

# 環境変異原研究

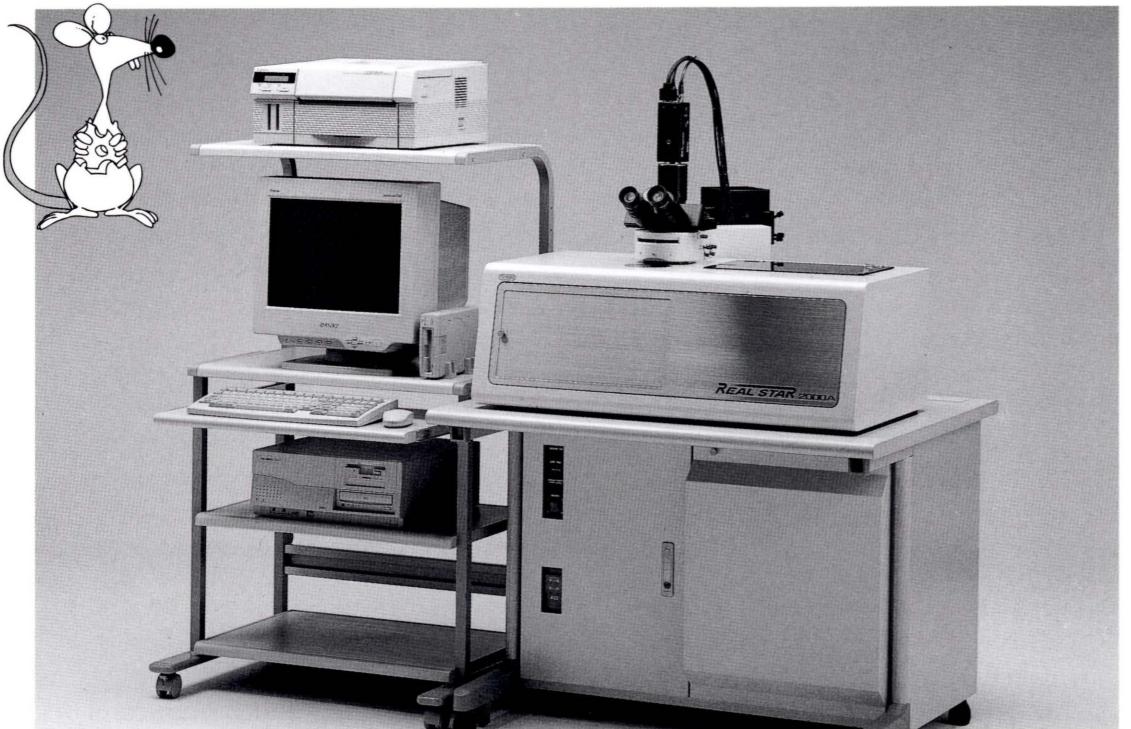
Environmental  
Mutagen  
Research

Vol.20 No.3 1998

## 小核試験自動計測装置

REAL STAR 2000  
2000A

マウス末梢血による小核試験を自動で行い、客観的なデータを計測することができます。



## 特徴

1. 標本(スライドグラス)自動供給装置を備えており、30枚までの標本を連続計測できます。
2. 標本名を入力するだけで、後は機械が自動的に計測を行います。
3. 当社のオリジナル技術を駆使した画像処理により、網赤血球(RET)と小核を有する網赤血球(MNRET)を精度良く認識し、個数を計測します。
4. 専用のアクリジンオレンジ塗布済みスライドグラス\*を用いることにより、簡単に安定したデータが得られます。

\*REAL STAR2000Aは、REAL STAR2000に連続計測機能を付加したものです。

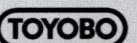


## 特徴

1. スライドグラスに既にアクリジンオレンジが塗布されています。
2. 専用の塗布装置を用いているため、均一な塗布が施されています。
3. グリッドありタイプ(末梢血滴下位置及びカバーグラス貼合わせ位置を印刷)とグリッドなしタイプがございます。

## 生化学事業部(東京)

東京都中央区日本橋小網町17番9号 〒103-8530  
TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951



## 東洋紡績株式会社

[URL] <http://www.toyobo.co.jp>

テクニカルライン TEL 06-348-3888 (開設時間: 9:00~12:00 13:00~17:00 土、日、祝を除く) e-mail:techosk@bio.toyobo.co.jp

## 生化学事業部(大阪)

大阪市北区堂島浜二丁目2番8号 〒530-8230  
TEL 06-348-3786 FAX 06-348-3833

Environ. Mutagen Res., 20: 159-165 (1998)

Original Article

## *In vitro* clastogenicity of 19 organic chemicals found in contaminated water and 7 structurally related chemicals

Atsuko Matsuoka, Makoto Hayashi and Toshio Sofuni

Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

### Summary

We tested the clastogenicity of 19 organic chemicals reportedly found in contaminated water, and 7 structurally related chemicals. We used the *in vitro* chromosomal aberration test with the Chinese hamster cell line CHL/IU in the presence and absence of mouse liver S9 mix. Nine of the 26 chemicals were positive. Benzaldehyde was positive only in the absence of S9 mix. Five chemicals (1,2-dichloroethane, 2,4,6-trichlorophenol, heptachlor, acetophenone, and biphenyl) were positive only in the presence of S9 mix. Three chemicals (1,3-dichloropropene, pentachlorophenol, and cyclohexylamine) were positive in both the absence and presence of S9 mix. Seventeen chemicals, including dibutylphthalate, di(2-ethylhexyl)phthalate, and methoxychlor (which we now suspect to be endocrine disruptors), and geosmin (a major odorous chemical in a water source) were negative in this study. All the chemicals mentioned above were water contaminants, except 1,3-dichloropropene and cyclohexylamine, which were structural relatives of contaminants.

**Keywords:** chromosome aberrations, organochloric chemicals, mouse liver S9, water contamination, endocrine disruptors

### Introduction

Water pollutants can come from industrial waste, organic solvents such as those used in dry cleaning, from drugs, including organochloric agricultural drugs that can disrupt the endocrine system (Kayama, 1998) (if released into the environment they could affect the reproduction of wild animals), etc. Many studies have reported contamination of surface water by geosmin and 2-methylisoborneol (Piet et al., 1972), of secondary effluents from wastewater treatment plants by chlorobenzene, benzaldehyde, biphenyl, etc. (Ellis et al., 1982), of ground water by dichloromethane, dichloroethanes, etc. (Sugito, 1983), and of river and tap water by trichlorophenol, methoxychlor, heptachlor, etc. (IARC, 1979). Sometimes sterilization of water with chlorine results in chlorine substituted organic chemicals (Rook, 1974) in tap water.

For the initial hazard identification of water pollutants, we investigated the clastogenicity of 19 water contaminants and 7 structurally related chemicals with and without mouse liver S9, which is reported to be a more effective activation system than rat liver S9 for chlorinated mutagens (Bartsch et al., 1975; Miyata et al., 1981), and most chemicals in the present study were chlorinated.

### Materials and Methods

#### Chemicals tested

We tested 13 organochloric chemicals, 9 aromatic chemicals, and 4 alicyclic chemicals. Table 1 shows their abbreviations, CAS Registry numbers, purity, sources, the references in which their contamination in water was reported, and their clastogenicity in this study.

#### Cells

We used the Chinese hamster lung fibroblast cell line CHL (Ishidate and Odashima, 1977). Cells were maintained in Eagle's minimum essential medium (Gibco 61100-061) supplemented with 10% heat-

received: June 10, 1998

accepted: July 31, 1998

© Environmental Mutagen Society of Japan

Table 1 Water contaminants tested and their clastogenicity

Chemical (Abbreviation)	CAS No.	Purity (%)	Source <sup>a</sup>	Ref. <sup>b</sup>	Clastogenicity <sup>c</sup>
					S9- S9+
<b>Organochloric chemicals</b>					
dichloromethane*	75-09-2	99	T	1	— —
1,1-dichloroethane (1,1-DCE)*	75-34-3	95	T	1	— —
1,2-dichloroethane (1,2-DCE)*	107-06-2	99	T	1	± +
cis-1,2-dichloroethylene*	156-59-2	97	A	1	— —
1,3-dichloropropene	542-75-6	96.5	T		+
chlorobenzene*	108-90-7	98.0	W	2	— —
p-dichlorobenzene*	106-46-7	98.0	W	2	— —
1,2,3-trichlorobenzene	87-61-6	99	T		— —
2,4,6-trichlorophenol*	88-06-2	99.9	W	3	— +
pentachlorophenol*	87-86-5	99.9	W	3	+
methoxychlor*	72-43-5	98	S	3	— —
heptachlor*	76-44-8	99.8	W	3	± +
heptachlor epoxide*	1024-57-3	99.9	W	3	— —
<b>Aromatic chemicals</b>					
benzaldehyde*	100-52-7	99.9	W	2	+
acetophenone*	98-86-2	99	T	2	— +
phenylacetonitrile	140-29-4	99.7	W		— ±
1,3,5-trimethylbenzene	108-67-8	97.0	W		— —
dibutylphthalate (DBP)*	84-74-2	99	T	2	— —
di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)*	117-81-7	98	T	2	— —
naphthalene*	91-20-3	>99	W	2	— ±
biphenyl*	92-52-4	99	T	2	— +
dibenzofuran	132-64-9	99.8	T		— —
<b>Alicyclic chemicals</b>					
cyclohexylamine	108-91-8	99	T		+
l-menthol	2216-51-5	99.9	T		— —
geosmin*	19700-21-1	>98.0	W	4	— —
2-methylisoborneol*	2371-42-8	99.9	W	4	— —

<sup>a</sup>T, Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan; A, Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI, USA; W, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan; S, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

<sup>b</sup>The chemical with an asterisk was reported as a water contaminant in 1: Sugito, 1983 (in ground water), 2: Ellis et al., 1982 (in secondary effluents from wastewater treatment plants), 3: IARC, 1979 (in river and tap water), and 4: Piet et al., 1972 (in surface waters). Chemicals without asterisk were structural relatives of contaminants.

<sup>c</sup>—, negative; ±, equivocal; +, positive.

inactivated calf serum. The modal chromosome number was 25. The doubling time was about 15 h.

#### S9 mix

The S9 fraction (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) was prepared from the liver of male BALB/c mice pretreated with polychlorinated biphenyl (Kanechlor-500, 500 mg/kg). 10 ml of S9 mix consisted of 2 ml of 20 mM HEPES buffer (pH7.2), 1 ml each of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 330 mM KCl, 50 mM glucose 6-phosphate, 40 mM NADP, and distilled water-all mixed and filter-sterilized-and 3 ml of the S9 fraction. The mixture was prepared just before use.

#### Treatment

Cells were seeded at a density of  $2 \times 10^4$ /5 ml of medium in a glass culture bottle. On the third day,

they were treated for 6 h with 0.5 ml of S9 mix or medium, 2.5 ml of medium, and 0.015 ml of a DMSO solution containing one dose of a chemical, except di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). Because the DEHP doses were very high, cells were treated with 0.5 ml of S9 mix or medium and 2.5 ml of DEHP suspended in medium. The culture bottle was sealed with a rubber stopper during treatment to prevent evaporation. Then the reaction mixture was replaced with fresh medium, and the cells were incubated for 18 h more. Chemicals were tested up to the dose showing clear cytotoxicity or practically preivable (homogeniously suspended in medium or the solubility limit in the solvent).

Chromosome preparations were made as follows. Colcemid (final concentration 0.2  $\mu$ g/ml) was added to the culture 2 h before cell harvesting. The cells

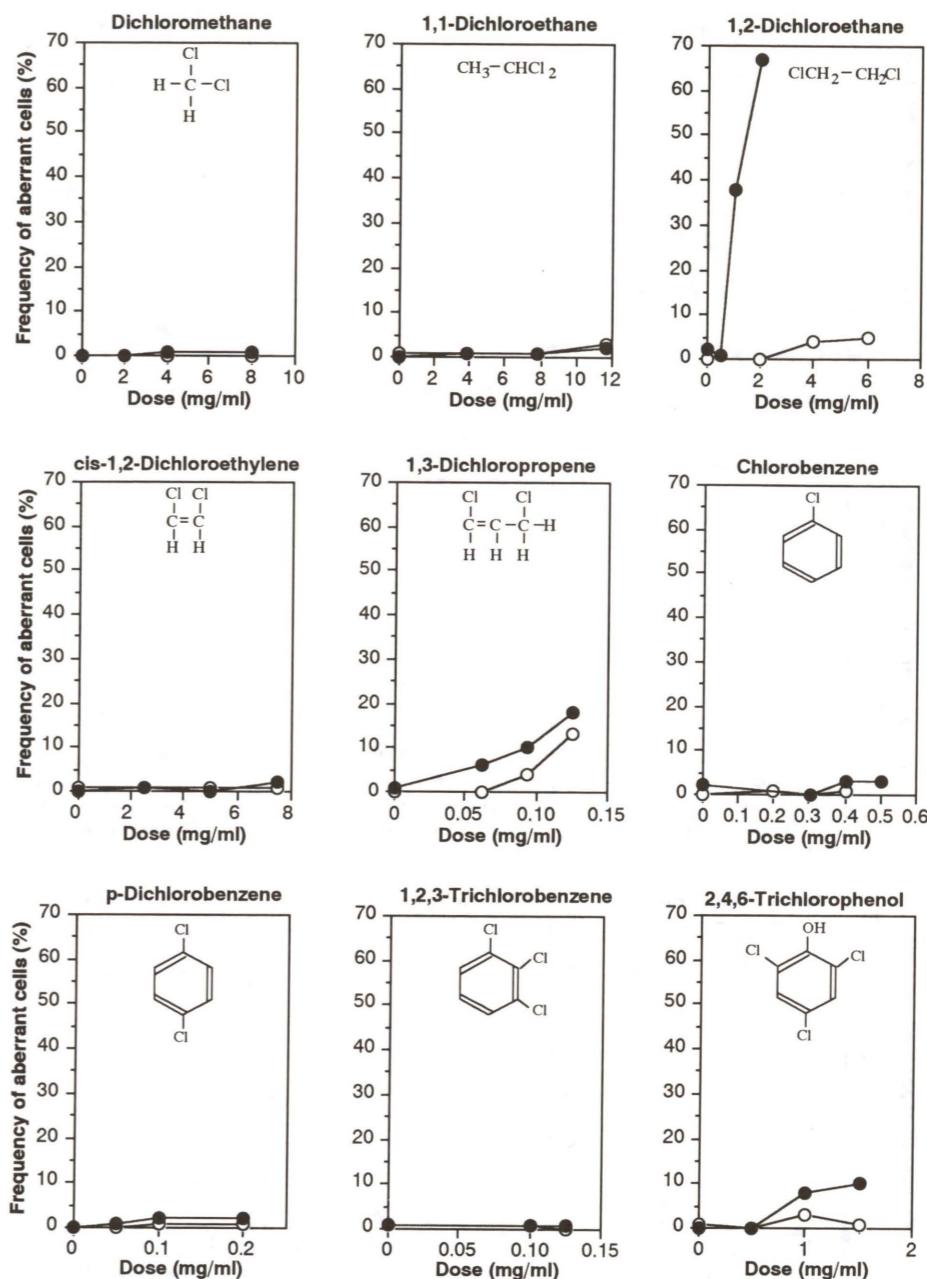


Fig. 1 Frequency of structural chromosome aberrations induced by chemicals in the presence (●—●) and absence (○—○) of mouse liver S9 mix.

were trypsinized and incubated in 75 mM KCl hypotonic solution for 15 min at 37°C. They were fixed with ice-cold fixative (methanol: glacial acetic acid, 3:1) three times. Two drops of the cell suspension were spread on a clean slide glass and stained with Giemsa solution.

All slides were coded before observation. The number of cells with chromosomal aberrations was counted on 100 well-spread metaphases. The types of aberrations were classified into 5 groups: chromatid gaps (including iso-chromatid gaps), chromatid breaks, chromatid exchanges, chromosome breaks, and chromosome exchanges (data not

shown). A gap was defined as an achromatic lesion equal to or more than the width of a chromatid that was not accompanied by a dislocation of the portion of the chromatid(s) distal to the lesion, and gaps were taken into account in the evaluation. The incidence of polyplid cells in the 100 metaphases was also recorded. Solvent treated cells served as controls. The following criteria, based on our historical database (Matsuoka et al., 1991), were used to judge clastogenicity: negative (—) if less than 4.0% of cells were aberrant; equivocal (±) if 5.0-9.9% cells were aberrant, and positive (+) if 10% or more cells were aberrant.

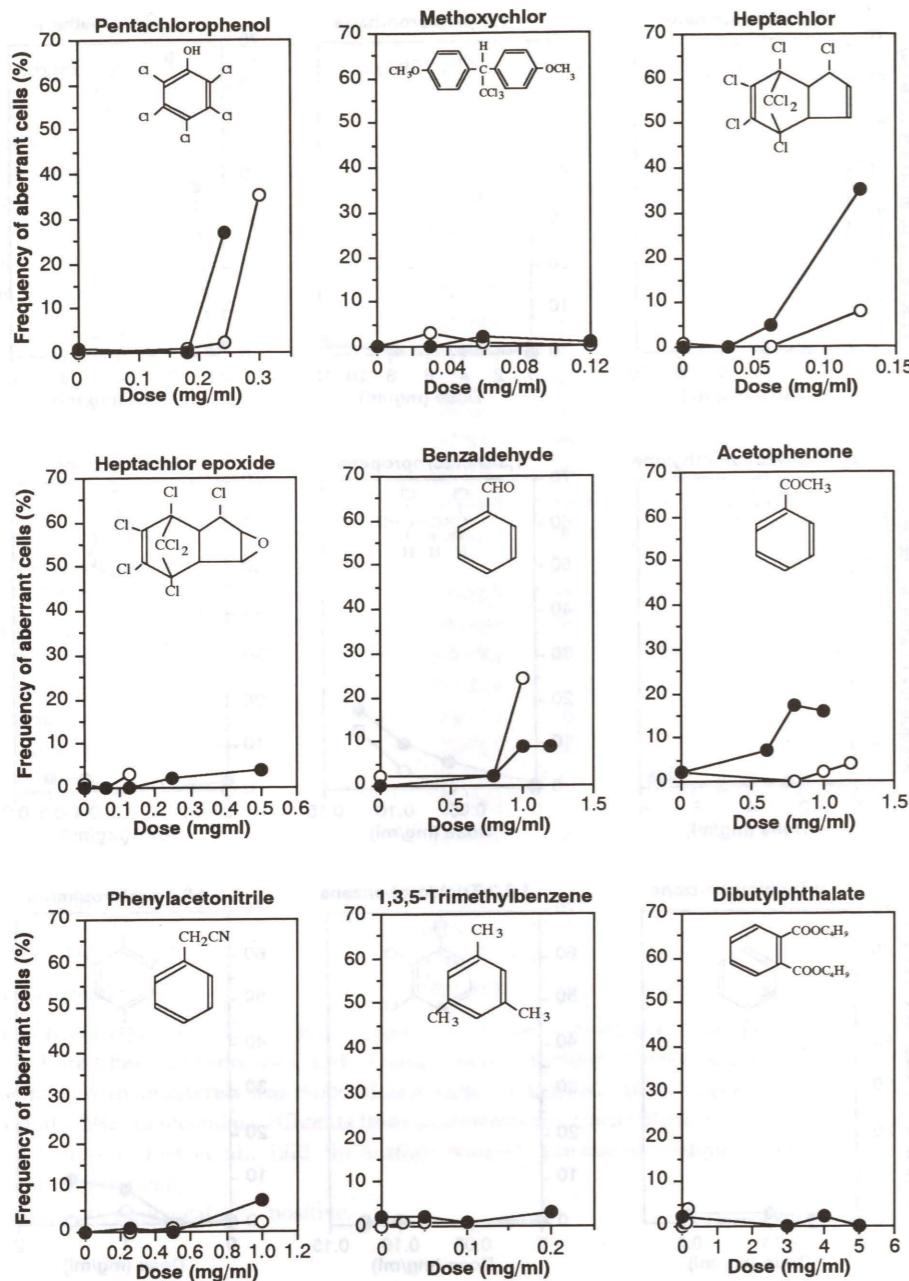


Fig. 1 (cont'd)

## Results

Fig. 1 shows the dose-response curves for frequencies of cells with structural chromosome aberrations along with the structures of the tested chemicals.

Dichloromethane did not cause cytotoxicity or clastogenicity even at the very high dose of 8 mg/ml (94 mM). 1,1-Dichloroethane (DCE) and its isomer 1,2-DCE did not induce chromosomal aberrations in the absence of S9 mix. In the presence of S9 mix, 1,2-DCE induced a high frequency (66.7%) of structural aberrations at 1.0-2.0 mg/ml (10-20 mM) while

1,1-DCE did not induce chromosomal aberrations even at 11.7 mg/ml (118 mM). 1,3-Dichloropropene was positive both with and without S9 mix. In the presence of S9 mix, it also induced polypliody with a frequency of 18% at 0.0625 mg/ml and 12% at 0.0938 mg/ml. Two chlorine-substituted phenols, 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol, induced structural aberrations in the presence of S9 mix. The latter induced structural aberrations (35% at 0.3 mg/ml (1.13 mM)) in the absence of S9 mix as well. Heptachlor at 0.125 mg/ml (0.34 mM) induced structural aberrations in 35% of cells in the presence of S9 mix. Heptachlor epoxide did not induce chro-

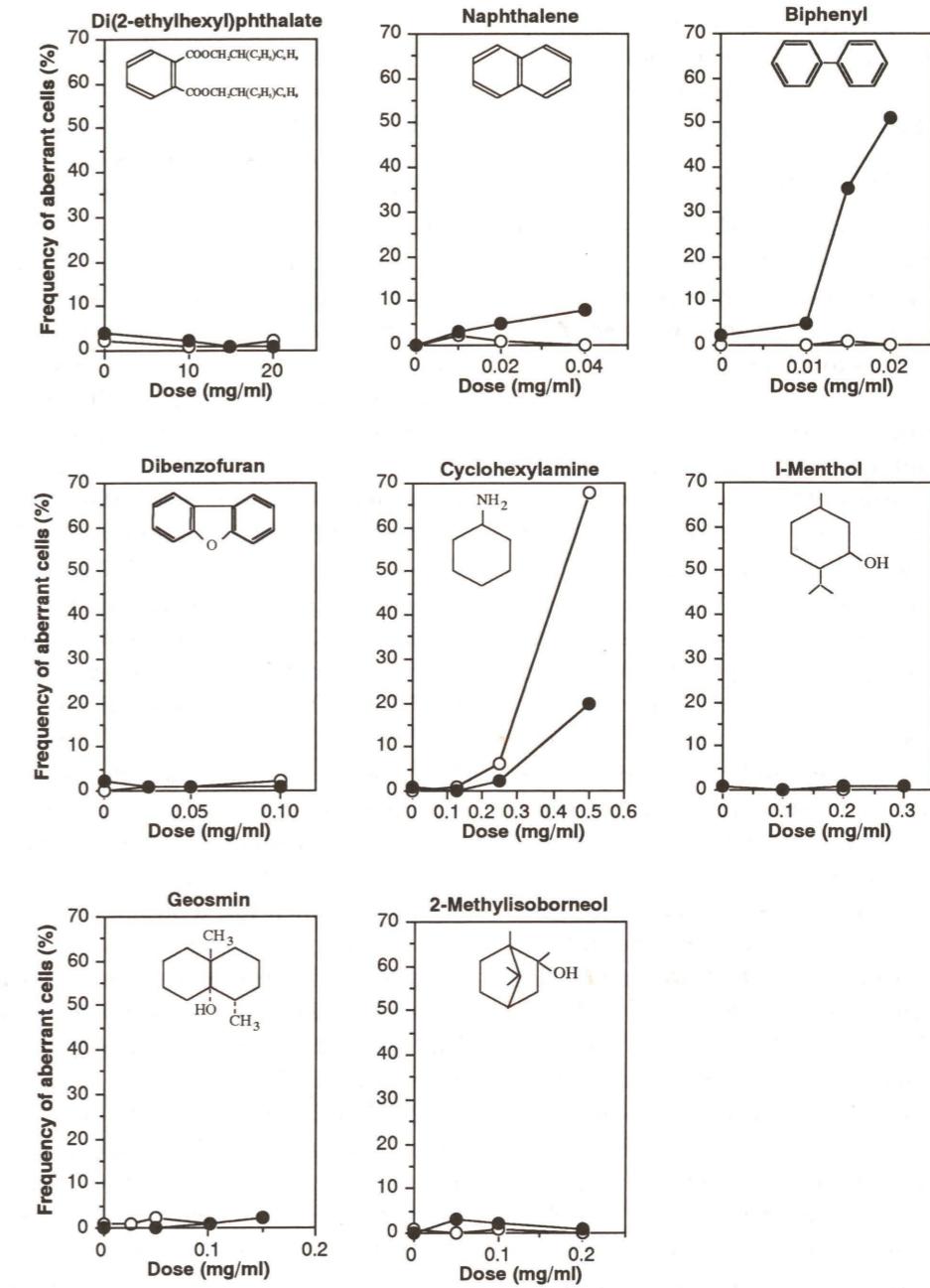


Fig. 1 (cont'd)

mosome aberrations, and its cytotoxicity decreased with the addition of S9 mix.

Benzaldehyde was positive without S9 mix and acetophenone was positive with it. Benzaldehyde induced polypliody (11% at 0.8 mg/ml with and without S9 mix). Phenylacetonitrile yielded an equivocal result (7% at 1 mg/ml) in the presence of S9 mix. Dibutylphthalate (DBP) and DEHP were negative. DEHP also did not cause any apparent cytotoxicity even at the very high dose of 20 mg/ml (51 mM). DBP was cytotoxic at > 0.2 mg/ml (0.72 mM) in the absence of S9 mix, but not in its presence. Naphthalene yielded an equivocal result (8%

at 0.04 mg/ml) in the presence of S9 mix. Biphenyl was clearly positive (35.0% at 0.015 mg/ml (0.1 mM) and 51.0% at 0.02 mg/ml (0.13 mM)) in the presence of S9 mix.

Cyclohexylamine at 0.5 mg/ml induced structural aberrations in 67.9% of cells in the absence of S9 mix, and the frequency decreased in the presence of S9 mix. Geosmin and 2-methylisoborneol, which are the major odorous chemicals produced by attached blue-green algae in a water source, was negative with and without S9 mix.

*cis*-1,2-Dichloroethylene, three chlorine-substituted benzenes (chlorobenzene, p-

dichlorobenzene, 1,2,3-trichlorobenzene), methoxychlor, 1,3,5-trimethylbenzene, dibenzofuran, and *l*-menthol did not induce chromosome aberrations with or without S9 mix.

## Discussion

Dichloromethane, an organic solvent used in laboratories and factories, did not cause any apparent cytotoxicity or clastogenicity in the present study although it is mutagenic in the *Salmonella*/microsome mutation assay (Jongen et al., 1978; Ishidate, 1991).

1,2-DCE was positive in the presence of S9 mix in the *Salmonella* mutation assay (Rannug et al., 1978) and in the present study. Those responses may have been due to activation by cytochrome P-450 and conjugation with glutathione (Rannug et al., 1978; Rannug and Beije, 1979; McCall et al., 1983). 1,2-DCE is also positive in the recessive sex-linked lethal mutation assay in *Drosophila* (King et al., 1979) and is carcinogenic in mice and rats (National Cancer Institute, 1978). It is negative in the *in vivo* micronucleus test (Jenssen and Ramel, 1980), perhaps because an active metabolite does not reach the bone marrow. The fact that 1,2-DCE induced chromosome aberrations and 1,1-DCE did not may be due to metabolic differences (McCall et al., 1983).

1,3-Dichloropropene, a widely used ground fumigation agent, is positive in *S. typhimurium* TA100 and TA1535 (Stolzenberg and Hine, 1980) and in *E. coli* WP2 *hcr* (Moriya et al., 1983). It was clastogenic in the present study and induces sarcoma in mice after subcutaneous administration (Van Duuren et al., 1979).

Heptachlor was used as an insecticide in Japan until 1972, when its registration was cancelled (IARC, 1979). Although heptachlor epoxide is no longer manufactured, it has been detected in air, water, food, etc., indicating its formation in the environment (IARC, 1979). As expected, heptachlor induced chromosome aberrations in the presence of S9 mix. The purported metabolite, heptachlor epoxide, however, did not induce chromosomal aberrations although its cytotoxicity was as strong as that of heptachlor.

*p*-Dichlorobenzene used as a moth repellent and fungicide, was negative in the present study. It is also negative in mutagenicity (Löser and Litchfield, 1983) and teratogenic studies in rats (Giavini et al., 1986) and rabbits (Hayes et al., 1985).

Chemicals with an aldehyde as a main functional group, such as acetaldehyde, formaldehyde, cinnamic aldehyde, and perillaldehyde, induce chromo-

some aberrations in CHL cells (Ishidate, 1988). In the present study, benzaldehyde also induced positive response.

DBP and DEHP were negative in this study, but DEHP is positive in the mouse dominant lethal test (Singh et al., 1974; Autian, 1982) and induced 8AG/6TG-resistant mutation, chromosomal aberrations and morphological transformation in the Syrian golden hamster embryonic cells after transplacental administration (Tomita et al., 1982). DEHP is negative in the Ames test and L5178Y mouse lymphoma assay (Kirby et al., 1983) and the *in vivo* cytogenetic test in Fischer 344 rats (Putman et al., 1983), but its hydrolysis product, mono(2-ethylhexyl)phthalate, is clastogenic in CHO cells (Phillips et al., 1982). Because DEHP is not hydrolyzed in the presence of S9 mix (Daniel and Bratt, 1974), the clastogenicity of DEHP could not be detected in the present study.

Biphenyl, used mainly as a material in organic chemical synthesis, was positive (35% and 51% at 0.015 and 0.02 mg/ml, respectively) in the presence of S9 mix. It is negative in the Ames test (Ishidate, 1991), so the active metabolite produced by the S9 mix might not be mutagenic in bacteria.

The clastogenicity of geosmin and 2-methylisoborneol has not been reported previously. Geosmin (which has a strong earthy, musty smell) and 2-methylisoborneol (which has an earthy, muddy smell) were cytotoxic at about 1 mM but did not induce chromosome aberrations. Geosmin is not mutagenic in the *Salmonella* mutation assay (Simmon et al., 1977).

The detected level of contaminants in water was much lower than the dose used in the present study. For example, 1,2-DCE, which was clastogenic in the present study, was detected at a level of 8 µg/l in tap water (IARC, 1979). The lowest dose of 1,2-DCE that showed clastogenicity was 1 mg/ml. That is 10<sup>5</sup> times higher than the contamination level. This study may be more important qualitatively than quantitatively.

In conclusion, 9 of the 26 chemicals were clastogenic in the present study. Seven of the 19 contaminants were clastogenic. The strongest clastogen among the water contaminants was biphenyl. 1,2-DCE, heptachlor, and biphenyl, which were all water contaminants, were strongly activated by mouse liver S9 mix, suggesting that the chemicals may be metabolized in humans to potent clastogens. DBP, DEHP, and methoxychlor are endocrine disruptors, acting on hormone and arylhydrocarbon receptors (Ema et al., 1994). They do not target DNA, which explains why they were negative in the present study.

## Acknowledgments

This study was done in part at the request of the Ministry of Health and Welfare, Japan.

## References

- Autian, J. (1982) Antifertility effects and dominant lethal assays for mutagenic effects of DEHP, *Environ. Health Perspect.*, 45, 115-118.
- Bartsch, H., C. Malaveille, R. Montesano and L. Tomatis (1975) Tissue-mediated mutagenicity of vinylidene chloride and 2-chlorobutadiene in *Salmonella typhimurium*, *Nature*, 255, 641-643.
- Daniel, J.W. and H. Bratt (1974) The absorption, metabolism and tissue distribution of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats, *Toxicology*, 2, 51-65.
- Ellis, D.D., C.M. Jone, R.A. Larson and D.J. Schaeffer (1982) Organic constituents of mutagenic secondary effluents from waste water treatment plants, *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, 11, 373-382.
- Ema, M., N. Ohe, M. Suzuki, J. Miura, K. Sagawa, S. Ikawa and Y. Fujii-Kuriyama (1994) Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors, *J. Biol. Chem.*, 269, 27337-27343.
- Giavini, E., M.L. Broccia, M. Prati and C. Vismara (1986) Teratologic evaluation of p-dichlorobenzene in the rat, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 37, 164-168.
- Hayes, W.C., T.R. Hanley, T.S. Gushow, K.A. Johnson and J.A. John (1985) Teratogenic potential of inhaled dichlorobenzenes in rats and rabbits, *Fund. Appl. Toxicol.*, 5, 190-202.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1979) Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans 20, 129-367.
- Ishidate, M. Jr. and S. Odashima (1977) Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro—a screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res.*, 48, 337-354.
- Ishidate, M. Jr. (Ed) (1988) Data book of chromosomal aberration tests in vitro L.I.C./Elsevier, Tokyo/Amsterdam.
- Ishidate, M. Jr. (Ed) (1991) Data book of bacterial mutation tests, L.I.C., Tokyo, pp. 203-204.
- Jenssen, D. and C. Ramel (1980) The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested, *Mutat. Res.*, 75, 191-202.
- Jongen, W.M.F., G.M. Alink and J.H. Koeman (1978) Mutagenic effect of dichloromethane on *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.*, 56, 245-248.
- Kayama, F. (1998) What is the problem on endocrine disruptors?, *Chemistry*, 53, 12-14. (In Japanese)
- King, M.-T., H. Beikirch, K. Eckhardt, E. Gocke and D. Wild (1979) Mutagenicity studies with X-ray-contrast media, analgesics, antipyretics, antirheumatics and some other pharmaceutical drugs in bacterial, *Drosophila* and mammalian test systems, *Mutat. Res.*, 66, 33-43.
- Kirby, P.E., R.F. Pizzarelli, T.E. Lawlor, S.R. Haworth and J.R. Hodgson (1983) Evaluation of di(2-ethylhexyl)phthalate and its major metabolites in the Ames test and L5178Y mouse lymphoma mutagenicity assay, *Environ. Mutagen.*, 5, 657-663.
- Löser, E. and M.H. Litchfield (1983) Review of recent toxicology studies on *p*-dichlorobenzene, *Fd Chem. Toxic.*, 21, 825-832.
- Matsuoka, A., T. Sofuni, N. Miyata and M. Ishidate, Jr. (1991) Clastogenicity of 1-nitropyrene, dinitropyrenes, fluorene and mononitrofluorenes in cultured Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, 259, 103-110.
- McCall, S.N., P. Jurgens and K.M. Ivanetich (1983) Hepatic microsomal metabolism of the dichloroethanes, *Biochem. Pharmacol.*, 32, 207-213.
- Miyata, R., T. Nohmi, K. Yoshikawa and M. Ishidate, Jr. (1981) Metabolic activation of p-nitrotoluene and trichloroethylene by rat-liver S9 or mouse-liver S9 fractions in *Salmonella typhimurium* strains, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 99, 60-65.
- Moriya, M., T. Ohta, K. Watanabe, T. Miyazawa, K. Kato and Y. Shirasu (1983) Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems, *Mutat. Res.*, 116, 185-216.
- National Cancer Institute (1978) Bioassay of 1,2-dichloroethane for possible carcinogenicity (Technical Report Series No. 55) DHEW Publication No.(NIH) 78-1361, Washington, DC, US Department of Health, Education, and Welfare.
- Phillips, B.J., T.E.B. James and S.D. Gangolli (1982) Genotoxicity studies of di(2-ethylhexyl)phthalate and its metabolites in CHO cells, *Mutat. Res.*, 102, 297-304.
- Piet, G.J., B.C.J. Zoetman and A.J.A. Kraayeveld (1972) Earthy smelling substances in surface waters of the Netherlands, *Water Treatment Examination*, 21, 281-286.
- Putman, D.L., W.A. Moore, L.M. Schechtman and J.R. Hodgson (1983) Cytogenetic evaluation of di(2-ethylhexyl)phthalate and its major metabolites in Fischer 344 rats, *Environ. Mutagen.*, 5, 227-231.
- Rannug, U., A. Sundvall and C. Ramel (1978) The mutagenic effect of 1,2-dichloroethane on *Salmonella typhimurium* I. Activation through conjugation with glutathione in vitro, *Chem.-Biol. Interact.*, 20, 1-16.
- Rannug, U. and B. Beije (1979) The mutagenic effect of 1,2-dichloroethane on *Salmonella typhimurium*. II. Activation by the isolated perfused rat liver, *Chem.-Biol. Interact.*, 24, 265-285.
- Rook, J.J. (1974) Formation of haloform during chlorination of natural waters, *J. Water Treat. Exam.*, 23, 234-243.
- Simmon, V.F., K. Kauhanen and R.G. Tardiff (1977) Mutagenic activity of chemicals identified in drinking water, In : D. Scott, B.A. Bridges, F.H. Sobels (Eds), *Progress in Genetic Toxicology*, pp.249-258.
- Singh, A.R., W.H. Lawrence and J. Autian (1974) Mutagenic and antifertility sensitivities of mice to DEHP and DMEP, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 29, 35-46.
- Stolzenberg, S.J. and C.H. Hine (1980) Mutagenicity of 2-and 3-carbon halogenated chemicals in the *Salmonella*/mammalian-microsome test, *Environ. Mutagen.*, 2, 59-66.
- Sugito, D. (1983) The ground water pollution, *Suido Kyokai Zasshi*, 52, 53-61. (In Japanese)
- Tomita, I., Y. Nakamura, N. Aoki and N. Inui (1982) Mutagenic/carcinogenic potential of DEHP and MEHP, *Environ. Health Perspect.*, 45, 119-125.
- Van Duuren, B.L., B.M. Goldschmidt, G. Loewengart, A.C. Smith, S. Melchionne, I. Seidman and D. Roth (1979) Carcinogenicity of halogenated olefinic and aliphatic hydrocarbons in mice, *JNCI*, 63, 1433-1439.

本稿は1997年12月3-5日、秦野市文化会館で開催された日本環境変異原学会第26回大会の特別講演で発表された(座長:松島泰次郎)。

## 発癌物質の同定とリスク評価の新動向 —メカニズム知見を重視した 個々の物質の個々人へのリスク評価

山崎 洋

WHO国際癌研究センター(IARC)多段階発癌部 150 cours Albert-Thomas Lyon Cedex 69372, France

### New era in hazard identification and risk assessment of carcinogens: from 'testing' to 'studying' agents and from "groups (population)" to "individuals"

Hiroshi Yamasaki

Unit of MuHistage Carcinogenesis, International agency for Research on Cancer  
150 cours Albert-Thomas, Lyon Cedex 69372, France

#### Summary

Recent advanced knowledge in mechanism of multistage carcinogenesis is changing the way by which we identify carcinogens and estimate their risks to human. Thus, IARC monographs on carcinogen evaluation now incorporate mechanistic information as an important component for the final classification of agents for their carcinogenic risk to humans. The NTP and EPA of USA also consider full use of mechanistic information. These trends reflect the progress made not only in biological sciences, but also in regulatory sciences, both of which now realize that more solid scientific information and less default assumptions can be used for risk assessment of carcinogens. The use of mechanistic information on cancer hazard identification and risk assessment is often regarded as if a revolutionary step had been created. However, it is only in fact a form of evolution from earlier practice. In the past, we used data from mutation assays, as well as those derived from cytogenetic studies, for identifying carcinogens. These endpoints were based upon our mechanistic understanding of carcinogenesis at that time, according to which carcinogenesis involved gene and chromosomal mutations. We have thus been using mechanistic information for a long time.

Then, why a seemingly new era is being welcomed? A major reason may stem from the fact that both scientists and regulators started to realize that we can do better than hazard identification based on "white" and "black" decisions. Thus, we started to characterize hazard, using mechanistic information so that we can provide better basis for risk assessment. At the same time, we started to realize that not all carcinogens are mutagenic and thus "non-genotoxic" mechanisms of carcinogenesis have attracted much attention. Since numerous cellular molecules are possible targets of non-genotoxic activities of agents, it is more practical to study various chemicals with working hypothesis rather than making efforts to establish short-term tests based on individual endpoints.

There have been, and still are, attempts to categorize agents based on mechanistic information, in the hope that risk assessment will thus be simplified. Such categories include "genotoxic/nongenotoxic", "tumor-initiating/-promoting" and "peroxisome proliferation inducing" agents.

受付: 1998年6月3日

受理: 1998年6月13日

©日本環境変異原学会

It is my personal view that such categorization is not only useless, but sometimes impedes the conduct of meaningful risk assessment. Since we usually evaluate the possible risk of "individual" agents rather than as a "group" or a "category", there is no need to group agents. As we need to evaluate "individual" agents, risk assessment needs to be conducted also for "individuals" rather than for "general population"; even if we are exposed to a given agent at a similar level, the actual risks we receive from it heavily depends on host factors of individuals.

(This paper, chaired by Taijiro Matsushima, was presented as the special lecture at the 26th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Hadano Culture Hall in Hadano, Japan, December 3-5, 1997.)

**Keywords:** nongenotoxic, cancer risk assessment, molecular epidemiology, hazard characterization

### 緒 言(これまでの発癌評価の歴史)

最初にヒトの発癌物質が Pott により同定されて以来、疫学による発癌物質の同定は重要な役割を果してき、現在でも International Agency for Research on Cancer (IARC) の発癌評価会議で疫学データが最も重要な役割を持っている。しかし、疫学研究は長時間をする事と、犠牲者が出てからしかデータが出ないという欠点を持っている。そのため、山極・市川によるウサギ発癌実験にはじまり、筒井によるマウス実験成功がもとになり、動物実験による発癌物質同定が始まった。マウス・ラットを用いた動物実験が、現在も発癌物質同定の基本になっているのは周知のごとくである (Tomatis, 1990)。

しかし、動物実験も時間とコストがかかる事から、短期でしかも低コストで発癌物質を検出できる方法として種々の短期スクリーニング法が開発された。特に、発癌物質の多くが代謝されないと変異原性がみられない事を考慮してラット肝の代謝系を組込んで開発された Ames 法が一つの遺伝毒性時代を築いた (Ames et al., 1975)。1970 年代後半から 1980 年代には突然変異・染色体異常を軸にしたスクリーニング法が開発され、そこから得られたデータは物質の発癌評価に大切な役割を果した (De Serres and Ashby, 1981)。

一方、1990 年代のヒト発癌メカニズムの研究は、分子レベルで、発癌にはいくつかの遺伝子変化が必要である事を確かめた (Fearon and Vogelstein, 1990)。したがって、発癌物質がこれらの遺伝子変化を引き起こしたのだろうとする説が当然支持される。他方、遺伝毒性を指標としたスクリーニング法からのデータは動物発癌物質の 65 % しか予見できない事が明らかになった (Ashby and Tennant, 1991)。すなわち、われわれの環境中には、遺伝毒性を指摘したテストでは検出できない物質が多数存在する事が指摘された。いわゆる nongenotoxic な発癌作用を検出できるテスト法はないので、メカニズム

の研究が必要になった (Yamasaki et al., 1996)。

以上のような推移とともに、単なるテスト結果だけではなく、いろいろな情報をもとに発癌同定・評価をしようとする機運が高まつた。そして 1991 年に IARC は、モノグラフの Preamble を改定して、メカニズム知見や他の情報を取入れてヒトの発癌物質を評価する事を決定した (IARC, 1991)。NTP (National Toxicology Program) も 1996 年の発癌レポートから同じような方針を取り入れている。米国 Environmental Protection Agency (EPA) の Cancer Assessment Guidelines は 1998 年 5 月現在、改定の最終段階に入っているが、メカニズム知見を一つの軸にした改定案が承認されるものと思われる (Page et al., 1997)。

われわれは、テスト結果で単に発癌性 "あり" "なし"だけの判定では満足できない時代になっている。すなわち、研究者も行政者も、もう少し詳しい "hazard characterization" を望んでいる。同時に分子レベルでの発癌研究は驚異のペースで進んでおり、これらから得られた知見を発癌物質評価に取入れるのは当然の動向だと思われる。

**Hazard と Risk:** この二つの言葉はよく混同されて使われているが重要な違いがある。例として "Benzo (a) Pyrene" を用いて説明すると、試薬瓶に封入されているときには "hazard" であり、瓶を開けてヒトが暴露されると "risk" になる。したがって、"hazard identification" は "risk assessment" の第一段階目になる。

### メカニズム知見を基礎にする発癌性評価 は新しい試みではない

メカニズム知見を発癌性評価に使うのは、あたかも新しい方法のように考えられがちであるが、相当以前から実施されていたのである。Ames テスト、染色体異常テストは、発癌過程に "突然変異"、"染色体異常" がメカニズムとして関与しているという考えに基づいている。このような genotoxic メカニズムに、新しく nongenotoxic メカニズム知見が入り、直接に暴露されたヒトの細胞

Table 1 Use by IARC Monographs working groups of mechanistic information in making overall evaluations of carcinogenicity (modified from Vainio, 1994)

AGENT	IARC Monogr. Vol. (year)	Degree of evidence of carcinogenicity		Overall evaluation	Supporting evidence
		Human	Animal		
Atrazine	53 (1991b)	I	I	2B	<i>Other mechanisms</i> : increased risk of tumours known to be associated with hormonal factors observed in both epidemiological and experimental studies are consistent with the effects of atrazine on the hypo-thalamic-pituitary-gonadal axis
Beryllium and beryllium compounds	58 (1993c)	S	S	1	<i>Evaluation as a group</i> : all the beryllium compounds studied were found to be carcinogenic in experimental animals
Cadmium and cadmium compounds :	58 (1993c)	S		1	<i>Evaluation as a group</i> : based on the fact that ionic cadmium causes genotoxic effects in a wide variety of tests, including human cells
-Cadmium compounds		S			
-Cadmium metal		L			
Diethyl sulfate	54 (1992a)	I	S	2A	<i>Structure-activity</i> : alkylating agent which ethylates DNA. Consistently positive results in a broad spectrum of assays including somatic and germ cells of mammals <i>in vivo</i> See Fig. 2
Ethylene oxide	60 (1994)	L	S	1	Comprehensive genotoxic
4,4'-Methylene bis 2(chloroaniline) (MOCA)	57 (1993b)	I	S	2A	<i>Structure-activity</i> : aromatic amine Metabolism : humans metabolize MOCA to N-hydroxy MOCA which can bind to DNA in urothelial cells in man
Methylmercury compounds	58 (1993c)	I		2B	<i>Evaluation as a group</i> : based on similarities between various methylmercury compounds with regard to kinetics, metabolism and genetic toxicity
Methylmercury chloride		S			
Tetrachlorodibenzo-para-dioxin (TCDD)	69 (1997)	L	S	1	See Fig. 3
Ultraviolet A, B and C radiations	55 (1992b)		S	2A	Mutagenic in a broad spectrum of assays, including human cells <i>in vivo</i>

I, inadequate evidence; L, limited evidence; S, sufficient evidence

1, 2A, 2B : IARC classification of carcinogens (see IARC, 1991 or Preamble to any IARC Monographs published)

を分子レベルで研究した知見を取入れるという事で、あたかも新しい評価法のように考えられているのである。これからも明らかのように、発癌性評価はわれわれの発癌メカニズム知見が進歩するに伴って新知見を取入れる事が必要である。

読者のほとんどにはこのような事は当然で、特に改めて書く事でもないかも知れない。しかし、1970 年代にマウス皮膚の二段階発癌の研究から、発癌物質には genotoxic でない物質がある事はすでに明らかだった

(Yamasaki, 1988)。ヒトの発癌も同じように genotoxic および nongenotoxic な要因がともに作用し (多因子発癌)、多段階である事はすでに明白だった。しかし、このような知見が発癌性評価に使われ (考えられ) はじめたのは最近の事である。

このように新しい知見を応用するのに長時間必要だった一つの要因は、genotoxic、特に遺伝子変異が発癌メカニズムとして明白だったからであろう。"Genotoxic" なメカニズムは明白に知られている。しかし、nongenotoxic

Group 1—The agent (mixture) is carcinogenic to humans.

The exposure circumstance entails exposures that are carcinogenic to humans.

This category is used when there is *sufficient evidence* of carcinogenicity in humans. Exceptionally, an agent (mixture) may be placed in this category when evidence in humans is less than sufficient but there is sufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals and strong evidence in exposed humans that the agent (mixture) acts through a relevant mechanism of carcinogenicity.

Fig. 1 Example of the use of mechanistic information in carcinogen evaluation by the IARC Monographs. Directly taken from the Preamble of IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1998). The underline was added by the autor.

#### Evaluation

There is *limited evidence* in humans for the carcinogenicity of ethylene oxide.

There is *sufficient evidence* in experimental animals for the carcinogenicity of ethylene oxide.

In making the overall evaluation, the Working Group took into consideration the following supporting evidence. Ethylene oxide is a directly acting alkylating agent that :

- (i) induces a sensitive, persistent dose-related increase in the frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes and micronuclei in bone-marrow cells of exposed workers ;
- (ii) has been associated with malignancies of the lymphatic and haematopoietic system in both humans and experimental animals ;
- (iii) induces a dose-related increase in the frequency of haemoglobin adducts in exposed humans and dose-related increases in the numbers of adducts in both DNA and haemoglobin in exposed rodents ;
- (iv) induces gene mutations and heritable translocations in germ cells of exposed rodents ; and
- (v) is a powerful mutagen and clastogen at all phylogenetic levels.

#### Overall evaluation

Ethylene oxide is carcinogenic to humans (Group 1)

Fig. 2 Mechanistic evaluation used to upgrade ethylene oxide from "Group 2A" to "Group 1" by the IARC Monographs (IARC, 1994).

#### Overall evaluation

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*para*-dioxin is carcinogenic to humans (Group 1).

In making the overall evaluation, the Working Group took into consideration the following supporting evidence :

- (i) 2,3,7,8-TCDD is a multi-site carcinogen in experimental animals that has been shown by several lines of evidence to act through a mechanism involving the Ah receptor ;
- (ii) this receptor is highly conserved in an evolutionary sense and functions the same way in humans as in experimental animals ;
- (iii) tissue concentrations are similar both in heavily exposed human populations in which an increased overall cancer risk was observed and in rats exposed to carcinogenic dosage regimens in bioassays.

Fig. 3 Mechanistic information used to upgrade TCDD from "Group 2A" to "Group 1" by the IARC Monographs (IARC, 1977).

なメカニズムはあまり知られていない。”これ自身正しい考え方である。しかし、“だから genotoxic メカニズムの方が大切である”という考えは誤っていると思う。細胞・分子レベルでの研究成果が急速に進んでいる現在、それらの最近知見を柔軟な考えで取入れて行く姿勢が必要だと思う。

#### メカニズム知見によって影響された 発癌性評価の例

IARC が 1991 年に発癌リスク評価モノグラフの Preamble を改定し、メカニズム知見を取り入れて以来、その事により最終評価が影響した例を Table 1 にあげる。

IARC の評価では Group 1 の評価が下されるには、疫

学データが十分なときだけであった。しかし、改定後は Fig. 1 に転載したように、“評価されている物質に暴露されたヒトからの知見が発癌メカニズムとしてヒトに作用する、と判断されたときには、疫学データが十分でなくても Group 1 に分類できる”事になった。1998 年現在この新しい Preamble で二つの物質が Group 1 になった。奇しくも一つは genotoxic (ethylene oxide) (IARC, 1994), もう一つは nongenotoxic なメカニズム (TCDD) 知見が取入れられた結果 (IARC, 1997) である。この二つの例で、どのようなメカニズムが評価の対象になったかを、Fig. 2, 3 にそれぞれ引用した。

メカニズム知見は、物質の発癌性評価をより高いグループに分類するためだけではなく、低いグループへ移行

するためにも使用できる。たとえば、ある物質が動物実験結果から発癌性があるとして Group 2 A, あるいは 2 B に分類されるような物質の中で“メカニズム知見により動物での発癌メカニズムがヒトでは作用しない”と判断されると、Group 3 に分類される。このような動物発癌に特異的なメカニズムの可能性としては、“peroxisome proliferation による肝癌”“尿中 precipitates による膀胱癌”“ $\alpha_2$ -microglobulin による腎癌”等がある。これが適用されるには、評価されている物質が上記のメカニズムによってのみ動物に癌を誘発するという確固たる知見が必要である。

米国 NTP も 1996 年の会議以来 Report on Carcinogen にリストされる発癌物質の選択にはメカニズム知見を取り入れている。筆者はそのメンバーとしてここ数年 NTP の委員会に参加しているが、メカニズム知見使用の根本方針は、IARC のものと同じだと感じる。しかし、IARC は発癌物質を 4 つのグループに分類するのに対して NTP では 2 つのグループしかないので当然メカニズム知見の具体的な使用法には違いが出てくる。1998 年 5 月現在、IARC と NTP の分類でメカニズム知見を含めた判断に差があったのは紫外線 (UV) だけだと思う。IARC が Group 2 A にしたのに対して、NTP は Known human carcinogen と決定した。

メカニズム知見を取り入れて発癌物質を評価するには、どうしても個々の科学者の知識をもとにした判断が大切になる。毒性学者、分子生物学者、細胞学者、生化学者、化学者、病理学者等の一つのメカニズムに対する判断には大きな差がある。したがって、メカニズム知見を取り入れて発癌物質の評価をするには、これまでの疫学データ、動物および短期スクリーニング法からのデータを “+”, “-”, “?” と単純に分類する考え方から、科学的判断をするという思考に移る必要がある。筆者の経験では、この過程は単純ではないが、最新の科学知識が発癌物質の評価に使われる事には満足感がある。

#### 発癌物質を一つのメカニズムで 分類するのは弊害が多い

発癌物質をメカニズム知見から分類しようとする試みは、まず発癌イニシエーターとプロモーターから始まった。一般的に二段階発癌を論ずるときに、この言葉は確かに便利である。それは、“マウス皮膚の二段階発癌モデルで発癌プロモーション作用を持つ”発癌プロモーターの多くは突然変異能を持たない、というような文脈の中で使用されるので誤解が少ないのである。しかし、周知のごとく、発癌物質の分類として使用されると、上記の “ ” 内の重要な条件が無視されて、“発癌プロモーターの多くは nongenotoxic” になり、“Nongenotoxic な物質はプロモーターとして作用する” になってしまうのである。さらに、“発癌プロモーターは nongenotoxic” なので

リスクが低い”という論議に飛躍してしまった。TCDD や TPA は発癌プロモーション作用を持つが、非常に低濃度で作用するのでリスクが低いとはいえない事は明白である。また一度“発癌プロモーター”と分類されると、“イニシエーター”でも“完全な発癌物質”でもないと受け取られる。これも誤りで、現在、イニシエーター、あるいはプロモーター作用しか持たない物質は知らない。以前に小生が提唱したように、“発癌プロモーション作用を持つ”物質として、物質を特徴づけるのは有用であるが、“発癌プロモーター”として物質を分類するのは意義がない (Yamasaki, 1988)。

同じように、peroxisome proliferation がヒトの肝細胞では起らないと考えられる事から、“peroxisome proliferator”という物質群が生まれた。これも“peroxisome proliferation を引き起す物質”としての最初の定義は有用であった。しかし、peroxisome proliferation はヒトでは起ないので、“peroxisome proliferator”は動物特異的発癌物質である”と進展してしまった。しかし、“ある物質が peroxisome proliferation をラットの肝細胞に引き起したので、これは peroxisome proliferator であり、ヒトに発癌性はない”，とはいえない。この物質は他の作用を細胞に及ぼしている可能性があり、その作用がヒト発癌性に関与しているかもわからないのである。

現在、一番発癌物質の分類でやっかいなものは “Genotoxic” と “Nongenotoxic” であろう。この分類を genotoxic はメカニズム、あるいは物質の作用として使うときには非常に便利である。それは“突然変異”, “DNA 附加体” 等、特定の event あるいは作用を限定して使用しているからである。しかし、物質を分類するときにはこの定義は使用が難しく、混乱を招く。

元来、“Nongenotoxic” という言葉から理解できるように、genotoxic 以外のメカニズムがほとんど解明されていなかったための分類であった。しかし、TCDD が Ah レセプターを介して遺伝子発現を促進させたり、X 線や化学発癌物質がフリーラジカル発生を促し、肝癌プロモーション活性を持つ物質の多くがギャップ結合コミュニケーションを阻害したりする事実が明らかになつた。すなわち、nongenotoxic 発癌物質と総称される一群には、このような種々の作用を持つ物が入っている。筆者には Ah レセプター結合物質、フリーラジカル生成物質、ギャップ結合阻害物質と個々に称した方が有益に思われる。このような分類の方が、さらに大きくこれらを nongenotoxic carcinogen と称するよりもリスク評価には役立つと思う (Yamasaki et al., 1996)。

身近な例えでこの事の説明を終りたい。IARC に多数の国籍の研究者が働いている。当然われわれは、その人たちがフランス人、日本人、アメリカ人、ドイツ人、中国人、ブラジル人だと知っており、その人たちの考えに

もその国の特徴がみられる。さて、genotoxic/non-genotoxic のようにこれらの人々をヨーロッパ人/非ヨーロッパ人にも分類する事ができる。しかし、たとえば小生は“日本人である”というのを、わざわざ“ああ、あなたは非ヨーロッパ人ですね”に置き換えて論議するであろうか。発癌物質の評価は常に個々の物質に対して下される。個々の持つ特徴(たとえばギャップ結合阻害物質)をわざわざ特徴をなくしてしまうような分類(non-genotoxic)をするのは、せっかくの貴重なデータを隠す事になる。

### 発癌物質に閾値はあるか

この論議は、発癌メカニズムが genotoxic だけではないという事が明らかになって活発化した。ある物質が直接に作用して変異を起すのであれば閾値はないだろうが、protein kinase C を活性化しながら作用するような物質には閾値が存在するだろう、と考えられた。この理論は、“突然変異誘導”および“protein kinase C 活性化”自身を end-point にすると正しいかも知れない。しかし、“発癌閾値”にまで外挿するには、多段階発癌メカニズムの基本から考えて無理がある。“発癌過程には複数の遺伝子変化が必要である”事を認めるならば、細胞に起った一つだけの変異はすぐには発癌に結びつかず、このような変異は他のいくつかの変異が起るまで生物学には“閾値”となる。

“発癌プロモーションに閾値がある”という考えは、元来この過程がある程度可逆的である事から提唱された。そして、確かに TPA 塗布の頻度を低くすると皮膚発癌プロモーション効果が低くなる事は証明された(Burns et al., 1983)。しかし、この場合、塗布された TPA 総量は同じであるので、従来の量的閾値ではない。筆者はまだ本当に閾値が存在する事を明確にした発癌実験をみた事がない。“閾値がある”として引用されるほとんどの動物実験は、発癌がみられないとされる低濃度で使用された動物数が少ないために“発癌性が検出できない”のが原因である。

閾値の有無よりも、低濃度での発癌物質の反応はどのような曲線で現されるか、を研究する方が重要であろう。そのような情報を得るためにやはりメカニズム知見を得るような実験データがより信頼度の高い外挿を可能にすると考える。

### ヒトの発癌リスクは一様ではない

発癌物質を genotoxic/nongenotoxic のグループにわけても、グループ内の個々の物質の持つリスクは違うように、ヒトもアジア/ヨーロッパ/アメリカ/アフリカ人に分類しても、個々の発癌リスクは異なる。遺伝的背景が個々によって違うからである。したがって、理想的には発癌リスクは、個々人に対して研究されるべきだろ

う。将来もこの実現は不可能であろうが、ヒトゲノムプロジェクトにより、個々人の遺伝子多型地図作成等が可能になり、個人の発癌リスク評価に近づくと思われる。

すでに、BRCA 1, 2, hMSH 2, APC, ATM といった比較的浸透度の強く、家族性発癌の明らかな遺伝子は同定されている。しかし、P 450 の多型のように発癌のリスクを左右するが、他の遺伝的背景と区別しにくいものが多数あると思われ、これらの同定は重要であろう。これまでの遺伝子-環境相関の研究からゲノム-環境相関解明へ、ヒトゲノムプロジェクトからのデータを取り入れて進んで行くだろう。

### 結語(“テスト”から“研究”の時代へ)

過去 15~20 年間、われわれは突然変異原性、染色体異常などを発癌メカニズムとしてよりも、単なるテストとして取扱いすぎたと思う。たとえば Ames テストの結果が動物発癌実験と 60~65 % の相関性しかない事は解っている。しかし、これは Ames テスト自身が問題ではなくて、Ames テストのもとになっている突然変異原性だけが発癌メカニズムではないという明白な事実を示しているにすぎない。したがって、いくら突然変異原性をもとにした他のテスト法を開発しても 60~65 % の相関性は動かない。

この教訓は、nonmutagenic carcinogen の検出とリスク評価に生かされるべきだと思う。たとえば、ギャップ結合阻害を一つのメカニズムと考える。もし、しっかりとモデルを使用し、ある物質が細胞間コミュニケーションを切断したとすると、この結果は、もしそのモデルが確立されたテスト法ではなくても発癌評価の参考データとして使用されるべきである。筆者は、これから発癌評価は、アッセイからの結果だけではなく、作業仮説のテスト結果を重要視すべきであると思う(Yamasaki, 1996)。

われわれは、すでに多くのヒト発癌物質を同定してきた。これからは、もっと同定の難しいものにぶつかるだろう。たとえば電磁波(electromagnetic field)は、発癌性は低いだろうが、たくさん的人が暴露されているのでその評価が大切である。われわれの食物中の発癌物質も難しい問題である。やはりここでも必要なのは、われわれのメカニズム知見を増加する事であり、その知見を生かして発癌評価に取組むことだと思う。

### 参考文献

- 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, 1975.  
Ashby, J. and R. W. Tennant (1991) Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the US NTP.

*Mutat. Res.*, 257, 229-306.

Burns, F., R. Albert, B. Altschuler and E. Morris (1983) Approach to risk assessment for genotoxic carcinogens based on data from the mouse skin initiation-promotion model. *Environ. Health Perspect.*, 50, 309-320.

De Serres, F. J. and J. Ashby (Eds.) (1981) Evaluation of short-term Tests for Carcinogens, *Prog. Cell Res.*, Vol. 1, Elsevier, Amsterdam.

Fearon, E. R. and B. A. Vogelstein (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767.

IARC (1991) A Consensus Report of an IARC Monographs Working Group on the Use of Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification (IARC Internal Technical Report No.91/002), Lyon.

IARC (1994) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Vol. 60, Some Industrial Chemicals, Lyon.

IARC (1997) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 69, Polychlorinated Dibenzodioxins and Dibenzofurans, Lyon.

Page, N. P., D. V. Singh, W. Farland, J. I. Goodman, R. B.

Connelly, M. E. Andersen, H. J. Clewell, C. B. Frederick, H. Yamasaki and G. Lucier (1997) Implementation of EPA revised cancer assessment guidelines: Incorporation of mechanistic and pharmacokinetic data, *Fund. and Appl. Toxicol.*, 37, 16-36.

Tomatis, L. (1990) Cancer: Causes, Occurrence and Control. IARC Scientific Publications No.100, IARC, Lyon.

Vainio, H. (1994) Use of mechanistic information in risk estimation, *Arch. Toxicol.*, Suppl., 16, 281-294.

Yamasaki, H. (1988) Multi-stage carcinogenesis: Implications for risk estimation, *Cancer and Metastasis Rev.*, 7, 5-18.

Yamasaki, H., J. Ashby, M. Bignami, W. Jongen, K. Linnainmaa, R. F. Newbold, G. Nguyen-Ba, S. Parodi, E. Rivedal, D. Schiffmann, J. W. I. M. Simons and P. Vasseur (1996) Non-genotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms-a European project. *Mutat. Res.*, 353, 47-63.

Yamasaki, H. (1996) Role of disrupted gap junctional intercellular communication in detection and characterization of carcinogens, *Mutat. Res.*, 365, 91-105.

This paper, chaired by Makoto Umeda and Hiroshi Yamasaki, was presented to the symposium "The present condition of cell transformation assays for predicting the carcinogenic potential of chemicals", organized by Noriho Tanaka, at the 26th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Hadano Culture Hall in Hadano, Japan, December 3-5, 1997.

## Cell transformation assays in predicting carcinogenic potential of chemicals and mechanistic studies of carcinogenesis

J. Carl Barrett\* and Cynthia A. Afshari

Laboratory of Molecular Carcinogenesis, National Institute of Environmental Health Sciences,  
National Institutes of Health, P.O. Box 12233,  
Research Triangle Park, NC 27709 USA

### Summary

Cell transformation assays are *in vitro* assays that measure the ability of chemicals, viruses or specific genes to alter the cellular phenotypes that are associated with neoplastic transformation of cells. Cells with induced, heritable phenotypic changes, such as morphological alterations, can be shown to have a higher propensity to progress to tumor cells, which validates the use of these phenotypic markers as quantitative measures of cell transformation. Cell transformation assays differ from other short-term *in vitro* assays for carcinogens because they are not predicated on a theoretical association between carcinogenesis and mutagenesis and therefore are able to detect chemical carcinogens that are not active in mutational assays. Cell transformation assays can be used for the identification of potential carcinogens, for studies of the mechanism of action of chemicals, and for studies of the carcinogenic process. Each of these uses are illustrated with the Syrian hamster embryo cell transformation model. This model uses normal, diploid cells and identifies a number of known human carcinogens not active in other short-term assays for carcinogens. The limitations of cell transformation assays are also discussed. One major limitation is the use of rodent cells rather than human cells, and the possible ramifications of this are discussed. The differences between transformation of human versus rodent cells have implications to the cancer and aging processes.

**Keywords :** cell transformation, mutagenesis, nongenotoxic carcinogens, Syrian hamster embryo cells, cellular senescence, immortalization

### Introduction

Identification of environmental carcinogens and assessment of the potential risks of these substances to humans requires experimental systems to mea-

received : July, 11, 1998

accepted : July, 13, 1998

\* To whom correspondence should be addressed.

Tel. 919/541-3205 ; Fax. 919/541-7784 ; E-Mail. barrett@niehs.nih.gov

© Environmental Mutagen Society of Japan

sure qualitatively and quantitatively the activity of carcinogens and tumor promoters. Cell culture systems are potentially very useful experimental models for such studies. A variety of short-term, inexpensive cell culture assays to examine the effects of putative carcinogens is readily available. Some of these cell transformation assays have a high predictive ability for the detection of known carcinogens with few false-positive results (Isfort and LeBoeuf, 1995 ; Isfort and LeBoeuf, 1996). Cell transformation is defined as the induction of phenotypic alterations

**Table 1** Advantages and disadvantages of cell transformation systems for carcinogen testing

Advantages	
1.	Cell transformation assays are not predicated on a theoretical correlation between carcinogenesis and mutagenesis or other genotoxic endpoints.
2.	
3.	Cell transformation assays have been shown to detect known human carcinogens not readily detected by other tests.
4.	These assays can potentially detect tumor promoters and cocarcinogens.
5.	Cell transformation systems can be used to study the cellular mechanisms of carcinogenesis.
Disadvantages	
1.	Cell transformation assays require more specialized technical expertise than assays with prokaryotic cells.
2.	Some cell transformation assays involve subjective scoring criteria.
3.	The time required to perform cell transformation assays can be relatively long compared to mutational assays.
4.	The development of cell transformation assays is not as advanced as other toxicity tests.
5.	Cell transformation assays commonly use rodent cells rather than human cells.

in cells in culture (for example, morphological transformation, focus formation on cell monolayer, growth in agar, and altered growth potential on plastic). These phenotypic changes are associated with the neoplastic transformation of the cells measured by their ability to form tumors in animals. The use of cell transformation assays to study chemical carcinogenesis allows analysis of the cellular events in neoplastic progression independent of certain host effects, such as immunological surveillance and cell-tissue interactions.

Cell transformation assays as tests for the potential carcinogenicity of chemicals have several advantages and disadvantages as listed in Table 1. In contrast to several other short-term *in vitro* tests, such as the Ames test, cell transformation assays for carcinogens are not predicated on a theoretical correlation between carcinogenesis and mutagenesis or other genotoxic endpoints. Rather, the endpoints of these assays can be related to the neoplastic conversion of a cell, a central, but not singular, aspect of carcinogenesis. Cell transformation assays are based, however, on the assumption that neoplastic transformation induced in cells in culture occurs by the same mechanisms as neoplastic alteration of cells *in vivo*. Cell transformation assays have detected chemicals that are not detected readily in gene mutation assays (Table 2). This result suggests that cell transformation assays detect relevant

**Table 2** Chemicals that induce SHE cell transformation and are reported as nonmutagenic

3-Aminotriazole (Amitrole) (Inoue et al., 1981)
Arsenicals* (Lee et al., 1985)
Asbestos* (Hesterberg and Barrett, 1984)
Benzene (Tsutsui et al., 1997)
Colcemid* (Tsutsui et al., 1984)
Diethylstilbestrol* (Barrett et al., 1981)
17 $\beta$ -Estradiol (Tsutsui et al., 1987)
Sodium Bisulfite (Tsutsui and Barrett, 1990)
Testosterone (Tsutsui et al., 1995)

\*Gene mutation and cell transformation measured concomitantly in the same cells.

carcinogen-induced events other than gene mutations. For example, certain known human carcinogens that are not readily detected by other short-term tests have been shown to induce SHE cell transformation; including diethylstilbestrol (Barrett et al., 1981), 17 $\beta$ -estradiol (Tsutsui et al., 1987), arsenic (Lee et al., 1985), benzene (Tsutsui et al., 1997), and asbestos (Hesterberg et al., 1984). These results emphasize the importance of cell transformation assays in the testing of chemicals for potential carcinogenicity.

The cellular mechanisms of carcinogenesis can also be addressed experimentally with transformation assays, including the multi-stage models of carcinogenesis, oncogenes and cancer, and the relationship between mutagenesis and carcinogenesis (Barrett, 1991; Barrett et al., 1987a). In addition to detecting carcinogens, cell transformation assays can potentially detect tumor promoters (Barrett et al., 1987b). However, the mechanisms of tumor promotion are undefined as we have discussed in more detail elsewhere (Barrett, 1987). Tumor promotion probably involves changes in population dynamics that cannot be mimicked in cell culture. Therefore, the relevance of cell transformation systems to study this problem can be questioned (Barrett and Thomassen, 1985).

The disadvantages of cell transformation assays include the more specialized technical expertise and facilities needed for these assays compared to some other short-term assays. Some variability in results with cell transformation assays exists due mostly to variability in fetal bovine serum which is a required, but undefined, component in most mammalian cell culture systems. This variability has been reduced with optimization of culture conditions.

Another disadvantage of cell transformation as-

says includes subjective scoring criteria. However, recent attempts to use computer-based image analysis look promising. The time required for these assays, which is 2 to 6 weeks depending on the system, is protracted compared to prokaryotic mutation assays. In general, several months may be required to complete and repeat assays on a chemical. In addition, if one wishes to confirm that cells transformed by a chemical are tumorigenic *in vivo*, several additional months, up to 1 year, are required. An advantage, however, is the strong correlation between *in vitro* agar growth and tumorigenicity *in vivo*. However, this is still more rapid and cost efficient than *in vivo* animal bioassays.

Cell culture systems for studying carcinogenesis provide important information on the cellular basis for neoplastic transformation and permit the detection of chemicals that induce this change. In addition, cell transformation assays are valuable experimental tools for predicting the carcinogenic potential of chemicals and for studies for mechanism of action of carcinogens and mechanisms of the carcinogenic process.

The Syrian hamster embryo (SHE) system has been used successfully for each of these applications. This system has a number of advantages, including the fact that it uses normal, diploid cells; it has a low frequency of spontaneous transformation, and the cells are highly sensitive to a wide variety of carcinogenic agents. Drs. LeBouef and Tsutsui have illustrated the utility of this model to predict carcinogenic potential of chemicals. Our laboratory has shown that this system detects many of the known human carcinogens (Barrett et al., 1985), and we have studied their mechanisms of action with this model (Barrett, 1991; Barrett et al., 1987a). This system has also been used to study the relationship between mutagenesis and carcinogenesis (Barrett and Fletcher, 1987).

The multistep process of carcinogenesis can also be studied in the SHE cell model (Barrett, 1987). The first detectable change in these cells, following carcinogen exposure, is a morphological change. Morphological transformation is the basis for quantitative studies of cell transformation by chemicals in this model, but the mechanisms leading to morphological transformation are yet undefined. SHE cells that are morphologically transformed have a higher propensity to escape cellular senescence and become immortal. Carcinogenic-induced immortal cells are initially nontumorigenic and must undergo

a number of additional alterations to become tumorigenic, including loss of tumor suppressor gene (s) and activation of oncogene (s), but the exact genes involved are mostly unknown (Barrett, 1993; Boyd and Barrett, 1990).

Escape from cellular senescence is an important, carcinogen-induced step in the neoplastic progression of cells (Vojta and Barrett, 1995). However, human cells and hamster cells have shown a distinct difference in the ability to escape cellular senescence (Vojta and Barrett, 1995), a process that requires the loss of normal genes that regulate cellular senescence (termed senescence genes). Identification of these genes and their role in cancer is important for understanding multistep cell transformation. Therefore, our laboratory has focused on this question.

Normal cells in culture have a limited lifespan in culture. After a number of population doublings, they cease proliferating, fail to respond to mitogenic signals, and enlarge in size, a process termed cellular senescence. Many, but not all, tumor cells can be grown indefinitely in culture and therefore have escaped senescence and are immortal. Several lines of evidence support the hypothesis that the program of cellular senescence is controlled by specific genes and these senescence genes are inactive or mutated in immortal, cancer cells (Vojta and Barrett, 1995). Most hybrids between normal cells and immortal cells undergo cellular senescence, indicating that immortality is recessive. Hybrids that escape senescence have nonrandom chromosome losses. Fusions of certain immortal cell lines with other immortal cell lines may also yield senescent cell hybrids, and four complementation groups for senescence have been reported (Pereira-Smith and Smith, 1983). Introduction of the senescence program to immortal cell lines has been shown by chromosome transfer and more than a dozen cellular senescence genes have been mapped to chromosomes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 17, 18, and X by this experimental approach (Vojta and Barrett, 1995; Oshimura and Barrett, 1997). Specific chromosomes induce senescence of certain cell lines and not others, indicating that different senescence genes are altered in different immortal cell lines. Cell cycle control proteins (e.g., p53, Rb, and p16) are often mutated in immortal cell lines, and transfer of these genes to immortal cell lines can restore the senescent phenotype. These findings support the hypothesis that senescence is genetically controlled. A few known genes are involved in this process, but multiple other genes have been mapped but not yet cloned.

Following the introduction of specific chromosomes to immortal cell lines and the restoration of the senescent program, the cells may show growth arrest after only a limited number of cell divisions (<10), or after 20-40 population doublings, depending on the chromosome introduced (Oshimura and Barrett, 1997). These results suggest different mechanisms of senescence regulation and that two functions are associated with senescence genes. The first function is cell cycle arrest. Cell cycle control proteins (e.g., Rb, p53, and p16) have properties of senescence genes as discussed above. A second putative function of senescence genes, which have been mapped but not yet cloned, is the regulation of telomerase. Telomeres, the repeat sequences at the ends of chromosomes, shorten in normal somatic cells, but not in immortal cells that have an active telomerase enzyme that synthesizes new telomere repeat sequences. Senescence genes may function by regulating the activity of telomerase in immortal cells, resulting in telomere shortening and eventual cellular senescence. For example, introduction of chromosome 3 into a renal cell carcinoma cell line resulted in suppression of telomerase activity, telomere shortening, and cellular senescence.

A model for cellular senescence has been proposed (Oshimura and Barrett, 1997). According to this model, cellular senescence is the consequence of the accumulation of multiple types of cellular damage during growth and aging. Cell division arrest in senescent cells is the consequence of damage-induced activation of specific cell cycle control pathways (checkpoints) that arrest cells for repair. Cellular senescence may be a state of semi-permanent arrest (checkmate) due to the inability to repair cellular damage. Escape from cellular senescence requires multiple mutations/defects in cell cycle checkpoint controls, and/or activation of new "repair" capacities, protection from cell damage, or blocks to cell death. Escape from cellular senescence may lead to genetic instability and increased risk of neoplastic progression. Several lines of evidence support this model, including the findings that cellular senescence is genetically controlled, multiple senescence genes are inactivated in immortal cell lines, multiple pathways are involved in cellular senescence, and multiple types of cellular damage accumulate in aging cells.

A further understanding of the genes involved in cell transformation and immortalization or, more importantly, a better understanding of non-mutagenic mechanisms leading to cell transforma-

tion and carcinogenesis, will assist in the understanding and development of better *in vitro* predictor assays for carcinogens.

### References

- Barrett, J. C., A. Wong and J. A. McLachlan (1981) Diethylstilbestrol induces neoplastic transformation of cells in culture without measurable somatic mutation at two loci, *Science*, 212, 1402-1404.
- Barrett, J. C., T. W. Hesterberg, M. Oshimura and T. Tsutsui (1985) Role of chemically induced mutagenic events in neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells, In : J. C. Barrett and R. W. Tennant (Eds.), *Carcinogenesis-A Comprehensive Survey : Mammalian Cell Transformation : Mechanisms of Carcinogenesis and Assays for Carcinogens*, Vol. 9, Raven Press, New York, pp. 123-137.
- Barrett, J. C. and D. G. Thomassen (1985) Use of quantitative cell transformation assays in risk estimation, In : V. B., Vouk, G. C. Butler, D. G. Hoel and D.B. Peakall (Eds.), *Methods for Estimating Risk of Chemical Injury : Human and Non-Human Biota and Ecosystems*. SCOPE, SGO, SEC 2, IPCS Joint Symposia 3, John Wiley and Sons, New York, pp. 201-234.
- Barrett, J. C. (1987) A multistep model for neoplastic development : role of genetic and epigenetic changes, In : J. C. Barrett (Ed.), *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis : Multistep Models of Carcinogenesis*, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, pp. 117-126.
- Barrett, J. C. and W. F. Fletcher (1987) Cellular and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis in cell culture models, In : Barrett, J. C. (Ed.), *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis : Multistep Models of Carcinogenesis*, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, pp. 73-116.
- Barrett, J. C., M. Oshimura, N. Tanaka and T. Tsutsui (1987a) Genetic and epigenetic mechanisms of presumed nongenotoxic carcinogens, In : B. Butterworth and T. J. Slaga (Eds.), *Nongenotoxic Mechanisms in Carcinogenesis* : Banbury Report 25, Cold Spring Harbor Press, New York, pp. 311-324.
- Barrett, J. C., T. T. Kakunaga, T. Kuroki, D. Neubert, J. E. Trosko, J. M. Vasiliev, G. M. Williams and H. Yamasaki (1987b) In-vitro assays that may be predictive of tumor-promoting agents, In : R. Montesano H. Bartsch, H. Vainio, J. Wilbourn and H. Yamasaki (Eds.), *Report 10-Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens*, Vol. 83, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 287-302.
- Barrett, J. C. (1991) Relationship between mutagenesis and carcinogenesis, In : *Origins of Human Cancer : A Comprehensive Review*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 101-112.
- Barrett, J. C. (1993) Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment, *Environ. Health Perspect.*, 100, 9-20.
- Boyd, J. A. and J. C. Barrett (1990) Genetic and cellular basis of multistep carcinogenesis, *Pharmacol. Ther.*, 46, 469-486.
- Hesterberg, T. W. and J. C. Barrett (1984) Dependence of asbestos-and mineral dust-induced transformation of mammalian cells in culture on fiber dimension, *Cancer Res.*, 44, 2170-2180.
- Inoue, K., Y. Katoh and S. Takayama (1981) In vitro transformation of hamster cells by 3-(N-salicyl)amino-1, 2, 4-triazole, *Toxicol. Lett.*, 1, 211-215.
- Isfort, R. and R. A. LeBoeuf (1995) The Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation system : a biologically relevant *in vitro* model--with carcinogen predicting capabilities--of *in vivo* multistage neoplastic transformation, *Crit. Rev. Oncog.*, 6, 251-260.
- Isfort, R. J. and R. A. LeBoeuf (1996) Application of *in vitro* cell transformation assays to predict the carcinogenic potential of chemicals, *Mutat. Res.*, 365, 161-173.
- Lee, T. C., M. Oshimura and J. C. Barrett (1985) Comparison of arsenic-induced cell transformation, cytotoxicity, mutation and cytogenetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture, *Carcinogenesis*, 6, 1421-1426.
- Oshimura, M. and J. C. Barrett (1997) Multiple pathways to cellular senescence : Role of telomerase repressors, *Eur. J. Cancer*, 33, 710-715.
- Pereira-Smith, O. M. and J. R. Smith (1983) Evidence for the recessive nature of cellular immortality, *Science*, 221, 964-966.
- Tsutsui, T. and J. C. Barrett (1990) Sodium bisulfite induces morphological transformation of cultured Syrian hamster embryo cells but lacks the ability to induce detectable gene mutations, chromosome mutations, or DNA damage, *Carcinogenesis*, 11, 1869-1873.
- Tsutsui, T., N. Hayashi, M. Maizumi, J. Huff and J. C. Barrett (1997) Benzene-, catechol-, hydroquinone-, and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells, *Mutat. Res.*, 373, 113-123.
- Tsutsui, T., A. Komine, J. Huff and J. C. Barrett (1995) Effects of testosterone, testosterone propionate, 17 $\beta$ -trenbolone, and progesterone on cell transformation and mutagenesis in Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis*, 16, 1329-1333.
- Tsutsui, T., H. Maizumi, and J. C. Barrett (1984) Colcemid-induced neoplastic transformation and aneuploidy in Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis*, 5, 89-93.
- Tsutsui, T., N. Suzuki, S. Fukuda, M. Sato, H. Maizumi, J. A. McLachlan and J. C. Barrett (1987) 17 $\beta$ -Estradiol-induced cell transformation and aneuploidy of Syrian hamster embryo cells in culture, *Carcinogenesis*, 8, 1715-1719.
- Vojta, P. J. and J. C. Barrett (1995) Genetic analysis of cellular senescence, *Biochim. Biophys. Acta*, 1242, 29-41.

本稿は1998年5月29日、東京のヤクルトホールで開催された日本環境変異原学会主催の第9回公開シンポジウム「モデルDNA損傷と変異機構」（企画：根岸和雄、早津彦哉）で発表された（座長：太田敏博）。

## シトシンアナログによる塩基の誤対合と変異

根岸 和雄

岡山大学遺伝子実験施設 〒700-8530 岡山市津島中1-1-1

### Mutagenic cytosine analogs: Mispairing and mutagenesis

Kazuo Negishi

Gene Research Center, Okayama University, Tsushima, Okayama 700-8530, Japan

#### Summary

We have found two highly mutagenic cytosine analogs, *N*<sup>4</sup>-aminocytidine and P-nucleoside. Inside cells, these analogs are metabolized to the triphosphates, which can be incorporated into DNA by the replication machinery. Due to their ability to pair with guanine and adenine, they can induce replicational errors which would result in mutations. There seems to be two reasons for their high mutagenic potency. First, their efficient incorporation and low tautomeric constants cause high error rates in replication. Second, the analogs are retained in DNA because the cellular repair systems cannot remove these incorporated analogs efficiently.

(This paper, chaired by Toshihiro Ohta, was presented to the 9th JEMS Annual Symposium, "Synthetic Models for DNA Damage and Mutagenesis", organized by Kazuo Negishi and Hikoya Hayatsu, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at Yakult Hall, Tokyo, May, 29, 1998.)

**Keywords:** *N*<sup>4</sup>-aminocytidine, P-nucleoside, methoxyamine, hydrazine, replicational errors, transition mutation

#### 1. 変異原性ヌクレオシドアナログとは

核酸構成成分によく似た物質を細胞に与えれば、細胞の核酸代謝と関わって、生体にさまざまな影響を与える可能性があることは容易に想像される。正常のヌクレオシドではないが、これによく似た構造を持ち、正常ヌクレオシドと同様に代謝される物質をヌクレオシドアナログという。そのアナログがDNA複製の際にエラーを引き起こせば、変異が誘導される。このような性質を持つ化合物が変異原性ヌクレオシドアナログ、あるいは変異原性塩基アナログであり、長い間多くの研究が行われてきた(Negishi et al., 1994; 根岸和雄、早津彦哉, 1995)。自然突然変異の原因の一つは塩基が互変異性を起すこと

受付: 1998年8月5日

受理: 1998年8月25日

©日本環境変異原学会

であると信じられてきた。ピリミジン塩基を考えると、シトシンは通常のアミノ型の他にイミノ型を取ればアデニンと塩基対を形成しうるし、チミンがエノール型を取れば、グアニンと塩基対を形成する可能性がある(ただし、実際に変異の原因となるだけの割合で、rare formが存在するかどうかは問題である)。変異原性アナログとはこの互変異性定数が正常の塩基よりずっと大きい化合物と考えられてきた。Freeseは、5-ブロモウラシルや2-アミノプリンによる変異のメカニズムとして、取込みエラーと複製エラーによる変異のメカニズムを提出した(Freese, 1959 a, b)。すなわち、アナログが取込まれる際に対合する塩基と、取込まれた後に錆型となる際に対合する塩基が、異なっていれば、変異の誘導が起きる(Fig. 1に後述のdPの例を示した)。5-ブロモウラシルの場合、KatrizekyとWaring(1962)による有名な実験があり、エノール型の存在比率がウラシルよりもずっと大きいという推定がなされているが、この測定は濃い酸の中

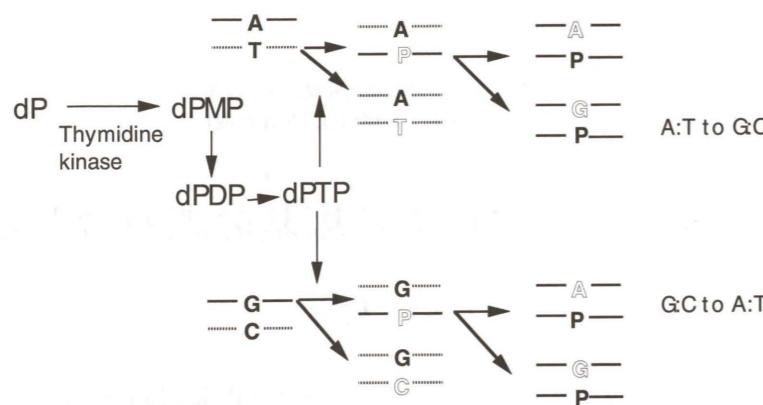


Fig. 1 Probable pathway of dP mutagenesis in *E. coli*.

で行われており、生理的な中性条件下でもこの数値が正しいかどうかは判断がむずかしい。一方、Brown らはヒドロキシルアミンとシトシンの反応で生じる *N*<sup>4</sup>-ヒドロキシシトシンやヒドラジンとシトシンとの反応で生じる *N*<sup>4</sup>-アミノシトシンについて、アミノ型に固定された誘導体とイミノ型に固定された誘導体をそれぞれの化合物について合成し、それらの pKa から、*N*<sup>4</sup>-ヒドロキシシトシン(*N*<sup>4</sup>-Coh)ではアミノ型:イミノ型が 1:10, *N*<sup>4</sup>-アミノシトシン(*N*<sup>4</sup>-Cam)では 30:1 と推定した (Brown et al., 1968)。この値から単純に計算すると、もし DNA にこれらの塩基が取込まれれば、*N*<sup>4</sup>-Coh ひとつにつき 10%, *N*<sup>4</sup>-Cam ひとつにつき 3% の確率で変異が生じることになる。

## 2. アナログの DNA への取込みと変異誘導

Brown のグループは実際にこれらの塩基アナログやそのデオキシリボシドに変異原性があることを見出した (Chu, et al., 1974)。一方われわれは、亜硫酸イオン触媒下のヒドラジンとシチジンとの反応を研究していたが、その反応生成物である *N*<sup>4</sup>-アミノシチジンの変異原性に興味を持ち、その変異原性を調べたところ、大腸菌やサルモネラ菌でデオキシ体に比べ非常に強い変異原性を持つことがわかった (Negishi et al., 1983)。これは大腸菌やサルモネラ菌がデオキシシチジンをリン酸化するデオキシシチジンキナーゼを持っていないことによると考えられる。ただし、デオキシシチジンキナーゼを持っている枯草菌でも *N*<sup>4</sup>-アミノシチジンの方が *N*<sup>4</sup>-アミノデオキシシチジンより変異原性が強い理由は不明である。*N*<sup>4</sup>-アミノシチジンはウリジン・シチジンキナーゼによりリン酸化され、核酸代謝系に入り、デオキシ体となつ後、トリリン酸体になり DNA に取込まれると考えられる。培養細胞や大腸菌を *N*<sup>4</sup>-アミノシチジンが DNA 中に観察される (Nomura, et al., 1987; Negishi, et al., 1988)。ただし、大部分の *N*<sup>4</sup>-アミノシチジンは代謝のどこかの段階で脱アミノ化を受け、ウリジン型の化合物に

変化する。5 位をトリチウムで標識した *N*<sup>4</sup>-アミノシチジンを大腸菌に取込ませると、DNA 中の放射活性の大部分はデオキシシチジンに取込まれている。これは、一度、*N*<sup>4</sup>-アミノシチジンまたはその代謝物がウリジン誘導体となつ後、デオキシシチジン合成に用いられたものと考えられる。また、取込みのメカニズムから考えて、RNA に DNA よりも高い含量で取込まれている可能性もあり、現在分析中である。このようにヒドラジン型のシトシンアナログは高い変異原性を持つことがわかった。一方、ヒドロキシルアミン型のシトシンアナログもよく研究されてきた (Janion and Glickman, 1980; Śledziewska-Gójska and Janion, 1982; Bębenek and Janion, 1985)。*N*<sup>4</sup>-ヒドロキシシチジンの場合も、リボ型の方がデオキシ型よりもずっと変異原性が大きい。構造がイミノ型に近い *N*<sup>4</sup>-ヒドロキシデオキシシチジンの場合、チミジンキナーゼによる取込みも十分に考えられるが、その効率は高くないようにみえる。*N*<sup>4</sup>-ヒドロキシシチジンも細菌内で代謝されるが (Popowska and Janion, 1975; Popowska and Janion, 1977)，その詳細はよくわかっていない。ヒドロキシルアミンの代りにメトキシアミンをシチジンに働かせると、*N*<sup>4</sup>-メトキシシチジンを生じる。その類縁体として、Brown らのグループは新たなデオキシリボヌクレオシドアナログを作り、P-ヌクレオシド(dP)と名付けた。この化合物の変異原性を調べたところ、強い活性を持つことがわかった。

そこで、これに興味を持ち、その変異メカニズムを研究した (Negishi et al., 1997)。この化合物は前述のシトシンアナログとは異なり、チミジンキナーゼによりリン酸化されて核酸代謝系に入るらしい (Fig. 1)。チミジンキナーゼを欠く変異体大腸菌では、ほとんど変異原性を示さない。また、リボ P-ヌクレオシド(rP)はほとんど変異原性を示さないが、これは、ウリジンシチジンキナーゼが 5 位置換ピリミジンをリン酸化しないためと思われる。大腸菌 dP を含む培地に添加すると、少なくともチミジン 1000 分子に対して dP 1 分子までは、加えた dP 量に比例して DNA 中の dP 量が増加する。

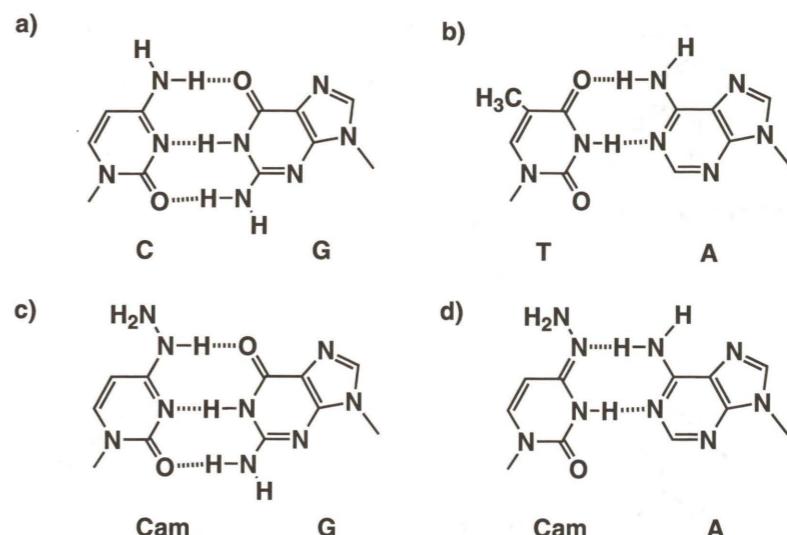


Fig. 2 Normal base-pairs (a, b) and models of Cam-G pair (c) and Cam-A pair (d). An amino form of Cam is close to C not only in its ability to hydrogen-bond with G, but also in its shape. Its imino form is close to T in its shape as well as in its ability to hydrogen-bond with A.

## 3. 複製エラー誘導の機構

*N*<sup>4</sup>-アミノデオキシシチジン dCam のトリリン酸体、dCamTP (Negishi et al., 1985) や dP のトリリン酸体、dPTP (Zaccollo et al., 1996; Negishi et al., 1997) がグアニンの相手にもアデニンの相手にも取込まれることは、生化学的に証明することができる。錆型中に含まれる場合については、dP を含むオリゴヌクレオチドの合成に成功し、dATP と dGTP を取込むことが証明されている。dCam がヒドラジン化合物としての反応性を持っているため、分解物を含まない dCam を含むオリゴヌクレオチドの合成は困難である。そこで、dCamTP を取込まれた DNA を大腸菌に導入したときの変異を解析することにより、間接的に証明している (Matsumoto et al., 1992)。

それでは、なぜこれらのアナログはグアニンともアデニンとも塩基対を形成できるのだろうか。その理由としては、最初に述べた互変異性による説明がまず考えられる。正常塩基であるシトシンはほとんどがアミノ型で存在しているが、*N*<sup>4</sup>-アミノシチジンの場合、NMR で分析すると、2 セットのシグナルが観察され、その量比は 7:3 である。X 線結晶構造解析の結果から結晶中の形がアミノ型であることがわかっている。また、紫外吸収がシチジンによく似ていること、Brown らによる誘導体の実験 (Brown et al., 1968) からアミノ型が大部分であることは間違いない。そこで、アミノ型が約 70%，イミノ型が約 30% 水溶液中で存在していると考えることができる。DNA 合成における取込みの実験では、dCamTP は dCTP の 1/2 の効率でグアニンの相手として、dTTP

の 1/20 の効率でアデニンの相手に取込まれる。アミノ型がグアニンの相手に、イミノ型がアデニンの相手に取込まれるとすれば、イミノ型の取込み効率はアミノ型よりも低いことになる。最近米国の Kool らは、チミジンと分子の形はよく似ているが全く塩基対形成能を持たないジフルオロトルエン誘導体が、選択的にアデニンの相手として取込まれることを報告し、水素結合が DNA 合成の際の塩基の選択に必須ではないことを報告している (Moran et al., 1997)。もしこれが一般的に当てはまるとなれば、アミノ型、イミノ型はそれぞれグアニン、またはアデニンと水素結合を形成できるからではなく、シトシン、またはチミン (ウラシル) に格好が似ているゆえにそれらの代りに取込まれるということになる (Fig. 2)。このことは今後の興味深い問題と考えられる。

*N*<sup>4</sup>-アミノシチジンはリボヌクレオシドとして核酸代謝系に入る。このことは、リボヌクレオチドである *N*<sup>4</sup>-CamTP が細胞内で生じている可能性が大きいことを示している。dP の場合には、デオキシ体であるので、リボヌクレオチド PTP が dP から生じる可能性は少ないが、このようなリボヌクレオチドアナログが複数の塩基と塩基対を形成して、RNA に取込まれるかどうかは興味深い問題である。そこで、PTP を合成し、その取込みをモデル系で調べたところ、CTP の代りとしても、UTP の代りとしても働くことから、アデニンともグアニンとも塩基対を形成できることがわかった (Moriyama et al., 1998)。効率は、CTP の代りとして働く場合、CTP の 25 分の 1, UTP の代りとして働くとき、UTP の 5 分の 1 である。もし、細胞内で PTP ができれば、転写や翻訳のプロセスでエラーを起すことが予想される。

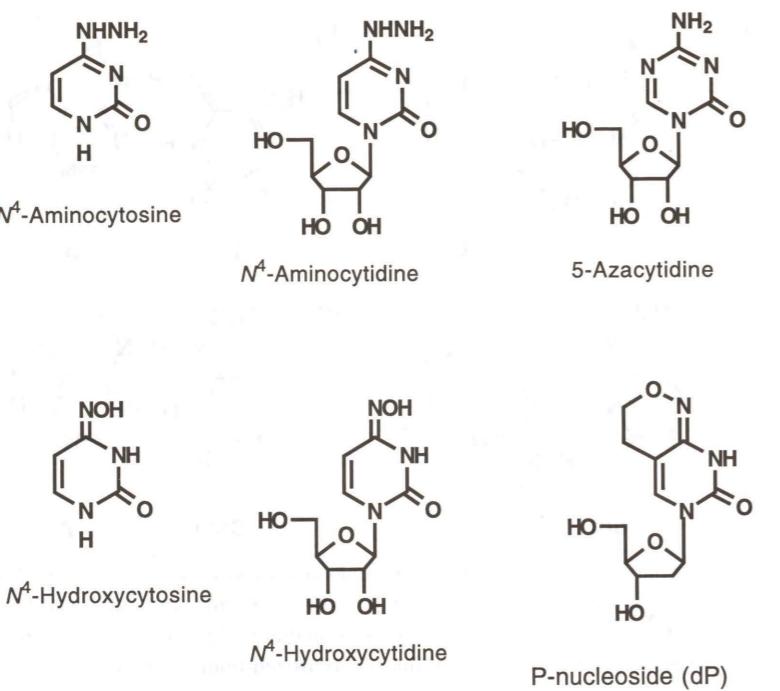


Fig. 3 Mutagenic cytosine analogs.

#### 4. N<sup>4</sup>-アミノシチジンやP-ヌクレオシドの変異原性はなぜ高いか

その原因の一つ目は、取込みの効率がよいことが考えられる。いずれも、少なくとも数千ヌクレオチドにつき度までは、ほとんど毒性も示さず取込まれる。このようないくつかのヌクレオチドを加えて培養すると、1時間程度で最大となつた後含量はどんどん減少していく。おそらく観察されている変異の大部分は、培養の比較的初期に起こっているものと考えられる。他の変異原性アノログの場合、5-ブロモウラシルを除けば、変異をみるような条件でDNA中の含量が計られた例は、筆者の知る限りない。これはおそらく含量が少なすぎるためと考えられる。5-ブロモウラシルは条件によっては100%チミンと置き換えることができるが、変異誘導能は高くない。たとえばエームズテストでは全く活性を示さない。われわれの酵母の実験でも、5-ブロモウラシルを染色体DNAに導入しても、変異誘導は全く観察されなかった(Noskov et al., 1994)。5-ブロモウラシルが変異を起すためには、ヌクレオチドプールがアンバランスになっている必要があるといわれている(Kaufman, 1988)。アミノシチジンやP-ヌクレオシドの場合、このようなヌクレオチドプールを乱すことによる促進効果があるかどうかは、まだ明らかで

はないが、培地中に加えたアノログの濃度、DNA中の量、変異頻度の三者が比例関係にあることから、プールの影響はあまりなく、単純に複製エラーにより変異が起きている可能性が高い(Negishi et al., 1988; Negishi et al., 1997)。

もう一つの可能性としては修復との関係が考えられる。細胞の修復系により修復されにくければ、DNA中に変異原性アノログが長くとどまることになり、変異頻度も高くなることが予想される。*uvrABC*除去修復系の有無で比べると、アミノシチジンの場合、この修復系を欠いた*uvrA*変異株でのDNA中のdCmの含量は、野生型のものに比べ、約50%高く、変異頻度は3倍程度にすぎない。ミスマッチ修復系の有無でアミノシチジンによる変異頻度を比較すると、その比は2-4倍であった。ヒドロキシシチジンの場合、比は数十倍になるので、ヒドロキシシチジンの方がずっと効率良くミスマッチ修復系で修復されることがわかる(Negishi et al., 1988)。このような修復系のほかに、DNAポリメラーゼ自身に異常ヌクレオチドを排除する機構が備わっているらしい。その機能が強まった変異株、すなわちアンチミューターター株がいくつか分離されている。あるアンチミューターター株では、アデニンのアノログであるヒドロキシアデニンがほとんど変異原性を示さない。一方、アミノシチジンではその比は最高6.5倍で、ずっと小さい(Schaaper and Dunn, 1998)。P-ヌクレオシドでもその比はたかだか7倍程度である。このように、アミノシチジンやP-ヌクレオシドは細胞の異常塩基排除機構の効率があまりよくなさそうに見える。このことも、変異

原性の強さの原因と考えられる。

Fig. 3に、今まで知られている変異原性シトシン(シチジン)アノログを示す。変異原性のシチジンアノログとして他と性質が異なるようにみえるものに5-アザシチジンがある。この化合物は、もともと動物細胞DNA中の5-メチルシトシンをシトシンに戻す物質として有名である(Jost and Saluz, 1993)が、このものは変異原性も示すことが知られている(Podger, 1983; Zimmermann and Scheel, 1984; Katz, 1985; Podger and Grigg, 1986; Schmuck, 1986; McGregor et al., 1989; Katoh et al., 1993; Stopper, 1993)。この化合物が興味深い点は、GC塩基対からCG塩基対へのトランスポージョンを引起すことである。複製エラーモデルに従えば、このアノログは、通常のグアニンとの塩基対形成に加え、シトシンとも塩基対を形成する必要がある。これは互変異性では説明することができない。このアノログによる動物細胞における変異がメチル基転移酵素との反応によるという説が最近出されている(Jackson-Grusby et al., 1997)。しかし、これで大腸菌や酵母の変異メカニズムまで説明できるとは考えにくいので、依然として興味深い未知の問題と思われる。

#### 参考文献

- Brown, D. M., M. J. E. Hewlins and P. Schell (1968) The tautomeric state of N(4)-hydroxy-and N(4)-amino-cytosine derivatives, *J. Chem. Soc. (C)*, 1925-1929.  
 Bcebene, K. and C. Janion (1985) Ability of base analogs to induce the SOS response: effect of a dam mutation and mismatch repair system, *Mol. Gen. Genet.*, 201, 519-524.  
 Chu, B. C. F., D. M. Brown and M. G. Burdon (1974) N(4)-Amino-and N(4)-hydroxycytosines as base analogue mutagens, *Mutat. Res.*, 23, 267-273.  
 Freese, E. (1959a) The difference between spontaneous and base-analogue induced mutations of phage T4, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 45, 622-633.  
 Freese, E. (1959b) The specific mutagenic effect of base analogues on phage T4, *J. Mol. Biol.*, 1, 87-105.  
 Jackson-Grusby, L., P. W. Laird, S. N. Magge, B. J. Moeller and R. Jaenisch (1997) Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 4681-4685.  
 Janion, C. and B. W. Glickman (1980) N(4)-Hydroxycytidine: A mutagen specific for AT to GC transitions, *Mutat. Res.*, 72, 43-47.  
 Jost, J. P. and H. P. Saluz (1993) (Eds) DNA methylation: Molecular biology and biological significance, Birkhäuser Verlag, Basel.  
 Kaufman, E. R. (1988) The role of deoxyribonucleotide metabolism in 5-bromo-2'-deoxyuridine mutagenesis in mammalian cells, *Mutation Res.*, 200, 149-155.  
 Katoh, Y., M. Maekawa and Y. Sano (1993) Effects of 5-azacytidine on somatic mutation in a soybean test system, *Mutat. Res.*, 300, 49-55.  
 Katritzky, A. R. and A. J. Waring (1962) Tautometric azines. Part I. The tautomerism of 1-methyluracil and 5-bromo-1-methyluracil, *J. Chem. Soc.*, 1540-1544.  
 Katz, A. J. (1985) Genotoxicity of 5-azacytidine in somatic cells of *Drosophila*, *Mutat. Res.*, 143, 195-199.  
 Matsumoto, K., T. Yashiki, T. Bessho, K. Negishi and H. Hayatsu (1992) Analysis of phage M13mp2 mutants produced from transfection of phage DNA having N<sup>4</sup>-aminocytosines at defined sequence positions, *Mutat. Res.*, 268, 59-64.  
 McGregor, D. B., A. G. Brown, P. Cattanach, W. Shepherd, C. Riach, D. S. Daston and W. J. Caspary (1989) TFT and 6TG resistance of mouse lymphoma cells to analogs of azacytidine, *Carcinogenesis*, 10, 2003-2008.  
 Moran, S., R. X.-F. Ren and E. T. Kool (1997) A thymidine triphosphate shape analog lacking Watson-Crick pairing ability is replicated with high sequence selectivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 10506-10511.  
 Moriyama, K., K. Negishi, M. S. J. Briggs, C. L. Smith, F. Hills, M. J. Churcher, D. M. Brown and D. Loakes (1998) Synthesis and RNA polymerase incorporation of the degenerate ribonucleotide analogue rPTP, *Nucleic Acids Res.*, 26, 2105-2111.  
 Negishi, K., C. Harada, Y. Ohara, K. Oohara, N. Nitta and H. Hayatsu (1983) N<sup>4</sup>-Aminocytidine, a nucleoside analog that has an exceptionally high mutagenic activity, *Nucleic Acids Res.*, 11, 5223-5233.  
 Negishi, K., T. Bessho and H. Hayatsu (1994) Nucleoside and nucleobase analog mutagens, *Mutat. Res.*, 318, 227-238.  
 根岸和雄, 早津彦哉(1995)ヌクレオチドアノログによる塩基対合異常と突然変異, 蛋白質・核酸・酵素, 40, 1564-1571.  
 Negishi, K., M. Takahashi, Y. Yamashita, M. Nishizawa and H. Hayatsu (1985) Mutagenesis by N<sup>4</sup>-aminocytidine: induction of AT to GC transition and its molecular mechanism, *Biochemistry*, 24, 7273-7278.  
 Negishi, K., K. Tamanoi, M. Ishii, M. Kawakami, Y. Yamashita and H. Hayatsu (1988) Mutagenic nucleoside analog N<sup>4</sup>-aminocytidine: Metabolism, incorporation into DNA, and mutagenesis in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 170, 5257-5262.  
 Negishi, K., D. M. Williams, Y. Inoue, K. Moriyama, D. M. Brown and H. Hayatsu (1997) The mechanism of mutation induction by a hydrogen bond ambivalent, bicyclic N<sup>4</sup>-oxy-2'-deoxycytidine in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, 25, 1548-1552.  
 Nomura, A., K. Negishi, H. Hayatsu and Y. Kuroda (1987) Mutagenicity of N<sup>4</sup>-aminocytidine and its derivatives in Chinese hamster lung V79 cells: Incorporation of N<sup>4</sup>-aminocytosine into cellular DNA, *Mutat. Res.*, 177, 283-287.  
 Noskov, V., K. Negishi, A. Ono, A. Matsuda, B. Ono and H. Hayatsu (1994) Mutagenicity of 5-bromouracil and N<sup>6</sup>-hydroxyadenine studied by yeast oligonucleotide transformation assay, *Mutat. Res.*, 308, 43-51.  
 Podger, D. M. (1983) Mutagenicity of 5-azacytidine in *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.*, 121, 1-6.  
 Podger, D. M. and G. W. Grigg (1986) Enhancement of frameshift mutagenesis in *Salmonella typhimurium* derivatives of hisC3076 by 5-azacytidine and other agents, *Mutagenesis*, 1, 283-286.  
 Popowska, E. and C. Janion (1975) The metabolism of N<sup>4</sup>-hydroxycytidine-a mutagen for *Salmonella typhimurium*, *Nucleic Acids Res.*, 2, 1143-1151.  
 Popowska, E. and C. Janion (1977) N<sup>4</sup>-Hydroxycytidine

- reduction system in toluenized cells of *Salmonella typhimurium*, *Acta Biochim. Pol.*, 24, 197-205.
- Schaaper, R. M. and R. L. Dunn (1998) Effect of *Escherichia coli* dnaE antimutator mutants on mutagenesis by the base analog *N*<sup>4</sup>-aminocytidine, *Mutat. Res.*, 402, 23-28.
- Schmuck, G., R. Pechan, D. Wild, D. Schiffmann and D. Henschler (1986) SOS-dependent mutagenic activity of 5-azacytidine in *Salmonella*, *Mutat. Res.*, 175, 205-208.
- Stopper, H., C. Körber, D. Schiffmann and W. J. Caspary (1993) Cell-cycle dependent micronucleus formation and mitotic disturbances induced by 5-azacytidine in mammalian cells, *Mutat. Res.*, 300, 165-177.
- Zimmermann, F.K. and I. Scheel (1984) Genetic effects of 5-azacytidine in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat. Res.*, 139, 21-24.
- Zaccolo, M., D. M. Williams, D. M. Brown and E. Gherardi (1996) An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues, *J. Mol. Biol.*, 255, 589-603.
- Śledziewska-Gójska, E. and C. Janion (1982) Effect of proof-reading and *dam*-instructed mismatch repair systems on *N*<sup>4</sup>-hydroxycytidine-induced mutagenesis, *Mol. Gen. Genet.*, 186, 411-418.

*Environ. Mutagen Res.*, 20: 187-194 (1998)

本稿は1998年5月29日、東京のヤクルトホールで開催された日本環境変異原学会主催の第9回公開シンポジウム「モデルDNA損傷と変異機構」(企画:根岸和雄、早津彦哉)で発表された(座長:望月正隆)。

## 酸化的チミン損傷を含むDNAの調製とDNA修復酵素による認識

井出 博

広島大学理学部遺伝子科学専攻 〒739-8526 東広島市鏡山1-3-1

### Preparation of DNA substrates containing unique thymine oxidation lesions and their recognition by DNA repair enzymes

Hiroshi Ide

Graduate Department of Gene Science, Faculty of Science  
1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan

#### Summary

Reactive oxygen species generate structurally diverse thymine lesions that exert differential cytotoxic and genotoxic effects. They are also processed by different DNA repair enzymes depending on their structure. Thymine glycol, urea residues and 5-formyluracil represent three major classes of oxidative thymine damage formed by C5,C6 hydroxylation, ring fragmentation and oxidation of the methyl group, respectively. Chemical and biochemical methods to introduce these lesions into natural DNA and oligonucleotides have been developed and the introduced damage can be characterized and confirmed by specific base excision repair enzymes, mostly cloned from *Escherichia coli*. These DNA substrates have also proved to be powerful tools to uncover catalytic mechanisms and to screen the activity of mammalian DNA repair enzymes.

(This paper, chaired by Masataka Mochizuki, was presented to the 9th JEMS Annual Symposium, "Synthetic Models for DNA Damage and Mutagenesis", organized by Kazuo Negishi and Hikoya Hayatsu, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at Yakult Hall, Tokyo, May, 29, 1998.)

**Keywords:** DNA damage, DNA repair, damage introduction, oligonucleotide, reactive oxygen species

#### 緒 言

生物の遺伝情報を担うDNAには、内的あるいは外的要因によりさまざまな損傷が発生する。未修復の損傷はDNA複製阻害や複製エラーを誘発し、細胞毒性や突然変異性を示す(Friedberg et al., 1995)。細胞の正常な代

受付: 1998年7月21日  
受理: 1998年7月29日  
©日本環境変異原学会

謝活動の副産物として生成する活性酸素は、典型的な内的損傷因子であり、主として反応性の高いヒドロキシリジカルがDNAと反応し酸化的損傷を生成する。また、これらの酸化損傷は、外的損傷因子であるX線やガンマ線の照射によって生成する生成物とオーバーラップしているものが多い。活性酸素は紫外線やアルキル化剤とは異なり、構造的にきわめて多様なDNA損傷を与えるのが特徴で、塩基部位および糖部位を含めると、これまでに100近い損傷がすでに同定されている(von Sonntag, 1987; Breen and Murphy, 1995)。したがって、活性酸

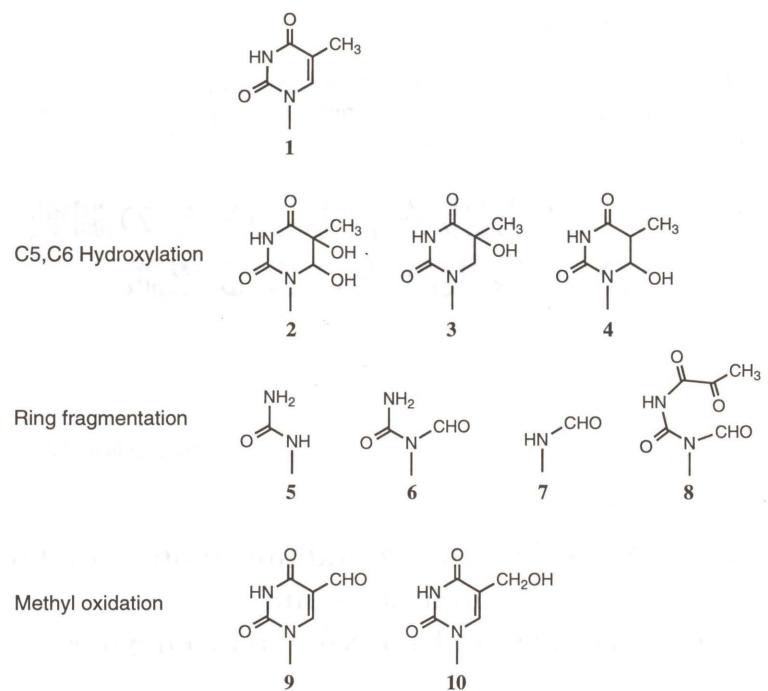


Fig. 1 Structures of major oxidative thymine damage. 1, thymine; 2, thymine glycol (5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymine); 3, 5,6-dihydro-5-hydroxythymine (thymine C5-hydrate); 4, 5,6-dihydro-6-hydroxythymine (thymine C6-hydrate); 5, urea; 6, *N*-formylurea; 7, formamide; 8, *N*<sup>1</sup>-formyl-*N*<sup>2</sup>-pyruvylurea; 9, 5-formyluracil; 10, 5-hydroxymethyluracil.

素によるDNA損傷の生物学的影響を分子レベルで明らかにするためには、細胞内に存在するDNA複製系・修復系が構造的に多様性に富む損傷をそれそれぞれどのようにプロセスするかを知る必要がある。そのために、個々の損傷をDNAに特異的に導入しDNA複製の録型あるいは修復酵素の基質として用いることにより、DNA損傷の細胞内プロセシングが研究してきた。

DNAと活性酸素の反応では糖部位の損傷も生成するが、量的には塩基部位の損傷が圧倒的に多い(von Sonntag, 1987; Breen and Murphy, 1995)。本論文では、4種の塩基の中で生成物の構造が最も詳細に研究されているthymine由来の損傷を中心に、DNAへの特異的な導入法とDNA修復酵素による認識について解説する。

### 1. Thymine酸化損傷の特異的な導入法

これまでに同定されたthymine由来の損傷はその構造に基づき、C5,C6位水酸化生成物、環開裂生成物、methyl基酸化生成物に大別される(Fig. 1)。Thymine glycol(2)はC5,C6位水酸化生成物の代表的な生成物であり、そのほか5位あるいは6位だけが水酸化された水和物(3,4)も同定されている。電離放射線では5位、6位いずれの水酸化物も生成するのに対し、紫外線で生成する水和物は6位の水酸化体(4)のみである。さらにピリミジン環の酸化・断片化が進むと尿素残基(5)のような環開裂生成物が生じる。環開裂生成物に関しても、断片

化の程度に応じてさまざまな構造の生成物(6-8)が同定されている。5位のmethyl基の酸化生成物には、5-formyluracil(9)、5-hydroxymethyluracil(10)がある。

Thymine glycolの導入には、過マンガン酸カリウム(KMnO<sub>4</sub>)または四酸化オスミウム(O<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)酸化が用いられる。過マンガニ酸カリウムはthymineの5,6位の二重結合を酸化し、アルカリ側(pH 8.6)ではthymine glycolを、酸性側(pH 4.3)では5-hydroxy-5-methylbarbituric acidを選択的に生成する(Iida and Hayatsu, 1971)。中性では両者の混合物となる。Thymineの酸化反応で生成する5-hydroxy-5-methylbarbituric acidは安定であるが、N1位がデオキシリボースで置換されたヌクレオシド誘導体は加水分解により開環したmethyltartronylurea誘導体に変化しやすい。したがって、過マンガニ酸カリウム処理でDNA中に生じた5-hydroxy-5-methylbarbituric acidもmethyltartronylureaに変化していると考えられる。過マンガニ酸カリウムは酸化力が強く他の塩基の酸化など副反応が起こりやすいため、反応条件(温度、反応時間、濃度)に注意する必要がある。また、thymineを1カ所だけ含むオリゴヌクレオチドを酸化し、thymine glycolを選択的に導入することも可能である(Kao et al., 1993; Sarkar et al., 1998)。Fig. 2に、thymineを1カ所だけ含む19merオリゴヌクレオチドを過マンガニ酸カリウム(pH 8.6)で処理した直後の生成物およびHPLC分取

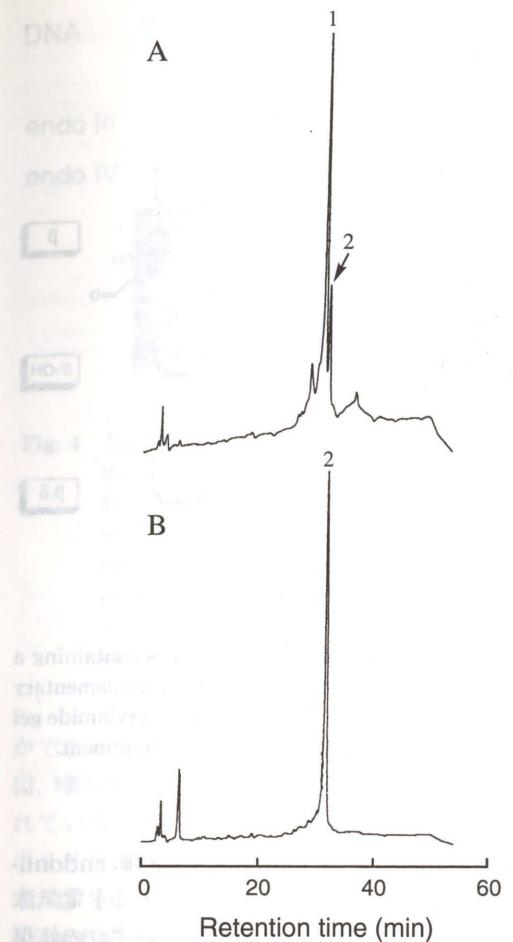


Fig. 2 HPLC elution profiles of oligonucleotides treated with KMnO<sub>4</sub>. A 19mer oligonucleotide containing a single thymine was treated with KMnO<sub>4</sub> and products were analyzed before (A) and after (B) HPLC purification. Samples were eluted with a acetonitrile gradient [7% (0-5 min), 7-12% (5-45 min)] in 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), and monitored by UV absorption at 260 nm. Peak 1, unreacted 19mer; peak 2, 19mer containing thymine glycol.

により精製した生成物のHPLC分析チャートを示す。この結果からわかるように、オリゴヌクレオチド中のthymineを完全に酸化しようとすると、副反応のため、反応後の試料は他の分解生成物との混合物となる。したがって、HPLCあるいはポリアクリラミド電気泳動による精製が必要となる。四酸化オスミウム(O<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)もthymineの5,6位の二重結合を選択的に酸化し、thymine glycolが生成する(Beer et al., 1966; Ide et al., 1985)。Cytosineもわずかに反応するが量的には無視できる。一般的に、安価で水に対する溶解度が高い過マンガニ酸カリウムはヌクレオシドやオリゴヌクレオチドのpreparativeな酸化に用いられるのに対し、高価で溶解度が低い四酸化オスミウムはプラスミドなど天然のDNAの酸化に用いられている。四酸化オスミウムを用いるとDNA中の全thymineの約数%をthymine

glycolに変換することが可能であるが、過マンガニ酸カリウムの場合と同様、副反応を考慮すると特定の部位を完全にthymine glycolに変換するのは難しい。以上述べた方法のほかに、thymine glycolについては、対応するデオキシリボヌクレオチド三リン酸(thymidine glycol 5'-triphosphate)を合成し、これをterminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)でDNA中に導入する方法が考案されている(Hatahet et al., 1993)。

上記の方法でプラスミドあるいはオリゴヌクレオチドに導入したthymine glycolをアルカリ処理(pH 12, 室温)するとピリミジン環が開裂し、thymine glycolは定量的に尿素残基に変換される(Ide et al., 1985; Sarker et al., 1998)。この処理条件下では鎖切断は起こらない。また、thymineのmethyl基をあらかじめ<sup>3</sup>Hで標識しておくと、この反応により脱離するacetol fragmentを定量することにより、導入されたthymine glycolおよび尿素残基の量を知ることができる(Hariharan, 1980)。ホスホアミダイトモノマーを用いた直接的な尿素残基の導入法も報告されている(Guy et al., 1990)。この場合、DNA合成に用いるA,Gのアミノ基の保護基にはphenoxyacetyl(PAC)基、Cの保護基にはacetyl基を用いることにより、通常の塩基の脱保護条件(濃アンモニア水中, 60°C, 6時間)に比べより穏和な条件下(濃アンモニア水中, 室温, 6時間)で脱保護を行っている。

DNA合成機を用いると比較的大量の試料を合成できるため、二次元NMRによるオリゴヌクレオチドの溶液構造に関する研究も行われている(Gervais et al., 1998)。

5-Formyluracilの導入には、酵素的な方法とホスホアミダイトモノマーを用いた方法が報告されている。酵素的な方法では、対応するデオキシリボヌクレオチド三リン酸(5-formyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate, fdUTP)を合成し、これをDNAポリメラーゼ反応でDNA中に導入する(Yoshida et al., 1997)。fdUTPは大腸菌DNAポリメラーゼIおよびファージT7 DNAポリメラーゼのよい基質であり、DNA複製反応系にこれを添加すると効率よくdTTPに置換する。一方、DNA合成機を用いる合成法では、5-formyluracilが通常の脱保護条件下では不安定で分解してしまうため、formyl基の保護基としてethylenediamine誘導体を用いる方法、または5-formyluracilの前駆体となる修飾塩基を導入する方法が用いられている。前者では、アンモニアによる通常の脱保護の後、formyl基の保護基[N, N-di-(3,5-dichlorophenyl)ethylenediamine]を酸により除去する(Ono et al., 1994)。後者では、5-formyluracilの前駆体として2つの水酸基をacetyl基で保護した5-(1,2-dihydroxyethyl)uracilをアミダイト法により導入後、アンモニア処理により前駆体のacetyl基を含めたすべての塩基の保護基を除去する。次いで、オリゴヌクレオチドを過ヨウ素酸(NaIO<sub>4</sub>)処理し5-(1,2-

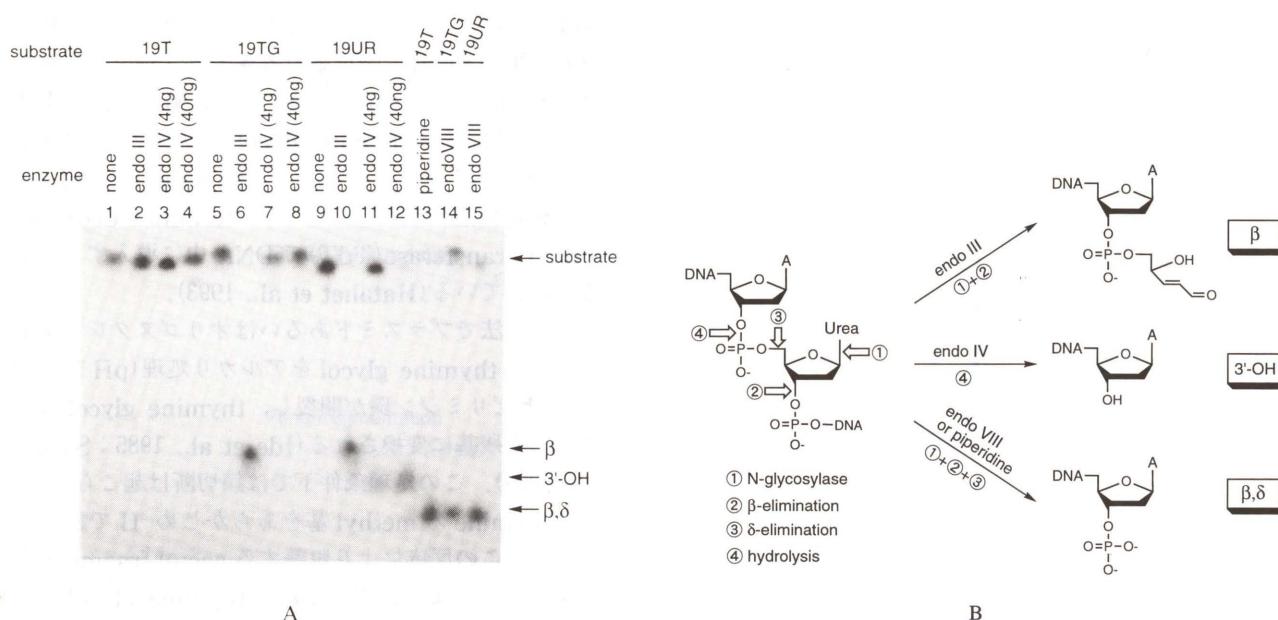


Fig. 3 Recognition of thymine damage by endonucleases III, IV and VIII. A, 5'-<sup>32</sup>P-labeled 19mer oligonucleotides containing a single thymine (19T), thymine glycol (19TG) or urea (19UR) at the same position were annealed to the complementary strand and incubated with endonucleases III, IV, and VIII. Products were analyzed by 16% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. B, cleavage sites (arrows) and products formed by the repair enzymes and piperidine treatment.

dihydroxyethyl)uracil から 5-formyluracil への変換を行っている (Sugiyama et al., 1996)。これらの研究では、合成したオリゴヌクレオチドを用いて UV 融解曲線測定も行い、5-formyluracil の二重鎖安定性に対する影響も検討している。

## 2. 修復酵素を用いた損傷の確認

### 1) オリゴヌクレオチド

導入した損傷の確認には、基質特異性がよく確立されている大腸菌由来のDNA修復酵素が用いられる。Thymine glycol は N-glycosylase/AP lyase 活性をもつ endonuclease III (Nth) および VIII (Nei) により認識される (Melamede et al., 1994; Wallace, 1994; Dongyan et al., 1997; 井出, 1997)。尿素残基は endonuclease III, VIII のほか、formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) および AP endonuclease [endonuclease IV (Nfo), exonuclease III (Xth)] によっても認識される (Melamede et al., 1994; Wallace, 1994; Dongyan et al., 1997; 井出, 1997)。したがって、アルカリ処理前後の thymine glycol DNA を endonuclease III (あるいは endonuclease VIII) および endonuclease IV (あるいは exonuclease III) で処理し切断活性を調べることにより損傷の変換を確認することができる。Fig. 3 A にその一例を示す。Thymine glycol および尿素残基を含むオリゴヌクレオチドは上記 1. に述べた方法で合成し、T4 ポリヌクレオチドキナーゼと [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP を用いて 5' 末端を <sup>32</sup>P 標識した後、相補鎖とアミールし

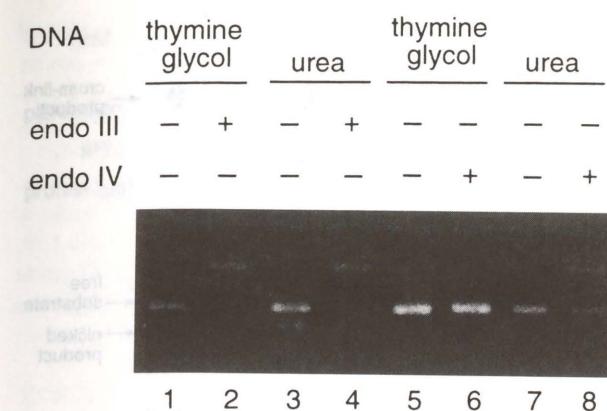


Fig. 4 Agarose gel analysis of plasmid DNA containing thymine glycol and urea residues. pDEL19 plasmid DNA containing thymine glycol (lanes 1, 2, 5, 6) or urea residues (lanes 3, 4, 7, 8) was treated with endonucleases III (lanes 2, 4) or IV (lanes 6, 8). Intact (Form I, lower bands) and nicked (Form II, upper bands) DNA were separated by 0.8% agarose gel electrophoresis.

ができる。なお、修復機構との関連では、endonuclease III, VIII の生成物は 3' 末端が糖やリン酸によりブロックされているため (Fig. 3 B), このままでは引き続く DNA ポリメラーゼによる修復合成ができない。実際の細胞内では、endonuclease III, VIII が作用した後、3'-phosphodiesterase および 3'-phosphatase 活性をもつ endonuclease IV または exonuclease III が 3' 末端から 5'-糖リン酸 (β-脱離生成物) やリン酸 (β, δ-脱離生成物) を除去し 3'-OH 基をもつプライマー末端が形成される。

5-Formyluracil は、3-methyladenine glycosylase II (AlkA) により認識される (Bjelland et al., 1994; 井出, 未発表)。5-Formyluracil を部位特異的に導入したオリゴヌクレオチド基質を AlkA とインキュベートすると、AlkA の N-glycosylase 活性により DNA から 5-formyluracil が切除され脱塩基部位 (abasic site) が生じる。しかし、このままでは鎖切断が起こらないため、ポリアクリルアミド電気泳動では検出できない。そこで、AlkA 処理後に AP endonuclease 活性をもつ酵素 (たとえば endonuclease IV) とインキュベートすると脱塩基部位で鎖切断が起こり検出可能となる。

### 2) 天然型のDNA

プラスミドに導入した thymine glycol は、endonuclease III あるいは VIII 処理により鎖切断が生じコンホーメーションが Form I (super coil) から Form II (nicked circular) へ変化する (Melamede et al., 1994)。Form I と II のプラスミドはアガロース電気泳動により簡便に分離できる。Thymine glycol DNA のアルカリ処理により導入した尿素残基は、上記酵素のほか、endonuclease IV および exonuclease III により切断される。Fig. 4 は、

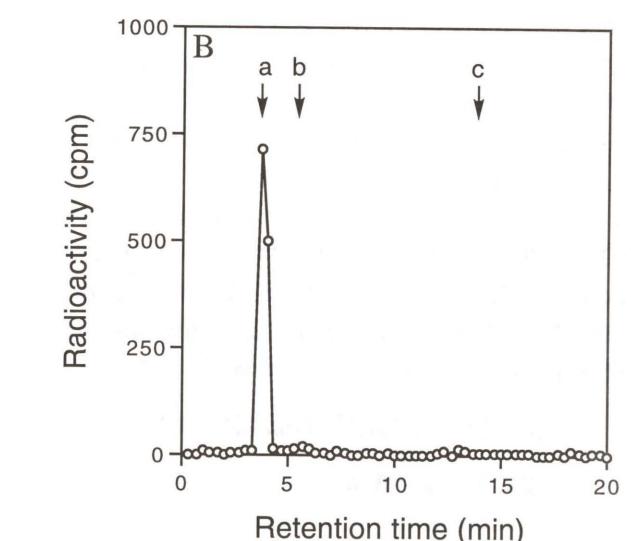
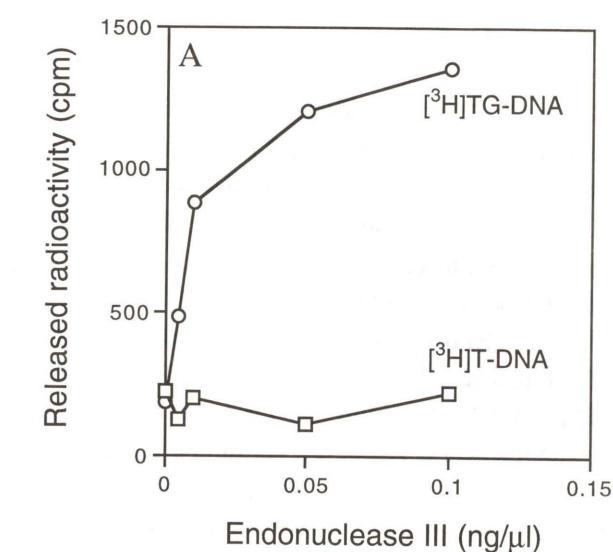


Fig. 5 Analysis of N-glycosylase activity of endonuclease III. A, Duplex M13 DNA containing <sup>3</sup>H-labeled thymine glycol ([<sup>3</sup>H] TG-DNA) or thymine ([<sup>3</sup>H] T-DNA) was incubated with the indicated amounts of endonuclease III. Radioactivity released from DNA was measured after removal of [<sup>3</sup>H] DNA by an anion exchange column. B, HPLC analysis of radioactive materials released from [<sup>3</sup>H] TG-DNA upon endonuclease III treatment. Arrows indicate the elution positions of authentic thymine glycol (a), 5-hydroxymethyluracil (b) and thymine (c).

四酸化オスミウム処理および四酸化オスミウム + アルカリ処理により thymine glycol および尿素残基をそれぞれ導入した pDEL19 プラスミド (4.8 kb) を endonuclease III, endonuclease IV とインキュベート後、アガロース電気泳動により分析した結果である。Thymine glycol を含むプラスミド DNA は endonuclease III のみにより認識され Form II へ変化している (レーン 2), 尿素残基を含むプラスミド DNA は endonuclease III のほか endonuclease IV によっても Form II へ変化して

いる(レーン4, 8)。

### 3) N-グリコシラーゼ活性

Endonuclease III, VIIIは上述の endonuclease 活性のほかに、塩基とデオキシリボースを繋ぐ N-glycosid 結合を切断する活性(N-glycosylase 活性)を有している (Fig. 3 B) (Wallace, 1994; 井出, 1997)。したがって、損傷塩基の適当な部位が<sup>3</sup>Hあるいは<sup>14</sup>Cで標識されていれば、N-glycosylase 活性による損傷の確認が可能である。Fig. 5は、DNA ポリメラーゼを用いて一重鎖 M 13 DNA を [<sup>3</sup>H-methyl] dTTP 存在下で複製し、これを四酸化オスミウム処理後、endonuclease IIIとインキュベートした結果である。N-glycosylase 活性により切除された [<sup>3</sup>H-methyl] thymine glycol をアニオン交換カラムにより DNA から分離し、遊離された放射活性を測定した。Thymine glycol を導入した DNA では、遊離された放射活性がインキュベートした endonuclease IIIの量とともに増加しているが、対照の [<sup>3</sup>H-methyl] thymine DNA では増加は認められていない (Fig. 5 A)。さらに遊離された放射活性の由来を確かめるために、アニオン交換カラムの溶出液を逆相 HPLC で分析した (Fig. 5 B)。溶出液の放射活性ピークが標品の thymine glycol ピークと一致したことから、endonuclease IIIの N-glycosylase 活性により thymine glycol が DNA から除去されていることが確認された。

## 3. DNA 修復酵素研究への応用

### 1) 修復酵素の作用機構

これまでに精製された塩基除去修復酵素は、N-glycosylase 活性のみを有する単純なグリコシラーゼと N-glycosylase のほかに AP lyase 活性を合わせもつものに分類される。部位特異的アミノ酸置換や X 線結晶構造解析の結果から、これらの酵素の触媒機構が推定されている (David and Williams, 1998)。単純なグリコシラーゼでは、デオキシリボースの C 1' 近傍に存在する水分子が酵素により活性化され ( $H_2O + : B-Enz \rightarrow OH^- + H^+ B-Enz$ )、 $OH^-$  が C 1' に対し求核反応することにより塩基が脱離すると考えられている。後者の酵素では、酵素のアミノ基が活性化され C 1' に直接求核反応し、塩基の脱離と同時に基質一酵素間に Schiff 塩基が形成される。さらに、Schiff 塩基中間体から 3' 側のリン酸の  $\beta$  脱離(および 5' 側のリン酸の  $\delta$  脱離)が進行すると考えられている (David and Williams, 1998)。Schiff 塩基中間体は、水素化ホウ素ナトリウム ( $NaBH_4$ ) により還元され、酵素一基質間に安定なクロスリンクが形成される。Fig. 6 は、水素化ホウ素ナトリウム存在下、thymine glycol あるいは尿素残基を含む 5'-<sup>32</sup>P 標識オリゴヌクレオチド基質 (19 TG, 19 UR) と endonuclease III をインキュベートし、これを SDS-PAGE で分析した結果で

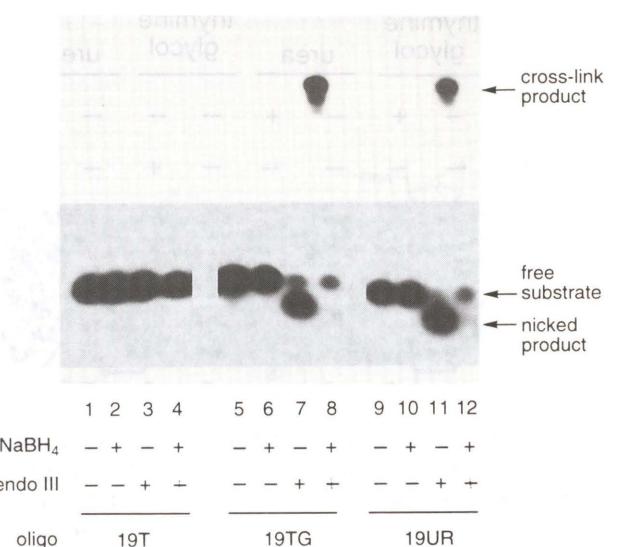


Fig. 6 NaBH<sub>4</sub> trap of the Schiff base intermediate formed between oligonucleotide substrates and endonuclease III. Endonuclease III was incubated with 19mer oligonucleotide substrates (<sup>32</sup>P 5'-labeled) containing thymine (19T), thymine glycol (19TG) or urea (19UR) in the absence and presence of NaBH<sub>4</sub>. After incubation, samples were analyzed by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

ある。水素化ホウ素ナトリウムで処理しない場合は、thymine glycol および尿素残基のいずれの基質でも、低分子量の切断バンドが生成した(レーン7, 11)。水素化ホウ素ナトリウムで処理した場合は、切断生成物がなくなり、endonuclease III(分子量 23.4 kDa)と基質(19mer)がクロスリンクされた高分子量のバンドが認められた(レーン8, 12)。また、これらのバンドは、基質だけの水素化ホウ素ナトリウム処理(レーン6, 10)あるいは損傷を含まない基質 19T と endonuclease III の処理(レーン4)では生じなかった。Endonuclease III の部位特異的アミノ酸置換や X 線結晶構造解析の結果から、反応には 120-Lys が関わっていることが示唆されていることから、クロスリンクは 120-Lys と損傷部位のデオキシリボースの C 1' の間に形成されているものと考えられる。

### 2) 高等動物の DNA 修復酵素

最近、ヒトおよびマウスから大腸菌 endonuclease III ホモログがクローニングされた (Hibert et al., 1997; Aspinwall et al., 1997; Sarker et al., 1998)。クローニングされたホモログは、endonuclease III に比べ N-末端側に約 80-100 残基の余分なアミノ酸配列を含み、この部分を除くアミノ酸配列のホモジニーは 26% 程度であった。しかし、endonuclease III の触媒活性に不可欠な hairpin-helix-hairpin (HhH) モチーフと C 末端側の 4 Fe-4 S クラスターが保存されており、endonuclease III と同様な酵素活性をもつと予想された。クローニングし

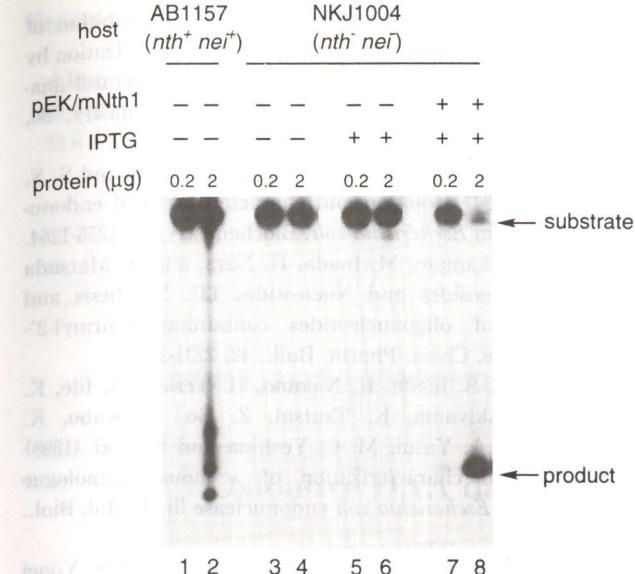


Fig. 7 Repair activity for thymine glycol in the cell free extracts from *E. coli* AB1157 and NKJ1004 harboring pEK/mNth1. Cell free extracts (0.2 or 2 μg as protein) from *E. coli* AB1157 (*nth<sup>+</sup> nei<sup>+</sup>*) (lanes 1, 2), NKJ1004 (*nth<sup>-</sup> nei<sup>-</sup>*) (lanes 3, 4), IPTG-treated NKJ1004 harboring pEK/mNth1 (lanes 5, 6), and IPTG-treated NKJ1004 harboring pEK/mNth1 (lanes 7, 8) were tested for the 19mer oligonucleotide substrate containing thymine glycol. Products were analyzed by 16% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

たマウス遺伝子 (mNth 1) を大腸菌で発現させ、細胞粗抽出液中に存在する修復酵素活性を測定した (Fig. 7)。遺伝子の発現は、thymine glycol を認識する 2 種の酵素 endonuclease III (Nth) および VIII (Nei) を欠損した大腸菌株 (*nth<sup>-</sup> nei<sup>-</sup>*) で行い、活性測定には thymine glycol を含むオリゴヌクレオチドを基質として用いた。切断生成物の生成量からわかるように、大腸菌 NKJ 1004 (*nth<sup>-</sup> nei<sup>-</sup>*) では酵素活性が認められないのに対し (レーン3, 4), 野生株の AB 1157 (*nth<sup>+</sup> nei<sup>+</sup>*) では endonuclease III および VIII に由来するわずかな活性が認められた (レーン2)。マウス endonuclease III ホモログの発現ベクター (pEK/mNth 1) を導入した NKJ 1004 では、IPTG 誘導後に明確な切断活性が認められた (レーン8)。以上の結果は、mNth 1 遺伝子産物が大腸菌の endonuclease III と同様な thymine glycol 修復活性をもつことを示している。

## 4. DNA 損傷の一般的な導入法

本論文では、チミン酸化損傷の DNA への特異的な導入法と DNA 修復酵素による認識について述べた。このほかさまざまな酸化的損傷およびモデル化合物の DNA・オリゴヌクレオチドへの導入法 1)~3) が開発されている。

- 1) 選択的な反応性を示す試薬・処理
- 2) ホスホアミダイトユニットを用いた合成法
- 3) 酵素的な導入法

現在のところ、すべての酸化損傷に適用できる導入方法はなく、損傷および研究目的に応じてこれらの方が使い分けられている。誌面の関係で紹介できなかった 20 種の損傷および導入法 1)~3) の長所・短所については、最近の総説を参考にしていただきたい (井出, 1997)。また、方法 2) については、損傷が一般的に塩基に対して不安定なためアンモニア処理による脱保護が最大の障害となっている。これを克服する方法として、塩基の保護基に allyloxy 基を用い Pd<sup>0</sup> により除去する方法 (Hayakawa et al., 1990), 塩基無保護の H-ホスホネートモノマーを用いる方法がある (Wada et al., 1997)。実際、allyloxy 保護基を用いた方法が 5-hydroxy-5, 6-dihydrothymine (thymine C 5-hydrate) を含むオリゴヌクレオチドの合成に応用されており (Matray and Greenberg, 1994; 1997), 今後これら二つの方法が損傷を含むオリゴヌクレオチド合成に応用されることが期待される。

## 謝 辞

本論文で用いた実験データを提供していただいた広島大学理学部遺伝子化学研究室の大学院生、Ezat Asgarani さん、中野浩伸君、城元竜也君、ならびに内容に関して貴重なコメントをいただいた同研究室の寺東宏明先生に感謝いたします。

## 参考文献

- Aspinwall, R., D. G. Rothwell, T. Roldan-Arjona, C. Anselmino, C. J. Ward, J. P. Cheadle, J. R. Sampson, T. Lindahl, P. C. Harris and I. D. Hickson (1997) Cloning and characterization of a functional human homolog of *Escherichia coli* endonuclease III, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94, 109-114.  
 Beer, M., S. Stern, D. Carmalt and K. H. Mohlhenrich (1966) Determination of base sequence in nucleic acids with electron microscope. V. The thymine-specific reactions of osmium tetroxide with deoxyribonucleic acid and its components, Biochemistry, 5, 2283-2288.  
 Bjelland, S., N.-K. Birkeland, T. Benneche, G. Volden and E. Seeberg (1994) DNA glycosylase activities for thymine residues oxidized in the methyl group are functions of the AlkA enzyme in *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 269, 30489-30495.  
 Breen, A. P. and J. A. Murphy (1995) Reactions of oxy radicals with DNA, Free Radic. Biol. Med., 18, 1033-1077.  
 David, S. S. and S. D. Williams (1998) Chemistry of glycosylases and endonucleases involved in base-excision repair, Chem. Rev., 98, 1221-1261.  
 Dongyan, J., Z. Hatahet, R. J. Melamede, Y. W. Kow and S. S. Wallace (1997) Characterization of *Escherichia coli* endonuclease VIII, J. Biol. Chem., 272, 32230-32239.  
 Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede (Eds) (1995) DNA Repair and Mutagenesis, ASM, Washington D.C.

- Gervais, V., J. A. H. Cognet, A. Guy, J. Cadet, R. Teoule and G. V. Fazakerley (1998) Solution structure of *N*-(2-deoxy-D-erythro-pentofuranosyl)urea frameshifts, one intrahelical and the other extrahelical, by nuclear magnetic resonance and molecular dynamics, *Biochemistry*, 37, 1083-1093.
- Guy, A. and R. Teoule (1990) Insertion of the fragile 2'-deoxyribosylurea residue into oligodeoxynucleotides, *Tetrahedron Lett.*, 31, 5745-5748.
- Hariharan, P. V. (1980) Determination of thymine ring saturation products of the 5, 6-dihydroxydihydrothymine type by the alkali degradation assay, *Radiat. Res.*, 81, 496-498.
- Hatahet, Z., A. A. Purmal and S. S. Wallace (1993) A novel method for site specific introduction of single model oxidative DNA lesions into oligodeoxyribonucleotides, *Nucleic Acids Res.*, 21, 1563-1568.
- Hayakawa, Y., S. Wakabayashi, H. Kato and R. Noyori (1990) The allylic protection method in solid phase oligonucleotide synthesis. An efficient preparation of solid-anchored DNA oligomers, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 1691-1699.
- Hibert, T. P., W. Chaung, R. J. Boorstein, R. P. Cunningham and G. W. Teebor (1997) Cloning and expression of the cDNA encoding the human homologue of the DNA repair enzyme, *Escherichia coli* endonuclease III, *J. Biol. Chem.*, 272, 6733-6740.
- Ide, H., Y. W. Kow and S. S. Wallace (1985) Thymine glycols and urea residues in M13 DNA constitute replication blocks *in vitro*, *Nucleic Acids Res.*, 13, 8035-8052.
- 井出 博(1997)酸化的損傷を特異的に含むDNA基質と生化学研究への応用, 放射線生物研究, 32, 307-325.
- Iida, S. and H. Hayatsu (1971) The permanganate oxidation of thymidine and thymidylic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, 228, 1-8.
- Kao, J. Y., I. Goljer, T. A. Phan and P. H. Bolton (1993) Characterization of the effects of a thymine glycol residue on the structure, dynamics, and stability of duplex DNA by NMR, *J. Biol. Chem.*, 268, 17787-17793.
- Matray T. J. and M. M. Greenberg (1994) Site-specific incorporation of the alkaline labile, oxidative stress product (5*R*)-5, 6-dihydro-5-hydroxythymidine in an oligonucleotide, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 6931-6932.
- Matray T. J. and M. M. Greenberg (1997) Inhibition of Klenow fragment (exo<sup>-</sup>) catalyzed DNA polymerization by (5*R*)-5, 6-dihydro-5-hydroxythymidine and structural analogue 5, 6-dihydro-5-methylthymidine, *Biochemistry*, 36, 14071-14079.
- Melamede, R. J., Z. Hatahet, Y. W. Kow, H. Ide and S. S. Wallace (1994) Isolation and characterization of endonuclease VIII from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 33, 1255-1264.
- Ono, A., T. Okamoto, M. Inada, H. Nara, and A. Matsuda (1994) Nucleosides and Nucleotides 131. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 5-formyl-2'-deoxyuridine, *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 2231-2237.
- Sarker, A. H., S. Ikeda, H. Nakano, H. Terato, H. Ide, K. Imai, K. Akiyama, K. Tsutsui, Z. Bo, K. Kubo, K. Yamamoto, A. Yasui, M. C. Yoshida and S. Seki (1998) Cloning and characterization of a mouse homologue (mNth1) of *Escherichia coli* endonuclease III, *J. Mol. Biol.*, 282, 761-774.
- Sugiyama, H., S. Matsuda, K. Kino, Q.-M. Zhang, S. Yonei and I. Saito (1996) New synthetic method of 5-formyluracil-containing oligonucleotides and their melting behavior, *Tetrahedron Lett.*, 37, 9067-9070.
- von Sonntag, C. (Ed) (1987) *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, New York.
- Wada, T., Y. Sato, F. Honda, S. Kawahara and M. Sekine (1997) Chemical synthesis of oligonucleotides using *N*-unprotected *H*-phosphonate monomers and carbonium and phosphonium condensing reagents: *O*-selective phosphorylation and condensation, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 12710-12721.
- Wallace S. S. (1994) DNA damages processed by base excision repair: biological consequences, *Int. J. Radiat. Biol.*, 66, 579-589.
- Yoshida, M., K. Makino, H. Morita, H. Terato, Y. Ohyama and H. Ide (1997) Substrate and mispairing properties of 5-formyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate assessed by *in vitro* DNA polymerase reactions, *Nucleic Acids Res.*, 25, 1570-1577.

Environ. Mutagen Res., 20: 195-200 (1998)

本稿は1998年5月29日、東京のヤクルトホールで開催された日本環境変異原学会主催の第9回公開シンポジウム「モデルDNA損傷と変異機構」(企画:根岸和雄、早津彦哉)で発表された(座長:若林敬二)。

## 酸化的DNA損傷と変異機構

紙谷 浩之, 葛西 宏

産業医科大学産業生態科学研究所 職業性腫瘍学 〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1

### Oxidative DNA damage and mechanisms of mutagenesis

Hiroyuki Kamiya and Hiroshi Kasai

Department of Environmental Oncology, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health  
1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan

### Summary

DNA lesions produced by reactive oxygen species appear to be one of the causes of mutations that either occur spontaneously or are induced by environmental mutagens. Recently, we found that 2-hydroxyadenine is formed by Fenton-type reactions and that this DNA damage is as mutagenic as 8-hydroxyguanine when present either in DNA or in the nucleotide pool.

We review here the mutagenicity of 2-hydroxyadenine, which is studied in *in vitro* and *in vivo* experiments carried out in our laboratory.

(This paper, chaired by Keiji Wakabayashi, was presented to the 9th JEMS Annual Symposium, "Synthetic Models for DNA Damage and Mutagenesis", organized by Kazuo Negishi and Hikoya Hayatsu, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at Yakult Hall, Tokyo, May, 29, 1998.)

Keywords: reactive oxygen species, 2-hydroxyadenine, 8-hydroxyguanine, mutation

### 緒 言

近年、人々の耳目を集めている活性酸素が、生体にさまざまな影響を与えてることが明らかになりつつある。活性酸素は細胞内で自然に生ずるのみならず、ある種の環境変異原や心理的ストレスによっても生成する。活性酸素によって生じた損傷DNAは、塩基対形成の誤りを誘発することにより、変異や発癌、老化等を引き起こすと考えられる(Ames, 1983; 紙谷, 葛西, 1996)。

本稿では、活性酸素によって生ずる重要な酸化的DNA損傷であることが明らかになりつつある、2-hydroxyadenine(2-OH-Ade)と変異との関連について述べることとする。最初に、2-OH-Adeの生成について、

次に、DNA中の2-OH-Adeの誘発する変異について述べる。最後に、ヌクレオチドプール中に生成する2-hydroxy-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate(2-OH-dATP)の誘発する変異について述べる。

### 1. 2-Hydroxyadenineの生成

#### 1) 試験管内反応における2-hydroxyadenineの生成

活性酸素によって塩基部、糖部が修飾を受けると、さまざまな種類のDNA損傷が生ずる。特に著名なのが8-hydroxyguanine(7, 8-dihydro-8-oxoguanine, 8-OH-Gua)で、活性酸素を産生する環境変異原によって生ずることが数多く報告されているDNA損傷であり(Kasai, 1997; Kasai and Nishimura, 1984 a, 1984 b, 1984 c; Kasai et al., 1984, 1986; 紙谷, 葛西, 1995), 細胞内で

受付: 1998年7月9日

受理: 1998年7月16日

©日本環境変異原学会

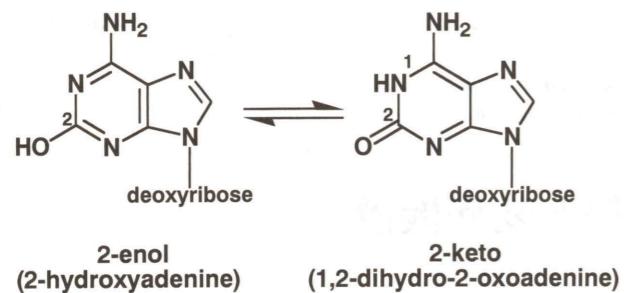


Fig. 1 Structure of 2-hydroxyadenine.

主として G → T 変異を誘発することが明らかにされている (Wood et al., 1990; Cheng et al., 1992; Kamiya et al., 1992, 1995 a; Wagner et al., 1997).

最近、著者らは、DNA, dA, dATP を活性酸素産生系である  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA- $\text{O}_2$  で処理すると、塩基部が水酸化され、2-hydroxyadenine(1,2-dihydro-2-oxo-adenine, 2-OH-Ade, guanine の異性体であることから isoguanine とも呼ばれる) (Fig. 1) が生ずることを見出した (Kamiya and Kasai, 1995)。また、腎発癌物質であるニトリロ三酢酸(NTA)と  $\text{Fe}^{2+}$  との錯体の系 ( $\text{Fe}^{2+}$ -NTA- $\text{O}_2$ ) でも 2-OH-Ade が生成することを見出している (Murata-Kamiya et al., 1997)。Fig. 2 に  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA- $\text{O}_2$  の他、 $\text{Fe}^{2+}$ -NTA- $\text{O}_2$  処理、 $\gamma$  線処理によって生ずる 2-OH-Ade の生成量を示した。

モノマー(dA)を  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA- $\text{O}_2$  や  $\text{Fe}^{2+}$ -NTA- $\text{O}_2$  処理した場合、細かい条件の違いにより若干の変動はあるが、2-OH-Ade の生成量は 8-OH-Gua とほぼ同程度であった (Fig. 2)。細胞内でも同様に、モノマーにおいてはこの両者は同程度生成すると推定される。一方、DNA を  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA- $\text{O}_2$  処理した場合には、2-OH-Ade は 8-OH-Gua の 1/40 程度しか生成しなかった (Fig. 2)。したがって、DNA 中のアデニン残基が直接酸化されて 2-OH-Ade が生成する割合はあまり高くはないと思われる。

$\gamma$  線で dA を処理した場合には、2-OH-Ade は検出できなかった (Fig. 2)。また、X 線処理した場合も同様の結果であった (葛西, 未発表データ)。興味深いことに、 $\gamma$  線、X 線処理の際には、代わりに 8-hydroxyadenine が生成する。この両者はたまに混同されるが、別の損傷塩基である。少なくとも試験管内の実験では、 $\text{Fe}^{2+}$  の関与する Fenton 様反応では 2-OH-Ade が、放射線では 8-hydroxyadenine が生成すると考えられる。

## 2) DNA 中に 2-OH-Ade が生成するルート

上記のように、2-OH-Ade は、DNA 中では生成量が低いと予想されるが、このことは変異誘発に 2-OH-Ade は関与していないことを意味するのであろうか。

最近、**mutT** として知られていた大腸菌のミューターゲン遺伝子が、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 5'

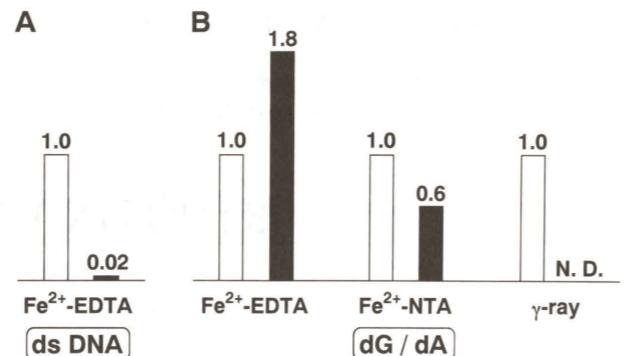


Fig. 2 Formation of 2-OH-Ade in DNA (A) and in monomer (B). Relative yields (8-OH-Gua=1.0) are shown. Open and closed bars represent the yields of 8-OH-Gua and 2-OH-Ade, respectively. N. D., not detected.

triphosphate(8-OH-dGTP)を加水分解する酵素 (MutT 蛋白質)をコードしていることが明らかにされた (Maki and Sekiguchi, 1992)。このことは、DNA 中のグアニン塩基の直接的な酸化による 8-OH-Gua のみならず、ヌクレオチドプールに生じる酸化的損傷ヌクレオチド、8-OH-dGTP も変異を誘発することと、DNA ポリメラーゼが複製の際に 8-OH-dGTP を取り込むことを示している。実際に、この酸化的損傷ヌクレオチドは DNA ポリメラーゼの基質となり、DNA 鎖中に取り込まれることが明らかにされている (Cheng et al., 1992; Maki and Sekiguchi, 1992)。また、MutT 活性を欠く大腸菌変異株等の解析により、DNA 中における 8-OH-Gua の蓄積には両方の経路が同程度の寄与をしていると推察されている (Tajiri et al., 1995)。

類推すると、2-OH-Ade の場合にもこの 2 つのルートによって 2-OH-Ade が DNA 中に生成すると考えられる。ただし、2-OH-Ade の場合、DNA 中での生成が相対的に少ないとから、生成した 2-OH-dATP の DNA ポリメラーゼによる取り込みが重要な経路であると考えられる。実際、著者は 2-OH-dATP が DNA ポリメラーゼの基質となることを明らかにしている (後述)。

## 3) 細胞内 DNA で検出される 2-hydroxyadenine

電気化学検出器は、8-OH-Gua の高感度検出に繋用されるが、2-OH-Ade に対しては、有効な分析手段ではない。したがって、現段階では、細胞内 DNA 中の 2-OH-Ade の検出は、他の手段を用いなければならないのが現状である。ガスクロマトグラフィーと質量分析器を組み合わせた GC-MS 法は、アーティファクトと分析値が高いことが懸念されるものの、現在でも広く用いられている検出法である。Jaruga らは、ヒト培養細胞を過酸化水素で処理し、各種酸化的損傷塩基を GC-MS 法で分析した。その結果、処理から 1 時間後には、2-OH-Ade が 8-OH-Gua の 1/5 程度 DNA 中に蓄積したことを報告し

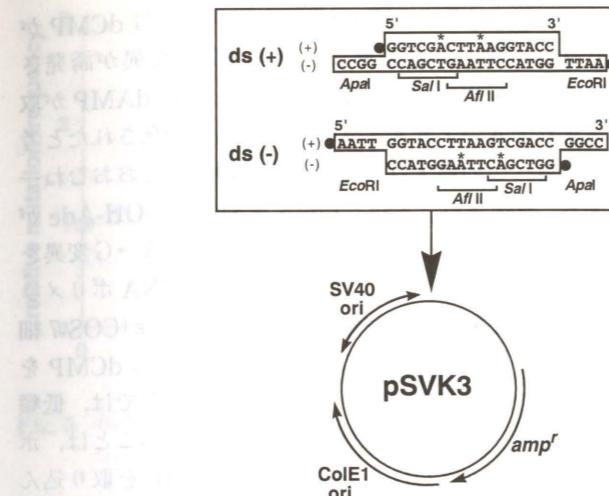


Fig. 3 Structure of shuttle vectors containing 2-OH-Ade (left) and schematic presentation of the replication of template strands with 2-OH-Ade (right). Closed circles represent 5'-phosphate groups. The A\* indicates the position where the 2-OH-Ade or the unmodified adenine was incorporated. The SV40 origin and the ColE1 origin for the replication in COS-7 and in *E. coli*, respectively, and the ampicillin resistance gene are also shown.

ている (Jaruga and Dizdaroglu, 1996)。したがって、活性酸素の産生によって、2-OH-Ade が細胞中の DNA に蓄積することが、実際に起こっていると思われる。

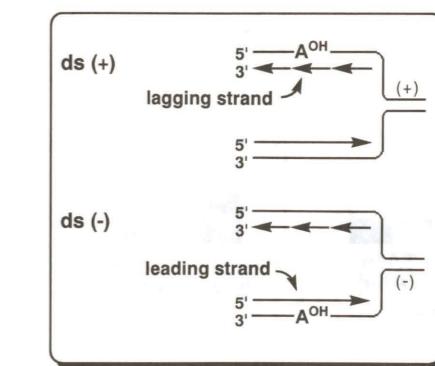
## 2. 2-Hydroxyadenine の誘発する変異

### 1) DNA 中の 2-hydroxyadenine が誘発するヌクレオチドのミスインコーポレーション

次に、著者は、2-OH-Ade が DNA ポリメラーゼによる試験管内 DNA 合成の系において、ヌクレオチドのミスインコーポレーションを誘発するかどうかを調べた。

5' および 3' 隣接塩基をいろいろと置換した、2-OH-Ade を含む 12 種類のオリゴヌクレオチドを合成し、錆型 DNA として用いた。各錆型 DNA にプライマーをアニールさせ、1 種類の基質 (dNTP, N=A, G, C, T) を加えた緩衝液中で DNA ポリメラーゼ (ポリメラーゼ  $\alpha$  および  $\beta$ , クレノー断片) によるプライマー伸長を行ったところ、配列によって若干の違いがあるものの、(1) ポリメラーゼ  $\alpha$  と  $\beta$  では dTMP と dCMP が、(2) クレノー断片では dTMP と dGMP が取り込まれる傾向を観察した (Kamiya and Kasai, 1996)。

興味深い点は、5' TA\* A 3' (A\* = 2-OH-Ade) 配列中の 2-OH-Ade に対しては 3 種のポリメラーゼとも dAMP を取り込んだことである (Kamiya et al., 1995 b; Kamiya and Kasai, 1996)。また、2 種の錆型 DNA を用い、4 種類の dNTP 存在下でのポリメラーゼ反応で得られた、完全鎖長産物を解析したところ、TA\*A 配列の場合には dAMP の取り込みが、そうでない配列 (この場合は GA\*C 配列) では dCMP の取り込みが観察された (Kamiya et al., 1995 b; Kamiya and Kasai, 1996)。



以上の結果から、2-OH-Ade は試験管内の系においてヌクレオチドのミスインコーポレーションを誘発することが明らかになった。

### 2) DNA 中の 2-hydroxyadenine が細胞内で誘発する変異

著者は、上記の結果を踏まえて、2-OH-Ade の大腸菌および培養細胞における誘発変異を解析した。標的配列はスクリーニングを考慮し、制限酵素部位、5' GTCGA\* C 3' (SalI 部位) と 5' CTTA\*AG 3' (AfII 部位) に導入した。後者は dAMP の取り込みが観察された TA\*A 部位中の 2-OH-Ade、前者はその他の部位の 2-OH-Ade を想定したものである。2-OH-Ade を含むオリゴヌクレオチドを二本鎖シャトルベクター pSVK 3 に導入し、大腸菌およびサル由来の COS-7 細胞にトランスフェクションした。その際に、複製の際のリーディング、ラギング鎖合成の違いを観察するために、二本鎖のそれぞれの鎖に 2-OH-Ade を導入したプラスミドを構築した (Kamiya and Kasai, 1997 a, 1997 b) (Fig. 3)。

Fig. 4 に大腸菌、COS-7 細胞中での誘発変異率とその内訳を示した。大腸菌、COS-7 細胞ともに GA\*C 配列の 2-OH-Ade の変異率はラギング鎖合成時では 0.6–0.8 % で、リーディング鎖合成時よりも高い。一方、TA\*A 配列中の 2-OH-Ade の変異率はそれよりも低く、リーディング、ラギング鎖合成時ともに 0.1 % 程度であった。TA\*A 配列は、上述したように dAMP の取り込みが試験管内で観察された、やや特殊な配列であり、それを考慮すると 2-OH-Ade の変異率は、約 0.5 % であると推定される。この変異率には、相補鎖 (2-OH-Ade を含まない鎖)

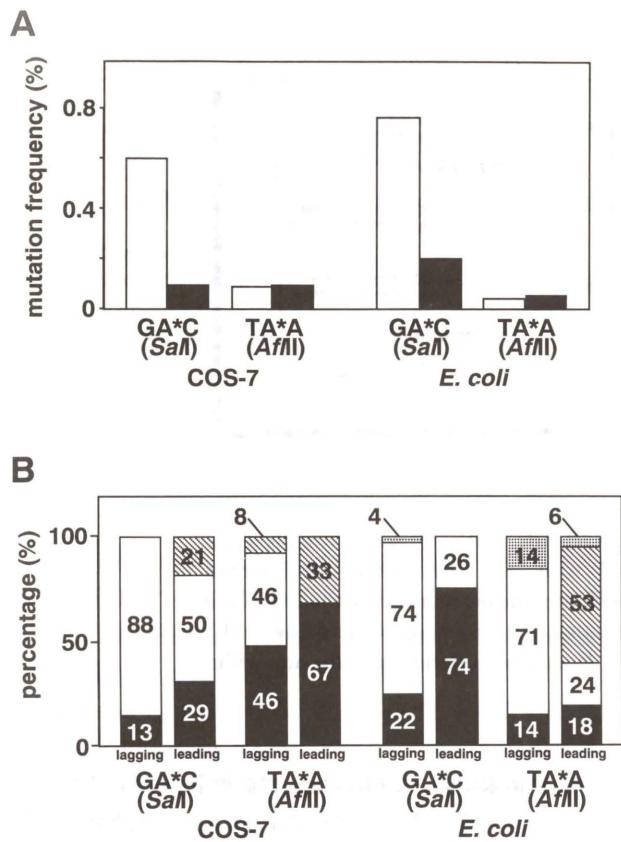


Fig. 4 Comparison of mutations induced by 2-OH-Ade in COS-7 and *E. coli*. (A) Mutation frequencies in COS-7 and *E. coli*. Open and closed bars represent the mutation frequencies during lagging and leading DNA syntheses, respectively. (B) Content of the induced mutations. Closed box, A→G; open box, A→T; hatched box, A→C. Reprinted with permission from Biochemistry, 36, 11125-11130, 1997. Copyright 1997 American Chemical Society.

の複製も反映されるため、実際の変異率は約1%であると推定される。この値は、二本鎖DNAを用いて得られている8-OH-Guaの変異率と同程度である(Cheng et al., 1992; Kamiya et al., 1992, 1995a; Wagner et al., 1997)。したがって、DNA中に生じた2-OH-Adeは8-OH-Guaと同程度に変異を誘発するといえる。

GA\*C配列中の2-OH-Adeは、大腸菌、COS-7細胞のいずれの場合にも、ラギング鎖合成時にアデニンの欠失変異を誘発した。同様にTA\*A配列中の2-OH-Adeの誘発変異にもアデニンの欠失変異がラギング鎖合成時に観察されている。この欠失変異が生ずる機構は、すでに提唱・証明されているように、2-OH-Adeに対してdCMP(GA\*C)またはdAMP(TA\*A)が取り込まれた結果であると思われる(Kunkel, 1990; Shibusaki and Grollman, 1993)。リーディング鎖合成時の際には、欠失変異の割合が減少した。これは、前述のモデルから考えると、2-OH-Ade・Cまたは2-OH-Ade・Aからの伸長がリーディング鎖合成時の方が高いことを示唆する。した

がって、GA\*C配列の2-OH-Adeに対してはdCMPが取り込まれてA→G変異またはAの欠失変異が誘発され、TA\*A配列中の2-OH-Adeに対してはdAMPが取り込まれてA→T変異とAの欠失変異が誘発されたと考えられる。この結果は、試験管内の結果とおおむね一致する。興味深いことは、TA\*A配列中の2-OH-Adeが大腸菌、COS-7細胞のいずれの場合にも、A→G変異をも誘発したことである。これは、細胞内でDNAポリメラーゼIII(大腸菌)やポリメラーゼδまたはε(COS-7細胞)がTA\*A配列中の2-OH-Adeに対してもdCMPを取り込んだことを示している。また、大腸菌では、低頻度ながらA→C変異が観察されている。このことは、ポリメラーゼIIIが2-OH-Adeに対してdGMPを取り込んだことを示す。

以上のデータをまとめると、2-OH-Adeは8-OH-Guaと同程度に変異原性を有し、そのスペクトルは、主としてA→G変異、5'-隣接塩基がGの場合には、A→Gの他にAの欠失、TA\*A配列の場合には、A→T、A→G変異と欠失変異であると結論づけられる。

### 3. 2-OH-dATPの誘発する変異

#### 1) 2-OH-dATPのDNAポリメラーゼによる取り込み

最初に、ヌクレオチドプール中に生ずると思われる2-OH-dATPのDNAポリメラーゼによる取り込みを検討した。合成オリゴヌクレオチドを用いた鉄型-プライマーを用い、2-OH-dATPを基質として与えてDNAポリメラーゼ反応を行ったところ、プライマー鎖の伸長が観察された。大腸菌のクレノー断片では鉄型DNA中のT残基に対してのみ2-OH-dATPの取り込みが観察された。一方、哺乳動物細胞の複製酵素であるDNAポリメラーゼαの場合には、鉄型中のTまたはC残基に対して、取り込みが観察された(Kamiya and Kasai, 1995)。

さらに最近、大腸菌の複製酵素、DNAポリメラーゼIIIの場合には、鉄型DNA中のG残基に対して2-OH-dATPが取り込まれることを見出した(紙谷・葛西、未発表データ)。このポリメラーゼ依存的に形成される塩基対の違いの機構についての詳細は現在不明である。

#### 2) 2-OH-dATPが細胞内で誘発する変異

著者らは、損傷を受けたDNA前駆体(デオキシヌクレオシド三リン酸)が細胞内で誘発する変異のアッセイ系を新たに開発し、2-OH-dATPが誘発する変異を調べた。この方法は、大腸菌懸濁液に損傷ヌクレオチドを添加して取り込みませ、染色体DNA上のlacI遺伝子中に生じた変異を解析するものである(Inoue et al., 1998)。

最初に、さまざまな濃度のヌクレオチドを添加し、lacIまたはlacO遺伝子座における変異体率を求めた(Fig. 5)。未修飾のdATPやdGTPを添加しても変異は誘発

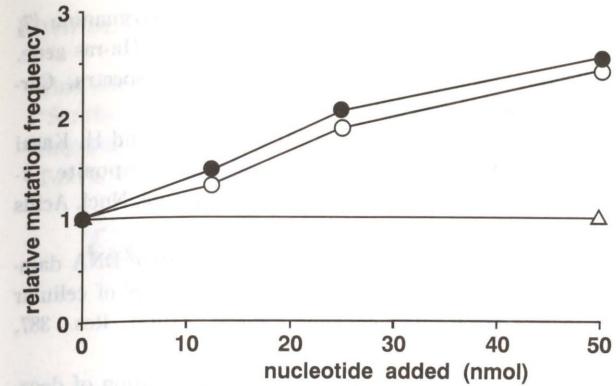


Fig. 5 Induction of mutations in *lacI* and *lacO* loci by 2-OH-dATP and 8-OH-dGTP. Relative frequencies of *lacI*<sup>-</sup> and *lacO*<sup>+</sup> mutations in the chromosomal DNA are shown. Closed circles, 2-OH-dATP; open circles, 8-OH-dGTP; open triangles, dATP or dGTP.

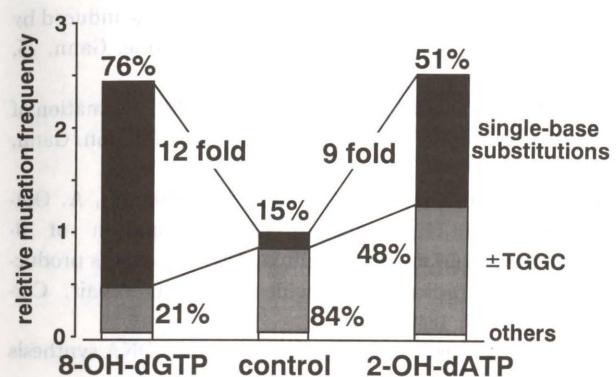


Fig. 6 Frequencies and content of mutations induced by 8-OH-dGTP and 2-OH-dATP.

されなかったのに対し、2-OH-dATPや比較として用いた8-OH-dGTPの添加では、量依存的に変異体率の上昇が観察された。このことは、外から添加した損傷ヌクレオチドが大腸菌体内に取り込まれて変異を誘発したことを示唆する。事実、放射性同位元素で標識したヌクレオチドを添加した場合には、菌体内への放射性同位元素の移行が観察されている。

次に、変異体のlacI遺伝子の配列を解析した。Fig. 6に、変異の大まかな内訳と変異率の相対値を示した。その結果、塩基置換変異の頻度は、2-OH-dATPの添加により約9倍上昇したことが明らかになった。8-OH-dGTPの場合にはその上昇率は約12倍であった。この結果を標識ヌクレオチドを用いて調べた菌体内への取り込み効率に照らし合わせると、2-OH-dATPの方が8-OH-dGTPより約3倍変異原性が高いことになる。このことは、ヌクレオチドプール中に生じた2-OH-dATPが活性酸素が関与する変異にきわめて重要な役割を担っていることを示唆するものである。

2-OH-dATPによって誘発された塩基置換変異の84%はG・C→T・Aトランスポーションであった(Inoue et al., 1998)。一方、8-OH-dGTPによって誘発された塩

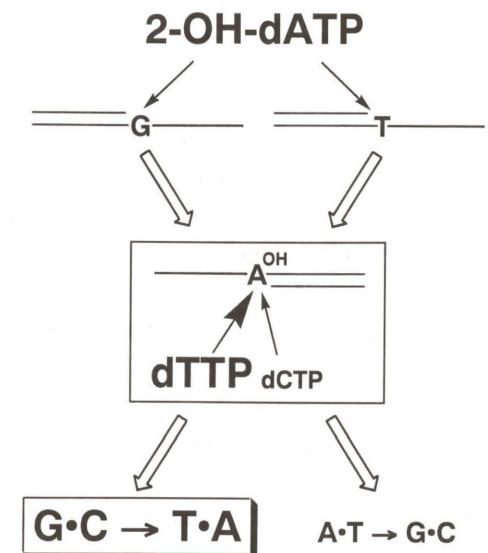


Fig. 7 Proposed model for G・C → T・A transversion induced by 2-OH-dATP in *E. coli*.

基置換変異は、ほとんどがA・T→C・Gトランスポーションであった。8-OH-dGTPの誘発変異は、分解酵素活性を欠くmutT株大腸菌で見出される変異や試験管内でのDNAポリメラーゼ反応の結果から予測されていた変異と同一のものであった。このことは、新たに開発した実験系が有効なものであることを示している。2-OH-dATPが誘発したG・C→T・Aトランスポーションの生成機構としては、Fig. 7に示すように、鉄型DNA中のG残基に対して2-OH-dATPが挿入され、次の複製の際に2-OH-Ade残基に対してdTTPが取り込まれることを推定している。事実、最近の著者の実験で、大腸菌の複製酵素、DNAポリメラーゼIIIが、鉄型DNA中のG残基に対して2-OH-dATPを取り込むことを見出している(紙谷、葛西、未発表データ)。

2-OH-dATPは8-OH-dGTPよりも変異原性が高く、また、G・C→T・Aトランスポーションを誘発することは大いに着目されるべきことである。以前には、活性酸素によりG・C→T・A変異の頻度が上昇すると、それはDNA中に生じた8-OH-Guaの誘発変異だと(確かに根拠もなく)思われてきた。しかし、著者らの結果は、G・C→T・Aトランスポーションの誘発には、少なくとも2-OH-dATPの生成が関与する可能性を示唆している。さらに、赤坂、山本は、脂質過酸化で誘発される変異はG・C→T・Aトランスポーションであるが、8-OH-Guaは生成されていないことを報告している(Akasaka and Yamamoto, 1994)。したがって、活性酸素の誘発する変異を単独のDNA損傷だけで説明するのは、未解明の部分が多い現在では、危険なことであると思われる。

以上、著者らが研究を進めている 2-OH-Ade を取り上げ、酸化的 DNA 損傷と誘発する変異の関連について簡単に述べてきた。一連の実験結果を踏まえると、2-OH-Ade の生成、特にヌクレオチドプール中での 2-OH-dATP の生成は、活性酸素が誘発する変異の中で大きな役割を担っている可能性が示されたと思われる。今後も、さらなる研究によって、活性酸素の誘発変異機構の解明が必要である。

## 参考文献

- Akasaka, S. and K. Yamamoto (1994) Mutagenesis resulting from DNA damage by lipid peroxidation in the supF gene of *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, 315, 105-112.
- 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.
- Inoue, M., H. Kamiya, K. Fujikawa, Y. Ootsuyama, N. Murata-Kamiya, T. Osaki, Y. Kosei and H. Kasai (1998) Induction of chromosomal gene mutations in *Escherichia coli* by direct incorporation of oxidatively damaged nucleotides, *J. Biol. Chem.*, 273, 11069-11074.
- Jaruga, P. and M. Dizdaroglu (1996) Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells, *Nucl. Acids Res.* 24, 1389-1394.
- Kamiya, H. and H. Kasai (1995) Formation of 2-hydroxydeoxyadenosine triphosphate, an oxidatively damaged nucleotide, and its incorporation by DNA polymerases, *J. Biol. Chem.*, 270, 19446-19450.
- 紙谷浩之, 葛西 宏(1995)活性酸素による8-ヒドロキシグアニンの生成と生体との関わり:変異誘発・発がん・修復, 衛生化学, 41, 307-319.
- 紙谷浩之, 葛西 宏(1996)活性酸素によるDNA損傷と突然変異, 環境変異原研究, 18, 181-189.
- Kamiya, H. and H. Kasai (1996) Effects of sequence contexts on misincorporation of nucleotides opposite 2-hydroxyadenine, *FEBS Lett.*, 391, 113-116.
- Kamiya, H. and H. Kasai (1997a) Substitution and deletion mutations induced by 2-hydroxyadenine in *Escherichia coli*: Effects of sequence contexts in leading and lagging strands, *Nucl. Acids Res.*, 25, 304-311.
- Kamiya, H. and H. Kasai (1997b) Mutations induced by 2-hydroxyadenine on a shuttle vector during leading and lagging strand syntheses in mammalian cells, *Biochemistry*, 36, 11125-11130.
- 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, *Cancer Res.*, 52, 3483-3485.
- Kamiya, H., N. Murata-Kamiya, S. Koizume, H. Inoue, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1995a) 8-Hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in hot spots of the c-Ha-ras gene. Effects of sequence contexts on mutation spectra, *Carcinogenesis*, 16, 883-889.
- Kamiya, H., T. Ueda, T. Ohgi, A. Matsukage and H. Kasai (1995b) Misincorporation of dAMP opposite 2-hydroxyadenine, an oxidative form of adenine, *Nucl. Acids Res.*, 23, 761-766.
- Kasai, H. (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis, *Mutat. Res.*, 387, 147-163.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984a) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, *Nucl. 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, 841-844.
- 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.
- Kunkel, T. A. (1990) Misalignment-mediated DNA synthesis errors, *Biochemistry*, 29, 8003-8011.
- Maki, H. and M. Sekiguchi (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis, *Nature*, 355, 273-275.
- Murata-Kamiya, N., H. Kamiya, M. Muraoka, H. Kaji and H. Kasai (1997) Comparison of oxidation products from DNA components by  $\gamma$ -irradiation and Fenton-type reactions, *J. Radiat. Res.*, 38, 121-131.
- Shibutani, S. and A.P. Grollman (1993) On the mechanism of frameshift (deletion) mutagenesis in vitro, *J. Biol. Chem.*, 268, 11703-11710.
- Tajiri, T., H. Maki and M. Sekiguchi (1995) Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, 336, 257-267.
- Wagner, J., H. Kamiya, H. and R.P.P. Fuchs (1997) Leading versus lagging strand mutagenesis induced by 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in *E. coli*, *J. Mol. Biol.*, 265, 302-309.
- 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.

This paper, chaired by Tadashi Watabe, was presented to the 9th JEMS Annual Symposium, "Synthetic Models for DNA Damage and Mutagenesis", Organized by Kazuo Negishi and Hikoya Hayatsu, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at Yakult Hall, Tokyo, May, 29, 1998.

## Genotoxicity of estrogen-and tamoxifen-derived DNA adducts in mammalian cells

Shinya Shibutani

Department of Pharmacological Sciences, State University of New York at Stony Brook  
Stony Brook, New York, USA 11794-8651

### Summary

Site-specifically modified oligodeoxynucleotides were used to explore the mutagenic properties of estrogen-derived DNA adducts or anti-estrogen, tamoxifen-derived DNA adducts in mammalian cells. Using an *in vitro* experimental system that can quantify base substitutions and deletions, estrone 2, 3-quinone-induced DNA adducts,  $N^2$ -(2-hydroxyestrone-6 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-yl)-2'-deoxyguanosine (2-OHE<sub>1</sub>-6-N<sup>2</sup>-dG) and  $N^6$ -(2-hydroxyestrone-6 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-yl)-2'-deoxyadenosine (2-OHE<sub>1</sub>-6-N<sup>6</sup>-dA), were found to be miscoding lesions. Model estrogen-DNA adducts,  $N^2$ -[3-methoxyestra-1, 3, 5 (10)-trien-6 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-yl]-2'-deoxyguanosine (dG-N<sup>2</sup>-3MeE) and  $N^6$ -[3-methoxyestra-1, 3, 5 (10)-trien-6 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-yl]-2'-deoxyadenosine (dA-N<sup>6</sup>-3MeE), structurally similar to 2-OHE<sub>1</sub>-6-N<sup>2</sup>-dG and 2-OHE<sub>1</sub>-6-N<sup>6</sup>-dA, were inserted into single-stranded (ss) phagemid vectors. These modified ss vectors were transfected into simian kidney (COS-7) cells. The progeny plasmid obtained were used to transform *Escherichia coli* DH10B. The transformants were analyzed by oligodeoxynucleotide hybridization and sequencing to determine the mutation frequency and spectrum. Targeted mutations representing G → T and A → T transversions were mainly detected opposite 2-OHE<sub>1</sub>-6-N<sup>2</sup>-dG and 2-OHE<sub>1</sub>-6-N<sup>6</sup>-dA, respectively. These results indicate that estrogen-DNA adducts are mutagenic and act as initiators in mammalian cells.

We also found that  $\alpha$ -sulfate tamoxifens are highly reactive to DNA, forming four diastereoisomers of  $\alpha$ -( $N^2$ -deoxyguanosinyl)tamoxifen (dG-N<sup>2</sup>-TAM). Sulfation of  $\alpha$ -hydroxytamoxifen ( $\alpha$ -OHTAM), a major metabolite of tamoxifen, catalyzed by rat or human liver hydroxysteroid sulfotransferase resulted in dG-N<sup>2</sup>-TAM adducts in DNA. dG-N<sup>2</sup>-TAM adducts are highly miscoding and mutagenic lesions, generating mainly G → T transversions, along with G → A transitions and/or G → C transversions in mammalian cells. These mutagenic TAM-DNA adducts were detected in endometrium obtained from patients treated with TAM.

Thus, estrogen-and tamoxifen-derived DNA adducts result in mutations and pose a potential risk to women treated with estrogen or tamoxifen.

**Keywords :** estrogen, tamoxifen, DNA adduct, DNA polymerase, mutagenesis

### 1. Genotoxicity of estrogens

Endogenous and synthetic estrogens have been suspected to be involved in the development of breast and endometrial cancers (IARC Monographs, 1979; Henderson et al., 1988; Zumoff, 1993). These

received : June, 29, 1998

accepted : July, 1, 1998

Telephone : (USA) +1-516-444-8018 Telefax : (USA) +1-

516-444-3218 E-mail : shinya@pharm.som.sunysb.edu

© Environmental Mutagen Society of Japan

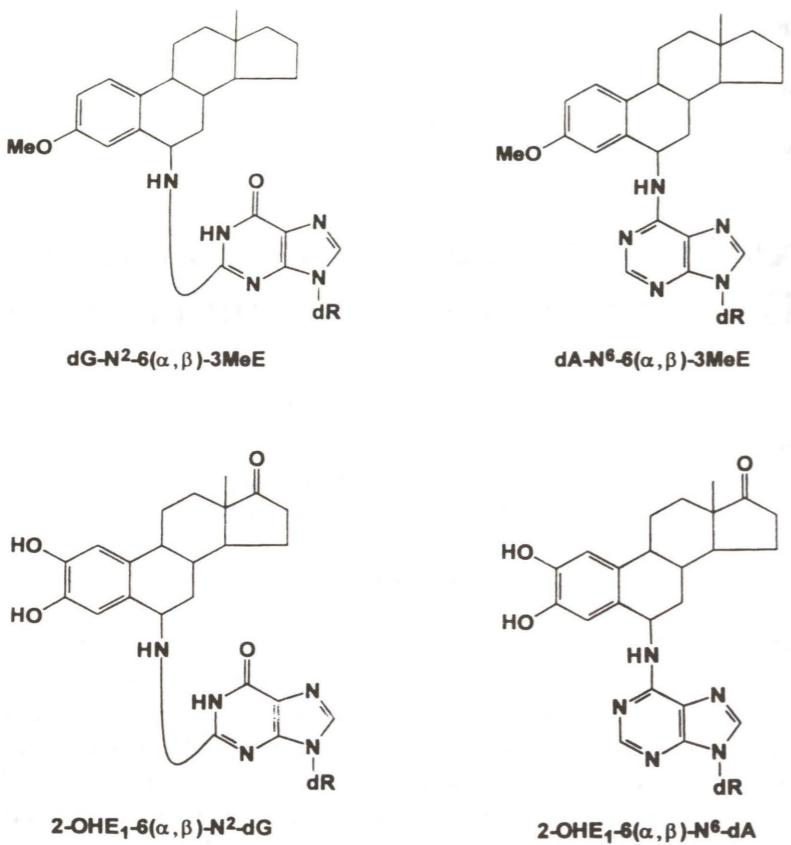


Fig. 1 Structures of estrogen-DNA adducts.

hormonal substances induce several different tumors including mammary and uterine tumors in rodents (IARC Monographs, 1979; Liehr, 1990). The mechanism of the carcinogenic effect of estrogens is unknown and may relate to promotion and/or initiation of cancer (Henderson et al., 1988; Fishman et al., 1995). Estrogens increase the frequency of mitotic activity in target organs. As a rare consequence of this estrogen-induced proliferation, malignant phenotypes may occur due to replication and chromosomal translocation errors during cell division (Henderson et al., 1988; Preston-Martin et al., 1990) and may develop cancers. Alternatively, treatment of estrogens has been known to form DNA adducts in tissues of animals (Liehr et al., 1986a; Gladek and Liehr, 1989; Liehr, 1990). DNA damage may lead to mutations that initiate human cancers (Lawley, 1994).

### 1) Estrogen-induced DNA damage

Estrogens are metabolized by estrogen 2- and 4-hydroxylases to catecholestrogens (Liehr et al., 1995; Hayes et al., 1996), which, in turn, are oxidized to form semiquinones and quinones by cytochrome P450 (Martucci and Fishman, 1993). Both 2- and 4-hydroxyestradiols induce DNA adducts in

cultured Syrian hamster embryo cells (Hayashi et al., 1996). The 2, 3-and 3, 4-quinones of estrogens are thought to be reactive intermediates that directly bind to DNA (Dwivedy et al., 1992). Estrone 2, 3-quinone reacts with dG or dA, forming *N*<sup>2</sup>-(2-hydroxyestrone-6 (α, β)-yl)-2'-deoxyguanosine (2-OHE<sub>1</sub>-6-N<sup>2</sup>-dG) and *N*<sup>6</sup>-(2-hydroxyestrone-6 (α, β)-yl)-2'-deoxyadenosine (2-OHE<sub>1</sub>-6-N<sup>6</sup>-dA) (the structures in Fig. 1), respectively (Stack et al., 1996). Reaction of estrone 3, 4-quinone with dG produced 7-[4-hydroxyestrone-1 (α, β)-yl] guanine, with loss of deoxyribose (Stack et al., 1996).

Yoshizawa and his colleagues found that pyridinium 3-methoxyestra-1, 3, 5 (10)-trien-6-yl sulfate (3MeE-6-S) is highly reactive to deoxynucleosides and DNA, forming *N*<sup>2</sup>-[3-methoxyestra-1, 3, 5 (10)-trien-6 (α, β)-yl]-2'-deoxyguanosine (dG-N<sup>2</sup>-3MeE) and *N*<sup>6</sup>-[3-methoxyestra-1, 3, 5 (10)-trien-6 (α, β)-yl]-2'-deoxyadenosine (dA-N<sup>6</sup>-3MeE) adducts (Fig. 1) (Itoh et al., 1996 and 1998; Shibutani et al., 1997a). They proposed (Takagi et al., 1991) that the 6-hydroxyl group of 6-hydroxyestrogens is sulfonated, and that the highly reactive benzyl esters may form covalent adducts with DNA. Surprisingly, the reacting positions of 3MeE-6-S to dG and dA were same to that induced by estrone-2,

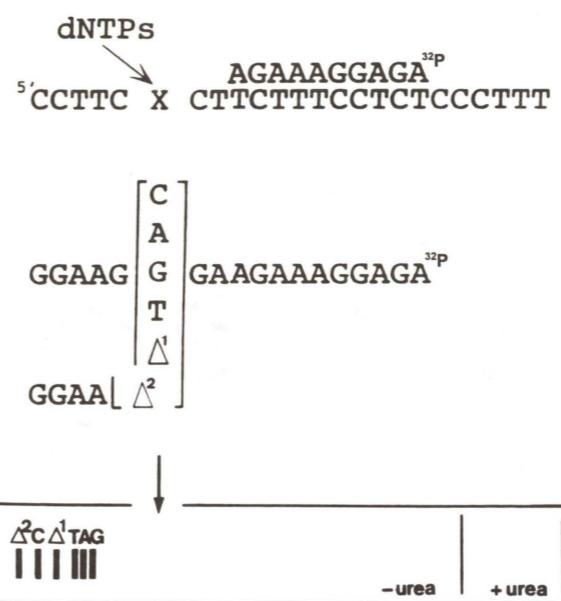


Fig. 2 Diagram of the primer extension assay and analysis of reaction products.

3-quinone. The chemical structures of dG-N<sup>2</sup>-3MeE and dA-N<sup>6</sup>-3MeE are quite similar to that of 2-OHE<sub>1</sub>-6-N<sup>2</sup>-dG and 2-OHE<sub>1</sub>-6-N<sup>6</sup>-dA. Thus, dG-N<sup>2</sup>-3MeE and dA-N<sup>6</sup>-3MeE may also be used as model estrogen-DNA adducts.

### 2) Miscoding specificity of estrogen-DNA adducts

2-OHE<sub>1</sub>-N<sup>2</sup>-dG-or 2-OHE<sub>1</sub>-N<sup>6</sup>-dA-modified 24-mer was prepared by reacting a single dG or dA embedded in a 24-mer oligodeoxynucleotide with 2-OHE<sub>1</sub>-derived quinone (Terashima et al., 1998a) and used for *in vitro* mutagenesis studies. Primer extension reactions catalyzed by mammalian DNA polymerases were conducted in the presence of four deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) on the modified templates, as shown in Fig. 2. The fully extended products were recovered from the gel and subjected to two-phase gel electrophoresis (Shibutani, 1993). The migration of fully extended products was compared with standards representing products containing dC, dA, dG, or dT opposite the lesion or one-and two-base deletions that can be completely resolved on our established two-phase gel electrophoresis, based on their different migration (Fig. 2). Thus, miscoding specificities can be determined quantitatively.

When pol α, a mammalian replicative enzyme was used, 2-OHE<sub>1</sub>-N<sup>2</sup>-dG directed the incorporation of dCMP (6.3%), the correct base, opposite the lesion. 2-OHE<sub>1</sub>-N<sup>6</sup>-dA generated preferential incorporation of dTMP (23%), the correct base, opposite the lesion, accompanied by small amounts of misin-

corporation of dCMP (0.54%) and one base deletion (0.56%). Using pol β, functioning as a repair enzyme, only the correct bases, dCMP and dTMP, were incorporated opposite 2-OHE<sub>1</sub>-N<sup>2</sup>-dG and 2-OHE<sub>1</sub>-N<sup>6</sup>-dA, respectively. When pol δ, another mammalian replicative enzyme, and PCNA were used, 2-OHE<sub>1</sub>-N<sup>2</sup>-dG promoted incorporation of dCMP (3.1%) opposite the lesion, accompanied by small amounts of misincorporation of dTMP (0.52%). 2-OHE<sub>1</sub>-N<sup>6</sup>-dA promoted preferential incorporation of dTMP (62%) opposite the lesion, along with small amounts of misincorporation of dCMP (3.2%) and one-base deletions (0.34%). Thus, the miscoding specificities and frequencies varied depending on the DNA polymerase used as similarly reported for other DNA adduct (Shibutani et al., 1991).

These results indicate that endogenous estrogen quinone-derived DNA adducts have miscoding potential: G → A and A → G transitions and deletions are predicted in mammalian cells. In human breast cancer, G → A (Mazars et al., 1992; Sasa et al., 1993) and A → G transitions (Blaszyk et al., 1994; Nigro et al., 1994) were detected mainly, along with some G → T transversions (Coles et al., 1992; Biggs et al., 1993) and deletions (Sato et al., 1992; Hamelin et al., 1994). Thus, the miscoding specificities of estrogen quinone-derived DNA adducts are quite similar to that observed in human breast cancer.

### 3) Mutagenic event of estrogen-DNA adducts

We also found that model estrogen DNA adducts, dG-N<sup>2</sup>-3MeE and dA-N<sup>6</sup>-3MeE adducts, have miscoding potential (Shibutani et al., 1997a). Site-specifically modified oligodeoxynucleotides containing a single dG-N<sup>2</sup>-3MeE or dA-N<sup>6</sup>-3MeE were inserted into a gapped single-strand vector as described in Fig. 3 (Terashima et al., 1998b). Due to the ss structure, repair of DNA adducts is minimal (Moriya, 1993). These constructed vectors were used to establish the mutagenic specificities and frequencies of dG-N<sup>2</sup>-3MeE and dA-N<sup>6</sup>-3MeE. The vectors modified with dG-N<sup>2</sup>-3MeE and dA-N<sup>6</sup>-3MeE were used to transfect simian kidney (COS-7) cells. The progeny plasmid obtained were used to transform *Escherichia coli* DH10B. The transformants were analyzed by oligodeoxynucleotide hybridization and sequencing to determine the mutation specificity.

When a dG-N<sup>2</sup>-3MeE-modified vector was used, dCMP (92.5%), the correct base, was preferentially incorporated opposite the lesion (Table 1). Fifteen targeted mutants representing G → T transversions

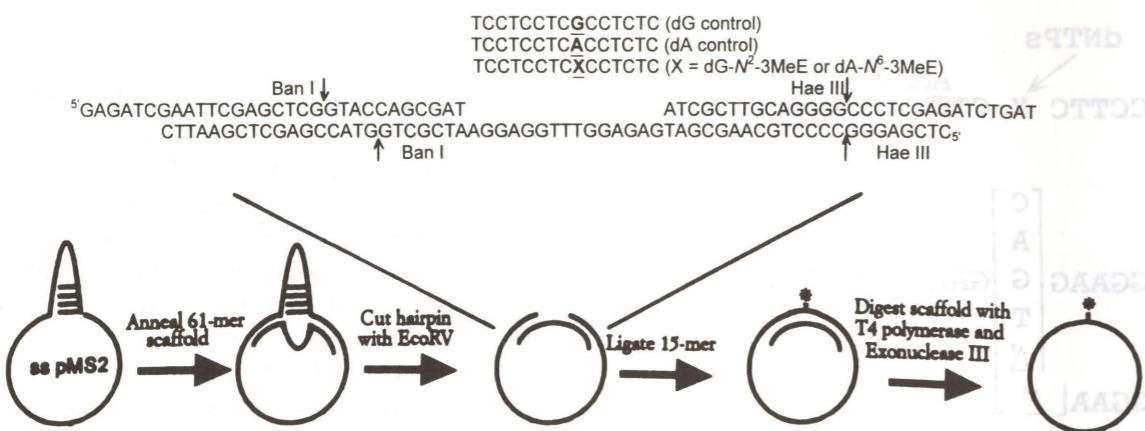


Fig. 3 Construction of a single-strand vector containing a single estrogen-DNA adduct  
The upper stand is a part of ss pMS2 sequence : X represents dG-N<sup>2</sup>-3MeE or dA-N<sup>6</sup>-3MeE

Table 1 Mutational specificity of model estrogen-DNA adducts in COS-7 cells<sup>a</sup>

Plasmid	Number of Targeted Mutations (dG, dG-N <sup>2</sup> -3MeE, dA or dA-N <sup>6</sup> -3MeE → X)					
	G	T	A	C	Δ	others <sup>b</sup>
pMS2(dG)	198(100%)	0(<0.5%)	0(<0.5%)	0(<0.5%)	0(<0.5%)	0
pMS2(dG-N <sup>2</sup> -3MeE)	212(93%)	15(6.6%)	0	2(0.9%)	0	0
pMS2(dA)	0(<0.5%)	0(<0.5%)	200(100%)	0(<0.5%)	0(<0.5%)	1
pMS2(dA-N <sup>6</sup> -3MeE)	3(1.5%)	33(16%)	171(83%)	0	0	5

<sup>a</sup>Adducted ssDNA (100 fmol) was used to transfet COS-7 cells. Progeny phagemid was recovered and used to transform *E. coli* DH10B for mutation analysis.

<sup>b</sup>Non-targeted mutations are listed below.

<sup>5</sup>TCC(→ t)TCCTCACCTCTC     <sup>5</sup>TCCTCCTCA\*CC(→ g<sup>2</sup> and t<sup>3</sup>)TCTC

were detected, along with two mutants showing G → C. The frequency of the targeted mutation was 7.5%. No mutations were observed with the unmodified vector. When a dA-N<sup>6</sup>-3MeE-modified vector was used, preferential incorporation of dTMP (82.6%), the correct base, was also observed opposite the lesion (Table 1). Thirty-three targeted mutants representing A → T transversions were detected, accompanied by a small number of mutants showing A → G transitions.

The frequency of the targeted mutation was 17.4%. Some non-targeted mutations were detected opposite dC two bases 3' to dA-N<sup>6</sup>-3MeE lesion. The frequency of targeted mutation observed opposite dA-N<sup>6</sup>-3MeE was 2.3 times higher than that observed opposite dG-N<sup>2</sup>-3MeE. Thus, the dA-N<sup>6</sup>-3MeE lesion was much more mutagenic than the dG-N<sup>2</sup>-3MeE lesion. This is the first evidence that the estrogen-DNA adducts are highly mutagenic and act as initiators in mammalian cells.

#### 4) Other possible mechanisms of estrogen-induced mutation

When estrogen quinones are reduced to the semi-quinones during redox cycling, free radicals produce

oxidative damage, including 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) in DNA (Han and Liehr, 1994). 8-OxodG is a mutagenic lesion, generating primarily G → T transversions in mammalian cells (Shibutani et al., 1991; Cheng et al., 1992; Moriya, 1993). This mutagenic lesion has been detected in mammary DNA from breast cancer patients (Malins et al., 1993). Thus, if 8-oxodG is not repaired, oxidative damage may also contribute to the initiation of cancer.

Estrogen-3, 4-quinone directly reacts with dG residue, resulting in N7-(4-hydroxyestrone-1-yl) guanine and an apurinic site in DNA (Stack et al., 1996; Cavalieri et al., 1997). Apurinic/apyrimidinic (abasic) sites have been shown to generate mutations in mammalian cells. In our *in vitro* studies using pol  $\alpha$  and pol  $\delta$  (Shibutani et al., 1997b; Mozzherin et al., 1997), preferential misincorporation of dAMP was detected opposite a natural or synthetic abasic site during DNA synthesis. In COS-7 cells, dAMP, dCMP, and dTMP were incorporated at similar frequencies opposite a natural abasic site (Cabral Neto, et al., 1992). In another study in COS-7 cells, preferential incorporation of dAMP was observed opposite a synthetic abasic

site, accompanied by a small number of deletions (Takeshita and Eisenberg, 1994). In human lymphoblastoid cells, dGMP was incorporated primarily opposite natural abasic sites (Klinedinst and Drinkwater, 1992). Although the mutation spectra observed in the three studies were different, unstable depurinating sites induced by estrogen-3, 4-quinone may promote mutations. Alternatively, the unstable adduct, N7-(4-hydroxyestrone-1-yl)-2'-deoxyguanosine, itself may also have a mutagenic potential.

The increased formation of 16 $\alpha$ -hydroxyestrogen metabolites may be associated with an increased risk for developing mammary cancer in rodents (Fishman et al., 1995). Since 16 $\alpha$ -hydroxyestrone reacts covalently with amino groups in proteins through the Schiff base (Miyairi et al., 1991), 16 $\alpha$ -hydroxyestrogen may also react with DNA, forming DNA adducts.

Both 2-and 4-hydroxyestradiols have been shown to form DNA adducts in cultured hamster embryo cells (Hayashi et al., 1996). In our studies, stable model estrogen-DNA adducts similar to that generated by 2-hydroxyestrogen have highly mutagenic potential. Thus, estrogen-derived DNA adducts,

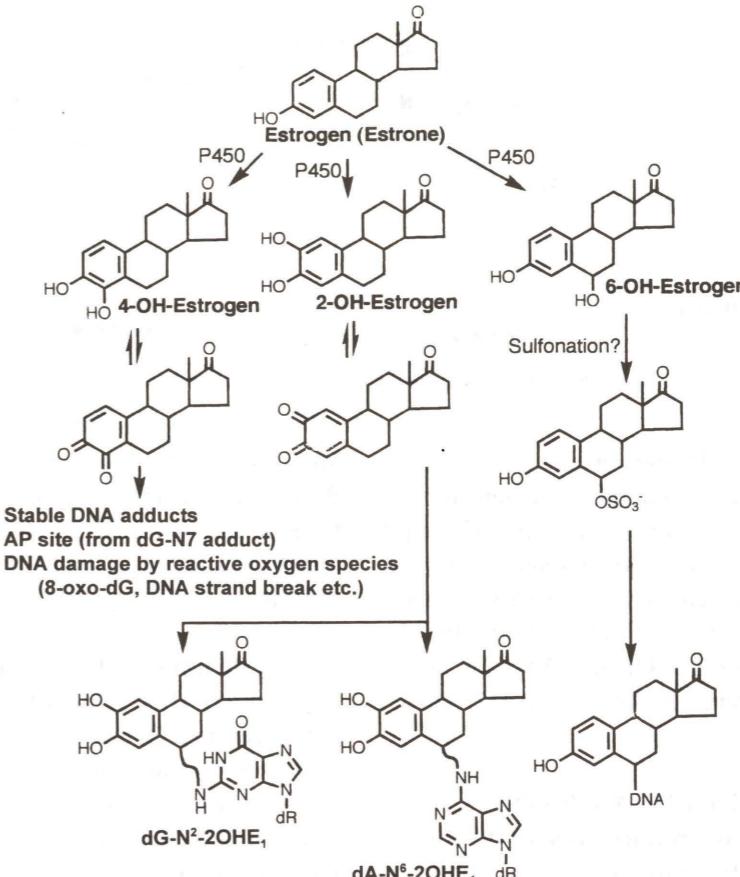


Fig. 4 Proposed mechanisms of DNA damage induced by estrogen.

depurinic sites, as well as oxidative damage may be involved in the development of human cancers including breast and endometrial cancers (Fig. 4).

4-Hydroxyestrogens have been shown to be carcinogenic in the kidneys of male Syrian hamsters while 2-hydroxyestrogens were not (Liehr et al., 1986b; Li and Li, 1987). However, 2-and 4-hydroxyestrogens and their major metabolites, estradiol-2, 3-quinone and estradiol-3, 4-quinone, did not show any tumorigenic potency in liver of B6C3F<sub>1</sub> male mice (Cavalieri et al., 1997). Carcinogenicity of estrogen may vary depending on the organs examined, the species and the sex of animals. So far no carcinogenic studies of estrogen metabolites such as hydroxyestrogens and estrogen quinones have been investigated in mammary and uterus tissues of animals. Further studies will be required to explore the carcinogenicity of estrogen and its metabolites.

#### 2. Genotoxicity of an anti-estrogen, tamoxifen

Tamoxifen (TAM) is widely used for the chemotherapy of breast cancer and is being considered as a prophylactic agent for healthy women with a positive family history of breast cancer (Nayfield et

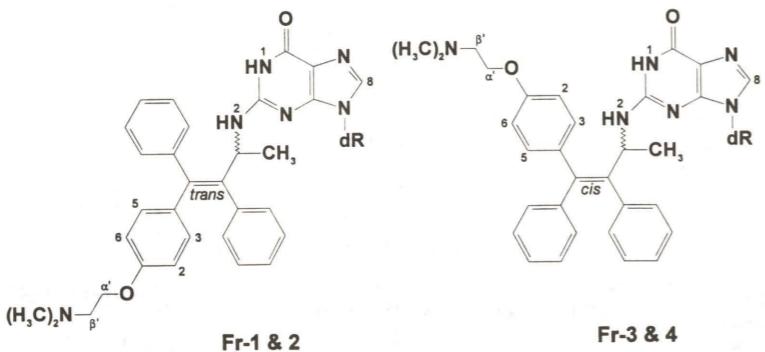


Fig. 5 Structures of *trans*-or *cis*-forms of dG-N<sup>2</sup>-tamoxifen.

al., 1991; Jordan, 1993; Powles et al., 1993). However, this drug is a potent hepatocarcinogen in rats (Williams et al., 1993; Greaves et al., 1993; Hard et al., 1993). Treatment with TAM increases the incidence of endometrial cancer in breast cancer patients (Seoud et al., 1993; Fischer et al., 1994; van Leeuwen et al., 1994). Thus, TAM has been listed as a human carcinogen by the IARC (IARC Monographs, 1996).

### 1) Tamoxifen-derived DNA adducts

Treatment with TAM produces DNA adducts in the livers of rodents (Han and Liehr, 1992; White et al., 1993). Several mechanisms have been proposed to explain the formation of DNA adducts induced by TAM (Potter et al., 1994). 4-Hydroxytamoxifen quinone methide, produced by the oxidation of 4-hydroxytamoxifen, may react with DNA to form TAM-DNA adducts (Moorthy et al., 1996). Tamoxifen 1, 2-epoxide, another oxidative species, was initially reported to react with DNA (Phillips et al., 1994a and 1996a). However, the same group recently concluded that tamoxifen 1, 2-epoxide itself is devoid of DNA-binding activity (Osborne et al., 1996).  $\alpha$ -Hydroxylation of TAM and its metabolites, tamoxifen N-oxide, N-desmethyltamoxifen, and 4-hydroxytamoxifen, leads to formation of nucleoside adducts (Potter et al., 1994; Phillips et al., 1994a and b; Jarman et al., 1995). However,  $\alpha$ -hydroxytamoxifen has only a low level of reactivity to DNA *in vitro* (Phillips et al., 1994a).

We found that when 2'-deoxyguanosine (dG) was reacted with  $\alpha$ -sulfate tamoxifen ( $\alpha$ -sulfate TAM), four reaction products were isolated by HPLC (Dasaradhi and Shibutani, 1997). All products have similar UV absorbance and exhibited at *m/z* 637, identifying the molecular weight as 636 daltons. These data suggest that four products are expected to be diastereoisomers of dG-tamoxifen. The structure of each of the isomers of dG-tamoxifens was analyzed by 600 Hz NMR. Fr-1 and fr-2 were

identified as the epimers of *trans*-form of  $\alpha$ -(N<sup>2</sup>-deoxyguanosinyl)tamoxifen (dG-N<sup>2</sup>-TAM, the structures in Fig. 5). Fr-3 and fr-4 were identified as the epimers of *cis*-form of dG-N<sup>2</sup>-TAM (Dasaradhi and Shibutani, 1997).

### 2) Formation of tamoxifen-derived DNA adducts through sulfation of $\alpha$ -OHTAM

We recently found that sulfation of  $\alpha$ -OHTAM catalyzed by rat liver hydroxysteroid (alcohol) sulfotransferase a (STa) resulted in dG-N<sup>2</sup>-TAM adducts in DNA (Shibutani et al., 1998b). Based on the levels of the expression and relationship of human sulfotransferases to the rat enzymes that activate benzylic alcohols, human hydroxysteroid sulfotransferase (hHST) may play a significant role in the activation of benzylic alcohols in human livers (Glatt et al., 1995). Moreover, similarities in the substrate specificities of STa and hHST are consistent with the possibility that hHST may also catalyze the sulfation of  $\alpha$ -OHTAM. The formation of TAM-derived DNA adducts was investigated by incubation of DNA with (*E*)- $\alpha$ -OHTAM, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS), and four distinct recombinant human sulfotransferases. Using <sup>32</sup>P-postlabeling and HPLC analysis, two TAM-DNA adducts were detected in incubations that included the human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2A1 (hHST), but not with human phenol sulfotransferase SULT1A1\*2, estrogen sulfotransferase SULT1E, or monoamine sulfotransferase SULT1A3 (Shibutani et al., 1998c). When compared with standards of stereoisomers of  $\alpha$ -(N<sup>2</sup>-deoxyguanosinyl) tamoxifen 3'-monophosphate (dG<sub>3'</sub>P-N<sup>2</sup>-TAM), the major adduct was identified chromatographically as an epimer of the *trans*-form of dG-N<sup>2</sup>-TAM, and the minor adduct was identified as an epimer of the *cis*-form. As shown in Fig. 6, since a conversion between the (*E*)-and (*Z*)-form of  $\alpha$ -OHTAM occurs through a carbocation intermediate (Dasaradhi and Shibutani, 1997; Shibutani et

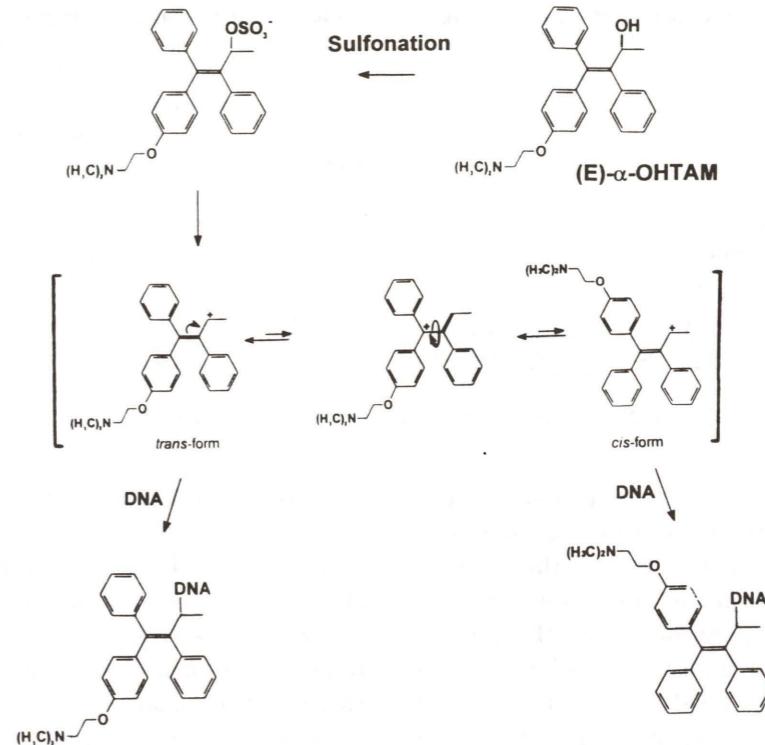


Fig. 6 A mechanism for the formation of dG-N<sup>2</sup>-tamoxifen DNA adducts.

Table 2 Miscoding specificities of dG-N<sup>2</sup>-tamoxifen adducts<sup>a)</sup>

	C(%)	A(%)	G(%)	T(%)	$\Delta^1$ (%)	$\Delta^2$ (%)
pol $\alpha$						
dG	78.0					
dG-N <sup>2</sup> -tamoxifen						
fr-1	14.6	4.9	0.79		1.0	1.4
fr-2	1.5	1.6	0.24		0.30	0.60
fr-3	1.0	1.5	0.29		1.3	1.6
fr-4	2.3	2.3	0.70		0.53	3.3
pol $\delta$						
dG	13.8					
dG-N <sup>2</sup> -tamoxifen					0.30	
fr-1	6.5					
fr-2	1.4					
fr-3	0.70					
fr-4	0.40					

<sup>a)</sup>C, A, G, T,  $\Delta^1$ , and  $\Delta^2$  represent the amount of the fully extended product containing dC, dA, dG, dT, and one-and two-base deletions opposite the lesion produced from the starting primer, respectively.

al., 1998b), the *cis*-form of dG-N<sup>2</sup>-TAM can be formed through this conversion. These results indicate that sulfation of  $\alpha$ -OHTAM catalyzed by hHST results in the formation of dG-N<sup>2</sup>-TAMs in human tissues.

### 3) Miscoding and Mutagenic properties of tamoxifen DNA adducts

Primer extension reactions catalyzed by mammalian DNA polymerases were conducted in the presence of all four dNTPs on site-specifically

modified templates containing a single stereoisomer of dG-N<sup>2</sup>-TAMs (Shibutani and Dasaradhi, 1997), as similarly described in Fig. 2 (Shibutani et al., 1996). When pol  $\alpha$  was used, DNA synthesis on unmodified templates led to the expected incorporation of dCMP opposite dG (Table 2). The epimers of *trans*-forms (fr-1 and fr-2) and the epimers of *cis*-forms (fr-3 and fr-4) of dG-N<sup>2</sup>-TAM adducts promoted the incorporation of dCMP (1.0-14%) and dAMP (1.5-4.9%) opposite the lesions, accompanied by small amounts of incorporation of dGMP. One-and

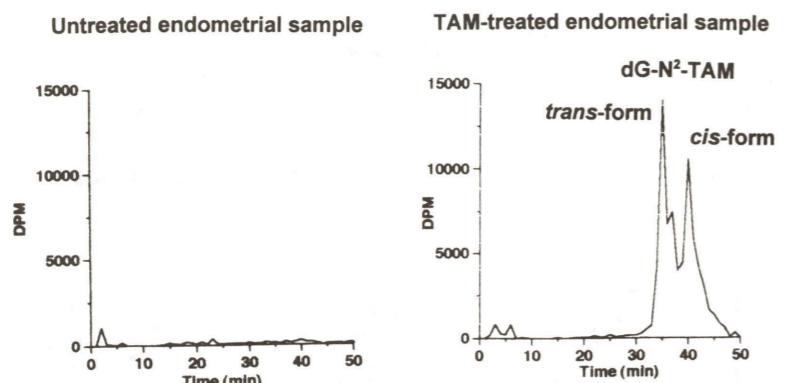


Fig. 7 Tamoxifen-DNA adducts in human endometrium.

two-base deletions were also detected. Using pol  $\delta$ , primer extension reactions were blocked one-base before dG-N<sup>2</sup>-TAM lesions. Some of the primers passed the lesions to form the fully extended products. Preferential incorporation of dCMP, the correct base, was observed opposite the lesions. Fr-1 of the *trans*-form of dG-N<sup>2</sup>-TAM only promoted small amounts of misincorporation of dTMP (0.3%). No deletions were detected. The miscoding specificities obtained by pol  $\delta$  were much different from that of pol  $\alpha$ . Thus, dG-N<sup>2</sup>-TAMs have miscoding potentials: G  $\rightarrow$  T and G  $\rightarrow$  C transversions and deletions are predicted in mammalian cells.

#### 4) Mutagenic properties of dG-N<sup>2</sup>-tamoxifen DNA adducts

15-mer oligodeoxynucleotides containing an each isomer of dG-N<sup>2</sup>-TAM or unmodified dG were prepared as described previously (Shibutani and Dasaradhi, 1997). These oligodeoxynucleotides were ligated into a gapped single-strand vector as similarly described in Fig. 3. The vectors modified with dG-N<sup>2</sup>-TAM were used to transfect COS-7 cells. When dG-N<sup>2</sup>-TAM-modified vectors were used, targeted mutants representing G  $\rightarrow$  T transversions were mainly detected, along with G  $\rightarrow$  A transitions and/or G  $\rightarrow$  C transversions. No mutations were observed with the unmodified vector. The mutagenic specificities were quite similar to that observed *in vitro* (Shibutani and Dasaradhi, 1997) and in the liver DNA of lambda/*lacI* transgenic rats (Davies et al., 1997). Thus, dG-N<sup>2</sup>-TAMs were mutagenic lesions in mammalian cells.

#### 5) Detection of tamoxifen-DNA adducts in human endometrium

Phillips and his colleagues failed to detect TAM-DNA adducts in leucocytes (Phillips et al., 1996b) or in endometrium (Carmichael et al., 1996) of TAM-treated patients. On the other hand, using a <sup>32</sup>P-

postlabeling-HPLC method, Hemminki et al. detected a TAM-induced adduct in leucocytes (Hemminki et al., 1997) and endometrial tissues (Hemminki et al., 1996) obtained from breast cancer patients. However, these results were criticized because the radioactivity of a TAM adduct detected was only twice that of background, and the adduct was not identified using standard (Orton et al., 1997). Recently we have analyzed 13 endometrial samples obtained from TAM-treated patients and 10 untreated samples, using a combination of <sup>32</sup>P-postlabeling and HPLC analysis (Shibutani et al., 1998a). TAM-DNA adducts were detected in 6 samples while no adducts were observed in the control samples. Using standard markers, the major TAM adducts were identified chromatographically as *trans*-form and *cis*-form of dG-N<sup>2</sup>-TAM (Fig. 7). Thus, mutagenic dG-N<sup>2</sup>-TAM adducts may participate in the initiation of endometrial cancer.

#### Conclusion

Estrogen-and tamoxifen-derived DNA adducts result in mutations and pose a potential risk to women treated with estrogen or tamoxifen. These results raises concerns about the use of estrogen in hormone replacement treatment or the use of tamoxifen as a chemopreventive agent for healthy women as well as its use in treatment of breast cancer.

#### Acknowledgments

I thank Dr. I. Terashima and Ms. N. Suzuki for investigating miscoding and mutagenic properties of estrogen-and tamoxifen-DNA adducts, Dr. L. Dasaradhi for synthesizing tamoxifen metabolites, and Drs. M. Pearl and S. Sugarman for collecting endometrial samples from patients. I am indebted to Drs. A. P. Grollman and I. Yoshizawa for encouragement and interest in this program. This research was supported in part by Emil C. Voll Award and Classic Breast Cancer Research Award, the School

of Medicine, SUNY at Stony Brook, and NIH grant ES09418.

#### References

- Biggs, P. J., W. Warren, S. Venitt and M. R. Stratton (1993) Does a genotoxic carcinogen contribute to human breast cancer? The value of mutational spectra in unravelling the aetiology of cancer, *Mutagenesis*, 8, 275-283.
- Blaszyk, H., C. B. Vaughn, A. Hartmann, R. M. McGovern, J. J. Schroeder, J. Cunningham, D. Schaid, S. S. Sommer and J. S. Kovach (1994) Novel pattern of p53 gene mutations in an American black cohort with high mortality from breast cancer, *Lancet*, 343, 1195-1197.
- Cabral, Neto, J. B., A. Gentil, R. E. C. Carbal and A. Sarasin (1992) Mutation spectrum of heat-induced abasic sites on a single-stranded shuttle vector replicated in mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, 267, 19718-19723.
- Carmichael, P. L., A. H. N. Ugwumadu, P. Neven, A. J. Hewer, G. K. Poon and D. H. Phillips (1996) Lack of genotoxicity of tamoxifen in human endometrium, *Cancer Res.*, 56, 1475-1479.
- Cavalieri, E. L., D. E. Stack, P. D. Devanesan, R. Todorovic, I. Dwivedy, S. Higginbotham, S. L. Johansson, K. Patil, M. L. Gross, J. K. Gooden, R. Ramanathan, R. L. Cerny and E. G. Rogan (1997) Molecular origin of cancer: Catechol estrogen-3, 4-quinones as endogenous tumor initiators, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 10937-10942.
- Cheng, K. C., D. S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura and L. A. Loeb (1992) 8-Hydroxyguanosine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G  $\rightarrow$  T and A  $\rightarrow$  C substitutions, *J. Biol. Chem.*, 267, 166-172.
- Coles, C., A. Condie, U. Chetty, C. M. Steel, H. J. Evans and J. Prosser (1992) p53 Mutations in breast cancer, *Cancer Res.*, 52, 5291-5298.
- Dasaradhi, L. and S. Shibutani (1997) Identification of tamoxifen-DNA adducts formed by  $\alpha$ -sulfate tamoxifen and  $\alpha$ -acetoxytamoxifen, *Chem. Res. Toxicol.*, 10, 189-196.
- Davies, R., V. I. C. Oreffo, E. A. Martin, M. F. W. Festing, I. N. H. White, L. L. Smith and J. A. Styles (1997) Tamoxifen causes gene mutations in the livers of lambda/*lacI* transgenic rats, *Cancer Res.*, 57, 1288-1293.
- Dwivedy, I., P. Devanesan, P. Cremonesi, E. Rogan and E. Cavalieri (1992) Synthesis and characterization of estrogen 2, 3-and 3, 4-quinones. Comparison of DNA adducts formed by the quinones versus horseradish peroxidase-activated catechol estrogens, *Chem. Res. Toxicol.*, 5, 828-833.
- Fischer, B., J. P. Costantino, C. K. Redmond, E. R. Fisher, D. L. Wickerham and W. M. Cronin (1994) Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: Findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14, *J. Natl. Cancer Inst.*, 86, 527-537.
- Fishman, J., M. P. Osborne and N. T. Telang (1995) The role of estrogen in mammary carcinogenesis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 768, 91-100.
- Gladek, A. and J. G. Liehr (1989) Mechanism of genotoxicity of diethylstilbestrol *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, 264, 16847-16852.
- Glatt, H., K. Pauly, A. Czich, J. L. Falany and C. N. Falany (1995) Activation of benzyl alcohol to mutagens by rat and human sulfotransferases expressed in *Escherichia coli*, *Eur. J. Pharmacol.*, 293, 173-181.
- Greaves, P., R. Goonetilleke, G. Nunn, J. Topham and T. Orton (1993) Two-year carcinogenicity study of tamoxifen in Alderley Park Wister-derived rats, *Cancer Res.*, 53, 3919-3924.
- Hamelin, R., F. Barichard, I. Henry, C. Junien and G. Thomas (1994) Single base pair germ-line deletion in the p53 gene in a cancer predisposed family, *Human Genet.*, 94, 88-90.
- Han, X. and J. G. Liehr (1992) Induction of covalent DNA adducts in rodents by tamoxifen, *Cancer Res.*, 52, 1360-1363.
- Han, X. and J. G. Liehr (1994) 8-Hydroxylation of guanine bases in kidney and liver DNA of hamsters treated with estradiol: Role of free radicals in estrogen-induced carcinogenesis, *Cancer Res.*, 54, 5515-5517.
- Hard, G. C., M. J. Iatropoulos, K. Jordan, L. Radi, O. P. Kaltenberg, A. R. Imondi and G. M. Williams (1993) Major difference in the hepatocarcinogenicity and DNA adduct forming ability between toremifene and tamoxifen in female Crl:CD (BR) rats, *Cancer Res.*, 53, 4534-4541.
- Hayashi, N., K. Hasegawa, A. Komine, Y. Tanaka, J. A. McLachlan, J. C. Barrett and T. Tsutsui (1996) Estrogen-induced cell transformation and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells, *Mol. Carcinog.*, 16, 149-156.
- Hayes, C. L., D. C. Spink, B. C. Spink, J. Q. Cao, N. J. Walker and T. R. Sutter (1996) 17 $\beta$ -Estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9776-9781.
- Hemminki, K., H. Rajaniemi, M. Koskinen and J. Hansson (1997) Tamoxifen-induced DNA adducts in leucocytes of breast cancer patients, *Carcinogenesis*, 18, 9-13.
- Hemminki, K., H. Rajaniemi, B. Lindahl and B. Moberger (1996) Tamoxifen-induced DNA adducts in endometrial samples from breast cancer patients, *Cancer Res.*, 56, 4374-4377.
- Henderson, B. E., and R. Ross and L. Bernstein (1988) Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture, *Cancer Res.*, 48, 246-253.
- IARC (1979) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. II, Vol. 21, pp. 139-362, Sex Hormones IARC, Lyon.
- IARC (1996) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 66, Some pharmaceutical drugs, IARC, Lyon.
- Itoh, S., A. Yamauchi, Y. Itoh, H. Takagi and I. Yoshizawa (1996) Reaction of adenine with 6-hydroxyestrogen-6-sulfates: model compounds to demonstrate carcinogenesis by estrogen, *Chem. Pharm. Bull.*, 44, 1754-1757.
- Itoh, S., T. Hirai, Y. Totuka, H. Takagi, Y. Tashiro, K. Wada, K. Wakabayashi, S. Shibutani and I. Yoshizawa (1998) Identification of estrogen-modified nucleosides from calf thymus DNA reacted with 6-hydroxyestrogen-6-sulfates, *Chem. Res. Toxicol.*, in press.
- Jarman, M., G. K. Poon, G. Rowlands, R. M. Grimshaw, M. N. Horton, G. A. Potter and R. McCague (1995) The deuterium isotope effect for the  $\alpha$ -hydroxylation of tamoxifen by rat liver microsomes accounts for the reduced genotoxicity of [D<sub>5</sub>-ethyl] tamoxifen, *Carcinogenesis*, 16, 683-688.
- Jordan, V. C. (1993) A current view of tamoxifen for the

- treatment and prevention of breast cancer, *Br. J. Pharmacol.*, 110, 507-517.
- Klinedinst, D. K. and N. R. Drinkwater (1992) Mutagenesis by apurinic sites in normal and ataxia telangiectasia human lymphoblastoid cells, *Mol. Carcinog.*, 6, 32-42.
- Lawley, P. D. (1994) From fluorescence spectra to mutational spectra, a historical overview of DNA-reactive compound, In: K. Hemminki, et al. (Eds), *DNA Adducts: Carcinogen and Mutagenic Agents: Chemistry, Identification and Biological Significance*, IARC Scientific Publication No. 125, Lyon, pp. 3-22.
- Li, J. J. and S. A. Li (1987) Estrogen carcinogenesis in Syrian hamster tissues: role of metabolism, *Fed. Proc.*, 46, 1858-1863.
- Liehr, J. G. (1990) Genotoxic effects of estrogens, *Mutat. Res.*, 238, 269-276.
- Liehr, J. G., T. A. Avitts, E. Randerath and K. Randerath (1986a) Estrogen-induced endogenous DNA adduction: Possible mechanism of hormonal cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 5301-5305.
- Liehr, J. G., W. F. Fang, D. A. Sirbasku and A. Ari-Ulubelen (1986b) Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamster, *J. Steroid Biochem.*, 24, 353-356.
- Liehr, J. G., M. J. Ricci, C. R. Jefcoate, E. V. Hannigan, J. A. Hokanson and B. T. Zhu (1995) 4-Hydroxylation of estradiol by human uterine myometrium and myoma microsomes: Implications for the mechanism of uterine tumorigenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9220-9224.
- Malins, D. C., E. H. Holmes, N. L. Polissar and S. J. Gusselman (1993) The etiology of breast cancer: Characteristic alterations in hydroxyl radical-induced DNA base lesions during oncogenesis with potential for evaluating incidence risk, *Cancer*, 71, 3036-3043.
- Martucci, C. P. and J. Fishman (1993) P450 enzymes of estrogen metabolism, *Pharmac. Ther.*, 57, 237-257.
- Mazars, R., L. Spinardi, M. BenCheikh, J. Simony-Lafontaine, P. Jeanteur and C. Theillet (1992) p53 Mutations occur in aggressive breast cancer, *Cancer Res.*, 52, 3918-3923.
- Miyairi, S., T. Ichikawa and T. Nambara (1991) Structure of the adduct of 16 $\alpha$ -hydroxyestrone with a primary amine: evidence for the Heyns rearrangement of steroid D-ring  $\alpha$ -hydroxyimines, *Steroids*, 56, 361-366.
- Moorthy, B., P. Sriram, D. N. Pathak, J. W. Bodell and K. Randerath (1996) Tamoxifen metabolic activation: comparison of DNA adducts formed by microsomal and chemical activation of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen with DNA adducts formed *in vitro*, *Cancer Res.*, 56, 53-57.
- Moriya, M. (1993) Single strand shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G : C  $\rightarrow$  T : A transversion in simian kidney cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1122-1126.
- Mozzherin, D. J., S. Shibutani, C.-K. Tan, K. M. Downey and P. A. Fisher (1997) Proliferating cell nuclear antigen promotes DNA synthesis past template lesions by mammalian DNA polymerase  $\delta$ , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 6126-6131.
- Nayfield, S. G., J. E. Karp, L. G. Ford, F. A. Dorr and B. S. Kramer (1991) Potential role of tamoxifen in prevention of breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, 83, 1450-1459.
- Nigro, V., M. Napolitano, C. Abbondanza, N. Medici, A. A. Puca, M. Schiavulli, I. Armetta, B. Moncharmont, G. A. Puca and A. M. Molinari (1994) A novel p53 mutant in human breast cancer revealed by multiple SSCP analysis, *Cancer Lett.*, 79, 73-75.
- Orton, T. C., J. C. Topham and A. Park (1997) Correspondence re: K. Hemminki et al., tamoxifen-induced DNA adducts in endometrial samples from breast cancer patients, *Cancer Res.*, 57, 4148.
- Osborne, M. R., A. Hewer, I. R. Hardcastle, P. L. Carmichael and D. H. Phillips (1996) Identification of the major tamoxifen-deoxyguanosine adduct formed in the liver DNA of rats treated with tamoxifen, *Cancer Res.*, 56, 66-71.
- Phillips, D. H., P. L. Carmichael, A. Hewer, K. J. Cole and G. K. Poon (1994a)  $\alpha$ -Hydroxytamoxifen, a metabolite of tamoxifen with exceptionally high DNA-binding activity in rat hepatocytes, *Cancer Res.*, 54, 5518-5522.
- Phillips, D. H., P. L. Carmichael, A. Hewer, K. J. Cole, I. R. Hardcastle, G. K. Poon, A. Keogh and A. J. Strain (1996a) Activation of tamoxifen and its metabolite  $\alpha$ -hydroxytamoxifen to DNA-binding products: comparisons between human, rat and mouse hepatocytes, *Carcinogenesis*, 17, 89-94.
- Phillips, D. H., A. Hewer, P. L. Grover, G. K. Poon and P. L. Carmichael (1996b) Tamoxifen does not form detectable adducts in white blood cells of breast cancer patients, *Carcinogenesis*, 17, 1149-1152.
- Phillips, D. H., G. A. Potter, M. N. Horton, A. Hewer, C. Crofton-Sleigh, M. Jarman and S. Venitt (1994b) Reduced genotoxicity of [D<sub>5</sub>-ethyl]-tamoxifen implicates  $\alpha$ -hydroxylation of the ethyl group as a major pathway of tamoxifen activation to a liver carcinogen, *Carcinogenesis*, 15, 1487-1492.
- Potter, G. A., R. McCague and M. Jarman (1994) A mechanism hypothesis for DNA adduct formation by tamoxifen following hepatic oxidative metabolism, *Carcinogenesis*, 15, 439-442.
- Powles, T. J., J. R. Hardy, S. E. Ashley, G. H. Farrington, D. Cosgrove, J. R. Davey, M. Dowsett, J. A. McKinna, A. G. Wash, H. D. Sennet, C. R. Tillyer and J. G. Treleaven (1993) A pilot trial to evaluate the acute toxicology and feasibility of tamoxifen for the prevention of breast cancer, *Br. J. Cancer*, 60, 126-131.
- Preston-Martin, S., M. C. Pike, R. K. Ross, P. A. Jones and B. E. Henderson (1990) Increased cell division as a cause of human cancer, *Cancer Res.*, 50, 7415-7421.
- Sasa, M., K. Kondo, K. Komaki, T. Uyama, T. Morimoto and Y. Monden (1993) Frequency of spontaneous p53 mutations (CpG site) in breast cancer in Japan, *Breast Cancer Res. and Treat.*, 27, 247-252.
- Sato, T., H. Saito, J. Swensen, A. Olifant, C. Wood, D. Danner, T. Sakamoto, K. Takita, F. Kasumi and Y. Miki (1992) The human prohibitin gene located on chromosome 17q21 is mutated in sporadic breast cancer, *Cancer Res.*, 52, 1643-1646.
- Seoud, M. A.-F., J. Johnson and J. C. Weed (1993) Gynecologic tumors in tamoxifen-treated women with breast cancer, *Obstet. Gynecol.*, 82, 165-169.
- Shibutani, S. (1993) Quantitation of base substitutions and deletions induced by chemical mutagens during DNA synthesis *in vitro*, *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 625-629.
- Shibutani, S. and L. Dasaradhi (1997) Misconduct potential of tamoxifen-derived DNA adducts:  $\alpha$ -(N<sup>2</sup>-deoxyguanosinyl) tamoxifen, *Biochemistry*, 36, 13010-13017.
- Shibutani, S., L. Dasaradhi, S. Sugarman, A. P. Grollman and M. Pearl (1998a) Tamoxifen-derived DNA adducts in endometrial samples obtained from patients treated with tamoxifen, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 39, 636.
- Shibutani, S., L. Dasaradhi, I. Terashima, E. Banoglu and M. W. Duffel (1998b)  $\alpha$ -Hydroxytamoxifen is a substrate of hydroxysteroid (alcohol) sulfotransferase, resulting in tamoxifen DNA adducts, *Cancer Res.*, 58, 647-653.
- Shibutani, S., S. Itoh and I. Yoshizawa (1997a) Misconduct properties of model estrogen-DNA adducts in reactions catalyzed by mammalian and *Escherichia coli* DNA polymerases, *Biochemistry*, 36, 1755-1765.
- Shibutani, S., P. Shaw, N. Suzuki, L. Dasaradhi, M. W. Duffel and I. Terashima (1998c) Sulfation of  $\alpha$ -hydroxytamoxifen catalyzed by human hydroxysteroid sulfotransferase results in tamoxifen DNA adducts, *Carcinogenesis*, in press.
- Shibutani, S., N. Suzuki, Y. Matsumoto and A. P. Grollman (1996) Misconduct properties of 3, N<sup>4</sup>-etheno-2'-deoxycytidine in reactions catalyzed by mammalian DNA polymerases, *Biochemistry*, 35, 14992-14998.
- Shibutani, S., M. Takeshita and A. P. Grollman (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxoG, *Nature*, 349, 431-434.
- Shibutani, S., M. Takeshita and A. P. Grollman (1997b) Translesional synthesis on DNA templates containing a single abasic site: a mechanistic study of the "A rule", *J. Biol. Chem.*, 272, 13916-13922.
- Stack, D. E., J. Byun, M. L. Gross, E. G. Rogan and E. L. Cavalieri (1996) Molecular characteristics of catechol estrogen quinone in reactions with deoxyribonucleosides, *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 851-859.
- Takagi, H., K. Komatsu and I. Yoshizawa (1991) Synthesis and mechanism of hydrolysis of estrogen 6-sulfate: model compounds for demonstrating the carcinogenesis of estrogen, *Steroids*, 56, 173-179.
- Takeshita, M. and W. Eisenberg (1994) Mechanism of mutation on DNA template containing synthetic abasic sites: study with a double strand vector, *Nucleic Acids Res.*, 22, 1897-1902.
- Terashima, I., N. Suzuki, L. Dasaradhi, C.-K. Tan, K. M. Downey, S. Shibutani (1998a) Translesional synthesis on DNA templates containing an estrogen quinone-derived adduct: N<sup>2</sup>-(2-hydroxyestrone-6-yl)-2'-deoxyguanosine and N<sup>6</sup>-(2-hydroxyestrone-6-yl)-2'-deoxyadenosine, *Biochemistry*, 37, 13807-13815.
- Terashima, I., N. Suzuki, S. Itoh, I. Yoshizawa and S. Shibutani (1998b) Mutagenic specificity of model estrogen-DNA adducts in mammalian cells, *Biochemistry*, 37, 8803-8807.
- van Leeuwen, F. E., J. Benraadt, J. W. W. Coebergh, L. A. L. M. Kiemeney, F. W. Diepenhorst, A. W. van den Belt-Dusebout and H. van Tinteren (1994) Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer, *Lancet*, 343, 448-452.
- White, I. N. H., F. de Matteis, A. Davies, L. L. Smith, C. Crofton-Sleigh, S. Venitt, A. Hewer and D. H. Phillips (1992) Genotoxic potential of tamoxifen and analogues in female Fischer F344/n rats, DBA/2 and C57B1/6 mice and in human MCL-5 cells, *Carcinogenesis*, 13, 2197-2203.
- Williams, G. M., M. J. Iatropoulos, M. V. Djordjevic and O. P. Kaltenberg (1993) The triphenylethylene drug tamoxifen is a strong liver carcinogen in the rat, *Carcinogenesis*, 14, 315-317.
- Zumoff, B. (1993) Biological and endocrinological insights into the possible breast cancer risk from menopausal estrogen replacement therapy, *Steroids*, 58, 196-204.

本稿は1998年5月29日、東京のヤクルトホールで開催された日本環境変異原学会主催の第9回公開シンポジウム「モデルDNA損傷と変異機構」（企画：根岸和雄、早津彦哉）で発表された（座長：菊川清見）。

## ピリミジン2量体の変異作用

紙谷 浩之<sup>1</sup>、紙谷(村田) 尚子<sup>1</sup>、大塚 栄子<sup>2</sup>

<sup>1</sup>産業医科大学産業生態科学研究所 〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1

<sup>2</sup>北海道大学大学院薬学研究科 〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目

### Mutagenesis by pyrimidine dimers

Hiroyuki Kamiya<sup>1</sup>, Naoko Murata-Kamiya<sup>1</sup> and Eiko Ohtsuka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health

1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan

<sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University  
Kita-12, Nishi-6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan

### Summary

Ultraviolet (UV) light damages biologically important molecules including DNA, and the damage to DNA appears to be involved in the process of skin cancer through the mutagenic activation of proto-oncogenes and/or the inactivation of tumor suppressor genes.

In this paper, we review the mutational properties of UV-induced DNA lesions, and in particular, those of photoproducts at thymine-thymine sites.

(This paper, chaired by Kiyomi Kikugawa, was presented to the 9th JEMS Annual Symposium, "Synthetic Models for DNA Damage and Mutagenesis", organized by Kazuo Negishi and Hikoya Hayatsu, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at Yakult Hall, Tokyo, May, 29, 1998.)

**Keywords:** ultraviolet, cyclobutane thymine dimer, pyrimidine (6-4) pyrimidone photodimer, mutation

### 緒 言

紫外線は、以前からヒトの皮膚癌の危険因子として知られていたが、近年のオゾン層の破壊に伴う地上線量の増加により、その作用が一層着目されている。紫外線による発癌機構としては、DNAに損傷を与えて変異を誘発することにより、(原)癌遺伝子の活性化や腫瘍抑制遺伝子の不活性化をもたらすことが大きく寄与していると思われる。

紫外線によって生ずるDNA損傷には、さまざまなもの

のが報告されているが、主要な損傷として、隣接ピリミジン部位(T-T, T-C, C-T, C-C)に生ずるシクロブタン型ピリミジンダイマーと(6-4)ピリミジン-ピリミドン光産物があげられる。

本稿では、紫外線によって生ずるDNA損傷、シクロブタン型チミンダイマーと(6-4)チミンダイマー(Fig. 1)が哺乳動物細胞中で誘発する変異を中心に、紫外線誘発変異について述べる。

#### 1. ras遺伝子中のシクロブタン型チミンダイマーが誘発する変異

1) ヒトc-Ha-ras遺伝子の全合成と部位特異的導入法を用いたDNA損傷誘発変異の研究

ヒトc-Ha-ras遺伝子は、ヒトの腫瘍から数多く単離

受付: 1998年7月9日

受理: 1998年7月16日

©日本環境変異原学会

される癌遺伝子であり、その活性化には *ras* 遺伝子の特定位置(コドン 12, 13, または 61)の塩基置換が原因であることが明らかにされている(Nishimura and Sekiya, 1987)。著者らは、蛋白質の大量調製を目的として、ヒト c-Ha-ras 遺伝子の化学合成を以前に行なった(Miura et al., 1987)。また、この合成 c-Ha-ras 遺伝子をラウス肉腫ウイルスの long terminal repeat の下流に導入すると、マウス由来の NIH 3T3 細胞で発現し、あらかじめ活性化部位とされるアミノ酸を変換しておいた *ras* 遺伝子の場合には、形質転換(トランスフォーメーション)を誘発することを見出した(Kamiya et al., 1989)。

c-Ha-ras 遺伝子の設計の際に、DNA カセット変換法による遺伝子配列の変換が容易になるよう、内部に制限酵素認識部位を設けた(詳細については他の総説(大塚・紙谷, 1990)を参照されたい)。そのため、DNA カセット変換法により損傷部位を含む二本鎖 DNA を *ras* 遺伝子中に、部位特異的に導入することが可能である。したがって、*ras* 遺伝子の活性化部位である、コドン 12, 61 に DNA 損傷を導入し、*ras* 遺伝子ベクターに組んだ後に NIH 3T3 細胞にトランスフェクションすると、塩基置

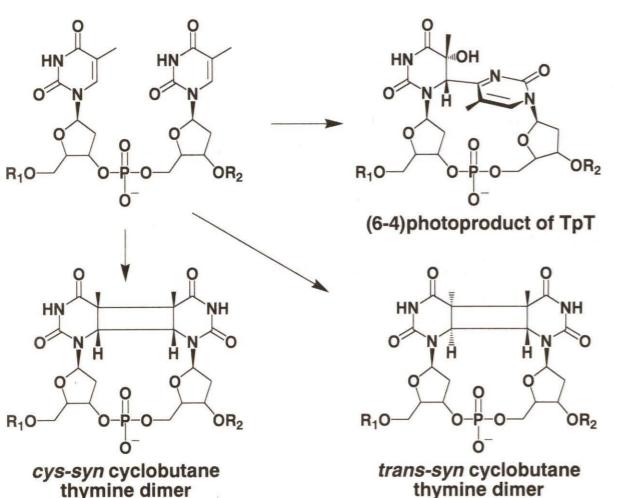


Fig. 1 Structures of DNA lesions formed by ultraviolet light.

換変異が生じてアミノ酸が変換された *ras* 遺伝子を持った細胞を、形質転換してフォーカスを形成したコロニーとして単離することができる。この発想により、著者らは、数種類の DNA 損傷の誘発変異を研究した。それを Table 1 に示す。

### 2) シクロブタン型チミンダイマーを導入した c-Ha-ras 遺伝子ベクターの構築

c-Ha-ras 遺伝子のコドン 61 は 5'-CAR-3'(R=A または G) という配列となっており、グルタミンをコードしている。著者らは、5'-CAA-3' の相補鎖 3'-GTT-5' 配列中の TT 部位にシクロブタン型チミンダイマー(シス-シン異性体, csT=T およびトランス-シン異性体, tsT=T)を導入することにした。チミンダイマーを含むオリゴヌクレオチド(Fig. 2 の L12)を化学合成し、高速液体クロマトグラフィーにより高純度に精製した。これを他のオリゴヌクレオチドとアニーリングし、DNA リガーゼにより連結させて DNA カセットを調製した。この DNA カセットは、末端に *BclI*, 内部に *EcoRV* 配列を有している(Fig. 2)。

ベクターとして、合成 c-Ha-ras 遺伝子の *EcoRV*-*BclI* 領域(コドン 61 を含む)が終止コドンの導入等によりナンセンスな配列となっている pEB(Fig. 2)を用いた。まず、pEB を *EcoRV*, *BclI* で処理しナンセンス配列を除去した DNA にチミンダイマーを含む DNA カセットを *BclI* 領域で連結した。ついで、*EcoRV* 処理により内部の *EcoRV* 領域を露出させ、再び連結し、目的のベクターを構築した(Kamiya et al., 1993 a)。

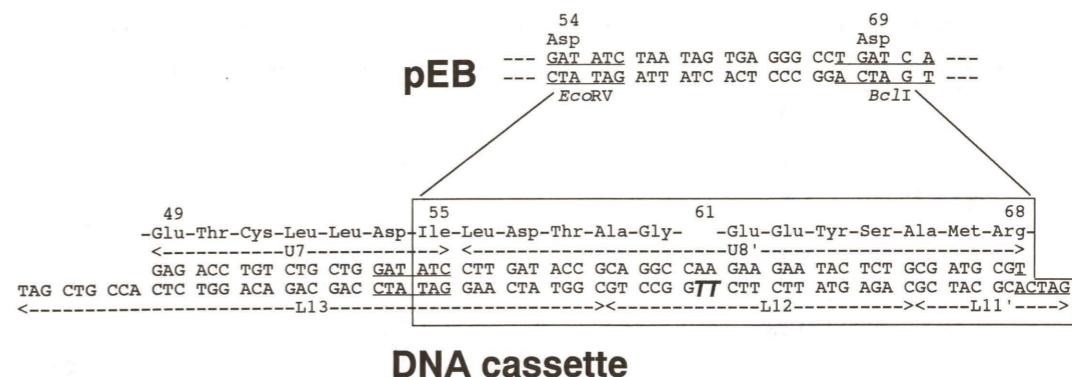
### 3) シクロブタン型チミンダイマーを導入した c-Ha-ras 遺伝子による NIH3T3 細胞のトランスフォーメーション

上述したように構築したベクターを NIH 3T3 細胞にトランスフェクションした。その結果を Table 2 に示す。正常型アミノ酸であるグルタミン-61 をコードしている 3'-GTT-5' (sense 鎌は 5'-CAA-3') 配列を持つ c-

Table 1 DNA lesions studied with *ras*-NIH3T3 system

DNA lesions	Mutation	Reference <sup>a)</sup>
<i>O</i> <sup>6</sup> -methylguanine	G → A	(1)
8-hydroxyguanine	G → T, flanking mutation	(2), (3)
8-hydroxyadenine	A → G, A → T, (A → C)	(4)
abasic site analogue	G → A, flanking mutation	(5)
abasic site	G → A, flanking mutation	(6)
hypoxanthine	A → G	(7)
xanthine	G → A	(8)

<sup>a)</sup>(1) Kamiya et al., 1991; (2) Kamiya et al., 1992b; (3) Kamiya et al., 1995b; (4) Kamiya et al., 1995a; (5) Kamiya et al., 1992d; (6) Kamiya et al., 1993b; (7) Kamiya et al., 1992a; (8) Kamiya et al., 1992c.



### DNA cassette

Fig. 2 Nucleotide sequence of the DNA cassette with a cyclobutane thymine dimer. The cassette was inserted into pEB digested with *EcoRV* and *BclI*. The thymine dimer are shown by TT.

Table 2 Number of foci induced by *ras* genes

<i>ras</i> gene	Codon 61 <sup>a)</sup>	Experiment No.			
		1 <sup>b)</sup>	2 <sup>c)</sup>	3 <sup>d)</sup>	4 <sup>e)</sup>
Gln-61 (normal)	3' GTT5'	0	5	0	4
csT=T	3' GT=T5'	2	49	6	15
tsT=T	3' GT=T5'	16	93	11	41
Lys-61 (activated)	3' TTT5'	37	512	88	360

<sup>a)</sup>Sequences in the antisense strand are shown.

<sup>b)</sup>30 ng of DNA was used.

<sup>c)</sup>150 ng of DNA was used.

<sup>d)</sup>20 ng of DNA was used.

<sup>e)</sup>50 ng of DNA was used.

### 4) シクロブタン型チミンダイマーの誘発する変異

上記のようにして得られたフォーカスの細胞から染色体 DNA を抽出し、導入された c-Ha-ras 遺伝子の解析を行なった(Table 3)。csT=T が誘発した変異としては、3'-T → A トランスバージョンが解析例の半数であった。この場合には、sense 鎌のコドン 61 の配列は 5'-CTA-3' となり、アミノ酸がロイシンに変換されたことによって *ras* 遺伝子が活性化されたと推定される。他に、5'-T, 3'-T の塩基置換が見出されている。tsT=T が誘発した変異の半数は 5'-T → A トランスバージョンであった(Table 3)。また、5'-TT-3' が 5'-AA-3' とタンデムに置換していたものも多く検出された。

後述するように、大腸菌における変異スペクトルは、csT=T が 3'-T → A トランスバージョン、tsT=T が 5'-T → A トランスバージョンと報告されているので、類似の結果が得られたことになる。

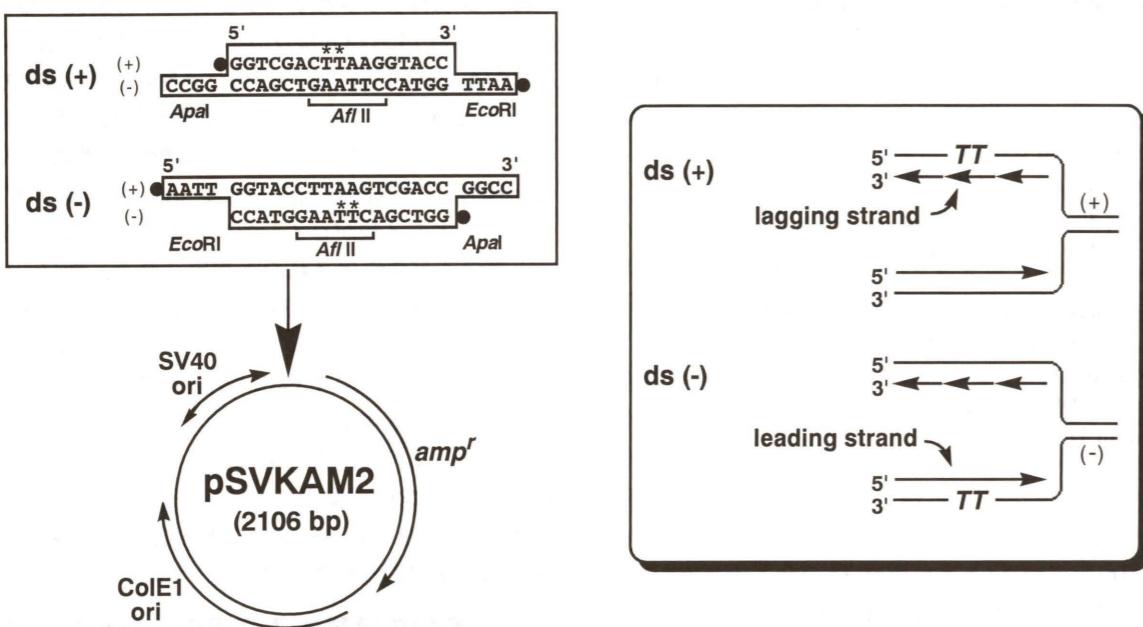
## 2. 光産物の誘発する変異のシャトルベクターを用いた解析

### 1) チミンダイマーを導入したシャトルベクターの構築

最近、著者の一人は、サル由来の COS-7 細胞でプラスミドとして増殖するシャトルベクターを用いて、T(6-4)T および csT=T(Fig. 1)の誘発する変異の解析を行なった(Kamiya et al., 1998)。このシャトルベクター(Fig. 3)は、SV 40 の複製起点を持ち、COS-7 細胞内でプラスミドとして複製される。また、ColE 1 の複製起点を有し、COS-7 細胞から回収したプラスミドを大腸菌で増殖させて解析可能である。2種類の DNA 損傷は、制限酵素 *AflII* の認識部位である 5'-CTTAAG-3' の TT に導入することとし、亜リン酸アミダイト法を用いてオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドは高速液体クロマトグラフィーにより高純度に精製した。また、DNA 損傷はベクターの(+)鎖または(-)鎖のいずれかに導入した。損傷部位を含む領域は(+)鎖がラギング

Table 3 Mutations detected in cells transformed by a *ras* gene with a thymine dimer

Thymine dimer	Sequence <sup>a)</sup>	Focus observed	Codon 61 (amino acid)
csT=T	5' <u>TA</u> 3'	8	CTA (Leu)
	GT	2	CAC (His)
	AT	1	CAT (His)
	CA	1	CTG (Leu)
	TC	1	CGA (Arg)
	TA+TG	1	CTA+CCA (Leu+Pro)
	CT+GT+AT	1	CAG+CAC+CAT (Gln+His)
tsT=T	5' <u>AT</u> 3'	9	CAT (His)
	AA	7	CTT (Leu)
	TC	1	CGA (Arg)
	AA+TA+GA	1	CTT+CTA+CTC (Leu)
	other <sup>b)</sup>	1	

<sup>a)</sup>Mutated sites are indicated by underlines.<sup>b)</sup>Both sites were mixtures of T and A.Fig. 3 Structure of double-stranded vectors with either T(6-4)T or csT=T (left) and schematic presentation of the replication of template strands containing T(6-4)T or csT=T (right). The SV40 origin and the ColE1 origin, which work in COS-7 cells and in *E. coli*, respectively, and the *E. coli* ampicillin resistance gene are shown. Closed circles represent 5'-phosphate groups. The TT with asterisks or the TT represents the photolesion.

鎖合成時に、(−)-鎖がリーディング鎖合成時に「読まれる」ように設計してあるので、複製時における読み誤り頻度の違いを調べることができる。

## 2) チミンダイマーの変異誘発能

T(6-4)T および csT=T を含むベクターを COS-7 細胞に導入し、細胞内から複製された DNA を回収した。回収した DNA を制限酵素 *A*/*I*II で処理したものと処理しないものをそれぞれ大腸菌へとトランسفエクションし、変異率を求めた (Fig. 4)。変異率は、T(6-4)T の方が csT=T よりも高く、ラギング鎖合成時に 4.7%、リーディング鎖合成時に 2.3% であった。それに対して、

csT=T の変異率は 1% 以下であった。このアッセイ系の場合は、相補鎖(DNA 損傷を含まない鎖)も複製されるために、実際の変異率は少なくとも得られた値の 2 倍であると推定される。また、いずれの場合もラギング鎖合成の方がリーディング鎖合成よりも変異率が高いという結果であった。csT=T の変異率が、上述した *ras* 遺伝子-*NIH 3T3* 細胞の系よりも低いが、これは、(1) *ras* 遺伝子の系では、コピー数の制御が困難であるために変異率を高く見積もる可能性があり、(2) シャトルベクターの系では、相補鎖の存在により DNA 損傷の変異率が 1/2 以下になることや、(3) 用いた配列が異なることなどが原因であると思われる。(3)に関してであるが、*ras* 遺

伝子の系では、ピリミジンに富む配列と GC に富む配列のジャンクション部に csT=T がある (Fig. 2)。DNA ポリメラーゼがヌクレオチドを挿入する際に、隣接塩基や、配列による二次構造の違いが原因で異なる結果が得られた可能性がある。他の可能性として、(4) サル (COS-7 細胞) とマウス (NIH 3T3 細胞) の DNA ポリメラーゼによる違いも考えられるが、この可能性は低いように思われる。

## 3) チミンダイマーの変異スペクトル

T(6-4)T の変異スペクトルは、3'-T → C が最も多く半数以上を占めている (Table 4)。他の変異としても 3'-T の塩基置換変異が多い。興味深いものとしては、T(6-4)T の 5'-隣接部位の C が T に置換されたものが 4 例見出されていることである。いずれもリーディング鎖

合成時のものである。

一方、csT=T は幅広いスペクトルを示した (Table 4)。ラギング鎖合成時とリーディング鎖合成時で傾向が若干異なるが、3'-T → C または 3'-T → G や 5'-T → A などが見出されている。また、5'-TT-3' が 5'-AC-3' へとタンデムに変異したものも見出されている。*ras* 遺伝子-*NIH 3T3* 細胞の系では主であった 3'-T → A トランスバージョンはほとんど見出されていない。これは、上述した配列の違いの影響が大きいと推定している。

## 3. 紫外線誘発 DNA 損傷の変異スペクトル

### 1) チミンダイマーの誘発変異の比較

上述したように、哺乳動物細胞で T(6-4)T, csT=T, tsT=T の 3 種のチミンダイマーはいずれも変異を誘発することが明らかになった。以上の 3 種類の光損傷については、他のグループにより大腸菌や出芽酵母中での変異スペクトルが調べられている (Table 5)。csT=T は大腸菌中で 3'-T → A トランスバージョンや 3'-T → C トランジションを誘発するが、酵母ではあまり変異を誘発しないと報告されている。大腸菌で得られた結果は、*ras* 遺伝子-*NIH 3T3* 細胞の系で得られた結果と類似しているが、COS-7 細胞の系で得られたものとは異なっている。

tsT=T は大腸菌の系、酵母の系の両方で 5'-T → A トランスバージョンや T の欠失変異を誘発すると報告されている。*ras* 遺伝子の系では 5'-T → A トランスバージョンの誘発が観察されたのでこの点は一致している。しかし、*ras* 遺伝子の系では、TT → AA のタンデム変異が観察され、T の欠失変異は観察されていない。1 塩基欠

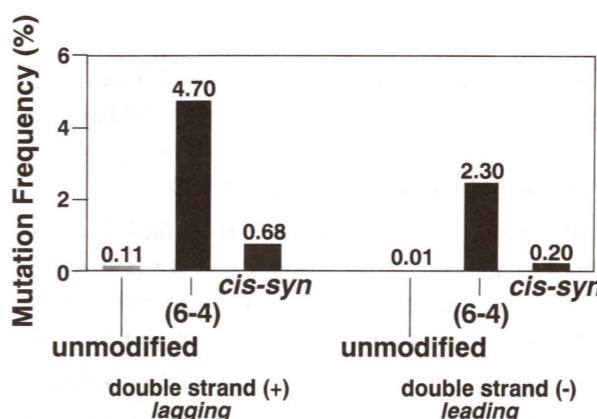


Fig. 4 Mutation frequencies of photoproducts in COS-7 cells.

Table 4 Mutations induced by T(6-4)T and csT=T in COS-7 cells

Sequence <sup>a)</sup>	T(6-4)T		csT=T	
	double strand(+)	double strand(-)	double strand(+)	double strand(-)
	lagging	leading	lagging	leading
5' <u>TC</u> 3'	17	10	6	4
5' <u>TG</u> 3'	3	0	7	2
5' <u>TA</u> 3'	5	4	1	1
5' <u>CT</u> 3'	1	1	4	2
5' <u>GT</u> 3'	0	1	2	2
5' <u>AT</u> 3'	0	0	2	3
5' <u>AC</u> 3'	0	0	1	3
ΔT	0	0	2	2
ΔTT	0	0	0	1
+A	0	0	0	2 <sup>d)</sup>
others	0	4 <sup>b)</sup>	6 <sup>c)</sup>	2 <sup>e)</sup>

<sup>a)</sup>Mutated sites are indicated by underlines.<sup>b)</sup>The C residue at the 5'-flanking position of TT changed to T (5' CTTA to TTTA).<sup>c)</sup>One clone has a 5' GTTA sequence and four clones have a 5' CTTT sequence. One clone has a sequence deleted at A (5' CTTA to CTT).<sup>d)</sup>These clones have a 5' CTATA sequence.<sup>e)</sup>One clone has a 5' GTTA sequence and one clone has a 5' CTTT sequence.

Table 5 Mutations induced by UV lesions

DNA lesions	Organism	Mutation	Reference <sup>a)</sup>
csT=T	<i>E. coli</i>	3'-T → A, 3'-T → C	(1)
	<i>E. coli</i>	3'-T → A, 3'-T → C	(2)
tsT=T	<i>S. cerevisiae</i>	weakly mutagenic	(3)
	<i>E. coli</i>	5'-T → A, ΔT	(1)
T(6-4)T	<i>E. coli</i>	5'-T → A, ΔT	(2)
	<i>S. cerevisiae</i>	5'-T → A, ΔT	(3)
T(6-4)T (Dewar isomer)	<i>E. coli</i>	3'-T → C	(4)
	<i>E. coli</i>	3'-T → C	(2)
<i>cis-syn</i> cyclobutane TU dimer	<i>E. coli</i>	3'-T → C	(5)
	<i>E. coli</i>	3'-T → C etc.	(4)
<i>cis-syn</i> cyclobutane TC dimer	<i>E. coli</i>	3'-U → T(C → T)	(6)
	<i>E. coli</i>	weakly mutagenic	(7)
TA dimer	<i>E. coli</i>	3'-A → T	(8)

<sup>a)</sup>(1) Lawrence et al., 1990; (2) Smith et al., 1996; (3) Gibbs et al., 1993; (4) LeClerc et al., 1991; (5) Gibbs et al., 1995; (6) Jiang et al., 1993; (7) Hossfeld et al., 1997; (8) Zhao and Taylor, 1996.

失変異は、*ras* 遺伝子の系では原理上検出できないので、実際にその変異が生じたか否かは明らかではないが、タンデム変異の誘発は *ras* 遺伝子- NIH 3T3 細胞での変異を大きく特徴づけるものといえる。

T(6-4)T は大腸菌、酵母中で 3'-T → C トランジションを誘発し、COS-7 細胞の系で得られた結果と一致する。この変異誘発には、T(6-4)T の 3'-T と G 塩基との水素結合が想定されており、T(6-4)T を含む二本鎖の熱力学的安定性のデータもこれを支持している(Fujiwara and Iwai, 1997)。

他に、著者らの研究では取り上げなかったが、T(6-4)T には 3'-T の構造が異なる、Dewar isomer が存在する。この損傷の誘発変異は大腸菌で調べられているが、3'-T → C など、幅広いスペクトルを示すと報告されている。

## 2) 他の紫外線誘発 DNA 損傷が引き起こす変異

これまで、5'-TT-3'部位に生ずる DNA 損傷の変異について述べてきた。当然であるが、他の部位にも損傷は生ずる。著者らが用いたような部位特異的導入法による他の紫外線誘発 DNA 損傷が引き起こす変異の解析例としては、シス-シン シクロブタン型 T-U ダイマーがあげられる(Table 5)。これは、シクロブタン型ダイマー中のC塩基は、5, 6-位が飽和結合となっているために脱アミノ化されやすいとの報告(Tessman et al., 1994)に基づき、研究されたものである。これによると TU ダイマーはほとんど “TT” と読まれ、3'-U → T 変異を引き起こす。この U が T-C ダイマー由来と考えると C → T 変異を誘発すると解釈できる。しかし、シス-シン シクロブタン型 T-C ダイマーは、あまり変異原性が高くなないと報告されており(Table 5)、まだ議論の余地が残つ

ている。化学構造が明らかになった損傷に T-A ダイマーがあるが、これは 3'-A → T 変異を誘発する(Table 5)。

## 3) 紫外線が誘発する変異スペクトル

Miller は、大腸菌に紫外線を照射し、*lacI* 遺伝子における変異を解析した。塩基置換変異は G · C → A · T が圧倒的に多く、ついで G · C → T · A が検出された(Miller, 1985)。Hauser らは、シャトルベクターに紫外線を照射し、サル CV-1 細胞中で誘発される変異を解析した。その結果、G · C → A · T が 61 %, G · C → T · A が 13 % と報告している(Hauser et al., 1986)。また、シャトルベクターを有するヒト培養細胞に紫外線を照射し、G · C → A · T 変異が 70 % であることが報告されている(Calcagnile et al., 1996)。

紫外線を照射したプラスミドをヒトやサルの細胞抽出物中で複製させ、その変異を観察すると同様に G · C → A · T 変異が誘発された(Thomas and Kunkel, 1993; Carty et al., 1993)。さらに彼らは、誘発変異のはほとんどはシクロブタン型ピリミジンダイマーが原因と報告している。

以上の結果は、C を含むシクロブタン型ダイマー中の C 塩基が脱アミノ化されて、G · C → A · T 変異を誘発するというモデルを支持する。しかし、上述したように、このメカニズムに否定的な結果も得られている(Table 5)。また、シクロブタン型ダイマー中の C 塩基の脱アミノ化反応の速度は大腸菌の複製速度に比較して遅いという報告(Barak et al., 1995)もあり、少なくとも大腸菌に関してこの問題は未解決といえる。

根岸らは、一本鎖ファージ DNA に日光を照射し、大腸菌にトランスフェクションしたところ、G → C 変異、ついで G → T 変異を検出した(Negishi and Hao, 1992)。

この変異を誘発した DNA 損傷は、未知であるが、紫外線照射による活性酸素産生の寄与が考えられる。

## 結語

以上、著者らの研究を中心に紫外線誘発 DNA 損傷が引き起こす変異について述べてきた。現状を振り返ると、紫外線によって誘発される変異の機構の詳細についてはまだ不明な点が多い。今後も、さらなる研究によって、変異の実体の解明が必要である。

## 参考文献

- Barak, Y., O. Cohen-Fix and Z. Livneh (1995) Deamination of cytosine-containing pyrimidine photodimers in UV-irradiated DNA, *J. Biol. Chem.*, 270, 24174-24179.
- Calcagnile, A., T. Basic-Zaninovic, F. Palombo and E. Dogliotti (1996) Misincorporation rate and type on the leading and lagging strands of UV-damaged DNA, *Nucl. Acids Res.*, 24, 3005-3009.
- Carty, M. P., J. Hauser, A. S. Levine and K. Dixon (1993) Replication and mutagenesis of UV-damaged DNA templates in human and monkey cell extracts, *Mol. Cell. Biol.*, 13, 533-542.
- Fujiwara, Y. and S. Iwai (1997) Thermodynamic studies of the hybridization properties of photolesions in DNA, *Biochemistry*, 36, 1544-1550.
- Gibbs, P. E. M., B. J. Kilbey, S. K. Banerjee and C. W. Lawrence (1993) The frequency and accuracy of replication past thymine-thymine cyclobutane dimer are very different in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 175, 2607-2612.
- Gibbs, P. E. M., A. Borden and C. W. Lawrence (1995) The T-T pyrimidine (6-4) pyrimidone UV photoproduct is much less mutagenic in yeast than in *Escherichia coli*, *Nucl. Acids Res.*, 23, 1919-1922.
- 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.
- Horsfall, M. J., A. Borden and C. W. Lawrence (1997) Mutagenic properties of the T-C cyclobutane dimer, *J. Bacteriol.*, 179, 2835-2839.
- Jiang, N. and J.-S. Taylor (1993) In vivo evidence that UV-induced C → T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of *cis-syn* cyclobutane dimers or their deamination products, *Biochemistry*, 32, 472-481.
- Kamiya, H., K. Miura, N. Ohotomo, T. Koda, M. Kakinuma, 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., K. Miura, N. Ohtomo, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1991) Transforming activity of a synthetic c-Ha-ras gene containing O<sup>6</sup>-methylguanine in codon 12, *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 997-1002.
- 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., M. Shimizu, M. Suzuki, H. Inoue and E. Ohtsuka (1992c) Mutation induced by deoxyxanthosine in codon 12 of a synthetic c-Ha-ras gene, *Nucleosides and Nucleotides*, 11, 247-260.
- Kamiya, H., M. Suzuki, Y. Komatsu, H. Miura, K. Kikuchi, T. Sakaguchi, N. Murata, C. Masutani, F. Hanaoka and E. Ohtsuka (1992d) An abasic site analogue activates a c-Ha-ras gene by a point mutation at modified and adjacent positions, *Nucl. Acids Res.*, 20, 4409-4415.
- Kamiya, H., N. Murata, T. Murata, S. Iwai, A. Matsukage, C. Masutani, F. Hanaoka and E. Ohtsuka (1993a) Cyclobutane thymine dimers in a ras proto-oncogene hot spot activate the gene by point mutation, *Nucl. Acids Res.*, 21, 2355-2361.
- Kamiya, H., M. Suzuki and E. Ohtsuka (1993b) Mutation spectrum of a true abasic site in codon 12 of a c-Ha-ras gene in mammalian cells, *FEBS Lett.*, 328, 125-129.
- Kamiya, H., H. Miura, N. Murata-Kamiya, H. Ishikawa, T. Sakaguchi, H. Inoue, H. T. Sasaki, C. Masutani, F. Hanaoka, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1995a) 8-Hydroxyadenine (7,8-dihydro-8-oxoadenine) induces misincorporation in *in vitro* DNA synthesis and mutations in NIH3T3 cells, *Nucl. Acids Res.*, 23, 2893-2899.
- Kamiya, H., N. Murata-Kamiya, S. Koizume, H. Inoue, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1995b) 8-Hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in hot spots of the c-Ha-ras gene. Effects of sequence contexts on mutation spectra, *Carcinogenesis*, 16, 883-889.
- Kamiya, H., S. Iwai and H. Kasai (1998) The (6-4) photoproduct of thymine-thymine induces targeted substitution mutations in mammalian cells, *Nucl. Acids Res.*, 26, 2611-2617.
- Lawrence, C. W., S. K. Banerjee, A. Borden and J. E. LeClerc (1990) T-T cyclobutane dimers are misinstructive, rather than non-instructive, mutagenic lesions, *Mol. Gen. Genet.*, 222, 166-168.
- LeClerc, J. E., A. Borden and C. W. Lawrence (1991) The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9685-9689.
- Miller, J. H. (1985) Mutagenic specificity of ultraviolet light, *J. Mol. Biol.*, 182, 45-68.
- Miura, K., H. Kamiya, M. Tominaga, Y. Inoue, M. Ikehara, S. Noguchi, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1987) Overexpression of cellular and activated human c-Ha-ras proteins by mutating a synthetic gene, *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 4878-4882.
- Negishi, K. and W. Hao (1992) Spectrum of mutations in single-stranded DNA phage M13mp2 exposed to sunlight: predominance of G-to-C transversion, *Carcinogenesis*, 13, 1615-1618.
- Nishimura, S. and T. Sekiya (1987) Human cancer and cellular oncogenes, *Biochem. J.*, 243, 313-327.
- 大塚栄子、紙谷浩之(1990) c-Ha-ras 遺伝子の化学合成と大腸菌における発現、蛋白質・核酸・酵素, 35, 2382-2390.
- Smith, C. A., M. Wang, N. Jiang, L. Che, X. Zhao and J.-S. Taylor (1996) Mutation spectra of M13 vectors containing

site-specific cis-syn, trans-syn-I, (6-4), and Dewar pyrimidone photoproducts of thymidyl-(3'→5')-thymidine in *Escherichia coli* under SOS conditions, *Biochemistry*, 35, 4146-4154.

Tessman, I., M. A. Kennedy and S.-K. Liu (1994) Unusual kinetics of uracil formation in single and double-stranded DNA by deamination of cytosine in cyclobutane pyrimidine dimers, *J. Mol. Biol.*, 235, 807-812.

Thomas, D. C. and T. A. Kunkel (1993) Replication of UV-irradiated DNA in human cell extracts: Evidence for mutagenic bypass of pyrimidine dimers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7744-7748.

Zhao, X. and J.-S. Taylor (1996) Mutation spectra of TA\*, the major photoproduct of thymidyl-(3'-5')-deoxyadenosine, in *Escherichia coli* under SOS conditions, *Nucl. Acids Res.*, 24, 1561-1565.

*Environ. Mutagen Res.*, 20: 221-227 (1998)

シンポジウム

本稿は1998年5月29日、東京のヤクルトホールで開催された日本環境変異原学会主催の第9回公開シンポジウム「モデルDNA損傷と変異機構」(企画:根岸和雄、早津彦哉)で発表された(座長:能美健彦)。

## DNA 損傷における塩基配列特異性とその意義

及川 伸二, 川西 正祐

三重大学医学部衛生学教室 〒514-8507 三重県津市江戸橋2-174

### Role of sequence-specificity of DNA damage

Shinji Oikawa and Shosuke Kawanishi

Department of Hygiene, Mie University School of Medicine  
2-174, Edobashi, Tsu, Mie 514-8507, Japan

### Summary

It is well known that various kinds of active oxygen and other radical species, alkylating agents and UV can induce site-specific DNA damage. Sequence-specificity of DNA damage is determined by oxidation potential of radical species, DNA recognition of alkylating agents, ionization potential and molecular electrostatic potential of DNA. Cells have repair mechanisms that correct such site-specific DNA damage. However, when these defenses are oversaturated, such as under conditions of highly oxidative stress, the DNA damage has an increased miscoding potential. In this paper, we review mechanisms of the site-specific DNA damage and its association with the carcinogenicity process and with the carcinostatic effect.

(This paper, chaired by Takehiko Nohmi, was presented to the 9th JEMS Annual Symposium, "Synthetic Models for DNA Damage and Mutagenesis", organized by Kazuo Negishi and Hikoya Hayatsu, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at Yakult Hall, Tokyo, May, 29, 1998.)

Keywords: oxygen radical, UV, alkylating agent, DNA damage, sequence-specificity

### 緒 言

生体の組織の正常細胞は細胞周期が制御されており、細胞は個体の成長や維持に合致する増殖を続けている。しかし、無制御の増殖(uncontrolled growth)を繰り返し、他の組織へ侵襲や転移する細胞集団があり、これが悪性腫瘍すなわち“がん”である。細胞ががん化する過程には多くのステップがあり、重要な要因のひとつにDNAの損傷がある。DNA損傷をもたらす主要な原因是放射線や紫外線等の物理的因子、環境化学物質等の化学的因子およびウイルス等の生物的因子と考えられている。特に環境化学物質、食物、紫外線、放射線などの化

学的因子や物理的因子によるDNA損傷において活性酸素は重要な役割を果たしている。また最近は、慢性的な感染や炎症による発がんに、NOおよび活性酸素の関与が疑われている。われわれがこれまでに明らかにしてきたDNA損傷の塩基配列特異性を活性酸素や各種ラジカルによるDNA損傷、UVA照射による電子移動を介するDNA損傷およびアルキル化剤や抗がん剤によるDNA損傷について概説し、変異原、発がん、抗がん作用における意義を考察する。

われわれが確立したDNA損傷機構や損傷の塩基特異性の解析は、ヒトがん原遺伝子c-Ha-ras-1およびがん抑制遺伝子p53から変異のホットスポットを含む100~400 bpの断片をサブクローニングすることにより行った(Yamamoto and Kawanishi, 1991a; Yamashita et al., 1998)。DNA損傷の塩基配列特異性の解析にはMaxam-Gilbert法を応用し、オートラジオグラム

受付: 1998年8月24日

受理: 1998年9月2日

©日本環境変異原学会

Table 1 Site specificity of DNA damage induced by various kinds of active oxygen and other radical species

Radical	Site-specificity of DNA damage
OH radical }	G~T~C>A
ONOO <sup>-</sup>	
N centered radical	G
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> radical	GG>G
RO radical	poly G

をレーザーデンシトメーターで定量化し解析した。さらに、酸化的DNA損傷のひとつである8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine(8-oxodG)の定量は電気化学検出器付HPLCを用いて行った。DNA損傷の活性種をスピントラップ剤を用いてelectron spin resonance(ESR)法により解析した。

### 1. 活性酸素および各種ラジカルによるDNA損傷の塩基配列特異性

生体内で生じる狭義の活性酸素にはスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、ヒドロキシルラジカル(·OH)、一重項酸素(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)がある。広義には有機化合物の酸素中心ラジカル(RO<sup>·</sup>, ROO<sup>·</sup>)、脂質過酸化物や金属酸素錯体、NOなども含まれる。活性酸素によるDNA損傷には種々の機構が存在し、損傷の塩基特異性もそれ異なる。

O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OHは3重項酸素分子(O<sub>2</sub>)がそれぞれ1, 2, 3電子還元された分子であり、<sup>1</sup>O<sub>2</sub>は励起状態の酸素分子である。実質的にDNAを損傷する活性種はO<sub>2</sub><sup>-</sup>やH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>ではなく、それらから金属イオン等の触媒作用によって生じる、より反応性に富む·OH, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, 金属酸素錯体等であると考えられる。Table 1に示すように、·OHは非常に大きな酸化還元電位を持っているので、ほとんどすべての塩基を損傷し多様な分解生成物を产生する。また糖-磷酸結合とも反応してDNA鎖を切断する。塩基の主要な分解生成物としてアデニン(A)が損傷された2-hydroxydeoxyadenosine(2-OH-dA), 8, 5'-cyclodeoxyadenosine(cyclo-dA), 8-hydroxydeoxyadenosine(8-OH-dA), シトシン(C)が酸化された5-hydroxydeoxycytidine(5-OH-dC), グアニン(G)が損傷された8-oxodG, 8,5'-cyclodeoxyguanosine(cyclo-dG), glyoxal-dG付加物、チミン(T)が損傷されたチミングリコール、尿素、5-formyldeoxyuridine(5-CHO-dU)等が報告されている(Ide et al., 1993; Murata-Kamiya et al., 1997)。一方、<sup>1</sup>O<sub>2</sub>はGを特異的に損傷する(Kawanishi et al., 1986; Ito et al., 1993)。

NOは不対電子一つを持った反応性の高いフリーラジカルであり、生理性に重要な役割を演ずる一方で、感染

や炎症によって過剰に产生されるとDNA損傷などを引き起こし発がんをもたらす可能性が示唆されている(Liu and Hotchkiss, 1995)。NOは生理的条件下で酸化や還元を受けやすく、NOとO<sub>2</sub><sup>-</sup>の反応生成物であるパーオキシナイトライト(ONOO<sup>-</sup>)はNOより活性の強い二次的反応種である。ONOO<sup>-</sup>は、A, G, C, T, すべての塩基を損傷し、さらに、子牛胸腺DNA中の8-oxodG生成量も増加させる(Inoue and Kawanishi, 1995)。また、これらの酸化的DNA損傷は·OH捕捉剤で抑制されることから、DNA損傷の活性種は非常に·OHに近い反応性を持つことが明らかになり、この活性種はNOとO<sub>2</sub><sup>-</sup>が反応して生成したONOO<sup>-</sup>のある種の異性体か、またはONOO<sup>-</sup>の分解過程で生成したものと考えられる(Epe et al., 1996)。

一方、ヒドロラジカル等の窒素中心ラジカルはDNAの塩基配列中のGを特異的に損傷する(Yamamoto and Kawanishi, 1991b)。硫酸ラジカルは単独のGよりもGGのようなGの連続配列を強く損傷する(Kawanishi et al., 1989a)。酸素中心ラジカル(RO<sup>·</sup>, ROO<sup>·</sup>)は5'-GGG-3'のようなポリG配列中の5'側のGを損傷する(Tada-Oikawa et al., 1998)。各ラジカルの酸化還元電位は、窒素中心ラジカル、硫酸ラジカル、酸素中心ラジカルの順に低くなると考えられる。また、4つの塩基(A, G, C, T)中Gの酸化電位が最も低く、特にGGやGGG等のポリG配列は容易に酸化されやすい(Sugiyama and Saito, 1996)。したがって、ラジカルの酸化還元電位が高ければA, G, C, T, 4つの塩基すべてが損傷されるが、酸化還元電位が低くなるに従い酸化されやすいGが、さらにGG, GGGが特異的に損傷される。

金属酸素錯体では金属によってDNAとの結合状態が異なるため、それぞれ特定の配列でDNAに損傷を与えると考えられる。発がん性が指摘されているニッケル化合物やコバルトはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の存在下で金属酸素錯体を形成しDNAを塩基特異的に損傷する。ニッケル化合物のDNA損傷の塩基配列特異性はC, T, Gであり(Kawanishi et al., 1989b)、コバルトはGがやや強く損傷される(Yamamoto et al., 1989)。また、変異原性は古くから認められているが発がん性は証明されていない銅もH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の存在下で金属酸素錯体を生成し、DNA配列中のTを、特に5'-GTC-3'のTを塩基特異的に損傷する(Oikawa and Kawanishi, 1998)。

### 2. UVA照射による電子移動を介した塩基配列特異的DNA損傷

太陽紫外線がヒトに皮膚癌を引き起こすことはよく知られている。これまで紫外線による発がんに関与するのはUVB(280-320 nm)と考えられてきたが、UVAにも発がん性のあることが報告された(Setlow et al., 1993)。

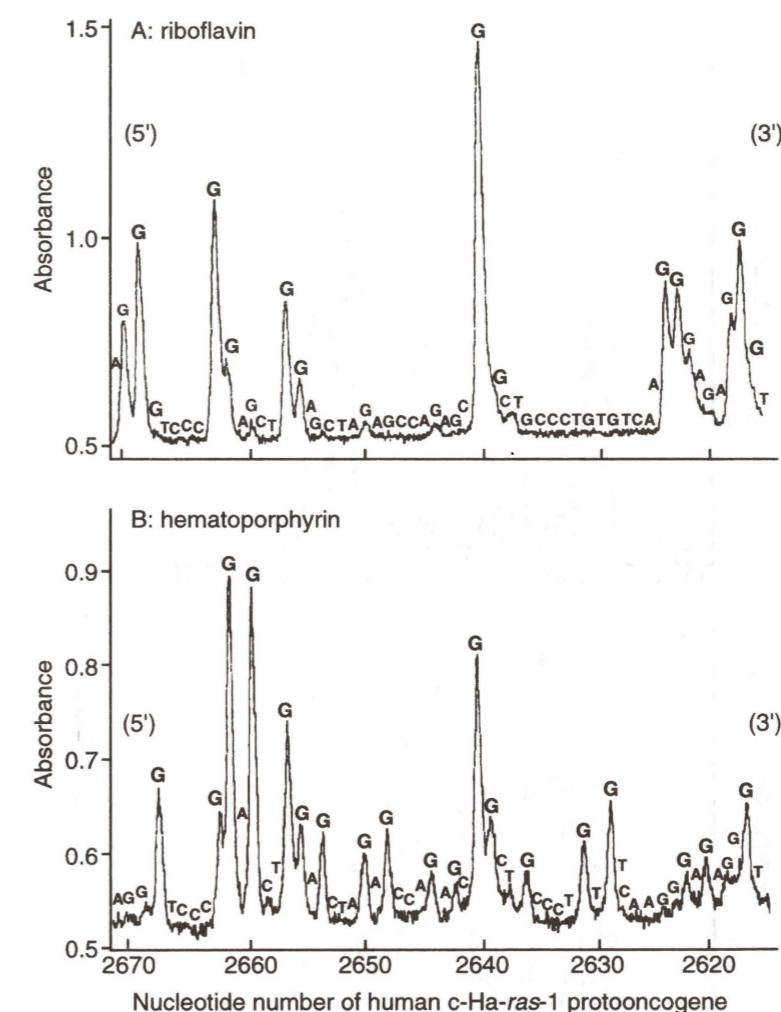


Fig. 1 Site-specificity of DNA cleavage induced by 365 nm irradiation in the presence of riboflavin or hematoporphyrin.

The <sup>32</sup>P 5' end-labeled 337 bp DNA fragment obtained from the c-Ha-ras-1 protooncogene was exposed to 6.6 J/cm<sup>2</sup> UV light (365 nm) with 0.05 mM riboflavin (A) or 0.1 mM hematoporphyrin (B) in 100 μl of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.9) containing 2 μM/base sonicated calf thymus DNA and 5 μM DTPA.

IARC(International Agency for Research on Cancer)においてもUVAの発がん性はUVBと同程度の2(Aヒトに対して発がんの可能性が非常に高い)と評価している。UVAはDNAを直接損傷しないことから、生体内光増感分子を介した間接的なDNA損傷の可能性がある。生体内にはフラビン類、ブテリン類やポルフィリン類などの光増感分子が多数存在する。したがって、これらの生体内分子が紫外線により励起されて生成する活性種が間接的にDNAを損傷すると考えられる。われわれはUVAによる発がん機構を解明するため、光増感分子存在下においてUVA照射によるDNA損傷の塩基配列特異性や損傷機構を検討した。

(1) リボフラビン(Ito et al., 1993)およびブテリン類(Ito, and Kawanishi, 1997a): リボフラビン(riboflavin)やブテリン(pterin)存在下でUVA(365 nm)を

DNAに照射した結果、照射量依存的にDNAが損傷された。その塩基配列特異性は2本鎖DNAにおいてGが連続した配列(5'-GG-3')の5'側のGであり、G単独配列では損傷は認められなかった(Fig. 1A)。また、酸化的DNA損傷のひとつである8-oxodG生成量が増加し、さらに8-oxodGはGにおける8-oxodG以外の損傷に比べて優勢に生成した。この8-oxodG生成は5'-GG-3'の5'側のGにおいて顕著に増加した。これらのことは2本鎖DNA中のGG連続配列の5'側のGが最も電子供与性であると報告されていることとよく一致する(Sugiyama and Saito, 1996)。したがって、UVA照射により励起されたリボフラビンやブテリンはDNA塩基の中で最も酸化されやすいGと電子移動を介して特異的に反応し、8-oxodG等の酸化的損傷を生ずることが示唆された。最近の研究は、長距離電子移動反応によって

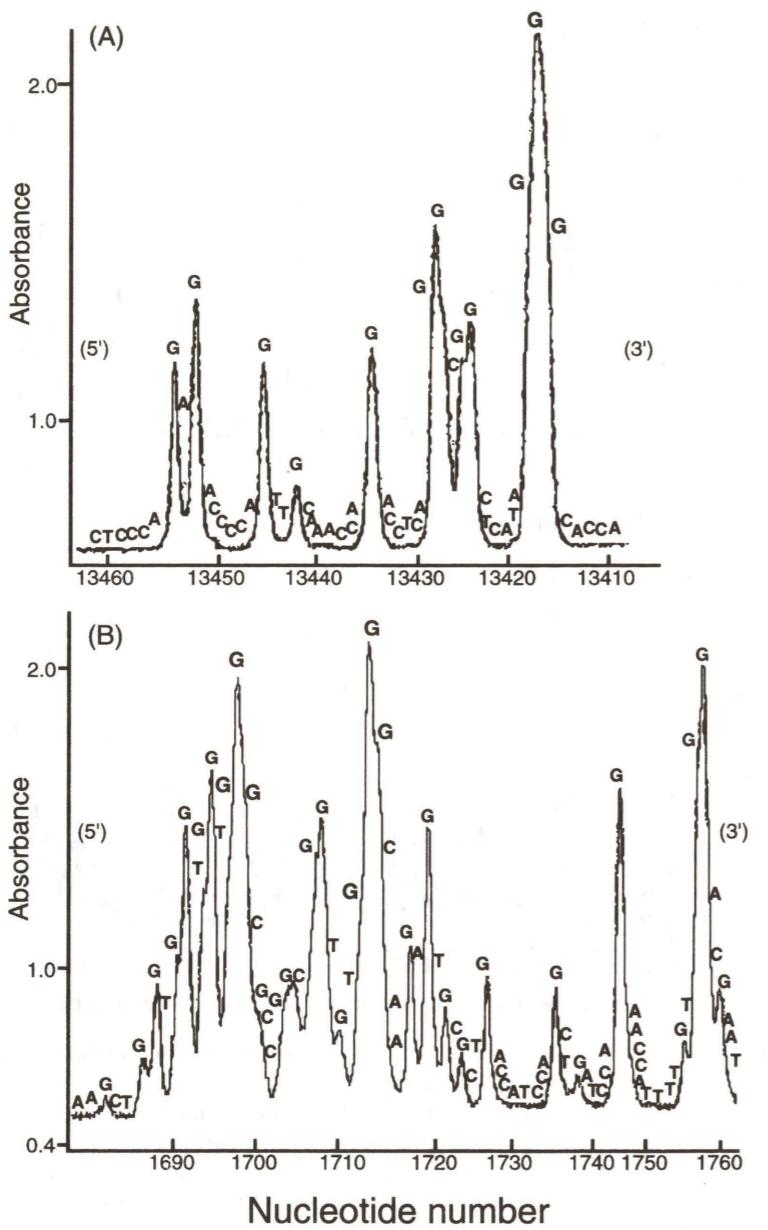


Fig. 2 Site-specificity of DNA cleavage induced by streptozotocin. The  $^{32}\text{P}$  5' end-labeled 348-bp DNA fragment obtained from the human *p53* tumor suppressor gene (A), or 261-bp fragment obtained from the *c-Ha-ras-1* protooncogene (B), was incubated with 0.5 mM STZ and 10  $\mu\text{M}$ /base of sonicated calf thymus DNA in 200  $\mu\text{l}$  of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.8) containing 2.5  $\mu\text{M}$  DTPA.

光増感分子が GG 連続配列から 37 Å も離れたところで DNA 分子と反応しても GG 配列中に 8-oxodG を生成することを報告している (Hall et al., 1996)。したがって生体内においても、光増感分子は GG と直接的に反応する必要はなく、離れていても塩基配列特異的な DNA 損傷が起こりうると考えられる。

(2) ポルフィリン類 (Kawanishi et al., 1986)：ポルフィリン代謝異常では、組織中にポルフィリンが沈着することにより光に対して皮膚が過敏になる。内在性ポルフィリン類のひとつであるヘマトポルフィリン (hematoporphyrin) の存在下で UVA を照射した結果、

1 本鎖 DNA において G が特異的に損傷され (Fig. 1 B), また、8-oxodG 量も増加した。ESR の結果等からこの損傷には  $^1\text{O}_2$  の関与が示唆された。また、2 本鎖 DNA の損傷は認められなかった。

以上の結果から、UVA は生体内光増感分子存在下で DNA を損傷することが示唆された。この DNA 損傷の塩基配列特異性は光増感分子の化学的性質に依存する。特に電子受容性の光増感分子は電子移動を介して間接的に 5'-GG-3' 配列の 5' 側 G を特異的に損傷することが認められた。

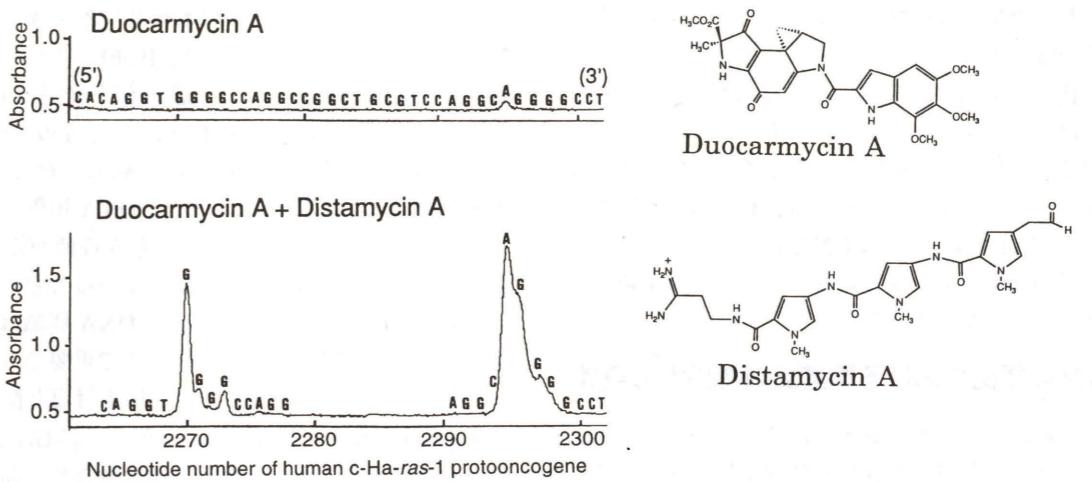


Fig. 3 Alteration of site-specificity of duocarmycin A-induced cleavage of DNA fragment by distamycin A. The  $^{32}\text{P}$  5' end-labeled 98-bp DNA fragment obtained from the *c-Ha-ras-1* protooncogene in 200  $\mu\text{l}$  of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.9) containing 50  $\mu\text{M}$ /base of sonicated calf thymus DNA was incubated 37°C for 5 min in the presence of 10  $\mu\text{M}$  distamycin A. Then 5  $\mu\text{M}$  duocarmycin A was added, and the reaction mixture was incubated at 20°C for 60 min.

### 3. アルキル化剤や抗がん剤による塩基配列特異的 DNA 損傷

アルキル化剤のストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) は、膵臓ランゲルハンス島  $\beta$  細胞の DNA を損傷し、最終的に糖尿病発症にいたると考えられている。STZ は単離 DNA を損傷し、また培養細胞においても DNA 損傷、さらにアポトーシスを誘導した (Murata et al., 1998)。STZ による DNA のメチル化には塩基配列特異性があり、5'-GGG-3' 配列の中央の G あるいは 5'-GG-3' の 3' 側の G が強く損傷された (Fig. 2)。これらの DNA 損傷やアポトーシスが塩化ナトリウムや酢酸ナトリウム等により抑制されることから、活性種として  $\text{CH}_3^+$  の関与が示唆された。また、メチルニトロソ尿素は DNA の G をメチル化するが、特に 5'-GGG-3' の中央の G をメチル化しやすい。これらの塩基配列特異性は損傷される部位の分子静電位 (molecular electrostatic potential) によって説明される。

がんの化学療法に用いられる抗がん剤による DNA の塩基特異的分子認識の研究も重要である。新規抗癌性抗生物質であるデュオカルマイシン A (duocarmycin A) は 2 本鎖 DNA において、A または T が 3 つ以上連続している配列の中で最も 3' 末端に近い A の窒素 (N 3) を活性なシクロプロパン環で塩基配列特異的にアルキル化する。また、ブレオマイシン (bleomycin) は DNA 分子の 5'-GC-3' および 5'-GT-3' 配列をピチアゾール基で認識し、キレートした 2 個の鉄が酸素分子を活性化し、デオキシリボースの部分で DNA 切断を起こす (アンダーラインは切断される部位) (Yamamoto and Kawanishi, 1992)。ネオカルチノスタチン (neocarzinostatin) は DNA のマイナーグループ (溝) を認識し、さらにクロモフォアのエンジン構造がグルタチオン等の SH 化合物により活性化され、水素引き抜きにより DNA 分子の相補対の 5'-AGC-3'・3'-TCG-5' を塩基配列特異的に切断する (Hiraku and Kawanishi, 1997)。このように、抗がん剤は DNA の特定の塩基配列を認識し、アルキル化や DNA 切断等により DNA を損傷し、DNA 複製阻害や突然変異を導入することによりがん化した細胞を死滅させる。しかし、抗がん剤を長期間、多量に投与すると重篤な副作用や薬剤耐性が現れる。抗がん剤の DNA 切断活性を DNA 結合試薬と共存させることにより増強させ副作用を低減することが可能である。われわれは多数の DNA 結合試薬について抗がん剤の DNA 切断活性増強効果および DNA 切断の塩基特異性の変化について検討を行った。デュオカルマイシン A は、A・T 塩基対の連続配列の A をアルキル化するが、G・C 塩基対に富む部位でのアルキル化は認められない。しかし、デュオカルマイシン A に DNA 結合試薬であるディスタマイシン A (distamycin A) を共存させると、G・C 塩基対が 3-4 塩基連続して配列する部位でアルキル化の顕著な増大が認められた (Fig. 3) (Yamamoto et al., 1993)。この DNA 損傷の塩基特異性の変化は、ディスタマイシン A 単独では A あるいは T の連続配列による溝の幅が狭いマイナーグループを認識しアルキル化するが、ディスタマイシン A と共存したときには G あるいは C の連続配列部位の幅が広いマイナーグループを認識しアルキル化すると考えられる。すなわち、デュオカルマイシン A とディスタマイシン A が共存すると DNA の G あるいは C 連続配列の部位で 3 重錯体が形成され、その結果 G あるいは C 連続配列部位がアルキル化されると推定される。さら

に、われわれは抗がん剤ブレオマイシンのDNA結合試薬による増強作用についても検討を行った。3つのピロール環(Py)から構成されているDNA結合試薬PyPyPyはブレオマイシンの一種であるペプロマイシンによるDNA切断の塩基特異性を変化させ、Gが4つ連続した配列の3'側に隣接したC(5'-GGGC-3')を特異的に切断した。以上の結果から、DNA結合試薬は抗がん剤の塩基特異的分子認識を変化させ、さらにDNA切断活性を増強することが示唆された。

#### 4. DNA損傷における塩基配列特異性の意義

化学発がんはイニシエーション、プロモーション、ログレッションの各段階を経て長時間かけて進行する。イニシエーションは正常細胞のDNAが塩基配列特異的な損傷を受け、修復や複製時の誤りにより突然変異が導入され潜在的ながん細胞が生じる不可逆的な過程である。活性酸素や各種ラジカルは多様なDNA損傷を誘発する。酸化還元電位の非常に高いOHはすべての塩基を酸化し、酸化還元電位の低い窒素中心ラジカル、硫酸ラジカル、酸素中心ラジカルは比較的酸化されやすいG、特にGG、GGG配列中のGの8位を酸化し8-oxodG等を生成する。DNA損傷から突然変異さらには発がんにいたるプロセスにはいまだ不明な部分が多いが、突然変異が起きるには少なくともホットスポット等のDNAの特定の部位が損傷されることが必要である。したがって、DNAのどの部分に塩基配列特異的な損傷が引き起こされるかについて解析を行うことは発がん機構を解明するうえで非常に重要である。

紫外線による塩基配列特異的DNA損傷については、UVBによるDNAの直接的な損傷として、ピリミジン光産物が同定されている(Davies, 1995)。さらにわれわれは発がん性を示すUVAと生体内光増感物質(リボフラビン、ブテリン類)による電子移動を介したDNA損傷機構を解析した結果、二本鎖DNAにおいて5'-GG-3'配列の5'側のGが損傷され、そのGの酸化生成物には8-oxodGが含まれることを報告した(Ito and Kawanishi, 1997b)。この光励起電子移動による塩基配列特異的な8-oxodGの生成は電子受容性の光増感分子に共通した機構である。渋谷ら(Shibutani et al., 1991)は8-oxodG生成による突然変異のスペクトルとしてG→Tのトランスバージョンを報告している。したがって、ヒト皮膚腫瘍でのras遺伝子の変異のうちGG→TGの変異はこれまで相補対のCCでのピリミジン光産物の生成によるとされてきたが、われわれは5'-GG-3'配列の5'側のGに生成した8-oxodGによるGG→TGのトランスバージョンの可能性も十分にありうると考えている。

がん関連遺伝子の中で重要な役割を果たしている遺伝子にがん抑制遺伝子p53がある。この遺伝子の変異は肺癌、大腸癌、乳癌、膀胱癌等ほとんどのがんで高頻度で

認められ、ホットスポットにおける突然変異の研究も数多くなされている(Saito et al., 1996)。これらの研究を検討した結果、肺癌組織のp53遺伝子変異はG→Tトランスバージョンが変異全体の1/3を占め、そのうち約60%に酸化されやすいGG連続配列におけるGに点突然変異が認められた。したがって、DNA損傷における塩基配列特異性はp53をはじめとする各種がん関連遺伝子の突然変異の導入に深く関与していると考えられる。

アルキル化剤や抗がん剤によるDNA認識はDNA損傷の塩基配列特異性を決定するうえで重要である。ストレプトゾトシンやメチルニトロソ尿素は塩基配列特異的に5'-GGG-3'配列の中央のGあるいは5'-GG-3'の3'側のGをメチル化する。このことは損傷される部位の分子静電位(molecular electrostatic potential)によると考えられる。また、がんの化学療法に用いられる抗がん剤の多くはDNAを作用部位とするので、抗がん剤によるDNAの塩基特異的分子認識の研究も非常に重要である。われわれは種々の抗がん剤とDNAとの反応を分子生物学的手法と有機化学的手法を駆使して分子レベルで解析し、抗がん剤によるDNA切断やアルキル化には塩基配列特異的な分子認識が重要な役割を果たしていることを解明してきた。さらに、われわれはDNAの分子認識による抗がん剤の塩基配列特異的切断がDNA結合試薬と共に存することにより変化する可能性を検討した。その結果、二つの相異なる分子が協奏的にDNAの塩基配列特異性を認識する反応を初めて見出し、“協奏的DNA認識(Concerted DNA recognition)”という新しい概念を提唱した(Yamamoto et al., 1993)。これは新しいがん化学療法の分子論的基礎になりうると考えられ、新しい効果的ながん化学療法を可能にすると考えられる。

また、加齢とともに活性酸素、放射線や太陽紫外線などの酸化的ストレスによりDNAや蛋白質の損傷が蓄積され老化が進行するとの仮説が提唱されている。最近、染色体の末端部に存在するテロメア繰り返し配列(TTAGGG)<sub>n</sub>の切断が老化のプログラムに関与しているとの報告がなされた。われわれはこのテロメア繰り返し配列中のGGG配列が酸化的ストレスによって塩基配列特異的に損傷されることを明らかにした。

以上をまとめるとDNA損傷における塩基配列特異性を決定する因子としては、各種ラジカルの酸化還元電位で示される酸化力、アルキル化剤のDNA認識、塩基やジヌクレオチドまたはトリヌクレオチドのイオン化ボテンシャル(酸化還元電位)や分子静電位(molecular electrostatic potential)などが考えられる。したがってこれらの因子がDNAの塩基配列特異的損傷として発がん過程のイニシエーションやプロモーション作用、また抗がん効果等にどのように影響を及ぼすか、今後さらなる研究が必要である。

#### 参考文献

- Davies, R. J. H. (1995) Ultraviolet radiation damage in DNA, *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 407-418.
- Epe, B., D. Ballmaier, I. Roussyn, K. Briviba and H. Sies (1996) DNA damage by peroxy nitrite characterized with DNA repair enzymes, *Nucleic Acids Res.*, 24, 4105-4110.
- Hall, D. B., R. E. Holmlin and J. K. Barton (1996) Oxidative DNA damage through long-range electron transfer, *Nature*, 382, 731-735.
- Hiraku, Y. and S. Kawanishi (1997) Actinomycin D amplifies site-specific DNA cleavage induced by neocarzinostatin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 239, 134-138.
- Ide, H., K. Akamatsu, Y. Kimura, K. Michiue, K. Makino, A. Asaeda, Y. Takamori and K. Kubo (1993) Synthesis and damage specificity of a novel probe for the detection of abasic sites in DNA, *Biochemistry*, 32, 8276-8283.
- Inoue, S. and S. Kawanishi (1995) Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide, *FEBS Lett.*, 371, 86-88.
- Ito, K., S. Inoue, K. Yamamoto and S. Kawanishi (1993) 8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin, *J. Biol. Chem.*, 268, 13221-13227.
- Ito, K. and S. Kawanishi (1997a) Photoinduced hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by pterins: sequence specificity and mechanism, *Biochemistry*, 36, 1774-1781.
- Ito, K. and S. Kawanishi (1997b) Site-specific DNA damage induced by UVA radiation in the presence of endogenous photosensitizer, *Biol. Chem.*, 378, 1307-1312.
- Kawanishi, S., S. Inoue, S. Sano and H. Aiba (1986) Photodynamic guanine modification by hematoporphyrin is specific for single-stranded DNA with singlet oxygen as a mediator, *J. Biol. Chem.*, 261, 6090-6095.
- Kawanishi, S., K. Yamamoto and S. Inoue (1989a) Site-specific DNA damage induced by sulfite in the presence of cobalt(II) ion. Role of sulfate radical, *Biochem. Pharmacol.*, 38, 3491-3496.
- Kawanishi, S., S. Inoue and K. Yamamoto (1989b) Site-specific DNA damage induced by nickel(II) ion in the presence of hydrogen peroxide, *Carcinogenesis*, 10, 2231-2235.
- Liu, R. H. and J. H. Hotchkiss (1995) Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review, *Mutat. Res.*, 339, 73-89.
- Murata, M., A. Takahashi, I. Saito and S. Kawanishi (1998) Site-specific DNA methylation and apoptosis induced by diabetogenic streptozotocin, *Biochemical Pharmacology*, in press.
- Murata-Kamiya, N., H. Kamiya, M. Muraoka, H. Kaji and H. Kasai (1997) Comparison of oxidation products from DNA components by gamma-irradiation and Fenton-type reactions, *J. Radiation Res.*, 38, 121-131.
- Oikawa, S. and S. Kawanishi (1998) Distinct Mechanisms of Site-specific DNA Damage Induced by Endogenous Reductants in the Presence of Iron(III) and Copper(II), *Biochem. Biophys. Acta*, in press.
- Saito, M., S. Takahashi, Y. Uesaka and K. Enomoto (1996) p53 gene mutations in the human lung carcinoma, *Nippon Rinsho-Japanese Journal of Clinical Medicine*, 54, 497-502.
- Setlow, R. B., E. Grist, K. Thompson and A. D. Woodhead (1993) Wavelengths effective in induction of malignant melanoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6666-6670.
- Shibutani, S., M. Takeshata and A.P. Grollman (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, 349, 431-434.
- Sugiyama, H. and I. Saito (1996) Theoretical studies of GG-specific photocleavage of DNA via electron transfer: significant lowering of ionization potential and 5'-localization of HOMO of stacked GG bases in B-form DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 7063-7068.
- Tada-Oikawa, S., S. Oikawa and S. Kawanishi (1998) Oxidative DNA damage and apoptosis induced by metabolites of butylated hydroxytoluene, *Biochem. Pharmacol.*, 56, 361-370.
- 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.
- Yamamoto, K. and S. Kawanishi (1991a) Site-specific DNA damage induced by hydrazine in the presence of manganese and copper ions: The role of hydroxyl radical and hydrogen atom, *J. Biol. Chem.*, 266, 1509-1515.
- Yamamoto, K. and S. Kawanishi (1991b) Free radical production and site-specific DNA damage induced by hydralazine in the presence of metal ions or peroxidase/hydrogen peroxide, *Biochem. Pharmacol.*, 41, 905-914.
- Yamamoto, K. and S. Kawanishi (1992) Enhancement and alteration of bleomycin-catalyzed site specific DNA cleavage by distamycin A and some minor groove binders, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 183, 292-299.
- Yamamoto, K., H. Sugiyama and S. Kawanishi (1993) Concerted DNA recognition and novel site-specific alkylation by duocarmycin A with distamycin A, *Biochemistry*, 32, 1059-1066.
- Yamashita, N., M. Murata, S. Inoue, Y. Hiraku, T. Yoshinaga and S. Kawanishi (1998) Superoxide formation and DNA damage induced by a fragrant furanone in the presence of copper(II), *Mutat. Res.*, 397, 191-201.

This paper, chaired by Hideo Ikeda, was presented to the 9th JEMS Annual Symposium, "Synthetic Models for DNA Damage and Mutagenesis", organized by Kazuo Negishi and Hikoya Hayatsu, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at Yakult Hall, Tokyo, May, 29, 1998.

## Specific interaction between damaged bases in DNA and repair enzymes

Kosuke Morikawa

The Department of Structural Biology, Biomolecular Engineering Research Institute (BERI)  
6-2-3 Furuedai, Suita, Osaka 565-0874, Japan

### Summary

T4 endonuclease V is a DNA repair enzyme from bacteriophage T4 which catalyzes the first reaction step of the pyrimidine dimer specific base excision repair pathway. The crystal structure of the enzyme complexed with a duplex DNA substrate, containing a thymine dimer, has been determined at 2.75 Å resolution. The atomic structure of the complex reveals the unique conformation of the DNA duplex, which exhibits a sharp kink with a 60° inclination at the central thymine dimer. This kink divides the duplex into two B-DNA regions, each of which makes extensive polar interactions with the basic concave surface of the enzyme. The adenine base complementary to the 5' side of the thymine dimer is completely flipped out of the DNA duplex and is trapped in a cavity on the protein surface. These structural features allow an understanding of the catalytic mechanism and implicate a general mechanism of how other repair enzymes recognize damaged DNA duplexes.

**Keywords :** T4 endonuclease V, base excision repair, pyrimidine dimer, base flip-out

### Introduction

Excision repair directly acts on damaged moieties within DNA duplexes to proceed reactions for their elimination. Although nucleotide excision repair (NER) is assumed to play a central role in this process, the structural analyses of its molecular machinery is not impressive, because of their complicated and unstable architectures. On the other hand, base excision repair (BER) involves simpler enzymes at least for the initial steps of the reaction pathways, although it remains unclear how these enzymes may interact with other molecules participating in the later reaction steps. In the initial step of BER, a DNA glycosylase directly excises the modified base moieties from DNA duplexes to produce apurinic-apirimidinic (AP) sites. The phosphate backbone at the abasic site is subsequently

cleaved, either by the AP lyase activity belonging to the same DNA glycosylase or by the actions of other AP endonucleases. From the structural biology viewpoint, the BER enzymes are indeed good targets to clarify the mechanism by which repair enzymes specifically recognize lesions within DNA duplexes.

This report focuses, in particular, on the direct visualization of a damage recognition mechanism, which is based on the first successful X-ray structure determination of a representative BER enzyme, T4 endonuclease V, complexed with a DNA duplex containing a pyrimidine photodimer. This crystallographic study revealed an unexpected damage recognition mechanism that flips a base out of a DNA duplex. The structural features of the DNA deformation implied that this mechanism can be generalized to damage recognition by various repair enzymes. Since then, the crystal structures of some other BER enzymes have been determined and such implications for the repair mechanism are indeed

received : July, 8, 1998

accepted : July, 13, 1998

© Environmental Mutagen Society of Japan

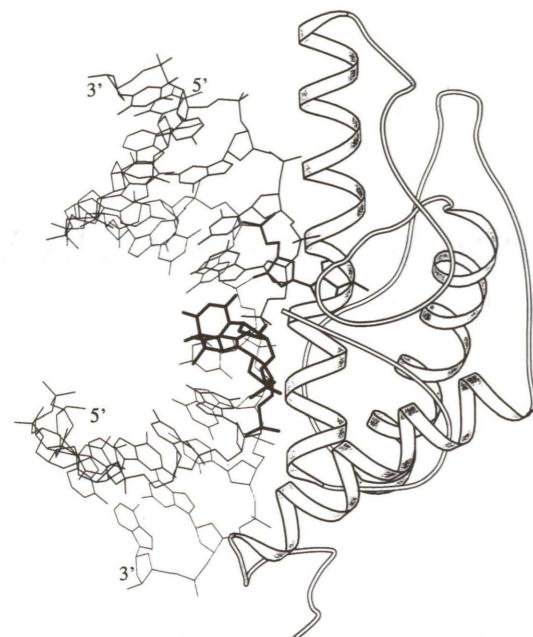


Fig. 1 Structure of T4 endo V-DNA substrate complex. The protein and the DNA substrate containing a thymine-dimer at the center are shown by a ribbon model and a wire model. The thymine-dimer is denoted by bold lines. Note the flipped-out adenine base which lies behind the H1 helix.

becoming a reality.

### 1. Crystal structure of T4 endonuclease V in the DNA-free state

Endonuclease (endo) V from bacteriophage T4 is the most popular DNA repair enzyme that has been biochemically investigated for a long time (Dobson and Lloyd, 1989). This enzyme has high affinity for both cyclobutane-type pyrimidine dimers (PDs) and AP sites within DNA duplexes and two distinct catalytic activities: scission of the glycosyl bond at the 5' side of PD and subsequent cleavage of the phosphodiester bond at the 3' position of the abasic site through  $\beta$ -elimination. This enzyme binds only to double stranded DNA and scans nontarget sequences by electrostatic interaction to search for the damaged site (Dobson and Lloyd, 1989).

The T4 endo V protein purified from *E. coli* overproducing strain was crystallized (Morikawa et al., 1988) and the first crystal structure of DNA repair enzymes was determined at 1.6 Å resolution (Morikawa et al., 1992) and afterwards refined at 1.45 Å resolution (Morikawa et al., 1995). The enzyme is composed of a single compact domain, although it exhibits the two distinct activities. The molecule, consisting of three  $\alpha$ -helices and the connecting loops, shows a remarkably unique arrangements of  $\alpha$ -helices (Fig. 1). The NH<sub>2</sub> terminal seg-

ments penetrates between the two major H1 and H3 third helices, preventing their direct contacts. The two residues at the terminus lies on the molecular surface, whereas the internal peptide groups all form hydrogen bonds with the surrounding atoms. This folding scheme is inexplicable with the close packing category for the assembly of  $\alpha$ -helices. The molecular graphic display of the electrostatic potentials exhibits a positively charged concave surface with a dimension of about 50 Å  $\times$  40 Å. This positive area, contributed by about ten basic residues, is largely over the diameter of a B-DNA duplex and hence overall appears to be consistent with the proposal that the enzyme can scan non-target sequences (Dobson and Lloyd, 1989).

In parallel with crystallographic study, the extensive mutation analyses were carried out to identify crucial residues for the glycosylase activity (Doi et al., 1992). Various mutant enzymes were isolated using site directed mutagenesis and their activities were examined. Among them, E23Q (replacement of Glu by Gln), E23D and R3Q completely abolished the activity. Notably, the former two mutants maintained the full DNA substrate binding ability, although R3Q completely lost this ability. Two mutants, R22Q and R26Q, also exhibited the extremely low activity. In the crystal structure, Arg 3, Arg22, Glu23, and Arg26, were concentrated in a small area on the basic and concave surface, as though the negative charge of the Glu23 side chain floats in a sea of the positive charges. In combination with the mutational analysis (Doi et al., 1992), thus, the crystal structure allowed the identification of the glycosylase catalytic center (Morikawa et al., 1992), where Glu23 are surrounded by the three basic Arg3, Arg22, and Arg26 residues.

The crystal structures of the three active site mutants, E23Q, E23D and R3Q, all were determined at atomic resolution (Morikawa et al., 1995). The E23Q and R3Q mutants hardly showed the significant conformational change, except for the substituted side chains and some water molecules in the close vicinity of the catalytic center. On the other hand, the E23D mutation induced a small, but significant, change in the backbone structure, such as an increased central kink of the H1 helix at the Pro25. However, the catalytic center showed no notable structural change that should be directly associated with the impairment of the glycosylase activity. These results suggest that the negatively charged side chain of Glu23 and the positively charged guanidino group are crucial for the glycosylase activity and the DNA substrate binding, respectively.

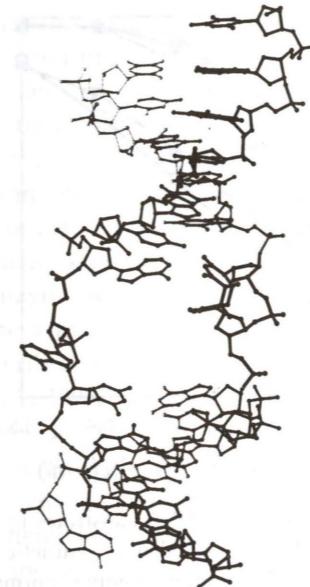
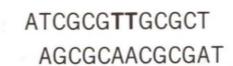


Fig. 2 Wire model of the DNA duplex in the complex (protein part not shown). The thymine-dimer and the complementary adenine on the 5' side are denoted by bold lines. Note the hole generated by the flipping-out of the adenine base and the distortions of the adjacent two base pairs. This hole is actually filled up by various chemical groups involved in the catalytic reaction.

### 2. Crystal structure of T4 endonuclease V complexed with a DNA duplex

#### 1) Overall view of the complex

The crystallographic study of the active site mutants also revealed that the E23Q mutant is the most appropriate to cocrystallize with a DNA substrate duplex, because it retains the full substrate binding ability and exhibits no significant conformational change. After the extensive screening of synthetic DNA duplexes, we finally obtained the crystals of the mutant enzyme complexed with a DNA duplex,



which has a thymine dimer (bold letters) at the center.

The crystal structure of the complex was solved at 2.75 Å resolution by the molecular replacement method using a 1.45 Å structure of the DNA-free enzyme. The conformation of the enzyme in complex with the DNA coincide well with that of the DNA-free enzyme, except for a loop (residues 125-130) near the carboxyl terminus and side chains and a part (83-91) of a long loop which shows different side chain orientations. The rmsd values between the two structures are 0.39 Å for all main chain atoms and 0.68 Å for all the atoms including side

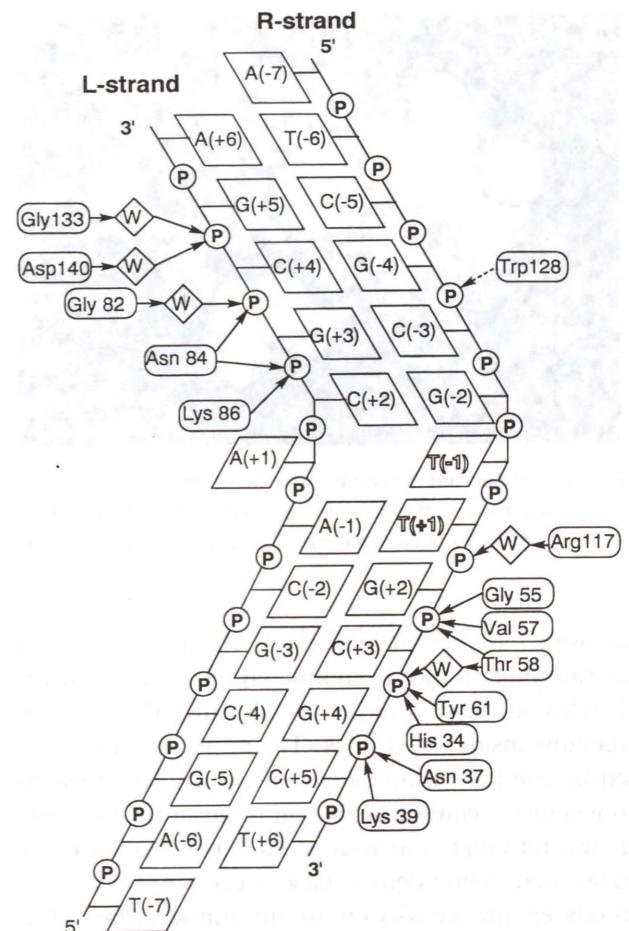


Fig. 3 Schematic drawing of polar interactions between the enzyme and the DNA substrate. Open letters denote the thymine dimer. Polar interactions in the close vicinity of the thymine dimer are eliminated from the figure. Trp128 makes stacking interaction with the sugar ring of C (R-3). Note that direct read-out and water mediated indirect read-out are equally important for the enzyme-DNA substrate recognition.

chains.

The sharply kinked (60 degrees) DNA duplex is bound to the concave basic surface and this kink divides the duplex into two B-DNA regions (Figs. 1 and 2). Half of the basic surface covers the L-strand through lots of direct and water-mediated hydrogen bonds with a sugar-phosphate backbone and likewise the remaining half does the R-strand (Fig. 3). However, any interactions were not observed between DNA bases and protein atoms at all. As suggested before (Iwai et al., 1994), the enzyme interacts with the thymine dimer in the minor groove (Fig. 1).

#### 2) Base flipping out

Compared with other protein-DNA complex involved in transcription, the most remarkable feature of the complex (Figs. 1 and 2) is that the

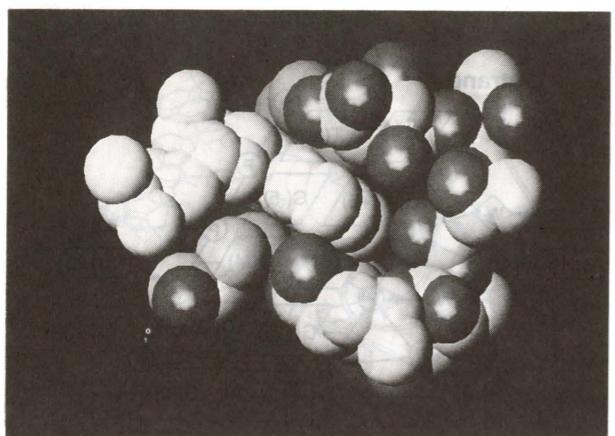


Fig. 4 Flipped-out adenine base accommodated into the cavity on the protein surface. The adenine base (white) makes very intimate contacts with protein atoms.

adenine base complementary to the 5' side thymine of the photo-dimer is completely flipped out of the B-DNA duplex interior, while the dimer itself remains inside the duplex. The apparent hole created by the base flipping-out is further expanded by the concavo-convex distortion of adjacent two base pairs, although the base-pairs themselves are not disrupted. The adenine base flipped out is accommodated into a cavity on the enzymatic surface (Fig. 4). Surprisingly, this adenine makes no polar interaction with protein atoms within the cavity. Instead, it appears to be sandwiched between two layers consisting of protein atoms and water molecules through van-der Waals interactions. In fact, T4 endo V could efficiently cleave the modified DNA substrate duplexes (Fig. 5), which contain guanine, thymine, cytosine and even 5-phenyl uracil in place of the complementary adenine (Maeda, unpublished result). This finding supports the above hypothesis that no polar interactions in the cavity are prerequisite for the cleavage.

### 3) Other interactions with DNA

The sharp kink at the central thymine dimer is accompanied with striking deformation of the backbone structure. Most notably, the spacings between the adjacent two phosphates, both of which belong to the thymidine dimer becomes smaller by 1.5 Å, as compared with 6.7 Å in the B-DNA duplex. These two phosphates are recognized through seven direct polar interactions with five basic residues including Arg3. In particular, the two phosphates form four hydrogen bonds with the side chain of Arg3, whose replacement by Gln abolished the substrate binding ability. Likewise, the neighboring phosphate pair with a shortened spacing forms water-mediated

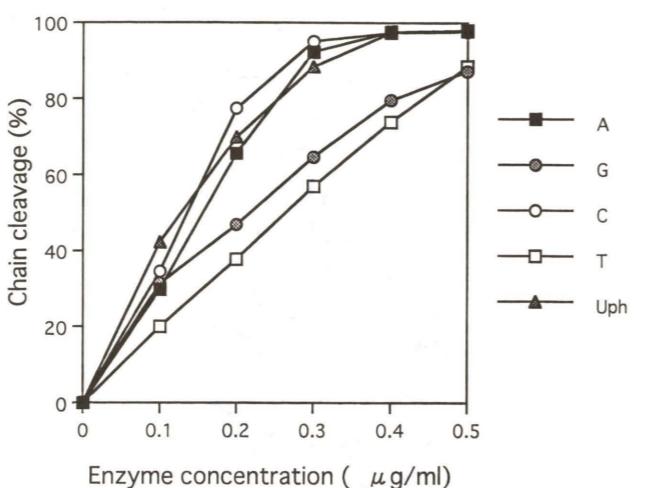


Fig. 5 Cleavage of various DNA substrates by T4 endo V. A, G, C, T, and Uph denote synthetic 30-mer DNA duplexes which contain adenine (normal substrate), guanine, cytosine, thymine, and 5-phenyl uracil, respectively, as complementary bases to the 5' side of the thymine dimer. All of the DNA duplexes are efficiently cleaved by T4 endo V.

hydrogen bonds with the enzyme.

### 4) Roles of base flipping-out

The crystal structure of the DNA substrate has not been determined in the absence of the enzyme yet. However, NMR analyses revealed that synthetic DNA duplexes containing PD maintains all of base pairs, although hydrogen bonds with PD are weakened (Kemmink et al., 1987a and b; Lee et al., 1994). These results imply that the remarkable DNA kink is induced by the binding of the enzyme. Presumably, the electrostatic force between the enzyme and the DNA backbone may crash the PD moiety which has weaker stacking interactions. Thus, the kink should be coupled with the deformation of the sugar-phosphate back bone around PD. I assume that the flipping-out of the adenine base even takes place in concert with the kink. Then, the roles of the base flipping-out partly would be to alleviate the local tension generated by the kink. In addition to no polar interaction between the base and protein atoms within the cavity, this hypothesis is consistent with the finding that a DNA duplex containing an abasic site is efficiently bound to the enzyme (Latham et al., 1995).

Another interesting feature of the base flipping is that the resultant hole of the DNA duplex is filled up by many protein atoms that all participate in the catalytic reaction of endo V. Thus, the apparent hole provides an empty space for the catalytically active residues, such as the NH<sub>2</sub> terminus, Arg22, Glu23 and Arg26, to access to a target for the catalytic reaction. The enclosure of the hole also may

play an important role in the protection of the transition state from unfavorable contacts with the solvent molecules. In addition, the trapping of the flipped-out base into the cavity may contribute to preventing the slippage of the DNA substrate along the protein interface and thus to making its correct and intimate contact with the enzyme.

Biochemical studies revealed that an imino-covalent enzyme-substrate intermediate is formed between the  $\alpha$ -amino terminus and the C1' atom of the 5' deoxyribose of PD (Schrock and Lloyd, 1991; Dodson et al., 1993). The configurations of the catalytic residues in the hole essentially supports the catalytic scheme (Schrock and Lloyd 1991; Dodson et al., 1993; Iwai et al., 1995) proposed on the basis of this biochemical evidence. The  $\alpha$ -amino terminus is actually located within a distance from the C1' atom, which is capable of the covalent bond formation. The carboxyl side chain of Glu23 would stabilize the positively charged Schiff base intermediate (Manuel et al., 1995) and donate a proton to a pyrimidine ring so as to make the N-glycosyl bond cleavable. Furthermore, it also may participate in  $\beta$ -elimination. The side chains of Arg22 and Arg26 appear to have structural roles in securing of the thymine ring and sugar moiety.

### 5) Comparison with other enzymes

A similar flipping-out base was also found in DNA methyltransferase (MT)-DNA complexes (Cheng et al., 1993; Klimasukas et al., 1994), although this enzyme does not belong to DNA repair enzymes. In detail, however, the base-flipping out in these complexes are seriously different from that in T4 endo V. First, in the MT-DNA complex, a loop of the enzyme undergoes a large conformational change and penetrates into the hole within the DNA duplex, although the T4 endo V-DNA complex shows no conformational change of the enzyme. Secondly, the former complex shows a straight B-DNA duplex, in contrast with the sharp kink in the latter complex. Thirdly, in the PD recognition, only one adenine base complementary to PD is flipped out, whereas the flipped-out cytosine in the MT-DNA complex is the actual target for the catalytic reaction. Most recently, the crystal structure of the uracil-DNA glycosylase (UDG) complexed with a DNA duplex (Slupphaug et al., 1997) has been reported. This repair enzyme cleaves the N-glycosyl bond at toxic uracil bases within DNA duplex to produce abasic sites. The complex structure revealed that the uracil base is flipped out of the straight B-DNA duplex and is completely buried into the enzyme through many polar interactions with protein atoms. This struc-

tural feature is very similar to that of the MT-DNA complex, although one side chain of the enzyme is inserted into the hole of the DNA duplex. In both of the MT-DNA and UDG-DNA complexes, many polar interactions are concentrated in the close vicinity to the target bases for the catalytic reaction. It is conceivable that these enzymes may be able to compulsorily pull the target bases out of the DNA duplexes. The T4 endo V-DNA complex contrasts with these complexes. In the former complex, the polar interactions are spread over the entire DNA duplex with the sharp kink, and the mechanism of the DNA deformation induced by binding with the enzyme already has been discussed above. Therefore, at the moment, it is likely that there are two distinct base flipping-out mechanisms.

### Concluding remarks

The base flipping out is indeed an important and universal phenomenon in the biological world. Conceivably, this is the DNA recognition mechanism specific for enzymes, since simple DNA binding proteins like transcriptional regulatory factors have never shown the disruption of base pairs. Replication or transcription process requires very large molecular machinery which consist of dozens proteins. In order for these super molecular complexes to achieve sophisticated catalytic reactions involving sequential many steps, they need to contact with the large internal region of a DNA duplex which contains many reaction targets, and hence the DNA duplex must be unwound to expose them. On the other hand, the target for BER or MT is simply a small base, and then catalytic residues within enzymes are allowed to access to target bases, inside or outside the duplex case by case, only if they could be flipped out of the interior to exterior. It is prerequisite for this hypothesis that the base flipping-out should be frequently found in DNA relevant enzymes, in particular, involved in repair for mismatch base pair.

### References

- Cheng, X., S. Kumar, J. Posfai, J. W. Pflugrath and R. J. Roberts (1993). Crystal structure of the Hhal DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine, *Cell*, 74, 299-307.
- Dodson, M. L. and R. S. Lloyd (1989) Structure-function studies of the T4 endonuclease V repair enzyme, *Mutat. Res.*, 218, 49-65.
- Dodson, M. L., R. D. Schrock III and R. S. Lloyd (1993) Evidence for an imino intermediate in the T4 endonuclease V reaction, *Biochemistry*, 32, 8284-8290.
- Doi, T., Recktenwald, A. Recktenwald, Y. Karaki, M. Kiku-

- chi, K. Morikawa, M. Ikehara, T. Inaoka, N. Hori and E. Ohtsuka (1992) Role of the basic amino acid cluster and Glu-23 in pyrimidine dimer glycosylase activity of T4 endonuclease V, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 9420-9424.
- Iwai, S., M. Maeda, M. Shirai, Y. Shimada, T. Osafune, T. Murata and E. Ohtsuka (1995) Reaction mechanism of T4 endonuclease V determined by analysis using modified oligonucleotide duplexes, Biochemistry, 34, 4601-4609.
- Kemmink, J., R. Boelens, T. M. G. Koning, R. Kaptein, G. A. van der Marel and J. H. van Boom (1987) Conformational changes in the oligonucleotide duplex d (GCGTTGCG) · d (CGCAACGC) induced by formation of a *cis-syn* thymine dimer, Eur. J. Biochem., 162, 37-43.
- Kemmink, J., R. Boelens, T. Koning, G. A. van der Marel, J. H. van Boom and R. Kaptein (1987) <sup>1</sup>H NMR study of the exchangeable protons of the duplex d (GCGTTGCG) · d (CGCAACGC) containing a thymine photodimer, Nucleic Acids Res., 15, 4645-4653.
- Kilmasaukas, S., S. Kumar, R. J. Roberts and X. Cheng (1994) Hhal methyltransferase flips its target base out of DNA helix, Cell, 76, 357-369.
- Latham, K. A., R. C. Manuel and R. S. Lloyd (1995) The interaction of T4 endonuclease V E23Q mutant with thymine dimer-and tetrahydrofuran-containing DNA, J. Bacteriol., 177, 5166-5168.
- Lee, B. J., H. Sakashita, T. Ohkubo, M. Ikehara, T. Doi, K. Morikawa, Y. Kyogoku, T. Osafune, S. Iwai and E. Ohtsuka (1994) Nuclear magnetic resonance study of the interaction of T4 endonuclease V with DNA, Biochemistry, 33, 57-64.
- Manuel, R. C., K. A. Latham, M. L. Dodson and R. S. Lloyd (1995) Involvement of glutamic acid 23 in the catalytic mechanism of T4 endonuclease V, J. Biol. Chem., 270, 2652-2661.
- Miaskiewicz, K., J. Miller, M. Cooney and R. Osman (1996) Computational simulations of DNA distortions by a *cis-syn*-cyclobutane thymine dimer lesion, J. Am. Chem. Soc., 118, 9156-9163.
- Morikawa, K., M. Tsujimoto, M. Ikehara, T. Inaoka and E. Ohtsuka (1988) Preliminary crystallographic study of pyrimidine dimer-specific excision-repair enzyme from bacteriophage T4, J. Mol. Biol., 202, 683-684.
- Morikawa, K., O. Matsumoto, M. Tsujimoto, K. Katayanagi, M. Ariyoshi, T. Doi, M. Ikehara, T. Inaoka and E. Ohtsuka (1992) X-ray structure of T4 endonuclease V: an excision repair enzyme specific for a pyrimidine dimer, Science, 256, 523-526.
- Morikawa, K., M. Ariyoshi, D. G. Vassilyev, O. Matsumoto, K. Katayanagi and E. Ohtsuka (1995) Crystal structure of a pyrimidine dimer-specific excision repair enzyme from bacteriophage T4: refinement at 1.45 Å and X-ray analysis of three active site mutants, J. Mol. Biol., 249, 360-375.
- Osman, R., N. Luo, K. Miaskiewicz and L. Miller (1995) Structure/function relationships at early times. In: A. F. Fuciarelli and J. D. Zimbrick, (Eds), Radiation damage in DNA, Batelle Press, Columbus, OH, pp. 323-330.
- Schrock, R. D. III and R. S. Lloyd (1991) Reductive methylation of the amino terminus of endonuclease V eradicates catalytic activities, J. Biol. Chem., 266, 17631-17639.
- Slupphaug, G., C. D. Mol, B. Kavil, A. S. Arvai, H. E. Krokan and J. A. Tainer (1996) Structure of human uracil-DNA glycosylase bound to DNA shows nucleotide flipping mechanism, Nature, 384, 87-92.
- Vassilyev, D. G. and K. Morikawa (1997) DNA-repair enzymes, Curr. Opin. Struc. Biol., 7, 103-109.

Environ. Mutagen Res., 20: 235-236 (1998)

本稿は1998年5月29日、東京のヤクルトホールで開催された日本環境変異原学会主催の第9回公開シンポジウム「モデルDNA損傷と変異機構」(企画:根岸和雄、早津彦哉)で発表された(座長:木苗直秀)。

## 変異原研究の課題——核酸化学の経験から

早津 彦哉

岡山大学薬学部 〒700-8530 岡山市津島中1-1-1

### Problems in environmental mutagenesis, as viewed by a nucleic-acid chemist

Hikoya Hayatsu

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University  
Tsushima, Okayama 700-8530, Japan

#### Summary

Problems, both current and future, in the studies of environmental mutagens and their actions are raised by the author, whose speciality has been chemical and biochemical investigations on reactions of nucleic-acids.

(This paper, chaired by Naohide Kinae, was presented to the 9th JEMS Annual Symposium, "Synthetic Models for DNA Damage and Mutagenesis", organized by Kazuo Negishi and Hikoya Hayatsu, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at Yakult Hall, Tokyo, May, 29, 1998.)

Keywords: mechanism of induced mutagenesis, importance of DNA chemistry, slow-acting mutagens

#### 緒 言

私は環境変異原の研究を開始する以前から核酸の化学的研究に従事してきた。とくに、核酸と化学物質との水溶液中の反応について主眼を置いて研究していたし、現在もその流れは継続している。この経験をふまえて現在の私の変異原研究がある。今回のシンポジウムを機会に、変異原研究に関するいろいろな研究課題について考えてみた。この短文でそれらを述べることにより環境変異原研究の進展に役立ちたい。

#### 1. 化学物質で誘起される変異のメカニズム

変異原が核酸のどこにどのように働いてそれに「傷」をつけるのか。また、その傷がどのような過程を経て子

孫のDNAの塩基配列変化を導くのか。これらが中心課題であり、多くの化学物質についてすでに解明されている部分がたくさんあることは周知の事実である。しかしいまだに基本的なことでわからないことが多い。たとえば脱塩基部位が一本鎖上に生じた場合、複製時に相手方の鎖上にアデニンが優先的にに入るという「A-rule」があるが、これが本当に一般則として通用するのか。また、なぜAが選ばれるのかは未知である。また、化学物質がDNAに共有結合することが必要なのか、あるいは単に非共有結合で付着するだけでも変異が導かれるのかという問題もまだ残っていると思う。非共有結合であっても、強い付着が起きれば、DNA複製時の誤りの原因となりうると予想される。

#### 2. 変異原活性の検出法

最も広く利用されているサルモネラ菌による検出法は、裸のDNAへの化学物質の反応性を調べることと、動物へ投与して遺伝子毒性をみるシステムとの中間に当た

受付: 1998年9月2日  
受理: 1998年9月10日  
©日本環境変異原学会

ると考えられる。生物のDNAは細胞膜、核膜で包み込まれているうえ、細胞内外の生理物質群によって守られている。またDNAに傷がついても、それは後で修復される。しかし、すべてこれらのことと横に置いて、そもそもDNAに水溶液中である化学物質が反応するのかどうかをみるのも重要ではないかと考える。たとえば、亜硝酸や亜硫酸はAmes testでは通常陰性であるが、DNAとの反応が起こることがよく知られている。亜硫酸の反応は私自身が1970年に発見したものである(Hayatsu, 1996)、シトシンの脱アミノ化を起こす反応であり、DNAの近傍への薬物送達的なメカニズムが働けば変異が誘起される可能性はある。現在 $10^8$ ヌクレオチド当たり1個のレベルで「傷」が検出され、それが「遺伝子毒性」として議論されている。それを思えば、ゆっくり起こる、わずかの反応も気にしなければいけなくなってきた。化学物質を裸のDNAと混せて、長時間置いても全くDNA構造に変化が認められなければ、その化学物質自身には毒性はないと判定できるだろう。ただし、生体内では代謝などで変形するかも知れないので、この実験の結果だけからでは非遺伝子毒性的(non-genotoxic)とはいえない。

### 3. 生物側の対応

これは化学実験を行っている研究者からみると想像を絶するといってよい世界である。すなわち大腸菌でみた場合400万余の塩基配列が20分以内で複製されるのであるから、1秒間で数千ヌクレオチド分がDNAポリメラーゼによってコピーされて子DNA鎖が生成することになる。その猛烈なスピードでの作用で、一つでも間違えないといふのだから驚くべきである。複製後に誤りをみつけて修復する系も非常に能率的である。たとえばウラシル基をみつけて切り取る作業など、どうやって正確に、かつ高速でできるのかイメージできない。これらの神秘(まさに「神」というべきか)もこれから徐々にそのヴェールがはがされてゆくものと期待される。変異原の作用はこれに密接に関連している。この辺は分子生物学者のテリトリーではあるが常に心にとめて、その進歩をくみ取っていかなければならないと思う。

### 4. 変異原の探索

もはや環境中の変異原は探しつくされたのだろうか。私はまだ未知の物質がいろいろとあるように漠然と思っている。たとえば2年ほど前にWeisburgerら(Chen et al., 1995)によって「サンマのひらき」からの新しい変異原の生成が報告された。その構造は意外な形をしている

メチオチニン誘導体であり、変異機構は未知である。また最近では糠谷ら(Nukaya et al., 1997)によって桂川の水から新変異原が分離され、構造決定された。上述したように今は $10^8$ ヌクレオチドに1個のアグクトが検出される時代である。DNAにくついてじわりじわりと共有結合が形成されてゆくような遅効性変異原(slow acting mutagens)がみつかってくるかも知れない。活性酸素がもてはやされ、「酸化的ストレス」などといわれるが、逆に「還元的ストレス」はないだろうかと、ふと考えたりする。また、変異原は親電子性(electrophile)であるというのが通説であるが、逆に親核性(nucleophile)のものはないのだろうか。前述した亜硫酸イオンなどは親核性である。

### 5. 抑制とそのメカニズム

抗変異原という言葉ができるまで日が浅いが、何となく意味がほんやりとしている。つまり、「この植物成分には抗変異原性がある」というと、何だか、ありとあらゆる変異原物質に対して抑制作用があるかに思ってしまう。そんなものはおそらくありえないの、「変異原AとBに対して抑制作用がある」というふうな限定された表現にしなければいけないと思う。抗変異原作用はAmesテストで簡単にみることができるために、実験結果がたくさん出る。しかしメカニズムが少しでもよいかわからないと報告できない時世になっている。それは、機構がわからないまま、ただ抑制したといわれても、何か実験上のミスがあるのでないかと人々は疑ってしまうからである。メカニズムを追っているのは知的刺激が大きいので、謎がとけたときは喜びがある。これから「変異原Xに対する抑制物質Y」というようなリストをますます大きくしてゆき、そのメカニズムを明らかにすることで、最終目標である人間健康への寄与ということに努力する必要がある。

### 参考文献

- Chen, W., J. H. Weisburger, E. S. Flala, S.G. Carmella, D. Chen, T. E. Spratt and S. S. Hecht (1995) Unexpected mutagen in fish, *Nature*, 374, 599.  
Hayatsu, H. (1996) The 5,6-double bond of pyrimidine nucleosides, a fragile site in nucleic acids, *J. Biochem.*, 119, 391-395.  
Nukaya, H., J. Yamashita, K. Tsuji, Y. Terao, T. Ohe, H. Sawanishi, T. Katsuhara, K. Kiyokawa, M. Tezuka, A. Oguri, T. Sugimura and K. Wakabayashi (1997) Isolation and chemical-structural determination of a novel aromatic amine mutagen in water from the Nishitakase River in Kyoto, *Chem. Res. Toxicol.*, 10, 1061-1066.

Environ. Mutagen Res., 20: 237-239(1998)

## 情報は力なり!? 化学情報協会のサービス

千原 秀昭

(社) 化学情報協会副会長 〒113-0021 東京都文京区本駒込6-25-4 中居ビル

### Information as strength. Services from JAICI

Hideki Hihara

Japan Association for International Chemical Information (JAICI)  
Nakai Bldg., 6-25-4 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0021

### はじめに

情報氾濫の時代になって、ただの「情報」は力というより、ゴミになりかねないのが実状であろう。本当に役に立つ(力となる)情報を、必要なときに提供するのが情報機関の使命だが、それには研究者と情報専門家との息のあった連携がもっとも望ましい。化学とその周辺分野については情報システムが整備されているので、ゴミの山から宝を掘り出すよりも、ずっと容易にできるようになっている。本稿では化学物質とそれが起す事象(生理活性を含めて)に関する情報のソースを紹介したい。

### 化学情報協会とは?

1971年に日本化学会が提唱し、化学系の学協会によって設立された化学情報の専門機関で、1975年に社団法人に改組された。業務は大別して3つある。

a) Chemical Abstracts Service (CAS)の情報を主体とする科学技術情報全般のオンラインサービスであるSTN Internationalのユーザーサポート、販売、利用法講習会を行い、冊子体Chemical Abstracts (CA), CD-ROM版のCAをはじめ、多数の検索補助資料を販売している。

b) 日本の化学系雑誌論文および特許の英文抄録・索引を作成して、CASのデータベースへ載せる。特に日本の化学系特許は世界の60.1%(1997)を占めていて、欧米から重要な情報源として注目されている。

c) 研究開発: 化学用の日英・英日機械翻訳。

化学はもともと幅の広い分野で、CAでは星のスペク

トルからほとんど臨床医学に近いところまで、およそ物質に関係のある情報を80のセクションに分類して収録しているが、最近の世界的な研究動向を反映して、環境問題と生化学に関する情報が多い。化学情報協会は広い意味での化学の情報機関として、情報の取得や情報源についての問い合わせ、文献複写、翻訳など総合的なサービスも行っている。

### STN International(略称STN)

STNは米国のChemical Abstracts Service、ドイツのFIZ Karlsruhe、日本の科学技術振興事業団が専用通信回線で結ばれた国際科学技術情報ネットワークで、それぞれのセンターに物質情報、文献、ファクト、ビジネスなどいろいろな情報が搭載されており、ユーザーは地域を意識せずにすべての情報にアクセスできる。これらの情報は、データベース(ファイルという)の形で、搭載され、探したい情報の種類によって、組み合わせて検索できる。全部で200以上のファイルがあるが、そのうち本誌の読者に興味があると思われるものを、表1に物質・ファクト情報のファイル、表2に文献情報ファイルとして掲げた。

ごく単純な検索の例を示そう。「環境ホルモン(内分泌擾乱物質)、変異原物質としてのビスフェノールA」に関する文献を探すことにする。キーワードとしてはENDOCRINE DISRUPTOR, HORMONE DISRUPTOR, MUTAGEN, IMMUNOLOGY, TOXICOLOGY, GENOTOXICITY, CARCINOGENなど多数が考えられるので、これらの同意語や語尾変化を考慮に入れる。ビスフェノールAのCAS登録番号、80-05-7も検索語とする。もしもみつかる文献が多すぎたら、さらに絞り込めばよい。

200以上もあるファイルのうちどれに目的の情報があ

表1 STN International のデータベース (ファイル) :  
化学物質・ファクト情報を収録するファイル(抜粋)

ファイル名	収録物質	収録開始年	収録物質数
BEILSTEIN	有機化合物, 有機金属化合物	1779	7,268,893
CHEMLIST	各国の既存化学物質台帳, 規制物質	1979	207,445
MSDS-OHS	化学工業で頻繁に使用されている物質	1984	56,700
REGISTRY	既知の特定化学物質(有機, 無機, 核酸, タンパク質, 合金など)	1957	18,155,335

表2 STN International のデータベース: 文献情報ファイル(抜粋)

ファイル名	収録情報	収録開始年	収録件数
BIOSIS	世界の生命科学と生物医学分野	1969	11,439,268
CA, CAPLUS	世界の化学, 化学工学の雑誌論文と特許	1967	14,661,282
CABA	世界の農学とその関連分野	1973	3,565,457
CANCERLIT	生物医学的などの観点からの癌	1963	1,409,001
DDFU	医薬品の合成, 開発, 評価, 製造, 使用	1983	788,500
EMBASE	世界の生物医学と薬学	1974	7,293,502
FSTA	食品科学と食品工業	1969	520,978
HEALSAFE	環境, 産業, 労働, 運輸, 航空宇宙, 医学その他の安全情報	1981	111,374
IPA	世界の薬学, 健康関連	1978	286,738
JICST-EPLUS	日本で発行された科学技術医学分野の情報	1985	3,564,120
MEDLINE	世界の医学と薬学	1966	9,578,943
TOXLINE	医薬品などの化学物質の薬理, 生化学作用, 生理作用, 毒性	1965	2,445,568
PROMT	全産業の会社製品, 市場, 応用技術のニュースレターなど	1978	6,611,782

るかを知るために、STN 全体にわたってキーワードの分布を調べてくれる INDEX という命令語がある。また、生命科学分野の 49 のファイルを一括して BIOSCIENCE というクラスターとして検索対象とすることができる。そこで、

=>IND BIOSCIENCE

と入力してクラスターの索引を呼び出す。つぎに検索命令(S)に続けてキーワードを入力する。

=>S (BISPHENOL (W) A OR 80-05-7) AND (ENDOCRINE (W) DISRUPT? OR HORMONE (W) DISRUPT? ORESTROG? OR MUTAGE? OR GENOTOXIC? OR CARCINOGEN? OR POISON? OR IMMUNOL? OR TOXIC?)

すると、49 種のファイルそれぞれについて、このキーワードで検索すれば得られるはずの文献数が表示される(省略)。そこで、ヒット件数の多い順に並べる命令(D RANK)を入れると

=>D RANK

F 1 2792 USPATFULL  
F 2 401 TOXLINE  
F 3 336 CAPLUS  
F 4 175 TOXLIT  
.

のように、どのファイルに何件の情報が入っているかが

わかる。これらのファイルを検索対象に指定して、あらためて検索命令を入れると、全部で 4687 件がみつかった。いろいろなファイルを検索すると、同じ文献が複数のファイルに収録されていることがあるので、それを検出して、重複除去のコマンドを入れると、正味 3959 件が残った。ビスフェノール A に対する世界的な関心の高さがうかがわれる結果である。

L 8 3959 DUP REM L 7(728 DUPLICATES  
REMOVED)  
ANSWERS '1-336' FROM FILE CAPLUS  
ANSWERS '337-3119' FROM FILE  
USPATFULL  
ANSWERS '3120-3284' FROM FILE  
WPINDEX  
.

ためしに、CAS の文献ファイルである CAPLUS の先頭の文献の書誌事項だけ(抄録は長いので省略)みると、

AN 1998:428585 CAPLUS  
TI The \* \* \* mutagenic \* \* \* activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V 79 cells  
AU Schweikl, Helmut; Schmalz, Gottfried; Rackebrandt, Kirsten

CS Department of Operative Dentistry and Periodo-iodontology, University of Regensburg, Regensburg, D-93042, Germany

SO Mutat. Res. (1998), 415 (1-2), 119-130  
CODEN: MUREAV; ISSN: 0027-5107

PB Elsevier Science B.V.

DT Journal

LA English

のように、検索命令に使ったキーワードの場所を \* \* \* ではさんで表示される。'BISPHENOL A' は標題には含まれていないが、抄録と索引に入っている。

これらの文献のうち、原報を読みたければ、オンラインを接続したまま、複写注文や、翻訳注文ができる。検索の途中で困ったときは、化学情報協会のヘルプデスクへ電話すれば助けてくれる。

### STN 検索を始めるための準備

パソコンと電話、それに通信ソフトが必要だが、通信ソフトとしては STN Express がオンライン検索用とし

て便利である。特に化学物質情報を部分構造式から検索するとき、パソコンで構造式を簡単に組み立てられる。

あとは STN との事前契約をしておけばよい。STN の姉妹版でインターネット経由で使える STNEasy は、画面の指示に従ってクリックしていく人でも、マニュアルなしで相当程度の検索ができる。ただし使える機能はある程度限られている。しかし、その一方で、インターネットの長所を生かして、得られた文献リストのうち原報を読みたいものをクリックすれば、その場で呼び出しができる(ChemPort サービス、現在アメリカ化学会、Springer Verlag など 8 社の雑誌に限る)。

### 問い合わせ先

(社) 化学情報協会情報事業部 Tel 03-5978-3601, Fax 03-5978-3600

### 参考書

千原秀昭・時実象共著「化学情報: 文献とデータへのアクセス」東京化学同人、1998 年

## 天津市薬品検験所での2カ月

坂本 豊

国際協力事業団 短期専門家 〒560-0051 豊中市永楽荘1-10-40

### Experiences for two months in Tianjin Municipal Institute for Drug Control

Yutaka Sakamoto

Expert of Japan International Cooperation Agency (JICA)  
1-10-40, Eirakuso, Toyonaka 560-0051, Japan

#### はじめての街

橋の上で、大人が手伝いながら子供たちがトビやサカナの形の凧を揚げている。川岸には6階建てのアパート群が並び、川面に映え、全く枯れ木の並木の上には、滑らかな曲線を描く東洋一(415m)のテレビ塔、4車線の舗装道路を自転車やバスやトラックやダンプカーを上手に避けて走る黄色の軽ライトバン型タクシーのけたたましい警笛。3月なのに真っ赤な切り口を見せたスイカが、パイナップル、イチゴ、サクランボ、ミカン、リンゴ、ブドウや輸入品のバナナ、マンゴ、オレンジやスウィーティなどとともに色鮮やかに並んでいる。屋台やリヤカーの店で料理を待つ人、大きな鉢の熱い豆乳を飲みながらベンチに座って食べている人たち。

中心部に入ると30数階の高層のマンションや新聞社やビジネスビルが、古い煉瓦造りの向こうに聳え建ち、さらに麦当勞(マクドナルド)や肯德基(ケンタッキー)の文字に驚き、そしてあちこちで道路を占拠した、何でも売っている自由市場の店先に、子羊や豚以外に、ウサギや巨大なネズミや蛇が、鶏や鳩や白い烏骨鶏とともに調理されるのを待っている。人々の声高に早口で話す言葉や厚めの冬の服装が、今、中国にいるのだと教えてくれる。公園では、帽子をかぶり杖をついたお年寄りがベンチにずらりと並んで座っており、近くでは丸く大きな駒を使って中国将棋をしたり、トランプをする人たち。暖かな日差しの午後、赤色の多い幟や垂れ幕、北京空港に着き、高速道路をJICAの車で2時間足らずで走って来た天津の街の二日目の印象だった。

#### プロジェクト

天津は北京の隣で同じく河北省にあり、面積は北京と合わせて四国くらいの広さ。北京、瀋陽とともに中国政府の直轄地で、化学品、金属製品、繊維製品等の製造会社とともに多数の製薬会社があり、天津港を通じ毎年大量の中薬(漢方薬)および西薬(新薬)を国内外に販売している。天津市薬品検験所は中国衛生部(厚生省に該当)から輸出入港における医薬品の検査業務を授権され、天津市衛生局の監督の下、法定医薬品の品質管理ならびに検査業務を行っている。日常業務は①医薬品の行政抜き取り検査、②輸出入医薬品の検査、③製造業者の品質管理、試験規格に関する指導および監督、④申請医薬品の試験規格の作成、指導および一部医薬品の承認審査、⑤中国衛生部の医薬品行政に分担参加し、中国薬局方、衛生部承認医薬品の試験規格等の検討審議、⑥以上に関する技術研究、である。なお、北京にある中国衛生部直属の中央薬品検査所は主に研究を行っている。

中国では国家をあげて医薬品の安全性と有効性を保証するために、品質管理と試験検査業務の強化を図っている。このような背景の下で「天津医薬品検査技術プロジェクト」は1993年11月に発足した。実施機関は天津市薬品検査所で、天津市人民政府・科学技術委員会がプロジェクト実施のすべての責任を負っている。日本側の協力機関は厚生省薬務局、国立医薬品食品衛生研究所(以下国立衛研と略記)、国立感染症研究所(旧予研)、大学、各地衛生研究所など、有識者で構成する国内委員会の下で国際協力事業団(JICAと略記)が5年間にわたり、長期・短期の専門家派遣、機材の供与、赴日研修生の受け入れなどを行っている。幸い日中関係者の尽力によりプロジェクトは成果をあげ、天津市薬品検査所を設備や人材の面で強化した。ただ、初期はどちらかというと化学系の

表1 こわいもの(調査 天津市薬品検査所職員)

順位	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
女性	大気汚染	水質汚染	偽食品	ウイルス	火災	偽薬品	病原菌	有毒物	煙草	暴徒	食中毒
男性	大気汚染	水質汚染	偽食品	病原菌	食中毒	火災	エイズ	有毒物	食品添加物	X線	ウイルス
総数	大気汚染	水質汚染	偽食品	ウイルス	火災	病原菌	偽薬品	有毒物	食品添加物	食中毒	煙草

総数には女性、男性、男女不明の合計を示す。

強化が主で、微生物や培養細胞を用いる *in vitro* 試験や動物を用いる試験など生物系は後半に残されていた。今回、国立衛研から、天津市薬品検査所でエイムス試験を指導する人を探しているとのお話があり、私が3~4月の2ヶ月間 JICA から派遣された。所属する武田薬品にはフィンソロピー休職制度(ボランティア活動あるいはその準備のための休職制度)があり、その適用第1号だった。

### 準備の日々

国立衛研に半年間滞在していた韓 晶さんと E-mail で打ち合わせ、持参する機材の振盪機から  $\gamma$  線滅菌ペトリ皿、試薬まで 200 アイテム以上を準備した。間に合うように JICA と会社から発送した段ボール 10 箱の機材は中国に到着したが、中国の税関のコンピュータから JICA の名前が消えたとかで、検査所の担当者が連日北京のお役所に通って再度輸入と免税の手続きをし、やっと 3 月中旬過ぎに入手できた。

荷物到着まで、直接指導するカウンターパートの韓晶さんや華小東君に手伝ってもらい、過去に検査所に引き渡され保管されていた分光光度計や pH メーターや超音波洗浄器などの実験に必要な機器の点検、実験室の無菌作業環境への整備、白衣や履き物の室内外での交換や手指の消毒や実験室の薬液清掃などの手順決定、現地購入機材の準備と点検、近藤宗平先生に倣って「こわいもの」についてのアンケート調査、エイムス試験や SOP についての薬理室対象のセミナーなどを実施。セミナーは 2 ヶ月間に検査所以外の人も対象にした内分泌擾乱物質も含む「化学物質と健康」や「安全性試験施設の管理」など 3 回行ったが、いずれも中国語の OHP 作成と当日の通訳は優秀な姜 成君(瀋陽の中国薬科大卒)に依頼。カウンターパートの韓 晶さん以外にも唐元泰主任(副所長)以下日本語のわかる方が薬理室に数人おられ、日本人専門家には中国語の達者な藤井 晃調整員、日本語の上手な左 紅秘書、そして中国語を勉強中のリーダーの内藤克司先生(元国立衛研・毒性部)や大屋和美先生(第一製薬)、高橋佐喜子先生(元予研)もおられたので検査所では日本語で会話し、使った中国語は 20 単語くらいだった。

### 検査所にて

明日停電と前日に聞いて、-80°C のフリーザーの温度

上昇を心配しながら 3 月 6 日(金)に出勤すると 9 時になつて范積芬所長(女性)以下本館の前に人集りし、音楽まで鳴り出した。聞くと、次の日曜日が国際婦人の日で祝日だから、今日は記念運動会とのこと。布ボールを投げてバケツに入れるゲームや縄跳び、足で蹴る羽根突き、そして綱引きまであった。白衣を着た所員が子供も交えて参加し、女性コックの高さんも参加した綱引きは必ず女性チームが勝つて歓呼の声を上げていた。

出勤すると突然行事があることはたびたびで、周恩来生誕百周年記念映画鑑賞会、新築周恩来記念館の見学、全職員受講の講習会と資格試験、近隣チームとの卓球大会など、私たちが当日か前日に知るのはしばしばだった。私たちも招待されて映画会に参加し、また、所長や王均有副所長(党書記)に案内されて、水上公園近くにできた立派な建物の周恩来記念館に出かけた。政府首脳も見学してテレビで放映され、メーテーが近い 4 月末には、北京方面から十数台のバスを連ねて見学にきていた。

私のいた旧館ではちょうど改造が始まり、JICA の援助で 1 階に情報処理設備や移動式書架がある図書室、2 階にクリーンとダーティエリアに分かれた動物室が 4 月に完成。動物室は人も物も一方通行だが、家庭用エアコン、カーテンのない明るい窓など、動物への影響が心配される。SPF 動物は北京で入手可能とのことであった。

所長の許可を得て実施した「こわいもの」調査(表1)では約 200 名の職員に対して、約 30 から一人 5 つ以内を選んでもらったが、男性 18、女性 45、不明 11 の回答があり、原子力発電所、ピストル、交通事故、煙草、X 線、着色料、アルコール飲料などの日米で高い項目ではなく、大気汚染、水質汚染、偽食品、ウイルス、火災、病原菌、偽薬品(売れ筋商品の偽物や無許可薬品)や日本のニュースが伝わった大腸菌 O-157 などによる食中毒などだった。

日本と異なる制度や慣習は沢山あったが、興味があつたのは次期の主任や所長が早くから決まっていることで、女性であつたり、とても若かったりするがすでに堂々とした態度や、素早い決断力などを身につけており、「長」に絶対的な権限があることと併せて、中国においては弊害よりもメリットが多いのではないかと感じた。

### 実験室で、その1

S9 と cofactor は、ドライアイス詰めで持参した。菌株も従来の日本のガイドラインの 5 株に TA 97 a,

TA 102, WP 2/pKM 101, WP 2 uvrA/pKM 101 の 4 株、合わせて 9 株を凍結して持参した。これらの菌株の準備は日本バイオアッセイ研究センターの荒木室長にお世話になった。現地で入手できない試薬は和光純薬から購入し、文房具や白衣とともに個人で郵便局から送り、10 日ほどで到着し、天津駅近くの国際郵便局で受領された。

JICA に納入されたニュートリエントプロス(NB)はエイムス試験に不適当なロットのため、当社の松村主席研究員を通じて関東化学の久保さんに適切なロットの送付を依頼し、同時にとりあえず使う分を料金は高いが確実に届く宅配便で送ってもらった。連絡に FAX を利用したが高いので、以後は E-mail を利用した。急ぐ場合も、実験関連で尋ねる場合も、また会社や友人など多くの方に連絡する場合も E-mail はとても便利だった。天津では個人加入でき、日本人専門家室の 1 台と薬理室の 1 台もプロバイダーに接続されていたが、私は個人で AT & T Jens の world roaming 可能なアドレスをっていたので、日本のアドレスのまま、SONY の VAIO 726 をホテルの部屋から北京につないで使い、混む時間帯や別の原因で北京につながらないときは直接日本につなぐこともでき、送受信をまとめてすれば料金はあまりかかりなかった。検査所とは今でも E-mail をやりとりしており、手順書作成などに協力している。

4 月以降、JICA の援助で、若い郭成明副所長を責任者として急ピッチで LAN の構築が進められていたが、パソコンは増えるものの、電話代を含む維持費は中国側負担のため、使用者は限定されるようだった。

### 実験室で、その2

菌の特性検査や種菌凍結保存、陽性対照溶液凍結保存や培地調製、実験は労働省のガイドブックの最新の原稿に従って実施したが、寒天平板はやかんでまいたり、菌株の培養は over night で行うなど、少し現場に合わせて修正した。

寒天平板を作製する実験台が凸凹だと、どこからか大きな板を探してきたり、ざらざらした床の消毒清掃がしやすいように一枚物のビニールシートを床全面に敷いたり、培養後の寒天平板のコロニー計数に、アンプルの異物発見装置を縦から水平にしてガラス板を乗せて作ったり、手指消毒に持参した貴重なヒビテン(70% エタノール加 0.5% 溶液に小片の綿を浸して使用)節約のため、器具滅菌には石炭酸系の消毒薬を準備したり、彼らもいろいろ工夫してくれた。天津にプラスチック製品はあるがエチレンオキサイド滅菌が多く、 $\gamma$  線滅菌のものは入手困難で、セラムチューブや大小遠沈管、ペトリ皿などのように持参するか、無滅菌のものを高压蒸気滅菌して使った。三角コルベットの口ややかんの覆いに使うアルミフィルも持参したが、アルミは貴重品らしく、635 mL の

瓶ビールが 4~10 元、アルミ缶は 350 mL が 12~20 元だった。

その他、役に立ったのは、実験台に敷く片面プラスチックコート吸湿紙、カラーテープ(タイムテープ)、太めの白金線と柄、アルミキャップ、耐熱キャップ付きガラス広口瓶、使い捨てプラスチックピペット、充電式ピペットエイド、各サイズのチップ式ピペットーとチップ、滅菌インディケーター、ハンドカウンター、極細のマジックインク、注射器用使い捨て濾過フィルター、ハンディータイプの pH メーター、電池でも働く小型電子天秤(最大 200 g、精度 0.1 g)、センサー分離型デジタル温度計(200~+80°C)、試験管ミキサー、ステンレス試験管ラックなど。天津では注射筒、メスリンダー、ガラス製品、プラスチック製品、ラップ類、フエルトペン、白衣、ロール綿、ティッシュなどは入手でき、試薬も入手できたが、褐色の固まりが入ったグルコースのように純度に問題があるようだった。

### 実験室で、その3

実験室にはガス配管がきていないので火炎滅菌はアルコールランプを用いたが、プロパンガスボンベの持ち込みは可能で、新館の抗生素室や天津武田薬品有限公司の実験室ではブンゼンバーナーが用いられていた。電気は中国は 220~240 V でプラグの形状は複数あった。中国製の実験機器はわずかな使用経験しかないが、上海から新規購入の隔水式電気恒温培養器(熱媒体用にてっぺんからたっぷり水を入れる)が夜中に 95°C になるなどトラブルがあった。しかも、先払い方式なので、返品や無償修理は難しく、検査所の機材担当者が昔ながらの水銀式レギュレーターを取り付けて修理してくれた。規格外の試験管も返品できないようだった。

薬理室のあるフロアにはドロフトがなく、器具滅菌の煮沸などに困ったこと、実験室が狭く、3 人入ると機器類の発熱と合わせて温度が上昇し、暖房用のスチームはあるがクーラーがないので、まだ 4 月なのに白衣を脱ぎたいくらいだったこと、などの不便な面もあった。

指導内容は一杯なのに実験開始が遅れてはらはらしていたが、やがて焦らないで、向こうのペースに合わせることにした。また、実験も四六時中そばであれこれ指図しないで任せることにした。その分、機器の点検から試薬の管理、実験準備などまで十数種のワークシートの原案作り、セミナーの準備にと専門家室でパソコンに向かった。カウンターパートは「先生大丈夫」といい、準備に朝早く出てきたり、朝から 2 時間おきの連続測定を夜また出てきて完了したり、一生懸命やってくれた。彼らは目下の人といふときにはミスを注意されるとともに傷つく、「任せて下さい」といったときに、途中であれこれ尋ねたり指図するのも嫌がるようで、プライドを持つ研究者だから、新しい技術は最初にきっちりと見本を示し、

後で復習できるように図や文字によるメモを残しながら打ち合わせ、必ず2回は実施して理解してもらうこと、ある時点から信頼して任せるのがうまく行くコツのように思つた。ただ、結果が予想外のときなどは、なぜこうなつたかを言葉で説明するだけでなく、手間はかかるがそれを確認する方法も実地指導し、ともかく、実験もGLPも、生け花のように形から入るというか手と体で覚えてもらうことを重視した。

### 新薬(西薬)ガイドライン

終わり近く、薬理室が依頼を受けた被験物質の試験を実施することになり、唐副所長から中国の新薬(西薬)の前臨床試験についてのガイドライン「新薬(西薬)臨床前研究指導原則彙編(薬学、薬理学、毒理学)」(中華人民共和国衛生部薬政局1993.11作成。制定は1985年?)を見せてもらい、菌株の一部が日本と異なる以外はほぼ同様であることを確認し、菌株の単離と特性検査、そして試験を開始した。TA 97aもTA 102ほどではないが自然復帰変異コロニー数が多く使いにくい菌で、中国で実際にこのガイドライン通りに実施されているのか知りたいと思ったが、副所長の話では、北京でもこの通り行われているとのことであった。

ガイドラインは、第一部 新薬(西薬)薬学研究指導原則、第二部 新薬(西薬)薬理毒理学研究的指導原則、となっている。第一部では新薬名称制定の原則、組成、製造工程、純度、原料や製剤の分析法などについて、原則の注釈では赤外吸収、紫外吸収、核磁気共鳴、質量分析についての記載となっている。第二部では総則、薬理を含む臨床前試験になっている。新薬のための変異原性試験には微生物復帰突然変異試験、哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験、および小核試験が必須で、このうちTA 100, TA 98, TA 97 および TA 102の4株を用いる微生物復帰突然変異試験では最低用量が1  $\mu$ g/plateあるいは0.1  $\mu$ g/plateと決められ、抗菌性などのため結果が不明確のときは哺乳動物細胞を用いる遺伝子突然変異試験を、また、同様にわずかに陽性あるいは疑陽性のときは哺乳動物細胞を用いる遺伝子突然変異試験かショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験を実施してもよい、となっている。CHL細胞を用いる染色体異常試験では異常率10%以上を陽性とし、陽性あるいは疑陽性(異常率5%以上)の場合、げっ歯類優性致死試験あるいは精原細胞染色体異常試験を実施してもよいとされている。3番目の小核試験にはげっ歯類動物を用い、ギムザ染色で疑陽性あるいは弱陽性のときは蛍光染色で確認し、また、骨髄に到達しない薬物の場合は哺乳動物胎児肝細胞での小核試験を実施してもよい。さらに、小核試験で陽性あるいは疑陽性のときはUDS試験あるいはSOS chromotestを実施してもよい、として方法が紹介されている。

他に、新規化学物質、農薬、食品、化粧品の安全性試験のガイドラインもあるそうなので、資料を依頼している。なお、医薬品、農薬、食品などではGLP基準は制定されているが、まだ適用はされていないようだ。

### 毎日の生活

検験所の人たちは早い人は8時前に到着していたが、私たちは9時に迎えのワゴン車がホテルに到着し、5時半まで勤務し、昼休みは12時~13時半(夏は14時まで)だった。私たちは専任コックの高さんが作ってくれる一食25元の暖かい昼食(数種の中華風料理と日替わりスープとご飯にジャスミン茶。金曜日のみご馳走で、水餃子か包子か25cmほどの茹でたシャコの大盛りのいすれかに小豆粥)を食べた。検験所の人たちは弁当を持ってくるか、自宅が近い人は自転車で帰宅していた。検験所の皆さんにはジャスミン茶(蓋付きの湯飲みに葉をたっぷり入れ、朝汲んだポットのお湯だけ繰り返し追加する)と一緒におやつもよく食べ、カボチャやスイカの種子、イチゴ、1個20~30元(1元約17円)の大きなスイカやゴマを飴で固めたお菓子、甘い小麦粉の棒をねじって油で揚げた天津名物の十八番街麻花、甘栗などいろいろで私もおすそ分けにあづかった。

平日の朝食はフランス系の巨大なスーパーマーケット(超市)などで買ったパンやお菓子やチーズやヨーグルトや自由市場で買った果物や温室物のトマトやキュウリなどを食べ、休日は洋華バイキング形式のホテルの朝食を食べ、治りにくい風邪をひいたときは持参のご飯パックとおいしい凍結乾燥の味噌汁を電子レンジで温めた。カップラーメンは韓国製か中国製で、トウガラシが辛かった。長期滞在者の中にはホテルやマンションで、電磁調理器を用いてご飯を炊く人もいた。

天津にはレストランが多く、突然の宴会も含めていろいろな所へ行ったが、昼の会食も含めて同じ所はなかつた。韓国料理や日本風居酒屋以外は中華料理だが、羊のシャブシャブや天津ダック、狗不理の包子などとともに、以前は嫌われた生きの良い海の魚介類もよく食べた。

売っているお菓子や飴類は、甘い物よりも塩っからいが甘酸っぱいものが多く、品質のよいものとして台湾の梅製品やスイカの種子やお菓子類もよく見かけた。

中国で水道水は飲まない方がよく、トイレが水洗式でない問題もあって肝炎が流行しており、濡れたコップなどは日本人だけでなく中国人も紙ナプキンできれいに拭いていた。

街で見かける漢字は簡体字が多く、使用されている六千以上の漢字の内、日中で異なる字体は600以上で、文字の一部分の略字、発音が同じ当て字、形を大雑把にまねた字などが存在し、日本や台湾、香港、韓国などで使用の漢字と表意上の共通性が崩れることになり、将来問題にならないか気になった。

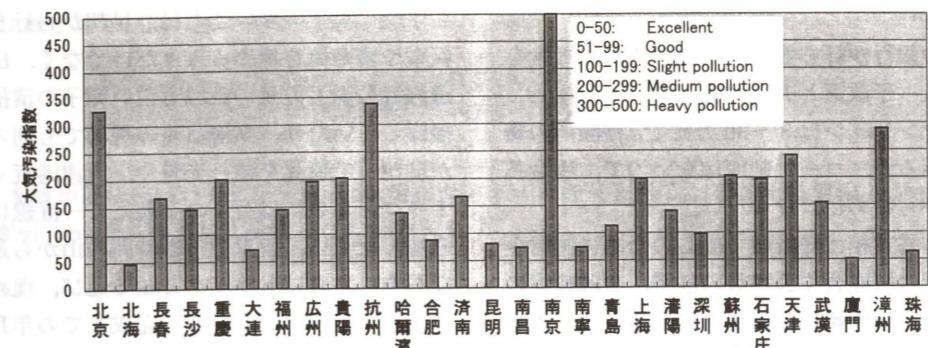


図1 中国主要都市における大気汚染状況 (1998.4.17-4.23. China Daily から)

### テレビ

ホテルでは衛星中継によりNHKもCNN(香港)も韓国語放送も見ることができ、時差の関係で時計上は1時間早く見られるニュースや「甘辛しゃん」も見たが、大抵は北京か天津の放送を見た。

中国のTVはコマーシャルを含めて日本とそんなに変わらないが、早朝から深夜までいすれかの局で抗日関係のドキュメントやドラマ、映画を放送しており、戦争の被害については、日本人の行かない田舎に行っても、日本軍との戦いを村の老人が話し出す。天津市内には旧日仏英などの租界が残っているだけでなく、その時代のことを覚えている人も多く、忘れかけている私たち日本人と差が開いていくようにも感じた。特に今年は周恩来生誕百周年で多いようだった。中国のテレビや新聞では現在の日本のニュースは少なく、「リーベン(日本)」と聞こえると、すぐに見たが、竹下登氏が北京を訪問して歓迎されたとか新しい保守政党ができたとか政治か経済関係が多く、英字新聞では皇太子ご夫妻が明石大橋の開通式に出席されたことを報じた。ニュース特集では、偽薬に絡んで、学力増進の薬を飲んだ小学生が多数救急車で運ばれる事件があり、砒素か鉛中毒のようだった。

### 自然と風俗

着いたときは全くの枯れ木だった並木道は柳の仲間からうっすらと色づき、ポプラとなり、綿が飛び、帰国時には鮮やかな緑に覆われた。モモの1種に始まった花は、レンギョウ、モモ、サクラ、ナシ、ハナミズキなどと続き、帰るときは市内の至る所に植えられた天津の花のバラが、蕾が今にも開きそうな状態だった。街は広いので、道路の多くが4車線以上の車道とその両側の自転車道、そのまた両端に並木に覆われた歩道があり、その中の大きな樹には中国で大切にされるカラスのようなカササギの巣がある。自転車道にはリヤカーもバイクも走り、広い歩道にはわずかな道具の自転車修理や合意鍵作り、中学生受験問題売り、花屋、証券新聞売り、飲料水売り、果物売り、食べ物屋などがあり、道によっては新聞の掲示

板、公衆電話、また、小物やCD売り、記念切手売りもいた。ポケットベルや携帯電話を持つ人も見かけた。

郊外への道は両側に大きな溝が掘られていたが、市内の道には雨が少ないせいか雨水溝がなく、3月18日に到着後はじめて雨が降ったときは、翌朝道が凍り、両側の自転車道が使えず車道に出てきたため混乱し、いつも車で15分で到着するのが45分かかった。

市内には冬には凍結してスケート遊びのできる大きな海河(ハイファ)や中心部を取り囲む直線状の河や、湖や池もあるが、いずれも黒っぽく、強い日差しの日には硫化水素のような臭いがした。しかし、アヒルが泳ぎ、魚も棲んでいるようだった。アンケートの結果でもわかるように、天津では大気汚染と水質汚染対策が重要課題のようだ。China Dailyに毎週出る大気汚染指数(図1)。石炭の煤塵や黄砂などの粒子や排気ガスの窒素酸化物などを数値化。汚染度の高い都市は毎週変動)では天津は北京より低いが、暖房に石炭を使うせいか黄砂のため朝日は肉眼で見ることができた。北京の北海公園では、ウエディングドレスを借りて、華やかな高級自動車を背景に結婚写真を写す何組もの若い夫婦がおり、西太后の別荘の頤和園では中国人の団体が外国人以上に多く、ビデオ撮影係が付き、また、ミニスカートやアフロヘア、アイスクリームやアイスキャンディの食べ歩きなど、日本と変わらぬ風景も見た。

### 豊かな暮らし

3月にスイカが食べられるなど天津に全国から生鮮食品が集まるようになったのは、ここ3年以内で、道路と物流関連システムが整備されてからだそうだ。

天津ではマクドナルドで12元以上のハンバーガーや10元のマックシェイクがよく売れ、いつも満員で、最近開店した伊勢丹では日本から輸入した電気製品や時計や食器や衣類や化粧品を売り、連日見物客も含めて満員だったが、中のヘアサロンではカットだけで40元(日本人技術者なら110元)、パーマや染髪なら最高300元(日本人技術者だと500元)払う人たちでいっぱいだった。私の散髪は、街で洗髪もひげ剃りも付けて20元。自由市場な

ら10元以下らしい。

中国では沢山の銀行が軒を並べ、数%の年利で貯金を集めている。一人っ子政策と夫婦共稼ぎで収入は増え、他方アパートやマンションは3~30万元で、検査所の職員にも購入者がいるが、ローン制度はないので、現金払いとなり、貯金から始めねばならない。

上海出身の朱鎔基首相は経済建て直しのために国営企業群の整理、省庁の統廃合や公務員の削減、金融政策の見直し、住宅ローンの開始など消費活動の活性化、等を掲げて、元を切り下げるに国際社会の中で中国の力を維持していくとしている。新聞やテレビでは、就任早々欧州に飛び、英国やフランスの銀行関係者や経済界と接触して融資を取り付けたり、イスラエル経済界からの客を迎えるなど、活発な動きが報道されていた。

次々高層ビルが建設されている反面、工事を中止して荒れているところもあり、地元資本の百貨店では、冬物衣料を2~3割値下げしているが売れていない。輸出が落ちて、国内に商品があふれ、衣料、プラスチック製品、電気製品だけでなく食品もそれほど売れていないようだった。超市の売上げも3月以降落ちてきているらしい。この時期に公務員の削減は難しいだろうが、省庁の統廃合や国内消費の拡大政策は避けられず、事実、帰国時に衛生局と科学技術委員会関連の機構改革で天津でも看板の書き換えと人事異動があった。

中国に着いて真っ先に感じたのは広さと人の多さで、デパートでも検査所でも日本の2~3倍の職員で、無駄と思ったが、実は雇用の平等化で、4人で一人分の給料(日本の約1/25)だと気づいた。検査所でも所長の給料は所員(約500~700元)の約3倍しかなく、他方外資系企業ではその2倍から10倍以上だそうだ。

中国に人手の多いことは、早朝から行き交う沢山の自転車や繁華街を埋める人々だけでなく、広い北京市内の道路も公園も万里の長城も白い帽子の清掃係がきれいに掃除していたり、高層ビルの現場でも朝の6時から大勢が群がって煉瓦を積む光景や、天津港近くで、湾岸の何十キロ、ときには百キロを超えて一直線に続く舗装道路を進んだ先に、貨車で十数時間の山から運んできた大きな石を、さらにトラックと船で運び、埋め立て地の護岸に人手で積み上げている、完成までの年月を考えるとまるで万里の長城の再現のような広大な現場を見たときにも感じた。

しかし、一方ではマクドナルドできびきびと働く学生や、JICAプロジェクトや外資系企業で働く人々が増え、効率と給与の関係を理解すれば、優秀な人が多く、資源があり、国際社会を知る指導層もいるので、現在の中国だけを見て将来の評価を誤ってはならないと感じた。

### 帰国して

成田空港に着いた翌日、国立衛研に報告のため訪れた時、中国と同じように紫の桐の花が咲いていた。いや、全く同じではなく、10m離れているのに快い香りが感じられたのである。天津では木々に次々と花が咲いたが、思い出すと香りは全く感じられなかった。それも大気汚染の影響だったのだろうか。

さて、ここには見聞したり考えたことのごく一部しか書けなかったが、天津での貴重な体験ができた。今回のチャンスを与えて下さった国立衛研の祖父尼部長、能美室長、さらに寺尾所長をはじめとする国内委員会の先生方、プロジェクト関係者、そして天津市薬品検査所の皆さんに心から感謝します。謝謝。

Environ. Mutagen Res., 20: 247-252(1998)

Act 活性物質と環境工学

Eco 化学物質と環境問題

Ecological and Toxicology

and Organism and Environment

ETS 有害物質と環境問題

EW 環境と危険物質

Environmental and Hazardous

EW

CIA	Chemical Industries Association	(英) 化学工業協会	EPCRA	Emergency Planning and Community Right-to-know Act	緊急計画・地域社会知る権利法(SARA タイトルIII)
CIIT	Chemical Industry Institute of Toxicology	(米) 化学工業毒性学研究所	ESCA	Economic and Social Committee	(欧) 経済社会評議会
CIM	Convention Internationale concernant le transport des Marchandises par chemins de fer	鉄道貨物輸送に関する国際合意	ETAD	Ecological and Toxicological Association of the Dyes and Organic Pigments Manufacturers	生態系・毒性に関する染料および有機顔料工業協会
CMA	Chemical Manufacturers Association	(米) 化学品製造者協会	ETS	Emergency Temporary Standard	緊急暫定基準
CMR	Chemical Marketing Reporter	(雑誌名)	ETUC	European Trades Union Confederation	欧洲労働組合連盟
COT	Committee on Toxicity and Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment	食品・消費者製品・環境中の毒性と化学品に関する委員会	EU	European Union	欧洲連合
CPB	Chemicals in Progress Bulletin	(米国 EPA 発行の文書名)	EW	Environment Week	(雑誌名)
CPR	Controlled Products Regulation	(加) 管理製品規則	FACOSH	Federal Advisory Council on Occupational Safety and Health	(米) 労働安全衛生諮問委員会
CPSA	Consumer Products Safety Act	消費者製品安全法	FAO	Food and Agricultural Organization	国連食糧農業機関
CPSC	Consumer Products Safety Commission	消費者製品安全委員会	FCN	Food Chemical News	(雑誌名)
CRR	Chemical Regulation Reporter	(雑誌名)	FDA	Food and Drug Administration	(米) 食品医薬品局=HHS
CSIN	Chemical Substances Information Network	化学物質情報ネットワーク	FFDCA	Federal Food, Drug and Cosmetic Act	連邦食品・医薬品・化粧品法
CSMA	Chemical Specialities Manufacturers Association	(米) 特殊化学品製造者協会	FHSA	Federal Hazardous Substances Act	連邦有害物質法
CUI	Chemical Use Inventory	(米) 化学品使用インベントリー	FIFRA	Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act	連邦殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法
CW	Chemical Week	(雑誌名)	FMC	Federal Maritime Commission	(米) 連邦海事委員会
CWA	Clean Water Act	水質清浄法	FOIA	Freedom of Information Act	情報自由法
DAO	DENR Administrative Order	(比) DENR 行政命令	FQPA	Food Quality Protection Act	食品品質保護法
DEA	Drug Enforcement Administration	(米) 麻薬取締局	FR	Federal Register	(米) 連邦公報
DENR	Department of Environment and Natural Resources	(比) 環境天然資源省	GAO	General Accounting Office	(米) 会計検査院(議会)
DHHS	Department of Health and Human Services	(米) 保健福祉省=HHS	GATT	General Agreement on Tariffs and Trade	関税および貿易に関する一般協定
DIG	Data Interpretation Guides	(OECD) 試験データ解析手引	GEF	Global Environment Facility	地球環境基金
DOA	Department of Agriculture	(米) 農務省=USDA	GLP	Good Laboratory Practice	優良試験所規範
DOC	Department of Commerce	(米) 商務省	GMP	Good Manufacturing Practice	優良製造規範
DOL	Department of Labor	(米) 労働省	GRAS	Generally Recognized as Safe (Substances)	一般に安全と認められる(物質)
DOT	Department of Transportation	(米) 運輸省	GWP	Global Warming Potential	地球温暖化係数
DSL	Domestic Substances List	(加) 国内物質リスト	HAP	Hazardous Air Pollutant	有害性大気汚染物質
EC	European Commission	欧州委員会	HCS	Hazard Communication Standard	危険有害性周知基準
EC	European Communities	欧州共同体	HHS	Department of Health and Human Services	(米) 保健福祉省=DHHS
ECA	Enforceable Consent Agreement	強制力のある同意協定	HMIP	Her Majesty's Inspectorate of Pollution	(英) 汚染監察部
ECB	European Chemicals Bureau	欧州化学品局	HMIS	Hazardous Materials Information System	危険有害性情報システム
ECCMF	European Council of Chemical Manufacturers Federation	欧州化学品製造者連合評議会	HMR	Hazardous Materials Regulations	有害性物質規則
ECDIN	Environmental Chemicals Data and Information Network	EC 環境化学物質データベース	HON	Hazardous Organic NESHAP	有害性有機 NESHAP(CAA)
ECE	United Nations Economic Commission for Europe	国連欧州経済委員会	HPA	Hazardous Products Act (CANADA)	(加) 危険有害性製品法
ECETOC	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals	欧州化学物質生態毒性および毒性センター	HPB	Health Protection Board	(加) 健康保護局
ECN	European Chemical News	(雑誌名)	HPVC	High Production Volume Chemical	高生産量化成品
ECR	Euro Chemicals Report	(雑誌名)	HSC	Health and Safety Committee	(英) 健康安全委員会
EDCEL	European Dangerous Chemicals & Environment Law	(雑誌名)	HSE	Health and Safety Executive	(英) 健康安全局
EDC	Endocrine Disrupting Chemical	内分泌擾乱物質	HSIA	Halogenated Solvents Industry Alliance	ハロゲン化溶剤工業連盟
EDF	Environmental Defence Fund	環境防衛基金	HSWA	Health and Safety at Work etc. Act	(英) 労働衛生安全法
EDSTAC	Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee	内分泌擾乱物質スクリーニングおよび試験諮問委員会	IAEMS	International Association of Environmental Mutagen Societies	国際環境変異原性学会
EEA	European Economic Area	欧州経済地域	IAES	International Association of Environmental Safety	国際環境安全性学会
EEB	European Environmental Bureau	欧州環境団体事務所	IARC	International Agency for Research on Cancer	国際がん研究機関(WHO)
EEC	European Economic Community	欧州経済共同体	IATA	International Air Transport Association	国際航空輸送協会
EFTA	European Free Trade Association	欧州自由貿易連合	ICAO	International Civil Aviation Organization	国際民間航空機関
EHC	Environmental Health Criteria	環境保健クライテリア(IPCS)	ICCA	International Council of Chemical Association	国際化学工業協会協議会
EHS	Environmental Health Service	(米) 環境衛生局(HHS)	ICPEMC	International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens	国際環境変異原性および発がん性物質防護委員会
EINECS	European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances	欧州既存商業化学物質 インベントリー	ICSC	International Chemical safety Cards	国際化学物質安全性カード(IPCS)
ELINCS	European List of Notified Chemical Substances	欧州届出新規化学物質リスト	ICWU	International Chemical Workers Union	国際化学労働組合
EMAS	European Union's Eco-Management and Audit Scheme	欧州連合環境マネジメントおよび監査スキーム	IER	International Environment Reporter	(雑誌名)
EMIC	Environmental Mutagen Information Centre	環境変異原情報センター	IFCS	Intergovernmental Forum on Chemical Safety	政府間化学物質安全性フォーラム
EPA	Environmental Protection Agency	(米) 環境保護庁	ILO	International Labor Organization	国際労働機関
			IMDG	International Maritime Dangerous Goods (Code)	国際海上危険物(規約)

IMO	International Maritime Organization	国際海事機関	NRC	National Response Center	国家対応センター
IOCU	International Organization of Consumer Unions	国際消費者機関	NRDC	Natural Resources Defence Council	天然資源防護審議会
IOMC	Inter-Organization Program for the Sound Management of Chemicals	化学品の健全管理のための組織間プログラム	NSF	National Science Foundation	(米)国立科学基金
IPCS	International Programm on Chemical Safety	国際化学物質安全性計画(WHO)	NSPS	New Source Performance Standards	新規発生源実施基準(CAA)
IPCC	Inter-Governmental Panel on Climate Change	気候変動に関する政府間パネル	NTIS	National Technical Information Service	(米)技術情報サービス(DOC)
IPPC	Integrated Pollution Prevention and Control	統合的汚染防止管理	NTP	National Toxicology Program	(米)国家毒性プログラム(HHS)
IRIS	Integrated Risk Information System	統合的リスク情報システム	ODP	Ozone Depletion Potential	オゾン層破壊係数
IRLG	Interagency Regulatory Liaison Group	(米)省庁間規制連絡グループ	ODS	Ozone Depleting Substance	オゾン枯渇性物質
IRPTC	International Register of Potentially Toxic Chemicals	国際有害化学物質登録制度(UNEP)	OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
ISO	International Organization for Standardization	国際標準化機構	OEHHA	Office of Environmental Health Hazard Assessment	環境保健有害性評価部(カリフォルニア州)
ITC	Interagency Testing Committee	(米)省庁間試験委員会	OJEC	Official Journal of the European Communities	EC官報
IUCLID	International Uniform Chemical Information Database	(欧州委員会作成の既存化学物質データベース)	OMB	Office of Management and Budget	(米)行政管理予算庁
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	国際純正応用化学連合	OPP	Office of Pesticide Programs	(米)農薬プログラム部
KISCO	Korea Industrial Safety Corporation	韓国産業安全公団	OPPT	Office of Pollution Prevention and Toxics	(米)汚染防止有害物質部
KTCMA	Korea Toxic Chemicals Management Association	韓国有害化学物質管理協会	OPPTS	Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances	(米)汚染防止農薬有害物質局
LCA	Life Cycle Assessment	ライフサイクルアセスメント	OSHA	Occupational Safety and Health Administration	(米)労働安全衛生局(DOL)
LCA	Life Cycle Analysis	ライフサイクル分析	OSHAct	Occupational Safety and Health Act	労働安全衛生活
LOAEL(C)	Lowest Observed Adverse Effect Level (Concentration)	最低有害性影響量(濃度)	OSHR	Occupational Safety and Health Reporter	(雑誌名)
LOEL(C)	Lowest Observed Effect Level (Concentration)	最低影響量(濃度)	OTA	Office of Technology Assessment	(米)技術評価局(議会)
MAC	Maximum Allowable Concentration	最大許容濃度	PAIR	Preliminary Assessment Information Rule	予備的評価情報規則(TSCA 8 a)
MACT	Maximum Achievable Control Technology	最大達成可能管理技術(CAA)	PCL	Priority Chemicals List	(比)優先化学品リスト
MAFF	Ministry of Agriculture, Fisheries and Food	(英)農漁食糧省	PEC	Priority Existing Chemical	(豪)優先既存化学品
MRC	Medical Research Council	(英)医学研究評議会	PEL	Permissible Exposure Limit	許容暴露限度
MSDS	Material Safety Data Sheet	物質安全性データシート	PHS	Public Health Service	(米)公衆衛生局(HHS)
NAAQS	National Ambient Air Quality Standards	国家環境大気質基準	PIC	Prior Informed Consent	事前通報承認(事前の情報に基づく同意)
NACOSH	National Advisory Committee on Occupational Safety and Health	国家労働安全衛生諮問委員会	PICCS	Philippine Inventory of Chemicals and Chemical Substances	(比)化学品および化学物質インベントリー
NAFTA	North America Free Trade Agreement	北米自由貿易協定	PMA	Pharmaceutical Manufacturers Association	医薬品製造者協会
NAM	National Association of Manufacturers	全米製造者協会	PMN	Premanufacture Notification	製造前届出
NAS	National Academy of Science	米国科学アカデミー	PMPIN	Pre-Manufacturing and Pre-Importation Notification	(比)製造前および輸入前届出
NBHW	National Bureau of Health and Welfare	(瑞)健康福祉局	POP	Persistent Organic Pollutant	難分解性有機汚染物質
NCAB	National Cancer Advisory Board	国立がん諮問委員会	PPA	Pollution Prevention Act	(米)汚染防止法
NCEL	New Chemical Exposure Limit	新規化学品暴露限度	PPPA	Poison Prevention Packaging Act	毒物予防包装法
NCI	National Cancer Institute	(米)国立がん研究所	Prop65	Proposition 65 (Safe Drinking Water and Toxic Enforcement Act of 1986)	安全飲料水・有害物質施行法(カリフォルニア州)
NCP	National Cancer Program	国立がんプログラム	PRTR	Pollution Release and Transfer Register	汚染物質排出移動登録
NDSL	Non-Domestic Substances List	(加)非国内物質リスト	PTCN	Pesticide & Toxic Chemical News	(雑誌名)
NEPA	National Environmental Policy Act	(米)国家環境政策法	QAU	Quality Assurance Unit	信頼性保証部門(GLP)
NEPA	National Environmental Protection Agency	(中)国家環境保護局	QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship	定量的構造活性相関
NESHAP	National Emission Standards for Hazardous Air Pollutants	有害性大気汚染物質国家排出基準	RACT	Reasonably Available Control Technology	当然利用可能な管理技術
NFPA	National Fire Protection Association	(米)防火協会	RAL	Deutsches Institut fuer Guetesicherung und Kennzeichnung e. V.	(独)品質保証表示委員会
NICNAS	National Industrial Chemicals Notification & Assessment Scheme	(豪)工業化学品(届出およびアセスメント)制度	RC	Responsible Care	レスポンシブルケア
NIEHS	National Institute of Environmental Health Science	(米)国立環境衛生科学研究所(HHS)	RCRA	Resource Conservation and Recovery Act	資源保護回収法
NIH	National Institutes of Health	(米)国立衛生研究所(HHS)	RID	Reglement International concernant le transport des marchandises Dangereuses par chemins de fer	鉄道による危険物輸送
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health	(米)国立労働安全衛生研究所(HHS)	RMCL	Recommended Maximum Contaminant Level	の国際合意(公的略称はCIM)
NOAEL(C)	No Observed Adverse Effect Level (Concentration)	最大無有害性影響量(濃度)	RSPA	Research and Special Programs Administration	勧告最高汚染物質レベル
NOC	Notice of Commencement of Manufacture or Import	製造または輸入の開始届出	RTECS	Registry of the Toxic Effects of Chemical Substances	(米)調査・特別プログラム局(DOT)
NOEL(C)	No Observed Effect Level (Concentration)	最大無影響量(濃度)	SAB	Science Advisory Board	化学物質毒性データ総覧
NOHSC	National Occupational Health and Safety Commission	(豪)国家労働安全衛生委員会	SAR	Structure Activity Relationship	(米)科学諮問委員会
NPCA	National Paint and Coatings Association	(米)塗料塗装業協会	SARA	Superfund Amendments and Reauthorization Act	構造活性相関
NPDES	National Pollutant Discharge Elimination System	国家汚染物質排出防止システム(CWA)	SDS	Safety Data Sheet	スーパーファンド改正・再承認法
NPL	National Priority List	国家優先リスト(SARA)	SDWA	Safety Drinking Water Act	安全件データシート
NPRI	National Pollutant Release Inventory	(加)汚染物質放出インベントリー	SETAC	Society of Environmental Toxicology and Chemistry	安全飲料水法
NRC	National Research Council	米国研究協議会	SIC	Standard Industrial Classification	環境毒性学および環境化学の国際学会
					標準工業分類

SIDS	Screening Information Data Set	スクリーニング用情報データセット
SNAP	Significant New Alternative Policy	重要新規代替品政策(CAA)
SNUN	Significant New Use Notification	重要新規利用届出
SNUR	Significant New Use Rule	重要新規利用規則
SOCMA	Synthetic Organic Chemicals Manufacturers Association	(米)合成有機化学品製造者協会
SPI	Society of the Plastics Industry	(米)プラスチック工業会
STEL	Short-term Exposure Limit	短時間暴露限度
TXLR	Toxics Law Reporter	(雑誌名)
TLV	Threshold Limit Value	(ACGIHによる許容濃度)
TLV-C	Threshold Limit Value-Ceiling	(TLVの天井値)
TRI	Toxic Release Inventory	(米)有害物質放出インベントリー(EPCRA)
TSCA	Toxic Substances Control Act	有害物質規制法
TWA	Time Weighted Average	時間加重平均
UAW	United Auto Workers	全米自動車労組
UBA	Umweltbundesamt	(独)連邦環境局
UNCED	United Nations Conference on Environment & Development	国連環境開発会議
UNEP	United Nations Environment Programme	国連環境計画
USDA	United States Department of Agriculture	(米)農務省=DOA
VCI	Verband der Chemischen Industrie	(独)化学工業協会
VOC	Volatile Organic Compound	揮発性有機化合物(CAA)
WFCN	World Food Chemical News	(雑誌名)
WHMIS	Workplace Hazardous Materials Information System	(加)作業場危険有害物質情報システム
WHO	World Health Organization	世界保健機関
WSA	Worksafe Australia	オーストラリア労働安全衛生委員会

(案:石館 基, 転載責:須藤鎮世, 協力:下位香代子)

## Author Index (Vol. 20)

<b>A</b> Aardema, M.J. 20; 131 Adler, I.-D. 20; 107 Afshari, C. A. 20; 175 Asanami, S. 20; 71  <b>B</b> Banno, F. 20; 19 Barrett, J. C. 20; 175  <b>E</b> Ebata, J. 20; 45  <b>F</b> Fujikawa, K. 20; 119 Fukagai, N. 20; 45 Furukawa, H. 20; 45  <b>G</b> Gibson, D.P. 20; 131 Goto, S. 20; 29  <b>H</b> Hagiwara, Y. 20; 19 Hasegawa, K. 20; 29 Hayashi, M. 20; 1, 159 Hayatsu, H. 20; 235 Hihara, H. 20; 237  <b>I</b> Ide, H. 20; 187 Isfort, R.J. 20; 131 Ishidate, M. 20; 85 Ishihara, H. 20; 75 Iwasaki, K. 20; 1	<b>K</b> Kamiguchi, Y. 20; 123 Kamiya, H. 20; 195, 213 Kasai, H. 20; 195 Kawaguchi, Y. 20; 75 Kawai, K. 20; 41 Kawanishi, S. 20; 221 Kerckaert, K.A. 20; 131 Kinae, N. 20; 1 Kita, Y. 20; 75 Kodama, T. 20; 83  <b>L</b> LeBoeuf, R.A. 20; 131  <b>M</b> Matsuoka, A. 20; 159 Matsushita, H. 20; 29 Mitsuiki, M. 20; 83 Miyamae, Y. 20; 51 Mori, H. 20; 35 Mori, Y. 20; 29 Morikawa, K. 20; 229 Murata-Kamiya, N. 20; 213  <b>N</b> Nagao, T. 20; 119 Negishi, K. 20; 181 Nonaka, M. 20; 83  <b>O</b> Ohta, T. 20; 11, 51, 75 Ohtsuka, E. 20; 213 Oikawa, S. 20; 221 Okumura, A. 20; 35 Omura, H. 20; 83 Onodera, S. 20; 29	<b>S</b> Saito, S. 20; 19 Sakamoto, Y. 20; 241 Sasaki, Yu F. 20; 51 Sera, N. 20; 97 Setsuda, S. 20; 29 Shibutani, S. 20; 201 Shiga, Y. 20; 11, 75 Shima, A. 20; 113 Shimada, A. 20; 113 Shimamura, M. 20; 75 Shimoi, K. 20; 1 Shimono, K. 20; 71 Sofuni, T. 20; 1, 159 Sugie, S. 20; 35  <b>T</b> Tanisho, T. 20; 1 Tokishita, S. 20; 11, 75 Tsuchiya, T. 20; 19, 129, 149 Tsuda, S. 20; 51 Tsutsui, T. 20; 137  <b>U</b> Ueno, S. 20; 51 Umeda, M. 20; 129, 149 Utsunomiya, A. 20; 29  <b>W</b> Wakabayashi, K. 20; 35 Watanabe-Akanuma, M. 20; 11, 75 Woodgate, R. 20; 11  <b>Y</b> Yagi, T. 20; 1 Yamagata, H. 20; 11, 75 Yamasaki, H. 20; 167
--	---	---

## Keyword Index (Vol. 20)

<b>A</b>		cyclobutane thymine dimer	20 ; 213
		<b>D</b>	
a battery system for mutagenicity testing	20 ; 85	D <sub>20</sub> value	20 ; 85
action of tumor promotion	20 ; 150	damage introduction	20 ; 187
alkaline SCG assay	20 ; 51	detection of carcinogens	20 ; 129, 150
alkylating agent	20 ; 221	DNA adduct	20 ; 201
Ames mutagenicity test	20 ; 29	DNA damage	20 ; 187, 221
Ames test	20 ; 1	DNA polymerase	20 ; 201
antimutagenesis	20 ; 45	DNA repair	20 ; 187
AP-PCR	20 ; 113	DNA repair test	20 ; 41
ascorbic acid	20 ; 83	Drosophila	20 ; 41
<b>B</b>		<b>E</b>	
BALB/c 3T3 cells	20 ; 129, 150	endocrine disruptors	20 ; 159
base excision repair	20 ; 229	estrogen	20 ; 201
base flip-out	20 ; 229	<i>E. coli</i>	20 ; 19
body temperature	20 ; 71	<i>E. coli</i> WP2uvrA	20 ; 75
bone marrow	20 ; 83	<b>F</b>	
<b>C</b>		FISH	20 ; 85
cancer risk assessment	20 ; 168	<b>G</b>	
carcinogenicity	20 ; 51	gap junctional intercellular communication	20 ; 129
catechins	20 ; 45	Genotoxicity	20 ; 35
Cell culture insert DNA retention	20 ; 35	genotoxicity	20 ; 137
cell transformation	20 ; 129, 137, 175	germ-line mutation	20 ; 113
cellular senescence	20 ; 175	<b>H</b>	
chromosomal aberration	20 ; 85	hazard characterization	20 ; 168
chromosome aberrations	20 ; 159		
COD	20 ; 1		
collaborative study	20 ; 150		

<i>hisG428</i> OS	20 ; 11	mouse liver S9	20 ; 159
<i>hisG46</i> OS	20 ; 11	<i>mucAB</i>	20 ; 11
household product	20 ; 29	mutagen	20 ; 1
human spermatozoa	20 ; 123	mutagenesis	20 ; 175, 201
hydrazine	20 ; 181	mutagenicity	20 ; 97
2-hydroxyadenine	20 ; 195	mutagenicity testing	20 ; 123
8-hydroxyguanine	20 ; 195	mutation	20 ; 195, 213
hydroxyl radical	20 ; 45	mutational specificity	20 ; 75
		MX	20 ; 41
<b>I</b>		<b>N</b>	
immortalization	20 ; 175	<i>N</i> <sup>4</sup> -aminocytidine	20 ; 181
importance of DNA chemistry	20 ; 235	2,2'-nitrilodi-2 (2')-deoxy-ascorbic acid	20 ; 113
<i>in vivo</i> genotoxicity	20 ; 51	monoammonium salt	20 ; 83
<b>L</b>		nitroazabenzo[a]pyrene	20 ; 97
liver	20 ; 51	nitrobenzo[a]pyrene	20 ; 97
LSC	20 ; 85	nongenotoxic	20 ; 168
lung cancer	20 ; 97	nongenotoxic carcinogens	20 ; 175
<b>M</b>		non-mutagenic carcinogen	20 ; 137
male-mediated teratogenesis	20 ; 119	<i>N</i> -nitrosodimethylamine	20 ; 45
marine fish	20 ; 1	<b>O</b>	
mechanism of induced mutagenesis	20 ; 235	oligonucleotide	20 ; 187
medaka	20 ; 113	organochloric chemicals	20 ; 159
MeIQ	20 ; 35	1,1'-oxybis [2,3,3,3-tetrachloropropane]	20 ; 29
methoxyamine	20 ; 181	oxidation potential	20 ; 45
microbial mutagenicity test	20 ; 19	oxygen radical	20 ; 221
Micronuclei	20 ; 71	<b>P</b>	
micronucleus assay	20 ; 83	pKM101	20 ; 75
micronucleus test	20 ; 1, 123	promotion of mutagenesis	20 ; 11
Mitogenicity	20 ; 35	pyrethroid pesticide	20 ; 29
molecular epidemiology	20 ; 168	pyrimidine (6-4) pyrimidone photodimer	20 ; 213
mouse	20 ; 71, 83		

pyrimidine dimer	20 ; 229	Syrian hamster embryo cells	20 ; 129, 175
P-nucleoside	20 ; 181	<i>S. typhimurium</i>	20 ; 19
R		T	
reactive oxygen species	20 ; 187, 195	tamoxifen	20 ; 201
repeated hyperthermia	20 ; 71	target organ	20 ; 51
replication errors	20 ; 181	time-course study	20 ; 71
Risk assessment	20 ; 35	transition	20 ; 75
<i>rumAB</i>	20 ; 11	transition mutation	20 ; 181
S		transversion	20 ; 75
sequence-specificity	20 ; 221	TR value	20 ; 85
slow-acting mutagens	20 ; 235	two-stage cell transformation	20 ; 150
solvents	20 ; 19	T4 endonuclease V	20 ; 229
specific-locus test	20 ; 113	U	
sperm chromosome analysis	20 ; 123	ultraviolet	20 ; 213
sperm nuclear FISH	20 ; 123	UV	20 ; 221
spontaneous teratogenesis	20 ; 119	W	
susceptibility	20 ; 119	water contamination	20 ; 159
synergist	20 ; 29	wing spot test	20 ; 41
Syrian hamster embryo(SHE)cells	20 ; 137		

## 日本環境変異原学会入会申込書

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署名を添えて申し込みます。

フリガナ：	
氏名：	<input checked="" type="checkbox"/>
Name (ローマ字つづり)	
生年月日 (性別)	19 年 月 日 (男・女)
所属機関名：	
住所所：	〒
TEL：	FAX：
電子メール：	
Affiliation	
Address	
Belong	
自宅住所：	
電話：	
Home address	
学会誌送付先：	<input type="checkbox"/> ①所属機関 <input type="checkbox"/> ②自宅
学位：	年取得
研究領域 (複数可)	
加入学会名：	

\_\_\_\_\_の本学会への入会を推薦致します。

日本環境変異原学会評議員

(署名)  
日付

印

入会申込書の送付先：〒170-0003 東京都豊島区駒込1-44-2 芥川ビル  
(財)口腔保健協会内 日本環境変異原学会事務局  
Tel. 03-3947-8891 Fax 03-3947-8341

## 日本環境変異原学会 学生会員申込書

[1年間（翌年の3月31日まで）のみ有効です]

年 月 日

### 日本環境変異原学会長 殿

貴学会に学生会員として入会いたしたく貴学会員である指導教官の署名および在学証明書  
(裏面に添付) を添えて申し込みます。

フリガナ：	
氏名：	印
Name (ローマ字つづり)	
生年月日 (性別)	19 年 月 日 (男・女)
校名／学部：	
住所：〒	
TEL：	FAX：
電子メール：	
Affiliation	
Address	
Belong	
自宅住所：	
電話：	
Home address	
学会誌送付先：	①大学 ②自宅
研究領域 (複数可)	
指導教官名：	
連絡先：	

\_\_\_\_\_の本学会への学生会員としての入会を推薦致します。

指導教官

(署名)

日付

印

入会申込書の送付先：〒170-0003 東京都豊島区駒込1-44-2 芥川ビル  
財団口腔保健協会内 日本環境変異原学会事務局  
Tel. 03-3947-8891 Fax 03-3947-8341

## 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」、および「特別企画（受賞講演）」、「論説」、「資料・情報」などを掲載する。なお、投稿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。原則として編集委員会より寄稿を依頼する。

「一般論文」は、変異原に関する独創的研究の原著論文で、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。陰性データも受付ける。

「短報」は、新しい技術の紹介や価値あるデータを含む短い報告とする。陰性データも受付ける。

「論説」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、会員からの投稿によるものとする。

「資料・情報」は、環境変異原に関する調査の結果などをまとめたもの、および公開シンポジウム、分科会の要旨などとする。

（Letter to Editor も受付けます。）

### 2. 投稿資格

共著者のうちの1人は日本環境変異原学会会員でなければならない。ただし、招待寄稿の場合にはこの限りではない。

### 3. 論文原稿の書き方

論文原稿の用語は日本語または英語とし、最新の執筆規定に従い簡潔にわかりやすく書く。総説、一般論文、論説は、写真・図表を含めて刷り上がり8頁以内。短報は4頁以内とする。頁数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. 論文原稿の送り先

論文原稿は正1部コピー2部の計3部を、日本環境変異原学会誌編集係宛に（簡易）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（3.5インチ、使用した機種とソフト名を明記して、テキストファイル形式で保存）を編集委員長宛に送付すること。

### 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がある。ただし、著作者自身が自分の記事、論文などの一部の複製、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) 投稿料は無料とする。ただし規定の頁数を超えることが明らかな場合、頁数の削減を求めることがある。

2) カラー印刷等の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) 別刷りは招待寄稿の場合も含め、すべて著者負担とする。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。

### 論文原稿の送付先

〒170-0003

東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TSビル

インテルナ出版

日本環境変異原学会誌編集係

Tel. 03-3944-2591

Fax. 03-3947-8073

### 最終稿の送付先、その他編集についての問い合わせ先

〒302-0104

茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1-2

伊藤ハム中央研究所

日本環境変異原学会 編集委員長

須藤 鎮世

Tel. 0297-45-6311

Fax. 0297-45-6353

E-mail sutou@fureai.or.jp

## 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。
- 日本文の原稿：  
原稿はA4判用紙に1行約40字、1頁30~31行で印字する(刷り上がりの約1/2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(フルネーム)、所属機関名ならびに所在地を付ける。
- 英文の原稿：  
原稿はA4判用紙にダブルスペースで印字する。1頁25~27行を標準とする。原稿は著者の責任において英語の添削訂正を受けたものに限る。
- 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、固有名詞や遺伝子名などで大文字の使用が必要な場合を除き、原則として小文字表記とする)、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)または結果および考察、結語(Conclusion)、謝辞(Acknowledgments)、参考文献(References)、表、図の説明および図の順序とする。ただし、緒説の記述は、第3頁以下、緒言、1.……、2.……、結語、謝辞、参考文献、表、図の説明および図の順序とする。なお、図と表の説明文はすべて英文とする。
- 学名、遺伝子記号などはイタリックとし、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、化学物質のCAS登録番号を記載する。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)。
- 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、英文の

- 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判の台紙に一枚づつ軽く糊付けする。台紙の下部にFig.(一連番号)を付す。
  - 表は上部にTable(一連番号)と英文の説明を記入すること(文頭のみ大文字)。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。脚注を要するときに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。
  - 参考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。単行本そのものを引用する場合は、編者名、年号、書名、発行所、発行地の順とする。文献の記載方法は下記の例に従う。
  - Ames, B. N., J. MacCann 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。

改訂(1998年9月、下線部)

↑東京↑



トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験に!

## DNAシークエンシング受託サービス

(株)アイシン・コスモス研究所では、お客様の研究をサポートするためにDNAシークエンシングの受託サービス業務を行っております。

### ◆Single Primer Extensionによるシークエンシング

基本料金: ¥12,000/run (納期: お問い合わせ下さい)

一度にお受けするサンプル数に応じて割り引き致します!  
(サンプルの本数や状態に応じて別途お見積り致します。)

### ◆変異解析のためのgpt遺伝子(全長456bp)のシークエンシングの場合に限り累計注文数に応じ、価格をディスカウント!!

《累計注文数》 1run~50runまで 定価 ¥12,000  → ¥10,200/run

51run~100runまで 定価 ¥12,000  → ¥9,600/run

101run~ 定価 ¥12,000  → ¥9,000/run

### ◆変異解析のためのcII遺伝子(全長300bp)のシークエンシングの場合

1runからでも ¥7,200/run 

突然変異部位の解析も別途料金にて承ります!

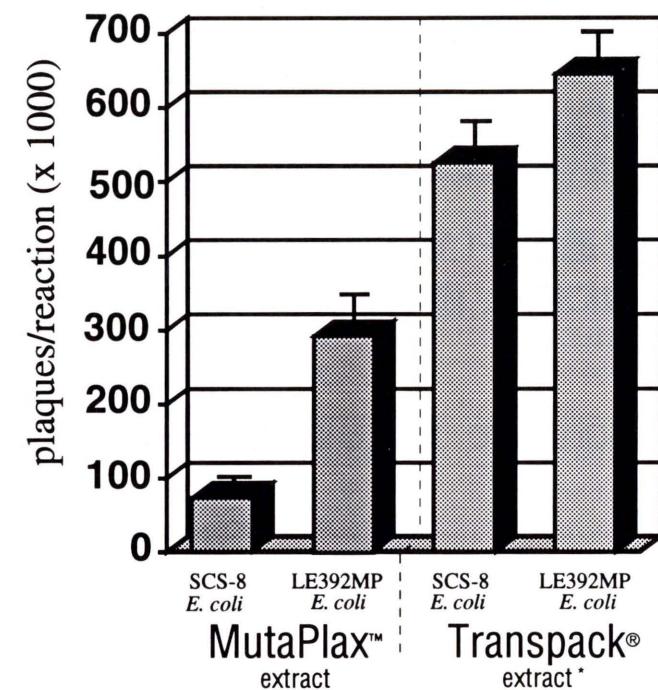
サンプルは、精製DNA・PCR産物の状態でクール宛配便にてお送り下さい(電気泳動のデータの添付をお願いいたします)。

なお、プラスミドは菌体の状態でも別途料金にて受け付けております。

その他、cDNAクローンなどのFull lengthシークエンシングも承っておりますので、お気軽にご相談下さい。

# Make No Mistake!

**Transpack® λ Packaging Extract\***  
**outperforms MutaPlax™ extract**  
**5 to 1 for transgene recovery\***



Now available to researchers using Muta™ Mouse with proof of Muta Mouse purchase.

\* U.S. Patent No. 5,188,957  
 ♦ Using SCS-8 *E. coli* host cells

Big Blue® and Transpack® are registered trademarks of Stratagene.  
 Muta™ Mouse is a trademark of HRP Inc.  
 MutaPlax™ is a trademark of Epicentre Technologies Corp.

**STRATAGENE®**  
 pioneering the future of in vivo mutation research

お問い合わせ先：

**KASHO 加商株式会社**  
 ライフサイエンスグループ

〒103-0024 東京都中央区日本橋2丁目14番9号  
 電話 03-3276-7676 FAX.03-3276-7626  
 E-mail : Tsumoru\_Miyano@kasho.co.jp

**KIKKOMAN S-9**

このS-9は、キッコーマン研究本部で調製されたものです。

## 変異原性試験用凍結S-9

### S-9調製法

家田貿易のS-9は7週令のS口ラットの雄に誘導剤としてフェノバルビタール及び5,6-ベンゾフランボンを腹腔内投与した肝臓から調整したものを標準としていますが、その他の動物種及び誘導剤についても御相談に応じております。

### 保存

S-9は活性の高い酵素系となっておりますので、-80°Cで保存して下さい。まれに解凍後分離することがあります。活性には異常がありませんので、よく攪拌して御使用下さい。

●包装単位：1.5ml × 12本詰 ●特注品、S-9に関して詰容量は4.5mlまでお受けいたします。

### 活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

分 画	測 定 デ タ
S-9 (9,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量 DMN脱メチル酵素活性 アニリン水酸化酵素活性 ベンゾ(a)ピレン水酸化酵素活性
ミクロソーム (105,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量

ロット毎に下記の変異原活性データ(突然変異株数)を添付致します。

薬 物	菌 株 *
ベンゾ(a)ピレン	TA-100、TA-98、TA-1537
2-アミノアントラセン	TA-100、TA-98、TA-1537
9,10-ジメチルアントラセン	TA-100、TA-98、TA-1537
自然発生突然変異株数	TA-100、TA-98、TA-1537

\* Salmonella typhimurium

## エームス試験用凍結S-9MIX

### 特長

- ①エームス試験がより手軽になりました。
- ②S-9にコファクターミックスを加え無菌的に調整しました。
- ③解凍後、直ちにエームス試験にご使用いただけます。
- ④S-9が1mlとコファクターミックスが9ml入っており、20プレート分の試験が可能です。

●包装単位：10ml × 8本、5ml × 4本

Salmonella typhimurium TA-100,  
 Benzo(a)pyrene 5μg/plate



-S-9 Mix



+S-9 Mix

## 染色体異常試験用凍結S-9MIX

### 特長

- ①染色体異常試験がより簡単になりました。
- ②S-9にコファクターミックスを加え無菌的に調整しました。
- ③解凍後、直ちに染色体異常試験にご使用いただけます。
- ④S-9が1.05mlとコファクターミックスが2.45ml入っており、7プレート分の試験が可能です。

●包装単位：3.5ml × 3本

カタログNo.	品 名	包 装	価 格
S-9	変異原性試験用凍結S-9	1.5ml × 12本	¥36,000
S-9 MIX	エームス試験用凍結S-9 MIX	10ml × 8本	¥43,200
S-9 MIXTS	染色体異常試験用凍結S-9 MIX	3.5ml × 3本	¥12,000

東京：〒113-0033 東京都文京区本郷3-14-16 EKビル  
 TEL.03(3816)2861 FAX.03(3814)5347  
 大阪：〒564-0044 大阪府吹田市南金田1-14-5  
 TEL.06(338)1518 FAX.06(338)5626

**家田貿易株式会社**

# 変異原性試験画像解析支援システム

各種変異原性試験をサポートする画像解析システムをご用意しております。

## SCG画像解析システム

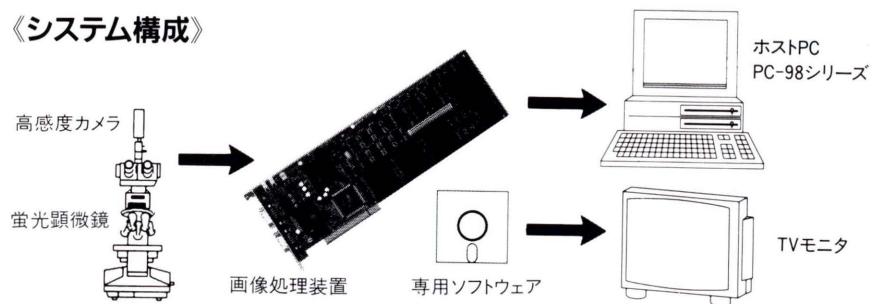
SCG試験に必要なデータを計測します。

高感度カメラの使用及び画像強調処理により細胞の不鮮明な箇所も計測が可能です。

### 《計測内容》

- Tail Length
- Shape Factor
- Nuclear Diameter
- Tail Intensity
- DNA Migration
- Ratio
- Tail Moment

### 《システム構成》



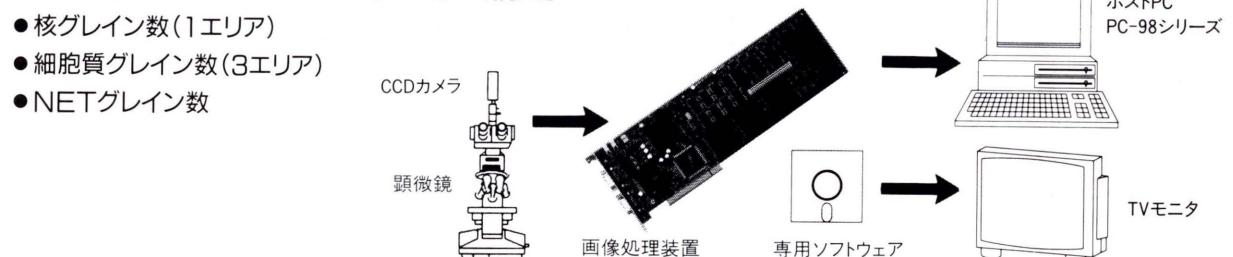
## UDS画像解析システム

UDS試験に必要なデータを計測します。

フィルタ処理により画像強調を行ない、核と細胞質の各エリア内グレイン数及び、NETグレイン数の計測が行なえます。

### 《計測内容》

### 《システム構成》



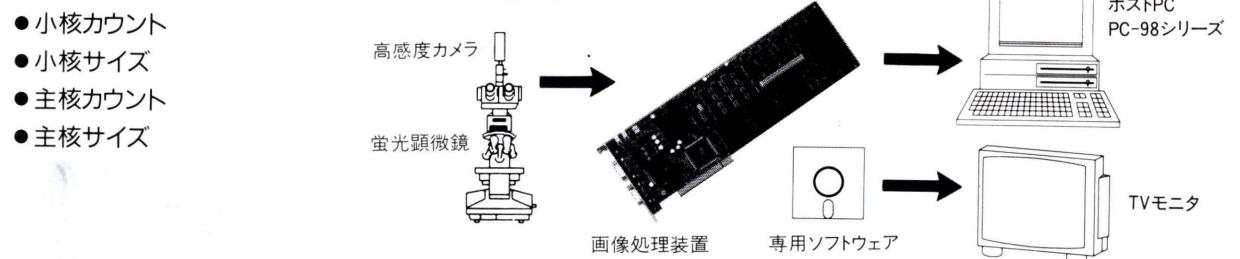
## 小核画像解析システム

小核試験に必要なデータを計測します。

フルカラー画像解析装置に取込まれた画面内の核を抽出し、小核、主核のカウントやサイズを解析できます。

### 《計測内容》

### 《システム構成》



実績が保証します!

開発製造元

(社)日本システムハウス協会会員)

ImageTech®



ケイオ一電子工業株式会社

〒567-0828 大阪府茨木市舟木町5番12号 TEL. 0726-34-1022  
FAX. 0726-34-1018

JIMRO 研究用試薬

コードNo.:655510 容量:96 テスト用 値格:30,000円

# 変異原性試験キット

## umu-テスト ウムラック

### ☆ヒスチジン含有物質でもテスト可能!

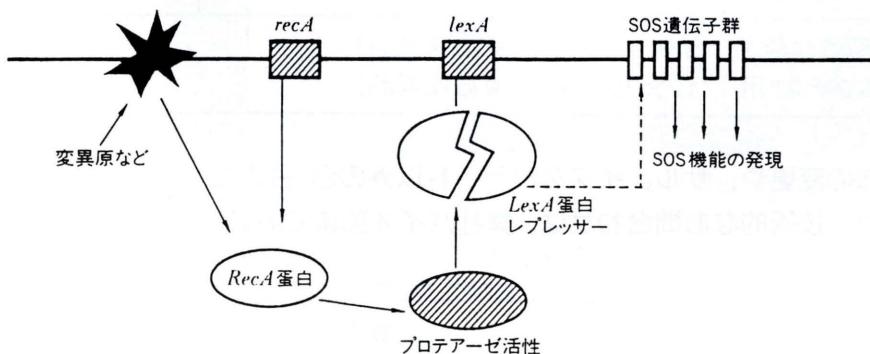
Amesテストでは不可能なヒスチジンを含んだ物質でもテスト可能。食品、尿、血液、粗抽出液等の検体にも適用できます。

### ☆高感度! Ames法と関連

標準的変異原性物質 AF-2 で 5ng/ml まで測定。Ames法とよく関連します。

- **単一試験菌株:** Amesテストでは反応機構の異なる変異原を検出するために数種以上の試験菌株を要しますが、本テストでは一種類のみで同等以上の成果を期待できます。
- **簡便:** 菌、S-9 Mix が凍結乾燥してあるので、無菌操作などの特殊な設備を必要とせずに簡便な操作が可能です。
- **多数迅速:** マイクロプレート1枚/キットが添付されているので同時に多数の試料を約6時間で迅速にテストできます。
- **代謝活性化:** 凍結乾燥した S-9 Mix を添加することによりすべての well において代謝活性化が可能です。
- **制癌剤のスクリーニング:** 多くの制癌剤はDNAに作用するので制癌剤開発過程で、多数の抗生物質や合成化合物の中から制癌作用のもつ物質のスクリーニングに有用です。

### ◇ SOS誘発状態 (SOS調節機構のモデル)



製造・発売元 株式会社 日本抗体研究所

〒370-0021 群馬県高崎市西横手町 351-1

ホームページ <http://www.ijnet.or.jp/jimro/>

TEL.027-353-1411(代) FAX. 027-353-1770

# オリエンタルの変異原性試験用試薬 S-9/コファクター セット

無菌凍結品の変異原性試験用コファクターが、S-9とセットで販売になります。

より便利に！ より手頃な価格に！

## 特徴

- エームテスト用と染色体異常試験用の2種類の試薬セットです。
- コファクターが無菌凍結品になり、解凍後S-9と混合するだけで使用できます。
- S-9とコファクターは実用的な分注量比ですから、混合が容易です。
- S-9とコファクターは未混合ですから、混合条件を変更しての試験が可能です。  
また、保存中にS-9とコファクターの未知の反応が起りません。
- セット販売ですから、購入と在庫管理が便利です。
- 包装単位を少量化し、より手頃な価格に致しました。

製品名	包装単位	備考
エームテスト用 S-9/コファクターAセット	S-9 1ml × 10本 コファクターA 9ml × 10本	エームテストでのデータを添付します
染色体異常試験用 S-9/コファクターCセット	S-9 2ml × 3本 コファクターC 4.7ml × 3本	染色体異常試験でのデータを添付します
(保存は-80°Cでお願い致します)		

- エームテスト用コファクターA(注文量100ml以上)および染色体異常試験用コファクターC(注文量30ml以上)の単品注文もお受け致します。

- 従来品は引き取り扱いしております。

変異原性試験用 S-9 (無菌凍結品)	2ml × 10本
エームテスト用 コファクターI (凍結乾燥品)	9ml用粉末 × 10本

誘導法の変更や、サル、イヌなどラット以外のS-9またはミクロソームの調製、  
その他、技術的なお問い合わせは、弊社バイオ部までお願い致します。

## 製造元

オリエンタル酵母工業株式会社  
飼料・バイオ事業部

〒174-8505 東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号  
Tel.(03)3968-1192 Fax.(03)3968-4863

## 販売元

和光純薬工業株式会社

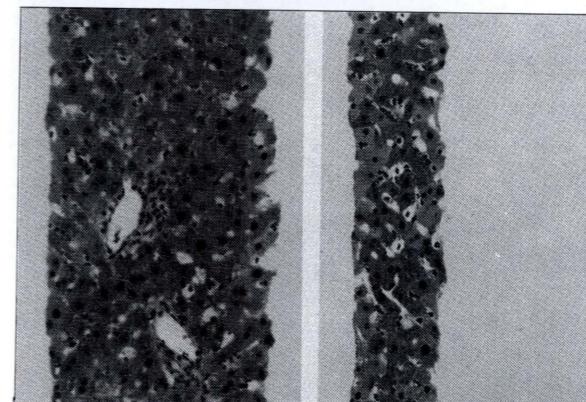
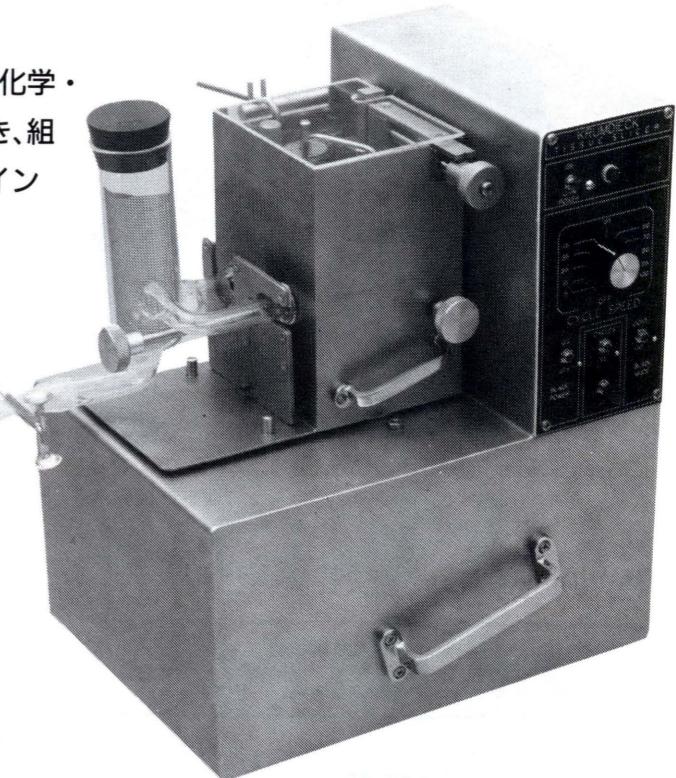
本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
電話 (06) 203-3741 (代表)  
東京支店 〒103-0023 東京都中央区日本橋四丁目5番13号  
電話 (03) 3270-8571 (代表)

# THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

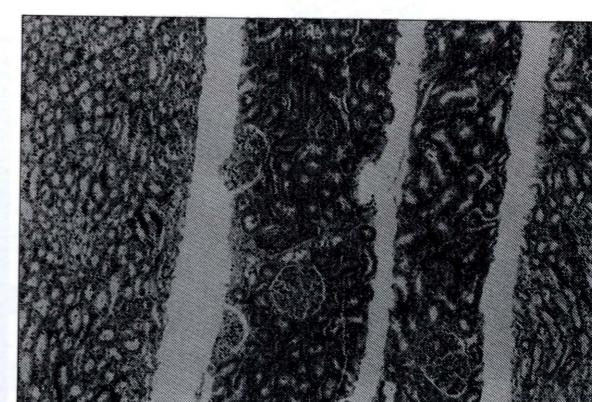
生きた組織の無菌スライスができます。

クルムディーク・ティッシュスライサーは、生化学・生理学・薬理学・毒物学などの研究に応用でき、組織培養のための無菌スライス作成用にデザインされています。

- 薄い円形のスライスが、5~15mm直径の範囲で作成できます。
- ボタンを押すだけで、2~3秒に一枚の割合で(最高スピードの場合)作成でき、初心者でも取扱いは簡単です。
- スライスは再現性良く、バラツキもなく60~1000μmの厚さで作成されます。



ラットの肝臓(倍率430×)



ラットの腎臓(倍率100×)

右の写真はラットの肝臓のスライス(厚さ60μmおよび135μm)で、左の写真はラットの腎臓のスライス(135~200μm)です。  
どちらも切片面の平行性と美しさ(ダメージがない)に注目して下さい。



販売元  
ショーシンEM株式会社

〒444-0241 愛知県岡崎市赤浜町蔵西1番地14(ショーシンビル)  
TEL. (0564) 54-1231番 (代表)  
FAX. (0564) 54-3207番

## 全自动培地作成システム

FULLY AUTOMATED MEDIA PREPARATION SYSTEM



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。

種火のいらない電子着火式ブンゼンバーナー

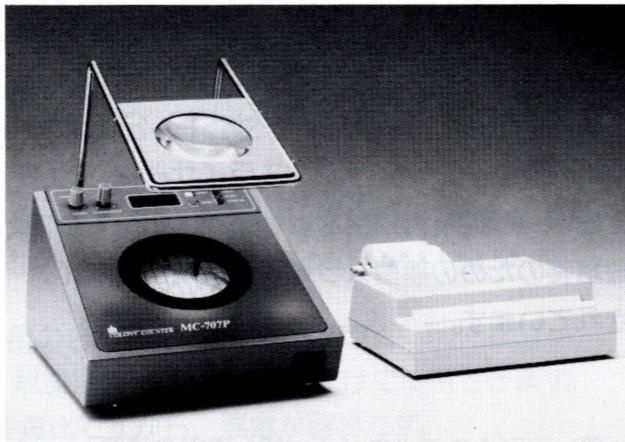
## ガスプロфиー



- コンパクト・低価格。
- IRセンサーによる電子着火。
- ガス配管不要(オプション装着)。
- タイマー／連続点火／フットスイッチ切替え付

## MC707P

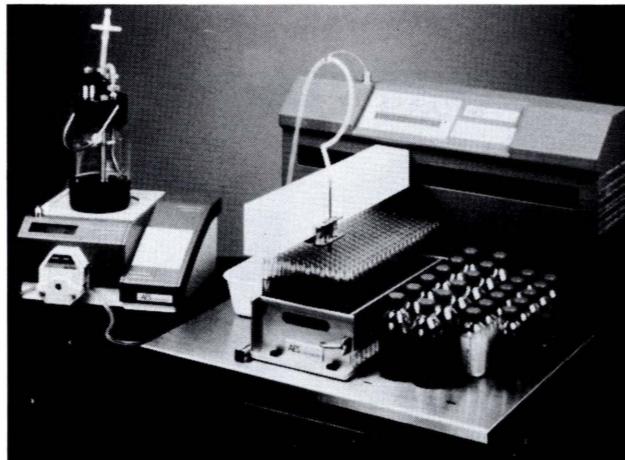
コロニーカウンター



- お手持ちのサインペンで使えます。
- ×2のレンズにより、コロニーを容易に判別できます。
- カウント数は、見易いLED表示。
- プリンター接続可能(オプション)。

精巧な、多目的ディスペンサー

## XY500



XY500は、2方向軸運動を行なうマイクロプロセッサー駆動のアームがあります。どんな種類の容量分注器(シリング、ポンプ、ペリスチルティックポンプ等)でも楽に使用することができる。どんな液体サンプルもスピードと正確さで手をわざわざ分注することができる。



フランス・AES Laboratoire総代理店

株式会社 東京エム・アイ商会

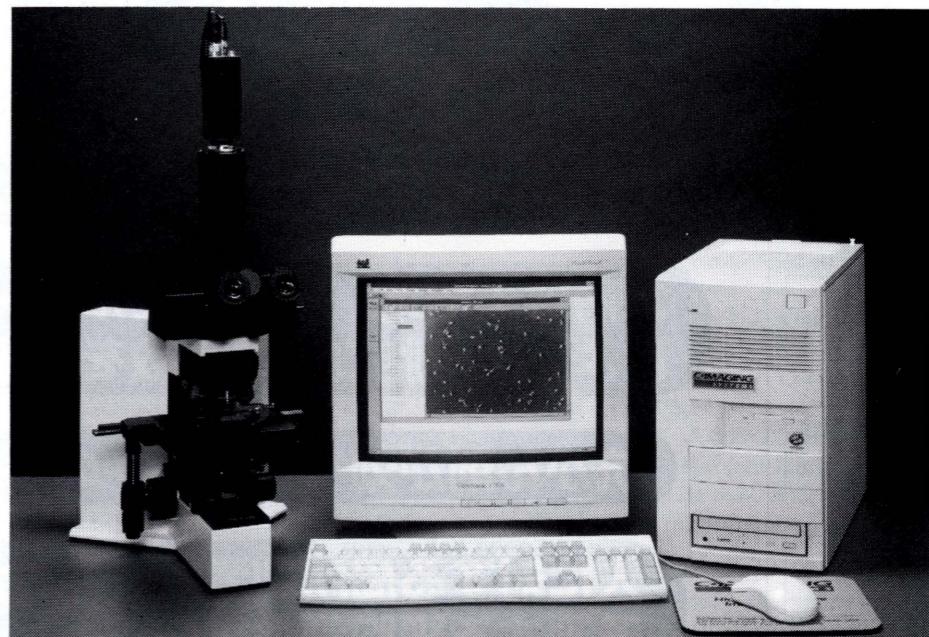
〒104-0033 東京都中央区新川2-7-1

TEL(03)3551-7873  
FAX(03)3551-7318

# 低価格・高解像度・高速処理を実現 精子画像解析装置 C·IMAGING C·men

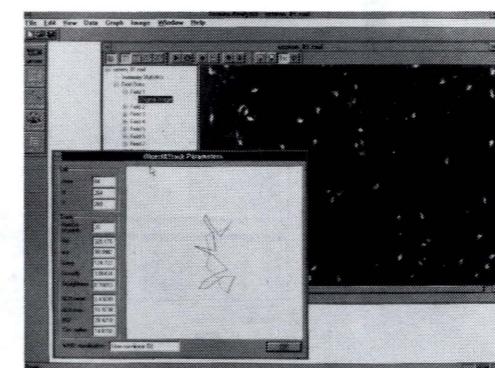
米国Compix社により開発された**C·IMAGING C·men**は、精子、微小生物等の運動能解析を目的とした、精子画像解析装置です。

顕微鏡のステージにセットされたサンプル(精子)の画像をコンピュータに取り込み、精子を自動認識し、精子数、精子濃度、運動率等のさまざまな運動能のパラメータについて解析を行います。



このシステムの導入により、精子検査の処理時間の短縮、検査データの均一化等、精子運動の定量的把握による精子研究の促進がはかれます。

- Windows NTアプリケーション
- 先進の画像処理技術により、確実に精子のみを識別
- 解像度640×480ピクセル、60フレーム/秒の高速サンプリングによる正確な運動解析データ



### 解析対象

- 精子(ヒト、猿、牛、ラット、マウス、魚類、等全ての精子)
- 微小生物、寄生虫等

### 解析項目

- |                    |                   |
|--------------------|-------------------|
| ●解析精子数(cell)       | ●精子濃度(million/ml) |
| ●総精子数(cell)        | ●運動精子数(cell)      |
| ●非運動精子数(cell)      |                   |
| ●運動率(%)            |                   |
| ●速度(μm/sec)        | ●直進性              |
| ●ヘッド平均首振り幅(μm)     |                   |
| ●ヘッド最大首振り幅(μm)     |                   |
| ●ヘッド首振り周波数(Hz/sec) |                   |
| ●精子ヘッド面積           |                   |

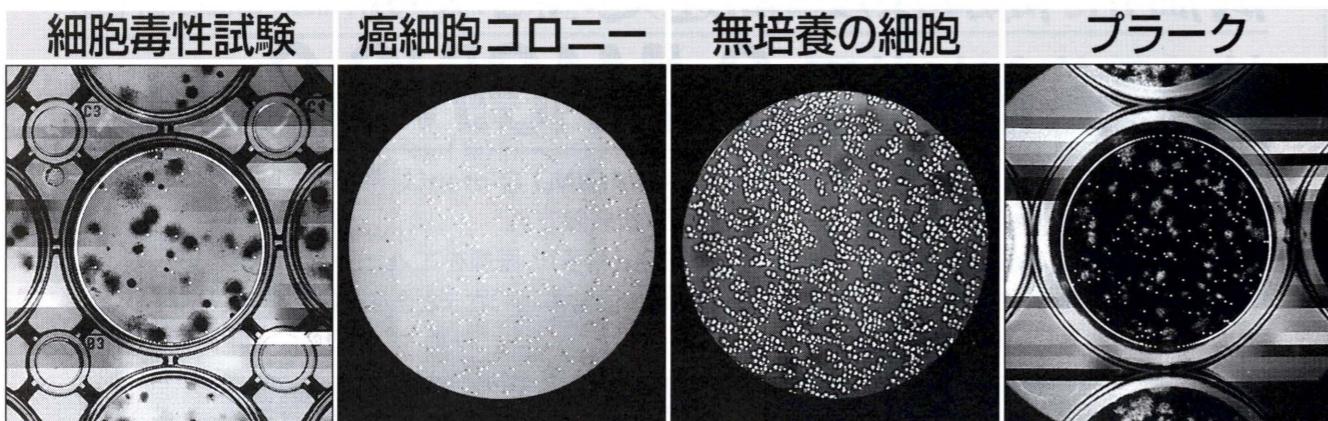
日本総代理店

株式会社  
**ニュー・ロサイエンス**

本社 〒110 東京都台東区台東2-29-12 サンケイホワイトビル4F  
TEL.(03)5688-1061 FAX.(03)5688-1065  
大阪支店 〒532 大阪市淀川区西中島6-1-19  
TEL.(06)307-7311 FAX.(06)307-7727  
福岡支店 〒812 福岡市博多区博多駅南4-3-9 アバンダント86  
TEL.(092)414-0251 FAX.(092)414-0125

# PCA-11D 細胞測定システム

種々のシャーレはもとより6穴から96穴までのプレート内の試料が計測できます。



無培養の細胞数、生死細胞数、癌細胞・細胞コロニー数からpla-que数等を自動計測

プリントアウト例

〈細胞コロニー数〉		
01	32	C
〈生死細胞数〉		
P1	P2	RESULT
192	C	64
128		
〈pla-que数〉		
01	126	C

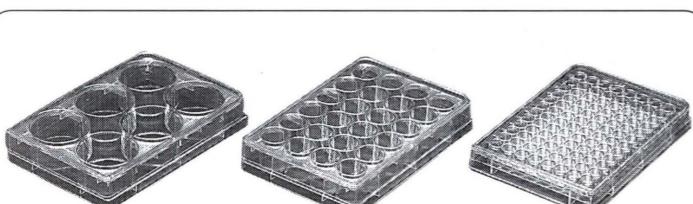
生細胞、死細胞を別々に選択して計測

二層寒天培地、メチルセルロース培地による癌細胞コロニー数を計測

抗がん剤が効くかどうかの事前試験

人に対する局所刺激性、急性毒性を予測する細胞毒性試験

pla-que数の計測により免疫毒性試験の迅速化



主な測定対象試料

- ・35~150mmシャーレ
- ・顕微鏡用スライドグラス
- ・6~ 96穴プレート
- ・血球計算盤等

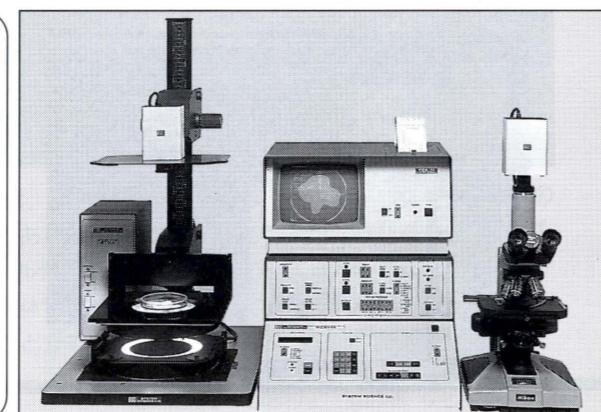
※ 依託試料の測定を行っております。お気軽にご相談下さい。

製造発売元



システムサイエンス株式会社

本社・工場/〒197-0011 東京都福生市福生1253-16  
TEL 042(552)5956 (代表)



(PCA-11DSF SYSTEM)

## 編集後記

本号では、一般投稿論文は1編でしたが、第26回大会(秦野)より2編、第9回公開シンポジウム(東京)より8編、資料・情報として3編が寄稿されました。ご協力を感謝申しあげます。編集業務も年々整備され、充実してきております。本号より、執筆規定が一部改訂されましたので、ご注意下さい。

本誌はChemical Abstract, JICST, 文部省学術情報センター事業部データベースに収録されております。本誌のさらなる発展のため、ふるってご投稿下さい。

担当編集委員 下位香代子

## 編集委員

須藤 鎮世 (委員長) (1998-)

〒302-0104 茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1-2

伊藤ハム株式会社・中央研究所

Tel: 0297-45-6311 Fax: 0297-45-6353

E-mail: sutou@fureai.or.jp

太田 敏博 (1994-)

〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1

東京薬科大学・生命科学部・環境分子生物学研究室

Tel: 0426-76-7093 Fax: 0426-76-7081

E-mail: ohta@ls.toyaku.ac.jp

下位 香代子 (1995-)

〒422-8526 静岡県静岡市谷田 52-1

静岡県立大学・食品栄養科学部・食品衛生学研究室

Tel: 054-264-5528 Fax: 054-264-5528

E-mail: shimo@fnsl.u-shizuoka-ken.ac.jp

降旗 千恵 (1996-)

〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1

東京大学・医学研究所・ヒト疾患モデル研究センター

Tel: 03-5449-5625 Fax: 03-5449-5445

E-mail: furi@ims.u-tokyo.ac.jp

荒木 明宏 (1997-)

〒257-0015 神奈川県秦野市平沢字大芝原 2445

日本バイオアッセイ研究センター・変異原性試験部

Tel: 0463-82-3911 Fax: 0463-82-3860

E-mail: akiaraki@da2.so-net.or.jp

鈴木 勇司 (1998-)

〒105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8

東京慈恵会医科大学・環境保健医学教室

Tel: 03-3433-1111 Fax: 03-5472-7526

森田 健 (1998-)

〒300-4247 茨城県つくば市和台 43

日本グラクソ株式会社・筑波研究所

Tel: 0298-64-5532 Fax: 0298-64-8558

E-mail: tm28417@glaxowellcome.co.uk

## 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

Tel: 03-3475-4621 Fax: 03-3403-1738

環境変異原研究 第20巻 第3号 1998年

平成10年10月23日 印刷

平成10年10月31日 発行

発行者 日本環境変異原学会

発行責任者 大西 克成

製作 インテルナ出版

## 目 次

## 一般論文

- In vitro* clastogenicity of 19 organic chemicals found in contaminated water and 7 structurally related chemicals ..... A. Matsuoka, M. Hayashi, and T. Sofuni 159

## 第 26 回大会特別講演

- 発癌物質の同定とリスク評価の新動向—メカニズム知見を重視した個々の物質の個々人への  
リスク評価 ..... 山崎 洋 167

## 第 26 回大会シンポジウム

- 癌原性物質検出系としてのセルトランスフォーメーション試験の現状  
Cell transformation assays in predicting carcinogenic potential of chemicals and mechanistic  
studies of carcinogenesis ..... J. C. Barrett and C. A. Afshari 175

## 第 9 回公開シンポジウム

## モデル DNA 損傷と変異機構

- シトシンアナログによる塩基の誤対合と変異 ..... 根岸和雄 181  
酸化的チミン損傷を含む DNA の調製と DNA 修復酵素による認識 ..... 井出 博 187  
酸化的 DNA 損傷と変異機構 ..... 紙谷浩之, 葛西 宏 195  
Genotoxicity of estrogen-and tamoxifen-derived DNA adducts in mammalian cells  
..... S. Shibutani 201  
ピリミジン 2 量体の変異作用 ..... 紙谷浩之, 紙谷 (村田) 尚子, 大塚栄子 213  
DNA 損傷における塩基配列特異性とその意義 ..... 及川伸二, 川西正祐 221  
Specific interaction between damaged bases in DNA and repair enzymes ..... K. Morikawa 229  
変異原研究の課題——核酸化学の経験から ..... 早津彦哉 235

## 資料・情報

- 情報は力なり!? 化学情報協会のサービス ..... 千原秀昭 237  
天津市薬品検査所での 2 カ月 ..... 坂本 豊 241  
略語集 ..... 247

- AUTHOR INDEX ..... 253  
KEYWORD INDEX ..... 254

## 付 記

- 日本環境変異原学会入会申込書  
投稿規定  
執筆規定