



gpt deltaラットを用いた オクラトキシンAの欠失変異誘発メカニズムの解明

○黒田 顕¹⁾、渡辺麻衣子²⁾、日比大介¹⁾、石井雄二¹⁾、高須伸二¹⁾、木島綾希¹⁾、松下幸平¹⁾、
能美健彦³⁾、小川久美子¹⁾、小西良子²⁾、梅村隆志¹⁾
(国立医薬品食品衛生研究所 ¹⁾病理部、²⁾衛生微生物部、³⁾安全性生物試験研究センター)

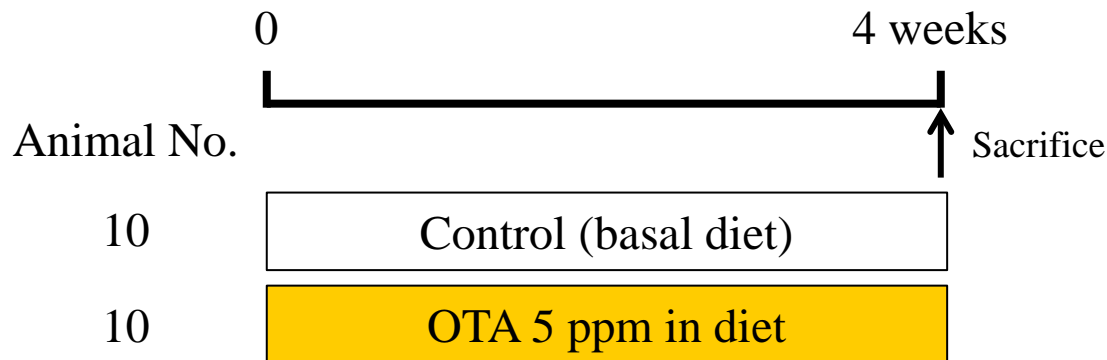
背景および目的

我々はこれまでに、発がん用量のオクラトキシンA(OTA)を *gpt delta*ラットに4週間混餌投与した結果、発がん標的的部位である腎臓髓質外帯において、欠失変異を示唆するSpi⁻変異頻度が増加することを明らかにした。欠失変異はDNA損傷が修復される過程で生じると考えられており、DNA損傷の種類によって異なるパターンの欠失変異が起こることが示唆されている。

そこで本研究では、OTA誘発欠失変異の発生メカニズムの解明を目的として、実験1では、発がん用量のOTAを *gpt delta*ラットに投与して得られたSpi⁻変異体について、欠失変異スペクトラム解析を実施した。実験2では、同ラットに種々の濃度のOTAを投与後、DNA損傷を検出するコメットアッセイおよびDNA損傷・修復関連分子のmRNAあるいはタンパク質発現解析を実施し、DNA損傷と欠失変異誘発との関連性を解析した。

方法

実験1: 発がん用量のOTAを*gpt delta*ラットに4週間混餌投与

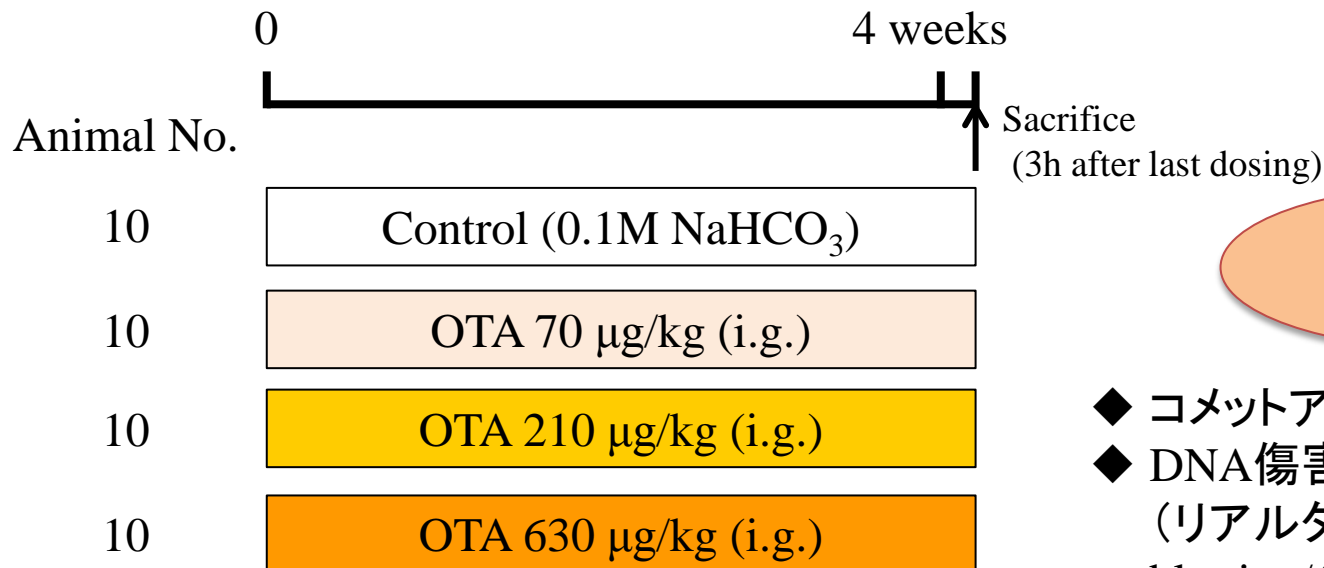


Animal: F344 *gpt delta* rats (male)

腎臓
(髄質外帯)

- ◆ Spi assay
- ◆ Spi 変異スペクトラム解析

実験2: OTAを3用量で*gpt delta*ラットに4週間強制経口投与



Animal: F344 *gpt delta* rats (male)

腎臓
(髄質外帯)

- ◆ コメットアッセイ
- ◆ DNA傷害/修復分子の発現解析
(リアルタイムPCR/Western blotting/免疫染色)

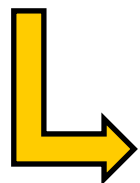
Spi⁻ assay

Group	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA ($\times 10^5$)	Plaques within WL95 (P2)	Mutant Frequency ($\times 10^{-5}$)	Mean \pm SD
Control	1	1.3	5	0.40	0.24 \pm 0.19
	2	2.0	1	0.05	
	4	1.6	1	0.06	
	5	1.5	1	0.07	
	6	1.6	5	0.31	
	7	1.2	7	0.60	
	8	1.5	1	0.06	
	9	1.6	5	0.32	
	10	1.2	3	0.26	
	OTA 5 ppm	11	1.7	9	
12		1.6	7	0.32	
13		1.5	5	0.26	
14		1.1	9	0.66	
15		1.4	7	0.44	
16		1.9	5	0.21	
17		1.0	11	0.79	
18		1.2	4	0.33	
19		1.5	11	0.65	
20		1.3	5	0.38	

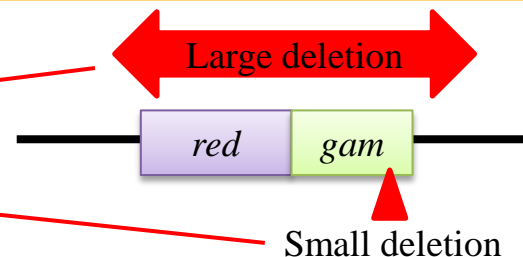
*: $p < 0.05$ vs. Control

Spi-変異スペクトラム解析について

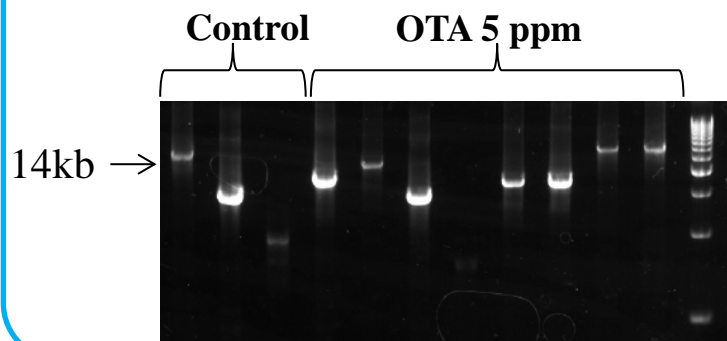
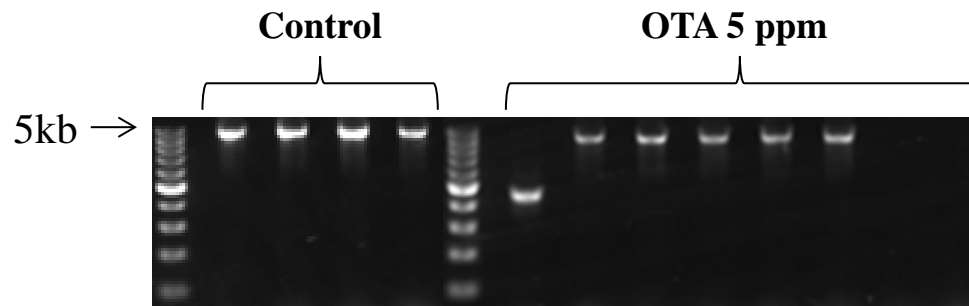
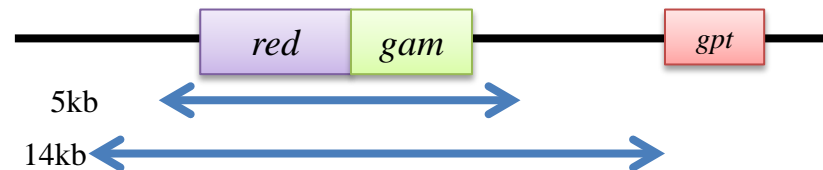
Spi-変異体：レポーター遺伝子である*red*および*gam*遺伝子の両方が不活性



*red/gam*遺伝子にまたがる大きな欠失変異
あるいは
*gam*遺伝子上の小さな欠失変異



Spi-変異体について、*red/gam*遺伝子を含む
5kb、14kb断片のPCRを行うことにより、
その欠失変異の大きさが判別可能である。



増幅したDNA断片を用いて
シーケンス解析を実施

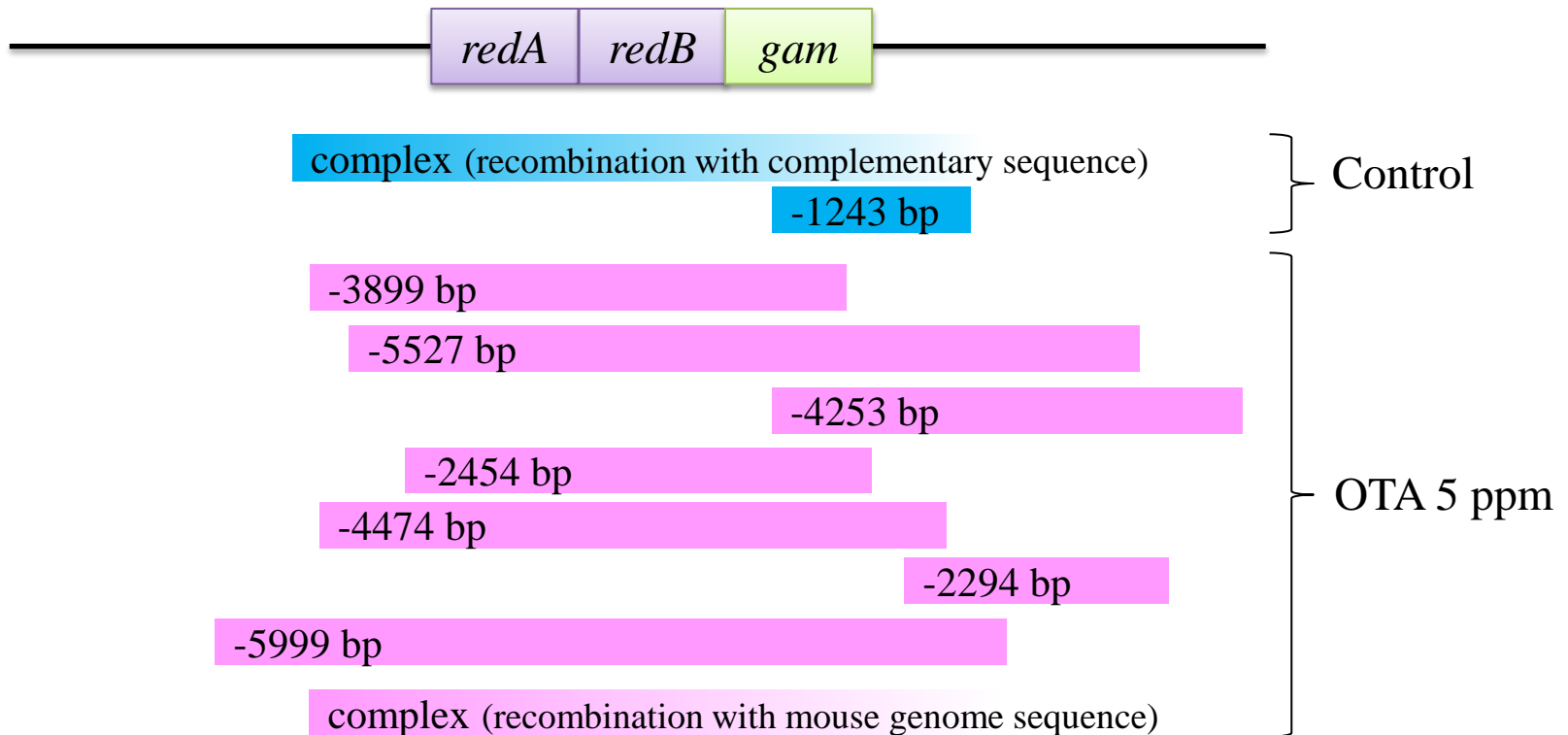
Spi-変異スペクトラム解析結果

Mutation	Control			OTA 5 ppm				
	No.	%	Specific MF ($\times 10^{-6}$)	No.	%	Specific MF ($\times 10^{-6}$)		
1 bp	25	86	2.06 \pm 1.79	46	63	3.34 \pm 1.46		
Deletion	simple	G/C	4	14	0.31 \pm 0.49	11	15	0.83 \pm 0.85
		A/T	0	0	0.00 \pm 0.00	1	1	0.08 \pm 0.24
	in run	G/C	10	34	0.88 \pm 1.20	18	25	1.37 \pm 0.77
		A/T	11	38	0.87 \pm 0.66	16	22	1.07 \pm 0.95
	2 bp ~1 kb	0	0	0.00 \pm 0.00	1	1	0.07 \pm 0.23	
>1 kb	2	7	0.14\pm0.29	8	11	0.67 \pm 1.00		
Complex	1	3	0.09 \pm 0.28	2	3	0.13 \pm 0.27		
Insertion	0	0	0.00 \pm 0.00	1	1	0.06 \pm 0.18		
Base substitution	1	3	0.07 \pm 0.21	4	5	0.29 \pm 0.39		
Total	29	100	2.37\pm1.92	62	100	4.56 \pm 1.94*		

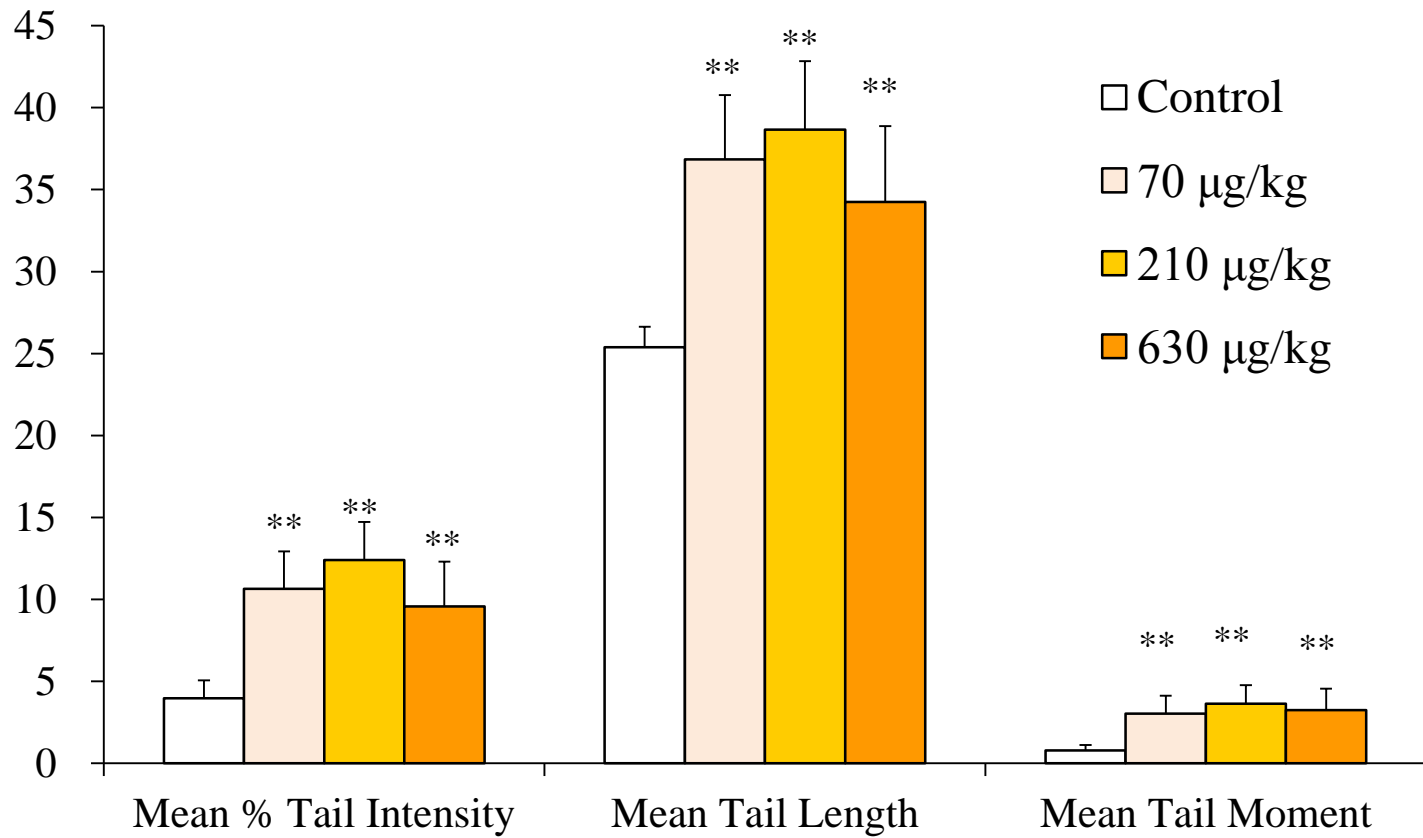
*: $p < 0.05$ vs. Control

OTA投与により誘発されたlarge deletion

λ EG10

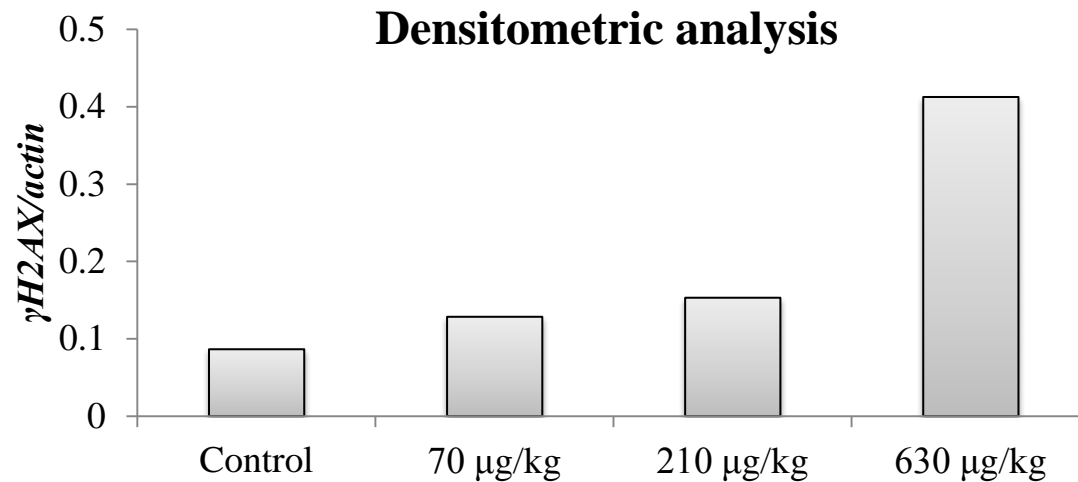
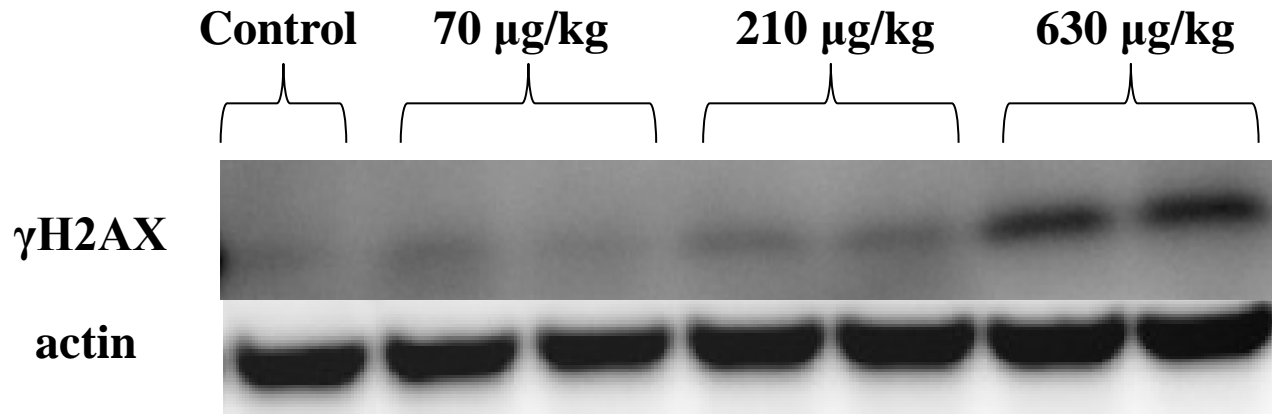


コメットアッセイ



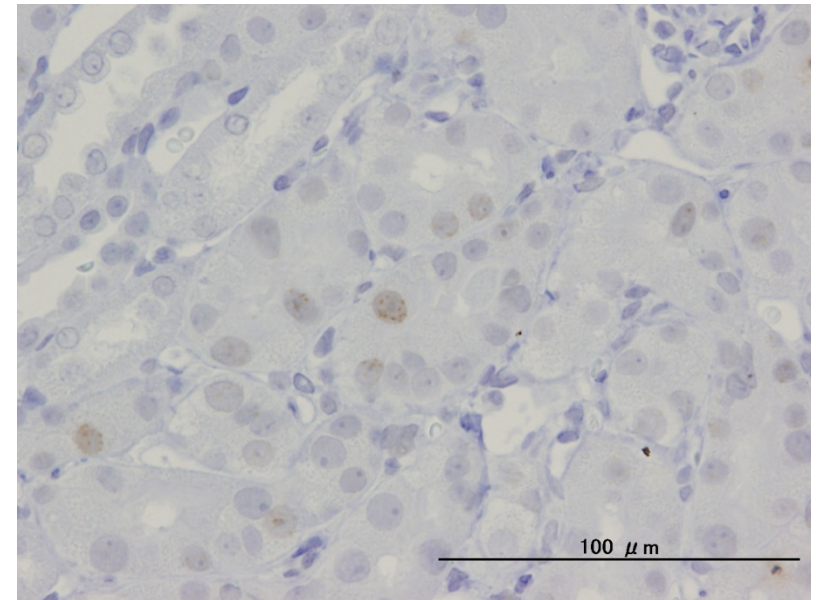
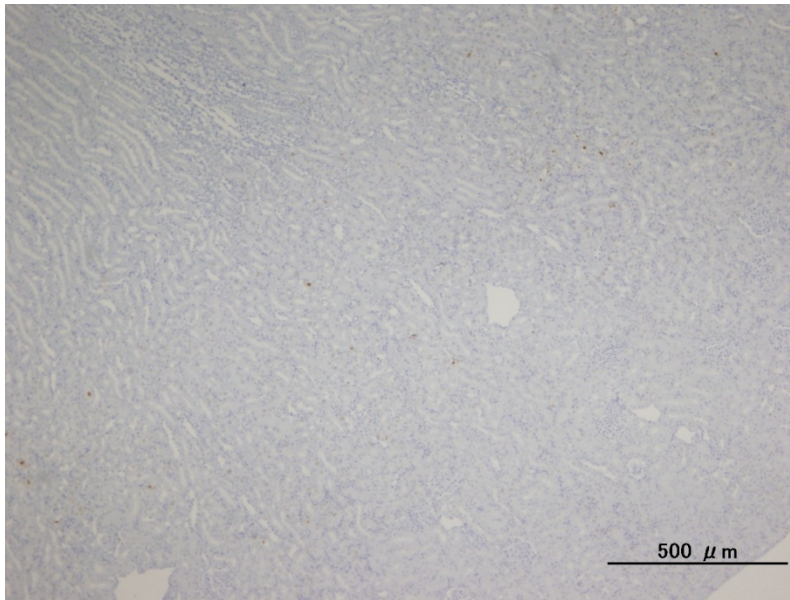
** : $p < 0.01$ vs. Control

γ H2AX (DNA二重鎖切断マーカー)の発現



γ H2AX (DNA二重鎖切断マーカー)の発現

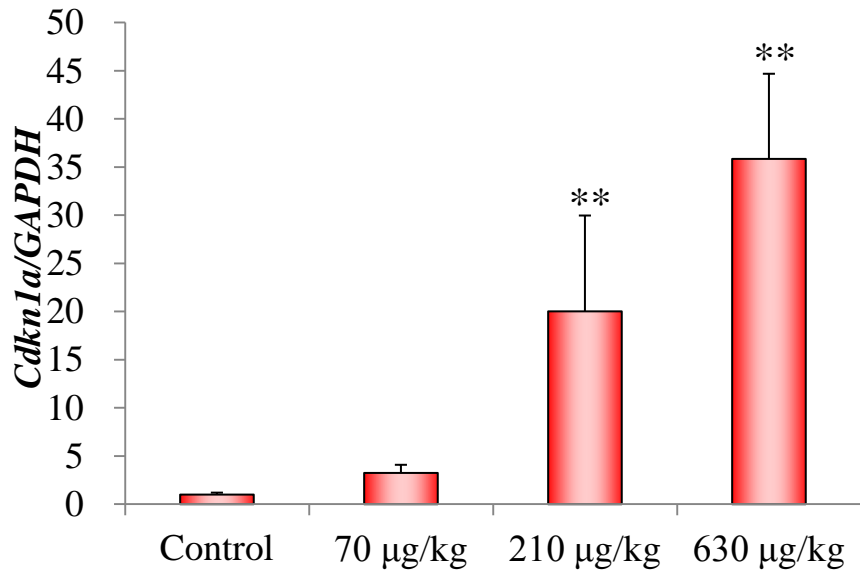
OTA 210 $\mu\text{g}/\text{kg}$



リアルタイムPCRによる mRNA発現解析

Cell cycle arrest

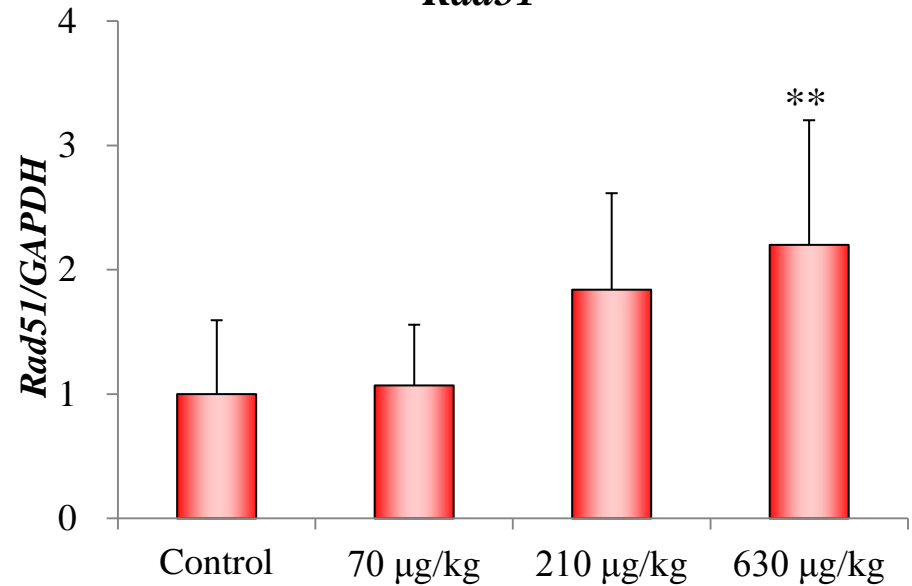
Cdkn1a



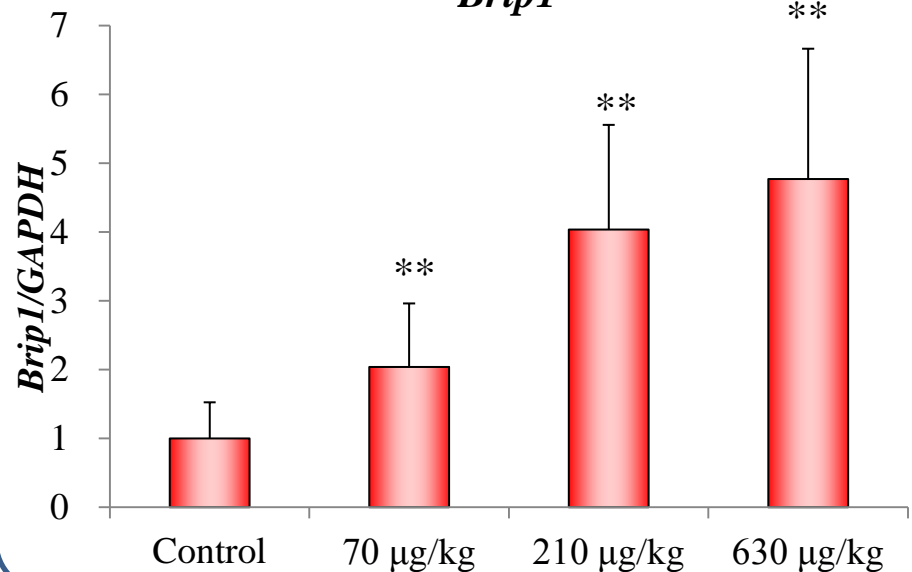
** : $p < 0.01$ vs. Control

DNA double strand break repair

Rad51

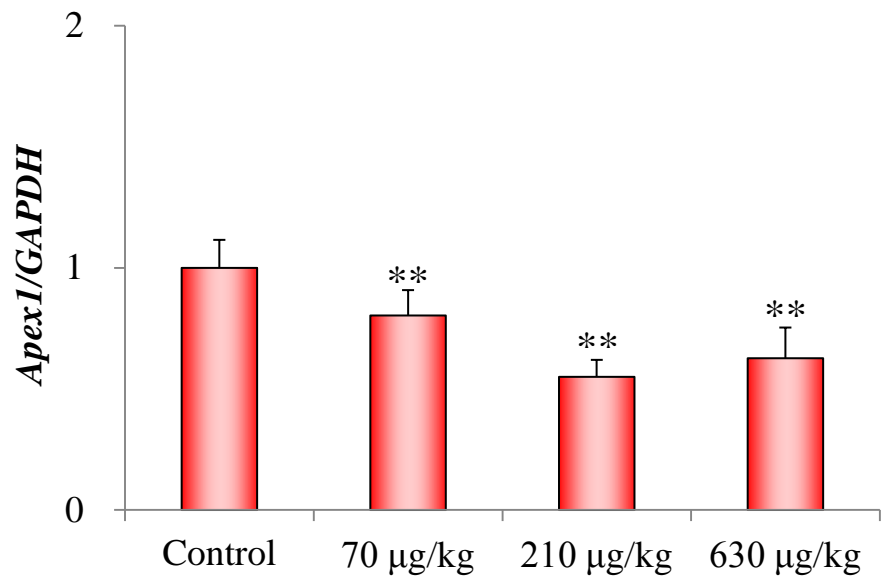


Brip1

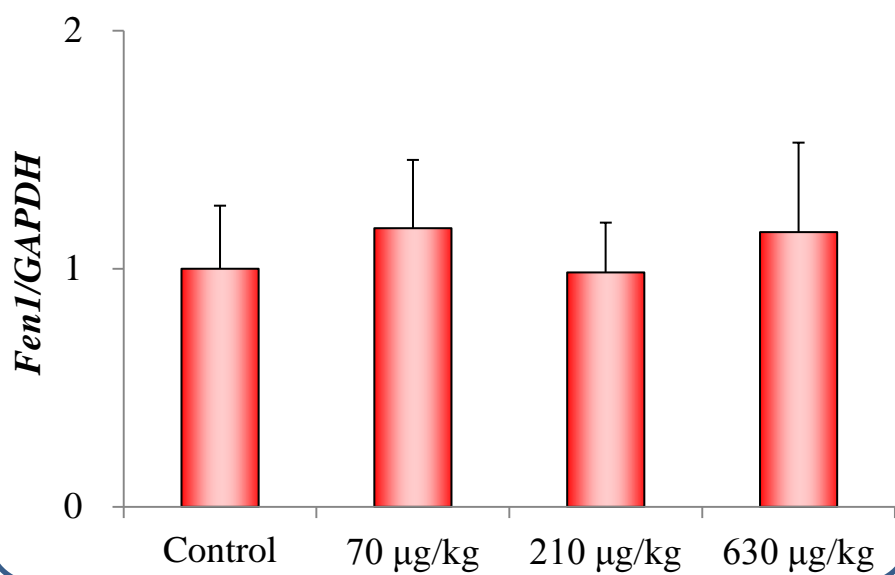


Base excision repair

Apex1

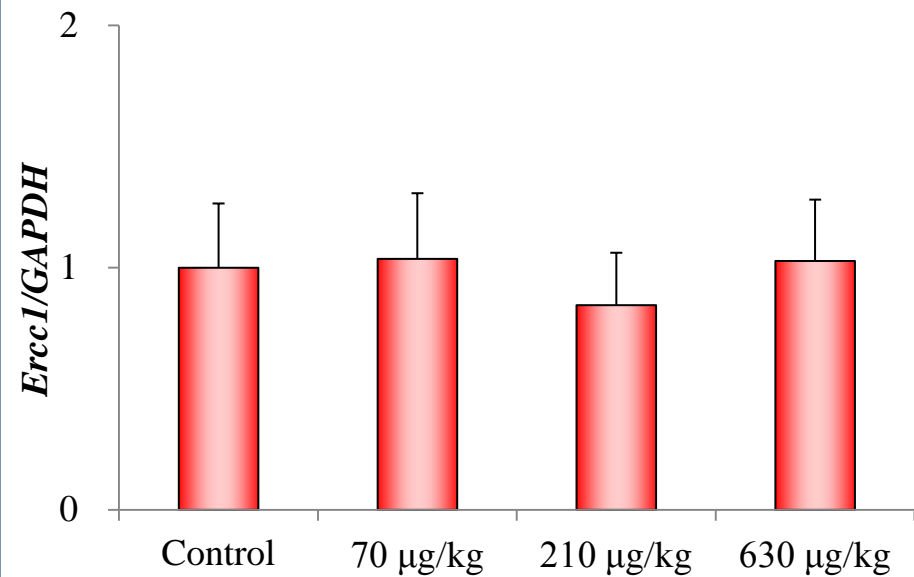


Fen1

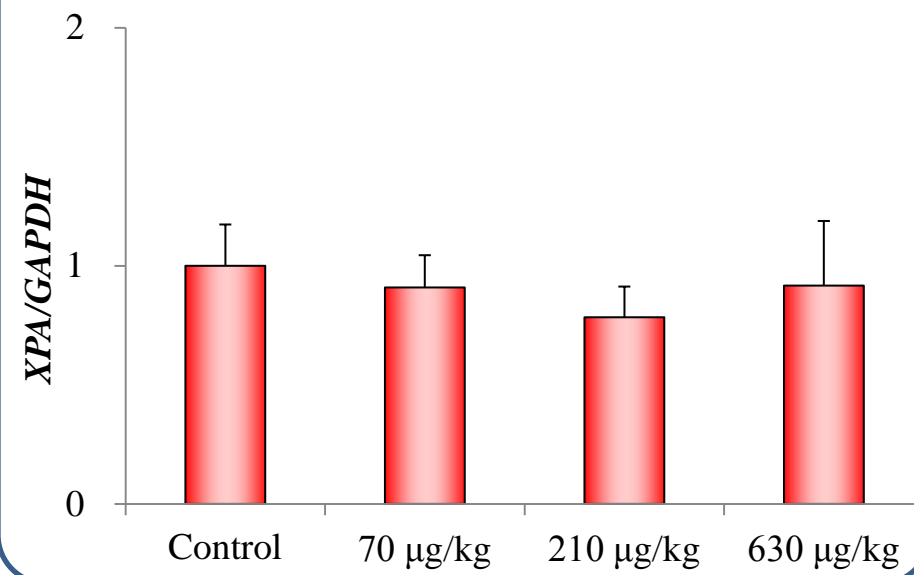


Nucleotide excision repair

Ercc1

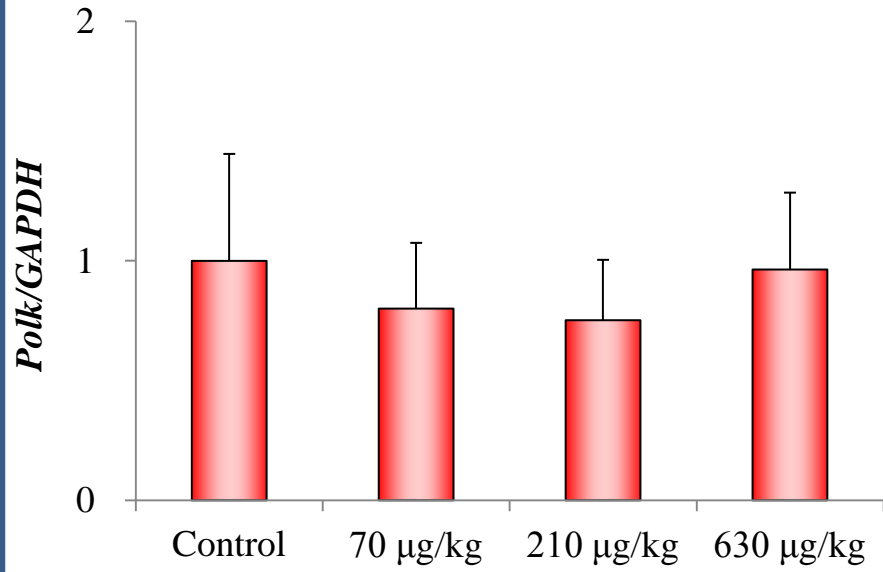


XPA

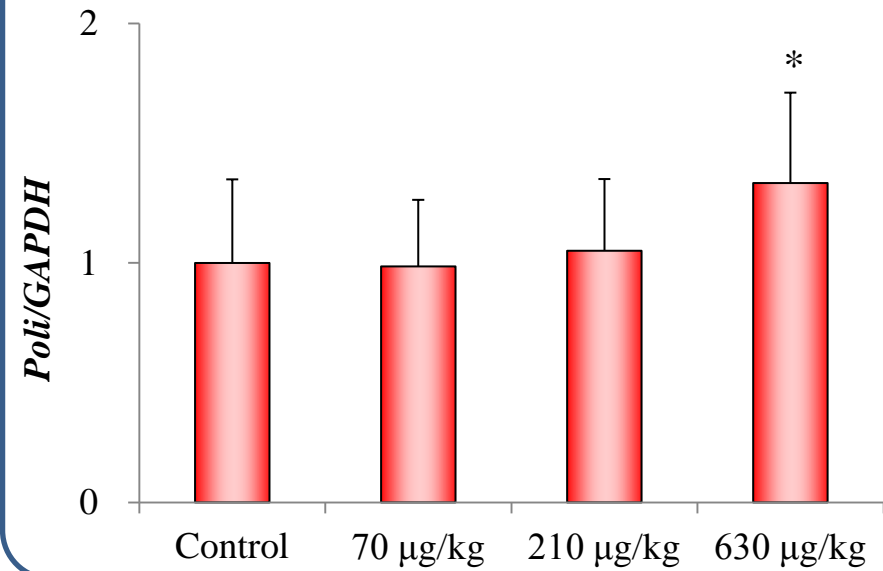


Translesion synthesis

Polk



Poli



結果のまとめ

実験1:

- ✓ OTA 5 ppmの混餌投与により、腎臓髄質外帯におけるSpi-変異体頻度が対照群と比較して約2倍有意に増加した。
- ✓ Spi-変異スペクトラム解析の結果、OTA投与によるSpi-変異体頻度の増加に最も寄与していた変異は1 kb以上のlarge deletionであり、対照群と比較して約4倍増加した。

実験2:

- ✓ 腎臓髄質外帯を用いたコメットアッセイにおいて、OTA70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与によりDNA傷害が認められた。
- ✓ 腎臓髄質外帯において、OTAの用量相関性にDNA二重鎖切断マーカである γH2AX の増加が認められた。
- ✓ リアルタイムPCRの結果、主に細胞周期停止やDNA二重鎖切断修復に関する遺伝子群のmRNAレベルが用量相関性に増加した。

考察

- OTAを投与したラットの腎臓で、コメットアッセイが陽性を示したことに加え、リン酸化H2AX (γ H2AX)の増加が認められたことから、OTAは発がん標的臓器でDNA二重鎖切断を誘発する可能性が考えられた。
- γ H2AXはDNA切断部位にDNA修復分子をリクルートするとともに、細胞周期の停止を促進することが知られている。従って、本試験で認められたDNA二重鎖切断修復関連遺伝子および細胞周期停止に関わる*cdkn1a*のmRNA発現増加は、 γ H2AXの増加に起因した変化と考えられた。
- OTA投与により、レポーター遺伝子上で誘発された欠失変異は、主に1 kb以上のlarge deletionであった。Large deletionはDNA二重鎖切断の修復(再接合)過程で生じることが示唆されていることから、本試験で認められたSpi-変異体頻度の増加はOTA投与によるDNA二重鎖切断より生じた変化である可能性が示唆された。

結論

OTAは発がん標的的部位である腎臓髓質外帯においてDNA二重鎖切断を起こし、引き続いて生じるDNA修復過程においてlarge deletionを誘発する可能性が示唆された。