

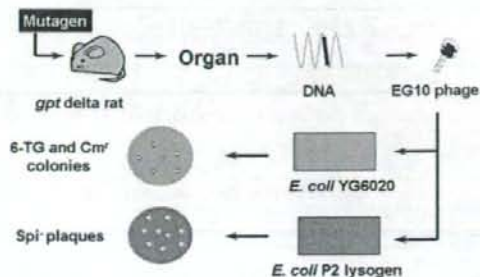
せるものと考えられている。これは、突然変異の誘発は、たとえ1分子の発がん物質がDNAと反応することによっても起こりうるとする原理的な立場に基づいた考えである。だが、生体には抗酸化物質(例えばグルタチオン)、解毒酵素(例えばグルタチオン転移酵素)、DNA修復(例えば8-ハイドロキシグアニン(8-OH-G)DNAグリコシラーゼ)、誤りのない損傷乗り越えDNA合成(例えばDNAポリメラーゼ η による鋳型上のチミン二量体の乗り越えDNA合成)、アポトーシスなど、数々の生体防御機構が存在しており、これらが低用量の遺伝毒性を抑制し「事実上の閾値」を形成することが考えられるが、この点については、現在も議論のあるところである。

また、どのような遺伝毒性試験の結果をもって「遺伝毒性物質」とするかについても、議論のあるところである。一般に、バクテリアを用いるAmes試験の結果をもって遺伝毒性物質とする場合が多いが、Ames試験で陽性であっても個体(マウス、ラット)には遺伝毒性を示さない場合(2,6-diaminotoluene (2,6-DAT))、Ames試験では陰性であっても個体では遺伝毒性を示す場合(ウレタン、ジサイクラニルなど)もあり、実験動物の発がん標的臓器で変異を検出・解析することが望まれる。

実験動物で遺伝毒性を検出するin vivo遺伝毒性試験には、マウスを用いる小核試験、ラット肝臓を用いる不定期DNA合成試験等があるが、いずれも一つの臓器(小核試験は骨髄あるいは血液系細胞、不定期DNA合成試験は肝臓)でのみ遺伝毒性を検出し、複数の臓器で遺伝毒性を検出することはできない。

複数の臓器において遺伝毒性を検出する、現在、最も信頼できる手法は、変異検出用のレポーター遺伝子を導入したトランスジェニック動物遺伝毒性試験法である。この試験に用いられるトランスジェニックマウス、ラットの全ての臓器・細胞には、レポーター遺伝子を組み込んだ λ ファージDNAが導入されている。この試験では、トランスジェニックマウスあるいはラットを化学物質に曝露し、各種臓器(肝臓、腎臓、肺等)からレポーター遺伝子をin vitroパッケージング法により λ ファージ粒子として回収して大腸菌に感染させ、動物個体で起きた変異を、大腸菌を用いて検出する(第1図)。

検出された変異体は、DNAシーケンシス解析により分子解析することができる。



第1図 *gpt delta*トランスジェニックマウス・ラットを用いた遺伝毒性試験法の概要

我々は、従来からのトランスジェニック遺伝毒性試験法では検出しにくかった欠失変異を効率良く検出することを目的に、新規な λ ファージ λ EG10を開発し、これをC57BL6/Jマウスの受精卵に導入することで点突然変異と欠失変異を検出できる*gpt delta*トランスジェニックマウスを樹立した。また λ EG10DNAをSprague Dawley (S.D.)ラットに導入してS.D. *gpt delta*ラットを樹立した。さらにS.D. *gpt delta*ラットをF-344ラットにバッククロスし、F-344 *gpt delta*ラットを樹立した。

本研究では、*gpt delta*トランスジェニック遺伝毒性試験の有用性を検討するため、標的臓器を異にする遺伝毒性物質を投与し、その発がん標的臓器と非発がん臓器における変異頻度を比較した(平成18年度、20年度)。また*gpt delta*トランスジェニックマウス由来の胚繊維芽(MEF)細胞の有用性について検討した(平成19年)。

B. 研究方法

1) F-344 *gpt delta*ラットの樹立

S.D. *gpt delta*ラットの雄をF-344ラットの雌と15世代戻し交配を行い、F-344 *gpt delta*ラットを樹立した(平成20年度)。

2) MEF細胞の培養

妊娠14日目の*gpt delta*マウスから胎児を摘出し培養に供した。細胞培養は、5%炭酸ガス存在下、37°C、15%熱変性牛胎児血清とペニシリン(100 U/mL)、ストレプトマイシン(50 μ

g/mL)を含むダルベッコウ改変イーグル培地(Gibco-BRL)で行った(平成19年度)。

3) 臭素酸カリウムの投与

5週齢の雄S.D. *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(平成18年度)。

4) クリソタイルの調製

クリソタイル(平均長7.8 μ m、平均半径0.2 μ m)を蒸留水に懸濁し、20ゲージの注射針を用いて6-8回混ぜ合わせた。混合液はオートクレーブ滅菌し、適宜希釈して細胞への曝露に用いた(平成19年度)。

5) 2,4-DATと2,6-DATの投与

7週齢の雄F-344 *gpt delta* ラットに2,4-DAT(125ppm, 250ppm, 500ppm)を、一群5匹、13週間混餌投与した。500ppm投与群は、毒性影響のため9週以降は400ppmに用量を下げた。2,6-DATは、500ppmの用量で13週間混餌にて投与した(平成20年度)。

6) *gpt*点突然変異の検出と解析

臓器(腎臓と肝臓)あるいはMEF細胞からゲノムDNAを採取しTranspack(Stratagene)を用いて λ ファージのin vitroパッケージング反応を行い、ゲノムDNAから λ EG10DNAをファージ粒子として回収した。回収したファージ粒子を大腸菌YG6020に感染させ6-チオグアニン(6-TG)とクロラムフェニコール(Cm)を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TGとCmを含むプレートにストリークして生育することを確認した。またファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後にYG6020株に感染させ、Cmのみを含む培地上で生育するコロニー数を計測した。Cmプレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数(あるいは回収した総トランスジーン数)を求めた。6-TGとCmに耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して*gpt*変異頻度(MF)を算出した。6-TGとCmに耐性となったコロニーの*gpt*遺伝子配列を決定して変異部位を同定した。

7) *SpI*欠失変異の検出と解析

ファージはP2 lysogen(大腸菌XL-1 Blue MRA(P2)株)に感染させ、*SpI*プラークの候補を検出した。*SpI*プラークの候補については、さらに他のP2溶原菌(大腸菌WL95株)に感染させ、*red/gam*遺伝子機能が不活化した真の*SpI*プラークを検出した。またパッケージング反応後の懸濁液を、適宜希釈した後にP2ファージが溶原化していない大腸菌XL-1 Blue MRA株に感染させて、総プラーク数を算出した。真の*SpI*プラーク数を回収した総プラーク数で除して*SpI* MFを算出した。*SpI*変異体については、PCR法を用いて1kb以上の大きな欠失とそれ以下の小さな欠失に分類し、さらにシーケンス解析を組み合わせて変異体の欠失部位を同定した。

8) 統計的手法

すべての測定値について平均値と標準偏差を求め、統計的な有意差はStudent's *t*-testにより評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、実験動物あるいは培養細胞を用いたものであり、ヒトに関する倫理上の問題は無い。全ての実験は、遺伝子組換え実験、動物実験に関する所内の規定に準拠して行った。

C. 研究結果

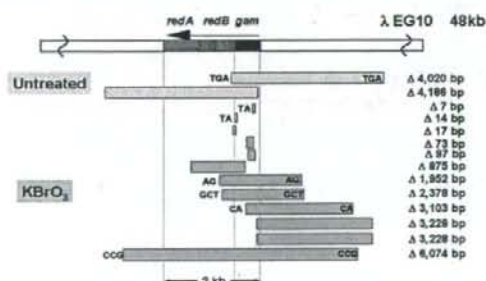
1) 臭素酸カリウム処理により誘発される点突然変異

腎臓における*gpt* MFは、臭素酸カリウム投与群では $9.44 \pm 4.67 \times 10^{-6}$ であったのに対し、非投与群では $3.97 \pm 2.38 \times 10^{-6}$ であり、投与によりMFは2倍以上増加した($P = 0.02, n=5$)。シーケンス解析により、投与によりG:C→A:T変異が6倍(投与群 3.21×10^{-6} に対して非投与群 0.54×10^{-6})増加していることが明らかになった。G:C→T:A変異は、投与により増加しなかった。肝臓では有意なMFの増加は認められなかった(平成18年度)。

2) 臭素酸カリウムにより誘発される欠失変異

腎臓における*SpI* MFは、投与群では $5.39 \pm 2.49 \times 10^{-6}$ であったのに対し、無投与群が $1.30 \pm 0.45 \times 10^{-6}$ であり、投与によりMFは

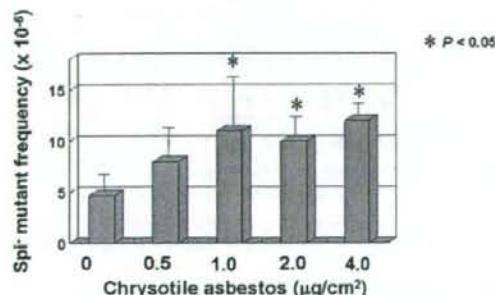
約4倍増加した($P=0.006, n=5$)。臭素酸カリウムの投与により1塩基欠失が4~8倍、2塩基以上の大きさの欠失は10倍以上増加していた。1塩基欠失の2/3は、A(アデニン)あるいはT(チミン)が2から6塩基連続して並ぶ配列からの欠失であった。2塩基以上の欠失変異体の半分は1 kb以上の大きな欠失であった(第2図)。1 kb以上の大きな欠失の頻度を投与群と非投与群で比較すると、臭素酸カリウム投与により約6倍頻度が増大していた。大きな欠失変異体には、末端に短い相同配列を持つものと、持たないものが含まれていた。肝臓におけるSpi MFの増加は認められなかった($P=0.50, n=5$) (平成18年度)。



第2図 臭素酸カリウム(KBrO3)処理により誘発された欠失変異

3) クリソタイル処理による Spi MF の増大

MEF 細胞における無処理群の Spi MF は $4.69 \pm 1.80 \times 10^{-6}$ であった。クリソタイルで処理すると $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ と $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ では用量依存的に MF が増大し、 $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ では無処理群に比べて MF が 2.4 倍上昇した (11.4×10^{-6} vs 4.69×10^{-6}) (第3図)。 $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上の用量での MF は、無処理群に比べて有意差を示した ($P < 0.005$) (平成19年度)。



第3図 クリソタイル処理による Spi MF の増大

4) Spi 変異体の分子解析(平成19年度)

無処理群およびクリソタイル $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 処理群から 93 個および 74 個の Spi 変異体を採取し、その変異スペクトルを解析した。その結果、クリソタイル処理により 2 kb 以上の欠失変異体頻度が 5 倍以上増大していることが明らかになった。これに対して 2 kb 以下の欠失(その大部分は1塩基の欠失である)は、クリソタイル処理により約2倍増大した。これらの結果から、クリソタイルが誘発する欠失は、主に 2 kb 以上の欠失であることが示唆された(平成19年度)。

5) 変異誘発への酸化ラジカルの関与

アスベストによる変異誘発には酸化ラジカルの関与が示唆されている。そこで MEF 細胞をクリソタイル ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) あるいは過酸化水素 (2.4 mM) で処理し、その Spi MF を測定した。Spi MF は、いずれも無処理群の2倍以上の値を示したが両者の間に有意な差はなかった。またカタラーゼ ($5,000 \text{ U/mL}$) をクリソタイル処理あるいは過酸化水素処理の際に共存させると、その Spi MF は無処理群のレベルまで低下した。カタラーゼ単独処理では Spi MF に影響を与えなかった。これらの結果は、クリソタイル処理による欠失変異の誘発に酸化ラジカルが関与していることを示唆している(平成19年度)。

6) 2,4-DAT による gpt MF の増大

肝臓の gpt MF は、2,4-DAT 投与群においては非投与群に比較して有意に増加し、125ppm 投与群において非投与群の約2倍、250ppm および 500ppm 投与群で約7倍高い MF を示した(第1表)。一方、2,6-DAT は、500ppm 投与群において、非投与群に比べ低い値を示した。陽性対照は非投与群に比べ250倍以上高い値を示した。一方、腎臓においては、2,4-DAT、2,6-DAT とともに、非投与群よりも有意に高い gpt MF を示さなかった。陽性対照である DEN は、非投与群に比べ30倍以上高い値を示した(平成20年度)。

第1表 肝臓の *gpt* MF

	<i>gpt</i> MF (10^{-6})
非投与群	6.0±2.4
DEN 投与群	1625.8±517.9***
2,4-DAT 125 ppm	13.7±5.7*
250 ppm	42.9±23.9**
500 ppm	44.2±19.6**
2,6-DAT 500 ppm	3.0±1.5*

gpt MF は 5 匹の値の平均値±標準偏差を示す。

各群の MF の非投与群に対する統計的有意差を t テストにより検定した。*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ を表す。

D. 考察

臭素酸カリウムは、酸化剤として主にパンの製造過程で使われてきたが、ラットに対して腎細胞腫瘍を誘発することが明らかにされ、食品添加物として使用する際には、最終製品に残留しないことが求められている。臭素酸カリウムは、腎臓に対しては発がん作用を示すものの肝臓に対しては発がん性を示さない。また臭素酸カリウムは DNA に酸化損傷を誘発することが明らかにされており、臭素酸カリウムを飲水投与するとラットの腎臓の DNA 中に 8-OH-G が増大する。このため臭素酸カリウムは、食品添加物の遺伝毒性発がん作用を考察する際に重要な化合物と考えられている。

平成 18 年度の研究で、我々は臭素酸カリウム投与によりラットの腎臓に塩基置換変異と欠失変異が誘発されることを明らかにした。鋳型 DNA 鎖上の 8-OH-G は複製の際に C(シトシン)以外に A(アデニン)とも対合するため、DNA 上に 8-OH-G が形成されると G:C 塩基対が 2 回の複製を経て A:T 塩基対に変異する。臭素酸カリウムは腎臓に 8-OH-G を誘発することから、当初、8-OH-G に由来する G:C→T:A 変異が増大することを予想した。だが G:C→T:A 変異は増大せず、G:C→A:T 変異や A:T→T:A 変異が増大していた。この結果は、鋳型鎖上の 8-OH-G に A が対合しても、この A を除去する修復系(8-OH-G:アデニン DNA グリコシラーゼやミスマッチ修復系)が存在するため、*in vivo* においては G:C→T:A 変異が強く抑制されることを示している。5-ハイドロキシウラシルやウラシルグリコールは、シトシンの酸

化と脱アミノ化により生じ G:C→A:T 変異を誘発することが知られている。酸化ストレスに基づく発がんにおいては、むしろ 8-OH-G 以外の酸化損傷が重要な役割をはたしていることが示唆された。

今回、*red/gam* 遺伝子をレポーターとする Spi 選択法を用いることにより、臭素酸カリウム投与によりさまざまな大きさの欠失変異が誘発されることを明らかにした。1 kb 以上の大きな欠失は、変異体の連結部分に短い相同配列を持っており、DNA の二重鎖切断が起きた後に DNA 鎖が一部消化され、その後連結することにより生じた変異体と考えられる。平成 19 年度の研究で、アスベストが過酸化水素の発生を介して 2kb 以上の大きな欠失変異を誘発する可能性を示した。この結果は、臭素酸カリウムの結果とともに、活性酸素種が *in vivo* において欠失変異を誘発することを示している。

DNA 鎖の切断に基づく DNA の再編成(欠失、転座などの染色体異常)は、発がんの有力な機構である。本研究で用いた *gpt delta* トランスジェニック動物では Spi 検出法を用いて、欠失変異体を効率よく検出することができる。これまでに検出された最も大きな欠失変異体の大きさは 9.6kb であり、Spi の多くがキロベースサイズの欠失変異体であることを示唆している。しかし、このマウスの 17 番染色体には λ EG10(約 48kb)が 80 コピータンデムに並んで挿入されている(合計の挿入サイズは 3.8kb)ため、複数のコピーにまたがって大きな(メガ)サイズの欠失がおこっても、見かけ上は 10kb 以下の欠失変異体となってしまう。したがって、今回検出されたキロベースサイズの欠失変異体も、実際にはより大きな欠失変異体である可能性がある。

アスベストがヒトに対して発がん性を示すことは明らかであるが、この発がん性がどのような機構によるのかは明らかではない。アスベストは不活性な鉱物であり、化学発がん物質のように DNA と反応して付加体を形成することは考えられない。しかし、本研究で示したように、アスベストに由来する酸化ラジカルが DNA を損傷し、これに基づく染色体異常や突然変異が発がんの基礎となっている可能性は大きい。平成 19 年度の結果は、カタラーゼが Spi 欠失変異や DNA 二本鎖切断を抑制したこと、

酸化ラジカルのうち過酸化水素が遺伝毒性に関与している可能性を示唆している。過酸化水素は、DNA塩基の修飾だけでなく、DNAの一本鎖切断、二本鎖切断も誘発する。どのような機構によりアスベスト処理により酸化ラジカルが生ずるかは不明であるが、アスベスト表面に付着した金属の作用や、in vivo においては慢性炎症が酸化ラジカル発生の原因として考えられる。

平成20年度は、F344 *gpt delta* ラットに構造の類似した発がん物質(2,4-DAT)と非発がん物質(2,6-DAT)を投与し、標的臓器(肝臓)と非標的臓器(腎臓)での遺伝毒性を検索した。その結果、2,4-DAT のみに肝臓で変異頻度の上昇を認めた(第1表)。腎臓では2,4-DAT、2,6-DATともに遺伝毒性を示さなかった。2,4-DATと2,6-DATは代謝活性化系(S9)の存在下で、ともにAmes試験で陽性となる。このことは両者の代謝物がDNAに損傷作用を持つ可能性を示している。だがin vivo(ラット、マウス)においては、2,4-DATが選択的に遺伝毒性、発がん性を示す。この原因としては、(1) in vivo では2,6-DATの解毒代謝が2,4-DATに比べて効率良く進むため(2)2,4-DATのみが肝臓において細胞増殖活性を示すため等が考えられる。

一般に発がん物質には顕著な臓器特異性があり、臭素酸カリウムについては、腎臓が標的臓器であるのに対して肝臓が非標的臓器であり、2,4-DATについては逆に肝臓が標的臓器であり腎臓は非標的臓器である。今回、発がんの標的臓器と非標的臓器で遺伝毒性を検索すると、臭素酸カリウムについては腎臓では塩基置換や欠失が検出されたが、肝臓では何らの変異も検出されず、2,4-DATでは肝臓で*gpt MF*の上昇を認めたのに対して腎臓ではMFの上昇は起きなかった。この結果は、発がん物質の遺伝毒性を検索する際には、その標的臓器において変異を調べることが重要であることを示している。現行の遺伝毒性試験ガイドラインでは、マウスの骨髄(あるいは末梢血)を用いる小核試験や、ラットの肝臓を用いる不定期DNA合成(UDS)試験が推奨されているが、肝臓や骨髄以外が発がんの標的である場合には、*gpt delta* ラットなどを用いて標的臓器における遺伝毒性を精査することが重要

と考える。また、発がんとの良い相関を示すトランスジェニック遺伝毒性試験を用いて、遺伝毒性物質の閾値についての検討を行うことが重要と考える。

E. 結論

S.D.系およびF-344系 *gpt delta* トランスジェニックラットに、それぞれ臭素酸カリウムおよび2,4-DATを投与し、発がんの標的臓器で陽性、非標的臓器で陰性の結果を得た。この結果は *gpt delta* ラットが、発がんの機構に遺伝毒性が関与しているかを判定上で有用であることを示している。臭素酸カリウムおよびアスベストを用いた実験から、活性酸素種が欠失変異を誘発することが示された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) A. Takeiri, M. Mishima, K. Tanaka, A. Shioda, A. Harada, K. Watanabe, K. Masumura, T. Nohmi, A newly established GDL1 cell line from *gpt delta* mice well reflects the in vivo mutation spectra induced by mitomycin C, *Mutat. Res.*, 609, 102-115 (2006)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) A.H. Hashimoto, K. Amanuma, K. Hiyoshi, H. Takano, K. Masumura, T. Nohmi and Y. Aoki, in vivo mutagenesis in the lungs of *gpt*-delta transgenic mice treated intratracheally with 1,6-dinitropyrene, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47, 277-283 (2006)
 - 6) A. Nishikawa, K. Sai, K. Okazaki, H.Y. Son, K. Kanki, M. Nakajima, N. Kinae, T. Nohmi, J.E. Trosko, T. Inoue and M. Hirose, MX, a by-product of water chlorination, lacks in vivo genotoxicity in *gpt* delta mice but inhibits gap junctional intercellular communication in rat WB cells, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47, 48-55 (2006)
 - 7) 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)
 - 8) Y. Kuroiwa, T. Umemura, A. Nishikawa, K. Kanki, Y. Ishii, Y. Kodama, K. Masumura, T. Nohmi and M. Hirose, Lack of in vivo mutagenicity and oxidative DNA damage by flumequine in the livers of *gpt* delta mice, *Arch. Toxicol.*, 81, 63-69 (2007)
 - 9) D.J. Tweats, D. Blakey, R.H. Heflich, A. Jacobs, S.D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M.R. O'donovan, Y.F. Sasaki, T. Sofuni and R. Tice, Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards, *Mutat. Res.*, 627, 78-91 (2007)
 - 10) D.J. Tweats, D. Blakey, R.H. Heflich, A. Jacobs, S.D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M.R. O'donovan, Y.F. Sasaki, T. Sofuni and R. Tice, Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test, *Mutat. Res.* 627, 92-105 (2007)
 - 11) A.H. Hashimoto, K. Amanuma, K. Hiyoshi, Y. Sugawara, S. Goto, R. Yanagisawa, H. Takano, K. Masumura, T. Nohmi and Y. Aoki, Mutations in the lungs of *gpt* delta transgenic mice following inhalation of diesel exhaust, *Environ. Mol. Mutagen.*, 48, 682-693 (2007)
 - 12) T. Umemura, Y. Kuroiwa, M. Tasaki, T. Okamura, Y. Ishii, Y. Kodama, T. Nohmi, K. Mitsumori, A. Nishikawa and M. Hirose, Detection of oxidative DNA damage, cell proliferation and in vivo mutagenicity induced by dicyclanil, a non-genotoxic carcinogen, using *gpt* delta mice, *Mutat. Res.*, 633, 46-54 (2007)
 - 13) Y. Aoki, A.H. Hashimoto, K. Amanuma, M. Matsumoto, K. Hiyoshi, H. Takano, K. Masumura, K. Itoh, T. Nohmi and M. Yamamoto, Enhanced spontaneous and benzo(a)pyrene-induced mutations in the lung of Nrf2-deficient *gpt* delta mice, *Cancer Res.*, 67, 5643-5648 (2007)
 - 14) A. Takeiri, M. Mishima, K. Tanaka, A. Shioda, A. Hrada, K. Masumura and T. Nohmi, Mutation spectra in cisplatin- and transplatin-treated GDL1 cells clarified the different mode of action of these compounds in mammalian cells, *Genes and Environ.*, 29, 89-99 (2007)
 - 15) A. Xu, L.B. Smilenov, P. He, K. Masumura, T. Nohmi, Z. Yu and T.K. Hei, New insight into intrachromosomal deletions induced by chrysotile in *gpt* delta transgenic, *Environ. Health Perspective*, 115, 87-92 (2007)
 - 16) K. Yamauchi, S. Kakinuma, S. Sudo, S. Kito, Y. Oota, T. Nohmi, K. Masumura, M. Nishimura and Y. Shimada, Differential effects of low- and high-dose X-rays on

N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutagenesis in thymocytes of B6C3F1 *gpt*-delta mice, *Mutat. Res.*, 640, 27-37 (2008)

- 17) T. Nohmi, Possible mechanisms of practical thresholds for genotoxicity, *Genes and Environ.*, 30, 108-113 (2008)
- 18) T. Nohmi, N. Toyoda-Hokaiwado, M. Yamada, K. Masumura, M. Honma and S. Fukushima, International symposium on genotoxic and carcinogenic thresholds, *Genes and Environ.*, 30, 101-107 (2008)
- 19) A. Nishikawa, T. Umemura, Y. Ishii, M. Tasaki, T. Okamura, T. Inoue, K. Masumura and T. Nohmi, in vivo approaches to study mechanism of action of genotoxic carcinogens, *Genes and Environ.*, 30, 120-124 (2008)
- 20) T. Umemura, M. Tasaki, A. Kijima, T. Okamura, T. Inoue, Y. Ishii, Y. Suzuki, N. Masui, T. Nohmi and A. Nishikawa, Possible participation of oxidative stress in causation of cell proliferation and in vivo mutagenicity in kidneys of *gpt* delta rats treated with potassium bromate, *Toxicol.*, 257, 46-52 (2009)
- 21) K. Masumura and T. Nohmi, Spontaneous mutagenesis in rodents: spontaneous gene mutations identified by neutral reporter genes in *gpt* delta transgenic mice and rats, *J. Health Sci.*, 55, 40-49 (2009)
- 22) A. Shibata, D. Maeda, H. Ogino, M. Tsutsumi, T. Nohmi, H. Nakagama, T. Sugimura, H. Teraoka and M. Masutani, Role of Parp-1 in suppressing spontaneous deletion mutation in the liver and brain of mice at adolescence and advanced age, *Mutat. Res.*, in press.
- 23) A.H. Hashimoto, K. Amanuma, K. Masumura, T. Nohmi and Y. Aoki, in vivo mutagenesis caused by diesel exhaust in the testis of *gpt* delta transgenic mice, *Genes and Environ.*, 31, 1-8 (2009)

2. 学会発表

- 1) 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)

- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)

- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) T. Nohmi, Asbestos and other environmental toxic chemicals, The 5th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations in Antalya, Turkey, May 2007.
- 16) T. Nohmi, Roles of Y-family DNA polymerases in mutagenesis via the misincorporation of oxidized dNTPs, The 3rd Japan US DNA repair meeting in Sendai, Japan, May 2007.
- 17) T. Ono, N. Okudaira, Y. Uehara, T. Matsumoto, Y. Oghiso, K. Tanaka, K. Ichinohe, S. Nakamura, S. Tanaka, N. Kagawa, K. Fujikawa, A. Ootsuyama, T. Norimura and T. Nohmi, Dose and dose rate dependency in radiation-induced mutation in liver and spleen of *gpt*-delta mice, 13th International Congress of Radiation Research (ICRP) in San Francisco, USA, July 2007.
- 18) T. Nohmi, Validity of in vivo genotoxicology, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, in Tokyo, Japan, August 2007.
- 19) T. Nohmi, DNA repair as a constituent of thresholds of genotoxicity, 37th European Environmental Mutagen Society, Basel, Switzerland, September 2007.
- 20) T. Nohmi, The role of Y-family DNA polymerase in oxidative mutagenesis, 38th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Atlanta, USA, October 2007.
- 21) Y. Totsuka, R. Nishigaki, T. Takamura-Enya, T. Nohmi, T. Sugimura and K. Wakabayashi, Formation of RNA adduct with a novel endogenous mutagen and carcinogen, aminophenylnorharman, 38th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Atlanta, USA, October 2007.
- 22) T. Nohmi, Development of bacteria genotoxicity assays: past, present and future perspective, VIII Congresso Brasileiro de Mutagenese Carcinogenese e Teratogenese Ambiental (SBMCTA 2007), in Angra dos Reis, Brazil, October 2007.
- 23) M. Ikeda, K. Masumura, Y. Sakamoto, B.

- Wang, M. Neno, K. Sakuma, I. Hayata and T. Nohmi, Suppression of radiation-induced large deletions by combined treatments with a tobacco-specific nitrosamine in the lung of *gpt* delta transgenic mice, New Nuclear Research Symposium, Biological Responses to Low Dose Radiation in Tokyo, Japan, November 2007.
- 24) Y. Shimada, M. Nishimura, S. Kakinuma, K. Yamauchi, T. Imaoka, Y. Shang, T. Nohmi, I. Kawaguchi and M. Doi, Dose dependency of combined effects of ionizing radiation and other agents on cancer induction, New Nuclear Research Symposium, Biological Responses to Low Dose Radiation in Tokyo, Japan, November 2007.
- 25) M. Ikeda, K. Masumura, K. Matsui, H. Kohno, K. Sakuma, T. Tanaka, T. Kamataki and T. Nohmi, Chemopreventive effects of nobiletin, a citrus constituent, against the genotoxicity of NNK, a tobacco-specific nitrosamine, in the lung of *gpt* delta transgenic mice, The 9th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA-2007) in Jeju island, Korea, December 2007.
- 26) T. Nohmi, Development of in vivo genotoxicity assays with transgenic mice and rats, International Symposium on the Predictive, Preventive and Mechanistic Mutagenesis & XXXIII EMSI Annual Meeting in Aligarh, India, January 2008.
- 27) T. Nohmi, Possible Mechanisms of Practical Genotoxic Thresholds, International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds, Tokyo, July, 2008.
- 28) Y. Totsuka, T. Ichinose, K. Hiyoshi, T. Kato, S. Masuda, T. Nohmi, T. Sugimura and K. Wakabayashi, Genotoxicity of nanoparticles in *in vivo* mutation assay systems, 38th European Environmental Mutagen Society, Covtat, Croatia, September 2008.
- 29) T. Nohmi, Recent topics of mutation research with *gpt* delta mice and rats, 39th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Puerto Rico, October 2008.
- 30) K. Masumura, Y. Sakamoto, M. Ikeda, T. Tsukamoto, H. Ikehata, Y. Kuroiwa, T. Umemura, A. Nishikawa, M. Tatematsu, T. Ono, T. Nohmi, p53 suppresses deletions in the epidermis of mice unirradiated or irradiated with low doses of UVB, The 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2008. 10)
- 31) N. Toyoda-Hokaiwado, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, H. Sanada, T. Inoue, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, In vivo mutagenicity of structural isomers 2,4-DAT and 2,6-DAT in F344 *gpt* delta transgenic rat, The 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2008. 10)
- 32) M. Ikeda, K. Masumura, Y. Sakamoto, B. Wang, M. Neno, K. Sakuma, I. Hayata, A. Yamamoto, M. Honma and T. Nohmi, *gpt* delta transgenic mice for in vivo genotoxicity assays: application for analysis of combined effects of radiation and chemicals, the 7th Japan-France Workshop on Radiation Biology, Chiba, October, 2008.
- 33) T. Nohmi, Combined genotoxic effects of a methylating agent and radiation on human cells, New Nuclear Research Symposium, Biological Responses to Low Dose Radiation in Kitakyushu, Japan, November 2008.
- 34) T. Nohmi, *gpt* delta transgenic mouse and rat for analysis of in vivo mutagenesis, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (37th JEMS)(2008, 12)
- 35) N. Koyama, A. Kimura, M. Yasui, S. Takami, M. Takahashi, T. Imai, A. Yamamoto, W. Kumita, K. Masumura, S. Masuda, N. Kinae, T. Matsuda, T. Nohmi and M. Honma, Child-adult differences in

evaluation of in vivo genotoxicity of acrylamide, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (37th JEMS)(2008, 12)

- 36) Y. Ishii, T. Okamura, M. Tasaki, T. Inoue, T. Nohmi, T. Umemura and A. Nishimura, *in vivo* mutagenicity of madder color and its constituents using *gpt* delta rats, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (37th JEMS)(2008, 12)
- 37) Y. Tosuka, T. Kato, S. Masuda, T. Nohmi, T. Sugimura and K. Wakabayashi, Genotoxicity of nanoparticles in *in vivo* assay systems, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (37th JEMS)(2008, 12)
- 38) N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi, Difference in mutagenicity of structural isomers 2,4-DAT and 2,6-DAT in the target organ for carcinogenicity of F344 *gpt* delta transgenic rat, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (37th JEMS)(2008, 12)
- 39) T. Nohmi, Transgenic in vivo genotoxicity

assays: basic features and the possible applications, 14th Alexander Hollaender Course on Genetic Toxicology: Genomic and Proteomic Approaches & Special Workshop on Arsenic Exposure Assessment in Kolkata, India, December 10-12, 2008.

- 40) N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, Applying F344 *gpt* delta transgenic rat for in vivo genotoxicity study of structural isomer 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene, The 25th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology (2009. 1)

H. 知的所有権の取得状況

平成18年5月12日

特許第3799445号

発明の名称: 突然変異検出用トランスジェニッククラットとその作製方法およびそれを用いた突然変異試験法

出願人: 国立医薬品食品衛生研究所長

発明者: 能美健彦、増村健一、神藤康弘、林宏行

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
K. Matsui, <u>M. Yamada</u> , M. Imai, K. Yamamoto, <u>T. Nohmi</u>	Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of <i>Salmonella typhimurium</i> strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens	DNA Repair	5	465-478	2006
M. Mazaki, K. Kataoka, T. Kinouchi, U. Vinitketkumnuen, <u>M. Yamada</u> , <u>T. Nohmi</u> , T. Kuwahara, S. Akimoto, T. Ohnishi	Inhibitory effects of caraway (<i>Carum carvi</i> L.) and its component on <i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine-induced mutagenicity	J. Med. Invest.	53	123-133	2006
<u>M. Yamada</u> , K. Matsui, <u>T. Nohmi</u>	Development of a bacterial hyper-sensitive tester strain for specific detection of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons	Genes & Environ.	28	23-30	2006
<u>M. Yamada</u> , T. Nunoshiro, M. Shimizu, P. Grúz, H. Kamiya, H. Harashima, <u>T. Nohmi</u>	Involvement of Y-Family DNA polymerases in Mutagenesis by oxidized nucleotides in <i>Escherichia coli</i>	J. Bacteriol.	188	4992-4995	2006
N. Koyama, H. Sakamoto, M. Sakuraba, T. Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N., <u>M. Honma</u>	Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells	Mutat. Res.	603	151-158	2006
H. Oka, K. Ikeda, H. Yoshimura, A. Ohuchida, <u>M. Honma</u>	Relationship between <i>p53</i> status and 5-fluorouracil sensitivity in 3 cell lines	Mutat. Res.	606	52-60	2006
Y. Umebayashi, <u>M. Honma</u> , T. Abe, H. Ryuto, H. Suzuki, T. Shimazu, N. Ishioka, M. Iwaki, F. Yatagai	Mutation induction after low-dose carbon-ion beam irradiation of frozen human cultured cells	Biological Sci. in Space	19	237-241	2006

S. Ishikawa, Y. Sasaki, S. Kawaguchi, M. Mochizuki, <u>M. Nagao</u>	Characterization of genotoxicity of Kojic acid by mutagenicity in Salmonella and micronucleus induction in rodent liver	Genes & Environ	28	31-37	2006
乙部史子、周佩欣、松井三郎、小田美光、 <u>松田知成</u>	HPLC-バイオアッセイを用いた下水処理排水中のDNA損傷性およびAhRリガンド活性の解析	環境工学研究論文集	第43巻	113-118	2006
<u>T. Matsuda</u> , H. Yabushita, R.A. Kanaly, S. Shibutani, A. Yokoyama	Increased DNA Damage in <i>ALDH2</i> -Deficient Alcoholics	Chem. Res. Toxicol.	19	1374-1378	2006
S.Y. Kim, N. Suzuki, Y.R. Santosh Laxmi, A. Umamoto, <u>T. Matsuda</u> , S. Shinya	Antiestrogens and the formation of DNA damage in rats: A comparison	Chem. Res. Toxicol.	19	852-858	2006
P.H. Chou, S. Matsui, <u>T. Matsuda</u>	Detection and identification of dyes showing AhR-binding affinity in treated sewage effluents	Wat.Sci.Tech.	53	35-42	2006
RA. Kanaly, T. Hanaoka, H. Sugimura, H. Toda, S. Matsui, <u>T. Matsuda</u>	Development of the adductome approach to detect DNA damage in humans	Antioxid Redox Signal.	8	993-1001	2006
T. Umemura, K. Kanki, Y. Kuroiwa, Y. Ishii, K. Okano, <u>T. Nohmi</u> , A. Nishikawa, 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
A. Takeiri, M. Mishima, K. Tanaka, A. Shioda, A. Harada, K. Watanabe, K. Masumura, <u>T. Nohmi</u>	A newly established GDL1 cell line from <i>gpt</i> delta mice well reflects the in vivo mutation spectra induced by mitomycin C	Mutat. Res.	609	102-115	2006
L. Jiang, Y. Zhong, S. Akatsuka, Y.Liu, K.K. Dutta, W. Lee, J. Onuki, K. Masumura, <u>T. Nohmi</u> , S. Toyokuni	Deletion and single nucleotide substitution at G:C in the kidney of <i>gpt</i> delta transgenic mice after ferric nitrilotriacetate treatment	Cancer Sci.	97	1159-1167	2006

M. Ikeda, K. Masumura, K. Matsui, H. Kohno, K. Sakuma, T. Tanaka, <u>T. Nohmi</u>	Chemopreventive effects of nobiletin against genotoxicity induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-but anone (NNK) in the lung of <i>gpt</i> delta transgenic mice	Genes and Environ.	28	84-91	2006
A.H. Hashimoto, K. Amanuma, K. Hiyoshi, H. Takano, K. Masumura, <u>T. Nohmi</u> , Y. Aoki	In vivo mutagenesis in the lungs of <i>gpt</i> -delta transgenic mice treated intratracheally with 1,6-dinitropyrene	Environ. Mol. Mutagen	47	277-283	2006
A. Nishikawa, K. Sai, K. Okazaki, H.Y. Son, K. Kanki, M. Nakajima, N. Kinae, <u>T. Nohmi</u> , J.E. Trosko, T. Inoue, M. Hirose	MX, a by-product of water chlorination, lacks in vivo genotoxicity in <i>gpt</i> delta mice but inhibits gap junctional intercellular communication in rat WB cells	Environ. Mol. Mutagen.	47	48-55	2006
F. Barone, S.D. McCulloch, P. Macpherson, G. Maga, <u>M. Yamada</u> , <u>T. Nohmi</u> , A. Minoprio, F. Mazzei, T.A. Kunkel, P. Karran, M. Bignami	Replication of 2-hydroxyadenine-containing DNA and recognition by human MutS α	DNA Repair	5	355-366	2007
P.H. Chou, S. Matsui, K. Misaki, <u>T. Matsuda</u>	Isolation and identification of xenobiotic aryl hydrocarbon receptor ligands in dyeing wastewater	Environ. Sci. Technol.	41	652-657	2007
B. Burlinson, R.R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S.Y. Brendler-Schwaab, A.R. Collins, P. Escobar, <u>M. Honma</u> , T.S. Kumaravel, M. Nakajima, Y.F. Sasaki, V. Thybaud, Y. Uno, M. Vasquez, A. Hartmann	Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup	Mutat. Res.	627	31-35	2007

MM. Moore, M. Honma, J. Clements, J. Bolcsfoldi, B. Burlinson, M. Cifone, J. Clark, P. Clay, R. Doppalapudi, M. Fellows, B. Gollapudi, S. Hou, J. Jenkinson, W. Muster, K. Pant, D.A. Kidd, E. Lorge, M. Lloyd, B. Myhr, M. O'Donovan, C. Riach, L.F. Stankowski, Jr., A.K. Thakur, F. Van Goethem	Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment	Mutat. Res.	627	36-40	2007
W.W. Ku, A. Bigger, G. Brambilla, H. Glatt, E. Gocke, P.J. Guzzie, A. Hakura, M. Honma, H.-J. Martus, R.S. Obach, R. Roberts,	Strategy for genotoxicity testing- Metabolic considerations	Mutat. Res.	627	59-77	2007
J. Wang, T. Chen, M. Honma, L. Chen, M. Moore	3' -Azido-3' -deoxythymidine induces deletions in L5178Y mouse lymphoma cells	Environ. Mol. Mutagen.	48	248-257	2007
M. Honma, M. Sakuraba, T. Koizumi, Y. Takashima, H. Sakamoto, M. Hayashi	Non-homologous end-joining for repairing I-SceI-induced DNA double strand breaks in human cells	DNA Repair	6	781-788	2007
Y. Luan, T. Suzuki, R. Palanisamy, T. Takashima, H. Sakamoto, M. Sakuraba, T. Koizumi, M. Saito, H. Matsufuji, K. Yamagata, T. Yamaguchi, M. Hayashi, M. Honma	Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells	Mutat. Res.	619	113-123	2007

E. Newwirth, <u>M. Honma</u> , A. Grosovsky	Interchromosomal crossover in human cell is associated with long gene conversion tracts	Mol. Cell. Biol.	27	5261-5274	2007
F. Yatagai, Y. Umabayashi, M. Suzuki, T. Abe, H. Suzuki, T. Shimazu, M. Ishioka, M. Iwaki, <u>M. Honma</u>	Influence of low-dose and low-dose-rate ionizing radiation on mutation induction in human cells	Advan. Space Res.	40	470-473	2007
R.A. Kanaly, S. Matsui, T. Hanaoka, <u>T. Matsuda</u>	Application of the adductome approach to assess intertissue DNA damage variations in human lung and esophagus	Mutat. Res.	625	83-93	2007
K. Misaki, H. Kawami, T. Tanaka, Y. Handa, M. Nakamura, <u>S. Matsui, T. Matsuda</u>	Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of polycyclic aromatic ketones and polycyclic aromatic quinones	Environmental Toxicology and Chemistry	26	1370-1379	2007
<u>T. Matsuda</u> , A. Matsumoto, M. Uchida, R. Kanaly, K. Misaki, S. Shibutan, T. Kawamoto, K. Kitagawa, K. Nakayam, K. Tomokuni, M. Ichiba	Increased formation of hepatic N2-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice treated with ethanol	Carcinogenesis	28	2363-2366	2007
K. Misaki, S. Matsui, <u>T. Matsuda</u>	Metabolic enzyme induction by HepG2 cells exposed to oxygenated and Non-oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons	Chem. Res. Toxicol.	20	277-283	2007
M. Ikeda, K. Masumura, Y. Sakamoto, B. Wang, M. Neno, K. Sakuma, I. Hayata, <u>T. Nohmi</u>	Combined genotoxic effects of radiation and a tobacco-specific nitrosamine in the lung of <i>gpt</i> delta transgenic mice	Mutat. Res.	626	15-25	2007
Y. Kuroiwa, T. Umemura, A. Nishikawa, K. Kanki, Y. Ishii, Y. Kodama, K. Masumura, <u>T. Nohmi</u> , M. Hirose	Lack of in vivo mutagenicity and oxidative DNA damage by flumequine in the livers of <i>gpt</i> delta mice	Arch. Toxicol.	81	63-69	2007

D.J. Tweats, D. Blakey, R.H. Heflich, A. Jacobs, S.D. Jacobsen, T. Morita, <u>T. Nohmi</u> , M.R. O'donovan, Y.F. Sasaki, T. Sofuni, R. Tice	Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards	Mutat. Res.	627	78-91	2007
D.J. Tweats, D. Blakey, R.H. Heflich, A. Jacobs, S.D. Jacobsen, T. Morita, <u>T. Nohmi</u> , M.R. O'donovan, Y.F. Sasaki, T. Sofuni, R. Tice	Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test	Mutat. Res.	627	92-105	2007
A.H. Hashimoto, K. Amanuma, K. Hiyoshi, Y. Sugawara, S. Goto, R. Yanagisawa, H. Takano, K. Masumura, <u>T. Nohmi</u> , Y. Aoki	Mutations in the lungs of <i>gpt</i> delta transgenic mice following inhalation of diesel exhaust	Environ. Mol. Mutagen.	48	682-693	2007
T. Umemura, Y. Kuroiwa, M. Tasaki, T. Okamura, Y. Ishii, Y. Kodama, <u>T. Nohmi</u> , K. Mitsumori, A. Nishikawa, M. Hirose	Detection of oxidative DNA damage, cell proliferation and in vivo mutagenicity induced by dicyclanil, a non-genotoxic carcinogen, using <i>gpt</i> delta mice	Mutat. Res.	633	46-54	2007
Y. Aoki, A.H. Hashimoto, K. Akanuma, M. Matsumoto, K. Hiyoshi, H. Takano, K. Masumura, K. Itoh, <u>T. Nohmi</u> , M. Yamamoto	Enhanced spontaneous and benzo(a)pyrene-induced mutations in the lung of <i>Nrf2</i> -deficient <i>gpt</i> delta mice	Cancer Res.	67	5643-5648	2007
A. Takeiri, M. Mishima, K. Tanaka, A. Shioda, A. Hrada, K. Masumura, <u>T. Nohmi</u>	Mutation spectra in cisplatin- and transplatin-treated GDL1 cells clarified the different mode of action of these compounds in mammalian cells	Genes and Environ.	29	89-99	2007
A. Xu, L.B. Smilenovl, P. He, K. Masumura, <u>T. Nohmi</u> , Z. Yu, T.K. Hei	New insight into intrachromosomal deletions induced by chrysotile in <i>gpt</i> delta transgenic	Environ. Health Perspective	115	87-92	2007

K. Hidaka, M. Yamada, H. Kamiya, C. Masutani, H. Harashima, F. Hanaoka, T. Nohmi	Specificity of mutations induced by incorporation of oxidized dNTPs into DNA by human DNA polymerase η	DNA Repair	7	497-506	2008
T. Nohmi, N. Toyoda-Hokaiwado, M. Yamada, K. Masumura, M. Honma, S. Fukushima	International symposium on genotoxic and carcinogenic thresholds	Genes & Environ.	30	101-107	2008
T. Nohmi, M. Yamada, Grúz P	DNA Repair and DNA damage tolerance in archaea: Extreme environments and genome integrity, Archaea: New models for prokaryotic biology	Norwich, UK, Caister Academic Press		147-169	2008
F. Yatagai, Y. Umebayashi, M. Honma, K. Sugasawa, Y. Takayama, F. Hanaoka	Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line	Mutat. Res.	638	48-55	2008
M. Yasui, E. Suenaga, N. Koyama, C. Masutani, F. Hanaoka, P. Gruz, S. Shibutani, T. Nohmi, M. Hayashi, M. Honma	Miscoding properties of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA Adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases	J. Mol. Biol.	377	1015-1023	2008
F. Yatagai, M. Suzuki, N. Ishioka, H. Ohmori, M. Honma	Repair of I-SceI Induced DSB at a specific site of chromosome in human cells: influence of low-dose, low-dose-rate gamma-rays	Radiat. Environ. Biophys.	47	439-444	2008
M. Nagao, S. Ishikawa, H. Nakagama, M. Watanabe	Extrapolation of the animal carcinogenesis threshold to humans	Genes & Environ.	30	160-165	2008
T. Sakai, S. Tokishita, K. Mochizuki, A. Motomiya, H. Yamagata, T. Ohta	Mutagenesis of uracil-DNA glycosylase deficient mutants of the extremely thermophilic eubacterium <i>Thermus thermophilus</i>	DNA Repair	7	663-669	2008
Y. Okamoto, P.H. Chou, S.W. Kim, N. Suzuki, Y.R. Laxmi, K. Okamoto, X. Liu, T. Matsuda, S. Shibutani	Oxidative DNA damage in XPC-knockout and its wild mice treated with equine estrogen	Chem. Res. Toxicol.	21	1120-1124	2008
K. Misaki, M. Suzuki, M. Nakamura, H. Handa, M. Iida, T. Kato, S. Matsui, T. Matsuda	Aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor ligand activity of organic extracts from road dust and diesel exhaust particulates	Arch. Environ. Contam. Toxicol.	55	199-209	2008

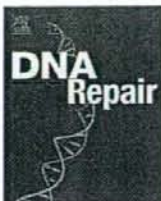
K. Yamauchi, S. Kakinuma, S. Sudo, S.Kito, Y. Oota, <u>T. Nohmi</u> , K. Masumura, M. Nishimura, Y. Shimada	Differential effects of low- and high-dose X-rays on <i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced mutagenesis in thymocytes of B6C3F1 <i>gpt</i> -delta mice	Mutat. Res.	640	27-37	2008
<u>T. Nohmi</u>	Possible mechanisms of practical thresholds for genotoxicity	Genes & Environ.	30	108-113	2008
A. Nishikawa, T. Umemura, Y. Ishii, M. Tasaki, T. Okamura, T. Inoue, K. Masumura, <u>T. Nohmi</u>	In vivo approaches to study mechanism of action of genotoxic carcinogens	Genes & Environ.	30	120-124	2008
<u>本間正充</u>	遺伝毒性物質に閾値はあるのか？	ファルマシア	45	143-148	2009
H. Nagayoshi, A. Matsumoto, R. Nishi, T. Kawamoto, M. Ichiba, <u>T. Matsuda</u>	Increased formation of gastric <i>N</i> 2-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase-2 knockout mice treated with ethanol	Mutat. Res.	673	74-77	2009
T. Umemura, M. Tasaki, A. Kijima, T. Okamura, T. Inoue, Y. Ishii, Y. Suzuki, N. Masui, <u>T. Nohmi</u> , A. Nishikawa	Possible participation of oxidative stress in causation of cell proliferation and in vivo mutagenicity in kidneys of <i>gpt</i> delta rats treated with potassium bromate	Toxicology	257	46-52	2009
K. Masumura, <u>T. Nohmi</u>	Spontaneous mutagenesis in rodents: spontaneous gene mutations identified by neutral reporter genes in <i>gpt</i> delta transgenic mice and rats	J. Health Sci.	55	40-49	2009
A. Shibata, D. Maeda, H. Ogino, M. Tsutsumi, <u>T. Nohmi</u> , H. Nakagama, T. Sugimura, H. Teraoka, M. Masutani	Role of Parp-1 in suppressing spontaneous deletion mutation in the liver and brain of mice at adolescence and advanced age	Mutat. Res.			in press
A.H. Hashimoto, K. Amanuma, K. Masumura, <u>T. Nohmi</u> , Y.Aoki	In vivo mutagenesis caused by diesel exhaust in the testis of <i>gpt</i> delta transgenic mice	Genes & Environ.	31	1-8	2009



available at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dnarepair



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

Keiko Matsui^a, Masami Yamada^a, Masaru Imai^b, Kazuo Yamamoto^b,
Takehiko Nohmi^{a,*}

^a Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^b Department of Biomolecular Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Katahira 2-1-1, Aoba-ku, Sendai, Miyagi Prefecture 980-8577, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2005

Received in revised form 26

November 2005

Accepted 15 December 2005

Published on line 7 February 2006

Keywords:

SOS-inducible DNA polymerases

Replicative DNA polymerase

Translesion DNA synthesis

Frameshift

Mutagens

ABSTRACT

DNA replication is frequently hindered because of the presence of DNA lesions induced by endogenous and exogenous genotoxic agents. To circumvent the replication block, cells are endowed with multiple specialized DNA polymerases that can bypass a variety of DNA damage. To better understand the specificity of specialized DNA polymerases to bypass lesions, we have constructed a set of derivatives of *Salmonella typhimurium* TA1538 harboring plasmids carrying the *polB*, *dinB* or *mucAB* genes encoding *Escherichia coli* DNA polymerase II, DNA polymerase IV or DNA polymerase I, respectively, and examined the mutability to 30 chemicals. The parent strain TA1538 possesses CCGCGCGG hotspot sequence for -2 frameshift. Interestingly, the chemicals could be classified into four groups based on the mutagenicity to the derivatives: group I whose mutagenicity was highest in strain YG5161 harboring plasmid carrying *dinB*; group II whose mutagenicity was almost equally high in strain YG5161 and strain TA98 harboring plasmid carrying *mucAB*; group III whose mutagenicity was highest in strain TA98; group IV whose mutagenicity was not affected by the introduction of any of the plasmids. Introduction of plasmid carrying *polB* did not enhance the mutagenicity except for benz[a]anthracene. We also introduced a plasmid carrying *polA* encoding *E. coli* DNA polymerase I to strain TA1538. Strikingly, the introduction of the plasmid reduced the mutagenicity of chemicals belonging to groups I, II and III, but not the chemicals of group IV, to the levels observed in the derivative whose SOS-inducible DNA polymerases were all deleted. These results suggest that (i) DNA polymerase IV and DNA polymerase I possess distinct but partly overlapping specificity to bypass lesions leading to -2 frameshift, (ii) the replicative DNA polymerase, i.e., DNA polymerase III, participates in the mutagenesis and (iii) the enhanced expression of *E. coli* *polA* may suppress the access of Y-family DNA polymerases to the replication complex.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 9873; fax: +81 3 3707 6950.

E-mail address: nohmi@nihs.go.jp (T. Nohmi).

1568-7864/\$ - see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.dnarep.2005.12.010



ELSEVIER

available at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dnarepairDNA
Repair

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

Keiko Matsui^a, Masami Yamada^a, Masaru Imai^b, Kazuo Yamamoto^b,
Takehiko Nohmi^{a,*}

^a Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^b Department of Biomolecular Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Katahira 2-1-1, Aoba-ku, Sendai, Miyagi Prefecture 980-8577, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2005

Received in revised form 26

November 2005

Accepted 15 December 2005

Published on line 7 February 2006

Keywords:

SOS-inducible DNA polymerases

Replicative DNA polymerase

Translesion DNA synthesis

Frameshift

Mutagens

ABSTRACT

DNA replication is frequently hindered because of the presence of DNA lesions induced by endogenous and exogenous genotoxic agents. To circumvent the replication block, cells are endowed with multiple specialized DNA polymerases that can bypass a variety of DNA damage. To better understand the specificity of specialized DNA polymerases to bypass lesions, we have constructed a set of derivatives of *Salmonella typhimurium* TA1538 harboring plasmids carrying the *polB*, *dinB* or *mucAB* genes encoding *Escherichia coli* DNA polymerase II, DNA polymerase IV or DNA polymerase I, respectively, and examined the mutability to 30 chemicals. The parent strain TA1538 possesses CGCGCGCG hotspot sequence for -2 frameshift. Interestingly, the chemicals could be classified into four groups based on the mutagenicity to the derivatives: group I whose mutagenicity was highest in strain YG5161 harboring plasmid carrying *dinB*; group II whose mutagenicity was almost equally high in strain YG5161 and strain TA98 harboring plasmid carrying *mucAB*; group III whose mutagenicity was highest in strain TA98; group IV whose mutagenicity was not affected by the introduction of any of the plasmids. Introduction of plasmid carrying *polB* did not enhance the mutagenicity except for benz[a]anthracene. We also introduced a plasmid carrying *polA* encoding *E. coli* DNA polymerase I to strain TA1538. Strikingly, the introduction of the plasmid reduced the mutagenicity of chemicals belonging to groups I, II and III, but not the chemicals of group IV, to the levels observed in the derivative whose SOS-inducible DNA polymerases were all deleted. These results suggest that (i) DNA polymerase IV and DNA polymerase I possess distinct but partly overlapping specificity to bypass lesions leading to -2 frameshift, (ii) the replicative DNA polymerase, i.e., DNA polymerase III, participates in the mutagenesis and (iii) the enhanced expression of *E. coli* *polA* may suppress the access of Y-family DNA polymerases to the replication complex.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 9873; fax: +81 3 3707 6950.

E-mail address: nohmi@nihns.go.jp (T. Nohmi).

1568-7864/\$ - see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.dnarep.2005.12.010