

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 29 年 4 月 28 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 国立医薬品食品衛生研究所・病理部
 職 名 主任研究官
 申請代表者名 赤木純一
 研究代表者名 赤木純一

下記のとおり平成 28 年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:282005)

| | | | |
|------------------|---|-------------|--------------|
| 1. 共同利用研究 課題名 | ヒト細胞内損傷乗り越え複製アッセイを用いたアクリルアミド誘発突然変異に関わる TLS ポリメラーゼの解析 | | |
| 2. 共同利用研究 目的 | 食品の加熱調理で生成する発がん物質であるアクリルアミドにより誘発される突然変異の分子機構を明らかにするため、シャトルベクターを用いた部位特異的細胞内損傷乗り越え複製アッセイを用いてヒト細胞におけるアクリルアミド誘発 DNA 損傷の乗り越えや突然変異誘発、または抑制に関わる DNA ポリメラーゼを明らかにする。 | | |
| 3. 共同利用研究 期間 | 平成 28 年 7 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日 | | |
| 4. 共同利用研究組織 | | | |
| 氏 名 | 所属部局等 | 職名等 | 役割分担 |
| (研究代表者) 赤木純一 | 国立医薬品食品衛生研究所・病理部 | 研究員 | 研究全般の統括および推進 |
| (分担研究者) | | | |
| 5. センター内受入研究者 | 研究部門・ 分野名 | ゲノム機能制御研究分野 | 氏 名 横井雅幸 |

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:282005)

6. 共同利用研究計画

本研究ではヌクレオチド除去修復(NER)が欠損した色素性乾皮症(XP)患者由来細胞をベースとして、ゲノム編集により損傷乗り越え複製(TLS)において中心的な役割を果たすと考えられているDNAポリメラーゼ η (イータ)、 ι (イオタ)、 κ (カッパ)、 ζ (ゼータ)、およびREV1をノックアウトした細胞を作出する。これらの細胞に部位特異的にグリシドアミド(GA)付加体を組み込んだシャトルベクターをトランスフェクションして細胞内で複製させ、複製産物を解析することで突然変異に関与するTLSポリメラーゼおよびその関連因子を解析する。ただし、主要なGA付加体であるN7-GA-dGは脱塩基しやすいため、修飾塩基の糖部に2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノグアノシン(FdG)を用いた安定化アナログであるN7-GA-FdGを持つオリゴDNAを使用する。このオリゴの配列に合わせてシャトルベクターのクローニングサイトを改変した後、VCSM13ヘルパーファージを用いて一本鎖DNAを調製する。得られた一本鎖ベクターにN7-GA-FdGをアニールさせ、T4 DNAポリメラーゼとT4 DNAリガーゼを用いた相補鎖合成とライゲーションにより二本鎖DNAを作成し、CsCl超遠心により閉環状DNAを精製する。

7. 共同利用研究の成果

【細胞の作出】当初使用していたEdit-R CRISPR-Cas9ゲノム編集システムではゲノム編集が検出できなかったが、菅澤研究室の酒井恒助教授に教えていただいたGeneArtゲノム編集システムを用いたところ、Genomic Cleavage Detection Kitにより変異導入によるとみられるゲノムのcleavageが検出できた。引き続き変異細胞の作出を行っている。

【シャトルベクターの作成】N7-GA-FdGを持つオリゴDNA(Gca 30-mer)およびコントロールとしてFdGを持つオリゴDNA(Cont 30-mer)を、大阪大学大学院基礎工学研究科の岩井成憲教授との共同研究により作成した。このオリゴDNAの配列に合わせてpMTEXベクターのクローニングサイトを改変し、菅澤研のプロトコルを参考に一本鎖ベクターを調製した。Gca 30-merおよびCont 30-merの収量がそれぞれ0.32 nmol、0.39 nmolと微量だったため、非修飾の30 merオリゴDNAを用いて閉環状二本鎖DNAの作成効率を上げるための条件検討を行っている。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

- Jun-ichi Akagi, Masayuki Yokoi, Takeshi Toyoda, Young-Man Cho, Haruo Ohmori, Fumio Hanaoka, Kumiko Ogawa. Pol η , Pol ι , and Pol κ exhibit different genetic interactions to genotoxins of various mechanisms and the triple knockout cells are useful for screening of chemical genotoxicity. Gordon Research Seminar: Mutagenesis. 平成28年7月4,5日.
- Jun-ichi Akagi, Masayuki Yokoi, Takeshi Toyoda, Young-Man Cho, Haruo Ohmori, Fumio Hanaoka, Kumiko Ogawa. Pol η , Pol ι , and Pol κ exhibit different genetic interactions to genotoxins of various mechanisms and the triple knockout cells are useful for screening of chemical genotoxicity. Gordon Research Conference: Mutagenesis. 平成28年7月6-9日.
- 赤木純一, 横井雅幸, 豊田武士, 曹永晩, 西川秋佳, 大森治夫, 花岡文雄, 小川久美子. 損傷乗り越えDNAポリメラーゼ $\eta \cdot \iota \cdot \kappa$ 三重欠損細胞およびPol κ 欠損マウスの遺伝毒性物質曝露に対する応答. 第31回発癌病理研究会. 平成28年8月24日.
- 赤木純一, 横井雅幸, 豊田武士, Young-Man Cho, 花岡文雄, 小川久美子. Pol η , Pol ι , およびPol κ の欠損はさまざまな化学物質に対して異なる感受性を示し、遺伝毒性のスクリーニングに有用である. 第75回日本癌学会学術総会. 平成28年10月8日.
- Wataru Sakai, Aiko Kishimoto, Yuki Kaneko, Takeshi Matsui, Jun-ichi Akagi, Kaoru Sugawara. Functional impact of ubiquitin-proteasome system on UV-induced DNA damage response and repair. 10th 3R International Symposium. 平成28年11月14日.
- Jun-ichi Akagi, Masayuki Yokoi, Takeshi Toyoda, Young-Man Cho, Haruo Ohmori, Fumio Hanaoka, Kumiko Ogawa. Triple knockout mouse fibroblast cells defective for DNA polymerases η , ι , and κ exhibit hypersensitivity to various genotoxic agents and increased activation of DNA damage responses. 10th 3R International Symposium. 平成28年11月15日.
- 赤木純一, 横井雅幸, Young-Man Cho, 豊田武士, 大森治夫, 花岡文雄, 小川久美子. 損傷乗り越え型DNAポリメラーゼ $\eta \cdot \iota \cdot \kappa$ 三重欠損細胞は非代謝ベンゾ[a]ピレンに高感受性を示す. 第39回日本分子生物学会年会. 平成28年12月2日.
- 酒井亘, 岸本藍子, 金子雄貴, 松井豪志, 赤木純一, 菅澤薫. タンパク質分解系による紫外線誘発DNA損傷応答機構. 第39回日本分子生物学会年会. 平成28年12月2日.

9. 共同利用研究に関連した受賞, 博士学位論文の取得, 大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

- 若手研究(B) 細胞内損傷乗り越え複製アッセイを用いたアクリルアミド誘発遺伝毒性の分子機構の研究. 平成28年度-平成30年度, 研究代表者:赤木純一. 直接経費:3,100千円.