

201033023A

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発がん物質の
評価法に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

主任研究者 能美 健彦

平成23 (2011)年3月

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発がん物質の
評価法に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

主任研究者 能美 健彦

平成23 (2011)年3月

目 次

I. 研究報告	
食品添加物等における遺伝毒性発がん物質の 評価法に関する研究	----- 1
能美健彦	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 43
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 46

研究課題名: 食品添加物等における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

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 部長

研究要旨

遺伝毒性物質の作用には閾値がないと考えられており、食品添加物等に発がん性が認められた場合、その作用機序に遺伝毒性が関与していると、原則的にその使用は禁止となる。だが、ヒトはさまざまな生体防御機能(解毒代謝、DNA 修復、損傷部位の乗り越え DNA 合成等)を備えており、これらが遺伝毒性物質の作用を抑制し「実質的な閾値」を形成する可能性が考えられる。本研究では、生体防御機能が「実質的な閾値」形成に関与する可能性を検討することを主な目的とする。平成 22 年度は、解毒代謝に関連する *Nrf2* 欠損マウス(青木)、DNA 修復に関連する *MutYh* 欠損マウス(續)、乗り越え DNA 合成に関わる *Polk* 欠損ヒト細胞(能美)の発がん感受性あるいは変異感受性について検討した。またヒト細胞染色体の特定箇所に 1 分子の酸化 DNA 損傷塩基、8-オキシグアニンを導入する手法を開発し、超低用量域における変異誘発の可能性について検討した(安井)。さらに次世代 DNA シークエンサー、一分子 DNA シークエンサーを用いてゲノム配列を解読することにより、直接、変異を検出する可能性について検討した(山田、松田)。これらの研究を通し、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した。

キーワード: 遺伝毒性発がん物質、閾値、DNA 修復、解毒代謝、損傷部位の乗り越え DNA 合成、食品添加物

分担研究者

青木康展	国立環境研究所、環境リスク研究センター、副センター長
續 輝久	九州大学大学院医学研究院教授
安井 学	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 主任研究官
山田雅巳	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
松田知成	京都大学工学研究科 准教授

A. 研究目的

一般に遺伝毒性物質の作用には閾値がないとされており、DNA と反応することにより突然変異や染色体異常を誘発し、発がん性を示す物質は、どのように低用量であってもヒトに対して発がんリスクを負わせるものと考えられている。このため、食品添加物等に発がん性と遺伝毒性が認められた場合には、原則的に ADI (一日摂取許容量) は設定されず使用が禁止となる。環境汚染物質等、当該物質への曝露が不可避な遺伝毒性発がん物質については、閾値がないことを前提に、数理モデルを用いて発がんリスクが推定される。

しかしヒトは、自らの染色体 DNA を守るために種々の生体防御機能や生体防御物質を具備しており、これらの生体防御機能が遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し閾値を形成する可能性が予想される。DNA と反応性を示す物質の多くは、生体防御物質、抗酸化物質と反応して不活化される。またグルタチオン抱合酵素やグルクロン酸抱合酵素などの解毒酵素により、代謝的に不活化され体外へと排泄される。さらに DNA に反応したとしても、DNA 修復酵素や、損傷部位を乗り越えて複製を続けるトランスレージョン DNA 合成 (以下 TLS と略)、また DNA 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などが、遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し、実際的な閾値を形成している可能性が考えられる。

本研究では、解毒代謝能を欠損した *Nrf2* 欠損マウス、DNA 修復能を欠損した *Mutyh* 欠損マウス、TLS 活性に関わる DNA ポリメラーゼ κ を欠損した *Polk* 欠損ヒト細胞を用いて、生体防御機能が「実際上の閾値」形成に寄与する可能性を検討することを主な目的とする。また 1 分子の DNA 損傷をヒト染色体の特定箇所に導入する手法を開発することにより、1 分子の DNA 損傷が変異に結びつくか否かを検討する。さらに次世代 DNA シークエンサーによる新規な変異検出法の開発についても検討する。

今年度は、小麦粉の改良剤として使用されている臭素酸カリウムを、*Nrf2* 欠損マウスと野生型マウスに飲水投与し、*Nrf2* 欠損マウスが高い致死感受性を示すことを明らかにした (青木)。*Mutyh* 欠損マウスの臭素酸カリウムに対する発がん感受性を検討し、*Mutyh* が酸化剤による発がん性に関して「事実上の閾値」を形成している可能性を示唆した (續)。また TLS 活性を欠損した *Polk* 欠損ヒト細胞が過酸化水素に対して高い感受性を示すことを明らかにした (能美)。さらに 1 分子の酸化 DNA 損傷をヒト染色体の特定箇所に導入する手法を確立し

た (安井)。次世代 DNA シークエンサー、1 分子 DNA シークエンサーによりゲノム配列を分析することにより、直接、変異部位を同定する手法を検討した (山田、松田)。これらの研究を通し、遺伝毒性発がん物質のリスク評価と規制に関する基盤的研究を推進した。

B. 研究方法

1) *Nrf2* ノックアウト *gpt delta* マウスへの臭素酸カリウムの投与

東北大院医・山本雅之教授より恵与を受け国立環境研究所で維持している *Nrf2* (+/-) 遺伝型マウス (C57BL バックグラウンド) と *gpt delta* マウスを交配し、*Nrf2* (+/-) *gpt* (+/-) マウスを作成した。これを *gpt delta* マウスと交配して *Nrf2* (+/-) *gpt* (+/+) マウスを作成し、さらに交配により、*Nrf2* (-/-) *gpt* (+/+) マウスを作成した。臭素酸カリウム (シグマ社製) を投与直前にイオン交換水に 2g/L の用量に溶解して、6 週齢目から 1 ヶ月間飲水投与した (青木)。

2) *Mutyh* 欠損マウスの臭素酸カリウムに対する感受性の検討

C57BL6/J の遺伝的背景を持つ *Mutyh* 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体同士の掛け合わせにより *Mutyh* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。臭素酸カリウム (シグマ社製) を純水に溶解し、0.1% および 0.2% 溶液を調製後濾過滅菌し、16 週間自由に飲水させた。摂取量については週一回モニターした。発がん実験は、マウスを安楽死させた後、腸管を摘出し 10% ホルマリンで固定後、固定液を 70% に置き換え、腸粘膜を実体顕微鏡下で観察し、腫瘍の形成を確認した。検出した腫瘍から病理切片を作製し、病理解析を行った (續)。

3) *Polk* ノックアウトヒト細胞株の樹立と細胞毒性試験

Polk ノックアウト (KO) 細胞樹立のため *POLK* 遺伝子のエキソン 6 を除くようなターゲティングベクターをエレクトロポレーションにより、ヒトプレ B 細胞由来の nalm-6 細胞へトランスフェクションし、ハイグロマイシン耐性、ピューロマイシン耐性により、導入遺伝子が染色体上に組み込まれた株をスクリーニングした。細胞毒性試験には、過酸化水素 (H_2O_2)、ベンツピレン (BP)、マイトマイシン C (MMC)、紫外線 (UV-C) を用いた。BP は代謝活性化が必要なため、ラットの肝 9,000 x *g* 上清 (S9) と co-factor を添加した (S9 mix)。生存率は平板効率から求めた。平板効率算出のために、細胞は適当な濃度に希釈し、96 ウェルプレートに播種し、培養した。約 17 日間培養して、コロニーが形成されていない well 数を計測した。細胞の平板効率はポアソン分布に基づき算出した (能美)。

4) 8-オキソグアニン (8-Oxo-Gua) を部位特異的に導入したヒト細胞の樹立と変異頻度の測定

8-Oxo-Gua を特定箇所に導入した直鎖状二本鎖プラスミド (pYTK15^{0xo})、あるいは正常塩基 Gua が入ったコントロールターゲティングベクター (pYTK) 2 μ g を、5 x 10⁶ cells/100 μ L に調整した TSCER122 細胞に、I-SceI を発現させるベクター (pCBASCE) 50 μ g と共にトランスフェクション (Amaya 社製 Cell Line Nucleofactor kit) し、75 cm² の培養フラスコで 3 日間培養 (37°C, 5% CO₂) した。次に、その細胞を 5 x 10³ cells/mL に調製し、HAT 試薬を添加後、96 穴プレート上 (1000 cells/well) でさらに 2 週間培養することによって、復帰細胞のクローン (TK+/-) を回収した。その後、各クローンのゲノム DNA を抽出し、8-Oxo-Gua 部位

だった周辺のシーケンスを行い、8-Oxo-Gua の突然変異誘スペクトルおよび頻度を決定した (安井)。

5) DNA シークエンサーによる大腸菌ゲノム変異の解析

Escherichia coli AB1157 (野生株; WT)、YG6156 (*mutT* 欠損変異株; ΔT)、YG2250 (*mutM/mutY* 二重欠損変異株; ΔMY)、AB1157/pYG782 (*dinB* 高発現株; +B) の一夜培養液から、ゲノム DNA を調製した。Illumina 社、Genome Analyzer GA II 用 DNA Sample Prep Kit を用いて、ゲノム DNA を断片化して、アダプターライゲーションを行い、アガロースゲル電気泳動で断片を切り出して DNA ライブラリーを調製した。DNA シークエンス解析は、gDNA ペアエンド法、解析スケールは 1 レーン当たり 4 サンプルで 1 レーン、読み取り塩基長は 1 リードで 75 塩基 x 2、総取得データ量は 1 サンプル当たり 3 ギガ (3 x 10⁹) 塩基以上である (山田)。

6) 一分子 DNA シークエンサーに関する調査

最新の DNA シークエンサーに関する文献を調査し、DNA シークエンサーを利用した新しい突然変異検出系の原理と解決すべき技術的課題について考察した (松田)。

(倫理面への配慮)

本研究は、培養細胞、実験動物を用いたものであり、ヒトに関する倫理上の問題はない。また、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) *Nrf2* (-/-)および *Nrf2* (+/+)マウスの臭素酸カリウムに対する感受性

♂ *Nrf2*(+/+)*gpt delta* マウス 4 匹、*Nrf2*(-/-)*gpt delta* マウス 2 匹に臭素酸カリウムを飲水投与した。また、対照群として♂ *Nrf2*(+/+)*gpt delta* マウス 3 匹、*Nrf2*(-/-)*gpt delta* マウス 2 匹にイオン交換水を投与した。*Nrf2*(+/+)*gpt delta* マウスでは、投与による死亡は認められなかったが、*Nrf2*(-/-)*gpt delta* マウスでは 2 匹とも投与期間中に体重が減少し、生存できなかった。*Nrf2* 欠損は臭素酸カリウムへの感受性を高くすることが明らかになった(青木)。

2) *Mutyh* 欠損マウスの臭素酸カリウムに対する感受性の検討

遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するため、0.2%およびより0.1%臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った。

0.2%臭素酸カリウムを投与した *Mutyh* 遺伝子欠損マウス 4 匹に生じた 1 個体当たりの平均腫瘍数は 60.8 ± 35.0 で、前回行った大規模な投与実験の結果 (51.0 ± 28.4) と同程度の腫瘍発生頻度であった。一方、0.1%臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウス 4 匹の小腸には、1 個体当たり平均 9.0 ± 8.3 の腫瘍が発生していた(續)。

3) *Polk* KO ヒト細胞株の遺伝毒性物質に対する感受性

H_2O_2 に対して、野生型および KO 株は $30 \mu M$ の用量で生存率が顕著に低下し、KO 株は野生型に比べ有意に低い生存率を示した。BP、MMC に対して、二株は用量依存的な生存率の低下が見られたが、二株の間に感受性の差は見られなかった。また、UVC 照射に対しても、二株は照射量依存的な生存率の低下を示したが、二株の間に感受性の差

は見られなかった(能美)。

4) 染色体中に導入した 1 分子の 8-oxo-Gua が誘発する変異

8-oxo-Gua の導入部位は、*TK* 遺伝子のエクソン 5 から上流の 68 番目および 131 番目の 2 カ所である。エクソン 5 から 68 番目の塩基部位に 8-oxo-Gua を導入した場合、33 細胞中 27 では正常塩基 Cyt (82%) が対合していたが、5 細胞では Ade (15%)、1 細胞では Thy (3%) が対合していた。一方、無修飾の Gua (コントロール) を導入した場合は、22 細胞のうち、すべてが Cyt と塩基対形成していた。次に、131 番目の Gua 部位に 8-oxo-Gua を導入した場合、334 細胞中 263 から正常塩基 Cyt (79%)、30 から Ade (9%)、11 から一塩基欠失 (3%) が検出され、その他 (9%) の塩基置換も低頻度で見つかった(安井)。

4) 大腸菌ミューテーター株の変異スペクトル

4 つの配列を比較して、ミューテーター株それぞれに特異的な(他には見られない)変異を抽出したところ、 ΔT で 15 個、 ΔMY で 24 個、+B で 13 個であった。 ΔT では 15 個の変異の半数が AT 塩基対の変化であり、中でも A:T から C:G への変異頻度が 40% (6/15) だった。 ΔMY では 24 個の 4 分の 3 に当たる 18 個が G:C から T:A へのトランスポージョンであった。一方、+B には特徴的なスペクトラムは見られなかった。また、全体として挿入には GC 塩基対が多く、欠失には AT 塩基対が多く含まれる傾向があった(山田)。

5) 1 分子 DNA シーケンサーの特徴

任意の生体材料中の任意の遺伝子における突然変異頻度・スペクトルを測定する画期的な突然変異検出系、SMRT 法について調査を行った。SMRT 法とは、米国 PACIFIC

BIOSCIENCES 社が開発した、SMRT™(Single Molecule Real Time の略)DNA シーケンサーを用いて、極低頻度の体細胞突然変異を直接読む方法である。この DNA シーケンサーは一時間に 1000 億塩基読み、一分子の DNA テンプレートに、蛍光ラベルした dNTP が取り込まれる様子(一秒間に数十個)をリアルタイムで観察できる点に特徴がある(松田)。

D. 考察

Nrf2 は第 2 相薬物代謝酵素や酸化たんぱく質の遺伝子発現に必須な転写因子である。Nrf2 が欠損した状態では、薬物代謝酵素や酸化系酵素をはじめとした DNA を防御する機能の活性が低下して、変異原物質への感受性が増加し、突然変異頻度が著しく上昇、その結果「実質的な閾値」が低下あるいは消失する可能性がある。Nrf2(+/-)マウスの交配により、Nrf2(-/-)マウスを作出したが、♂23匹中 4 匹、♀14匹中3匹と、メンデルズムで期待される 1/4 より出生の割合は低かった。Nrf2(-/-)は出生時においても活性酸素等への感受性が高いものと考えられた。臭素酸カリウムを、小腸での発がん実験の標準投与量(2g/L)の用量で 4 週間投与したが、Nrf2(-/-)マウスは生存できなかった。Nrf2 の欠損により、臭素酸カリウムへの感受性が上昇したが、これは臭素酸カリウム投与による発生する活性酸素種への感受性が上昇したものによると考えられた(青木)。

0.2%臭素酸カリウムを投与された *MutYh* 遺伝子欠損マウスでは野生型に比べて小腸での発がん頻度は 1 個体当たり 60.8 ± 35.0 で、約 60 倍上昇していた。一方、0.1%臭素酸カリウムを投与された *MutYh* 遺伝子欠損マウスの平均腫瘍発生頻度は 1 個体当たり 9.0 ± 8.3 で、0.2%臭素酸カリウム投与群と比較すると、約 7 分の 1 に減少していた。最近の研究で、MUTYH は DNA 修復以外に酸化 DNA 損傷に起因する細胞死誘導に関与することが示され

ている(Oka et al, EMBO J, 2008)。今回の結果は、*MutYh* 遺伝子産物が DNA 修復と細胞死誘導の両面から、酸化剤の遺伝毒性発がんに関する「事実上の閾値」形成に貢献している可能性を示している。今後、使用マウスの数を増やして、複数の低用量臭素酸カリウムを投与することにより、発がん解析を行っていく必要がある(續)。

今回、化学物質に対する致死および変異感受性について比較を行い、 H_2O_2 において野生型と比較して KO 細胞株では生存率が有意に低下していた。*in vitro* の実験において hPol κ は酸化損傷であるチミングリコールに対して乗越え DNA 合成を行うことが報告されている。KO 細胞株では H_2O_2 暴露により生じたチミングリコールをはじめとする酸化損傷を乗り越えることができず、野生型と比較し、有意に生存率が低下した可能性が考えられる。これらの結果は、hPol κ が酸化剤による遺伝毒性に関して「事実上の閾値」形成に貢献している可能性を示唆している(能美)。

TSCER122 細胞 (*TK*^{-/-}) は、TK6 細胞由来の細胞で、*TK* 遺伝子のエキソン 5 を欠き、その欠失部位から 100 bp 上流に I-SceI 認識配列 18 bp (^{5'} ATT ACC CTG TTA TCC CTA) を 1 つ持っている。その配列は、本来のヒトゲノムには無いいため、I-SceI を発現させると、ゲノムの 1 ヶ所だけに二本鎖切断を形成させることができる。二本鎖切断部位では、相同組換えが起りやすいため、染色体 DNA と相同配列を持ち DNA 付加体を含むターゲティングベクターを細胞に導入すると、エキソン 5 で相同組換えが起き、DNA 付加体がゲノムに導入される。エキソン 5 で組換えが起り、*TK*^{+/-}となった細胞は、HAT セレクションによって選択できるため、付加体を持った細胞を特異的に選択できる。*TK* 遺伝子のイントロン 4 内の 2 カ所に 8-Oxo-Gua を導入し、そこで起こる突然変異

頻度およびスペクトラムを調べた。その結果、両方の部位とも主に G・C → T・A トランスバージョンを誘発させ、その頻度は、一方が 15 %、他方は 9 % であった。この結果から、ゲノムに形成された全ての 8-Oxo-Gua が変異に結びつくわけではないことが示唆された(安井)。

本研究で用いたミューテーター株は高い変異頻度を示すもので *lacZ* の復帰突然変異でスペクトラム別に変異頻度を調べた場合、 ΔT では A:T から C:G への変異が 1×10^{-3} 、 ΔMY では G:C から T:A への変異が約 2×10^{-5} 、+B では G が 6 個続く配列から 1 個欠失するフレームシフトが約 2×10^{-4} の頻度であることが報告されている。大腸菌のゲノムサイズは約 5 メガ塩基対であるので、それに比して、今回検出された突然変異の数が少ないことについては、これらの株が作製後すぐに凍結保存されており、ミューテーターの性質を持つてからの継代数が少ないことがあげられる。次年度は、それぞれについて長期継代した後に DNA を調製してシーケンサー解析することを検討したい(山田)。

SMRT シーケンサーは、DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応を利用して DNA シーケンスを決定するが、DNA 損傷部位では、DNA 合成は停止するか、合成速度が遅くなることが期待される。DNA 合成反応をリアルタイムで検出できる時間分解能を有する SMRT ならば、塩基取り込み速度によって、真の突然変異と DNA 損傷由来のアーティファクトを見分けることが可能かもしれない(松田)。

E. 結論

解毒代謝(*Nrf2*)、DNA 修復(*Mutyh*)、TLS(*Polk*)に関与する遺伝子を不活化させたマウスあるいはヒト細胞を用い、遺伝毒性物質に対する感受性を検討し、それぞれが感受性要因として重要な役割をはたし、遺伝毒性発現に関する「事実上の閾値」形成に関与して

いる可能性を示唆した。また 1 分子の 8-Oxo-Gua をヒト細胞の特定箇所に導入する技術を確認し、その変異頻度を測定した。さらに次世代 DNA シーケンサー、一分子 DNA シーケンサーによる変異検出法について検討した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A. Furuhashi, T. Toida, M. Nishikawa, Y. Aoki, Y. Yoshioka and F. Shiraishi, Development of an ecotoxicity QSAR model for the KAshinhou Tool for Ecotoxicity (KATE) system, March 2009 version, SAR QSAR Environ. Res., 21, 403-413 (2010)
- 2) J. Kawahara, C. Tanaka, C. Tanaka, Y. Aoki and J. Yonemoto, Estimation of the respiratory ventilation rate of preschool children in daily life, J. Air Waste Manag. Assoc., 61, 46-54 (2011)
- 3) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu and Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice. Health Physics, in press
- 4) N. Sagata, A. Iwaki, T. Aramaki, K. Takao, S. Kura, T. Tsuzuki, R. Kawakami, I. Ito, T. Kitamura, H. Sugiyama, T. Miyakawa, and Y. Fukumaki, Comprehensive behavioral study of GluR4 knockout mice: implication in cognitive function. Genes, Brain Behavior, 9, 899-909 (2010)
- 5) T. Nakamura, S. Meshitsuka, S. Kitagawa, N. Abe, J. Yamada, T. Ishino, H. Nakano,

- T. Tsuzuki, T. Doi, Y. Kobayashi, S. Fujii, M. Sekiguchi and Y. Yamagata, Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base, *J. Biol. Chem.*, 285, 444–452 (2010)
- 6) H. Kamiya M. Uchiyam, J.-S. Piao, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki and H. Harashima, Targeted sequence alteration of a chromosomal locus in mouse liver. *Inter. J. Pharmaceutics*, 387, 180-183 (2010)
- 7) A. Sassaa, N. Niimi, H. Fujimoto, A. Katafuchi, P. Grúz, M. Yasui, R. C. Gupta, F. Johnson, T. Ohta and T. Nohmi, Phenylalanine 171 is a molecular brake for translesion synthesis across benzo[a]pyrene-guanine adducts by human DNA polymerase kappa, *Mutat. Res.*, 718, 10–17 (2011)
- 8) M. Hori, S. Yonekura, T. Nohmi, P. Gruz, H. Sugiyama, S. Yonei and Q.-M. Zhang-Akiyama, Error-prone translesion DNA synthesis by Escherichia coli DNA polymerase IV (DinB) on templates containing 1,2-dihydro-2-oxoadenine, *J. Nucleic Acids*, in press.
- 9) M. Tasaki, T. Umemura, Y. Suzuki, D. Hibi, T. Inoue, T. Okamura, Y. Ishii, S. Maruyama, T. Nohmi and A. Nishikawa, Oxidative DNA damage and reporter gene mutation in the livers of *gpt* delta rats given non-genotoxic hepatocarcinogens with cytochrome P450-inducible potency, *Cancer Sci.*, 101, 2525–2530 (2010)
- 10) A. Sheh, C.W. Lee, K. Masumura, B.H. Rickman, T. Nohmi, G. N. Wogan, J.G. Fox and D.B. Schauer, Mutagenic potency of Helicobacter pylori in the gastric mucosa of mice is determined by sex and duration of infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, 15217–15222 (2010)
- 11) K. Masumura, Y. Sakamoto, M. Ikeda, Y. Asami, T. Tsukamoto, H. Ikehata, Y. Kuroiwa, T. Umemura, A. Nishikawa, M. Tatematsu, T. Ono and T. Nohmi, Antigenotoxic effects of p53 on spontaneous and UVB-induced deletions in the epidermis of *gpt* delta transgenic mice, *Environ. Mol. Mutagen.*, 52, 244–252 (2011)
- 12) J.H.Y. Wong, J.A. Brown, Z. Suo, P. Blum, T. Nohmi and H. Ling, Dynamic bypass of a major cisplatin-DNA adduct revealed in structural, kinetic and in vivo studies, *EMBO J.*, 29, 2059–2069 (2010)
- 13) T. Okamura, Y. Ishii, Y. Suzuki, T. Inoue, M. Tasaki, Y. Kodama, T. Nohmi, K. Mitsumori, T. Umemura and A. Nishikawa, Effects of co-treatment of dextran sulfate sodium and MeIQx on genotoxicity and possible carcinogenicity in the colon of p53-deficient mice, *J. Toxicol. Sci.* 35, 731–741 (2010)
- 14) T. Okamura, Y. Ishii, Y. Suzuki, T. Inoue, M. Tasaki, Y. Kodama, T. Nohmi, K. Mitsumori, T. Umemura and A. Nishikawa, Enhancing effects of carbon tetrachloride on in vivo mutagenicity in the liver of mice fed 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), *J. Toxicol. Sci.*, 35, 709–720 (2010)
- 15) N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi, Integration of in vivo genotoxicity and short-term carcinogenicity assays

- using F344 *gpt* delta transgenic rats: in vivo mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene structural isomers, *Toxicol. Sci.*, 114, 71-78 (2010)
- 16) A. Katafuchi, A. Sassa, N. Niimi, P. Gruz, H. Fujimoto, C. Masutani, F. Hanaoka, T. Ohta and T. Nohmi, Critical amino acids in human DNA polymerases eta and kappa involved in erroneous incorporation of oxidized nucleotides, *Nucleic Acids Res.*, 38, 859-867 (2010)
- 17) N. Okudaira, F. Uehara, K. Fujikawa, N. Kagawa, A. Ootsuyama, T. Norimura, K. Saeki, T. Nohmi, K. Masumura, T. Matsumoto, Y. Oghiso, K. Tanaka, K. Ichinohe, S. Nakamura, S. Tanaka and T. Ono, Radiation dose-rate effect on mutation induction in spleen and liver of *gpt* delta mice, *Radiat. Res.*, 173, 138-147 (2010)
- 18) V. Thybaud, J.T. Macgregor, L. Muller, R. Crebelli, K. Dearfield, G. Douglas, P.B. Farmer, E. Gocke, M. Hayashi, D.P. Lovell, W.K. Lutz, D. Marzin, M. Moore, T. Nohmi, D.H. Phillips and J. Van Benthem, Strategies in case of positive in vivo results in genotoxicity testing, *Mutat. Res.*, in press.
- 19) T. Nohmi and M. Bignami, Nucleotide pool damage and its biological consequences, *Mutat. Res.*, 703, 1-1 (2010)
- 20) A. Katafuchi and T. Nohmi, DNA polymerases involved in the incorporation of oxidized nucleotides into DNA: the efficiency and template base preference, *Mutat. Res.*, 703, 24-31 (2010)
- 21) M. Yasui, N. Koyama, T. Koizumi, K. Senda-Murata, Y. Takashima, M. Hayashi, K. Sugimoto, and M. Honma, Live cell imaging of micronucleus formation and development. *Mutat. Res.* 692, 12-18 (2010)
- 22) N. Koyama, M. Yasui, Y. Oda, S. Suzuki, T. Satoh, T. Suzuki, T. Matsuda, S. Masuda, N. Kinoshita, and M. Honma, Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 11-19 (2011)
- 23) K. Kato, E. Yamamura, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Matsuda, A. Sugiyama and Y. Uno, Application of the DNA adductome approach to assess the DNA-damaging capability of in vitro micronucleus test-positive compounds. *Mutat. Res.* 721, 21-26 (2011)
- 24) P.H. Chou, S. Kageyama, S. Matsuda, K. Kanemoto, Y. Sasada, M. Oka, K. Shinmura, H. Mori, K. Kawai, H. Kasai, H. Sugimura and T. Matsuda, Detection of lipid peroxidation-induced DNA adducts caused by 4-oxo-2(E)-nonenal and 4-oxo-2(E)-hexenal in human autopsy tissues. *Chem Res Toxicol*, 23, 1442-1448 (2010)
- 25) T. Matsuda, Anticipated Mutation Assay Using Single-molecule Real-time (SMRT™) Sequencing Technology. *Genes and Environment*, 32, 21-24 (2010)
- 26) H. Takemura, H. Nagayoshi, T. Matsuda, H. Sakakibara, M. Morita, A. Matsui, T. Ohura and K. Shimoi, Inhibitory effects of chrysoeriol on DNA adduct formation with benzo[a]pyrene in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology*, 274, 42-48 (2010)
- 27) T. Oyama, H. Nagayoshi, T. Matsuda, M. Oka, T. Isse, H.S. Yu, T.T. Pham, K.

- Tanaka, N. Kagawa, K. Kaneko and T. Kawamoto, Effects of acetaldehyde inhalation in mitochondrial aldehyde dehydrogenase deficient mice (Aldh2-/-). *Front Biosci (Elite Ed)*, 2, 1344-1354 (2010)
- 28) K. Kawai, P.H. Chou, T. Matsuda, M. Inoue, K. Aaltonen, K. Savela, Y. Takahashi, H. Nakamura, T. Kimura, T. Watanabe, R. Sawa, K. Dobashi, Y.S. Li, and H. Kasai, DNA Modifications by the omega-3 Lipid Peroxidation-Derived Mutagen 4-Oxo-2-hexenal in Vitro and Their Analysis in Mouse and Human DNA. *Chem Res Toxicol.* 23, 630-636 (2010)
- 29) K. Ishino, C. Wakita, T. Shibata, S. Toyokuni, S. Machida, S. Matsuda, T. Matsuda and K. Uchida, Lipid peroxidation generates body odor component trans-2-nonenal covalently bound to protein in vivo. *J Biol Chem*, 285, 15302-15313 (2010)
- ## 2. 学会発表
- 1) H. Sato, M. Matsumoto, Y. Aoki, K. Itoh, M. Yamamoto, Functional prediction analysis based on global gene expression by using Nrf2 Knockout mouse liver exposed to TCDD. 12th Int. Congr. Toxicol. Barcelona July 2010.
- 2) 青木康展, 化学物質の体内動態など毒性発現メカニズムを考慮したリスク評価値算出の考え方. 第 51 回大気環境学会年会 大阪 September 2010.
- 3) 松本理, 青木康展, 大気中の発がん物質のリスク評価 -疫学研究データと動物実験データに基づく評価値の比較-. 日本環境変異原学会 第 39 回大会 つくば November 2010.
- 4) 青木康展, 佐藤陽美, 中島大介, 影山志保, 阪下由香利, 柳澤利枝, 後藤純雄, 松下秀鶴, 増村健一, 能美健彦 大気中の粒子状物質抽出物が *gpt delta* マウス肺中に示す変異原性; 2009 年つくば市内, 1989 年バンコク市内の試料について. 日本環境変異原学会 第 39 回大会 つくば November 2010.
- 5) 佐藤陽美, 阪下由香利, 増村健一, 古山昭子, 平野靖史郎, 能美健彦, 青木康展 ディーゼルナノ粒子長期曝露により *gpt delta* マウス肺・肝臓に誘導される突然変異. 日本環境変異原学会 第 39 回大会 つくば November 2010.
- 6) H. Sato, D. Nakajima, S. Kageyama, Y. Sakashita, R. Yanagisawa, K. Masumura, T. Nohmi and Y. Aoki, In vivo mutagenicity of ambient air in the lungs of *gpt delta* transgenic mice; A case studies in Tsukuba City, Japan. The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pataya December 2010.
- 7) 佐藤陽美, 中島大介, 影山志保, 後藤純雄, 松下秀鶴, 渡辺徹志, 青木康展, 遺伝子発現プロファイルと分子ネットワークによる都市大気成分の毒性寄与予測手法の開発. 日本薬学会第 131 年会 静岡 March 2011
- 8) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Prevention of Oxidative Mutagenesis by DNA Repair Enzymes: Implication in Human Cancer, 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens (ACEM): Harmonize Gene & Environment, Pattaya, Thailand, 2010.12.17.
- 9) 大野みずき, 作見邦彦, 續輝久, 中別府雄作, 8-oxoguanine は DNA 鎖切断を誘発することで減数分裂期の相同染色体組

- 換え頻度を上昇させる, 日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 神戸, 2010. 12.8.
- 10) 中西恵美, 大野みずき, 中津可道, 續輝久, 腸管と精巣における放射線誘発 DNA 損傷とその修復機構の解析, 日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 神戸, 2010.12.7.
 - 11) 大野みずき, 中西恵美, 作見邦彦, 古市正人, 中別府雄作, 續輝久, 酸化損傷 DNA が生殖細胞ゲノムに及ぼす影響, 日本環境変異学会第 39 回大会, 茨城, 2010.11.16.
 - 12) 大野みずき, 中西恵美, 中津可道, 續輝久, 低 LET 放射線による核酸の損傷とその修復機構: 腸管と精巣における解析, 日本放射線影響学会第 53 回大会, 京都, 2010.10.20.
 - 13) 高橋富美, 吉原達也, 中津可道, 續輝久, 中別府雄作, 笹栗俊之, 酸化ストレス誘発小腸腫瘍に対する Differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍効果, 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010.9.22.
 - 14) 日高真純, 高木康光, Teik-How Lim, 中津可道, 續輝久, 佐野しおり, 坂上竜資, 関口睦夫, 哺乳類細胞のゲノム安定性と細胞死, 日本遺伝学会第 82 回大会, 札幌, 2010.9.20.
 - 15) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, Workshop: Biological effects of low-level exposure to ionizing radiation, health risks and clinical consequences, Richland, WA, USA, 2010.5.5.
 - 16) T. Nohmi, Transgenic in vivo genotoxicity assays: current status of *gpt* delta transgenic mice and rats, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
 - 17) Y. Totsuka, T. Kato, S. Matsuda, D. Nakae, Y. Tada, T. Nohmi, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Ichinose, T. Sugimura and K. Wakabayashi, Genotoxicity induced by nanoparticles, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
 - 18) M. Yamada, M. Takamune, A. Katafuchi and T. Nohmi, Novel Salmonella strains for Ames test that can detect pyrimidine damage in DNA, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
 - 19) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, M. Takamune, M. Yamada, T. Tanaka and T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin on mutagenesis and carcinogenesis in *gpt* delta transgenic rats, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
 - 20) A. Sassa, N. Niimi, H. Fujimoto, A. Katafuchi, P. Gruz, M. Yasui, R.C. Gupta, F. Johnson, T. Ohta and T. Nohmi, Phenylalanine 171 as a molecular brake for dCMP incorporation opposite benzo[a]pyrene-guanine adducts by human DNA polymerase kappa, The 7th 3R symposium, Toyama, Japan, October 26-30, 2010.
 - 21) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, M. Takamune,

- M. Yamada, T. Ohta and T. Nohmi,
Chemopreventive effects of silymarin, a
plant constituent, against the
carcinogenicity of dimethylhydrazine plus
dextran sodium sulfate in the colon of *gpt*
delta transgenic rats, The 10th
International Conference on Mechanisms
of Antimutagenesis and
Anticarcinogenesis (ICMAA), Guaruja,
Brazil, September 26-29, 2010.
- 22) T. Nohmi, *gpt* delta transgenic mouse and
rat for in vivo genotoxicity assays, The
2nd Westlake Conference- Translational
Medicine, Hangzhou, Zhejiang, China,
June 24-26, 2010.
- 25) 安井 学, 佐々 彰, 鴨下 渚, 太田敏博,
松田知成, 能美健彦, 本間正充; DNA 付
加体を含む修飾 DNA オリゴマーの生化学
的構築法の最適化. 日本環境変異原
学会第 39 回大会 (2010. 11)
- 26) 佐々 彰, 太田敏博, 能美健彦, 本間正
充, 安井 学; 臭素化 DNA 付加体の誤塩
基対形成機構. 日本環境変異原学会第
39 回大会 (2010. 11)
- 27) A. Sassa, N. Kamoshita, T. Ohta, T.
Nohmi, M. Honma, and M. Yasui ; A rapid
system for the biochemical preparation of
oligodeoxynucleotides containing a single
DNA adduct. The 37th International
Symposium on Nucleic Acids Chemistry
(2010. 11)
- 28) 本間正充, 安井 学, 堀端克良, 鈴木哲
矢, 谷田貝文夫; DNA 二本鎖切断修復
に対する低線量放射線等の環境ストレス
の影響. 第 33 回日本分子生物学会年会・
第 83 回日本生化学会大会 合同大会
(2010. 12)
- 29) A. Sassa, T. Ohta, T. Nohmi, M. Honma,
and M. Yasui ; Miscoding events during
DNA synthesis past brominated DNA
adducts. The 2nd Asian Conference of
Environmental Mutagen (2010. 12)
- 30) M. Yasui, A. Sassa, T. Ohta, T. Nohmi,
and M. Honma ; Miscoding properties of
brominated DNA adducts catalyzed by
human DNA polymerases. UKEMS /
Dutch EMS-sponsored Workshop on
Biomarker of Exposure and Oxidative
DNA Damage (2011. 3)
- 1) M. Yamada, K. Matsui, M. Takamune, A.
Katafuchi, T. Nohmi, Sensitive
detection of oxidative damages using
BER-deficient Ames tester strains,
European Environmental Mutagen
Society 2010, (2010. 9)
- 2) 須井 哉, 川上久美子, 桜井徳子, 奥富
弘子, 太田 亮, 山田雅巳, 能美健彦,
ハイ・スループット微生物遺伝毒性試
験法の検討6, 日本環境変異原学会第
39回大会(2010. 11)
- 3) 本山茂記, 竹入章, 和田直子, 寺社下
浩一, 三島雅之, 新見直子, ピーター・
グルーズ, 増村健一, 山田雅巳, 能美
健彦, DNA polymerase κ 遺伝子ノック
イン *gpt* delta マウスにおいて
mitomycin C によって骨髄に誘発された
変異の解析, 日本環境変異原学会第39
回大会 (2010. 11)
- 31) 山田雅巳, 高宗万希子, 能美健彦, 香
辛料成分カプサイシンによる変異原性
修飾効果について, 日本環境変異原学
会第 39 回大会(2010.11)
- 32) 堀 貴美子, 武藤 学, 松田 知成, 湯河
良之, アセトアルデヒド由来 DNA アダクト
の安定性に関する検討, 第 69 回日本癌
学会学術総会, 大阪
- 33) 湯河 良之, 堀 貴美子, 江副 康正, 宮
本 心一, 武藤 学, 松田 知成, 千葉 勉,

- Aldh2 欠損および p53 欠損とアセトアルデヒド由来 DNA アダクト形成との関連性の検討, 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪
- 34) 小山 倫浩, 田中 政幸, 永吉 春奈, 松田 知成, 川本 俊弘, アセトアルデヒド吸入曝露によるアルデヒド脱水素酵素2ノックアウトマウス臓器の N2-ethylidene-dG による DNA 付加体, 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪
- 35) 石野 孔祐, 加藤 竜也, 増田 修一, 松田 知成, 杉村 隆, 若林 敬二, 戸塚 ゆ加里, ナノマテリアルにより誘発される DNA 付加体の解析, 日本環境変異原学会(JEMS) 第 39 回大会, つくば, 2010
- 36) 松田 知成, 質量分析器、次世代 DNA シーケンサーの変異原研究への応用可能性, 日本環境変異原学会(JEMS) 第 39 回大会, つくば, 2010
- 37) 松田 俊, 足立 淳, 井原 賢, 井倉 正枝, 井倉 毅, 松田 知成, 芳香族炭化水素受容体 (AhR) 複合体のプロテオーム解析, 日本環境変異原学会(JEMS) 第 39 回大会, つくば, 2010
- 38) 加藤 杏子, 山村 英二, 川西 優喜, 八木 孝司, 松田 知成, 杉山 明男, 宇野 芳文, CHL/IU 細胞を用いた in vitro 小核試験における DNA アダクトーム解析(第 2 報), 日本環境変異原学会(JEMS) 第 39 回大会, つくば, 2010
- H. 知的所有権の取得状況
なし

平成22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:食品添加物における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

分担研究課題名:DNA防御機能抑制条件下での体内突然変異の解析

分担研究者: 青木康展 独立行政法人国立環境研究所
環境リスク研究センター 副センター長

研究要旨

第2相薬物代謝酵素や抗酸化たんぱく質の発現が抑制された状態では、酸化ヌクレオチドなどのDNA付加体の生成が促進されて、突然変異発生頻度が上昇し、「実質的閾値」が低下する可能性がある。これを検証する実験系として、第2相薬物代謝酵素等の遺伝子発現に必須な転写因子であるNrf2が欠損した *gpt delta* マウス(Nrf2(-/-)*gpt*(+/+))の作出を進めた。

Nrf2(-/-)マウスの活性酸素種への感受性を明らかにするために、8-oxodGの生成を亢進し、小腸で癌を生成することが知られる臭素酸カリウムを標準的な用量(2g/l)で、4週間飲水投与した。その結果、臭素酸カリウム投与によりNrf2(+/+) *gpt delta* では死亡した個体が認められないのに対し、Nrf2(-/-) *gpt delta* では投与した2個体とも投与期間中生存できなかった。Nrf2(-/-)は、Nrf2(+/+)に比べて活性酸素種生成に対する感受性が高いことが明らかになった。

キーワード: 遺伝毒性発がん物質、活性酸素種、Nrf2、ノックアウトマウス、*gpt delta* トランスジェニックマウス

A. 研究目的

薬物代謝酵素やDNA修復系などDNA防御機能が抑制された動物の臓器では、変異原物質への感受性が増加して、突然変異頻度が著しく上昇し、「実質的な閾値」が低下あるいは消失する可能性がある。

第2相薬物代謝酵素や抗酸化たんぱく質の遺伝子発現に必須な転写因子であるNrf2を、遺伝子導入技術により欠損させたNrf2-KOマウスでは、薬物代謝酵素誘導をはじめとしたDNA付加体の生成を抑制する機能が低下している。一方、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は、標的臓器で発生した突然変異を検出する最もよい方法である。この方法では、化学物質に曝露した動物の臓器からλファージDNA上に載せた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。また、検出された変異体をDNAシーケンス解析することで、どのような塩基置換等が発生するかを明らかにすることも出来る(変異スペクトル解析)。そこで、Nrf2-KOマウスと、能美らが開発した *gpt*

(guanine phosphoribosyltransferase)遺伝子をレポーター遺伝子として導入したトランスジェニック動物・*gpt delta*マウスを交配し、Nrf2-KO *gpt delta*マウスを作出することとした。

昨年度までの研究により、Nrf2-KOマウスの肝臓ではG:C→T:A transversionの割合が増加することが明らかとなった。この塩基置換は活性酸素種が核酸塩基に反応した酸化ヌクレオチドの一種8-oxodGが生成されることにより発生するものである。Nrf2(-/-)マウスの臓器内では、活性酸素種の発生が著しく亢進し、8-oxodGの生成が上昇していることが示唆された。

そこで、Nrf2(-/-)マウスに8-oxodGを産生し、小腸で癌を発症することが知られる臭素酸カリウムを飲水投与し、第2相薬物代謝酵素や酸化たんぱく質の遺伝子発現の低下が、臭素酸カリウムの標的臓器である小腸等の突然変異に与える量的質的な影響、さらに「実質的な閾値」の存在にどの程度影響を与えているかを明らかにしようとした。

B. 研究方法

1) Nrf2-KO *gpt delta* マウスの作出

東北大院医・山本雅之教授より恵与を受け国立環境研究所で維持している Nrf2(+/-)遺伝型マウス(C57BL バックグラウンド)と *gpt delta* マウスを交配し、Nrf2(+/-)*gpt*(+/-)マウスを作出した。さらに、Nrf2(+/-)*gpt*(+/-)マウスと *gpt delta* マウスを交配して生まれた仔の尾から、アルカリ消化により DNA を抽出した後、PCR 法により遺伝型を決定し、選抜された Nrf2(+/-)*gpt*(+/+)マウスの雌雄を交配することで、Nrf2(-/-)*gpt*(+/+)の遺伝型をもつマウス(Nrf2-KO *gpt delta* マウス)を作出した。

(ア) 遺伝型の決定

Nrf2(+)の遺伝型は Nrf2遺伝子の5'側と3'側をプローブとした PCR により、Nrf2(-)の遺伝型は Nrf2 遺伝子の5'側と Nrf2 遺伝子をノ

ックアウトに導入した lacZ 遺伝子をプローブとしてPCRにより増幅した産物(それぞれ700 bpと400 bp)をゲル電気泳動により検出して同定した。

また、*gpt* 遺伝子については、*gpt*(+)はλ EG10 が導入されている17番染色体の配列をForward、λ EG10の配列をReverseとしたPCRにより、*gpt*(-)は17番染色体の配列をForwardとReverseとしたPCR産物により(それぞれ360 bpと970 bp)同定した。

(イ) 臭素酸カリウムの投与

臭素酸カリウム(シグマ社製)を投与直前にイオン交換水に2g/lの濃度に溶解し、6週齢目から1ヶ月間飲水投与した。

4) *gpt* 変異体頻度(MF)の測定と変異スペクトル解析

マウス臓器から RecoverEase DNA isolation kit (Stratagene)を用いてゲノムDNAを採取した。その後、Transpack (Stratagene)を用いて in vitro パッケージング反応を行い、ゲノムDNAからλ EG10をファージ粒子として回収した。ファージは大腸菌 YG6020に感染させ、6-チオグアニンとクロラムフェニコールを含む培地上に播種し耐性となったコロニー(*gpt* 変異体候補コロニー)を検出した。検出したコロニーは、再度、6-チオグアニンとクロラムフェニコールを含む培地上にストリークして、真の *gpt* 変異体を検出した。回収したファージの一部は適宜希釈した後 YG6020に感染させ、クロラムフェニコールのみを含む培地上に播種し、耐性コロニー数を計測して回収したレポーター遺伝子の総数を求めた。*gpt* MFは、真の *gpt* 変異体数を回収したレポーター遺伝子数で除して算出した。また、変異体 *gpt* 遺伝子はPCRで増幅した後、DNAシーケンス解析を行い、発生した突然変異の性質(塩基置換、欠失など)を同定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、実験動物を用いたものであり、ヒトに関する倫理上の問題はない。また、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) Nrf2-KO *gpt delta* マウスの作出

♂Nrf2(+/-)遺伝型マウス x ♀*gpt delta* マウス 1ペア、♂*gpt delta* マウス x ♂Nrf2(+/-)遺伝型マウス 2ペアを交配して得た♂5匹、♀9匹の仔の遺伝型を決定したところ、♂4匹、♀3匹が Nrf2(+/-)*gpt*(+/-)の遺伝型をもつマウスであった。

さらに、♂Nrf2(+/-)*gpt*(+/-)遺伝型マウス x ♀*gpt delta* マウス 4ペア、♂*gpt delta* マウス x ♀Nrf2(+/-)*gpt*(+/-)遺伝型マウス 2ペアを交配し♂19匹、♀16匹の仔を得たが、うち♂2匹、♀2匹が Nrf2(+/-)*gpt*(+/+)の遺伝型をもっていた。

Nrf2(+/-)*gpt*(+/+)遺伝型マウス雌雄 2ペアを交配してその後代の Nrf2(+/-)*gpt*(+/+)遺伝型マウスを作出し、8ペアの交配を行った。その結果、♂Nrf2(+/+)7匹、Nrf2(+/-)12匹、Nrf2(-/-)4匹、♀Nrf2(+/+)6匹、Nrf2(+/-)5匹、Nrf2(-/-)3匹の *gpt delta* マウスを得た。

現在、Nrf2(-/-) *gpt delta* マウスの作出を続けている。

2) 臭素酸カリウムの投与

小腸に8-oxodGの産生が認められ、かつ癌が発症する標準投与量である2g/lの用量で♂Nrf2(+/+)4匹、Nrf2(-/-)2匹の *gpt delta* マウスに臭素酸カリウムを飲水投与した。また、対照群として♂Nrf2(+/+)3匹、Nrf2(-/-)2匹の *gpt delta* マウスにイオン交換水を投与した。

その結果、図1および2に示すように、Nrf2(+/+)は投与による死亡は認められなかったが、Nrf2(-/-)は2匹とも投与期間中に体重が減少し、生存できなかった。Nrf2 欠損は臭

素酸カリウムへの感受性を高くすることが明らかになった。

D. 考察

Nrf2は第2相薬物代謝酵素や抗酸化たんぱく質の遺伝子発現に必須な転写因子である。Nrf2が欠損した状態では、薬物代謝酵素や抗酸化系酵素をはじめとしたDNAを防御する機能の活性が低下して、変異原物質への感受性が増加して突然変異頻度が著しく上昇し、その結果「実質的な閾値」が低下あるいは消失する可能性がある。

Nrf2(-/-)マウスの臓器内では、活性酸素種の発生が亢進し、酸化ヌクレオチドの一種8-oxodGの生成が上昇していることが示唆された。そこで、Nrf2(-/-) *gpt delta* マウスに、8-oxodGを産生することが知られる臭素酸カリウムを経口投与し、標的臓器(小腸)における活性酸素の発生とそれに伴う8-oxodG生成亢進が、突然変異頻度をどの程度上昇するかを定量的に明らかにしようとした。

Nrf2(+/-)マウスの交配により、Nrf2(-/-)マウスを作出したが、♂23匹中4匹、♀14匹中3匹と、メンデルリズムで期待される1/4より守出生の割合は低かった。Nrf2(-/-)は出生時においても活性酸素等への感受性が高いものと考えられた。

臭素酸カリウムを小腸での発がん実験の標準投与量(2g/l)の用量で4週間投与したが、Nrf2(-/-)マウスは生存できなかった。Nrf2の欠損により、臭素酸カリウムへの感受性が上昇したが、これは臭素酸カリウム投与による発生する活性酸素種への感受性が上昇したのものによると考えられた。

本研究の進捗により、Nrf2-KO *gpt delta* マウスは、抗酸化酵素の閾値決定への関与を検証するのに適切な実験系であることが示された。今後は臭素酸カリウムの投与用量を下げ(例えば0.6g/l)、Nrf2(-/-)マウスへの投与実験を行い、Nrf2欠損状態での小腸等の標

的臓器における 8-oxodG 等酸化ヌクレオチドの生成と、突然変異頻度の上昇の程度を明らかにすることを計画している。

E. 結 論

Nrf2(-/-)マウスに8-oxodGの産生を亢進する臭素酸カリウムを標準的な用量投与したところ、感受性が上昇し4週間生存できなかつた。Nrf2-KO *gpt delta* マウスは活性酸素種に対する感受性が高く、8-oxodG 等酸化ヌクレオシドの生成が上昇した状態での突然変異発生解析に適した実験動物である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 30) Furuhashi A., Toida T., Nishikawa M., Aoki Y., Yoshioka Y., Shiraishi F. (2010) Development of an ecotoxicity QSAR model for the KAsinhou Tool for Ecotoxicity (KATE) system, March 2009 version. SAR QSAR Environ. Res., 21, 403-413
- 31) Kawahara J., Tanaka C., Tanaka C., Aoki Y., Yonemoto J. (2010) Estimation of the respiratory ventilation rate of preschool children in daily life. J. Air Waste Manag. Assoc. 61, 46-54 (2011)

2. 学会発表

- 16) Sato H., Matsumoto M., Aoki Y., Itoh K., Yamamoto M. Functional prediction analysis based on global gene expression by using Nrf2 Knockout mouse liver exposed to TCDD. 12th Int. Congr. Toxicol. Barcelona July 2010.

- 17) 青木康展 化学物質の体内動態など毒性発現メカニズムを考慮したリスク評価値算出の考え方. 第51回大気環境学会年会 大阪 September 2010.
- 18) 松本理, 青木康展 大気中の発がん物質のリスク評価 一疫学研究データと動物実験データに基づく評価値の比較一. 日本環境変異原学会 第39回大会 つくば November 2010.
- 19) 青木康展, 佐藤陽美, 中島大介, 影山志保, 阪下由香利, 柳澤利枝, 後藤純雄, 松下秀鶴, 増村健一, 能美健彦 大気中の粒子状物質抽出物が *gpt delta* マウス肺中に示す変異原性; 2009年つくば市内, 1989年バンコク市内の試料について. 日本環境変異原学会 第39回大会 つくば November 2010.
- 20) 佐藤陽美, 阪下由香利, 増村健一, 古山昭子, 平野靖史郎, 能美健彦, 青木康展 ディーゼルナノ粒子長期曝露により *gpt delta* マウス肺・肝臓に誘導される突然変異. 日本環境変異原学会 第39回大会 つくば November 2010.
- 21) Sato H., Nakajima D., Kageyama S., Sakashita Y., Yanagisawa R., Masumura K., Nohmi T., Aoki Y. In vivo mutagenicity of ambient air in the lungs of *gpt delta* transgenic mice; A case studies in Tsukuba City, Japan. The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pataya December 2010.
- 22) 佐藤陽美、中島大介、影山志保、後藤純雄、松下秀鶴、渡辺徹志、青木康展 遺伝子発現プロファイルと分子ネットワークによる都市大気成分の毒性寄与予測手法の開発. 日本薬学会第131年会 静岡 March 2011

H. 知的所有権の取得状況 特になし

