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 30 年 4 月 26 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
 研究代表者名 赤木純一

下記のとおり平成 29 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、シヤ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 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 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)	国立医薬品食品衛生研究所・病理部	主任研究官	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

【シャトルベクターを用いた細胞内 TLS アッセイ】

本研究計画ではアクリルアミドにより引き起こされる突然変異の誘発または抑制に関わる分子機構を明らかにすることを目的として、シャトルベクターを用いた部位特異的損傷乗り越え複製アッセイによりヒト細胞におけるアクリルアミド誘発突然変異を解析する。アクリルアミドの活性代謝産物であるグリシドアミド (GA) の付加体 N7-GA-dG は不安定で脱塩基しやすいため、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 を特定の位置の一つだけ持つシャトルベクターを作成し、ヌクレオチド除去修復 (NER) が欠損した XP4PA SV 細胞にトランスフェクションして細胞内で複製させ、複製産物を回収して TLS 効率及び変異スペクトラムを解析する。さらに、ゲノム編集により XP4PA SV 細胞の TLS ポリメラーゼをノックアウトした細胞株を作成し、これを用いてヒト細胞で GA 付加体の乗り越えに関与する TLS ポリメラーゼを明らかにする。

7. 共同利用研究の成果

【細胞の作出】 XP4PA SV 細胞由来の TLS ポリメラーゼ欠損株を作成するためゲノム編集を行ったところ、*POLK* については片側のアレルにフレームシフト変異を持つクローンが複数得られた。現在、その細胞に再度同じ gRNA をトランスフェクションして両アレル欠失細胞の作成を行っている。また *POLH* 欠損株についても作成を進めている。

【マウス細胞を用いた GA 付加体の TLS 解析】 N7-GA-FdG を持つオリゴ DNA、コントロールとして FdG を持つオリゴ DNA、及び無修飾の dG を持つオリゴを pMTEX-GA1 ベクターに組み込み、*Xpc*^{-/-}マウス由来胚性線維芽細胞 (MEF) にトランスフェクションして細胞内で複製させた。複製産物を回収して解析した結果、N7-GA-FdG の複製効率はコントロールと比べて約半分程度に低下しており、GA 付加体により DNA 複製が強く阻害されることが示唆された。一方で N7-GA-FdG の複製において塩基置換・欠失変異体の頻度はそれぞれ 1% 程度であったことから、GA 付加体による複製阻害を正確に乗り越える機構が存在すると考えられた。

【ヒト細胞内で複製可能なシャトルベクターの作成】

SV40 で不死化されたヒト細胞株で複製するシャトルベクターを作成するため、pMTEX-GA1 ベクターのポリオーマオリジンとポリオーマ T 抗原を SV40 オリジンに置換したベクターを作成した。このベクターの一本鎖 DNA を作成し、無修飾の dG を持つ 30-mer のオリゴヌクレオチドを組み込んで XP4PASV 細胞にトランスフェクションした。細胞から回収したプラスミドを DpnI で処理した後、大腸菌を形質転換可能であったことから、このベクターが細胞内で複製されることを確認した。引き続き、このベクターを用いて XP4PASV 細胞における N7-GA-FdG の TLS の解析を行っている。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

学会発表

- **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 イータ・イオタ・カッパ三重欠損細胞を用いた新規遺伝毒性試験法の研究. 第3回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2017.9.16 優秀発表賞受賞
- **赤木純一**、Young-Man Cho、豊田武士、水田保子、横井雅幸、花岡文雄、大森治夫、小川久美子. ベンゾ[a]ピレン混餌投与によるマウス前胃腫瘍発生に対する Pol κ の寄与. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 2017.12.7.
- **赤木純一**、Young-Man Cho、豊田武士、水田保子、横井雅幸、大森治夫、花岡文雄、小川久美子. ベンゾ[a]ピレン誘発発がんに対する Pol κ の寄与の解析. 日本薬学会第 138 年会. 2018.3.27.

論文発表

- **Akagi J**, Yokoi M, Cho YM, Toyoda T, Ohmori H, Hanaoka F, Ogawa K. Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases η , ι and κ to various genotoxic compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening. *DNA Repair* (2018) 61, 76-85.

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.