

## ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築

所属 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部  
研究者 能美 健彦

研究要旨 ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験系の開発を進め、ヒト遺伝子を発現する新規テスター株を樹立した。トランスジェニックラット、マウス培養細胞の有用性について検討し、ヒト遺伝子を発現するマウス催奇形性試験系を構築した。

### 分担研究者

- (1) 北海道大学大学院薬学研究科 鎌滝哲也
- (2) 明治製菓株式会社 林 宏行
- (3) 中外製薬株式会社 新倉博文
- (4) 食品薬品安全センター秦野研究所 原 巧
- (5) 日本抗体研究所 金谷一司
- (6) 大阪府公衆衛生研究所 小田美光

### A. 研究目的

創薬技術の進歩に伴い、従来に比べて飛躍的に多数の候補化合物が開発の初期段階に生じている。このため、微量かつ多数の候補化合物の中から、安全で有効な化合物をいかに迅速に選択するかが創薬研究において重要になりつつある。薬効のスクリーニングに関してはレセプター・アッセイなどの新手法が開発され、そのスループット性の増大が計られている。しかし、安全性の検索に関しては、従来と同様の方法がとられることが多く、安全性検索の過程が律速となり創薬の開発速度が制約される恐れがある。

遺伝毒性試験は、ヒトゲノムに対する化学物質の毒性を検索・評価する試験系であり、その結果は発がん性と強く関連することから、発がん性の予測試験として汎用されてきた。また、遺伝毒性を介して発がん性を示す化合物には、一般に閾値が無いと考えられており、医薬品の使用に伴う発がん性のメカニズムに遺伝毒性（DNA に対する変

異作用）が介在するか否かは重要な問題である。創薬にあたっては、開発の状況に見合った適切な遺伝毒性試験を実施し、遺伝毒性を示さない候補化合物を選択することが大切である。

本研究班では、微生物を用いたハイ・スループット遺伝毒性検出系を構築するとともに、トランスジェニックラットおよびマウス細胞を用いて、化合物の発がん作用に遺伝毒性が寄与しているかを明らかにする in vivo 試験系の開発評価を進めている（図1）。

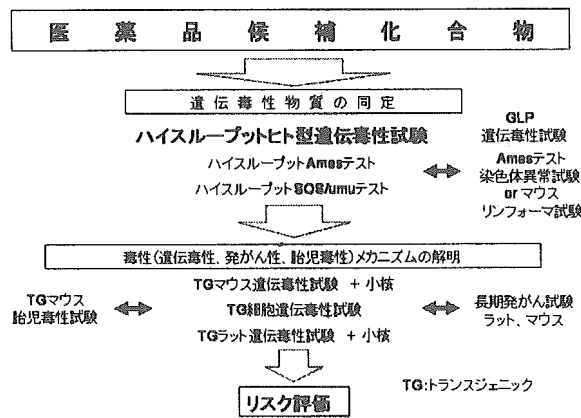


図1 遺伝毒性、発がん性、胎児毒性を勘案した毒性スクリーニングのフローチャート

今年度はヒトアセチル転移酵素(NAT1)を発現する新しい umu テスト株 (NM6001)が芳香族アミンに対して高い感受性を示すことを明らかにした。さらに umu テストのキット化を進めた。また、遺

伝毒性と密接な関係にあり次世代への化合物の影響を調べる催奇形性の検索に有用な、ヒト薬物代謝酵素遺伝子を組み込んだ新規トランスジェニックマウスを開発した。

## B. 研究方法

### B-1 umu テスト

LB 培養液に *Salmonella typhimurium* (以下サルモネラと略) NM6000 (TA1538/1, 8-DNP/pSK1002、対照株)、NM6001 (ヒト NAT1 高生産株)、NM6002 (ヒト NAT2 高生産株) を接種し、37°C で一夜培養した。菌液を TGA 培地で 100 倍希釈し、その菌液を 37°C で 1 時間培養した。菌液 0.85 mL に被験物質溶液 10  $\mu$ L、S9 mix 0.15 mL を加え、37°C、2 時間振盪培養した。その後 X-Gal を加え 37°C、1 時間反応後、菌液の  $\beta$ -D-galactosidase 活性を測定した。濃度に依存して相対酵素活性が増加し、かつその値が陰性対照 (溶媒) の 2 倍以上となった場合を陽性と判定した。

### B-2 umu テストのキット化

サルモネラ NM2009 (サルモネラ NAT 高生産株) を凍結乾燥させ、試験当日に 1 mL の TGA 培養液加えて 1 時間前培養し、さらに 10 mL の培養液を加えて 37°C で 2 時間培養した。96 ウェルプレートに被験物質 10  $\mu$ L、試験菌液を 100  $\mu$ L 加え、37°C で 2 時間培養した。その後 X-Gal を 100  $\mu$ L 加え 37°C、1 時間反応後、反応停止液を 100  $\mu$ L 加え、 $\beta$ -D-galactosidase 活性を測定した。また 96 ウェルハーフエリアプレートを用いて試験を実施した。

### B-3 フラクチュエーション Ames 試験 (FAT)

試験菌株にはサルモネラ TA100、TA98 株を用いた。被験物質による処理は 24 ウェルマイクロプレートを用いて行った。S9 mix 非存在下では各ウェルに被験物質調製液 10  $\mu$ L および菌懸濁液 490  $\mu$ L を、S9 mix 存在下では各ウェルに被験物質調製液 10  $\mu$ L、菌懸濁液 415  $\mu$ L および S9 mix 75  $\mu$ L を入れて、37°C、90 分間回転培養した。培養終了

後の各ウェルに指示培地を 2.5 mL 加えた後、24 ウェルマイクロプレートの 1 ウェル中の処理液を、384 ウェルマイクロプレートの 48 ウェルに 50  $\mu$ L ずつ分注した。指示培地には発色試薬の bromocresol purple の他に histidine、biotin および glucose が含まれている。37°C で 3 日間静置培養後、48 ウェル中の黄変したウェル (黄変ウェル) の数を計測した後、黄変ウェルの出現頻度 (%) を算出した。黄変ウェルの出現頻度が陰性対照の 3 倍以上となり用量依存性が認められた場合に陽性と判定した。

### B-4 ヒト DNA polymerase $\kappa$ を発現するサルモネラ株の作製

ヒト DNA polymerase  $\kappa$  (hDNA pol  $\kappa$ ) をサルモネラで発現させるプラスミド pYG8573 (*lac* プロモーターから HisTag-hDNA pol  $\kappa$  を発現) と pYG8576 (大腸菌 *dinB* 遺伝子のプロモーターから HisTag-hDNA pol  $\kappa$  を発現) を作製した。対照として、大腸菌 *dinB* 遺伝子のプロモーターから HisTag-DinB を発現するプラスミド pYG8574 を作製した。作製したプラスミドをサルモネラ TA1538 株に導入し、HisTag に対する抗体を用いて発現を確認し、benzo[a]pyrene (BP)、10-azabenz[a]pyrene (10-azaBP)、3-methylcholanthrene (3-MC) を用いて S9mix の存在下で Ames 試験を行った。

### B-5 トランスジェニックマウス肺由来 *gpt delta* L1 細胞を用いる変異の解析

Cisplatin、transplatin および溶媒処置群において、それぞれ 3 本ずつの 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコに *gpt delta* L1 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/flask の密度で播種した。翌日、cisplatin を 0.25, 0.5, 1  $\mu$ g/mL の用量で、transplatin を 12.5, 25, 50  $\mu$ g/mL の用量でそれぞれ添加した。24 時間培養後に培養液を交換し、以降、適宜継代して 75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコで細胞が confluent になった時点で細胞を回収した。細胞の培養期間は化合物添加から 3~9

日間であった。細胞から DNA を抽出し、*in vitro* packaging により λEG10 ファージを回収した。得られたファージを宿主菌に感染させ、6-thioguanine selection および Spi<sup>-</sup>selection により *gpt* 変異体頻度 (MF) および Spi<sup>-</sup>MF を測定した。得られた *gpt* mutant および Spi<sup>-</sup>mutant について DNA シークエンス解析を実施した。

#### B-6 Phenacetin の長期間混餌投与における遺伝子突然変異誘発性検討

*gpt* delta ラット (ヘテロ体、13-14 週齢、雄雌計 46 匹) に 0.5% phenacetin を 26 および 52 週間混餌投与した。投与群および非投与群のラット肝臓からゲノム DNA を抽出し、*in vitro* packaging 法にて λEG10 ファージを回収後、6-TG および Spi<sup>-</sup>MF を測定した。

#### B-7 トランスジェニックマウスを用いる催奇形性試験

野生型マウスおよびヒト胎児 P450 分子種 (CYP1A1、CYP1B1 および CYP3A7) をそれぞれ単独で発現するトランスジェニックマウスの胎生 11.5 日の胎子を摘出し、thalidomide (500 μg/mL) 存在下、非存在下で 24 時間胎仔全培養を行った。胎仔を培養した後、胎仔の形態を観察し、奇形の有無を評価した。

(倫理面への配慮) 全ての動物実験は、実施施設における「動物実験管理に関する指針」従い、動物実験管理委員会の承認を受けて実施された。マウス培養細胞ならびに微生物を用いる実験は、倫理面の問題は無いものと判断した。

### C. 研究結果

#### C-1 ヒトアセチル転移酵素 NAT1 と NAT2 を発現する umu テスト株の感受性

NM6001 (ヒト NAT1 高生産株)、NM6002 (ヒト NAT2 高生産株) および親株 NM6000 を用いて 4-aminobiphenyl (4-ABP)

2-acetylaminofluorene (2-AAF)、β-naphthylamine、*o*-tolidine、*o*-anisidine、および benzidine による *umuC* 遺伝子誘導を調べた。NM6001 株は、検索したすべての化合物について NM6002 株よりも高感受性を示し、低用量からより強く *umuC* 遺伝子を誘導した。ヒトアセチル転移酵素遺伝子を導入していない NM6000 株では、これらの化合物による *umuC* 遺伝子誘導が認められなかった。*o*-tolidine および benzidine については、NM6000 株だけでなく、ヒト NAT2 を発現する NM6002 でも *umuC* 遺伝子誘導が見られなかった。これらの結果から、NM6001 株が芳香族アミン類の DNA 損傷作用に対して高い感受性を示すことが示唆された (小田)。

#### C-2 キット化 umu テストと Ames 試験の相関

米国国家毒性計画 (NTP) で試験された 20 種類の化合物について、本キットを用いて umu 試験を行い Ames 試験の結果と比較した。Ames 試験で陰性を示す 8 化合物は、本キットを用いた試験においても陰性を示した。Ames 試験で陽性を示した 12 化合物のうち 9 化合物が本キットにおいて陽性を示した (75%)。被験物質、菌液の量が半分で行える 96 ウェルハーフエリアプレートを用いて同一の試験を実施し、96 ウェルプレートと同様の結果を得た (金谷)。

#### C-3 改良法 FAT と Ames 試験の相関

これまでに、菌懸濁液だけでなく指示培地に histidine を添加することにより、陽性反応が顕著となり、しかも陰性対照値には影響を及ぼさないことを明らかにしている。今年度は、この改良法 FAT を用いて NTP で試験された 22 種類の化合物について試験を行い、その結果を従来からの Ames 試験の結果と比較した。Ames 試験で陰性の 4 化合物はすべて改良法 FAT でも陰性となり特異性は 100% であった。また、Ames 試験で陽性の 18 化合物のうち 12 化合物 (67%) は改良法 FAT でも陽性となった (原)。

#### C-4 ヒト DNA polymerase $\kappa$ を発現するサルモネラ株

Ames 試験のテスターであるサルモネラ TA1538 株に、損傷乗り越え型ヒト DNA ポリメラーゼ  $\kappa$  (hDNA pol  $\kappa$ ) 遺伝子を導入・発現させ、多環芳香族炭化水素に高感受性を示すテスター株の構築を試みた。*lac* プロモーターを用いて hDNA pol  $\kappa$  を発現する pYG8573 プラスミドからは、フルサイズおよび C 末側が欠損した hDNA pol  $\kappa$  が発現した。だが BP を用いて Ames test を行っても BP に対する変異感受性の増大は観察されなかった。*lac* プロモーターからは構成的に hDNA pol  $\kappa$  が発現するが、大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV の発現は DNA 損傷が起きた時に誘導される。そこで大腸菌 *dinB* のプロモーターを用いて hDNA pol  $\kappa$  を発現するプラスミド pYG8576 (HisTag-hDNA pol  $\kappa$ ) を作製し TA1538 株に導入した。また hDNA pol  $\kappa$  の C 末端部分を大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV の C 末端部分で置き換えたキメラ蛋白を発現するプラスミドを 3 種作製して TA1538 株に導入した。また導入する親株も TA1538 以外に、サルモネラの *dinB* を欠損させた株や他の損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ (DNA pol II, V) を欠損させた株を用い、変異原も BP、10-azaBP、3-MC を用いた。だが、いずれの場合も、変異感受性の変化は観察されなかった (能美)。

#### C-5 *gpt delta* L1 細胞を用いた変異解析

*gpt* MF は、溶媒処置群に対して cisplatin 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  処置群で 3.4 倍、transplatin 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  処置群で 2.6 倍であった。Cisplatin 処理群では、塩基置換、欠失、挿入など全ての変異の増加が認められ、塩基置換では transversion、transition とともに増加した。また、その変異は A:T 塩基対、G:C 塩基対のいずれにおいても認められた。Transplatin では transition の増加が顕著であり、transversion の増加は認められなかった。Spi<sup>-</sup> MF は、溶媒処置群に対して cisplatin 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  処置群および transplatin 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  処置群でいずれも 2 倍であった。両処置群ともに 1 塩基欠失およ

び大きな欠失変異の増加が認められた。Cisplatin で誘発された欠失変異の多くには、切断末端結合部に短い相同配列が認められた。一方、transplatin では切断末端結合部に相同配列を持たない欠失変異が多く見られた (新倉)。

#### C-6 *gpt delta* トランスジェニックラットを用いた変異検出

26 週間投与および 52 週間投与のトランスジェニックラットの肝臓における control 群の *gpt* MF は 2.41 $\pm$ 1.95、3.96 $\pm$ 2.23 (26 週、52 週、mean  $\pm$  SD) に対し、phenacetin 投与群の MF 値は 17.5 $\pm$ 10.5、32.26 $\pm$ 19.98 (26 週、52 週 mean  $\pm$  SD) と非常に強い上昇を示した。また、control 群の Spi<sup>-</sup> MF 値は 3.91 $\pm$ 2.37、2.58 $\pm$ 1.04 (26 週、52 週、mean  $\pm$  SD) に対し、phenacetin 投与群の MF 値は 6.04 $\pm$ 2.21、8.26 $\pm$ 3.31 (26 週、52 週 mean  $\pm$  SD) と強い上昇を示した。*gpt* MF、Spi<sup>-</sup> MF ともに 26 週よりも 52 週で高値傾向を示しており、変異の蓄積が示唆された。

S.D. 系の *gpt delta* ラットを、F344 ラットと 10 世代にわたってバッククロスした。3 匹の産仔の肝臓を採取し、遺伝子回収効率を調べたところ、541,500 $\sim$ 841,200  $\lambda$  EG10/3 reactions/animal を示し、オリジナルである SD 系 *gpt delta* ラットと遜色ない値であることが確認された (林)。

#### C-7 トランスジェニックマウスを用いる催奇形性試験

胎仔全培養の結果、ヒト P450 遺伝子を持たない野生型マウスでは thalidomide による奇形は誘発されなかった。またヒト CYP1A1 および CYP1B1 を発現するトランスジェニックマウスでは野生型と同様、thalidomide によって奇形は誘発されなかった。一方で、ヒト CYP3A7 を発現するトランスジェニックマウスでは thalidomide 処置によって四肢に奇形が誘発された。このトランスジェニックマウスにおいて thalidomide によって誘発される奇形の頻度は 57% であった (鎌滝)。

#### D. 考察

創薬の初期段階にあつては、候補化合物の（遺伝）毒性を少量の試料で迅速にスクリーニングするシステムの確立が望まれている。今年度は、ヒト NAT1 を発現する *umu* テストの新規指標菌株 (NM6001) の評価を進めるとともに、*umu* テストのキット化を行った。また改良法 FAT を行い良好な結果を得た。さらに個体レベルで候補化合物の遺伝毒性や催奇形性を評価する系の開発を進めた。

膀胱がんを起こす既知芳香族アミンが、ヒト型アセチル転移酵素 NAT1 あるいは NAT2 により代謝的活性化され、*umuC* 遺伝子発現を誘導するかどうかを、ヒト型アセチル転移酵素遺伝子 NAT1 と NAT2 を導入した菌株 NM6001 と NM6002 および親株 NM6000 を用いて検討した。*umuC* 遺伝子は、DNA 損傷が起こると発現が誘導される SOS 遺伝子の一つである。NAT1 発現株と NAT2 発現株の感受性を比較し、ヒト型 NAT1 発現株 (NM6001) が芳香族アミンに対して高感受性を示すことを明らかにした。このことは、膀胱がんを生じる芳香族アミンは、NAT2 よりも NAT1 によって遺伝毒性を発揮することを示唆している。以上のことから、今後 *umu* テストにヒト型 NAT 遺伝子発現株を導入することにより、創薬のハイ・スループット化が促進されるものと期待される（小田）。

*umu* テストのキット化を進め、作製したキットを用いれば、準備から測定までおよそ 7 時間で被験物質の遺伝毒性を検出することが可能であることを明らかにした。また NTP 化合物 20 種について Ames 試験との相関を調べ、同試験で陰性であった化合物は本キットでも陰性であり、陽性を示す物質も難溶性の化合物以外はよい相関を得た。難溶性の物質については、被験物質が溶媒に溶けずに菌体に作用しなかった可能性が考えられる。また 96 ウェルハーフエリアプレートを用いた場合にも、通常の 96 ウェルプレートを用いたのと同様の結果を得ており、より微量のサンプルを用いてその遺伝毒性を検索する際に有用と考えられる。今

後は、小田の開発したヒト NAT を発現する株を用いた *umu* 試験のキット化を試みる必要があるだろう（金谷）。

改良法 FAT のバリデーションのため、NTP 選定化合物から無作為に 22 種の化合物を選んで Ames 試験と改良法 FAT を実施し、両試験の結果がどの程度一致するかを調べた。その結果、特異性 (Ames 試験で陰性の化合物を陰性と判定する率): 100%、感受性 (Ames 試験で陽性の化合物を陽性と判定する率): 66.7%、予測性 (陽性、陰性を問わず Ames 試験と結果が一致する率): 72.7% であった。これまでに 18 種の NTP 選定化合物について改良法 FAT で試験をしており、今回の結果 (22 化合物) と合わせた 40 化合物についての相関は、特異性: 100%、感受性: 72.4%、予測性: 80.0% であった。特異性はこれまで調べた範囲では 100% であり、Ames 試験で陰性の化合物においては改良法 FAT においても陰性の結果が得られる可能性が非常に高いことが確認された。この結果は、創薬開発の初期において、試験に十分な量の化合物を合成することが難しく、少量で Ames 試験の結果が陰性となる化合物の候補を選択したい場合に、改良法 FAT が非常に有用となることを意味している。感受性の値 (72.4%) は、開発の初期段階に僅か 5 mg で変異原性を予測できることを考慮すれば、十分に実用価値のあるものと考えられるが、試験法をさらに改良することにより、より高い感受性を得ることが必要である。この点については、今回 3 種の化合物について、被験物質調製液の濃度を高くすることにより陽性結果を得ることができたことから、感受性向上の可能性が期待される。今後、使用する化合物量を増加させずに高い感受性が得られるような試験法について検討していきたい（原）。

これまでに Y ファミリー DNA ポリメラーゼに属する大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV をコードする *dinB* 遺伝子をサルモネラ TA1538 株に導入・発現させることで、多環芳香属炭化水素に対して高い感受性を有する新しい菌株 YG5161 を作製している。今年度は、DNA ポリメラーゼ IV のヒトにおけ

るカウンターパートである hDNA pol  $\kappa$  をサルモネラで発現させ、高感度化とともにヒトの属性を微生物テスターに導入することを試みた。hDNA pol  $\kappa$  の発現は観察されたが、変異原に対する感受性の向上は観察されなかった。大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV については、大腸菌の複製型 DNA ポリメラーゼの  $\beta$  サブユニットと C 末端部分および little finger domain で相互作用することが明らかにされている。 $\beta$  サブユニットはドーナツ状の蛋白質で、中空部分に DNA を通して DNA 上をスライドし、DNA ポリメラーゼが鋳型鎖から脱落することを防いでいる。hDNA pol  $\kappa$  の C 末端部分を大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV の C 末端部分で置き換えたキメラ蛋白を発現するプラスミドを作製しサルモネラ株に導入したが、いずれの場合も、変異感受性の変化は観察されなかった。ヒトと大腸菌とではコドンの使い方に違いがあるため、現在、ヒトの mRNA から蛋白質への翻訳を促進するプラスミド pRIL をサルモネラ株に導入してキメラ蛋白の発現促進を試みている。今後は、hDNA pol  $\kappa$  をマウス細胞で発現する発現プラスミドを構築し、変異検出用トランスジェニックマウス細胞 *gpt delta L1* で発現させ変異感受性の増大が認められるか否かを検討する（能美）。

*gpt delta L1* 細胞を用いて cisplatin および transplatin によって誘発された変異を検出した。Cisplatin で誘発される変異の hot spot は、報告されている adduct 形成部位と一致していた。Transplatin によって哺乳類細胞で誘発される変異の hot spot を明らかにし、G:C rich な配列に複数の monoadduct が形成されることで変異が誘発される可能性を示した。Cisplatin と transplatin では誘発される DNA 二重鎖切断末端の形状が異なることが示唆された。*gpt delta L1* 細胞は、変異の誘発メカニズムの解析に有用である（新倉）。

これまでに *gpt delta* ラットに phenacetin を長期連投し、発がん標的臓器である腎臓で遺伝子突然変異頻度が非投与群の 2 倍前後まで上昇する

ことを明らかにしている。今年度は、発がん非標的臓器である肝臓について遺伝子突然変異頻度を測定し、腎臓における変異頻度と比較することで、発がん遺伝子変異の関連性を明らかにすることを企画した。肝臓では、予想に反して強い変異頻度の上昇が認められ、投与期間によって変異が蓄積する傾向が認められた。特に *gpt* 遺伝子変異は、非投与群の 8 倍以上に上昇しており、毒性等による二次的な変異の誘発である可能性は低く、phenacetin から生成した活性代謝物によって生じた遺伝子損傷に基づくものと考えられる。トランスジェニック動物を用いる遺伝毒性試験は、微量の遺伝毒性物質が長期にわたり暴露すると考えられる環境汚染物質等の評価にも有用であると考えられた。

肝臓における変異の上昇が発がんにはつながらないことから、変異の誘発が発がんの必要条件ではあるが、phenacetin の場合は十分条件ではないと考えられる。発がんは遺伝子損傷を起点に多段階のステップを経る必要があり、その中でも DNA 修復系の異常や細胞増殖系の制限解除が重要なチェックポイントとなる。これらの異常を引き起こすまでには、生物学的な閾値の存在が予想され、転写にリンクして修復が行われる発現量の多い遺伝子群においては、遺伝子損傷の誘発が一定レベルまでであれば、修復しうる許容範囲内の変化であることが推測される。また、肝臓においては DNA 修復酵素が高く発現していることから、固定された変異は特定の DNA 配列に偏りがみられる可能性がある。今後は、変異スペクトルを解析し、他の発がん物質と比較することが重要であると考えられる。また、3 日間の短期高用量投与における肝臓の変異頻度を測定し、解析することで、変異蓄積の有無をより明確にし、リスク評価を確かなものにしていく必要がある。

F344 系の *gpt delta* ラットを作製するため、SD 系 *gpt delta* ラットと F344 系ラットを交配することでバックグランドを F344 系へと変更した。変更後に遺伝子回収効率を確認した結果、SD 系と

ほぼ同等レベルであることが確認された。次に自然突然変異率および陽性対照物質への反応性を確認する予定である。また、F344系の *gpt delta* ラットを交配し、ホモ体の作製も併せて試みたところ、産子は得られるもののSD系 *gpt delta* ラットと同様にホモ個体には、歯の欠損が認められ、系統として維持することが出来なかった。F344系は、発がん性試験に最も汎用されている系統であり、SDよりも長寿命であることから、長期の評価にも活用できると考えられる(林)。

Thalidomideによる四肢に誘発される奇形が、ヒト CYP3A7を発現するトランスジェニックマウスを用いることで再現できた。このことから、thalidomideが誘発するアザラシ症等の奇形発生にはヒト胎児で発現するCYP3A7が関与することが示唆された。樹立したトランスジェニックマウスを用いて化学物質の催奇形性を検討し得ることが示された(鎌滝)。

#### E. 結論

創薬に有用な遺伝毒性試験系の構築を行った。創薬の初期段階において迅速に遺伝毒性を検索する、ヒト遺伝子を発現するハイ・スループット微生物試験菌株を確立し、その評価を行った。また創薬の後期段階において、ラット、マウスに発がん性を示す候補化合物の作用機構を明らかにするため、トランスジェニックラットおよびトランスジェニックマウス細胞試験系を樹立し、その有用性について検討を進めた。催奇形性を検索するトランスジェニックマウス試験系を樹立した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. T. Nohmi, K. Masumura, Molecular natural of intra-chromosomal deletions and base substitutions induced by environmental mutagens, *Env. Mol. Mutagen.*, in press.
2. T. Nohmi, S.-R. Kim and M. Yamada, Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes, *Mutat. Res.*, in

press.

3. A. Hashimoto, K. Amanuma, K. Hiyoshi, H. Takano, K. Masumura, T. Nohmi, and Y. Aoki, in vivo mutagenesis caused by benzo[a]pyrene instilled into the lung of *gpt delta* transgenic mice, *Env. Mol. Mutagen.*, in press.
4. S.-R. Kim, K. Kokubo, K. Matsui, N. Yamada, Y. Kanke, M. Fukuoka, M. Yamada and T. Nohmi, Light-dependent mutagenesis by benzo[a]pyrene is mediated via oxidative DNA damage, *Env. Mol. Mutagen.*, in press.
5. K. Kanki, A. Nishikawa, K. Masumura, T. Umemura, T. Imazawa, Y. Kitamura, T. Nohmi, M. Hirose, In vivo mutational analysis of liver DNA in *gpt delta* transgenic rats treated with the hepatocarcinogens N-nitrosopyrrolidine, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and di(2-ethylhexyl)phthalate., *Mol. Carcinog.* 42, 9-17 (2005)
6. A. Shibata, N. Kamada, K. Masumura, T. Nohmi, S. Kobayashi, H. Teraoka, H. Nakagama, T. Sugimura, H. Suzuki and M. Masutani, Parp-1 deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements in vivo after treatment with an alkylating agent, *Oncogene*, 24, 1328-1337 (2005)
7. T. Nohmi and K. Masumura, *gpt delta* transgenic mouse: a novel approach for molecular dissection of deletion mutations in vivo, *Advances in Biophysics*, 38, 97-121 (2004)
8. A. Shibata, M. Masutani, N. Kamada, K. Masumura, H. Nakagama, S. Kobayashi, H. Teraoka, H. Suzuki and T. Nohmi, An efficient method for mapping and characterizing structures of deletion mutations in *gpt delta* mice using Southern blot analysis with oligo DNA probes, *Env. Mol. Mutagen.*, 43, 204-207 (2004)
9. S.-R. Kim, K. Matsui, M. Yamada, T. Kohno, H. Kasai, J. Yokota and T. Nohmi, Suppression of chemically-induced and spontaneously occurring oxidative mutagenesis by three alleles of human OGG1 gene encoding 8-hydroxyguanine DNA

- glycosylase, *Mutat. Res.*, 554, 365-374 (2004)
10. K. Matsumura, T. Saito, Y. Takahashi, T. Ozeki, K. Kiyotani, M. Fujieda, H. Yamazaki, H. Kunitoh, and T. Kamataki, Identification of a novel polymorphic enhancer of the human CYP3A4 gene, *Mol. Pharmacol.*, 65, 326-334 (2004)
  11. H. Yamazaki, M. Fujieda, M. Togashi, T. Saito, G. Pretib, J.R. Cashman and T. Kamataki, Effects of the dietary supplements, activated charcoal and copper chlorophyllin, on urinary excretion of trimethylamine in Japanese trimethylaminuria patients, *Life Sci.*, 74, 2739-2747 (2004)
  12. M. Nukaya, Y. Takahashi, F.J. Gonzalez and T. Kamataki, Aryl hydrocarbon receptor-mediated suppression of GH receptor and janus kinase 2 expression in mice, *FEBS Letter*, 558, 96-100 (2004)
  13. S. Yamaori, H. Yamazaki, S. Iwano, K. Kiyotani, K. Matsumura, G. Honda, K. Nakagawa, T. Ishizaki and T. Kamataki, CYP3A5 contributes significantly to CYP3A-mediated drug oxidations in liver microsomes from Japanese subjects, *Drug Metab. Pharmacokin.*, 19, 120-129 (2004)
  14. T. Sakuma, T. Shimojima, K. Miwa and T. Kamataki, Cloning of CYP2D21 and CYP3A22 cDNAs from liver of miniature pigs, *Drug Metab. Dispos.*, 32, 376-378 (2004)
  15. K. Toide, Y. Terauchi, T. Fujii, H. Yamazaki and T. Kamataki, Uridine diphosphate sugar-selective conjugation of an aldose reductase inhibitor (AS-3201) by UDP-glucuronosyltransferase 2B subfamily in human liver microsomes, *Biochem. Pharmacol.*, 67, 1269-1278 (2004)
  16. N. Ariyoshi, H. Sekine, K. Nakayama, K. Saito, A. Miyamoto and T. Kamataki, Identification of deletion-junction site of CYP2A6\*4B allele lacking entire coding region of CYP2A6 in Japanese, *Pharmacogenetics*, 14, 701-705 (2004)
  17. Y. Yamazaki, K. Fujita, K. Nakayama, A. Suzuki, K. Nakamura, H. Yamazaki and T. Kamataki, Establishment of ten strains of genetically engineered *Salmonella typhimurium* TA1538 each co-expressing a form of human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase sensitive to various promutagens, *Mutat. Res.*, 562, 151-162 (2004)
  18. M. Fujieda, H. Yamazaki, T. Saito, K. Kiyotani, M. A. Gyamfi, M. Sakurai, H. Dosaka-Akita, Y. Sawamura, J. Yokota, H. Kunitoh and T. Kamataki, Evaluation of CYP2A6 Genetic Polymorphisms as Determinants of Smoking Behavior and Tobacco-related Lung Cancer Risk in Male Japanese Smokers, *Carcinogenesis*, 25, 2451-2458 (2004)
  19. Y. Oda, Analysis of the involvement of human *N*-acetyltransferase 1 in the genotoxic activation of bladder carcinogenic arylamines using a SOS/*umu* assay system, *Mutat. Res.*, 554, 399-406 (2004)
- ## 2. 学会発表
1. 1. M. Yamada, T. Nunoshiba, M. Shimizu, K. Matsui, T. Nohmi, Involvement of Y-family DNA polymerases in oxidized nucleotide incorporation in *sod/fur* deficient strains, Keystone symposium "Genome Instability and Repair" in New Mexico, U.S.A., March 2005.
  2. Y. Aoki, A. Hashimoto, K. Amanuma, M. Matsumoto, K. Hiyoshi, H. Takano, K. Masumura, K. Itoh, T. Nohmi and M. Yamamoto, Enhanced mutagenesis in the lung of Nrf2 knockout *gpt* delta mice, ERATO Symposium "Molecular Mechanism of Environmental Response to Food and Oxygen" in Ibaraki, March 2005.
  3. 能美健彦, 環境化学物質の発がん・遺伝毒性リスク評価: トランスジェニック動物を用いたアプローチ, 日本薬学会関東支部第29回学術講演会「化学物質の毒性メカニズムとリスク評価」(2005, 1)
  4. 佐藤和哉, 山田雅巳, 能美健彦, 原島秀吉,



- 紙谷浩之, 大腸菌DinB、UmuDC蛋白質の酸化損傷DNA前駆体による変異誘発に対する影響, Workshop on DNA Repair, Recombination and Mutagenesis (2005, 1)
5. 小久保清子, 山田雅巳, 松井恵子, 金秀良, 菅家祐輔, 能美健彦, バクテリアにおける-2フレームシフト変異に関わるDNAポリメラーゼの多様性, Workshop on DNA Repair, Recombination and Mutagenesis (2005, 1)
  6. T. Nohmi, Possible roles of Y-family DNA polymerases in mutagenesis through incorporation of oxidized dNTPs, US-Japan Cancer Research Cooperation Seminar "Error-Prone DNA Polymerases in Mutagenesis and Carcinogenesis" in Hawaii, U. S. A., December 2004.
  7. T. Nohmi, Roles of Y-family DNA Polymerases in Oxidative Mutagenesis, 40<sup>th</sup> Anniversary Meeting of Japan-US Medical Cooperation, Environmental Genomics and Carcinogenesis Panel in Kyoto, December 2004.
  8. 小久保清子, 山田雅巳, 菅家祐輔, 能美健彦, 損傷乗り越えDNA合成に関わるDNAポリメラーゼの多様性について, 第27回日本分子生物学会年会 (2004, 12)
  9. 山田 雅巳, 布柴 達男, 松井 恵子, 能美 健彦, 大腸菌*sod/fur*欠損株での酸化損傷ヌクレオチド取り込みに対するY-ファミリーDNAポリメラーゼの関与, 第27回日本分子生物学会年会 (2004, 12)
  10. 佐藤和哉, 山田雅巳, 能美健彦, 原島秀吉, 紙谷浩之, ポリメラーゼ活性を欠損した大腸菌DinB、UmuDC蛋白質の酸化損傷DNA前駆体による変異誘発に対する影響, 第27回日本分子生物学会年会 (2004, 12)
  11. 能美健彦, 環境とゲノミクス: これからの環境変異原研究, 日本環境変異原学会第33回大会会長講演 (2004, 12)
  12. P. Gruz, K. Matsui and T. Nohmi, Progress in the establishment of a microbial *in vivo* assay for the human DNA polymerase  $\kappa$ , 日本環境変異原学会第33回大会 (2004, 12)
  13. 池田恵, 増村健一, 坂元康晃, 王冰, 根井充, 早田勇, 能美健彦, *gpt delta* マウスを用いたNNK 誘発突然変異に対する低線量率放射線の影響検策, 日本環境変異原学会第33回大会 (2004, 12)
  14. 落合雅子, 須江真由美, 肥後仁大, 増村健一, 能美健彦, 杉村隆, 中釜斉, *scid*変異のヘテロ接合体における自然発生及び azoxymethane誘発欠失型突然変異, 日本環境変異原学会第33回大会 (2004, 12)
  15. 橋本顯子, 天沼喜美子, 日吉孝子, 柳澤利枝, 高野裕久, 増村健一, 能美健彦, 青木康展, ディーゼル粒子の気管内投与により *gpt delta*マウスの肺に生じた突然変異スペクトルの解析, 日本環境変異原学会第33回大会 (2004, 12)
  16. 竹入 章, 三島 雅之, 田中 健司, 塩田 明文, 原田 麻子, 新倉 博文, 出来 俊昭, 増村 健一, 能美 健彦, *gpt delta* L1細胞においてcisplatin およびtransplatinにより誘発された変異の解析, 日本環境変異原学会第33回大会 (2004, 12)
  17. 山田雅巳, 松井恵子, 宮崎雅史, 鎌滝哲也, 能美健彦, 多環芳香族炭化水素に特異的な微生物遺伝毒性検索系の開発, 日本環境変異原学会第33回大会 (2004, 12)
  18. M. Shimizu, P. Gruz, H. Kamiya, C. Masutani, Y. Xu, H. Sugiyama, H. Harashima, F. Hanaoka and T. Nohmi, Incorporation specificity of oxidized dNTPs by human DNA polymerase, ASM meeting "DNA repair and mutagenesis" in Bermuda, November 2004.
  19. K. Kokubo, K. Matsui, M. Yamada, S.-R. Kim,

- P. Gruz, M. Shimizu, Y. Kanke and T. Nohmi, Multiple DNA polymerases involved in chemically-induced frameshift mutagenesis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, 35<sup>th</sup> Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Pittsburgh, U.S.A., October 2004.
20. 橋本顯子, 天沼喜美子, 松本 理, 日吉孝子, 高野裕久, 増村健一, 伊東 健, 能美健彦, 山本雅之, 青木康展, B[a]Pを気管内投与したNrf2ノックアウト*gpt delta*マウスの肺中に生じた突然変異スペクトルの解析, フォーラム2004: 衛生化学・環境トキシコロジー (2004, 10)
21. 岡保夫, 三井雅之, 北橋宋, 戸塚ゆ加里, 増村健一, 森幸雄, 山田雅巳, 能美健彦, 若林敬二, 堤雅弘, 発癌物質を投与した動物における腭液の変異原性, 第63回日本癌学会学術総会 (2004, 10)
22. 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦, アルキル化剤高感受性サルモネラ株を用いた腭発がん変異原の検索, 第63回日本癌学会学術総会 (2004, 10)
23. T. Nohmi and K. Masumura, Molecular dissection of *in vivo* DNA rearrangements induced by chemical mutagens and radiations, 6th International Conference on High Levels of Natural Radiation and Radon Areas in Osaka, Japan, September 2004.
24. T. Nohmi and K. Masumura, An *in vivo* approach to analyze combined effects of chemical exposure and low-dose radiations, International Workshop on Biological Responses to Low Dose Radiation in Sendai, Japan, August 2004.
25. T. Nohmi, Involvement of DNA polymerase III holoenzyme as well as SOS-inducible DNA polymerases in chemically-induced frameshift mutagenesis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. The 2<sup>nd</sup> US-Japan DNA Repair Meeting in Hawaii, USA, June 2004.
26. M. Shimizu, P. Gruz and T. Nohmi, Y-family DNA polymerases: the roles in oxidative mutagenesis, the 5th Japan-France Workshop in Chiba, Japan, June 2004.
27. 能美健彦, スクレオチドプールの酸化と突然変異, 日本進化学会第6回大会 (2004, 8)
28. 須井 哉, 川上久美子, 大山徳子, 原 巧, ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討3, 日本環境変異原学会第33回大会 (2004, 12)
29. 湯本聡一, 斉藤俊光, 原 巧, 小田美光, 金谷一司, umu-試験用試薬キットを用いたNTP 選定化合物の測定およびハイスループットの検討, 日本環境変異原学会第 33 回大会 (2004, 12)
30. 小田美光, 渡辺徹志, 高村岳樹, 平山晃久, 3-Nitrobenzanthrone の *N*-ヒドロキシ代謝産物による代謝的活性化- ヒトアセチル転移酵素とヒト硫酸転移酵素の役割-, 日本環境変異原学会第 33 回大会 (2004, 12)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし