

- 10) 富永洋平, 續 輝久, 中別府雄作. *OGG1*及び*MYH*遺伝子欠損マウスの樹立. 第57回日本癌学会総会, 1998
- 11) 土本大介, 西岡憲一, 藤原俊幸, 大坪俊夫, 中別府雄作. ミトコンドリア型AP endonuclease候補のcDNAクローニング. 第21回日本分子生物学会年会, 1998
- 12) 西岡憲一, 小田尚伸, 大坪俊夫, 康東天, 藤原俊幸, 中別府雄作. ミトコンドリア型ヒト*OGG1*蛋白質は内膜に結合して存在する. 第21回日本分子生物学会年会, 1998
- 13) 富永洋平, 作見邦彦, 續 輝久, 築山忠維, 中別府雄作. *OGG1*遺伝子欠損マウスの樹立と解析. 第21回日本分子生物学会年会, 1998
- 14) 伊東理世子, 河手久弥, 作見邦彦, 續輝久, 野田哲生, 中鶴陽子, 石川隆俊, 中別府雄作, 関口睦夫. 2つのDNA修復系を欠損したマウスにおけるアルキル化剤による致死効果と発癌. 第21回日本分子生物学会年会, 1998
- 15) 下川英俊, 藤井喜充, 古市正人, 関口睦夫, 中別府雄作. Site-directed mutagenesisによる大腸菌MutT蛋白質の機能ドメインの解析. 第21回日本分子生物学会年会, 1998
- 16) 藤川勝義, 紙谷浩之, 藤井喜充, 葉師寺浩之, 中別府雄作, 葛西宏. 各種酸化的損傷ヌクレオチドに対する大腸菌MutT蛋白質の基質特異性. 第57回日本癌学会総会, 1998
- 17) Kenichi NISHIOKA1, Toshio OHTSUBO, Hisanobu ODA, Donchan KANG, Toshiyuki FUJIWARA, Yusaku NAKABEPPU.
Regulation of expression and intracellular localization of the 8-oxoguanine DNA glycosylases (*OGG1* proteins) in human cells. The 14th Workshop on "DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 1999", 1999.

表1. MTH1遺伝子多型の分布

グループ	例数	性別			MTH1遺伝子型		
		計	男性	女性	不明	V/V	V/M
健常人	400	254	117	29	330	67	3
肝細胞癌患者	104	84	20	0	81	21	2
肺がん患者	186	125	61	0	155	29	2
パーキンソン氏病患者	100	45	55	0	83	15	2
乾癬患者	145	104	41	0	122	21	2
結核患者	67	48	18	1	52	15	0
患者合計	602	406	195	1	493	101	8
総計	1002	660	312	30	823	168	11

V:Val83, M: Met83

遺伝的早老症・ウェルナー患者由来細胞の不死化

二階堂 修（金沢大学薬学部教授）

本研究室では遺伝的早老症を特徴とするウェルナー（WS）患者由来細胞 24 系のうち、WS101KA 細胞で継代培養の 4 回試行のうち 2 回で不死化に成功した。現在他の WS および WS が疑われた患者細胞について WS101KA と同様に試験管内で不死化兆候を示すか検討中である。

キーワード：ウェルナー症候群（WS）、ヒト細胞、不死化、造腫瘍性、染色体異常、

A. 研究目的

ウェルナー症候群（WS）は早期老化症状を特徴とする常染色体性劣性遺伝疾患である。ポジショナルクローニングの手法によって原因遺伝子 *WRN* がクローニングされた（1）。*WRN* は 35 個のエキソンから構成される全長 100 kbp 以上の長大なゲノム構造が特徴である。日本人の WS 患者由来細胞に見出される突然変異は全体の 50% が突然変異部位 4（第 25 イントロン）に、10% が突然変異部位 6（第 9 エキソン）に、6% が変異部位 1（第 33 エキソン）に見出される特徴がある（2）。*WRN* タンパクの機能については試験管内の系においてヘリケース活性（3）およびエキソヌクレアーゼ活性（4）が報告されているが、細胞内における機能は依然不明である。本研究室において WS 患者皮膚由来細胞（WS101KA）を培養したところ、年齢を揃えた正常ヒト由来細胞の集団倍加数（PDL）をはるかに越える結果が得られ、

PDL が 200 を越えたので不死化したと判断した。これまでヒト由来細胞の自然的不死化の現象については先天的に *p53* 遺伝子に突然変異を持つ Li-Fraumeni 症候群細胞（5）以外の報告がないので、本研究では何故 WS 細胞が不死化したのか、その原因について検討を行っている。これまでは WS101KA 細胞でのみ解析を行ってきたが、現在、WS101KA と同様に WS と診断されながら分離後に高い増殖能を示す他の老化症候群細胞（以下疑 WS 細胞と略す）3 種類について、試験管内での継代培養を継続中である。今回はこれらの細胞についての培養実験と性格付けの結果について報告する。

B. 研究方式

WRN 遺伝子の変異部位の検出は MASA（Mutant allele specific Amplification）法（2）を用いて行った。長期継代培養は、継代に当たって 10^6 個の細胞を植え込む方式で行った。集

団倍加数 (n) は増殖した細胞数を植え込み細胞数で除して求め、 2^n として表現した。細胞培養はウシ胎児血清を添加した DMEM を用いて 37℃で行った。WRN 遺伝子の mRNA 発現量の解析は半定量的 RT-PCR 法を用いて行い、 β -アクトチンの発現量を標準として PCR 反応がプラトーに達しない条件で定量化した。また、Santa Cruz 社の抗 WRN 抗体および抗 p53 抗体を用いて Western blotting を行い、それぞれのタンパク量を定量化した。

C. 研究結果

1. 細胞の継代培養：培養条件下で典型的な WS 細胞 4 種類は、これまでの報告通り非常に低い増殖能を示した。これに対して WS101KA を含む疑 WS 細胞 4 種類は正常細胞とほぼ同等の高い増殖能を示した。これまでに WS101KA 細胞について、継代培養を行ったところ 740 PDL に達している。現在、他の疑 WS 細胞についても同様の方法で培養を継続しており培養日数はいずれも 100 日を超え、1 種類については 50 PDL を超えてなお、非常に活発な増殖能を示している。今後、さらに継代培養を継続していく予定である。
2. MASA 法による突然変異部位 1、4、6 の解析：解析の結果、典型的な WS 細胞として用いた 4 種類の細胞のうち 3 種類までが最も頻度の高いとされている突然変異部位 4 の同型接合体であった。一方、疑 WS 細胞については、いずれも突然変異部位を同定できなかった。
3. 半定量的 RT-PCR による WRN 遺伝子発現量の定量化：多くの突然変異遺伝子において、その発現量の低下が報告されているため、RT-PCR を用いて WRN 遺伝子 mRNA 量の定量化を試みた。発現量の低下が認められれば、WRN

遺伝子またはその発現調節領域に突然変異が存在することを示唆する。その結果、2. において突然変異が同定された WS 細胞については WRN 遺伝子 mRNA 量の明らかな低下が認められたが、疑 WS 細胞については、発現量の低下は全く検出できなかった。

4. Western blotting による発現タンパクの定量化：WRN タンパクについては正常細胞において発現量の少ないことが知られており、本研究においてもタンパク量の明らかな低下や欠損は検出できなかった。p53 タンパクについては WS101KA 細胞のみについて発現量の低下が認められており、今後 p53 に関する解析が必要であると考えられる。

D. 考察

今回新たに収集した疑 WS 細胞は、異常な早期老化傾向が認められた患者から分離されたものである。培養条件下での異常な増殖と WS101KA 細胞における不死化の確認は、これらの細胞の解析が WS における多重がんの多発を解明する端緒となりうると期待される。MASA 法を用いた WRN 遺伝子突然変異部位の検出を行ったところ、少なくとも発生頻度の高い突然変異部位 1、4、6 における突然変異の同定には失敗した。しかし、WS における WRN 遺伝子突然変異はさらに 10 種類以上存在することが知られており、今後は MASA 法に加えて PCR-CFLP (Cleavase Fragment Length Polymorphism) 法などを用いて疑 WS 細胞の WRN 遺伝子突然変異を検索していく予定である。また、不死化にあたっては WRN 遺伝子の変異が、他の不死化に関わる遺伝子の変異を誘発していることが予想され、これらの遺伝子群について同定していくことも機構解明にあたっては

必須である。Western blotting によって WS101KA 細胞において p53 タンパク量の低下が認められたが、この結果は培養早期における p53 の発現異常が不死化に関わることを示唆するものと考えられ、今後更に検討していく予定である。

E. 結 論

本研究では、低い PDL を特徴とする WS 細胞 WS101KA が、培養条件下で活発な増殖能を示し、継代培養のみによって不死化したことを報告してきた。Li-Fraumeni 症候群細胞以外のヒト細胞は継代培養によって不死化しないと考えられており、WS 細胞において同様な例があるかを知るために登録された細胞を調べた。その結果、WS101KA 細胞と同様に高い増殖能を示す細胞 3 種類を見出した。これらの細胞についても今後継代培養に加えて、不死化機構の解析を進めていく予定である。早発性老化を主徴とする WS 患者は、一方で悪性新生物を多発することが知られており、WRN 遺伝子の突然変異と細胞の不死化との関連性を分子生物学的レベルで今後検討する必要があると考える。

F. 引用文献

- 1) C.E. Yu, et al : Positional cloning of the Werner's syndrome gene. Science, Vol. 272: 258-262. 1996.
- 2) S. Takeda, et al : Detection of K-ras mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA). Hum. Mutat., Vol. 2: 112-117. 1993.
- 3) N. Suzuki, et al : DNA helicase activity in Werner's syndrome gene product synthesized in a baculovirus system. Nucleic Acids Res.

Vol. 25:2973-2978.1997

- 4) S. Huang, et al : The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'→5' exonuclease. Nat. Genet. Vol. 20:114-116. 1998.

- 5) J.W. Shay et al : Spontaneous *in vitro* immortalization of breast epithelial cells from a patient with Li-Fraumeni syndrome. Mol. Cell Biol. Vol.15:425-32.1995

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Y. Ishigaki, F. Suzuki, J. Hayakawa, H. Hiai, O. Nikaïdo, An UVB-carcinogenesis model with KSN nude mice. J. Radiat. Res., Vol. 39: 73-81. 1998.
- ② Y. Ishigaki, K. Yasuda, N. Hashimoto, J. Hayakawa, H. Hiai, O. Nikaïdo, A comparison of UVB-carcinogenesis between nude mice and nude beige mice. J. Radiat. Res., Vol. 39: 119-127. 1998.
- ③ Y. Ishigaki, K. Yasuda, N. Hashimoto, H. Nikaïdo, O. Nikaïdo, J. Hayakawa, Enhanced human tumor cell transplantability in a new congenic immunodeficient mouse; KSN-BNX. Folia Microbiol. Vol.43:493-494. 1998.
- ④ H. Kawai, Y. Kitamura, O. Nikaïdo, M. Tatsuka, H. Hama-Inaba, M. Muto, H. Ohyama, F. Suzuki, Isolation and characterization of apoptosis-resistant mutants from a radiosensitive mouse lymphoma cell line. Radiat. Res., Vol. 149: 41-51. 1998.
- ⑤ Y.N. Harada, N. Shiomi, M. Koike, M.

- Ikawa, M. Okabe, S. Hirota, Y. Kitamura, M. Kitagawa, T. Matsunaga, O. Nikaïdo, T. Shlomi, Postnatal growth failure, short life span, and early onset of cellular senescence and subsequent immortalization in mice lacking the xeroderma pigmentosum group G gene. *Mol. Cell Biol.* 19:2366-2372. 1999.
- ⑥ H. Kobayashi, H. Morioka, K. Tobisawa, T. Torizawa, K. Kato, I. Shimada, O. Nikaïdo, J.D. Stewart, E. Ohtsuka, Probing the interaction between a high-affinity single-chain Fv and a pyrimidine (6-4)pyrimidone photodimer by site-directed mutagenesis. *Biochemistry Vol.* 38:532-539. 1999.
- ⑦ H. Kobayashi, H. Morioka, O. Nikaïdo, J.D. Stewart, E. Ohtsuka, The role of surface lysines in pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct binding by a high-affinity antibody. *Protein Eng.* 11:1089-1092. 1998
- ⑧ A.R. Young, C.A. Chadwick, G.I. Harrison, O. Nikaïdo, J. Ramsden, C.S. Potten, The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema. *J. Invest. Dermatol.* 111:982-988. 1998
- ⑨ A.R. Young, C.S. Potten, O. Nikaïdo, P.G. Parsons, J. Boenders, J.M. Ramsden, C.A. Chadwick, Human melanocytes and keratinocytes exposed to UVB or UVA in vivo show comparable levels of thymine dimers. *J. Invest. Dermatol.* 111:936-940. 1998
- ⑩ T. Kobayashi, S. Takeuchi, M. Saijo, Y. Nakatsu, H. Morioka, E. Otsuka, M. Wakasugi, O. Nikaïdo, K. Tanaka, Mutational analysis of a function of xeroderma pigmentosum group A (XPA) protein in strand-specific DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 26:4662-4668. 1998
- ⑪ Y. Takeuchi, M. Murakami, N. Nakajima, N. Kondo, O. Nikaïdo, The photorepair and photoisomerization of DNA lesions in etiolated cucumber cotyledons after irradiation by UV-B depends on wavelength. *Plant Cell Physiol.* 39:745-750. 1998
- ⑫ T. Sasaki, H. Tian, Y. Kukita, M. Inazuka, T. Tahira, T. Imai, M. Yamauchi, T. Saito, T. Hori, T. Hashimoto-Tamaoki, K. Komatsu, O. Nikaïdo, K. Hayashi, ATM mutations in patients with ataxia telangiectasia screened by a hierarchical strategy. *Hum. Mutat.* 12:186-195. 1998
- ⑬ T. Torizawa, K. Kato, Y. Kimura, T. Asada, H. Kobayashi, Y. Komatsu, H. Morioka, O. Nikaïdo, E. Ohtsuka, I. Shimada, 31P NMR study of the interactions between oligodeoxynucleotides containing (6-4) photoproduct and Fab fragments of monoclonal antibodies specific for (6-4) photoproduct. *FEBS Lett.* 429:157-161. 1998
- ⑭ H. Morioka, H. Miura, H. Kobayashi, T. Kolzumi, K. Fujii, K. Asano, T.

Matsunaga, O. Nikaïdo, J.D. Stewart, E. Ohtsuka, Antibodies specific for (6-4) DNA photoproducts: cloning, antibody modeling and construction of a single-chain Fv derivative.

Biochim Biophys Acta 1385:17-32. 1998

- ⑮ H. Kobayashi, H. Morioka, T. Torizawa, K. Kato, I. Shimada, O. Nikaïdo, E. Ohtsuka, Specificities and rates of binding of anti-(6-4) photoproduct antibody fragments to synthetic thymine photoproducts.
J. Biochem. 123:182-188. 1998

2. 学会発表

- ⑯ 石垣靖人、安田和弘、二階堂修、紫外線発がん過程におけるナチュラルキラー活性の役割。第20回日本日本光医学・光生物学会、1998
- ⑰ 石垣靖人、島田俊介、二階堂修、シス型ウロカニン酸のマウスナチュラルキラー活性抑制効果の解析。第20回日本日本光医学・光生物学会、1998
- ⑱ 石垣靖人、二階堂修、紫外線感受性遺伝疾患-色素性乾皮症異型接合体細胞のDNA損傷修復能の解析。第57回日本癌学会総会、1998
- ⑲ 石垣靖人、二階堂修、ウロカニン酸のマウスナチュラルキラー活性抑制効果の解析。日本放射線影響学会第41回大会、1998

ヒトの老化と体細胞突然変異に関する研究

平井 裕子（放射線影響研究所・放射線生物学部 主任研究員）

体細胞突然変異の蓄積が老化に伴う疾患の原因になっているか否かを明らかにするために、原爆被爆者のリンパ球ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)及び T 細胞抗原レセプター(TCR)遺伝子突然変異体頻度(Mf)と発癌率との関係を解析し、Mf の高い群に弱いながら癌発生率の増加を認めた。死亡年齢と Mf は赤血球グリコフォリン A(GPA)遺伝子 Mf を含め、3 種類の Mf とも相関を認めなかった。

A. 研究目的

老化は体細胞遺伝子の突然変異の蓄積によって起こるといふ仮説が提唱されてきた。しかし、ヒト体細胞突然変異が個体の老化と寿命の短縮の原因になっているという直接的証拠は得られていない。この仮説を検証するために、我々は原爆被爆者という固定集団について、血液細胞の突然変異と各種疾患発生との関係を長期にわたり調べてきた。昨年度は赤血球のグリコフォリン A(GPA)遺伝子突然変異体頻度(Mf)と発癌率の関係を解析し、Mf の上昇と共に癌発生率は有意に上昇することが明らかとなった。この有意な関係が、赤血球 GPA Mf に特異的に認められる現象か、種々の血液細胞においても認められる現象かを検証するために、本年度は末梢血単核球における Mf と癌発生率との関係を調べたので報告する。また、赤血球の末梢血中での半減期は約 120 日と短く、赤血球の Mf は、骨髄幹細胞に生じた異常を反映していると考えられる。しかし、こ

の測定法は対象者が GPA 遺伝子座ヘテロ接合体の人に限られるため、日本人では約 50% の人しか測定可能でない。本年度、骨髄幹細胞における Mf を反映する測定法として、末梢血好中球(末梢血中での半減期 6~8 時間)における Mf を測定する方法を樹立したので併せて報告する。

B. 研究方法

1. 末梢血単核球 HPRT Mf の測定：広島の実験被爆者 333 名(放射線影響研究所・成人健康調査対象者)について、クローニング法を用い、HPRT Mf を測定した。測定法に関しては既報に準じた(1)。
2. 末梢血単核球 TCR Mf の測定：HPRT Mf 測定同様、広島の実験被爆者 616 名について、フローサイトメトリーを用いて測定した(2)。
3. 統計解析：各 Mf と発癌リスクの相関関係を多変量解析(Mf、性、年齢、被爆線量を

変量とする)により推定した。

4. 各 Mf と寿命: GPA、HPRT、TCR Mf 測定群のうち、死亡した人、各々265名、77名、105名について死亡時年齢と Mf の関係を多変量解析(Mf、年齢、被曝線量を変量とする)により推定した。
5. 好中球 Fcγ RIII 遺伝子座における Mf の測定: Fcγ RIII 遺伝子座には NA1 および NA2 の共優性対立遺伝子が存在し、NA1/2 ヘテロ接合体の人の細胞から NA1 あるいは NA2 抗原を消失した好中球をフローサイトメトリーにより検出した。

C. 研究結果

癌の既往歴を持つ人は HPRT Mf 測定集団では 77 名(23.1%)、TCR Mf 測定集団では 135 名(21.9%)であった。今回測定した 2 つの Mf 測定群では、GPA Mf とは異なり、発癌リスクは被曝線量による影響を認めなかった。

TCR Mf では、Mf の上昇とともに発癌リスクは上昇した($p < 0.05$)。HPRT Mf では統計的有意差は認められなかった。また、いずれの Mf 測定集団においても Mf を平均の 3 倍以上高い群と低い群に分け、両群間での発癌リスクを調べると、HPRT Mf 測定群では $Mf \geq 10.0 \times 10^{-6}$ 群 125 名、 $Mf < 10.0 \times 10^{-6}$ 群 208 名のうち癌の既往歴があった人は各々 36 名と 41 名であり、t 検定の結果 $P < 0.06$ と、統計的な有意差が示唆された。また、TCR Mf 測定群では $Mf \geq 5.0 \times 10^{-5}$ 群 76 名、 $Mf < 5.0 \times 10^{-5}$ 群 540 名のうち各々 25 名と 110 名に癌の既往歴が報告されており、 $P < 0.014$ と Mf の高い群が統計的に有意に発癌リスクが高いという結果であった。

死亡時年齢と Mf は、いずれの Mf 測定群

においても統計的有意差は認めなかった。癌の既往症のある人について、死亡群と生存群に分けて各群の Mf を比べたが有意な結果は得られなかった。

好中球 Fcγ RIII 遺伝子座における Mf の測定は、Fcγ RIII 遺伝子座には NA1 および NA2 の共優性対立遺伝子が存在するので、NA1/2 ヘテロの人の末梢血多形核白血球を抗 NA1 抗体と抗 CD16 抗体(NA1、2 の共通部分を認識する)で二重染色後、フローサイトメーターを用いて NA1 抗原の発現を失った変異体好中球(NA1-CD16+)の頻度(Mf)を求めた。フローサイトメトリーで解析している変異好中球が NA1 抗原を欠損した真の変異体好中球であることは、変異細胞を 1 細胞ずつソーティングして RT-PCR 及び SSCP 法により、NA1 の cDNA の正常な band が認められるか否かを調べたところ、cDNA の band を完全に欠損しているか、band が認められても、いずれも正常な band を認めなかったことより確認した。

D. 考察

体細胞突然変異体頻度は年齢とともに上昇するが、その蓄積が老化に直接関与しているか否かは明かではない。それを明らかにするためには、体細胞突然変異と老化に伴う疾患の発生や寿命との関係を調べる必要があると考える。

我々がこれまでに測定した Mf は、いずれも年齢とともに有意に上昇することを報告している(3)。昨年より、老化に伴う疾患の一つである癌の罹患リスクが血液細胞の Mf と関係があるかを解析している。昨年、赤血球 GPA Mf が癌のリスクと相関することをはじめて示し、

GPA 遺伝子は発癌に直接関係した遺伝子ではないが、個人の癌関連遺伝子の Mf を間接的に反映していることを示唆した。この現象が赤血球 GPA に特異的なことであるか否かを調べるために、本年度、リンパ球の Mf と発癌リスクの関係を解析したが、GPA Mf ほど有意な関係は認められなかった。その原因の一つとして、赤血球は末梢血での半減期が約 120 日と短く、測定している突然変異細胞が骨髄幹細胞に生じた異常を反映しており、突然変異頻度と突然変異細胞頻度が等しいと考えられるが、リンパ球は末梢血での半減期が 3-4 年と長く、リンパ球の突然変異細胞が末梢血でクローナルに増殖している場合があり、Mf が高いのは必ずしも突然変異の頻度が高いのではなく、突然変異細胞の頻度(割合)が高いだけで、突然変異の頻度としては正常の可能性もある。しかし、個々の対象者について、クローン性の増大を調べることは困難である。そこで、本年度赤血球と同様、骨髄幹細胞に生じた突然変異を測定する方法を開発した。この方法は赤血球 GPA Mf 測定法と異なり、突然変異細胞の遺伝子レベルの変異も調べることが可能である。

現在までのところ死亡年齢と Mf はいずれのマーカーにおいても相関が認められていないが、体細胞突然変異の蓄積と老化の関係により明確な結論を得るためには、今後癌以外の老年疾患や寿命と Mf の関係について、長期にフォローアップし、解析することが必要であると考えられる。

E. 結論

1. リンパ球の HPRT、TCR 遺伝子の体細胞突然変異体頻度(Mf)と癌の発生率は

Mf の高い群に癌発生率の増加が認められた。

2. 赤血球 GPA 遺伝子座の Mf を含め血液細胞の体細胞突然変異体頻度と死亡年齢には相関は認められなかった。
3. 老化の突然変異蓄積説に明確な結論を得るためには、癌以外の老年疾患や寿命と血液細胞の Mf との関係について長期にフォローアップすることが必要である。

F. 参考文献

- (1) Hirai Y, Kusunoki Y, Kyoizumi S, et al.: Mutant frequency at the HPRT locus in peripheral blood T-lymphocytes of atomic bomb survivors. *Mutat. Res.* 329:183-196, 1995
- (2) Umeki S: Somatic cell mutation analysis on the T-cell antigen receptor using flow cytometry. *Hiroshima Daigaku Igaku Zasshi* 42:249-264, 1994
- (3) Akiyama M, Kyoizumi S, Hirai Y, et al.: Mutation frequency in human blood cells increase with age. *Mutat. Res.* 338:141-149, 1995

G. 研究発表

1. 論文発表

Umeki S, Hirai Y, et al.: Lifespan of human memory T-cells in the absence of T-cell receptor expression. *Immunology Letters* 62:99-104, 1998

Kusunoki Y, Hirai Y, et al.: Flow cytometry measurements of subsets of T, B and NK cells in peripheral blood lymphocytes of

atomic bomb survivors. Radiation Research
150:227-236, 1998

2. 学会発表

児玉喜明、平井裕子 他: 原爆被爆者のリン
パ球における染色体異常クローンの起源.
第 41 回日本放射線影響学会. 1998

H. 知的所有権取得状況

なし

老化と DNA 修復機構ならびに変異の蓄積に関する研究

若林敬二

(国立がんセンター研究所がん予防研究部)

環境中に幅広く存在するノルハルマンは、S9 mixの存在下でアニリンと共存させると *Salmonella typhimurium* TA98 に対して変異原性を示すようになる。このことからノルハルマンはco-mutagenと呼ばれている。ノルハルマンのアニリン共存下におけるco-mutagenic作用機構は、S9 mixの存在下で両者が結合し、新規変異原物質であるアミノフェニルノルハルマンを形成し、これがDNAと付加体を形成することによると示唆された。

A. 研究目的

トリプトファンの加熱分解により生成するノルハルマン(9H-pyrido[3,4-b]indole)は、タバコの煙や加熱食品中に豊富に存在する。この化合物は、アニリンやo-トルイジン等の芳香族アミンと共存させた時のみ、代謝活性化酵素の存在下でサルモネラ菌TA98に変異原性を示すことからco-mutagenと呼ばれている。アニリンやo-トルイジン等の芳香族アミンもまた、タバコの煙やある種の野菜中に存在していることから我々は日常生活においてこれら化合物に同時に曝露していると思われる。そこで、ノルハルマンのco-mutagenic作用機構を解明することは、これら化合物のヒトに対する影響を知るうえで重要であると考え、変異原性を誘発する一つの要因であるDNA付加体の生成及びノルハルマンとアニリンから生成される変異原物質の構造解析について検討を行った。

B. 研究方法

1. DNA付加体の解析

一晚培養した*Salmonella typhimurium* TA 98を

0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4) 4 mlに懸濁し、ノルハルマン(8 mg)とアニリン(4 mg)をS9 mix (20 ml)の存在下で37°C、1-24時間反応させた。反応終了後、遠心分離により菌を集め、通常フェノール、クロロホルム抽出法によりDNAを抽出した。

DNA付加体の解析は³²P-ポストラベル法の改良付加物増感法により行った。すなわち、DNA (5 µg)をヌクレアーゼにより3' -モノフォスフェート体に分解し、T4-ポリヌクレオチドキナーゼと γ -³²P-ATPで5'末端を標識した。次にヌクレアーゼP1とホスホジエステラーゼIにより残存するオリゴヌクレオチドを分解し、付加体を全て5' -モノフォスフェート体とした。得られた付加体をポリエチレンイミン(PEI)-セルロースシートを用いた薄層クロマトグラフィーを用いて、正常ヌクレオチドと分離し、バイオイメーリアナライザーにより解析した。

2. 変異原物質の分離

ノルハルマン塩酸塩(4 mg)とアニリン塩酸塩(2 mg)を精製水に溶解し、S9 mix存在下で37°C、20分間反応させた。反応させた。

反応終了後、冷却したアセトニトリルを添加して除蛋白を行い、上清を ODS カラムを用いた HPLC により分離した。

C. 研究結果

ノルハルマンとアニリンを S9 mix の存在下で *S. typhimurium* TA 98 と 37℃、1, 3, 6, 9, 12 及び 24 時間反応させ、生成する DNA 付加体の解析を行った。その結果、ノルハルマン及びアニリンをそれぞれ単独で反応させた場合には DNA 付加体の生成は認められないが、両者を同時に TA98 と反応させた場合に 3 個の DNA 付加体スポットが検出された。各反応時間における総 DNA 付加体量は、1.24、4.28、10.8、20.2 及び 35.0 / 10⁸ ヌクレオチドであり、反応時間の増加と共に上昇した。又、検討した全ての反応時間における DNA 付加体のパターンは、同一であった。

次に、ノルハルマンとアニリンを S9 mix の存在下で反応させ、生成する変異原物質を ODS カラムを用いた HPLC で分離した。その結果、ノルハルマン及びアニリンとは異なる保持時間に、変異原性の発現に S9 mix を必要とする画分と S9 mix を必要としない画分が溶出された。まず始めに、変異原性の発現に S9 mix を必要とする画分について更に別の HPLC 条件を用いて単離・精製し、UV, EI-MS 及び H¹-NMR スペクトルの測定を行った。その結果、この変異原物質は 238, 287, 356 nm に極大吸収を持つ分子量 259 の化合物であることがわかった。また、H¹-NMR のデータ及び別途合成からこの化合物の構造は、ノルハルマンの N9 位にアニリンの C4 位が結合した、9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido [3,4-b]indole (アミノフェニルノルハルマン) であると決定した。一方、変異原性の発現に S9 mix を必要としない変異原物質の構造は、アミノフェニルノルハルマンのヒドロキシアミン体であることが各種機器データ及び

別途合成等により明らかになった。この新規変異原物質はフレームシフトタイプの変異を検出する菌株である TA98 及び YG1024 に高い変異原性を示し、そのレベルは発がん性ヘテロサイクリックアミン(HCA)である 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) や 2-aminodipyrido-[1,2-a:3';2'-d]imidazole (Glu-P-2) と同程度のレベルであることがわかった。また、アミノフェニルノルハルマンを S9 mix の存在下で *S. typhimurium* YG1024 と反応させると、ノルハルマンとアニリンを同時に YG1024 に反応させた時に生成する DNA 付加体と同一のパターンを示すことがわかった。

D. 考察

ノルハルマンは代謝活性化酵素の存在に関わらず、それ自身では変異原性を示さないが、アニリンと共存させると S9 mix の存在下で *S. typhimurium* TA 98 に対して変異原性を示すようになる。今回、このノルハルマンの co-mutagenic 作用機構の解明を目的として、まずノルハルマンとアニリンの共存下に DNA 付加体が生成されるか否かについて検討を行った。その結果、3 個の DNA 付加体スポットが検出され、その総付加体量は 10.8 / 10⁸ ヌクレオチドであった。付加体の解析に用いた³²P-ポストラベル法の改良付加物増感法は、DNA の 5' 末端を標識した後に更にヌクレアーゼ P1 及びホスホジエステラーゼ I で処理することにより、残存するオリゴヌクレオチドを分解し、付加体は全て 5' -モノホスフェート体として検出される。この操作を行うことにより、同一の構造を持つ付加体を一つのスポットに集約して検出することが可能になる。従って、この改良付加物増感法において検出された 3 種の DNA 付加体スポットは、それぞれ、異なった構造であると思われる、(1) 結合している塩基は同一であるが、付

加物の構造が異なっている。(2) 結合している塩基は同一であり、付加物の構造も同一であるが、付加物と塩基の結合部位が異なっている。(3) 付加物の構造は同一であるが、塩基が異なっている、等の可能性が考えられた。

次に、ノルハルマンとアニリンをS9 mixの存在下で反応させ、生成される変異原物質をHPLCを用いて分離し、その構造の解析を各種機器分析及び別途合成により行った。

その結果、ノルハルマンとアニリンの結合した複合体であるアミノフェニルノルハルマン及びそのヒドロキシアミン体が生成されていることが分かった。

アミノフェニルノルハルマンをS9 mixの存在下で *S. typhimurium* YG1024 と反応させると、ノルハルマンとアニリンの共存下に YG1024 に生成する DNA 付加体パターンと同一のパターンを示した。また、ヒドロキシアミノフェニルノルハルマンを YG1024 と反応させた場合にも、ノルハルマンとアニリンの共存下に YG1024 に生成する DNA 付加体パターンと一致することから、アミノフェニルノルハルマンは S9 mix により代謝活性化を受けヒドロキシアミン体に変換され、それが O-アセチル転移酵素等により更に反応性の高いエステル体を経て DNA と付加体を形成すると考えられた。

E. 結論

環境中に豊富に存在するノルハルマンのアニリン共存下における co-mutagenic 作用機構は、S9 mix の作用によりノルハルマンの N-9 位とアニリンの C-4 位が結合し、新規変異原物質であるアミノフェニルノルハルマンを形成し、これが DNA と付加体を形成し、最終的にサルモネラ菌に変異原性を誘発するようになることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Structural determination of a mutagenic aminophenylnorharman produced by the co-mutagen norharman with aniline.
Totsuka, Y., Hada, N., Matsumoto, K., Kawahara, N., Murakami, Y., Yokoyama, Y., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. *Carcinogenesis*, 19, 1995-2000, 1998.

2. 学会発表

1. Norharman と aniline との反応により生成する aminophenylnorharman の生物活性
戸塚ゆ加里、石原純子、杉村 隆、若林敬二
第 57 回日本癌学会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

19980208

報告書 続き[1]は下記に掲載

肺癌とテロメア・テロメラーゼ

檜山桂子, 石岡伸一, 檜山英三, 山木戸道郎
分子呼吸器病. 2巻3号, pp.233-235, 1998

19980208

報告書 続き[2]は下記に掲載

テロメラーゼ研究の現状

檜山桂子, 石岡伸一, 檜山英三, 山木戸道郎

癌と化学療法. 25 卷 8 号, pp1105-1110, 1998

19980208

報告書 続き[3]は下記に掲載

2-Hydroxyadenine, a mutagenic form of oxidative DNA damage is not repaired by a glycosylase type mechanism in rat organs

Yosuke Tsurudome, Takeshi Hirano, Hiriyoyuki Kamiya, Raizo Yamaguchi, Shinya Asami, Hideaki Itoh, Hiroshi Kasai

Mutation Research. Volume 408, pp.121-127, 1998

19980208

報告書 続き[4]は下記に掲載

The mutations induced by oxidatively damaged nucleotides, 5-formyl-dUTP and 5-hydroxy-dCTP, in *Escherichia coli*

Katsuyoshi Fujikawa, Hiroyuki Kamiya and Hiroshi Kasai

Nucleic Acids Research. Volume 26 Number 20, pp.4582-4587, 1998

19980208

報告書 続き[5]は下記に掲載

Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced *OGG1* mRNAs

Kenichi Nishioka, Toshio Ohtsubo, Hisanobu Oda, Toshiyuki Fujiwara, Dongchon Kang, Keizo Sugimachi, and Yusaku Nakabeppu

Molecular Biology of the Cell. Volume 10 Number5, pp.1637-1652, 1999

19980208

報告書 続き[6]は下記に掲載

Molecular cloning of *AtMMH*, an *Arabidopsis thaliana* ortholog of the *Escherichia coli mutM* gene, and analysis of functional domains of its product

T. Otsubo, O. Matsuda, K. Iba, I. Terashima, M. Sekiguchi, Y. Nakabeppu

Molecular & General Genetics. Volume 259 Number 6, pp.577–590, 1998