

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

分担研究課題名：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

研究分担者： 戸塚ゆ加里 国立がん研究センター研究所 発がん・予防研究分野 ユニット長

研究要旨

ジクロロメタン (DCM) および 1,2-ジクロロプロパン(1,2-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。これらハロゲン系炭化水素の代謝活性化にはグルタチオン-S-転移酵素(GSTT1)が関与することが報告されているが、これら化学物質の GSTT1 による代謝と印刷業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。本研究では、GSTT1 を導入した *Salmonella typhimurium* TA100(TA100-GST) を用いて、DCM および DCP の変異原性に対する GSTT1 の影響を調べた。その結果、DCM および 1,2-DCP の変異原性は、いずれの菌株を用いた場合でも両化学物質の濃度依存的に復帰変異コロニー数の上昇が観察された。一方、DCM の変異原性は、TA100-GST 株で TA100-pCTC に比べ顕著に増加したが、1,2-DCP ではそのような菌株による違いは観察されなかった。変異スペクトラムの解析結果では、1,2-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。さらに、DCM 由来の付加体である N2-GSH-Me-dG を測定したところ、TA100-pCTC に比べ TA100-GST で約 10 倍程度に増加していた。これらのことから、GSTT1 は DCM の代謝活性化に寄与しており、TA100-GST 株では DCM の暴露により N2-GSH-Me-dG が生成され、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。しかしながら、GSTT1 は 1,2-DCP の代謝活性化には寄与しないことが示唆された。

キーワード: ハロゲン系炭化水素、発がん性、突然変異スペクトラム

A . 研究目的

ジクロロメタンやジクロロエタン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、ジクロロメタンおよび 1,2-ジクロロプロパン(1,2-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。また、ハロゲン系炭化水素の代謝活性化

にはグルタチオン-S-転移酵素(GSTT1)が関与することが報告されているが、これら化学物質の GSTT1 による代謝と印刷業者で多発するヒト胆道がんとの関係についても未だ良くわかっていない。本研究では、GSTT1 を導入した *Salmonella typhimurium* TA100(TA100-GST)を用いて、DCM および DCP の変異原性に対する GSTT1 の影響を調べた。

B . 研究方法

1. DCM および 1,2-DCP の変異原性発生へのグルタチオン-S-転移酵素(GSTT1)の関与

ヒト GSTT1 を導入した菌株を以下の方法で作成した。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。pCTC-kanGST を Hanahan 法で調整した LB5000(制限酵素欠損株)コンピテントセルに導入し、プラスミドを回収後、TA100 株に導入した(TA100-GST)。TA100-GST に対応するコントロールとしては、ベクターのみを導入した TA100-pCTC を作成し、これ以降の実験に用いた。ヒト GSTT1 の発現誘導のため、IPTG を含む培地で全培養を行った。これら菌株を用いて、DCM, 1,2-DCP の変異原性を測定した。DCM および 1,2-DCP は難溶性かつ揮発性が高いので、バクテリアへの暴露は気相により行った。具体的には、TA100-pCTC および TA100-GST を最小培地に播種したのち、蓋を外した状態でラッピーバックの中央に入れた。その両端にペーパーを敷き、DCM 及び 1,2-DCP を適量添加した後にシーラーで密閉した。曝露 2 時間後にラッピーバックからプレートを取り出し 37 48 時間培養した。変異スペクトルの解析はコロニー-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。

2. N2-GSH-Me-dG の分析

DCM の GSTT1 の代謝により生成される、究極活性体(S-(acetoxymethyl)glutathione (GSCH₂OAc)) を既報に従って合成し、2'-dG と混合した。生成される N₂-GSH-Me-dG を質量分析器機により分析した。

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。

(倫理面への配慮)

今年度の研究には該当しないが、本研究で行う

動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C . 研究結果

1. DCM および 1,2-DCP の変異原性発生へのグルタチオン-S-転移酵素(GSTT1)の関与

DCM および 1,2-DCP の変異原性発現に GSTT1 が寄与するかどうかを、ヒト GSTT1 を発現させた TA100-GST 株とそのコントロールである TA100-pCTC を用いて検討した。その結果を図 1 及び 2 に示す。1,2-DCP の変異原性は、いずれの菌株を用いた場合でも両化学物質の濃度依存的に復帰変異コロニー数の上昇が観察され、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。このことから、GSTT1 は DCM の代謝活性化に寄与するものの、1,2-DCP の代謝活性化には寄与しないことが示唆された。次に、変異スペクトラムの解析を行った。その結果を図 3 に示す。1,2-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。このことから、TA100-GST 株では DCM の暴露により N₂-GSH-Me-dG が生成され、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。

2. N2-GSH-Me-dG の分析

TA100-pCTC および TA100-GST に DCM を暴露させ、ゲノム DNA 中に存在する 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おり、TA100-GST で DCM の変異原性が上昇した結果を支持するものとなった(図 4)。

D . 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 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、2016年6月)
2. 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）
3. 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）
4. 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）第45回日本環境変異原学会（つくば、2016年11月）
5. 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 第45回日本環境変異原学会（つくば、2016年11月）

E . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

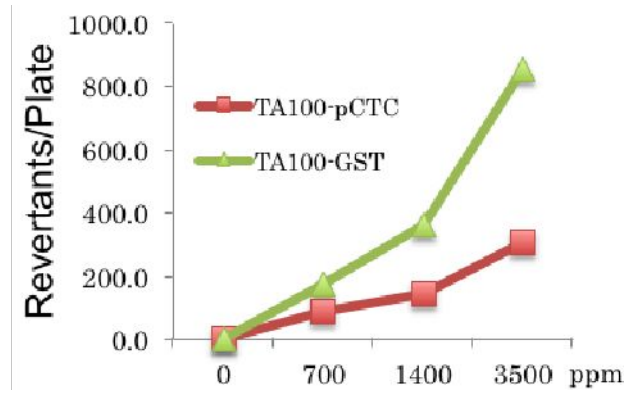


図1 DCMの変異原性発生へのGSTT1の影響

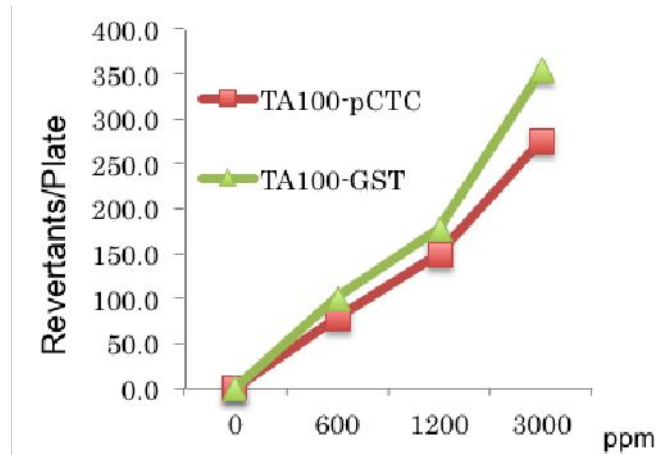


図2 1,2-DCPの変異原性発生へのGSTT1の影響

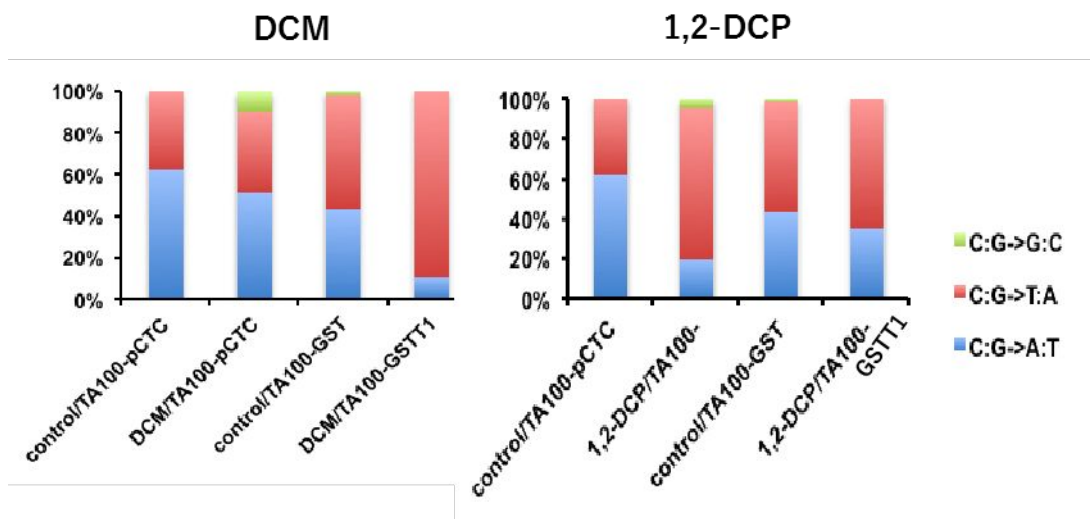


図3 DCM, 1,2-DCPの暴露により観察された変異スペクトラム

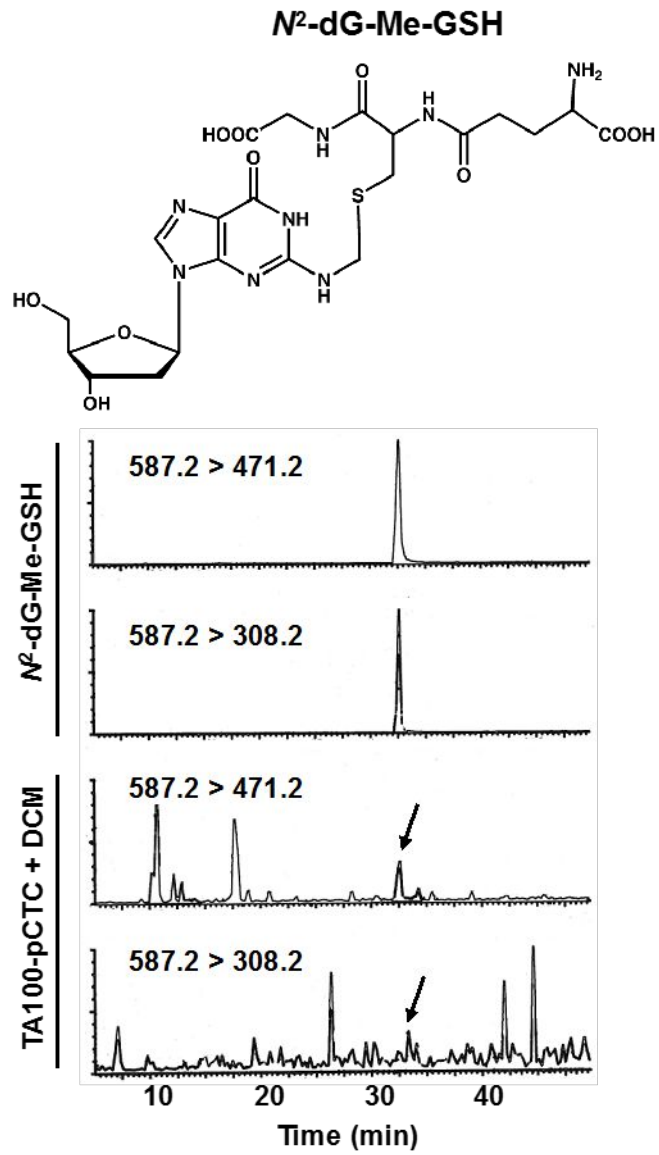


図4 DCM 暴露 TA100-pCTC に検出された N2-GSH-Me-dG

