

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究(A)
研究期間：平成 18 年度～平成 21 年度
課題番号：18201010
研究課題名（和文） 遺伝毒性物質の閾値形成におけるトランスリージョン DNA 合成の役割に関する研究
研究課題名（英文） Studies on roles of translesion DNA synthesis in thresholds for genotoxic substances
研究代表者
能美 健彦 (NOUMI TAKEHIKO)
国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長
研究者番号：30150890

研究成果の概要（和文）：DNA ポリメラーゼ κ (Pol κ) は、損傷を持った DNA の複製（トランスリージョン DNA 合成）に関与する酵素である。トランスリージョン DNA 合成に重要な役割を担う Pol κ のアミノ酸を同定するとともに、Pol κ が不活化したヒト細胞株とノックインマウスを樹立し、トランスリージョン DNA 合成が遺伝毒性物質の閾値形成に関与する可能性を示唆した。遺伝毒性発がん物質の閾値に関する国際シンポジウムを開催した。

研究成果の概要（英文）：DNA polymerase kappa (Pol κ) is an enzyme involved in DNA synthesis across DNA lesions (translesion DNA synthesis). We identified important amino acids involved in the translesion DNA synthesis and generated human cells and mice, whose Pol κ activities were inactivated by specific amino acids substitutions. The results suggest that translesion DNA synthesis may be one of mechanisms underlying practical thresholds for genotoxicity. An international symposium on genotoxic and carcinogenic thresholds has been organized.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18 年度	20,000,000	0	20,000,000
19 年度	11,000,000	0	11,000,000
20 年度	4,900,000	0	4,900,000
21 年度	4,100,000	0	4,100,000
年度			
総計	40,000,000	0	40,000,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学，放射線・化学物質影響科学

キーワード：トキシコロジー；遺伝毒性の閾値；有害化学物質；遺伝子；環境；癌

1. 研究開始当初の背景

ヒトは、さまざまな内因性、外因性の遺伝毒性物質に曝露されており、ヒトで起こる癌の原因の 70-80%は環境因子によると考えられる。遺伝毒性物質の多くは DNA に付加体を形成し、DNA 付加体は DNA ポリメラーゼによる染色体複製を阻害することで細胞死、突然変異、染色体異常を誘発する。近年、ヒトを含む多くの生物種で、DNA 損傷を乗り越えて DNA 合成を続けることができる特殊な DNA ポリメラーゼが見出された。これらの酵素は、損傷の向かい側に正しい塩基を挿入するため、発がん、突然変異、染色体異常誘発の抑制に関与していると考えられている。DNA 損傷を乗り越えて進む DNA 合成は、トランスリージョン DNA 合成と呼ばれる。一方、環境化学物質の行政的規制においては、遺伝毒性物質の作用には閾値が存在しないとする考えが支配的であり、突然変異や染色体異常により、がんを誘発する遺伝毒性発がん物質は、どのように微量であってもヒトに発がんリスクを負わせるものと考えられてきた。このため、食品添加物、動物用医薬品、残留農薬等に遺伝毒性に基づく発がん性が検出されると、一日許容摂取量 (ADI) は設定されず、事実上、使用禁止の措置が執られている。だが、ヒトには、さまざまな生体防御機構 (解毒代謝、DNA 修復、トランスリージョン DNA 合成、アポトーシス等) が備えられており、これらの生体防御機構により、少量の遺伝毒性物質の作用は、自然突然変異のレベルにまで抑制され、事実上の閾値が形成されるものと予想された。トランスリージョン DNA 合成は、他の生体防御機構とともに遺伝毒性物質の閾値形成に貢献すると予想されたが、実験的にその貢献度を明らかにする手法は確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、(1) トランスリージョン DNA 合成に関わるヒト DNA ポリメラーゼ κ (Pol κ) の生化学的解析、(2) Pol κ の活性を不活化させたヒト細胞株と (3) ノックインマウスを樹立することにより、トランスリージョン DNA 合成が遺伝毒性物質の閾値形成に及ぼす影響について考察することを目的とする。また、(4) 遺伝毒性物質の閾値に関する国際シンポジウムの開催等を通じ、本研究の成果を国内外の研究者、行政官に発信し、低用量域における遺伝毒性発がん物質の安全性評価に関する理解の促進を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト Pol κ の生化学的解析: N-末端に HisTag を持つヒト Pol κ (N 末から 560 番目までのアミノ酸を含むポリペプチドで 561 番目以降のアミノ酸は欠失している) を大腸菌で発現させ、金属キレートカラム、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーで精製した。Pol κ のチロシン 112 (Y112) とフェニルアラニン 171 (F171) をアラニンあるいはバリンに置換した Pol κ 変異体 (Y112A, Y112V, F171A) は、プラスミド上にクローン化した Pol κ 遺伝子 (*POLK*) の配列を部位特異的変異法で変異させ、変異蛋白質を精製し調製した。*in vitro* トランスリージョン DNA 合成は、損傷を含む鋳型/プライマー鎖と Pol κ を dNTP 存在下でインキュベーションし、プライマー鎖の伸長をゲル電気泳動とイメージアナライザーで分析した。プライマー鎖の 5' 末端は蛍光色素 Cy3 でラベルした。酵素反応速度論的解析は、Michaelis-Menten の条件下において行い、 k_{cat}/K_m を算出した。鋳型プライマー鎖と Pol κ との解離定数 (K_d) は、BIAcore3000 を用いて測定した。

(2) ヒト細胞株の樹立: Pol κ を不活化させたヒト細胞株は、リンパ芽球細胞株 Nalm-6 を用い、ノックアウト (KO) 法あるいはノックイン (KI) 法により作製した。KO 法で作製した場合には、活性中心アミノ酸であるアスパラギン酸 (D198) とグルタミン酸 (E199) をコードするエクソン 6 を薬剤耐性遺伝子で置換し、その後 Cre リコンビナーゼを発現させて薬剤耐性遺伝子を除去した。KI 法で作製した場合は、D198, E199 をそれぞれアラニンに置換させる配列を持ったターゲティングベクターを Nalm-6 細胞に導入して、アミノ酸特異的な変異を導入し、その後 Cre リコンビナーゼを発現させて薬剤耐性遺伝子を除去した (D198A/E199A)。KO 法で作製した細胞で Pol κ が発現していないことは、ウエスタンブロット法で確認した。KI 法で作製した細胞の両方の染色体 DNA に目的とする変異が導入されていることは、ゲノム DNA 配列を解析して確認した。変異蛋白質が発現していることは、ウエスタンブロット法で確認した。D198A/E199A 変異を持つ Pol κ が活性を失っていることは、別途、変異蛋白質を精製し *in vitro* DNA 合成実験を行い確認した。作製した細胞の遺伝毒性物質 (ヒドロキシウレア、ベンツピレン+S9, 過酸化水素) に対する感受性を、細胞生存率と *HPRT* 変異頻度を指標に比較した。

(3) Pol κ を不活化させた KI マウスの樹立: Pol κ を不活化させたマウスは、ヒト細

胞でKI法により変異させた活性中心アミノ酸に対応するD197とE198をアラニンに置換して作製した。すなわち、変異*Polk*遺伝子配列の一部とネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲティングベクターをC57BL6 ES細胞に導入して組換えを行い、Creリコンビナーゼを発現させて薬剤耐性遺伝子を除去して作製した。樹立したKIマウスは、変異検出用*gpt delta*マウス(C57BL6/J)と交配し、*Pol κ* KI *gpt delta*マウスとした。マウスの突然変異頻度は、*gpt*アッセイとSpi⁻アッセイにより測定した。

(4) 遺伝毒性発がん物質の閾値に関する国際シンポジウム：研究者、行政官、消費者代表に講演を依頼し、講演と討論を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト*Pol κ*の生化学的解析：*Pol κ*の大腸菌におけるホモログであるDNAポリメラーゼIV(DinB)については、rNTPとdNTPを識別するアミノ酸(ステリックゲート・アミノ酸と呼ばれる)が、ベンツピレン付加体を含むN^ε-グアニン付加体のトランスリージョンDNA合成に必須な役割をはたしていると報告されていた(Nature, 439, 225, 2006)。そこでヒト*Pol κ*の対応するステリックゲートアミノ酸(Y112)がN^ε-グアニン付加体のトランスリージョンDNA合成に関与しているかを検討した。Y112をアラニン(Y112A)あるいはバリン(Y112V)に置換した変異*Pol κ*のベンツピレンN^ε-グアニン付加体のトランスリージョンDNA合成活性を測定した。しかし、活性の減少は認められず、むしろ付加体の向かい側にdCMPを挿入する活性は約8倍上昇した。興味深いことに、ミスマッチ末端(鋳型鎖/プライマー鎖, G/A, G/G, G/T)からのプライマー鎖伸長活性は、Y112AおよびY112Vが野生型酵素に比べ約20倍低下していた。これらの結果から、大腸菌DNAポリメラーゼIV(DinB)とは異なり、ヒト*Pol κ*のステリックゲートアミノ酸(Y112)は、主にミスマッチ末端からの伸長反応を制御しているものと結論した。次に、*Pol κ*の活性中心部でベンツピレン付加体と相互作用することが示唆されているアミノ酸(F171)をアラニンに置換し(F171A)、そのベンツピレン付加体に対するトランスリージョンDNA合成活性を測定した。その結果、F171Aは野生型酵素に比べトランスリージョンDNA合成活性が約20倍上昇していることが明らかになった。この結果から、F171は*Pol κ*がベンツピレン付加体を乗り越えてDNA合成を続ける際の「ブレーキ」として働いているものと結論した。*Pol κ*とベンツピレン付加体を持つ鋳型プライマーDNAとの解離定数を測定したところ、*Pol κ*はベンツピレン付加体のうち(-)-trans-anti型の付加体に強く結合し、そ

の結合はF171A変異体が野生型よりも強いことを明らかにした。現在、*Pol κ*をKOしたヒト細胞でY112AとF171A変異体を発現させ、ベンツピレンによる変異作用、致死作用に対する防護効果を、野生型細胞と比較している。

(2) *Pol κ*を不活化させたヒト細胞株の遺伝毒性物質に対する感受性：一般に、ヒト細胞での標的遺伝子組換え(ジーンターゲティング)の効率は0.5%以下と低く、特定遺伝子の機能を検討する研究は、RNAiなどのノックダウン法に依っている場合が多い。だが、ノックダウン法では遺伝子機能が残存するため、当該遺伝子の機能を明確にできるかは議論のあるところである。今回、ジーンターゲティングに用いたNalm-6細胞は、ターゲティング効率がよく、今回の実験においても約5%の効率でターゲティングが成功した(ターゲティングベクター導入により薬剤耐性となった細胞のうち、約5%の細胞で標的とした*POLK*遺伝子に変異が導入されていた)。*Pol κ*を不活化させたKO細胞、KI細胞の倍加時間、細胞周期を野生型細胞と比較したが顕著な差は見られなかった。ヒドロキシウレア、ベンツピレン+S9で処理すると、3株はほぼ同等の致死感受性を示した。これに対し過酸化水素の致死作用に対しては、KO細胞はKI細胞や野生型細胞よりも高い感受性を示した。この結果から、*Pol κ*は、酸化損傷に基づく細胞死の抑制に関与していることが示唆された。突然変異誘発性については、Nalm-6株がミスマッチ修復欠損細胞であるため、自然突然変異頻度が高く、ヒドロキシウレアと過酸化水素については、その変異誘発性を検出することができなかった。ベンツピレン+S9に対して、KO細胞はKI細胞や野生型細胞よりも、統計的な有意差はないものの、より高い感受性を示した。この結果は、*Pol κ*がベンツピレンの突然変異誘発作用に対して抑制的に働き、閾値の形成に関与している可能性を示唆している。*Pol κ*の遺伝毒性閾値に対する関与の可能性をより明確にするため、Nalm-6のミスマッチ修復活性を還元し自然突然変異頻度を低下させる試みを進めている。また、染色体異常を指標にして3株のベンツピレンジオールエポキシド(ベンツピレンの活性代謝物)に対する感受性を比較している。

(3) *Pol κ* KIマウスの性状解析：*Pol κ* KIマウスは、雌雄ともに各遺伝子型の割合に関しメンデルの法則に従って産仔が得られ、*Polk*遺伝子の不活化はマウスの発生過程に大きな影響を及ぼさないことが示唆された。遺伝毒性物質に対する感受性を調べる基礎実験として、*Pol κ* KI *gpt delta*マウスの肝臓および精巣における自然突然変異頻度を測定した。*Pol κ* KIマウス(両遺伝子がKIにより不活化しているマウス)の*gpt*変異体

頻度は $6.6 \pm 1.2 \times 10^{-6}$ (肝臓), $2.1 \pm 1.2 \times 10^{-6}$ (精巣) であり, 野生型マウスの値 $8.3 \pm 8.9 \times 10^{-6}$ (肝臓), $2.8 \pm 1.6 \times 10^{-6}$ (精巣) との間に有意な差はなかった. Pol κ の不活化の有無に関わらず, 肝臓に比べ精巣の *gpt* 変異体頻度は低い値を示した. 得られた変異体について *gpt* 遺伝子のシーケンス解析を行ったが, どちらのマウスも G:C→A:T, G:C→T:A, 一塩基欠失が主要な変異であった. 欠失変異を中心に検出する Spi 変異体頻度は, Pol κ KI マウスでは $5.3 \pm 0.8 \times 10^{-6}$ (肝臓), $5.2 \pm 1.6 \times 10^{-6}$ (精巣) であり, 野生型マウスの値 $4.0 \pm 1.2 \times 10^{-6}$ (肝臓), $4.0 \pm 0.5 \times 10^{-6}$ (精巣) に比べ僅かであるが高い値を示した (肝臓については統計的な有意差が認められた). *gpt* 変異体頻度とは異なり, Spi 変異体頻度については, 肝臓と精巣の間で差は認められなかった. 野生型 *gpt* delta マウスについては, ベンツピレン投与により肺, 肝臓, 精巣において *gpt* 変異体頻度の増大が認められており, 現在, Pol κ KI マウスのベンツピレン等に対する感受性を野生型マウスと比較している.

(4) 遺伝毒性発がん物質の閾値に関する国際シンポジウム: 国内 15 名, 国外 6 名の研究者, 行政官, 消費者代表に講演を依頼し, 参加者 200 名を得て, 2008 年 7 月に 2 日間にわたり講演と討論を行った. 講演内容は, 日本環境変異原学会の機関誌 Genes and Environment に特集号として出版した. また, 2009 年 8 月には, イタリア, フィレンツェで開催された第 10 回国際環境変異原学会 (10th ICEM) に出席し, 遺伝毒性の閾値に関し講演を行った.

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 55 件) すべて査読あり

- ① J.H.Y. Wong, J.A. Brown, Z. Suo, P. Blum, T. Nohmi and H. Ling, Dynamic Bypass of a Major Cisplatin-DNA Adduct Revealed in Structural, Kinetic and *in vivo* Studies, EMBO J. in press.
- ② A. Katafuchi and T. Nohmi, DNA polymerases involved in the incorporation of oxidized nucleotides into DNA: the efficiency and template base preference, Mutat. Res., in

press.

- ③ A. Katafuchi, A. Sassa, N. Niimi, P. Gruz, H. Fujimoto, C. Masutani, F. Hanaoka, T. Ohta and T. Nohmi, Critical amino acids in human DNA polymerases η and κ involved in erroneous incorporation of oxidized nucleotides, Nucleic Acids Res., 38, 859-867 (2010)
- ④ N. Niimi, A. Sassa, A. Katafuchi, P. Grúz, H. Fujimoto, R.R. Bonala, F. Johnson, T. Ohta and T. Nohmi, The steric gate amino acid tyrosine 112 is required for efficient mismatched-primer extension by human DNA polymerase κ , Biochem., 48, 4239-4246 (2009)
- ⑤ K. Masumura and T. Nohmi, Spontaneous mutagenesis in rodents: spontaneous gene mutations identified by neutral reporter genes in *gpt* delta transgenic mice and rats, J. Health Sci., 55, 40-49 (2009)
- ⑥ T. Nohmi, Possible mechanisms of practical thresholds for genotoxicity, Genes and Environ., 30, 108-113 (2008)
- ⑦ T. Nohmi, N. Toyoda-Hokaiwado, M. Yamada, K. Masumura, M. Honma and S. Fukushima, International symposium on genotoxic and carcinogenic thresholds, Genes and Environ., 30, 101-107 (2008)
- ⑧ K. Hidaka, M. Yamada, H. Kamiya, C. Masutani, H. Harashima, F. Hanaoka and T. Nohmi, Specificity of mutations induced by incorporation of oxidized dNTPs into DNA by human DNA polymerase η , DNA Repair, 7, 497-506 (2008)
- ⑨ Y. Aoki, A.H. Hashimoto, K. Akanuma,

- M. Matsumoto, K. Hiyoshi, H. Takano, K. Masumura, K. Itoh, T. Nohmi and M. Yamamoto, Enhanced spontaneous and benzo(a)pyrene-induced mutations in the lung of Nrf2-deficient *gpt* delta mice, *Cancer Res.*, 67, 5643-5648 (2007)
- ⑩ T. Nohmi, Novel DNA polymerases and novel genotoxicity assays, *Genes and Environ.*, 29, 75-88 (2007)
- ⑪ M. Shimizu, P. Gruz, H. Kamiya, C. Masutani, Y. Xu, Y. Usui, H. Sugiyama, H. Harashima, F. Hanaoka and T. Nohmi, Efficient and erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by human DNA polymerase η , *Biochem.*, 46, 5515-5522 (2007)
- ⑫ T. Nohmi, Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases, *Ann. Rev. Microbiol.*, 60, 231-253 (2006)
- ⑬ M. Yamada, T. Nunoshiba, M. Shimizu, P. Gruz, H. Kamiya, H. Harashima, T. Nohmi, Involvement of Y-family DNA polymerases in mutagenesis caused by oxidized nucleotides in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 188, 4992-4995 (2006)
- ⑭ K. Matsui, M. Yamada, M. Imai, K. Yamamoto and T. Nohmi, Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of *Salmonella typhimurium* strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens, *DNA Repair*, 5, 465-478 (2006)
- ① T. Nohmi, Nucleotide pool damage and Y-family DNA polymerases, Gordon Research Conferences, DNA damage, mutation & cancer, Ventura, CA, USA, March 21-26, 2010
- ② 新見直子, 飯泉晋, 足立典隆, 小山秀樹, 能美健彦, ヒト細胞におけるDNAポリメラーゼ κ の機能解析, 第32回日本分子生物学会年会, 横浜 (2009, 12)
- ③ N. Niimi, P. Grúz, S. Iizumi, N. Adachi, H. Koyama and T. Nohmi, Establishment of human cell lines lacking the catalytic activity of DNA polymerase κ involved in translesion DNA synthesis, The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Foundation, Tokyo, November 10-12, 2009.
- ④ A. Katafuchi, A. Sassa, N. Niimi, P. Gruz, H. Fujimoto, C. Masutani, F. Hanaoka, T. Ohta and T. Nohmi, Erroneous incorporation of oxidized nucleotides by Y-family DNA polymerases, 10th International Conference on Environmental Mutagens in Firenze, Italy, August 20-15, 2009
- ⑤ T. Nohmi, Possible mechanisms underlying practical thresholds for genotoxic carcinogens, 10th International Conference on Environmental Mutagens in Firenze, Italy, August 20-15, 2009
- ⑥ T. Nohmi, Genotoxic versus non-genotoxic mechanisms: feed-back from Genotoxic and Carcinogenic Thresholds in Tokyo, 5th International Workshop on

- genotoxicity testing, Basel, Switzerland, August 18-19, 2009
- ⑦ N. Niimi, A. Sassa, A. Katafuchi, P. Grúz, H. Fujimoto, R.-R. Bonala, F. Johnson, T. Ohta and T. Nohmi, A crucial role for the steric gate amino acid tyrosine 112 in efficient mismatched-primer extension by human DNA polymerase κ , ASM Conferences, DNA Repair and Mutagenesis in Whistler, BC, Canada, May 30-June 5, 2009.
- ⑧ T. Nohmi, Possible Mechanisms of Practical Genotoxic Thresholds, International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds, Tokyo, July, 2008.
- ⑨ T. Nohmi, The role of Y-family DNA polymerase in oxidative mutagenesis, 38th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Atlanta, USA, October 2007.
- ⑩ T. Nohmi, DNA repair as a constituent of thresholds of genotoxicity, 37th European Environmental Mutagen Society, Basel, Switzerland, September 2007
- ⑪ T. Nohmi, Roles of Y-family DNA polymerases in mutagenesis via the misincorporation of oxidized dNTPs, The 3rd Japan US DNA repair meeting in Sendai, Japan, May 2007.
- ⑫ T. Nohmi, K. Kokubo, M. Yamada and P. Gruz, Control of multiple DNA polymerases dealing with lesions induced by environmental mutagens, 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society in

Prague, Czech, July 2006.

〔図書〕 (計1件)

- 1) T. Nohmi, M. Yamada and P. Gruz, DNA repair and DNA damage tolerance in archaeal bacteria: extreme environments and genome integrity, in Archaea: new models for prokaryotic biology, Horizon Scientific Press. P147-169, 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計1件)

名称: 突然変異検出用トランスジェニックラットとその作製方法およびそれを用いた突然変異試験法

発明者: 能美健彦、増村健一、神藤康弘、林宏行

権利者: 国立医薬品食品衛生研究所長

種類: 特許権

番号: 特許第3799445号

取得年月日: 平成18年5月12日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://dgm2alpha.nihs.go.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能美 健彦 (NOUMI TAKEHIKO)

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究者番号: 30150890

(2) 研究分担者

増村 健一 (MASUMURA KENICHI)

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: 40291116