

平成 21-23 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確立し、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、0.05%、0.1% および 0.2% 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結果を得た。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。さらに、遺伝子欠損マウスを利用した発がん・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。
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) を備えており、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。さらにマウスに酸化剤であり食品添加物としても使用されている臭素酸カリウムを経口投与し、個体での突然変異誘導・発がん感受性を検討するための系を樹立した。

本研究では、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に、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスに低用量域の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

1) *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの飼養

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。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。

2) 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、0.1% および 0.2% 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。

3) 発がん実験

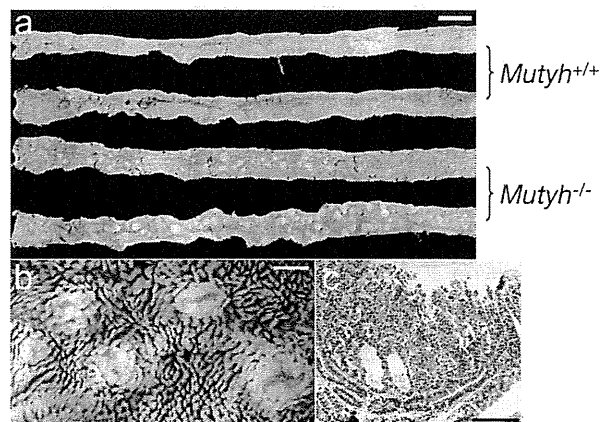
マウスを安楽死させた後、腸管を摘出して 10%ホルマリンを用いて固定した。その後、固定液を 70%エタノールに置換えて、腸粘膜を実体顕微鏡下で観察し、腫瘍の形成を確認した。検出した腫瘍から病理切片を作製し、病理解析を行った。

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た。

C. 研究結果

これまでの *Mutyh* 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、*Mutyh* 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 (図 1)。臭素酸カリウムを投与した野生型マウス雌 9 匹および *Mutyh* 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 ± 0.7 、 51.0 ± 28.4 であった。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実験として、従来から用いてきた用量である 0.2%、およびより低用量の 0.05%、0.1%の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が、0.05%臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウス 9 匹の小腸には全く腫瘍の発生を認めなかった (表 1、図 2)。



第 1 図 臭素酸カリウム誘発小腸腫瘍
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の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した。

本研究で行った発がん実験の結果では、臭素酸カリウム0.2%を投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウスで、小腸での発がん頻度は1個体当たり60.8 ± 35.0と野生型の個体当たり約1個に比べて顕著な上昇を認めた。0.1%の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%の臭素酸カリウム投与群と比較すると、約7分の1近くに減少していたものの、多数の腫瘍発生を認めた。これらの結果は、*Mutyh* が酸化剤KBrO₃がもたらす遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に寄与している可

能性を示唆している。また、さらに低用量の0.05%の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とから、*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。すなわち、*Mutyh* 以外の因子も酸化剤の発がん性に関して「閾値」形成に関わっている可能性を示唆している。

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）の出現を防ぐ役割を果たすことから、このDNA損傷細胞の排除の分子機構も発がん抑制に大きく関わっていると考えられる。以上、*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、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* 遺伝子欠損マウスの小腸上皮における突然変異や細胞死を解析することで、「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。また、本研究では、*Mutyh* 以外の因子が酸化剤の遺伝毒性に関する「閾値」形成に関与していることが示唆されたが、これらの他の因子（群）の解明のためには、想定される因子（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）の遺伝子との2重欠損マウスを用いた突然変異・発がん解析が有効であると思われる。

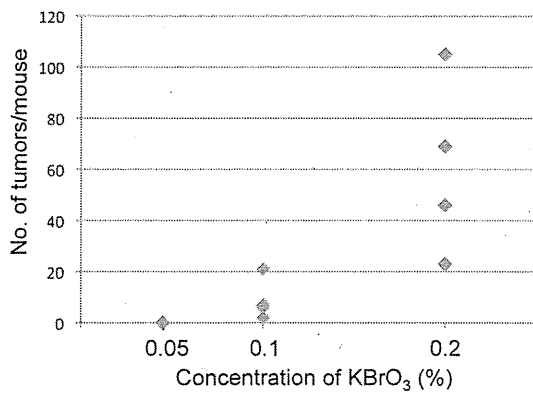


図2 臭素酸カリウム濃度と *Mutyh* 欠損マウス小腸での腫瘍発生頻度

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確立して、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、0.05%、0.1%および0.2%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結果を得た。また、DNA 修復関連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。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

[学術雑誌]

- 1) 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. [査読有]
- 2) 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. [査読有]

- 3) 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. [査読有]
- 4) 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]
- 5) T.-H., Lim, R. Fujikane, S. Sano, R. Saka, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, M. Sekiguchi and M. Hidaka, Activation of AMP-activated protein kinase by MAPO1 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylated base mismatch in DNA. *DNA Repair*, 11, 259-266 (2012) [査読有]

[図書]

- 1) T. Tsuzuki, T. Isoda, J. Piao, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestines of DNA repair-deficient mice, *International Proceedings: The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund "DNA Repair and Cancers"* Eds. S. Nishimura, L. A. Loeb, M. Masutani, H. Nakagama, T. Sekiya, Princess Takamatsu Cancer

Research Fund, 2010.

- 2) 江頭明典, 前原喜彦, 續輝久, DNA 修復異常と発がんモデル pp. 82-99, 「完全版 マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック」 秋山徹・奥山隆平・河府和義編, 羊土社 2011.
- 3) 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) Jingshu Piao, Takuro Isoda, Yoshimichi Nakatsu, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu, Teruhisa Tsuzuki, Susceptibility of various types of DNA repair-deficient mice to intestinal tumorigenesis induced by potassium bromate, 2nd Asian Congress of Radiation Research (ACRR 2009), Seoul, Korea, 2009. 05. 18.
- 2) Teruhisa Tsuzuki, Jingshu Piao, Takuro Isoda, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, 3rd ASM Conference on DNA Repair and Mutagenesis, Whistler, Canada, 2009. 06. 01.
- 3) Masumi Hidaka, Kayoko Komori, Yasumitsu Takagi, Masayuki Sanada, Teik-How Lim, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki, Mutsuo Sekiguchi, A new member of genes, Mapo1, involve in O⁶-methylguanine-induced apoptosis, 3rd ASM Conference on DNA Repair and Mutagenesis, Whistler, Canada, 2009. 06. 01.
- 4) Teruhisa Tsuzuki, Jingshu Piao, Takuro Isoda, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), Florence, Italy, 2009. 08. 23.
- 5) 中津可道, 松本戴恭, 朴晶淑, 續輝久, 酸化ストレス誘発消化管発癌抑制における癌関連遺伝子の働き, 日本遺伝学会第 81 回大会, 松本, 2009. 09. 16.
- 6) 日高真純, 高木康光, 真田正幸, Lim Teik-How, 中津可道, 續輝久, 関口睦夫, アルキル化損傷誘導アポトーシス経路で機能する MAPO1 タンパク質複合体, 日本遺伝学会第 81 回大会, 松本, 2009. 09. 16.
- 7) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 續輝久, 中別府雄作, 酸化損傷塩基の修復能を欠損するマウスにおける継世代的影響の解析, 日本遺伝学会第 81 回大会, 松本, 2009. 09. 16.
- 8) 松本戴恭, 朴晶淑, 中津可道, 前原喜彦, 續輝久, Trp53 欠損マウスを用いた KBrO₃ 投与による酸化ストレス誘発小腸腫瘍の解析, 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009. 10. 01.
- 9) 續輝久, 酸化ストレス誘発発がんの抑制に關与する分子機構の解明-Mut^yh 遺伝子欠損マウスにおける消化管発がんの解析を中心として-, 第 51 回日本消化器病学会大会, 京都, 2009. 10. 15.
- 10) 續輝久, 磯田拓郎, 朴晶淑, 作見邦彦, 中別府雄作, 中津可道, 酸化ストレス誘発発がんの抑制に關与する分子機構の解明-Mut^yh 遺伝子欠損マウスにおける消化管発がんの解析を中心として-, 日本生化学会第 82 回大会, 神戸, 2009. 10. 24.
- 11) Teruhisa Tsuzuki, Jingshu Piao,

- Takuro Isoda, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund "Cancer and DNA Repair", Tokyo, 2009. 11. 10.
- 12) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 續輝久, 中別府雄作, 酸化的 DNA 損傷と生殖細胞ゲノム変異, 日本放射線影響学会第 52 大会, 広島, 2009. 11. 11.
- 13) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 續輝久, 中別府雄作, 酸化的 DNA 損傷と生殖細胞ゲノム変異, 日本環境変異学会第 38 回大会, 静岡, 2009. 11. 26.
- 14) Teik-How Lim, Masumi Hidaka, Yoshimichi Nakatsu, Mutsuo Sekiguchi, Teruhisa Tsuzuki, Characterization of Mapo1-defective mutant that is unable to induce apoptosis triggered by alkylated DNA damage, 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009. 12. 09.
- 15) Masumi Hidaka, Kayoko Komori, Yasumitsu Takagi, Masayuki Sanada, Teik-How Lim, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki, Mutsuo Sekiguchi, MAPO1 plays a role in the induction of apoptosis to preserve genome integrity from environmental stress, 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009. 12. 10.
- 16) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 岡素雅子, 續輝久, 中別府雄作, 酸化的 DNA 損傷に起因する染色体変異とその抑制機構, 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009. 12. 10.
- 17) Teruhisa Tsuzuki, Jingshu Piao, Takuro Isoda, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Teruhisa Tsuzuki, Jingshu Piao, Takuro Isoda, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi

- 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.
- 25) 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, 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland, 2011, 8. 30.
- 26) Mizuki Ohno, Megumi Nakanishi, Teruhisa Tsuzuki, A study of radiation-induced oxidative DNA damage and its repair in mouse tissues, 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland, 2011, 8. 30.
- 27) 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 会大会, 京都, 2011. 9. 21.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) Teruhisa Tsuzuki, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of Mutyh-deficient mice: the effect of low-level exposure to KBrO₃, The 2nd 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.
- 31) 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, Kunihiko 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.
- 32) 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.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

平成 21-23 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：動物個体および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

遺伝毒性発がん物質の作用には閾値がないとされ、どのように微量であってもヒトに発がんリスクを負わせるものとして行政的な規制が行われている。しかし、ヒトには各種の生体防御機構があり、これらが低用量の遺伝毒性発がん物質の作用を抑制して「実質的な閾値」を形成する可能性が考えられる。トランスレージョン DNA 合成 (TLS) とは、DNA 損傷部位での DNA 合成の意味であり、染色体複製を補佐して細胞死を抑制し、突然変異、染色体異常の抑制に関与していると考えられている。遺伝毒性発がん物質に対する「実質的な閾値」の形成に TLS が貢献する可能性を検討するため、TLS に関わる DNA ポリメラーゼ (Pol) を特異的に不活化させたマウスおよびヒト細胞株を樹立し、その自然突然変異頻度および遺伝毒性発がん物質に対する感受性を検討した。特に DNA 損傷部位を乗り越えた後の DNA 鎖の伸長に関与することが示唆されている Pol κ と Pol ζ に注目して研究を行った。平成 21 年度は、Pol κ を特異的に不活化させたノックインマウスを樹立し、その自然突然変異頻度を検討した。12 週齢のマウスに関しては、肝臓、精巣ともに野生型マウスと変異頻度に差は認められなかった。平成 22 年度は、ヒトの Pol κ をノックアウト (KO) した細胞を樹立し、その致死感受性を野生型細胞と比較した。Pol κ KO 細胞は、過酸化水素に対して高い感受性を示し、酸化ストレスからの防御に貢献している可能性を示した。平成 23 年度は、ヒトの Pol ζ KO 細胞を樹立し、Pol ζ が臭素酸カリウムをはじめ多様な遺伝毒性発がん物質からの防御に関与していることを明らかにした。これらの研究成果に基づき、TLS が遺伝毒性発がん物質の「実質的な閾値形成」に貢献している可能性を考察した。

キーワード: 遺伝毒性発がん物質、閾値、トランスレージョン DNA 合成、DNA ポリメラーゼ、酸化ストレス

A. 研究目的

がんは「遺伝子の病気」と考えられ、複数の突然変異や染色体異常が起こることにより、正常な細胞ががん細胞へと変化すると考えられている。突然変異や染色体異常は、通常の DNA 複製や細胞分裂の過程でも起こるが、染色体 DNA が内因性、外因性の遺伝毒性物質に曝露されることにより、その頻度が高まる。内因性の遺伝毒性物質としては活性酸素や活性窒素を代表例としてあげることができる。外因性の遺伝毒性物質としては、たばこの煙に含まれる多環芳香族炭化水素やニトロサミン、焦げた食品中に含まれるヘテロサイクリックアミンなどが代表例としてあげられる。こうした DNA に反応して付加体を形成したり、DNA 鎖切断を起こすことにより突然変異や染色体異常を誘発する発がん物質を、トシキコロジーの分野では「遺伝毒性発がん物質」と呼ぶ。これに対し、ホルモン作用や細胞毒性などにより細胞増殖を高めることにより発がんを促進する物質を「非遺伝毒性発がん物質」と呼ぶ。

「遺伝毒性発がん物質」は、放射線と同様、DNA に作用するため、その変異誘発作用は「確率的事象」と考えられ、どのように低用量であってもヒトに発がんリスクを負わせるものと考えられている。したがって、化学物質の発がん作用に遺伝毒性（突然変異、染色体異常誘発性）が関与している場合には、一日許容摂取量（acceptable daily intake, ADI）は設定されず、食品添加物、農薬、動物用医薬品については、原則、禁止の措置が執られる。一方、「非遺伝毒性発がん物質」は、他の毒性物質と同様に、低用量域ではその作用が現れない「閾値」があり、閾値の範囲内であればヒトに発がんリスクを負わせることはないと考えられている。したがって、「非遺伝毒性発がん物質」については、動物実験の結果から無毒性量（non-observed-adverse-effect level, NOAEL）を導き、これを安全係数で除して、ADI を設定する。

しかし、ヒトを含む生物には、さまざま

な防御機構が備わっており、たとえ「遺伝毒性発がん物質」であっても、微量であれば、その作用を打ち消し、自然突然変異頻度あるいは自然発がんのレベルにまで遺伝毒性や発がん性を抑制する可能性が考えられる。生体防御機構としては、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-ハイロドキシグアニン（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（translesion DNA synthesis, TLS）、アポトーシスなどをあげること出来る。これらの機構が低用量の遺伝毒性を抑制し「実質的な閾値」を形成することが考えられる。

TLS とは、DNA の損傷部位での DNA 合成の意味であり、染色体複製を補佐して、遺伝毒性物質の変異作用、染色体異常誘発作用、細胞毒性からの防御に重要な役割を果たしていると考えられている。通常の染色体複製を担当する DNA ポリメラーゼ（Pol）（例えば Pol δ 、 ϵ ）は DNA 損傷部位で DNA 合成を停止するケースが多いので、ヒトの細胞には 10 種類以上の TLS に関わる Pol（これを TLS 型 Pol と呼ぶ）が常備されており、損傷の種類に応じてさまざまな TLS 型 Pol が損傷部位での短い DNA 合成に関与し、再び複製型の Pol と交換して、染色体全体の複製を完遂するものと考えられている（図 1）。

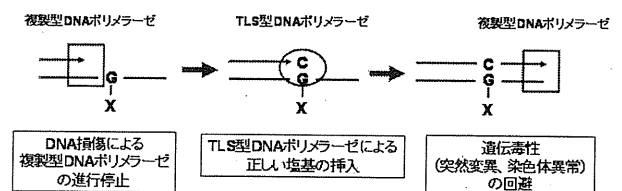


図 1 TLS による遺伝毒性の回避

本研究では、生体防御機構のうち、TLS に注目し、TLS に関わる DNA ポリメラーゼ（Pol）を不活化させた遺伝子改変マウス、遺伝子改変ヒト細胞を樹立することで、TLS が遺伝毒性発がん物質の「実質的な閾値」の形成機構に貢献している可能性を検討した。

B. 研究方法

1) Pol κ ノックイン (KI) マウスの樹立

マウス DNA Pol κ の活性中心の 2 アミノ酸、アスパラギン酸とグルタミン酸をそれぞれアラニンに置換した変異 Pol κ 遺伝子配列の一部、ネオマイシン耐性遺伝子および一対の loxP 配列を含むターゲティングベクターをマウス ES 細胞に導入して組換えを行った後、Cre /loxP 組換えによってネオマイシン耐性遺伝子を除去した。得られた遺伝子組換え体は、変異 Pol κ 遺伝子および 1 つの loxP 配列を持つ点のみ野生型と異なる (図 2)。

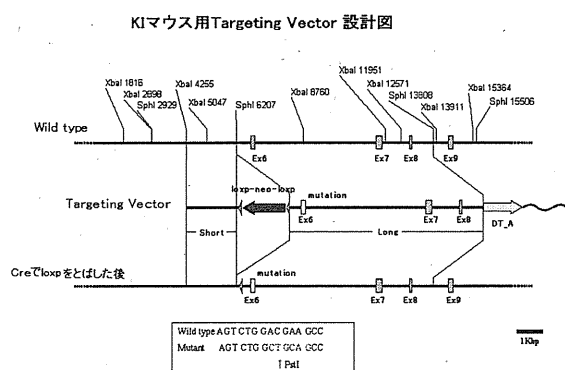


図 2 Pol κ KI マウスの樹立

作成した F1 マウスに変異検出用の *gpt* delta マウスを交配しダブルトランスジェニック動物を得た。その後、交配により *gpt* delta のホモバックグラウンドの Pol κ KI マウスを作出した。

2) 動物実験

12 週令の雄性 Pol κ (KI/KI) *gpt* delta マウスと Pol κ (wild) *gpt* delta マウス各 5 匹に 10 ml/kg b. w. DMSO を単回腹腔内投与した。動物は翌日屠殺し、剖検時に肝臓および精巣の凍結サンプルを採取した。

3) 変異解析用 DNA の抽出とファージ粒子の回収

肝臓および精巣から 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。

4) *gpt* 変異体頻度 (MF) の測定

ファージを大腸菌 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。

5) Spi⁻ 変異体頻度 (MF) の測定

ファージを P2 溶原菌である XL-1 Blue MRA P2 に感染させ、培地上に播種し P2 interference 耐性 (Spi⁻) となったプラークを検出した。検出したプラークの懸濁液を、XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA P2 および WL95 P2 をそれぞれ播種したプレートに滴下し、全てのプレートで明らかなプラークを形成する真の Spi⁻ 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 XL-1 Blue MRA に感染させ、培地上に播種し、形成されたプラーク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。Spi⁻ MF は、真の Spi⁻ 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。

6) ヒト Nalm-6 細胞の培養条件

培地は RPMI1640 培地を用いた。これに非働化处理 (56 度で 30 分間処理) したウシ血清 (50 μ g/ml カナマイシン添加) を 10% 添加し、 β -メルカプトエタノールを 50 μ M になるよう加えた。培養は CO₂ インキュベーターにて 37 度、5% 濃度の CO₂ 条件下で行った。

7) Polκノックアウト (KO) ヒト細胞株の樹立

Polκ KO ヒト細胞樹立のため、POLK 遺伝子のエクソン 6 を除くようなターゲティングベクターを作製した (図 3)。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 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 (hyg^r)、ピューロマイシン耐性 (puro^r) 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。

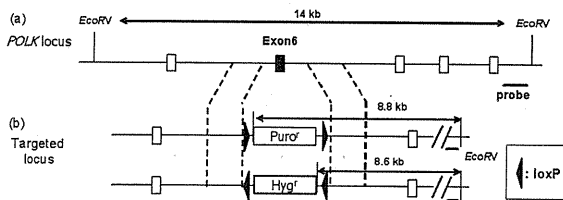


図 3 KO 細胞樹立用ターゲティングベクター (a) POLK のゲノム構造 (b) KO 細胞樹立用ターゲティングベクターの構造

8) Polζノックアウト ヒト細胞株の樹立
Polζ KO 細胞樹立のため、POLZ (REV3) 遺伝子のエクソン 5 を除くようなターゲティングベクターを作製した (図 4)。作製したターゲティングベクターは、Polκノックアウト細胞を樹立したのと同様の手法で Nalm-6 細胞へ導入し、ノックアウト細胞を樹立した。

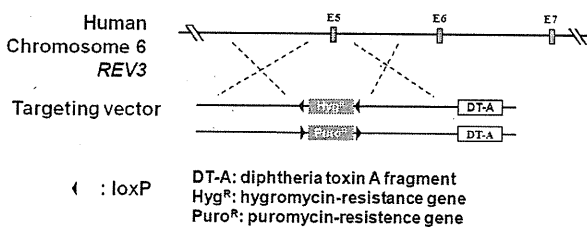


図 4 Polζ KO 細胞樹立用ターゲティングベクター

9) 薬剤処理による細胞毒性試験

Polκ KO 細胞：細胞毒性試験には、過酸化水素 (H₂O₂)、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。各培養細胞液 5 ml (5 × 10⁵ cells/ml) に H₂O₂ は 0、10、20、30 μM、BP は 0、0.8、1.6、2.4 μg/mL、MMC は 0、0.1、0.2、0.4 μg/mL になるよう添加した。また、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)。UV-C は 0、4、8、10、12、15 J/m² となるように照射した。薬剤処理時間は H₂O₂ は 1 時間、BP と MMC はインキュベーター内で軽く振湯しつつ 4 時間処理した。培養後、細胞は薬剤を含まない培地で洗い、薬剤を除去した。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。

Polζ KO 細胞：細胞毒性試験には、臭素酸カリウム (KBrO₃)、ベンツピレン ジオールエポキシド (BPDE)、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 × 10³ cells/well) を播種し、KBrO₃ 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。

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、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、実験動物あるいはヒト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) Pol κ KI *gpt* delta マウスの樹立

交配により、Pol κ KI *gpt* delta マウスを作出した。*gpt* delta ホモの Pol κ KI マウスの産仔は、雌雄ともに各遺伝子型の割合はメンデルの法則に従って得られた。Pol κ は、DNA 損傷部位の乗り越えに関わる TLS 型 DNA ポリメラーゼであり、その不活化により変異の蓄積のおそれがあるため、今後の系統維持にはヘテロ (Pol κ (KI/+)) の遺伝子型を持つ Pol κ KI *gpt* delta ホモマウスを使用する。

2) 肝臓および精巣の *gpt* 遺伝子自然突然変異解析

肝臓の *gpt* MF、精巣の *gpt* MF は、共に Pol κ (KI/KI) と野生型のあいだで有意な差は認められなかった。一方、Pol κ の不活化の有無に関わらず、肝臓に対して精巣で変異の頻度が低い傾向が認められた。

第1表 肝臓の *gpt* MF

	<i>gpt</i> MF (10^{-6})	<i>p</i> value
Pol κ (KI/KI)	6.6 ± 1.2	0.343
Wild	8.3 ± 8.9	

第2表 精巣の *gpt* MF

	<i>gpt</i> MF (10^{-6})	<i>p</i> value
Pol κ (KI/KI)	2.1 ± 1.2	0.238
Wild	2.8 ± 1.6	

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。

シーケンス解析により変異のスペクトラムを解析したが、遺伝子型の違いによるスペクトラムの違いは認められなかった。

3) 肝臓および精巣の Spi⁻変異解析

肝臓の Spi⁻ MF、精巣の Spi⁻ MF は、いずれもバックグラウンドレベルではあるが、共に Pol κ (KI/KI) で野生型に対し僅かに高い傾向が認められた。*gpt* MF 解析で認められたような、精巣と肝臓間での変異頻度の違いは認められなかった。

第4表 肝臓の Spi⁻ MF

	Spi ⁻ MF (10^{-6})	<i>p</i> value
Pol κ (KI/KI)	5.3 ± 0.8	0.038
Wild	4.0 ± 1.2	

第5表 精巣の Spi⁻ MF

	Spi ⁻ MF (10^{-6})	<i>p</i> value
Pol κ (KI/KI)	5.2 ± 1.6	0.076
Wild	4.0 ± 0.5	

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。

4) Pol κ KO ヒト細胞の選別と確認

薬剤耐性を示した細胞由来のゲノム DNA を *EcoRV* で切断し、Southern blot 法によりハイブリダイズするバンドの大きさが 8.6 kb (*hyg^r*) あるいは 8.8 kb (*puro^r*) になっているものを選択した (図 5a)。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。KO 細胞から Pol κ が発現していないことを Western blot 法にて確認した (図 5b)。

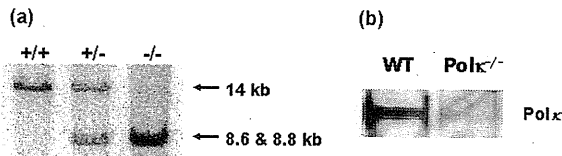


図5 (a) hPol κ KO細胞のサザン解析
+/+, *POLK* 野生型細胞; +/-, ヘテロ細胞;
-/-, KO細胞 サザン解析は、ゲノムDNA
を *EcoRV* で切断後、図1に示すprobeを
用いて行った (b) ウェスタン解析 WT, 野
生型細胞; -/-, KO細胞 hPol κ 精製標品
に対するポリクローナル抗体を用いた

5) Pol κ KOの化学物質に対する感受性

H₂O₂ に対して、野生型および KO 株は
30 μ M の用量で生存率が顕著に低下した。
また、KO 株では野生型と比べ有意に生存
率の低下が見られた。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が見られた
が、二株の間に感受性の差は見られなかつ
た。

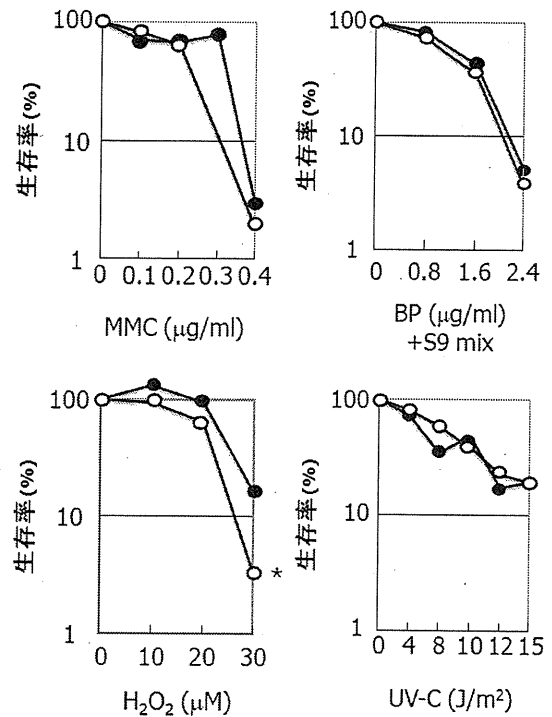


図6 野生型と Pol κ KO 細胞株の
MMC、BP (+S9 mix)、H₂O₂ および UV-C
に対する致死感受性の比較 (●), 野生型
細胞; (○), KO細胞

6) Pol κ KO ヒト細胞の選別と確認

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7A)。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7B)。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。

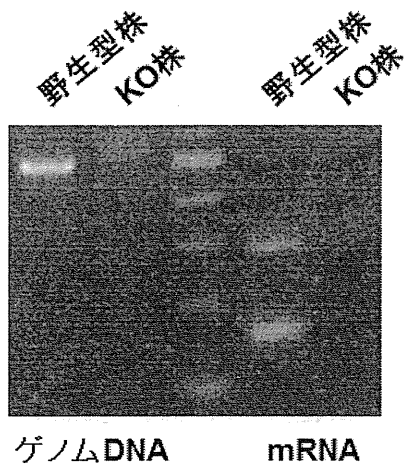


図 7 hPol ζ KO 細胞の PCR および RT-PCR 解析

7) Pol ζ KO 細胞の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 $_3$ 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 μ g/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。

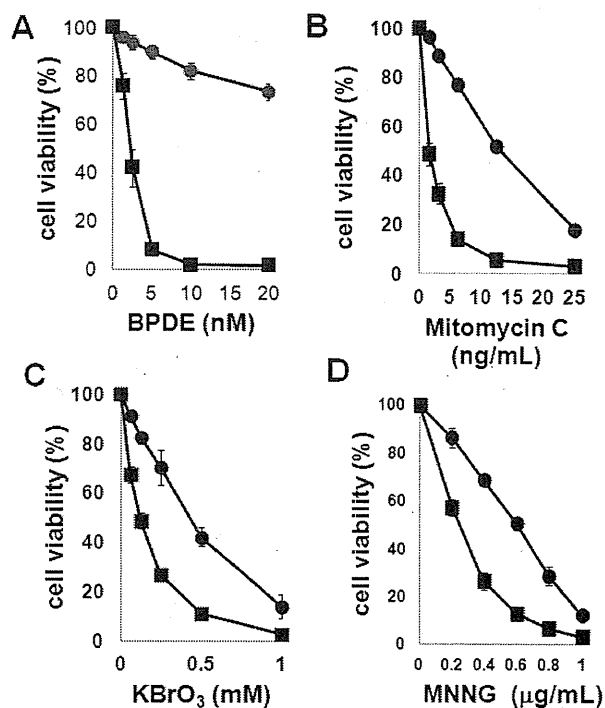


図 8 野生型と Pol ζ KO 細胞株の BPDE (A)、MMC (B)、KBrO $_3$ (C) および MNNG (D) に対する致死感受性の比較。 (●), 野生型細胞; (■), KO 細胞

D. 考 察

発がん物質は、DNA と反応して突然変異や染色体異常を起こす遺伝毒性発がん物質と、遺伝毒性以外のメカニズム（細胞増殖、ホルモン作用など）で発がん作用を示す非遺伝毒性物質発がん物質に分類され、遺伝毒性物質発がん物質には閾値がないとされている。本研究では、TLS に関わる Pol を不活化あるいは欠損したマウスとヒト細胞を作出し、遺伝毒性発がん物質の閾値形成における TLS の役割を検討した。

化合物に暴露された場合に、がんが発生する臓器には特異性があるため、トランスジェニック動物モデルの遺伝毒性試験を使用することで、様々な臓器における遺伝毒性を一個体の動物で検索することが出来る。Pol κ KO マウスでは、自然突然変異の頻度が加齢に伴い、腎臓、肝臓および肺で上昇していることが報告されている

(JNK. Stancel et al., DNA repair, 8, 1355-62, 2009)。本研究で用いた Pol κ ノ

ックインマウスの週令は12週であり、比較的若い。今後、加齢の影響とともに蓄積する変異の検出を検討する予定である。また、Pol κ KO細胞においてH₂O₂に対して感受性が増大していることから(図6)、酸化剤に対する感受性を検討する予定である。

ヒトNalm-6細胞は、遺伝子ターゲティング効率が高いことから、遺伝子欠損のほか、アミノ酸置換など、さまざまな遺伝的修飾を加えることができる。今回、Pol κ KO細胞とPol ζ KO細胞を樹立し、その遺伝毒性物質に対する感受性を検討した。その結果、Pol ζ KO細胞株がBPDE、MMC、KBrO₃、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(図8)。以上の結果は、Pol ζ が多様なDNA損傷のTLSに関与していることを示唆している。上述したようにPol κ KO株は、H₂O₂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。一方、Pol ζ KO細胞はH₂O₂に対して野生型細胞と同程度の感受性を示した。以上の結果は、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。H₂O₂とKBrO₃は、ともにDNA上に8-オキシグアニンを形成するが、H₂O₂が一本鎖DNA切断を誘発するのに対し、KBrO₃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。

KBrO₃とH₂O₂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

際的な閾値(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

遺伝毒性発がん物質の「実質的な閾値形成」におけるTLSの役割を明らかにするため、遺伝子変異検出用のレポーター遺伝子を具備したPol κ ノックインマウス、Pol κ KOヒト細胞株、Pol ζ KO細胞を樹立し、(1) Pol ζ が広範なDNA損傷のTLSに関与していること(2)酸化ストレスに基づくDNA損傷のTLSにはPol ζ のほかにPol κ が関与している可能性を示し、TLSが遺伝毒性発がん物質の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

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) RS. Galhardo, R. Do, M. Yamada, EC. Friedberg, PJ. Hastings, T. Nohmi and SM. Rosenberg, DinB upregulation is the sole of the SOS response in stress-induced mutagenesis in *Escherichia coli*, Genetics., 182, 55-68 (2009)
- 2) N. Niimi, A. Sassa, A. Katafuchi, P. Gruz, H. Fujimoto, RR. Bonala, F. Johnson, T. Ohta and T. Nohmi, The steric gate amino acid tyrosine 112 is required for efficient mismatched-primer extension by human DNA polymerase kappa, Biochemistry., 48, 4239-4246 (2009)
- 3) 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., 37, 4287-4295, (2009)
- 4) 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)
 - 5) DA. Eastmond, A. Hartwig, D. Anderson, WA. Anwar, MC. Cimino, I. Dobrev, GR. Douglas, T. Nohmi, DH. Phillips and C. Vickers, Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme, *Mutagenesis.*, 24, 431-349 (2009)
 - 6) AM. Salem, T. Nakao, M. Takuwa, N. Matoba, T. Tsuboi, H. Terato, K. Yamamoto, M. Yamada, T. Nohmi and H. Ide, Genetic analysis of repair and damage tolerance mechanisms for DNA-protein cross-links in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 191, 5657-5668 (2009)
 - 7) H. Fukuda, T. Takamura-Enya, Y. Masuda, T. Nohmi, C. Seki, K. Kamiya, T. Sugimura, C. Masutani, F. Hanaoka and H. Nakagama, Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) *in vitro*: REV1 inserts dC opposite the lesion, and DNA polymerase kappa potentially catalyzes extension reaction from the 3' -dC terminus, *J. Biol. Chem.*, 284, 25585-25592 (2009)
 - 8) Y. Totsuka, T. Higuchi, T. Imai, A. Nishikawa, T. Nohmi, T. Kato, S. Masuda, N. Kinase, K. Hiyoshi, S. Ogo, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Ichinose, N. Fukumori, M. Watanabe, T. Sugimura and K. Wakabayashi, Genotoxicity of nano/microparticles in *in vitro* micronuclei, *in vivo* comet and mutation assay systems, *Part. Fibre. Toxicol.*, 6, 23 (2009)
 - 9) 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 η and κ involved in erroneous incorporation of oxidized nucleotides, *Nucleic Acids Res.*, 38, 859-867 (2010)
 - 10) 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).
 - 11) N. Okudaira, Y. Uehara, K. Fujiwara, 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)
 - 12) 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)
 - 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 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., 723, 121-128 (2011)
- 21) T. Nohmi and M. Bignami, Nucleotide pool damage and its biological consequences, Mutat. Res., 703, 1-1 (2010)
- 23) 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)
- 24) 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)
- 25) K. Horibata, M. Saijo, M.N. Bay, L. Lan, I. Kuraoka, P.J. Brooks, M.

- Honma, T. Nohmi, A. Yasui and K. Tanaka, Mutant Cockayne syndrome group B protein inhibits repair of DNA topoisomerase I-DNA covalent complex, *Genes to Cells*, 16, 101-114 (2011)
- 26) A. Sassa, 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)
- 27) 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*, 807579 (2010)
- 28) 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)
- 29) N. Toyoda-Hokaiwado1, 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)
- 30) N. Toyoda-Hokaiwado1, 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)
- 31) 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)
- 32) 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 γ -induced genotoxicity in human cells, *Mutat. Res.*, 713, 56-63 (2011)
- 33) N. Koyama, M. Yasui, A. Kimura, S. Takami, T. Suzuki, K. Masumura, T. Nohmi, S. Masuda, N. Kinoue, T. Matsuda, T. Imai and M. Honma, Acrylamide genotoxicity in young versus adult *gpt* delta male rats, *Mutagenesis*, 26, 525-529 (2011)
- 34) 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)
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- ## 2. 学会発表
- 1) T. Nohmi, Possible mechanisms underlying practical threshold for genotoxic carcinogens, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
- 2) Y. Totsuka, T. Nohmi, T. Kato, S. Masuda, N. Kinoue, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Genotoxicity of nanoparticles in *in vitro* micronuclei, *in vivo* comet and mutation assay systems, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
- 3) N. Koyama, A. Kimura, M. Yasui, S. Takami, M. Takahashi, K. Inoue, M. Yoshida, T. Imal, M. Shibutani, T. Suzuki, A. Yamamoto, W. Kumita, K. Masumura, K. Horibata, S. Masuda, N. Kinoue, T. Matsuda, T. Nohmi, M. Honma, Child-adult differences in evaluation of *in vivo* genotoxicity of acrylamide, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
- 4) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, *In vivo* mutagenicity of structural isomers 2,4-DAT and 2,6-DAT in the target organ for carcinogenicity in F344 *gpt* delta transgenic rat, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
- 5) Y. Totsuka, T. Imai, A. Nishikawa, T. Nohmi, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Ichinose, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Genotoxicity of nanoparticles in *in vitro* micronuclei, *in vivo* comet and mutation assay systems, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 6) Y. Suzuki, T. Okamura, D. Hibi, Y. Ishii, M. Jin, T. Umemura, T. Nohmi, A. Nishikawa, Combined effects of food-derived CYP1A2 inducers on *in vivo* mutagenicity of IQ, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 7) T. Inoue, M. Tasaki, Y. Ishii, T. Okamura, Y. Suzuki, M. Jin, D. Hibi, T. Nohmi, T. Umemura, A. Nishikawa, Lack of *in vivo* mutagenicity and tumor-promotion activity in the livers of rats treated with tocotrienol, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 8) M. Yamada and T. Nohmi, Screening of endogenous mutagens using YG3206, modified Ames tester strain, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 9) N. Toyoda, T. Inoue, K. Masumura, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, The

- aromatic amine 2,4-DAT induced point mutations in the target organ of carcinogenicity in F344 *gpt* delta rat, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 10) T. Umemura, Y. Ishii, T. Inoue, M. Jin, Y. Suzuki, D. Hibi, Y. Kodama, T. Nohmi, A. Nishikawa, Facilitative effects of simultaneous administration of flumequine on *in vivo* mutagenicity of MeIQx, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 11) R. Ohta, H. Sui, T. Shiragiku, A. Akahori, M. Nakajima, H. Hayashi, K. Masumura, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 1) Distinguishable of hepatic carcinogens from a non-carcinogen, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
- 12) O. Tajima, S. Yamada, Y. Kawamura, H. Hayashi, T. Takayanagi, H. Hori, W. Fujii, K. Masumura, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 2) Evaluation of genotoxicity of aristolochic acid, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
- 13) T. Noguchi, T. Kamigaito, K. Narumi, R. Takashima, S. Hamada, H. Sanada, K. Masumura, M. Hasuko, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 3) Evaluation of genotoxicity of Nickel subsulfide by intratracheal instillation, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
- 14) H. Sui, K. Kawakami, N. Sakurai, H. Okutomi, R. Ohta and T. Nohmi, Further improvement of high-throughput fluctuation Ames test (Part V), The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
- 15) N. Koyama, A. Kimura, M. Yasui, S. Takami, M. Takahashi, K. Inoue, M. Yoshida, T. Imai, M. Shibutani, T. Suzuki, K. Masumura, S. Masuda, N. Kinoue, T. Matsuda, T. Nohmi and M. Honma, Difference between child-adult in evaluation of *in vivo* genotoxicity of acrylamide, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
- 16) Y. Matsumoto, Y. Totsuka, S. Masuda, T. Kato, T. Nohmi, S. Goto, T. Sugimura, K. Wakabayashi, *In vivo* genotoxicity induced by nanoparticles, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
- 17) H. Ide, A. Salem, T. Nakano, M. Takuwa, H. Terato, K. Yamamoto, M. Yamada and T. Nohmi, Genetic analysis of repair and damage tolerance mechanisms for DNA-protein crosslinks, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
- 18) P. Gruz, M. Takamune, M. Yamada and T. Nohmi, Detection of UV-mutagenesis in umuDC-deficient strain of Escherichia coli expressing human DNA polymerase η , The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)