

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23221006

研究課題名(和文) 遺伝毒性試験の新機軸 - DNA損傷、突然変異、染色体 -

研究課題名(英文) Innovation of genotoxicity tests - DNA damage, Mutation, Chromosome -

## 研究代表者

松田 知成 (Matsuda, Tomonari)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50273488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 146,400,000円

研究成果の概要(和文)：新規化合物開発現場では、安全性評価のため遺伝毒性試験が重要であり、より信頼性の高い試験法の開発が望まれている。本研究では、DNA損傷、突然変異、染色体異常をエンドポイントとする、メカニズム解明型の新しい遺伝毒性試験を開発した。DNA損傷については、DNAアダクトーム法の大幅な時間短縮と高感度化を実現した。突然変異については、1分子リアルタイムDNAシーケンサーを用いて、任意の細胞、組織における突然変異を検出する方法、SMRT突然変異解析法を開発した。また、化学物質によるDNA損傷を介さない染色体異常の誘発に、DNA損傷応答の阻害が重要であることを突き止め、この活性を評価する手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Genotoxicity tests are essential for pre-marketing hazard assessment of newly-developed chemicals. Recent development of analytical equipment and cell biology allow us to make innovation in this area. In this study, we tried to develop innovative genotoxicity tests which focused on DNA damage, mutation and mechanism of chromosomal aberration. As for DNA damage, we modified the protocol of DNA adductome method to make it faster and more sensitive. We also developed a new mutation assay using a single molecule real time DNA sequencer, enabling direct monitoring of mutation frequency in DNA of any samples. We also developed methods to evaluate inhibition of DNA damage response which is the important mechanism for DNA damage independent chromosomal aberration.

研究分野：環境変異原

キーワード：突然変異 DNA損傷 染色体異常 遺伝毒性試験 1分子リアルタイムDNAシーケンサー

1. 研究開始当初の背景

新規化合物（医薬品、農薬、工業原料等）開発現場では、比較的初期に遺伝毒性試験が行われ、開発の続非について判断を行う。しかし、小核試験や染色体異常試験など、現在もよく用いられている遺伝毒性試験は、発がん性を予測するという意味においては疑陽性が多いという欠点がある。そのため、より信頼性の高い遺伝毒性試験の開発が求められていた。一方で、質量分析計や次世代 DNA シークエンサーなどの分析機器の飛躍的な性能向上、染色体分配に関わる分子生物学的知見の集積など、新しいメカニズム解明型の遺伝毒性試験を開発するための準備は整っていた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、新規化合物開発現場において適用可能な「メカニズム解明型遺伝毒性試験」を開発することを目的とした。特に、化学物質が引き起こす未知の DNA 付加体を LC/MS/MS を使って直接検出する方法（DNA アダクトーム法）、任意の生物の任意の遺伝子における点突然変異頻度を、1 分子リアルタイム DNA シークエンサーを使って直接測定する方法（SMRT 法）、染色体異常を引き起こす化学物質の DNA 以外のターゲットを調べる方法、などについて研究を行った。

3. 研究の方法

(1) DNA アダクトーム法の実用化：

以前、我々が開発した DNA アダクトーム法は、すでに製薬企業の安全性評価に利用されているが、解析に多くの DNA 量と、長い時間が必要であり、スループットの点で問題があった。そこで、最新の UPLC/MS/MS を導入して、プロトコルの見直しを行った。

(2) SMRT 突然変異解析法の開発：

PacBio RSII DNA シークエンサーは、1 分子リアルタイム（Single molecule real time: SMRT）技術を実装した機種である。我々は、この最新の SMRT シークエンサーを用いた変異原性試験を開発した。この機種を用いると、DNA 1 分子ごとに塩基配列情報が得られるので、もしもそれが極めて正確であれば、DNA をただシークエンスするだけで、極低頻度の変異を検出できることになる（図 1）。



図 1 SMRT 突然変異解析法の概要

(3) DNA 損傷を介さない染色体異常誘発物質検索法の開発：

我々はまず、様々なタンパク質キナーゼの阻害剤について小核試験を行い、DNA 損傷応答の破たんが、DNA 損傷を介さない染色体異常誘発メカニズムとして重要であることを突き止めた。そこで、DNA 損傷応答を簡便に測定する技術を開発し、様々な染色体異常誘発物質が、DNA 損傷応答に与える影響を評価した。また、DNA 損傷応答に関するタンパク質複合体の解析をいくつか行い、メカニズム研究を展開した。

4. 研究成果

(1) DNA アダクトーム法の実用化：

最新の UPLC/MS/MS を導入して、DNA アダクトーム法のプロトコルを見直し、大幅な時間短縮と DNA 量の削減（高感度化）を実現した。このことにより、同法の安全性評価現場への適用をより容易にした。

また、この技術を応用した基礎研究として、飲酒による食道がんの発生において、代謝酵素 ALDH2 が食道における DNA 損傷の防御に重要であることを証明したり、日本人の胃粘膜において、極めて高レベルの過酸化脂質由来の DNA 付加体が生じていることを明らかにしたり、5 メチルシトシンの極めて鋭敏な測定法を開発し、受精卵発生過程におけるエピジェネティックマーカーの消去と再生のダイナミクスを明らかにした。（発表論文）

(2) SMRT 突然変異解析法の開発：

我々は、試験生物から抽出した DNA を、SMRT シークエンサーを用いて、ただシークエンスするだけで、極低頻度（ $10^7$  塩基に 1 個程度）の突然変異を検出できることを世界で初めて実験的に示した。極めて正確なシーケンスをするために、SMRTBell という技術を用いて、1 分子の DNA テンプレートを何度も繰り返しシークエンスし、バイオフィォーマティクスを用いて、真の突然変異とミスマッチ、DNA 損傷を区別して検出する方法を開発した（図 2）。この方法は、原理的には任意の細胞、組織に適用できるので、将来的には実験動物を用いた in vivo 変異原性試験への応用が期待される。（発表論文）

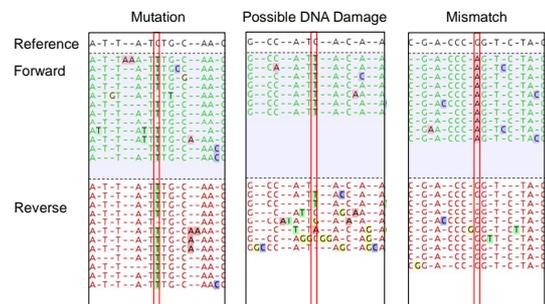


図 2 単一分子の繰り返しシーケンスによる真の突然変異とミスマッチ、DNA 損傷の区別

### (3) DNA 損傷を介さない染色体異常誘発物質検索法の開発：

様々なキナーゼの特異的阻害剤について小核試験を行った結果、DNA 損傷を介さない染色体異常誘発メカニズムとして、DNA 損傷応答の阻害が重要であることが明らかとなった。そこで、DNA 損傷応答の簡便なスクリーニング法をいくつか開発した。一つは、DNA 損傷に反応して、核内でフォーカスを形成する MDC 1 というタンパク質に着目し、この遺伝子に GFP をつないだ細胞株を作成した。これを用いれば、試験物質を曝露して、蛍光顕微鏡で観察するだけで DNA 損傷応答を評価することができる(図 3)。もう一つは、ヒストン H2AX のリン酸化を、LC/MS/MS を用いて直接定量する方法を開発した。(発表論文 )

DNA 損傷応答を阻害して染色体異常を引き起こす物質としてカフェインが知られている。カフェインは摂取量が多くなると危険だが、多くの食品や医薬品に含まれており、取り過ぎなければ安全であると考えられている。今回我々が開発した実験系を使えば、カフェインと同じように、染色体異常を引き起こすが、低濃度では安全である物質をスクリーニングすることができる。

そこで、染色体異常を引き起こすが、発がん性のないいくつかの物質についてスクリーニングを行った結果、プロピルガレットと 9-アミノアクリジンが DNA 損傷応答を阻害することで小核を引き起こすことを明らかになった。この研究は、小核試験の疑陽性のメカニズムを解明するための手順を示したものであり、レギュラトリーサイエンスとしての意義は大きい。(発表論文 )

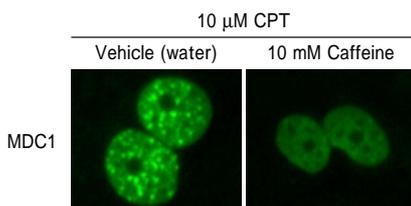


図 3 MDC1 アッセイによる DNA 損傷応答阻害物質のスクリーニング：DNA 損傷性物質のカンプトテシン (CPT) で細胞を処理すると、核の中に MDC 1 のフォーカスが形成されるが、DNA 損傷応答阻害物質であるカフェインを同時に処理しておくことで形成されない。

### (4) タンパク質複合体解析による基礎研究：

本研究では、染色体異常の仕組みをより深く理解するために、主に、DNA 損傷応答に関するタンパク質複合体解析を行った。興味のあるタンパク質に Flag - HA タグをつけたものを HeLa 細胞に発現させ、複合体を精製して、TOF-MS を用いて複合体中のタンパク質を同定した。そして、これらのデータをもとに、分子生物学的な基礎研究を展開し、一部成果がまとまった。

癌細胞ではピルビン酸キナーゼ M2 (PKM2) が高発現しており、核内で転写の補助因子となっていることが知られていたがその詳細なメカニズムはよくわかっていなかった。我々は、転写因子 AhR の複合体中に PKM2 とピルビン酸デヒドロゲナーゼが存在することを見出し、様々な生化学的検討を行った結果、以下のモデルを構築するに至った(図 4)。すなわち、PKM2 とピルビン酸デヒドロゲナーゼは転写因子 AhR と転写の局所において複合体を作り、そこで局所的にアセチル補酵素 A を合成し、ヒストンアセチル化を容易にすることで転写を活性化するというものである。本研究の成果は、染色体代謝における PKM2 の重要性を明らかにし、癌細胞における PKM2 の役割について重要な知見を与えるものである。(発表論文 )

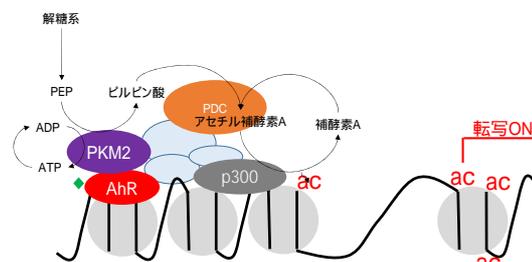


図 4 PKM2 が転写の補助因子として働くメカニズム：PKM2 は転写の局所でピルビン酸を合成し、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDC) はピルビン酸からアセチル補酵素 A を合成する。アセチル補酵素 A はアセチル化酵素 p300 により、ヒストンをアセチルするために使用される。ヒストンがアセチル化されるとクロマチンが開き、転写装置のアクセスが容易になり転写が活性化される。

また、分担者の井倉が中心となって、DNA 損傷応答に関与する、ヒストン H2AX、TIP60、NBS1、PARP1 などのタンパク質複合体解析を行い、DNA 損傷領域におけるヒストン H2AX のダイナミックなターンオーバーにこれらの因子が重要であることを明らかにした。これらの知見は、今後の新しい遺伝毒性試験の開発に役立つものである。(発表論文 )

また、分担者の足立は高度なプロテオーム技術の開発をすすめ、クロマチンタンパク質の一斉分析法や、効率的なリン酸化プロテオーム解析方法などを開発した。(発表論文 )

### (5) まとめ

以上の研究成果をまとめると、当初の目的のうち、DNA アダクトームの改良と、SMRT 突然変異検出法の開発については達成した。また、染色体異常を引き起こす化学物質の DNA 以外のターゲットを調べる方法については、DNA 損傷応答の評価系を作ることで一部達成した。また、タンパク質複合体解析や新しいプロテオーム技術を用いて、染色体代謝に関する重要な基礎的知見を得ることもできた。しかし、染色体異常の重要なターゲット

は DNA 損傷応答以外にもあり、今後、さらに研究を進める必要がある。

#### 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 64 件 すべて査読有)

Ikura, M., (他 3 名), Adachi, J., Matsuda, T., Kakizuka, A., Ikura, T. (2016) Coordinated regulation of TIP60 and PARP-1 in damaged chromatin dynamics, *Molecular and cellular biology.*, in press, DOI: 10.1128/MCB.01085-15

Matsuda, S., Adachi, J., (他 5 名), Ikura, T., Matsuda, T. (2016) Nuclear pyruvate kinase M2 complex serves as a transcriptional coactivator of arylhydrocarbon receptor, *Nucleic Acids Res* 44, 636-647. DOI: 10.1093/nar/gkv967

Matsuda, S., (他 3 名), Ikura, T., Matsuda, T. (2016) Disruption of DNA Damage-response by Propyl Gallate and 9-Aminoacridine, *Toxicol Sci.*, in press, DOI:10.1093/toxsci/kfw039

Okamoto, Y., (他 4 名), Matsuda, T., Kojima, N., Perry, A. C., Takada, T. (2016) DNA methylation dynamics in mouse preimplantation embryos revealed by mass spectrometry, *Scientific reports* 6, 19134. DOI: 10.1038/srep19134

Amanuma, Y., (他 12 名), Matsuda, T., Muto, M. (2015) Protective role of ALDH2 against acetaldehyde-derived DNA damage in oesophageal squamous epithelium, *Scientific reports* 5, 14142. DOI: 10.1038/srep14142

Ikura, M., (他 4 名), Adachi, J., Matsuda, T., Shiraki, T., Ikura, T. (2015) Acetylation of Histone H2AX at Lys 5 by the TIP60 Histone Acetyltransferase Complex Is Essential for the Dynamic Binding of NBS1

to Damaged Chromatin, *Molecular and cellular biology* 35, 4147-4157. DOI: 10.1128/MCB.00757-15

Matsuda, S., Ikura, T., Matsuda, T. (2015) Absolute quantification of gammaH2AX using liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 407, 5521-5527. DOI: 10.1007/s00216-015-8725-z

Matsuda, T., Matsuda, S., Yamada, M. (2015) Mutation assay using single-molecule real-time (SMRT™) sequencing technology, *Genes and Environment* 37, 15. DOI:10.1186/s41021-015-0017-5

Matsuda, S., (他 4 名), Ikura, T., Matsuda, T. (2014) An easy-to-use genotoxicity assay using EGFP-MDC1-expressing human cells, *Genes and Environment* 36, 17-28. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jemsge/36/1/36\\_2014.001/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jemsge/36/1/36_2014.001/_pdf)

Adachi, J., (他 5 名). Proteome-wide discovery of unknown ATP-binding proteins and kinase inhibitor target proteins using an ATP probe. *Journal of proteome research*, 2014, 13 (12), 5461–5470. DOI: 10.1021/pr500845u.

Matsuda, T., Takamune, M., Matsuda, Y., Yamada, M. (2013) A Pilot Study for the Mutation Assay Using a High-throughput DNA Sequencer, *Genes and Environment* 35, 53-56. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jemsge/35/2/35\\_ge-2012-0030/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jemsge/35/2/35_ge-2012-0030/_pdf)

Matsuda, T., (他 14 名), Sugimura, H. (2013) Lipid peroxidation-induced DNA adducts in human gastric mucosa, *Carcinogenesis* 34, 121-127. DOI: 10.1093/carcin/bgs327

[学会発表](計 91 件)

Matsuda, T. “DNA adductome and mutation assay using NGS”, Malaysian congress of toxicology (MyCOT 2015), 2015 年 10 月 29-30 日, クアラルンプール, マレーシア  
Ikura, T. “The Role of Histone H2AX Dynamics in DNA Damage Response” 第 15 回国際放射線研究会議 (ICRR2015) 2015 年 5 月 25-29 日, 京都市

Adachi, J. “Simplified and minimized fractionation using StageTips for in-depth proteome and phosphoproteome analysis” HUPO2014 13th World Congress, 2014 年 10 月 6 日, マドリード, スペイン

松田知成「1 分子 DNA シーケンサーを用いた突然変異検出法の開発」, がん予防学術大会 2015 さいたま, 2015 年 6 月 5-6 日, さいたま市

松田知成「DNA アダクトーム法による遺伝毒性の評価」, 日本環境変異原学会第 43 回大会, 2014 年 12 月 4-5 日, 東京  
松田知成「DNA 損傷応答の定量的理解」, 第 87 回 日本生化学会, 2014 年 10 月 15-18 日, 京都

松田知成「内因性 DNA 損傷と自然突然変異頻度」, 日本進化学会 第 16 回大阪大会, 2014 年 8 月 21-24 日, 高槻市

〔図書〕(計 2 件)

Matsuda, T., Chou, P.-H., Sugimura, H. (2014) Cancer and Inflammation Mechanisms: Chemical, Biological, and Clinical Aspects, pp 75-81, Wiley.  
井倉毅(翻訳)(2012) 遺伝情報の発現制御 - 転写機構からエピジェネティクスまで - 著 David S. Latchman, 第 3 章, メディカル・サイエンス・インターナショナル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 知成 (Matsuda Tomonari)  
京都大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：50273488

(2) 研究分担者

井倉 毅 (Ikura Tsuyoshi)  
京都大学・放射線生物学研究センター・准教

授

研究者番号：70335686

(3) 連携研究者

足立 淳 (Adachi Jun)  
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・創薬基盤研究部・プロジェクト研究員  
研究者番号：20437255