

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

令和元年 5月 7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30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、精製酵素を用いた生化学的解析と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により、ヒト細胞において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 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 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6~9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6~9の項目全体では1頁に収めて下さい。

## 6. 共同利用研究計画

食品に含まれる発がん物質であるアクリルアミドは生体内で CYP2E1 によりグリシドアミド(GA)に代謝され、主に dG の N7 位に付加体(GA<sup>7</sup>dG)を形成する。dG の N7 位アルキル化体である GA<sup>7</sup>dG は不安定であり容易に脱塩基するため、GA<sup>7</sup>dG がアクリルアミドの遺伝毒性・突然変異原性にどのように寄与するかは明らかになっていない。そこで本研究計画では GA<sup>7</sup>dG の安定化アナログを作成し、精製 DNA ポリメラーゼと基質 DNA を用いた *in vitro* 損傷 DNA 乗り越え合成(TLS)アッセイ、およびシヤトルベクターを用いた細胞内 TLS 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の分子機構を解析する。

【*In vitro* TLS アッセイ】これまでの研究で作成した、糖部を 2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノグアノシン(FdG)に置換した安定化アナログ(GA<sup>7</sup>FdG)を 16 塩基目に持つ 30 塩基長のオリゴ DNA を鋳型 DNA として用いて、5'末端を  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP で標識した 15 塩基長のプライマーとアニールさせ、DNA 伸長反応の基質とする。これに精製 DNA ポリメラーゼ(Pol $\eta$  [イータ]、Pol $\iota$  [イオタ]、Pol $\kappa$  [カッパ]、REV1、Pol $\zeta$  [ゼータ]および Pol $\epsilon$  [イプシロン])と dNTP を加えて反応させ、GA<sup>7</sup>FdG の TLS 活性を持つ DNA ポリメラーゼを明らかにする。本アッセイは神戸大学研究基盤センターアイトープ部門の設備を利用して横井准教授と共同で実施する。

【細胞内 TLS アッセイ】SV40 複製起点を持つシヤトルベクターの片側の鎖に GA<sup>7</sup>FdG を組み込み、細胞内 TLS アッセイの基質を作成する。GA<sup>7</sup>FdG の反対側の鎖には制限酵素 *SmiI* の認識部位となる 3 塩基のミスマッチがあり、細胞から回収したプラスミドを *SmiI* で処理すると、損傷を乗り越えて複製された産物を識別することができる。ミスマッチ上の GA<sup>7</sup>FdG はヌクレオチド除去修復(NER)により除去されることが予備的な検討により明らかになっているため、NER を欠損した色素性乾皮症患者由来細胞株(XP4PASV)にトランスフェクションして細胞内で複製させ、GA<sup>7</sup>FdG によりヒト細胞内で DNA 複製阻害および突然変異が誘発されるかどうか検討する。さらに、ゲノム編集により特定の DNA ポリメラーゼをノックアウトした細胞を作出して同様の実験を行い、GA<sup>7</sup>FdG の TLS および突然変異誘発に関与する DNA ポリメラーゼおよびその関連因子を解析する。

## 7. 共同利用研究の成果

*In vitro* TLS アッセイでは、複製型 DNA ポリメラーゼである Pol $\epsilon$  の DNA 合成活性は鋳型 DNA 上の GA<sup>7</sup>FdG により著しく阻害された。さらに、本研究で用いた TLS ポリメラーゼ(Pol $\eta$ 、Pol $\iota$ 、Pol $\kappa$ 、REV1、Pol $\zeta$ )のいずれも GA<sup>7</sup>FdG により著しく阻害され、単独で GA<sup>7</sup>FdG を乗り越える活性を持つ DNA ポリメラーゼは見られなかった。これらの結果から、GA<sup>7</sup>dG は DNA 合成を強く阻害することが示された。細胞内 TLS アッセイでは、XP4PASV 細胞内における GA<sup>7</sup>FdG 鎖の複製効率は損傷のないコントロールベクターと比べて半分程度であった。また、GA<sup>7</sup>FdG に対して T、A または C を重合した塩基置換変異および 1 塩基欠失が見られた。これらの結果から、ヒト細胞内において GA<sup>7</sup>dG が複製阻害と点突然変異を誘発することが示された。ゲノム編集により Pol $\kappa$  をノックアウトした XP4PASV/*POLK*<sup>-/-</sup>細胞を作成し、同様のアッセイを行ったところ、GA<sup>7</sup>FdG 鎖の複製効率は XP4PASV と同程度であった。さらに Pol $\zeta$  の活性サブユニットである REV3L のノックアウト細胞の作出を試みたところ、得られたクローンの多くがモノアレルの欠失変異体であり、両アレル変異体はすべて *in-frame* 欠失変異であったことから、NER 欠損バックグラウンドにおける REV3L の両アレル欠損は細胞の生存に重大な影響を及ぼす可能性が考えられた。今後、他の TLS ポリメラーゼについても欠損細胞を作成し、細胞内で GA<sup>7</sup>FdG の TLS を行うポリメラーゼの解析を行う予定である。本共同研究で得られた成果をもとにさらに研究を進展させるために横井准教授と共同で平成 31 年度科学研究費助成事業に応募し、採択された。

## 8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

- [Jun-ichi Akagi](#), Young-Man Cho, Takeshi Toyoda, [Masayuki Yokoi](#), Fumio Hanaoka, Haruo Ohmori, Kumiko Ogawa. Effect of Polk deficiency on benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis. 5<sup>th</sup> DNA Polymerases meeting, 2018 年 9 月 23-26 日, オランダ・ライデン
- [Jun-ichi Akagi](#), Young-Man Cho, Takeshi Toyoda, [Masayuki Yokoi](#), Fumio Hanaoka, Haruo Ohmori, Kumiko Ogawa. Benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis in Polk-knockout mice. 3R&3C Symposium, 2018 年 11 月 12-16 日, 金沢
- [赤木純一](#), [横井雅幸](#), Young-Man Cho, 岩井成憲, 花岡文雄, 小川久美子. N7 グリシドアミド dG 付加体は哺乳類細胞において DNA 複製を阻害する. 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年 11 月 28 日, 神戸
- [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. C57BL/6J 野生型および Polk 欠損マウスにおけるベンゾ[a]ピレンおよび  $\alpha$ -ナフトフラボン併用投与の効果. 第 35 回日本毒性病理学会学術集会, 2019 年 1 月 31 日, 東京

## 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。

科学研究費助成事業(基盤(C)) 損傷乗り越え DNA 合成を介したアクリルアミド誘発突然変異の分子機構の解析 2019 年 4 月 - 2022 年 3 月 研究代表者: [赤木純一](#), 分担研究者: [横井雅幸](#)