

表1 臭素酸カリウムを投与した Nrf2-0K マウス小腸上皮組織の突然変異体発生頻度

	# animal	# mutants	titer	MF (xE-05)
(-/-) 0 g/L	1	2	297000	0.673
	2	6	1022550	0.587
	3	3	393000	0.763
	ave			0.674
	Std			0.088
<hr/>				
(-/-) 0.6g/L	4	7	369000	1.897
	5	8	1278000	0.626
	6	6	330000	1.818
	ave			1.447
	Std			0.712
	t-test (-/-)0			0.136
<hr/>				
(+/+) 0 g/L	7	2	548100	0.365
	8	1	225600	0.443
	9	3	390000	0.769
	ave			0.526
	Std			0.214
	t-test (-/-)0			0.329
<hr/>				
(+/+) 0.6g/L	10	9	498000	1.807
	11	3	666000	0.450
	12	9	756900	1.189
	ave			1.149
	Std			0.679
	t-test (-/-)0			0.297
	t-test (+/+)0			0.204
	t-test (-/-)0.6			0.627

研究課題名：食品添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究

分担研究課題名：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

分担研究者： 續 輝久 九州大学大学院医学研究院基礎医学部門  
生体制御学講座 基礎放射線医学（分子遺伝学）分野 教授

## 研究要旨

*Mutyh* 遺伝子欠損マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん実験系を用いて、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するために、低用量臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行い、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん・突然変異誘発の実験系は、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討する上で、有用な試験系であることが示された。また、*Mutyh* 遺伝子が欠損した個体でも酸化剤の発がん性に関して「閾値」が存在することを示唆する結果を得た。

キーワード：臭素酸カリウム、*Mutyh* 遺伝子、*rpsL* トランスジェニックマウス

### A. 研究目的

遺伝毒性物質の作用には一般に閾値がないとされており、どのように微量であってもヒトに対してリスクを示すと考えられている。このため遺伝毒性を示す発がん物質には ADI (Acceptable Daily Intake) が設定されず、食品添加物等に発がん性が認められた場合、その発生機序に遺伝毒性が関与するかは、行政上重要な問題になっている。だが、ヒトにはさまざまな生体防御機能 (DNA 修復、解毒代謝、損傷乗り越え DNA 合成、アポトーシスなど) が備わっており、ある限度 (閾値) 以下の作用は、事実上無毒化される可能性が考えられる。

生命にとって必須の酸素は、エネルギー生産系で利用される際に活性酸素種の生成を伴い、遺伝情報を司る DNA、RNA 並びにそ

れらの前駆体を酸化する。これら内在性の酸素ストレスに加え、環境中の放射線や遺伝毒性を示すある種の化学物質、さらには感染に伴う炎症によっても活性酸素種が生じている。活性酸素種は生体高分子を酸化し、発がんや老化を引き起こす。様々な酸化的損傷の中で、核酸のグアニン塩基の酸化体 8-オキシグアニン (8-oxoG) は遺伝情報保持及び伝達に異常を引き起こす点で最も重要である。8-oxoG はシトシンと同程度にアデニンとも対合できるので、DNA 中の 8-oxoG は突然変異の原因となる。8-oxoG による突然変異生成に対処するために生物は種々の酵素系を持っている。ヒトでは、OGG1 が DNA 中の 8-oxoG を取り除き、MUTYH が 8-oxoG に対して取り込まれたアデニンを除去する。また MTH1 はヌクレオチドプール中

に生じた 8-oxo-dGTP を分解し、DNA 複製の際に 8-oxoG が DNA へ取り込まれるのを防いでいる。我々はこれらの酵素の遺伝子を欠損したマウスを樹立し、これらのマウスでは自然発がんが上昇していることを示し、酸化 DNA 損傷が自然発がんの要因であることを明らかにしてきた。さらに *Mut* 遺伝子欠損マウスに酸化剤である臭素酸カリウムを経口投与し、その突然変異誘導・発がん感受性を野生型と比較することにより、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するための試験系の樹立を試みた。

本年度は、この実験系を用いて遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するための予備実験として、低用量 (0.05%) 臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った。

## B. 研究方法

### 7) *Mut* 遺伝子欠損マウスの飼養

C57BL6/J の遺伝的背景を持つ *Mut* 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 *Mut* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。マウスの飼養については、九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則並びに動物実験規則に従って実施した。

### 8) 臭素酸カリウム溶液の投与

臭素酸カリウム (Sigma) を純水に溶解し、0.05% 溶液を調製後濾過滅菌し、マウスの飲料水とした。投与方法としては、発がん解析には 16 週間の自由飲水で行い、消費量については週一回モニターした。

### 9) 発がん実験

マウスを安楽死させた後、腸管を摘出して 10%ホルマリンを用いて固定した。その後、固定液を 70%エタノールに置換えて、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。

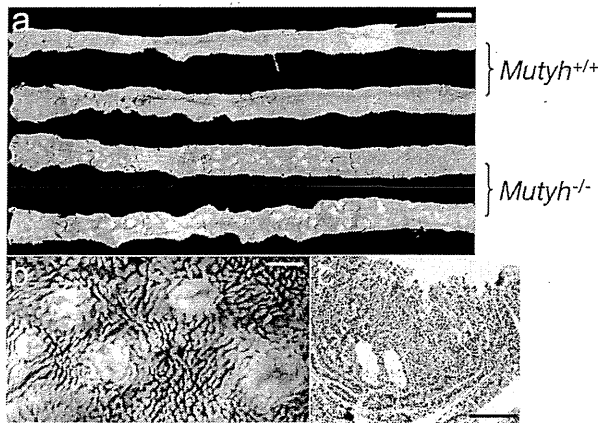
### 10) 統計的手法

すべての測定値について平均値と標準偏差を求めた。

## C. 研究結果

### 臭素酸カリウム誘発消化管発がん

これまでの *Mut* 遺伝子欠損マウスを用いた 0.2%臭素酸カリウム溶液を 16 週間連続飲水投与した誘発消化管発がん実験では、*Mut* 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸で多数の上皮性腫瘍の発生を認めた (第 1 図)。臭素酸カリウムを投与した野生型マウス雌 9 匹および *Mut* 遺伝子欠損マウス雌 8 匹に生じた 1 個体当たりの平均腫瘍数はそれぞれ  $1.0 \pm 0.7$ ,  $51.0 \pm 28.4$  であった。これらの結果は、*Mut* 遺伝子産物が酸化剤の遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献していることを示唆する。今回、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するための予備実験として、従来から用いてきた用量より低用量の 0.05%臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った。0.05%臭素酸カリウムを投与された *Mut* 遺伝子欠損マウス 9 匹の小腸には、腫瘍の発生を認めなかった。前年度までに行った 0.1%および 0.2%臭素酸カリウムを *Mut* 遺伝子欠損マウスに経口投与して行った発がん実験のデータと共に表 1 および図 2 にまとめて示す。



第1図 臭素酸カリウム誘発小腸腫瘍  
(代表的な病理像)

表1 Mutyh 欠損マウスにおける臭素酸カリウム誘発小腸腫瘍の発生頻度

No of Mutyh mice	KBrO3 (%)	No of tumor/mouse (mean ± SD)
9	0.05	0
4	0.1	9.0 ± 8.3
4	0.2	60.8 ± 35.0

#### D. 考 察

遺伝毒性物質の作用には閾値がないとされるため、遺伝毒性に基づく発がん作用が検出された場合には、食品添加物等にはADIが設定されない。しかし、福島昭治博士(現、日本バイオアッセイ研究センター所長)らの系統的な研究により、遺伝毒性発がん物質であっても「事実上の閾値」(それ以下では有意な発がん頻度の上昇が見られない用量)のあることが示唆されている(Carcinogenesis, 26, 1835-1845, 2005)。ヒトにはさまざまな生体防御機構(DNA修復、解毒代謝、誤りのない損傷乗り越えDNA合成、アポトーシス等)が存在し、これらが遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し「事実上の閾値」を形成する可能性が考えられる。本研究では、酸化DNA損傷に起因する突然変異を抑制する *Mutyh* 遺伝子を欠損したマウスを用い、パンの製造過程でも使用

され酸化ストレスを負荷することが知られている食品添加物、臭素酸カリウムを投与する実験を行い、DNA修復が遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献する可能性について検討するための試験系の樹立をめざしている。

前年度までに行った小規模な発がん実験の結果では、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  $60.8 \pm 35.0$  で、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  $9.0 \pm 8.3$  で、0.2%臭素酸カリウム投与群と比較すると、約6.7分の1に減少していたが、顕著な腫瘍発生頻度の上昇が認められた。今回の実験で明らかになったように、0.05%臭素酸カリウム投与群では全く腫瘍の発生が認められなかった。これらの結果は、*Mutyh* 遺伝子が欠損した個体でも酸化剤の発がん性に関して「閾値」が存在することを示唆している。

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)。突然変異の蓄積を防ぐDNA修復は発がん抑制に大きく寄与する。一方、DNA損傷に起因する細胞死誘導能も個体における突然変異体(前がん細胞)の出現を防ぐことから、この機構も発がん抑制に大きく関わっていると考えられる。したがって、*Mutyh* 遺伝子産物のDNA修復機能と細胞死誘導機能が酸化剤の遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献している可能性が考えられる。今後、腫瘍発生が認められなかった低用量域の臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウス小腸上皮における突然変異や細胞死を解析することにより、「閾値」形成におけるそれぞれの細胞機能の貢献度を明らかにすることができると

考える。

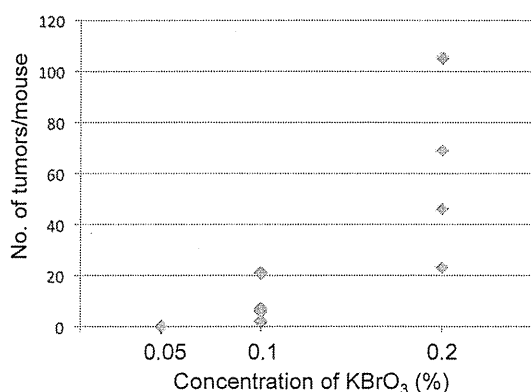


図2 臭素酸カリウム濃度と *Mutyh* 欠損マウス小腸での腫瘍発生頻度

## E. 結論

*Mutyh* 遺伝子マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん実験系は、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討する上で有用な試験系であると考えられる。また、*Mutyh* 遺伝子産物は酸化剤の遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献していると示唆される。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 論文発表

[学術雑誌]

- 50) Lim, T.-H., Fujikane, R., Sano, S., Sakagami, R., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M., and Hidaka, M. Activation of AMP-activated protein kinase by MAP1 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylated base mismatch in DNA. *DNA Repair*, 11, 259-266 (2012) [査読有]
- 51) 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 (Note). *Health Physics.*, 100: 293-294, 2011. [査読有]

[図書]

- 1) 大野みずき, 續輝久, DNA 修復酵素遺伝子-酸化的 DNA 損傷の修復系を中心として, 「疾患モデルマウス表現型解析指南-標準解析から専門解析まで」(山村研一/若菜茂晴 編), 中山書店, pp. 339-345, pp. 466-467 (2011) .

### 学会発表

- 1) 大野みずき, 中西恵美, 續輝久, マウス小腸における放射線誘発酸化損傷塩基の解析, [Mizuki Ohno, Megumi Nakanishi, Teruhisa Tsuzuki, A study of radiation-induced oxidative DNA damage and its repair in mouse intestine.], 日本分子生物学会第34回年会, 横浜, 2011. 12. 15.
- 2) 中津可道, 朴晶淑, 松本載恭, 磯田拓郎, 作見邦彦, 中別府雄作, 續輝久, 酸化DNA損傷修復系の異常と発がん, [Yoshimichi Nakatsu, Jingshu Piao, Noritaka Matsumoto, Takuro Isoda, Kunihiro Sakumi, Yusaku Nakabeppu, Teruhisa Tsuzuki, Defects of DNA repair systems against oxidative mutagenesis: implication in oxidative-stress induced carcinogenesis.], 日本分子生物学会第34回年会, 横浜, 2011. 12. 14.
- 3) Teruhisa Tsuzuki, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of *Mutyh*-deficient mice: the effect of low-level exposure to KBrO<sub>3</sub>, The 2<sup>nd</sup>

International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds (第2回 遺伝毒性発がん物質の閾値に関する国際シンポジウム), 東京, 2011. 11. 23.

2011. 8. 30.

G. 知的所有権の取得状況  
特になし

- 4) 大野みずき, 中西恵美, 續輝久, マウス腸管における放射線誘発酸化DNA損傷の解析, [Mizuki Ohno, Megumi Nakanishi, Teruhisa Tsuzuki, A study of radiation-induced oxidative DNA damage in mouse intestine.], 日本環境変異原学会第40回大会, 東京, 2011. 11. 22.
- 5) 大野みずき, 中西恵美, 續輝久, マウス小腸における放射線誘発酸化損傷塩基の解析, [Mizuki Ohno, Megumi Nakanishi, Teruhisa Tsuzuki, A study of radiation-induced oxidative DNA damage and its repair in mouse intestine.], 日本放射線影響学会第54大会, 神戸, 2011. 11. 17.
- 6) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 中西恵美, 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, 日本遺伝学会第83回大会, 京都, 2011. 9. 21.
- 7) Teruhisa Tsuzuki, Jingshu Piao, Noritaka Matsumoto, Yoshimichi Nakatsu, Antitumorigenic effects of p53 and mismatch DNA repair system on oxidative stress-induced intestinal tumors in mice, 14<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland, 2011. 8. 30.
- 8) Mizuki Ohno, Megumi Nakanishi, Teruhisa Tsuzuki, A study of radiation-induced oxidative DNA damage and its repair in mouse tissues, 14<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland,

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

分担研究課題名：培養細胞を用いた遺伝毒性研究

分担研究者： 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

トランスレージョン DNA 合成 (TLS) とは、DNA 損傷部位を乗り越えて進む DNA 合成のことであり、この過程には TLS 型 DNA ポリメラーゼと呼ばれる特殊な DNA ポリメラーゼが関与する。TLS は、損傷部位で停止した DNA 合成を継続させ、染色体複製が完遂することを補佐しており、TLS が起こらない場合には、DNA 鎖切断、染色体異常、細胞死が起こる。このため、TLS は遺伝毒性からの生体防御に関わる因子の一つと考えられている。本研究では、TLS 型 DNA ポリメラーゼである DNA ポリメラーゼ  $\zeta$  (Pol  $\zeta$ ) を欠損したノックアウトヒト細胞を樹立し、臭素酸カリウムに対する感受性を野生型細胞と比較した。臭素酸カリウムは、ラットに投与すると酸化ストレスにより腎臓癌を誘発するが、最終産物に残留しないことを条件に食品添加物としての使用が認められている。細胞毒性を指標に感受性を比較すると、Pol  $\zeta$  欠損株は臭素酸カリウムに対して高い感受性を示した。このほか、Pol  $\zeta$  欠損株は、ベンツピレン ジオールエポキシド、マイトマイシン C、*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N'*-ニトロソグアニジンに対しても高い致死感受性を示した。以上の結果は、Pol  $\zeta$  が、酸化ストレスを含む多様な遺伝毒性発がん物質からの生体防御に重要な役割を果たしていることを示しており、遺伝毒性物質の実際的な閾値形成に貢献している可能性を示唆している。

キーワード：トランスレージョン DNA 合成、DNA ポリメラーゼ  $\zeta$ 、遺伝子ノックアウト、ヒト細胞、臭素酸カリウム、生体防御、閾値

#### A. 研究目的

規制科学の分野においては、DNA に反応して突然変異や染色体異常を誘発する遺伝毒性物質は、その作用に閾値がないとされ、どのように低用量であつてもリスクを伴うと考えられている。このため、発がん物質の作用に遺伝毒性が関与する場合には、当

該物質の作用に閾値が設定されず、一日許容摂取量 (acceptable daily intake = ADI) も設定されない。遺伝毒性に基づいて発がん性を示す物質を遺伝毒性発がん物質と呼ぶが、食品添加物等に遺伝毒性に基づく発がん性が検出された場合には、遺伝毒性発がん物質と認定され、事実上、禁止の措置

が執られる。これに対し、遺伝毒性以外のメカニズム（例えばホルモン作用など）によって発がんを促進する非遺伝毒性発がん物質の場合には、閾値の存在が認められ、ADIは無毒性量 (no-observed adverse effect level = NOAEL) に基づいて設定される。

しかしヒトを含む生物は、さまざまな生体防御機能（解毒代謝、DNA修復、誤りのないトランスリージョンDNA合成(TLS)、アポトーシス等）、生体防御物質（グルタチオン等）を具備しており、遺伝毒性物質であっても、その用量が低い場合には、その作用を自然突然変異のレベルにまで低減させ、「事実上の閾値」を形成する可能性が考えられる。本研究では、TLSに係わるDNAポリメラーゼ(Pol I)を不活化したヒト細胞株を樹立し、その遺伝毒性物質に対する感受性を精査することで、遺伝毒性物質に対する閾値形成の機構を明らかにすることを目的とする。

遺伝毒性物質によって誘発される塩基置換変異やフレームシフト変異などの点突然変異は、損傷特異的なPol IがDNA損傷（付加体）を乗り越える際に損傷部位の向かい側や近傍に誤った塩基を挿入したり、損傷部位を飛ばしてDNA合成を行うために生ずると考えられている。この損傷部位を乗り越えて進むDNA合成を、TLSと呼ぶ。TLSは、染色体複製に関与するPol (Pol  $\delta$ 、 $\epsilon$ ) が損傷部位で進行を停止した場合に機能し、複製フォークの進行停止に伴うDNA鎖の切断や染色体異常、細胞死の誘発を防止する役割をはたし、DNA修復機構とともに染色体の恒常性維持に必要な生物機能と考えられている。ヒト細胞には14種類以上のPolが存在するが、その中でもBファミリーに属するPol  $\zeta$  とYファミリーに属する4種類のPol ( $\kappa$ 、 $\eta$ 、 $\iota$ 、REV1) はTLSにおいて中心的な役割を果たしていると考え

えられている。

昨年度は、ヒト Pol  $\kappa$  の活性中心が存在するエクソン6を欠失させたノックアウト(KO)細胞株を樹立し、表現型解析と細胞毒性試験を行った。その結果、Pol  $\kappa$  KO株は過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) の致死作用に対して高い感受性を示すことを明らかにした。Pol  $\kappa$  によるTLSが、酸化ストレスに基づく細胞死に対する防御機構として重要な役割を果たしている可能性が考えられる。今年度は、ヒト Pol  $\zeta$  遺伝子のエクソン5を欠失させ、Pol  $\zeta$  が発現しないようにしたKO細胞株を樹立し、遺伝毒性物質に対する感受性を検討した。その結果、Pol  $\zeta$  KO株は臭素酸カリウム ( $KBrO_3$ ) を含む多様な遺伝毒性発がん物質の致死作用に高い感受性を示すことが明らかになった。Pol  $\zeta$  は遺伝毒性物質に対する防御機構として重要な役割を果たしているものと考えられる。

## B. 研究方法

### 1) 培養条件

培地はRPMI1640培地を用いた。これに非働化処理(56度で30分間処理)したウシ血清(50  $\mu$ g/mlカナマイシン添加)を10%添加し、 $\beta$ -メルカプトエタノールを50  $\mu$ Mになるよう加えた。培養はCO<sub>2</sub>インキュベーターにて37度、5%濃度のCO<sub>2</sub>条件下で行った。

### 2) Pol $\zeta$ ノックアウト細胞の樹立

Pol  $\zeta$  KO細胞樹立のため、POLZ (REV3) 遺伝子のエキソン5を除くようなターゲティングベクターを作製した(図1)。作製したターゲティングベクターはエレクトロポレーションにより、ヒトプレB細胞由来のNaIm-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(hyg<sup>r</sup>)、ピューロマイシン耐性(puro<sup>r</sup>)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。相同組換えを介さずにベクターDNAが挿入した細胞は、ジフテリア毒素感受性を指標にして除いた。染色体上に組み込まれた薬剤耐性遺伝子は、Cre 部位特異的組換え酵素を一過的に発現させることにより除去した。

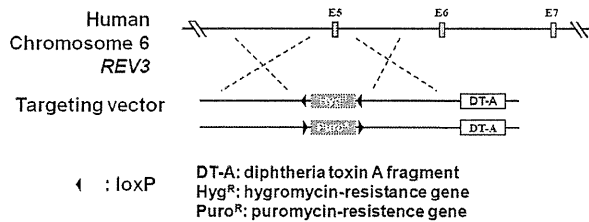


図1 Polζ KO 細胞樹立用ターゲティングベクター

### 3) 薬剤処理による細胞毒性試験

細胞毒性試験には、KBrO<sub>3</sub>、ベンツピレンジオールエポキシド (BPDE)、マイトマイシンC (MMC)、*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (MNNG) を用いた。96 穴プレートに各培養細胞液 0.1 ml (2 × 10<sup>3</sup> cells/well) を播種し、KBrO<sub>3</sub> は 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mM、BPDE は 0、1、2.5、5.0、10、20 nM、MMC は 0、1.56、3.13、6.25、12.5、25 ng/mL、MNNG は 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μg/mL になるよう添加した。薬剤存在下、48 時間、インキュベーター内で培養し、培養後、生存率を測定した。生存率は、ミトコンドリアの脱水素酵素による水溶性ホルマザンの生成量を測定する MTS

((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)アッセイにより求めた。

### 4) 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)

本研究で用いたヒト細胞は株化細胞であり、倫理問題は生じないと考える。

## C. 研究結果

### 1) KO 細胞の選別と確認

薬剤耐性を示した細胞由来のゲノム DNA を、イントロン 4 およびエクソン 5 にハイブリダイズするプライマーを用いて PCR 法により増幅し、野生型株ではバンドが検出されるが、KO 株では検出されないことを確認した (図 2A)。また mRNA については、エクソン 1 とエクソン 5 にハイブリダイズするプライマーを用いて逆転写した後に増幅し、野生型株ではバンドが検出されるが、KO 株では検出されないことを確認した (図 2B)。Cre 組換え酵素遺伝子により薬剤耐性遺伝子を除き KO 細胞とした。

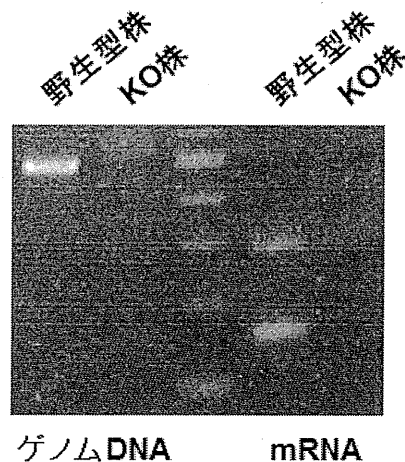


図2 hPolζ KO 細胞の PCR および RT-PCR 解析

### 2) 化学物質に対する感受性

BPDE に対して、KO 株は 5nM の用量で生存率が 10%以下に低下したが、野生型株では 90%以上の生存率を示した。MMC に対して、

KO 株は 12.5ng/mL の用量で生存率が 10%以下に低下したが、野生型株では 50%程度の生存率を保持した。KBrO<sub>3</sub> に対して、KO 株は 0.5mM の用量で生存率が 10%以下に低下したが、野生型株では約 40%の生存率を示した。MNNG に対して、KO 株は 0.4 μg/mL の用量で生存率が約 30%に低下したが、野生型株では約 70%の生存率を示した。

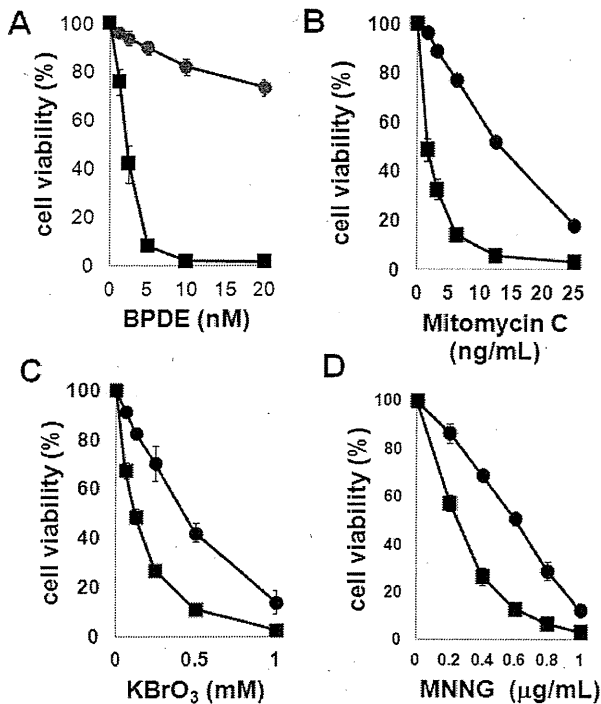


図3 野生型と KO 細胞株の BPDE (A)、MMC (B)、KBrO<sub>3</sub> (C) および MNNG (D) に対する致死感受性の比較。(●), 野生型細胞; (■), KO 細胞

#### D. 考 察

今回、hPol $\kappa$  KO 細胞を樹立し、各種の遺伝毒性発がん物質に対する致死感受性について野生型株と比較を行い、KO 細胞株が BPDE、MMC、KBrO<sub>3</sub>、MNNG に対して野生型株よりも高い感受性を示すことを明らかにした。以上の結果は、hPol $\kappa$  が、遺伝毒性物質により誘発される多様な DNA 損傷の TLS に幅広く関与していることを示唆している。昨年度に樹立した hPol $\kappa$  KO 株は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に

おいて野生型と比較して生存率が有意に低下していた。今回、hPol $\kappa$  KO 細胞を用いて H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する感受性を検討したが、hPol $\kappa$  KO 細胞は野生型細胞と同程度の感受性を示した。これらの結果は、酸化ストレスに対する DNA 防御に関して、異なった Pol が関与していることを示唆している。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と KBrO<sub>3</sub> は、ともに DNA 上に 8-オキソグアニンが生成を形成するが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が一本鎖 DNA 切断を誘発するのに対し、KBrO<sub>3</sub> では二本鎖切断を誘発することが示唆されている。DNA 損傷とその修復あるいは TLS に関わる Pol の関係は更に検討する必要がある。

KBrO<sub>3</sub> と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> については、最近、*in vitro* 小核試験、TK 遺伝子突然変異、*in vitro* コメット試験を用いて、遺伝毒性が検出されない用量 (NOGELs, No-Observed-Genotoxic-Effect-Levels)、すなわち「実質的な閾値」の存在が報告されている (Mutat. Res., 678, 30-37, 2009; Mutat. Res., 726, 151-159, 2011)。我々は、ミスマッチ修復タンパク質を再発現させることで自然突然変異頻度を低下させた Nalm-6 細胞 (Nalm-6-MSH+) を樹立しており、今後は、この細胞を用いて KO 細胞を樹立し、突然変異試験、*in vitro* 小核試験、*in vitro* コメット試験を行い、実質的な閾値 (上記の NOGELs) の確認と、閾値形成における TLS 型 DNA ポリメラーゼの役割について検討する予定である。

#### E. 結 論

作製した hPol $\kappa$  KO 細胞株と野生型株を用いて、薬剤処理による生存率を調べた。BPDE、MMC、KBrO<sub>3</sub>、MNNG において、KO 株は野生型株と比べ有意に生存率の低下がみられた。DNA ポリメラーゼ $\kappa$  が、多様な遺伝毒性物質からの防御機構として重要な役割を果たしていることが示され、遺伝毒性物質の実質的な閾値形成に貢献している可能

性を示唆した。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) T. Kamigaito, T. Noguchi, K. Narumi, R. Takashima, S. Hamada, H. Sanada, M. Hasuko, H. Hayashi, K. Masumura and T. Nohmi, Evaluation of the *in vivo* mutagenicity of nickel subsulfide in the lung of F344 *gpt* delta transgenic rats exposed by intratracheal instillation: A collaborative study for the *gpt* delta transgenic rat mutation assay, *Genes and Environ.*, in press.
- 2) H. Sui, R. Ohta, T. Shiragiku, A. Akahori, K. Suzuki, M. Nakajima, H. Hayashi, K. Masumura and T. Nohmi, Evaluation of *in vivo* mutagenicity by 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene in liver of F344 *gpt* delta transgenic rat dosed for 28 days: a collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assay, *Genes and Environ.*, in press.
- 3) Y. Kawamura, H. Hayashi, O. Tajima, S. Yamada, T. Takayanagi, H. Hori, W. Fujii, K. Masumura and T. Nohmi, Evaluation of the genotoxicity of aristolochic acid in the kidney and liver of F344 *gpt* delta transgenic rat using a 28-day repeated-dose protocol: a collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assay, *Genes and Environ.*, in press.
- 4) M. Jin, A. Kijima, Y. Suzuki, D. Hibi, T. Inoue, Y. Ishii, T. Nohmi, A. Nishikawa, K. Ogawa and T. Umemura, Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with *gpt* delta rats, *Toxicol.*, 290, 312-321 (2011)
- 5) N. Toyoda-Hokaiwadol, Y. Yasui, M. Takamune, M. Yamada, M. Muramatsu, K. Masumura, M., T. Ohta, T. Tanaka and T. Nohmi, Modulatory effects of capsaicin on N-diethylnitrosamine (DEN)-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* YG7108 and DEN-induced hepatocarcinogenesis in *gpt* delta transgenic rats, *Genes and Environ.*, 33, 160-166 (2011)
- 6) N. Toyoda-Hokaiwadol, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, M. Takamune, M. Yamada, T. Ohta, T. Tanaka and T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin against 1,2-dimethylhydrazine plus dextran sodium sulfate-induced inflammation-associated carcinogenicity and genotoxicity in the colon of *gpt* delta rats, *Carcinogenesis*, 32, 1512-1517 (2011)
- 7) D. Hibi, Y. Suzuki, Y. Ishii, M. Jin, M. Watanabe, Y. Sugita-Konishi, T. Yanai, T. Nohmi, A. Nishikawa and T. Umemura, Site-specific *in vivo* mutagenicity in the kidney of *gpt* delta rats given a carcinogenic dose of ochratoxin A, *Toxicol. Sci.*, 122, 406-414 (2011)
- 8) A. Yamamoto, Y. Sakamoto, K. Masumura, M. Honma and T. Nohmi, Involvement of mismatch repair proteins in adaptive responses induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine against  $\gamma$ -induced genotoxicity in human cells, *Mutat. Res.*, 713, 56-63 (2011)
- 9) N. Koyama, M. Yasui, A. Kimura, S.

- Takami, T. Suzuki, K. Masumura, T. Nohmi, S. Masuda, N. Kinae, T. Matsuda, T. Imai and M. Honma, Acrylamide genotoxicity in young versus adult *gpt* delta male rats, *Mutagenesis*, 26, 525-529 (2011)
- 10) A. Sassa, T. Ohta, T. Nohmi, M. Honma and M. Yasui; Mutational specificities of brominated DNA adducts catalyzed by human DNA polymerases, *J. Mol. Biol.*, 406, 679-686 (2011)
2. 学会発表
- 1) T. Nohmi, K. Masumura, P Gruz, N. Toyoda-Hokaiwado, M. Takamune, N. Niimi, T. Suzuki, Y. Kanemaru, M. Yasui, M. Yamada, M. Honma, N. Adachi and A. Nishikawa, Genotoxic thresholds: identification of mutations *in vivo* and mechanistic studies *in vitro*, 2nd International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds, Tokyo, November 23, 2011.
- 2) A. Yamamoto, Y. Sakamoto, K. Masumura, M. Honma and T. Nohmi, Critical roles of mismatch repair proteins in modulation of genotoxicity of gamma-irradiation in human cells by pretreatments with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine at low doses, 14th International Congress of Radiation Research, Warszawa, Poland August 28 - September 1, 2011.
- 3) 張 雪, 堀端克良, 西條将文, 石上智愛, 鵜飼明子, 菅野新一郎, Neilan, E. G., 田原栄俊, 本間正充, 能美健彦, 安井 明, 田中亀代次, 転写と共役した DNA 修復機構を欠損する紫外線高感受性症候群の原因遺伝子の同定, 第 34 回日本分子生物学学会年会, 横浜 (2011.12)
- 4) 西條将文, 張 雪, 堀端克良, 石上智愛, 鵜飼明子, 菅野新一郎, 田原栄俊, Neilan, E. G., 本間正充, 能美健彦, 安井 明, 田中亀代次, 転写と共役した DNA 修復機構において UVSSA と USP7 は協調的に CSB を安定化する, 第 34 回日本分子生物学学会年会, 横浜 (2011.12)
- 5) 鈴木哲矢, 兼丸祐紀, 豊田 (外岩戸) 尚美, 増村健一, ピーター・グルーズ, 足立典隆, 本間正充, 能美健彦, 酸化的損傷を持つ DNA を乗り越える際の損傷乗り越え DNA ポリメラーゼの役割, 第 34 回日本分子生物学学会年会, 横浜 (2011.12)
- 6) 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, 次世代シーケンサーを用いた大腸菌ミューター株のゲノムに蓄積する突然変異の解析, 第 34 回日本分子生物学学会年会, 横浜 (2011.12)
- 7) 安井学, 佐々彰, 鴨下渚, 松田知成, 太田敏博, 能美健彦, 本間正充, 8-クロログアニン DNA 付加体を含むオリゴマーの構築とその誤塩基対形成機構に関する研究, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京 (2011.11)
- 8) 須井哉, 川上久美子, 奥富弘子, 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 7, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京 (2011.11)
- 9) 高木久宜, 野崎祐次, 河田昭彦, 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, F344 系 *gpt* delta ラットの 6 ヶ月飼育試験による背景データの取得, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京 (2011.11)
- 10) 増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 能美健彦, *gpt* delta マウスの加齢に伴う点突然変異および欠失変異の蓄積, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京

- (2011. 11)
- 11) 堀端克良, 鵜飼明子, 木本崇文, 鈴木哲矢, 鴨下渚, 能美健彦, 本間正充, Pig-a アッセイとトランスジェニック突然変異試験の組合せに関する研究, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京 (2011. 11)
  - 12) 内村有邦, 日高裕子, 増村健一, 能美健彦, 三浦郁生, 若菜茂晴, 八木健, マウスをモデルとした、高頻度に発生する生殖系列突然変異が次世代以降の個体に与える影響の解析, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京 (2011. 11)
  - 13) 青木康展, 松本理, 能美健彦, 大気汚染物質による *gpt delta* マウス肺中の突然変異とヒト肺がん組織中 p53 遺伝子の突然変異の比較, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京 (2011. 11)
  - 14) 鈴木哲矢, Petr Grúz, 足立典隆, 本間正充, 能美健彦, 忠実度ないし活性を低下させた DNA ポリメラーゼ $\zeta$ を発現するヒト細胞株の樹立と遺伝毒性物質に対する感受性, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京 (2011. 11)
  - 15) 兼丸祐紀, 鈴木哲矢, 新見直子, Petr Grúz, 松元郷六, 足立典隆, 本間正充, 能美健彦, DNA ポリメラーゼ $\kappa$  遺伝子改変ヒト細胞を用いた遺伝毒性物質に対する感受性の検討, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京 (2011. 11)
  - 16) 本山茂記, 竹入章, 和田直子, 寺社下浩一, 三島雅之, 新見直子, Petr Grúz, 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦, MitomycinC による DNA 二本鎖切断の誘発に対する DNA polymerase  $\kappa$  の役割, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京 (2011. 11)
  - 17) 堀端克良, 増村健一, 能美健彦, 本間正充, *gpt delta* トランスジェニックマウス由来初代培養肝細胞を用いること  
で薬物代謝活性を考慮した *in vitro* 遺伝毒性試験, 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
  - 18) 金美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 井上智紀, 石井雄二, 能美健彦, 西川秋佳, 梅村隆志, F344 *gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験法によるメチルオイケノールの *in vivo* 遺伝毒性の検索, 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
  - 19) 増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 高木久宜, 能美健彦, *gpt delta* マウスの肝臓及び精巣に蓄積する加齢に伴う点突然変異及び欠失変異の解析, 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
  - 20) 大波冴子, 曹永晩, 豊田武士, 堀端克良, 本間正充, 能美健彦, 西川秋佳, 小川久美子, Glycidol と 3-MCPD 及びこれらのエステル化合物における Pig-A 遺伝子突然変異試験と小核試験を用いた *in vivo* 遺伝毒性学的検討, 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
  - 21) 鈴木裕太, 木島綾希, 日比大介, 金美蘭, 石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳, Estragole のラットにおける発がん性および遺伝毒性の検討, 第 38 回日本トキシコロジー学会 学術年会, 横浜 (2011, 7)
  - 22) 金美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 木島綾希, 石井雄二, 能美健彦, 西川秋佳, 梅村隆志, Safrole, piperonyl butoxide または estragole で処理した F344 ラットの肝臓における遺伝子発現プロファイルの比較, 第 38 回日本トキシコロジー学会 学術年会, 横浜 (2011, 7)
  - 23) 小山直己, 安井学, 木村葵, 高見成昭, 鈴木拓也, 増村健一, 能美健彦, 増田修一, 木苗直秀, 松田知成, 今井俊夫, 本間正充, *gpt delta* トランスジェニックラットを用いたライフステージ (週

齡) を考慮したアクリルアミドの遺伝  
毒性評価, 第 38 回 日本トキシコロジ  
ー学会 学術年会, 横浜 (2011, 7)

H. 知的所有権の取得状況

なし

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

分担研究課題名：極低用量暴露モデル系を用いた DNA 付加体 1 分子の突然変異誘発能の解析

分担研究者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

### 研究要旨

一般的にヒトが食餌や環境から暴露される発癌物質は、非常に低用量である。極めて低い濃度の発癌物質の暴露（極低用量暴露）を想定し、我々は 1 分子の DNA 損傷をヒトリンパ球細胞株のゲノム内に導入させ、その細胞に与えられる遺伝的な影響を調べる実験系を確立した。それは、わずか 1 分子の DNA 損傷であっても、理論的に突然変異をもたらし、その変異を固定化させ、細胞から細胞へと伝播させる可能性があるからである。本研究では、酸化的な DNA 損傷である 8-オキシグアニン（8-Oxo-Gua）DNA 付加体をゲノム内に 1 分子導入し、その突然変異誘発スペクトルと頻度を解析した。その結果、1 分子の 8-Oxo-Gua は、17.3 %の頻度でポイントミューテーションを誘発することが分かった。そのスペクトルは、G:C → T:A (9.0%), G:C → C:G (2.7%) の一塩基変異、一塩基欠失 (3.4%), その他 (2.2%) であった。一方、コントロールとして正常塩基 Gua をゲノムに導入した時は、その部位にポイントミューテーションはほとんど検出されなかった。本実験系は、8-Oxo-Gua が修復され難いかもしれない問題点を有するが、以上の結果から、少なくとも極低用量暴露であっても突然変異が誘発する可能性は否定できないことが、本研究によって明らかになった。

キーワード: DNA 付加体, 8-オキシグアニン, 低用量暴露, 遺伝毒性発癌物質

#### A. 研究目的

一般的にヒトが食餌や環境から暴露される発癌物質は、非常に低用量である。DNA 損傷を介する発癌物質は、わずか 1 分子の DNA 損傷（DNA 付加体や DNA 鎖切断）であっても、理論的に突然変異をもたらし、その変異を固定化させ、それは細胞から細胞へと伝播させる可能性がある（福島ら、環境

変異原研究 27, 75-79)。しかしながら、我々はわずか 1 分子の DNA 損傷がどれくらい遺伝子変異や発癌に寄与しているかを実験的に解析する術を持っていない。

そこで本分担研究者は、最近、1 分子の DNA 付加体 8-オキシグアニン（8-Oxo-Gua）を部位特異的に TSCER122 細胞株（ヒトリンパ球細胞 TK6 由来）のチミジンキナーゼ遺

伝子 (TK) 領域に導入させ、その DNA 付加体の遺伝的影響を解析する実験系を確立した。さらに、その手法は 1 分子だけでなく、数個の DNA 付加体を近接した部位に配置させることが可能であることから、低用量暴露よりもさらに低い極低用量暴露モデル系として利用している。

本年度の研究では、1 分子の 8-Oxo-Gua を TK 遺伝子のイントロン 4 内に導入して得られる突然変異誘発スペクトラムと頻度を詳細に解析した。

## B. 研究方法

### 11) ヒト培養細胞を用いる極低用量暴露モデルの実験系

本研究の基礎は、ヒト TK6 細胞由来の TSCER122 細胞株 (TK<sup>-/-</sup>) である。本細胞は、TK6 細胞から 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ため、その培養細胞に *I-SceI* を発現させるベクター

(pCBASce) を導入すれば、*I-SceI* 酵素の切断により、ゲノムの 1 ヶ所だけに二本鎖切断 (DSB) を形成させることができる (図 1)。その切断部位では、DNA 修復されやすくなっているため、そこに相同配列を持ち、且つ DNA 付加体を含むターゲティングベクター (エキソン 5 を含む TK 遺伝子の一部) を導入すれば、相同組み換えにより、エキソン 5 と DNA 付加体が同時にゲノム内に入る。その組み換えにより、細胞は TK<sup>-/-</sup> から TK<sup>+/-</sup> に復帰するため、HAT セレクションによって TK 復帰細胞だけ (つまり DNA 付加体が導入された細胞だけ) を後に回収し、分析することができる。

### 12) 8-Oxo-Gua を部位特異的に含むターゲティングベクターの構築と形質転換

8-Oxo-Gua を部位特異的に 1 つ含むターゲティングベクターは、荒川らの方法

(Arakawa, T. *et al*, *Anal. Biochem.* 416, 211-217) を一部改変し作製した (図 2)。TK 遺伝子のエキソン 5, 6, 7 を有する pTK15 プラスミド (Honma, M. *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen* 42, 288-298) を用意し、目的とする DNA 配列の 5' 末端から 8-Oxo-Gua 修飾プライマー領域の前方までを PCR する組とその後方までを PCR する組、そして、3' 末端からも同様の PCR を行い、計 4 組の PCR 産物 (1FR, 2FR, 3FR, 4FR) を用意した。引き続き、ビオチン-アビジン反応を利用して、それぞれの一本鎖 DNA (ss1FR, ss2FR, ss3FR, ss4FR) を分離した後、それらをアニーリングさせライゲーションを行うことにより直鎖状二本鎖プラスミド (pYTK15<sup>Oxo</sup>) を作製した。これと同様の方法で、正常塩基 Gua が入ったコントロールのターゲティングベクター (pYTK15) も用意した。

ターゲティングは、 $5 \times 10^6$  cells/100  $\mu$  L に調整した TSCER122 細胞に、pCBASce 50  $\mu$  g と pYTK15<sup>Oxo</sup> (あるいは pYTK15) 2  $\mu$  g を同時にトランスフェクション (Amaya 社製 Cell Line Nucleofactor kit) し、75 cm<sup>2</sup> の培養フラスコで 3 日間培養 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) した。次に、その細胞を  $5 \times 10^3$  cells/mL に調整し、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、TK 復帰細胞のクローンを回収した。その後、各クローンのゲノム DNA を DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。BssSI 酵素処理は、8-Oxo-Gua 導入部位周辺を PCR で増幅後に行い、BssSI 処理に抵抗性を持つフラグメントに対して、シーケンスを行った。



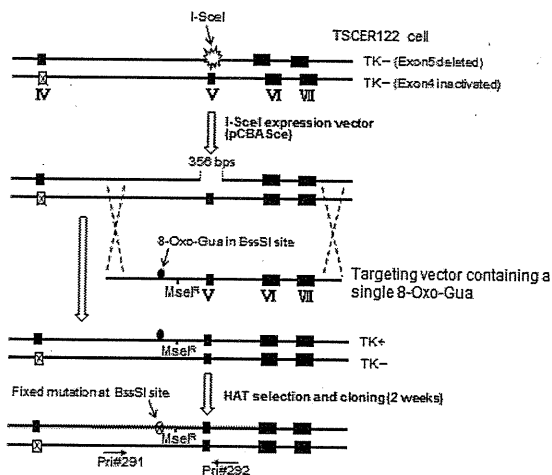


図1. ヒトリンパ球細胞を用いる極低用量暴露モデルの概略

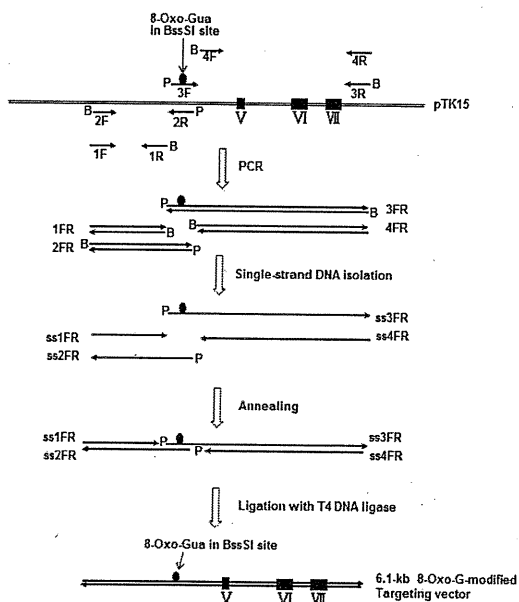


図2. 8-Oxo-Gua を1分子含むターゲティングベクターの作製。PおよびBは、プライマーの5'末端にそれぞれリン酸化およびビオチン化されていることを示す。

### C. 研究結果

#### 1) 1分子の8-Oxo-Guaによって増加する突然変異誘発頻度

8-Oxo-Guaの導入部位は、TK遺伝子イントロン4内のBssSI認識配列内(5' CTCGTG)である(エクソン5から上流の131番目のGua部位)。ターゲティングベクター pYTK15<sup>0xo</sup>あるいはpYTK15(コントロール)をゲノム内に導入し、TK復帰した細胞クロ

ーンのゲノムDNAをそれぞれ668, および578サンプル回収した。そのうち, 142(21%), 28(4.8%)サンプルがそれぞれBssSI処理に抵抗性(BssSI配列内で塩基置換があることを意味する)を示した。つまり, 8-Oxo-Guaによって突然変異誘発頻度が4.4倍(21%/4.8%)上昇することが分かった。

#### 2) 1分子の8-Oxo-Guaによって誘発する突然変異誘発スペクトラム

次に, 8-Oxo-Guaが導入された部位周辺をシーケンスした結果(表1), 668細胞中526から正常塩基Gua(79%)が検出されたが, 60からG:C → T:A(9.0%), 18からG:C → C:G(2.7%)の一塩基変異も多く観察された。また, 23細胞から一塩基欠失(3.4%)も高頻度に検出された。その他(2.2%)として, 一塩基挿入やG:C → A:T塩基置換も低頻度で見つかった。つまり, 1分子の8-Oxo-Guaは, 17.3%の頻度でポイントミューテーションを誘発することが分かった。一方, コントロールとしてpYTK15を導入した時は, ポイントミューテーションはほとんど検出されなかった。

表1. 1分子の8-Oxo-Guaによって誘発する突然変異誘発スペクトラムと頻度

Sequence	Mutation	Ctrl (Gua)		8-Oxo-Gua	
		Number	%	Number	%
Wild-type 5'-agc ctcgtg gga					
<b>Base-change in BssSI<sup>R</sup> site</b>					
5'-agc ctcTtg gga	G → T	60	9.0		
5'-agc ctcctg gga	G → C	18	2.7		
5'-agc ctcctg gga	G → A	5	0.7		
5'-agc ctcAtg gga	one-base del.			23	3.4
5'-agc ctcGtg gga	C Ins	2	0.3	5	0.7
5'-agc ctcTtg gga	T Ins (5')			1	0.1
5'-agc ctcgtg gga	T Ins (3')	1	0.2	3	0.4
5'-agc ctcGtg gga	G Ins			2	0.3
<b>Subtotal of Point mutation</b>		<b>3</b>	<b>0.5</b>	<b>117</b>	<b>17.3</b>
<b>Large deletions (&gt;2bp)</b>				<b>3</b>	<b>0.4</b>
<b>Other base changes</b>		22	3.8	18	2.7
<b>Not Detectable</b>		3	0.5	4	0.6
<b>Total BssSI<sup>R</sup> fragments</b>		<b>28</b>		<b>142</b>	

### D. 考察

ヒトは, 発癌に対して様々な防御機構を

備えており、発癌物質の極低用量暴露は、発癌リスクを上昇させないと信じられている。本研究は、発癌性を守備範囲としておらず、その前段階である突然変異誘発性に関して検討した。極低用量の酸化的な暴露を想定し、1分子の 8-Oxo-Gua をヒト培養細胞のゲノムに導入して、その細胞に与える遺伝的な影響を調べた。その結果、わずか1分子の DNA 付加体であっても突然変異が誘発することが明らかになった。これは、“遺伝毒性発癌物質には閾値が無い”という従来からの考え方をサポートしている。

しかしながら、本研究で用いた極低用量暴露モデル系は、次の2つの問題点を有する。①ゲノムにインテグレートされなかったターゲティングベクター上の 8-Oxo-Gua が細胞内に多数残存すること。つまり、細胞内の DNA 修復タンパク質 (OGG1 など) が、それら多数の 8-Oxo-Gua に働き、ゲノム内に導入させた 8-Oxo-Gua への修復が不十分だった可能性がある。②遺伝毒性発癌物質が DNA と反応する前の代謝・除去機構を考慮していないこと。本研究は、DNA 付加体をゲノム DNA 内に直接デリバリーさせるため、遺伝毒性発癌物質が DNA と反応した後を想定している。以上の問題点から、本モデル系だけで“遺伝毒性発癌物質には閾値が無い”という証拠にはならない。しかしながら、少なくともゲノム DNA 上に存在する DNA 付加体は、わずか1分子であっても突然変異を誘発させる能力があるということが明らかとなった。

## E. 結論

生きた細胞のゲノム内において、1分子の 8-Oxo-Gua の運命を追跡できた。わずか1分子であっても、8-Oxo-Gua は 17.3 % の頻度でポイントミューテーションを引き起こすが分かったが、上述の通り本モデル系が有する問題点から、そのまま解釈するこ

とはできない。しかしながら、遺伝毒性発癌物質を評価するにあたり、たとえ極低用量暴露であっても、突然変異が誘発する可能性は否定できないことが、本研究によって明らかになった。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sassa, A., Ohta, T., Nohmi, T., Honma, M., and Yasui, M.; Mutational specificities of brominated DNA adducts catalyzed by human DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 406, 679-686 (2011).
- 2) Hakulinen, P., Yamamoto, A., Koyama, N., Kumita, W., Yasui, M., and Honma, M.; Induction of TK mutations in human lymphoblastoid TK6 cells by the rat carcinogen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX). *Mutat. Res.* 725, 43-49 (2011).

### 2. 学会発表

- 1) Yasui, M., Sassa, A., Kamoshita, N., Matsuda, T., Ohta, T., Nohmi, T., and Honma, M.; Miscoding events during DNA synthesis past 8-chloroguanine DNA adduct. 日本環境変異原学会第 40 回大会 (2011. 11)
- 2) Yasui, M., Kamoshita, N., and Honma, M.; Tracking a single DNA adduct in targeted mutagenesis. 第 34 回日本分子生物学会 (2011. 12)

## H. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
（分担）研究年度終了報告書

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

研究分担者：山田 雅巳 国立医薬品食品衛生研究所 室長

### 研究要旨

変異頻度が高いバクテリアのゲノム DNA 配列に生じる変化を継時的に解析し、スペクトラム変化、変異の分布、蓄積等をまとめた。

キーワード；次世代シーケンサー、ゲノム配列解析、ミューテーター

### A. 研究目的

化学物質が DNA と反応して付加体を作り、それがもとで DNA の複製が誤った形で行われると突然変異が生じる。一方で、ヒトを含む生物では、さまざまな生体防御機構により突然変異の誘発が抑制されていると考えられる。まず、解毒代謝は、化学物質が DNA と反応する前に働いて、反応性を低くする。化学物質が DNA と反応して付加体ができたとしても、複製の鋳型になる前に修復系がそれを取り除けば突然変異には至らない。さらに、取り除かれなかった付加体が複製の鋳型になった場合でも、特別な DNA ポリメラーゼがエラーフリーに損傷を乗り越えれば（トランスリージョン DNA 合成：以下 TLS）突然変異は起こらない。しかしながら、DNA ポリメラーゼは損傷を乗り越える際に、逆に突然変異を積極的に起こす場合（誤りがちな TLS）があることがわかっている。

今年度は、昨年度に引き続き次世代シーケンサーを用いてバクテリアの全ゲノムを解析した。サンプルとしては、突然変異頻度の高い株を1種類選び、それを1週間、1, 2, 3 か月間継代した後のゲノム DNA を使用した。

### B. 研究方法

#### 1) 使用した菌株及び参照配列

菌株は *Escherichia coli* AB1157 の *mutM/mutY* 二重欠損変異株 YG2250 を用いた。*mutM* および *mutY* 遺伝子は、それぞれ、カナマイシン耐性遺伝子カセット、トランスポゾン mini-Tn10 の挿入により欠損している。したがって、YG2250 株はカナマイシンと、テトラサイクリンに耐性である。参照配列は、NCBI より取得した *E. coli* K12 subsrt. W3110 uid58567 を使用した。

#### 2) 使用したシーケンサー

Illumina 社、HiSeq2000 を使用した。

#### 3) サンプル DNA の調製方法

1) 培養条件：菌株のストックを LB プレートに広げて、単一コロニーを得、そのうち4個を選んでそれぞれを別々に LB 培地 10 mL に接種し、24 時間培養する。その培養液の 20  $\mu$ L を別々に新しい LB 培地 10 mL に接種する。これを 24 時間ごとに繰り返し、12 週間継代培養した。1 週間に 1 度培地にカナマイシンとテトラサイクリンを添加し、雑菌の増殖を防いだ。

2) ゲノム DNA の調製：コロニーを培地に接種してから、1 週間後、4 週間後、8 週間後、12 週間後に 10 mL の培養液を 1

本にまとめて集菌し、以下の方法でゲノム DNA を調製した。遠心分離した沈渣を TE 5,670  $\mu$ L に懸濁し、SDS 溶液 (10%) を 300  $\mu$ L、proteinase K 溶液 (20 mg/mL) を 30  $\mu$ L 加えてよく混ぜ、37°C で 1 時間処理した。次に、NaCl 溶液 (5M) を 1 mL 加えてよく混和し、さらに臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 溶液 (10%CTAB/0.7MNaCl) を 800  $\mu$ L 加えて混和し、65°C で 10 分処理した。クロロホルム/イソアミルアルコール混合液 (24:1) を 7.5 mL 加えて夾雑物を抽出した。遠心分離した上清をフェノクロ処理して、遠心上清に含まれる DNA を 4.5 mL の 2-プロパノールで沈殿させた。沈渣をエタノール (75%) で洗って、乾燥させたのち TE 溶液に懸濁し、RNaseA 溶液を加えて 37°C で 1 時間反応、残っている RNA を分解した。フェノクロで除蛋白し、エタノール沈殿により精製ゲノム DNA を得た。さらに、Nanodrop 分光光度計、Invitrogen 社の Qubit Fluorometer とアガロースゲル電気泳動で品質と濃度を確認した。ゲノム DNA 量は、1 週間後、4 週間後、8 週間後、12 週間後それぞれ、197.8  $\mu$ g、311.0  $\mu$ g、101.2  $\mu$ g、151.8  $\mu$ g であった。

#### 4) HiSeq2000 解析用ライブラリー調製

Illumina 社、TruSeq DNA Sample Prep Kit を用いて、Kit 添付の標準プロトコールに従い、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精製した DNA を PCR で増幅した。

#### 5) HiSeq2000 によるデータ取得方法

解析方法はペアエンド解析、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 100 塩基  $\times$  2、総取得データ量は 4 サンプルで 20 ギガ (2  $\times$  10<sup>10</sup>) 塩基以上である。

#### 6) シークエンスデータからの変異解析方法

出力されたリードデータより、次の手順で変異解析を実施した。

##### (1) ベースコール

クラスターごとに選出された A、T、G、C の 4 つのシグナルのうち、もっとも大きなシグナル値を持つ塩基を選出する作業

##### (2) QV フィルタリング

計算式を使って蛍光強度の低いクラスターをデータから排除する作業

##### (3) タグ配列によるデータ振り分け

インデックスタグ配列を利用して検体ごとのデータに振り分ける。

##### (4) 参照配列へのマッピング

シークエンスが決定した断片の配列が、参照配列のどの部分に当たるかを決める作業

##### (5) 変異候補箇所の抽出・リスト作成

参照配列と違っている配列を探す作業

##### (6) 変異候補箇所へのアノテーション情報付加

変異箇所を含む遺伝子名、アミノ酸変化の有無等の情報を追加する作業

#### 7) 突然変異頻度の解析

1 週間に 1 度、rifampicin 耐性コロニーの数を測定した：1 番の試験管の培養液を 10  $\mu$ L もしくは 50  $\mu$ L とって、リファンピシン (100  $\mu$ g/mL) を加えた LB プレートに播いて (4 枚) 37°C で一晩培養し、出たコロニーを数える。同じく 1 番の試験管の培養液を 10<sup>6</sup> 希釈して、その 50  $\mu$ L を LB プレートに播いて (4 枚) 37°C で一晩培養し、出たコロニーを数える。プレートにはいずれもカナマイシン (25  $\mu$ g/mL) とテトラサイクリン (10  $\mu$ g/mL) を含む。生菌数あたりのリファンピシン耐性コロニーの数を突然変異頻度とする。