

平成 21 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19570144  
 研究課題名（和文） 発癌物質 PhIP に対する細胞応答及同付加体部位での損傷乗り越え DNA 修復の解析  
 研究課題名（英文） DNA-damage Checkpoint Response to PhIP-exposure and Translesion DNA Synthesis at PhIP-dG  
 研究代表者  
 福田 博政（FUKUDA HIROKAZU）  
 国立がんセンター（研究所及び東病院臨床開発センター）・生化学部・室長  
 研究者番号：60300943

## 研究成果の概要：

PhIP は、食肉・魚を加熱調理した際に生成される発がん性物質で、我々の細胞中の DNA と付加体（傷の一種）を形成して変異を誘発することが知られている。PhIP を部位特異的に導入した鋳型 DNA を用いて種々の DNA polymerase による DNA 合成反応の解析を行い、pol d (±PCNA) 等の複製 polymerase がこの傷の部位で停止してしまうこと、損傷乗り越え polymerase の REV1 と pol k がこの傷を乗り越えて DNA 合成を行うことを見出した。このとき、1 塩基の飛び越しや誤った塩基の挿入がしばしば起こった。さらに詳細な解析から、PhIP により変異が導入される分子機構を明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000 円	420,000 円	1,820,000 円
2008 年度	1,900,000 円	570,000 円	2,470,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000 円	990,000 円	4,290,000 円

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：遺伝子の情報発現と複製 DNA 付加体

## 1. 研究開始当初の背景

加熱調理した肉・魚（特に焼焦げ及煙）に強い変異原性及発がん性が見出され<sup>1)</sup>、その後この活性は食品中のクレアチニンと糖・アミノ酸が加熱されることによる生成するヘテロサイクリックアミン（HCA）と呼ばれる一群の化合物に起因することが明らかとなった。なかでも Felton ら<sup>2)</sup>によって牛ハンバーガー中より見出された 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]

pyridine (PhIP) は、加熱食品中に最も多く含まれる HCA であり、強い変異原性を示す。ラットを用いた発がん実験では、大腸がん、前立腺がん、乳がんができる。HCA 中で最も強い変異原性を示す MeIQx を含めた他の HCA が主に肝臓がんをつくるのとは対照的である。PhIP は生体内で代謝活性化され DNA 中の dG の C8 位に結合することが示され（図 1）、この DNA 付加体の生成が変異原性及発がん性の直接の原因と考えられている。発がん研究

と同時に、細菌から高等動物までの種々の系で変異スペクトラムの解析が進められ、GがTに変異するトランバージョンが主要な変異で、その他に-1のフレームシフト等が生じることが示された。また、PhIP投与により生じたラット大腸がんでもAPCや $\beta$ -catenin遺伝子のリン酸化部位にも同様な変異が認められた<sup>3)</sup>。PhIPを含むHCAによる変異・発がんの実験はこれまで国立がんセンター研究所の我々の研究グループを中心とした国内の数研究機関及米国保健財団、ローレンスリバモア国立研究所等の海外研究機関において精力的に行われてきた。

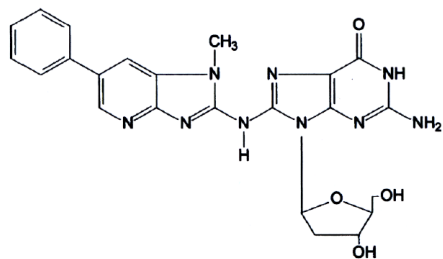


図1 PhIP-C8-dG

しかしながら、PhIP付加体の生成がどのような機序で上記の変異として固定されるのかは明らかにされていない。1990年代末から損傷乗り越えDNA合成(TLS)に関与するDNAポリメラーゼが相次いで報告され、紫外線等による損傷や芳香族炭化水素及芳香族アミン等の付加体での損傷乗り越え合成と忠実度についての研究も国内外で数多く行われている。他方、HCA付加体についてのTLSの研究はまだほとんど報告がない。最近、国立がんセンター研究所においてdG-C8-PhIPをアミダイト試薬の形で有機合成することに成功し、DNA合成機での付加体オリゴヌクレオチド合成に利用する道が開かれた<sup>4)</sup>。そこで、部位特異的PhIP付加体(オリゴヌクレオチド)を用いて、*in vitro*での詳細なTLS解析を行おうと考えた。

我々の研究室で行われたPhIP投与ラットの発がん実験及び各臓器の付加体量とその修復速度の測定実験の結果から推察すると、PhIPによる発がんは付加体生成に起因するがん抑制遺伝子又は原がん遺伝子の変異だけで起こるとは考え難く、変異プラスアルファの要因が必要と結論された。即ち、PhIPにより細胞がストレスを受けることにより、DNA損傷チェックポイントが活性化される等して何らかのPhIPによる直接的な遺伝子変異以外の変化が生じていて、1~2個の発がんのキーとなる遺伝子の変異に加えてこの変化が発がんに必要なと考えられる。培養細胞を活性化したPhIPで処理した時の応答・変

化を調べる意義は大きい。

1: Sugimura (1976) In *Origins of Human Cancer* (Book C), pp1561-1577. Cold Spring Harbor Lab.

2: Felton *et al.* (1986) *Carcinogenesis* 7, 1081-1096

3: Dashwood *et al.* (1998) *Cancer Res.* 59, 3893-3898

4: Takamura-Enya *et al.* (2006) *Chem. Res. Toxicol.* 19, 770-778

## 2. 研究の目的

(1) 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

現在までに、CAGGGCAの真ん中のGにPhIPの導入された7-merのオリゴヌクレオチドを合成し、これを他のオリゴヌクレオチドとライゲートすることにより64-merの鋳型オリゴヌクレオチド作製した。この鋳型DNAを用いて複製polymeraseによるDNA合成反応を調べる。この鋳型及びdG-PhIPの周囲の配列を変えた鋳型DNAを用いて、各種TLS polymeraseでdG-PhIPの反対側にヌクレオチドを付加できるかどうかと、その時の効率及び忠実度を定量的に評価する。さらに、dG-PhIPの反対側にヌクレオチドを付加した後の伸長反応についても各polymeraseを用いて忠実度を含めて定量的に評価する。既に活性化型(hydroxylamino体)になっているPhIP誘導体で培養細胞を処理したときのS期チェックポイント等の応答や変化を調べる。具体的にはchk1、chk2の活性化(リン酸化)、p53やヒストンH2AXのリン酸化状態を特異的抗体を用いた免疫染色及びイムノブロットにより調べる。同様の実験を、PhIPを胃内投与したラットから分離した大腸上皮を用いて行う。

(2) 本研究の特色・独創的な点及び予想される結果と意義

BulkyなDNA付加体でのTLS研究はBPDEの様な芳香族炭化水素やAAFの様な芳香族アミンの付加体で主に行われており、HCA付加体での研究はほとんど報告がない。本研究によりPhIP付加体で各TLS polymeraseがどの程度の効率・忠実度で行うかが明らかとなることにより、複製時付加体乗り越えてどの程度合成が進めるか、逆に言うとPhIP付加体によりどの程度複製フォーク進行阻害が引き起こされるのか、その結果としてDNA2重鎖切断やDNA損傷チェックポイントについても定量的に評価出来る。同時にPhIPにより変異が誘発される分子機構の解明が大きく前進することが期待できる。BDPEやAAFは古くから発がん性化学物質の代表として研究されTLS研究でもその一翼を担ってきたが、HCAは構

造・性質が大きく異なるので、付加体での TLS もかなり違ったものであると予想される。BPDE 等が職業がんの原因物質として同定されかつて特殊な環境下の人々が暴露していた物質、また AAF や AF は過去に農薬や食品防腐剤として用いられたが現在は使用が禁止されている物質であるのに対して、HCA は現在も人類が日々暴露され続けている化学物質であるという点でも前者の化学物質群とは異なっている。以上の様な観点から PhIP 付加体での TLS 研究を行う意義は甚大であると言える。

ATM/ATR によって制御される DNA 損傷応答が細胞のがん化を抑えるバリアーとなっていて、この経路の破綻ががん化の初期過程のキー・イベントの 1 つと考えられる<sup>5)</sup>。PhIP (HCA) による DNA 損傷応答の研究については S 期の遅延が起こるといった報告<sup>6)</sup>があるのみで、ほとんど手がつけられていないのが現状である。PhIP に暴露した培養細胞で DNA 損傷チェックポイントの活性化、即ち ATM/ATR の下流の chk2 (chk1)、p53 の活性化及びヒストン H2AX のリン酸化が起こることを明確に示すことが不可欠である。また、もし PhIP 暴露により誘発される DNA 損傷チェックポイントの破綻が観察されたなら、PhIP による発がんの初期過程で起こっている現象を捉えている可能性があり、その意義は非常に大きい。DNA 複製ストレスが DNA2 重鎖切断を引き起こし、結果としてゲノム不安定性を誘発し、これががん化につながるのではないかと考えられる<sup>7)</sup>が、PhIP の場合も付加体での複製フォークの停止によりその近傍で DNA2 重鎖切断が起こると考えられる。γH2AX 抗体によるクロマチン免疫沈降により、PhIP 付加体生成のホットスポットがゲノムワイドに同定できると期待される。

5: Bartkova *et al.* (2005) *Nature* 434, 864-870

6: Zhu *et al.* (2000) *Cancer Res.* 60, 1283-1289

7: Gorgoulis *et al.* (2005) *Nature* 434, 907-913

### 3. 研究の方法

アミダイト試薬の形で有機合成した dG-C8-PhIP を用い、dG-C8-PhIP を特異的部位に含むオリゴヌクレオチドを DNA 合成機で作製した。この時周囲の塩基配列を変えたものやリピート配列を含むものなどを用意し、*in vitro* での DNA 合成反応の鋳型とした。この鋳型オリゴヌクレオチドに RI ラベルしたプライマーをアニールさせて、各種 TLS polymerase を用いて PhIP 付加体での損傷乗り越え DNA 合成を調べた。TLS polymerase は 3~4 種を国内研究機関より精製標品を供与して頂き、3 種程度を市販品として購入した。各 polymerase 毎に 4 種の塩

基について、定量的解析を行い Km 値や *kcat* 等の kinetic parameter を算出して、TLS の効率・忠実度を判定した。dG-C8-PhIP の反対側に 1 塩基付加された後の伸長反応についても、同様に解析を行った。この時、dG-C8-PhIP の周囲の塩基配列の影響、特に 5' 側に隣接する塩基の違いによる影響についても調べた。

予め活性化型 (hydroxylamino 体) になっている PhIP 誘導体で培養細胞を処理したときの DNA 損傷チェックポイント等の応答を調べる。使用する培養細胞は正常組織由来細胞及びがん由来細胞株、数種類で行う。具体的には ATM、chk1、chk2、p53 やヒストン H2AX の部位特異的リン酸化を認識する特異的抗体を用いた免疫染色及びイムノブロットを行った。同様の実験を、PhIP を胃内投与したラットから分離した大腸上皮を用いて行った。

### 4. 研究成果

がん抑制遺伝子 APC の PhIP 誘発ラット大腸がんにおける変異ホットスポット (コドン 869:GGG → GG) 前後の配列 TCCGGGAAC の真ん中の G に PhIP を導入し、さらに 3' 側に 23 塩基の配列を付け加えた 32 塩基の鋳型 DNA を用い、各種 polymerase による DNA 合成を行なった。

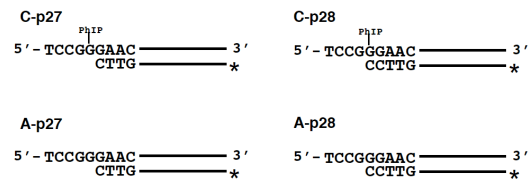


図 2 Template-primer complexes

17mer のプライマーを用いた伸長反応では、大腸菌 Klenow 断片やヒト pol α、ヒト pol δ (± PCNA) など用いた Replicative DNA polymerase のいずれにおいても、PhIP-dG の部位での強力な DNA 合成の停止が観察された (図 3)。

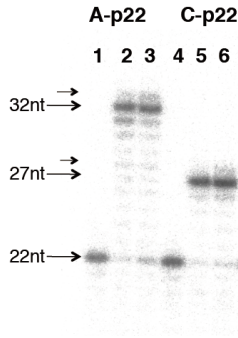


図3 pol $\delta$ による伸長反応  
lane 1 & 4: controls without proteins  
lane 2 & 5: + pol $\delta$   
lane 3 & 6: + pol $\delta$  +PCNA

次に、26mer のプライマーを用いて、TLS polymerase による PhIP-dG の向かいへの塩基挿入反応を調べた (図2 参照)。4 種の TLS polymerase のうち、pol $\eta$ 、pol $\kappa$ 、REV1 の3 種は PhIP-dG の向かいへ dC を挿入できた。中でも、REV1 が最も効率良く塩基挿入反応を触媒した。27mer のプライマーを用いて伸長反応を行ない (図2 参照)、pol $\kappa$  及び pol $\eta$  で dG 2 塩基の挿入が観察された (図4)。即ち、鋳型中の dG 1 塩基分のスリッページが起こったことが示唆された。PhIP が付加した dG の部位を前後にずらした鋳型でも、同様の結果が得られた。pol $\kappa$  及び pol $\eta$  による伸長反応時のこの dG 1 塩基分のスリッページが、除去修復後に dG の1 塩基欠失として固定されると考えられる (図5)。

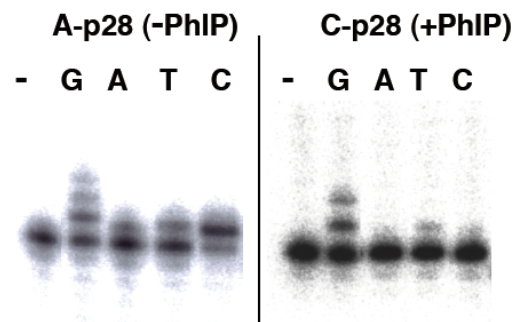


図4 pol $\kappa$ による伸長反応  
A-p28, C-p28 (図2 参照) を Template-primer complex として、レーン上に示した1 種類の dNTP 存在下で、pol $\kappa$  による伸長反応を行った。

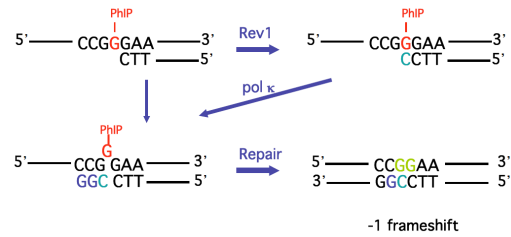


図5 PhIP による GGG→GG 変異導入のモデル

各種 TLS polymerase による挿入・伸長反応の定性的解析に引き続き、詳細な反応速度論的解析を実施し、PhIP により誘発される特徴的な変異である GGG から GG への1 塩基欠失導入の機序に関する上記モデルが支持された。活性化型 PhIP 誘導体 (hydroxylamino 体) で培養細胞を処理したときのヒストン H2AX のリン酸化状態等のチェックポイント応答を、特異的抗体を用いたイムノプロットにより調べたが、溶媒処理の細胞を用いた対照との差異が見いだせなかった。PhIP 誘導体がうまく機能している確証が得られなかったため、当初の予定を変更し PhIP を胃内投与したラットの大腸粘膜から蛋白質を抽出して同様の実験を行った。その結果、PhIP 投与群では非投与対照群と比較して有意に H2AX の発現量及び  $\gamma$ H2AX (リン酸化活性化体) の量が上昇していた。PhIP 付加体での複製フォーク伸長阻害に起因する2 重鎖切断により、S 期チェックポイントの活性化が示唆されるので、現在 ATM/ATR、chk1/chk2 や p53 のリン酸化について調べている。

#### 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 5 件)

Paramasivam M, Membrino A, Cogoi S, Fukuda H, Nakagama H, Xodo LE. Protein hnRNP A1 and its derivative Up1 unfold quadruplex DNA in the human KRAS promoter: implications for transcription. Nucleic Acids Res. 37, 2841-2853, 2009、査読有

Nagata T, Takada Y, Ono A, Nagata K, Konishi Y, Nukina T, Ono M, Matsugami A, Furukawa A, Fujimoto N, Fukuda H, Nakagama H, Katahira M. Elucidation of the mode of interaction in the UP1-telomerase

RNA-telomeric DNA ternary complex which serves to recruit telomerase to telomeric DNA and to enhance the telomerase activity.、Nucleic Acids Res.、36、6816-6824、2008、査読有

Fukuta K, Kohri K, Fukuda H, Watanabe M, Sugimura T, Nakagama H.、Induction of multinucleated cells and apoptosis in the PC-3 prostate cancer cell line by low concentrations of polyethylene glycol 1000.、Cancer Sci.、99、1055-1062、2008、査読有

Tanaka E, Fukuda H, Nakashima K, Tsuchiya N, Seimiya H, Nakagama H.、HnRNP A3 binds to and protects mammalian telomeric repeats in vitro.、Biochem. Biophys Res. Commun.、358、608-614、2007、査読有

Fukuda H, Tsuchiya N, Hara-Fujita K, Takagi S, Nagao M, Nakagama H.、Induction of abnormal nuclear shapes in two distinct modes by overexpression of serine/threonine protein phosphatase 5 in HeLa cells.、J. Cell. Biochem.、101、321-330、2007、査読有

[学会発表] (計 5 件)

Fukuda H., Takamura T., Nakagama H.、Translesion DNA synthesis at PhIP-dG、日本癌学会学術総会、2008年10月28日、名古屋国際会議場

Kanemoto K., Fukuta K., Fukuda H., Ochiai M., Kohri K., Sugimura T., Nakagama H.、Genomic copy number aberrations in *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BHBN)-induced invasive bladder cancers of mice.、日本癌学会学術総会、2008年10月28日、名古屋国際会議場

Fukuda H., Takamura T., Seki C., Nakagama H.、Translesion DNA synthesis at PhIP-adducted dG.、日本分子生物学会年会、2007年12月11日、パシフィコ横浜

Fukuda H., Seki C., Takamura T., Nakagama H.、Translesion DNA synthesis at PhIP-dG adduct、日本癌学会学術総会、2007年10月3日、パシフィコ横浜

Fukuta K, Kohri K, Fukuda H, Watanabe M, Sugimura T, Nakagama H.、Induction of multinucleated cells and apoptosis in the

PC-3 prostate cancer cell line by low concentrations of polyethylene glycol 1000.、日本癌学会学術総会、2007年10月3日、パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 博政 (FUKUDA HIROKAZU)  
国立がんセンター (研究所及び東病院臨床開発センター)・生化学部・室長  
研究者番号：60300943

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者