

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

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

(H27-食品-一般-002)

平成 28 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成 29 (2017) 年 5 月

## 目 次

### I. 総括研究報告書（別添 3）

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	1
本間 正充	

### II. 分担研究報告書（別添 4）

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	1 3
安井 学	

エピ遺伝毒性物質の評価系の開発	2 1
杉山 圭一	

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	3 3
戸塚 ゆ加里	

重要な 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	3 9
高村 岳樹	

重要な DNA アダクトの合成に関する研究	4 3
正田 卓司	

III.研究成果の刊行に関する一覧表（別添 5）	5 1
--------------------------	-----

**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 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 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 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 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 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そ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<sub>r</sub>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-C8-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)。

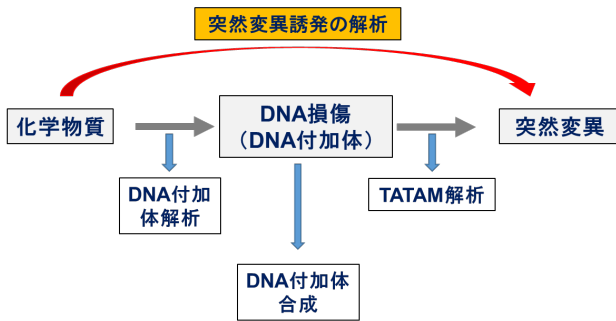


図 1

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  $H=SC$

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

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。

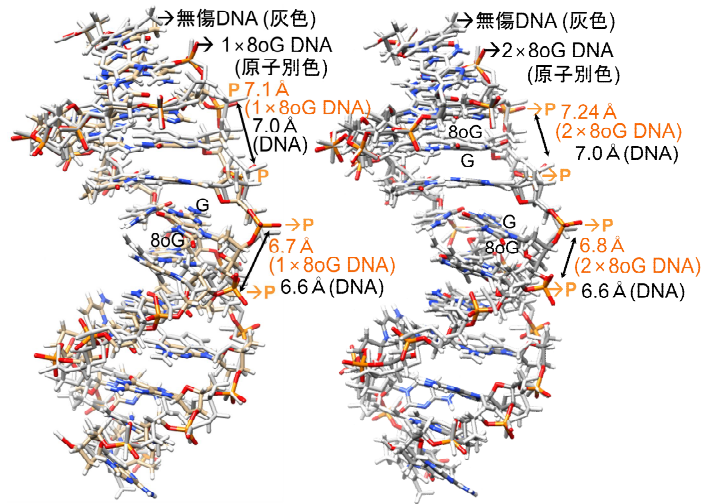


図 2

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)。

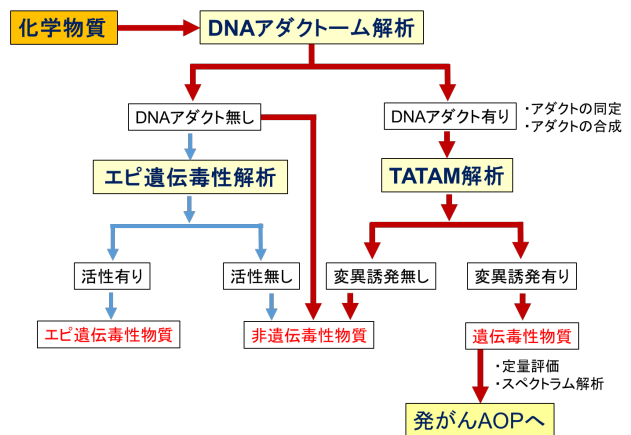


図 3

DNA 付加体解析により、特定の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、グルーズ 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



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：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

研究分担者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

## 研究要旨

魚肉類の焼け焦げに含まれるヘテロサイクリックアミン類（HCA）は、組織中の DNA と反応し、バルキーDNA 付加体を形成し、発がん性を有するとされている。バルキー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知られている。しかし、バルキーDNA 付加体のほとんどは NER のうち、グローバルゲノム NER か転写共役型 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 CRISPR/Cas9 技術を用いることによって、グローバルゲノム NER および転写共役型 NER に必須の遺伝子である *XPC* および *ERCC6* をそれぞれノックアウト（KO）した細胞を構築し、バルキーDNA 付加体の NER 機構を解明することを目的とする。*XPC* および *ERCC6* の開始コドン部位をターゲットとして遺伝子 KO を試みた結果、*XPC* については開始コドン配列を欠失した細胞が得られ、その *XPC* KO 細胞は紫外線照射に対して高感受性を示した。一方、*ERCC6* の開始コドン部位を欠失させた細胞は分離できなかった。そこで、*ERCC6* を欠損する患者の変異を有するノックイン（KI）コンストラクトを作製し、CRISPR/Cas9 系を用いて KI 細胞を構築した。その *ERCC6* KI 細胞は、紫外線照射に対して感受性を示し、さらに臭素酸カリウムを用いたアルカリコメットアッセイにおいても、その野生株より DNA 修復効率が有意に減少した。以上のことから、*XPC* および *ERCC6* の破壊細胞を構築することができた。それらの細胞を用いることによって、HCA のバルキーDNA 付加体に対するグローバルゲノム NER および転写共役型 NER の研究を進展させることができると思われる。

キーワード:バルキーDNA 付加体，ヌクレオチド除去修復，CRISPR/Cas9

## A．研究目的

食品中の発がん性物質として最も注目され、研究が進んでいるものは、魚肉類の焼け焦げに含まれるヘテロサイクリックアミン類（HCA）である。HCA は、DNA と反応し、バルキー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に分類される。事実、焼け焦げに含まれる発

がん性を示す物質として、PhIP，MeIQ，Trp-P-1 などの HCA が同定されており、それらはラットなどの実験動物の臓器にがんを高頻度に形成させることが知られている。その発がん機構に、HCA のバルキーDNA 付加体が強く関与していると考えられる。

バルキー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、バルキー 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そ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、バルキー DNA 付加体の NER 機構を解明することを目的とする。

## B . 研究方法

### 1 . 細胞培養

ヒトリンパ芽球細胞 TSCER122 は、TK6 細胞株を由来とする細胞である (Honma, M. *et al*, *Environ. Mol. Mutagenesis* **42**, 288-298 (2003), Yasui, M. *et al*, *DNA repair* **15**, 11-20 (2014))。細胞は、10% 馬血清 (JRH Bioscience), 200 µg/mL ピルビン酸ナトリウム (和光純薬工業(株)), 100 U/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン (ナカライテスク(株))を含む RPMI 培地 (ナカライテスク(株)) で培養した (37 度, 5% CO<sub>2</sub>)。

### 2 . XPC 遺伝子 KO 細胞の構築

XPC 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。次に、それら 3 つのベクター (CRISPR/Cas9 ベクター; 6 µg, 薬剤耐性ターゲティングベクター 2 種; 各 2 µg) 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、XPC の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ング解析や紫外線照射による感受性試験を行った。

### 3 . ERCC6 遺伝子 KO, および KI 細胞の構築

ERCC6 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。細胞へのコトランスフェクションなどの方法は前述と同様である。

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 コンストラクトを構築した (Troelstra *et al*, *Cell* **71**, 939-953 (1992))。この変異を薬剤耐性遺伝子のターゲティングベクターのエキソン 5 に組み込んだ。エキソン 5 の下流をターゲットとする CRISPR/Cas9 ベクターを構築後、前述と同様の方法で細胞へコトランスフェクションし、選択培地を用いてクローニングを行った。

### 4 . ウェスタンブロットング

対数増殖期の細胞から得られた全細胞抽出物を 10% SDS ポリアクリアミドゲルで電気泳動した。その後、タンパク質を PVDF 膜に移行させ、5% スキムミルクまたは 1% BSA でブロッキングし、Can Get Signal Immunoreaction enhancer solution (東洋紡 (株)) で希釈した抗 CSB モノクローナル抗体 (sc-25370, サンタクルズ (株)), 抗 XPC モノクローナル抗体 (ab6264, アブカム(株)), あるいは抗 α チューブリンモノクローナル抗体



(ab7291, アブカム(株))と共に室温で1時間反応させた。0.05% Tween20を含むPBSで膜を洗浄後、抗マウスIgG ホースラディッシュペルオキシダーゼ(GEヘルスケアバイオサイエンス(株))と反応させ、化学発光によりタンパク質を検出した。

## 5. 紫外線照射による感受性試験

細胞をフェノールレッドを含まないRPMI培地で洗浄、再懸濁した。ペトリ皿(35 mm x 100 mm)に細胞( $2.5 \times 10^6$ )を5 mL培地で調整し、 $2.7 \text{ W/m}^2$ のUV殺菌ランプを用いてUVC(254 nm)を照射した。UVライトの測定は、UV-light meter (Lutron)を用いた。照射後、その細胞を1.6 cells/mLの濃度で96穴マイクロプレートで培養し、細胞生存度を計算した。

## 6. mRNA発現の解析

対数増殖期の細胞( $10^6$  cells)を分取し、遠心分離後PBSで洗い、最終的に細胞ペレットとした。RNeasy mini kit (キアゲン(株))を使って、Total RNAを抽出した。次に、Superscript III First strand synthesis system (インビトロジェン(株))を用いて、Total RNA 10 ngから逆転写反応を行った。その反応生成物を用いて、目的遺伝子についてPCRを実施し、アガロースゲルで解析した。

## 7. コメットアッセイ

臭素酸カリウムを注射用水(株大塚製薬工場)で溶解後、対数増殖期にある細胞に暴露し、4時間振盪培養した。RPMI培地で細胞を洗浄後、DMSO(試薬特級、和光純薬工業(株))10v/v%と20mM EDTA(Sigma)を含む冷却したHBSS(Life Technoligise Co.)で懸濁し、0.45%低融点アガロース溶液(株ロンザジャパン)と混合した。引き続き、1.5%アガロース溶液(Sigma)を塗抹・乾燥したスライドガラスに重層し、これを細胞融解液に浸漬し、冷蔵下で一晩静置した。冷却した精製水でスライドガラスを穏やかに洗浄後、泳動槽に並べ、電気泳動緩衝液(pH>13、約4□)に20分間浸漬した後、300mA・36Vの条件で20分間

電気泳動した。その後、中和液に約10分間浸漬し、自然乾燥してスライド標本とした。SYBR Gold(Life Technoligise Co.)をTE緩衝液で10,000倍希釈した染色液で染色し、CCDカメラ(AVT FireWire CCDビデオカメラ)を装着した落射蛍光顕微鏡(OLYMPUS社、BX-50)を用い、200倍率で観察を行った。観察は100細胞/用量で行い、画像解析システム(Comet Assay IV、Perceptive Instruments Ltd.)を使用した。得られた結果のTail Intensityを指標とし、統計解析(Dunnett検定、Excel統計2010)を行った。

## C. 研究結果

### 1. XPC KO細胞の分離と特性解析

XPCの開始コドン部位をターゲットとして、CRISPR/Cas9系でKOをしたところ、32クローン中19クローン(59%)について、そのターゲットとなる両アレルに薬剤耐性遺伝子が導入されていることを確認した。そのクローン細胞について、ウェスタンブロッティング解析を行うと、野生株ではXPCタンパク質の発現が観察されたが、XPC KO細胞では観察されなかった(図1)。また、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(図2)。

### 2. ERCC6 KI細胞の分離と特性解析

ERCC6の開始コドン部位をターゲットとして、CRISPR/Cas9系でKOをしたところ、薬剤耐性となったクローンを単離したが、そのターゲットとなる両アレルに薬剤耐性遺伝子が導入されている細胞を得ることはできなかった。

そこで研究方法で述べた通り、エキソン5で検出される変異(K337\*)を導入したERCC6 KI細胞を分離したところ、56クローン中3クローン(5.4%)について、そのターゲットとなる変異(K337\*)と両アレルに薬剤耐性遺伝子が導入されていることを確認した。そのクローン細胞について、ウェスタンブロッティング解析を行うと、野生株では全長のCSBタンパク質の発現が観察

されたが、*ERCC6* KI 細胞では観察されなかった (図 3)。次に、その mRNA の発現について調べると、野生株では *ERCC6* の発現をはっきりと観察することができたが、*ERCC6* KI 細胞では微量に観察できた (図 4 左)。それをシーケンス解析すると、目的どおりの配列に改変できていることが分かった (図 4 右)。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 (図 5)。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。10 mM ~ 0.041 mM の用量設定試験を行い、相対的細胞集団倍加 (RPD) が野生株で 18%、*ERCC6* KI 細胞で 32% となる臭素酸カリウム濃度 (3.3 mM) を本試験に採用することにした。コメットアッセイの結果 (図 6)、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。

#### D. 考 察

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、その各修復経路の必須遺伝子であることから、それらの遺伝子の KO、あるいは KI 細胞を構築することを目的とした。なぜなら、バルキー DNA 付加体のほとんどは、そのグローバルゲノム NER か転写共役型 NER のどちらに進むかは全く不明であり、もし、*XPC* と *ERCC6* を破壊した細胞を構築できれば、そのどちらの NER 修復経路が働いているかを容易に判定することができるからである。*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。CRISPR/Cas9 ベクターのみを利用したときは、ターゲティング効率は数%程度にしかならず、薬剤耐性遺伝子をターゲティング部

位に導入させ薬剤選択によって、目的の KO 細胞を分離することは非常に有用であることも確認できた。

しかしながら、その 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る方法であっても、*ERCC6* の KO 細胞を分離することができなかった。それは、欠損させようとした *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た。すなわち、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る方法であっても、遺伝子によって KO できないこともあった。

そこで、*ERCC6* 欠損患者で検出されている変異をコンストラクトに導入し、CRISPR/Cas9 系と薬剤耐性遺伝子ターゲティングベクターを用いて、細胞に形質転換したところ、5.4% のターゲティング効率で KI 細胞を分離することができた。今回の 5.4% という低めのターゲティング効率から推察すると、もし、薬剤耐性遺伝子を用いず、CRISPR/Cas9 ベクターと KI コンストラクトの通常のプロトコールで形質転換したとしても、*ERCC6* KI 細胞は分離できなかったと予想できる。以上のことから、薬剤耐性遺伝子を用いる CRISPR/Cas9 系は、KO 並びに KI 細胞を分離するために必須の方法であることが分かった。

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、少し感受性が高くなっただけであった。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分かっているため (Waard et al, *DNA Repair* 2, 13-25 (2003))、もう一つのエンドポイントとして、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、これは DNA 修復機構が働くことで DNA 損傷が除去されたと予想できた。一方、今回分離

できた *ERCC6* KI 細胞は、臭素酸カリウムを処理した直後 (0 min) と 120 min の 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できた。酸化 DNA 損傷に対して CSB が関与していると考えられた (Guo et al, *Nucleic Acids Res.* 41, 7700-7712 (2013))。つまり、*ERCC6* KI 細胞の良好な表現型を確認できたと考えられる。

## E. 結論

グローバルゲノム NER の *XPC* 遺伝子、転写共役型 NER の *ERCC6* 遺伝子が、その修復経路の必須遺伝子であることから、それらの遺伝子の KO、あるいは KI 細胞を構築した。これらの細胞を用いることにより、これまで不明だったバルキー DNA 付加体のヌクレオチド除去修復機構の全容が明らかになると期待できる。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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)

### 2. 学会発表

1. 佐々彰, Çağlayan 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. 第 45 回日本環境変異原学会, つくば (2016 年 11 月)

2. 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. 第 45 回日本環境変異原学会, つくば (2016 年 11 月)

1)

## H. 知的所有権の取得状況

なし

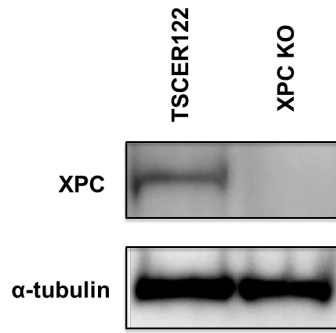


図 1 . *XPC* ノックアウト細胞のウェスタンブロッティング解析

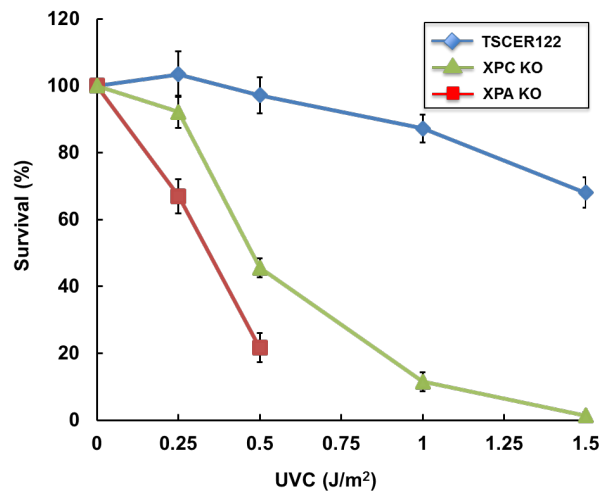


図 2 . 紫外線照射に対する *XPC* ノックアウト細胞の感受性

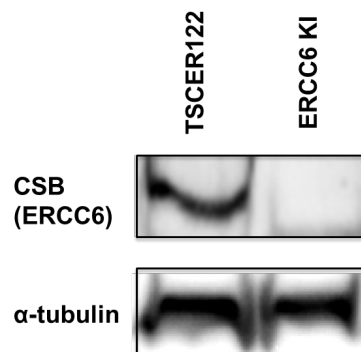


図 3 . *ERCC6* ノックイン細胞のウェスタンブロッティング解析

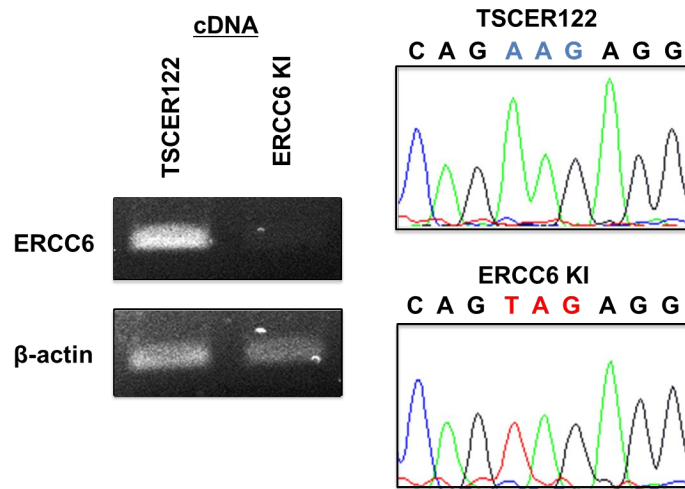


図4 . *ERCC6* ノックイン細胞の mRNA 解析

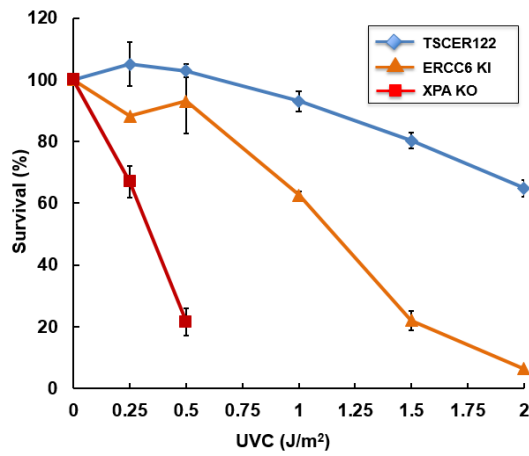


図5 . 紫外線照射に対する *ERCC6* ノックイン細胞の感受性

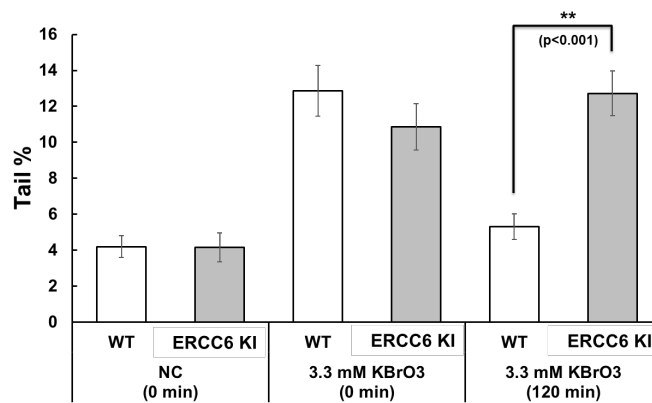


図6 . コメットアッセイを用いた *ERCC6* ノックイン細胞の DNA 修復効率の低下



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：エピ遺伝毒性物質の評価系の開発

研究分担者： 杉山圭一 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

#### 研究要旨

化学物質の発がん性検出精緻化の観点からエピ遺伝毒性物質（エピ変異原）の検出系が求められているが、グローバルレベルで認められている試験系はない。今年度の本分担研究では、DNA メチル化阻害剤以外のエピ変異原に焦点をあて、昨年度に 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 (TSA) 存在下(0–50  $\mu$ M)において、濃度依存的な凝集性の誘発が認められた。ヒト DNMT 酵母が示す凝集性に関与すると考えられる凝集性関連遺伝子 FLO1 の mRNA レベルは、同様の濃度域において増加傾向が確認された。元既存添加物アカネ色素（平成 16 年に同名簿より削除）含有成分アリザリンは、発がんプロモーション作用が懸念される化学物質である。ヒト DNMT 酵母の凝集性に対するアリザリン（0–4.0  $\mu$ M）の影響を検討した結果、TSA と同様に凝集促進作用と FLO1 の mRNA レベル上昇を認めた。ヒストンへの影響を検討した結果、アリザリンはバルクレベルでコアヒストン H3 量を減少させることが明らかになった。また、アリザリン（4.0  $\mu$ M）処理時における核染色像の異常も観察された。TSA とアリザリンが凝集性に示した作用は、コントロール株となる非ヒト DNMT 酵母（発現用ベクターのみ形質転換した酵母）においてもほぼ同様の傾向として確認された。

以上の結果は、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ている。すなわち、本研究によりヒト DNMT 酵母の凝集性をエンドポイントに、ユニバーサルなエピ変異原の短期スクリーニング系の構築が可能であることが明らかとなった。

キーワード：エピ変異原、DNA methyltransferase、酵母、Trichostatin A、アリザリン

#### A. 研究目的

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（エピ変異）の関与も指摘されている。ジェネティック（遺伝的）な変化である突然変異とは異なり、エピ変異は、クロマチンへの後天的な修飾異常により遺伝子発現をかく乱する。エピ遺伝毒性物質（エピ変異原）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。

エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列非依存的な遺伝子発現制御を対象とする遺伝学領域を指す。したがって、エピ変異原には、DNA とヒストンの複合体であるヌクレオソームに作用する化学物質が相当する。昨年度では、DNA メチル化阻害剤検出系を構築することを目的に、ヒト DNA methyltransferase (DNMT) 遺伝子形質転換酵

母(ヒト DNMT 酵母)を作出し、DNMT 阻害剤に対する応答性を検討した。その結果、ヒト DNMT 酵母は凝集性を獲得し、同表現型は DNMT 阻害剤により抑制されることを報告した。

本年度では、昨年度の結果を踏まえ、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。

## B. 研究方法

### 1. 酵母株

出芽酵母 *S. cerevisiae* YPH250 株 (*MATa trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 ade2-101 ura3-52*) は、University of California at Berkeley, CA, USA より入手した。本研究では、コントロール株として、YPH250/pY2\_3 (*MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 pYES2CT pYES3CT*)を、YPH250/pY2hD1\_ pY3hD3A (*MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 pY2hD1 pY3hD3A*)株もしくは YPH250/pY2hD1\_ pY3hD3B (*MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 pY2hD1 pY3hD3B*)株をヒト DNMT 酵母として使用した(表 1)。

### 2. 使用した化学物質

Trichostatin A (TSA) は東京化成工業(株)から、アリザリンおよびアントラセンは和光純薬工業(株)より購入した。

### 3. 培地

Synthetic Dextrose (SD) -Trp/-Ura 最少液体培地は以下の通りに調製した。MilliQ 水に-Trp/-Ura DO Supplement (Clontech, USA) 0.072%、Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (Becton and Dickinson, USA) 0.67%を加えオートクレーブ (121 20 min) 後、20% グルコース (Wako, Osaka, Japan) もしくは

20% ガラクトース (SIGMA-ALDRICH, USA)を最終濃度が 2.0%になるよう加えて 4 で保存した。

### 4. 凝集試験

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。

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

### 5. Reverse-Transcription (RT)-PCR 解析

対数増殖期中期から後期まで培養した酵母細胞より RNA を抽出後、Super Script<sup>®</sup> One-Step RT-PCR with Platinum<sup>®</sup> Taq (Life technologies, USA)を使用し RT-PCR を行った。なお、使用したプライマーは表 2 の通りである。

### 6. Western blot

対数増殖期後期まで培養した後、集菌・洗浄後、ガラスビーズで細胞を破碎し細胞抽出液を得た。得られたサンプルに対して、rabbit polyclonal anti-histone H3 (ab1791; Abcam, Cambridge, UK)および mouse monoclonal anti-β-actin (ab8224; Abcam) の各 1 次抗体を用いて Western blot を行った。なお、2 次抗体には、anti-rabbit/mouse Immunoglobulin G antibodies (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA, USA)を使用した。

### 7. 核の蛍光染色

対数増殖期後期まで培養した酵母細胞を 100 ng/mL の 4',6-diamidino-2-2-phenylindole (DAPI; 和光純薬工業(株))で染色した。蛍光観察には Olympus FluoView FV1000 with an IX81 inverted microscope (オリンパス(株))を使用した。



## 8. 統計処理

一元配置分散分析を行った後、Dunnett's *post hoc* test を用いて有意差検定をした。測定値は標準誤差で表示した。

## C. 研究結果

### 1. TSA が酵母凝集性と *FLO1* 発現に及ぼす影響

Histone deacetylase (HDAC) 阻害剤である TSA がヒト *DNMT* 酵母および、コントロール株の凝集レベルに及ぼす影響を凝集試験により検討した。その結果、ヒト *DNMT* 酵母およびコントロール株両株において、TSA 濃度 (0–50  $\mu\text{M}$ ) 依存的な凝集促進作用が認められた (図 1A)。RT-PCR 解析の結果、凝集性関連遺伝子 *FLO1* の発現量についても TSA 濃度 (0–50  $\mu\text{M}$ ) 依存的に誘導されることが確認された (図 1B)。

### 2. アリザリンが酵母凝集性に及ぼす影響

元既存添加物アカネ色素に含まれる発がんプロモーション作用が懸念される化学物質アリザリンについて、凝集試験を実施した。その結果、ヒト *DNMT* 酵母、コントロールの両株に対して、アリザリンは濃度 (0–4.0  $\mu\text{M}$ ) 依存的に凝集反応を促進した。一方、がんプロモーション作用について明確な報告がないアリザリンの構造類縁体であるアントラセンにおいては、400  $\mu\text{M}$  処理時においても同様の作用は検出されなかった (図 2)。

ヒト *DNMT* 酵母、コントロールの両株に対して、アリザリンもしくはアントラセンが *FLO1* 発現に及ぼす影響を検討した結果、アリザリン存在下においてのみ濃度 (0–4.0  $\mu\text{M}$ ) 依存的な発現上昇が認められ、アントラセン (0–400  $\mu\text{M}$ ) 存在下では同様の作用は確認されなかった (図 3)。

### 3. アリザリンがヒストンに及ぼす影響

ヒト *DNMT* 酵母、コントロールの両株に対して、アリザリンは、TSA と同様の凝集性促進作用を示したことから、同剤によるヒストンへの影響を検討した。コアヒストン構成成分の 1 つヒストン H3 を Western blot 法により解析した結果、アリザリン (0–4.0  $\mu\text{M}$ ) 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。一方、アントラセン (0–400  $\mu\text{M}$ ) 存在下では同様の効果は認められなかった (図 4)。

### 4. アリザリンが核染色像に及ぼす影響

コアヒストン H3 量の減少により、核 DNA がユーロクロマチン状態となることが推測される。そこで、ヒト *DNMT* 酵母、コントロールの両株におけるアリザリン (4.0  $\mu\text{M}$ ) 処理時における DAPI による核染色像を観察した。通常、核 DNA は細胞内において多くはドット状として観察されるが、アリザリン存在下では拡散状態となる細胞が増えることが明らかとなった (図 5)。

## D. 考察

エピ変異原検出系を構築することを目的に、ゲノム DNA メチル化レベルが低いとされる真核生物、出芽酵母にヒト *DNMT* 遺伝子を導入した「ヒト *DNMT* 酵母」をプラットフォームに、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 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。本効果は、ヒト *DNMT* 酵母のみならずコントロール株においても観察された (図 1)。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。したがって、ヒストン修飾酵素阻害剤が両株で同様の作用を示すことは妥当と考えられる。また、酵母におけ

る HDAC である 2 遺伝子の破壊株 (*hda1, rpd3* 二重遺伝子破壊株) が強い凝集性を示すことが知られており (BBA. Gene. Regul. Mech., 1839 (2014), pp. 1242-1255) この既知報告とも矛盾しない。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、元既存添加物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 (Cancer Sci., 100 (2009), pp. 2261-2267)。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。本研究で得られた結果は、この可能性を支持するものである。すなわち、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 (図 2,3)。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 (図 4,5)。なお、凝集およびヒストン H3 に対するアリザリンの作用はアントラセンでは認められないことから、アリザリン分子が持つ官能基が凝集性に重要であることが予想される。

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 (図 1,2)。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

今年度は、*DNMT* 阻害剤抑制性ヒト *DNMT* 酵母の凝集性に及ぼす同阻害剤以外のエピ変異原の影響を検討した。その結果、HDAC 阻害剤の TSA については、濃度依存的に凝集反応が促進されることが明らかとなった。また、げっ歯類発がん試験陽性結果を示す元既存添加物アカネ色素に含まれる成分アリザリンによっても、濃度依存的な凝集促進作用が検出された。以上の結果は、育種した酵母の凝集性を指標に、ユニバーサルなエピ変異原検出系が構築できる可能性と、食品添加物を含む環境化学物質からエピ変異原活性を検知できることを示している。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 誌上発表

1. 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).

### 学会発表

1. 杉山圭一、古沢博子、清水雅富、グルーズ 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 回大会プログラム・要旨集 pp. 127 (2016・つくば) (2016, 11)。
2. 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 回大会プログラム・要旨集 pp. 121 (2016・つくば) (2016, 11)。

3. 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プログラム集 pp. 171(2016・仙台) (2016, 9) .
4. 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 (2016, 8 コペンハーゲン・デンマーク).

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

表 1 使用した菌株

Strain name	Genotypes
YPH250/pY2_3	MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 p[2μ URA3] p[2μ TRP1]
YPH250/pY2hD1_pY3hD3A	MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 p[2μ URA3 hDNMT1] p[2μ TRP1 hDNMT3A]
YPH250/pY2hD1_pY3hD3B	MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 p[2μ URA3 hDNMT1] p[2μ TRP1 hDNMT3B]

表 2 使用したプライマー

ターゲット遺伝子	Primer名	DNA配列
<i>FLO1</i>	RT1A (Forward)	5' - CTCATCGCTATATGTTTTTGG - 3'
	RT1B (Reverse)	5' - CGAGTAAACAACCTTCATTGG - 3'
<i>ACT1</i>	RTactA (Forward)	5' - ATTCTGAGGTTGCTGCTTTTGG - 3'
	RTactB (Reverse)	5' - GAAGATTGAGCAGCGGTTTGC - 3'

# Trichostatin A (TSA)

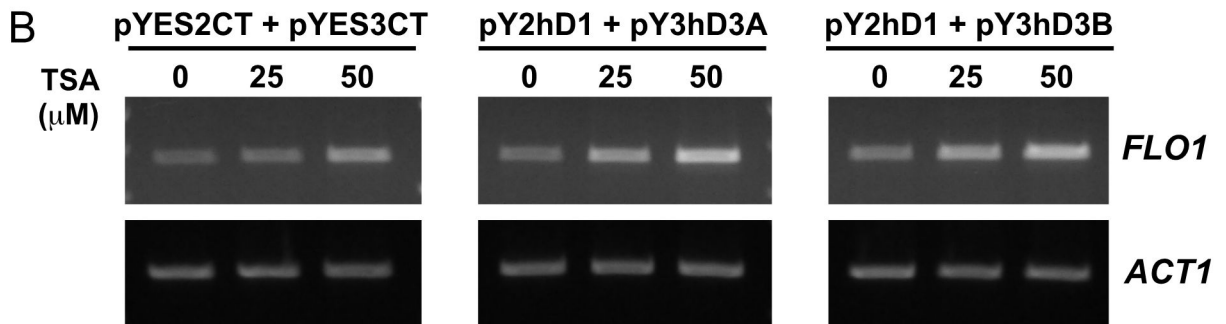
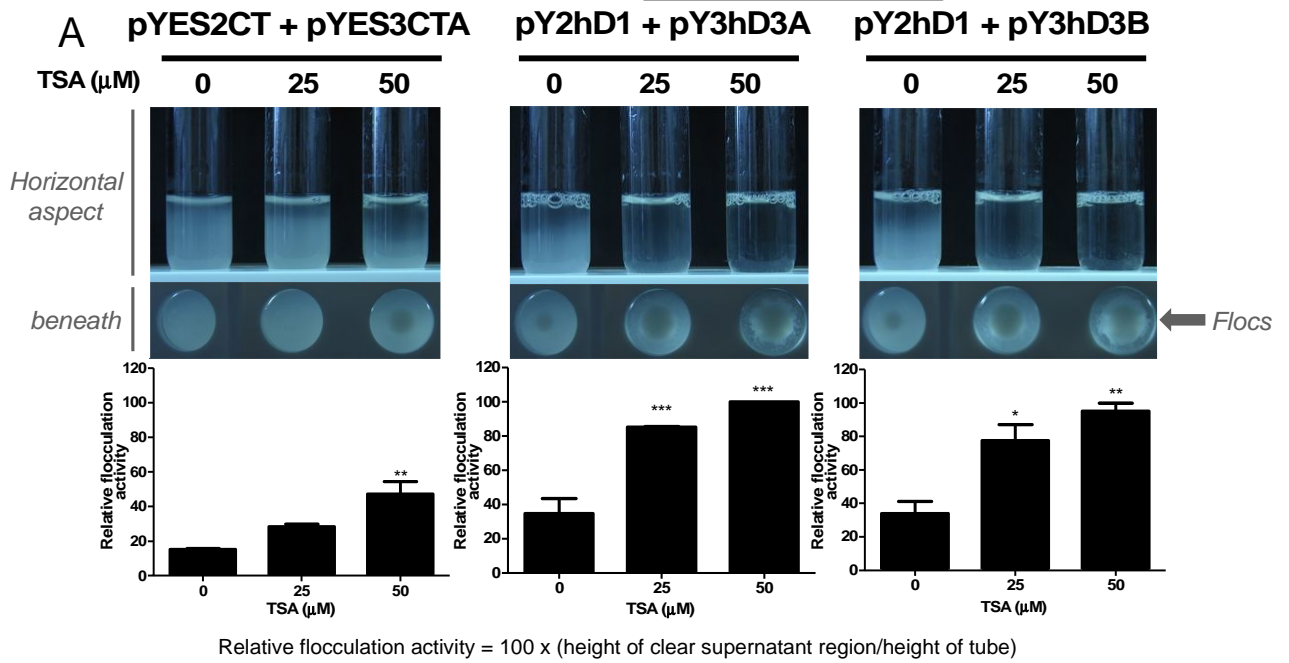
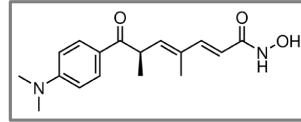


図1 TSAが凝集反応に及ぼす影響

A: 凝集試験, B: RT-PCR

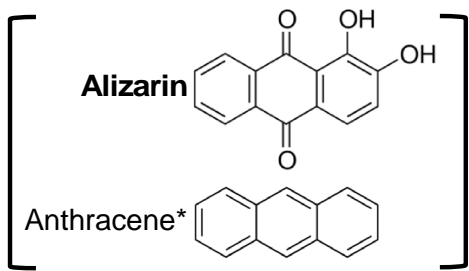
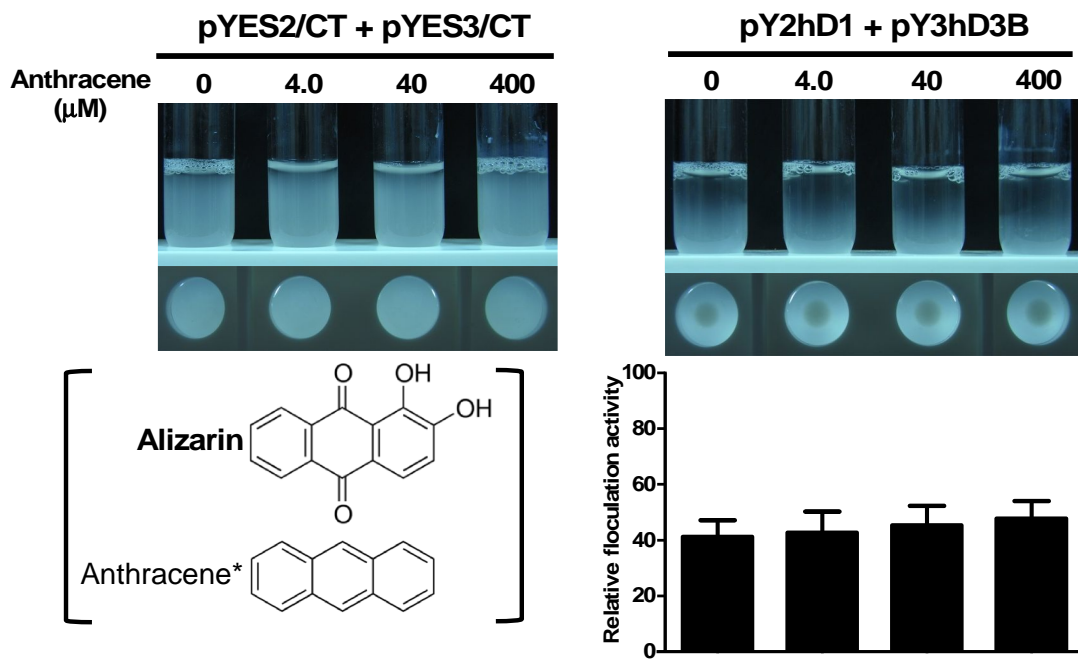
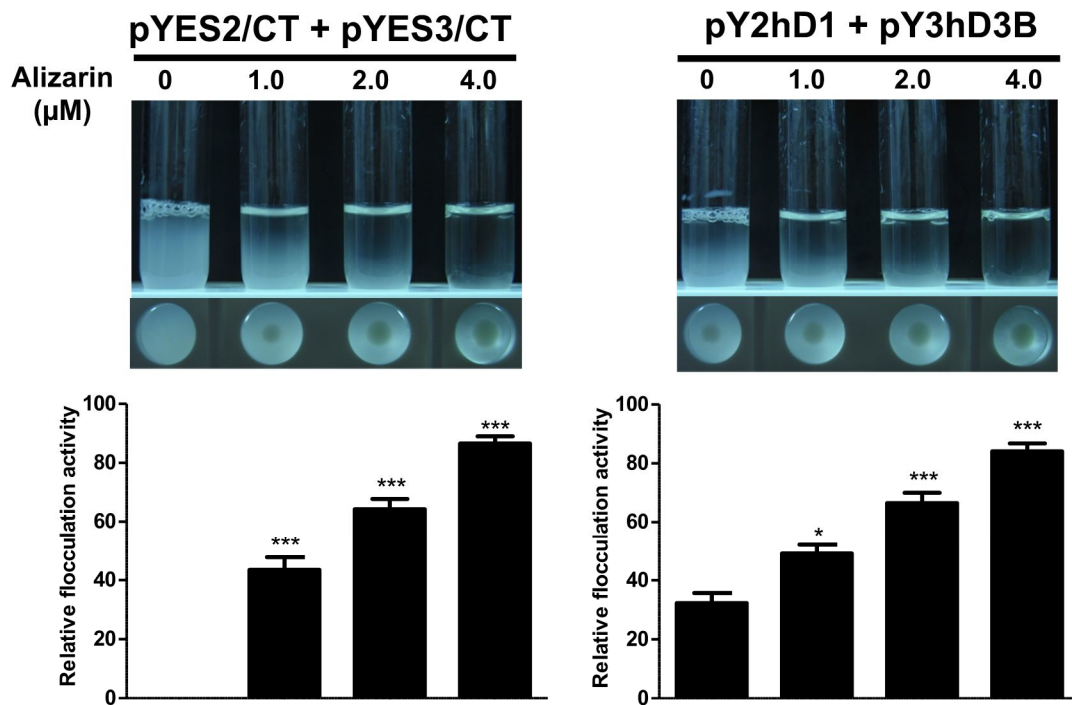


図2 アリザリンとアントラセンの化学構造式および同剤処理時の凝集試験結果

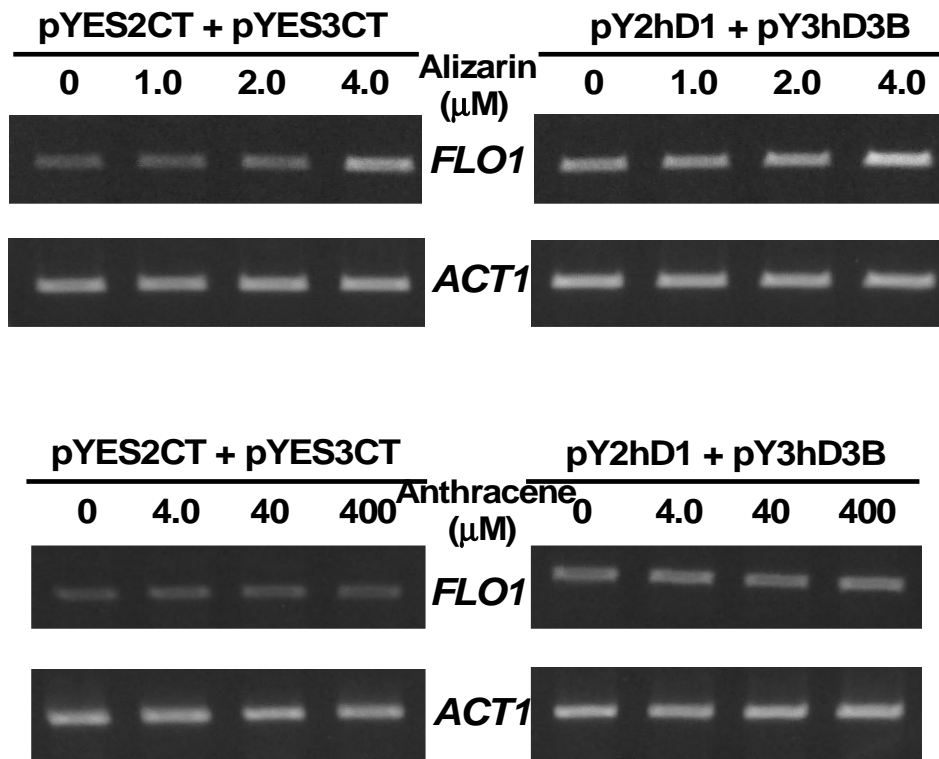


図3 アリザリンとアントラセンが *FLO1* 遺伝子の発現レベルに及ぼす影響

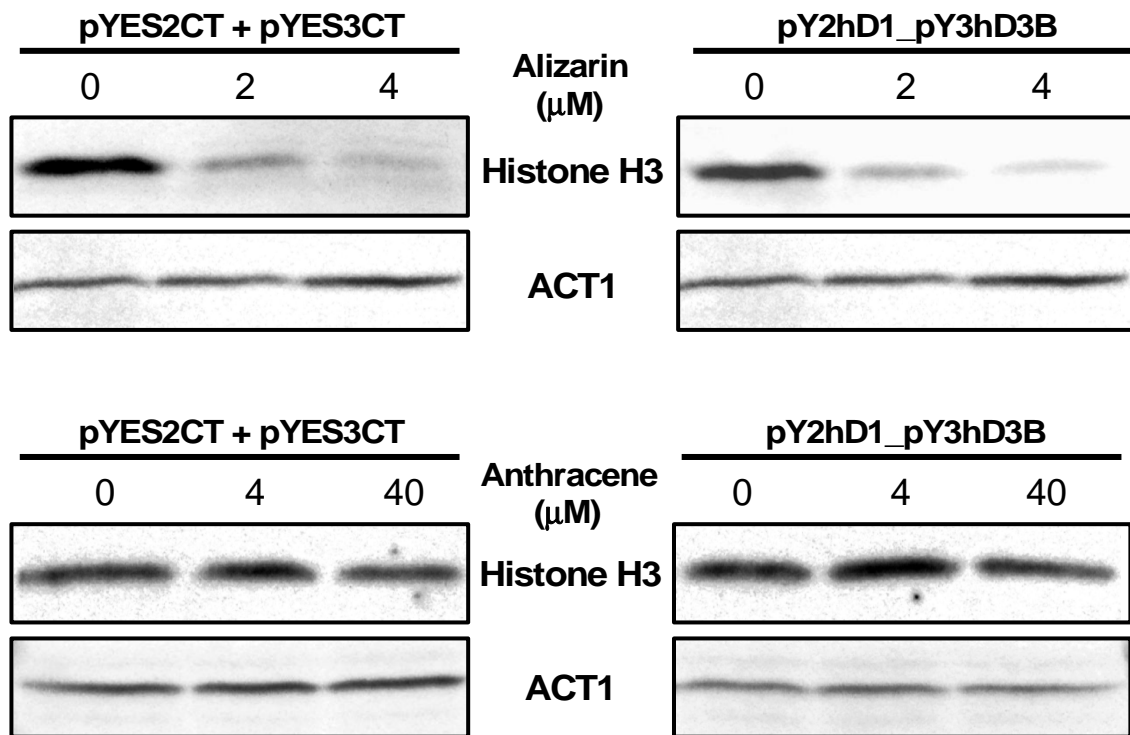


図4 アリザリンとアントラセンが細胞内ヒストン H3 量に及ぼす影響



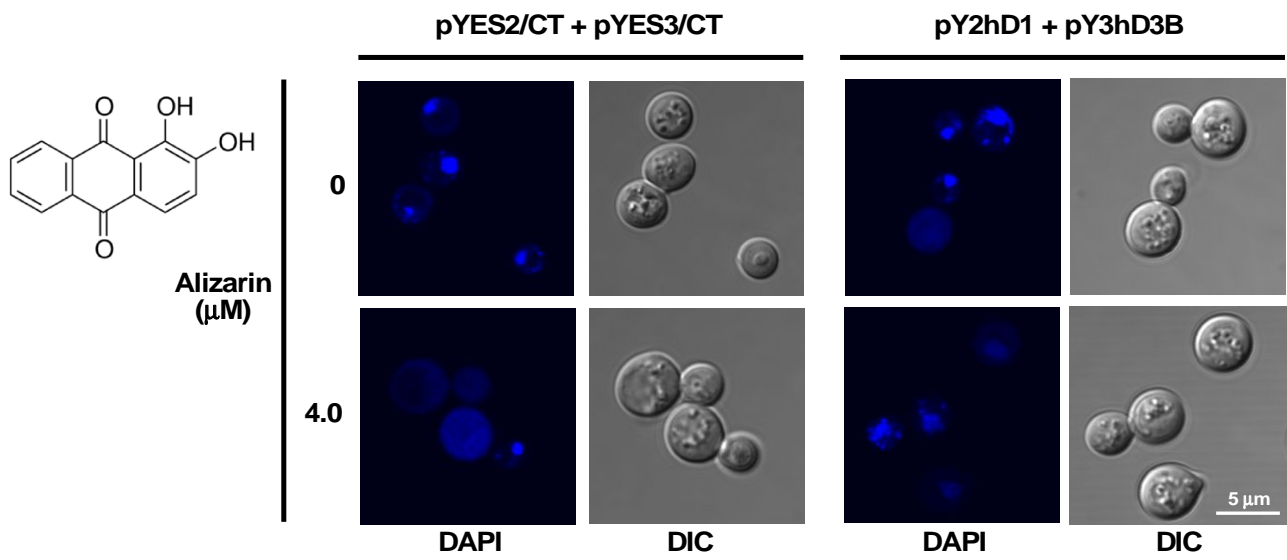


図5 アリザリンが核染色像に及ぼす影響



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、ダイレクトシークエ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 (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。

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 N<sub>2</sub>-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 (N<sub>2</sub>-GSH-Me-dG) の分析を行ったところ、両菌株から N<sub>2</sub>-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

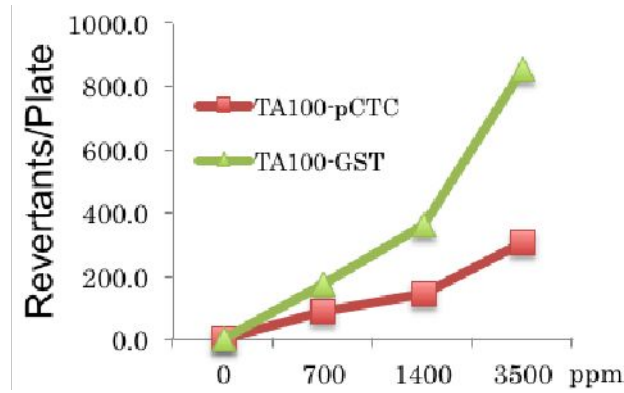


図1 DCMの変異原性発生へのGSTT1の影響

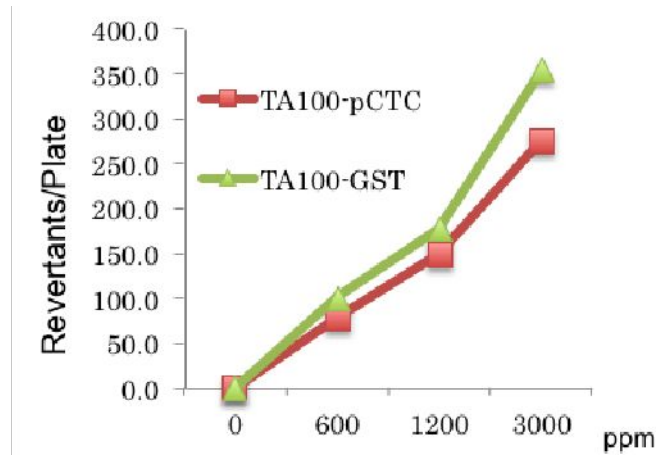


図2 1,2-DCPの変異原性発生へのGSTT1の影響

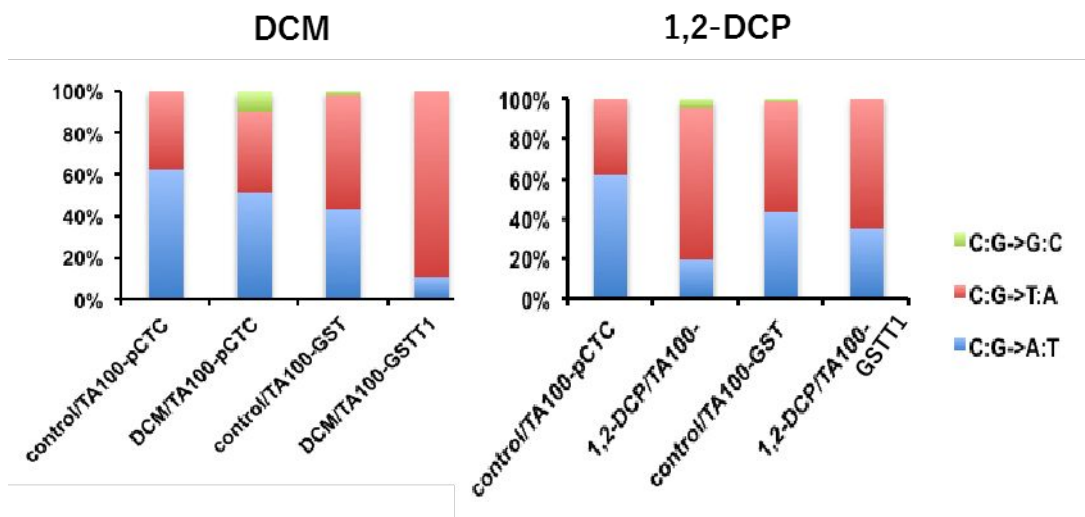


図3 DCM, 1,2-DCPの暴露により観察された変異スペクトラム

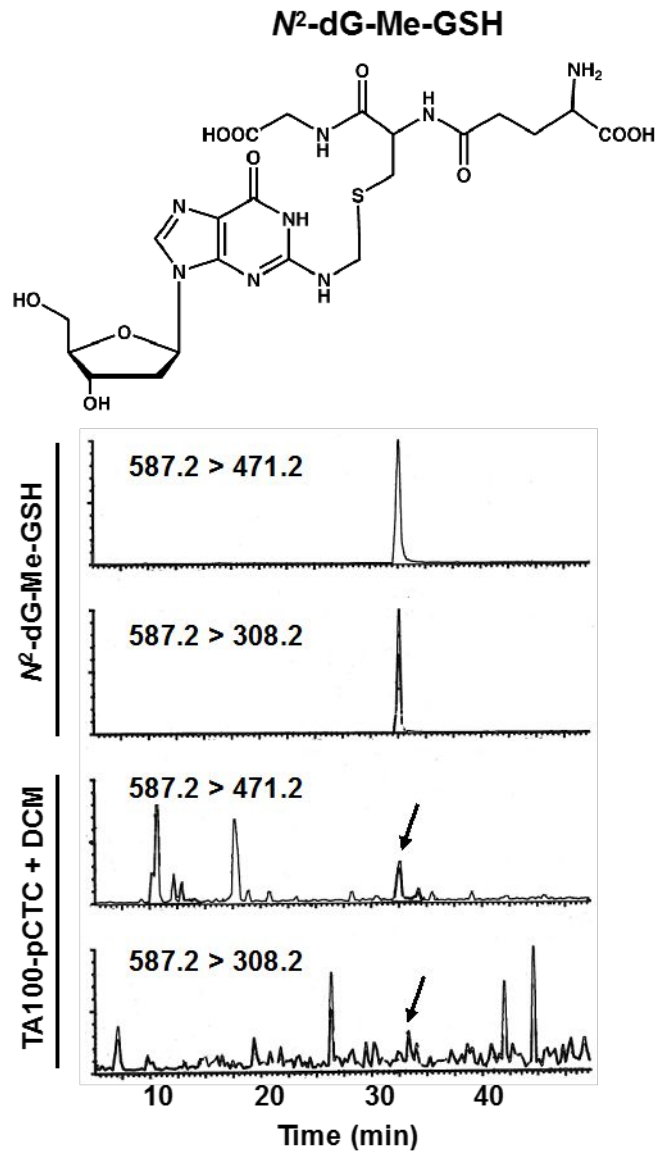


図4 DCM 暴露 TA100-pCTC に検出された N2-GSH-Me-dG





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：重要な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

研究分担者： 高村 岳樹 神奈川工科大学工学部教授

## 研究要旨

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) 修飾オリゴヌクレオチドの合成を行った。PhIP の付加体はこれまでに デオキシグアノシン (dG) の C8 位に PhIP のアミノ基が結合したもののみが知られているため、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。一般的な付加体合成は 8-ブロモ - dG の誘導体を合成する必要があり、今回、この原料の大量合成に成功している。得られた化合物 1 は PhIP とアリルアミネーション反応によりカップリングさせた。その後、オリゴ合成に必要なアミダイトを得るまで各種脱保護、および大量合成に必要な精製法の開発とともに系を最適化した。アミダイトを得るまでの全収率は最適化した条件で dG から初めて 2 % 程度である。得られたアミダイトをオリゴ合成反応に用いるが、このとき脱保護にメルカプトエタノールなどの抗酸化試薬を加えることで、効率よく合成が進むことがわかった。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  $m/z$  7141, 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。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。そのため、オリゴ内でも PhIP の互変異体が存在しているものと思われる。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、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。

キーワード: バルキ-DNA 付加体, PhIP, オリゴ合成

## A. 研究目的

食品中の変異原物質は DNA を損傷し、変異を誘発することが知られているが、変異誘発機構については、十分に理解されている状態ではない。変異誘発機構の解明には、損傷塩基を含んだ短鎖

オリゴヌクレオチドである、部位特異的修飾オリゴヌクレオチドを用いた *in vitro* の系による損傷乗り越え修復 (TLS) の研究がなされてきており、多くの知見が蓄積されている。一方で、*in vivo* TLS の例としてはバクテリアを用いる系やヒト細胞

株を用いる系など様々であるが、系によっては、異なる TLS の結果を与えることがわかっている。そのため、いくつかの *vivo* の系を組み合わせることにより、得られる情報を相互に比較し、動物個体に変異原物質を投与した際の変異データから得られる知見を担保することが重要である。

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が、上述のように既存の動物個体データを活用できるものは多くない。焼肉などの加熱食品中に含まれるがん原性ヘテロサイクリックアミンの一つである

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP 図1) は、Ames 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。PhIP の環外アミノ基が酸化され、ヒドロキシルアミンに変化し、その後アセチル化された後、ニトレンウムイオンとなりこれが強い求電子性を持つことからグアニンの8位と共有結合し DNA 付加体を形成することが予想されている(図2)。この付加体は 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 TLS 試験では APC 遺伝子に部位特異的に PhIP 修飾を施したものをを用いた *in vitro* の系が知られているが、*in vivo* TLS のデータは存在しない。そこで、*in vivo* TLS に向けた PhIP 修飾オリゴヌクレオチドの合成をおこなった。

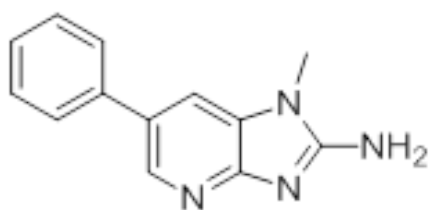


図1 PhIP の化学構造

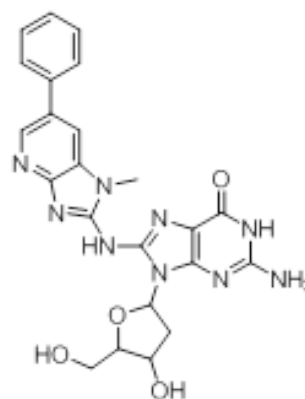


図2 dG-C8-PhIP の化学構造

## B . 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

ヒトおよび動物を用いない実験であるため、必要な倫理審査はない。廃液などの観点から、不必要な量の溶媒の使用をしないなど、環境に影響を与える部分で注意をしながら実験を行った。

## C . 研究結果

昨年度までの結果を参考に、dG の8位のプロモ体(8-Br-dG)誘導体の合成からはじめた(図3)。シリル基で保護をしたデオキシグアノシンを NBS / 酢酸の系でプロモ化し、得られた誘導体の O6 位をベンジル保護をおこない、さらに N2 位をトリチル保護を行った。得られた dG 誘導体は PhIP との Buchwald アミノ化反応をもちい、xanthophos 存在下、Pd(0)および塩基として炭酸セシウムをもちいて、カップリングさせた。PhIP の有機溶媒への溶解性の問題から DMSO を溶媒として用い、反応温度は 150 で1時間でおこなっ

た。得られた付加体誘導体は NMR により構造を確認した後、Pd black 存在下、水素添加反応により、ベンジル位の脱保護をおこない、さらにトリチル基は 3% トリクロロ酢酸処理により脱保護した。各段階を HPLC で反応の進行を確認した。その後 DMF-DMA による、アミジン保護は 1 時間で反応が完結し、またシリル保護はトリエチルアミン・フッ化水素により脱離させた。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。このとき、ジトリチル体の生成はほとんどないことを確認した。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。なお、用いたアミダイトはアルドリッチ社から TCI へと変更を行っている。

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。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  $m/z$  7141, 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 (図 4)。

一方、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。

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。そのため、オリゴ内でも PhIP の図に示すような互変異体が存在しているものと思われる (図 5)。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。

## D. 考察

昨年度から続いてオリゴヌクレオチドの合成を行った。カラム分離の方法および試薬メーカー、合成メーカーを変更することで目的とするオリゴヌクレオチドを得ることができた。現在さらにオリゴヌクレオチドを合成中である。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  - 1) 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(2016, つくば)
  - 2) 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(2016, つくば)
  - 3)

## H. 知的所有権の取得状況

なし

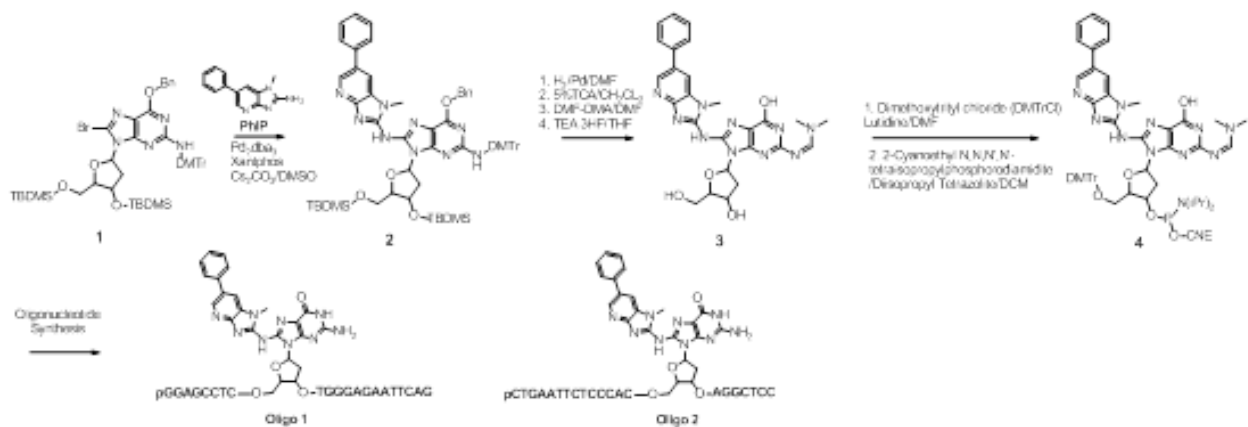


図3 PhIP 修飾オリゴヌクレオチド合成のスキーム

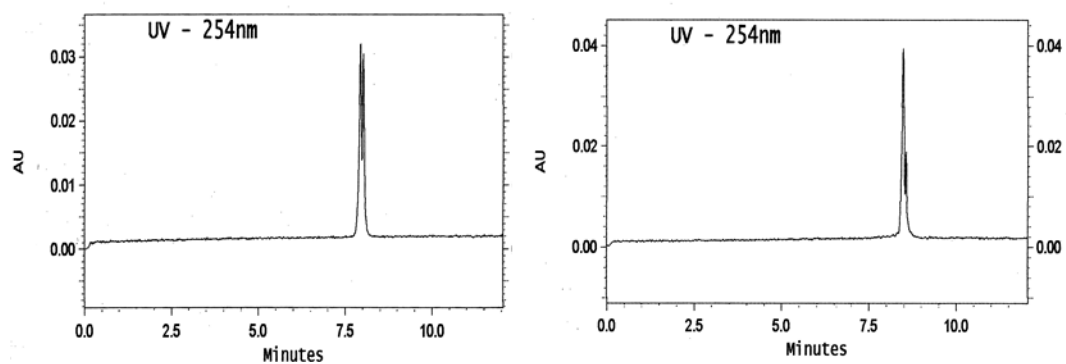


図4 キャピラリー電気泳動によるオリゴヌクレオチドの解析  
(上)オリゴ1の結果 (下)オリゴ2の結果

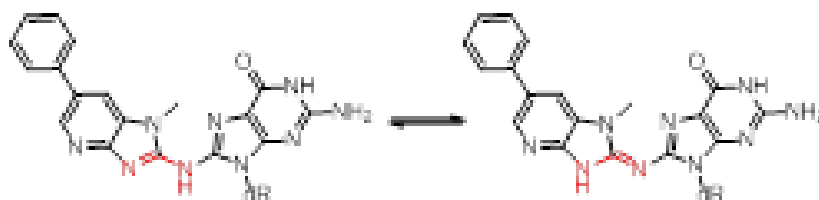


図5 PhIP の互変異性

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： 重要な DNA アダクトの合成に関する研究**

研究分担者：正田 卓司 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 室長

**研究要旨**

生命の設計図である DNA に化学物質が結合すると、その遺伝子の機能が破壊される。このような DNA アダクトが蓄積すると細胞の癌化につながると考えられる。そのため、DNA アダクトの生成機構、除去、修復機構を明らかにすることは極めて重要である。本研究では、安井らが開発した TATAM 法に必要な DNA アダクト含有オリゴ DNA を提供するために、DNA 合成に使用するホスホロアミダイト体の合成法を確立することを目的とする。本年度は IQ (3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinolin-2-amine) の DNA アダクトの合成を試みた。平成 27 年度において見出した Microwave を使用した Buchwald-Hartig 反応によって、保護 8-Br-dG に IQ を導入したが、精製の段階において順相条件では純品を得ることができなかった。そこで粗生成物の保護基 (DMTr 基および TBDMS 基) の脱保護を行い、生成した IQ 付加体を逆相 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。今後ホスホロアミダイト体の合成及びオリゴ DNA の合成を行う。

**A. 研究目的**

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。生命の設計図である DNA も化学物質と結合し、DNA アダクトを形成する。そのため、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。この分野での古典的な研究は個体あるいは細胞に化学物質を与え続けてがん化した細胞から DNA アダクトを検出、同定するといったものである。しかしながら、実際に生じた DNA アダクトが、細胞の発がん性に与えた影響について定量的に解析された例はほとんどなかった。一方、当所変異遺伝部安井らが開発した TATAM 法<sup>1)</sup>は、DNA 損傷と発がん性を定量的に解析できる手法であり、DNA アダクトと発がん

性の関係を詳細に解明することが可能になると考えられる。そこで本研究では、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 アダクトの合成および、そのホスホロアミダイト体の合成を行うこととした。

DNA アダクトのホスホロアミダイト体を合成するには、出発原料である 2'-デオキシグアノシン (dG) の構造に含まれる窒素原子 (N) や酸素原子 (O) を適切に保護することが重要である。DNA アダクトにはグアニン塩基の 1 位、2 位、8 位に N があり、6 位に O がある (Figure 1)。一般的には、6 位 O をベンジル (Bn) 基で、2 位をジメトキシトリチル (DMTr) 基で保護した化合物を合成中間体として用い、ホスホロアミダイト体合成前に 6 位 Bn 基は脱保護するが、6 位 Bn 基の脱保護条件は化合物の構造や実験環境の影響を受けやすく、反応条件が一定しないなどの問題が

あり、適宜反応条件の検討が必要となる。また、保護・脱保護の繰り返しによるステップ数の増加は、収率の低下にもつながるため、できるだけステップ数を短縮することが重要となる。私は平成27年度において、6位無保護のdGに対してBuchwald-Hartwig反応条件(Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, Xantphos, 炭酸セシウム)にTHFを溶媒としてさらにmicrowaveを用いることで2-aminofluorene(9*H*-fluoren-2-amine, Figure 2)やMeIQx(3,8-dimethyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoxalin-2-amine, Figure 2)を導入することが可能であることを示している。その結果、既存の合成スキームにくらべて2ステップ分の短縮が可能となった。そこで本研究では本手法の有効性を確認するため、IQ(3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinolin-2-amine, Figure 2)の付加体合成(dG-C<sup>8</sup>-IQ)への検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試薬と装置

試薬は和光純薬、東京化成、関東化学から購入し、特に精製せずにそのまま用いた。化合物の精製には中圧分取液体クロマトグラフ(EPCLC-W-Prep 山善)および逆相分取LCMS(島津社製 MS 検出器; prepLCMS-2010EV)を用いた。逆相系の溶媒としてはA: 0.2 M HCOONH<sub>4</sub>, B: CH<sub>3</sub>CNを用いた。

Microwave 照射装置には Initiator (Biotage) を用いた。

<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR スペクトルは ECZ600 (プロトン共鳴周波数 600MHz (JEOL)) を用いて測定した。溶媒には CDCl<sub>3</sub> または DMSO-*d*<sub>6</sub> を用い、化学シフトは TMS を内部標準として用いた。

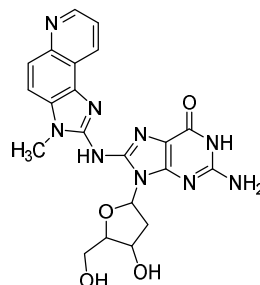
分析用 LCMS は島津 IT-TOFMS (LC 部分: システムコントローラ CBM-20A, ポンプ LC-20A, カラムオープン CTO-10AC, UV/フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M20A) を用いて測定した。カラムは CAPCELL PAK C18 MGII 5μm, 2.0 x 35 mm (SHISEIDO) を用いた。溶媒は A: 0.1%

HCOOH/H<sub>2</sub>O, B: 0.1% HCOOH/CH<sub>3</sub>CN (いずれも関東化学) を用いた。

### 2. 合成

#### 1) dG-C<sup>8</sup>-IQ (12) の合成

十分に窒素置換した 3 ml の THF に化合物 4 (44.3 mg, 0.05 mmol), IQ (22.1 mg, 0.1 mmol), xantphos (30.2 mg, 0.05 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (33.6 mg, 0.1 mmol), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (10.6 mg, 0.01 mmol) を添加し, microwave 照射下, 100 °C, 6h 撹拌した。ろ過した反応液を減圧留去し, シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。上記の反応を繰り返して得られた粗生成物(約 350mg)を 5 ml の 3% TCA/DCM に溶解し, 室温にて 4 時間撹拌した。ここにトリエチルアミン 150 ul を添加して中和し, 更に TEA · 3HF 600 ul を添加して終夜撹拌した。固体が析出してきたことを確認し, 溶媒を減圧留去した。固体を DMSO に溶解し, 逆相 HPLC にて該当画分を凍結乾燥した。白色固体を少量の水に溶解し, 析出してきたオレンジ色の固体を桐山ロートで一旦濾取し, 濾液を捨てた後にさらにメタノールでオレンジ固体を溶解し, この溶媒を減圧留去したところ, 白色固体とオレンジ固体の混ざりが得られた。ここに少量の水を注ぐと両固体は溶解したので, SepPak (5g) にロードし, 水で洗浄した後にメタノールで溶出した。着色したメタノール画分を減圧留去したところ白色固体は見られず, オレンジ固体が得られた。33 mg の化合物 12 (黄色固体) を得た。



<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.98 (s, 1H), 8.78 (m, 1H), 8.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.54 (dd,

$J = 8.4, 4.2$  Hz, 1H), 6.52 – 6.42 (m, 3H), 4.50 – 4.45 (m, 1H), 3.78 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.66 (m, 1H), 3.31 (m, 1H), 2.04 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  154.62, 153.83, 153.23, 149.73, 149.12, 148.31, 145.08, 131.18, 129.64, 128.99, 122.29, 121.34, 118.25, 113.72, 104.60, 90.58, 87.91, 82.45, 71.84, 62.86, 40.56, 40.44, 40.30, 40.17, 40.03, 39.89, 39.75, 39.61, 36.36, 29.12.

MS (ESI+)  $m/z = 463$  [M + H]<sup>+</sup>

## C. 結果と考察

### 1. dG- $C^8$ -IQ 付加体の合成

ヘテロサイクリックアミン (Heterocyclic amine, HCA) 類は食品中の焦げに含まれる化学物質であり、これらが DNA アダクトを形成することが知られている。前年度で検討した MeIQ<sub>x</sub> 付加体 (dG- $C^8$ -MeIQ<sub>x</sub>) の合成ルートを Scheme 1 に示す。一般的な dG 付加体合成ルートは、6 位の O を Bn で保護するが、前年度、特にキーとなる反応である Buchwald-Hartwig 反応について、6 位 O が無保護の状態である化合物 4 を用いて条件検討を行ったところ、溶媒を THF とし、microwave を用いることで MeIQ<sub>x</sub> を導入することが可能であることがわかった。そこで本年度は導入するヘテロサイクリックアミンを IQ に変更して、条件検討を行った。まず、化合物 4 に対して IQ 2 当量、xantphos 1 当量、炭酸セシウム 2 当量、Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> 0.2 当量、溶媒を THF とし、microwave 照射下、100 °C、6 時間で反応を行ったところ、目的化合物 5 が生成していることを LCMS にて確認した。原料 4 が数%残っていることが確認されたが、反応時間を延長しても変化がなかったため、反応は終了したと判断した。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。TLC で確認できたスポットを含む画分を集め、その溶媒を留去し、得られた固体の構造を NMR にて確認したところ、大量の不純物が含まれており、生成物 5 のシグナ

ルを確認することが困難であった。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る。少量を逆相 LCMS に供したところ、目的化合物 5 の分子量が確認されたため、複数回の精製作業で純度を高めることができると考えたが、改善されなかった。そこで、逆相条件での精製を検討したが、化合物の疎水性が高く、溶解する溶媒が見当たらなかった。そこで、化合物の脱保護を行い、水溶性を高めてから逆相 HPLC にて精製することを考えた。そこで合成ルートの再検討を行った。新たな合成ルートを Scheme 2 に示す。当初予定していた合成ルート (Scheme 1) では、順相カラムによる精製を前提としていたため、各ステップで得られる化合物の疎水性は高い。そのため 3', 5' 位を TBDMS で保護した化合物 6 を DMF-DMA で処理して化合物 7 を得た後に 3', 5' 位を脱保護して化合物 8 を得た。化合物 6, 7 は水溶性官能基である OH 基が保護されているため、親水性が低い。そのため、順相カラムによる精製が容易であった。一方、逆相 HPLC による精製は、化合物の親水性が高いほうが望ましい。そのため 3', 5' 位を脱保護して OH 基が露出した化合物 12 を経由して化合物 8 を得ることとした。化合物 12 は比較的親水性が高いため、逆相 HPLC による精製が容易になると考えた。

予備的検討により、DMTr 基をトリクロロ酢酸 (TCA) で処理した後に、トリエチルアミン (TEA) 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、化合物 12 の粗生成物を得た。逆相 HPLC で精製するために化合物 12 を溶解する溶媒を検討したところ、水、アセトニトリル、メタノール等では沈殿が生じたため不適切であり、DMSO が最適であることがわかった。また逆相 HPLC での精製は通常は HCOOH や TFA を 0.1% を含む酸性条件 (pH2.5 程度) の溶媒を用いるが、化合物が酸に

対して不安定である可能性を考え、0.2M HCOONH<sub>4</sub> を用いて中性条件による精製を行った。化合物 12 の分子量を指標に得られた画分を凍結乾燥したところ、白色固体が大量に析出したことから、HCOONH<sub>4</sub> が揮発せずに析出したと考えられた。そこで、少量の水を添加したところ白色固体は溶解し、オレンジ色の固体が析出した。このオレンジ色個体を桐山ルートで濾取し、少量の水で洗浄しようとしたところ、一部固体が溶解した。以上の状況から、化合物は塩析により析出しており、この濾液にはギ酸アンモニウムが含まれていると考えられたので、この濾液を捨てた後に大量の水およびメタノールでオレンジ色固体を溶解し、溶液を減圧留去後、再度少量の水に溶解し、SepPak C18 cartridge にロードし、大量の水で洗浄後、メタノールで抽出した。メタノールを減圧留去したところ、オレンジ色の固体(30mg)を得た。これを NMR にて構造を確認したところ、化合物 12 であることを確認した。

#### D. 結論

本研究では、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 MeIQ<sub>x</sub> 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。

#### E. 参考文献

- 1) Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T, Honma M: Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair (Amst)*, **15**, 11-20 (2014).
- 2) Gillet LC, Scharer OD: Preparation of C8-amine and acetylamine adducts of 2'-deoxyguanosine suitably protected for DNA synthesis. *Org Lett*, **4**, 4205-4208 (2002).

#### F. 健康危機情報

特になし。

#### G. 研究発表

- 1) 特になし

#### H. 学会発表

- 1) 特になし



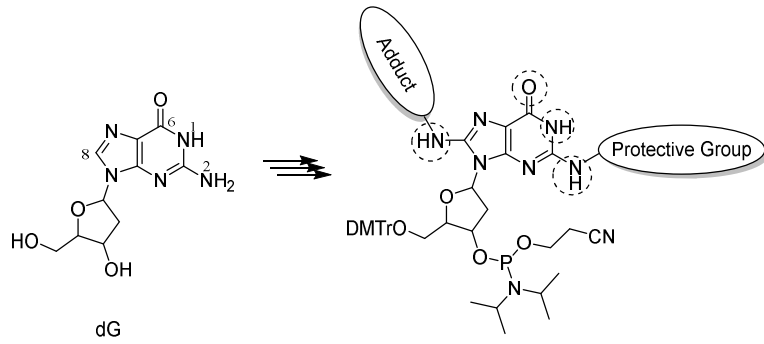


Figure 1 dG (2'-deoxyguanosine) および , ホスホロアミダイト体の構造

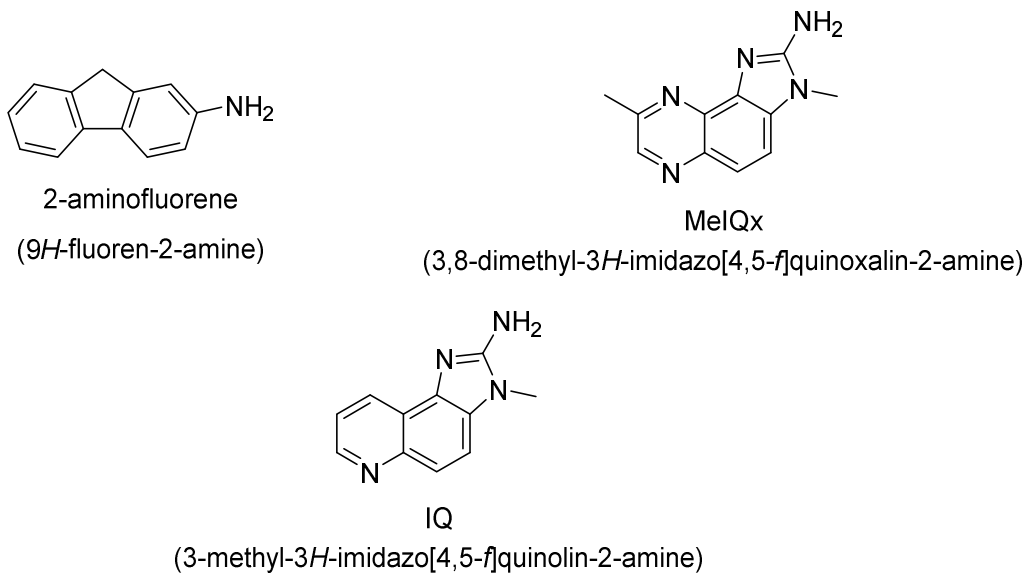
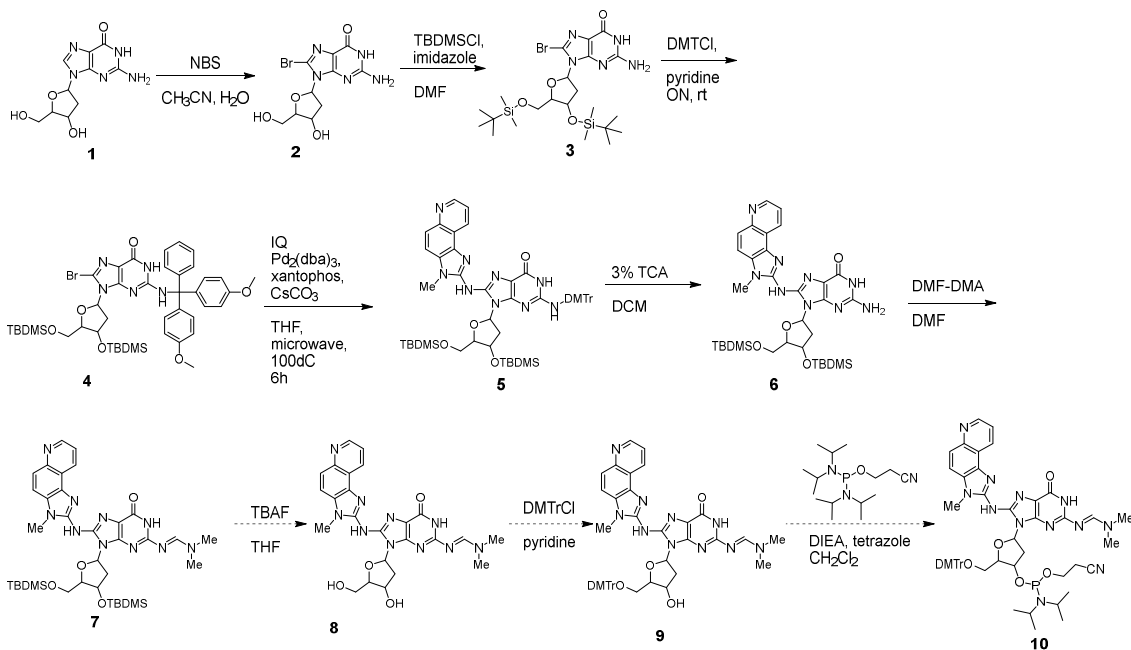
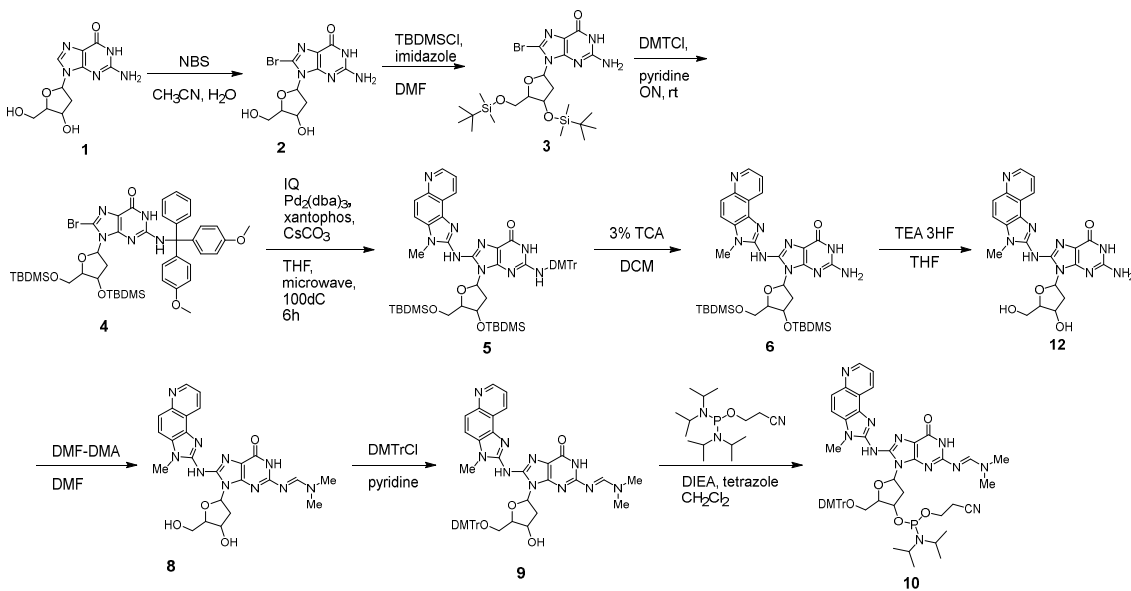


Figure 2 本研究で取り上げたヘテロサイクリックアミンの構造

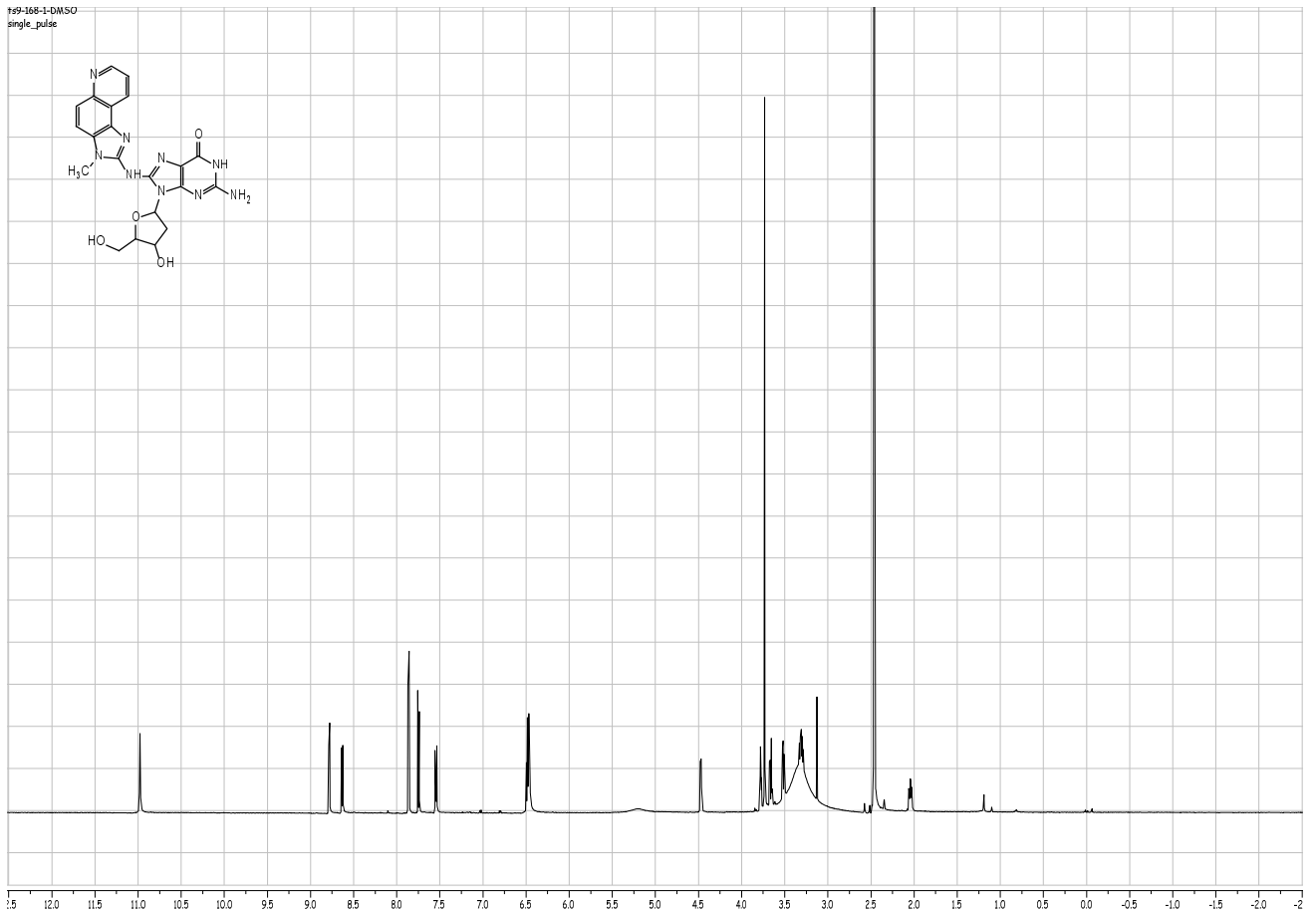
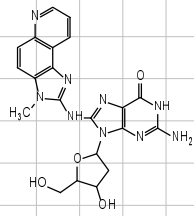


Scheme 1 dG-C8-MeIQx アダクトの合成スキーム.

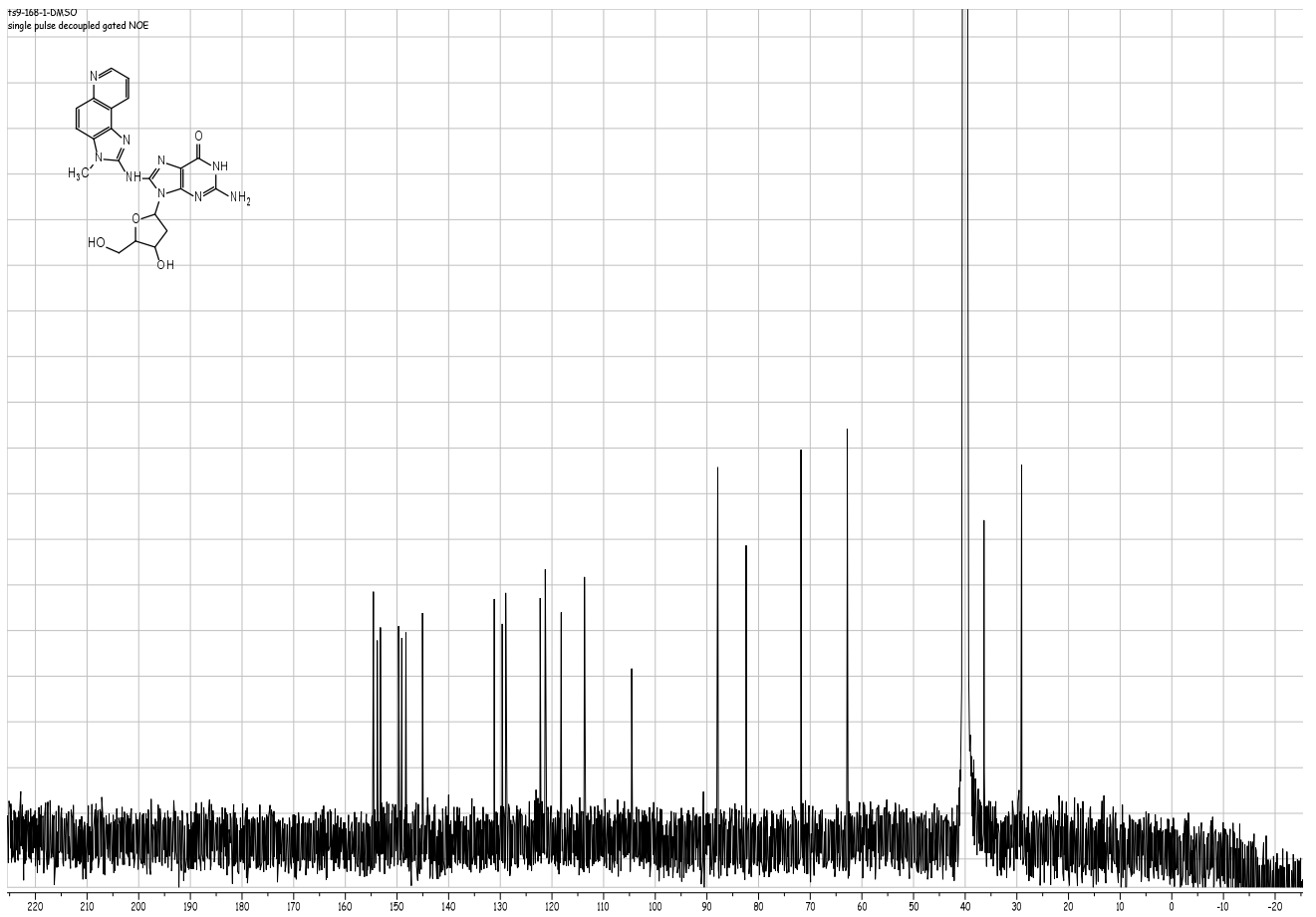
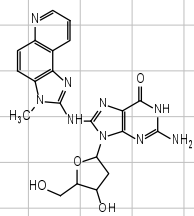


Scheme 1 dG-C8-AAF の合成ルート

F99-166-1-DMSO  
single\_pulse



F99-166-1-DMSO  
single\_pulse decoupled gated NOE





## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Sassa A, Çağlayan M, Rodríguez Y, Beard W, 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
Sugiyama, K., Furusawa, H., Shimizu, M., Grúz, P. and Honma, M	Epigenetic mutagenesis as histone modulation can be detected by yeast flocculation.	Mutagenesis	31	687-693	2016
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
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