

# 環境変異原研究

**Environmental  
Mutagen  
Research**





トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験に！

## DNAシーケ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シーケンシングの受託サービス業務を行っております。


### ◆Single Primer Extensionによるシーケンシング

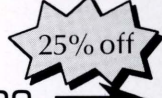
基本料金：¥12,000/run (納期：お問い合わせ下さい)

一度にお受けするサンプル数に応じて割引致します！  
(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)のシーケ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)のシーケンシングの場合

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宅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シーケンシングも承っておりますので、お気軽にご相談下さい。

# 環境変異原研究

Environmental Mutagen Research



蛍光検出の未来を拓く

株式会社アイシン・コスモス研究所

本社：〒448-8650 愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地

TEL.0566 (62) 1606 FAX.0566 (62) 1607

Home Page URL : <http://www.ai-c.co.jp>



目次	
総説	
DNA polymerase $\beta$ 山田雅巳 .....	115
一般論文	
Micronucleus test in rats after oral administration of methyl methanesulfonate for 4 weeks Shigenari Ozawa, Rika Takayama, Kazuo Kobayashi, Tsuyoshi Kitamura and Nobuo Shibata .....	125
第11回公開シンポジウム「環境変異原の活性発現と抑制の化学的機構」	
環境変異原研究における有機化学の役割 早津彦哉 .....	131
Does tamoxifen-induced DNA damage cause endometrial cancer? Shinya Shibutani .....	133
水中の直接変異原MXの生成と毒性発現の機構 木苗直秀, 杉山千歳, 下位香代子 .....	141
フリーラジカルを経由する変異・発がん物質の生成と発現 菊川清見, 平本一幸, 加藤哲太 .....	149
化学物質による活性酸素の生成と消去 福原 潔, 宮田直樹 .....	155
アルキル化剤の変異原性発現と抑制機構 高橋和彦, 加藤千晴, 加藤宏明 .....	163
ポルフィリン・鉄モデル酸化系による変異原活性化の機構 稲見圭子, 大河内江里子, 望月正隆 .....	173
Author Index .....	183
Keyword Index .....	184
入会申込書	
学生会員申込書	
投稿論文チェックリスト	
投稿規定	
執筆規定	

複製される方に  
本誌（書）に掲載された著作物を複製したい方は、著作権者から複製権の委託をうけている下記の協会から許諾を受けて下さい。著作物の転載・翻訳のような複製以外の許諾は、直接日本環境変異原学会へご連絡下さい。  
学術著作権協会  
〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル Tel：03-3475-5618 Fax：03-3475-5619

## DNA polymerase $\beta$

山田 雅巳

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

### DNA polymerase $\beta$

Masami Yamada

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

#### Summary

DNA polymerase is required for producing mutations in DNA. Prior to replication, a DNA adduct is only a lesion, and not yet a mutation. In view of this, the features of DNA polymerase can determine the mutation spectrum. DNA polymerase  $\beta$  (pol  $\beta$ ) is one of the mammalian DNA polymerase which is well conserved among organisms. It is the smallest and the most inaccurate of DNA polymerases. The reason for its inaccuracy seems to be derived from its distributive fashion of polymerization. In this review, the enzymatic activities, including polymerase activity, of pol  $\beta$  are summarized, along with its function *in vivo*, and its translesion synthesis in relation to mutagenesis, and base excision repair in which pol  $\beta$  is mainly involved on the replication step.

**Keywords：**mammalian DNA polymerase, fidelity, processivity, mutants, base excision repair

#### はじめに

突然変異の生成にDNA polymeraseの存在は欠かせない。変異原による付加体がDNA上に存在するだけではそれはただの損傷であり、突然変異とはいえない。その損傷を鋳型に、間違った情報が伝えられて複製が行われ、その結果として正しくない蛋白質ができたときに、初めて突然変異が起こったことになる。Table 1に現在までに同定されている真核生物のDNA polymeraseの一覧表を載せた。Pol $\alpha$ から $\epsilon$ までは、polymeraseとして同定された時期は10年以上前にさかのぼるが、subunitsや個々の役割等が詳細にわかってきたのは比較的最近のことである。ここ1-2年の間に新たに7個増えているが、そのほとんどが損傷を乗り越えるタイプのDNA polymeraseである。これらのDNA polymeraseには、損傷を乗り越える際に、正しくない塩基を入れて複製を進ませるものもあり、見かけ上、突然変異を促進しているかに見えて興味深い。しかし、これらのDNA polymeraseについての紹介は、各種ジャーナルに出て

いるreviewに譲ることにして、ここでは、構造的な解析を含む詳細な研究が進んでいるDNA ploymerase $\beta$ (pol  $\beta$ )について紹介したい。

pol  $\beta$ は、真核生物のDNA polymeraseの中で一番小さく(39 kDa)、他のDNA polymeraseはアクセサリー蛋白を要求するものがほとんどであるが、単独で働くことのできるpolymeraseである。ラットやヒトのpol  $\beta$ のcDNAを持つプラスミドを大腸菌に入れると活性のある可溶性の蛋白質が大量に発現するため、容易に精製できて生化学的な研究も進んでいる。X線結晶解析は1994年に2つのグループによって個別に発表され、構造の詳細もすでに明らかにされている(後述)。pol  $\beta$ は真核生物において高度に保存されている(Singhal and Wilson, 1993)。Fig. 1にラットとヒトのアミノ酸配列を示したが、335アミノ酸残基のうち15残基異なるだけである(96% identity)。84番目のアミノ酸付近にトリプシン感受性の短い領域があり、それによってN末端側8 kDaとC末端側31 kDaの2つのきちんと折り畳まれたドメインに分けることができる(Kumar et al., 1990 a)。N末端側の8 kDaは鋳型DNAに結合する役割とともにdeoxyribonucleotide phosphatase活性を持つ(後述)。N末端側のドメインを欠いたC末端側31 kDaは、鋳型



Table 1 The DNA polymerases in mammalian cells				
Pol	Subunits	Enzymatic activity	Function	References
$\alpha$	165	DNA polymerase primase	Replication : initiation ; repair : DSBR ; telomer length regulation ; cell cycle regulation	Foiani et al., 1997
	67			
	58			
	48			
$\beta$	39	DNA polymerase, dRPase	Repair : BER, DSB $\beta$ ; meiosis	* *
$\gamma$	125	DNA polymerase, 3'-5' exonuclease	Mitochondrial DNA replication	Burgers, 1998
$\delta$	125	DNA polymerase, 3'-5' exonuclease	Replication : leading strand, lagging strand ; repair : MMR, DSBR, BER, NER ; translesion DNA synthesis ; cell cycle regulation	Burgers, 1998
	66			
	50			
$\epsilon$	261	DNA polymerase, 3'-5' exonuclease	Replication : lagging strand ; repair : DSB $\beta$ , BER, NER ; cell cycle regulation	Kesti et al., 1999
	59			
$\zeta$	353	DNA polymerase	Error-prone translesion DNA synthesis	Nelson et al., 1996
$\eta$	78	DNA polymerase	Error-free translesion DNA synthesis	Masutani et al., 1999
$\theta$	198	DNA polymerase, helicase ?	Repair of interstrand crosslinks	Sharief et al., 1999
$\iota$	80	DNA polymerase	Error-prone translesion DNA synthesis	Zhang et al., 2000
$\kappa$ (= $\theta$ )	99	DNA polymerase	Error-prone translesion DNA synthesis	Gerlach et al., 2000 (Johnson et al., 2000)
$\kappa$ (= Trf-4)	60	DNA polymerase	Sister chromatid cohesion	Wang et al., 2000
$\lambda$	68	DNA polymerase dRPase ?	Repair ; meiotic recombination	Garcia-Diaz et al., 2000
$\mu$	55	Terminal deoxynucleotidyltransferase	Somatic hypermutation ?	Dominguez et al., 2000

\* DSB $\beta$ , double-strand break repair ; BER, base excision repair ; MMR, mismatch repair ; NER, nucleotide excision repair

\*\* See the reference section in this article.

DNAに結合する力が弱い(後述). 基質としては, ギャップのあるDNAを好む傾向にある(Kumar et al., 1990 b). Mammalianで最も「不正確な」複製を行うといわれており(Kunkel, 1985 b), ゲノムの複製をしているという報告はない. 塩基除去修復(base excision repair ; BER)の一つの経路での修復合成を行うのが主たる役割だと考えられている(後述).

本総説では, まずpolymerase活性を含めたpol  $\beta$ の酵素としての性質を紹介したあとで, *in vivo*での働きを示唆する研究結果にふれ, 突然変異との関わりという観点からtranslesion synthesisについて, またDNA修復の中でpol  $\beta$ が中心的な役割を担うBERについての知見をまとめる. さらに, 構造解析とmutantsの解析から得られた詳細なそして膨大な研究結果の一部を概説する.

### 1. 酵素としての性質

DNAを合成する酵素には3種類のタイプがある. ①DNAを鋳型にしてDNAを合成するDNA dependent DNA polymerase, ②RNAを鋳型にしてDNAを合成するRNA dependent DNA polymerase (= reverse transcriptase), ③鋳型が無くても3'-OHの末端を伸長してゆくterminal transferaseの3つである. この中で一般的にDNA ploymerasesと呼ばれるのは①であり, DNA鎖を合成する際に, 鋳型DNAの情報を元にdNTPを取り込む. この取り込みの正確さをfidelity(忠実度という訳もある)と呼ぶ. Pol  $\beta$ のfidelityはさまざまな系で調べられているがいずれも低い.  $\phi$ X174のDNAを鋳型にした系でも(Kunkel and Loeb, 1981), M 13 mp 2を鋳型

1'	MSKRKAPQETLNGGITDMLVELANFEKNVSQAIHKYNAYRKAASVIAKYPHKIKSGAEAK ***** *****
1"	MSKRKAPQETLNGGITDMLTELANFEKNVSQAIHKYNAYRKAASVIAKYPHKIKSGAEAK
61'	KLPGVGTKIAEKIDEFLATGKLRKLEKIRQDDTSSSINFLTRVTGIGPSAARKLVDEGIK ***** ***** *****
61"	KLPGVGTKIAEKIDEFLATGKLRKLEKIRQDDTSSSINFLTRVSGIGPSAARKFVDEGIK
121'	TLEDLRKNEDKLNHHQRIGLKYFEDFEKRIPREEMLQMQDIVLNEVKKLDPEYIATVCGS ***** ***** ***** * *****
121"	TLEDLRKNEDKLNHHQRIGLKYFGDFEKRIPREEMLQMQDIVLNEVKKVDSEYIATVCGS
181'	FRRGAESSGDMDVLLTHPNFTSESSKQPKLLHRVVEQLQKVRFITDTRSKGETKFMGVCQ ***** ***** ***** ***** ***** *****
181"	FRRGAESSGDMDVLLTHPSFTSESTKQPKLLHQVVEQLQKVHFITDTLSKGETKFMGVCQ
241'	LPSSENDENEYPHRRIDIRLIPKDQYYCGVLYFTGSDIFNKNMRAHALEKGFTINEYTIRP *** *** *****
241"	LPSKNDEKEYPHRRIDIRLIPKDQYYCGVLYFTGSDIFNKNMRAHALEKGFTINEYTIRP
301'	LGVTGVAGEPLPVDSEQDIFDYIQWRYREPKDRSE ***** ***** *****
301"	LGVTGVAGEPLPVDSEKDIFDYIQWKYREPKDRSE

Fig. 1 Amino acid squences of rat (top) and human (bottom) DNA polymerase  $\beta$ . Asterisks and small bars indicate identical and different amino acid residues between rat and human, respectively.

に用いた系でも(Kunkel, 1985 a)正しくない塩基を入れる頻度は約 $2 \times 10^{-4}$ だった. 真核生物のゲノムの複製で突然変異が生じる頻度は $10^{-9}$ レベルなので, pol  $\beta$ は間違いやすいということがわかる. 一般に, DNA polymeraseは3'-5'exonuclease活性を持ち, 間違っただNTPを取り込んだ場合に, それを取り除いて取り込みをやり直す(校正機能と呼ばれる)ということをする. Pol  $\beta$ にはこの活性がないため, 間違っただ場合にやり直すことができない. エラー頻度が高い理由の一つである.

DNA polymeraseとしての性質を論じるときには, fidelityの他にprocessivityが重要となる. これには適当な訳語がないのだが, 酵素が「基質であるprimer/templateに結合してからいくつのdNTPを取りこめるか」ということで, processivityの低いpolymeraseは, 'distributive'であると表現する. これは, primer/templateに対する結合1回当たり1塩基しか入れない反応形式を指し, distributiveな反応形式のDNA polymeraseは結合して1個伸ばしては解離する, 結合-解離を繰り返しながらprimerを伸長してゆく. pol  $\beta$ はssDNAを鋳型にdistributiveなDNA合成を行うことがわかっている. ただし, 6 nucleotidesまでのshort gapを埋める場合は, 埋めていく先に5'-PO $_4$ があればprocessiveに合成が進むという(Prasad et al., 1994). *In vitro*のgap filling assayでギャップの長さによるエラー頻度を比較した報告がある(Osheroﬀ et al., 1999). ヒトpol  $\beta$ の塩基置換のfidelityは5塩基のギャップを

processiveに埋めるときも361塩基のギャップをdistributiveに埋めるときも同じ程度だったが, 5塩基を埋めるよりも1塩基を埋めるときの方が高かった( $2.2 \times 10^{-4}$ ). Pol  $\beta$ により生じるエラーの特徴として, 塩基置換と同程度にFrameshiftが高いことがあげられる(Kunkel, 1985 a). これはdistributive mannerで複製する際に起こると考えられ, 同じヌクレオチドの続くところで複製する際には, pol  $\beta$ と鋳型DNAが解離-結合を繰り返すうちに, strand slippageが起こるというメカニズムで1塩基欠失が生じると説明できる. しかし, 1塩基欠失が生じる頻度は6塩基をprocessiveに埋めるときも, 390塩基をdistributiveに埋めるときも変わらなかったことから, pol  $\beta$ のprocessivityが高くなると酵素の鋳型ミスアラインメントが起こりやすくなるわけではないといえる.

Polymeraseとしての触媒中心は, トリプシン処理で得られるC末端側の31 kDaのペプチド断片にあり, この断片を精製して用いると, *in vitro*でDNA合成能があることがわかった. プライマー伸長反応のバンドパターンからdNTPの取り込みの性質が全長39 kDaのものとは違っており, 比活性は100分の1に低下していた. また, キモトリプシン処理により得られる27 kDaの断片(31 kDaの断片のN末端がさらに短くなったもの)のDNA合成能は無視できるほど低かった. (Kumar et al., 1990 b)

Pol  $\beta$ はDNA polymeraseとしての活性だけでなく, 5'-deoxytbose phophodiesterase(dRPase)活性も持つ(Feng



et al., 1998). 前述のトリプシン処理で得られるN末端側8 kDaのドメインにその活性があり、ギャップを埋めるpolymeraseとして働くために、このdRPase活性が重要な役割を果たす。AP siteの5'側に一本鎖切断が入った場合に、5'側のホスホジエステル結合が加水分解されて塩基のないdeoxyribose-5'-phosphateが生じる。これを取り除くのがdRPaseである。これを取り除かないとDNAの修復合成は進まないものである。

## 2. 生体内での役割

Pol  $\beta$ をホモで欠損したマウスは発生段階で死亡するが(Gu et al., 1994), fibroblastの培養細胞のpol  $\beta$ ホモ欠失体は正常に増殖した。この培養細胞は塩基除去修復系が欠損しており、monofunctionalなアルキル化剤に感受性になった。紫外線や $\gamma$ 照射線に耐性であった。アルキル化剤に対する感受性は、野生型のpol  $\beta$ 遺伝子をトランスフェクションすることで回復することが確認された(Sobol et al., 1996)。ヒト線維芽細胞において、MNNGにより誘導されるDNA修復合成はそれぞれのポリメラーゼに対する阻害剤を用いた実験から、pol  $\alpha$ をではなく、pol  $\beta$ やpol  $\delta$ が関与することが示唆されている。さらに、透過性細胞では修復合成がddTTPによって29%阻害されたことから、pol  $\beta$ が修復合成に強く関わっていると考えられている(Hammond et al., 1990)。マウス精原細胞の分化の際にtestisに存在したことからmeiosisに直接関与していることが示唆され(Plug et al., 1997)、このことは酵母のpol  $\beta$ ホモログのpol IVがmeiosisに移行するときに発現が誘導される(Shimizu et al., 1993)こととも符号した。白血病のようないくつかの腫瘍の培養細胞で、pol  $\beta$ が非常に高発現しており(Canitrot, et al., 1999)、卵巣、大腸白血球の腫瘍細胞でシスプラチンに耐性のものについて、pol  $\beta$ のmRNAや遺伝子産物の増加が観察されている(Scanlon et al., 1989)。

ここで特筆すべきは、大腸菌のDNA polymerase I(pol I)を欠損した株で、pol  $\beta$ のcDNAを発現させると相補したことである(Sweasy and Loeb, 1992)。この実験は、pol IがDNAの修復合成を行ったり、岡崎フラグメントをつなげたりすることから、pol  $\beta$ との反応形式の類似性を推定して行われたものである。真核生物のpolymeraseではあるがバクテリア内で活性を持っているため、突然変異体を分離して*in vivo* (本来の生体内ではないが)での解析が可能となった。このことはpol  $\beta$ の研究に非常に貢献している(後述)。

## 3. Translesion 合成 (TLS) における役割

Pol  $\beta$ が鋳型に損傷塩基が存在したときどのような塩基を選択して複製するのかについて、損傷別に研究されているので、ここではスペクトラムに関する内容を中心に紹介する。

### 1) シスプラチン(cis-diamminedichloroplatinum (II))

シスプラチンにより形成される付加体のうち主なものは隣り合ったグアニンが架橋されたもの(G<sup>+</sup>G)である(Sherman and Lippard, 1987)。Pol  $\beta$ とHIV-1逆転写酵素(RT)はこの損傷をもつDNAを*in vitro*で乗り越えて複製することができる(Hoffmann et al. 1996)。このとき、突然変異の起こる頻度はpol  $\beta$ が42%, HIV-1 RTが26%で、突然変異のタイプとしては-1の欠失によるフレームシフト変異が最も多かった。興味深いのは、pol  $\beta$ での突然変異のhotspotは、G<sup>+</sup>Gの5'側の塩基とそれからさらに4-6ヌクレオチド離れた位置の2カ所だったのに対して、HIV-1 RTの突然変異のhotspotは、G<sup>+</sup>Gの向かいのみであったことである。モデルとして、pol  $\beta$ はG<sup>+</sup>Gを鋳型とした複製はerror freeに行えるが、そのあと、鋳型のmisalignmentを起こすため、結果的に欠失が起こってしまうことが考えられている。一方、HIV-1 RTはG<sup>+</sup>Gの3'側のGのところで鋳型のmisalignmentを起こすので、付加体のところに欠失が起こる。Pol  $\beta$ のようにdistributiveにDNA合成を行う酵素は、基質に対して頻繁に会合-解離を繰り返す。これは鋳型がよりflexibleになることを意味し、bulkyな付加体のところでは鋳型のslippageが起こりやすくなるのだろう。

### 2) 8-oxo-dG

8-oxo-dGは酸化的DNA損傷の一つであり、DNA上で好んでsynフォームを取る。通常、DNA上に取り込まれても修復系により除去されるが、除去されなかった場合、複製の段階でDNA polymeraseに出会うことになる。8-oxo-dGのsynフォームはアデニンと安定な塩基対を形成するため(Kouchakdjian et al., 1991)、複製を経てG:C $\rightarrow$ T:Aの塩基置換が固定される。*In vitro*では8-oxo-dGの向かいに取り込むヌクレオチドの特異性は使うポリメラーゼによって異なることが知られている(Shibutani et al., 1991)。8-oxo-dGのすぐ下流の鋳型の塩基を4種類に換えた基質を用いてプライマー伸長反応を行うと、ヒトのpol  $\beta$ は8-oxo-dGに対してシトシンよりもアデニンを取り込む比率がわずかに高かった。8-oxo-dGがギャップのところに位置し、その下流の塩基がグアニンのとき、シトシンを取り込む比率が高くなった(Efrati et al. 1999)。参考までに、pol  $\alpha$ は8-oxo-dGに対して10倍以上高い比率でシトシンよりもアデニンを取り込んだ。(Efrati et al., 1997)

### 3) Propanodeoxy guanosine

Propanodeoxy guanosine(PdG)は、脂質の過酸化の際に生じるbifunctionalなカルボニル化合物とDNAの反応

により生成する不安定な付加体のモデルとして、Marnettらのグループにより研究がすすめられている。PdGは比較的小さな損傷であるため、ワトソン-クリックの塩基対を完全に阻害するけれども、DNA分子の局所的な構造をほとんど変えない。PdGを含むprimer/templateを基質に伸長反応を行わせたところ、pol  $\beta$ はPdGの向かいに、PdGの5'側にある塩基と相補的な塩基を取り込んでbypassする傾向にあった(Hashim et al., 1997)。このことから、strand slippageが起こっていることが示唆される。また、この結果は、大腸菌のpol I, Klenow fragmentを用いた結果とは異なっていた。

### 4) Abasic lesion

Abasic lesionには自然に起こるものと、DNAグリコシラーゼがシトシンの脱アミノ化でできたウラシルを取り除くときにできるものの2種類がある。前者に関して、真核細胞1日当たりに脱プリン化は $10^4$ 、脱ピリミジン化は $10^2$ の頻度で起こっていると推定されている(Lindahl, 1982)。Abasic site(apurinic/aprimidinic site; APサイト)ではDNA polymeraseが止まってしまうため、大腸菌ではSOS誘導がかかる(Lawrence et al., 1990)。APサイトは基本的にはBERでなおされる傷で、その際に、ポリメラーゼはAPサイトの向かいにdAMPを取り込む傾向(A-ruleと呼ばれている)があるため(Lawrence et al., 1990)、Tが取り除かれて生じたAPサイト以外では突然変異が起こってしまうことになる。取り込まれやすさの順はA>G>C=Tで、AはGの10倍、CやTの50倍の頻度であるという報告がある(Randall et al., 1987; Takeshita et al., 1987)。周囲の配列によってヌクレオチドの相対的な取り込みの率が変化するという報告はあるが、基本的にポリメラーゼはA-ruleに従うというのが通説となっている。これにはNMRを用いた物理的な裏付けがある。AがAPサイトの向かいに入ったときはDNAらせんがゆがむことなしにAがらせん内のコンフィグレーションに収まるのに対して(Cuniasse et al., 1987; Kalnik et al., 1988)、CやTはらせんの外に出てしまい、Gは温度によってはらせんの外に出てしまうことがあるという性質があるという(Cuniasse et al., 1990)。ところが、近年、真核細胞ではA-ruleに従わない結果が数多く報告されてきている。COS7の細胞ではAPサイトの向かいに取り込まれる塩基はランダムだった(Neto et al., 1992; Cabral Note et al., 1994)。正常細胞と、アタキシアの細胞ではapurinic siteの向かいにはGが取り込まれる傾向にあり(Klinedinst and Drinkwater, 1992)、酵母のプラスミドを用いた系でもGが優先的に取り込まれた(Kunz et al., 1994)。c-Ha-ras遺伝子の活性化の際にはTが取り込まれた(Kamiya et al, 1992)が、80%がCの取り込みであったためC-ruleというのも報

告されている(Gibbs and Lawrence, 1995)。Efratiらは*in vitro*でヒトpol  $\alpha$ とpol  $\beta$ を用いてAPサイトのtranslesion合成を行い、pol  $\beta$ にはAPサイトの5'側にある塩基と相補的な塩基を取り込んでbypassする傾向があることを見つけた。これを"dNTP-stabilized"メカニズムと名付けている。その結果、-1のフレームシフトまたは塩基置換が起こる(Efrati et al., 1997)。これは、上述のPdGでも見られた現象である。このことから、PdGはpol  $\beta$ にとって塩基としての情報がないのと同じであることがわかる。

## 4. BER における役割

Pol  $\beta$ はBERの際に特異的に働くpolymeraseで、UV損傷の修復(Nucleotide excision repair; NER)には働かない。ここでは、Fig. 2に沿って、pol  $\beta$ の役割を含めたBERの過程を説明する。

BERの最初のステップはDNA glycosylaseによる変化した塩基の認識と除去である。DNA glycosylaseにはmonofunctionalなものと、bifunctionalなものの2種類がある。塩基を認識して除去しAPサイトができるところまでは共通した反応だが、後者はさらにできたAPサイトの3'側に切り込みを入れて $\beta$ 離脱反応で除去するAP lyase活性を持つ。これにより3'末端に生じるtrans-4-hydroxy-2-penten-5-phosphateはプライマー伸長反応を阻害する(Fig. 2右側)。前者により生じたAPサイトにはAP endonucleaseが働いて5'側には2-deoxyribose 5-phosphate(dRP)を、3'側にはそのまま伸長反応に続けられる水酸基(3'-OH)が残される。dRPもその後の反応を阻害する。

BERの次のステップは切り出しとDNA合成である。まず、Fig. 2右側に示す経路で、3'の阻害基はAP endonucleaseなどが持っている3'-phosphodiesterase活性により除去されるのに対して、monofunctional glycosylase/AP endonucleaseの経路で生じたdRPは、pol  $\beta$ の持つdRP活性で除かれる。また、S3というリボゾームの蛋白質はこの両方の活性を持っているため、いずれのブロックにも働くことができる。メインとなるDNA合成のステップについては、Fortiniらが、DNA glycosylaseの選択により使われるDNA polymeraseが決まるというモデルを提唱している(Fortini et al., 1999)。Bifunctional glycosylaseの経路では、5'末端がすぐにライゲーションできる状態にあるため、3'末端のブロックが取り除かれるとすぐに、pol  $\beta$ が1塩基を挿入してギャップが埋められる(short patch)。一方、monofunctional glycosylaseの経路では、律速であるdRPの除去が遅いため、pol  $\beta$ による1塩基の挿入(short patch)と、PCNA依存性のDNA polymerase  $\delta/\epsilon$ による、DNA鎖を剥がしながらの伸長反応(long patch)が競合することになる。前者の場合すぐに次のステップに移るが、後者の場合は、



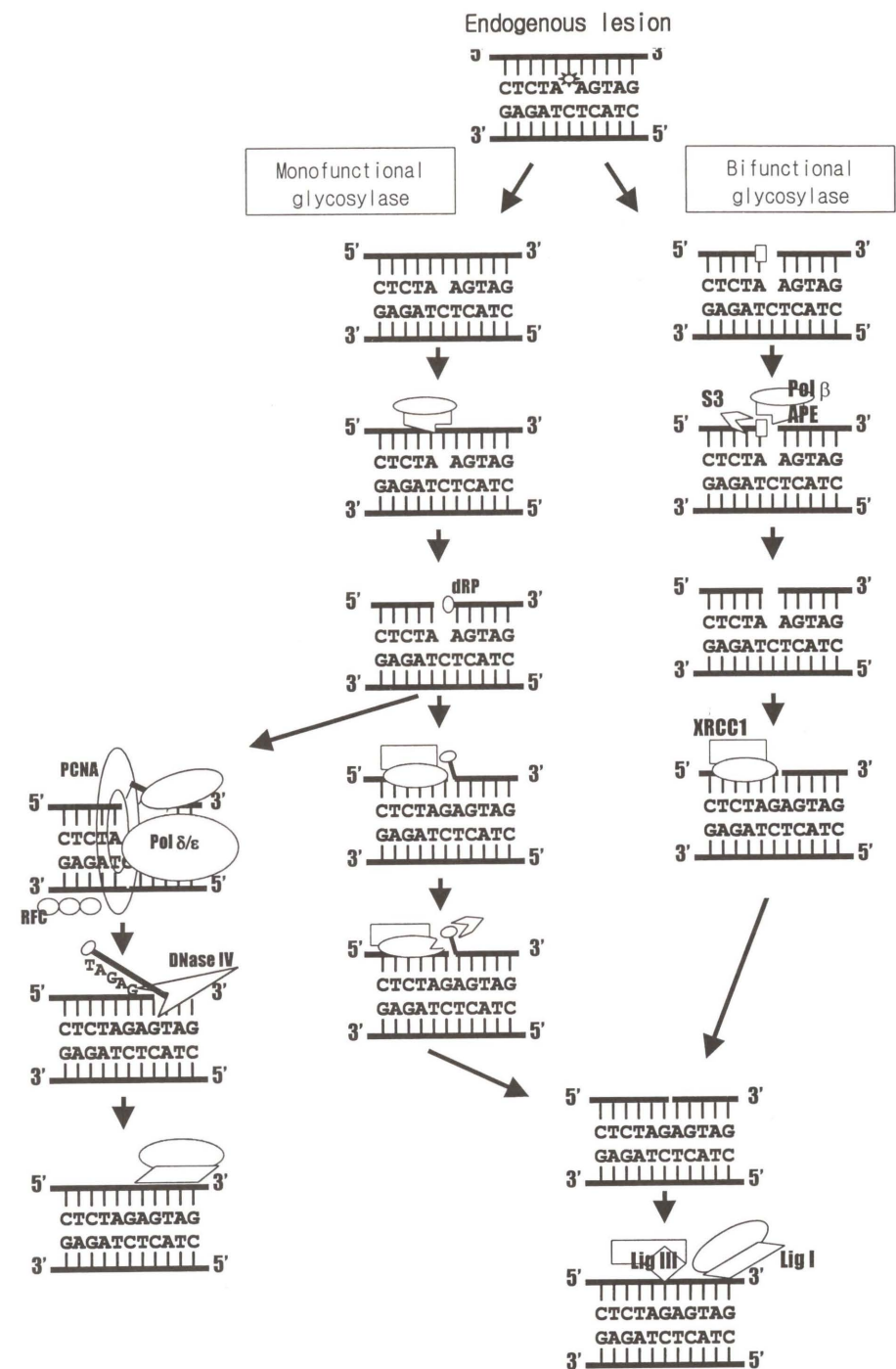


Fig. 2 Outline of BER pathways in mammals. The enzymes believed to be responsible for the various reaction steps are indicated. See text for details.

剥がしたDNA鎖を根元のところでDNase IV (FEN1)が切る (Klungland and Lindahl, 1997) というステップが入る (Fig. 2左側)。

BERの最後のステップは、修復合成されたDNAの3'末端と、元からあるDNA鎖の5'末端をligaseによりつなぐことである。真核細胞では4つのDNA ligasesが発見されているが、ここではDNA ligase IとIIIが働いていると考えられている。Short patch経路にはDNA ligase IとIIIの両方が、long patch経路には主として

DNA ligase Iが働いているらしい。XRCC1には触媒活性は見つかっていないが、pol βとligase IIIを1カ所にまとめる働きをするため、この修復系には関与している蛋白質であると考えられる。XRCC1のN末端がpol βのC末端と結合し、XRCC1のC末端がDNA ligase IIIと結合していることがわかっている (Kubota et al. 1996)。XRCC1のみならず、ここに示された蛋白質どうしに相互作用があることは実験的に証明されている。詳細については文献を参照されたい。

分子レベルでpol βに起こっていることをまとめると以下になる (Kunkel and Wilson, 1998)。Pol βの8kDaドメインの中のHhH (Helix hairpin helix)モチーフ付近の触媒溝の中心で触媒反応が起こると (dRP基の1位の炭素とシッフ塩基を形成してβ解離反応が起きる) APサイトの5'側に切り込みが入り、5'dRP基がDNAらせんから離れてLys 72残基のあるgrooveに収まるとギャップができる。それをpol βが埋めて、そのあとぶらぶらしている5'dRP基が8kDaドメインのdRPase活性により切りだされてからDNA ligaseが閉じる。pol βがギャップを埋める反応は、まず、pol βがdNTPを選択するステップから始まる。Single nucleotideギャップを持つDNAに結合したとき、入ってくるdNTPを対を作る鋳型の5'末端のリン酸が8kDaドメインにあるAP lyaseの活性部位近くに結合し、それによって鋳型DNAが90度ねじれるのが鋳型塩基の5'ホスホジエステル結合のところで観察される。このねじれにより活性部位の下流の塩基対が露出されることになる。pol βのN末端8kDaのドメインがギャップの5'-phosphateに結合することによりpol βがよりコンパクトな構造となる。pol βによるヌクレオチドの選択は基本的に非特異的結合だが、正しいdNTPと結合すると、8kDaのドメインはわずかに活性中心の方へ動き、C末端ドメインの一部分が大きく回りこんで入ってくるヌクレオチドを鋳型との相補性を安定化する。pol βと正しい塩基対との相補性が確認できれば、沢山の小さなコンフォメーションの変化が触媒反応の引き金を引く。その活性部位のポケットを形成するのに重要な役割を果たしているのがArg 283でminor grooveと相互作用する残基であり、鋳型の塩基と水素結合をとれる距離にある。側鎖が分子間引力で鋳型ヌクレオチドの端のminor grooveと相互作用すると考えられる。R283Aの変異体ではpol βとminor grooveとの相互作用がなくなる。ポリメラーゼのヌクレオチドの選択性が非常に低下することがわかっている。

## 5. 構造解析から得られた知見

1994年2つのグループによって結晶解析の結果が報告された。前述のプロテアーゼ処理で分けられるN末端側の8kDaとC末端側の31kDaの2つのドメインのうち、触媒部位の存在する31kDaドメインを用いて、Davies IIらは、Mn<sup>2+</sup>との共結晶、また、Mn<sup>2+</sup>とdTTPとの共結晶を作らせて (Davies II et al., 1994)、Sawayaらは31kDaドメインと39kDaの全長を比較して解析した (Sawaya et al., 1994)。Pelletierらはラットpol β (全長)とprimer/templateとddCTPの共結晶について解析している (Pelletier et al., 1994)。ともに、矛盾のない結果を導いている。8kDaドメインと類似のアミノ酸配列を持つものにはterminal deoxynucleotidyl transferaseやpolyadenylate polymeraseがあって、C末端側はDNAに

結合するチャンネルのサイズと形状が他の3つのポリメラーゼすなわち、Klenow fragment、HIV-1逆転写酵素、T7RNAポリメラーゼと類似している。C末端側と共通した構造は、たとえば床があってそれを囲むように2つの壁があるような格好で、B型DNAに結合しやすい形状といえる。棒状のもの (DNA)を持つ右手の形に似ることから、床の部分をもpalm (手のひら)、2つの壁をthumb (親指)とfingers (親指以外の4本の指)と呼んでいる。8kDaドメインはfingersドメインの先についている形で、お互いに80度傾いて交差する2つの逆向きの平行なhelixからなる。2つのドメインの継ぎ手部分は親水性で、palmドメインからそれが離れるように動くチャンネルが開く。継ぎ手部分は鋳型DNAに結合しているとき以外は非常にプロテアーゼに感受性が高い。このことから、DNAに結合しているときは、この8kDaの部分が鋳型を包み込むような形を取っていると推測され、実際にも、鋳型プライマー複合体では8kDaドメインはpalmにより近い位置にある (ただし、結晶化の影響で構造が密になっている可能性も否定できない) (Sawaya et al., 1994)。

既知のpolymerasesのアミノ酸配列とKlenow fragmentの構造の情報と照らし合わせて、Delarueらは、活性に重要な、保存されたアミノ酸の共通するモチーフを見つけ、Motif A, B, Cと名付けている (Fig. 3; Delarue et al., 1990)。結晶構造より、pol βではAsp 256がMotif A, Asp 190/Asp 192がMotif Cに当たると考えられ、いずれも活性に重要であると考えられた。そのことは、これらのアミノ酸の変異体ではヌクレオチドトランスファーのk<sub>cat</sub>が100倍から50,000倍減少していたことでも裏付けられている。Asp 256はArg 254とともに効率の良い触媒反応のために二価の金属イオンと基質の正確な向きを決める役割をしている。Motif Cの酸性アミノ酸は2つの金属イオンを保持すると考えられており、pol β-Mn<sup>2+</sup>複合体の構造からも確認されている (Davies II et al., 1994)。Pol βの活性部位では伸長するプライマーの攻撃する3'-OHとddCTPのリン酸基と2つのMg<sup>2+</sup>イオンがすべて、Asp 190/192とAsp 256の周囲にあった (Pelletier et al., 1994)。Palmドメインは他のドメインよりも前出の3つのポリメラーゼとpol βの間で保存性が高いが、pol βは他の3つといくつかの点で異なる性質を持つ。①触媒部位のβ構造が他の3つのようにアンチパラレルではなく、パラレルであること、②Motif AがMotif Cよりも下流にある、③Motif Cがβターンの中にないなどである (Sawaya et al., 1994)。これらの知見は、後述の突然変異体の解析と合わせてpol βの働きを詳しく知る手がかりとなった。

## 6. Mutantsの解析から得られた知見

ある、機能が未知の蛋白質を解析する場合に、突然変



**Fig. 3** Multiple alignments of polymerase sequences for motifs A, B and C. Strictly conserved positions are boxed generally hydrophobic residues are indicated by a (+) at the top line. The three motifs are identified as motif A, motif B and motif C. The number of amino acids between motifs for each sequence is also indicated.

そのほかに、野生型の  $\text{pol } \beta$  と共存させてもその性質が優性になる dominant negative mutants が、ラットで2つ報告されている。いずれも、random mutagenesis により大腸菌の  $\text{polA}$  の変異体を宿主にして分離されたものである (Clairmont and Sweasy 1996)。一つは、171 番目から 340 番目までのアミノ酸を欠失させた変異体で  $\beta\text{-TR}$  と名付けられている。出芽酵母で大量発現させると MMS 感受性になるが、UV 感受性は変わらないことから、NER ではなく BER が阻害されていると考えられる。もう一つは Y265C mutant で、塩基置換とフレームシフトの頻度が高くなり、この蛋白質を発現させた大腸菌は野生型の  $\text{pol } \beta$  が存在していてもアルキル化剤感受性に

おわりに

## 参考文献

Beard, W. A., W. P. Osheroff, R. Prasad, M. R. Sawaya, M. Jaju, T. G. Wood, J. Kraut, T. A. Kunkel and S. H. Wilson (1996) Enzyme-DNA interactions required for efficient nucleotide incorporation and discrimination in human DNA polymerase  $\beta$ , *J. Biol. Chem.*, 271, 12141-12144.

Burgers, P. M. J. (1998) Eukaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair, *Chromosoma*, 107, 55-58.

Cabral Neto, J. B., R. E. Cabral, A. Margot, F. Le Page, A. Sarasin and A. Gentil (1994) Coding properties of a unique apurinic/apyrimidinic site replicated in mammalian cells, *J. Mol. Biol.*, 240, 416-420.

Canitrot, Y., D. Lautier, G. Laurent, M. Frechet, A. Ahmed, A. Turhan, B. Salles, C. Cazaux and J. S. Hoffmann (1999) Mutator phenotype of BCR-ABL transfected Ba/F3 cell lines an with association with enhanced expression of DNA polymerase  $\beta$ , *Oncogene*, 18, 2676-2780.

Clairmont, C. A and J. B. Sweasy (1996) Dominant negative rat DNA polymerase  $\beta$  mutants interfere with base excision repair in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, 178, 656-661.

Clairmont, C. A. and J. B. Sweasy (1998) The pol  $\beta$ -14 dominant negative rat DNA polymerase  $\beta$  mutator mutant commits errors during the gap-filling step of base excision repair in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, 180, 2292-2297.

Clairmont, C. A., L. Narayanan, K. W. Sun, P. M. Glazer and J. B. Sweasy (1999) The Tyr-265-to-Cys mutator mutant of DNA polymerase  $\beta$  induces a mutator phenotype in mouse LN12 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 17, 9580-9585.

Cuniasse, P., G. V. Fazakerley, W. Guschlbauer, B. E. Kaplan and L. C. Sowers (1990) The abasic site as a challenge to DNA polymerase, *J. Mol. Biol.*, 213, 303-314.

Cuniasse, P., L. C. Sowers, R. Eritja, B. Kaplan, M. F. Goodman, J. A. Cognet, M. LeBret, W. Guschlbauer and G. V. Fazakerley (1987) An abasic site in DNA, *Nuc. Acids Res.*, 15, 8003-8022.

Date, T., S. Yamamoto, K. Tanihara, Y. Nishimoto, N. Liu and A. Matsukage (1990) Site-directed mutagenesis of recombinant rat DNA polymerase  $\beta$  : involvement of arginine-183 in primer recognition, *Biochemistry*, 29, 5027-5034.

Davies II, J. F., R. J. Almassy, Z. Hostomska, R. A. Ferre and Z. Hostomsky (1994) 2.3 Å crystal structure of the catalytic domain of DNA polymerase  $\beta$ , *Cell*, 76, 1123-1133.

Delarue, M., O. Posh, N. Tordo, D. Moras and P. Argos (1990) An attempt to unify the structure of polymerases, *Protein Eng.*, 3, 461-467.

Dominguez, O., J. F. Ruiz, L. T. de Lera, M. Garcia-Diaz, M. A. Gonzalez, T. Kirchhoff, C. Martinez, A. A. Bernad and L. Blanco (2000) DNA polymerase mu (Pol  $\beta$ ), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells, *EMBO J.*, 19, 1731-1742.

Efrati, E., G. Tocco, R. Eritja, S. H. Wilson and M. F. Goodman (1997) Abasic translesion synthesis by DNA polymerase  $\beta$  violates the "A-rule", *J. Biol. Chem.* 272, 2559-2569.

Efrati, E., G. Tocco, R. Eritja, S. H. Wilson and M. F. Goodman (1999) "Action-at-a-distance" mutagenesis, *J. Biol. Chem.*, 274, 15920-15926.

Feng, J. A., C. J. Crasto and Y. Matsumoto (1998) Deoxyribose phosphate excision by the N-terminal domain of the polymerase  $\beta$  : the mechanism revisited, *Biochemistry*, 37, 9605-9611.

Foiani, M., G. Lucchini and P. Plevani (1997) The DNA polymerase  $\alpha$ -primase complex couples DNA replication, cell cycle progression and DNA damage response, *Trends Biochem. Sci.*, 22, 424-427.

Fortini, P., E. Parlanti, O. M. Sidorkina, J. Laval and E. Dogliotti (1999) The type of DNA glycoxylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, 274, 15230-15236.

Garcia-Diaz, M., O. Dominguez, L. A. Lopez-Fernandez, L. T. de Lera, M. L. Saniger, J. F. Ruiz, M. Parraga, M. J. Garcia-Ortiz, T.

Kirchhoff, J. del Mazo, A. Bernad and L. Blanco (2000) DNA polymerase lambda (Pol  $\lambda$ ), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis, J. Mol. Biol., 301, 851-867.

Gerlach, V. L., W. J. Feaver, P. L. Fischhaber and E. C. Friedberg (2000) Purification and characterization of pol  $\beta$ , a DNA polymerase encoded by the human DINB1 gene, J. Biol. Chem., in press.

Gibbs, P. E. and C. W. Lawrence (1995) Novel mutagenic properties of abasic sites in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Mol. Biol., 251, 229-236.

Gu, H., J. D. Marth, P. C. Orban, H. Mossmann and K. Rajewsky (1994) Deletion of a DNA polymerase  $\beta$  gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting, Science, 265, 103-106.

Hammond, R. A., J. K. McClung and M. R. Miller (1990) Effect of DNA polymerase inhibitors on DNA repair in intact and permeable human fibroblasts : evidence that DNA polymerases  $\delta$  and  $\beta$  are involved in DNA repair synthesis induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, Biochemistry, 29, 286-291.

Hashim, M. F., N. Schnetz-Boutaud and L. J. Marnett (1997) Replication of template-primers containing propanodeoxyguanosine by DNA polymerase  $\beta$ , J. Biol. Chem. 272, 20205-20212.

Hoffmann, J. -S., M. J. Pillaire, D. Garcia-Estefania, S. Lapalu and G. Villani (1996) *In vitro* bypass replication of the cisplatin-d (GpG) lesion by calf thymus DNA polymerase  $\beta$  and human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase is highly mutagenic, J. Biol. Chem., 271, 15386-15392.

Johnson, R. E., S. Prakash and L. Prakash (2000) The human *DINB1* gene encodes the DNA polymerase pol  $\theta$ , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 3838-3843.

Kalnik, M. W., D. N. Chang, A. P. Grollman and D. J. Patel (1988) NMR studies of abasic sites in DNA duplexes : deoxyadenosine stacks into the helix opposite the cyclic analogue of 2-deoxyribose, Biochemistry, 27, 924-931.

Kamiya, H., M. Suzuki, Y. Komatsu, H. Miura, K. Kikuchi, T. Sakaguchi, N. Murata, C. Masutani, F. Hanaoka and E. Ohtsuka (1992) An abasic site analogue activates a c-Ha-ras gene by a point mutation at modified and adjacent positions, Nuc. Acids Res., 20, 4409-4415.

Kesti, T., K. Flick, S. Keranen, J. E. Syvaaja and C. Wittenberg (1999) DNA polymerase  $\epsilon$  catalytic domains are dispensable for DNA replication, DNA repair and cell viability, Mol. Cell, 3, 679-685.

Klinedinst, D. K. and N. R. Drinkwater (1992) Mutagenesis by aprurinic sites in normal and ataxia telangiectasia human lymphoblastoid cells, Mol. Carcinogen., 6, 32-42.

Klungland A. and T Lindahl (1997) Second pathway for completion of human DNA base excision-repair : reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1) , EMBO J., 16, 3341-3348.

Kouchakdjian, M., V. Bodepudi, S. Shibutani, M. Eisenberg, F. Johnson, A. P. Grollman and D. J. Patel (1991) NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosin (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-oxo-7H-dG (*syn*) -dA (*anti*) alignment at lesion site, Biochemistry, 30, 1403-1412.

Kubota, Y., R. A. Nash, A. Klungland, P. Schar, D. E. Barnes and T. Lindahl (1996) Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins : interaction between DNA polymerase  $\beta$  and the XRCC1 protein, EMBO J., 15, 6662-6670.

Kumar, A., J. Abbotts, E. M. Karawya and S. H. Wilson (1990a) Identification and properties of the catalytic domain of mammalian



# Micronucleus test in rats after oral administration of methyl methanesulfonate for 4 weeks

Shigenari Ozawa, Rika Takayama, Kazuo Kobayashi, Tsuyoshi Kitamura and Nobuo Shibata

Toxicology Research Laboratory, Kissei Pharmaceutical Co., Ltd.  
2320-1, Maki, Minamiazumi, Nagano 399-8305, Japan

## Summary

As a part of an extensive collaborative study of micronucleus assays, we examined whether the micronucleus test can be integrated into the 4-week general toxicity study of rats in a study in which methyl methanesulfonate (MMS) was administered at doses of 3, 10, and 30 mg/kg/day. The results can be summarized as follows : 1) Increased frequencies of reticulocytes with micronucleus in peripheral blood was observed from the second day of administration in the 10 and 30 mg/kg/day groups. 2) Increased frequencies of immature erythrocytes with micronucleus of bone marrow was observed in the 30 mg/kg group. 3) There were no effects on the incidence of mature erythrocytes with micronucleus in either peripheral blood or bone marrow in any dose group. 4) On histopathological examination, an inhibitory effect of MMS on development of sperm but no effect in the spleen was observed. These results obtained with MMS suggest that it is possible to integrate the micronucleus assay into general toxicity studies using rats. The peripheral blood samples collected at the 3rd day after the beginning of treatment and bone marrow and peripheral blood samples collected at necropsy 4 weeks after the beginning of treatment were shown to be reliable for assessment of the frequency of micronucleated cells.

**Keywords :** micronucleus assay, chronic treatment, rat, CSGMT

## Introduction

The micronucleus test using methyl methanesulfonate (MMS) described here was conducted as a part of the 13th collaborative study organized by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT). The study was designed to demonstrate the feasibility of incorporating micronucleus assays into general toxicity studies using the same animals. The scope and summary of this study are reported separately (Hamada et al., 2000). MMS is an alkylating agent and known to be a micronucleus inducer (rat treated twice : Wakata et al., 1998 ; mouse with single treatment : Hayashi et al., 1989 ; CSGMT, 1992)

## Materials and Methods

### Chemicals

Methyl methanesulfonate (MMS, CASRN 66-27-3, Lot No.09419 LR, purity : 99.9%) was purchased from

Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA) and dissolved in water for injection (JP grade, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Tokushima, Japan).

### Animals

Twenty-five male Sprague-Dawley (IGS) rats aged 4 weeks (body weight range : 70 to 80 g) were purchased from Charles River Japan, Inc. (Atsugi, Japan) and were housed in a room maintained with controlled temperature (22.7 to 23.3 °C) and relative humidity (45.3 to 55.3%), with 13.5 changes of air per hour, and a 12-hour light/dark cycle in a barrier system. The animals were allowed free access to tap water and a laboratory animal diet ( $\gamma$ -irradiated CE-2, CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) throughout the acclimatization and experimental periods.

### Study design

Rats were treated with 3, 10, or 30 mg/kg of MMS for 4 weeks. The maximum dose in this study was the minimum dose that had produced positive results in a rat micronucleus study (Wakata et al., 1998), and the additional two doses were selected with a common ratio of

received : October 19, 1999 accepted : December 28, 1999  
©Environmental Mutagen Society of Japan

- DNA polymerase  $\beta$ , Biochemistry, 29, 7156-7159.
- Kumar, A., S. G. Widen, K. R. Williams, P. Kedar, R. L. Karpel and S. H. Wilson (1990b) Studies of the domain structure of mammalian DNA polymerase  $\beta$ , J. Biol. Chem., 265, 2124-2131.
- Kunkel, T. A. (1985a) The mutational specificity of DNA polymerase- $\alpha$  during *in vitro* DNA synthesis, J. Biol. Chem., 260, 5787-5796.
- Kunkel, T. A. (1985b) The mutational specificity of DNA polymerases- $\alpha$  and  $\beta$  during *in vitro* DNA synthesis, J. Biol. Chem., 260, 12866-12874.
- Kunkel, T. A. and L. A. Loeb (1981) Fidelity of mammalian DNA polymerase, Science, 213, 765-767.
- Kunkel, T. A. and S. H. Wilson (1998) DNA polymerases on the move, Nature Struc. Biol., 5, 95-99.
- Kunz, B. A., E. S. Henson, H. Roche, D. Ramotar, T. Nunoshiba and B. Demple (1994) Specificity of the mutator caused by deletion of the yeast structural gene (APN1) for the major apurinic endonuclease, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 8165-8169.
- Lawrence, C. W., A. Borden, S. K. Banerjee and J. E. LeClerc (1990) Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in a single-stranded vector, Nuc. Acids Res., 18, 2153-2157.
- Lindahl, T. (1982) DNA repair enzymes, Annu. Rev. Biochem., 51, 61-87.
- Masutani, C., R. Kusumoto, A. Yamada, N. Dohmae, M. Yokoi, M. Yuasa, M. Araki, S. Iwai, K. Takio and F. Hanaoka (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase  $\eta$ , Nature, 399, 700-704.
- Nelson, J. R., C. W. Lawrence and D. C. Hinckle (1996) Thymine-thymine dime bypass by yeast DNA polymerase  $\zeta$ , Science, 272, 1646-1649.
- Neto, J. B., A. Gentil, R. E. Cabral 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.
- Osheroff, W. P., H. K. Jung, W. A. Beard, S. H. Wilson and T. A. Kunkel (1999) The fidelity of DNA polymerase  $\beta$  during distributive and processive DNA synthesis, J. Biol. Chem., 274, 3642-3650.
- Pelletier, H., M. R. Sawaya, A. Kumar, S. H. Wilson and J. Kraut (1994) Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase  $\beta$ , a DNA template-primer, and ddCTP, Science, 264, 1891-1903.
- Plug, A. W., C. A. Clairmont, E. Sapi, T. Ashley and J. B. Sweasy (1997) Evidence or a role for DNA polymerase  $\beta$  in mammalian meiosis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 94, 1327-1331.
- Prasad, R., W. A. Beard and S. H. Wilson (1994) Studies of gapped DNA substrate binding by mammalian DNA polymerase  $\beta$ , J. Biol. Chem., 269, 18096-18101.
- Randall, S. K., R. Eritja, B. E., Kaplan, J. Petruska and M. F. Goodman (1987) Nucleotide insertion kinetics opposite abasic lesions in DNA, J. Biol. Chem., 262, 6864-6870.
- Sawaya, M. R., H. Pelletier, A. Kumar, S. H. Wilson and J. Kraut (1994) Crystal structure of rat DNA polymerase  $\beta$  : evidence for a common polymerase mechanism, Science, 264, 1930-1935.
- Scanlon, K., M. Kashani-Sabet and H. Miyachi (1989) Differential gene expression in human cancer cells resistant to cisplatin, Cancer Invest., 7, 581-587.
- Sharief, F. S., P. J. Vojta, P. A. Ropp and W. C. Copeland (1999) Cloning and chromosomal mapping of the human DNA polymerase  $\theta$  (pol  $\theta$ ), the eighth human DNA polymerase, Genomics, 59, 90-96.
- Sherman, S. E. and S. J. Lippard (1987) Structural aspects of platinum anticancer drug interaction with DNA, Chem. Rev. 87, 1153-1181.
- Shibutani, S., M. Takeshita and A. P. Grollman (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, Nature, 349, 431-434.
- Shimizu, K., C. Santocanale, P. A. Ropp, M. P. Longhese, P. Plevani, G. Lucchini and A. Sugino (1993) Purification and characterization of a new DNA polymerase from budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., 268, 27148-27153.
- Singhal, R. K. and S. H. Wilson (1993) Short gap-filling synthesis by DNA polymerase  $\beta$  is processive, J. Biol. Chem., 268, 15906-15911.
- Sobol, R. W., J. K. Horton, R. Kuehn, H. Gu, R. K. Singhal, R. Prasad, K. Rajewsky and S. H. Wilson (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase- $\beta$  in base-excision repair, Nature, 379, 183-186.
- Sweasy, J. B. and L. A. Loeb (1992) Mammalian DNA polymerase  $\beta$  can substitute for DNA polymerase I during DNA replication in *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 267, 1407-1410.
- Takeshita, M., C. -N. Chang, F. Johnson, S. Will and A. P. Grollman (1987) Oligodeoxynucleotides containing synthetic abasic sites, J. Biol. Chem., 262, 10171-10179.
- Wang, Z., I. B. Castanyo, A. de Las Penyas, C. Adams and M. F. Christman (2000) Pol  $\kappa$  : A DNA polymerase required for sister chromatid cohesion, Science, 289, 774-779.
- Zhang, Y., F. Yuan, X. Wu and A. Wang (2000) Preferential incorporation of G opposite template T by the low-fidelity human DNA polymerase  $\epsilon$ , Mol. Cell. Biol., 20, 7099-7108.



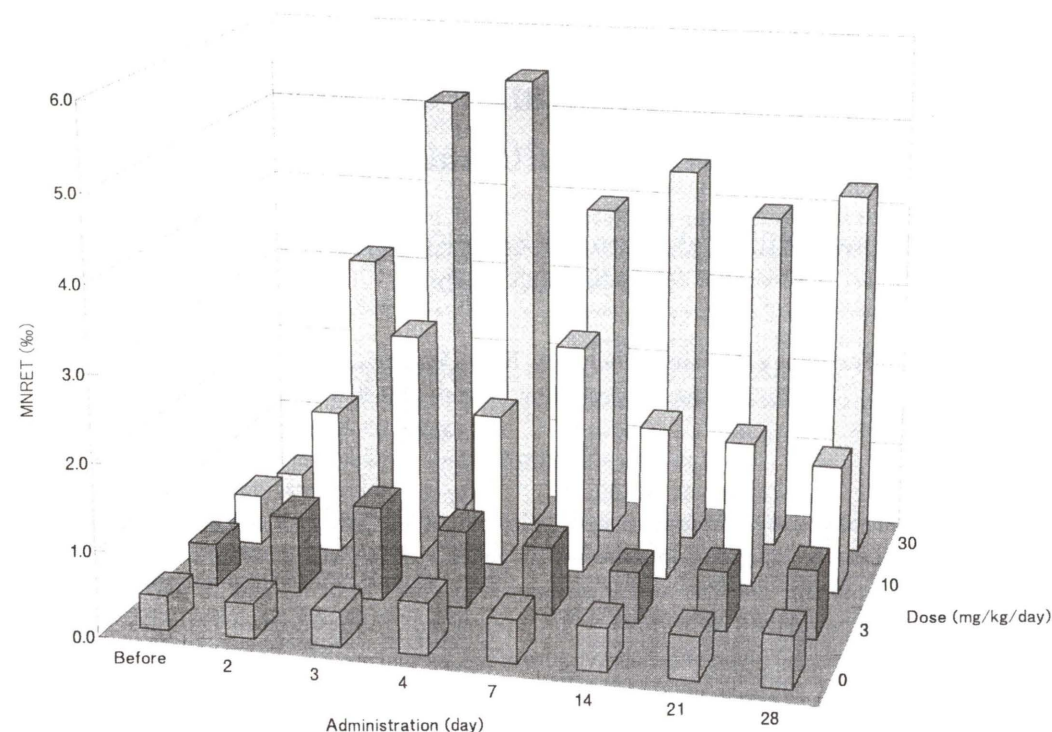


Fig. 1 Time-course of changes in frequencies of MNRET in peripheral blood of male rats treated orally with MMS once a day for 28 days

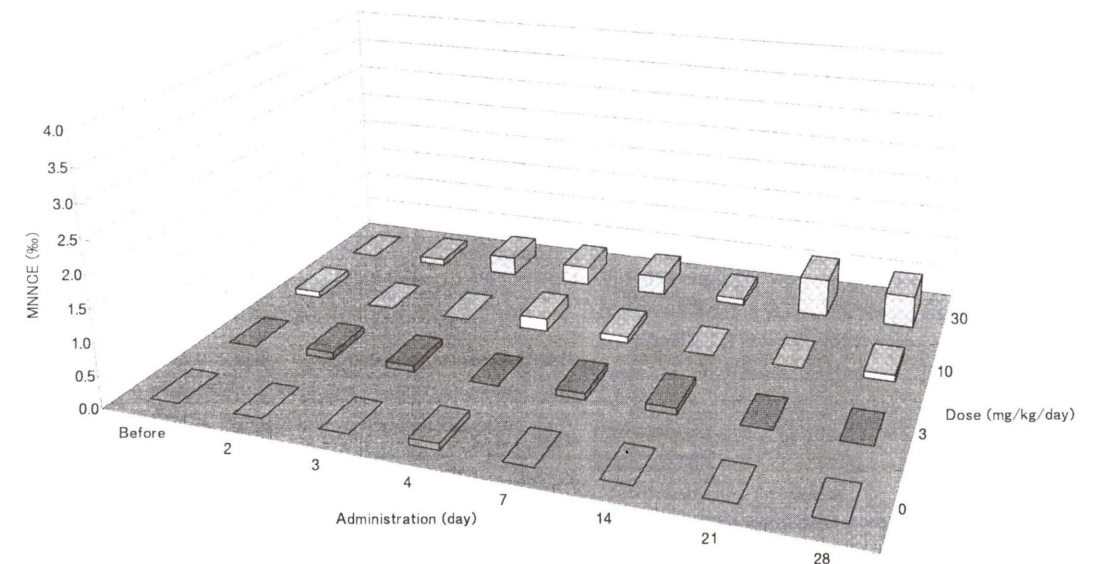


Fig. 2 Time-course of changes in frequencies of MNNCE in peripheral blood of male rats treated orally with MMS once a day for 28 days

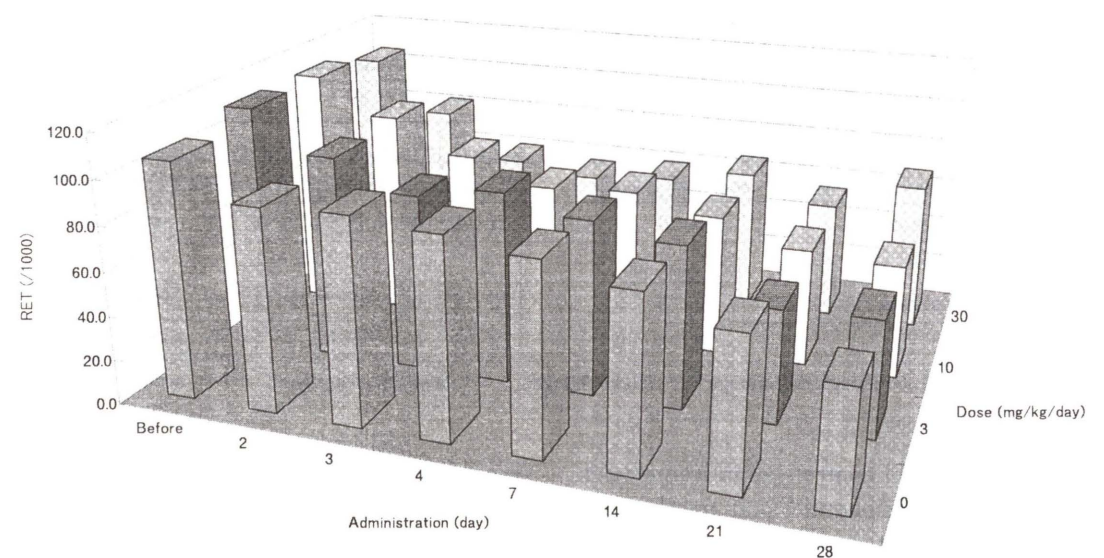


Fig. 3 Time-course of changes in percentages of RET in peripheral blood of male rats treated orally with MMS once a day for 28 days

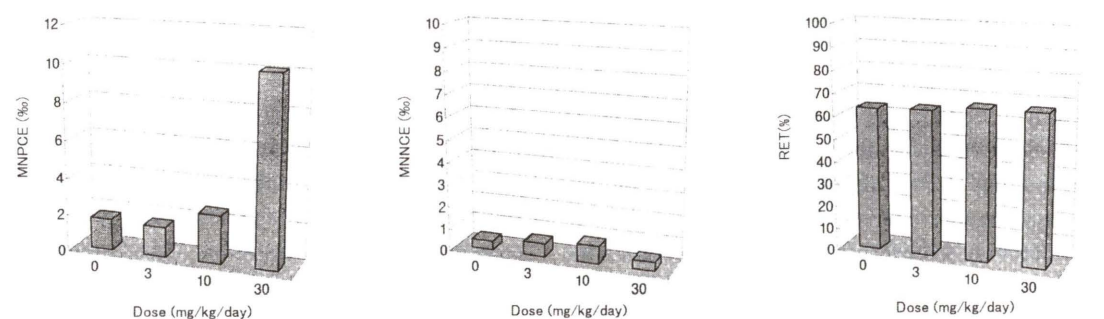


Fig. 4 Micronucleus and RET frequencies in bone marrow of male rats treated orally with MMS once a day for 28 days

about 3. The volume of administration was 5 ml/kg body weight. Five animals were assigned to each group. The control animals received distilled water in the same manner as MMS. All animals were observed for survival every day and were weighed once a week. A 24 h food consumption value was determined weekly.

The peripheral blood was sampled before treatment and at 24 h after the 2nd, 3rd, 4th, 7th, 14th, 21st, and final treatments. The bone marrow was collected 24 h after the last treatment. Acridine orange staining (Hayashi et al., 1983) was used to identify bone marrow micronuclei, and peripheral erythrocytes were stained with acridine orange supravitaly (Hayashi et al., 1990). The animals were necropsied on the day following the final dose after euthanasia with carbon dioxide. Various organs, such as the liver, spleen, testes, and epididymides, were weighed and fixed with 10% buffered formalin. These fixed organs were embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin (HE). The specimens were then examined microscopically to evaluate the effects of MMS. The frequencies of micronucleated immature erythrocytes (MNPCE), micronucleated mature erythrocytes (MNNCE), and micronucleated reticulocytes (MNRET) were examined on the basis of observation of 2,000 of each respective cell type. To assess cytotoxicity, the percentage of reticulocytes (RET) was obtained by analyzing 1,000 erythrocytes for bone marrow and for peripheral blood.

#### Statistical analysis

The mean and standard deviation were calculated for the frequencies of MNPCE, MNNCE and MNRET, and the percentage of RET in the overall erythrocyte count for each treatment group. The frequencies of MNPCE, MNNCE, and MNRET were compared between the negative control group and each treatment group, using a significance test employing a binomial distribution-based statistical procedure (Kastenbaum and Bowman, 1970). Student's t-test (Yoshimura, 1987) was used for comparison of RET percentage in the overall erythrocyte count between the negative control and the treatment groups. The level of statistical significance of difference was set at 0.05.

#### Results and Discussion

No animal died during the treatment period. No changes in clinical signs, body weight or food consumption were observed. The MNRET frequencies in peripheral blood are shown in Fig. 1. Increases in MNRET frequencies were observed from day 2 of administration in MMS-treated groups. Significant differences from the control group were observed in the 10 or 30 mg/kg groups. The maximum frequency of MNRET was observed at day 2 or 3 of administration, and remained constant thereafter. The frequencies of MNNCE in the peripheral blood are shown in Fig. 2. High MNNCE frequencies were observed at day 21 or 28 of administration in the 30 mg/kg group, but were not



**Table 1** Organ weights in male rats treated orally with MMS once a day for 28 days

Dose (mg/kg)	No. of animals	Final body weight (g)	Liver	Spleen	Testes	Epididymides
[Absolute organ weight <sup>a)</sup> ]						
Control	5	347.2 ± 18.7	14.35 ± 1.39	0.78 ± 0.09	2.94 ± 0.15	0.85 ± 0.07
MMS : 3 mg/kg	5	369.0 ± 49.2	16.68 ± 3.46	0.75 ± 0.12	3.19 ± 0.30	0.87 ± 0.09
MMS : 10 mg/kg	5	381.2 ± 20.3	19.07 ± 1.68	0.77 ± 0.11	3.16 ± 0.20	0.90 ± 0.07
MMS : 30 mg/kg	5	320.4 ± 46.8	17.21 ± 2.71	0.84 ± 0.17	2.64 ± 0.30	0.69 ± 0.07 **
[Relative organ weight <sup>b)</sup> ]						
Control			41.28 ± 2.36	2.25 ± 0.28	8.48 ± 0.21	2.45 ± 0.14
MMS : 3 mg/kg			44.92 ± 3.97	2.07 ± 0.45	8.73 ± 1.09	2.36 ± 0.19
MMS : 10 mg/kg			49.98 ± 2.12 **	2.02 ± 0.30	8.32 ± 0.83	2.36 ± 0.21
MMS : 30 mg/kg			53.65 ± 1.14 **	2.60 ± 0.22	8.34 ± 1.15	2.17 ± 0.29

Values are means ± standard deviations. Units are as follows : a) g and b) g/kg.

\*\* : p < 0.01 (significant difference from the control)

**Table 2** Histopathological findings in male rats treated with MMS orally once a day for 28 days

Findings	Dose (mg/kg)	Control				MMS 3 mg/kg				MMS 10 mg/kg				MMS 30 mg/kg			
	Grade	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Testes																	
Vacuolar degeneration of seminiferous tubules		5	0	0	0	5	0	0	0	4	1	0	0	3	1	1	0
Exfoliation of germ cells into the lumen		5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0
Epididymal spermatids																	
Cell debris in epididymal ducts		5	0	0	0	5	0	0	0	3	2	0	0	0	0	4	1
Liver																	
Extramedullary hematopoiesis		0	5	0	0	0	5	0	0	1	4	0	0	0	5	0	0
Granulomatous lesion		2	3	0	0	3	2	0	0	4	1	0	0	4	1	0	0

Grading was as follows : -, no remarkable change ; +, slight changes ; ++, moderate changes ; +++, severe changes.

significantly different from control group frequencies. Percentages of RET in peripheral blood are shown in Fig. 3. There were dose-dependent decreases in RET percentage for about 1 week, but no dose-dependent changes thereafter. The MNPCE frequencies, MNNCE frequencies and RET percentages in bone marrow are shown in Fig. 4. Increase in MNPCE frequencies was observed at 30 mg/kg. A significant difference from the control group was observed for the 30 mg/kg group. However, there were no significant differences from the control group in either MNNCE frequencies or RET percentages. No remarkable abnormalities were observed in necropsy findings at 24 h after the final administration. The organ weights and relative organ weights are shown in Table 1. A tendency toward increased liver weight was observed in the 10 and 30 mg/kg groups. Significantly decreased weight of the epididymides was observed in the 30 mg/kg group. Significantly increased relative liver weights were observed in the 10 and 30 mg/kg group. The histopathological findings are shown in Table 2.

Vacuolar degeneration of the seminiferous tubules and exfoliation of germ cells into the lumen or cell debris in epididymal ducts were observed in 2 of 5 males in the 10 mg/kg/day group and all males in the 30 mg/kg/day group. The range and severity of these findings were focal and mild in the 10 mg/kg/day group, and extensive and moderate in the 30 mg/kg/day group, respectively. Only spontaneous or incidental findings were observed in the liver. No abnormalities were observed in the spleen or bone marrow.

Micronucleus assays are usually performed as independent studies in mice using a short-term treatment protocol. The mouse peripheral blood micronucleus assay has been integrated into general toxicity studies and long-term carcinogenesis bioassays (MacGregor et al., 1990). However, long-term micronucleus assays with mice are not usually performed, since most general toxicity studies use rats. If repeat-dose micronucleus assays with 2-week or longer treatment is feasible with rats, labor and number of animals can be reduced ; in addition

information on toxicokinetics and other diverse toxicity information and genotoxicity can be obtained simultaneously in the same animals, with great benefit to the comprehensive safety evaluation of chemicals. We conducted a micronucleus assay in rats receiving repeated treatment for 4 weeks, and evaluated whether the micronucleus assay could be incorporated in the 4-week general toxicity study of the rat when methyl methanesulfonate (MMS), a well known micronucleus inducer was used as a model chemical at doses of 3, 10, and 30 mg/kg/day.

The present study suggested that the micronucleus assay can be integrated into general toxicity studies in rats. The peripheral blood samples collected at the 3 rd day after the beginning of treatment and the bone marrow and peripheral blood samples collected at necropsy 4 weeks after the beginning of treatment were found to be acceptable for assessment of micronucleus frequencies.

## References

- CSGMT (The Collaborative Study Group for Micronucleus Test) (1992) Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining : The summary report of 5th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS, Mutat. Res., 278, 83-89.
- Hamada, H., S. Sutou, T. Morita, A. Wakata, S. Asanami, S. Hosoya, S. Ozawa, K. Kondo, M. Nakajima, H. Shimada, K. Osawa, Y.

- Kondo, N. Asano, S. Sato, H. Tamura, N. Yajima, R. Marchall, C. Moore, D. H. Blakey, L. M. Schechtman, S. Ito, C. Namiki and M. Hayashi (2000) Evaluation of the rodent long-term micronucleus assay : Summary of the 13th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS, Environ. Mol. Mutagen. (in press).

- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr (1990) An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutat. Res., 120, 241-247.

- Hayashi, M., S. Sutou, H. Shimada, S. Sato, Y.F. Sasaki and A. Wakata (1989) Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test, The 3rd collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS, Mutat. Res., 223, 329-344.

- Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M. Ishidate, Jr (1983) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutat. Res., 245, 245-249.

- Kastenbaum, M. A. and K. O. Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, Mutat. Res., 9, 529-549.

- MacGregor, J. T., C. M. Wehr, P. R. Henica and M. D. Shelby (1990) The *in vivo* erythrocyte micronucleus test : Measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundam. Appl. Toxicol., 14, 513-522.

- Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo and M. Hayashi (1998) Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood : Summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS, Environ. Mol. Mutagen., 32, 84-100.

- Yoshimura, I. (1987) Statistical analysis of toxicity and drug efficacy data, Scientist Inc., Tokyo, pp. 28-40 (in Japanese).



## 環境変異原研究における有機化学の役割

早津 彦哉

共立薬科大学 〒105-8512 港区芝公園 1-5-30  
岡山大学薬学部 〒700-8530 岡山市津島中 1-1-1

## Organic chemistry plays critical roles in studies of environmental mutagens

Hikoya Hayatsu

Kyoritsu College of Pharmacy, and Okayama University,  
Tsushima, Okayama 700-8530, Japan

## Summary

The role of organic chemistry in the science of environmental mutagenesis is discussed. The importance of teaching young students the fascination of organic chemistry is emphasized.

**Keywords** : organic chemistry, genome, mutagenesis, mutagens

変異原 (mutagens) とその起こす変異 (mutagenesis) に関する諸問題を解明することが、環境変異原学会の主要な目的である。この解明に向けて動員される諸科学の中で、化学、特に有機化学は重要な役割を担っている。以下の課題を解くためには、有機化学が必須であったし、これからもますます重要である。

- (1) 未知の変異原物質の構造解明
- (2) 変異原物質のDNAへの反応の機構解析
- (3) 変異誘導の化学的理解
- (4) 変異原の代謝活性化の研究
- (5) 変異原に関する周辺の諸問題
  - (i) 抗変異原, 抗発癌性因子の化学的同定とその作用機構の解明
  - (ii) 変異原物質の分離定量法の研究

有機化学は精密科学である。有機化合物の構造決定で代表されるように、いったん決まった構造は、科学の根本原理が崩れない限り、千古不変の真理として続いてゆく人類の知恵の成果である。もちろん元素の名称とか、構造式の書き方などは、約束事として人間が仮に決めたものであり、変わりうるものであるが、構造の本質は将

来変わることはない。変異原と核酸との反応の記述についても、その本質はほとんど誤りのないものと考えられる。

これに対して、生物現象の方とはいうと、その記載は不変とはいえないものが多い。たとえば遺伝子の構造と機能など、ほんやりとした部分がたくさんあって、現在のところ「千古不変」とはとても言い難い。もっと具体的な話になると、遺伝子診断は精密有機化学の装いはしているが、突き詰めると、「酵素は100%正確に働く」、「ハイブリダイゼーションは必ず正確に起こる」という「信条」に基づいている。最近、遺伝子診断の誤りで人生が滅茶苦茶にされた実例があり、これは科学が人間の不幸をもたらした悪例である。

さて、有機化学がかくも大切であるとして、変異原研究においてどうしたらよいかを考えると、私が一番重要と思うのは教育である。科学者の卵が有機化学に興味を持って、人生をそれに打ち込もうと心を決めるように、よい教育がなされることが大切である。私自身を振り返ると、大学生の時に聞いた落合英二先生の有機化学の講義に目を開かされ、以後ずっと有機化学が「好きで、面白い」という気持ちが続いている。

このシンポジウムを機に、環境変異原研究での化学の重要性が増すことが期待される。

受付：2000年9月22日 受理：2000年9月22日  
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第11回公開シンポジウム「環境変異原の活性発現と抑制の化学的機構」で発表された。  
This paper was presented at the 11th JEMS Annual Symposium at the ABC Hall, Tokyo, June 3rd, 2000. The Symposium entitled "Chemical Mechanisms of Depression and Repression of Activity In Environmental Mutagenesis", was organized by Masataka Mochizuki and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.



## Does tamoxifen-induced DNA damage cause endometrial cancer?

Shinya Shibutani

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

### Summary

I have previously described genotoxicity of tamoxifen-derived DNA adducts in this journal (Environ. Mutagen Res., 20 : 201-211, 1998) . However, a large number of reports regarding this issue have published in last two years. Here I review the recent findings from my laboratory and others. Tamoxifen-DNA adducts are primarily formed via sulfation of  $\alpha$ -hydroxy moieties of tamoxifen, *N*-desmethyltamoxifen, and tamoxifen *N*-oxide.  $\alpha$ -(*N*<sup>2</sup>-Deoxyguanosinyl) tamoxifen (dG-N<sup>2</sup>-TAM) and  $\alpha$ -(*N*<sup>2</sup>-deoxyguanosinyl)-*N*-desmethyltamoxifen (dG-N<sup>2</sup>-*N*-desmethylTAM) were major adducts in the liver of rats and mice treated with tamoxifen.  $\alpha$ -(*N*<sup>2</sup>-Deoxyguanosinyl) tamoxifen *N*-oxide (dG-N<sup>2</sup>-TAM *N*-oxide) was also detected as a minor adduct in mouse liver. Site-specific mutagenesis studies showed that dG-N<sup>2</sup>-TAM is a potential mutagenic lesion, generating mainly G  $\rightarrow$  T transversions, accompanied by fewer G  $\rightarrow$  A transitions in mammalian cells. This tamoxifen adduct can be removed from DNA by nucleotide excision repair. Significant amounts of dG-N<sup>2</sup>-TAM adducts were detected in the endometrium of women treated with tamoxifen; a marked inter-individual variation was observed in the level of tamoxifen-DNA adducts. Such mutagenic tamoxifen-DNA adducts, if not repaired, may act as initiators, leading to development of endometrial cancer. Genotoxicity of toremifene, a chlorinated tamoxifen analog, was much lower than tamoxifen, due to the limited formation of DNA adducts induced by toremifene metabolites. Use of toremifene, instead of tamoxifen, may reduce incidence of endometrial cancer in women receiving breast cancer prevention treatment.

**Keywords :** tamoxifen, toremifene, DNA adduct, endometrial cancer, breast cancer

Tamoxifen, an antiestrogen, is widely used as a first-line endocrine therapy for breast cancer patients ; more than 500,000 women in the United States currently are being treated with this drug (Osborne, 1998). A randomized clinical trial of healthy women at high risk of developing this disease showed that therapeutic doses of tamoxifen reduced the risk of invasive breast cancer approximately 50 % (Fischer et al., 1998). Therefore, tamoxifen was approved in 1998 for use as a chemopreventive agent. Unfortunately administration of tamoxifen to breast cancer patients was associated with an increased risk of endometrial cancer (Killackey et al., 1985 ; Seoud et al.,

1993 ; Fischer et al., 1994 ; van Leeuwen et al., 1994 ; Clarke et al., 1998 ; Bernstein et al., 1999). The increase in endometrial cancers was also observed during the tamoxifen chemoprevention trial (Fischer et al., 1994 & 1998). Tamoxifen has been listed as a human carcinogen by the IARC (IARC Monographs, 1996). The cellular mechanism responsible for this carcinogenic effect has not been defined (Tannenbaum, 1997 ; Wogan, 1997 ; Stearns and Gelman, 1998). Since tamoxifen induces hepatocellular carcinomas in rats (Williams et al., 1993 ; Greaves et al., 1993 ; Hard et al., 1993) and tamoxifen-DNA adducts have been detected in rat liver (Han and Liehr, 1992 ; Osborne et al., 1996 ; Tannenbaum, 1997 ; Divi et al., 1999), DNA adducts induced by

received : October 27, 2000 accepted : October 30, 2000

© Environmental Mutagen Society of Japan

本稿は日本環境変異原学会第11回公開シンポジウム「環境変異原の活性発現と抑制の化学的機構」で発表された。  
This paper was presented at the 11th JEMS Annual Symposium at the ABC Hall, Tokyo, June 3rd, 2000. The Symposium entitled "Chemical Mechanisms of Depression and Repression of Activity In Environmental Mutagenesis", was organized by Masataka Mochizuki and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.



tamoxifen metabolites may initiate endometrial cancer. However, in women treated with tamoxifen, the risk of developing hepatocellular cancer is minimal. The failure to detect tamoxifen-DNA adducts (Carmichael et al., 1996 & 1999) in human endometrial tissue (Hemminki et al., 1996) or in liver (Martin et al., 1995) supported the view held by some investigators (Stearn and Gelman, 1998; Carmichael et al., 1999) that estrogenic and/or other epigenetic effects of tamoxifen account for the carcinogenic properties of the drug.

### Formation of tamoxifen-DNA adducts in rodents

Tamoxifen is metabolized in the liver of rodents and humans to  $\alpha$ -hydroxytamoxifen ( $\alpha$ -OHTAM), *N*-desmethyltamoxifen (*N*-desmethylTAM), tamoxifen *N*-oxide (TAM *N*-oxide), and 4-hydroxytamoxifen (4-OHTAM) (Phillips et al., 1994; Jarman et al., 1995; Poon et al., 1995). The differences in metabolism and activation of tamoxifen in rat and human has been recently reviewed (White, 1999). Tamoxifen  $\alpha$ -sulfate is highly reactive the exocyclic amino group of guanine in DNA, resulting in the formation of two *trans* (fr-1 & fr-2) and two *cis* (fr-3 & fr-4) epimers of  $\alpha$ -(*N*<sup>2</sup>-deoxyguanosyl) tamoxifen (dG-*N*<sup>2</sup>-TAM) (Fig. 1) (Dasaradhi and Shibutani, 1997), as similarly observed with  $\alpha$ -acetyltamoxifen (Osborne et al., 1996 & 1997; Dasaradhi and Shibutani, 1997). *Trans* and *cis* forms of dG-*N*<sup>2</sup>-TAM are produced via a short-lived carbocation intermediate (Sanchez et al., 1998).  $\alpha$ -OHTAM is a substrate for rat and human hydroxysteroid sulfotransferases, suggesting a metabolic pathway by which tamoxifen could be activated to react with DNA and thereby exert genotoxic effects in target tissues (Shibutani et al., 1998b & 1998c; Davis et al., 1998).

A mass-spectroscopy analysis indicated that dG-*N*-desmethylTAM is another major adduct, in addition to dG-*N*<sup>2</sup>-TAM, in the liver of rats treated with tamoxifen (Rajaniemi et al., 1999). When rats were treated with *N*-desmethylTAM, one major adduct was also detected in the liver by <sup>32</sup>P-postlabeling-HPLC analysis (Phillips et al., 1999; Brown et al., 1999).  $\alpha$ -acetoxy-*N*-desmethylTAM was recently prepared from  $\alpha$ -OHTAM as a model activated form of *N*-desmethylTAM (Gamboa da Costa et al., 2000; Kitagawa et al., 2000). This activated form is highly reactive to dG, resulting in two products identified as a mixture of two *trans*-epimers or two *cis*-epimers of  $\alpha$ -(*N*<sup>2</sup>-deoxyguanosyl)-*N*-desmethyltamoxifen (dG-*N*<sup>2</sup>-*N*-desmethylTAM) (Fig. 1). Using these standards, dG-*N*<sup>2</sup>-*N*-desmethylTAM was detected as the second major adduct in the liver of rats and mice treated with tamoxifen by <sup>32</sup>P-postlabeling-HPLC analysis (Umemoto et al., in submission).

$\alpha$ -(*N*<sup>2</sup>-Deoxyguanosyl) tamoxifen *N*-oxide (dG-*N*<sup>2</sup>-

TAM *N*-oxide) (Fig. 1) was identified by reacting dG with  $\alpha$ -acetyltamoxifen *N*-oxide (Umemoto et al., 1999). This adduct was also detected in the liver of mice treated with tamoxifen; the *trans*- and *cis*-forms of dG-*N*<sup>2</sup>-TAM *N*-oxide accounted for 7.2% and 0.7%, respectively, of the total tamoxifen-DNA adducts observed (Umemoto et al., 2000). However, these adducts were not detected in the liver of rats (Umemoto et al., in submission). The formation of dG-*N*<sup>2</sup>-TAM *N*-oxide adducts may be due to the *N*-oxidation activity of flavin-containing monooxygenase in the mouse liver (Mani and Kupfer, 1991; Mani et al., 1993; Lim et al., 1994; Hengstler et al., 1999).

$\alpha$ -(*N*<sup>2</sup>-Deoxyguanosyl)-4-hydroxytamoxifen (dG-*N*<sup>2</sup>-4-OHTAM) is also generated when 4-OHTAM quinone methide (Moorthy et al., 1996), produced by oxidation of 4-OHTAM, is reacted with dG *in vitro* (Marques and Beland, 1997). However, this adduct was not found in the liver of rats treated with tamoxifen or  $\alpha$ -OHTAM, and 4-OHTAM (Martin et al., 1998; Beland et al., 1999). These results suggest that 4-OHTAM may not be involved in the formation of tamoxifen-DNA adducts. Thus, tamoxifen-DNA adducts are formed primarily via sulfation or acetylation of  $\alpha$ -hydroxylation of tamoxifen and its metabolites, *N*-desmethylTAM and TAM *N*-oxide.

### Mutagenic potential of dG-*N*<sup>2</sup>-tamoxifen DNA adducts

Among several tamoxifen-DNA adducts described above, mutagenic specificity and frequency of dG-*N*<sup>2</sup>-TAM was established using site-specific mutagenesis studies (Moriya, 1993). Oligodeoxynucleotides containing a single stereoisomer of dG-*N*<sup>2</sup>-TAM were inserted into a gapped single-strand vector as described in Fig. 2 (Terashima et al., 1999). The constructed vectors modified with dG-*N*<sup>2</sup>-TAM were used to transfect simian kidney (COS-7) cells. The progeny plasmid obtained was used to transform *Escherichia coli* DH10B for detecting mutations. The transformants were analyzed by oligodeoxynucleotide hybridization and sequencing to determine the mutational specificity.

dG-*N*<sup>2</sup>-TAM adducts promoted primarily G  $\rightarrow$  T transversions, along with small numbers of G  $\rightarrow$  A transitions (Table 1). Except for one *trans*-epimer (fr-1) of dG-*N*<sup>2</sup>-TAM, the mutational frequencies were 12.4-14.3%, which is slightly higher than that observed with dG-C8-AAF, a typical model chemical carcinogen (Shibutani et al., 1998a). No significant mutations were observed with the unmodified vector. The mutagenic specificities were similar to that observed in primer extension reactions catalyzed by mammalian DNA polymerases on dG-*N*<sup>2</sup>-TAM-modified DNA templates (Shibutani & Dasaradhi, 1997) and in the liver DNA of lambda/lacI transgenic rats (Davies et al., 1997). Thus, dG-*N*<sup>2</sup>-TAMs

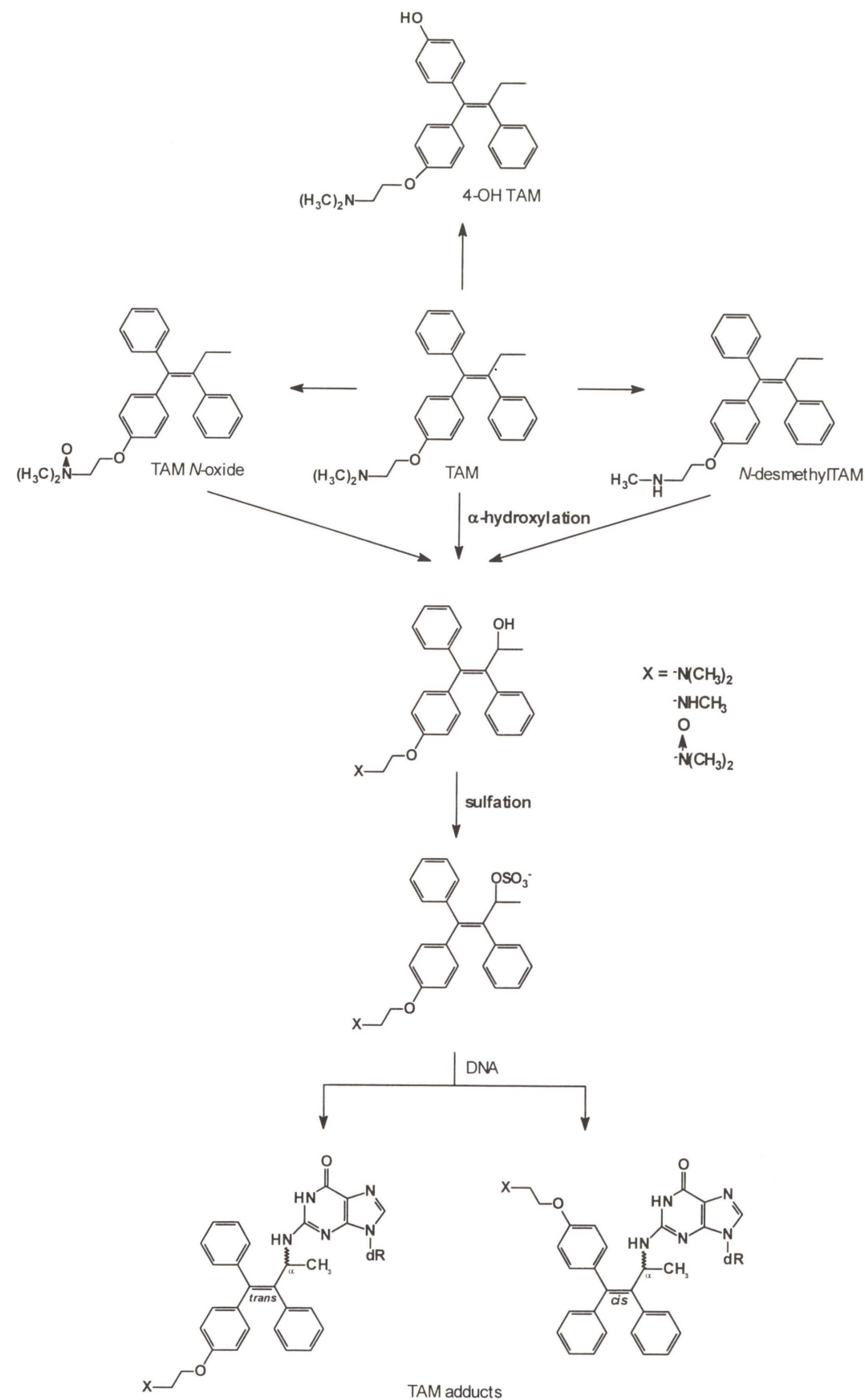


Fig. 1 Formation of *trans* and *cis* forms of tamoxifen-DNA adducts via *O*-sulfation of tamoxifen metabolites



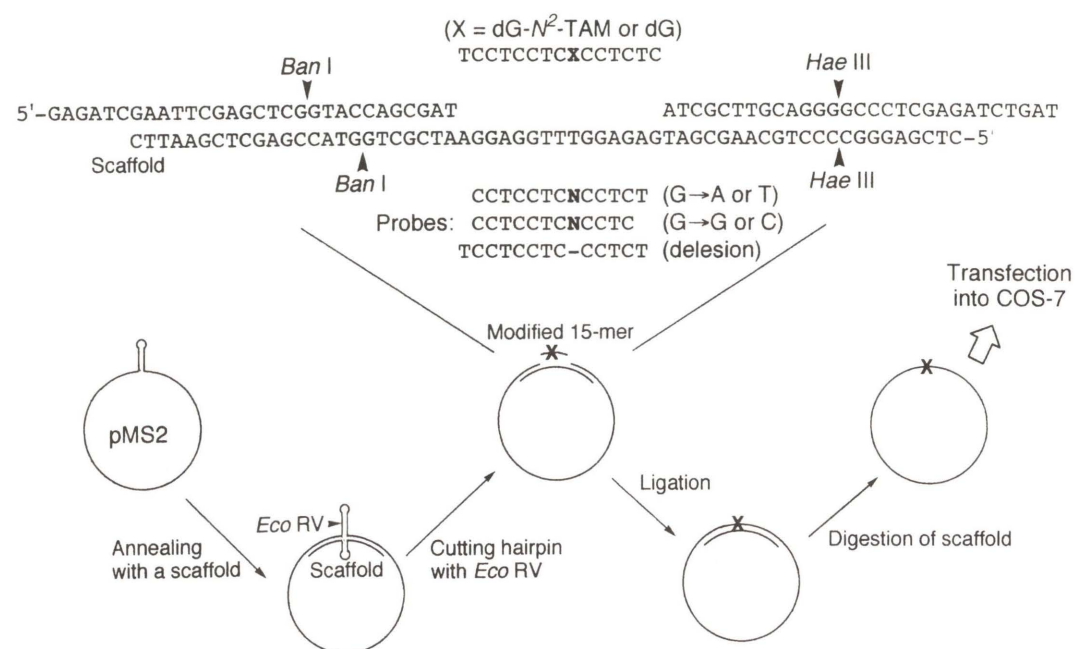


Fig. 2 Construction of single-stranded vectors containing a single dG-N<sup>2</sup>-TAM adduct. The upper strand is a part of ss pMS2 sequence. The probes listed were used for oligodeoxynucleotide hybridization to determine mutation specificity of dG-N<sup>2</sup>-TAM.

Table 1 Mutagenic potential of dG-N<sup>2</sup>-TAM in simian kidney cells

Mutation	dG	dG-N <sup>2</sup> -TAM			
		<i>trans</i> -1	<i>trans</i> -2	<i>cis</i> -1	<i>cis</i> -2
G→T	0.4	1.1	9.6	10.9	12.3
G→A	0	1.5	2.8	1.7	1.7
G→C	0	0.7	0	0.8	0
Δ <sup>1</sup>	0	0	0	0	0
Total	0.4 %	3.3 %	12.4 %	13.4 %	14.0 %

are mutagenic lesions in mammalian cells. The mutagenic potential of dG-N<sup>2</sup>-N-desmethylTAM and dG-N<sup>2</sup>-TAM N-oxide adducts has not yet examined.

### Repair of tamoxifen-DNA adducts

To determine the repair potential of tamoxifen-DNA adducts, a labeled 143 base pair duplex was assembled from six different oligodeoxynucleotides (Fig. 3). A 15-mer oligodeoxynucleotide containing a single dG-N<sup>2</sup>-TAM used for site-specific mutagenesis studies (Terashima et al., 1999) was 5' labeled with <sup>32</sup>P and inserted at the center of the DNA duplex. Arrows in Fig. 3 indicate the expected sites of dual DNA incision by mammalian or human nucleotide excision repair. When the duplex was incubated with cell-free extracts from mammalian cells or reconstituted human excision nuclease system, <sup>32</sup>P-labeled 24-32 mers were released (Shibutani et al., 2000 b). This indicates that dG-N<sup>2</sup>-TAM adducts can be removed by nucleotide excision repair. If tamoxifen-DNA adducts are not repaired, such adducts may initiate mutations, leading to development of endometrial cancers.

\* 5'-TCCTCCTCXCCTCTC-3' (X = dG-N<sup>2</sup>-TAM; \* = <sup>32</sup>P)

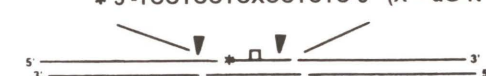


Fig. 3 Schematic representation of the oligonucleotide excision assay

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

<sup>32</sup>P-Postlabeling combined with chromatography have been used to detect tamoxifen-DNA adducts in endometrial tissues (Hemminki et al., 1996 ; Carmichael et al., 1996 ; Shibutani et al., 1999). However, there is a conflict regarding the detection of tamoxifen-DNA adducts in the human tissues. Using a <sup>32</sup>P-postlabelling-TLC technique, Carmichael and his colleagues failed to detect tamoxifen adducts in the endometrium of tamoxifen-treated patients (Carmichael et al., 1996). Using <sup>32</sup>P-postlabeling-HPLC analysis, Hemminki et al. detected a putative tamoxifen-induced adduct in the endometrial tissues obtained from breast cancer patients (Hemminki et al., 1996) : the level of tamoxifen adducts was 0.29-0.82 adducts/10<sup>8</sup> bases but the adducts were not identified using standard markers. Carmichael et al. (1999) recently reported a <sup>32</sup>P-postlabeling-HPLC analysis in which they were unable to reproduce the results of a study by Hemminki et al. (1996).

Using a combination of butanol extraction procedure and <sup>32</sup>P-postlabeling-TLC (Shibutani et al., 1999) (Fig. 4),

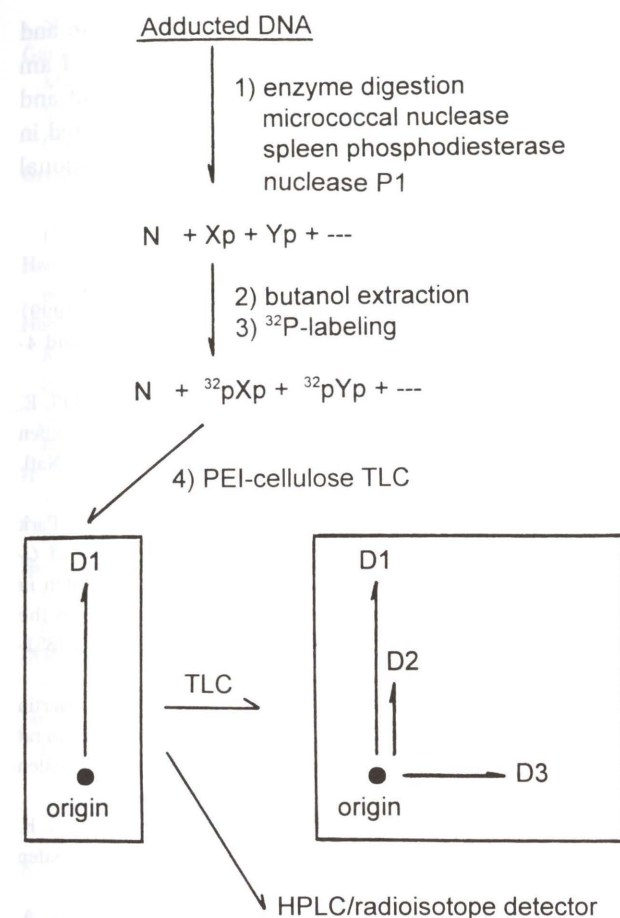


Fig. 4 <sup>32</sup>P-Postlabeling analysis used for detection of tamoxifen-DNA adducts

we detected tamoxifen-DNA adducts in endometrial tissues ; the level of the total tamoxifen adducts were 1.5-13.1 adducts/10<sup>8</sup> bases. This analytical method, however, fails to resolve the two *trans*-epimers of dG-N<sup>2</sup>-TAM and to clearly separate them from other tamoxifen-DNA adducts. Therefore, analysis of tamoxifen adducts in the human endometrium was recently attempted by coupling high resolution <sup>32</sup>P-postlabeling-HPLC (Martin et al., 1998) with partial purification of DNA adducts (Shibutani et al., 2000 a). We found that *cis* and *trans* tamoxifen-DNA adducts were present in significant amounts in endometrial tissue in eight of 16 women treated with tamoxifen (Table 2). The level of total tamoxifen adducts was 0.2-18.0 adducts/10<sup>8</sup> bases in agreement with our previous study using <sup>32</sup>P-postlabeling-TLC (Shibutani et al., 1999). We attribute the failure of other investigators to detect these lesions (Carmichael et al., 1996 & 1999) to a relative lack of sensitivity of methods used for the analysis. The tamoxifen-DNA adduct levels in target organs have been correlated with tumor incidence in experimental animals (Ottender and Lutz, 1999) ; comparable data do not exist for human subjects. Tamoxifen-DNA adducts are miscoding lesions (Shibutani and Dasaradhi, 1997) and have been shown to

Table 2 Level of Tamoxifen-DNA adducts in the endometrium of women treated with tamoxifen

Sample	Age	Duration of therapy (months)	dG-N <sup>2</sup> -TAM			Total
			<i>trans</i> -form fr-1	<i>trans</i> -form fr-2	<i>cis</i> -form fr-3&4	
T1	46	4	4.9	2.5	8.3	15.7
T4	45	37	3.2	0.26	2.8	6.3
T7	49	40	0.52	4.2	N.D.	4.7
T8	75	34	N.D.	N.D.	4.0	4.0
T10	38	7	0.51	1.6	N.D.	2.1
T11	73	72	6.0	5.6	6.4	18.0
T12	76	15	N.D.	0.20	N.D.	0.20
T14	52	60	N.D.	N.D.	1.6	1.6

be mutagenic in mammalian cells (Terashima et al., 1999). This fact, coupled with their presence in the endometrium, suggests that a genotoxic mechanism may be responsible for tamoxifen carcinogenic effect on this tissue.

One of the *trans*-epimers (fr-1) of dG-N<sup>2</sup>-TAM was detected in six endometrial samples (Table 2) ; the level of adduct was 0.5-6.0 adducts/10<sup>8</sup> bases (Shibutani et al., 2000 a). Under <sup>32</sup>P-postlabeling-HPLC condition used for this analysis, the retention time of fr-1 of dG-N<sup>2</sup>-TAM was similar to that of the major *trans*-epimer (fr-2) of dG-N<sup>2</sup>-N-desmethylTAM observed *in vitro* (Kitagawa et al., 2000). Therefore, fr-1 detected in the endometrial samples may contain the *trans*-epimer of the dG-N<sup>2</sup>-N-desmethylTAM adducts. The endometrial DNA samples will be reexamined when an appropriate HPLC system that can resolve all the isomers of dG-N<sup>2</sup>-TAM, dG-N<sup>2</sup>-N-desmethylTAM, and dG-N<sup>2</sup>-TAM N-oxide has been established.

### Inter-individual variation in the level of tamoxifen-DNA adducts in human endometrium

A marked inter-individual variation was observed in the level of tamoxifen-DNA adducts in the endometrium of women treated with tamoxifen (Shibutani et al., 2000 a) (Table 2) ; one subject developed a high level of adducts (15.7 adducts/10<sup>8</sup> bases) after only 4 months treatment while another subject showed a low level of adducts (1.6 adducts/10<sup>8</sup> bases) even after 5 years treatment. No tamoxifen adducts were detected in eight of 16 patients. This variability may occur due to the differences in the activity of enzymes involved in the  $\alpha$ -hydroxylation of tamoxifen and its metabolites and/or cellular sulfotransferases that converts  $\alpha$ -OHTAM to an activated form that can react with DNA.  $\alpha$ -OHTAM was recently found to be deactivated by O-glucuronylation (Boocock et al., 2000). The capacity detoxifying  $\alpha$ -OHTAM may vary depending on individuals and influence the formation



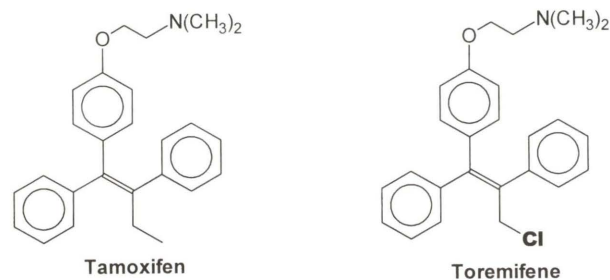


Fig. 5 Structures of tamoxifen and toremifene

of tamoxifen-DNA adduct. In addition, adduct levels also vary depending on the ability of nucleotide excision repair to tamoxifen adducts (Shibutani et al., 2000b).

### Lower genotoxicity of toremifene

Toremifene, a chlorinated tamoxifen analog (Fig. 5), has been used for breast cancer chemotherapy since 1996 in Japan and 1998 in United States. Tamoxifen is a hepatocarcinogen in rats while toremifene is not (Hard et al., 1993). We found recently that  $\alpha$ -hydroxytoremifene is not a substrate for hydroxysteroid sulfotransferases and that reactivity of  $\alpha$ -acetoxytoremifene to DNA is at least two order of magnitudes less than that of  $\alpha$ -acetoxytamoxifen (Shibutani et al., unpublished data). These results are consistent with the fact that toremifene promoted two-order of magnitude lower levels of DNA adducts in rat liver compared to tamoxifen (White et al., 1992). Genotoxic effects of tamoxifen are thought to be involved in development of rat hepatocarcinoma. The lower genotoxicity of toremifene may be due to the limited formation of DNA adducts induced by toremifene. Since clinical effects of toremifene for breast cancer patients are similar to that of tamoxifen, the use of toremifene may reduce incidents of endometrial cancer observed in breast cancer patients treated with tamoxifen and healthy women receiving tamoxifen chemoprevention.

### Conclusion

Mutagenic tamoxifen-derived DNA adducts, if not repaired, may pose a potential risk of development of endometrial cancer in women treated with tamoxifen. Less genotoxic drugs such as toremifene may be better chemopreventive agents for healthy women at high risk of breast cancer.

### Acknowledgements

I thank Drs. L. Dasaradhi and A. Ravindernath for synthesizing tamoxifen and toremifene metabolites, Ms. N. Suzuki and Dr. I. Terashima for exploring mutagenic property of tamoxifen-DNA adducts, and Drs. M. Pearl and S. Sugarman for collecting endometrial samples from patients. Analysis of tamoxifen adducts in rodents has

been conducted in collaboration with Dr. Umemoto and his colleagues, Tokushima University in Japan. I am indebted to Dr. A. P. Grollman for encouragement and interest in this program. This research was supported in part by a Grant ES 09418 (to S.S.) from the National Institute of Environmental Health Sciences.

### References

- Beland, F. A., L.P. McDaniel and M. M. Marques (1999) Comparison of the DNA adducts formed by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen *in vivo*, *Carcinogenesis* 20, 471-477.
- Bernstein, L., D. Deapen, J. R. Cerhan, S. M. Schwartz, J. Liff, E. McGann-Maloney, J. A. Perlman and L. Ford (1999) Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk, *J. Natl. Cancer Institute* 91, 1654-1662.
- Boocock, D. J., J. L. Maggs, K. Brown, I. N. White and B. K. Park (2000) Major inter-species differences in the rates of *O*-sulphonation and *O*-glucuronylation of  $\alpha$ -hydroxytamoxifen *in vitro*: a metabolic disparity protecting human liver from the formation of tamoxifen-DNA adducts, *Carcinogenesis* 21, 1851-1858.
- Brown, K., R. T. Heydon, R. Jukes, I. N. H. White and E. A. Martin (1999) Further characterization of the DNA adducts formed in rat liver after the administration of tamoxifen, *N*-desmethyltamoxifen or *N*,*N*-didesmethyltamoxifen, *Carcinogenesis* 20, 2011-2016.
- Carmichael, P. L., A. H. N. Ugumadu, 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.
- Carmichael, P. L., S. Sardar, N. Crooks, P. Neven, I. Van Hoof, A. Ugumadu, T. Bourne, E. Tomas, P. Hellberg, A. Hewer and D. H. Phillips (1999) Lack of evidence from HPLC  $^{32}$ P-postlabeling from tamoxifen-DNA adducts in the human endometrium, *Carcinogenesis* 20, 339-342.
- Clarke, M., R. Cillins, C. Davies, J. Godwin, R. Gray and R. Peto (1998) Tamoxifen for early breast cancer: An overview of the randomized trials, *Lancet* 351, 1451-1467.
- 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 lamda/lacl transgenic rats, *Cancer Res.* 57, 1288-1293.
- Davis, W., S. Venitt and D. H. Phillips (1998) The metabolic activation of tamoxifen and alpha-hydroxytamoxifen to DNA-binding species in rat hepatocytes proceeds via sulphonation, *Carcinogenesis* 19, 861-866.
- Divi, R. L., M. R. Osborne, A. Hewer, D. H. Phillips and M. C. Poirier (1999) Tamoxifen-DNA adduct formation in rat liver determined by immunoassay and  $^{32}$ P-postlabeling, *Cancer Res.* 59, 4829-4833.
- 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.
- Fischer, B., J. P. Costantino, L. Wickerham, C. K. Redmond, M. Kavanah, W. M. Cronin, V. Botel, A. Robidoux, N. Dimitrov, J. Atkins, M. Daly, S. Wieand, E. Tan-Chiu, L. Ford, N. Wormark, et al. (1998) Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study, *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1371-1388.
- Gamboa da Costa, G., L. P. Hamilton, F. A. Beland and M. M. Marques (2000) Characterization of the major DNA adduct formed by  $\alpha$ -hydroxy-*N*-desmethyltamoxifen *in vitro* and *in vivo*, *Chem. Res. Toxicol.* 13, 200-207.
- Greaves, P., R. Goonetilleke, G. Nunn, J. Topham and T. Orton (1993) Two-year carcinogenicity study of tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived rats, *Cancer Res.* 53, 3919-3924.
- Han, X. and J. G. Liehr (1992) Induction of covalent DNA adducts in rodents by tamoxifen, *Cancer Res.* 52, 1360-1363.
- 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.
- 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.
- Hengstler, J. G., B. Van der Burg, P. Steinberg and F. Oesch (1999) Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity, *Drug Metab. Rev.* 31, 917-970.
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 66. Some pharmaceutical drugs. Lyon : IARC, 1996.
- 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 [ $D_5$ -ethyl] tamoxifen, *Carcinogenesis* 16, 683-688.
- Killackey, M., T. B. Hakes and V. K. Pierce (1985) Endometrial adenocarcinoma in breast cancer patients receiving antiestrogens, *Cancer Treat. Rep.* 69, 237-238.
- Kitagawa, M., A. Ravindernath, N. Suzuki, R. Rieger, I. Terashima, A. Umemoto and S. Shibutani (2000) Identification of tamoxifen-DNA adducts induced by  $\alpha$ -acetoxyl-*N*-desmethyltamoxifen, *Chem. Res. Toxicol.* 13, 761-769.
- Lim, C. K., Z. X. Yuan, J. H. Lamb, I. N. White, F. De Matteis and L. L. Smith (1994) A comparative study of tamoxifen metabolism in female rat, mouse and human liver microsomes, *Carcinogenesis* 15, 589-593.
- Mani, C. and D. Kupfer (1991) Cytochrome P-450-mediated activation and irreversible binding of the antioestrogen tamoxifen to proteins in rats and human liver: possible involvement of flavin-containing mono-oxygenases in tamoxifen activation, *Cancer Res.* 51, 6052-6058.
- Mani, C., E. Hodgson and D. Kupfer (1993) Metabolism of the antimammary cancer antioestrogenic agent tamoxifen. II. Flavin-containing monooxygenase-mediated *N*-oxidation, *Drug Metab. Dispos.* 21, 657-666.
- Marques, M. M. and F. A. Beland, (1997) Identification of tamoxifen-DNA adducts formed by 4-hydroxytamoxifen quinone methide, *Carcinogenesis* 18, 1949-1954.
- Martin, E. A., K. J. Rich, I. N. White, K. L. Woods, T. J. Powles and L. L. Smith (1995)  $^{32}$ P-postlabelled DNA adducts in liver obtained from women treated with tamoxifen, *Carcinogenesis* 16, 1651-1654.
- Martin, E. A., R. T. Heydon, K. Brown, J. E. B. Brown, C. K. Lim, I. N. H. White and L. L. Smith (1998) Evaluation of tamoxifen and  $\alpha$ -hydroxytamoxifen  $^{32}$ P-postlabelled DNA adducts by the development of a novel automated on-line solid-phase extraction HPLC method, *Carcinogenesis* 19, 1061-1069.
- Moorthy, B., P. Sriram, D. N. Pathak, W. J. 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.
- Osborne, C. K. (1998) Tamoxifen in the treatment of breast cancer, *New Eng. J. Med.* 339, 1609-1617.
- 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.
- Osborne, M. R., I. R. Hardcastle and D. H. Phillips (1997) Minor products of reaction of DNA with  $\alpha$ -acetoxytamoxifen, *Carcinogenesis* 18, 539-543.
- Ottender, M. and S. K. Lutz (1999) Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts, *Mutat. Res.* 424, 237-247.
- Phillips, D. H., P. L. Carmichael, A. Hewer, K. J. Cole and G. K. Poon (1994)  $\alpha$ -Hydroxytamoxifen, a metabolite of tamoxifen with exceptionally high DNA-binding activity in rat hepatocytes, *Cancer Res.* 54, 5518-5522.
- Phillips, D. H., A. Hewer, M. N. Horton, K. J. Cole, P. L. Carmichael, W. Davis and M. R. Osborne (1999) *N*-Demethylation accompanies  $\alpha$ -hydroxylation in the metabolite activation of tamoxifen in rat liver cells, *Carcinogenesis* 20, 2003-2009.
- Poon, G. K., B. Walter, P. E. Lonning, M. N. Horton and R. McCague (1995) Identification of tamoxifen metabolites in human Hep G2 cell line, human liver homogenate and patients on long-term therapy for breast cancer, *Drug Metab. Dispos.* 23, 377-382.
- Rajaniemi, H., I. Rasanen, P. Koivisto, K. Peltonen and K. Hemminki (1999) Identification of the major tamoxifen-DNA adducts in rats liver by mass spectroscopy, *Carcinogenesis* 20, 305-309.
- Sanchez, C., S. Shibutani, L. Dasaradhi, J. L. Bolton, P. W. Fan and R. A. McClelland (1998) Lifetime and reactivity of an ultimate tamoxifen carcinogen: The tamoxifen carbocation, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 13513-13514.
- 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. and L. Dasaradhi (1997) Miscoding potential of tamoxifen-derived DNA adducts:  $\alpha$ -( $N^2$ -deoxyguanosinyl) tamoxifen, *Biochemistry* 36, 13010-13017.
- Shibutani, S., N. Suzuki and A. P. Grollman (1998a) Mutagenic specificity of (acetylamino) fluorene-derived DNA adducts in mammalian cells, *Biochemistry* 37, 12034-12041.
- 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., 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* 19, 2007-2011.
- Shibutani, S., N. Suzuki, I. Terashima, M. S. Sugarman, A. P. Grollman and L. M. Pearl (1999) Tamoxifen-DNA adducts detected in the endometrium of women treated with tamoxifen, *Chem. Res. Toxicol.* 12, 646-653.
- Shibutani, S., A. Ravindernath, N. Suzuki, I. Terashima, S. M.



Sugarman, A. P. Grollman and L. M. Pearl (2000a) Identification of tamoxifen-DNA adducts in the endometrium of women treated with tamoxifen, *Carcinogenesis* 21, 1461-1467.

Shibutani, S., J. T. Reardon, N. Suzuki and A. Sancar (2000b) Excision of tamoxifen-DNA adducts by the human nucleotide excision repair system, *Cancer Res.* 60, 2607-2610.

Stearns, V. and E. P. Gelman (1998) Does tamoxifen cause cancer in human? *J. Clin. Oncol.* 16, 779-792.

Tannenbaum, S. R. (1997) Comparative metabolism of tamoxifen and DNA adduct formation and *in vitro* studies on genotoxicity, *Semin. Oncol.* 24, 81-86.

Terashima, I., N. Suzuki and S. Shibutani (1999) Mutagenic potential of  $\alpha$ -( $N^2$ -deoxyguanosinyl) tamoxifen lesions, the major DNA adducts detected in endometrial tissues of patients treated with tamoxifen, *Cancer Res.* 59, 2091-2095.

Umemoto, A., Y. Monden, K. Komaki, M. Suwa, Y. Kanno, M. Suzuki, C.-X. Lin, Y. Ueyama, M. A. Momen, A. Ravindernath, S. Shibutani (1999) Tamoxifen-DNA adducts formed by  $\alpha$ -acetoxytamoxifen *N*-oxide, *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1083-1089.

Umemoto, A., Y. Monden, M. Suwa, Y. Kanno, M. Suzuki, C.-X. Lin, Y. Ueyama, M. A. Momen, A. Ravindernath, S. Shibutani and K. Komaki (2000) Identification of hepatic tamoxifen-DNA adducts in mice :  $\alpha$ -( $N^2$ -deoxyguanosinyl) tamoxifen and  $\alpha$ -( $N^2$ -

deoxyguanosinyl) tamoxifen *N*-oxide, *Carcinogenesis* 21, 1737-1744.

Umemoto, A., K. Komaki, Y. Monden, M. Suwa, Y. Kanno, M. Kitagawa, M. Suzuki, C.-X. Lin, Y. Ueyama, M. A. Momen, A. Ravindernath and S. Shibutani (2000) Identification and quantification of tamoxifen-DNA adducts in the liver of rats and mice (in submission).

van Leeuwen, F.E., J. Benraadt, J. W. W. Coebergh, L. A. L. M. Kiemeny, 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 C57 B1/6 mice and in human MCL-5 cells, *Carcinogenesis* 13, 2197-2203.

White, I.N. (1999) The tamoxifen dilemma, *Carcinogenesis* 20, 1153-1160.

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.

Wogan, G.N. (1997) Review of the toxicology of tamoxifen, *Semin. Oncol.* 24 (Suppl. 1), 87-97.

Environ. Mutagen Res., 22 : 141 - 148 (2000)

シンポジウム

## 水中の直接変異原 MX の生成と毒性発現の機構

木苗 直秀, 杉山 千歳, 下位 香代子

静岡県立大学食品栄養科学部 〒422-8526 静岡市谷田52-1

### Formation of direct mutagen MX in water samples and induction of toxic effects

Naohide Kinae, Chitose Sugiyama, Kayoko Shimoi

School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, 52-1, Yada, Shizuoka 422-8526, Japan

#### Summary

A potent direct mutagen, 3-chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5*H*)-furanone (MX), has been detected from tap water, swimming pool water and domestic effluent after chlorine disinfection. MX induced glandular stomach cancer on Wistar rats in two stage carcinogenesis test with *N*-methy-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. After intragastrically administration of MX to Wistar rats, the liver and stomach were applied to  $^{32}$ P-postlabeling method, DNA-adducts were formed with and without 2-amino-3-methylimidazo-[4, 5-*f*]-quinoxaline (MeIQx) which is found in broiled meats and fish. To detect the precursors of MX contained in domestic effluent, several materials were chlorinated and analyzed by GC-MS-SIM method. Polyphenolic compounds containing (±)catechin and diosmin were identified. These results show that MX may give adverse effect on aquatic organisms and also on human beings as a potent mutagen and carcinogen in the water samples. Therefore, the risk assessment and risk management of MX will be important task in near future.

**Keywords** : 3-chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5*H*)-furanone (MX), mutagenicity, carcinogenicity, DNA-adduct, MX precursor

## 緒 言

1974年, 米国のHarrisら(1974)はミシシッピー川下流のニューオリンズで, トリハロメタン含量が高い水道水を飲用している住民に各種がんの発生率が高いこと, 1992年ノルウェーのFlaten(1992)は水道水中の塩素濃度とヒトの結腸がんや直腸がんの発生率が相関すること, さらに1995年米国のMorris(1995)は塩素処理した水道水を飲用することにより毎年5,000人が膀胱がん, 8,000人が直腸がん, 罹患している可能性があることなどを報告している。わが国では, 簗輪ら(1987)が水道原水中の有機物量がヒトの肺がん発生率と弱いながら相関

することを認めているが, 塩素処理とがんとの報告はみられない。水道原水の塩素処理は食品衛生上有効な手段であり, オゾン処理と比べて利便性はあるが, 生成する有機塩素系副生成物の人体への毒性評価が重要な課題となっている。一方, 1981年製紙工場排水中に強い変異原性物質が存在することが見い出され, 1984年カナダのHolmbomら(1987)はその化学構造が3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5*H*)-furanone (MX)であることを明らかにした。MXはpH5以下の酸性領域ではクロロフラノン骨格(閉環型)をとり, pH6-8では開環型となり, さらにジアステレオマーであるE-MXとしても存在すると考えられている(Fig. 1)。水道水中にはすでに有機塩素系変異原物質やがん原物質としてトリハロメタン, ハロ酢酸, ハロニトリル, ハロフェノール, 抱水

受付: 2000年9月25日 受理: 2000年9月25日  
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第11回公開シンポジウム「環境変異原の活性発現と抑制の化学的機構」で発表された。  
This paper was presented at the 11th JEMS Annual Symposium at the ABC Hall, Tokyo, June 3rd 2000. The Symposium entitled "Chemical Mechanisms of Depression and Repression of Activity In Environmental Mutagenesis", was organized by Masataka Mochizuki and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.



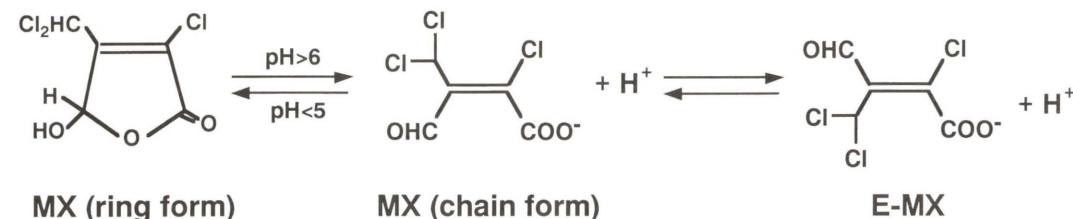


Fig. 1 Chemical structure of 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2-(5H)-furanone (MX)

クロラール等が報告されている(相沢, 1993, 中室, 1993)が, 1986年以降米国(Meier et al., 1987), フィンランド(Hemming et al., 1986), 日本(Suzuki et al., 1990, 石黒 et al., 1991)等でMXが水道水中の強力な変異原物質として分離同定された。著者らは水道水(Kinae, 1992)とともに, プール水(後藤ら, 1994)や河川水(Kinae et al., in press)よりMXを分離同定した。またMXがラットを用いた二段階発がん実験で胃に腺がんを誘発すること(Nishikawaら, 1999), さらにMXが既知発がん物質等のDNA付加体形成に関与すること(木苗, 2000)などを明らかにした。MXの前駆体としてはフミン酸, フルボ酸などのフミン質, さらにチロシン(Horth, 1992)を含むフェノール化合物が想定されているが, 著者らは生活排水より新たなMXの前駆体の検索を行った。ここでは, 著者らのデータとともに最近の知見について述べる。

## 1. 水試料からMXの分離定量

著者らは1990年から2年間にわたり, 全国20地点の水道水を定期的に採取し, pHを2に調整したのちAmberlite XAD-2000樹脂に通した。吸着物を酢酸エチルで抽出したのち, *Salmonella typhimurium* TA100(-S9 mix)を用いてAmes試験を行った。さらに, 酢酸エチル抽出物中のMX相当画分をHPLCで分画したのちメチル化し, GC-MS-SIM法でMXの定量を行った(Kinae, 1992)。著者らのデータを含めて各国で報告されているMX量と水道水の全変異活性に対する寄与率をTable 1および一部Table 2に示した。MX量はいずれの国においても採取地点や時期により異なり, フィンランドが最高値67 ppmを示し, 寄与率では英国が60%, 中国が57%と高値を示した。

プール水には一般に水道水が利用されており, かつ日常的に循環させながら塩素滅菌していることからMXの存在が推定された。そこで静岡市内の公営, 市営プール水を採取し, 水道水と同様に処理して, 変異原性とともにMX量を測定した。その結果をTable 2に示した。変異原性は*S. typhimurium*で1L当たり最高3,212 revertantsを示し, MXの全変異活性に対する寄与率は17.0%であった(後藤 et al., 1994)。

近年, 淀川水系の河川水の有機汚濁が社会問題となっ

ている。そこで, 同水域の桂川の河川水より変異原物質の検索を行った。その結果, 下水処理場下流の河川水に強い変異原性が認められ, HPLCで分画した後, メチル化しGC-MS-SIM法に適用したところMXが存在することを確認した(Fig. 2)。MXの河川水の全変異活性に対する寄与率は5.0-30.0%であった(Kinae et al., in press)。現在までの報告から, MXが製紙工場排水, 水道水, プール水, 河川水に存在することが明らかとなった。

## 2. MXの変異原性と発がん性

MXの変異原性に関してMeierら(1987)は*S. typhimurium* TA100株を用いるAmes試験で代謝活性化することなく, 1nmol当たりおよそ6,000-13,000 revertantsを誘発することを報告しており, その強さはカビ毒のアフラトキシンB<sub>1</sub>や, わが国で使用された食品防腐剤のAF-2に匹敵するものであった。その後, MXについて各種培養細胞やラット個体を用いて, 染色体異常誘発能を含む多くの変異原性が報告されている。最近, 佐々木・木苗らはマウスにMXを経口投与したのち, 単細胞ゲル電気泳動(コメット)アッセイを用いて検討した。その結果, MXは肝臓, 腎臓, 脳, 胃, 尿細胞など多臓器にDNA損傷を誘発すること(Sasaki et al., 1997), またCHO細胞においてマイトマイシンCや鉛酸化合物が共存すると, 染色体異常誘発能を増強すること(佐々木 et al., 1995)を明らかにした。

一方, 著者らは降旗らとの共同研究で, MXをF344ラットの胃内に投与すると短時間で幽門部粘膜にDNA一本鎖切断や不定期DNA合成がみられることからMXが発がんイニシエーターとしての活性を有すること, また強い複製DNA合成能やオルニチン脱炭酸酵素活性を示すことから発がんプロモーターとしても作用する可能性が強いことを報告した(Furihata et al., 1992)。さらに, 西川らとの共同研究でMXを飲料水としてWistarラットに与えた場合, 胃粘膜に細胞増殖活性がみられ, 脂質過酸化を亢進することから, MXが胃がん誘発におけるプロモーターとして作用する可能性を指摘した(Nishikawa et al., 1994)。そこで雄のWistarラットに100 ppmの*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine水溶液を8週間投与したのち, 0, 10, 30 ppmのMXを飲水投与した。実験開始65週後に剖検したところ, 胃の基底部と幽門部にそ

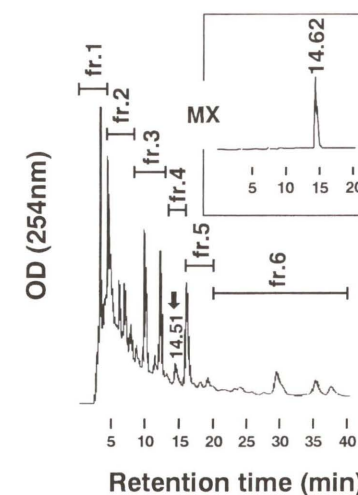
Table 1 Contents of MX in tap water

Country	Contents (ng/L)	Contribution (%)	Researchers
U. S. A.	ND-33	~ 33	Meier (1987)
Russia	ND-15	~ 36	Meier (1987)
Finland	15-67	19-46	Kronberg (1988)
Japan	ND-9	~ 23	Suzuki (1990)
Japan	0.1-33	0.2-36	Kinae (1990)
U. K.	ND-3	~ 60	Horth (1990)
Japan	0.18-1.05	0.5-2.2	Ishiguro (1991)
China	3.8-58.4	15-57	Huixian (1995)
Spain	5.6-10	8.3-20	Romero (1997)

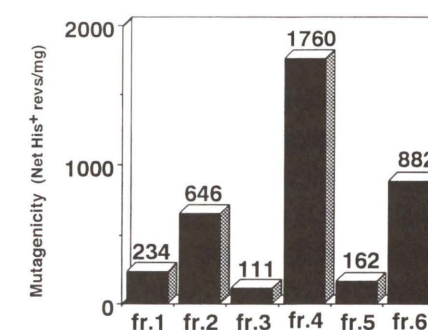
Table 2 Contents of MX in swimming pool water and the contribution ratio to the total mutagenicity (Kinae 1994)

Type of pool	MX Contents (ng/L)	Contribution of MX (%)
A private/indoor	0.6	1.0
B "	1.4	2.2
C "	0.6	0.5
D "	13.9	17.0
E "	1.1	3.4
F public/indoor	2.0	8.1
G "	1.0	5.6
H public/outdoor	0.9	1.8
I "	1.6	3.2

HPLC Elution Profile of AcOEt Ext.



Mutagenic Activity of Fr.1~6



Mass Spectra of Methylated Samples

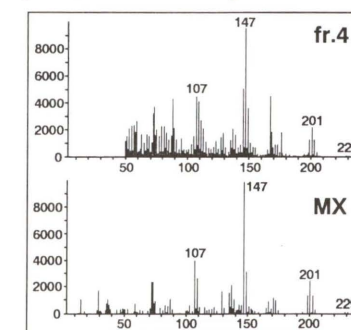


Fig. 2 Isolation of MX from river water



**Table 3** Incidence of gastric proliferative lesions in rats treated with MNNG and/or MX (Nishikawa, 1999)

Group (ppm)	No. of rats	Fundus		Pylorus		Total	
		ADC	AH	ADC	AH	ADC	AH
1 MNNG + MX (30)	27	3 (11.1)	15 (55.5)	6 (22.2)	24 (88.8) **	8 (29.6) *	25 (92.5) *
2 MNNG + MX (10)	27	1 (3.7)	21 (77.7)	6 (22.2)	17 (62.9) **	7 (25.9)	26 (96.2) **
3 MNNG	26	0	13 (50.0)	1 (3.8)	8 (30.7)	1 (3.8)	17 (65.3)
4 MX (30)	9	0	0	0	2 (22.2)	0	2 (22.2)
5 MX (10)	10	0	0	0	0	0	0
6 Nontreatment	10	0	0	0	0	0	0

MNNG : *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine

ADC : adenocarcinoma

AH : atypical hyperplasia

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. MNNG alone group

**Table 4** Induction of primary tumors in wistar rats after exposure to MX in drinking water for 104 weeks (Komulainen, 1997)

Tissue	Male	Female
Mammary glands		adenocarcinoma (22 %) fibroadenoma (68 %)
Liver	cholangioma (8 %) adenoma (8 %)	cholangioma (66 %)
Adrenal glands	cortical adenoma (28 %)	cortical adenoma (32 %)
Thyroid glands	follicular carcinoma (55 %) follicular adenoma (43 %)	follicular adenoma (72 %)
Lungs	alveolar & bronchiolar adenoma (14 %)	alveolar & bronchilar adenoma (4 %)

MX : male 5.0, female 6.6 mg/kg/day

れぞれ腺がんが3.8%, 25.9%, 29.6%の割合で誘発していることを確認した(Nishikawaら, 1999) (Table 3)。また, 異型の過形成も65.0-92.5%と高率で認めた。なお, MX (30 ppm)の単独投与においても幽門部に異型の過形成を2.2%の割合で誘発した。フィンランドのKomulainenらもMXを雌雄のラットにそれぞれ5.0および6.6 mg/kg/dayを投与したのち, 104週間飼育したところ, 乳腺, 肝臓, 副腎, 甲状腺, 肺に高率に腺がんや繊維がんが誘発したと報告している(Komulainenら, 1997) (Table 4)。これらの実験結果から, MXは直接変異原物質として作用すること, 哺乳動物の発がんにおいてはイニシエーターおよびプロモーターとして作用すること, 共存化学物質に対して変異原性増強作用を発現することが明らかとなった。

### 3. MXのDNA付加体

Schutら(1991)は仔牛胸腺由来のDNAにMXを加えて保温したのち, <sup>32</sup>P-ポストラベル法で検討したところ, MXのDNA付加体が10<sup>7</sup>スクレオチド当たり1-2個形成されることを報告した。Curieuxら(1997)はMXを仔牛胸腺DNAと反応させると10<sup>5</sup>スクレオチド当たり1スク

レオチドの割合で3-(2'-deoxyribofuranosyl-N<sup>6</sup>-adenosinyl)propenal (M<sub>1</sub>A-dR)を生成することを明らかにし, この化合物がサルモネラ菌における変異に深く関わっているとしている。Franzenら(1998)はMXをグアノシンやアデノシン, シチジンと水溶液中で反応させ, グアノシンの縮合物である10-formyl-1, N<sup>2</sup>-benzoquinone propenoguanosineを0.1%の収率で得ている。また, Munterら(1998)はMXを牛胸腺DNAと反応させ, 10<sup>5</sup>スクレオチド当たり0.6個の3-(2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-7H-8-formyl[2, 1-i]pyrimidopurine (pfA-dR)とともに3-(2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-7H-8-formyl-9-chloro[2, 1-i]pyrimidopurine (cl-pfA-dR)を分離している。Munterら(1999)はさらに3-(β-D-ribofuranosyl)-7-formylimidazo[1, 2-a]purine-9(4H)-one (efGuo)を0.3 mol%の収率で分離した。これらの実験からMXがDNAの主としてグアニン残基やアデニン残基と結合するものと推定される。著者らはMX単独および加熱食品由来の2-amino-3, 8-dimethylimidazo-[4, 5-f]quinoxaline (MeIQx)が共存した場合のDNA付加体の定量を行った。雄のWistarラット(6週令)に体重1 kg当たり30 mgになるようにMX水溶液を3日間経口投与

**Table 5** MeIQx-DNA adduct formation with and without MX

Group	MeIQx-DNA adduct (per 10 <sup>7</sup> nucleotides)	
	Liver	Gastric mucosa
MeIQx	6.3	1.7
MX-MeIQx	12.2	2.4

**Table 6** Mutagenic activity of several chemicals before and after chlorination

Sample	Mutagenic activity (Net His <sup>+</sup> revertants) TA100, -S9 mix (mg/plate)		
	NaClO, 1000 ppm	H <sub>2</sub> O	Sample
Catechin mix	104 (6.25)	56 (6.25)	35 (5)
(±) Catechin	70 (6.25)	G.I.	K. E.
Hesperetin	266 (1.56)	20 (12.5)	K. E.
Hesperidin	912 (12.5)	18 (12.5)	K. E.
Quercetin	117 (3.13)	164 (6.25)	447 (5)
Rutin	157 (12.5)	152 (12.5)	124 (5)
Diosmin	915 (3.13)	7 (12.5)	35 (5)
Phloroglucinol	K. E.	G. I.	G. I.
Phloroglucinol trimethyl ether	227 (0.78)	K. E.	K. E.
2,4-Dichlorophenol	K. E.	K. E.	K. E.
2,6-Dichlorophenol	K. E.	K. E.	K. E.
2,4,6-Trichlorophenol	K. E.	K. E.	K. E.
L-Tryptophan	90 (1.56)	7 (6.25)	27 (5)
MeIQx	145 (0.2)	10 (0.25)	0 (0.2)

K. E. : Killing effect

G. I. : Growth inhibition

The figures in parentheses showed the amount (mg) per plate

した。3日間の投与後にMeIQx (50% DMSO)を50 mg/kg体重となるよう経口投与した。MeIQxを投与してから24時間後に解剖し, 肝臓と胃粘膜を摘出した。各組織よりDNAを抽出し, <sup>32</sup>P-ポストラベル法によりMeIQx-DNA付加体を定量した(Table 5)。その結果, MeIQx単独投与群では肝臓で10<sup>7</sup>スクレオチド当たり6.3個, 胃粘膜で10<sup>7</sup>スクレオチド当たり1.7個のMeIQx-DNA付加体が形成されたのに対して, MXとMeIQxを投与した群では肝臓, 胃粘膜でそれぞれ10<sup>7</sup>スクレオチド当たり12.2個, 10<sup>7</sup>スクレオチド当たり2.4個の付加体が形成された。MXをあらかじめ投与したことによりMeIQx-DNA付加体の形成が, 肝臓では約2倍, 胃粘膜では1.5倍増加していた。この結果からMXの投与により薬物の代謝酵素の活性が上昇し, MeIQxの活性体がより多く生成し, DNA付加体量が上昇した可能性が考えられた。また, MXが修復酵素系に直接作用してその活性を妨げること, あるいはMX-DNA付加体が形成されることにより, 間接的にMeIQx-DNA付加体の修復が遅延する可能性も考えられた。すなわち, MXはそれ自身がDNAと付加体形成能を有するとともに, 他の発がん物質が存在するとそのDNA付加体量を増加させる可能性が示唆された。

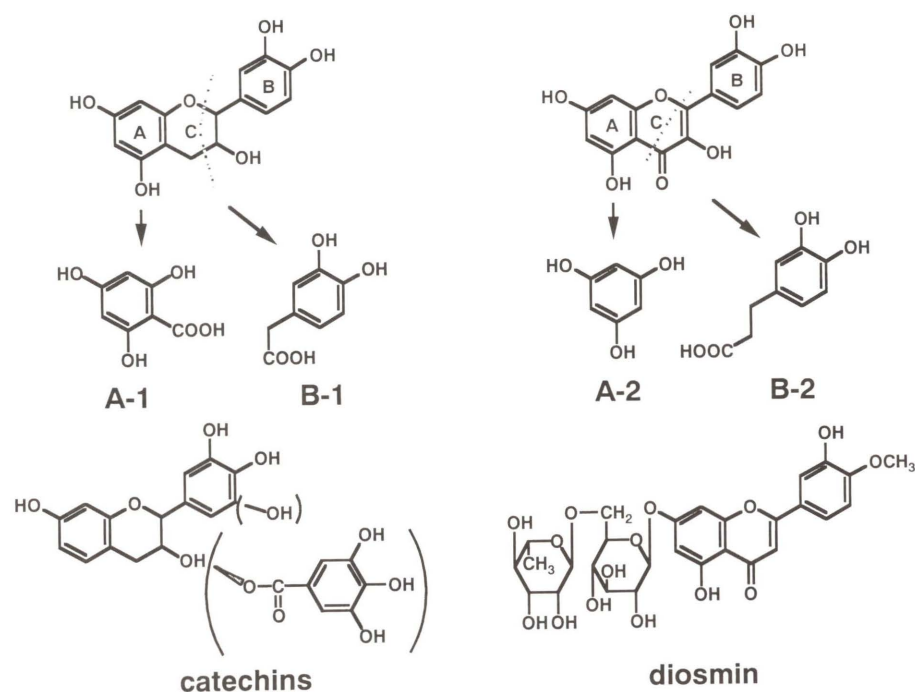
### 4. MXの前駆体の分離同定

我が国や欧米の水道水よりMXが検出されているが, 現在までに水道原水中に存在するフミン酸やフルボ酸などのフミン質が前駆体となり, 塩素処理過程でMXを生成しているものと考えられている(Meier et al., 1985, Kronberg et al., 1988)。さらに, 近年チロシンやトリプトファンなどのアミノ酸の塩素処理においてもMXが生成することが報告されている(Horth, 1989, Huixian et al., in press)。著者らは我が国の水道水とともにプール水, さらに生活排水や産業排水の集積場である河川水よりMXを分離同定した。これらのことを考えると, フミン質のみならず他の有機化学物質もMXの前駆体となりうるものと推測された。そこで, 水道原水や生活排水中に存在する可能性があるカテキン類, フラボノイド類, MeIQxなど14種の化合物を用いて, 次亜塩素酸水溶液中, 常温24時間暗所で塩素処理(500 - 1000 ppm)を行った。ジエチルエーテルで抽出後, Ames法により変異原性試験を行った。*S. typhimurium* TA100, -S9 mixでcatechin, hesperetin, hesperidin, diosminが強い変異原性を示した(Table 6)。活性画分についてHPLCを行い, MX相当画分を分画したのち, 硫酸-メタノールでメチル化した。次いで, GC-MS-SIM法でMXの有無を調べ,



**Table 7** Contribution ratio of MX to the total mutagenicity of chlorinated samples

Saple	Mutagenicity (revs/250 mg)	MX content (ng/250 mg)	Contribution (%)
Catechin mix	4160	84	36.3
(±) Catechin	4240	225	95.5
Diosmin	73200	173	4.3



**Fig. 3** Possible mechanisms for formation of MX

MXの存在を確認した試料について高分解能GC-MS-SIM法を行い、検量線法により定量した(Table 7)。その結果、catechin mix(緑茶熱水浸出液を酢酸エチルで抽出したもの)、(±)catechin、diosminがそれぞれ250mg当たり84ng、225ng、173ngのMXを生成した。それらの総変異活性に対する寄与率はそれぞれ36.3%、95.5%、4.3%を示した。最近、Huixianらはtryptophanを塩素処理することによりMXを分離している(in press)。Langvikら(1994)は3, 4, 5位のHが-OHまたは-OCH<sub>3</sub>に置換したベンズアルデヒドからMXが生成すること、さらにhomovanillic acidのように1位のformyl基の代わりに炭素鎖を有する化合物からの少量ながらMXの生成を認めている。また、Huixianら(in press)は3, 4位のHが-OHまたは-OCH<sub>3</sub>に置換したベンズアルデヒドからMXが生成すること、ferulic acidのようにformyl基の代わりに炭素鎖を有する化合物からはMXが生成するが、2位のHが-OHに置換した化合物からはMXが生成しないと報告した。それゆえ、カテキン類やdiosminからMXが生成したことを考えるとFig.3においてcatechin由来のA-1はベンゼン環の2, 6位に置換基があ

るため、またdiosmin由来のA-2はベンゼン環に炭素鎖がないことからMXの前駆体とはなりにくく、むしろB-1およびB-2はベンゼン環に炭素鎖が存在し、3, 4位に置換基があることからMXの前駆体となっているものと推定した。これらの実験結果から、MXがポリフェノール化合物より生成することが明らかとなった。現在さらに日常食品およびそれらに含まれる化学成分を用いて塩素処理を行って、MXの生成の可能性を追求している。

## 結 語

水道水はわれわれの生命を維持し、且つ日常生活を営むうえでは必須のものであり、飲用のほか、調理、洗濯、トイレ用、さらに産業、農業等に幅広く利用されている。しかし、水道原水中に生活排水、工場排水、農業排水、畜産排水、雨水等が混入することを考えると、それらを飲用するためには塩素消毒、オゾン処理、生物処理が必要である。筆者らはMXの水試料中での分布状態、変異原性、発がん性とともにそれらの分解性(木苗, 1998)について検討してきた。MXが直接変異原であり、発がん性を有することが明らかになった。また、他の化学物質

が共存すると染色体異常誘発能の上昇やDNA付加体の生成量が増加が観察された。最近、Hiroseら(1999)はMXの各種毒性データから水道水におけるMXのリスク評価を行い、実質安全量は5ng/kg体重/日、1日の摂取許容量は40ng/kg体重、飲料水1L当たりの許容できるMX濃度を150ngとしている。これらはMXのヒトへの安全性評価を行った最初の事例である。現在、環境水がダイオキシン類をはじめ、DDT、フタル酸エステル類、有機スズ剤に汚染されており、それらの内分泌攪乱作用が問題となっている。今後MXとそれらとの複合作用についても十分に検討する必要がある。

## 謝 辞

本研究に貴重な御助言を賜りました国立がんセンター研究所・がん予防部長、若林敬二先生に謝意を表します。なお、本研究の一部は厚生省がん研究助成金により実施した。

## 参 考 文 献

- 相沢貴子(1993) 浄水処理における副生成物, 水環境学会誌, 16, 830-835.
- Flaten, T. P. (1992) Chlorination of drinking water and cancer incidence in Norway, Int. J. Epidemiol., 21 (1), 6-15.
- Franzen, R., K. Tanabe and M. Morita (1998) Isolation of a MX-guanosine adduct formed at physiological conditions, Chemosphere, 36 (13), 2803-2808.
- Furihata, C., M. Yamashita, N. Kinai and T. Matsushima (1992) Genotoxicity and cell proliferative activity of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in rat glandular stomach, Wat. Sci. Tech., 25, 341-345.
- 後藤和弥, 後藤真美, 下位香代子, 木苗直秀(1994) プール水抽出物の変異原性, 日本薬学会第114年会(東京), 講演要旨集, p 161.
- Harris, R. H. and E. M. Brecher (1974) Is the water safe to drinking? Part 1. The problem, Consumer Reports, 39, 436-443.
- Hemming, B. R., B. Holmbom, M. Reunanen and L. Kronberg (1986) Determination of the strong mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in chlorinated drinking and humic waters, Chemosphere, 15, 549-556.
- Hirose, A., A. Nishikawa, N. Kinai and R. Hasegawa (1999) 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX): Toxicological properties and risk assessment in drinking water, Review on Environ. Health, 14 (3), 103-120.
- Holmbom, B. R., R. H. Voss, R. D. Mortimer and A. Wong (1987) Isolation and identification of an Ames-mutagenic compound present in kraft chlorination effluents, Tappi, 64 (3), 172-174.
- Horth, H. (1989) Identification of mutagens in drinking water, Aqua, 38, 80-100.
- Huixian, Z., L. Junhe, C. Zhuo, Y. Chengyong and Z. Jinqi (私信).
- 石黒靖尚, 大野賢治(1991) 水道水および廃水中の3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanoneの調査, 第25回水質汚濁学会講演集, 日本水質汚濁研究協会(東京), 62-63.
- Kinai, N., C. Sugiyama, M. Y. Nasuda, K. Goto, K. Tokumoto, M. Furugori and K. Shimoi (1992) Seasonal variation and stability of chlorinated organic mutagens in drinking water, Wat. Sci. Tech., 25 (11), 333-340.

- 木苗直秀(1998) 飲料水の新しい安全性評価手法と対策技術, サイエンスフォーラム(東京), 要旨集, 3-3-1.
- 木苗直秀(2000) 水中の直接変異原MXの生成と毒性発現の機構, 平成12年度日本環境変異原学会公開シンポジウム「環境変異原の活性発現と抑制の化学的機構」要項集, p 5.
- Kinai, N., J. Tanaka, N. Kamio, C. Sugiyama, M. Furugori, K. Shimoi and K. Tanji (in press) Detection and origin of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in river water, Water Sci. Technol.
- Komulainen, H., Veli-Matti Kosma, V. Sirkka-Liisa, T. Vartiainen, E. Kaliste-Korhonen, S. Lotjonen, K. Raimo and J. Tuomisto (1997) Carcinogenicity of the drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in the rat, J. Natl Cancer Inst., 89 (12), 18, 848-856.
- Kronberg, L., B. Holmbom, M. Reunanen and L. Tikkanen (1988) Identification and quantification of the Ames mutagenic compound 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and of its geometric chlorine-treated humic water and drinking water extracts, Environ. Sci. Technol., 22, 1097-1103.
- Langvik, V. A. and O. Hormi (1994) Possible reaction pathway for the formation of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX), Chemosphere, 28, 1111-1117.
- Le Curieux, F., T. Munter and L. Kronberg (1997) Identification of adenine adduct formed in reaction of calf thymus DNA with mutagenic chlorohydroxyfuranones found in drinking water, Chemical Res. in Toxicol., 10 (10), 1180-1185.
- Meier, J. R., H. P. Ringhand, W. E. Coleman, J. W. Munch, R. P. Streicher, W. H. Kaylor and K. M. Schench (1985) Identification of mutagenic compounds formed during chlorination of humic acid, Mutat. Res., 157, 111-122.
- Meier, J. R., W. E. Coleman, H. P. Ringhand, J. W. Munch, W. H. Kaylor, R. P. Streicher and F. C. Kopfler (1987) Studies on the potent bacterial mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone: Aqueous stability, XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic acid solutions, Mutat. Res., 189, 363-373.
- Meier, J. R., W. F. Blazak and R. B. Knohl (1987) Mutagenic and clastogenic properties of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone: a potent bacterial mutagen in drinking water, Environ. Mol. Mutagenesis, 10, 411-424.
- 箕輪真澄, 真柄泰基, 大村外志隆(1987) 水道原水の有機物質濃度とがん死亡率との関連に関する予備的検討, 公衆衛生院研究報告, 36 (4), 157-161.
- Morris, R. D. (1995) Drinking water and cancer, Environ. Health Perspect, 103 (Suppl. 8), 225-231.
- 中室克彦, 佐谷戸安好(1993) 浄水処理における変異原性物質の毒性評価, 水環境学会誌, 16, 847-853.
- Munter, T., F. Le Curieux, R. Sjöholm and L. Kronberg (1998) Reaction of the potent bacterial mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) with 2'-deoxyadenosine and calf thymus DNA: Identification of fluorescent propenoformyl derivatives, Chem. Res. Toxicol., 11, 226-233.
- Munter, T., F. Le Curieux, R. Sjöholm and L. Kronberg (1999) Identification of an ethenoformyl adduct formed in the reaction of the potent bacterial mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone with guanosine, Chem. Res. Toxicol., 12, 46-52.
- Nishikawa, A., N. Kinai, F. Furukawa, M. Mitsui, T. Enami, T. Hasegawa and M. Takahashi (1994) Enhancing effects of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) on



cell proliferation and lipid peroxidation in the rat gastric mucosa, Cancer Letters, 85, 151-157.

Nishikawa, A., F. Furukawa, I-S. Lee, K. Kasahara, Z. Tanakamaru, H. Nakamura, M. Miyauchi, N. Kinae and M. Hirose (1999) Promoting effects of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5*H*)-furanone on rat glandular stomach carcinogenesis initiated with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*- nitrosoguanidine, Cancer Res., 59, 2045-2049.

Sasaki, YF., E. Nishidate, F. Izumiyama, M. Watanabe-Akanura, N. Kinae, N. Matsusaka and S. Tsuda (1997) Detection of in vivo genotoxicity of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5*H*)-furanone (MX) by the alkaline single cell gel electrophoresis

(comet) assay in multiple mouse organs, Mutat. Res., 393 (1-2), 45-53.

佐々木有, 木苗直秀 (1995) 水質汚濁性物質の変異原性増強作用, 環境変異原研究, 17, 65-74.

Schut, H. A. J., D. A. Cummings, E. L. C. Lin and F. B. Daniel (1991) <sup>32</sup>P-postlabeling anaysis of DNA adduct formation of the drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5*H*)-furanone (MX), EMS abstracts, 232, 65-66.

Suzuki, N. and J. Nakanisi (1990) The determination of strong mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5*H*)-furanone in drinking water in Japan, Chemosphere, 21, 387-392.

Environ. Mutagen Res., 22 : 149 - 154 (2000)

シンポジウム

## フリーラジカルを経由する変異・発がん物質の生成と発現

菊川 清見, 平本 一幸, 加藤 哲太

東京薬科大学薬学部 〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1

### Formation and development of mutagenic and/or carcinogenic compounds through free radical mechanisms in foods

Kiyomi Kikugawa, Kazuyuki Hiramoto and Tetsuta Kato

School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, 1432-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

#### Summary

Free radicals including carbon-centered, oxygen-centered and pyrazine cation radicals are involved in the DNA damage and the formation of mutagens in foods. Carbon-centered radicals generated from arylbenzenediazonium salts modified DNA bases. Reactive oxygen species generated from fragrant furanones or pyranones produced by Maillard reaction in many foodstuffs or hydroxyhydroquinone in roasted coffee beans broke the DNA strand. Scavenging of the free radicals by ethanol or phenolic antioxidants prevented the DNA damage. Pyrazine cation radical produced in the Maillard reaction participated in the formation of heterocyclic amine mutagens. Scavenging of the pyrazine cation radicals by ascorbate or erythorbate or decreasing the pyrazine cation radical by controlling sugar content prevented the formation of the mutagens. The mutagenicity of hamburger was effectively reduced by addition of ascorbate or erythorbate and by addition of a large amount of sugars or onion.

**Keywords** : carbon-centered radical, reactive oxygen species, pyrazine cation radical, Maillard reaction, DNA damage, heterocyclic amine

#### 緒 言

フリーラジカルは環境や食品中での変異・発がん物質の生成や発現に関わっていると考えられてきたにもかかわらず、その実態は不明の点が多かった。フリーラジカルは不対電子をもつ化学的に活性な分子種であり、ESR法およびESR-スピントラップ法で検出される化学種である。フリーラジカルは、環境や食品中で変異・発がん物質が生成する過程、環境や食品中の変異・発がん物質が直接的に遺伝子を修飾する過程、環境や食品中

の物質が体内で代謝を受けたのち遺伝子を修飾する過程に関与している。ここでは、演者らの研究を中心に、フリーラジカルの、変異・発がん物質が生成する過程、変異・発がん物質が直接的に遺伝子を修飾する過程における関わりとその阻止について述べる。本内容の一部は既に本誌に紹介した(菊川ら, 1996)ので、そこで触れなかった点を中心に述べる。

#### 1. アリルジアゾニウム塩は自発的に炭素中心ラジカルを発生してDNAを修飾する

新鮮な西洋きのこ *Agaricus bisporus* には4-(hydroxymethyl) benzene diazonium salt (HMBD) (Toth et al.,

受付: 2000年7月10日 受理: 2000年7月12日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第11回公開シンポジウム「環境変異原の活性発現と抑制の化学的機構」で発表された。  
This paper was presented at the 11th JEMS Annual Symposium at the ABC Hall, Tokyo, June 3rd 2000. The Symposium entitled "Chemical Mechanisms of Depression and Repression of Activity In Environmental Mutagenesis", was organized by Masataka Mochizuki and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.



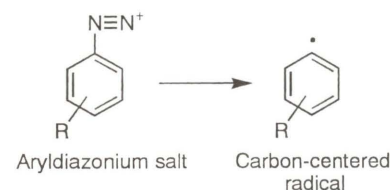


Fig. 1 Generation of carbon-centered radicals from aryldiazonium salts

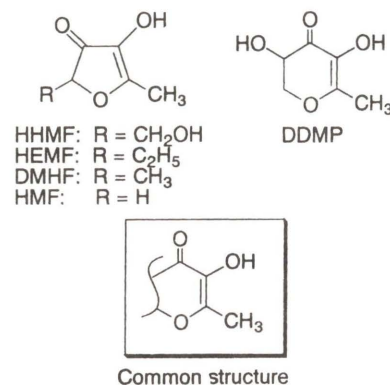


Fig. 2 Fragrant furanones and pyranones produced by Maillard reaction

1981), 醤油中の tyramine やくん煙中の phenol, 医薬品 bamethan や etilefrin, さらに 2-aminofluorene が胃内で亜硝酸と反応して生成する可能性のある diazotyramine (Ochiai et al., 1984), *p*(or *o*)-diazophenol 類 (Kikugawa and Kato, 1988), diazo bamethan, diazo etilefrin (Kikugawa et al., 1987, 1989) および fluorene-2-diazonium 塩 (Kato et al., 1991), diazouracil (Katchman et al., 1963) などのアリルジアゾニウム塩がある。これらの多くは変異・発がん性を示し, HMBD, *p*(or *o*)-dizaophenol, fluorene-2-diazonium salt, 5-diazouracil は Fig. 1 に示すように自発的に窒素分子を遊離して, スピントラップ剤を用いた ESR によって, 炭素中心ラジカルの発生が確認されている。炭素中心ラジカルが直接 DNA 塩基を修飾すること, DNA 鎖切断を起こすことがわかっている (菊川ら, 1996)。炭素中心ラジカルの遺伝子修飾反応が, アリルジアゾニウム塩の変異・発がん性に関与していると考えられる。炭素中心ラジカルは, エタノールやフェノール性抗酸化剤によって消去され, 反応性が失われる特徴がある。

## 2. 加熱 Maillard 反応により生成する食品の芳香成分は酸素存在下, 自発的に酸素中心ラジカルを発生し, DNA を修飾する

Maillard 反応により生成し, 醤油など広範な植物性食品に存在する芳香性のフラノン, ピラノン類 (Fig. 2) に DNA 鎖切断性があることがわかった。これらの成分は強い芳香をもっているため, 食品の品質評価の指標とされている。これらの成分は酸性では安定であるが, 中

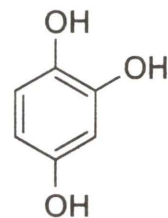


Fig. 3 Structure of hydroxyhydroquinone (HHQ) in roasted coffee beans

性条件下で DNA 鎖切断活性を示す。これらの成分には還元性があり, 酸素を一電子還元して生成するスーパーオキシドが基になって過酸化水素に不均化し, 混在重金属イオンによりヒドロキシルラジカルを生成するためと考えられた (Hiramoto et al., 1995)。ヒドロキシルラジカルの生成がスピントラップ剤を用いた ESR によって確認されている。動物実験で, 経口的に投与してすみやかに吸収され, 末梢血の小核試験も陽性であった。これら成分の作用はエタノール, フェノール性抗酸化剤, 金属キレート剤などで阻止される。これらの詳細はすでに総説で述べた (菊川ら, 1996 ; Kikugawa et al., 1999)。

興味あることに, これらは, Fe イオンによる赤血球膜や LDL の酸化を阻害する作用をもち (Ando et al., 2000), この局面では DNA の場合と異なり, 酸化阻害活性をもっていることになる。これら成分は DNA と赤血球や LDL では全く逆の作用をするが, これら成分の作用は反応の場が重要な意味をもっていることを示している。

## 3. コーヒー煎り豆に存在するヒドロキシヒドロキノンは酸素存在下, 自発的に酸素中心ラジカルを発生し, DNA を修飾する

コーヒーには DNA 鎖切断を引き起こす物質の存在が示されていたが (Kato et al., 1994), その本体は hydroxyhydroquinone (HHQ) (1, 2, 4-benzenetriol) (Fig. 3) であることがわかった (Hiramoto et al., 1998)。HHQ はベンゼンの代謝物として活性酸素を発生し DNA 鎖切断を起こすことが報告されていた (Kawanishi et al., 1989) が, コーヒーにも多量存在し, コーヒーの活性酸素発生源であることがつきとめられた。コーヒーには他の食品に比較して過酸化水素の存在量が多く, その原因成分として caffeic acid などが推定されていたが, HHQ がその発生源であることがわかった。HHQ は pyrogallol (1, 2, 3-benzenetriol) をはじめとする他のポリフェノールに比較して多量の過酸化水素を発生する (Hiramoto et al., 2000)。HHQ は酸性条件では安定であるが, 中性条件下ではたちどころに自動酸化を起こしてスーパーオキシド, 過酸化水素, ヒドロキシルラジカルを発生する。中性では HHQ 1 モルから 0.5 - 0.6 モルの過酸化水素を発生する。ヒドロキシルラジカルの生成がスピントラッ

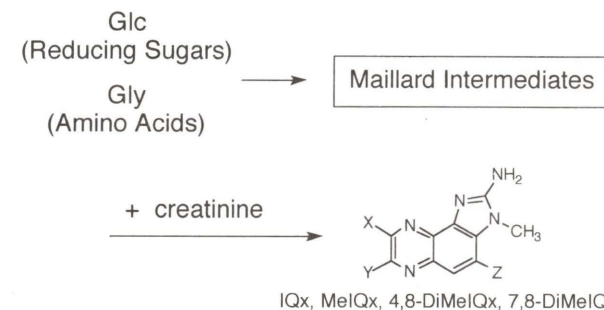


Fig. 4 Formation of imidazoquinoxaline-type heterocyclic amines (Jägerstadt et al., 1983)

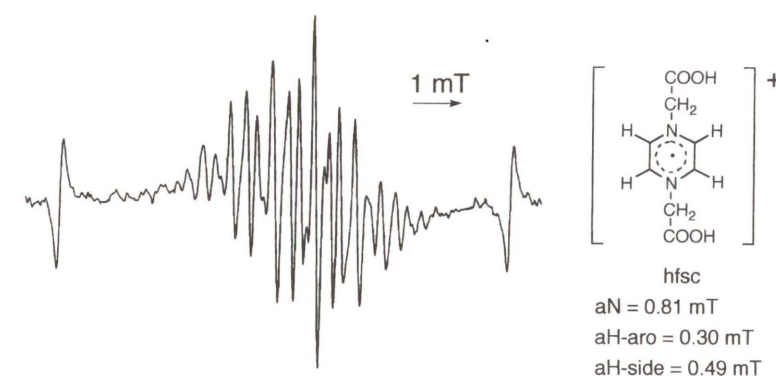


Fig. 5 ESR signal and structure of pyrazine cation radical (Kikugawa et al., 1999)

ブ剤を用いた ESR で確認されている。HHQ の自動酸化はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) で阻止され, 発生したスーパーオキシドが触媒的に自動酸化を促進していると考えられる。DNA の鎖切断反応はエタノール, フェノール性抗酸化剤, 金属キレート剤などで阻止される。コーヒーを飲むと数時間後に尿中の過酸化水素濃度が上昇し, 生体内の活性酸素除去システムをかいぐるほど生体内の活性酸素が飽和状態になっている可能性があるとの報告がある (Long and Halliwell, 2000)。

## 4. 加熱メイラード反応中間体のピラチンカチオンラジカルはヘテロサイクリックアミン変異原の生成に関与している

加熱調理, 加工食品には MelQx などの imidazoquinoxaline-type の変異・発がん性ヘテロサイクリックアミンが生成する。われわれは glucose/glycine/creatinine から成るこれらヘテロサイクリックアミン生成のモデル系において中間に生成する pyrazine cation radical が変異原生成に深く関与していることを見出した (Kato et al., 1996 ; Kikugawa et al., 1999 ; Kikugawa, 1999 ; Kikugawa et al., 2000 a ; Kikugawa et al., 2000 b)。これら変異原の生成は glucose/glycine の Maillard 反応の中間体に creatinine が反応して生成するというメカニズム (Jägerstadt et al., 1983) (Fig. 4) が提唱

されていた。glucose/glycine の反応で生成する pyrazine cation radical (Namiki et al., 1975) は Fig. 5 に示すような ESR スペクトルを示すが, glucose/glycine の加熱反応液の pyrazine cation radical の存在量と, glucose/glycine/creatinine の加熱反応液の変異原性の強さを比較検討したところ, glucose/glycine のモル比が 1 : 2 のとき, pyrazine cation radical の量と変異原性の強さが最大になった。Pyrazine cation radical の生成にも, 変異原性の生成にも, とともに同様な glucose の量依存性が認められ, pyrazine cation radical が変異原生成に関与していることが示唆された。

Pyrazine cation radical と変異原生成との関連は, 反応系に両者に共通して影響を与える食物成分の添加によって確認された。植物性ポリフェノール類がモデル反応系での変異原生成を抑制することがわかっていた (Weisburger et al, 1994 ; Oguri et al., 1998) が, われわれは, BHA, sesamol, EGCG などのフェノール類が pyrazine cation radical を消去するとともに変異原生成を抑制することを見出し, pyrazine cation radical の発生と変異原の生成の関連を確かめた。さらに, 反応系にエタノールを添加しても, pyrazine cation radical の発生にも変異原の生成にも全く影響を与えず, cysteine や N-acetylcysteine などのチオール化合物, ascorbate, erythorbate などのレダクトン類の添加により pyrazine

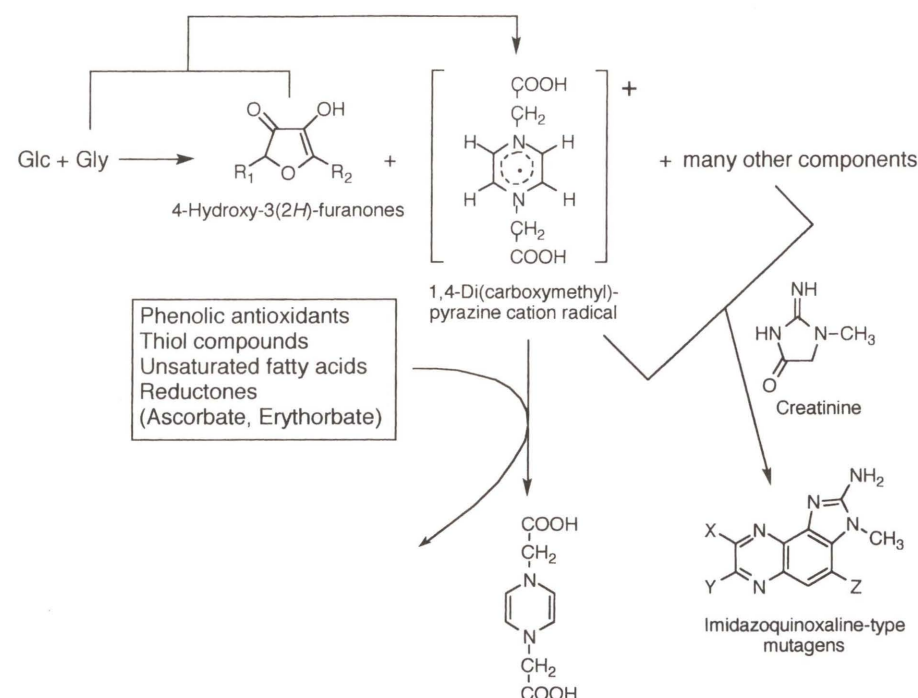


**Table 1** Effect of food factors on the generation of pyrazine cation radical and the formation of mutagenicity in the model system and in hamburger

Food factor	% ESR signals of the model system (mM) <sup>a)</sup>	% Mutagenicity of the model system (mM) <sup>b)</sup>	% Mutagenicity of cooked hamburger (%) <sup>c)</sup>
Phenolic antioxidant			
BHA	0 (100)	20 (100)	
Sesamol	0 (100)	40 (100)	
EGCG	0 (100)	40 (100)	97 (0.33)
Thiol compound			
CysH	10 (10)	30 (50)	100 (0.33)
NAC	0 (10)		94 (0.33)
Reductone			
Ascorbate	0 (50)	60 (50)	65 (0.33)
Erythorbate	0 (50)	60 (50)	60 (0.33)
Maillard reductone			
4-Hydroxy-3(2H)-furanones	200 (20)	100 (100)	

<sup>a)</sup> The model system composed of 0.2 M Glc/0.4 M Gly heated at 120 °C for 5 min

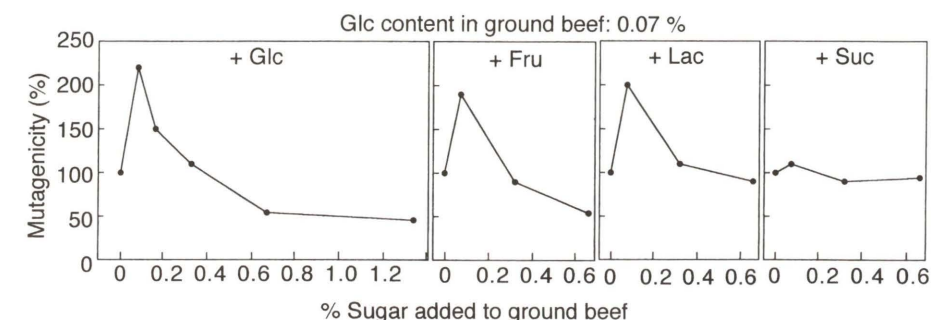
<sup>b)</sup> The model system composed of 0.2 M Glc/0.4 M Gly/0.4 M creatinine heated at 120 °C for 2 h. <sup>c)</sup> Hamburger prepared by heating ground beef at 200 °C for 20 min



**Fig. 6** Possible pathway for the generation of pyrazine cation radical and the mutagen formation in the reaction of glucose, glycine and creatinine, and the effect of food factors

cation radicalが消去され、変異原の生成も抑制された。Maillard反応で生成するレダクトンの芳香性フラノン類の添加は pyrazine cation radical を消去することなく、むしろ増強する傾向にあり、変異原生成も抑制しなかった。このことは、Maillard反応において、フラノン類が pyrazine cation radical の中間体になっていることを示唆している。以上の結果を Table 1 と Fig. 6 にまとめて示した。

モデル系で変異原生成を抑制した食物成分のうち EGCG を多量に含む茶葉抽出液をかつお節の製造に適用したが、高濃度の茶葉抽出液でかつおを煮沸したのちくん煙で焙乾した場合、かつお節の変異原生成を若干抑制したものの、実用的な低濃度では、ほとんど効果がなかった (Kato and Kikugawa, 1999)。EGCG, cysteine, N-acetylcysteine, ascorbate, erythorbate をハンバーグの変異原の低減に適用したが、実用的に用いられる程度



**Fig. 7** Mutagenicity of cooked hamburger prepared by addition of glucose (Glc), fructose (Fru), lactose (Lac) and sucrose (Suc) to ground beef. Thirty grams of ground beef was heated at 200 °C for 20 min. The mutagens in cooked hamburger were concentrated by use of blue rayon, and the mutagenicity was tested using *Salmonella typhimurium* TA98 strain with metabolic activation

**Table 2** Participation of free radical species in mutagen formation and activity.

Source	Free radical species	Scavenging or reducing factor	Activity
Aryldiazonium salts	Carbon-centered radical	Ethanol	DNA base modification
Maillard reductones	Oxygen-centered radical	Ethanol	DNA strand break
Coffee HHQ	Oxygen-centered radical	Ethanol	DNA strand break
Maillard reaction	Pyrazine cation radical	Ascorbate Erythorbate Glucose at high amount	Heterocyclic amine formation

(0.33%)の牛ひき肉への添加では、EGCGやチオール化合物には効果がなく、ascorbateおよびerythorbateのみが有効で、これらによって加熱調理したハンバーグの変異原性は半分にまで低減された (Kato et al., 2000) (Table 1)。ハンバーグの調理時に牛ひき肉に0.33% (w/w)のascorbate, erythorbateを添加することにより変異原の生成が抑制されることがわかった。

モデル系でglucoseの添加量により、pyrazine cation radicalと変異原の生成量が左右されたので、ハンバーグの調理時に、もともと0.07% (w/w)程度の還元糖が含まれている牛ひき肉に、異なる量の還元糖 glucose, fructoseおよびlactoseを添加してハンバーグの変異原性を検討した。その結果、終濃度0.3% (w/w)の還元糖添加では、変異原性は約2倍に増強され、終濃度0.7% (w/w)以上の還元糖添加では変異原性は約半分に減少した (Fig. 7) (Kato et al., 2000)。終濃度0.7% (w/w)以上の還元糖添加がハンバーグの変異原抑制に効果的であることがわかった。牛ひき肉に糖分を含まないブランデーを33% (v/w)加えた場合、変異原生成は全く影響を受けなかったが、赤ワインまたは白ワインを同量加えた場合、変異原生成は約1.8倍に増強した。この量の赤ワインと

白ワインの添加は終濃度0.3% (w/w)以下の還元糖濃度に匹敵するので、変異原性が増加したと考えられる。赤ワインに比較的多量に含まれるポリフェノールの効果は認められず、糖の添加の影響が大きいことを示している。日本では、ハンバーグの調理にタマネギを入れる調理が行われるが、牛ひき肉に16.6% (w/w), 33% (w/w)のタマネギの添加により、ハンバーグの変異原性は80%および50%に低下した (Kato et al., 1998)。この場合は還元糖濃度が0.9% (w/w)以上になる。ハンバーグの調理にタマネギを添加することにより、変異原生成を抑制できることがわかった。このように、ハンバーグの変異原の生成量は、還元糖の添加により、微妙にコントロールされることがわかり、変異原の生成を抑制するには終濃度0.7% (w/w)以上の還元糖を添加するとよいことがわかった。多量の糖の添加により pyrazine cation radicalの生成が抑制されるためと考えられる。

## 結 語

変異・発がん物質が生成する過程、変異・発がん物質が直接的に遺伝子を修飾する過程にフリーラジカルが関与していることを述べた。ここでは述べなかったが、環



境や食品中の物質が体内で代謝を受けたのち遺伝子を修飾する過程でもフリーラジカルが関与していることも明らかにされている。フリーラジカルが関与する変異原の生成、発現のメカニズムを探ることによって、その生成や発現を抑制する食物成分を明らかにすることができよう。ここで述べた変異原生成と発現に関与するフリーラジカルの発生源、フリーラジカル種、効果的な消去あるいは低減成分、作用メカニズムについてTable 2にまとめた。

## 参考文献

- Ando, K., K. Ogawa, X. Li and K. Kikugawa (2000) Inhibition of iron ion-induced oxidative damage of erythrocyte membranes and low density lipoprotein by a Maillard product, 4-hydroxy-2 (or 5) -ethyl-5 (or 2) -methyl-3 (2H) -furanone (HEMF), Biol. Pharm. Bull., 23, 689-694.
- Hiramoto, K. and K. Kikugawa (2000) Effective generation of hydrogen peroxide from hydroxyhydroquinone in roasted coffee beans and its inhibition by superoxide dismutase, J. Oleo Sci., in press.
- Hiramoto, K., X. Li, M. Makimoto, T. Kato and K. Kikugawa (1998) Identification of hydroxyhydroquinone (HHQ) in coffee as a generator of reactive oxygen species that break DNA single strands, Mutat. Res., 419, 43-51.
- Hiramoto, K., K. Sekiguchi, R. Aso-o, K. Ayuha, H. Ni-iyama, T. Kato and K. Kikugawa (1995) DNA strand breaks induced through active oxygen radicals by fragrant component 4-hydroxy-2-hydroxymethyl-5-methyl-3 (2H) -furanone in Maillard reaction of hexose/amino acid, Food Chem. Toxicol., 33, 803-814.
- Jägerstadt, M., R. A. Kaser, R. Oste, A. Dahlqvist, S. Grivas, K. Olsson and T. Nyhammar (1983) Creatinine and Maillard reaction products as precursors of mutagenic compounds formed in fried beef, in Waller, G. R. and M.S. Feather (Eds.), the Maillard Reaction in Foods and Nutrition. ACS Symposium Series 215, American Chemical Society, Washington, D. C., pp 507-520.
- Katchman, B. J., R. E. Zipf and P. F. Murphy (1963) The effect of chemotherapeutic agents upon the metabolism of intact human cancer cells. An *in vitro* technique of cell sensitivity, Clin. Chem., 9, 511-529.
- Kato, T., T. Harashima, N. Moriya, K. Kikugawa and K. Hiramoto (1996) Formation of the mutagenic/carcinogenic imidazoquinoxaline-type heterocyclic amines through the unstable free radical Maillard intermediates and its inhibition by phenolic antioxidants, Carcinogenesis, 17, 2469-2476.
- Kato, T., K. Hiramoto and K. Kikugawa (1994) Possible occurrence of new mutagens with the DNA breaking activity in coffee, Mutat. Res., 306, 9-17.
- Kato, T., K. Hiramoto and K. Kikugawa (2000a) Mutagenicity of cooked hamburger is reduced by addition of ascorbate and erythorbate to ground beef, J. Health Sci., in press.
- Kato, T. and K. Kikugawa (1999) Attempt to decrease the mutagenicity of smoked-and-dried bonito (Katsuobushi) by boiling of bonito meat in green tea extract, J. Health Sci., 45, 130-132.
- Kato, T., K. Michikoshi, Y. Minowa and K. Kikugawa (2000b) Mutagenicity of cooked hamburger is controlled delicately by

- reducing sugar content in ground beef, Mutat. Res., in press.
- Kato, T., K. Michikoshi, Y. Minowa, Y. Maeda and K. Kikugawa (1998) Mutagenicity of hamburger is reduced by cooking ground beef with onion, Mutat. Res., 420, 109-114.
- Kato, T., N. Tadokoro, M. Tsutsui and K. Kikugawa (1991) Transformation of arylamines into direct-acting mutagens by reaction with nitrite, Mutat. Res., 249, 243-254.
- Kawanishi, S., S. Inoue and M. Kawanishi (1989) Human DNA damage induced by 1, 2, 4-benzenetriol, a benzene metabolite, Cancer Res., 164-168.
- Kikugawa, K. (1999) Involvement of free radicals in the formation of heterocyclic amines and prevention by antioxidants, Cancer Lett., 143, 123-126.
- Kikugawa, K., K. Hiramoto and T. Kato (2000a) Prevention of the formation of mutagenic and/or carcinogenic heterocyclic amines by food factors, BioFactors, in press.
- 菊川清見, 平本一幸, 加藤哲太 (1996) 食品におけるフリーラジカル性変異原の生成とその阻止, 環境変異原研究, 18, 47-51.
- Kikugawa, K., K. Hiramoto and T. Kato (1999) Generation of oxygen-derived radicals in the Maillard reaction that induce DNA strand cleavage, Recent Res. Devel Agric. Food Chem., 2, 237-257.
- Kikugawa, K., K. Hiramoto, T. Kato and Y. Yanagawa (2000b), Effect of food reductones on the generation of the pyrazine cation radical and on the formation of the mutagens in the reaction of glucose, glycine and creatinine, Mutat. Res., 465, 183-190.
- Kikugawa, K. and T. Kato (1988) Formation of a mutagenic diazoquinone by interaction of phenol with nitrite, Food Chem. Toxicol., 26, 209-214.
- Kikugawa, K., T. Kato, K. Hiramoto, C. Takada, M. Tanaka, Y. Maeda and T. Ishihara (1999), Participation of the pyrazine cation radical in the formation of the mutagens in the reaction of glucose/glycine/creatinine, Mutat. Res., 133-144.
- Kikugawa, K., T. Kato and Y. Takeda (1987) Formation of a highly mutagenic diazo compound from the bamethan-nitrite reaction, Mutat. Res., 177, 35-43.
- Kikugawa, K., T. Kato and Y. Takeda (1989) Formation of a direct mutagen, diazo-N-nitroso-etilefirin, by interaction of etilefirin with nitrite, Chem. Pharm. Bull., 37, 1600-1603.
- Long, L.H. and B. Halliwell (2000) Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in healthy human volunteers, Free Rad. Res., 32, 463-467.
- Namiki, M. and T. Hayashi (1975) Development of novel free radicals during the amino-carbonyl reaction of sugars with amino acids, J. Agric. Food Chem., 23, 487-491.
- Ochiai, M., K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1984) Tyramine is a major mutagen precursor in soy sauce, being convertible to a mutagen by nitrite, Gann, 75, 1-3.
- Oguri, A., M. Suda, Y. Totsuka, T. Sugimura and K. Wakabayashi (1998) Inhibitory effects of antioxidants on formation of heterocyclic amines, Mutat. Res., 402, 237-245.
- Toth, B., D. Nagel and H. Jae (1981) Carcinogenesis of 4-(hydroxymethyl) benzene diazonium ion (tetrafluoroborate) of Agaricus bisporus, Cancer Res., 41, 2444-2449.
- Weisburger, W.H., M. Nagao, K. Wakabayashi and A. Oguri (1994) Prevention of heterocyclic amine formation by tea and tea polyphenols, Cancer Lett., 83, 143-147.

Environ. Mutagen Res., 22 : 155 - 162 (2000)

シンポジウム

## 化学物質による活性酸素の生成と消去

福原 潔, 宮田 直樹

国立医薬品食品衛生研究所 〒158-8501 世田谷区上用賀1-18-1

### Electrochemical studies of quinone and nitroarene in generation and quenching of superoxide

Kiyoshi Fukuhara and Naoki Miyata

National Institute of Health Sciences  
Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

### Summary

Quinones are common in several natural products and endogenous biochemicals or generated through metabolism of aromatic hydrocarbons. Some quinones are potent redox active compounds which can undergo enzymatic redox cycling with their corresponding semiquinone anion radicals and as a result generate superoxide anion radicals.

In this paper, we review the catalytic activity of quinones and nitroarenes, as mediators in the reductive activation of molecular oxygen and in the oxidative quenching of superoxide, examined by electrochemical method.

**Keywords :** quinone, nitroarene, superoxide, electrochemistry

## 緒言

酸素障害は反応性の高い酸素の還元分子種(スーパーオキシド, 過酸化水素, ヒドロキシルラジカル)あるいは励起分子種(一重項酸素)等の活性酸素が核酸, 脂質, 蛋白質などの生体高分子を特異的に酸化することによってもたらされ, 発がん, 炎症, 心疾患等の多くの疾患や老化の要因にも関与していることが報告されている。通常, 活性化したマクロファージ, 白血球, 細胞内顆粒, 酸化酵素等によって発生した活性酸素は, 生体における防御機構の一つとして重要な役割をはたしている。また, 生体は活性酸素の生成抑制機構や活性酸素に対する消去機能が働いており, 過剰の活性酸素による酸素障害を防いでいる。しかし, 過労やストレス等で活性酸素の生成抑制と消去機能が十分に機能しないとき, あるいは, 外因性の化学物質が活性酸素の生成を促進するとき, 活性

酸素は細胞成分を酸化し, 酸素障害を与える。

活性酸素を生成する化学物質には, キノン系環境化学物質や芳香族炭化水素のキノン代謝物(Bolton et al., 2000), アドリアマイシンやストリプトニグリン等のキノン系制がん剤(Doroshov and Davis, 1986), プレオマイシン(Hecht, 1995)やビタミンK(Kim et al., 1996)等が知られている。このうちキノン系化合物によって生じる酸素障害は, キノン類が一電子還元酵素によって生成するセミキノンアニオンラジカルが酸素分子を還元的に活性化して生成するスーパーオキシドが引き金となる(O'Brien, 1991)。スーパーオキシドはさらに酵素的またはHaber-Weiss反応によって, より反応性の高い過酸化水素やヒドロキシルラジカル等の活性酸素種を生成し, 成人病を引き起こす原因の一つにこれらの活性酸素種による生体高分子の酸化的修飾反応が考えられている。特にこれらの活性酸素種による核酸に対する酸化的損傷反応は細胞の突然変異を誘発し, がん化のための主な要因の一つであることが明らかとなっている。環境化

受付: 2000年8月11日 受理: 2000年8月12日  
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第11回公開シンポジウム「環境変異原の活性発現と抑制の化学的機構」で発表された。  
This paper was presented at the 11th JEMS Annual Symposium at the ABC Hall, Tokyo, June 3rd 2000. The Symposium entitled "Chemical Mechanisms of Depression and Repression of Activity In Environmental Mutagenesis", was organized by Masataka Mochizuki and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.



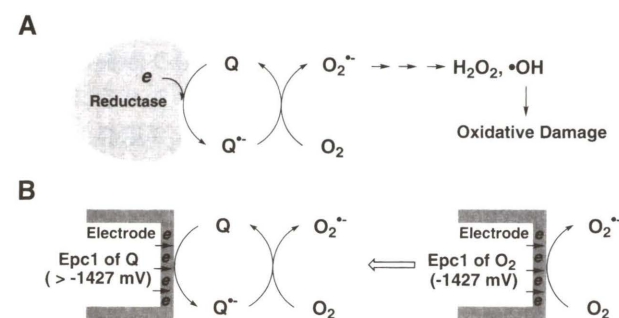


Fig. 1 Generation of superoxide catalyzed by quinone in biological (A) and electrochemical (B) systems

学物質として特にその変異原性と発がん性が注目されているニトロアレーンも、近年、ニトロ基の代謝活性化反応の過程でスーパーオキシドが生成することが報告されている (Mason et al. 1975). すなわち、ニトロアレーンの還元代謝活性化反応は、好氣的条件下ではニトロアニオンラジカルから酸素分子への一電子移動反応が進行してスーパーオキシドが生成することが予測されている。

われわれは、活性酸素生成の重要なステップと考えられる酸素の一電子還元によるスーパーオキシドの生成反応に注目し、キノンおよびニトロアレーンと酸素分子との間の電子移動反応についてサイクリックボルタンメトリー法 (CV 法)、ディファレンシャルパルスボルタンメトリー法 (DPV 法)、ポテンシャルステップクロノクーロメトリー法 (PSCC 法) 等の電気化学的手法による解析を試みた。本稿ではキノンおよびニトロアレーンのアニオンラジカルから酸素分子への一電子移動反応 (スーパーオキシドの生成) と、スーパーオキシドからニトロアレーンおよびキノンへの一電子移動反応 (スーパーオキシドの消去) の電気化学的解析法の確立および本方法によって得られたこれらの化合物の酸化還元特性とスーパーオキシド発生能および消去能との相関について述べる。

## 1. スーパーオキシド生成反応の解析

### 1) CV 法, および DPV 法による解析

アントラキノン誘導体による細胞障害は活性酸素によって引き起こされる。すなわちアントラキノンは cytochrome P450 reductase 等の還元酵素によって一電子還元を受けてアントラキノンアニオンラジカルが生成する。酸素はアントラキノンアニオンラジカルによって一電子還元されてスーパーオキシドが生成し、この酸素への一電子移動反応が細胞障害の引き金となる (Doroshov, 1983). そこでアントラキノンによる酸素の触媒的還元活性化反応を電気化学的に解析することを試みた (Fig. 1). 測定は、0.1 M の過塩素酸テトラエチルアンモニウムを支持電解質とした DMF 溶液中、白金作用電極、針状白金対極、および非水溶媒用銀参照電極を

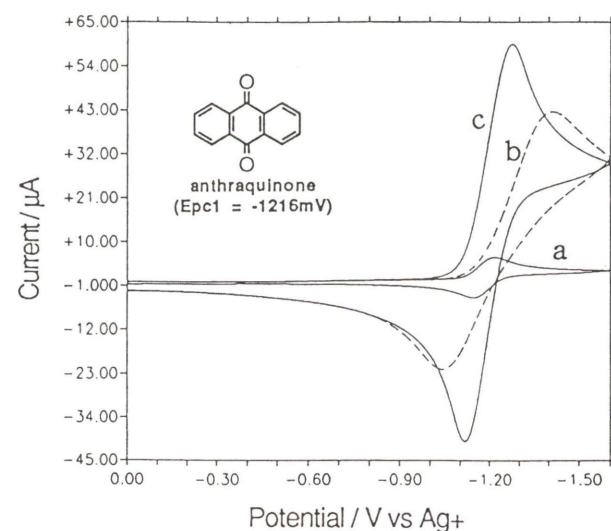


Fig. 2 CV of 0.1 mmol dm<sup>-3</sup> anthraquinone under argon (a), saturated O<sub>2</sub> (b) or anthraquinone under saturated O<sub>2</sub> (c) in DMF solutions (1 ml) containing 0.1 mol dm<sup>-3</sup> NEt<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub> at a Pt electrode (diameter 1.6 mm) with a scan rate of 100 mV s<sup>-1</sup> at 25 °C. The potentials are vs. Ag/Ag<sup>+</sup> (0.01 mol dm<sup>-3</sup>) AgNO<sub>3</sub> in 0.1 mol dm<sup>-3</sup> NBu<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub> in MeCN

用いて行った (Fig. 2). 酸素 (約 4.5 mM 飽和酸素濃度) は -1427 mV で一電子還元 (Epc1) されてスーパーオキシドが生成し、逆に -1038 mV でスーパーオキシドは酸素へ一電子酸化 (Epa1) される。一方、アントラキノンの 1 mM 溶液は嫌氣的条件下では -1216 mV で一電子還元 (Epc1) されてアニオンラジカルが生成し、このアニオンラジカルは -1155 mV で一電子酸化 (Epa1) されてアントラキノン再生する。このアントラキノン溶液中に酸素を飽和させて酸化還元電位を測定すると酸素の還元電位は Epc1 = -1257 mV, またスーパーオキシドの酸化電位は Epa1 = -1108 mV となり、アントラキノン非存在下と比べ酸素の還元電位はプラス側に 152 mV シフトし、またスーパーオキシドの酸化電位は、70 mV マイナス側にシフトしていることが示された。酸素の還元電位のプラス側へのシフトは、アントラキノンアニオンラジカルと酸素が酸化還元サイクルを形成していることを示す。すなわち、1) アントラキノンは酸素より還元されやすいため、電極表面上でアントラキノンが先に還元され、2) 生成したアニオンラジカルは溶存酸素存在下、酸素への電子移動反応が進行して、スーパーオキシドの発生とアントラキノンの再生が起き、3) 再生したアントラキノンは再度還元される。1) - 3) の酸化還元サイクルが繰り返されることによって酸素の還元電位はアントラキノンの還元電位の近くにシフトし、還元電流は増加する。以上、アントラキノンによるスーパーオキシドの触媒的な生成反応が電気化学的手法 (CV 法) によって再現された。この結果は、キノンによるスーパーオキシドの触媒的な生成反応が電気化学的手法によって解析可能である

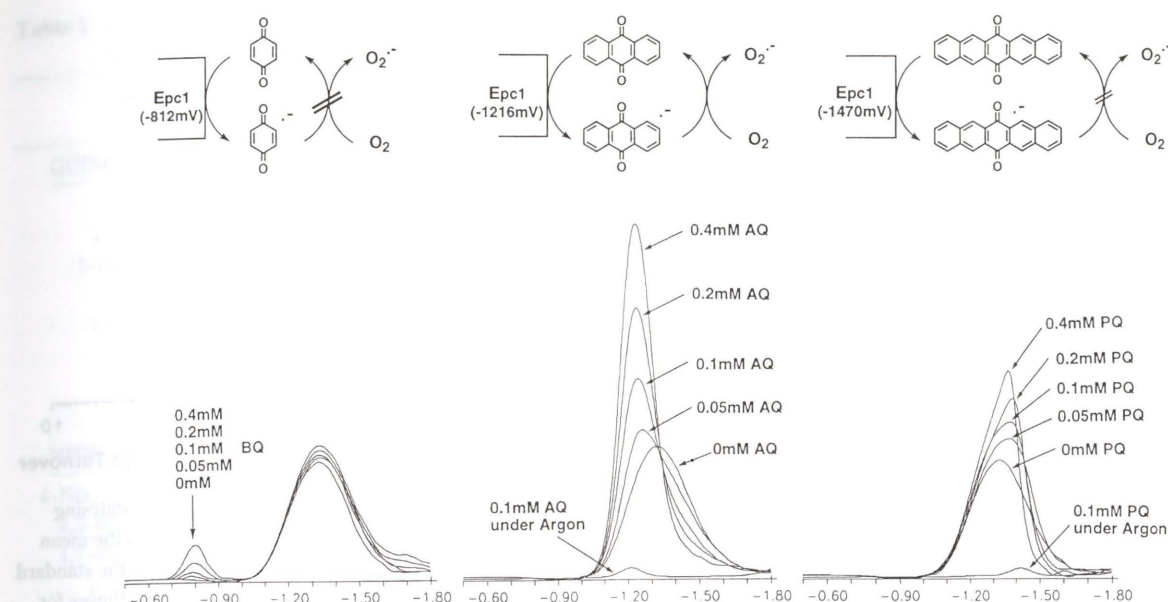


Fig. 3 DPV of p-benzoquinone (BQ), anthraquinone (AQ) or 6, 13-pentacenequinone (PQ) under saturated O<sub>2</sub>. The conditions is as follows ; 0 mV init E, -1800 mV final E, 20 mV/s scan rate, 50 mV pulse amp, 50 ms pulse width, 200 mV pulse period, 5 s quiet T

ことを示している。

CV 法は酸化還元過程でバックグラウンド電流 (容量性電流) を生じるため、酸素の酸化還元に伴い、CV 曲線のベースラインは大きく変化する。DPV 法は電位を順次ステップアップして電流応答をサンプリングする方法であり、CV 法で問題となる酸化還元反応過程に生じるバックグラウンド電流の影響を受けない。そのため、DPV 法で観測される電流曲線の変化はキノンによるスーパーオキシドの生成のみを直接反映することが考えられる。そこで、スーパーオキシドの生成反応を DPV 法で測定し、還元電位の異なるキノン化合物について電子移動反応に伴うスーパーオキシドの生成反応の比較を行った (Fig. 3). CV 法で酸素への電子移動反応が観測されたアントラキノンの場合、DPV 法においてもアントラキノンアニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応に伴う酸素の還元電位のプラスへのシフトと酸化還元サイクルに伴う還元電流量の増加がみられた。また、アントラキノン濃度が 0.05 - 0.2 mM の範囲では酸素飽和条件下、還元電流量が比例して増加していることから、アントラキノンはこの濃度範囲では飽和酸素と一定の酸化還元サイクルでスーパーオキシドを生成していることが示された。一方、アントラキノンよりも一電子還元されやすいベンゾキノ (Epc1 = -812 mV) や一電子還元され難い 6, 13-ペンタセンキノ (Epc1 = -1415 mV) では還元電流量の増加がほとんどみられないことから、これらのキノン体はスーパーオキシドの発生を触媒していないことが示された。以上、DPV 法によってキノンアニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応によるスーパーオキシド発生の解析を行った結果、アントラキノンは酸化還元

サイクルによってスーパーオキシドを発生するのに対し、一電子還元電位の異なるベンゾキノや 6, 13-ペンタセンキノのアニオンラジカルからは酸素への電子移動反応が起こらないことが明らかとなった。

### 2) PSCC 法による解析

種々のキノンと酸素との間の電子移動反応の行きやすさを比較するためには、電子移動反応の数値化が必要である。PSCC 法は、電位をある値から第 2 の値にステップしたときに得られる電流量 (Q) の経時変化 (クーロメトリー) を調べる方法であり、電極反応の速度論的パラメータの解析に有効な手法である。そこで PSCC 法を用いて、キノンアニオンラジカルから酸素分子への一電子移動反応によって生じる酸化還元サイクルの回数 (ターンオーバー数) を数値化し、キノン化合物のスーパーオキシド発生能を明らかにした。また、同様の実験をニトロアレーンについても行い、キノンと比較した。測定は CV 法や DPV 法と同様の条件で行った。初期電位は 0 mV に設定し、ついで電位をそれぞれの化合物の一電子還元電位 (Epc1) に、250 m 秒間ステップした時の、還元電流量の経時変化 (Q vs t) を測定した。還元電流量の対時間プロット曲線 (クロノクーログラム) は、Anson プロット (Q vs t<sup>1/2</sup>) 表示法により直線プロットへと変換した後、この直線プロットの勾配 (μC / msec<sup>1/2</sup>) を求めた。実験は、嫌氣的条件下および化合物非存在下でも行い、これらの勾配値から化合物のスーパーオキシド生成量とターンオーバー数で表わした触媒能を算出した。まず、アントラキノンのスーパーオキシド生成能を PSCC 法によって解析した (Fig. 4). アントラキノンの一電子還元



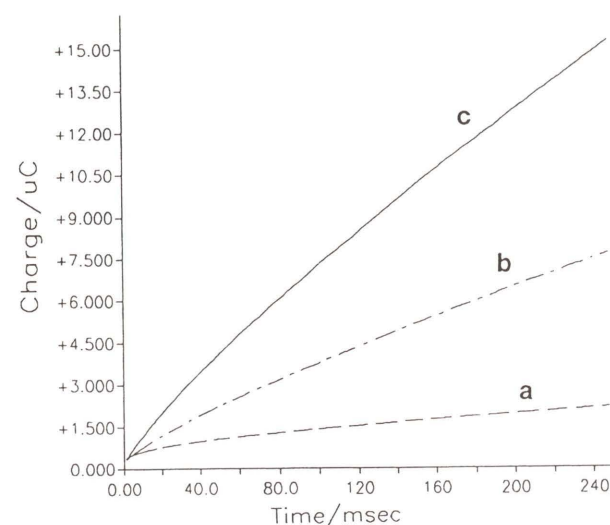


Fig. 4 PSCC of 0.1 mmol dm<sup>-3</sup> anthraquinone under argon (a), saturated O<sub>2</sub> (b) or anthraquinone under saturated O<sub>2</sub> (c). The potentials are stepped from 0 to -1216 mV (Epc1 of anthraquinone) for 250 ms. Other conditions are as in Fig. 1

電位(Epc1)は-1216 mVであるため、この電位条件下でPSCC法を行った。その結果、酸素飽和条件下、アントラキノン0.1 mM溶液で測定された電気量([S + O<sub>2</sub>] = 0.755 μC/msec<sup>1/2</sup>)は、嫌氣的条件下([S] = 0.018 μC/msec<sup>1/2</sup>)およびアントラキノン非存在下([O<sub>2</sub>] = 0.480 μC/msec<sup>1/2</sup>)での電気量をはるかに上回ることが示され、アントラキノンアニオンラジカルは酸素分子と酸化還元サイクルを繰り返してスーパーオキシドの発生を触媒していることが示された。さらにAnsonプロット変換で求めた電流量からスーパーオキシドの発生量は1400 mmol dm<sup>-3</sup>、ターンオーバー数は14.1であることが明らかとなった。次にアントラキノン濃度を変えて同様の実験を行った(Fig. 5)。その結果、0.001 mM - 0.1 mMの濃度範囲ではスーパーオキシドの生成量は化合物濃度に比例し、一定のターンオーバー数によってスーパーオキシドの生成を触媒していることが示され、アントラキノンの触媒能はこの濃度範囲では計測可能であることが明らかとなった。

以上、PSCC法によりアントラキノンのスーパーオキシド生成能を数値化することが可能になった。そこで種々のキノンやニトロアレーンのスーパーオキシド生成能を明らかにし、さらに化合物の酸化電位(Epa1)との相関についても検討した(Table 1)。その結果、-1000 mVから-1300 mVに酸化電位(Epa1)を有するキノンやニトロアレーンでは、アニオンラジカルから酸素分子への電子移動に伴う電気量の増加([S + O<sub>2</sub>] > [S] + [O<sub>2</sub>])がみられ、スーパーオキシドが触媒的に発生していることが示された。特に、Epa1が小さい化合物ほどスーパーオキシドを発生しやすく、Epa1が酸素分子のEpc1(-1437 mV)に近い時、触媒作用が最も強くなり効率よく

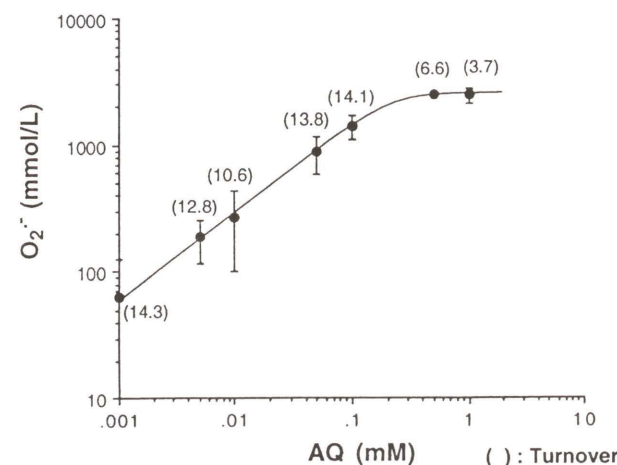


Fig. 5 Effect of anthraquinone concentration on the catalysing formation of superoxide. Each point represents the mean value of three runs, and the error bars indicate the standard deviation. Turnover numbers are given in parentheses for each concentration

スーパーオキシドを発生した。一方、Epa1が-1000 mVよりも大きい化合物では、アニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応は進行しなかった。キノンの中では5, 12-ナフトセンキノンが最高のターンオーバー数29.7を示し、ニトロアレーンの中では1-ニトロピレンのターンオーバー数16.2が最高であった。また、同程度のEpa1を持つキノンとニトロアレーンを比較すると、ニトロアレーンの電子移動能はキノンの約60%であった。

以上、電気化学的手法を用いることによりキノンおよびニトロアレーンのアニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応を明らかにした。-1000 mV ~ -1300 mVに酸化電位のあるキノンやニトロアレーンから酸素分子への電子移動は、酸化還元の電位ギャップを乗り越えて電子が移動している。この電子移動反応は酸素に特徴的な現象であり、酸素分子の還元電位(Epc1 = -1437 mV)と酸化電位(Epa1 = -1056 mV)との差がキノンやニトロアレーンよりも大きいことによると考える。キノンやニトロアレーンが酸素分子と酸化還元サイクルを形成してスーパーオキシドを触媒的に発生するためには、酸素の還元電位よりもプラスの電位で容易に化合物の還元反応が進行すること(ステップ1)、化合物が一電子還元後、その電位で酸素への電子移動反応がすみやかに進行すること(ステップ2)が必要である。PSCC法によって明らかにした電位ギャップを乗り越えた電子移動反応はステップ2の反応が電気化学的に進行可能であること示しており、この特徴的な電子移動反応が進行することによって、キノンやニトロアレーンは酸素分子とレドックスサイクルを形成してスーパーオキシドを触媒的に発生することが考えられる。

Table 1 Chronocoulometric data for quinone and nitroarenes in the presence or absence of oxygen : Catalytic activity of quinone and nitroarene anion radical for superoxide generation

compounds	Epc1 <sup>a</sup> (mV vs. Ag/Ag <sup>+</sup> )	[S] <sup>b</sup> (μC/msec <sup>1/2</sup> )	[S + O <sub>2</sub> ] <sup>b</sup> (μC/msec <sup>1/2</sup> )	[O <sub>2</sub> ] <sup>b</sup> (μC/msec <sup>1/2</sup> )	Amount of O <sub>2</sub> · <sup>-c</sup> (mmol dm <sup>-3</sup> )	Turnover number <sup>d</sup>
QUINONE						
benzoquinone	-812	0.022	0.027	0.006	1	0
1,4-naphthoquinone	-981	0.019	0.037	0.017	3	0
1-OH-anthraquinone	-1052	0.018	0.048	0.030	9	0.1
menadione	-1071	0.018	0.060	0.035	46	0.5
1-Cl-anthraquinone	-1166	0.020	0.389	0.225	786	7.3
anthraquinone	-1216	0.018	0.755	0.480	1400	14.1
5,12-naphthacene-quinone	-1319	0.019	1.667	1.087	3060	29.7
NITROARENE						
4-NO <sub>2</sub> -quinoline N-oxide	-1012	0.017	0.041	0.015	43	0.5
1,3-diNO <sub>2</sub> -naphthalene	-1095	0.018	0.079	0.048	70	0.7
1,7-diNO <sub>2</sub> -naphthalene	-1134	0.019	0.198	0.107	395	3.9
3-NO <sub>2</sub> -fluoranthene	-1204	0.019	0.521	0.378	675	6.5
m-diNO <sub>2</sub> -benzene	-1227	0.018	0.560	0.400	773	7.8
1,6-diNO <sub>2</sub> -naphthalene	-1248	0.019	0.738	0.550	928	9.2
1-NO <sub>2</sub> -pyrene	-1325	0.018	1.394	1.086	1580	16.2

<sup>a</sup> Applied potential for PSCC experiment.

<sup>b</sup> The potentials were stepped from 0 mV to Epc1 of compounds. The integrations of current were measured for 250 ms with 0.1 mM substrate under argon [S], 0.1 mM substrate under saturated O<sub>2</sub> [S + O<sub>2</sub>] or saturated O<sub>2</sub> [O<sub>2</sub>] in DMF (1 mL) containing 0.1 mmol dm<sup>-3</sup> TEAP at a Pt electrode (diam. 1.6 mm), and the diffusional slopes of a linear plot (charge vs t<sup>1/2</sup>; Anson plot) were obtained. All values were subtracted by [DMF] as background. The concentration and diffusion coefficient of saturated O<sub>2</sub> in DMF are 4.5 mmol dm<sup>-3</sup> and 4.7 × 10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup>/s.

<sup>c</sup> Amounts of generated superoxide = [S + O] - ([S] + [O]) × 5.45 × 1000

<sup>d</sup> Turnover numbers of redox cycling = ([S + O] - ([S] + [O]))/[S]

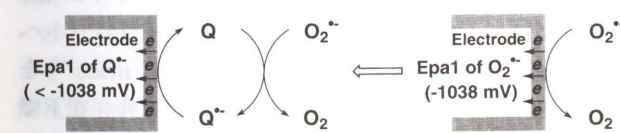


Fig. 6 Electrochemical system for superoxide quenching catalyzed by quinone

## 2. スーパーオキシドの消去反応の解析

スーパーオキシドからキノンやニトロアレーンへの電子移動反応が進行するとスーパーオキシドが消去されて酸素分子が再生する。このスーパーオキシドの消去反応は、CV法によるアントラキノンと酸素分子との間の電子移動反応過程で明らかとなった(Fig. 2)。すなわち、スーパーオキシドは-1038 mVで酸素分子への電子酸化反応を受けるのに対して、アントラキノン1 mM溶液ではスーパーオキシドの酸化は-1110 mVで進行し、アントラキノン非存在下と比べて72 mVスーパーオキシドは酸化されやすいことが示された。また、この酸化電位における電流ピークの増加もみられた。このスーパーオキシドの電子酸化反応性の増加は、スーパーオキシドからアントラキノンへの電子移動反応が進行して、レドックスサイクルを形成していることが考えられる(Fig. 6)。すなわち、-1600 mVから0 mVへ電位を掃引す

ると、1) アントラキノンアニオンラジカルは、スーパーオキシドよりも一電子酸化されやすいため(Epa1 = -1190 mV)、アントラキノンアニオンラジカルはスーパーオキシドよりも先にアントラキノンへ酸化される、2) スーパーオキシドからアントラキノンへの電子移動反応が進行して酸素分子が生成し、アントラキノンが再還元される、3) 再還元されたアントラキノンアニオンラジカルは再度酸化され、その結果酸化電流が増加する。以上のような酸化還元サイクルを繰り返すことによってスーパーオキシドの酸化電位はアントラキノンアニオンラジカルの酸化電位の近くにシフトし、アントラキノンがスーパーオキシドの消去反応を触媒することが明らかとなった。

さらにDPV法を用いてスーパーオキシドからキノンへの電子移動反応の詳細な解析を行った(Fig. 7)。その結果2, 3-ジメチルアントラキノン、スーパーオキシドからキノン分子への電子移動反応に伴う酸化電位のマイナスへのシフトとレドックスサイクルの形成に伴う酸化電流量の増加がみられ、2, 3-ジメチルアントラキノンがスーパーオキシドの酸素分子への消去反応を触媒していることが示された。また、スーパーオキシドの酸化電流量は2, 3-ジメチルアントラキノン溶液濃度(0.05 - 0.2 mM)に比例して増加していることから、こ



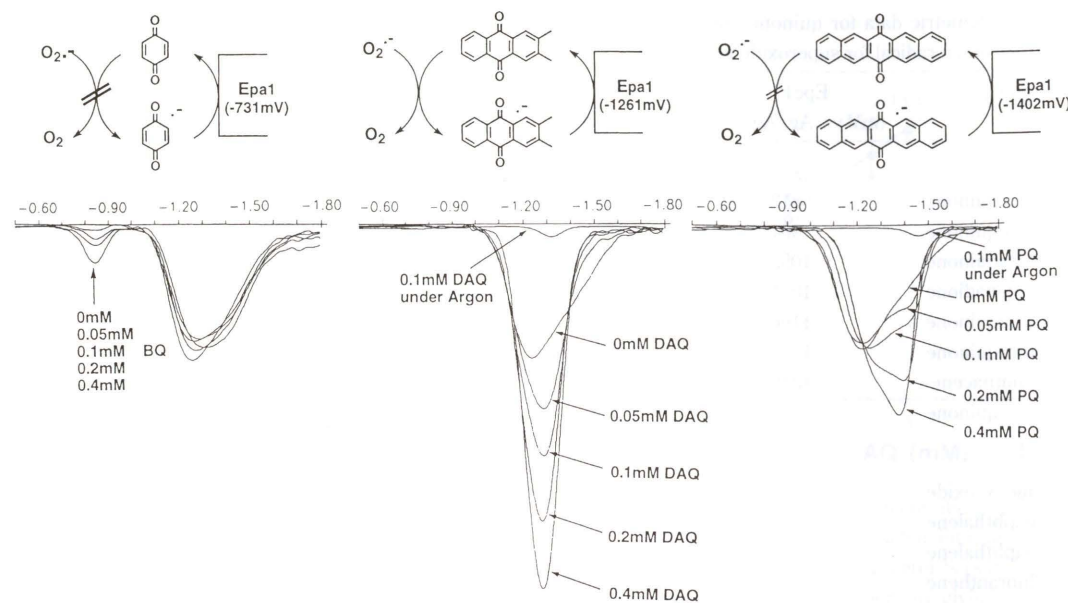


Fig. 7 DPV of p-benzoquinone (BQ), 2,3-dimethyl anthraquinone (DAQ) or 6,13-pentacenequinone (PQ) under saturated  $O_2$ . The conditions are as follows: -1800 mV init E, 0 mV final E, 20 mV/s scan rate, 50 mV pulse amp, 50 ms pulse width, 200 mV pulse period, 5 s pre-excitation T

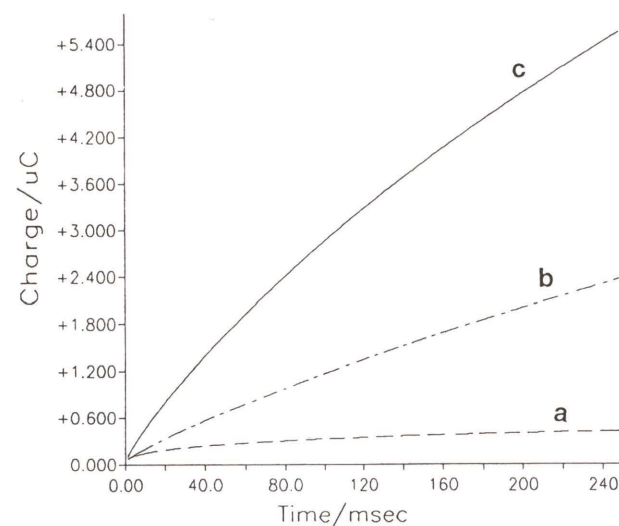


Fig. 8 PSCC of 0.1 mmol  $dm^{-3}$  2-methylanthraquinone under argon (a), saturated  $O_2$  (b) or anthraquinone under saturated  $O_2$  (c). The potentials are stepped from -1437 to -1226 mV (Epa 1 of 2-methylanthraquinone) for 250 ms. Other conditions are as in Fig. 1

の濃度範囲では、飽和酸素濃度は2,3-ジメチルアントラキノンと酸化還元サイクルを形成するのに十分量存在していることが明らかとなった。一方、ベンゾキノンや6,13-ペンタセンキノンでは、2,3-ジメチルアントラキノンと同様の電子移動反応はみられなかった。

次にPSCC法を用いてキノンやニトロアレーンのスーパーオキシド消去能の数値化を試み、スーパーオキシド消去能を化学的に解析した。初期電位は0 mVに設定し、ついで電位を酸素の還元電位(-1437 mV)に10 sec ステッ

プして電極表面上に十分量のスーパーオキシドと化合物のアニオンラジカルを発生させた。さらに電位をそれぞれの化合物の酸化電位(Epa1)に250 msec ステップしたときの、酸化電流量の経時変化(Q vs t)を測定した。酸化電流量の対時間プロット曲線(クロノクーログラム)は、Ansonプロット(Q vs  $t^{1/2}$ )表示法により直線プロットへと変換した後、この直線プロットの勾配( $\mu C/msec^{1/2}$ )を求めた。実験は、嫌気的条件下および化合物非存在下でも行い、これらの勾配値から化合物によって触媒されたスーパーオキシド消去量とターンオーバー数で表わした触媒能を算出した。その結果、2-メチルアントラキノンの0.1mM溶液では(Fig. 8),スーパーオキシドの酸素分子への一電子酸化電流量( $[S + O_2] = 0.448 \mu C/msec^{1/2}$ )は、嫌気的条件下( $[S] = 0.014 \mu C/msec^{1/2}$ )およびキノン非存在下( $[O_2] = 0.194 \mu C/msec^{1/2}$ )での電流量をはるかに上回ることが示された。さらにAnsonプロット変換で求めた電流量より2-メチルアントラキノンのスーパーオキシド消去量は1310 mmol  $dm^{-3}$ 、ターンオーバー数は16.9であることが明らかとなった。同様の方法で種々のキノンやニトロアレーンのスーパーオキシド消去能を明らかにし、一電子還元電位(Epc1)との相関を検討した(Table 2)。その結果、-1250~-1100 mVに一電子還元電位(Epc1)を有するキノンやニトロアレーンではスーパーオキシドの一電子酸化に伴う酸化電流量の増加( $[S + O_2] > [S] + [O_2]$ )がみられ、スーパーオキシドが触媒的に消去されていることが示された。特に、Epc1が大きく、スーパーオキシドの酸化電位(-1056 mV)に近いEpc1を有する化合物ほど、触媒作用が強く効率よく

Table 2 Chronocoulometric data for quinone and nitroarenes in the presence or absence of oxygen: Catalytic activity of quinone and nitroarene for superoxide quenching

compounds	Epa1 <sup>a</sup> (mV vs. Ag/Ag <sup>+</sup> )	[S] <sup>b</sup> ( $\mu C/msec^{1/2}$ )	[S + O <sub>2</sub> ] <sup>b</sup> ( $\mu C/msec^{1/2}$ )	[O <sub>2</sub> ] <sup>b</sup> ( $\mu C/msec^{1/2}$ )	Amount of O <sub>2</sub> <sup>-c</sup> (mmol $dm^{-3}$ )	Turnover number <sup>d</sup>
QUINONE						
1-Cl-anthraquinone	-1136	0.015	1.019	0.711	1600	19.6
anthraquinone	-1190	0.016	0.679	0.357	1670	19.5
2-t-Bu-anthraquinone	-1212	0.014	0.382	0.177	1040	14.0
2-Me-anthraquinone	-1226	0.014	0.448	0.194	1310	16.9
2,3-diMe-anthraquinone	-1261	0.018	0.318	0.126	947	9.7
5,12-naphthacene-quinone	-1286	0.014	0.137	0.121	218	2.9
NITROARENE						
3-NO <sub>2</sub> -fluoranthene	-1155	0.018	0.670	0.342	1690	17.0
1-NO <sub>2</sub> -pyrene	-1289	0.019	0.183	0.083	439	4.2

<sup>a</sup> Applied potential for PSCC experiment

<sup>b</sup>  $O_2^{\cdot -}$  were generated at -1437 mV (Epc1 of  $O_2$ ) for 10 s and the potentials were stepped to Epa1 of compounds. The integrations of current were measured for 250 ms with 0.1 mM substrate under argon [S], 0.1 mM substrate under saturated  $O_2$  [S +  $O_2$ ] or saturated  $O_2$  [ $O_2$ ] in DMF (1 mL) containing 0.1 mmol  $dm^{-3}$  TEAP at a Pt electrode (diam. 1.6 mm), and the diffusional slopes of a linear plot (charge vs  $t^{1/2}$ ; Anson plot) were obtained. All values were subtracted by [DMF] as background. The concentration and diffusion coefficient of saturated  $O_2$  in DMF are 4.5 mmol  $dm^{-3}$  and  $4.7 \times 10^{-5} cm^2/s$

<sup>c</sup> Amounts of depleted superoxide =  $[S + O] - ([S] + [O]) \times 5.45 \times 1000$

<sup>d</sup> Turnover numbers of redox cycling =  $([S + O] - ([S] + [O])) / [S]$

スーパーオキシドを消去した。キノンの中ではアントラキノンおよびその1-クロル誘導体が最高のターンオーバー数19.6を示し、ニトロアレーンの中では3-ニトロフルオランテンがターンオーバー数17.0を示した。

以上、電気化学的手法を用いることにより、スーパーオキシドからキノンおよびニトロアレーンへの一電子移動反応を明らかにした。スーパーオキシドの消去能はキノンおよびニトロアレーンの一電子還元電位(Epc1)に依存し、スーパーオキシド(Epa1 = -1056 mV)から-1100 mV~-1250 mVに還元電位(Epc1)のあるキノンやニトロアレーンへの電子移動反応は、酸化還元電位ギャップを乗り越えて進行している。スーパーオキシドがキノンやニトロアレーンとレドックスサイクルを形成してスーパーオキシドを触媒的に消去するためには、スーパーオキシドから化合物への一電子移動反応がすみやかに進行すること(ステップ1)、一電子還元された化合物の酸化反応がスーパーオキシドの酸化よりも先にマイナスの電位で容易に進行して化合物が再生すること(ステップ2)が必要である。PSCC法により明らかにした電位ギャップを乗り越えた電子移動反応はステップ1の反応が電気化学的に進行可能であることを示しており、この特徴的な電子移動反応が進行することによって、キノンやニトロアレーンはスーパーオキシドを触媒的に酸素分子へ消去することが考えられる。

## 結 語

ベンツピレンに代表される環境化学物質は生体内で代

謝活性化を受けた後、DNA等の生体高分子と反応することが毒性発現の引き金となる。しかし、近年、活性酸素による生体高分子の損傷反応とそれによって引き起こされる突然変異のメカニズムが明らかになるにつれて、活性酸素を産生する化学物質の変異原性および発がん性が注目されるようになってきた。例えば、ベンツピレンもその酸化代謝物としてキノン体が生成することが報告され、ベンツピレンのキノン体が活性酸素を発生して毒性を発現することも報告されている(Penning et al. 1998)。化学物質由来の活性酸素の生成反応は生体内では還元酵素による酸素の還元活性化をキノン等の化学物質が触媒していることが考えられる。われわれは同様の反応を電気化学的手法を用いることによって再現し、種々のキノンおよびニトロアレーンと酸素との間の電子移動反応を調べ、酸化還元特性からスーパーオキシドの発生および消去反応についての解析を行った。その結果、電子移動反応が酸化還元電位のギャップを乗り越えて触媒的に進行すること、スーパーオキシドの発生および消去能は化合物に固有の一電子酸化電位(Epa1)および一電子還元電位(Epc1)にそれぞれ依存していること、ニトロアレーンはキノンと同様に酸素への一電子移動反応が進行してスーパーオキシドの発生および消去反応を触媒すること等を明らかにした。われわれが明らかにしたキノン等の化学物質の酸素毒性と酸化還元特性との相関は、今後、化学物質の酸素毒性を明らかにするうえでの有効な知見と考えられる。また、酸素毒性が報告されているアントラキノン誘導体が電気化学的解析結果にお



いてもスーパーオキシドを効率良く発生することは、われわれの手法が種々のキノン等の化学物質の酸素毒性の予測において有効であることを示唆するものである。

## 参考文献

- Bolton, J. L., M. A. Trush, T. M. Penning, G. Dryhurst and T. J. Monks (2000) Role of quinones in toxicology, Chem. Res. Toxicol., 13, 135-160.
- Doroshov, J. H. (1983) Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase, Cancer Res. 43, 4543-4551.
- Doroshov, J. H. and K. J. Davis (1986) Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical, J. Biol. Chem., 261, 3068-3074.
- Fukuhara, K., Y. Hara and N. Miyata (1994) Electron transfer from quinone and nitroarene anion radicals studied by the potential step chronocoulometry method, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 955-956.
- Fukuhara, K., Y. Hara and N. Miyata (1992) Electron transfer from

quinone or nitroarene to molecular oxygen, in "Oxygen Radicals", Elsevier, Amsterdam, pp. 11-14.

福原 潔, 宮田直樹 (1995) アニオンラジカルによる活性酸素の生成, 放射線化学, 38, 161-165.

Hecht, S. M. (1995) Bleomycin-group antitumor agents, In : W. O. Foye (Ed), Cancer Chemotherapeutic agents, American Chemical Society, Washington, D. C., pp. 369-388.

Kim, K. A., J. Y. Lee, K. S. Park, M. J. Kim and J. H. Chung (1996) Mechanism of menadione-induced cytotoxicity in rat platelets, Toxicol. Appl. Pharmacol., 138, 12-19.

Mason, R. P. and J. L. Holtzman (1975) The role of catalytic superoxide formation in the O<sub>2</sub> inhibition of nitroreductase, Biochem. Biophys. Res. Commun., 67, 1267-1274.

Miyata, N. and K. Fukuhara (1997) Generation and quenching of superoxide examined by chronocoulometric methods, Free Radicals in Clinical Medicine, 11, 44-49.

O'Brien, P. J. (1991) Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity, Chem. Biol. Interactions, 80, 1-41.

Penning, T. M., M. E. Burczynski, C-F Hung, K. D. McCoull, N. T. Palackal and L. S. Tsuruda (1998) Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation : Generation of reactive and redox active *o*-quinones, Chem. Res. Toxicol., 12, 1-18.

Environ. Mutagen Res., 20 : 163 - 172 (2000)

シンポジウム

## アルキル化剤の変異原性発現と抑制機構

高橋 和彦, 加藤 千晴, 加藤 宏明

名古屋市立大学薬学部 〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通3-1

### Genotoxic properties of alkylating agents : mutagenicity and its modulating effects

Kazuhiko Takahashi, Chiharu Kato, Hiroaki Kato

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University  
3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

### Summary

Our study is focused on the relationships between chemical reactivity and genotoxic properties. Mutational specificities of *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) and methyl methanesulfonate (MMS) were analysed using *ada*-and/or *ogt*-deficient strains of *Escherichia coli*, which encode *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferases. SN1-type methylating agents, MNU, induced predominantly GC→AT transitions in all strains. In contrast, SN2-type methylating agents, MMS, showed wide mutation spectrum. MMS efficiently induced GC→AT and AT→GC transitions in both wild type and *ogt*-strains. In *ada*-strain, GC→TA transversions were strongly induced. However, GC→AT transitions were predominantly induced in *ada-ogt*-strain.

The capacities of methylating agents in inducing the adaptive response were also examined. Exposure of *E. coli* cells to a low concentration of methylating agents increases their resistance to both mutagenic and cytotoxic effects of alkylating agents. This process is known as the adaptive response and is triggered by formation of methylphosphotriesters in the DNA. Methyl iodide, a typical SN2-type methylating agents and a very weak mutagen, induced the adaptive response in *E. coli* to a similar extent to those induced by potent mutagenic methylating agents such as MNU and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG). The mechanism of induction of the adaptive response involve direct methylation of Ada protein itself.

**Keywords** : methylating agents, mutation spectrum, adaptive response, *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase

## 緒言

アルキル化剤は細胞にさらすと遺伝子DNAを化学修飾し、細胞に致死作用や突然変異誘発作用・発癌性を有することが知られている。一方で、多くの生物はこのようなアルキル化剤の作用に対して抵抗する手段を持っている。細胞をメチル化剤にさらすと、そのDNA中に少なくとも10種類以上のメチル化塩基が生成する。細胞

はこれらのメチル化DNA塩基を効率よく修復する酵素系を有している。さらに、大腸菌などでは低濃度のメチル化剤に前もってさらしておく、高濃度のアルキル化剤による突然変異誘発作用や致死作用に対して抵抗性を獲得する。この反応は「適応応答」と呼ばれ、アルキル化DNA損傷を修復する酵素群が誘導合成された結果であることが明らかとなっている(Nakabeppu and Sekiguchi, 1986 ; Teo et al., 1986 ; Sekiguchi and Nakabeppu, 1987)。このようなアルキル化剤の致死作用・突然変異誘発作用や適応応答誘導能はアルキル化剤の化学的反応

受付：2000年8月18日 受理：2000年8月18日  
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第11回公開シンポジウム「環境変異原の活性発現と抑制の化学的機構」で発表された。  
This paper was presented at the 11th JEMS Annual Symposium at the ABC Hall, Tokyo, June 3rd 2000. The Symposium entitled "Chemical Mechanisms of Depression and Repression of Activity In Environmental Mutagenesis", was organized by Masataka Mochizuki and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.



Table 1 *In vitro* alkylation patterns of DNA expressed as percent of total alkylation

	MNU (s = 0.42)	MNNG (s = 0.42)	MMS (s = 0.83)	DMS (s = 0.86)
Adenine				
N 1-	0.7-1.3	1.0	1.9-3.8	1.0-3.0
N 3-	8.0-9.0	12.0	10.4-11.3	15.0-18.0
N 6-	nd	—	nd	—
N 7-	0.8-2.0	—	1.8	2.0
Cytosine				
O <sup>2</sup> -	0.1	—	nd	nd
N 3-	0.06-0.6	2.0	< 1.0	< 2.2
Guanine				
N 1-	nd	—	nd	—
N 3-	0.6-1.9	—	0.6	1.1-1.3
O 6-	5.9-8.2	7.0	0.3	0.2-0.3
N 7-	65.0-70.0	67.0	81.0-83.0	71.0-76.0
Thymine				
O <sup>2</sup> -	0.1-0.3	—	nd	—
N 3-	0.1-0.3	—	0.1	—
O <sup>4</sup> -	0.1-0.7	—	nd	—
Total				
phosphotriesters	12.0-17.0	—	0.8	—
References	b, c, d, e	a	b, d	a, c, d

Dash indicates data not reported. nd indicates adduct not detected or below limits of detection. Data from (a) Lawley and Thatcher (1970), (b) Beranek et al. (1980), (c) Newbold et al. (1980), (d) Singer and Grunberger (1983), (e) Den Engelse et al. (1986)

性に依存することが考えられている。化学的反応性の異なる種々のメチル化剤を用い、変異原特性および適応応答誘導能について検討した。

## 1. メチル化剤の化学的反応性と DNA メチル化部位

アルキル化剤は炭素を反応中心とし、生理的条件下で反応する求電子体の一つである。アルキル化剤の反応は、その反応機構により一分子の求核置換 (SN1) 反応と二分子の求核置換 (SN2) 反応に分類される。SN1 反応では、その反応速度がアルキル化剤の濃度に依存し、求核体の濃度や求核性には無関係である。一方、SN2 反応では、その反応速度がアルキル化剤の濃度と求核体の濃度に依存する。また、求核性の高い求核体に対して反応性は高くなる。Swain と Scott (1953) は、substrate constant (s 値) を指標にしてアルキル化剤の反応選択性と定量的に比較している。すなわち、s 値は典型的な SN2 型アルキル化剤である臭化メチルに対する相対的反応性として表され、s 値の小さいアルキル化剤は SN1 的反応性を有している。

Table 1 には、*N*-ニトロソ尿素 (MNU)、*N*-メチル-*N*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (MNNG)、メチルメタンスルホン酸 (MMS)、ジメチル硫酸 (DMS) を *in vitro* で DNA と反応したときのアルキル化付加体の生成比とこれらのメチル化剤の s 値を示す。これらのメチル化剤と

DNA との反応により 12 種類以上の付加体が生成する。このうち、*O*<sup>6</sup>-メチルグアニン、*O*<sup>4</sup>-メチルチミン、メチルリン酸トリエステルなど、酸素原子との反応付加体が、SN2 的反応性を示す MMS や DMS に比べて SN1 的反応性を示す MNU や MNNG で多く生成している。このうち、*O*<sup>6</sup>:7-メチルグアニン生成比は、s 値と相関性があることが報告されている (Lawley, 1974 ; Bartsch et al., 1983)。

## 2. メチル化剤の遺伝子傷害性

SN1 的メチル化剤と SN2 的メチル化剤による DNA 付加体の生成比の最も大きな相違点は、*O*<sup>6</sup>-メチルグアニンや *O*<sup>4</sup>-メチルチミンなどの酸素原子との反応生成物である。これらのメチル化付加体は DNA の際に誤った塩基対を生成し、突然変異の誘発に深く関与していると考えられている (Loveless, 1969 ; Preston et al., 1986)。

ほとんどすべての生物の細胞には、*O*<sup>6</sup>-メチルグアニンや *O*<sup>4</sup>-メチルチミンのメチル基を修復酵素タンパク質上のシステイン残基に受け取る活性を有する *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMTase) が存在する (Potter et al., 1987 ; Rebeck et al., 1988 ; Samson, 1992)。大腸菌には *ada* 遺伝子と *ogt* 遺伝子によりコードされる 2 つの MGMTase が存在する。Ogt タンパク質は構成的に存在するタンパク質であるのに対して、Ada タンパク質は低濃度のメチル化剤により誘導合成される。

Table 2 Bacteria strains used

Strain	Genotype	Reference or source
WU 3610	B/r, <i>leu</i> ( <i>am</i> ), <i>tyr</i> ( <i>och</i> )	George and Witkin (1975)
MZ 101	as WU 3610, but $\Delta$ <i>ogt</i> :: <i>cat</i>	Takahashi (P 1. KT 211 $\times$ WU 3610, Cm <sup>r</sup> )
MZ 120	as WU 3610, but $\Delta$ ( <i>ada-alkB</i> ):: <i>kan</i>	Takahashi (P 1. KT 180 $\times$ WU 3610, Km <sup>r</sup> )
MZ 140	as MZ 101, but $\Delta$ ( <i>ada-alkB</i> ):: <i>kan</i>	Takahashi (P 1. KT 180 $\times$ MZ 101, Km <sup>r</sup> )
AB 1157	K-12, <i>argE3 hisG4 leuB6 proA2</i> <i>thr-1 ara-14 galK2 lacY1 mtl-1</i> <i>xyl-1 thi-1 rpsL 31 supE 44 tsx-33</i>	Howard-Flanders et al. (1964)
KT 211	as AB 1157, but $\Delta$ <i>ogt</i> :: <i>cat</i>	Takano et al. (1991)
YN 180	as AB 1157, but $\Delta$ ( <i>ada-alkB</i> ):: <i>kan</i>	Takano et al. (1988)

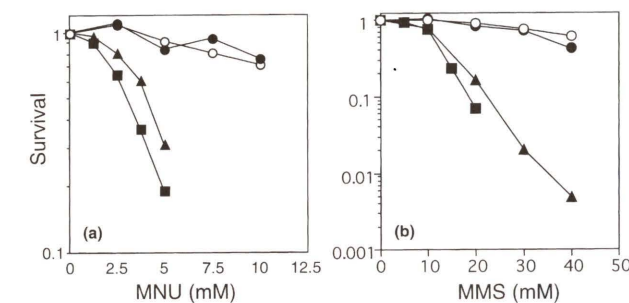


Fig. 1 Killing effect of MNU (a) and MMS (b) in *E. coli* tester strains.

(○) in WU3610 (wild type); (●) in MZ101 (*ogt*); (▲) in MZ120 (*ada*); (■) in MZ140 (*ada,ogt*)

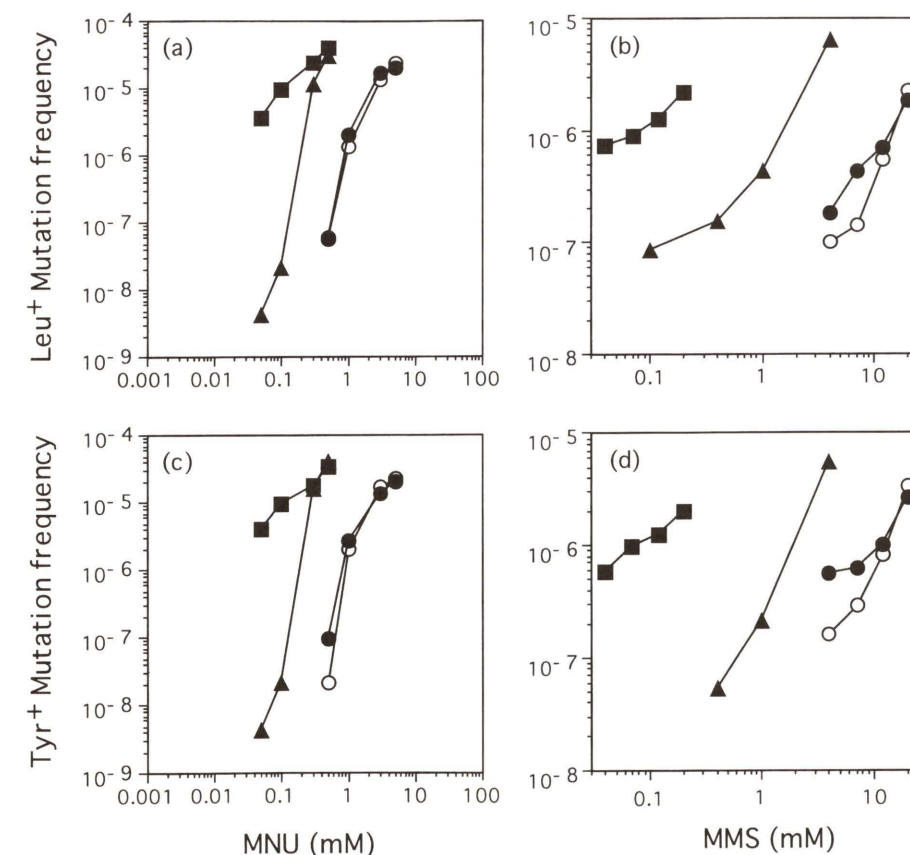


Fig. 2 Mutation frequency induced by MNU (a, c) and MMS (b, d) in *E. coli* tester strains.  
(○) in WU3610 (wild type); (●) in MZ101 (*ogt*); (▲) in MZ120 (*ada*); (■) in MZ140 (*ada,ogt*)



Table 3 Growth of T<sub>4</sub> bacteriophage on *E. coli* suppressors

Suppressor	DNA sequence change	T <sub>4</sub> bacteriophage					
		wild type	B 17	NG 19	och 427	ps 292	ps 205
Leucine locus							
wild-type	AT→GC	+	—	—	—	—	—
Su1	GC→TA	+	+	+	—	—	—
Su2	GC→AT	+	+	—	—	—	—
Su3	GC→CG	+	—	+	—	—	—
Tyrosine locus							
wild-type	AT→GC	+	—	—	—	—	—
SuB	GC→AT	+	—	—	+	+	+
Su5	TA→AT	+	—	—	+	+	—
SuC	GC→TA	+	—	+	+	+	—
Och427	?	+	—	—	+	—	—
pseudo wild-type	GC→AT	+	—	—	—	—	—

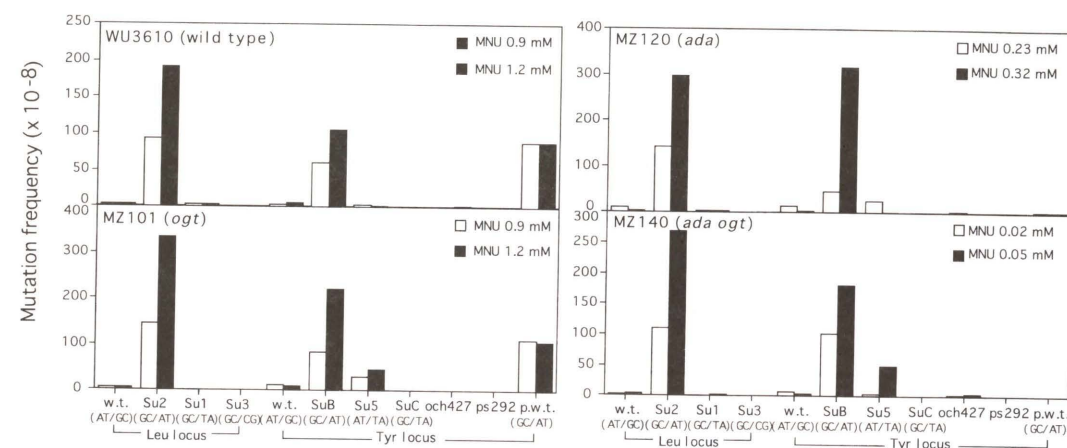


Fig. 3 Mutational fingerprints of MNU

大腸菌試験株 WU3610 に、アルキル化 DNA 損傷の修復に関与する遺伝子、*ada* および *ogt* 遺伝子を欠損した試験株を作成し (Table 2), SN1 的メチル化剤である MNU と SN2 的メチル化剤である MMS の遺伝子傷害性に対する Ada タンパク質と Ogt タンパク質の関与を検討した。

### 1) 殺細胞作用

SN1 的メチル化剤である MNU は、*ogt* 欠損株 (MZ101) に対して野性株 (WU3610) と同程度の感受性を示した。一方、*ada* 遺伝子を欠損した MZ120 株では野性株に比べて高感受性となり、および *ada* 遺伝子と *ogt* 遺伝子の二重欠損株である MZ140 に対して最も感受性が高くなった (Fig. 1)。同様に、MMS の致死作用においても、*ogt* 欠損株 (MZ101) は野性株と同程度の感受性であり、*ada* 欠損株 (MZ120) および *ogt* 欠損株では高感受性となった。以上のように、いずれのメチル化剤による致死作用の発現には *ada* 遺伝子が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

### 2) 変異誘発作用

本研究で用いた試験株は、*tyr* 遺伝子および *leu* 遺伝子上にそれぞれ ochre, amber 終止コドンを持つチロシン、ロイシン要求性株である。したがって、ロイシンまたはチロシンを含む SEM プレートで培養することにより、チロシン非要求性復帰変異株とロイシン非要求復帰変異株への変異を検出することができる。

Fig. 2 には、MNU および MMS 誘発 *Leu*<sup>+</sup> および *Tyr*<sup>+</sup> 復帰変異頻度を示す。MNU, MMS いずれに対しても、MZ101 (*ogt*) 株は WU3610 (wild type) 株とほぼ同程度の感受性であった。一方、*ada* 遺伝子を欠損している株では高感受性となり、特に *ada*, *ogt* 二重欠損株で最も高感受性となった。

### 3) 変異スペクトル

WU3610 (*leu*, *tyr*) 株およびその修復酵素欠損株では、amber および ochre 部位での突然変異に加え、サプレッサー変異によっても復帰変異体が生成する。これらの復帰変異体の大部分は T<sub>4</sub> bacteriophage を用いたサプレッサー解析により分類することができる (Osborn et al.,

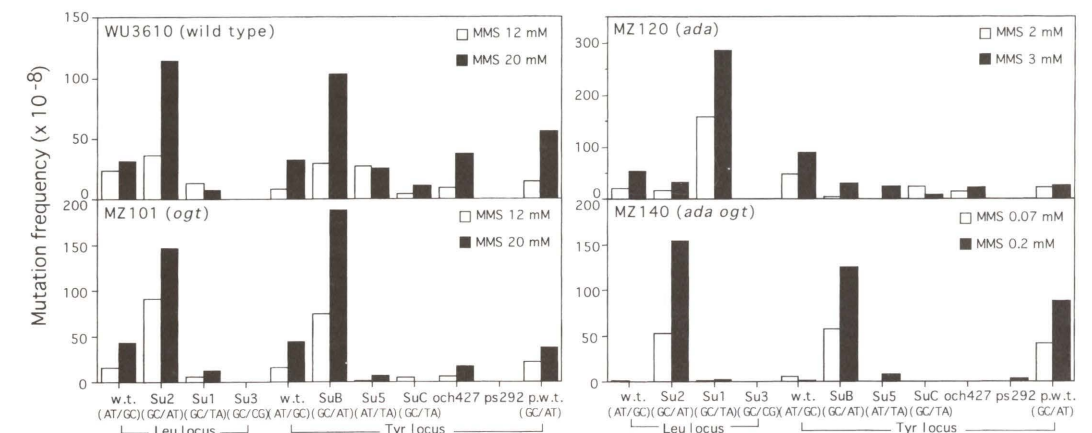


Fig. 4 Mutational fingerprints of MMS

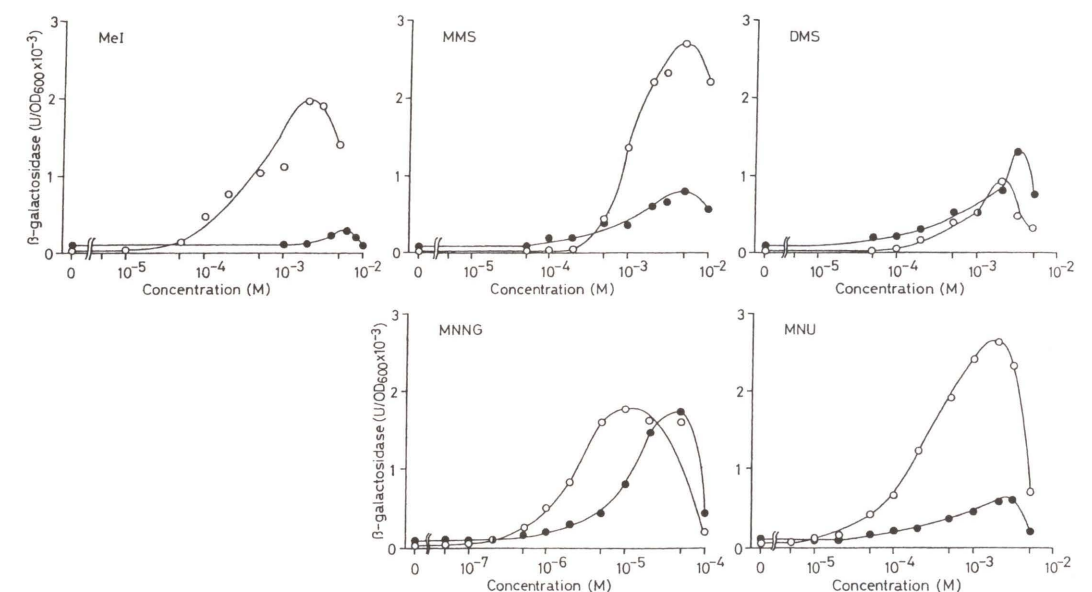


Fig. 5  $\beta$ -Galactosidase activity induced by methylating agents (Takahashi and Kawazoe, 1987b).

The tester strains were treated with methylating agents in K-medium. After incubation at 37 °C for 2 h, the optical density at 600 nm was measured and  $\beta$ -galactosidase activity was quantified according to the method of Miller (1972). (○) in the strains *E. coli* CSH 26/pMCP1000 carrying *alkA*<sup>+</sup>*lacZ* gene; and (●) in CSH 26/pSK1002 carrying *umuDC*<sup>+</sup>*lacZ* gene

1967; Kato et al., 1980). Table 3 には、用いたサプレッサー変異 T<sub>4</sub> bacteriophage とその増殖パターン、および推定される DNA 塩基配列の変化を示す (Elespuru et al., 1991)。

Fig. 3 には、MNU 誘発 *Leu*<sup>+</sup> および *Tyr*<sup>+</sup> 復帰変異体を、サプレッサー解析した結果を示す。WU3610 (wild type) 株においては、いずれの濃度でも Su2, SuB, pseudo wild type への変異が高頻度で検出され、これらはいずれも GC→AT transition であった。MZ101 (*ogt*) 株においても、WU3610 株と同様に Su2, SuB, pseudo wild type への変異が高頻度で検出された。また、MZ120 (*ada*) 株と MZ140 (*ada*, *ogt*) 株では、Su2 と SuB への変異が高頻度で検出され、WU3610 株や MZ101 株でみられた pseudo

wild type への変異はほとんど認められなかった。このように、MNU で誘発される変異は、MGase の有無にかかわらず GC→AT transition が主であった。

Fig. 4 には、MMS 誘発 *Leu*<sup>+</sup> および *Tyr*<sup>+</sup> 復帰変異体を、サプレッサー解析した結果を示す。WU3610 (wild type) 株、MZ101 (*ogt*) 株においては、MNU に比べて広い変異スペクトルを示し、Su2, SuB, pseudo wild type への変異のほか、wild type や Su5 のような AT 部位での変異も検出された。MZ120 (*ada*) 株においては、GC→AT transition が減少し、Su1 への変異 (GC→TA transversion) が増加した。また、MZ140 (*ada*, *ogt*) 株では、大部分が Su2, SuB, pseudo wild type への変異にみられるように GC→AT transition であった。



Table 4 Induction of  $\beta$ -galactosidase by methylating agents (Takahashi and Kawazone, 1987 b)

	s value	CSH 26/pMCP 1000 ( <i>alkA</i> )		CSH 26/pSK 1002 ( <i>umuDC</i> )		Ratio ( <i>alkA/umuDC</i> )	
		Sensitivity	Potency	Sensitivity	Potency	Sensitivity	Potency
MNNG	0.42	0.00008	404,500	0.0007	83,100	0.11	4.87
MNU	0.42	0.016	3,461	0.15	794	0.11	4.36
MMS	0.83	0.22	980	0.14	441	1.57	2.22
DMS	0.86	0.095	860	0.13	480	0.73	1.79
MeI	> 1	0.035	1,489	4.05	61	0.00864	24.47

Sensitivity (mM) is the concentration of the compound at which the response is twice the background

Potency (unis/OD 600/mM) is the  $\beta$ -galactosidase activity per mM calculated from the half-maximal activity

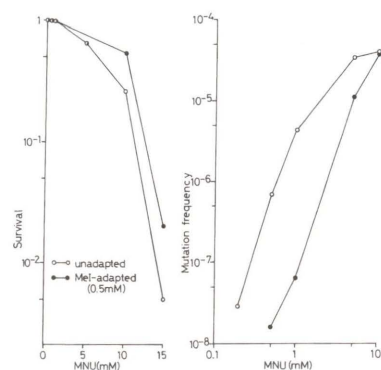


Fig. 6 Killing and mutagenic effects of MNU in *E. coli* WP2 cells adapted by pretreatment with 0.5 mM of MeI (Takahashi and Kawazoe, 1987a ; 1987b)

(●) in the adapted cells ; and (○) in the unadapted cells

### 3. 適応応答の誘導能

アルキル化剤に対する耐性獲得機構である「適応応答」は、多種多様のDNA損傷で誘導される修復経路「SOS応答」とは明らかに異なった経路で誘導される (Little and Mount, 1982 ; Walker, 1985 ; Lindahl et al., 1988). この適応応答はメチル化剤によるDNA損傷を修復酵素群が誘導合成された結果である。この反応には *ada*, *alkA*, *alkB*, *aidB* などの遺伝子が含まれるが (Volkert, 1988), そのうち *ada* 遺伝子が中心的な役割を果たしている。*ada* 遺伝子がコードする Ada タンパク質はメチル化DNA損傷の修復酵素 *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGase) 活性を持つと同時に一連の遺伝子群の正の転写因子として機能している。Ada タンパク質は354個のアミノ酸からなり、MGaseとしては69番目のシステイン残基 (Cys-69) 上にメチルリン酸トリエステルからのメチル基を、321番目のシステイン残基 (Cys-321) 上には *O*<sup>6</sup>-メチルグアニンか *O*<sup>4</sup>-メチルチミンからのメチル基を受け取る活性を持つ、一種の自殺酵素である。このうち、Cys-69にメチル基を受け取った Ada タンパク質は *ada* 遺伝子を含めた一連の遺伝子群の転写促進因子として機能する (Nakabeppu and Sekiguchi, 1986 ; Teo et al., 1986 ; Sekiguchi and Nakabeppu, 1987).

Table 5 Induction of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase by MeI in *E. coli* WP2 (Takahashi, 1995)

Methyl iodide (mM)	Activity (units/mg protein)
0	0.85
0.01	3.87
0.03	22.80
0.1	20.96

*E. coli* WP2 cells were treated with MeI in K-medium. After incubation at 37 °C for 90 min, cell lysate was prepared by the method described by Takahashi et al. (1991). *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in the lysate was measured by incubation with [<sup>3</sup>H] MNU-treated DNA. One unit of activity represents acceptance of 1 pmol of methyl group from methylated DNA

#### 1) メチル化剤の適応応答誘導能と SOS 応答誘導能の比較

適応応答誘導能と SOS 応答誘導能を、それぞれ *alkA*'-*lacZ* 融合遺伝子 (Otsuka et al., 1985) と *umuDC*'-*lacZ* 融合遺伝子 (Oda et al., 1985) を持つ大腸菌からの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性により定量的に比較した。Fig. 5 には、メチル化剤として MNU, MNNG, MMS, DMS, ヨウ化メチル (MeI) により誘導された  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示す。これらのメチル化剤による誘導能を、Sensitivity と Potency を指標にして定量的に比較した (Otsuka et al., 1985). Sensitivity (mM) はバックグラウンドの2倍の活性を示す濃度であり、Potency (units/OD 600/mM) は最大活性の1/2を示す濃度における mM 当たりの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示す。これらの値を Table 4 に示す。SN1 的メチル化剤である MNU, MNNG は、SN2 的メチル化剤である MMS, DMS に比べて *alkA* と *umuDC* との Sensitivity の比が小さく、Potency の比が大きい。すなわち、MNU, MNNG が MMS, DMS に比べて適応応答誘導能が強く、メチルリン酸トリエステルの生成量と相関していると考えられる。これに対して、典型的な SN2 的メチル化剤である MeI が、MNU や MNNG に比べて Sensitivity の比が小さく、Potency の比が大きい値を示した。

このように、遺伝子の発現を指標にした場合に変異原性の弱い MeI が強い適応応答誘導能を示したが、実際

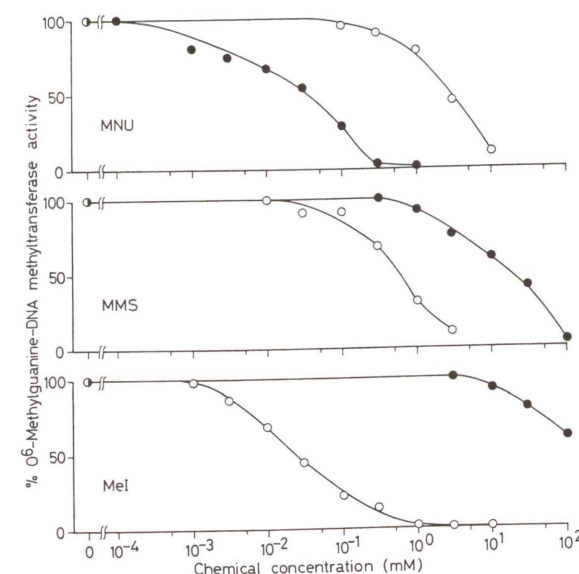


Fig. 7 Inactivation of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase activity by direct and DNA-mediated methylation of Ada protein (Takahashi et al., 1988).

The remaining methyltransferase activities after incubation with methylated DNA (●) and the activity of directly methylated Ada protein (○) are plotted against concentration of the agents used

に大腸菌において耐性獲得機構としての適応応答が誘導されているかどうかを調べた。大腸菌 WP2 株を増殖培地中で 0.5 mM ヨウ化メチルの存在下 37 °C, 90 分間前培養すると、MNU の致死作用、突然変異誘発作用に対して抵抗性となった (Fig. 6)。また、適応応答の key enzyme である MGase も MeI で誘導合成されており (Table 5), MeI がアルキル化剤に対する耐性獲得機構としての適応応答を誘導していることが明らかとなった。

#### 2) ヨウ化メチルによる適応応答誘導の分子機構

SN1 的メチル化剤である MNU や MNNG は細胞内 DNA との反応により変異誘発に関与している *O*<sup>6</sup>-メチルグアニンや *O*<sup>4</sup>-メチルチミンやメチルリン酸トリエステルを多く生成することから、変異原性が強く、かつ適応応答誘導能も強い。このことは適応応答の誘導機構から考えても理解できる (Otsuka et al., 1985)。ところが、変異原性の弱い MeI が強い適応応答誘導能を示したことは、MNU や MNNG とは異なった誘導機構が存在することが示唆される。MeI の化学的反応性を基に、Ada タンパク質を直接メチル化することにより転写促進因子として活性化される可能性が考えられる。そこで、精製タンパク質を用いた *in vitro* の再構成系による証明を試みた。

まず、メチル化剤の Ada タンパク質の持つ MGase 活性に対する不活性化作用について検討した。Fig. 7 に示すように、MeI 処理した DNA では MGase を高濃度の

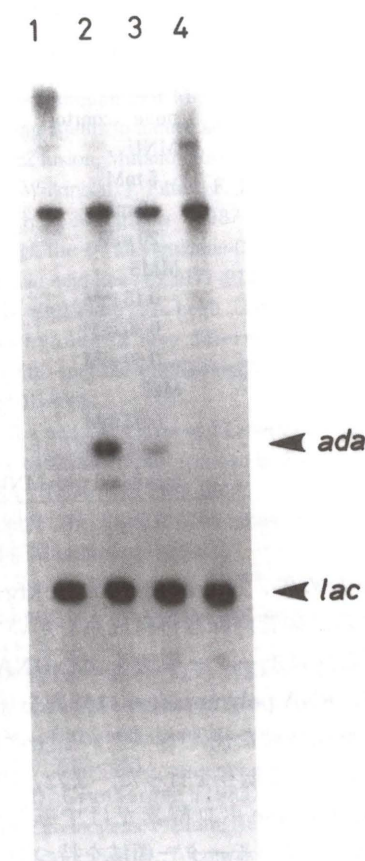


Fig. 8 Transcription-promotion activity of Ada protein pretreated with methylated DNA (Takahashi et al., 1988).

Ada protein was incubated with DNAs indicated and then applied to transcription reaction. Lane 1, DNA without treatment ; lane 2, DNA treated with 10 mM MNU at 37 °C for 0.5 h ; lane 3, DNA treated with 100 mM MMS at 37 °C for 16 h ; lane 4, DNA treated with 100 mM MeI at 37 °C for 16 h

MeI でわずかに不活性化するにすぎなかった (DNA-mediated methylation) が、Ada タンパク質を MeI で処理すると (direct methylation), より低濃度で MGase 活性は失活した。これらの結果は、MeI は DNA との反応により適応応答の引き金となる *O*<sup>6</sup>-メチルグアニン、*O*<sup>4</sup>-メチルチミン、メチルリン酸トリエステルなどはわずかし生成せず、むしろタンパク質との反応性が高いことを示しており、MeI の変異原性がきわめて弱いことと一致する。一方、SN1 的メチル化剤である MNU が DNA を介した DNA のメチル化 (DNA-mediated methylation) により Ada タンパク質を効率よく不活化し、SN2 的変異原性メチル化剤である MMS は MNU と MeI との中間的な作用を示した。

次に、メチル化剤で直接メチル化した Ada タンパク質が *ada* 遺伝子の転写促進因子として活性化されるかを明



**Table 6** Methyltransferase and transcription-promotion activities of Ada protein treated with methylating agents (Takahashi et al., 1988)

Ada proteintreated with	MGTase activity (%)	Relative transcription level
none (conrtol)	100	1.0
MNU		
5 mM	85	1.2
10 mM	57	1.2
20 mM	16	1.2
MMS		
0.15 mM	83	20.5
0.30 mM	52	36.1
0.60 mM	31	82.1
MeI		
0.02 mM	66	5.0
0.04 mM	42	8.0
Incubated with MNU-treated DNA		88.2

らかにするために、Nakabeppu と Sekiguchi の方法 (1986) による試験管内転写再構成系を用いて検討した。ada 遺伝子のプロモーター領域を含む DNA 断片に Ada タンパク質、RNA polymerase ホロ酵素を加えて転写開始複合体を形成させた後、ヘパリンと [ $\alpha$ - $^{32}$ P]UTP を含む基質溶液を加えて転写を行った。また、内部標準として RNA polymerase ホロ酵素だけで転写が進行する lacUV5 遺伝子のプロモーター領域を持つ DNA 断片を用いた。これらの転写物をポリアクリルアミド電気泳動により分離し、ada 転写物は 98 塩基の mRNA、lacUV5 転写物は 63 塩基の mRNA として検出される。

Fig. 8 には、メチル化剤で処理した DNA による Ada タンパク質の ada 遺伝子の転写促進活性を示す。未処理の DNA を添加した場合には、ada プロモーターからの転写は促進されない。10 mM の MNU で、37℃、30 分間処理した DNA を共存させると、ada 遺伝子の転写が強く促進された。MMS で処理した場合には、MNU の場合に比べ、ada 遺伝子の転写促進活性は弱い。これに対して、MeI の場合には MMS と同じ条件で DNA を処理しても ada 遺伝子の転写は促進されず、MeI は DNA のメチル化を介して ada 遺伝子の転写を促進しないことが明らかとなった。

Table 6 には、メチル化剤で直接メチル化した Ada タンパク質による ada 遺伝子の転写促進活性を示す。ここでは、転写物のオートラジオグラムをデンストメータで定量し、ada 転写物と lacUV5 転写物の相対値で示してある。MNU で Ada タンパク質を処理しても ada 遺伝子の転写は促進されない。しかし、MeI で Ada タンパク質を処理すると、弱いながらも ada 遺伝子の転写を促進した。さらに、MMS で処理した場合には、ada 遺伝子の転写を強く促進し、ada 遺伝子の転写量は MNU 処理した DNA 共存下と同程度であった。このように、Ada タンパク質はメチル化 DNA を介さないで、直接メチル化

剤で処理することによっても ada 遺伝子の転写促進因子として活性化された。特に、変異原性の弱い MeI が強い適応答誘導能を示すのは、今まで知られていたような DNA のメチル化を介さず Ada タンパク質が直接メチル化されて転写促進因子として活性化される新しい適応答の誘導機構が存在することが明らかとなった。

メチル化剤により Ada タンパク質のどの部位がメチル化されると転写促進因子として活性化されるかは、今のところ明らかとなっていない。DNA のメチル化を介した場合と同様に、cys-69 が選択的に S<sub>N</sub>2 的メチル化剤によりメチル化される可能性や、転写調節機能に重要な領域 (Shevell et al., 1988) のアミノ基への非特異的なメチル化が関与している可能性などが考えられる。

## 結 語

遺伝子傷害性を特徴づける化学物質の最も重要な因子の一つは、反応選択性、すなわち chemoselectivity, regioselectivity, および stereoselectivity であろう。細胞工学的ないしは遺伝子工学的手法の発達に伴い、多角的な側面から遺伝子傷害性を検討することが可能になってきた。同じメチル化という損傷を与えるメチル化剤においても、多様な生物作用を示すことが明らかとなった。MMS による O<sup>6</sup>-メチルグアニンの修復が *in vivo* と *in vitro* では異なることという結果が、MMS による MGTase の不活性化によると推測されている (Sledziewska-Gójska and Torzewska, 1997)。化学的側面からの変異原研究により変異誘発機構の解明に大きく貢献できることを期待している。

## 謝 辞

本研究を行うにあたりご協力をいただきました、名古屋市立大学薬学部・川添豊名誉教授、福岡歯科大学・関口睦夫教授、九州大学生医研・中別府雄作教授、作見邦

彦博士、愛知淑徳大学・多田万里子教授、FDA (USA) ・ R. K. Elespuru 博士に感謝いたします。

## 参 考 文 献

- Bartsch, H., B. Terracini, C. Malaveille, L. Tomatis, J. Wahrendorf, G. Brun and B. Dodet (1983) Quantitative comparison of carcinogenicity, mutagenicity and electrophilicity of 10 direct-acting alkylating agents and of the initial O<sup>6</sup>:7-alkylguanine ratio in DNA with carcinogenic potency in rodents, *Mutat. Res.*, 110, 181-219.
- Beranek, D. T., C. C. Weis and D. H. Swenson (1980) A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using pressure liquid chromatography, *Carcinogenesis*, 1, 595-606.
- Den Engelse, L., G. J. Menkveld, R. J. De Brij and A. D. Bates (1986) Formation and stability of alkylated pyrimidines and purines (including imidazole ring-opened 7-alkylguanine) and alkylphosphotriesters in liver DNA of adult rat treated with ethylnitrosourea or dimethyl nitrosamine, *Carcinogenesis*, 7, 393-403.
- Elespuru, E. K., L. L. Stupar and J. A. Gordon (1991) Discrimination of mutagenic intermediates derived from alkylating agents by mutational patterns generated in *Escherichia coli*, *Carcinogenesis*, 12, 1161-1167.
- George, D. and E. Witkin (1975) Ultraviolet light-induced response of an mfd mutation of *Escherichia coli* B/r having a slow rate of dimer excision, *Mutat. Res.*, 28, 347-354.
- Howard-Flanders, P., E. Simson and L. Theriot (1964) A locus that controls filament formation and sensitivity to radiation in *Escherichia coli* K-12, *Genetics*, 49, 237-246.
- Kato, T., Y. Shinoura, A. Templin and A. J. Clark (1980) Analysis of ultraviolet light-induced suppressor mutations in the strain of *Escherichia coli* K-12 AB1157: an implication for molecular mechanisms of UV mutagenesis, *Mol. Gen. Genet.*, 180, 283-291.
- Lawley, P. D. and C. J. Thatcher (1970) Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; influence of cellular thiol concentrations on the extent of methylation and the 6-oxygen atom of guanine as a site of methylation, *Biochem. J.*, 116, 893-707.
- Lawley, P. D. (1974) Some chemical aspects of dose-response relationships in alkylation mutagenesis, *Mutat. Res.*, 23, 283-295.
- Lindhal, T., B. Sedgwick, M. Sekiguchi and Y. Nakabeppu (1988) Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents, *Ann. Rev. Biochem.*, 57, 133-157.
- Little, J. W. and D. W. Mount (1982) The SOS regulatory system of *Escherichia coli*, *Cell*, 29, 11-22.
- Loveless, A. (1969) Possible relevance of O<sup>6</sup>-alkylated deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides, *Nature (London)*, 223, 206-207.
- Nakabeppu, Y. and M. Sekiguchi (1986) Regulatory mechanisms for induction of synthesis of repair enzymes in response to alkylating agents: Ada protein acts as a transcriptional regulator, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 83, 6297-6301.
- Newbold, R. F., W. Warren, A. S. C. Medcalf and J. Amos (1980) Mutagenicity of carcinogenic methylating agents is associated with a specific DNA modification, *Nature (London)*, 283, 596-599.
- Oda, Y., S. Nakamura, I. Oki, T. Kato and H. Shinagawa (1985) Evaluation of the new system (*umu*-test) for detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutation Res.*, 147, 219-229.

219-229.

- Osborn, M., S. Person, S. Phillips and F. Funk (1967) A determination of mutagen specificity in bacteria using nonsense mutations of bacteriophage T<sub>4</sub>, *J. Mol. Biol.*, 26, 437-447.
- Otsuka, M., Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1985) Ability of various alkylating agents to induce adaptive and SOS responses: a study with *lacZ* fusion, *Mutation Res.*, 146, 149-154.
- Potter, P. M., C. Wilkinson, J. Fitton, F. J. Carr, J. Brennand, D. P. Copper and G. P. Margison (1987) Characterization and nucleotide of *ogt*, the O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene of *E. coli*, *Nucleic Acid Res.*, 15, 9177-9193.
- Preston, B. D., B. Singer and L. A. Loeb (1986) Mutagenic potential of O<sup>4</sup>-methylthymine *in vivo* determined by an enzymatic approach to site-specific mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 83, 8501-8505.
- Rèbeck, G. W., S. Coons, P. Carrol and L. Samson (1988) A second DNA methyltransferase repair enzyme in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 85, 3039-3043.
- Samson, L. (1992) The suicidal DNA repair methyltransferases of microbes, *Mol. Microbiol.*, 6, 825-831.
- Sekiguchi, M. and Y. Nakabeppu (1987) Adaptive response: induced synthesis of DNA repair enzymes by alkylating agents, *Trends. Genet.*, 3, 51-54.
- Shevell, D. E., P. K. LeMotte and G. C. Walker (1988) Alteration of the carboxy-terminal domain of Ada protein influences its inducibility, specificity, and strength as a transcriptional activator, *J. Bacteriol.*, 170, 5263-5271.
- Singer, B. and D. Grunberger (1983) *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, Plenum, New York.
- Sledziewska-Gójska, E. and D. Torzewska (1997) Different repair of O<sup>6</sup>-methylguanine in DNA modified by MMS *in vivo* or *in vitro*, *Mutat. Res.*, 383, 31-37.
- Swain, C. C. and C. B. Scott (1953) Quantitative correlation of relative rates: comparison of hydroxide ion with other nucleophilic reagents toward alkyl halides, esters, epoxides and acyl halides, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 141-147.
- Takahashi, K. and Y. Kawazoe (1987a) Methyl iodide, a potent inducer of the adaptive response without appreciable mutagenicity in *E. coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 144, 447-453.
- Takahashi, K. and Y. Kawazoe (1987b) Potent induction of the adaptive response by a weak mutagen, methyl iodide, in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, 180, 163-169.
- Takahashi, K., Y. Kawazoe, K. Sakumi, Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1988) Activation of Ada protein as a transcriptional regulator by direct alkylation with methylating agents, *J. Biol. Chem.*, 263, 13490-13492.
- Takahashi, K., T. Imaeda and Y. Kawazoe (1991) Inhibitory effect of cadmium and mercury ions on induction of the adaptive response in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, 254, 45-53.
- Takahashi, K. (1995) Molecular mechanisms for modulation of mutagenesis induced by alkylating agents, *Environ. Mut. Res. Commun.*, 17, 35-45.
- Takano, K., Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1988) Functional sites of the Ada regulatory protein of *Escherichia coli*: analysis by amino acid substitutions, *J. Mol. Biol.*, 201, 261-271.
- Takano, K., T. Nakamura and M. Sekiguchi (1991) Roles of two types of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferases in DNA repair, *Mutat. Res.*, 254, 37-44.
- Teo, I., B. Sedgwick, M. W. Kilpatrick, T. V. McCarthy and T. Lindahl (1986) The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*, *Cell*, 45, 315-324.



Volkert, M. R. (1988) Adaptive response of *Escherichia coli* to alkylation damage, Environ. Mol. Mutagen., 11, 241-255.

Walker, G. C. (1985) Inducible DNA repair system, Ann. Rev. Biochem., 54, 25-57.

Environ. Mutagen Res., 22 : 173 - 181 (2000)

シンポジウム

## ポルフィリン・鉄モデル酸化系による 変異原活性化の機構

稲見 圭子, 大河内 江里子, 望月 正隆

共立薬科大学 〒105-8512 東京都港区芝公園1-5-30

### Activation mechanism of environmental mutagens by porphyrin iron model oxidation systems

Keiko Inami, Eriko Okochi, Masataka Mochizuki

Kyoritsu College of Pharmacy, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

#### Summary

Many environmental carcinogens damage DNA at an initiation step in carcinogenesis, and Ames test is a short term screening of possible carcinogens. Most carcinogens require enzymatic activation through oxidation by cytochrome P450, which metabolizes promutagens to active species in the mutation assay. Iron (III) porphyrin and an oxidant catalyze the oxidation mimicking the metabolism by cytochrome P450. In this study, some carcinogens were tested in order to generalize the use of the chemical models. We investigated the best conditions for mutation assay with the chemical models. The activation of 2-aminofluorene, benzo[*a*]pyrene and tryptophan pyrrolisates (Trp-P-1 and Trp-P-2) and 2-acetylaminofluorene (AAF) in mutation assay using Fe(F<sub>5</sub>P)Cl and three oxidants; *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH), *m*-chloroperoxybenzoic acid (*m*CPBA), and magnesium monoperoxyphthalate (MPPT). Aromatic amines displayed higher levels of mutagenicity with *t*-BuOOH, whereas the polycyclic hydrocarbon was preferentially activated when *m*CPBA was used. All promutagens were mutagenic in the presence of Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/MPPT. Our results show that this activation system will be generally useful as an alternative of the conventional assay with S9 mix, and a type of mutagens will be able to be estimated from the difference of activity in different models used.

On the other hands, the mechanism of metabolic activation of AAF was investigated with Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOH. A major product obtained from this reaction was 2-nitro-9-fluorenone (NO<sub>2</sub>F = O), which showed mutagenicity on *Salmonella typhimurium* TA1538. During the oxidation of AAF by the chemical model, the formation of NO<sub>2</sub>F = O attended with a decrease of AAF, which was analyzed by HPLC. In order to estimate the contribution of NO<sub>2</sub>F = O to the total mutagenicity after chemical model oxidation, mutagenicity was assayed using *Salmonella typhimurium* YG7131 which is deficient in nitroreductase, and the result was compared to that in a parent strain *Salmonella typhimurium* TA1538. The mutagenicity of AAF decreased significantly in *Salmonella typhimurium* YG7131, which suggested that most of the mutagenicity derived from AAF in the presence of the chemical model was due to NO<sub>2</sub>F = O formed. Furthermore, the amount of NO<sub>2</sub>F = O formed in the incubation mixture accounted for the mutagenicity, and suggested further that the mutagen formed in the models was NO<sub>2</sub>F = O.

**Keywords :** Cytochrome P450 model, metalloporphyrin, metabolic activation, oxidation, 2-acetylaminofluorene

#### 緒 言

受付: 2000年7月10日 受理: 2000年7月10日  
©日本環境変異原学会

生体に取り込まれた異物は、通常は水溶性の化合物に

本稿は日本環境変異原学会第11回公開シンポジウム「環境変異原の活性発現と抑制の化学的機構」で発表された。  
This paper was presented at the 11th JEMS Annual Symposium at the ABC Hall, Tokyo, June 3rd 2000. The Symposium entitled "Chemical Mechanisms of Depression and Repression of Activity In Environmental Mutagenesis", was organized by Masataka Mochizuki and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.



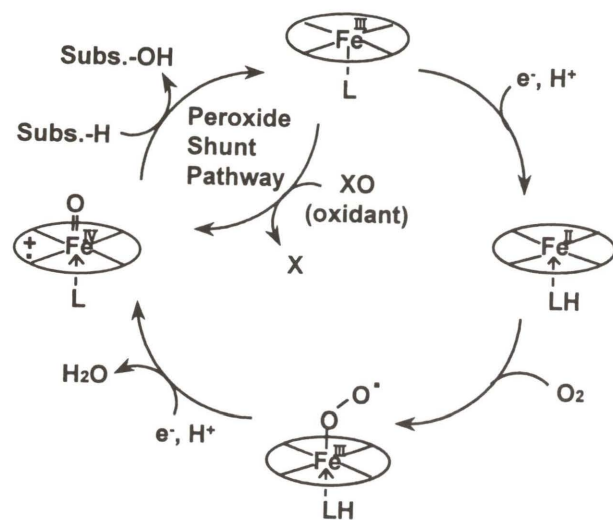


Fig. 1 Mechanism of cytochrome P450-catalyzed oxidation

変換されて生体外に排泄されるが、一方で代謝活性化を起し毒性を発現することがある。代謝により親化合物から予測できない毒性を生じることもあり、代謝機構をふまえた研究は重要である (Wright, 1980)。生体内酵素を用いた代謝研究は、酵素系を含むために反応温度、pH、イオン強度などの制約を受ける (Paolini and Cantelli-Forti, 1997)。また酵素系では大量の基質を用いることができないことに加えて、生成した代謝物がタンパク質に吸着されて生成物を十分に検出することができず、代謝研究における限界となっている。それらを改善する目的で、タンパク質を含まない代謝系の開発が重要となる (Meunier, 1994; Mansuy et al., 1989)。酵素モデルはpHや反応温度に影響を受けにくく、取り扱いに制限が少ない。さらに用いる実験動物によるロット差や種差の違いによる代謝能の変化がなく、一定の結果が得られる。このように酵素モデルを用いることでさまざまな反応条件を設定することができ、不安定な反応中間体の捕捉や微量代謝生成物の単離が可能となり、詳細な代謝機構の解明に有用である。

代謝反応のうち最も重要なのが酸化反応であり、ミクロソームに含まれる cytochrome P450 が中心的な役割を担っている。Cytochrome P450 の作用は一原子酸素添加酵素で、NADPH 由来の還元力を利用して酸素原子を活性化し、その結果、酸素原子が異物に導入されることによって水溶性の高い化合物へと変換する (Sheldon, 1994) (Fig. 1)。Cytochrome P450 の触媒サイクルでは休止状態の cytochrome P450 に基質が導入されると、一電子還元されてポルフィリンオキセノイド中間体を生じて基質を酸化し、それ自身は再び休止状態に戻る。Cytochrome P450 の活性中心であるポルフィリン鉄錯体は酸化剤が共存すると直接酸素原子が供給され、すみやかに活性種であるポルフィリンオキセノイド中間体を形

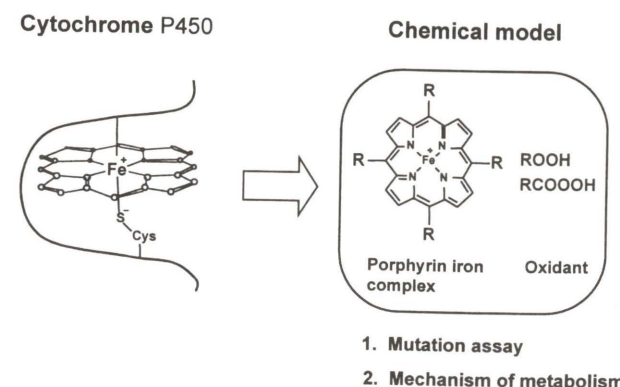


Fig. 2 Alternatives for cytochrome P450

成し基質を酸化する“ペルオキシシヤント”を形成することが知られている (Groves et al., 1979)。その cytochrome P450 をはじめとする生体内の酸化酵素の多くが、ポルフィリン鉄錯体を活性中心に持つこととペルオキシシヤントを形成することから、ポルフィリン鉄錯体と酸化剤から成る化学モデルの構築を目的とした (Fig. 2)。

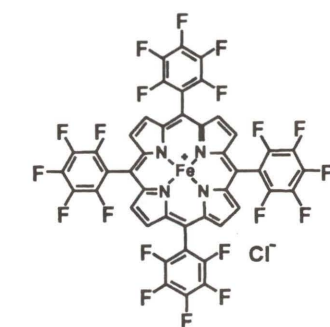
これまでは主に *N*-nitrosodialkylamine の代謝産物であるアルデヒドとアルコールの生成を指標にして、酸化が進行する化学モデルの確立を行った (Okochi and Mochizuki, 1995)。さらに変異原性発現に基づく生物活性を指標に *N*-nitrosodialkylamine の酸化を追跡したところ、アルキル化剤に感受性の高い *Salmonella typhimurium* YG 7108 で 4 種のアルキル基 (メチル、エチル、プロピル、ブチル) を持つ *N*-nitrosodialkylamine の変異原性が発現し、その変異原性がアルキル基由来であることを明らかにした (Okochi et al., 1995; Okochi et al., 1997)。つまり化学モデルによって *N*-nitrosodialkylamine は生体内と同様に  $\alpha$ -水酸化経路で代謝されることが示された。

本研究では化学モデルを用いた変異原性試験において、反応溶媒や酸化剤の違いによる変異原性への影響を検討したうえで、いくつかの変異原を用いて変異原性を検出し、化学モデルの変異原性試験への応用拡大を目的とした。さらに化学モデルを用いて変異原の酸化機構を解明することで化学モデルの有用性を検討した。

## 1. 変異原性試験における化学モデルの有用性

化学モデルを代謝系として Ames 法に適用している研究はあるものの、それらの方法では代謝活性化体を溶媒抽出した後に試験を行っているために中間体が安定な場合に限られ操作が面倒である (Salmeen et al., 1988; Rueff et al., 1992)。本研究では Ames 法において化学モデルを代謝酵素の代わりに用いて、化学モデルを含んだままの反応液を直接プレートに添加して試験した。本実

## Metalloporphyrin



Tetrakis(pentafluorophenyl)-porphyrinatoiron(III) chloride (Fe(F<sub>5</sub>P)Cl)

## Oxidant

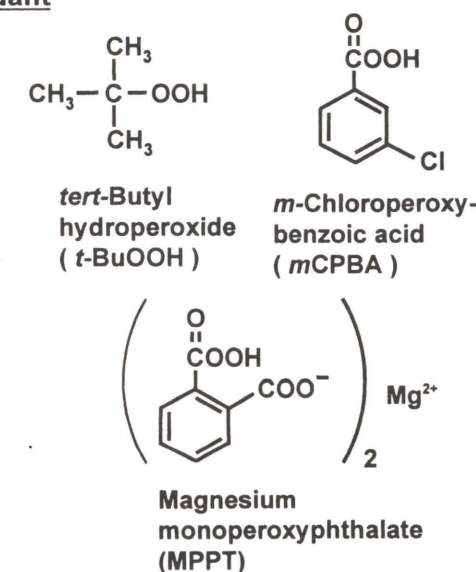


Fig. 3 Structures of chemicals used

験に用いた化合物の構造を Fig. 3 に示した。

### 1) 変異原性への溶媒の影響

変異原である 2-aminofluorene (AF) は詳細な反応機構がすでに検討されていることに加え、容易に入手できることから、本研究において条件を検討するための化合物として選んだ。AF の変異原性発現機構はアミノ基が cytochrome P450 により酸化されてヒドロキシルアミノ体になった後、アセチル化などの抱合化を受けて究極的な活性体である *N*-acetoxy-2-aminofluorene となり DNA と反応する (Heflich and Neft, 1994)。

検討した反応溶媒は変異原を溶かし、さらに菌液を混和するために CH<sub>3</sub>CN、dioxane または dimethylformamide (DMF) を用いた。AF を溶媒 (CH<sub>3</sub>CN、dioxane または DMF) に溶解し、Fe(F<sub>5</sub>P)Cl 50 nmol/ (CH<sub>3</sub>CN、dioxane または DMF) を試験管に分注し、*t*-BuOOH 150 nmol/リン酸緩衝液 (pH 7.4) を添加して反応開始とした。その反応液をインキュベート (25℃, 1, 3, 5, 10, 20 min) した後、*Salmonella typhimurium* TA 1538 とリン酸緩衝液 (pH 7.4) の混液を加え、さらにトップアガーを手早く加えて最小グルコース寒天培地に一様に広げた。この寒天培地を培養し、出現した復帰変異コロニーを数えた。変異原活性の比較は、各反応時間 (1, 3, 5, 10, 20 min) のなかで最も高い活性を示した時間でのコロニーで比較した。CH<sub>3</sub>CN、dioxane または DMF のいずれの反応溶媒を用いても AF の変異原性は発現したが、その変異原活性は CH<sub>3</sub>CN > dioxane > DMF の順であった (Fig. 4A)。溶媒による反応性の違う原因は、溶媒によって生成する酸化活性種が異なることや溶媒自身が酸化活性種と反応することなどがあげられる。DMF は生体内の cytochrome P450 により *N*-メチル基の酸化が報

告されており (Iley, 1990)、本研究においても DMF は化学モデルと反応するために AF の変異原性が低下すると考えた。

### 2) 変異原性への酸化剤の影響

化学モデルは用いる酸化剤により生成する酸化活性種が異なり、変異原に対する酸化力も異なる (Guengerich and MacDonald, 1984)。そこでヒドロペルオキシドとして *t*-BuOOH (Traylor and Xu, 1990)、過酸として *m*-chloroperoxybenzoic acid (*m*CPBA) (Groves et al., 1981)、と magnesium monoperoxyphthalate (MPPT) (Querci and Ricci, 1989; Hoffmann et al., 1990) を用いて変異原性を試験した。酸化剤の違いによる反応性の違いを検討するために、芳香族アミンである AF と多環式芳香族炭化水素である benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) を用いて検討した。

AF を用いた場合はいずれの酸化剤を用いても変異原性が発現し、その変異原活性の強さは *t*-BuOOH > MPPT > *m*CPBA であった (Fig. 4B)。AF について最も高い変異原活性が得られた条件で、Fe(F<sub>5</sub>P)Cl、または酸化剤を除く系で変異原性を試験した (Fig. 4C)。その結果、Fe(F<sub>5</sub>P)Cl または酸化剤を除く系では変異原性を発現せず、Fe(F<sub>5</sub>P)Cl と酸化剤が共存した系のみで変異原性を発現した。

一方、B[*a*]P の変異原性試験では *m*CPBA と MPPT とともに明らかに変異原性が発現した (Fig. 5A)。*t*-BuOOH を用いた系ではコントロールでのコロニー数が 20 で、B[*a*]P では最も多いコロニー数が 90 であったので、わずかながら変異原性を発現した。B[*a*]P について最も高い変異原活性が得られた条件で、Fe(F<sub>5</sub>P)Cl、または酸化剤を除く系で変異原性を試験した (Fig. 5B)。その結果、



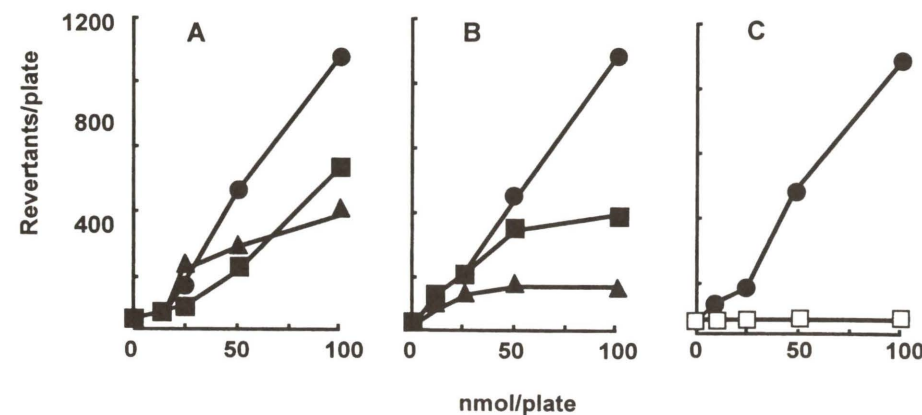


Fig. 4 Mutagenicity of AF in *Salmonella typhimurium* TA1538

(A) Effect of oxidant on the mutagenicity of AF in *Salmonella typhimurium* TA1538 in the presence of Fe(F<sub>5</sub>P)Cl. Fe(F<sub>5</sub>P)Cl 50 nmol/plate and *t*-BuOOH (●); 150 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 3 min, *m*CPBA (■); *m*CPBA 500 nmol/dioxane, 20 min, MPPT (▲); MPPT 500 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 20 min.

(B) Effect of solvent on the mutagenicity of AF in *Salmonella typhimurium* TA1538 in the presence of Fe(F<sub>5</sub>P)Cl and *t*-BuOOH. Fe(F<sub>5</sub>P)Cl 50 nmol/plate and *t*-BuOOH 150 nmol/plate. CH<sub>3</sub>CN (●), dioxane (■), DMF (▲)

(C) Mutagenicity of AF in *Salmonella typhimurium* TA1538

AF/CH<sub>3</sub>CN, Fe(F<sub>5</sub>P)Cl 50 nmol/CH<sub>3</sub>CN, *t*-BuOOH 150 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 3 min; Complete (●), - Fe(F<sub>5</sub>P)Cl (△), - *t*-BuOOH (□)

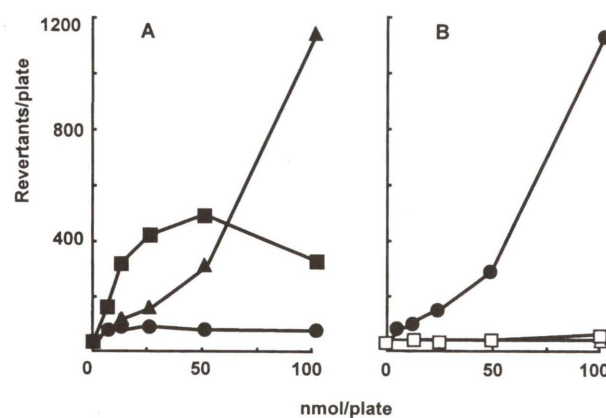


Fig. 5 Mutagenicity of B[a]P in *Salmonella typhimurium* TA1538

(A) Effect of oxidant on the mutagenicity of AF in *Salmonella typhimurium* TA1538 in the presence of Fe(F<sub>5</sub>P)Cl. Fe(F<sub>5</sub>P)Cl 50 nmol/plate and *t*-BuOOH (●); 150 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 20 min, *m*CPBA (■); *m*CPBA 500 nmol/dioxane, 20 min, MPPT (▲); MPPT 200 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 20 min

(B) Mutagenicity of B[a]P in *Salmonella typhimurium* TA1538. B[a]P/CH<sub>3</sub>CN, Fe(F<sub>5</sub>P)Cl 50 nmol/CH<sub>3</sub>CN MPPT 200 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 20 min; Complete (●), - Fe(F<sub>5</sub>P)Cl (△), - *t*-BuOOH (□)

Fe(F<sub>5</sub>P)Clまたは酸化剤を除く系では変異原性を発現せず、Fe(F<sub>5</sub>P)Clと酸化剤が共存した系でのみ変異原性を発現した。

同じ基質に対する酸化剤の活性の違いは、ヒドロペル

オキシドと過酸を用いた化学モデルでは、酸化活性種が異なるために異なる変異原が活性を発現していることが考えられるが、本研究では変異原をはじめ酸化生成物を同定していないので反応機構の詳細はわからない。

### 3) 種々の変異原を用いた変異原性発現

これまでの結果から、Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOHが芳香族アミン類を強く活性化し、Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*m*CPBAとFe(F<sub>5</sub>P)Cl/MPPTは多環式芳香族炭化水素を強く活性化し、変異原に対する酸化剤の特異性が認められた。芳香族アミン類を酸化するFe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOHを用いてヘテロサイクリックアミンであるTrp-P-1とTrp-P-2の変異原性を試験した。Trp-P-1とTrp-P-2もアミノ基が酸化されてヒドロキシルアミノ体を形成した後に変異原性を発現する(Mita et al., 1981)。Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOHの反応溶媒を検討した結果より、CH<sub>3</sub>CN > dioxane > DMFの順に変異原性が発現したことから、その優先順位と化合物の溶解性に基づいて変異原性を試験した。Trp-P-1はCH<sub>3</sub>CNを用いて試験したが、Trp-P-2はCH<sub>3</sub>CNとdioxaneには溶解しなかったためDMFを用いて試験した。その結果はAFの変異原性試験と同じ条件で、Trp-P-1とTrp-P-2のいずれの化合物も変異原性を発現した(Fig. 6)。Trp-P-1では酸化剤のみでも変異原性を発現したが、その変異原活性はFe(F<sub>5</sub>P)Clの共存によってさらに増加した。Trp-P-2ではFe(F<sub>5</sub>P)Clあるいは*t*-BuOOHを除く系では変異原性を発現せず、Fe(F<sub>5</sub>P)

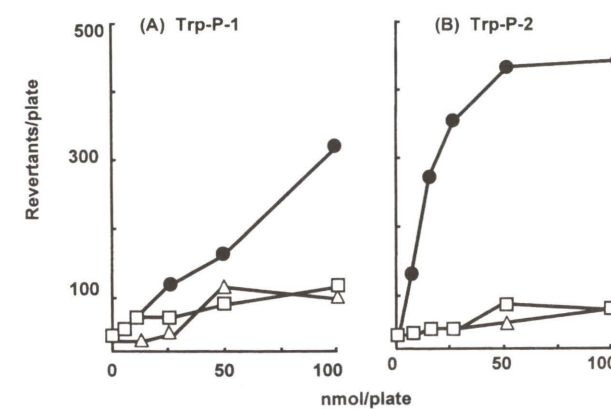


Fig. 6 Mutagenicity of Trp-P-1 (A) and Trp-P-2 (B) in *Salmonella typhimurium* TA1538

(A) Trp-P-1/CH<sub>3</sub>CN, Fe(F<sub>5</sub>P)Cl 50 nmol/CH<sub>3</sub>CN, *t*-BuOOH 150 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 20 min; Complete (●), - Fe(F<sub>5</sub>P)Cl (△), - *t*-BuOOH (□)

(B) Trp-P-2/DMF, Fe(F<sub>5</sub>P)Cl 50 nmol DMF, *t*-BuOOH 150 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 20 min; Complete (●), - Fe(F<sub>5</sub>P)Cl (△), - *t*-BuOOH (□)

Clと*t*-BuOOHが共存した系でのみ変異原性を検出した。

また、芳香族アミン誘導体である2-acetylamino-fluorene (AAF)はアミノ基がアセチル化されており、アセトアミド基の*N*-水酸化体を形成して変異原性を発現する(Heflich and Neft, 1994)。AFではFe(F<sub>5</sub>P)Cl 50 nmol/*t*-BuOOH 150 nmolで変異原性を検出できたが、AAFはAFと同じ条件では変異原性を発現しなかった。そこでAAFの量を増やすと同時に化学モデルの量を増やした条件であるFe(F<sub>5</sub>P)Cl 250 nmol/*t*-BuOOH 750 nmolで検討したところ、AAFは用量に依存して変異原性を発現した(Fig. 7)。またFe(F<sub>5</sub>P)Clあるいは*t*-BuOOHを除く系では変異原性を発現せず、Fe(F<sub>5</sub>P)Clと*t*-BuOOHが共存した系でのみAAFの活性を検出した。AAFの変異原活性はAFよりも低く、アミノ基に比べてアミド基の方が酸化されにくいためにAAFの変異原活性が低下したと考えた。

これまでの結果をTable 1にまとめた。異なる酸化剤を用いることで生成する変異原が異なる可能性もあるものの、種々の変異原は濃度に依存して変異原性を発現しており、化学モデルによって酸化されて変異原性を発現した。Rueffらは種々の化学モデルを用いて変異原性試験に応用しているが、反応液を溶媒抽出した後に変異原性を試験している(Rueff et al., 1992)。その結果では芳香族アミン(AF, AAF)やヘテロサイクリックアミン(IQ)は*t*-BuOOHで強く活性化され、多環式芳香族炭化水素(B[a]P, 7, 12-dimethylbenzo[a]anthracene, 3-methylcholanthrene)はPhIOで高い変異原性を発現することを報告している。化学モデルとして*t*-BuOOHは芳香族ア

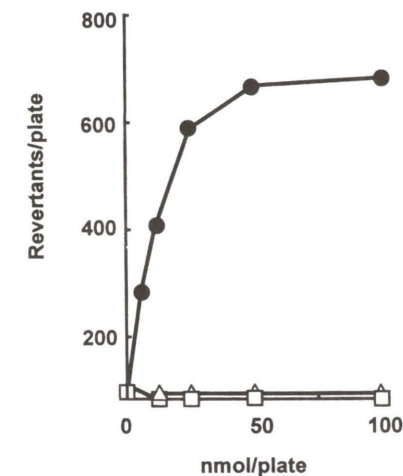


Fig. 7 Mutagenicity of AAF in *Salmonella typhimurium* TA1538  
AAF/CH<sub>3</sub>CN, Fe(F<sub>5</sub>P)Cl 250 nmol/CH<sub>3</sub>CN, *t*-BuOOH 750 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 10 min; Complete (●), - Fe(F<sub>5</sub>P)Cl (△), - *t*-BuOOH (□)

ミンやその誘導体を活性化するのに対し、MPPTや*m*CPBAは多環式芳香族炭化水素をより強く活性化した。本研究での結果は、Rueffらの報告と変異原に対する酸化剤の特異性が同じ傾向であった。Fe(F<sub>5</sub>P)Cl、酸化剤あるいは基質を除く系では変異原性を発現せず、化学モデルがS9mixの代替として変異原性試験に応用できることがわかった。

## 2. 化学モデルによる2-acetylamino-fluoreneの変異原性発現機構の解明

化学モデルを用いて代謝機構の検討に応用するため、化学モデルによって変異原性を発現したAAFから変異原活性体の単離・同定を試みた。AAFはMillerらによって発がん物質の代謝活性化の概念が確立した化合物であり、現在までに詳細な代謝機構が検討されている(Miller et al., 1961)。

反応条件は変異原性試験の条件(AAF 500 nmol, Fe(F<sub>5</sub>P)Cl 250 nmol, *t*-BuOOH 750 nmol)よりも大量の化学モデルを用い(AAF 0.5 mmol, Fe(F<sub>5</sub>P)Cl 0.06 mol, *t*-BuOOH 15 mmol)、さらに反応時間を2時間と長くしてAAFを酸化させて変異原を追跡した。得られた反応液を溶媒抽出したのちオープンカラムクロマトグラフィーにより分離し、得られた各分画の変異原活性を検定し、変異原活性体を単離した。<sup>1</sup>H-NMR, IR, MSの機器データより、代謝を必要としない変異原として2-nitro-9-fluorenone(NO<sub>2</sub>F = O)を同定した(Fig. 8)。

そこで変異原性試験の条件下でのNO<sub>2</sub>F = Oの生成を検討するために、基質であるAAFとNO<sub>2</sub>F = Oの経時的な変化をHPLCで検討した。AAFはFe(F<sub>5</sub>P)Clのみ、または*t*-BuOOHのみの存在下では減少しなかったが、Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOHの存在下ではAAF 500 nmolは反応



Table 1 Mutagenicity of some mutagens activated by Fe(F<sub>5</sub>P)Cl and oxidant

mutagen		oxidant
Aromatic amine	AF, AAF	<i>t</i> -BuOOH > MPPT
Polycyclic aromatic hydrocarbon	B[a]P	MPPT > mCPBA
Heterocyclic amines	Trp-P-1, Trp-P-2,	<i>t</i> -BuOOH
<i>N</i> -Nitroso compounds	<i>N</i> -Nitrosodialkylamine	<i>t</i> -BuOOH
	Alkyl = methyl, ethyl, propyl, butyl	

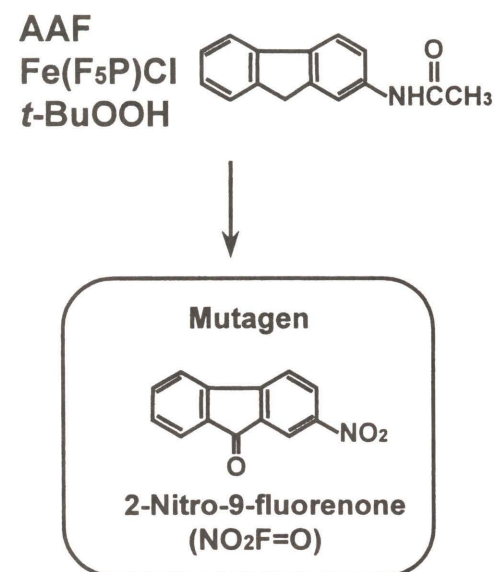


Fig. 8 Identification of NO<sub>2</sub>F=O from AAF by Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOH

# Physical properties

<sup>1</sup>H-NMR (ppm, in CDCl<sub>3</sub>)

8.47-8.50 (m, 1H, Ar-H)

8.40-8.45 (m, 1H, Ar-H)

7.58-7.80 (m, 4H, Ar-H)

7.42-7.49 (m, 1H, Ar-H)

IR (cm<sup>-1</sup>)

1714 (-C=O)

1520, 1338 (-NO<sub>2</sub>)

MS

*m/z* 225

*m p.*

221.0~223.5 °C

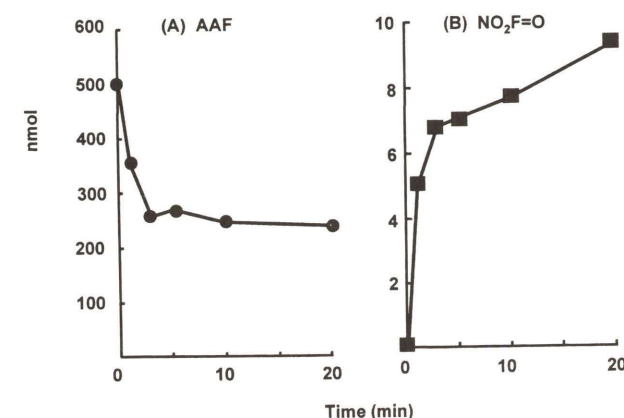


Fig. 9 Decrease of AAF (A) and increase of NO<sub>2</sub>F=O (B) by Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOH AAF/CH<sub>3</sub>CN, Fe(F<sub>5</sub>P)Cl 250 nmol/CH<sub>3</sub>CN, *t*-BuOOH 750 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 25 °C

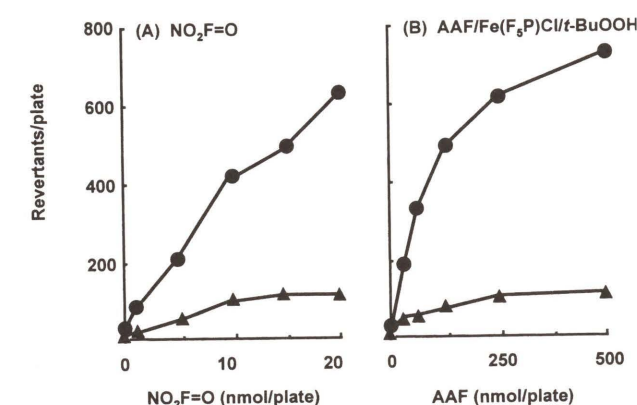


Fig. 10 Mutagenicity of NO<sub>2</sub>F=O (A) and AAF with Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOH (B) in *Salmonella typhimurium* TA 1538 (●) and *Salmonella typhimurium* YG 7131 (▲)

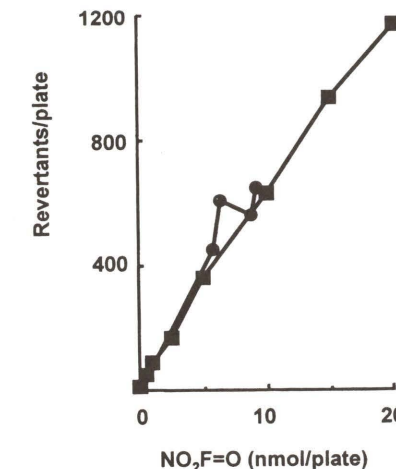


Fig. 11 Correlation of mutagenicity of AAF by Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOH with that calculated based on NO<sub>2</sub>F=O formed under the same conditions  
Mutagenicity of AAF in the presence of Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOH (●), mutagenicity of 2-nitro-9-fluorenone (○)

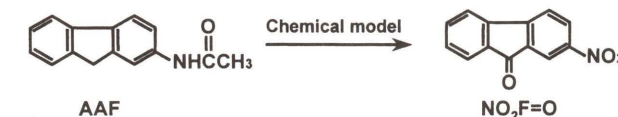


Fig. 12 Formation of NO<sub>2</sub>F=O from AAF by Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOH

時間に依存して 221.5 nmol (約 50%) まで減少した (Fig. 9A). 変異原性試験の結果より, Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOH で変異原性を発現し, Fe(F<sub>5</sub>P)Cl または *t*-BuOOH を除く系では変異原性を発現しないことも一致した. また Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOH の存在下において, AAF から直接的な変異原として同定した NO<sub>2</sub>F=O の生成を観察した (Fig. 9B). その結果, NO<sub>2</sub>F=O の生成は反応時間に依存して増加し, 減少した AAF のうち NO<sub>2</sub>F=O は 3.6% を生成した.

さらに化学モデルの存在下における NO<sub>2</sub>F=O の変異原性発現への寄与を観察するために, ニトロレダクターゼを欠損した *Salmonella typhimurium* YG 7131 を用い, 親株である *Salmonella typhimurium* TA 1538 との変異原活性を比較した. ニトロレダクターゼを欠損した *Salmonella typhimurium* YG 7131 は, ニトロ化合物をヒドロキシルアミンに還元することができないために変異原活性が低下する (Yamada et al., 1997). 標品である NO<sub>2</sub>F=O は *Salmonella typhimurium* TA 1538 に比べて *Salmonella typhimurium* YG 7131 で著しい変異原活性の低下がみられ, NO<sub>2</sub>F=O が活性化されず変異原性が低

下した (Fig. 10A). 同様に Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOH による AAF の変異原活性も *Salmonella typhimurium* YG 7131 において著しい低下がみられたことから, 化学モデルの存在下における AAF の変異原活性の大部分が NO<sub>2</sub>F=O によるものであることがわかった (Fig. 10B).

そこで Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOH により AAF から生成した NO<sub>2</sub>F=O 量に対して AAF の変異原性をプロットし, 標品の NO<sub>2</sub>F=O の変異原活性と比較したところ, 両方の活性は一致し, AAF の変異原活性は生成する NO<sub>2</sub>F=O で説明できた (Fig. 11).

以上の結果より, Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOH によって AAF は NO<sub>2</sub>F=O に酸化されることを証明し, さらに化学モデルの存在下における AAF の変異原活性は NO<sub>2</sub>F=O による活性であることが明らかになった (Fig. 12).

フルオレン環の 9 位の酸化は報告されており, NO<sub>2</sub>F の 9 位酸化は線虫である *C. elegans* での主代謝経路であり, またラット肝のミクロソームによっても生成する (Pothuluri et al., 1996; Cui et al., 1996). ラットやウサギの肝ミクロソームを用いた AAF の代謝機構では, AF, 7-hydroxy-AAF, 5-hydroxy-AAF, 3-hydroxy-AAF, 1-

hydroxy-AAF などが知られているが, その中でフルオレン環の 9 位の酸化で 2-acetylaminofluorene と 2-acetylaminofluorenone が生成することが報告され, さらに 9 位酸化は主代謝経路であった (Smith and Thorgeirsson, 1981; Lenk and Rosenbauer-Thilmann, 1993). つまり化学モデルによる AAF の酸化反応では, 生体内と同様にフルオレン環の 9 位を酸化することが示された.

一方, N 酸化によるニトロ化合物の生成は, prostaglandin H synthase や peroxidase を酸化酵素として用いた研究で, AF から 2-nitrofluorene (NO<sub>2</sub>F) の生成が報告されている (Boyd et al., 1983; Boyd and Eling, 1984). Prostaglandin H synthase による AF の酸化で変異原性を発現することが確認されており, 詳細な酸化機構および変異原性発現機構が検討されているが, その変異原活性体はニトロ化合物以外の酸化生成物とされ, 特に AF 由来のフリーラジカルとされている (Boyd and Eling, 1985; Boyd et al., 1985). また NO<sub>2</sub>F から生体内

の腸内細菌によって AF を経由して AAF が生成し, NO<sub>2</sub>F と AAF では同じ DNA 付加体を形成することが報告されている (Möller et al., 1987; Möller and Zeisig, 1993; Möller et al., 1994). AF と NO<sub>2</sub>F はそれぞれ酸化還元されて変換する可能性があるが, アセトアミド基がアミノ基になるにはペプチターゼが関与する. 化学モデルではペプチターゼ等の酵素は存在せず, 酸化系によってアミド結合が切断されることを示した (Peng et al., 1995). 化学モデルによる AAF の酸化によりアセトアミド基の N-酸化とフルオレン環の 9 位が酸化された NO<sub>2</sub>F=O を同定したことは, これまでに報告されておらず, 新規酸化経路である.

## 結 語

細菌の突然変異原性試験の代謝系として化学モデルを用いたところ, 変異原である 2-aminofluorene, benzo[a]pyrene, トリプトファン熱分解物である Trp-P-1 と Trp-P-2, 2-acetylaminofluorene の変異原性を検出した. さらにポルフィリン金属錯体, 酸化剤を含まない系では変異原性は発現せず, 化学モデルの共存下のみで活性を検出した. このように変異原性試験において, 化学モデルによって変異原を活性化することができ, 化学モデルの代謝代替系としての有用性が明らかになった. さらに用いるポルフィリン鉄錯体と酸化剤の酸化力を制御するこ



とであらゆる変異原を一様に検出することも可能となり、また逆に構造あるいは置換基の異なる変異原を選択的に活性化する化学モデルの構築も期待できる。

化学モデルによって生成する変異原と代謝中間体の同定を行うことで、いままで解明されていない代謝過程の詳細な分子機構を化学的に解明した。化学モデルによるAAFの酸化経路と変異原性発現機構を解明した。Fe(F<sub>5</sub>P)Cl/*t*-BuOOHによるAAFの変異原活性の大部分が2-nitro-9-fluorenoneによるものであった。化学モデルを用いることで酵素タンパク質の影響を受けず大量の基質を用いて反応を行うことができた。さらに容易に反応液中での酸化生成物を同定でき、化学モデルが代謝研究に応用できることを示した。純粋な化学触媒系である化学モデルが代謝研究における反応機構の検討に有用であると同時に、新規代謝経路の発見につながる事が明らかになった。

## 参考文献

- Boyd, J. A., D. J. Harvans and T. E. Eling (1983) The oxidation of 2-aminofluorene by prostaglandin endoperoxide synthetase, *J. Biol. Chem.*, 258, 8246-8254.
- Boyd, J. A. and T. E. Eling (1984) Evidence for a one-electron mechanism of 2-aminofluorene oxidation by prostaglandin H synthase and horseradish peroxidase, *J. Biol. Chem.*, 259, 13885-13896.
- Boyd, J. A. and T. E. Eling (1985) Metabolism of aromatic amines by prostaglandin H synthase, *Environ. Health Perspect.*, 64, 45-51.
- Boyd, J. A., E. Zeiger and T. E. Eling (1985) The prostaglandin H synthase-dependent activation of 2-aminofluorene to products mutagenic to *S. typhimurium* TA98 and TA98NR, *Mutat. Res.*, 143, 187-190.
- Cui, X., J. Bergman and L. Möller (1996) Preneoplastic lesions DNA adducts formation and mutagenicity of 5-, 7- and 9-hydroxy-2-nitrofluorene, metabolites of the air pollutant 2-nitrofluorene, *Mutat. Res.*, 369, 147-155.
- Groves, J. T., T. E. Nemo and R. S. Myers (1979) Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron porphyrin complexes. Oxygen transfer from iodosylbenzene, *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 1032-1033.
- Groves, J. T., R. C. Haushalter, M. Nakamura, T. E. Nemo and B. J. Evans (1981) High-valent iron-porphyrin complexes related to peroxidase and cytochrome P-450, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 2884-2886.
- Guengerich, F. P. and T. L. MacDonald (1984) Chemical mechanisms of catalysis by cytochrome P450 : a unified view, *Acc. Chem. Res.*, 17, 9-16.
- Heflich, R. H., R. E. Neft (1994) Genetic toxicity of 2-acetylaminofluorene, 2-aminofluorene and some their metabolites and model metabolites, *Mutat. Res.*, 318, 173-174.
- Hoffmann, P., G. Labat, A. Robert and B. Meunier (1990) Highly selective bromination of tetramesitylporphyrin : an easy access to robust metalloporphyrins, M-Br8TMP and M-Br8TMPs, *Tetrahedron Lett.*, 31, 1991-1994.
- Iley, J. (1990) Oxidation of methyl groups of *N,N*-dimethylbenzamides by a cytochrome P450 mono-oxygenase model system, *Tetrahedron Lett.*, 31, 4921-4922.
- Lenk, W. and R. Rosenbauer-Thilmann (1993) Metabolism of 2-aminofluorene. I, metabolism *in vitro* of 2-acetylaminofluorene and 2-acetylaminofluorene-9-one by hepatic enzymes, *Xenobiotica*, 23, 241-257.
- Mansuy, D., P. Battioni and J. Battioni (1989) Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome P450-dependent monooxygenases, *Eur. J. Biochem.*, 184, 267-285.
- Meunier, B. (1994) General overview on oxidation catalyzed by metalloporphyrins, In : F. Montanari and L. Casella (Eds.), *Catalysis by metal complexes*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 1-47.
- Miller, E. C., J. A. Miller and H. A. Hartmann (1961) *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluorene : a metabolite of 2-acetylaminofluorene with increased carcinogenic activity in the rat, *Cancer Res.*, 21, 815-824.
- Mita, S., K. Ishii, Y. Yamazoe, T. Kamataki, R. Kato and T. Sugimura (1981) Evidence for the involvement of *N*-hydroxylation of 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4, 3-*b*]indole by cytochrome P450 in the covalent binding to DNA, *Cancer Res.*, 41, 3610-3614.
- Möller, L., J. Rafter and J. -Å. Gustafsson (1987) Metabolism of the carcinogenic air pollutant 2-nitrofluorene in the rat, *Carcinogenesis*, 8, 637-645.
- Möller, L. and M. Zeisig (1993) DNA adduct formation after oral administration of 2-nitrofluorene and *N*-acetyl-2-aminofluorene, analyzed by <sup>32</sup>P-TLC and <sup>32</sup>P-HPLC, *Carcinogenesis*, 14, 53-59.
- Möller, L., M. Zeisig, T. Midtvedt and J. -Å. Gustafsson (1994) Intestinal microflora enhances formation of DNA adducts following administration of 2-NF and 2-AAF, *Carcinogenesis*, 15, 857-861.
- Okochi, E. and M. Mochizuki (1995) Dealkylation of *N*-nitrosodibenzylamine by metalloporphyrin/oxidant model systems for cytochrome P450, *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 2173-2176.
- Okochi, E., E. Namai, K. Ito and M. Mochizuki (1995) Activation of *N*-nitrosodialkylamines to mutagens by a metalloporphyrin/oxidant model system for cytochrome P450, *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 49-52.
- Okochi, E., A. Kurahashi, K. Ito and M. Mochizuki (1997) Detection of mutagenicity in Ames test using a metalloporphyrin/oxidants model system for cytochrome P450, *Mutat. Res.*, 373, 99-105.
- Paolini, M. and G. Cantelli-Forti (1997) On the metabolizing systems for short-term genotoxicity assays, *Mutat. Res.*, 387, 17-34.
- Peng, H., G. M. Raner, A. D. N. Vaz and M. J. Coon (1995) Oxidative cleavage of esters and amides to carbonyl products by cytochrome P450, *Arch. Biochem. Biophys.*, 318, 333-339.
- Pothuluri, J. V., F. E. Evans, T. M. Heinze, P. P. Fu and C. E. Cerniglia (1996) Fungal metabolism of 2-nitrofluorene, *J. Toxicol. Environ. Health*, 47, 587-599.
- Querci, C. and M. Ricci (1989) A very efficient alkene epoxidation by magnesium monoperoxyphthalate catalysed by manganese porphyrins, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 14, 889-890.
- Rueff, J., A. Rodrigues, A. Laires and J. Gaspar (1992) Activation of promutagens by porphyrinic biomimetic systems, *Mutat. Res.*, 269, 243-250.
- Salmeen, I. T., S. Foxall-VanAken and J. C. Ball (1988) A preliminary study of an iron porphyrin-iodosylbenzene system for activation of mutagens in Ames assay, *Mutat. Res.*, 207, 111-115.
- Sheldon, R. A., (1994) Oxidation catalysis by metalloporphyrins, A historical perspective, In : R. A. Sheldon (Eds.), *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidation*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1-27.
- Smith, C. L. and S. S. Thorgeirsson (1981) An improved high-pressure liquid chromatographic assay for 2-acetylaminofluorene and eight of its metabolites, *Anal. Biochem.*, 113, 62-67.
- Traylor, T. G. and F. Xu (1990) Mechanisms of reaction of iron (III) porphyrins with hydrogen peroxide and hydroperoxides : solvent and solvent isotope effects, *J. Am. Chem. Soc.*, 11, 178-186.
- Wright, A. S. (1980) The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis, *Mutat. Res.*, 75, 215-241.
- Yamada, M., J. J. Espinosa-Aguirre, M. Watanabe, K. Matsui, T. Sofuni and T. Nohmi (1997) Targeted disruption of gene encoding the classical nitroreductase enzyme in *Salmonella typhimurium* Ames test strains TA1535 and TA1538, *Mutat. Res.*, 375, 9-17.



# Author Index (Vol. 22)

A			Inami, K.	22 ; 173	S		
			K				
Alcaide, E. A.	22 ; 9				Sasaki, K.	22 ; 91	
Aoki, T.	22 ; 15		Kikugawa, K.	22 ; 149	Shibutani, S.	22 ; 133	
F			Kinae, N.	22 ; 141	T		
			M				
Fukuhara, K.	22 ; 155		Mori, T.	22 ; 97	Takahashi, K.	22 ; 163	
G			Murakami, M.	22 ; 103	Takahashi, M.	22 ; 19	U
Goto, S.	22 ; 45		N		Uno, Y.	22 ; 67	
H			Nagao, M.	22 ; 55	W		
			Nishino, H.	22 ; 77			
Hayashi, M.	22 ; 27		Nohmi, T.	22 ; 83, 85	Watanabe, T.	22 ; 61	
Hayatsu, H.	22 ; 131				Y		
I			O				
Ikeda, H.	22 ; 107		Ozawa, S.	22 ; 125	Yamada, M.	22 ; 115	
Imaeda, A.	22 ; 1						



# Keyword Index (Vol. 22)

A		Cytochrome P450 model	22 ; 173
2-acetylaminofluorene	22 ; 173	D	
active oxygen	22 ; 1	deletion mutation	22 ; 85
adaptive response	22 ; 163	dinitropyrene	22 ; 61
airborne particles	22 ; 46	DNA	22 ; 91
Ames test	22 ; 19	DNA adduct	22 ; 133, 141
antioxidants	22 ; 1	DNA damage	22 ; 103, 149
atomic force microscope	22 ; 103	DNA exonuclease	22 ; 107
B		DNA gyrase	22 ; 107
base excision repair	22 ; 115	DNA helicase	22 ; 107
bio-chemoprevention	22 ; 77	E	
bone marrow	22 ; 15	electrochemistry	22 ; 155
breast cancer	22 ; 133	endometrial cancer	22 ; 133
C		F	
carbon-centered radical	22 ; 149	fidelity	22 ; 115
carcinogenicity	22 ; 141	FISH	22 ; 91
cancer	22 ; 91	G	
carotenoids	22 ; 77	genome	22 ; 131
cell proliferation	22 ; 67	<i>gpt</i> delta mouse	22 ; 85
CGH	22 ; 91	H	
chlorinated by-products	22 ; 19	hepatocarcinogen	22 ; 67
3-chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2		heterocyclic amine	22 ; 149
(5 <i>H</i> )-furanone (MX)	22 ; 141	hybridization	22 ; 91
chronic treatment	22 ; 125		
CoCl <sub>2</sub>	22 ; 9		
CSGMT	22 ; 125		
cyclobutane pyrimidine dimer	22 ; 97		

I		organic chemistry	22 ; 131
immunofluorescence	22 ; 97	oxidation	22 ; 173
L		P	
lactoferrin	22 ; 77	peripheral blood	22 ; 15
M		(6-4) photoproduct	22 ; 97
Maillard reaction	22 ; 149	pre-incubation assay	22 ; 46
mammalian DNA polymerase	22 ; 115	processivity	22 ; 115
metabolic activation	22 ; 173	pyrazine cation radical	22 ; 149
metalloporphyrin	22 ; 173	Q	
2-methyl aziridine	22 ; 15	quantification	22 ; 61
methylating agents	22 ; 163	quinone	22 ; 155
methylmethanesulfonate	22 ; 9	R	
micronucleus	22 ; 9, 15	rat	22 ; 125
micronucleus assay	22 ; 125	RDS test	22 ; 67
monitoring	22 ; 46	reactive oxygen species	22 ; 149
mutagenesis	22 ; 131	replicative DNA synthesis	22 ; 67
mutagenic activity	22 ; 19	river water	22 ; 46
mutagenicity	22 ; 1, 46, 61, 141	S	
mutagens	22 ; 131	<i>Salmonella typhimurium</i>	22 ; 46
mutants	22 ; 115	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 102	22 ; 1
mutation spectrum	22 ; 163	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 104	22 ; 1
MX precursor	22 ; 141	short homology-dependent illegitimate	
N		recombination	22 ; 107
nitroarene	22 ; 155	short homology-independent illegitimate	
nongenotoxic carcinogen	22 ; 67	recombination	22 ; 107
O		SKY	22 ; 91
<i>O</i> <sup>6</sup> -methylguanine-DNA methyltransferase	22 ; 163	soil	22 ; 46
onion seedling	22 ; 9	Spi selection	22 ; 85
		superoxide	22 ; 155



surface soil	22 ; 61		
		W	
T			
		4-week repeated exposure	22 ; 15
tamoxifen	22 ; 133		
terpenoids	22 ; 77	X	
6-thioguanine selection	22 ; 85	xeroderma pigmentosum	22 ; 97
toremifene	22 ; 133	X-rays	22 ; 9
U			
unscheduled DNA synthesis	22 ; 97		

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：	㊟
Name（ローマ字つづり）	
生年月日（性別）	年 月 日 （男・女）
所属機関名：	
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所属機関 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1-43-9 駒込TS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:	㊦
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 1-43-9 駒込 TS ビル  
 働口腔保健協会内 日本環境変異原学会事務局  
 Tel. 03-3947-8891 Fax 03-3947-8341

投稿論文チェックリスト

論文ご投稿の際、この用紙に必要事項をご記入のうえ、添付してください。

論文名 (日本語):  
(英 語):

窓口著者名:

連絡先 (住所)

(TEL)  
(FAX)  
(E-mail)

分類 (該当するものに印をつけてください)

- ☐ 突然変異のメカニズム
- ☐ 変異原の検出
- ☐ 環境汚染物質
- ☐ 抗変異原
- ☐ DNA 損傷 (付加体)
- ☐ 変異原の代謝
- ☐ 変異原の修飾, 発現
- ☐ 試験法の開発, 改良
- ☐ その他 ( )

送付前のチェック項目

- ☐ 投稿規定, 執筆規定に沿っていますか (特に引用文献)
- ☐ 英文校閲はお済みですか
- ☐ 投稿論文は5部ありますか



## 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, 研究会の要旨などとする。

(Letter to Editor も受付ける。)

### 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

論文原稿の用語は英語または日本語とし, 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。ただし規定の頁数を超えることが明らかな場合は, 事前に編集委員に相談する。

### 4. 論文原稿の送付

論文原稿は5部と本誌に綴じ込みの「投稿論文チェックリスト」を, 下記に (簡易) 書留便または宅配便で送付する。

〒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

### 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することがある。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, 事前に文書にて学会長に申し出を行い, 許諾を求めなければならない。

### 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場合がある。
- 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。

### 編集委員会からのお願い

「環境変異原研究 Environmental Mutagen Research」への投稿論文の, 投稿から印刷までの時間の短縮を目指し, 投稿論文の査読を評議員にお願いすることになりました。それに伴い, 投稿規定の見直しも行い, 今後は年大会での発表と同様に, 投稿論文の分野を著者に申告していただき, 同一分野を登録していただいている評議員に査読していただくこととなります。今回投稿時のチェックリストをお届けしますので, 投稿論文と一緒に必ずお送り下さい。

現在7名の編集委員が分担して学会誌, *Jems News* の編集作業を行っていますが, それぞれ自分の仕事を抱えボランティアとして活動しています。そこで, 会員の皆様の積極的な雑誌作りへの協力として, 年大会で発表されたものを一報でも多く論文にまとめ, 本学会誌に投稿していただきますようお願い致します。また, *Jems News* への投稿, 情報, 意見, 公募等もお願いします。

本誌の将来像に関する議論を進めております。英文誌化の話も出ており, 編集委員を中心に検討を始めたところですが, 皆様のご意見を是非お聞かせいただきたいと思います。どんな些細なことでも結構ですから, 学会誌に関することでコメント, 提案等がありましたら, 編集委員まで E-mail にてお知らせください。編集委員一同



## 環境変異原研究 執筆規定

1. 用語は日本語または英語とする。
2. 原稿は原則としてワープロを用いて作成する。  
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、別に題名、著者名(フルネーム)、所属機関名ならびに所在地を英文で付ける。  
英文の原稿：  
原稿はA4判用紙にダブルスペースで印字(12ポイント)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。
3. 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、総説の記述は、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。
4. 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。
5. 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)。
6. 数字は算用数字を用い、単位は慣用による省略記号を用いる。
7. 略語を使用するときは、論文中にはじめて使用するときに完全な語とその略語を括弧内に示す。
8. 句読点はカンマ(,)およびピリオド(.)とする。
9. 表、図は本文と別にし、それらの挿入箇所を本文の右余白に明示する。グラフ、写真、線画等はすべて図とし、一連の番号Fig. 1, 2…を付し、説明文(英文)を別紙に添える。

10. 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する。
11. 表は上部に一連の番号Table 1, 2…と英文の表題を記入する(文頭のみ大文字)。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。
12. 本文中の文献引用は著者名および年号をもってする。
13. 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)題名、雑誌名、巻、頁(単行本の一部引用の場合は著者氏名、(年)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、編者名あるいは著者名、(年)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. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 31, 347-364.

Ashby, J., F. J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate Jr., B. H. Margolin, B. Matter and M. D. Shelby (1985) Overview and conclusion of the IPCS collaborative study on in vitro assay systems, In: J. Ashby, F. J. de Serres et al. (Eds), *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens*, Elsevier, Amsterdam, pp. 117-174.

Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, D. C.

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, 外村晶(編), *染色体異常*, 朝倉書店, 東京, pp. 107-113.

松影昭夫(編)(1996)DNA複製、修復と発癌, 羊土社, 東京.

(改訂 2000年12月)

## 日本環境変異原学会の概要

### The Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)

所在地 〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TSビル(財)口腔保健協会内日本環境変異原学会  
TEL 03 (3947) 8891 FAX 03 (3947) 8341

会長 木苗直秀(静岡県立大学食品栄養科学部教授)

設立 昭和47年8月21日

創設経緯・沿革 昭和47年8月21日に下記の目的に賛同する研究者が集り研究会を組織した。その後会員数が増大し、昭和58年1月1日より学会に改組された。昭和56年には国際環境変異原大会の開催、その運営に当たった。なお、2001年10月に第8回国際環境変異原学会が静岡で開催予定で現在その準備が進められている。

目的 人間・生物・地球環境における突然変異原、とくに公衆の健康に重大な関係を有する変異原と、これに関連する基礎研究の推進ならびに関連情報技術の伝達を目的とする。

会員数 正会員912 学生会員58 名誉会員7 賛助30団体

集会 年次大会(1回/年) シンポジウム、ワークショップ(1回/年)

刊行物 ①環境変異原研究 *Environmental Mutagen Research* (3回/年, 350頁/年, 1000部/回) ②JEMS News (3回/年, 50頁, 1000部/回)

顕彰事業 ①日本環境変異原学会学術賞 創設 平成5年11月25日(1件/年) ②日本環境変異原学会研究奨励賞 創設 平成5年11月25日(2件程度/年)

国際学術団体への加入 国際変異原学会連合 *Int. Assoc. of Environmental Mutagen Socs. (IAEMS)* オランダ(正会員 分担金450ドル 1972年加入)

関係国際学術団体 国際環境変異原学会・癌原防御委員会 *Int. Commission for Protection Against Environmental Mutagen and Carcinogen (ICPEMC)* オランダ

国際会議の国内開催 第3回国際環境変異原学会(東京, 三島, 1981年), 第8回国際環境変異原学会(静岡, 2001年予定)

国際会議への派遣 第6回国際環境変異原学会 6th International Conference on Environmental Mutagen (1993年2月オーストラリア12名)

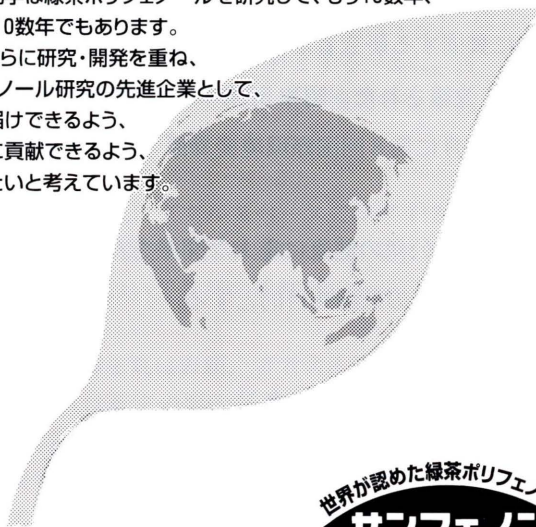
国際人物交流等 <外国人科学者の招へい等> ①第22回大会の特別講演演者, シンポジストとして 平成5年11月 アメリカ3人, イギリス1人, カナダ1人 ②環境変異原学会・放射線影響学会・合同シンポジウムの特別講演演者として 平成6年 特別11月アメリカ2人 ③第23回大会の特別講演演者として 平成6年11月 アメリカ1人 ④環境変異原学会・放射線影響学会・合同シンポジウムの特別講演演者として 平成7年5月 アメリカ2人 ⑤第24回大会の特別講演演者, シンポジウムとして 平成7年11月 フィンランド1人, イギリス1人 ⑥第25回大会の特別講演演者として 平成8年11月 オランダ1人 ⑦第26回大会のシンポジストとして 平成9年12月 ドイツ1人, アメリカ2人 ⑧第27回大会のパネルディスカッション, シンポジストとして 平成10年11月 カナダ1人, ドイツ1人, イギリス1人, フランス1人, アメリカ2人 ⑨第28回大会のシンポジストとして 平成11年12月 アメリカ2人

国際文献交流等 <定期刊行物の海外送付> 環境変異原研究 (*Environmental Mutagen Research*), JEMS News <海外学術誌の受入> 4種4ヵ国



# 日本発、世界標準へ。

サンフェノンはこの度、米国で日本初の「アワード」を受賞。  
私たち太陽化学は緑茶ポリフェノールを研究して、もう10数年、  
しかし、まだ10数年でもあります。  
これからもさらに研究・開発を重ね、  
緑茶ポリフェノール研究の先進企業として、  
自信作をお届けできるよう、  
社会に大いに貢献できるよう、  
努めていきたいと考えています。



世界が認めた緑茶ポリフェノール  
**サンフェノン**

受賞

世界最大級の食品素材展示会で緑茶ポリフェノール「サンフェノン」が日本企業として初めて受賞しました。  
米国ダラスにて開催されたIFT (Institute of Food Technologists: 食品技術者協会) が主催する全米最大の展示会IFT Food Expo 2000で当社の「サンフェノンDCF-1」がアワード (IFT Industrial Achievement Award: IFT産業功績賞) を受賞しました。

## 緑茶ポリフェノール「サンフェノン」の歴史

- 1987 緑茶のポリフェノール(カテキン類)に**虫歯予防効果**のあることを、世界で初めて確認しました。
- 1988 緑茶ポリフェノールを抽出・精製した緑茶抽出物「サンフェノン」の**工業的な生産**に成功し、食品業界への販売が本格的に開始されました。
- 1989 緑茶ポリフェノールは、乳幼児に下痢を起こすロタウイルスに対して効果を発揮、お腹の中で**ウイルスの感染を予防**することが確認されました。また、腸内の悪玉菌である**クロストリジウム菌の増殖を抑える**ことを確認、緑茶ポリフェノールがお腹の調子を整えることが判明しました。
- 1990 緑茶ポリフェノールの**がん予防効果**について動物実験をしましたところ、大腸がんの発生を抑制することが確認されました。  
虫歯と並んで口腔疾患の一つである**歯周病菌**に対しても、抗菌性のあることを確認しました。
- 1992 緑茶ポリフェノールの**生体内抗酸化効果**を確認しました。
- 1993 緑茶ポリフェノールの**胃不全改善効果**を解明しました。  
ヒトでの試験で、**歯垢形成を抑制**することが証明され、**特定保健用食品**の関与する成分として(財)日本健康・栄養食品協会より認可されました。  
同時に緑茶ポリフェノールを配合したガムやチョコレートが特定保健用食品として、“虫歯になりにくい”などの強調された表現で販売されるようになりました。胃がんや胃潰瘍の原因とされる**ヘリコバクター・ピロリ菌を胃から排除**することがヒトで確認されました。
- 1996 腸管出血性大腸菌O-157に対して、抗菌性を発揮、ペロ毒素の産生を抑制することがわかりました。
- 1999 **鼻炎アレルギー**の改善効果を証明しました。

太陽化学株式会社  
TATYO KAGAKU

〒510-0825  
三重県四日市市赤坂新町9番5号  
TEL.0593-52-2555

## 話題の緑茶カテキン高含有エキス

# ポリフェノン®

### 健康食品、新食品の素材として…

- 成人病の原因といわれる活性酸素を取り除く効果 (SOD様作用) が各種植物ポリフェノールの中でも抜群に高く、優れた健康食品素材として利用できます。  
(例) ポリフェノン60の場合 150万ユニット/g
- 抗菌作用で腸内の悪玉細菌を抑制し、善玉菌を増やすため便中の有害悪臭成分を減らし、腸内環境を整えます。

### 豊富なラインアップ…

品名	ポリフェノール含有量	用途
ポリフェノン70S(脱カフェイン)	75%以上	健康食品、食品
ポリフェノン60A	65%以上	健康食品、食品、化粧品
ポリフェノン30	35%以上	健康食品、食品
ポリフェノンG	30%以上	健康食品、食品

緑茶カテキン成分のスタンダードとしてポリフェノンをご利用ください。お問い合わせは下記まで。

東京フードテクノ株式会社 ポリフェノン営業部

〒101-0025 東京都千代田区神田佐久間町1丁目26番地  
秋葉原村井ビル  
TEL: 03-5298-1320 FAX: 03-5298-1322



# 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こりません。
- 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℃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。
- 従来品は引続き取扱いしております。

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またはマイクロソームの調製、その他、技術的なお問合わせは、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  
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) 6203-3741 (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)



# 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SD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よりなっておりますので、-80℃で保存して下さい。まれに解凍後分離すること  
がありますが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 ー 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

## 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



-S-9 Mix



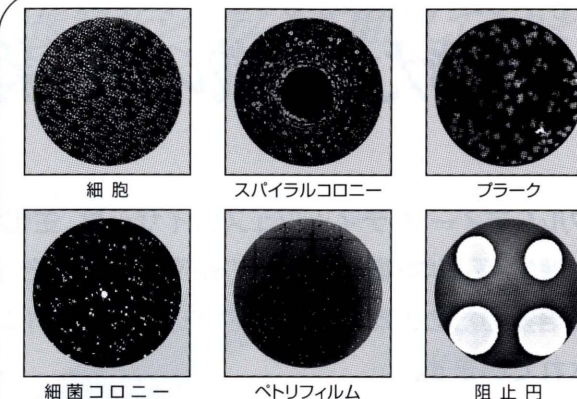
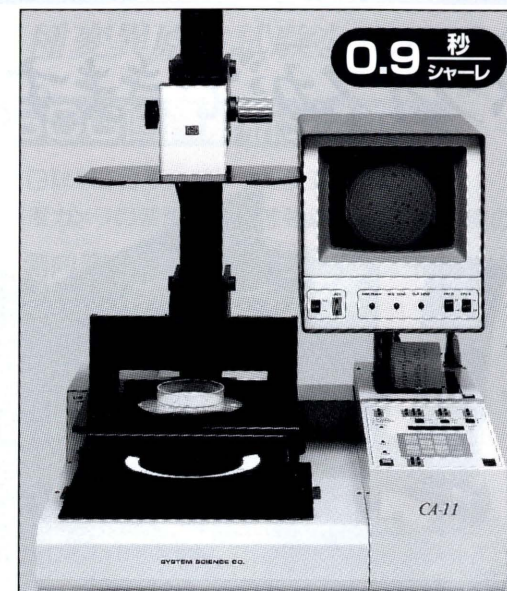
+S-9 Mix

**家田貿易株式会社**

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(6338)1518 FAX.06(6338)5626

# 高速画像積算機能を持った CA-11D コロニー アナライザー

GLP、GMP、HACCP対応



- 食品コロニー ●水コロニー ●細胞コロニー
- 大腸菌コロニー ●レジオネラ菌コロニー
- 抗菌コロニー ●エームステスト
- フーズスタンプ ●フィルター上のコロニー 等

## コロニー等を検出する能力と操作性を追求した国産実用機

CCDカメラによる撮像画像を次々に加算累積(32画面で約0.5秒)していき、高品質な計測画像を得る画像積算機能

計測する試料の培地や照明等の不均一なところの濃度差等を検出して計測する、実時間シェーディング補正機能

- 混釈コロニー等での淡く小さいコロニーの計測
- 不均一な培地、透過しない培地のコロニー計測
- ゴミ、インク、気泡が入ったコロニーの計測

- 選択培地等色の付いた培地のコロニー計測
- 培地やコロニーが片寄ったサンプルの計測
- 短時間培養コロニーの計測

### コンパクト体型で低価格

僅か60cm巾のワゴンにのります。  
(プリンター付き)

### 操作が簡単(面倒な操作不要)

電源投入後サンプルをセットしてスタート  
ボタン(フットスイッチでも可)を押すだけ  
でどなたにでも使えます。

### データの信頼性

サンプルをセットすると同時にCRT  
画面上に計測状況が表示されます。

### 強力な分離機能

重なり合ったコロニーを自動分離しても  
1シャッター0.9秒で計測できます。

### 拡大計測

数十μmのコロニーや数万個の  
コロニーが計測できます。

### 豊富な拡張性

顕微鏡、高倍率レンズ、パソコン等の  
接続により更に効率の良い運用がで  
きます。

※ 現在、測定しているサンプルを、お客様の所へ伺って測定するデモを行います。

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)

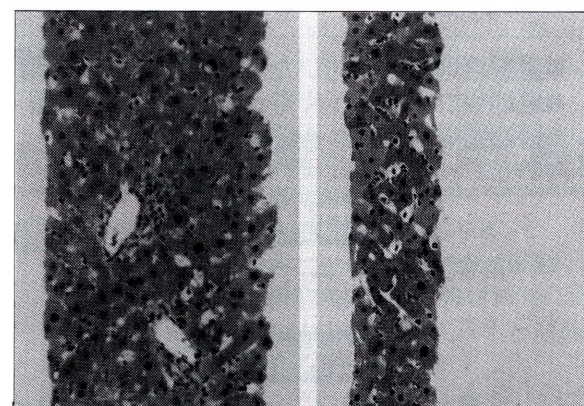
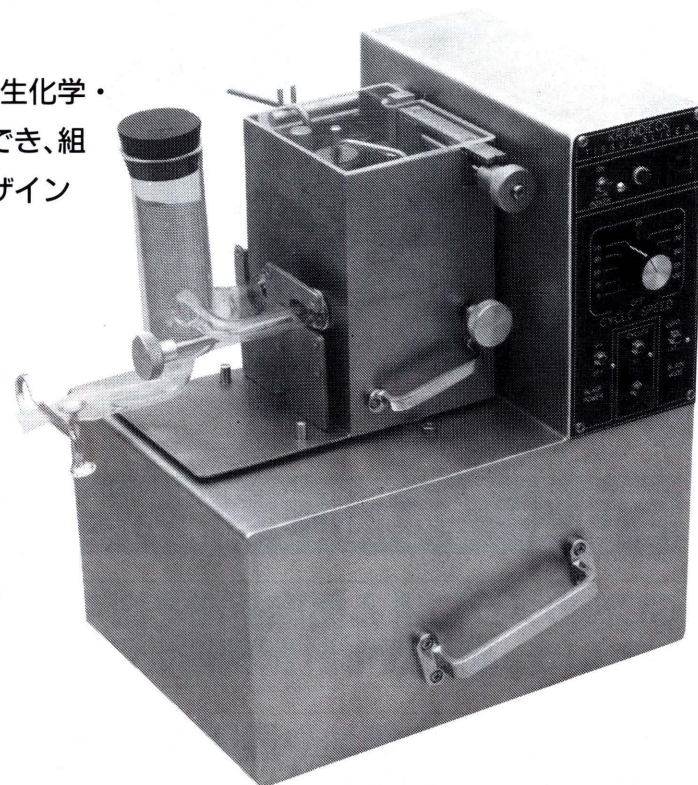


# THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

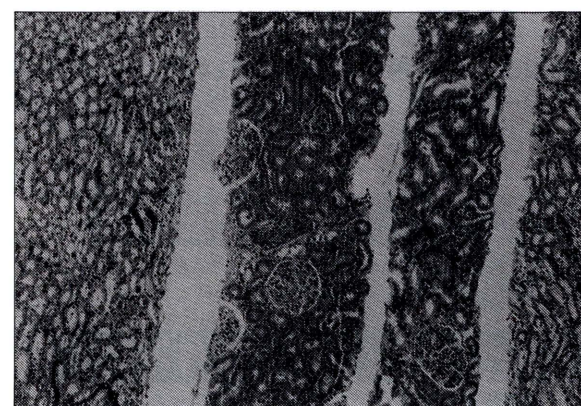
## 生きた組織の無菌スライスができます。

クルムディーク・ティッシュサイザーは、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。
- スライス再現性良く、バラツキもなく60～1000 $\mu$ mの厚さで作成されます。



ラットの肝臓(倍率430 $\times$ )



ラットの腎臓(倍率100 $\times$ )

右の写真はラットの肝臓のスライス(厚さ60 $\mu$ mおよび135 $\mu$ m)で、左の写真はラットの腎臓のスライス(135～200 $\mu$ m)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

# 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

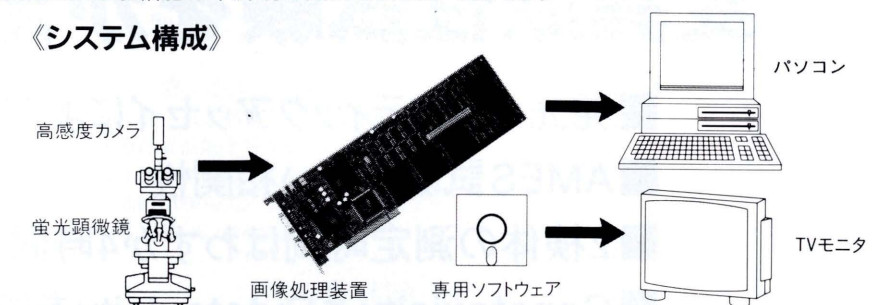
SCG試験に必要なデータを計測します。

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

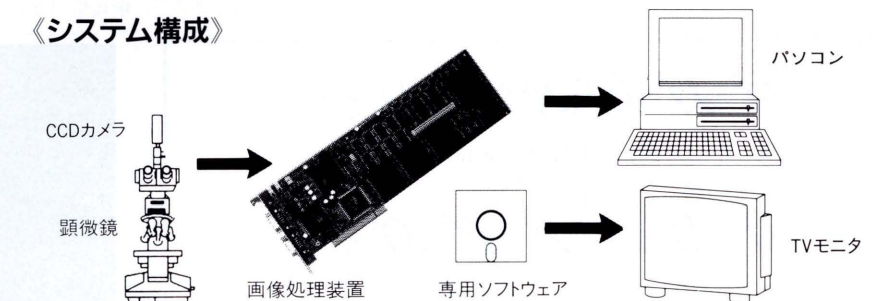
UDS試験に必要なデータを計測します。

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》

- 核グレイン数(1エリア)
- 細胞質グレイン数(3エリア)
- NETグレイン数

### 《システム構成》



## 小核画像解析システム

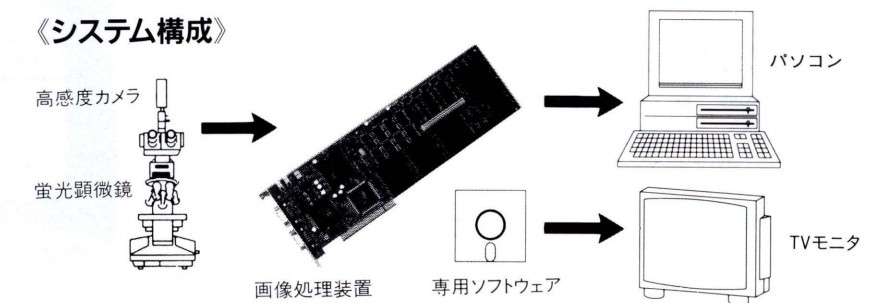
小核試験に必要なデータを計測します。

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》

- 小核カウント
- 小核サイズ
- 主核カウント
- 主核サイズ

### 《システム構成》



特許出願中

実績が保証します!

開発製造元

**ImageTech®**

**ケイオー電子工業株式会社**

E-mail: keio@magical.egg.or.jp  
URL: http://www.Tokyoweb.or.jp/KEIO/

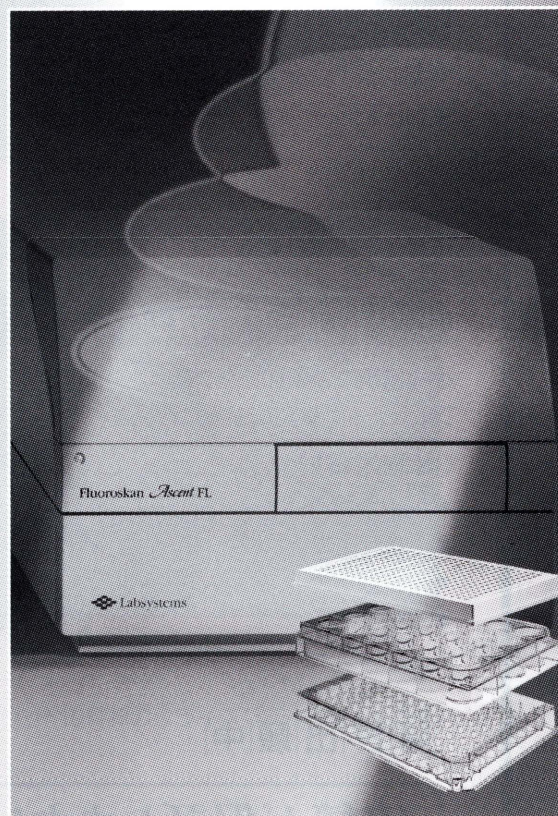
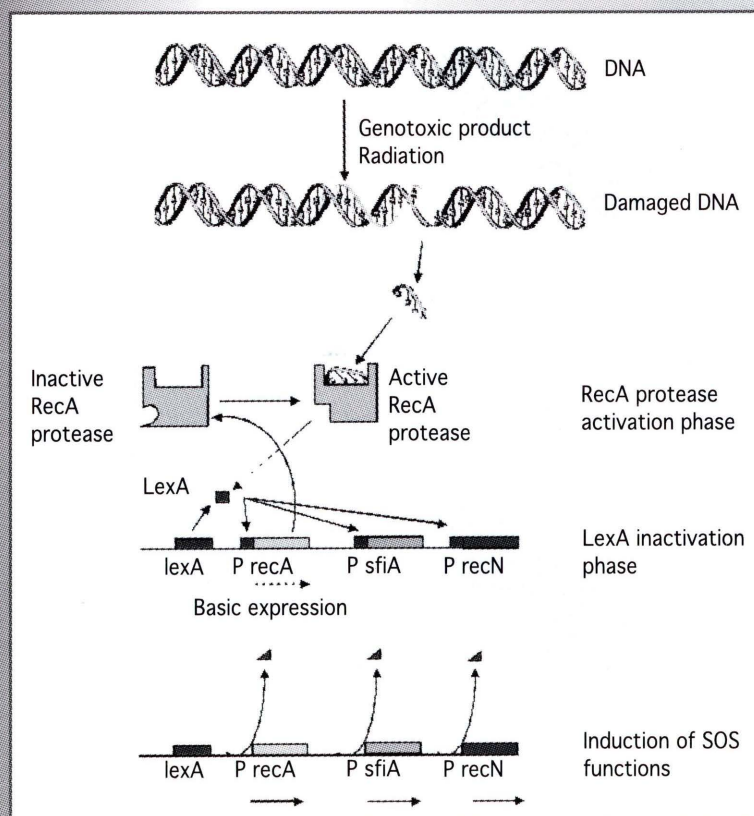
本社 〒567-0828 大阪府茨木市舟木町5番12号  
TEL.0726-34-1022 FAX.0726-34-1018  
東京支店 〒105-0003 東京都港区西新橋1丁目13番3号 MYビル2F  
TEL.03-5251-4355 FAX.03-5251-4420



# Vitotox™

## 変異原性試験をかえます！

- 発光カイネティックアッセイによる高感度
- AMES試験と高い相関性
- 2検体の測定時間はわずか4時間
- GenotoxicityとCytotoxicityを同時に測定
- 測定および結果判定は全自動
- わずか1mgの検体量



### 編集後記

本号は6月に行われた公開シンポジウムの特集号ですが、発表内容の都合で執筆を辞退された先生がおられるため、シンポジウムの内容がすべて網羅されているわけではないことをご了承ください。せめて大会前に発送を、と思っておりましたが、叶わぬ夢でした。頁数は少ないですが中身は濃くなっています。どうぞ20世紀最後の環境変異原研究をお楽しみください。

また、次々号 (vol. 23 No. 2) では光遺伝毒性特集を計画しています。光遺伝毒性に関するデータ、考え等をお持ちの方は是非ご投稿ください。よろしくお願いします。

担当編集委員 山田 雅巳

### 編集委員

林 真 (委員長) (2000-)  
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1  
国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター変異遺伝部  
Tel: 03-3700-9872 Fax: 03-3700-2348  
E-mail: hayashi@nihs.go.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.ne.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  
E-mail: suzuki@jikei.ac.jp

森田 健 (1998-)  
〒300-4247 茨城県つくば市和台43  
グラクソ・ウエルカム株式会社 筑波研究所  
Tel: 0298-64-5532 Fax: 0298-64-8558  
E-mail: tm28417@glaxowellcome.co.uk

矢嶋 信浩 (1999-)  
〒329-0512 栃木県下都賀郡石橋町下石橋519  
雪印乳業株式会社・生物科学研究所  
Tel: 0285-52-1322 Fax: 0285-53-1314  
E-mail: n-yajima@snowbrand.co.jp

山田 雅巳 (1999-)  
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1  
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部  
Tel: 03-3700-1141 (ext 282)  
Fax: 03-3707-6950  
E-mail: myamada@nihs.go.jp

赤沼 三恵 (2000-)  
〒187-0011 東京都小平市鈴木町2-772  
(財)残留農薬研究所試験企画部  
Tel: 042-382-2146 Fax: 042-383-7640  
E-mail: mie.a@viola.ocn.ne.jp

### 評議員

赤沼 三恵	荒木 明宏	宇野 芳文	太田 敏博	大塚 雅則
大西 克成	葛西 宏	鎌滝 哲也	川西 正祐	菊池 康基
木苗 直秀	後藤 純雄	佐々木 有	澁谷 徹	島田 弘康
清水 英佑	下位香代子	須藤 鎮世	祖父尼俊雄	高橋 和彦
田中 憲穂	出川 雅邦	寺尾 良保	長尾美奈子	中嶋 圓
中村 好志	糠谷 東雄	布柴 達男	根岸 和雄	能美 健彦
林 真	早津 彦哉	平山 晃久	藤川 和男	降旗 千恵
本間 正充	宮川 誠	望月 正隆	森 秀樹	森 幸雄
森田 健	矢嶋 信浩	山添 康	吉川 邦衛	若田 明裕
若林 敬二	(五十音順)			

環境変異原研究 第22巻 第3号 2000年

平成12年12月15日 印刷  
平成12年12月22日 発行

発行者 日本環境変異原学会  
発行責任者 木苗 直秀  
製作 インテルナ出版



目 次

総 説

DNA polymerase  $\beta$

山田雅巳 .....115

一般論文

Micronucleus test in rats after oral administration of methyl methanesulfonate for 4 weeks

Shigenari Ozawa, Rika Takayama, Kazuo Kobayashi, Tsuyoshi Kitamura and Nobuo Shibata .....125

第11回公開シンポジウム「環境変異原の活性発現と抑制の化学的機構」

環境変異原研究における有機化学の役割

早津彦哉 .....131

Does tamoxifen-induced DNA damage cause endometrial cancer?

Shinya Shibutani .....133

水中の直接変異原MXの生成と毒性発現の機構

木苗直秀, 杉山千歳, 下位香代子 .....141

フリーラジカルを経由する変異・発がん物質の生成と発現

菊川清見, 平本一幸, 加藤哲太 .....149

化学物質による活性酸素の生成と消去

福原 潔, 宮田直樹 .....155

アルキル化剤の変異原性発現と抑制機構

高橋和彦, 加藤千晴, 加藤宏明 .....163

ポルフィリン・鉄モデル酸化系による変異原活性化の機構

稲見圭子, 大河内江里子, 望月正隆 .....173

Author Index .....183

Keyword Index .....184

付 記

日本環境変異原学会 入会申込書  
学生会員申込書

環境変異原研究

投稿論文チェックリスト  
投稿規定  
執筆規定