

**研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法に関する研究**

研究代表者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

**研究要旨**

遺伝毒性試験は発がん性物質のスクリーニング試験であると同時に、その遺伝毒性メカニズムが、発がん性リスク評価の上で重要な情報となる。本研究では、OECD が提唱する「有害性転帰事象（AOP）」を取り入れた遺伝毒性評価ストラテジーと、追跡型試験系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。主な研究のテーマは、発がん AOP の分子初期事象である「化学物質 DNA 付加体 突然変異」のプロセスから（A）「化学物質 DNA 付加体」と、（B）「DNA 付加体 突然変異」を分離し、独立に定性、定量的に解析する試験系を構築すること。（C）発がん AOP からはずれるエピ遺伝毒性物質の検出系の開発することである。

DNA 付加体に関してはヘテロサイクリックアミン（HCA）である PhIP と IQ の修飾オリゴヌクレオチドの合成を行った。PhIP の付加体は dG の C8 位に PhIP のアミノ基が結合したものが知られており、その付加体を部位特異的に含むオリゴヌクレオチドの合成を試みた。得られた修飾オリゴヌクレオチドをキャピラリー電気泳動で解析を行ったところ、2 種類のピークが観察された。これはオリゴ内で PhIP の互変異体が存在していることを示しており、変異原性との関連に興味を持たれる。一方、IQ の DNA 付加体に関しては保護基（DMTr 基および TBDMS 基）の脱保護を行い、逆相 HPLC にて精製したところ、高い純度の IQ 付加体を得ることができた。

PhIP と IQ は dG の C8 位にバルキー DNA 付加体を形成し、さらにインターカレーションを引き起こす。このような DNA 付加体は、DNA 除去修復機構（NER）によって修復されると考えられている。NER を詳細に解析するため XPC および ERCC6 遺伝子のノックアウト細胞を作成した。これら細胞の DNA 修復効率は有意に減少していた。

職業性胆管がんの原因物質であることが示唆されているジクロロメタン付加体は、グルタチオン-S-転移酵素の代謝により生じた N2-GSH-Me-dG であることが明らかとなった。この付加体が C:G->T:A トランジクションを誘導していることが示唆された。

エピ変異原に関しては DNA methyltransferase (DNMT) 阻害剤に応答性を示したヒト DNMT 遺伝子形質転換酵母(ヒト DNMT 酵母)の凝集性を指標にその応答性を検討した。Histone deacetylase (HDAC) 阻害剤である Trichostatin A とアリザリンは、凝集促進作用と FLO1 の mRNA レベル上昇させ、本系は DNMT 阻害剤に加え、ヒストンを作用点とする化学物質についても、ヒト DNMT 酵母の凝集性を指標に検出できる可能性を示した。

## 研究分担者

|       |                                   |
|-------|-----------------------------------|
| 安井 学  | 国立医薬品食品衛生研究所<br>変異遺伝部 主任研究官       |
| 杉山圭一  | 国立医薬品食品衛生研究所<br>変異遺伝部 室長          |
| 戸塚ゆ加里 | 国立がん研究センター研究所<br>発がん・予防研究分野 ユニット長 |
| 高村岳樹  | 神奈川工科大学工学部<br>分子生物学研究室 教授         |
| 正田卓司  | 国立医薬品食品衛生研究所<br>有機化学部 主任研究官       |

## A. 研究目的

食品の安全性に対して、多くの国民が関心を寄せている今日、食品添加物や残留農薬等の食品中に含まれる微量の化学物質の安全性が問題となっている。多くの化学物質の毒性は、健康リスクを評価する場合、理論的、実証的研究から、これ以下であれば健康影響が見られないレベル、すなわち閾値がある用量反応モデルが用いられてきた。これにより一日摂取許容量(Acceptable Daily Intake; ADI)を定めることができる。しかしながら、その化学物質の発がん性が問題となり、さらに遺伝毒性が認められるとやっかいである。他の毒性と異なり遺伝毒性には閾値がないとされているため、摂取量をゼロにしない限り、健康リスクもゼロのならないとの論理から ADI を設定することができない。ここに遺伝毒性発がん物質のリスク管理の問題点がある。同様の問題は、福島第一原発事故からの低レベル放射線の発がんリスクの議論においても焦点となっている。我々は日常的に、食物を通して多くの発がん物質を摂取しており、また、太陽からの紫外線、自然環境からの放射線も先史からの発がん因子である。さらに、現代社会で生活する限り、工業製品等からの微量の発がん可能性物質の暴露を避けることはできない。現在必要なのは、食品中に含まれる化学物質の危険性とそのリスクを国民に対して合

理的、且つ高い透明性をもって、説明可能な評価方法と管理方法を確立することである。このための重要な研究は、リスクをもたらすハザードのメカニズムの解明と、定量化であると考え(Hazard Characterization)。

遺伝毒性試験は発がん性物質のスクリーニング試験であると同時に、発がん性が認められた場合には、その遺伝毒性メカニズムが安全性評価の上で重要な情報となる。また、遺伝毒性発がん物質のリスク評価においても、近年では、ある一定レベル以下のリスクであれば許容されるという考えが浸透しつつあるが、この場合でも、適切な遺伝毒性メカニズムと、定量評価による透明性の高い説明が求められている。これまでの一般的な遺伝毒性試験としてはエームス試験(バクテリア; 遺伝子変異)、染色体異常試験(哺乳類; 染色体構造異常)、小核試験(げっ歯類動物; 染色体構造および数的異常)が利用されてきた。これらの組み合わせ試験は、異なる生物種、複数のエンドポイントを用いることにより、様々なタイプの遺伝毒性物質を広範に検出するためにデザインされたものである。しかしながら、この結果から発がんに関連する遺伝毒性メカニズムの情報は得ることは困難であり、また、試験結果自体も発がん性との相関性が低い。本研究では、これまでの既成概念を破り、最新の情報と分子生物学的技術に基づく評価系を構築し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。

OECD では化学物質と生体(組織)の相互作用から個体での毒性発現を関連づけて説明する手法(Adverse Outcome Pathway; AOP)と、それに基づく統合的試験法と評価方法(Integrated Approaches to Testing and Assessment; IATA)を提唱し、化学物質の安全性評価の合理化と、実験動物削減を目指している。本研究では、発がんAOPの分子初期事象(Molecular Initial Event; MIE)である「化学物質 DNA 付加体 突然変異」に注目し、このMIEプロセスを追跡し、定性、定量的に解析する試験系を構築し、メカニズムと定量性に基づいた新たな遺伝毒性IATAを開

発することを目的とする。本研究では、1. DNA 付加体検出、2. 付加体合成、3. 遺伝子ターゲットによるゲノム中への付加体の導入、が技術の核心である。特に、3の技術に関しては、わずか1分子のDNA付加体をゲノム中に導入し、その結果生じる突然変異の定性・定量的に解析することができる。1分子のDNA損傷は究極的な低用量モデルであり、本試験系でDNA付加体が突然変異をもたらさなければ、そのDNA付加体(損傷)は閾値を持つか、閾値が無くとも突然変異を引き起こさないことを理論的に証明したことになる。

また、本研究班ではDNA付加体形成が認められず、発がんAOPのスキームに載らない非遺伝毒性発がん物質の評価法にも取り組んでいる。これら化学物質はDNAの一次構造に変化を与えず、がんや他の疾患を引き起こすエピ遺伝毒性物質と考えられる。エピ遺伝毒性物質に反応する新たなトランスジェニック生物を作成し、エピ遺伝毒性物質の評価系の開発も行った。

本研究班は上記の目的を達成するため、5名の分担研究者が以下の研究に取り組んだ。

#### 1) パルキーDNA付加体に関わるヌクレオチド除去修復遺伝子の破壊細胞の構築(安井):

これまで1分子のDNA付加体をゲノム中に導入し、その運命を定性・定量的に解析できるTATAM法の開発に成功した。このTATAMの系を用いてヘテロサイクリックアミン類(HCA)であるPhIP、MeIQ、Trp-P-1等の変異原性の解析を今後進める。HCAは、DNAと反応し、パルキーDNA付加体を形成させ、発がんに至らせる遺伝毒性発がん物質である。パルキーDNA付加体は、ヌクレオチド除去修復機構(NER)によってDNAから除去されることがよく知られている。NERは、大きく分けてグローバルゲノムNERと転写共役型NERの2種類がある。しかし、パルキーDNA付加体のほとんどは、そのグローバルゲノムNERが転写共役型NERのどちらに進むかは全く不明であり、HCAの発がん作用機序を理解するうえで大きな障害となっている。本研究では、グローバルゲノムNERのXPC遺伝子(XPCタンパク質)、

転写共役型NERのERCC6遺伝子(CSBタンパク質)が、その修復経路の必須遺伝子であることから、CRISPR/Cas9技術を用いることによってこれらの遺伝子のノックアウト(KO)あるいはノックイン(KI)細胞を構築し、パルキーDNA付加体のNER機構を解明する。

#### 2) エピ遺伝毒性物質の評価系の開発(杉山):

発がんメカニズムとして、近年エピジェネティックな変異の関与も指摘されている。エピ遺伝毒性物質のスクリーニング試験については、短期・長期に関わらず現時点では確立されていない。これまでエピ遺伝毒性の一つであるDNAメチル化阻害剤検出系を構築することを目的としてヒトDNA methyltransferase(DNMT)遺伝子形質転換酵母(ヒトDNMT酵母)を作出に成功し、DNMT阻害剤に対する応答性を検討してきた。本年度は、DNMT阻害剤以外の主要なエピ変異原となるヒストンに作用点を有する化学物質が凝集性に及ぼす影響を検討した。

#### 3) DNAアダクトの定性・定量評価とアダクトのカタログ化に関する研究(戸塚):

ジクロロメタン(DCM)やジクロロエタン(DCE)等のハロゲン系炭化水素は主に工業溶剤として幅広く使用されている。また、DCMおよび1,2-ジクロロプロパン(DCP)は、最近、職業性胆管がんの原因物質であることが示唆されているが、これらハロゲン系炭化水素と印刷業従事者で多発するヒト胆道がんとの関係は未だ良くわかっていない。これらハロゲン系炭化水素は代謝活性化を受け、がんの原因となるDNA付加体を形成することが予想される。本年度はこのDNA付加体の同定と、変異原性を解析する。

#### 4) DNAアダクトの合成と、ターゲットベクターへの導入に関する研究(高村):

ヒトが暴露する可能性のある変異・発がん性物質は様々である。焼肉などの加熱食品中に含まれるがん原性HCAの一つである2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP)は、エームス試験などバクテリアを用いる変異原性試験では、比較的低い変異原性

を示すが、ラットに対し大腸がんや乳がんを誘発することが知られている。また APC 遺伝子に変異を誘発することが明らかとなっている。PhIP の突然変異誘発能を TATAM 試験系で解析し、その変異原性を明らかにする目的で、PhIP 修飾オリゴヌクレオチドの合成を試みた。

#### 5)重要な DNA アダクトの合成に関する研究(正田):

生物は常に多種多様な化学物質にさらされており、それら化学物質が生体分子と結合することで、その生体分子の正常な機能は破壊される。DNA アダクトの生成機構をはじめ、その除去機構、除去後の修復機構などの詳細を明らかにすることは極めて重要である。安井らが開発した TATAM 法は、DNA 損傷と発がん性を定量的に解析できる手法である。これまで、HCA の 2-aminofluorene(9H-fluoren-2-amin)や MeIQx (3,8-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxalin-2-amine)に注目し、Buchwald-Hartwig 反応条件に THF を溶媒として、さらに microwave を用いることにより dG 位に対して導入することが可能であることを示した。その結果、既存の合成スキームに比べて2ステップ分の短縮が可能となった。本年度は本手法の有効性を確認するため、IQ (3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinolin-2-amine)の付加体合成(dG-C8-IQ)への検討を行った。そこで本研究では、TATAM 法に必要な DNA ア

### **B . 研究方法**

#### 1) パルキーDNA 付加体に関わるヌクレオチド除去修復遺伝子の破壊細胞の構築(安井):

NER に関与する XPC および ERCC の遺伝子を KO するために、その開始コドン部位をターゲットとして CRISPR/ Cas9 ベクター、そして、ネオマイシンおよびハイグロマイシン薬剤耐性遺伝子を含む各ターゲティングベクターを用意した。CRISPR/Cas9 ベクターと、薬剤耐性ターゲティングベクター2種を TSCER122 細胞(5 x 10<sup>6</sup> cells)に Neon Transfection System (1350 V, 10 mS, 3 pulses) を用いてコトランスフェクション

した。その細胞を 20 mL の RPMI 培地で 37 度で 48 時間培養した。細胞を適宜希釈し、様々な細胞濃度で、96 ウェルマイクロプレート上でさらに 14 日間培養した。その際、G418 (500 µg/mL) とハイグロマイシン (500 µg/mL) の両方を含む培地を用いた。CRISPR/Cas9 による標的配列での DNA 鎖切断と薬剤耐性遺伝子のターゲティングにより、開始コドン部位に耐性遺伝子が導入されているクローンは、その選択培地でコロニーを形成するため、そのクローン細胞についてジェノタイピングを行った。得られた細胞について、ウェスタンブロット解析や紫外線照射による感受性試験を行った。

ERCC6 の KI 実験については、ERCC6(CSB) を欠損する患者において、エキソン 5 で検出される変異(K337\*)を有する KI コンストラクトを作製した。

#### 2) エピ遺伝毒性物質の評価系の開発(杉山):

ヒト DNMT 遺伝子形質転換酵母の凝集性を利用したエピ遺伝毒性物質の評価系を作出した。各被検物質存在下もしくは非存在下にて 30 度で対数増殖期中期から定常期初期まで振盪培養を行い、凝集レベルを相対的凝集活性として測定した。相対的凝集活性(Relative flocculation activity)は、培養液中の透明領域の高さ(T)と培養液全体の高さ(C)を測定し、次式を用いて算出した。

$$\text{Relative flocculation activity} = 100 \times (T/C)$$

Histone deacetylase (HDAC) 阻害剤である Trichostatin A (TSA)、アリザリン、アントラセンについて検討を行った。ウェスタンブロットにより各 DNMT の発現を確認した。また、遺伝子の転写レベルを(RT)-PCR 解析により検証した。

#### 3) DNA アダクトの定性・定量評価とアダクトのカタログ化に関する研究(戸塚):

pFLAG-CTC ベクターにカナマイシン耐性遺伝子とヒト GSTT1cDNA を導入(pCTC-kanGST)したプラスミドを作成し、TA100 株に導入し、ヒト GSTT1 を導入(TA100-GST)エームス菌株を開発した。これら菌株を用いて、DCM、DCP の変異原性を測定した。変異スペクトルの解析はコロ

ニ-PCRにて変異標的部位を増幅し、ダイレクトシーケンス法により解析した。

バクテリアおよび生体試料からの付加体の解析は、ゲノムDNAを各種核酸分解酵素によりモノヌクレオシドまで分解し、質量分析器機により分析した。DCMのGSTT1の代謝により生成される、究極活性体(S-(acetoxymethyl)glutathione (GSCH<sub>2</sub>OAc))を既報に従って合成し、2'-dGと混合した。生成されるN<sub>2</sub>-GSH-Me-dGを質量分析器機により分析した。

#### 4) DNA アダクトの合成と、ターゲットベクターへの導入に関する研究(高村):

昨年度の方法ではオリゴヌクレオチドの合成を試みたが、目的とするオリゴヌクレオチドを合成することができなかったため、より慎重に各段階の合成方法の確認を行いながらPhIPの部位特異的修飾オリゴヌクレオチドの合成を行った。PhIPのdG-C8の付加体を有するオリゴヌクレオチドの合成には、使用していたアミダイトおよび修飾オリゴヌクレオチドの合成を行う企業の変更を行った。

#### 5)重要なDNAアダクトの合成に関する研究(正田):

TATAM法に必要なDNAアダクト含有オリゴDNAを供給するために、そのDNAアダクトであるdG-C8-IQの合成法の検討を試みた。前回の合成法の改良に加えて、粗生成物の保護基(DMT基およびTBDMS基)の脱保護と逆相HPLCによる精製法の改良を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究は多くは文献調査、バクテリア、酵母、哺乳類培養細胞による*in vitro*試験に基づくものであり、倫理上の問題はない。

## C. 研究結果

### 1)バルキーDNA付加体に関わるヌクレオチド除去修復遺伝子の破壊細胞の構築(安井):

CRISPR/Cas9によりXPC KO細胞の作成に成功した。紫外線照射による感受性を調べると、

XPC KO細胞は、野生株よりも非常に高い感受性を示し、細胞生存率が著しく低下した。一方、ERCC6 KO細胞は作成できなかった。しかしながら、エキソン5で検出される変異(K337\*)を導入したERCC6 KI細胞の作成に成功した。このERCC6 KI細胞について、紫外線照射による感受性試験を行ったところ、前述のXPC KO細胞ほどではないが、ERCC6 KI細胞は野生株よりも感受性を示すことが分かった。さらに、臭素酸カリウムを用いてコメットアッセイを実施した。臭素酸カリウムを処理した直後(0 min)は、野生株とERCC6 KI細胞のDNA損傷量(Tail(%))に差はなかったが、120 min後の野生株のDNA損傷量はERCC6 KI細胞よりも有意に減少することが分かった。

### 2)エピ遺伝毒性物質の評価系の開発(杉山):

HDAC阻害剤であるTSAは濃度(0-50 μM)依存的な凝集促進作用を示した。また、RT-PCR解析の結果、凝集性関連遺伝子FLO1の発現量も濃度依存的に誘導されていた。発がんプロモーション作用が懸念されるアリザリンも濃度(0-4.0 μM)依存的に凝集反応を促進した。一方、アリザリンの構造類縁体であるアントラセンにはその作用は無かった。アリザリンによるヒストンへの影響を検討した結果、アリザリン処理によりヒストンH3量が減少することが明らかとなった。また、コアヒストンH3量の減少により、核DNAは細胞内においてドット状から拡散状態となることが明らかとなった。

### 3)DNAアダクトの定性・定量評価とアダクトのカタログ化に関する研究(戸塚):

DCPは、TA100-GST株とそのコントロール菌において同様に濃度依存的に変異原性を示し、菌株による違いは観察されなかった。一方、DCMの変異原性は、TA100-GST株でTA100-pCTCに比べ顕著に増加し、菌株による違いが観察された。変異スペクトラムの解析ではDCPではC:G->T:Aトランジションが両菌株において優位であるのに対して、DCMではC:G->T:AトランジションはTA100-GSTを用いたときのみ優位

となった。DCM 由来の付加体(N2-GSH-Me-dG)の分析を行ったところ、両菌株からN2-GSH-Me-dG に相当するピークが観察された。付加体レベルを概算したところ、TA100-GST の方がTA100-pCTC よりも 10 倍程度多く存在していた。

#### 4) DNA アダクトの合成と、ターゲットベクターへの導入に関する研究(高村):

昨年度までの結果を参考に、dG の 8 位のプロモ体(8-Br-dG)誘導体の合成を行った。得られた付加体誘導体はオリゴヌクレオチド合成に必要な 5' 位のトリチル化反応を行った。これは 2,6 ルチジン / DMF 混合溶媒中、DIPEA 存在下でトリチルクロライドを 80 ° に加温処理することで得られた。最終的にアミダイト体はジクロロメタン溶媒中、ジイソプロピルアミノテトラゾリトを加え、N,N-tetraisopropyl phosphorodiamidate を滴下して反応を行った。得られたアミダイトはジクロロメタン / シクロヘキサン / トリエチルアミンを 0.5 : 0.5 : 0.005 の割合で混合した溶媒でカラムを行うことで、残存アミダイトのない目的化合物を得ることができた。得られたアミダイトは日本遺伝子研究所にて、オリゴヌクレオチドの合成を行った。オリゴヌクレオチドの合成には、脱保護中の修飾塩基の損傷を恐れて、0.25 mol/L の 2-メルカプトエタノール / アンモニア水溶液にて脱保護を行うこととした。アミダイト約 40mg から約 5 nmol の修飾オリゴヌクレオチドを合成することができた。オリゴヌクレオチドをキャピラリー電気泳動に供して純度を確かめたところ、2 種類のピークが観察されることがわかった。合成したオリゴが HPLC では単一ピークであるが、2 種類に分かれる例は過去に報告がなく、これは PhIP 付加体の特殊な例である。

#### 5)重要な DNA アダクトの合成に関する研究(正田):

前年度で検討した MeIQx 付加体 (dG-C8-MeIQx) の合成ルートを参考に IQ (3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinolin-2-amin) の付加体合成 (dG-C8-IQ) の検討を行った。反

応終了後、不溶な触媒を濾過し、溶媒を減圧留去し順相クロマトグラフィーにて精製を行ったが、大量の不純物が含まれていた。この不純物は xantphos の酸化体や触媒由来の dba などであると考えられた。そこで合成ルートの再検討を行った。予備的検討により、DMTr 基をトリクロロ酢酸で処理した後に、トリエチルアミンで一旦中和し、そのままフッ化物を添加することで脱シリル化することが可能であった。そこで Buchwald-Hartwig 反応を複数回繰り返して得た粗生成物 5 約 300mg をまとめて反応にかけ、粗生成物を得た。逆相 HPLC で精製を行った。目的の画分を凍結乾燥しこれを NMR にて構造を確認したところ、dG-C<sup>8</sup>-IQ であることを確認した。

#### **D. 考 察**

遺伝毒性試験は発がん性物質のスクリーニング試験であると同時に、その遺伝毒性メカニズムが、発がん性リスク評価の上で重要な情報となる。本研究では、OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカニズムを関連づけて説明する手法 (AOP)」を取り入れた新たな遺伝毒性評価ストラテジーと、階層からなる追跡型試験系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。主な研究のテーマは、発がんの AOP の分子初期事象である「化学物質 DNA 付加体 突然変異」のプロセスから、(A)「化学物質 DNA 付加体」と、(B)「DNA 付加体 突然変異」を分離し、独立に定性、定量的に解析する試験系を構築すること。(C)発がん AOP からはずれるエピ遺伝毒性物質の検出系の開発である。

(A)の「化学物質 DNA 付加体」のに関しては、国立がんセンターの戸塚が、化学物質に曝露された生物個体 DNA をマスマスペクトルメトリーで解析し、化学物質によって形成される DNA 付加体の解析と、主要な DNA 付加体のカタログ化を目指している。今年度は DCM と DCP に着目した。DCM と DCP を扱う印刷業従事者で、胆道がんが多発することが報告されて以来、その

遺伝毒性の有無と強さが問題となっている。DCM と DCP の変異原性発現に薬物代謝が寄与するかどうかを、ヒト GSTT1 を発現させた TA100-GST 株検討結果、DCP の変異原性は、代謝の影響がなかったのに対して、DCM の変異原性は、TA100-GST 株で顕著に増加した。このことから、GSTT1 は DCM の代謝活性化に寄与するものの、DCP の代謝活性化には寄与しないことが示唆された。DCP では C:G->T:A トランジションが両菌株において優位であるのに対して、DCM では C:G->T:A トランジションは TA100-GST を用いたときにのみ優位となった。このことから、DCM は GSTT1 の代謝により N2-GSH-Me-dG を生成し、これが C:G->T:A トランジションを誘導していることが示唆された。また、質量分析の結果、DCM 由来の付加体は dG の 2 位の環外アミノ基に結合した N2-GSH-Me-dG であることが示された。この付加体を含むオリゴヌクレオチドを化学合成し、TATAM 法により解析することにより、より詳細な突然変異メカニズムを解析できる。

(B) の「DNA 付加体 突然変異」に研究に関しては、国立衛研の安井らが開発した TATAM 法による解析が重要である。将来的には高村、正田によって化学合成された HCA 付加体オリゴヌクレオチドの変異原性を TATAM によって解析することを予定している。HCA は dG の C8 位にアミノ基を介して付加体を作り、さらに dG:dC 間でインターカレーションし安定化すると考えられている。このような DNA 付加体は著しく DNA の高次構造をゆがめるため、NER のターゲットとなる。NER にはグローバルゲノム NER と転写共役型 NER がある。本研究では、グローバルゲノム NER の XPC 遺伝子 (XPC タンパク質)、転写共役型 NER の ERCC6 遺伝子 (CSB タンパク質) の KO、あるいは KI 細胞を構築し、ヘテロサイクリックアミン付加体の NER 修復経路を詳細に検討することを目的とする。XPC KO 細胞は、CRISPR/Cas9 系と薬剤耐性遺伝子を含むター

ゲティングベクターを用いて、59%という非常に高効率なターゲティングにより分離することができたが、ERCC6 の KO 細胞を分離することができなかった。ERCC6 遺伝子の開始コドン領域が、CRISPR/Cas9 による切断に対して耐性を示すような立体構造、または DNA 配列を持つなどの可能性が考えられる。そこで、ERCC6 に関しては欠損患者で検出されている変異を導入した KI 細胞を分離した。

本研究で分離できた XPC KO 細胞は、紫外線照射に非常に感受性が高く、良好な表現型を得られたが、ERCC6 KI 細胞については、顕著ではなかった。そこで、ERCC6 (CSB) 欠損患者の細胞は、紫外線照射だけでなく酸化反応にも感受性を示すことが報告されているため酸化的 DNA 損傷を引き起こす臭素酸カリウムを用いたアルカリコメットアッセイを実施した。野生株の細胞は、臭素酸カリウムを処理した直後 (0 min) から 120 min の間に DNA 損傷量の減少が観察されたが、ERCC6 KI 細胞は、時間経過に伴う DNA 損傷量に変化が無く、その間に DNA 修復が進んでいないと推測され、酸化 DNA 損傷に対して CSB が関与していると考えられた。これにより、ERCC6 KI 細胞の良好な表現型を確認できた。これらの細胞を用いることにより、これまで不明だったヘテロサイクリックアミン DNA 付加体の NER 機構の詳細が明らかになると期待できる。

神奈川工科大学の高村と、国立衛研の正田は同定された DNA 付加体を化学合成し、オリゴヌクレオチド化する研究を行っている。合成に成功した DNA 付加体オリゴヌクレオチドは安井らによって TATAM 解析することになっている。高村は、HCA の一つである PhIP 付加体を含む修飾オリゴヌクレオチドの合成を試みた。得られた HPLC 精製後の PhIP 修飾オリゴヌクレオチドを MALDI-TOF・MS による分析を行ったところ、それぞれ m/z7141、6934 と理論値どおりであった。他の分子イオンピークは観察されないため、きわめて純度は高いと思われる。

る。一方、修飾オリゴヌクレオチドをキャピラリー電気泳動で解析を行ったところ、2種類のピークが観察されることがわかった。合成したオリゴがHPLCでは単一ピークであるが、2種類に分かれる例は過去に報告がなく、これはPhIP付加体の特殊な例である。PhIPはグアニジン骨格部位の互変異性がよく知られており、代謝産物のグルクロン酸抱合においても、その互変異性が知られている。興味深いことに、この互変異体の存在割合はオリゴヌクレオチドによって異なっており、オリゴ1では互変異化合物の両者はほぼ同量存在しているがオリゴ2ではどちらかの異性体が他より2~3倍程度多くなっている。こうした異性体の存在が、ポリメラーゼの伸長反応にどのような影響を及ぼすかは興味深く、今後の検討課題である。

正田はHCAオリゴDNAを供給するために、DNAアダクトのホスホロアミダイト体を合成することを最終目標として、そのキーとなる反応であるBuchwald-Hartwig反応に着目し、その反応条件の検討を行った。前年度はMeIQxを用い、本年度はIQを用いて検討したところ、IQの場合、順相条件での精製作業で目的化合物を単離することができなかった。反応系中にはxantphosやその酸化体、触媒に含まれるdbaなどが含まれており、それらを取り除くことが出来なかったとかがえられる。そこで合成ルートを再考し、逆相HPLCを使って化合物を単離することとしたところ、約30mgの化合物を得ることに成功した。今後、ホスホロアミダイト体の合成を進め、オリゴDNAの合成を行う予定である。

(C)の発がんAOPからはずれるエピ遺伝毒性物質の検出系の開発に関しては、国立衛研の杉山が、ヒトDNMT酵母が示す凝集反応を指標としたDNAメチル化阻害作用をもつ薬剤の検出に成功し、本年度は同酵母が特異的に示す表現型「凝集性」に対するDNMT阻害剤以外のエピ変異原に対する応答性を検討した。その結果、HDAC阻害剤であるTSAにより凝集性および

FLO1発現が濃度依存的に誘導されることが明らかとなった。HDACだけでなくヒストンメチル化酵素など各種ヒストン修飾酵素は、ヒトおよび酵母においてホモログが存在する。以上の結果は、ヒトDNMT酵母とコントロール株の凝集性を指標にヒストン修飾酵素阻害剤の検出が可能であることを示唆している。

アリザリンは、アカネ色素に含まれる成分の一つであり、発がんプロモーション作用が指摘されている。発がんプロモーション作用はDNAの一次構造変化を伴わないとされており、エピ変異原のカテゴリーに含まれる可能性がある。アリザリンが示すヒトDNMT酵母とコントロール株を用いた凝集試験、およびFLO1発現レベルへの影響は、TSAと類似しており、ヒストンへの影響が推測された。さらに、アリザリン処理によりコアヒストンのH3がバルクレベルで減少し、DNAのDAPI染色像異常(拡散した核)が確認された事実は、アリザリンがヒストンを作用点にもつエピ変異原である可能性を強く示すものである。本研究から、アリザリンの凝集誘発性はTSAと異なりコントロール株においてより好感度に検出される可能性が認められた。この違いはエピ変異原としての作用メカニズムの違いを反映している可能性がある。この違いは、酵母凝集性を指標としてエピ変異原検出した際、その作用機序を推測する上で貴重な知見となる可能性がある。

## E. 結論

本研究では、新たな遺伝毒性発がん物質の評価法として、化学物質と生体分子の相互作用から、個体・集団レベルでの毒性発現(AOP)までの一連の生物学的な反応を関連づけ、それに基づく統合的試験法と評価方法(IATA)を開発し、化学物質の安全性評価の科学的合理化と、実験動物削減を目指す。化学物質による発がんのAOPの分子初期事象(MIE)は、遺伝毒性・変異原性で有り、このプロセスは「化学物質 DNA付加体(損傷) 突然変異」に集約される(図1)。



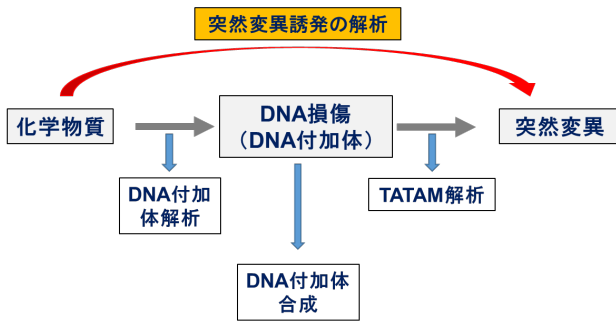


図 1

一方、この仮定された MIE が定性・定量的に正当であるかを検証する必要があると考えられる。そのためには「化学物質→突然変異を」のデータを取得、解析する必要がある(図 1)。今後、実際の *in vitro* 試験、もしくは文献情報により対象とする化学物質の遺伝子突然変異誘発能に関する情報を収集する。最終的にはこれら研究結果と、化学物質構造から、*in silico* で化学物質の変異原性を予測するモデルを開発し、試験の迅速化、3R に貢献する。

*In silico* 予測に関しては、昨年ヒト 8-オキシグアニン(8-oxoG)DNA の TATAM による突然変異解析からグリコシラーゼ(hOGG1)が関与する修復モデルを構築した。hOGG1 は 8-oxoG を特異的に除去する一方、無傷な塩基は無視することが知られている。しかしながら、8-oxoG の位置や数が塩基の変異頻度を变化させるが、その機構が明らかでない。そこで Schrödinger 方程式  $H\psi = E\psi$  中のイオン化ポテンシャル  $H$  と重なり積分  $S$  を第一原理的に決定した値を使用する事で精度を維持しながらも分子中の各電子の空間分布を高速に演算できる高速化量子分子動力学法を用い、無傷の 10塩基対 DNA(約 640 原子)に対して、8-oxoG を 1 分子、2 分子含む 10 塩基対 DNA の hOGG1(約 4800 原子)に対する構造親和性を評価した。hOGG1 の DNA の探索初期のモデルには 2I5w.pdb を用いた。8-oxoG-リボース間の N-グリコシル結合の回転や切断に対する触媒機能を持つアミノ酸 Lys249 は、無傷 DNA のグアニンより 8-oxoG を 1 分子、2 分子含む DNA の方がより近い配置を取った。また 8-oxoG を 2 分子含む

無傷 DNA のグアニンより 8-oxoG を 1 分子、2 分子含む DNA の方がより近い配置を取った。また 8-oxoG を 2 分子含む

DNA は Gly245 のカルボニル基酸素と反発し 8-oxoG を 1 分子含む DNA よりも hOGG1 から離れる配置を取る様子が見られた(図 2)。TATAM 法で得られた実際の突然変異スペクトラムとを比較してモデルの検証を進めている。

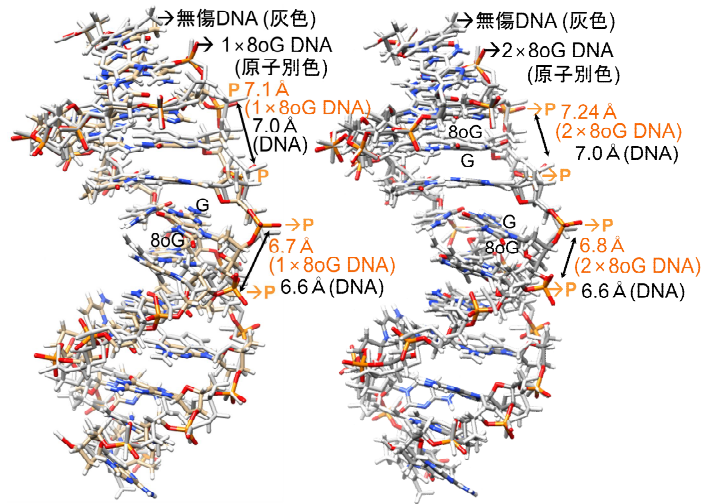


図 2

また、この MIE を化学物質の遺伝毒性評価の新たなスキームにする(図 3)。

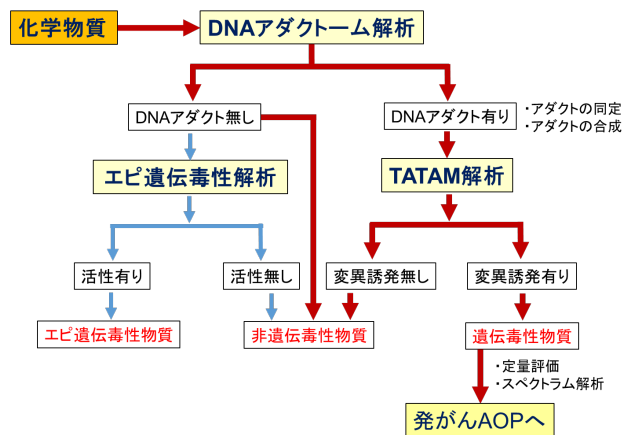


図 3

DNA 付加体解析により、特定な付加体が検出されなければ、非遺伝毒性物質とすることができる。この場合、エピ遺伝毒性の可能性が残されているので、本研究班で開発中のエピ遺伝毒性解析を行い、非遺伝毒性発がん物質の可能性を検討する。一方、DNA 付加体が検出されたからといっ

ても、変異原性があるわけでは無い。修復や、損傷乗り越え DNA 合成がおきれば突然変異は起こさない。おそらく、大部分の DNA 付加体は修復されるが、その一部は修復されず、突然変異を引き起こすものと考えられる。TATAM 法はこれら性質を定性・定量的に解析できる。十分に特徴的な突然変異がみとめられた場合、本化学物質は遺伝毒性物質（遺伝毒性変異原物質）と判断され、次の発がん AOP のスキームに載る。また、TATAM 法で明らかな突然変異誘発が認められない場合、本化学物質は遺伝毒性非変異原物質（非遺伝毒性物質）とし、発がんの懸念は無いと判断することができる。

このような分子レベルで可視化された変異メカニズムの情報の蓄積が、最終的に *in silico* で化学物質の変異原性・発がん性の定量的予測を実現させるものとする。変異原性は化学物質にあるのではなく、化学物質によって引き起こされる DNA 付加体（損傷）にある。この当たり前の考え方は、遺伝毒性（変異原性）の評価の合理化にも繋がると考える。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

誌上発表

1. Sassa A, Kanemaru Y, Kamoshita N, Honma M, Yasui M.; Mutagenic consequences of cytosine alterations site-specifically embedded in the human genome. *Genes and Environment* 38:17 (2016)
2. Sassa A, Çağlayan M, Rodriguez Y, Beard WA, Wilson SH, Nohmi T, Honma M, Yasui M; Impact of Ribonucleotide Backbone on Translesion Synthesis and Repair of 7,8-Dihydro-8-oxoguanine. *J. Biol. Chem.* 291, 24314-24323 (2016)

3. Sugiyama, K., Furusawa, H., Shimizu, M., Grúz, P. and Honma, M: Epigenetic mutagen as histone modulator can be detected by yeast flocculation. *Mutagenesis* 31, 687-693 (2016)
4. 本間正充；ゲノム上に起きた DNA 損傷の運命をターゲットミュータジェネシスにより追跡する．日本がん疫学・分子疫学研究会 News Letter 114, 11-12 (2016)
5. 本間正充；食品添加物等の遺伝毒性リスク評価法．食品衛生学雑誌 57 (1), J12-J15 (2016)

学会発表

1. 本間正充；ゲノム上に起きた DNA 損傷の運命をターゲットミュータジェネシスにより追跡する 平成 28 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム、東京 (2016.5)
6. 佐々彰, Caglayan M, Beard WA, Wilson SH, 能美健彦, 本間正充, 安井学；DNA 中の酸化リボヌクレオチドが DNA 複製および修復機構に及ぼす影響 日本環境変異原学会第 45 回大会、つくば (2016 年 11 月)
7. Suzuki A, Bonaand A, Sassa A, Yasui M, Miyamoto A, Honma M； Theoretical Comparison of Conformational Affinity between hOOG1 DNA Repair Protein and DNA Holding Different Number of 8-OxoG. CBI 学会 2016 年大会，東京 (2016.11)
8. 鈴木愛, Bonnaud P, 佐々彰, 安井学, 宮本明, 本間正充；8-oxoG 付加数の異なる DNA に対する修復タンパク hOGG1 の高速化量子分子動力学法による親和性評価 日本環境変異原学会第 45 回大会、つくば (2016 年 11 月)
9. 杉山圭一、古沢博子、清水雅富、グリーブ ピーター、本間正充：エピ変異原検出系としてのヒト DNMT 酵母の有用性の検討 日

- 本環境変異原学会第 45 回大会, つくば (2016, 11) .
10. グルーズ ピーター、清水雅富、山田雅巳、杉山圭一、本間正充 : Ames テスター改変株を用いた過酸化脂質誘発性 GC 塩基置換に対する Y ファミリー DNA ポリメラーゼの役割 日本環境変異原学会第 45 回大会つくば (2016, 11) .
  11. 杉山圭一、古沢博子、清水雅富、グルーズ ピーター、本間正充 : DNA メチル化酵素阻害剤応答性凝集酵母に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の影響 第 89 回日本生化学会大会、仙台 (2016, 9) .
  12. Sugiyama, K., Furusawa, H., Shimizu, M., Grúz, P. and Honma, M: Establishment of a universal detection system for epimutagen using yeast carrying human DNA methyltransferase genes, European Environmental Mutagenesis and Genomics Society Annual Meeting 2016 (コペンハーゲン・デンマーク、2016, 8).
  13. Totsuka Y, Lin Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Matsushima Y, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) 50th Anniversary Conference IARC (リヨン・フランス、2016, 6)
  14. 戸塚ゆ加里、林 櫻松、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、松島芳隆、中釜 斉 : DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する 第 75 回日本癌学会学術総会 (横浜 2016 年 10 月)
  15. 戸塚ゆ加里 : ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析の統合による発がん要因の探索 第 59 回日本放射線影響学会. (広島 2016 年 10 月)
  16. 前迫裕也、善家 茜、古川英作、加藤 護、椎崎一宏、中釜 斉、戸塚ゆ加里 : 職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析) 日本環境変異原学会第 45 回大会つくば (2016, 11)
  17. 戸塚ゆ加里、善家 茜、古川 英作、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、中釜 斉 : 次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索 日本環境変異原学会第 45 回大会つくば (2016, 11)
  18. 高村 岳樹、村上 湖都美、小笠原 楓、益谷 美都子ポリ (ADP - リボース)加水分解産物を用いた新規な DNA 損傷活性測定法の開発 日本環境変異原学会第 45 回大会つくば (2016, 11)
  19. 森 みずき、伊藤 早紀、長谷川 一貴、佐藤 匠、高村 岳樹 エチジウムプロマイド類縁体の変異原性及び構造活性相関 日本環境変異原学会第 45 回大会つくば (2016, 11)
  - 20.

**H . 知的財産権の出願・登録状況**  
特になし

