

称号及び氏名	博士（理学） 澤井 知子
学位授与の日付	平成21年 3月31日
論文名	「A study on mutagenesis due to translesion DNA synthesis across 4-aminobiphenyl adducts in human cells. (アミノビフェニルDNA付加体の損傷乗り越えDNA合成を介した突然変異誘発の研究)」
論文審査委員	主査 八木 孝司 副査 原 正之 副査 児玉 靖司

論文要旨

序論

損傷乗り越え DNA 合成と変異誘発

環境中に存在する多環芳香族炭化水素は DNA の塩基に付加体を生じさせる。付加体の多くは DNA 修復機構によって取り除かれるが、付加体を持つ DNA が複製されると細胞死や突然変異を引き起こし、発がんの原因になると考えられている。近年、DNA 損傷を乗り越えて DNA 合成 (translesion DNA synthesis: TLS と略) を行うポリメラーゼが発見され、誤りがちな複製によって突然変異を生じさせることがわかった。誘導される TLS ポリメラーゼによっては付加体に対し誤った塩基を挿入して突然変異生じさせることがある。例えば、ベンツピレンの DNA 付加体の場合、Pol κ は正しい塩基を挿入するが、Pol η は誤った塩基を挿入する。このように変異原の人体影響を知る上で DNA の損傷とそれを TLS するポリメラーゼの解明は重要である。本研究では、4-aminobiphenyl (ABP) の DNA 付加体を一分子含むプラスミドをヒト細胞内で複製させて、付加体乗り越え TLS 率および TLS を介した突然変異誘発率 (塩基変化率) を算出する *in vivo* TLS アッセイ法を確立した。

4-aminobiphenyl の p53 変異スポットにおける付加体形成

ABP は化石燃料の燃焼で生成され、染料としても広く工業的に使用されていたが、膀胱癌を引き起こすことが示唆され、現在では工業使用が禁止されている。また、ABP はたばこ煙中にも検出されており、喫煙者、非喫煙者の間で、尿中から検出される ABP DNA 付加体の量に差があることが示されている。

変異誘発についてはヒト細胞中で ABP 付加体による変異を調べた実験はなく、付加体の変異を誘導する過程は明らかにされていない。最近になって ABP の p53 遺伝子上の結合ホットスポットと膀胱癌細胞の p53 変異ホットスポットがよく一致することが報告され、ABP の膀胱癌への寄与が強く示唆されている。そこで本研究では次に述べる3つを目的とした。第一章ではヒト細胞を用いた *in vivo* の TLS アッセイ系の確立を目的とし、第二章では ABP 付加体の TLS 率および突然変異率の測定と付加体周辺配列の突然変異特異性を解明することを目

的とし、第三章では polη の過剰発現ヒト細胞を作製し、この細胞をアッセイに用いて polη の dG-ABP 変異誘発への関わりを調べることを目的とした。

第一章 ヒト細胞を用いた in vivo の TLS アッセイ系の確立

<実験方法> 神奈川工科大学の高村准教授の協力により合成した dG-ABP 付加体 (dG-C8-ABP) を用い、この付加体を含むプラスミドを作製した。このプラスミドは *LacZ* 遺伝子中に挿入された *p53* 遺伝子コドン 248、249 周辺配列に 1 箇所だけに付加体を持ち、付加体の反対側には 2 塩基のふくらみを持つ。プラスミドは SV40 の複製 origin と T 抗原の遺伝子をあらかじめ導入してあり、ヒト細胞中で複製が可能である。2 塩基のふくらみはこのプラスミドが複製されたとき、どちらの鎖を複製したかを区別する標識となる。このプラスミドをヒト細胞に導入し複製させた。細胞はヌクレオチド除去修復による付加体の切り出しを防ぐため色素性乾皮症 D 群患者の繊維芽細胞から樹立された細胞株 XP6BE (SV40) を用いた。48 時間培養後、細胞からプラスミドを回収し、制限酵素 *Dpn I* で鑄型プラスミドを切断した。次にプラスミドを大腸菌 (DH5・) に導入しコロニーの青白で DNA 付加体部位の TLS を解析した。付加体箇所で TLS が起こっていると *LacZ* 遺伝子の読み枠が正しくコロニーは青になる。出現した全コロニーの内、青色コロニーが占める割合から TLS 率を算出した。さらに青色のコロニーからプラスミドを抽出し、塩基配列を決定して付加体の反対側にどの塩基が対合したかを明らかにした。

<結果と考察> 非修飾プラスミドで TLS アッセイを行った場合 DNA の 2 本鎖が同様に複製されるため理論上青色コロニーの割合は 50%になることが予想されたが、実際には 43%であった。ABP 修飾プラスミドでアッセイを行った場合は、青色コロニーの割合はわずか 4%であった。TLS 率は ABP 修飾プラスミドの青色コロニー率 (4%) を非修飾プラスミドの青色コロニー率 (43%) で割って算出する。その結果、dG-ABP の TLS 率は 9%となった。次に dG-ABP を TLS した際に生じる突然変異の頻度を求めた。その結果、TLS あたりの変異は 30%となった。

以上の結果より、我々のアッセイによってヒト細胞内での TLS 率および変異頻度の測定が可能ながわかった。

第二章 dG-ABP の TLS とその配列特異性

第一章でアッセイに用いたプラスミドは、*p53* 遺伝子の変異ホットスポットでかつ ABP の結合ホットスポットでもある箇所 (コドン 248) に dG-ABP を配置するよう設計した。第 2 章では、さらにどちらのホットスポットでもない配列 (コドン 249) に dG-ABP を配置したプラスミドを加えて解析した。

<実験方法> 第一章と同様にして dG-ABP (dG-C8-ABP) を *p53* のコドン 249 に配置するようアッセイ用プラスミドを作製した。このプラスミドと第一章で述べたコドン 248 に付加体を持つプラスミドをそれぞれ、色素性乾皮症 A 群患者の繊維芽細胞から樹立された細胞株 XP20S (SV) に導入し TLS の解析を行った。XP20S (SV) はヌクレオチド除去修復機構が完全に欠損しており、XP6BE (SV) より適すると考えた。

<結果と考察> XP20S (SV) 細胞において、dG-ABP がコドン 248 にある場合 TLS 率は 36%であり、強い DNA 合成阻害が見られた。TLS されたプラスミドのうち 4%に変異を生じていた。変異のパターンは G→T が最も多く、第一章の結果と同じ傾向が見られた。コドン 249 では TLS 率は 77%であり、強い DNA 合成阻害は見られなかった。また、変異誘発も 1%と低くなることがわかった。

このように dG-ABP の TLS は周辺配列に大きく影響を受けることがわかった。したがって膀胱癌細胞で観察される変異ホットスポットの分布は、付加体生成の配列特異性だけでなく TLS の配列特異性にも依存することが推測される。TLS の配列特異性は CpG サイトやラン配列

でフレームシフトを生じるものについては報告が多いが、それ以外の配列特異的 TLS については報告が少なく、一本鎖 DNA の作る二次構造や付加体が形成された場合の DNA 高次構造の違いにより生じる可能性が論じられているが、現在のところ原因ははっきりとはわからない。

第三章 Pol η による dG-ABP TLS の特性

ベンツピレン DNA 付加体の TLS では、Pol κ と、Pol \cdot で挿入する塩基が異なると報告されている。そこで、dG-ABP を TLS するポリメラーゼを調べるため、主要な TLS ポリメラーゼである Pol κ と Pol \cdot の過剰発現細胞株を樹立し、この細胞中での ABP 付加体の TLS 率および突然変異率の測定を行うことを目的とした。

<実験方法> 大阪大学の花岡教授（現学習院大学）から供与された Pol \cdot cDNA をヒト細胞内で発現させるため CMV プロモーターを持つベクター（pCMV script）に挿入した。構築した発現ベクターを XP20S(SV)細胞に導入し選択マーカー（Geneticin）により分離を行った後、リアルタイム PCR とウェスタンブロッティングにより pol \cdot の発現上昇を確認した。作成した過剰発現細胞に前述の TLS アッセイプラスミド（コドン 248、コドン 249）を導入し、TLS 解析を行った。Pol κ については発現ベクターを導入したが過剰発現株を得ることができなかった。

<結果と考察> コドン 248 においては、TLS 率は Pol \cdot の過剰発現によって上昇することが予想されたが、実際には非過剰発現細胞の 1/2 以下（17%）であった。変異率は 31%と、非過剰発現細胞の 8 倍の上昇になった。変異のパターンは非過剰発現細胞同様 G \rightarrow T が最も多く見られたが、非過剰発現細胞で見られなかった G \rightarrow A も多く見られた。G \rightarrow A は膀胱癌細胞の p53 遺伝子上で最も多く生じている変異であり、これらの変異に Pol \cdot が関わっている可能性が示唆された。一方、コドン 249 では DNA 合成阻害は非過剰発現細胞（XP20S(SV)）と同様、ほとんど生じず、dG-ABP がコドン 249 においては DNA 合成を阻害しないことが示された。

<総括> これまで多くの TLS 研究が *in vitro* で行われてきたが *in vivo* TLS 研究は数が少なく、ヒト細胞を用いたものは国内では本研究が唯一である。現在の TLS 研究では、ユビキチン化による TLS スイッチ機構が発見され、複数の TLS ポリメラーゼの誘導が PCNA を介し巧妙に調節されていることがわかってきている。また、TLS は DNA のクロマチン構造にも影響を受けるが、*in vitro* TLS 研究ではこのような影響を知ることは困難であり、DNA 付加体の変異誘発能を調べるためには *in vitro*・*in vivo* TLS 研究の結果を合わせて分析することが必要である。本研究結果で最も興味深いのは TLS の配列特異性であり、配列に依存した TLS を調べることにより新たな TLS ポリメラーゼの特性が解明されるかもしれない。また、dG-ABP のヒト細胞における変異誘発の特性を定量的に調べた報告はなく、本研究を進展させることにより、アミノビフェニルの発がん機構の解明につながるかもしれない。

審査結果の要旨

学位論文審査委員は申請者より提出された学位申請論文を検討し、その内容が最新の分子生物学的手法を用いた、質・量共にレベルの高い研究であると判断した。さらに 2009 年 2 月 23 日に、論文内容についての公聴会を開催し、質疑応答を約 30 分行なった。申請内容について審議を行なった結果、博士の学位を授与するに値すると最終的に判断した。

これまで DNA 損傷の乗り越え DNA 合成 (TLS) による突然変異形成機構の研究は無細胞系を用いた研究が主であり、それによって得られた結果が実際の細胞内での機構を反映しているかどうか疑問であった。申請者はヒト培養細胞を用いた独自の TLS アッセイ系を樹立し、4-アミノビフェニル付加体をモデル DNA 損傷として突然変異頻度を測定し、このアッセイ系が有効であることを示した。申請者はこのアッセイ系を用いて、がんの p53 遺伝子の突然変異ホットスポットがなぜ生じるかという、この研究分野における長年の疑問に 1 つの答えを与えた。また本研究では、種々の TLS ポリメラーゼの欠損細胞を樹立してさらなる実験を行ない、変異に関わる TLS ポリメラーゼの同定にまでつなげると、さらに研究が発展する可能性を示した。この研究の一部は Genes & Environment 誌に受理され、現在印刷中である。

本論文は博士の学位を与えるに足る高い内容であると判断した。