

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22241016

研究課題名(和文) DNAポリメラーゼ(ゼータ)の遺伝的改変による遺伝毒性閾値形成機構に関する研究

研究課題名(英文) Studies on mechanisms underlying genotoxic thresholds through genetic modification of DNA polymerase zeta

研究代表者

能美 健彦(Nohmi, Takehiko)

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・客員研究員

研究者番号：30150890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,000,000円、(間接経費) 1,440,000円

研究成果の概要(和文)：DNAに損傷を与え突然変異を誘発する遺伝毒性物質の作用には閾値がないとされ、各種の行政的な規制が行われている。しかし、ヒトはさまざまな生体防御機構を具備しており、これらが低用量の遺伝毒性物質の作用を抑制して「事実上の閾値」を形成する可能性が考えられる。本研究では、DNA損傷の乗り越えに關与するDNAポリメラーゼを遺伝的に改変することにより、遺伝毒性物質の閾値形成機構を検討することを目的とした。DNAポリメラーゼの活性を減弱させると、酸化DNA損傷に対するヒト細胞の感受性が増大したことから、遺伝毒性に対する「事実上の閾値」形成にDNAポリメラーゼが重要な役割を果たしているものと結論した。

研究成果の概要(英文)：In regulatory toxicology, it is an axiom that there is no threshold for the action of genotoxic chemicals. Thus, genotoxic agents are not allowed to be present in food additives and others even at very low concentrations. However, humans possess various self defense mechanisms, which may suppress genotoxicity of chemicals at low doses. It is expected that self-defense mechanisms may constitute practical threshold for genotoxicity. In this study, we examined the possibility whether DNA polymerase zeta involved in translesion DNA synthesis plays a role in the practical threshold. To this end, we engineered human cells that expressed genetically modified DNA polymerase zeta. The cells expressing a variant of DNA polymerase zeta with low activity exhibited much higher sensitivity to oxidative genotoxic agents than the wild-type cells. We concluded that DNA polymerase zeta is an important constituent of the practical threshold for genotoxicity.

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：閾値 遺伝毒性発がん物質 トランスレージョンDNA合成 DNAポリメラーゼ 突然変異 DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝毒性物質とは、DNA と反応して付加体を形成したり、あるいは DNA 鎖を切断することにより、突然変異や染色体異常を誘発する物質であり、その中にはヒトに対して発がん性を示すものが少なくない。遺伝毒性物質は、その作用が放射線に類似していることから「放射線類似作用物質 (radiomimetic agents)」とも呼ばれてきた。放射線の生物作用は、一般的に、直線閾値なし (linear non-threshold) モデルによるとされており、どのように低線量であっても、一定のリスクをヒトに及ぼすものと考えられている。同様に、遺伝毒性物質についても、その作用には閾値はなく、どのように低用量であってもヒトに対してリスクを負わせるものとして、各種の行政的な規制が行われている。特に、遺伝毒性に基づき発がん性を示す物質 (遺伝毒性発がん物質) については、食品添加物、残留農薬、動物用医薬品に含まれることが認められておらず、医薬品の場合も、遺伝毒性発がん物質については、微量であってもヒトに発がんリスクを負わせるものとして規制が行われている。しかし、分析機器の進歩により、従来は「不検出」とされてきた試料の中に微量の「遺伝毒性発がん物質」が検出される場合が増加しており、低用量の遺伝毒性物質のリスクをどのように評価するかが、科学的、社会的に重要な問題となっている。

(2) ヒトを含む生物は多様な生体防御機構を有しており、抗酸化物質、解毒代謝機構、DNA 修復機構、アポトーシスなどの作用が分子レベルで解明されている。一方、DNA は内因性の遺伝毒性物質 (例えば活性酸素種) に絶えず暴露されており、内因性遺伝毒性物質による DNA 損傷は、自然突然変異の主要な原因となっている。生体防御機構が、生体外に由来する微量の遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し、自然突然変異、自然発がんのレベルに毒性のレベルを抑制し「事実上の

閾値」を形成することが予想された。

(3) 遺伝毒性物質に対する生体防御機構の中で特に重要なのが、DNA 損傷部位を乗り越えて進む DNA 合成、すなわちトランスリージョン DNA 合成である。ヒトは 10 種類以上のトランスリージョン DNA 合成に関与する特別な DNA ポリメラーゼを持っており、これらの酵素が、DNA 付加体などにより進行が停止した複製型 DNA ポリメラーゼに代わって損傷部位での DNA 合成を行い、染色体全体の複製を継続し遺伝毒性の回避に貢献している。トランスリージョン DNA 合成は、DNA 上の損傷を修復する訳ではなく、損傷に基づく DNA 合成の停止を緩和することで遺伝毒性のリスクの抑制に貢献していると考えられているが、その詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝毒性に基づく致死作用の抑制に関わるトランスリージョン型 DNA ポリメラーゼの一つである DNA ポリメラーゼ (ゼータ) (以下 PolI と略) を遺伝的に改変したヒト細胞株およびマウスを作製し、遺伝毒性の閾値形成に対する PolI の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NaIm-6-MSH+株の樹立: ヒトリンパ芽球細胞 NaIm-6 は、安定な二倍体染色体構造と野生型の p53 遺伝子を有し、遺伝子ターゲット効率が高い特徴を持っている。NaIm-6 細胞の MSH2 遺伝子のエクソン 8 下流の欠失領域に、MSH2 のエクソン 9 から 16 に相当する cDNA を挿入し MSH2 の発現を回復させた。また TK 遺伝子の一方の座位に +1 フレームシフト変異を導入し、TK 遺伝子変異の検出を可能にした。ミスマッチ修復能を回復させ TK 遺伝子変異を検出するこの細胞株を、NaIm-6-MSH+株とした。

(2) Pol の DNA ポリメラーゼ活性を不活化あるいは減弱させたヒト細胞株の樹立：Pol の閾値形成に及ぼす影響を検討するため Pol 遺伝子 (*REV3*) をノックアウトした細胞株 (KO 株) 活性中心部に位置する 2781 番目と 2783 番目のアスパラギン酸をいずれもアラニンに置換し Pol の活性を不活化させた catalytically dead 細胞株 (CD 株) 2781 番目のアスパラギン酸のみをアスパラギンに置換し、DNA 合成活性を一部減弱させたノックイン細胞株 (D2781N 株) を樹立した。KO 株、CD 株は Nalm-6 細胞を基に樹立し、D2781N 株は Nalm-6-MSH+株を基に樹立した。

(3) Pol の DNA ポリメラーゼ活性の忠実度を低下させたヒト細胞株の樹立：酵母 Pol の 979 番目のロイシンをフェニルアラニンあるいはメチオニンに置換すると、DNA 合成時の忠実度が低下し、自然突然変異頻度および紫外線に対する変異感受性が上昇することが報告されている。この報告を基に、ヒト Pol の対応するアミノ酸 (2618 番目のロイシン) をフェニルアラニンあるいはメチオニンに置換したノックイン細胞株 (L2618F 株、L2618M 株) を、Nalm-6-MSH+株を用いて樹立した。

(4) *TK* 遺伝子突然変異、*in vitro* 小核試験：遺伝毒性物質に対する致死感受性は、Cell Counting Kit8 (同仁化学研究所) を用いて測定した。*TK* 遺伝子突然変異は trifluorothymidine に対する耐性を指標に検出した。*in vitro* 小核試験は、OECD テストガイドライン 487 に基づいて実施した。

(5) Pol を遺伝的に改変したノックインマウスの樹立：Pol の 2610 番目のロイシンをメチオニンに置換したノックインマウス (L2610M マウス) と 2771 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したノックインマウス (Y2771F マウス) の ES 細胞からキメラマウスを作出した。L2610M では Pol の DNA 合成の忠実度が低下し、Y2771F では DNA 合成活性が低下していると考えられる。F1 個体が得られた場合は、F1 同士を交配することでホモ体を作製し、変異検出用の *gpt delta* マウスと交配した。

ウス (Y2771F マウス) の ES 細胞からキメラマウスを作出した。L2610M では Pol の DNA 合成の忠実度が低下し、Y2771F では DNA 合成活性が低下していると考えられる。F1 個体が得られた場合は、F1 同士を交配することでホモ体を作製し、変異検出用の *gpt delta* マウスと交配した。

4. 研究成果

(1) ミスマッチ修復能を回復させたヒト細胞 Nalm-6-MSH+株の樹立：Nalm-6 細胞は高い遺伝子ターゲティング効率 (1-30%) を示し、点突然変異を導入してその生物学的効果を検討する上では最適な細胞株であるが、ミスマッチ修復活性が欠損しており、ゲノム不安定性を呈し、高い自然突然変異率を示す。Nalm-6 細胞のミスマッチ修復活性欠損の原因を究明するため comparative genome hybridization (CGH) array 解析を行い、二番染色体上の *MSH2* 遺伝子のエクソン 9 から 16 までが欠失していることを認めた。もう一方の二番染色体上の *MSH2* 遺伝子は完全に欠損していた。内因性のプロモーターから *MSH2* を発現させるため、*MSH2* 遺伝子のエクソン 9 から 16 に対応する cDNA を調製し、これを残存している *MSH2* 遺伝子のエクソン 8 の下流に導入して *MSH2* 遺伝子の発現を回復させた。*MSH2* の発現回復により、*MSH2* と複合体を形成する *MSH6* が安定化し、ミスマッチ修復活性が復元した。これにより自然突然変異頻度が顕著に低下した。ミスマッチ修復活性が復元しても、高い遺伝子ターゲティング効率に変化はなく、Nalm-6 細胞の高い遺伝子ターゲティング効率はミスマッチ修復活性の欠損に原因があるわけではないことが示唆された (PLOS ONE, e61189, 2013)。

(2) 遺伝毒性物質の致死作用に対する Pol の防護的役割：Pol が、どのような遺伝毒性物質の致死作用に対してヒト細胞を防

護しているかを明らかにするため、KO 株および CD 株を用いて 16 種類の遺伝毒性物質と紫外線 (UVC) に対する感受性を比較した。その結果、KO 株、CD 株ともに、benzo[a]pyrene dioloepoxide、4-nitroquinoline N-oxide、cisplatin、UVC などに感受性を示し、Pol が DNA 付加体や DNA 架橋部位のトランスリージョン DNA 合成に参与することが示唆された。KO 株、CD 株は、camptothecin、etoposide には感受性を示さなかったことから、Pol が DNA 鎖切断の修復に参与する可能性は低いと考えられる。また DNA 合成の忠実度が低下した L2618M 株は、benzo[a]pyrene dioloepoxide、UVC の変異作用に対して高い感受性を示した (論文投稿準備中)。

(3) Pol の閾値形成における役割 : KO 株および CD 株は、野生型株に比べて増殖が遅く、遺伝毒性試験には適していない。このため、部分的に DNA ポリメラーゼを減弱させた D2781N 株を作製し、DNA 合成の忠実度が低下した L2618M 株、野生型株の 3 株を用い、臭素酸カリウムに対する感受性を、TK 遺伝子突然変異、*in vitro* 小核試験を指標に検討した。その結果、D2781N 株は他の 2 株よりも高い感受性を示した。この結果から、Pol は酸化 DNA 損傷に基づく遺伝毒性の閾値形成において重要な役割を果たすことが示唆された (論文投稿準備中)。

(4) Pol を遺伝的に改変したノックインマウス : DNA 合成の忠実度が低下していると考えられる L2610M マウスについては、F1 が得られたのでホモ体を樹立し、さらに突然変異のレポーター遺伝子を有する *gpt delta* マウスと交配した。交配したマウスは、理化学研究所生物資源センター (理研 BRC) に寄託した。DNA ポリメラーゼ活性を減弱させた Y2771F マウスは、F1 が得られなかった。

(5) 総括 : ヒト細胞を用いて Pol の活性あるいは DNA 合成の忠実度を低下させた株を樹立し、さまざまな遺伝毒性物質に対する感受性を検討した。その結果、Pol は主に DNA 付加体のトランスリージョン DNA 合成に参与していることが示唆された。また酸化 DNA 損傷に基づく突然変異、小核形成に対しても防護的な役割を果たしており、これら遺伝毒性物質の閾値形成に深く参与している可能性が示唆された。Pol の DNA 合成の忠実度を低下させたノックインマウス (L2610M) は、*gpt delta* マウスと交配させ変異検出のレポーター遺伝子を導入した。Pol の活性を低下させたノックインマウス (Y2771F) は F1 が得られず、Pol の活性が生殖系においてきわめて重要な役割を果たしていることが示唆された。

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 46 件) 全て査読あり

A. Sassa, T. Suzuki, Y. Kanemaru, N. Niimi, H. Fujimoto, A. Katafuchi, P. Gruz, M. Yasui, R.C. Gupta, F. Johnson, T. Ohta, M. Honma, N. Adachi and T. Nohmi, *in vivo* evidence that phenylalanine 171 acts as a molecular brake for translesion DNA synthesis across benzo[a]pyrene DNA adducts by human DNA polymerase κ , DNA Repair, 15, 21-28 (2014)

DOI: 10.1016/j.dnarep.2013.12.008

T. Suzuki, A. Ukai, M. Honma, N. Adachi and T. Nohmi, Restoration of mismatch repair functions in human cell line NaIm-6, which has high efficiency for gene targeting, PLoS.One, 8, e61189 (2013)

DOI: 10.1371/journal.pone.0061189
M. Yamada, M. Shimizu, A. Katafuchi, P. Gruz, S. Fujii, Y. Usui, R.P. Fuchs and T. Nohmi, *Escherichia coli* DNA polymerase III is responsible for the high level of spontaneous mutations in *mutT* strains, *Mol. Microbiol.*, 86, 1364-1375 (2012)
DOI: 10.1111/mmi.12061
T. Nohmi, M. Yamada and K. Masumura, *in vivo* approaches to identify mutations and *in vitro* research to reveal underlying mechanisms of genotoxic thresholds, *Genes and Environ.*, 34, 146-152 (2012)
DOI: 10.3123/jemsge.34.146
T. Nohmi, M. Honma, M. Yamada, K. Masumura, M. Yasui, K. Horibata and S. Fukushima, 2nd International symposium on genotoxic and carcinogenic thresholds, *Genes and Environ.*, 34, 141-145 (2012)
DOI: 10.3123/jemsge.34.141
A. Sassa, N. Niimi, H. Fujimoto, A. Katafuchi, P. Gruz, M. Yasui, R. C. Gupta, F. Johnson, T. Ohta and T. Nohmi, Phenylalanine 171 is a molecular brake for translesion synthesis across benzo[a]pyrene-guanine adducts by human DNA polymerase kappa, *Mutat. Res.*, 718, 10-17 (2011)
DOI:10.1016/j.mrgentox.2010.11.002
N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi, Integration of *in vivo* genotoxicity and short-term carcinogenicity assays using F344 *gpt* delta transgenic rats: *in vivo*

mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene structural isomers, *Toxicol. Sci.*, 114, 71-78 (2010)

DOI: 10.1093/toxsci/kfp306

[学会発表](計 107 件)

T. Nohmi, Germ cell and somatic cell mutagenesis in *gpt* delta rodents, International Symposium on Germline Mutagenesis and Biodiversity, Fukuoka, Japan, March 21-22, 2014

T. Nohmi, T. Suzuki, K. Matsumoto and M. Honma, Introduction and roles of self-defense mechanisms in thresholds for genotoxic chemicals, 11th International Conference on Environmental Mutagens, Iguacu, Brazil, November 6, 2013

T. Nohmi, T. Suzuki, K. Matsumoto and M. Honma, DNA repair and translesion DNA synthesis as constituents of "threshold" of genotoxicity, The XIII International Congress of Toxicology, Seoul, Korea, July 3, 2013
T. Nohmi, DNA repair and translesion DNA synthesis as possible mechanisms underlying genotoxic thresholds, UKEMS, Swansea, UK, July 16-18, 2012 (July 17, 2012)

T. Nohmi, K. Masumura, P. Gruz, N. Toyoda-Hokaiwado, M. Takamune, N. Niimi, T. Suzuki, Y. Kanemaru, M. Yasui, M. Yamada, M. Honma, N. Adachi and A. Nishikawa, Genotoxic thresholds: identification of mutations *in vivo* and mechanistic studies *in vitro*, 2nd International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds, Tokyo,

November 23, 2011.

T. Nohmi, Transgenic *in vivo* genotoxicity assays: current status of *gpt* delta transgenic mice and rats, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能美 健彦 (NOHMI, Takehiko)

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・客員研究員

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・室長

研究者番号: 40291116

(平成 22~25 年度、分担研究者)

安井 学 (YASUI, Manabu)

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: 50435707

(平成 23 年度、分担研究者)

佐治(鈴木) 哲矢 (SAJI, SUZUKI, Tetsuya)

労働安全衛生総合研究所・健康障害予防研究部・研究員

研究者番号: 20573950

(平成 24 年度、25 年度、分担研究者)

(3) 連携研究者

豊田(外岩戸) 尚美 (TOYODA, HOKAIWADO, Naomi)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・非常勤職員

研究者番号: 70381853

(平成 22~25 年度、連携研究者)

グルーズ、ピーター (GRUZ, Petr)

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: 10321853

(平成 22 年度、23 年度、連携研究者)