

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品添加物等における遺伝毒性評価のための
戦略構築に関する研究

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 能美 健彦

平成19 (2007)年3月

目 次

I. 研究報告	
食品添加物等における遺伝毒性評価のための 戦略構築に関する研究	----- 1
能美健彦	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 41
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 43

研究課題名: 食品添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究

主任研究者: 能美健彦 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部室長

研究要旨

バクテリアおよびヒト細胞を用いた研究から、DNA 修復と DNA 損傷の乗り越えに関わる DNA ポリメラーゼが、遺伝毒性の閾値形成に関与していることを示唆した。閾値に関する国際動向の分析に基づき、DNA に直接作用する物質であっても DNA 修復等により閾値が形成されることを提言した。低用量域での遺伝毒性作用を検討するため、5 つの酸化 DNA 損傷を一斉分析しうる LC/MS/MS 法を確立した。*gpt delta* トランスジェニックラットに臭素酸カリウムを投与し、発がん遺伝毒性の標的臓器が一致することを示した。遺伝毒性発がん物質の閾値形成機構を分子レベル、細胞レベル、個体レベルで研究する基盤形成を進めた。

キーワード: 遺伝毒性発がん物質、閾値、DNA 修復、DNA ポリメラーゼ、酸化 DNA 損傷、発がん標的臓器

分担研究者

山田雅巳	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 主任研究官
本間正充	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
長尾美奈子	共立薬科大学客員教授
松田知成	京都大学地球環境学学 助教授

A. 研究目的

安全性評価の分野では、遺伝毒性発がん物質には閾値がないという考えが一般的であり、遺伝毒性発がん物質に曝露されたヒトは、どんなに低用量であっても発がんのリスクが高まるものと考えられている。したがって、食品添加物や残留農薬等に遺伝毒性と発がん性が認められた場合には、原則的に ADI(一日摂

取許容量)は設定されない。また大気汚染などのように曝露が不可避である場合には、ユニットリスクという考え方に基づき、生涯の発がんリスクが推定される。

しかしヒトは、さまざまな生体防御物質や防御機構を有しており、遺伝毒性や遺伝毒性に基づく発がん作用にも閾値が存在することが予想される。発がん物質や活性酸素種の多くは、グルタチオンなどの生体防御物質によって不活化されるし、グルタチオンとの抱合を触媒するグルタチオン抱合酵素は主要な解毒酵素として知られている。さらに DNA に損傷が起きても、これを修復する DNA 修復系の存在や、損傷を受けた細胞を死に至らしめて個体としての恒常性を保つアポトーシスも、遺伝毒性発がん物質の閾値形成に寄与している可能性が考えられる。

本研究では、分子生物学的手法を用いて

作製した DNA 修復欠損細胞を用い、その遺伝毒性物質に対する感受性を野生型細胞と比較することで、低用量域における遺伝毒性作用の抑制に DNA 修復系がどのように関与するかを明らかにすることを目的とする。また当該領域における文献を検索し、閾値を加味した遺伝毒性発がん物質の評価方法を提案する。さらに酸化的 DNA 損傷の分析法、動物個体において遺伝毒性を検出するトランスジェニックラットのバリデーションを進め、遺伝毒性発がん物質の閾値形成機構に関する基盤的研究を推進する。

B. 研究方法

1) バクテリアを用いた遺伝毒性閾値の研究

細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験) に用いられる *Salmonella typhimurium* TA1535 株の 8-ハイドロキシグアニン (8-OHG)DNA グリコシラーゼを欠損させた株 (YG3001) と、エンドヌクレアーゼ III と VIII を欠損させた株 (YG3008) を作製した。また TA1535、YG3001、YG3008 に損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼ遺伝子 (*mucAB*) を持つ pKM101 プラスミドを導入し、TA100、YG3206、YG3216 とした (山田)。

2) 哺乳類細胞を用いた遺伝毒性閾値の研究

ヒト細胞 TK6 の染色体中に一カ所だけ制限酵素 I-SceI の切断部位を導入した細胞 TSCE5 を樹立し、I-SceI 制限酵素を一過的に発現させて生ずる突然変異を解析した (本間)。

3) 遺伝毒性閾値に関する国際動向の分析

欧州アカデミーなどの意見をはじめ、文献検索により情報を収集した (長尾)。

4) 食品中 DNA 損傷性物質による DNA 付加体解析法の開発

8-OH-1, *N*⁶-propano-2'-deoxyguanosine

(8-OH-Acro-dG), 6-OH-1, *N*⁶-propano-2'-deoxyguanosine (6-OH-Acro-dG), α -Me- γ -OH-1, *N*⁶-propano-2'-deoxyguanosine (CdG), 1, *N*⁶-etheno-deoxyadenosine (ϵ dA), 3-(2'-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5,6,7-trihydro-6,7-dihydroxyimidazo-[1,2- α] purine-9-one (Glyoxal-dG) の標準品とその安定同位体を合成し LC/MS/MS を用いた同位体希釈法による 5 成分の一斉分析を行った (松田)。

5) 動物個体を用いた遺伝毒性研究

5 週齢の雄 *gpt delta* トランスジェニックラット (各群 10 匹) に臭素酸カリウムを飲水にて 500ppm を 12 週間連続投与した。腎臓と肝臓からゲノム DNA を採取し、*gpt* アッセイと Spi⁺ アッセイにより点突然変異と欠失変異を解析した (能美)。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立医薬品食品衛生研究所の倫理規定に準拠して行った。その他の実験は、倫理上の問題に該当しない。

C. 研究結果

1) バクテリアを用いた遺伝毒性閾値の研究

臭素酸カリウムは、親株および Endo III/VIII 欠損株では変異原性を示さなかったが、8-OHG DNA グリコシラーゼを欠損した株では、復帰変異株の増加が見られ 5000 μ g/plate で対照値の約 5 倍まで増加した。フェナジンメトサルフェート (PMS) とフェナジンエトサルフェート (PES) は、親株および 8-OHG DNA グリコシラーゼを欠損した株では変異原性を示さなかったが、Endo III/VIII を欠損し pKM101 を導入した株 (YG3216) では対照値の 2 倍を超える復帰変異株数の増加が観察された (山田)。

2) 哺乳類細胞を用いた遺伝毒性閾値の研究
I-SceI 発現ベクターを導入することにより、細胞集団の約 70%に単一の DNA 二重鎖切断 (DSB)を導入することができた。DSB によって生じた突然変異体の出現頻度は約 3%であり、残りのほとんどの細胞は突然変異を起こさずに元通り修復されるものと考えられた(本間)。

3) 遺伝毒性閾値に関する国際動向の分析
欧州アカデミーが提言している閾値発現の機構に基く遺伝毒性物質の分類に従い、閾値があると考えられる物質について個々に考察した。その結果、欧州アカデミーの提言による4群、A [DNA に直接反応し linear non-threshold (LNT)として取り扱われる物質]、B (LNTとして取り扱われるが作用様式不明な物質)、C (実用的閾値が存在する物質)および D(間接作用によるもので閾値が存在すると考えられる物質)に分類することが、適切であると判断するに至った。DNA に直接作用する物質についても、少なくとも *in vitro* では DNA 修復による閾値が存在するので、それらを A' 群に分類することを提言する(長尾)。

4) 食品中 DNA 損傷性物質による DNA 付加体解析法の開発
5種の DNA 付加体の混合液の希釈列を作り、250fg から 50pgを LC/MS/MS にて分析した。それぞれの希釈列には一定量の安定同位体を加え内部標準とした。検量線の R² 値はいずれも 0.999 以上であった。また、いずれの付加体においても 250fg でピークが検出された。これは、10 μg の DNA を使った場合、10⁸塩基当たり 2-3 付加体が検出できる感度であった。子牛胸腺 DNA にグリオキサール、アクロレインおよびクロトンアルデヒドを 0.1%(v/v)になるように加え、1 時間反応させ付加体の量を測定した。それぞれ 10⁸塩基当たり、3300 (Glyoxal-dG)、680 (8-OH-Acro-dG)、50 (6-OH-Acro-dG)、830 (CdG)個の付加体が

検出された。これより、グリオキサールの付加体形成能が非常に高いこと、また、アクロレインと DNA の反応物は 8-OH-Acro-dG が主要なものであることがわかった(松田)。

5) 動物個体を用いた遺伝毒性研究
臭素酸カリウムの投与により、腎臓の *gpt* 点突然変異頻度は約 2 倍、*Sp1* 欠失変異頻度は約 4 倍増加した。変異のうちわけを調べると、点突然変異としては G:C→A:T 変異、欠失変異としては 1塩基欠失と 1kb 以上の大きな欠失が増大していた。非標的臓器である肝臓では、点突然変異、欠失変異ともに変異頻度の上昇は認められなかった(能美)。

D. 考 察

化学物質の遺伝毒性に閾値が存在するかを明らかにするため、DNA 修復能を欠損したバクテリアを用いて、その用量効果曲線を野生型株と比較した。その結果、DNA の酸化損傷を誘発する臭素酸カリウムの変異原性は酸化損傷グアニンの修復に関与する 8-OH-G DNA グリコシラーゼにより抑制され、PMS と PES については、酸化ピリミジンの修復に関与する Endo III/VIII により抑制されることが明らかになった。損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼが存在すると PMS、PES の変異原性が現れることから、DNA 修復系のみならず DNA ポリメラーゼの種類や発現量も、遺伝毒性の閾値形成に影響を与えていると考えられる(山田)。

I-SceI 制限酵素を一過的に発現させることにより、ヒト細胞 TSCE5 でさまざまな欠失変異体が観察されている。ヒト細胞に生じた欠失変異体の遺伝子解析の結果、突然変異の大部分は 60bp 以下の小さな欠失であって、その発生には非相同型接合 (NHEJ) 機構が関与していることが示された。この機構はエラーを引き起こさない修復にも関与し、突然変異の抑制にも寄与している可能性がある。以上の結果は、DSB の大部分は突然変異を引き起こさずに修

復され、そのような損傷を引き起こす化学物質にも閾値が存在する可能性を示唆するものである(本間)。

閾値に関する分類上 A' 群(直接 DNA に作用する遺伝毒性発がん物質だが DNA 修復系により閾値が形成されると考えられる化合物)に属す化合物がどれくらいあるか、*in vivo* で閾値が確認できるかが今後の問題である。また、B 群(閾値無しとして評価されるが、作用様式が不明な化合物)に属すアクリルアミドは、*in vivo* における遺伝毒性に関するデータが蓄積されつつあり、遺伝毒性が発がんの原因になっているかについては現在研究が進められている。環境中には B 群に属す発がん物質が多数あると考えられる。閾値の有無を含めて遺伝毒性発現機構の不明確な物質の個々の機構解明を詳細に行ない、データを蓄積することにより、食品添加物を含め環境中の弱い遺伝毒性発がん物質をより正確に評価できるようにすることが重要と考える(長尾)。

今回調べた付加体のうち、4 種類はプロパノ付加体、1 種類はエセノ付加体であったが、いずれも LC/MS/MS と相性がよく、高感度で測定することができた。今回開発した系を用いて、抗酸化剤などの食品添加物による遺伝毒性防御効果を評価できるようになると考える(松田)。

臭素酸カリウムを *gpt delta* トランスジェニックラットに投与し、発がん標的臓器において G:C → A:T 変異と欠失変異が増加していることを明らかにした。臭素酸カリウムは DNA 中に 8-OH-G を形成するので、8-OH-G に特徴的な G:C → T:A 変異が増加するものと予想したが、予想に反してそれ以外の変異(G:C → A:T 変異と欠失変異)が増加した。この結果は、生体内では 8-OH-G から G:C → T:A 変異に至る経路がなんらかの修復系によって強力に抑制されていることを示唆している。また *gpt delta* トランスジェニックラットで観察された欠失変異体の特徴は、ヒト細胞に I-SceI を発現させて得

られる欠失変異体と特徴が類似しており、DSB が NHEJ により修復された結果生じたものと考えられる。*gpt delta* トランスジェニックラットあるいは *gpt delta* トランスジェニックマウスは発がんの標的臓器において遺伝毒性を検出することができる。今後は、これらのトランスジェニック動物を用いて、個体レベルで遺伝毒性物質の低用量域における反応を調べることが重要である。特に DNA 修復系を欠損した動物モデルの使用は、閾値形成の機構に関して重要な情報を提供すると考えられる(能美)。

E. 結論

遺伝毒性の閾値形成には、DNA 修復系や DNA ポリメラーゼの働きが重要な役割をはたしていると考えられる。バクテリアや哺乳類細胞を用いた分子生物学的アプローチと、高感度 LC/MS/MS による DNA 損傷の定量分析をかみ合わせて化学的基礎を持った閾値研究を行うことが重要である。また国際動向の分析、個体レベルでの遺伝毒性閾値研究もさらに推進する必要がある。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsui K, Yamada M, Imai M, Yamamoto K, Nohmi T, Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of *Salmonella typhimurium* strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens. DNA Repair, (2006) 5, 465-478

- 2) Yamada M, Matsui K, Nohmi T,
Development of a bacterial hyper-sensitive tester strain for specific detection of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Genes & Environ.*, (2006) 28, 23-30
- 3) Yamada M, Nunoshiro T, Shimizu M, Grúz P, Kamiya H, Harashima H, Nohmi T,
Involvement of Y-Family DNA polymerases in Mutagenesis by oxidized nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, (2006) 188, 4992-4995
- 4) Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N., and Honma, M. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res.*, 603, 151-158 (2006)
- 5) Oka, H., Ikeda, K., Yoshimura, H., Ohuchida, A., Honma, M. Relationship between p53 status and 5-fluorouracil sensitivity in 3 cell lines. *Mutat. Res.*, 606, 52-60 (2006)
- 6) Ishikawa, S, Sasaki Y, Kawaguchi S, Mochizuki M, Nagao M. Characterization of genotoxicity of Kojic acid by mutagenicity in Salmonella and micronucleus induction in rodent liver. *Genes & Environ*, 28, 31-37, 2006.
- 7) Misaki, K.; Matsui, S.; Matsuda, T.: Metabolic Enzyme Induction by HepG2 Cells Exposed to Oxygenated and Non-oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 277-283, 2007
- 8) T. Matsuda, H. Yabushita, R.A. Kanaly, S. Shibutani, and A. Yokoyama: Increased DNA Damage in ALDH2-Deficient Alcoholics, *Chem. Res. Toxicol.*, 19 (10), 1374 -1378, 2006
- 9) M. Ikeda, K. Masumura, Y. Sakamoto, B. Wang, M. Neno, K. Sakuma, I. Hayata and T. Nohmi, Combined genotoxic effects of radiation and a tobacco-specific nitrosamine in the lung of *gpt* delta transgenic mice, *Mutat. Res.*, 626, 15-25 (2007)
- 10) T. Umemura, K. Kanki, Y. Kuroiwa, Y. Ishii, K. Okano, T. Nohmi, A. Nishikawa and M. Hirose, In vivo mutagenicity and initiation following oxidative DNA lesion in the kidneys of rats given potassium bromate, *Cancer Sci.*, 97, 829-835 (2006)
- 11) L. Jiang, Y. Zhong, S. Akatsuka, Y. Liu, K.K. Dutta, W. Lee, J. Onuki, K. Masumura, T. Nohmi and S. Toyokuni, Deletion and single nucleotide substitution at G:C in the kidney of *gpt* delta transgenic mice after ferric nitrilotriacetate treatment, *Cancer Sci.*, 97, 1159-11167 (2006)
- 12) M. Ikeda, K. Masumura, K. Matsui, H. Kohno, K. Sakuma, T. Tanaka and T. Nohmi, Chemopreventive effects of nobiletin against genotoxicity induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in the lung of *gpt* delta transgenic mice, *Genes and Environ*. 28, 84-91 (2006)

2. 学会発表

- 1) Yamada M, Matsui K, Imai M, Yamamoto K, Nohmi T, Roles of replicative and specialized DNA polymerases in frameshift mutagenesis 第 29 回日本分子生物学会年会(2006.6)
- 2) Yamada M, Matsui K, Nohmi T, Control of multiple DNA polymerases dealing with lesions induced by environmental mutagens. 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2006.7)
- 3) 山田雅巳、布柴達男、清水雅富、Petr Grúz、紙谷浩之、原島秀吉、能美健彦 大腸菌における酸化ヌクレオチドの取り込みと Y-ファミリー DNA ポリメラーゼの関与 日本遺伝学会第 78 回大会(2006.9)
- 4) 山田雅巳、松井恵子、能美健彦 多環芳香族炭化水素の変異原性を高感度、特異的に検出するバクテリアテスター株の開発 第 65 回日本癌学会学術総会(2006.9)
- 5) 山田雅巳、松井恵子、能美健彦 酸化変異原を高感度に検出するバクテリアテスター株の開発 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)
- 6) Yamada M, Hidaka K, Kamiya H, Masutani C, Harashima H, Hanaoka F, Nohmi T, Specificity of mutations associated with misincorporation of oxidized dNTPs by human DNA polymerase η in vitro Gordon Research Conference-Mammalian DNA Repair (2007.2)
- 7) 本間正充 In vitro コメット試験は遺伝毒性のエビデンスになりうるか? 日本環境変異原学会 MMS 研究会第 49 回定例会 (2006.5)
- 8) Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Error-prone and error-free nonhomologous end-joining for repairing DNA double strand breaks in human cells. 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2006.7)
- 9) Honma M., Yamakage K. *In vitro* Comet assay—A possible candidate as a member of the standard test battery. JaCVAM/MMS Joint Seminar -Pros & Cons of Comet Assay- (2006.8)
- 10) 本間正充、高島良生、安井学、谷田貝文夫、鈴木雅雄、林 真 低放射繊維による相同組換え修飾効果 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)
- 11) 谷田貝文夫、梅林志浩、本間正充、阿部知子、鈴木ひろみ、島津徹、石岡憲昭、岩本正哉 ISS 利用実験計画:宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の推定 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)
- 12) 高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、安井学、林 真、本間正充 ヒト細胞に誘導された DNA 二重鎖切断修復とその細胞周期依存性 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)
- 13) Kohara A., Ozawa Y., Ohtani A., Shioda S., Takeuchi K., Morita K., Hirano T., Honma M., Suzuki T., Masui T., Mizusawa H. High resolution genomic analysis of immortal human cells and tumor cells using array-based comparative genomic hybridization. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)
- 14) Luan Y., Honma M., Suresh T., Kogi M.,

- Yamaguchi T., Suzuki T. CGH and SNP array are powerful tools for chromosome analysis. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)
- 15) Matsufuji H., Chino M., Hayashi M., Honma M., Yamagata K. Genotoxicity of quercetin in the presence of reactive oxygen species using human lymphoblastoid TK6 cells. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)
- 16) 本間正充, 鈴木雅雄, 谷田貝文夫 染色体切断に対する放射線影響の検討 日本宇宙生物科学会第 20 回大会(2006.9)
- 17) 梅林志浩, 菅澤薫, 本間正充, 島津徹, 鈴木ひろみ, 石岡憲昭, 岩本正哉, 谷田貝文夫 放射線適応応答による突然変異の抑制 ISS 利用実験計画:宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の推定 日本宇宙生物科学会第 20 回大会(2006.9)
- 18) Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Requirement of p53 for maintenance of chromosome integrity against DNA double strand breaks. DNA Repair 2006 (2006.9)
- 19) 本間正充 DNA2 本鎖切断修復によるゲノム安定化機構 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)
- 20) 齊藤美香, 高島良生, 坂本浩子, 林 真, 松藤寛, 山形一雄, 本間正充 簡便な in vitro コメット試験法の確立とその評価 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)
- 21) 小山直己, 加藤竜也, 本間正充, 林 真, 増田修一, 木苗直秀 ヒトリンパ芽球トランスジェニック細胞を用いたアクリルアミドおよびグリシダミドの遺伝毒性試験 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)
- 22) 谷田貝文夫, 梅林志浩, 鈴木雅雄, 岩本正哉 本間正充 染色体特定部位 DSB の修復:低線量/低線量率ガンマ線照射による影響 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)
- 23) 高島良生, 小泉朋子, 櫻庭真弓, 林 真, 本間正充 ライブセルイメージングによる小核の運命の追跡 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)
- 24) 松藤寛, 千野誠, 本間正充, 林 真, 山形一雄 ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた亜硝酸ナトリウムと抗酸化剤の複合遺伝毒性 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)
- 25) Honma M. DNA double strand break inducing chromosome instability and its genetic consequences. International Conference on Biomarkers in Health and Environmental Management & XXXII Annual Meeting Environmental Mutagen Society of India (2007.1)
- 26) Honma M. DNA double strand breaks inducing chromosome instability in p53-deficient human cells. Key Stone Symposia -Genome Instability and Repair (2007.1)
- 27) Nagao M. Do we have enough data to demonstrate the presence of threshold in mutagenicity induced by genotoxic carcinogens? International Symposium-Threshold of Carcinogenicity and Genotoxicity, March 15-16, 2006, International Conference Center Kobe.
- 28) K. Yamauchi, S. Kakinuma, S. Sudo, S.

- Kito, Y. Oota, T. Nohmi, Y. Shimada, Mutation frequency of thymocytes after combined exposure of X-rays with N-ethyl-N-nitrosourea is dependent on X-ray-dose, 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006, 11)
- 29) Y. Sakamoto, K. Masumura, S. Takahashi, D. Nakae, T. Nohmi, Dietary choline deficiency induces oxidative mutagenesis in the liver of *gpt delta* rats, 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006, 11)
- 30) T. Nohmi, M. Ikeda, K. Masumura, Y. Sakamoto, B. Wang, M. Neno, K. Sakuma, I. Hayata, Combined genotoxicity of low-dose-rate radiation and tobacco-specific nitrosamine NNK, CODATA 2006 in Beijing, China (2006, 10)
- 31) 梅村隆志、岡野圭太、黒岩有一、田崎雅子、児玉幸夫、能美健彦、西川秋佳、広瀬雅雄、マウス肝発癌剤dicyclanilが誘発する*gpt delta*マウス肝の酸化的DNA損傷およびin vivo変異原性、第65回日本癌学会学術総会(2006, 9)
- 32) 蔣麗、鐘毅、赤塚慎也、劉玉亭、増村健一、能美健彦、豊國伸哉、トランスジェニックマウス*gpt delta*を用いた鉄ニトリロ三酢酸誘導の腎発がんモデルのDNA変異を検出、第65回日本癌学会学術総会(2006, 9)
- 33) 大森雅子、魏民、木下アンナ、柚木孝之、土井賢一郎、加藤あゆみ、増村健一、能美健彦、福島昭治、鰐淵英機、*gpt delta*ラット肝における1,4-ジオキサンの発がん性および変異原性、第65回日本癌学会学術総会(2006, 9)
- 34) 池田恵、増村健一、松井恵子、甲野裕之、佐久間慶子、田中卓治、能美健彦、*gpt delta*トランスジェニックマウスの肺におけるNNK誘発突然変異に対するNobiletinの化学予防効果の解析、第65回日本癌学会学術総会(2006, 9)
- 35) 増村健一、中江大、坂元康晃、高橋正一、鰐淵英機、梅村隆志、広瀬雅雄、能美健彦、F344系およびSD系*gpt delta*ラットを用いたコリン欠乏アミノ酸食による内因性ラット肝発がん突然変異誘発能の解析、第65回日本癌学会学術総会(2006, 9)
- 36) 坂元康晃、増村健一、黒岩有一、今井聖子、林宏行、西川秋佳、広瀬雅雄、津田洋幸、能美健彦、ヒトプロト型c-Ha-ras導入*gpt delta*トランスジェニックラットを用いた化学発がん高感受性モデルにおける突然変異誘発能の解析、第65回日本癌学会学術総会(2006, 9)
- 37) 田崎雅子、黒岩有一、神吉けい太、児玉幸夫、能美健彦、梅村隆志、西川秋佳、ペンタクロロフェノール誘発マウス肝DNAの酸化的損傷ならびにin vivo変異原性に及ぼすp53の影響、第65回日本癌学会学術総会(2006, 9)
- 38) T. Nohmi, M. Ikeda, K. Masumura, Y. Sakamoto, B. Wang, M. Neno, K. Sakuma, I. Hayata, Evaluation of combined genotoxicity of low-dose-rate radiation and tobacco-specific nitrosamine NNK, The 49th Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society in Sapporo (2006, 9)

- 39) 能美健彦、増村健一、マウス個体で観察される欠失変異と点突然変異の分子解析、日本放射線影響学会 第49回大会 (2006, 9)
- 40) 塩見尚子、野代勝子、鬼頭靖司、増村健一、能美健彦、塩見忠博、生殖細胞と体細胞における自然および放射線誘発突然変異発生率の比較研究 II、精細胞期照射における放射線誘発突然変異、日本放射線影響学会 第49回大会 (2006, 9)
- 41) 山内一己、柿沼志津子、須藤聡美、鬼頭靖司、能美健彦、増村健一、島田義也、マウス胸腺リンパ腫における放射線とエチルニトロソウレアの複合影響、日本放射線影響学会 第49回大会 (2006, 9)

G. 知的所有権の取得状況

なし

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

研究課題名:食品添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究

分担研究課題名:バクテリアを用いた遺伝毒性閾値の研究

分担研究者: 山田 雅巳 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨

化学物質が誘発する突然変異(主に塩基置換)に閾値が存在するかどうかを検討するため、臭素酸カリウム、フェナジンメトサルフェート、フェナジンエトサルフェートの 3 つの化学物質について、バクテリアを用いた遺伝毒性試験である Ames 試験を実施した。2 種類の酸化損傷 DNA 修復系をそれぞれ欠損させた株を作製し、修復系を保持している菌株(TA1535)の結果と比較した。いずれの化学物質に対しても、DNA 修復系を欠損させた株では TA1535 で変異原性が見られない低用量で復帰変異株数の増加が観察された。さらに、低用量で復帰変異株数の増加を示す条件は物質ごとに異なっていた。以上の結果は、用いた化学物質による DNA 上の傷は突然変異として固定される前に修復され、DNA 損傷を引き起こす遺伝毒性物質に閾値が存在する可能性を示唆すると考える。

キーワード; 閾値、Ames 試験、DNA グリコシラーゼ、突然変異

A. 研究目的

食品中に含まれる微量の化学物質である食品添加物等の安全性に多くの国民が注意を払うようになって来た。しかし問題となる化学物質が発がん性を示す場合、そのリスク評価は困難である。多くの発がん性化学物質の健康リスクを評価する場合、実証的な理由を付してこれ以下であれば健康影響が見られないというレベル、すなわち「閾値」のない線形の用量反応モデルが用いられてきた。その後、がんの発生メカニズムに関する理解が進み、遺伝子に直接損傷を与えない非遺伝毒性発がん物質には、他の毒性同様に閾値を設定することができるとの考えが定着してきている。

このように、ある一定レベル以下の非遺伝毒

性発がん物質に実質的な発がんリスクはないものと考えられている一方で、遺伝毒性を持つ発がん物質には、「暴露量をゼロにしない限り、がんを引き起こすリスクはゼロにならない」という思想がある。これに従えば、遺伝毒性発がん物質には、原則使用禁止という形でしか対応できない。

だが生体には DNA 修復を初めとするさまざまな防御機能があり、遺伝毒性物質の引き起こす損傷レベルが低ければ、突然変異には至らない可能性がある。特に、DNA の酸化的損傷に関しては、それに対抗する防御機能として塩基除去修復が大きな役割をはたしていると考えられている。

本研究では、酸化損傷を引き起こす物質の

変異原性を、バクテリアを用いた試験により調べる。塩基除去修復の最初の段階に働くDNAグリコシラーゼのうち、主として酸化プリン除去に働く8-ヒドロキシグアニン(8-OHG)DNAグリコシラーゼを欠損した株(YG3001とYG3008)と、主として酸化ピリミジンの除去に働くエンドヌクレアーゼ III(Endo III)およびエンドヌクレアーゼ VIII(Endo VIII)を欠損した株(YG3206とYG3216)を作製し、当該修復系に関して野生型の菌株と比較することで遺伝毒性物質の閾値形成に及ぼすDNA修復系の影響について考察する。

B. 研究方法

1) 菌株作製

Ames試験株である *Salmonella typhimurium* (以下サルモネラ) TA1535株を親株に、8-OHG DNAグリコシラーゼをコードする *mutM* 遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子のカセットを挿入して YG3001株を作製した。TA1535の染色体上にある Endo III をコードする *nth* 遺伝子の大部分を欠失させ、さらに Endo VIII をコードする *nei* 遺伝子を、クロラムフェニコール耐性遺伝子のカセットを挿入することで YG3206株を作製した。また、TA1535、YG3001、YG3206株に損傷乗り越え型DNAポリメラーゼ(TLS DNA pol)をコードする pKM101 プラスミドを導入し TA100、YG3008、YG3216とした(表1)。

表1 使用菌株一覧

菌株名	<i>mutM</i>	<i>nth</i>	<i>nei</i>	pKM101
TA1535	+	+	+	no
YG3001	-	+	+	no
YG3206	+	-	-	no
TA100	+	+	+	+
YG3008	-	+	+	+
YG3216	+	-	-	+

2) 使用した化学物質

臭素酸カリウム (KBrO₃、CAS No. 7758-01-2) — 食品添加物。フェナジンメトサルフェート (PMS、CAS No. 299-11-6)、フェナジンエトサルフェート (PES) — ともに生存細胞の計測の際に電子捕獲剤として用いられる。

3) Ames試験

Ames試験は以下の条件で行った。段階希釈した化学物質の水溶液 0.1 mL、試験菌株の一夜培養液 0.1 mL、りん酸緩衝液 0.5 mL を試験管内で混合し、37°Cの湯浴で20分間振盪後、2 mLの軟寒天培地を加えて最小培地にまき広げた。培地を37°Cのインキュベーターで48時間培養後、コロニー数を計測した。復帰株数が対照値の2倍を超えた場合を、変異原性陽性と判定した。

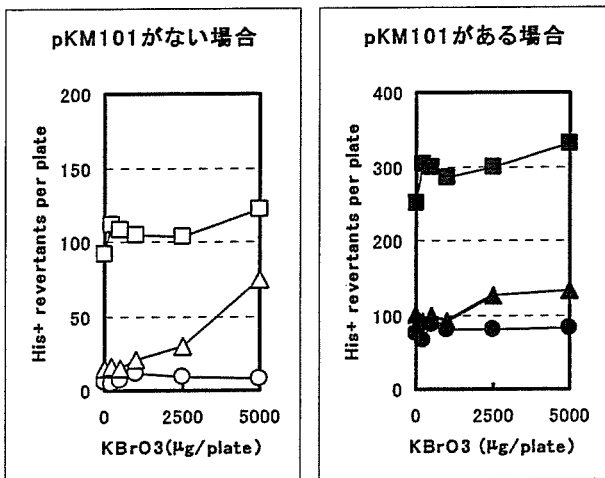
(倫理面への配慮)

本研究は細菌を用いた実験なので配慮の対象ではない。

C. 研究結果

1) KBrO₃

TA1535株、Endo III/VIIIを欠損した YG3206株において最高用量(5000 μg/plate)まで復帰変異株数が対照値(6および92 His⁺/plate)を超えなかったのに対して、酸化プリンを修復するDNAグリコシラーゼを欠損した YG3001株において2500 μg/plate以上で対照値(15 His⁺/plate)の2倍を超える復帰変異株数が計測された(図1左)。一方、pKM101を保持する3株では、対照値の2倍を超える復帰株数は計測されなかった(図1右)。

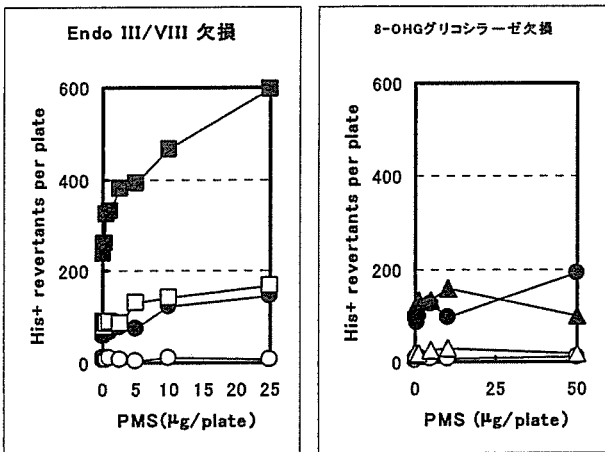


第1図 KBrO₃の変異原性

○:TA1535、△:YG3001、□:YG3206、
●:TA100、▲:YG3008、■:YG3216

2) PMS (図2)

YG3206株においては5~25 µg/plateの範囲で用量に依存した復帰変異株数の増加が観察されたが、対照値(89 His⁺/plate)の2倍を超えることはなかった(図2左)。



第2図 PMSの変異原性

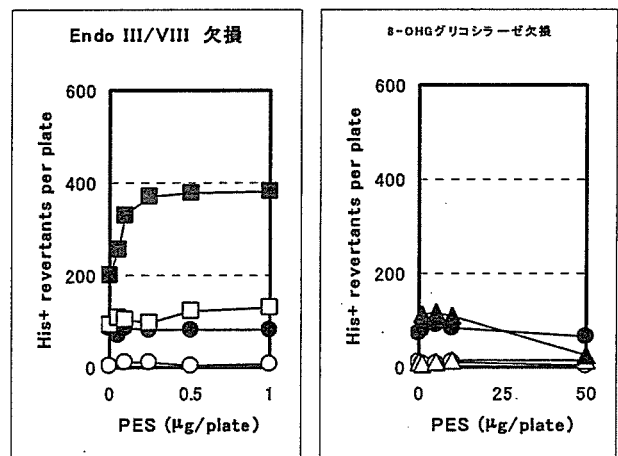
○:TA1535、△:YG3001、□:YG3206、
●:TA100、▲:YG3008、■:YG3216

TLS DNA polを導入した株(TA100およびYG3216)では、導入しない株に比べて全体に復帰変異株数が増加し、TA100では25 µg/plateで、YG3216では0.5 µg/plate以上で対照値の2倍を超えた(図2左)。一方、8-OHGグリコシラーゼを欠損した株では、TLS DNAポリメラーゼの有無にかかわらず、最高

用量まで復帰変異株数が対照値の2倍を超えることはなかった(図2右)。

3) PES (図3)

修復酵素をもつTA1535、TA100両株において、最高用量(100 µg/plate)まで復帰変異株数の増加は観察されなかった(図3右)。一方、YG3206においては、0.5 µg/plateから用量に依存した復帰変異株数の増加が見られた。TLS DNA polを導入したYG3216ではより低い用量(0.05 µg/plate)から復帰変異株数の増加が観察され、5 µg/plate以上で対照値(201 His⁺/plate)の2倍を超えた(図3左)。8-OHGグリコシラーゼを欠損した株ではTLS DNAポリメラーゼの有無にかかわらず50 µg/plate以上で致死作用が見られた。それ以下の濃度でも対照値の2倍を超えることはなかった(図3右)。



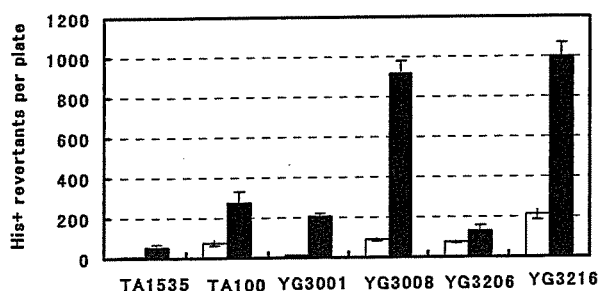
第3図 PESの変異原性

○:TA1535、△:YG3001、□:YG3206、
●:TA100、▲:YG3008、■:YG3216

4) 自然復帰変異株数(図4)

試験に用いた6株について、化学物質で処理しない対照値を示す。照射下(■)で培養すると非照射条件(□)に比べていずれの菌株でも復帰変異株数が増加した。中でも8-OHG DNAグリコシラーゼを欠損した株(YG3001、YG3008)で増加の比率が大きかった(10~14倍)。一方、Endo III/VIIIを欠損し

た株(YG3206、YG3216)では光照射の効果はあるものの、復帰株数の増加は2~5倍と小さかった。



第4図

また、pKM101を保持した株(TA100、YG3008、YG3216)は保持しない株に比べて3~13倍高い復帰株数を示した。さらに、光非照射、pKM101不在下ではEndo III/VIIIを欠損した株の復帰変異株数が高かった。

D. 考察

今回用いた化学物質は、酸化剤として用いられるものである。いずれの化合物の場合も、損傷を修復する系を欠損した株では、より低用量で復帰変異株数が増加した。このことは、細胞ではある程度の濃度までは修復系の作用により、化学物質の変異原性が無作用に等しいレベルまで抑制されることを示唆する。

KBrO₃は親株およびEndo III/VIIIの欠損株では変異原性を示さないが、8-OHG DNAグリコシラーゼを欠損した株(YG3001)では、KBrO₃ 1000 μg/plate 辺りから復帰変異株の増加が見られ5000 μg/plateで対照値の約5倍まで増加した。このことは、KBrO₃がDNA上に8-OHGを生じさせるという報告と符合する。

PMS、PESは、親株および8-OHG DNAグリコシラーゼを欠損した株では変異原性を示さなかったが、Endo III/VIIIを欠損しpKM101を導入した株(YG3216)では対照値の2倍を超える復帰変異株数の増加が観察された。このことは、PMS、PESの作用で生じるDNA損傷がピリミジンを対象としたものであり、さらにそれが通

常のDNAポリメラーゼで乗り越えにくいものであることを示唆している。今後は、機器分析によりその損傷を同定できればと考えている。

自然突然変異の結果から、通常の実験室の蛍光灯の照射でも活性化されて酸化損傷を引き起こす内因性の物質の存在が示唆された。さらに、pKM101を保持した、グリコシラーゼの欠損株で約1000個の復帰変異株が光照射下で計測されたことから、光照射により生じるDNA損傷は通常の実験室のDNAポリメラーゼでは乗り越えにくいものであると考えられた。また、内因性の物質による酸化損傷はプリンよりもピリミジンを標的にしたものが多く示唆された。

E. 結論

KBrO₃については、8-OHG DNAグリコシラーゼが遺伝毒性に関する閾値形成において重要な役割をはたしていることが示唆された。PMS、PESについては、Endo III/VIIIおよび損傷乗り越え型のDNAポリメラーゼが閾値形成に関与していると考えられる。可視光の照射により活性化される内因性の変異原の存在が示唆された。酸化剤は代謝活性化を経ずにDNAに損傷を与えるものが多く、バクテリアを用いた実験結果はヒトを含む他の生物における作用を推測するに足るものと考えられる。

F. 健康危機情報

省略

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsui K, Yamada M, Imai M, Yamamoto K, Nohmi T, Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of *Salmonella typhimurium* strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens. DNA Repair, (2006) 5, 45-478

Mazaki M, Kataoka K, Kinouchi T, Vinitketkumnuen U, Yamada M, Nohmi T, Kuwahara T, Akimoto S, Ohnishi Y, Inhibitory effects of caraway (*Carum carvi* L.) and its component on *N*-methyl-*N*'-nitroso-*N*-nitrosoguanidine-induced mutagenicity. J. Med. Invest., (2006) 53,123-133

Yamada M, Matsui K, Nohmi T, Development of a bacterial hyper-sensitive tester strain for specific detection of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. Genes & Environ., (2006) 28, 23-30

Yamada M, Nunoshiro T, Shimizu M, Grúz P, Kamiya H, Harashima H, Nohmi T, Involvement of Y-Family DNA polymerases in Mutagenesis by oxidized nucleotides in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., (2006) 188, 4992-4995

Barone F, McCulloch SD, Macpherson P, Maga G, Yamada M, Nohmi T, Minoprio A, Mazzei F, Kunkel TA, Karran P, Bignami M, Replication of 2-hydroxyadenine-containing DNA and recognition by human MutS \cdot . DNA Repair, (2007) 5, 355-366

2. 学会発表

Yamada M, Matsui K, Imai M, Yamamoto K, Nohmi T, Roles of replicative and specialized DNA polymerases in frameshift mutagenesis 第 29 回日本分子生物学会年会(2006.6)

Yamada M, Matsui K, Nohmi T, Control of multiple DNA polymerases dealing with lesions induced by environmental mutagens. 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2006.7)

山田雅巳、布柴達男、清水雅富、Petr Grúz、紙谷浩之、原島秀吉、能美健彦 大腸菌にお

ける酸化ヌクレオチドの取り込みと Y-ファミリー DNA ポリメラーゼの関与 日本遺伝学会第 78 回大会(2006.9)

山田雅巳、松井恵子、能美健彦 多環芳香族炭化水素の変異原性を高感度、特異的に検出するバクテリアテスター株の開発 第 65 回日本癌学会学術総会(2006.9)

山田雅巳、松井恵子、能美健彦 酸化変異原を高感度に検出するバクテリアテスター株の開発 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

Yamada M, Hidaka K, Kamiya H, Masutani C, Harashima H, Hanaoka F, Nohmi T, Specificity of mutations associated with misincorporation of oxidized dNTPs by human DNA polymerase η in vitro Gordon Research Conference-Mammalian DNA Repair (2007.2)

H. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | 無し |
| 2. 実用新案登録 | 無し |
| 3. その他 | 無し |

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

研究課題名:食品添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究

分担研究課題名:哺乳類細胞を用いた遺伝毒性閾値の研究

分担研究者: 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長

研究要旨

染色体異常陽性化学物質や放射線等が誘発する DNA2 本鎖切断損傷(DSB)に閾値が存在するかどうかを検討するため、制限酵素により DSB を発生するモデル細胞を用いて DSB の修復様式を解析した。ヒト細胞 TSCE5 はゲノム中に制限酵素 I-SceI を一つだけもつトランスジェニック細胞である。この細胞に I-SceI 発現ベクターを導入することにより、細胞集団の約 70%に単一の DSB を導入することができた。DSB によって生じた突然変異体の出現頻度は約 3%であり、残りのほとんどの細胞は突然変異を起こさずに元通り修復されるものと考えられた。突然変異体の遺伝子解析の結果、突然変異の大部分は 60bp 以下の小さな欠失であって、その発生には非相同型接合(NHEJ)機構が関与していることが示された。この機構はエラーを引き起こさない修復にも関与し、突然変異の抑制にも寄与している可能性がある。以上の結果は、DSB の大部分は突然変異を引き起こさずに修復され、そのような損傷を引き起こす化学物質にも閾値が存在する可能性を示唆するものである。

キーワード; 閾値、DNA2 本鎖切断(DSB)、DNA 修復、エラーフリー型修復

A. 研究目的

食品の安全性に対して、多くの国民が関心を寄せている今日、食品添加物等の食品中に含まれる微量の化学物質の安全性が問題となっている。特にその問題となる化学物質が発がん性を示す場合は、その評価が困難であることが多い。多くの発がん性化学物質に関しては、健康リスクを評価する場合、理論的、実証的理由から、これ以下であれば健康影響が見られないレベル、すなわち閾値のない線形の用量反応モデルが用いられてきた。しかしながら、近年、がんの発生メカニズムに関する理解から、発がん物質のなかでも、遺伝子に直

接損傷を与えない非遺伝毒性発がん物質に関しては、他の毒性同様に閾値を設定することができるとの考えが定着し、ある一定レベル以下の非遺伝毒性発がん物質に関しては、実質的に発がんリスクはないものと考えられている。

一方、遺伝毒性を持つ発がん物質に関しては、「暴露量をゼロにしない限り、がんを引き起こすリスクはゼロにならない」という思想のため、規制するならば使用を禁止するほかはないため、その発がん性を認めることができず、逆に化学物質の規制が進まないといった矛盾が生じている。しかしながら、ヒトを含む生体にはさ

さまざまな防御機能(DNA 修復、解毒代謝、アポトーシスなど)が備わっており、遺伝毒性物質であっても、その損傷レベルが低ければ、がんを引き起こすような突然変異にならない可能性も考えられる。特に、突然変異を引き起こす内的、外的 DNA 損傷の 1 つである酸化損傷に関しては、それに対抗する防御機能として塩基除去修復によりそのほとんどが正常に修復されると考えられている。このような修復機構はエラーフリー型修復と呼ばれている。一方、放射線によって引き起こされる DNA の 2 本鎖切断 (DSB) は、非相同型接合 (Non-Homologous End-Joining; NHEJ) もしくは、相同組換え (Homologous Recombination; HR) によって修復される。後者は、塩基除去修復同様、エラーフリー型で突然変異を起こさないが、後者は理論的に欠失等の突然変異をもたらすエラー発生型の修復経路である。ヒト等のほ乳類細胞では、NHEJ が DSB 修復の主要経路であるため、放射線による DSB は理論的には必ず突然変異をもたらす。放射線生物学では、放射線傷害には閾値が無く、いかなる低線量でも DNA に影響を与えるとする説が定着しているが、その根拠の一つに、このエラー発生型の NHEJ 修復がある。

本研究では、ヒト細胞のゲノム中で発生する DSB の修復様式を、制限酵素により DSB を発生するモデル細胞を用いて再検討する。DSB の多くが、他の修復経路と同様に突然変異を発生しないのであれば、放射線傷害にも閾値ないことを示唆できるかもしれない。

B. 研究方法

4) 細胞、および DSB の発生

チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子をヘテロ (TK+/-) に持つヒトリンパ芽球細胞株 TK6 に由来する TSCE5 と、TSCER2 細胞を用いた。TSCE5 細胞は TK+ アリルのエクソン 5 の約 100bp 上流に、I-SceI 部位をもつ。また、TSCER2 は TSCE5 より得られたエクソン 5 に点

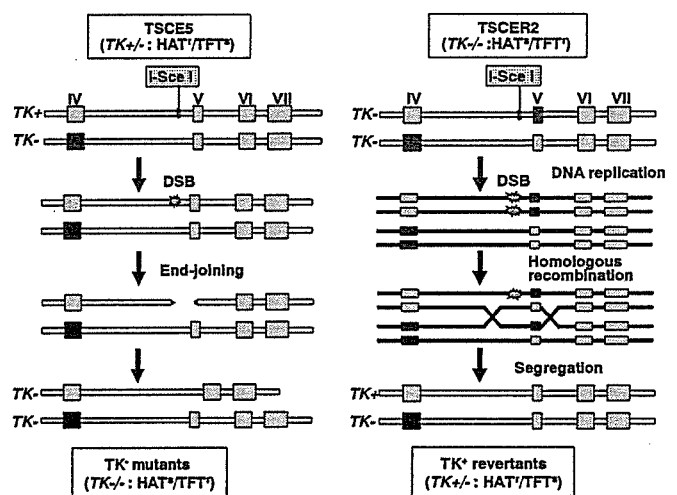
突然変異をもつコンパウンドヘテロ型 (TK-/-) の TK 変異体である。両細胞に I-SceI 発現ベクター (pCMV3xnlS-I-SceI) を導入した。導入には Amaxa 社の Nucleofector を用いた。

5) DSB の導入効率の測定

発現ベクター導入後 72 時間まで経時的にベクターの発現をモニターした。発現ベクターには HA タグがついているため、抗 HA 抗体を用いたフローサイトメトリーにより、I-SceI を発現する細胞の割合を測定できる。

6) 突然変異体の検出

TSCE5 ではその DSB が NHEJ によって修復されると、欠失が生じ、細胞は TK 欠失変異体として検出される。一方、TSCER2 では相同染色体間で組換え修復 (HR) が起きると、野生型 TK 遺伝子が生じ、細胞は TK 復帰変異体として検出される。両細胞はそれぞれ TFT 耐性、HAT 耐性として検出できる (図1)。また、TSCE5 細胞では薬剤耐性を指標としない非選択クローンも無作為に回収し、遺伝子レベルで突然変異を解析した。



第1図 DSB の NHEJ、HR 修復検出

7) 遺伝子解析

I-SceI が含まれる TK 遺伝子のイントロン 4 とエクソン 5 の領域を PCR によって増幅し、ABI の GeneScan によりフラグメント解析を行った。変異が確認されたクローンに関しては塩基配列を決定し、欠失様式を検討した。

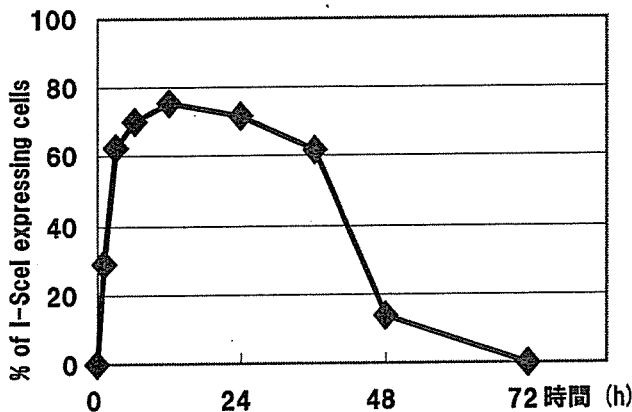
(倫理面への配慮)

本研究で使用したヒト細胞は株化細胞で、国際的に広く普及している細胞であり、倫理上問題は無い。また、全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) DSB の細胞への導入

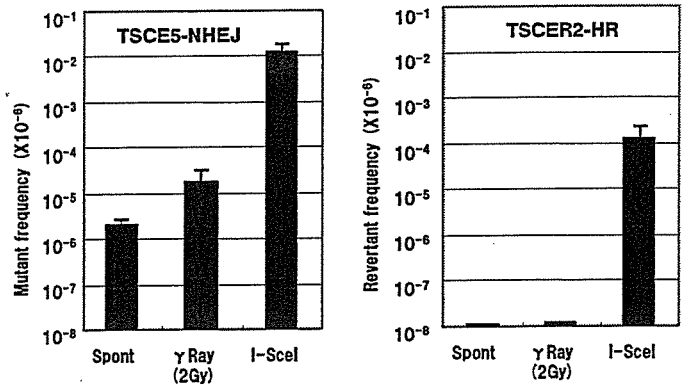
5×10^6 の細胞に 50ug の pCMV3xnlS-I-SceI ベクターを Amaxa-Nucleofector により導入し、その後 I-SceI を発現する細胞をフローサイトメトリーにより経時的に観察した。その結果、発現細胞は 12 時間をピークとして 72 時間まで観察された。約 70% の細胞が I-SceI を発現し、DSB が引き起こされていると考えられた (図 2)。



第2図 I-SceI 発現細胞の経時的変化

2) 変異頻度と修復様式

ベクター導入後 72 時間に TSCE5 は TFT 存在下で、TSCER2 は HAT 存在下で 96 穴プレートでの再はん種し、2 週間後に薬剤耐性細胞の出現を観察した。TSCE5 の突然変異頻度は約 1%、TSCER2 は約 0.01% であった。このことから、DSB の 99% は NHEJ によって修復されることが示唆された (図 3)。



第3図 DSB の修復様式と頻度

また、薬剤耐性を利用しないで、非選択ランダムクローンでの突然変異の検出を試みた。926 の非選択クローンを解析した結果 29 (3.3%) に変異が観察された。これら変異クローンの約 80% は 60bp 以下の小さな欠失であり、14% はそれ以上の大きな欠失であった。組換えによる変異クローンが 1 つ (3.5%) 観察された。

3) 変異体の欠失領域の遺伝子解析

短い欠失をもつ TSCE5 変異体の I-SceI 領域をシーケンスし、NHEJ による結合領域を解析した。欠失は 10bp 以下がほとんどで、結合領域に 1~4bp のマイクロホモロジーを含んでいた。連続する同一ヌクレオチド内の 1bp 欠失や、1bp の挿入、または 50bp の欠失に 9bp の逆向き配列が挿入された複雑な変異体も観察された。これらの結果は、DSB 修復はマイクロホモロジーを介した NHEJ のメカニズムが主であることを示している。DSB の修復は、できるだけ欠失領域を小さくすることにより遺伝的安定性を保つものと予想された。

D. 考察

DSB は一般に NHEJ もしくは HR によって修復されるが、ほ乳類細胞においては前者が主に関与すると考えられている。しかしながら、遺伝的安定性を考慮すると、突然変異を発生しない後者のメカニズムが有利であるはずである。このようなことから、NHEJ には単なる修復だけでなく、他の生物学的意義があるものと予想さ

れる。

今回の我々の研究では、DSBの99%がNHEJによって修復されHRの関与はわずかに1%であった。しかしながらこの割合は、HRの寄与率を正しく反映しない。我々が検出するHRは相同染色体間の組換えであり、生物学的に重要と考えられている姉妹染色体間の組換えを検出するものではない。姉妹染色体間の組換えはDNA合成中に生じる複製エラーを修復に関与し、この機能の欠失は細胞死をもたらすため、もっとも重要な組換え機構と考えられている。しかしながら、I-SceIの系では理論的に両方の姉妹染色体が切断されるため姉妹染色体間の組換えは、まれにしか起こらず、また、起こったとしても、修復前後が同一であるため評価ができない。I-SceIの切断モデルは、G1期におこる外因性変異原による切断モデルとして考えるべきである。この場合の主たる修復経路がNHEJであることは間違いのないであろう。

Amaza- Nucleofector を用いて約70%の細胞にI-SceIを発現させることに成功したが、実際に観察された突然変異体はわずか3%程度であった。この理由として以下のことが考えられる。①I-SceIが発現したとしても、実際に酵素が働き、DSBを生じた細胞はごくわずかである。②DSBを持つ細胞の大部分はアポトーシスにより死滅する。③DSBが起きたとしても元通りに修復されるために変異体として検出できない。H2AXヒストンタンパクのリン酸化の測定と、細胞生存率の測定から、①と②の可能性は否定され、③の可能性が示唆された。変異体の遺伝子解析の結果からもその可能性が支持された。

DSBの大部分はNHEJによって修復され小さな欠失を引き起こした。これまで放射線にDSBは数Kb～数Mbの大きな欠失を起こすと考えられてきた。しかしながら、これら放射線の結果は数グレイ以上の高線量で生じる複数のDSBからなる結果であり、一つのDSB結果を

反映するものではない。我々のI-SceIの系はゲノム中にたった一つのDSBを発生させる系であり、これは0.5センチグレイに相当する。この線量での突然変異を観察した例はこれまでにない。

一つのDSBが変異体の欠失領域は極めて小さいことは、大部分のDSBは欠失を起こさず結合することを想像させる。特に制限酵素によるのりしろをもつDNA断片は、そのまま結合し、元通りになる可能性が高い。しかしながら、放射線によって生じるDSBのDNA断片はこのようないきれいな構造を持つとは考えにくい。そのような場合は、やはり短い欠失をもたらすのかもしれない。そのような場合でもその欠失をできるだけ小さくするように働くものと考えられる。NHEJはDSBを修復するだけでなく、DSBによって生じるDNAの欠失をできるだけ小さく押さえ、DSBが引き起こす可能性がある染色体レベルの大きな欠失や、転座が起こるのを押さえ替えているのかもしれない。

これらの研究結果は、外来性の変異原によって生じたDSBは必ずしも突然変異をもたらさないか、仮に引き起こしたとしても、がん導くような大きな遺伝子変異にはならない可能性がある。これまで、紫外線や化学物質などDNAの塩基修飾等のDNA損傷はエラーを伴わない修復経路により修復されるため、閾値があるとの考えが論じられるようになったが、放射線等のDSBにもこの考えが適用できるかもしれない。

E. 結論

制限酵素によるDNAの切断を、放射線によるDSBのモデルとし、そこでの修復プロセスを完全にトレースした。この研究により、ヒト細胞でのDSBの修復について以下のことがわかった。

a)ヒト細胞ゲノム中に生じた単一DSBのほとんどはNHEJによって修復され、見かけ上短いDNA欠失をもたらす。