チョウから学ぶ遺伝学	

〔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	川西 優喜  (Kawanishi Masanobu)  (70332963)	大阪公立大学・大学院理学研究科 ・教授   (24405)	

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