

機関番号：17102  
 研究種目：基盤研究B  
 研究期間：2008～2011  
 課題番号：20310031  
 研究課題名（和文）DNA修復系遺伝子欠損マウスを用いた変異原性・発がん性の高感度評価系の開発  
 研究課題名（英文）A highly sensitive assay system for examining chemical mutagenicity and carcinogenicity using DNA repair-deficient mice  
 研究代表者  
 續 輝久(TSUZUKI TERUHISA)  
 九州大学・大学院医学研究院・教授  
 研究者番号：40155429

研究成果の概要（和文）：活性酸素によって生じる8-オキシグアニンが誘発すると考えられる自然突然変異・自然発がんの抑制に関与する DNA 修復遺伝子欠損マウスシステムを用いて、酸化 DNA 損傷を引き起こす変異原性物質の発がん性を高感度で評価する実験系の開発を行った。この研究の過程で、突然変異を抑制する DNA 修復系よりも突然変異体の出現を抑制する細胞死誘導系の方が、発がん抑制により強く関わることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：In order to establish a highly sensitive assay system for examining chemical mutagenicity and tumorigenesis, we performed  $\text{KBrO}_3$ -induced mutagenesis and tumorigenesis experiments using *Ogg1*-, *Mutyh*- or *Msh2*-deficient mice. We observed an enhanced tumor-formation in the small intestines of *Mutyh*- or *Msh2*-deficient mice, as compared with wild type and heterozygous mice. These results indicate that *Mutyh*- or *Msh2*-deficient mice are ideal animal models for examining tumorigenesis of chemicals of interest. The number of tumors was marginally increased in *Ogg1*-deficient mice in which the increased  $\text{KBrO}_3$ -induced mutagenesis was observed at an almost same extent as in *Mutyh*-deficient mice, suggesting that the induction of cell death might play a more important role than the suppression of mutagenesis for avoiding intestinal tumorigenesis caused by oxidative stress.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 6,900,000  | 2,070,000 | 8,970,000  |
| 2009年度 | 4,100,000  | 1,230,000 | 5,330,000  |
| 2010年度 | 3,500,000  | 1,050,000 | 4,550,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：遺伝子、核酸、環境、ゲノム、放射線、突然変異、酸化ストレス、活性酸素

## 1. 研究開始当初の背景

酸化DNA損傷は生体において自然突然変異を引き起こし、自然発がんの主要な原因と考えられている。グアニンの酸化体 8-オキシグアニン

(8-oxoG) はシトシンと同程度にアデニンとも対合できるので、DNA 中の 8-oxoG は強い突然変異原性を示し、G:C→T:A 変異を引き起こす。8-oxoG 等の酸化的損傷に起因する突然変異の

抑制系である酵素群について、これまでに *Mth1*, *Ogg1*, *Mutyh*, *Msh2* 遺伝子欠損マウスを樹立し、自然突然変異およびがんの発生を抑制することを示してきた。また、食品添加物としても用いられている酸化剤  $\text{KBrO}_3$  を飲水投与することで、酸化ストレスを負荷された *Mutyh* 遺伝子欠損マウスでは、G:C→T:A 変異および小腸がんの頻度が劇的に上昇することを示し、生体では MUTYH が酸化ストレス誘発突然変異およびがんを効率良く防いでいることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

酸化 DNA 損傷に起因する突然変異の抑制を行っていると考えられる *Ogg1* あるいは *Mutyh* 遺伝子を欠損したマウス、さらに、DNA 損傷を持つ細胞のアポトーシス誘導に関与する *Msh2* 遺伝子を欠損したマウス系統を用いて、酸化ストレスの負荷を与えた条件下でのがんの解析を行い、それぞれのマウス系統のがん感受性を検討することにより、変異原性物質のがん性を高感度で評価する実験系の開発をめざした。

## 3. 研究の方法

酸化 DNA 損傷によるがんに対して抑制的に働くことが期待される各種 DNA 修復能を欠損したマウスを用いた下記の実験を計画した。

(1) *Ogg1* 遺伝子欠損マウスを用いて、 $\text{KBrO}_3$  の飲水投与による消化管での酸化ストレス誘発突然変異の解析を行い、以前行った *Mutyh* 遺伝子欠損マウスを用いて得られた結果と比較する。

(2) *Ogg1*, *Mutyh*, *Msh2* 遺伝子欠損マウスを用いて、 $\text{KBrO}_3$  の飲水投与による消化管での酸化ストレス条件下における消化管でのがん解析を行う。

(3) 遺伝子欠損マウスで消化管腫瘍の発生が顕著に上昇していた場合は、酸化ストレス誘発消化管腫瘍の組織でのがん関連遺伝子の突然変異解析を行う。

(4) マウス個体で発生する突然変異を効率良く解析するために、改変型 *rpsL* 遺伝子トランスジェニックマウスを作製し、従来型の検出系との比較解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 酸化ストレス誘発突然変異

*Ogg1* 遺伝子欠損マウスに、0.2%  $\text{KBrO}_3$  を 4 週間飲水投与した後、小腸上皮において誘発される突然変異の解析を行った。*Ogg1* 遺伝子欠損マウスでは  $\text{KBrO}_3$  投与により、以前行った *Mutyh* 遺伝子欠損マウスと同程度に G:C→T:A 変異が顕著に上昇していた。これらの結果は、OGG1 が 8-oxoG を DNA から取り除くことで酸化ストレ

スにより誘発される突然変異を抑制していることを示す。また、その突然変異を抑制する効果は MUTYH と同程度であることが判明した。

### (2) 酸化ストレス誘発がん

*Ogg1*, *Mutyh*, *Msh2* 遺伝子欠損マウスに、0.2%  $\text{KBrO}_3$  を 16 週間飲水投与した後、消化管に発生する腫瘍数の比較を行った。その結果、*Mutyh*, *Msh2* 遺伝子欠損マウスでは消化管腫瘍の発生頻度は野生型マウスと比較して、それぞれ 60.8 倍、22.8 倍と顕著に上昇していた。一方、*Ogg1* 遺伝子欠損マウスでの消化管腫瘍の発生頻度は野生型マウスと比較して 2 倍程度上昇していることを認めた。これらの結果は、*Mutyh*, *Msh2* 遺伝子欠損マウス、特に *Mutyh* 遺伝子欠損マウスは酸化ストレスを生じさせる化学物質のがん性を検討する上で、非常に有用な実験動物であることを示している。OGG1 は MUTYH と同程度に酸化ストレス誘発突然変異を抑制しているが、MUTYH や MSH2 に比べて、酸化ストレス誘発がんの抑制にはそれほど大きな役割を果たしていないことが判明した。MUTYH およびミスマッチ修復因子は酸化ストレス誘発細胞死に関与していることが報告されており、これらの知見と今回の実験結果とを合わせて考えると、酸化ストレス誘発消化管がんの抑制には、酸化 DNA 損傷に起因する突然変異の抑制よりは、酸化 DNA 損傷により誘導される細胞死の制御がより大きく関与していることが推測される。

### (3) 酸化ストレス誘発消化管腫瘍のがん関連遺伝子の突然変異解析

以前の解析で、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおいて顕著に発生が上昇していた酸化ストレス誘発消化管腫瘍の組織での *Cttnb1* 遺伝子の突然変異解析を行い、36 例の塩基置換変異を認め、そのうち 35 例が G:C→T:A 変異であった。今回、*Msh2* 遺伝子欠損マウスにおいて顕著に発生が上昇していた酸化ストレス誘発消化管腫瘍の組織での *Cttnb1* 遺伝子の突然変異解析を行った。これまでに調べた 92 例のうち 22 例に塩基置換変異を認めた。また、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスの腫瘍とは大きく異なり、22 例中 16 例が G:C→A:T 変異であった。

### (4) 改変型 *rpsL* 遺伝子トランスジェニックマウスの作製

マウス個体で発生する突然変異を効率良く解析するために、プラスミドの複製起点を変更し、マウスゲノム DNA を切断しない I-CeuI 認識部位を新たに付加した新規 *rpsL* 遺伝子プラスミド pSWAN2 を作製し、トランスジェニックマウスを作製した。これまでに得られたトランスジェニックマウス 3 匹はいずれもトランスジェノムのコピー数が 10 コピー以下で、I-CeuI 認識部位の導入でマウスゲノムからプラスミド DNA の回収効率が改善さ

れたものの、従来のトランスジェニックマウス(>100コピー)と比較して、マウスゲノム DNA 当りのプラスミド DNA の回収量が低く、実用化には更なる改良が必要であった。そこで、ラクトースオペレーターとそれに結合する LacI を用いて、低コピー数のトランスジーンを濃縮・回収する新たな方法の開発を行っている。pSWAN2 に LacI が結合するラクトースオペレーターを導入した pSWAN3 を作製し、また pSWAN3 を濃縮・精製するための LacI-Strep tag 発現ベクターを作製し、LacI-Strep tag を精製した。現在、新規 *rpsL* 遺伝子トランスジェニックマウス実用化にむけた研究が進行中である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- (1) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu and Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, *Health Physics* (in press) [査読有]
- (2) N. Sagata, A. Iwaki, T. Aramaki, K. Takao, S. Kura, T. Tsuzuki, R. Kawakami, I. Ito, T. Kitamura, H. Sugiyama, T. Miyakawa, and Y. Fukumaki, Comprehensive behavioral study of GluR4 knockout mice: implication in cognitive function. *Genes, Brain Behavior*, 9: 899-909, 2010. [査読有]
- (3) T. Nakamura, S. Meshitsuka, S. Kitagawa, N. Abe, J. Yamada, T. Ishino, H. Nakano, T. Tsuzuki, T. Doi, Y. Kobayashi, S. Fujii, M. Sekiguchi and Y. Yamagata, Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base, *J. Biol. Chem.*, 285: 444-452, 2010. [査読有]
- (4) H. Kamiya M. Uchiyam, J.-S. Piao, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki and H. Harashima, Targeted sequence alteration of a chromosomal locus in mouse liver., *Inter. J. Pharmaceutics* : 180-183, 2010. [査読有]
- (5) K. Komori, Y. Takagi, M. Sanada, T.-H. Lim, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, M. Sekiguchi and M. Hidaka. A novel protein, MAPO1, that functions in apoptosis triggered by O<sup>6</sup>-methylguanine mispair in DNA. *Oncogene*, 28: 1142-1150, 2009. [査読有]
- (6) H. Tsuchiya, M. Uchiyama, K. Hara, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, H. Inoue, H. Harashima and H. Kamiya. Improved gene correction efficiency with a tailed duplex DNA fragment. *Biochemistry*, 47: 8754-8759, 2008. [査読有]
- (7) H. Kamiya, M. Uchiyama, Y. Nakatsu, T.

Tsuzuki and H. Harashima. Effects of target sequence and sense versus anti-sense strands on gene correction with single-stranded DNA fragments. *J. Biochem.*, 144: 431-436, 2008. [査読有]

(8) Y. Maehara, A. Egashira, E. Oki, K. Kakeji and T. Tsuzuki, DNA repair dysfunction in gasterointestinal tract cancers. *Cancer Sci.*, 99:451-458, 2008. [査読有]

[学会発表] (計 2 1 件)

- (1) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Prevention of Oxidative Mutagenesis by DNA Repair Enzymes: Implication in Human Cancer, 2<sup>nd</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens (ACEM): Harmonize Gene & Environment, Pattaya, Thailand, 2010.12.17.
- (2) 大野みずき, 作見邦彦, 續 輝久, 中別府雄作, 8-oxoguanine は DNA 鎖切断を誘発することで減数分裂期の相同染色体組換え頻度を上昇させる, 日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 神戸, 2010. 12.8.
- (3) 中西恵美, 大野みずき, 中津可道, 續 輝久, 腸管と精巣における放射線誘発 DNA 損傷とその修復機構の解析, 日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 神戸, 2010.12.7.
- (4) 大野みずき, 中西恵美, 作見邦彦, 古市正人, 中別府雄作, 續 輝久, 酸化損傷 DNA が生殖細胞ゲノムに及ぼす影響, 日本環境変異学会第 39 回大会, 茨城, 2010.11.16.
- (5) 大野みずき, 中西恵美, 中津可道, 續 輝久, 低 LET 放射線による核酸の損傷とその修復機構: 腸管と精巣における解析, 日本放射線影響学会第 53 大会, 京都, 2010.10.20.
- (6) 日高真純, 高木康光, Teik-How Lim, 中津可道, 續 輝久, 佐野しおり, 坂上竜資, 関口睦夫, 哺乳類細胞のゲノム安定性と細胞死, 日本遺伝学会第 82 回大会, 札幌, 2010.9.20.
- (7) 高橋富美, 吉原達也, 中津可道, 續 輝久, 中別府雄作, 笹栗俊之, 酸化ストレス誘発小腸腫瘍に対する Differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍効果, 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010.9.22.
- (8) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, Workshop: Biological effects of low-level exposure to ionizing radiation, health risks and clinical consequences, Richland, WA, USA, 2010.5.
- (9) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y.

Nakabeppu, Y., Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund "Cancer and DNA Repair", Tokyo, 2009.11.10.

(10) 續 輝久, 酸化ストレス誘発発がんの抑制に関与する分子機構の解明—*Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおける消化管発がんの解析を中心として—, 第 51 回日本消化器病学会大会 シンポジウム: S9 炎症と消化器発癌, 京都, 2009.10.15.

(11) 松本戴恭, 朴晶淑, 中津可道, 前原喜彦, 續 輝久, *Trp53* 欠損マウスを用いた KBrO<sub>3</sub> 投与による酸化ストレス誘発小腸腫瘍の解析, 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009.10.2.

(12) 中津可道, 松本戴恭, 朴晶淑, 續 輝久, 酸化ストレス誘発消化管発癌抑制における癌関連遺伝子の働き, 日本遺伝学会第 81 回大会, 長野, 2009.9.16.

(13) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) Symposium: Cancer Models and Mechanisms, Italy, 2009.8.23.

(14) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, 3rd ASM Conference on DNA Repair and Mutagenesis, Canada, 2009.6.1.

(15) 朴晶淑, 磯田拓郎, 中津可道, 中別府雄作, 續 輝久, *Msh2* 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発小腸腫瘍の解析, 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.10.29.

(16) 藏忍, 中津可道, 中別府雄作, 續 輝久, 哺乳動物細胞への 8-oxo-dGTP の導入は A:T → C:G 変異を引き起こす, 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.10.28.

(17) T. Tsuzuki, Prevention of oxidative mutagenesis by MUTYH: Implication in human cancer, Environmental Mutagen Society 39th Annual Meeting, Puerto Rico, USA, 2008.10.21.

(18) T. Tsuzuki, Significance of Error-avoiding Mechanism for Oxidative DNA Damage in Carcinogenesis, 9th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Poland, 2008.09.05.

(19) 續 輝久, 酸化ストレス誘発発がんの抑制に関与する分子機構の解明 - *Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおける消化管発がんの解析を中心として, 第 14 回日本家族性腫瘍学会学術集会,

東京, 2008.06.20.

(20) Y. Nakatsu, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, T. Tsuzuki, Oxidative Stress-Induced Tumorigenesis in the Small Intestine of Various DNA Repair-Deficient Mice, 10th International Workshop on Radiation Damage to DNA (IWRDD), 福島, 2008.06.08.

(21) 中津可道, 朴晶淑, 磯田拓郎, 續 輝久, 作見邦彦, 中別府雄作, DNA 修復関連遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発消化管発がん, がん予防大会 2008 福岡 (第 9 回日本がん分子疫学研究会 / 第 15 回日本がん予防学会 / 第 31 回日本がん疫学研究会), 福岡, 2008.05.22.

[図書] (計 3 件)

(1) T. Tsuzuki, T. Isoda, J. Piao, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestines of DNA repair-deficient mice, International Proceedings: The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund "DNA Repair and Cancers" Eds. S. Nishimura, L. A. Loeb, M. Masutani, H. Nakagama, T. Sekiya, Princess Takamatsu Cancer Research Fund, 2010.

(2) T. Tsuzuki, T. Isoda, J. Piao, K. Yamauchi, A. Egashira, K. Sakamoto, S. Kura, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Significance of Error-avoiding Mechanisms for Oxidative DNA Damage in Carcinogenesis, International Proceeding: 9th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Ed. H. Kozlowski, Medimond, 2008.

(3) 江頭明典, 前原喜彦, 續 輝久, DNA 修復異常と発がんモデル pp. 82-99, 「完全版 マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック」秋山徹, 奥山隆平, 河府和義 編, 羊土社 2011.

[その他] ホームページ等

基礎放射線医学 (分子遺伝学) 分野の URL  
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/biophys/>  
九州大学研究者情報の URL  
<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/index.html>

研究代表者: 續 輝久

[<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002228/index.html>]

研究分担者: 中津可道

[<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K000504/index.html>]

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

續 輝久 (TSUZUKI TERUHISA)

九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号:40155429

(2) 研究分担者

中津可道(NAKATSU YOSHIMICHI)  
九州大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号:00207820