

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510054
 研究課題名 (和文) 染色体分配機能破綻による遺伝的不安定性誘発と細胞がん化における役割
 研究課題名 (英文) Induction of Genomic Instability Induced by Chromosome Mis-segregation and the Implication on Carcinogenesis
 研究代表者
 布柴達男 (NUNOSHIBA TATSUO)
 東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
 研究者番号：10270802

研究成果の概要：

非変異発がん物質である輸入柑橘類の防カビ剤 *o*-phenyl phenol の代謝物、phenyl hydroquinone (PHQ) をモデル物質とし、細胞周期と染色体分配機構への影響を検討した。その結果、酵母では PHQ が Hog1-Swe1 checkpoint を活性化し G2/M の境界で細胞周期を停止させることが染色体異数化誘発に必要であること、ヒト培養細胞でも PHQ が染色体数の異常を誘発することが確認できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子遺伝学、放射線生物学、遺伝毒性学

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、morphogenesis checkpoint、染色体異数化

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。ヒトのような 2 倍体細胞では、染色体の両アレルのがん抑制遺伝子の変異が必要である。細胞がん化の 2 段階モデルの立場に立つと、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 の原因となる 3 つの過程うち、gene conversion allelic crossover は 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。これらのことから考えても「DNA 損傷やそれに由来する突然変異は細胞がん化に必須である」との考えは重要であり、放射線や環境化学物質などの外的および内的要因による DNA 損傷生成、修復などの防御、そして突然変異の誘発などの機構が積極的に研究されてきた。申請者らも、放射線の間接作用や内的要因として重要である活性酸素の生物作用を中心に、DNA およびヌクレオチドの損傷とその修復や浄化機構の研究に取り組み、突然変異抑制機構として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)。その一方で、trisomy や monosomy 患者が高発がんであることや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誘発（異数化誘発）も、細胞がん化のエピジェネティックな機構のひとつとして注目されている。染色体喪失 (chromosome loss) は DNA 損傷というより mitosis との関連で生じる。事実、染色体分配チェックポイントに関わる MAD や BUB 遺伝子変異株で染色体喪失が高頻度で生じる。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 (OPP) とその代謝物の phenyl hydroquinone (PHQ) が、1) LOH を誘発すること (図 1a, b)、2) PHQ が細胞周期を G1 と M 期で停止させること (図 1c)、3) PHQ が 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などを確認している。これらの結果は、PHQ が DNA ではなくタンパク質に作用して染色体分配機能不全を促し染色体喪失や異数化を引き起こすことを示唆するとして、現在投稿中である。この状況をヒト細胞で考えると、もしがん抑制遺伝子が heterozygous であった場合、PHQ のような物質は染色体分配機能不全を起こし染色体を不均等に分配し、正常アレルを持つ染色体を喪失することで細胞がん化を促進することになる。

2. 研究の目的

本申請では、これまでの知見をさらに発展させ、DNA 損傷とは無関係に遺伝的不安定性を招く染色体分配機能不全と染色体異数化の機構の解明を目指すとともに、細胞がん化における意義を考察することとした

3. 研究の方法

前述のPHQの作用機序解明を目指し以下の項目について解析した。

- (1) 細胞周期進行と細胞形態への影響 ; G1、S、M期の各周期の細胞にPHQを処理し、周期進行とともに生じる形態異常を顕微鏡観察した。
- (2) spindle checkpointへの影響 ; G2/Mにおける細胞周期停止（遅延）機構解明のため、この現象のMad2依存性をFACSにより、Pds1の安定性をWestern blotting (WB)により解析した。
- (3) morphogenesis checkpointへの影響 ; morphogenesis checkpointの活性化に寄与するHog1 (ヒトp38 MAPKホモログ)、Swe1(ヒトWee1ホモログ)の修飾や安定化をWBにより観

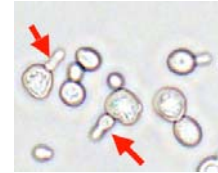
察した。

(4) Hog1およびSwe1破壊株でのPHQの細胞周期への影響 ; 出芽酵母Hog1およびSwe1の破壊株を作成し、G2/Mの境界での細胞周期停止を観察するとともに、我々が樹立した2倍体出芽酵母を用いたLOH検出系により染色体異数化を観察した。

(5) ヒト培養細胞でのPHQの効果 ; 大腸がん細胞におけるPHQの染色体異数化、G2期、M期の遅延などをFACSおよび蛍光抗体法により顕微鏡観察した。

4. 研究成果

(1) 細胞周期進行と細胞形態への影響 ; G1、S、M期の各周期に調整した細胞をPHQで処理し、周期進行をFACSで観察したところ、G1細胞はG1で、S細胞およびM期の細胞はG2/Mで進行を停止した。また細胞の形態を観察したところ、出芽したS期の細胞でelongated budが観察された (右図)。



(2) spindle checkpointへの影響 ; PHQがチューブリンと相互作用すること

から、G2/Mでの停止には spindle checkpoint が寄与すると仮定し、染色体分配を抑制しているセ

キュリン (Pds1) の安定性と checkpoint の key タンパク質である Mad2 の G2/M停止への関与を調べたところ、

PHQによりPds1の分解は抑制されたものの (図 2)、Mad2の細胞周期停止への関与は見られず (図 3)、G2/Mでの停止にspindle checkpointが関与する可能性は否定された。

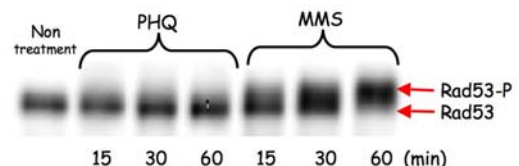


図 3. PHQ による Rad53 のリン酸化の有無

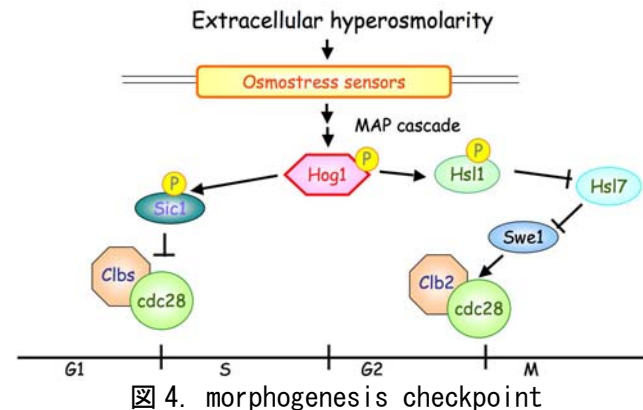


図 4. morphogenesis checkpoint

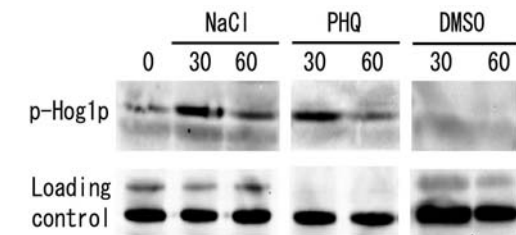


図 5. Hog1 のリン酸化

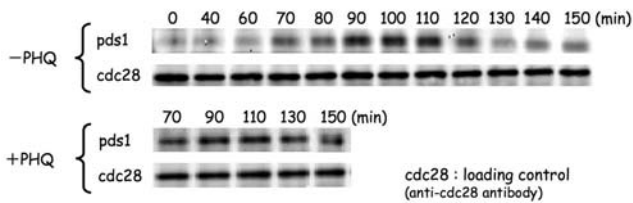


図 2. PHQ による Pds1 の安定化

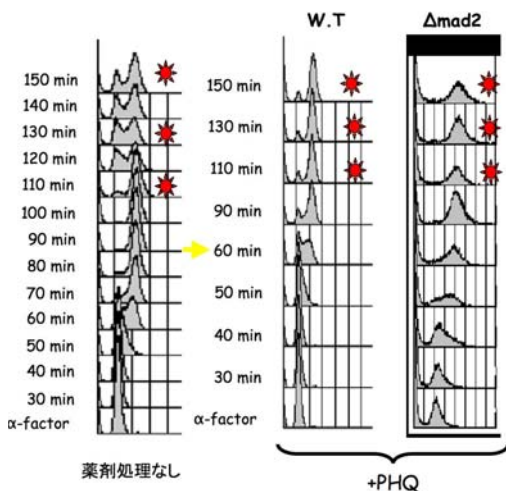


図 3. PHQ による G2/M 境界での停止への Mad2 の影響の安定化

またDNA損傷によってもPds1 が安定化されるとの報告から、PHQ 処理によるRad53 のリン酸化の有無をWBにより検討したが、Rad53 のリン酸化は確認できず (図 4)、DNA損傷によるPds1 の安定化の可能性も否定された。

(3) morphogenesis checkpointへの影響; S 期の細胞でPHQによるelongated bud誘導が観察され、morphogenesis checkpointの関与の可能性が示唆された。そもそも morphogenesis checkpointはosmotic stress に対する応答として見いだされたが、その後様々なストレスにより pathway が働くことが知られている。この pathway では MAP cascadeを介してHog1 がリン酸化され、下流のSwe1 が安定化される。Swe1 はCdc28 をリン酸化することでCDK complexを不活性化するため、G2/Mでの停止を引き起こす (図 5)。そこでHog1 のリン酸化とSwe1 の安定化をWBにより観察した結果、PHQによりHog1 がリン酸化され(図 5)、さらにSwe1 の安定化 (図 6) が認められた。このことは PHQ による G2/M 境界での停止に morphogenesis checkpointが関与する可能性を示唆している。

(4) Hog1 およびSwe1 破壊株でのPHQの細胞周期への影響; そこでHog1 およびSwe1 破壊株を作成し、この破壊株におけるG2/Mの境界での細胞周期停止を観察した。その結果、いずれの破壊株でも、PHQによるG2/M境界での細胞周期停止が消失した (図 7)。このことはG2/M境界での細胞周期停止へ

のmorphogenesis checkpointの関与を強く示している。さらにHog1 およびSwe1 破壊株におけるPHQによる染色体異数化を調べた結果、いずれの破壊株においても、染色体異数化はほとんど認められなかった (図 8)。

(5) ヒト培養細胞でのPHQの効果; ヒト大腸

がん細胞HCT116細胞を用い、PHQの染色体異数化、G2期、M期での遅延などをFACSおよび顕微鏡により観察した。HCT116細胞をPHQで処理し、染色体数を計数した結果、処理後1日後の染色体異数化細胞の割合は明らかに増加

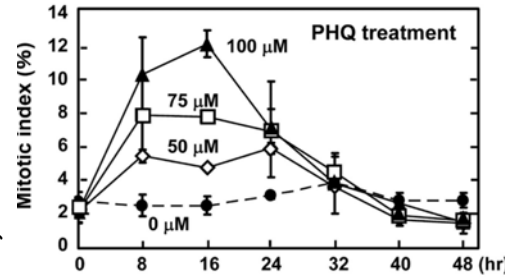


図 10. PHQ の細胞周期への影響

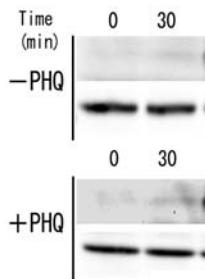


図 6

した (図9)。また様々な濃度のPHQで処理した細胞の Mitotic indexを調べたところ、その結果、濃度依存的

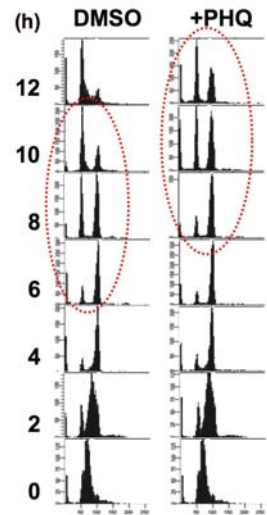


図 11. PHQ の細胞周期への影響

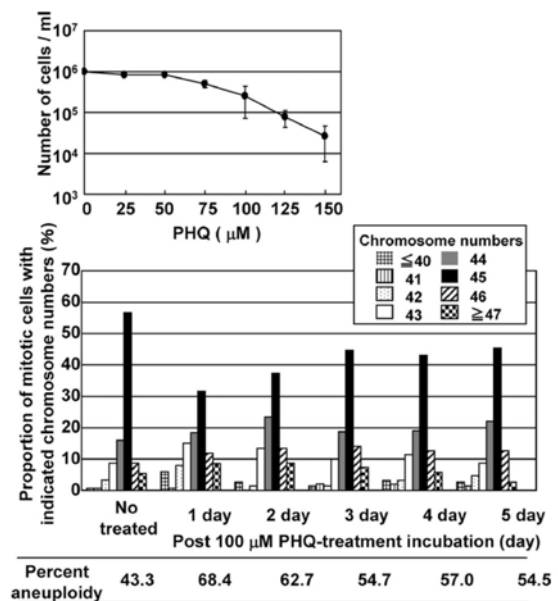


図 9. PHQ 処理による染色体異数化誘発

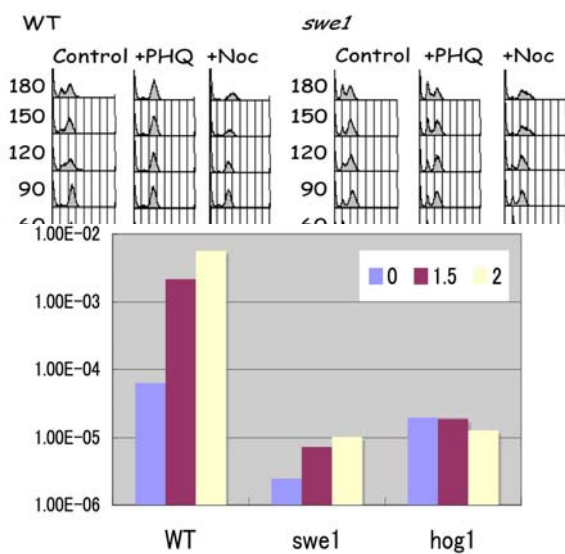


図 8. PHQ による染色体異数化

にM期細胞の割合が増加し(図10)、M期での遅延が見られた。これをFACSにより確認したところ、G2/Mの細胞割合が無処理で25.5%であったのが、PHQ処理により36.6%にまで増加した(図11)。これらの結果から、ヒト細胞でも、PHQは染色体異数化を誘発すること、細胞周期をG2/Mで遅延することなどが確認された。

これまでDNA損傷物質や変異原は、がん予防の見地から注目され、短期スクリーニング系の確立、検出、リスク評価を経て、世界レベルで行政的な規制という形で環境中から排除されてきた。しかしその一方で非変異・発がん物質の作用機序は必ずしも明らかではない。染色体異数化も、染色体分配に係るタンパク質が標的であると推定されているが、明らかではない。しかしがん細胞のほとんどで染色体異数化が観察され、最近ではNature誌に総説が掲載(Nature, 432, 338-341, 2004)されるなど、細胞がん化における染色体異数化が重要視されている。

このような状況下において本申請では、DNAではなく染色体分配機構ならびに細胞周期チェックポイントなどへの作用に焦点を絞った。本研究成果によると酵母ではPHQがHog1-Swe1 checkpoint pathwayを活性化しG2/Mの境界で細胞周期を停止させ、それが染色体異数化誘発に必要であることが明らかになった。またヒト培養細胞でもPHQが染色体数の異常を誘発することが確認された。しかしHog1-Swe1 pathway活性化機構、それによる染色体異数化機構などの詳細については今後の課題である。

本研究は出芽酵母2倍体細胞を用いた独自の手法により染色体異数化誘発物質を洗いだし、その機構解明により染色体構成を安定に維持する機構とその破綻による生物影響、さらに発がんに至る道筋を探るものである。すでに発見した染色体異数化誘導物質には、

食品添加物や農薬などとして生活環境に存在するものも多く、作用機序に基づく新しい毒性評価概念をうち立て、リスクの再評価の礎を築くことにもなると考えている。研究代表者は現在内閣府食品安全委員会農薬専門調査会専門委員を務める。この立場を利用して、本研究の知見を生活環境や労働環境に存在する染色体異数化誘導物質のリスク再評価というかたちで社会に還元したいと考える。

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8件)

1. Imai M, Matsuno R, Komura J, Ono T, Yamamoto K, Induction of mitosis delay, apoptosis and aneuploidy in human cells by phenyl hydroquinone, an Ames test-negative carcinogen, Genes Genet Systems, 2009, in press, 査読あり

2. Yamamoto A, Nunoshiba T, Umezu K, Enomoto T, Yamamoto Y, Phenyl hydroquinone, an Ames test-negative carcinogen, induces Hog1-dependent stress response signaling, FEBS J, 275(22), 5733-5744, 2008, 査読あり

3. Ikehata H, Kawai K, Komura J, Sakatsume K, Wang L, Imai M, Higashi S, Nikaido O, Yamamoto K, Hieda K, Watanabe M, Kasai H, Ono T, UVA1 genotoxicity is mediated not by oxidative damage but by cyclobutane pyrimidine dimers in normal mouse skin. J Invest Dermatol, 128, 2289-2296, 2008, 査読あり

4. Acharya N, Abu-Nasr NF, Kawaguchi G, Imai M, Yamamoto K, Frameshift mutations produced by 9-aminoacridine in wild-type, *uvrA* and *recA* strains of *Escherichia coli*; specificity within a hotspot. J Radiat Res, 48, 361-368, 2007, 査読あり

5. Endo K, Tago Y, Daigaku Y, Yamamoto K, Error-free RAD52 pathway and error-prone REV3 pathway determines spontaneous mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*, Genes Genet Syst, 82(1), 35-42, 2007, 査読あり

6. Imai M, Tago Y, Ihara M, Kawata M, Yamamoto K, Role of the 5'→3' exonuclease and Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I in base mismatch repair. Mol Genet Genomics, 278, 211-220, 2007, 査読あり

7. Nunoshiba T, Watanabe E, Takahashi T, Daigaku Y, Ishikawa S, Mochizuki M, Ui A, Enomoto T, Yamamoto K., Ames test-negative carcinogen, ortho-phenyl phenol, binds tubulin

and causes aneuploidy in budding yeast, *Mutat Res*, 617(1-2), 90-97, 2007, 査読あり

8. Hori M, Ishiguro C, Suzuki T, Nakagawa N, Nunoshiba T, Kuramitsu S, Yamamoto K, Kasai H, Harashima H, Kamiya H, UvrA and UvrB enhance mutations induced by oxidized deoxyribonucleotides, *DNA Repair (Amst)*, 6(12), 1786-1793, 2007, 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Masaru Imai, Ayumi Yamamoto, Tatsuo Nunoshiba, Jun-itiro Komura, Tetsuya Ono, Kazuo Yamamoto, Centrosome amplification mediated by G2 delay leads to aneuploidy, as a result of misaligned chromosomes, by phenyl hydroquinone, *Gordon Research Conference (Mammalian DNA repair)*, Feb. 8-13, 2009, Ventura, CA

2. 布柴達男, 出芽酵母に遺伝的不安定性を引き起こすもの一脱アミノ化ヌクレオチド損傷浄化機能Ham1 欠損と非変異原性発がん物質PHQ, シンポジウム「DNA修復と遺伝的不安定性」, 日本環境変異原学会第 37 回大会, 2008 年 12 月 4-6 日, 宜野湾

3. Ayumi Yamamoto, Youko Abe, Satoko Sawai, Masaru Imai, Kazuo Yamamoto, Genotoxic and non-genotoxic effects of chemical substances that make an impact on genome instability, *An International Symposium of Kyoto University RRI "Is There a Non-targeted Route in Radiation Carcinogenesis Process? -Candidate Playing an Important Role-"* Dec. 18, 2008, Osaka

4. 山本和生, 山本歩, 布柴達男, G2/Mチェックポイントとゲノム安定性, 日本遺伝学会第 80 回大会, 2008 年 9 月 3-5 日, 名古屋

5. Kazuo Yamamoto, Ayumi Yamamoto, Ryo Matsuno, Masaru Imai, G2/M transition arrest functions in the formation of aneuploidy, *The International Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008*, April 22-26, 2008, Ohtsu

6. Ayumi Yamamoto, Tatsuo Nunoshiba, Takemi Enomoto, Kazuo Yamamoto, Phenyl hydroquinone induced stabilization of Swi1 by Hog1 in budding yeast leads to arrest cell cycle at G2/M boundary, 1st Asia Conference on Environmental Mutagens / 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, Nov. 29-30, 2007, Kokura

7. 今井勝, 山本歩, 布柴達男, 小村潤一郎, 小野哲也, 山本和生, 非変異原性発がん物質PHQによるMAPKを介した染色体異数化〜がんへの道〜 ワークショップ「放射線発がんの“非標的仮説”について」, 第50回放射線影響学会, 2007年11月14-17日, 千葉

8. 山本 和生, 今井 勝, 松野 亮, 山本 歩, 布柴達男, 小野 哲也, Ames試験陰性発がん物質の作用機構に見る発がん突然変異説の危うさ, シンポジウム「突然変異と染色体異数性は発がんの共謀者か?」, 日本環境変異原学会公開シンポジウム, 2007 年 5 月 26 日, 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

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ており、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の多くは本研究で取り上げている非変異・発がん物質であり、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)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号：10270802

(2) 研究分担者

山本 和生 (YAMAMOTO KAZUO)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：20093536

(3) 連携研究者