

2007 34018A

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

既存添加物の発がん性等に関する安全性評価研究

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 神谷 研二 広島大学原爆放射線医科学研究所

平成 20 年 (2008) 4 月

# 目 次

I.	総括研究報告.....	1
	既存添加物の発がん性等に関する安全性評価研究	
	神谷研二	
II.	分担研究報告.....	1
	モデル動物の開発とばい煎ダイズ抽出物の発がん性等の検索	
	神谷研二	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表.....	
IV.	研究成果の刊行物・別刷.....	

既存添加物の発がん性等に関する安全性評価研究  
-モデル動物の開発とばい煎ダイズ抽出物の発がん性等の検索-

主任研究者 神谷 研二 広島大学原爆放射線医科学研究所 教授

研究要旨

ばい煎ダイズ抽出物のヒトでの生涯摂取を想定した安全性を動物実験により評価することを目的に実験を実施した。本検体は、大豆イソフラボンを含み、多様で微弱な生理活性があるためその安全性の評価は、従来の動物実験では難しい。本研究では、最近著しく進歩した自然突然変異を誘発する機構の研究成果を応用して、微量の発がん性を短時間に高感度で検定できるマウス発がんモデルの開発を行った。Rev1 は、突然変異を誘発する「損傷乗り越え」DNA ポリメラーゼであり、この遺伝子を両アレルに持つ Rev1 ホモトランスジェニックマウスは、変異原に対し高感受性である。即ち、変異原による小腸腫瘍の誘発と T 細胞受容体の突然変異頻度が有意に高く、検体の安全性を高感度で迅速に評価できるマウスモデルになると考えられた。そこで、このマウスを用いて、ばい煎ダイズ抽出物の発がん性や遺伝毒性の検索を開始し、実験は現在まで順調に進行している。

A. 研究目的

既存食品添加物は、平成7年5月の食品衛生法の改正により、天然添加物に対する経過措置として、その使用が認められている。法改正時の国会附帯決議で、既存添加物の速やかな安全性の見直しを行い、有害である場合には、使用禁止等の必要な措置を講じるとされた。平成8年度の厚生科学研究等を通じ、既存添加物全489品目のうち109品目については、その基本的安全性を評価するために、新たな反復投与毒性試験などの実施による安全性の検討が必要であるとされた。これを受けて、動物実験による科学的安全性データに欠ける既存添加物うちから、毎年数品目についてラットによる90日間反復投与毒性試験、及び十数品目について変異原性試験が実施されて来た。さらに、これら両試験の終了した既存添加物の中から長期発がん性試験が実施されて

いる。

本研究では、既存食品添加物の中からはばい煎ダイズ抽出物のヒトでの生涯摂取を想定した安全性を動物実験により評価する。ばい煎ダイズ抽出物は、大豆イソフラボンを含み、多様で微弱な生理活性があるためその安全性の評価は従来の動物実験では難しい。また、この検体は、エイムス試験では陰性であるが、哺乳類培養細胞での小核試験や染色体異常試験は陽性である。この様に、多くの既存添加物の遺伝毒性は明確でないことが多く、その発がん性や遺伝毒性を効率良く検定するためには、高感度な哺乳類の実験モデルが必要である。一方、既存添加物の安全性を検定するにはより多くの検体の発がん性試験を実施する必要があるが、長期発がん性試験には最低3年間の期間が必要である。そのため、多くの検体の発がん性試験を実施する事は時間的にも

困難な問題があり現実的でない。そこで、検体の発がん性等を効率良くスクリーニングできる哺乳類の動物モデルの開発が求められている。以上を踏まえ、本研究では、最近著しく進歩した自然突然変異を誘発する機構の研究成果を応用して、微量の発がん性を短時間に高感度で検定できるマウス発がんモデルの開発を行う。次いで、本研究で開発する高感度なマウス発がんモデルを用いてばい煎ダイズ抽出物の発がん性等を検索する。

## B. 研究方法

本研究では、既存添加物の発がん性や遺伝毒性等を高感度に検定できる遺伝子操作マウス (*Rev1* トランスジェニックマウス等) を開発する。開発したマウスを用いてばい煎ダイズ抽出物に対する発がん性や遺伝毒性を検索し、安全性を評価する。

### 1. 発がん性や突然変異誘発能を高感度に検定できるモデルマウスの開発

エイムス試験は、自然突然変異を誘発する遺伝子群の機能亢進により細菌の突然変異率を亢進させた測定系である。この原理に基づき自然突然変異を誘発する *Rev1* 遺伝子等の機能に注目して、*Rev1* トランスジェニックマウスの発がん性等を高感度に検出できるマウスモデルの開発を行う。

#### 1-1. *Rev1* トランスジェニックマウス (*Rev1* マウス) の樹立

*Rev1* マウスは、共同研究により作製したものを用いた。*Rev1* マウスの具体的な作製法は、次の通りである。プロモーターとして約 2kb の

*MTI*(metallothioneinI

enhancer/promoter)を用い、その下流に 3750bp の *Rev1* cDNA および SV40 由来の splicing+polyA signal を付加したものを injection fragment とした。同様に胸腺で遺伝子発現を誘導できる *Ick* promoter を組み込んだベクターを用いた injection fragment を作製した。マウス系統は C57BL/6 マウスを使用し、マウス受精卵前核に injection fragment を注入し、偽妊娠させた recipient マウスの卵管に移植し仔マウスを得た。ファウンダーマウスの同定は tail DNA のサザンブロットにより行った。これらのファウンダーマウスを C57BL/6 と交配してラインを確立し、PCR によりトランスジェン発現の確認を行い、以下の実験に用いた。

#### 1-2. 導入した *Rev1* 遺伝子を両アレルに持つ *Rev1* ホモマウスの樹立

上記で得られた *Rev1* マウス同士を交配し、仔マウス (F1 世代) を得た。この仔マウスを野生型 C57BL/6 マウスと交配し、F2 世代の仔マウスを得た。F2 世代の仔マウスのトランスジェンを検査し、生まれた全ての F2 世代の仔マウスにトランスジェンが確認できた場合に、その親マウスを「導入した *Rev1* 遺伝子」を両アレルに持つ *Rev1* ホモマウスとした。

#### 1-3. T 細胞受容体 (TCR) 突然変異体頻度の測定

8-12 週齢雌の C57BL/6 野生型マウスと *Rev1* ホモマウスを用いて、T 細胞受容体 (TCR) の表現型を指標とした突然変異体頻度の解析を行った。実験開始 1 週間前

から実験終了時まで 25mM ZnSO<sub>4</sub>水を自由摂取させた。投与群には *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) を 0.9% 生理食塩水に溶解し、腹腔内投与した。未投与群には、0.9%生理食塩水を投与した。投与 2 週間後に脾臓、リンパ節を回収し、細胞数の計測を行い 3×10<sup>6</sup> 個の細胞を PE 標識抗 CD3 抗体, FITC 標識抗 CD4 抗体で染色した。正常ヘルパー T 細胞 (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) のうち CD3 を提示できない変異体 (CD3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>) の頻度を FACSscan で検出した。

#### 1-4. 化学物質投与による *Rev1* マウスでの発がん実験

野生型雄マウス, *Rev1* (Hemi, Homo) 雄マウスに出生時から 25mM ZnSO<sub>4</sub>水を自由摂取させた。各実験群と使用したマウス数を表 1 に示した。6, 7 週齢時に MNU (50mg/ kg) を腹腔内投与した。その後終生観察し、小腸腫瘍の解析を行った。具体的には、屠殺後小腸を採取し、ただちに 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、アルカリフオスファターゼ染色を行い顕微鏡下で小腸腫瘍の数を計測した。また、写真撮影を行い腫瘍の大きさを測定した。

小腸における *Rev1* の mRNA 発現レベルを定量した。雌雄の野生型マウスと *Rev1* (Hemi, Homo) マウスを各々 6 匹用意した。それぞれ 3 匹ずつ 2 群にわけ、前者には水道水を、後者には 25 mM ZnSO<sub>4</sub>水を 1 週間自由摂取させた。その後、屠殺し小腸を採取し RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。各サンプルを 20 μg/ml に希釈し QuantiTect® SYBR®Green RT-PCR (QIAGEN) を用いて 7300 Real-Time PCR System (Applied

Biosystems)により Real-time RT-PCR を行った。*GAPDH* を内部標準とし、*Rev1* の相対的発現レベルを定量した。

#### 1-5. *Rev1* ホモマウスの化学物質に対する短期の発がん感受性の検討

8 週齢雄の C57BL/6 野生型マウスと *Rev1* ホモマウスに 25mM ZnSO<sub>4</sub>水を自由摂取させた。各実験群と使用したマウス数を表 2 に示した。9, 10 週齢時、投与群に MNU (50mg/ kg) を腹腔内投与した。未投与群には 0.9%生理食塩水を投与した。その後、19 週齢で屠殺し小腸を採取し、ただちに 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。その後、アルカリフオスファターゼ染色を行い顕微鏡下で小腸腫瘍の数を計測した。また、写真撮影を行い腫瘍の大きさを計測した。

## 2. ばい煎ダイズ抽出物の発がん性や遺伝毒性の検索

変異原に対し発がん高感受性のマウスを樹立し、ばい煎ダイズ抽出物に対する発がん性や遺伝毒性の検索を開始した。

雄 *Rev1* ホモマウス約 30 匹, 雌 *Rev1* ホモマウス約 90 匹を 1:3 の比率でケージに入れ、2 週間交配させた。得られた胎児の中から、出生日のずれが 1 週間以内になるマウスを対象とした。3 週齢の健康な雌雄マウス各 60 匹に 25mM ZnSO<sub>4</sub>水を自由摂取させ、6 週齢より実験を開始した飼育は温度 21.0~25.0°C, 湿度 40~70%, 換気回数 10~25 回/時間, 蛍光照明 12 時間に制御された動物室で、ポリカーボネート製ケージ (床敷使用) に 5 匹ずつ収容し固型飼料 (MF) を自由摂取させた。焙煎ダ

イズ抽出物は日本食品添加物協会より供与されたものを用いた。食品添加物として食品に含有される最高濃度である 5%を最高用量群として設定し、それ以下の用量を公比 2 で減じ、2.5, 1.25, 0.63%とした。対照群には水道水を投与し、被験物質調整時に新しい水に交換した。被験物質は、使用時まで 4℃で保存し、週 2 回調製し混水投与した。各実験群の披験物質投与濃度とマウス数を表 3 に示した。

試験では、一般状態及び死亡動物の有無を毎日観察し、体重及び摂餌量及び飲水量については投与開始後週一回測定した。なお、摂餌量及び飲水量は、給餌或いは給水量から残餌或いは残水量を差引いた量として算出し計算により 1 日 1 匹あたりの摂餌量(g/マウス/日)及び飲水量(g/マウス/日)を求めた。被験物質摂取量(g/kg/日)は、当該測定日の平均体重、平均摂餌量および被験物質添加濃度から、計算により求めた。

動物実験の観察期間を 12 ヶ月以内として剖検を実施する。剖検時の検査項目として血液学的検査(赤血球数, 白血球など 10 数項目), 血液生化学的検査(GOT, GPT など 20 数項目), 臓器重量測定(肝臓, 腎臓など 10 項目近く), 及び組織学的検査を含む病理学的検査(全臓器)を実施する。全臓器の肉眼的観察により腫瘍病変の検索を行い、特に小腸とリンパ系の病変については、腫瘍病変の有無のみならず特殊染色(アルカリフォスファターゼ染色, 免疫染色など)を行いより詳細な検索を行う。これらの検査を総合し、ばい煎ダイズ抽出物の安全性評価を行う。

## 倫理面への配慮

本申請研究には組換え DNA 実験が含まれているため、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき、広島大学組換え DNA 実験安全管理規定にしたがって承認を得ている。遺伝子組換えマウスの作製と飼育は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」等に従い、広島大学に実験計画を申請し、承認を得て実施した。動物の取り扱いに関しては、広島大学実験動物取り扱い指針にしたがい、動物の苦痛を最小限に留めるよう処置を行った。また、本申請研究には放射性同位元素を使用する実験が含まれているため「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」に基づき広島大学原爆放射線医科学研究所放射線障害予防規定にしたがって承認を得て行った。

## C. 研究結果

### 1. 発がん性や突然変異誘発能を高感度に検索できるモデルマウスの開発

#### 1-1. *Rev1* トランスジェニックマウス(*Rev1*マウス)の樹立

*Rev1*マウスは、共同研究により作製したものをを用いた。

#### 1-2. 導入した *Rev1* 遺伝子を両アレルに持つ *Rev1* ホモマウスの樹立

上記で得られた *Rev1*マウス同士を交配し、両側のアレルに *Rev1* 遺伝子を持っている *Rev1* ホモ(homo)マウスを得た。

#### 1-3. T 細胞受容体(TCR)突然変異体頻度の測定

##### a) リンパ節における TCR 突然変異体頻度の測定

リンパ球の TCR 突然変異体の出現頻度は、未投与群では、野生型マウス  $1.4 \times 10^{-4}$ 、*Rev1* ホモマウス  $1.4 \times 10^{-4}$  とほぼ同程度の頻度を示した。MNU (50, 100 mg/kg) 投与群では、両者ともに濃度依存的に TCR 突然変異体頻度の上昇がみられた。MNU (50, 100 mg/kg) 両濃度投与ともに、*Rev1* ホモマウスの方が、野生型マウスよりも有意に高い値を示した(図 1-A)。

#### b) 脾臓における TCR 突然変異体頻度の測定

リンパ球の TCR 突然変異体の出現頻度は、未投与群では、野生型マウスで  $2.5 \times 10^{-4}$ 、*Rev1* ホモマウスで  $2.6 \times 10^{-4}$  であり、共にほぼ同程度の頻度であった。MNU (50, 100 mg/kg) 投与により、両者とも濃度依存的な TCR 突然変異体頻度の上昇がみられた。MNU 50 mg/kg 投与群では、*Rev1* ホモマウスの方が、野生型マウスよりも高い値を示したが有意差は見られなかった(図 1-B)。

#### 1-4. 化学物質投与による *Rev1* マウスでの発がん実験

雄の野生型マウスと *Rev1*(Hemi, Homo) マウスにおける小腸腫瘍の数、大きさを表 1 に示した。*Rev1* ホモマウスでは野生型マウスや *Rev1* ヘミマウスに比べ早期にかつ高頻度な小腸腫瘍の形成がみられた(平成 18 年度報告)。表 1 及び図 2-A に示す様に小腸腫瘍の平均個数は、野生型マウス 17.4 個、*Rev1* ヘミ(Hemi)マウス 17.2 個、及び *Rev1* ホモ(Homo) マウス 33.7 個であり、*Rev1* ホモマウスでは有意に多数の腫瘍発生を認めた ( $p < 0.05$ )。

野生型マウスと *Rev1*(Hemi, Homo) マウスの小腸における *Rev1* mRNA レベルを

Real-time RT-PCR 法により定量した。*Rev1* ホモマウス雄では、 $ZnSO_4$  水投与により、野生型と比較して、約 40 倍の顕著な *Rev1* mRNA の発現誘導がみられたが、水道水を飲水した *Rev1* ホモマウスでは、発現誘導はみられなかった(図 2-B)。

#### 1-5. *Rev1* ホモマウスの化学物質に対する短期の発がん感受性の検討

野生型マウスと *Rev1* ホモマウスにおける小腸腫瘍の数、大きさを表 2 に示した。未投与群では、野生型マウスと *Rev1* ホモマウス間で腫瘍の数、大きさに顕著な差はみられなかった。MNU 投与群では、野生型マウスの平均腫瘍数は 16.3 個、*Rev1* ホモマウスでは 38.7 個と *Rev1* ホモマウスの方が有意に多数の腫瘍発生を認めた(表 2, 図 3-A) ( $p < 0.0026$ )。腫瘍の大きさの平均値は、野生型マウス 18.06mm、*Rev1* ホモマウス 21.78mm であり、*Rev1* ホモマウスの方が有意に大きな腫瘍が誘発されることが明らかとなった ( $p < 0.03$ )。両群ともに腫瘍の大きさにばらつきがみられたため、一定区間内にみられる相対的な腫瘍の割合を図 3-B に示した。野生型マウスでみられる腫瘍の大きさの分布が、*Rev1* ホモマウスでは右側へシフトする傾向がみられた。

## 2. ばい煎ダイズ抽出物の発がん性や遺伝毒性の検索

### a) 一般状態および死亡動物

実験群を表 3 に示した。現在、*Rev1* ホモマウスに 2.5, 1.25, 及び 0.63% の焙煎ダイズ抽出物の反復投与を継続しており、研究は順調に経過している。投与 3 週に 1.25% 投与群の雄マウス 1 例が不慮の事故

により死亡した。その他、試験期間中の動物の一般状態は、いずれの実験群においても焙煎ダイズ抽出物に起因すると考えられる特記すべき変化は認められていない。

#### b) 体重

試験開始から10週目までの各群の体重推移を図4-A、及び表4に示した。雌雄マウスとも対照群と被験物質投与群間で顕著な差はみられなかった。

#### c) 摂餌量、飲水量および被験物質摂取量

試験開始から10週目までの各群の摂餌量、飲水量の推移を図4-B、C、及び表4に示した。雌雄マウスとも対照群と被験物質投与群間で顕著な差はみられなかった。試験期間中におけるマウス1匹1日当たりの平均の摂餌量と体重1kg、及び1日当たりの被験物質摂取量を表4に示した。平均摂餌量、平均被験物質摂取量については、雌雄マウスとも対照群と被験物質投与群間で顕著な差はみられなかった。

### D. 考察

既存添加物は、平成7年5月の食品衛生法の改正にともなう経過措置として、使用が認められているものである。既存添加物の多くは、それ自体もしくはその起源が、長年食用に供されていた等の経験はあるものの、安全性の面から見れば動物実験などによる毒性試験などの科学的な安全性データに欠けるものが少なくない。そこで、既存添加物の発がん性等を効率良くスクリーニングできる哺乳類の動物モデルの開発が求められている。本研究では、最近著しく進歩した自然突

然変異を誘発する機構の研究成果を応用して、微量の発がん性を短時間に高感度で検定できるマウス発がんモデルの開発を行う。

近年の分子遺伝学的解析の結果、がんはがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異により生じる遺伝子病であり、遺伝子の突然変異のうち、点突然変異が遺伝子変異の誘発に重要であることが明らかになった。このような突然変異の誘発は、哺乳類においても細菌や酵母と同様に「損傷乗り越えDNA合成」(translesion DNA合成)をする特殊なDNAポリメラーゼによって行われる事が明らかにされた。さらに、高発がん性の色素性乾皮症バリエーション(XPV)の原因遺伝子産物が「損傷乗り越え」DNAポリメラーゼであるポリメラーゼ $\eta$ である事が明らかにされ、「損傷乗り越えDNA合成」とがん化との関係が世界中で注目されている。YファミリーDNAポリメラーゼによるDNA合成は校正修復の機能を持たず、また、DNA塩基間の対合を無視する様式のものが多いため、必然的に誤りの多いDNA合成となる。我々は、YファミリーDNAポリメラーゼのひとつであるRev1に着目し、突然変異の誘発機構を明らかにしてきた。Rev1はBRCTドメイン、deoxycytidyl transferase活性ドメイン、他のDNAポリメラーゼとの結合能を有する結合ドメインの3つから構成され、酵母やマウス、ヒトなどで広く保存されている。

本研究では、Rev1が「誤りがちなDNA合成」することで突然変異を誘発することに注目し、発がん性や突然変異誘発能を高感度に検索できるモデルマウスの開

発を試みた。具体的には、エイムス試験の原理を用いたマウスモデルの開発であり、*Rev1* トランスジェニックマウス等の遺伝子操作マウスを用いて既存添加物の発がん性や遺伝毒性を高感度に検定できるモデルマウスの樹立である。

平成 18 年度は、*Rev1* トランスジェニックマウスから両側のアレルに *Rev1* 遺伝子を持っている *Rev1* ホモ(homo)マウスを樹立し、化学物質の投与による発がん感受性を検討した。その結果、*Rev1* ホモマウスでは、短い潜伏時間で多数の小腸腫瘍が誘発されることが明らかとなった。今年度は、この点をさらに確認するため、*Rev1*mRNA の発現と小腸腫瘍の発生との関係を検討した。その結果、小腸での *Rev1*mRNA の発現は雌マウスより雄マウスに高い。さらに、*Rev1* ホモマウスは *Rev1* ヘミマウスや野生型マウスに比べ *Rev1*mRNA の発現が非常に高く、この発現と誘発された小腸腫瘍の個数が相関することが明らかになった(表 1, 図 2)。この事は、小腸の腫瘍発生に *Rev1* が強い関与をなし、gene dose effect が存在する可能性を示唆する。以上の結果は、*Rev1* ホモマウスが、発がん高感受性マウスとして優れた特徴を持ったモデルマウスとなる可能性を示唆している。そこで、より効率的な発がんモデルを開発する目的で、化学物質を投与後、短期間での小腸腫瘍の誘発を観察した。その結果、*Rev1* ホモマウスは、10 週間という短い期間で野生型マウスに比べ有意に多数の腫瘍が誘発されることが明らかとなった(表 2, 図 3)。従って、*Rev1* ホモマウスは、短期間に高感度で検体の遺伝毒性や発がん性

を検定できるモデルマウスになる可能性を有する。

一方、*Rev1* マウスの突然変異誘発に対する感受性を検討する目的で、T 細胞受容体 (TCR) 突然変異体の発生頻度を測定した。今回の結果では、リンパ節と脾臓における TCR 自然突然変異体の頻度は、野生型マウス、*Rev1* マウスとの間に差はみられなかった。このことより、自然環境中で生成される突然変異の誘発には *Rev1* は重要な寄与をしていないのかもしれない。しかし、MNU 投与により誘発される突然変異頻度は、リンパ節、脾臓ともに *Rev1* ホモマウスの方が、野生型マウスよりも高い値を示し、リンパ節で有意に高い結果が得られた(図 1)。このことは、*Rev1* は MNU により誘発される突然変異を促進することを示唆する。*Rev1* は、損傷による複製阻害時に損傷を乗り越えることで細胞死を回避する修復機構で働くと推定されている。*Rev1* は、この損傷乗り越え時に誤った塩基を挿入することで突然変異を誘発している可能性が考えられる。この様に、*Rev1* ホモマウスは、変異原による突然変異誘発に対する感受性が高いことが明らかとなった。

以上より、*Rev1* ホモマウスは、既存添加物の遺伝毒性や発がん性を高感度に検定できるマウスモデルになると考えられた。そこで、今年度より、*Rev1* ホモマウスを用いてばい煎ダイズ抽出物の発がん性や遺伝毒性の検索を開始した。

本研究の検体であるばい煎ダイズ抽出物は、大豆の種子を脱脂し、ばい煎したものより熱時水で抽出し、蛋白質をエタノールで除去したもので、マルトールを

主成分とする。大豆を原料とするため大豆イソフラボンを含み、多様な生理活性があり、その安全性の検索が必要である。この検体は、エイムス試験では陰性であるが、哺乳類培養細胞での小核試験や染色体異常試験は陽性である。また、ラットを用いた動物実験である13週間反復投与試験では、投与したばい煎ダイズ抽出物に起因した変化は認められていない。これと同様に、多くの既存食品添加物は、明確な遺伝毒性を示すものは少なく、それ故、検体の科学的根拠に基づく安全性評価が難しくなっている。特にばい煎ダイズ抽出物は、多様な生理活性を有する大豆イソフラボンを含むことから、生涯摂取した場合の人体影響については慎重に評価する必要があるが、現時点でこれに答えうる資料はない。この様な微弱な人体影響を検定するには、多数の動物を用いた動物実験に依らざるを得ないが、その作用が非常に微弱な場合は、現実的には実験不可能な数の動物数が必要になってくる。そこで、本研究では、この様な微弱な人体影響を高感度に検定できる *Rev1* ホモマウスを開発し、その検索を開始した。現時点まで実験は順調に進行している(図4, 表4)。

本研究により既存添加物の安全性を高感度に検定できるモデルマウスが樹立でき、それを活用・利用すれば以下のことが可能となる。(1) 多数の既存添加物の遺伝毒性や発がん性等に関する安全性を高感度で迅速に評価できるマウスモデルが開発できる。(2) ばい煎ダイズ抽出物を長期摂取した場合の発がん性を含む影響について科学的根拠に基づいた安全性

の検索が可能となり、既存添加物の国際的レベルでの安全性評価が進む。(3) 国民の既存添加物ひいては食に対する不安を解消するのに役立ち、安全な食料に対する国民の信頼性を高めることで豊かな食生活の確保と国民の健康・保険の増進に貢献できる。

## E. 結論

ばい煎ダイズ抽出物のヒトでの生涯摂取を想定した安全性を動物実験により評価することを目的に実験を実施した。本検体は、大豆イソフラボンを含み、多様で微弱な生理活性があるためその安全性の評価は、従来の動物実験では難しい。本研究では、最近著しく進歩した自然突然変異を誘発する機構の研究成果を応用して、微量の発がん性を短時間に高感度で検定できるマウス発がんモデルの開発を行った。*Rev1* は、突然変異を誘発する「損傷乗り越え」DNAポリメラーゼであり、この遺伝子を両アレルに持つ *Rev1* ホモトランスジェニックマウスは、変異原に対し高感受性である。即ち、変異原による小腸腫瘍の誘発とT細胞受容体の突然変異頻度が有意に高く、検体の安全性を高感度で迅速に評価できるマウスモデルになると考えられた。そこで、このマウスを用いて、ばい煎ダイズ抽出物の発がん性や遺伝毒性の検索を開始し、実験は現在まで順調に進行している。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., Yoder, K., Izumi, S., Kuraoka, I., Tanaka, K., Kimura, H., Ikura, M., Nishikubo, S., Ito, T., Muto, A., Miyagawa, K., Takeda, S., Fishel, R., Igarashi, K., Kamiya, K.: DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol.*, 27(20): 7028-7040, 2007.
  - Masuda, Y., Suzuki, M., Piao, J.L., Gu, Y.Q., Tsurimoto, T., Kamiya, K.: Dynamics of human replication factors in the elongation phase of DNA replication. *Nucl. Acids Res.*; 35(20): 6904-6916, 2007.
  - Tomida, J., Masuda, Y., Hiroaki, H., Ishikawa, T., Song, I., Tsurimoto, T., Tateishi, S., Shiomi, T., Kamei, Y., Kim, J., Kamiya, K., Vaziri, C., Ohmori, H., Todo, T.: DNA damage induced ubiquitylation of RFC2 subunit of RFC complex. *J. Biol. Chem.*; in press, 2008.
- ### 2. 学会発表
- 朴金蓮, 増田雄司, 神谷研二: ヒト REV1 による損傷乗り越え DNA 合成の生化学的解析. 第 48 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2007.6.3. (抄録, p.30, 2007)
  - 顧永清, 増田雄司, 神谷研二: Characterization of a human DNA helicase, PIF1. 第 48 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2007.6.3. (抄録, p.32, 2007)
  - 顧永清, 増田雄司, 神谷研二: Characterization of a human DNA helicase, PIF1, which is responsible for chromosomal integrity. 第 13 回国際放射線研究会議, サンフランシスコ, 2007.7.8-12. (抄録, p.57, 2007)
  - 朴金蓮, 増田雄司, 神谷研二: Deoxycytidyl transferase activity of human REV1 and its substrate specificity. 第 13 回国際放射線研究会議, サンフランシスコ, 2007.7.8-12. (抄録, p.57, 2007)
  - 増田雄司, 鈴木美紀, 朴金蓮, 顧永清, 釣本敏樹, 神谷研二: Dynamic properties of human replication factors in the elongation of DNA replication. CSHL Meeting-Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, ニューヨーク, 2007.9.5-9. (Abstracts, p.132, 2007)
  - 増田雄司, 鈴木美紀, 朴金蓮, 顧永清, 釣本敏樹, 神谷研二: ヒト DNA 複製装置のダイナミクス. 日本遺伝学会第 79 回大会, 岡山, 2007.9.19-21. (プログラム 予稿集, p.64, 2007)
  - 増田雄司, 鈴木美紀, 朴金蓮, 顧永清, 釣本敏樹, 神谷研二: 損傷乗り越え DNA 合成におけるポリメラーゼ交換反応と複製装置のダイナミクス. 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007.10.3-5. (抄録集, p.492, 2007)

8. 豊島めぐみ, 本田浩章, 増田雄司, 神谷研二: 損傷乗り越え DNA 合成酵素 Rev1 の発がんにおける役割. 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007.10.3-5. (抄録集, p.82, 2007)
9. 増田雄司, 鈴木美紀, 朴金蓮, 顧永清, 釣本敏樹, 神谷研二: ヒト DNA 複製装置のダイナミクスとポリメラーゼ交換反応. 日本放射線影響学会第 50 回大会, 千葉, 2007.11.14-17. (講演要旨集, p.69, 2007)
10. 豊島めぐみ, 梶村順子, 渡辺敦光, 本田浩章, 増田雄司, 神谷研二: 損傷乗り越え DNA 合成酵素 Rev1 の発がんにおける役割. 日本放射線影響学会第 50 回大会, 千葉, 2007.11.14-17. (講演要旨集, p.80, 2007)
11. 顧永清, 増田雄司, 神谷研二: 染色体の恒常性維持に必要とされる DNA ヘリカーゼ PIF1 の生化学的機能解析. 日本放射線影響学会第 50 回大会, 千葉, 2007.11.14-17. (講演要旨集, p.82, 2006)
12. 朴金蓮, 増田雄司, 神谷研二: 損傷乗り越え DNA 合成における REV1 の dCMP 転移活性の生化学的解析. 日本放射線影響学会第 50 回大会, 千葉, 2007.11.14-17. (講演要旨集, p.99, 2007)
13. 増田雄司, 鈴木美紀, 朴金蓮, 顧永清, 釣本敏樹, 神谷研二: ヒト DNA 複製装置のダイナミクスと PCNA のユビキチン化. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007), 横浜, 2007.12.11-15. (講演要旨集, p.165, 290, 2007)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案特許: なし
3. その他: なし

表 1. MNU 投与による *Rev1* ホモマウスでの発がん実験

Genotype	No. of mice	# of tumor	Size of tumor
Wt	22	17.4 ± 0.4	2.0 ± 0.7
<i>Rev1</i> (Hemi)	21	17.2 ± 8.0	2.1 ± 0.8
<i>Rev1</i> (Homo)	18	33.7 ± 17.2 *	3.6 ± 0.8

\*:  $p < 0.05$

表 2. *Rev1* ホモマウスの化学物質投与による短期の小腸腫瘍発生

Genotype	MNU (mg/ kg)	No. of mice	# of tumor	Size of tumor
Wt	0	10	0.3 ± 0.5	18.4 ± 4.9
	50 × 2	10	16.3 ± 8.9	18.1 ± 3.8
<i>Rev1</i> (Homo)	0	10	0.2 ± 0.4	11.3
	50 × 2	9	38.7 ± 15.7 *	21.8 ± 3.0 **

\*:  $p = 0.0026$ , \*\*:  $p = 0.030$

表 3. *Rev1* ホモマウス1年間反復投与試験

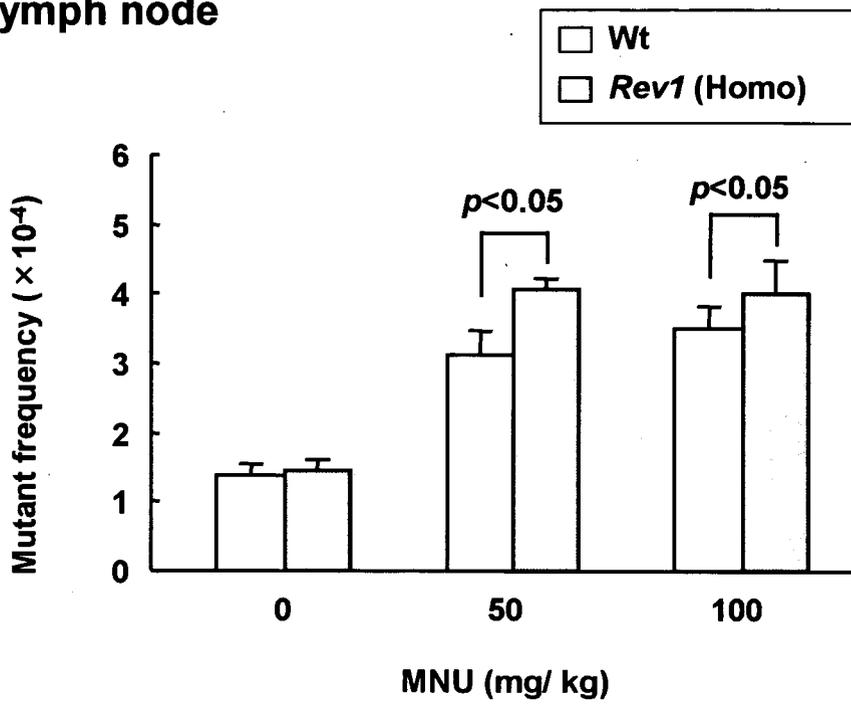
Dose level (%)	No. of Male mice (n=60)	No. of Female mice (n=60)
0	10	10
0.63	10	10
1.25	10	10
2.5	10	10
5	20	20

表 4. Rev1 ホモマウス 1 年間反復投与試験 (10 週までの被験物質摂餌量)

Sex	Dose level (%)	Diet intake (g/mouse/day)	Water consumption (g/mouse/day)	Soybean extracts intake (g/kg/day)	Final body weight (g)
Male	0	2.7	3.3	0	24.1
	0.63	2.4	3.4	0.8	26.8
	1.25	2.8	3.4	1.6	26.8
	2.5	2.9	3.5	3.4	25.7
	5	2.7	3.7	7.6	24.5
Female	0	2.6	3.0	0	20.2
	0.63	2.6	3.6	1.2	19.4
	1.25	2.5	3.5	2.3	19.2
	2.5	2.4	2.8	3.4	20.5
	5	2.3	3.2	8.3	19.4

図1 TCR 突然変異体頻度の検出

A Lymph node



B Spleen

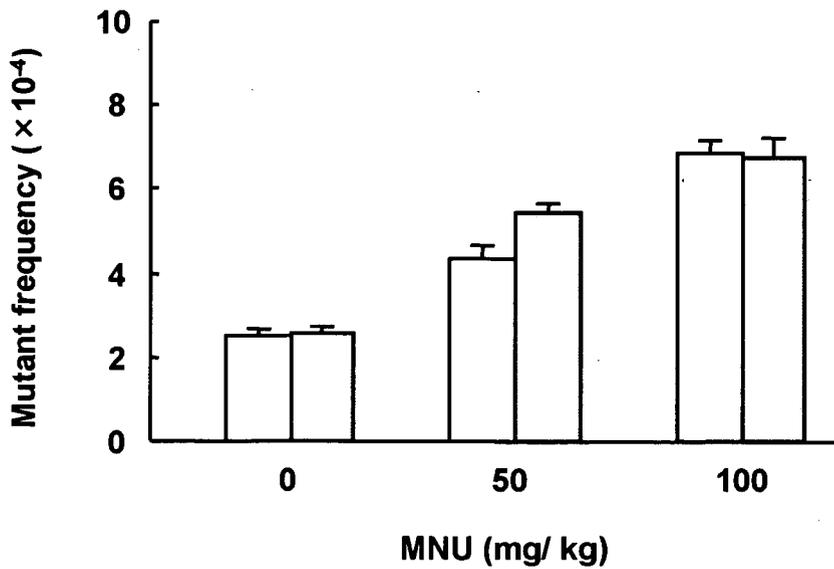


図2 MNU投与によるRev1マウスでの発がん実験

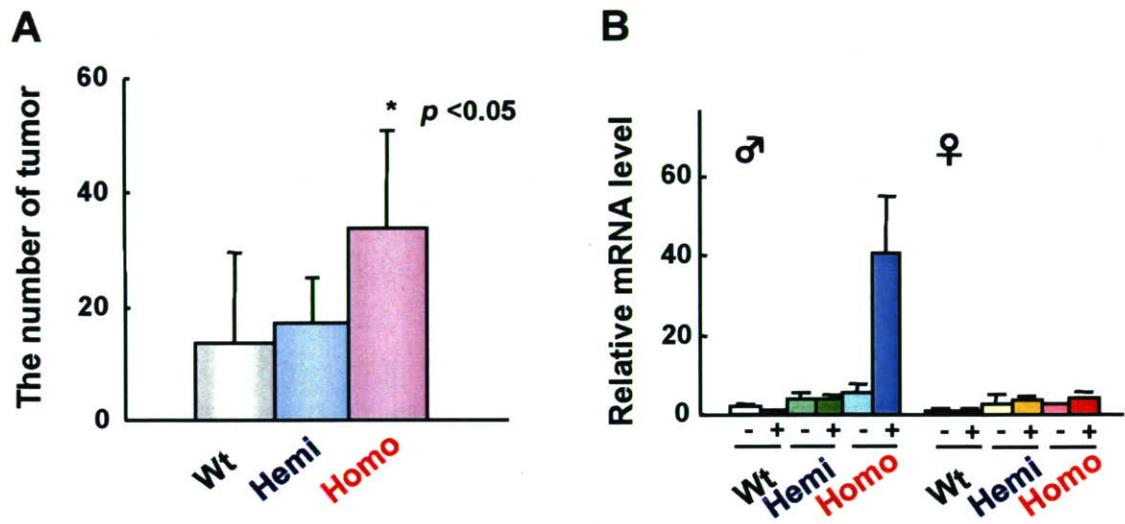
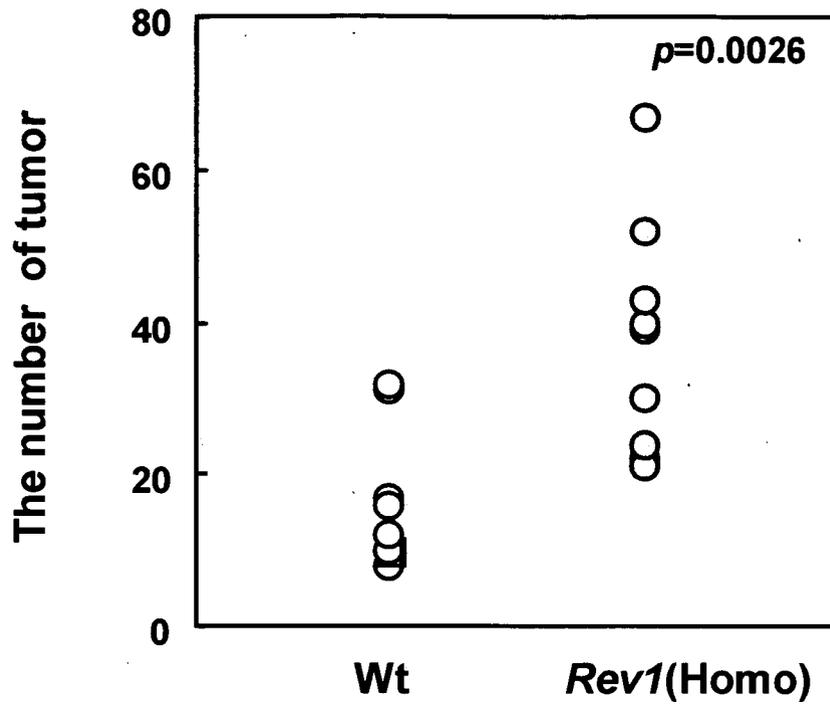


図 3 MNU投与によるRev1ホモマウスでの小腸腫瘍の発生頻度

A



B

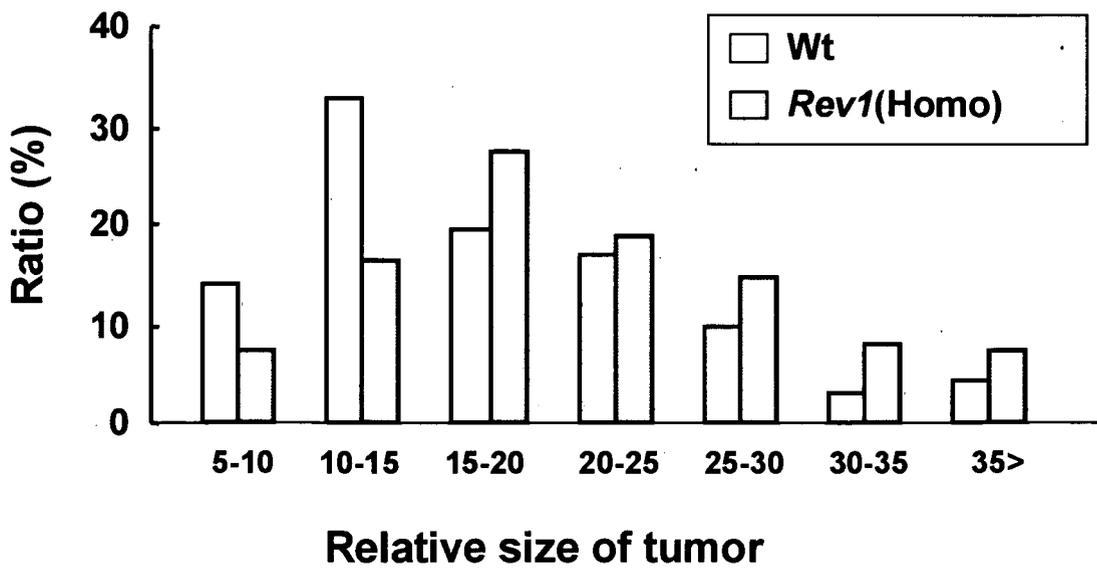
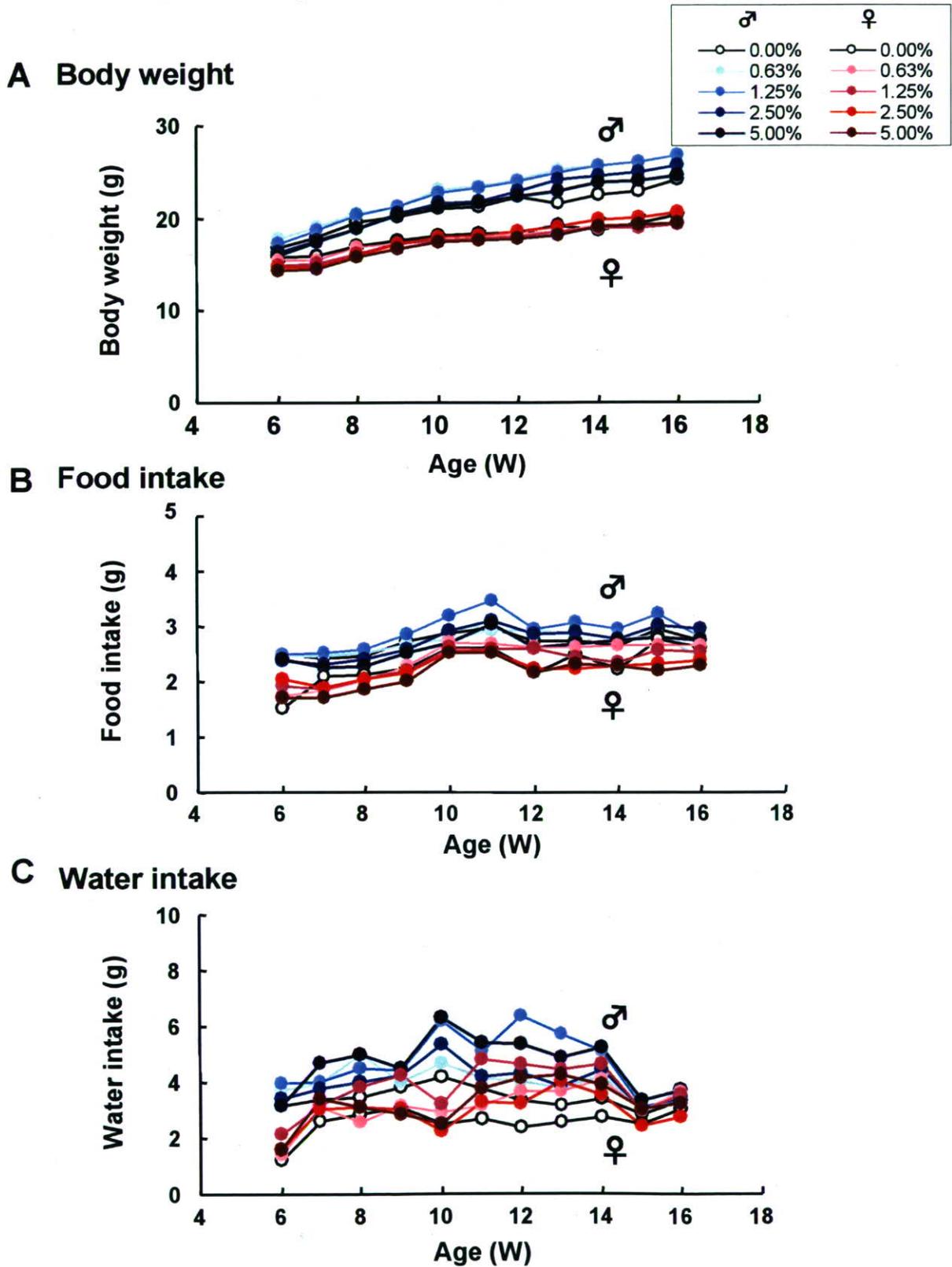


図 4 焙煎ダイズ抽出物のRev1 ホモマウス1年反復投与試験



## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., Yoder, K., Izumi, S., Kuraoka, I., Tanaka, K., Kimura, H., Ikura, M., Nishikubo, S., Ito, T., Muto, A., Miyagawa, K., Takeda, S., Fishel, R., Igarashi, K., Kamiya, K.	DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics	Mol Cell Biol.	27(20)	7028-7040	2007
Masuda, Y., Suzuki, M., Piao, J.L., Gu, Y.Q., Tsurimoto, T., Kamiya, K.	Dynamics of human replication factors in the elongation phase of DNA replication	Nucl. Acids Res.	35(20)	6904-6916	2007
Tomida, J., Masuda, Y., Hiroaki, H., Ishikawa, T., Song, I., Tsurimoto, T., Tateishi, S., Shiomi, T., Kamei, Y., Kim, J., Kamiya, K., Vaziri, C., Ohmori, H., Todo, T.	DNA damage induced ubiquitylation of RFC2 subunit of RFC complex	J. Biol. Chem.	<i>in press</i>		2008

## DNA Damage-Dependent Acetylation and Ubiquitination of H2AX Enhances Chromatin Dynamics<sup>†</sup>

Tsuyoshi Ikura,<sup>1\*‡</sup> Satoshi Tashiro,<sup>2‡</sup> Akemi Kakino,<sup>4</sup> Hiroki Shima,<sup>2</sup> Naduparambil Jacob,<sup>5</sup> Ravindra Amunugama,<sup>5</sup> Kristine Yoder,<sup>5</sup> Shunsuke Izumi,<sup>6</sup> Isao Kuraoka,<sup>7</sup> Kiyoji Tanaka,<sup>7</sup> Hiroshi Kimura,<sup>8</sup> Masae Ikura,<sup>1</sup> Shuichi Nishikubo,<sup>4</sup> Takashi Ito,<sup>9</sup> Akihiko Muto,<sup>1</sup> Kiyoshi Miyagawa,<sup>3</sup> Shunichi Takeda,<sup>10</sup> Richard Fishel,<sup>5</sup> Kazuhiko Igarashi,<sup>1</sup> and Kenji Kamiya<sup>4\*</sup>

Department of Biochemistry, Tohoku University Graduate School of Medicine, Seiryomachi 2-1, Aobaku Sendai 980-8575, Japan<sup>1</sup>; Department of Cellular Biology,<sup>2</sup> Department of Human Genetics,<sup>3</sup> and Department of Experimental Oncology,<sup>4</sup> RIRBM, Hiroshima University, Hiroshima 734-8553, Japan; Molecular Virology, Immunology and Medical Genetics, Human Cancer Genetics, The Ohio State University School of Medicine and Public Health, Columbus, Ohio 43210<sup>5</sup>; Graduate School of Science and The Center for Quantum Life Science, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashihiroshima 739-8526, Japan<sup>6</sup>; Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, 1-3 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan<sup>7</sup>; Nuclear Function and Dynamics Unit, HMRO, School of Medicine, Kyoto University, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan<sup>8</sup>; Department of Biochemistry, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki 852-8523, Japan<sup>9</sup>; and CREST Laboratory, Department of Radiation Genetics, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8501, Japan<sup>10</sup>

Received 2 April 2007/Returned for modification 17 May 2007/Accepted 2 August 2007

Chromatin reorganization plays an important role in DNA repair, apoptosis, and cell cycle checkpoints. Among proteins involved in chromatin reorganization, TIP60 histone acetyltransferase has been shown to play a role in DNA repair and apoptosis. However, how TIP60 regulates chromatin reorganization in the response of human cells to DNA damage is largely unknown. Here, we show that ionizing irradiation induces TIP60 acetylation of histone H2AX, a variant form of H2A known to be phosphorylated following DNA damage. Furthermore, TIP60 regulates the ubiquitination of H2AX via the ubiquitin-conjugating enzyme UBC13, which is induced by DNA damage. This ubiquitination of H2AX requires its prior acetylation. We also demonstrate that acetylation-dependent ubiquitination by the TIP60-UBC13 complex leads to the release of H2AX from damaged chromatin. We conclude that the sequential acetylation and ubiquitination of H2AX by TIP60-UBC13 promote enhanced histone dynamics, which in turn stimulate a DNA damage response.

Chromatin reorganization by histone modification and mobilization plays a crucial role in DNA metabolism, including replication, transcription, and repair. It appears that histone modification and mobilization can reorganize chromatin to allow DNA repair machinery to access damaged chromosomal DNA (11, 29, 52, 56, 57).

H2AX is a histone variant that differs from H2A at various amino acid residues along the entire protein and in its C-terminal extensions. H2AX is phosphorylated after the induction of DNA double-strand breaks (DSBs), and the phosphorylated H2AX ( $\gamma$ -H2AX) participates in focus formation at sites of DNA damage. After induction of DSBs, the MRN complex (MRE11, RAD50, and NBS1) binds to broken DNA ends and recruits active ATM, ATR, and/or DNA protein

kinase, resulting in the initial phosphorylation of H2AX (32, 38, 40). MDC1 then associates with  $\gamma$ -H2AX and recruits additional activated ATM to the sites of DSBs (23, 46). This positive feedback loop leads to the expansion of the  $\gamma$ -H2AX region surrounding DSBs and provides docking sites for many DNA damage and repair proteins, including the MRN complex, 53BP1, and BRCA1 (5, 6, 46).  $\gamma$ -H2AX plays a role in the accumulation but not in the initial recruitment of repair factors such as the MRN complex, 53BP1, and BRCA1 (10, 63). Therefore, modifications of H2AX other than phosphorylation could play a role in the initial step of the DNA damage response.

Until recently, the biological significance of ubiquitination in the DNA damage response has been unclear. H2B ubiquitination regulates the damage checkpoint response (15). H2A is ubiquitinated during the response to UV-induced DNA damage (8). UV-induced DNA damage also causes the ubiquitination of histones H3 and H4, resulting in their release from chromatin (60). Interestingly, ubiquitin-conjugated proteins appear to be accumulated at sites of DSBs, forming nuclear foci like  $\gamma$ -H2AX (34). These findings raise the possibility that histone ubiquitination is also involved in the reorganization of chromatin in response to DSBs. To date, how the ubiquitination of histones is organized in the DNA damage response remains unknown.

\* Corresponding author. Mailing address for Tsuyoshi Ikura: Department of Biochemistry, Tohoku University Graduate School of Medicine, Seiryomachi 2-1, Aobaku Sendai 980-8575, Japan. Phone: 81-022-717-7597. Fax: 81-022-717-7598. E-mail: ikurat@mail.tains.tohoku.ac.jp. Mailing address for Kenji Kamiya: Department of Experimental Oncology, RIRBM, Hiroshima University, Hiroshima 734-8553, Japan. Phone: 81-082-257-5842. Fax: 81-082-257-5844. E-mail: kkamiya@hiroshima-u.ac.jp.

† Supplemental material for this article may be found at <http://mcb.asm.org/>.

‡ These authors contributed equally to this work.

¶ Published ahead of print on 20 August 2007.