

厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総合研究報告書

食品中遺伝毒性物質の「事実上の閾値」形成における DNA ポリメラーゼ ζ
(ゼータ)の関与

研究代表者 石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官

研究要旨

本研究では、ミスマッチ末端からの伸長反応を行うと考えられているポリメラーゼ ζ (Pol ζ)の複製忠実度を低下させた Pol ζ KI *gpt delta* マウスを用いて、食品中化学物質の突然変異誘発性及び「事実上の閾値」形成における Pol ζ の関与を検討した。平成 27 年度は陽性対照として benzo[a]pyrene (BaP)を、平成 28 年度は食品中化学物質として estragole (ES) 及び 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline (IQ) を被験物質とした。用量設定試験から各被験物質について低用量、中間用量及び高用量を設定し、Pol ζ KI *gpt delta* マウス及び *gpt delta* マウスにそれぞれ投与した。解析の結果、BaP では Pol ζ KI *gpt delta* マウスの肺における *gpt* 変異体頻度 (MFs) が *gpt delta* マウスに比して有意な高値を示し、Pol ζ KI *gpt delta* マウスでは G:C 塩基対の変異の増加に加えて、連続した 2 塩基または 1 塩基をまたいだ 2 塩基の特徴的な complex 変異が高頻度に認められた。このことから、Pol ζ が BaP のグアニン塩基の損傷に対する乗り越え複製とミスマッチ末端からの伸長反応を行うことが示唆された。ES では、肝臓における *gpt* MFs が両遺伝子型ともに 200 mg/kg 群で有意に上昇し、G:C 塩基対における塩基置換の顕著な増加が認められたものの、遺伝子型間に差は認められなかった。しかしながら、Pol ζ KI *gpt delta* マウスでは特徴的な complex 変異の頻度が有意に上昇したことから、Pol ζ が ES によるグアニンの損傷によって生じたミスマッチ末端からの伸長反応に寄与するものと考えられた。IQ では、肝臓における *gpt* MFs が両遺伝子型とも 300 ppm 群で上昇し、G:C-T:A transversion の増加が認められたものの、遺伝子型間に差は認められなかったことから、Pol ζ は IQ による DNA 損傷の乗り越え複製やミスマッチ末端からの伸長反応に寄与しない可能性が考えられた。以上より、Pol ζ の働きには DNA 損傷に対する構造特異性があることが示唆された。また、本実験条件下において ES 及び IQ の「事実上の閾値」形成への Pol ζ の関与は明らかにならなかった。

A. 研究目的

遺伝毒性発がん物質は DNA を損傷することから「閾値」は存在しない。しかしながら、生体にはこれらに対する防御機構が存在しており、暴露量が極めて低い場合には「事実上の閾値」が形成されと考えられている¹⁾。食品中には調理過程で非意図的

に生成又は混入する遺伝毒性物質が存在することから、このような遺伝毒性物質の低用量暴露時のヒトリスクを考える上で、「事実上の閾値」の生物学的意義を理解することは重要である。

ポリメラーゼ (Pol) は 1 本鎖の核酸を鋳型として相補的な塩基配列をもつ DNA 鎖を

合成する酵素である。鋳型 DNA に損傷が生じた場合、複製型 DNA Pol は損傷を乗り越えられずに複製が停止するが、Y-family ポリメラーゼは損傷塩基に対し塩基を挿入し損傷を乗り越えることが可能である。しかし、その忠実度の低さから損傷塩基の対にはしばしば誤った塩基が挿入され、ミスマッチ末端が形成される。さらに、この形成されたミスマッチ末端からの伸長反応が停止すると細胞死（アポトーシス）が誘導されるが、伸長反応が進み複製が完了すると変異が固定される。本研究で注目した Pol ζ は、損傷乗り越え複製に加え、形成されたミスマッチ末端からの伸長反応を行うことが報告されている²⁾。それ故、Pol ζ はミスマッチ末端が形成された細胞の細胞死か変異誘発かを決定づけるポリメラーゼと考えられ、「事実上の閾値」形成への関与も疑われる。実際、Pol ζ の触媒サブユニットである Rev3 遺伝子を欠損した酵母やアンチセンス RNA を導入したヒト細胞では、UV 照射による突然変異誘発性が低下することが知られている³⁾。また、マウスでは Rev3 遺伝子の欠損は胎生致死となるが、B cell 特異的に Rev3 遺伝子を欠損したマウスでは自然発生性の突然変異が減少すること、B cell 特異的に Pol ζ の 2610 番目のロイシンをフェニルアラニンに置換することで活性を増大したノックインマウスではそれらの変異が増加することが報告されている⁴⁾。しかしながら、化学物質が誘発する突然変異への *in vivo* における Pol ζ の関与は知られていない。

本研究では、能美らが樹立した Pol ζ KI *gpt delta* マウスを用いて、食品中化学物質の突然変異誘発性及び「事実上の閾値」

形成における Pol ζ の関与を検討した。Pol ζ KI *gpt delta* マウスは、Pol ζ の 2610 番目のロイシンをメチオニンに置換することで Pol ζ の複製忠実度が低下している。また、このマウスの 17 番染色体にはそれぞれ約 80 コピーの EG10 DNA が挿入されており、*gpt* 遺伝子をレポーターとする突然変異の検出が可能であることから⁵⁾、Pol ζ の遺伝子改変の影響を *gpt* アッセイにより評価することができる。平成 27 年度は、Pol ζ の複製忠実度を低下させたヒト細胞で変異頻度の増加が認められた⁶⁾ benzo[a]pyrene (BaP) を、平成 28 年度は、食品中化学物質の中からヘテロサイクリックアミンの一つである 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) と estragole (ES) を被験物質として、これら遺伝毒性物質の突然変異誘発性と「事実上の閾値」形成への Pol ζ の寄与を検討した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

BaP は和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した ES は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。IQ は Toronto Research Chemicals, Inc.（カナダ）から購入した。

B-2. 動物実験操作

B-2-1. BaP の用量設定試験

動物は当研究所で系統維持している C57BL/6J *gpt delta* マウスを実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明 / 12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は

透明なポリカーボネート製箱型ケージに 3 又は 5 匹ずつ収納し，床敷は三共ラボサービス社（東京）のソフトチップを用い，週 2 回交換を行った．雄性 6 週齢の *gpt delta* マウス 18 匹を各群 3 匹に配し，対照群を含む 6 群を設けた．対象群には溶媒である tricapriline を，その他の 5 群には BaP をそれぞれ 0.02, 0.2, 2, 20 及び 200 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した．試験期間中，飲水及び飼料の交換は週 1 回，一般状態観察を連日実施した．体重は開始から試験終了までは毎週 1 回測定した．動物は BaP 投与後 31 日目にイソフルラン麻酔下にて放血致死させ，肺及び肝臓を採取し，重量を測定した．肺の右葉及び肝臓の外側左葉を 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し，残りは *gpt assay* のサンプルとして液体窒素により凍結し，-80°C で保存した．

B-2-2. Pol ζ K1 *gpt delta* マウスを用いた BaP の評価

動物は雄性 7 週齢の C57BL/6 系 Pol ζ K1 *gpt delta* マウス及び *gpt delta* マウス各 20 匹を日本エスエルシー株式会社（静岡）より購入した．飼育条件は B-2-1 に記載する．各遺伝子型マウス 20 匹を各群 5 匹に配し，対照群と低用量群，中間用量群及び高用量群の計 4 群を設けた．用量設定試験の結果に基づいて，対象群には溶媒である tricapriline を，低用量群，中間用量群，高用量群には BaP をそれぞれ 40, 80, 160 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した．試験期間中，飲水及び飼料の交換は週 1 回，一般状態観察を連日実施した．体重は開始から試験終了までは毎週 1 回測定した．動物は投与後 31 日目にイソフルラン麻酔下

にて放血致死させ，肺及び肝臓を採取し，重量を測定した．肺の右葉及び肝臓の外側左葉を 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し，残りは *gpt assay* のサンプルとして液体窒素により凍結し，-80°C で保存した．

B-2-3. ES の用量設定試験

動物は当研究所で系統維持している C57BL/6J *gpt delta* マウスを実験に供した．飼育条件は B-2-1 に記載する．雌性 6 週齢の *gpt delta* マウス 18 匹を各群 3 匹に配し，対照群を含む計 6 群を設けた．対象群には溶媒であるコーン油を，その他の 5 群には ES をそれぞれ 0.02, 0.2, 2, 20 及び 200 mg/kg 体重の用量で 28 日間強制経口投与した．試験期間中，飲水及び飼料の交換は週 1 回，一般状態観察を連日実施した．体重は開始から試験終了までは毎週 1 回測定した．最終投与後，3 日間の休薬期間を設け，動物は ES の投与開始から 31 日目にイソフルラン麻酔下にて放血致死させ，肝臓を採取し，重量を測定した．肝臓の外側左葉を 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し，残りは *gpt assay* のサンプルとして液体窒素により凍結し，-80°C で保存した．

B-2-4. Pol ζ K1 *gpt delta* マウスを用いた ES の評価

動物は雌性 6 週齢の C57BL/6 系 Pol ζ K1 *gpt delta* マウス及び *gpt delta* マウス各 20 匹を日本エスエルシー株式会社（静岡）より購入した．飼育条件は B-2-1 に記載する．各遺伝子型マウス 20 匹を各群 5 匹に配し，対照群と低用量群，中間用量群及び高用量群の計 4 群を設けた．用量設定試験の結果に基づいて，低用量群，中間用量群及

び高用量群には ES をそれぞれ 12.5, 50 及び 200 mg/kg 体重の用量で 28 日間強制経口投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施した。体重は開始から試験終了までは毎週 1 回測定した。最終投与後、3 日間の休薬期間を設け、動物は ES の投与開始から 31 日目にイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、肝臓を採取し、重量を測定した。肝臓の外側左葉を 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、残りは *gpt* assay のサンプルとして液体窒素により凍結し、-80°C で保存した。

B-2-5. IQ の用量設定試験

動物は当研究所で系統維持している C57BL/6J *gpt* delta マウスを実験に供した。動物の飼育条件は B-2-1 に記す。雄性 6 週齢の *gpt* delta マウス 18 匹を各群 3 匹に配し、対照群を含む計 6 群を設けた。IQ はそれぞれ 0.03, 0.3, 3, 30 及び 300 ppm の濃度で粉餌に混じり、28 日間投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施した。体重は開始から試験終了までは毎週 1 回測定した。3 日間の休薬期間を設け、動物は IQ の投与開始から 31 日目にイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、肝臓を採取し、重量を測定した。肝臓の外側左葉を 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、残りは *gpt* assay のサンプルとして液体窒素により凍結し、-80°C で保存した。

B-2-6. Pol ζ K1 *gpt* delta マウスを用いた IQ の評価

動物は雄性 6 週齢の C57BL/6 系 Pol ζ K1 *gpt* delta マウス及び *gpt* delta マウス各

20 匹を日本エスエルシー株式会社より購入した。動物の飼育条件は B-2-1 に記す。各遺伝子型マウス 20 匹を各群 5 匹に配し、対照群と低用量群、中間用量群及び高用量群の計 4 群を設けた。用量設定試験の結果に基づいて、低用量群、中間用量群及び高用量群には IQ を 75, 150 及び 300 ppm の濃度で粉餌に混じり 28 日間投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施した。体重は開始から試験終了までは毎週 1 回測定した。3 日間の休薬期間を設け、動物は IQ の投与開始から 31 日目にイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、肝臓を採取し、重量を測定した。肝臓の外側左葉を 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、残りは *gpt* assay のサンプルとして液体窒素により凍結し、-80°C で保存した。

B-3 *in vivo* 変異原性の検索

gpt assay では回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。また、ファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 遺伝子変異体頻度 (MFs) を算出した。また、6-TG と Cm に耐性となったコ

口ニーは Thermo Fisher Scientific 社製 3730xl DNA Analyzer にて *gpt* 遺伝子の塩基配列解析を行い、変異部位を同定した。

(統計学的処理方法)

体重、臓器重量、*gpt* MFs 及び各変異の特異的頻度の統計学的処理は、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較検定により行った。また、遺伝子型間の比較には Tukey の多重比較を用い、有意水準は 5%未満とした。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練者が実施し、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルラン麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。実験動物に関しては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組み換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

C. 研究結果

C-1. BaP の用量設定試験

試験期間中、一般状態観察及び体重の推移において投与に起因する変化は認められなかった。最終体重と肺及び肝重量を Table 1 に示す。肺の実重量及び相対重量は 200

mg/kg 投与群において高値を示したものの有意な差は認められなかった。また、いずれの群においても投与に伴う組織学的変化は認められなかった。

gpt assay の結果を Figure 1 に示す。*gpt* 変異体頻度 (MFs) は 200 mg/kg 群 (20.64 ± 8.75 , $p < 0.01$) において対照群 (0.69 ± 0.29) に比して顕著に上昇した。一方、20 mg/kg 群以下で変化は認められなかった。

C-2. Pol ζ KI *gpt* delta マウスを用いた BaP の評価

投与開始 1 週目において、Pol ζ KI *gpt* delta マウスの 80 及び 160 mg/kg 群において各 1 例死亡が認められた。その他の動物では、一般状態観察及び体重の推移において両遺伝子型とも投与に起因する変化は認められなかった。最終体重と肺及び肝重量を Table 2 に示す。投与に伴う肺及び肝重量の変化はいずれの遺伝子型においても認められなかった。

肺における *gpt* assay の結果を Figure 2 に示す。*gpt* delta マウスにおいて、*gpt* MFs は 40 mg/kg 群で変化は認められず、80 mg/kg 群 (1.92 ± 0.84) で上昇傾向が認められ、160 mg/kg 群 (3.73 ± 1.59 , $p < 0.05$) で対照群 (0.59 ± 0.22) に比して有意な上昇が認められた。Pol ζ KI *gpt* delta マウスでは、40 mg/kg 群で変化は認められず、80 mg/kg 群 (2.26 ± 1.05) で上昇傾向が認められ、160 mg/kg 群 (11.70 ± 6.58 , $p < 0.05$) で対照群 (1.05 ± 0.82) に比して有意に増加した。両遺伝子型を比較した結果、160 mg/kg 群において Pol ζ KI *gpt* delta マウスは *gpt* delta マウスに比して 3 倍以上の有意な高値 ($p < 0.05$) を示した。一方、上昇

傾向が認められた 80 mg/kg 及びその他の群で遺伝子型間に差は認められなかった。

gpt 変異体の変異スペクトラム解析の結果を Figure 3 に示す。*gpt delta* マウスの 80 mg/kg 群では G:C-T:A transversion (0.72 ± 0.55) の頻度が対照群 (0.17 ± 0.20) に比して上昇傾向を示した。160 mg/kg 群では, G:C-C:G transversion (0.79 ± 0.30 , $p < 0.05$) の頻度が対照群 (0.03 ± 0.06) に比して有意に上昇し, G:C-T:A transversion (0.93 ± 0.63), G:C-A:T transition (0.57 ± 0.18), single base deletion (0.26 ± 0.30) 及び complex 変異 (0.32 ± 0.22) の頻度は対照群 (0.17 ± 0.20 , 0.14 ± 0.21 , 0.05 ± 0.07 及び 0) に比して上昇傾向を示した。また, Pol ζ KI *gpt delta* マウスの 80 mg/kg 群では G:C-T:A transversion (0.67 ± 0.84) の頻度が対照群 (0.31 ± 0.42) に比して上昇傾向を示した。160 mg/kg 群では β :C-T:A transversion (4.57 ± 3.76 , $p < 0.05$), G:C-C:G transversion (0.72 ± 0.57 , $p < 0.05$), G:C-A:T transition (1.39 ± 0.90 , $p < 0.01$), single base deletion (1.46 ± 0.94 , $p < 0.05$) 及び complex 変異 (2.28 ± 2.02 , $p < 0.05$) の頻度が対照群 (0.31 ± 0.42 , 0.12 ± 0.18 , 0.32 ± 0.32 , 0.08 ± 0.11 及び 0.08 ± 0.11) に比して有意に上昇した。両遺伝子型を比較した結果, Pol ζ KI *gpt delta* マウスの 160 mg/kg 群では *gpt delta* マウスに比して single base deletion 及び complex 変異の頻度が有意な高値 ($p < 0.05$) を示し β :C-T:A transversion 及び G:C-A:T transition の頻度は明らかな高値を示した。一方, *gpt* MFs の上昇傾向が認められた 80 mg/kg 群を含め, その他の群では遺伝子型

間に差はみとめられなかった。

対照群及び 160 mg/kg 群で認められた complex 変異の詳細を Table 3 に示す。*gpt delta* マウスの 160 mg/kg 群では計 3 例だったのに対し, Pol ζ KI *gpt delta* マウスでは計 26 例認められ, そのほとんどは連続した 2 塩基 (61.5%) または 1 塩基をまたいだ 2 塩基の変異 (26.9%) であった。また, Pol ζ KI *gpt delta* マウスで認められたこれら complex 変異 26 例のうち 20 例は 3' 末端側がグアニンで, 残りは 5' 末端側がシトシンであった。同様の変異は Pol ζ KI *gpt delta* マウスの対照群においても 3 例認められたのに対し, *gpt delta* マウスの対照群では認められなかった。

C-3. ES の用量設定試験

試験期間中, 一般状態観察及び体重の推移において投与に起因する変化は認められなかった。最終体重と肝及び腎重量を Table 4 に示す。いずれの用量においても投与による変化は認められなかった。病理組織学的検索の結果, 200 mg/kg 群では肝細胞の有糸分裂像と辺縁部における肝細胞肥大, 単細胞壊死及び卵円形細胞の過形成が認められた。20 mg/kg 群以下では投与に伴う組織学的変化は認められなかった。

gpt assay の結果を Figure 4 に示す。*gpt* MFs は 200 mg/kg 群 (2.58 ± 1.10 , $p < 0.01$) で対照群 (0.39 ± 0.30) に比して有意に上昇した。一方, 20 mg/kg 群以下で変化は認められなかった。

C-4. Pol ζ KI *gpt delta* マウスを用いた ES の評価

試験期間中, 一般状態観察及び体重の推

移において投与に起因する変化は認められなかった。最終体重と肝重量を Table 5 に示す。gpt delta マウスにおいて肝臓の相対重量は 200 mg/kg 投与群において有意な高値($p<0.01$)を示した。Pol ζ KI gpt delta マウスでは 50 mg/kg 投与群において肝臓の相対重量の有意な低値($p<0.05$)が認められた。病理組織学的検索の結果、200 mg/kg 投与群では肝細胞の分裂像、卵円形細胞の過形成が認められ、炎症細胞の集簇が散見されたものの、これらの変化に遺伝子型間の差は認められなかった。

肝臓における gpt assay の結果を Figure 5 に示す。gpt delta マウスにおいて、gpt MFs は 50 mg/kg 群まで変化は認められず、200 mg/kg 群 (2.65 ± 0.51 , $p<0.01$) で対照群 (0.82 ± 0.45) に比して有意に増加した。Pol ζ KI gpt delta マウスでは、50 mg/kg 群まで変化は認められず、200 mg/kg 群 (3.25 ± 1.01 , $p<0.01$) で対照群 (0.54 ± 0.34) に比して有意に増加した。両遺伝子型を比較した結果、200 mg/kg 群において Pol ζ KI gpt delta マウスは gpt delta マウスに比して高値を示したものの、有意な差は認められなかった。

gpt 変異体の変異スペクトラム解析の結果を Figure 6 に示す。gpt delta マウスの 200 mg/kg 群では G:C-T:A transversion (1.01 ± 0.34 , $p<0.01$) 及び A:T-T:A transversion (0.23 ± 0.14 , $p<0.05$) の頻度が対照群 (0.20 ± 0.26 及び 0.02 ± 0.05) に比して有意に上昇し、G:C-A:T transition (0.58 ± 0.38) の頻度は対照群 (0.24 ± 0.27) に比して上昇傾向を示した。また、Pol ζ KI gpt delta マウスの 200 mg/kg 群では G:C-T:A transversion (1.13 ± 0.54 ,

$p<0.01$), G:C-C:G transversion (0.40 ± 0.19 , $p<0.01$) 及び complex 変異 (0.45 ± 0.22) の頻度が対照群 (0.14 ± 0.22 , 0 及び 0) に比して有意に上昇し、G:C-A:T transition (0.51 ± 0.48) 及び single base deletion (0.47 ± 0.60) の頻度が対照群 (0.17 ± 0.14 及び 0.06 ± 0.14) に比して上昇傾向を示した。両遺伝子型を比較した結果、いずれの変異についても遺伝子型間に有意な差は認められなかったものの、Pol ζ KI gpt delta マウスの 200 mg/kg 群では complex 変異の頻度が gpt delta マウスに比して上昇傾向を示した。

対照群及び 200 mg/kg 群で認められた complex 変異の詳細を Table 6 に示す。同様の変異は gpt delta マウスの 200 mg/kg 群では計 4 例認められたのに対し、Pol ζ KI gpt delta マウスでは計 11 例認められ、そのほとんどは連続した 2 塩基または 1 塩基をまたいだ 2 塩基の変異であった。また、認められたこれら complex 変異計 15 例のうち 14 例は 3' 末端側がグアニンであった。同様の変異は両遺伝子型とも対照群では認められなかった。

C-5. IQ の用量設定試験

試験期間中、一般状態観察及び体重の推移において投与に起因する変化は認められなかった。最終体重と肝重量を Table 7 に示す。最終体重、肝臓の実重量及び相対重量は 300 ppm 投与群において低値を示した。また、いずれの群においても投与に伴う組織学的変化は認められなかった。

gpt assay の結果を Figure 7 に示す。gpt MFs は 300 ppm 投与群 (1.38 ± 1.34) において対照群 (0.36 ± 0.19) に比して顕著に

上昇した。一方、30 ppm以下の群で変化は認められなかった。

C-6. Pol ζ KI *gpt* delta マウスを用いた IQ の評価

試験期間中、一般状態観察及び体重の推移において投与に起因する変化は認められなかった。最終体重と肝重量を Table 8 に示す。*gpt* delta マウスの 300 ppm 群では最終体重の低値が認められ、Pol ζ KI *gpt* delta マウスでは有意な低値 ($p < 0.01$) を示した。同群では Pol ζ KI *gpt* delta マウスにおいて肝実重量及び相対重量の低値が、*gpt* delta マウスにおいて有意な低値 ($p < 0.01$) が認められたが、遺伝子型間に差は認められなかった。また、いずれの群においても投与に伴う組織学的変化は認められなかった。

肝臓における *gpt* assay の結果を Figure 8 に示す。*gpt* delta マウスにおいて、*gpt* MFs は 300 ppm 群 (2.00 ± 0.67) で対照群 (0.79 ± 0.75) に比して上昇傾向が認められた。Pol ζ KI *gpt* delta マウスでも同様に、300 ppm 群 (2.19 ± 1.11) で、対照群 (1.20 ± 0.50) に比して上昇傾向が認められた。遺伝子型を比較した結果、すべての用量において差は認められなかった。

gpt 変異体の変異スペクトラム解析の結果を Figure 9 に示す。*gpt* delta マウス及び Pol ζ KI *gpt* delta マウスともに 300 ppm 群では G:C-T:A transversion 及び complex 変異の頻度の上昇傾向が認められたものの、遺伝子型間に差は認められなかった。

D. 考察

D-1. BaP の突然変異誘発性における Pol ζ

の寄与

BaP の用量設定試験では、200 mg/kg 群の肺において *gpt* MFs の顕著な上昇が認められたのに対し、20 mg/kg 以下の群で変化は認められなかったことから、本試験で使用する低用量、中間用量及び高用量は、それぞれ 40、80 及び 160 mg/kg に設定した。

本試験では、Pol ζ KI *gpt* delta マウスの 80 及び 160 mg/kg 群において各 1 例ずつ途中死亡が認められたものの、同群におけるその他のマウスで体重の変化及び一般状態の悪化は認められなかったことから、偶発的に生じたものと考えられた。

肺における *gpt* assay の結果 Pol ζ KI *gpt* delta マウスの 160 mg/kg 群では *gpt* MFs の顕著な上昇が認められ、*gpt* delta マウスに比べ約 3 倍の上昇が認められた。変異スペクトラム解析の結果、Pol ζ KI *gpt* delta マウスの 160 mg/kg 群では G:C 塩基対における塩基置換と欠失変異の頻度の増加が確認された。このことから、同群における *gpt* MFs の増加は、BaP によるグアニン塩基の損傷に対して複製忠実度が低下した Pol ζ が乗り越え複製を行ったことで生じたものと考えられた。また、同群では特徴的に連続した 2 塩基又は 1 塩基を挟んだ 2 塩基の complex 変異が増加した。同様の変異は Pol ζ を活性化 (L989F Pol ζ) した酵母でも自然発生及び UV 照射によって増加することが確認されている⁷⁾。さらに、今回認められた変異はいずれも 3' 末端及又は 5' 末端側がそれぞれグアニン又はシトシンであったことから、これらはグアニン塩基の損傷によって形成されたミスマッチ末端から伸長反応を行う際に Pol ζ が誤った塩基を挿入したことで生じたものと考えられ

た。

以上から、Pol ζ はBaPによって形成されたグアニンの損傷に対して乗り越え複製とミスマッチ末端からの伸長反応の両方を行うことが示唆された。また、Pol ζ の遺伝子改変によって特徴的に認められた complex 変異が少ないながらも *gpt delta* マウスの 160 mg/kg 群でも検出された事実は、通常のマウスにおいても BaP の突然変異誘発に Pol ζ が寄与していることを支持する結果と考えられた。一方、BaP 80 mg/kg 群では、両遺伝子型とも G:C-T:A transversion 変異の増加を伴う *gpt* MFs の上昇傾向が認められたものの、遺伝子型間に差は認められなかったことから、本実験条件下において Pol ζ の BaP の「事実上の閾値」形成への関与は明らかにならなかった。

D-2. ES の突然変異誘発性における Pol ζ の寄与

ES の用量設定試験では、200 mg/kg 群の肝臓において *gpt* MFs の顕著な上昇が認められたのに対し、20 mg/kg 群以下で変化は認められなかった。これらの結果から、本試験で使用する低用量、中間用量及び高用量を、それぞれ 12.5、50 及び 200 mg/kg に設定した。

本試験の結果、肝臓における *gpt* MFs は *gpt delta* マウス、Pol ζ KI *gpt delta* マウスともに 200 mg/kg 群で有意に上昇したものの、遺伝子型間に有意な差は認められなかった。変異スペクトラム解析の結果、両遺伝子型ともに 200 mg/kg 群で G:C 塩基対における塩基置換の頻度が増加したが、遺伝子型間に差は認められなかった。一方、Pol ζ KI *gpt delta* マウスでは BaP と同様

に特徴的に連続した 2 塩基又は 1 塩基を挟んだ 2 塩基の complex 変異が増加した。認められた変異のほとんどは 3' 末端側がグアニンであったことから、これらは ES によるグアニン塩基の損傷によって形成されたミスマッチ末端から伸長反応を行う際に Pol ζ が誤った塩基を挿入したことで生じたものと考えられた。また、ES はグアニンだけでなくアデニンの DNA 付加体を形成する⁸⁾。しかしながら、本研究においてアデニンの損傷が寄与したと考えられる A:T 塩基対の変異や、complex 変異の増加は認められなかったことから、Pol ζ は主にグアニンの損傷に対して生じたミスマッチ末端からの伸長反応を行うものと考えられた。また、Pol ζ の遺伝子改変で特徴的に認められた complex 変異が少ないながらも *gpt delta* マウスの 200 mg/kg 群でも検出された事実は、通常のマウスにおいても ES の突然変異誘発に Pol ζ が寄与することを示唆する結果と考えられた。一方、ES 50 mg/kg 群では、両遺伝子型とも *gpt* MFs の変化は認められず、遺伝子型間に差は認められなかったことから、本実験条件下において Pol ζ の ES の「事実上の閾値」形成への関与は明らかにならなかった。

D-3. IQ の突然変異誘発性における Pol ζ の寄与

用量設定試験では、IQ 300 ppm 群の肝臓において *gpt* MFs の上昇が認められたのに対し、30 ppm 以下の群で変化は認められなかった。これらの結果から、本試験で使用する低用量、中間用量及び高用量を、それぞれ 75、150 及び 300 ppm に設定した。

本試験の結果、肝臓における *gpt* MFs は

両遺伝子型とも 300 ppm 群で上昇傾向が認められたものの、すべての用量において遺伝子型間の差は認められなかった。また、変異スペクトラムにおいて complex 変異の増加も認められなかったことから、本実験条件下において Pol ζ は IQ の DNA 損傷に対する損傷乗り越え複製とミスマッチ末端からの伸長反応の両方に寄与しない可能性が示唆された。

E. 結論

Pol ζ は、BaP により生じたグアニン塩基の損傷には乗り越え複製とミスマッチ末端からの伸長反応を、ES により生じたグアニン塩基の損傷には生じたミスマッチ末端からの伸長反応を行うのに対し、IQ の DNA 損傷の複製反応には寄与しない可能性が示唆され、その働きには DNA 損傷に対する構造特異性があるものと考えられた。また、本実験条件下において遺伝毒性物質の「事実上の閾値」形成への Pol ζ の関与は明らかにならなかった。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

1) 石井雄二、高須伸二、木島綾希、能美健彦、小川久美子、梅村隆志
「Benzo[a]pyrene によるマウス肺の突然変異誘発過程における DNA Polymerase ζ の役割」第 45 回日本環境変異原学会

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし。

(参考文献)

- 1) Nohmi, T., Possible mechanisms of practical thresholds for genotoxicity. *Genes Environ.* 30, 108-113, 2008.
- 2) Stone, J.E., Kumar, D., Binz, S.K., Inase, A., Iwai, S., Chabes, A., Burgers, P.M., Kunkel, T.A. Lesion bypass by *S. cerevisiae* Pol ζ alone. *DNA Repair* 10, 826-834, 2011.
- 3) Diaz, M., Watson, N.B., Turkington, G., Verkoczy, L.K., Klinman, N.R., McGregor, W.G. Decreased frequency and highly aberrant spectrum of ultraviolet-induced mutations in the hprt gene of mouse fibroblasts expressing antisense RNA to DNA polymerase zeta. *Mol. Cancer Res.* 1, 836-847, 2003.
- 4) Ddaly, J., Bebenek, K., Wwatt, D.L., Richter, K., Jiang, C., Zhao, M.L., Ray, M., McGregor, W.G., Kunkel, T.A., Diaz, M. Altered Ig hypermutation pattern and frequency in complementary mouse models of DNA polymerase ζ activity. *J. Immunol.* 188, 5528-5537, 2012.
- 5) Nohmi, T., Suzuki, T., Masumura, K. Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assay. *Mutat. Res.* 455, 191-215, 2000.
- 6) Suzuki, T., Grúz, P., Honma, M., Adachi, N., Nohmi, T. The role of DNA polymerase ζ in translesion synthesis across bulky DNA adducts and cross-links in human cells. *Mutat. Res.* 791-792, 35-41, 2016.
- 7) Sakamoto, A.N., Stone, J.E., Kissling, G.E., McCulloch, S.D., Pavlov, Y.I., Kunkel, T.A. Mutator alleles of yeast DNA polymerase zeta. *DNA repair.* 6, 1829-1838, 2007.
- 8) Ishii, Y., Suzuki, Y., Hibi, D., Jin, M., Fukuhara, K., Umemura, T.,

Nishikawa, A. Detection and quantification of specific DNA adducts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the livers of rats given estragole at the carcinogenic dose. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 532-541, 2011.

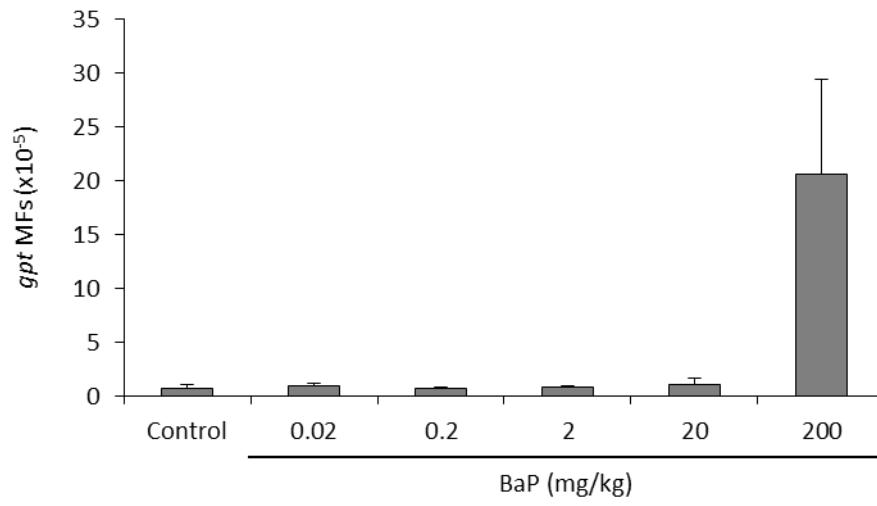


Figure 1. *gpt* MFs in the lungs of male *gpt* delta mice treated with BaP at a dose of 0.02, 0.2, 2, 20 and 200 mg/kg by single i.p. injection.

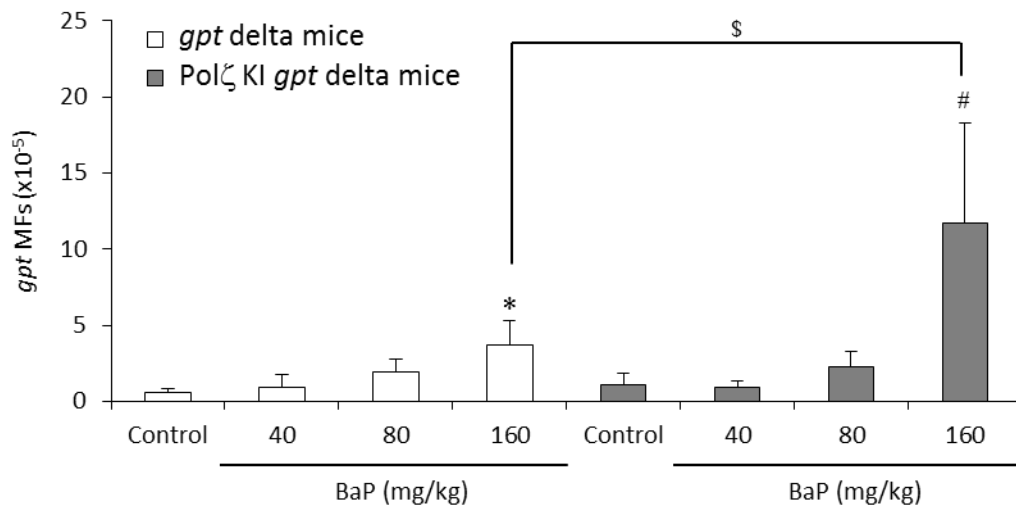


Figure 2. *gpt* MFs in the lungs of male Polζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with BaP at a dose of 40, 80 and 160 mg/kg by single i.p. injection. Values are means ± s.d. (n = 4 or 5 in each group), *, p < 0.05 vs control group of *gpt* delta mice using Dunnett ' s test. #, p < 0.05 vs control group of Polζ KI *gpt* delta mice using Dunnett ' s test. \$, p < 0.05 vs *gpt* delta mice using Tukey ' s test

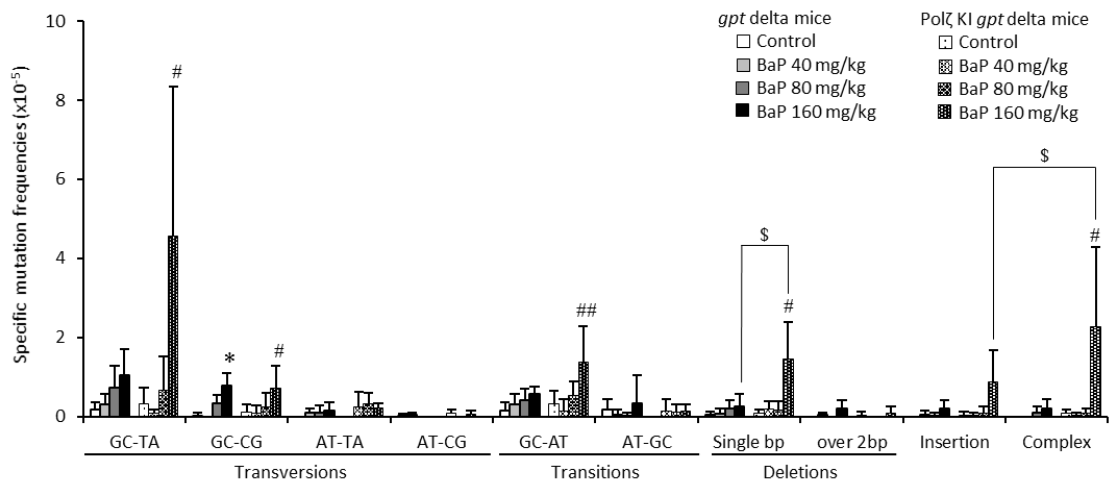


Figure 3. Specific mutation frequencies in the lungs of male Pol ζ KI *gpt delta* mice and *gpt delta* mice treated with BaP at a dose of 160 mg/kg by single i.p. injection. Values are means \pm s.d. (n = 4 or 5 in each group), *, p < 0.05 vs control group of *gpt delta* mice using Dunnett ' s test. #, ##, p < 0.05, 0.01 vs control group of Pol ζ KI *gpt delta* mice using Dunnett ' s test. \$, p < 0.05 vs *gpt delta* mice using Tukey ' s test.

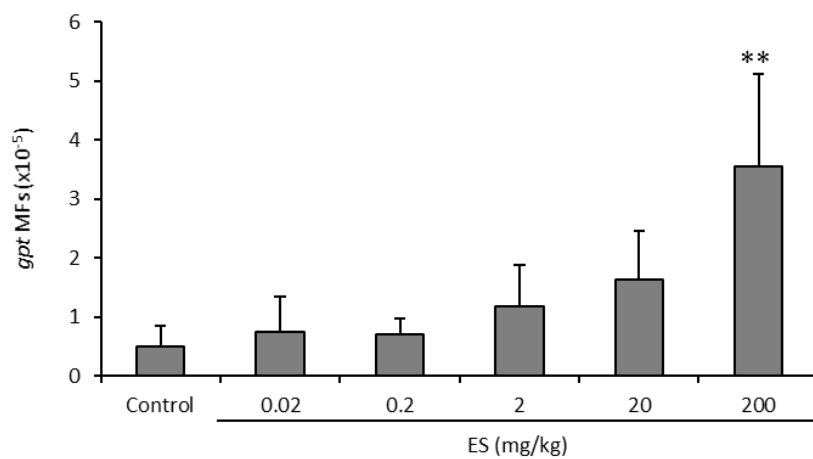


Figure 4. *gpt* MFs in the livers of female *gpt* delta mice treated with ES at a dose of 0.02, 0.2, 2, 20 and 200 mg/kg by gavage for 4 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 3 in each group).

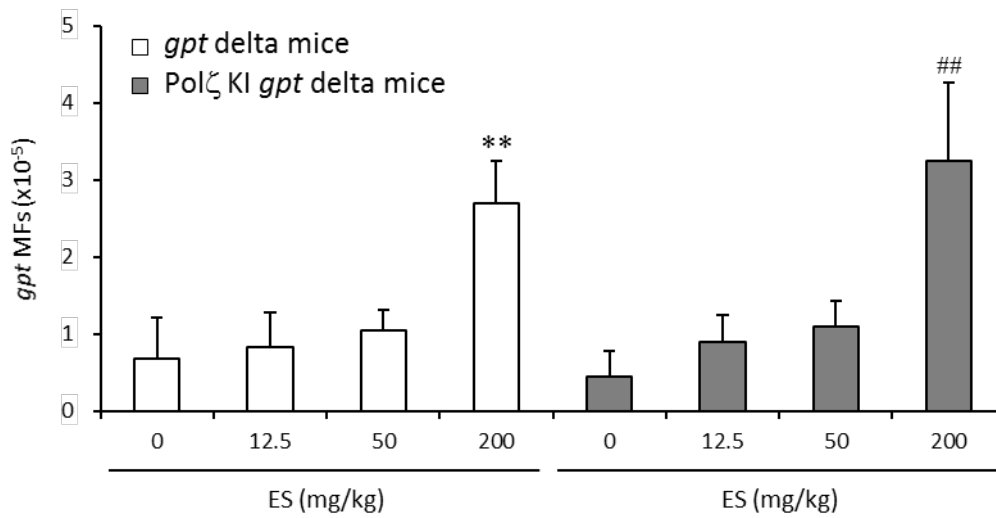


Figure 5. *gpt* MFs in the livers of female Polζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with ES at a dose of 12.5, 50 and 200 mg/kg by gavage for 4 weeks. Values are means ± s.d. (n = 5 in each group), **, p < 0.01 vs control group of *gpt* delta mice using Dunnett ' s test. ##, p < 0.01 vs control group of Polζ KI *gpt* delta mice using Dunnett ' s test.

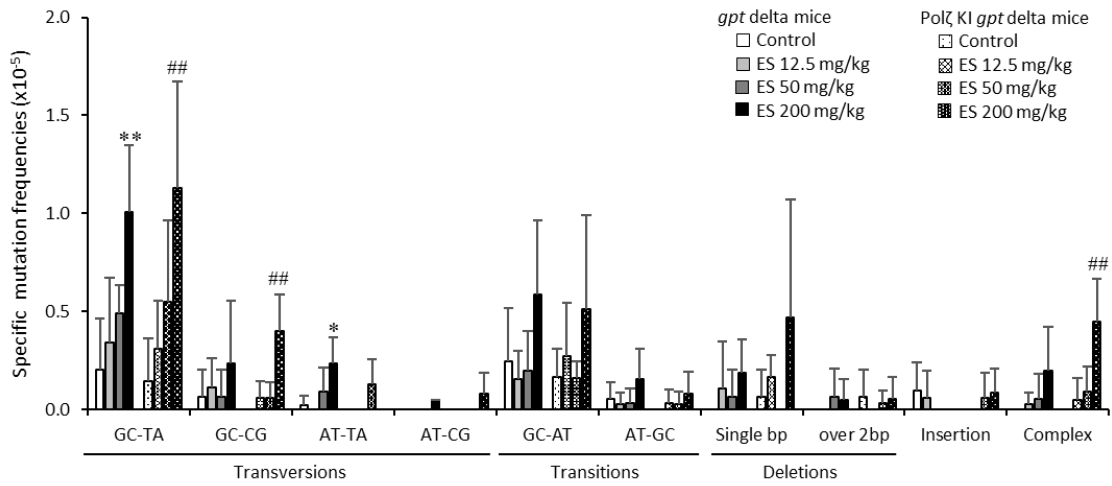


Figure 6. Specific mutation frequencies in the livers of female Polζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with ES at a dose of 12.5, 50 and 200 mg/kg by gavage for 4 weeks. Values are means \pm s.d. ($n = 5$ in each group) *, **, $p < 0.05, 0.01$ vs control group of *gpt* delta mice using Dunnett ' s test. ##, $p < 0.01$ vs control group of Polζ KI *gpt* delta mice using Dunnett ' s test.

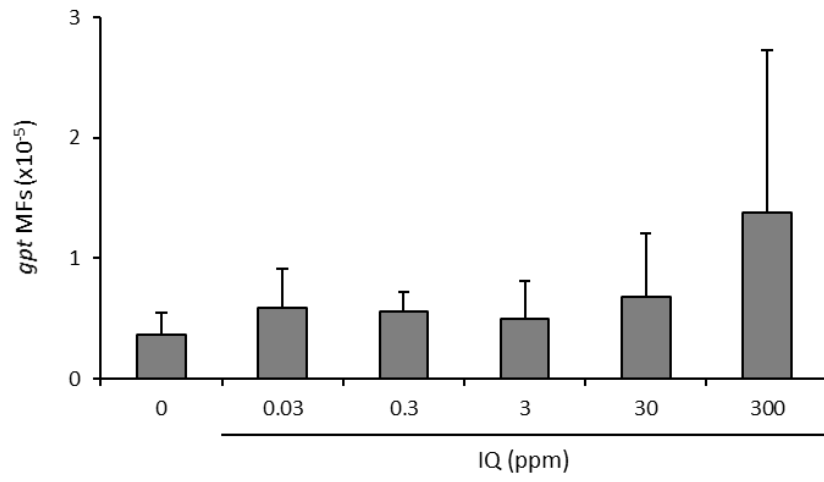


Figure 7. *gpt* MFs in the livers of male *gpt* delta mice treated with IQ 0.03, 0.3, 3, 30 and 300 ppm in diet for 4 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 3 in each group)

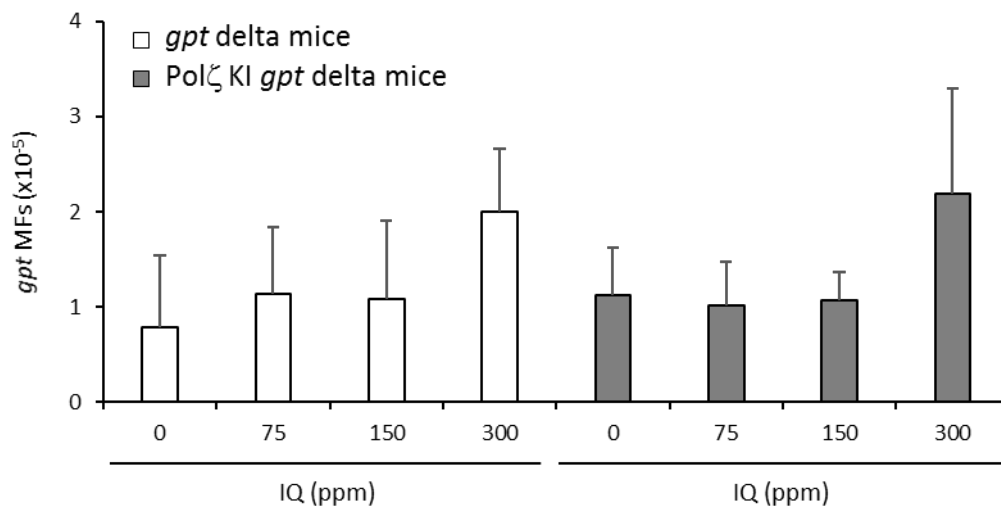


Figure 8. *gpt* MFs in the livers of male Polζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with IQ 75, 150 and 300 ppm in diet for 4 weeks. Values are means ± s.d. (n = 5 in each group)

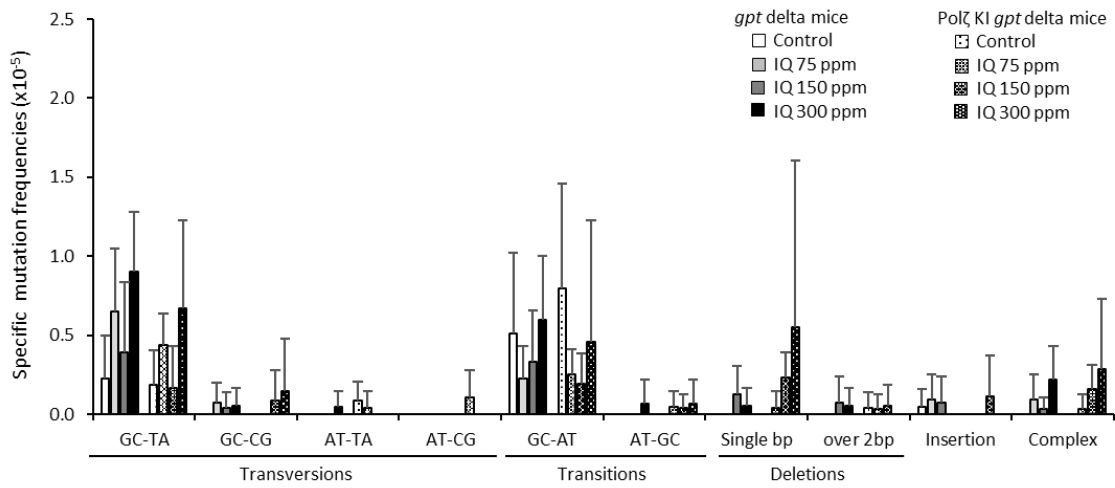


Figure 9. Specific mutation frequencies in the livers of male Polζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with IQ 75, 150 and 300 ppm in diet for 4 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 5 in each group)

Table 1 Final body, lung and liver weights

Item	BaP (mg/kg)					
	0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals	3	3	3	3	3	3
Body weight (g)	26.7 ± 0.5	28.1 ± 2.2	26.9 ± 0.5	27.3 ± 2.6	26.6 ± 1.6	25.7 ± 0.6
Absolute (g)						
Lung	0.137 ± 0.009	0.140 ± 0.006	0.140 ± 0.004	0.138 ± 0.011	0.147 ± 0.004	0.151 ± 0.015
Liver	1.37 ± 0.10	1.37 ± 0.19	1.41 ± 0.04	1.34 ± 0.20	1.32 ± 0.09	1.21 ± 0.05
Relative (g%)						
Lung	0.52 ± 0.04	0.50 ± 0.04	0.52 ± 0.01	0.51 ± 0.02	0.56 ± 0.02	0.59 ± 0.06
Liver	5.15 ± 0.32	4.85 ± 0.38	5.25 ± 0.11	4.88 ± 0.31	4.97 ± 0.60	4.72 ± 0.23

Table 2 Final body, lung and liver weights

Item	<i>gpt</i> delta mice					Pol ζ KI <i>gpt</i> delta mice				
	0	40	80	160	160	0	40	80	160	160
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4
Body weight (g)	26.1 ± 0.5	26.4 ± 2.3	26.3 ± 1.8	25.9 ± 1.3	27.1 ± 1.3	27.1 ± 1.5	25.5 ± 0.8	25.7 ± 1.6	25.1 ± 1.5	25.1 ± 1.5
Absolute (g)										
Lung	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02
Liver	1.16 ± 0.13	1.30 ± 0.16	1.28 ± 0.15	1.20 ± 0.08	1.19 ± 0.08	1.19 ± 0.15	1.31 ± 0.08	1.31 ± 0.15	1.17 ± 0.10	1.17 ± 0.10
Relative (g%)										
Lung	0.52 ± 0.04	0.52 ± 0.03	0.52 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.51 ± 0.02	0.51 ± 0.04	0.57 ± 0.03	0.55 ± 0.05	0.55 ± 0.06	0.55 ± 0.06
Liver	4.45 ± 0.45	4.92 ± 0.40	4.86 ± 0.32	4.65 ± 0.11	4.42 ± 0.11	4.42 ± 0.71	5.15 ± 0.36	5.09 ± 0.30	4.64 ± 0.24	4.64 ± 0.24

Table 3 Tandem and triplet base substitutions detected in the lung of male Pol ζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with vehicle and BaP 160 mg/kg by single i.p. injection

Geno type	Group	Animal No.	Position	wildtype	mutation		
<i>gpt</i> delta mice	Control	-	-	-	-		
	BaP 160 mg/kg	401	125	CCGGG	CGGTG		
		403	416	TGGGA	TAGAA		
		404	207	GCGA	GTTA		
Pol ζ <i>gpt</i> delta mice	Control	502	277	TACC	T_GC		
	BaP 160 mg/kg	503	25	CTGGG	CCGAG		
		801	801	25	CTGGG	CCGAG	
			103	CGTA	CAAA		
			114	GCGG	GATG		
			207	GCGA	GATA		
			279	GCGG	GAAG		
			320	GCGCA	GAGAA		
			412	GCCGT	G_CTT		
			803	803	44	CATGC	C_TAC
				56	CTCGC	CCTTC	
				320	GCGCA	GACAA	
				401	TGGA	TCTA	
				56	CTCGC	CACTC	
				101	GCCGT	G_CTT	
				114	GCGG	GATG	
				189	ACGA	AATA	
				207	GCGA	GGTA	
				269	CTGG	CCAG	
			804	804	398	ACCTG	AACAG
456	GCTA	GTAA					
804	24	CCTG		CTAG			
805	805	125	CCGG	CGTG			
	805	114	GCGG	GATG			
	124	CCGGG	C_ATG				
	226	ACGC	A_TC				
	278	CCGG	C_TG				
412	CCGT	C_TT					

Table 4 Final body and liver weights

Item	ES (mg/kg/day)					
	0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals	3	3	3	3	3	3
Body weight (g)	20.1 ± 1.3	20.3 ± 1.1	20.9 ± 1.1	20.6 ± 0.9	20.8 ± 0.2	19.9 ± 0.8
Absolute (g)						
Liver	0.92 ± 0.10	0.91 ± 0.08	1.01 ± 0.10	0.96 ± 0.07	0.93 ± 0.06	0.85 ± 0.11
Relative (g%)						
Liver	4.55 ± 0.23	4.48 ± 0.18	4.83 ± 0.24	4.63 ± 0.14	4.45 ± 0.26	4.26 ± 0.61

Table 5 Final body and liver weights

Item	gpt delta mice					Polζ KI gpt delta mice				
	0	12.5	50	200	200	0	12.5	50	200	200
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	20.8 ± 1.2	20.2 ± 0.9	20.3 ± 1.2	19.9 ± 1.2	20.8 ± 1.1	20.7 ± 0.6	20.2 ± 1.5	20.0 ± 0.8		
Absolute (g)										
Liver	0.84 ± 0.09	0.85 ± 0.05	0.86 ± 0.07	0.93 ± 0.08	0.88 ± 0.08	0.79 ± 0.08	0.75 ± 0.08	0.85 ± 0.05		
Relative (g%)										
Liver	4.02 ± 0.41	4.19 ± 0.15	4.24 ± 0.19	4.66 ± 0.35 ^{**}	4.22 ± 0.21	3.83 ± 0.37	3.73 ± 0.20 [*]	4.26 ± 0.19		

Table 6 Tandem mutations detected in the livers of female Pol ζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with vehicle and ES 200 mg/kg by gavage for 4 weeks

Geno type	Group	Animal No.	Position	Wild type	Mutation
<i>gpt</i> delta mice	Control	-	-	-	-
	ES 200 mg/kg	402	112	TGGC	TTTC
		403	25	CTGG	CGTT
		404	149	CTGG	CCTG
		404	273	TGGA	TTTA
Pol ζ KI <i>gpt</i> delta mice	Control	-	-	-	-
	ES 200 mg/kg	801	24	CCTGG	C_TAG
		801	76	TT	TAACAT
		801	235	GCGG	GATG
		802	110	CGT	CTTT
		802	114	GCGG	GACTG
		802	207	CGA	CCTTA
		803	413	CCGT	CATT
		804	115	CGGT	CATT
		804	288	TGC	TTCC
		804	413	CCGT	CGTT
805	115	CGGT	CTTT		

Table 7 Final body and liver weights

Item	IQ (ppm)					
	0	0.03	0.3	3	30	300
No. of animals	3	3	3	3	3	3
Body weight (g)	28.6 ± 0.6	29.2 ± 2.0	30.8 ± 2.1	30.8 ± 2.1	27.2 ± 4.0	25.9 ± 0.9
Absolute (g)						
Liver	1.43 ± 0.03	1.34 ± 0.23	1.40 ± 0.17	1.50 ± 0.06	1.32 ± 0.25	1.21 ± 0.21
Relative (g%)						
Liver	5.00 ± 0.06	4.63 ± 1.09	4.56 ± 0.71	4.87 ± 0.13	5.02 ± 1.65	4.67 ± 0.98

Table 8 Final body and liver weights

Item	gpt delta mice					Polζ KI gpt delta mice				
	0	75	150	300	300	0	75	150	300	300
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	28.1 ± 1.9	28.4 ± 1.2	27.7 ± 1.1	26.1 ± 2.0	27.6 ± 2.0	26.3 ± 0.8	26.7 ± 1.6	26.3 ± 0.9#		
Absolute (g)										
Liver	1.34 ± 0.06	1.32 ± 0.08	1.28 ± 0.04	1.16 ± 0.07**	1.27 ± 0.15	1.27 ± 0.15	1.24 ± 0.09	1.19 ± 0.05		
Relative (g%)										
Liver	4.78 ± 0.17	4.64 ± 0.14	4.61 ± 0.12	4.45 ± 0.14**	4.63 ± 0.80	4.82 ± 0.55	4.68 ± 0.58	4.50 ± 0.15		