

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22710068

研究課題名（和文）DNA 付加体 1 分子による遺伝子変異解析系の構築と閾値の存在の検証

研究課題名（英文）Development of a single DNA adduct-caused gene mutation assay as a model of low-dose exposure.

研究代表者

安井 学 (MANABU YASUI)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・主任研究員

研究者番号：50435707

研究成果の概要（和文）：低用量暴露の影響を解析するために、低用量域へ外挿する用量依存的な相関性を調べる古くからの手法に関して、我々は限界があると考えている。そこで、我々は低用量暴露のモデルとして、ヒトリンパ芽球細胞株 TSCER122（TK6 由来）のチミジンキナーゼ遺伝子のエキソン 5 内に DNA 付加体 1 分子を導入し、簡易に遺伝子変異誘発頻度を解析できる実験系を確立した。その結果、付加体が 1 分子でも DNA 上に形成すれば遺伝子変異が起きることを明らかにした。これは遺伝毒性発がん物質には閾値が無いという従来からのリスク評価法をサポートしている。しかしながら、この実験系は、DNA 修復機能が正しく働いていないなどの不明な点が多く、データの蓄積がさらに必要である。すなわち、閾値の存在を確認するには、DNA 修復遺伝子を改変させた細胞株を用いて、付加体 1 分子が起こす遺伝子変異誘発機構をさらに研究する必要がある。

研究成果の概要（英文）：Conventional technique of investigating an influence of low-dose exposure, commonly extrapolated from high-dose to low-dose region in Toxicology, is limited. Then, we have developed a new experimental system as a model of low-dose exposure, which can be used to determine the mutagenicity of synthetic DNA adducts at exon5 of thymidine kinase gene in human lymphoblastoid TSCER122 cells, derived from TK6 cell line. As a result, when an adduct forms at least one molecule on genomic DNA, it can cause gene mutation. The observation supports the idea that genotoxic carcinogens have no thresholds for the cancer risk. However, DNA repair functions in this experimental system do not work properly. In order to confirm the existence of threshold, it is necessary to study in detail the mechanisms of a single DNA adduct-caused gene mutation using TSCER122 cells knocked out DNA repair genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	0	1,100,000
2011 年度	900,000	0	900,000
2012 年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	0	3,000,000

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：環境解析学，放射線・化学物質影響科学

キーワード：トキシコロジー，DNA 付加体，閾値，放射線，遺伝毒性発がん物質，環境

1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷を介する遺伝毒性発がん物質には閾値が無いと考えられている。わずか1分子であってもDNA損傷(DNA付加体も含む)は、突然変異をもたらす変異を固定化させ、それは細胞から細胞へ、そして個体から個体へと伝播する不可逆的な性質を持つためである。これに対し、遺伝毒性発がん物質にも「事実上の閾値」が存在するという考え方があり。なぜなら、発がん物質が標的細胞に到達する前に解毒・排泄、代謝不活性化されたり、DNA損傷を形成させても、DNA修復やミュータント細胞のアポトーシスなどによって除去される可能性があるからである。実際に福島らは、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)の低用量域での肝発がん性を検証し、閾値の存在を示唆する実験データを得ている(Fukushima et al., *Jpn. J. Cancer Res.* **93**, 1076-7082, Hoshi et al., *Toxicol. Sci.* **81**, 273-279)。しかしながら、毒性が認められないMeIQx 0.01ppm暴露の低用量域において、MeIQxの付加体が 10^9 塩基に数個の頻度で検出(1細胞ゲノムに数個のレベル)されている事実があることから、我々は付加体1分子について追跡し、それがDNA修復あるいはアポトーシスによって、確実に除去されることを確認しなければ、本当に閾値が有るという証明にはならないと考えている。つまり、DNA付加体1分子を詳細に追跡できる実験系を用いて、閾値の存在を検証する必要がある。

そこで我々は、1分子の8-オキソ-7,8-ジヒドロ-2'-デオキシグアノシン(8-oxodG)付加体をヒトリンパ球細胞TK6のチミジンキナーゼ遺伝子(TK)のイントロン4に、部位特異的にゲノム導入させるtargeted mutagenesisという新しい手法(イントロン系)を最近確立している。本研究では、この手法を応用し、TKのエキソン5に付加体1分子を導入するtargeted mutagenesis(エキソン系)を試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、まずTKエキソン5に付加体1分子を導入し、復帰遺伝子突然変異解析系を構築する。次に、エキソン5の特定部位に導入された付加体1分子がDNA修復によって除去されることを追跡し、閾値の有無を検証・考察することである。最終目標として、閾値の形成機構を明らかにすることである。なお本研究は、遺伝毒性の閾値に関して取り組むもので、発がん性の閾値とは区別して考えることとする。

3. 研究の方法

(1) Targeted mutagenesis(エキソン系)の概

要

本系は、ヒトリンパ球細胞株TK6から構築したTSCER122細胞を用いる。この細胞は、TK6細胞のTKエキソン5を欠き(TK-/-)、その欠失部位にI-SceI認識配列18bp(5'-ATTACCCTGTTATCCCTA)を1つ持っている(図1)。その配列は、本来のヒトゲノムに無いため、その細胞にI-SceIを発現させるベクター(pCBASce)を導入すれば、I-SceI酵素の切断により、ゲノムの1ヶ所だけに二本鎖切断を形成させることができる。その切断部位では、DNA修復されやすくなっているため、そこに相同配列を持ち、且つ付加体を含むターゲティングベクターを導入すれば、相同組み換えにより、エキソン5と付加体が同時にゲノム内に入る(図1)。エキソン5配列の野生(WT)型5'-ATT(イソロイシン)の中央Tに、8-oxodGを入れた5'-AG⁸Tベクター(G⁸は8-oxodGを示す)をゲノムに導入したとき、8-oxodGはdCあるいはdAと塩基対形成するので、最終的に5'-AG⁸Tは、それぞれ変異(MT)型の5'-AGT(セリン)、あるいはWT型の5'-ATT(イソロイシン)としてDNA修復・複製される。つまり、8-oxodGが誤ってdAと塩基対形成したときだけ、TSCER122細胞はTK+になる。8-oxodG1分子のTK変異誘発頻度は、HAT選択培地でTK復帰細胞をカウントすることで算出される。このようにエキソン系は、WT配列に復帰させるように付加体の導入部位をデザインする必要がある。

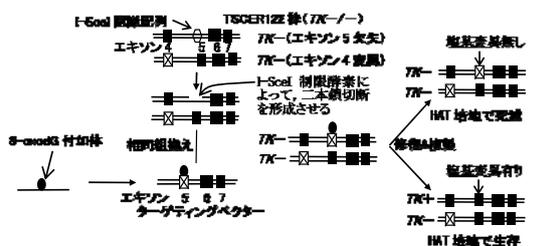


図1. Targeted mutagenesis(エキソン系)の概要

(2) 付加体を含むターゲティングベクターの構築

8-oxodG, 1,N⁶-エセノ-2'-デオキシアデノシン(edA),あるいは2'-デオキシキサンチン(dX)付加体を1分子含むDNAオリゴマー(43mer)は、シグマアルドリッチおよびつくばオリゴ株式会社から購入した。それを開始材料として、荒川らの方法(Arakawa, T. et al, *Anal. Biochem.* **416**, 211-217)に従って、付加体を含むターゲティングベクターを作製した。8-oxodG, edA, dX付加体の変異スペクトラムは、それぞれG→T(Shibutani et al., *Nature* **349**, 431-434), A→G(Basu et al.,

Biochemistry **32**, 12793-12801), そして G → A (Yasui et al., *J. Mol. Biol.*

344, 665-674) 一塩基変異がメジャーであることが報告されている。付加体の導入部位は、当研究室が有する TK6 細胞の TK 自然突然変異データベースの情報から決定した。

8-oxodG の導入部位は、エキソン 5 配列中の 5' -ATT (イソロイシン) の中央 dT (Exsys1 部位), edA 付加体の導入部位は 5' -AGG (アルギニン) の中央 dG (Exsys3 部位), そして, dX の導入部位は 5' -ACC (スレオニン) の dA (Exsys7 部位) であり, それぞれ pvEXO^{8dg}, pvEXO^{eda}, pvEXO^{dx} ターゲティングベクター (6.1kbp) を作製した。また, 各導入部位の陽性対象 (WT 型) と陰性対象 (MT 型) となるターゲティングベクターも同様の方法で作製した。なお, 各 Exsys の MT 型ターゲティングベクターの配列は, Exsys1 は 5' -AGT (セリン), Exsys3 は 5' -AAG (リジン), Exsys7 は 5' -GCC (アラニン) である。つまり, Exsys 部位ごとに陽性と陰性のコントロールベクターおよび付加体ベクター, 計 3 つのターゲティングベクターセットを用意し, TK 遺伝子変異の感受性について検討した。

(3) ゲノム導入と解析

細胞ゲノムへの導入は, Lonza 社製 Cell Line Nucleofector の手法に従って行った。5 x 10⁶ cells/100 μL に調整した TSCER122 細胞に, pCBASce 50 μg と pvEXO^{8dg} (あるいは pvEXO^{eda}, pvEXO^{dx}) ターゲティングベクター 2 μg を同時にトランスフェクションし, 75 cm² の培養フラスコで 3 日間培養 (37°C, 5% CO₂) した。次に, その細胞を 1~5 x 10³ cells/mL に適宜調整し, HAT 試薬を添加後, 96 穴プレートでさらに 2 週間培養することによって, TK 復帰細胞の頻度を決定した (Furth et al., *Anal. Biochem.* **110**, 1-8)。

(4) Exsys3 の検出感度の確認

A → G 塩基変異で TK 復帰する Exsys3 部位について, その変異頻度が 0, 10, 30, 100% 相当の WT 型ベクター (0, 0.2, 0.6, 2 μg) を MT 型ベクター (2, 1.8, 1.4, 0 μg) と混合 (計 2 μg) し, 上と同様の条件で実験を行った。WT ベクターの割合に対する TK 復帰頻度を解析した。

4. 研究成果

(1) TK 変異させる塩基部位の検討

WT 配列を持つ陽性対象ベクターと MT 配列を持つ陰性対象ベクターをゲノムに導入し, 各 Exsys の TK 復帰頻度を決定した。その結果, Exsys1 の WT 型と MT 型は, それぞれ 4.4 x 10⁻³, 6.3 x 10⁻⁴ であった (図 2)。WT 型は MT 型よりも 7.1 倍の TK 復帰頻度が得られた。これと同様の実験を Exsys3 と Exsys7 についても実施した結果, 15 倍 (WT 型 7.0 x 10⁻³/MT

型 4.7 x 10⁻⁴), 11 倍 (WT 型 4.6 x 10⁻³/MT 型 4.3 x 10⁻⁴) になった。

(2) 付加体のゲノム導入

次に, Exsys1 部位に 8-oxodG, Exsys3 部位に edA, Exsys7 部位に dX 付加体をそれぞれゲノム導入して調べた結果, それぞれの TK 復帰頻度は 6.3 x 10⁻⁴, 5.8 x 10⁻⁴, 1.4 x 10⁻³ になった。これら各値を, 各 Exsys の WT と MT から得られた値の差を 100% とし, 付加体の突然変異誘発頻度を算出すると, 8-oxodG はほとんど TK 変異を起こさず, edA は約 1.7%, dX は約 23% の頻度になることが分かった。

TK イントロン 4 のある部位に 8-oxodG, edA, および dX を導入して調べると, それぞれ 5.6% (G:C → T:A 変異), 7.6% (A:T → G:C 変異), および 20% (G:C → A:T 変異) の突然変異誘発頻度が観察されており, 前述の dX のエキソン系データはこれと一致した。8-oxodG と edA のデータが, イントロン系とエキソン系で一致しない原因としては, ①両付加体は 10% 以下程度の塩基変異しか起こせないで, エキソン系では検出できない可能性がある。②また, そもそも Exsys1 と 3 部位は TK 変異が起きにくい場所である可能性, ③あるいは, 生物学的にエキソンはイントロンよりも遺伝子変異が起きにくい (DNA 修復が効率的である) 可能性も予想できる。

そこで, ①の可能性を確かめるために, Exsys3 の検出感度を調べた (図 3)。WT ベクターの割合に対して, TK 復帰頻度は比例の関係であることが分かった。そして, MT ベクターに対する WT ベクターの割合が 10% の少量であっても, 検出可能であることが確認された。つまり, edA 付加体によって誘発する 7.6% の A → G 変異は, Exsys3 で検出できると考えられ, ①の可能性は否定できた。よって, 図 2 で示したように, edA から得られた TK 復帰頻度が, MT のそれと同程度の低い頻度しか得られない原因は, 前述の②や③の可能性が考えられる。

(3) 閾値の有無に関する考察

dX 付加体に関しては, イントロンおよびエキソン (Exsys7 部位のみ確認) のどちらでも TK 変異を誘発させることが分かった。しかし, edA 付加体の遺伝子変異誘発能はイントロンでは確認できたが, エキソン (Exsys3 部位のみ) ではできなかった。つまり, イントロン部位では edA を含めた 3 つの付加体すべてで遺伝子変異を誘発しているため, 閾値は無いと実験上言うことができる。一方, edA が TK エキソン (Exsys3 部位) に形成したとき, 塩基変異が起きないので, 閾値は有ると判定できる。以上のことから, 閾値の形成には複雑な遺伝子変異誘発機構が関与していること

が本研究によって明らかとなった。

もしかすると、“DNA 損傷が遺伝子のイントロンに形成した場合は閾値無し、エクソンに形成した場合もこれと原則として同様だが、DNA 修復の効率性が高い塩基部位の場合は閾値無し”のような考え方ができるかもしれない。少なくとも、閾値形成に重要な点は、DNA 損傷の量だけでなく、その形成部位であることを本研究データは示唆している。以上の疑問を解決するためには、付加体の修復遺伝子を改変させた TSCER122 細胞株を樹立し、本実験系を駆使することによって、付加体 1 分子が引き起こす遺伝子変異誘発の機構を今後明らかにする必要がある。

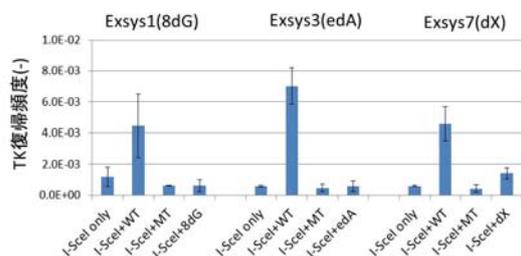


図 2. TK エクソン 5 に導入された付加体の突然変異誘発能

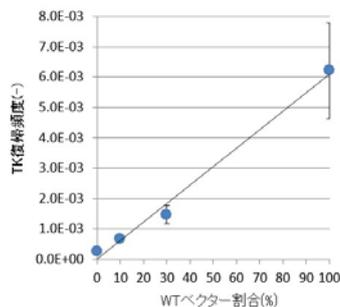


図 3. Exsys3 部位の検出感度

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 6 件)

- ① Sassa A, Kamoshita N, Matsuda T, Ishii Y, Kuraoka I, Nohmi T, Ohta T, Honma M, and Yasui M.; Miscoding properties of 8-chloro-2'-deoxyguanosine, a hypochlorous acid-induced DNA adduct, catalysed by human DNA polymerases. *Mutagenesis* **28**, 81-88 (2013) DOI: 10.1093/mutage/ges056
- ② Hakulinen P, Yamamoto A, Koyama N, Kumita W, Yasui M, and Honma M.; Induction of TK mutations in human lymphoblastoid TK6 cells by the rat

carcinogen

3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX). *Mutation Res.* **725**, 43-49 (2011) DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.07.004

- ③ Sassa A, Niimi N, Fujimoto H, Katafuchi A, Grúz P, Yasui M, Gupta RC, Johnson F, Ohta T, and Nohmi T.; Phenylalanine 171 is a molecular brake for translesion synthesis across benzo[a]pyrene-guanine adducts by human DNA polymerase kappa. *Mutation Res.* **718**, 10-17 (2011) DOI: 10.1016/j.mrgentox.2010.11.002
- ④ Koyama N, Yasui M, Kimura A, Takami S, Suzuki T, Masumura K, Nohmi T, Masuda S, Kinoshita N, Matsuda T, Imai T, and Honma M.; Acrylamide genotoxicity in young versus adult gpt delta male rats. *Mutagenesis* **26**, 545-549 (2011) DOI: 10.1093/mutage/ger014
- ⑤ Sassa A, Ohta T, Nohmi T, Honma M, and Yasui M.; Mutational specificities of brominated DNA adducts catalyzed by human DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* **406**, 679-686 (2011) DOI: 10.1016/j.jmb.2011.01.005.
- ⑥ Yasui M, Koyama N, Koizumi T, Senda-Murata K, Takashima Y, Hayashi M, Sugimoto K, and Honma M.; Live cell imaging of micronucleus formation and development. *Mutation Res.* **692**, 12-18 (2010) DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2010.07.009.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Sassa A, and Honma M; Mutation analysis of site-specific brominated DNA adducts located in the genome of human lymphoblastoid cells. Mammalian DNA Repair in Gordon Research Conferences (2013年2月), Ventura, USA
- ② 兼丸祐紀, 鴨下渚, 佐々彰, 本間正充, 安井学; ゲノムの特定部位に導入させたブロモ化DNA付加体の突然変異誘発能の解析. 日本環境変異原学会第41回大会 (2012年11月), 静岡市
- ③ 安井学, 鴨下渚, 本間正充; 極低線量暴露を想定した新しいDNA付加体1分子による遺伝子変異解析系の基礎的研究. 日本放射線影響学会第55回大会 (2012年9月), 仙台市
- ④ 安井学, 鴨下渚, 本間正充; ゲノムDNAに導入した1分子のDNA付加体の運命, 第34回日本分子生物学会年会 (2011年

- 12月), 横浜市
- ⑤ 安井学, 佐々彰, 鴨下渚, 松田知成, 太田敏博, 能美健彦, 本間正充; 8-クロログアニンDNA付加体を含むオリゴマーの構築とその誤塩基対形成機構に関する研究, 日本環境変異原学会第40回大会(2011年11月), 東京都
 - ⑥ 小山直己, 安井学, 木村葵, 高見成昭, 鈴木拓也, 増村健一, 能美健彦, 増田修一, 木苗直秀, 松田知成, 今井俊夫, 本間正充: gpt delta トランスジェニックラットを用いたライフステージ(週齢)を考慮したアクリルアミドの遺伝毒性評価, 第38回日本トキシコロジー学会学術年会(2011年7月), 横浜市
 - ⑦ Yasui M, Sassa A, Ohta T, Nohmi T, and Honma M; Miscoding properties of brominated DNA adducts catalyzed by human DNA polymerases. UKEMS / Dutch EMS-sponsored Workshop on Biomarker of Exposure and Oxidative DNA Damage (2011年3月), ミュンスター, ドイツ
 - ⑧ Sassa A, Ohta T, Nohmi T, Honma M, and Yasui M; Miscoding events during DNA synthesis past brominated DNA adducts. The 2nd Asian Conference of Environmental Mutagen (2010年12月), パタヤ, タイ
 - ⑨ 本間正充, 安井学, 堀端克良, 鈴木哲矢, 谷田貝丈夫; DNA2本鎖切断修復に対する低線量放射線等の環境ストレスの影響. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会(2010年12月), 横浜市
 - ⑩ 佐々彰, 太田敏博, 能美健彦, 本間正充, 安井学; 臭素化DNA付加体の誤塩基対形成機構. 日本環境変異原学会第39回大会(2010年11月), つくば市
 - ⑪ 安井学, 佐々彰, 鴨下渚, 太田敏博, 松田知成, 能美健彦, 本間正充; DNA付加体を含む修飾DNAオリゴマーの生化学的構築法の最適化. 日本環境変異原学会第39回大会(2010年11月), つくば市

[その他]

ホームページ等

<http://www.nihs.go.jp/dgm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 学 (MANABU YASUI)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・主任研究員

研究者番号：50435707

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

本間正充 (MASAMITSU HONMA)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・部長

研究者番号：30250179