

## 遺伝毒性試験の新機軸—DNA 損傷、突然変異、染色体—

Innovation of genotoxicity tests—DNA damage, Mutation, Chromosome—

松田 知成 (MATSUDA TOMONARI)

京都大学・大学院工学研究科・准教授



### 研究の概要

遺伝毒性試験は、化学物質の安全性評価において重要である。本研究では、化学物質の毒性メカニズムを判定しうる次世代型の遺伝毒性試験の開発をめざしている。DNA 損傷を直接測定する DNA アダクトーム法、表現型によらない突然変異検出法の開発、染色体異常誘発の分子ターゲット探索法の開発を行っている。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：遺伝毒性試験、人体有害物質

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝毒性とは、生物の遺伝情報に悪影響を与えることであり、発癌や催奇形性と関連している。遺伝毒性試験のデータは化学物質の安全性評価において特に重視される。しかし、現在行われている遺伝毒性試験の多くは表現型を観察することにとどまっており、間違った判定をすることも多い。そこで、最新の分析技術を駆使したメカニズム解明型の遺伝毒性試験の開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、①DNA の損傷を LC/MS/MS で直接検出する DNA アダクトーム法、②表現型によらない変異原性試験、③染色体異常誘発の分子ターゲット探索法、などの新しい遺伝毒性試験を開発する。また、これらの手法を数種類の化学物質に適用し、遺伝毒性判定の手順を提案する。

### 3. 研究の方法

上記の①では、最新鋭の LC/MS/MS を導入し、手法の高感度化、迅速化を達成する。②では、次世代 DNA シーケンサーを用いる方法や、一分子リアルタイム DNA シーケンサーを用いる変異原試験の開発に取り組む。③では染色体関連タンパク質の複合体解析を行い、染色体異常にかかわるメカニズム研究を展開するとともに、化学物質による染色体異常誘発の分子ターゲットを体系的に解析する手法を開発する。

### 4. これまでの成果

#### DNA アダクトーム法の実用化

最新の LC/MS/MS を導入し、プロトコールを見直すことにより、大幅な感度の向上と、分析時間の短縮を達成した。一方、遺伝毒性試験への適用研究、分子疫学研究、未知 DNA 付加体の同定研究などを展開した。

#### 表現型によらない突然変異検出法の開発

エームス試験は、サルモネラ菌を用いる簡便な変異原性試験であり、現在でも広く使われている。この方法の欠点は検出できる変異の種類に限られることである。そこで、我々は、サルモネラ菌を変異原物質に暴露したのち、コロニーをいくつか単離して、次世代 DNA シーケンサーを用いて全ゲノムをシーケンスし、突然変異を検出するという方法を提案した。この方法は変異スペクトルのバイアスを考えなくてもよいので変異原性を正確に判定することが可能になる。

#### DNA 損傷応答可視化細胞を用いた遺伝毒性試験の開発

DNA 損傷の指標としてヒストン H2AX（ヒストンバリエーションの一種）のリン酸化が注目されている。我々はリン酸化された H2AX に特異的に結合する MDC1 というタンパク質に GFP をつなぎ、DNA 損傷応答を簡便に、しかもリアルタイムで検出できるようにした。

### ヒストンアセチル化の分子機構の解明

化学物質が DNA 損傷を介さずに染色体異常を引き起こすメカニズムとして特に細胞周期チェックポイントが重要である。様々なチェックポイント機構があるが、まず、「DNA 損傷応答チェックポイント」に関する研究から進めている。細胞内の DNA は自発的に酸化損傷、脱アミノ化、脱塩基などの損傷を受けるが、「DNA 損傷応答チェックポイント」がおかしくなると、これらを修復しないまま細胞分裂して染色体異常が起きる。

研究分担者の井倉は DNA 損傷応答において、損傷領域のヒストン H2AX のアセチル化が引き金になり、染色体の構造変換に重要なヒストン H4 のアセチル化を誘発するメカニズムを明らかにしてきた。

また、今回我々は、ヒストンのアセチル化に必要なアセチル CoA を核に供給する新しい仕組みを明らかにした。アセチル CoA は従来ミトコンドリアで合成されると考えられていたが、我々はピルビン酸キナーゼ M2 とピルビン酸デヒドロゲナーゼが、転写因子とともに遺伝子プロモーター領域に集まり、核内における必要な場所とタイミングでアセチル CoA を生産していることを発見した。

### 生体分子ネットワークの定量解析法の開発

遺伝毒性物質のターゲットを突き止めるためには、複雑な生体分子ネットワークにアプローチする必要があり、このためには主要な生体分子について正確に定量する必要がある。タンパク質キナーゼのネットワークは特に重要である。研究分担者の足立は ATP と結合するキナーゼを濃縮し、活性化しているキナーゼのみを効率的にプロテオーム解析する新しい手法を開発した。

また、研究代表者は MRM (きわめて高感度かつ定量的な質量分析法) による定量的プロテオーム系を構築するため、細胞分裂、DNA 修復、細胞死、中心代謝経路などにかかわる約 500 種類のタンパク質を感度よく測定できるペプチド配列を選別し、内部標準ペプチドを合成し、分析系の開発を進めている。

ヒストンについては別途、リン酸化、アセチル化、メチル化 (モノ、ジ、トリ) などの修飾パターンをできる限り網羅的に検出する内部標準ペプチドを合成した。今後これら強力な定量法を用いて、DNA 損傷を介さない染色体異常誘発メカニズムにアプローチしていく。

### 5. 今後の計画

一分子リアルタイム DNA シーケンサーを用いる変異原性試験の開発については、26 年度早々にパイロット実験に取り掛かり、解析法を完成させる。

DNA 修復チェックポイントおよびスピンドルチェックポイントに関連するタンパク質の選択的阻害剤が染色体異常を引き起こすかどうかチェックし、これらを暴露した細胞において「活性化タンパクキナーゼの網羅的定量解析」、「MRM を用いたタンパク質の網羅的定量解析」、「ヒストン修飾の網羅的定量解析」を行い、細胞内のタンパク質の挙動を正確かつ網羅的に数値化する。これをパターン認識問題にうまく落とし込み、既知の選択的阻害剤によるタンパク質の挙動を練習セットとした教師付機械学習により、染色体異常誘発の分子メカニズムを分類する。

### 6. これまでの発表論文

- 1) Matsuda, S., Matsuda, T. et al. (2014) An easy-to-use genotoxicity assay using EGFP-MDC1-expressing human cells, *Genes and Environment* 36, 17-28
- 2) Matsuda, T., et al. (2013) A Pilot Study for the Mutation Assay Using a High-throughput DNA Sequencer, *Genes and Environment* 35, 53-56.
- 3) Ogawa, M., Matsuda, T. et al. (2013) DNA Damage in Rheumatoid Arthritis: An Age-Dependent Increase in the Lipid Peroxidation-Derived DNA Adduct, Heptanone-Etheno-2'-Deoxycytidine, *Autoimmune Diseases* 2013, 183487.
- 4) Matsuda, T., et al. (2013) Lipid peroxidation-induced DNA adducts in human gastric mucosa, *Carcinogenesis* 34, 121-127.
- 5) Kawai, K., Matsuda, T. et al. (2013) Identification of Octenal-Related dA and dC Adducts Formed by Reactions with a Hemin-omega-6-fat Peroxidation Model System, *Chem Res Toxicol* 26, 1554-1560.
- 6) Yukawa, Y., Matsuda, T. et al. (2012) Combination of ADH1B\*2/ALDH2\*2 polymorphisms alters acetaldehyde-derived DNA damage in the blood of Japanese alcoholics, *Cancer Sci* 103, 1651-1655.
- 7) Matsuda, S., Matsuda, T. et al. (2011) Genotoxicity of colloidal fullerene C60, *Environ Sci Technol* 45, 4133-4138.