

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 29 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成 30 (2018) 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 dG-C8-PhIP に関わるヌクレオチド除去修復機構に関する基礎的研究 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 2
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 1
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 5
高村 岳樹	

重要な DNA アダクトの合成に関する研究	3 9
出水 庸介	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添 5）	4 6
---------------------------	-----

**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。

（A）DNA 付加体に関しては PhIP 修飾オリゴヌクレオチドの合成を行った。脱保護の方法による影響についても今後検討する必要がある。また、ベンゾピレン（BaP）の付加体合成では、ピレノールから始める合成が適しており、ジオールエポキシサイドの合成までの方法論が明らかになった。MeIQx および IQ を含む DNA の合成ではアダホスホロアミダイト体の合成法の確立を試みた。Buchwald-Hartig 反応のリガンドや溶媒、反応時間等を検討するとともに、さらにステップ数を削減するべく、2 位無保護における反応条件を検討した。ジクロロメタンおよび 1,2-ジクロロプロパン（DCP）は、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。DCP の変異原性誘発メカニズムの解明のため DCP に由来する付加体の探索を行ったところ、デオキシグアノシン由来の付加体である DCP86 が同定できた。

（B）バルキー-DNA 付加体の dG-C8-PhIP を TATAM 法により XPC もしくは ERCC6 を改変細胞のゲノム DNA に導入し、その突然変異頻度と変異スペクトルを正常細胞と比較したところ、大きな違いは観察されなかった。このことは dG-C8-PhIP 付加体の DNA 修復に関与していないこと、もしくは TATAM 解析がバルキー付加体に適用できない可能性があることが示唆された。

（C）エピ変異原に関しては凝集遺伝子 *FLO1* プロモーター活性を指標としたエピ変異原検出系の構築を目指した。レポーター遺伝子には非破壊で測定可能な Green fluorescent protein（GFP）遺伝子を用い、被検物質には昨年度の研究からエピ変異原の可能性が推測されたプルプリンを使用した。*FLO1* レポーター活性に及ぼすプルプリンの効果については、凝集性に対する効果と矛盾ない濃度依存的な GFP 蛍光強度の上昇が確認された。プルプリンが *FLO1* レポーター活性に示した本効果は凝集促進作用を有するアリザリン処理においても認められた。

## 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 室長
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
出水庸介	国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 部長

## 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、健康リスクもゼロに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) バルキー-DNA 付加体 dG-C8-PhIP に関するヌクレオチド除去修復機構に関する基礎的研究 (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である PhIP の変異原性の解析を、正常細胞、および DNA 修復欠損細胞を用いて比較検討を行った。PhIP は、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である。一般的に、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が、ほとんどの

付加体は、NER 機構に存在するグローバルゲノム NER (GG-NER)、あるいは転写共役型 NER (TC-NER) のどちらで修復されるかは不明であり、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、GG-NER および TC-NER に必須の遺伝子である XPC および ERCC6 を、それぞれ改変した細胞を用いて、ゲノム導入された dG-C8-PhIP 付加体の突然変異誘発能の解析を行った。

#### 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。本年度では、昨年度までの結果を踏まえ、凝集性と比較してより定量的でかつ頑健性が期待できる凝集遺伝子 (FLO1 遺伝子) のプロモーターを用いたレポーターアッセイによるエピ変異原検出システムの構築を試みた。

#### 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 1,2-ジクロロプロパン (DCP) 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おり、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、その関連性は未だ良くわかっていない。昨年度の研究から代謝物の影響はないことが示唆されたため、本年度は DCP と DNA の直接反応によって形成される DNA 付加体の同定を試みた。

#### 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):

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 PhIP

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 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。また、加熱食品の加熱時に生成する可能性のある発ガン性物質ベンゾピレンが dG に付加した dG-N2 付加体の別途合成方法の開発、さらに、O6 位にグリコール酸 (GA) 修飾した付加体 dG-O6-GA 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 (出水):

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 DAN アダクトとホスホロアミダイト体の合成を行った。IQ 平の付加体合成 (dG-C8-IQ) への検討を行ってきたが、本年度は反応のリガンドや溶媒、反応時間等を検討するとともに、さらにステップ数を削減するべく、2 位無保護における反応条件を検討した。

### **B . 研究方法**

#### 1) バルキー-DNA 付加体 dG-C8-PhIP に関するヌクレオチド除去修復機構に関する基礎的研究 (安井):

ヌクレオチド除去修復機構 (NER) のにグローバルゲノム NER (GG-NER) に関与する XPC 遺伝子 (XPC タンパク質) と、転写共役型 NER (TC-NER) に関与する ERCC6 遺伝子 (CSB タンパク質) のノックアウト (KO) あるいはノックイン (KI) した改変細胞をヒトリンパ芽球 TSCER122 細胞から CRISPR/CAS9 を用いて作成した。また、研究分担者である高村より供与された部位特異的に dG-C8-PhIP を 1 分子含む DNA オリゴマーから作成したターゲティングベクターを構築した。このターゲッティン

グベクターを TATAM (Tracing DNA adducts in targeted mutagenesis) 法により正常細胞、GG-NER 細胞、TC-NER 細胞に導入し、突然変異頻度を計測すると共に、変異スペクトルを DNA シークエンスにより解析した。

#### 2) エピ遺伝毒性物質の評価系の開発 (杉山):

Green fluorescent protein (GFP) 変異体 (eGFP) をレポーター遺伝子として *FLO1* レポータープラスミドを構築した。構築したプラスミドを酵母に形質転換し、アリザリンおよびアリザリン類縁体のプルプリンが *FLO1* レポーター活性に及ぼす影響を解析した。

#### 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):

Ames 試験に用いる試験菌株である、*Salmonella typhimurium* TA100 に 1,2-DCP (15000ppm) を 2 時間気層曝露した後バクテリアを回収し、ゲノム DNA の抽出を行った。DNA を各種ヌクレアーゼによりモノヌクレオチドに分解し、生成する DNA 付加体を質量分析機器を用いて網羅的に解析した。得られたデータを主成分 (PCA) 解析により解析し、1,2-DCP 曝露に相関する付加体の抽出を実施した。精密質量数を用いて抽出した任意の付加体の分子組成式の推測をソフトウェアにより行った。

#### 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):

昨年度の同様の方法で、dG-C8-PhIP のアミダイトの合成を試みているが、合成の困難さも有り、現時点ではオリゴヌクレオチドまで合成できていない。PhIP で修飾された dG-C8-PhIP のアミダイトまではあと少しの行程であるが、昨年度までの合成時と若干、反応性が異なることが明らかになっており、その原因について検討が必要である。またベンゾピレンの付加体については付加体反応の手前までの合成を行った。また GA 付加体については、定法により合成を進めた。

#### 5) 重要な DNA アダクトの合成に関する研究

(出水):

MeIQx および IQ を含む DNA の合成ではアダホスホロアミダイト体の合成法の確立を試みた。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 撪拌した。上記反応条件をもとに、溶媒 (DMSO、DMF、toluene 等)、リガンド (JohnPhos、SPhos、XPhos、) DavePhos 等)、塩基 (t-BuOK、NaPO<sub>4</sub> 等)、触媒、反応時間、量比等を検討した。

(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-DNA 付加体 dG-C8-PhIP に関するヌクレオチド除去修復機構に関する基礎的研究 (安井):

野生株である TSCER122 細胞に dG-C8-PhIP を含むターゲティングベクターを TATAM 法によりゲノムに導入し、解析した結果、164 細胞中に 6 つの細胞で dG-C8-PhIP のゲノム導入部位周辺の塩基変異 (4.2%) が検出され、また、2 つの細胞からは大きな欠失 (1.4%) が観察された (合計 5.6%)。一方、コントロールベクターで得られる自然突然変異頻度は 1.7% (Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* 15, 11-20 (2014)) であるため、dG-C8-PhIP によって突然変異誘発頻度が約 3 倍増加したことが分かった。

一方、XPC KO 細胞、および ERCC6 KI 細胞のゲノムに dG-C8-PhIP 付加体を導入して同様の実験を行ったが、XPC KO 細胞では 186 細胞中に 4 つの細胞で塩基変異と一塩基欠失 (2.4%)、また、ERCC6 KI 細胞では 172 細胞

中にわずか 1 細胞 (塩基変異と一塩基欠失を同時に誘発; 0.6%) しか検出されなかった。

2) エピ遺伝毒性物質の評価系の開発 (杉山):

酵母凝集性に対するプルプリンの作用を検討した結果、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、プルプ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、プルプリン処理時における核染色像の異常も観察された。*FLO1* レポーター活性に及ぼすプルプリンの効果については、凝集性に対する効果と矛盾ない濃度依存的な GFP 蛍光強度の上昇が確認された。プルプリンが *FLO1* レポーター活性に示した本効果は凝集促進作用を示すアリザリン処理においても認められた。以上の結果は、凝集試験より簡便でかつ定量性が担保された *FLO1* レポーターアッセイが、エピ変異原検出系として利用可能であることを示唆している。

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):

PCA 解析を行なった結果、1,2-DCP に関連する付加体として抽出されたもののうち、DCP22 [m/z 368.1560; M+H] と DCP86 [m/z 384.1514; M+H] に注目してみたところ、両者の精密質量数から推測した分子組成式と MS/MS フラグメンテーションデータから、DCP86 ではグアニンに相当するフラグメントが、DCP22 ではアデニンに相当するフラグメントが観察され、このことから、DCP86 はデオキシグアノシン由来の、DCP22 はデオキシアデノシン由来の付加体であることが推測できた。

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):

dG の 8 位のプロモ体 (8-Br-dG) 誘導体の合成からはじめた。シリル基で保護をしたデオキシグアノシンのプロモ化は十分に進行しなかった。また保護を行った dG 誘導体は PhIP との Buchwald アミノ化反応をもちいて反応させた。

得られた付加体誘導体を、トリクロロ酢酸を用いて脱保護を行ったが、目的とする化合物が得られていないことが多く見られた。一方で、トリチル基が存在したままでも O6 位のベンジル基は Pd black 存在下、水素添加反応により脱保護可能であることが判明したため、今後脱保護の方法論も含めて検討を行う予定である。

一方、ベンゾピレンの dG 付加体合成に関しては既存の方法を用いた。ピレンアルコール5を脱水する反応で、トルエンスルホン酸をもちいて脱水させ、2重結合を生成させた。得られた化合物6を、ベンゼン溶媒中で I2 と安息香酸銀を用いる Prévost 法によりトランス1,2グリコールを生成した。これにはいくつかの合成方法を検討したが、反応混合物を光から保護し、室温で約1日、攪拌させた後に1時間還流させる方法で合成を行うと収率(80%)よく目的化合物7が得られることがわかった。得られた化合物は DDQ を用いて酸化反応を行い、目的化合物8を得ることが出来た。

#### 5) 重要な DNA アダクトの合成に関する研究(出水):

6位無保護の化合物を用いて IQ 付加体合成時における Buchwald-Hartwig 反応の溶媒(DMSO、DMF、toluene 等)、リガンド(JohnPhos、SPhos、XPhos、DavePhos 等、figure 3)、塩基(t-BuOK、NaPO4 等)、触媒(Pd2(dba)3、Pdacac 等)、反応時間、量比、microwave のありなし等を検討した。しかしながら、初期に見出した条件を上回る条件を見出すことができなかった。また、合成ルートのさらなる短縮化を目指し、2、6位無保護による Buchwald-Hartwig 反応を検討した。様々なリガンドにて検討したところ、LCMS および TLC で反応生成物が確認できたものもあったが、十分な収率で目的化合物を得ることができなかった。Microwave の影響については、どちらについても microwave を用いるほうが反応性の向上が認められた。

## 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」に関しては、国立がんセンターの戸塚が、DCP の変異原性誘発メカニズムの解明のため、バクテリアを用い、DNA 付加体の網羅的解析手法により、DCP に由来する付加体の探索を行った。その結果、グアニン及びアデニン塩基の付加体が生成していることが示唆された。また、これら付加体のフラグメントピークから、[m/z 117.05; M+H]を持つフラグメントが共通で観察されており、このことから、DCP の暴露に由来する官能基がそれぞれ dA 及び dG に付加した付加体であることが推測された。先行研究の結果から、DCP は G:C 塩基に変異を導入することから、おそらく、本研究で抽出されたグアニン付加体が DCP の変異導入に寄与している可能性が示唆された。

(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。XPC と ERCC6 の改変細胞で、dG-C8-PhIP 導入による突然変異誘発頻度の増加と変異スペクトルの変化から GG-NER、もしくは TC-NER のど



ちらかの修復機構の関与が期待された。しかしながら、dG-C8-PhIP 付加体を XPC KO , および ERCC6 KI 細胞のゲノムに導入して調べたが、野生株の突然変異誘発頻度よりも低い結果が得られた。dG-C8-PhIP を含むターゲティングベクターのゲノム導入効率が、野生株と変異株で類似の値を示したことから、各細胞のゲノムに同じような効率で付加体が導入されていると考えられたことから、XPC と ERCC6 は dG-C8-PhIP の DNA 修復に関与しておらず NER 以外の DNA 修復機構が働いていること、あるいは TATAM 解析がバルキー付加体に適用できない可能性があることが示唆された。

神奈川工科大学の高村と、国立衛研の出水は同定された 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。高村はデオキシグアノシンの C8 位に PhIP のアミノ基が結合した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。脱トリチル基後の反応の停止処理 (Workup) 方法によっては、トリチル基の再結合が観察された。より効率的な脱トリチル基の方法が望まれる他、脱ベンジル保護を先に行うほうがアミノ基の塩基性が下がるため、脱離しやすいことが考えられるため、脱保護の方法による影響についても今後検討する必要がある。一方、ベンゾピレン (BaP) の付加体合成では、ピレノールから始める合成が適しており、ジオールエポキサイドの合成までの方法論が明らかになった。既知文献とは、反応条件を異なることがあるため、さらに詳細に反応条件の検討を行っていく。また C8,N2 の付加体の他 O6 の付加体の代表である、O6 - グリコール酸 - dG の付加体の合成を進めた。ミツノブ反応による O6 位の付加体生成反応では、不純物との分離が困難であり、またアミダイトの1つ手前の合成ステップにおいても、不純物との分離が困難である結果となった。これにおいても他の方法論が必要であるが、ベンゾトリアゾールを用いる不可体生成反応は進行しなかったため、他の方法を現在検討中であ

る。

出水は 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。今回用いたヘテロサイクリックアミン類は比較的高い構造を有しており、そのため、触媒やリガンドの構造的特徴の影響を受けやすいと考えられる。Xantophos は 2 つのベンゼン環それぞれに、パラジウム触媒に配位するリン原子があり、二座でパラジウムに配位するのが特徴である。ヘテロサイクリックアミン類には二座配位が可能なりガンドが有利であることが考えられる。Microwave の影響については、一般的な SN2 反応で、同様の傾向が見出されており、Buchwald-Hartwig 反応においても microwave が有用であることがわかった。今後、反応時間や照射パワーの検討などを行い、より最適な反応条件を見出すことが必要である。

(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を行っているが、本年度は FLO1 プロモーターを用いたエピ変異原応答性レポーターアッセイ系の構築を試みた。本系においても、凝集反応促進作用を有するアリザリンと同類縁体プルプリンが、濃度依存的に凝集性と FLO1 レポーター活性を誘導することを明らかにした。この結果は、凝集試験以上にハイスループット性並びに精度向上が期待できる本レポーターシステムをエピ遺伝毒性物質の評価系に活用できる可能性を示したもので、成果としては大きいと判断される。

試験法として真核微生物酵母をプラットフォームとした本エピ遺伝毒性物質の評価系を考察した場合、凝集試験および FLO1 レポーターアッセイ共に極めて簡便なアッセイ方法であることから、食品添加物等の化学物質全般のスクリーニング毒性試験系として好適であり、

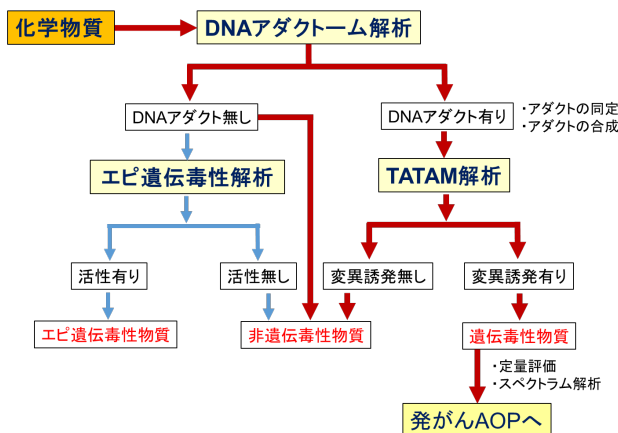
また動物愛護管理法が定める「3R」にも資する点でもその有用性は高いとも言えよう。

## 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。

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」のデータを取得、解析する必要がある。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。

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。



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ない。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. Suzuki T, Matsumoto K, Honma M, Nohmi T. Impact of DNA polymerase  $\zeta$  mutations on genotoxic thresholds of oxidative mutagens. *Mutat Res.* 2018, 828:10-14. doi:

- 10.1016/j.mrgentox.2018.02.001.
2. You X, Ando T, Xi J, Cao Y, Liu W, Zhang X, Honma M, Masumura K, Luan Y. Gene mutation and micronucleus assays in gpt delta mice treated with 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether. *Mutagenesis*. 2018 Feb 15. doi: 10.1093/mutage/gey002.
  3. Petkov, PI, Schultz TW, Honma M, Kirilov K, Kotov S, Mekenyan OG. Predicting in vitro genotoxicity by mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase mutation assay (MLA): Accounting for simulated metabolic activation of chemicals. *Computational Toxicology*. 4, 45-53, 2017. Doi:10.1016/j-comtox.2017.10.002
  4. Gadaleta D, Porta N, Vrontaki E, Manganelli S, Manganaro A, Sello G, Honma M, Benfenati E. Integrating computational methods to predict mutagenicity of aromatic azo compounds. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 35, 239-257, 2017. doi: 10.1080/10590501.2017.1391521.
  5. 本間正充、食品中に含まれる化学物質のリスクアセスメントと遺伝毒性評価、FFI ジャーナル、Vol.223 No.01、8-16、2018
  6. Grúz P, Shimizu M, Sugiyama KI, Honma M. Mutagenicity of  $\omega$ -3 fatty acid peroxidation products in the Ames test. *Mutat Res*. 2017 Jul;819:14-19. doi:10.1016/j.mrgentox.2017.05.004.
  7. Kanemaru Y, Suzuki T, Sassa A, Matsumoto K, Adachi N, Honma M, Numazawa S, Nohmi T. DNA polymerase kappa protects human cells against MMC-induced genotoxicity through error-free translesion DNA synthesis. *Genes Environ*. 2017 Jan 7;39:6. doi: 10.1186/s41021-016-0067-3.
  8. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M: Detection of epigenetic mutagens including anthracene-derived compounds using yeast FLO1 promoter GFP reporter gene assay, *Mutagenesis* 32, 429-435 (2017).
  9. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M: Functional role of DNA methylation at the FLO1 promoter in budding yeast, *FEMS Microbiol. Lett*. 364, doi: 10.1093/femsle/fnx221 (2017).
  10. Hashimoto, Akiko; Yamanaka, Takehiro; Takamura-Enya, Takeji, (2017) Synthesis of novel fluorescently labeled water-soluble fullerenes and their application to its cellular uptake and distribution properties *Journal of Nanoparticle Research*, 19: 402
  11. Kazue Someya, Hiroko Nakatsukasa, Minako Ito, Taisuke Kondo, Kenn-ichi Tateda, Takashi Akanuma, Ikuko Koya, Tsukasa Sanosaka, Jun Kohyama, Yu-ichi Tsukada, Takeji Takamura-Enya, Akihiko Yoshimura, (2017) Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation *International Immunology*, 29: 365-375
  12. Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and

1,2-dichloropropane. Mutagenesis, 2017, 32:455-462.

#### 学会発表

1. 本間正充、Ames/QSAR International Collaborative Study、口頭、第7回国際遺伝毒性試験国際ワークショップ、東京、2107/11/8
2. 本間正充、In Silico Approaches in Genetic Toxicology -Progress and Future- 口頭、第12回国際環境変異原学会、韓国、2017/11/15
3. 本間正充、AOP-based Evaluation of Chemical Mutagenicity and Development of New Endpoints and Models 口頭、第12回国際環境変異原学会、韓国、2017/11/14
4. 本間正充、In Silico Approaches in Genetic Toxicology -Progress and Future- 口頭、第17回中国環境変異原学会年次大会、中国、2017/12/7
5. 本間正充、QSARの最近の進歩について、第2回ICH M7関連ワークショップ、東京、2017/5/23
6. 戸塚ゆ加里：DNA付加体形成と突然変異誘発 第44回日本毒性学会（横浜 2017年7月）
7. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) EEMGS (ノースカロライナ、2017年9月)
8. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis 第76回日本癌学会学術総会(横浜 2017年9月)
9. 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆：マウス正常上皮の3次元培養系を用いる化学発がん家庭の早期変化検出系 第76回日本癌学会学術総会（横浜 2017年9月）
10. 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里：マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
11. 前迫裕也、善家 茜、アスマ エルザワハリ、古川英作、加藤 護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：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46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
12. 秋場 望、佐藤春菜、松田知成、遠藤 治、稲葉一穂、戸塚ゆ加里：モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
13. 神尾翔真、斎藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
14. Totsuka Y : Adductomics IWGT 2017（東京、2017年11月）
15. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis

12thICEM-5thACEM (仁川、2017年11月)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

16. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017 (つくば、2017年12月)
17. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics (コルカタ、2018年1月)
18. 中村真生, 鵜飼明子, 佐々彰, 高部道仁, 福田隆之, 高村岳樹, 本間正充, 安井学; TK6 及び変異株を用いたヌクレオチド除去修復機構におけるゲノム全体修復と転写共役修復を区別する方法の開発. 日本環境変異原学会第46回大会, 東京 (2017年11月)
19. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M: Detection of epigenetic mutagens by GFP reporter activity driven by yeast FLO1 promoter, Environmental Mutagenesis & Genomics Society 48th Annual Meeting (2017, 9 ローリー・米国).
20. 杉山圭一: エピジェネティック変異原試験系の開発、日本環境変異原学会第46回大会 (2017・東京) (2017, 11).
21. ナノダイヤモンド-臭化エチジウム複合体の細胞毒性評価, ○森 みずき・高村 岳樹、日本化学会 第98春季年会 (2018, 船橋)
22. 蛍光フラーレンの合成と評価. 01.口頭A講演. ○橋本 亜紀子・山中 岳寛・高村 岳樹、日本化学会 第98春季年会 (2018, 船橋)

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dG-C8-PhIPに関わるヌクレオチド除去修復機構に関する基礎的  
研究**

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**

バルキー-DNA 付加体 dG-C8-PhIP 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 PhIP が、代謝活性化後に DNA と反応することによって形成する。一般的に、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が、ほとんどの付加体は、NER 機構に存在するグローバルゲノム NER（GG-NER）、あるいは転写共役型 NER（TC-NER）のどちらで修復される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、GG-NER および TC-NER に必須の遺伝子である *XPC* および *ERCC6* を、それぞれ改変した細胞を用いて、ゲノム導入された dG-C8-PhIP 付加体の突然変異誘発能を解析することを目的とする。ヒトリンパ芽球細胞株 TSCER122 のゲノム内に dG-C8-PhIP 付加体を導入し、その部位で起きる突然変異誘発頻度とスペクトラムを調べた結果、164 細胞中に 6 つの細胞で dG-C8-PhIP のゲノム導入部位周辺の塩基変異（4.2%）が検出され、また、2 つの細胞からは大きな欠失（1.4%）が観察された（合計 5.6%）。一方、dG-C8-PhIP 付加体を導入しないコントロール実験（dG-C8-PhIP 部位に正常塩基 dG を導入）で得られる自然突然変異頻度は 1.7% であることから、dG-C8-PhIP 付加体は、その自然突然変異頻度よりも約 3 倍高く塩基置換や大きな欠失を誘発させることが分かった。次に、これと同様の実験を *XPC*、*ERCC6* の遺伝子改変細胞を用いて調べたが、dG-C8-PhIP 付加体の突然変異頻度はそれぞれ 2.4%、0.6% であった。これらの変異頻度は、自然突然変異頻度とほぼ同じであるため、これらの遺伝子が dG-C8-PhIP 付加体の DNA 修復に関与していないこと、あるいは TATAM 解析がバルキー付加体に適用できない可能性があることが予想された。

キーワード:バルキー-DNA 付加体,ヌクレオチド除去修復,遺伝子改変細胞

**A. 研究目的**

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）の一つである 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine（PhIP）は、生体内で代謝活性化、そして DNA と反応し、

N-(deoxyguanosin-8-yl)-PhIP（dG-C8-PhIP）バルキー-DNA 付加体を形成させる（図 1）。事実、PhIP は実験動物の大腸や小腸など様々な臓器にがんを高頻度に形成させるという報告が数多くある。その発がん機構に、dG-C8-PhIP 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 (GG-NER) と転写共役型 NER (TC-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 GG-NER か TC-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、dG-C8-PhIP 付加体が GG-NER と TC-NER のどちらの経路で DNA 修復されるかを明らかにすることを目的として、GG-NER の XPC 遺伝子 (XPC タンパク質)、TC-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、それらのノックアウト (KO)、あるいはノックイン (KI) した改変細胞を用いて、後述する TATAM 解析を行う。

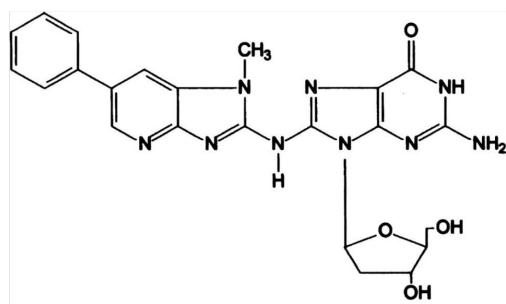


図 1 . dG-C8-PhIP バルキーDNA 付加体の構造

## 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) )。XPC KO TSCER122 細胞は、その開始コドン部位を CRISPR/Cas9 系によって欠失配列を有し、UV 照射に高感受性を有する。ERCC6 の TSCER122 改変細胞は、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\*) を有するノックイン (KI) 細胞 (Troelstra *et al*, *Cell* **71**, 939-953 (1992)) であ

り、UV 照射に対して高感受性を示す。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 . PhIP に対する相対細胞生存率の測定

PhIP (和光純薬工業(株), CAS NO. 105650-23-5) を DMSO (ナカライテスク(株)) で溶解後、表 1 のように S9mix (オリエンタル酵母工業(株)) の存在下において、対数増殖期にある細胞に暴露し、4 時間振盪培養した (用量設定試験; 最終濃度 0, 2.5, 5, 7.5 µg/mL, 本試験; 最終濃度 0, 1, 2, 3 µg/mL) (Duc *et al*, *Mutat. Res.* **486**, 155-164 (2001))。処理後、遠心分離 (1000 rpm, 5 分間) し、上清を除去後、無血清培地で細胞を洗浄した。再度、遠心分離 (1000 rpm, 5 分間) し、上清を除去後、10% 血清を含む培地で細胞を分散させ細胞濃度を測定した。細胞濃度を 8 cells/mL に希釈し、約 1.6 cell/ウェルの濃度で 96 ウェルマイクロプレートで 2 週間培養した。

表 1 . PhIP の暴露処理

細胞液 (約 1×10 <sup>6</sup> cells/mL)	5 mL
RPMI-0 (無血清培地)	3.3 mL
S9 mix	1.5 mL
被験液 (PhIP)	0.2 mL
処理容量	10 mL

細胞のコロニー形成率である Cloning efficiency (CE) は、ポアソン分布の式に従い、式 1 を用いて算出した。EW は、コロニーを含まないウェル数であり、TW は総ウェル数である。N は、1 ウェル当たりの平均細胞数 (本実験では N = 1.6) である。

$$CE = -\ln(EW / TW) / N \quad \dots (式 1)$$

また、暴露処理中の細胞毒性が強い場合など、

細胞消失があるため、次の計算式(式2)でCEを補正した。“処理終了時の細胞数”は、前述のPhIPの暴露処理(表1)において処理終了時の遠心分離後に得られた細胞数である。“処理開始時の細胞数”は、本研究では $5 \times 10^6$  cells(表1)である。

補正 CE = CE × 処理終了時の細胞数 / 処理開始時の細胞数  
・・・(式2)

被験物質で処理された培養の細胞相対生存率RS(%)は、次の式3で計算した。陰性対照(DMSO)の生存率を100%と定義した。なお、各細胞から得られた相対細胞生存率の有意差検定はDunnett法で行った。

RS (%) = 処理培養の補正 CE / 溶媒対照の補正 CE × 100  
・・・(式3)

### 3. dG-C8-PhIPを部位特異的に含むターゲティングベクターの構築

代表的なバルキー付加体であるdG-C8-PhIPを1つ含むターゲティングベクターを作製した。その手法として、北海道医療大学 荒川俊哉博士らが確立したPCRを基礎とする5-メチルシトシンを含む修飾ベクターの作製法(Arakawa, T. *et al.*, *Anal. Biochem.* **416**, 211-217(2011))を参考にし、それをさらに改良した方法によってPhIPを含むターゲティングベクターを構築した(Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* **15**, 11-20 (2014))。

部位特異的にdG-C8-PhIPを1分子含むDNAオリゴマーは、高村岳樹教授(神奈川工科大学)から分与して頂いた(Takamura-Enya T. *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 770-778 (2006))。ビオチン修飾やリン酸化、そして無修飾のDNAオリゴマーは、(株)シグマジェノシスから購入した。チミジンキナーゼ遺伝子(TK)配列の一部を有するpTK15プラスミド(Honma, M. *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen* **42**, 288-298)を用意し、TKの相同的な配列を含む5'末端から

dG-C8-PhIP修飾プライマー領域の前方までをPCRする組とその後方までをPCRする組、そして、3'末端からも同様のPCRを行い、計4組のPCR産物を用意した。各PCR生成物の一方の5'末端DNAには、ビオチン付加が施してあり、引き続き、ビオチン-アビジン反応を利用して、それぞれ的一本鎖DNA(ビオチン付加の無いDNA鎖)を分離した後、それらをアニーリングさせ、ライゲーションを行うことにより直鎖状二本鎖プラスミド(pvIT<sup>PhIP</sup>)を作製した(Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* **15**, 11-20 (2014))。

### 4. ヒト培養細胞を用いるTATAM実験系の概要

TSCER122細胞(TK<sup>-/-</sup>)は、TK6細胞からTKのエキソン5を欠き、その欠失部位の上流にI-SceI認識配列18bp(5'-ATTACCCTGT TATCCCTA)を1つ持っている。その配列は、本来のヒトゲノムに無いため、その培養細胞にI-SceIを発現させるベクター(pCBASce)を導入すれば、I-SceI酵素の切断により、ゲノムの1ヶ所だけに二本鎖切断を形成させることができる。そのI-SceI切断部位では、DNA修復されやすくなっているため、そこに相同配列を持ち、且つDNA付加体を含むターゲティングベクターを導入すれば、相同組み換えにより、エキソン5と付加体が同時にゲノム内に入る(MseI制限酵素に耐性を持つ配列MseI<sup>R</sup>の有無で区別できる)。その時、細胞はTK<sup>-/-</sup>からTK<sup>+/-</sup>になるため、HATセレクションによってTK復帰細胞だけ(つまり付加体が導入された細胞だけ)を回収することができ、後のシーケンス解析等に供することが可能である。この方法をTATAM(Tracing DNA adducts in targeted mutagenesis)実験系といい、図2に概要を示した。細胞ゲノムへの導入は、Lonza社製Cell Line Nucleofectorの手法に従っておこなった。 $5 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ Lに調整したTSCER122細胞に、pCBASce 50  $\mu$ gとpvIT<sup>PhIP</sup>ターゲティングベクター1  $\mu$ gを同時にトランスフェクションし、75 cm<sup>2</sup>の培養フラスコで3日間培養(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)した。次に、その細胞を



1 ~ 5×10<sup>3</sup> cells/mL に調整し、HAT 試薬を添加後、96 穴マイクロプレートでさらに 2 週間培養することによって、復帰細胞のクローン (TK+/-) を回収した。その後、各クローンのゲノム DNA を抽出し、dG-C8-PhIP 部位だった周辺のシーケンスを行い、その突然変異誘発スペクトルおよび頻度を決定した。解析する配列は、付加体を導入した部位とその周辺 (BssSI 制限酵素の認識配列) について、塩基の変異や欠失などを解析した (5'-CTCGTG / CACGAG-3', 下線部 dG に dG-C8-PhIP を導入)。

回収されたゲノム DNA について、シーケンスを行い、MseI 制限酵素に耐性を持つ配列が導入されているクローン (MseI<sup>R</sup>) と耐性を持たないクローン (MseI<sup>S</sup>) に分けてカウントした。dG-C8-PhIP を導入した部位をシーケンスで調べ、そこで配列を読めれば Mutation へ分類、読めないサンプルに関しては、さらに BssSI 制限酵素で反応させ、切断できなかったものを Mutation へ分類 (引き続きシーケンスも実施)、切断できたものを No mutation に分類した (表 2 ~ 4)。一方、PCR できない、あるいはアガロースチェック時にシグナルが弱い場合を ND とした。また、シーケンスで読めなかったサンプルを Seq.ND とした。表 2 ~ 4 の網掛部分は、Mutation に分類されたサンプルについてまとめた。なお、網掛の元の配列 CACGAG の真ん中の C は、dG-C8-PhIP 付加体の対面に相当し、Target site となる。突然変異誘発頻度 (MF) は、式 4 のように計算し、MseI<sup>R</sup> 配列が導入されたクローンの数を 100% とした (図 2, 表 5 参照)。

MF (%) = Mutation の数 / MseI<sup>R</sup> 配列が導入されたクローンの数 × 100 . . . (式 4)

## C . 研究結果

### 1 . 代謝活性化された PhIP に対する細胞毒性

基礎データとして、PhIP に対する TSCER122 細胞、XPC KO 細胞、および ERCC6 KI 細胞の RS の測定を行った。図 3 に示したように、最高

用量の 3 μg/mL で処理した時に、野生株の TSCER122 細胞に対して、XPC KO 細胞と ERCC6 KI 細胞の両方が、有意に RS の減少が確認された (\*\* : P<0.01)。つまり、PhIP が代謝活性化されることで形成する DNA 損傷群は、GG-NER と TC-NER の両方、特に、XPC KO 細胞の方がより高い感受性 (2, 3 μg/mL の 2 つの用量で有意差) を示したことから、PhIP の DNA 損傷は主に GG-NER によって修復除去されていることが分かった。

### 2 . TATAM 解析によるゲノム導入効率

TSCER122 細胞、XPC KO 細胞、ERCC6 KI 細胞の 3 種類の細胞ゲノムに、それぞれ dG-C8-PhIP バルキー DNA 付加体を導入し、そこで起きる突然変異誘発頻度およびスペクトラムを調べた (表 2 ~ 4)。96 クローンごとに 2 回の実験 (Exp.1 および Exp.2) を実施した。図 2 のとおり、付加体を含むターゲティングベクターが導入された場合は、MseI<sup>R</sup> 配列がゲノムに目印として残るため、それをカウントすることで付加体のゲノムへの導入効率が分かる。TSCER122 細胞、XPC KO 細胞、ERCC6 KI 細胞のゲノムへの導入効率は、それぞれ 86.6, 90.9, 96.5 % (表 2 ~ 4 の Targeted Freq) であり、野生株と変異株の差はなく、類似の値だった。

### 3 . 遺伝子改変細胞を用いる TATAM 解析の結果

野生株である TSCER122 細胞に dG-C8-PhIP を導入し調べた結果、表 2 と表 5 のとおり、164 細胞中に 6 つの細胞で dG-C8-PhIP のゲノム導入部位周辺の塩基変異 (4.2%) が検出され、その 6 つのうちの一つがグアニンからアデニンへの塩基変異だった。また、2 つの細胞からは大きな欠失 (1.4%) が観察された (合計 5.6%)。一方、dG-C8-PhIP 付加体を導入しないコントロール実験 (dG-C8-PhIP 部位に正常塩基 dG を導入) で得られる自然突然変異頻度は 1.7% (Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* 15, 11-20 (2014)) であるため、dG-C8-PhIP によって突然変異誘発頻度が約 3 倍

増加したことが分かった。

一方、*XPC* KO 細胞、および *ERCC6* KI 細胞のゲノムに dG-C8-PhIP 付加体を導入して同様の実験を行ったが、*XPC* KO 細胞では 186 細胞中に 4 つの細胞で塩基変異と一塩基欠失 (2.4%)、また、*ERCC6* KI 細胞では 172 細胞中にわずか 1 細胞(塩基変異と一塩基欠失を同時に誘発;0.6%)しか検出されなかった(表 3、表 4)。

#### D. 考 察

S9 mix 存在下で PhIP に対する TSCER122 細胞、*XPC* KO 細胞、および *ERCC6* KI 細胞の RS の測定を行ったところ、両方の変異体細胞が有意に感受性を示した(図 3)。この結果は、PhIP によって形成する DNA 損傷(DNA 鎖切断や欠失も含む)が複数あり、*XPC* だけでなく、*CSB*(*ERCC6* 遺伝子プロダクト)の両方のタンパク質が関与して修復されていることを示唆する。しかしながら、現在、PhIP の DNA 付加体として同定されているのは、dG-C8-PhIP の 1 つだけである(その N2 位付加の dG-N2-PhIP も形成すると推測されているが同定はされていない)。すなわち、例えば dG-C8-PhIP は GG-NER、dG-N2-PhIP は TC-NER が関与するなど、DNA 付加体一つ一つに対して DNA 修復機構が異なるはずである。PhIP は多種多様な DNA 損傷、および DNA 付加体を形成していると考えられるが、本研究の TATAM 解析では DNA 損傷という混合物ではなく、dG-C8-PhIP 付加体という一つの化学構造物を調べることによって、GG-NER か TC-NER のどちらで修復されているかを明らかにできることが大きなメリットである。

すでに同定されているほとんどのバルキー DNA 付加体は、GG-NER か TC-NER のどちらに進むかは全く不明であり、もし *XPC* と *ERCC6* の改変細胞で TATAM 解析をすれば、その野生株を使用した時よりも、高頻度に突然変異誘発頻度を得られ、GG-NER か TC-NER のどちらで修復されるかを明確にできる。しかしながら、dG-C8-PhIP 付加体を *XPC* KO 細胞、および

*ERCC6* KI 細胞のゲノムに導入して調べたが、表 5 に示した通り野生株の突然変異誘発頻度よりも低い結果が得られた。この結果は、図 3 で示した *XPC* KO 細胞、および *ERCC6* KI 細胞の両方の変異体細胞が PhIP に対して感受性を示した結果と相反する。さらに、研究結果の 2 で述べたとおり、dG-C8-PhIP 付加体を含むターゲティングベクターの導入効率が、野生株と変異株で類似の値を示すことから、付加体が各細胞のゲノムに同じような効率で導入されていると考えられた。以上のことから、これら *XPC* と *ERCC6* の遺伝子が dG-C8-PhIP 付加体の DNA 修復に関与しておらず、NER 以外の DNA 修復機構が働いていること、あるいは TATAM 解析がバルキー付加体に適用できない可能性があることが予想できた。

dG-C8-PhIP 付加体の突然変異スペクトラムについては、主にグアニン→チミン、グアニン→アデニンの塩基置換が誘発されやすく、一塩基欠失や付加体部位周辺の塩基置換も誘発することが報告されている(Shibutani, S. *et al.*, *J. Bio. Chem.* 274, 27433-27438 (1999))。また、PhIP を投与させた動物の大腸や前立腺の DNA からグアニン→チミン、グアニン→アデニンの塩基置換の突然変異スペクトラムが得られている(Lynch, AM. *et al.*, *Mutagenesis* 13, 601-605 (1998), Yang, H. *et al.*, *Mutagenesis* 18, 195-200 (2003))。本研究においても、野生株 TSCER122 に dG-C8-PhIP 付加体を導入した時に、グアニン→アデニンの塩基置換を観察することができたが、高頻度には得られることはなかった(表 2)。

#### E. 結 論

TSCER122 細胞のゲノムに導入された dG-C8-PhIP 付加体は、その自然突然変異頻度(合計 1.7%)よりも約 3 倍高く塩基置換や大きな欠失(合計 5.6%)を誘発させることが分かった。これと同様の実験を *XPC*、*ERCC6* の改変細胞を用いて調べたが、dG-C8-PhIP 付加体の突然変異誘発頻度は、その自然突然変異頻度とほぼ同じであった。従って、これらの遺伝子が dG-C8-PhIP

付加体の DNA 修復に関与しておらず NER 以外の DNA 修復機構が働いていること，あるいは TATAM 解析がバルキー付加体に適用できない可能性があることが予想された。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1. 中村真生，鵜飼明子，佐々彰，高部道仁，福田隆之，高村岳樹，本間正充，安井学；TK6 及び変異株を用いたヌクレオチド除去修復機構におけるゲノム全体修復と転写共役修復を区別する方法の開発．日本環境変異原学会第 46 回大会，東京（2017 年 11 月）

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

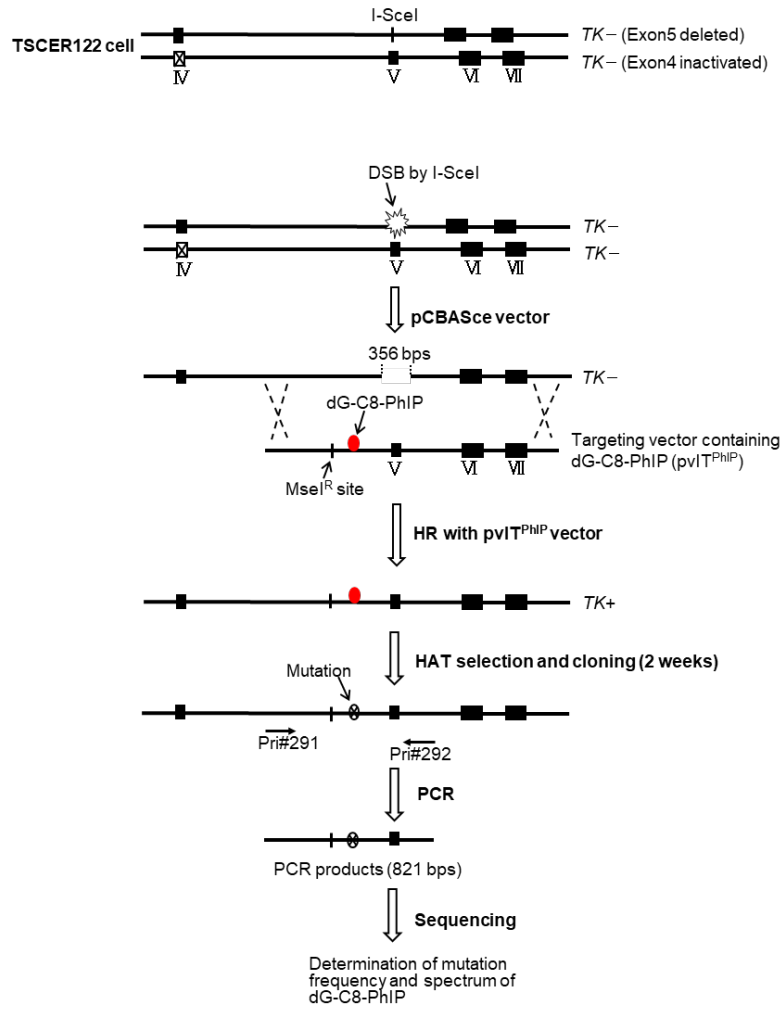


図 2 . TATAM 実験系の概要

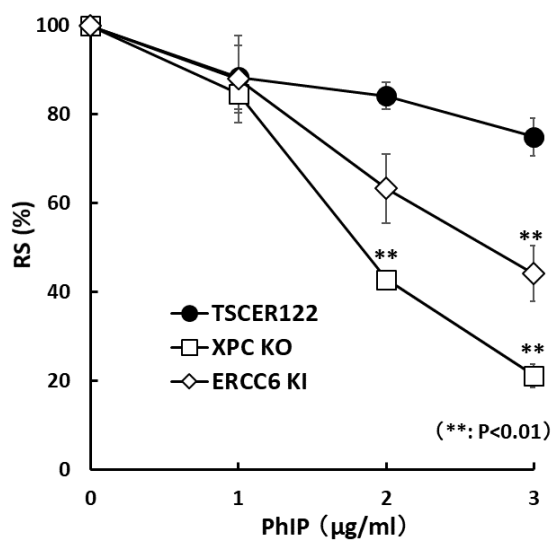


図 3 . S9 mix 存在下の PhIP に対する各細胞の相対細胞生存率

表2. dG-C8-PhIPをTSCER122細胞のゲノムに導入したTATAM解析

TSCER122(野生株)				元の配列CACGAG	判定
Exp.1	Exp.2	Subtotal			
Mutation	5	3	8	1. CACAGG	Non-targeted
No mutation	70	64	134	2. CACGCG	Non-targeted
ND	0	0	0	3. CTGAG	Non-targeted
Msel <sup>S</sup>	13	9	22	4. CAGGAG	Non-targeted
Seq.ND	8	20	28	5. CACGAC	Non-targeted
total	96	96		6. CACGGG	Non-targeted
			Total analyzed	7. 導入部位を含むLarge deletion	Large Del
			Total targeted(Msel <sup>R</sup> )	8. 導入部位を含むLarge deletion	Large Del
			Targeted Freq(%)	Δ; One-base deletion	
MF(%)	6.7	4.5	Ave. MF(%)	5.6	

表3. dG-C8-PhIPをXPC KO細胞のゲノムに導入したTATAM解析

XPC KO				元の配列CACGAG	判定
Exp.1	Exp.2	Subtotal			
Mutation	2	2	4	1. CACAAG	Non-targeted
No mutation	83	82	165	2. CACGAA	Non-targeted
ND	0	0	0	3. CACGAG	Non-targeted
Msel <sup>S</sup>	8	9	17	4. CATGAG	targeted
Seq.ND	3	3	6	Δ; One-base deletion	
Total	96	96			
			Total analyzed	186	
			Total targeted(Msel <sup>R</sup> )	169	
			Targeted Freq(%)	90.9	
MF(%)	2.4	2.4	Ave. MF(%)	2.4	

表4. dG-C8-PhIPをERCC6 KI細胞のゲノムに導入したTATAM解析

ERCC6 KI				元の配列CACGAG	判定
Exp.1	Exp.2	Subtotal			
Mutation	0	1	1	1. CACCG	Non-targeted & Multi
No mutation	86	77	163	One-base deletionがあるがどこで起きたか不明	
ND	2	0	2		
Msel <sup>S</sup>	4	2	6		
Seq.ND	4	16	20		
Total	96	96			
			Total analyzed	172	
			Total targeted(Msel <sup>R</sup> )	166	
			Targeted Freq(%)	96.5	
MF(%)	0.0	1.3	Ave. MF(%)	0.6	

表5. dG-C8-PhIPを遺伝子破壊細胞のゲノムに導入したTATAM解析の比較

Mutation spectrum	TSCER122(野生株)		XPC KO		ERCC6 KI	
	Number	頻度 (%)	Number	頻度 (%)	Number	頻度 (%)
C G	0		0		0	
C T	0		1	0.6	0	
C A	0		0		0	
Large Del	2	1.4	0		0	
Targeted Multi	0		0		0	
Non-targeted & Multi	0		0		1	0.6
Non-targeted	6	4.2	3	1.8	0	
No mutation	134	94.4	165	97.6	163	98.2
ND	0	0.0	0	0.0	2	1.2
Total targeted (MseI <sup>R</sup> )	142	100	169	100	166	100

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

これまでの一連の研究から、ヒト *DNA methyltransferase (DNMT)* 遺伝子形質転換酵母（ヒト *DNMT* 酵母）で顕在化した凝集性を指標にエピジェネティック変異原（エピ変異原）の可視化検出が可能であること明らかにしているが、今年度の本分担研究では、凝集遺伝子 *FL01* プロモーター活性を指標としたエピ変異原検出系の構築を目指した。*FL01* プロモーターを用いたレポーターアッセイ系は精度、客観性、定量性さらには簡便さ等、目視観察による凝集性を指標としたエピ変異原評価系よりも優れておりその有用性は高い。レポーター遺伝子には非破壊で測定可能な Green fluorescent protein（GFP）遺伝子を用い、被検物質には昨年度の研究でエピ変異原であることを明らかにしたアリザリンの類縁体となるプルプリンを使用した。酵母凝集性に対するプルプリンの作用を検討した結果、凝集促進作用と *FL01* 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、プルプ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、プルプリン処理時における核染色像の異常も観察された。*FL01* レポーター活性に及ぼすプルプリンの効果については、凝集性に対する効果と矛盾ない濃度依存的な GFP 蛍光強度の上昇が確認された。プルプリンが *FL01* レポーター活性に示した本効果はアリザリン処理においても認められた。

以上の結果は、凝集試験より簡便でかつ定量性が担保されたエピ変異原検出系の代替法として *FL01* レポーターアッセイが利用可能であることを示唆している。

キーワード：エピ変異原、DNA methyltransferase、酵母、凝集、*FL01* レポーターアッセイ

#### A. 研究目的

発がんに関与するエピジェネティックな変異（エピ変異）は、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、その解析にはハイスループット化が容易ではない生化学的手法を用いざるを得ない現状がある。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ものと定義でき、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、エピ変異原の検出系には少なくとも主要なエピジェネティック制御と考えられている DNA メチル化およびヒストン修飾、またそれを介したヌクレオソーム構造の変化を誘発する化学物質（エピ変異原）を検出できることが求められる。昨年度では、DNA methyltransferase（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* 遺伝子形質転換酵母 (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。すなわち、この結果はヒト *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を示していると換言できる。

本年度では、昨年度までの結果を踏まえ、凝集性と比較してより定量的でかつ頑健性が期待できる凝集遺伝子 (*FL01* 遺伝子) のプロモーターを用いたレポーターアッセイによるエピ変異原検出システムの構築を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 酵母株

出芽酵母 *S. cerevisiae* YPH250 株 (*MATa trp1- 1 his3- 200 leu2- 1 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- 200 leu2- 1 lys2-801 trp1- 1 ura3-52* pYES2CT pYES3CT) を、YPH250/pY2hD1\_ pY3hD3B (*MATa ade2-101 his3- 200 leu2- 1 lys2-801 trp1- 1 ura3-52* pY2hD1 pY3hD3B) 株をヒト *DNMT* 酵母として使用しているが、本年度はコントロール株のみを使用した。

### 2. 使用した化学物質

ブルプリンはシグマ-アルドリッチから、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. *FL01* レポータープラスミドの構築

Green fluorescent protein (GFP) 変異体 (*eGFP*) をレポーター遺伝子 (Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Sep;88(1):277-82.) として

*FL01* レポータープラスミドを構築した。酵母シヤトルベクター-pRS313 ベクターのマルチクローニングサイトの *SmaI* および *SacI* 部位に *eGFP* 遺伝子を挿入後、その上流 (*SaII*-*EcoRV* サイト) に PCR にて増幅した *FL01* プロモーター領域のフラグメント (-1,000 - -1) を導入し、p313F1GYeGFP プラスミドを構築した。なお、使用したプライマーは表 1 の通りである。

### 4. 培地

Synthetic Dextrose (SD) -Trp/-Ura もしくは -Trp/-Ura/-His 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%、もしくは -Trp/-Ura/-His DO Supplement (Clontech, USA) 0.07%、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) を終濃度が 2.0% になるよう加えて 4 で保存した。

### 5. 凝集試験

SD -Trp/-Ura 液体培地において、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。

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

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

SD -Trp/-Ura 液体培地において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® One-Step RT-PCR with Platinum® 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。

## 7. Western blot

SD -Trp/-Ura 液体培地において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- $\beta$ -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。

## 8. 核の蛍光染色

SD -Trp/-Ura 液体培地において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。

## 9. *FL01* レポーターアッセイ

レポータープラスミド p313F1GYeGFP を形質転換したコントロール株を用いてアッセイを行なった。SD -Trp/-Ura/-His 液体培地において対数増殖期後期まで培養(24-26 時間培養)した酵母細胞を回収後洗浄し蛍光(Excitation, 485 nm; Emission, 535 nm)を測定した。測定には TriStar<sup>2</sup> LB 942 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany)を使用

した。なお、蛍光強度は濁度(OD600)で補正した。

## 10. 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. プルプリンが酵母凝集性と *FL01* 発現に及ぼす影響

アリザリンの類縁体であるプルプリンが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、プルプリン濃度(0 - 500 nM)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 *FL01* の発現量についてもプルプリン濃度(0 - 1,000 nM)依存的に誘導されることが確認された(図 1B)。

### 2. プルプリンがヒストンに及ぼす影響

凝集促進作用を有することをすでに報告しているアリザリンは、コアヒストン構成成分の 1 つヒストン H3 を減少させる(Mutagenesis. 2016 Nov;31(6):687-693.)。今回プルプリンによるヒストンへの影響を Western blot 法により解析した結果、プルプリン(0 - 1,000 nM)処理によってもヒストン H3 量が減少することが明らかとなった(図 2)。

### 3. プルプ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様状態となることが推測される。そこで、プルプリン(500 nM)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、プルプ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3)。

#### 4. アントラセン類縁体が *FL01* レポーター活性に及ぼす影響

プルプリンが *FL01* mRNA の転写を誘導し凝集性促進作用も示したことから、*FL01* プロモーター誘導性レポーター活性に及ぼすプルプリンの影響を検討した。その結果、プルプリン(0 - 250 nM) の濃度依存的な GFP 蛍光強度の上昇が認められた。同様の活性上昇はアリザリン(0 - 2.0 μM) においても確認された。一方、凝集促進作用がないアントラセン(0 - 400 μM) 処理時では、同様の活性上昇作用は認められなかった(図4)。

#### D. 考 察

エピ変異原検出系を構築することを目的に、本年度は酵母のエピ変異原応答性凝集反応に関与する凝集遺伝子 *FL01* のプロモーターを用いたエピ変異原応答性レポーターアッセイの構築を行った。検討の結果、凝集反応促進作用を有するアリザリンの類縁体プルプリンが、濃度依存的に凝集性と同レポーター活性を誘導することを明らかにした。アリザリンについても同様のレポーター活性の誘導能が確認された。一方、基本骨格のみを有し凝集性に影響を及ぼさないアントラセンは *FL01* レポーター活性に影響を及ぼさない結果が得られたことから、本レポーターアッセイはエピ変異原に特異的に応答することが推測された。

工業用染料として使用されているプルプリンについては、エイムス試験陰性との報告もあるが、凝集性及び *FL01* レポーター活性ともに促進作用を示す。さらに、アリザリンと同様に

コアヒストンの H3 をバルクレベルでの減少と、DNA の DAPI 染色像異常(拡散した核)が確認された事実から、プルプリンもアリザリンと同様にヒストンを作用点にもつエピ変異原である可能性が強く示唆される。したがって、プルプリンによるエピジェネティクス制御の攪乱による発がん促進作用については留意する必要があると考える。

本研究において開発された *FL01* レポーターアッセイのレポーター遺伝子には GFP を使用している。本蛍光タンパク質由来の蛍光強度の測定には、基質(補因子)を必要としない特徴がある。また、凝集試験と比較して数値化が容易でアッセイに要する時間も大幅に短縮(約 50% 減)している。加えて培養スケールの縮小によりアッセイに必要な剤の必要量も節約できる可能性も有する。最終年度にエピ変異原の短期スクリーニング系としての凝集試験以上にハイスループット性並びに精度の向上が期待できる *FL01* レポーターアッセイ系のプロトタイプが構築できたことは、今後必要になると予想される本エピ変異原試験系の妥当性評価を効率的に進める上で大きな成果と考える。

#### E. 結 論

今年度は、アリザリンの類縁体であるプルプリンを被検物質として、エピ変異原応答性凝集反応に関与する酵母凝集遺伝子(*FL01* 遺伝子)のプロモーターを用いたレポーターアッセイ系の構築を試みた。その結果、アリザリンと同様に凝集反応促進性を示すプルプリンの濃度依存的な *FL01* レポーター活性の上昇が確認された。以上の結果は、構築した *FL01* レポーター活性を指標に、簡便にエピ変異原活性を検知できることを示唆している。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 誌上発表

1. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M.: Detection of epigenetic mutagens including anthracene-derived compounds using yeast *FLO1* promoter GFP reporter gene assay, *Mutagenesis* **32**, 429-435 (2017).
2. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M: Functional role of DNA methylation at the *FLO1* promoter in budding yeast, *FEMS Microbiol. Lett.* **364**, doi: 10.1093/femsle/fnx221 (2017).

### 学会発表

1. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M.: Detection of epigenetic mutagens by GFP reporter activity driven by yeast *FLO1* promoter, Environmental Mutagenesis & Genomics Society 48th Annual Meeting (2017, 9 口ーリー・米国).
2. 杉山圭一: エピジェネティック変異原試験系の開発、日本環境変異原学会第 46 回大会 (2017・東京) (2017, 11) .

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

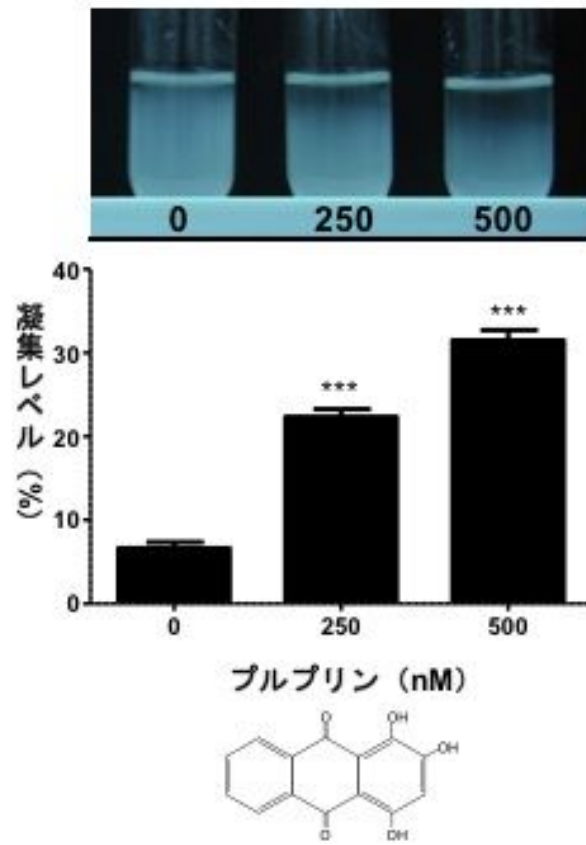
表1 *FL01* プロモーター増幅に使用したプライマー

	DNA 配列
Forward	5' - CCCGTCGACAAAAAGTGCATTTATTTAG -3'
Reverse	5' - GGGAAGCTTTTTGGATGTTCTGTTTACTGGTGACAAGA -3'

表2 RT-PCR に使用したプライマー

ターゲット遺伝子	Primer名	DNA配列
<i>FL01</i>	RT1A (Forward)	5' - CTCATCGCTATATGTTTTTTGG -3'
	RT1B (Reverse)	5' - CGAGTAAACAACCTTCATTGG -3'
<i>ACT1</i>	RTactA (Forward)	5' - ATTCTGAGGTTGCTGCTTTGG -3'
	RTactB (Reverse)	5' - GAAGATTGAGCAGCGGTTTGC -3'

A



B

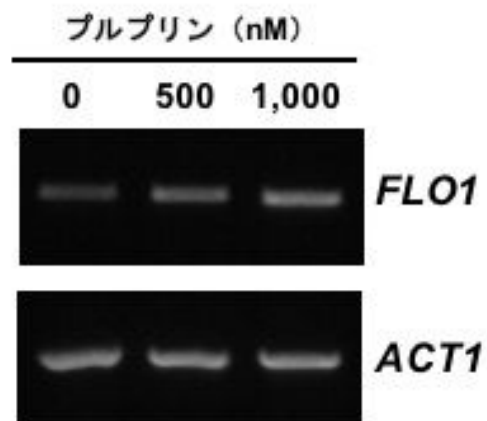


図1 プルプリンが凝集反応に及ぼす影響  
A: 凝集試験, B: RT-PCR

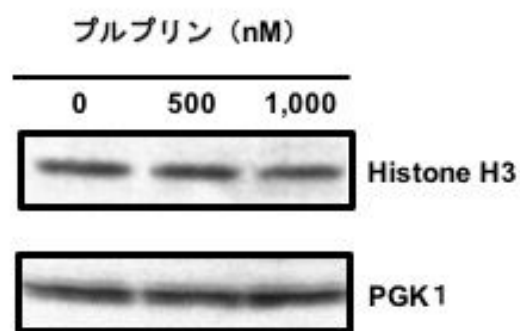


図2 プルプリンが細胞内ヒストン H3 量に及ぼす影響

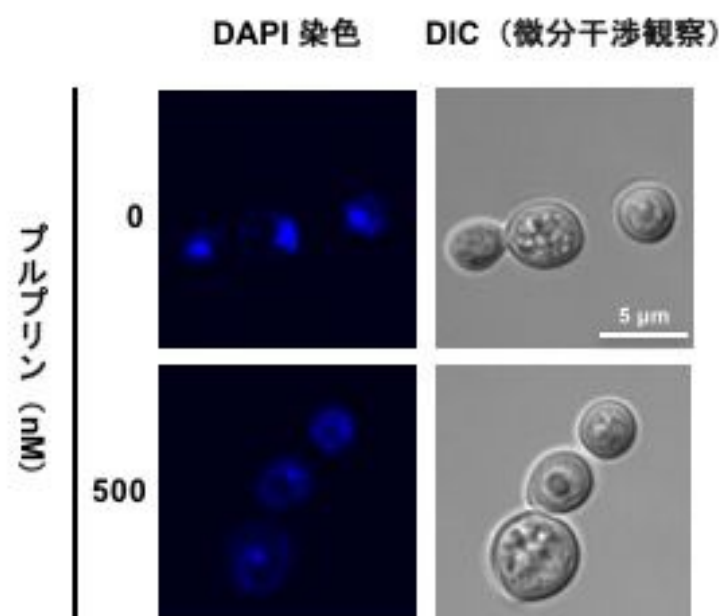
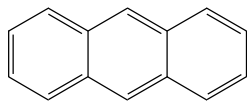
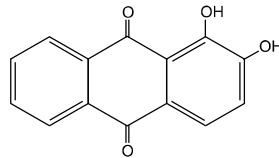


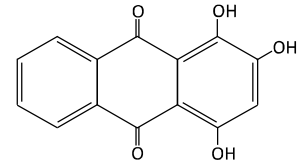
図3 アリザリンが核染色像に及ぼす影響



Anthracene



Alizarin



Purpurin

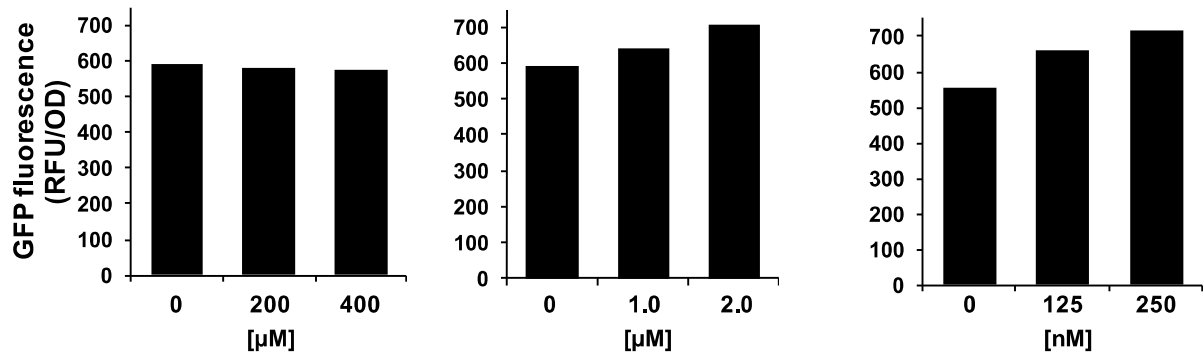


図4 アントラセン類縁化合物が *FL01* レポーター活性に及ぼす影響



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

分担研究者： 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。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、昨年度の研究の結果から、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。そこで、DCP の変異原性誘発メカニズムの解明のため、バクテリアを用い、DNA 付加体の網羅的解析手法により、DCP に由来する付加体の探索を行った。主成分解析(PCA)の結果、コントロールと DCP 暴露群で綺麗に 2 つのクラスターに分離されることがわかった。PCA>Loading plot の結果、DCP 暴露に関するものとして複数の付加体が検出された。このうち、 $[m/z\ 368.1560; M+H]$ (DCP22)と $[m/z\ 384.1514; M+H]$ (DCP86)に注目してみたところ、両者とも DCP 暴露によりそれぞれの存在レベルが顕著に上昇していることが確認できた。DCP22 及び DCP86 の精密質量数から推測した分子組成式と MS/MS フラグメンテーションデータから、DCP22 はデオキシアデノシン由来の、DCP86 はデオキシグアノシン由来の付加体であることが推測できた。また、 $[m/z\ 117.05; M+H]$ のフラグメントピークが DCP22 及び DCP86 の両方に観察されており、このことから、同じ官能基がそれぞれ dA 及び dG に付加した付加体であることが推測された。

## 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。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、昨年度の研究の結果から、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。そこで、DCP の変異原性誘発メカニズムの解明のため、バクテリアを用い、DNA 付加体の網羅的解析手法により、DCP に由来する付加体の探索を行った。

## B . 研究方法

Ames 試験に用いる試験菌株である、

Salmonella typhimurium TA100 に

1,2-DCP(15000ppm)を2時間気層曝露した後にバクテリアを回収し、ゲノムDNAの抽出を行った。DNAを各種ヌクレアーゼによりモノヌクレオシドに分解し、生成するDNA付加体を質量分析機器(AB SCIEX, TripleTOF TT6600)を用いて網羅的に解析した。得られたデータを主成分(PCA)解析により解析し、1,2-DCP曝露に相関する付加体の抽出を実施した。精密質量数を用いて抽出した任意の付加体の分子組成式の推測をソフトウェア(Peak View; AB SCIEX)により行った。

### C. 研究結果・考察

1,2-DCPを曝露したバクテリアDNAのアダクトーム解析を行なった結果を図1に示す。主成分(PCA)解析を行なったところ、コントロールとDCP暴露群で2つのクラスターに分類されることがわかった。次にPCA解析のLoading plotの結果から、1,2-DCPに相関する付加体の探索を行ったところ、複数の付加体が検出された(図2)。このうち、DCP22 [m/z 368.1560; M+H]とDCP86 [m/z 384.1514; M+H]に注目してみたところ、両者ともDCP暴露によりそれぞれの存在レベルが顕著に上昇していることが確認できた(図3)。DCP22及びDCP86の精密質量数から推測した分子組成式とMS/MSフラグメンテーションデータを図4に示す。両者とも、デオキシリボース骨格に由来する-116.0474のneutral lossが観察された。また、DCP86ではグアニンに相当する[m/z 152.0562]のフラグメントが、DCP22ではアデニンに相当する[m/z 136.0617]のフラグメントが観察され、このことから、DCP86はデオキシグアノシン由来の、DCP22はデオキシアデノシン由来の付加体であることが推測できた。また、[m/z 117.05; M+H]のフラグメントピークがDCP22及びDCP86の両方に観察されており、このことから、同じ官能基がそれぞれdA及びdGに付加した付加体であることが推測された。

### D. 健康危機情報

なし

### E. 研究発表

#### 論文発表

1. Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*, 2017, 32:455-462.

#### 学会発表

1. 戸塚ゆ加里: DNA付加体形成と突然変異誘発 第44回日本毒性学会(横浜 2017年7月)
2. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) EEMGS (ノースカロライナ、2017年9月)
3. Totsuka Y: Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis 第76回日本癌学会学術総会(横浜 2017年9月)
4. 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆: マウス正常上皮の3次元培養系を用いる化学発がん家庭の早期変化検出系 第76回日本癌学会学術総会(横浜 2017年9月)
5. 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里: マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第46回日本環境変異原学会(東京、2017年11月)
6. 前迫裕也、善家 茜、アスマ エルザワハリ、古川英作、加藤 護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚ゆ加里: 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46回日本

環境変異原学会（東京、2017年11月）

7. 秋場 望、佐藤春菜、松田知成、遠藤 治、  
稲葉一穂、戸塚ゆ加里：モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
8. 神尾翔真、斎藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、  
戸塚ゆ加里：生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
9. Totsuka Y : Adductomics IWGT 2017（東京、2017年11月）
10. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis 12thICEM-5thACEM（仁川、2017年11月）
11. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017（つくば、2017年12月）
12. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics（コルカタ、2018年1月）

#### F. 知的所有権の取得状況

なし

図1 1,2-DCP 曝露したバクテリアのアダクトーム解析結果

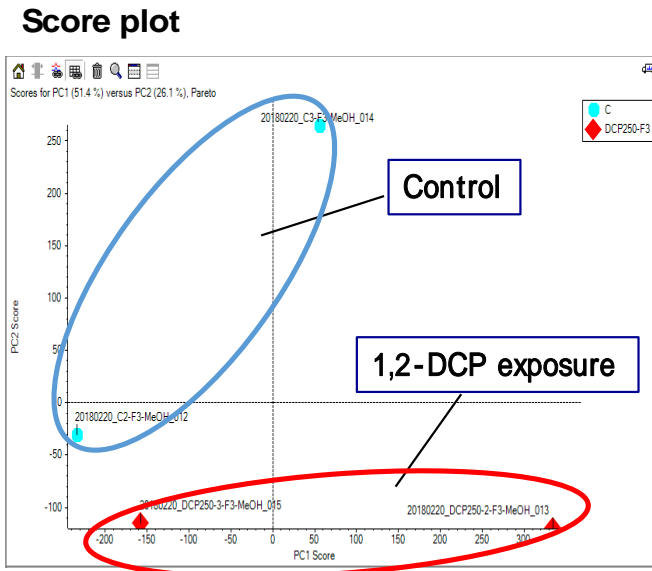


図3 抽出した付加体の存在レベル

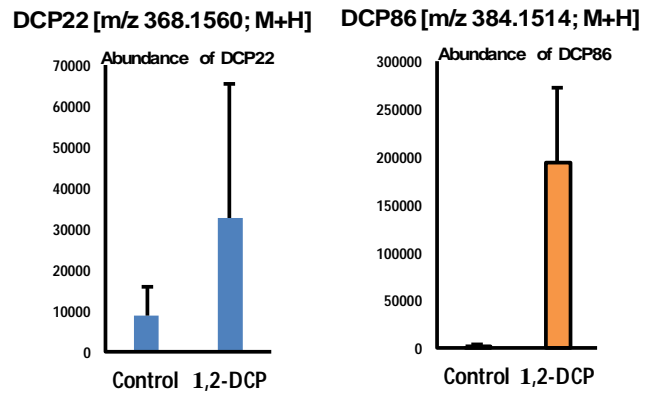


図2 1,2-DCP曝露と相関する付加体の探索結果

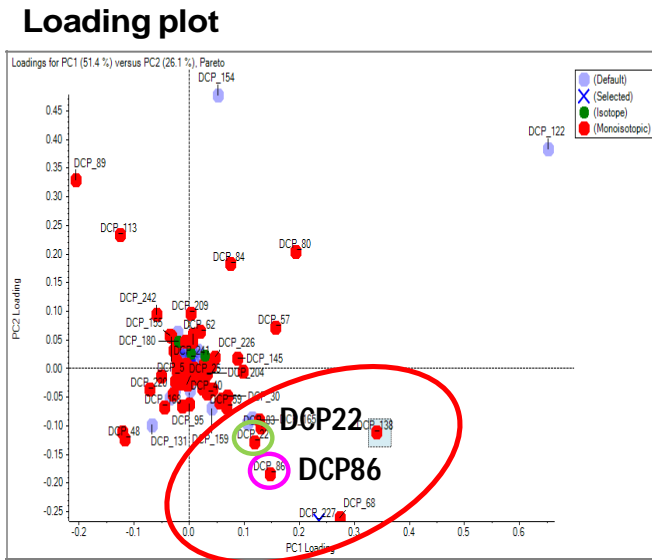
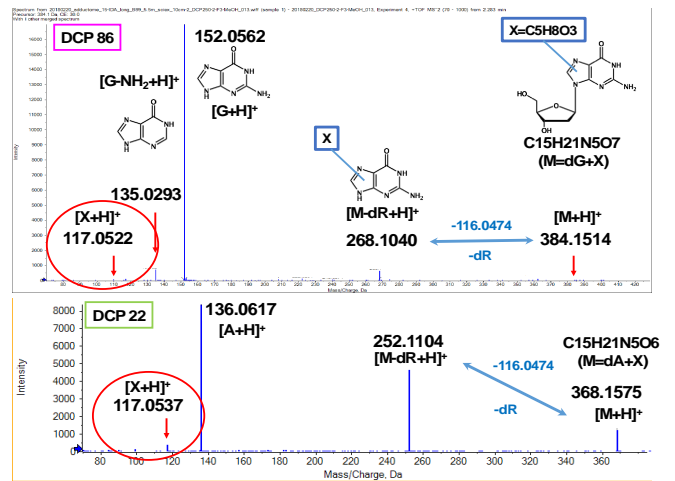


図4 抽出した付加体の組成式とMS/MSフラグメント



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

分担研究者： 高村 岳樹 神奈川工科大学工学部教授

## 研究要旨

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。昨年度と同様の方法で合成を試みているが、脱トリチル基後の反応の停止処理 ( Workup ) 方法によっては、トリチル基の再結合が観察された。より効率的な脱トリチル基の方法が望まれる他、脱ベンジル保護を先に行うほうが、アミノ基の塩基性が下がるため、脱離しやすいことが考えられるため、脱保護の方法による影響についても今後検討する必要がある。一方、ベンゾピレン ( BaP ) の付加体合成では、ピレノールから始める合成が適しており、ジオールエポキシサイドの合成までの方法論が明らかになった。既知文献とは、反応条件を異なることがあるため、さらに詳細に反応条件の検討を行っていく。また C8,N2 の付加体の他、O6 の付加体の代表である、O6 - グリコール酸 - dG の付加体の合成を進めた。ミツノブ反応による O6 位の付加体生成反応では、不純物との分離が困難であり、またアミダイトの 1 つ手前の合成ステップにおいても、不純物との分離が困難である結果となった。これにおいても、他の方法論が必要であるが、ベンゾトリアゾールを用いる不可体生成反応は進行しなかったため、他の方法を現在、検討中である。

## 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。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 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。また並行して、加熱食品の加熱時に生成する可能性のある発ガン性物質ベンゾピレンが dG に付加した dG-N2 付加体の別途合成方法の開発、さらに、O6 位にグリコール酸 (GA) 修飾した付加体 dG-O6-GA の合成を試みた (図 2)。これはグリシンが生体内でニトロソ化された場合に生成する付加体である。

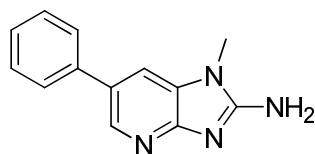


図 1 PhIP の化学構造

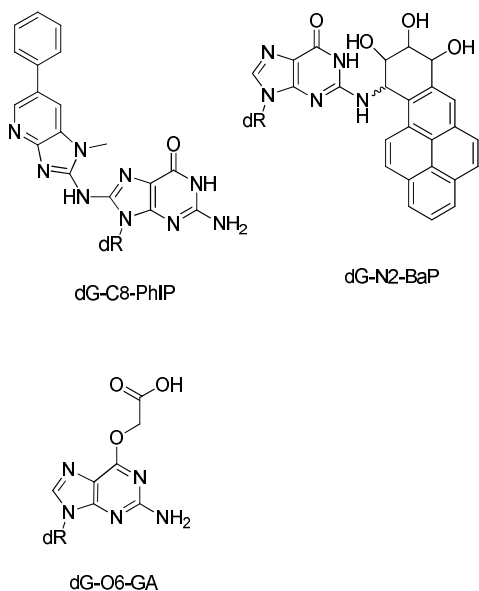


図 2 各種 dG 付加体の化学構造

## B. 研究方法

昨年度の同様の方法で、dG-C8-PhIP のアミダイトの合成を試みているが、合成の困難さも有

り、現時点ではオリゴヌクレオチドまで合成できていない。PhIP で修飾された dG-C8-PhIP のアミダイトまではあと少しの行程であるが、昨年度までの合成時と若干、反応性が異なることが明らかになっており、その原因について検討が必要である。またベンゾピレンの付加体については付加体反応の手前までの合成を行った。また GA 付加体については、定法により合成を進めた (図 3)。

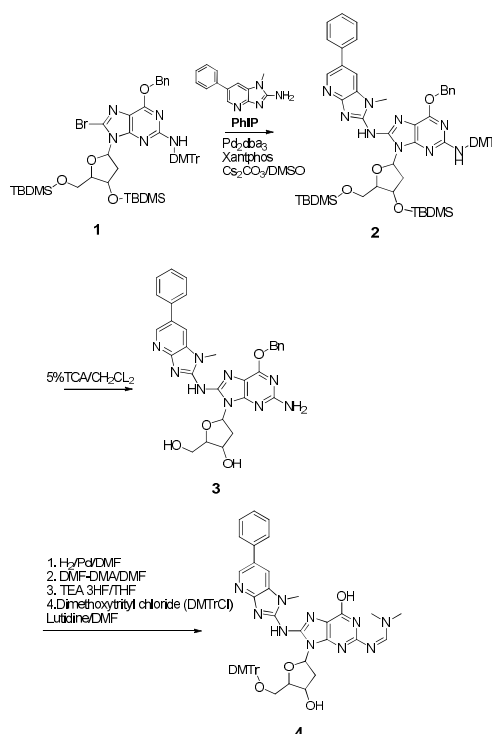


図 3 PhIP 修飾オリゴヌクレオチド合成のスキーム

(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 位のブロモ体(8-Br-dG)誘導体の合成からはじめた。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た。しかしながら

この反応が十分に進行せず，原料を回収することが多かったため今後，改良が必要であることがわかった。また保護を行った dG 誘導体は PhIP との Buchwald アミノ化反応をもちいて反応させた。得られた付加体誘導体を，トリクロロ酢酸を用いて脱保護を行ったが，反応が進行するもの，Workup 後にトリチル基が再結合して，目的とする化合物が得られていないことが多く見られた。トリチルカチオンの再結合は，生成したトリチルカチオンが十分に分解されていないために生じる現象であるが，これまでの Workup 方法では不十分であることが判明した。一方で，トリチル基が存在したままでも O6 位のベンジル基は Pd black 存在下，水素添加反応により，脱保護可能であることが判明したため，今後脱保護の方法論も含めて検討を行う予定である。現在，目的とするアミダイトの前段階の化合物まで合成が終了しているが，量的に不足しているため，大量に合成を進めている。

一方，ベンゾピレンの dG 付加体では，既報が存在しているため，それに従って合成を進めている。既存のピレンアルコール 5 を脱水する反応では，トルエンスルホン酸をもちいて脱水させ，2 重結合を生成させた。得られた化合物 6 を，ベンゼン溶媒中で I<sub>2</sub> と安息香酸銀を用いる Prévost 法によりトランス 1,2 グリコールを生成した。これにはいくつかの合成方法を検討したが，反応混合物を光から保護し，室温で約 1 日，攪拌させた後に 1 時間還流させる方法で合成を行うと収率（80%）よく目的化合物 7 が得られることがわかった。得られた化合物は DDQ を用いて酸化反応を行い，目的化合物 8 を得ることが出来た（図 4）。今後，脱保護の後にジオールエポキシサイドに変換し，付加体を合成する予定である。

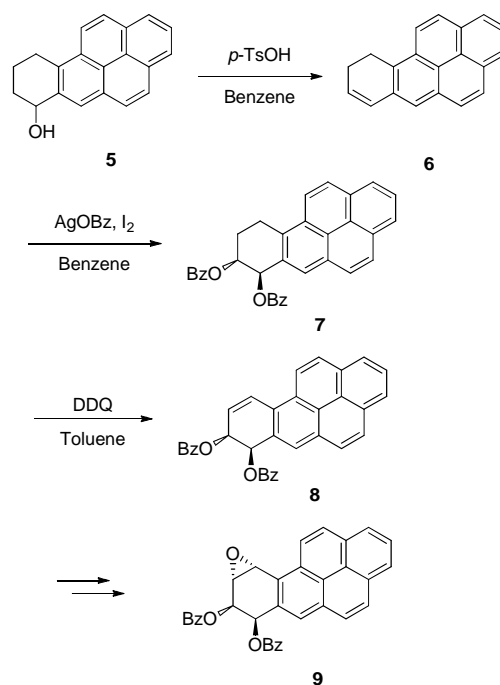


図 4 DDQ を用いたベンゾピレンの dG 付加体の合成

また dG-O6-GA の合成は，グリコール酸メチルとシリル保護した dG をミツノブ反応より合成して得るルートで行った(図 5)。しかしながら，目的化合物と，使用している Triphenylphosphine 由来の反応複製生物の分離が極めて困難であり，カラム数回後にも，目的物質を単離することが困難であった。次の脱シリル反応により，目的とする化合物を得ることが出来た。得られた化合物は N2 位のアミノ基をアミジン保護をし，さらにオリゴヌクレオチドで用いられる通常のトリチル保護を行った。目的とする化合物は得ることが可能であったが，HPLC で確認したところ，不純物と混ざった化合物であり，これは通常のカラム精製では単離できないことがわかった。そのため，まず dG の benzotriazole 誘導体を bis(dimethylamino)methylene]-1H-benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate と DBU を用いて生成させ，さらに methyl glyoxylate と反応させる方法を試みたが，目的とする化合物は得ることが出来なかった。そのため，今後，別の方法にて目的とする化合物を得る予定である。

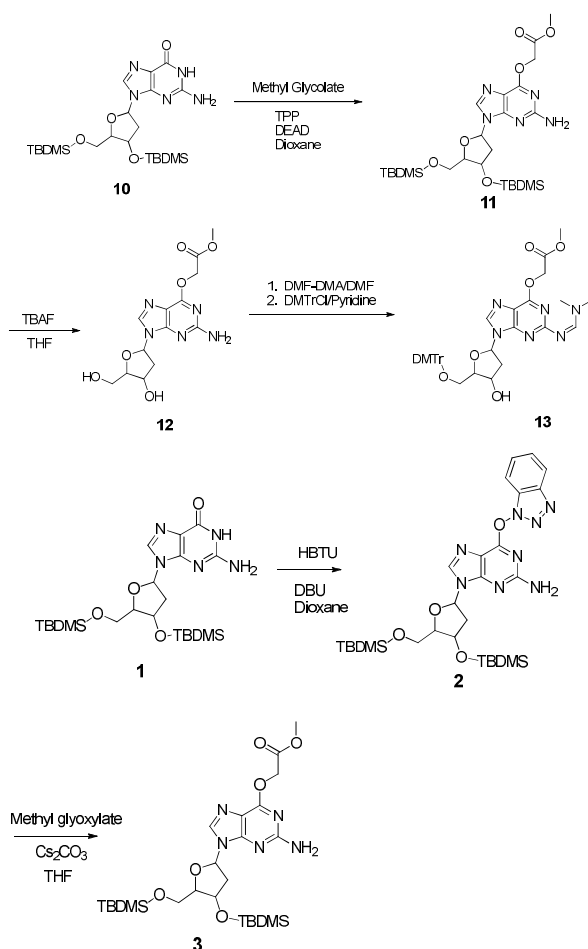


図5 *O*<sup>β</sup>-グリコール酸-dG付加体の別途合成スキーム

## D. 考察

昨年度から引き続き、修飾オリゴヌクレオチドの合成を行っているが、反応性の相違から、目的とするものまでまだ合成が終了していない。引き続き効率な方法論の検討をおこなう。

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Hashimoto, Akiko; Yamanaka, Takehiro; Takamura-Enya, Takeji, (2017) Synthesis of novel fluorescently labeled water-soluble fullerenes and their application to its cellular uptake and distribution properties Journal of Nanoparticle Research, 19: 402
2. Kazuo Someya, Hiroko Nakatsukasa, Minako Ito, Taisuke Kondo, Kenn-ichi Tateda, Takashi Akanuma, Ikuko Koya, Tsukasa Sanosaka, Jun Kohyama, Yu-ichi Tsukada, Takeji Takamura-Enya, Akihiko Yoshimura, (2017) Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation International Immunology, 29: 365-375

### 学会発表

1. ナノダイヤモンド-臭化エチジウム複合体の細胞毒性評価, 森みずき・高村 岳樹 日本化学会 第98春季年会 (2018, 船橋)
2. 蛍光フラーレンの合成と評価. 01.口頭A講演. 橋本 亜紀子・山中 岳寛・高村 岳樹 日本化学会 第98春季年会 (2018, 船橋)

## G. 知的所有権の取得状況

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： 重要な DNA アダクトの合成に関する研究**

研究分担者：出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 部長  
研究協力者：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 MeIQx (3,8-dimethyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoxalin-2-amine) および IQ (3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinolin-2-amine) の DNA アダクトの合成における Buchwald-Hartig 反応のリガンドや溶媒、反応時間等を検討するとともに、さらにステップ数を削減するべく、2 位無保護における反応条件を検討した。

**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。本研究では平成 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た。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。平成 28 年度は、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。本年度は上記の反応のリガンドや溶媒、反応時間等を検討するとともに、さらにステップ数を削減するべく、2 位無保護における反応条件を検討した。

## 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 撈拌した。上記反応条件をもとに, 溶媒 (DMSO, DMF, toluene 等), リガンド (JohnPhos, SPhos, XPhos, DavePhos 等, figure 3), 塩基 (t-BuOK, NaPO<sub>4</sub> 等), 触媒, 反応時間, 量比等を検討した。

## C. 結果と考察

### 1. dG-C<sup>8</sup>-IQ 付加体の合成

ヘテロサイクリックアミン (Heterocyclic amine, HCA, Figure 2) 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。初年度で検討した MeIQx 付加体 (dG-C<sup>8</sup>-MeIQx) 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, 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 MeIQx を導入することが可能であることがわかった。そこで次年度は導入するヘテロサイクリックアミンを IQ に変更したところ, 目的化合物が生成していることを確認できたが, リガンド由来の不純物が含まれており, 単離にはいたらなかった。そこで精製に関する各種検討を行い, 最終的に 3'位, 5'位を脱保護し, 逆相 HPLC による精製を行い, 3'位, 5'位無保護の化合物を得ることとなった。そこで本年度は, 反応条件の最適化を目指し, 6 位無保護 IQ 付加体合成時における Buchwald-Hartwig 反応の

溶媒 (DMSO, DMF, toluene 等), リガンド (JohnPhos, SPhos, XPhos, DavePhos 等 figure 3), 塩基 (t-BuOK, NaPO<sub>4</sub> 等), 触媒 (Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, Pdacac 等), 反応時間, 量比, microwave のありなし等を検討した。しかしながら, いずれの条件も, 反応が集結しない (目的化合物と原料が混在する), リガンドが残存する (順相クロマトグラフィーで最初のフラクションから最終フラクションまでリガンドが出続ける) 等により, 結果として, 初期に見出した条件 (十分に窒素置換した THF, microwave 照射下, 2 等量のアミン, 20-30mol% の Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, 塩基として 2 等量の Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, リガンドとして 1 等量の Xantophos) の組み合わせを上回る条件を見出すことができなかった。Buchwald-Hartwig 反応は芳香族ハロゲン化物とアミンをパラジウム触媒と塩基の存在下で結合させ, 芳香族アミンを生成する, いわゆるクロスカップリング反応である。今回用いたヘテロサイクリックアミン類は比較的高い構造を有しており, そのため, 触媒やリガンドの構造的特徴の影響を受けやすいと考えられる。Xantophos は 2 つのベンゼン環それぞれに, パラジウム触媒に配位するリン原子があり, 二座でパラジウムに配位するのが特徴である。一方で検討に用いたリガンドはリン原子を一つ有するものあったことから, 今回の化合物のようにヘテロサイクリックアミン類には二座配位が可能なりガンドが有利であることが考えられる。二座配位型のリガンドとしては DPEphos, Homoxantphos, Phosxantphos, Sixantphos, Thixantphos, N-xantphos など<sup>3)</sup> (Figure 4) があり, これらのリガンドを検討することで, リガンドの構造と反応性についての関係性が明らかになると考えられる。

また, さらに合成ルートの短縮化を目指し, 2, 6 位無保護 (化合物 3) による Buchwald-Hartwig 反応を検討した (scheme 2)。この場合, 合計ステップ数が 7 ステップとなり, 一般的な合成ルートより 4 ステップ分短くなるため, 合成工程の短

縮が見込まれた。しかしながら様々なリガンドにて検討したところ, LCMS および TLC で反応生成物が確認できたものもあったが, 十分な収率で目的化合物を得ることができなかった。

Microwave の影響については, どちらについても microwave を用いるほうが反応性の向上が認められた。一般的な SN<sub>2</sub> 反応で, 同様の傾向が見出されており<sup>4)</sup>, Buchwald-Hartwig 反応においても microwave が有用であることがわかった。今後, 反応時間や照射パワーの検討などを行い, より最適な反応条件を見出すことで, 反応収率の向上を目指す必要がある。

#### 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 8 位に対する Buchwald-Hartwig 反応に着目し, その反応条件の検討を行った。

MeIQx と IQ は一部構造が異なることから (MeIQx; 8 位 CH<sub>3</sub>, 9 位 N; IQ; 8 位 H, 9 位 C), その物性 (溶媒への溶解性等) が異なることが考えられ, その DNA 付加体も実際に溶媒への溶解性が異なっており, 同一の精製条件を用いることができなかった。本年度は, 6 位無保護での IQ 付加体合成時における Buchwald-Hartwig 反応の溶媒 (DMSO, DMF, toluene 等), リガンド (JohnPhos, SPhos, XPhos, DavePhos 等), 塩基 (t-BuOK, NaPO<sub>4</sub> 等), 触媒, 反応時間, 量比等を検討した。しかしながら, 初期の反応条件を凌駕するほどの効率的な反応条件を見出すことができなかった。また, 反応工程の短縮を目指し, 2 位無保護による Buchwald-Hartwig 反応を検討した。様々なリガンドにて検討したところ, LCMS および TLC で反応生成物が確認できたものもあったが, 十分な収率で目的化合物を得ることができなかった。Buchwald-Hartwig 反応のリガンドは現在でも様々な構造の化合物が開発

されており，今回の検討でもすべてを網羅したものであるのではない．今後も継続的に検討を行い，より最適な反応条件を見出すことが必要である．

#### 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 acetylamino adducts of 2'-deoxyguanosine suitably protected for DNA synthesis. *Org Lett*, **4**, 4205-4208 (2002).
- 3) Birkholz MN, Freixa Z, van Leeuwen PWNM: Bite angle effects of diphosphines in C-C and C-X bond forming cross coupling reactions. *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 1099-1118 (2009).
- 4) Gedye R, Smith F, Westaway K, Ali H, Baldisera L, Laberge L, Rousell J: The use of microwave oven for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **27**, 279-282 (1986).

#### 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

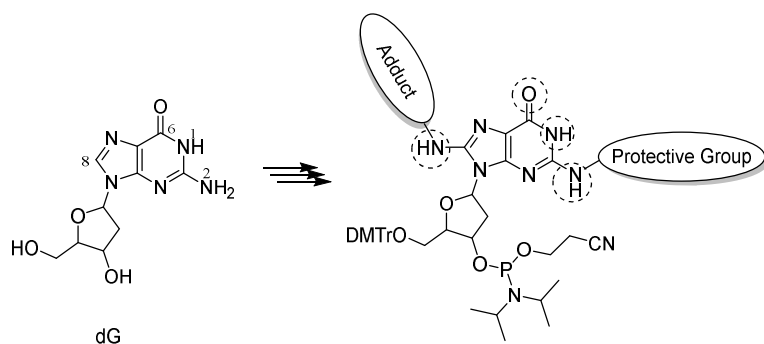


Figure 1 dG (2'-deoxyguanosine) および , ホスホロアミダイト体の構造

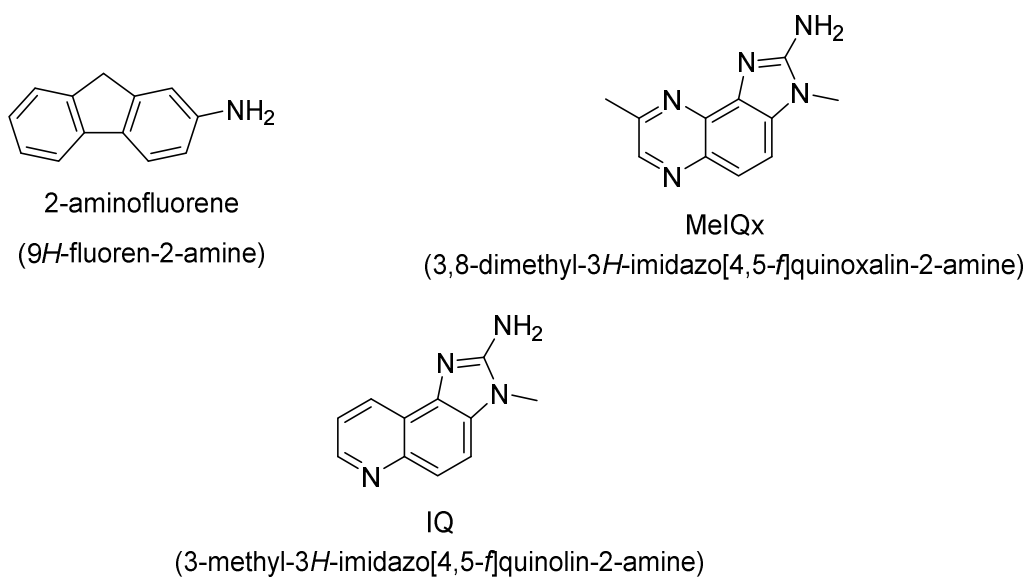


Figure 2 本研究で取り上げたヘテロサイクリックアミンの構造

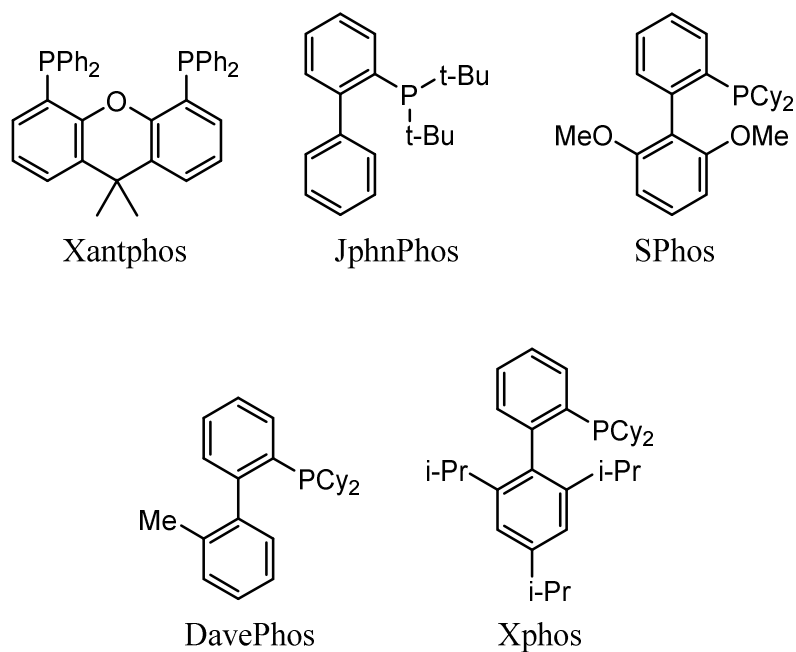
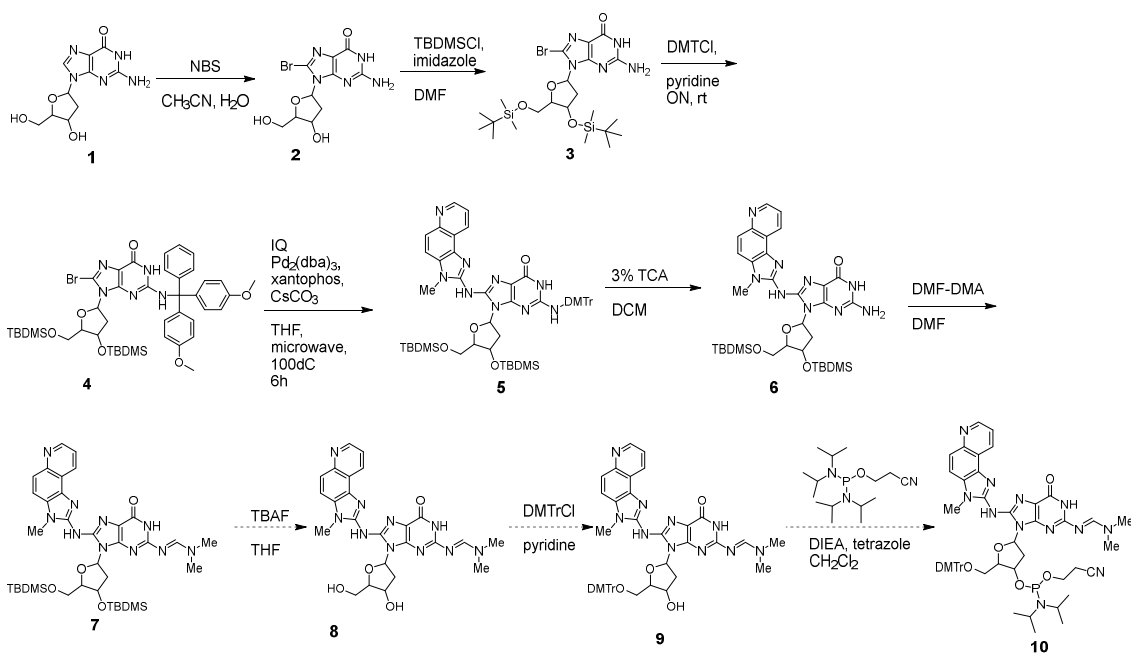
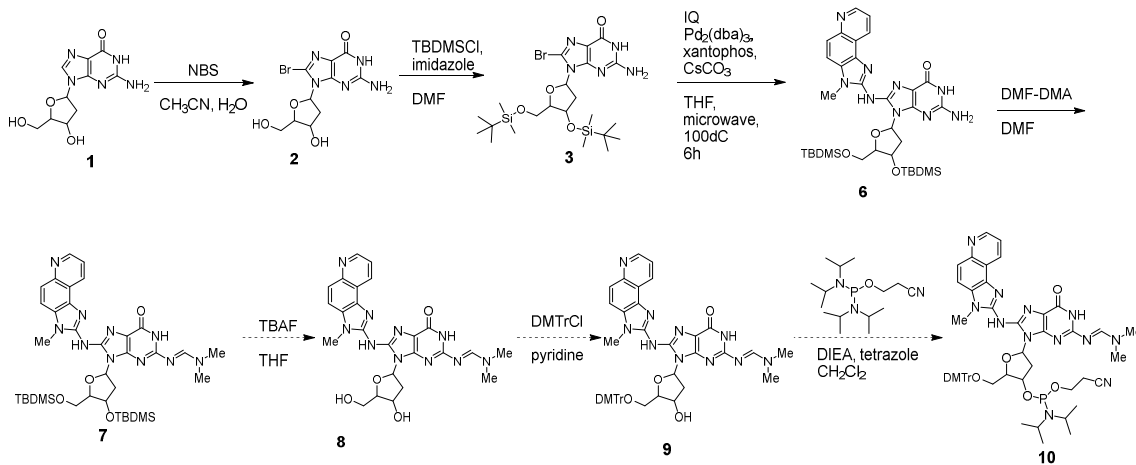


Figure 3 本研究で検討したリガンドの構造



Scheme 1 dG-C8-MeIQ<sub>x</sub> アダクトの合成スキーム(6位無保護). 合計9ステップ



Scheme 2 2位および6位無保護における合成スキーム（合計7ステップ）

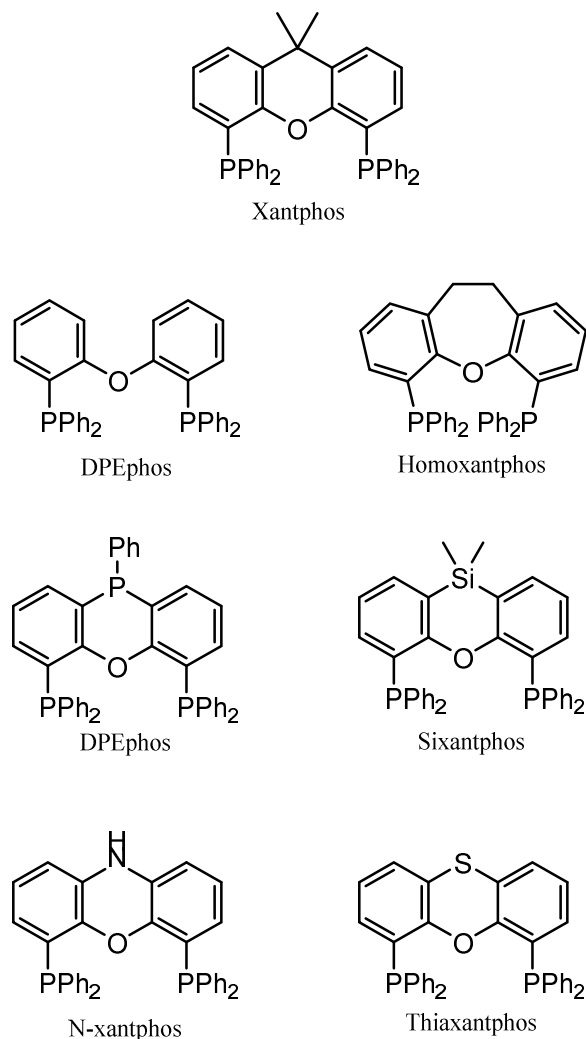


Figure 4 xantphos 型リガンド

## 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
本間正充	遺伝毒性	日本毒性学会教育委員会	トキシコロジー (第3版)	朝倉書店	東京	2017	128-141

## 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
Suzuki T, Matsumoto K, Honma M, Nohmi T	Impact of DNA polymerase $\zeta$ mutations on genotoxic thresholds of oxidative mutagens.	Mutat Res.	828	10-14	2018
You X, Ando T, Xi J, Cao Y, Liu W, Zhang X, Honma M, Masumura K, Luan Y.	Gene mutation and micronucleus assays in gpt delta mice treated with 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether.	Mutagenesis	33	153-160	2018
Petkov, PI, Schultz TW, Honma M, Kirilov K, Kotov S, Mekenyan OG.	Predicting in vitro genotoxicity by mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase mutation assay (MLA): Accounting for simulated metabolic activation of chemicals.	Computational Toxicology	4	45-53	2017
Gadaleta D, Porta N, Vrontaki E, Manganelli S, Manganaro A, Sello G, Honma M, Benfenati E.	Integrating computational methods to predict mutagenicity of aromatic azo compounds.	J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.	35	239-257	2017
本間正充	食品に含まれる化学物質のリスクアセスメントと遺伝毒性評価	FFIジャーナル	223	8-16	2018
Grúz P, Shimizu M, Sugiyama KI, Honma M.	Mutagenicity of $\omega$ -3 fatty acid peroxidation products in the Ames test.	Mutat Res.	819	14-19	2017



Kanemaru Y, Suzuki T, Sassa A, Matsumoto K, Adachi N, Honma M, Numazawa S, Nohmi T.	DNA polymerase kappa protects human cells against MMC-induced genotoxicity through error-free translesion DNA synthesis.	Genes Environ.	39	6	2017
Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P., Honma, M	Detection of epigenetic mutagens including anthracene-derived compounds using yeast <i>FLO1</i> promoter GFP reporter gene assay	Mutagenesis	32	429-435	2017
Fukai, E, Sato, H, Watanabe, M, Nakae, D, Totsuka, Y.	Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes.	Cancer Sci.	109	1024-1031.	2018
Toyoda T, Totsuka Y, Matsuehita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K.	$\gamma$ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline.	Journal of Applied Toxicology	16		2017
Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y.	Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane.	Mutagenesis	32	455-462	2017
Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, Totsuka Y.	Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potential of Kaolin.	Genes Environ	39	12	2017
Someya K, Nakatsukasa H, Ito M, Kondo T, Tateda KI, Akanuma T, Koya I, Sanosaka T, Kobayashi I.	Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation. Int. Immunol	Int. Immunol.	29	365-375	2017
Hashimoto, A., Yamanaka, T., Takamura-Enya, T.	Synthesis of novel fluorescently labeled water-soluble fullerenes and their application to its cellular uptake and distribution properties	J Nanopart Res	19:	402	2017

Misaki K, Takamura- Enya T, Ogawa H, Takamori K, Yanagida M.	Tumour-promoting activity of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated or nitrated derivatives.	Mutagenesis.	31	205-13	2016
Takamura- Enya T, Tokutake M.	Novel speciation analysis of copper in river water: observation of soluble anionic copper–ligand complexes	Limnology	17,	. 117-125	2016