

## P-017

**Mutagenic potential of cytosine modification at the CpG site in the genome of human lymphoblastoid cells**

Akira Sassa, Nagisa Kamoshita, Yuki Kanemaru,  
Masamitsu Honma, Manabu Yasui  
National Institute of Health Sciences

Due to spontaneous or enzymatic deamination in genomic DNA, cytosine and one of its modifications, 5-methylcytosine, may be converted into uracil and thymine, respectively. These modifications can cause the accumulation of C·G to T·A mutation in genome such as CpG islands. To examine the mechanism of mutation induction by cytosine modifications within the genome, the tracing DNA adducts in targeted mutagenesis (TATAM) experimental system was used in the present study. Using human lymphoblastoid TSCER122 cells, a single molecule of each base (cytosine, 5-methylcytosine, and uracil) was introduced into the cytosine site of CpG dinucleotide in intron 4 of the thymidine kinase gene, and the subsequent mutations was then analyzed. The introduction of cytosine did not induce any C·G to T·A mutations. However, both 5-methylcytosine and uracil caused C·G to T·A mutation with a frequency of 0.41 % and 4.8 %, respectively.

Based on the results using TATAM system, cytosine modification was revealed to cause C·G to T·A mutation with a high frequency. It was also indicated that TATAM system allowed high sensitivity detection of mutation caused by cytosine modification.

## P-018

**Characterization of the *Thermus thermophilus* Ham1 and its role on genome integrity**

Miki Nishimura<sup>1</sup>, Emiko Morimoto<sup>2</sup>, Keiichirou Hiratsu<sup>3</sup>,  
Hanaka Mera<sup>2</sup>, Tatsuo Nunoshiba<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>International Christian University Graduate School of Arts and Sciences,

<sup>2</sup>International Christian University College of Liberal Arts,

<sup>3</sup>National Defense Academy Department of Applied Chemistry

DNA lesions originate from direct modification of DNA and also from the incorporation of damaged nucleotides during replication. Such nucleotides are removed from the nucleotide pool by sanitizing enzymes such as Ham1. Our study focuses on the role of Ham1 in maintaining genome stability. We have already revealed that *Saccharomyces cerevisiae* Ham1 hydrolyzes dITP to dIMP. Further, the knockout strain showed signs of genetic instability, affirming that Ham1 plays a role in maintaining genome stability. Due to the fact that such lesions increase in high temperatures, we deduced that sanitizing enzymes would be playing a crucial role in *Thermus thermophilus*. The 25kDa Th-Ham1 candidate was expressed in *E. coli* as a GST fusion protein. The purified protein after GST-tag removal showed pyrophosphatase activity at 70°C with dITP as the substrate. We are currently studying the *in vivo* characteristics of *Th-ham1* deficient strain through investigation of its homologous recombination rate.

**ヒトリンパ球細胞のゲノムに導入したシトシン修飾体の潜在的な突然変異誘発能**

佐々彰、鴨下渚、兼丸祐紀、本間正充、安井学  
国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

ゲノム DNA 中のシトシン、及びその修飾体のひとつである 5-メチルシトシンは、自発的または酵素的な脱アミノ化によって、シトシン修飾体のウラシル、及びチミンにそれぞれ変換され、ゲノムや CpG アイランドにおける C·G → T·A 突然変異蓄積の原因となることが示唆されている。本研究では、これらシトシン修飾体の突然変異誘発機構を調べるために、TATAM (Tracing DNA adducts in targeted mutagenesis) 実験系を用いて、ヒトリンパ球細胞由来 TSCER122 株のチミジンキナーゼ遺伝子上に、1 分子のシトシン、5-メチルシトシン、そしてウラシルを導入 (5'-CTCGTG; 中央 C に導入) し、その突然変異誘発頻度を解析した。その結果、ゲノムに導入されたシトシンは、C·G → T·A 変異を全く起こさなかったが、5-メチルシトシン及びウラシルは、それぞれ 0.41% 及び 4.8% の頻度でその変異を誘発した。

以上のことから、本実験系においてシトシン修飾体は予想以上に高い頻度で突然変異を引き起こす傾向があることが分かった。また、TATAM 系を用いることで、シトシン修飾体を引き起こす突然変異を高感度に検出できることが示唆された。

**高度好熱菌の脱アミノ化ヌクレオチド浄化酵素 Ham1 の機能とゲノム安定化における役割**

西村美起<sup>1</sup>、森本絵美子<sup>2</sup>、平津圭一郎<sup>3</sup>、米良花香<sup>2</sup>、  
布柴達男<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>国際基督教大学大学院 アーツ・サイエンス研究科、<sup>2</sup>国際基督教大学 教養学部、<sup>3</sup>防衛大学校 応用科学群

突然変異は DNA の直接損傷だけでなく、ヌクレオチドプール内で生じた損傷ヌクレオチドの取り込みによる経路も知られており、脱アミノ化ヌクレオチドを分解する浄化機構が知られている。我々はすでに酵母の浄化酵素 Ham1 が dITP を dIMP へ加水分解するピロホスファターゼ活性をもつこと、*ham1* 欠損株では高頻度などのゲノム不安定化を示すことなどを確認し、浄化機構がゲノム安定化に寄与することを報告した。一方、高温下ではヌクレオチド損傷がより生じやすいことから、高度好熱菌のゲノム安定化にこの機構が重要であると考えられる。本研究では高度好熱菌における Ham1 ホモログの同定を目的とした。まず高度好熱菌 HB27 のゲノムから PCR により Th-Ham1 候補遺伝子を増幅し、発現ベクターを樹立した。このベクターを大腸菌に導入し、25kDa の GST 融合タンパク質を精製して、GST-tag 切断後、70°C で dITP に対するピロホスファターゼ活性を確認した。このタンパク質を Th-Ham1 とし、熱安定性および反応速度解析を行った。現在は組み換え頻度の測定などにより *Th-ham1* 欠損株のゲノム不安定性を検証している。