

環境変異原研究

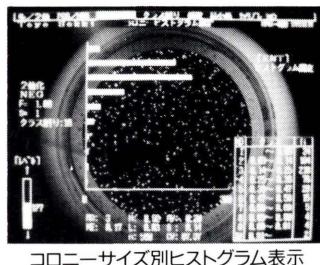
Environmental
Mutagen
Research
Communications

Vol.16 No.3 1995

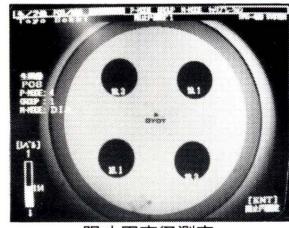
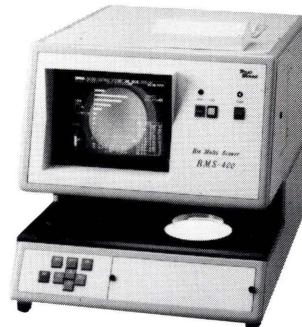
バイオ・マルチスキャナー BMS-400

- ① コロニーカウント { サイズ別ヒストグラム表示
スパイラルコロニー
エームステスト、グレインカウント
- ② MIC測定 (寒天希釀法による、27菌株の同時測定)
- ③ 阻止円測定 (4個の阻止円を同時測定)

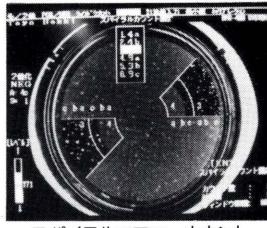
東洋測器のこの1台がすべてを瞬時測定



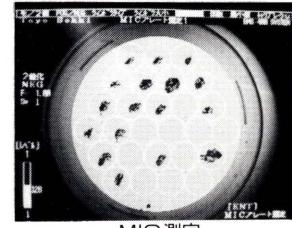
コロニーサイズ別ヒストグラム表示



阻止円直径測定



スパイラルコロニーカウント



MIC測定

M/Gエアーサンプラー



NASA基準 空中浮遊菌測定器

米国NASA基準の空中浮遊菌測定法によりデータは国際的に通用します。

測定時間は5分から連続1時間まで幅広い測定時間が得られます。クラス100のバイオクリーンルームも1回の測定で評価できる大量吸引測定。

* 詳細は、お問い合わせ下さい。

日本環境変異原学会、日本放射線影響学会
合同シンポジウム特集号の発刊によせて

日本環境変異原学会では毎年5月に公開シンポジウムを開催してきたが、今年（1994年）は第5回ということもあり、これまでとは趣を異にした企画として“活性酸素”という共通の研究テーマを持つ日本放射線影響学会との共催で、「活性酸素の生物作用」と題した合同シンポジウムを開くこととなった。

ご承知の通り、活性酸素は生体構造の損傷や生理機能の障害を引き起こし、様々な疾患の原因として最近注目されている。また老化や癌化における活性酸素の役割も徐々に解明されつつある。最近では活性酸素に関するシンポジウムも数多く開かれるようになってきている。このような現状の中で本シンポジウムでは特に、一環境因子により生成する活性酸素は生体に何を起こすか？—という問題を中心に、活性酸素の生成とその反応性、発癌との関わり、活性酸素関連遺伝子生理機能に及ぼす影響、活性酸素の生体防御、等に焦点を当てて、基調講演、特別講演、招待講演、ポスター発表の形式で、広い分野での発表と討論が行われるよう企画した。

当日には予想以上の260名余りの参加者があり、海外から3名、国内から14名の招待演者による講演があった。特にA. P. Grollman博士、I. C. Green、M. Greenご夫妻、杉村隆先生による特別講演は感銘を受けた。また専門を異にするシンポジストの講演に耳を傾けることにより、他分野、境界領域の理解を深めることができた。一方、一般発表（ポスター）会場では50もの発表が行われ、熱気に満ちた討論が行われた。

暖流と寒流が出会うところは「潮目」と呼ばれ、プランクトンが繁殖し、魚が寄ってくるのでよい漁場となるそうである。2つの学会が“活性酸素”という共通の場で合流することにより新しいエネルギーが生じ、新分野が生まれ出る予感がした。今回が第一回目の合同シンポジウムであったが、毎年開催してほしいという要望が多くあった。このような新しい試みが今後の両学会の進歩、発展に寄与することができれば幸いである。

最後に、このシンポジウムを行うにあたり、経済的な御援助を頂いた放射線影響協会および多くの企業に厚く御礼申し上げたい。

合同シンポジウム世話人 葛西 宏・湯川修身

環境変異原研究

Environmental Mutagen Research Communications

Volume 16, Number 3 1995

目 次

日本環境変異原学会、日本放射線影響学会 合同シンポジウム特集号の発刊によせて

特別講演

- デオキシリボ核酸 (DNA) にみられる 8-オキソグアニン (8-oxoguanine): 変異原性と
修復機序 A. P. Grollman..... 239

- Cytokines, Nitric Oxide DNA Damage and Insulin Secreting Cells
I. C. Green, C. A. Delaney, J. M. Cunningham, J. G. Mabley, M.-d. Matteo and
M. H. L. Green..... 245

- Protection of Human Lymphocytes against Endogenous and Ionising-Radiation-Induced DNA
Strand Breakage: Studies with the Comet Assay
M. H. L. Green, J. E. Lowe, K. Aldridge, A. P. W. Waugh, P. H. Clingen, J. Cole and
C. F. Arlett..... 255

総 説

- DNA 中の 8-ヒドロキシグアニンの生成 葛西 宏..... 263
ディーゼル排気微粒子 (DEP) による肺癌発生と活性酸素の役割 嵐井 勝, 市瀬孝道..... 275
DNA 損傷機構と生物作用

- 桑原幹典, 平岡和佳子, 夫馬香里, 郷司典子, 大島秀基, 佐藤文昭..... 287
放射線発がんと活性酸素 伊藤明弘, 渡邊敦光, 山田和正..... 301

- 放射線と生体防御機構 松原純子..... 309
生体計測用 ESR を用いた生体内ラジカルの挙動解析 内海英雄..... 317

- シグナルとしての活性酸素の役割 野瀬 清..... 327
生理機能に及ぼす低線量放射線の作用に関する研究 山岡聖典..... 333

- 酸化的ストレスによる遺伝子発現とその制御 米井脩治, 張秋 梅..... 345
SoxRS: 大腸菌レドックスストレス応答その役割と調節機構 布柴達男..... 357

- ADF/チオレドキシンの多様な発現調節機構と細胞傷害保護作用 丸山哲夫, 廣田喜一, 中村和史, 岩田哲史, 淀井淳司..... 369

一般論文

- ラットのシリカ曝露における肺組織 DNA の酸化的損傷
山野優子, 香川 順, 花岡知之, 高橋東生, 石原陽子, 葛西 宏,
津金昌一郎, 渡辺 昌..... 379

酸素ラジカル及び一酸化窒素 (NO) によって生ずる DNA 損傷が NIH3T3 細胞中で
誘発する点変異

紙谷浩之, 紙谷(村田)尚子, 三浦裕幸, 小井詰史朗, 清水美穂, 井上英夫,
西村 遼, 大塚栄子…… 385

大腸菌 *supF* 遺伝子における塩化コバルト (II) 誘発突然変異

尾川博昭, 西田一信, 小矢光晴, 柴原俊一, 柿本幸司, 木村 博,
坂田一矩, 加藤安彦…… 391

The sensitivity of three *soi* mutants (*soi-7*, *soi-9* and *soi-10*) of *Escherichia coli* to oxidizing
mutagens

Q.-M. Zhang, T. Takemoto and S. Yonei…… 397

ラット肝細胞における細胞情報伝達系への放射線影響について

中島徹夫, 湯川修身…… 403

活性酸素による突然変異のスペクトル

赤阪 進, 山本和生…… 409

AUTHOR INDEX 417

KEYWORD INDEX 419

日本学術会議だより (No. 35) 422

付記

日本環境変異原学会 会則 424

" 平成 6~7 年 役員名簿 425

" " 評議員名簿 426

環境変異原研究 投稿規定 427

" 執筆規定 428

住所・所属等変更届 429

日本環境変異原学会入会申込書 430

賛助会員 432

広告 433

広告掲載会社一覧

家田貿易株式会社

加商株式会社

Carl Zeiss Vision

KS オリンパス株式会社 (表 4)

システムサイエンス株式会社

株式会社 東京エム・アイ商会

東洋測器株式会社 (表 2)

フナコシ株式会社

Environ. Mut. Res. Commun., 16: 239-243 (1995)

特別講演

デオキシリボ核酸 (DNA) にみられる 8-オキソグアニン (8-oxoguanine):
変異原性と修復機序

Arthur P. Grollman

8-Oxoguanine in DNA: Is Mutagenic Properties and Repair

Arthur P. Grollman

(受付: 1994年9月14日; 受理 1994年9月14日)

Table 1. Relative incorporation of nucleotides opposite 8-oxodG by DNA polymerases *in vitro**

DNA polymerase	Incorporation C : A
pol α	1 : 200
pol δ	1 : 5
pol III	1 : 8
pol β	4 : 1
pol I	7 : 1

* Data from Shibutani *et al.* (1991) and from S. Shibutani (unpublished).

1. はじめに

細胞内の DNA には、8-oxoguanine を含めて 20 種以上の酸化的な損傷をもつ塩基 (base) が見出されている (Gajewski, *et al.*, 1990). これらの DNA 損傷のうちのあるものは DNA 複製を阻止し、またあるものは変異の誘発によって発がんや細胞老化を促進する (Ames and Gold, 1991).

Kasai と Nishimura による、細胞内 guanine と hydroxy radicals との反応による 8-oxoguanine の生成の発見 (Kasai and Nishimura, 1984; 1991), およびそれにひき続いで開発されたこの化学的被修飾塩基の高感度の検出定量法 (Gajewski *et al.*, 1990; Floyd, 1990) によれば、哺乳動物細胞内の guanine は約 10 万個に 1 個の割合で C-8 位において酸化され 8-oxoguanine になる (Floyd, 1990). このレベルは既知の化学発がん物質で処置されたマウスにおいて検出される被修飾塩基類より顕著に高い。この様に遍在的 (ubiquitous) に存在する DNA 損傷の変異原性を探究することは興味深い (Kuchino *et al.*, 1987; Shibutani *et al.*, 1991).

2. Misconducting の性質

8-oxoguanine の変異原性は DNA 複製反応における複製エラー (misconducting) の結果を反映する。8-oxodeoxyguanosine (8-oxodG) を特定の位置 (site specific) に含む鉢型の存在下での種々の DNA ポリメラーゼ反応による DNA 複製の結果を解析すると、8-oxodG はプライマー DNA 鎖の重合延長に際し、dAMP と dCMP をその反対位

置に容易に取り込ませる (Shibutani *et al.*, 1991). dAMP の相対的な取込み量は、DNA ポリメラーゼの種類によって顕著に異なることが認められた。Table 1 に示される様に dCMP と dAMP の取込みの比は DNA ポリメラーゼ α では 1 : 200 であるが、DNA ポリメラーゼ β では逆に 4 : 1 である (Shibutani *et al.*, 1991). 細胞核の DNA 複製をなう DNA ポリメラーゼと損傷修復ポリメラーゼのこの違いは 8-oxoguanine の修復に重要な関係があることを後述する (Michaels *et al.*, 1992).

3. 構造作用相関

8-oxodG の反対位置に deoxyadenosine (dA) が配位している二重鎖 DNA の構造は 2D-NMR によって解明され (Kouchakdjian *et al.*, 1991), 更に X 線結晶解析法によって確認された (McAuley-Hecht *et al.*, 1994). 8-oxoguanine は B-DNA 二重鎖中において syn conformation をとり、dA と Hoogsteen pair を形成すると想定されている

(Kouchakdjian *et al.*, 1991; McAuley-Hecht *et al.*, 1994). 8-oxodG : dA pair が Watson-Crick geometry と似ているためプライマー末端の重合延長反応を容易にすると考えられる (Shibutani *et al.*, 1991). 酸化損傷として構造的に関係があるが重合延長反応を強く阻止する Fapy とはこの点で異なる (O'connor *et al.*, 1988).

4. 変異性の研究

大腸菌における 8-oxoguanine に起因する変異誘発の頻度および変異の特異性は、8-oxoguanine で位置特異的に修飾したプラスミットを使用して研究された (Woal *et al.*, 1990; Moriya *et al.*, 1991; Cheng *et al.*, 1992; Moriya *et al.*, 1993). 哺乳動物細胞 (サル腎細胞) では SV40-ori をもった単鎖 DNA のシャトルベクターを使用した (Moriya *et al.*, 1993). 宿主細胞内での複製時に誘発された変異をもつプラスミッドの塩基配列は colony hybridization と DNA sequencing の併用によって分析された。8-oxoguanine による主な変異は G : C → T : A transversion であることが示された Wood *et al.*, 1990; Moriya *et al.*, 1991; Cheng *et al.*, 1992; Moriya *et al.*, 1993). この結果は上述の DNA ポリメラーゼ反応にみられた複製エラーの特異性とよく適合する。変異の頻度は大腸菌とサル腎細胞共に 3% 以下で、8-oxoguanine の変異作用は弱いと考えられる (Moriya *et al.*, 1993).

5. DNA 損傷の修復系

8-oxoguanine の修復はもともと Fapy 損傷をもつ DNA から Fapy を除去するためと考えられた N-glycosylase (mutM または Fpg 蛋白) (Chetsanga and Lindahl, 1979) の作用によって始まる (Tchou *et al.*, 1991). Fpg 蛋白は 8-oxodG をもつ DNA に対して Fapy をもつ二重鎖 DNA より僅かながら高い親和性をもっている (Tchou *et al.*, 1994; Tchou and Grollman, 1994). Fpg 蛋白の生理的基質は Fapy よりもむしろ 8-oxoguanine であることを遺伝学的実験も暗示している。

構造作用的観点からみて興味深いことに、共に酸化損傷塩基である 8-oxodG と Fapy は dC と対をなしたときだけ Fpg 蛋白の作用によって DNA

からとり除かれ、これに反し、8-oxodG : dA pair は Fpg の酵素作用の基質として不適切な構造である (Tchou *et al.*, 1991; Tchou and Grollman, 1994). 変異誘発の中間体である 8-oxodG : dA pair の修復には今一つの DNA glycosylase である adenine DNA glycosylase (*mutY* 蛋白) が関与する (Michaels *et al.*, 1992, 1993; Au *et al.*, 1989). Fpg 蛋白の場合と同様に、adenine DNA glycosylase ははじめ DNA 中の dG : dA mismatch の修復活性として発見、精製された (Michaels *et al.*, 1992, 1993; Au *et al.*, 1989). Adenine DNA glycosylase の第一義的生理作用は酸化損傷 DNA の修復をもかねている様である (Tchou and Grollman, 1993; Michaels and Miller, 1992).

8-oxoguanine の DNA 中への出現は、DNA の直接酸化の他に、8-oxodGTP の DNA 合成時の DNA への取込みによっても起り得る (Tchou and Grollman, 1993; Michaels and Miller, 1992). 8-oxoguanine は錆型中の dA と dC にほぼ同様に対合してプライマー末端に取込まれるので (Cheng *et al.*, 1992; Maki and Sekiguchi, 1992), もし修復が行われなければ、A : T → C : G transversion を起させる (Yanofsky *et al.*, 1966). 細胞内の nucleotide triphosphate pool から 8-oxodGTP を除くために 8-oxodGTPase が存在して変異を防いでいる (Maki and Sekiguchi, 1992).

種々の活性酸素の遍在的存在のため、あらゆる生物の DNA に 8-oxoguanine が存在することは確実である (Frenkel, 1992). 8-oxoguanine の変異作用に防禦的な DNA 修復酵素の役割を明らかにするために各種の大腸菌 mutator 株が使用された (Tchou and Grollman, 1993; Michaels and Miller, 1992). MutT 株は 8-oxodGTP の加水分解が不能のため (Maki and Sekiguchi, 1992), 高頻度で A : T → C : G transversion を生じる。MutM 株は Fpg 蛋白の欠損のため、8-oxodG の蓄積 (Bessho *et al.*, 1992) と高頻度の G : C → T : A transversion を起す (Michaels *et al.*, 1991). MutY 株は adenine DNA glycosylase 欠損のため同様な変異を多発する。MutM/MutY 二重変異は協働的に働き、両者は共同して 8-oxodG の変異作用から大腸菌を防禦している (Michaels *et al.*, 1992).

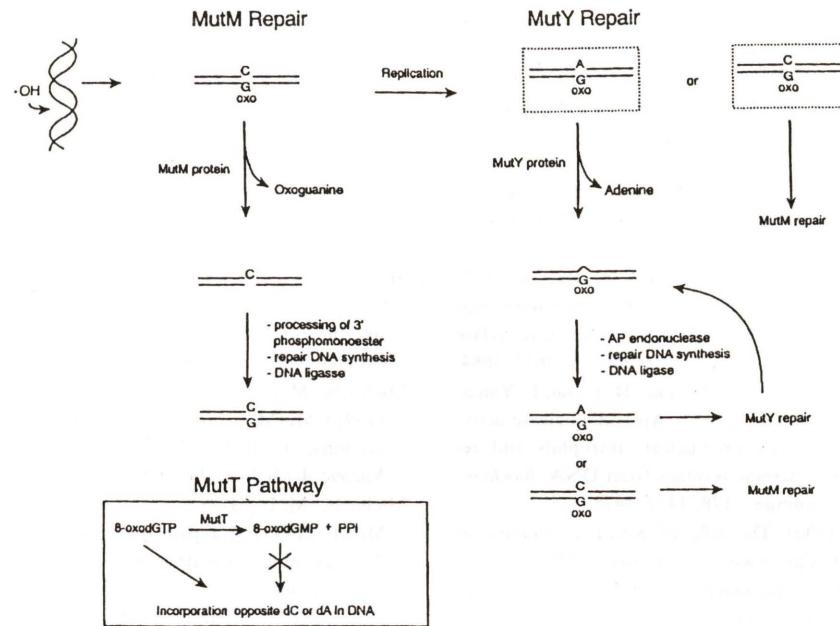


Fig. 1. Schematic diagram illustrating how the MutM, MutY, and MutT proteins reduce accumulation of 8-oxoguanine residues in DNA. 8-Oxoguanine is introduced into DNA by oxidative damage (unboxed pathway) or by incorporation of 8-oxodGTP during DNA biosynthesis (boxed pathway). MutM (8-oxoguanine DNA glycosylase) and MutY (adenine DNA glycosylase) act on oxidatively damaged DNA to minimize accumulation of 8-oxoguanine. MutT protein (8-oxodGTPase) depletes the pool of 8-oxoGTP. Excision of 8-oxoguanine from DNA is catalysed by combined action of the DNA-glycosylase and AP lyase activities of MutM protein. The single nucleotide gap is processed by DNA repair synthesis. If 8-oxoguanine escapes during repair, dAMP or dCMP is incorporated opposite the lesion. DNA containing 8-oxodG : dA is repaired by MutY protein, removing adenine. The MutY protein temporarily remains bound to DNA, protecting 8-oxoguanine from subsequent attack by MutM protein, thereby preventing loss of one base of information and a double-strand break. Repair DNA synthesis directs incorporation of dAMP and dCMP opposite 8-oxodG. The 8-oxodG : dA pair is repaired through the MutY pathway while the preferentially formed 8-oxodG : dC pair can be repaired through the MutM pathway.

6. 結論

種々の活性酸素は細胞内で継続的に生成され、DNA の酸化障害を引き起こす。これらの有害な影響からの防禦のため、複雑な修復系が存在している。大腸菌では Figure 1 に示された 8-oxodG 修復機序が解明されている。詳細な総説は Michaels *et al.*, (1992), Tchou and Grollman (1993), Michaels and Miller (1992) を参照されたい。哺乳動物細胞中にも MutM, MutY, MutT に対応する遺伝子産物が知られており、類似の error avoidance pathways が働いている様にみえる (Chung *et al.*, 1991; Yeh *et al.*, 1991; Mo *et al.*, 1992).

謝辞

著者は本研究に対する重要な貢献をされた協同研究者、とくに、本稿の基礎となる研究をされた S. Nishimura, S. Shibutani, F. Johnson, M. Moriya, M. Michaels, J. Miller, J. Tchou の諸先生に感謝します。本稿の日本語訳に貢献をいただいた M. Takeshita 教授にお礼を申し上げます。

References

- Ames, B. N. and L. S. Gold (1991) Endogenous mutations and the causes of aging and cancer. *Mutation Res.*, **250**, 3–16.
- Au, K. G., S. Clark, J. H. Miller, and P. Modrich, (1989) *Escherichia coli mutY* gene encodes an edenine glycosylase active on GA mispairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 8877–8881.

- Bessho, T. K., Tano, H., Kasai, and S. Nishimura (1992) Deficiency of 8-hydroxyguanine DNA endonuclease activity and accumulation of the 8-hydroxyguanine in mutator mutant (mutM) of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **188**, 372–378.
- Cheng, K. C., D. S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura, and L. A. Loeb, (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, cause G→T and A→C substitutions. *J. Biol. Chem.*, **267**, 166–172.
- Chetsanga, C. J. and T. Lindahl, (1979) Release of 7-methylguanine residues whose imidazole rings have been opened from damaged DNA by a DNA glycosylase from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 3673–3684.
- Chung, M. H., H. S. Kim, E. Ohtsuka, H. Kasai, F. Yamamoto, and S. Nishimura (1991) An endonuclease activity of human polymorphonuclear neutrophils and removes 8-hydroxyguanine residues from DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 1472–1478.
- Floyd, R. A. (1990) The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **11**, 1447–1450.
- Fraga, C. G., M. K. Shigenaga, J.-W. Park, P. Degan, and B. N. Ames, (1990) Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 4533–4537.
- Frenkel, K. (1992) Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmac. Ther.*, **53**, 127–166.
- Gajewski, E., G. Rao, Z. Nackerdein, and M. Dizdaroglu, (1990) Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals. *Biochemistry*, **29**, 7876–7882.
- Kasai, H. and S. Nishimura, (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2137–2145.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1991) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. In: *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants* (Sies, H., Ed.), Academic Press, NY, pp. 99–116.
- Kouchakdjian, M., V. Bodepudi, S. Shibutani, M. Eisenberg, F. Johnson, A. P. Grollman, and D. J. Patel, (1991) NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG (*syn*). dA (*anti*) alignment at lesion site. *Biochemistry*, **30**, 1403–1412.
- Kuchino, Y., F. Mori, H. Kasai, H. Inoue, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka, and S. Nishimura, (1987) Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature*, **327**, 77–79.
- Maki, H. and M. Sekiguchi, (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA Synthesis. *Nature*, **355**, 273–275.
- McAuley-Hecht, K. E., G. A. Leonard, N. J. Gibson, J. B. Thomson, W. P. Watson, W. N. Hunter, and T. Brown, (1994) Crystal structure of a DNA duplex containing 8-hydroxydeoxyguanine-adenine base pairs. *Biochemistry*, **33**, 10266–10270.
- Michaels, M. L., C. Cruz, A. P. Grollman, and J. H. Miller, (1992) Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 7022–7025.
- Michaels, M. L. and J. H. Miller, (1992) The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J. Bacteriology*, **174**, 6321–6325.
- Michaels, M. L., Y. Pham, C. Cruz, and J. H. Miller, (1991) MutM, a protein that prevents GC→TA transversions, is formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 3629–3632.
- Michaels, M. L., J. Tchou, A. P. Grollman, and J. H. Miller, (1993) A repair system for 8-oxo-7,8-dihydro-deoxyguanine (8-hydroxyguanine), *Biochemistry*, **31**, 10964–10968.
- Mo, J. Y., H. Maki, and M. Sekiguchi, (1992) Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: Sanitization of Nucleotide pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 11021–11025.
- Moriya, M. (1993) Single strand shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-Oxoguanine in DNA induces targeted G:C→T:A transversions in simian kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 1122–1126.
- Moriya, M., C. Ou, V. Bodepudi, F. Johnson, M. Takeshita, and A. P. Grollman, (1991) Site specific mutagenesis using a gapped duplex vector: a study of translesion synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*. *Mutation Res.*, **254**, 281–288.
- O'Connor, T. R., S. Boiteux, and J. Laval, (1988) Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to *in vitro* DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 5879–5894.
- Shibutani, S., M. Takeshita, and A. P. Grollman (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, **349**, 431–434.
- Tchou, J., V. Bodepudi, S. Shibutani, I. Antoshechkin, J. Miller, A. P. Grollman, and F. Johnson, (1994) Substrate specificity of Fpg protein. *J. Biol. Chem.*, **269**, 15318–15324.
- Tchou, J. and A. P. Grollman (1993) Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine. *Mutation Res.*, **299**, 277–287.
- Tchou, J. and A. P. Grollman, (1994) The catalytic mechanism of Fpg protein: Evidence for a Schiff base intermediate and amino-terminus localization of the catalytic site. *J. Biol. Chem.*, in press.
- Tchou, J., H. Kasai, S. Shibutani, M-H. Chung, J. Laval, A. P. Grollman, and S. Nishimura, (1991) 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 4690–4694.
- Wood, M. L., M. Dizdaroglu, E. Gajewski, and J. M. Essigmann, (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry*, **29**, 7024–7032.
- Yanofsky, C., E. C. Cox, and V. Hom, (1966) The unusual mutagenic specificity of an *E. coli* mutator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 274–281.
- Yeh, Y. C., D. Y. Chang, J. Musin, and A. L. Lu, (1991) Two nicking enzyme systems specific for mismatch-containing DNA in nuclear extracts from human cells. *J. Biol. Chem.*, **266**, 6480–6484.

Cytokines, Nitric Oxide DNA Damage and Insulin Secreting Cells

Irene C. Green, Carol A. Delaney, James M. Cunningham, Jon G. Mabley,
Maria di Matteo and Michael H. L. Green*

Biochemistry Laboratory, School of Biological Sciences, University of Sussex,
Brighton BN1 9QG Sussex UK and *MRC Cell Mutation Unit,
University of Sussex Brighton BN1 9RR UK

(Received Sent, 14, 1994; Accepted Sent, 14, 1994)

Summary

Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is an autoimmune disease in which insulin-secreting pancreatic β -cells are selectively destroyed. Cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β) are released by invading immune cells and have been shown to be capable of mediating inhibition of a variety of functions, including insulin secretion, in rat islet β -cells. Many of the inhibitory effects of IL-1 β in rat islets can be accounted for by its ability to induce nitric oxide synthase in β -cells. Nitric oxide is synthesised in response to IL-1 β at levels sufficient to induce DNA strand breakage. In the immune response, nitric oxide is frequently released together with other reactive species including superoxide anion and hydrogen peroxide and shows complex interactions with these active oxygen species. Nitric oxide and superoxide combine to form a further toxic species, peroxynitrite. The nitric oxide donor SIN-1 (3-morpholinosydnonimine) releases superoxide and hydrogen peroxide concomitantly with nitric oxide and may thus be a useful model compound to reproduce cytokine free radical generation. In contrast to results for neurotoxicity, superoxide dismutase does not protect islet cells against SIN-1-induced DNA strand breaks, whereas catalase largely reverses the effect. This suggests that formation of hydroxyl radical via the Fenton reaction may be more important than formation of peroxynitrite in these cells. A number of cytokines exert protective rather than cytotoxic effects. We have shown that transforming growth factor β (TGF β) protects islets against IL-1 β , apparently by suppressing nitric oxide synthesis (as measured by nitrite formation) rather than enzyme formation. Studies to date do not allow definite conclusions concerning the importance of cytokine-induced nitric oxide synthesis in the destruction of human islets.

Keywords: Interleukin-1 β , 3-morpholinosydnonimine (SIN-1), superoxide dismutase, islets of Langerhans, nitric oxide

1. Background

Extensive research over the last few years has shown that a group of regulatory and immunomodulatory molecules known as cytokines are involved in a number of physiological processes, including control of cell proliferation and differentiation, haematopoiesis, bone formation, wound healing, inflammatory and immune responses.

A number of disease states, including some forms of cancer or inflammatory and autoimmune diseases involve disruption of normal cytokine action or altered cytokine-induced responses. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is an autoimmune disease in which the insulin secreting pancreatic β cells are

selectively destroyed. During insulitis resident monocytes produce cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β) and tumour necrosis factor- α (TNF) and may liberate β cell autoantigens, thus establishing specificity of destruction (for review see (Mandrup-Poulsen *et al.*, 1993)).

Cytokines such as IL-1 β , identified in activated macrophage culture supernatants, may mediate the autoimmune destruction of insulin-containing cells (Bendtzen *et al.*, 1986; Mandrup-Poulsen *et al.*, 1986). Intensive research into the biological effects, signalling and destructive potential of IL-1 β , in particular, has ensued (for reviews see Mandrup-Poulsen *et al.*, 1990; Corbett and McDaniel, 1992;

Kolb and Kolb-Bachofen, 1992; Eizirik *et al.*, 1993; Mandrup-Poulsen *et al.*, 1993; Green *et al.*, 1994; Sandler *et al.*, 1994). In this article we describe the responses of insulin-secreting cells to cytokines and nitric oxide donors.

2. Inhibitory and Cytotoxic Effects of Cytokines on Islets of Langerhans

Following the identification of IL-1 β as the component of supernatants from activated macrophages which caused inhibition of insulin secretion and loss of viability in rat islets (Bendtzen *et al.*, 1986; Mandrup-Poulsen *et al.*, 1986), there has been intensive research into the responses of islets to those cytokines which may be present during insulitis. There is a bimodal response of islet insulin secretion to IL-1 β treatment *in vitro*, dependent on the duration of exposure and dose used; low dose or acute high dose treatment stimulates, while higher dose or longer term low dose treatment inhibits glucose-induced insulin secretion by rat islets (Spinas *et al.*, 1986; Comens *et al.*, 1987; Spinas *et al.*, 1988; Delaney *et al.*, 1993; Green *et al.*, 1993).

While the physiological or pathophysiological significance of cytokine-stimulated insulin secretion is unknown, there has been much interest in elucidating the mechanism of IL-1 β 's inhibition of insulin secretion, as a possible indicator of the processes which lead on to β -cell dysfunction and death in IDDM. Other inhibitory effects of IL-1 β on islets of Langerhans which have been described are reductions in insulin synthesis (Eizirik *et al.*, 1990), in mitochondrial aconitase activity (Welsh and Sandler, 1992), in glucose oxidation (Eizirik, 1988), in DNA synthesis and in intracellular levels of ATP, cAMP (Sandler *et al.*, 1990); Green *et al.*, 1993) and NAD (Yamada *et al.*, 1993; Bolaffi *et al.*, 1994). While IL-1 β also inhibits insulin secretion in the transformed hamster β -cell line HIT-T15 (Hammonds *et al.*, 1990) and in mouse islets (Welsh and Sandler, 1992), the results from human islet preparations have been less consistent. IL-1 β was reported to inhibit glucose-induced insulin secretion by perfused human islets (Kawahara and Kenney, 1991), whereas longer-term treatment in culture resulted in stimulation of secretion (Eizirik *et al.*, 1993).

Role of nitric oxide

We first reported that interleukin-1 β 's inhibitory effects on rat islet insulin secretion were nitric oxide related and highly dependent on the presence of

arginine in the culture medium (Southern *et al.*, 1990). This is consistent with the known involvement of nitric oxide in mediating cytokine effects in a number of cell types including macrophages, smooth muscle cells, fibroblasts and hepatocytes (for reviews see (Moncada *et al.*, 1991; Nathan, 1992)). Nitric oxide is generated from arginine by an oxidative reaction catalysed by the haem-containing enzyme nitric oxide synthase (NOS) (review by (Knowles and Moncada, 1994)). Indirect evidence for induction of NOS in islets of Langerhans arose from the observations that IL-1 β stimulated an arginine-dependent release of nitrite, a relatively stable oxidation product of nitric oxide (Southern *et al.*, 1990; Corbett *et al.*, 1991; Welsh *et al.*, 1991) and intracellular accumulation of cGMP (Corbett *et al.*, 1992; Southern *et al.*, 1992; Green *et al.*, 1993), which can result from nitric oxide activation of guanylate cyclase. Determination of nitrite or cGMP does have some limitations as an indicator of nitric oxide production. Nitrite levels are unreliable if there is likely to be any difference in the cellular redox state (Delaney *et al.*, 1993; Green *et al.*, 1994; Knowles and Moncada, 1994), while nitric oxide-induced elevation of cGMP relies on the presence of soluble guanylate cyclase which may be absent or at a very low level in some insulin secreting cell lines (Cunningham *et al.*, 1994). More specifically, by using electron paramagnetic resonance spectroscopy it was shown that IL-1 β induces formation of iron-nitrosyl complexes, indicative of nitric oxide reaction with iron-containing target proteins in islets (Corbett *et al.*, 1991). Nitric oxide has also been implicated in mediating the inhibitory effect of TNF, used in combination with IL-1 β , on rat islet insulin secretion (Southern *et al.*, 1990), and the cytotoxic effect of IFN plus TNF on mouse islets (Yamada *et al.*, 1993). By contrast, IL-6 inhibits rat islet insulin secretion by a mechanism distinct from that of IL-1 β (Sandler *et al.*, 1990; Southern *et al.*, 1990).

The cellular site of nitric oxide formation has been indicated by stimulation of cGMP accumulation by IL-1 β specifically in β -cells, but not alpha cells, using FACS-purified preparations from rat islets (Corbett *et al.*, 1992). Furthermore, IL-1 β treatment raised cGMP, nitrite and iron-nitrosyl complex formation (Corbett *et al.*, 1992) and stimulated conversion of radiolabelled arginine to citrulline, the co-product of the nitric oxide synthase-catalysed reaction (Cunningham *et al.*, 1993) in the

insulin-secreting cell line RINm5F. Expression of macrophagetype NOS has been confirmed by Northern blot analysis of IL-1 β -treated HIT-T15 cells (Eizirik *et al.*, 1992; Eizirik *et al.*, 1993) and Western blot of rat islet and RINm5F cell protein (Green *et al.*, 1994). Possible non-endocrine sources of nitric oxide in the islets include macrophages, vascular endothelial cells and fibroblasts.

Biological effects of nitric oxide donors on insulin-secreting cells

In order to investigate whether cytokine effects are reproduced by nitric oxide we have examined the effect of nitric oxide donors on β -cell function in rat islets and insulin-containing rodent cell lines. Nitric oxide donors which enter cells and release the free radical intracellularly may be more inhibitory than donors which release nitric oxide extracellularly (Cunningham *et al.*, 1994). We have also shown in HIT-T15 cells and in islets of Langerhans that nitric oxide released by donors causes DNA damage within 30 min. and inhibits insulin secretion in that time; this inhibition is similar in magnitude to that seen after cytokine treatment (Delaney *et al.*, 1993; Green *et al.*, 1993); unpublished observations). HIT-T15 cell responses to nitric oxide releasing compounds resemble those of primary tissue—islets of Langerhans—more closely than RINm5F cell responses. However, both types of cell respond to donors within 24–48 h with decrease in cell number and viability (this laboratory, unpublished observations).

Intracellular targets for nitric oxide

The ability of nitric oxide to inactivate enzymes suggests a means for mediation of some of IL-1 β 's effects on islets. Inhibition of glucose-induced insulin secretion has been proposed to result from iron-nitrosyl complex formation following nitric oxide interaction with iron-sulphur containing enzymes (Corbett *et al.*, 1991) such as aconitase (Welsh *et al.*, 1991), leading to a fall in glucose oxidation rate (Sandler *et al.*, 1987), impaired production of ATP (Sandler *et al.*, 1990) and, ultimately, defective synthesis and release of insulin. An additional inhibitory effect on insulin secretion may be brought about by nitric oxide activation of membrane potassium transport channels (Antoine *et al.*, 1993; Bolognina *et al.*, 1994). The inhibitory effects of IL-1 β on DNA synthesis may be accounted for by nitric oxide-inactivation of iron-containing ribonucleotide reductase, the rate-limiting enzyme in this process (Kwon *et al.*, 1992).

Nitric oxide or other free radicals released from macrophages or generated intracellularly are being investigated as the mediators of cytokine-induced toxicity (Kolb and Kolb-Bachofen, 1992; Rabinovitch *et al.*, 1992; Mandrup-Poulsen *et al.*, 1993). The DNA damaging effects of nitric oxide is evident in insulin-containing cells (Delaney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1993; Fehsel *et al.*, 1993). Cytokine-induced nitric oxide is sufficient to cause DNA damage and is a specific causative agent as shown by the use of arginine analogues which abolish IL-1 β -induced nitric oxide generation (Delaney *et al.*, 1993). It has been proposed that reduction of NAD by IL-1 β treatment of rat islets is associated with decreased islet viability, which is restored by nicotinamide treatment (Bolaffi *et al.*, 1994) and that nitric oxide induced lysis is diminished by nicotinamide or 3-aminobenzamide (Kallman *et al.*, 1992). However, nicotinamide treatment does not normalise insulin secretion (Sandler *et al.*, 1989; Bolaffi *et al.*, 1994), although one report suggests partial restoration (Buscema *et al.*, 1992).

DNA damaging action of nitric oxide \pm superoxide

Nitric oxide synthase has been shown to be capable of generating superoxide in addition to nitric oxide (Pou *et al.*, 1992). The nitric oxide donor SIN-1 releases superoxide anion and hydrogen peroxide concomitantly with nitric oxide (Ioannidis and de Groot, 1993). To determine whether the DNA damage we observed with SIN-1 (Delaney *et al.*, 1993) was mediated by nitric oxide or by active oxygen species the specificity of the effect was studied using the nitric oxide donor in combination with superoxide dismutase and catalase. Lipton *et al.*, (1993) found that superoxide dismutase afforded protection against the neurotoxicity of SIN-1. They argued that this suggested a role in nitric oxide toxicity for peroxynitrite, which would be formed from superoxide and nitric oxide, and which would release hydroxyl radical at neutral pH. In contrast, in our experiments superoxide dismutase combined with SIN-1 prolonged the half life of nitric oxide and increased comet formation. Possible formation of peroxynitrite was suggested by a decreased ratio of nitrate to nitrite in the presence of superoxide dismutase. Similar lack of protection by superoxide dismutase was found by Ioannidis and de Groot (1993). Oury *et al.* (1992) also suggested that superoxide might protect against nitric oxide toxicity.

In our experiments, however, catalase which re-

moves hydrogen peroxide, largely abolished SIN-1's ability to form comets (unpublished observations). It would therefore appear that hydroxyl radical formation via hydrogen peroxide and a Fenton-type reaction may be of more significance than its formation via decomposition of peroxy nitrite. The DNA-damaging activity of nitric oxide donors is unlikely to be solely due to formation of hydrogen peroxide, since neither superoxide dismutase nor catalase affected the ability of the nitric oxide donors s-nitrosoglutathione or Roussin's Black salt (Flitney *et al.*, 1992) to cause DNA damage (unpublished observations).

The interaction of nitric oxide with active oxygen species is clearly complex and highly dependent on cell type. Nitric oxide has been shown to protect against the cytotoxicity of reactive oxygen species, superoxide or hydrogen peroxide, in V79 cells (lung fibroblasts) (Wink *et al.*, 1993). However, in liver cells, Ioannidis and de Groot (1993) found that hydrogen peroxide and nitric oxide co-operated in cell killing, and *in vitro* nitric oxide and hydrogen peroxide gave singlet oxygen, a highly cytotoxic species (Noronha-Dutra *et al.*, 1993). Our results using the nitric oxide donor SIN-1 and measuring DNA damage in HIT-T15 cells and lymphocytes are consistent with those of Ioannidis and co-workers measuring liver cell injury by lactate dehydrogenase activity, in that the damaging activity of SIN-1 was reduced by catalase. No protection by superoxide dismutase from the DNA damaging effect of SIN-1 was provided in our studies (Delaney *et al.*, 1993) or from the cytotoxic effect of SIN-1 by Ioannidis *et al.* (Ioannidis and de Groot, 1993). In our own results we do not have evidence for or against a synergistic interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide at the present time.

Islet β -cells are specifically targeted by methylating agents e.g. streptozotocin, which is used *in vivo* to induce insulin-dependent diabetes. *In vitro* effects of streptozotocin on cultured islets are largely irreversible, unlike those of methyl methanesulphonate or methylnitrosourea (Eizirik *et al.*, 1991). We have examined streptozotocin, methyl- and ethyl-nitrosourea for nitric oxide production and compared them with methyl and ethyl methanesulphonate which do not release nitric oxide. All compounds inhibited insulin secretion, regardless of their possession of an NO group (unpublished observations). In the case of these diabetogenic compounds there seems to be no contribution made by

nitric oxide to inhibition of insulin release over and above the effects of methylation and ethylation. Intracellular targets for these compounds are not known.

Induction of prostaglandin synthesis

IL-1 β -induction of nitric oxide synthase in rat islets is accompanied by expression of the haem-based enzyme cyclooxygenase (COX-2) which catalyses the rate-limiting step in the production of prostaglandins, thromboxane A2 and prostacyclin (eicosanoids) from arachidonic acid (Corbett *et al.*, 1993). Since IL-1 β treatment of islets with an arginine analogue inhibited production of both nitrite and PGE2 (basal and arachidonic acid-stimulated), it is likely that, in islets, nitric oxide stimulates the activity of COX-2 (Corbett *et al.*, 1993). While prostaglandins are not principal mediators of the inhibitory effects of IL-1 on rat islet insulin secretion (Hughes *et al.*, 1989; Sandler *et al.*, 1989) and glucose oxidation (Hughes *et al.*, 1989), arachidonic acid metabolites have been implicated in mediating the cytotoxic effects of cytokines on islet cell monolayer cultures (Rabinovitch *et al.*, 1990; Rabinovitch *et al.*, 1992).

3. Protective Mechanisms

A recent proposal concerning the pathogenesis of IDDM is that the overall effect of cytokines on β cells is determined to some extent by the balance between cytokine-induced inhibitory and cytotoxic effects and a counteracting set of repair and defence mechanisms (for review see (Eizirik *et al.*, 1993)). Potentially important defence and repair responses induced by IL-1 β treatment of islets are the synthesis of heat shock proteins (Helqvist *et al.*, 1989; Eizirik *et al.*, 1990), which under conditions of cellular stress may stabilise denatured proteins or facilitate their refolding and disposal, haem oxygenase (Helqvist *et al.*, 1991) which can act as an antioxidant, and superoxide dismutase (Borg *et al.*, 1992), a scavenger of oxygen radicals.

In addition to a parallel induction of cellular defence and repair mechanisms, protection against assaulting cytokines may be provided by other cytokines and hormones. Cytokine induction of macrophage nitric oxide synthase has been shown to be inhibited by dexamethasone (Di Rosa *et al.*, 1990), IL-10 (Cunha *et al.*, 1992), IL-4 (Liew *et al.*, 1991) and TGF β (Ding *et al.*, 1990). Dexamethasone has been reported to block the inhibitory effect of IL-1 β on islet insulin secretion by reducing nitric

oxide formation, as reflected by the prevention of IL-1 β -induced cGMP (Kwon *et al.*, 1993). In IL-1 β -treated RINm5F cells, dexamethasone does not alter the induction of iNOS mRNA, but attenuates the increase in nitrite production (Cetkovic-Cvrlje *et al.*, 1993) and nitric oxide synthase activity (Cunningham *et al.*, 1993). IL-10 treatment of islets, while influencing some aspects of β cell function, does not affect IL-1 β 's inhibition of insulin secretion nor attenuate increased production of nitrite by RINm5F cells (Sandler and Welsh, 1993). Recent work in our laboratory has shown that TGF β reverses IL-1 β 's effects on insulin secretion and nitric oxide formation in rat islets (Mabley *et al.*, 1994) and RINm5F cells (Cunningham *et al.*, 1994). This effect in islets appears to be through a reduction of bioactive nitric oxide production (Mabley, Cunningham, Schulster & Green unpublished observations), rather than by suppression of enzyme synthesis as has been described in macrophages (Vodovotz *et al.*, 1993). In addition, the naturally synthesised IL-1 receptor antagonist IL-1ra counteracts IL-1 β 's inhibition of islet insulin secretion (Dayer-Metropoulos *et al.*, 1989; Eizirik *et al.*, 1991) and delays the onset of IDDM in an animal model of diabetes (Dayer-Metropoulos *et al.*, 1992) suggesting that IL-1ra may have a role in limiting the effects of IL-1 β on islet cells *in vivo*.

4. The Human Perspective

While there is an extensive literature on rodent islet responses to cytokines and the signalling systems mediating these parameters, far less is known about how human islets respond to cytokines. Although extrapolation of insulin secretory and second messenger data from rat to human islets has been possible in the past, the biological responses to cytokine treatment and mediators of cytokine effects in human islets may be very different. For example, compared with rat islets, human islets show greater resistance to streptozotocin, a specific β cell toxin which causes alkylation damage and possibly nitric oxide-related cellular damage, and are more sensitive to high glucose (Davalli *et al.*, 1991; Eizirik *et al.*, 1992).

There have been too few studies so far to allow conclusions to be drawn concerning the importance of nitric oxide in cytokine impaired function of human islets. Insulitis may augment nitric oxide and other free radical levels in the vicinity of the β cell, or more lethally within the β -cell, and these

radicals may synergise and contribute to cell death. Alternatively, islet response to nitric oxide may be of less importance in humans compared with some other species if human macrophages do not respond to cytokines by production of this radical. Interleukin-1 β , TNF α and IFN γ treatment of cultured human islets increased transcription of nitric oxide synthase mRNA (Eizirik *et al.*, 1994) and nitrite formation, while decreasing the insulin secretory response (Corbett *et al.*, 1993; Eizirik *et al.*, 1994). However, while Corbett *et al.* found this cytokine-induced inhibition of insulin secretion to be partially dependent on nitric oxide generation (Corbett *et al.*, 1993), these two events were dissociated in the study by Eizirik *et al.* (1994). In collaboration with the latter group, we are currently investigating the effects of nitric oxide donors on human islets.

Acknowledgements

We are grateful for the support of the British Diabetic Association, the Medical Research Council (UK), the Science and Engineering Research Council (UK), Smith Kline And Beecham plc. and the Commission of European Communities.

References

- Antoine, M. H., M. Hermann, A. Herchuelz and P. Lebrun (1993) Sodium nitroprusside inhibits glucose-induced insulin release by activating ATP-sensitive K⁺ channels, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1175**, 293–301.
- Bendtzen, K., T. Mandrup-Poulsen, J. Nerup, J. H. Nielsen, C. A. Dinarello and M. Svenson (1986) Cytotoxicity of human pI 7 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans, *Science*, **232**, 1545–1547.
- Bolaffi, J. L., G. G. Rodd, J. Wang and G. M. Grodsky (1994) Interrelationship of changes in islet nicotine adeninedinucleotide, insulin secretion, and cell viability induced by interleukin-1 β , *Endocrinology*, **134**, 537–542.
- Botolina, V. M., S. Najibi, J. J. Palacino, P. J. Pagano and R. A. Cohen (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle, *Nature*, **368**, 850–853.
- Borg, H. L. A., E. Cagliero, S. Sandler, N. Welsh and D. L. Eizirik (1992) Interleukin-1 β increases the activity of superoxide dismutase in rat pancreatic islets, *Endocrinology*, **130**, 2851–2857.
- Buscema, M., C. Vinci, C. Gatta, M. A. Rabuazzo, R. Vignen and F. Purrello (1992) Nicotinamide partially reverses the interleukin-1 β inhibition of glucose-induced insulin release in pancreatic islets, *Metabolism*, **41**, 296–300.
- Cetkovic-Cvrlje, M., S. Sandler and D. L. Eizirik (1993) Nicotinamide and dexamethasone inhibit interleukin-1

- induced nitric oxide production by RINm5F cells without decreasing messenger ribonucleic acid expression for nitric oxide synthase, *Endocrinology*, **133**, 1739–1743.
- Comens, P., B. A. Wolf, E. R. Unanue, P. E. Lacy and M. L. McDaniel (1987) Interleukin 1 is a potent modulator of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans, *Diabetes*, **36**, 963–970.
- Corbett, J. A., G. Kwon, J. Turk and M. L. McDaniel (1993) IL-1 β induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide, *Biochemistry*, **32**, 13767–13770.
- Corbett, J. A., J. R. Lancaster, M. A. Sweetland and M. L. McDaniel (1991) Interleukin-1 β -induced formation of EPR-detectable iron nitrosyl complexes in islets of Langerhans, *J. Biol. Chem.*, **266**, 21351–21354.
- Corbett, J. A. and M. L. McDaniel (1992) Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of β -cells?, *Diabetes*, **41**, 897–903.
- Corbett, J. A., M. A. Sweetland, J. L. Wang, J. R. Lancaster and M. L. McDaniel (1993) Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 1731–1735.
- Corbett, J. A., J. L. Wang, J. H. Hughes, B. A. Wolf, M. A. Sweetland and J. R. J. Lancaster (1992) Nitric oxide and cGMP formation induced by IL-1 β in the islets of Langerhans, *Biochem. J.*, **287**, 229–235.
- Corbett, J. A., J. L. Wang, M. A. Sweetland, J. R. Lancaster and M. L. McDaniel (1992) Interleukin-1 β induces the formation of nitric oxide by beta-cells purified from rodent islets of Langerhans, *J. Clin. Invest.*, **90**, 2384–2391.
- Cunha, F. Q., S. Moncada and F. Y. Liew (1992) Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**, 1155–1159.
- Cunningham, J. M., M. R. Elphick and I. C. Green (1993) The occurrence and characteristics of the cytokine-inducible nitric oxide synthase enzyme in islets of Langerhans and RIN-m5F cells, *Diabetic Medicine*, **10**, S7.
- Cunningham, J. M., J. G. Mabley, C. A. Delaney and I. C. Green (1994) The effect of nitric oxide donors on insulin secretion, cyclic GMP and cyclic AMP in rat islets of Langerhans and the insulin secreting lines HIT-T15 and RINm5F, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **102**, 23–29.
- Cunningham, J. M., J. G. Mabley, B. Mwebe, E. Kovani and I. C. Green (1994) Suppression of interleukin-1 β -induced nitric oxide synthase activity by transforming growth factor- β in the insulin-secreting cell line RINm5F, *J. Endocrinol.*, **140**, 37.
- Davalli, A. M., C. Ricordi, C. Soccia, S. Braghi, F. Bertuzzi, B. Fattor, V. DiCarlo, A. E. Pontiroli and G. Pozza (1991) Abnormal sensitivity to glucose of human islets cultured at a high glucose medium: partial reversibility after an additional culture in a normal glucose medium, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **72**, 202–208.
- Dayer-Metroz, M. D., D. Duhamel, N. Rufer, S. Izui, D. Carmichaels, C. B. Wollheim, R. C. Thompson and J. M. Dayer (1992) IL-1 receptor antagonist delays spontaneous autoimmune diabetes in BB rats, *Eur. J. Clin. Invest.*, **22**, A50.
- Dayer-Metroz, M. D., C. B. Wollheim, P. Seckinger and J. M. Dayer (1989) A natural interleukin 1 (IL-1) inhibitor counteracts the inhibitory effect of IL-1 on insulin production in cultured rat pancreatic islets, *J. Autoimmunity*, **2**, 163–171.
- Delaney, C. A., M. H. L. Green, J. Lowe and I. C. Green (1993) DNA damage in rat islet cells and HIT-T15 cells exposed to interleukin-1 β and nitric oxide—studies using the comet assay, *Diabetologia*, **36**, A77.
- Delaney, C. A., M. H. L. Green, J. E. Lowe and I. C. Green (1993) Endogenous nitric oxide induced by interleukin-1 β in rat islets of Langerhans and HIT-T15 cells causes significant DNA damage as measured by the ‘comet’ assay, *FEBS Lett.*, **333**, 291–295.
- Delaney, C. A., C. Southern, V. Karmiris and I. C. Green (1993) Short term effects of interleukin-1 β on insulin secretion and cyclic nucleotide levels in rat islets of Langerhans cultured with arginine and arginine analogues, *Biochem. Soc. Trans.*, **21**, 193S.
- Di Rosa, M., M. Radomski, R. Carnuccio and S. Moncada (1990) Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 1246–1252.
- Ding, A., C. F. Nathan, J. Graycar, R. Deryck, D. J. Stuehr and S. Srimal (1990) Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- β_1 , - β_2 and - β_3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by interferon-gamma, *J. Immunol.*, **145**, 940–944.
- Eizirik, D. L. (1988) Interleukin-1 induced impairment in pancreatic islet oxidative metabolism is potentiated by tumor necrosis factor, *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **119**, 321–325.
- Eizirik, D. L., A. Björkland and N. Welsh (1993) Interleukin-1-induced expression of nitric oxide synthase in insulin-producing cells is preceded by c-fos induction and depends on gene transcription and protein synthesis, *FEBS Lett.*, **317**, 62–66.
- Eizirik, D. L., E. Cagliero, A. Björkland and N. Welsh (1992) Interleukin 1 β induces the expression of an isoform of nitric oxide synthase in insulin producing cells, which is similar to that observed in activated macrophages, *FEBS Lett.*, **308**, 249–252.
- Eizirik, D. L., G. S. Korbutt and C. Hellerstrom (1992) Prolonged exposure of human pancreatic islets to high glucose concentrations *in vitro* impairs the β -cell function, *J. Clin. Invest.*, **90**, 1263–1268.
- Eizirik, D. L., S. Sandler, G. Ahnström and M. Welsh (1991) Exposure of pancreatic islets to different alkylating agents decreases mitochondrial DNA content but only streptozotocin induces long-lasting functional impairment of β -cells, *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 2275–2282.
- Eizirik, D. L., S. Sandler and J. P. Palmer (1993) Repair of pancreatic β -cells. A relevant phenomenon in early IDDM?, *Diabetes*, **42**, 1383–1391.
- Eizirik, D. L., S. Sandler, N. Welsh, M. Cetkovic-Cvrlje, A. Nieman, D. A. Geller, D. G. Pipeleers, K. Bendtsen and C. Hellerström (1994) Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation, *J. Clin. Invest.*, **93**, 1968–1974.
- Eizirik, D. L., D. E. Tracey, K. Bendtsen and S. Sandler (1991) An interleukin-1 receptor antagonist protein protects insulin-producing beta cells against suppressive effects of interleukin-1 β , *Diabetologia*, **34**, 445–448.
- Eizirik, D. L., M. Welsh, E. Strandell, N. Welsh and S. Sandler (1990) Interleukin-1 β depletes insulin messenger ribonucleic acid and increases the heat shock protein hsp70 in mouse pancreatic islets without impairing the glucose metabolism, *Endocrinology*, **127**, 2290–2297.
- Eizirik, D. L., N. Welsh and C. Hellerstrom (1993) Predominance of stimulatory effects of interleukin-1 β on isolated human pancreatic islets, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 399–403.
- Fehsel, K., A. Jalowy, S. Qi, V. Burkart, B. Hartmann and H. Kolb (1993) Islet DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide, *Diabetes*, **42**, 496–500.
- Flitney, F. W., I. L. Megason, D. E. Flitney and A. R. Butler (1992) Iron-sulphur cluster nitrosoys, a novel class of nitric oxide generator: mechanism of vasodilator action on rat isolated tail artery, *Br. J. Pharmacol.*, **107**, 842–848.
- Green, I. C., J. M. Cunningham, C. A. Delaney, M. R. Elphick, J. G. Mabley and M. H. L. Green (1994) Effects of cytokines and nitric oxide donors on insulin secretion cyclic GMP and DNA damage: relation to nitric oxide production, *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 30–37.
- Green, I. C., C. A. Delaney, J. M. Cunningham, V. Karmiris and C. Southern (1993) Interleukin 1 β effects on cyclic GMP and cyclic AMP in cultured rat islets of Langerhans-arginine dependence and relationship to insulin secretion, *Diabetologia*, **36**, 9–16.
- Hammonds, P., M. Beggs, G. Beresford, J. Espinal, J. Clarke and R. J. Metz (1990) Insulin-secreting β -cells possess specific receptors for interleukin-1 β , *FEBS Lett.*, **261**, 97–100.
- Helqvist, S., B. S. Hansen, J. Johannessen, H. U. Andersen, J. H. Nielsen and J. Nerup (1989) Interleukin 1 induces new protein formation in isolated rat islets of Langerhans, *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **121**, 136–140.
- Helqvist, S., B. S. Polla, J. Johannessen and J. Nerup (1991) Heat shock protein induction in rat pancreatic islets by recombinant human interleukin 1 β , *Diabetologia*, **34**, 150–156.
- Hughes, J. H., R. A. Easom, B. A. Wolf, J. Turk and M. McDaniel (1989) Interleukin-1 induced prostaglandin E 2 accumulation by isolated pancreatic islets, *Diabetes*, **38**, 1251–1257.
- Ioannidis, I. and H. de Groot (1993) Cytotoxicity of nitric oxide in Fu5 rat hepatome cells: evidence for cooperative action with hydrogen peroxide, *Biochem. J.*, **296**, 341–345.
- Kallman, B., V. Burkart, K. D. Kroncke, V. Kolb-Bachofen and H. Kolb (1992) Toxicity of chemically generated nitric oxide towards pancreatic islet cells can be prevented by nicotinamide, *Life Sci.*, **51**, 671–678.
- Kawahara, D. J. and J. S. Kenney (1991) Species difference in human and rat islet sensitivity to human cytokines. Monoclonal anti-interleukin-1 (IL-1) influences on direct and indirect IL-1-mediated islet effects, *Cytokine*, **3**, 117–124.
- Knowles, R. G. and S. Moncada (1994) Nitric oxide synthases in mammals, *Biochem. J.*, **298**, 249–258.
- Kolb, H. and V. Kolb-Bachofen (1992) Nitric oxide: a pathogenic factor in autoimmunity, *Immunology Today*, **13**, 157–160.
- Kwon, G., J. A. Corbett, J. L. Wang and M. L. McDaniel (1993) IL-1 β -induced inhibition of insulin secretion is prevented by dexamethasone and genistein: possible involvement of a tyrosine kinase during IL-1 β -induced iNOS expression by islets, *Diabetes*, **42**, 130A.
- Kwon, N. S., D. J. Stuehr and C. F. Nathan (1992) Ribonucleotide reductase as a molecular target of nitric oxide: comparable effects of macrophage nitric oxide synthase and hydroxyurea, a nitric oxide-generating inhibitor, *Biology of Nitric Oxide*, Portland Press, London, pp. 90–95.
- Liew, F. Y., Y. Li, A. Severn, S. Millot, J. Schmidt, M. Salter and S. Moncada (1991) A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages, *Eur. J. Immunol.*, **21**, 2489–2494.
- Lipton, S. A., Y. B. Choi, Z. H. Pan, S. Z. Lei, H. S. V. Chen, N. J. Sucher, J. Loscalzo, D. J. Singel and J. S. Stamler (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodepressive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds, *Nature*, **364**, 626–632.
- Mabley, J. G., D. Schulster and I. C. Green (1994) Transforming growth factor β_1 completely protects rat islets of Langerhans against the inhibitory effects on insulin secretion of interleukin-1 β , *Diabetic Medicine*, in press.
- Mandrup-Poulsen, T., K. Bendtsen, J. Nerup, C. A. Dinarello, M. Svensson and J. Nielsen (1986) Affinity-purified human interleukin-1 is cytotoxic to isolated islets of Langerhans, *Diabetologia*, **29**, 63–67.
- Mandrup-Poulsen, T., J. A. Corbett, M. L. McDaniel and J. Nerup (1993) What are the types and cellular sources of free-radicals in the pathogenesis of type-1 (insulin-dependent) diabetes mellitus?, *Diabetologia*, **36**, 470–

- Mandrup-Poulsen, T., S. Helqvist, L. D. Wogensen, J. Molvig, F. Pociot, J. Johannessen and J. Nerup (1990) Cytokines and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic β cells., Human diabetes-genetic, environmental and autoimmune etiology., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 166–193.
- Mandrup-Poulsen, T., U. Zumsteg, J. Reimers, F. Pociot, L. Mørch, S. Helqvist, C. A. Dinarello and J. Nerup (1993) Involvement of interleukin 1 and interleukin 1 antagonist in pancreatic β -cell destruction in insulin-dependent diabetes mellitus, *Cytokine*, **5**, 185–191.
- Moncada, S., R. M. J. Palmer and E. A. Higgs (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology., *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109–142.
- Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J.*, **6**, 3051–3064.
- Noronha-Dutra, A. A., M. M. Epperlein and N. Woolf (1993) Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing, *FEBS Lett.*, **321**, 59–62.
- Oury, T. D., Y.-S. Ho, C. A. Piantadosi and J. D. Crapo (1992) Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system oxygen toxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 9715–9719.
- Pou, S., W. S. Pou, D. S. Bredt, S. H. Snyder and G. M. Rosen (1992) Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase, *J. Biol. Chem.*, **267**, 24173–24176.
- Rabinovitch, A., H. Baquerizo and W. Sumoski (1990) Cytotoxic effects of cytokines on islet β -cells: evidence for involvement of eicosanoids, *Endocrinology*, **126**, 67–71.
- Rabinovitch, A., W. L. Suarez, P. D. Thomas, K. Strynadka and I. Simpson (1992) Cytotoxic effects of cytokines on rat islets: evidence for involvement of free radicals and lipid peroxidation, *Diabetologia*, **35**, 409–413.
- Sandler, S., A. Andersson and C. Hellerstrom (1987) Inhibitory effects of interleukin 1 on insulin secretion, insulin biosynthesis, and oxidative metabolism of isolated rat pancreatic islets, *Endocrinology*, **121**, 1424–1431.
- Sandler, S., K. Bendtzen, D. L. Eizirik, E. Strandell, M. Welsh and N. Wesh (1990) Metabolism and β -cell function of rat pancreatic islets exposed to human interleukin-1 β in the presence of a high glucose concentration, *Immunol. Lett.*, **26**, 245–252.
- Sandler, S., K. Bendtzen, D. L. Eizirik and M. Welsh (1990) Interleukin-6 affects insulin secretion and glucose metabolism of rat pancreatic islets in vitro, *Endocrinology*, **126**, 1288–1294.
- Sandler, S., K. Bendtzen, L. A. Håkan Borg, D. L. Eizirik, E. Strandell and N. Welsh (1989) Studies on the mechanisms causing inhibition of insulin secretion in rat pancreatic islets exposed to human interleukin-1 β indicate a perturbation in the mitochondrial function., *Endocrinology*, **124**, 1492–1501.
- Sandler, S., D. L. Eizirik, J. Sternesjo and N. Welsh (1994) Role of cytokines in regulation of pancreatic β cell function, *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 26–30.
- Sandler, S. and N. Welsh (1993) Interleukin-10 stimulates rat pancreatic islets in vitro, but fails to protect against interleukin-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 859–865.
- Southern, C., C. A. Delaney, D. Schulster and I. C. Green (1992) Nitric oxide and the inhibition of insulin secretion by interleukin-1 β and tumour necrosis factor α ., The biology of nitric oxide part 2, Portland Press, London, pp. 247–250.
- Southern, C., D. Schulster and I. C. Green (1990) Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 β and tumour necrosis factor-alpha via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism, *FEBS Lett.*, **276**, 42–44.
- Southern, C., D. Schulster and I. C. Green (1990) Inhibition of insulin secretion from rat islets of Langerhans by interleukin-6 - an effect distinct from that of interleukin-1, *Biochem. J.*, **272**, 243–245.
- Spinas, G. A., T. Mandrup-Poulsen, J. Molvig, L. Baek, K. Bendtzen, C. A. Dinarello and J. Nerup (1986) Low concentrations of interleukin-1 stimulate and high concentrations inhibit insulin release from isolated rat islets of Langerhans, *Acta Endocrinol (Copenh)*, **113**, 551–558.
- Spinas, G. A., J. P. Palmer, T. Mandrup-Poulsen, H. U. Andersen, J. H. Nielsen and J. Nerup (1988) The bimodal effect of interleukin-1 on rat pancreatic beta-cells-stimulation followed by inhibition-depends on dose, duration of exposure and ambient glucose concentration, *Acta Endocrinol*, **119**, 307–311.
- Vodovotz, Y., C. Bogdan, J. Paik, Q. Xie and C. Nathan (1993) Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor β , *J. Exp. Med.*, **178**, 605–613.
- Welsh, N., D. L. Eizirik, K. Bendtzen and S. Sandler (1991) Interleukin-1 β -induced nitric oxide production in isolated rat pancreatic islets requires gene transcription and may lead to inhibition of the Kerbs cycle enzyme aconitase., *Endocrinology*, **129**, 3167–3173.
- Welsh, N. and S. Sandler (1992) Interleukin-1 β induces nitric oxide production and inhibits the activity of aconitase without decreasing glucose oxidation rates in isolated mouse pancreatic islets, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**, 333–340.
- Wink, D. A., I. Hanbauer, M. C. Krishna, W. deGraff, J. Gamson and J. B. Mitchell (1993) Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 9813–9817.
- Yamada, K., C. Inada, S. Otabe, N. Takane, H. Hayashi and K. Nonaka (1993) Effects of free radical scavengers on cytokine actions on islet cells, *Acta Endocrinol.*, **128**, 379–384.
- Yamada, K., S. Otabe, C. Inada, N. Takane and K. Nonaka (1993) Nitric oxide and nitric oxide synthase mRNA induction in mouse islet cells by interferon- γ plus tumor necrosis factor- α , *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**, 22–27.

Protection of Human Lymphocytes against Endogenous and Ionising-Radiation-Induced DNA Strand Breakage: Studies with the Comet Assay

Michael H. L. Green, Jillian E. Lowe, Kay Aldridge,
Alastair P. W. Waugh, Peter H. Clingen,
Jane Cole and Colin F. Arlett

MRC Cell Mutation Unit, Sussex University, Falmer, Brighton, BN1 9RR., UK

(Received Sent, 14, 1994; Accepted Sent, 14, 1994)

Summary

We have measured DNA strand breaks induced by ionising radiation in human lymphocytes, using finger prick blood samples obtained from normal laboratory subjects. We used the comet assay (single cell gel electrophoresis) to measure strand breaks. A sample was taken after the subject had fasted overnight. The sample was embedded in agar and immediately irradiated with a ^{60}Co source. A second sample was taken one hour after the subject had eaten breakfast and consumed approximately 35 mg/kg vitamin C. Repeat experiments were performed on six subjects. In each case there was a highly significant reduction in the dose response of comet length to ionising radiation following breakfast/vitamin C. There was also a difference in comet length in the unirradiated controls. Consistent differences between individual subjects were found. On the other hand, when micronucleus formation or clonal survival in a clonogenic assay were measured in separated T-lymphocytes, no effect of breakfast and vitamin C was observed. A further paradox is that incubation of separated human lymphocytes with vitamin C *in vitro* does not offer protection, but causes increased DNA strand breakage. Studies using endonuclease III in the comet assay suggest that endonuclease-sensitive sites may be detectable in both stimulated and unstimulated human lymphocytes. The relevance of this endogenous damage to cell killing and mutation remains to be established.

Keywords: Ionising radiation; Diet; Vitamin C; Comet assay; Human lymphocytes

1. Introduction

It has been particularly exciting that this conference has been a joint meeting of the Japan Environmental Mutagen and Radiation Research Societies because the work reported here involves an attempt to draw a connection between these two fields.

There is extensive evidence for differences in cancer incidence between different populations, and indeed, the differences between Britain and Japan are among the greatest (see e.g. (Cairns, 1978)). These differences appear to be environmental rather than genetic, and have been ascribed to "lifestyle". Apart from smoking, the major component of lifestyle affecting cancer incidence would appear to be diet. An intriguing hypothesis is beginning to emerge that it is the protective components of diet,

in particular antioxidants, which are of most significance in affecting cancer incidence (Ames, 1983; Ames and Gold, 1991; Simic and Bergtold, 1991). Thus the major differences in diet affecting cancer incidence between Japan and Britain may relate to levels of antioxidants in our diet, rather than to differences in our exposure to genotoxins, or our fondness for Karaoke or the game of cricket.

The potential importance of antioxidants to cellular integrity may arise from our continuous exposure to a variety of endogenously generated reactive oxygen species and other possible DNA damaging agents. Although some of these reactive species are formed as byproducts of normal cellular metabolism, they may also be synthesised by specific enzymes in response to specific signals, especially

during the immune response. (It is worth noting that treatments which affect the induction of these enzymes, or their capacity to synthesise reactive species, may indirectly influence the level of DNA damage in tissue, and thus act as apparent carcinogens or anticarcinogens.)

The most important reactive oxygen species in terms of DNA damage is probably the hydroxyl radical (OH^-), which can be formed from hydrogen peroxide in the presence of Fe^{2+} by the Fenton reaction (Halliwell and Gutteridge, 1989). This radical has an extremely short half life and will react with a wide variety of cellular components. No specific system for its removal exists but a variety of antioxidants will react with it, protecting critical cellular targets. Hydroxyl radical, formed from radiolysis of water, is also of major importance in the generation of DNA damage by radiation. The formation of hydroxyl radical by radiation tends to be clustered, because of track structure, whereas formation from hydrogen peroxide may be somewhat more uniformly distributed. Such a distinction has been used to explain the differences in biological effectiveness between different qualities of ionising radiation and between ionising radiation and hydrogen peroxide.

It occurred to us that if variation in the level of antioxidants in diet can affect susceptibility to endogenous DNA damage, such variation ought also to affect radiation sensitivity. An extensive literature on radiosensitisation exists, but less attention appears to have been given to the possibility that normal dietary constituents might affect radiation response. Two studies have suggested that supplementation of drinking water with vitamin C may reduce bone marrow micronucleus formation in mice (Odagiri *et al.*, 1992) and rats (El-Nahas *et al.*, 1993) following ionising radiation. Okunieff (1991) has shown that very high levels of vitamin C increased normal tissue survival following ionising radiation in an animal tumour model. The only human data that we are aware of come from Sram *et al.* (1986) who found that a daily prophylactic dose of vitamin C appeared to reduce chromosome aberrations in individuals who may have been exposed to genotoxins in their working environment.

2. Radiosensitive Individuals in the Population—the Holy Grail

The efficacy of radiotherapy is limited by the maximum dose that can be given, without inducing

Design of experiment

- Subject fasts overnight
- Finger prick blood sample taken
- Sample immediately γ -irradiated and DNA damage measured
- Subject takes normal breakfast plus approximately 35 mg/kg vitamin C
- Second finger prick blood sample taken one hour later
- Second sample irradiated and DNA damage measured

Fig. 1. Design of experiment. All blood samples were taken with informed consent from normal laboratory volunteers.

unacceptable side effects in too high a proportion of patients. If those patients likely to respond adversely could be identified in advance, a more aggressive therapy, with greater chance of success, could be offered to the remaining patients (Arlett, 1992; Norman *et al.*, 1988). A long-standing goal of our research unit has been to identify individuals with an increased genetic susceptibility to ionising radiation (Arlett *et al.*, 1988; Cole *et al.*, 1988). Although such an approach has had some success in our laboratory and elsewhere (Deschavanne *et al.*, 1986; Weichselbaum *et al.*, 1980a; Weichselbaum *et al.*, 1980b; West *et al.*, 1991), techniques are slow and have poor resolution.

It dietary antioxidants affect ionising radiation sensitivity, this might suggest an additional mechanism for variation in human cellular response. Moreover, it might be significantly easier to determine the antioxidant status of a patient than to detect a genetic predisposition to radiosensitivity. We therefore set out to determine whether an alteration in antioxidant status of a subject would alter the response of freshly isolated human cells to radiation. A more detailed account of the work is to appear in Mutation Research (Green *et al.*, 1994).

The experiment we set up, measuring DNA damage in freshly isolated white blood cells from normal laboratory subjects, is shown in Fig. 1. In order to achieve a rapid alteration of antioxidant status, we used vitamin C, which is freely soluble and rapidly excreted (Frei *et al.*, 1989).

3. The "Comet" Assay

To determine DNA damage in irradiated whole blood, we made use of the comet assay (single cell

Comet assay procedure

- Embed blood sample in agar sandwich on frosted microscope slide
- ${}^{60}\text{Co}$ irradiate slide
- Place slide in lysis mixture, pH 10, 4°C, for at least 1 h
- Place slide in alkaline buffer, 0.3 M NaOH, 15°C for 40 min
- Apply 20 volts, 24 min
- Rinse, stain with ethidium bromide
- Capture images
- Measure nose to tail length of comets

Fig. 2. Protocol for the comet assay (Green *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1988)

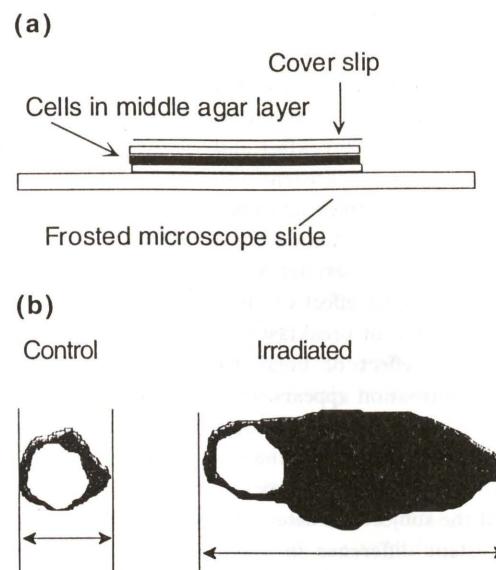


Fig. 3. The comet assay. (a) We embed the blood sample in an agar sandwich on a frosted microscope slide. (b) Electrophoresis causes DNA containing strand breaks to stream out of the nucleus in a "comet tail". Undamaged DNA remains trapped in the nucleus. We measure overall (nose to tail) comet length as an indicator of DNA damage.

4. Results

Effect of vitamin C on radiation-induced DNA strand breakage

From Fig. 4 it can be seen that in each of three independent experiments on the same subject, ionising radiation appeared to produce fewer strand breaks in the sample obtained after vitamin C and breakfast. It should be noted that there is a difference in comet formation both in the presence and

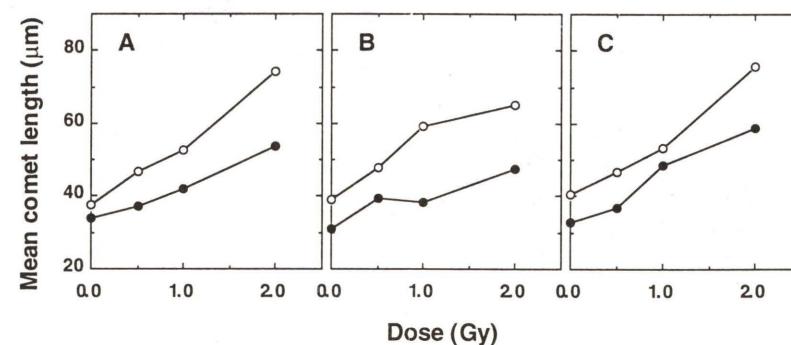


Fig. 4. Effect of breakfast and vitamin C on radiation-induced DNA strand breakage as measured by the comet assay. Three independent experiments with Subject 7. —○—, Sample obtained before breakfast and vitamin C; —●—, blood sample obtained one hour after breakfast and vitamin C.

absence of irradiation. Fig. 5 summarizes the best fit ionising radiation dose response slope for each of 6 subjects, obtained from a series of similar experiments. With each subject, the slope was different before and after breakfast and vitamin C. Moreover, there were consistent differences between subjects. For example, subjects 2 and 43 consistently showed greater radiation damage than subject 42.

In further experiments (not shown) we have found a smaller effect of vitamin C without breakfast, and also of breakfast without vitamin C. The maximum effect of breakfast and vitamin C on comet formation appears to occur after about 4 h.

Thus when the comet assay is used as a measure of DNA strand breakage, the response of human cells to ionising radiation appears to be dependent on what the subject has eaten. Moreover, there may be consistent difference in comet assay response between individual subjects.

Lack of effect of breakfast and vitamin C on survival and micronucleus formation

In further experiments, we looked for an effect of breakfast and vitamin C on cell survival as determined in a colony forming assay (Cole *et al.*, 1988), and on micronucleus formation as determined by the cytochalasin B method (Cole *et al.*, 1990; Fenech and Morley, 1986). Since the maximum effect on comet formation appeared to be found 4 h after breakfast and vitamin C, this interval was used for the experiments. In contrast to comet formation, which was measured in whole blood, survival and micronucleus formation are measured in T-lymphocytes within the mononuclear fraction,

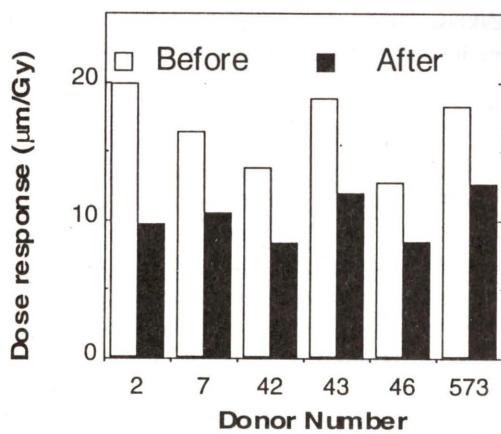


Fig. 5. Slope of ionising radiation dose response for 6 subjects. Best fit slopes were obtained for the combined data for each donor.

which constitute only about 20% of all white blood cells. Moreover, the T-lymphocytes required to be separated from whole blood in the mononuclear cell fraction by a Ficoll gradient. This procedure takes at least an hour, allowing the cells a longer period to equilibrate with their *in vitro* environment.

We found no effect of breakfast and vitamin C on survival or micronucleus formation in our experiments. Whether the difference from the comet assay result relates to the cell type studied, the isolation procedure, or the biological endpoint, remains to be established.

In vitro vitamin C treatment

More recently, we have treated separated mononuclear cells with vitamin C *in vitro* and measured comet formation. Instead of protection, we found that vitamin C induced DNA strand breakage. A similar result has been obtained by Anderson *et al.* (1994). Vitamin C gave positive results in a significant proportion of *in vitro* short term genotoxicity assays in the 1980 International Collaborative Test Evaluation Program (Ashby, 1981). Vitamin C can hydroxylate the C-8 position of guanine (Kasai and Nishimura, 1984) and can potentiate the formation of hydroxyl radical in the presence of hydrogen peroxide and iron (Halliwell and Gutteridge, 1989),

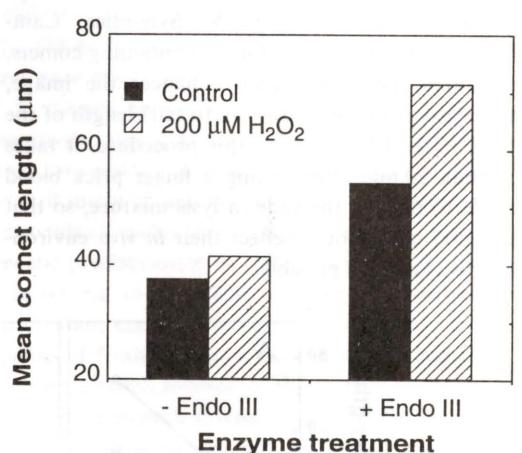


Fig. 6. Endonuclease III-sensitive sites in separated human lymphocytes (mononuclear fraction). Ficoll-separated mononuclear cells were treated with 200 μ M hydrogen peroxide for 5 min over ice. Cells were lysed, the lysis buffer removed, and incubated for 10 min in buffer with or without endonuclease III. Cells were returned to alkali and electrophoresis performed immediately (Collins *et al.*, 1993). Remaining steps were as in Fig. 2 (Green *et al.*, 1994).

so that this result is in itself not totally surprising. It is, however, striking in view of the apparent protective effect of vitamin C in the earlier experiments.

Endogenous DNA damage

Freshly isolated human lymphocytes show evidence of endogenous oxidation damage to their DNA (Collins *et al.*, 1993) in the form of endonuclease III-sensitive sites. Fig. 6 shows that although treatment with hydrogen peroxide treatment induces additional endonuclease III-sensitive sites in lymphocyte DNA, there are a substantial number of sites present in untreated cells. We have found similar evidence for oxidative damage in cycling T-lymphocytes and in primary fibroblast cultures (unpublished results). Collins *et al.* (1993), however, did not find evidence of such damage in HeLa cultures. The occurrence of endogenous oxidative damage is of interest since this type of damage has been shown to induce the adaptive resistance to radiation (Dominguez *et al.*, 1993; Olivieri *et al.*, 1984). The overall effect of different antioxidant regimes on *in vivo* cellular survival might thus be extremely complex.

5. Conclusions

We embarked on this project as a test of the hypothesis that dietary antioxidants might affect human susceptibility to endogenous oxidative damage. In view of the similarities between the damage caused by ionising radiation and that caused by active oxygen species, if no effect on radiation response were found, we considered that it would argue against the importance of dietary antioxidants in protection against oxidative damage. On the other hand, if an effect were found, it might well have implications for radiotherapy. As often happens in these situations, we have obtained both answers. The comet assay indicates that diet and an antioxidant have a clear effect on the response of freshly isolated cells to ionising radiation. In contrast, we found no effect on cell survival or micronucleus formation.

Our results are consistent with other studies in suggesting that the response of freshly isolated blood cells in the comet assay does indeed indicate changes in the antioxidant status of the donor. Betti *et al.* (1994) have shown increased comet formation in lymphocytes of smokers compared to non-smokers in a study of 100 subjects and Anderson *et al.* (1994) have obtained a borderline effect of smoking in a smaller series. Hartmann *et al.* (1994) have shown comet formation in lymphocytes isolated from individuals who had undertaken extreme physical activ-

ity.

The failure to find an effect equivalent to the comet assay with other genetic endpoints is more problematical. The protocol for our experiments has unsatisfactory features, but it is unlikely that an effect as striking as that observed with comet formation would have been found by any other procedure. It is of interest that Betti *et al.* (1994) did not find differences between smokers and non-smokers in SCE frequency to correspond to the differences they observed in the comet assay.

The relationship between endogenous oxidative damage and radiation will clearly be complex. On the one hand antioxidants such as vitamin C may have the potential to increase oxidative damage (Anderson *et al.*, 1994; Halliwell and Gutteridge, 1989). On the other hand, oxidative damage itself may induce an adaptive response to radiation and have a protective effect (Dominguez *et al.*, 1993; Olivieri *et al.*, 1984). The overall effect of different antioxidant regimes on *in vivo* cellular survival might thus be extremely complex.

Because of the fractionated nature of radiotherapy, even a small difference in cellular survival might have a very substantial effect on the response of patients and outcome (Norman *et al.*, 1988). It remains to be established whether the differences revealed by the comet assay have any predictive value in this respect. It should certainly be feasible to design a study to determine whether any correlation between diet, comet response and therapeutic outcome exists. The comet assay is relatively simple and quick, yielding results the same day. If it were to prove of predictive value, it would readily be feasible to scale it up to use as a routine screen of prospective radiotherapy patients.

Acknowledgements

An account of this work is to appear in Mutation Research. Work supported in part by EC contract B 17-0026 and the EC concerted action programme on DNA repair and cancer. We thank Dr. R. Tice (ILS, Research Triangle Park) for introducing us to the Comet assay. The helpful comments of Dr. A. Collins (Rowett Institute, Aberdeen, UK), Dr. T. McMillan (Sutton) and Dr. D. Floyd (Middlesex) are acknowledged.

References

- Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases, *Sci-*

- ence, **221**, 1256–1264.
- Ames, B. N. and L. S. Gold (1991) Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer, *Mut. Res.*, **250**, 3–16.
- Anderson, D., T. Yu, B. J. Phillips and P. Schmezer (1994) The effect of antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay, *Mut. Res.*, **307**, 261–272.
- Arlett, C. F. (1992) Human cellular radiosensitivity—the search for the holy grail or a poisoned chalice, *Adv. Rad. Biol.*, **16**, 273–292.
- Arlett, C. F., M. H. L. Green, A. Priestley, S. A. Harcourt and L. V. Mayne (1988) Comparative human cellular radiosensitivity: I. The effect of SV40 immortalisation on the gamma-irradiation survival of skin derived fibroblasts from normal individuals and from ataxiatelangiectasia patients and heterozygotes, *International J. Rad. Biol.*, **54**, 911–928.
- Ashby, J. (1981) Overview of study and test chemical activities. In: Evaluation of short-term test for carcinogens, Report of the International Collaborative Program F. J. d. Serres and J. Ashby Eds.) Elsevier/North Holland, New York, pp. 112–172.
- Betti, C., T. Davini, L. Gianessi, N. Loprieno and R. Barale (1994) Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects, *Mut. Res.*, **307**, 323–334.
- Cairns, J. (1978) Cancer: Science and Society, W. H. Freeman & Co., San Francisco.
- Cole, J., C. F. Arlett, M. H. L. Green, S. A. Harcourt, A. Priestley, L. Henderson, H. Cole, S. E. James and F. Richmond (1988) Comparative human cellular radiosensitivity: II. The survival following gammairradiation of T-lymphocytes, T-lymphocyte lines, lymphoblastoid cell line and fibroblasts from normal, ataxia-telangiectasia patients and heterozygotes, *Int. J. Rad. Biol.*, **54**, 929–943.
- Cole, J., M. Diot, F. N. Richmond and B. A. Bridges (1990) Comparative induction of gene mutations and chromosome damage by 1-methoxy-1,3,5-cycloheptatriene (MCHT). 2. Results using L5178Y cells to detect gene and chromosome damage; validation with ionizing radiation, methyl methanesulphonate, ethyl methanesulphonate and benzo [a] pyrene, *Mut. Res.*, **230**, 81–91.
- Collins, A. R., S. J. Duthie and V. L. Dobson (1993) Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA, *Carcinogenesis*, **14**, 1733–1735.
- Deschavanne, P. J., D. Debieu, B. Fertil and E. P. Malaise (1986) Reevaluation of *in vitro* radiosensitivity of human fibroblasts of different genetic origins, *International J. Rad. Biol.*, **50**, 279–293.
- Dominguez, I., N. Panneerselvam, P. Escalza, A. T. Natarajan and F. Cortes (1993) Adaptive response to radiation damage in human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide as measured by the cytokinesis-block micronucleus technique, *Mut. Res.*, **301**, 135–141.
- El-Nahas, S. M., F. E. Nattar and A. A. Mohamed (1993) Radioprotective effect of vitamins C and E, *Mut. Res.*, **301**, 143–147.
- Fenech, M. and A. A. Morley (1986) Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mut. Res.*, **161**, 193–198.
- Frei, B., L. England and B. N. Ames (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 6377–6381.
- Green, M. H. L., J. E. Lowe, S. A. Harcourt, P. Akinluyi, T. Rowe, J. Cole, A. V. Anstey and C. F. Arlett (1992) UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the Comet Assay: A potential diagnostic technique, *Mut. Res.*, **273**, 137–144.
- Green, M. H. L., J. E. Lowe, A. P. W. Waugh, K. E. Aldridge, J. Cole and C. F. Arlett (1994) Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly isolated human white blood cells, *Mut. Res.*, in press.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1989) Free radicals in biology and medicine, Clarendon Press, Oxford.
- Hartmann, A., U. Plappert, K. Raddatz, M. Grünert-Fuchs and G. Speit (1994) Does physical activity induce DNA damage?, *Mutagenesis*, **9**, 269–272.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, *Nucl. Acids Res.*, **21**, 2137–2145.
- Norman, A., A. R. Kagan and S. L. Chan (1988) The importance of genetics for the optimization of radiation therapy. A hypothesis, *Am. J. Clin. Oncol.*, **11**, 84–88.
- Odagiri, Y., T. Karube, H. Katayama and K. Takemoto (1992) Modification of the clastogenic activity of X-ray and 6-mercaptopurine in mice by prefeeding with vitamins C and E, *J. Nutr.*, **122**, 1553–1558.
- Okunieff, P. (1991) Interactions between ascorbic acid and the radiation of bone marrow skin and tumor, *American Journal of Clin. Nutr.*, **54**, 1281s–1283s.
- Olivieri, G., J. Bodcote and S. Wolff (1984) Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine, *Science*, **223**, 594–597.
- Simic, M. G. and D. S. Bergold (1991) Dietary modulation of DNA damage in human, *Mut. Res.*, **250**, 17–24.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider (1988) A simple technique of quantitation of low level of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Res.*, **175**, 184–191.
- Sram, R. J., M. Cernaand N. Hola (1986). Effect of ascorbic acid prophylaxis in groups occupationally exposed to mutagens. In: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals*, Part B Alan R. Liss, pp. 327–335.
- Weichselbaum, R. R., J. Nove and J. B. Little (1980a) X-ray sensitivity of fifty-three human diploid fibroblast cell strains from patients with characterized genetic disorders, *Cancer Res.*, **40**, 920–925.
- Weichselbaum, R. R., J. Nove and J. B. Little (1980b) X-ray sensitivity of human tumor cells *in vitro*, *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.*, **6**, 437–440.
- West, C. M. L., J. H. Hendry, D. Scott, S. E. Davidson and R. D. Hunter (1991) 25th Paterson symposium: Is there a future for radiosensitivity testing?, *British J. Cancer*, **64**, 197–199.

DNA 中の 8-ヒドロキシグアニンの生成

Formation of 8-hydroxyguanine in DNA by oxygen radicals

葛 西 宏
Hiroshi Kasai

産業医科大学職業性腫瘍学
807 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1

University of Occupational and Environmental Health, Japan
1-1, Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807, Japan

(受付: 1994 年 9 月 14 日; 受理: 1994 年 9 月 14 日)

Summary

Oxygen radicals are produced by ionizing radiation and many other environmental carcinogens. They are also produced in cells endogenously by the oxygen metabolism. In 1984, we first reported the formation of 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua, 8-oxo-7,8-dihydro-guanine) in DNA by oxygen radicals. An easy and sensitive analytical method for detecting 8-OH-Gua with an electrochemical detector was developed allowing its detection in cellular DNA. Recent studies have shown that 1) 8-OH-Gua is produced in DNA of target organs of rats after administration of a chemical carcinogen that induces formation of oxygen radicals; 2) E. coli or mammalian cells have an enzyme (s) for repair of 8-OH-Gua in DNA; 3) 8-OH-Gua in DNA or in nucleotide pool induces mutations. These studies on 8-OH-Gua will be reviewed in this paper. I will also describe the following recent topics of 8-OH-Gua.

- 1) Formation of 8-OH-Gua in hamster lung DNA after intratracheal injection of man-made fibers.
- 2) Formation of 8-OH-Gua in mouse lung DNA after an intratracheal injection of diesel exhaust particles.
- 3) Increased formation of 8-OH-Gua in human livers with chronic hepatitis.
- 4) Aging and 8-OH-Gua.

Keywords: Oxygen radicals, DNA damage, 8-Hydroxyguanine

1. 8-ヒドロキシグアニンとの出会い

8-ヒドロキシグアニン (8-OH-Gua) が見い出されてから 10 年の歳月が経過した。まず 8-OH-Gua の発見のいきさつについて説明したい。多少回り道になるが、私の研究生活の出発点から述べることにする。私は 20 年前には天然物化学を専門としていた。1973 年から大学院の学生として国立がんセンター生物学部・西村 達博士の指導のもとで転移 RNA 中の微量成分 (修飾塩基) について研究した。その後、米国コロンビア大化学科の中西香爾先生の研究室に留学する機会を得て、そこで超微量 (マイクログラム量) 天然物の分離、

構造決定について学ぶことになった。しかしそこで最初に飛び込んできた試料はコロンビア大・癌研からの多環芳香族炭化水素-グアニン-付加体であった。当時はまだベンツピレン (BP) の究極代謝物が BP-7,8-ジオール・9,10-エポキシドであると決定された直後であり、われわれの Science に発表した BP・グアニン付加体の構造はかなりの反響を呼んだ (Weinstein *et al.*, 1976)。化学を専門とする私にとって入り易かった点もあって、それ以降、私は発癌物質・DNA・付加体に大変興味を持つことになった。留学中にまとまった論文のほとんどが DNA 付加体に関するものであっ

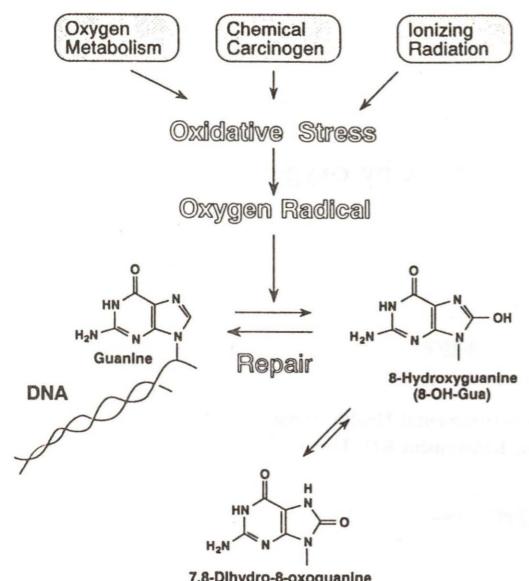


Fig. 1. 活性酸素(酸素ラジカル)による8-OH-Guaの生成。

た。1978年に国立がんセンターに職を得て、杉村隆博士(当時研究所長)、長尾美奈子博士らと共に加熱調理食品中の変異原の研究に着手した。2年間の努力の結果、幸いにも3種の強力な変異原、IQ, MeIQ, MeIQxを見出しが出来た(葛西, 1984)。この研究では辛いことも多かったが、いま振り返ってみると共同研究の楽しさが特に記憶に残っている。これらの研究も一段落し、少しタイプの異なる変異原を調べて見たり、調理食品のモデル、加熱グルコースに着手したのが1982年頃だった。変異原や発癌物質はDNAに反応して結合するという原理が頭に焼き付けられている私にとって、この不安定な、またS9mix無しでTA100に対し変異原性を示す加熱グルコースはDNA付加体を研究する絶好の材料となつた。500mlの三角フラスコ内で10gのグルコースを加熱し、イソプロピリデンガノシン(IPG)の溶液(100mg/100ml)を加え、37°Cで一晩反応させた。翌日、高速液体クロマトグラフィーで調べてみるとIPGの前後に二つのピークが現れた。前のピークはUVスペクトルから直ちにグリオキサール・IPG付加体と判明したが、後者については約2カ月の間構造は不明のままで

あった。しかし、その特異なUVスペクトル、質量分析の結果から酸素一原子(16マスユニット)分多いこと等から、その構造は8-ヒドロキシ-IPGと推定され、また8-プロモグアノシンからの化学合成により構造を決定することができた(Kasai et al., 1984a)。前のピークについては変異原グリオキサールがグアニン部分に反応したものであったが、後者については活性酸素がグアニンのC-8位に反応したと考えられた(Kasai and Nishimura, 1984a)(Fig. 1)。

このようにして8-OH-Guaは環境変異原によるDNA損傷を研究する過程で思いがけなく見出された訳で、何も活性酸素やフリーラジカルを最初から狙っていたわけではなかった。今から思えば「焼け焦げ」の研究テーマに関わったため8-OH-Guaが見つかったのである。ひょうたんから駒である。このテーマを与えて下さった杉村隆先生、西村謙先生に感謝すると同時に、暗中模索のなかでこのような泥臭い、流行りからは外れた研究が続けられた背景には環境変異原学会の温かいサポートがあったことを付け加えておきたい。

2. 生 成

8-OH-Guaは活性酸素を発生する様々な発癌因子[放射線(Kasai et al., 1984b)、たばこの煙濃縮物(葛西, 1989)、嗜みたばこ(Nair et al., 1987)、アスベストと過酸化水素(Kasai and Nishimura, 1984b)、ディーゼル排気微粒子(長島ら, 1994)など]により生成することが試験管内の実験からわかった。8-OH-Gua生成の反応機構については基本的に活性酸素(あるいは酸素ラジカル)の作用により生じるという表現は間違いないものであろう。しかしこの反応は最初考えていた程単純なものではなく、8-OH-Guaは様々な様式により生じることがわかった。例えばOHラジカル[X線、γ線(Dizdaroglu, 1985), furocoumarin hydroperoxide+UV(360nm)(Epe et al., 1993)], 一重項酸素[メチレンブルーと光(Floyd et al., 1989), 西洋ワサビペルオキシダーゼと過酸化水素(Kohda et al., 1990)], グアニンラジカルカチオンと水との反応(リボフラビンと光)(Kasai et al.,

Table 1. 動物臓器中の8-OH-Guaの生成

生物種	臓器	処理	研究者(文献)
ラット	肝	Clofibrate, Simfibrate	Sai, Kurokawa (89, 90)
	肝	Ciprofibrate	Kasai, Reddy (89)
	肝	Perfluoro acid	Hasegawa, Kurokawa (91)
	肝(核)	2-Nitropropane	Fiala (89)
	肝(核)	Nitroprolkanes	Conaway, Fliaia (91)
	肝(核)	Acetoxime	Hussain (90)
	肝	Diethylhexylphthalate	Takagi, Kurokawa (90)
	肝	Diethylhexyladipate	Takagi, Kurokawa (90)
	肝	Choline-deficiency	Hinrichsen, Floyd (90)
	肝	Choline-deficiency	Nakae, Konishi (90)
	肝(核)	Partial hepatectomy	Shigenaga, Ames (90)
	肝	Menadione	Denda, Konishi (91)
	肝	2-Nitropropane + Fe-deficiency	Adachi (93)
	腎	Psychological stress	Adachi (93)
	腎	Potassium bromate	Kasai, Kurokawa (87)
	腎	Nickel	Kasprzak (90)
	肺	Fe-nitritolriacetate	Umemura, Kurokawa (90)
	尿	Fe-nitritolriacetate	Toyokuni (94)
	尿, 臓器	Tabacco-specific nitrosamine	Chung (92)
マウス	肝	Gamma-ray	Park, Ames (92)
	肝	PCB + Iron	Fraga, Ames (90)
	肝	Gamma-ray	Kasai, Nishimura (86)
	肝, 腎	Luteoskyrin	Faux (92)
	皮膚	TPA	Mori (93)
	皮膚	Near-UV	Matsuda, Ueno (91)
	骨髄	Benzene	Frenkel (91)
	肺	Tabacco-specific nitrosamine	Hattori-Nakakuni (94)
	尿	Diethylstilbestrol	Kolachana (93)
	肝, 腎	Nitrofrantron	Chung (92)
ハムスター	肝, 腎	Tabacco-specific nitrosamine	Park, Ames (92)
シタビラメ	肝癌	Diethylstilbestrol	Roy, Floyd (91)
ニジマス	肝	Nitrofrantron	Nishimoto (91)
		MNNG + H ₂ O ₂	Kelly (92)

注) '92年以降の論文のみ文末の参考論文中に掲載した。他の論文については他の総説を参照(Kasai and Nishimura, 1993; 黒川ら, 1992など)

Table 2. 培養細胞における8-OH-Guaの生成

細胞	処理	研究者(文献)	
Mouse lymphoma L5178Y	Human lung fibroblast WI-38	Riboflavin + light	Yamamoto, Kasai (92)
Mouse lung carcinoma	Cigarette smoke		Leanderson (92)
Mouse keratinocytes	UVB + H ₂ O ₂		Beehler (92)
Mouse FM3A	Riboflavin + light		Bessho, Kasai (93)
Fanconi's anemia cells	H ₂ O ₂		Takeuchi, Morimoto (93)
Chinese hamster V79	Sun-lump (240–580 nm)		Fisher-Nielsen (93)
HeLa cells	Fecapentaene-12		Plummer, Faux (94)
Mouse leukaemia L1210	Visible light		Pflaum (94)

1992), 7-アリルグアニンの水和(Kohda et al., 1986)等による生成メカニズムがこれまでに知られている。最近 BruskovとPetrov(1992)は熱に

よる8-OH-Gua生成を報告した。この反応には一重項酸素が関与しているらしい。この機構による37°Cにおける8-OH-Guaの生成を計算すると

Ames のグループが検出したラットにおける 8-OH-Gua の生成量 (9×10^4 damage/DNA/cell/day) (Fraga *et al.*, 1990) に一致するという。

我々は試験管内で発癌因子のたばこの煙濃縮物により DNA 中に 8-OH-Gua が生成することをかなり初期に見出したが、特にたばこの煙に多量に含まれるカテコールが強力な Cocarcinogen として作用している可能性が示されており (Van Duuren and Goldschmidt, 1976), 作用機作としてはカテコールの自動酸化により発生した活性酸素により 8-OH-Gua などの酸化的 DNA 損傷が起こっている可能性が考えられる (Leanderson and Tagesson, 1990)。

これまでに活性酸素の関与する様々な変異原、発癌因子による細胞内 DNA 中の 8-OH-Gua の生成に関して多数報告されている。動物臓器内および培養細胞内の 8-OH-Gua の生成に関する代表的論文を Table 1, 2 に列挙する。これらの結果から、かなり多くの化学発癌物質（発癌プロモー

ター）が活性酸素を介して作用していることを示している。Ames 試験陰性のもの（いわゆる non-genotoxic carcinogen）でこの 8-OH-Gua 試験陽性のものがかなりある。Ames 法ではラット肝の活性化酵素 (S9mix) は組み込まれているが、マクロファージやペルオキシゾームなどの活性酸素発生系が含まれていないのでこれらの発癌物質を検出できないのも当然であろう。Fig. 2 のように、発癌性の予測において、8-OH-Gua 試験が Ames 試験を部分的にでも捕足出来るのではないかとわれわれは期待している。

Frenkel らは 8-OH-Gua その他の酸化的 DNA 損傷を指標にして発癌プロモーターの作用機作を研究している。発癌プロモーターに対し感受性の SENCAR マウスと抵抗性の C57BL/6J マウスについて、TPA 塗布による皮膚 (emiderma) DNA 中の 8-OH-Gua の増加を調べると、前者では 4 マイクロ g という低い dose の TPA により 8-OH-Gua が 11 倍に増加したが、後者では 20 マイクログラムの TPA で初めて 6 倍に増加し、4 マイクログラムでは増加は見られなかった (Wei *et al.*, 1993)。また化学発癌抑制剤である EGCG, tamoxifen (6.5 nmol) をあらかじめマウス皮膚に塗布しておくと TPA (6.5 nmol) による 8-OH-Gua の生成が抑制された (Wei and Frenkel, 1993)。同様の結果は抗発癌プロモーターである Sarcophytol (軟サンゴの成分) (Wei and Frenkel, 1992) や

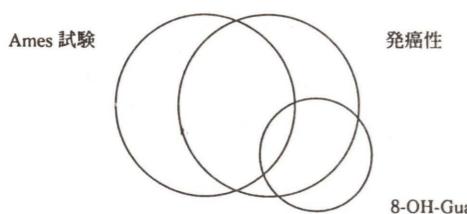


Fig. 2. 8-OH-Gua 試験による発癌性の予測。

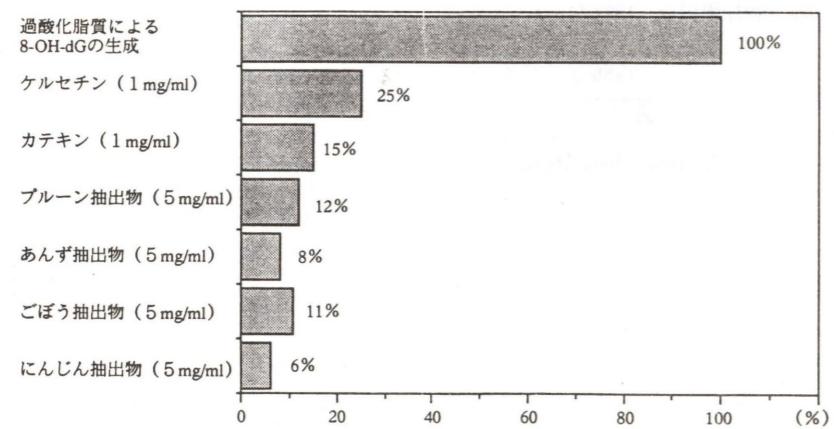


Fig. 3. 植物成分は過酸化脂質による dG からの 8-OH-dG の生成を阻害する。dG の溶液 [1 mg/0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 1 ml] を 100 mg のリノレン酸と共に 37°C で振とうし、エマルジョン状態で反応させ、HPLC-ECD により 8-OH-dG を測定 (Kasai and Nishimura, 1989)。

Caffeic acid phenethyl ester (ミツバチから採ったプロポリスの成分) にも認められた (Frenkel *et al.*, 1993)。また Shih と Lin (1993) は抗酸化剤であり抗炎症剤、抗プロモーター剤として知られているカレーの黄色成分 Curcumin がマウス繊維芽細胞において TPA による 8-OH-Gua の生成を抑制することを見出している。

Ames (1983) は Science の総説の中で活性酸素を放出する環境変異原の重要性を指摘し、野菜や果物などの食品中の抗酸化剤をうまく摂取することが癌予防の重要な戦略になるであろうと述べている。我々は試験管内での過酸化脂質のモデル系 (リノレン酸やリノール酸の自動酸化) の作用によるデオキシグアノシンからの 8-OH-dG の生成を認めたが、この系に種々の植物性フェノール類や野菜、果物の抽出物を加えたところ 8-OH-dG の生成が抑制されることを見出した (Fig. 3)。主要抑制物質はクロロゲン酸と同定された (Kasai *et al.*, 1993)。一方アスコルビン酸や 5-aminoosalicylic acid は試験管内で UV/可視光による DNA 中の 8-OH-Gua の生成を抑えることは既に知られていたが、V79 チャイニーズハムスター細胞を用いた実験でも、両化合物で前処理しておくと 8-OH-Gua の抑制が見られた (Fischer-Nielsen *et al.*, 1993)。試験管内での 8-OH-Gua の生成抑制能と細胞内への取り込まれ易さ等を指標にして天然抗酸化物質のスクリーニングを行い、最終的には細胞レベルの 8-OH-Gua の抑制を調べることにより、今後、癌予防薬、老化抑制剤が見出されることを期待する。

以下に最近の 8-OH-Gua のトピックスについて述べる。

3. 人造鉱物繊維のハムスター気管内注入による肺組織 DNA 中の 8-OH-Gua の生成

近年、石綿の代替品として様々な人造鉱物繊維 (MMMF) が使用されるようになり、その発癌性の評価は重要な課題である。特にこれらに関し活性酸素による発癌機構が示唆されている。われわれは産業医大の田中勇武教授らと共同で 5 種類の MMMF と 1 種類の石綿の懸濁液をハムスターの気管内に注入し、3 日後に肺組織の核分画から

DNA を抽出し、8-OH-Gua を定量したところ、予想に反し、セラミックファイバーの場合に特に高い値を示し、石綿では変化が見られなかった (山口ら, 1994)。Hesterberg ら (1991) はセラミックファイバーを吸入させたハムスターには腫瘍 (中皮腫) が多く発生 (43%) するが石綿では発生しないという報告している。これはわれわれの 8-OH-Gua の結果と一致しており興味深い。ヒトに対する発癌性の予測に関しては今後さらに検討が必要と思われる。

4. ディーゼル微粒子の発癌性と活性酸素

ディーゼル排気微粒子 (DEP) は実験動物の肺に癌を発生させることが知られている。発癌のメカニズムとしては① dinitropyrene や benzo[a]pyrene などの変異原が作用する可能性、② DEP の物理的刺激が肺に炎症を引き起こしその結果発生した活性酸素が作用している可能性が考えられる (Rosenkranz, 1993)。われわれは国立環境研究所の嵯峨井勝博士、市瀬孝道博士と共同で DEP 懸濁液をマウスの気管内に注入後、時期を追って肺 DNA 中の 8-OH-Gua を測定したところ、投与後 3-6 時間のところで 8-OH-Gua は増加することが判明した (長島ら, 1994)。特に高脂肪食 (16% コーン油) と DEP 処理が重なった場合に最も顕著な 8-OH-Gua の増加が見られた。これらの結果は DEP によるマウスの肺発癌に活性酸素が関与することを示しており、また高脂肪食の摂取が肺癌を増加させるという報告や変異原を含まない炭素粉末のみでもかなりの発癌性があるという最近の報告と一致し興味深い。

5. ヒト肝癌と慢性肝炎

ヒト肝癌は通常、背景に慢性肝障害を有しており、持続する炎症が癌発生に寄与している可能性が考えられる。またヒト肝癌の p53 癌抑制遺伝子では GC → TA トランスポージョンが多く見られ (Hollstein *et al.*, 1991)、これは 8-OH-Gua が引き起こす点突然変異と一致する。われわれはヒト肝癌発生における活性酸素の関与を調べるために、国立がんセンターと共同で、正常肝、慢性肝炎、肝硬変、肝癌の DNA 中の 8-OH-Gua を分析、定

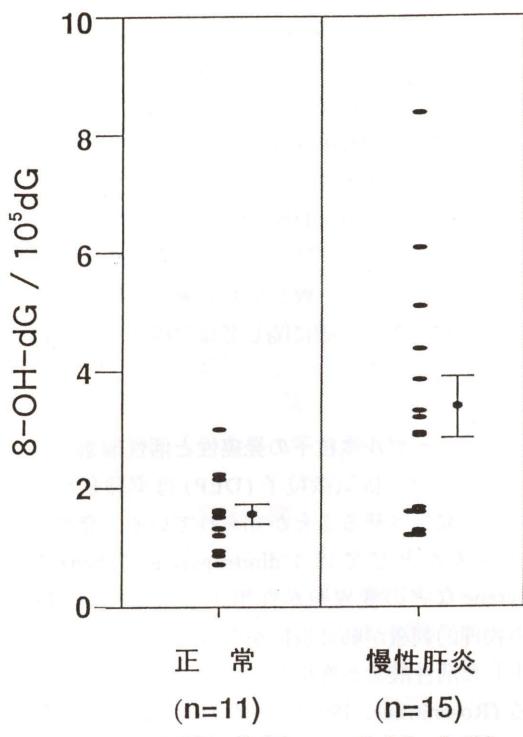


Fig. 4. 慢性肝炎による 8-OH-Gua の増加。

量した (Shimoda *et al.*, 1994)。その結果、慢性肝炎では正常肝に比べ高い 8-OH-Gua の値を示した (Fig. 4)。即ち、慢性肝炎の時点で、8-OH-Gua が増加し、発癌に関わる突然変異を誘発している可能性が示唆された。

6. 老化と活性酸素

Ames らはラットの各臓器の DNA を分析し肝臓、腎臓、腸で老化に伴い 8-OH-Gua が増加することを報告している (Fraga *et al.*, 1990)。われわれの同様の実験では、脳のみで 5 月齢あるいは 30 月齢ラットが 3 週齢ラットに比べ高い 8-OH-Gua 値を示したが、他の臓器では老化による有意差は見られなかった。また脳では他臓器に比べ 8-OH-Gua 修復活性が低いことがわかった (平野ら、未発表データ)。酸素消費量の多い脳で高い 8-OH-Gua が検出されたことは興味深い。しかし各臓器の 8-OH-Gua レベルと自然発生癌との相関は見られなかった。

一方、老化のモデルとしてヒト纖維芽細胞

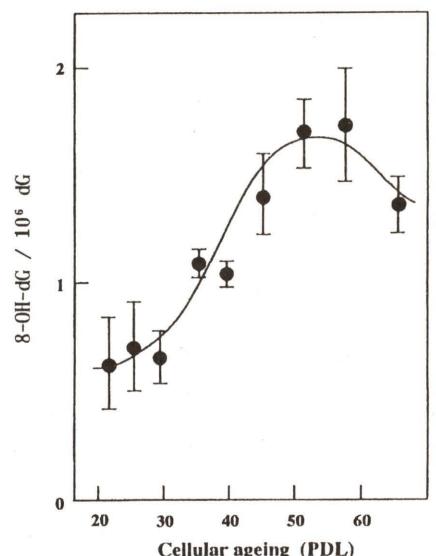


Fig. 5. 細胞の継代増養数 (population doubling time, PDL) と DNA 中の 8-OH-Gua 量の関係。

TIG-3 の継代培養数と 8-OH-Gua の関係を都老人研の本間好博士と共同で調べた (Homma *et al.*, 1994)。Fig. 5 のように継代数 30 から 50 にかけて 8-OH-Gua は増加した。また 8-OH-Gua の修復酵素活性を調べると明らかに継代数 25 の細胞では継代数 55 のものに比べ強かった。従ってこの場合には修復活性の低下によって 8-OH-Gua が増加したと思われる。

7. 突然変異

化学合成により 8-OH-Gua を DNA 上の特定の位置に導入することが可能であったため (チミングリコールや Fapy の場合には不可能)、8-OH-Gua の突然変異誘導に関して様々なグループにより研究された。8-OH-Gua を含む合成 DNA をテンプレートとして用いた DNA ポリメラーゼによるスクレオチドの取り込み実験 (Shibutani *et al.*, 1991)、大腸菌 (Wood *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1992) や哺乳動物細胞 (Moriya *et al.*, 1991) に 8-OH-Gua を含むプラスミド (ベクター) を導入し突然変異を調べる実験、等により 8-OH-Gua は主に GC→TA トランスバージョンを引き起こすことが分かった。8-OH-Gua は syn 型構造を取りやすく、また 8 位はケト型となりやすいため、シト

シンとだけではなく、アデニンとも塩基対を形成するためにこの変異を起こす。この突然変異のメカニズムは 8-OH-Gua: A 塩基対を含む DNA の NMR の測定から確認された (Kouchakdjian *et al.*, 1991)。北大の紙谷らは ras 遺伝子のコドン 12 の Gua を 8-OH-Gua に変えたベクター DNA を構築し、NIH3T3 細胞にトランسفクトしたところ、突然変異全体の 6 割が GC→TA 変異であったが、GC→AT 変異 (2 割) も起こることを見出した。(Kamiya *et al.*, 1992)

DNA 中のみならずスクレオチドプール中に 8-OH-dGTP が生じても突然変異が起こる。この場合には、テンプレート中のアデニンと塩基対を形成して 8-OH-dGTP が取り込まれるため AT→CG 変異を起こす (Cheng *et al.*, 1992)。Bruskov と Kuklina はかなり初期に (1988)、polyd(AT)・d(TA) をテンプレートとして用いた大腸菌 RNA ポリメラーゼによる試験管内 RNA 合成系で UTP の代わりに 8-OH-GTP も RNA 中に取り込まれる事を報告している。大腸菌の MutT 変異株では 8-OH-dGTP ホスファターゼの欠損のため AT→CG 変異が多く見られる (Maki and Sekiguchi, 1992)。

8. 修復

われわれはマウスのガンマ線照射により生じた 8-OH-Gua は時間の経過と共に減少することを見出しました (Kasai *et al.*, 1986)、その後、大腸菌から 8-OH-Gua エンドヌクレアーゼ活性を手掛かりにして修復酵素が精製された (Chung *et al.*, 1991a)。この酵素は 8-OH-Gua グリコシラーゼ活性と AP エンドヌクレアーゼ活性の両活性を持っていた。またこの酵素は仮の Laval らが精製した Fapy グリコシラーゼと同一酵素であることが基質特異性 (Tchou *et al.*, 1991)、分子量、N 末端アミノ酸配列などの比較によりわかった。ラットの各臓器 (Yamamoto *et al.*, 1992)、ヒト好中球 (Chung *et al.*, 1991b) などの粗抽出液からも 8-OH-Gua エンドヌクレアーゼ活性が検出された。HeLa 細胞の核抽出液からは 8-OH-Gua に対する作用の異なる 2 つの修復酵素が見出された (Bessho *et al.*, 1993a)。一つは 8-OH-Gua グリコシラーゼであ

り、他方はグリコシラーゼ活性を持たない 8-OH-Gua エンドヌクレアーゼであった。この 8-OH-Gua グリコシラーゼは大腸菌における 8-OH-Gua グリコシラーゼである MutM タンパクと異なり、AP エンドヌクレアーゼ活性を有していないこともわかった。ラットの各臓器からも、8-OH-Gua に対する抗体を結合させたアフィニティカラムと HPLC-ECD との併用により高感度に 8-OH-Gua グリコシラーゼ活性が測定されている (Lee *et al.*, 1993)。また 8-OH-Gua は哺乳動物の N-メチルプリンギリコシラーゼによつても修復されることがわかった (Bessho *et al.*, 1993b)。最近、アデニンのデアミネーションにより生じるヒポキサンチンが同様にアルキルプリン DNA グリコシラーゼ (大腸菌、酵母、ラット、ヒト) により除去修復されること (Saparbaev and Laval, 1994)、また活性酸素による DNA 損傷である 5-ヒドロキシトシンと 5-ヒドロキシウラシルが、チミングリコールに作用することが知られているエンドヌクレアーゼ III により修復され、5-ヒドロキシウラシルはウラシルグリコシラーゼの基質にもなること (Hatahet *et al.*, 1994) が報告されており、修復酵素は複数の DNA 損傷を基質にすることがわかった。

哺乳動物細胞からは 8-OH-Gua 修復酵素の完全精製までは至っていないが、細胞のガンマ線照射により 8-OH-Gua エンドヌクレアーゼ活性が高まることが報告されている。例えば 5-12 グレイのガンマ線照射により G2 期で静止した細胞では最高で 6 倍まで高まることが報告されている (Bases *et al.*, 1994)。

IARC の Hall ら (1993) は喫煙者 (20 名) と非喫煙者 (17 名) の白血球中の Fapy グリコシラーゼ (8-OH-Gua グリコシラーゼ) およびメチルプリンギリコシラーゼを調べたところ、両活性とも喫煙者の方が平均で約 2 倍高いことが判明した。煙草の煙成分により白血球 DNA のアルキル化や酸化が起きた結果、それらに対する修復酵素が誘導されたと考えられる。またこれらの修復酵素活性は喫煙者の場合で 13 倍、また非喫煙者の場合で 3 倍の個人差があることを報告している。このように 8-OH-Gua 修復酵素が誘導されたかど

うかを知ることにより細胞内での真の酸化ストレスの状態を知ることが出来るであろう。また個人個人の酸化的DNA損傷に対する修復能から発癌危険度を予測する試みも可能となるであろう。この修復活性を調べる方法は、これまでのHPLC-ECDによる8-OH-Guaの定量よりも、忠実に細胞内の出来事を見ている点で、勝っているかも知れない。われわれの最近の例ではエタノールを長期投与したラットの肝臓では、DNA中の8-OH-Guaが高まると同時に8-OH-Guaエンドヌクレアーゼ活性が高まることを見出している(平野ら, 1994)。この結果からエタノールの長期投与は肝臓の酸化ストレスを引き起こし肝硬変や肝がんの原因になっている可能性が示唆された。

9. 考 察

最後に現時点での問題点および今後の展望について述べる。

8-OH-Guaの検出法にはHPLC-ECD法、GCMS法、relaxation assay(mtDNAにFapyグリコシラーゼを作用させrelax formを定量)等が使われているが、同じ試料を分析しても、分析法により結果は大きく異なっている。例えばラット肝mtDNAをrelaxation assayで分析するとFapyと8-OH-Guaの和は $0.8/10^5$ 塩基対である(Hegler et al., 1993)。しかしHPLC-ECD法では $25/10^5$ 塩基対(Richter et al., 1988)、またGCMS法ではマウスの場合で $700/10^5$ 塩基対、と報告されている(Hayakawa et al., 1991)。分析法により、何と1000倍も結果が違うのである。このように結果が異なっている真の理由は不明であるが、一つには、8-OH-Guaがアーティファクトによっても出来る可能性がある。DNA抽出過程でフェノールやクロロホルム(Claycamp, 1992)、可視光線などの影響により8-OH-Guaが生成することが知られている。また少量の細胞(組織)に対し多量のDNA抽出用溶液を用いた場合やDNA濃度の薄い状態で酵素処理を行った場合、さらに加熱処理やDNA溶液を長時期放置(5~25°C)することにより8-OH-Guaが生成する。上記文献からミトコンドリアDNAでは 10^5 塩基対当たり約1残基、また我々のHPLC-ECDによる最近の結果ではヒト

培養細胞DNAで細胞では 10^7 塩基対当たり2残基がこれまでの最低の値であった(Fig. 6)。ちなみにヒト白血球中のチミングリコール量をComet Assay(endonuclease IIIによる細胞内DNA切断を電気泳動により調べる方法;本号269ページ、Green博士による総説参照)により調べた結果では、4残基/ 10^7 塩基対と報告されている(Collins, R. A. et al., 1993)。細胞内の絶対的な8-OH-Guaの存在量に関しては疑問が残るが、いずれにせよ前述したように一群の化学発癌物質が標的臓器で酸化ストレスを引き起こしていることがこの8-OH-Guaの分析により定性的に判定できることは確かであり、活性酸素による発癌機構を解明するための一つの糸口になったと信じている。

しかし、8-OH-Guaは活性酸素によるDNA損傷のほんの一端であるということを忘れてはいけない。最近の報告から一例を示すと、ヒト細胞にX線を照射し $hprt$ 遺伝子の突然変異116例についてその内訳を調べると、大きな断片の欠失が78例(67%)、点突然変異が38例(33%)、そのうちトランスポージョンが12例(10%)、8-OH-Gua型のGC→TA、およびAT→GCはそれぞれ僅か4例および1例であった(Nelson et al., 1994)。8-OH-Guaがこの十年間、集中的に研究されたが、他にも重要なものが多数存在することが最近わかってきた。例えば5-ヒドロキシシトシンは酸化的DNA損傷の中で最も突然変異誘導能が高いことが最近Loebらの研究室から報告された(Feig et al., 1994)。またわれわれは活性酸素の作用でDNA中あるいはヌクレオチドプール中に生じる2-ヒドロキシアデニンがin vitroのDNA合成系でミスペラーを起こす事を最近見出した(Kamiya et al. 未発表データ)。これら以外にもSOS誘導大腸菌において Fe^{2+} の自動酸化あるいはメチレンブルーと光によって誘導される主要な突然変異はGC→CGであり、この原因となっているDNA損傷の本体は不明である。

8-OH-Guaは“焼け焦げ”によるDNA損傷を研究中に偶然発見したことについては既に述べた。私の本来の目的は食品や環境中の変異原物質、発癌物質を見つけ出すことであった。グアニ

ンの修飾に関する最初の実験で8-OH-Guaという興味深いものが見つかったため、この十数年この8-OH-Guaの研究を集中して行ってきた。活性酸素に取りつかれてしまったのである。今、冷静に考えると、活性酸素を発生する変異原は環境変異原の一部であることに気がついた。杉村 隆先生の言われるよう各研究者は自分の今関わっている狭い分野のみを考えがちである。癌の原因は活性酸素だけではない。原点に戻ってヒトの癌を考えれば、まだ重要な原因物質は環境中あるいは食品中に潜んでいるに違いない。 ^{32}P ポストラベル法によるヒト組織DNA中の付加体で構造の明らかになったものがどれだけあるであろうか。それほどヒト発癌因子はわかっていないのである。ここ産業医大に赴任したのを機会に、一方で活性酸素による発癌機構の研究を続けると同時に、もう一方では振り出しに戻り食品中や環境中の変異原の研究も手掛けたいと思う。

References

- Adachi, S., K. Kawamura and K. Takemoto (1993a) Oxidative damage of nuclear DNA in liver of rats exposed to psychological stress, *Cancer Res.*, **53**, 4153–4155.
- Adachi, S., K. Takemoto T. Hirosue and Y. Hosogai (1993 b) Spontaneous and 2-nitropropane induced levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in liver DNA of rats fed iron-deficient or manganese- and copper-deficient diets, *Carcinogenesis*, **14**: 265–268.
- Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anti-carcinogens, Cxogen radicals and degenerative diseases, *Science* **221**, 1256–1264.
- Bases, R., F. Mendez and W. A. Franklin (1994) Enhanced repair endonuclease activities from radiation-arrested G₂ phase mammalian cells, *Int. J. Radiat. Biol.*, **65**, 591–603.
- Beehler B. C., J. Przybyszewski, H. B. Box and M. F. Kulesz-Martin (1992) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂, *Carcinogenesis*, **13**, 2003–2007.
- Bessho, T., K. Tano, H. Kasai, E. Ohtsuka and S. Nishimura (1993a) Evidence for two DNA repair enzymes for 8-hydroxyguanine (7, 8-dihydro-8-oxoguanine) in human cells *J. Biol. Chem.*, **268**, 19416–19421.
- Bessho, T., R. Roy, K. Yamamoto, H. Kasai, S. Nishimura, K. Tano and S. Mitra (1993b) Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian N-methylpurine-DNA glycosylase, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 8901–8904.
- Bessho, T., K. Tano, S. Nishimura and H. Kasai (1993c) Induction of mutation in mouse FM3A cells by treatment with riboflavin plus visible light and its possible relation with formation of 8-hydroxyguanine (7, 8-dihydro-8-oxoguanine) in DNA, *Carcinogenesis*, **14**, 1069–1071.
- Bruskov, V. I. and O. V. Kuklina (1988) Manifestation by 8-hydroxy-GTP of the substrate properties of UTP in the reaction of polynucleotide synthesis by *Escherichia coli* RNA polymerase on a poly[d(AT)].
- Bruskov, V. I. and A. I. Petrov (1992) Kinetics of heat-induced formation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate: estimation of rate constants and activation energy, *Molecular Biol.*, **26**, 898–902.
- Cheng KC. DS. Cahill H. Kasai S. Nishimura and LA. Loeb (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant from of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions, *J. Biol. Chem.*, **267** 166–172.
- Chung MH. H. Kasai, DS. Jones, H. Inoue, H. Ishikawa, E. Ohtsuka and S. Nishimura (1991a) An endonuclease activity of *Escherichia coli* that specifically removes 8-hydroxyguanine residues from DNA, *Mutat. Res.*, **254**, 1–12.
- Chung, MH. HS. Kim, E. Ohtsuka, H. Kasai F. Yamamoto and S. Nishimura (1991b) An endonuclease activity in human polymorphonuclear neutrophils that removes 8-hydroxyguanine residues from DNA, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 1422–1428.
- Chung F. L. and Xu, Y. (1992) Increased 8-Oxodeoxyguanosine Levels in Lung DNA of A/J Mice and F344 Rats Treated with the Tobacco-Specific Nitrosamine 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butane, *Carcinogenesis*, **13**, 1269–1272.
- Claycamp, H. G. (1992) Phenol sensitization of DNA to subsequent oxidative damage in 8-hydroxyguanine assays, *Carcinogenesis*, **13**, 1289–1292.
- Collins, A. R., S. J. Duthie, and V. L. Dobson (1993) Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA, *Carcinogenesis*, **14**, 1733–1735.
- Dizdaroglu, M. (1985) Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on γ -irradiation in aqueous solution, *Biochemistry*, **24**, 4476–4481.
- Epe, B., M. Häring, D. Ramaiah, H. Stopper, M. Abou-Elzahab, W. Adam and C. R. Saha-Möller (1993) DNA damage induced by furocoumarin hydroperoxides plus UV (360 nm), *Carcinogenesis*, **14**, 2271–2276.
- Faux, S. P., J. F. Francis, A. G. Smith, J. K. Chipman, (1992) Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in Ah-responsive mouse liver by iron and Aroclor 1254, *Carcinogenesis*, **13**, 247–250.
- Feig, D. I., L. C. Sower and L. A. Loeb (1994) Reverse chemical mutagenesis: Identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**,

- Fischer-Nielsen, A., S. Loft and K. G. Jensen (1993) Effect of ascorbate and 5-aminosalicylic acid on light-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in V79 Chinese hamster cells, *Carcinogenesis*, **14**, 2431–2433.
- Floyd, R. A., M. S. West, K. L. Eneff and J. E. Schneider (1989) Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA, *Arch. Biochem. Biophys.*, **273**, 106–111.
- Fraga, C.G., M.K. Shigenaga, J.W. Park, P. Degan and B.N. Ames (1990) Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 4533–4537.
- Frenkel, K., H. Wei, R. Bhimani, J. Ye, J. A. Zadunaisky, M.-T. Huang, T. Ferraro, A. H. Conney and D. Grunberger (1993) Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester, *Cancer Res.*, **53**, 1225–1261.
- Hall, J., H. Brésil, F. Donato, C. P. Wild, N. A. Lektonova, O. I. Kazanova, I. P. Komyakov, V. G. Lemekhov, A. J. Likhachev and R. Montesano (1990) Alkylation and oxidative-DNA damage repair activity in blood leukocytes of smokers and non-smokers, *Int. J. Cancer*, **54**, 728–733.
- Hatahet, Z., Y. W. Kow, A. A. Purmal, R. P. Cunningham and S. S. Wallace (1994) New substrates for old enzymes, 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for *E. coli* endonuclease III and formamido-pyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA glycosylase, *J. Biol. Chem.*, **269**, 18814–18820.
- Hattori-Nakakuki, Y., C. Nishigori, K. Okamoto, S. Imamura, H. Hiai and S. Toyokuni (1994) Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in epidermis of hairless mice exposed to near-UV, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 1132–1139.
- Hayakawa, M., T. Ogawa, S. Sugiyama, M. Tanaka and T. Ozawa (1991) Massive conversion of guanine to 8-hydroxyguanine in mouse liver mitochondrial DNA by administration of azidothymidine, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 87–93.
- Hegler, J., D. Bittner, S. Boiteux and B. Epe (1993) Quantification of oxidative DNA modifications in mitochondria, *Carcinogenesis*, **14**, 2309–2312.
- Hesterberg, T. W., E. E. McConnell, J. Chevalier, D. M. Bernstein, W. B. Bunn and R. Anderson, Chronic inhalation toxicity of refractory ceramic fibers in Syrian hamsters, Mechanisms in Fibre Carcinogenesis (eds. R. C. Brown *et al.*), Plenum Press, New York, 1991.
- 平野 雄, 山口雷藏, 平野英保, 葛西 宏 (1994) エタノール長期投与ラット肝における8-ヒドロキシグアニンおよびその修復酵素活性の測定, 日本環境変異原学会・日本放射線影響学会合同シンポジウム「活性酸素の生物作用」要旨集, p. 55.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. C. Harris (1991) p53 mutations in human cancers, *Science*, **253**, 49–53.
- Homma, Y., M. Tsunoda and H. Kasai (1994) Evidence for the accumulation of oxidative stress during cellular ageing of human diploid fibroblasts, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, in press.
- Kamiya, H., K. Miura, H. Ishikawa, H. Inoue, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1992) c-Ha-ras containing 8-hydroxyguanine at codon 12 induces point mutations at the modified and adjacent positions, *Chener Res.*, **52**, 3483–3485, 1992.
- 葛西 宏 (1984) 加熱食品中の強力な変異原イミダゾキノリン及びイミダゾキノキサリンの発見, 環境変異原研究 **6**, 21–25.
- 葛西 宏 (1989) 活性酸素により生じるDNAの傷8-ヒドロキシグアニンと発がん, *Oncologia*, **22**, 48–56.
- Kasai, H., H. Hayami, Z. Yamaizumi, H. Saito and S. Nishimura (1984a) Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives, *Nucl. Acids Res.*, **12**, 2127–2136.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984b) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, *Nucl. Acids Res.*, **12**, 2137–2145.
- Kasai, H., S. Nishimura (1984c) DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide, *Gann*, **75**, 841–844.
- Kasai, H., H. Tanooka and S. Nishimura (1984d) Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation, *Gann*, **75**, 1037–1039.
- Kasai, H., P.F. Crain, Y. Kuchino, S. Nishimura, A. Ootsuyama and H. Tanooka (1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair, *Carcinogenesis*, **7**, 1849–1851.
- Kasai, H. and S. Nishimura, Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by auto-oxidized unsaturated fatty acids, In Medical biochemical and chemical aspects of free radicals, ed. by O. Hayaishi, E. Niki, M. Kondo *et al.*, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1988, pp. 1021–1023.
- Kasai, H., M.-H. Chung, F. Yamamoto, E. Ohtsuka, J. Laval, A. P. Grollman and S. Nishimura, Formation, inhibition of formation and repair of oxidative 8-hydroxyguanine DNA damage, Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III, ed. G. Bronzetti *et al.*, Plenum Press, New York, 1993.
- Kasai, H., Z. Yamazumi, M. Berger and J. Cadet (1992) Photosensitized formation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in DNA by riboflavin: a non singlet oxygen mediated reaction, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9692–9694.
- Kasai, H. and S. Nishimura Formation of 8-hydroxyguanine by oxidative DNA damage, its repair and its mutagenic effects, Advances in Mutagenesis Res. Vol 4, (ed. G. B. Obe, G.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1993, pp. 31–45.
- Kelly, J. D., G. A. Orner, J. D. Hendricks and D. E. Williams, (1992) Dietary hydrogen peroxide enhances hepatocarcinogenesis in trout: correlation with 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in liver DNA, *Carcinogenesis*, **13**, 1639–1642.
- Kohda, K., M. Tada, H. Kasai, S. Nishimura and Y. Kawazoe (1986) Formation of 8-hydroxyguanine residues in cellular DNA exposed to the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**, 626–632.
- Kohda, K., T. Nakagawa and Y. Kawazoe (1990) Singlet oxygen take part in 8-hydroxydeoxyguanosine formation in deoxyribonucleic acid treated with the horseradish peroxidase-H₂O₂ system, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3072–3075.
- Kolachana, P., V. V. Subrahmanyam, K. B. Meyer, L. P. Zhang and M. T. Smith (1993) Benzene and Its Phenolic Metabolites Produce Oxidative DNA Damage in HL 60 Cell *In vitro* and in the Bone Marrow *In vivo* Cancer Res., **53**, 1023–1026.
- Kouchakdjian, M., V. Bodepudi, S. Shibutani, M. Eisenberg, F. Johnson, A.P. Grollman and D.J. Patel (1991) NMR structural studies of ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxydeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-oxo-7H-dG (syn) dA (anti) alignment at lesion site, *Biochemistry*, **30**, 1043–1412.
- 黒川雄二, 佐井君江, 高木篤也, 梅村隆志, 長谷川隆一, (1992) 環境化学物質による臓器DNAの酸化的損害, CRC, **1**, 150–158.
- Leanderson, P. and C. Tagesson (1990) Cigarette smoke-induced DNA-damage: Role of hydroquinone and catechol in the formation of the oxidative DNA-adduct, 8-hydroxydeoxyguanosine, *Chem. Biol. Interactions*, **75**, 71–81.
- Leanderson, P. and C. Tagesson (1992) Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: role of hydroxyl radical and endonuclease activation, *Chem. Biol. Interactions*, **81**, 197–208.
- Lee, Y. S., H. S. Lee, M. K. Park, E. S. Hwang, E. M. Park, H. Kasai and M. H. Chung (1993) Identification of 8-hydroxyguanine glycosylase activity in mammalian tissues using 8-hydroxyguanine specific monoclonal antibody, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 1545–1551.
- Maki, H. and M. Sekiguchi (1992) Mut T protein specifically hydrolyzes a potent mutagenic substrate for DNA synthesis, *Nature*, **355**, 273–275.
- Mori, T., Y. Hori and M. Dizdaroglu (1993) DNA base damage generated *in vivo* in hepatic chromatin of mice upon whole body γ -irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**, 645–650.
- Moriya, M., C. Ou, V. Bodepudi, F. Johnson, M. Takeshita and A.P. Grollman (1991) Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector: a study of translesion synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*, *Mutat. Res.*, **254**, 281–288.
- 長島 誠, 横田 淳, 市瀬孝道, 嶋井 勝, 葛西 宏 (1994) ディーゼル排気微粒子(DEP)気管内投与によるマウス肺DNA中の8-ヒドロキシデオキグアニンの生成, 日本環境変異原学会・日本放射線影響学会合同シンポジウム「活性酸素の生物作用」要旨集, p. 37.
- Nair, U.J., R.A. Floyd, J. Nair, V. Bussachini, M. Friesen and H. Bartsch (1987) Formation of reactive oxygen species and of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA in vitro with betel quid ingredients, *Chem. Biol. Interactions*, **63**, 157–169.
- Nelson, S. L., C. R. Giver and A. J. Grosovsky (1994) Spectrum of X-ray-induced mutations in the human hprt gene, *Carcinogenesis*, **15**, 495–502.
- Park, E.-M., Shigenaga, M. K., Degan, P., Korn, T. S., Ames, B. N. (1992) Assay of excised oxidative DNA lesions: Isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 3375–3379.
- Pflaum, M., S. Boiteux and B. Epe (1994) Visible light generates oxidative DNA base modifications in high excess of strand breaks in mammalian cells, *Carcinogenesis*, **15**, 297–300.
- Plummer, S. M. and S. P. Faux (1994) Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in isolated DNA and HeLa cells exposed to fecapentaene-12: evidence for the involvement of prostaglandin H synthase and iron, *Carcinogenesis*, **15**, 449–453.
- Richter, C., J. Park and B. Ames (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear-DNA is extensive, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 6465–6467.
- Rosenkranz, H. S. (1993) Revisiting the role of mutagenesis in the induction of lung cancers in rats by diesel emissions, *Mutat. Res.*, **303**, 91–95.
- Saparbaev, M. and J. Laval (1994) Excision of hypoxanthine from DNA containing dIMP residues by the *E. coli* yeast, rat and human alkylpurine DNA glycosylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 5873–5877.
- Shibutani, S., M. Takeshita and A.P. Grollman (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, **349**, 431–434.
- Shih, C.-A. and J.-K. Lin (1993) Inhibition of 8-hydroxydeoxyguanosine formation by curcumin in mouse fibroblast cells, *Carcinogenesis*, **14**, 709–712.
- Shimoda, R., M. Nagashima, M. Sakamoto, N. Yamaguchi, S. Hirohashi, J. Yokota and H. Kasai (1994) Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis, *Cancer Res.*, **54**, 3171–3172.
- Takeuchi, T. and K. Morimoto (1993) Increased formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, an oxidative DNA damage, in lymphoblasts from Fanconi's anemia patients due to possible catalase deficiency, *Carcinogenesis*, **14**, 1115–1120.
- Tchou, J., H. Kasai, S. Shibutani, M.H. Chung, J. Laval, A.P. Grollman and S. Nishimura (1991) 8-Oxoguanine

- (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity, *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.*, **88**, 4690–4694.
- Toyokuni, S., T. Mori and M. Dizdaroglu (1994) DNA base modification in renal chromatin of wister rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate, *Int. J. Cancer*, **57**, 123–128.
- Weinstein, B., A. M. Jefferey, K. W. Jennette, S. H. Blostein, R. G. Harvey, C. Harris, H. Autrup, H. Kasai and K. Nakanishi (1976) Benzo[a]pyrene diol epoxide as intermediates in nucleic acid binding *in vitro*, and *in vivo* *Science*, **193**, 592–595.
- Wei, H. and K. Frenkel (1992) Suppression of tumor promoter-induced oxidative events and DNA damage *in vitro* by sarcophytol A: a possible mechanism of anti-promotion, *Cancer Res.*, **52**, 2298–2303.
- Wei, L., H. Wei and F. Krystyna (1993a) Sensitivity to tumor promotion of SENCAR and C57BL/6J mice correlates with oxidative events and DNA damage, *Carcinogenesis*, **14**, 841–847.
- Wei, H. and K. Frenkel (1993b) Relationship of oxidative events and DNA oxidation in SENCAR mice to *in vivo* promoting activity of phorbol ester-type tumor promoters, *Carcinogenesis*, **14**, 1195–1201.
- Wood, M.L., M. Dizdaroglu, E. Gajewski and JM. Essigmann (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome, *Biochemistry*, **29**, 7024–7032.
- 山口雷藏, 平野 雄, 高橋 謙, 東 敏昭, 田中勇武, 葛西 宏 (1994) 石綿および人造鉱物纖維のハムスター気管内注入による肺組織中の8ハイドロキシデオキシグアノシンの生成, 日本環境変異原学会・日本放射線影響学会 合同シンポジウム「活性酸素の生物作用」要旨集, p. 33.
- Yamamoto, F., H. Kasai, MH. Chung, E. Ohtsuka, .. Hori, S. Nishimura (1992a) Ubiquitous presence in mammalian cells of enzymatic activity specifically cleaving 8-hydroxyguanine containing DNA, *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 351–357.
- Yamamoto, F., S. Nishimura and H. Kasai (1992b) Photosensitized formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in cellular DNA by riboflavin, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **187**, 809–813.
- Van Duuren, B. L. and B. M. Goldschmidt (1976) Cocarcinogenesis by tobacco smoke components: Bioassay in mouse skin, *J. Natl Cancer Inst.*, **56**, 1237–1242.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 275–285 (1995)

ディーゼル排気微粒子 (DEP) による肺癌発生と活性酸素の役割

Lung tumor incidence by diesel exhaust particles (DEP) and the role of active oxygens

嵯峨井 勝, 市瀬 孝道

Masaru Sagai and Takamichi Ichinose

国立環境研究所 大気影響評価研究チーム
305 つくば市小野川 16-2

National Institute for Environmental Studies, Research Team for Health Effect of Air Pollutants
P. O. Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

(受付: 1994年9月14日; 受理: 1994年9月14日)

Summary

Effect on tumor formation of diesel exhausts (DE) and diesel exhaust particles (DEP) were introduced. It is well established that DE and DEP produce lung tumors dose-dependently, and the mutagenicity of DEP is related with the carcinogenicity. These results have been explained by the formation of DNA-adducts between nucleic acid in cells and carcinogens in DEP.

Recently, author and coworkers examined the involvement of active oxygens on lung tumor formation by DEP, because we reported previously that DEP produced very much active oxygens, and it has well known that active oxygens also related with carcinogenesis. DEP were administered to mice with intratracheal instillation once per week for 10 weeks with each dose of 0 mg, 0.05 mg, 0.1 mg or 0.2 mg, respectively. The animals were fed four kinds of foods as follows; 1) ordinary food containing 4% corn oil, 2) high fat food containing 16% corn oil, 3) ordinary food containing 4% corn oil plus 0.02% β -carotene, 4) high fat food containing 16% corn oil plus 0.02% β -carotene, and sacrificed after one year.

Tumor formation was enhanced in the mice fed high fat diets, and lowered in the mice fed diets containing β -carotene. Especially, the suppressive effect of β -carotene on tumor formations was a marked on malignant tumors. It is well known that intake of high fat diets produces much lipid peroxides, free radicals and active oxygens in animal body, and β -carotene reduces their production. These evidences suggest that the peroxides, free radicals and active oxygens may play a role on tumor formation by DEP.

Keywords: diesel exhaust particles, mouse, lung cancer, active oxygens, β -carotene

1. はじめに

近年、大都市部の大気環境は悪化傾向をたどっている。その主な原因是自動車の排気ガス、特にディーゼル車からの排気ガスである。例えば、東京都内では NO_x 総排出量の約 7 割は自動車に由来する。ディーゼル車は NO_x 排出量がガソリン車の 2~20 倍多く、また黒煙排気微粒子の排出量はガソリン車の 30~100 倍も多い。Fig. 1 に示すように、東京都内の浮遊粒子状物質 (Suspended

particulate matters, SPM) の 3~4 割はディーゼル車に由来し (吉住ら, 1989), その比率は他の発生源に比べ圧倒的に高い。次に多いのは NO_x , SO_x から光化学反応で生じる HNO_3 や H_2SO_4 等の二次生成微粒子で、これも多くは車に由来する。

ディーゼル排気 (diesel exhaust, DE) あるいはその中の微粒子 (diesel exhaust particles, DEP) が実験動物に肺がんを発生させることはよく知られている (McClellan, 1989; Ishinishi *et al.*, 1986a;

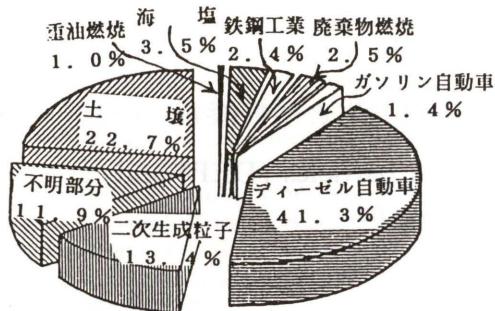


Fig. 1. Contribution rates on origins of suspended particulate matters (SPM) within Tokyo metropolitan area.

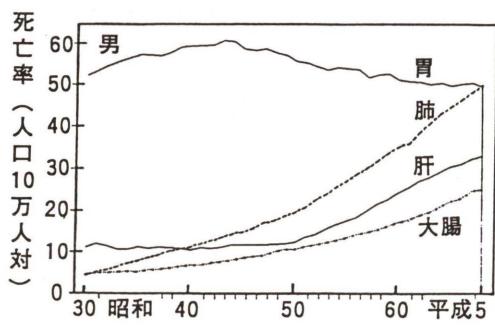


Fig. 2. Annual changes of death rates by cancers in various tissues per 100,000 persons in Japan.

Heinrich *et al.*, 1986; White *et al.*, 1983; Brightwell *et al.*, 1986; Mauderly *et al.*, 1987; Ishinishi *et al.*, 1986b; Suzuki *et al.*, 1990; Iwai *et al.*, 1986; Kawabata *et al.*, 1988). この場合、DEP を除いた残りの排気ガスには発がん性が認められないことから、DEP が発がんの原因物質であり、特に DEP 中のベンゾ[a]ピレンやニトロアレン等の発がん物質が DNA と付加物を形成し、これにより遺伝情報が攢乱され、がん化すると考えられてきた。しかし最近、DEP を含むディーゼル排気そのものと発がん物質を全く含まないカーボンブラック (CB) や酸化チタン (TiO_2) をディーゼル排気中の DEP と同じ濃度にして、ラットに 2 年間吸入させたところ、3 者の発がん率はほとんど同じであったという結果 (Mauderly *et al.*, 1994; Dungworth *et al.*, 1994) が報告され、ベンゾ[a]ピレンやニトロアレン等の DEP 中に含まれる発がん物質が実際の発がんに及ぼす寄与の程度が議論を呼んでいる。

本稿では、DNA 付加物の生成とは別のメカニズム、すなわち DEP が活性酸素を生成し、それが発がんに関与している可能性を示唆する結果について報告する。

2. 日本人の肺癌による死亡率の増加傾向とその原因について

日本人のがんによる死亡率のうち、肺がんによる死亡率は Fig. 2 に示すように年々増加の一途をたどっており、男性では 93 年度のデータで、すでに胃がんの死亡率を追い越している (厚生省統計情報部, 1994)。肺がん死亡率増加の原因として、喫煙や食事因子が圧倒的であることは論をまたない。しかし、最近増加しているのは、喫煙によって生じる扁平上皮がんではなく、喫煙のリスクが最も低い腺がんであること (土屋ら, 1982) から、他の因子として大気汚染物質の関与が考えられている。この根拠として、近年ディーゼル車が急増していること、前述のように、その排気中の DEP が肺がんの発生に関与していることを示す実験的研究が多くの研究者によって報告されており、さらに、ディーゼル排気のヒトの発がんに対するリスクの試算 (岩井 *et al.*, 1992a, 1992b) でも無視しえないレベルであること等があげられる。

一方、肺がんの増加には喫煙や大気汚染物質の他にも多くの環境因子が関与しており、中でも疫学的研究から、高脂肪、高カロリー食への食生活の変化が大きな要因になっていることが指摘されている (Carroll, 1975)。高脂肪食や高カロリー食ががんの発生を高める理由は、それらが生体内で活性酸素や過酸化脂質を増やしたり、発がんに関するプロスタグランジン類を活性化することなどによると考えられている (Lands *et al.*, 1984)。

このようなことから、DEP によるヒトの発癌リスクを評価する場合、ヒトの脂肪やカロリー摂取量に近いレベルの食事条件下の実験にもとづいてその評価を行なう必要がある。一方、 β -カロチンやビタミン A, E, C やセレニウム等の抗酸化物質を多量摂取する集団には肺がん発生率が低いという疫学的研究報告が多く、それらの中で β -カロチンの有効性を示す報告が特に多い (Stahalin *et al.*, 1991; Shekelle *et al.*, 1981; Knekt *et al.*, 1991;

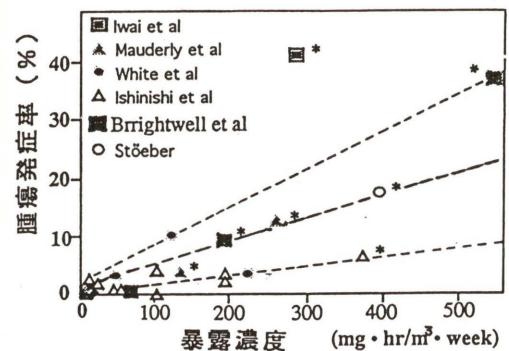


Fig. 3. Experiments on carcinogenicity of rats inhaled diesel exhausts for 2 years in six institutes in the world.

Table 1. Mutagenicity and carcinogenicity of various nitroarenes.

復帰コロニー/1nmol (TA98-S9 mix)	
100,000	1,8-DNP (+) (3.4 μ g/g) 3,6-DNBP (+) 1,6-DNP (+) (1.2 μ g/g) 3,7-DNF (+) 3,9-DNF (+) 1,3DNF (+) 1,3,6-TNP 1,3,6,8-TeNP 8-NF 3-NBP 1,3-DNP 1-NBP
10,000	3-NF (\pm) (1.2 μ g/g) 3,4-DNF 4-NP
5,000	1,6-DNBP (-) 1-NP (-) (93 μ g/g)
1,000	

Menkes *et al.*, 1986; Nomura *et al.*, 1985; Wald *et al.*, 1988; LeGardeur *et al.*, 1990).

そこで本稿では、DEP 中のニトロアレン類の変異原性と発がん性、ディーゼル排気および DEP による肺腫瘍発生に関するデーターの紹介に加えて、高脂肪食摂取による発がん率の増加と抗酸化物質の一つである β -カロチンによる DEP 発がんの抑制を検討した結果を紹介する。

3. ディーゼル排気暴露による発がん実験（世界 6 施設からの報告）

ラットを用いた約 2 年間の吸入実験でディーゼル排気が肺がんを発生させることは米、独、スイ

ス、日本等の 6 つの研究機関から報告されている (White *et al.*, 1983; Heinrich *et al.*, 1986; Iwai *et al.*, 1986; Mauderly *et al.*, 1987; Ishinishi *et al.*, 1986b; Brightwell *et al.*, 1986). Fig. 3 にはこれら 6 施設で行われたディーゼル排気 (DE) 暴露による発がん実験の結果を示した。横軸は DEP の暴露濃度と暴露時間をかけた 1 週間当たりの総暴露量を表わし、縦軸は肺腫瘍の発生率を示している。データ間にかなりのばらつきがあるが、全体的に見ると、一定の量-反応関係が認められ、星印 (*) を附けた 7 つの実験データについては統計的有意差も認められている。このことから、ディーゼル排気の発がん作用は疑いないものと思われる。なお、このディーゼル排気中には NO_2 をはじめとする多くのガス成分も含まれている。それらのうち、 NO_2 それ自身に肺がんを発生させる作用は無いが、発がんを促進する作用はある (嵯峨井 & Witschi, 1989; Ichinose *et al.*, 1991) ことが知られている。

4. DEP 中の変異原性と発がん性について

上に述べたディーゼル排気 (DE) の発がん性は、一般的には、DEP 中に含まれる発癌物質と核酸とが反応して DNA-付加物を生成し、これによって細胞の遺伝情報が攢乱されて発がんにいたると考えられている。

その発癌性の指標の一つとして、DEP 中の多環芳香族炭化水素やニトロアレン類の突然変異原性が広く調べられている。その中で、復帰コロニー数が nmol 当り 5000 個以上の物質は発癌性があるとみなされている。また、ピレンにニトロ基が 2 つ付加した 1,3-ジニトロピレン、1,6-ジニトロピレンおよび 1,8-ジニトロピレン等は復帰コロニー形成数が 10 万個以上でスーパーミュータージェンと呼ばれ、発癌性も極めて強いことが知られている。

5. 大気汚染物質による発がんと活性酸素・フリーラジカルとの関連

これまで、ディーゼル排気の生体影響に関する

Table 2. Summary of experimental studies on carcinogenicity of various nitroarenes.

ニトロアレン	動物	投与方法	投与量	発生部位および組織像	報告者
1-ニトロピレン	ラット	皮下	40 mg/ラット	皮下に纖維性組織球腫のみ	Ohgaki <i>et al.</i> (1982)
1-ニトロピレン	BALB/c マウス	皮下	2 mg/マウス	腫瘍なし	Tokiwa (1984)
1-ニトロピレン	マウス	塗布	1 mg/マウス	腫瘍なし	EL-Bayoumy (1982)
1-ニトロピレン	A/J マウス	腹腔		腫瘍	EL-Bayoumy (1984)
1-ニトロピレン	CD ラット	腹腔		乳頭腫	Imaeda <i>et al.</i> (1991)
2-ニトロフルオレン	ラット	塗布	69 mg/ラット	皮下、纖維腫	Morris <i>et al.</i> (1950)
2-ニトロフルオレン	ラット	経口	1.62 mM/kg 飼料, 8~12 カ月	前胃, 扁平上皮癌	Miller <i>et al.</i> (1955)
2-ニトロフルオレン	ラット	経口	1.62 mM/kg 飼料, 8 カ月	乳腺, 腺癌	Miller <i>et al.</i> (1962)
2-ニトロフルオレン	BALB/c マウス	皮下	2 mg/マウス	腫瘍	Tokiwa <i>et al.</i> (1984)
2-ニトロナフタレン	ラット	経口	340 g/kg 体重	膀胱, 乳頭腺	Conzelman <i>et al.</i> (1970)
5-ニトロアセナフテン	ラット	経口	24 g/ラット	小腸, 腺癌	Takemura <i>et al.</i> (1974)
3-ニトロフルオランテン	ラット	皮下	30 mg/ラット	皮下, 細維性組織球腫	Ohgaki <i>et al.</i> (1982)
6-ニトロベンゾピレン	マウス	塗布	0.05 mg/マウス	皮膚, 扁平上皮癌	EL-Bayoumy <i>et al.</i> (1982)
3-ニトロペリレン	マウス	塗布	1.00 mg/マウス	皮膚, 扁平上皮癌	EL-Bayoumy <i>et al.</i> (1982)
6-ニトロクリセン	マウス	塗布	1.00 mg/マウス	肺腫瘍 (気管内投与)	Iwagawa <i>et al.</i> (1989)
F344 ラット			0.03~0.15 mg		Tokiwa <i>et al.</i> (1984)
1,6-ジニトロピレン	BALB/c マウス	皮下	2 mg	皮下腫瘍	Otofuji <i>et al.</i> (1987)
1,6-ジニトロピレン	BALB/c マウス	皮下	1 mg	皮下腫瘍	Otofuji <i>et al.</i> (1987)
1,8-ジニトロピレン	BALB/c マウス	皮下	1 mg	皮下腫瘍	Tokiwa <i>et al.</i> (1987)
3,7-ジニトロフルオランテン	BALB/c マウス	皮下	1 mg	皮下腫瘍	Tokiwa <i>et al.</i> (1987)
3,9-ジニトロフルオランテン	BALB/c マウス	皮下	1 mg	皮下腫瘍	Tokiwa <i>et al.</i> (1987)
3,7-ジニトロフルオランテン	F344 ラット	肺	200 μ g	肺腫瘍	Horikawa <i>et al.</i> (1991)
3,9-ジニトロフルオランテン	F344 ラット	肺	200~500 μ g	肺腫瘍	Horikawa <i>et al.</i> (1991)
3-ニトロフルオレン	F344 ラット	肺	1000 μ g	肺腫瘍	Horikawa <i>et al.</i> (1991)
1,6-ジニトロベンゾピレン	F344 ラット	皮下	1000~8 μ g	肺腫瘍	

Table 3. Relationship among free radical formation, active oxygen formation and carcinogenicity of aromatic amine compounds.

化 合 物	H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	フリーラジカル生成	発がん性
N-ヒドロキシアミノアゾベンゼン	+	+	+	+
N-ヒドロキシモノメチルアミノアゾベンゼン	+	+	+	+
N-ヒドロキシ-1-アミノナフタレン	+	+	+	+
N-ヒドロキシ-2-アミノナフタレン	+	+	+	+
2-アミノ-1-ナフトール	+	+	+	+
1-アミノ-2-ナフトール	+	+	+	+
1-アミノ-4-ナフトール	+	+	+	+
1-ニトロソナフタレン	+	+	+	+
2-ニトロソナフタレン	+	+	+	+
1-アミノ-5-ナフトール	+	+	+	+
1-アミノ-6-ナフトール	+	+	+	+
1-アミノ-7-ナフトール	+	+	+	+
2-アミノ-3-ナフトール	+	+	+	+
1-ナフチルアミン	+	+	+	+
2-ナフチルアミン	+	+	+	+
1-ナフトール	+	+	+	+
2-ナフトール	+	+	+	+

研究は、その圧倒的な部分が DEP 中のベンゾ[a]ピレンやニトロアレン等の変異原性と発がん性に関するものであり、両者の間には高い相関性が認められてきた。(常盤 *et al.*, 1993)。しかし、現実に吸入実験で体内に取り込まれるベンゾ[a]ピレンやニトロアレンに匹敵する量で肺にがんが起ころうか。厳密な比較データはないが、Table 2 に示すように、動物の発がん実験のときに用いられているニトロアレン類の投与量は吸入で体内に取り込まれる時の量に比べると著しく高濃度である。このような事から、吸入による発がんの場合に DEP 中の発がん物質と DNAとの反応による DNA-付加物の生成がどの程度関与しているのかに疑問が投げかけられている。事実、Gallagher *et al.* (1994) は 7.5 mg/m³ の DEP 濃度のディーゼル排気を 2 年間吸入させたラットの肺の DNA-付加物量を ³²P-ポストラベル法で調べたところ、ニトロアレン類の DNA-付加物の生成量と発がん率との間には相関がないと報告している。

このことから、DEP による発がんには、DNA-付加物の生成の他に、DEP そのものや DEP を貪食したマクロファージ等が O₂⁻ や ·OH 等のフリーラジカルを生成すること、それらフ

リーラジカルによる DNA 損傷を介したプロモーション(促進)作用の存在等も考慮すべきであろう。たとえば、Table 3 に示すように、芳香族アミンの発がん性は活性酸素やフリーラジカルの生成と実によく相関していること(永田, 1983)が示されている。

一方、DEP による発がんが本当に活性酸素やフリーラジカルの作用と重要な関わりがあるとするならば、DEP による発がん実験においても、①DEP が活性酸素を発生することに加えて、②何らかの条件で生体内の活性酸素が増える場合には DEP の発がん率も上昇することが証明される必要がある。さらに、③そのような条件とは逆に活性酸素やフリーラジカルを消去する作用を持つ抗酸化剤等の投与によって発がん率が低下することも証明される必要がある。次項では、DEP 自身が活性酸素を生成することと、生体内で活性酸素の生成を高めていることが知られている高脂肪食、および活性酸素を消去することが知られている抗酸化剤の一つの β-カロチンの影響について、動物実験の結果を紹介する。

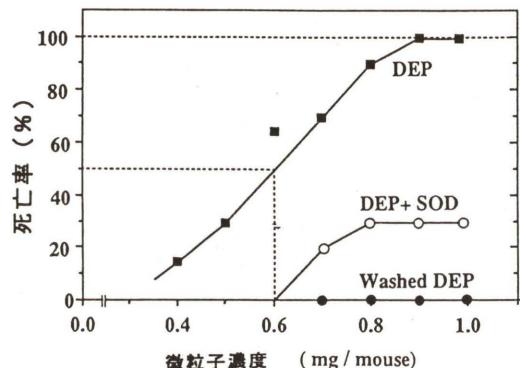


Fig. 4. Death rate curves of ICR mice instilled intratracheally diesel exhaust particles (DEP).

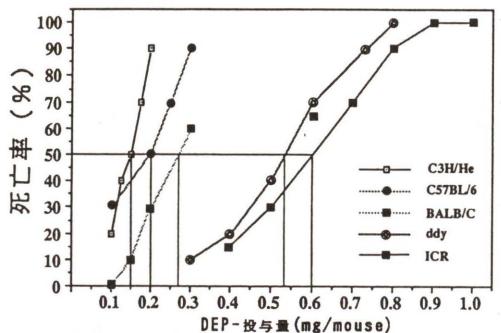


Fig. 5. Death rate curves of five strain mice instilled intratracheally diesel exhaust particles (DEP).

6. ディーゼル排気微粒子(DEP)の肺毒性と活性酸素産生能

6.1 DEPの気管内投与によるマウスの死亡率とSODの死亡率抑制効果

DEPの肺に及ぼす毒性を調べる為に、Sagai *et al.* (1993) は様々な濃度のDEPを0.05%のTween80を含むリン酸緩衝液(pH 7.4)に懸濁し、6週齢のICR系雄マウスに気管内投与し、その24時間以内の死亡率を調べた。その結果、Fig. 4に示すように、LD₅₀は0.6 mgで、0.9 mg投与では100%のマウスが死亡した。なお、このマウスの死因は血管内皮細胞傷害による肺水腫であった。このICR系マウスはDEP毒性に対して最も強いマウスで、調べた5系統の中で最も弱いマウスはC3H/Heであり、0.2 mg投与で100%が死亡した(Fig. 5)。

一方、DEPを気管内投与する1時間前に、O₂⁻

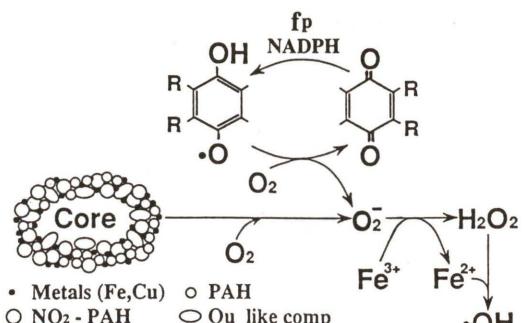


Fig. 6. Possible mechanism on the production of active oxygens such as superoxide (O₂⁻) and hydroxyl radical (-OH) from diesel exhaust particles (DEP).

を代謝する酵素のスーパーオキシドジスマターゼ(体内半減期を長くするために、ポリエチレンゴリコールを結合させた-SOD, PEG-SOD)を尾静脈から投与しておくと、100%のマウスが死亡する量のDEP投与でも、死亡率は30%以下に低下した。この結果はDEP毒性の本体はO₂⁻あるいはそれから派生した-OH等の活性酸素であることを示唆している。

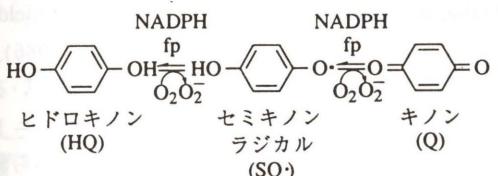
また、DEPをメタノールで充分洗浄して有機物画分を除いた残査のDEPを1.0 mg以上投与した場合、DEPを貪食した多数のマクロファージの遊走が認められたが、マウスの死亡例は1例も認められなかった。このことにより、肺水腫の原因になる血管内皮細胞傷害はマクロファージがDEP貪食時に放出するO₂⁻によるものではなく、DEP自身が产生するO₂⁻による可能性が示唆された。これらの結果より、DEPからO₂⁻を経て-OHが生成する可能なメカニズムをFig. 6のように推定した(嵯峨井、1994)。

6.2 DEPのO₂⁻, -OH等活性酸素産生能

DEPがそれ自身の化学反応によってO₂⁻を產生しているかどうかをチトクロームC還元法で確認した(Sagai *et al.*, 1993)。反応系は0.05%Tween80を含む50 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)に各量のDEPを懸濁し、ここに50 μMのチトクロームCを添加し、O₂⁻によるチトクロームC還元を550 nmの吸光度の増加で調べた。O₂⁻产生はインキュベーション時間につれて増加し、さらにこの増加は1週間以上も続いた。また、この反応

はDEPの量にも依存し、さらにこの反応系にSODを加えるとO₂⁻の発生は認められなくなった。なお、DEPを様々な有機溶媒で分画して、各画分のO₂⁻产生率を調べたところ、n-ヘキサン画分には9%存在し、ベンゼン画分には20%, メタノール画分には58%存在し、残査のDEPにも14%ほどの活性が認められた。このことから、O₂⁻はメタノール画分中に存在が知られているポリフェノールやキノン系化合物の次式に示すような自動酸化反応によって生じることが推測される(Fridovich, 1983)。

なお最近になって、この反応系にcytochrome P-450 reductase(fp)とNADPHを添加するとO₂⁻产生量は数十倍に増えることを見いだした(熊谷嘉人氏私信)。



また、DEPはそれ自身の自動酸化反応でO₂⁻を生成し、これがH₂O₂に変化した後に、DEP中に含まれている鉄、銅等の遷移金属の触媒によるフェントン反応によって-OHを产生することもESR等を用いた実験で明らかになった(Sagai *et al.*, 1993)。なお、DEPの中には鉄が126 ppm、銅が12 ppm、クロームが6 ppm、マンガンが2 ppm、その他の微量元素が含まれていた(嵯峨井、1994)。

7. DEPによる肺腫瘍発生実験

7.1 高脂肪食摂取の影響

実験ではマウスを1群30匹づつ8群に分け、DEPを1匹当たりに、0 mg, 0.05 mg, 0.1 mg及び0.2 mgずつ、週1回ずつ、10週間(10回)にわたりて気管内投与した。このマウスにコーン油4%を含む普通脂肪食及びコーン油16%含む高脂肪食を与え続け、1年後の肺腫瘍発生率を調べた。なお、飼料は舟橋農場製マウス用飼料F-2を基礎にしたもの用いた。

Fig. 7のAに示すように、普通脂肪食を摂取し、DEPを0 mg, 0.05 mg, 0.1 mg及び0.2 mgず

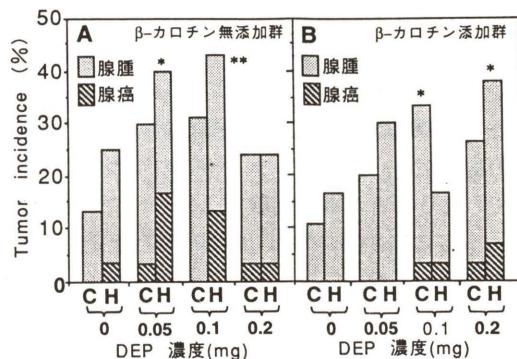


Fig. 7. Lung tumor incidences in the mice by diesel exhaust particles (DEP) and suppressive effects of lung tumor incidences by dietary β-carotene. The mice were repeatedly instilled intratracheally DEP for 10 times, once per week and they were fed the four kinds of diets for one year, respectively.

A. Lung tumor incidences in the mice fed the diet containing 4% corn oil or 16% corn oil, respectively, B. Lung tumor incidences in the mice fed the diet containing 4% corn oil + 0.02% β-carotene and 16% corn oil + 0.02% β-carotene, respectively, C. 4% corn oil group, H. 16% corn oil group, * p < 0.05.

投与されたマウスの肺の良性腫瘍(腺腫)発生率はそれぞれ13~31%となり、0.1 mg投与群の腫瘍発生率が最も高く、0.2 mg DEP投与群では低下していた。この結果には再現性が認められた。また、高脂肪食摂取マウスの肺の良性腫瘍発生率は普通脂肪食摂取群よりも高く、その発生率はそれぞれ25~43%であった。高脂肪食摂取動物の場合も0.1 mg群の腫瘍発生率が最も高かった。悪性腫瘍(腺癌)については、普通脂肪食摂取群と高脂肪食摂取群の発生率を比較すると、0.05 mg DEP投与群の普通脂肪食群では悪性腫瘍は30匹中1匹(3.3%)であったものが、高脂肪食群では5倍(16.7%)に増加し、0.1 mg DEP投与群では普通脂肪食で0匹であったのに対して、高脂肪食群では4匹(13.3%)に認められ、高脂肪食摂取群で悪性腫瘍の発生率が明らかに高くなっていた。また、悪性腫瘍も、0.05~0.1 mg DEP投与群で最も高く、0.2 mg投与群では低下していた。

発がん率が0.1 mg群より0.2 mg群で低下していた理由は、後に述べるが、DEPによる発癌には肺胞のマクロファージ等がDEPを処理しようと

して、貪食する時に放出する O_2^- やそれから派生する $\cdot OH$ や 1O_2 (一重項酸素) などの活性酸素が重要な役割を果たしていると考えられる。

一方、DEP 自身も相当の細胞毒性を持つため、その毒性によってマクロファージや肺の細胞が死んでしまうことが別の実験で認められている。このようなことから、DEP には肺細胞をがん化させる作用があるが、一定以上の濃度になるとがん化した細胞すら殺してしまうので、発がん率がどこまでも投与量に依存して上昇し続けるのではないかと思われる。これと同じ結果は、ベンゾ[a]ピレンと 1,6-ジニトロピレンの発がん実験においても認められている (Iwagawa *et al.*, 1989)。

7.2 β -カロチンの影響

β -カロチンは活性酸素やフリーラジカルを消去する作用を持っている (Rousseau *et al.*, 1992)。実験では前項と同様に、マウスの 1 匹当り、DEP を 0 mg, 0.05 mg, 0.1 mg 及び 0.2 mg ずつ週 1 回、10 週間 (10 回) にわたって気管内投与し、前記の普通脂肪食および高脂肪食にそれぞれ 0.02% (w/w) の β -カロチンを添加した飼料を 1 年間与えた。Fig. 7 の B に示すように、悪性腫瘍の発生率を比較すると、 β -カロチン添加群の悪性腫瘍発生率は無添加群より明らかに低下し、特に 0.05 mg DEP 群と 0.1 mg DEP 群で顕著であった。 β -カロチンを添加した普通脂肪食および高脂肪食を摂取した各々 0 mg, 0.05 mg, 0.1 mg 群及び 0.2 mg DEP 投与群の肺の腫瘍発生率はやはり高脂肪食群で若干高く、また Fig. 7A の β -カロチン無添加群より若干低下していた。また、0.1 mg DEP 投与群の腫瘍発生率が最も高いのも、 β -カロチン無添加群と同じであった。

以上のように、DEP による発がん率は高脂肪食で上昇し、 β -カロチンによって低下することが示され、この傾向は悪性腫瘍において特に顕著であった。このことは、DEP による発がんに活性酸素、フリーラジカルが深く関与していることを示唆していると考えられる。なお、 β -カロチン添加群のうち、0.1 mg DEP 投与マウスの普通脂肪食群の良性腫瘍発生率と高脂肪食群のそれを比べると、他の群の場合と異なり、高脂肪食群の発生率のほうが低いという結果が得られた。これは、こ

の群のマウスの途中死亡率が異常に高かったことによると思われる。死亡率が高かった主な原因是リンパ腫の発生による。

8. ディーゼル排気微粒子(DEP)による発癌研究の現状と問題点

これまで、ディーゼル排気による発がんのメカニズムは、DEP 中の発癌物質、すなわちベンゾ[a]ピレン(B[a]P) やニトロアレン等の強力な発癌物質が肺の細胞内 DNA と結合して DNA-付加物を作ることから癌化に進むと考えられてきた。事実、これら DEP 中の発癌物質が強い変異原性を示し、かつ動物実験でもこれら発がん物質が様々な臓器にがんを作る際に DNA-付加物を生成することを示す多くの研究がなされている (Gallagher *et al.*, 1994; Jackson *et al.*, 1985; Shields *et al.*, 1993; Bond *et al.*, 1988; Wong *et al.*, 1986)。

一方、このような研究が数多く報告されているけれど、DEP 中に含まれる発がん性の強いニトロアレン類の含量は DEP の 1 g 当り数 μg から数 10 μg 程度で非常に低濃度であること、一方発癌実験に用いられている量は mg 単位であり、その間の濃度の開きがありすぎること等から、ニトロアレン等が実際の発がんにどの程度関与しているかが問題とされていた。このような時に、ディーゼル排気そのものと発がん物質を全く含まないカーボンブラック (CB) や酸化チタン (TiO_2) をディーゼル排気中の DEP と同じ濃度にしたものを作成し、ラットに 2 年間吸入させ、発がん率がほとんど同じであったという結果 (Mauderly *et al.*, 1994; Dungworth *et al.*, 1994) が発表された (Table 4, 5)。このような事実は、国内においてはすでに 5 年前に Kawabata *et al.* (1988) が認めていた。彼らは有機溶媒で充分に洗浄した活性炭をラットの気管内に投与する実験をした。以上のように、活性炭や CB、酸化チタンのような発がん物質を含まない物質でも肺がんを発生させることが示された。このようなことが起こる理由は充分に明らかではないが、我々は、肺の中でマクロファージが CB 等の粒子を貪食する時に放出する O_2^- や $\cdot OH$ をはじめとする活性酸素やフリーラジカルが発がんに大きな役割を果たしているものと考えている。ま

Table 4. Lung tumor formation by chronic inhalation experiments of diesel exhaust particles (DEP) and carbon black (CB).

	暴露濃度	腫瘍発生率	B[a]P 濃度	1-NP 濃度
DEP	6.5 mg/m ³	17.9%	3900 ng/g	19000 ng/g
CB	6.5 mg/m ³	15.2%	0.6 ng/g	0.5 ng/g

1) 暴露期間: 16 hr/日, 5 日/週, 24 カ月

2) 動 物: F-344 ラット

3) 著 者: Mauderly *et al.* (1992), ITRI (U.S.A.)

Table 5. Lung tumor formation by chronic inhalation experiments of diesel exhaust particles (DEP), carbon black (CB) and titanium oxide (TiO_2)

	暴露濃度	腫瘍発生率	肺内沈着量	有機物濃度	粒 絆
DEP	7.5 mg/m ³	22%	63.9 mg/肺	33.9%	0.3 μm
CB	11.3 mg/m ³	39%	43.9 mg/肺	0.039%	0.65 μm
TiO_2	10.4 mg/m ³	32%	39.3 mg/肺	ND	0.82 μm

1) 暴露期間: 18 hr/日, 5 日/週, 24 カ月

2) 動 物: Wistar ラット

3) Gallagher *et al.* (1994), U. S. EPA, *Carcinogenesis*, 15, 1291.

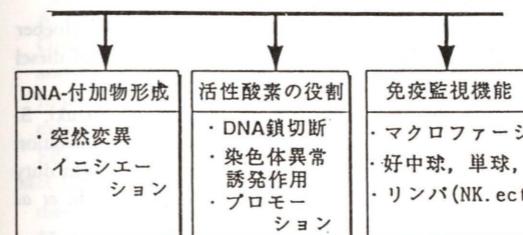


Fig. 8. Carcinogenicity of diesel exhaust particles (DEP) and the related factors.

た、このことは前項に述べた高脂肪食と β -カロチンによる DEP 発がん率の変化から活性酸素の関与を示唆した結果ともよく一致すると思われる。

これまで言ってきた DEP 中のニトロアレン等の発がん物質の実際の発がんに及ぼす意義には議論の余地が残されているが、上記のような研究結果から考えると、DEP 投与による発がんは DEP そのものが発生する活性酸素に加えて、活性炭や CB の場合と同様に、肺胞マクロファージ等の貪食細胞が DEP を貪食し、これを処理しようとすると放出される活性酸素と DEP 内に存在する微量の重金属等の作用による可能性を考えられる。

また、DEP による発がんには、DEP が肺内で発生したがん細胞を殺してしまう免疫監視細胞の機能低下をまねく可能性もあるかもしれない。最

近、 β -カロチンにこのような免疫監視機能を活性化する作用もあること (Bendich *et al.*, 1989, 1986; Tomita *et al.*, 1987; Newberene *et al.*, 1981; Leslie *et al.*, 1982; Shkler *et al.*, 1989) が知られるに及んで、免疫機能とも大きな関わりがある可能性が考えられる。

これらの事実から、今後は DEP 中の発癌物質の変異原性や DNA-付加物生成試験だけでなく、Fig. 8 に示すように、発がんにおける活性酸素の役割に加えてマクロファージや T リンパ球などの免疫監視機能の検討も重要な研究課題になるであろう。このような広範なメカニズムの検討によって、はじめて DEP 発がんの真のリスク評価も可能になるものと思われる。

9. まとめ

本稿では、ディーゼル排気 (DE) およびその中のディーゼル排気微粒子 (DEP) が腫瘍を発生することと、DEP の変異原性と発がん性との間に相関が認められていることを紹介した。また近年、活性酸素も発がんに重要な関連があることが知られているので、著者らは、DEP による発がんにも活性酸素が関与しているかどうかを調べた。実験は、DEP をマウス 1 匹当りに 0.05 mg, 0.1 mg 及び 0.2 mg を 1 週間に 1 回ずつ、10 週間にわ

たって気管内投与し、1年後に全例屠殺して肺の良性腫瘍と悪性腫瘍の発生率を調べた。この時、活性酸素の関与を調べる手段として、生体内で活性酸素の生成を高める高脂肪食を与えて、腫瘍の発生率が増加するかどうか、逆に β -カロチンを投与して活性酸素の生成を抑制した時に腫瘍発生率が低下するかどうかに焦点をあてた。その結果、DEPによる腫瘍発生率は0.1 mgのDEP投与群で最も高く、高脂肪食摂取によってその発生が促進され、特に悪性腫瘍の発生率は4~5倍にも増加した。また、 β -カロチンを飼料に添加した群では良性腫瘍の発生率は若干低下傾向を示した程度であったが、悪性腫瘍発生率の低下は顕著であった。これらのことから、DEPによる発がんには活性酸素の関与も深いことが示唆された。

さらにこれらの結果は、 β -カロチンやビタミンA、E等の抗酸化物質がヒトの肺がん発生を抑制するという疫学的調査結果を実験的にも支持するものと考えられる。さらに、ヒトの肺がんを予防するには、高脂肪、高カロリー食をさけ、 β -カロチン等の抗酸化性物質等を沢山含む緑黄色野菜の摂取が有効であることを示唆しており、動物実験の結果から、ヒトの発がんリスクを評価する場合には、食事因子の影響も考慮して行われることが望ましいことを示している。

参考文献

- Bendich, A. (1989) Carotenoids and the Immune Response, *J. Nutr.*, **119**, 112-115.
- Bendich, A. and S. S. Shapiro (1986) Effect of beta carotene and canthaxanthine on immune response of the rat, *J. Nutr.*, **116**, 2254-2262.
- Bond, J. A., R. K. Wolff, J. R. Harkeman, J. L. Mauderly, R. F. Henderson, W. C. Griffith and R. O. McClellan (1988) Distribution of DNA adducts in the respiratory tract of rats exposed to diesel exhaust, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **96**, 336-346.
- Brightwell, J., X. Fouillet, A. L. Cassano-Zoppi, R. Gatz and F. Duchosal (1986) Neoplastic and functional changes in rodents after chronic inhalation of engine exhaust emissions, *See Ref.*, Ishinishi, et al. (1986a), pp. 471-488.
- Carroll, K. K. (1975) Experimental evidence of dietary factors and hormone dependent cancers, *Cancer Res.*, **35**, 3374-3383.
- Dungworth, D. L., U. Mohr, U. Heinrich, H. Ernst and B. Kittel (1994) Pathologic effects of inhaled particles in rat lungs: Associations between inflammatory and neoplastic processes. In Mohr, U., D. L. Dungworth, J. L. Mauderly and G. Oberdörster (eds.), *Toxic and Carcinogenic Effects of Solid Particles in the Respiratory Tract*. ILSI Press, Washington, D. C. pp. 75-98.
- Fridovich, I. (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant, *Annu. Rev. Pharmacol.*, **23**, 239-257.
- Gallagher, J., U. Heinrich, M. George, L. Hendee, D. H. Phillips and J. Lewtas (1994) Formation of DNA adducts in rat lung following chronic inhalation of diesel emissions, carbon black and titanium dioxide particles, *Carcinogenesis*, **15**, 1291-1299.
- Heinrich, U., H. Muhle, S. Takenaka, H. Ernst, R. Fuhst, U. Mohr and W. Stober (1986) Chronic effects on the respiratory tract of hamsters, mice and rats after long-term inhalation of high concentrations of filtered and unfiltered diesel engine emissions, *J. Appl. Toxicol.*, **6**, 383-395.
- Horikawa, K., N. Sera, T. Otofugi, K. Munakami, H. Tokiwa, M. Iwagawa, K. Izumi and H. Ohosuka (1991) Pulmonary carcinogenicity of 3,0- and 3,7-dinitrofluoranthene, 3-nitrofluoranthene and benzo (a) pyrene in F344 rats. *Carcinogenesis*, **12**, 1003-1007.
- Ishinishi, N., A. Koizumi, R. O. McClellan and W. Stoeber (1986a) Carcinogenic and mutagenic effects of diesel engine exhaust, Elsevier Sci. Pub. (Amsterdam).
- Ishinishi, N., N. Kuwabara, S. Nagase, T. Suzuki, S. Ishikawa and T. Kohno (1986b) Long-term inhalation studies on effects of exhaust from heavy and light duty diesel engines on F344 rats. See. Ref. Ishinishi et al (1986a), pp. 329-348.
- Iwagawa, M., T. Maeda, K. Izumi, H. Otsuka, K. Nishifumi, Y. Ohnishi and S. Aoki (1989) Comparative dose response study on the pulmonary carcinogenicity of 1,6-dinitro fluoranthene, 3-nitrofluoranthene and benzo [a] pyrene in F-344 rats, *Carcinogenesis*, **10**, 1285-1290.
- Iwai, K., T. Udagawa, M. Yamagishi and H. Yamada (1986) Chronic inhalation studies of diesel exhaust gas-Morphological changes observed in intra- and extra-pulmonary organs. *J. Jpn. Soc. Air Pollut.*, **21**, 38-51.
- 岩井和郎, 河端美則, 宇田川忠, 佐藤秀隆, 林祐造(1992) ディーゼル排気粒子成分の人肺癌リスク計算. I. 動物実験からの計算値, 大気汚染学会誌, **27**, 289-295.
- 岩井和郎, 河端美則, 宇田川忠, 佐藤秀隆, 林祐造, 黒岩哲生(1992) ディーゼル排気粒子成分の人肺癌リスク計算. II. 疫学データからの計算と動物実験および人肺沈着粒子量からの計算値との比較, 大気汚染学会誌, **27**, 296-303.
- Jackson, A., L. C. King, L. M. Ball, S. Ghayourmanesh, A. M. Jeffrey and J. Lewtas (1985) Nitropyrene: DNA binding and adduct formation in respiratory tissues, *Environ. Health Perspec.*, **62**, 203-207.
- Kawabata, Y., T. Udagawa, K. Higuchi, H. Yamada, H. Hashimoto and K. Iwai (1988) Lung injury and carcinogenesis following transtracheal instillation of diesel soot particule to the lung. *J. Jpn. Soc. Air Pollut.*, **23**, 32-40.
- Knekt, P., R. Jarvinen, R. Seppanen, A. Rissanen, A. Aromaa, O. P. Heinonen, D. Alpanes, M. Heinonen, E. Pukkala and L. Teppo (1991) Dietary antioxidants and the risk of lung cancer, *Am. J. Epidemiol.*, **134**, 471-479.
- 厚生省統計情報部「人口動態統計月報(概数)」1994年6月発表。
- Lands, W. E., R. J. Kulmacz and P. J. Marshall (1984) Lipid Peroxide Actions in the Regulation of Prostaglandin Biosynthesis. *Free Radi. Biol.* (ed., W. A. Pryor) Acad. Press. Inc., Vol. VI, pp. 39-61.
- LeGardeur, B. Y., A. Lopez-S. and W. D. Johnson (1990) A case-control study of serum vitamin A, E and C in lung cancer patients, *Nutr. Cancer*, **14**, 133-140.
- Lesike, C. A. and D. P. Dubey (1982) Carotene and natural killer cell activity. *Fed. Proc.*, **41**, 331.
- Mauderly, J. L., R. K. Jones, W. G. Griffith, R. F. Henderson and R. O. McClellan (1987) Diesel exhaust is a pulmonary carcinogen in rats exposed chronically by inhalation, *Fund Appl. Toxicol.*, **9**, 208-291.
- Mauderly, J. L., M. B. Snipes, E. B. Barr, S. A. Belinsky, J. A. Bond, A. L. Brooks, I. Y. Cheng, N. A. Gillett, W. C. Griffith, R. F. Henderson, C. E. Mitchell, K. J. Nikula and D. G. Thomassen (1994) Pulmonary Toxicity of Inhaled Diesel exhaust and carbon black in chronically exposed rats. Part I. Neoplastic lung lesions. Health Effect Institute Research Report. No 68, pp. 1.
- McClellan, R. O. (1989) Health effects of exposure to diesel exhaust particles. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **27**, 279-300.
- Menkes, M. S., G. W. Comstock, J. P. Vuilleumier, K. J. Helsing, A. A. Rider and R. Brookmeyer (1986) Serum beta-carotene, vitamin A and E, selenium, and the risk of lung cancer, *New Engl. J. Med.*, **315**, 1250-1254.
- 永田親義(1983) 発がんにおけるフリーラジカル機構II. 科学, **53**, 372-380.
- Newberne, P. M. (1981) Dietary fat, immunological response and cancer in rats, *Cancer Res.*, **41**, 3783-3785.
- Nomura, A. M. Y., G. N. Stemmermann, L. K. Heilbrun, R. M. Salkeld and J. P. Vuilleumier (1985) Serum vitamin levels and the cancer of specific sites in men of Japanese ancestry in Hawaii, *Cancer Res.*, **45**, 2369-2372.
- Rousseau, E. J., A. J. Davidson and B. Dunn (1992) Protection by β -carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: Implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis, *Free Radical Biol. Med.*, **13**, 407-433.
- 嵯峨井勝, H. P. Witschi (1989) オゾンおよび二酸化窒素と肺がん—最近の知見と問題点—, 大気汚染学会誌, **24**, 1-20.
- Sagai, M., Y. Saito, T. Ichinose, M. Kodama and Y. Mori (1993) Biological effects of diesel exhaust particles. I. *In vitro* production of superoxide and in vivo toxicity in mouse, *Free Radical Biol. Med.*, **14**, 37-47.
- 嵯峨井勝編(1994) 粒子状物質を主体とした大気汚染物質の生体影響評価に関する実験的研究. 国立環境研究所特別研究報告書. SR-14.
- Shekelle, R. B., M. Lepper, S. Liu, C. Maliza, W. J. Raynor and A. H. Rossow (1981) Dietary vitamin A and risk of cancer in the Western Electric Study, *Lancet*, **28**, 1185-1190.
- Shklar, G. and J. Schwartz (1989) Tumor necrosis factor in experimental cancer regression with vitamin E, beta carotene, canthaxanthin and algae extract. *Eur. J. Cancer*, in press.
- Stahelin, H. B., K. F. Gey, M. Eichholzer, E. Ludin, F. Bernasconi, J. Thurneyens and G. Brubacher (1991) Plasma antioxidant vitamins and subsequent cancer mortality in the 12-year follow-up of the prospective Basel study, *Am. J. Epidemiol.*, **133**, 766-775.
- Shields, P. G., C. C. Harris, S. Petruzzelli, E. D. Bowman and A. Weston (1993) Standardization of the 32 P-postlabeling assay for polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, *Mutagenesis*, **8**, 121-126.
- Suzuki, T., T. Nakajima, K. Maejima, A. Kato, Y. Takaki, N. Kuwabara, A. Hisanaga and N. Ishinishi (1990) Long-term inhalation experiments on the health effects of diesel exhaust. The findings on F-344 rats in carcinogenicity experiment in terms of dose response relationship, *J. Jpn. Soc. Air Pollut.*, **25**, 192-205.
- 常盤寛(1983) ニトロアレンの変異原性と発癌性. 代謝 Vol. 20(臨時増刊号「癌'83」) pp. 3-11.
- 常盤寛(1992) 芳香族炭化水素ニトロ誘導体の変異原性, 癌がん性とその危険度, 大気汚染学会誌, **27**, 78-84.
- 土屋永寿, H. F. Concetti, 脇本謙二, 北川知行, 木下巖, 中川健, 菅野晴夫(1982) 癌研病院における全肺癌症例の組織型別頻度と年次推移, 癌の臨床, **28**, 196-203.
- Tomita, Y., K. Himeno, K. Nemoto, N. Endo, T. Hirohata (1987) Augmentation of tumor immunity against synergistic tumors in mice by beta-carotene. *J. Natl. Cancer Inst.*, **78**, 679-680.
- 吉住邦雄, 渡辺武春, 石井康一郎, 吉岡秀俊, 朝来野国彦, 田村健夫, 菅道彦, 吉野昇(1989) 東京都における浮遊粒子状物質へのリセプターモデルによる発生源寄与の評価, 東京都環境科学研究所年報, pp. 3-10.
- Wald, N. J., S. G. Thompson, J. W. Densem, J. Boreham and A. Bailey (1988) Serum vitamin E and β -carotene and subsequent risk of cancer. Results from the BUPA study, *Br. J. Cancer*, **57**, 428-433.
- White, H., J. J. Vostal, H. L. Kaplan and W. F. MacKenzie (1983) A long-term inhalation study evaluates the pulmonary effects of diesel emissions, *J. Appl. Toxicol.*, **3**, 332-300.
- Wong, D., C. E. Mitchell, R. K. Wolff, J. L. Mauderly and A. M. Jeffrey (1986) Identification of DNA damage as a result of exposure of rats to diesel exhaust, *Carcinogenesis*, **7**, 1595-1597.

DNA 損傷機構と生物作用

The Mechanisms of Oxygen Radical-Induced Damage of DNA
and Its Biological Effects

桑原幹典, 平岡和佳子*, 夫馬香里, 郷司典子,
大島秀基, 佐藤文昭

Mikinori Kuwabara, Wakako Hiraoka*, Kaori Fuma, Noriko Gouji,
Hideki Ohshima and Fumiaki Sato

北海道大学獣医学部放射線学講座
060 札幌市北区北 18 条西 9 丁目
*明治大学理工学部物理学科
214 川崎市多摩区東三田 1-1-1

Department of Radiation Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060
*Department of Physics, School of Technology and Science, Meiji University, Kawasaki 214

(受付: 1994年9月14日; 受理: 1994年9月14日)

Summary

When Chinese hamster V79 cells were exposed to X-rays in the presence of the spin trap α -phenyl-*t*-butylnitrone (PBN), enhancement of X-ray-killing effects was observed. Since X-rays are known to produce OH radicals by degrading intracellular water and to induce damage in DNA by the resulting OH radicals, the effects of PBN on the induction of both base alterations and strand breaks in X-irradiated cells were examined. PBN was observed to inhibit the OH-radical-induced formation of double-strand breaks and to enhance the OH-radical-induced formation of base alterations including 8-hydroxydeoxyguanosine. Although several investigations indicated that the formation of double-strand breaks of DNA was mainly responsible for the X-ray-induced cell death, the present study proved that the accumulation of OH-radical-induced base alterations as 8-hydroxydeoxyguanosine was also responsible for cell death.

Keywords: oxygen radicals, α -phenyl-*t*-butylnitrone, 8-hydroxydeoxyguanosine, DNA double-strand break, cell death

1.はじめに

活性酸素によるDNA損傷がどのような生物作用を有しているかを研究することは容易なことではない。その理由として、細胞を活性酸素処理する際、DNA損傷のみを選択的に誘発することが困難なこと、つまり細胞膜や細胞質中の酵素等の損傷も同時に誘発され、それらも生物学的影響を有すること、さらに仮にDNA損傷のみを誘発したとして、数多く生成するDNA損傷のうちどの損傷がどのような生物作用を有するかを決定することが極めて困難なこと、などが挙げられる。本

研究では、最初の問題を克服するため、細胞をX線照射することによりDNA以外の成分への損傷誘発を出来る限り抑制する方法を探った。Fig. 1を見ていただきたい。Fig. 1(a)は細胞の模式図と10%生存率を与えるに必要な活性酸素濃度を細胞核、細胞質、細胞外に別けて記載したものである。細胞の活性酸素処理方法は種々あるが、X線照射により10%生存率(チャイニーズハムスターV79細胞の例)を与えた場合、約10 Gyの線量を必要とし、それは細胞核内、細胞質、細胞外を問わず2.2 μ MのOHラジカル生成に相当す

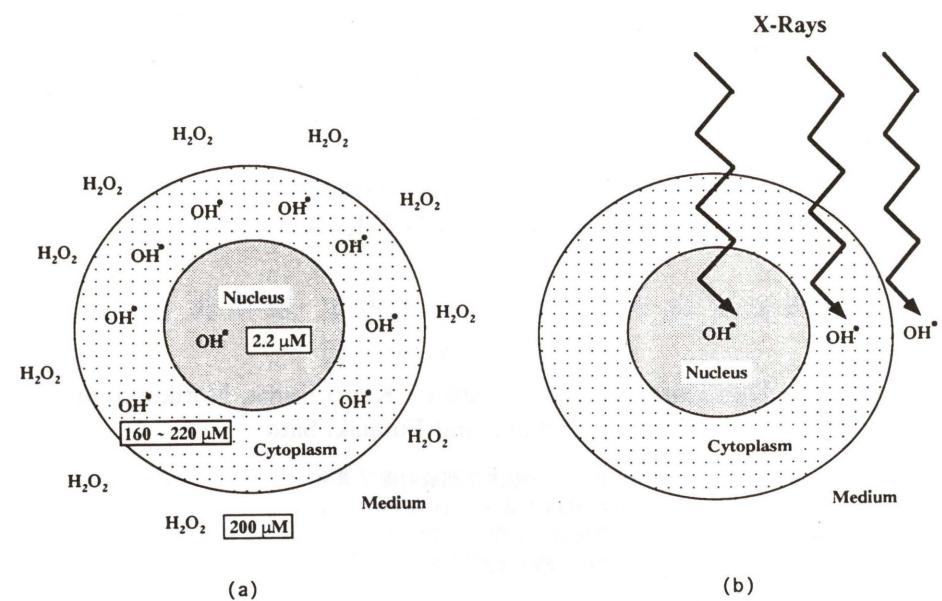


Fig. 1. (a) The concentration of reactive oxygens required for 10% cell survival when they are selectively introduced to cell nucleus, cytoplasm and outside of cell. (b) When 10% cell survival was induced by X irradiation, no critical lesions are induced in cytoplasm and outside of cell.

る。低速電子線を用い細胞質にのみエネルギー付与し、細胞核に電子線が届かない方法により、生存率を求めたデータ (von Sonntag, 1987a) を参考にすると 10% 生存率には OH ラジカル量として 160~220 μM が必要量として計算される。つまり、細胞核に活性酸素を生成し DNA 損傷を引き起こす方が、細胞質に活性酸素を生成し細胞質成分に損傷を引きこす方法よりはるかに効率良く細胞死をもたらす。一方、過酸化水素 (H₂O₂) を OH ラジカル源として細胞を処理すると、200 μM で 10% 生存率を与える (チャイニーズハムスター V79 細胞の場合)。この計算により求められた細胞質 OH ラジカル濃度と細胞外に H₂O₂ を添加する方法により実験的に求められた濃度との見事な一致は、H₂O₂ による細胞死は細胞質における損傷によるものであることを明白に物語っている。このように X 線を用いれば、核内では 10% 生存率を与えるに充分の活性酸素濃度でも、細胞質では細胞死に要求される量のわずか百分の一しかなっていない。このことから、X 線は細胞質において致命的な損傷を与えることなく、効率良く核内 DNA 損傷を与え、細胞死を引き起こすと結論される (Fig. 1(b))。

次に、具体的な DNA 損傷のタイプと細胞死との関係についてであるが、これについては種々の DNA 損傷のうち 2 本鎖切断が細胞死と密接に関係していることが明らかにされている (Hiraoka et al., 1990; Kuwabara et al., 1991)。問題は塩基損傷であるが、4 つの塩基に由来する変性物について、その幾つかに修復酵素が存在していることから (Wallace, 1979)，それらが細胞に大きい負荷を与えることは十分に推察できる。それは、例えば、突然変異や発癌因子としての可能性が指摘されていることからも明らかである。しかしながら、細胞死との関係となると未だ明白になっていないようと思われる。このような問題を解決するために、例え DNA の 2 本鎖切断誘発には何ら影響を与える (あるいはむしろ 2 本鎖切断誘発を抑制し)、塩基変性のみを増加あるいは減少させるような性質を持った化合物があれば、それを用いて何らかの情報が得られるかも知れない。この研究に先立ち、著者らは OH ラジカルが誘発する DNA ラジカルをスピントラッピング法により研究しているうちに、スピントラップ剤が DNA 鎮切断の前駆ラジカルをトラップすることにより、その切断を抑制すること (Kuwabara et al., 1993)、

またプリン塩基の酸化物 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (OH[·]dG) の前駆ラジカルと反応した際、その生成を促進することを見出した (大島ら, 1993)。さらに、5'-デオキシチミジン-1-リン酸 (5'-TMP) と OH ラジカルとの反応において見られる塩基と糖との分離を、スピントラップ剤が阻害すること (Kuwabara et al., 1989)，またスピントラップ剤は OH ラジカルによる蛋白質の分解反応を促進し、蛋白質間クロスリンク形成を阻害する (Inanami et al., 1993) ことなども観察され、スピントラップ剤がラジカル反応に介在し、スピントラップ剤としての本来の役割とともに最終生成物の収率に様々な影響を与えることを発見した。このようにスピントラップ剤が OH ラジカル誘発 DNA 鎮切断を抑制し、塩基変性を促進する性質を有しているという本研究の目的に添う化合物であることから、この化合物を培養哺乳動物細胞の X 線致死作用に適用し、その効果を調べた。

2. 核酸ラジカルとスピントラップ剤の反応

放射線 (X 線等) が H₂O を分解し、OH ラジカルやスーパーオキシド (O₂[·]) を生成するメカニズムは以下の通りである。



放射線のエネルギー付与は重量比に従って分けられるので、圧倒的に水の重量比が高い細胞の場合、放射線のエネルギーは OH ラジカルに変換され、その酸化作用により障害が与えられる。多くの還元剤が放射線障害を軽減させる理由がここにある (von Sonntag, 1987b)。OH ラジカルは不飽和 2 重結合に付加反応したり、飽和炭素から水素を引き抜く作用を有していることが知られているため、例え DNA と反応する際塩基の 2 重結合への付加反応、デオキシリボース分子からの水素 (H) 引き抜き反応がおこる (Fig. 2)。

当然のことながら、塩基との反応は塩基変性へ、デオキシリボースとの反応は DNA 鎮切断へ

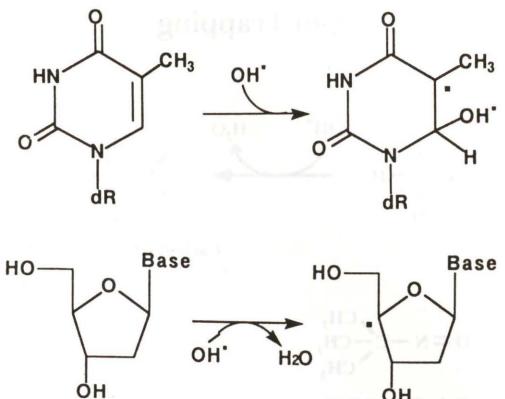


Fig. 2. OH radical-induced precursor radicals of DNA damage. This figure shows examples of thymidine. OH radicals add to the double bond of thymine base to form the precursor of base alterations and abstract hydrogen at the C4' of deoxyribose to form the precursor of strand breaks of DNA.

と進んでいくものと推察される。しかしながら、Fig. 2 に示したような反応、つまり塩基や糖でのラジカル形成、さらにこれらのラジカルがどのような変性物になっていくかについては明白な証明が得られていない。Teoule (1987) は総説の中で、OH ラジカルがプリンおよびピリミジン塩基と反応した際、様々な生成物が生じることを報告しているが、OH ラジカルが 2 重結合に付加反応するという考え方と最終生成物の化学構造式から OH ラジカル反応サイトと最終生成物との関連を推論している。

Fig. 2 のような核酸ラジカルの誘発を証明する場合、良く利用されるのがスピントラッピング法である。スピントラッピング法の原理を Fig. 3 に示す。この場合、OH ラジカルが炭素に結合した水素を引き抜く例を示している。生成した炭素ラジカルはスピントラップ剤 (この場合、2-メチル-2-ニトロソプロパン: MNP) 在存下でトラップ剤と反応し、ニトロオキシドフリーラジカルに転換する (スピニアダクトの形成)。このラジカルは t-ブチル基により保護され、比較的安定な長寿命ラジカルであるので、通常の電子スピン共鳴 (ESR) スペクトロメーターにより定量的・定性的測定が可能になる。ただし、ESR スペクトルはニトロオキシドラジカルのそれであり、Fig. 2 のような核

Spin Trapping

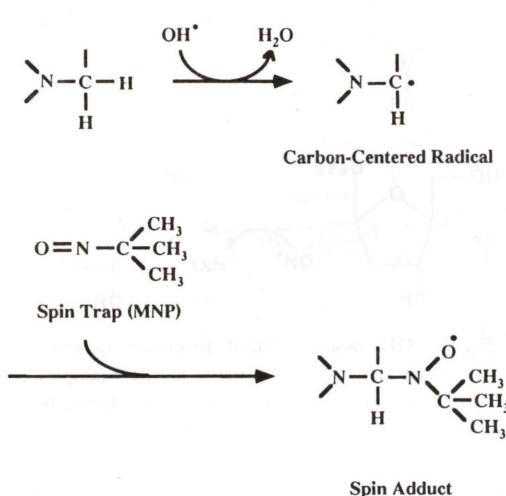


Fig. 3. The formation of spin adduct by spin-trapping reaction. OH radical first induces a carbon-centered radical by abstracting a hydrogen and the resulting radical is transformed to nitroxide free radical by spin trapping reaction with spin-trap 2-methyl-2-nitrosopropane (MNP).

酸ラジカルを直接観察している訳ではない。したがって、Fig. 2 のようなラジカルを同定する場合、ニトロオキシラジカルのスペクトルから間接的に構造を推定することになる。ただ、このスピントラッピング法の利点は、仮に同時に数種類のスピンドラジカルが形成されても、HPLC 等でそれぞれの分離が可能になるので、生成したラジカルの種類について正確な情報が得られる。また、場合によってはかなり正確にラジカルの構造の同定も可能になる。Fig. 4 に DNA の 5'-TMP の例を示す。5'-TMP とスピントラップ剤 MNP の水溶液を N_2O ガスで飽和した後、X 線照射したもの HPLC で各スピンドラジカルに分離し、その各々を ESR スペクトロメーターで調べた結果である。左側は ESR スペクトル、右側はそのスペクトルから推定されたラジカル構造である。OH ラジカルが最低 6 種類のラジカルを 5'-TMP に誘発したことわかる。どの ESR スペクトルにもニトロオキシラジカルのそれに特徴的な 3 つの成分が見られている。スペクトル a, b, e のように各成分が

Thymidine 5'-monophosphate

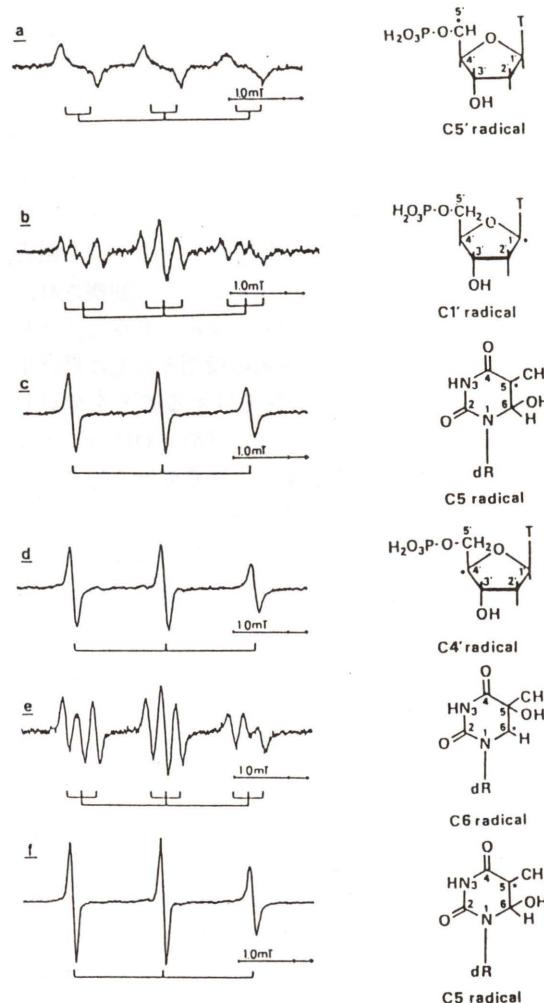


Fig. 4. ESR spectra obtained from HPLC fractions of X-irradiated (5.4 kGy), N_2O -saturated aqueous solution of 5'-TMP (5 mM) and MNP (10 mM). Left; ESR spectra. Right; Radical structures identified by analyzing the corresponding ESR spectra. a, b and d are precursor radicals of strand breaks and c, e and f are precursor radicals of base alterations.

さらに細かく分離しているものもある。この微細構造がラジカル構造の推定に役立つ。詳細は原論文 (Kuwabara *et al.*, 1989) にゆずるが、結果として、3 種類のデオキシリボースラジカルと 2 種類のチミン塩基ラジカルが同定された。c と f は互いにステレオアイソマーの関係にあるものと思われる。

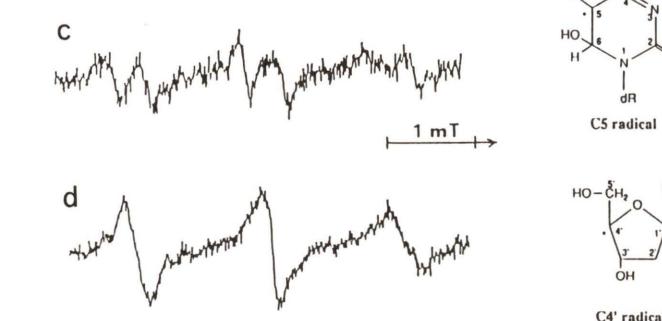
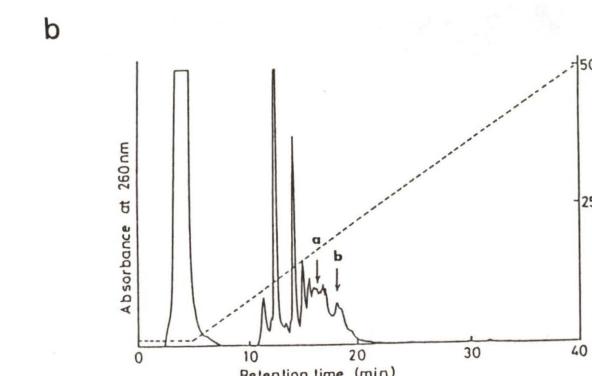


Fig. 5. (a) ESR spectrum of X-irradiated (2.7 kGy), N_2O -saturated 1 ml of aqueous solution containing oligo(dC)₁₀ (1 mg) and MNP (1.3 mg). (b) HPLC elution profile after the oligo(dC)₁₀ was digested with venom phosphodiesterase to release mononucleotide spin adducts. (c) Left; ESR spectrum obtained from fraction a. Right; Radical structures identified from the ESR spectrum. (d) Left; ESR spectrum obtained from fraction b. Right; Radical structures identified from the ESR spectrum.

れる。これらのうちデオキシリボースラジカルが DNA 鎖切断と関係していることは推定できるが、それを直接的に証明するため、DNA モデルとしてシトシンならびにチミンのオリゴヌクレオチド、oligo(dC)₁₀ と oligo(dT)₁₀ を合成し、これらについてスピントラッピング法を適用するとともに、それらの切断の頻度を測定した。

実験的には、10 mer のオリゴヌクレオチドを合成するとともに、まずその 5' 末端を ^{32}P で標識オリゴヌクレオチドとスピントラップ剤 MNP を含む水溶液を N_2O 飽和し、X 線照射した。サンプルについて行ったスピントラッピングの例を示す。

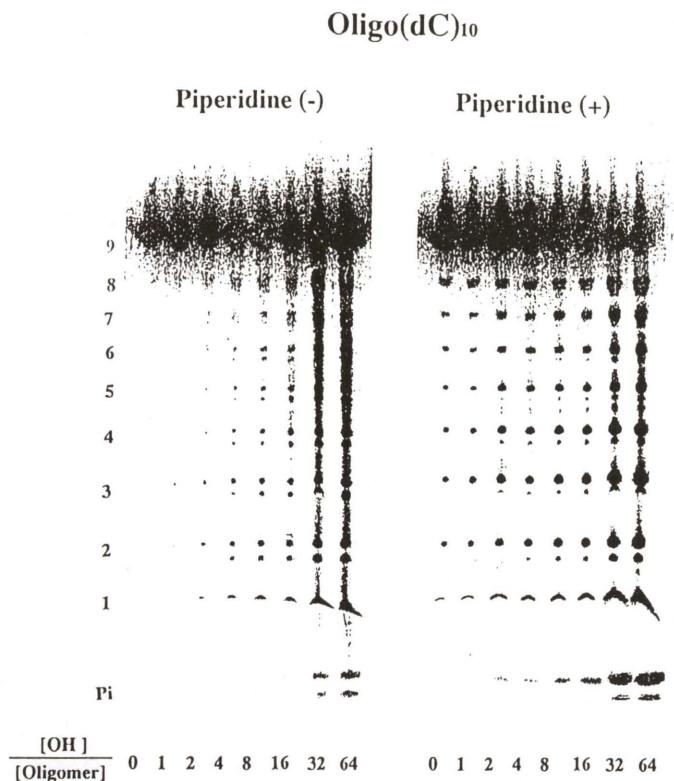


Fig. 6. PAGE of X-irradiated ^{32}P -5' end-labeled oligo(dC)₁₀. The numbers at left hand side and the bottom indicate the corresponding monomer to 9mer and the molar ratio of OH radicals to oligonucleotides, respectively. Left; PAGE pattern immediately after X irradiation. Right; PAGE pattern after X irradiated and subsequently treated with piperidine.

一番上はオリゴヌクレオチドスピントラップのESRスペクトルである。このスペクトルは分子量の高い分子に特有のブロードなスペクトルとなっている。このため、ラジカル構造の同定は不可能である。次の図はホスホジエステラーゼ処理し、モノヌクレオチドに分解した後のHPLCプロフィールである。幾つかのピークのうちフラクションaとbにESRスペクトルが観察された。それぞれのスペクトルをaとbに示す。シトシンヌクレオチドの結果を参考に(Hiraoka *et al.*, 1990), スペクトルaはシトシン塩基のC5ラジカルに、スペクトルbはデオキシリボースのC4'ラジカルに同定された。X線により生じたOHラジカルがoligo(dC)₁₀に反応し、塩基への付加反応とデオキシリボースからの引き抜き反応によりそれぞれのラジカルを形成したと思われる。Fig. 4の5'-TMPの例から見れば、さらに多くのラジカルが誘発されると考えられるが、実際には2種類のラジカルしかトラップされなかった。オリゴヌクレオチドとモノヌクレオチドとの間でOHラジカルの反応性に違いがあるのか、あるいはスピントラップ剤の反応性に違いがあるのか良くわからない。ただ、分子量が高くなると変性塩基の種類が減少する傾向にあると言われている。

次に、これらのラジカルが実際に塩基変性や鎖切断の前駆体になっていることを証明する必要がある。そのため、塩基変性物や鎖切断の収率がスピントラップ剤の存在によりどのように変化するかを調べた。仮に、Fig. 5のC4'ラジカルがオリゴヌクレオチド鎖切断(フラグメント化)に結び付くものであるなら、スピントラップ剤によるこのラジカルのトラップは切断の頻度を低下させるはずである。このような考え方の下で実験を行った結果がFig. 6である。これは、スピントラップ剤

MNP非存在下でのOHラジカル反応後のoligo(dC)₁₀のPAGEパターンである。モノマーから9merに至るフラグメントが観察されている。さらに、OHラジカル量に依存してフラグメント化が増加している。以上のことから、OHラジカルが確かにオリゴヌクレオチド鎖切断を誘発していることは明らかである。しかも、各フラグメントがほぼ等しい強度を示すことから、OHラジカルはオリゴヌクレオチドの10個のデオキシリボース各々に対し、等しい確率で反応していることがわかる。各フラグメントはさらに一対のスポットから成り立っている。これはフラグメントの3'-末端が2種類生じていることを意味している。X線照射後オリゴヌクレオチドをさらにピペリジン処理したところ、上方のスポットの強度が増加した。ピペリジン処理は塩基変性を鎖切断に変換し、その際3'-リン酸末端をもたらすので(Maxam and Gilbert, 1980)、一対のスポットのうち上方が3'-リン酸末端を有するフラグメントであると結論された。下方のスポットに対応するフラグメントの3'-末端はHenner *et al.*(1982)により提唱された構造(3'-リン酸-グリコレート)と考えられる。スピントラップ剤MNP存在下で同様の実験を行い、フラグメント化の程度をOHラジカル量に対しプロットした結果がFig. 7である。この場合、ダイマー生成の測定例を示している。他のフラグメントについてもほぼ同じ結果が得られている。MNP非存在下ではOHラジカル量の増加にともないダイマー生成すなわちフラグメント化が直線的に増加する。MNPを添加すると、フラグメント化の抑制が見られる。MNP自身もOHラジカルと反応するので、フラグメント化の抑制は単なるOHラジカルのスカベンジによる可能性がある。そこで、実際にオリゴヌクレオチドと反応したOHラジカル量を計算で求め、それに対するダイマー生成をプロットしたところ、やはりフラグメント化の抑制が見られた。MNPがOHラジカルのスカベンジのみでフラグメント化を防護するならば、計算により得られた直線はコントロールの直線に一致するはずである。したがって、この結果は、MNPがFig. 5で示したC4'ラジカルをトラップしたことにより切断

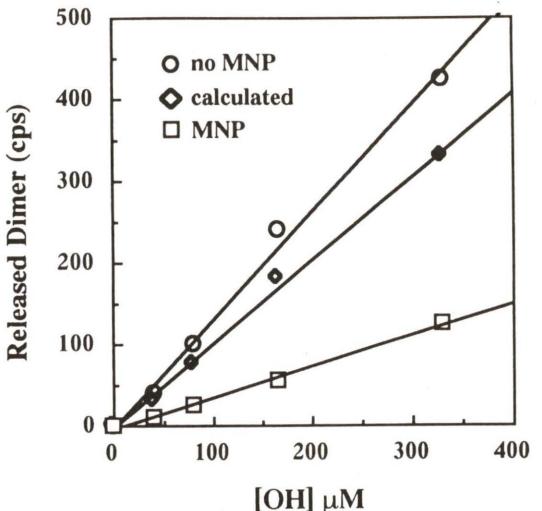
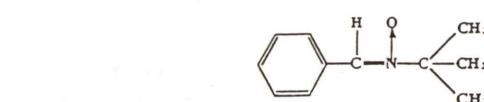


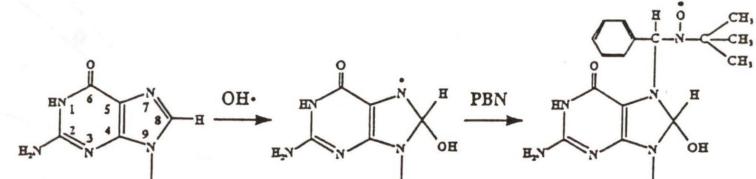
Fig. 7. Plots of released dimer vs OH-radical concentration as measured from PAGE patterns shown in Fig. 6. ○, X irradiation of aqueous solution containing oligo(dC)₁₀ alone. □, X irradiation of aqueous solution containing oligo(dC)₁₀ and MNP. ◇, Plot of released dimer vs OH radical concentration which actually reacted with oligonucleotide.

を防護したものと考えられた。このように、デオキシリボースラジカル(C4'ラジカル)のトラップは一方ではESRスペクトルとして観察され、他方ではそれをフラグメント化の抑制に反映した形で観察された。このように、C4'ラジカルがDNA鎖切断の前駆体であることが証明された。

塩基ラジカルのトラップの場合どうであろうか? Fig. 5にシトシン塩基C5ラジカルが示されているが、興味ある結果がグアニン塩基の方で得られているので、それを述べる。DNAのOHラジカル反応生成物の一つにoh⁸dGがある(Kasai and Nishimura, 1984; Dizdaroglu, 1985)。これはOHラジカルがグアニンに反応し、生成するものである。この物質の生成は電気化学検出器(ECD)により簡単に確認することができる。これについても、オリゴヌクレオチドの時と同様の実験を行った(大島ら, 1994)。すなわちサンプルとしてDNA成分であるデオキシグアノシン(2'-dG)を用い、これにスピントラップ剤(この場合、PBN)を共存させ、X線照射後ESRスペクトルの測定とoh⁸dG生成を調べた。Fig. 8はPBN



α -phenyl-t-butylnitron (PBN)



2'-dG

Fig. 8. Guanine N7-centered radical induced by the reaction of 2'-dG with OH radical and the subsequent spin-trapping reaction by PBN. The chemical structure of PBN is also shown at the top of figure.

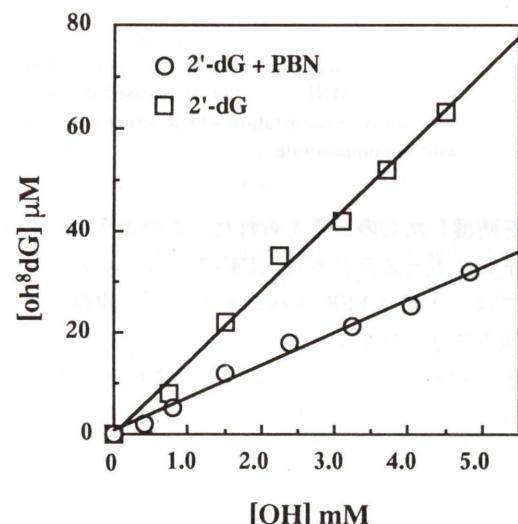


Fig. 9. Plots of OH-radical-induced oh^8dG vs OH-radical concentration. ○, X irradiation of aqueous solution containing 2'-dG (8 mM) alone. □, X irradiation of aqueous solution containing 2'-dG (8 mM) and PBN (8 mM).

の化学構造と予想されるスピントラッピング反応を示したものである。

OH ラジカルはまず、グアニン塩基の C8 に付加反応し、N7 ラジカルを誘起する。次いで、N7 ラジカルは PBN によりスピントラップされ、ニトロオキシドフリーラジカルに変換される。その結果、このスピニアダクトに由来する ESR スペクトルが観察されると同時に、もし N7 ラジカル

が oh^8dG の前駆体であるなら、このスピニアダクトの形成は oh^8dG 生成の抑制をもたらすことになるはずである。以下その結果を示す。まず、 oh^8dG 生成への PBN の影響の方から述べる。Fig. 9 は OH ラジカル量を横軸に oh^8dG 生成量を縦軸にプロットしたものである。PBN が共存すると、PBN による OH ラジカルのスカベンジ作用により 2'-dG の oh^8dG への変換が見かけ上抑制される。したがって、グラフはその点を補正し、プロットしたものである。結果は予想に反し、PBN 存在下の方が非存在下より高い oh^8dG 生成収率を与えた。グラフの傾きから、ほぼ 2 倍の生成収率であることがわかる。この結果は、Fig. 9 で示したようなスピントラッピング反応すなわちスピニアダクト形成反応は起こっていないことを示唆している。そこで、ESR スペクトルを調べたところ、Fig. 10 で示したようなスペクトルが得られた。Fig. 10(A) は PBN 水溶液を N_2O ガス飽和後、X 線照射した時の ESR スペクトルである。Fig. 10(B) は PBN に 2'-dG を加え、 N_2O ガス飽和後、X 線照射した時の ESR スペクトルである。両スペクトルを比較してみると、水素 (H) あるいは水和電子 (e_{aq}^-) が PBN にトラップされたスピニアダクト (PBN-H) と、OH ラジカルが PBN にトラップされたスピニアダクト (PBN-OH) の 2 種類のスペクトルが見られている。H あるいは

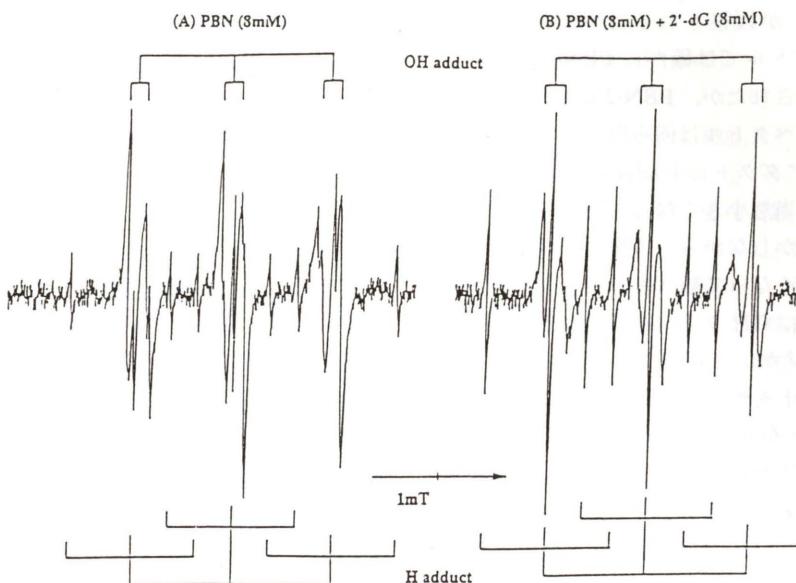
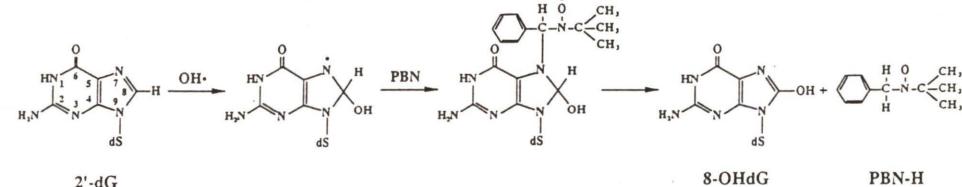


Fig. 10. (A) ESR spectrum of X-irradiated, N_2O -saturated aqueous solution of PBN (8 mM) alone. (B) ESR spectrum of X-irradiated, N_2O -saturated aqueous solution of PBN (8 mM) and 2'-dG (8 mM). Bars at the top of figure indicate the hyperfine structure of ESR signal corresponding to PBN-OH adduct and bars at the bottom of figure indicate the hyperfine structure of ESR signal corresponding to PBN-H adduct.

In the Presence of PBN



In the Absence of PBN

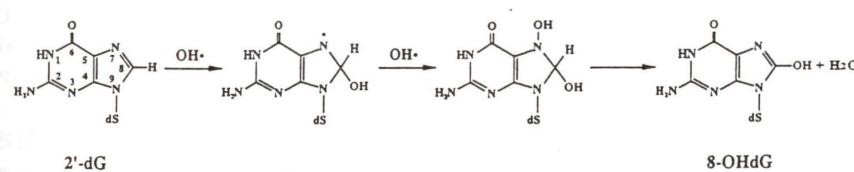


Fig. 11. The mechanisms of OH radical-induced formation of oh^8dG from 2'-dG in the presence and absence of PBN.

e_{aq}^- は (3), (4) 式により生成される。この場合、水溶液が N_2O 饱和されているので e_{aq}^- の大部分は OH ラジカルに変換されるため、PBN-H アダクトの ESR スペクトルは相対的に小さく、PBN-OH アダクトのそれは大きく観察される (Fig. 10(A))。これに対し、2'-dG が加わった場

合、PBN-H アダクトのスペクトルは大きくなり、PBN-OH アダクトのそれは小さくなっている (Fig. 10(B))。2'-dG が加わればその濃度に応じて OH ラジカルはスカベンジされ、その分 PBN-OH アダクト量は減少し、代わりに Fig. 8 に示したように PBN と 2'-dG 間のスピニアダクトによる

ESRスペクトルが観察されるはずである。Fig. 10(B)のスペクトルでは確かにPBN-OHアダクトの減少は観察されたが、PBN-2'dGのスピノアダクトによるスペクトルは何ら得られていない。一方、PBN-Hアダクトにも同様な理由が成り立つはずであり、当然小さくなつて観察されるものと思われた。しかしながら、予想とは逆にそのスペクトルは大きくなつて観察された。以上のことから推察すると、OHラジカルにより誘発された2'-dGのN7ラジカルがPBNと反応する際、安定なスピノアダクトを形成することは無く、むしろPBN-Hアダクトを形成するような反応を起こすのではないかと思われる。この時同時にoh⁸dGも生成され、この結果PBN存在下であっても阻害されること無くoh⁸dGが誘導されたものと思われる(Fig. 11)。

PBN非存在下でのoh⁸dG生成については、その収率がPBN存在下の二分の一であったことから(Fig. 9)，次のような説明が可能であるように思われる。OHラジカルにより誘発されたN7ラジカルは引き続きもう1個のOHラジカルと反応し、oh⁸dGとH₂Oを与える(Fig. 11)。このように考えれば、2個のOHラジカルが1個のoh⁸dGを与え、その生成効率がPBN存在下の二分の一になることを説明することができる。デオキシアデノシンでも似たようなESRの結果が得られており、このような現象はプリン塩基に共通なものであると思われる。

このように、スピントラップ剤は、一方ではデオキシリボースラジカルをトラップし、それによりオリゴヌクレオチド鎖切断誘発を抑制し、他方ではグアニン塩基ラジカルと反応し、oh⁸dG生成を促進する性質を有する。このようなスピントラップ剤の性質が細胞レベルでも発揮されれば、それは先に述べたように塩基損傷と細胞致死との関係について興味ある情報をもたらしてくれるかも知れない。次章でPBNを培養細胞に応用した例を述べる。

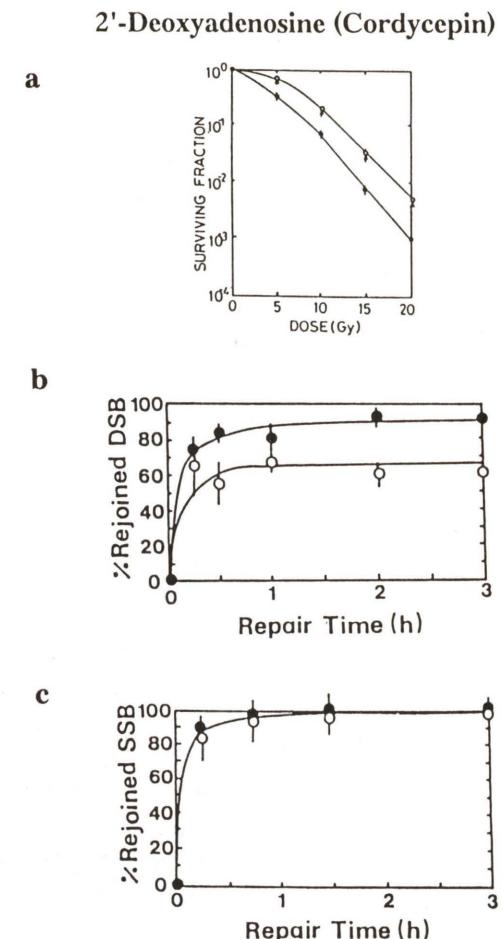


Fig. 12. (a) The dose-response curves of X-irradiated Chinese hamster V79 cells. The upper curve was obtained by X irradiation alone. The lower curve was obtained by X irradiation and subsequently incubating cells with cordycepin for 3 h. (b) Repair kinetics of X-ray-induced DNA double-strand breaks. ●, X irradiation alone. ○, X irradiation and treating with cordycepin.

3. スピントラップ剤存在下でX線照射された培養哺乳動物細胞のDNA鎖切断、塩基変性ならびに生存率

スピントラップ剤の結果に入る前に、DNA 2本鎖切断の誘発と細胞死が密接に関係していることを示す。Fig. 12はヌクレオシド抗生物質の一つであるコルジセピンを用いて、X線照射チャイニーズハムスターV79細胞の生存率、DNA 1本鎖および2本鎖切断の修復カイネティックスに対するその影響を調べたものである(Hiraoka *et al.*,

1990)。細胞生存率はコロニー形成法で求めた。コルジセピン処理の場合、細胞をX線照射後コルジセピン添加し、3時間インキュベート、洗浄後コロニーを作らせた。DNA 1本鎖および2本鎖切断の測定は、それぞれDNAのアルカリおよび中性フィルター溶出法により行われた。DNA鎖切断修復のカイネティックスは、X線照射後DNA修復のため一定時間(修復時間)細胞をインキュベートした後、細胞を溶解し、DNAを分析した。コルジセピン処理の場合、X線照射終了と同時に添加し、修復時間インキュベートした。図に見られるように、コルジセピン処理によるX線細胞致死効率の促進が観察された(Fig. 12a)。一方、DNA 1本鎖および2本鎖切断修復のカイネティックスを調べたところ、2本鎖切断

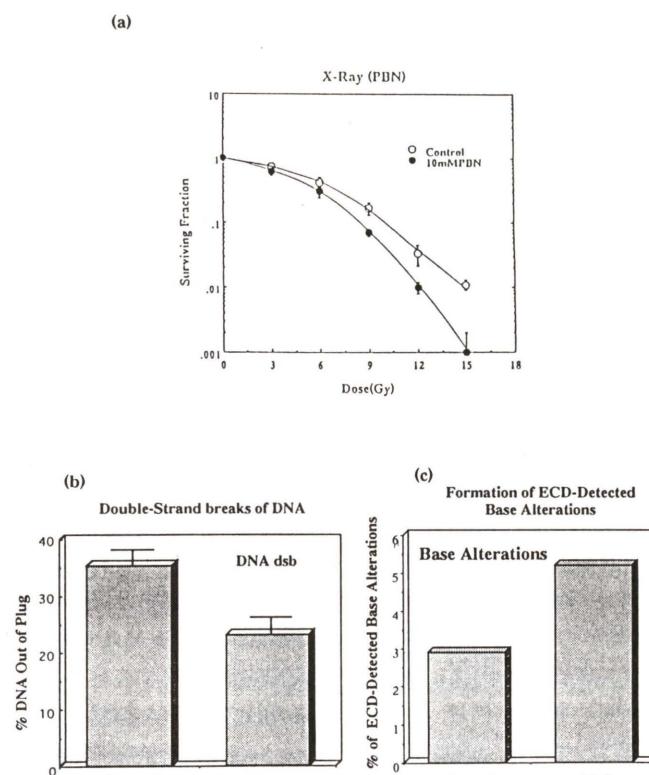


Fig. 13. (a) The dose-response curves of X-irradiated Chinese hamster V79 cells. The upper curve was obtained by X irradiation alone. The lower curve was obtained by X irradiation in the presence of PBN (10 mM). (b) Induction frequency of DNA double-strand breaks of 60 Gy-X-irradiated cells as measured by a method combining pulse-field gel electrophoresis and Bio Image Analyzer (BAS 2000). Left; X irradiation alone. Right; X irradiation in the presence of PBN. (c) Base alterations separated and detected by HPLC-ECD from DNA nucleosides obtained by extracting DNA from 15 Gy-X-irradiated cells in absence (Left) or presence (Right) of PBN and subsequently digesting with several enzymatic processes.

次に塩基変性の細胞致死への寄与を証明する実験を行った。この実験を計画するに際し、先のスピントラッピングの研究が役立った。もし、スピントラッピングによるDNA鎖切断の抑制作用と塩基変性の促進作用が細胞レベルでも発揮されるならば、スピントラッピング剤を用いることにより塩基変性と細胞致死との関係を明らかにすることができる。まず、チャイニーズハムスターV79細胞にスピントラッピング剤であるPBNを添加し、X線を照射後、細胞の生存率をコロニー形成法で測定した。0~15 Gyの全X線線量においてPBNによる致死促進作用が観察された(Fig. 13(a))。これとDNA損傷との関係を調べるために、X線照射後直ちに細胞からDNAを抽出し、塩基変性と2本鎖切断の定量的な測定を行った。塩基変性はスピントラッピング剤と2'-dGの研究をヒントに電気化学検出器で検出される変性物(例としてoh⁸dG)のみを測定対象とした。まず、DNA鎖切断に対する影響を見てみると(Fig. 13(b)), PBN存在下でX線照射したときの方が有意にDNA鎖切断誘発頻度を低下させているのがわかる。この場合、DNAをパルスフィールド電気泳動とバイオイメージアナライザにより分析したため、2本鎖切断誘発の測定になっている。この結果は、オリゴヌクレオチドのスピントラッピング実験で述べたように、PBNがDNA鎖切断の前駆ラジカルをトラップしたためと解釈され、スピントラッピングの結果が細胞レベルにおいても反映されていることが判明した。DNA 2本鎖切断がX線細胞致死と関係していることはすでに述べたが、PBNによる2本鎖切断誘発の抑制は、X線による細胞致死の増感よりはむしろ抑制の方に反映されなければならない。したがって、結果から判断するとPBNによる増感作用はDNA鎖切断以外の損傷に対し、何らかの影響があったためと推論される。先のスピントラッピングの研究はPBNがoh⁸dG生成を促進することを示した。このことから推察して、細胞レベルでも同様のことが予想された。そこで、oh⁸dGがECDにより検出されるものであることを考え、PBN存在および非存在下でX線照射後、細胞からDNAを抽出し、DNase I, ホスホジエステラーゼ、アルカリホスファターゼ処理に

よりヌクレオシドレベルまで分解し、それをHPLCで分離した。検出器としてECDを用い、検出できる塩基変性物全てを定量測定した。この結果、ECDで検出された塩基変性物は、PBNにより生成が促進されるもの、変化が無いもの、抑制されるものの3グループのどれかに属していた(未発表データ)。oh⁸dGは、その生成が促進されたグループに入り、その他未同定の生成物2,3種類が含まれていた。Fig. 13(c)は增加生成物全てを足してグラフにしたものである。生成促進が見られたものについては、PBNの増感効果から判断して、細胞致死と強く関連しているものと推定される。一方、生成に変化のみられないもの、抑制されたものは細胞致死との関係は薄いものと判断される。oh⁸dG以外の生成物については全て未同定であるので、PBNによる生成促進のメカニズムは明確になっていない。いずれにしても、このような生成物の細胞内での蓄積が細胞死をもたらすと判断され、塩基変性物の中で細胞致死と関連する成分の存在が明らかとなった。今後、構造の解析を進めたいと考えている。なお、今回の変性物はあくまでECDにより検出されるものだけであるので、他の塩基変性物との関係については全くわからない。

ここで、PBNがX線の細胞致死効果を促進することは述べたが、他の活性酸素種たとえばH₂O₂の細胞致死障害に対しては逆に防護作用を示す(未発表データ)。先に述べたように、H₂O₂はX線とは全く異なり、DNAというより細胞質での酸化障害を通して細胞死をもたらす。PBNは脂溶性であり、もともと脂質ラジカルのトラップ剤として開発されたものである。したがって、PBNが脂質ラジカルをトラップすることにより脂質過酸化反応を停止させ、結果としてH₂O₂の細胞致死作用を抑制したものと解釈される。このように、一般的にPBNはそのスピントラッピング作用を通して活性酸素障害を防止すると考えられている(Oliber et al., 1990; Phillis and Clough-Helfman, 1990)。本研究に従えば、それは細胞質成分での障害発生が細胞死と関係する場合のみに限ることになる。

4. まとめ

細胞をX線照射する方法とスピントラップ剤の特異な反応を利用して、DNA損傷と細胞死との関係につき様々な情報が得られた。X線照射は、決定的な細胞質酸化障害を起こすことなく、核内DNAにのみ効果的に酸化障害を誘発する方法であることから、活性酸素誘発DNA損傷と細胞死との直接的な関係を研究する最良の方法であると考えられた。

スピントラッピング法は活性酸素そのもの、あるいは活性酸素により誘発されたラジカルをトラップし、同定するために開発された方法である。この方法を利用してOHラジカルが誘発するDNAラジカルの研究を行い、塩基変性や鎖切断の前駆ラジカルを同定することができた。さらに、この研究を通して、スピントラップ剤がデオキシリボースラジカルをトラップした際、鎖切断に至る反応を停止させ、鎖切断を抑制すること、またプリン塩基ラジカルと反応した際、逆にラジカル反応を促進させ、最終生成物の収率をあげることが明らかにされた。このスピントラップ剤によるDNA損傷の修飾現象は培養細胞に適用した際も同様に観察された。すなわち、DNA 2本鎖切断の誘発を抑制し、oh⁸dGを含む幾つかの塩基変性物の生成を促進した。さらに、細胞に対しスピントラップ剤がX線の致死効率を高めたことから、細胞致死に関係する塩基変性物の存在を明らかにすることができた。

OHラジカルとDNAの反応については、*in vitro*の放射線化学的なモデル研究が多く、実際の照射細胞中で同様の反応が起こるか否かについては明確な証明が無かった。スピントラップ剤を用いた本研究は、その意味ではその間のギャップを埋めたと言えるかも知れない。また、今まで放射線増感剤や防護剤の作用をラジカル反応レベルでの修飾作用と捉えている研究が多いが、残念ながら、それらと反応する具体的なラジカルの構造については明確になっていない。スピントラップ剤は反応するラジカル構造の情報をもたらしつつ、一方ではラジカルが到達する生成物の収率に影響を与えることができ、もたらす情報量が多い。このことが、今回のような成果をもたらした大きな

要素になっているものと思われる。今後とも、他の活性酸素種による細胞障害誘発機構の研究に応用していきたいと考えている。

参考文献

- Dizdaroglu, M. (1985) Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on γ -irradiation in aqueous solution, *Biochemistry*, **24**, 4476–4481.
- Henner, W. D., S. M. Grunberg and W. A. Haseltine (1982) Sites and structure of γ radiation-induced DNA strand breaks, *J. Biol. Chem.*, **257**, 11750–11754.
- Hiraoka, W., M. Kuwabara, F. Sato, A. Matsuda and T. Ueda (1990) Free radical reactions induced by OH-radical attack on cytosine-related compounds: a study by a method combining ESR, spin trapping and HPLC, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1217–1223.
- Hiraoka, W., M. Kuwabara and F. Sato (1990) Effects of 3'-deoxyadenosine (Cordycepin) on the repair of X-ray-induced DNA single- and double-strand breaks in Chinese hamster V79 cells, *J. Radiat. Res.*, **31**, 156–161.
- Inanami, O., F. Sato and M. Kuwabara (1993) The spin trap 2-methyl-2-nitrosopropane enhances hydroxyl-radical-induced degradation in histone H1 and inhibits hydroxyl-radical-induced intermolecular cross-links in histone H2B, *Life Sci. Adv.*, **12**, 133–144.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2137–2145.
- Kuwabara, M., W. Hiraoka and F. Sato (1989) Evidence for the formation of strand-break precursors in hydroxy-attacked thymidine 5'-monophosphate by the spin trapping method, *Biochemistry*, **28**, 9625–9632.
- Kuwabara, M., T. Tanabe, W. Hiraoka, Y. Tamura, F. Sato, A. Matsuda and T. Ueda (1991) 2-Chlorodeoxyadenosine inhibits the repair of DNA double-strand breaks and does not inhibit the repair of DNA single-strand breaks in X-irradiated Chinese hamster V79 cells, *Chem.-Biol. Interact.*, **79**, 349–358.
- Kuwabara, M., H. Ohshima, F. Sato, A. Ono and A. Matsuda (1993) Spin-trapping detection of precursors of hydroxyl-radical-induced DNA damage: Identification of precursor radicals of DNA strand breaks in oligo(dC)₁₀ and oligo(dT)₁₀, *Biochemistry*, **32**, 10599–10606.
- Maxam, A. M. and W. Gilbert (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages, *Methods Enzymol.*, **65**, 499–560.
- 大島秀基, 小野晶, 三宅俊介, 沢村貞史, 松田彰, 佐藤文昭, 桑原幹典(1994) OHラジカルによる8-ヒドロキシデオキシグアノシン生成機構, 磁気共鳴と医学, **5**, 90–94.
- Oliver, C. N., P. E. Starke-Reed, E. R. Stadtman, G. J. Liu, J. M. Carney and R. A. Floyd (1990) Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ische-

- mia/reperfusion-induced injury to gerbil brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 5144–5147.
- Phillis, J. W. and C. Clough-Helfman (1990) Protection from cerebral ischemia injury in gerbils with the spin trap agent *N*-*tert*-butyl- α -phenylnitron (PBN), *Neurosci. Lett.*, **116**, 315–319.
- Teoule, R. (1987) Radiation-induced DNA damage and its repair, *Int. J. Radiat. Biol.*, **51**, 573–589.
- von Sonntag, C. (1987) The Chemical Basis of Radiation Biology, Taylor & Francis, London, (a), pp. 94–115; (b), pp. 295–352.
- Wallace, S. S. (1988) AP endonuclease and DNA glycosylase that recognize oxidative DNA damage, *Environ. Molec. Mutagen.*, **12**, 431–477.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 301–308 (1995)

放射線発がんと活性酸素

Radiation carcinogenesis and free radicals

伊藤 明弘, 渡邊 敦光, 山田 和正

Akihiro Ito, Hiromitsu Watanabe and Kazumasa Yamada

広島大学・原爆放射能医学研究所 予防腫瘍研究分野
734 広島市南区霞1丁目2-3

Department of Cancer Research, Research Institute of Radiation Biology and Medicine,
Kasumi 1-2-3, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan

(受付: 1994年9月14日; 受理: 1994年9月14日)

Summary

In this study, we present 3 types of experiment, in which 1) tumorigenicity study of orally administered hydrogen peroxide (H_2O_2) in mice, 2) Comparative liver tumorigenicity of ^{60}Co gamma rays and ^{252}Cf fission neutron, and 3) radiation carcinogenesis in hypocatalasemic mice (Csb/Gen).

1) Orally administered H_2O_2 with 0, 0.1 and 0.4% of H_2O_2 induced dose dependent increase of duodenal tumors in C57BL/6J mice. The incidence of those H_2O_2 induced duodenal tumors are inversely correlated to the catalase levels such as high incidence of tumors in hypocatalasemic mice and low incidence in hypercatalasemic mice, 2) Both sexes of B6C3F₁ mice of 6 weeks old were irradiated with either ^{60}Co gamma rays or ^{252}Cf fission neutron at once by the doses of 0–200 cGy. Each points consisted of about 30 mice and they were observed for 13.5 months after irradiation. The relative biological effectiveness (RBE) for liver tumorigenicity of ^{252}Cf versus ^{60}Co was 15.2 in male mice and 2.5 in female mice. 3) Hypocatalasemic mice, Csb/Gen, were exposed to ^{60}Co and ^{252}Cf similarly as described in 2). Incidence of liver tumors in males reached plateau at 12.5 or 50 cGy by the incidence of 75% and declined at 200 cGy. This findings were similarly observed at both ^{60}Co gamma rays and ^{252}Cf neutron. In the radiation response to liver tumorigenesis, Csb/Gen is superior than C3H/HeN mice.

Keywords: hydrogen peroxide, catalase, fission neutron, liver tumor

1. はじめに

放射線と酸素と生命は地球誕生以来の重要な事象である。強烈な太陽光線や宇宙線の中から地球が誕生し、更に無機物質の中から水と酸素が生じたことが生命誕生の起源であるとされている。試算によるとその年令は 4.6×10^9 年前であり、有機物質の発生が 3.0×10^9 年前に海草が出現、陸上生物の出現は 4×10^8 年前であり、人類の発生はこれに比べると数万年前といつ最近の出来事である。この人類を含めた哺乳類は、無論酸素なくしては生息し得ないし、一方で酸素の過剰は有毒となる宿命を背負っている（浅田, 1988）。放射線の存在は無論有史以前からであり、地球誕生以前か

ら存在したのであるが、生物の生存にとって水と共に不可欠の関係にある。放射線はヒトを含めた哺乳類全体、或いは生物種に対し、その照射線量が高いと到死効果をもたらし、それ以下では種々の疾病や障害をもたらすことが知られている。

2. 過酸化水素の発癌研究—経口投与によるマウスでの発癌性—

1) 研究目的

H_2O_2 は H_2O に比べ安定性を欠き、光などに当たると容易に H_2O と O_2 に分解することが知られており、生体内ではその分解酵素のカタラーゼにより瞬時に H_2O と O_2 に分解される。そこで、こ

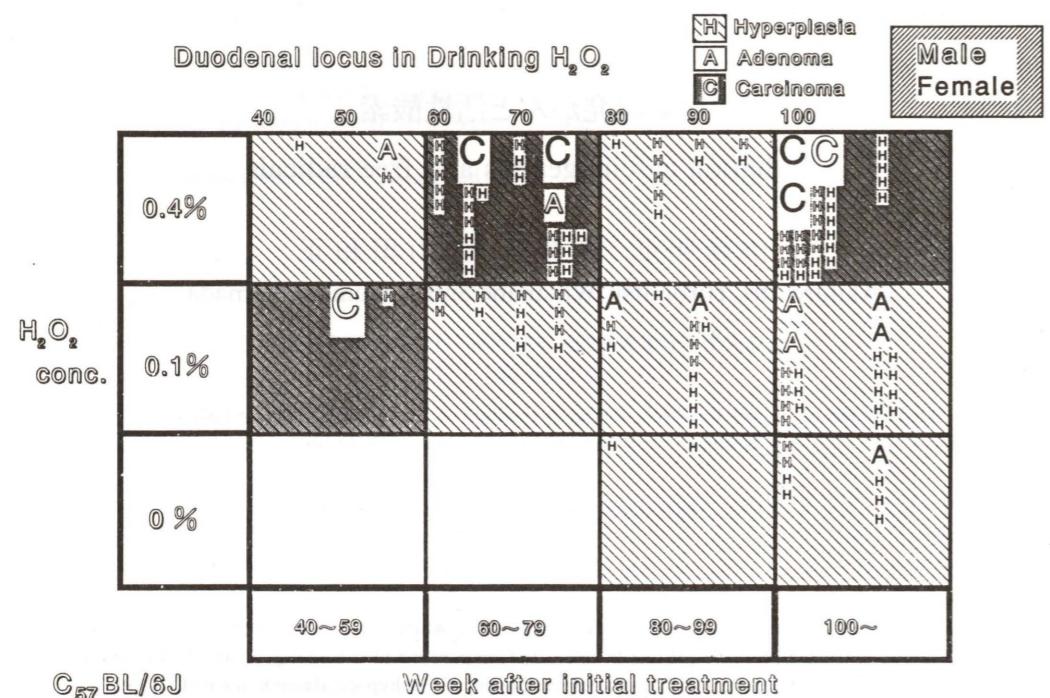


Fig. 1. Histogram of duodenal tumors in C57BL/6J mice after oral administration of hydrogen peroxide (H_2O_2).
Carcinomas were observed only in mice who received H_2O_2 .

の酵素の酸化力をを利用して漂白、殺菌の目的で世界中で多用されている。本邦でも最近まで食品添加物としてほぼ無制限に用いられていたが、本研究が発端となり 10 余年前から、一部規制の動きが出ている。即ち、うどん、かまぼこ、ちくわ、しらすばしなどの漂白や殺菌に対して重要な役割を果たしている。その殺菌効果はかなり強力で、枯草菌には 313 ppm、大腸菌には 160 ppm、腸炎ビブリオ菌には 77 ppm で殺菌効果を示すとされている。諸外国ではマカロニ、めん類、チーズや乳製品、魚肉製品など、米国、英国をはじめ東南アジアの諸国でも広く用いられている。 H_2O_2 は光、熱、外部からの刺激、アルカリ性の条件下では急速に分解するが、酸性下では可成り安定している。以上の知識を背景に我々はその発癌性について以下の実験を行った (Ito *et al.*, 1981; 伊藤 *et al.*, 1981; Ito *et al.*, 1982; Ito *et al.*, 1984)。

2) 材料と方法

動物: 日本クレアより購入した体重 19~22 g の雌雄両性 C57BL/6J マウス約 300 匹を 6 群に分か

ち、これらに基本食として GRF-1 (日本チャールス・リバー社) の固形飼料を自由摂取させた。飲料水は以下に述べる方法で投与した。検体: H_2O_2 水は 0%, 0.1%, 0.4% の 3 群として、これらを蒸留水 (DW) に溶解し、週 3 回新鮮なものとして投与した。

病理所見: 生後 2 カ月目より 26 カ月迄の全期間検体の経口投与を行い、病変を示した動物は適宜屠殺解剖した。特に、胃、十二指腸での病変を中心に観察を行い、消化管を開腹後アルカリフォスファターゼ染色を行い、病変の観察を容易にした。

3) 実験結果

体重の変化: 月 1 回の割合で体重測定を行ったが、 H_2O_2 投与開始後、13 カ月頃に最高の体重を示し、0% 群に比べ、雌雄とも H_2O_2 投与群でやや体重の低下が認められた。

動物の生存率: 26 カ月令での実験終了時の平均生存率は 56% であり、対照群では 54% であった。死因の多くは気管支肺炎の発症を示した。又、

肺、脾、腎等の感染症を合併してのアミロイド-シスの併発例が多発した。この実験で用いた H_2O_2 水溶液は経口投与であり誘発病変の多くは主として腺胃と上部十二指腸に限局して発現した。胃では腺胃にのみ限局し、前胃では全く著変を示さなかった。腺胃では 0.1% H_2O_2 投与群で 1 例の胃良性腺腫が認められ、他の病変としてビランと潰瘍、過形成が多発した。過形成の発生は 7~13% であり、この変化が長期間続くとビランや潰瘍に進展するものであった。最も多く認められた腫瘍性病変は上部十二指腸での変化であった。即ち、観察された病変は幽門部とファーテー氏乳頭の間に限局しており、それ以下の肛門側では病変は認められなかった。発現した病変は、過形成、腺腫、腺癌が認められ、いずれも内視鏡分類の I 型病変で平板状 (II 型) のものも認められた。この過形成、腺腫、腺癌の発現率はほぼ投与した H_2O_2 の濃度に依存しており、特に過形成は H_2O_2 の 0% で 9%, 0.1% H_2O_2 で 40%, 0.4% の H_2O_2 で 62% に達した。又、腺癌は 0.4% H_2O_2 で 5% 発現した (Fig. 1)。

4) 結論と考察

過酸化水素 (H_2O_2) の経口投与により発癌性を示した最初の論文である。十二指腸上部に限局して発現した過形成、腺、腺癌は H_2O_2 の直接作用により発現したと考えられる。即ち、 H_2O_2 は胃内では酸性のため比較的安定であるが、十二指腸に入ると突然アルカリ性のため H_2O_2 への分解作用が起こり、粘膜障害を引き起こすと考えられた。なお、この実験と相前後してラットを用いて他の研究者グループにより H_2O_2 の経口投与の実験が行われた。その結果、マウスに認められた結果は確認されなかった (高山ら私信)。その原因は本研究成果でも述べた如く、C57BL マウスは本来十二指腸を含む小腸領域に自然発症の結節形成を示すことが知られており、これが背景にあって初めて H_2O_2 の経口投与により病変が発症したと考えられた。ラットではこのような十二指腸には病変が発現することは認められておらず、従って、 H_2O_2 の単独投与では病変が発現しなかったと思われる。これに反し、Hirota らは、F344 ラットを

用いて MNU の経口投与で先ずイニシエーションを行い、次に H_2O_2 での持続的経口投与を行った結果、マウスで認められたと同様、十二指腸癌の発現を認めている (Hirota and Yokoyama, 1981)。従って、以上の実験成果を考慮すると H_2O_2 は発癌のプロモーターの働きを示している。

なお、 H_2O_2 の発癌研究では皮膚に H_2O_2 を塗布した研究もあるとされているが、これらはいずれも発癌性が証明されなかった。

3. ガンマー線と中性子線によるマウス肝腫瘍の発生

B6C3F₁ マウスに認められる肝腫瘍は食品添加物、医薬品、化粧品などの種々の生活関連物質に対する発癌性スクリーニングにおいて問題となる腫瘍である。なお、B6C3F₁ マウスは肝腫瘍以外はあまり顕著な腫瘍発生はみられず、その生存率が良好のため種々の薬物の毒性や発癌性の研究に用いられている。

さて、B6C3F₁ マウスの親マウスの C3H 系では肝腫瘍好発系であることがよく知られ、それは特に雌に比べ雄に多く発現する。なぜ C3H に肝腫瘍が多く発現するかについては定説はないが、その遺伝的素因は複数の遺伝因子が関係していることが知られ、化学発癌物質と同様、放射線でも発現が助長されることが知られている。もう一方の C57BL 系マウスは、その後半の生涯においてリンパ腫の多発が知られているが、肝腫瘍に対してはむしろ抵抗性を示す。本研究では C3H, C57BL, B6C3F₁, C3B6F₁ 及び C3H の変異株である低カタラーゼマウスの Csb/Gen を用いて、これらにガンマー線、²⁵²Cf 中性子線を照射して、肝腫瘍を指標として 1) ²⁵²Cf 中性子線の RBE (渡辺ら, 1986; Takahashi *et al.*, 1988), 2) 系統差による肝腫瘍発生率の差 (Ito *et al.*, 1991; Takahashi *et al.*, 1992), 3) 性差 (Ito *et al.*, 1992), 4) Csb/Gen を用いての放射線誘発肝腫瘍における種々の Radical Scavenger 酵素との相関について検討を行った (山田ら, 1994)。

動物: 両性の B6C3F₁、雌雄 C3B6F₁, C57BL/6N, C3H/HeN (HeN) 及び Csb/Gen の 6~8 週令のマウスを用いた。Csb/Gen は全て自家生産であ

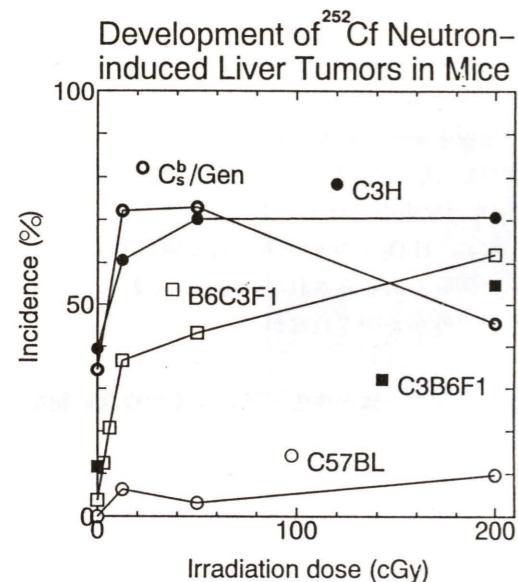


Fig. 2.

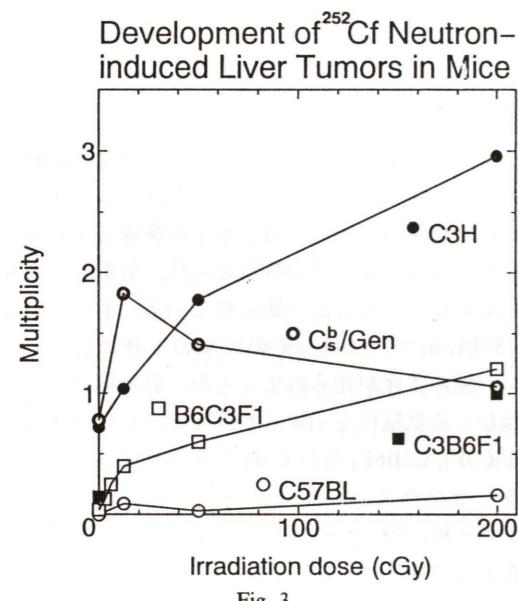


Fig. 3.

るが、他は日本チャールス・リバー社（神奈川）より購入した。飼料はオリエンタル製のMF固形飼料を与え、飲料水は水道水を自由摂取させた。動物の管理は広島大学の動物実験指針に従った。一部の動物には去勢を行い、又、テストステロンの投与はコレステロールペレットとして皮下投与し、月1回の割合で新しいものと交換した。

²⁵²Cf 中性子線の照射：本照射装置は当研究所に

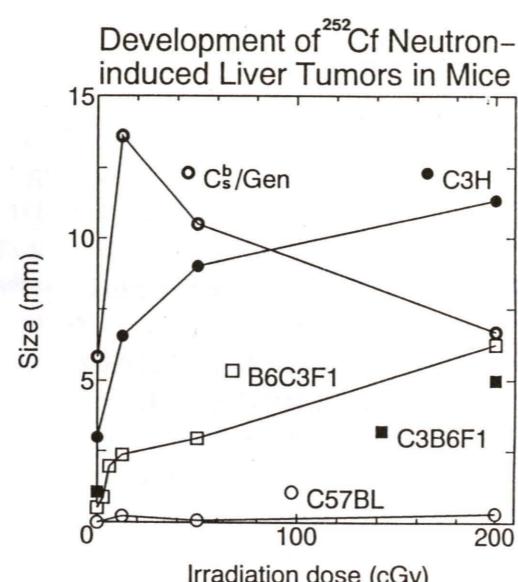


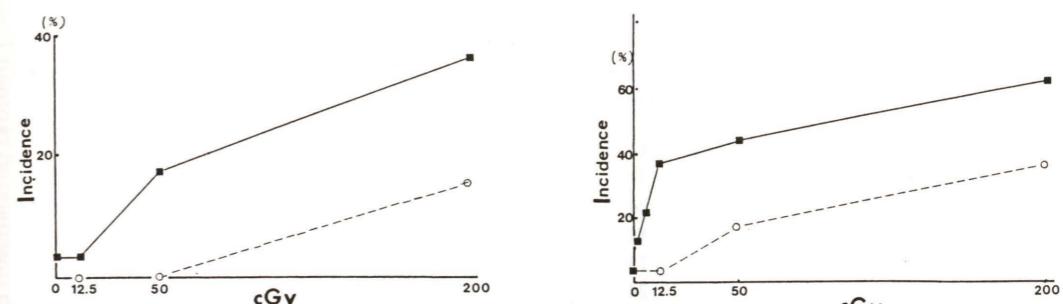
Fig. 4.

Figs. 2-4. Development of ²⁵²Cf neutron induced liver tumors in 5 different strains of mice. Radiation doses were between 0-200 cGy. Throughout the given doses, the highest incidence were noted in C3H/HeN and C^b/Gen, moderate in B6C3F₁ and C3B6F₁ and lowest in C57BL/6J mice.

設置されているもので、全て1回全身照射として0-200 cGyを0.6~0.8 cGy/分の割合でマウスに照射した。中性子線照射は全て6週令で照射し、これらを照射後13カ月間観察した。実験群は対照群の0 cGyと3, 6, 12.5, 50, 200 cGyの6線量を用いたが、B6C3F₁の雌、C57BL系マウスなどの腫瘍抵抗性マウスでは3, 6 cGyは行わなかった。結果を要約すると以下の如くなる。

1) 肝腫瘍発現における系統差及び線量依存性

雄の腫瘍発生率を順番に並べると C^b/Gen, C3H/HeN, B6C3F₁, C3B6F₁, C57BL であった。勿論これらは自然発生でもその順番に従って発現し、C57BLでは線量は増加しても発現率は上昇しなかった。これに反しC3Hでは自然発生も高値であるが、線量が高くなるに従って発現率も高値を示したが、200 cGyでは既に飽和状態に達しているがそれでも70%以下であり、約30%の動物には肝腫瘍は発現しなかった。更に、この両系統マ



Figs. 5 and 6. Comparative incidences of liver tumors in male (Fig. 5) and in female (Fig. 6) B6C3F₁ mice exposed to ²⁵²Cf neutron (—) and ⁶⁰Co gamma ray radiation (---). The RBE of ²⁵²Cf based on ⁶⁰Co is 15.2 in males and 2.5 in females using the single hit model (Ref. 12).

ウスのF₁では、その発現率はほぼ中間に位置し、メンデルの法則に一致した発現率を示した(Figs. 2-4)。一方、Gsb/GenではC3Hと同じく自然発生の肝腫瘍も高率であるが12.5及び50 cGyで既に最高値を示し、200 cGyでは逆に低下した。この現象は本マウス系が低カタラーゼのために放射線照射に対する感受性が高まっていること、或いはラジカルの除去酵素欠乏のため、脂質代謝などに障害を起こした結果と考えられる。

2) 性差

C3Hをはじめ、BCF₁, C57BL いずれのマウスの系においても自然発生腫瘍は雄に高い頻度を示し、雌では低率に止まっていた。この現象は放射線照射実験群でも認められ、²⁵²Cf及び⁶⁰Coの両放射線を照射したマウスでも0~200 cGyの間での線量に一致して発生頻度は上昇を示し、常にどのポイントでも雄が雌より高い発現率を示した。従って、これらの結果から、雄は雌に比べ自然発生と共に放射線に対してもより強い感受性を示している。次に去勢実験においては200 cGyの²⁵²Cf照射雄B6C3F₁マウスの肝腫瘍発生率が13カ月の観察期間後55.2%であるのに対し、これが去勢により25.9%と低下を示した。平均腫瘍個数も1.21から0.33と同様に減少した。更に去勢マウスにテストステロンの投与を行ったが、再び55%以上この回復は認められなかった。雄であることは単にテストステロンの補給のみでは充分とは云えず、睾丸が作り出すテストステロン以外の多くの因子がこれを男らしく見せており、雌と異

なる種々の形質に関与していると考えられる。次の研究では去勢マウスに自家の睾丸を移植する。一方ではテストステロンを補給する。この場合前立腺の変化を同時に指標する。可能性として睾丸の増殖因子として頸下腺などの唾液腺が作るEGFなども考えられる。従って睾丸と頸下腺の共同移植なども興味ある方法と考えられる。

3) マウス肝腫瘍を指標として⁶⁰Co ガンマ線に対する²⁵²Cf 中性子線の発癌性RBEについて

²⁵²Cf 中性子線の⁶⁰Co ガンマ線に対する肝腫瘍発現率を指標としてRBEを決定するために、以下の実験を行った。即ち、雌雄両性のB6C3F₁マウスを用い、一群約30匹として²⁵²Cfでは0, 3, 6, 12.5, 50及び、200 cGyを雄マウスに全身1回照射した。一方、雌マウスでは0, 12.5, 50及び200 cGyを同様に照射した。⁶⁰Co ガンマ線は0, 12.5, 50及び200 cGyを両性マウスに1回全身照射した。マウスは生後6週令で照射を受け、13カ月間観察した。その結果、肝腫瘍の発現率は非照射対照群では雄で3.8%、雌で3.2%であった。

²⁵²Cf 照射群では雌雄共に照射線量に相関して発現率、平均腫瘍数ともに増加し、最高発現率は雄で62.1%、雌で27.6%と雄でより高い発現率を示した。⁶⁰Co ガンマ線は²⁵²Cf 照射に比べその発現率は低値に止まった。即ち、最高発現率は雄で36.0%、雌で15.4%を示した。そこで平均腫瘍発現率を²⁵²Cfと⁶⁰Coについて比較した結果、RBEは雄で15.2、雌で2.5を示した(Figs. 5, 6)。

Table 1. Incidence of Liver Tumor and Cataract in Hypocatalasemic Mice

Sex	Strain	N (mice)	Survival (month)	Liver tumor			Cataract (%)
				(%)	(N/mouse)	(mm)	
♂	C3H/HeN	43	14	39.5	0.72	3.02	0
	C ^b /Gen	55	14	34.5	0.78	5.84	0
		51	24	66.7**	1.61**	16.11**	17.6**
♀	C3H/HeN	35	14	11.4	0.11	0.51	0
	C ^b /Gen	62	14	8.1	0.13	0.52	0
		48	24	14.6	0.15	1.31	0

** p < 0.01 vs. 14 month of age

Origin of "Hypocatalasemic mice"

Immunologically catalase protein is present in large amount in Blood of Hypocatalasemic mice.

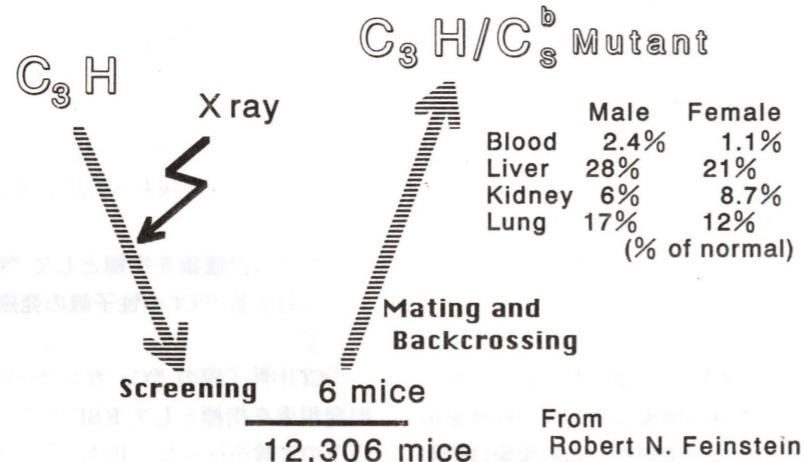


Fig. 7. Origin of hypocatalasemic mice, Csb/Gen. It was isolated from X-ray exposed C3H/He as a mutant. In our Institute at Hiroshima University, over 30 generations of sister brother mating have been done and used in the present study.

4) Csb マウスにおける放射線発癌

本系マウスの自然発生腫瘍を Table 1 に示した。このマウスは Feinstein らが C3H/He に X 線照射したものからスクリーニングして得られた系で Cs の a, b, c, d の 4 つのカタラーゼ欠損マウスが得られた (Feinstein *et al.*, 1966; Feinstein *et al.*, 1967)。その内、Csb を当研究室で入手し、広島大学原医研で純化したものである (Csb/Gen)。雌雄ともに血中カタラーゼ値は正常の 1.1-2.4% に低下し、肝でも 21-28% に止まっている (Fig. 7)。観察期間は 2 年間であり、90 週以降での肝腫瘍発現率は雄で 66.7%，雌では 14.6% であった。肝腫瘍以外の腫瘍では肺の腫瘍が雌雄に夫々 14.6%

と 14.6%，雄に 17.6% の白内障が認められた。この系のマウスに ²⁵²Cf を照射すると、前述の如く雄では 12.5 cGy で発現率は頂点に達してその頻度は 72.2% であり、この傾向は ⁶⁰Co ガンマ線でも同様で 12.5 cGy で 61.1% に達した。このことは本系マウスが肝腫瘍に関して放射線に対し感受性が高いことを示している (Nilay *et al.*, 1991)。雌では 0~200 cGy の照射線量に対し、線量依存性に肝腫瘍発現率は上昇した。次に、Csb マウスの胃部に 20 cGy の X 線を 1 回照射を行うことにより 13 カ月後に雄で 20%，雌で 15% の印環細胞癌が認められた (Watanabe *et al.*, 1991)。これら肝腫瘍や印環細胞癌の発生に低カタラーゼが何如に

Catalase activity in male normal liver and hepatoma of C^b/Gen mice

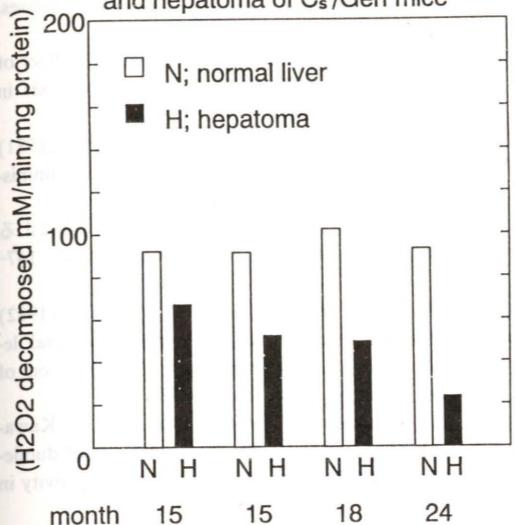


Fig. 8. Catalase activity in male normal liver (□) and hepatoma (■) of Csb/Gen mice. The results indicated that catalase activity was always high in normal liver between 15 to 24 month of age.

関連しているかは明らかでないが、肝腫瘍に関しては腫瘍で過酸化脂質が健康部に比べ増加していることより低カタラーゼ状態が放射線の感受性を高めていることが示唆される (山田ら, 投稿準備中)。

Superoxide anion (O₂⁻)、Hydrogen peroxide (H₂O₂) および過酸化脂質 (LOOH) などの活性酸素は、呼吸の副産物としてだけでなく、電離放射線が照射された場合や発癌物質など化学物質の生体内代謝の過程でも産出されると考えられている (永田, 1984; 児玉, 1988)。特に過酸化脂質は、ヒトの脳、赤血球、血清で加令と共に増大し、ラットなどの実験動物においても脳、脾臓、副腎、血清などで加令に伴う増量が確認されている。Csb マウスの正常肝は、加令に伴い 24 週で約 3 倍量まで過酸化脂質の増加が確認され、これ以降では約 2.7 nmole/mg protein と一定の過酸化脂質質量を示し、性差は全く認められなかった。その分解酵素であるグルタチオン・ペルオキシダーゼ活性を測定したところ、加令に伴う変動は見られなかった。

次に、肝腫瘍の過酸化脂質について正常肝と

SOD activity in male normal liver and hepatoma of C^b/Gen mice

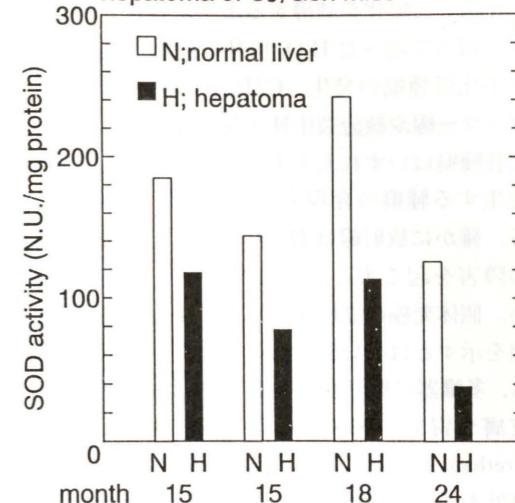


Fig. 9. SOD activity in male normal liver (□) and hepatoma (■) of Csb/Gen mice. The results indicated that SOD activity was always high in normal liver between 15 to 24 month of age.

腫瘍部を対比させて測定したところ正常肝に比べ平均 4 倍以上過酸化脂質の上昇が認められた。この所見は組織学的にも明らかであり、腫瘍部では肝腫瘍細胞中での脂肪含量が多く、HE 染色で一見空胞細胞様に認められた。これに反し、正常肝ではこれら空胞変性様の変化は放射線照射直後 3 カ月頃迄の肝細胞において散見される所見であり、この変化の延長線において肝腫瘍の発現、特に放射線誘発肝腫瘍の場合の母地となる可能性がある。

一方、カタラーゼ活性及び SOD 活性はいずれも腫瘍化と共に減少する傾向が認められた (Figs. 8, 9)。

4. まとめ

放射線発癌の中で、活性酸素の役割は最も重要なものの一つに挙げられている。この活性酸素は細胞膜と核との間にあって、放射線の照射により生体から誘起された生体自身を障害するというオートクリン的性格を示す増殖因子にも似た働きを示すと考えられる。但し、増殖因子と異なって細胞に対し破壊的効果を示し、その過剰生産が細

胞膜、細胞質及び核自身に損傷をもたらし、炎症、老化或いは癌化を誘導すると考えられている。

本報告で述べた H_2O_2 自身の長期経口投与による消化管腫瘍の発生、C3H 系マウスを用いてのガンマ線や核分裂中性子線照射により誘発された肝腫瘍はいずれも本来これらのマウスに自然に発生する腫瘍の発現率を上昇させたと考えられる。確かに放射線は DNA の切断、突然変異などの障害を起こすことはよく知られた事実であるが、個体発癌の立場からすると決して強い発癌作用を示すとは云い難い。こと発癌のみから考えれば、多臓器に標的性を示す MNU、肝での DEN、皮膚や胃での MNNG、乳腺の DMBA、肺での Urethane、神経に対する ENU など少量で強い発癌性を示す化学物質が放射線に比べより強力な発癌物質である。従って、放射線の活性酸素を通じての発癌効果は細胞側からみれば非特異的な細胞障害現象の結果起こる慢性病変の一つと考えられる。

この予防は如何に行うか。活性酸素除去酵素が充分に働けば活性酸素障害からまぬがれることが可能であるという理論からすれば酵素活性を常にバランス良くしかも充分に生体側に付与しておけば良いということになる。そんなことが可能であろうか、トランスジェニック人間の方法しかあるまい。

謝 辞

本研究の遂行に当たっては、文部省、厚生省、大塚製薬、味噌中央研究所などからの研究費の援助を受けた。又、この研究は、高橋忠照博士、Nilay Basaran, Peter Osa Ogundigie, Goutam Roy 学士ら、酒井葉子、谷崎みどり、石丸くるみ氏らの技術的援助および宮本孝子氏の原稿作成の協力を得た。

参考文献

- 浅田浩二 (1988) 活性酸素の生成・消去・作用、活性酸素、中野稔他 2 名編 pp. 7-12. 共立出版、東京。
- Feinstein, R. N., J. B. Howard, J. T. Braun and J. E. Seatholm (1966) Acatalasemic and hypocatalasemic mouse mutants, *Genetics*, **53**, 923-933.
- Feinstein, R. N., J. T. Braun and J. B. Howard (1967)
- Acatalasemic and hypocatalasemic mouse mutants. II. Mutational variations in blood and solid tissue catalases, *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 165-169.
- Hirota, N. and T. Yokoyama (1981) Promoting effect of hydrogen peroxide upon duodenum carcinogenesis in rats, *Gann*, **72**, 811-812.
- Ito, A., H. Watanabe, M. Naito and Y. Naito (1981) Induction of duodenal tumors in mice by oral administration of hydrogen peroxide, *Gann*, **72**, 174-175.
- 伊藤明弘、内藤正志、渡辺敦光 (1981) 化学物質による動物発癌研究について、広大原研年報、**22**, 147-158.
- Ito, A., M. Naito, Y. Naito and H. Watanabe (1982) Induction and characterization of gastroduodenal lesions in mice given continuous oral administration of hydrogen peroxide, *Gann*, **72**, 315-322.
- Ito, A., H. Watanabe, M. Naito, Y. Naito and K. Kawashima (1984) Correlation between induction of duodenal tumor by hydrogen peroxide and catalase activity in mice, *Gann*, **75**, 17-20.
- Ito, A., H. Watanabe and T. Takahashi (1991) Potent hepatic tumorigenicity of fission neutron (Cf-252) in directly irradiated mice and their off-spring whose male parents were irradiated. In "Proc. Symp. Env. Genome (by S. B. Bhattacharjee). Environmental Mutagen Society of India, pp. 182-202.
- Takahashi, T., H. Watanabe, K. Dohi and A. Ito (1992a) ^{252}Cf relative biological effectiveness and inheritable effect of fission neutrons in mouse liver tumorigenesis. *Cancer Res.*, **52**, 1948-1953.
- Ito, A., P. O. Ogundigie and T. Okamoto (1992b) Significance of strain and sex difference in the development of ^{252}Cf neutron induced liver tumors in mice, *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 1052-1056.
- 児玉昌彦 (1988) 活性酸素の生成・消去・作用、活性酸素、中野稔他 2 名編 pp. 484-491. 共立出版、東京。
- 永田親義 (1984) 癌がんにおける活性酸素の役割. 最新医学、**39**, 1388-1396. 共立出版、東京。
- Nilay, B., M. Naito, H. Watanabe and A. Ito (1991) Changes of superoxide dismutase and catalase activities in C3H mice of normal and hypocatalasemic substrains after ^{60}Co gamma-ray. 広大原研年報、**32**, 468-473.
- Takahashi, T., H. Watanabe, Y. Nakagawa, M. Mori, H. Aoyama and A. Ito (1988) Tumor induction in B6C3F₁ mice by californium-252. *J. Radiat. Res.*, **29**, 220-228.
- Watanabe, H., P. O. Ogundigie, T. Takahashi, T. Ishimoto and A. Ito (1991) Induction of signet ring cell carcinomas in X-irradiated hypocatalasemic mice (C3H.Cbs). *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1175-1177.
- 渡辺敦光、高橋忠照、酒井葉子、中川義基、伊藤明弘、沢田昭三、横路謙次郎 (1988) ^{252}Cf 中性子並びに ^{60}Co γ 線照射によるマウス LD50 値の検討、広島医学、**41**, 362-365.
- 山田和正、渡辺敦光、伊藤明弘 (1994) 加齢低カターラーゼマウス肝腫瘍化と活性酸素. 基礎老化研究、**18**, 56-60.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 309-315 (1995)

放射線と生体防御機構

Activation of hostdefense mechanism induced by radiation exposure

松 原 純 子

Junko Matsubara

横浜市立大学看護短期大学部
236 横浜市金沢区福浦 3-9

Yokohama City University, College of Nursing
3-9, Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236, Japan

(受付 1995 年 1 月 25 日; 受理: 1995 年 1 月 25 日)

Summary

The biological effect of ionizing radiation can be investigated either at molecular level using subcellular specimens or at the whole body level observing tissues or whole animals. In order to approach to the mechanism of radiation hazard and radioresistance in organisms, the author accumulated evidences of the coordinating reaction of chemical protection at molecular level and immunological stimulation in mice induced by various exotic factors including radiation. The body-reaction against radiation is dose dependent. One remarkable reaction against sublethal dose of radiation exposure in animal is an increase of metallothionein (MT) synthesis in the liver after 10 to 20 hours of irradiation, while reaction against 7 or 50 cGy exposure is more immunological stimulation of which effects reveal after 2 to several weeks. Roles of antioxidative substances including MT, GSH, Vit. C, Vit. E, SOD, GP and NADPH, and those of free radicals such as NO, O_2^-OH are discussed with presenting authors speculations and tentative review.

Keywords: Survival, Metallothionein, Antioxidative mechanism, Spleen PFC, Macrophages

放射線の生体影響を考える時、まずは放射線と水との相互作用によるフリーラジカルの生成や細胞内の染色体や DNA の損傷に焦点があてられて、長年ミクロな分析的研究が多くなされてきた。筆者は放射線の生体に対する影響を総合的に眺める立場から、マウスに放射線や他の刺激を負荷する多重リスク曝露実験を行いながら、得られた個体レベルの実験結果を重視しつつ、その反応のメカニズムを考察するために生化学や免疫学的方法を用いた多面的アプローチを続けてきた。

あたかも H. セリエのストレス学説¹⁾を支持するかの如く、環境からの化学物質、放射線、過激な運動など物理化学的なストレスや、創傷、絶食などの生理的ストレスに対して、生体は驚く程共通の反応を示す。筆者らは上記の各種の刺激に対

して動物が肝臓中にメタロチオネイン (MT) を誘導合成することを実証した上で、マウスにおける免疫系に関連したさまざまな生体防御機構の活性化現象を観察した。

放射線に対する生体反応は照射線量によって異なるので、以下にその二側面を論じたい。

1. 致死ないし亜致死線量である数グレイの放射線に曝露する場合

放射線はストレッサとして働き、マウスやラットでは肝臓中に MT が曝露の 10-20 時間後に誘導合成され、MT 濃度は平常時の 2-3 倍程度になる。MT は単に $\cdot OH$ ラジカルなどをスカベンジするのみならず、グルタチオン・ペルオキシダーゼ系に働き、効率よく肝における生体膜の過酸化を

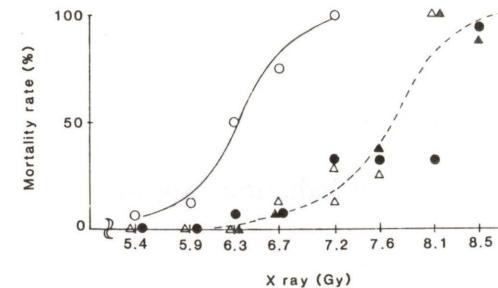


Fig. 1. Dose-response curves of untreated mice and mice given various pretreatments prior to irradiation. ○, group 1: Controls without pretreatment. ●, group 2: 3 mg Cd/kg (CdCl₂ in saline) injected sc. △, group 3: 10 mg Mn/kg (MnCl₂ in saline) injected sc. ▲, group 4: Dermal excision (2×2 cm² at dorsal skin).

抑制する。さて致死量の放射線照射の前にMT誘導性の前処置をしておくと、マウスは放射線抵抗性となり、数グレイの放射線に対して生存率が著しく向上し、LD₅₀は20–30%高線量側にずれる。(Fig. 1)²⁾。この際、Table 1に示すように放射線照射の1–2日後の肝MT濃度は平常時の数倍ないし20倍に達し^{2,3)}、同時に末梢血に好中球が遊出していることが、ケミルミネッセンス法によるSOA測定で確認された(Fig. 2)⁴⁾。これらの前処理マウスではT cell機能の貢進を示していることが、羊赤血球(SRBC)に対する脾細胞のPFCの有意な増加(Fig. 3上半分のデータ参照)、血球凝集反応(HA)、および溶血反応(HR)など免疫反応の亢進として観察される⁵⁾。これら前処置を施

Table 1. Numbers of endogenous splenal colonies at 11th day of 6 Gy-postirradiation and hepatic MT concentration immediately before irradiation.

Pretreatment 24th prior to irradiation	Number of splenal colony formation Mean±S.D.	Hepatic MT concentration (n mole/g)
Saline injected	0.5±0.7	1.6±0.65
CdCl ₂ (3 mg Cd/kg)	11.6±3.1	67±9
Zn acetate (20 mg Zn/kg)	8.0±4.2	83±10
Zn acetate (3 mg Zn/kg)	2.8±2.4	15±9.2
MnCl ₂ (20 mg Mn/kg)	5.4±2.5	19±4.6
IL-1	2.0±2.9	12±2.0
OK432	3.8±1.3	5.5±2.4
Toki	5.6±1.6	3.8±0.76
Skin excision*	7.7±3.7	17±1.2

* Pretreatment was given 48 h prior to irradiation

したマウスでは、放射線照射1–7日後位までは放射線による造血細胞の破壊と減少を防ぐことはできないが、放射線照射の約10日後には白血球や赤血球の数が増加しはじめ(Figs. 4, 5)、個体レベルでの放射線抵抗性が著しく高まることになる。上記の前処置は、骨髄幹細胞のほとんどが破壊される9 Gy以上の照射ではマウスの生存率を上げることはできないが、5–8 Gyの放射線による造血器傷害性の死亡を著しく減少させる効果がある。この際、亜致死線量(5 Gy程度)を照射した後の10日目前後に脾コロニー数を測定すると、前処置をしない場合に較べ、脾コロニー数の増加がみられ、骨髄幹細胞の回復が促進されているこ

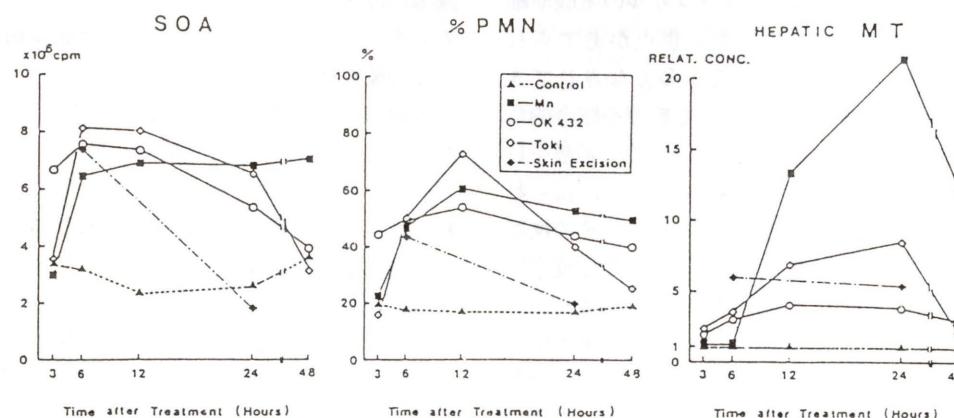


Fig. 2. Changes in leukocyte SOA and %PMN and hepatic MT concentration after various MT inducing pretreatments in mice.

とがわかる⁶⁾。これらの事実は、数グレイの放射線曝露による死亡は、個体の生体防御機構の活性化との微妙なバランスの中で生じることを示している。

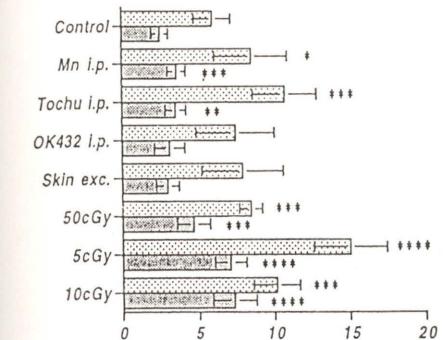


Fig. 3. Numbers of spleen plaque forming cell counts 4 days after SRBC injection to mice with various MT inducive pretreatments or preirradiation.

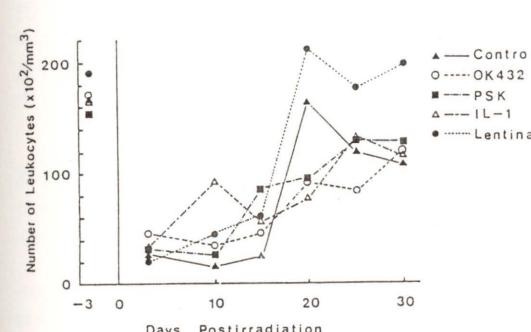


Fig. 4. Changes in leukocyte counts in survived mice with MT inducive pretreatments during 30-day postirradiation period. left panel 6.0 Gy, right panel 6.4 Gy, each single dose.

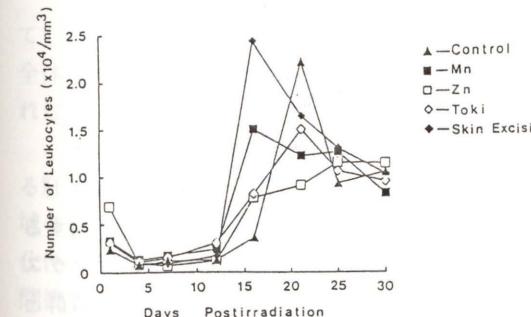


Fig. 5. Changes in erythrocyte counts in survived mice with MT inducive pretreatments during 30-day postirradiation period, left panel 6.0 Gy, right panel 6.4 Gy each single dose.

2. 低線量の放射線曝露の場合

放射線ホルミシスに関する最近の研究によれば、生体の低線量放射線反応性には線量に特異な反応性の高い線量域(windows)があり、マウスでは5~10 cGy照射の8週間後、50 cGy照射の2週間後にのみ、生体の放射線抵抗性が高まっている⁷⁾。このメカニズムを探るため、筆者らは1.で行ったと同様の各種の測定を試みたところ、この線量域の前照射でも、次に示すよ

Table 2. Hemolytic reaction (HR) titers in sera of mice with pre-irradiation treatments at 7 days after SRBC i.p.

Pre-irradiation treatment	HR titer	t-test
Sham-irradiated, 2 weeks prior	6.6±0.7	
50 cGy, 2 weeks prior	7.6±0.7	p<0.01
Sham-irradiated, 8 weeks prior	6.4±0.8	
5 cGy, 8 weeks prior	6.7±0.9	N.S.
10 cGy, 8 weeks prior	6.9±1.0	N.S.

(Mean±S.D.)

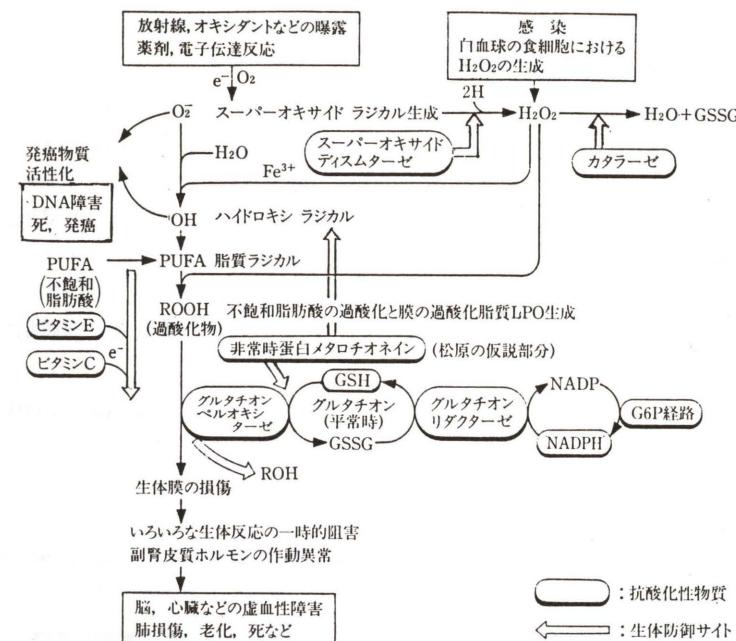


Fig. 6. Production of free radicals and chemical protection mechanism in organisms.

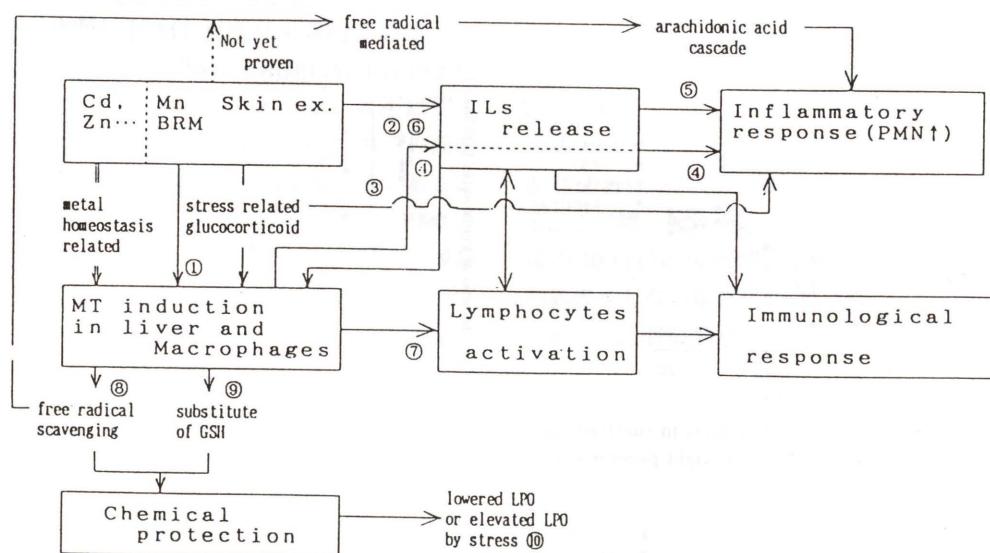


Fig. 7. Coordination of chemical protection with biological response.
A noted number on each route indicates the reference cited in the text.
For established routes, references were not cited.

うに免疫系の諸機能が活性化していることが確認された。すなわち上記各種の前処理を施した後、生存率の増加など放射線抵抗性の増強が確認された時点でのマウスの免疫活性を調べるために、その時点でマウスに羊赤血球(SRBC)を腹腔内注射

し、その4日後の脾細胞におけるSRBCに対するプラック形成能(PFC)を測定し、無処置マウス(Control群)および前述のMT誘導性前処置群と比較し、Fig. 3の結果を得た。特に50cGyの前照射2週間後では、有意に($p < 0.01$)PFCが亢進し

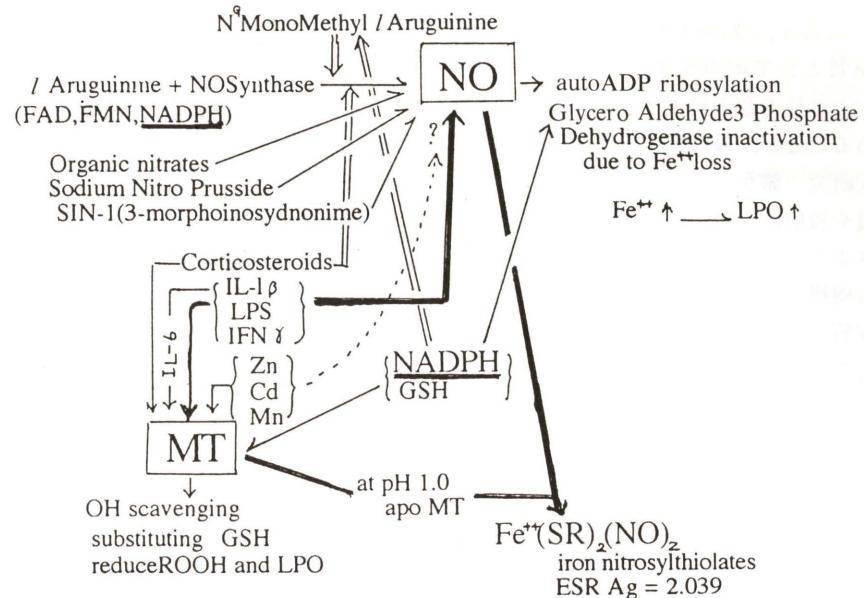


Fig. 8. Possible interaction between metallothionein (MT) and nitric oxide (NO) in the liver.

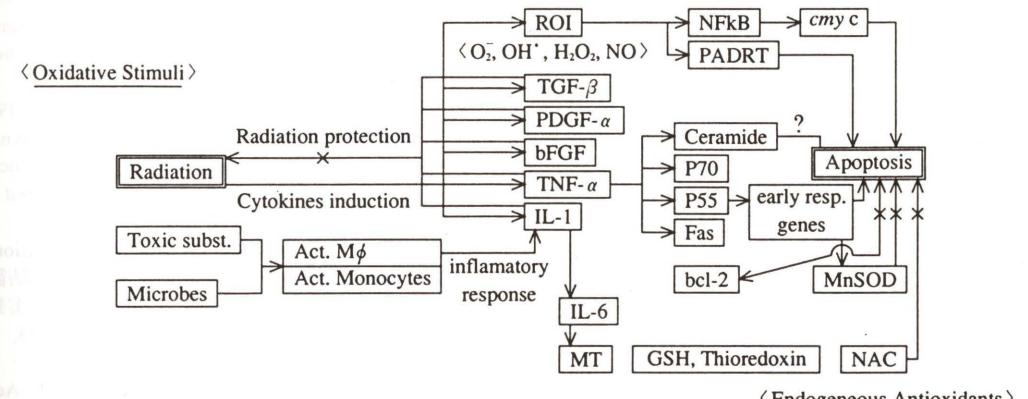


Fig. 9. Releases of cytokines induced by oxidative stressors including radiation and coordinated radioprotective reactions.

ている。この際、Table 2に示すように、HR値は全体的に亢進していたが、HA値は有意差はみられなかった。

一方、5-50cGyの線量域の放射線前処置による肝MT誘導性は明らかでなく、従ってこの線量域の放射線曝露の場合は、MT産生等による抗酸化性の化学的防御よりも、2週間後あるいは8週間後という、より長時間後に発現する免疫系の防御機能の活性化が主たる役割を演じているとみられる。

3. 化学的防御機構と免疫機構活性化の接点としての活性酸素（今後の課題）

上で述べた化学的防御機構と免疫機構の活性化の接点は何であろうか。Fig. 6は放射線に対する生体の化学的防御機構を図示したものである⁸⁾。化学的防御の主役はSODやGSHであり、cofactorとしてのvit.C, vit.E, NADPHなどの関与も無視できない。筆者は早くから抗酸化物質としてのメタロチオネイン(MT)の役割に注目しているが、MTは単なるO₂⁻やOH[·]のスカベンジャー

であるのみならず、グルタチオン・ペルオキシダーゼの基質としての役を果たすことを示す^{8,9)}とともに、より長寿命の有機ラジカルを減少させる作用のあることが、最近名古屋大学の宮崎哲郎氏との共同研究で確かめられた¹⁰⁾。

有害物質や放射線などの環境刺激要因に対して生体は、さまざまなストレス反応を示すと同時に自身の防御機構を活性化させる。刺激は脳下垂体から副腎皮質を通じて各種の臓器へホルモン性に伝達されるが、受け皿として主役を演ずるのは化学的解毒を司る肝臓と、初期免疫反応を担う第一線の兵士マクロファージである。

筆者はこれらの因子の相互関係を Fig. 7 のように暫定的に想定している。図中の番号は個々の関連についての文献的裏付けを説明するためのもので以下の情報を参考にして作成した。

- ① Cd や Mn などの金属は肝臓のみならず、マクロファージやリンパ球でも MT 生成を促す。
- ② Cd や Zn などの金属や OK432 はサイトカインを放失させ、Mn も BRM (免疫増強剤) と報告されている。
- ③ 重金属はグルココルチコイドホルモンを放失させ、骨髄から末梢への白血球の流出を促す。
- ④ 金属投与はニハトリの肝 MT の増加と共に炎症反応をおこす。
- ⑤ IL-1 の放出から好中球の放出を観測している。
- ⑦ Pb, Ni, Zn などの金属イオンと、外因性チオールの存在とリンパ球の活性化について検討。
- ⑩ ストレスによって LPO, GP, GR, GSH レベルが変化する。

さて①に示すようにマクロファージ中に MT が産生されているという報告がいくつかあるが¹¹⁾、筆者は Fig. 8 に示すような仮定のもとにマクロファージにおける MT の産生は、近年着目されている情報伝達性フリーラジカルである一酸化窒素 NO との関連に注目している。NO は、TNF や LPS などの刺激でマクロファージ中に誘起され、酵素の不活化や殺菌作用を示すが¹²⁾、MT どのような相互作用を営んでいるのであろうか。

筆者は目下、ルイ・パスツール大学のグループと共同研究を始めたところである。

Fig. 9 は、最近の知見、文献¹³⁾等を参考に、酸化的ストレスの一つとしての放射線の誘起する細胞因子の活性化と、それに対する防御反応（文献的に報告のあるもの）を図示したものである。

今後は、放射線障害と肝臓における MT や SOD など解毒機構との関係、マクロファージ等から出されるサイトカイン類や情報伝達性フリーラジカル特に NO との関係などの解明が望まれる。

参考文献

- 1) Selye, H. (1978) *The Stress of Life* (revised edition), McGraw-Hill, N. Y.
- 2) Matsubara, J., Tajima, Y. and Karasawa, M. (1987) Metallothionein induction as a potent means of radiation protection in mice. *Radiat. Res.*, **111**, 267-275.
- 3) Matsubara, J., Ikeda, A., Kinoshita, T. and Shimoyma, T. (1988) A new perspective of radiation protection by metallothionein induction. *Pharmac. Therapeutics*, **39**, 331-333.
- 4) Sasagawa, S., Matsubara, J. and Satow, Y. (1993) Stress-related induction of metallothionein synthesis and increase in peripheral polymorphonuclear leukocytes in mice. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, **15**, 217-226.
- 5) Matsubara, J. and Ina, Y., paper in preparation.
- 6) 松原純子 (1992) メタロチオネインと生体防御機構「放射線抵抗性の誘導」。色田、山田編 実業公報社 放医研 シンポジウム・シリーズ 23, pp. 23-31.
- 7) Yonezawa, M., Takeda, A. and Misonoh, J. Acquired radioresistance after low dose X-irradiation in mice. *J. Rad. Res.* **31**, 256-262 (1990), and Yonezawa, M., Misonoh, J. and Hosokawa, Y., Two types of acquired radioresistance after low dose of X-rays in mice. In "Low dose irradiation and biological defense mechanisms" Eds., Sugawara, Sagan and Aoyama, pp. 215-218 (1992).
- 8) 松原純子 (1986) メタロチオネインと生体防御機構、科学, **56**, 86-95.
- 9) Matsubara, J. (1987) Alteration of radiosensitivity in metallothionein induced mice and a possible role of Zn-Cuthionein in GSH-peroxidase system, In "Metallothionein II" Eds. Kägi and Kojima Birkhäuser, Basel, pp. 603-613.
- 10) 宮崎哲郎、松本拓郎、松原純子、マウスの放射線抵抗性獲得に関する ESR による研究、長寿命ラジカルとメタロチオネインの反応、日本化学会、第 69 回春季年会、1995 年 4 月、京都。
- 11) Laurin, D. E. and Klasing, K. C. (1990) Roles of synthesis and degradation in the regulation of metallothionein accretion in a chicken macrophage cell line. *Biochem. J.*, **268**, 459-463.
- 12) Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, **6**, 3051-3064.
- 13) Weichselbaum, R., Fuks, Z., Hallahan, D., Haimovitz-Friedman, A. and Kufe, D. (1993) Radiation-induced cytokines and growth factors: cellular and molecular basis of the modification of radiation damage. In "Molecular Biology for Oncologists" CHAPTER 18 Eds. Yarnold, J., Stxatton, M. and McMillan, T. pp. 213-221.

生体計測用 ESR を用いた生体内ラジカルの挙動解析

In vivo ESR measurement of free radical reactions in living mice

内 海 英 雄

Hideo Utsumi

九州大学薬学部 812-82 福岡市東区馬出 3-1-1

Kyushu University, Faculty of Pharmaceutical Sciences
Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-82, Japan

(受付 1994 年 12 月 5 日; 受理 1994 年 12 月 5 日)

Summary

Recently, free radicals such as active oxygen species and nitric oxide are believed to be one of the key substances in physiological and pathological phenomena. Formation and extinction of free radicals may be regulated through bio-redox system, in which various enzymes and compounds should be involved in very complicated manner. Thus, direct and non-invasive measurement of *in vivo* free radical reactions with living animals must be essential to understand the role of free radicals in pathophysiological phenomena.

Electron spin resonance spectroscopy (ESR) is very selective and sensitive technique to detect free radicals, but a conventional ESR spectrometer has large defect in application to living animals, since high frequent microwave is absorbed with water, resulting in generation of high fever in living body. In order to estimate *in vivo* free radical reactions in living whole animals, we develop *in vivo* ESR-CT technique using nitroxide radicals as spin-probes.

In the present paper, I will introduce *in vivo* ESR technique and our recent results concerning non-invasive evaluation of free radical reactions in living mice.

Keywords: *in vivo* ESR, free radical, active oxygen, nitric oxide

はじめに

ESR は electron spin resonance (電子スピン共鳴) の略称で EPR (electron paramagnetic resonance) とも呼ばれる磁気共鳴法の一つである。NMR がプロトンや炭素などの核スピンを見ているのに対し ESR では不対電子のスピンを対象している。不対電子を持つ代表的物質には活性酸素や最近注目を集めている一酸化窒素 (NO; nitric oxide) などのフリーラジカル、遷移金属がある。ESR は反応中間体や金属錯体の構造解析、生体膜の動的構造解析、活性酸素や一酸化窒素の生理機能の解析に盛んに利用されている。

不対電子は電子スピンを有し、棒磁石としての性質があるために、静磁場中におかれるとゼーマン分裂によりそのエネルギー状態は安定状態と不安定状態に分裂する。ここに外から両状態間のエネルギー差に相当する電磁波を照射すると電子スピンはそのエネルギーを吸収して安定状態から不安定状態に遷移する。ESR はこの電磁波の吸収を観測する分光器である。このときのエネルギー差は 400 mT の静磁場で 10 GHz (10^{10} Hz) 程度の、また 40 mT の静磁場では 1 GHz 程度のマイクロ波に相当し、NMR でのプロトンのゼーマン分裂に比べて数百倍大きい。

最も広く用いられている X-バンド ESR 分光器では 9.4 GHz の高周波マイクロ波を用いている。これはこの周波数帯が感度上および装置の製作上最も好都合であることによる。しかし、このよう

な高周波のマイクロ波は水のような誘電率の大きい溶媒によって吸収され易く、その結果、溶媒が発熱を起こすため、0.1 mL 以下という少量の試料しか測定できない。

生体内ではさまざまな系でフリーラジカルが生成する。生成したフリーラジカルは生体由来あるいは外来の抗酸化剤の影響を受けたり、生体物質と種々の反応を行うことにより様々な生体作用を発現する。従来、生体内のフリーラジカル反応は試験管内反応からの類推で議論されてきた。しかし、非常に単純化された試験管内反応の結果を複雑な生体内フリーラジカル反応に演繹することは自ら限界がある。生体内で起こっているフリーラジカル反応を理解するためには生体丸ごとを生きた状態で ESR 測定することが不可欠である。

本稿では、生体を丸ごと ESR 測定することを可能とした生体計測用 ESR について我々が行ってきた研究を中心に概説する。

1. 生体計測用 ESR

生体内的ラジカルを初めて *in vivo* 測定したのは 1975 年、Feldman らである (Feldman *et al.*, 1975)。彼らはラット肝臓中にヘリックスコイルを埋挿し、腹腔内投与したニトロキシドラジカルの消失を X-バンド ESR で測定した。この方法は非共鳴型であるため X-バンドでも測定可能であった。しかし、コイルを外科的に測定部位に挿入する侵襲的方法で感度もよくなく、あまり注目されなかった。

生体そのものを *in vivo* ESR 測定するためには水によるマイクロ波の吸収を抑えなければならない。マイクロ波の磁界と電界成分のうち、ESR 測定には磁界成分が必要で、電界成分と水が接触するとマイクロ波の誘電損失をもたらす。現在の ESR 装置では感度を高めるために試料測定部に空洞型共振器を用いているが、この空洞型共振器では試料と電界成分が接触し易いので、大容量試料には適さない。生体計測用 ESR にはマイクロ波の磁場成分だけ存在する広い空間が必要であり、スプリット・リング共振器やループ・ギャップ共振器、リ・エントラント共振器などが考案されている。又、共振器を用いないものとして、ヘ

リックスコイルやサーフェスコイルがある。

一方、水の誘電分散特性によると誘電損失の起り易さはマイクロ波の周波数に強く依存し、低い周波数帯域、例えば、1 GHz のマイクロ波を用いると誘電損失は著しく低減される。この周波数帯域は L-バンドと呼ばれ、その ESR 装置を L-バンド ESR と総称している。また、最近では更に低周波数の ESR、例えば 300 MHz の P-バンド ESR も開発されている。現在市販されている生体計測用 ESR 装置では L-バンドのマイクロ波を用い磁场成分だけを動物に照射するためのループギャップレゾネーター方式が採用されている (内海ら, 1990)。この装置を使うと、生体中のラジカルやスピノン標識薬物の挙動を無侵襲測定でき、更に CT 化によりラジカルの体内分布も 0.1 mm 程度の分解能で画像化できる。

2. 生体計測用 ESR の測定対象

多くの活性酸素、突然変異の原因となるラジカル反応中間体、金属錯体や生命化学の分野で最近話題となっている一酸化窒素などは全て常磁性種である。原則的にはこれらの不対電子を有する常磁性種は全て測定の対象となりうる。しかし、安定性や量的問題、緩和時間の関係で必ずしも全てが室温で測定できるわけではない。

現在の生体計測用 ESR の感度は通常の X-バンド装置の数十分の一で、動物存在下ではさらに悪くなる (Utsumi *et al.*, 1991)。そのために生体内で発生した活性酸素や金属酵素などの微量常磁性物質を直接測定するのは困難である。生体内で產生した一酸化窒素については後述するように、鉄錯体に捕捉することで測定できるようになったが、不安定な活性酸素はスピントラップ法によつても未だ観測できていない。そこで、安定なニトロキシドラジカルを投与し、そのシグナル変化から間接的にラジカル反応を計測する方法が採られている。

ニトロキシドラジカルは種々の生体内酸化還元酵素や活性酸素、抗酸化剤などと反応し、その常磁性を消失したり獲得したりする (Miura *et al.*, 1993)。この活性酸素との反応性のために、脂溶性や水溶性のニトロキシドラジカルは脂質過酸化を

Table 1. Abbreviation and chemical structure of spin-probes for *in vivo* ESR Measurement.

Acronym	Chemical name	R	Basic structure
1. TEMPO derivatives			
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl	-H	
Hydroxy-TEMPO	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl	-OH	
Amino-TEMPO	4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl	-NH ₂	
Carboxy-TEMPO	4-carboxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl	-COOH	
Oxo-TEMPO	4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl	=O	
CAT-1	4-trimethylammonium-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl iodide	-N ⁺ (CH ₃) ₃ I ⁻	
Phosphonoxy-TEMPO	4-phosphonoxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl	-OPO ₃ H ₂	
Glutarammide-TEMPO		-NHCO(CH ₂) ₃ COOH	
Methylglutaramide-TEMPO		-NHCO(CH ₂) ₃ COOCH ₃	
TEMPO-T	4-N'-[N-3-(1,5-disodiumsulfonaphthyl)]-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl		
Hexamethonium-TEMPO			
2. PROXYL derivatives			
Carboxy-PROXYL	3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl	-COOH	
Carbamoyl-PROXYL	3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl	-CONH ₂	
Aminomethyl-PROXYL	3-aminomethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl	-CH ₂ NH ₂	
Sulfonamide-PROXYL			
Barbiturate-PROXYL			
3. Oxazolidine derivatives			
OXANO	2-ethyl-2,4,4-trimethyloxazolidine-3-oxyl		
nSLS	n-(N-oxyl-4'4'-dimethyloxazolidine)-stearic acid		
nSL-PC	1-palmitoyl-2-(n-SLS)-phosphatidylcholine		
nSL-TG	1,2-dipalmitoyl-3-(n-SLS)-glycerol		
SL-Cholestane			
nSLS-Cholesterol			

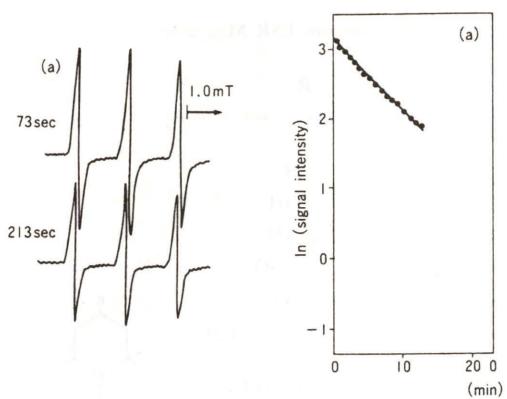


Fig. 1. *In vivo* ESR spectra of carbamoyl-PROXYL at abdomen of mouse after i.v. administration and its signal decay-curve (Utsumi *et al.*, 1990).

抑制する性質がある。一方、還元されたヒドロキシルアミンは酸化酵素の作用を受け高酸素状態で再びニトロキシドラジカルに酸化され、常磁性を獲得する。

我々は、このニトロキシドラジカルの性質に注目し、安定なニトロキシドラジカルを生体内に投与し、そのシグナル変化から間接的に生体内フリーラジカル反応を評価した。Table 1 に我々がスピンプローブとして用いているニトロキシドラジカルの一覧を示す。薬物受容体結合能を持つプローブを用いた場合には特定部位でのフリーラジカル反応を評価できる。また、両親媒性のプローブを利用すると、細胞やリポ蛋白、薬物輸送担体などの体内挙動を解析できる。

3. ニトロキシドプローブを用いた生体内フリーラジカル反応の解析

Fig. 1 に ddY マウスにニトロキシドラジカルの一つである Carbamoyl-PROXYL の水溶液を尾静脈内投与し、肝臓部位を中心に測定したときの ESR スペクトルを示す (Utsumi *et al.*, 1990)。ニトロキシドラジカルでは窒素の核スピンが 1 であるためにゼーマン分裂は更に -1, 0, 1 の 3 つの状態に分裂し、その結果 3 本の超微細分裂吸収が見られる。ここで規則的に現われるノイズはマウスの呼吸によるもので、測定中にマウスが死んだ場合にはこのノイズも消える。この ESR スペクトルでは 3 本の吸収線が等強度であることから、ニ

Table 2. Reduction rate of nitroxyl spin-probes at mice abdomen after intravenous injection (min^{-1} ; mean \pm S.D.) (Sano *et al.*, 1994).

	Breast	Head
Hydroxy-TEMPO	0.97 \pm 0.33(5)	0.55 \pm 0.13(5)
Amino-TEMPO	1.53 \pm 0.54(8)	0.92 \pm 0.14(5)
CAT-1	0.21 \pm 0.08(6)	0.07 \pm 0.05(5)
TEMPO-T	0.27 \pm 0.10(6)	0.12 \pm 0.04(6)
Carboxy-TEMPO	0.46 \pm 0.10(5)	0.25 \pm 0.02(5)
Hexamethonium-TEMPO	0.06 \pm 0.04(4)	0.02 \pm 0.01(2)
Carbamoyl-PROXYL	0.10 \pm 0.05(6)	0.05 \pm 0.01(5)
Carboxy-PROXYL	0.04 \pm 0.01(5)	0.04 \pm 0.02(5)
Barbiturate-PROXYL	0.06 \pm 0.03(4)	0.04 \pm 0.02(2)
Sulfonamide-PROXYL	0.20 \pm 0.08(5)	0.12 \pm 0.02(2)

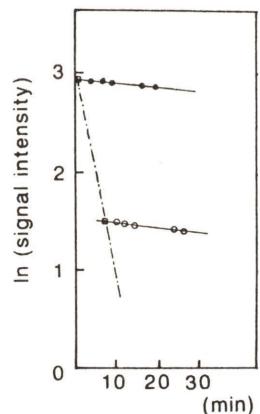


Fig. 2. ESR signal decay-curve of carbamoyl-PROXYL in the collected blood after i.v. injection (Utsumi *et al.*, 1990).

トロキシドラジカルは遊離状態で存在していると思われる。もし、ラジカルが血清アルブミンやリボ蛋白などと結合した場合や粘性の高い媒体に取り込まれると分子運動が遅くなるために、両端のシグナルは小さくなる。Fig. 1 に示すように、ESR シグナル強度の経時変化を片対数プロットすると初期には直線的に減衰する。従って、静脈内投与されたニトロキシドラジカルは投与直後、生体内で一次反応で消失すると見做される。

このシグナル消失速度はスピンプローブの種類や測定部位により大きく異なる (Table 2) (佐野ら, 1994)。一般に、荷電を持たないプローブの方が消失速度は大きい。また、同じ置換基同士で比較すると、TEMPO 系の方が PROXYL 系のそれよりも約 10 倍程度大きい。また、測定部位間では膀胱部位と肝臓部位では有意差はないが、頭部では遅い化合物もある。我々は当初酸化還元電位がスピンクリアランスの速度に関係するものと考えたが、今のところ、必ずしもニトロキシドラジカルの酸化還元電位だけでは説明できない。

このシグナルの減衰、即ち、スピンクリアランスの機構を明らかにするために、予めニトロキシドラジカルをマウス尾静脈に投与し、間隔をおいて 2 回採血し、血液中のニトロキシドラジカルの減衰を調べた (Fig. 2) (Utsumi *et al.*, 1990)。採血後の血液中ではいずれのラジカルでもその減衰速度は生体内のほぼ十分の一で、外挿法で得た生体内消去速度定数は *in vivo* での結果と一致した。

Table 3. Influence of aging and feeding on ESR signal decay of nitroxide radical at head of BDF1 mice (min^{-1} ; mean \pm S.D.) (Gomi *et al.*, 1993).

Age (mo.)	Number of mice	Feeding	Spin clearance rate (min^{-1}) mean \pm SD
6	10	<i>ad libitum</i>	0.038 \pm 0.006 [§]
30	4	<i>ad libitum</i>	0.026 \pm 0.004 ^{§†}
39	4	restricted	0.035 \pm 0.004 [†]

^{§†} Means are significantly different from each other at the $p < 0.05$ level as analyzed by Student's *t*-test.

還元力」即ち “Reducing Capability” を示しており、生体自身の総合抗酸化力 (Antioxidant Capacity) とも密接に関係している。

4. 総合還元力の生理的意味

ニトロキシドプローブの減衰から評価される総合還元力は生理的にどのような意味を持つのであるか。我々は種々の生理状態でのマウスを用いてこの ESR シグナルの減衰を調べた。

マウスの 6 月齢、30 月齢、および食餌を 60% に制限した 39 月齢マウスにスピンプローブとして carbamoyl-PROXYL を腹腔内投与し、頭部での ESR シグナルの減衰を調べると、老化群で明らかに減衰速度の低下が認められる (Table 3) (Gomi *et al.*, 1993)。しかし、興味深いことに食餌を制限した群では幼若群に匹敵する減衰速度を示した。従って、マウスの総合還元力は老化により低下することおよび食餌の摂取量が関係することが示唆される。

更に、 γ -線全身照射によっても総合還元力は低下し、放射線障害が生体抗酸化システムにも及んでいることや、種々の抗酸化剤、例えばビタミン C や E をマウスに投与すると生体の総合還元力が有意に大きくなることが示されている。

一方、酸化的ストレスに曝した場合にもこのシグナル減衰は変化する。Table 4 に種々の酸素濃度にマウスを暴露した状態で頭部、腹部での ESR シグナルの減衰速度を示す。酸素濃度、測定部位に依存してシグナルの消失速度は異なり、低酸素状態では頭部、腹部ともに ESR シグナルの減衰が亢進される (Miura *et al.*, 1992)。*in vitro* の実験結果からはニトロキシドラジカルは酸素濃度が低

Table 4. Influence of oxygen concentration in inspired gas on ESR signal decay of nitroxide radical in living mice (min^{-1} ; mean \pm S.D.) (Miura et al., 1992).

	Hydroxy-TEMPO		Carbamoyl-PROXYL	
	abdomen	head	abdomen	head
12% O ₂	0.95 \pm 0.03*	0.69 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01**	0.10 \pm 0.01***
20% O ₂	0.85 \pm 0.01	0.71 \pm 0.01	0.10 \pm 0.02***	0.07 \pm 0.01
80% O ₂	0.84 \pm 0.02	0.71 \pm 0.01	0.15 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01

Clearance constants are presented as mean \pm S.E. over 5 or 6 experiments.

* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

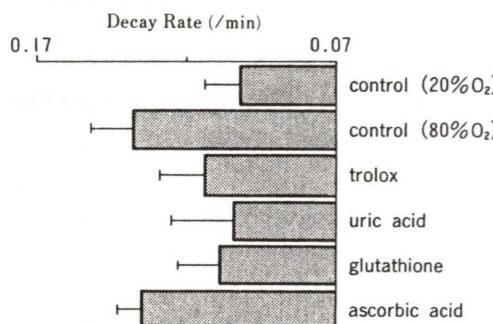


Fig. 3. Influence of antioxidants on ESR signal decay of nitroxide radical at abdomen of mice under hyperoxia (min^{-1} ; mean \pm S.D.) (Miura et al., 1994).

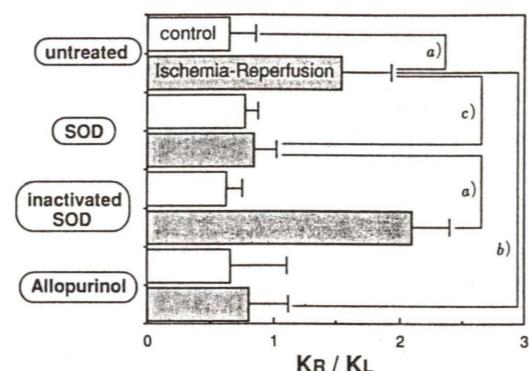


Fig. 4. Influence of ischemia-reperfusion injury and antioxidants on ESR signal decay of nitroxide radical at thigh of mice (Utsumi et al., 1993).

いほど一電子還元され易いことが知られており (Miura et al., 1993), この意味では低酸素状態で消失速度が速くなることは妥当である。

興味深いことに腹部では高酸素状態でもシグナル消失速度が著しく増大する。ニトロキシラジカルはヒドロキシラジカルなどの活性酸素の作用によってもそのESRシグナルを消失する。Fig. 3に示すように、ここで消失速度の増大はTroloxやグルタチオン、尿酸などの抗酸化剤の前処理により抑えられることから、酸化的ストレスによるシグナルの消失と判断される (Miura et al., 1994)。もし、高酸素状態で腹部のいづれかの臓器内で活性酸素が産生しているとする、この活性酸素が直接あるいは間接的にニトロキシラジカルと反応し、そのESRシグナルを減衰させ、その結果として消失速度を亢進させたのであろう。

一方、マウス大腿部で大柳らの方法を改良して虚血再灌流を起こすとその部位でのシグナル消失速度は有意に増大する (Utsumi et al., 1993)。Fig. 4は、マウスの左右大腿部にスピンドローブを投

与し、両者のシグナル消失速度の比を採ったものである。何も処置しないマウス群に較べ右大腿部に虚血再灌流を起こした群で有意に消失速度比は増加している。ここにSODやキサンチンオキシダーゼの阻害剤であるAllopurinolを添加するとその増大は抑制され、虚血再灌流による消失速度の増大にスーパーオキシドの産生が関与していることが示される。

以上に示した酸化的ストレス状態でのシグナル消失速度の増大はいずれも活性酸素の生成が関与しており、抗酸化剤の生体内での総合抗酸化力を評価するのに本方法が非常に有用であることを示している。

5. 肺における抗酸化システム

肺は直接空気と晒されており、最も酸化的なストレスを受けやすい臓器である。従って、肺には酸素障害に対する防御機構が存在するものと考えられ種々の検討がなされている。しかし、その多くは *in vitro* での結果を基にしており、実際に *in*

Table 5. Influence of SH modifying reagents on ESR signal decay of nitroxide radical at lung of mice (min^{-1} ; mean \pm S.D.) (Takeshita et al., 1993).

Sulfhydryl-blockers	Distance ^a (Å)	k^b (min^{-1})	%
None		0.111 \pm 0.013 (7)	100
Membrane-permeable			
NEM		0.037 \pm 0.001 (3)	33
Floating in membrane			
MCA	10.8	0.040 \pm 0.002 (3)	36
MBA	8.3	0.076 \pm 0.015 (4)	68
MPA	7.1	0.120 \pm 0.011 (4)	108
Membrane-impermeable			
CMBs		0.105 \pm 0.023 (4)	95

^a The distance is that from the reactive maleimide moiety to the carbon atom of the carboxyl group (27).

^b Each value represents the mean \pm SD. The numbers in parentheses are numbers of animals.

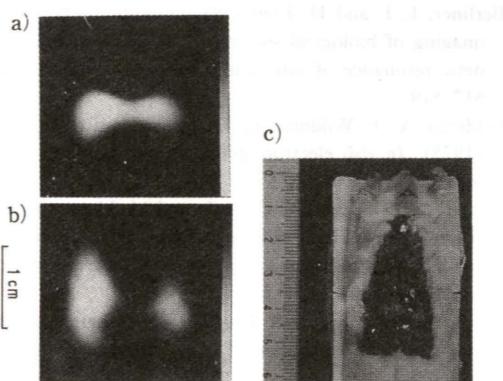


Fig. 5. ESR-CT imaging at mouse chest after intratracheal injection of carbamoyl-PROXYL (Takeshita et al., 1991).

a) and b) indicate the section images observed from tail to head and from front to back, respectively. c) is anatomical picture of mouse chest used for the ESR-CT.

in vivo で解析したものはあまりない。我々は、ニトロキシラジカルの水溶液をマウスの肺内に注入し、ニトロキシラジカルのスピノの減衰から肺におけるラジカル還元機構を探った (Takeshita et al., 1991; 竹下ら, 1992)。後に示す通り、ESR-CTでの画像診断では投与したニトロキシラジカルは肺全体で一様に分布しており、肺胞内に達していることが示された (Fig. 5)。この肺胞内へ投与したニトロキシラジカルのESRシグナルは一次反応で減衰し、薄層クロマトグラフィーの結果からニトロキシラジカルがヒドロキシルアミンに還元されることに由来することが示された。ま

た、減衰の程度は従来より言われているグルタチオンやアスコルビン酸量では説明できなかった。このニトロキシド還元力は肺洗浄液中や肺ホモジネートには認められず、細胞膜を修飾すると減少することから、実質細胞の膜酵素が関与している可能性が強く示唆された。この系では脂溶性SH修飾化合物は調節的に作用するが、グルタチオン等の水溶性抗酸化物質は関与しない (Table 5) (Takeshita et al., 1993)。従って、ここで見い出した還元系はこれまで報告されている肺における酸化障害防御系とは性質が異なる可能性が強い。

6. 一酸化窒素の *in vivo* 測定

最近、フリーラジカルの一種である一酸化窒素がその多様な生理作用と共に非常に注目を集めている。この一酸化窒素のESR測定に関し、最近、生理的温度で *in vivo* 測定する可能性が開かれた。例えば、マウス体内で产生した一酸化窒素を鉄錯体にトラップさせ、形成したニトロシル鉄錯体の *in vivo* 測定に成功したことが報告された (Lai et al., 1994)。我々も水溶性鉄錯体やリポソーム封入鉄錯体を用いてマウス体内の一酸化窒素産生を測定すると、5配位型のニトロシル鉄錯体特有の3本のESRシグナルが観測された (竹原ら, 1994)。生体計測用ESRに動物移動装置を付けると5mm間隔で正確にESRスペクトルを測定することができる。この方法で一酸化窒素の分布を見ると上腹部で有意に多く存在することが示された。今後画像化の手法を組み合わせるなどにより、一

酸化窒素の产生臓器を特定したり活性酸素と一酸化窒素との反応部位などを直接測定することも不可能でなくなるものと期待される。

7. 生体内ラジカルの画像化 (ESR-CT)

生体計測用 ESR は電子スピンのみを選択的に測定するものであり、もし画像化手法が導入されればこれまでの画像診断とは質的に異なる情報が期待できる。ESR-CT の可能性は 1979 年 Hoch 和 Day により初めて報告された (Hoch and Day, 1979)。原理は X 線 CT で用いられている手法と全く同様で、位置情報を持つスペクトルから二次元ないし三次元画像を逆投影法で作成する。

これまでの報告として Berliner ら (1987) によるラットの尾部肉腫中のニトロキシドラジカルの分布画像 (Berliner et al., 1987), 尾形ら (1992) のラット尾静脈投与ニトロキシドラジカルの頭部での CT 画像, Sotgui ら (1990) による尾静脈の 3 次元画像、あるいは我々のマウス腹部 (増水ら, 1991) や胸部 (Takeshita et al., 1991) でのニトロキシドラジカルの分布画像 (Fig. 5) などがある。この画像化の手法を発展させれば酸化還元という代謝能そのものの画像化も夢ではなく、今後の展開が望まれる。

その他に、リポソームにスピン標識薬物を封入すると、薬物輸送担体の体内挙動や担体からの薬物の放出過程についても一匹毎にリアルタイム無侵襲評価が可能であり、更に ESR-CT による体内分布の画像も得られる (大口ら, 1994)。

8. 生体計測用 ESR の今後の展望

以上のように、生体計測用 ESR は医学、薬学、生物学など生命化学研究者にとって非常に有望な測定手段となるものと期待される。現在、放射線や紫外線の照射、あるいは変異原性物質の作用で生体内にラジカル中間体が生成し、これが突然変異に関係することが示されつつある。しかし、生体内でのラジカル反応は非常に多様性に富んでおり、抗酸化剤の生体内作用一つをとっても試験管内実験での結果と相反する結果が *in vivo* では認められている。一方、広く病態の解析に関しては、活性酸素や一酸化窒素などラジカルが関与する化

学反応を詳細に解析することが不可欠となってきた。本稿で示したように、生体計測用 ESR はこの分野の研究にも威力を發揮するものと期待される。例えば、虚血・再灌流障害や老化などの研究にも有効で、我々もいくつかの系で興味ある結果を得ている。このことは、これら障害に対する薬物の評価にも我々の用いている測定系が利用できることを示唆しており、今後、生体計測用 ESR の応用がますます期待される。

参考文献

- Alecci, M., S. Colacicchi, P. L. Indovina, F. Momo, P. Pavone and A. Sotgiu (1990) Three-dimensional *in vivo* ESR imaging in rats. *Magn. Reson. Imaging*, **8**, 59–63.
- Berliner, L. J. and H. Fujii (1985) Magnetic resonance imaging of biological specimens by electron paramagnetic resonance of nitroxide spin labels. *Science*, **227**, 517–519.
- Feldman, A., E. Wildman, G. Bartolinini and L. H. Piette (1975) *In vivo* electron spin resonance in rats. *Phys. Med. Biol.*, **20**, 602–612.
- Gomi, F., H. Utsumi, A. Hamada and M. Matsuo (1993) Aging Retards spin clearance from mouse brain and food restriction prevents its age-dependent retardation. *Life Science*, **52**, 2027–2033.
- Hoch, M. J. R., and A. R. Day (1979) Imaging of paramagnetic centres in diamond. *Solid State Commun.*, **30**, 211–213.
- Ishida, S., S. Matsumoto, H. Yokoyama, N. Mori, H. Kumashiro, N. Tsuchihashi, T. Ogata, M. Yamada, M. Ono, T. Kitajima, H. Kamada and E. Yoshida (1992) An ESR-CT imaging of the head of a living rat receiving an administration of a nitroxide radical. *Magn. Reson. Imaging*, **10**, 109–114.
- Lai, C-S. and A. M. Komarov (1994) Spin trapping of nitric oxide produced *in vivo* in septic-Shock mice, *FEBS Lett.*, **345**, 120–124.
- 増水章季, 建部卓司, 増田貞夫, 武藤江美子, 内海英雄, 濱田 昭 (1991) ESR-CT 装置の試作. 磁気共鳴と医学, **2**, 63–68.
- Miura, Y., H. Utsumi, A. Hamada (1992) Effect of inspired oxygen concentration on *in vivo redox reaction of nitroxide radicals in whole mice*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**, 1108–1114.
- Miura, Y., H. Utsumi and A. Hamada (1993) Antioxidant activity of nitroxide radicals in lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 148–156.
- Miura, Y., A. Hamada and H. Utsumi (1992) *In vivo* ESR studies of antioxidant activity on free radical reaction in living mice under oxidative stress. *Free Rad. Res.*, in press.
- 大口健司, 橋本美穂, 内海英雄, 濱田 昭 (1994) *in vivo* ESRによるリポソーム体内挙動の解析, 日本薬学会第 114 年会 (東京) 講演要旨集.
- 佐野浩亮, 内海英雄, 濱田 昭, Colin F. Chignell (1994) 種々のスピン標識化合物を用いた生体内局所フリーラジカル反応の解析. 日本薬学会第 114 年会 (東京) 講演要旨集.
- 竹原宏明, 竹下啓蔵, 内海英雄 (1994) 生体計測 ESR を用いた NO の無侵襲測定. 日本薬学会九州支部大会講演要旨集.
- Takeshita, K., H. Utsumi and A. Hamada (1992) ESR measurement of radical clearance in lung of whole mouse. *Biochem. Biophys. Res.*, **177**, 874–880.
- 竹下啓蔵, 内海英雄, 濱田 昭 (1992) 生体計測 ESR によるマウス肺内におけるニトロキシドラジカルの動態解析, 磁気共鳴と医学, **3**, 65–68.
- Takeshita, K., H. Utsumi and A. Hamada (1993) Whole mouse measurement of paramagnetism-loss of nitroxide free radical in lung with L-band ESR spectrometer. *Biochem. Molec. Internat.*, **29**, 17–24.
- Utsumi, H., E. Muto, S. Masuda A. Hamada (1990) *In vivo* ESR measurement of free radicals in whole mice. *Biochem. Biophys. Commun.*, **172**, 1342–1348.
- 内海英雄, 濱田 昭, 河野雅弘 (1990) 電子スピン共鳴スペクトラル装置, *Pharm. Tech. Japan*, **6**, 1329–1335
- Utsumi, H., S. Masuda, E. Muto and A. Hamada (1991) *In vivo* ESR studies on pharmacokinetics of nitroxide radicals in whole mice. *Oxidative Damage & Repair: Clinical, Biological and Medical Aspects*. (K.J.A. Davies ed.), Pergamon Press, New York, pp. 165–170.
- Utsumi, H., K. Takeshita, Y. Miura, S. Masuda and A. Hamada (1993) *In vivo* EPR measurement of Radical reaction in whole mice, *Free Radical Res. Commun.*, **19**, ss219–ss225.

シグナルとしての活性酸素の役割

Role of Active Oxygens in Signal Transduction

野瀬 清
Kiyoshi Nose

昭和大学薬学部微生物薬品化学教室
142 品川区旗の台 1-5-8

Department of Microbiology, Showa University School of Pharmaceutical Sciences,
Hatanodai 1-5-8, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan

(受付: 1994年9月14日; 受理: 1994年9月14日)

Summary

Active oxygens are produced from cells stimulated by growth factors and cytokines. Biological significance of these active oxygens in growth regulation and gene expression was examined using tumor growth factor (TGF) β 1 and mouse osteoblastic cells as a model system. First, change in intracellular redox state was measured by a fluorescent dye, 2',7'-dichlorofluorescein, and laser-scanning confocal microscopy. The intracellular oxidized state was transiently increased about 70 min following TGF β 1-stimulation, and this increase was inhibited by the addition of catalase into the culture media. These results indicate that hydrogen peroxide was produced into culture fluid from cells treated with TGF β 1. Next, expression of egr-1 gene that is induced both by TGF β 1 and hydrogen peroxide was examined. The induction of egr-1 by TGF β 1 was inhibited by addition of catalase into culture media, whereas that by tumor promoting phorbol ester was not affected. From transient expression experiments using chloramphenicol acetyltransferase gene linked to serially deleted egr-1 gene 5'-upstream region, the CArG elements in the 5' flanking region of egr-1 promoter was identified as an essential sequence in the transcriptional stimulation. These findings suggest that hydrogen peroxide acts as a mediator for the TGF β 1-induced transcription of egr-1 gene. We have also tried to isolate a common target gene for TGF β 1 and hydrogen peroxide by differential screening of cDNA library, and have isolated a novel gene (HIC-5) that encodes a polypeptide with 7 Zn-finger structure. Induction of HIC-5 by TGF β 1 was inhibited by catalase, and these findings add further support to the notion that hydrogen peroxide acts as a second messenger for TGF β 1.

Keywords: hydrogen peroxide, TGF β 1, egr-1, gene expression

緒 言

生体を構成する各種の細胞は、さまざまなストレスやホルモン・増殖因子で刺激された場合、活性酸素を産生する (Matsubara and Ziff, 1986; Robertson *et al.*, 1990). 活性酸素は生体高分子と反応して細胞・組織を傷害することはよく知られており、非特異的防御や炎症その他の病因となる。しかし一方では、低レベルの活性酸素が細胞増殖、分化に何らかの生理的役割を果たしているとの証拠も、最近いくつか報告してきた。

我々は、培養線維芽細胞や白血病細胞に発ガンプロモーターや増殖因子の処理を行うと、微量の活性酸素が細胞から産生されることを見い出した (Shibunuma *et al.*, 1987, 1991)。この活性酸素をスカベンジャーで消去すると細胞増殖が影響をうけ、また静止期の細胞を活性酸素で処理すると、増殖因子で誘導される初期発現遺伝子の誘導およびDNA合成の上昇が見られることから、活性酸素は増殖因子のシグナルとして作用する可能性を考えた。

特に、増殖を負に制御する腫瘍増殖因子 TGF β の DNA 合成抑制作用は、培地にカタラーゼを加えると部分的に解除され、また過酸化水素は細胞毒性を示さない濃度で TGF β と同様な G1 後期特異的な DNA 合成抑制を起こした (Shibunuma et al., 1991)。これらの結果から、活性酸素は増殖因子の作用を媒介するセカンドメッセンジャーとしての機能も持つと考え、この点を TGF β の作用を中心にして解析した。

材料および方法

細胞内酸化状態の測定

マウス骨芽細胞 MC3T3 (Kurihara et al., 1986) は DMEM+10%FCS で培養し、培地交換後 7 日間培養して静止期に同調した。5 ng/ml の TGF β (キング醸造) で細胞を処理し、経時的にレドクス感受性蛍光試薬 dichlorofluorescein diacetate (DCFH, Eastman Kodak) を 5 分間取り込ませた。蛍光強度は共焦点レーザー顕微鏡 (Bio Rad, MRC500) で測定した (Bass et al., 1983; Szejda et al., 1984)。

RNA の分析

細胞からグアニジン・熱フェノール法により RNA を抽出し、ホルマリンを含むアガロースゲルで電気泳動した後、メンブランフィルターにプロットした。フィルターは 32 P 標識した遺伝子プローブとハイブリダイズした (Nose et al., 1991)。洗浄後オートラジオグラフィーを行った。

CAT アッセイ

マウスゲノムライブラリーから egr-1 cDNA の 5' 末端断片をプローブとしてスクリーニングし、egr-1 遺伝子転写制御領域 (Tsai-Morris et al., 1985) を分離した。これを CAT 遺伝子につなぎレポーターとした。細胞へは磷酸カルシウム法で遺伝子を導入した (Gorman et al., 1985)。

結果

1. TGF β 処理による細胞内レドクスの変化

我々は以前に、MC3T3 細胞を G1 後期で TGF β 処理すると、培地中に過酸化水素が産生されることを報告した (Shibunuma et al., 1991)。その定量には p-ヒドロキシフェニルプロピオン酸

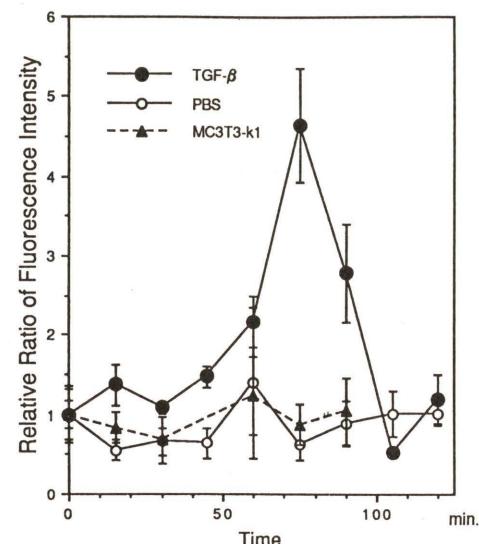


Fig. 1. Change in intracellular redox state in MC3T3 cells. Cells were either treated with saline (○) or 5 ng/ml TGF β (●) for indicated times. DCFH-DA was incorporated, and fluorescence intensity was measured by confocal microscopy. Closed triangles indicate the results obtained with ras-transformed MC3T3 cells that contained no receptor TGF β .

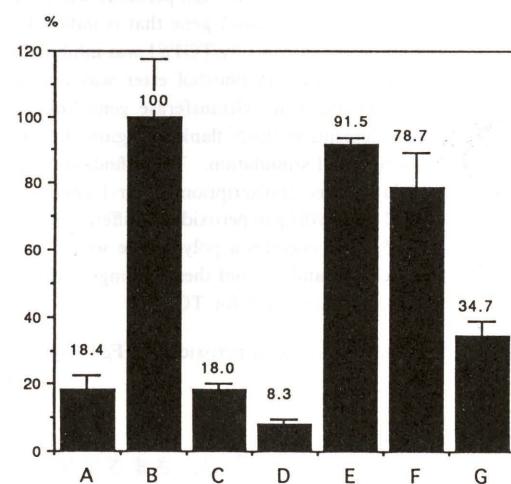


Fig. 2. Effect of radical scavengers on the increase in cellular oxidized state. MC3T3 cells were treated with TGF β for 70 min in the absence or presence of scavengers, and intracellular oxidized state was measured as shown in Fig. 1. A, untreated. B, 5 ng/ml TGF β . C, TGF β +catalase. D, catalase. E, TGF β +inactivated catalase. F, TGF β +0.5 mM N-acetylcysteine. G, TGF β +5 mM N-acetylcysteine.

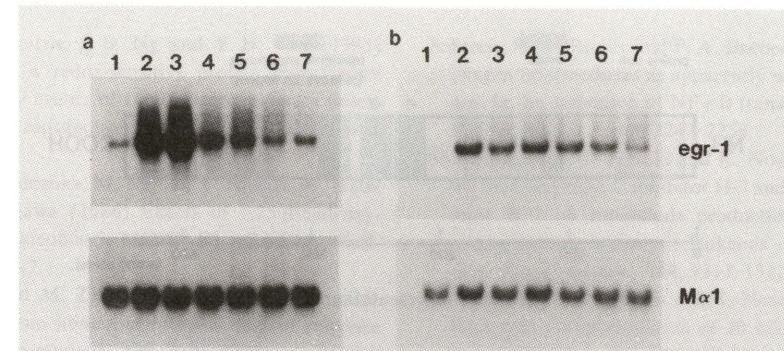


Fig. 3. Effect of scavengers on the induction of egr-1. a; MC3T3 cells were either untreated (1), or treated with 5 ng/ml TGF β in the absence (2), or presence of 0.5 mM N-acetylcysteine (3), 0.1 mM pyrrolidine thiocarbamate (4), 5 mM K-ferricyanide (5), 5 mM ascorbic acid (6), or catalase 170 u/ml (7). b; Cells were untreated (1), or treated with 5 ng/ml TGF β in the absence (2), or presence of N-acetylcysteine at 0.1, 0.5, 1, 2.5, or 5 mM, respectively. Total RNA was extracted, and egr-1 mRNA levels were analyzed by Northern blot hybridization.

を用いたが、さらに感度の高い方法として、DCFH と共に焦点顕微鏡による細胞内酸化状態の変化を測定した。

Fig. 1 に示されるように、静止期の細胞を TGF β 処理すると、約 70 分をピークとする一過性の細胞内酸化状態の上昇が認められた。この上昇は TGF β の受容体を持たない細胞では見られず、受容体を介した反応と考えられる。細胞内酸化状態の上昇は、培地中に各種の活性酸素スカベンジャーを加えると抑制され、特にカタラーゼにより顕著に抑制された (Fig. 2)。このことは、過酸化水素が細胞内酸化状態の上昇に寄与していることを示している。

2. TGF β による egr-1 遺伝子誘導に対するスカベンジャーの作用

過酸化水素が TGF β の刺激に応じて細胞から產生され、何らかの生理的機能を持つのであれば、TGF β による遺伝子誘導も過酸化水素を消去してやれば変化することが期待される。TGF β および過酸化水素で共通に誘導される遺伝子を検索した結果、初期発現遺伝子 egr-1 が MC3T3 細胞においていずれの物質によっても強く誘導されることがわかった。

Fig. 3 にノーザン分析の結果を示すが、TGF β による egr-1 遺伝子の誘導は、pyrrolidine thiocarbamate (PTDC), フェリシアン化カリ、アスコルビン酸、カタラーゼで顕著に抑制された。また、N-acetylcysteine (NAC) も 5 mM 以上の濃度では

	Relative CAT Activity	TGF β	H ₂ O ₂
pEgr417	100	100	
pEgr393	43	33	
pEgr356	25	18	
pEgr111	7	7	
pEgr-94	5	3	
pEgr-72	4	3	

Fig. 4. Effect of TGF β and hydrogen peroxide on egr-1/CAT. Serial deletions of mouse egr-1 enhancer region were linked to CAT reporter, and the plasmids were transfected into MC3T3 cells. Cells were treated with 2 ng/ml TGF β or 0.1 mM hydrogen peroxide for 8 hr, and CAT activity was measured.

抑制作用を示した。

3. TGF β , 過酸化水素に共通な egr-1 遺伝子転写制御領域

過酸化水素を介した TGF β の egr-1 遺伝子誘導に関与するシスエレメントを解析するため、マウス egr-1 遺伝子 5' 上流のゲノム DNA を分離し、CAT 遺伝子に結合した。この 5' 上流域には 2 個の AP-1 エレメントと 5 個の CArG エレメントが含まれる。これらを段階的に欠失させた DNA 断片を持つ CAT プラスミドを作製し、MC3T3 細胞に導入した。細胞を TGF β または過酸化水素で処理して、CAT 活性を測定した結果が Fig. 4 である。この結果から、いずれの因子による egr-1 遺伝子転写活性化には少なくとも 3 個の CArG エレメントが必要とされることが明らかである (Ohba et al., 1994)。

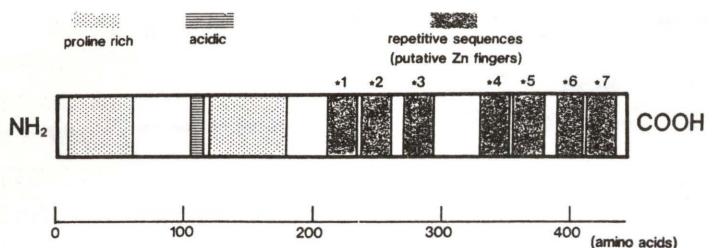


Fig. 5. Schematic representation of HIC-5 protein.

4. TGF β , 過酸化水素の共通な標的遺伝子の検索

TGF β , 過酸化水素はいずれも MC3T3 細胞において、増殖抑制作用を持つ。この増殖抑制作用に直接関与する新規遺伝子を分離する試みを行った。TGF β で 4 時間処理をした細胞の mRNA から cDNA ライブライリーを作製し、過酸化水素 4 時間処理細胞および未処理細胞からの mRNA を鋳型とした cDNA をプローブとして、差し引きハイブリダイズを行った。いくつかの陽性クローリングが得られたが、その一つ (HIC-5) は、いずれの因子によっても誘導される新しい遺伝子であることが判明した (Shibamura et al., 1994)。

HIC-5 cDNA の塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、Fig. 5 に模式的に示すように 7 個の Zn-フィンガーを持つ特徴的な蛋白質を示唆した。この cDNA の動物細胞での発現ベクターを作製し、MC3T3 細胞、ヒト不死化線維芽細胞に導入したところ、センス鎖の発現によりコロニー形成が抑制され、HIC-5 遺伝子は増殖の負の制御に関与することが示唆された。

考 察

以上の結果から、TGF β 処理により、細胞内の酸化状態が上昇し、これは過酸化水素によることが示された。培地中に加えたカタラーゼが、この酸化状態の上昇を抑制し、カタラーゼは細胞内には取り込まれないと考えられるので、過酸化水素は細胞外に放出されると考えられる。その产生系は不明だが、過酸化水素が生体膜を自由に通過できることを考えると、細胞内で產生され、培地と平衡状態にあるのかもしれない。

TGF β で誘導される遺伝子のなかで、egr-1 遺

伝子の誘導が培地中にカタラーゼその他のスカベンジャーを添加すると抑制されることから、過酸化水素は egr-1 遺伝子誘導においてセカンドメッセージとして機能していることが考えられる。この点は、egr-1 遺伝子の転写制御領域のなかで、CArG エレメントが TGF β , 過酸化水素の共通の標的となっているとの知見からも裏づけられる。

活性酸素は、その高い反応性からさまざまな生体物質と反応し、その結果細胞に傷害を与えることは良く知られている (Cerutti et al., 1985)。しかし、最近細胞内レドクスの変化により蛋白質キナーゼ (Bauskin et al., 1991) やホスファターゼ (Guy et al., 1993) の活性が制御されること、また NF κ B (Schreck et al., 1991) や AP-1 (Abate et al., 1990) もレドクス制御をうけることが報告されており、生理機能の調節因子の一つとして、活性酸素が機能していることが考えられる。

文 献

- Abate, C., L. Patel, F. J. Rauscher, III and T. Curran (1990) Redox regulation of fos and jun DNA binding activity *in vitro*, *Science*, **249**, 1157–1161.
- Bass, D. A., J. W. Parce, L. R. Dechatelet, P. Szejda, M. S. Seed and M. Thomas (1983) Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation, *J. Immunol.*, **130**, 1910–1917.
- Bauskin, A. R., I. Alkalay and Y. Ben-Neriah (1991) Redox regulation of a protein tyrosine kinase in the endoplasmic reticulum, *Cell*, **66**, 685–696.
- Cerutti, P. S. (1985) Prooxidant state and tumor promotion, *Science*, **227**, 375–381.
- Gorman, C. M., L. F. Moffat and B. H. Howard (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1044–1051.
- Guy, G. R., J. Cairns, S. B. Ng and Y. H. Tan (1993) Inactivation of a redox-sensitive protein phosphatase during the early events of tumor necrosis factor/interleukin-1 signal transduction, *J. Biol. Chem.*, **268**, 2141–2148.
- Kurihara, H., S. Ishizuka, M. Kiyoki, Y. Hakata, K. Ikeda and M. Kumegawa (1986) Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Endocrinology*, **118**, 940–947.
- Matsubara, T. and M. Ziff (1986) Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines, *J. Immunol.*, **137**, 3295–3298.
- Nose, K., M. Shibamura, K. Kikuchi, H. Kageyama, S. Sakiyama and T. Kuroki (1991) Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line, *Eur. J. Biochem.*, **201**, 99–106.
- Ohba, M., M. Shibamura, T. Kuroki and K. Nose (1994) Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor β 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells, *J. Cell Biol.*, **126**, in press.
- Robertson, F. M., A. J. Beavis, T. M. Oberyszyn, S. M. O'Connell, A. Dokidos, D. L. Laskin, J. D. Laskin and J. J. Reiner, Jr. (1990) Production of hydrogen peroxide by murine keratinocytes following treatment with the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Cancer Res.*, **50**, 6062–6067.
- Schreck, R., P. Rieber and P. A. Baeuerle (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NF- κ B transcription factor and HIV-1, *EMBO J.*, **10**, 2247–2258.
- Shibamura, M., T. Kuroki and K. Nose (1987) Effects of the protein kinase C inhibitor H-7 and calmodulin antagonist W-7 on superoxide production in growing and resting human histiocytic leukemia cells, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **144**, 1317–1332.
- Shibamura, M., T. Kuroki and K. Nose (1991) Release of H₂O₂ and phosphorylation of 30 kilodalton proteins as early responses of cell cycle-dependent inhibition of DNA synthesis by transforming growth factor β 1, *Cell Growth & Differ.*, **2**, 583–591.
- Shibamura, M., J. Mashimo, T. Kuroki and K. Nose (1994) Characterization of the TGF β 1-inducible HIC-5 gene that encodes a putative novel Zn finger protein and its possible involvement in cellular senescence, *J. Biol. Chem.*, **269**, 26767–26774.
- Szejda, P., J. W. Parce, M. S. Seeds and D. A. Bass (1984) Flow cytometric quantitation of oxidative product formation by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis, *J. Immunol.*, **133**, 3303–3307.
- Tsai-Morris, C.-H., X. Cao and V. P. Sukhatme (1985) 5'-flanking and genomic structure of egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene, *Nucleic Acid Res.*, **13**, 8835–8846.

生理機能に及ぼす低線量放射線の作用に関する研究
Study on effects of low dose radiation on physiological function

山 岡 聖 典
Kiyonori Yamaoka

(財)電力中央研究所 放射線グループ
201 猫江市岩戸北 2-11-1

Radiation Safety Group, Central Research Institute of Electric Power Industry
11-1 Iwato kita 2-chome, Komae-shi, Tokyo 201, Japan

(受付: 1994年9月14日; 受理: 1994年9月14日)

Summary

The effects of radiation on lipid peroxide levels in the organs, membrane fluidity and SOD activity were examined in rats and rabbits. Rats were wholebody irradiated with low dose X-rays, and rabbits were inhaled vaporized radon spring water, which primarily emitted α -rays. The following results were obtained.

Unlike high dose X-rays, low dose X-rays and radon inhalation both reduced lipid peroxide levels and made the state of the SH-group on membrane-bound proteins closer to that of juvenile animals, although the sensitivity to radioactivity varied depending on the age of the animals and among different organs and tissues. The SOD activity was elevated, suggesting that low dose X-rays and radon both activate the host defensive function. These changes were particularly marked in the organs related to immune functions of the animals which received low dose X-rays, while they were particularly marked in the brain after radon inhalation. It was also found that these changes continued for longer periods after low dose X-ray irradiation.

These results suggest that adequate activation of the functions of the living body by low levels of radioactivity can contribute to suppressing aging and to preventing or reducing brain diseases and other diseases which are thought to involve peroxidation and have been regarded as diseases for which radon spring water is an effective treatment.

Keywords: low dose X-irradiation, radon inhalation, decrease in lipid peroxide level, induction of SOD, increase in fluidity of membrane protein

緒 言

抗酸化系酵素の一つである superoxide dismutase (SOD) の活性は、高線量の X 線照射により生体内に生じた superoxide anion radical (O_2^-) の濃度に依存して減少することはよく知られている (Bartoz *et al.*, 1979). しかしラット中の SOD 活性が高分圧酸素下で増加するとの報告 (Kimball *et al.*, 1976) や SOD 様作用のあるメタロチオネインの活性が比較的低線量の X 線照射など過酸化脂質を増加させるようなストレスにより増加するとの報告 (Shiraishi *et al.*, 1983) などから、

低線量放射線の場合には逆に SOD 活性が増加する可能性があると考えられた。他方、SOD が O_2^- 産生系によって誘導される脂質過酸化反応を阻害することは数多く報告されており、しかもこの現象が *in vivo* においても生じる可能性のあることを示唆する報告も散見される (Paynter, 1980)。また膜脂質の過酸化は膜の流動性、構造および輸送を変化させるとの報告もあり (Evans *et al.*, 1989), 低線量放射線による SOD 活性や過酸化脂質などへの作用について検討することは興味深い。他方、“若返りの湯”とも言われるラドン（主に α 線

を放出する放射性ガス元素) 温泉の適応症には活性酸素病と言われる高血圧症や脳疾患などがある。これに関して、今までに組織循環や脈管作動物質の挙動などに着目しての研究がなされ有益な知見が報告されている (Komoto *et al.*, 1988) が、適応症が活性酸素病との観点からの研究、即ち上記の SOD 活性などの指標を用いての研究は未検討であり、対応が期待されている。また、これに関連して老化に対する低線量放射線の作用について検討することも有益と考えられる。本研究では、低線量の X 線照射やラドン吸入による若齢ラット、老齢ラットおよびウサギの諸臓器中における SOD 活性などの生理機能に及ぼす作用について検討を行った結果、以下に示す知見を得ることができた (Yamaoka *et al.*, 1991, 1993, 1994, in press).

実験材料および方法

1. 試料調製

1.1 低線量 X 線照射のラット

7 週齢、65 週齢および 91 週齢の日本 SLC 社製、雄性 Wistar ラット (SPF 規格) に、東芝製 KXC-18 装置により、所定の X 線照射線量を 1 回全身均等照射した。この X 線発生装置の照射条件は、最大定格出力管電圧が 180 kV、管電流が 20 mA、線量率が 0.20 Gy/min. である。対照群には、照射しない以外は照射群と全く同じ空操作を施した。照射あるいは空操作の所定時間後に断頭して目的の臓器を摘出し、一部、脳についてはさらに Glowinski らの方法 (Glowinski *et al.*, 1966) に従い部位分けし大脳皮質を水上に摘出した。得られた臓器を緩衝液により適宜希釀しホモジナイズして遠心分離を施した後、型通りの方法により測定用試料を調製した。なお膜流動性用の試料調製は、Zaleska らの方法 (Zaleska *et al.*, 1989) に従った。

1.2 ラドン吸入のウサギ

平均 2 kg の家兔に、25 mg/kg ペントバルビタール Na を耳静脈に注射し麻酔を施した。その後、頸動脈ヘポリグラフのセンサーを挿入するとともに頸静脈へ 0.3~0.4% のペントバルビタール Na を毎分 15~20 滴の割合で注入し静脈維持

麻酔をした。同時に気管を切開して管を挿入し、人工呼吸装置により 20~30 ml の室内空気を 10 mmHg の圧で毎分 30 回の割合で調節呼吸を行った。その後、ポリグラフにより動脈圧および心電計の監視を持続し、また平均動脈圧を 80~100 mmHg に調節した。ウサギは腹部、大腿部にわたり広範囲に剃毛し、側臥位で頸部より頭部を外部に出して 20 l の恒温槽に収容水温を体温と同じく 36~37°C に維持し、室温は 24~26°C に調節した。ラドン水はシャープ製超音波ネブライザー MU-32 を用いて噴霧状にし、これを 90 分間、ウサギの肺に直接、吸入させた。噴霧されたラドンの吸入後、ウサギは直ちに脱血屠殺し、1~1.5 l の生理食塩水で血管内を灌流洗浄した後、脳および肺を摘出し、1.1 節と同様の方法により測定試料を調製した。

2. 試料測定

SOD 活性は spin trapping 法により、日本電子製 ESR (JES-FE1XG) 装置を用いて測定した (Hiramatsu *et al.*, 1992)。この際、低分子量の SOD 様物質を除去するため透析を施した。また SOD 活性を蛋白重量当たりで求めるため試料を分取し、bicinchoninic acid (BCA: PIERCE 社) 法により日本分光製光度計 UVIDEC-220B を用いて蛋白定量した。他方、過酸化脂質量は thiobarbituric acid (TBA) 法により、日立製分光蛍光光度計 650-10S を用いて測定した (Ookawa *et al.*, 1979)。また SOD 活性測定と同様、試料を分取し蛋白定量を行った。さらに膜流動性は spin label 法により、上記 ESR 装置を用いて測定した (Butterfield *et al.*, 1976)。SOD mRNA は AGPC 法により臓器から採取した (Chomczynski *et al.*, 1987) total RNA を Oligotex-dT 30 を用いて Poly(A)⁺ RNA まで精製した (Kurabayashi *et al.*, 1988) 後、プローブとして Mn-SODcDNA と Cu/Zn-SODcDNA を用いた northern blotting 法により定量した。特異的アミノ酸残基はアミノ酸分析法 (この内、システインのみはシスチンに酸化されやすいので DTNB 試薬との反応に伴う滴定法による) により、リン脂質はフォスホリパーゼ D を用いた酵素法 (Richmond, 1973) により、コレステロール

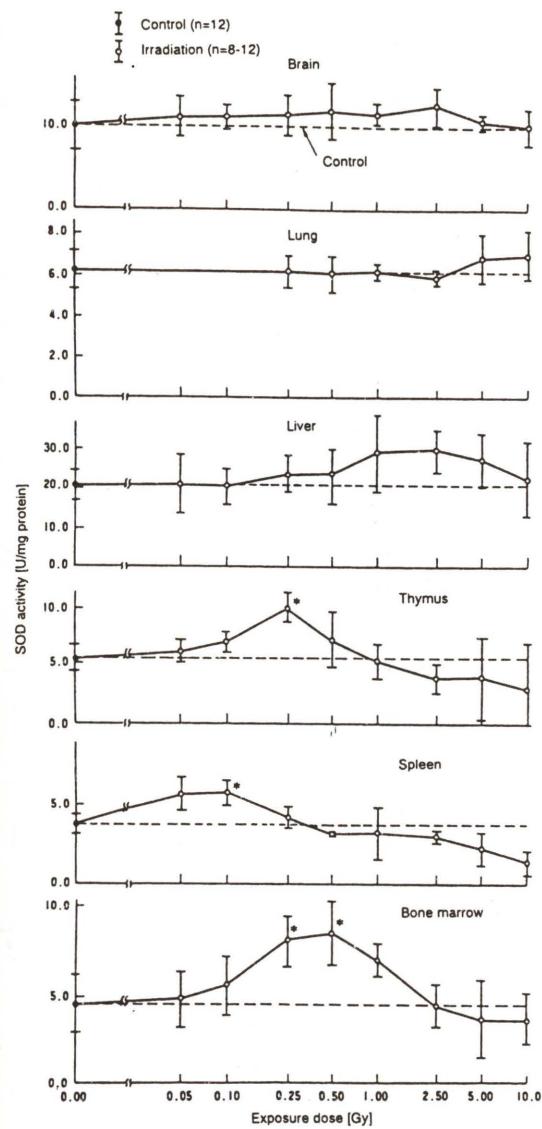


Fig. 1. Dose-dependent changes in SOD activity in organs of rats at 4 h after X-irradiation. Each value indicates the mean \pm SEM. * p < 0.05 vs. sham-irradiated control by Student *t* test.

はコレステロールオキシダーゼ法 (Takayama *et al.*, 1977) により、Na⁺, K⁺-ATPase 活性は Leong らの方法 (Leong *et al.*, 1991) により、各々、測定した。また脳中の生体アミンは HPLC 法により定量した。

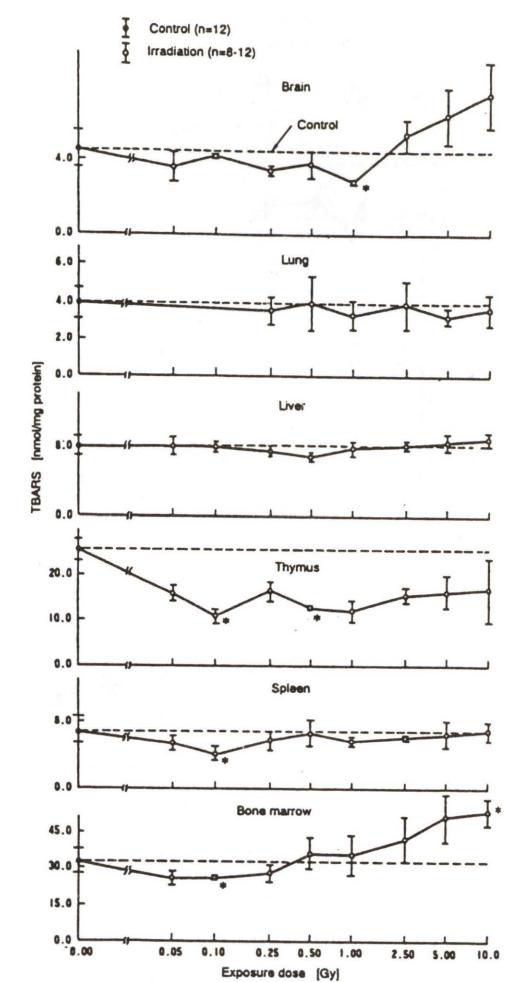


Fig. 2. Dose-dependent changes in TBARS level in organs of rats at 4 h after X-irradiation. The figures are expressed as described in Fig. 1.

結 果

1. 低線量 X 線が若齢ラットに及ぼす作用

1.1 SOD活性と過酸化脂質量の照射線量依存性 脳、肺、肝臓、胸腺、脾臓および骨髄における SOD 活性と過酸化脂質量の X 線照射による線量依存性については、予備実験の結果を踏まえ照射 4 時間後の状態について検討した。

SOD 活性は、脾臓では 10.0 Gy の照射により非照射群に比べ 60% 減少した。しかし低線量域においては、胸腺では 0.25 Gy で 70%，脾臓では 0.1 Gy で 50%，骨髄では 0.25~0.5 Gy で 90%，各々、有意に増加した。これら以外の臓器・組織

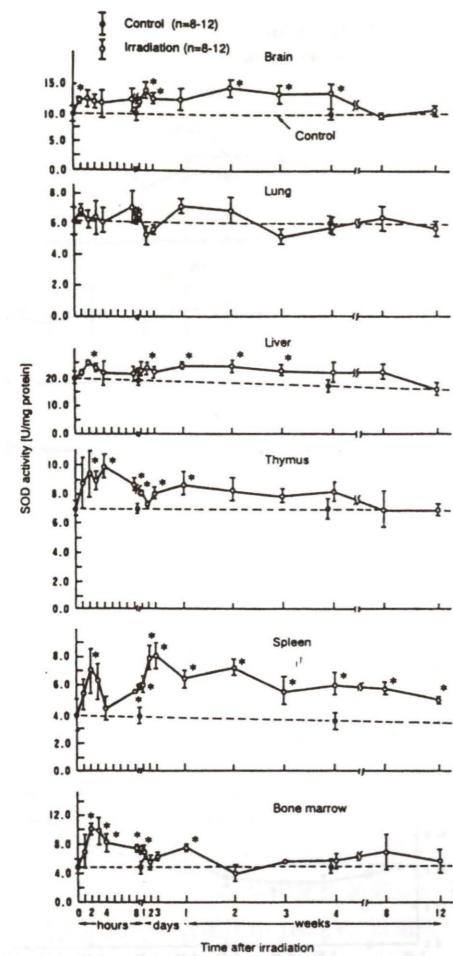


Fig. 3. Time-dependent changes in SOD activity in organs of rats after X-irradiation at dose of 0.25 Gy. The figures are expressed as described in Fig. 1.

については有意な変化はなかった (Fig. 1)。他方、過酸化脂質量は、骨髓では 10.0 Gy の照射により 60% 有意に増加した。しかし低線量域においては、脳では 1.0 Gy で 40%, 胸腺では 0.1 Gy と 0.5 Gy で 50%, 脾臓では 0.1 Gy で 40%, そして骨髓では 0.1 Gy で 20%, 各々、有意に減少した。肺と肝臓では有意な変化はなかった (Fig. 2)。

1.2 SOD 活性と過酸化脂質量の照射後の経時変化

同様に照射後の経時変化については、1.1 の結果より SOD 活性と過酸化脂質量が相対的に大きく変化した 0.25 Gy の照射線量に着目し検討した。

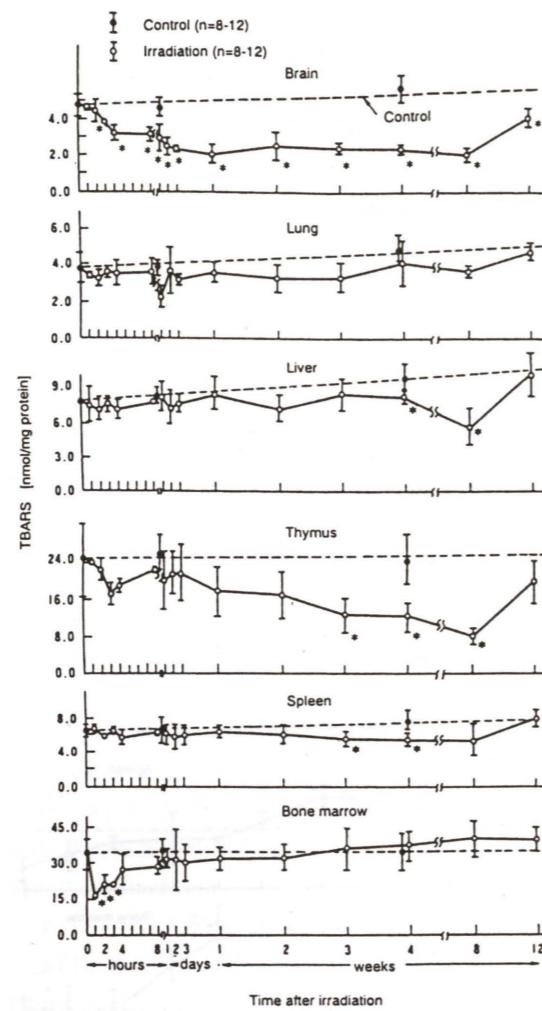


Fig. 4. Time-dependent changes in TBARS level in organs of rats after X-irradiation at Dose of 0.25 Gy. The figures are expressed as described in Fig. 1.

SOD 活性は、脾臓では少なくとも照射後 12 週間 (40~110%), 脳では 4 週間 (10~50%), 肝臓では 3 週間 (10~30%), 胸腺と骨髓では 1 週間 (10~40%, 60~100%), 各々、有意に増加した (Fig. 3)。他方、過酸化脂質量は、脳では少なくとも照射後 12 週間 (40~60%) まで、骨髓では 3 週間 (40~50%), 各々、有意に減少した。また肝臓、胸腺および脾臓では、各々、照射後 3~8 週間 (20~50%, 50~60%, 30%) の間ににおいて有意に減少した (Fig. 4)。以上より、低線量 X 線照射による SOD 活性の増加と過酸化脂質量の減少が、臓器、

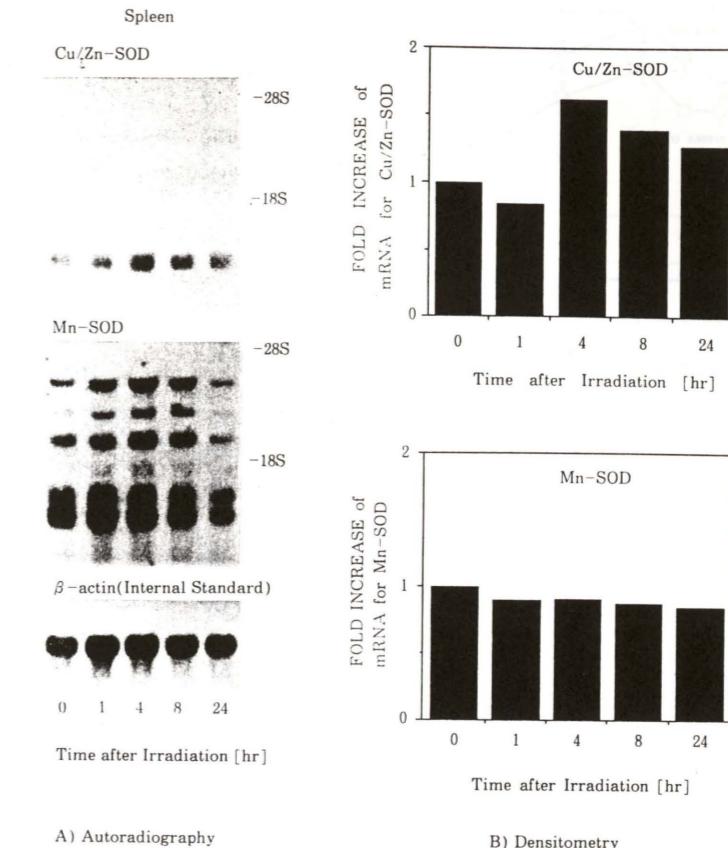


Fig. 5. Time-dependent changes in concentrations of mRNA for two species of SOD in the spleen of mature rats after X-irradiation at a dose of 0.25 Gy. The mRNA for Mn-SOD showed the 4.1 kb, 3.0 kb, 2.1 kb, 1.08 kb and 0.85 kb bands. The mRNA for Cu/Zn-SOD showed a 0.72 kb band.

組織により持続時間に程度の差はあるものの、照射後、比較的長期に亘り持続していることがわかった。

1.3 SOD の誘導合成

妊娠ラットおよびその胎児の肝臓における照射 4 時間後の Cu/Zn-SOD および Mn-SOD の活性と mRNA 量の線量依存性を調べた。

母体では Cu/Zn-SOD, Mn-SOD のいずれについても活性ならびに mRNA 量に変化は認められなかった。しかし胎児では 1.0 Gy の照射によって Cu/Zn-SOD, Mn-SOD のいずれについても活性が増加し、これにほぼ対応する形で mRNA 量も増加した。

他方、1.1 の結果において対象臓器・組織中の SOD 活性が 0.25 Gy の照射で概ね増加していることが明らかにされたことに着目し、0.25 Gy 照

射後の成熟 (22 週齢) ラット脾臓の SOD 活性の経時変化を検討した。その結果、Mn-SOD 活性は照射によって変化しなかったが、Cu/Zn-SOD は 4 時間後に有意に増加した。従って 1.1 の結果において明らかにされた脾臓の SOD 活性の増加は Cu/Zn-SOD 活性の増加を反映するものと考えられた。

照射による mRNA 量の変化は Mn-SOD については、変化がなかったが、Cu/Zn-SOD では 4 時間後に顕著な増加 (densitometry によると 70% の増加), 即ち誘導合成が認められた (Fig. 5)。

胎児では、肝臓が造血器官の役割も持つことが知られており、成熟ラットの免疫担当器官である脾臓での結果と部分的に一致したことは興味深い。

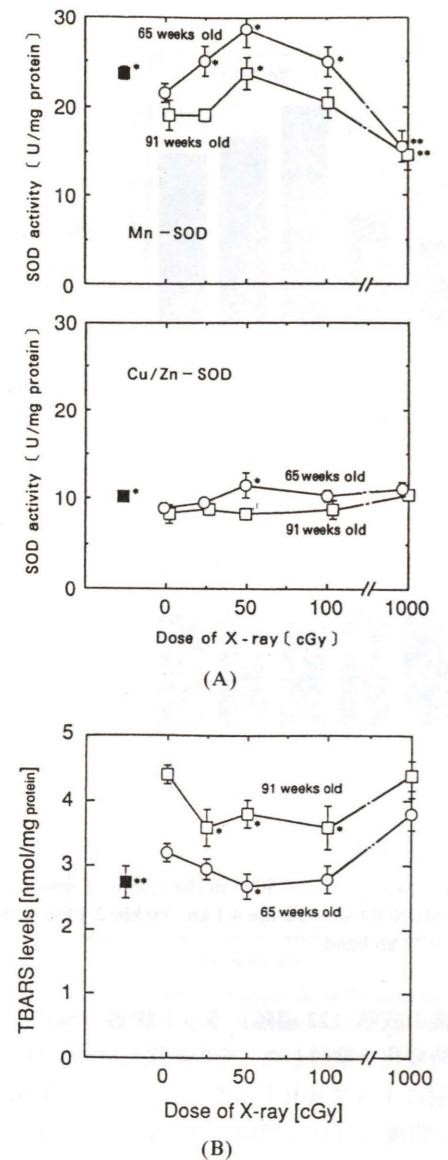


Fig. 6. Dose- and aging-dependent changes in SOD activity (A) and TBARS level (B) in the brain cortex of rats at 4 h after X-irradiation. ■ shows the data from sham-irradiated 7-weeks-old control, and each value indicates the mean \pm S.E.M.. The number of rats per experimental point is 10~15. * p <0.05 and ** p <0.01 vs. sham-irradiated 65- or 91-weeks-old control by t test.

2. 低線量 X 線が老齢ラットに及ぼす作用

本実験では、老化を受けやすい部位の一つである大脳皮質の照射 4 時間後に着目し検討した。

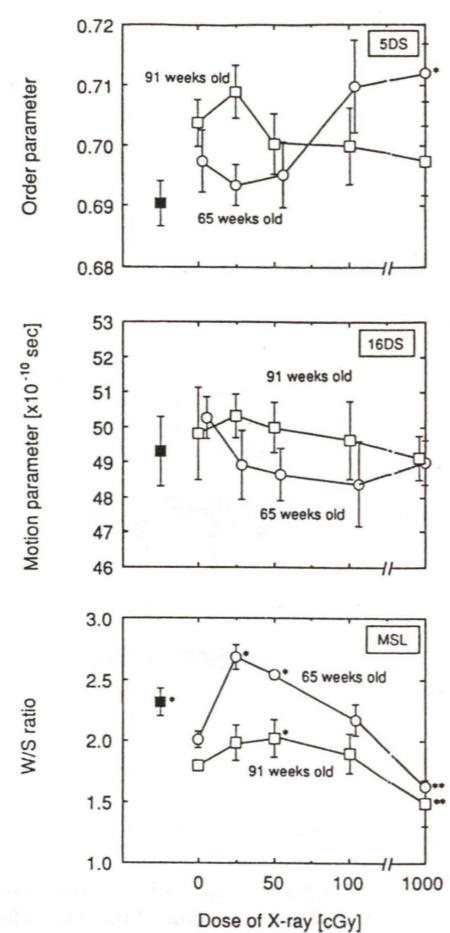


Fig. 7. Dose- and aging-dependent changes in membrane fluidity in the brain cortex of rats at 4 h after X-irradiation. The figures are expressed as described in Fig. 6.

2.1 SOD 活性と過酸化脂質量の加齢に伴う変化と老齢時での低線量照射の作用

65 過齢および 91 過齢ラットの大脳皮質の SOD 活性は、Mn-SOD, Cu/Zn-SOD 共に加齢に伴い 7 過齢ラットに比べ 10~20% 有意に減少し、過酸化脂質量は 20~60% 有意に増加した。しかし、低線量 X 線照射の作用により SOD 活性は、65 過齢の Mn-SOD 活性では 0.25~1.0 Gy で非照射群に比べ 10~30%，同じく Cu/Zn-SOD 活性では 0.5 Gy で 10%，91 過齢では Mn-SOD 活性のみが 0.5 Gy で 20%，各々、有意に増加した。過酸化脂質量は、65 過齢では 0.5 Gy で 15%，91 過齢では 0.25~1.0 Gy で 15~20%，各々、有意に減少

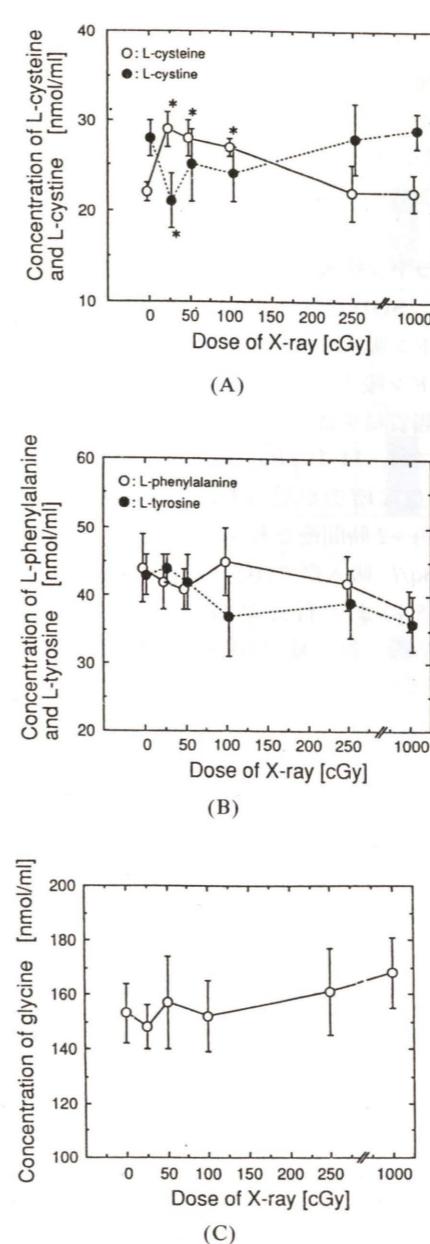


Fig. 8. Dose-dependent changes of cysteine, cystine (A), phenylalanine, tyrosine (B) and glycine (C) concentrations in the brain cortex of rats at 4 h after X-irradiation. Each value indicates the mean \pm SEM. The number of rats per experimental point is 10~15. * p <0.05 vs. sham-irradiated control group by t test.

した (Fig. 6).

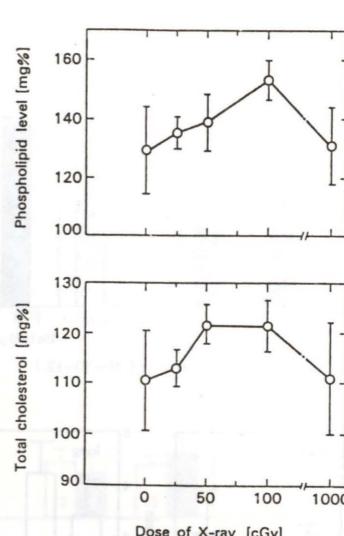


Fig. 9. Dose-dependent changes in phospholipid and cholesterol concentrations in the brain cortex of rats at 4 h after X-irradiation. The figures are expressed as described in Fig. 8.

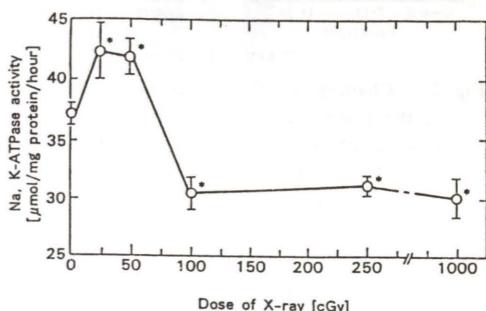


Fig. 10. Dose-dependent changes in Na⁺, K⁺-ATPase activity in the brain cortex of rats at 4 h after X-irradiation. The figures are expressed as described in Fig. 8.

2.2 膜流動性の加齢に伴う変化と老齢時での低線量照射の作用

大脳皮質膜の親水極性頭部基の 5-doxyl stearic acid (5DS) の order parameter および疎水中心部の 16-doxyl stearic acid (16DS) の motion parameter には加齢に伴う有意な変化は認められなかったが、膜結合性蛋白上のチオール基 (SH 基) の状態、または蛋白質の可動性を示す 4-maleimid-TEMPO spin label (MSL) の weakly bound/strong bound (W/S) 比は加齢に伴い 15~20% 有意に減少した。しかし低線量 X 線照射の作用により MSL の W/S 比が 65 過齢では 0.25~0.5 Gy で 30

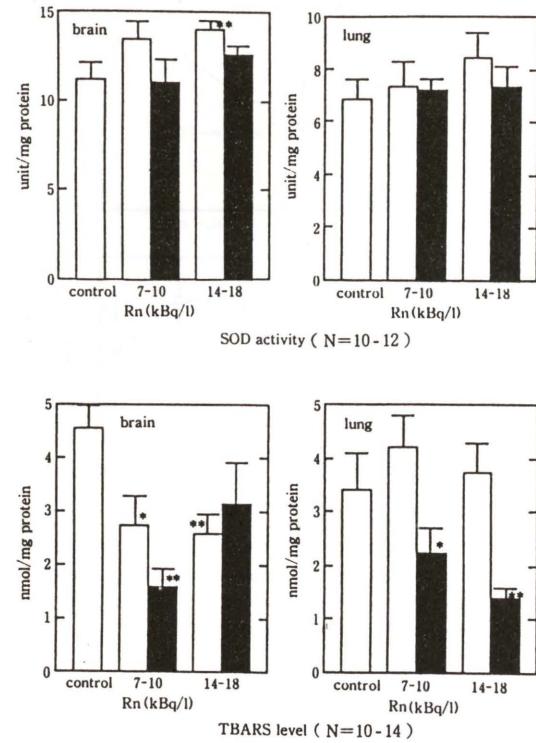


Fig. 11. Changes in SOD activity and TBARS level in the brain and lungs of rabbits after radon water inhalation. Each value indicates the mean \pm SEM. □, immediately after inhalation; ■, 2 h after inhalation. * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. sham-inhaled control by t test.

~35%, 91週齢では0.5 Gyで10%, 各々、有意に増加した。なお5DSのorder parameterおよび16DSのmotion parameterには有意な変化はなかった(Fig. 7)。

2.3 特異的アミノ酸残基

大脳皮質の細胞膜蛋白を構成するアミノ酸残基について検討した。放射線感受性の高いことが知られているアミノ酸残基中、唯一SH基を持つシスティンが0.25~1.0 Gyで20~30%有意に増加し、システィンの酸化代謝物質であるシスチンが、ほぼこれに見合う減少を示した。しかし、芳香族であるフェニルアラニンおよびチロシン、さらに他のアミノ酸残基の破壊によって増量するグリシンには有意な変化が見られなかった(Fig. 8)。

また、膜蛋白とともに細胞膜の主要構成成分であるリン脂質およびコレステロールについても有意な変化が見られなかった(Fig. 9)。

考 察

本研究の結果、低線量照射により老齢ラットの大脳皮質におけるSOD活性、過酸化脂質量、膜

2.4 ATPase活性

膜輸送の指標となる Na^+, K^+ -ATPase活性は、1.0 Gy以上の線量域においては20%有意に減少したが、0.25~0.5 Gyの低線量域では15%有意に増加した(Fig. 10)。

3. ラドン吸入がウサギに及ぼす作用

3.1 SOD活性と過酸化脂質量

ラドン吸入直後と2時間後における脳および直接ラドン吸入の影響を受ける肺のSOD活性と過酸化脂質量を調べた。

脳では、14~18 kBq/l吸入群においてSOD活性の有意な増加が見られ、その程度は吸入直後(25%)>2時間後であった。過酸化脂質量は、7~10 kBq/l吸入群では吸入直後(40%)から2時間後(65%)まで有意に減少し続けたが、14~18 kBq/l吸入群の減少の程度は吸入直後(45%)>2時間後となった。

肺のSOD活性は2時間後まで有意な変化を示さなかったが、過酸化脂質量は2時間後7~10 kBq/l吸入群、14~18 kBq/l吸入群とも35~60%有意に減少した(Fig. 11)。

3.2 膜流動性

7~10 kBq/l吸入群の2時間後の脳において16DSのmotion parameterが減少することを除き、5DSのorder parameterおよび16DSのmotion parameterは、いずれにおいても有意には変化しなかった。しかしMSLのW/S比は、概ね脳では吸入直後に10%, 肺では吸入2時間後に50~90%有意に増加した(Fig. 12)。

3.3 生体アミン

吸入直後のカテコールアミン類では、ノルアドレナリン(NA)の細胞内プール量が13 kBq/l以上の吸入群で50%有意に減少した。インドールアミン類では13 kBq/l以上の吸入群で、セロトニン(5-HT)および5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)の細胞内濃度が各々、80%有意に減少した(Fig. 13)。

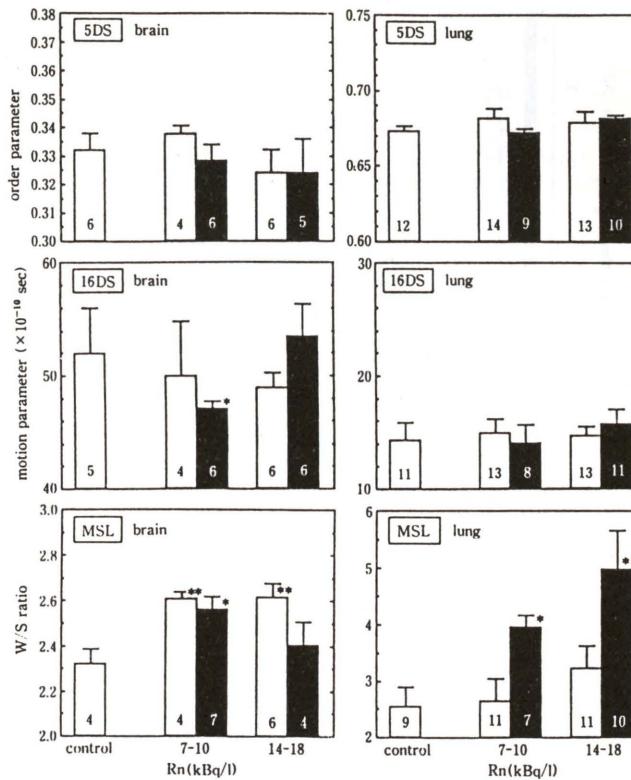


Fig. 12. Changes in membrane fluidity in the brain and lungs of rabbits after radon water inhalation. The figures are expressed as described in Fig. 11. The number of rabbits per experiment is indicated in italics.

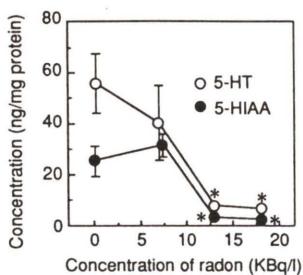


Fig. 13. Changes in concentrations of 5-HT and 5-HIAA in the brain of rabbits immediately after radon water inhalation. Each value indicates the mean \pm SEM. The number of rabbits per experimental point is five at 0 kBq/l, four at 7 kBq/l, six at 13 kBq/l and five at 18 kBq/l. * p < 0.05 vs. sham-inhaled control by t test.

流動性(膜結合蛋白のSH基の状態変化)および膜輸送調節機能(ATPase活性)を各々、若齢値に近づけることが明らかになった。またラドン吸入による過酸化脂質量の減少と膜流動性の増加とは、概ね脳では吸入直後に、肺では吸入2時間後

に大きくなっている。また生体アミンの内、5-HTなどが細胞内濃度が減少することから生体の情報伝達を興奮側に変化させる可能性も示唆された。これらの現象は、ラドン泉浴後の保温作用が組織循環の増加によってもたらされるとの報告(Komoto *et al.*, 1988; 鈴鹿, 1993)と関連性が示唆され、興味深い。さらに低線量X線を若齢ラットに照射した場合、SOD活性の増加や過酸化脂質量の減少が比較的長期に亘り持続することも明らかとなった。

膜流動性は、膜構造の変化と細胞機能の変化に深く関係することが予想されている。例えば、構造面では、脂質の不飽和結合の増加(過酸化脂質量の減少)などが原因となって流動性が高まると考えられている(Evans *et al.*, 1989)。また機能面では、外界からの刺激によって、 Ca^{2+} 濃度に依存して細胞機能が活性化するような場合にも膜流動性が高まることが言われている。

このような膜構造の変化が細胞機能の変化に結

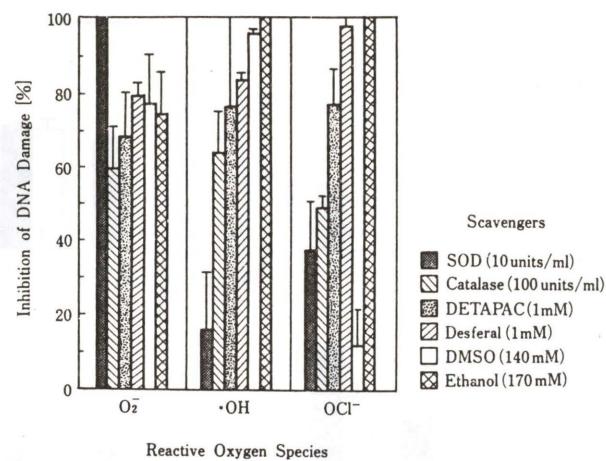


Fig. 14. Effects of various scavengers on DNA damage induced by active oxygen and radicals. Damaged DNA was quantitated 30 min, 5 min and 5 min for X-XOD, $\cdot OH$ and OCl^- , respectively.

びついたものとして、マイトジエンによって誘導されるリンパ球の幼若化反応がある（例えば、Ishii *et al.*, in press）。この場合には、マイトジエンと結合した膜表面レセプターが極形成のために移動して膜流動性を高めるものと考えられている（山村，1981）。この幼若化反応に見られる膜表面レセプターの多くは、基質となる糖鎖と結合した膜蛋白質であり、幼若化反応におけるレセプターの移動度の亢進と、本研究で確認した脳における膜流動性（膜結合性蛋白上のSH基の状態変化）が高まるという実験結果は、いずれも膜蛋白質が動き易くなるということを示唆している。さらに低線量X線照射により特異的アミノ酸残基の中で唯一SH基を持つシステインの量や活性中心にSH基を持つ Na^+ , K^+ -ATPaseの活性が増加するとの結果と、前述の膜流動性が増加するとの結果は、共通してSH基を介してもたらされた結果の可能性が示唆される。これに関して、システインを照射前に哺乳動物に投与すると放射線抵抗性が高まるとの報告（Streffer, 1968）やラット脾臓の全蛋白のSH基は7.5 Gy照射直後むしろ増加し、SS基の数（シスチン量）は有意に減少するとの報告（Neuwirt *et al.*, 1965）は興味深い。

脳はフリーラジカルの攻撃を受けやすい多価不飽和脂質を豊富にもっている。老化の過程で何らかの原因により活性酸素が多量に発生するとSODなどの防御システムをくぐり抜けて、細胞

膜にある脂質の過酸化を起こす。長い年月の過程を経て過酸化脂質などのフリーラジカル反応産物が蓄積され、膜流動性などの細胞機能が低下することにより血液循環の低下、エネルギー産生の低下などの老化現象が進むと言われている。

高等動物のSODには、細胞質に多いCu/Zn-SODとミトコンドリアに多いMn-SODの2種類がある。本研究では、低線量照射により特に脳細胞のミトコンドリア中のSOD活性に顕著な増加が認められたが、この結果は、高分圧酸素に曝露された条件下において、ミトコンドリアの膜系蛋白質であるMn-SODが誘導合成されるという報告（Kimball *et al.*, 1976）と一致する。この現象を考慮すれば、高分圧酸素と似た作用を示す反応度の高い活性酸素が低線量放射線によって生成され、これが特にMn-SOD活性を増加させたと考えられる。

低線量のX線照射やラドン吸入を施した場合には、高線量の放射線の場合とは異り、過酸化脂質質量の減少や膜流動性、膜輸送調節機能の亢進することが明らかとなった。生理の基本的過程に関係し、細胞の主要構造物である生体膜に対して低線量放射線照射が及ぼす作用のメカニズムについて検討した結果、膜結合蛋白のSH基へのフリーラジカルの刺激が関与している可能性が示唆された。さらに観察された以上の生体反応には、脂質の過酸化を抑制するSODなどの酵素の誘導、即

ち自己防御機構の活性化も関与している可能性が明らかになったことから、低線量照射に伴うこれら一連の生理的変化が、ラドン温泉の適応症の一つで過酸化反応の関与する脳疾患などの予防・改善効果に寄与する可能性のあることが示唆できた。

本総説では、主に低線量放射線照射により生体内に生じた少量の活性酸素が生体膜に及ぼす影響について論じた。同様に、この活性酸素による（プラスミド）DNAへの損傷と活性酸素消去剤によるその阻害についても検討している（Takehara *et al.*, 1994）。例えば O_2^- による一本鎖切断をSODが100%阻害することを明らかにした（Fig. 14）。これらの知見と前述の低線量放射線照射によりSODが誘導合成されるとの知見から、生理学的に意味することは何かを解明することは今後の課題として興味深い。

謝 辞

本研究は岡山大学医学部の森 昭胤教授、古元嘉昭名誉教授および高知医科大学の内海耕輔名誉教授の御指導と共同研究者である枝松 礼先生、伊藤武彦博士、鈴鹿伊智雄博士、佐藤英介博士および竹原良記博士の御協力によりなし得た成果である。また筆者の所属する財団法人電力中央研究所の石田健二部長をはじめ関係各位にも御協力を戴いた。深甚なる謝意を表します。

参考文献

- Bartosz, G., W. Leyko and R. Fried (1979) Is superoxide dismutase a physiological radioprotector?, *Experientia*, **35**, 1194.
- Butterfield, D. A., A. D. Roses, S. H. Appel and D. B. Chesnut (1976) Electron spin resonance studies of membrane proteins in erythrocytes in myotonic muscular dystrophy, *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 226-234.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction, *Anal. Biochem.*, **162**, 152-159.
- Evans, W. H. and J. M. Graham (1989) Membrane Structure and Function, IRL Press at Oxford University Press.
- Glowinski, J. and L. Iversen (1966) Regional studies of catecholamines in the rat, *J. Neurochem.*, **13**, 655-669.
- Hiramatsu, M., M. Kohno, R. Edamatsu, K. Mitsuta and A. Mori (1992) Increased Superoxide Dismutase Activity in Aged Human Cerebrospinal Fluid and Rat Brain Determined by Electron Spin Resonance Spectrometry Using the Spin Trap Method, *J. Neurochem.*, **58**(3), 1160-1164.
- Ishii, K., K. Yamaoka, Y. Hosoi, T. Ono and K. Sakamoto, Enhanced mitogen-induced proliferation of rat splenocytes by low-dose whole-body X-irradiation, *Physiol. Chem. Phys.*, in press.
- Kimball, R. E., K. Reddy, T. H. Pearce, I. W. Schwartz, M. G. Mustafa and C. E. Cross (1976) Oxygen toxicity: augmentation of antioxidant defense mechanisms in rat Lung, *Am. J. Physiol.*, **230**(5), 1425-1431.
- Komoto, Y., T. Kohmoto, T. Nakano, M. Sunakawa and H. Yorozu (1988) Tissue perfusion with a Radon bath in combination with CO_2 , *Z. Phys. Med. Baln. Med. Klin.*, **17**, 72-78.
- Kurabayashi, K., M. Hikata, O. Hiraoka, C. Miyamoto and Y. Furuichi (1988) A rapid and efficient purification of Poly(A)-mRNA by oligo(dT)-Latex, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, **19**, 61-64.
- Leong, S. F. and T. K. C. Leung (1991) Diabetes induced by streptozotocine causes reduced Na^+ , K^+ -ATPase in the brain, *Neurochem. Res.*, **16**, 1161-1165.
- Neuwirt, J., J. Taborsky, I. Borova and Z. Pokorny (1965) *Acta Biol. Med. Germ. Suppl. III*, S. 287.
- Ookawa, H., S. Ooishi, K. Yagi (1979) Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- Paynter, D. I. (1980) *Biol. Trace Element Res.*, **2**, 121-135.
- Richmond, W. (1973) Preparation and properties of a cholesterol oxidase from nocardia sp and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum, *Clin. Chem.*, **19**(12), 1350-1356.
- Shiraishi, N., K. Aono and K. Utsumi (1983) Increased Metallothionein Content in Rat Liver Induced by X-Irradiation and Exposure to High Oxygen Tension, *Radiat. Res.*, **95**, 298-302.
- Streffer, C. (1968) Umschau in Wissenschaft und Technik, *Int. J. Radiat. Biol.*, **16**, 492.
- 鈴鹿伊智雄（1993）ラドン水吸入による家兔の副腎髓質カテコラミン分泌作用—組織循環增加作用との関わりについて、岡山医誌, **105**, 419-426.
- Takayama, M., S. Itoh, T. Nagasaki and I. Tanimizu (1977) A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids, *Clin. Chem. Acta*, **79**, 93-98.
- Takehara, Y., K. Yamaoka (1994) E. F. Sato, T. Yoshioka and K. Utsumi, DNA Damage by Various Forms of Active Oxygens and its Inhibition by Different Scavengers using Plasmid DNA, *Physiol. Chem. Phys.*, **26**, 215-226.
- 山村雄一（1981）免疫学1免疫担当細胞リンパ球膜表面レセプター、中山書店、pp. 170-181.
- Yamaoka, K., R. Edamatsu and A. Mori (1991) Increase SOD Activities and Decrease Lipid Peroxides Levels in

- Rat Organs Induced by Low Dose X Irradiation, *Free Radic. Biol. Med.*, **11**, 299–306.
- Yamaoka, K., Y. Komoto, I. Suzuka, R. Edamatsu and A. Mori (1993) Effects of Radon Inhalation on Biological Function—Lipid Peroxide Levels, SOD Activity and Membrane Fluidity—, *Arch. Biochem. Biophys.*, **302**, 37–41.
- Yamaoka, K., R. Edamatsu, T. Itoh and A. Mori (1994a) Effects of Low Dose X-ray Irradiation on Biomembrane in Brain Cortex of Aged Rats, *Free Radic. Biol. Med.*, **16**, 529–534.
- Yamaoka, K., K. Ishii, Y., T. Itoh, R. Edamatsu, Y. Komoto, I. Suzuka and A. Mori (1994b) Changes in Biogenic Amine Neurotransmitters in Rabbit Brain after Radon Inhalation, *Neurosciences*, **20**, 17–22.
- Yamaoka, K., E. F. Sato and K. Utsumi (1994c) Induction of Two Species of Superoxide Dismutase in Some Organs of Rats by Low Dose X-irradiation, *Physiol. Chem. Phys.*, **26**, 205–214.
- Yamaoka, K., K. Ishii, Y., T. Itoh, R. Edamatsu and A. Mori, Changes in Specific Amino Acid Residues and Na^+ , K^+ -ATPase Activity in Cell Membranes of Rat Cerebral Cortex by Low Dose X-Irradiation, *Physiol. Chem. Phys.*, in press.
- Zaleska, M. M., K. Nagy and R. Floyd (1989) Iron-induced lipid peroxidation and inhibition of dopamine synthesis in striatum synaptosomes, *Neurochem. Res.*, **14**, 597–605.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 345–355 (1995)

酸化的ストレスによる遺伝子発現とその制御 Regulation of bacterial oxidative stress genes

米井脩治, 張秋梅
Shuji Yonei and Q. M. Zhang

京都大学理学部
606-01 京都市左京区北白川追分町

Faculty of Science, Kyoto University, Kitashirakawa-Oiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan

(受付: 1994年9月14日; 受理: 1994年9月14日)

Summary

Escherichia coli cells respond to increased flux of active oxygens by invoking a set of co-regulated genes. In response to increased levels of hydrogen peroxide and organic peroxides, the expression of more than 30 proteins is elevated over the basal levels. The peroxide stimulon includes at least eight proteins that are positively regulated by the locus, *oxyR*. The *E. coli oxyR* gene has been cloned and its nucleotide sequence has been determined. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence has a high degree of homology to those of several bacterial activator proteins called LysR family. The OxyR protein specifically binds to the upstream region of its regulon as revealed by DNase I footprinting experiment. The reduced form of the OxyR is converted to the oxidized form by peroxide stress, which in turn activates the transcription of the regulon. On the other hand, upon exposure to increased level of superoxide, *E. coli* cells respond to the superoxide stress by activating different stimulon, more than 40 proteins, from the peroxide stimulon. At least nine proteins are produced by a regulon controlled by two regulatory genes, *soxR* and *soxS*. The *soxRS* system would be triggered in a sequential fashion by a novel two-component system. SoxR activated by superoxide would switch on expression of the *soxS* gene and the increased level of SoxS would activate expression of the various regulon genes. Recently, we have isolated several strains of *E. coli* that contain new gene fusion (*soi-lacZ*) specifically inducible by superoxide radical under the control of the *SoxRS*. The *soi-7*, *soi-9* and *soi-10* mutants show increased sensitivity to redox-active drugs such as methyl viologen, menadione bisulfite and 4-NQO. The *sol-10* gene has been cloned on plasmid vectors and its nucleotide sequence has been determined. There were no genes and proteins with homology to the *soi-10* gene. The oxidative stress response is a global response. The activated functions impinge on a remarkable variety of biochemical pathways, from active oxygen scavenging and DNA repair, to the balance of energy co-factors and membrane composition. All aerobic organisms have evolved to deal with oxidative stress as the price of utilizing molecular oxygen. A molecular understanding of oxidative stress regulons in *E. coli* will lead us to analyze their control and functions in many organisms.

Keywords: oxygen stress response, gene expression, OxyR regulon, SoxRS regulon, superoxide-inducible genes

1. はじめに

地球の大気に酸素が出現したのはおよそ30億年前のことだろうと推測されている。この大気中の酸素が光合成生物の生産したものに由来していることは現在も変わらない。生物はこの酸素を利

用して効率よくエネルギーを得るしくみを進化の過程で獲得することになった。しかし、酸素は、生物にこのような利益を提供してきた一方で、その細胞毒性ゆえに生物にきわめて過酷な試練をも課してきた。おそらく、それ以後の生物の長い歴

史の中で、生物はなによりも酸素との「益と害」の相反する関係の中で生き抜く知恵を獲得しなければならなかった。それは活性酸素に対する高度に制御された防御システムの獲得であった。

スーパーオキシドラジカル、過酸化水素やヒドロキシルラジカルなどの活性酸素は、分子状酸素が還元される過程で生じる反応性の高い分子種であり、細胞内では呼吸などの過程で微量ながら常に生成している。つまり、活性酸素は、正常な好気的代謝の過程で細胞にとって逃れることのできない副産物として生じている (Fridovich, 1978; Ames, 1983)。これらの活性酸素はほとんどの細胞成分と反応し、とくに DNA, タンパク、脂質の損傷を引き起こす。明らかに、好気的条件下では、細胞は不斷に活性酸素のチャレンジを受けていることになる。しかし、細胞は、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) やカタラーゼ、ペルオキシダーゼなどの活性酸素を消去するユニークな酵素を備えており、さらに DNA に生じた損傷を修復することによって、活性酸素がもたらす危険性を最小限に抑えるいくつかのシステムを発達させている (Fridovich, 1989; Farr and Kogoma, 1991)。通常では、細胞内での活性酸素の生成と消去の間にはきわめてエレガントなバランスが維持されている。しかし、細胞内外のいろいろな条件によって細胞内の活性酸素濃度が増大し、消去系の処理能力を超えるような事態になると、細胞のレッドックスのバランスは酸化的状態に大きく傾く。すなわち、酸化的ストレスを招くようになる。酸化的ストレスを起こす環境因子としては、活性酸素そのもの、活性酸素誘導体、SH 反応性化合物、重金属、光や放射線さらにラジカル生成物質などがあげられる。酸化的ストレスは、突然変異の生成や発がんあるいは老化の主な原因の 1 つとして考えられている (Ames, 1983; Ames et al., 1993)。

最近の研究から、細胞にはこの活性酸素濃度の増大を感じ、特定の遺伝子群の発現を開始あるいは促進させるシステムが備わっていることが分かってきた。例えば大腸菌では、メチルビオロゲン (MV) などのスーパーオキシド増産剤を与えると、Mn-SOD や DNA 修復酵素であるエンドヌクレアーゼ IV などの誘導合成が起こる (Chan

and Weiss, 1987; Demple, 1991; Farr and Kogoma, 1991; Loewen, 1992; 米井, 1992; 米井・張, 1993)。また、過酸化水素では、カタラーゼ/ヒドロペルオキシダーゼ (HPI) など約 30 種類のタンパクが誘導合成されるようになる。これらのタンパクの機能は一部のものを除いてはまだほとんど理解されていないが、活性酸素に対する防御上重要な役割を担うものと考えられている。また、未同定の DNA 修復酵素が誘導されることを示す報告もある (Demple and Halbrook, 1983; Farr et al., 1985)。この結果、細胞は活性酸素そのものに対しだけでなく、放射線や近紫外光などに対しても抵抗性を獲得する (Demple, 1991; Farr and Kogoma, 1991)。この合目的な細胞の応答を活性酸素適応応答、酸化的ストレス応答などと呼んでいる。

大腸菌をはじめ多くの細胞では、ヒートショック、コールドショック、チオール、界面活性剤、脱共役剤、浸透圧変化など多くの環境ストレスに対する適応応答を行うようになることが分かっているが、それの中でも、酸化的ストレスに対する適応応答は細胞にとって最も重要な機能である。酸化的ストレス応答に関しては、1970 年代、SOD やカタラーゼがそれぞれ redox-active な薬剤 (スーパーオキシド増産剤)、過酸化水素で誘導合成されることが発見され、詳細な生化学的研究が行われた。しかし、これらの酸化的ストレス応答の機構を遺伝子のレベルで解明する試みが始まつたのはつい 10 年ほど前のことである。この小文では、それ以後に明らかにされた、主に大腸菌における活性酸素適応応答とその調節の分子機構を中心に概説する。

2. 大腸菌における酸化的ストレス応答

大腸菌やサルモネラ菌は多様な環境ストレスに応答し一連の特定の遺伝子群の発現を誘導する。これまでに少なくとも 13 種類の multigene 系がそれぞれ異なるストレスに応答して誘導されることが明らかにされている (Neihardt, 1987)。これらはプログラムされた遺伝子発現の誘導あるいは抑制を含み、多様な細胞機能を誘導させる、いわゆる「グローバルレスポンス」である。酸化的ストレス状態になると、大腸菌やサルモネラ菌は 1 あ

Table 1. Genes and proteins induced in response to oxidative stress in *E. coli*

Protein	Gene	Regulon
Defense enzymes		
Alkyl hydroperoxide reductase	<i>ahpF</i>	OxyR
	<i>ahpC</i>	OxyR
Catalase HPI	<i>katG</i>	OxyR
Glutathione reductase	<i>gor</i>	OxyR
Superoxide dismutase (Mn)	<i>sodA</i>	SoxRS
DNA repair enzymes		
Endonuclease IV	<i>nfo</i>	SoxRS
Metabolic enzymes		
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	<i>zwf</i>	SoxRS
NADH dehydrogenase	<i>ndh?</i>	SoxRS?
Glutaredoxin reductase	<i>grx</i>	OxyR
Ferredoxin oxidoreductase	<i>fpr</i>	SoxRS
Pyruvate flavodoxin oxidoreductase	<i>soi-28</i>	SoxRS
Chaperons		
DnaK	<i>dnaK</i>	HS
GroEL	<i>groEL</i>	HS
GroES	<i>groES</i>	HS
Unknowns		
Soi-17/19	<i>soi-17/19</i>	SoxRS
Soi-7	<i>soi-7</i>	SoxRS
Soi-9	<i>soi-9</i>	SoxRS
Soi-10/12	<i>soi-10/12</i>	SoxRS

パクが含まれている (Demple, 1991; Farr and Kogoma, 1991)。サルモネラ菌では、30 種類のタンパクのうち 12 種類 (初期タンパク) は過酸化水素投与後の 30 min 以内にその発現が最大になるのに対して、残る 18 種類は後の 30 min の間も誘導が持続する。初期タンパクのうち 9 種類はサルモネラ菌の *oxyR1* 変異株 (Oxy^c) では構成的に発現しており、*oxyR* 欠損株では過酸化水素を投与してもすべて誘導されなかった。残る 21 種類のタンパクの発現は *oxyR* 欠損変異の影響を受けない。したがって、30 種類のうち 9 種類が *oxyR* によって調節されていることが分かった。大腸菌の 8 種類の *oxyR* レギュロンのうち、HPI、アルキルペルオキシド還元酵素 (AHP) の 2 つのサブユニット、グルタチオン還元酵素がこれまでに同定されている。HPI, AHP は過酸化水素、有機過酸化物を除去することによって細胞に抵抗性を与える (Demple, 1991; Farr and Kogoma, 1991)。残りの過酸化水素誘導遺伝子は *oxyR* には依存しない。最近になって、第 2 のレギュロンとして OxoR レギュロンが示唆されている (Gidrol et al., 1993)。

一方、スーパーオキシドの濃度が増大すると、大腸菌やサルモネラ菌ではペルオキシド応答とは異なる遺伝子を発現させるようになる。例えば、MV によって 30 種類以上のタンパクが誘導合成されることが二次元電気泳動で明らかになった。スーパーオキシドに対する大腸菌の応答は、初期の研究ではきわめて単純なものと考えられた。MV で前処理するとその後のチャレンジの高濃度の MV に対して抵抗性になることが発見されたが、その原因是 Mn-SOD の誘導で説明できるとされた (Demple, 1991)。しかし、後では、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) の誘導や DNA 修復系の誘導が明らかにされ、スーパーオキシド応答はもっとグローバルであり、より複雑な機構で起こるものであることが明らかにされた。2 次元電気泳動の結果はこのことをさらに確かめることになった。スーパーオキシドで誘導される stimulon のほとんどは peroxide stimulon に属するタンパクとは異なるものであった (Walkup and Kogoma, 1989)。このうち少なくとも

9種類は *soxR*, *soxS* の2つの調節遺伝子の産物によって正に制御される。これまでに *soxRS* レギュロンとして同定されているものは、Mn-SOD (*sodA*), G6PD (*zwf*), OmpF の発現を抑制するアンチセンス RNA (*micF*), フマラーゼ C (*fumC*), フェレドキシン還元酵素, エンドヌクレアーゼ IV (*nfo*) などである (Chan and Weiss, 1987; Hassan, 1988; Rowly and Wolf, 1991; Liochev and Fridovich, 1992a). *SoxR*^c 株では有機過酸化物のブレオマイシンに *insensitive* になるが、これは *micF* RNA の誘導によってブレオマイシン通過路の OmpF の合成が抑制されてしまうためである。この他に機能はまだ解明されていない5つの *soi* (*superoxide inducible*) 遺伝子が *soxRS* レギュロンのメンバーであることが分かっている (Kogoma, et al., 1988; Mito et al., 1993; Zhang et al., 1994; Zhang and Yonei, 1994).

3. 遺伝子発現の制御機構

クローニングされた *oxyR* 遺伝子は 915 個のヌクレオチド配列の ORF を含んでおり、305 個のアミノ酸からなるタンパクをコードしていることが明らかになった (Tao et al., 1989)。このヌクレオチド配列から予想されるアミノ酸配列には Lys ファミリーと呼ばれる遺伝子の正の調節因子とホモロジーの高い配列および DNA 結合タンパクと共に見られるヘリックス-スターン-ヘリックス構造が存在している。LysR ファミリーとは、大腸菌の LysR, IlvY, CysB, MetR, *Rhizobium meliloti* の NodD に代表される single-component regulator である (Ronson et al., 1987)。*oxyR* 遺伝子は過酸化水素による *katG* 遺伝子 (HPI をコード) の発現を正に調節するが、*oxyR* 遺伝子自身の発現は抑制する作用があった (Tao et al., 1989)。

さらに、OxyR タンパクを精製して、そのレギュロンである *katG* 遺伝子や *oxyR* 遺伝子の DNA への結合性を調べたところ、Fig. 1 のように、それらの遺伝子のプロモーター領域およびそのすぐ上流の領域に特異的に結合することが DNaseI フットプリントティングの結果から明らかになった (Tao et al., 1991)。この2つの遺伝子の OxyR 結合領域には相同意の高いヌクレオチド配

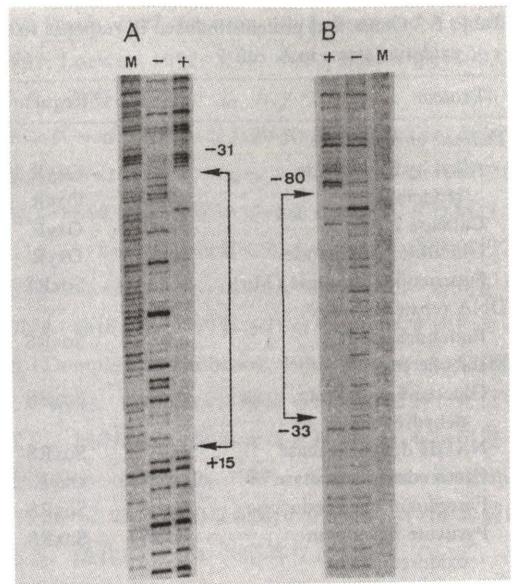


Fig. 1. DNase I footprinting experiments of the regulatory regions of *oxyR* (A) and *katG* (B) genes. 5'-End labeled probe DNA's were incubated in the presence (lane +) or absence (lane -) of purified OxyR protein and treated with DNase I. The samples were analyzed by electrophoresis on 8% polyacrylamide gel. M, size marker.

列が存在する。さらに、試験管内での転写系を用いて、OxyR が実際に *katG* 遺伝子の転写を促進する事実が確かめられた (Tao et al., 1991)。Ames らも同様の結果を得ており (Christman et al., 1989; Storz et al., 1990; Tartaglia et al., 1989), OxyR タンパクによる遺伝子発現の調節は Fig. 2 のモデルのような機構で起こると提唱した (Storz et al., 1990)。OxyR には還元型と酸化型が存在し、還元型 OxyR は常にそのレギュロン遺伝子のプロモーター領域に結合している。細胞内の過酸化水素 (あるいは真のインデューサー) との反応によって還元型 OxyR は酸化型に変換し、タンパクの構造変化が起こる。これに伴って、OxyR の DNA への結合様式が変わり、その結果、プロモーターに結合した RNA ポリメラーゼと相互作用をして RNA ポリメラーゼによる転写を促進させるようになるというものである。しかし、酸化型、還元型の実際の構造は解明されていない。酸化型に転換されただけでは転写を促進しないの

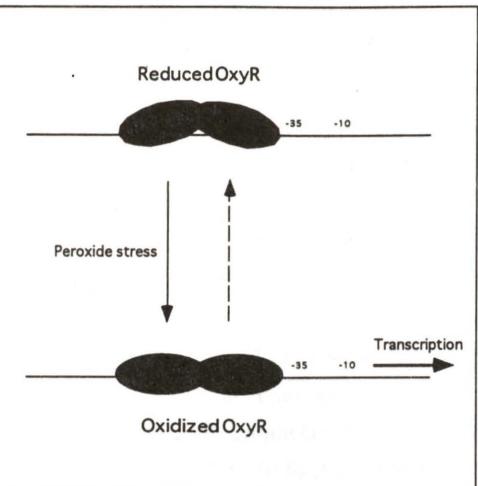


Fig. 2. Model for the regulation of peroxide-induced gene expression by the OxyR protein.

は、*oxyR* 遺伝子自身に対してはレプレッサーとして作用することから明らかである (Tao et al., 1991)。この場合では、OxyR は RNA ポリメラーゼのプロモータへの結合を阻止している。

還元型および酸化型 OxyR の DNA への結合様式が異なることは、両者での DNase フットプリントティングのパターンがわずかだが変化することから証明された (Storz et al., 1990)。Ames らによれば、OxyR そのものが過酸化水素のセンサーにもなっている。OxyR には 6 ケのシステイン残基を含んでいるが、199 番目のシステインをセリンに変化させると活性を失った。過酸化水素に対する sensing の詳細な機構は分かっていないが、このシステインが OxyR の機能に重要であると考えられている。また、redox-active な金属の関与は分かっていない。過酸化水素のストレスは一過性のものであるが、酸化型 OxyR がどのような機構で元の還元型に戻るかはまだ明らかではない。また、*oxyR* レギュロンとして大腸菌では少なくとも 8 種の遺伝子が含まれるとされているが、*katG*, *ahpCF*, *dnaK* (Loewen, 1992; Morgan et al., 1986; Storz et al., 1989) 以外はまだ同定されておらずその全貌が解明されるには至っていない。最近、グルタレドキシン還元酵素が OxyR レギュロンに属することが報告されている (Eliel, 1993)。

OxyR は Mu ファージの *mom* 遺伝子の発現も

制御している (Bolker and Kahmann, 1989)。OxyR (MomR) は *mom* 構造遺伝子の 5' 領域 (3つの GATC サイトが存在する) に結合して転写を阻止する。ただし、この GATC はメチル化されていない場合である。つまり、OxyR は *mom* プロモーターのメチル化、非メチル化を区別することができる。しかし、Dam 依存性の *mom* 遺伝子の発現が酸化的ストレスに関連しているのかどうかはまだ分かっていない。大腸菌の *dam* 変異株は過酸化水素に高感受性なので、メチル化に依存する OxyR レギュロンがあると考えてよいだろう。

活性酸素による遺伝子発現はその活性酸素の分子種に対して特異的に応答することはすでに述べた通りである。例えば、大腸菌の *katG* 遺伝子はスーパーオキシドでは誘導が起こらないし、*sodA* (Mn-SOD 遺伝子) や *nfo* (エンドヌクレアーゼ IV 遺伝子) はスーパーオキシドで誘導されるのが過酸化水素ではその効果がない (米井ら, 1989)。したがって、少なくとも大腸菌ではスーパーオキサイド、過酸化水素それぞれに特異的なセンサーが備わっており、一方が特定の活性酸素と反応すれば、そのシグナルはそれぞれに連関した調節機構に伝達され、特異的遺伝子群の発現が誘導されるのにちがいない。事実、スーパーオキシドによる *sodA* 遺伝子の発現は *oxyR* 遺伝子の機能にはまったく依存性を示さなかった (Farr and Kogoma, 1991)。これらの事実は、スーパーオキシドが細胞内で増産された場合、それを感知し、つづいて遺伝子の発現を起こさせるような、*oxyR* システムとは別の遺伝子発現の調節機構が存在することを強く示唆している。

1990 年、Weiss および Demple の研究室から別々にスーパーオキシドによる遺伝子発現を正に調節する大腸菌の新しい遺伝子、*soxR* が発見された (Greenberg et al., 1990; Tsaneva and Weiss, 1990)。この遺伝子は、*sodA*, *nfo* などの遺伝子の転写を正に調節する trans-acting positive factor である。クローニングされた *soxR* 遺伝子のヌクレオチド配列から、その中に転写の方向が反対の 2 つの遺伝子、*soxR* と *soxS* が含まれていることが明らかになった (Wu and Weiss, 1991)。Weiss らは、前者がスーパーオキシドのセンサーで、後者が実

際にレギュロンの発現を調節する役割を果たすものと考えている。*soxS* 遺伝子自身もスーパーオキシド誘導性であり、その発現は *SoxR* によって制御されている (Wu and Weiss, 1992)。したがって、スーパーオキシドによる遺伝子発現は、1) スーパーオキシドによる *SoxR* の活性化、2) 活性化された *SoxR* による *soxS* 遺伝子の発現誘導の2段階で起こると考えられている。マルチコピープラスミドで *SoxS* を過剰產生させると、それだけで支配下のレギュロン、たとえば *zwf* 遺伝子の発現が促進される。つまり、*SoxR* の活性化によって *SoxS* タンパクの過剰產生が起こるが、Weissによれば、これがシグナルの增幅機構になっているという。ただし、*soxRS* レギュロンに属する遺伝子がすべてがスーパーオキシドそのもので誘導されるわけではなく、*fumC* 遺伝子のように NADPH の枯渇をシグナルとするものも含まれる (Liochev et al., 1992a)。*SoxR* タンパクは分子量が 17 kDa で水銀耐性を支配する *MerR* と 23% のアミノ酸配列上のホモロジーがある。分子内に Fe をもっており、その酸化還元がこのタンパクの活性化に関連している (Weiss and Wu, 1994; Hidalgo and Demple, 1994)。精製した *SoxR* は 280, 320, 420, 460, 550 nm にピークを持つ吸収スペクトルを示すが、420 と 460 nm は Fe-S クラスターの特性を示す、550 nm はシステム以外のアミノ酸と Fe との相互作用を示唆している (Weiss and Wu, 1994; Hidalgo and Demple, 1994)。一方、*SoxS* は AraC ファミリーに属する分子量 13 kDa のタンパクで、*SoxR*, *SoxS* ともに DNA 結合ドメインを持っている (Wu and Weiss, 1992)。この意味で典型的な two-component regulatory system とは違っている。むしろ、*SoxR*, *SoxS* ともに regulatory である。OxyR でも *SoxR* でも、それらが実際に何を感じているのか、過酸化水素やスーパーオキシドそのものなのか、はまだ解明されているわけではない。筆者らは細胞内の redox のバランスの乱れのような状態をこれらのセンサー分子が感じるとのではないかと考えている。興味深いのは、*SoxR* の 3' 末端近くの欠失あるいは挿入変異株は *SoxR^c* になっていることである。*SoxR* の活性化にはこの 3' 末端の切断が必須であるのかも知れ

ない。これが正しいとすれば、酸化的ストレスがない状態では、*SoxR* の切断されるべき 3' 末端が存在していることによって、活性化がむやみに起こることを抑制しているとも考えられる。なぜなら、*SoxR* の 4 つのシステインは C 末端近くに存在しており、ここに Fe が結合しており、この redox 状態で *SoxR* の活性が現れるとされているからである (Weiss and Wu, 1994; Hidalgo and Demple, 1994)。

大腸菌の *soxRS* レギュロンとして、現在までに、*sodA*, *nfo*, *zwf*, *micF* などいくつかの遺伝子が同定されている (Demple, 1991; Farr and Kogoma, 1991)。*micF* は大腸菌の主要な外膜タンパク OmpF の発現を抑制するアンチセンス RNA で (Mizuno et al., 1984)，これがスーパーオキシドで誘導合成されると OmpF 量が低下し、その結果、OmpF を通過路とするブレオマイシンやアンピシリンなどの抗生物質に対して大腸菌は抵抗性になることが分かった (Chou et al., 1993; 米井・張, 1993)。

残りの *soxR* レギュロンも含めてスーパーオキシド誘導性の遺伝子はまだ明らかではない。著者らは、大腸菌のスーパーオキシド誘導性遺伝子を分離する試みを行っている。大腸菌の *lac* 欠失株に *Mud* (*Ap*, *lac*) ファージ (Casadaban and Cohen, 1979) を感染させ、得られたアンピシリン抵抗性のコロニーを 2 枚の X-Gal プレート (1 枚には微量の MV を添加) にレプリカした。MV を含むプレート上でより強いブルーを呈するコロニーを選択し、その性質をさらに詳細に調べた結果、MV 誘導性の融合遺伝子を持つ別々のクローニングを 3 種類得た (Mito et al., 1993)。これらの融合遺伝子はいずれも MV だけでなく、他のスーパーオキシド増産剤 (メナジオンやプランバギン、ただし酸素の存在が必須) や高压酸素の下で発現誘導が見られた (Fig. 3)。一方、過酸化水素やクメンペルオキシドはこれらの遺伝子の発現を引き起こさなかった。そこで、これらの融合遺伝子を *soi* (*superoxide inducible*) と名付けた。*soi* 遺伝子の発現は *oxyR* や *recA* 遺伝子には依存しないが、*soxS* 欠損株では MV による発現誘導はまったく起らなかった (Fig. 4)。すなわち、*soi* 遺伝子はいず

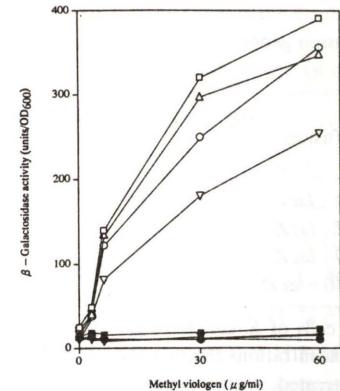


Fig. 3. Induction of the *soi'-lacZ* fusions of *E. coli* by methyl viologen: Exponentially growing cells of *E. coli* containing the *soi'-lacZ* fusions were treated with methyl viologen at 30°C for 1 hr under aerobic (open symbols) or anaerobic (closed symbols) conditions, followed by the assay for β -galactosidase activity. (a) □, *soi-7*; ○, *soi-10*; △, *soi-9*; ▽, *soi-11*. (b) □, *soi-5*; ○, *soi-8*; △, *soi-12*; ▽, *soi-13*.

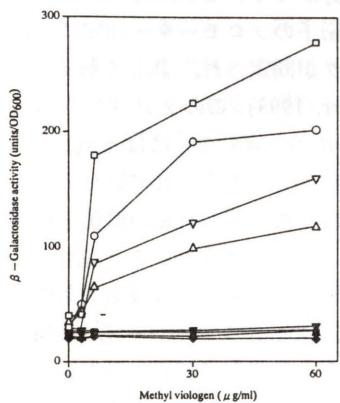
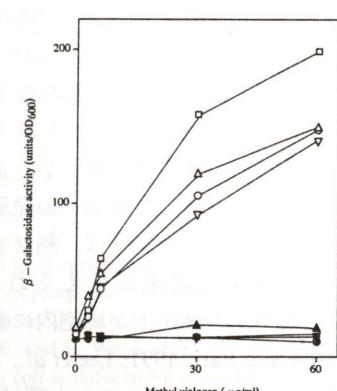
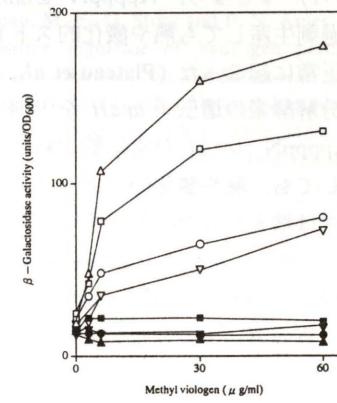


Fig. 4. The *soxS* gene-dependent induction of *soi'-lacZ* fusions upon treatment with methyl viologen in *E. coli*. Symbols were the same as those in the legends for Fig. 3.



れも *soxRS* レギュロンに属することが分かった。これらの融合遺伝子の大腸菌遺伝子地図上での位置 (*soi-7*, *soi-9*, *soi-10* はそれぞれ約 13, 34, 30 分) から、*soxRS* レギュロンとしてはこれまでに同定されたものとは異なっており、新しい遺伝子であることが明らかになった。さらに、これらの融合遺伝子を持つ *soi* 変異株は MV や他のスーパーオキシド増産剤に高感受性を示した (Mito et al., 1993; Takemoto et al., 1994; Zhang et al., 1994)。この意味するところは大きく、これらの遺伝子産物が活性酸素に対する防御で重要な役割を果たすことを示唆している。これらの遺伝子のいくつかについてはすでにクローニングに成功し、現在その解析を行っているところである。*soi-10* 遺伝子は

897 ヌクレオチドから構成される ORF を持っており、約 32 kDa のタンパクをコードしていることが分かった (Zhang and Yonei, 1994)。この遺伝子とヌクレオチド、アミノ酸配列でホモロジーを持つ遺伝子あるいはタンパクは見つけられなかった。これらの *soi* 遺伝子については他にいくつかの興味ある性質が明らかになっているが別の総説 (張・米井, 1994) を参照していただきたい。

真核細胞、原核細胞はいろいろの環境ストレスに遭遇すると、特定の遺伝子の発現を促進あるいは誘導させる。これらのストレス応答で誘導される遺伝子はほとんどの場合そのストレッサーに特異的であるが、中にはいくつかのストレスに共通して誘導される遺伝子も含まれる (Farr and

Kogoma, 1991). このクロストークの機構はあまり理解されていない。しかし、熱と酸化的ストレスに対する応答に関しては少なくとも次の2つの機構が考えられる。1つは、この2つのストレスによって共通の遺伝子制御機構が働くか、または共通のメディエーターを介して遺伝子の発現を誘導するというものである。たとえば、熱ショックや酸化的ストレスが大腸菌に与えられると、AppppNのようなヌクレオチドが細胞内に蓄積してくる (Johnson and Farr, 1991; Lee et al., 1983)。これらのヌクレオチドはアラーモンと呼ばれ、2つのストレス応答に共通したメディエーターではないかと考えられた (Bochner et al., 1984)。しかし、現在、この考えは否定的である (Farr and Kogome, 1991)。なぜなら、AppppNを加水分解する酵素を過剰生産しても熱や酸化的ストレスによる応答は正常に起こった (Plateau et al., 1987)。また、この分解酵素の遺伝子 *apaH* を欠損させて細胞内の AppppN レベルが常に約 100 倍に増大した状態にても、熱や酸化的ストレスで誘導されるタンパクは増大しなかったからである (Farr et al., 1989)。熱ショックによる *sodA* の発現や *ompF* 発現抑制が *soxS* には依存しないことと合わせると、これらの遺伝子の発現調節には多重経路の関与が考えられる (張・米井, 1994)。事実、*sodA* 遺伝子の発現調節には少なくとも 6 種類の因子が関与していることが分かっている (Compan and Touati, 1993; Greenberg et al., 1991; Hassan, 1988; Moody and Hassan, 1984; Hassan, 1994)。

熱や膜作用試薬による *sodA* 遺伝子の発現 (Prieville and Fridovich, 1987; Zhang and Yonei, 1991) は、これらの因子のうち *soxQ* (Greenberg et al., 1991) に依存すると考えられる (張・米井, 1994)。*soxQ* は *SoxR* と同じような性質を示す突然変異であるが、染色体上の位置は 34 min で *soxRS* とは異なっている (Demple, 1991)。*soxQ1* 株では Mn-SOD, G6PDなどの*SoxRS* レギュロン以外にも 7 つのタンパクの合成が構成的になっている。この変異株はメナジオン、t-ブチルペルオキシドなどに耐性で、さらに multiple antibiotic resistance の性質を示す。*soxQ* の支配下にある一群の

Table 2. Induction of the *soi-7*, *soi-9*, *soi-10* and *sodA* fusion genes by diamide and 1,10-phenanthroline under anaerobic conditions*

Gene fusion	Fold increase in β -galactosidase activity	
	Diamide	1, 10-Phenanthroline
<i>sodA :: lacZ</i>	4.5	3.8
<i>soi-7 :: lacZ</i>	2.0	1.0
<i>soi-9 :: lacZ</i>	2.8	1.0
<i>soi-10 :: lacZ</i>	2.5	1.0

* The cells of *E. coli* were grown anaerobically until the concentrations reached about 2×10^8 cells/ml and then treated with diamide at 0.5 mM or 1, 10-phenanthroline at 0.1 mM at 37°C for 120 min under anaerobic conditions.

遺伝子の発現を誘導する natural inducer が何であるかも分かっていない。さらに、最近、*micF* や *zwf* 遺伝子のプロモーター領域に結合する新しいタンパクが同定され、詳しく解析された (Didrol and Farr, 1993)。このタンパクの DNA への結合は、*soxR* や *soxS* さらには *soxQ* にも依存性がなく、これまでに考えられていたメカニズムよりもより複雑な機構がこれらの遺伝子の調節に関与していることが示されている。細胞内の SH と反応性のあるジアミドなどは嫌気的条件でも *sodA* や *soi* 遺伝子の発現を誘導させる (Table 2)。また、過酸化水素も高濃度で細胞に添加した場合、*sodA* 遺伝子などのスーパーオキシド誘導性遺伝子の発現が起こるが、これは過酸化水素そのものがシグナルになったというよりもむしろ細胞内の redox 状態に変化をもたらした結果と考えるほうが妥当である。著者らは、細胞内の redox 状態のバランスの維持に関与しているチオレドキシン、チオレドキシン還元酵素などの一連の「doxin」が酸化的ストレス応答に重要な役割を果たすことを明らかにしつつある。

4. おわりに

大腸菌には SOD 活性を完全に欠失した変異株が分離されているが、この変異株では細胞内でのスーパーオキシド濃度は常に野生株に比べて数千倍にも達しているという (Liochev and Fridovich, 1992b)。したがって、これらの変異株では常に酸化的ストレス状態にあると考えられ、事実、自然

突然変異頻度が著しく増大することが分かっている (Farr et al., 1990)。それでも好気的条件下で生育できるのは SOD に代わる他の酵素がバックアップしているのか、あるいは DNA などの酸化的損傷を修復する機構がきわめて効率よく作動するからであろう。いずれにせよ、genetic stability を維持するしくみは酸素に対しては高度に発達したのではないか。また、生命に重大な危害をもたらす活性酸素であれば、細胞は SOD などを過剰产生してその濃度を限りなく低く下げればいいはずである。しかし、細胞内の活性酸素濃度はある一定の範囲内で維持されている。むしろ SOD などの酸素を過剰に产生するとスーパーオキシドに対する感受性は逆に高くなってしまうことがある。一言でいえば、metabolic imbalance の効果が現れるわけであるが、このことは、例えば、過剰の SOD により生成される過剰の過酸化水素の毒性なのか、スーパーオキシド濃度の異常な減少によって細胞にとって必要な SoxRS レギュロンが発現できなくなったり効果なのかも知れない。また、細胞は増殖や情報伝達に活性酸素を利用していているにちがいないと考える研究者も多い (Nose et al., 1992)。すでに述べたが、筆者らは、酸化的ストレス応答の誘導機構は、おそらく活性酸素それ自身よりも redox 状態の変動を感じて作動を始めるのではないかと考えている。さらに、細胞は単に redox の変動を一次元的に知るだけでなく、この変動の幅をも感知しているだろうと考えている。さらに言えば、細胞はその局面でどの遺伝子をどの順番で、しかもどの程度発現させればよいかを瞬間に察知して、必要な遺伝子を発現させているように見える。

謝 辞

環境変異原学会と放射線影響学会の合同シンポジウムというユニークなシンポジウムを企画され、そこで講演とこの小文をまとめる機会を与えていただいた葛西 宏氏（産業医大）と湯川修身氏（放医研）に深く感謝いたします。

参考文献

Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogenesis and degenera-

- tive diseases, *Science*, **221**, 1256–1264.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga and T. M. Hagen (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 7915–7922.
- Bochner, B. R., P. C. Lee, S. W. Wilson, C. W. Cutler and B. N. Ames (1984) AppppA and related adenylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidative stress, *Cell*, **37**, 225–232.
- Casadaván, M. J. and S. N. Cohen (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: *In vivo* probe for transcriptional control sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4530–4533.
- Chan, E. and B. Weiss (1987) Endonuclease IV of *Escherichia coli* is induced by paraquat, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 3189–3193.
- Chou, J. H., J. T. Greeberg and B. Demple (1993) Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: Positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus, *J. Bacteriol.*, **175**, 1026–1031.
- Christman, M. F., G. Storz and B. N. Ames (1989) OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is homologous to a family of bacterial regulatory proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 3484–3488.
- Compan, I. and D. Touati (1993) Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, **175**, 1687–1696.
- Demple, B. and J. Halbrook (1983) Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*, *Nature* (London), **304**, 446–448.
- Demple, B. (1991) Regulation of bacterial oxidative stress genes, *Annu. Rev. Genet.*, **25**, 315–337.
- Farr, S. B., D. O. Natving and T. Kogoma (1985) Toxicity and mutagenicity of plumbagin and the induction of a possible new DNA repair pathway in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **164**, 1309–1316.
- Farr, S. B., D. N. Arnosti, M. J. Chamberlin and B. N. Ames (1989) An *apaH* mutation causes AppppA to accumulate and affects motility and metabolic repression in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 5010–5014.
- Farr, S. B., R. D'Ari and D. Touati (1990) Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 8268–8272.
- Farr, S. B. and T. Kogoma (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Microbiol. Rev.*, **55**, 561–585.
- Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals, *Science*, **201**, 875–880.
- Fridovich, I. (1989) Superoxide dismutases, *J. Biol. Chem.*, **264**, 7761–7764.
- Didrol, X. and S. B. Farr (1993) Interaction of a redox-sensitive DNA-binding factor with the 5' flanking region

- of the *micF* gene in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **10**, 877–884.
- Gidrol, X., S. B. Farr and T. Kogoma (1993) Oxidative stress responses in bacteria, *Encyclopedia of Microbiology*, **3**, 315–326.
- Gereenberg, J. T., P. Monach, J. H. Chou, P. D. Josephy and B. Demple, B. (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 6181–6185.
- Greenberg, J. H., J. H. Chou, P. Monach and B. Demple (1991) Activation of oxidative stress genes by mutations at the *soxQ/cfxB/marA* locus of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **173**, 4433–4439.
- Hassan, H. M. (1988) Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases, *Free Radical Biol. Med.*, **5**, 377–385.
- Hassan, H. M. (1994) Regulation of the biosynthesis of manganese-superoxide dismutase in *Escherichia coli* in response to iron and manganese, In: K. Asada and T. Yoshikawa (Eds.), *Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine*, Elsevier, Amsterdam, pp. 245–250.
- Hidalgo, E. and B. Demple (1994) An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein, *EMBO J.*, **13**, 138–146.
- Johoson, D. B. and S. B. Farr (1991) AppppA binds to several proteins in *Escherichia coli*, including the heat shock and oxidative stress proteins DnaK, GroEL, E89, C45 and C40., *EMBO J.*, **10**, 3897–3904.
- Kogoma, T., S. B. Farr, K. M. Joyce and D. O. Natvig (1988) Isolation of gene fusions (*soi::lacZ*) inducible by oxidative stress in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 4799–4803.
- Lee, P. C., B. R. Bochner and B. N. Ames (1983) AppppA, heat shock stress and cell oxidation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 7596–7600.
- Liochev, S. I. and I. Fridovich (1992a) Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the *soxRS* regulon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 5892–5896.
- Liochev, S. I. and I. Fridovich (1992b) Superoxide radical in *Escherichia coli*, In: J. G. Scandalios (Ed.), *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 213–229.
- Loewen, P. C. (1992) Regulation of bacterial catalase synthesis, In: J. G. Scandalios (Ed.), *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 97–115.
- Mito, S., Q. M. Zhang and S. Yonei (1993) Isolation and characterization of *Escherichia coli* strains containing new gene fusions (*soi::lacZ*) inducible by superoxide radicals, *J. Bacteriol.*, **175**, 2645–2651.
- Mizuno, T., M. Y. Chou and M. Inouye (1984) A unique mechanism regulating gene expression: Translation inhibition by a complementary RNA transcript (*mic RNA*), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1966–1970.
- Moody, C. S. and H. M. Hassan (1984) Anaerobic biosynthesis of the manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **259**, 12821–12825.
- Morgan, R. W., M. F. Christman, F. S. Jacobson, G. Storz and B. N. Ames (1986) Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 8059–8063.
- Neihardt, F. C. (1987) Multigene systems and regulons, In: F. C. Neihardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik and M. Schaechter (Eds.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington, pp. 1313–1317.
- Nose, K., M. Shibanuma, K. Kikuchi, H. Kageyama, S. Sakiyama and T. Kuroki, T. (1991) Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line, *Eur. J. Biochem.*, **201**, 99–106.
- Plateau, P., M. Fromant and S. Blanquet (1987) Heat shock and hydrogen peroxide responses of *Escherichia coli* are not changed by dinucleotide tetraphosphate hydrolase overproduction, *J. Bacteriol.*, **169**, 3817–3820.
- Privalle, C. T. and I. Fridovich (1987) Induction of superoxide dismutase in *Escherichia coli* by heat shock, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 2723–2726.
- Ronson, C. W., B. T. Nixon and F. M. Ausubel (1987) Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli, *Cell*, **49**, 579–581.
- Rowly, D. L. and R. E. Wolf, Jr. (1991) Molecular characterization of the *Escherichia coli* K12 zwf gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase, *J. Bacteriol.*, **179**, 968–977.
- Storz, G., F. S. Jacobson, L. A. Tartaglia, R. W. Morgan, L. A. Silveira and B. N. Ames (1989) An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: Genetic characterization and cloning of *ahp*, *J. Bacteriol.*, **171**, 2049–2055.
- Storz, G., L. A. Tartaglia and B. N. Ames (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: Direct activation by oxidation, *Science*, **248**, 189–194.
- Takemoto, T., Q. M. Zhang and S. Yonei (1994) Isolation and characterization of new *soi* genes inducible by superoxide radicals in *Escherichia coli* K12, In: K. Asada and T. Yoshikawa (Eds.), *Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine*, Elsevier, Amsterdam, pp. 279–280.
- Tao, K., K. Makino, S. Yonei, A. Nakata and H. Shina-gawa (1989) Molecular cloning and nucleotide sequencing of *oxyR*, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: Homologies between OxyR protein and a family of bacterial proteins, *Mol. Gen. Genet.*, **218**, 371–376.
- Tao, K., K. Makino, S. Yonei, A. Nakata and H. Shina-gawa (1991) Purification and characterization of the *Escherichia coli* OxyR protein, the positive regulator for a hydrogen peroxide-inducible regulon, *J. Biochem.*, **109**, 262–266.
- ヰ和之 (1993) 大腸菌 OxyR レギュロン遺伝子群のクローニングと機能解析, 日本放射線影響学会第36回大会講演要旨集, pp. 229.
- Tartaglia, L. A., G. Storz and B. N. Ames (1989) Identification and molecular analysis of *oxyR* regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress, *J. Mol. Biol.*, **210**, 709–719.
- Tsaneva, I. R. and B. Weiss (1990) *SoxR*, a Locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, **172**, 4179–4205.
- Walkup, K. B. and T. Kogoma (1989) *Escherichia coli* proteins inducible by oxidative stress mediated by the superoxide radical, *J. Bacteriol.*, **171**, 1476–1484.
- Weiss, B. and J. Wu (1994) A superoxide response regulon of *E. coli*, In: K. Asada and T. Yoshikawa (Eds.), *Frontiers of Reactive Oxygen Species in and Medicine*, Elsevier, Amsterdam, pp. 241–244.
- Wu, J. and B. Weiss (1991) Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **173**, 2864–2871.
- Wu, J. and B. Weiss (1992) Two-stage induction of the *soxRS* (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **174**, 3915–3920.
- 米井脩治, 池畠広伸, 張 秋梅, 加藤幹太 (1989) 過酸化水素とスーパーオキサイドラジカルの生物作用機構の比較, 日本放射線影響学会第32回大会講演要旨集, pp. 239.
- 米井脩治 (1992) 活性酸素誘導性遺伝子, 放射線抵抗性の誘導 (色田幹雄, 山田武編), 実業公報社, 東京, pp. 32–40.
- 米井脩治, 張 秋梅 (1993) 酸素ストレスと遺伝子発現の誘導, 凍結及び乾燥研究会会誌, **39**, 83–89.
- Zhang, Q. M. and S. Yonei (1991) Induction of manganese-superoxide dismutase by membrane-binding drugs in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **173**, 3488–3491.
- Zhang, Q. M., T. Takemoto, T. and S. Yonei (1994) Molecular cloning and characterization of new members of the *soxRS* regulon in *Escherichia coli*, In: K. Asada and T. Yoshikawa (Eds.), *Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine*, Elsevier, Amsterdam, pp. 281–282.
- Zhang, Q. M. and S. Yonei (1994) Molecular cloning and characterization of a new member of the *soxRS* regulon, *soi-10/12*, in *Escherichia coli*, submitted.
- 張 秋梅, 米井脩治 (1994) スーパーオキサイド誘導性遺伝子, 放射線科学, 印刷中.

SoxRS: 大腸菌レドックスストレス応答その役割と調節機構

SoxRS: *E. coli* redox stress response Role of the response and regulation

布 柴 達 男

Tatsuo Nunoshiba

ハーバード大学公衆衛生学部分子細胞毒性学*

Dept. of Molecular and Cellular Toxicology, Harvard School of Public Health
665 Huntington Ave., Boston, MA 02115

(受付: 1994年9月14日; 受理: 1994年9月14日)

Summary

All aerobic organisms confront toxic effects of reactive oxygen species, which can initiate lipid peroxidation, can oxidize proteins, and can damage DNA. To defend themselves from such oxidative stress, cells evolved multistage defense systems that scavenge reactive oxygens, decompose lipid peroxide, repair oxidative DNA damages, etc.

E. coli SoxRS response induced by redox stress is controlled by two-stage system in which SoxR acts as a sensing transcriptional activator for the *soxS* gene, whose product then stimulates transcription of the regulon genes required for these defense systems. The SoxRS has been found to be induced in response to nitric oxide besides oxidative stress, and to contribute to the protection against cytotoxicity of macrophages. To understand the mechanism for its regulation (e.g. how does SoxR protein recognize the oxidative stress?), molecular biological approaches have been employed. Here, the roles of the SoxRS response and mechanism for the regulation are discussed.

Keywords: global response, superoxide, nitric oxide, two-component regulation, macrophage-phagocytosis

1. はじめに

Superoxide anion radical (O_2^-), 過酸化水素 (H_2O_2), hydroxyl radical ($OH\cdot$) などの活性酸素は非常に反応性が高く、脂質、蛋白質、DNA やその前駆物質などの生体物質と容易に反応してそれらを損傷するため、がんを含む種々の疾病や老化の原因になると考えられている。活性酸素は、好気性生物の通常の呼吸鎖での酸素の 4 電子還元の過程で不均化中間体として生じるほか、電離放射線照射や化学発がん物質などの代謝によっても増強される。したがって酸素を利用する細胞は、常にその毒性に曝されることになる。ところがこれらの生物は、進化の過程で酸素を有効利用することとともに、その毒性から身を守るために防御機

構を得し、細胞内での活性酸素の生成と消去のバランスを巧みに保っている。例えば大腸菌は、構成的に備えられている防御系のほか、高い酸化ストレス条件下でのみ誘導される防御系をもつ。しかもそれらの防御遺伝子は、regulonとして *oxyR* や *soxRS* という少なくとも 2 つのメインスイッチにより制御され、活性酸素消去から酸化損傷部位の修復や過酸化生成物の代謝、そして原因物質の取り込みの抑制に至る、まさに “global response” として巧妙かつ合目的に誘導が調節されている。

本稿では、特に redox-cycling agent (RCA; O_2^- 増産剤) で誘導されるレドックスストレス応答 SoxRS の役割やその調節機構について紹介する。

* 現所属 東北大学理学部生物学教室分子遺伝学講座

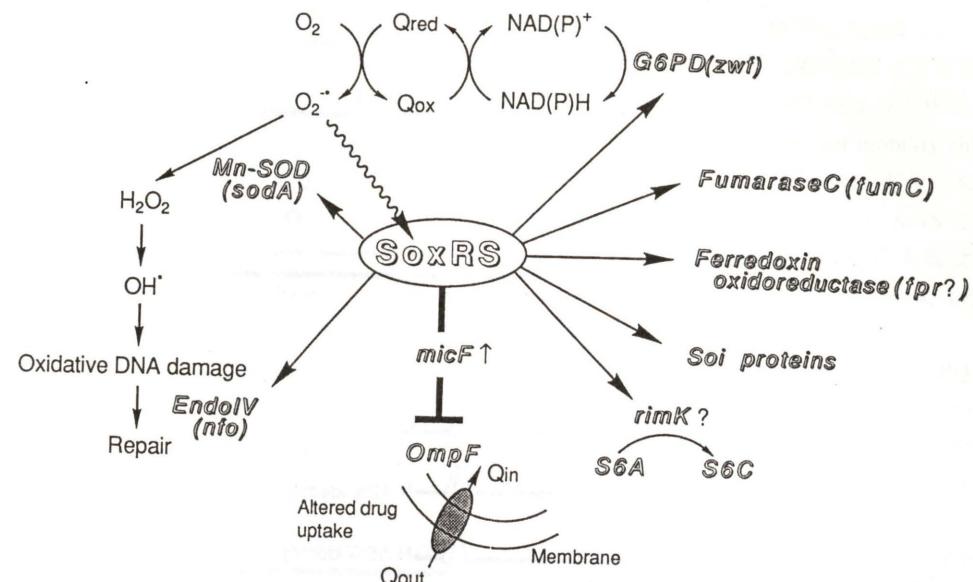
Table 1. The *Escherichia coli* regulons in response to oxidative stress.

Regulon	Gene	Map(min)	Gene product
<i>oxyR</i>	<i>oxyR</i>	89	OxyR regulon activator ↓
	<i>ahpCF</i>	13	Alkylhydroperoxide reductase ↑
	<i>gor</i>	77	Glutathione reductase ↑
	<i>katG</i>	89	Catalase HPI ↑
	<i>oxyS</i>	89	Untranslated mRNA that controls production of FhlA, FhlA; Formate hydrogen-lyase ↓ RndD; metal resistant/cell division type transport ↓ UhpT; hexose phosphate transporter ↑ Dps; non-specific DNA binding protein ↑
<i>soxRS</i>	<i>soxR</i>	92	Sensing activator for <i>soxS</i>
	<i>soxS</i>	92	SoxRS regulon activator (↓ by <i>SoxS</i> ; ↑ by <i>SoxR</i>)
	<i>fumC</i>	36	Redox-resistant fumaraseC ↑
	<i>micF</i>	48	Antisense RNA for OmpF ↑ (Inhibitor of OmpF translation)
	<i>fpr(?)</i>	88	NADPH:ferredoxin oxidoreductase ↑
	<i>nfo</i>	47	DNA endonucleaseIV ↑
	<i>rimK(?)</i>	17	Ribosomal protein S6 glutamic acid transferase ↑?
	<i>sodA</i>	88	Mn-containing superoxide dismutase ↑
	<i>soi</i>		?
	<i>zwf</i>	41	Glucose-6-phosphate dehydrogenase ↑

2. 大腸菌における酸化ストレス応答

好気条件下で増殖する大腸菌を sublethal dose の RCA で処理すると、約 80 種の蛋白合成が誘導され、結果としてそれらの酸化ストレスに対して抵抗性を獲得する。そのうちの約半数は H_2O_2 で誘導される蛋白と重複しており、細胞内での不均化により O_2^- から生じる H_2O_2 により間接的に誘導されるものと解釈されている (Greenberg and Demple, 1989)。大腸菌にはこれまでに、OxyR と SoxRS の少なくとも 2 種のストレス応答の転写調節因子が発見されている。OxyR, SoxRS ともそれぞれ H_2O_2 , RCA で誘導される蛋白のうちの約十数種をコードする遺伝子の発現を調節している (Table 1) (私信)。

一方、SoxRS 応答により誘導される蛋白には、 O_2^- の消去酵素の Mn-superoxide dismutase (MnSOD), 細胞内の NAD(P)H/NAD(P)⁺ のバランスの調節に関わる glucose-6-phosphate dehy-

Fig. 1. Functions of the *soxRS* regulons.

drogenase (G6PD), DNA の酸化的損傷の修復酵素である DNA endonucleaseIV (Greenberg et al., 1990; Tsaneva and Weiss, 1990), 熱耐性 fumaraseC (Liochev and Fridovich, 1992), そして NADPH 依存 ferredoxin oxidoreductase (Liochev and Fridovich, 1994) などが知られている (Fig. 1)。これらの蛋白をコードする遺伝子のうち *sodA*, *zwf*, *nfo* については、その遺伝子発現が転写レベルで SoxRS の調節を受けていることが証明されている。また ferredoxin oxidoreductase については、その酵素活性が SoxRS に依存して誘導されることを確認しているが、それをコードする遺伝子 *fpr* が最近クローニングされたばかりで (Bianchi et al., 1993), その遺伝子発現に SoxRS が関与するかどうかは確認されていない。

また SoxRS が少なくとも 2 種の蛋白の誘導を抑制することも知られている (Greenberg et al., 1990; Tsaneva and Weiss, 1990)。外膜ポーリン蛋白 OmpF は、antisense RNA である *micF* が SoxRS 応答により誘導されるため、翻訳レベルで合成が抑制される (Chou et al., 1993) (Fig. 1)。この OmpF 蛋白量の減少は、細胞内への物質の取り込みを抑制することから、RCA を含む原因物質の取り込み抑制により細胞を酸化ストレスから防御しているものと考えられる。またリボゾーム

蛋白 S6A の減少とそれにともなう S6C の増加が観察される (Greenberg et al., 1990; Tsaneva and Weiss, 1990) (Fig. 1)。S6A は、*rimK* にコードされる S6 グルタミン酸転移酵素によりその C 末端にグルタミン酸が添加され、S6C に変化する (Kang et al., 1989)。この変化は、S6 リボゾームの抗生物質に対する抵抗性に関与しており、おそらくこの *rimK* の転写が SoxRS に調節され、リボゾームを酸化ストレスから防御するのかも知れない。

さらに、これまで知られていた *soi* (superoxide inducible) 遺伝子 *soi17/19* と *soi28* (Kogoma et al., 1988) に加えて、新たに数種の *soi* 遺伝子の存在が確認され (Mito et al., 1993)，最近そのひとつ *soi10* がクローニングされたが、コードする蛋白の機能については未だ不明である。

3. *soxRS* 遺伝子のクローニングと二段階調節機構

最初 *soxRS* regulon は、2 つのグループにより見いだされた。Demple らのグループは、低濃度 menadione (MD) で前処理された大腸菌が高濃度処理に対して抵抗性を獲得することから、前処理により防御系が誘導されると考え、MD 抵抗性変異株を分離した。二次元電気泳動による蛋白解析

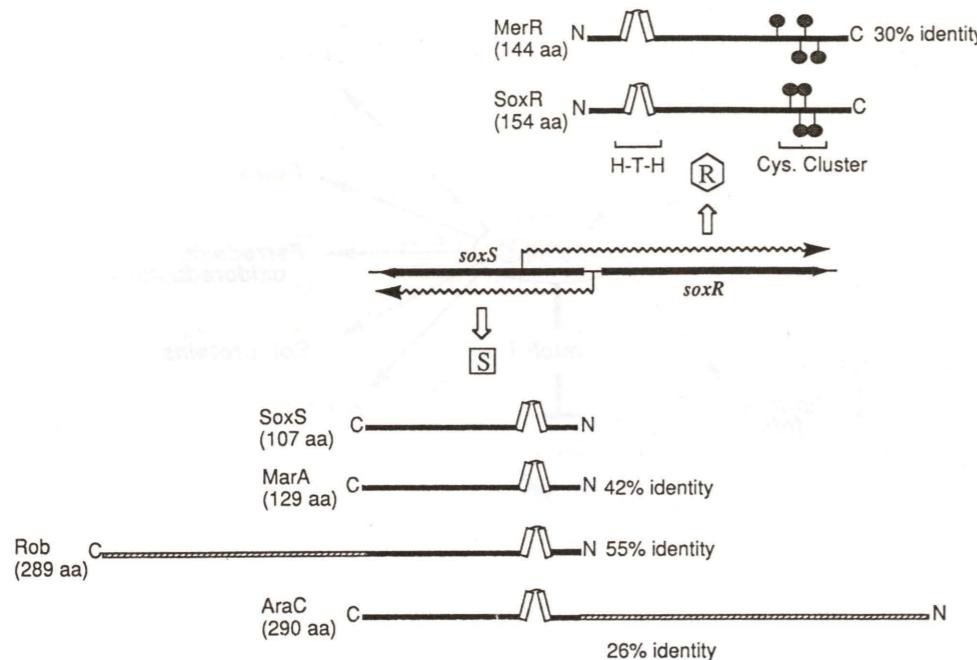


Fig. 2. The *soxRS* locus and the homologous.

から、MnSOD, G6PD, EndoIV, Soi28などの蛋白の誘導を確認し、これを *soxR^c* (*superoxide response constitutive*) と名付けた (Greenberg *et al.*, 1990)。一方 Weiss らのグループは、endo-nucleaseIV が PQ により誘導されることから、*nfo* :: *lacZ* operon fusion が高いレベルに発現される変異株を分離し、*nfo* 以外の regulon 蛋白の誘導を確認して *soxR^c* とした (Tsaneva and Weiss, 1990)。

これらの遺伝子はともに大腸菌の遺伝子地図の約 92 分にマップされる同一の遺伝子で、DNA のクローニングと塩基配列解析の結果、この locus には *soxR* と *soxS* の二つの遺伝子が head-to-head で隣り合って存在し、転写領域の一部が重複することが示された (Amábile-Cuevas and Demple, 1991; Wu and Weiss, 1991) (Fig. 2)。それらの遺伝子にコードされる蛋白は、それぞれ 17kDa, 13 kDa で、共に N 末端に helix-turn-helix motif をもつ DNA 結合蛋白である。DNA 塩基配列から予想されるアミノ酸のホモロジー検索の結果、SoxR はある種のプラスミドやトランスポゾンのもつ水銀解毒 operon *mer* の sensor であり activator である MerR と約 30% (Amábile-Cuevas

and Demple, 1991)、一方 SoxS は、抗生素抵抗性 operon *mar* (*multiantibiotics resistance*) の activator である MarA と 42% (Cohen *et al.*, 1993)、大腸菌の replication origin の *oriC* に結合する蛋白である Rob の N 末端と 55% (Skarstad *et al.*, 1993)、そしてアラビノース代謝 operon の activator の AraC の C 末端と 26% (Amábile-Cuevas and Demple, 1991; Wu and Weiss, 1991) ホモロジーをもつことが報告されている (Fig. 2)。SoxR と MerR のホモロジーは、DNA 結合部位のほか、MerR の水銀結合部位である 4 つの cysteine からなるクラスターを含み (Amábile-Cuevas and Demple, 1991) (Fig. 2)、酸化還元に高感受性の金属、例えば Fe や Cu などの結合が予想された。

これらに加えて、細胞内の SoxS 量を増産させると、SoxR とは無関係に G6PD, EndoIV, Mn-SOD などの酵素活性が誘導されること (Amábile-Cuevas and Demple, 1991), RCA 处理により *soxS* の mRNA 量が増加すること (Wu and Weiss, 1991) などから、二段階調節モデル、すなわち細胞内に構成的に存在するセンサーでかつ *soxS* の activator の SoxR が、O₂⁻あるいはな

んらかのシグナルにより活性化されて *soxS* の転写を誘導し、増産された regulon 遺伝子の activator である SoxS がそれぞれの regulon 遺伝子の転写を促進するというモデル (Fig. 3) が提唱された (Demple and Amábile-Cuevas, 1991)。

そこで Fig. 4 に示すような *soxS'* :: *lacZ* operon fusion を chromosome に挿入した株を作成し、PQ による *soxS* の転写誘導と SoxR の関与を検討した。*soxS* の転写に対応する β -galactosidase 活性

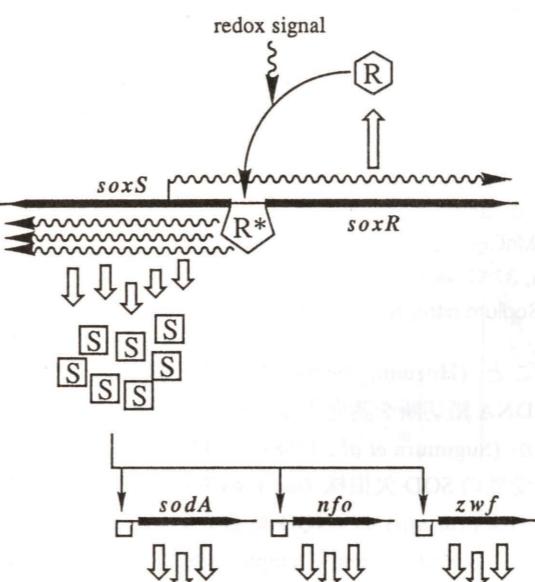
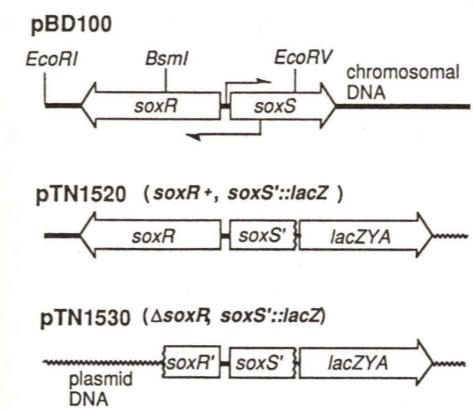


Fig. 3. Two-stage control system for SoxRS response.



は、PQ により *soxR⁺* 株でのみ誘導され、*soxS* の誘導が明らかに SoxR に依存することが確認された (Nunoshiba *et al.*, 1992; Wu and Weiss, 1992) (Fig. 4)。また *in vitro* でも gel mobility shift assay により、SoxR の *soxS* promoter 部位への結合が (Nunoshiba *et al.*, 1992)，さらに SoxS の regulon 遺伝子の promoter 部位への結合も確認された (Li and Demple, 1994)。これらの結果は先の二段階調節モデルを強く支持している。

また、Fig. 4 に示されるように、PQ による *soxS'* :: *lacZ* の誘導レベルが Δ *soxS* 株により *soxS⁺* 株で有意に低いこと、さらに plasmid で SoxS を増産すると *soxS'* :: *lacZ* の誘導レベルが著しく減少すること (Nunoshiba *et al.*, 1993a) から、SoxS 蛋白自身が転写を自己抑制すると考えられる。*in vitro* でも、SoxS が *soxS* promoter に結合すること、SoxR の promoter への結合は阻害しないことが確認されている (Nunoshiba *et al.*, 1993a) が、SoxS の結合領域、RNA polymerase の結合への影響などの詳細な機構、そしてこの自己制御の意義などについては不明で、おそらく細胞内の *soxRS* regulon の発現量を微妙に調整しているものと推察されている。

4. SoxRS 応答の inducer と non-inducer

soxS' :: *lacZ* operon fusion 株を用いて、SoxRS 応答の inducer/non-inducer が screening された。

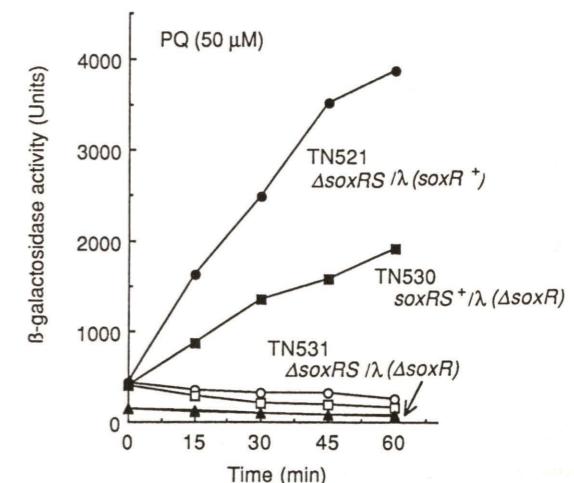


Fig. 4. The *soxS'* :: *lacZ* operon fusions and SoxR-dependent *soxS* induction by PQ.

Table 2. Inducers and non-inducers for SoxRS response

Inducers for the *soxS'::lacZ* fusion

Redox cycling agent

Phenazine methosulfate, Plumbagin, Paraquat, Menadione bisulfite

Others

4-Nitroquinoline N-oxide, 4-Nitropyridine N-oxide,
4-Hydroxyquinoline N-oxide, Nitric oxide, Methylene blue
Sodium hypochlorite,Non-inducers

Oxidative stress related

 H_2O_2 , t-Butyl hydroperoxide, Formaldehyde, Bleomycin,
Xanthine/xanthine oxidase, g-radiation (10 and 20 krads)

Others

Mitomycin C, N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, Alloxan
Methyl methanesulfonate, Chlorpromazine, Nalidixic acid,
 $K_2Cr_2O_7$, $HgCl_2$, $CdCl_2$, $NiCl_2$, $MnCl_2$, $CoCl_2$, $NaAsO_2$, Na_2SeO_3 ,
Heat shock ($30^{\circ}C \rightarrow 37^{\circ}C$; 15 min, $37^{\circ}C \rightarrow 42^{\circ}C$; 15 min,
 $37^{\circ}C \rightarrow 45^{\circ}C$; 15 min), Diamide, Sodium nitroprusside, etc.

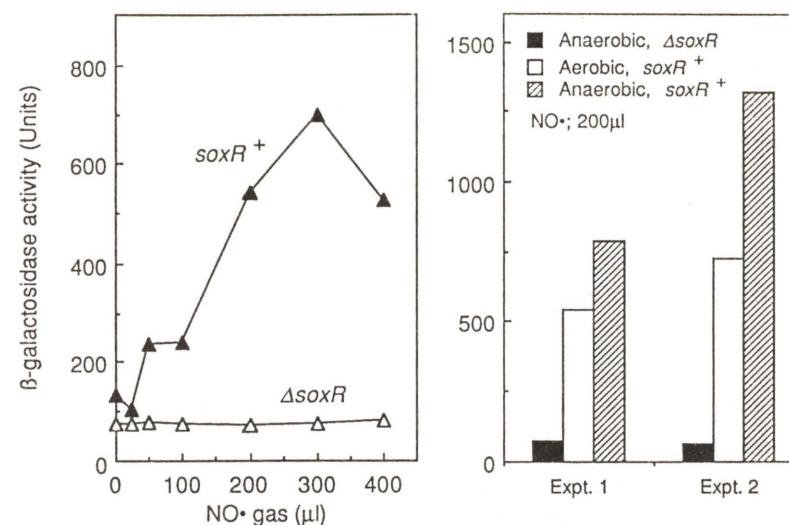
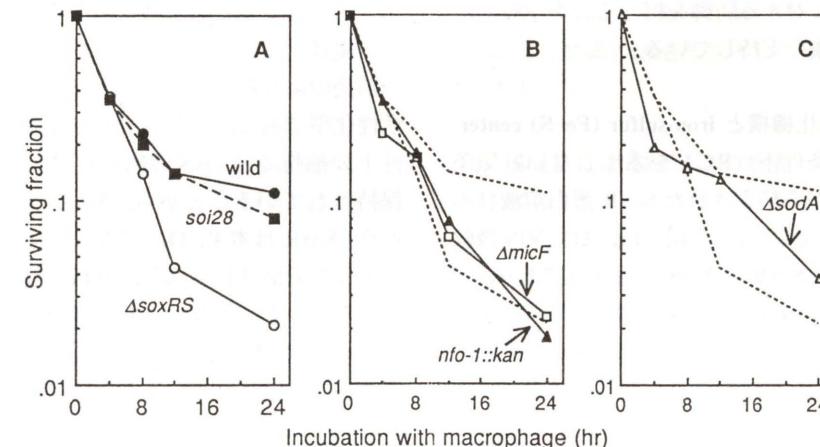
典型的な RCA である PQ, MD, phenazine methosulfate, plumbagin は、いずれも SoxR に依存して *soxS* の転写を誘導した。その一方で、 H_2O_2 や近紫外線、電離放射線などの O_2^- 増産剤以外の活性酸素関連物質や DNA のアルキル化剤、金属化合物、熱ショックでは誘導されない (Nunoshiba et al., 1992) (Table 2)。また xanthine/xanthine oxidase による細胞外での O_2^- 増産でも *soxS* は誘導されない (Table 2)。これは O_2^- が細胞膜を通過できないためと考えられている。

予想外に有名な発がん物質である 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) が、典型的な RCA の PQ より数十倍、MD より約 100 倍強力に *soxS* を誘導した (Nunoshiba and Demple, 1993) (Table 2)。その誘導は嫌気条件下では見られないことから、4NQO も RCA 同様、 O_2^- 増産剤と言えるかもしれない。4NQO のニトロ基は細胞内で還元されるが、その際、還元中間体として nitro anion radical や nitroxide radical などのラジカル種の生じる可能性がある。これらのラジカルは酸素分子と容易に反応して O_2^- を生ずると考えられる (Biangrow et al., 1977)。またヒドロキシルアミン体である 4HAQO が、水溶液中で H_2O_2 を発生させる

こと (Hozumi, 1969)，さらにそれに起因する DNA 鎮切断を誘発することが報告されているほか (Sugimura et al., 1968)，活性酸素に対して高感受性の SOD 欠損株 (*sodA sodB*) や DNA 修復欠損株 (*xth nfo*) の 4NQO 高感受性も観察されている (Nunoshiba and Demple, 1993) ことから、4NQO と活性酸素の関わりは興味深い。また活性酸素の発がんプロモーターとしての関与も示唆されており (Burdon et al., 1990)，4NQO の強力な発がん性が、強い変異原性と強い O_2^- 増産性の両方に起因するととも推測できる。

5. 一酸化窒素 radical ($NO\cdot$) による *soxS* 誘導とその役割

$NO\cdot$ gas の bubbling も SoxR に依存してこの応答を誘導する (Nunoshiba et al., 1993b) (Fig. 5)。 $NO\cdot$ は容易に酸素と反応し、硝酸、亜硝酸を、また O_2^- とも反応して、非常に酸化性の強い peroxinitrite ($ONOO^-$) を生じる (Koppenol et al., 1992)。したがってこれらの反応生成物による SoxR の活性化の可能性も考えられたが、PCA や 4NQO の場合とは異なり酸素非依存的に誘導される (Fig. 5) ことから、おそらく $NO\cdot$ が直接に

Fig. 5 Induction of *soxS* by nitric oxide and its oxygen-independency.Fig. 6. SoxRS-mediated protection of *E. coli* against murine peritoneal macrophages.

SoxR を活性化するものと考えられている (Nunoshiba et al., 1993b)。

$NO\cdot$ は O_2^- 同様、生体内のあらゆるところで $NO\cdot$ 合成酵素の L-arginine 酸化反応により生産され、neurotransmitter として、また血管の緩和による血圧や降下やマクロファージの細菌やがん細胞に対する細胞毒性に関与している (Moncada et al., 1991) ほか、その DNA 損傷性や変異原性 (Nguyen et al., 1992) から内因性発がん物質としても注目されている。

大腸菌が、どういった目的で $NO\cdot$ に応答して活性酸素に対する防御系である SoxRS を誘導するのかという疑問に対し、『マクロファージの食菌

作用に対する防御系として SoxRS 応答を誘導する』との仮説を立てた。そこでマウスから腹腔マクロファージを調製し、大腸菌のマクロファージ細胞内での survival を検討した。その結果、 $\Delta soxRS$ 株は野生株より有意に高感受性でその差は、8 時間以後に観察された (Fig. 6)。Phagocytosis により活性化されたマクロファージが検出可能な量の $NO\cdot$ を産生するのにおよそ 5–6 時間が必要といわれている。したがって観察された感受性の差はおそらく $NO\cdot$ の産生に起因する。また SoxRS に調節される機能のうち、特に OmpF の antisense RNA である *micF*, endonucleaseIV (Fig. 6), G6PD (Nunoshiba et al., in press) の欠損株に

Δ soxRS 株と類似の高感受性が観察された。Mn-SOD 欠損株の場合は 4 時間後から野生株よりも高感受性を示すことから (Fig. 5), NO[•] よりはむしろ, phagocytosis の直後から生産される H₂O₂ に起因するものと考えられる (Nunoshiba et al., 1993b). 最近マクロファージによる NO[•] 产生濃度に概ね匹敵する 25–125 μM/hr の dose-rate での NO[•] 处理により 10–20 倍の soxS'::lacZ の誘導が観察されたほか, 実際にマクロファージ細胞内で soxS が誘導されること, さらにその誘導は NO[•] 合成酵素の阻害剤である N-monomethyl-L-arginine でほぼ完全に抑制されることが確認されている (Nunoshiba et al., in press). これらの結果は, 大腸菌はマイクロファージ細胞内で NO[•] に応答して SoxRS を誘導し, これがマクロファージの細胞毒性に対する防御を担うことを示唆し, 前述の仮説を強く支持している。

6. SoxR 活性化機構と iron-sulfur (Fe-S) center

非ストレス条件下 (RCA を添加しない好気条件下) の細胞から精製された SoxR 蛋白溶液は赤茶色を呈すること, 含有金属分析, UV/VIS 吸収スペクトルから SoxR は Fe-S 含有蛋白であり, C 末端に存在する cysteine cluster に Fe が結合するものと考えられている。この Fe は 2-メルカプトエタノール存在下で精製された蛋白には確認されず, Fe 非含有の SoxR (Apo-SoxR) であることが示された。これらの 2 種の SoxR 蛋白を用いた *in vitro* での解析の結果, soxS promoter への結合性や結合領域には相違は認められず, RNA polymerase の soxS promoter への結合性が, Fe-SoxR 存在下では Apo-SoxR 存在下やあるいは SoxR 非存在下に比べてわずか 2 倍高められたにすぎなかった。ところが RNA polymerase による *in vitro* での soxS 遺伝子転写は, Fe-SoxR により約 100 倍にも促進される一方, Apo-SoxR にはその活性がほとんど認められなかった。このことは, 精製された蛋白はすでに活性型であり, その活性には Fe 含有が不可欠であることを示唆している (Hidalgo and Demple, 1994)。

活性化機構として最も可能性が強いのは Fe-S 部位の酸化であろう。もしこのことが正しければ

活性型 Fe-SoxR は還元されると仮定し, 嫌気条件下で低濃度ジチオナイトにより, 精製された活性型 Fe-SoxR の還元を試みた結果, 活性型蛋白のもつ特異的な UV/VIS 吸収スペクトルは, Fe-S の還元を示唆するスペクトルに変化した (Hidalgo and Demple, 1994)。さらに還元された Fe-SoxR を空気あるいは NO[•] に暴露させると瞬時に酸化型のスペクトルに戻ることから, SoxR の Fe-S は酸化/還元されると考えられている (私信)。しかしこの還元型蛋白を取り出すことは非常に困難で, soxS の転写に対して不活性であるか否かは確認されていない, いざれにしても SoxR の活性化と Fe-S center の酸化とは密接に関連していると思われる。

7. 活性化シグナルと SoxR の酸化ストレス認識機構

前述のように, 精製された SoxR 蛋白はすでに活性型である。しかし少なくとも非ストレス条件下の細胞では soxS の転写がかなり低レベルに保持されていることから, SoxR は不活性型であろう。SoxR は本来, O₂⁻ でなくても空気中の酸素によっても活性化される, 非常に酸化されやすい蛋白なのかもしれない。もしこのことが正しいとすると, SoxR は細胞内で何らかの機構によって不活性型に保たれていることになる。活性化シグナルとしてこれまで O₂⁻ が第一の候補としてあげられ, SoxR が O₂⁻ により活性化されると考えられてきた。事実, MnSOD と FeSOD の両方を欠損した菌株では, 通常の soxS の転写が 4~5 倍高いことが観察されている (Nunoshiba et al., 1992)。しかし PQ 处理による MnSOD や G6PD の誘導レベルは SOD の過剰生産によって変化しないこと, 同じく PQ 处理による fumarase C の誘導が G6PD 欠損株で高められることなどから, SoxRS 応答のシグナルは O₂⁻ ではなく, 細胞内の NAD(P)⁺/NAD(P)H のバランスである可能性も提出されている (Liochev and Fridovich, 1992)。これらのことから, NAD(P)⁺/NAD(P)H のバランスによって保たれている細胞内の還元的雰囲気あるいはある種の還元酵素が SoxR の不活性型維持に関与していると推察することができる。

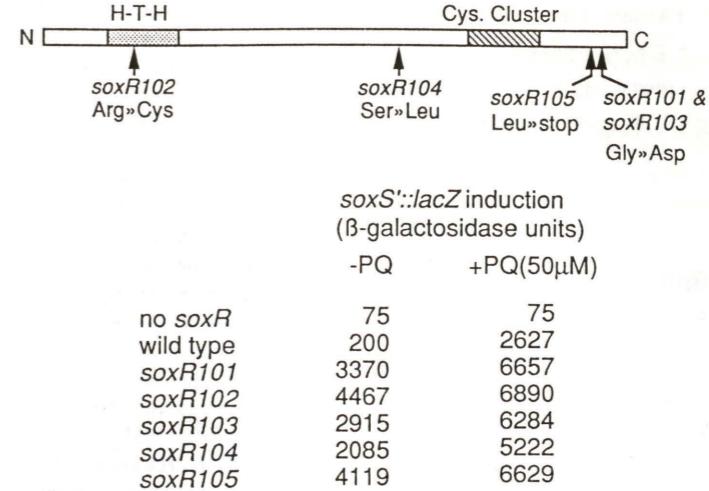


Fig. 7. The constitutive mutations in the soxR gene and effect of the soxR^c mutants on the soxS expression.

このことに関連して興味深い実験がある。クローニングされた soxR 遺伝子の 3' 末端を切断して SoxR 蛋白の C 末端の 20 アミノ酸を変化させると, その変異 SoxR は非ストレス条件下で高レベルに SoxRS 応答を誘導する (Nunoshiba and Demple, 1994)。また逆に前述の MD 抵抗性変異株として分離された soxR^c 株 5 種について DNA 塩基配列が調べられた結果, 3 種の変異株が soxR の 3' 末端に点突然変異を起こしていた (Fig. 7)。しかも cysteine cluster には何の変異も認められない。これらのこととは SoxR の C 末端が活性化/不活性化に重要な役割を果たしていることを示唆している (Nunoshiba and Demple, 1994)。

さらに興味深いことに, この変異株は嫌気性条件下では野生株程度の soxS の転写レベルにもどる。したがってこの変異 SoxR 蛋白は構成的に活性型の SoxR ではなく, むしろ非ストレス条件下でも活性化される高感度センサー変異体か, または還元を受けにくい変異体であると考えることができる (Nunoshiba and Demple, unpublished)。Fe-S を活性部位として含む大腸菌の数種の酵素は O₂⁻ に感受性で, Fe の欠落によって不活性化されるとの報告がある (Kuo et al., 1987; Gardner and Fridovich, 1991)。さらに SoxR の場合も高濃度の O₂⁻ や NO[•] 处理により, Fe の欠落を示す Apo-SoxR と同様の UV/VIS スペクトルが観察された (私信)。SoxR の C 末端が Fe-S

を保護するような微妙な蛋白構造に関わるか, または還元酵素の認識部位として働いていると推察できる。

8. SoxR による転写促進機構

DNaseI フットプリント実験において観察される SoxR による soxS promoter 上の保護領域は, Fe-SoxR 単独または RNA polymerase が存在する場合も共に -10 領域から -35 領域を覆い, 領域の変化は先に述べた結合性と合様ほとんど認められない。したがって現在までのところ, SoxR が RNA polymerase の soxS promoter への結合を促進するというよりは, むしろ転写自体を促進する可能性が強いと考えられている (Hidalgo and Demple, 1994)。

興味深いことに, promoter の -10 領域と -35 領域の間隔は, 一般に 17 塩基であるのに対し, soxS の場合は 19 塩基と 2 塩基多い。同様のことが SoxR 蛋白と高いホモロジーをもつ MerR が sensor activator として働く merT promoter にも確認されており, 保護領域もほぼ類似している (Hidalgo and Demple, 1994)。この 2 塩基のずれのため RNA polymerase が -10 領域を認識できず, activator なしには転写はほとんど起こらないものと考えられる。MerR の場合, Hg²⁺ を含有する活性型蛋白が merT promoter に結合して, DNA を巻き戻すと共に DNA 鎖自身を歪めるこ

とが確認されており (Ansari *et al.*, 1991), これが RNA polymearse による転写を助長すると考えられている (Summers, 1992). おそらく SoxR の場合も同様の機構が考えられるが, 証明には至っていない.

9. おわりに

本稿では、大腸菌のレドックスストレス応答 SoxRS について、その役割、そして誘導や調節の仕組みについて述べてきた。誘導機構の詳細やシグナルについてはまだ data が十分とはいえず、いまだ推測の域を脱していないところもあり、さらなる *in vitro* での分子生物学的な解析が必要である。

SoxRS に調節されている遺伝子のいくつかは、multi antibiotics resistance operon である *mar* をはじめ、SoxRS 以外の複数の調節を受けていることが明らかになっている。事実、*soxR^c* 変異株や *soxRS* が誘導された細胞は、酸化ストレスだけでなく、各種 antibiotics にたいしても抵抗性を示す。したがって、それらの調節機構がどのように協奏または競争(?) しあっているかは興味深いところである。大腸菌以外の細菌や好気性細胞に同様の SoxRS 応答が存在するか否かについては明らかではない。たとえばもある種の病原細菌に同様の応答があると仮定すると、環境中の RCA あるいは変異原/発がん物質などによりこれらの細菌の SoxRS が誘導され、活性酸素や抗生物質に対して抵抗性を獲得するばかりか、マクロファージにも抵抗性を示すようになる可能性がある。そういう微生物学的な見地からもこの種の研究は重要かも知れない。

参考文献

- Amáble-Cuevas, C. F., and B. Demple (1991) Molecular characterization of the *soxRS* genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4479–4484.
- Ansari, A. Z., M. L. Chael and T. V. O'Halloran (1991) Allosteric underwinding of DNA is a critical step in positive control of transcription by Hg-MerR, *Nature* (London), **355**, 87–89.
- Biagrow, J. E., B. E. Jacobsen and O. F. Nygaard (1977) Metabolic reduction of 4-nitroquinoline N-oxide and other radical producing drugs to oxygen-reactive intermediates, *Cancer Res.*, **37**, 3306–3313.
- Bianchi, V., P. Reichard, R. Eliasson, E. Pontis, M. Krook, H. Jörnvall and E. Haggård-Ljungquist (1993) *Escherichia coli* ferredoxin NADP⁺ reductase: Activation of *E. coli* anaerobic ribonucleotide reduction, cloning of the gene (*fpr*), and overexpression of the protein, *J. Bacteriol.*, **175**, 1590–1595.
- Burdon, R. H., V. Gill and C. Rice-Evans (1990) Oxidative stress and tumor cell proliferation, *Free Radical Res. Commun.*, **11**, 65–76.
- Chou, J. H., J. T. Greenberg and B. Demple (1993) Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: Positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus, *J. Bacteriol.*, **175**, 1026–1031.
- Cohen, S. P., H. Hächlaer and S. B. Levy (1993) Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (mar) locus in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **175**, 1484–1492.
- Demple, B. and C. F. Amáble-Cuevas (1991) Redox redux: the control of oxidative stress responses, *Cell*, **67**, 837–839.
- Gardner, P. and I. Fridovich (1991) Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase, *J. Biol. Chem.*, **266**, 1478–1483.
- Greenberg, J. T. and B. Demple (1989) A global response induced in *Escherichia coli* by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress, *J. Bacteriol.*, **171**, 3933–3939.
- Greenberg, J. T., P. Monach, J. H. Chou, D. Josephy and B. Demple (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 6181–6185.
- Hidalgo, E. and B. Demple (1994) An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein, *EMBO J.*, **13**, 138–146.
- Hozumi, M. (1969) Production of hydrogen peroxide by 4-hydroxylaminoquinoline-1-oxide, *Gann*, **60**, 83–90.
- Kang, W.-K., T. Icho, S. Isono, M. Kitakawa and K. Isono (1989) Characterization of the gene *rimK* responsible for the addition of glutamic acid residues to the C-terminus of ribosomal protein S6 in *Escherichia coli* K12, *Mol. Gen. Genet.*, **217**, 281–288.
- Kogoma, T., S. B. Farr, K. M. Joyce and D. O. Natvig (1988) Isolation of gene fusions (*soi::lacZ*) inducible by oxidative stress in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 4799–4803.
- Koppenol, W. H., J. J. Moreno, W. A. Pryor, H. Ischiropoulos and J. S. Beckman (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide, *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 834–842.
- Kuo, C. F., T. Mashino and I. Fridovich (1987) Alpha, beta-dihydroxy-isovalerate dehydratase: a superoxide sensitive enzyme, *J. Biol. Chem.*, **262**, 4724–4727.
- Li, Z. and B. Demple (1994) SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*. Purification and interaction with DNA, *J. Biol. Chem.*, **269**, 18371–18377.
- Liochev, S. I. and I. Fridovich (1992) Fumarate C, the stable fumarate, of *Escherichia coli*, is controlled by the *soxRS* regulon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 5892–5896.
- Liochev, S. I., A. Hausladen, W. F. Beyer Jr. and I. Fridovich (1994) NADPH: ferredoxin oxidoreductase acts as a paraquat diaphorase and is a member of the *soxRS* regulon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 1328–1331.
- Mito, S., Q.-M. Zhang and S. Yonei (1993) Isolation and characterization of *Escherichia coli* strains containing new gene fusions (*soi::lacZ*) inducible by superoxide radicals, *J. Bacteriol.*, **175**, 2645–2651.
- Moncada, S., R. M. J. Palmer and E. A. Higgs (1991) Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology, *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109–142.
- Morgan, R. W., M. F. Christman, F. S. Jacobson, G. Storz and B. N. Ames (1986) Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 8059–8063.
- Nguyen, T., D. Brunson, C. L. Crespi, B. W. Penman, J. S. Wishnok and S. R. Tannenbaum (1992) DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 3030–3034.
- Nunoshiba, T., E. Hidalgo, C. F. Amáble-Cuevas and B. Demple (1992) Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene, *J. Bacteriol.*, **174**, 6054–6060.
- Nunoshiba, T. and B. Demple (1993) Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide, *Cancer Res.*, **53**, 3250–3252.
- Nunoshiba, T., E. Hidalgo, Z. Li and B. Demple (1993a) Negative autoregulation by the *Escherichia coli* SoxS protein: a dampening mechanism for the *soxRS* redox stress response, *J. Bacteriol.*, **175**, 7492–7494.
- Nunoshiba, T., T. deRojas-Walker, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum and B. Demple (1993b) Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 9993–9997.
- Nunoshiba, T. and B. Demple (1994) A cluster of constitutive mutations affecting the C-terminus of the redox-sensitive SoxR transcriptional activator, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2958–2962.
- Nunoshiba, T., T. deRojas-Walker, S. R. Tannenbaum and B. Demple, Roles of nitric oxide in inducible resistance of *Escherichia coli* to activated macrophages, *Infect. Immun.*, in press
- Skarstad, K., B. Thiny, D. S. Hwang and A. Kornberg (1993) A novel binding protein of the origin of the *Escherichia coli* chromosome, *J. Biol. Chem.*, **268**, 5365–5370.
- Sugimura, T., H. Otake and T. Matsushima (1968) Single strand scissions of DNA caused by a carcinogen, 4-hydroxylaminoquinoline-1-oxide, *Nature* (London), **218**, 392–393.
- Summers, A. O. (1992) Untwist and Shout: a Heavy metal-responsive transcriptional regulator, *J. Bacteriol.*, **174**, 3097–3101.
- Tao, K., K. Makino, S. Yonei, K. Nakata and H. Shinagawa (1989) Molecular cloning and nucleotide sequencing of *oxyR*, the positive regulator gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: homologies between *OxyR* and a family of a bacterial activator proteins, *Mol. Gen. Genet.*, **218**, 371–376.
- Tsanava, I. R., and B. Weiss (1990) *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, **172**, 4197–4205.
- Wu, J. and B. Weiss (1991) Two divergently transcribed genes, *soxS* and *soxR*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **173**, 2864–2871.
- Wu, J. and B. Weiss (1992) Two-stage induction of the *soxRS* (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **174**, 3915–3920.

**ADF/チオレドキシンの多様な発現調節機構と細胞傷害保護作用
Various regulations of adult T cell leukemia-derived factor (ADF)/
human thioredoxin expression and its cytoprotective action**

丸山哲夫^{1,2}, 廣田喜一¹, 中村和史¹,
岩田哲史¹, 淀井淳司¹

Tetsuo Maruyama^{1,2}, Kiichi Hirota, Kazufumi Nakamura
Satoshi Iwata, and Junji Yodoi

¹京都大学ウイルス研究所生体応答学研究部門
606 京都市左京区聖護院川原町 53

²慶應義塾大学医学部産婦人科
160 新宿区信濃町 35

¹ Department of Biological Responses, Institute for Virus Research, Kyoto University
² Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Keio University

(受付: 1994年12月5日; 受理 1994年12月5日)

Summary

Reactive oxygen intermediates are involved in many biological events including signal transduction, apoptosis, tumorigenesis, and cellular proliferation and differentiation. Adult T cell leukemia-derived factor (ADF)/human thioredoxin(hTRX), which has been reported to be produced by many human T cell lymphotropic virus-I-transformed T cells, has an important and fundamental role in cellular responses against oxidative stress. Here, we discuss various regulations of ADF/hTRX expression and the mechanism of its cytoprotective action.

Keywords: ATL-derived factor (ADF)/thioredoxin, thiol compounds, cytoprotection, signal transduction, localization, sex steroid

活性酸素を中心とする酸化ストレスが、種々の疾患における病態形成に関与するのみならず、細胞の増殖、癌化あるいは細胞死に細胞内外の酸化還元状態が深くかかわりのあることが明らかくなっている。一方、我々が HTLV-I 感染細胞株培養上清より IL-2 receptor α 鎖誘導因子として分離した ATL 由来因子 (ADF) は、大腸菌の還元酵素 thioredoxin のヒト homologue であり、GSH system とともに細胞内外の酸化還元状態を制御する因子として注目されている^{1,2}。ADF/チオレドキシン (TRX) は、リンパ球の活性化に伴い誘導され、ダイチオールを介する強い還元活性を持ち、細胞内酸化還元状態 (レドックス) のホメ

オスタークスの維持に関する重要な抗ストレス蛋白質であることが明らかになりつつある¹。

本総説では ADF/TRX の多様な発現調節機構と細胞傷害保護作用を、我々の最近の知見を中心に紹介し、今後の基礎及び臨床医学における研究の方向性について論じたい。

1) ADF/TRX の抗細胞傷害効果

a) 免疫細胞の ADF 及びチオール化合物依存性について
リンパ球の増殖や NK, CTL の細胞障害活性等の機能に、L-cysteine/L-cystine や glutathione (GSH) 等のチオール化合物の重要性が報告され

ている^{3)~5)}。また近年、HIV 感染症或は AIDS 患者において、チオール化合物の減少に基づくレドックス制御機構の異常や^{6), 7)}、炎症の場において発生する活性酸素或いは ROIS (Reactive Oxygen Intermediates) が、免疫系細胞のアポトーシスの一因であることが示唆されている⁸⁾。

我々はこのため GSH, L-cystine/L-cysteine, NAC (*N*-acetyl cysteine) 等の低分子量チオール化合物依存性のレドックス制御機構と ADF/TRX との相互作用の基礎的検討を行った。さらにこのような解析を基礎に低分子量チオール化合物の除去によりリンパ系細胞に引き起こされるアポトーシスについて検討を行った⁹⁾。

細胞増殖において、ADF/TRX と GSH はともに ribonucleotide reductase の co-factor として DNA 合成に関与し¹⁰⁾、酸化ストレスに対する防御においては、とともに H₂O₂ のスカベンジャーとして機能することが知られている¹¹⁾。そこで、ADF/TRX system と GSH system の関連を解析するために、ADF/TRX の細胞外からの作用機序について、glutathione の source であり、その律速段階のひとつと考えられる L-cystine の細胞内への取り込みに対する ADF/TRX の作用をリンパ系細胞を用いて解析した。また、細胞内の GSH 濃度に対する ADF/TRX 添加の効果も検討した⁹⁾。

PBL-blast を用いて、¹⁴C ラベルした L-cystine の細胞内への取り込みを測定する cystine transport assay を行った結果、細胞外培養液に添加した ADF/TRX は、用量依存的に¹⁴C-L-cystine の取り込みを増強することが判明した (2 ng/ml で数倍、10 ng/ml では、10 倍以上)。ADF/TRX のこの作用は、¹⁴C-L-glutamic acid 及び L-alanine の細胞への取り込みに対しては認められなかった。また、活性部位の一方の cysteine を serine に変換し、還元作用を持たない mutant ADF を用いた場合も、このような作用は殆ど認められなかった。2-ME, NAC 等の還元剤も同様の効果を持つが、ADF/TRX との併用により、synergistic に L-cystine transport を増強した。さらに、enzymatic recycling assay による GSH 定量により、細胞外培養液に添加した ADF/TRX は、PBL-blast の細胞内 GSH 濃度を増加させることができた⁹⁾。(Fig. 1) また、BSO の添加により通常の

た。これらのことより、ADF/TRX はその抗ストレス作用および co-cytokine 作用に加えて、L-cystine の細胞内への取り込み促進作用を持ち、その作用を介して GSH system と相互作用していることが判明した⁹⁾。

b) ADF と細胞死

細胞死とレドックス制御異常の密接な関係は、Bcl-2 に関する最近の研究の展開からも明らかになっている。bcl-2 は、ヒト滤胞性 B 細胞リンパ腫における染色体転座 t (14, 18) の break point より免疫グロブリンの heavy chain と融合遺伝子をつくる遺伝子として見つけられた細胞死防御因子として広く知られている。その機序は、細胞の活性化、増強を誘導することにより発癌過程に寄与するのではなく、細胞死の誘導を抑制することにより細胞を不死化に導くとされている。

S. Korsmyer らの解析から、最近 Bcl-2 の細胞死抑制は、Bcl-2 が活性酸素の产生系には影響を与えないが、活性酸素を除去過程（特に H₂O₂ 除去過程）に対して促進的作用を持つことにより抗酸化作用を発揮することによることが明らかにされた¹²⁾。このことはよりもなおさず活性酸素による細胞死のみならず種々の刺激による細胞死の過程に活性酸素が共通項として関与することを示唆している。

しかし Bcl-2 タンパク自体には glutathione peroxidase や catalase の活性が認められないことから Bcl-2 が何らかのタンパクを介して抗酸化作用を発揮し細胞を不死化に導いているものと考えられる。

今回我々は、培地中の低分子量チオール化合物である L-cystine, GSH の除去によるリンパ系細胞株での細胞死の誘導と、それに対する ADF 及び GSH の投与効果を検討した⁹⁾。

PI 染色による flowcytometry により、T 細胞株 Molt-4 において、GSH, L-cystine 除去培地での培養により 24~48 時間以内にアポトーシスが誘導されることが明らかとなった⁹⁾。また、この系において、GSH と ADF/TRX は用量依存性に Molt-4 のアポトーシスを抑制した。一方、ADF を用いた場合にはこのような効果は認められなかった⁹⁾。(Fig. 1) また、BSO の添加により通常の

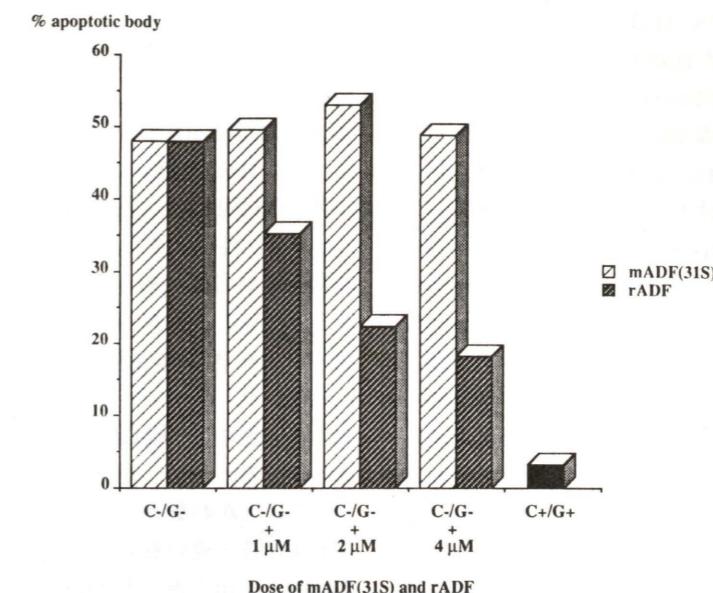


Fig. 1. Effect of rADF and mADF on apoptosis of Molt-4 caused by thiol depletion. C=L-cystine, G=GSH.

培地においても GSH, L-cystine 除去培地の場合よりは軽度であるがアポトーシスが誘導された⁹⁾。

以上の結果より、ADF/TRX が、L-cystine の細胞内への取り込み促進作用を持ち、その作用を介して細胞内 GSH 濃度を上昇させることが判明した。また、チオール化合物の減少によりリンパ系細胞にアポトーシスが誘導されること、細胞外の ADF/TRX は、その細胞死を抑制することが示唆された⁹⁾。

Dröge⁶⁾ び Herzenberg ら⁷⁾は、AIDS 患者の生体内での GSH, L-cysteine の低下を、また、我々は ADF/TRX 高発現細胞の減少を報告している¹³⁾。さらに、Buttke らは HIV 感染細胞のアポトーシスをカタラーゼが抑制することを明らかにした⁸⁾。一方 ADF/TRX もカタラーゼ活性を持つことが明らかとなっている¹¹⁾。L-cysteine とそのジスルフィドである L-cystine は、GSH の source として重要であるばかりでなく、それ自身 redox buffer として、細胞内外のレドックス環境を保持する上で重要な役割をしていると思われる。これらのアミノ酸は、それぞれ ASC 系と、Xc という異なる transporter を介して細胞膜を通過することが知られている。特にリンパ球系細胞において

は、Xc 系の輸送活性が限られており、かつ、細胞外の酸化的環境の故に、L-cysteine の量が限られているため（血清中で L-cystine の 1/5, *in vitro* では全ての L-cysteine が酸化されて L-cystine に変換してしまう）、細胞の増殖・活性化において、L-cystine あるいは L-cysteine の delivery は、ひとつの律速段階となるといえる。正常状態において、これらのチオール化合物は macrophage からリンパ球に供給されるが^{14), 15)}、HIV 感染症における macrophage 及びリンパ節の破壊によりその供給が阻害されていること、或いは生体内でのチオール化合物の減少が、直接リンパ球の fragility の一因となっている可能性が考えられる。

2) レドックス反応と燐酸化反応

さて、活性酸素等の酸化ストレスによりどのような細胞内変化が観察されるのであろうか？ 細胞内情報伝達系の初期シグナルに重要な役割を果たすとされる src ファミリーチロシンキナーゼ (PTK) のリン酸化及び活性の亢進が活性酸素により誘導されることが我々を含めいくつかの研究室から報告されている^{16)~23)}。我々は過酸化水素あるいは細胞内チオール基 (-SH 基) の特異的酸化剤の diamide が T 細胞においてリンパ球特異

的src ファミリー PTK (Lck)を中心とするいくつかの細胞内タンパク質のチロシンリン酸化を誘導することを観察している¹⁷⁾。電離放射線やUV 照射による細胞死誘導の場合にも、細胞内で活性酸素が産生され、それによりチロシンリン酸化やチロシンキナーゼ活性の亢進が認められる。この場合に細胞を *N*-acetylcysteine で処理し細胞内の活性酸素のスカベジング能あるいは還元型の GSH 量を増加させておくと細胞死が防御できるとされている。また一方でこれらの活性酸素による細胞死はチロシンキナーゼインヒビターでも抑制が可能との報告もあることから^{16), 17)}、活性酸素によるチロシンリン酸化の誘導が細胞死に至るシグナル伝達系に関与していることが示唆される。src ファミリー PTK は *N* 末端が myristylation されることにより、細胞膜に結合した形で存在し、膜表面分子に会合することでそれらの分子からの初期細胞内シグナル伝達に深く関わっていることが既に明らかとなっている。それらの発見の端緒は、1988 年 Rudd²⁴⁾, Veillette ら²⁵⁾による CD4 あるいは CD8 分子と src ファミリー PTK (Lck)との会合の証明である。その後 TCR と Fyn²⁶⁾, BCR (B 細胞抗原ヘセプター) と Lyn²⁷⁾など様々な膜表面分子と src ファミリー PTK 会合が証明され、その細胞質内ドメインにキナーゼ活性を持たないリンパ球膜表面分子からのシグナル伝達の初期段階に、これらチロシンキナーゼが機能していると考えられている。一方脂質膜は活性酸素の影響を最も受けやすい部分の一つであり、膜にアンカーされた src ファミリー PTK が酸化ストレスに対するセンサーあるいはシグナル伝達分子となっていることは、細胞にとって極めて合理的とも思われる。また HeLa 細胞では UV による転写因子 AP-1 の活性化過程に、活性酸素による c-Src, Fyn キナーゼの活性の亢進とそれに伴う Ha-Ras, Raf-1 の活性化が必要であることが証明されており¹⁶⁾、さらに UV による NF-κB の活性化においても src ファミリー PTK の活性化が必要であるとされることがある²²⁾。酸化ストレスに対する細胞内初期シグナル伝達には、膜表面分子からのシグナルとともに src ファミリー PTK が重要な役割を果たしていることがわかる。しかし膜表面分子からのシグナル伝達と違い酸化ストレスは細胞外から直接細胞内へ作用でき、また細胞内においても産生されていることから、酸化ストレスがチロシンキナーゼを含めた細胞内情報伝達系のいくつかの段階でシグナル伝達を制御していることも考えられる。(Fig. 2)

3) 細胞のストレス応答における細胞内 ADF/TRX の局在とその役割

最近 ADF/TRX の細胞内 relocalization 現象が明らかになった。皮膚の初代培養の keratinocyte に UVB を照射し ADF/TRX を免疫蛍光染色法 (immunofluorescence, IF) で検出するという実験系のデータである。初代培養 keratinocyte では、

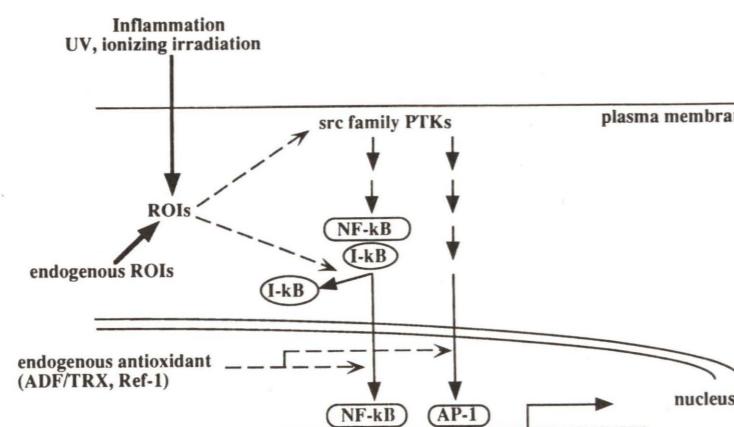


Fig. 2. Schematic representation of the cross-talk between signal transduction and redox regulation.

無刺激の培養条件下では、ADF/TRX は、細胞質内にごくわずかに検出できるが、UVB 照射後 1 時間後には、細胞質内の ADF/TRX は、核内に移行し細胞質内の染色は検出できなくなる。8 時間後には、核内の染色は持続しているが細胞質にも強い染色が起こる。最終的に核内の染色は、UVB 照射後 20 時間以上持続する。このデータから、ADF/TRX の UVB による核移行・発現誘導が示された。同じく keratinocyte の cell line を用い、ADF/TRX の検出に Western Blot を用いた実験系においても同様な結果を得ている。すなわち、細胞に UVB を照射後、時系列に ADF/TRX の蛋白量を、細胞質分画・核分画に分けて調べたところ、照射後 1 時間後には細胞質分画における ADF/TRX の減少とともに核分画での増加が観察され 8 時間後には細胞質分画での発現量が増え細胞全体としての ADF/TRX の発現量が増加するという結果が得られている。(Fig. 3)

この核移行した ADF/TRX は核内でどのような役割を担っているのであろうか。近年、転写因子のレドックス制御についての報告が相次いでいる。AP1 は Ref-1 とよばれる分子によって転写活性が調節されていることが、米国のカラム博士によって示されているが、この調節には ADF/

TRX が関わっていることが明らかにされている。*in vitro* で精製 ADF/TRX は精製 NF-κBp50 の DNA 結合能を Cys⁶² の thiol 基の還元をとおして調節することを、我々は明らかにしてきた。このように核内に移行した ADF/TRX は、一つには転写因子のレドックス制御を担っている可能性がある。UVB の照射後 1 時間以内というきわめて早い応答性は、ADF/TRX が細胞のストレス応答のきわめて初期に key molecule として働いていることを示唆し、大変興味深い。

UV 照射により細胞内に ROIs (reactive oxygen intermediates) が発生し、この ROIs が一種のセカンドメセンジャーとして作用し細胞の活性化に関わるというモデルが提唱されている。ADF/TRX が UV 被照射後、迅速に核内に移行するという減少から ADF/TRX を stress senser として捉えることができる。ADF/TRX は、還元型・酸化型として細胞内に存在するが、この両者で大きくタンパク質としての 3 次元構造が異なることが知られている。UV 照射により ADF/TRX の酸化還元状態が変化し、その結果、核内に移行するという可能性が考えられるが、また ADF/TRX と細胞質で結合しているタンパク質との結合・解離が ADF/TRX の細胞内局在を決定しているとのモデルも

Western Blotting Nuclear Extracts

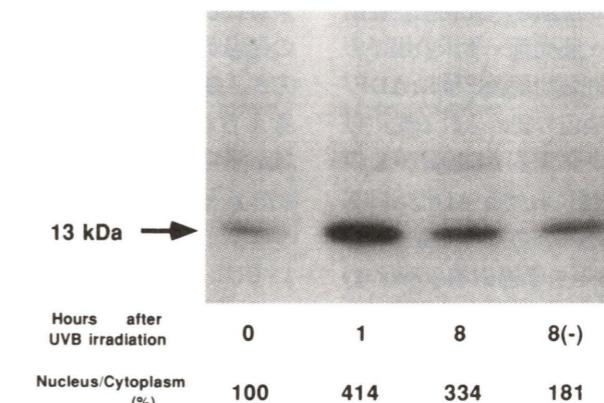


Fig. 3. Expression and distribution of ADF/kTRX after UVB irradiation were examined with Western blot analysis in human keratinocyte cell line HSC-1. ADF/hTRX was translocated rapidly from cytosol to nucleus after UVB irradiation and this translocation persisted for 8 hours.

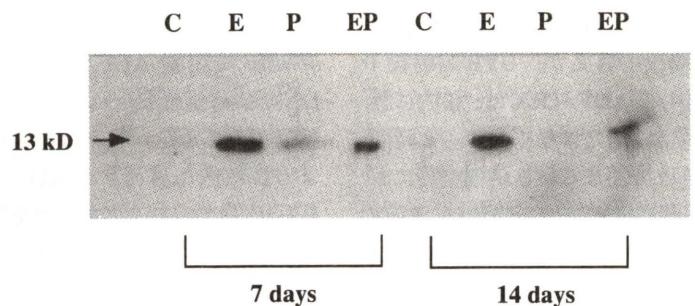


Fig. 4. Western blot analysis of ADF/TRX in cultures of isolated human endometrial stromal cells (ESCs). ESCs were treated with no gonadal steroids (C), 10 nM of estradiol-17 β (E), 100 nM of progesterone (P), and 10 nM of estradiol-17 β plus 100 nM of progesterone (EP) for 7 and 14 days.

考えうる。

われわれは、この ADF/TRX の細胞内局在の変化が、keratinocytes の系のみならず、リンパ球や子宮内膜細胞でも起こることを確認しており、それぞれ細胞の活性化、以下述べるように性ホルモンとの関連についての検討を行っている。

4) 性ホルモンによる ADF/hTRX の発現とその制御機構について

TRX は、妊娠個体の体液中に増加する免疫調節因子である Early Pregnancy Factor (EPF) の主要成分であることが報告されている²⁸⁾。更に生殖現象において重要な役割を担っていることを示唆する知見が近年報告されている。たとえば、*in vitro* における胚発育を停止・遅延させる原因は酸化ストレスによるが、thioredoxin を培養液に添加することにより、胚発育停止が解除され胚発育が促進される²⁹⁾。また、胚発育・胚発育・着床の場である卵管上皮、子宮内膜、妊娠初期脱落膜に ADF/hTRX の発現が免疫組織染色で認められる³⁰⁾。以上の知見から、性ホルモンによる ADF/hTRX の発現調節機構、子宮内環境における ADF/hTRX を中心とした redox regulation、あるいは増殖・分化・剥離を短期間に繰り返す子宮内膜の biology における ADF/hTRX の役割など、生殖生理学のみならず産婦人科学の観点からも興味深い。

われわれは、性ホルモンの target のひとつである子宮内膜を material に用い、ヒト月経周期に関連した子宮内膜における ADF/hTRX の発現を免疫組織染色で検討するとともに、ヒトより得られ

た子宮内膜細胞の初代培養系を用いて、性ステロイドによる ADF 発現制御を検討した。

免疫染色では、月経周期に関連した cyclic な発現を認め、性ステロイドの影響が示唆された。特に間質細胞が脱落膜変化 (decidualization) を起こすと、発現の増強を認めた。また高 estrogen 環境 (progesterone に曝露されていない) によって誘導される内膜過形成では、発現の増強が認められた。一方、内膜初代培養細胞での ADF 蛋白の発現は、間質細胞において、*in vitro* decidualization を誘導させる Estrogen + Progesterone 添加培養群で発現が亢進するが、estradiol 単独添加群でより強い細胞内 ADF 蛋白の発現が認められた。(Fig. 4) 免疫染色の結果からは、progesterone 依存性 (特に腺細胞において) の発現機構が示唆されたが、内膜過形成で強度に ADF/hTRX が発現していること、また *in vitro* で estradiol によって ADF の発現が増強されていることからも、estradiol の方が ADF の重要な inducing factor ではないかと考えられる。少なくとも ADF/hTRX の発現には、子宮内膜が estrogen に prime されている必要があると思われる。

ヒト子宮内膜における ADF/hTRX の意義については、あくまでも推測の域をでないが、子宮内にはマクロファージやナチュラルキラー細胞などが着床期周辺に集積し^{31), 32)}、TNF などの種々の炎症性サイトカインが産生され^{31), 33)}、それに伴い種々の活性酸素種が生成されている³¹⁾。このように酸化ストレスに暴露されている子宮内環境のホメオスタシスを維持するために、おそらく

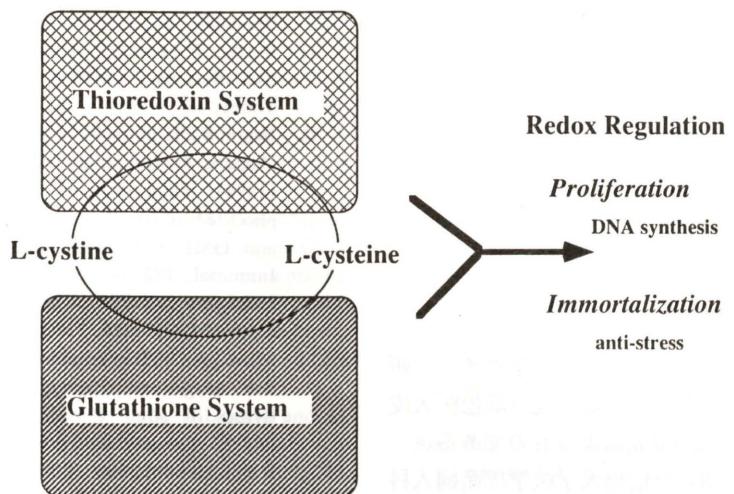


Fig. 5. Possible roles of intracellular ADF/TRX system and L-cystine/L-cysteine in redox regulation.

ADFを中心とした防御系が働いている可能性が考えられる。

まとめ

ADF は、104 個のアミノ酸からなる分子量約 13 kDa の蛋白であり、HTLV-I, EBV などのウイルス感染細胞や悪性腫瘍細胞などに高発現しているとともに、紫外線、放射線照射、H₂O₂ 他の酸化剤、ディーゼル排気微粒子などの酸化ストレスにより強く誘導されることから一種のストレス反応性蛋白質と考えられる。また、当研究室の谷口らの ADF 遺伝子の発現制御に関する解析により、ADF 遺伝子の 5' 上流約 900 ベース近傍に H₂O₂, -SH 基酸化剤、カドミウム、紫外線などの酸化ストレスに反応する 32 bp の領域が enhancer 部位として存在することが明らかになった。この sequence は既知の enhancer sequence を含んでおらず、酸化ストレスによる ADF/TRX の発現誘導には新たな cis-acting regulatory element の存在が示唆されている。

蛋白レベルにおいては ADF は酸化ストレスに対する防御因子として機能しているものと考えられる。細胞外より加えた recombinant ADF は H₂O₂, TNF α , 抗 Fas 抗体などによる細胞障害、細胞死を防御することが判明している¹⁾。recombinant ADF は細胞内 GSH 合成の律速段階であ

る L-シスチンの細胞内への取り込みを促進することから、これらの防御機構には radical scavenger としての作用と共に GSH system を介した作用も考えられる。また、ADF は活性中心にある 2 つのチオール基を介した還元活性により蛋白と蛋白、蛋白と DNA / RNA との interaction を制御し、細胞内における機能調節因子としての作用を有している。Jun/Fos や NF κ B などの転写因子の活性は、ADF を介する細胞内酸化還元状態により制御されていることが示唆されているが、前述したように ADF が紫外線照射により細胞質から核内へ移行することが明らかとなり、ストレス下における遺伝子の発現調節においては特に重要な役割を果たしている可能性がある。(Fig. 5)

ADF の発現は、種々のストレスのみならず、子宮内膜においては性ステロイド (特に estradiol) により増強されることが示唆された。谷口らが解析した ADF 遺伝子の 5' 上流約 2.6 kbp までには (manuscript in preparation), palindrome 構造をとる estrogen-responsive element の consensus (AGG-TCA-XXX-TGACCT) は存在しない。しかし最近核内レセプターや転写因子の活性化・translocation に関して ADF/TRX のレドックス制御機構が関与する知見が急速に集積している。Estrogen receptor の制御に、レドックス制御機構が関与する可能性は今後検討すべき課題である。

以上のように ADF は多くの機能を有し、細胞外環境の調整、細胞内 redox 状態の制御、さらには細胞ストレスに対する防御因子として働くことより、細胞の増殖や細胞死の防御に関与しているものと思われる。今後、ADF をはじめとした redox 制御機構とシグナル情報伝達系がさらに詳細に解明されることが期待される。

謝 辞

ここに、紹介した知見は、京都大学ウイルス研究所谷口良久、北岡有喜、佐地良文（浜松医大皮膚科）の各氏らと共同研究によるものである。

貴重な御助言を頂いた信州大学医学部産婦人科藤井信吾教授、二階堂敏雄講師、京都大学医学部婦人科産科神崎秀陽助教授、今井公俊助手に謝意を表します。

参考文献

- 1) Yodoi, J. and T. Uchiyama (1992) Diseases associated with HTLV-1: virus, IL-2 receptor dysregulation and redox regulation, *Immunol. Today*, **13**, 381–411.
- 2) Tagaya, Y., Y. Maeda, A. Mitsui, N. Kondo, H. Matsui, J. Hamuro, N. Brown, K. Arai, T. Yokota, H. Wakasugi and J. Yodoi (1989) ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction, *EMBO*, **8**, 757–764.
- 3) Fanger, M. W., D. A. Hart, J. V. Wells and A. Nisonoff (1970) Enhancement by reducing agents of the transformation of human and rabbit peripheral lymphocytes, *J. Immunol.*, **105**, 1043–1045.
- 4) Dröge W., C. Pottmeyer-Gerber, H. Schmit and S. Nick (1986) Glutathione augments the activation of cytotoxic T lymphocytes *in vivo*, *Immunobiol.*, **172**, 151–156.
- 5) Yamauchi, A. and E. T. Bloom (1993) Requirement of thiol compounds as reducing agents for IL-2 mediated induction of LAK activity and proliferation of human NK cells, *J. Immunol.*, **151**, 5535–5544.
- 6) Dröge, W., H. P. Eck and S. Mihm (1992) HIV-induced cysteine deficiency and T-cell dysfunction—a rationale for treatment with N-acetylcysteine, *Immunol. Today*, **13**, 211–214.
- 7) Roederer, M., F. J. T. Staal, H. Osada and L. A. Herzenberg (1991) CD4 and CD8 T cells with high intracellular glutathione levels are selectively lost as the HIV infection progresses, *Int. Immunol.*, **3**, 933–937.
- 8) Buttke, T. M. and P. A. Sandstrom (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis, *Immunol. Today*, **15**, 7–10.
- 9) Iwata, S., T. Hori, N. Sato, Y. Ueda-Taniguchi, T. Yamabe, H. Nakamura, H. Masutani and J. Yodoi (1994) Thiol-mediated redox regulation of lymphocyte proliferation; possible involvement of ADF and GSH in transferrin receptor expression, *J. Immunol.*, **152**, 5633–5642.
- 10) Holmgren, A (1985) Thioredoxin, *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 237–271.
- 11) Mitsui, A., T. Hirakawa and J. Yodoi (1992) Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor (ADF)/human thioredoxin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**, 1220–1226.
- 12) Hockenberry, D. M., Z. N. Oltvai, X. M. Yin, C. L. Millman and S. J. Kormeyer (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis, *Cell*, **75**, 241–251.
- 13) Masutani, H., M. Naito, K. Takahashi, T. Hattori, A. Koito, K. Takatsuki, T. Go, H. Nakamura, S. Fujii, Y. Yoshida, S. Okuma and J. Yodoi (1992) Dysregulation of adult T-cell leukemia-derived factor (ADF)/thioredoxin in HIV infection: loss of ADF high-producer cells in lymphoid tissues of AIDS patients, *AIDS Res Hum Retroviruses*, **8**, 1707–1715.
- 14) Bannai, S. (1984) Transport of cystine and cysteine in mammalian cells, *Biochem. Biophys. Acta.*, **779**, 289–306.
- 15) Dröge, W., H. P. Eck, H. Gmünder and S. Mihm (1991) Modulation of lymphocyte functions and immune responses by cysteine and cysteine derivatives, *Am J. Med.*, **91**, 140S–1440.
- 16) Devary, Y., R. A. Gottlieb, T. Smeal and M. Karin (1992) The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases, *Cell*, **71**, 1081–1091.
- 17) Uckun, F. M., L. M. Tuel-Ahlgren, C. W. Song, K. Waddick, D. E. Myers, J. Kirihara, J. A. Ledbetter and G. L. Schieven (1992) Ionizing radiation stimulates unidentified tyrosine-specific protein kinase in human B-lymphocyte precursors, triggering apoptosis and clonogenic cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 9005–9009.
- 18) Nakamura, K., T. Hori, N. Sato, K. Sugie, T. Kawakami and J. Yodoi (1993) Redox regulation of a src family protein tyrosine kinase p56^{lk} in T cells, *Oncogene*, **8**, 3133–3139.
- 19) Schieven, G. L., J. M. Kirihara, D. E. Myers, J. A. Ledbetter and F. M. Uckun (1993) Reactive oxygen intermediates activate NF-κB in a tyrosine kinase-dependent mechanism and in combination with vanadate activate the p56^{lk} and p59^{fyn} tyrosine kinases in human lymphocytes, *Blood*, **82**, 1212–1220.
- 20) Schieven, G. L., J. M. Kirihara, L. K. Gilliland, F. M. Uckun and J. A. Ledbetter (1993) Ultraviolet radiation rapidly induces tyrosine phosphorylation and calcium signaling in lymphocytes, *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 523–530.
- 21) Uckun, F. M., G. L. Schieven, L. M. Tuel-Ahlgren, I. Dibirdik, D. E. Myers, J. A. Ledbetter and C. W. Song (1993) Tyrosine phosphorylation is a mandatory proximal step in radiation-induced activation of the protein kinase C signaling pathway in human B-lymphocyte precursors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 252–256.
- 22) Devary, Y., C. Rosette, J. A. DiDonato and M. Karin (1993) NF-κB activation by ultraviolet light is not dependent on a nuclear signal, *Science*, **261**, 1442–1444.
- 23) Nakashima, I., M.-Y. Pu, A. Nishizaki, I. Rosila, L. Ma, Y. Katano, K. Ohkusu, S. M. J. Rahman, K. Isobe, M. Hamaguchi and K. Saga (1994) Redox mechanism as alternative to ligand binding for receptor activation delivering dysregulated cellular signals, *J. Immunol.*, **152**, 1064–1071.
- 24) Rudd, C. E., J. M. Trevillyan, J. D. Dasgupta, L. L. Wong and S. F. Schlossman (1988) The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 5190–5194.
- 25) Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak and J. B. Bolen (1988) The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lk}, *Cell*, **55**, 301–308.
- 26) Samelson, L. E., A. F. Phillips, E. T. Luong and R. D. Klausner (1990) Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 4358–4362.
- 27) Yamanashi, Y., T. Kakiuchi, J. Mizuguchi, T. Yamamoto and K. Toyoshima (1991) Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn, *Science*, **251**, 192–194.
- 28) Clarke, F. M., C. Orozco, A. V. Perkins, I. Cock, K. F. Tonissen, A. J. Robins and J. R. Wells (1991) Identification of molecules involved in the 'early pregnancy factor' phenomenon, *J. Reprod. Fertil.*, **93**, 525–539.
- 29) 野田洋一 (1992) 哺乳類初期発生に及ぼす環境因子の解析, *日産婦誌*, **44**, 960–970.
- 30) Fujii, S., Y. Nanbu, I. Konishi, T. Mori, H. Masutani and J. Yodoi (1991) Immunohistochemical localization of adult T-cell leukemia-derived factor, a human thioredoxin homologue, in human fetal tissues, *Virchow's Arch. (A)*, **419**, 317–326.
- 31) Hunt, J. S. (1994) Immunologically relevant cells in the uterus, *Biol. Reprod.*, **50**, 461–466.
- 32) Maruyama, T., T. Makino, T. Sugi, H. Matsubayashi, N. Ozawa and S. Nozawa (1992) Flow-cytometric analysis of immune cell populations in human decidua from various types of first trimester pregnancy, *Hum. Immunol.*, **34**, 212–218.
- 33) Saito, S., K. Nishikawa, T. Morii, M. Enomoto, N. Narita, K. Motoyoshi and M. Ichijo (1993) Cytokine production by CD16-CD56^{bright} natural killer cells in the human early pregnancy decidua, *Int. Immunol.*, **5**, 559–563.

ラットのシリカ曝露における肺組織DNAの酸化的損傷
Oxidative DNA damage in lung tissue of rats exposed to silica dust

山野 優子^{1,2}, 香川 順¹, 花岡 知之³, 高橋 東生², 石原 陽子¹,
葛西 宏⁴, 津金昌一郎², 渡辺 昌²

Yuko Yamano^{1,2}, Jun Kagawa¹, Tomoyuki Hanaoka³, Tousei Takahashi²,
Yoko Ishihara¹, Hiroshi Kasai⁴, Shoichiro Tsugane² and Shaw Watanabe²

¹東京女子医科大学衛生学公衆衛生学教室 162 東京都新宿区河田町 8-1, ²国立がんセンター研究所疫学部
104 東京都中央区築地 5-1-1, ³労働科学研究所労働環境保健研究部 213 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-8-14,

⁴産業医科大学産業生態科学研究所職業性腫瘍学 807 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1

¹Department of Hygiene and Public Health, Tokyo Women's Medical College 8-1 Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan

²Epidemiology Division, National Cancer Center Research Institute 5-1-1 Chuo-ku, Tokyo 104, Japan

³Division of Work Environment and Occupational Health, The Institute for Science of Labour 2-8-14 Sugao,
Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa 213, Japan

⁴Department of Environmental Oncology, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational
and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyusyu 807, Japan

(受付: 1994年9月14日; 受理: 1994年10月25日)

Summary

Occupational exposure to silica is often associated with the development of pulmonary fibrosis and occasionally, lung cancer. These developments may be mediated through oxidant-induced cellular injury. The effects in rats were investigated at 1, 3, 5, 7, 14 and 28 days after a single intratracheal instillation of silica (50 mg/kg). We measured the levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (oh^8dG) in the lung tissues, reduced glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) in the bronchoalveolar lavage fluids (BALF). The levels of pulmonary oh^8dG increased at approximately 2-3 fold on 1st, 3rd and 5th day after the exposure to silica compared with those of the control groups (1.27±0.68 vs. 2.85±1.14, 1.43±0.82 vs. 3.63±2.01, 1.14±0.64 vs. 3.26±1.75, respectively). It is considered that the pulmonary DNA was damaged by reactive oxygen species, which was generated from alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes stimulated by instillation of silica. The decreased levels of SOD in the early stage and increased levels of GSH in the late stage observed in BALF of exposed rats might be protective reactions against the generation of oxygen species. These results suggest that oxidant-induced cellular injury might play an important role in early stage of silica-induced toxicity.

Keywords: silica, oxygen radical, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, lung tissue, bronchoalveolar lavage fluids

緒 言

シリカの長期間吸入は、肺の纖維増殖性変化を主体とした珪肺症の病因として知られており、一方、肺癌を引き起こすという報告もある (Stenback and Rowland, 1979; Goldsmith *et al.*, 1982; IARC, 1987; Mastrangelo *et al.*, 1988; Nurminen *et al.*, 1992)。また、近年、*in vitro* や *in vivo* の研究に

おいて、シリカやアスベスト吸入による肺への毒性発現機序に、活性酸素が引き起こす細胞傷害を伴っていることが示唆されている (Vallyathan *et al.*, 1988; Vallyathan *et al.*, 1992; Ghio *et al.*, 1992)。

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (oh^8dG) は、多くの環境発癌物質などに関連して発生する活性酸素

によってDNAが損傷を受けた結果、生じることが明らかにされている物質で、活性酸素発生に伴うDNAの酸化的損傷マーカーのひとつである(Floyd, 1990; 葛西, 1990)。また、oh⁸dGを含むDNAは、DNA合成中にGC→TAのトランスポーテーションを引き起こすことが知られており(Shibutani *et al.*, 1991)、動物を用いた発癌実験においても、発癌の標的臓器のDNA中に生じることが確認されている(Kasai *et al.*, 1987; Kasai *et al.*, 1989; Umemura *et al.*, 1990)。

本報告は、経気道的にシリカを投与したラットの、肺組織DNA中のoh⁸dGと肺胞洗浄液(BALF)中の還元型グルタチオン(GSH)とスーパーオキサイドダムターゼ(SOD)を測定し、シリカ曝露により肺組織のDNAへの酸化的損傷の機構について検討を加えたものである。

実験材料および方法

1. 実験動物

体重220~300gのSPF-Wistar系雄性ラット10週令を用い、飼料と飲料水は自由摂取とした。

2. シリカの経気道的注入方法

粒径5μmの工業用シリカ(Berkeley Min-U-Sil: Pennsylvania Glass sand Corporation, Pittsburgh, PA)を、ソニケーターで生理食塩水に均一に50mg/mlに懸濁したものを、シリカ懸濁液とした。ラットは、ペントバルビタールで麻酔後、気管を露出して、シリカ懸濁液1ml/kg体重になるように経気道的に一回注入した。なお、対照群は生理食塩水のみを等量投与した。投与後1, 3, 5, 7, 14, 28日目にBALF、肺組織を採取し試料とした。

BALFは、開胸後、気管切開し、テフロンチューブを挿入固定後、37°Cに加温した2.0%ヘパリン添加生理食塩水40ml/kg体重を注入し、同一洗浄液で注入、排出操作を3回繰り返した後、ガーゼで濾過した液をBALF試料とした。肺組織は脱血後、左側肺を切除し、DNA抽出まで-80°Cで保存した。

3. 肺組織DNA中oh⁸dGの測定

左肺組織約0.1gを0.1M EDTA-saline buffer

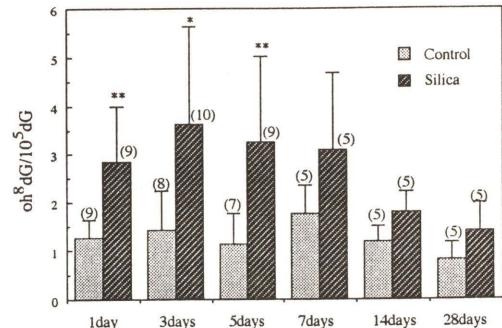


Fig. 1. The levels of 8-hydroxydeoxyguanosine (oh⁸dG) in lung tissues from silica exposed rats and their controls.

(): Number of samples, *p<0.05, **p<0.01.

(pH 8.0) 2mlでホモジナイズしてDNA抽出用試料とした。DNA抽出は、自動DNA抽出器(GENEPURETM Model341 Nucleic Acid Purification system, Applied Biosystems, USA)を用いて、イソプロパノールで抽出した。DNA試料は、蒸留水200μlに溶解後、Nuclease P1(Yamasa Co., Japan)とalkaline phosphatase(SIGMA Chemical Co., USA)でヌクレオシドにまで分解し、 Floydや葛西らの方法により、電気化学的検出器を接続したHPLC法により定量した(Floyd *et al.*, 1986; Kasai and Nishimura, 1986)。

4. 生化学的検索

SODは、SOD測定用キット(和光純薬社製)を使用し、GSHは比色法(Cantin *et al.*, 1987)で測定した。

結果

1. 肺組織DNA中oh⁸dG

肺組織DNA中oh⁸dGの変動をFig. 1に示した。対照群は、全期間を通して、0.83~1.77/10⁵ dGで推移したが、シリカ投与群では、投与後1日目で2.85±1.14/10⁵ dGと有意(p<0.01)に増加し、投与7日目まで約2~3倍程度増加した。

2. BALF生化学的検査

BALF中SODとGSHをFig. 2に示した。対照群のSODの平均は、35~60U/mg proteinで推移したが、シリカ投与群は、全期間を通して対照群

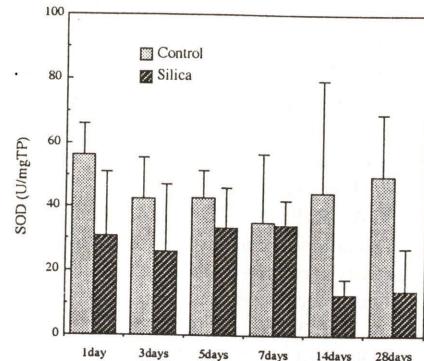


Fig. 2. The levels of superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione (GSH) in bronchoalveolar lavage fluids from silica exposed rats and their controls.

Number of rats in each group was 5. *p<0.05.

に比し低下傾向が認められた。GSHは、シリカ投与7日目から増加し始め、7日と28日是有意(p<0.05)な増加が認められた。

考察

本研究は、吸入されたシリカによる肺組織への毒性発現機序に、活性酸素が関与しているか否かを、肺組織DNA中のoh⁸dGの生成量を測定することで検討したものである。

活性酸素を発生し、かつ発癌因子といわれているX線照射やアスベストとH₂O₂との共存実験、ニッケル化合物などによって、oh⁸dGが生成されることは *in vitro*において確認されており(Kasai *et al.*, 1984; Kasai and Nishimura, 1984; Kasprzak *et al.*, 1989), また動物実験においても、臭素酸カリウムや種々のペルオキソゾーム増殖剤などの発癌物質投与で標的臓器DNA中にoh⁸dGの生成

が認められている(Kasai *et al.*, 1987; Kasai *et al.*, 1989a; Takagi *et al.*, 1990)。またoh⁸dGは、GC→TAなどのトランスポーテーションを起こし、遺伝子変異の頻度を増加させる(Shibutani *et al.*, 1991)。ヒト肺癌のp53癌抑制遺伝子においても、高頻度にGC→TAが見い出されていることから、肺癌に対して、oh⁸dGの関与も示唆されている(Hollstein *et al.*, 1991; 葛西, 1990)。

今回、ラットにシリカを経気道的に投与した結果、投与後1日目から5日目において、標的臓器である肺組織DNA中のoh⁸dGが有意に増加し、シリカにより肺組織において活性酸素が発生することが明かとなったが、14日目以降は対照群と同レベルにまで回復した。

経気道的に投与されたシリカは、まず肺胞内に到達し、肺胞腔に存在している肺胞マクロファージ(AMs)に貪食され、そこでAMsから種々のchemotactic factorの放出および活性酸素が産生され、AMsは死滅し、そこからシリカが遊離して再び別のAMsに貪食されると思われる(Wallaert *et al.*, 1990; 松岡ら, 1992)。また、多核好中球(PMNs)も遊走され、PMNsからも同様にchemotactic factorの放出および活性酸素の産生が起こり、さらに毒性を発揮するという過程が繰り返されたものと推測された。

それに対してSODやGSHは、直接または間接的に活性酸素を除去することが知られており(Armato *et al.*, 1984; Evelo *et al.*, 1993; Sohn *et al.*, 1993), 事実、oh⁸dGの生成もこれらにより阻害されるという報告がある(Kasai *et al.*, 1989b)。シリカ投与により、BALF中SODは、投与1日目より減少傾向を示し14日目以降はさらに低下し、GSHは、7日目以降で増加した。

シリカの貪食刺激により発生した活性酸素は、SODによりO₂⁻からH₂O₂に変換されると思われるが、同時にAMsなどの破壊やO₂⁻産生に伴ってグルタチオニアペルオキシダーゼやGSHの活性を低下させる(Kono and Fridovich, 1982; Blum and Fridovich, 1985)。それに伴いさらにO₂⁻の産生、H₂O₂の蓄積をきたし、結果的にH₂O₂は逆にSOD活性を低下させた可能性が示唆された。また、GSH活性の低下により逆にその代

謝回転が高まり、同時に、活性酸素による刺激で、GSH の基質となるシスチンの輸送系である X-c 系の活性も誘導（坂内、立石、1988）され、結果として、遅れて GSH が増加してきたものと推測された。

このようにシリカ刺激により発生した活性酸素により、投与後早期に、肺組織において $\text{OH}^{\bullet}\text{dG}$ が増加したが、14日目以降には、GSH などの活性酸素に対する防御機構がより活性化されて、結果的に $\text{OH}^{\bullet}\text{dG}$ の生成を阻害したものと思われた。一方、 $\text{OH}^{\bullet}\text{dG}$ には、すでに *E. coli* において修復酵素 ($\text{OH}^{\bullet}\text{dG}$ エンドヌクレアーゼ) が精製されている (Chung *et al.*, 1990)。また、放射線照射によって生じたマウス肝 DNA 中の $\text{OH}^{\bullet}\text{dG}$ が時間とともに減少することから、マウスの肝臓には、 $\text{OH}^{\bullet}\text{dG}$ の修復機構が存在することも示唆されており (Kasai *et al.*, 1986)，マウス、ラット、ウシの各種臓器や、ヒト好中球からも修復酵素が検出されている (Chung, 1991; Yamamoto *et al.*, 1992)。また、*in vitro* において、 $\text{OH}^{\bullet}\text{dG}$ の半減期は約 30 分と非常に短いことも報告されている (Kasai *et al.*, 1986)。このように、 $\text{OH}^{\bullet}\text{dG}$ の修復機構も同時に働いて修復された可能性がある。

以上、シリカの経気道的投与は、投与初期に標的臓器である肺組織において活性酸素を発生させ、DNA に損傷を与えることが明らかとなった。この現象が肺の纖維化や癌など肺への毒性発現に際しての trigger となる可能性が示唆された。

参考文献

- Armatto, U., P. G. Andreis and F. Romano (1984) Exogenous Cu, Zn-superoxide dismutase suppresses the stimulation of neonatal rat hepatocytes' growth by tumor promoters, *Carcinogenesis*, **5**, 1547–1555.
- 坂内四郎、立石紀子 (1988) 動物細胞のグルタチオン維持機構。グルタチオン研究のエポック、蛋白質核酸酵素, **33**, 1442–1449.
- Blum, L. and I. Fridovich (1985) Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical, *Arch. Biochem. Biophys.*, **240**, 500–508.
- Cantin, A. M., S. L. North, R. C. Hubbard and R. G. Crystal (1987) Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione, *J. Appl. Phys.*, **63**, 152–157.
- Chung, M. H., H. Kasai, D. S. Jones, H. Inoue, H. Ishikawa, E. Ohtsuka and S. Nishimura (1990) An endonuclease activity of *Escherichia coli* that specifically removes 8-hydroxyguanine residues from DNA, *Mutat. Res.*, **254**, 1–12.
- Chung, M. H. (1991) An endonuclease activity in human polymorphonuclear neutrophils that removes 8-hydroxyguanine residues from DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 1422–1478.
- Evelo, C. T. A., R. P. Bos and P. J. A. Borm (1993) Decreased glutathione content and glutathione S-transferase activity in red blood cells of coal miners with early stages of pneumoconiosis, *Br. J. Ind. Med.*, **50**, 633–636.
- Floyd, R. A., J. J. Watson, P. K. Wong, D. H. Altmiller and P. C. Rickard (1986) Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: Sensitive detection and mechanisms of formation, *Free Rad. Res. Commun.*, **1**, 163–172.
- Floyd, R. A. (1990) The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis, *Carcinogenesis*, **11**, 1447–1450.
- Ghio, A. J., T. P. Kennedy, A. R. Whorton, A. L. Crumblett, G. E. Hatch and J. R. Hoidal (1992) Role of surface complexed iron in oxidant generation and lung inflammation induced by silicates, *Am. J. Phys.*, **263**, L511–L518.
- Goldsmith, D. F., T. L. Guidotti and D. R. Johnston (1982) Dose occupational exposure to silica cause lung cancer? *Am. J. Ind. Med.*, **3**, 423–440.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. C. Harris (1991) p53 mutations in human cancers, *Science*, **253**, 49–53.
- IARC (1987) International Agency for Research on Cancer. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: silica and some silicates, *IARC monographs*, **42**, 39–143. IARC, Lyon.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984) DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide, *Gann*, **75**, 841–844.
- Kasai, H., H. Tanooka and S. Nishimura (1984) Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation, *Gann*, **75**, 1037–1039.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1986) Hydroxylation of guanine in nucleosides and DNA at the C-8 Position by heated glucose and oxygen radical-forming agents, *Environ. Health Perspect.*, **67**, 111–116.
- Kasai, H., P. F. Crain, Y. Kuchino, S. Nishimura, A. Ootsuyama and H. Tanooka (1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair, *Carcinogenesis*, **7**, 1849–1851.
- Kasai, H., S. Nishimura, Y. Kurokawa and Y. Hayashi (1987) Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA, *Carcinogenesis*, **8**, 1959–1961.
- Kasai, H., Y. Okada, S. Nishimura, M. S. Rao and J. K. Reddy (1989a) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator, *Cancer Res.*, **49**, 2603–2605.
- Kasai, H., M. Nakayama, N. Toda, Z. Yamaizumi, J. Oikawa and S. Nishimura (1989b) Methylreducing acid and hydroxymethylreducing acid: oxygen radical forming agents in heated starch, *Mutat. Res.*, **214**, 159–164.
- 葛西 宏 (1992) 活性酸素研究の立場から、環境変異原研究, **14**, 93–98.
- Kasprzak, K. S. and L. Hernandez (1989) Enhancement of hydroxylation and deglycosylation of 2-deoxyguanosine by carcinogenic nickel compounds, *Cancer Res.*, **49**, 5964–5968.
- Kono, Y. and I. Fridovich (1982) Superoxide radical inhibits catalase, *J. Biol. Chem.*, **257**, 5751–5754.
- Mastrangelo, G., P. Zambon, L. Simonato and P. Rizzi (1988) A case-referent study investigating the relationship between exposure to silica dust and lung cancer, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **60**, 299–302.
- 松岡芳子、富田真佐子、吉野 泉、細田 裕 (1992) じん肺と自己免疫疾患. 産業医学, **34**, 421–431.
- Nurminen, M., C. Corvalan, J. Leigh and G. Baker (1992) Prediction of silicosis and lung cancer in the Australian labor force exposed to silica, *Scand. J. Work Environ. Health*, **18**, 393–399.
- Shibutani, S., M. Takeshita and A. P. Grollman (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation damaged base 8-oxodG, *Nature*, **349**, 431–434.
- Sohn, H. O., H. B. Lim, Y. G. Lee, D. W. Lee and Y. T. Kim (1993) Effect of subchronic administration of antioxidants against cigarette smoke exposure in rats, *Arch. Toxicol.*, **67**, 667–673.
- Stenback, F. and J. Rowland (1979) Experimental respiratory carcinogenesis in hamsters: Environmental, physicochemical and biological aspects, *Oncol.*, **36**, 63–71.
- Takagi, A., K. Sai, T. Umemura, R. Hasegawa and Y. Kurokawa (1990) Significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following short-term exposure to the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and di(2-ethylhexyl)adipate, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 213–215.
- Umemura, T., K. Sai, A. Takagi, R. Hasegawa and Y. Kurokawa (1990) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) in rat kidney DNA after intraperitoneal administration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA), *Carcinogenesis*, **11**, 345–347.
- Vallyathan, V., X. Shi, N. S. Dalal, W. Irr and V. Castranova (1988) Generation of free radicals from freshly fractured silica dust, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **138**, 1213–1219.
- Vallyathan, V., J. F. Mega, X. Shi and N. S. Dalal (1992) Enhanced generation of free radicals from phagocytes induced by mineral dusts, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **6**, 404–413.
- Wallaert, B., F. Lassalle, F. Fortin, C. Aerts, F. Bart, E. Fournier and C. Voisin (1990) Superoxide anion generation by alveolar inflammatory cells in simple pneumoconiosis and in progressive massive fibrosis of nonsmoking coal workers, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **141**, 129–133.
- Yamamoto, F., H. Kasai, M. H. Chung, E. Ohtsuka, T. Hori and S. Nishimura (1992) Ubiquitous presence in mammalian cells of enzymatic activity specifically cleaving 8-hydroxyguanine containing DNA, *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 351–357.

酸素ラジカル及び一酸化窒素(NO)によって生ずる
DNA 損傷が NIH3T3 細胞中で誘発する点変異

DNA lesions produced by oxygen radicals and nitric oxide
induce point mutations in NIH3T3 cells

紙谷浩之*, 紙谷(村田)尚子*, 三浦裕幸, 小井詰史朗, 清水美穂,
井上英夫, 西村 遼¹, 大塚栄子

Hiroyuki Kamiya*, Naoko Murata-Kamiya*, Hiroyuki Miura, Shiro Koizume,
Miho Shimizu, Hideo Inoue, Susumu Nishimura¹ and Eiko Ohtsuka

北海道大学薬学部 060 札幌市北区北 12 条西 6 丁目, ¹萬有製薬株式会社つくば研究所
¹300-33 茨城県つくば市大久保 3 番 つくばテクノパーク大穂,

*現産業医科大学産業生態科学研究所 *807 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita-12, Nishi-6, Kita-ku, Sapporo 060, Japan

¹Banyu Tsukuba Research Institute, Okubo-3, Tsukuba 300-33, Japan

*Present address: Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational
and Environmental Health, Iseigaoka 1-1, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807, Japan

(受付: 1994年9月14日; 受理: 1994年11月12日)

Summary

To determine mutations induced by 8-hydroxyguanine (8-OHG), xanthine (X), and hypoxanthine (I) which are produced by oxygen radicals and nitric oxide, synthetic c-Ha-ras genes with a DNA lesion at codon 12 or codon 61 were constructed. When transfected into NIH3T3 cells, foci were formed by these lesions. We analyzed the amplified ras gene fragments derived from some transformed cells and found that point mutations were induced by the lesions at the modified sites (8-OHG→T, X→A, and I→G). Moreover, we observed 8-OHG→A transitions and mutations in the 5'-flanking site of 8-OHG.

Keywords: 8-hydroxyguanine, xanthine, hypoxanthine, mutations, NIH3T3 cells

緒 言

活性酸素によって多種多様な DNA 損傷が生じ、それらが変異や発癌と関係していることが知られている (Ames, 1983).

8-Hydroxyguanine (8-OHG, Fig. 1) は、1984年、葛西と西村によって報告された DNA 損傷であり、活性酸素を産生する環境変異原によって生ずることが報告されている (Kasai and Nishimura, 1984a, 1984b, 1984c; Kasai *et al.*, 1984, 1986). この修飾塩基に対して DNA ポリメラーゼが *in vitro* の系において、C と A を取り込むことや (Shibutani *et al.*, 1991; Kamiya *et al.*, 1992c), 大腸菌を用

いた系において、G→T 変異を誘発することが知られている (Wood *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1992). 我々は、哺乳動物細胞内における 8-OHG の変異誘発能と変異スペクトルを明らかにするために、8-OHG を含むオリゴデオキシヌクレオチドを化學合成し、c-Ha-ras 遺伝子のコドン 12 又はコドン 61 に導入し、NIH3T3 細胞にトランスフェクションした。

活性酸素に関連した化合物として nitric oxide (NO) が知られている。NO は様々な生物作用を有していることが知られているが、DNA に対して作用し、脱アミノ化反応を促進することが報告

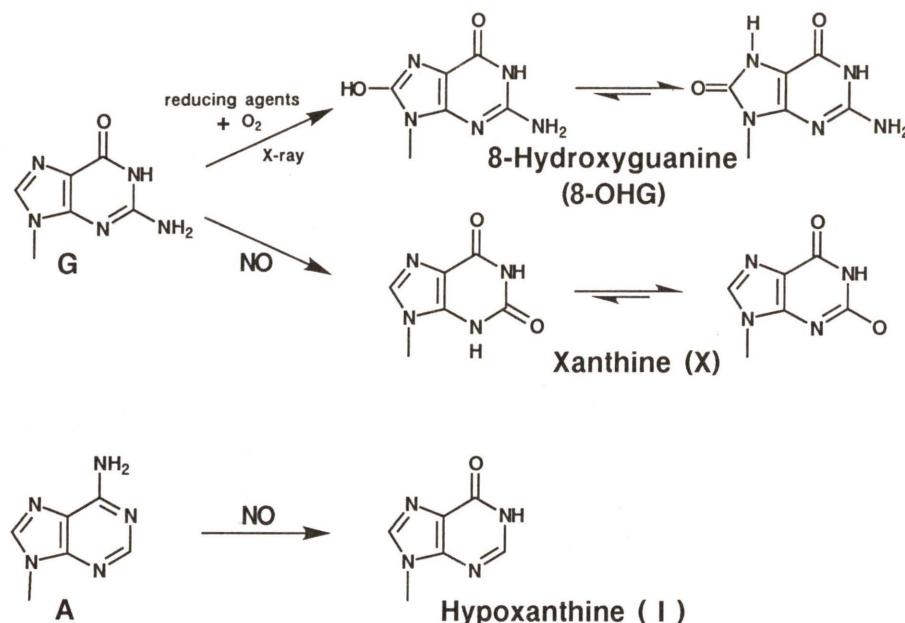


Fig. 1. Formation and chemical structures of DNA lesions investigated in this study.

されている (Nguyen *et al.*, 1992)。つまり、NOによって、C から U (5-methyl C から T) が、G から xanthine (X, Fig. 1) が、A から hypoxanthine (I, Fig. 1) が生ずる。我々は、X 及び I の哺乳動物細胞における変異誘発能を調べる目的で、X を c-Ha-ras 遺伝子のコドン 12 に、I をコドン 61 に導入し、NIH3T3 細胞にトランسفェクションした。

これらの DNA 損傷がどのような変異を誘発したを解析したところ、修飾部位における点変異が検出された (8-OHG → T, X → A, I → G)。8-OHG の場合、導入部位によっては他の変異 (8-OHG → A, 5'-隣接部位の変異) も観察された。

実験材料および方法

1. オリゴヌクレオチドの合成と精製

8-OHG 及び X を含むオリゴヌクレオチドは、既に報告した方法により合成した (Kamiya *et al.*, 1992d; Koizume *et al.*, 1994)。I を含むオリゴヌクレオチドは市販のフォスフォロアミダイト体 (Applied Biosystems) を用いて合成した。

オリゴヌクレオチドは逆相及びイオン交換 HPLC により高純度に精製した (Kamiya *et al.*,

1992d)。

2. DNA カセットの構築とベクターへの挿入

DNA カセット (Fig. 2) は数種の合成オリゴヌクレオチドを酵素的に連結することにより調製した。

ベクターへの挿入は既報に従って行った (Kamiya *et al.*, 1992a, 1992d)。

3. DNA トランسفェクション

NIH3T3 細胞への c-Ha-ras 遺伝子の導入は、リソ酸カルシウム法により行った (Kamiya *et al.*, 1989)。1 回のアッセイには 30 μg の NIH3T3 細胞のゲノム DNA と適量 (50~500 ng) の c-Ha-ras ベクターを用いた。

4. トランسفォーマント中の c-Ha-ras 遺伝子の解析

フォーカスを形成した細胞を単離し、ゲノム DNA を抽出した。コドン 12 又はコドン 61 の近傍領域をポリメラーゼ・チェイン・リアクション (PCR) 法により增幅した。

DNA 損傷によって誘発された点変異は PCR-

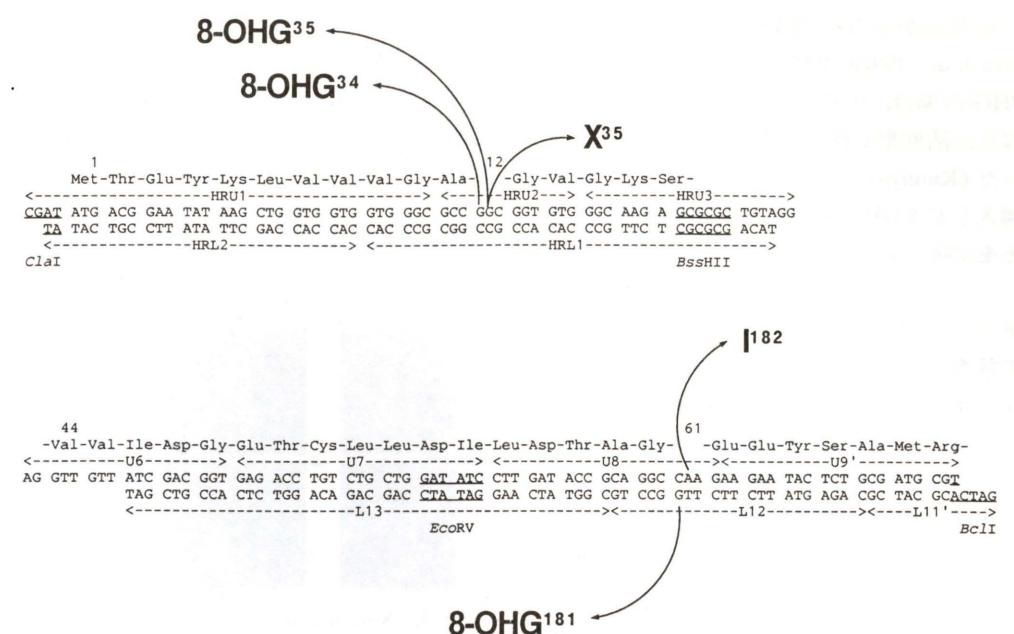


Fig. 2. DNA cassettes used for construction of c-Ha-ras genes with a DNA lesion at a unique site. Underlines indicate restriction enzyme sites used for insertion into vectors.

制限酵素法 (8-OHG, X) または single-strand conformation polymorphism を利用した PCR-SSCP 法 (I) を用いて解析した (Kamiya *et al.*, 1992a, 1992b, 1992d)。

結果

1. DNA 損傷を含む c-Ha-ras ベクターの構築

8-OHG 及び X は DNA 中の G が修飾されて生成したものであることから、c-Ha-ras 遺伝子の点変異のホットスポットであるコドン 12 又はコドン 61 中の G の位置に導入した。X はコドン 12 (GGC) の 2 番目の位置 (以下、35 位) に導入した (Fig. 2)。8-OHG の場合、位置による変異スペクトルの違いを明らかにする目的で、35 位のみならず、コドン 12 の 1 番目の位置 (34 位) 及びコドン 61 の non-coding 鎖 (GTT) の 1 番目の位置 (181 位) にも導入した (Fig. 2)。I は DNA 中の A が脱アミノ化されて生じたものであり、コドン 61 (CAA) の 2 番目 (182 位) に導入した (Fig. 2)。

これらの損傷塩基を含む DNA カセットは合成オリゴヌクレオチドの酵素的連結により調製し、ラウス肉腫ウィルスの LTR を有するベクターへ、2 種類の制限酵素部位 (ClaI-BssHII 又は Eco-

RV-BclI, Fig. 2) を用いて導入した (Kamiya *et al.*, 1992a, 1992d)。

2. DNA 損傷を導入した c-Ha-ras 遺伝子のトランسفォーム活性

以上の様にして調製したベクターを NIH3T3 細胞にトランسفェクションしたところ、細胞の集落であるフォーカスが生じた。フォーカスの形成は原則的には、c-Ha-ras 遺伝子の活性化 (点変異) によって生じると考えられるために、生じたフォーカスの数を測定することにより NIH3T3 細胞中における変異の頻度を知ることが可能である。対照として、正常型の配列を有する Gly-12 (コドン 12 の場合) または Gln-61 (コドン 61 の場合)、及び活性型の Val-12, Asp-12 (以上、コドン 12 の場合)、Lys-61, His-61、または Leu-61 (以上コドン 61 の場合) を用いた。

X を導入した c-Ha-ras 遺伝子によって多数のフォーカスが形成された。その数は活性型の Asp-12 のおよそ 25~45% 程度であった。一方、I の場合にもフォーカスの形成が誘導された。この場合にも活性型 Leu-61 によって生じたフォーカスのおよそ 35~50% であった。以上の観察結果は、X

やIの変異率がかなり高いことを示している (Kamiya et al., 1992a, 1992d).

8-OHGの場合、生じたフォーカスの数はかなり少なく、活性型c-Ha-ras遺伝子の1~2%程度であった (Kamiya et al., 1995)。このことは、細胞中に導入した8-OHGのほとんどが修復されていることを示唆している。

3. トランスフォーマント中のc-Ha-ras遺伝子の解析

フォーカスを形成した細胞中のras遺伝子をPCR法により增幅させ、DNA損傷によって誘発された点変異の検出を行った。

35位に8-OHGを含むras遺伝子によってトランスフォームした細胞の分析結果の一例をFig. 3に示す。点変異の検出には、我々の開発した、PCRと制限酵素処理を組み合わせる方法 (PCR-制限酵素法) によって行った (Kamiya et al., 1992b, 1992d)。この方法は、特定位置に特定の変異が生じている場合にのみDNA断片が切断されるので、容易に点変異の検出が可能となる。Fig. 3aに示したクローナーの場合には制限酵素AatIIによる切断が生じていた。これは、35位、すなわち、8-OHGを導入した部位にG→T変異が生じたことを示す。一方、bに示したクローナーの場合には制限酵素StuIによって生じていた。興味深いことに、これは、35位に8-OHGを導入したことにより、その5'-隣接部位(34位)にG→T変異が生

じたことを示している。同様に解析を行った結果、変異の見い出された37クローナー中、修飾部位(35位)がT, A, 及びCに変異していたものはそれぞれ22, 8, 1クローナーであった (Fig. 4)。5'-隣接部位(34位)に変異が検出されたクローナーは、

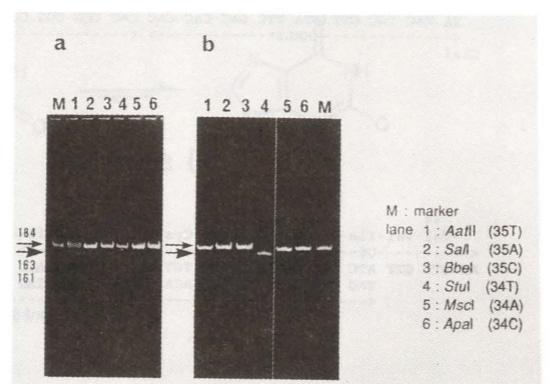


Fig. 3. Sequence analysis of c-Ha-ras genes present in transformed NIH3T3 cells.

a) Analysis of a clone with a mutation at the 8-OHG site. b) Analysis of a clone with a mutation in the position adjacent to 8-OHG. Lanes 1 to 3, analysis of the second position of codon 12, AatII for T (lane 1), SalI for A (lane 2), and BbeI for C (lane 3). Lanes 4 to 6, analysis of the first position of codon 12, StuI for T (lane 4), MscI for A (lane 5), and ApaI for C (lane 6). M corresponds to the PCR product without treatment with the restriction enzymes. Uncleaved PCR products are 184 bp. Cleaved products are 161 (AatII, SalI, and BbeI) or 163 bp (StuI, MscI, and ApaI). Arrows indicate position of the cleaved and uncleaved fragments.

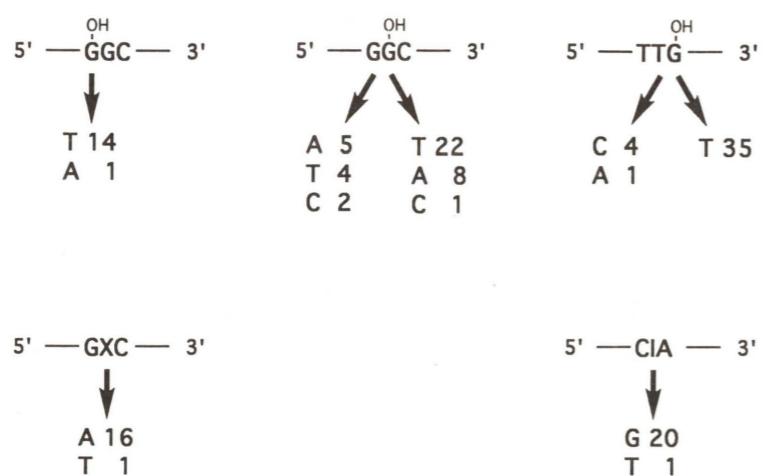


Fig. 4. Mutations induced by 8-OHG, X, and I.

G→A変異を持つものが5クローナー有り、G→T, G→C変異を持つものがそれぞれ4, 2クローナーであった (Fig. 4)。34位に8-OHGを導入したras遺伝子の場合、変異を有する15クローナーのほとんどがTへの変異を有していた (Fig. 4)。3'-隣接部位(35位)における変異は検出されなかった。181位の場合、検出できる変異が限られているが、修飾部位におけるTへの変異と、5'-隣接部位における変異が観察された (Fig. 4)。

XおよびIの誘発した点変異も検出した。Xの場合にはPCR-制限酵素法により、Iの場合にはPCR-SSCP法によって分析を行った。その結果、Xは主としてG→A変異、Iは主としてA→G変異を誘発していた (Fig. 4)。また、XによってG→T変異が、IによってA→T変異が各1クローナー検出された。

考 察

活性酸素及びその関連化合物がどのような変異を誘発するかを調べることは、変異や発癌の機構を考える上で極めて重要なことである。今回我々は、活性酸素及びNOによって生ずるDNA損傷である、8-OHG, X, Iの哺乳動物細胞における変異スペクトルを調べた。

8-OHGはin vitroや大腸菌を用いた系で、G→T変異を誘発することが知られている (Wood et al., 1990; Shibutani et al., 1991; Kamiya et al., 1992c; Cheng et al., 1992)。本研究で得られた結果は、大筋としてはこれらの報告と一致している。しかし、8-OHGを導入した位置によっては、G→T変異のみならず、G→A変異を誘発すること、また、5'-隣接部位における点変異が生ずることが哺乳動物細胞 (NIH3T3細胞) 中の変異スペクトルの特徴である (Kamiya et al., 1995)。この5'-隣接部位の変異は複数の配列中の8-OHGにおいて検出されていることから、かなり一般的な現象と思われる。以前に我々は、35位に8-OHGを導入したc-Ha-ras遺伝子の変異について報告しているが (Kamiya et al., 1992b)，今回の35位の8-OHGの結果と一致している。以前の研究では、8-OHGを含むオリゴヌクレオチドを8-メトキシグアニンを有するオリゴヌクレオチドからの化学

的変換によって調製していた (Kamiya et al., 1992b)。本研究で用いたオリゴヌクレオチドは別の合成ルートを経て調製されたものであり (Kizume et al., 1994)，2つの研究で同様な結果が得られたことは、G→T以外の変異がオリゴヌクレオチド中の不純物である可能性を否定するものである。また、同じ配列のDNAを用いたin vitroの実験では、DNAポリメラーゼによるC, A以外のヌクレオチドの取り込みも、隣接部位における誤ったヌクレオチドの取り込みも観察されていない (Kamiya et al., 1992c)。おそらく、G→T以外の変異は哺乳動物細胞特有のものであると思われる。従って、活性酸素によって生ずる変異のうち、G→A変異やGの5'-隣接部位の変異も8-OHGが関与していることが示唆される。

XやIの誘発する変異はそれぞれG→A, A→Gであった (Kamiya et al., 1992a, 1992d)。RoutledgeらはNOをDNAに作用させ、ヒトAd293細胞における変異を調べている (Routledge et al., 1993)。彼らが検出した点変異のうち、61%がAT→GCで、29%がGC→ATであった。GC→AT変異に関しては、C又は5-methyl Cの脱アミノ化によるU又はTの生成も考慮する必要があるものの、これらの結果は、A及びGがNOによって脱アミノ化されてX, Iを生じて変異を引き起こしたと考えることができる。

我々は本研究で、8-OHG, X, 及びIの誘発する変異スペクトルを明らかにした。哺乳動物細胞中で活性酸素及びNOによって生ずる変異のうちの少なくとも一部は、これらのDNA損傷によって引き起こされると思われる。

参考文献

- Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens, *Science*, **221**, 1256-1264.
- Cheng, K. C., D. S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura and L. A. Loeb (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions, *J. Biol. Chem.*, **267**, 166-172.
- Kamiya, H., K. Miura, N. Ohtomo, T. Koda, M. Kakunuma, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1989) Transformation of NIH3T3 cells with synthetic c-Ha-ras genes, *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 200-203.
- Kamiya, H., H. Miura, H. Kato, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1992a) Induction of mutation of a synthetic

- c-Ha-ras gene containing hypoxanthine, *Cancer Res.*, **52**, 1836–1839.
- Kamiya, H., K. Miura, H. Ishikawa, H. Inoue, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1992b) c-Ha-ras containing 8-hydroxyguanine at codon 12 induces point mutations at the modified and adjacent positions, *Cancer Res.*, **52**, 3483–3485.
- Kamiya, H., T. Sakaguchi, N. Murata, M. Fujimuro, H. Miura, H. Ishikawa, M. Shimizu, H. Inoue, S. Nishimura, A. Matsukage, C. Masutani, F. Hanaoka and E. Ohtsuka (1992c) *In vitro* replication study of modified bases in ras sequences, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2792–2795.
- Kamiya, H., M. Shimizu, M. Suzuki, H. Inoue and E. Ohtsuka (1992d) Mutations induced by deoxyxanthosine in codon 12 of a synthetic c-Ha-ras gene, *Nucleosides & Nucleotides*, **11**, 247–260.
- Kamiya, H., N. Murata-Kamiya, S. Koizume, H. Inoue, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1995) 8-Hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in hot spots of the c-Ha-ras gene. Effects of sequence contexts on mutation spectra, *Carcinogenesis*, in press.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984a) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2137–2145.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984b) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion, *Gann*, **75**, 565–566.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984c) DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide, *Gann*, **75**, 842–844.
- Kasai, H., H. Tanooka and S. Nishimura (1984) Formation of 8-hydroxyguanine residue in DNA by X-irradiation, *Gann*, **75**, 1037–1039.
- Kasai, H., P. F. Crain, Y. Kuchino, S. Nishimura, A. Ootsuyama and H. Tanooka (1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair, *Carcinogenesis*, **7**, 1849–1851.
- Koizume, S., H. Kamiya, H. Inoue and E. Ohtsuka (1994) Synthesis and thermodynamic stabilities of damaged DNA involving 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in a ras-gene fragment, *Nucleosides & Nucleotides*, **13**, 1517–1534.
- Nguyen, T., D. Brunson, C. L. Crespi, B. W. Penman, J. S. Wishnok and S. R. Tannenbaum (1992) DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 3030–3034.
- Routledge, M. N., D. A. Wink, L. K. Keefer and A. Dipple (1993) Mutations induced by saturated aqueous nitric oxide in the pSP189 supF gene in human Ad293 and *E. coli* MBM7070 cells, *Carcinogenesis*, **14**, 1251–1254.
- Shibutani, S., M. Takeshita and A. P. Grollman (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, **349**, 431–434.
- Wood, M. L., M. Dizdaroglu, E. Gajewski and J. M. Essigmann (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome, *Biochemistry*, **29**, 7024–7032.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 391–396 (1995)

大腸菌 supF 遺伝子における塩化コバルト(II) 誘発突然変異

Cobalt(II) chloride-induced mutagenesis in the supF gene of *Escherichia coli*

尾川博昭¹, 西田一信¹, 小矢光晴¹, 柴原俊一², 柿本幸司¹, 木村博³, 坂田一矩¹, 加藤安彦¹, Ogawa, Hiroaki Iyehara¹, Kazunobu Nishida¹, Mitsuharu Koya¹, Toshikazu Shibahara², Kohji Kakimoto¹, Hiroshi Kimura³, Kazunori Sakata¹ and Yasuhiko Kato¹

¹九州工業大学工学部物質工学科応用化学教室
804 北九州市戸畠区仙水町 1-1, ²大塚製薬株式会社徳島研究所安全性研究部
771-01 徳島市川内町加賀須野 436-10, ³滋賀医科大学放射線基礎医学講座
520-21 大津市瀬田月輪町

¹Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu Institute of Technology,
1-1 Sensui-cho, Tobata-ku, Kitakyushu 804, Japan

²Drug Safety Research Center, Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.,
463-10 Kagasuno, Kawauchi-cho, Tokushima, Tokushima 771-01, Japan

³Department of Experimental Radiology, Shiga University of Medical Science,
Setatsukinowa-cho, Otsu, Shiga 520-21, Japan

(受付: 1994年9月14日; 受理 1994年11月16日)

Summary

The spectrum of mutations induced by cobalt(II) chloride (CoCl_2) was examined using the pZ189 plasmid DNA, which was propagated after transfection into *Escherichia coli* KS40/pKY241 host cells. The vector plasmid carries an *E. coli* supF suppressor tRNA gene as a target for mutations. After CoCl_2 treatment, 25 independent nalidixic acid-resistant, ampicillin-resistant and *lacZ*⁻ (SupF^-) mutant clones were obtained and altered sequences of the mutated supF^- genes were determined. Deletions and frameshifts were the predominant mutational events (81%) induced by CoCl_2 and the remainder were base substitutions (19%). Analysis of sequence alterations at all the sites of mutation revealed that: (i) 96% of mutations occurred at G:C sites, suggesting that the formation of N7G-Co(II) adducts and/or the induction of DNA-strand breaks probably generated by oxygen free radicals may be responsible for the mutagenic lesions for these mutations; and (ii) short sequence repeats were mostly found at the sites of deletion and frameshift. Slippage-misalignment is also suggested to be a mechanism for the induction of mutations at these sites.

Keywords: cobalt(II) chloride, mutation specificity, pZ189 supF, KS40/pKY241 system, deletion

緒言

金属単体およびその化合物の細胞毒性や発がん性などは古くから注目され、研究が行われてきた。我々は金属の中でもコバルトに興味を持ち、cobalt(II) chloride (CoCl_2 , CAS No. 7646-79-9) がバクテリアと培養細胞系の変異原性試験で遺伝子

突然変異性を示すこと (Ogawa *et al.*, 1986, 1988; Morita *et al.*, 1991), ショウジョウバエでは体細胞突然変異を誘発することを報告してきた (Ogawa *et al.*, 1994)。また、コバルト(II) 塩類の変異原性は Co^{2+} ($\text{Co}(II)$) イオンに起因することも示した。一方、コバルト化合物は実験動物に発がん性

を示すことが知られている (Heath, 1956; Heath and Webb, 1967)。さらに、CoCl₂ は DNA と結合すること (Eichhorn and Shin, 1968; Zimmer et al., 1974), DNA 鎖を切断すること (Robison et al., 1982; Hamilton-Koch et al., 1986; Hartwig et al., 1990) および DNA 合成の忠実度を低下させること (Sirover and Loeb, 1976) なども報告されている。本稿では、我々がこれまで行ってきた金属イオンによる突然変異研究の一環として (Ogawa et al., 1986, 1987a, 1987b, 1988, 1994; Morita et al., 1991), CoCl₂ 誘発による突然変異生成機構を解明する目的のため、大腸菌アンバー・サブレッサー tRNA (*supF*) 遺伝子を持つベクター pZ189 (Seidman et al., 1985) と Akasaka ら (1992) の開発した大腸菌 KS40/pKY241 株を用いて、誘発された *supF*⁻ 変異遺伝子の DNA 塩基配列を解析した。突然変異スペクトルの解析数が少ないため最終的な結論の記述はできないが、2~3 の興味ある知見が読みとれるので速報として報告する。

実験材料および方法

1. プラスミドおよび大腸菌

突然変異検出には、Seidman ら (1985) が構築した標的遺伝子として大腸菌 *supF* 遺伝子およびアンピシリン耐性 (Amp^r) マーカーを持つベクター pZ189 を使用した。宿主大腸菌としては KS40/pKY241 株 (F⁻ lacZ(am)CA7020 gyrA lacY1 hsdR hsdM araD139 △(araABC-leu)7679 galU galK rpsL thi/gyrA(am) cml) (Akasaka et al., 1992) および CSH 2 株 (F⁻ lacZ(am) trp rpsL thi) (Miller, 1972) を用いた。

2. 試薬類

CoCl₂ をはじめとする試薬は和光純薬工業(株) (大阪)より購入した。培地類は L 液体培地、L 寒天培地および M 緩衝液などを用いた (Otsuji et al., 1974)。IPTG と X-gal は Hauser ら (1986) の報告に従って使用した。ナリジキシン酸 (Nal), アンピシリン (Amp) およびクロラムフェニコール (Cml) は L 寒天培地に各々 50, 150 および 30 μg/ml を添加した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dCTP は DuPont 社 (Wilmington, DE, USA) から購入した。

3. CoCl₂ 誘発突然変異

CoCl₂ 誘発による *supF*⁻ 変異細胞クローニングは Akasaka ら (1992) の方法に準じて行った。L 液体培地で培養した CSH2/pZ189 株から分離・精製した pZ189 プラスミド DNA を最大の突然変異率を示す 20 μM CoCl₂ で 2 時間暴露して、*supF* 遺伝子に突然変異を誘発した。次に、このプラスミド DNA を塩化カルシウム・塩化ルビジウム法 (Maniatis et al., 1982) で宿主菌 KS40/pKY241 株へ形質導入を行った。その後、形質導入体は Nal, Amp, Cml, IPTG および X-gal を添加した L 寒天培地にプレートし、CoCl₂ 誘発 *supF*⁻ 変異細胞クローニングを収集した。*supF*⁻ 変異遺伝子の分離は、宿主菌では pKY241 プラスミドからのアンバー・ナリジキシン酸耐性 (*gyrA*(am); Nal^r) 遺伝子の発現があるので、pZ189 プラスミドの *supF* サブレッサー tRNA が活性であればナリジキシン酸感受性 (Nal^s) Amp^r LacZ⁺ (クロラムフェニコール耐性 (Cml^r)) となって、この選択培地では増殖できないが、*supF* 遺伝子に突然変異が誘起されれば Nal^r Amp^r LacZ⁻ (Cml^r) で白色コロニーを生じることに基づいている。

4. プラスミド DNA の調製と DNA 塩基配列の同定

突然変異をもつ *supF*⁻ 遺伝子をプラスミド DNA として、KS40/pZ189 (*supF*⁻) pKY241 株から Qiagen キット (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) のミニ・プロトコール (Lutze and Winegar, 1990) により Kimura ら (1993) の方法で分離して精製した。また、変異 DNA 塩基配列の同定は pBR322 プライマー R と *Bca*BEST™ Dideoxyシーケンシングキット-dCTP Version (宝酒造(株), 滋賀) を用いて、ジデオキシ法を行った。

結果および考察

大腸菌 *supF* 遺伝子を持つベクター pZ189 と宿主大腸菌 KS40/pKY241 株を用いて、CoCl₂ 誘発による突然変異スペクトルの解析を行った。最初に、pZ189 プラスミド DNA 700 ng を 20 μM CoCl₂ で 2 時間暴露して、宿主菌 KS40/pKY241 株への形質導入を行った。形質導入率は約 9.7 ×

10⁻¹ であり、無処理 DNA のものとほとんど変わらなかった。また、L 寒天培地に Nal, Amp, Cml, IPTG および X-gal を添加した選択培地による形質導入体の Nal^r Amp^r LacZ⁻ (*SupF*⁻) 変異の突然変異率は平均で 2.5 × 10⁻⁶ であり、自然突然変異率 (5 × 10⁻⁷) の約 5 倍であった。この結果は *SupF*⁻ 変異の約 80% が CoCl₂ によって誘起されたことを示唆している。次に、選択培地から CoCl₂ 処理により *supF* 遺伝子に変異を生じたと考えられる、互いに独立なクローニングを多数分離して収集した。これらの内、25 個の変異クローニングからプラスミド DNA を回収し、ジデオキシ法により *supF*⁻ 変異遺伝子 DNA の Pre-tRNA から End-tRNA 領域を含む約 150 塩基の配列を決定し

Table 1. Classes of CoCl₂-induced and spontaneous mutations in an *E. coli supF* tRNA gene

Class of mutation	CoCl ₂ -induced mutations	Spontaneous mutations ^a
Base substitution	5(19%)	33(64%)
Transition	1	5
Transversion	4	28
Frameshift ^b	5(19%)	1(2%)
Deletion	16(62%)	5(10%)
Insertion sequence	0	13(25%)
Total	26	52

^a Data from Akasaka et al. (1992).

^b Frameshift mutation here means the deletion of a single nucleotide, shifting of coding frame.

た。解析の結果、1 クローン (CC19) から二重変異が 1 例検出され、合計 26 例の突然変異を同定した。

Table 1 に CoCl₂ 誘発による突然変異スペクトルを示す。最も多く見られたのが欠失型の変異で、全体の 62% を占め、38 から 53 塩基対を失っていた。次いで多かったのがフレームシフト型と塩基置換型の変異で、各々 19% であった。また、Akasaka ら (1992) の報告による自然突然変異スペクトルで見られた挿入配列は検出されなかった。突然変異スペクトルの解析数が不足のため結論的な記述はできないが、2~3 の興味ある知見が読みとれるので、以下に個々の型の変異についてもう少し詳しく見ていくこととする。

欠失型変異が発生した部位での塩基配列変化を Table 2 に示す。CoCl₂ 誘発による欠失型変異が、自然突然変異 (Akasaka et al., 1992) でも検出された部位 68–129 で多発しており、ホットスポットになっている。その部位は長さ 10 塩基のダイレクト・リピートが存在しているところで、2 つのリピート配列に挟まれた部分の 52 塩基対が消失しており、その後にリピート配列が 1 つだけ残るという構造変化が起きている。このような変化は他の欠失型の変異 (部位 55–111, 60–112 および 77–119) の場合でも同様に起こっており、長さ 4 から 6 塩基のダイレクト・リピートが存在する部位で見られる。これらの結果は、欠失型のみなら

Table 2. Deletions.

Site ^a	Incidence	Sequence context ^b	Nucleotide change	Mutant gene
55–111	1	CGCCCCGCTT---GTTCCCGAGC → CGCCCCGAGC	-53	CC6
60–112	1	GCTTCCCGAT---GTTCCCGAGC → GCTTCCCGAGC	-46	CC13
68–129	13	GATAAGGGAGCAGGC --- CAAAGGGAGCAGACT → GATAAGGGAGCAGACT	-52	CC1, CC2, CC3, CC4, CC5, CC11, CC14, CC17, CC18, CC22, CC23, CC24, CC25
77–119	1	GCAGGCCAGT --- GCAGGCCAAAG → GCAGGCCAAAG	-38	CC15

^a Numbers indicated are the nucleotide number of an *E. coli supF* DNA; numbering is in accordance with Hauser et al. (1986).

^b Arrows below and bars above the sequences indicate direct repeats and deleted nucleotides, respectively.

Table 3. Frameshifts.

Site	Incidence	Sequence context ^a	Nucleotide change	Mutant gene
70-72	3	GATAAGGGAGCA → GATAAGGAGCA ***	-G	CC10, CC16, CC20
172-176	2	CCTTCCCCCACC → CCTTCCCCACC *****	-C	CC9, CC21

^aAsterisks above the sequences indicate deleted nucleotides.

Table 4. Base substitutions.

Site	Incidence	Sequence context ^a	Nucleotide change	Mutant gene
108	1	GGGGTTCCCGAG → GGGGTTACCGAG *	C : G → A : T	CC7
108&113	1	GTTCCCGAGCGG → GTTACCGAACGG * * * *	C : G → A : T G : C → A : T	C19
144	1	TCTGCCGTTCATC → TCTGCCCTCATC * *	G : C → C : G	CC8
168	1	TCGAATCCTTCC → TCGAATACTTCC * *	C : G → A : T	CC12

^a Sequences shown in the left and right portions are those of normal and mutant genes respectively. The bases substituted are indicated by asterisks.

ず、フレームシフトおよび重複型変異など塩基置換型変異を除く多くの突然変異生成に短いダイレクト・リピートが関与していることに注目して、我々が提出したスリップ-誤整合機構 (Ikehata *et al.*, 1989; Akagi *et al.*, 1990; Ogawa *et al.*, 1993) が CoCl_2 誘発突然変異においても存在することを示唆している。このモデルは、変異原によって DNA 中に生じた損傷が 3' 側のダイレクト・リピートの近辺にあるとき、DNA 合成はその位置で停止する。新生鎖のダイレクト・リピート相補部分が、ランダムな熱運動で偶然 5' 側のダイレクト・リピート部分と誤整合し、一時的にループアウトした中間体を形成し、DNA 合成の再開により中間体は安定化される。ループアウトした部分は切除されるか、分配によって最終的に突然変異が固定されると想定している。

さらに、それぞれの塩基配列からスリップの引き金になる損傷塩基を推定すると、約 94% がグアニン (G) 残基であり、残り約 6% がチミン (T) またはアデニン (A) 残基である。この結果は、 CoCl_2 と DNA の結合がグアニン 7 位の窒素 (N7-G) と Co(II) イオンの結合 (N7G-Co(II) 付加体)、リン酸基 ($-\text{O}_3\text{PO}^-$) と Co(II) イオンの結合

($-\text{O}_3\text{PO}-\text{Co}(II)$ 付加体) および N7G, Co(II) イオンと $-\text{O}_3\text{PO}^-$ 間の架橋の形成 (N7G-Co(II)-OPO₃⁻) によるとされており (Eichhorn and Shin, 1968; Zimmer *et al.*, 1974), CoCl_2 による前変異原性損傷は N7G-Co(II) 付加体であることが考えられる。一方、 CoCl_2 による DNA 鎖の切断 (Robison *et al.*, 1982; Hamilton-Koch *et al.*, 1986; Hartwig *et al.*, 1990) は Co(II) イオンと生体内のスーパーオキシドや過酸化水素との反応で生じる活性酸素の関与が示唆されている (Moorhouse *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1989; Kadiiska *et al.*, 1989)。欠失型の変異のもう一つの前変異原性損傷は $-\text{O}_3\text{PO}-\text{Co}(II)$ 付加体とスーパーオキシドや過酸化水素の反応で生じた活性酸素の作用による DNA 鎖の 3' または 5' のリン酸エステル結合の切断が考えられる。

Table 3 にフレームシフト型の変異の発生部位での塩基配列変化を示す。部位 70-72 には 3 個の G が、また部位 172-176 では 4 個のシトシン (C) が並んでおり、それらの部位で 1 塩基対の G または C の脱落が起こっている。これらの結果は、 CoCl_2 が Ames 試験の TA1537 株および TA2637 株 (*hisC3076* フレームシフト変異株; *hisC* 遺伝子

の -GGG- 部位に 1 塩基対の G の付加を持ち、1 塩基対の G の脱落によって復帰突然変異を検出できる) (Ames *et al.*, 1973, 1975) に対し、特異的にフレームシフト型変異を誘発した我々の以前の研究 (Ogawa *et al.*, 1986, 1988) を裏付けるものである。また、1 塩基対の G または C の脱落もスリップ-誤整合の範疇に入れると、フレームシフトおよび欠失変異の 95% は G 塩基の損傷 (N7G-Co(II) 付加体) または DNA 鎖の切断がスリップの引き金になったと考えられる。

塩基置換型の変異で特徴的なことはトランスポーバージョンが多いことである (Table 4)。しかし、他の大腸菌や真核細胞の系ではトランジションの方が多く出たものもある (Streisinger *et al.*, 1966; DeJong *et al.*, 1988)，両者が半々に見られたものもあり (Schaaper *et al.*, 1986; Ashman and Davidson, 1987)，検出系によってかなり違いが見られる。さらに特徴的なことは、突然変異の全てが G:C 部位で起きていることである。この結果は Co(II) イオンによる前変異原性損傷を N7G-Co(II) 付加体と考えるとよく符合する。また、CC19 変異遺伝子からトランスポーバージョンとトランジションからなる継列二重の塩基置換型変異が見つかった。

終わりに、 CoCl_2 誘発による突然変異スペクトルは主に欠失型とフレームシフト型の変異であった。突然変異部位での塩基配列変化の解析から、変異の 96% が G:C 部位の損傷であることが示された。スリップ-誤整合機構は CoCl_2 誘発突然変異の欠失型とフレームシフト型変異においても存在することが示唆された。また、 CoCl_2 誘発による大腸菌 *supF* 変異遺伝子は KS40/pKY241 システムによって効率よく分離することができた。

謝 辞

pZ189 プラスミドと大腸菌 CSH 2 株は加藤武司博士 (大阪大学医学部) から供与していただきました。また、山本和生博士 (東北大学理学部) と赤阪 進博士 (大阪府立公衆衛生研究所) からは大腸菌 KS40/pKY241 株の供与とそのシステムの助言ならびに大腸菌 *supF* 遺伝子における自然突然変異スペクトルの掲載の許可をいただきまし

た。ここに感謝します。

参考文献

- Akagi, T., K. Morota, H.-I. Ogawa, H. Kimura and T. Kato (1990) Mutational specificity of the carcinogen 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole in mammalian cells, *Carcinogenesis*, **11**, 841-846.
- Akasaka, S., K. Takimoto and K. Yamamoto (1992) G : C → T : A and G : C → C : G transversions are the predominant spontaneous mutations in the *Escherichia coli supF* gene: an improved *lacZ*(am) *E. coli* host designed for assaying pZ189 *supF* mutational specificity, *Mol. Gen. Genet.*, **235**, 173-178.
- Ames, B. N., F. D. Lee and W. E. Durston (1973) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 782-786.
- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **31**, 347-364.
- Ashman, C. R. and R. L. Davidson (1987) Sequence analysis of spontaneous mutations in a shuttle vector gene integrated into mammalian chromosomal DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 3354-3358.
- DeJong, P. T., A. J. Grosovsky and B. W. Glickman (1988) Spectrum of spontaneous mutations at the *aprt* locus of CHO cells: an analysis at the DNA sequence level, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 3499-3503.
- Eichhorn, G. L. and Y. A. Shin (1968) Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds, XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 7323-7328.
- Hamilton-Koch, W., R. D. Snyder and J. M. La Velle (1986) Metal-induced DNA damage and repair in human diploid fibroblasts and Chinese hamster ovary cells, *Chem. Biol. Interact.*, **59**, 17-28.
- Hartwig, A., U. Kasten, K. Boakye-Dankwa and D. Beyersmann (1990) Uptake and genotoxicity of micromolar concentrations of cobalt chloride in mammalian cells, *Toxicol. Environ. Chem.*, **28**, 205-215.
- Hauser, J., M. M. Seidman, K. Sidur and K. Dixon (1986) Sequence specificity of point mutations induced during passage of a UV-irradiated shuttle vector plasmid in monkey cells, *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 277-285.
- Heath, J. C. (1956) The production of malignant tumours by cobalt in the rat, *Br. J. Cancer*, **10**, 668-673.
- Heath, J. C. and M. Webb (1967) Content and intracellular distribution of the inducing metal in the primary rhabdomyosarcomata induced in the rat by cobalt, nickel and cadmium, *Br. J. Cancer*, **21**, 768-779.
- Ikehata, H., T. Akagi, H. Kimura, S. Akasaka and T. Kato (1989) Spectrum of spontaneous mutations in a cDNA of the human *hprt* gene integrated in chromosomal DNA, *Mol. Gen. Genet.*, **219**, 349-358.

- Kadiiska, M. B., K. R. Maples and R. P. Mason (1989) A comparison of cobalt(II) and iron(II) hydroxyl and superoxide free radical formation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **275**, 98–111.
- Kimura, H., H. Higuchi, H.-I. Ogawa and T. Kato (1993) Sequence analysis of X-ray-induced mutations occurring in a cDNA of the human *hppt* gene integrated into mammalian chromosomal DNA, *Radiat. Res.*, **134**, 202–208.
- Lutze, L. H. and R. A. Winegar (1990) A quick and efficient method for the recovery of plasmid or viral DNA from mammalian cells, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6150.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Moorhouse, C. P., B. Halliwell, M. Grootveld and J. M. C. Gutteridge (1985) Cobalt(II) ion as a promoter of hydroxyl radical and possible 'crypto-hydroxyl' radical formation under physiological conditions, Differential effects of hydroxyl radical scavengers, *Biochim. Biophys. Acta*, **843**, 261–268.
- Morita, H., M. Umeda and H. I. Ogawa (1991) Mutagenicity of various chemicals including nickel and cobalt compounds in cultured mouse FM3A cells, *Mutat. Res.*, **261**, 131–137.
- Ogawa, H. I., K. Sakata, T. Inouye, S. Jyosui, Y. Niyitani, K. Kakimoto, M. Morishita, S. Tsuruta and Y. Kato (1986) Combined mutagenicity of cobalt(II) salt and heteroaromatic compounds in *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.*, **172**, 97–104.
- Ogawa, H. I., S. Tsuruta, Y. Niyitani, H. Mino, K. Sakata and Y. Kato (1987a) Mutagenicity of metal salts in combination with 9-aminoacridine in *Salmonella typhimurium*, *Jpn. J. Genet.*, **62**, 159–162.
- Ogawa, H. I., K. Sakata, S.-Y. Liu, H. Mino, S. Tsuruta and Y. Kato (1987b) Cobalt(II) salt-quinoline compound interaction: combined mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* and strength of coordinate bond in the mixtures, *Jpn. J. Genet.*, **62**, 485–491.
- Ogawa, H. I., S.-Y. Liu, K. Sakata, Y. Niyitani, S. Tsuruta and Y. Kato (1988) Inverse correlation between combined mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and strength of coordinate bond in mixture of cobalt(II) chloride and 4-substituted pyridines, *Mutat. Res.*, **204**, 117–121.
- Ogawa, H. I., H. Kimura, M. Koya, H. Higuchi and T. Kato (1993) N-Acetoxy-N-acetyl-2-aminofluorene-induced mutation spectrum in a human *hppt* cDNA shuttle vector integrated into mammalian cells, *Carcinogenesis*, **14**, 2245–2250.
- Ogawa, H. I., T. Shibahara, H. Iwata, T. Okada, S. Tsuruta, K. Kakimoto, K. Sakata, Y. Kato, H. Ryo, T. Itoh and K. Fujikawa (1994) Genotoxic activities *in vivo* of cobaltous chloride and other metal chlorides as assayed in the Drosophila wing spot test, *Mutat. Res.*, **320**, 133–140.
- Otsuji, N., H. Iyehara and Y. Hidemitsu (1974) Isolation and characterization of an *Escherichia coli* *rvu* mutant which forms nonseptate filaments after low doses of ultraviolet light irradiation, *J. Bact.*, **117**, 337–344.
- Robison, S. H., O. Cantoni and M. Costa (1982) Strand breakage and decreased molecular weight of DNA induced by specific metal compounds, *Carcinogenesis*, **3**, 657–662.
- Schaaper, R. M., B. N. Danforth and B. W. Glickman (1986) Mechanisms of spontaneous mutagenesis: an analysis of the spectrum of spontaneous mutation in the *Escherichia coli lacI* gene, *J. Mol. Biol.*, **189**, 273–284.
- Seidman, M. M., K. Dixon, A. Razzaque, R. J. Zagursky and M. L. Berman (1985) A shuttle vector plasmid for studying carcinogen-induced point mutations in mammalian cells, *Gene*, **38**, 233–237.
- Sirover, M. A. and L. A. Loeb (1976) Infidelity of DNA synthesis *in vitro*: screening for potential metal mutagens or carcinogens, *Science*, **194**, 1434–1436.
- Streisinger, G., Y. Okada, J. Emrich, J. Newton, A. Tsugita, E. Terzaghi and M. Inouye (1966) Frameshift mutations and the genetic code, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **31**, 77–84.
- Yamamoto, K., S. Inoue, A. Yamazaki, T. Yoshinaga and S. Kawanishi (1989) Site-specific DNA damage induced by cobalt(II) ion and hydrogen peroxide: role of singlet oxygen, *Chem. Res. Toxicol.*, **2**, 234–239.
- Zimmer, Ch., G. Luck and H. Triebel (1974) Conformation and reactivity of DNA, IV. Base binding ability of transition metal ions to native DNA and effect on helix conformation with special reference to DNA-Zn(II) complex, *Biopolymers*, **13**, 425–453.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 397–402 (1995)

The sensitivity of three *soi* mutants (*soi-7*, *soi-9* and *soi-10*) of *Escherichia coli* to oxidizing mutagens

Qiu-Mei Zhang, Tadashi Takemoto and Shuji Yonei

Laboratory of Radiation Biology, Faculty of Science, Kyoto University, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan

(Received: September 14, 1994; Accepted: November 18, 1994)

Summary

We have isolated several strains of *Escherichia coli* that contain new gene fusions (*soi::lacZ*) specifically inducible by superoxide radicals under the control of the *soxR* and *soxS* genes. The fusion genes were induced by low concentrations of menadione, methyl viologen and also 4-NQO only under aerobic conditions. The *soi-7* and *soi-10* mutants were more sensitive to the lethal effect of superoxide generating drugs menadione and 4-NQO but not to non-oxidizing drugs MMS and MNNG. The results indicate that the *soi* gene products play a critical role in protection against oxidative stress. The *soi-10 sodA* double mutant showed higher sensitivity to these agents than parental strains. In addition, the *soi* genes were induced by diamide under anaerobic conditions, suggesting that they respond to changes in cellular redox state.

Keywords: Reactive oxygen species; Superoxide radical; Superoxide-inducible genes; Redox state; SoxRS

Introduction

Reactive oxygen species such as superoxide radical naturally occur during normal metabolism in aerobically growing cells and also arise from a variety of endogenous and environmental sources such as redox-cycling agents (Fridovich, 1978; Hassan and Fridovich, 1979; Pryor, 1982; Farr and Kogoma, 1991; Zhang and Yonei, 1991). Cytotoxic and mutagenic effects of oxygen are attributed to these reactive oxygen species (Fridovich, 1978). Prokaryotic and eukaryotic cells have defense mechanisms against the toxicity of these reactive oxygen species. *Escherichia coli* cells possess enzymes, such as superoxide dismutases, catalases and peroxidases, which scavenge reactive oxygen species (Touati, 1988; Fridovich, 1989; Farr and Kogoma, 1991). Furthermore, *E. coli* cells also have several DNA repair systems for oxidatively damaged DNA (Farr and Kogoma, 1991; Ramotar and Demple, 1993).

On the other hand, at moderate concentrations, reactive oxygen species may exert signaling functions and regulate gene expression (Demple, 1991; Farr and Kogoma, 1991). Upon exposure to elevat-

ed levels of superoxide radical, *E. coli* cells respond to the superoxide stress by invoking more than 30 proteins (Walkup and Kogoma, 1991). At least nine of these proteins are produced by a regulon controlled by two regulatory genes, *soxR* and *soxS* (Tsaneva and Weiss, 1990; Greenberg *et al.*, 1990; Wu and Weiss, 1991, 1992). Gene products (genes) already known to be a member of the SoxRS regulon are Mn-SOD (*sodA*), glucose-6-phosphate dehydrogenase (*zwf*), fumarate C (*fumC*), an antisense RNA for OmpF expression (*micF*) and a DNA repair enzyme endonuclease IV (*nfo*) (Chan and Weiss, 1987; Greenberg *et al.*, 1990; Demple, 1991; Farr and Kogoma, 1991; Rowley and Wolf, 1991; Liochev and Fridovich, 1992; Chou *et al.*, 1993). Two *soi* genes, *soi-28* and *soi-17/19*, are also positively regulated by the SoxRS (Kogoma *et al.*, 1988; Farr and Kogoma, 1991). In addition, by using a Mud (Ap, lac) phage which randomly inserts into the *E. coli* chromosome (Casadaban and Cohen, 1979), we have isolated three clones of *E. coli* with new superoxide inducible fusion genes (*soi::lacZ*) (Mito *et al.*, 1993). The expression of the *soi::lacZ*

Table 1. *E. coli* strains used.

Strain	Genotype	Source or reference
GC4468	F- <i>lac</i> 4169 <i>rpsL</i>	Carlio and Touati 1986
QC772	as GC4468, but ϕ (<i>sodA-lacZ</i>)49	Carlio and Touati 1986
CM ^R Lac ⁺	Cm ^R Lac ⁺	
KS262	as GC4468, also <i>soi-7::lacZ</i>	Mito et al. 1993
KS264	as GC4468, also <i>soi-9::lacZ</i>	Mito et al. 1993
KS265	as GC4468, also <i>soi-10::lacZ</i>	Mito et al. 1993
TT7	as GC4468, also λ (<i>soi-7::lacZ</i>)	Takemoto et al. 1994
SY9	as GC4468, also λ (<i>soi-9::lacZ</i>)	This study
QM10	as GC4468, also λ (<i>soi-10::lacZ</i>)	Zhang et al. 1994
QM101	as QM10, also ϕ (<i>sodA-lacZ</i>)49	This study

fusions was under the control of the *soxRS* regulatory genes (Mito et al., 1993). The *soi-7*, *soi-9* and *soi-10* genes are located at about 13, 34 and 30 min on the *E. coli* genetic map, respectively (Mito et al., 1993; Takemoto et al., 1994; Zhang et al., 1994), indicating that these *soi* genes are different from genes already identified to be inducible by superoxide radicals under the control of the *SoxRS*. In the present experiments we attempted to clarify the regulation and functions of the *soi* genes in more details.

Materials and Methods

1. Bacterial strains, phage and growth medium

All bacterial strains used during this study are derivatives of *E. coli* K-12 and listed in Table 1. P1_{vir} phage was used for transduction experiments. *E. coli* cells were routinely grown in LB medium (Miller, 1972). The concentrations of antibiotics used were 50 µg of ampicillin, 25 µg of tetracycline and 50 µg of kanamycin per ml.

2. Chemicals

Menadione sodium bisulfite (MD) was obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO (USA). Ampicillin, tetracycline hydrochloride, kanamycin, diamide, 1,10-phenanthroline and 2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside were purchased from Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka (Japan). Parquat (methyl viologen, MV), 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG), 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) and methyl methanesulfonate (MMS) were obtained from Nakalai Tesque Inc., Kyoto (Japan). All other reagents used were of the highest purity commercially available.

3. Induction experiments

Overnight cultures of *E. coli* were diluted 100-fold into fresh LB medium and incubated at 30°C until

the concentration reached about 2×10^8 cells per ml. Three-ml aliquots of the cultures were mixed with various concentrations of agents and the cell suspensions were subsequently incubated at 30°C for 90 min with vigorous shaking. β-Galactosidase activity in whole cells was determined as previously described by Miller (1972). Anaerobic conditions were achieved by bubbling nitrogen gas through a culture medium.

4. Assays for sensitivity to MD, 4-NQO and MMS

The sensitivity of the *soi* mutants was assayed as previously described (Zhang et al., 1994; Takemoto et al., 1994). To assay for 4-NQO, MMS and MNNG sensitivity, 0.1 ml overnight culture of *E. coli* cells was plated on LB plate and drugs were added on sterilized paper disks (6 mm in diameter) placed on the plates. The plates were incubated at 30°C overnight before the zone of growth inhibition was determined.

Results

1. Induction of *soi::lacZ* fusion genes by MV, MD and 4-NQO

Induction of the *soi* genes by various agents was examined in *soi-7::lacZ*, *soi-9::lacZ* and *soi-10::lacZ* fusions strains of *E. coli*. In these strains, the *lacZ* gene encoding β-galactosidase has been fused to the *soi-7*, *soi-9* and *soi-10* promoter (Mito et al., 1993). β-Galactosidase activity strictly reflects the level of the *soi* gene expression (Casadav and Cohen, 1979). Two well-known redox-cycling agents, MV and MD, induced the *soi::lacZ* fusions under aerobic conditions (Fig. 1). 4-NQO is a well-known potent mutagen and carcinogen. Recently, some reports connected 4-NQO to the production of reactive oxygen species. The potency of

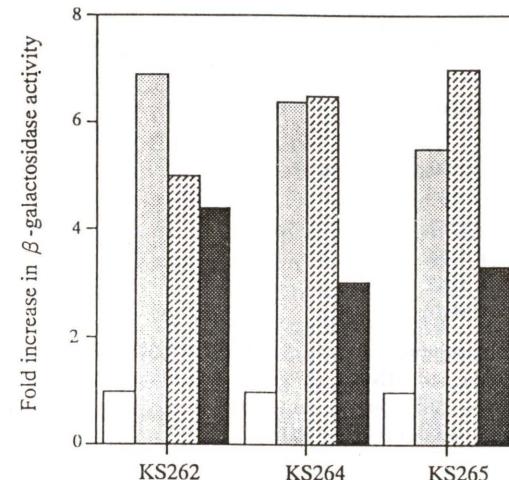


Fig. 1. Induction of the *soi-7::lacZ*, *soi-9::lacZ* and *soi-10::lacZ* fusion genes by various oxidizing agents. Exponentially growing cells of *E. coli* were treated with agents at 30°C for 90 min under aerobic conditions, followed by the assay for β-galactosidase activity. The background values for the *soi-7::lacZ*, *soi-9::lacZ* and *soi-10::lacZ* fusion genes were 108, 153 and 211 units/OD₆₀₀, respectively. □, no drug; ▨, 30 µg/ml MV; ▨, 100 µg/ml MD; ▨, 10 µM 4-NQO.

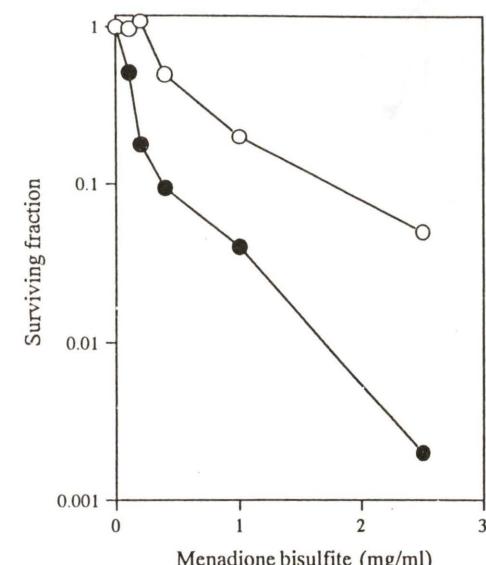


Fig. 2. Lethal effect of MD on *E. coli* GC4468 (wild-type) and TT7 (*soi-7::lacZ*). Exponentially growing cells of *E. coli* GC4468 (○) and TT7 (●) were collected, washed and resuspended in PBS. The cell suspensions were incubated with MD at 30°C for 60 min and then appropriately diluted and plated on LB plates. After incubation at 30°C for about 18 hr, the number of viable colonies was counted to estimate survival.

Table 2. Induction of the *soi-7*, *soi-9*, *soi-10* and *sodA* fusion genes by diamide and 1,10-phenanthroline under anaerobic conditions^a

Gene fusion	Fold increase in β-galactosidase activity	
	Diamide	1,10-Phenanthroline
<i>sodA::lacZ</i>	4.5	3.8
<i>soi-7::lacZ</i>	2.0	1.0
<i>soi-9::lacZ</i>	2.8	1.0
<i>soi-10::lacZ</i>	2.5	1.0

^a The cells of *E. coli* were grown anaerobically until the concentrations reached about 2×10^8 cells/ml and then treated with the agents at 37°C for 120 min under anaerobic conditions.

4-NQO as an oxidative stressor has been recently suggested (Nunoshiba and Demple, 1993). In the present experiments, the effect of 4-NQO on expression of the *soi::lacZ* fusions was examined. β-Galactosidase activity in *soi::lacZ* strains treated with 4-NQO was measured by using freshly prepared extracts. As shown in Fig. 1, when 4-NQO was added to cell suspensions at 10 µM, the specific

activity of β-galactosidase 3-4.4 fold increased under aerobic conditions, while no significant induction was observed under anaerobic conditions (data not shown).

2. Induction of the *soi::lacZ* fusion genes by diamide and 1,10-phenanthroline

It has been previously demonstrated that anaerobic electron sinks such as diamide, a thiol oxidant, elicit anaerobic biosynthesis of Mn-SOD (Privalle et al., 1993). Hence, we examined diamide-mediated induction of the *soi::lacZ* fusions. As shown in Table 2, these *soi::lacZ* fusions were induced by diamide under anaerobic conditions. 1,10-Phenanthroline is also known to induce Mn-SOD under anaerobic conditions by chelating Fe²⁺ (Moody and Hassan, 1984; Privalle et al., 1993). However, it did not affect the expression of the *soi::lacZ* fusions (Table 2).

3. Sensitivity of the *soi::lacZ* fusion strains to 4-NQO, MMS, MNNG and MD

The insertion of Mud (Ap, lac) phage into the *E. coli* chromosome is a mutational event. The sensitivity of the *soi::lacZ* fusion strains to the lethal effect

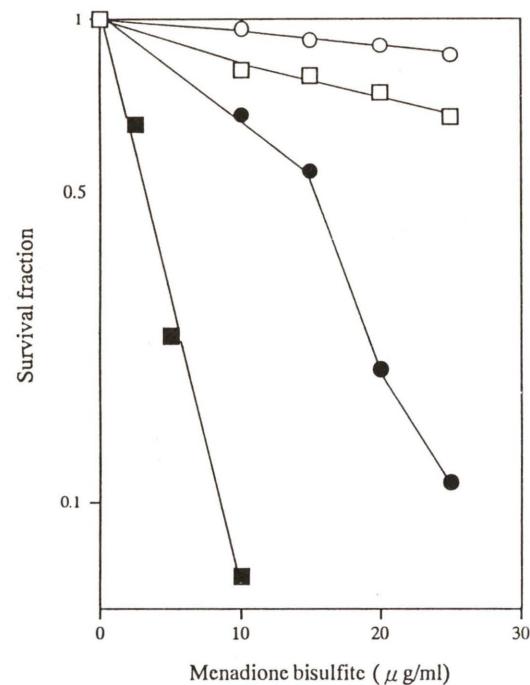


Fig. 3. Lethal effect of MD on *E. coli* cells. Over-night cultures of *E. coli* GC4468 (○), QM101 (■), QC772 (●) and KS262 (□) were appropriately diluted and plated on minimal agar plates containing MD at various concentrations. After incubation at 30°C for about 40 hr, the number of viable colonies was counted to estimate survival.

of superoxide-generating agents were examined. As shown in Fig. 2, the *soi-7* mutant strain was more sensitive to MD than wild-type strain when challenged in phosphate-buffered saline (PBS). The sensitivity of the *soi-10* mutants was also higher than that of wild-type strains (Fig. 3). Furthermore, the *soi-7*, *soi-9* and *soi-10* mutants showed higher sensitivity to 4-NQO than wild-type GC4468 (Table 3). On the other hand, these *soi* strains did not show increased sensitivity to non-oxidizing mutagens such as MMS and MNNG (Table 3). The *soi-10 sodA* double mutant are more sensitive to 4-NQO and MD than *soi-10* and *sodA* single mutants (Fig. 3 and Table 3).

Discussion

We have isolated several strains of *E. coli* that contain new superoxide-inducible fusion genes (*soi::lacZ*) (Mito *et al.*, 1993). P1 transduction and dot blot hybridization experiments revealed that these

Table 3. Sensitivities of the *sodA*, *soi-7*, *soi-9* and *soi-10* mutants to 4-NQO, MMS and MNNG.

Strain	Zone of growth inhibition (mm)		
	4-NQO	MMS	MNNG
GC4468	6	13	10
QC772	9	14	10
KS262	8	14	10
KS264	8	14	10
KS265	8	13	10
QM101	12	15	10

The solution (20 μ l) of 4-NQO (75 mM), MMS (88 mM) and MNNG (375 mM) was added to sterilized paper disks on the center of LB plates, followed by incubation for about 20 hr.

genes were classified into three groups, *soi-7*, *soi-9* and *soi-10* (Takemoto *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994). It was in particular interest to clarify the regulation of expression and physiological functions of the *soi* genes. The results in this study showed that three *soi* genes were induced by superoxide generators such as MV and MD under aerobic conditions (Fig. 1). The induction was under the control of the *soxRS* regulator genes (Mito *et al.*, 1993). Therefore, it is likely that an inducer for the *soi* gene expression is superoxide radical itself. The argument was supported by the fact that 4-NQO also induced the *soi* genes under aerobic conditions, because 4-NQO has been shown to be a superoxide generating agent (Nunoshiba and Demple, 1993).

The *soi* genes was also induced by diamide under anaerobic conditions (Table 2) as well as the *sodA* gene (Privalle *et al.*, 1993). Therefore, it is also possible that the *soi* genes respond to changes in the redox state in *E. coli* cells. The SoxR protein contain Fe-S cluster (Hidalgo and Demple, 1994), which sensitively responds to the redox state. 1,10-Phenanthroline induces the Mn-SOD by chelating Fe^{2+} in *E. coli* cells (Moody and Hassan, 1984). However, it did not affect the expression of the *soi* genes, suggesting that the *soi* genes are not negatively regulated by Fe^{2+} -containing repressor protein(s) proposed by Moody and Hassan (1984). Molecular mechanisms for the redox-controlled induction of certain genes are under investigation in our laboratory.

The generation of random operon fusions by Mu^d (Ap, lac) phage is a mutational event. Examining the sensitivity of the mutant cells with *soi::lacZ* fusion leads us to know whether or not the *soi* gene

products play a critical role in superoxide stress response and in protection against the oxidative damage. It is evident that the *soi* mutants are more sensitive to superoxide generators such as MV and MD (Mito *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994; Figs. 2 and 3). In addition, they also showed increased sensitivity to 4-NQO. On the other hand, they showed the same level of sensitivity to MMS and MNNG. Reactive oxygen species are not involved in the action of MMS and MNNG in *E. coli* cells. In conclusion, the results demonstrated that the gene products have an important role in protection against oxidative stress. To clarify the physiological functions of the *soi* gene products needs further experiments.

Acknowledgments

The authors express gratitude to Drs. D. Touati and B. Weiss for kindly supplying *E. coli* strains. This study was partly supported by grants from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan and from the Inamori Foundation.

References

- Carlioz, A. and D. Touati (1986) Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.*, **5**, 623–630.
- Casadavan, M. J. and S. N. Cohen (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: *In vivo* probe for transcriptional control sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4530–4533.
- Chan, E. and B. Weiss (1987) Endonuclease IV of *Escherichia coli* is induced by paraquat, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 3189–3193.
- Chou, J. H., J. T. Greenberg and B. Demple (1993) Post-transcriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: Positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus, *J. Bacteriol.*, **175**, 1026–1031.
- Demple, B. (1991) Regulation of bacterial oxidative stress genes, *Annu. Rev. Genet.*, **25**, 315–337.
- Farr, S. B. and T. Kogoma (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Microbiol. Rev.*, **55**, 561–585.
- Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals, *Science*, **201**, 875–880.
- Fridovich, I. (1989) Superoxide dismutases, *J. Biol. Chem.*, **264**, 7761–7764.
- Greenberg, J. T., P. Monach, J. H. Chou, P. D. Josephy and B. Demple (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 6181–6185.
- Hassan, H. M. and I. Fridovich (1979) Intracellular production of superoxide radical and hydrogen peroxide by redox active compounds, *Arch. Biochem. Biophys.*, **196**, 385–395.
- Hidalgo, E. and B. Demple (1994) An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein, *EMBO J.*, **13**, 138–146.
- Kogoma, T., S. B. Farr, K. M. Joyce and D. O. Natvig (1988) Isolation of gene fusions (*soi::lacZ*) inducible by oxidative stress in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 4799–4803.
- Liochev, S. I. and I. Fridovich (1992) Fumarate C, the stable fumarate of *Escherichia coli*, is controlled by the *soxRS* regulon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 5892–5896.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Mito, S., Q. M. Zhang and S. Yonei (1993) Isolation and characterization of *Escherichia coli* strains containing new gene fusions (*soi::lacZ*) inducible by superoxide radicals, *J. Bacteriol.*, **175**, 2645–2651.
- Moody, C. S. and H. M. Hassan (1984) Anaerobic biosynthesis of the manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **259**, 12821–12825.
- Nunoshiba, T. and B. Demple (1993) Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide, *Cancer Res.*, **53**, 3250–3252.
- Privalle, C. T., S. E. Kong and I. Fridovich (1993) Induction of manganese-containing superoxide dismutase in anaerobic *Escherichia coli* by diamide and 1,10-phenanthroline: Sites of transcriptional regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 2310–2314.
- Pryor, W. A. (1982) Free radical biology: xenobiotics, cancer, and aging, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **393**, 1–22.
- Ramotar, D. and B. Demple (1993) Enzymes that repair oxidative damage to DNA, In: B. Halliwell and O.I. Aruoma (Eds.), DNA and Free Radicals, Ellis Horwood, West Sussex, pp. 165–191.
- Rowly, D. L. and R. E. Wolf, Jr. (1991) Molecular characterization of the *Escherichia coli* K12 zwf gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase, *J. Bacteriol.*, **173**, 968–977.
- Takemoto, T., Q. M. Zhang and S. Yonei (1994) Isolation and characterization of new *soi* genes inducible by superoxide radicals in *Escherichia coli* K12, In: K. Asada and T. Yoshikawa (Eds.), Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine, Elsevier, Amsterdam, pp. 279–280.
- Touati, D. (1988) Transcriptional and posttranscriptional regulation of manganese superoxide dismutase biosynthesis in *Escherichia coli*, studied with operon and protein fusions, *J. Bacteriol.*, **170**, 2511–2520.
- Tsaneva, I. R. and B. Weiss (1990) SoxR, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-

- 12, *J. Bacteriol.*, **172**, 4197–4205.
 Walkup, K. B. and T. Kogoma (1989) *Escherichia coli* proteins inducible by oxidative stress mediated by the superoxide radical, *J. Bacteriol.*, **171**, 1476–1484.
 Wu, J. and B. Weiss (1991) Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **173**, 2864–2871.
 Wu, J. and B. Weiss (1992) Two-stage induction of the *soxRS* (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **174**, 3915–3920.

- Zhang, Q. M. and S. Yonei (1991) Induction of manganese superoxide dismutase by membrane-binding drugs in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **173**, 3488–3491.
 Zhang, Q. M., T. Takemoto and S. Yonei (1994) Molecular cloning and characterization of new members of the *soxRS* regulon in *Escherichia coli*. In: K. Asada and T. Yoshikawa (Eds.), *Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine*, Elsevier, Amsterdam, pp. 281–282.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 403–408 (1995)

ラット肝細胞における細胞情報伝達系への放射線影響について Radiation effect on signal transduction in rat hepatocytes

中島徹夫, 湯川修身
Tetsuo Nakajima and Osami Yukawa

放射線医学総合研究所生物研究部
263 千葉市稲毛区穴川 4-9-1

Division of Biology, Natl. Inst. Radiat. Sci., 9-1, Anagawa-4-chome, Inage-ku, Chiba-shi 263, Japan

(受付: 1994年9月14日; 受理: 1994年11月29日)

Summary

Active oxygens produced by irradiation induced lipid peroxidation of biological membranes and simultaneously damaged to functions of the membranes. In this study, we investigated effects of radiation on Ca^{2+} signaling in rat hepatocytes. IP_3 -induced Ca^{2+} release in rat liver microsomes was inhibited by irradiation. On the other hand, the Ca^{2+} loading capacity of rat liver microsomes showed no change after irradiation. These results indicated that radiation influenced the regulation of Ca^{2+} signaling. To develop the study of effect of radiation on Ca^{2+} signaling in rat liver, we used cultured rat hepatocytes. Radiation induced lipid peroxidation in cultured rat hepatocytes as well as in rat liver microsome and suppressed an increase in an accumulation of Ca^{2+} incorporated into the hepatocytes in the presence of ATP, glucagon or both of them. However, no effect of radiation was observed in the absence of these Ca^{2+} mediators. Functions of these mediators are thought to be coupled with phospholipase C system, suggesting that phospholipase C in hepatocytes plasma membranes is affected by irradiation. In fact, the IP_3 productivity in hepatocytes decreased after irradiation. Particularly, an increase of IP_3 productivity in the presence of both ATP and glucagon was greatly inhibited. In addition, we have studied radiation effects on Protein Kinase C (PKC) activity, which have much relationship to Ca^{2+} signaling. PKC in the hepatocytes was activated by irradiation and it was suggested that the activation was due to translocation of this enzyme from cytosol to membranes. Although the mechanism of PKC activation by irradiation is unclear, the activation might be induced by changes in not only Ca^{2+} signaling but the composition of phospholipids in rat hepatocytes.

Keywords: radiation, rat hepatocytes, lipid peroxidation, signal transduction, Ca^{2+} signaling

緒 言

放射線照射により生ずる活性酸素・フリーラジカルが生体内で種々の構成成分（核酸、タンパク質、脂質）に作用し、放射線障害が生じることが明らかにされている（Leyko, 1986）。我々はこれまで生体内構成成分のなかでも活性酸素・フリーラジカルによって酸化され易い生体膜への影響を解析してきた。ラット小胞体膜において、放射線照射により生ずる生体膜脂質の脂質過酸化反応により小胞体膜における薬物代謝酵素系が失活されることなどを報告してきた（Yukawa, 1980,

1983）。生体膜は様々な機能を有しており、中でも生体機能維持、増殖、分化等に非常に重要な細胞情報伝達系の主要な場となっている。放射線による生体膜への影響が細胞情報伝達系にまで及んでいれば、それは各々の細胞レベルへの影響にとどまらず広く細胞社会・組織・個体にまで影響がおよぶことが考えられる。今回、我々は細胞情報伝達系の中でも特に Ca^{2+} 関連の情報伝達系を中心に、ラット肝、ラット初代培養肝細胞を用いて放射線影響を解析した。

実験材料および方法

1. ラット小胞体画分と初代培養肝細胞の調製

ラットは3箇月齢のWistarラットを用いラット小胞体膜画分を超遠心法により調製した。肝細胞はラットからコラゲナーゼ還流法により単離調製し(生残率85%以上)その後5%牛胎児血清、 10^{-7} Mインシュリン、 10^{-7} Mデキサメザンを含むDME(ダルベッコ変法イーグル)培地で3時間培養、無血清の培地にかえてさらに21時間の培養の後実験に使用した。(Seglen, 1976; Tanaka, 1978)

2. 放射線照射

X線発生装置は島津製作所信愛-250(200kV, 20mA, フィルター0.5mm Cuと0.5mm Al)を用いて線量率0.81Gy/minで行った。 γ 線照射は ^{60}Co を用いて線量率70Gy/minで行った。

3. 過酸化脂質の測定

過酸化脂質の測定はHunter等(Hunter, 1963)の方法を用いて行った。培養1日後の肝細胞を0.15M KCl, 10mM Tris-HCl(pH 7.5)の緩衝液で3回洗浄し培養皿から細胞を集めて 2×10^5 cells/mlになるように上記緩衝液で調製し、放射線照射を行った。照射後細胞調製液2mlに0.5mlの40%TCA, 0.25mlの5N HCl及び0.5mlのチオバルビタール酸ナトリウム(TBA)を加えて攪拌した後100°C, 15分間処理をし、流水で常温にした後、3000 rpm 15分遠心して得られた上清の535nm-600nmの吸光度を測定し脂質過酸化の最終産物であるマロンアルデヒド(MDA)を定量した。照射は $^{60}\text{Co}-\gamma$ 線源を用いて行った。

4. タンパク質定量

タンパク量はLowry法により測定した(Lowry, 1951)。

5. Ca^{2+} 貯蔵能とIP₃依存性 Ca^{2+} 放出量の測定

調製した小胞体膜画分を Ca^{2+} load緩衝液[0.15M KCl, 10mM Tris-HCl(pH 7.5), 4mM MgCl₂, 0.2mM EGTA, 0.15mM CaCl₂($^{45}\text{Ca}^{2+}$ 4

Ci/mol), 1mM ATP]で 2.5 mg/ml の濃度になるよう希釈し、37°Cで1時間処理して小胞体膜内に Ca^{2+} を貯蔵させ、その後氷中に移し Ca^{2+} 貯蔵を終了させた。 Ca^{2+} をloadした小胞体膜は氷上でX線照射(50Gy)をし、ただちに実験に使用した。20 μl の小胞体膜を170 μl の Ca^{2+} load緩衝液で希釈して37°Cで前処理し、10 μl の反応液[200 μM IP₃, 200 μM A23187, 0.15M KCl, 10mM Tris-HCl]を加えて、 Ca^{2+} 放出反応及び Ca^{2+} 貯蔵能の測定を開始した。IP₃による Ca^{2+} 放出反応は30秒、A23187による Ca^{2+} 貯蔵能測定は1時間とした。そして、反応後ただちにガラスフィルター(GF/F)でろ過して洗浄用緩衝液(5mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.15M KCl, 10mM Tris-HCl)で洗浄後、液体シンチレーションカウンターで測定した。

6. 肝細胞における細胞外 Ca^{2+} の取り込み量の測定

1日培養後の肝細胞を0.15M KCl, 10mM Tris-HCl緩衝液で洗浄後、ラバーポリスマンで細胞をかきとり、上記緩衝液で 2.5×10^5 cells/mlの濃度にして γ 線照射(50Gy)を行い、ただちに実験に使用した。肝細胞浮遊液500 μl にたいして、反応液(0.15M KCl, 10mM Tris-HCl, 4mM MgCl₂, 0.2mM CaCl₂($^{45}\text{Ca}^{2+}$ 40Ci/mol)を含む溶液に1mM ATP, 100 μM のフェニルエフリン、あるいは1 μM のグルカゴンを添加したもの)500 μl を加えて反応を開始した。37°C, 15分の反応のうち10mMのLaCl₃の入ったHepes緩衝液100 μl を加えて反応を止め、ただちにGF/Cフィルターでろ過し1mM LaCl₃の入ったHepes緩衝液で2回洗浄した後、1mM EGTAを添加したHepes緩衝液で1回洗浄し、液体シンチレーションカウンターで測定した。

7. Inositol 1,4,5-trisphosphate [IP₃]生成量の測定

1日培養後の肝細胞を0.15M KCl, 10mM Tris-HCl緩衝液で洗浄しラバーポリスマンでかきとり、 0.7×10^7 cells/mlの濃度にして γ 線照射(50Gy)を行い、ただちに実験に使用した。肝細胞浮遊液500 μl にたいして反応液50 μl を加えて反応

を開始(最終濃度ATP 0.5mM, グルカゴン0.5 μM)し1分間反応の後110 μl の20%過塩素酸を加えて20分氷中において。その後、3000 rpm, 15分の遠心によりタンパク質を除いた。遠心後の上清400 μl を1.5M KOHで中和後、アマシャム社のIP₃アッセイシステムを用いてIP₃の生成量の測定を行った。

8. Protein kinase Cの活性測定

1日培養後の肝細胞をディッシュ上で γ 線照射(50Gy)し、さらに30分間培養の後、緩衝液(0.15M KCl, 10mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 0.5mM EGTA)で2回洗浄後、0.1mg/mlのロイベプチノンを含んだ上記緩衝液中で肝細胞を採取した。得られた肝細胞をホモジナイズ後超遠心(100,000g, 1時間)し、上清を細胞質可溶性画分として、沈殿は再度緩衝液中でホモジナイズした後に膜画分として実験に使用した。Protein kinase Cの活性測定はアマシャム社のProtein kinase Cアッセイシステムを用いて測定した。本システムはPKCを Ca^{2+} , PS(ホスファチジルセリン)存在下、ホルボールエステルを用いて活性化させて測定するものである。

結 果

1. 肝細胞における生体膜の脂質過酸化

これまで生体膜に対する放射線障害を肝臓から直接採取した種々の生体膜を用いて、生体膜脂質の過酸化と生体膜機能の損傷との関連から解析してきた。これらの結果を生体内に近い状態の解析に発展させるために、細胞情報伝達系への放射線影響を解析していく上で有用な系となりうる初代培養肝細胞においても放射線により脂質過酸化が生じているかどうかを調べた。Fig. 1に示すようにラットから採取し培養を行った後の初代培養肝細胞においても脂質過酸化が生じていること、照射線量の増加に伴って脂質過酸化も増加していくことが明らかになった。

2. ラット肝小胞体画分における Ca^{2+} シグナリング系への放射線影響

細胞内 Ca^{2+} シグナリング系において主要な役

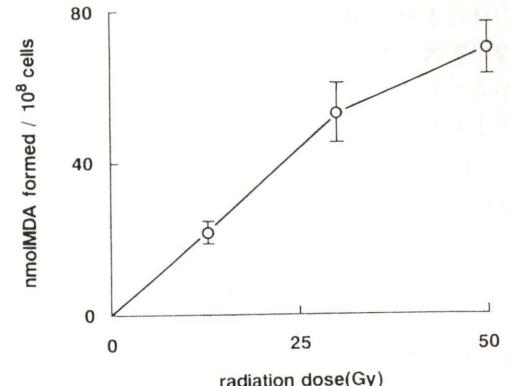


Fig. 1. Radiation-induced lipid peroxidation in cultured rat hepatocytes. Each point is the mean \pm S.E.M. from four experiments.

Table 1. Radiation effect on Ca^{2+} loading capacity in rat liver microsome. Each value is the mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

	Control	50 Gy
nmol/mg protein	1.10 \pm 0.22	1.21 \pm 0.30

Table 2. Radiation effect on IP₃-induced Ca^{2+} release in rat liver microsome. Each value is the mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

	Control	50 Gy
Released Ca^{2+} amount (nmol/mg protein/30 sec)	0.58 \pm 0.08	0.16 \pm 0.03*

* p < 0.01

割を果たすのは小胞体膜である。小胞体膜はその中に Ca^{2+} を蓄えたり Ca^{2+} 制御因子のシグナルに応じて Ca^{2+} の放出を行い、細胞内 Ca^{2+} の濃度調節、ひいては細胞の正常な生理機能を制御する(Marshall, 1993)。そこで、ラット肝から採取した小胞体膜画分における Ca^{2+} の貯蔵能および細胞内 Ca^{2+} の制御因子の一つであるIP₃への小胞体の応答反応への放射線影響を調べた。小胞体膜画分を $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を用いて、ATP存在下でインキュベートして Ca^{2+} を貯蔵させその貯蔵能のX線照射による変化を調べた。Table 1に示すように放射線照射後も Ca^{2+} の貯蔵能には変化は見られなかった。このことから、放射線照射により Ca^{2+} の貯蔵が阻害されたり、障害により貯蔵 Ca^{2+} が漏れ出たりすることはないと考えられる。次に小

胞体における IP_3 依存性の Ca^{2+} 放出に対する X 線の影響を見た。 IP_3 により誘起される小胞体膜からの Ca^{2+} の放出量を測定すると、放射線照射により Ca^{2+} の放出量は対照群の半分以下になった (Table 2)。このことから細胞内での Ca^{2+} の濃度の調節が正常に機能しなくなっていることが明らかになった。次に細胞レベルで Ca^{2+} シグナリング系への放射線影響を解析した。

3. 肝細胞における細胞外からの Ca^{2+} の取り込み量における放射線影響

肝細胞においては種々の影響因子が作用することで細胞内外での Ca^{2+} に変動が起き、それが次の生理機能を制御することが考えられている (Bygrave, 1993; Charest, 1985; Mine, 1993)。細胞内での Ca^{2+} の制御が放射線により障害を受けていることから、細胞膜を介しての Ca^{2+} の出入りにも変化が生じている可能性がある。そこで、 Ca^{2+} 取り込みの刺激因子を添加した際の細胞外からの $^{45}Ca^{2+}$ の取り込み量を対照群と比較した。刺激因子をなにも添加しない時、また因子としてフェニルエフリンを加えた時には反応後細胞内に取り込まれている $^{45}Ca^{2+}$ の量に変化は見られなかっ。しかし、ATP やグルカゴンを加えた際には対照群に比べて照射群では取り込まれた $^{45}Ca^{2+}$ 量が減少し、二つの刺激因子を加えた際にはその差が顕著になっていた (Table 3)。

4. 肝細胞における IP_3 生成への放射線影響

Ca^{2+} の動きの変動を指標に放射線影響を見てきたが、次にその Ca^{2+} の動きを制御している細胞内 Ca^{2+} 制御因子に対する放射線影響を解析した。細胞外からの刺激因子に対する応答反応として細胞内で種々の情報伝達因子が生成され、それが次の細胞機能への伝達を果たしている。 Ca^{2+} への伝令を果たす情報伝達因子の一つに IP_3 がある (Berridge, 1993)、刺激因子に対する細胞外 $^{45}Ca^{2+}$ の取り込み量の差は放射線による IP_3 生成の障害に由来する情報伝達障害の結果である可能性がある。そこで Ca^{2+} の取り込み量に差が見られた刺激因子について IP_3 の生成量に対する放射線の効果を解析した。その結果、ATP、グルカゴ

Table 3. Radiation effect on Ca^{2+} flux in cultured rat hepatocytes. Each value is the mean of independent experiments \pm S.E.M. ($n=3-6$)

Incorporated Ca^{2+} radioactivity in rat hepatocytes (10^5 cpm/ 10^5 cells/15 min)	
	Control 50 Gy
Non mediator	1.61 \pm 0.09
Glucagon	1.77 \pm 0.18
ATP	1.90 \pm 0.15
Glucagon + ATP	2.40 \pm 0.09
	1.77 \pm 0.12*

* $p < 0.05$

Table 4. Radiation effect on IP_3 productivity in cultured rat hepatocytes. Each value is the mean of independent experiments \pm S.E.M. ($n=3-6$)

IP_3 productivity (pmoles/min/ 10^6 cells)	
	Control 50 Gy
Non mediator	0.60 \pm 0.31
ATP	4.45 \pm 1.55
Glucagon + ATP	18.63 \pm 3.77
	7.86 \pm 1.70*

* $p < 0.05$

ンをそれぞれ単独で加えた際にはあまり差はみられなかったが、二つの刺激因子を共存させた時に生じる IP_3 の顕著な増加が放射線照射群では強く抑制されていた (Table 4)。このことから肝細胞における Ca^{2+} シグナリング系は、放射線照射により刺激因子に対する応答の段階で情報伝達因子の生成が抑制されて正常に機能しなくなることが示唆された。

以上、 IP_3 に関する一連の Ca^{2+} 情報伝達系への放射線影響を解析したが、いずれの段階（小胞体、細胞膜、情報伝達因子）でも放射線影響が生じることが明らかになった。このような Ca^{2+} 情報伝達の障害はその情報伝達の結果である細胞機能発現にも影響を与えていていると考えられる。そこで次に細胞内の機能発現に重要な酵素であり、 Ca^{2+} 依存性、また脂質依存性でもある Protein kinase C (PKC) (Nishizuka, 1986) の活性についてその放射線影響を調べた。

Table 5. Radiation effect on Protein Kinase C activity in cultured rat hepatocytes. Each value is the mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

PKC activity (pmoles/min/mg)	
Cytosol fraction	Membrane fraction
Control 113.90 \pm 7.97	6.78 \pm 0.44
50 Gy 95.67 \pm 8.29	12.49 \pm 2.45*

* $p < 0.05$

5. PKC の活性に対する放射線効果

肝細胞を γ 線照射してさらに 30 分間培養後、細胞質可溶性画分と膜画分に分けてその各々での PKC 活性を測定した。細胞質画分では PKC 活性の減少傾向が観察され膜画分においては PKC 活性の上昇が見られた (Table 5)。

考 察

放射線の細胞情報伝達系への影響はいくつか報告されている。中には、低線量域で PKC の mRNA 量の上昇が誘起された報告もある (Woloschak, 1990)。しかし、それらは使用された細胞種によって放射線影響が別々の様式で現われてくることを示していた (Hallahan, 1994)。今回使用した初代培養肝細胞はより生体内の生理条件を維持していて、臓器の放射線影響を調べる上で非常に有用な系である。さらに、この培養系では 50 Gy の放射線照射後の細胞の生存率において、対照群との間に差がみられない。しかしこのような細胞においても実際には放射線障害が細胞機能に生じていることが明かとなった。特に今回は IP_3 関連の Ca^{2+} シグナリングの異常がみとめられ、それが細胞外からのシグナルに応ずる機能であることから多種細胞の混合臓器である肝臓における放射線影響を知るうえで重要な結果となった。今回、我々は 50 Gy というやや高い線量で Ca^{2+} シグナリング系や PKC の活性変動を測定した。この線量域での影響は低い線量域での影響とは異なる可能性もあり、線量依存性や線量率依存性は現在検討中である。

今回示した Protein kinase C (PKC) の放射線による活性化がどのような機構によって生じるのかは明らかではない。PKC は Ca^{2+} 依存性酵素であ

ることから細胞内 Ca^{2+} の変動により生じているのかもしれない。また放射線照射により Phosphatidylcholine (PC) の減少が観察されたことから (未発表データ)， PC から生成される脂質因子を介して脂質依存性でもある PKC を活性化している可能性もある (Nakamura, 1994)。一方で、活性酸素生成系で単離肝細胞処理すると膜画分での PKC の増加がみられたことが報告されている (von Ruecker, 1989)。放射線による PKC の活性化も活性酸素生成を介して同様の機構で生じていることも考えられる。現在、PKC の活性化の機構を酵素の膜移行の観点から解析中である。

参考文献

- Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling, *Nature*, **361**, 315–325.
- Bygrave, F. L. et al. (1993) Evidence that stimulation of plasma-membrane Ca^{2+} inflow is an early action of glucagon and dibutyryl cyclic AMP in rat hepatocytes, *Biochem. J.*, **292**, 19–22.
- Charest, R., P. F. Blackmore, and J. H. Exton (1985) Characterization of responses of isolated rat hepatocytes to ATP and ADP, *J. Biol. Chem.*, **260**, 15789–15794.
- Hallahan, D. E. et al. (1994) The Role of Intracellular Calcium in the Cellular Response to Ionizing Radiation, *Radiat. Res.*, **138**, 392–400.
- Hunter, F. E. Jr., J. M. Gebicki, P. E. Hoffsten, J. Weinstein and T. Scott (1963) Swelling and Lysis of Rat Liver Mitochondria Induced by Ferrous Ions, *J. Biol. Chem.*, **238**, 828–835.
- Leyko, W. and G. Bartoz (1986) Membrane effects of ionizing radiation and hyperthermia, *Int. J. Radiat. Biol.*, **49**, 743–770.
- Lowry, O. H. et al. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Marshall, I. C. B. and C. W. Taylor (1993) Biphasic effects of cytosolic Ca^{2+} on Ins(1,4,5)P₃-stimulated Ca^{2+} mobilization in hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, **268**, 13214–13220.
- Mine, T., I. Kojima and E. Ogata (1993) Role of Calcium fluxes in the action of glucagon on glucose metabolism in rat hepatocytes, *Am. J. Physiol.*, **265**, G35–G42.
- Nakamura, S. and Y. Nishizuka (1994) Lipid Mediators and Protein Kinase C Activation for the Intracellular Signaling Network, *J. Biochem.*, **115**, 1029–1034.
- Nishizuka, Y. (1986) Studies and prospectives of protein kinase C, *Science*, **233**, 305–312.
- Seglen, P. O. (1976) Preparation of isolated liver cells, *Methods Cell Biol.*, **13**, 29–83.
- Tanaka, K. et al. (1978) Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats,

- J. Biochem.*, **84**, 937–946.
 von Ruecker, A. A. et al. (1989) Protein kinase C involvement in lipid peroxidation and membrane damage induced by oxygen based radicals in hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 836–842.
 Yukawa, O. and T. Nakazawa (1980) Radiation-induced lipid peroxidation and membrane-bound enzymes in liver microsomes, *Int. J. Radiat. Biol.*, **37**, 621–631.

- Yukawa, O., S. Nagatsuka and T. Nakazawa (1983) Reconstitution studies on the involvement of radiation-induced lipid peroxidation in damage to membrane enzymes, *Int. J. Radiat. Biol.*, **43**, 391–398.
 Woloschak, G. E., Chin-Mei Chang-Liu and Pocahontas Shearin-Jones (1990) Regulation of Protein Kinase C by Ionizing Radiation, *Cancer Res.*, **50**, 3963–3967.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 409–415 (1995)

活性酸素による突然変異のスペクトル

Mutational spectrum by active oxygen species in the *supF* gene of *Escherichia coli*

赤阪 進¹, 山本和生²

Susumu Akasaka¹ and Kazuo Yamamoto²

¹大阪府立公衆衛生研究所 537 大阪市東成区中道一丁目

²東北大学理学部生物学教室, 980-77 仙台市青葉区荒巻

¹Osaka Prefectural Institute of Public Health, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537, Japan

²Biological Institute, Faculty of Science, Tohoku University, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-77, Japan

(受付: 1994年9月14日; 受理 1994年11月29日)

Summary

To establish the spectrum of mutagenesis by active oxygen species, we have utilized the *supF* gene in plasmid pZ189. The DNA was treated with hydrogen peroxide and Fe^{3+} /EDTA complex, NADPH-dependent lipid peroxidation system or Fe^{2+} /EDTA complex and was propagated in *E. coli* host cells that had been induced for SOS functions. The mutation frequencies increased by 30, 12 and 20-fold, respectively, over background levels. Sequence analysis of 82 independent *supF* mutants by hydrogen peroxide + Fe^{3+} /EDTA revealed that 85% of the mutants contained base substitutions, with G : C → C : G (40% of base substitutions) and G : C → T : A (37%) transversions predominating. Fifty-four of 8-hydroxydeoxyguanosine(8-ohdG)/10⁵ deoxyguanosine were generated in the plasmid DNA incubated with hydrogen peroxide. By lipid peroxidation, 47 (87%) of 54 mutants were base substitutions and 32% and 26% of that were G : C → C : G and G : C → T : A transversions. Formation of 8-ohdG was hardly detected in the DNA treated with lipid peroxidation. Fe^{2+} /EDTA induced predominantly G : C → C : G (45% of base substitutions) transversion and G : C → A : T (23%) transition. The results suggest that the origins of G : C → C : G and G : C → T : A transversions may be as yet unidentified lesions generated by active oxygen species.

Keywords: mutational spectrum, pZ189, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, ferrrous ion

緒 言

活性酸素 (superoxide, hydrogen peroxide) は塩基修飾を引き起こし、その結果複製時に間違ったヌクレオチドを取り込み、突然変異を起こす。 *in vitro* での、活性酸素による DNA の塩基修飾の分析の結果 (Aruoma et al., 1989) や種々の酵素による複製の研究 (Shibutani et al., 1991), あるいは *in vivo* での大腸菌の DNA 修復酵素欠損株による研究 (Cabrena et al., 1988; Bessho et al., 1992) の結果は、8-hydroxydeoxyguanosine (8-ohdG) が活性酸素による突然変異に寄与する主

要な損傷であることを示した。

生体内の活性酸素による DNA 損傷生成には 2 つの経路が考えられる。1つは hydrogen peroxide を経てヒドロキシラジカルが直接 DNA を攻撃する経路であり、もう 1 つは脂質過酸化を経由し反応生成物が DNA に作用する間接的な経路である。反応生成物には alkane 類や alkene 類、あるいは aldehyde, epoxide, carboxy, hydroperoxy 化合物が含まれており、これらの幾つかは DNA に直接作用すること (Segerback, 1983; Summerfield and Tappel, 1983), 変異原性を持つこと (Mukai

and Goldstein, 1976; Marnett *et al.*, 1985; Basu and Marnett, 1984; Benamira and Marnett, 1992) が示されている。

活性酸素による突然変異を塩基配列レベルで調べることは、変異の分子的機構を追求する手段になるだけではなく、紫外線や電離放射線、酸化性化学物質などの環境変異原の作用機構を知る手がかりになると考へられる。活性酸素による突然変異スペクトルを完成させるために、我々はシャトルベクター pZ189 の *supF* 遺伝子を用いてフォワード変異を検出するための方法を改良した (Akasaka *et al.*, 1992)。この方法を用いて、*Escherichia coli* 内での *supF* 遺伝子の自然突然変異頻度が 1 複製当たり 3.06×10^{-7} であることを示した。すなわち、これまでの方法に比べ変異頻度が 10^{-3} 低い場合でも、*in vitro* での突然変異を検出することが可能になった。

我々は活性酸素による突然変異の機構を知るために hydrogen peroxide + Fe³⁺-EDTA (Aruoma *et al.*, 1989) と Fe²⁺-EDTA (McBride *et al.*, 1991) のヒドロキシラジカル生成系、および肝ミクロソーム NADPH 依存性脂質過酸化系 (Akasaka, 1986) を用いて、pZ189 の *supF* 遺伝子の突然変異スペクトルをもとめた。脂質過酸化系ではヒドロキシラジカルの影響を除くために反応を Tris 緩衝液中でおこなった。

材料及び方法

1. 菌株とプラスミド

E. coli K12 株の KS40 (*lacZam*) と DL16 (*recA*)、プラスミド pKY241 は先に述べた通りである (Akasaka *et al.*, 1992)。ベクター pZ189 はチロシンのアンバーサプレッサー tRNA (*supF*) 遺伝子を持っている (Seidman *et al.*, 1985)。

2. 試薬

NADPH-cytochrome P-450 reductase, cytochrome P-450 および脂質をラット肝臓のミクロソームから抽出、精製した (Akasaka, 1986)。

3. DNA の処理

Hydrogen peroxide: Aruoma *et al.* (1989) の方

法に準じておこなった。プラスミド pZ189 (5 µg/100 µl) を 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 100 µM EDTA, 25 µM FeCl₃, 9 mM H₂O₂ を含む反応液中で 37°C, 30 分間処理した。反応液を Sephadex G50 のスパンカラム (Sambrook *et al.*, 1989) に通すことによって反応を停止させた。溶離液中の DNA はエタノール沈澱によって回収した (Akasaka and Yamamoto, 1994a)。

脂質過酸化: プラスミド pZ189 (5 µg/100 µl) を 100 µl の NADPH 依存性脂質過酸化反応液中 37°C で処理した (Akasaka, 1986)。反応液は 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) に 100 µmol lipid/ml のリポソーム (NADPH-cytochrome P-450 reductase, 0.05 U/µmol lipid; cytochrome P-450, 0.25 nmol/µmol lipid), 5 mM NADPH, 50 µM EDTA, 50 µM FeCl₃ を加えたものをもちいた。2 時間処理後 0.1% 8-hydroxyquinoline を含む TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) 鮫和 phenol を 100 µl 加え反応停止した。脂質過酸化反応は thiobarbituric acid 反応性物質 (TBARS) 測定によって調べた (Kornbrust and Mavis, 1980)。

Ferrous イオン: プラスミド pZ189 (5 µg/100 µl) を 100 µl の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 125 µM FeSO₄, 500 µM EDTA を含む反応液中で 37°C, 30 分間処理した。反応液を Sephadex G50 のスパンカラムに通すことによって反応を停止させた。

4. 処理 pZ189 DNA の導入及び突然変異の解析

pZ189 DNA の導入法については先に述べた通りである (Akasaka and Yamamoto, 1994a)。SOS を誘導した KS40 を CaCl₂ 処理によってコンピメント細胞にし、これに処理した pZ189 DNA を導入した。一晩 LB 培地中でインキュベイトした後、大腸菌から複製した pZ189 を抽出した。

抽出した pZ189 を再度、プラスミド pKY241 を既に導入している KS40 (KS40/pKY241) に導入し、LB 寒天培地 (30 µg/ml chloramphenicol, 150 µg/ml ampicillin, 50 µg/ml nalidixic acid, 80 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactoside (X-Gal), 15 µM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) を添加) 上にまいた。supF 突然変異 pZ

Table 1. Mutation frequency of *supF* gene in pZ189 treated with hydrogen peroxide + Fe³⁺-EDTA, lipid peroxidation and Fe²⁺-EDTA.

Treatments	Mutation frequency (x 10 ⁻⁷)	8-ohdG/10 ⁵ dG
0 mM H ₂ O ₂ + Fe ³⁺ -EDTA ^{a)}	1.6	8.0
9 mM H ₂ O ₂ + Fe ³⁺ -EDTA ^{a)}	47	64
0 µmol/ml liposome ^{b)}	11	2.6
100 µmol/ml liposome ^{b)}	130	1.5
no addition ^{c)}	3.0	- e)
Fe ²⁺ -EDTA ^{d)}	62	- e)

a) incubated with 25 µM FeCl₃ and 100 µM EDTA in 100 mM phosphate buffer at 37°C for 30 min.

b) incubated with 50 µM FeCl₃, 50 µM EDTA and 5 mM NADPH in 50 mM Tris-HCl at 37°C for 2 hr.

c) incubated in 100 mM phosphate buffer at 37°C for 30 min.

d) incubated with 125 µM FeSO₄ and 500 µM EDTA in 100 mM phosphate buffer at 37°C for 30 min.

e) not determined.

189 を持つ大腸菌は nalidixic acid 抵抗性で白色のコロニーとして選択できる。このコロニーからプラスミドを抽出し DL16 に導入し lactose-MacConkey 寒天培地で白色のコロニーをつくることを確認した (Akasaka *et al.*, 1992)。突然変異選択用プレート 1 枚につき 1 個の突然変異コロニーからプラスミド pZ189 を抽出し、pBR322 の EcoRI プライマーを用い dideoxy 法 (Sanger *et al.*, 1977) によって *supF* 遺伝子の塩基配列を求めた。シークエンスには Sequenese Kit (US Biochemical Co.) あるいは AutoRead™ Sequencing Kit (Pharmacia Co.) を用いた。

結 果

1. 突然変異頻度

プラスミド pZ189 を hydrogen peroxide + FeCl₃-EDTA, 脂質過酸化, FeSO₄-EDTA 処理し、SOS を誘導した大腸菌 KS40 に導入して固定、KS40/pKY241 に導入して *supF* 変異を選択した。この系の自然突然変異頻度は 3×10^{-7} である (Akasaka *et al.*, 1992)。

Hydrogen peroxide + Fe³⁺-EDTA では H₂O₂ 濃度 0 mM から 9 mM までほぼ直線的に增加了 (Table 1, Akasaka and Yamamoto, 1994a)。8-hydroxydeoxyguanosine (8-ohdG) は 8.0/10⁵ deox-

guanosine (dG) から 64/10⁵ dG にまで增加了。1500 dGあたり 1 個の 8-ohdG が出来ていたことになり、変異原性の DNA 損傷はヒドロキシラジカルによるものであることを示していると考えられる。

リポソームによる NADPH 依存性脂質過酸化では、10 µmol lipid/ml を反応液に加えると 300 nmol/ml の thiobarbituric acid 反応性物質 (TBARS) が生成した。この反応液中に加えたプラスミドの変異頻度は約 12 倍增加了 (Table 1, Akasaka and Yamamoto, 1994b)。8-ohdG の生成は見られず、ヒドロキシラジカル以外の脂質過酸化生成物が突然変異に関与していると考えられる。一方、リポソームを加えないときの変異頻度は 1.1×10^{-6} であった。このことは、NADPH + Fe³⁺-EDTA だけでも変異原性をもつ DNA 損傷を引き起こしていると考えられる。

Fe²⁺-EDTA による変異頻度も濃度に応じて増加し、125 µM FeSO₄-500 µM EDTA で約 20 倍の增加であった (Table 1)。

2. 突然変異スペクトル

9 mM hydrogen peroxide + Fe³⁺-EDTA, 10 µmol lipid/ml 脂質過酸化, 125 µM Fe²⁺-500 µM EDTA 処理による独立した *supF* 変異プラスミド

Table 2. Distribution of hydrogen peroxide-induced, lipid peroxidation-induced and ferrous ion-induced *supF* mutants by class.

Class of change	% of total mutants examined		
	Hydrogen peroxide*	Lipid peroxidation*	Fe ²⁺ -EDTA*
Base substitution	85.4	87.0	78.3
Insertion sequence	4.9	0.0	0.0
Deletion	4.9	0.0	10.0
Single-base frameshift	4.9	13.0	11.7
Number of Total mutants	82	54	60

*; Treated plasmid was propagated in *Escherichia coli* host cell that had been induced for SOS functions.

Table 3. Types of base substitution among hydrogen peroxide-induced, lipid peroxidation-induced and ferrous ion-induced *supF* mutants.

Type of mutation	% of total mutants examined		
	Hydrogen peroxide*	Lipid peroxidation*	Fe ²⁺ -EDTA*
Transition			
G:C>A:T	12.9	19.1	23.4
A:T>G:C	4.3	10.6	6.4
Total	17.2	29.8	29.8
Transversion			
G:C>T:A	37.1	25.5	10.6
G:C>C:G	40.0	31.9	44.7
A:T>T:A	4.3	10.6	10.6
A:T>C:G	1.4	2.1	4.3
Total	82.8	70.2	70.2

*; Treated plasmid was propagated in *Escherichia coli* host cell that had been induced for SOS functions.

を、それぞれ 82, 54, 60 個分離し、塩基配列を調べた。変化のクラスを Table 2 に、塩基置換のタイプを Table 3 に、塩基置換と 1 塩基フレームシフトのスペクトルを Fig. 1 に示した。

それぞれの処理による変異のほとんどは (85, 87, 78%) 1 塩基置換であった (Table 2)。-1 塩基フレームシフトのほとんどは 172-176 番の 5 個連続した G:C 塩基対間の欠失であった。連続した G:C に生じた損傷が、局所的な配列の乱れを引き起こしたためだろう (Streisinger *et al.*, 1966)。

1 塩基置換のほとんどは、G:C 塩基対で生じていた (H_2O_2 90%, 脂質過酸化 77%, Fe^{2+} -EDTA 79%; Table 3)。Hydrogen peroxide では、

77% が G:C でのトランスバージョン変異で、T:A あるいは C:G への変化が同程度生じていた。脂質過酸化では 57%, Fe^{2+} -EDTA では 55% が G:C のトランスバージョンだった。この内 G:C→C:G はすべて全体の 40% 程度だった。

変異は *supF* 遺伝子の多くの部位に生じていたが (Fig. 1), 大半 (H_2O_2 70%, 脂質過酸化 57%, Fe^{2+} -EDTA 60%) は 133 (tRNA のアンチコドン部) と 156~160, 168~172 で生じていた。これらは、自然突然変異の場合と同様だった (Akasaka *et al.*, 1991)。

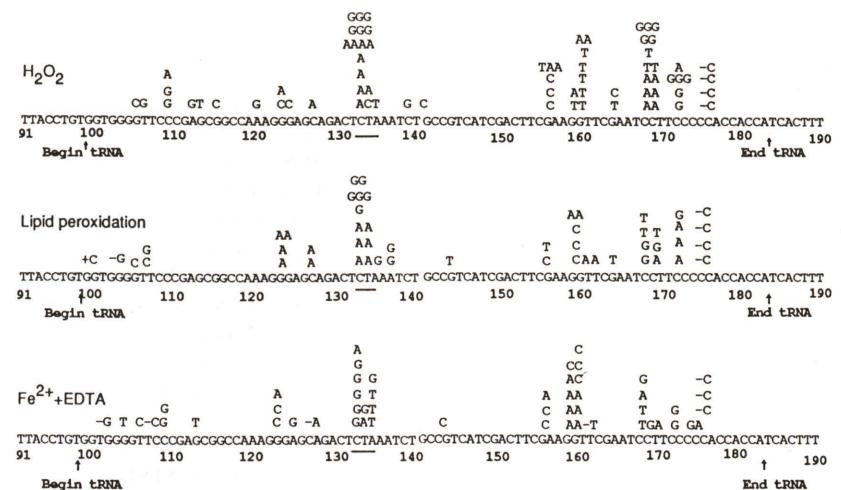


Fig. 1. Changes in the base sequence in the *supF* mutations, including base substitutions and frameshifts, in the pZ189 plasmid treated with hydrogen peroxide (H_2O_2), lipid peroxidation or Fe^{2+} -EDTA, and used to transfect SOS-induced KS40 cells. These mutations are shown above the sequence: single base changes are indicated as single letters. Minus-one or plus-one frameshifts are indicated as -C or +C. The anticodon is underlined.

考 察

プラスミド pZ189 を hydrogen peroxide + $FeCl_3$ -EDTA, 脂質過酸化, $FeSO_4$ -EDTA 処理し, SOS を誘導した大腸菌 KS40 に導入して *supF* 変異のスペクトルを求めた。Hydrogen peroxide + Fe^{3+} -EDTA 処理による塩基修飾の 41% は 8-ohdG であることが知られている (Aruoma *et al.*, 1989)。

我々の結果でも 1500G に 1 個の 8-ohdG が生じていた。また *in vitro* の DNA 合成の結果, 8-ohdG は Adenine と間違って対合することが報告されている (Cheng *et al.*, 1992; Shibutani *et al.*, 1991), したがって, G:C→T:A 変化は主に 8-ohdG が寄与していると考えられる。Hydrogen peroxide 処理をした pZ189 をサル細胞に導入した場合には G:C→A:T トランジションが主な変化であったことが報告されている (Moraes *et al.*, 1989)。

一方, 1 本鎖 DNA M13mp2 ファージを鉄イオンで処理 (たぶん Hydrogen peroxide あるいはヒドロキシラジカルが作用) し大腸菌に感染させると, G→C が多く, 続いて C→T と G→T の変化がみられた (McBride *et al.*, 1991)。我々の結果も含め, いずれも G:C が主要なターゲットである点は一致しており, 活性酸素による thymine

glycol, 8-hydroxyadenine, fapyAdenine (4, 6-diamino-5-formamidopyrimidine) の生成は突然変異には大きくは寄与していないと考えられる。サルの細胞と大腸菌との大きな差は, DNA 複製に関わる場や酵素あるいは修復酵素の違いによるものと考えられる。また, 彼らが大きな欠失を同時に持つものも数えていることも違の原因と考えられる。

脂質過酸化処理による変異には, 8-ohdG の生成が見られないことから, 8-ohdG の寄与は少ないと考えられる。このことが, G:C→T:A が少なく, G:C→A:T が多くなったことに反映していると考えられる。それでも G:C→T:A が 1 塩基置換の 26% あることから, 8-ohdG 以外で, 脂質過酸化による guanine あるいは cytosine にたいする修飾がトランスバージョンを引き起こしていると考えられる。

Fe^{2+} -EDTA では G:C→C:G のトランスバージョンが最も多く, 続いて G:C→A:T が多くみられた (Table 3)。この結果は, M13mp2 ファージの結果とよく一致している。 Fe^{2+} -EDTA による変異は, カタラーゼやヒドロキシラジカルスキャベンジャーで阻害される (Moraes *et al.*, 1989) ことから, 反応液中に僅かに存在する Hydrogen

peroxide との Fenton 反応によって生成するヒドロキシラジカルが DNA を攻撃した結果と考えられる。これは Hydrogen peroxide + Fe³⁺-EDTA の場合も同じと考えられ、生成速度がこの様な違いを生じたかも知れない。

我々がおこなった DNA 处理で、3つ共に全体の 40% 近くが G : C → C : G のトランスポージョン変異であった。Purmal *et al.* (1994) は *E. coli* DNA polymerase I Klenow fragment (KfExo⁻) を用いた *in vitro* DNA 合成で、5-hydroxycytosine で置き換えた 5'-GCT-3' のテンプレートでは 5-ohC が C と対応することを見いだし、これが G : C → C : G を引き起こす損傷であることを提唱した。しかし、Feig *et al.* (1994) の 5-ohC を含む M13mp2 ファージを大腸菌中で増殖させた研究では、174 個の C での塩基置換の内 5'-GCT-3' の配列を含む 169 個が C → T で、C → G は 4 個だけであった。活性酸素による突然変異の大きな部分を占める G : C → C : G を引き起こす損傷については未だ今後の課題である。

謝 辞

本研究は文部省科学研究費一般研究および重点領域の援助によって行った。

参考文献

- Akasaka, S. (1986) Inactivation of transforming activity of plasmid DNA by lipid peroxidation, *Biochim. Biophys. Acta*, **867**, 201-208.
- Akasaka, S., K. Takimoto and K. Yamamoto (1992) G : C → T : A and G : C → C : G transversions are the predominant spontaneous mutations in the *Escherichia coli supF* gene: an improved lacZ(am) *E. coli* host designed for assaying pZ189 supF mutational specificity, *Mol. Gen. Genet.*, **235**, 173-178.
- Akasaka, S. and K. Yamamoto (1994a) Hydrogen peroxide induces G : C to T : A and G : C to C : G transversions in the supF gene of *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 500-505.
- Akasaka, S. and K. Yamamoto (1994b) Mutagenesis resulting from DNA damage by lipid peroxidation in the supF gene of *Escherichia coli*, *Mutation Res.*, **315**, 105-112.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, E. Gajewski and M. Dizdaroglu (1989) Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates, *J. Biol. Chem.*, **264**, 20509-20512.
- Basu, A. K. and L. J. Marnett (1984) Molecular requirements for the mutagenicity of malon-dialdehyde and related acroleins, *Cancer Res.*, **44**, 2848-2854.
- Benamira, M. and L. J. Marnett (1992) The lipid peroxidation product 4-hydroxyneonal is a potent inducer of the SOS response, *Mutation Res.*, **293**, 1-10.
- Bessho, T., K. Tano, H. Kasai and S. Nishimura (1992) Deficiency of 8-hydroxyguanine DNA endonuclease activity and accumulation of the 8-hydroxyguanine in mutator strain (*mut M*) of *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **188**, 372-378.
- Cabrena, M., Y. Nghiem and J. H. Miller (1988) *mutM*, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G : C → T : A transversions, *J. Bacteriol.*, **170**, 5404-5407.
- Cheng, K. C., D. S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura and L. A. Loeb (1992) 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G → T and A → C substitutions, *J. Biol. Chem.*, **267**, 166-172.
- Feig, D. I., L. C. Sowers and L. A. Loeb (1994) Reverse chemical mutagenesis: Identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 6609-6613.
- Kornbrust, D. J. and R. D. Mavis (1980) Microsomal lipid peroxidation, I. Characterization of the role of iron and NADPH, *Mol. Pharmacol.*, **17**, 400-407.
- Marnet, L. J., H. K. Hurd, M. C. Hollstein, D. E. Levin, H. Esterbauer and B. N. Ames (1985) Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain TA104, *Mutation Res.*, **148**, 25-34.
- McBride, T. J., B. D. Perston and L. A. Loeb (1991) Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals, *Biochemistry*, **30**, 207-213.
- Moraes, E. C., S. M. Keyse, M. Pidoux and R. M. Tyrrell (1989) The spectrum of mutations generated by passage of a hydrogen peroxide-damaged shuttle vector plasmid through a mammalian host, *Nucl. Acids Res.*, **17**, 8301-8312.
- Mukai, F. H. and G. D. Goldstein (1976) Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids, *Science*, **191**, 868-869.
- Purmal, A. A., Y. W. Kow and S. S. Wallace (1994) Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing *in vitro*, *Nucl. Acids Res.*, **22**, 72-78.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989) Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harber, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5463-5467.
- Segerback, D. (1983) Alkylation of DNA and hemoglobin in the mouse following exposure to ethene and ethene oxide, *Chem.-Biol. Interact.*, **45**, 135-151.
- Seidman, M. M., K. Dixon, A. Razzaque, R. Zagursky and M. L. Berman (1985) A shuttle vector plasmid for studying carcinogen induced point mutations in mammalian cells, *Gene*, **38**, 233-237.
- Shibutani, S., M. Takesita and A. P. Grollman (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, **349**, 431-434.
- Streisinger, K., Y. Okada, J. Emrich, J. Newton, A. Tsugita, E. Terzaghi and M. Inouye (1966) Frameshift mutations and the genetic code, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **31**, 77-84.
- Summerfield, F. W. and A. L. Tappel (1983) Determination by fluorescence quenching of the environment of DNA crosslinks made by malondialdehyde, *Biochim. Biophys. Acta*, **740**, 185-189.

AUTHOR INDEX

Akasaka, S.	16; 409	Ishihara, Y.	16; 379
Aldridge, K.	16; 255	Ishii, T.	16; 177
Arlett, C.F.	16; 255	Ito, A.	16; 301
		Iwata, S.	16; 369
Baba, H.	16; 113	Kagawa, J.	16; 379
Baba, T.	16; 79	Kakimoto, K.	16; 391
Clingen, P.H.	16; 255	Kamataki, T.	16; 31
Cole, J.	16; 255	Kamiya, H.	16; 385
Cunningham, J.M.	16; 245	Kasai, H.	16; 263, 379
		Kato, T.	16; 217
Delaney, C.A.	16; 245	Kato, Y.	16; 391
		Katoh, M.	16; 211
Eguchi, H.	16; 205	Katsuki, M.	16; 53
Endo, O.	16; 177	Kikuchi, M.	16; 223
		Kikuchi, Y.	16; 173
Fukuhara, A.	16; 217	Kikugawa, K.	16; 217
Fuma, K.	16; 287	Kimura, H.	16; 391
Furihata, C.	16; 161	Kinouchi, T.	16; 1
		Koizume, S.	16; 385
Gondo, Y.	16; 53	Kondo, K.	16; 141
Gossen, J.A.	16; 45	Konishi, Y.	16; 195
Goto, S.	16; 177	Kousaka, Y	16; 233
Gouji, N.	16; 287	Koya, M.	16; 391
Green, I.C.	16; 245	Kuwabara, M.	16; 287
Green, M.H.L.	16; 245, 255	Lowe, J.E.	16; 255
Grollman, A.P.	16; 239		
Hanaoka, T.	16; 379	Mabley, J.G.	16; 245
Hara, M.	16; 91	Martus, H.-J.	16; 45
Hara, T.	16; 211	Maruyama, T.	16; 369
Hayashi, M.	16; 37, 67, 165	Matsubara, J.	16; 309
Hiraoka, W.	16; 287	Matsuoka, A.	16; 37
Hirota, K.	16; 369	Matteo, M.	16; 245
Horiya, N.	16; 211	Miura, H.	16; 385
		Miyagawa, M.	16; 113
Ichinose, T.	16; 275	Mizoguchi, T.	16; 177
Iimura, K.	16; 195	Mori, H.	16; 161
Ikeda, Y.	16; 53	Mori, Y.	16; 195
Ikuta, Y.	16; 229	Morita, T.	16; 141
Inoue, H.	16; 385	Motegi, Y.	16; 53

AUTHOR INDEX

- Murata-Kamiya, N. 16; 385
 Nagahara, A. 16; 223
 Nakajima, T. 16; 403
 Nakamura, K. 16; 369
 Nakao, K. 16; 53
 Nishi, Y. 16; 151
 Nishida, K. 16; 391
 Nishimura, S. 16; 385
 Nishimura, Y. 16; 177
 Noboru, S. 16; 233
 Nohmi, T. 16; 137
 Nose, K. 16; 327
 Nukaya, H. 16; 17
 Nunoshiba, T. 16; 357
 Ogawa, H. 16; 391
 Ohkubo, T. 16; 177
 Ohshima, H. 16; 287
 Ohta, T. 16; 137
 Ohtsuka, E. 16; 385
 Ohuchida, A. 16; 97
 Sagai, M. 16; 275
 Sakata, K. 16; 391
 Sato, F. 16; 287
 Shibahara, T. 16; 391
 Shibuya, T. 16; 211
 Shimada, H. 16; 165
 Shimizu, M. 16; 385
 Sofuni, T. 16; 37, 67
 Sugiki, Y. 16; 37
 Sugimoto, K. 16; 223
 Sugiyama, A. 16; 113
 Sugiyama, C. 16; 127
 Sutou, S. 16; 165
 Suzuki, T. 16; 37, 67
 Taguchi, Y. 16; 205
 Takahashi, M. 16; 53
 Takahashi, T. 16; 379
- Takasawa, H. 16; 113
 Takemoto, T. 16; 397
 Takeshita, A. 16; 53
 Tanabe, K. 16; 177
 Tano, S. 16; 205
 Tatara, A. 16; 205
 Tsugane, S. 16; 379
 Tsutsumi, N. 16; 205
 Uno, Y. 16; 113
 Utsumi, H. 16; 317
 Vijg, J. 16; 45
 Watanabe, H. 16; 301
 Watanabe, S. 16; 379
 Waugh, A.P.W. 16; 255
 Yamada, K. 16; 301
 Yamamoto, K. 16; 409
 Yamano, Y. 16; 379
 Yamaoka, K. 16; 333
 Yamazaki, N. 16; 37
 Yodoi, J. 16; 369
 Yonei, S. 16; 345, 397
 Yoshikawa, K. 16; 113
 Yukawa, O. 16; 403
 Zhang, Q. M. 16; 345, 397

KEYWORD INDEX

- active oxygen(s) 16; 275, 317
 Ames method 16; 217
 Ames test 16; 137, 233
 anticancer drugs 16; 97
 antioxidant 16; 127
 antioxidative mechanism 16; 309
 AS52/XPRT 16; 151
 ATL-derived factor (ADF) 16; 369
 /thioredoxin 16; 217
 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride 16; 287
- bacterial mutation assay 16; 137
 barley 16; 205
 N-benzylimidazole 16; 195
 bioaccumulation 16; 79
 biodegradability 16; 79
 bronchoalveolar lavage fluid 16; 379
- Ca ion signaling 16; 403
 carbon-centered radical 16; 217
 carcinogenicity 16; 91, 127
 carcinogenicity tests 16; 97
 β -carotene 16; 275
 catalase 16; 301
 cell death 16; 287
 cell proliferation 16; 113, 223
 CHO/HPRT 16; 151
 chromosomal aberration 16; 37
 chronic toxicity 16; 79
 cobalt(II) chloride 16; 391
 colony forming efficiency 16; 37
 comet assay 16; 255
 commodity chemicals 16; 79
 complete spectrum of mutations 16; 45
 cosmetic ingredients 16; 127
 cycle-sequencing 16; 229
 cysteine conjugate β -lyase 16; 1
 cytochrome P-450 16; 31
 cytoprotection 16; 369
- daily life 16; 177
 decrease in lipid peroxide level 16; 333
 deletion(s) 16; 45, 391
 α -dicarbonyl 16; 17
 diesel exhaust particles 16; 275
 diet 16; 255
 diet control 16; 177
 DNA damage 16; 263
 DNA double-strand break 16; 287
- egr-1 16; 327
 ethyl acrylate 16; 211
- ferrous ion 16; 409
 fission neutron 16; 301
 free radical 16; 317
- gamma-ray 16; 205
 gene expression 16; 327, 345
 genotoxic characteristics 16; 67
 genotoxicity 16; 91, 173
 global response 16; 357
 growth inhibition 16; 37
 guideline 16; 137
- harmonization 16; 173
 hepatocytes 16; 161
- heterocyclic amine 16; 17
 human lymphocytes 16; 255
 hydrogen peroxide 16; 17, 301, 327, 409
- 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 16; 287, 379
- 8-hydroxyguanine 16; 263, 385
 hypoxanthine 16; 385
- in vitro 16; 161
- in vitro chromosomal aberration test 16; 141

KEYWORD INDEX

- in vivo 16; 161
 in vivo ESR 16; 317
 in vivo gene mutation 16; 67
 increase in fluidity of membrane protein 16; 333
 induction of SOD 16; 333
 insertion 16; 45
 interleukin-1 β 16; 245
 international harmonization 16; 165
 international workshop 16; 141
 intestinal microflora 16; 1
 ionising radiation 16; 255
 islets of Langerhans 16; 245
 isolation 16; 17
 jelly strength 16; 233
 KS40/pKY241 system 16; 391
 L5178Y TK+/- 16; 151
 lactate dehydrogenase 16; 37
 law concerning regulations 16; 79
 lipid peroxidation 16; 403, 409
 liver 16; 161
 liver tumor 16; 301
 localization 16; 369
 low dose X-irradiation 16; 333
 lung cancer 16; 275
 lung tissue 16; 379
 macrophage-phagocytosis 16; 357
 macrophages 16; 309
 mammalian cell gene mutation 16; 151
 Melbourne 16; 141
 metabolic activation 16; 31
 metallothionein 16; 309
 method of antibiotic treatment 16; 1
 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) 16; 229
- micronucleus 16; 67, 165
 micronucleus test 16; 211, 217
 mitotic index 16; 37, 205
 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) 16; 245
 motility 16; 233
 mouse 16; 275
 mutagen 16; 17
 mutagenesis 16; 53
 mutagenicity 16; 79, 91, 127, 177, 217
 mutagenicity tests 16; 97
 mutation specificity 16; 391
 mutational spectrum 16; 409
 mutations 16; 385
 new chemical substances 16; 79
 NIH3T3 cells 16; 385
 nitric oxide 16; 245, 317, 357
 1-nitropyrene 16; 1
 non-genotoxic carcinogens 16; 211
 non-smoker's urine 16; 177
 nongenotoxic hepatocarcinogen(s) 16; 113, 223
 NSAID-induced small-intestinal ulcer 16; 1
 oxygen radical(s) 16; 263, 287, 379
 oxygen stress response 16; 345
 oxyR regulon 16; 345
 pesticide 16; 91
 phase III reaction 16; 1
 α -phenyl-t-butylnitronite 16; 287
 polymerase chain reaction 16; 229
 potent S9 inducer 16; 195
 prevention of environmental pollution 16; 79
 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 16; 223
 promutagen 16; 31

KEYWORD INDEX

- protection from chemical exposure 16; 79
 pZ189 16; 409
 pZ189 supF 16; 391
 radiation 16; 403
 radon inhalation 16; 333
 rat hepatocytes 16; 403
 rat liver 16; 223
 rat liver CYP 16; 195
 reactive oxygen species 16; 397
 redox state 16; 397
 replicative DNA synthesis (RDS) 16; 113
 risk assessment 16; 53
 rodent erythrocyte 16; 165
 rough-shaped revertant colony 16; 233
 Salmonella typhimurium TA1535 16; 229
 Salmonella/microsome test 16; 195
 sex steroid 16; 369
 signal transduction 16; 369, 403
 silica 16; 379
 somatic mutation 16; 53
 soxRS 16; 397
 soxRS regulon 16; 345
 spleenal PFC 16; 309
 standardisation 16; 137, 141, 151
 superoxide 16; 357
 superoxide dismutase 16; 245
 superoxide radical 16; 397
 superoxide-inducible genes 16; 345, 397
 survival 16; 309
 TGF β 1 16; 327
 thiol compounds 16; 369
 thymidine 16; 205
 time-course study 16; 177
 transgenic animal models 16; 45
- transgenic mouse 16; 53, 67
 two-component regulation 16; 357
 UDS tests 16; 161
 V79/HPRT 16; 151
 various carcinogens 16; 195
 vitamin C 16; 255
 xanthine 16; 385

第16期活動計画決まる

平成6年11月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、9月28日から30日までの3日間、第120回総会を開催しました。今回の日本学術会議だよりでは、総会の概要及び第16期活動計画についてお知らせします。

日本学術会議第120回総会報告

日本学術会議第120回総会は、平成6年9月28日から3日にわたり開催されました。

この中で、①第16期の活動の指針となる「第16期活動計画(申合せ)」を賛成多数で可決しました。その他②第2部世話担当の「環境法學・環境政策学研究連絡委員会」の設置及び第3部世話担当の「技術革新問題研究連絡委員会」を「技術革新・技術移転問題研究連絡委員会」に名称変更することを内容とした日本学術会議会則の改正、③運営審議会附置将来計画委員会を改組して、移転準備委員会を設置することをいずれも賛成多数で可決しました。

なお、活動計画の内容は、下記のとおりです。

第16期活動計画(申合せ)

今世紀後半、世界は大きく変化し、今や重大な転換期を迎えるに至った。人類は、多くの新たな問題に直面し、21世紀に向けてその生存と繁栄のための新たな世界秩序を模索している。ここにおいて人類の「知」の適切な行使が求められ、学術に対する期待が高まるとともに、学術自体のあり方にもまた問い合わせられるようとしている。このような世界情勢の中で、我が国の諸活動における学術的重要性はますます増大しており、我が国の将来は一に学術の発展にかかっているといつても過言ではない。

本会議は、科学が文化国家の基礎であるという確信に立って、科学者の総意の下に、我が国の平和的復興、人類社会の福祉に貢献し、世界の学界と提携して学術の進歩に寄与することを使命として設立された(日本学術会議法前文)。その後半世紀にわたり、本会議は我が国の科学者の内外に対する代表機関として、学術の進展に貢献してきたが、上記の学術的重要性にかんがみ、本会議の果たすべき役割は、さらに増大しつつある。

本会議は、その役割を遂行するために、以下のとおり第16期における活動計画を定め、人文・社会科学及び自然科学を網羅する我が国唯一の機関であるという特色を生かしつつ、これに即して活動する。

1. 活動の視点

日本学術会議は、第16期の活動において、以下の視点を重視する。

(1) 歴史的転換期における新たな展望の探求

人類の歴史は、今や重大な転換期を迎え、その先行きはさわめて不透明である。人類社会は、21世紀に向けてその未来を切り開くために、学術の発展をますます必要とし、学術の主体性を確立することを求めていた。日本学術会議は、学術と社会との深い関わりに思いをいたし、人文・社会科学及び自然科学にわたる我が国の科学者の

総意を結集し、人類社会の新たな展望の探求のために、学術が果たすべき役割を考察する。

(2) 日本の学術研究体制の方向づけ

学術が果たすべき役割からみたとき、日本の学術研究体制の現状には、早急に改善すべき点が多く存在する。特に、その中軸をなす大学、研究機関、学術団体は、研究の進歩に伴う新たな専門分化や、急速に進行しつつある学術の国際化、情報化に早急に対応することを迫られている。また、これらは、研究上の後継者を含む人材育成における深刻な困難に直面し、その克服の方法を模索している。日本学術会議は、日本の学術研究体制が新たな状況に対応し、人類社会の期待に応える研究成果を生み出すことができるよう、その方向づけについて協力する。

(3) 國際学術活動への積極的貢献

我が国における学術の国際交流は、従来ややもすると先進諸国との学術を受容することに重点が置かれてきた。しかし、今や我が国には、国際平和の推進や環境問題の解決等、地球的、国際的規模の課題について、自らの研究を充実させつつ、広く世界の学術の発展に積極的に寄与することが求められている。

このため、日本学術会議は、日本の学術が受け身の態勢を脱し、その特色を生かしつつ、世界の学術の発展のためにイニシアチブを發揮することができるよう、自らの役割を果たすべきである。

2. 重点課題

日本学術会議が対応すべき学術上の課題としては、(1)各学術分野に共通する学術研究体制上の当面の重要課題、(2)現在、人類社会が直面している重要課題で、人文・社会科学から自然科学にわたる総合的な知見が必要とされているもの、(3)今後重要なと予想される学術的な重要課題のうち、本会議として特に先見性を發揮して研究環境の整備等を訴えるべきもの、が考えられる。

本会議は、これらの中から早急に取り組むべき重点課題を設定し、人文・社会科学から自然科学にわたる全分野の科学者の意見を結集して検討にあたる。

これらのうち、特に緊急な対応を要する課題は、機動的かつ早急に審議を行い、その結果を対外的に発表する。さらに、第16期中に発生するであろう新たな問題についても、遅滞なく対応する。

日本学術会議は、発足して50年近くになるが、本会議そのものについても常に検討を続ける必要がある。現時点において取り組むべき重点課題を以下に示す。

(1) 21世紀に向けての新しい学術の動向

「知」の総合化や学術諸分野の再編成など、新しい学術の動向を、とりわけパラダイムの転換を中心に把握し、21世紀に向けての学術のあり方について検討する。

(2) 学術研究体制の整備

① 学術団体の支援・強化方策

さまざまな困難に直面している学術団体の現状を踏まえ、その支援・強化等の方策について検討する。

② 大学・研究機関における研究基盤の改革

大学院重点化やセンター・オブ・エクセレンスの構想等我が国の研究体制の新しい動向を把握し、大学・研究機関における研究基盤の改革について検討する。

③ 優れた研究者の養成・確保と教育

若者が理工系を始めとして長期の学習をする学術分野を離れる傾向が指摘されていることから、優れた研究者の養成・確保方策について、教育のあり方をも含めて検討する。

(3) 科学者の地位と社会的責任

女性科学者の研究環境の改善について声明を発した第15期に引き続き、学問・思想の自由、科学者の地位と倫理・社会的責任について検討を深める。特に、我が国の若手研究者の研究環境を改善し、研究意欲を向上させるために、科学者の地位・待遇、研究費の配分、業績評価のあり方等について検討する。

(4) 学術情報・資料の充実・整備

① 学術における情報化の推進

今後極めて重要となるデータベースの作成やコンピュータ・ネットワーク・システムの整備など、学術における情報化の推進方策について検討する。

② 公的資料等の保存・施設の整備と公開

公的資料等の保存、その施設・設備の整備と公開手続きの確立についてさらに前進させる。

③ 知的財産権

急速な情報技術の進展に伴い、顕在化してきた知的財産権の問題について、専門家の養成の問題をも含めて検討する。

(5) 国際学術交流・協力の推進

① 学術における国際化の推進と国際対応力の強化

学術分野における国際化の推進と国際対応力の強化方策について、いわゆるメガサイエンスにおける国際協力のあり方をも含めて検討する。

② 國際的にバランスのとれた学術交流・協力のあり方

欧米諸国との交流に偏っている現状を見直し、バランスのとれた学術交流・協力を実現するために、アジアを中心とする世界の諸地域との学術交流・協力のあり方や交流・協力のための基盤の育成方策について検討する。

③ 学術国際貢献のための新システム

学術分野における国際貢献のために必要とされ、第15期において検討された新たなシステムの構築について、さらに努力する。

(6) 高齢化社会の多面的検討

高齢化の急速な進行に直面しつつも、健やかに老いることのできる社会の実現のため、生き甲斐の問題や小児期からのライフスタイルの改善、雇用・年金・医療・福祉など高齢化社会に伴う経済上、法律上の諸問題、高齢化社会に向けての研究開発体制、高齢化社会に適合しうる医療とケアのシステムなどについて、老人医学を始めとする諸科学が協力して多面的に検討する。

(7) 生命科学の進展と社会的合意の形成

生命科学とその応用の急速な進展のもたらす倫理的、社会的諸問題について、自然科学と人文・社会科学との協力の下に検討し、これら諸問題の解決方策の検討及びこれに対する社会的合意の形成に資する。

(8) 学術と産業

学術と産業の関わりの実態分析の上に立ち、今日の学術と産業とがそれぞれにとって有する意義と問題点とを明らかにするとともに、企業と大学・研究機関における適切な研究の役割分担や基礎的研究の研究体制など、学術と産業との関係のあり方を行政の位置づけをも含めて検討する。

(9) 地球環境と人間活動

人類の経済社会活動の拡大等に伴い深刻化している環境問題について、エネルギーや土地の利用などの人間活動との関連や、ライフスタイルのあり方、人口と食糧の問題の検討を含め、持続可能な発展のための方策、及びこれに対する我が国貢献のあり方について検討する。

(10) 脳の科学とこころの問題

今後の学術研究において重要な学際的課題となることが予想される脳の科学とこころの問題について、21世紀に向けての学術研究上の課題と展望とを明らかにするとともに、今後の研究体制のあり方について検討する。

(11) アジア・太平洋地域における平和と共生

国際的な平和の問題が新たな様相を呈している冷戦後の世界情勢を検討する中で、特にアジア・太平洋地域における平和と安全に関連する諸要因を分析し、貧困の克服と福祉の増進、経済発展と科学技術、文化の相互関係と多様な価値の共存の問題など、平和と共生に寄与するための学術的視点について、アジア・太平洋地域に重点を置いて検討する。

(12) グローバリゼーションと社会構造の変化

世界が、国際化・情報化・市場経済などを通じてグローバリゼーションに向かって大きく変化している中で、我が国の産業空洞化、日本型経営・雇用慣行の変化、多国籍企業や知的財産権の問題、市民生活・文化へのインパクトなど社会構造に生じている新しい課題を洞察し、これに抜本的に対処するため、学術的視点から検討する。

3. 重点課題の審議

上記の重点課題の審議は、常置委員会及び今期の当初設置する特別委員会(別表2)がこれにあたる。両委員会は、速やかに審議を行い、第16期中(緊急性のあるものについては、1年ないし2年内)に検討結果を発表する。常置委員会、特別委員会及び研究連絡委員会は、相互の連絡・協力を密にする。

なお、常置委員会及び特別委員会の所掌事項は別表1及び2に示すとおりである。(別表1及び別表2省略)

※参考

<常置委員会名> (事項)

第1常置—研究連絡委員会活動活性化の方策及び日本学術会議の組織に関すること。

第2常置—学問・思想の自由並びに科学者の倫理と社会的責任及び地位の向上に関すること。

第3常置—学術の動向の現状分析及び学術の発展の長期的動向に関すること。

第4常置—創造的研究醸成のための学術体制に関するこ

と及び学術関係諸機関との連携に関すること。

第5常置—学術情報・資料に関すること。(第7常置委員会の事項に属するものを除く)。

第6常置—国際学術交流・協力に関すること(第7常置委員会の事項に属するものを除く)。

第7常置—学術に関する国際団体への対応及びその団体が行う国際学術協力事業・計画への対応に関するこ

と。

<特別委員会名>

高齢化社会の多面的検討

生命科学の進展と社会的合意の形成

学術と産業

研究者の養成・確保と教育

地球環境と人間活動

脳の科学とこころの問題

アジア・太平洋地域における平和と共生

グローバリゼーションと社会構造の変化

(注) 特別委員会の検討事項は「2 重点課題」の関係項目に同じ。

日本環境変異原学会平成6~7年役員名簿

日本環境変異原学会会則

- 第1条 本会は日本環境変異原学会 (The Environmental Mutagen Society of Japan)と称する。
- 第2条 本会は人間環境における突然変異原、とくに公衆の健康に重大な関係を有する突然変異原の研究を推進することを目的とする。
- 第3条 本会の会員は、正会員、学生会員、賛助会員および購読会員とする。正会員は本会の趣旨に賛同し、環境変異原の研究に必要な知識と経験を有し、定められた会費を納入した者とする。学生会員は、大学、または大学院に在籍し、毎年所定の手続を経て、定められた会費を納入した者とする。賛助会員はこの学会の事業を後援し、定められた会費を納入した個人または法人とする。購読会員は学会誌「環境変異原研究」の購読のみを行うものとする。
- 第4条 本会に入会を希望するものは、1名以上の評議員の推せん書とともに所定の申込書に記入の上、本会事務所に申込むものとする。
- 第5条 会員は毎年会費を納入しなければならない。次年度の年会費の額は評議員会において審議し総会において定める。
- 第6条 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。
1. 年1回大会を開催し、学術上の研究成果の発表および知識の交換を行う。
 2. 学会賞を設け、環境変異原の分野ですぐれた研究を行った会員および将来の成果が期待される会員（原則として個人）に授与する。
 3. Mutation Research 誌を特価で購入配付する。
 4. 国際環境変異原学会連合に加入し、国際協力に必要な活動を行う。
 5. 学会誌「環境変異原研究」を発行する。
 6. その他本会の目的を達成するために必要な活動を行う。
- 第7条 本会に次のとおり役員および評議員を置く。
- 会長 1名 庶務幹事 1名

- 会計幹事 1名 國際交流幹事 1名
編集幹事 1名 会計監査 2名
および評議員若干名
評議員は正会員の投票により選ぶ。
会長は評議員の互選によって定める。
庶務幹事、会計幹事、國際交流幹事、編集幹事および会計監査は会長が委嘱する。この他会長は必要な場合には会員の中より若干名を指名し総会の承諾を得て、評議員に加えることができる。
役員および評議員の任期は2年とする。
役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。
- 第8条 評議員会は会員を代表し、事業計画、経費の収支、予算決算およびその他の重要事項について審議する。
- 第9条 本会は年1回総会を開く。
総会において会則の改廃制定、予算・決算の承認、その他評議員会において審議した重要事項の承認を行う。
- 第10条 本会の事務執行機関は会長および4名の幹事をもって構成する。
会長は執行機関の長となり、また本会を代表する。
- 第11条 本会の事務は曆年による。
- 第12条 本会に名誉会員をおく。

附記

1. 本会則は平成6年1月1日より施行する。
2. 本会の事務所を
東京都世田谷区上用賀1-18-1
国立衛生試験所内に置く。
3. 正会員、学生会員、賛助会員および購読会員の会費は、それぞれ年額7,000円、5,000円および1口50,000円および年額10,000円とする。
ただし、Mutation Research 誌の配布を希望するものは、会費の他に別途定める購読料を本会へ前納するものとする。

会長	祖父尼俊雄
庶務幹事	林真
会計幹事	田中憲穂
國際交流幹事	大西克成
編集幹事	長尾美奈子
会計監査	菊池康基 佐藤茂秋
賞等選考委員	須藤鎮世 武部啓 常盤寛 若林敬二 渡部烈
編集委員	石館基 太田敏博 菊川清見 後藤純雄 瀧谷徹 島田弘康 鈴木潤三
企画委員	秋山実利 葛西宏 能美健彦 山添康

原著論文募集のお知らせ

日本環境変異原学会平成6~7年評議員名簿

(五十音順)

氏名 所属

石館 基	オリンパス工業(株)染色体研究センター
大西 克成	徳島大学医学部
葛西 宏	産業医科大学
菊川 清見	東京薬科大学
菊池 康基	(株)ラビトン研究所
木苗 直秀	静岡県立大学食品栄養科学部
黒田 行昭	麻布大学環境保健学部
後藤 純雄	国立公衆衛生院
澁谷 徹	(財)食品薬品安全センター秦野研究所
島田 弘康	第一製薬(株)開発研究所
清水 英佑	東京慈恵会医科大学
須藤 鎮世	伊藤ハム(株)中央研究所
祖父尼 俊雄	国立衛生試験所
武部 啓	京都大学医学部
田中 憲穂	(財)食品薬品安全センター秦野研究所
常盤 寛	九州女子大学栄養学科
長尾 美奈子	国立がんセンター研究所
西岡 一	同志社大学工学部
能美 健彦	国立衛生試験所
林 真	国立衛生試験所
早津 彦哉	岡山大学薬学部
一つ町 晋也	武田薬品工業(株)薬剤安全性研究所
松島 泰次郎	日本バイオアッセイ研究センター
森田 健	日本グラクソ(株)筑波研究所
吉川 邦衛	三菱化成(株)総合研究所
若林 敬二	国立がんセンター研究所
渡部 烈	東京薬科大学

「環境変異原研究」に掲載する原著論文を随時受け付けています。昭和63年8月に学会活性化対策の一環として編集委員会が組織され、以来機関誌「環境変異原研究」および「JEMS News」の定期刊行をめざして努力してまいりました。その間執筆規定の整備、編集委員会の体制強化等原著論文掲載に関する準備を進め、昨年より原著論文掲載誌の刊行を開始しました。編集委員会では、「環境変異原研究」を会員相互のコミュニケーション誌として位置づけ、会員のための機関誌として育てていきたいと念じておりますので、会員の皆様の積極的な投稿をお願いします。

JEMS 編集委員会

原稿の送付および校正刷の返却、その他編集についての問い合わせ先:

〒192 八王子市久保山町2-3

オリンパス光学工業(株)

染色体研究センター

石館 基

TEL 0426-91-7115

FAX 0426-91-7662

環境変異原研究投稿規定

1. 掲載論文

環境変異原研究に関する未発表の「総説」「一般論文」「短報」「資料」などを掲載する。なお、掲載論文の採否は編集委員会の審査により決定する。

「総説」は、一つのテーマに関連する多くの研究論文の総括、評価、解説などである。

「一般論文」は、変異原に関する独創的研究の報文で、それ自身独立して価値ある結論あるいは事実を含むものとする。

「短報」は、新しい事実や価値あるデータを含む短い報告とする。

「資料」は、環境変異原に関する調査の結果または統計などをまとめたものとする。

2. 投稿資格

筆頭著者は日本環境変異原学会会員に限る。ただし、招待寄稿の場合にはこの限りではない。

3. 報文の書き方

報文の用語は日本語または英語とし、執筆規定に従い簡潔にわかりやすく書く。総説・原著は、写真・図表を含めて刷り上がり8頁以内、短報・資料は4頁以内とする。この制限頁の超過分や多額の経費を要する図表の実費は著者負担とする。

4. 報論文の送り先

報文原稿は正1部コピー2部の計3部を、日本環境変異原学会編集委員長宛に書留便で送付すること。なお、最終稿では正1部、コピー1部ならびにフロッピーディスク(使用した機種とソフト名を明記)を送付すること。

5. 著作権

本誌に掲載された記事、論文などの著作権は日本環境変異原学会に帰属するものとする。従って、本会が必要と認めた場合は転載し、また外部から引用の申請の許可があった場合には、編集委員会において検討の上許可があることある。ただし、著作者自身が自分の記事、論文などの一部を複製、翻訳などの形で利用することを妨げるものではない。しかし、著作者自身であっても、全文を複製の形で他の著作物に利用する場合には、事前に文書にて申し出を行い、許諾を求めるなければならない。

6. 校正

著者校正は原則として原稿に対する誤植の訂正に限る。原稿にない加筆・変更はしないこと。

7. 著者負担金

1) 投稿論文は、組版代の一部負担金として刷り上がり1頁につき2,000円を著者が負担する。また規定の頁数を越えた分については、超過頁分についての実費は著者負担とする。

2) カラー印刷等特殊印刷のため付加的に発生する費用は著者負担とする。

3) 別刷りは著者負担とする。別刷り希望者は著者

校正時に添付する申し込み書に 50 部単位で申し込むこと。

環境変異原研究執筆規定

- 用語は日本語または英語とする。
- 原稿は原則としてワープロを用い、左横書きで作成する。
日本文の場合：原稿は A4 版用紙に 1 行 22 字、1 頁 20 行で印字する（刷り上がりの 1/4 頁に相当する）。ただし、要約は英文（300 語以内）とする。また、別に英文の題名、著者名、所属機関名ならびに所在地を付ける。
英文の場合：原稿は A4 版のタイプ用紙にダブルスペースでタイプする。一行打字数は約 60 字、1 頁 25~27 行を標準とする。原稿は著者で責任において英語の添削訂正を受けたものに限る。
なお、各頁は左 3 cm、右 5 cm、上 3 cm、下 6 cm の余白をとる。
- 論文の記述は、第 1 頁は表題、著者名、所属および所在地、第 2 頁は英文の要約 (Summary) およびキーワード（英文 5 語以内）、第 3 頁以下、緒言 (Introduction)、実験材料および方法 (Materials and Methods)、結果 (Results)、考察 (Discussion)、謝辞 (Acknowledgements)、参考文献 (References)、表・図の説明および図の順序とする。なお図と表の説明はすべて英文とする。
- 学名、遺伝子記号などはイタリック（原稿に赤字でアンダーライン表示）とし、その他まぎらわしい記号については原稿に適宜指示を与える。
- 化学物質名は原則として英語とし、一般名を用いる。また、CAS 番号を文中に表示する。文中に用いる英語の単語あるいは句は固有名詞を除いて小文字で書きはじめる（文頭の場合は大文字）。また文中の英語はすべてタイプするかまたは活字体で書く。
- 数字は算用数字を用い、単位は英文の慣用による省略記号を用いる。
- 略字を使用するときは、論文中にはじめて使用する

- ときに完全な語とその略字を括弧内に示す。
- 句読点はカンマ(,)およびピリオド(.)とする。
- 表、図（写真）は本文と別にし、それらの挿入箇所を本文の右余白に明示する。グラフ、写真、線画等はすべて図とし、一連の番号 Fig. 1, 2, … を付し、説明文を別紙に添える。
- 図と写真は原図またはキャビネ大の光沢写真版とし、裏面に Fig. 1, 2, … および上下を鉛筆書きし、A4 版の台紙に一枚ずつ軽く糊付けする。台紙の下部に Fig. (一連番号) を付す。
- 表は表の上部に Table (一連番号) と説明を記入すること。表には縦罫を使用せず、また各語句の始めは原則として大文字とする。脚注を要するときは表示の語句の右肩に a, b, c, … を付記し、表の下欄外にそれぞれの説明を記す。
- 本文中の文献引用は著者名および年号をもってする。
- 引用文献は筆頭著者名のアルファベット順に配列し、雑誌の省略名は Chemical Abstracts の記載方法に従う。記載順序は著者氏名、年号、題名、雑誌名、巻、頁（単行本の場合は著者氏名、年号、題名、編者名、書名、発行所、発行地、頁）の順とする。文献の記載方法は下記の例に従う。
Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975)
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, Mutat. Res., 31, 347-364.
Ashby, J., F. J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate Jr., B. H. Margolin, B. Matter and M. D. Shelby (1985) Overview and conclusion of the IPCS collaborative study on in vitro assay systems, In: J. Ashby, F. J. de Serres et al. (Eds.), Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens, Elsevier, Amsterdam, pp. 117-174.
藤川和男、梁 治子、近藤宗平 (1984) ハエの翅毛スポットテスト—近ごろ注目されている短期試験法、環境変異原研究、6, 107-113.
佐々木正夫 (1983) 環境変異原と染色体異常、染色体異常 (外村 晶編), 朝倉書店, pp. 107-113.

住 所・所 属 等 変 更 届

平成 年 月 日

日本環境変異原学会
事務局 御中

下記変更がありましたのでお届け致します。

フ リ ガ ナ	
氏 名	(印)
旧 所 属	

新 所属機関 部局 職名	(和)		
	(英)		
新 所属機関 所在地	〒 電話 内線 () FAX (和)		
	(英)		
新 自 宅 住 所	〒 電話 内線 () FAX (和)		
	(英)		
会誌送付先	① 所属機関	② 自 宅	

送付先: 〒105 東京都港区新橋 5-23-7
三造写真工業株式会社内 学会事務局

日本環境変異原学会入会申込書

平成 年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしたく評議員の推薦を添えて申し込みます。

フリガナ		
氏名	印	
ローマ字つづり		
生年月日、性別	年 月 日	男 女

所属機関 部局 職名	(和)		
	(英)		
所属機関 所在地	〒	電話	内線
	(和)		
	(英)		
自宅 住所	〒	電話	
	(和)		
	(英)		
会誌送付先 ① 所属機関 ② 自宅			

学歴	学部	学部学校名	卒業年次 年	
	大学院	課程学校名	修了年次 年	
学位			取得年年	
研究領域 (下記にあてはまる項の2,3を○で囲んでください)				
1. 変異原 2. 検出系 3. 毒性 4. 発生異常 5. 汚染 6. 疫学 7. 遺伝 8. がん 9. 微生物 10. 高等動物 11. 高等植物 12. 食品 13. 気体・粉じん 14. 医薬品 15. 農薬 16. 代謝 17. 分子機構 18. その他()				
研究歴 (現在行っている研究の動向や興味の点について数行記入のこと)				
加入学会名 (本学会以外の)				
推薦者 (日本環境変異原学会評議員)				
氏名(署名) 印				
入会申込者との関係(数行ご記入ください)				

入会申込書の送付先: 〒158 東京都世田谷区上用賀1-18-1
国立衛生試験所 変異遺伝部 祖父尼俊雄

マイクロタイマー方式による遺伝毒性解析システム
GEN-TOX

〈研究用試薬〉



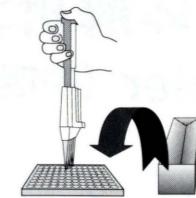
賛助会員名簿（五十音順）

下記の皆様に日本環境変異原学会の賛助会員となって頂き、
学会活動にご協力頂いております。

家田貿易株式会社
エスピー食品株式会社 中央研究所
大塚製薬株式会社 PMS 部
株式会社化合物安全性研究所
株式会社新日化環境エンジニアリング
株式会社ツムラ ツムラ中央研究所
株式会社東京エム・アイ商会
株式会社ナード研究所
株式会社ノエビア 滋賀中央研究所
キャノン株式会社 化学安全部
三光純薬株式会社
サンド药品株式会社テクノパーク大穂 筑波総合研究所
シオノギ製薬株式会社
システムサイエンス株式会社
正晃株式会社
大正製薬株式会社 総合研究所安全性研究部
大鵬药品工業株式会社 製薬センター安全性研究所
田辺製薬株式会社 研究開発企画センター
帝国臓器製薬株式会社 研究企画部
帝人株式会社 生物医学総合研究所
東洋測器株式会社
内藤環境管理株式会社
日新製粉株式会社 ヘルスケア新事業室
日本化学物質安全・情報センター
日本コカ・コーラ株式会社 学術調査部
日本たばこ産業株式会社 安全性研究所
日本たばこ産業株式会社 生命科学研究所
日本チバガイギー株式会社 研究開発統括
日本バイオアッセイ研究センター
ハウス食品株式会社 ソマティックセンター
藤沢药品工業株式会社 安全性研究所
フナコシ株式会社 研究開発部
三菱化成安全科学研究所 鹿島研究所
明治製菓株式会社 薬品総合研究所

96穴マイクロタイマー方式採用 !!

簡便で短時間に定量性のある結果が得られます。



AMES II ASSAY 商品番号 XE-0215-00

従来のエイムス試験を改良したもので、塩基対置換型の突然変異を同定することにより、突然変異原性物質を検出するシステムです。

特長

- ◆ 突然変異原性物質によるミスセンス変異の同定が、シークエンシングをせずにできます。
- ◆ 6種のサルモネラ菌株間の相補性が低いので、6種の菌株を混ぜて同時に使用することにより、迅速スクリーニングをすることもできます。
- ◆ 自然復帰率が低いので、低濃度の変異原物質の検定ができます。
- ◆ 細菌生存率も同時に簡単に測定できます。

E. COLI TRP ASSAY 商品番号 XE-0240-00



トリプトファン合成酵素の遺伝子 *trp E 65* に、ナンセンスコドン（オーカー）を含む *E. coli* WP2株を用いて、突然変異原物質を検出するシステムです。

特長

- ◆ 広いスペクトルの点変異を検出できます。
- ◆ 細胞生存率も測定できます。
- ◆ Ames II Assayとの併用により、遺伝毒性に関するより詳しい情報を得ることができます。

YEAST DEL ASSAY 商品番号 XE-0200-00



his 3 に変異を有する *Saccharomyces cerevisiae* XY2 株を用い、遺伝子の欠失頻度を測定することにより、遺伝毒性を有する物質を検出するシステムです。

特長

- ◆ ゲノムの再配列を誘起する物質を検出するシステムなので、Ames II や *E. coli* Trp では検出できない発癌性物質を検出できる可能性があります。
- ◆ 細胞生存率も測定できます。

※詳細は下記宛にお問い合わせ下さい。

フナコシのライフサイエンス研究用試薬と機器

日本総代理店

フナコシ株式会社

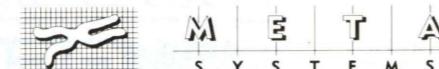
〒113 東京都文京区本郷2丁目9番7号 ユピテル・ユニビルディング

価格・在庫・納期に関するお問い合わせ……
ライフサイエンス推進本部
営業業務部・研究試薬部・研究機器部 Tel. (代表) 03-5684-1616 Fax. 03-5684-1634

製品内容・資料請求に関するお問い合わせ……
研究開発本部
技術情報部 Tel. (直通) 03-5684-1620 Fax. 03-5684-1775

宮城業務部・研究試薬部・研究機器部 Tel. (代表) 03-5684-1616 Fax. 03-5684-1634

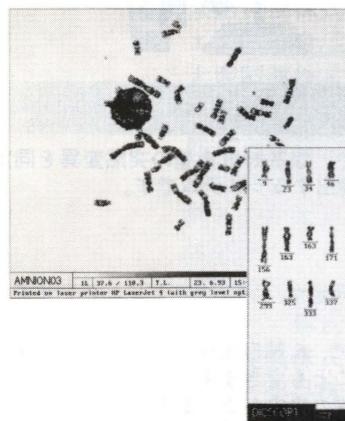
新製品



染色体解析システム

metafer (中期核型自動検索システム)

メタファー



- 8枚スライドステージ(標準)、16枚用(付属)も準備
- 自動焦点・自動照度制御による全面スキャン
- 高速検索: 5視野/秒(自動焦点を含む)で3モード選択
- 検索時自動ランク付けおよび座標ストア
- ストア座標値のほか顕微鏡用座標変換

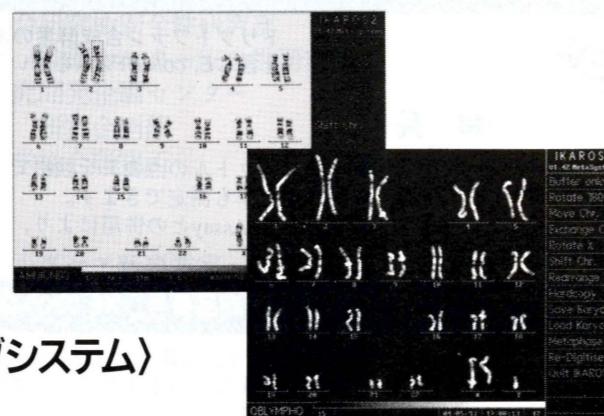
オプション

- 異常染色体の自動スコアリング
- 検索核型のアイコン化表示と選択機能

ikaros (染色体自動並び替えシステム)

イカロス

- 積算型CCDカメラ入力による高品質画像
- 染色体の分離・切断のズーム拡大確認機能付き
- 高速カラオタイプ: 自動並び替え 約1.5秒
- 任意フォーマットでの並び替え
- 120個の染色体(付属: 200個)の並び替え
- イデオグラムの並行表示および機能
- Qバンド染色処理機能付き



isis (FISHイメージングシステム)

アイシス

- 蛍光像入力用機能
- FISH画像のハードコピー
- リアルカラー表示と保存

dmag (データ管理システム(日本語対応))

テマグ

- WINDOWSアプリケーション
- データ検索・ドキュメント作成
- 日本語対応による簡単操作

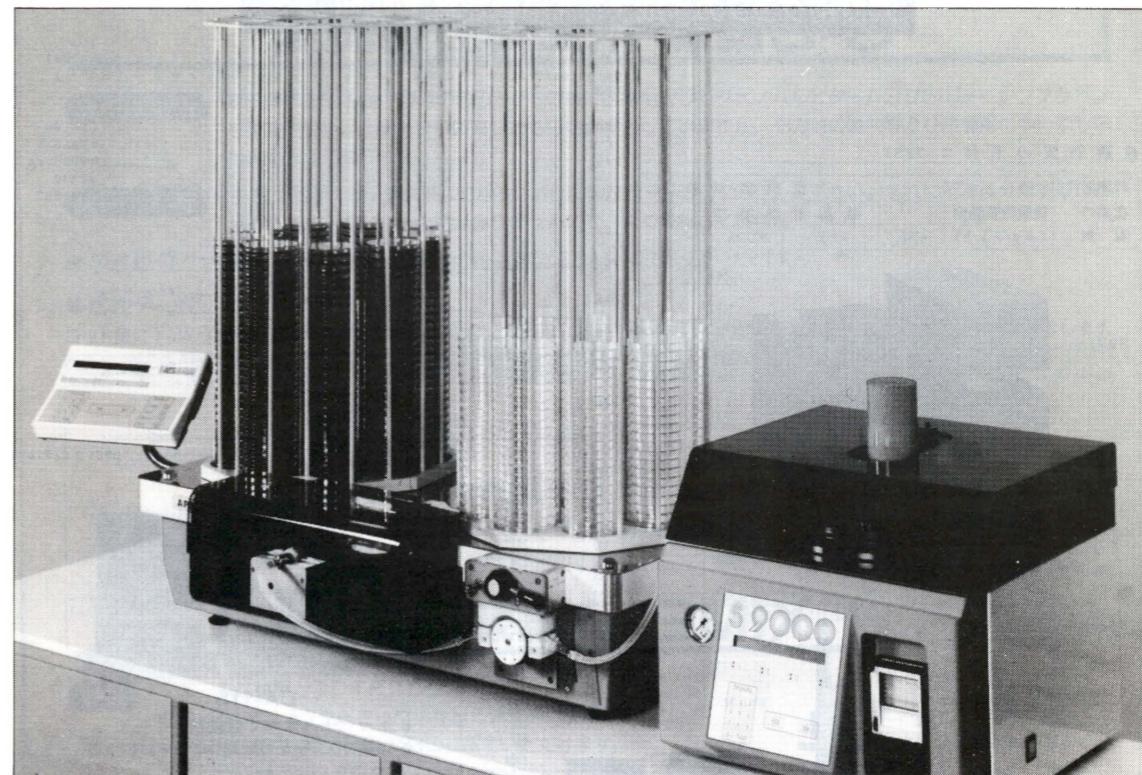


Carl Zeiss Vision
Zeiss Group, Germany

カールツァイスビジョン株式会社
〒160 東京都新宿区本塙町7番地
7, Honshiocho, Shinjuku-ku, Tokyo 160 Japan
Phone: 03-3352-8294
Fax: 03-3352-8226

全自动培地作成システム

FULLY AUTOMATED MEDIA PREPARATION SYSTEM



新製品全自动培地作成システムは、自動培地分注装置APS450と新型培地滅菌保温器S9000で構成され、いかなる要求にも充分に適用できるシステムを初めて市場に出ました。

※従来のようにユニット別の機種もあります!!



マルチ試験管自動分注装置



ピペットボイアキュ



コロニーカウンタ MC-707P



フランス・AES Laboratoire総代理店

株式会社 東京エム・アイ商会

〒104 東京都中央区新川2-7-1
TEL.(03)3551-7873㈹ FAX. (03)3551-7318

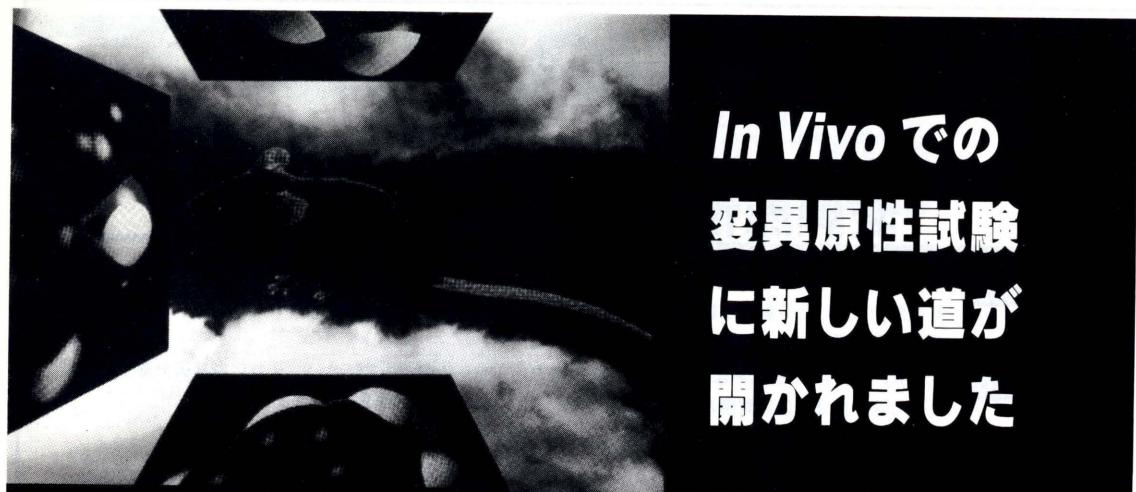
エームステストシステム CA-11・CA-7II・PCA-11

〈微生物を用いる変異原性試験〉

コロニーカウントからデータの保存、試験結果表
濃度別グラフの作成までを自動で高速処理します。

試験物質の名称 : TEST

代謝活性化系の有無	復帰変異数(コロニー)			
	被験物質濃度(μg/プレート)	TA100	TA1535	WP2uvrA
-	150	150	149	147
-	149	149	147	147
-	147	147	145	145
-	155	155	153	153
-	153	153	151	151
-	152	152	150	150
-	162	162	160	160
-	160	160	158	158
-	158	158	156	156
-	156	156	154	154
-	154	154	152	152
-	152	152	150	150
-	150	150	148	148
-	148	148	146	146
-	146	146	144	144
-	144	144	142	142
-	142	142	140	140
-	140	140	138	138
-	138	138	136	136
-	136	136	134	134
-	134	134	132	132
-	132	132	130	130
-	130	130	128	128
-	128	128	126	126
-	126	126	124	124
-	124	124	122	122
-	122	122	120	120
-	120	120	118	118
-	118	118	116	116
-	116	116	114	114
-	114	114	112	112
-	112	112	110	110
-	110	110	108	108
-	108	108	106	106
-	106	106	104	104
-	104	104	102	102
-	102	102	100	100
-	100	100	98	98
-	98	98	96	96
-	96	96	94	94
-	94	94	92	92
-	92	92	90	90
-	90	90	88	88
-	88	88	86	86
-	86	86	84	84
-	84	84	82	82
-	82	82	80	80
-	80	80	78	78
-	78	78	76	76
-	76	76	74	74
-	74	74	72	72
-	72	72	70	70
-	70	70	68	68
-	68	68	66	66
-	66	66	64	64
-	64	64	62	62
-	62	62	60	60
-	60	60	58	58
-	58	58	56	56
-	56	56	54	54
-	54	54	52	52
-	52	52	50	50
-	50	50	48	48
-	48	48	46	46
-	46	46	44	44
-	44	44	42	42
-	42	42	40	40
-	40	40	38	38
-	38	38	36	36
-	36	36	34	34
-	34	34	32	32
-	32	32	30	30
-	30	30	28	28
-	28	28	26	26
-	26	26	24	24
-	24	24	22	22
-	22	22	20	20
-	20	20	18	18
-	18	18	16	16
-	16	16	14	14
-	14	14	12	12
-	12	12	10	10
-	10	10	8	8
-	8	8	6	6
-	6	6	4	4
-	4	4	2	2
-	2	2	0	0
(+)	35	35 (36)	112	112
(+)	36	36 (36)	112	112
(+)	1	1	182	182
(+)	28	28 (29)	182	182
(+)	29	29 (29)	193	193
(+)	29	29 (29)	193	193
(+)	625	625 (29)	197	197
(+)	38	38 (31)	208 (283)	208 (283)
(+)	1250	1250 (31)	110 (111)	110 (111)
(+)	31	31 (31)	276 (269)	276 (269)
(+)	2500	2500 (31)	272 (275)	272 (275)
(+)	31	31 (31)	288*	288* (288)
(+)	5000	5000 (31)	269*	269* (249)
S9Mix	名 称 AF-2	濃 度 (μg/プレート)	8.0	AA
S9Mix	名 称 TA-100	濃 度 (μg/プレート)	8.0	AA
S9Mix	名 称 TA-98	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 TA-1537	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 TA-1535	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 WP2uvrA	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-7MII	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 CA-11	濃 度 (μg/プレート)	4.0	AA
S9Mix	名 称 PCA-11S	濃 度 (μg/プレート)	4.0</td	



In Vivo での 変異原性試験 に新しい道が 開かれました

Big Blue™ : 遺伝子導入 マウス変異原性試験*

世界で唯一 In Vivo 内で
完全かつ短期間又、特定
の組織を対象とする事が
できる変異原性試験です

- ・ビッグブルー：遺伝子導入マウス
近交系 C57BL/6 及びハイブリッド B6C3F1
- ・Sequence 分析によって、容易な変異解析
- ・簡単な変異体検出
- ・アメリカ、ヨーロッパにおける無料ワークショップ
- ・強力な技術サポート
- ・現在米国政府監督機関が評価を実施中
- ・生殖細胞を含むすべての組織の変異が同定可能
- ・経済効率が良い

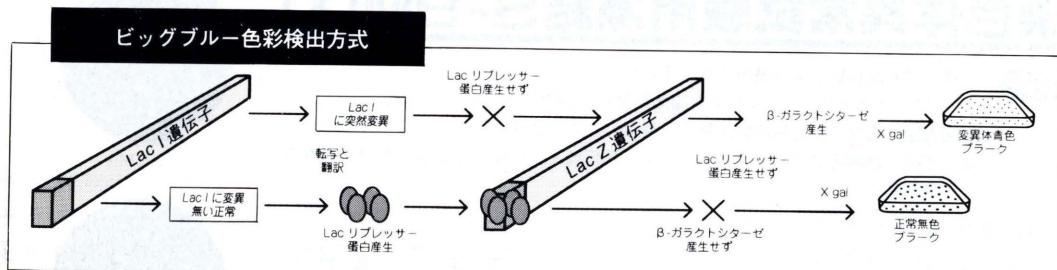
以前は、In Vivo 内で測定できなかった特定の組織における突然変異の貴重で重要なデータが測定可能になりました。

ビッグブルーマウスの全細胞内には、Lac I 標的遺伝子を含むラムダシャトルベクターが多数組み込まれています。どの様な経路によって投与されたテストコンパウンドでもこれらの標的遺伝子を含むシャトルベクターは Lambda phage particle にパッケージングする事により、容易にすばやくゲノム DNA から回収する事ができます。大腸菌に感染させると、Lac I 遺伝子内における突然変異は、下記の様にして

検出できます。変異体頻度は、正常な無色ブラークと変異体の青色ブラークの数の比率により確定できます。

Lac I を標的遺伝子として選んだのは、多くの変異 endpoint に対し高い感受性、簡単な検出方法、そして In Vitro の変異原性のデータと比較ができるということです。

弊社 (STRATAGENE) 製品の完全なシステム、使用についての御案内、無料ワークショップの日程また御社に代わり研究を実施することが出来る提携受託試験機関を紹介することもできますので併せてお問い合わせ下さい。



*特許出願中

STRATAGENE (ストラタジーン)

本社、米国：
電話オーダー：(800) 424-5444
ファックス：(619) 535-0034
テレックス：9103809841
技術サービス：(800) 424-5444

ドイツ：
電話：(06221) 400634
ファックス：(06221) 400639

イギリス：
電話：(0223) 420955
ファックス：(06221) 400639

フランス：
電話：(0590) 7236
ファックス：(0223) 420234
テレックス：81417 INNCENG

スイス：
電話：(01) 3641106
ファックス：(01) 44281900

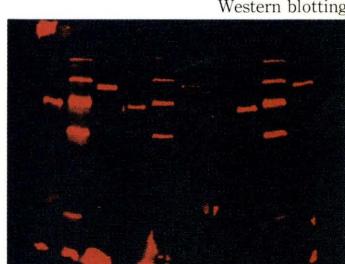
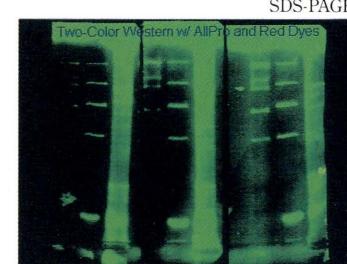
お問合せ先：加商（株）ライフサイエンスグループ 電話：東京 03-3276-7696・ファックス：03-3276-7626

NEW

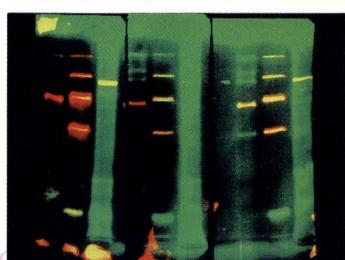
新世代の蛍光イメージアナライザ

FluorImager™

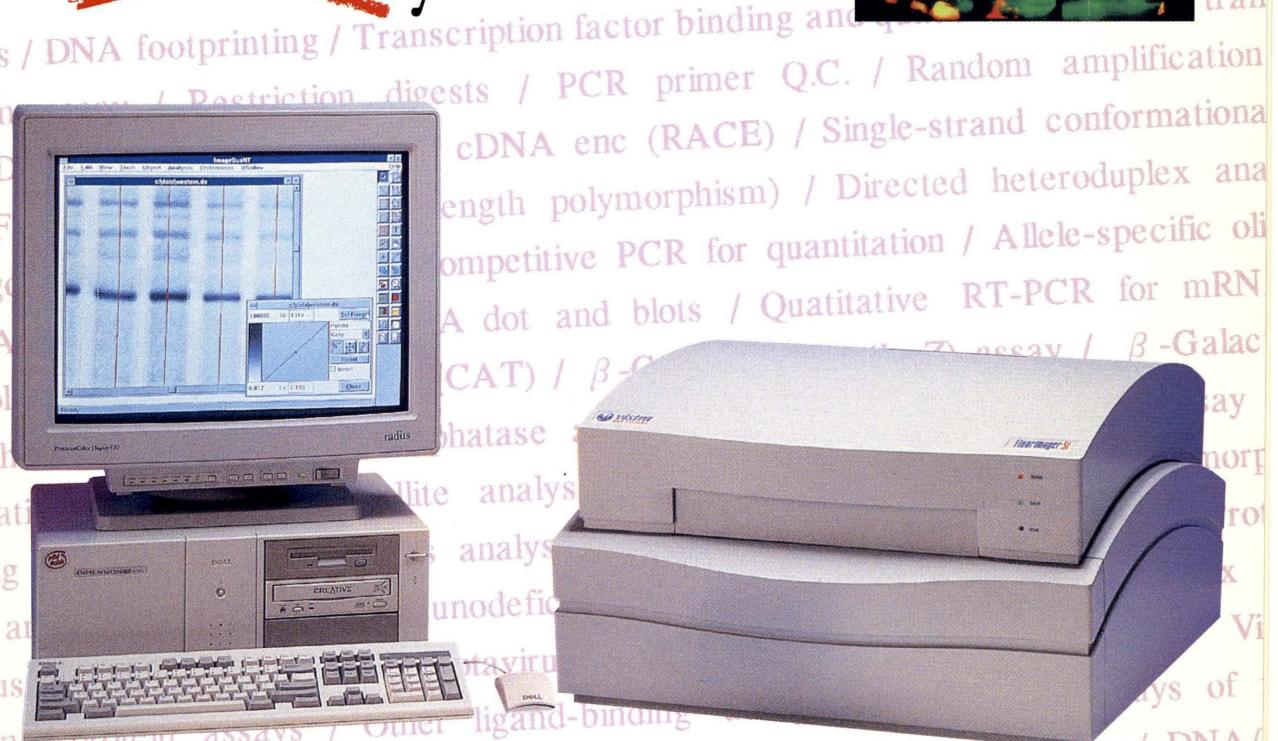
SDS-PAGE
アクリルアミドゲル、アガロースゲル、ササン・ノーザン・ウェスタンプロットティング、TLCプレート、マイクロタイタープレートのサンプルを直接スキャンすることにより、従来のRI法での実験を蛍光法で行うことが可能になりました。



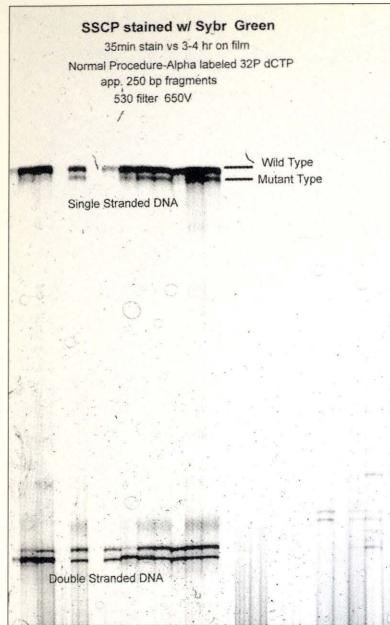
2重染色法を用いたウェスタンプロットティング SDS-PAGE後のゲルをAllProで蛍光標識後、メンブレンにトランスポーターしました。ウェスタンプロットティングでは、ビオチン標識した2次抗体を用い、ストレプトアビシンと蛍光物質のコンジュゲートとビオチンの結合により蛍光標識しました。



~~Radioactivity~~



says / DNA footprinting / Transcription factor binding and quan-
tification assays / Restriction digests / PCR primer Q.C. / Random amplification
of polymorphic DNA (RAPD) / cDNA library screening / Single-strand conformational
length polymorphism (SSCP) / Directed heteroduplex analysis / Competitive PCR for quantitation / Allele-specific oligo-
nucleotide probes / A dot and blots / Quantitative RT-PCR for mRNA / CAT assay / β -Galactosidase assay / Phosphatase assay / Mutant library analysis / Bandshift assay / S1 mapping / Ligand binding assays / Protein-protein interaction assays / Other ligand-binding assays / [Applications of the FluorImager] Southern blotting / Northern Blotting / DNA sequencing / Cloning techniques / S1 mapping / Screening of libraries / Band/gel shift assays / RNA footprinting / Transcription factor binding and quantitation / In vitro transcript
polymerase assay / Restriction digests / PCR primer Q.C. / Random amplification polymerase chain reaction (RAMP) / Single-strand conformational polymorphism (SSCP) / Directed heteroduplex analysis / Allele-specific oligonucleotide probes / A dot and blots / Quantitative RT-PCR for mRNA / CAT assay / β -Galactosidase assay / Phosphatase assay / Mutant library analysis / Bandshift assay / S1 mapping / Ligand binding assays / Protein-protein interaction assays / Other ligand-binding assays / 日本総発売元
モレキュラーダイナミクスジャパン株式会社



SYBR GREEN Iを用いたPCR-SSCPのイメージ

SYBR GREEN Iを用いると電気泳動後のサンプルを簡単、迅速に蛍光標識することが出来ます。FluorImagerを用いてスキャンするとRI法と同等の感度が得られます。

(フローチャート)

サンプルの電気泳動



ガラスプレートの片面を外し、1:10,000に希釈したSYBR GREEN Iをゲルにかける。



10~30分後FluorImagerでスキャンする。

公 告

本誌「環境変異原研究」16巻2号189-194ページ(1994年)に掲載された論文「ヒドロキシラジカル捕捉作用を有するビフェニル化合物による紫外線突然変異抑制効果」は著者の願いにより削除となりました。

1995年1月5日 日本環境変異原学会
「環境変異原研究」編集委員会

Announcement

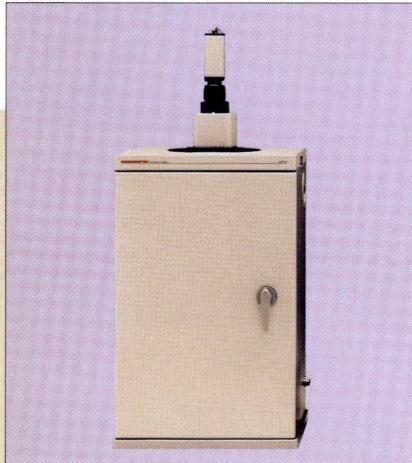
The paper entitled "Biphenyl compounds are hydroxyl radical scavengers: Their effective inhibition for UV-induced mutation in *Salmonella typhimurium* TA 102" which appeared in Environmental Mutagen Research Communications Vol. 16, Number 2, Page 189-194 (1994) is canceled according to the request of the authors.

January 5, 1995 The Environmental Mutagen Society of Japan

"Environmental Mutagen Research Communications"
Editorial Board

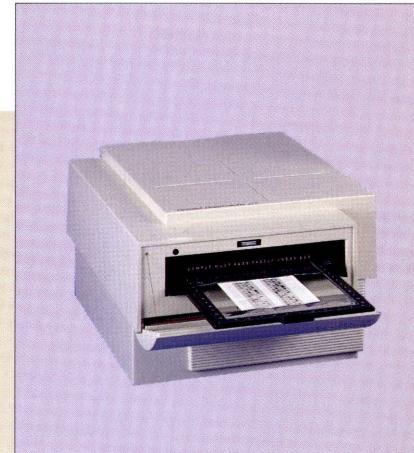
Scanner Options

ケミルミネッセンスイメージヤーHAMA



化学発光を利用したプロッティングのイメージ入力を行ないます。微弱な発光をフォトンカウンティングにより、リアルタイムに、高感度にイメージ化します。

PDSI



可視域の生ゲル、オートラジオグラフィーフィルム、メンブレン、TLCプレート等の様々なサンプルのイメージ入力を行ないます。

FluorImager 575 Specifications

コンピュータ CPU486DX, 32MB RAM, 450MB HD
本体サイズ 590×780×350mm(W×D×H)

●アプリケーションの詳しい資料をご希望の方はご連絡ください。

日本総発売元

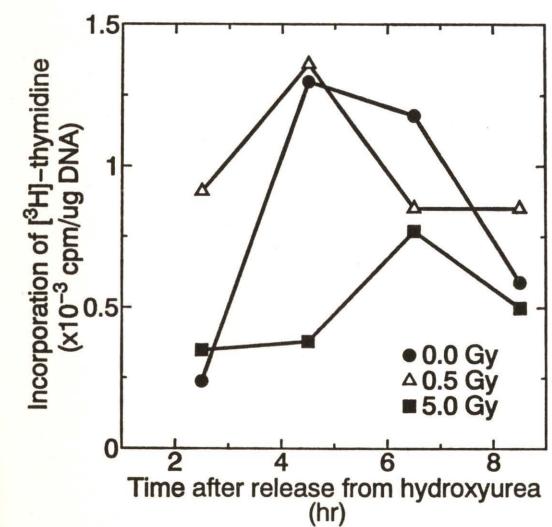
モレキュラー ダイナミクス ジャパン 株式会社

〒175 東京都板橋区成増1-28-12シモダビル6F TEL.(03)3976-9692/FAX.(03)3976-8845

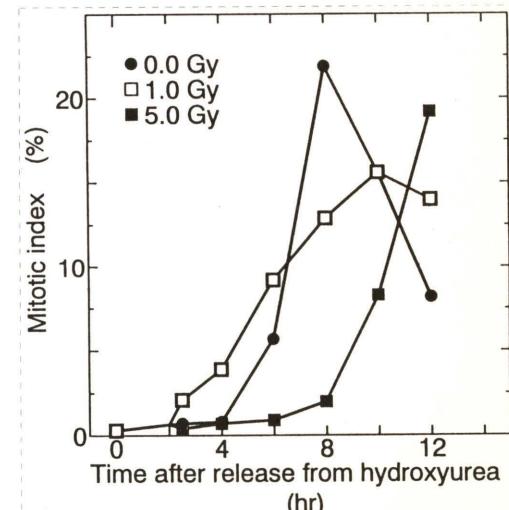
正誤表

Vol. 16, No. 2 Y. Taguchi et al. p. 207において以下の
のような誤りがありました。
お詫びするとともに訂正いたします。

誤 Fig. 2



正 Fig. 2



複写される方に

本誌(書)に掲載された著作物を複写したい方は、著作権者から複写権の委託をうけている次の団体から許諾を受けて下さい。

学協会著作権協議会
〒107 東京都港区赤坂 9-6-41
社団法人 日本工学会内
Phone: 03-3475-4621
Fax : 03-3403-1738

編集委員

委員長	菊川 清見
委員	石館 基 太田 敏博 後藤 純雄 瀧谷 徹 島田 弘康 鈴木 潤三

環境変異原研究 第16巻 第3号 1995年

平成 7年 3月 15日 印刷
平成 7年 3月 20日 発行

発行者 日本環境変異原学会
発行責任者 祖父尼俊雄
印刷所 三造写真工業株式会社

OLYMPUS®

最先端の、さらに未来の研究にも
応えるために、いま新登場！



PROVISは、最先端の、さらに未来の研究に応えうるUIS光学系とともに、研究の進展に伴って性能や機能を柔軟に拡げていける、豊かなシステム性を内包。次世紀にも、研究顕微鏡の標準・規範になり得る“原器”として、オリンパスの先端技術のすべてを結集させました。

**観察から撮影まで、
一貫した自動化を実現した——
最高級写真顕微鏡 AX80**

対物レンズ、フォーカシング、コンデンサ、調光、励起光の切換え等を、すべて電動化。多様な観察法へのラクな、スピーディな切換えを可能にしました。さらに、撮影、各種光路への切換え、測光、ズーム変倍なども自動化。すべての操作をマルチコントロールボックスで集中制御できます。

最先端研究ニーズに、世界最高の光学性

能と豊かなシステムで対応——

最高級システム研究顕微鏡 AX70

独自のUIS光学系による、高解像度、高コントラストの最高の観察像。研究の広がりに対応して、システムを拡張していく鏡基の剛性、照明の多様性。周辺機器の配備や大型標本の観察もラクな操作環境。さらに、U-PHOTOの搭載により撮影の全自動化も可能に。研究の進展を限りなくサポートします。

未来性能を先取りした
トップリサーチャの研究顕微鏡

PROVIS

AX
AX80/AX70

オリンパス光学工業株式会社

KSオリンパス株式会社

〒113 東京都文京区本郷3丁目43番16号 成田ビル
TEL. 03(5684)1375 FAX. 03(5684)1380