

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：32615

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510054

研究課題名（和文） DNA 損傷とは無関係に遺伝的不安定性を誘発する機構と細胞がん化における役割

研究課題名（英文） Induction Mechanism of Genomic Instability Induced Independent of DNA Damage and the Implication on Carcinogenesis

研究代表者

布柴 達男（NUNOSHIBA TATSUO）

国際基督教大学・教養学部・教授

研究者番号：10270802

研究成果の概要（和文）：非変異発がん物質 Benzene の代謝物、hydroquinone (HQ) の染色体分配異常に伴うヘテロ接合性喪失(LOH)誘発性を確認した。HQ が tubulin との相互作用を介し紡錘体形成における tubulin 重合／解離のバランスを乱すことやHog1-Swe1 morphogenesis checkpoint を活性化することから、それらの性質が LOH 誘発に寄与すると考えられた。また様々な線エネルギー付与(LET)のイオンビームが相同組換えに起因する LOH を誘発することを確認した。

研究成果の概要（英文）：Hydroquinone (HQ), which is the metabolite of the non-mutagenic carcinogen, benzene, induced loss of heterozygosity (LOH), through chromosomal mis-segregation. HQ interacted to tubulin, interfered valance between polymerization/ dissociation during microtubule formation, and activated Hog1-Swe1 morphogenesis checkpoint, suggesting that LOH induced by HQ is implicated in these characteristics of HQ. By using the LOH detection system, various iron beams with different LET also induced LOH through homologous recombination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響学

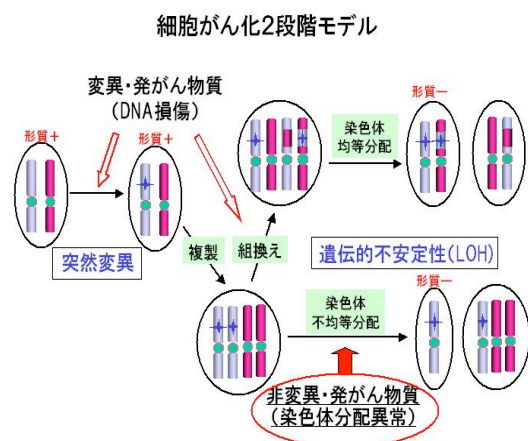
キーワード：放射線生物影響、ゲノム安定性、染色体不均等分配、非変異発がん物質、LOH、phenyl hydroquinone、hydroquinone、morphogenesis

1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子の機能不全が細胞がん化と密接に関わっていることは多くの研究から明らかである。ヒトのような2倍体細胞でがん抑制遺伝子の機能不全を引き起こすに

は、染色体の両アレルのがん抑制遺伝子に変異が必要になる。細胞がん化の2段階モデル（次頁図）では、最初は DNA の損傷や複製誤りに由来する一方のアレルへの変異の導

入であり、2段階目は loss of heterozygosity (LOH)によるもう一方のアレルの失活である。LOHは、遺伝子変換(gene conversion)と交叉(allelic crossover)というDNA損傷の組み換え修復過程で生じ、やはり2段階目でもDNA損傷が主役を演じる。このことは申請者も放



射線の間接作用や細胞内の要因として知られる活性酸素の生物作用、防御の仕組み、突然変異の誘発機構などの研究を通しその重要性を指摘してきた (Nunoshiba et al., JBC 1999; DNA Repair 2002; BBRC 2003; NAR 2004; BBRC 2004; J Bacteriol 2006; Gene Environ 2006)。

しかしその一方で、がん細胞の多くで染色体異数化が見られることから、2段階目における染色体喪失(異数化)も、LOH誘発機構のひとつとして注目される。我々はすでに酵母2倍体細胞を用いたLOH検出系を構築し、変異原性陰性の発がん物質(非変異・発がん物質) o-phenyl phenolの代謝物の phenyl hydroquinone (PHQ)が、1) LOHを誘発し、2) β -チューブリンと相互作用し重合チューブリンの解離を阻害すること、3)細胞周期をG1とG2/M期で停止させることなどを報告した (Mutation Res 2007)。さらに予想外にもPHQが、4) Hog1をリン酸化し、それにより Swelを安定化すること、5) *swel* や *hog1* の欠損株ではPHQによるG2/Mでのarrestがおこらないこと、6) またその一方で Chk1 や Rad53を

リン化しないこと、7) *swel* や *hog1* の欠損がPHQに対する感受性を低下させ、染色体喪失誘発を抑制することなどを見いだした。以上の結果はPHQがMec/Tel1依存のDNA damage checkpointではなく、浸透圧ストレス等に応答するHog1-Swel pathwayにより活性化されるG2/M checkpointにより細胞周期が停止すること、またその pathwayの活性化がPHQによる染色体異数化誘発に寄与することを示唆している (FEBS 2008)。

2. 研究の目的

本申請では、真核細胞のモデル細胞として出芽酵母2倍体細胞を用い、DNA損傷とは無関係に遺伝的不安定性を招く機構、特に染色体異数化誘発がいかなる機構で生じるのかを染色体分配機能不全やチェックポイントへの影響に注目しつつ明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HQの染色体喪失に伴うLOH誘発とその作用機序の検討

① HQによるLOH誘発能; 独自で開発した出芽酵母2倍体細胞を用いたLOH検出法を用い、HQによるLOH誘発およびその機構を検討した。

② HQの β -チューブリンと相互作用; 酵母の β -チューブリンタンパク質GSTとの融合タンパク質として大腸菌内で発現させ、グルタチオンセファロースカラムにより精製した。一方HQをEAH-セファロースにカップリングさせたアフィニティークラム(HQ-EAH)を作成し、精製したGST- β -チューブリンをアプライしよく洗浄したのち、0.1-0.5Mの塩で溶出し、抗GST抗体を用いたウェスタンブロッティングでHQの β -チューブリンとの相互作用を観察した。

③ チューブリンの重合/解離への影響; ウシの脳由来のチューブリンのin vitroでの重合/解離を、340nmの吸収を重合の指標に

検出し、HQ の添加による影響を観察した。

④ 細胞周期の進行と細胞形態への影響 ;

G1、S 期の各周期の細胞に HQ を処理し、周期の進行を FACS で追跡するとともに形態異常を顕微鏡で観察した。

⑤ Swe1 の安定化 ; morphogenesis checkpoint の活性化に関わる Swe1 の安定化をみるため、出芽酵母の Swe1 に myc-tag をつけ、抗 myc 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより観察した。

⑥ swe1 や hog1 の欠損株における LOH 誘発 ; 2 倍体出芽酵母の *swe1* や *hog1* 欠損株を用いた LOH 検出系により、HQ による LOH 誘発、特に染色体喪失誘発への Hog1、Swe1 の寄与を観察した。

(2) NaCl と PHQ の複合影響

NaCl は Hog1 をリン酸化し Swe1 を安定化させて、Hog1-Swe1 pathway を誘発することが知られている。そこで PHQ や HQ 同様、染色体分配異常による LOH を誘発するかどうかを検討した。さらに PHQ による LOH 誘発に NaCl 処理がどのような影響を及ぼすかを観察し、複合影響を検討した。

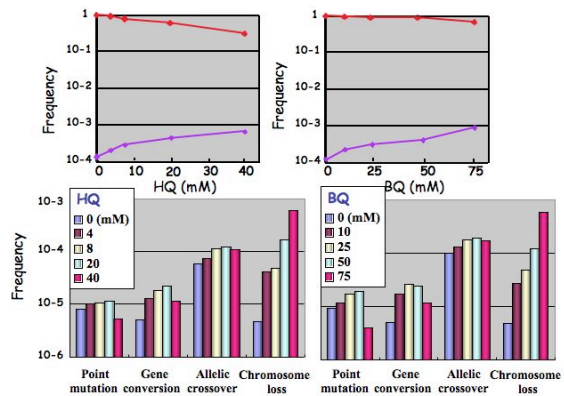
(3) LOH 誘発物質のスクリーニングの実施

これまでいくつかの発がん物質の LOH 誘発性を調べ、LOH の誘発には DNA 損傷をきっかけに相同組換えを介した遺伝子変換 (gene conversion) と交叉 (allelic crossover) による LOH と紡錘体や中心体との相互作用などによる染色体分配異常による LOH が存在することが明らかになってきた。そこで化学物質から放射線に視点を移し、線エネルギー付与 (LET) の異なるイオンビーム照射による LOH 誘発について検討を行った。イオンビームは日本原子力研究開発機構の高崎量子応用研究所深度制御種子照射装置により照射した。さらに LOH 誘発への DNA 修復酵素や translesion DNA polymerase などの関与も検討した。

4. 研究成果

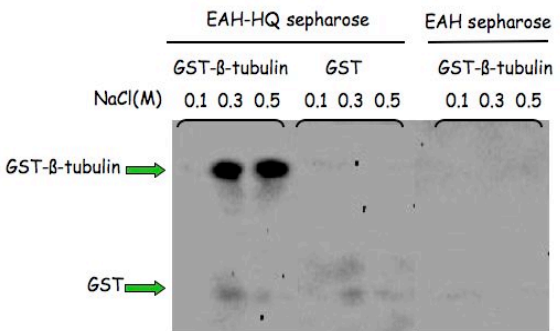
(1) HQ の染色体喪失に伴う LOH 誘発とその作用機序の検討

① HQ による LOH 誘発能 ; Benzene の代謝物である hydroquinone (HQ) や benzoquinone (BQ) の LOH 誘発性を検討したところ、いずれも dose dependent に LOH を誘発し、その機構として染色体喪失がもっとも顕著で、dose dependency も観察された。

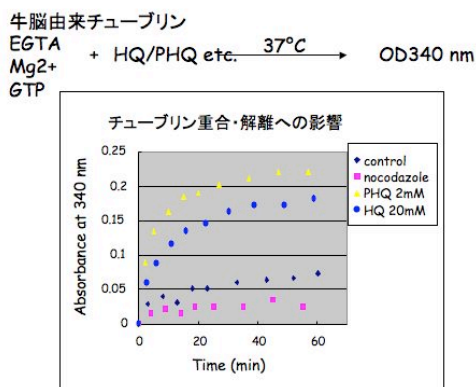


② HQ の β-チューブリンと相互作用 ;

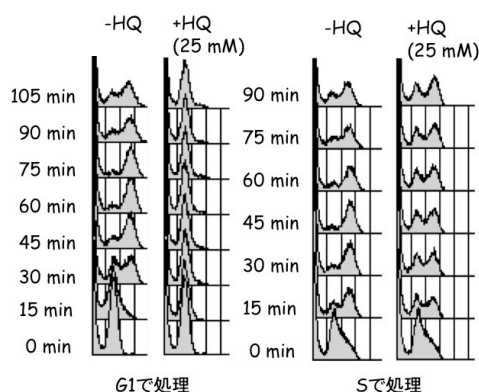
GST-β-チューブリンを HQ-EAH アフィニティークラムにアプライし、よく洗浄したのち、0.1-0.5M の塩で溶出し、抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロッティングしたところ、抗 GST 抗体が結合するシグナルは 0.3M および 0.5M の NaCl で溶出されるサンプルに検出された。しかしながら、HQ-EAH に GST をアプライした場合、また EAH に GST-β-チューブリンをアプライした場合は、塩で溶出されるサンプルに抗 GST 抗体が結合するシグナルは認められなかった。従って、β-チューブリンが HQ と相互作用することが確認された。



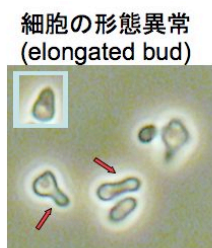
③ チューブリンの重合／解離への影響；
ウシの脳由来のチューブリンの *in vitro* での重合／解離を 340 nm の吸収を重合の指標に検出し、HQ の添加による影響を観察したところ、positive control として用いた PHQ ほどではないが、重合チューブリンの解離阻害を示した。



④ 細胞周期の進行と細胞形態への影響；
G1、S 期の各周期の細胞に HQ を処理し、周期の進行を FACS で追跡したところ、HQ は G1 の細胞は G1 のまま進行を抑制し、S の細胞は G2/M で細胞周期の進行を抑制した。

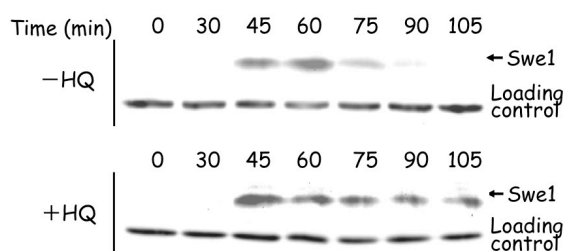


また細胞の形態を観察したところ、HQ 処理によりいわゆる elongated bud の誘導が観察された。



⑤ Swe1 の安定化；
morphogenesis
checkpoint の活性化に関わる Swe1 の安定化をみるため、出芽酵母の Swe1 に myc-tag を

つけ、抗 myc 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより観察したところ、HQ 未処理では G1 release から 45 分で Swe1 が誘導され、75 分後には減少したが、一方、HQ 処理すると同様に G1 release から 45 分で Swe1 が誘導されるが、その後も減少せず、105 分後でも安定的に細胞内に存在した。このことは 4) で観察された細胞周期の進行阻害や elongated bud の誘導が PHQ と同様に Hog1-Swe1 pathway の活性化に依存することを示唆している。



⑥ swel や hog1 の欠損株における LOH 誘発；
2 倍体出芽酵母の *swel* や *hog1* 欠損株を用いた LOH 検出系により、HQ による染色体喪失誘発への Hog1、Swe1 の寄与を観察したところ、野生株で 80%以上を占めていた染色体喪失が *swel* や *hog1* 欠損株ではほとんど見られなかった。

(2) NaCl と PHQ の複合影響

NaCl は Hog1-Swe1 pathway を誘発することが知られていることから、PHQ や HQ 同様、染色体分配異常による LOH を誘発するかどうかを検討した。その結果、NaCl は少なくとも実験に用いた 1.2 M までの範囲では、3%までの dose dependent な細胞毒性が認められたが LOH の誘発は確認できなかった。そこで NaCl と PHQ の複合的な作用を想定し、PHQ の染色体喪失誘発や LOH 誘発性への NaCl の同時処理効果を検討した結果、単独では致死作用を示さない濃度範囲の NaCl 処理により、野生株では PHQ の感受性の増強がみられ、逆に染色体喪失誘発性の抑制が見られた。一方 *swel* や *hog1* 欠損では感受性の増強は見られなかった。NaCl による Hog1-Swe1 pathway

の活性化がどのように PHQ による感受性や染色体喪失誘発性に影響したかについては更なる検討が必要である。

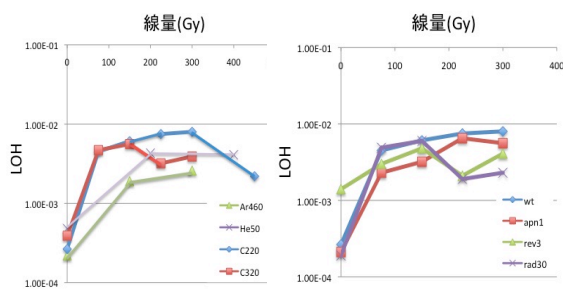
本研究では、これまでにPHQで確認された染色体分配異常やLOH誘発の機構が、PHQに特異的なものであるかどうかを確認する目的でOPPやPHQ同様、非変異発がん物質であるBenzeneの代謝物であるhydroquinone (HQ)について検討した。その結果、HQによる染色体分配異常の誘発にはHog1-Swe1 pathwayが寄与していることが示唆され、PHQによる染色体分配異常やLOH誘発の機構と同様であることが示された。PHQの分子構造にはHQが存在することから、HQの構造や化学的性質がチューブリンとの相互作用に関与する可能性が示唆された。言い換えればこのようなHQ構造をとる化学物質にはチューブリンとの相互作用を介して染色体分配異常やLOHを誘発する可能性を示唆している。しかし残念ながら本研究によりこれらの化合物の染色体分配異常やLOH誘発機構の詳細の解明にまでは届かなかった。Hog1-Swe1の上流にはPbsが、そしてその上流には、SlnやShoなどの2つの経路が存在するといわれている。これらの関与については更なる検討が必要である。

(3) LOH誘発物質のスクリーニングの実施

線エネルギー付与(LET)の異なるイオンビーム照射による LOH 誘発について検討を行った。さらに LOH 誘発への DNA 修復酵素や translesion DNA polymerase の関与も検討した。野生株の場合、非照射が概ね $2-3 \times 10^{-4}$ であるのに対し、 $^{12}\text{C}^{5+}$ 、 $^{12}\text{C}^{6+}$ は照射最小線量の 75 Gy でそれぞれ 4.5×10^{-3} 、 4.7×10^{-3} と 10 倍以上の頻度で LOH を誘発し、それ以上の線量による大きな LOH 誘発頻度の上昇は見られなかった。 $^4\text{He}^{2+}$ についても非照射が 5×10^{-4} であるのに対し照射最小線量の 200 Gy で 4.5×10^{-3} と約 10 倍、 $^{40}\text{Ar}^{13+}$ でも非照射が 2×10^{-4} である

のに対し照射最小線量の 150 Gy で 1.9×10^{-3} と 10 倍の頻度で LOH を誘発し、それ以上の線量による大きな LOH 誘発頻度の上昇は見られなかった。これらの $^{12}\text{C}^{5+}$ 、 $^{12}\text{C}^{6+}$ 、 $^4\text{He}^{2+}$ 及び $^{40}\text{Ar}^{13+}$ 照射最小線量による致死効果はいずれも 30-50%程度であった。いずれの核種も致死作用、LOH 誘発性にそれほど大きな差は見られなかった。LOH 誘発機構としては、LOH の 90%程度は相同組換え依存の遺伝子変換や交叉によるもので、残る 10%程度は染色体喪失によるもので、イオンビーム照射が染色体不均等分配を引き起こす可能性は確認できなかった。

また、 $^{12}\text{C}^{5+}$ については DNA 脱塩基(AP)部位の DNA 修復に関わる AP endonuclease 欠損株、translesion DNA polymerase である Pol η 及び Pol ζ 欠損株についても検討した結果、 Δapn1 欠損株及び Δrad30 欠損株については野生株と大きな差は見られなかったが、 Δrev3 欠損株では、非照射で 1.9×10^{-3} と他の株より高頻度で LOH が高いものの、照射によっても 75 Gy、150 Gy でそれぞれ 4.9×10^{-3} 、 6×10^{-3} と 2-3 倍の LOH 誘発しか見られず、これらの LOH 誘発に translesion DNA polymerase Pol ζ の関与が伺えた。



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2件)

① Nunoshiba T, Kuraoka I, Ibuki Y, Narumi I “Challenge to Conquer Cancer ~ New Trends in Mutation Research”, *Gene and Environment*, 査読あり, 33, 2012, 55-57.

② 山本歩, 布柴達男, 細胞周期チェックポ

イントと染色体異数性誘発, 放射線生物研究, 査読なし, 44, 2009, 251-262

[学会発表] (計 11 件)

① 塩谷詩織、牧野耕三、布柴達男、平津圭一郎、植物ゲノムの突然変異検出法の開発、日本農芸化学会2012年度大会、京都、Mar.24 (2012)

② 橋本剛志、日野真吾、布柴達男、出芽酵母Ham1のゲノム安定化における役割～脱アミノ化ヌクレオチドによる相同組換えの誘発、日本環境変異原学会第40回大会、東京、Nov.21 (2011)

③ 平澤佑啓、阿部真弓、平津圭一郎、布柴達男、高度好熱菌におけるUV誘発DNA損傷に対するUV損傷ヌクレアーゼと光回復酵素の関係性、日本環境変異原学会第40回大会、東京、Nov.21 (2011)

④ 米良花香、河東祐季、太田敏博、布柴達男、高度好熱菌*Thermus thermophilus*のゲノム安定化機構の解析～相同組換え検出系の樹立、日本環境変異原学会第40回大会、東京、Nov.21 (2011)

⑤ 大塚久美、戸塚ゆ加里、若林敬二、布柴達男、渡辺徹志、中釜斉、トリプトファンとグルコースのメイラード反応生成物ABAQの*in vivo*変異原性、日本環境変異原学会第40回大会、東京、Nov.21 (2011)

⑥ 河東祐季、平津圭一郎、布柴達男、高度好熱菌のゲノム安定化機構の解析～突然変異スペクトル解析システムの樹立、日本環境変異原学会第39回大会、つくば、Nov.16 (2010)

⑦ 阿部真弓、前西真梨子、太田敏博、布柴達男、高度好熱菌の紫外線DNA損傷に対する光回復酵素の役割、日本環境変異原学会第39回大会、つくば、Nov.16 (2010)

⑧ 布柴達男、活性酸素による突然変異とエピゲノミクス、環境エピゲノミクス研究会、つくば、Nov.15 (2010)

⑨ Nunoshiba T, Genetic Instability Inducers in *Saccharomyces cerevisiae*: An Ames-negative carcinogen, Phenyl hydroquinone (PHQ), International Workshop on "Genomic stability under environmental stress", 日本分子生物学会, 横浜, Dec.10 (2009).

⑩ Nunoshiba T, Genome Instability Caused by Deaminated Nucleotide Lesions in *Saccharomyces cerevisiae*, 日本環境変異原学会第38回大会, 静岡, Nov.26 (2009).

⑪ Nunoshiba T, Genetic Instability Inducers in *Saccharomyces cerevisiae*: Mutation in Cellular Defense System and Environmental Chemicals, NAIST Global COE International Symposium "Environmental Adaptation", Nara, Nov.13 (2009).

[図書] (計 1 件)

Nunoshiba T, Kuraoka I, Eds., Special Issue: JEMS symposium on New Trend in Mutation Research, Gene and Environment, 査読あり, 33, 2012, 55-100.

[その他]

研究代表者は、本申請期間内に高等学校のべ3校に出前講義を行い、主に「細胞はいかにがん化するか?」といったテーマで講演を行った。それらの折には本研究の成果の一部を高校生にも分かるように紹介するとともにがん研究の重要性などについても講演している。

また研究代表者は、内閣府食品安全委員会の農薬調査会専門委員を務め、本申請期間内には幹事や確認評価部会副座長を歴任し、数々の農薬の一日摂取許容量 ADI 設定に関わっている。その際対象となる農薬にはいくつもの非変異発がん物質が含まれており、本研究から得られた知見が貢献できる機会もある。

このような取り組みを通じ、本研究成果の社会に向けての発信と次世代への科学・研究に対する興味の喚起に務めている。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

布柴 達男 (NUNOSHIBA TATSUO)
国際基督教大学・教養学部・教授
研究者番号：10270802

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()
研究者番号：