2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　６ 月 ２４ 日現在

機関番号：８２６０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ１６１９９

研究課題名（和文）細胞内損傷乗り越え複製アッセイを用いたアクリルアミド誘発遺伝毒性の分子機構の研究

研究課題名（英文）Analysis of the molecular mechanisms of acrylamide-induced mutagenesis by using intracellular translesion synthesis assay

研究代表者
赤木　純一（Akagi, Jun-ichi）

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官

研究者番号：６０５１２５５６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：アクリルアミド（AA）は食品の加熱調理により生成する遺伝毒性発がん性物質である。本研究ではAAの活性代謝物であるグリシドアミドのDNA付加体の安定化アナログ（GA7FdG）を持つDNAを鋳型として損傷乗り越えDNA合成アッセイを行い、AAにより誘発される遺伝毒性の分子機序を解析した。その結果、鋳型DNA上のGA7FdGは様々なDNAポリメラーゼによる伸長反応を強く阻害した。さらにGA7FdGを持つシャトルベクターはヒト細胞内で複製効率が顕著に低下し、複製産物では点突然変異が見られた。これらの結果から、GA付加体によるDNA複製阻害および突然変異誘発がAAの遺伝毒性に直接寄与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
化学物質誘発突然変異では生体内で複数の付加体が生じることなどから、詳細な機序の解析には化学合成された単一の損傷塩基を用いた解析が欠かせない。アクリルアミド曝露により生じる主なDNA損傷であるGA7dGは不安定なため、化学合成された塩基を用いた解析はこれまで行われていなかった。本研究ではGA7dGの安定化アナログを用いることにより、GA7dGがDNA複製を強く阻害すること、および点突然変異を誘発することを明らかにした。アクリルアミド誘発遺伝毒性の詳細な発現機序が明らかになることは食品由来の慢性曝露によるリスクを評価する上で有用な知見となり、社会的にも大きな意義を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Acrylamide (AA) is a genotoxic carcinogen that forms by cooking foods at high temperature. In this study, we performed translesion DNA synthesis assay by using DNA template carrying GA7FdG, a stable analogue of dG adduct of glycidamide, the active metabolite of AA, to examine the molecular mechanism of AA-induced genotoxicity. We found that DNA synthesis by all DNA polymerases tested almost completely stalled at GA7FdG on the template strand. Moreover, replication efficiency of a shuttle vector carrying GA7FdG is significantly reduced in human cells. Base substitution mutations were observed in progeny of the GA7FdG strand. These results indicated that DNA replication arrest and mutagenesis by GA adducts directly contributes to AA-induced genotoxicity.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：アクリルアミド　グリシドアミド　損傷乗り越えDNA合成　遺伝毒性　食品汚染物質

１．研究開始当初の背景

アクリルアミドは水処理剤、土壌凝固剤、漏水防止剤など工業用途に用いられるポリアクリルアミドの原料であり、動物実験で発がん性を示すことから国際がん研究機関（IARC）発がん性分類において 2A（人に対しておそらく発がん性がある）に分類されている。2002 年、スウェーデン食品庁とストックホルム大学により、炭水化物を多く含むイモ等を焼く、または揚げることによりアクリルアミドが大量に生成することが発表され、現在も世界各国で食品中に含まれるアクリルアミドの調査研究や有害性を低減するための研究が行われている。国内においては内閣府食品安全委員会が自ら食品健康影響評価を行うことを決定し、「遺伝毒性を持つ発がん物質」とする評価書案をまとめるなどリスク評価の重要性が高いと考えられている物質である。

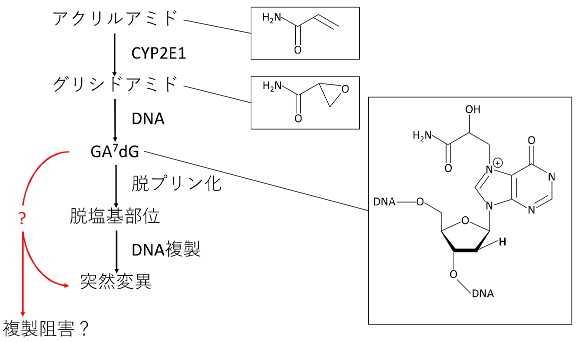

図 1. アクリルアミド誘発遺伝毒性の想定される作用機序
赤矢印は本研究課題において検証した機序。

アクリルアミドは生体内でシトクロム P450 2E1 によりエポキシ体であるグリシドアミド（GA）に代謝され、GA は主にグアニンの *N*7 位に付加体（GA[7]dG）を形成する（図 1）。動物実験では GA 投与により生じた腫瘍組織で *H-ras* 遺伝子上の突然変異が有意に増加することから、アクリルアミドの遺伝毒性には代謝活性化を介した DNA 付加体生成が関与すると考えられている。GA[7]dG は脱プリン反応を起こしやすく、その結果生じた脱塩基部位が突然変異を誘発すると考えられているが、*in vivo* ではマウスへのアクリルアミド単回投与後24時間後も 8 および 16 時間後と同程度の GA[7]dG が組織ゲノム中に残存しており、反復投与による蓄積も認められている。こうしたゲノム中の損傷塩基は DNA 複製を阻害し染色体異常や細胞死を引き起こすため、細胞には損傷をバイパスして DNA 複製を継続する機構が備わっており、その一つが損傷乗り越え DNA 合成（translesion synthesis; TLS）である。TLS では損傷塩基を鋳型として直接 DNA 合成を行うため誤った塩基を取り込みやすく、高等真核細胞では点突然変異の大部分はこうした“誤りがちな”（error-prone）TLS により生じると考えられている。そこで、本研究ではアクリルアミド誘発遺伝毒性・変異原性におけるゲノム DNA 中の GA[7]dG の影響を明らかにするため、GA[7]dG の安定化アナログを用いて DNA 複製および突然変異誘発に対する影響を調べた。

２．研究の目的

本研究は GA[7]dG の安定化誘導体を用いて、細胞内で部位特異的に損傷 DNA の TLS 効率および突然変異スペクトラムを解析する手法（細胞内 TLS アッセイ）、および精製 DNA ポリメラーゼを用いたプライマー伸長アッセイにより、アクリルアミド誘発遺伝毒性・突然変異における GA[7]dG の寄与、および GA[7]dG の TLS に関与する DNA ポリメラーゼを明らかにすることを目的として実施した。

３．研究の方法

GA[7]dG の安定化誘導体である GA[7]FdG を特定の位置に持つオリゴ DNA およびプラスミドを作成し、それらを DNA 複製の基質として細胞内および細胞外で DNA 合成アッセイを行い、その複製産物を解析した。具体的には、以下の方法により研究を進めた。

1) GA[7]FdG を特定の位置に一つだけ持つ 30 塩基長のオリゴ DNA を合成し、ほ乳類細胞の複製起点を持つシャトルベクターの特定の位置に組み込み細胞内 TLS アッセイの基質を作成した。

2) 上記のプラスミドをマウス胚性線維芽細胞（MEF）およびヒト線維芽細胞にトランスフェクションして細胞内で複製させ、複製産物のシークエンス解析により GA[7]FdG による DNA 複製への影響と複製産物の突然変異スペクトラムを解析した。

3) 1 で作成した GA[7]FdG を持つ 30 塩基長のオリゴ DNA に ^{32}P で放射標識したプライマーDNA をアニールさせ、様々な DNA ポリメラーゼと dNTPs を加えて反応させ、プライマー伸長反応における鋳型鎖上の GA[7]FdG の影響を調べた。

４．研究成果

4-1.　GA[7]FdG を特定の位置に持つオリゴ DNA およびシャトルベクターの作成

GA[7]dG は dG に GA を直接反応させることで生じるが、付加したアルキル基により dG の *N*7 位に正電荷を生じるため糖と塩基のグリコシド結合が切れ、容易に脱塩基してしまう。また付加体部分に水酸基を持つため、ホスホアミダイト単量体を修飾してオリゴヌクレオチド合成に用いる場合には官能基の保護方法を検討する必要がある。そこで糖部の 2′位の水素を電気陰性度の高いフッ素に置換した 2′-デオキシ-2′-フルオロアラビノグアノシン（FdG）を、GA との反応性

を持たない dT の中央に組み込んだ 9 塩基長のオリゴ DNA（5′-dTTTTFTTTT-3′; F=FdG）に GA を反応させる方法で塩基修飾を行った。反応産物には *N7* 位以外の GA 付加体や 2 分子付加体も含まれていたが、HPLC 精製により除去し、質量分析により目的産物が得られたことを確認した。得られた 9 塩基のオリゴ DNA の 5′および 3′に足場オリゴ DNA を用いてベクターと相補的な配列をライゲーションし、30 塩基長のオリゴ DNA（GA^{7}FdG 30-mer）を作成した（図 2）。同様に、GA 修飾のない FdG または dG を持つオリゴ DNA（FdG 30-mer、dG 30-mer）をそれぞれ作成した。このオリゴ DNA の配列に合わせて、ポリオーマウイルス（Py）複製起点（ori）および Py T 抗原を持ち、マウス細胞内で複製可能なシャトルベクターである pMTEX7 のクローニングサイトを改変して pMTEX-GA1 シャトルベクターを作成し、VCSM13 ヘルパーファージを用いて一本鎖ベクターを調製した。このベクターに 5′末端をリン酸化した 30 塩基長のオリゴ DNA をアニールさせ、T4 DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成と T4 DNA リガーゼによるライゲーションを行って閉環状二本鎖 DNA を作成した。エチジウムブロマイドを添加したアガロースゲル電気泳動において想定される移動度のバンドが見られ、制限酵素による切断で予定塩基長のバンドが得られたことにより、計画通りのシャトルベクターが作成できたことを確認した。

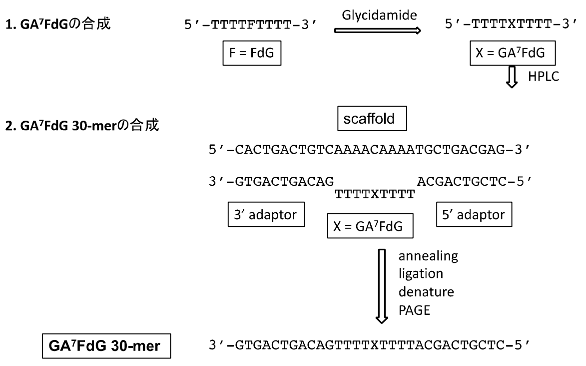

図 2. GA^{7}FdG を特定の位置に持つ 30 塩基長のオリゴ DNA の合成

4-2. シャトルベクターを用いた細胞内 TLS アッセイ

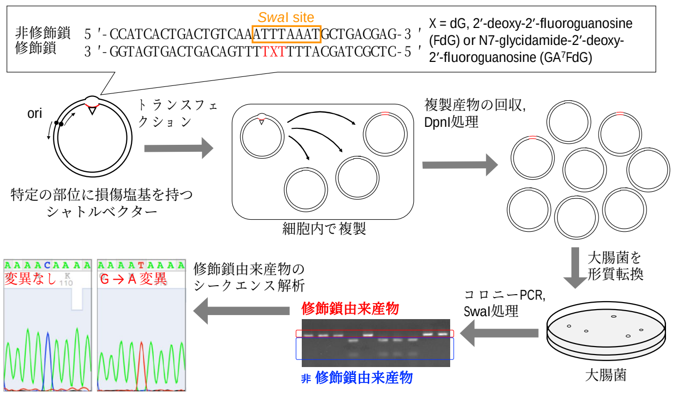

図 3. 細胞内 TLS アッセイの概略図

細胞内 TLS アッセイの概略を図 3 に示した。初めに、上記の方法で GA^{7}FdG、FdG、または dG を片側の鎖（修飾鎖）の特定の位置に組み込んだ pMTEX-GA1 シャトルベクターを野生型 MEF にトランスフェクションし、48 時間後に複製産物を回収して修飾鎖の複製比率を算出した。その結果、野生型細胞では修飾鎖に通常の dG を持つシャトルベクターの場合、修飾鎖／非修飾鎖の複製産物の比率はおよそ半々であったが、FdG を持つシャトルベクターでは付加基がないにも関わらず修飾鎖の複製産物の比率が約 25%に低下しており（図 4A）、FdG 自身が複製阻害を引き起こすか、または除去修復で除去されてしまう可能性が考えられた。特に本アッセイのシャトルベクターではミスマッチ上に修飾塩基が存在するため、DNA 二重鎖の歪みを認識するヌクレオチド除去修復機構（NER）によって除去されやすいのではないかと考えられた。そこで NER を欠損した *Xpc*$^{-/-}$ MEF を用いて同様のアッセイを行ったところ、dG と FdG の複製産物の割合は同程度であった（図 4B）。このことから、シャトルベクター上の FdG は NER の基質となって除去されてしまうために見かけの複製効率が低下すると考えられた。さらに、*Xpc*$^{-/-}$ MEF では GA^{7}FdG の複製産物が約 30%見られたのに対して野生型 MEF では 5%程度であったことから、GA^{7}FdG は NER の影響をより強く受けると考えられた。当初の計画ではさまざまな TLS ポリメラーゼ欠損 MEF を用いて GA^{7}FdG の複製および突然変異誘発に関わるポリメラーゼを明らかにする予定であったが、これらの MEF はいずれも NER 活性を持つため、DNA 複製に対する GA^{7}FdG の影響を正しく測定することは困難であると考えられた。

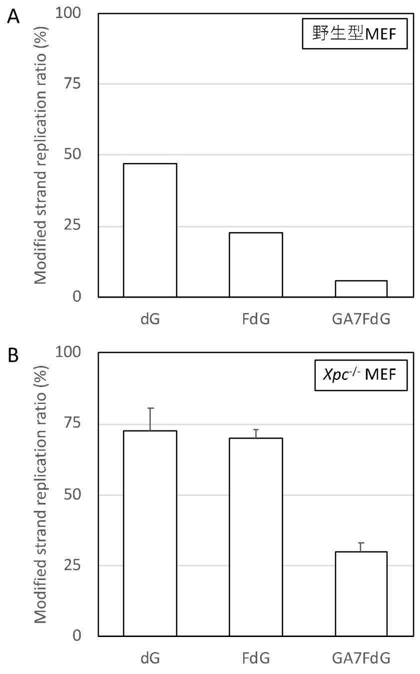

図 4. MEF における GA^{7}FdG 鎖の複製効率

そこで、NER を欠損した色素性乾皮症患者由来細胞株である XP4PASV をベースとして、ゲノム編集により TLS ポリメラーゼ欠損細胞を作成することとした。Py ori および Py T 抗原はヒト細胞では機能しないため、pMTEX-GA1 シャトルベクターからこれらを切り出して SV40 ori を挿入し、SV40 で形質転換されたヒト細胞株で複製可能な pMTEX-GA2 シャトルベクターを作成した。これを用いて XP4PASV で細胞内 TLS アッセイを行ったところ、*Xpc*$^{-/-}$ MEF（図 4B）と同様に、dG および FdG 鎖の複製効率はほぼ同程度であり、GA^{7}FdG 鎖の複製効率はそれらの半分以下であった（図 5）。また GA^{7}FdG 鎖の複製産物のシークエンス解析により、損傷部位特異的に点突然変異および一塩基欠失が見られた（表 1）。現在、XP4PASV 細胞のゲノム編集により TLS ポリメラーゼノックアウト細胞を作成し、それらを用いたアッセイを進めている。

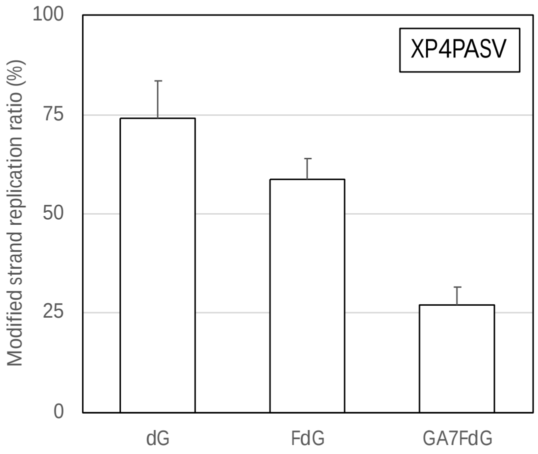

図 5. ヒト細胞における GA^{7}FdG 鎖の複製効率

	XP4PASV					
	dG		FdG		GA^{7}FdG	
No mutation	**146**	**(99.3)**	**116**	**(100.0)**	**95**	**(90.5)**
Target mutation	**0**	**(0.0)**	**0**	**(0.0)**	**9**	**(8.6)** **
C → A	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(1.9)
C → T	0	(0.0)	0	(0.0)	5	(4.8) *
C → G	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(1.0)
C → Δ	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(1.0)
Semi-target mutation†	**1**	**(0.7)**	**0**	**(0.0)**	**1**	**(1.0)**
5′-CA-3′ → 5′-CC-3′	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(1.0)
5′-CA-3′ → 5′-CT-3′	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
5′-CA-3′ → 5′-CG-3′	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
5′-AC-3′ → 5′-ΔC-3′	1	(0.7)	0	(0.0)	0	(0.0)
Total clones analysed	**147**	**(100.0)**	**116**	**(100.0)**	**105**	**(100.0)**

$^{*}P < 0.05$, $^{*}P < 0.01$ compared to dG and FdG. †Mutations within the three nucleotides next to the lesion. Underline indicates the site of the leasion.

表 1. GA^{7}FdG の変異スペクトラム

4-3. DNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* プライマー伸長アッセイ

細胞内 TLS アッセイで見られた GA^{7}FdG 鎖の複製効率の低下が DNA ポリメラーゼによる DNA 合成の阻害に起因しているかどうか調べるため、4-1.で作成した 30 塩基長のオリゴ DNA（dG、FdG、GA^{7}FdG 30-mer）を鋳型 DNA として、5′末端を ^{32}P 標識した 15 塩基長のプライマーをアニールさせ、様々な DNA ポリメラーゼによるプライマー伸長反応を測定した。その結果、損傷のない鋳型 DNA を忠実に複製する活性を持つ複製型 DNA ポリメラーゼである Polε（イプシロン）は、鋳型鎖上の塩基が dG および FdG の場合には鋳型 DNA の末端まで伸長した産物が主に見られたのに対して、プライマー末端の直後に GA^{7}FdG が存在する場合にはほとんど伸長反応が見られなかった。さらに、損傷 DNA を鋳型として直接 DNA 合成を行う活性を持つ TLS ポリメラーゼ（Polη [イータ]、Polκ [カッパ]、Polι [イオタ]、REV1）およびミスペア末端からの伸長反応を効率よく行う活性を持つ Polζ（ゼータ）についても同様にアッセイしたところ、GA^{7}FdG に対して 1 塩基のみを重合して停止した産物か、全く伸長しなかったプライマーのみが検出され、単独で GA^{7}FdG を乗り越える活性を持つ TLS ポリメラーゼは見られなかった（図 6）。

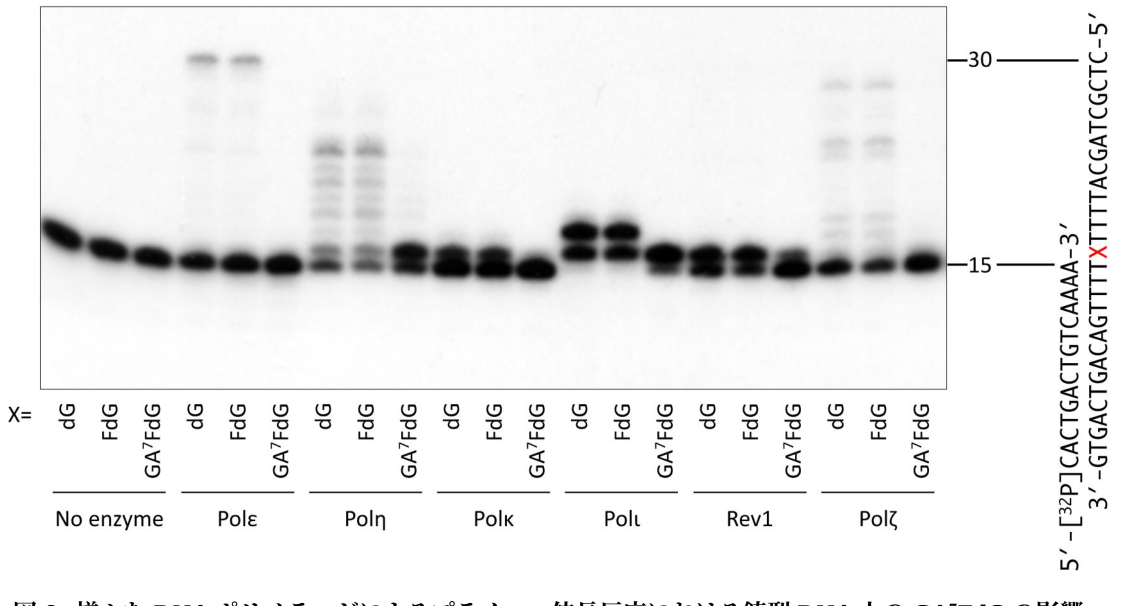

図 6. 様々な DNA ポリメラーゼによるプライマー伸長反応における鋳型 DNA 上の GA^{7}FdG の影響

4-4. 結論
これらの結果から、ゲノム中に残存した GA^7dG は DNA 複製阻害および点突然変異を誘発すると考えられ、アクリルアミドの遺伝毒性・変異原性に直接寄与することが示唆された。

５．主な発表論文等
〔雑誌論文〕（計　1 件）
Akagi J, Yokoi M, Cho YM, Toyoda T, Ohmori H, Hanaoka F, Ogawa K. (2018)
Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases η, ι and κ to various genotoxic compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening. *DNA repair* 61, 76-85.

〔学会発表〕（計　13 件）
赤木純一, CHO Young-Man, 豊田武士, 横井雅幸, 花岡文雄, 大森治夫, 小川久美子
C57BL/6J 野生型および Polκ 欠損マウスにおけるベンゾ[*a*]ピレンおよび α-ナフトフラボン併用投与の効果
第 35 回日本毒性病理学会学術総会 （2019 年 1 月 31 日、東京）

赤木純一, 横井雅幸, Young-Man Cho, 岩井成憲, 花岡文雄, 小川久美子
*N*7 グリシドアミド dG 付加体は哺乳類細胞において DNA 複製を阻害する
第 41 回日本分子生物学会年会（2018 年 11 月 28 日、横浜）

Jun-ichi Akagi, Young-Man Cho, Takeshi Toyoda, Masayuki Yokoi, Fumio Hanaoka, Haruo Ohmori, Kumiko Ogawa
Benzo[*a*]pyrene-induced tumorigenesis in Polκ-knockout mice
The 11th 3R & 3C Symposium （国際学会）（2018 年 11 月 13 日、金沢）

Jun-ichi Akagi, Young-Man Cho, Takeshi Toyoda, Masayuki Yokoi, Fumio Hanaoka, Haruo Ohmori, Kumiko Ogawa
Effect of Polκ deficiency on benzo[*a*]pyrene-induced tumorigenesis
5th DNA Polymerases meeting （国際学会）（2018 年 9 月 23 日、Leiden, the Netherlands）

赤木純一, Young-Man Cho, 豊田武士, 水田保子, 横井雅幸, 大森治夫, 花岡文雄, 小川久美子
ベンゾ[*a*]ピレン誘発発がんに対する Polκ の寄与の解析
日本薬学会第 138 年会（2018 年 3 月 26 日、金沢）

Jun-ichi Akagi, Young-Man Cho, Takeshi Toyoda, Yasuko Mizuta, Masayuki Yokoi, Fumio Hanaoka, Haruo Ohmori, Kumiko Ogawa
ベンゾ[*a*]ピレン混餌投与によるマウス前胃腫瘍発生に対する Polκ の寄与
2017 年度生命科学系学会合同年次大会（2017 年 12 月 7 日、神戸）

赤木純一, 横井雅幸, Young-Man Cho, 豊田武士, 大森治夫, 花岡文雄, 小川久美子
損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ イータ・イオタ・カッパ三重欠損細胞を用いた新規遺伝毒性試験法の研究
第３回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム（2017 年 9 月 16 日、東京）（優秀発表賞）

赤木純一, 横井雅幸, Young-Man Cho, 豊田武士, 大森治夫, 花岡文雄, 小川久美子
損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ η・ι・κ 三重欠損細胞は非代謝ベンゾ[a]ピレンに高感受性を示す
第 39 回日本分子生物学会年会（2016 年 12 月、横浜）

Jun-ichi Akagi, Masayuki Yokoi, Takeshi Toyoda, Young-Man Cho, Haruo Ohmori, Fumio Hanaoka, Kumiko Ogawa
Triple knockout mouse fibroblast cells defective for DNA polymerases η, ι, and κ exhibit hypersensitivity to various genotoxic agents and increased activation of DNA damage responses
The 10th 3R Symposium（国際学会）（2016 年 11 月、松江）

赤木純一, 横井雅幸, 豊田武士, Young-Man Cho, 花岡文雄, 小川久美子
Polη, Polι,および Polκ の欠損はさまざまな化学物質に対して異なる感受性を示し、遺伝毒性のスクリーニングに有用である
第 75 回日本癌学会学術総会（2016 年 10 月、横浜）

赤木純一, 横井雅幸, 豊田武士, 曺永晩, 西川秋佳, 大森治夫, 花岡文雄, 小川 久美子

損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ η・ι・κ 三重欠損細胞および Polκ 欠損マウスの遺伝毒性物質曝露に対する応答
発癌病理研究会（2016 年 8 月、長野）

Jun-ichi Akagi, Masayuki Yokoi, Takeshi Toyoda, Young-Man Cho, Haruo Ohmori, Fumio Hanaoka, Kumiko Ogawa
Pol eta, Pol iota, and Pol kappa exhibit different genetic interactions to genotoxins of various mechanisms and the triple knockout cells are useful for screening of chemical genotoxity
Gordon Research Conference (GRC) Mutagenesis（国際学会）（2016 年 6 月、Girona, Spain）

Jun-ichi Akagi, Masayuki Yokoi, Takeshi Toyoda, Young-Man Cho, Haruo Ohmori, Fumio Hanaoka, Kumiko Ogawa
Pol eta, Pol iota, and Pol kappa exhibit different genetic interactions to genotoxins of various mechanisms and the triple knockout cells are useful for screening of chemical genotoxity
Gordon Research Seminar (GRS) Mutagenesis（国際学会）（2016 年 6 月、Girona, Spain）

６．研究組織
研究協力者
研究協力者氏名：岩井成憲
ローマ字氏名：Iwai, Shigenori

研究協力者氏名：花岡文雄
ローマ字氏名：Hanaoka, Fumio

研究協力者氏名：横井雅幸
ローマ字氏名：Yokoi, Masayuki