

環境変異原研究

Environmental
Mutagen
Research

環境変異原研究

Environmental Mutagen Research

目 次

第12回公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」

酸素ストレスの分子病態学	
菊川清見	137
活性酸素による突然変異誘発機構－大腸菌の鉄の取り込み調節機構とその活性酸素防御としての役割－	
布柴達男	147
ヒトスクレオチド除去修復機構によって修復されるDNA酸化損傷とその生物学的意義	
倉岡 功	159
哺乳類の酸化損傷塩基修復酵素NTH1とOGG1の基質特異性と作用機序	
井出 博	167
酸化ストレス発がんの分子機構とその標的遺伝子	
豊國伸哉	177
Mechanisms protecting genomic integrity from damage caused by reactive oxygen species:	
Implications for carcinogenesis and neurodegeneration	
Nakabeppu Y, Tominaga Y, Tsuchimoto D, Ide Y, Hirano S, Sakai Y, Sakumi K and Furuichi M	183
ミトコンドリア遺伝子変異の蓄積と老化	
田中雅嗣	197
環境因子による酸化的DNA損傷とがん、老化	
及川伸二、村田真理子、平工雄介、川西正祐	207
一般論文	
Exposure to a power frequency magnetic field (50 Hz, 40 mT) did not cause point mutation in bacteria	
Ikehata M, Takashima Y, Suzuki Y, Shimizu H, Miyakoshi J and Koana T	215
Comparison of mutation spectra induced by ethylating agents in DNA-alkyltransferase-deficient mutants of <i>E. coli</i>	
Ohta T, Hanao K, Tokishita S and Yamagata H	223
Author Index	229
Keyword Index	230

付 記

日本環境変異原学会 入会申込書	環境変異原研究	投稿規定
学生会員申込書		執筆規定

複写される方に

本誌（書）に掲載された著作物を複写したい方は、著作権者から複写権の委託を受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・翻訳のような複写以外の許諾は、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

Notice about photocopying

In order to photocopy any work from this publication, you or your organization must obtain permission from the following organization which has been delegated for copyright for clearance by the copyright owner of this publication.

Except in the USA

Japan Academic Association for Copyright Clearance (JAACC)

6-41 Akasaka 9-chome, Minato-ku, Tokyo 107-0052, Japan

Phone: 81-3-3475-5618, FAX: 81-3-3475-5619, E-mail: naka-atsu@muj.biglobe.ne.jp

In the USA

Copyright Clearance Center, Inc. (CCC)

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, Phone: (978) 750-8400, FAX: (978) 750-4744, www.copyright.com

Environ. Mutagen Res., 23 : 137 – 145 (2001)

シンポジウム

酸素ストレスの分子病態学

菊川 清見*

東京薬科大学薬学部 〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1

Molecular pathology of oxidative stress

Kiyomi Kikugawa

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

Summary

Intake of molecular oxygen generates oxidative stress in the body.

Oxidative stress induces aging, and results in mutation and several diseases including cancer. This paper describes aspects of oxidative stress including its generation oxidative damage of biological components repair and removal of the damage, and also the effect of the damage to the human body.

Furthermore, studies by the authors on the oxidative stress-induced blood cell aging and its modulation by oxidized protein hydrolase are introduced.

Keywords : oxidative stress-induced damage, repair and removal system, free radical disease, blood cell aging, oxidized protein hydrolase

緒 言

ヒトは酸素を摂取する限り、酸素ストレスによる傷害を受けることを避けることはできない。酸素ストレスによる老化や種々の疾病、特にDNAの変異や発がんにつながる傷害の研究は環境変異原研究において重要な分野である。酸素ストレスの傷害を与えるのはいわゆる活性酸素であるが、その分子種は多岐にわたっており、またそれぞれの分子種が活性かつ不安定で取り出すことができないため、その実体を明らかにするのは困難である。また、それぞれの分子種の作用も環境や対象によってさまざまな様相を呈しており、酸素ストレスの作用を一元的に論じることはできない。本稿では酸素ストレスを分子種別にとらえ、酸素ストレスの全貌について概説する。また本稿の後半では、以下の稿では触れられない酸素ストレスによるタンパク質傷害とその排除について、筆者

らの研究を紹介する。参考文献は膨大な数になるのでここでは割愛した。

1. 酸素ストレス (ROS, RNOS) の発生

酸素 (O_2) は好気生物にとって栄養素を燃焼して、エネルギーを獲得するために不可欠な因子である。大気 (160 mmHgの酸素分圧) を吸入すると、肺胞では100、血液では40、細胞では1 mmHg以下と酸素分圧は低下するが、細胞内ではきわめて少ない酸素を利用して、栄養素を燃焼しエネルギーを獲得している。その一方で、酸素はさまざまな活性種となって、生体に対して好しからざる影響を与える。細胞内の酸素の80%はミトコンドリアで消費されるが、その一部の酸素が一電子還元を受けて superoxide (O_2^-) となり、不均化反応によって過酸化水素 (H_2O_2)、さらに金属イオンの作用によってより活性の強い hydroxyl radical ($\bullet OH$) を生じる。ミクロソームにおける薬物代謝、虚血再灌流時の細胞質、糖尿病の非酵素的反応によっても O_2^- が生成する。白血球やマクロファージでは H_2O_2 と Cl^- からも活性な ClO^-

*kikugawa@ps.toyaku.ac.jp

受付: 2001年9月28日 受理: 2001年9月28日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第12回公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」で発表された。

This paper was presented at the 12th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 26th, 2001. The symposium entitled "Molecular Pathogenesis for Oxidative Stress", was organized by Tatsuo Nunoshiba and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

Table 1 ROS-inducing factors

Cell or subcellular organ	Action	Factor	Induced ROS
Mitochondria	Energy production	NADH dehydrogenase	O_2^-
Microsome	Drug metabolism	Cytochrome P-450 reductase	O_2^-
Cytosol	Ischemia-Reperfusion	Xanthine-xanthine oxidase	O_2^-
Leukocyte	Bactericidal action	NADPH oxidase	O_2^-
Macrophage		Myeloperoxidase	OCl^-
	Diabetes	Maillard reaction	O_2^-
Skin	Light hypersensitivity	Light sensitizer	1O_2

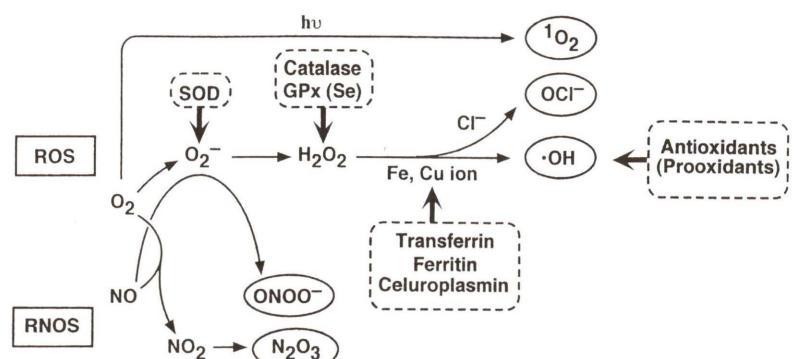


Fig. 1 Production and removal of ROS and RNOS

を発生する。また、酸素は皮膚などで光増感作用を受けて化学的に活性な一重項酸素 (1O_2) を生じる (Table 1)。これらは化学反応性が強いため活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) と呼ばれ、生体の酸素ストレスの要因と考えられている。1987年、Moncada らによって発見された内皮細胞由来弛緩因子 (endothelial-derived relaxing factor : EDRF) として重要なはたらきをしている一酸化窒素 (NO) も O_2 や O_2^- と反応して、化学反応性の高い二酸化窒素 (NO_2)、三酸化二窒素 (N_2O_3)、ペルオキシナイトライド ($ONOO^-$) などの活性窒素酸化物種 (reactive nitrogen oxide species, RNOS) を形成し、ROS と同様に酸素ストレスの要因になっている (Fig. 1)。

2. ROS, RNOS の作用と消去

ROS は酵素反応のような選択的な反応を起こすのではなく、生体成分に無差別的に反応して傷害を与えるのが特徴である。一方、 O_2^- の発生は酵素的に制御されている。 O_2^- は superoxide dismutase (SOD) により H_2O_2 に、 H_2O_2 は catalase および Se 含有の glutathione peroxidase (GPx) によって H_2O と O_2 に分解される。 $\bullet OH$ の発生は金属イオンを捕捉する transferrin, ferritin, ceruloplasmin によって制御されている。ROS が消去酵素系や発生制御系をかいくぐって作用したとき、生体に重度の傷害が起こると考えられる。ROS はその発生や分解に酵素が関与しているので (Fig. 1)、作用する分

子種の特定化はある程度可能である。1969年、Fridovich らによって発見された SOD が ROS の作用の解明に大きく寄与している。しかし、 $\bullet OH$ が生体に直接傷害を与える分子種であるかどうかについては異論もあり、さらに別の活性な分子種が存在するのではないかと考えられているが、特定化するにはいたっていない。ここでは、ROS による傷害は $\bullet OH$ による傷害として記すことにする。

RNOS の NO_2 と N_2O_3 は NO と O_2 が反応して生成し、 $ONOO^-$ は NO と O_2^- の反応によって生成するが、ここには酵素反応は介在しない。酵素系が知られていない点が ROS と異なっており、そのため作用する RNOS の分子種の特定化はより困難である。 $ONOO^-$ はプロトン化した $ONOOH$ が傷害反応に関与するが、その反応も $NO_2 + \bullet OH$ となって反応するのかどうか不明である。最近の筆者らの研究によると、 $ONOOH$ は酸素存在下でないと反応性がない。 $ONOOH$ の反応性に分子状の酸素もからんでいるようである。RNOS も ROS とともに生体内で無差別的な傷害を引き起こしているらしい。

3. ROS, RNOS による DNA の傷害

ROS のなかで最も活性の強い $\bullet OH$ は、DNA 鎮の開裂や最も酸化に弱いとされる guanine が酸化を受けて生成する 8-hydroxyguanine (8OG) で代表される塩基部分の酸化物の生成を引き起こす。これらの反応は生体組織でも認められており、8OG は ROS のマーカーとして利用されている。しかし、8OG の生成量はごく微量であるため、試料の取り扱いに注意しないと artifact として検

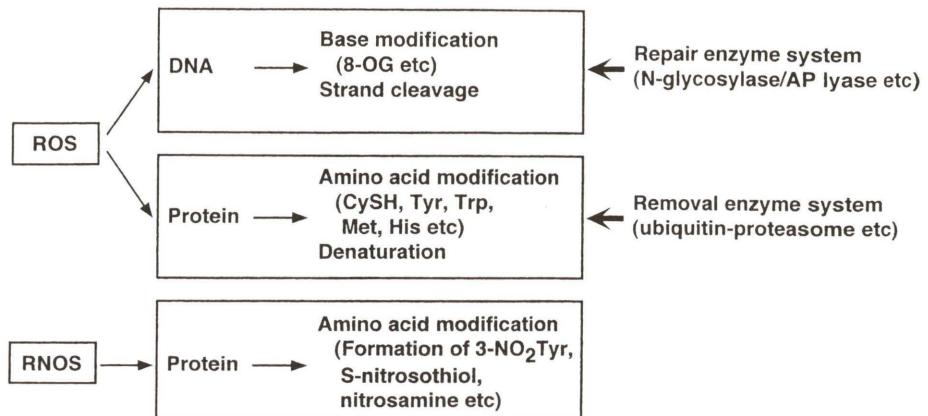


Fig. 2 DNA and protein damage induced by ROS and RNOS

出する恐れがあることが指摘されている。ROS による DNA の傷害は発がんの視点から重要視され、変異の誘発、翻訳エラー、タンパク質合成の阻害などにつながる。一方、このような修飾は種々の DNA 修復酵素系によって修復されるため、ROS による DNA の傷害は生体組織では修飾と修復のバランスによって起こると考えられる (Fig. 2)。ROS は DNA に傷害を与える initiation 段階だけでなく、細胞のがん化 promotion 段階にもはたらくことが報告されている。

RNOS のなかで最も反応性の強い $ONOO^-$ は $ONOOH$ となって、試験管内で DNA の鎖開裂、塩基の脱アミノ化、8-nitroguanine の生成などの guanine 塩基の修飾などを起こすことが観察されているが、生体組織中にこれら反応物が生成しているという証拠は現在のところ乏しい。

4. ROS, RNOS によるタンパク質の傷害

ROS による最も緩和なタンパク質の傷害は、CysH の可逆的な disulfide 結合の生成である。不可逆的な反応の Tyr からの dityrosine の生成、Trp の分解、Met の酸化、His の分解などもあり、試験管内の反応ではこれらの反応によって酵素タンパク質活性の失活、タンパク質の変性が認められている (Fig. 2)。ROS によって傷害を受けたタンパク質は、ubiquitin 化されたのち proteasome によってばらばらに分解され、必要なアミノ酸を再利用するという分解システムが知られている。

RNOS によるタンパク質の修飾は 3-nitrotyrosine と S-nitrosothiol の生成である。 $ONOO^-$ から生じる $ONOOH$ による 3-nitrotyrosine の生成は CO_3^{2-} 存在下で促進される。3-nitrotyrosine は種々の疾患の組織に検出されており、RNOS のマーカーと見なされている。また、S-nitrosothiol は NO のプールとして NO の transnitrosation に関与しているといわれている。RNOS は第二級アミンとも反応して発がん性の nitrosamine を生成する。RNOS によるタンパク質傷害が生体でどのような傷害に

つながっているのかは現在のところ未知である。

5. ROS によるリン脂質の傷害

ROS による多価不飽和脂肪酸 (LH) の傷害は DNA やタンパク質の傷害より大きいと考えられている。LH は大気の酸素存在下では ROS による酸化的傷害が大きい。LH の活性メチレン基から ROS による水素引き抜きが起こり生成した炭素ラジカル ($L\bullet$) に酸素が付加して活性の高い脂肪酸 peroxyradical ($LOO\bullet$) を生成する。 $LOO\bullet$ が脂肪酸から水素を引き抜き、自身は脂肪酸 hydroperoxide ($LOOH$) となるが、酸素の存在によってこの反応が繰り返され、いわゆるラジカルの連鎖反応が進行する。酸素存在下のラジカル連鎖反応によって、ROS 1 分子から 40-50 分子の $LOOH$ が生成する。これを脂質過酸化反応というが、脂質過酸化を促す連鎖反応は ROS だけでは進行せず、酸素が十分供給されないと進行しない。

体内のリン脂質 (PL) は 2 位に結合している多価不飽和脂肪酸が ROS によって大気下と同様に脂質過酸化を起こすと考えられていた。事実、活性メチレン基の多い多価不飽和脂肪酸を投与した実験動物の組織を取り出し、チオバルビツール酸 (TBA) 試験を行うとより高い脂質過酸化度を示すという報告がある。しかし、体内の酸素分圧は大気より低いので、大気中と同様にラジカル連鎖反応が起こり、リン脂質の過酸化が進むとは考えられない。筆者らも活性メチレン基の多い多価不飽和脂肪酸を投与した実験動物の組織を取り出し、TBA 試験を行った。TBA 試験は大気中加熱して行うので、測定中の過酸化による artifact を測定しないように注意をはらって試験した。その結果、活性メチレン基の多い脂肪酸の摂取によって、体内リン脂質の酸化がより高進することはなかった。体内でのリン脂質の過酸化は大気中での過酸化とは異なることがわかった。この際、vitamin E が十分に存在しているので、vitamin E が ROS と少量の酸素から生成する $LOO\bullet$ に水素を供与し、少量

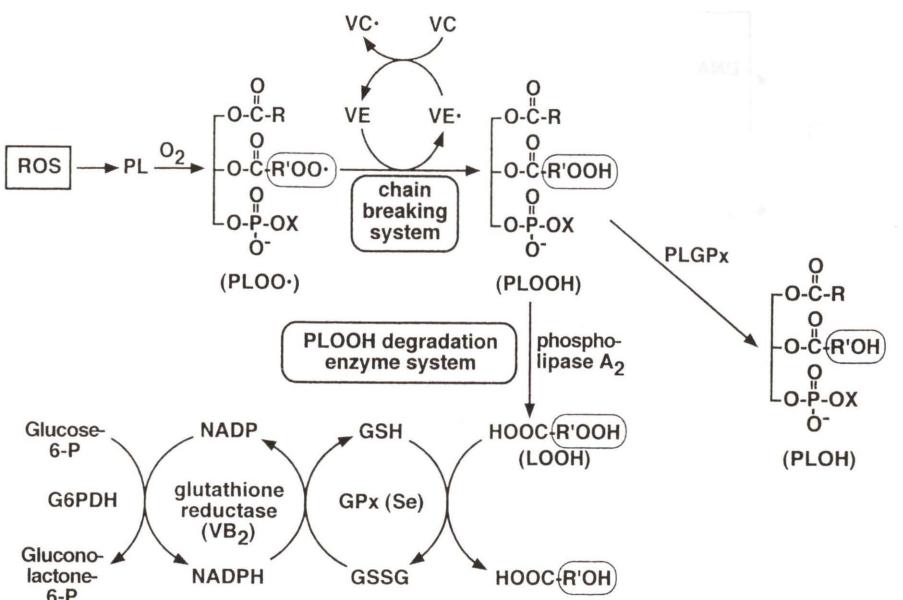


Fig. 3 Phospholipid damage induced by ROS and its removal

の準安定なPLOOH生成する(Fig. 3)。体内のPLの酸化されやすさは大気中のLHの酸化されやすさとは相関しないことがわかった。リン脂質中の多価不飽和脂肪酸はvitamin Eと共にROSの消去系と考えることができる。

PLOOHは生体がROSによる酸素ストレスを受けたときに最初に生成する物質であり、酸素ストレスマーカーとみなされている。また、リン脂質の2位に位置するarachidonic acidはシクロオキシゲナーゼ阻害剤添加によってその生成が阻害されないPGF₂様物質(F₂-isoprotane)を生成し、これも酸素ストレスマーカーとみなされている。

PLOOHは金属イオンなどの存在下で分解し、反応性の強いアルデヒドを生成する。生体組織内にこの反応に由来する遊離のアルデヒド類の存在は認められていないが、その反応生成物が検出されている。反応生成物はTBA反応陽性物質として酸素ストレスあるいは脂質過酸化のマーカーとして用いられている。Malonaldehydeとguanine, malonaldehyde, 4-hydroxynonenal, acroleinとlysineのアダクトが病態組織などに見出されている。これらも生体組織に酸素ストレスがあったことを物語るマーカーとしてとらえられている。しかし、生体内のリン脂質の酸素ストレスによる傷害が生体に対してどのような悪影響を及ぼしているのかについては必ずしも明らかではない。むしろリン脂質がROSによって傷害を受けることによってROSを消去し、ROSによるDNAやタンパク質の傷害を守っているとも考えられる。

リン脂質傷害の悪影響は、動脈硬化の発症との関連で議論されている。PLOOHが分解して生成したアルデヒド類とタンパク質との反応が、動脈硬化発症のメカニズムの一つとしてとらえられている。Cholesterolを含む

low density lipoprotein (LDL)が酸素ストレスを受けるとリン脂質の過酸化を起こし、生成したアルデヒド類がアポタンパク質を修飾して変性LDLを生じる。変性LDLは動脈壁のマクロファージのスカベンジャー受容体(SR)により認識、取り込まれ、cholesterolを含む泡沫細胞になる。これが動脈硬化症の初期病変と考えられている。生体リン脂質の酸素ストレス傷害が、生体に影響を与える唯一の例といえるが、生体内でPLOOHの生成が動脈硬化の発症につながるとの証拠は必ずしも確立しているわけではない。

PLOOHは生体内では酵素反応によって除去される。PLOOHはphospholipid Gpxで消去されるか、PLOOHにより活性化されたphospholipase A₂によって切り出されLOOHとなつたのち、Seを含むGPxによりアルコールに還元される。GPxの基質となる還元型のglutathioneはvitamin B₂補酵素とglutathione reductaseおよびNADPHによって再生され、NADPHはglucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)によって再生される。これらの酵素系の活性の低下によってPLOOHが体内に蓄積することになる。G6PDHの先天性欠損症では溶血を起こしやすく、ROSに弱いマラリアにかかりにくく。ROSによる酸素ストレス傷害の消去の終末点がG6PDHであることを示している。

6. 抗酸化システム

抗酸化剤(antioxidant)はROS、RNOSを還元的に消し去る物質か、PLOO[•]のラジカル連鎖停止作用をもつ食物成分である。体内で生合成されるglutathione、uric acidなども抗酸化剤であるが、多くは食物から摂取される。抗酸化システムは、他の酸素ストレスの消去および分解系が体の中で準備されているのに対し、食物から摂

取される系である点が異なる。

連鎖停止剤はvitamin Eで代表されるフェノール性の脂溶性物質で、PLOO[•]に水素を供与して安定なPLOOHとし、自身がラジカル(VE[•])になって連鎖反応をくい止める(chain breaking) (Fig. 3)。Vitamin Eのように、連鎖停止剤は細胞膜に溶け込む脂溶性物質であり、水ともなじむ、PLOO[•]に水素を供与したのちに生成する連鎖停止剤のラジカルが比較的安定である、他の抗酸化剤と相乗性がある、などの性質をもっていることが必要である。ヒトでは最近までvitamin E欠乏症が知られていなかったが、ヒトのvitamin Eを運搬するタンパク質の先天性欠損症が見つかり、その欠損症ではvitamin Eが利用できないため歩行困難になるなど、酸素ストレスによる感覚神経が侵されている可能性が示された。疫学的調査でもvitamin Eの十分な摂取は冠動脈疾患のリスクを低下することが示されている。これらのことから生体内ではvitamin Eは酸素ストレスを軽減するのに必要な連鎖停止作用をもつ抗酸化剤と考えられる。β-Caroteneは脂溶性が高く連鎖停止作用は弱いが¹O₂を消去する物質として、体内で重要なはたらきをしていると考えられている。しかし、臨床的に多量の投与により喫煙者の肺がんの発症が上昇したとの報告があり、過量のβ-carotene摂取は悪影響を与えるようである。

水溶性抗酸化剤は概ね強い還元作用を有する。代表的なものがvitamin Cである。Vitamin Cは細胞膜リン脂質と水層の境界面に存在するVEラジカル(VE[•])と接して、VEラジカルを消去する相乗剤として知られている。Vitamin Cの摂取によりvitamin Eの再生が可能となるのでvitamin Eとならぶ重要な抗酸化剤である。Vitamin CはROSやRNOSとも直接反応して、それらを消去する作用がある(Fig. 1)。Vitamin Cと同類のものとして、フラボノイド、カテキンなどのポリフェノール類やその配糖体がある。試験管内の実験で、これらポリフェノール類にROS、RNOSを消去する作用があることがわかつている。配糖体は腸内細菌によってアグリコンに分解されて吸収されるが、vitamin E、C、β-caroteneと違って体内の滞留時間は短いという特徴がある。

Vitamin Cやポリフェノール類は場合によって酸素を還元してROSを発生するprooxidantとして作用することにも注意しなければならない(Fig. 1)。Vitamin Cの大量摂取によりDNAの酸化的傷害が上昇するとの危惧がもたれているが、これはartifactをとらえているのではないかとの反論もある。筆者らは、コーヒー中に還元性の強いhydroxyhydroquinone (HHQ)を見出し、HHQが大気中の中性の試験管内では酸素に由来する多量のH₂O₂を発生し、DNAに傷害を与えることを明らかにした。HHQをラットに投与すると、酸素分圧の高い肺組織に脂質過酸化の高進が認められ、酸素ストレスを

高進していることがわかった。また、コーヒーを飲用すると、尿中にH₂O₂が多量に排せつされるらしいことがわかつてき、これらの事実もポリフェノール類などは抗酸化作用をもつ反面、環境によってはprooxidant作用を発現することを示している。

食物から摂取するもので、ROSおよびLOOHを消去するGpxの構成成分となるSe、glutathione reductaseの補酵素となるvitamin B₂も抗酸化剤といえる。

7. 酸素ストレスの生体影響と予防

1956年、Harmanによって"Free radical theory of aging"という説が提唱され、酸素ストレスなどのフリーラジカルが動物の老化に関わっていることが提唱された。その後、動物の寿命と酸素の関わりについて、異なる種の動物の最大寿命の長さは単位体重あたりの酸素消費量や食餌の量と負の相関があること、同種の動物でも食餌制限と運動抑制による酸素消費量低下によって寿命が伸びること、SOD活性、vitamin Eやβ-carotene濃度の高い動物ほど寿命が長いことなどによって、動物の老化に酸素摂取が悪影響を及ぼすことが示されている。雌が雄よりも長寿なのはなぜか、未解決の問題であるが、酸素ストレスを防御する系が雄よりも雌の方が整っているとの考え方がある。その鍵は胎児の時にあるようである。新生児は酸素の少ない胎内の環境から、出生を契機にして一気に大気圧の酸素にさらされる。新生児は既にSODなどの酸素ストレスの防御システムが整っているわけであるが、出生時に雄と雌では酸素ストレスによる傷のつき方に違いがあり、その違いが成熟後の寿命の長さに関係しているというのである。性染色体X上にあるG6PDHにより、XX染色体をもつ雌は、X染色体の雄よりも酸素ストレスに強くなっているとの考え方もある。

種々の疾患についても、酸素ストレスやその他のフリーラジカルとの関係が議論されている。動脈硬化症、がん、心疾患、炎症、糖尿病、脳疾患、消化器疾患、リウマチなどの発症に酸素ストレスが関与していると考えられている。Harmanは酸素ストレスによる疾患を"Free radical disease"としてあげている(Table 2)が、現在でもこれらの疾患が酸素ストレスによって引き起こされている。

正常な状態でも酸素ストレスが発生するが、外的要因や薬物の摂取によって酸素ストレスが増産され、これらの要因によって種々の疾病が起こることがわかつてき、Table 3にその例を示した。これらの要因は直接あるいは代謝によって、酸素からROSを発生させたり、フリーラジカルを発生して、組織傷害を与え、種々の疾病を引き起こす。多くの発がん性物質による発がん過程にROSが関与していることが明らかにされている。

ROSの作用を抑制することにより、酸素ストレスによる疾病を予防、治療する試みがなされている。抗酸化

Table 2 A list of the "Free Radical Diseases" (from D. Harman, "Lipofuscin-1987 : State of the Art, I. Zs-Nagy, ed., Excerpta Medica, Amsterdam, 1988)

Atherosclerosis	Cancer	Essential hypertension
Senile dementia of Alzheimer type	Amyloidosis	Osteoarthritis
Senile macular degeneration	Senile cataract	Perkinson's disease
Fanconi's anemia	Bloom syndrome	Systemic lupus erythematosus
Diabetes mellitus type I	Preeclampsia	Laennic's cirrhosis
Acute pancreatitis		Adult respiratory distress syndrome
Disseminated intravascular coagulation		

Table 3 ROS or free radical producing factors and tissue damage

Drug or treatment	ROS or free radical	Damage
Radiation	•OH	Cancer
Pheophorbide, hv	$^1\text{O}_2$	Light hypersensitization
Paraquat (herbicide)	O_2^-	Lung damage
Ferric nitrilo-triacetate	•OH	Liver cancer
CCl_4 , halothane	$\bullet\text{CCl}_3$	Liver damage
Palacetamol, phenacetin	O_2^-	Liver damage
Alloxan, Streptozocin	O_2^-	Diabetes
Hydrazine derivatives	O_2^-	Hemolysis
Ethanol	Hydroxyethyl radical	Liver damage
Cigarette smoke	O_2^- , NO_2 , semiquinone radical	Lung damage

Table 4 Treatment using ROS and free radicals

Effect	Treatment	Metabolized by	ROS or free radical
Antimalarial	Primaquine, pamaquine		O_2^-
Anticancer	Pheophorbide, hv		$^1\text{O}_2$
	Radiation		•OH
	Bleomycin- Fe^{2+}		O_2^-
	Quinones (Adriamycin, Mitomycin C etc)	NADPH cytochrome reductase	O_2^-
	Ene-dyne antibiotics (Neocarzinostatin etc.)		•C

剤のvitamin E, vitamin Cおよびカロテノイドによる発がん抑制が試みられているし, NSAIDなどの抗炎症剤, 抗リウマチ薬, 抗てんかん薬には白血球からのROS発生を抑える作用があること, SODそのものは血中保持が短いが血中滞留時間を長する誘導体, SODはCu, Zn さく体であるがそれを模倣した銅誘導体を用いた種々の疾患の治療の試み, Gpxを模倣したSe含有ebseleinの利用, 脂溶性人工連鎖停止剤probucolの抗動脈硬化作用, 最近発売された脳梗塞防御剤edaraboneに抗酸化作用があることなど, 酸素ストレス低減が種々の疾患の治療に役立っている。

一方, ROSあるいはフリーラジカルを発生させることによって, がんなどの治療も行われている (Table 4). 薬物が直接あるいは代謝されることによってROSなどのフリーラジカルを発生してがん細胞を攻撃し死滅させるが, この場合当然正常細胞も傷害を受けることにな

る。

8. 酸素ストレスの生体好影響

酸素ストレスは生体にとって好ましい反応もある。白血球は OCl^- や $\bullet\text{OH}$ を発生し, 侵入した細菌を殺すことによって生体を防御している。しかし, 同時にその部位に酸素ストレスによる炎症的な傷害も起こす。また, 最近の研究によると, ROSは細胞内のシグナル伝達因子として重要な役割を果たしているといわれている。細胞質内の転写因子NF- κ Bは阻害因子I κ Bによって制御されているが, 細胞が腫瘍壞死因子(TNF)や炎症性サイトカインIL-1による刺激を受けるとI κ Bがリン酸化され, NF- κ Bは阻害がとけ核内に移行しDNAに結合する。この際, 細胞の刺激によりミトコンドリアにROSが発生してこれがI κ Bのリン酸化を促進するといわれている (Fig. 4)。しかし, 無差別的な反応をするのが特徴であ

るROSが, なぜ特定のシグナル伝達系の刺激に関与するのか, 解決すべき問題が残されている。

9. 酸素ストレスによる血球傷害と排除

この項では, 血球細胞の酸素ストレスによるタンパク質傷害と, 細胞の老化の関係について, 筆者らの研究結果について記す。ヒト赤血球が骨髄で生まれて体内で120回循環したのち, 脾臓マクロファージによって壊されるに至るまでの過程についていくつかの説があった。筆者らはこの過程に酸素ストレスが関与していることを明らかにした。ヒト循環血から若い赤血球と老化赤血球を遠心法で分離し, 遊離している鉄イオンと膜リン脂質の過酸化度を定量したところ, 遊離鉄イオンも膜リン脂質の過酸化度とともに老化赤血球の方が高値を示し, 老化赤血球が体内で酸素ストレスを受けていることがわかった。未分離の赤血球を試験管内で鉄イオン存在下緩和に酸化すると, 自己抗体IgGの結合が高進し, この結合がdithiothreitolの処理で低下したことから, IgGの結合は主として酸素ストレスによるdisulfide結合の生成が原因であると考えられた。結合IgGはanti-band 3 IgGであり, IgGの結合は赤血球膜から単離したband 3糖タンパク質によって阻害されたことから, anti-band 3 IgGの結合のエピトープはband 3であることがわかった。さらに結合部位はband 3のタンパク質部位ではなく表面糖鎖のsialylated poly-N-acetyllactosamine (PL)であることも明らかになった。このエピトープはもともと未酸化赤血球表面膜に存在するが, 酸化によってband 3を含む膜タンパク質が凝集を起こし, 抗体結合性が上昇した

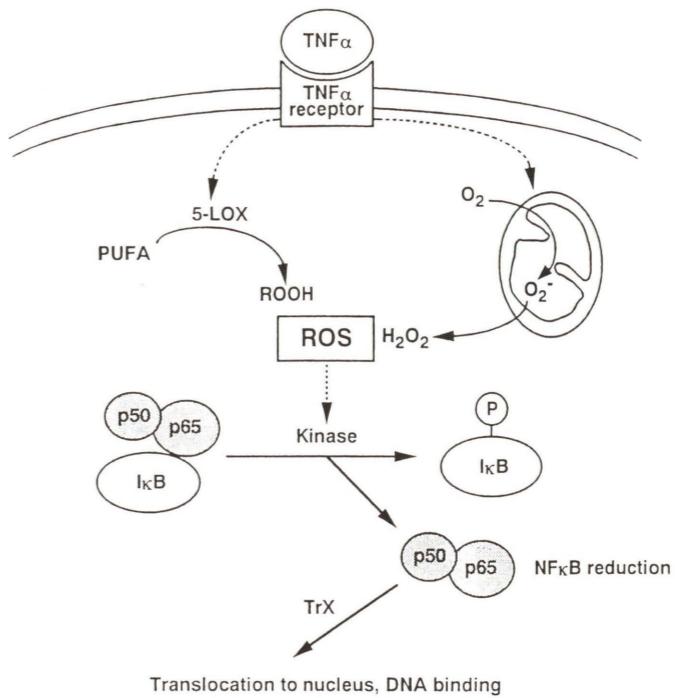


Fig. 4 NF-κB activation by ROS

ことが原因であった。分離した若い赤血球と老化赤血球についてanti-band 3 IgGの量を ^{125}I -goat anti-human IgGを2次抗体として調べたところ, 老化赤血球の方が多いに多く, 結合した2次抗体は膜表面band 3糖鎖のPL部分を酵素的に切断することによって遊離した。老化赤血球の膜タンパク質の凝集の程度も若い赤血球よりも高かった。

鉄イオン酸化未分離赤血球は無血清下, ヒトTHP-1を分化させたマクロファージに直接結合し, この結合のエピトープも赤血球表面の凝集PLであった。ヒト赤血球は体内の老化過程で, 酸素ストレスにより膜糖タンパク質の凝集変性を起こし, 密集した表面糖鎖PLに自己抗体IgGおよびマクロファージが結合するというダイナミックな変化を起こすことが明らかになった (Fig. 5)。

このように酸素ストレスによる膜糖タンパク質の凝集が, 細胞の老化をきたし自己抗体IgGの結合やマクロファージによって認識される機構は, ヒト赤血球に限らず骨髄由来細胞に共通する機構であることも明らかになった。酸化マウス赤血球および多形核白血球はTG誘導マウスマクロファージに, 酸化ヒトリンパ球系細胞JurkatはヒトTHP-1由来マクロファージに, いずれも酸化血球表面の凝集PL (band 3またはCD43)をエピトープとして結合することが明らかになり, 骨髄系細胞に共通の現象と考えられた。THP-1マクロファージのPLレセプターを単離し, そのN-末端部分アミノ酸配列を決定した。そのアミノ酸配列はこれまでに知られていない配列であり, マクロファージ表面の新規なPLレセプターの存在が確認された。

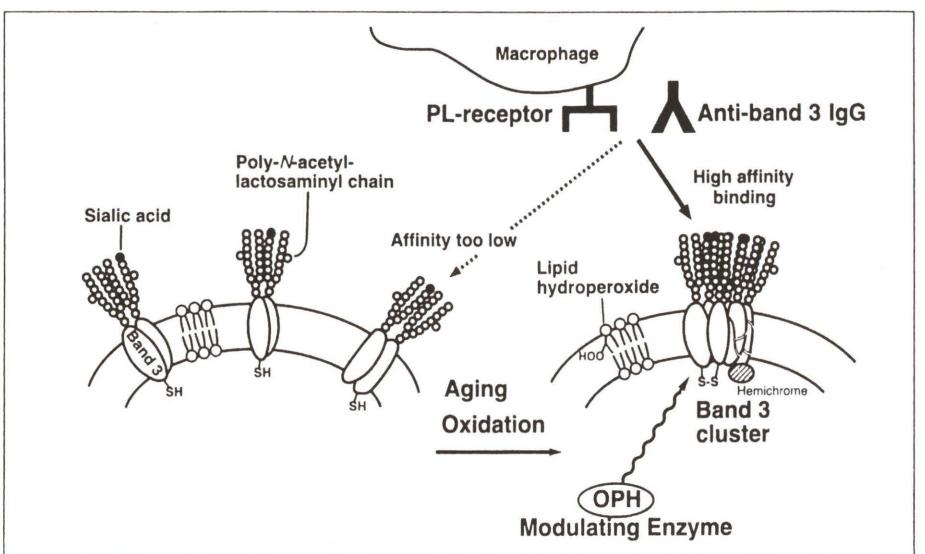


Fig. 5 A proposed mechanism of binding of anti-band 3 IgG and macrophages to senescent or oxidized red blood cells and its modulation by oxidized protein hydrolase (OPH) (from 7th World Congress for Microcirculation, Sydney, August 19-22, 2001)

マクロファージのPLレセプターや、酸化LDLを取り込むSRの活性もまた細胞内の酸素ストレスによって活性化していることを明らかにした。酸化マウスマクロファージによる認識において、あらかじめマクロファージを水溶性のphenol性、vitamin C系、glutathione系の抗酸化剤で処理するとマクロファージ内のROSが低下し、同時に酸化赤血球の結合能が低下した。このことから、酸化赤血球を認識するマクロファージPLレセプターの活性化にもマクロファージ内の酸素ストレスが関与していることが推測された。酸化LDLを認識するマクロファージのSRの活性化にも酸素ストレスが関与していることがわかり、酸素ストレスはマクロファージ内のタンパク質リン酸化を促進しているためであることがわかった。以上のこととは、酸化した血球を排除するマクロファージ側にもその排除の機構に酸素ストレスが絡んでいることを示している。

10. 二次的防御システムとしての酸化タンパク質分解酵素 (OPH) の発見

酸素ストレスによって傷害を受けたタンパク質はubiquitin-proteasome系で分解されることが示されている (Fig. 2) が、筆者らは鉄酸化赤血球の実験の過程で、新たな酸化タンパク質分解酵素を発見した。鉄酸化赤血球膜をいったん単離したのち、インキュベートすると、band 3を含む膜タンパク質のフラグメント化が起こり、膜タンパク質が消失した。この分解はserine protease阻害剤のdiisopropyl fluorophosphate (DFP)の添加で抑えられた。また、この分解は未酸化の赤血球膜では起こらず、酸化赤血球に特有な現象であった。この酵素は赤血球の細胞質に存在し膜に酸化が起こると膜に吸着して

結語

本稿では酸素ストレスによる生体影響の全貌と、筆者らの研究を中心にしたタンパク質修飾とその除去について述べた。酸素ストレスの生体影響を研究するにあたり、常に遭遇するのは、生体内では酸素分圧は肺胞から組織細胞にいくにつれて低くなっているが、酸素ストレスの影響を見きわめる場は常に大気環境であることである。大気中の測定でartifactをとらえていないか、どれだけ

正確に生体内の状況を把握しているのか、常に問題になる。さらに、生体内には種々の抗酸化剤が存在するが、抗酸化剤は酸素の存在下ではprooxidantに変貌する。酸素分圧の異なる特定の組織において、抗酸化剤はどのように作用しているのであろうか。酸素ストレスの生体影響を研究するにあたり、生体内状況と測定時の状況において、酸素分圧—抗酸化剤の作用の違い、を常に考慮に入れて実験データを解釈する必要があろう。

はたらくらしいことがわかったので、細胞質からhemoglobinを除いたのち、³H] DFPで部分ラベルしてこの酵素を80 kDaのタンパク質として精製し、酸化タンパク質分解酵素 (oxidized protein hydrolase : OPH)と名づけた。この酵素の部分アミノ酸配列を決定し、ホモロジー検索を行った結果、既知ではあるが未だ生体内での機能がわかつっていない acylpeptide hydrolase (ACPH) と同一酵素であった。ヒトK562細胞のcDNAからバキュロウイルスシステムを用いて、recombinant ACPHを作成して、精製したOPHと酵素活性の比較を行った。その結果、両者ともにAc-Met-Alaを分解してAlaを遊離する exotype の ACPH 活性と、酸化BSAのLeu₂₁₈₋₂₁₉Ser, Tyr₄₁₀₋₄₁₁Thr, Phe₅₉₆₋₅₉₇Pheを切断する chymotrypsin-type の endotype の OPH 活性を示した。BSAの上記アミノ酸部位はいずれも埋もれているが、酸化によって表面に露出して切断されるものと考えられる。OPHは酸化赤血球においては、凝集した膜タンパク質を分解するので、赤血球の体内老化過程におけるIgGやマクロファージの認識を制御している可能性がある (Fig. 4)。

この酵素の存在について、OPHの抗体を作成し検索したところ、調べたすべてのラット臓器や培養細胞に存在していることがわかり、この酵素は赤血球に限定されたものではなく、普遍的に存在する酵素であることがわかった。OPHを高発現したCOS-7細胞はH₂O₂、paraquatなどの酸素ストレスに対して抵抗性が強く、本酵素はubiquitin-proteasome系と同様に、酸素ストレスによって傷害を受けて生成したタンパク質を分解除去する二次的防御システムとしてはたらいている可能性が示された。

活性酸素による突然変異誘発機構 —大腸菌の鉄の取り込み調節機構とその活性酸素防御としての役割—

布柴 達男*

東北大学大学院生命科学研究科分子生命科学専攻遺伝子システム学講座
〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉

Oxidative mutagenesis

—Regulation of iron transporting systems and their role in protection from oxidative stress in *Escherichia coli*—

Tatsuo Nunoshiba

Department of Biomolecular Science, Graduate School of Life Science, Tohoku University
Aramaki-Aza-Aoba, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan

Summary

It is generally accepted that iron is one of the most important metals for microorganisms, because it is essential as a co-factor for a number of enzymes involved in cellular metabolism. However, it is not easily available to them due to its insolubility in aerobic environments. In order to acquire iron, microorganisms have evolved iron transport systems wherein so-called siderophores -low molecular weight compounds- are secreted and which function to chelate iron with high affinity. In addition to the iron transport systems, they also have a genetic regulation system in which a regulatory protein can sense the cellular level of iron and controls the gene expression of transport systems. While iron is essential, excess iron is toxic due to its ability to catalyze Fenton reactions that produce hydroxyl radicals. Thus, these iron-uptake-systems have important roles in prevention of both iron starvation and oxidative stress. Here we describe the gene regulation of iron-uptake-systems and their roles in protection from oxidative mutagenesis.

Keywords : Fur, iron overload, superoxide dismutase, Harber-Weiss/Fenton reaction, mutation spectrum

緒 言

好気条件下では、溶解性の高いFe(II)は簡単に酸化されFe(III)になるが、このFe(III)は中性pHでは極めて溶解性が低く、沈澱する。このことは微生物にとっての鉄の飢餓の原因となりうる。したがって微生物は、Fe(III)を結合させるための鉄キレータを細胞外に放出し、高いaffinityで必須元素であるFe(III)を取り込むための極めて巧妙な機構を発達させてきた。しかしながら鉄に毒性がないわけではなく、細胞内濃度が高ければよいと

いうものではない。好気性生物の細胞内では、酸素呼吸に伴って常に活性酸素が生じ、その中でも生体成分に対して最も酸化作用を示す•OHの生成には、遊離したFe(II)とH₂O₂によるFenton反応が関与するといわれている。したがって過剰量の鉄はむしろ細胞にとっては好ましくない。事実、大腸菌をはじめとする多くの微生物では、前述した鉄輸送機構、鉄貯蔵に加え、細胞内の鉄濃度を感知し、遺伝子レベルで調節する機構を組み合わせることで、細胞内の鉄濃度の微調整を行っている(Hantke, 2001; Escolar et al., 1999)。換言すれば、この鉄輸送のシステムには必須金属である鉄の枯渇を防ぐ役割があると同時に、活性酸素に対する防御機能としての役割も合わせもつといえる。

*tnuno@mail.cc.tohoku.ac.jp

受付: 2001年7月15日 受理: 2001年7月15日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第12回公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」で発表された。
This paper was presented at the 12th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 26th, 2001. The symposium entitled "Molecular Pathogenesis for Oxidative Stress", was organized by Tatsuo Nunoshiba and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

Table 1 Iron-uptake-systems in *E. coli*

Siderophores	Sensing & Regulation	Transporting systems	Storage proteins
Citrate	Fur	Fec operon-TonB system	
Enterochelin	Fur	FepA operon -TonB system	Bft (Bacterioferritin) & Ptn (Ferritin)
Aerobactin	Fur	IutA operon -TonB system	
Ferrichrome	Fur	FhuA operon -TonB system	

本稿では、大腸菌における鉄輸送のシステムとそれらの活性酸素に対する防御系としての側面を紹介し、活性酸素による突然変異誘発機構について述べる。

1. 鉄輸送と貯蔵

前述のように微生物はキレート物質を放出することにより鉄を確保し細胞内に取り込むシステムをもつ。大腸菌は、citrate, enterochelin, aerobactin, ferrichromeなどをキレート物質として利用し、それぞれ独自の鉄輸送システムを備えている (Hantke, 1981; Bagg and Neilands, 1987a) (Table 1)。例えば、citrateをキレート物質として取り込む場合にはFecA-TonB系という機構 (Frost and Rosenberg, 1973; Hancock, et al., 1976; Wagegg and Braun, 1981) により、同様に、enterochelin, aerobactin, ferrichromeなどをキレート物質として取り込む場合はそれぞれFepA-TonB系 (Wookey and Rosenberg, 1978), IutA-TonB系 (de Lorenzo et al., 1986), FhuA (TonA)-TonB系 (Fecker and Braun, 1983) により鉄輸送を行っている。さらに取り込まれたFe(III)を、貯蔵タンパク質であるBacterio ferritinやFerritinに貯蔵することで鉄の枯渇を凌ぎ (Andrews et al., 1989; Izuohara et al., 1991)、必要に応じてヘムや鉄-イオウクラスター含有タンパク質の合成の際に受け渡されるのであるが、その詳しい機構についてはよくわからっていない。同時に細胞内の鉄イオン濃度を敏感に感知し、不足の状態では積極的に取り込むように、一方、十分量存在するときには逆に過剰にならないように微調整するFur (ferric iron uptake regulator) も存在し、細胞内の鉄イオン濃度の微調整を行っている。

2. 鉄イオン濃度の感知と鉄輸送オペロンの遺伝子調節

1) Furタンパク質

Fe(III)の輸送システムに関わる遺伝子は、いずれもオペロンを形成し、細胞内の鉄イオン濃度に敏感に制御されている。例えば、鉄が十分な培養条件では、ほとんど全てのオペロンの発現は抑制される。そこでキーになる調節タンパク質が存在すると考えられ、輸送遺伝子群が構成的に発現する変異株が分離されて、fur (ferric uptake regulation) と呼ばれるlocusが同定された (Hantke, 1981; Hantke, 1982; Hantke, 1984)。大腸菌

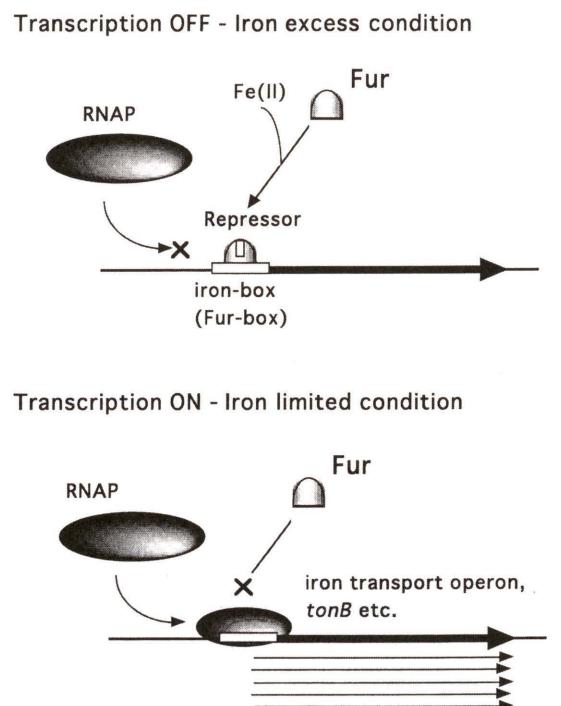


Fig. 1 Negative regulation of iron-uptake system by Fur protein. In iron excess condition, Fur protein activated by Fe(II) binds to iron-box (Fur-box) at the upstream of the genes involved in iron-transport, and blocks transcription of these genes (A). On the other hand, when the iron concentration is limited, the Fur without Fe(II) cannot bind, followed by transcription of these genes (B).

のfur遺伝子は148アミノ酸17kDaのヒスチジンを比較的多く含むタンパク質をコードする (Schaffer et al., 1985)。精製されたこのFurタンパク質が、aerobactin合成遺伝子の上流部、すなわちpromoterの隣接領域 (operator部位と予想される) に結合することが確認されたことから、転写調節因子であると考えられた (Bindereif and Neilands, 1985; de Lorenzo et al., 1987)。Furのpromoterへの結合は、鉄イオン濃度の低いときは弱く、逆に過剰の条件では強く結合することから、Furのレプレッサーとしての機能に鉄イオン濃度が重要な役割があることが考えられた (Wee et al., 1988)。Furの結合領域の解析とco-factorとしての鉄の関与は、Fe(II)よりも酸化されにくく、Fe(II)同様にFurに結合するMn(II)を用い、Mn(II)存在の有無によるDNaseIフットプリントティングにより行われた。その結果、Mn(II)を結合し

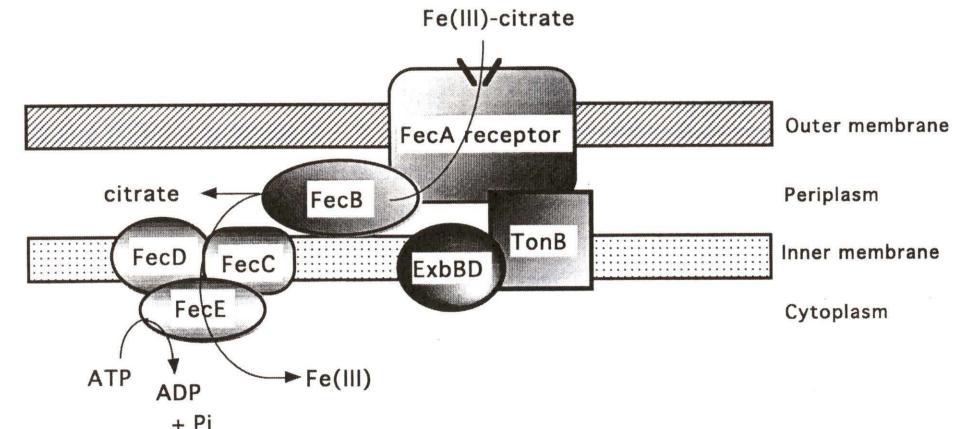
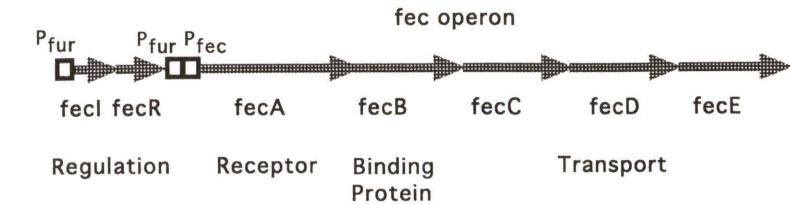


Fig. 2 Fe(III)-citrate transporting system. The upper figure indicates the Fec operon for iron-citrate transporting system. The five transport genes *fecABCDE* form an operon and transcribed from *fecA* to *fecF*. Two genes, *fecI* and *fecR*, are identified upstream of *fecA*, and regulate the gene expression of the operon genes. The lower figure indicates the mechanism of the Fe(III)-citrate transporting system. The outer membrane protein FecA recognizes and transports Fe(III)-citrate. The periplasmic protein FecB passes Fe(III) released in the periplasm, to the inner membrane protein FecC, FecD and FecE. The passage across the inner membrane requires ATP energy through FecE. TonB-ExbBD complex serves as an energy transducer to couple cytoplasm membrane energy to high affinity active Fe(III) transport systems.

ないFurタンパク質は調節する遺伝子のpromoterの-35, -10領域を含む31bpにわずかに結合するが、Mn(II)結合により、その結合が1000倍程度強くなること、加えて、19bpの第二の結合部位の生じることが確認された (Griggs and Konisky, 1989)。各々の鉄輸送オペロンの上流には、Furタンパク質の結合のコンセンサス配列 (GATAATGATAATCATTATC) が観察され、Fur-box (またはiron-box) と名付けられている。鉄輸送オペロンのpromoter領域とレポーター遺伝子としてのlacZ遺伝子のオペロン融合遺伝子の発現によっても、FurとFe(II)の複合体がこれらのオペロンの転写レプレッサーであることが確認されている (Bagg and Neilands, 1987b; Calderwood and Mekalanos, 1988)。また、いずれの鉄輸送にも重要な役割を果たすTonBも、このFurの発現調節を受ける (Postle, 1990) (Fig. 1)。

その後の研究により、Furは鉄輸送のみならず、さまざまな遺伝子の発現調節に関与することが報告されている。その一つの例として、大腸菌のFe含有SODをコードするsodB遺伝子があげられる。Furは、Fe(II)との結合なしにこの遺伝子の転写を促進することが知られている (Niederhoffer et al., 1990; Fee, 1991)。別の例として、Fur欠損株は、グリセロールやコハク酸、フマル酸を炭素源として増殖することができないことが知られて

いる (Foster and Hall, 1992)。さらにサルモネラ菌のfurホモログの変異株は酸に感受性が強いことから、消化器官を通じる際、特に胃での生存に関わる遺伝子群の調節に寄与していることが示唆されている (Foster and Hall, 1992; Hall and Foster, 1996)。以上のようにFurは鉄輸送に重要であるには違いないものの、必ずしも鉄輸送に特異的に関わる調節タンパク質ではなく、多面的な機能をもつ遺伝子調節タンパク質であるといえる。

2) Fecオペロン

ここに大腸菌の鉄輸送系の一つの例として、citrateをキレート物質とした鉄輸送系FecA-TonB系を紹介する (Fig. 2)。この鉄輸送は、大腸菌の染色体地図の7分に存在するfecと呼ばれるlocusにより行われている (Hussein et al., 1981; Pressler et al., 1988)。このlocusには5つの遺伝子、すなわちfecA, fecB, fecC, fecD, fecEがオペロンを形成し、fecAからfecEに向かって転写される (Pressler et al., 1988; Staudenmaier et al., 1989)。この鉄輸送系には、Fig. 2に示すように、5種のFecタンパク質に加え、ExbBD-TonBというこのシステムを機能させるためのエネルギー供給に関わるタンパク質が関与する (Hancock, et al., 1976)。FecAは外膜に存在する膜タンパク質で、細胞外に存在するFe(III)-citrateを感

知するレセプターとして働く。このとき、内膜タンパク質である TonB-ExbBD 複合体はこの FecA と結合することで、FecA が Fe(III)-citrate を取り込み、ペリプラズムに存在する Fe(III)-citrate の結合タンパク質 FecB に受け渡すエネルギーを安定に供給する。ExbB タンパク質は TonB の機能を安定化するかあるいは促進する働きをもつといわれている (Wagegg and Braun, 1981)。FecA から受け渡された Fe(III) は、ここで citrate から離れ、FecC と FecD の複合体へと受け渡される。FecE は FecC と FecD とともに複合体を形成して内膜に存在する ATP 結合タンパク質で、FecE の ATPase 活性により得られたエネルギーで鉄を細胞質に取り入れる。こうしてこれらのタンパク質が複雑に機能して citrate にキレートされた Fe(III) を細胞内に取り込む (Pressler et al., 1988; Staudenmaier et al., 1989)。この鉄輸送の仕組みは、いずれのキレート物質を用いた鉄輸送系でも概ね共通で、外膜のレセプターが認識して取り込み、ペリプラズムの結合タンパク質に受け渡し、さらに内膜の輸送タンパク質複合体へ受け渡す。いずれのレセプターの働きにも、TonB-ExbB によるエネルギーの安定供給は必須で、これらのタンパク質の欠損株では、鉄の取り込みが著しく阻害されている (Heller et al., 1988; Fischer et al., 1989)。また、これらの輸送システムは鉄に特異的なわけではなく、コリシン B, I, M の取り込みや T1 や T5 ファージの感染にも関与していることが知られている。

鉄輸送は前述したように、Fe(II) との結合により活性化された Fur/Fe(II) により負に制御されるが、この制御は FecA-TonB 系に対しても同様で、鉄枯渋状態ではこの制御がはずれ、fec オペロンは発現する。fec オペロンの調節はこの Fur による負の制御だけでなく、0.1 mM の citrate または 0.1 μ M の鉄イオンの添加により誘導される (Hussein et al., 1981; Zimmermann et al., 1984)。この誘導は、外膜タンパク質の FecA や TonB, ExbBD に変異が生じると阻止される一方で、FecCDE といった transport タンパク質の変異では全く阻止されない。また、isocitrate dehydrogenase をコードする *icd* を欠損させることにより、細胞内の citrate 濃度を 10~100 倍に高めても誘導されないことなどから、このオペロンの誘導には誘導物質である citrate の細胞質への取り込みが必要であることが示された (Hussein et al., 1981)。

一方 *fecA* の上流に 2 つの遺伝子、*fecI* と *fecR* の存在が示され、Fe(III)-citrate により誘導される fec オペロンの転写調節に関与することが明らかになった (van Hove et al., 1990)。*fecI* は 173 アミノ酸の 19 kDa のタンパク質をコードする遺伝子で、そのタンパク質は、C 末端に DNA 結合性を予想させる helix-turn-helix の motif をもち、内膜に接して細胞質に存在する。一方の *fecR* は 317 アミノ酸 35.5 kDa のタンパク質をコードする遺伝子で、

このタンパク質はペリプラズムに存在する。Mu d1 ファージの挿入による *fecIR* の破壊株は、Fe(III)-citrate により鉄を取り込むことができず、FecA タンパク質合成も見られない。しかしながら、plasmid により *fecI* や *fecI* と *fecR* の両方を発現させると Fe(III)-citrate の輸送は復帰するが、FecI のみの大量発現ではオペロンの誘導は構成的であるのに対し、FecI と FecR をともに発現させると Fe(III)-citrate による野生型の誘導が見られるという違いがある。さらに、FecI タンパク質が fec オペロンのオペレーター領域に結合し、転写を促進することが、また citrate 非存在下では、FecR は FecI を不活性化することが in vitro の実験で確認されている。以上の結果から、FecI は転写因子、FecR はペリプラズムの Fe(III)-citrate を認識するセンサーであると考えられている (van Hove et al., 1990) (Fig. 3)。

以上を整理すると、細胞内の鉄濃度が過剰のときは Fur タンパク質は鉄と結合することで活性型になり、fec オペロンをはじめとする鉄輸送オペロンの転写を抑制する。しかしながら、鉄が枯渋状態に陥ると、Fur は不活性型となり、転写の抑制が解かれ、低いレベルの発現が起こる。そのとき細胞は、キレート物質を放し鉄を確保すると、例えば、外膜に存在する FecA は Fe(III)-citrate のレセプターとして働き、TonB-ExbB から供給されるエネルギーを利用して Fe(III)-citrate をペリプラズムに取り込む。このときの FecA の N 末端が signal transduction に関与し、FecR と結合する。さらに FecR はペリプラズムの Fe(III)-citrate を認識して、おそらくは構造変化を起こし、FecI を活性化する。そして活性された FecI は fec オペロンの転写因子として転写を促進する (Harle et al., 1995)。こうして多量発現された Fec タンパク質は積極的に Fe(III)-citrate を取り込む。そしてふたたび細胞内の鉄濃度が上昇すると Fur は鉄と結合して、再び活性化され、鉄輸送オペロンの転写を抑制するのである。

3. 酸化ストレスに対する防御としての役割

1) 活性酸素と DNA 損傷、突然変異とその抑制機構

スーパーオキサイド (O_2^-) や過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\bullet OH$) などの活性酸素は、反応性が高く、さまざまな生体成分と容易に反応し、酸化損傷を与える (Babior, 1992; Farr and Kogoma, 1991)。DNA やその前駆物質であるスクレオチドなどは、活性酸素による酸化損傷の最も重要な標的として詳しく研究されている (Imlay and Linn, 1988; Demple and Harrison, 1994)。活性酸素による DNA 損傷としては、7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG), 1,2-dihydro-2-oxoadenine (2-oxoA), thymine glycol (Tg) などの塩基損傷や DNA 鎮の切断などが、DNA の前駆物質であるスクレオチドの損傷としては、7,8-dihydro-8-oxo-2'-guano-

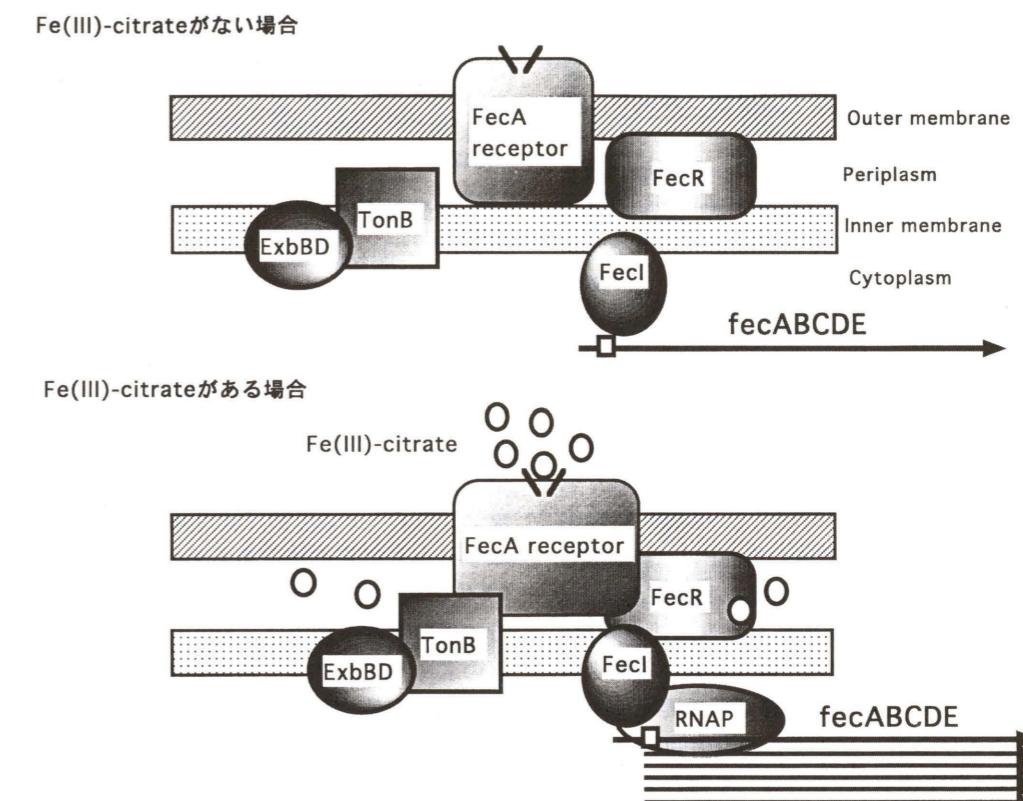
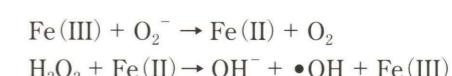


Fig. 3 Regulation of the Fe(III)-citrate transport system. In the iron limited condition, Fur is inactivated cannot work as a repressor, allowing the transcription of the iron transport operons. In the absence of Fe(III)-citrate, the fec-operon is still not induced, whereas the operon is actively transcribed in the presence of Fe(III)-citrate. Fe(III)-citrate binds the outer membrane protein FecA produced at the basal level, and triggers a conformational change in FecR that results in the activation of FecI. The activated FecI can bind to the promoter region of fec operon, and stimulates the transcription.

sine 5'-triphosphate (8-oxodGTP) (Maki and Sekiguchi, 1992), 1,2-dihydro-2-oxo-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate (2-oxodATP) (Kamiya and Kasai, 1995) が知られ、突然変異や DNA 複製阻害を引き起こす (Demple and Harrison, 1994)。これらの酸化損傷による突然変異や細胞致死に対し、大腸菌は複数の DNA 修復系、酸化スクレオチドの浄化系を備えている (Michaels and Miller, 1992; Yamamoto et al., 1997)。例えば、DNA 修復酵素としては、DNA 中の 8-oxoG : C を認識して 8-oxoG を切り出す glycosylase (MutM/Fpg) や 8-oxoG : A の誤対合を認識して A を切り出す glycosylase (MutY) ((Michaels and Miller, 1992), また Tg の glycosylase (Nth, Nei) など (Cunningham and Weiss, 1985; Melamede et al., 1994; Saito et al., 1997; Jiang et al., 1997) が、また酸化スクレオチドの浄化酵素としては、スクレオチドプールの 8-oxodGTP を加水分解して 8-oxodGMP とすることで DNA への取り込みを抑制する 8-oxodGTPase (MutT) が知られている (Michaels and Miller, 1992; Maki and Sekiguchi, 1992)。これらの遺伝子の変異株はいずれもミューターゼの表現型を示し、mutM mutY 変異株では 10-100 倍の、一方 mutT 変異株で

は 1000 倍もの高い自然突然変異率を示し、それぞれ主に $GC \rightarrow TA$, $AT \rightarrow CG$ の変異を誘発する (Michaels and Miller, 1992)。このことは、これらの DNA 修復系やスクレオチド浄化系が DNA 中の酸化損傷を最小限に保ち、自然突然変異頻度を $10^{-8} \sim 10^{-9}$ 程度に維持するために重要に関わっていることを示している。

活性酸素の中でも最も注目されているのは、最も反応性に富む $\bullet OH$ で、活性酸素による多くの酸化損傷の大部分がこの $\bullet OH$ によると考えられている。 $\bullet OH$ は以下に示す Harber-Weiss/Fenton 反応により O_2^- や H_2O_2 から生じるといわれ、



そのことは in vitro のモデル実験で証明されている (Brown and Fridovich, 1981; Akasaka and Yamamoto, 1994; Akasaka and Yamamoto, 1995)。例えば、試験管内で H_2O_2 , FeCl_3 , EDTA を加え、ある種のラジカルトラップ剤で、生じたラジカルをトラップして electroparamagnetic resonance (EPR) で解析すると、 $\bullet OH$ が生じていることが確認できる (Jenzer et al., 1987)。またラジ

カルトラップ剤の代わりに plasmid DNA を処理すると、8-oxoG が H_2O_2 濃度の上昇に伴って増加することが確認されている。さらにその plasmid を大腸菌に導入し、細胞内での複製に伴う突然変異を解析することで GC → TA が高頻度で誘発されることも明らかにされている (Akasaka and Yamamoto, 1994; Akasaka and Yamamoto, 1995)。一方細胞レベルの実験では、大腸菌を H_2O_2 処理することで突然変異が誘導することは確認されているものの (Imlay et al., 1988)，細胞内でも同様に、呼吸鎖から生じた O_2^- や H_2O_2 ，添加された H_2O_2 が Harber-Weiss/Fenton 反応を経由して鉄依存的に $\cdot OH$ を生成するか、さらにそれが DNA やヌクレオチドを酸化して突然変異を誘発するかどうかを実際に解析した例はこれまでにない。もしそうして生じた $\cdot OH$ が自然突然変異の原因だとすると、活性酸素の細胞内レベル同様、鉄含有量も自然突然変異に影響を及ぼす可能性がある。前述のような大腸菌の巧みな鉄の取り込み調節機構は、鉄の枯渇を防ぐのみならず、過剰に取り込むことによる DNA 損傷や突然変異を抑制する立場でも重要であるのかもしれない。

2) 活性酸素消去系と鉄過剰取り込み変異による突然変異

そこで著者らは「細胞内で生じる活性酸素と細胞内に取り込まれた鉄が in vitro のような Fenton 反応により $\cdot OH$ を生成するか、そして自然突然変異の原因となるか」あるいは「自然突然変異の抑制に鉄の取り込み調節機構がいかに関わるか」の解明を試みた。まず O_2^- や H_2O_2 の消去系であるスーパーオキサイドディスミュータース (SOD) やカタラーゼの欠損 (それぞれ sodAB 欠損と katEG 欠損) や、前述の鉄取り込みを負に制御している Fur を欠損することによる鉄の過剰取り込みが、自然突然変異頻度の変化に寄与するかどうかをリファンピシン抵抗性への前進変異を指標に調べた (Table 2)。その結果、katEG 欠損株は野生株とほぼ同程度の自然突然変異率を示したのに対し、sodAB 欠損株では 6 倍程度の上昇が観察され、自然突然変異の抑制に関しては SOD の方がより重要な働きをしていることが分かった。一方、鉄の取り込みのリプレッサーである Fur を欠損させた fur 株では野生株とほぼ同様の変異率、また katEG fur 株でも 3 倍程度の変異率の上昇しか見られなかった。しかしながら sodAB 株に Fur 欠損を導入した sodAB fur 株は、野生株の約 140 倍という極めて高い自然突然変異率を示し、SOD と Fur の欠損により相加というよりはむしろ相乗的な変異頻度の上昇が確認された (Nunoshiba et al., 1999)。

そこでこの自然突然変異率の上昇が本当に細胞内への鉄の取り込みに依存するかどうかを、化学分析と遺伝学的手法の 2 つのアプローチにより確認した。化学分析で

Table 2 Spontaneous mutation frequency in *E. coli* strains

Strains	Genotype	Spontaneous mutation freq.	Ratio
GC4468	wild	1.2×10^{-8}	1
QC1726	sodA sodB	7.0×10^{-8}	5.84
QC1732	fur	2.0×10^{-8}	1.7
QC1736	sodA sodB fur	1.7×10^{-6}	142
SY5	Wild	2.0×10^{-8}	1
SY54	katG katE	2.1×10^{-8}	1.1
TN52	fur	1.7×10^{-8}	0.9
TN542	katG katE fur	6.4×10^{-8}	3.2

The results represent averages obtained from six independent experiment. Nunoshiba et al., 1999

は、野生株、sodAB 株、sodAB fur 株の細胞中の鉄含有量をプラズマ分光分析により比較した。その結果、鉄の取り込み過剰変異株である sodAB fur 株で、他の 2 株の 2.4 倍の鉄含有量を示した (Nunoshiba et al., 1999)。一方の遺伝学的手法では、Fur の支配下にあり、鉄の取り込みの Key タンパク質である TonB の変異体を分離し、その変異の自然突然変異率への影響を比較した。tonB 変異体は、TonB がコリシンの取り込みにも関わることを利用し、コリシン抵抗性を指標に、sodAB fur 株を親株として、独立に 9 クローン分離した (Kitamura et al., 1995)。分離したコリシン抵抗性株の tonB 変異は、シークエンスにより、全てのクローンについて確認された。これらのクローンの自然突然変異率は、 $2 \times 10^{-8} \sim 4 \times 10^{-7}$ の範囲に見られ、親株である sodAB fur 株の 1~25% に減少した (Nunoshiba et al., 1999)。これらの結果は、sodAB fur 株における自然突然変異率上昇が、fur 変異による TonB 依存的な鉄の過剰取り込みが関わることを強く示唆している。以上の結果から、細胞内で起こっていると推測できるモデルを Fig. 4 に示した。すなわち、Fur 欠損により TonB 依存的に取り込まれた Fe(III) が、SOD 欠損により高まった O_2^- によって還元され、Fenton active な Fe(II) になる。この Fe(II) が O_2^- から不均化反応により生じた H_2O_2 と反応して $\cdot OH$ を生成する。あるいは、 O_2^- に非常に高感受性の Fe-S タンパク質が O_2^- によって攻撃を受け、Fenton active な Fe(II) を遊離し、Fenton 反応を促進する。この不活性されたタンパク質は、Fur 欠損により過剰に存在する鉄貯蔵タンパク質から鉄を受け取り再生されることで、この一連の反応が継続的に起こり、 $\cdot OH$ が増産される。その結果として、この $\cdot OH$ が DNA やヌクレオチドに酸化損傷を生じ、突然変異を誘発すると考えられる。

3) 活性酸素消去系と鉄過剰取り込み変異により $\cdot OH$ が生じるか、そして DNA 酸化損傷は？

その機構を明らかにする目的で、それまで不可能とされてきた通常の好気条件下で増殖した細胞内での $\cdot OH$ 生成の測定と、その genomic DNA 中の典型的な DNA 酸

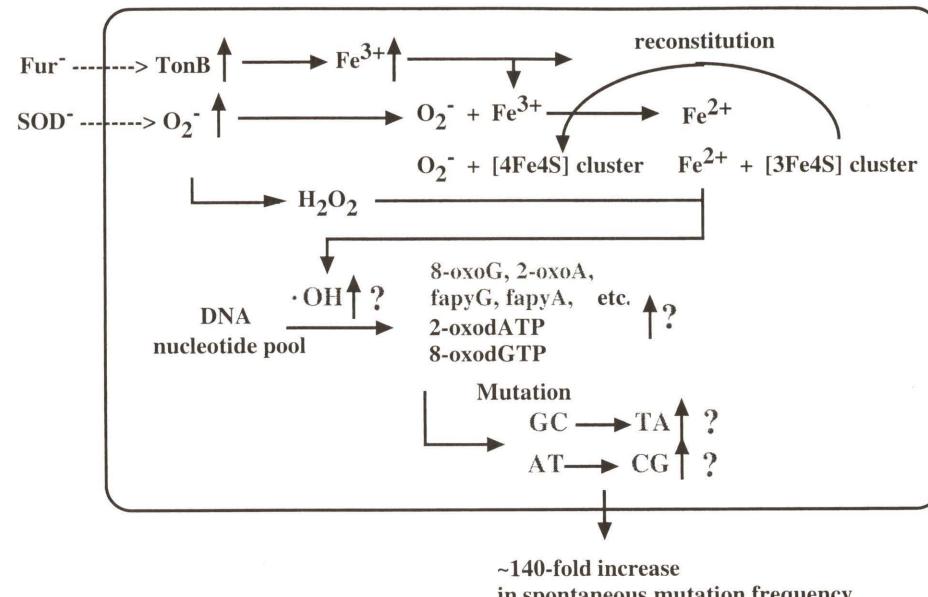


Fig. 4 The model for mutator effect of sodA sodB fur mutations

化損傷の含有量の比較を試みた。

Fenton 反応による $\cdot OH$ の生成は、 H_2O_2 に Fe-EDTA 加えた in vitro のモデル実験で、さまざまなラジカルトラップ剤を用いた Electro Paramagnetic Resonance (EPR) 法により確認されている。しかしながら細胞レベルでの測定は、細胞内という生体分子が複雑にいり乱れた状況での $\cdot OH$ の不安定性から、あるいはトラップ剤の細胞内への拡散の難しさなどのため不可能とされてきた。しかしながら我々は、sodAB fur 株では培養中、継続的に $\cdot OH$ が生成しているものと推測し、もしそうなら $\cdot OH$ ラジカルをエタノールにスカベンジすることで比較的長寿命なアルコキシラジカルに変換し、それをラジカルトラップ剤である 4-POBN にトラップさせれば、その特異的なシグナルを EPR で測定できるのではないかと考えた。その結果、野生株、fur 株、sodAB 株、katEG 株、katEG fur 株ではまったくシグナルは確認されなかったが、sodAB fur 株では、アルコキシラジカルをトラップした 4-POBN の特異的なシグナルが検出することができ、通常培養条件での細胞レベルでの $\cdot OH$ 生成の証明にはじめて成功した (Nunoshiba et al., 1999) (Fig. 5)。

つぎに、こうして生じた $\cdot OH$ が DNA 損傷を引き起こすかどうかを明らかにするため、GC/MS により、典型的な DNA 酸化損傷である 8-oxoG, fapyG, 2-oxoA, fapyA を、さらに活性酸素とは無縁といわれている塩基損傷のキサンチンの DNA 中の含有量を測定した。一般に DNA 中の 8-oxoG の絶対量の測定は、HPLC-EC detector による検出が最も正確であるといわれているが、我々の目的が絶対量の測定ではなく、野生株、sodAB 株、sodAB fur 株間の相対比較であることから、HPLC よりも

しろ他の酸化損傷もあわせて検出できる GC/MS を採用した。その結果、sodAB fur 株由来の DNA 中には、野生株や sodAB 株の 2~5 倍量の酸化損傷が認められた一方で、キサンチンの DNA 中含有量には、株間で明瞭な差は認められなかった (Nunoshiba et al., 1999) (Fig. 6)。

これらの生化学的な測定結果は、いずれも通常の条件下で培養された細胞内でも、SOD 欠損と鉄の過剰取り込み変異により、 $\cdot OH$ が生じ、それに由来して DNA の酸化損傷が生じたことを強く示唆し、前述の自然突然変異の著しい上昇の原因として注目できる。また逆に、SOD や Fur による細胞内の O_2^- レベルや鉄含有量の調整は、自然突然変異の抑制に極めて重要な働きをしているといえる。

4) sodAB fur 変異はいかなるタイプの突然変異を引き起こすか？

数ある DNA の酸化損傷のうち、突然変異性の損傷としても最も広く受け入れられているのは、8-oxoG と 2-oxoA である。sodAB fur 株において、DNA 中の 8-oxoG と 2-oxoA の含有量の増加が確認された。これらの損傷は、DNA が活性酸素に暴露されて生じる場合と DNA の原料であるヌクレオチドが酸化され、それが DNA 複製に伴って取り込まれて生じる場合がある。これらの損傷が、GC → TA や AT → CG を誘発することは、in vitro, in vivo の実験で証明されている (Michaels and Miller, 1992; Kamiya and Kasai, 1997; Inoue et al., 1998; Watanabe et al., 2001a)。これまで我々は、標的遺伝子大腸菌 supF 上に生じる突然変異を塩基レベルで解析する方法を樹立し、さまざまな DNA 修復欠損株にみられる突然変異スペクトルの解析を行ってきた (Obata et al.

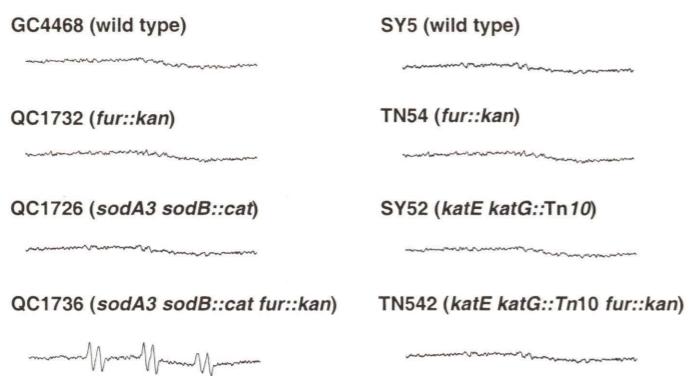


Fig. 5 •OH radical generation in *E. coli* strains aerobically grown in normal growth medium. *E. coli* strains were inoculated into LB containing 70 units/ml catalase, 10 mM 4-POBN, and 170 mM ethanol and aerobically grown at 37 °C for 17 hr. Spin-trapping spectrum was detected at room temperature with an EPR (JEOL model JES-TE100) operating the following instrument settings: modulation frequency, 100 kHz; microwave power, 16 mW; sweep width, 5 mT; modulation amplitude, 0.05 mT; receiver gain, 1 × 1000; time constant, 1 min; sweep time, 8 min. Nunoshiba et al., 1999

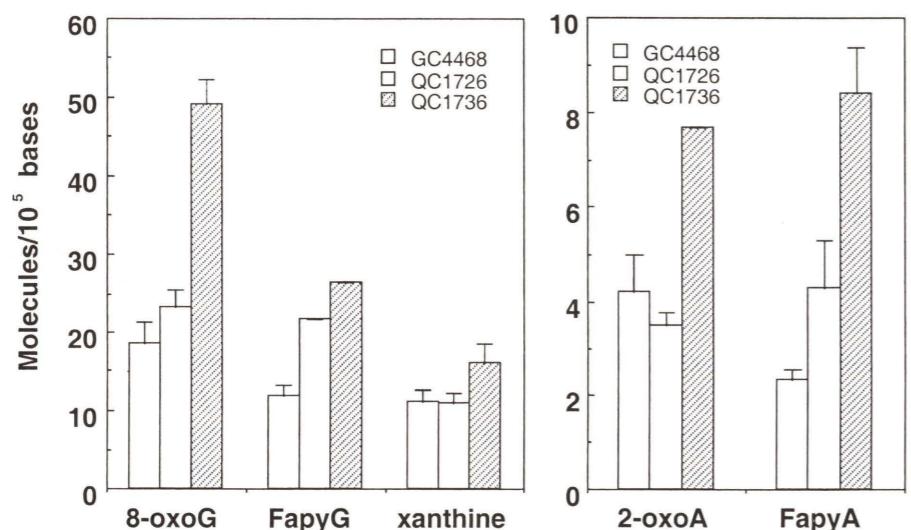


Fig. 6 Yield of modified bases in DNA prepared from overnight growing *E. coli* strains. *E. coli* strains aerobically grown overnight were washed twice with phosphate buffer, and the genomic DNA was prepared with DNA Extractor WB Kit. A portion of the DNA sample was used for estimation of DNA/RNA ratio with HPLC. The remaining sample was applied to analyze modified bases by GC/MS-SIM. The concentrations of modified bases in DNA were calculated from the calibration curves obtained from aliquots of the mixture of known concentrations of the modified bases and internal standards. Most of data presented are averages obtained from duplicated measurements with standard deviations. Nunoshiba et al., 1999

1998). そこでこの方法を用い, *sodAB fur* 株でいかなるタイプの変異が生じるかを検討した。その結果、いずれの株でも塩基置換が最も多く出現し、活性酸素によると考えられている GC → TA と AT → CG の変異については、野生株や *sodAB* 株では 20~30% であったのに対し、*sodAB fur* 株では 70% 以上を占めるという著しい違いが見られた (Nunoshiba et al., 1999) (Table 3)。

5) Harber-Weiss/Fenton 反応に関わる遊離鉄はいかに生じるか?

Table 2 に示したように、*sodAB*, *fur* のいずれかの欠損株の自然突然変異頻度はそれぞれ野生株の 6 倍と 3 倍程度であったのに対して、二重変異株のそれは 140 倍以上という予想以上の高い自然突然変異頻度を示した。この synergistic な変異頻度の上昇は、Imlay らにより最近提唱されている Harber-Weiss/Fenton reaction における O₂[·] の役割についての説により説明できるかもしれない

Table 3 Types of base substitution among spontaneous *supF* mutants

Type of base substitution	Number of detected (% of total mutants)		
	GC4468 (wild type)	QC1726 (sodA sodB)	QC1736 (sodA sodB fur)
Transition			
GC → AT	5 (18)	7 (22)	2 (5)
AT → GC	2 (7)	0 (0)	1 (2)
Transversion			
GC → TA	3 (11)	6 (18)	20 (49)
GC → CG	13 (46)	11 (33)	4 (10)
AT → TA	2 (7)	6 (18)	4 (10)
AT → CG	3 (11)	3 (9)	10 (24)
Total	28	33	41
Mutation frequency	1.4×10^{-7}	3.5×10^{-7}	6.8×10^{-7}

Nunoshiba et al., 1999

い。前述したようにこれまで O₂[·] は Fe (III) を Fenton active な Fe (II) に還元するのに働くと考えられてきた。しかしながら細胞内の状況を考えると、細胞内にはグルタチオンなどのチオール化合物や NADH などといった Fe (III) の還元剤が存在し、しかもその濃度はそれぞれ 10⁻³ M, 10⁻⁴ M で、仮に SOD の欠損により O₂[·] の細胞内濃度が通常の濃度と推定されている 10⁻¹⁰ M を数オーダー上回ったとしても遙かに高濃度で存在する。一方、遷移金属を活性部位にもつ酵素は O₂[·] に極めて高感受性であることが知られている (Stadtman, 1993)。中でも 4 つのシステイン残基の thiol が 4 分子の鉄イオンを抱える [4Fe-4S] タイプの鉄-イオウ (Fe-S) クラスターを含有する酵素は、O₂[·] の標的となりやすく、O₂[·] の攻撃により [3Fe-4S] となり不活性化される。α, β-dihydroxy acid dehydratase や 6-phosphogluconate dehydratase, fumarase, そして aconitase などがその代表で、in vitro での実験結果だけでなく、SOD 欠損大腸菌でこれらの酵素活性が低下していることも報告されている (Gardner and Fridovich, 1991a, 1991b and 1992; Flint et al., 1993)。これらの酵素の不活性化は、単に酵素活性を失活させるにとどまらず、Fe (II) を細胞質に遊離する。こうして遊離された Fe (II) が Fenton 反応を促進するというものである (Keyer and Imlay, 1996; Liochev and Fridovich, 1994)。さらに鉄を遊離して [3Fe-4S] となつた酵素は、ferritin などの鉄貯蔵タンパク質から鉄を受け取り、再構成されることが知られている。したがって、SOD と Fur の欠損により O₂[·] と鉄レベルの高まった細胞内では、O₂[·] が [4Fe-4S] を攻撃して Fe (II) を遊離し、その [3Fe-4S] の再構成を過剰量の鉄貯蔵タンパク質が行うというある種の Fe (II) 生産サイクルが生じていると考えると、この synergistic な変異頻度の上昇を理解できる (Fig. 7)。Imlay らは 6-phosphogluconate dehydratase をプラスミドで大量発現させた細胞では、細胞内に遊離の Fe (II) が上昇し、過酸化水素に対する感受性が高まる

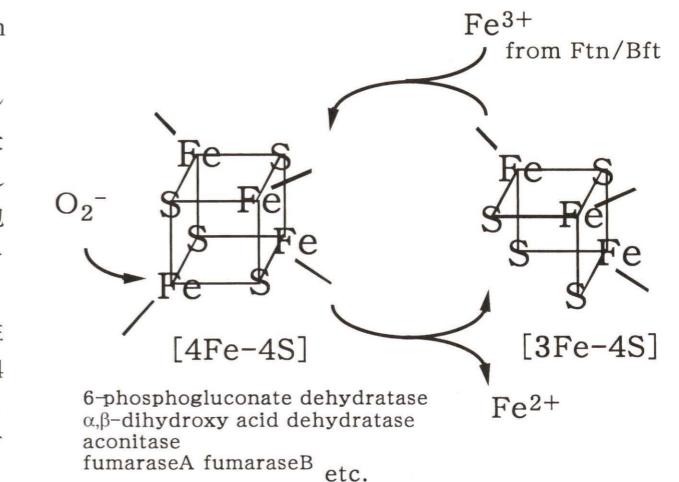


Fig. 7 The circulation of free Fe (II) production through inactivation of [4Fe-4S] cluster by O₂[·] and reconstitution of the cluster by accepting Fe (III) from iron storage protein.

こと、また *sodAB fur* 株ではさらに遊離の Fe (II) 濃度が増加し、それとともに過酸化水素に対する感受性も増大することを報告している (Keyer and Imlay, 1996)。これらの結果は、*sodAB fur* 株における変異頻度の synergistic な上昇を Fe (II) 生産サイクルにより理解しようとする仮説を支持するものであるといえる。

6) SOD 欠損と鉄の過剰取り込み変異により生じた酸化ストレスは、よりスケレオチドを攻撃する？

前述の DNA 酸化損傷の測定結果から、DNA 鎮中に突然変異性の 8-oxoG や 2-oxoA の存在が確認された。これらの損傷の生成は 1) DNA の直接酸化による経路、2) 酸化されたスケレオチドの複製に伴う取り込みによる経路の 2 通りが考えられる。8-oxoG については *supF* における *mutM mutY* 二重変異株、*mutT* 株の自然突然変異スペクトルの解析により、前者の経路で生じた場合は、全塩基置換変異のうち 70% 程度が GC → TA、後者の場合は、

90 %が AT → CG であることが確認されている (Watanabe et al., 2001a). 一方, 2-oxoAについては, 前者の経路ではあまり生じないと報告もあるが, もし生じた場合, AT → CG が生じると予想され, 一方, 後者の経路の 2-oxoATP は, 8-oxoGTP と同程度に生じるといわれ, 大腸菌の *lacI* を標的遺伝子において主に GC → TA を誘発することが確認されている (Kamiya and Kasai, 1997; Inoue et al., 1998). そこで我々は, *sodAB fur* 株で多く認められた GC → TA と AT → CG の変異がいずれの経路によるかを推測しようと, *supF* 塩基配列上の変異のばらつきを, *mutM* *mutY* 二重変異株, *mutT* 株のそれと比較した. その結果, AT → CG の変異の生じた部位は, *mutT* 株で観察された AT → CG の変異生じた部位とほぼ一致した. 一方, *mutM* *mutY* 二重変異株で, GC → TA の変異の生じた部位は 3 カ所のホットスポットとして観察され, いずれも AGA, AGG, GGA という 5'-PuGPu-3' の配列の真ん中の G であった (Watanabe et al., 2001a and b). しかしながら, このホットスポットは *sodAB fur* 株で見られた GC → TA 変異は GGG および GGT の真ん中の G に高頻度で生じる傾向が観察され, ホットスポットも大きく異なる傾向が観察された (投稿準備中). これは, 2-oxoATP を取り込ませ, *lacI* を標的として変異を解析された結果に極めて類似している (Inoue et al., 1998). 以上の結果は, SOD 欠損と鉄の過剰取り込み変異により生じた酸化ストレスの標的が, DNA よりスクレオチドである可能性を推察させるものである. 最近, 大腸菌の MutT とヒトの MutT ホモログである hMTH1 の基質特異性が比較され, ともに 8-oxoGTPase の活性, すなわち 8-oxoGTP を 8-oxoGMP とピロリン酸にする活性はあるものの, 2-oxoATP に対しては異なり, hMTH1 のみで 2-oxoATPase 活性が確認された (Fujikawa et al., 1999). そこで今後, 両タンパク質をコードする *mutT* と *hMTH1* 遺伝子をそれぞれ *sodAB fur* 株に導入し, 生じる変異スペクトルの変化などから, GC → TA の変異がどちらに起因するのかを検討しつつある.

結 語

本稿では, 好気, 中性 pH 条件下で, 溶解性の極めて低い必須金属の鉄イオンの枯渇を防ぐため, 微生物がいかに巧みな機構で確保しているか, また, 過剰の取り込みを防いでいるかについて述べた. またそれらの機構が活性酸素に対する防御機構, 特に突然変異抑制の意味でも極めて重要であることを, 著者らの研究結果を紹介することで述べた. 最近, *fur* 遺伝子が, 大腸菌の 2 つの活性酸素に対する防御応答である SoxRS および OxyR 応答により調節されていることが報告された. このことからも, 鉄の輸送システムが活性酸素に対する防御機構としての側面をもつことは明らかであろう.

鉄や銅をはじめとする Fenton 反応に関わる金属の両刃の刃としての効果は, 微生物に限ったことではなく, 我々ヒトを含む哺乳類でも同様であると考えられる. 例えば, 家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) と Cu/Zn-SOD 変異の因果関係の例からもそのことが伺える. すなわち, FALS の一部の患者の Cu/Zn-SOD をコードする *SOD1* 遺伝子に変異が観察されるというのである. このことは変異 SOD の活性が正常より低下していることが FALS の原因であると予想できるが, 実際にはその活性は必ずしも低くはなく, むしろ, その異常なタンパク質構造のため Cu の結合が不安定であることが重要だと考えられている. すなわち, その不安定さ故に Cu²⁺ が遊離し, Fenton 反応を触媒することで •OH の生成を促進するため, 酸化障害が生じるという. この件についてはまだ不明な点も多く, 一概に FALS の原因は SOD の変異であるとはいえない. しかしながら, 本稿で紹介した細胞内の遊離金属と活性酸素障害あるいは突然変異誘発機構との関係は多くの好気性生物に類似しているものと思われる.

謝 辞

本総説の後半部に紹介させていただきました *sodAB fur* 株における自然突然変異に関する研究の一部, 細胞内での •OH の生成の測定は三重大学医学部の川西正祐教授と及川伸二博士との共同研究, また GC-MS による DNA の酸化損傷の定量は大阪府立大学先端科学研究所の森 利明博士との共同研究によるものです. その先生方の多大なるご協力に心から感謝いたします. その他の突然変異の遺伝学的解析には, 東北大学大学院理学研究科生物学専攻(現 生命科学研究科分子生命科学専攻)山本和生教授, 小幡史子博士(現 岩手医科大学)の協力を得ました. あわせて心から感謝いたします. また本総説は, 公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」での講演内容として書かせていただきましたが, 同時に平成 12 年度の研究奨励賞の受賞講演内容の一部であることも, ここに加筆させていただきます. これらの研究の一部は, 日本学術振興会科学研究費補助金により行われたものである.

参考文献

- Akasaki, S. and K. Yamamoto (1994) Hydrogen peroxide induces G : C to T : A and G : C to C : G transversions in the *supF* gene of *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.*, 243, 500-505.
- Akasaki, S. and K. Yamamoto (1995) Mutational specificity of the ferrous ion in a *supF* gene of *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 213, 74-80.
- Andrews, S.C., P.M. Harrison and J.R. Guest (1989) Cloning, sequencing, and mapping of the bacterioferritin (*bfr*) of *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, 171, 3940-3947.
- Babior, B.M. (1992) The respiratory burst oxidase, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 65, 49-95.
- Bagg, A. and J.B. Neilands (1987a) Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation, *Microbiol. Rev.*, 51, 509-518.
- Bagg, A. and J.B. Neilands (1987b) Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 26, 5471-5477.
- Bindereif, A. and J.B. Neilands (1985) Promoter mapping and transcriptional regulation of the iron assimilation system of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, 162, 1039-1046.
- Brown, K. and I. Fridovich (1981) DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals, *Arch. Biochem. Biophys.*, 206, 414-419.
- Calderwood, S.B. and J.J. Mekalanos (1988) Confirmation of the Fur operator site by insertion of a synthetic oligonucleotide into an operon fusion plasmid, *J. Bacteriol.*, 170, 1015-1017.
- Cunningham, R.P. and B. Weiss (1985) Endonuclease III (*nth*) mutants of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 474-478.
- de Lorenzo, V., A. Bindereif, B.H. Paw and J.B. Neilands (1986) Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, 165, 570-578.
- de Lorenzo, V., S. Wee, M. Herrero and J.B. Neilands (1987) Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor, *J. Bacteriol.*, 169, 2624-2630.
- Demple, B. and L. Harrison (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology, *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 915-948.
- Escolar, L., J. Perez-Martin and V. de Lorenzo (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein, *J. Bacteriol.*, 181, 6223-6229.
- Farr, S.B. and T. Kogoma (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Microbiol. Rev.*, 55, 561-585.
- Fecker, L. and V. Braun (1983) Cloning and expression of the *fhu* genes involved in iron (III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 156, 1301-1314.
- Fee, J.A. (1991) Regulation of *sod* genes in *Escherichia coli*: relevance to superoxide dismutase function, *Mol. Microbiol.*, 5, 2599-2610.
- Fischer, E., K. Gunter and V. Braun (1989) Involvement of *ExbB* and *TonB* in transport across the outer membrane of *Escherichia coli*: phenotypic complementation of *exb* mutants by overexpressed *tonB* and physical stabilization of *TonB* by *ExbB*, *J. Bacteriol.*, 171, 5127-5134.
- Flint, D.H., J.F. Tuminello and M.H. Emptage (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide, *J. Biol. Chem.*, 268, 22369-22376.
- Foster, J.W. and H.K. Hall (1992) Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis, *J. Bacteriol.*, 174, 4317-4323.
- Frost, G.E. and H. Rosenberg (1973) The inducible citrate-dependent iron transport system in *Escherichia coli* K12, *Biochim. Biophys. Acta*, 330, 90-101.
- Fujikawa, K., H. Kamiya, H. Yakushiji, Y. Fujii, Y. Nakabeppu and H. Kasai (1999) The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein, *J. Biol. Chem.*, 274, 18201-18205.
- Gardner, P.R. and I. Fridovich (1991a) Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase, *J. Biol. Chem.*, 266, 1478-1483.
- Gardner, P.R. and I. Fridovich (1991b) Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase, *J. Biol. Chem.*, 266, 19328-19333.
- Gardner, P.R. and I. Fridovich (1992) Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical, *J. Biol. Chem.*, 267, 8757-8763.
- Griggs, D.W. and J. Konisky (1989) Mechanism for iron-regulated transcription of the *Escherichia coli* *cir* gene: metal-dependent binding of Fur protein to the promoters, *J. Bacteriol.*, 171, 1048-1052.
- Hall, H.K. and J.W. Foster (1996) The role of *fur* in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition, *J. Bacteriol.*, 178, 5683-5691.
- Hancock, R.E., K. Hantke and V. Braun (1976) Iron transport of *Escherichia coli* K-12: involvement of the colicin B receptor and of a citrate-inducible protein, *J. Bacteriol.*, 127, 1370-1375.
- Hantke, K. (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: Isolation of a constitutive mutant, *Mol. Gen. Genet.*, 182, 288-292.
- Hantke, K. (1982) Negative control of iron uptake systems in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 15, 83-86.
- Hantke, K. (1984) Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in *Escherichia coli* K12, *Mol. Gen. Genet.*, 197, 337-341.
- Hantke, K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria, *Curr. Opin. Microbiol.*, 4, 172-177.
- Harle, C., I. Kim, A. Angerer and V. Braun (1995) Signal transfer through three compartments: transcription initiation of the *Escherichia coli* ferric citrate transport system from the cell surface, *EMBO J.*, 14, 1430-1438.
- Heller, K.J., R.J. Kadner and K. Gunther (1988) Suppression of the *btuB451* mutation by mutations in the *tonB* gene suggests a direct interaction between TonB and TonB-dependent receptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*, *Gene*, 64, 147-153.
- Hussein, S., K. Hantke and V. Braun (1981) Citrate-dependent iron transport system in *Escherichia coli* K-12, *Eur. J. Biochem.*, 117, 431-437.
- Imlay, J.A., S.M. Chin and S. Linn (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro, *Science*, 240, 640-642.
- Imlay, J.A. and S. Linn (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity, *Science*, 240, 1302-1309.
- Inoue, M., H. Kamiya, K. Fujikawa, Y. Ootsuyama, N. Murata-Kamiya, T. Osaki, K. Yasumoto and H. Kasai (1998) Induction of chromosomal gene mutations in *Escherichia coli* by direct incorporation of oxidatively damaged nucleotides. New evaluation method for mutagenesis by damaged DNA precursors in vivo, *J. Biol. Chem.*, 273, 11069-11074.
- Izuhara, M., K. Takamune and R. Takata (1991) Cloning and sequencing of an *Escherichia coli* K12 gene which encodes a polypeptide having similarity to the human ferritin H subunit, *Mol. Gen. Genet.*, 225, 510-513.
- Jenzer, H., H. Kohler and C. Broger (1987) The role of hydroxyl radicals in irreversible inactivation of lactoperoxidase by excess H₂O₂. A spin-trapping/ESR and absorption spectroscopy study, *Arch. Biochem. Biophys.*, 258, 381-390.
- Jiang, D., Z. Hatahet, J.O. Blaisdell, R.J. Melamede and S.S. Wallace (1997) *Escherichia coli* endonuclease VIII: cloning, sequencing, and overexpression of the *nei* structural gene and characterization of *nei* and *nei nth* mutants, *J. Bacteriol.*, 179, 3773-3782.
- Kamiya, H. and H. Kasai (1995) Formation of 2-hydroxy-

- deoxyadenosine triphosphate, an oxidatively damaged nucleotide, and its incorporation by DNA polymerases. Steady-state kinetics of the incorporation, *J. Biol. Chem.*, 270, 19446-19450.
- Kamiya, H. and H. Kasai (1997) Mutations induced by 2-hydroxyadenine on a shuttle vector during leading and lagging strand syntheses in mammalian cells, *Biochemistry*, 36, 11125-11130.
- Keyer, K. and J.A. Imlay (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 13635-13640.
- Kitamura, K., Y. Torii, C. Matsuoka and K. Yamamoto (1995) DNA sequence changes in mutations in the *tonB* gene on the chromosome of *Escherichia coli* K12: insertion elements dominate the spontaneous spectra, *Jpn. J. Genet.*, 70, 35-46.
- Liochev, S.I. and I. Fridovich (1994) The role of O_2^- in the production of $HO\cdot$ in vitro and in vivo, *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 29-33.
- Maki, H. and M. Sekiguchi (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis, *Nature*, 355, 273-275.
- Melamede, R.J., Z. Hatahet, Y.W. Kow, H. Ide and S.S. Wallace (1994) Isolation and characterization of endonuclease VIII from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 33, 1255-1264.
- Michaels, M.L. and J.H. Miller (1992) The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine), *J. Bacteriol.*, 174, 6321-6325.
- Niederhoffer, E.C., C.M. Naranjo, K.L. Bradley and J.A. Fee (1990) Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus, *J. Bacteriol.*, 172, 1930-1938.
- Nunoshiba, T., F. Obata, A.C. Boss, S. Oikawa, T. Mori, S. Kawanishi and K. Yamamoto (1999) Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 274, 34832-34837.
- Obata, F., T. Nunoshiba, T. Hashimoto-Gotoh and K. Yamamoto (1998) An improved system for selection of forward mutations in an *Escherichia coli* *supF* gene carried by plasmids, *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, 39, 263-270.
- Postle, K. (1990) Aerobic regulation of the *Escherichia coli* *tonB* gene by changes in iron availability and the *fur* locus, *J. Bacteriol.*, 172, 2287-2293.
- Pressler, U., H. Staudenmaier, L. Zimmermann and V. Braun (1988) Genetics of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 170, 2716-2724.
- Saito, Y., F. Uraki, S. Nakajima, A. Asaeda, K. Ono, K. Kubo and K. Yamamoto (1997) Characterization of endonuclease III (*nth*) and endonuclease VIII (*nei*) mutants of *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, 179, 3783-3785.
- Schaffer, S., K. Hantke and V. Braun (1985) Nucleotide sequence of the iron regulatory gene *fur*, *Mol. Gen. Genet.*, 200, 110-113.
- Stadtman, E.R. (1993) Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions, *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 797-821.
- Staudenmaier, H., B. Van Hove, Z. Yaraghi and V. Braun (1989) Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron (III) dicitrate in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 171, 2626-2633.
- van Hove, B., H. Staudenmaier and V. Braun (1990) Novel two-component transmembrane transcription control: regulation of iron dicitrate transport in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, 172, 6749-6758.
- Wagegg, W. and V. Braun (1981) Ferric citrate transport in *Escherichia coli* requires outer membrane receptor protein *fecA*, *J. Bacteriol.*, 145, 156-163.
- Watanabe, T., G. van Geldorp, T. Najrana, E. Yamamura, T. Nunoshiba and K. Yamamoto (2001a) Misincorporation of 8-oxo-guanine during leading and lagging strand synthesis in *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.*, 264, 836-841.
- Watanabe, T., T. Nunoshiba, M. Kawata and K. Yamamoto (2001b) An in vivo approach to identifying sequence context of 8-oxoguanine mutagenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 284, 179-184.
- Wee, S., J.B. Neilands, M.L. Bittner, B.C. Hemming, B.L. Haymore and R. Seetharam (1988) Expression, isolation and properties of Fur (ferric uptake regulation) protein of *Escherichia coli* K-12, *Biol. Met.*, 1, 62-68.
- Wookey, P. and H. Rosenberg (1978) Involvement of inner and outer membrane components in the transport of iron and in colicin B action in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 133, 661-666.
- Yamamoto, K., F. Uraki, S. Yonei and O. Yukawa (1997) Enzymatic repair mechanisms for base modifications induced by oxygen radicals, *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, 38, 1-4.
- Zimmermann, L., K. Hantke and V. Braun (1984) Exogenous induction of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, 159, 271-277.

Environ. Mutagen Res., 23 : 159 - 166 (2001)

ヒトヌクレオチド除去修復機構によって修復されるDNA酸化損傷とその生物学的意義

倉岡 功*

大阪大学細胞生体工学センター 〒567-0871 吹田市山田丘1-3

Correction of oxygen free-radical induced 5',8 purine cyclodeoxynucleosides by the nucleotide excision-repair pathway in human cells

Isao Kuraoka

Institute of Molecular and Cellular Biology, Osaka University,
1-3 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Summary

Exposure of cellular DNA to reactive oxygen species generates several classes of base lesions, many of which are removed by the base excision-repair pathway. However, the lesions include purine cyclodeoxynucleoside formation by intramolecular cross-linking between the C-8 position of adenine or guanine and the 5' position of 2-deoxyribose. This distorting form of DNA damage, in which the purine is attached by two covalent bonds to the sugar-phosphate backbone, occurs as distinct diastereoisomers (*R* and *S*). It was observed here that both diastereoisomers block primer extension by mammalian and microbial replicative DNA polymerases, using DNA with a site-specific purine cyclodeoxynucleoside residue as template, and consequently appear to be cytotoxic lesions. The two forms of purine cyclodeoxynucleoside also interfered with digestion by 3'-5' exonuclease. Plasmid DNA containing either the 5'*R* or 5'*S* form of 5',8 cyclo-2-deoxyadenosine was a substrate for the human nucleotide excision-repair enzyme complex. The *R* isomer was more efficiently repaired than the *S* isomer. No correction of the lesion by direct damage reversal or base excision-repair was detected. Dual incision around the lesion was dependent on the core nucleotide excision-repair protein XPA. In contrast to several other types of oxidative DNA damage, purine cyclodeoxynucleosides are chemically stable and would be expected to accumulate at a slow rate over many years in the DNA of non-regenerating cells from xeroderma pigmentosum patients. High levels of this form of DNA damage may help explain the progressive neurodegeneration seen in XPA individuals.

Keywords : cyclopurine deoxynucleosides, nucleotide excision repair, xeroderma pigmentosum, neurodegeneration

緒 言

正確に情報伝達を行うためには、情報それ自身が正確に維持されていかなくてはならない。特に遺伝情報伝達においては、その情報を失うことは、生命の維持のみならず種の維持にも影響を及ぼす。しかし、この遺伝情報を

* ikuraoka@imcb.osaka-u.ac.jp

受付：2001年9月18日 受理：2001年9月18日

©日本環境変異原学会

担うDNAは、環境中あるいは生体内に存在する多くのDNA損傷物質により傷を受けやすい。したがって、生命が遺伝情報の維持を行う上で、このDNAの損傷を修復することは重要であるといえる。

ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair : NER) 機構と塩基除去修復 (base excision repair : BER) 機構は生体内で生じたDNA損傷を除去する典型的な2つの修復系である。NER機構は紫外線照射やシスプラチンなどの薬剤処理によって生じる大きなDNA損傷を

本稿は日本環境変異原学会第12回公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」で発表された。
This paper was presented at the 12th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 26th, 2001. The symposium entitled "Molecular Pathogenesis for Oxidative Stress", was organized by Tatsuo Nunoshiba and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

含んだ25-30 merのオリゴスクレオチドとして除去することができるのに対し, BER機構は電離放射線照射やアルキル化剤などの薬剤処理により生じる小さなDNA損傷を塩基損傷を含むグリコシド結合を切断することで取り除くことができる。つまり, 生物は, 大きなDNA損傷をスクレオチド単位で修復するNER機構と小さなDNA損傷を塩基単位で修復するBER機構とを有している。

一般に生体内で生じた活性酸素は種々多様な経路によってDNAに損傷を与えるが, これらの損傷は多くの場合塩基単位での修復(BER機構)によって効率良く修復されることが知られている。しかし, 一方で, 同じ活性酸素で生じる損傷の中でサイクロプリンという損傷が存在している。我々およびBrooksらはこれらの損傷がヒト細胞内でBER機構ではなくNER機構によって修復されたことを報告した(Kuraoka et al., 2000; Brooks et al., 2000)。

本稿では, その知見をふまえ, ヒトスクレオチド除去修復機構によって修復されるサイクロプリン酸化損傷より考えられる一つの仮説を提示する。

1. 色素性乾皮症 (Xeroderma Pigmentosum: XP)

XPは, 日光過敏症, 皮膚癌高頻度発生, 精神神経症合併を臨床的特徴とする, ヒトの常染色体劣性遺伝疾患である(Cleaver and Kraemer, 1995; Robbins, 1989)。この患者は, 健常人と比較して, 日光過敏症を示すこと

に対応して, 患者細胞由来の細胞は紫外線に対して高感受性を示す。それは, この細胞が紫外線照射によるDNA損傷を修復するスクレオチド除去修復機構に異常をもつからである。そのことから, 皮膚高頻度発癌は, 紫外線露光部に修復されなかった損傷が残されることによって突然変異を誘発し, 発癌を導くと説明されている。しかし, XP患者(NERの欠落)における紫外線照射が症状のすべてを解決したわけではなかった。XP患者に特有に起こる精神神経症に対する整合的な説明が依然として欠落していたからである。なぜなら, 精神神経症を引き起こす神経細胞の脱落は, 脳内に起こっているにもかかわらず日光光線中の紫外線は体内を通過して, 脳内のDNAに損傷を与えることがないからである。

そこで放射線および活性酸素によるDNA障害がXP患者の生体内に生じていることが示唆されていた(Satoh et al., 1993; Reardon et al., 1997)。生化学的手法を用いて, 活性酸素により生じるDNA損傷であり, かつNER機構によって修復されるものを検討された。これに該当するものとして, 事実, thymine glycolなどの損傷は確かにNER機構によって修復される。しかし, これらの損傷は同時にBER機構によっても修復できることがわかつており, 生体内に蓄積することは考えられにくい。

つまり, BER機構によって修復されない損傷を検索する必要があるのであった。

我々は, この仮定に基づいて, 活性酸素により生じるDNA損傷であり, BER機構で修復されず, かつNER機構によってのみ修復されるものとして, サイクロプリン損傷を候補として以下の実験を行った。

2. サイクロプリン損傷

DNAは, リン酸ジエチル結合により糖:デオキリボースと塩基(A:アデニン, C:シトシン, G:グアニン, T:チミン)からなる直鎖状高分子であるが, 活性酸素(ヒドロキシラジカル)はこのどちらにも損傷を引き起こす。デオキシリボースの酸化は, デオキシリボース環の開裂, 塩基の欠失およびDNA鎖の切断を生じる。一方, 塩基の酸化は, 4つの塩基に各々に構造特有の損傷を生じさせ, 一般的には30以上もの酸化塩基とその誘導体が同定されている(Dizdaroglu, 1992)。その中の, 例えば誤塩基対を形成する8-oxoguanine(8-oxo), また複製阻害を引き起こすとされるFapyGuanineおよびthymine glycolなどはよく知られた酸化塩基損傷である。これらの損傷は, 直接塩基が酸化されたり塩基が開環することによってその構造が変化しているものだが, これは別に塩基(アデニンもしくはグアニン)とデオキシリボースの間で共有結合でクロスリンクされ, 環状構造を構成するサイクロプリン損傷(Dizdaroglu et al., 1987; Schroder et al., 1995)というものが存在する(Fig. 1)。

この損傷はヒト細胞中でマススペクトロメトリーによって検出されており, さらに放射線照射によって生じる活性酸素によってその濃度が高くなることがわかっている。さらに, この損傷はRおよびS形の光学異性体をもち, 一本鎖DNA上ではR形がより多く生じるが, 2本鎖DNA上ではどちらの異性体も同量生じること, また, サイクロプリン損傷を受けているアデニンはグアニンよりも化学的に安定して多く存在していることが報告されている。

今まで, このサイクロプリン損傷に関するDNA修復の研究は, この損傷を作成することが困難であったことから進められていなかったが, 共同研究者らがこのサイクロプリン損傷(RおよびS形)を含んだオリゴスクレオチドを化学合成することに成功したことによって, この損傷に対する研究が進められた。

この損傷においてまずRおよびS形の光学異性体による違いがあるのかどうかをT4 DNA polymeraseのNuclease活性によって調べた。一般的にはDNAに大きく歪みを与える損傷はこのNuclease活性に抵抗性があることが知られている。Fig. 2で示すように損傷のないDNA基質はNuclease活性で分解されてしまうが, 損傷を含むDNA基質は抵抗性がありかつS形がR形よりも

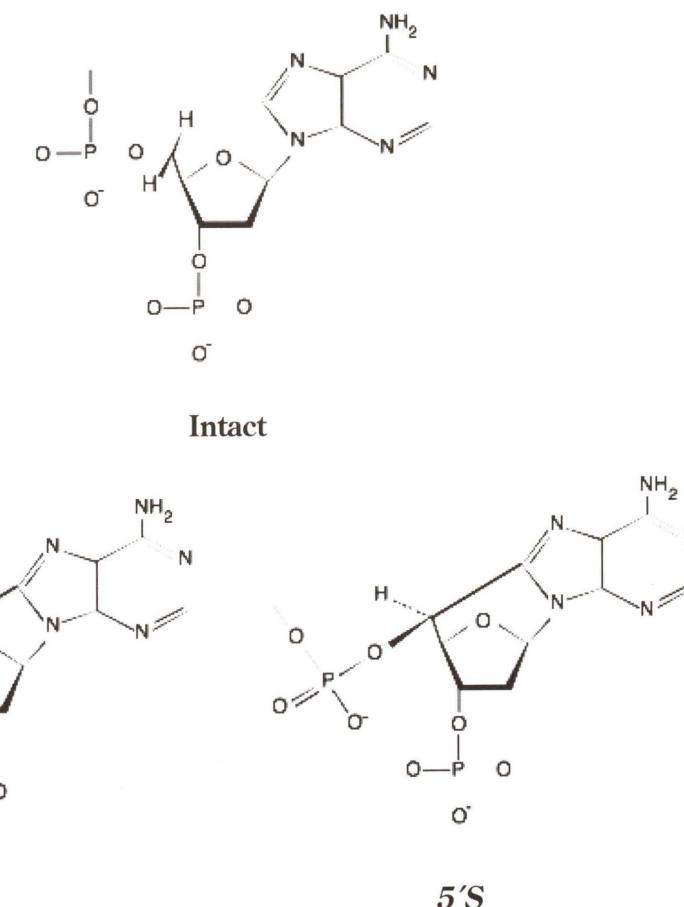


Fig. 1 The 5'R and 5'S diastereoisomers of 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine in DNA damaged by hydroxyl radicals

より抵抗性であるのがわかる。このことは2つの可能性を示唆している。つまりサイクロプリンのS形がR形よりも取り除かれにくいうことと, この各々の異性体が生体に与える影響がそれぞれ異なるということである。

さて, これらの損傷の生物学的影響を細胞学的に観察することは困難であるが, (細胞内でこのサイクロプリン損傷のみを生産することができないため,)これらの化学合成されたサイクロプリン損傷を部位特異的をもつM13 DNAを基質として使い, バクテリアおよびヒトのポリメラーゼのDNA伸長反応が行われるかどうかを調べた。損傷のない基質では, ポリメラーゼのDNA伸長反応は錆型が存在するところまで進んでいる。しかし, 損傷を有するDNA基質はどちらの光学異性体においても阻害される。これらのことから, 少なくともこの損傷は一般的な複製反応を阻害し, 細胞内で致死に働くことが推測されている(Fig. 3)。また, 複製反応のみならず転写反応も同様に阻害することがBrooksらによって報告されている(Brooks et al., 2000)。

3. NER 機構と BER 機構

生体内においてこのサイクロプリン損傷が活性酸素に

より生じ, 細胞致死性を示すことから, 生物は生存のためにこの損傷を取り除くことが何らかの形で必要になるはずである。このサイクロプリン損傷はどのように修復されるのであろうか? 修復機構としては2つの典型的なNER機構とBER機構というものがまずあげられる。簡単にそれらの概略を述べる。

NER機構は1) DNA損傷の認識, 2) 損傷周辺の構造変化, 3) 損傷の5'側と3'側のDNA 1本鎖切断, 4) 切断より生じた損傷を含んだオリゴスクレオチド(25-30mer)の切り出し, 5) 新しいDNA鎖の合成および連結からなる多段階な過程を経る。この過程においてヒト細胞では少なくとも30以上の蛋白質複合体を必要とする。ヒトにおけるNER機構の重要性は, NER機構に異常をもつヒトの常染色体劣性遺伝疾患の色素性乾皮症の患者が, 精神神経症状を呈し, 紫外線に対し高感受性で, 皮膚癌を多発するということから容易に理解できる。XPにはAからG群の7群およびバリエントとに分類されているが, NER機構に関してはAからG群の原因遺伝子産物が先に述べた1)から4)までの初期過程に働いている。

BER機構も, 基本的には損傷塩基を切り出す損傷特異的なグリコシラーゼが作用することで修復がなされる

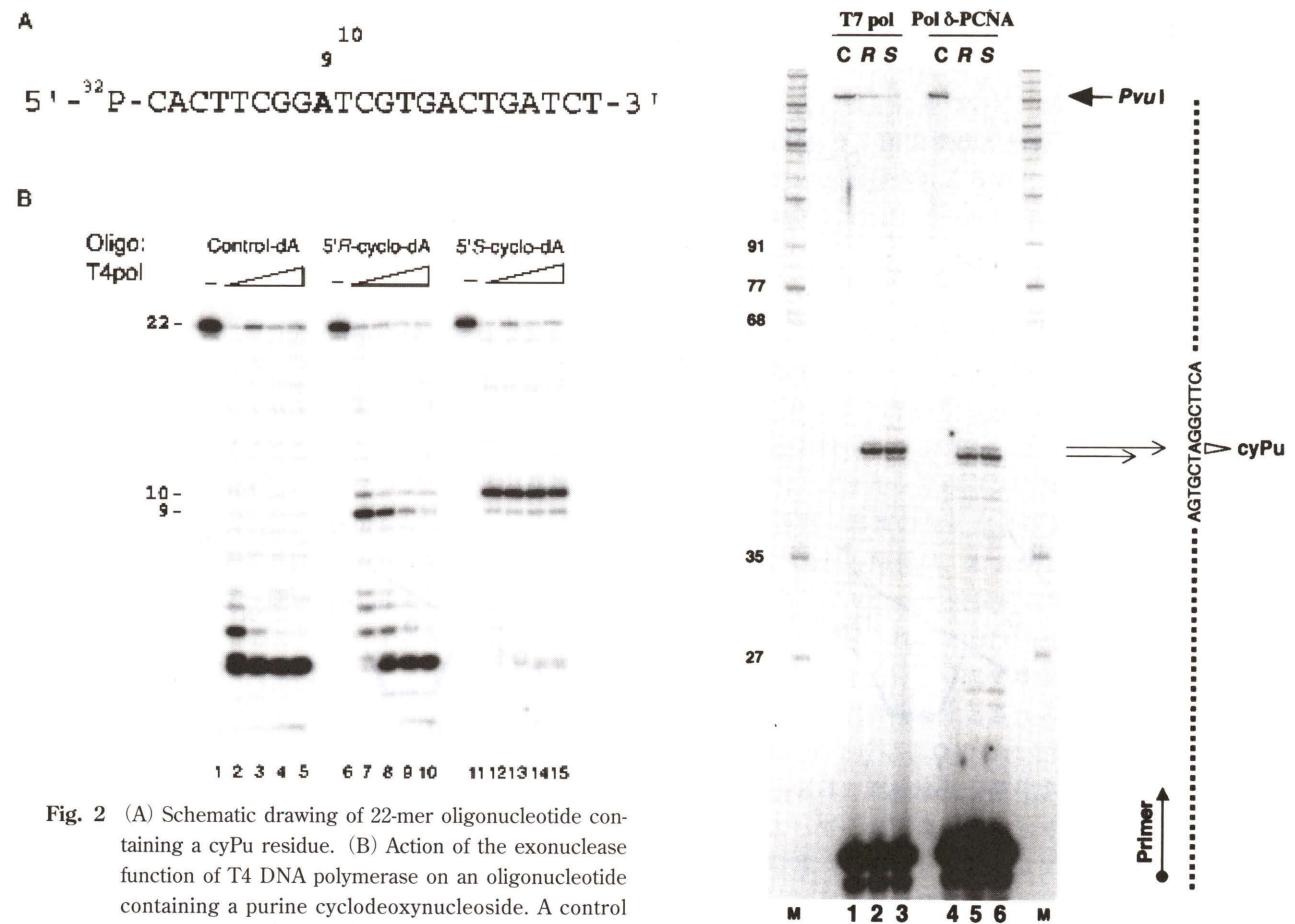


Fig. 2 (A) Schematic drawing of 22-mer oligonucleotide containing a cyPu residue. (B) Action of the exonuclease function of T4 DNA polymerase on an oligonucleotide containing a purine cyclodeoxyribonucleoside. A control oligonucleotide (lanes 1-5), a 5'R-cyclodeoxyadenosine-containing oligonucleotide (lanes 6-10), or a 5'S-cyclodeoxyadenosine-containing oligonucleotide (lanes 11-15) were digested with increasing amounts of T4 DNA polymerase (0.3, 0.75, 1.5 and 3 units) in the absence of deoxynucleoside triphosphates.

が、典型的な反応として1) 損傷塩基をその構造に特異的なDNA-N-グリコシラーゼが除去し、2) その結果生じたAP部位の5'側をAPエンドスクレアーゼが切断し、3) 残されているデオキシリボースリン酸基が除去され、4) 新しいDNA鎖の合成および連結によって修復が完了する。

NER機構とBER機構とを比較したときに、非常にユニークな点が一つあげられる。それは、BER機構が塩基損傷に対して損傷特異的なグリコシラーゼを幾つももっているのに対して、NER機構は一つの修復酵素群で多種多様なDNA損傷を認識し、修復していることである。例えば、DNA上のシトシンのデアミネーションによって生じるウラシルを取り除くウラシルDNAグリコシラーゼはヒト細胞中に4種類も存在し、その一つがなくなってしまっても、バックアップすることができる。しかし、NER機構は、紫外線で生じたピリミジンダイマーも6-4フォトプロダクトも両方とも修復できるが、NER蛋白質群の一つが欠損しても、その機能は失われてしまう。そして現在のところNERをバックアップする修復機構

Fig. 3 Inhibition of primer extension by T7 DNA polymerase and mammalian DNA polymerase δ by purine cyclodeoxyribonucleosides. Autoradiograph after denaturing 14% polyacrylamide gel electrophoresis showing the inhibition of primer extension by 5'R- and 5'S-cyclodeoxyadenosine. Lanes 1-3, T7 DNA polymerase; Lane 1, control plasmid without cyclo-dA; lane 2, 5'R-cyclo-dA; lane 3, 5'S-cyclo-dA. Lanes 4-6, Pol δ/PCNA. Lane 4, control without cyclo-dA; lane 5, 5'R-cyclo-dA; lane 6, 5'S-cyclo-dA. M, size markers ($3^{\text{-32}}\text{P}$ labelled MspI digest of pBR322).

は確認されてはいない。

4. 塩基除去修復もしくは損傷回復酵素によって修復されるか？

一般的には、活性酸素によって生じた損傷はBER機構によって取り除かれることが知られている。このサイクロプリン損傷も活性酸素で生じる損傷であるから、まず、我々はサイクロプリン損傷がBER機構によって除去されるかをグリコシダーゼの活性を指標に調べた。化学合成によりRおよびS形のサイクロプリンアデニンを含んだ放射ラベルされたオリゴスクレオチド基質をヒト細胞抽出液と反応させた後、もし抽出液中にこの損傷特異的なグリコシダーゼが存在すれば、グリコシダーゼによって塩基が除去された後に生じるAP部位のDNA鎖がピ

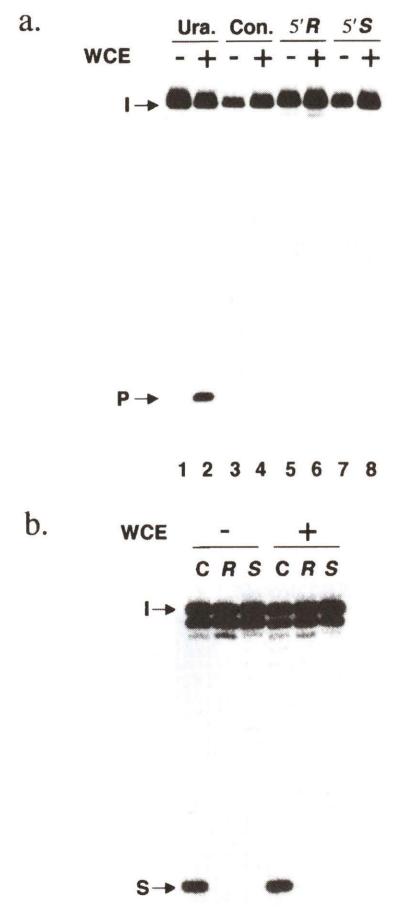


Fig. 4 Search for a DNA glycosylase or lesion reversal enzyme acting on cyclopurine deoxynucleosides
(a) DNA glycosylase assay. Lanes 1 and 2, duplex oligonucleotide containing a uracil instead of cyPu at the same position; Lanes 3 and 4, control oligonucleotide without any lesion; Lanes 5 and 6, 5'R-cyclodeoxyadenosine-containing oligonucleotide; Lanes 7 and 8, 5'S-cyclodeoxyadenosine-containing oligonucleotide. These oligonucleotides were incubated with (Lanes 2, 4, 6 and 8) or without (Lanes 1, 3, 5 and 7) HeLa whole cell extract (WCE). The arrows mark the positions of intact oligonucleotide (I), and product (P) after DNA glycosylase action followed by piperidine treatment.
(b) Lesion reversal assay. Lanes 1 and 4, control oligonucleotide without any lesion; Lanes 2 and 5, 5'R-cyclodeoxyadenosine-containing oligonucleotide; Lanes 3 and 6, 5'S-cyclodeoxyadenosine-containing oligonucleotide. The duplex oligonucleotides were incubated with (Lanes 4-6) or without (Lanes 1-3) HeLa cell extract and then digested with Sau3AI . The arrows mark the positions of intact oligonucleotide (I), and product of Sau3AI cleavage (S).

ペリジン存在下で切断されるはずである。
まず、ポジティブコントロールとして、ウラシル基を含むオリゴスクレオチド基質（ウラシルグリコシダーゼで修復されることが知られている基質）は細胞抽出液中のグリコシダーゼによって切断されていた（Fig. 4a レーン2）。RおよびS形のサイクロプリン損傷を含むオリゴスクレオチド基質は少なくともこの実験系においては（この実験系では0.01%までの放射活性は検出できるが）切断されたDNA鎖は観察されなかった（Fig. 4a レーン6と8）。

一方、BERおよびNERとは異なる修復方法として損傷回復という手段を生物はときとしてもつ。例えば大腸菌のフォトリアーゼという酵素は、紫外線照射によって生じるピリミジンダイマーを可視光のエネルギーを利用して損傷を修復する。この酵素は、グリコシド結合もDNA鎖も切断することなしに、ピリミジンダイマーのシクロプロパン環を直接開環し、損傷を完全に戻す。我々はこのサイクロプリン損傷が特異的な（このフォトリアーゼのような）損傷回復酵素によって修復される可能性を検討した。つまり、直接、酸化損傷としてできた新しい共有結合を切断できる酵素がヒト細胞抽出液の中に存在するかを調べた。

サイクロプリン損傷は、無傷な塩基とは構造が異なってしまっているため、損傷を含む領域に制限酵素部位が存在する場合、制限酵素による認識および切断を阻害する（Fig. 4b レーン2と3）。（もちろん、傷がない場合は制限酵素によって切断される（Fig. 4b レーン1）。もし、サイクロプリン損傷を含んだオリゴスクレオチド基質が細胞抽出液の酵素によって、損傷塩基から正常塩基に回復したとすると、この損傷を含む領域にある制限酵素部位は、制限酵素によって認識され切断されるはずである。しかしながら、RおよびS形のサイクロプリンアデニンを含んだオリゴスクレオチドの基質は制限酵素によって全く切断されることはない（Fig. 4b レーン5と6）。つまり、直接この損傷が細胞抽出液によって回復することはなかったのである。

5. スクレオチド除去修復機構による修復

ここでまず、このサイクロプリン損傷が本当に修復されているかどうかをDNA修復合成によって調べた。典型的な除去修復では、損傷が切り出された後、その損傷に相補するDNAを鋳型として用い、新しいDNAが合成される。この合成のときに、放射活性をもったスクレオチドを共存させ、DNAに取り込ませることで、定量的にDNA修復合成を観察することができる（Moggs et al., 1996）。この実験のためにRおよびS形のサイクロプリンアデニンをM13DNAの特異的位置に挿入した基質を調整し、この基質と放射性活性をもつスクレオチドの存在下でヒト細胞抽出液と反応させた。その結果、DNA

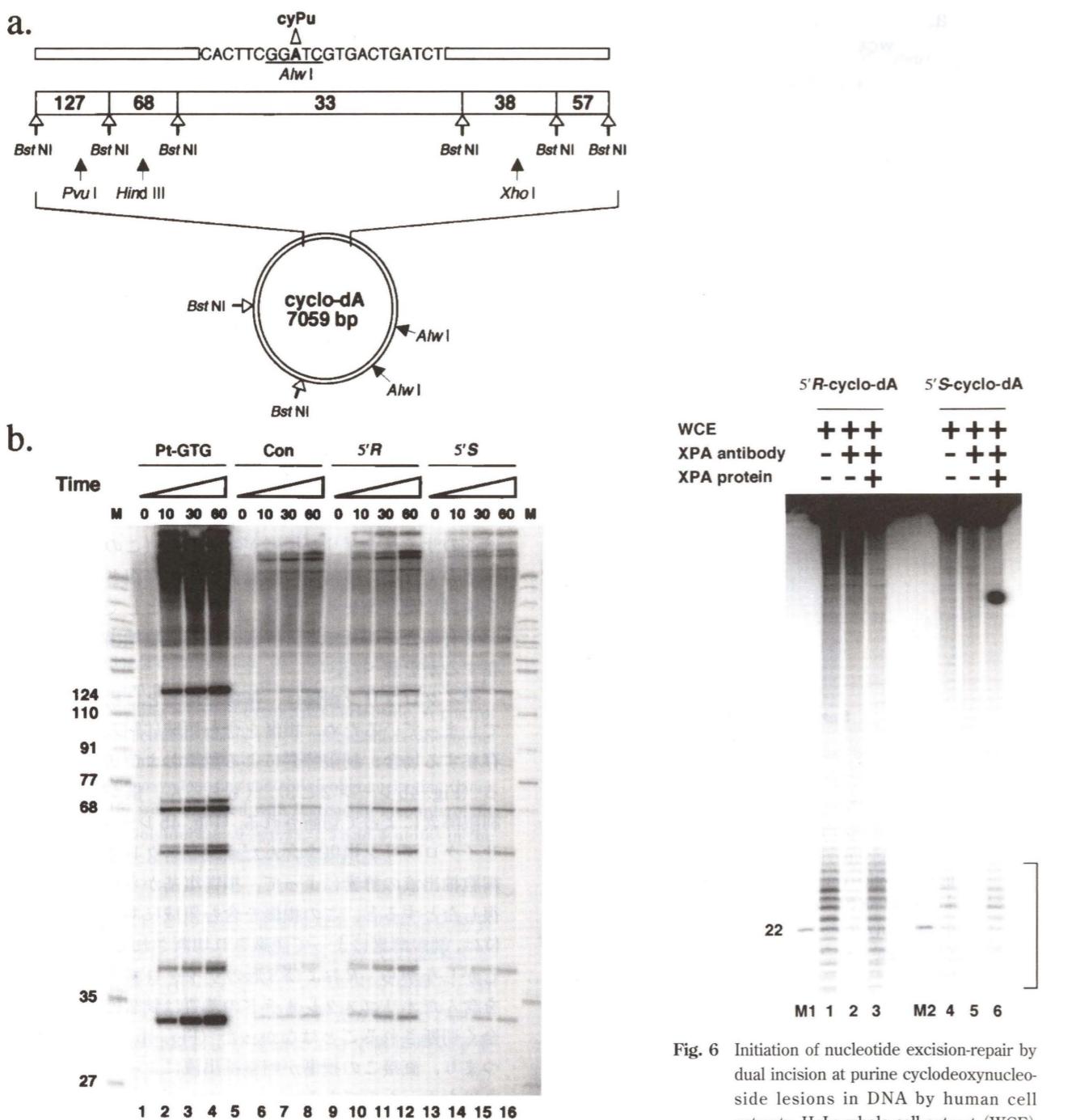


Fig. 5 DNA repair synthesis in response to a purine cyclodeoxynucleoside lesion

(a) The plasmid M13mp18 cyclo-dA is shown diagrammatically. Eight *Bst*NI restriction sites and the three *Alw*I restriction sites are indicated. One *Alw*I site (underlined) overlaps the region containing the cyPu residue. Unique *Pvu*I, *Hind*III, and *Xhol* restriction enzyme sites are also indicated.

(b) Autoradiograph after denaturing 14% polyacrylamide gel electrophoresis demonstrating DNA repair synthesis in the region containing the cyPu lesion. Plasmid DNA was incubated with HeLa cell extracts and radioactively labelled deoxynucleoside triphosphates and subsequently digested with *Bst*NI before electrophoresis. Lanes 1-4, Pt-GTG substrate as positive control; Lanes 5-8, control DNA without any lesion; Lanes 9-12, 5'R-cyclo-dA substrate; Lanes 13-16, 5'S-cyclo-dA substrate. M, size markers as in Fig. 3.

Fig. 6 Initiation of nucleotide excision-repair by dual incision at purine cyclodeoxynucleoside lesions in DNA by human cell extracts. HeLa whole cell extract (WCE) was incubated with plasmid DNA containing a 5',8'-cyclo-2'-deoxyadenosine residue in either the *R* or *S* stereoisomeric form, as indicated (Lanes 1 and 4). Excision products are indicated by the bracket. Addition of 2 μ l neutralizing XPA antiserum to the 50 μ l reaction mixture was employed in lanes 2, 3, 5, and 6. In addition, lanes 3 and 6 show reaction mixtures supplemented with 450 ng purified XPA protein to reverse the inhibitory effect of the antiserum. The M1 and M2 markers are oligo-nucleotides of 22 residues containing a single cyPu residue in the 5'R or 5'S form, respectively.

修復合成によるヌクレオチドの取り込みが、ヌクレオチド除去修復で効率良く修復されるシスプラチン損傷と比べて、効率が低いものの有意に修復合成されていることがわかった (Fig. 5)。

この結果はヌクレオチドレベルで修復することができる NER 機構によって、サイクロプロリン損傷が除去される可能性を示唆するものである。そこで NER 機構による除去修復による両鎖切断を直接観察するために、放射ラベルされた *R* および *S* 形のサイクロプロリンアデニンを含むオリゴヌクレオチドを M13 DNA の特異的位置に挿入し、ヒト細胞抽出液と反応させた。損傷を含んだオリゴヌクレオチドが損傷の 5' 側および 3' 側で切断された場合、基質 M13 DNA から放射活性のもつオリゴヌクレオチドが出てくることが見られるはずである。

事実、*R* および *S* 形ともに 25-30 mer のサイクロプロリン損傷を含んだオリゴヌクレオチドが NER 機構特有の両鎖切断反応によって除去されることまた *R* 形が *S* 形よりも効率よく取り除かれていることがわかった (Fig. 6 レーン 1 と 4)。さらに、この反応液にヒトの NER 蛋白質の一つである XPA の抗体を加えたところ、この両鎖切断は観察されず、さらにそこに XPA を加えたときに、両鎖切断反応が回復することから、この反応は XPA に依存していることがわかった (Fig. 6 レーン 2, 3 と 5, 6)。すなわち、この結果は、サイクロプロリン損傷が XPA に依存する NER 機構によって修復していることを示している。

同じ種類の損傷、光学異性体であるにもかかわらず、このサイクロプロリン損傷の修復効率が大きく異なることは興味深い一つの結果である。この結果は先に示した T4 DNA polymerase の Nuclease 活性のものと比較した場合非常に興味深い。それはそれぞれの光学異性体は生体内ではもしかすると各々の異なる生物学的影響をもつているという可能性をさらに示している。

6. XP 患者におけるサイクロプロリン損傷の影響

先に述べたように XP 患者の精神神経症以外の症状 (日光過敏症、皮膚癌高頻度発生) はヌクレオチド除去修復機構に異常をもつことに対応して、紫外線照射における DNA 損傷が原因であると説明してきた。このことは、精神神経症状を正確には説明できない。ここに我々は、活性酸素により生じる DNA 損傷であり、BER 機構で修復されず、かつ NER 機構によってのみ修復されるものとして、サイクロプロリン損傷がこの精神神経症状を説明できる DNA 損傷として存在することを明らかにした。この損傷は他の活性酸素が引き起こす DNA 損傷と比べて量的には必ずしも多くはないかもしれないが、実際には化学的に安定しており、何年もの時間軸のなかで特に複製をしない脳内のニューロン内に蓄積し、細胞死を導くと考えられる。

このサイクロプロリン損傷が XP 患者に蓄積しているかどうか、直接の証明は患者の中脳細胞から DNA を得て、この損傷が存在するかどうかを健常人と比較する事によって調べられる。しかし、これらの実験は人道的に不可能であるし、正確な対象となるコントロールが存在しない。しかし、サイクロプロリン損傷が NER がないバックグラウンドで脳内に蓄積するかどうかは XPA ノックアウトマウスを用いた実験によって証明できるかもしれない。残念ながら、XPA ノックアウトマウスではこの精神神経症は観察されていないが、ある程度加齢した、もしくは放射線処理した XPA ノックアウトマウスの脳から DNA を回収し、これを野生型のマウスのものと比較したとき、サイクロプロリン損傷が蓄積しているかを調べるのである。

結語

エントロピーの法則に従うとすれば、生命の遺伝情報を担う DNA もいすれは傷つけられ、崩壊しなければならない。しかし、生物はこの法則に従いつつ、修復という機構をもって DNA を維持しつづけ、次の世代に遺伝情報を伝えてゆく。おそらくまだ多く未知の DNA 損傷が生体内に存在しているだろう。しかし、生物が存続していくためには、そのすべての損傷を回避する機構を兼ね備えているはずである。DNA 損傷の同定と修復機構の解析は、既存の生物感に新しい解釈を与える一つ機会ともなるかもしれない。

参考文献

- Brooks, P.J., D.S. Wise, D.A. Berry, J.V. Kosmoski, M.J. Smerdon, R.L. Somers, H. Mackie, A.Y. Spooner, E.J. Ackerman, K. Coleman, R.E. Tarone and J.H. Robbins (2000) The oxidative DNA lesion 8,5'-(S)-cyclo-2'-deoxyadenosine is repaired by the nucleotide excision repair pathway and blocks gene expression in mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, 275, 22355-22362.
- Cleaver, J.E. and K.H. Kraemer (1995) Xeroderma pigmentosum and cockayne syndrome, In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly and D. Valle (Eds), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 7th Edition, McGraw-Hill, New York, pp. 4393-4419.
- Dizdaroglu, M., M.L. Dirksen, H.X. Jiang and J.H. Robbins (1987) Ionizing-radiation-induced damage in the DNA of cultured human cells. Identification of 8,5-cyclo-2-deoxyguanosine, *Biochem. J.*, 241, 929-932.
- Dizdaroglu, M. (1992) Measurement of radiation-induced damage to DNA at the molecular level, *Int. J. Radiat.*, 61, 175-183.
- Kuraoka, I., C. Bender, A. Romieu, J. Cadet, R.D. Wood and T. Lindahl (2000) Removal of oxygen free-radical-induced 5',8'-purine cyclodeoxynucleosides from DNA by the nucleotide excision-repair pathway in human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 3832-3837.
- Moggs, J.G., K.J. Yarema, J.M. Essigmann and R.D. Wood (1996) Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct, *J. Biol. Chem.*, 271, 7177-7186.

- Reardon, J.T., T. Bessho, H.C. Kung, P.H. Bolton and A. Sancar (1997) In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 9463-9468.
- Robbins, J.H. (1989) A childhood neurodegeneration due to defective DNA repair: a novel concept of disease based on studies xeroderma pigmentosum, *J. Child Neurol.*, 4, 143-146.

- Satoh, M.S., C.J. Jones, R.D. Wood and T. Lindahl (1993) DNA excision-repair defect of xeroderma pigmentosum prevents removal of a class of oxygen free radical-induced base lesions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6335-6339.
- Schroder, E., E.E. Budzinski, J.C. Wallace, J.D. Zimbrick and H.C. Box (1995) Radiation chemistry of d (ApCpGpT), *Int. J. Radiat. Biol.*, 68, 509-523.

Environ. Mutagen Res., 23 : 167 - 176 (2001)

哺乳類の酸化損傷塩基修復酵素NTH1とOGG1の基質特異性と作用機序

井出 博*

広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻
〒739-8526 東広島市鏡山1-3-1

Substrate specificities and reaction mechanisms of mammalian base excision repair enzymes NTH1 and OGG1

Hiroshi Ide

Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan

Summary

Reactive oxygen species generate structurally diverse base lesions in DNA. In *E. coli* cells, oxidative pyrimidine lesions are removed by Endo III and Endo VIII, whereas oxidative purine lesions by Fpg. In the present study, substrate specificities and reaction mechanisms of NTH1, a mammalian homologue of Endo III, and OGG1, a mammalian functional homologue of Fpg, were characterized using defined oligonucleotide substrates and the obtained results were compared to those of Endo III and Fpg. Mouse NTH1 (mNTH1) recognized not only urea (UR), thymine glycol (TG), 5,6-dihydrothymine (DHT), and 5-hydroxyuracil (HOU) derived from pyrimidine bases but also formamidopyrimidine (FAPY) derived from guanine. With both mNTH1 and human NTH1, the activity for FAPY was comparable to TG. Unlike Endo III, the activities of mNTH1 for these lesions were essentially independent of paired bases. Human OGG1 (hOGG1) recognized 7,8-dihydro-8-oxoguanine (OG) and FAPY. hOGG1 excised OG in a paired base-dependent manner but paired base effects were not evident for FAPY. The difference in the activity for the most preferred OG : C and the least preferred OG : A was 20-fold, while that for the most preferred FAPY : C and the least preferred FAPY : A was only 2.3-fold. These results indicate that FAPY : C is a good substrate for both NTH1 and OGG1, suggesting participation of the two enzymes in repair of this lesion in mammalian cells. In contrast, Endo III and Endo VIII recognized FAPY : C very poorly relative to TG. Determination of enzymatic parameters revealed that catalytic rate constants (k_{cat}) of mNTH1 and hOGG1 were much lower than those of Endo III and Fpg. It seems that distinctive rate determining steps for the enzymatic reaction are responsible for the differential paired base effects observed for Endo III and mNTH1. For Endo III with high k_{cat} , the rate determining step is flip out of a damaged base, thereby making the activity sensitive to paired bases. In contrast, for mNTH1 with low k_{cat} , the rate determining step is subsequent *N*-glycosylase and/or AP lyase, thereby making the activity insensitive to paired bases.

Keywords : oxidative base damage, NTH1, OGG1, substrate specificity, paired base effects

緒 言

好気的代謝や放射線により生成する活性酸素はDNAに損傷を誘発し、これが適切に修復されないと、突然変異や細胞死が起こる。活性酸素により塩基部位に生じる

*ideh@hiroshima-u.ac.jp

受付：2001年9月27日 受理：2001年9月27日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第12回公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」で発表された。
This paper was presented at the 12th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 26th, 2001. The symposium entitled "Molecular Pathogenesis for Oxidative Stress", was organized by Tatsuo Nunoshiba and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

Table 1 Base excision repair enzymes for oxidative base damage

Damage	Repair enzymes		
	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Mammal
Pyrimidine	Endo III Endo VIII	Ntg1, Ntg2 yOgg1	NTH1
Purine	Fpg		OGG1

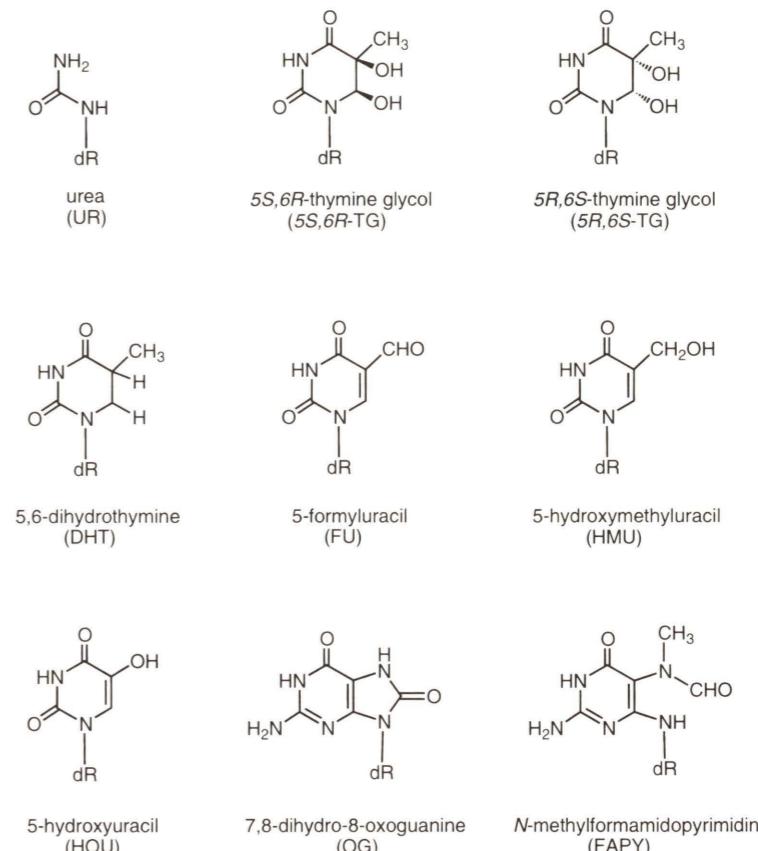
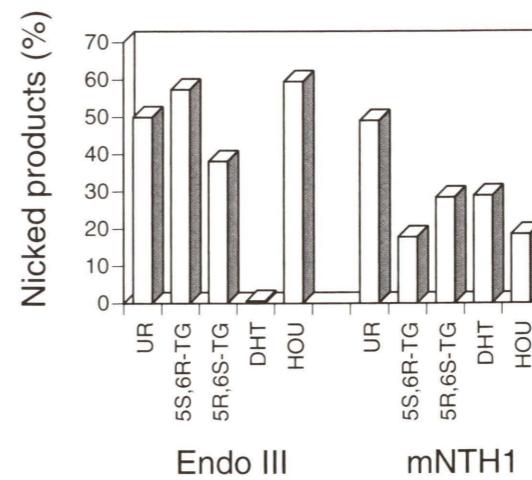
酸化損傷は構造的に極めて多様性に富むことが明らかにされているが、これらは主に *N*-glycosylase/AP lyase 活性を持つ塩基除去修復酵素により DNA から除去される。大腸菌では、酸化損傷塩基の修復に関わる修復酵素として、ピリミジン酸化損傷を認識する endonuclease (Endo) III と Endo VIII、プリン酸化損傷を認識する formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) が同定され、詳細な生化学的ならびに遺伝学的解析に基づき遺伝情報維持における役割が明らかにされている (Table 1) (Wallace, 1997)。Endo III 欠損株 (*nth*) および Endo VIII 欠損株 (*nei*) は明確な表現型を示さないが、両者の欠損株 (*nth nei*) は過酸化水素や放射線に感受性であり自然突然変異率も上昇する (Jiang et al., 1997; Saito et al., 1997)。したがって、Endo III と Endo VIII は細胞内において機能的なバックアップ関係にあると考えられる。Fpg 欠損株 (*fpg/mutM*) は過酸化水素や放射線に感受性を示さないが、自然突然変異率が上昇し GC → TA トランスポージョンを誘発する (Michaels et al., 1991)。Fpg 欠損株では、G の酸化により生じる突然変異性の高い損傷 7,8-dihydro-8-oxoguanine (OG) を修復できないため、DNA 複製の際、新生鎖に A が取り込まれ突然変異を誘発する。近年、Endo III および Fpg の哺乳類ホモログとして、それぞれ NTH1 および OGG1 がクローニングされた (Table 1)。マウスおよびヒト NTH1 のアミノ酸配列は、Endo III に比べ N 末端側が約 90 残基長く、この部分に核移行シグナル (NLS) とミトコンドリア移行シグナル (MTS) が含まれている (Sarker et al., 1998; Takao et al., 1998)。ホモロジーのある部分では、活性部位の Helix-hairpin-Helix モチーフと C 末端の 4Fe-4S クラスターが保存されており、DNA への結合とタンパクのフォールディングに関与している。一方、OGG1 (酵母、マウス、ヒト) と Fpg はアミノ酸配列レベルでの相同意性は全くないが、OG などのプリン酸化損傷を認識するという点で機能的なホモログである。OGG1 には、4Fe-4S クラスターはないが Helix-hairpin-Helix モチーフがあり、構造的に Endo III のスーパーファミリーに属する (Bruner et al., 2000)。OGG1 には複数の splicing isoform が存在し、C 末端側のアミノ酸配列の違いにより核移行型とミトコンドリア移行型が生じる (Aburatani et al., 1997; Takao et al., 1998; Nishioka et al., 1999)。最近、NTH1 (岡野と安井, 2001) および OGG1 (Klungland et al., 1999b; Minowa et al., 2000) の機能解析を目的に

ノックアウトマウスが作製された。OGG1 ノックアウトマウスではゲノム中に OG が蓄積するが、現在報告されている限り両マウスは正常に生まれ、発癌率の上昇等の明瞭な表現型は現れていない。したがって、NTH1 や OGG1 の遺伝情報維持における役割についてはさらに検討が必要である。本研究では、NTH1・OGG1 の遺伝情報維持における役割を生化学的な視点から検討するために、両酵素の基質特異性と作用機序を調べ、その結果を大腸菌ホモログ (Endo III, Fpg) と比較した。

1. NTH1 と Endo III

活性アッセイは、マウス由来 NTH1 (mNTH1) を用いて行った (Sarker et al., 1998)。基質としては、ピリミジン損傷 urea (UR), *cis*-thymine glycol (TG, 5S,6R-および 5R,6S-異性体), 5,6-dihydrothymine (DHT), 5-hydroxyuracil (HOU) を含むオリゴヌクレオチドを用いた (Fig. 1)。基質を Endo III あるいは mNTH1 とインキュベートし、生成物を PAGE で分析した (Asagoshi et al., 2000a)。両酵素とも β 脱離により切断された生成物が認められた。生じた基質の切断率を定量したところ、Endo III の UR, TG, HOU に対する活性は同程度であったが、DHT に対する活性は著しく低くかった (Fig. 2)。mNTH1 の UR 活性は若干高かったものの、基質間でそれほど大きな違いは認められなかった。この結果から、Endo III と mNTH1 で DHT に対する相対活性に差があることがわかった。DHT に対する活性の差の原因を明らかにするため、TG と DHT に対する酵素パラメーターを求めて (Table 2)。Endo III の両基質に対する K_m を比較すると、DHT に対する値は TG よりも約 27 倍高く、DHT は非常に親和性の低い基質であることがわかった。また、DHT に対する反応速度 (k_{cat}) も低く、TG の 1/11 であった。その結果、DHT に対する反応効率 (k_{cat}/K_m) は TG の 1/315 となった。mNTH1 の両基質に対する K_m は低く、Endo III に比べ TG で 6 倍、DHT では 170 倍の親和性を示した。逆に k_{cat} は Endo III に比べかなり低く、TG で 1/26、DHT では 1/4 であった。しかし、 K_m , k_{cat} の値は両基質で大きな差ではなく、反応効率 (k_{cat}/K_m) はほぼ同じ値となった。つまり、Endo III は DHT に対する親和性、反応速度が TG に比べいずれも低いに対し、mNTH1 では両者で差がないため、同程度の活性を示すことがわかった。また、mNTH1 の k_{cat} は Endo III に比べ低かった (特に TG の場合)。この原因として実験に用いた mNTH1 の失活が考えられたので、NaBH₄ トラップ反応 (後述) を用いて活性な酵素の割合を調べたところ、mNTH1 の 68% および Endo III の 95% が活性であった。したがって、mNTH1 は本質的に k_{cat} の低い酵素であるといえる。

Endo III は基質 DNA と結合後、Lys120 が損傷部位のデオキシリボース C1' を攻撃し、反応中間体として

**Fig. 1** Structures of base lesions formed by reactive oxygen species and related compounds**Fig. 2** Activities of Endo III and mNTH1 for different types of pyrimidine damage. UR: urea; TG: *cis*-thymine glycol; DHT: 5,6-dihydrothymine; HOU: 5-hydroxyuracil**Table 2** Parameters of Endo III and mNTH1 for TG and DHT

Enzyme	Substrate	K_m (nM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m ($\times 10^4$)
Endo III	TG : A ^a	19	0.78	410(315) ^b
	DHT : A	510	0.07	1.3(1)
mNTH1	TG : A ^a	3	0.03	100(77)
	DHT : A	3	0.02	66(51)

^a TG = 5R,6S-TG^b Numbers in parentheses are relative values

Schiff base を形成する (Fig. 3)。この場合、反応系に還元剤 (NaBH₄) が共存すると基質-酵素間のイミン結合 (C = N) が還元され、不可逆的な基質-酵素クロスリンクが形成される。そこで、mNTH1 が Endo III と同様に Schiff base 中間体を形成し反応しているかどうか検討した。NaBH₄ 存在下、酵素と TG, UR, DHT をインキュベートし、生成物を SDS-PAGE で分析した。Endo III だけでなく mNTH1 においても基質と酵素がクロスリンクされた生成物のバンドが確認された。これより、mNTH1 でも Schiff base が反応中間体として形成されることがわかった。Endo III の Lys120 に対応する mNTH1 のアミノ酸は Lys208 であることから、これが基質との Schiff base 形成に関与しているものと予想される。また、Endo III の場合、DHT ではクロスリンクされた Schiff base の量は他の基質に比べて少なかったが、mNTH1 の場合はすべての基質でクロスリンクされた生成物の量は同じだった。これらの結果は、前に述べた切断活性アッセイの結果とよく一致している。

DNA 中の塩基がダメージを受けると、隣接した塩基との水素結合・スタッキング相互作用が変わる。Endo III がこの部位に結合すると、不安定化した損傷塩基がヘリックス内から酵素の活性部位にフリップアウトし DNA から除去されると考えられている (Thayer et al., 1995)。TG は相補鎖の A と水素結合を形成していると考

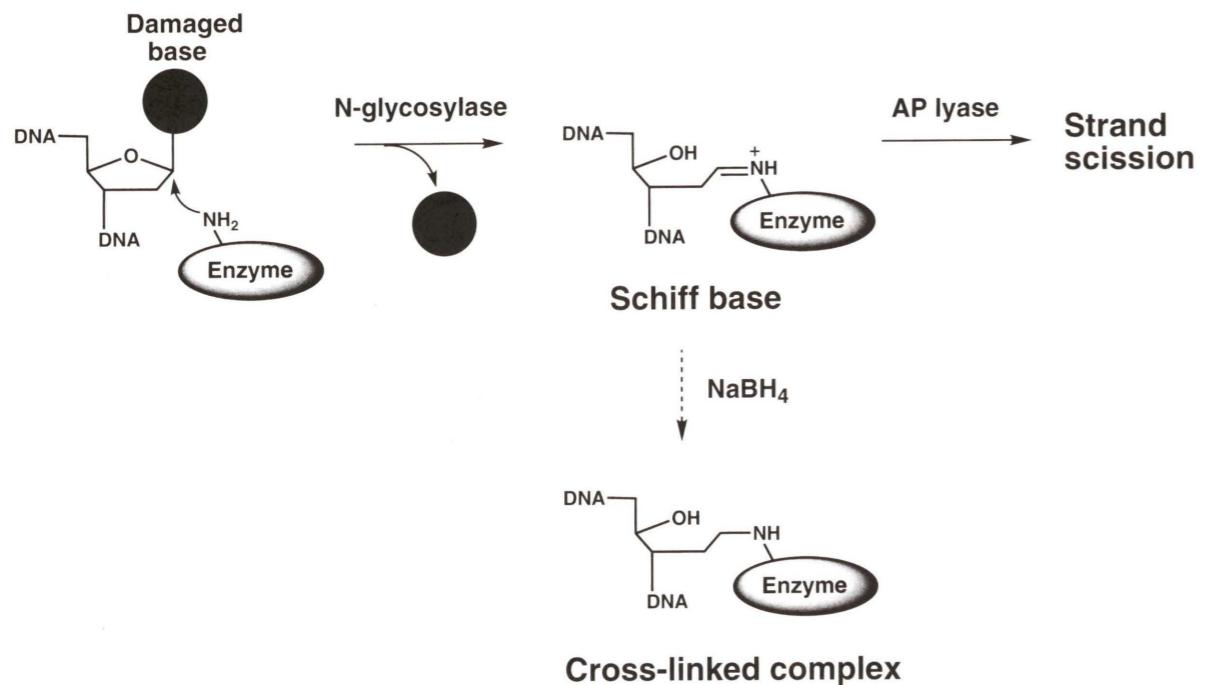


Fig. 3 Formation of a Schiff base intermediate during the action of base excision repair enzymes

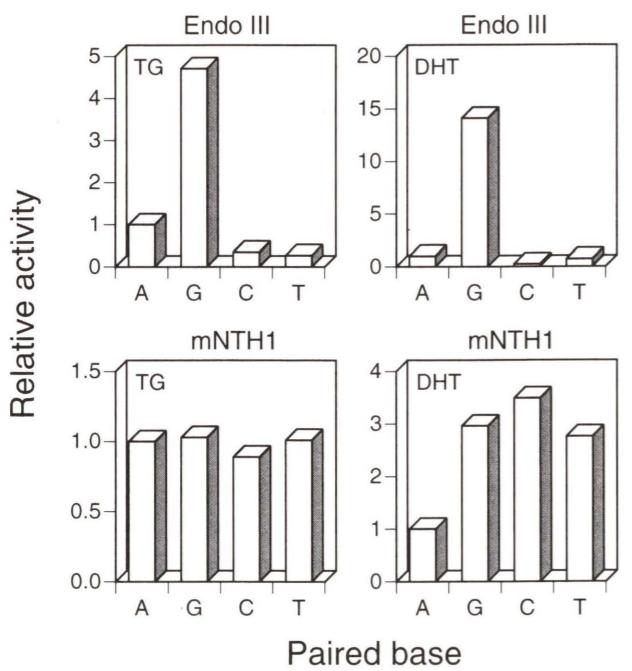


Fig. 4 Paired base effects on the activity of Endo III and mNTH1 for thymine glycol (TG) and 5,6-dihydrothymine (DHT)

えられるが、5,6位にかさだかく極性のあるヒドロキシル基が置換されているため、スタッキング相互作用が弱くなるとともに極性の高いヘリックス外へフリップアウトしやすくなる。それに対して、DHTでは5,6位に小さな水素原子がついているだけであり、水素結合やスタッキング相互作用はTGほど大きな影響を受けない。したがって、DHTはヘリックス内に収まり、フリップアウト

が起こりにくいため、Endo IIIにより除去されにくくものと考えられる。もしこのようなフリップアウト機構で反応が起こっているとすれば、損傷に対応する塩基を変えることにより酵素の反応性が変化する可能性がある。そこで、TGおよびDHTの対合塩基を変えて酵素活性を調べた(Asagoshi et al., 2000a)。Endo IIIの場合、TG:Gペアに対する活性はTG:Aペアに比べ約5倍上昇したが、ピリミジンと対合した場合は活性の上昇は認められなかった(Fig. 4)。同様に、DHTでもGと対合した場合はAに比べ約15倍活性が上昇した。Endo VIIIでも類似した対合塩基依存性が認められた(Ide, 2001)。TGやDHTがGと対合すると、G:Tミスマッチと同じようにwobble型のbase pair配置をとっていると予想される(Fig. 5)。Aと対合したWatson-Crick型の配置に比べ、Gと対合したwobble型の配置では、TGはヘリックス内からmajor groove側に移動しているためフリップアウトしやすくなっていると考えられ、その結果、TG:Gに対する活性が上昇したと考えられる。一方、mNTH1では、TGおよびDHTいずれの場合もEndo IIIのようなはっきりした対合塩基依存性は認められなかった(Fig. 4)。Endo IIIでは k_{cat} が大きいため、基質酵素複合体が形成された後のフリップアウトが律速段階となり対合塩基の影響がはっきり見られたと考えられる。一方、mNTH1ではEndo IIIに比べて k_{cat} が20倍以上遅いことから、塩基のフリップアウトよりもその後の反応(N-グリコシド結合の切断あるいはβ脱離による鎖切断)が律速となりフリップアウトの起こりやすさの違いが活性の差として現れにくかったものと考えられる。

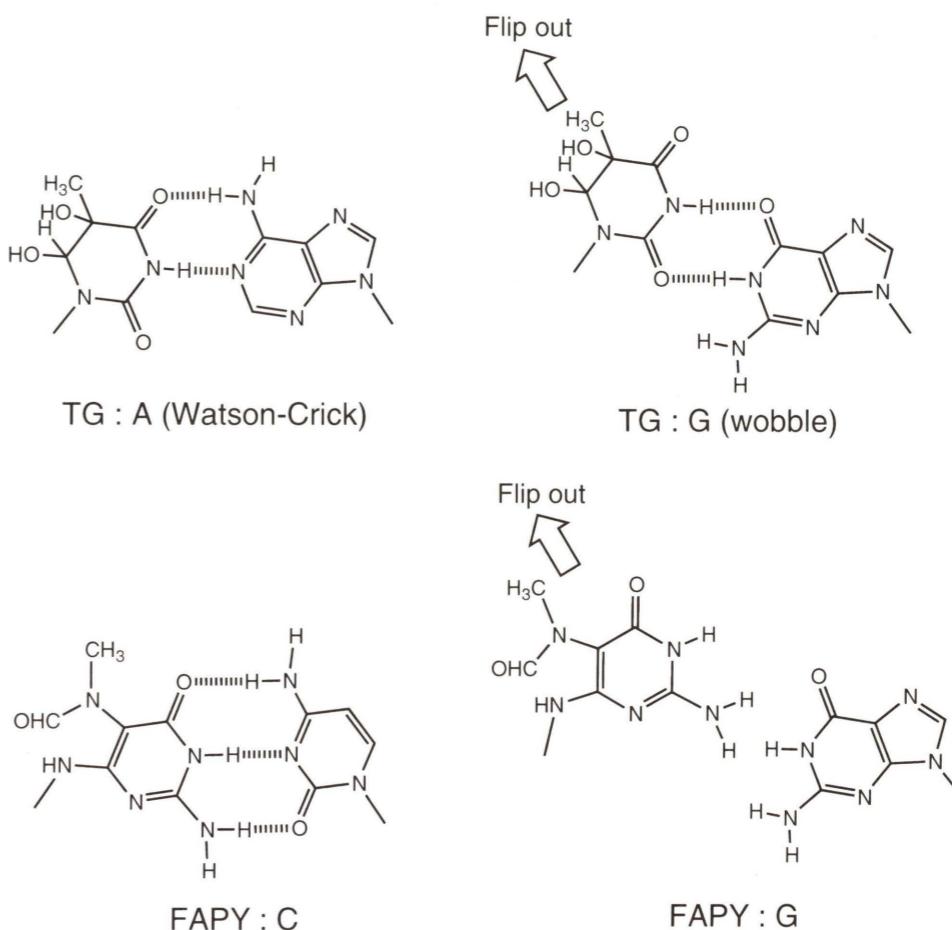


Fig. 5 Possible base pairing schemes for thymine glycol (TG) and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine (FAPY)

活性酸素種とピリミジン塩基の反応は主にC5-C6二重結合に起こるが、Tの場合5位のメチル基の酸化により5-formyluracil (FU)と5-hydroxymethyluracil (HMU)が生成する(Fig. 1)。TやHMUと異なり、電子吸引性のホルミル基を持つFUでは、 pK_a が低下し塩基のイオン化が生理条件でも無視できなくなる。イオン化型のFUは、DNA複製の際、Gと誤対合し突然変異性を示す(Yoshida et al., 1997; Masaoka et al., 2001)。当研究室では、T:Aペアの酸化により生じるFU:AとdGTPのミスインコーポレーションにより生じるFU:Gが、それぞれ大腸菌の3-methyladenine glycosylase II (AlkA)およびミスマッチ修復タンパクMutSにより認識されることを明らかにした(Masaoka et al., 1999; Terato et al., 1999)。ヒト培養細胞にもDNAからFUをリリースする活性があることから(Bjelland et al., 1995), AlkAのヒト機能ホモログ methylpurine glycosylase (hMPG)のFUに対する活性を調べたが、活性は認められなかった。最近、Endo III, Endo VIII, FpgおよびhNTH1がFU修復活性を持つことが報告された(Zhang et al., 2000; Zhang, 2001)。報告された実験では、大過剰の酵素を用いて活性アッセイを行っていたので、定量的な検

討を行い、活性をTGと比較した。これらの酵素のFU活性(k_{cat}/K_m)はTGに比べ極めて低く、TGの1/50から1/400であった(Masaoka et al., to be published)。したがって、Endo III, Endo VIII, FpgおよびhNTH1が実際の細胞内でFU修復に関与しているとは考えにくく、また、哺乳類ではFUを認識する新規な酵素が存在するものと思われる。

2. OGG1とFpg

OGG1には、スプライシング様式の違いから多種のisoformが存在する(Aburatani et al., 1997; Nishioka et al., 1999)。酵素活性アッセイにはヒト由来OGG1の核移行型isoform 1a (hOGG1)を用いた。基質としては、7,8-dihydro-8-oxoguanine (OG)およびG由来のN-methyl型formamidopyrimidine (2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine, FAPY)を含むオリゴスクレオチド用いた(Fig. 1)。OGまたはFAPYを含む基質をFpg, hOGG1とインキュベートし、生成物をPAGEで分析した(Asagoshi et al., 2000c)。Fpgでは、OG・FAPYとともに損傷部位でδ脱離により切断された生成物が認められたが、hOGG1ではβ脱離により切断

Table 3 Parameters of Fpg and hOGG1 for OG and FAPY

Enzyme/Substrate	K_m (nM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m ($\times 10^3$)
Fpg			
OG	13 ± 4	1.8	140 (82) ^a
FAPY	38 ± 9	5.1	130 (76)
hOGG1			
OG	23 ± 8	0.034	1.5 (0.9)
FAPY	15 ± 4	0.025	1.7 (1)

^a Numbers in parentheses are relative values

されたバンドが生じた。この結果は、*N*-glycosylase後に作用するAP lyaseの鎖切断モードがOGG1とFpgで異なることを示している。次に酵素パラメーターを求めた(Table 3)。FpgのOGに対する K_m はFAPYに対する値よりも低く、OGの方が親和性の高い基質であるといえる。しかし、 k_{cat} はFAPYに対する値の方が高く、反応効率(k_{cat}/K_m)は両基質に対してほぼ等しい値となった。hOGG1では両基質に対する K_m 、 k_{cat} に大きな差異は見られず、反応効率はFpgと同様に両基質に対してほぼ等しい値が得られた。この結果から、hOGG1がOGおよびFAPYを同程度の反応効率でDNAから除去することが明らかとなった。また、hOGG1の k_{cat} はFpgに比べ著しく低かった。マウスOGG1では、鎖切断を行うAP lyase活性が先行する*N*-glycosylase活性とカップルしないとの報告があり(後述)、本研究で活性測定に用いたニッキングアッセイでは k_{cat} が多少低く見積もられている可能性がある。しかし、これを考慮してもhOGG1とFpgの結果はmNTH1とEndo IIIの結果と類似しており(Table 2, 3)、哺乳類塩基除去酵素の k_{cat} は大腸菌に比べ本質的に低いといえる。一般に、発生期を除き哺乳類細胞の増殖速度は大腸菌に比べ遅い。したがって、DNA損傷の修復には時間的余裕があり、 k_{cat} が低くても細胞周期内に十分に修復を行えるのかもしれない。この点に関しては、原核生物と真核生物のゲノム中のDNA損傷の量と細胞あたりの修復酵素の数を考慮してさらに検討する必要がある。また、酸化損傷塩基の修復と転写の共役が示唆されており、XPG・TFIIE・CSB等とOGG1あるいはNTH1の相互作用によりこれらの酵素の細胞内における修復効率が上昇する可能性もある(Klungland et al., 1999a; Le Page et al., 2000)。

両酵素の反応機構を検討するために、NaBH₄存在下で酵素と基質をインキュベートし、クロスリンク生成物(還元されたSchiff base中間体)が生じるかどうかをSDS-PAGEで分析した。Fpgでは、OG・FAPYとともにクロスリンク形成によりシフトしたバンドが見られた。同様に、hOGG1でも両基質とクロスリンクしたバンドが認められた。これに対し、損傷の代わりにGを含むコントロールでは、クロスリンク生成物は認められなかつた。この結果から、FpgとhOGG1が、Schiff base中間

体を経た反応によりOG・FAPYを除去することが示された(Fig. 3)。FpgのSchiff base形成にはN末端付近のProが関与するとされているが(Zharkov et al., 1997)、Endo IIIのスーパーファミリーに属するhOGG1では、Helix-hairpin-Helixモチーフに近いLys249(Endo IIIのLys120に対応)がSchiff base形成に関与しているものと思われる。酵素濃度を変化させた場合、同濃度のFpgに対してはFAPYに比べOGの方がクロスリンク生成物が多く、FpgがFAPYよりOGに対して高い親和性を持つことが示された。hOGG1では、基質間でクロスリンクの生成率にほとんど差が認められなかつた。これらの結果は、前に述べたFpgおよびhOGG1の両基質に対する K_m の比較結果とも一致した。最近、OGG1(マウス)の反応機構に関して、*N*-glycosylase活性とAP lyase活性がカップルしていないという興味深い結果がGrollmanらのグループにより報告された(Zharkov et al., 2000)。塩基除去修復酵素は従来、*N*-glycosylase活性のみを持つmonofunctional glycosylase(たとえばuracil glycosylaseや3-methylpurine glycosylase)と*N*-glycosylase活性とAP lyase活性の両方を持つbifunctional glycosylase(たとえばEndo IIIやFpg)に分類されてきた。前者では、反応生成物として脱塩基部位が生じるのに対し、後者では、2つの活性が協調的に作用し、損傷塩基がDNAから除去されると同時に脱塩基部位のβ脱離(あるいはδ脱離)が起こり鎖切断が生じる。hOGG1の作用は、2つのタイプのglycosylaseの中間に位置し、損傷塩基が除去された後一時的に脱塩基部位が蓄積し、その後時間をおいて鎖切断が生じる。したがって、hOGG1のAP lyase活性が生理的に意味があるどうかについてはさらに検討が必要である。実際の細胞では、大量に存在するAP endonucleaseであるAPE(APEX, HAP)がこのステップを行っているかもしれない。

FpgおよびhOGG1のOG除去効率は、対合塩基の種類によって著しく変化する。これは、error freeな修復(OG:CペアからのOGの除去)を行うと同時に、error proneな修復(OG:AペアからのOGの除去)を防ぐために重要である(Michaels et al., 1991)。OG:Aペアは、DNA複製の際、dATPのミスインコーポレーションにより生じ、OG除去後の修復合成により突然変異が固定される。しかし、FAPYについては、対合塩基の影響はこれまでに検討されていなかった。そこで、本研究ではFAPY修復に対する対合塩基の影響を検討した(Asagoshi et al., 2000c)。同一配列中にOGおよびFAPYを導入し、対合塩基としてA, G, C, Tのいずれかを含む基質を調製した。これをFpgあるいはhOGG1とインキュベートし生成物をPAGEで分析した。Fpgの場合、OGがG, C, Tと対合した場合、強い切断バンドが生じたが、Aと対合した場合は、非常に弱い切断バンドしか生じなかつた。FAPYではG, C, Tだけでなく、Aと対

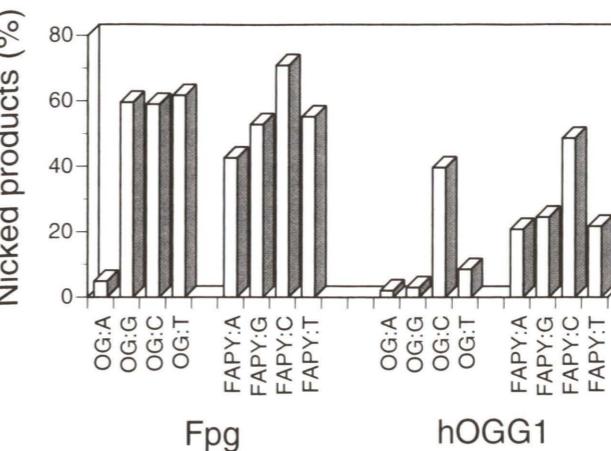


Fig. 6 Paired base effects on the activity of Fpg and hOGG1 for 7,8-dihydro-8-oxoguanine (OG) and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine (FAPY)

合した場合も強い切断バンドが生じた。hOGG1の場合、OGではCと対合したときのみ強い切断バンドが生じた。FAPYでは、CだけでなくA, G, Tと対合した場合も強い切断バンドが生じた。PAGEによる生成物分析の結果に基づき、各基質の切断率を定量した(Fig. 6)。OGでは、既に報告されているFpgおよびhOGG1の対合塩基依存性とよく一致した。一方、FAPYでは、Cと対合した場合、除去効率は高い傾向にあるものの、他の3種の対合塩基の効率も高く、塩基間でOGほど大きな差は認められなかつた。したがって、OGでは、FpgおよびhOGG1に固有の対合塩基依存性があるが、いずれの場合もOG:CペアからのOGの除去効率は高く、OG:Aペアからの効率は著しく低い。しかし、FAPYではOGのような明確な対合塩基依存性は存在せず、どの塩基対も比較的高い効率で除去されることがわかつた。当研究室でFAPY(G由来)を含む鉄型を用いDNA複製を調べたところ、FAPYはDNA合成を強く阻害するが、translesion synthesisが起こる場合はFAPYの向かいにCが選択的に取り込まれることが明らかとなつた(Asagoshi et al., to be published)。この結果は、FAPY(G由来)が実際の生体内でFAPY:Cペアとしてのみ存在しており、他の塩基対は生じないことを示している。したがって、2種の塩基対(OG:CとOG:A)が生じるOGのケースとは異なり、修復酵素はFAPYの対合塩基を特別識別する必要がないものと思われる。A由来のFAPYについては実験を行っていないが、構造から考えてA由来のFAPYについても同様な議論ができるものと推測される。

最近、OGを含むオリゴヌクレオチド基質-hOGG1複合体の三次元構造がVerdineらのグループにより報告された(Bruner et al., 2000)。これによると、hOGG1は損傷結合ポケットと対合塩基を特異的に認識する結合部位を持つ。ヘリックスからフリップアウトしたOGとヘ

リックス内に収まっている対合塩基Cは、特異的な水素結合と芳香族アミノ酸残基のスタッキング相互作用により認識されている。OGの対合塩基がAの場合は、Cの結合部位に収まらず酵素は活性化状態に移れない。この結果は、hOGG1のOG:CとOG:Aに対する認識の差をうまく説明しているが、なぜ構造の異なるFAPYが同じ効率で認識され、さらに対合塩基の影響もOGの様に顕著に現れないのか等の問題は依然残されたままである。たとえば、GとOGを区別する水素結合は1本のみで、OGのN7位のNHとGly42の主鎖COの間に形成される。しかし、N7-methyl型のFAPYは、このような水素結合が形成できないにもかかわらず、hOGG1のよい基質である。報告された複合体で認められた特異的相互作用はOG:Cに対するinduced fitの結果であり、実際の2つの結合部位における相互作用はもう少しフレキシブルであると考えられる。

3. NTH1とOGG1の認識基質オーバーラップ

OGやFAPYなどプリン酸化損傷は、大腸菌ではFpg、真核生物ではOGG1により修復される。一方、TGなどピリミジン酸化損傷は、大腸菌ではEndo III、酵母ではNtg1, Ntg2(*S. cerevisiae*)およびNth-spo(*S. pombe*)、哺乳類ではNTH1によって修復される(Table 1)。最近、酵母Ntg1とNtg2がFAPY修復活性を持つことが示された(Senturker et al., 1998; Alseth et al., 1999)。Endo IIIおよびNTH1はNtg1・Ntg2とアミノ酸配列の相同性があることから、これらの酵素がFAPY修復活性を持つ可能性がある。そこで、Endo IIIおよびmNTH1のFAPYに対する活性を検討した(Asagoshi et al., 2000b)。

アッセイでは、FAPYを含むオリゴヌクレオチドと、対合塩基としてA, G, C, T、いずれかを含む相補鎖とアニールし、これを修復酵素とインキュベートし、生成物をPAGEで分析した。活性は生じた切断バンドにより定量した。Endo IIIでは、FAPY:Cペアに対する活性が最も低く、TGに対する活性に比べると1/22であった(Fig. 7)。プリン塩基A, Gと対合した場合の活性は上昇し、TGの活性の1/2となつた。Endo IIIと類似した基質特異性を持つ大腸菌Endo VIIIについても同様な結果が得られた。mNTH1では、FAPY:Cペアに対する活性はTGとほぼ同じであり、A, G, C, Tの間で対合塩基依存性は認められなかつた。ヒト由来NTH1(hNTH1)についても同様な検討を行ったところmNTH1と同じ結果が得られた。これらの結果は、Endo IIIおよびNTH1(マウス・ヒト)に潜在的なFAPY修復活性があること、さらにEndo IIIとNTH1では活性の対合塩基依存性が異なることを示している。この結果をさらに確認するため、NaBH₄トラップ反応を用いて反応中間体の形成を調べた。Endo IIIの場合、酵素-基質クロスリンク生成物の量を対合塩基で比較すると、A, G, Tに比べCが著し

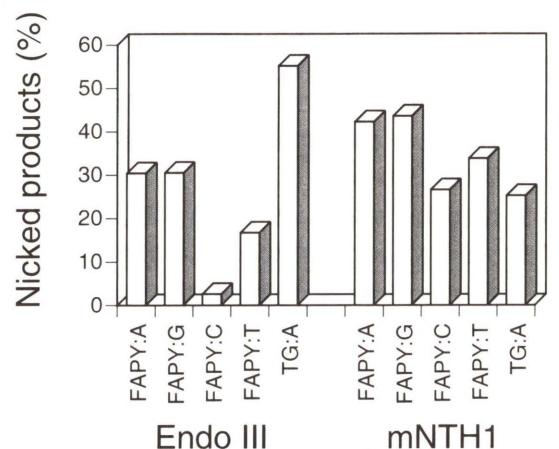


Fig. 7 Paired base effects on the activity of Endo III and mNTH1 for 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine (FAPY)

く少なかった。mNTH1では、A, G, C, Tいずれの塩基と対合した場合も、クロスリンク生成物の量は同じであった。これらの結果は、基質のニッキングアッセイの結果と一致した。最近、SeebergらのグループもhNTH1がpoly (dG-dC)からFAPYをリリースすることを報告している (Luna et al., 2000)。

以上の結果から、Endo IIIによるFAPYの修復には対合塩基依存性があり、FAPYがプリンと対合したときに効率よくDNAから除去されることがわかった。Endo IIIはフリップアウト機構により損傷を認識する (1. NTH1とEndo III参照)。FAPYがCと対合した場合は、塩基間で水素結合が形成され安定化するため、損傷塩基であるFAPYが活性部位にフリップアウトしにくい (Fig. 5)。これは、DNA複製の際、FAPYの向かいにCが選択的に取り込まれることからも支持される。一方、FAPYがGやAと対合した場合は、そのかさ高さのために立体障害が生じ、不安定化されたFAPYは活性部位にフリップアウトしやすくなる。その結果、対合塩基によって活性に差が生じたものと考えられる。mNTH1のFAPY修復活性は、4種の対合塩基で差が認められなかった。既に述べたように、本酵素はEndo IIIに比べ反応速度 (k_{cat})の低い酵素であり、反応の律速段階がフリップアウトではなく、これに続くN-グリコシド結合の切断あるいは鎖切断にあるためだと考えられる。

以上の結果から、Endo III (およびEndo VIII)はFAPYに対する潜在的な活性を持つものの、FAPY : Cペアに対する活性は本来の基質であるTGと比較し著しく低いことが示された。したがって、大腸菌細胞内では、これまで知られているようにFpgがFAPY修復を行い、Endo IIIはFAPYの修復に関与していないと予想される。これを確認するため、大腸菌の野生株およびEndo III欠損株 (*nth*)の細胞粗抽出物を調製しFAPY活性を調べた。FAPY : Cペアを基質とした場合、野生株・*nth*株

いずれの場合もEndo IIIによる β 脱離生成物は認められず、Fpgによる δ 脱離生成物が認められた。FAPY : Gペアを基質とした場合、野生株ではEndo IIIによる明瞭な β 脱離生成物が認められたが、*nth*株ではこの生成物はなくなった。これらの結果は、artificialな基質であるFAPY : Gペアを用いると粗抽出物中のEndo III活性は検出されるが、実際の細胞内に生成するFAPY : Cペアに対する活性は検出されないこと、つまり大腸菌ではEndo IIIがFAPY : Cペアの修復に関与していないということを示す。また、Endo VIII欠損株 (*nei*)およびEndoIII・Endo VIII二重欠損株 (*nth nei*)欠損を用いた検討結果から、Endo VIIIもFAPY : Cペアの修復に関与していないことが確認された。一方、精製したmNTH1はFAPY : Cペアに対してTGと同程度の活性を示した (Fig. 7)。哺乳類ではこれまでに、FAPYの修復酵素としてOGG1が知られていることから、本研究の結果をあわせて考慮すると、哺乳類ではOGG1とNTH1の両者がFAPY修復に関わっていると考えられる。実際、OGG1ノックアウトマウスでは、OG活性は完全に消失したが、FAPYに対しては野生型の1/3程度の残留活性があると報告されている (Klungland et al., 1999b)。我々も、野生型のマウス臓器から核粗抽出物を調製し、FAPY活性を調べた。FAPY活性は、ネガティブコントロールのTを含むオリゴヌクレオチド基質では阻害されなかったが、TGを含む基質では競争的に阻害された。同様にFAPY活性は、OGを含む基質でも阻害された。ノックアウトマウスの結果およびTG阻害実験の結果は、FAPYの細胞内修復に対するNTH1・OGG1両酵素の関与を強く支持するものである。

NTH1・OGG1両酵素により認識される他の酸化損傷については、まだほとんど研究は行われていないが、当研究グループではhOGG1がURを認識することを見出している (Ide, 2001)。mNTH1のURに対する活性は対合塩基依存性がないが (Asagoshi et al., 2000a), hOGG1ではUR : Cペアに対する活性が最も高かった。Endo III, hNTH1およびEndo VIIIにOG修復活性があるとの報告がある (Matsumoto et al., 2001; Hazra et al., 2000)。当研究室で過剰量の酵素を用いてOG : N (N = A, G, C, T)ペアに対する活性を調べてみたが、数パーセントの基質が切断されただけであり、活性の酵素濃度依存性も認められなかった。化学合成したOGを含むオリゴヌクレオチドの脱保護を通常の条件で行うとOGが分解するため、脱保護はメルカプトエタノール存在下で行う必要がある。たとえば、何らかの原因でOGの一部が分解しFAPYタイプの生成物に変わった場合、既に述べたようにEndo IIIホモログやEndo VIIIに認識され、さらに対合塩基依存的に活性が変化するはずである。特にGと対合した場合活性は高いと予想される。Endo III, hNTH1, Endo VIIIのOGに対する活性は、オリゴヌク

レオチドに導入されたOGの純度を十分にチェックして再度調べる必要があると思われる。

今後、さらに多くの酸化損傷に対してNTH1とOGG1の活性オーバーラップを調べるとともに、これらを相補する新規な活性について検討し、修復酵素間の機能相補による酸化損傷修復ネットワークを明らかにしてゆく必要がある。

謝 辞

本研究は、万有製薬(株)つくば研究所・西村謹博士 (hOGG1), 中国短期女子大学・関周司博士 (mNTH1), 岡山理科大学・池田正五博士 (hNTH1), 東北大学大学院・山本和生博士 (大腸菌 *nth* および *nei* 変異株)との共同研究であり、ご協力に心より感謝申し上げます。また、本研究に精力的に取り組んでくれた遺伝子化学研究室の学生諸君ならびに本原稿に対し有意義なコメントをいただいた広島大学大学院・寺東宏明博士、大山義彦博士にお礼申し上げます。

参考文献

- Aburatani, H., Y. Hippo, T. Ishida, R. Takashima, C. Matsuba, T. Kodama, M. Takao, A. Yasui, K. Yamamoto, M. Asano, K. Fukasawa, T. Yoshinari, H. Inoue, E. Ohtsuka and S. Nishimura (1997) Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue, *Cancer Res.*, 57, 2151-2156.
- Alseth, I., L. Eide, M. Pirovano, T. Rognes, E. Seeberg and M. Bjoras (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* homologues of endonuclease III from *Escherichia coli*, Ntg1 and Ntg2, are both required for efficient repair of spontaneous and induced oxidative DNA damage in yeast, *Mol. Cell Biol.*, 19, 3779-3787.
- Asagoshi, K., H. Odawara, H. Nakano, T. Miyano, H. Terato, Y. Ohyama, S. Seki and H. Ide (2000a) Comparison of substrate specificities of *Escherichia coli* endonuclease III and its mouse homologue (mNTH1) using defined oligonucleotide substrates, *Biochemistry*, 39, 11389-11398.
- Asagoshi, K., T. Yamada, Y. Okada, H. Terato, Y. Ohyama, S. Seki and H. Ide (2000b) Recognition of formamidopyrimidine by *Escherichia coli* and mammalian thymine glycol glycosylases. Distinctive paired base effects and biological and mechanistic implications, *J. Biol. Chem.*, 275, 24781-24786.
- Asagoshi, K., T. Yamada, H. Terato, Y. Ohyama, Y. Monden, T. Arai, S. Nishimura, H. Aburatani, T. Lindahl and H. Ide (2000c) Distinct repair activities of human 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase for formamidopyrimidine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine, *J. Biol. Chem.*, 275, 4956-4964.
- Bjelland, S., L. Eide, R.W. Time, R. Stote, I. Eftedal, G. Volden and E. Seeberg (1995) Oxidation of thymine to 5-formyluracil in DNA: mechanisms of formation, structural implications, and base excision by human cell free extracts, *Biochemistry*, 34, 14758-14764.
- Bruner, S.D., D.P. Norman and G.L. Verdine (2000) Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA, *Nature*, 403, 859-866.
- Hazra, T.K., T. Izumi, R. Venkataraman, Y.W. Kow, M. Dizdaroglu and S. Mitra (2000) Characterization of a novel 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity in *Escherichia coli* and identification of the enzyme as endonuclease VIII, *J. Biol. Chem.*, 275, 27762-27767.
- Ide, H. (2001) DNA substrates containing defined oxidative base lesions and their application to study substrate specificities of base excision repair enzymes, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 68, 207-221.
- Jiang, D., Z. Hatahet, J.O. Blaisdell, R.J. Melamede and S.S. Wallace (1997) *Escherichia coli* endonuclease VIII: cloning, sequencing, and overexpression of the *nei* structural gene and characterization of *nei* and *nei nth* mutants, *J. Bacteriol.*, 179, 3773-3782.
- Klungland, A., M. Hoss, D. Gunz, A. Constantinou, S.G. Clarkson, P. W. Doetsch, P.H. Bolton, R.D. Wood and T. Lindahl (1999a) Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein, *Mol. Cell*, 3, 33-42.
- Klungland, A., I. Rosewell, S. Hollenbach, E. Larsen, G. Daly, B. Epe, E. Seeberg, T. Lindahl and D.E. Barnes (1999b) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 13300-13305.
- Le Page, F., E.E. Kwoh, A. Avrutskaya, A. Gentil, S.A. Leadon, A. Sarasin and P.K. Cooper (2000) Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome, *Cell*, 101, 159-171.
- Luna, L., M. Bjoras, E. Hoff, T. Rognes and E. Seeberg (2000) Cell-cycle regulation, intracellular sorting and induced overexpression of the human NTH1 DNA glycosylase involved in removal of formamidopyrimidine residues from DNA, *Mutat. Res.*, 460, 95-104.
- Masaoka, A., H. Terato, M. Kobayashi, A. Honsho, Y. Ohyama and H. Ide (1999) Enzymatic repair of 5-formyluracil. I. Excision of 5-formyluracil site-specifically incorporated into oligonucleotide substrates by AlkA protein (*Escherichia coli* 3-methyladenine DNA glycosylase II), *J. Biol. Chem.*, 274, 25136-25143.
- Masaoka, A., H. Terato, M. Kobayashi, Y. Ohyama and H. Ide (2001) Oxidation of thymine to 5-formyluracil in DNA promotes misincorporation of dGMP and subsequent elongation of a mismatched primer terminus by DNA polymerase, *J. Biol. Chem.*, 276, 16501-16510.
- Matsumoto, Y., Q.M. Zhang, M. Takao, A. Yasui and S. Yonei (2001) *Escherichia coli* Nth and human hNTH1 DNA glycosylases are involved in removal of 8-oxoguanine from 8-oxoguanine/guanine mispairs in DNA, *Nucleic Acids Res.*, 29, 1975-1981.
- Michaels, M.L., L. Pham, C. Cruz and J.H. Miller (1991) MutM, a protein that prevents G-C-T-A transversions, is formamidopyrimidine-DNA glycosylase, *Nucleic Acids Res.*, 19, 3629-3632.
- Minowa, O., T. Arai, M. Hirano, Y. Monden, S. Nakai, M. Fukuda, M. Itoh, H. Takano, Y. Hippou, H. Aburatani, K. Masumura, T. Nohmi, S. Nishimura and T. Noda (2000) Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 4156-4161.
- Nishioka, K., T. Ohtsubo, H. Oda, T. Fujiwara, D. Kang, K. Sugimachi and Y. Nakabeppu (1999) Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs, *Mol. Biol. Cell*, 10, 1637-1652.
- 岡野聰、安井明 (2001) 塩基損傷と単鎖切断の修復ネットワーク、蛋白質核酸酵素, 46, 959-967。
- Saito Y., F. Uraki, S. Nakajima, A. Asaeda, K. Ono, K. Kubo and K. Yamamoto (1997) Characterization of endonuclease III (*nth*) and endonuclease VIII (*nei*) mutants of *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, 179, 3783-3785.
- Sarker A.H., S. Ikeda, H. Nakano, H. Terato, K. Imai, K.

- Akiyama, K. Tsutsui, Z. Bo, K. Kubo, K. Yamamoto, A. Yasui, M. C. Yoshida and S. Seki (1998) Cloning and characterization of a mouse homologue (mNth1) of *Escherichia coli* endonuclease III, *J. Mol. Biol.*, 282, 761-774.
- Senturker, S., P. Auffret van der Kemp, H.J. You, P.W. Doetsch, M. Dizdaroglu and S. Boiteux (1998) Substrate specificities of the ntg1 and ntg2 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* for oxidized DNA bases are not identical, *Nucleic Acids Res.*, 26, 5270-5276.
- Takao, M., H. Aburatani, K. Kobayashi and A. Yasui (1998) Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage, *Nucleic Acids Res.*, 26, 2917-2922.
- Terato, H., A. Masaoka, M. Kobayashi, S. Fukushima, Y. Ohyama, M. Yoshida and H. Ide (1999) Enzymatic repair of 5-formyluracil. II. Mismatch formation between 5-formyluracil and guanine during dna replication and its recognition by two proteins involved in base excision repair (AlkA) and mismatch repair (MutS), *J. Biol. Chem.*, 274, 25144-25150.
- Thayer, M.M., H. Ahern, D. Xing, R.P. Cunningham and J.A. Tainer (1995) Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure, *EMBO J.*, 14, 4108-4120.
- Wallace, S.S. (1997) Oxidative damage to DNA and its repair, In : J.G. Scandalios (Ed), *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 49-90.
- Yoshida, M., K. Makino, H. Morita, H. Terato, Y. Ohyama and H. Ide (1997) Substrate and mispairing properties of 5-formyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate assessed by in vitro DNA polymerase reactions, *Nucleic Acids Res.*, 25, 1570-1577.
- Zhang, Q.M. (2001) Role of the *Escherichia coli* and human DNA glycosylases that remove 5-formyluracil from DNA in the prevention of mutations, *J. Radiat. Res.*, 42, 11-19.
- Zhang, Q.M., I. Miyabe, Y. Matsumoto, K. Kino, H. Sugiyama and S. Yonei (2000) Identification of repair enzymes for 5-formyluracil in DNA. Nth, Nei, and MutM proteins of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 275, 35471-35477.
- Zharkov, D.O., R.A. Rieger, C.R. Iden and A.P. Grollman (1997) NH₂-terminal proline acts as a nucleophile in the glycosylase/AP-lyase reaction catalyzed by *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) protein, *J. Biol. Chem.*, 272, 5335-5341.
- Zharkov, D.O., T.A. Rosenquist, S.E. Gerchman and A.P. Grollman (2000) Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase, *J. Biol. Chem.*, 275, 28607-28617.

Environ. Mutagen Res., 23 : 177 - 182 (2001)

酸化ストレス発がんの分子機構とその標的遺伝子

豊國 伸哉*

京都大学大学院医学研究科基礎病態学講座病態生物学専攻
〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町

Target genes in oxystress-induced carcinogenesis and its molecular mechanisms

Shinya Toyokuni

Department of Pathology and Biology of Diseases, Graduate School of Medicine, Kyoto University
Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

Summary

Oxidative stress has been associated with carcinogenesis. In 1982, our laboratory established an oxystress-induced carcinogenesis model of rodent kidney by the use of an iron chelate, ferric nitrilotriacetate. This model is unique in that 1) only carcinoma, not sarcoma, is induced, 2) the induced tumor is of high malignant potential to kill the animal by pulmonary metastasis, peritoneal invasion or rupture of the primary tumor, and, 3) increase in a variety of covalently modified products including 8-oxoguanine, thymine-tyrosine cross-link, 4-hydroxy-2-nonenal and its modified proteins are demonstrated in its early stage. Since in general free radicals are not considered to react with specific target molecules in contrast with immune reaction, we undertook to answer the question whether there is any specific target gene (s) in this carcinogenesis model. By genetically analyzing F₁ hybrid rats, we found two chromosomal areas that showed a high incidence of loss of heterozygosity, which lead to a finding that *p15^{INK4B}*/*p16^{INK4A}* tumor suppressor genes are one of the major pathways responsible for this oxystress-induced cancer. Furthermore, by screening 84,000 transcripts by differential display techniques, we found that at least 15 genes associated with stress-response or cellular proliferation are differentially expressed in this model. We believe that not only genetic changes but also epigenetic changes play a role in oxidative stress-induced carcinogenesis.

Keywords : oxidative stress, iron, carcinogenesis, allelic loss, p16 tumor suppressor gene

緒 言

近年、マスメディアにおいて、「酸化ストレス、活性酸素、フリーラジカル」といった用語が盛んに使用されるようになっている。科学の進歩より、マスメディアの話題づくりの方が先行している感は否めないが、私は科学者がこれを分子レベルで明らかにしていく義務があると考える。事実、活性酸素、フリーラジカルの発生が、

動脈硬化症、発がん、糖尿病をはじめとする「生活習慣病」に大いに関係していることが世界中の研究により判明しつつある。この総説においては、最初に、酸化ストレスについて概説し、次に重金属のひとつである鉄と発がんの関係について、私たちのデータを中心に紹介させていただく。

活性酸素とフリーラジカルは、ほぼ同じ意味に使用されてはいるものの、厳密にはその定義は異なる。フリーラジカルは、「1つ以上の不対電子（unpaired electron）を有する化学種」と明確に定義されるが、活性酸素の定義はやや曖昧で、ヒドロキシラジカル（•OH）、スーパ

* toyokuni@path1.med.kyoto-u.ac.jp

受付：2001年9月6日 受理：2001年9月6日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第12回公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」で発表された。
This paper was presented at the 12th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 26th, 2001. The symposium entitled "Molecular Pathogenesis for Oxidative Stress", was organized by Tatsuo Nunoshiba and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

一オキシド (O_2^-) といった本来のフリーラジカル以外に、酸素原子を含む化学種でフリーラジカルではないが反応性はフリーラジカルと同様に高いものが含まれる。これには過酸化水素 (H_2O_2)、一重項酸素 (1O_2)、脂質ペルオキシド (lipid peroxide) などが含まれる。後述するが、活性酸素の発生の際には、遷移金属を介したフェントン反応もしくはハーバー・ワイス反応が重要となる。フェントン反応は実際に100年以上前に報告がある (Fenton, 1894)。また、活性酸素ではないがフリーラジカルである化学種といえば、四塩化炭素が肝臓で活性化された $\bullet CCl_3$ のような分子種が挙げられる。

一方、酸化ストレスは、「活性酸素・フリーラジカルによる負荷から、抗酸化酵素・抗酸化剤・分子傷害の修復酵素などによる防御・消去・修復作用をさしひいたもの」であると定義される。活性酸素が過剰に生成する病態は、紫外線・放射線照射、鉄・銅などの遷移金属の負荷、ウイルス感染症、炎症、抗癌剤の薬理作用、移植や心筋梗塞などに伴う虚血・再灌流傷害など多岐に渡る。ここで興味深いことは、再灌流傷害以外の上記病態はすべて、ヒトにおいて発がんとの関連が指摘されているということである。すなわち、紫外線による皮膚癌、放射線による白血病、鉄の過剰蓄積による肝細胞癌 (原発性ヘモクロマトーシス、鉄の吸収が増加する遺伝性疾患) や中皮腫 (アスペスト線維の吸引による胸膜腫瘍、アスペストの鉄含量は約30%と高いことで知られる)、B型・C型肝炎後の肝硬変に伴う肝細胞癌、重症火傷後の皮膚癌、結核性胸膜炎・膿胸に伴う悪性リンパ腫、化学療法後の2次発がんなどである。全例において酸化ストレスが主要因として関与しているかどうかは不明であるが、前述の現象は発がんと酸化ストレスを結びつける重要な証拠と考えられる。

1. 内因性の酸化ストレス

発がんと酸化ストレスを考える上で、未解決でかつ最も重要な命題は、私たちが生きている限り存在し、主に、ミトコンドリアの活動に起因する内因性の酸化ストレスが、果たして発がんに関連しているかどうかであろう。ここに80年代に米国カリフォルニア大学のAmes博士により報告された興味あるデータがある。ラットとヒトの発癌リスクの年齢分布を検討すると、共に年齢の5乗に比例して増加するというのである (Ames et al, 1985)。実際、飼育室で観察していると、正常ラットも高齢になると白血病や肉腫などの悪性腫瘍が高頻度に出現することがわかる。この際、動物の寿命が、体重あたりの酸素消費量に密接に関連していることは注目される (Shigenaga et al, 1989)。すなわち、内因性の酸化ストレスが発がんの最大の要因になっている可能性があると私は考えている。

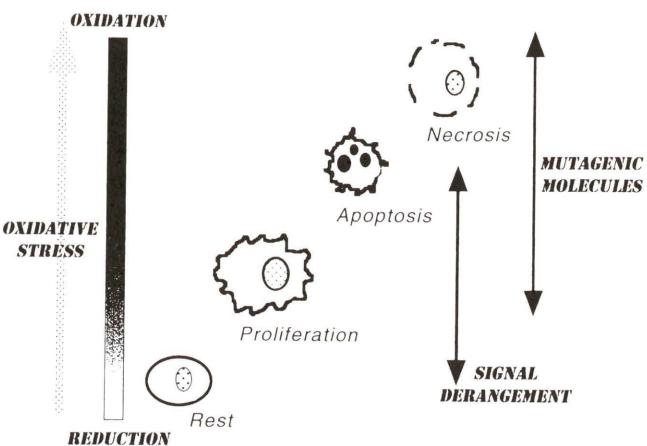


Fig. 1 Biological significance of oxidative stress

2. 酸化ストレスと発がんのつながり

90年代において、「軽度の酸化ストレスは、かえって細胞の増殖を促進する」という新しいコンセプトが確立された。たとえば、フラスコの中で、臍β細胞由来の *RINm5F* という名前の細胞株に、薬剤を加えていくことにより酸化ストレスをかけていくと、その程度が強くなるにしたがい、細胞増殖促進、アポトーシス (積極的細胞死)、壊死 (受動的細胞死) という全く異なる生物現象が観察される (Dypbukt et al, 1994)。

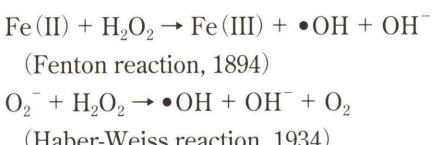
このコンセプト (Fig. 1) (Toyokuni, 1999) を基に、私たちは発がん過程における酸化ストレスの役割に関して、以下のような仮説をたてている。発がんに関しては、実験皮膚がんモデルで確立された「2段階説」が古典的である。2段階とは、ゲノムDNAに何らかの不可逆的な傷の入った細胞ができる「イニシエーション」の段階、それにひきつづいて起こるDNAに傷の入った細胞がクローナルに増殖する「プロモーション」の段階をいう。これを酸化ストレス発がんにあてはめると、高度の酸化ストレスによるDNA構造の不可逆的な変化に基づく、ゲノムDNAの点突然変異、欠損、塩基の付加あるいは染色体転座の形成などがイニシエーション、それにひきつづいた持続的酸化ストレス状況下で耐性細胞が選択的に増殖していく過程がプロモーションであると考えることができよう。ゲノムの中で遺伝子として意味をなす部分はわずか数パーセントであることが知られており、イニシエーションにおいては、当然ながら、確率論的な問題を生じる。また、プロモーションの時期においては、後述のごとく、タンパクの発現様式が正常細胞と大幅に変わっていることが判明しつつある。

発がんのメカニズムに関する研究は、この20年間で長足の進歩を遂げた。「がんは、細胞に存在するゲノムDNAの異常が原因で発生する」というコンセプトが確立されたが、これは「がん遺伝子」および「がん抑制遺

伝子」の発見による。これらは、すべての細胞に存在する遺伝子であるが、その概念を簡単に説明すると、がん遺伝子とは、変異などのゲノム情報の変化や高発現に伴って細胞の恒常的な増殖を促す方向に作用する遺伝子、がん抑制遺伝子とは、逆に、ゲノムDNAに傷が入るような細胞の一大事に、細胞の増殖をいったん停止し修復したり、場合によってはアポトーシスへ導く遺伝子である。がん遺伝子は、現在、100以上のものが、がん抑制遺伝子は20ほどのものが報告されている。勿論、個々のがんには個性があるのであるが、ひとつの仮説として「がん化には、細胞増殖のためのエンジンが2段階くらい加速され、ブレーキが2つ以上は必要がある」というふうに譬えられる。中でも、ヒトの大腸癌においては、Vogelgramという図に示されるように、がん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子への突然変異の起こり方における順番があるということが判明している (Vogelstein and Kinzler, 1998)。さて、ここで問題は、これらのヒト遺伝子の変化が酸化ストレスに起因するかどうかをいかに追究するかである。

3. 酸化ストレスによるDNA傷害と分子疫学

DNA傷害を引き起こす活性酸素は、最終的に、ヒドロキシラジカル (あるいはその類縁分子) と一重項酸素に集約される。ここで注意すべきは、過酸化水素やスーパーオキシドの反応力は相当弱いものであり、単独で分子の不可逆的な構造変化を起こすことはできないという事実である。このことは逆に、これら2つの分子がタンパク質のシステイン残基の酸化・還元を介したレドックス制御に重要な役割を果たす所以でもある。しかしながら、過酸化水素とスーパーオキシドは、触媒としてはたらく遷移金属の存在下ではフェントン反応 (Fenton, 1894) あるいはハーバー・ワイス反応 (Haber and Weiss, 1934) によりヒドロキシラジカルを生ずる。



一重項酸素は、光反応あるいは塩素のようなハロゲンと過酸化水素の反応から生じるが、ヒドロキシラジカルより反応性はやや弱い。ヒドロキシラジカルとDNAの反応により生じる修飾された塩基の種類は実際に多く100種類を越えるといわれているが、そのほとんどのものは定量するのにガスクロマトグラフィーと質量検出器を必要とする (Dizdaroglu, 1991)。このうち、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) は、葛西・西村両博士により初めて報告された修飾塩基であるが (Kasai and Nishimura, 1984), HPLCと電気化学検出器により容易に測定できること (Floyd et al, 1986), およびDNA複製

の際に存在すると G : C から T : A への transversion を起こすという生物学的意義がある (Shibutani et al, 1991) ことより、最も頻繁に測定されており、さまざまな発がん系の標的臓器において増加が見られることが明らかにされている (Kasai, 1997)。また、8-OHdG は尿中に排泄されることも知られており (Shigenaga et al, 1989), 特異モノクローナル抗体 (N45.1) (Toyokuni et al, 1997) を使用した enzyme-linked immunosorbent assay 系により、体内の酸化ストレスを評価するのに使用されるようになっている (Erhola et al, 1997; Leinonen et al, 1997)。また、組織切片上で 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (Toyokuni et al, 1997) や 4-hydroxy-2-nonenal 修飾蛋白 (Toyokuni et al, 1994; Toyokuni et al, 1995) に対するモノクローナル抗体を使用して免疫染色を行うことによる酸化ストレスの評価に関しては、これまでに発表した総説を参照されたい (Toyokuni, 1999)。

発生した癌組織における特定遺伝子の変異の種類を調べることによって、どのような変異原物質が作用したのかを推測しようとする試みが分子疫学 (molecular epidemiology) である。この種の研究は、ヒトの肝癌、皮膚癌、肺癌の *p53* がん抑制遺伝子の点突然変異について、最も詳細に解析されている (Harris, 1995)。たとえば、カビ毒素であるアフラトキシンによる肝癌ではコドン249の3番目の塩基のGからTへの変異が量依存性に起こることが知られている。また、紫外線誘発と考えられる皮膚癌ではCCからTTへの変異が起こり、喫煙に起因する肺癌においても決まったコドンでGからTへの変異が起こることが明らかにされた。これらの塩基置換はそれぞれ、アフラトキシン、シクロブタンピリミジンダイマー、ベンツピレンとDNAとの反応産物に起因していることを裏づけるデータが集積している。これまで、GからTあるいはCCからTTへの点突然変異は活性酸素によるDNA傷害に起因するという in vitro のデータが数多く提出してきた (Reid and Loeb, 1993) が、in vivo における変異のスペクトラムについては、データをさらに積み重ねる必要があると考えられる。ざっと2~3万個は存在するといわれる遺伝子の中からどの遺伝子を選択して評価するかということも重要な観点であるが、何らかのゲノムワイドなスクリーニング方法の開発が望まれる。この話は後述の酸化ストレス発がんの動物モデルの標的遺伝子の話題と大いに関係する。*p53* の場合は転写因子としての作用をもっているため種々の遺伝子の発現に影響を及ぼすことが知られており、これが点突然変異という変異形態の多い理由かもしれない。*p16INK4A* がん抑制遺伝子は cell cycle における cyclin-dependent kinase 4 or 6 の重要な抑制タンパク質である (Kamb et al, 1994; Nobori et al, 1994)。ヒト癌における変異は、ホモ欠損・点突然変異・プロモーター領域メチル化の3種類の不活性化様式が認められるのが特徴であるが

(Liggett and Sidransky, 1998), 欠損が33%と多く、それに23%のGからTへの変異が次いでいる (Hussain and Harris, 1998)。このことは、後述の動物実験の結果とあわせて興味深い事実である。

4. 鉄による発癌モデルとその標的遺伝子

ヒト癌を使用したアプローチのみでは、上述のような解析に限られるため、動物実験が必要となる。私たちは1982年以来、京都大学において、鉄ニトリロ三酢酸 (ferric nitrilotriacetate) によるラット腎発がんモデルを酸化ストレスによる発がんモデルとして確立し、研究を重ねてきた (Fig. 2)。このモデルの特色は、1) 腫瘍がヒト腎細胞癌と同じく必ず上皮由来であること、2) 固形腫瘍で転移や浸潤が高率に起こり、それにより動物が死亡すること、3) 発がんの過程において鉄を介した酸化ストレスを実証できるという3点である。その詳細なデータについては、これまでに発表した総説に譲る (Toyokuni, 1996; Toyokuni, 1999)。このモデルにおいて特異的標的となる遺伝子は存在するのか、あるとすればそれはどの遺伝子かについて、私たちは以下の4つのアプローチを平行して推進した。1) ヒト腫瘍などより類推される候補遺伝子の検討、2) 活性酸素の代謝に関連する遺伝子の検討、3) Differential Display 法、4) F_1 ハイブリッド動物で作製した腫瘍におけるLOH (loss of heterozygosity) あるいは allelic loss の解析である。1) では、*ras*, *p53*, *vhl*, *tsc2*などの遺伝子を検討したがいずれも主要な標的遺伝子ではなかった (Nishiyama et al, 1995; Toyokuni et al, 1998)。2) のアプローチではグルタチオンSトランスフェラーゼのπアイソザイムの特異的な発現上昇を認め (Tanaka et al, 1998)、3) からはCD47, annexin IIをはじめ多数の遺伝子の発現の増減を認め (Nishiyama et al, 1997; Tanaka et al, 2000)、現在も精力的に追究を行っている。ここでは4) より得られた最新の結果を紹介する。

一般的に哺乳類では、ゲノムDNAの非遺伝子部分に、単純な繰り返し配列を有することが知られており、これはマイクロサテライトと呼ばれる。各マイクロサテライトの染色体位置に関する情報はインターネットで公開されており、さらにその領域を polymerase chain reaction (PCR) により増幅するためのプライマーも市販されている。ラットにおいても精密な染色体マッピングが行われ、使用できるマーカー数は優に3000を越える。ここで利用するのは、繰り返し配列の反復数がラットの系統によって異なるという事実である。これはラットが種々の系統に進化する過程で起こった現象であると考えられている。同様の現象はヒトでも認められるが、ヒトは極めて複雑な雑種であるため、解析はそれほど単純ではない。ここで、ある2種類の異なる近交系のラットをかけあわせる (F_1 ハイブリッド動物) と、すべての体細胞の



Fig. 2 An example of renal cell carcinoma induced by ferric nitrilotriacetate

ゲノムDNAは一对のうち、片方が異なる近交系の親由来ということになる。マイクロサテライトマーカーはあらかじめ、2種類の系統でPCR産物の異なるものをスクリーニングしておく。 F_1 ハイブリッド動物の正常な細胞を使用して、2系統で繰り返し配列の反復数が異なるマイクロサテライトを選択し、ゲノムスキャンすると、ラット染色体5番と8番に限って、数個の連続したマイクロサテライト領域にまたがってPCR産物の電気泳動バンドが1本になる腫瘍が高頻度に存在することが判明した。これは、すなわち、その染色体部位の一方のアレルが失われていることを意味し、loss of heterozygosity (LOH) または allelic loss と呼ばれる状態である。がん抑制遺伝子では両方のアレルが不活性化されて、初めてある形質の変化が出現するが、一般的にLOHが起こると残った遺伝子のアレルにさらに点突然変異や欠損が起こりやすくなるとされているため (おそらくhomologous recombinationによる修復が困難となるため)、これはがん抑制遺伝子を探索する手段の一つである。この戦略により、私たちは、鉄ニトリロ三酢酸の標的遺伝子の一つが $p15^{INK4B}/p16^{INK4A}$ がん抑制遺伝子であることを見出した。さらに、この標的遺伝子に起こる変異のほとんどは点突然変異ではなく欠損であり、5'プロモーター領域のメチル化も高率に起こっていた (Tanaka et al, 1999)。 $p15/p16$ 遺伝子の欠損は、前述のごとくヒトでは何種類かの癌で高頻度に認められるものの、培養細胞ではない動物の腫瘍における報告例はこれが世界で初めてであった。

活性酸素の反応は、免疫反応と対極をなし、特異性がなく相手を選ぶことなく近傍のどんな分子とも反応するのが特徴である。したがって、活性酸素による発がんの際には、種々の遺伝子が均等に傷害を受けるだろうとの

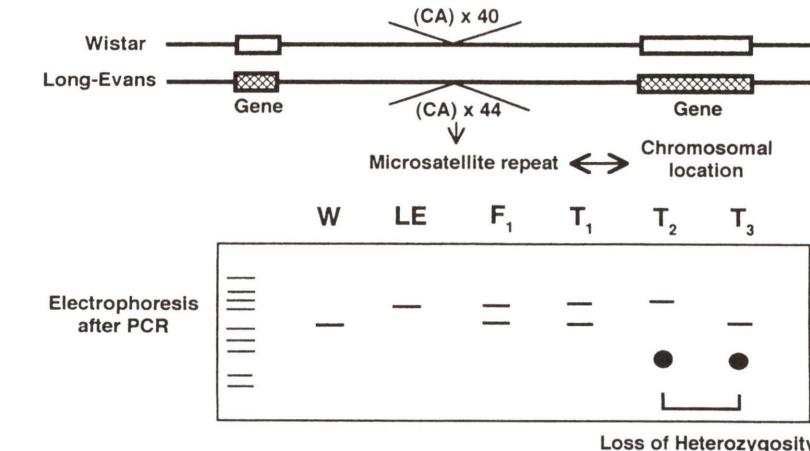


Fig. 3 Principle of a search for allelic loss in ferric nitrilotriacetate-induced tumor by the use of polymerase chain reaction. LE, Long-Evans strain of rats; W, Wistar strain of rats

予測もなされていたが、私たちのデータは思いがけずこの仮説に反するものとなった。これはすなわち、生体内における活性酸素の反応は、試験管内反応と異なり、かなり特異的でもあるということを意味する。最近、私たちは捺印細胞を使用した fluorescent in situ hybridization を駆使することにより、上記LOHが鉄ニトリロ三酢酸の投与開始後、わずか数週の早期にこの遺伝子特異的に起こっていることを見出した (投稿中)。この事実を踏まえたがん予防あるいはがん治療の新たな展開が期待される。

結語

酸化ストレスと発がんの関係は、アルデヒド化合物やDNA修飾塩基など変異原性を有する産物の存在証明に始まり、ようやく標的遺伝子に迫りつつあるところである。この際、上記のモデルからもわかるように、鉄はキープレーヤーの一つである。私たちは酸素を利用していながら、酸素から効率良くエネルギーを得るために鉄の存在は欠かせない。しかしながら、鉄は諸刃の剣であり、そのために私たちの体内では常に活性酸素が発生している。すなわち、ヒトにおいては、鉄の摂取量が少なすぎれば、鉄欠乏性貧血により労働に支障を来すが、逆に鉄を摂取しすぎると発がんの危険性が増加するのである。これに関しては、米国をはじめとしたいくつかの調査報告がある (Stevens et al, 1988)。特に、中年以降の男性は、健康を保つためには鉄と上手につきあうことが重要であろう。

参考文献

- Ames, B.N., R.L. Saul, E. Schwiers, R. Adelman and R. Cathcar (1985) Oxidative DNA damage as related to cancer and aging : The assay of thymine glycol, thymidine glycol, and hydroxymethyluracil in human and rat urine. In : R.S. Sohal, L.S. Birnbaum and
- Kasai, H. (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis, Mutat. Res., 387, 147-163.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing

- agents, *Nucleic Acids Res.*, 12, 2137-2145.
- Leinonen, J., T. Lehtimaki, S. Toyokuni, K. Okada, T. Tanaka, H. Hiai, H. Ochi, P. Laippala, V. Rantalahti, O. Wirta, A. Pasternack and H. Alho (1997) New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus, *FEBS Lett.*, 417, 150-152.
- Liggett, W.H. Jr. and D. Sidransky (1998) Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer, *J. Clin. Oncol.*, 16, 1197-1206.
- Nishiyama, Y., H. Suwa, K. Okamoto, M. Fukumoto, H. Hiai and S. Toyokuni (1995) Low incidence of point mutations in H-, K- and N-ras oncogenes and p53 tumor suppressor gene in renal cell carcinoma and peritoneal mesothelioma of Wistar rats induced by ferric nitrotriacetate, *Carcinogenesis*, 19, 897-903.
- Toyokuni, S. (1996) Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation, *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 553-566.
- Toyokuni, S. (1999) Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology, *Pathol. Int.*, 49, 91-102.
- Toyokuni, S., N. Miyake, H. Hiai, M. Hagiwara, S. Kawakishi, T. Osawa and K. Uchida (1995) The monoclonal antibody specific for the 4-hydroxy-2-nonenal histidine adduct, *FEBS Lett.*, 359, 189-191.
- Toyokuni, S., K. Okada, S. Kondo, H. Nishioka, T. Tanaka, Y. Nishiyama, O. Hino and H. Hiai (1998) Development of high-grade renal cell carcinomas in rats independent of somatic mutations in the Tsc2 and VHL tumor suppressor genes, *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 814-820.
- 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.
- Shigenaga, M.K., C.J. Gimeno and B.N. Ames (1989) Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9697-9701.
- Stevens, R.G., D.Y. Jones, M.S. Micozzi and P.R. Taylor (1988) Body iron stores and the risk of cancer, *N. Engl. J. Med.*, 319, 1047-1052.
- Tanaka, T., Y. Iwasa, S. Kondo, H. Hiai and S. Toyokuni (1999) High incidence of allelic loss on chromosome 5 and inactivation of p15^{INK4B} and p16^{INK4A} tumor suppressor genes in oxystress-induced renal cell carcinoma of rats, *Oncogene*, 18, 3793-3797.
- Tanaka, T., S. Kondo, Y. Iwasa, H. Hiai and S. Toyokuni (2000) Expression of stress-response and cell proliferation genes in renal cell carcinoma induced by oxidative stress, *Am. J. Pathol.*, 166, 2149-2157.
- Tanaka, T., Y. Nishiyama, K. Okada, K. Satoh, A. Fukuda, K. Uchida, T. Osawa, H. Hiai and S. Toyokuni (1998) Over-expression of glutathione S-transferase Yp isozyme and concomitant down-regulation of Ya isozyme in renal cell carcinoma of rats induced by ferric nitrotriacetate, *Carcinogenesis*, 19, 897-903.
- Toyokuni, S. (1996) Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation, *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 553-566.
- Toyokuni, S. (1999) Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology, *Pathol. Int.*, 49, 91-102.
- Toyokuni, S., N. Miyake, H. Hiai, M. Hagiwara, S. Kawakishi, T. Osawa and K. Uchida (1995) The monoclonal antibody specific for the 4-hydroxy-2-nonenal histidine adduct, *FEBS Lett.*, 359, 189-191.
- Toyokuni, S., K. Okada, S. Kondo, H. Nishioka, T. Tanaka, Y. Nishiyama, O. Hino and H. Hiai (1998) Development of high-grade renal cell carcinomas in rats independent of somatic mutations in the Tsc2 and VHL tumor suppressor genes, *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 814-820.
- Toyokuni, S., T. Tanaka, Y. Hattori, Y. Nishiyama, H. Ochi, H. Hiai, K. Uchida and T. Osawa (1997) Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrotriacetate-induced renal carcinogenesis model, *Lab. Invest.*, 76, 365-374.
- Toyokuni, S., K. Uchida, K. Okamoto, Y. Hattori-Nakakuki, H. Hiai and E.R. Stadtman (1994) Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrotriacetate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 2616-2620.
- Vogelstein, B. and K.W. Kinzler (1998) The Genetic Basis of Human Cancer, McGraw-Hill, New York.

Environ. Mutagen Res., 23: 183 - 195 (2001)

Mechanisms protecting genomic integrity from damage caused by reactive oxygen species: Implications for carcinogenesis and neurodegeneration

Yusaku Nakabeppu*, Yohei Tominaga, Daisuke Tsuchimoto, Yasuhito Ide, Seiki Hirano, Yasunari Sakai, Kunihiko Sakumi and Masato Furuichi

Division of Neurofunctional Genomics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, and CREST, JST, 3-1-1 Maidashi, Higashi-Ku, Fukuoka 812-8582, Japan

Summary

In mammalian cells, more than one genome in a single cell has to be maintained throughout the entire life of the cell, one in the nucleus and the other in the mitochondria. It seems likely that the genomes and their precursor nucleotides are highly exposed to reactive oxygen species, which are inevitably generated as a result of the respiratory function in mitochondria. To counteract such oxidative damage in nucleic acids, these cells are equipped with several defense mechanisms. Modified nucleotides in the nucleotide pools are hydrolyzed, thus avoiding their incorporation during synthesis of DNA or RNA. Damaged bases in DNA with relatively small chemical alterations, are mainly repaired by the base excision repair (BER) system, which is initiated by the excision of damaged bases by specific DNA glycosylases. Human MTH1 (hMTH1) protein hydrolyzes oxidized purine nucleoside triphosphates, such as 8-oxo-dGTP, 8-oxo-dATP and 2-hydroxy (OH)-dATP to the monophosphates. In human cells, multi-forms of hMTH1 polypeptides are located in the cytoplasm, mitochondria and nucleus, and their synthesis is regulated by both alternative splicing of the transcripts and the alternative initiation of their translation, both of which are further altered by a single nucleotide polymorphism. We observed an increased susceptibility to spontaneous carcinogenesis in *mth1* deficient mice, and alteration of MTH1 expression along with accumulation of 8-oxo-dG in patients with various neurodegenerative diseases. Human enzymes for the BER pathway, namely 8-oxoG DNA glycosylase (hOGG1), 2-OH-A/adenine DNA glycosylase (hMYH), and a novel AP endonuclease (hAPE2) are also located in the mitochondria as well as the nuclei in human cells, and the expression of mitochondrial OGG1 is altered in patients with various neurodegenerative diseases. Furthermore, MYH and APE2 have a functional PCNA binding motif, thus suggesting that the PCNA-dependent post-replicative BER plays an essential role in the repair of such misincorporated bases as 2-OH-dA or adenine opposite 8-oxoG in templates.

Keywords: oxidative damage, DNA repair, mutation, cell death, mitochondria

Introduction

Oxidative phosphorylation in mitochondria makes it feasible for eukaryotic organisms to produce energy to

*yusaku@bioreg.kyushu-u.ac.jp

Received: October 2, 2001, accepted: October 2, 2001

© Environmental Mutagen Society of Japan

maintain life. By electrons leaked from the respiratory chain, about 1 to 3 percent of consumed oxygen molecules are partially reduced, thus generating reactive oxygen species (ROS) such as superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals (Kang et al., 1998). ROS are so highly reactive that they can readily oxidize macromolecules in living cells, including lipids, proteins and

本稿は日本環境変異原学会第12回公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」で発表された。

This paper was presented at the 12th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 26th, 2001. The symposium entitled "Molecular Pathogenesis for Oxidative Stress", was organized by Tatsuo Nunoshiba and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

nucleic acids, thereby leading to various types of cellular dysfunction including cell death and mutagenesis (Ames et al., 1993; Shigenaga et al., 1994).

Among the various types of oxidative damage in cellular macromolecules, damage to nucleic acid is particularly hazardous because the genetic information present in genomic DNAs, such as nuclear and mitochondrial DNAs, can thus be altered. Damage to genomic DNAs often leads to cell death and degenerative diseases, or related mutations resulting in neoplasia and hereditary diseases (Ames and Gold, 1991). ROS also leads to various base or sugar modifications in DNA and free nucleotides, and strand breaks in DNA are introduced (Demple and Harrison, 1994). Especially, 8-oxoguanine (8-oxoG), one of the oxidized forms of guanine, is produced by ROS in a fairly large amount in both DNA and nucleotide pools, and being fairly stable is likely to accumulate in genomic DNAs in nuclei and mitochondria during normal aging of humans (Kasai and Nishimura, 1984; Hayakawa et al., 1993; Kang, et al., 1998). The accumulation of 8-oxoG in DNA, as a result of the incorporation of 8-oxo-dGTP from nucleotide pools or because of direct oxidation of DNA, increases the occurrence of A:T to C:G or G:C to T:A transversion mutation, respectively. This is because 8-oxoG forms a stable base pair with adenine as well as with cytosine (Shibutani, et al., 1991; Cheng et al., 1992; Maki and Sekiguchi, 1992).

Studies on mutator mutants revealed that *Escherichia coli* has several error avoiding mechanisms which minimize the deleterious effects of 8-oxoG, and in which MutT, FPG (MutM) and MutY proteins play important roles (Michaels and Miller, 1992; Sekiguchi, 1996). MutT protein hydrolyses 8-oxo-dGTP to 8-oxo-dGMP and pyrophosphate (Maki and Sekiguchi, 1992), thus avoiding the spontaneous occurrence of A:T to C:G transversion mutation during DNA synthesis, the rate of which in a *mutT* deficient strain increases hundreds to thousand-fold compared to the wild type (Tajiri et al., 1995). FPG (MutM) protein, originally identified as formamidopyrimidine DNA glycosylase, removes the 8-oxoG paired with cytosine (Bailly et al., 1989; Michaels et al., 1992). MutY protein with its DNA glycosylase activity excises adenine paired with guanine or 8-oxoG (Au et al., 1989). Resulting base-loss sites called apurinic or apyrimidinic (AP) sites are further processed through the base excision repair (BER) pathway, in which AP endonuclease plays a critical role for initiating repair replication. The rate of spontaneous occurrence of G:C to T:A transversion mutation in *fpg*(*mutM*) or *mutY* deficient strain is 10 to 50 times higher than that in wild type strain (Cabrera et al., 1988; Nghiem et al., 1988), and in double mutants of *mutM* and *mutY* is equivalent to that of the *mutT* mutant.

Mammalian cells also possess similar error avoiding mechanisms. cDNAs encoding MutT homolog (MTH1)

proteins with 8-oxo-dGTPase activity have been cloned from human as well as from the mouse and rat (Sakumi et al., 1993; Kakuma et al., 1995; Cai et al., 1995), and genomic organizations and the regulation of expression have been well characterized (Furuichi et al., 1994; Igarashi et al., 1997; Oda et al., 1997; Oda et al., 1999). An activity which excises adenine paired with guanine or 8-oxoG in DNA has been identified in human cells (Yeh et al., 1991), and a human gene encoding MutY homolog (MYH) protein has been cloned (Slupska et al., 1996). In contrast to the *mutT* and *mutY* gene families, there are at least two different genes in eukaryotes that encode 8-oxoG DNA glycosylase, one is the *fpg* or *mutM* homolog *AtMMH* identified in *Arabidopsis thaliana* (Ohtsubo et al., 1998), while the other is a novel gene found in yeast, *ogg1* (van der Kemp et al., 1996; Nash et al., 1996). In addition, human and mouse genes encoding proteins homologous to the yeast Ogg1 protein have also been identified (Boiteux and Radicella, 1999). As a result, mammalian cells have developed error avoiding mechanisms against 8-oxoG, combining ones evolved from *E. coli* with the other evolved from yeast.

In mammalian cells, more than one genome in a single cell has to be maintained throughout the entire life of the cell, one in the nucleus and the other in mitochondria. mtDNA is more susceptible to an attack by ROS than nuclear DNA since it is located in the vicinity of the mitochondrial respiratory chain, where ROS are continuously generated (Richter et al., 1988). It has recently been noted that damaged bases in mtDNA appear to be efficiently repaired by BER (Bogenhagen, 1999).

In this paper, we review the defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acids in human cells, and also discuss their biological significance (Table 1).

Sanitization of Oxidized Purine Nucleotides in the Nucleotide Pools

1. hMTH1 as oxidized purine nucleoside triphosphatase

The human *MTH1* gene located on chromosome 7p22 consists of 5 major exons. There are two alternative exon 1 sequences, namely exon 1a and 1b, and three contiguous segments (exon 2a, 2b, and 2c) in exon 2 which are alternatively spliced (Furuichi et al., 1994; Oda et al., 1997; Oda et al., 1999). As a result, the *hMTH1* gene produces 7 types (type 1, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A and 4B) of mRNAs. The B-type mRNAs with exon 2b-2c segments direct synthesis of three forms of hMTH1 polypeptides, hMTH1b (p22), hMTH1c (p21), and hMTH1d (p18) by alternative initiations of translation, while the others encode only hMTH1d. In human cells, hMTH1d is a major form, and is mostly localized in the cytoplasm with about 5% in the mitochondrial matrix (Kang et al., 1995). A single cell of Jurkat and HeLa lines contains about 4×10^5 and 2×10^5

Table 1 Mechanisms protecting genomic integrity from damage caused by reactive oxygen species

Enzyme	8-oxoG DNA Glycosylase	2-OH-A/Adenine DNA Glycosylase	AP endonuclease	Oxidized Purine Nucleoside Triphosphatase
Function	C: GO ↓ C: ■ + GO	AO: G ↓ AO + ■: G	A: GO ↓ A + ■: GO	C: ■ ↓ C + ■
Gene	<i>OGG1</i>	<i>MYH</i>	<i>APE2</i>	<i>MTH1</i>
Localization	Nucleus Mitochondria	Nucleus Mitochondria	Nucleus Mitochondria	(Nucleus) Cytoplasm Mitochondria
Expression	Brain > Thymus, Testis, Kidney, Spleen, Ovary	Thymus > Brain, Testis, Kidney, Spleen, Ovary	Heart, Kidney > Liver, Lung, Brain	Thymus, Testis, Kidney, Spleen, Ovary > Brain
Human Disease	SAH (↑), ALS (↓) AD (↓): NFT, SP (+)	NE	NE	PD, ALS, BT (↑) AD (↓): SP (+)
KO Mice	tumor (?)	tumor (?)	tumor (?)	Lung tumor (↑) Liver tumor (↑) Stomach tumor (↑)

GO: 8-oxoguanine, AO: 2-OH-adenine, ■: abasic site, AD: Alzheimer's disease, ALS: amyotrophic lateral sclerosis, SAH: subarachnoid hemorrhage, PD: Parkinson's disease, BT: brain tumor, NFT: neurofibrillary tangle, SP: senile plaque, NE: not examined

molecules, respectively, of the hMTH1d, thus 1 to 2×10^4 molecules of hMTH1d are present in the mitochondria of each cell (Oda et al., 1999). The other two forms are localized in the cytoplasm, however, their amounts reached only about 10% that of the levels for hMTH1d.

There is a single nucleotide polymorphism (SNP) that affects the splicing pattern of MTH1 mRNAs, and this SNP has a T to C base substitution at the beginning of exon 2c segment (Oda et al., 1997; Oda et al., 1999). This site serves as the 5' splicing site during the maturation of types 1, 2A, 3A and 4A mRNA, and this base change abolishes proper splicing at this site, leaving segments 2b and 2c connected, thus resulting in formation of only four types of RNAs, corresponding to types 1, 2B, 3B and 4B. The SNP in exon 2 also creates an additional alternative in-frame AUG in B type *MTH1* mRNAs yielding the fourth MTH1 polypeptide, MTH1a (p26) that possesses an additional mitochondrial targeting signal. As a result, in human cells the synthesis of multi-forms of MTH1 is regulated by both alternative splicing of their transcripts and alternative initiation of their translation, both of which are further altered by SNP.

MTH1 but not MutT efficiently hydrolyzes 2 forms of oxidized dATP, 2-OH-dATP and 8-oxo-dATP, as well as 8-oxo-dGTP (Sakumi et al., 1993; Yakushiji et al., 1997; Fujikawa et al., 1999), and MTH1 also hydrolyzes oxidized ribonucleotides, 2-OH-ATP, 8-oxoATP, and 8-oxo-GTP (Hayakawa et al., 1999; Fujikawa et al., 2001). MTH1 protein is therefore designated as an oxidized purine nucleoside triphosphatase (Table 1; Nakabeppu, 2001a). We have previously shown that 4 forms of recombinant hMTH1(a to d) efficiently hydrolyzes 2-OH-dATP as well

as 8-oxo-dGTP (Sakai unpublished results).

As shown in Fig. 1, thirty amino acid residues are identical between hMTH1 and *E. coli* MutT, and there is a highly conserved region consisting of 23 residues (MTH1: Gly36 to Gly58), with 14 identical residues. A chimeric protein, hMTH1-Ec, in which the 23 residue sequence of hMTH1 was replaced with that of MutT, and it thus retains the potential to hydrolyze 2-OH-dATP as well as 8-oxo-dGTP, thus indicating that the 23 residue sequences of hMTH1 and MutT are not only functionally and structurally equivalent, but also constitute a functional phosphohydrolase module (Fujii et al., 1999; Sakai et al., in preparation). Saturation mutagenesis of the module in hMTH1 indicated that an amphipathic property of the α -helix I consisting of 14 residues of the module (Thr44 to Gly58) is essential to maintain the stable catalytic surface of the enzyme (Cai et al., 1997; Fujii et al., 1999). A unique C-terminal region (aa.130-156) in hMTH1, which is missing in MutT, plays an important role in the maintenance of higher order structures of the substrate binding pocket or catalytic center of hMTH1 through the hydrophobic interaction with other hydrophobic β strands (Sakai et al., in preparation). A model for the solution structure of hMTH1 which also supports this hypothesis has been proposed based on NMR analyses (Mishima et al, in preparation). Mutation analyses for residues F27, W117 and D119, which showed apparent chemical shift perturbations in NMR analyses, suggesting that these residues likely form the substrate binding pocket, revealed that W117 is essential for MTH1 to recognize 2-OH-dATP and 8-oxo-dGTP, while D119 is essential especially for its recognition of 2-OH-dATP (Sakai et al., in

	βA	βB		
hMTH1	MGASRLYTLV	LVLQPQRVLL	GMKKRG G GAG	RWN-GF-GG
mMTH1	MSTSRLYTLV	LVLQPQRVLL	GMKKRG G GAG	RWN-GF-GG
rMTH1	MSTSRLYTLV	LVLQPQRVLL	GMKKRG G GAG	RWN-GF-GG
MutT	M-KKLQIAV	GIIRNENNEI	FITRRAAADAH	MANKLEFPGG
			**	
				37
				37
				37
				38
	$\alpha 1$		βC	
hMTH1	KVQEGETIED	GARRELQEEES	GLTVDALHKV	GQIVFEFVGE
mMTH1	KVQEGETIED	GAKRELLEES	GLSVDTLHKV	GHISFEFVGS
rMTH1	KVQEGETIED	GAKRELLEES	GLRVDTLHKV	GHISFEFVGS
MutT	KIEMGETPEQ	AVVRELQEEV	GITPQHFSLF	EKLEYEFPDR
	**	**		
				77
				77
				77
				78
	βD	βE		
hMTH1	PELMDVHVFC	TDSIQGTPVE	SDEMRPCWFQ	LDQIPFKDMW
mMTH1	PELMDVHIFS	ADHVHGTPTE	SEEMRPQWFQ	LDQIPFADLW
rMTH1	PELMDVHIFS	TDHVHGTPTE	SEEMRPQWFQ	LDQIPFADMW
MutT	H-ITLWFWL	VERWEGEPEWG	KEGQPGEWMS	LVGLNADDWP
				117
				117
				117
				116
	$\alpha 2$	βF	βG	
hMTH1	PDDSYWFPLL	LQKKKFHGYF	KFQGQDTILD	YTLREVDTV
mMTH1	PDDSYWFPLL	LQKKKFCGHF	KFQDQDTILS	YSLREVDSF
rMTH1	PDDSYWFPLL	LQKKKFCGHF	KFHGQDTILS	YSLREVDEF
MutT	PANEPVIAKL	KRL		
				156
				156
				156
				129

Fig. 1 Comparison of the structures of human (h), mouse (m), rat (r) MTH1 and *E. coli* MutT. Conserved residues among MTH1 and MutT are shaded in gray. The phosphohydrolase modules of MutT and MTH1 are shaded in dark gray. The asterisks indicate 14 amino acid residues of hMTH1 essential for 8-oxo-dGTPase in phosphohydrolase modules (Cai et al., 1997; Fujii et al., 1999). Amino acid residues of hMTH1 that are shown in a boxed represent those in which chemical shift perturbations were observed. Secondary structures of hMTH1 are shown above the sequence (Yakushiji et al., 1997). $\alpha 1, 2$; α -helix 1, 2. βA - βG ; β -strand A-G

preparation).

2. Biological Significance of MTH1

In *mth1*-deficient mice, the incidence of spontaneous carcinogenesis in the lung, liver and stomach increased to several-fold of that in wild type mice (Table 1; Tsuzuki et al., 2001). We detected a two to three-fold increase in the accumulation of 8-oxo-dG in such tissues (Furuichi et al., unpublished results) and also in the spontaneous mutation rate in *mth1*-deficient ES cells (Tsuzuki et al., 2001). Furthermore, the increased accumulation of 8-oxo-dG in human cancerous tissues including brain tumors is generally coincidental with the increased expression of hMTH1 protein (Table 1; Okamoto et al., 1996; Iida et al., 2001a). G:C to T:A transversion mutations that can be caused by 8-oxo-dGTP and 2-OH-dATP is frequently observed in p53 gene in human cancer, especially in the lung and liver (Hainaut et al., 1997), and these findings agree with our observation in *mth1*-deficient mice.

We recently found the regional accumulation of 8-oxo-dG and altered expression of hMTH1 in patients with various neurodegenerative diseases (Table 1). The most typi-

cal cases are patients with Parkinson's disease, in which we found a significant increase of 8-oxo-dG accumulated in the cytoplasm or mitochondria with a coincidentally elevated expression of hMTH1 in the substantia nigra neurons (Shimura-Miura et al., 1999). In postmortem tissue specimens from patients with Alzheimer's disease, the expression levels of hMTH1 at entorhinal cortex are also elevated, while levels of hMTH1 apparently decrease in the stratum lucidum at CA3 corresponding to mossy fiber synapses, where hMTH1 is highly expressed in control subjects (Furuta et al., 2001).

It is therefore very likely that oxidative damage to nucleotides by reactive oxygen species is implicated in the development and progress of cancer, neurodegeneration, or other age-associated diseases, and that MTH1 plays important roles to avoid such damage as summarized in Fig. 2. However, the damaged molecules responsible for their molecular etiologies are largely unknown. There is accumulating evidence suggesting that either 8-oxo-dG or 8-oxo-dGTP may be involved in these diseases because of the availability of methods including antibodies for its detection. On the other hand, concerning 2-OH-

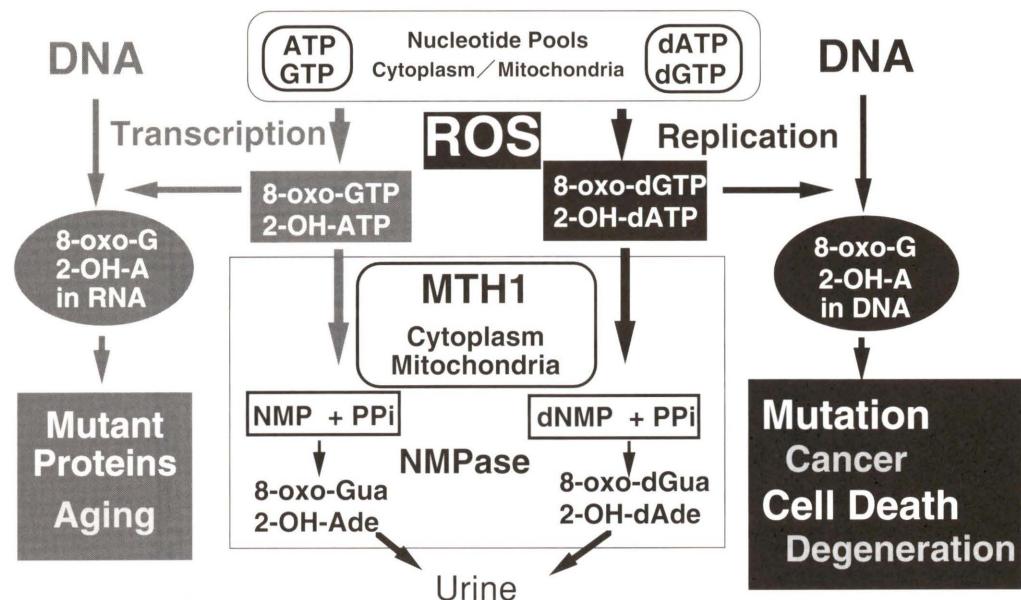


Fig. 2 The biological roles of MTH1 protein which hydrolyzes oxidized purine nucleoside triphosphates. Oxidized purine nucleoside triphosphates, such as 2-OH-dATP, 8-oxo-dGTP, 8-oxo-dATP and 2-OH-ATP, 8-oxo-GTP or 8-oxo-ATP are hydrolyzed to the corresponding monophosphates by the action of MTH1 protein. It has been demonstrated that guanylate kinase, which phosphorylates GMP and dGMP to the corresponding nucleoside diphosphates is inactive on 8-oxo-dGMP, thus prevents the re-utilization of the MTH1 cleavage product during DNA replication or transcription (Hayakawa et al., 1999). 8-oxo-dGMP is rapidly dephosphorylated, yielding 8-oxo-deoxyguanosine, a form readily excreted to the cell exterior. 8-Oxo-deoxyguanosine is present in mammalian urine, and urinary 8-oxo-deoxyguanosine has also been proposed to serve as a biomarker for oxidative stress (Ames et al., 1993; Shigenaga et al., 1994). Based on the biochemical and genetic data discussed in the present review, MTH1 protein may thus play an important role in maintaining the fidelities of DNA replication and transcription, thereby protecting humans from cancer and neurodegeneration.

dATP, a major substrate of hMTH1, there is little data suggesting any biological implication with these diseases probably because of the difficulty of accurately detecting 2-OH-dA. Two groups reported that mice lacking *ogg1* gene encoding the 8-oxoG DNA glycosylase, are not cancer-prone even though increased accumulation of 8-oxo-dG in their genomic DNA was observed (Klungland et al., 1999; Minowa et al., 2000). These observations strongly suggest that the increased incidence of carcinogenesis in *mth1*-deficient mice is due to incorporation of 2-OH-dATP into DNA rather than 8-oxo-dGTP.

As shown in Figs. 2 and 3, oxidized purine nucleoside triphosphates generated in the ribonucleotide pool may also be involved in various types of cellular dysfunction during aging, since MTH1 efficiently hydrolyzes 2-OH-ATP or other oxidized ribonucleotides.

Base Excision Repair of Oxidized Purine Bases in DNA

1. Nuclear and mitochondrial 8-OxoG DNA glycosylase

The human *OGG1* gene located on chromosome 3p25, has 8 major exons (Boiteux and Radicella, 1999). More

than seven alternatively spliced forms of hOGG1 mRNAs are produced, and are classified into two types based on their last exons (type 1 with exon 7: 1a and 1b; type 2 with exon 8: 2a to 2e) (Nishioka et al., 1999). hOGG1 polypeptides encoded by these mRNAs share the same first 190 aa, which are encoded by exons 1 through 3, and each has a unique C-terminal region, with the exception that polypeptides encoded by type 2a and 2b mRNAs share the common C-terminal 108 aa. Five polypeptides (hOGG1-1a, 1b, 2a, 2d and 2e) carry the helix-hairpin-helix-PVD (HhH-PVD) motif which seems to be essential for 8-oxoG DNA glycosylase activity (Nash et al., 1996; Girard et al., 1997). Types 1a and 2a mRNAs are major in various human tissues. We predicted that all forms of hOGG1 polypeptides carry a relatively poor MTS, consisting of residues 9 to 26 at the common N-terminal region and the MTS is likely to be processed at residue 23 (W) after being translocated into the mitochondria. Among all the polypeptides, only hOGG1-1a has a nuclear localization signal (NLS) at the C-terminal end. Interestingly, such multi-forms of OGG1 mRNAs have not yet been identified in rodent cells.

A 36-kD polypeptide, corresponding to hOGG1-1a and

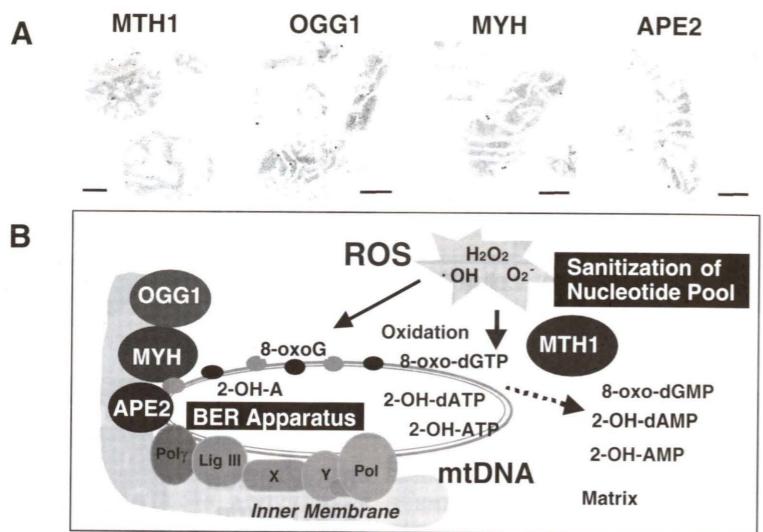


Fig. 3 Mechanisms protecting mitochondrial genomes from damage caused by reactive oxygen species
 A : Submitochondrial localization of human MTH1d, OGG1-2a, MYH and APE2 proteins, determined by electron microscopic immunocytochemistry. After each mitochondria was isolated from HeLa MR cells, thin sections (about 0.1 μ m) were prepared for electron microscopic immunocytochemistry with anti-hMTH1, anti-2a-CT, anti-hMYH, and anti-APE2 in combination with protein A-gold. Bars indicate 0.2 μ m.
 B : Hypothetical representation of human MTH1d, OGG1-2a, MYH and APE2 proteins located in the mitochondria. Human MTH1 is localized in matrix of mitochondria, while OGG1-2a, MYH and APE2 are localized adjacent to the mitochondrial inner membrane (Nakabeppu, 2001a, b; Tsuchimoto et al., 2001). It is likely that a repair complex containing the entire machinery essential for a base excision repair is associated with the inner-membrane and mitochondrial DNAs. As a result, the efficient repair by the complex thus probably helps to maintain the functions and the integrity of mitochondrial DNAs, even if threatened by an attack of ROS produced during oxidative phosphorylation.

recognized only by antibodies against the region containing the HhH-PVD motif, was co-purified from a nuclear extract prepared from Jurkat cells, and the purified fraction containing the polypeptide possessed an activity to introduce a nick at 8-oxoG paired with cytosine in double stranded oligonucleotides (Fig. 4; Nishioka et al., 1999). A 40-kD polypeptide corresponding to a processed form of hOGG1-2a was detected in the mitochondria of Jurkat cells when we used antibodies against its C-terminus. Electron microscopic immunocytochemistry and subfractionation of the mitochondria showed that hOGG1-2a to be located on the inner-membrane of the mitochondria, in contrast to the hMTH1d present in the mitochondrial matrix (Fig. 3; Kang et al., 1995; Nishioka et al., 1999). Deletion mutant analyses revealed that the unique C-terminus of hOGG1-2a and its MTS are essential for mitochondrial localization while the nuclear localization of hOGG1-1a depends on NLS at its C-terminus (Nishioka et al., 1999).

Since the unique C-terminal region of hOGG1-2a consists of two distinct regions: namely the N-terminal side acidic region (aa from Ile³⁴⁵ to Asp³⁸¹) and the C-terminal side hydrophobic region (the last 20 residues), we spec-

ulate that the latter mediates a hydrophobic interaction between hOGG1-2a and inner-membrane of the mitochondria (Fig. 3). This affinity may be comparable to that in the association of Bcl2 with the mitochondrial membrane (Nishioka et al., 1999; Nguyen et al., 1993). Recombinant hOGG1-2a, but not hOGG1-1a, expressed in *E. coli*, was mostly insoluble, which means that this C-terminal region contributes to insolubility as a result of its hydrophobicity. On the other hand, the acidic region with a value of 3.63 for local isoelectric pH may possibly provide a protein-protein interacting surface for other component(s), and if so, it may be involved in its stabilization and/or in the base excision repair pathway in the mitochondria.

2. Abnormal expression of mitochondrial OGG1 in various neurodegenerative diseases

We examined brain tissue specimens from autopsy cases with Alzheimer's disease and controls using antibodies for hOGG1-2a, the mitochondrial form of hOGG1. hOGG1-2a is mainly expressed in the neuronal cytoplasm in both Alzheimer's disease and control cases in regionally different manners (Table 1; Iida et al., 2001b). The expression of hOGG1-2a decreases in orbitofrontal gyrus

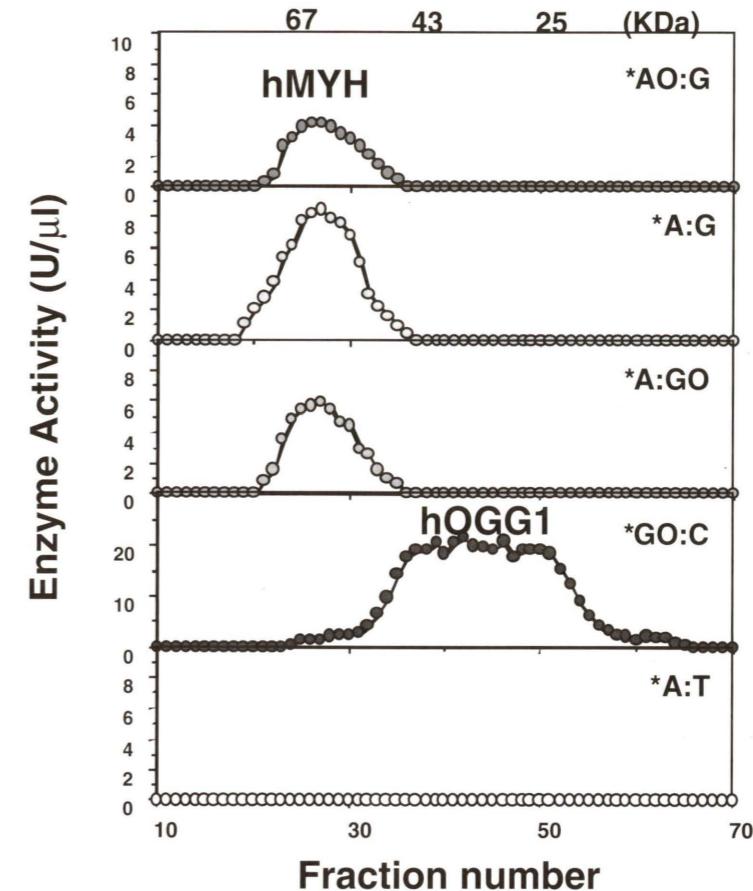


Fig. 4 Purification of the repair activities for 8-oxoG paired with cytosine, 2-OH-A and adenine paired with guanine or 8-oxoG from nuclear extracts. Nuclear extracts prepared from Jurkat cells were applied to successive chromatographies (Nishioka et al., 1999; Ohtsubo et al., 2000). Each fraction from gel filtration chromatography was incubated with various double-stranded oligonucleotides containing an abnormal base pair shown in the figure, and nicking activities were determined. Fractions with repair activities for *AO:G, *A:G and *A:GO substrates whose molecular mass is estimated to be approximately 55-kDa, contain hMYH protein, and those with a repair activity for *GO:C pair contains hOGG1-1a protein.

* indicates a strand labeled at its 5' end with FAM. AO, 2-OH-A; GO, 8-oxoG.

and the entorhinal cortex in Alzheimer's disease in comparison to that in the control cases. Immunoreactivity for hOGG1-2a is occasionally associated with neurofibrillary tangles, dystrophic neurites and reactive astrocytes in Alzheimer's disease. Our results indicate that the repair enzyme for the oxidative damage in mitochondrial DNA may not appropriately exert its function in Alzheimer's disease, and thus oxidative DNA damage in the mitochondria may be involved in the first step of the pathomechanism of Alzheimer's disease.

Furthermore, we also investigated expression of hOGG1-2a, by comparing the 8-oxoG accumulation observed in the large motor neurons of the lumbar spinal cord in 7 cases of adult onset sporadic ALS, 4 cases of subarachnoid hemorrhage (SAH) and 4 control cases (Table 1; Kikuchi et al., 2001). The 8-oxoG immunoreactivity

increased in a majority of the large motor neurons in both the ALS and SAH cases. However, the mitochondrial hOGG1-2a-immunoreactivity varied as follows: homogeneous cytoplasmic staining was noted in the control cases, a fine granular pattern was seen in the SAH cases, and either no staining or weak staining was seen in the ALS cases, respectively. Our results thus indicate that oxidative damage accumulates in the mitochondria of motor neurons in ALS and that the repair function of hOGG1 is not sufficient to excise the damage efficiently, which may therefore lead to a loss of motor neuron in ALS.

In addition to the altered expression of hOGG1 in various neurodegenerative diseases, we obtained evidences of another mechanism which causes an alteration of hOGG1 function, namely, a chemical modification of the hOGG1 protein itself by NO or its metabolites. Tyrosine-nitration

in hOGG1 protein occurs in cells exposed to NO, and its repair activity is completely diminished, thus suggesting that the inactivation of OGG1 by NO is another pathological pathway involved in neurodegeneration (Jaiswal et al., 2001).

3. hMYH as a bifunctional DNA glycosylase for 2-hydroxyadenine and adenine paired with 8-oxoguanine

2-OH-A is also known as isoguanine and has been reported to be detected in DNA from isolated human tissues or from experimental animals and its amounts have also been reported to increase after exposure to various sources of reactive oxygen species, both in vitro and in vivo (Nackerdien et al., 1991; Toyokuni et al., 1994; Kamiya and Kasai, 1995). Furthermore, it has been shown that in certain human cancerous tissues, the amounts of 2-OH-A increase several fold in comparison to the findings of normal non-cancerous tissues (Olinski et al., 1992). Concerning the origin of 2-OH-A, the extent of oxidation of the 2nd position of adenine base by hydroxyl radical is higher in its free nucleotide form than that in DNA (Kamiya and Kasai, 1995), thereby indicating that a misincorporation of 2-OH-dATP from the nucleotide pool is the major source of 2-OH-A in DNA. The incorporated 2-OH-A forms a relatively stable base pair with thymine and cytosine (Robinson et al., 1998; Yang et al., 1998), and may also pair with the syn forms of guanine and adenine (Kamiya and Kasai, 1995).

Since hMTH1 has the lowest Km value with 2-OH-dATP, and *E. coli* MutT, a prototype of 8-oxo-dGTPase which has little activity to hydrolyze 2-OH-dATP, one can argue that human or mammalian cells are exposed to a higher risk of incorporating 2-OH-dATP into their genome than *E. coli* cells, and thus eliminate the precursor from nucleotide pools. Since 2-OH-A in DNA forms a stable Watson-Crick base pair with thymine, it has been speculated that 2-OH-A paired with thymine in DNA may escape repair (Robinson et al., 1998). However, Jaruga and Dizdaroglu (1996) reported that amounts of 2-OH-A detected in DNA of human cells after H_2O_2 exposure decreases within 4 hr to reach background levels, thus indicating that human cells possess repair activity for 2-OH-A in DNA.

We examined an enzyme activity that introduces an alkali-labile site into 2-OH-A containing oligonucleotides, and we found evidence for such DNA repair activity that is likely to act as a DNA glycosylase (Fig. 4; Ohtsubo et al., 2000; Nakabeppu, 2001b). Furthermore we showed that the repair activity is co-purified with hMYH, and that recombinant hMYH itself has such activity. hMYH, namely 2-OH-A/adenine DNA glycosylase, lacks a AP-lyase activity and efficiently recognizes 2-OH-A paired with 8-oxoG or purines as well as adenine paired with guanine or

8-oxoG. hMYH acts more strongly on adenine paired with guanine in DNA than on that with 8-oxoG, however hMYH binds more efficiently to the substrate containing 8-oxoG.

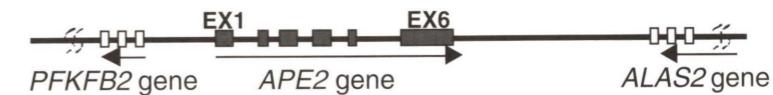
In human cells, western blots showed authentic hMYH in nuclei and in mitochondria and that the molecular masses differed, p52/53 and p57, respectively, thereby indicating that there are multi-forms of hMYH (Ohtsubo et al., 2000). Based on the results obtained from 5'-RACE and RT-PCR of *hMYH* transcripts, we concluded that there are 3 major *hMYH* transcripts, namely hMYH α , β , γ , with a different 5' sequence or first exons and further that each transcript is alternatively spliced, thus forming over 10 mature transcripts. A major transcript, hMYH α 3 essentially corresponds to the *hMYH* cDNA originally reported (Slupska et al., 1996) and encodes two polypeptides, p54 and p53, the former translated from the first AUG and the latter from 2nd AUG. The hMYH α 1 transcript has a 33 nucleotide insertion into hMYH α 3, thus encoding a polypeptide with an expected molecular mass of 60,031, and this may be the p57 detected in the mitochondria. Moreover, the nuclear form of hMYH, p52 partially purified from Jurkat cells, is likely to correspond to the p53 translated from the 2nd AUG of hMYH α 3 transcript, and hMYH β 1, β 3 and γ 2 transcripts which are missing the first AUG and may encode the nuclear form of p52 hMYH (Ohtsubo et al., 2000).

Electron microscopic immunocytochemistry revealed that hMYH in the mitochondria is associated with the inner-membrane structure, as is hOGG1-2a (Nishioka et al., 1999; Nakabeppu, 2001b), thus suggesting that the mechanisms required for base excision repair in the mitochondria is generally associated with the inner-membrane to achieve efficient repair of mitochondrial DNA (Fig. 3).

4. APE2, the 2nd AP endonuclease in human cells

In human cells, APE1 (HAP1/APEX/REF-1) is a major class II AP endonuclease in the nucleus (Demple et al., 1991; Seki et al., 1992), which is considered to be involved in both the short patch and long patch BER pathways for the nuclear DNA. On the other hand, eukaryotic cells have mitochondrial DNA (mtDNA) in addition to nuclear DNA. mtDNA is more susceptible to an attack by ROS than nuclear DNA since it is located in the vicinity of the mitochondrial respiratory chain, where ROS are continuously generated (Richter et al., 1988; Kang et al., 1998). As summarized in Table 1 and Fig. 3, we demonstrated that human cells possess nuclear and mitochondrial DNA glycosylases for oxidized bases, 8-oxoG and 2-OH-A or adenine opposite 8-oxoG, which are encoded by alternatively spliced forms of OGG1 and MYH transcripts (Nishioka et al., 1999; Ohtsubo et al., 2000; Nakabeppu, 2001b). The human UNG gene encodes both nuclear (UNG2) and mitochondrial (UNG1) forms of uracil DNA

A. Genomic Structure of Human APE2 Gene (X p11.21)



B. APE2 Family Proteins

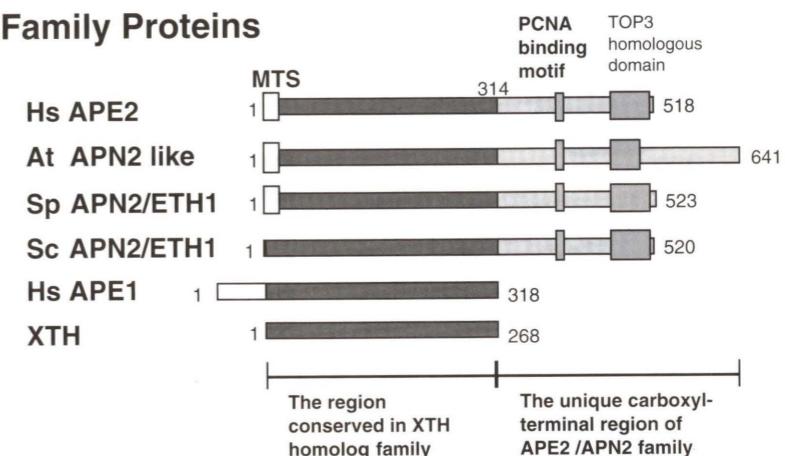


Fig. 5 Genomic structure of the human *APE2* gene and comparison of the *APE2/APN2* family proteins
A : Genomic structure for the human *APE2* gene. The alignment of *APE2* cDNA and human genomic clone Z83821 revealed the human *APE2* gene to be located between the 5-aminolevulinate synthase (*ALAS2*) gene and the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2 (*PFKFB2*) gene on the X chromosome (Xp11.21) and also to consist of 6 exons.
B : Structures of the *APE2/APN2* family proteins, *E. coli* XTH and human APE1 are shown. The regions conserved in the XTH family (hatched box) and the unique C-terminal region of *APE2/APN2* family are indicated (Tsuchimoto et al., 2001). The boxes indicate the three unique subregions found in the *APE2/APN2* family:mitochondrial targeting sequence (MTS); PCNA-binding motif; TOP3 homologous subregion.

glycosylase (Nilsen et al., 1997). Another human DNA glycosylase encoded by the *NTH1* gene was also reported to potentially be localized in the mitochondria (Takao et al., 1998), while the thymine-glycol DNA glycosylase activity, which is similar to that of *NTH1*, was purified from the rat mitochondria (Stierum et al., 1999). In addition to these DNA glycosylases, DNA polymerase γ and DNA ligase III are considered to participate in mitochondrial BER (Ropp and Copeland, 1996; Lakshmipathy and Campbell, 1999; Pinz and Bogenhagen, 1998). Although the AP endonuclease activities were also detected and partially purified from the mitochondria isolated from *Xenopus* oocytes (Pinz and Bogenhagen, 1998) and a mouse cell line (Tomkinson et al., 1988), no gene responsible for them has yet been identified until recently.

Based on genome databases from various organisms, a novel group of AP endonucleases has recently been reported (Fig. 5; Johnson et al., 1998; Bennett, 1999; Hadi and Wilson, 2000; Unk et al., 2000; Tsuchimoto et al., 2001). Among them, the APE2 protein is the second human AP endonuclease which has been shown to have a

weak class II AP endonuclease activity and was also sug-

gested to be localized in the nuclei. We found that APE2 protein possesses a putative MTS (Tsuchimoto et al., 2001). When its N-terminal 15 amino acid residues were fused to the N-terminus of a green fluorescent protein and transiently expressed in HeLa cells, the fusion protein was localized in the mitochondria. By electron microscopic immunocytochemistry, we detected authentic APE2 protein in the mitochondria from HeLa cells. Human APE2 protein was detected adjacent to the mitochondrial inner membrane by electron microscopic immunocytochemistry. It is likely that a repair complex containing the entire machinery essential for base excision repair is associated with the inner-membrane and mitochondrial DNAs as expected for the two DNA glycosylases, OGG1 and MYH proteins, and APE2. As a result, the efficient repair by the complex thus probably helps to maintain the functions and the integrity of mitochondrial DNAs, even if threatened by an attack of ROS produced during oxidative phosphorylation (Fig. 3).

Western blotting of the subcellular fraction of HeLa cells revealed most of the APE2 protein to be localized in the nuclei. We found a putative proliferating cell nuclear

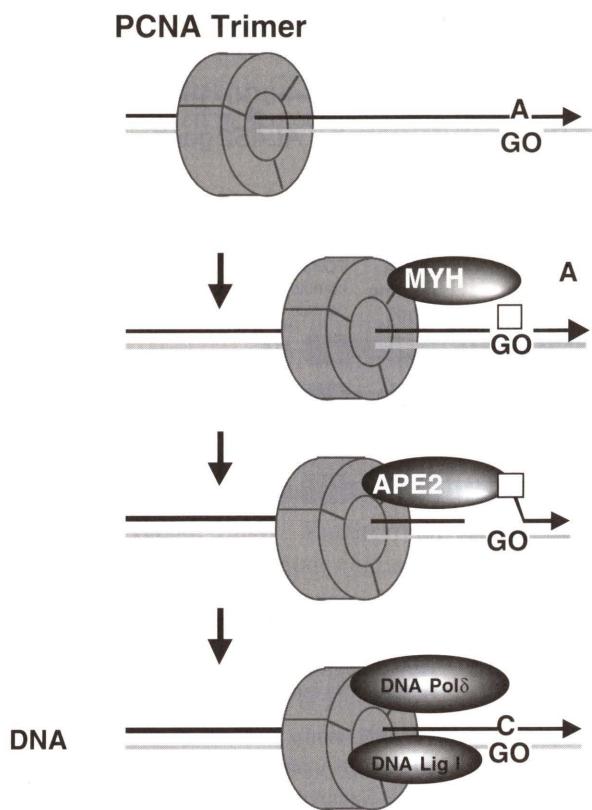


Fig. 6 PCNA dependent post-replicative BER

dAMP may be misincorporated opposite 8-oxoG in template DNA, and oxidized nucleotides such as 2-OH-dATP, which are known to be substrates for oxidized purine nucleoside triphosphatase, MTH1, may also be incorporated during DNA replication (Nakabeppu, 2001a). These misincorporated bases on newly replicated DNA strand can be excised by human MYH protein in association with PCNA which may discriminate the DNA strands, and APE2 recruited by PCNA is therefore likely to incise the AP site generated by MYH. PCNA forms a homo-trimer in a ring structure and functions as a DNA sliding clamp, which is an accessory factor for a number of proteins related in DNA replication and DNA repair including DNA polymerase δ/ϵ , FEN1, DNA ligase I and so on, which play essential roles in the completion of PCNA-dependent BER (Matsumoto et al., 1999). An arrow indicates the direction of the replication of a newly synthesized strand (solid line).

antigen (PCNA) binding motif in the C-terminal region of APE2 (Fig. 5), and showed this motif to be functional by immunoprecipitation and in vitro pull-down binding assays (Tsuchimoto et al., 2001). Laser-scanning immunofluorescence microscopy of HeLa cells demonstrated both APE2 and PCNA to form foci in the nucleus and also be co-localized in some of the foci. The incubation of HeLa cells in the HAT medium containing deoxyuridine significantly increased the number of foci in which both molecules were co-localized. Our results suggest that APE2 participates in both nuclear and mitochondrial BER, and also that nuclear APE2 functions in the

PCNA-dependent BER pathway.

PCNA-Dependent Post-Replicative BER

PCNA forms a homo-trimer in a ring structure and functions as a DNA sliding clamp, which is an accessory factor for a number of proteins related in DNA replication and DNA repair including DNA polymerase δ/ϵ , FEN1, DNA ligase I and so on (Hingorani and O'Donnell, 2000; Tsurimoto, 1999). Matsumoto et al. (1999) reconstituted a novel BER pathway dependent on PCNA using purified enzyme components. PCNA-dependent BER pathway may have two biological roles. First of all, PCNA-dependent BER may repair modified AP sites which cannot be processed by the dRPase activity of DNA polymerase β , namely, FEN1 cleaves the flapped ends generated during the elongation of DNA strand by DNA polymerase δ/ϵ . Secondly, post-replicative BER for the efficient repair of dUMP misincorporated during DNA replication, as proposed by Nilsen et al. (1997) and Otterlei et al. (1999), is also likely to be PCNA-dependent. A nuclear form of uracil DNA glycosylase (UNG2) possesses a PCNA binding motif, and it may initiate the post-replicative BER in association with PCNA once dUMP was misincorporated during DNA replication.

Oxidized nucleotides such as 8-oxo-dGTP and 2-OH-dATP, which are known to be substrates for oxidized purine nucleoside triphosphatase, MTH1 (Nakabeppu, 2001a), may also be incorporated during DNA replication (Kamiya and Kasai, 1995). dAMP may be misincorporated opposite 8-oxoG in template DNA (Matsumoto, 2001). As shown in Fig. 6, these misincorporated nucleotides can be repaired by human MYH proteins (Ohtsubo et al., 2000; Nakabeppu, 2001b), and post-replicative BER dependent on PCNA is likely to promote an efficient and well-coordinated repair of these misincorporated nucleotides during DNA replication. Recently, MYH protein was reported to bind to PCNA (Parker et al., 2001). In the PCNA-dependent BER pathway, most steps are likely to be processed dependent on a DNA clamp, PCNA. Already, several catalytic components in the pathway have been demonstrated to have a PCNA binding motif, namely, their functions are somehow PCNA-dependent (Matsumoto et al., 1999). Among them, only APE1 lacks a PCNA binding motif. Since APE2 has a functional PCNA binding motif and is actually associated with PCNA in the nuclei, APE2 is likely the responsible AP endonuclease for the PCNA-dependent BER pathway (Tsuchimoto et al., 2001).

The accumulation of 8-oxoG in DNA is minimized by the coordinated actions of hMTH1, hOGG1 and hMYH. hMYH excises adenine paired with 8-oxoG and binds tightly to DNA containing the 8-oxoG opposite abasic site. Binding of hMYH may protect 8-oxoG from the action of OGG1 during the first round of base excision repair, otherwise the DNA may be incised in both strands by the

actions of 8-oxoG DNA glycosylase and AP-endonuclease (Tominaga et al., in preparation). Probably, PCNA tightly regulates the coordinated action of MYH and APE2 in order to initiate gap filling with DNA polymerase (Fig. 6). Once cytosine is inserted opposite 8-oxoG by PCNA-dependent DNA polymerase δ and the ends are joined by DNA ligase III, hMYH dissociates from the DNA and OGG1 may take place to initiate the next round of the base excision repair of 8-oxoG.

Conclusion

Among the many oxidized bases, 8-oxoG has been intensively studied, and also has been implicated in various diseases, such as cancer, neurodegeneration and teratogenicity. 8-oxoG has a mutagenic potential and various enzymes specifically act on the lesion (Table 1). We herein propose that 2-OH-A, an oxidized form of adenine as well as 8-oxoG, appears to also be involved in such biological responses, as hMTH1 efficiently hydrolyzes 2-OH-dATP, and 2-OH-A in DNA can be efficiently excised by a DNA glycosylase encoded by the *hMYH* gene. The interaction of MYH or APE2 with PCNA indicates that there is a highly coordinated BER system in human cells. Furthermore, the intracellular localization of hMTH1, hOGG1, hMYH and hAPE2 indicates that such oxidized nucleotides and oxidative DNA damage are likely highly deleterious to the human mitochondrial genome, and therefore such mitochondria as well as nuclei possess highly elaborated defense mechanisms. There are accumulating data indicating that these defense mechanisms play an essential role in minimizing the cellular dysfunction caused by oxidative damage in nucleic acids, which may result in both carcinogenesis and the development of neurodegenerative diseases.

Acknowledgments

We extend special thanks to all other members in our laboratory and to Drs. Y. Matsumoto, T. Iwaki, A. Furuta, M. Takahashi, M. Shirakawa, H. Kamiya, H. Kasai, T. Tsuzuki and M. Sekiguchi for helpful discussions, and to Dr. B. Quinn for useful comments on this manuscript.

References

- Ames, B.N. and L.S. Gold (1991) Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer, *Mutat. Res.*, 250, 3-16.
- Ames, B.N., M.K. Shigenaga and T.M. Hagen (1993) Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7915-7922.
- Au, K.G., S. Clark, J.H. Miller and P. Modrich (1989) *Escherichia coli* *mutY* gene encodes an adenine glycosylase active on G-A mispairs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8877-8881.
- Bailly, V., W.G. Verly, T. O'Connor and J. Laval (1989) Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/aprimidinic sites by *Escherichia coli* formamidopyrimidine DNA glycosylase, *Biochem. J.*, 262, 581-589.
- Bennett, R.A. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* *ETH1* gene, an inducible homolog of exonuclease III that provides resistance to DNA-damaging agents and limits spontaneous mutagenesis, *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1800-1809.
- Bogenhagen, D.F. (1999) Repair of mtDNA in vertebrates, *Am. J. Hum. Genet.*, 64, 1276-1281.
- Boiteux, S. and J.P. Radicella (1999) Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress, *Biochimie*, 81, 56-67.
- Cabrera, M., Y. Nghiem and J.H. Miller (1988) *mutM*, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G:C \rightarrow T:A transversions, *J. Bacteriol.*, 170, 5405-5407.
- Cai, J.P., T. Kakuma, T. Tsuzuki and M. Sekiguchi (1995) cDNA and genomic sequences for rat 8-oxo-dGTPase that prevents occurrence of spontaneous mutations due to oxidation of guanine nucleotides, *Carcinogenesis*, 16, 2343-2350.
- Cai, J.P., H. Kawate, K. Ihara, H. Yakushiji, Y. Nakabeppu, T. Tsuzuki and M. Sekiguchi (1997) Significance of the conserved amino acid sequence for human MTH1 protein with antimutator activity, *Nucleic Acids Res.*, 25, 1170-1176.
- Cheng, K.C., D.S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura and L.A. Loeb (1992) 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G \rightarrow T and A \rightarrow C substitutions, *J. Biol. Chem.*, 267, 166-172.
- Demple, B., T. Herman and D.S. Chen (1991) Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 11450-11454.
- Demple, B. and L. Harrison (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology, *Ann. Rev. Biochem.*, 63, 915-948.
- Fujii, Y., H. Shimokawa, M. Sekiguchi and Y. Nakabeppu (1999) Functional significance of the conserved residues for the 23 residue module among MTH1 and MutT family proteins, *J. Biol. Chem.*, 274, 38251-38259.
- Fujikawa, K., H. Kamiya, H. Yakushiji, Y. Fujii, Y. Nakabeppu and H. Kasai (1999) The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein, *J. Biol. Chem.*, 274, 18201-18205.
- Fujikawa, K., H. Kamiya, H. Yakushiji, Y. Nakabeppu and H. Kasai (2001) Human MTH1 protein hydrolyzes the oxidized ribonucleotide, 2-hydroxy-ATP, *Nucleic Acids Res.*, 29, 449-454.
- Furuichi, M., M.C. Yoshida, H. Oda, T. Tajiri, Y. Nakabeppu, T. Tsuzuki and M. Sekiguchi (1994) Genomic structure and chromosome location of the human *mutT* homologue gene MTH1 encoding 8-oxo-dGTPase for prevention of A:T to C:G transversion, *Genomics*, 24, 485-490.
- Furuta, A., T. Iida, Y. Nakabeppu and T. Iwaki (2001) Expression of hMTH1 in the hippocampus of control and Alzheimer's disease, *Neuro Report*, 12, 2895-2899.
- Girard, P.M., N. Guibourt, S. Boiteux (1997) The Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: a 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase/AP lyase whose lysine 241 is a critical residue for catalytic activity, *Nucleic Acids Res.*, 25, 3204-3211.
- Hadi, M.Z. and D.M.III. Wilson (2000) Second human protein with homology to the *Escherichia coli* abasic endonuclease exonuclease III, *Environ. Mol. Mutagen.*, 36, 312-324.
- Hainaut, P., T. Soussi, B. Shomer, M. Hollstein, M. Greenblatt, E. Hovig, C.C. Harris and R. Montesano (1997) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects, *Nucleic Acids Res.*, 25, 151-157.
- Hayakawa, M., S. Sugiyama, K. Hattori, M. Takasawa and T. Ozawa. (1993) Age-associated damage in mitochondrial DNA in human

- hearts, Mol. Cell. Biochem., 119, 95-103.
- Hayakawa, H., A. Hofer, L. Thelander, S. Kitajima, Y. Cai, S. Oshiro, H. Yakushiji, Y. Nakabeppu, M. Kuwano and M. Sekiguchi (1999) Metabolic fate of oxidized guanine ribonucleotides in mammalian cells, Biochemistry, 38, 3610-3614.
- Hingorani, M.M. and M. O'Donnell (2000) Sliding clamps: a (tail) ored fit, Curr. Biol., 10, R25-29.
- Igarashi, H., T. Tsuzuki, T. Kakuma, Y. Tominaga, Y. and M. Sekiguchi (1997) Organization and expression of the mouse *MTH1* gene for preventing transversion mutation, J. Biol. Chem., 272, 3766-3772.
- Iida, T., A. Furuta, M. Kawashima, J. Nishida, Y. Nakabeppu and T. Iwaki (2001a) Accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and increased expression of hMTH1 protein in brain tumors, Neuro-oncol., 3, 73-81.
- Iida, T., A. Furuta, K. Nishioka, Y. Nakabeppu and T. Iwaki (2001b) Expression of mitochondrial OGG1-2a protein for 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain, Acta Neuropathol.,
- Jaiswal, M., N.F. LaRusso, K. Nishioka, Y. Nakabeppu and G.J. Gores (2001) Human Ogg1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide, Cancer Res., 61, 6388-6393.
- Jaruga, P. and M. Dizdaroglu (1996) Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells, Nucleic Acids Res., 24, 1389-1394.
- Johnson, R.E., C.A. Torres-Ramos, T. Izumi, S. Mitra, S. Prakash and L. Prakash (1998) Identification of APN2, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the major human AP endonuclease HAP1, and its role in the repair of abasic sites, Genes Dev., 12, 3137-3143.
- Kakuma, T., J. Nishida, T. Tsuzuki and M. Sekiguchi (1995) Mouse MTH1 protein with 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphatase activity that prevents transversion mutation, cDNA cloning and tissue distribution, J. Biol. Chem., 270, 25942-25948.
- Kamiya, H. and H. Kasai (1995) Formation of 2-hydroxydeoxyadenosine triphosphate, an oxidatively damaged nucleotide, and its incorporation by DNA polymerases. Steady-state kinetics of the incorporation, J. Biol. Chem., 270, 19446-19450.
- Kang, D., J. Nishida, A. Iyama, Y. Nakabeppu, M. Furuichi, T. Fujiwara, M. Sekiguchi and K. Takeshige (1995) Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria, J. Biol. Chem., 270, 14659-14665.
- Kang, D., K. Takeshige, M. Sekiguchi and K.K. Singh (1998) Introduction, In : K.K. Singh, (Ed), Mitochondrial DNA Mutations in Aging, Disease and Cancer, Springer/Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1-15.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, Nucleic Acids Res., 12, 2137-2145.
- Kikuchi, H., A. Furuta, K. Nishioka, S.O. Suzuki, Y. Nakabeppu and T. Iwaki (2001) Impairment of mitochondrial DNA repair enzymes against accumulation of 8-oxo-guanine in the spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis, Acta Neuropathol. (in press).
- Klungland, A., I. Rosewell, S. Hollenbach, E. Larsen, G. Daly, B. Epe, E. Seeberg, T. Lindahl and D.E. Barnes (1999) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 13300-13305.
- Lakshmi, U. and C. Campbell (1999) The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins, Mol. Cell. Biol., 19, 3869-3876.
- Maki, H. and M. Sekiguchi (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis, Nature, 355, 273-275.
- Matsumoto, Y. (2001) Molecular mechanism of PCNA-dependent base excision repair, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 68, 129-138.
- Matsumoto, Y., K. Kim, J. Hurwitz, R. Gary, D.S. Levin, A.E. Tomkinson and M.S. Park (1999) Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins, J. Biol. Chem., 274, 33703-33708.
- Michaels, M.L. and J.H. Miller (1992) The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine), J. Bacteriol., 174, 6321-6325.
- Michaels, M.L., C. Cruz, A.P. Grollmann and J.H. Miller (1992) Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 7022-7025.
- Minowa, O., T. Arai, M. Hirano, Y. Monden, S. Nakai, M. Fukuda, M. Itoh, H. Takano, Y. Hippou, H. Aburatani, K. Masumura, T. Nohmi, S. Nishimura, T. Noda (2000) Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 4156-4161.
- Nackerdien, Z., K.S. Kasprzak, G. Rao, B. Halliwell and M. Dizdaroglu (1991) Nickel(II)- and cobalt(II)-dependent damage by hydrogen peroxide to the DNA bases in isolated human chromatin, Cancer Res., 51, 5837-5842.
- Nakabeppu, Y. (2001a) Molecular genetics and structural biology of human MutT homolog, MTH1, Mutat. Res., 477, 59-70.
- Nakabeppu, Y. (2001b) Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1 and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 68, 75-94.
- Nash, H.M., S.D. Bruner, O.D. Scharer, T. Kawate, T.A. Addona, E. Spooner, W.S. Lane and G.L. Verdine (1996) Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily, Curr. Biol., 6, 968-980.
- Nghiem, Y., M. Cabrera, C.G. Cupples and J.H. Miller (1988) The *mutY* gene: A mutator locus in *Escherichia coli* that generates G:C → T:A transversions, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2709-2713.
- Nguyen, M., D.G. Millar, V.W. Yong, S.J. Korsmeyer and G.C. Shore (1993) Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence, J. Biol. Chem., 268, 25265-25268.
- Nilsen, H., M. Otterlei, T. Haug, K. Solum, T.A. Nagelhus, F. Skorpen and H.E. Krokan (1997) Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene, Nucleic Acids Res., 25, 750-755.
- Nishioka, K., T. Ohtsubo, H. Oda, T. Fujiwara, D. Kang, K. Sugimachi and Y. Nakabeppu (1999) Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs, Mol. Biol. Cell, 10, 1637-1652.
- Oda, H., Y. Nakabeppu, M. Furuichi and M. Sekiguchi (1997) Regulation of expression of the human MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase: alternative splicing of transcription products, J. Biol. Chem., 272, 17843-17850.
- Oda, H., A. Taketomi, I. Maruyama, R. Itoh, K. Nishioka, H. Yakushiji, T. Suzuki, M. Sekiguchi and Y. Nakabeppu (1999) Multi-forms of human MTH1 polypeptides produced by alternative translation initiation and single nucleotide polymorphism, Nucleic Acid Res., 27, 4335-4343.
- Ohtsubo, T., O. Matsuda, K. Iba, I. Terashima, M. Sekiguchi and Y. Nakabeppu (1998) Cloning of *AtMMH*, an *Arabidopsis thaliana* ortholog of *Escherichia coli* *mutM* gene and characterization of its products, Mol. Gen. Genet., 259, 577-590.
- Ohtsubo, T., K. Nishioka, Y. Imaiso, S. Iwai, H. Shimokawa, H. Oda, T. Fujiwara and Y. Nakabeppu (2000) Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria, Nucleic Acids Res., 28, 1355-1364.
- Okamoto, K., S. Toyokuni, W.J. Kim, O. Ogawa, Y. Kakehi, S. Arao, H. Hiai and O. Yoshida (1996) Overexpression of human *mutT* homologue gene messenger RNA in renal-cell carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer, Int. J. Cancer, 65, 437-441.
- Olinski, R., T. Zastawny, J. Budzbon, J. Skokowski, W. Zegarski and M. Dizdaroglu (1992) DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues, FEBS lett., 309, 193-198.
- Otterlei, M., E. Warbrick, T.A. Nagelhus, T. Haug, G. Slupphaug, M. Akbari, P.A. Aas, K. Steinsbekk, O. Bakke, H.E. Krokan (1999) Post-replicative base excision repair in replication foci, EMBO J., 18, 3834-3844.
- Parker, A., Y. Gu, W. Mahoney, S.H. Lee, K.K. Singh and A.L. Lu (2001) Human homolog of the MutY repair protein (hMYH) physically interacts with proteins involved in long-patch DNA base excision repair, J. Biol. Chem., 276, 5547-5555.
- Pinz, K.G. and D.F. Bogenhagen (1998) Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes, Mol. Cell. Biol., 18, 1257-1265.
- Richter, C., J.W. Park and B.N. Ames (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6465-6467.
- Robinson, H., Y.-G. Gao, C. Bauer, C. Roberts, C. Switzer and A.H.-J. Wang (1998) 2'-Deoxyisoguanosine adopts more than one tautomer to form base pairs with thymidine observed by high-resolution crystal structure analysis, Biochemistry, 37, 10897-10905.
- Ropp, P.A. and W.C. Copeland (1996) Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase gamma, Genomics, 36, 449-458.
- Sakumi, K., M. Furuichi, T. Tsuzuki, T. Kakuma, S. Kawabata, H. Maki and M. Sekiguchi (1993) Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis, J. Biol. Chem., 268, 23524-23530.
- Seki, S., M. Hatsuhashi, S. Watanabe, K. Akiyama, K. Nagao and K. Tsutsui (1992) cDNA cloning, sequencing, expression and possible domain structure of human APEX nuclease homologous to *Escherichia coli* exonuclease III, Biochim. Biophys. Acta, 1131, 287-299.
- Sekiguchi, M. (1996) MutT-related error avoidance mechanism for DNA synthesis, Genes to Cells, 1, 139-145.
- 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.
- Shigenaga, M.K., T.M. Hagen and B.N. Ames (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 10771-10778.
- Shimura-Miura, H., N. Hattori, D. Kang, K. Miyako, Y. Nakabeppu and Y. Mizuno (1999) Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigra neurons in Parkinson's disease, Ann. Neurol., 46, 920-924.
- Slupka, M.M., C. Baikov, W.M. Luther, J.H. Chiang, Y.F. Wei and J.H. Miller (1996) Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the *Escherichia coli* *mutY* gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage, J. Bacteriol., 178, 3885-3892.
- Stierum, R.H., D.L. Croteau and V.A. Bohr (1999) Purification and characterization of a mitochondrial thymine glycol endonuclease from rat liver, J. Biol. Chem., 274(11), 7128-7136.
- Tajiri, T., H. Maki and M. Sekiguchi (1995) Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*, Mutat. Res., 336, 257-267.
- Takao, M., H. Aburatani, K. Kobayashi and A. Yasui (1998) Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage, Nucleic Acids Res., 26, 2917-2922.
- Tomkinson, A.E., R.T. Bonk and S. Linn (1988) Mitochondrial endonuclease activities specific for apurinic/apyrimidinic sites in DNA from mouse cells, J. Biol. Chem., 263, 12532-12537.
- Toyokuni, S., T. Mori and M. Dizdaroglu (1994) DNA base modifications in renal chromatin of Wistar rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate, Int. J. Cancer, 57, 123-128.
- Tsuchimoto, D., Y. Sakai, K. Sakumi, K. Nishioka, M. Sasaki, T. Fujiwara and Y. Nakabeppu (2001) Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen, Nucleic Acids Res., 29, 2349-2360.
- Tsurimoto, T. (1999) PCNA binding proteins, Front. Biosci., 4, D849-858.
- Tsuzuki, T., A. Egashira, H. Igarashi, T. Iwakuma, Y. Nakatsuru, Y. Tominaga, H. Kawate, K. Nakao, K. Nakamura, K. Ide, F. Kura, Y. Nakabeppu, M. Katsuki, T. Ishikawa and M. Sekiguchi (2001) Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the *MTH1* gene encoding 8-oxo-dGTPase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 11456-11461.
- Unk, I., L. Haracska, R.E. Johnson, S. Prakash and L. Prakash (2000) Apurinic endonuclease activity of yeast Apn2 protein, J. Biol. Chem., 275(29), 22427-22434.
- van der Kemp, P.A., D. Thomas, R. Barbey, R. de Oliveira, and S. Boiteux (1996) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *ogg1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 5197-5202.
- Yakushiji, H., F. Marabouef, M. Takahashi, Z.S. Deng, S. Kawabata, Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1997) Biochemical and physicochemical characterization of normal and variant forms of human MTH1 protein with antimutagenic activity, Mutat. Res., 384, 181-194.
- Yang, X.-L., H. Sugiyama, S. Ikeda, I. Saito and A.H.-J. Wang (1998) Structural studies of a stable parallel-stranded DNA duplex incorporating isoguanine:cytosine and isocytosine:guanine basepairs by nuclear magnetic resonance spectroscopy, Biophys. J., 75, 1163-1171.
- Yeh, Y.C., D.Y. Chang, J. Masin and A.L. Lu (1991) Two nicking enzyme systems specific for mismatch-containing DNA in nuclear extracts from human cells, J. Biol. Chem., 266, 6480-6484.

ミトコンドリア遺伝子変異の蓄積と老化

田中 雅嗣*

岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部 〒505-0116 岐阜県可児郡御嵩町八木記念パーク

Mitochondrial DNA polymorphisms and aging

Masashi Tanaka

Gifu International Institute of Biotechnology

Summary

All of the genes in mitochondrial DNA (mtDNA) are fully expressed in cells, whereas only 1.5% of the nuclear DNA (nDNA) is functionally expressed. Assuming that the copy number of mtDNA is 2000 per cell, the total functioning mtDNA is 3×10^7 bp, which is 1/3 of the functioning nDNA. Because the evolutionary rate of mtDNA is 5-10 times higher than that of nDNA, the functional significance of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in mtDNA is comparable to those in nDNA. Thus, SNPs in mtDNA are expected to influence the susceptibility of individuals to various diseases in combination with SNPs in nDNA.

First, we analyzed synonymous mutations in mtDNA to understand the mutational mechanisms. Replication of mtDNA is highly asymmetric between the heavy (H) and light (L) strands. The parental H strand is displaced by the daughter H strand and remains in a single-stranded state until the daughter L strand is synthesized. Occurrence of nucleotide substitutions was distinctly asymmetric between the two strands; G → A and T → C transitions were 9-fold and 1.8-fold more frequent on the L strand than on the H strand, respectively. This nucleotide substitution bias is consistent with the T- and G-abundance of the H strand as well as the A- and C-abundance of the L strand. Deamination of cytosine to uracil or adenine to hypoxanthine in the single-stranded state of the parental H strand seems to contribute to the mutagenesis in mtDNA.

Second, we examined the effect of mitochondrial genotypes on the predisposition to longevity or various diseases. Mt5178A, causing a Leu → Met replacement in the *ND2* gene, was more frequently observed in centenarians than in controls. The longevity-associated genotype Mt5178A predisposes resistance to adult-onset diseases. We have confirmed that Mt5178A exhibits an anti-arteriosclerotic effect at least in diabetic patients. Genotyping of patients with mitochondrial diseases has revealed that the Mt5178A genotype suppresses the occurrence of mtDNA mutations, especially the Mt8993 T → G transversion. Because T → G transversion can be induced by oxidative damage to DNA, the difference in the occurrence of this mutation may be relevant to the functional differences between genotypes Mt5178A and Mt5178C. We can also speculate that the rates of age-associated accumulation of mitochondrial mutations in somatic cells are different between these mitochondrial genotypes.

Keywords : mitochondrial DNA, deamination, uracil, hypoxanthine, longevity

緒 言

加齢に伴って癌や成人発症性疾患あるいは生活習慣病の頻度が上昇する。これらの発症に関して、動脈硬化など血管病変の形成における脂質過酸化反応、発癌過程に

*mtanaka@giib.or.jp

受付：2001年11月17日 受理：2001年11月17日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第12回公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」で発表された。
This paper was presented at the 12th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 26th, 2001. The symposium entitled "Molecular Pathogenesis for Oxidative Stress", was organized by Tatsuo Nunoshiba and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

おける活性酸素種 (reactive oxygen species) による核DNAの酸化的損傷などが注目されている。ミトコンドリアは活性酸素種および過酸化脂質の細胞内における主要な産生の場である。体重あたりの代謝速度が大きい動物ほど寿命が短いことは、ミトコンドリアにおける呼吸が活発であれば、それによる酸化的損傷が増大し、細胞老化が促進されることを示唆する。ミトコンドリアDNA (mtDNA) の進化速度は大きく、アミノ酸配列も種間で大きく異なる。アミノ酸配列の種差の一部はミトコンドリアの呼吸速度に適応したものであろう。本稿では第1に mtDNA の同義置換の分析結果に基づいて mtDNA の変異発生機構について論じる。第2にヒトの種内変異であるミトコンドリア遺伝子多型が、個体間のミトコンドリア機能の多様性に関与し、ひいては成人発症性疾患に対する感受性に影響を与えるとの仮説に基づき、長寿者群と疾患群のミトコンドリア遺伝子型を比較した結果について紹介する。長寿に関連する遺伝子多型 Mt5178A の抗動脈硬化作用ならびに mtDNA 変異発生抑制効果についても報告したい。

1. ミトコンドリアDNAにおける多型および変異の発生機構

1) ミトコンドリアゲノムの单塩基置換多型の機能的重要性

ミトコンドリアゲノムは16,569塩基からなる環状二重鎖DNAであり、2種のリボソームRNA、22種のトランスクアーナーRNA、13種のメッセンジャーRNAをコードしている (Anderson et al., 1981)。これらによって、ミトコンドリア内において、酸化的リソ酸化系の複合体I-Vの13種のサブユニットが合成される。

ミトコンドリアは酸素を利用してATPを合成する。心筋細胞ではその断面積の33%を占め、神経細胞においても重要な役割を果たしている。mtDNAは母性遺伝し、活性酸素の主要な発生源であるミトコンドリア内にあるため、老化や各種の病態において mtDNA の変異が蓄積することが明らかになっている。またアボトーシスの過程や高血糖時の内皮細胞傷害にミトコンドリアが関与していることが注目されている。

一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) が注目されており、我が国では標準SNPデータベースの整備が進められている。著者らは、ミレニアムプロジェクトの一環として、各96例からなる6群 (百寿者・パーキンソン病患者・一般糖尿病患者・血管病変を伴う糖尿病患者・若年肥満者・若年非肥満者)、合計576例のミトコンドリアゲノムの全塩基配列 (2000万塩基対) を決定し、長寿あるいは疾患に関連する新規の遺伝子多型を探索する計画を進めている。これは科学技術振興事業団のデータベース構築支援事業に基づくものであり、平成15年春に公開される予定である。これによって日

本人のミトコンドリアゲノムにおけるSNPsの全貌が明らかになる。

核DNAは、30億塩基対のゲノムが2対あるので60億塩基対である。核のゲノムには2万6千~4万個の遺伝子があり、その機能している部分は9000万塩基対 (1.5%) である。一方、mtDNA (1.5万塩基対) では37個の遺伝子 (2 rRNA, 22 tRNA, 13 mRNA) が機能しているが、1個の細胞あたり2000コピー存在するので、細胞あたり3000万塩基対が機能していることになる。従って mtDNA の機能部分は核DNAの機能部分の1/3となる。ここで、mtDNAの進化速度が核DNAより5~10倍高いことを考慮すると mtDNA の SNPs は機能的重要性において核DNAの SNPs を凌駕するといえる (Tanaka et al., 2000)。

2) ミトコンドリアのコドン表と塩基置換の発生状況

mtDNAの変異発生機構を論じる前に、mtDNAのコドン表の特徴についてまとめよう。まず、ミトコンドリアのtRNAは22種類であり、重複は2組ある。LeuにはCUN (N = A/C/G/U) とUUR (R = A/G) に対応するtRNAがあり、SerにもUCNとAGY (Y = C/U) に対応するtRNAがある。普遍コドン表ではAGRはアルギニンをコードしているが、ミトコンドリアのコドン表ではAGRは終止コドンとなっており、GCNのみがArgをコードしている。注目すべきは、コドン第3部位のtransitionが全て同義置換となることである。普遍コドン表ではUGAは終止コドンになるが、ミトコンドリアのコドン表ではUGR (UGAとUGG) の両方がTrpをコードしている。また、普遍コドン表ではAUAはIleコードしているが、ミトコンドリアのコドン表ではAUR (AUAとAUGの両方) がMetをコードしている。これらによってA→G transitionが生じてもTrpとMetを安定して使用することができる。

43例のmtDNA (16,565塩基対)、合計712,467塩基対の分析結果に基づいて13種のサブユニット遺伝子 (11,320塩基対) を分析すると、合計295個の塩基置換 (295/11320 = 2.9%) が見出された。そのうち、同義置換は194個 (66%) であったが、非同義置換も101個 (34%) 存在した (Tanaka and Ozawa, 1994)。

3) H鎖とL鎖の間における非対称的な塩基置換の発生

まず、mtDNAの同義置換の特徴について述べる。同義置換のうち、ArgをコードするコドンGCNの第3位置のようにどの塩基に置換が生じてもアミノ酸置換を生じない部位 (4重縮退部位) における塩基置換に注目した。著者らは43例の個体のmtDNAの全塩基配列の解析結果に基づいて4重縮退部位における変異発生頻度を計算し、種内変異の発生機構を探った (Tanaka and Ozawa, 1994)。

mtDNAの二本の鎖はlight strand (L鎖) とheavy strand (H鎖) からなる。L鎖はCとAの含量が高く、GとTの含量が低い。一方、H鎖はGとTの含量が高く、CとAの含量が低い。

L鎖の4重縮退部位におけるG→A transitionの頻度は20/97 (20.6%) であるのに対し、A→G transitionの頻度は24/771 (3.1%) であった。またT→C transitionの

頻度は15/264 (5.7%) であるのに対し、C→T transitionの頻度は18/821 (2.2%) であった。A→GよりG→Aの頻度が高いために、Gが少数となりAが多数になる。同様にC→TよりT→Cの頻度が高いために、Tが少数となりCが多数になる。このように、4重縮退部位における塩基の頻度が変異発生頻度の逆数に比例すると仮定して計算すると、予測値と観測値はよく一致した。

L鎖においてG→A transitionの頻度がC→T transitionの頻度より高いことは、G→A transitionの頻度がH鎖よりもL鎖において高いことを意味する。同様にL鎖においてT→C transitionの頻度がA→G transitionの頻度より高いことは、T→C transitionの頻度がH鎖よりもL鎖において高いことを意味する。このようにH鎖とL鎖の間で、変異が非対称的に生じることは、mtDNAの複製の特殊性に関連がある。

4) MtDNAの複製機構

Fig. 2にMtDNAの複製機構を示した (Clayton, 1982)。MtDNAのH鎖の複製は、D-loopにあるH鎖の複製開始点 (Ori_H) から始まる。親H鎖を押しのけながら、娘H鎖の合成が進む。娘H鎖の上にあるL鎖の複製開始点 (Ori_L) が現れると、初めて娘L鎖の複製が始まる。この間に親H鎖は一本鎖状態におかれる。MtDNAの複製は緩徐であり、約2時間かかるとされている。これは、mtDNAの複製が行われるマトリックス空間は蛋白質の密度が高く、速やかな

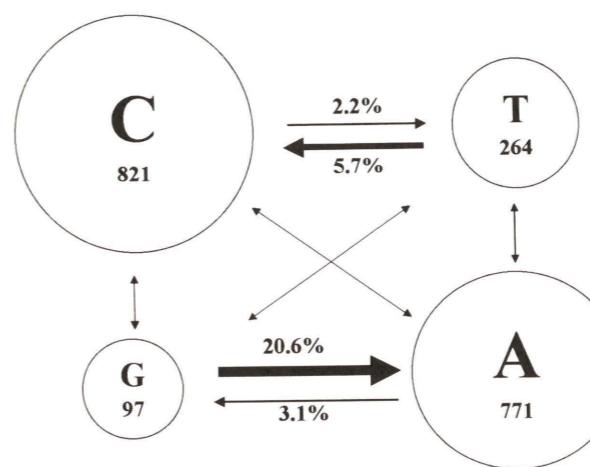


Fig. 1 Frequency of nucleotide substitutions in the fourfold degenerate sites within the heavy-strand encoded genes of human mtDNA. Number of nucleotides at the fourfold degenerate sites is shown in each circle. The arrows and percentages show directions and frequencies of substitutions.

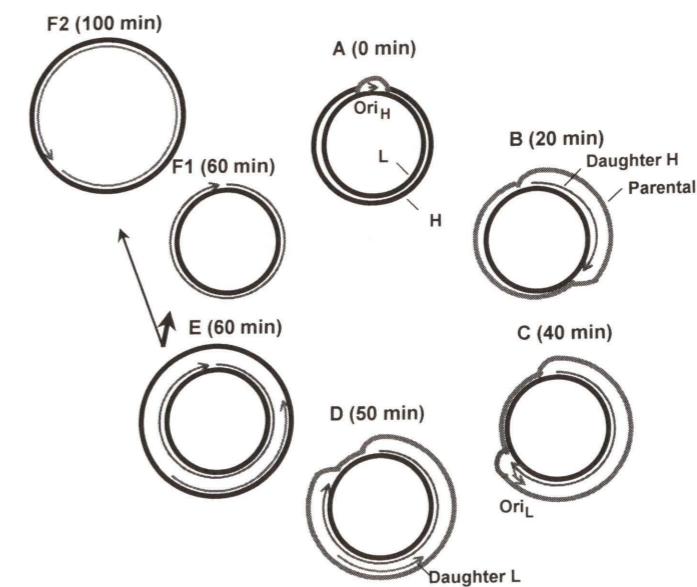


Fig. 2 Replication of mitochondrial genome. Replication of the daughter heavy (H) strand starts from the origin of H strand replication (Ori_H) within the major non-coding region (Step A at 0 min). The author assumes that it takes 60 min for the replication of H strand to be completed. The replication of the daughter light (L) strand starts at 40 min (Step C) from the origin of L strand replication (Ori_L) and ends at 100 min (Step F2). The duration of single-stranded state of the parental H strand near the non-coding region is 40 + 40 = 80 min. Deamination of cytosine to uracil or adenine to hypoxanthine on the parental H strand is highly mutagenic.

Table 1 Comparison of nucleotides at fourfold degenerate sites where A-to-G transition was detected at least one individual among 43 individuals

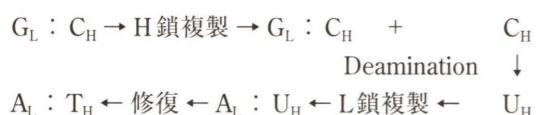
Nuc	Gene	Sia	Ora	Gor	Pyg	Chi	Hum	Mut	Obs	Anal	Occur
4715	ND2	A	A	A	A	A	A	G	1	43	once
4961	ND2	A	A	A	A	A	A	G	1	43	once
5240	ND2	A	A	A	A	A	A	G	1	43	once
7055	CO1	A	A	A	A	A	A	G	1	43	once
7403	CO1	A	A	A	A	A	A	G	1	43	once
8071	CO2	A	A	A	A	A	A	G	2	43	twice
7250	CO1	C	A	A	A	A	A	G	1	43	once
5351	ND2	A	A	A	C	A	A	G	2	43	once
5441	ND2	T	T	C	C	C	A	G	1	43	once
7828	CO2	C	A	A	G	A	G	1	43	once	

Abbreviations used are: Nuc, nucleotide position; Sia, Siamang, *Sympalangus syndactylus*; Ora, orangutan; Gor, gorilla; Pyg, pygmy chimpanzee; Chim, chimpanzee; Hum, standard nucleotide in human; Mut, mutated nucleotide detected at least in one individual; Obs, number of individuals with the substitution; Anal, number of individuals analyzed; and Occur, number of mutational occurrence in the phylogenetic tree.

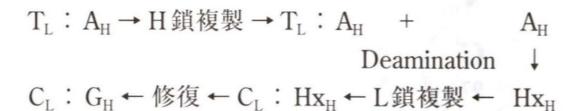
DNAの合成ができないためと推定されている。親H鎖には一本鎖DNA結合蛋白質(single strand binding protein, SSB)が結合して安定化されるとはいって、一本鎖DNAは二本鎖DNAよりもDNA損傷が生じやすい。損傷された親H鎖を鋳型として合成される娘L鎖の複製の過程において変異が発生する。

5) MtDNAにおけるtransitionの発生機構

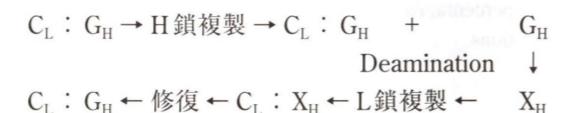
G→A transitionの発生機構をここに示す。母H鎖上でCからUへ脱アミノ反応が起こる。母H鎖上に生じたUを鋳型として娘L鎖が合成されるときAが取り込まれる。この結果L鎖上でG→A transitionが生じる。変異原性のあるUを排除するために、uracil DNA-glycosylaseが存在するが、Gと対をなしているUを除去する場合のみに有効である。一本鎖状態においてCがUに転換し、それを鋳型としてAが取り込まれた場合には、uracil DNA-glycosylaseが作用してもUがTに置き換えるのみである。



同様にT→C transitionの発生機構も母H鎖上のAの脱アミノで説明できる。母H鎖上でAからhypoxanthine(Hx)へ脱アミノ反応が起こる。HxはTではなくCと対をなすので、その結果としてT→C transitionを生じる。変異原性のあるHxを排除するために、hypoxanthine DNA-glycosylaseが存在するが、Tと対をなしているHxを除去する場合のみに有効である。一本鎖状態においてAがHxに転換し、それを鋳型としてCが取り込まれた場合には、hypoxanthine DNA-glycosylaseが作用してもHxがGに置き換えるのみである。



これに対し母H鎖上でGからxanthine(X)へ脱アミノ反応が起きた場合、Xには変異原性がない。これはXがCと対をなすためである。従って、L鎖上のCは安定であり、このため頻度が高い。



Ori_Lに近いcytochrome c oxidaseの遺伝子COIおよびCOII遺伝子では、親H鎖は一本鎖状態における時間が短いために、これらの遺伝子領域では変異発生頻度が低いと予想される。一方、Ori_Lから遠いcytochrome bのCytb遺伝子では、親H鎖は一本鎖状態における時間が長いために、この遺伝子領域では変異発生頻度が高いと予想される。4重縮退部位におけるGの含量はOri_Lから距離に関わらず全般的に低いが、Ori_Lから遠い遺伝子ほど4重縮退部位におけるTの含量が低くなっている。しかしながら、実際にOri_Lから距離によって遺伝子間で発生頻度が異なるかどうかを実証するために、さらに多数の個体を用いて種内変異を解析している。

6) 種内変異と種間変異の比較

次に、人類の種内変異(intraspecific mutation)の解析から得られたG→A transitionの頻度がA→G transitionの頻度よりも高いという結果が、靈長類の種間比較によって支持されるか否かを検討した。

Table 1に、43個体の中で、1個体以上において、A→G transitionが検出された4重縮退部位において、5種の靈長類、すなわちシャーマン、オランウータン、ゴリラ、

Table 2 Comparison of nucleotides at fourfold degenerate sites where G-to-A transition was detected at least one individual among 43 individuals

Nuc	Gene	Sia	Ora	Gor	Pyg	Chi	Hum	Mut	Obs	Anal	Occur
4655	ND2	A	A	A	A	A	G	A	2	43	once
5147	ND2	A	A	A	A	A	G	A	2	43	once
6962	CO1	A	A	A	A	A	G	A	4	43	twice
8020	CO2	A	A	A	A	A	G	A	3	43	once
8155	CO2	A	A	A	A	A	G	A	1	43	once
8856	ATP6	A	A	A	A	A	G	A	2	43	twice
5231	ND2	A	G	A	A	A	G	A	2	43	once
8251	CO2	G	A	A	A	A	G	A	1	43	once
7600	CO2	T	A	G	G	G	G	A	2	43	once

Abbreviations used are the same as in Table 1.

ピグミーチンパンジー、チンパンジーで対応する位置にどのような塩基が見出されるかを比較したものである。5441番および7828番のAを除いて、多くの種においてAが観察されている。人類の共通の祖先(いわゆるミトコンドリアイブ)が持っていたA塩基のほとんどは靈長類と共に通である。このことは靈長類の共通の祖先から、長期間にわたってAが保存されていたことを意味する。少数のヒト個体においてAからGへ新変異が生じたと考えられる。

Table 2は、43個体の中で、1個体以上において、G→A transitionが検出された4重縮退部位において、5種の靈長類で対応する位置にどのような塩基が見出されるかを比較したものである。7600番のGを除いて、多くの種において、また、ヒトに近縁のピグミーチンパンジーおよびチンパンジーにおいて、Aが観察されている。また系統樹を描くと6962G→Aと8856G→Aが2つの系統で独立に2回生じたことが分かっている。これらの比較から、ヒトとチンパンジーの共通の祖先から、ヒトの祖先が分岐した時にその祖先が偶然保有していたG変異が多くヒトに伝達されていると考えられる。すなわち、ミトコンドリアイブが有していたGは新変異であったと考えられる。そのGは、少数の個人においてGからAに先祖帰りしている。近縁の種の塩基と比較すると、Gは一瞬出現し、急速に消滅していくようである。

2. 長寿とミトコンドリアDNA多型

1) 人類の歴史と慣習遺伝子型

ヒトは長い後生殖期を持つが、これは生物としては想定外である。後生殖期に発症する疾患は、次世代へ遺伝子が既に伝達された後に発症するので、これらの疾患に関連する遺伝子変異は選別されず、ヒト集団の中に多型として蓄積しうることを示している。人類の歴史の中で、飢餓や寒冷に適応した遺伝子型(慣習遺伝子型 thrifty genotype)が選択され、これが現代社会においては肥満し易い遺伝的特質をもたらしている可能性がある。ミトコンドリアのエネルギー産生系の特性がmtDNAの慣習

遺伝子型によって規定されているかどうかについては、検証が進んでいない。

2) 老化に関するミトコンドリア仮説

ミトコンドリア脳筋症、心筋症、糖尿病においてミトコンドリアDNA(mtDNA)の多様な変異が報告されている。病的変異によってミトコンドリア機能障害が生じると、ミトコンドリアからの活性酸素種の漏出が増大する(Zhang et al., 1998)。その結果、mtDNA自身の酸化的損傷による二次的変異の発生が起きること(Kovalenko et al., 1996)、脂質過酸化反応の副産物である4ヒドロキシノネアルなどによって修飾された蛋白質(Yoritaka et al., 1996)が主としてミトコンドリアにおいて増加することなどが明らかになった。

これらの疾患の病因となる変異に関する知見を、加齢に伴うミトコンドリア機能障害に外挿したものが、老化に関するミトコンドリア仮説である。著者らは体細胞におけるmtDNA変異の蓄積が加齢と変性疾患に関与していることを1989年に提唱した(Linnane et al., 1989)。この仮説を検証した結果、多様な病態においてmtDNAの欠失(Hattori et al., 1991; Ikebe et al., 1990)あるいは点変異(Kovalenko et al., 1996)が蓄積することをPCR法あるいはin situ hybridization(Nakamura et al., 1996)によって示すことができた。

mtDNAの進化速度は核DNAの進化速度の5~10倍高く、mtDNAの塩基配列の多様性は個体間で顕著である。ミトコンドリアが老化において重要な役割を演じていることを明示するためには、mtDNA多型の相違によってミトコンドリアからのラジカル産生量が異なり、その結果、成人発症性疾患に罹患する危険率が変化し、ひいては寿命にも影響を及ぼすという仮説を検証する必要がある。著者らは現在、多様なミトコンドリア遺伝子多型を解析し、それらの多型の老化過程への影響、あるいは生活習慣病に罹患するリスクファクターとしての意義を明しようとしている。

Table 3 Nucleotide substitutions detected frequently in Japanese centenarians

Substitution	Gene	Amino acid replacement	Centenarian	Control
5178C → A	ND2	Leu237Met	9/11	12/43
8414C → T	ATP8	Leu17Phe	7/11	11/43
3010G → A	16S rRNA	—	7/11	11/42

3) 長寿に関連するミトコンドリアゲノムの一塩基多型

ミトコンドリアゲノムは Sanger らが 1981 年に全塩基配列を決定しており、ヒトゲノム計画のさきがけである。著者らは、パーキンソン病あるいは特発性心筋症の患者について mtDNA の全塩基配列の決定を行った。それらの患者で見出された塩基置換が、病態に関与していることを証明するためには、疾患群での SNP の頻度と正常者での頻度を比較する必要がある。しかし、中高年で発症する疾患について考えると正常者の定義が難しい。ほぼ同年齢の個体を対照群としても、数年後にその疾患を発症する可能性は否定できない。そこで長寿者の代表である百寿者（100 歳以上）を疾患群に対峙するコントロール群として選択した。

4) 長寿と母性遺伝

冠動脈の異常に基づく心臓病に関する疫学的研究（Framingham study）によれば、長寿は父親の死亡年齢よりも母親の死亡年齢によって強い影響を受ける（Brand et al., 1992）。母性遺伝によって伝えられたミトコンドリア遺伝子型が、mtDNA に対する酸化的損傷、mtDNA 変異の蓄積速度、変性疾患に対する罹り易さ、さらには個体の寿命に影響を及ぼしている可能性がある。この仮説を検証するために、著者らは 37 例の日本人の百寿者の mtDNA を分析した（Tanaka et al., 1998）。

5) 百寿者のミトコンドリア遺伝子の解析

はじめに、11 例の百寿者において mtDNA の全塩基配列を解析した。多様な塩基置換が存在したが、mtDNA の全塩基配列が既に決定されていた 43 例の対照群と比較して、これらの百寿者において数個の塩基置換がより高い頻度で検出された（Table 3）。

アミノ酸置換を伴う 2 カ所の塩基置換が百寿者群でより高い頻度で観察された。第 1 の塩基置換（Mt5178A）は、NADH 脱水素酵素の第 2 サブユニットの遺伝子（ND2）領域内の塩基番号 5178C → A transversion であり、Leu237Met 置換を伴う。Mt5178A は百寿者の 11 例中 9 例で検出されたのに対し、対照群では 43 例中 12 例にのみ検出された。この頻度の差は危険率 0.01 以下で統計学的に有意であった。

第 2 の塩基置換（Mt8414T）は、ATP 合成酵素の第 8 サブユニットの遺伝子（ATP8）領域内の 8414C → T transition であり、Leu17Phe 置換を伴う。Mt8414T は百

寿者の 11 例中 7 例で検出されたのに対し、対照群では 43 例中 11 例にのみ検出された。この頻度の差は危険率 0.05 以下で有意であった。

さらに第 3 の塩基置換（Mt3010A）は 16S リボソーム RNA 遺伝子領域内の 3010G → A transition である。Mt3010A は百寿者の 11 例中 7 例で検出されたのに対し、対照群では 42 例中 11 例にのみ検出された。この頻度の差は危険率 0.05 以下で有意であった。

Mt8414T と Mt3010A の両者を有する百寿者 7 例は、Mt5178A を有する百寿者 9 例に含まれていたので、これらの塩基置換の大部分は連鎖していることが示唆された。

6) ミトコンドリア遺伝子型の頻度比較

これらの塩基置換の中から Mt5178A に注目し、PCR-RFLP 法によって、37 例の百寿者と 252 例の愛知県内の健康な献血者の試料をスクリーニングした。Mt5178A の百寿者における頻度（23/37, 62%）は、献血者における頻度（114/252, 45%）より統計学的に有意に高かった（危険率 0.04、オッズ比 = 1.99）。このことは Mt5178A が長寿に関連していることを示唆している。

これらの mtDNA の塩基置換が疾患の発生に及ぼす影響を評価するために、Mt5178A と Mt5178C の頻度を、無作為抽出した大学病院の入院患者および外来患者 338 例において調べた。Mt5178A または Mt5178C を有する患者の年齢分布から、若い患者における Mt5178C の頻度は Mt5178A の頻度とほぼ等しかったのに対し（46 歳未満の患者での Mt5178A : C 比 46 : 40），高齢の患者における Mt5178C の頻度は Mt5178A の頻度と比較してより顕著な増加を示し（46 歳以上の患者での Mt5178A : C 比 86 : 166），46 歳において明瞭な屈折点を示すことが明らかになった。高齢の患者における Mt5178A/C 比（86 : 166）は、百寿者における比（23 : 14, p = 0.001）および健常人対照における比（114 : 138, p = 0.01）と比較して統計学的に有意に低かった。この結果は Mt5178C を有する個体が、Mt5178A を有する個体と比較して、成人発症性の疾患に罹患しやすいことを示唆している。

7) ミトコンドリア遺伝子型間の機能的相違

ミトコンドリア遺伝子型の相違によって呼吸活性・活性酸素種の発生量に相違があるか否かを明らかにするた

めに、新生児の臍帯血から血小板を単離し、骨肉腫由来の ρ^0 細胞と融合し、Mt5178A あるいは Mt5178C 型のミトコンドリアを有する細胞株を多数確立した。しかしながら、細胞株間の呼吸活性あるいは活性酸素種の発生量の分散が大きいため、遺伝子型間で有意な差を示すことはできなかった。

Mt5178C → A によってアミノ酸置換が生じる残基 Leu237 は哺乳類では保存されていない。ヒトでは Leu であるが、ラット・マウス・ウシでは Thr である。水生哺乳類であるアザラシおよびシロナガスクジラにおいて Met が観察される。この Met 残基が長時間潜水することができるクジラのミトコンドリア機能にどのような関連があるかは不明である。

メチオニンはイオウを含むアミノ酸であり、このイオウがスーパーオキシドアニオン（superoxide anion, O_2^- ）あるいはパーオキシナイトライト（peroxynitrite, $ONOO^-$ ）と反応し、メチオニンスルホキシド methionine sulfoxide となりうる（Levine et al., 1996）。さらに形成されたスルホキシドを修復しメチオニンに戻す機構が存在すると考えられている。すなわち蛋白の表面にある Met 残基は活性酸素種を捕捉するラジカルスカベンジャーであると提唱されている。ヒトのミトコンドリア DNA によってコードされている 13 種の蛋白質のメチオニン含量を調べると 5.4% であり、ND2 遺伝子産物のメチオニン含量は 6.9% であった。この値は一般の蛋白質のメチオニン含量（2.2%）の 2.2 倍ないし 3.1 倍高い。もし、ミトコンドリアに対する酸化的ストレスが加齢において重要であるならば、ND2 サブユニットの長寿に関連する Leu237Met 置換はミトコンドリアに対する保護作用を有している可能性があろう（Tanaka et al., 2000）。

3. 糖尿病とミトコンドリア DNA 多型

1) ミトコンドリア遺伝子型と 1 型糖尿病における糖尿病性腎症との関連

無作為抽出した大学病院の患者で、遺伝子頻度に有意の差が現れたことは、ミトコンドリア遺伝子多型の影響が、神経変性疾患だけでなく、広範な成人発症性の疾患に関与していることを示唆している。そこで、著者らは、心筋梗塞、脳血管障害、パーキンソン病、閉経、骨粗鬆症などについて Mt5178A/C 型の影響を検討している。ここでは糖尿病との関連について紹介する。

糖尿病は白内障・網膜症・神経障害などを惹起するとともに、動脈硬化を促進し心筋梗塞や腎障害をもたらす。糖尿病患者では家族歴を有するものが多く、遺伝的要因と環境要因の複合がその発症に関与していると考えられる。

1 型糖尿病については、東京女子医大糖尿病センターの内湯安子助教授らと共同研究を行った。10 年以上の罹患歴を有する 1 型糖尿病患者において、ミトコンド

ア遺伝子型と網膜症および腎症の重症度との関連を検討した。その結果、糖尿病性網膜症の進行と遺伝子型との関連は認められなかったが、糖尿病性腎症の重症化は Mt5178A 型の患者と比較して Mt5178C 型の患者で著しいことが明らかになった（Miura et al., 2000）。網膜症が進行するか否かは血糖値のコントロールの良否に大きく依存するのに対して、腎症の進行は遺伝的影響が大きいと考えられている。Mt5178C 型は糖尿病性腎症の重症化に影響を与える遺伝的要因の一つであると推定される。

2) ミトコンドリア遺伝子型と 2 型糖尿病の動脈硬化病変との関連

2 型糖尿病については、順天堂大学内科内分泌学講座の河盛隆造教授らと共同研究を行った。2 型糖尿病患者群と正常コントロール群との間で Mt5178A/C の遺伝子頻度に有意差はなかったが、超音波エコーによって検出される動脈壁プラークの出現頻度も Mt5178A 型の患者より Mt5178C 型の患者において有意に高いことが明らかになった（Matsunaga et al., 2001）。また頸動脈の内膜中膜厚（IMT, intimal plus medial thickness）は Mt5178A 型の患者より Mt5178C 型の患者の方が有意に大きかった。IMT は年齢依存性に増大するが、糖尿病患者において Mt5178A 型は頸動脈の肥厚を 8 ないしは 9 年分遅らせることが明らかになった。一方、糖代謝が正常である群では Mt5178C 型群より、Mt5178A 型群の方が動脈硬化の進行が約 3 年遅い傾向がみられたが、両群の間で統計学的に有意差はなかった（未発表）。このように Mt5178A 型は、糖尿病の発症を抑制しないが、糖尿病患者における動脈硬化の進行を抑制する効果を有すると考えられた。

Nishikawa ら（Nishikawa et al., 2000）はミトコンドリアが高グルコース濃度の条件下で培養された血管内皮細胞におけるスーパーオキシドの産生部位であると報告している。すなわち、コハク酸脱水素酵素阻害剤または脱共役剤の添加、あるいは脱共役蛋白質または Mn-SOD の過剰発現によってミトコンドリアからの高血糖によって惹起される ROS 産生を抑制することができたとしている。ミトコンドリア遺伝子型によってミトコンドリアからの ROS 産生量が部分的に規定されていると仮定すると、高血糖によって誘発される、あるいは加齢に伴う動脈硬化の進行は、異なるミトコンドリア遺伝子型を有する個体間で相違があると考えられる。

4. ミトコンドリア DNA 多型の世界的分布

1) 長寿に関連する遺伝子型の世界における分布

Cann らはヒトの進化に関する研究において、世界中から集めた 147 例の試料の中で、わずかに 5 例のアジア人と 1 例のヨーロッパ人が Mt5178A を有していたと報告

した (Cann et al., 1987)。この観察は Mt5178A が世界のヒト集団の中で比較的稀であることを示している。Mt5178A の頻度が日本人集団の中で 45% と高いことは、日本の平均余命（女性 83.59 歳、男性 77.01 歳）が世界中で最も高いことと関連している可能性がある。

2) AFLP 法による多型分析

最近、著者は山形大学法医学の梅津和夫助教授と協同して、日本・韓国・中国の 10 地点で得られた各 100 人以上の DNA 試料（合計約 1100 人）について、AFLP（amplified fragment length polymorphism）分析法を用いてミトコンドリア DNA の一塩基多型（SNPs）を詳細に分析している。AFLP は、1 塩基の相違によって PCR 産物の長さが約 5 塩基対だけ異なるように、また遺伝子座によって PCR 産物が約 10 塩基対だけ異なるようにプライマーを設計し、複数のプライマー対を同時に加えることによって、1 回の PCR 増幅で複数の SNPs を同時に分析する系である。AFLP 分析では PCR-RFLP 分析と異なり、制限酵素による消化が不要であるので、PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ゲルを染色するだけで結果が得られる。

3) 東アジアにおける長寿関連ミトコンドリア遺伝子多型の分布

長寿に関連する遺伝子型 Mt5178A は日本ばかりでなく、韓国、中国でも検出されたが、ドイツでは検出されなかった。Mt5178A 型を有する群を、ミトコンドリアの 16S リボソーム RNA 遺伝子の多型である Mt3010G → A に注目して、Mt3010A を有する A2 型と Mt3010G を有する A1 型に細分した。A2 型は、五島（44%）、新潟（43%）、沖縄（39%）で頻度が高く、奄美（34%）、対馬（33%）、鳥取（29%）で頻度が低かった。中国では華北（24%）で A2 型の頻度が高く、韓国（24%）と同じ頻度であったが、中国東北部（17%）、華中（14%）、華南（11%）では頻度が低下した。これに対し、A1 型は中国東北部（12%）、対馬（11%）、韓国（10%）に多く、華中および華南では 6% ないし 4% であった。A1 型は、韓国と日本の間に有る対馬（11%）で高頻度であったが、五島と沖縄では検出されず、新潟（3%）と奄美（2%）で低頻度であった。

成人発症性疾患に罹患しやすいと考えられる Mt5178C 型の群を NADH 脱水素酵素の第 3 サブユニットの多型である Mt10398A → G (Leu114Phe) に注目して、Mt10398G 型を有する B 型（B1～B6 型に細分）と Mt10398A 型を有する C 型（C1～C7 型に細分）に分類した。その結果、B1 型が華南（44%）で主要な型であること、B2 型が沖縄（22%）で頻度が高いこと、C1 型がドイツ（70%）で主要な型であることなどが明らかになった。このようにミトコンドリア遺伝子型を一塩基

多型に基づいて細分類すると、東アジアにおいて、異なる多型を有する集団が一定の傾斜をもって分布していることが明らかになった。

4) ミトコンドリア多型分析から長寿社会へ

これらの結果は、日本人およびアジア人の起源を考える上で興味あるデータではあるが、医学的観点からも重要な示唆を与える。アジア人と欧米人の間でミトコンドリア遺伝子型に大きな差があることは、欧米人のアルツハイマー病あるいはパーキンソン病患者において報告された mtDNA 変異の多くが欧米人に固有のものであり、日本や東アジアの国々における疾患の解明にはアジア人を対象にした独自の研究が必要であることを示している。また、日本と近隣諸国との間で、遺伝子頻度に差はあるものの、基本的な多型の種類が同じであることは、日本においてミトコンドリア遺伝子型の成人発症性疾患への影響を研究することによって、東アジア諸国の人々の健康づくりにも貢献できることを意味する。

結 語

現在、著者らはヒト mtDNA の SNP データベースを構築している。これによって日本人のミトコンドリアゲノムにおける SNPs の全貌が明らかになる。第二段階として、発見された各 SNPs の頻度をさらに多数の症例において分析することにより、長寿の遺伝的要因あるいはそれぞれの疾患に関連する危険因子が明らかになると期待される。第 3 段階では、長期縦断研究と連携することによって、生活習慣と遺伝因子の交絡関係を明らかにする。それぞれの個人のミトコンドリア遺伝子多型に応じて、どのような栄養指導、運動処方、薬剤選択を行うべきかなどを決定することによって、健康で豊かな長寿社会を築くことができるものと期待している。

参考文献

- Anderson, S., A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H.L. de Brujin, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J.H. Smith, R. Staden and I.G. Young (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 290, 457-465.
- Brand, F., D. Kiely, W. Kannel and R. Myers (1992) Family patterns of coronary heart disease mortality: the Framingham longevity study, *J Clin Epidemiol*, 45, 169-174.
- Cann, R.L., M. Stoneking and A.C. Wilson (1987) Mitochondrial DNA and human evolution, *Nature*, 325, 31-36.
- Clayton, D.A. (1982) Replication of animal mitochondrial DNA, *Cell*, 28, 693-705.
- Hattori, K., M. Tanaka, S. Sugiyama, T. Obayashi, T. Ito, T. Satake, Y. Hanaki, J. Asai, M. Nagano and T. Ozawa (1991) Age-dependent increase in deleted mitochondrial DNA in the human heart: possible contributory factor to presbycardia, *Am Heart J*, 121, 1735-1742.
- Ikebe, S., M. Tanaka, K. Ohno, W. Sato, K. Hattori, T. Kondo, Y. Mizuno and T. Ozawa (1990) Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence, *Biochem Biophys Res Commun*, 170, 1044-1048.
- Kovalenko, S.A., M. Tanaka, M. Yoneda, A.F. Iakovlev and T. Ozawa (1996) Accumulation of somatic nucleotide substitutions in mitochondrial DNA associated with the 3243 A → G tRNA^{Leu} (UUR) mutation in encephalopathy and cardiomyopathy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 222, 201-207.
- Levine, R.L., L. Mosoni, B.S. Berlett and E.R. Stadtman (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 15036-15040.
- Linnane, A.W., S. Marzuki, T. Ozawa and M. Tanaka (1989) Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases, *Lancet*, i, 642-645.
- Matsunaga, H., Y. Tanaka, M. Tanaka, J.S. Gong, J. Zhang, T. Nomiyama, O. Ogawa, T. Ogihara, Y. Yamada, K. Yagi and R. Kawamori (2001) Antiatherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes, *Diabetes Care*, 24, 500-503.
- Miura, J., Y. Uchigata, J.-S. Gong, J. Zhang, Y. Iwamoto, K. Yagi and M. Tanaka (2000) Mitochondrial genotype Mt5178C is associated with diabetic nephropathy in Japanese type-1 diabetic patients, In: M. Shichiri, S. Shinn and N. Hotta (Eds), *Diabetes Mellitus: Recent Advances for the 21st Century*, Elsevier Science, Tokyo, pp. 271-274.
- Nakamura, N., N. Hattori, M. Tanaka and Y. Mizuno (1996) Specific detection of deleted mitochondrial DNA by in situ hybridization using a chimera probe, *Biochim. Biophys. Acta*, 1308, 215-221.
- Nishikawa, T., D. Edelstein, X.L. Du, S. Yamagishi, T. Matsumura, Y. Kaneda, M.A. Yorek, D. Beebe, P.J. Oates, H.P. Hammes, I. Giardino and M. Brownlee (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage, *Nature*, 404, 787-790.
- Tanaka, M. and T. Ozawa (1994) Strand asymmetry in human mitochondrial DNA mutations, *Genomics*, 22, 327-335.
- Tanaka, M., J.S. Gong, J. Zhang, M. Yoneda and K. Yagi (1998) Mitochondrial genotype associated with longevity, *Lancet*, 351, 185-186.
- Tanaka, M., J. Gong, J. Zhang, Y. Yamada, H. Borgeld and K. Yagi (2000) Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis, *Mech. Ageing Dev.*, 116, 65-76.
- Yoritaka, A., N. Hattori, K. Uchida, M. Tanaka, Y. Mizuno and E.R. Stadtman (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxyynonenal protein adducts in Parkinson disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2696-2701.
- Zhang, J., M. Yoneda, K. Naruse, H.J. Borgeld, J.S. Gong, S. Obata, M. Tanaka and K. Yagi (1998) Peroxide production and apoptosis in cultured cells carrying mtDNA mutation causing encephalomyopathy, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 46, 71-79.

環境因子による酸化的DNA損傷とがん、老化

及川 伸二, 村田 真理子, 平工 雄介, 川西 正祐*

三重大学医学部衛生学教室 〒514-8507 三重県津市江戸橋2丁目174

Mechanism of oxidative DNA damage by environmental chemicals and its role in carcinogenesis and aging

Shinji Oikawa, Mariko Murata, Yusuke Hiraku and Shosuke Kawanishi

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

Summary

Reactive oxygen species are capable of causing damage to various cellular constituents, such as DNA, proteins and lipids, leading to carcinogenesis, aging and a number of diseases. We have investigated the sequence specificity of oxidative stress-mediated DNA damage by using ^{32}P -labeled DNA fragments obtained from the human *c-Ha-ras-1*, *p53* and *p16* genes. The sequence specificity of DNA damage plays the key role in the mutagenic process, and affects the mutation frequency. Therefore, investigation on sequence specificity of DNA damage would provide clues on the biological significance of DNA damage which in turn may be beneficial for cancer prevention strategy. Here we discuss the mechanisms and sequence specificity of DNA damage caused by various environmental chemicals and UVA-activated photosensitizers in relation to carcinogenesis and aging.

Keywords : DNA damage, carcinogenesis, aging, environmental chemicals, reactive oxygen species

緒 言

環境因子や食餌性因子により生体内で生成される活性酸素は、さまざまな生体分子を攻撃し、細胞傷害をもたらす。なかでも活性酸素による遺伝子の損傷は、細胞死、老化、突然変異、発がんなどに密接に関連している。化学発がん過程の第一段階（イニシエーション）におけるDNA損傷機構は付加体形成と酸化的損傷に大別される。DNA付加体は環境化学物質が生体内の薬物代謝酵素で代謝活性化され、DNAに直接作用することにより形成される。一方、活性酸素は、イニシエーションに加えて、発がん過程の第二段階であるプロモーションやプロゲッションに寄与すると考えられる。我々は、発がん性金属やベンゼンなどの単環芳香族化合物が酸化的にDNA損傷を介して発がんに至ることを報告してきた。さらに、

従来、DNA付加体形成によりその発がん機構が説明されてきた多環芳香族化合物が酸化的DNA損傷性も有することを見出している。すなわち、多くの環境化学物質の発がん過程において酸化的DNA損傷が非常に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

活性酸素がDNAを損傷し、老化の進行に関与するという仮説が提唱されている。また、最近染色体の末端部に存在するテロメア繰り返し配列の短縮が老化のプログラムに関与しているとの報告がなされている。我々は、老化促進機構の一つとして、活性酸素によるテロメア短縮促進の研究を行い、酸化ストレスと老化の関係を解明している。

本総説では、最新の研究をもとに、発がんや老化における酸化的DNA損傷の意義を概説する。

1. 実験方法の原理

実験にはヒトがん原遺伝子 *c-Ha-ras-1* およびがん抑制遺伝子 *p53* や *p16* のホットスポットを含む約 100 ~ 400

* kawanisi@doc.medic.mie-u.ac.jp

受付：2001年11月12日 受理：2001年11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12回公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」で発表された。
This paper was presented at the 12th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 26th, 2001. The symposium entitled "Molecular Pathogenesis for Oxidative Stress", was organized by Tatsuo Nunoshiba and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

Table 1 Mechanisms of oxidative DNA damage and/or adduct formation induced by various carcinogens

	Ames test	DNA adduct formation	Oxidative DNA damage	References
Aromatic nitro and amino compounds				
4-Aminobiphenyl (polynuclear)	+	+++	+	Murata et al. (2001)
MeIQx and IQ (polynuclear)	+	+++	+	Murata et al. (1999a, 1999b)
<i>o</i> -Toluidine (mononuclear)	-	-	+++	Ohkuma et al. (1999)
Nitrobenzene (mononuclear)	-	-	+++	Ohkuma and Kawanishi (1999)
<i>o</i> -Anisidine (mononuclear)	-	-	+++	Ohkuma and Kawanishi (2001)
Aromatic hydrocarbons				
Benzo[<i>a</i>]pyrene (polynuclear)	+	+++	+	Flowers et al. (1997)
Benzene (mononuclear)	-	+	+++	Kawanishi et al. (1989a)
Pentachlorophenol (mononuclear)	-	+	+++	Hiraku and Kawanishi (1996)
<i>p</i> -Dichlorobenzene (mononuclear)	-	-	+++	Oikawa et al. (2001a)
Caffeic acid (mononuclear)	-	-	+++	Naito et al. (1994)
Others				Oikawa and Kawanishi (1996)
2-Nitropropane (aliphatic amino compound)	±	+	+++	Inoue et al. (1992)
Benzoyl peroxide	-	-	+++	Sakano et al. (2001)
				Kawanishi et al. (1999)

塩基対のDNA断片をサブクローニングにより多量に得た。これらのDNA断片の5'末端を³²Pで標識し、制限酵素で切断して一端のみが標識された単離DNA断片を調製した。また、テロメア配列を含むDNA断片(5'-(TAGTAG)₄(TTAGGG)₄3')は合成し、同様に³²Pで標識して実験に用いた。Maxam-Gilbert法を応用し、オートラジオグラムからDNA損傷性とその塩基特異性を決定した。また、培養細胞を用いた実験においては、ヒト白血病細胞HL-60とそのカタラーゼ過発現株のHP100を用い、細胞内DNA損傷における過酸化水素の関与を検討した。

2. 酸化的DNA損傷と発がん

発がん物質のスクリーニングとして、変異原性試験の一つであるAmes試験が実施されている。1976年にAmesが300種の化学物質を試験した時には、発がん物質の90%が変異原性を示し、非発がん物質の90%は変異原性を示さないことから、変異原性の検出により発がん性が予測できると期待された。しかし、その後の研究からAmes試験陽性物質と発がん物質との一致率は、現在では約60%程度といわれている。新規化合物はAmes試験陰性を確認後、使用が許可される。それゆえ、Ames試験陰性物質の安全性の評価方法に関する研究が必要である。我々は、“Ames test negative”な発がん物質についてDNA損傷性を検討した。その結果、Ames試験陰性の発がん物質は多くの場合、活性酸素生成を介してDNA損傷を起こし発がんに関与することを見い出した。これまでの研究においてAmes試験陰性の発がん物質と酸化的DNA損傷性との間に定性的な相関関係を認めている。すなわち、Ames試験がDNA付加体を形成する発がん物質を効率よく検出するのに対して、我々

のシステムは酸化的DNA損傷をもたらす発がん物質を検出するのに優れていると考えられる。種々の発がん物質によるDNA損傷形態とAmes試験による判定との関係をTable 1に示した。本セクションでは、発がん物質の化学構造とDNA損傷形態との関係に注目し、酸化的DNA損傷とその機構について述べる。また、発がん性金属における活性酸素の生成と塩基配列特異的DNA損傷の発がんへの関与についても概説する。

1) 芳香族アミノ化合物

(1) 多環芳香族アミノ化合物

芳香族アミノ化合物である2-ナフチルアミン(2-naphthylamine), 4-アミノビフェニル(4-aminobiphenyl, ABP)やベンジン(benzidine)は、染料や酸化防止剤の合成中間体として広く使用されていたが、ヒトに膀胱癌を発生させることが明らかとなり、現在、労働安全衛生法で製造が禁止されている。しかし、これらの発がん物質はタバコの主流煙中に含まれていることが明らかになっており、喫煙者の膀胱癌への関与が示唆される。一般にこれらの化合物は、生体内でシトクロムP-450によりN-水酸化されて、ヒドロキサム酸が形成される。ヒドロキサム酸は、アセチルトランスクレーベルあるいはスルホトランスクレーベルによりエステル化される。このヒドロキサム酸エステルは、硫酸エステルの脱離性のため非酵素的に解離し、ナイトレニウムイオンを生じ、核酸やタンパク質と結合する。発がん性化学物質のうち、ベンゼン環の数が多い場合、一般に、DNA付加体形成による発がんの第1段階(イニシエーション)に関与すると考えられている。

我々は、ABPの発がん機構には、以上のようなDNA付加体の形成のみならず、酸化的DNA損傷も関与する

ことを明らかにした(Murata et al., 2001)。ABPの代謝物であるN-ヒドロキシ-4-アミノビフェニルは、自動酸化し、ニトロソ体となる過程で活性酸素が生じ、生体内重金属存在下でDNAを損傷する。さらに生体内還元物質NADHによりニトロソ体が還元され、酸化還元サイクルが形成されると活性酸素の生成が増強し、著しいDNA損傷が認められる。さらに、食品加熱生成物ヘテロサイクリックアミンやアゾ染料などの多環式アミノ化合物についてもDNA付加体の形成のみならず、そのN-ヒドロキシ代謝物が酸化的にDNAを損傷することを明らかにし(Murata et al., 1999a; Ohnishi et al., 2000, 2001)、活性酸素を介して発がん過程に関与する可能性を示した。

(2) 单環芳香族アミノ化合物

ベンゼン環が一つのアミノ化合物であるオルトトルイジン(*o*-toluidine)は、染料や化学薬品の精製、除草剤などに使用され、膀胱癌の多発が認められている[IARC評価: 2B(ヒトに対して発がん性を示す可能性がある)]。オルトトルイジンがDNAに付加体を形成するという報告はなく、その発がん機構は解明されていない。我々は、オルトトルイジンの代謝物である4-amino-3-methylphenolおよび*o*-nitrosotolueneが、Cu(II)およびNADHとの共存下で濃度依存的にDNAを強く損傷することを認めた(Ohkuma et al., 1999)。DNA損傷の塩基特異性は、4-amino-3-methylphenol, *o*-nitrosotoluene + NADHとともにチミンおよびシトシンが、強く損傷された。酸化的DNA損傷の指標である8-oxodGの生成量を検討した結果、Cu(II)存在下で4-amino-3-methylphenol, *o*-nitrosotoluene + NADHとともに8-oxodG量が濃度依存的に著しく増加した。従って、オルトトルイジンの代謝物が、生体内物質存在下で酸化還元サイクル(redox cycle)を形成し、酸化的にDNAを損傷することが発がんにおいて重要な役割を果たしていることが示唆された。我々は、さらにニトロベンゼンなどの代謝物が酸化的DNA損傷を起こすことを認めており(Ohkuma and Kawanishi, 1999, 2001)、ベンゼン環が一つのアミノ化合物は主に酸化によりDNAを損傷することを明らかにした。

2) 芳香族炭化水素

(1) 多環芳香族炭化水素

ベンゾ[*a*]ピレン(benzo[*a*]pyrene)は数多くの強力な発がん性芳香族炭化水素中で最も良く知られたもの一つである。ベンゾ[*a*]ピレンは、シトクロムP-450により7,8-ジオール-9,10-エポキシド(7,8-diol-9,10-epoxide)まで代謝され、湾領域エポキシドが形成されグアニンの2位のアミノ基に結合しDNAに付加体を形成する。多環芳香族炭化水素の発がん性において、この湾領域エポキシドは非常に重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、最近、ベンゾ[*a*]ピレンの代謝物が活性酸素を生成し酸化的DNA損傷も引き起こすことが報告され(Flowers et al., 1997)、現在、我々はその機構解明を行っている。

(2) 单環芳香族炭化水素

ベンゼンは、Ames試験では変異原性を検出できない発がん性環境化学物質である。ベンゼンは、造血系障害および悪性腫瘍(白血病)を引き起こす。我々は、ベンゼンの代謝物であるカテコール(Oikawa et al., 2001a), ハイドロキノン(Hiraku and Kawanishi, 1996)および1,2,4-ベンゼントリオール(Kawanishi et al., 1989a)が生体内物質存在下において、酸化的にDNAを損傷することを証明した。特に、生体内還元物質NADH共存下において、カテコールは非常に強くDNAを損傷した。この損傷機構(Fig. 1)として、カテコールの酸化生成物である1,2-ベンゾキノンがNADHにより速やかにカテコールまで2電子還元され、酸化還元サイクルを形成し、活性酸素が持続的かつ多量に生成されることを明らかにした。また、ヒト白血病由来のHL-60とHP100細胞を用いた結果から、カテコールはH₂O₂の生成を介して細胞内DNAを損傷することが認められた。これらのベンゼン代謝物、とくにカテコールは活性酸素生成を介してDNA損傷を引き起こし、ベンゼンの発がん性に深く関与することが示唆された。その他のAmes試験陰性の発がん物質であるオルトフェニルフェノール(OPP)(Inoue et al., 1990)、ペンタクロロフェノール(PCP)(Naito et al., 1994)、パラジクロロベンゼン(*p*-DCB)(Oikawa and Kawanishi, 1996)の各代謝物のハイドロキノン誘導体およびベンゾキノン誘導体が生体内物質の存在下で同様に活性酸素生成を介してDNA損傷を起こすことも解明している。

3) 発がん性金属

金属は生体にとって必須なものもあると同時に、その量や種類により毒性を示すものがある。6価クロム、ニッケル、砒素、ベリリウム、カドミウムの発がん性は、職業がんに関する疫学調査や動物実験の研究などから疑う余地はない。また、鉄錯体、鉛、コバルトなどについても、ヒトに対して発がん性を示す可能性が報告されている。我々はin vitroの実験に基づき、発がん性金属によるDNA損傷をもたらす活性種は活性酸素であることを明らかにし、1986年に世界に先駆けて金属発がんの活性酸素説を提唱した(Fig. 2)。6価クロム(Kawanishi et al., 1986)、2価のニッケル(Kawanishi et al., 1989b, 2001a; Inoue and Kawanishi, 1989)、Fe(III)ニトリロ三酢酸錯体(Inoue and Kawanishi, 1987)及び2価のコバルト(Kawanishi et al., 1989c)などの発がん性金属化合物が、H₂O₂からヒドロキシラジカル(•OH)、一重項酸素(¹O₂; ラジカルでないが反応性に富む励起状分子酸素)、金属-酸素錯体など種々のタイプの活性酸素

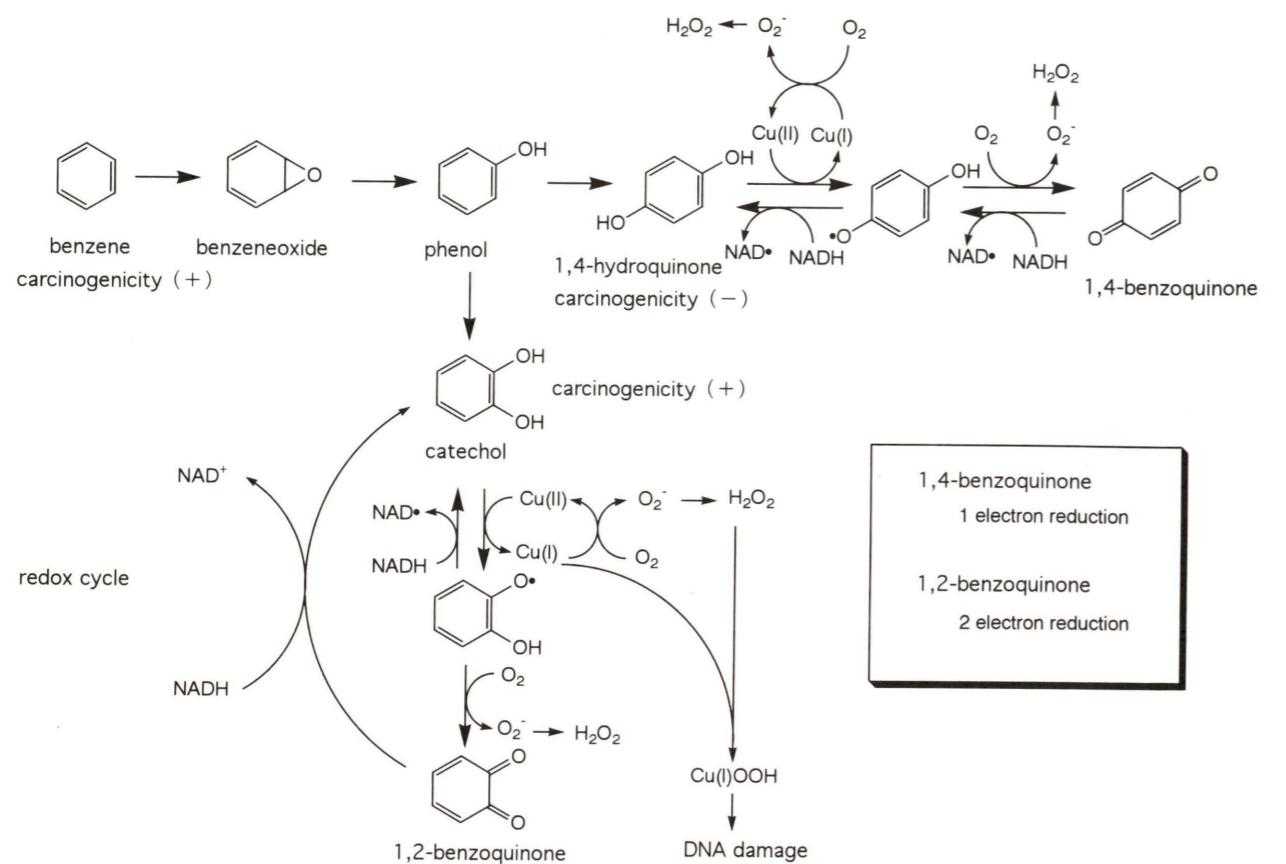


Fig. 1 Mechanisms of oxidative DNA damage by benzene metabolites

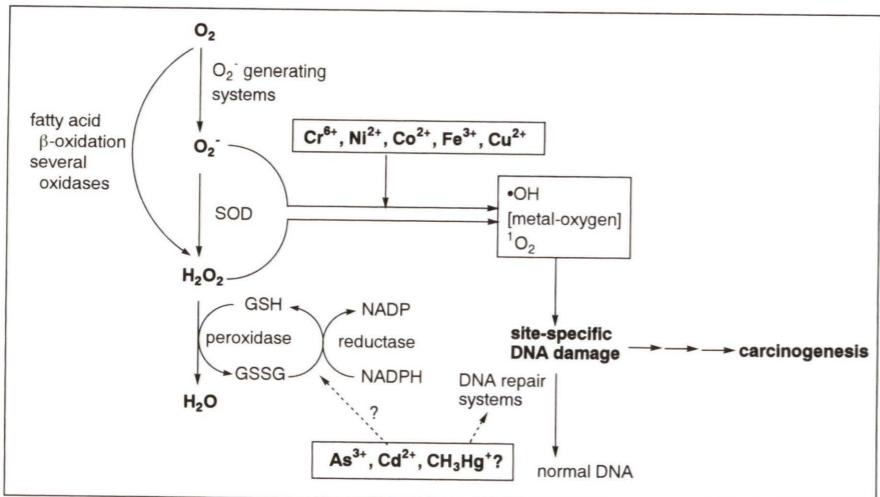


Fig. 2 Scheme of metal carcinogenesis mediated by reactive oxygen species

種を生成する。これらの活性酸素種は、塩基配列に特異的なDNA損傷を起こし、発がんに関与する (Kawanishi et al., 2001b)。

以上のように、酸化的DNA損傷は環境化学物質の発がん過程において非常に重要な役割を果たしている。現在、我々は、酸化的DNA損傷に加えDNA付加体形成をも簡便に検出できるシステムを構築中であり、酸化的損傷と付加体形成の比率が発がん感受性に与える影響の解

明を行っている。

3. 酸化的DNA損傷と老化

加齢とともに活性酸素、放射線や太陽紫外線などによる酸化的ストレスが蓄積し、その結果、DNAや蛋白質が損傷され、老化が進行するとの仮説が提唱されている。染色体の末端部に存在するテロメア繰り返し配列 (5'-TTAGGG-3')_n の短縮が老化のプログラムに関与すると

の報告がなされている。テロメアは、真核生物の染色体の末端に存在し、ヒトでは約10 kbも続き、染色体の安定性や構造維持に重要な役割を果たしている。細胞分裂のDNA複製時に新生鎖5'末端部分のテロメアDNAは一定の割合で短縮する。このテロメア繰り返し配列の短縮が酸化的ストレスにより通常の4~5倍促進されることが報告された。(von Zglinicki et al., 1995, 2000)。さらに、炎症組織ではテロメアの短縮促進が認められることがから、炎症が老化促進に関与することも考えられる。従って、我々は、環境因子や炎症による酸化ストレスに注目し、テロメア短縮促進を介した老化促進機構の解明を行っている。

1) 太陽紫外線

太陽紫外線が、発がんのみならず、皮膚の老化を進行させることが知られている。太陽紫外線によるDNA損傷はDNAに吸収領域を持つUVBが主要な役割を果たしていると考えられてきたが、光増感物質を介したUVAによる損傷も近年注目されている (Hiraku and Kawanishi, 2000; Ito and Kawanishi, 1997; Tada-Oikawa et al., 1997)。我々は生体内光増感物質 (リボフラビンなど) の存在下、ヒト繊維芽細胞WI-38にUVAを照射し、テロメア繰り返し配列領域の短縮促進を検討した。その結果、UVA照射量に依存してテロメア長の指標の一つであるTRF (terminal restriction fragment) の短縮が認められ、また、同条件下においてヒト培養細胞 (WI-38や前骨髓性白血病細胞HL-60) にUVAを照射すると照射量に依存して有意に8-oxodGが増加した (Table 2) (Oikawa et al., 2001b)。この酸化的DNA損傷によるTRFの短縮促進機構を解明するため、テロメア繰り返し配列を含む合成DNA (5'-(TAGTAG)₄ (TTAGGG)₄3')を用いてDNA損傷とその塩基配列特異性をピペリジン処理と8-oxodG修復酵素Fpg protein処理を行って検討した。生体内光増感物質存在下、UVA照射により、テロメア配列中の5'-GGG-3'の中央のGに特異的に8-oxodGが生成することを認めた。8-oxodGを電気化学検出器付HPLC (HPLC-ECD) で定量した結果、Gの連続配列を含まない合成DNAに比べ、テロメア繰り返し配列を含む合成DNAにおいて8-oxodG生成量の著しい増加を認めた。この塩基配列特異的DNA損傷は、UVAにより励起された光増感物質が5'-GGG-3'配列の5'側Gから電子を引き抜き、その後中央のGへhole (+

電荷) の移動が起こることにより、その部位に8-oxodGが生成するためと考えられ、電子受容性の光増感分子に共通した機構である。

2) 過酸化水素

酸化ストレスとして過酸化水素 (H₂O₂) を用いたとき、Cu(II) 存在下においてテロメア繰り返し配列中の5'-GGG-3'配列の5'側Gが顕著に損傷される (Fig. 3A) (Oikawa and Kawanishi, 1999)。4つの塩基 (A, G, C, T) 中ではGの酸化電位が最も低く、特にGGやGGG等のポリG配列は容易に酸化される。二本鎖DNAでは、GGやGGG配列の5'側のGが最も酸化されやすいことが最高被占軌道 (HOMO: highest occupied molecular orbital) の理論計算からも示されている (Yoshioka et al., 1999; Kawanishi et al., 1999)。テロメア配列中の5'-GGG-3'配列の5'側Gの損傷は、最高被占軌道による理論計算とよく一致する。さらにテロメア繰り返し配列を含むDNAでは、グアニンの酸化生成物である8-oxodGが、テロメア配列を含まないDNAよりも約5倍増加した。このDNA損傷はカタラーゼとCu(I)キレート剤であるバソキュプロインにより抑制されたことから、損傷の活性種はH₂O₂とCu(I)から生成された金属-酸素錯体であると考えられる。

3) 炎症

慢性的な感染や炎症組織ではマクロファージや好中球から一酸化窒素 (NO) 及びスーパーオキシド (O₂⁻) が過剰に生成される。NOとO₂⁻同時発生試薬 (SIN-1)においても5'-GGG-3'配列中の5'側Gの著しい損傷が認められた (Fig. 3B) (Oikawa and Kawanishi, 1999)。このGGG配列特異的な損傷には、NOとO₂⁻の反応生成物ペルオキシナイトライド (ONOO⁻) が重要な役割を果たしていると考えられる。この反応は条件により8-oxodGが生成される場合と8-nitroGが生成される場合があり、Gのニトロ化も塩基配列特異的損傷に関与すると推定される。

以上の結果から酸化的ストレスによりテロメア繰り返し配列 (5'-TTAGGG-3')_n 中の5'-GGG-3'配列に特異的に損傷が起こることが解明された。従って、環境化学物質やUVAによるGGG配列特異的な損傷を介したテロメア繰り返し配列の短縮促進が、老化促進に関与していると考えられる。遺伝的早老症のウェルナー症候群などでは、その原因遺伝子であるDNAヘリカーゼの変異により、DNAの複製や修復、転写などに異常をきたすことが知られているが、テロメアの短縮速度も速いことが報告されている。テロメア短縮促進については、正常なヘリカーゼなどが、DNA修復過程において、テロメア繰り返し配列中の5'-GGG-3'配列特異的な損傷部位の切断に関与する可能性が考えられるため、現在検討を行っている。

Table 2 8-oxodG formation and TRF length in WI-38 fibroblasts

UVA (J/cm ²)	8-oxodG/10 ⁵ dG ± S.E.	TRF (kb)
0	0.44 ± 0.07	9.48
2	0.72 ± 0.03	8.53
5	0.98 ± 0.16	7.98
10	1.09 ± 0.26	8.25

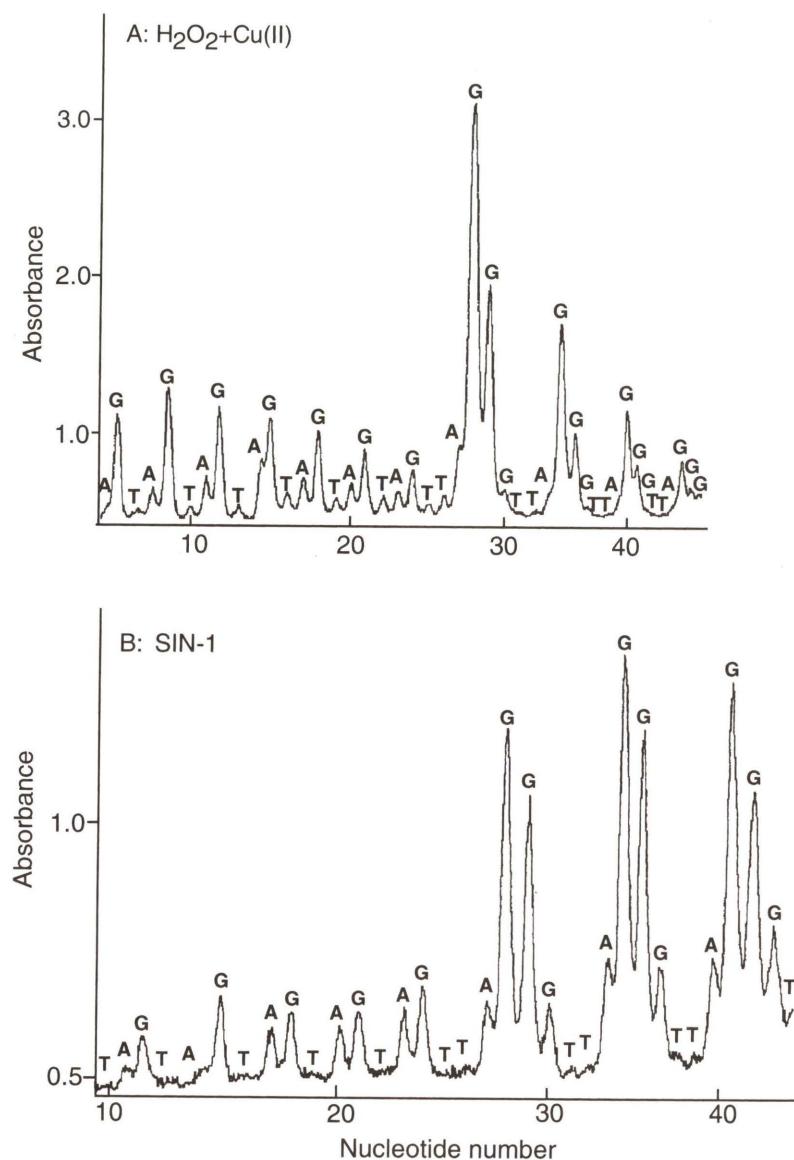


Fig. 3 Guanine-specific DNA cleavage by oxidative stress. The ^{32}P 5' end-labeled 48-base pair fragment (5'-(TAGTAG)₄ (TTAGGG)₄3') in 200 μl of 10 mM sodium bicarbonate buffer at pH 7 containing 5 μM DTPA and 20 μM per base of sonicated calf thymus DNA was incubated with 250 μM H_2O_2 in the presence of 20 μM Cu (II) (A) or 1 mM SIN-1 (B) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 60 min. After piperidine treatment, DNA fragments were electrophoresed on an 8% polyacrylamide/8 M urea gel using a DNA-sequencing system and the autoradiogram was obtained by exposing X-ray film to the gel. The relative amounts of oligonucleotides produced were measured using a laser densitometer (LKB 2222 UltroScan XL). The piperidine-labile sites of the treated DNA were determined by direct comparison with the same DNA fragment after undergoing DNA sequencing reactions according to the Maxam-Gilbert procedure. The horizontal axis shows the nucleotide number.

参考文献

- Flowers, L., S.T. Ohnishi and T.M. Penning (1997) DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon *o*-quinones : role of reactive oxygen species, Cu (II) /Cu (I) redox cycling, and *o*-semiquinone anion radicals, *Biochemistry*, 36, 8640-8648.
- Hiraku, Y. and S. Kawanishi (1996) Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites, *Cancer Res.*, 56, 5172-5178.
- Hiraku, Y. and S. Kawanishi (2000) Distinct mechanisms of guanine-specific DNA photodamage induced by nalidixic acid and fluoroquinolone antibiotics, *Arch. Biochem. Biophys.*, 38, 211-218.
- Inoue, S. and S. Kawanishi (1987) Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide, *Cancer Res.*, 47, 6522-6527.
- Inoue, S. and S. Kawanishi (1989) ESR evidence for superoxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen produced from hydrogen peroxide and nickel (II) complex of glycylglycyl-L-histidine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159, 445-451.
- Inoue, S., K. Yamamoto and S. Kawanishi (1990) DNA damage induced by metabolites of *o*-phenylphenol in the presence of copper (II) ion, *Chem. Res. Toxicol.*, 3, 144-149.
- Inoue, S., K. Ito, K. Yamamoto and S. Kawanishi (1992) Caffeic acid causes metal-dependent damage to cellular and isolated DNA through H_2O_2 formation, *Carcinogenesis*, 13, 1497-1502.
- Ito, K. and S. Kawanishi (1997) Site-specific DNA damage induced by UVA radiation in the presence of endogenous photosensitizer, *Biol. Chem.*, 378, 1307-1312.
- Kawanishi, S., S. Inoue and S. Sano (1986) Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.*, 261, 5952-5958.
- Kawanishi, S., S. Inoue and M. Kawanishi (1989a) Human DNA damage induced by 1,2,4-benzenetriol, a benzene metabolite, *Cancer Res.*, 49, 164-168.
- Kawanishi, S., S. Inoue and K. Yamamoto (1989b) Site-specific DNA damage induced by nickel (II) ion in the presence of hydrogen peroxide, *Carcinogenesis*, 10, 2231-2235.
- Kawanishi, S., K. Yamamoto and S. Inoue (1989c) Site-specific DNA damage induced by sulfite in the presence of cobalt (II) ion, role of sulfate radical, *Biochem. Pharmacol.*, 38, 3491-3496.
- Kawanishi, S., S. Oikawa, M. Murata, H. Tsukitome and I. Saito (1999) Site-specific oxidation at GG and GGG sequences in double-stranded DNA by benzoyl peroxide as a tumor promoter, *Biochemistry*, 38, 16733-16739.
- Kawanishi, S., S. Inoue, S. Oikawa, N. Yamashita, S. Toyokuni, M. Kawanishi and K. Nishino (2001a) Oxidative DNA damage in cultured cells and rat lungs by carcinogenic nickel compounds, *Free Radic. Biol. Med.*, 31, 108-116.
- Kawanishi, S., Y. Hiraku and S. Oikawa (2001b) Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging, *Mutat. Res.*, 488, 65-76.
- Murata, M., M. Kobayashi and S. Kawanishi (1999a) Mechanism of oxidative DNA damage induced by a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4, 5-*f*] quinoxaline, *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 268-275.
- Murata, M., M. Kobayashi and S. Kawanishi (1999b) Non-enzymatic reduction of nitro-derivative of a heterocyclic amine IQ by NADH and Cu (II) leads to oxidative DNA damage, *Biochemistry*, 38, 7624-7629.
- Murata, M., A. Tamura, M. Tada and S. Kawanishi (2001) Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic 4-aminobiphenyl, *Free Radic. Biol. Med.*, 30, 765-773.
- Naito, S., Y. Ono, I. Somiya, S. Inoue, K. Ito, K. Yamamoto and S. Kawanishi (1994) Role of active oxygen species in DNA damage by pentachlorophenol metabolites, *Mutat. Res.*, 310, 79-88.
- Ohkuma, Y., Y. Hiraku, S. Oikawa, N. Yamashita, M. Murata and S. Kawanishi (1999) Distinct mechanisms of oxidative DNA damage by two metabolites of carcinogenic *o*-toluidine, *Arch. Biochem. Biophys.*, 372, 97-106.
- Ohkuma, Y. and S. Kawanishi (1999) Oxidative DNA damage by a metabolite of carcinogenic and reproductive toxic nitrobenzene in the presence of NADH and Cu (II), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257, 555-560.
- Ohkuma, Y. and S. Kawanishi (2001) Oxidative DNA damage induced by a metabolite of carcinogenic *o*-anisidine : enhancement of DNA damage and alteration in its sequence-specificity by superoxide dismutase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 389, 49-56.
- Ohnishi, S., M. Murata, S. Oikawa, Y. Hiraku and S. Kawanishi (2000) Copper-dependent DNA damage induced by hydrazobenzene, an azobenzene metabolite, *Free Radic. Res.*, 32, 469-478.
- Ohnishi, S., M. Murata, M. Degawa and S. Kawanishi (2001) Oxidative DNA damage induced by an *N*-hydroxy metabolite of carcinogenic 4-dimethylaminoazobenzene, *Jpn. J. Cancer Res.*, 92, 23-29.
- Oikawa, S. and S. Kawanishi (1996) Copper-mediated DNA damage by metabolites of *p*-dichlorobenzene, *Carcinogenesis*, 17, 2733-2739.
- Oikawa, S. and S. Kawanishi (1999) Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening, *FEBS Lett.*, 453, 365-368.
- Oikawa, S., I. Hirosawa, K. Hirakawa and S. Kawanishi (2001a) Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol, *Carcinogenesis*, 22, 1239-1245.
- Oikawa, S., S. Tada-Oikawa and S. Kawanishi (2001b) Site-specific DNA damage at GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening, *Biochemistry*, 40, 4763-4768.
- Sakano, K., S. Oikawa, M. Murata, Y. Hiraku, N. Kojima and S. Kawanishi (2001) Mechanism of metal-mediated DNA damage induced by metabolites of carcinogenic 2-nitropropane, *Mutat. Res.*, 479, 101-111.
- Tada-Oikawa, S., S. Oikawa and S. Kawanishi (1997) Cellular DNA damage and apoptosis induced by UV-A radiation, *Photomed. Photobiol.*, 19, 29-32.
- von Zglinicki, T., G. Saretzki, W. Docke and C. Lotze (1995) Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts : a model for senescence ? *Exp. Cell Res.*, 220, 186-193.
- von Zglinicki, T., R. Pilger, and N. Sitte (2000) Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts, *Free Radic. Biol. Med.*, 28, 64-74.
- Yoshioka, Y., Y. Kitagawa, Y. Takano, K. Yamaguchi, T. Nakamura, and I. Saito (1999) Experimental and theoretical studies on the selectivity of GGG triplets toward one-electron oxidation in B-form DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 8712-8719.

Exposure to a power frequency magnetic field (50 Hz, 40 mT) did not cause point mutation in bacteria

Masateru Ikehata^{1*}, Yoshio Takashima², Yuji Suzuki³, Hidesuke Shimizu³,
Junji Miyakoshi⁴ and Takao Koana^{1,2}

¹ Biotechnology Laboratory, Railway Technical Research Institute, 2-8-38, Hikari-cho,
Kokubunji, Tokyo 185-8540, Japan

² Department of Built Environment, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta-cho,
Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8502, Japan

³ Department of Public Health and Environmental Medicine, Jikei University School of
Medicine, 3-25-8, Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan

⁴ Department of Radiation Genetics, Graduate School of Medicine, Kyoto University,
Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

Summary

Possible mutagenic effects of 50 Hz sinusoidal magnetic fields (MFs) were estimated using bacterial mutation assay. Mutagenic potential of MFs of up to 40 mTesla (1 T = 10,000 Gauss) was not detected by the bacterial mutation assay using *Escherichia coli* WP2 *uvrA* and four strains of *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537), either in the pre-incubation method or in the plate incorporation method. This suggested that 50 Hz, up to 40 mT MFs does not cause base substitutions or frame-shifts in bacteria.

Keywords: magnetic fields, extremely low frequency, Ames test, mutagenesis

Introduction

The chances of being exposed to extremely low frequency (ELF, 0-300 Hz) magnetic fields (MFs) are increasing due to an increase in power consumption in developed and developing countries. MFs are generated from various sources like power lines, electric appliances in homes and offices, electrified transportation systems and diagnostic devices such as magnetic resonance imaging (MRI). However, we do not yet have convincing scientific evidences that guarantee that exposure to such MFs is not hazardous to us. Since Wertheimer and Leeper (1979) reported possible association between the incidence of childhood cancer and wiring configuration, a number of studies on the biological effects of exposure to 50/60 Hz MFs have been performed. These include studies at molecular and cellular level, and also at individual level and epidemiological studies. Most of the studies focused on the possible adverse health effects of exposure

to weak ELF MFs that we are actually exposed to. Possible risks of loss of memory, Parkinson's and Alzheimer's diseases and especially of cancers have been extensively studied.

Many studies claiming positive genotoxic effects of ELF MFs exposure have been reported. It was reported that an acute exposure of 60 Hz MFs (0.1-0.5 mT) caused a dose-dependent increase in DNA strand breaks in brain cells of rats (Lai et al., 1997a). Exposure to 60 Hz MFs caused an increase in radiation-induced hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) gene mutation frequency (Walczek et al., 1999). Effects on radical pair reactions (Lai et al., 1997a), on DNA replication (Lai and Singh, 1997b), and on DNA repair processes (Walczek et al., 1999) were suggested as plausible mechanisms of these effects. On the other hand, there are several reports with negative results. Exposure to a 50 Hz 0.0002-0.2 mT MFs did not affect the rate of repair of single strand breaks in DNA in CHO cells treated with hydrogen peroxide (Cantoni et al., 1995). 60 Hz 0.0012, 0.1 and 0.9 mT MFs did not cause any genetic damage in MCF-7 cells (Dees et al., 1996). Genotoxic effects of MFs such as chromosome aberration, sister chromatid

* ikehata@rtri.or.jp

Received: March 16, 2001, accepted: August 13, 2001

© Environmental Mutagen Society of Japan

exchange and suppression of DNA repair process have been reported (see Murphy et al., 1993, McCann et al., 1993, 1998 for review). In these reviews, a decision have been given that MFs of 50 Hz, 0.15 to 5 mT are inferred to be negative for mutagenic potential.

Recently, NIEHS working group of EMF Research and Public Information Dissemination program (EMFRAPID, United States) published a report (Portier et al., 1998) suggesting that ELF EMFs would be categorized as possibly carcinogenic to humans (Group 2B of IARC evaluation). This statement of the NIEHS working group was made depending on limited evidences of carcinogenicity in humans and less than sufficient evidences of carcinogenicity in experimental animals. The report stated that they did not find sufficient scientific evidences for positive effects of environmental density of 50/60 Hz MFs (up to 2 mT) except in some epidemiological studies conducted or estimated in this program. Results of experimental studies were often found to be ambiguous and often contradictory to each other. This happened possibly due to the variety of biological test systems, the different wave forms of MFs, and most probably, due to the weakness of the flux density.

To estimate the risk of weak MFs that we are actually exposed to is the final goal of these studies. However, using a higher density to explore effects of MFs is a common strategy for safety evaluation. Miyakoshi and colleagues reported that exposure to a 50 Hz, 400 mT MF caused a distinct increase in HPRT gene mutation in human melanoma MeWo cells (Miyakoshi et al., 1996) and in HPRT locus in human osteosarcoma Saos-2 cells (Miyakoshi et al., 1998). The flux density used in these studies was one million times greater than in a typical environmental MFs. The results are unambiguous and the involvement of eddy currents induced in the culture medium was suggested. In Saos-2 cells, complete deletion of the HPRT locus rather than point mutation was the major cause of mutation. Koana et al. (2001) reported consistent results using the SMART test in *Drosophila melanogaster*, where the exposure to a 50 Hz, 20 mT MF caused an increase in somatic recombination frequency whereas the frequency of point mutation remained unchanged. The involvement of the eddy currents was again suggested.

However, in the SMART test, the detection efficiency of point mutation is much lower than that of recombination. Therefore, it is not possible to conclude that exposure to time-varying MFs does not cause point mutation. It is necessary to investigate the mutagenic effects of ELF-MFs, using an assay system with a high detection efficiency for point mutation to estimate possible health risk of ELF-MFs. In addition, it is important to compare the genotoxicity of MFs to that of other well-known mutagens. A general, widely used assay system should be

employed. For these reasons, we used the bacterial mutation assay (Ames et al., 1975) as this assay is commonly used to screen mutagenicity of drugs, chemicals and environmental pollutants. The risks of exposure to MFs can be easily compared with that of other environmental pollutants or mutagenic agents.

Previous reports state that a 100 Hz 0.2 mT EMF and a 0.3 Hz triangular wave EMFs (0.08 mT) did not affect the mutagenic frequency of histidine auxotroph *Salmonella typhimurium* TA100 (Juutilainen et al., 1986 and Moore et al., 1979), or that a 0.3 mT of 60, 600, 6000 Hz EMFs did not induce genotoxicity in *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100 and TA102 (Morandi et al., 1996). However, EMFs used in the above experiments were below 1 mT and thus, these results do not prove the absence of the genotoxic effects of strong static magnetic fields. On the other hand, we have already published several studies to examine strong magnetic fields on the mutagenicity and co-mutagenicity of static MFs up to 5 T using bacterial mutation assay (Ikehata et al., 1999) and lack of mutagenicity and co-mutagenicity of a 50 Hz, 14 mT MF using bacterial mutation assay (Nakasono et al., 2000). Here we examined the cytotoxicity and mutagenicity of stronger MFs of 50 Hz, up to 40 mT sinusoidal MFs using the bacterial mutation assay, as Koana et al (2001) reported mutagenicity of 50 Hz, 20 mT MF using SMART test. We found neither cytotoxicity nor genotoxicity in bacteria used in this study.

Materials and Methods

1. Bacterial strains

Five routinely used tester strains were used in this study. Four strains of *S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) were kindly provided by Dr. B.N. Ames of the University of California, Berkeley and *E. coli* WP2 *uvrA* was kindly provided by Japan Bioassay center (Kanagawa, Japan).

2. Reagents

Nutrient broth (Oxoid, Nutrient broth No.2) was purchased from Unipath Ltd. (Hampshire, UK). Bacto-agar was purchased from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA). The S9mix, prepared from liver of phenobarbital and 5,6-benzoflavone pretreated male Sprague-Dawley rats, was purchased from Kikkoman Co. (Chiba, Japan). Other reagents were laboratory-grade materials purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan).

3. Magnetic field exposure

Pair of water-cooled Helmholtz coils (ISM-12K12-2, IDX Co., Tokyo, Japan) was located in a constant temperature room (MCU-2000, Sanyo Co., Osaka, Japan) and the bacterial plates were maintained at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ during exposure.

The coils were energized to generate horizontal sinusoidal MFs of 50 Hz, up to 40 mT (Fig. 1). Fifteen bacterial plates (90 mm ϕ) could be placed in the exposure space (140 mm ϕ \times 300 mm). Spatial inhomogeneity of flux density in exposure space was less than 10%. For shake cultures, we used reciprocal shaker incubators to maintain the bacterial suspension tubes in the MF and in the control space simultaneously at $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ using circulating hot water.

4. Determination of cytotoxicity of 50 Hz MFs

Four L-tubes (16 mm diameter) containing 5 ml nutrient broth were inoculated with 10 μl inoculum from 8.75% dimethylsulfoxide (DMSO) stock stored at -80°C . Two of the tubes were placed in a tube stand on one side of the reciprocal shaker incubator (37°C , 50 rpm) while the other two were placed in the stand on the opposite side. One tube stand was placed in a 50 Hz MF and the other in control space. Stray flux density in the control position was less than 1/100 of that in the exposure space. (i.e. 0.4 mT when exposure coil generate a 40 mT field). Viable cell concentration was determined by colony forming units (CFUs). 50 μl of each culture was sampled at each incubation time. The aliquot was diluted appropriately to obtain a concentration of 10^2 to 10^4 cells/ml with 0.1 M-phosphate buffer (pH 7.4), and 100 μl of the diluted cell suspension was mixed with 2 ml of molten top-agar (0.6% Bacto-agar, 0.5% NaCl) and poured on to nutrient agar plate. Viable cell number was counted after 24 h incubation at 37°C and viable cell concentration in each culture at each time point was calculated. At least three independent tests were performed. Student's *t*-test was used for statistical analysis of the results between the cell concentrations at each sampling point in the exposed group to that of control.

5. Mutagenicity assay of 50 Hz MFs

Experiments were carried out with plate incorporation method and also with preincubation method (Ames et al., 1975 and Yahagi et al., 1977). Bacterial culture was incubated aerobically using L-tubes containing 12 ml nutrient broth and 10 μl inoculum from 8.75% dimethylsulfoxide (DMSO) stock stored at -80°C and was grown to late-log phase (final cell concentration reached 1.3×10^9 cells/ml). In the preincubation method, tubes contained cell suspensions (0.1 ml) with phosphate buffer (0.5 ml) were made and randomly divided two groups. MF-exposed group was preincubated in a 50 Hz MF while control group was incubated in a control space for 20 min using reciprocal shaker incubator (37°C , 50 rpm) simultaneously. After preincubation, each content was mixed with molten top-agar (2 ml), plated onto glucose minimal agar plates and incubated at 37°C in a conventional incubator for 48 hr. Revertant colonies were counted using Colony Analyzer CA-90S

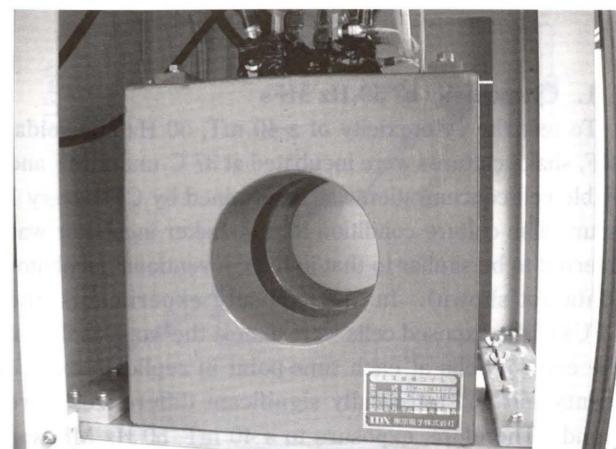


Fig. 1 A pair of Helmholtz coils to generate time-varying magnetic fields (ISM-12K12-2, IDX Co., Japan)
Field density: maximum 40 mT at 50 Hz
Temperature control: $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ with shaker incubator
 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ using air conditioner
Exposure space: Φ 200 mm \times 60 \sim 300 mm

(Toyo Sokki, Kanagawa, Japan) after 48 hr incubation at 37°C . When the number of colonies/plate was small (\leq ca. 100), the accuracy of Colony Analyzer decreases. In such a case, each plate was also counted manually to confirm the score.

In the plate incorporation method, cell suspensions (0.1 ml), phosphate buffer (0.5 ml), molten top-agar (2 ml) were mixed and plated onto glucose minimal agar plates. The plates were randomly divided two groups and MF-exposed group was incubated at 37°C for 48 hr in a 50 Hz MF while negative control group was incubated in a conventional incubator, and then revertant colonies were scored.

Top-agar consists of 0.6% Bacto-agar and 0.5% NaCl with 50 μM L-histidine and 50 μM D-biotin for *S. typhimurium* strains and with 50 μM L-tryptophane for *E. coli* strain. Sodium azide (CAS No. 26628-22-8) was used as positive control for *S. typhimurium* TA1535 (0.5 μg /plate). 9-aminoacridine (9-AA, 90-45-9) was used as positive control for *S. typhimurium* TA1537 (80 μg /plate). 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2, 3688-53-7) was used as positive control for *S. typhimurium* TA100 and *E. coli* WP2 *uvrA* (0.01 μg /plate) and for *S. typhimurium* TA98 (0.1 μg /plate). 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO, 56-57-5) was used as positive control for *S. typhimurium* TA100 (0.025 μg /plate) and for *S. typhimurium* TA98 (0.2 μg /plate) in plate incorporation method. Each experiment was performed in at least triplicate plates and conducted at least three times. Statistical analysis was performed using linear regression model and non-statistical method of dose relationship and 2-fold cut off was used for evaluation of the results.

Results

1. Cytotoxicity of 50 Hz MFs

To test the cytotoxicity of a 40 mT, 50 Hz sinusoidal MF, shake cultures were incubated at 37 °C under MF and viable cell concentration was determined by CFU every 1 hour. The culture condition in the shaker incubator was inferred to be similar to that in the conventional incubator (data not shown). In MF exposure experiments, the CFUs of the exposed cells were almost the same as that of the control cells at each time-point in replicate experiments and no statistically significant differences were found. Therefore, exposure to a 40 mT, 50 Hz MF was inferred to be non-toxic to bacteria used in this study (Fig. 2). This would suggest that 50 Hz sinusoidal MFs up to 40 mT has no toxic effect on bacteria provided that a linear dose-response relationship exists between the effects of MFs and its flux density.

2. Mutagenicity of 50 Hz MFs

In the preincubation method, cell suspension in sterilized tubes was exposed to MFs of various flux densities for 20 min at 37 °C. Control cells were incubated for 20 min at 37 °C simultaneously. The number of reverse mutant colonies in the control plates of each strain was almost the same as the number of spontaneous revertant colonies of the corresponding strain incubated in conventional incubator. The results suggest that culture conditions in the shaker incubator did not cause any artifacts in our assay. Under these experimental conditions, statistically significant difference in the number of revertant colonies was not found in all five tester strains at any flux densities. Fig. 3 shows the average of revertant colony number with standard deviation for MF-exposed, negative and positive control cultures in preincubation method.

In plate incorporation method, each plate was exposed up to 40 mT, 50 Hz MFs for 48 h at 37 °C. Fig. 4 shows the average of revertant colony number with standard deviation for MF-exposed, negative control (each experimental set) and positive control groups in plate incorporation method. There was also no difference in the number of revertant colonies for all tester strains between MF exposed and control groups. No difference was observed in the shape and size of revertant colonies of MF exposed and control groups (data not shown). On the other hand, the number of revertant colonies increased significantly in the chemical mutagen treated groups in both experimental methods for all tester strains. Therefore, these results suggest that MFs up to 40 mT, 50 Hz had no mutagenic potential under our experimental conditions.

Discussion

In this study, we examined possible mutagenic activity of 50 Hz MFs up to 40 mT using bacterial mutation assay.

We found no mutagenic effect of exposure either in the preincubation method or in the plate incorporation method. These results suggest that even if MF causes point mutations (base substitution or frame shift) the degree of the mutagenic effects was less than the detection limit of the bacterial mutation assay used in this study.

The International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP) has guidelines for limiting exposure to ELF magnetic fields (ICNIRP, 1998). It states that occupational exposure should be limited to fields that induce current densities less than 10 mA/m² in order to avoid excitatory stimulation of nerve or muscle in the range of 4 Hz to 1 kHz. Previous studies (Miyakoshi et al., 1996, Koana et al., 2001) have reported that 50 Hz MFs cause chromosomal deletion and somatic recombination and that the eddy currents were involved in mutagenesis. As the mutation frequency was observed to be proportional to the radius of culture plates used in the experiment (Miyakoshi et al., 1996, Koana et al., 2001), eddy current rather than MFs itself appears to be responsible for the increase in the mutation frequency. Therefore, eddy current induced in the bacterial plates in our experiments was calculated. The electric conductivity of the glucose minimal agar plates was measured using a conductivity meter (Model SC82, Yokogawa Electric Co., Tokyo, Japan) and was determined to be 0.78 S/m. Assuming that the eddy current induced in a plate perpendicular to a time-varying magnetic flux is proportional to the radius of the plate, the induced eddy current by exposure to a 40 mT, 50 Hz sinusoidal MF is estimated to be 440 mA/m² at the periphery of the plates and zero at the center. In our experiment, the revertant colonies appeared uniformly on the glucose minimal agar plates and the mutation frequency proportional to the radius of culture plates was not observed (data not shown). This suggests that the eddy currents up to 440 mA/m² did not cause any point mutation in bacterial cells. The exposure limitation recommended in the ICNIRP guideline (10 mA/m²) is much lower than this. It is inferred that the eddy current below the ICNIRP limitation should not cause point mutation. Possible risk for point mutation from exposure to ELF-MFs in living environment, which is several thousand times weaker than the MFs (up to 40 mT) used in this study, can be considered to be negligibly small.

From the view of physical energy coupling, the thermodynamic energy of the interaction between an electron spin and a 40 mT, 50 Hz sinusoidal MF is only $10^6 \sim 10^7$ kcal/mol which is much lower than that of X-rays, UV light and even of thermal noise. The bonding energy of weak chemical bonds in organisms such as van der Waals bonding (ca. 1 kcal/mol), hydrogen bonding (ca. 3-7 kcal/mol) and ion bonding (ca. 5 kcal/mol) are much higher. Therefore, it is expected that chemical bonds will

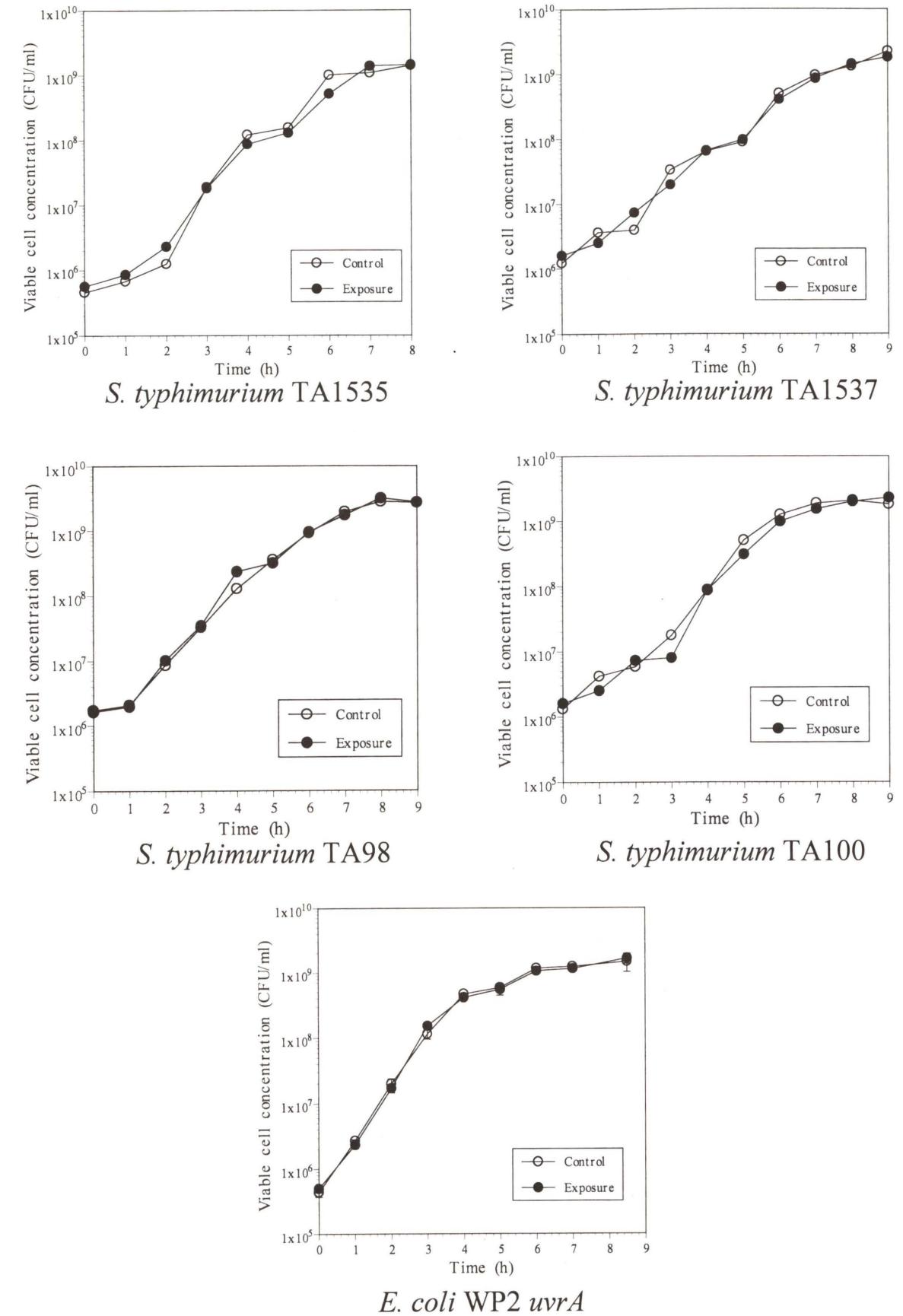
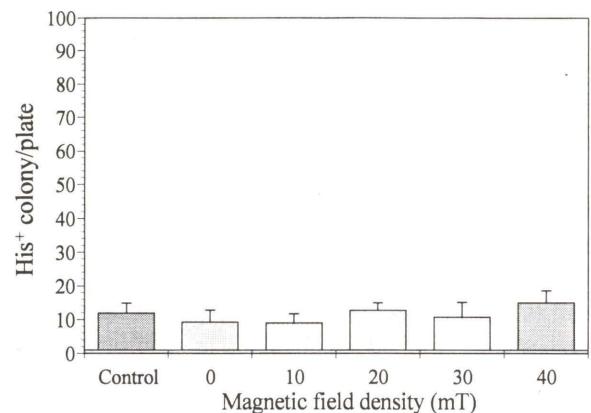
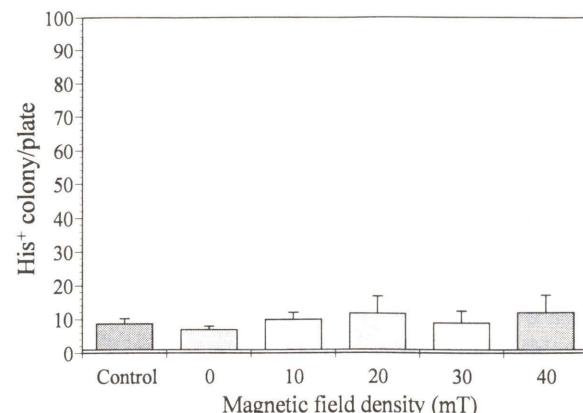


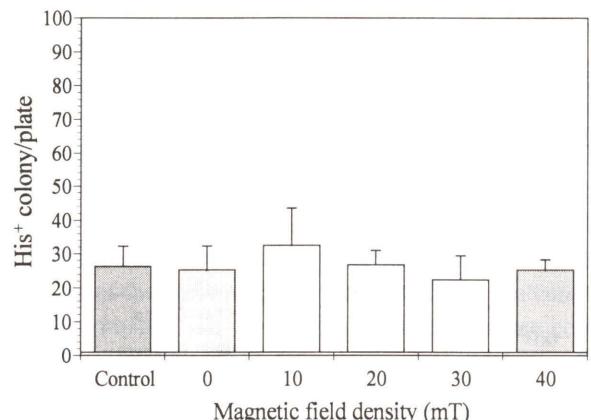
Fig. 2 Growth of tester strains (*S. typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100 and *E. coli* WP2 *uvrA*) in a 50 Hz, 40 mT magnetic field. Cell concentration was calculated using colony forming unit (CFU) on nutrient agar plate in each culture at each time point. Open circles indicate sham exposure group and closed circles indicate MF exposure group. Data are given as mean of at least three independent tests and standard deviation are within symbols.



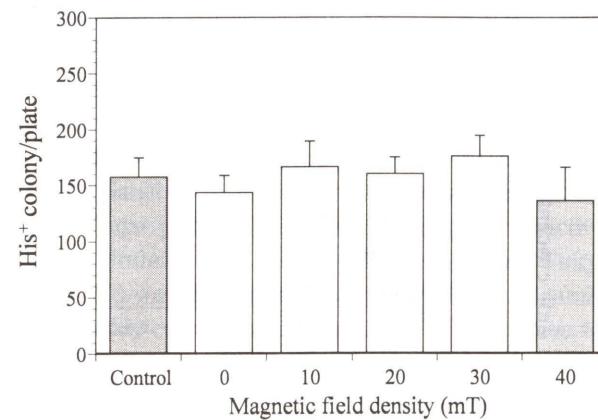
S. typhimurium TA1535



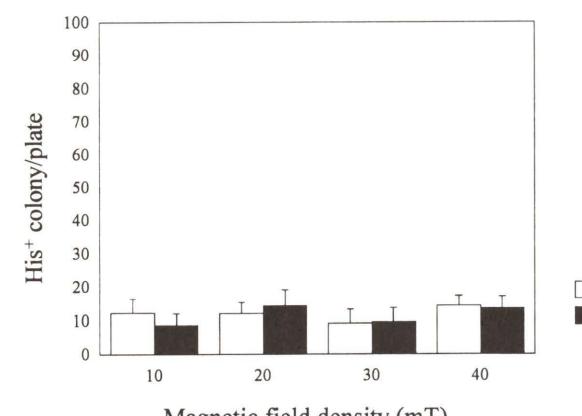
S. typhimurium TA1537



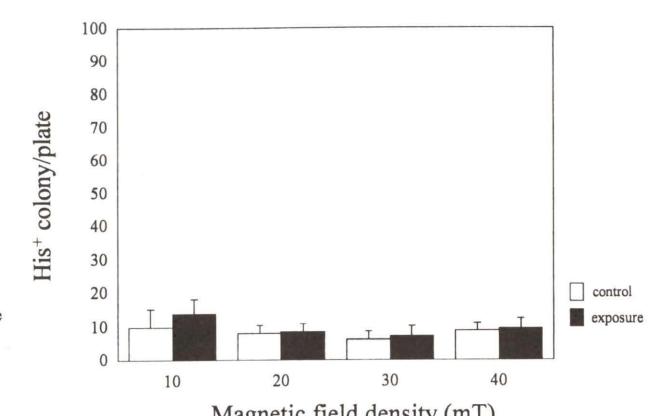
S. typhimurium TA98



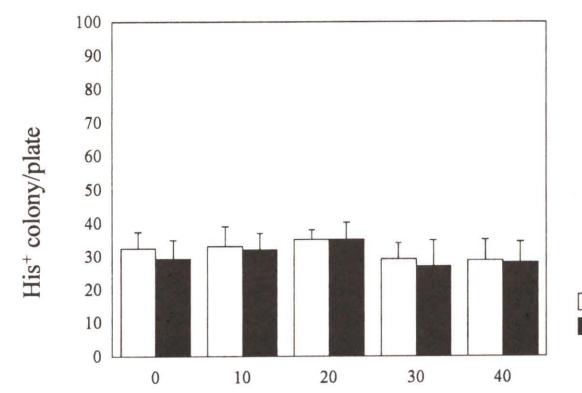
S. typhimurium TA100



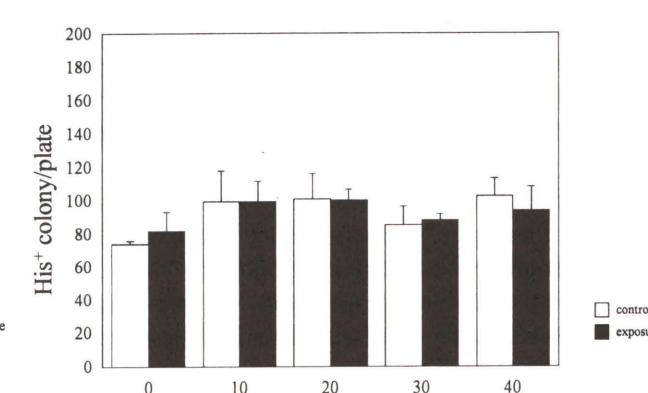
S. typhimurium TA1535



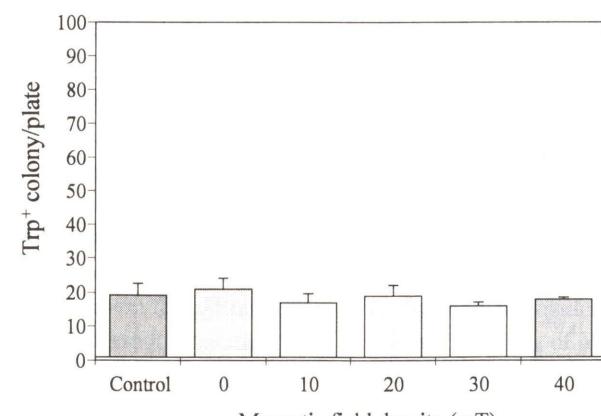
S. typhimurium TA1537



S. typhimurium TA98

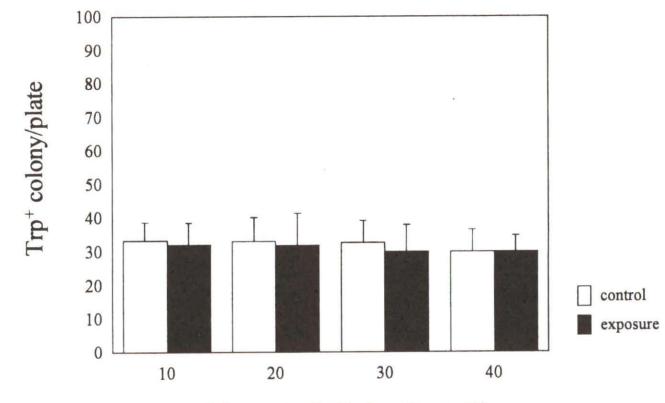


S. typhimurium TA100



E. coli WP2 uvrA

Fig. 3 Mutagenicity test of a 50 Hz magnetic field in preincubation method
Positive controls: TA1535: Sodium azide (0.5 µg per plate) 262 ± 2; TA1537 (80 µg per plate) 790 ± 23; TA98: AF-2 (0.1 µg per plate) 982 ± 118; TA100: AF-2 (0.01 µg per plate) 717 ± 98; WP2 *uvrA*: AF-2 (0.01 µg per plate) 68 ± 8.
Data are given as mean with standard deviation from at least three independent tests with triplicate plates.



E. coli WP2 *uvrA*

Fig. 4 Mutagenicity test of a 50 Hz, magnetic field in plate incorporation method
Positive controls: TA1535: Sodium azide (0.5 µg per plate) 276 ± 29; TA1537 (80 µg per plate) 1493 ± 208; TA98: AF-2 (0.1 µg per plate) 468 ± 70; TA100: AF-2 (0.01 µg per plate) 508 ± 70; WP2 *uvrA*: AF-2 (0.01 µg per plate) 106 ± 12.
Data are given as mean with standard deviation from at least three independent tests with at least triplicate plates.

not be affected by exposure to a 40 mT, 50 Hz sinusoidal MF. It seems reasonable that a 40 mT, 50 Hz MF did not cause point mutation in bacterial cells.

However, in *Drosophila*, exposure to a 20 mT, 50 Hz MF caused an increase of somatic recombination and terminal deletion while frequency of point mutation or chromosome non-disjunction were not affected (Koana, 2001). This result suggested that exposure to 50 Hz strong MFs may be associated with mutations at the chromosome level rather than at DNA level. In future studies, detection of large deletion, loss of heterozygosity or recombination in yeast, cultured cell line or other suitable systems should be performed to establish the mechanism of mutagenic effects by exposure to ELF-MFs.

On the other hand, the World Health Organization is conducting an International EMF Project to evaluate the health effects of EMFs ranging from static (0 Hz) to radio frequency (300 GHz) fields and also to determine the limiting MFs exposure. In the minutes of the project meetings, several research needs are pointed out; in vitro studies that are directly relevant to possible *in vivo* effects, studies that address the issues of ELF exposure thresholds, studies that examine reproducibility of the reported positive effects, and studies using compound exposure of static and time-varying fields are research themes with high priorities (<http://www.who.int/peh-emf/index.htm>). Thus, it is important to investigate the effect of MFs on different types on biological systems not only to understand the mechanism involved but also find a solution to public health issue.

Acknowledgments

We gratefully thank Dr. Gouri Mukerjee Dhar for her critical reading of the manuscript and correcting English. This work is supported in part by a Grant-in-aid from Research for the Future Program of Japan Society for the Promotion of Science and by a Grant-in-aid from Ministry of Land, Infrastructure and Transport.

References

- Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 31, 347-363.
- Cantoni, O., P. Sestili, M. Fiorani, M. Dacha (1995) The effect of 50-Hz sinusoidal electric and/or magnetic fields on the rate of repair of DNA single/double strand breaks in oxidatively injured cells, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 37, 681-689.
- Dees, C., S. Garrett, D. Henley, C. Travis (1996) Effects of 60-Hz fields, estradiol and xenoestrogens on human breast cancer cells, *Radiat. Res.*, 146, 444-452.
- Ikehata, M., T. Koana, Y. Suzuki, H. Shimizu and M. Nakagawa (1999) Mutagenicity and co-mutagenicity of static magnetic fields detected by bacterial mutation assay, *Mutat. Res.*, 427, 147-156.
- International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (1998) Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz), *Health Physics*, 74, 494-522.
- Juutilainen, J., A. Liimatainen (1986) Mutation frequency in *Salmonella* exposed to weak 100-Hz magnetic fields, *Hereditas*, 104, 145-147.
- Koana T., M.O. Okada, Y. Takashima, M. Ikehata and J. Miyakoshi (2001) Involvement of eddy currents in the mutagenicity of ELF magnetic fields, *Mutat. Res.*, 476, 55-62.
- Lai H. and N.P. Singh (1997a) Acute exposure to a 60 Hz magnetic field increases DNA single and double strand breaks in rat brain cells, *Bioelectromagnetics*, 18, 156-165.
- Lai H. and N.P. Singh (1997b) Melatonin and *N*-*tert*-butyl- α -phenylnitro block 60 Hz magnetic field-induced single and double strand breaks in rat brain cells, *J. Pineal. Res.*, 22, 152-162.
- McCann, J., F. Dietrich, C. Rafferty, A.O. Martin (1993) A critical review of the genotoxic potential of electric and magnetic fields, *Mutat. Res.*, 297, 61-95.
- McCann, J., F. Dietrich, C. Rafferty, A.O. Martin (1998) The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update, *Mutat. Res.*, 411, 45-86.
- Miyakoshi, J., N. Yamagishi, S. Ohtsu, K. Mohri, H. Takebe (1996) Increase in hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene mutations by exposure to high-density 50-Hz magnetic fields, *Mutat. Res.*, 349, 109-114.
- Miyakoshi, J., Y. Mori, N. Yamagishi, K. Yagi and H. Takebe (1998) Suppression of high-density magnetic field (400 mT at 50 Hz)-induced mutations by wild-type p53 expression in human osteosarcoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 243, 579-584.
- Moore, R.L. (1979) Biological effects of magnetic fields: studies with microorganisms, *Can. J. Microbiol.*, 25, 1145-1151.
- Morandi, M.A., C.M. Pak, R.P. Caren and L.D. Caren (1996) Lack of an EMF-induced genotoxic effect in the Ames assay, *Life Sci.*, 59, 263-271.
- Murphy, J.C., D.A. Kaden, J. Warren, A. Sivak (1993) Power frequency electric and magnetic fields: a review of genetic toxicology, *Mutat. Res.*, 296, 221-240.
- Nakasono, S., M. Ikehata, T. Koana and H. Saiki (2000) A 50 Hz, 14 mT magnetic field is not mutagenic or co-mutagenic in bacterial mutation assays, *Mutat. Res.*, 471, 127-134.
- Portier, C.J. and M.S. Wolfe (Eds) (1998) Assessment of health effects from exposure to power-line frequency electric and magnetic fields, NIEHS working group report, NIH Publication No. 98-3981.
- Wertheimer, N. and E. Leeper (1979) Electrical wiring configurations and childhood cancer, *Am. J. Epidemiol.*, 109, 273-284.
- Walczek, J., E.C. Shiu, G.M. Hahn (1999) Increase in radiation-induced HPRT gene mutation frequency after nonthermal exposure to nonionizing 60 Hz electromagnetic fields, *Radiat. Res.*, 151, 489-497.
- Yahagi, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura, M. Okada (1977) Mutagenicities of N-nitrosamine on *Salmonella*, *Mutat. Res.*, 48, 121-130.

Environ. Mutagen Res., 23: 223 - 228 (2001)

Comparison of mutation spectra induced by ethylating agents in DNA-alkyltransferase-deficient mutants of *E. coli*

Toshihiro Ohta*, Kouhei Hanao, Shin-ichi Tokishita and Hideo Yamagata

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

Summary

The mutational spectra of ethylating agents, *N*-ethyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG) and *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU), were investigated using *lacZ* reversion assay in *Escherichia coli* *ada* and *ogt* mutants. ENNG and ENU induced all types of base substitutions with G : C → A : T transitions most predominant, followed by A : T → G : C transitions. In an *ada* background, induction of G : C → A : T and A : T → G : C transitions were not enhanced, while 4 types of transversions (G : C → T : A, A : T → C : G, G : C → C : G, and A : T → T : A) were induced more strongly than in a wild-type background. In an *ogt* background, however, the opposite effects were observed, i.e. ENNG and ENU induced considerable increase of G : C → A : T and A : T → G : C transitions while no difference in transversions was observed between *ogt* mutant and its parent strain.

Keywords: mutation spectrum, ENNG, ENU, *ada*, *ogt*

Introduction

Among a variety of lesions formed by exposure to alkylating agents, O⁶-alkylguanine and O⁴-alkylthymine are potentially mutagenic lesions because they can mispair during DNA synthesis and give rise to G : C → A : T and A : T → G : C transitions, respectively (Preston et al., 1986; Richardson et al., 1987; Dosanjh et al., 1991). *E. coli* cells contain alkyltransferase activity, which catalyzes the removal of alkyl groups from O⁶-alkylguanine and O⁴-alkylthymine. Two kinds of alkyltransferase, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase I (Ada-alkyltransferase) and O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase II (Ogt-alkyltransferase) are identified in *E. coli*. The *ada*-encoded Ada-alkyltransferase removes methyl groups from O⁶-methylguanine and O⁴-methylthymine as well as from methylphosphotriesters (Schendel and Robins, 1978; McCarthy and Lindahl, 1985). On the other hand, the *ogt*-encoded Ogt-alkyltransferase repairs O⁶-methylguanine and O⁴-methylthymine but not methylphosphotriesters (Potter et al., 1987; Rebeck et al., 1988). It was reported that ethyl groups in the O⁶-position of guanine were removed by Ogt-alkyltransferase more rapidly than Ada-alkyltransferase, while removal rate of methyl groups was

approximately the same for Ada- and Ogt-alkyltransferase (Wilkinson et al., 1989). As regards mutagenesis by ethylating agents, Abril et al. (1992) reported that the defect in *ada* gene function had no effect on mutagenesis induced by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU). On the contrary, it was reported that *ogt* mutant showed increased mutability to ethylating agents such as ENU and ethylmethanesulphonate (Abril et al., 1994; Vidal et al., 1997). Compared to predominant G : C → A : T and A : T → G : C transitions induced by alkylating agents, the role of the Ada- and Ogt-alkyltransferases on the minor transversion mutagenesis is not well characterized, because the induction frequency of transversion by alkylating agents is very low (Vidal et al., 1997).

It is expected that the mutational spectra of chemical mutagens in bacterial cells with different genetic background for DNA repair would provide novel findings on mutagenesis and DNA repair. For the purpose of investigating such mutation spectra, we have been employing the *lacZ* reverse mutation analysis system with a set of six specific tester strains (Ohta et al., 1998, 1999, 2000, 2001). The mutational target is an F' plasmid-encoded mutant *lacZ461* allele (Cupples and Miller, 1989), and the test system can detect each of the six possible base-pair substitution mutations by measuring Lac⁺ revertant colonies. The Lac⁺ reversion system can detect minor transitions and transversions induced by mutagens even when their induction level is very low (Ohta et al., 1999, 2000). It is,

* ohta@ls.toyaku.ac.jp

Received: April 17, 2001, accepted: June 13, 2001

© Environmental Mutagen Society of Japan

Table 1 Detectable base substitution events in tester strains of *E. coli*

(1) WP5101P, WP5201P (Δ ada), WP5301P (Δ ogt)		
1) A : T \rightarrow C : G	2) aat Tag agt \rightarrow aat Gag agt	3) stop \rightarrow Glu
(2) WP5102P, WP5202P (Δ ada), WP5302P (Δ ogt)		
1) G : C \rightarrow A : T	2) aat gGg agt \rightarrow aat gAg agt	3) Gly \rightarrow Glu
(3) WP5103P, WP5203P (Δ ada), WP5303P (Δ ogt)		
1) G : C \rightarrow C : G	2) aat Cag agt \rightarrow aat Gag agt	3) Gln \rightarrow Glu
(4) WP5104P, WP5204P (Δ ada), WP5304P (Δ ogt)		
1) G : C \rightarrow T : A	2) aat gCg agt \rightarrow aat gAg agt	3) Ala \rightarrow Glu
(5) WP5105P, WP5205P (Δ ada), WP5305P (Δ ogt)		
1) A : T \rightarrow T : A	2) aat gTg agt \rightarrow aat gAg agt	3) Val \rightarrow Glu
(6) WP5106P, WP5206P (Δ ada), WP5306P (Δ ogt)		
1) A : T \rightarrow G : C	2) aat Aag agt \rightarrow aat Gag agt	3) Lys \rightarrow Glu

1) Detectable base substitution event in the tester strains

2) Base substitution occurred in reverse mutation at position 461 (Capital letter denotes target base)

3) Amino acid change at position 461 (Since substitution of the Glu-461 residue with any amino acid other than glutamic acid severely lowers β -galactosidase activity, Lac⁺ revertants arise only when a mutational event restores a glutamic acid codon)

therefore, preferable for the investigation of transversions induced by ethylating agents at low frequency. We report here the different mutational spectra of ethylating agents in alkyltransferase-deficient mutants.

Materials and Methods

Construction of tester strains

WP2012 [*uvrA155, trpE65, Δ(lac-pro), Δada::Cm^r*] and WP2013 [*uvrA155, trpE65, Δ(lac-pro), Δogt::Cm^r*] were constructed by introducing *Δada::Cm^r* from GW7101 and *Δogt::Cm^r* from KT211, respectively, into the strain WP2000 (Ohta et al., 1998) of *Escherichia coli* by P1 phage-mediated transduction. *E. coli* strains GW7101 and KT211 (Yamada et al., 1995) were provided by Dr. M. Yamada, National Institute of Health Science (Tokyo, Japan). The method of phage P1 transduction was described previously (Ohta et al., 1998). Tetracycline-resistance (Tc^r) gene from *E. coli* XL1-Blue [F' : *lacZ* *ΔM15, proAB^r, Tn10(tet^r)*] was introduced into the F' (*lacI⁻, lacZ461, proAB^r*) (Cupples and Miller, 1989) in strains AB101-AB106 (Ohta et al., 1998) by the P1 transduction. Each of the six F' (*lacI⁻, lacZ461, proAB^r, Tc^r*) plasmids possesses a unique *lacZ* mutation at the GAG codon corresponding to Glu-461 (Cupples and Miller, 1988), and Lac⁺ revertants arise only when a mutational event restores a glutamic acid codon. The F' (*lacI⁻, lacZ461, proAB^r, Tc^r*) and pKM101 (*mucAB, Ap^r*) plasmids were transferred to WP2000, WP2012, and WP2013 by means of conjugation method (Ohta et al. 1998). A set of strains, WP5101P-WP5106P, are F'- and pKM101-carrying derivatives of strain WP2000, and exhibit a Lac⁻, Trp⁻ phenotype. Strains WP5201P-WP5206P and WP5301P-WP5306P were *Δada* and *Δogt* derivatives of WP5101P-WP5106P, respectively. The reverse mutations required at the codon to restore the Lac⁺ phenotype to each strain and the corresponding base substitutions are presented in

Table 1.

Chemicals and media

N-Ethyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG; CAS No. 4245-77-6) was obtained from Aldrich Chemical Co. (WI, USA). *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea (ENU; CAS No. 759-73-9) was purchased from Iwai Kagaku Yakuhin Co. Tokyo. Mutagens were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, Wako Pure Chemical Ind., Tokyo). MGT medium (Ohta et al., 2000) consisted of Vogel-Bonner E medium supplemented with 0.5% glucose and 50 μ g/ml tryptophan. ML agar plates consisted of Vogel-Bonner E medium supplemented with 0.5% lactose and 1.5% agar. MG agar plates contained 0.5% glucose instead of lactose. NBT-top agar contained 0.5 mg/ml nutrient broth powder (Oxoid, No.2), 0.5 mg/ml tryptophan, 0.5% NaCl, and 0.6% agar. Ampicillin at a final concentration of 10 μ g/ml was added to MGT medium when the strains were cultured.

Lac⁺ reversion assay

In a preliminary assay by pulse-treatment with ENNG for 30 min, transversions were scarcely detected in WP5103P and WP5104P but were detected by a plate incorporation method. Therefore, all the assays were conducted with the plate incorporation method. The Lac⁺ reversion assay was performed as described previously (Ohta et al., 1999, 2000). Aliquots of 0.1 ml of bacterial overnight culture in MGT medium (adjusted OD₆₀₀=1.0 with phosphate buffer) and 0.1 ml of a mutagen solution were added to a test tube containing 0.5 ml of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). After preincubation at 37 °C for 20 min with gentle shaking, treated cells were overlaid onto ML agar plates with 2 ml molten NBT-top agar. The number of Lac⁺ revertants was counted following 48 h incubation at 37 °C. Assays were repeated at least twice with single or duplicate plates and data presented in

Table 2 Cell killing effect of ENNG and ENU on the alkyltransferase-deficient strains

Compound	Dose (μ g/plate)	Number of survivals / plate (% control)		
		WP5106P	WP5206P (<i>ada</i>)	WP5306P (<i>ogt</i>)
ENNG	0	192 (100)	199 (100)	138 (100)
	0.5	196 (102)	206 (104)	140 (101)
	1	189 (98)	204 (103)	131 (95)
	2	192 (100)	209 (105)	116 (84)
	5	169 (88)	157 (79)	107 (78)
	25	187 (98)	187 (106)	141 (97)
ENU	50	188 (98)	189 (107)	138 (95)
	100	196 (103)	182 (103)	135 (92)
	200	180 (94)	188 (106)	139 (95)

figures are the averages from 2-5 independent experiments.

Since it is difficult to measure the exact surviving fraction in the plate incorporation method, the cell killing effect of ENNG and ENU was assayed independently with a similar method to the Lac⁺ reversion assay. Aliquots of 0.5 ml of diluted cell suspension (300-400 cells/ml) of WP5106P, WP5206P (*ada*), or WP5306P (*ogt*) were mixed with 0.1 ml of ENNG or ENU solution. After preincubation at 37 °C for 20 min, cells were plated on minimal glucose agar plates by means of 2 ml NBT top agar. Survival colonies of WP5106P, WP5206P, and WP5306P were counted after 2 days incubation at 37 °C. Because strains WP5101P-WP5106P are isogenic except the mutation in *lacZ* gene on the F' plasmid and the *lacZ* mutations have no effect on cellular viability under the assay condition using minimal glucose plates, it is considered that cell killing effects are equal among these strains. Therefore, we used a set of WP5106P, WP5206P (*ada*), and WP5306P (*ogt*) as representative strains to measure the cell killing effect of ENNG and ENU.

Results

Under the conditions of plate incorporation assay with ENNG at a dose range of 0.5-5 μ g/plate and ENU at 25-200 μ g/plate, both the *ada* and *ogt* mutants showed almost the same sensitivity to cell killing effects as the wild-type strain (Table 2). Therefore, it is reasonable to compare the sensitivity to mutagenesis of alkyltransferase-deficient and -proficient strains by the number of Lac⁺ revertant colonies per plate without calculating the induced mutation frequency.

Fig. 1 shows the base-pair substitution mutations induced by ENU. The compounds induced all types of base substitutions with G : C \rightarrow A : T transitions most predominant, followed by A : T \rightarrow G : C transitions. WP5102P, which detects G : C \rightarrow A : T transitions, was highly susceptible to ENU at lower doses (5-20 μ g/plate) than the other five tester strains (50-200 μ g/plate). ENU-induced G : C \rightarrow C : G transversions were the most infrequent base substi-

tutions, but the dose-dependent increase was detected in WP5103P. A weak induction of G : C \rightarrow T : A, A : T \rightarrow C : G, and A : T \rightarrow T : A transversions was observed in WP5104P, WP5101P, and WP5105P, respectively. In an *ada* background (WP5201P-WP5206P), four types of transversions, namely G : C \rightarrow T : A, A : T \rightarrow C : G, G : C \rightarrow C : G, and A : T \rightarrow T : A were induced more strongly than in an *ada*⁺ background (WP5101P-WP5106P). Induction of A : T \rightarrow G : C transitions by ENU in WP5206P (*ada*) appeared to be greater than in WP5106P. However, induction of G : C \rightarrow A : T transitions in WP5202P (*ada*) and of A : T \rightarrow G : C transitions in WP5206P (*ada*) was not different to the induction in their parent strains WP5102P (*ada*⁺) and WP5106P (*ada*⁺), respectively.

On the other hand, the opposite effects were observed in an *ogt* background (WP5301P-WP5306P). The defect in the *ogt* gene function did not increase the number of Lac⁺ revertants induced by ENU in strains WP5304P (G : C \rightarrow T : A), WP5301P (A : T \rightarrow C : G), WP5303P (G : C \rightarrow C : G), and WP5305P (A : T \rightarrow T : A) as shown in Fig 1. On the contrary, G : C \rightarrow A : T and A : T \rightarrow G : C transitions detectable in WP5302P and WP5306P, respectively, were enhanced considerably. Quite similar results were obtained with ENNG (Fig. 2). Enhanced mutability in *ada* strains was evident with four types of transversions, while that in *ogt* strains was evident with two types of transitions.

Discussion

Differences between the Ada- and Ogt-alkyltransferases in substrate specificity in vitro have been reported by Wilkinson et al. (1989). Ada-alkyltransferase of *E. coli* does not efficiently remove ethyl groups from the DNA lesion. Ogt-alkyltransferase was 173 times more efficient than Ada-alkyltransferase in removing O⁶-ethylguanine in DNA. Yamada et al. (1993) showed that an *ada* mutant exhibited almost the same levels of sensitivities to the cell-killing effect of ethylating agents as did the parent strain. Our present results also showed similar sensitivity to cell killing effects of ENNG and ENU among the *ada*, *ogt*, and

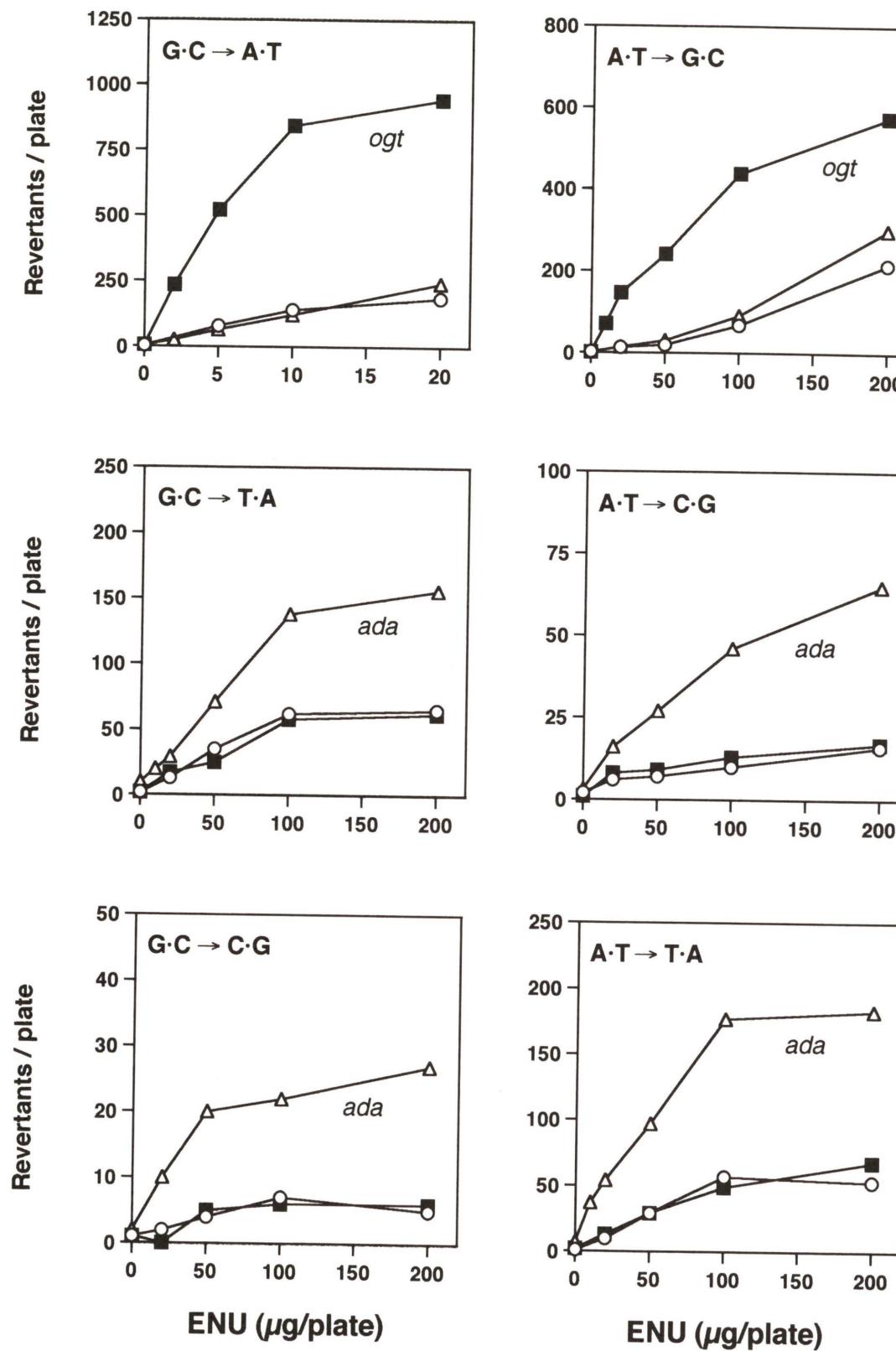


Fig. 1 Base substitutions induced by ENU
(circle), WP5101P-WP5106P (ada^+ , ogt^+); (triangle), WP5201P-WP5206P (Δada); (square), WP5301P-WP5306P (Δogt)

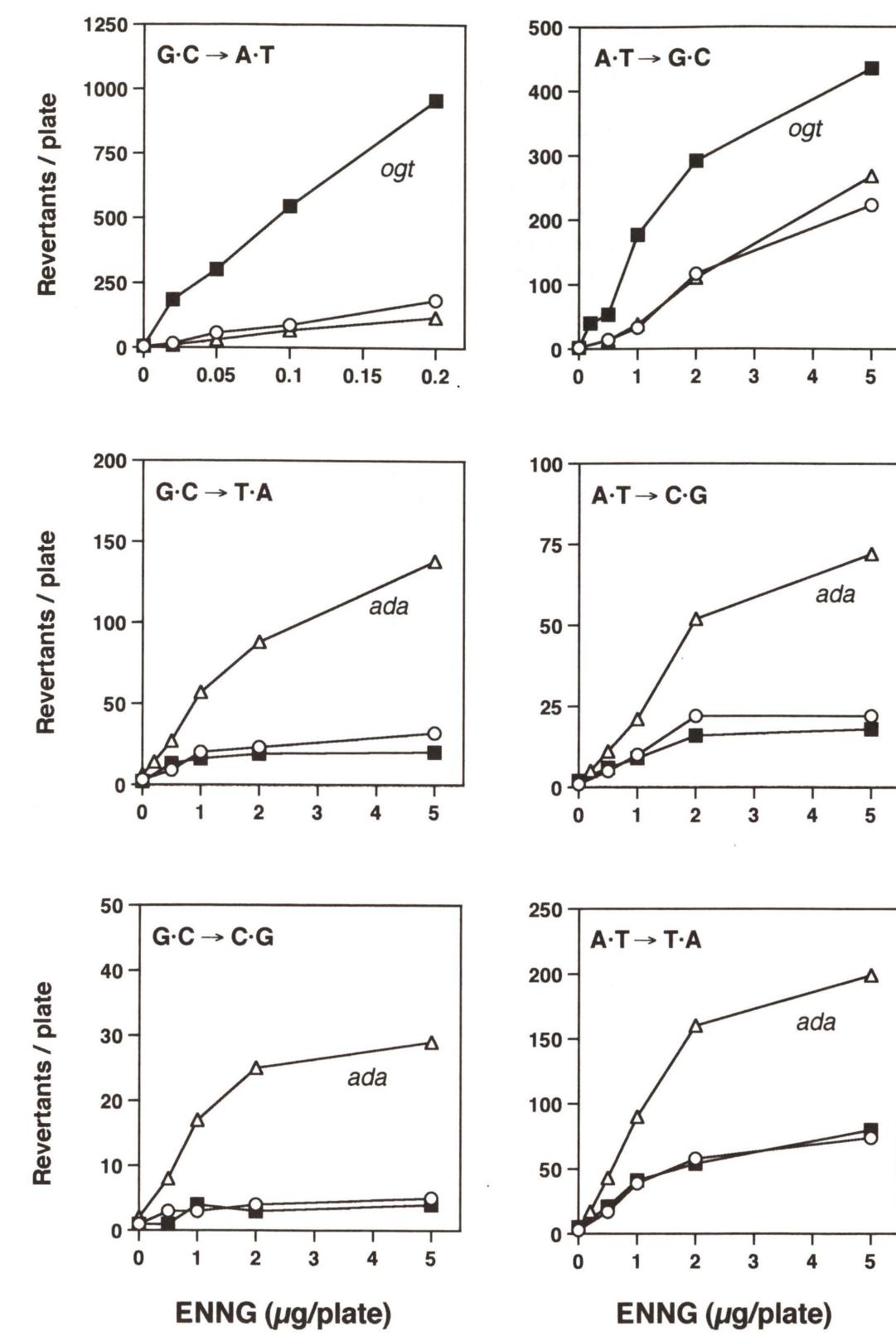


Fig. 2 Base substitutions induced by ENNG
(circle), WP5101P-WP5106P (ada^+ , ogt^+); (triangle), WP5201P-WP5206P (Δada); (square), WP5301P-WP5306P (Δogt)

wild-type cells (Table 2). On the contrary, it was reported that an *ogt* mutant of *E. coli* showed greater sensitivity to mutagenesis by ethylating agents such as ENU than that by methylating agents, and defect of an *ada* gene showed no effect on ENU-induced mutagenesis (Abril et al., 1992, 1994). These findings were consistent with our present result indicating increased induction of G : C→A : T and A : T→G : C transitions in an *ogt* background. The absence of mutation enhancement of the transitions in a *ada* mutant may be due to the high activity of intact Ogt-alkyltransferase.

Vidal et al. (1997) investigated the mutation spectrum in *lacI^q* mutations induced by ENU in an *ogt* and a wild-type strain. Results of DNA sequence analysis on 84-91 *lacI^q* mutants revealed that the majority of mutations (92% in the *ogt* strain and 84% in the wild-type strain) were G : C→A : T transitions. No significant ENU-induced transversions of G : C→T : A and G : C→C : G were detected in their system. Due to the marked preferential induction of G : C→A : T transitions by ethylating agents, it has been unclear whether the *ada* and *ogt* genes played a role in ENU-induced transversions. However, using the present Lac⁺ reversion system which can detect low levels of transitions and transversions induced by ethylating agents, we found that Ada-alkyltransferase but not Ogt-alkyltransferase is responsible for the induction of transversions induced by ethylating agents. The mechanism of *ada*-dependent transversions induced by ethylating agents is unclear. Ethylphosphotriesters or some ethylating bases other than O⁶-ethylguanine and O⁴-ethylthymine that are removed by Ada-alkyltransferase but not by Ogt-alkyltransferase might be responsible for the weak induction of the transversions.

In our present study, the defect of *ada* gene function resulted in increased transversions induced by ethylating agents such as ENU and ENNG, while the defect of *ogt* gene function increased only transitions induced by the ethylating agents. Investigation with *ada*, *ogt* double mutants may be important to clarify a possible contribution of Ada-alkyltransferase in transversions induced by ethylating agents.

Acknowledgments

We thank Kimiko Ando and Yukari Kanemichi for their technical assistance and Dr. Jim Fitzgerald for his critical reading of the manuscript. We also thank Dr. Masami Yamada for providing bacterial strains.

References

- Abril, N., T. Roldan-Arjona, M.J. Prieto-Alamo, A. van Zeeland and C. Pueyo (1992) Mutagenesis and DNA repair for alkylation damages in *Escherichia coli* K-12, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, 288-296.
- Abril, N., C. Hera, E. Alejandre, J.A. Rafferty, G.P. Margison and C. Pueyo (1994) Effect of *ogt* expression on mutation induction by methyl-, ethyl-, and propylmethanesulphonate in *Escherichia coli* K-12 strains, *Mol. Gen. Genet.*, 242, 744-748.
- Cupples, C.G. and J.H. Miller (1988) Effect of amino acid substitutions at the active site in *Escherichia coli* β -galactosidase, *Genetics*, 120, 637-644.
- Cupples, C.G. and J.H. Miller (1989) A set of *lacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5345-5349.
- Dosanjh, M.K., B. Singer and J.M. Essigmann (1991) Comparative mutagenesis of O⁶-methylguanine and O⁴-methylthymine in *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 30, 7027-7033.
- McCarthy, T.V. and T. Lindahl (1985) Methyl phosphotriesters in alkylated DNA are repaired by the Ada regulatory protein of *E. coli*, *Nucleic Acid Res.*, 13, 2683-2698.
- Ohta, T., M. Watanabe-Akanuma, S. Tokishita, Y. Shiga and H. Yamagata (1998) Development of new tester strains derived from *E. coli* WP2 *uvrA* for the determination of mutational specificity, *Mutat. Res.*, 413, 219-225.
- Ohta, T., M. Watanabe-Akanuma, S. Tokishita and H. Yamagata (1999) Mutation spectra of chemical mutagens determined by Lac⁺ reversion assay with *Escherichia coli* WP3101P-WP3106P tester strains, *Mutat. Res.*, 440, 59-74.
- Ohta, T., M. Watanabe-Akanuma and H. Yamagata (2000) A comparison of mutation spectra detected by the *E. coli* Lac⁺ reversion assay and the *S. typhimurium* His⁺ reversion assay, *Mutagenesis*, 15, 317-323.
- Ohta, T., S. Ohmae, K. Yamaya, Y. Kanemichi, S. Tokishita and H. Yamagata (2001) Characterization of the mutational specificity of DNA cross-linking mutagens by the Lac⁺ reversion assay with *Escherichia coli*, *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.*, 21, 275-282.
- Potter, P.M., M.C. Wilkinson, J. Fitton, F.J. Carr, J. Brennand, D.P. Cooper and G.P. Margison (1987) Characterization and nucleotide sequence of *ogt*, the O⁶-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 O⁴-methylthymine in vivo determined by an enzymatic approach to site specific mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8501-8505.
- Rebeck, G.W., S. Coons, P. Carroll and L. Samson (1988) A second DNA methyltransferase repair enzyme in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3039-3043.
- Richardson, K.K., F.C. Richardson, R.M. Crosby, J.A. Swenberg and T.R. Skopek (1987) DNA base changes and alkylation following in vivo exposure of *Escherichia coli* to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 344-348.
- Schendel, P.F. and P.E. Robins (1978) Repair of O⁶-methylguanine in adapted *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 6017-6020.
- Vidal, A., N. Abril and C. Pueyo (1997) The influence of DNA repair by Ogt alkyltransferase on the distribution of alkylnitrosourea-induced mutations in *Escherichia coli*, *Environ. Mol. Mutagen.*, 29, 180-188.
- Wilkinson, M.C., P.M. Potter, L. Cawkwell, P. Georgiadis, D. Patel, P.F. Swann and G.P. Margison (1989) Purification of the *E. coli* *ogt* gene product to homogeneity and its rate of action on O⁶-methylguanine, O⁶-ethylguanine and O⁴-methylthymine in dodecadoxyribonucleotides, *Nucleic Acid Res.*, 17, 8475-8484.
- Yamada, M., A. Hakura, T. Sofuni and T. Nohmi (1993) New method for gene disruption in *Salmonella typhimurium*: construction and characterization of an *ada*-deletion derivative of *Salmonella typhimurium* TA1535, *J. Bacteriol.*, 175, 5539-5547.
- Yamada, M., B. Sedgwick, T. Sofuni and T. Nohmi (1995) Construction and characterization of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in DNA repair of O⁶-methylguanine, *J. Bacteriol.*, 177, 1511-1519.

Author Index (Vol. 23)

A	Kasper, P.	23; 89, 97	Sasaki, Y.F.	23; 39
	Kawanishi, S.	23; 207	Sato, M.	23; 1
	Akada, Y.	23; 1	Kersten, B.	23; 89, 97
	Ariyoshi, N.	23; 33	Kikugawa, K.	23; 137
	Asanoma, M.	23; 103	Koana, T.	23; 215
B	Brendler-Schwaab, S.Y.	23; 97	Kuraoka, I.	23; 159
			Kushida, H.	23; 33
			Kuwahara, T.	23; 1
C			M	
	Chételat, A.A.	23; 47	Müller, L.	23; 89, 97
F			Miyabe, M.	23; 103
			Miyakoshi, J.	23; 215
	Fujita, K.	23; 33	Miyamoto, M.	23; 33
	Furuichi, M.	23; 183	Miyata, N.	23; 65
G	Gocke, E.	23; 47	Morita, T.	23; 119
			Murata, M.	23; 207
H			N	
	Hanao, K.	23; 223	Nakabeppu, Y.	23; 183
	Higashimoto, M.	23; 1	Nakagawa, Y.	23; 107
	Hiraku, Y.	23; 207	Nakanishi, I.	23; 65
	Hirano, S.	23; 183	Nunoshiba, T.	23; 23, 147
	Honma, M.	23; 15	O	
I			Ohnishi, Y.	23; 1
	Ide, H.	23; 167	Ohta, T.	23; 223
	Ide, Y.	23; 183	Oikawa, S.	23; 207
	Ikehata, M.	23; 215	Okamoto, Y.	23; 73
K			S	
	Kamataki, T.	23; 33	Sakai, Y.	23; 183
			Sakumi, K.	23; 183
			Z	
			Zhang, J.	23; 89

Keyword Index (Vol. 23)

A	5-aminolevulinic acid	23; 97	F	fluoroquinolone	23; 83	N	mutagenesis research	23; 9	Q	plasmid-relaxation assay	23; 107
	active oxygen species	23; 65		free radical disease	23; 137		mutagenicity	23; 103		psoralen	23; 89
	acute photocytotoxicity	23; 53		Fur	23; 161		mutation	23; 183			
	<i>ada</i>	23; 223					mutation spectrum	23; 147, 223			
	aging	23; 207								questionnaires	23; 119
	allelic loss	23; 177		genomic instability	23; 15						
	Ames test	23; 215		genotoxicity test battery	23; 47		<i>N</i> -nitrosamine	23; 33			
	antimutagenicity	23; 1					neurodegeneration	23; 159			
	apoptosis	23; 89					nitrosation	23; 1			
							NTH1	23; 167			
B			G				nucleotide excision repair	23; 159			
	blood cell aging	23; 137		genomic instability	23; 15						
				genotoxicity test battery	23; 47						
C			H			O		S			
	carcinogenesis	23; 177, 207		Harber-Weiss/Fenton reaction	23; 147		OGG1	23; 167			
	cell death	23; 183		herb	23; 1		<i>ogt</i>	23; 223			
	chemical phototoxicity	23; 53		hypoxanthine	23; 197		oxidative base damage	23; 167			
	cyclopurine deoxynucleosides	23; 159					oxidative damage	23; 183			
	cytochrome P450	23; 33					oxidative stress	23; 177			
							oxidative stress-induced damage	23; 137			
							oxidized protein hydrolase	23; 137			
							OxyR	23; 23			
D			I			P		T			
	deamination	23; 197		in vitro chromosomal aberration test	23; 9		p16 tumor suppressor gene	23; 177			
	disulfide bond	23; 23		in vitro micronucleus test	23; 9		p53	23; 15			
	DMBA	23; 103		in vitro photohaemolysis	23; 73		paired base effects	23; 167			
	DNA damage	23; 65, 207		in vitro test	23; 53		perspective	23; 39			
	DNA repair	23; 183		iron	23; 177		photo-micronucleus test	23; 97			
	double-strand break (DSB)	23; 15		iron overload	23; 147		photoactivation	23; 47, 103			
				iron-sulfur cluster	23; 23		photochemical genotoxicity	23; 107			
							photogenotoxicity	23; 83, 89, 97, 103, 119			
							photosensitizer	23; 65, 97			
E			J				phototoxic potential	23; 53			
	electron transfer	23; 65		JPMA	23; 119		phototoxicity	23; 47, 89, 97, 107			
	energy transfer	23; 65									
	ENNG	23; 223									
	ENU	23; 223									
	environmental chemicals	23; 207									
	environmental mutagen research	23; 39									
	ethanol	23; 1									
	extremely low frequency	23; 215									
F			M			Q		R			
G			N								
H			O			Q		R			
I			P			Q		R			
J			Q			R		S			

入会手続きのご案内

入会申込書に必要事項をご記入の上、年会費とともに現金書留にて事務局宛てお送りください。

年会費 7,000円(正会員)

5,000円(学生会員)

事業年度（1月1日～12月31日）

(お申し込みについて)

1. 入会申込書に必要事項を楷書でご記入の上、年会費とともに現金書留にて事務局までお送りください。
 2. 正会員は評議員の推薦を必要とします。推薦者がおられない場合は、事務局にご相談ください。
 3. 学生会員は指導教官の推薦と在学証明書を必要とします。翌年の3月31日まで会員として登録されます。
 4. 年度末に入会申し込みをされる場合で、翌年度から入会希望の場合は、その旨お知らせください。
 5. 学会誌は入会後に発行した号からお送りしますが、当該年度で入会前の学会誌をご希望の場合は事務局までご連絡ください。
 6. 住所変更（学会誌送付先の変更）の際は、会員番号（学会誌等送付する際、宛名ラベルに印刷されています）、氏名、新・旧住所をご記入の上、事務局宛、書面にてご連絡ください。

日本環境変異原学会
〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9
駒込TSビル3F 財団法人 口腔保健協会内
電話 03-3947-8891(代) FAX 03-3947-8341

日本環境変異原学会入会申込書

年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしたく評議員の署名を添えて申し込みます。

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

の本学会への学生会員としての入会を推薦致します。

指導教官

(署名)

印

日付

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
財団法人日本環境変異原学会事務局
TEL 03-3947-8891 FAX 03-3947-8341

環境変異原研究 投稿規定

1. 掲載論文

環境変異原研究に関する未発表の「総説」、「一般論文」、「短報」、および「特別企画（受賞講演）」、「論説」、「資料・情報」などを掲載する。なお、投稿論文の採否は編集委員会の審査により決定する。

「総説」は、一つのテーマに関連する多くの研究論文の総括、評価、解説などである。原則として編集委員会より寄稿を依頼する。

「一般論文」は、変異原に関する独創的研究の原著論文で、それ自身独立して価値ある結論あるいは事実を含むものとする。陰性データも受け付ける。

「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。陰性データも受け付ける。

「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 も受け付ける。)

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があることがある。ただし、著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込書に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になります。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る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

投稿論文チェックリスト

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つてする。
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. MaCann 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)

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

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 Soc.(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カ国

新製品
近日発売予定

【エームス試験用】陽性対照コントロール

研究者の方に代わって
エームス試験用陽性対照コントロールを調製

- ◆ 安衛法のガイドラインに従って調製した陽性対照コントロールです。
- ◆ 調製済み陽性対照を各々0.5mlずつ2mlセラムチューブに分注して-80°C以下でお届けします。
- ◆ 最終希釀の手間はいりません。溶解して直ちにご使用いただけます。(復帰試験データ付き)
- ◆ マルチセット: 4種類 計8濃度 10本入(下記参照)

マルチセット内容

陽性対照物質: 2AA	濃度: 5, 10, 20(*), 100μg/ml	溶媒: DMSO
AF-2	0.1(*), 1.0μg/ml	DMSO
NaN ₃	5.0μg/ml	注射用水
9AA	800μg/ml	DMSO

(*)は各々2本、他は各1本

- 予定販売価格: 1セット10本入 ￥15,000
- 保証期限: -80°C以下の保存で1年間

新製品
近日発売予定【エームス試験用】スモール培地
【テスマディア AN】研究者の皆様のご要望にお応えして
小さいシャーレ(径6cm)のエームス培地を作りました

- ◆ 本培地は安衛法のガイドラインに従って調製した最少グルコース寒天培地です。
- ◆ 一般的な径9cmのシャーレに比べて面積が約半分になりました。貴重なサンプルの使用量が大幅に削減できます。

組成: A. 硫酸マグネシウム七水和物	0.2g	B. ぶどう糖	20g
クエン酸一水和物	2g	蒸留水	100ml
りん酸二カリウム、無水	10g		
りん酸アンモニウム	1.92g	C. 寒天	15g
水酸化ナトリウム	0.66g	蒸留水	700ml
蒸留水	200ml		

A、B、Cそれぞれを高压蒸気滅菌し、60°Cに冷却して混合。これを放射線滅菌したシャーレに12ml分注し凝固させます。

- 予定販売価格: ￥10,000/10枚
- 保証期限: 室温(15°C~25°C)暗所保存で6ヶ月間安定です。
- 標準サイズ(径9cm)シャーレ「テスマディアAN 培地」も販売しておりますのでご照会下さい。

お問い合わせ・カタログ請求は

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
e-mail: fbi@oyc.co.jp

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
TEL: 06-6203-3741(代表)
東京支店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号
TEL: 03-3270-8571(代表)

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となっておりますので、-80°Cで保存して下さい。まれに解凍後分離することがありますか活性には異常ありませんので、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 テ ー タ
S-9 (9,000×g分画)	タンパク質含量 チトフローム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。
- ② S-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。
- ④ S-9が1mlとコファクターミックスが9ml入っており、20プレート分の試験が可能です。

● 包装単位: 10ml × 8本、5ml × 4本

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

-S-9 Mix

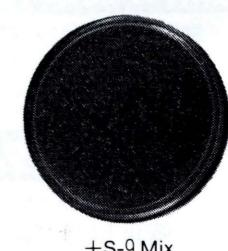
染色体異常試験用凍結S-9MIX

特長

- ① 染色体異常試験がより簡単になりました。
- ② S-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。
- ④ S-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

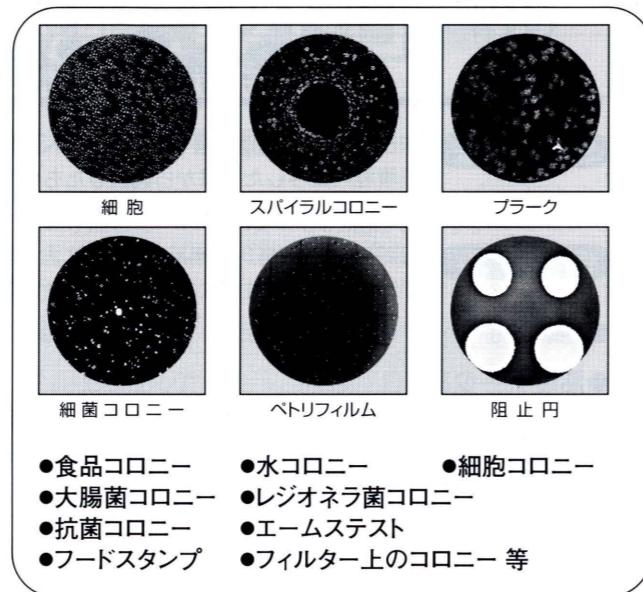
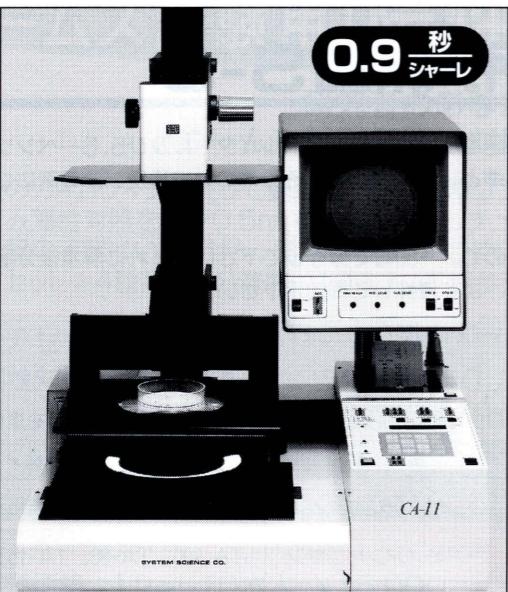
カタログNo.	品 名	包 装	価 格
S-9	変異原性試験用凍結S-9	1.5ml × 12本	¥36,000
S-9 MIX	エームス試験用凍結S-9 MIX	10ml × 8本	¥43,200
S-9 MIXTS	染色体異常試験用凍結S-9 MIX	3.5ml × 3本	¥12,000



+S-9 Mix

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



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

- 混雑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

コンパクト一体型で低価格

僅か60cm巾のワゴンにあります。
(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)を押すだけでどこにでも使えます。

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。

※ 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

SSC システムサイエンス株式会社

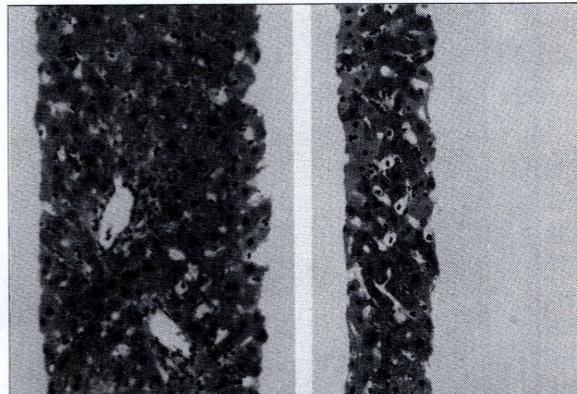
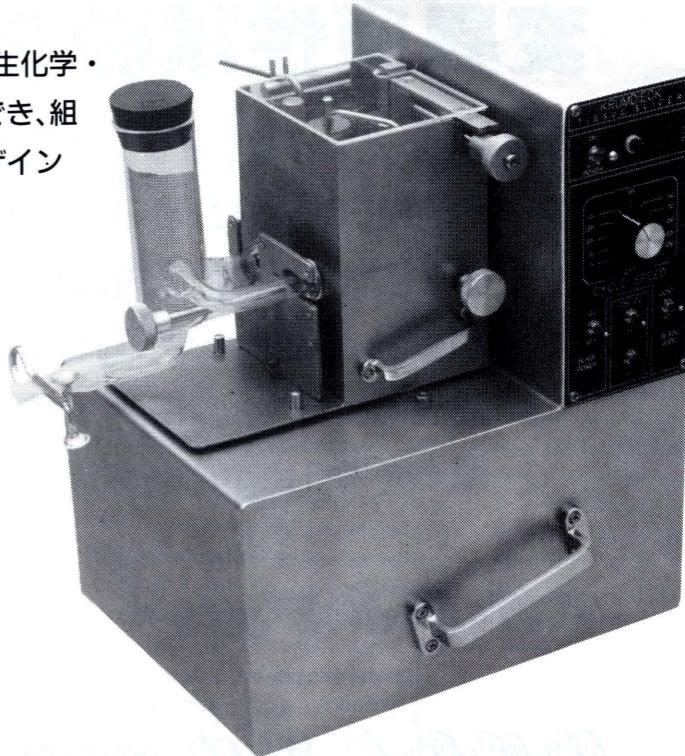
本社・工場／〒197-0011 東京都福生市福生1253-16
TEL 042(552)5956(代表)
URL: <http://www.ssc-bios.co.jp> E-mail: info@ssc-bios.co.jp

THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

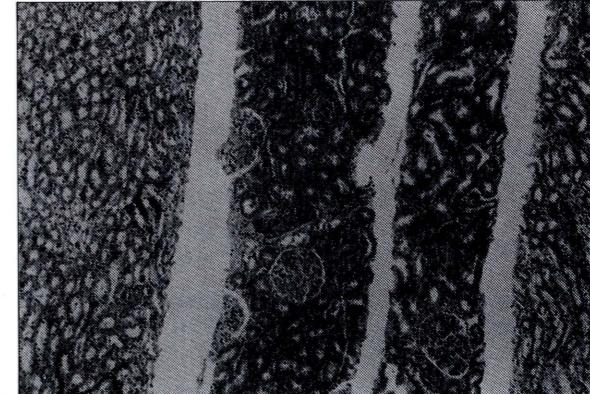
生きた組織の無菌スライスができます。

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

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



ラットの肝臓(倍率430×)



ラットの腎臓(倍率100×)

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



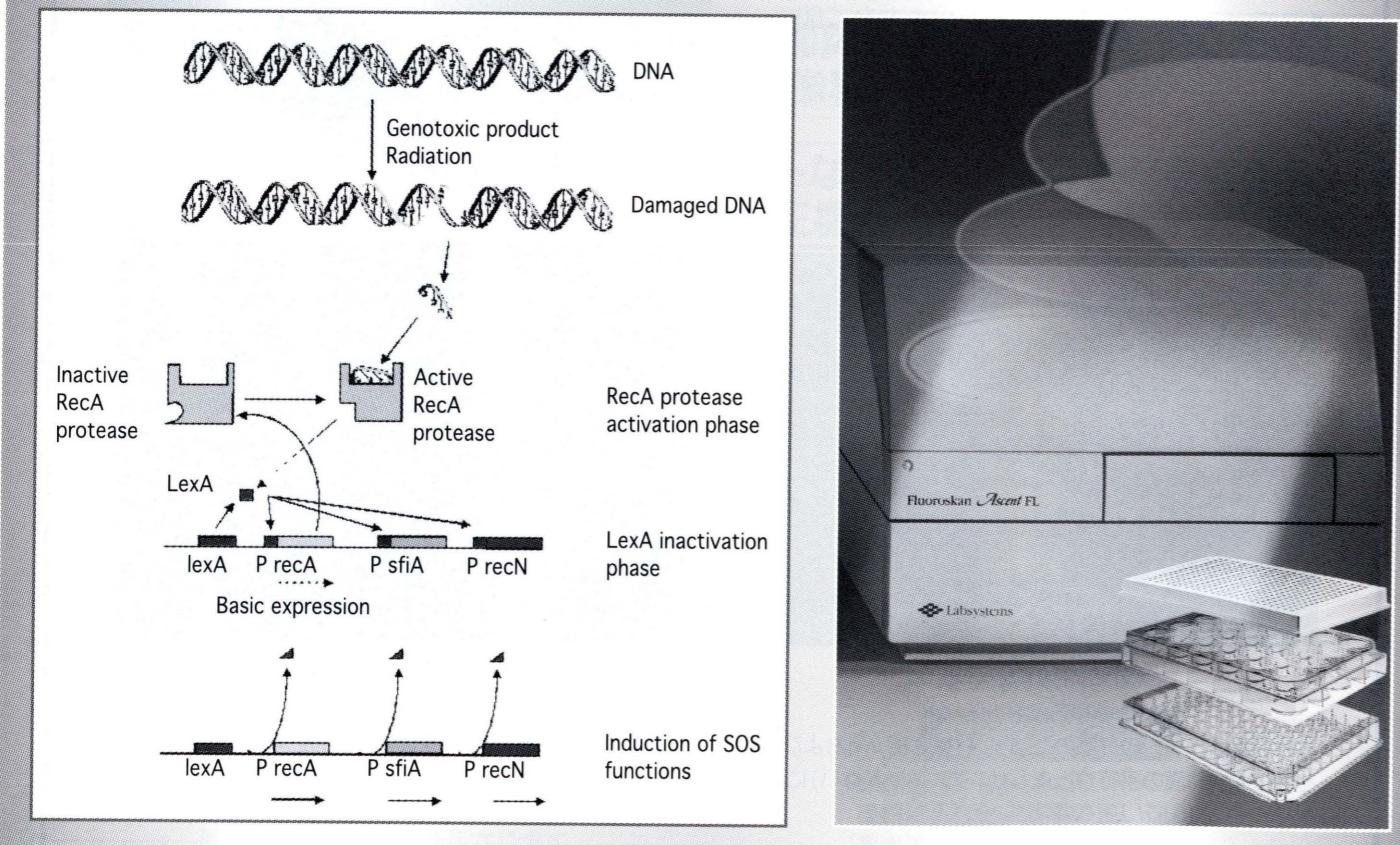
販売元
ショーシンEM株式会社

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

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动
- わずか1mgの検体量



P 大日本製薬株式会社
ラボラトリー プロダクト部

〒564-0053 大阪府吹田市江の木町33番94号
TEL(06) 6386-2164(代表) FAX(06) 6337-1606
〒110-0001 東京都台東区谷中3丁目25番6号
TEL(03) 5685-7205(代表) FAX(03) 3828-6547
ホームページアドレス <http://www.dainippon-pharm.co.jp/labopro/>
学術的問い合わせ
TEL(06) 6386-2184 FAX(06) 6337-1606

編集後記

環境変異原学会にとって21世紀の幕開けを飾る8th ICEMが終了しました。皆様、これからの研究への思いを新たにされていることと思います。本号は、原著論文および5月に開催されました公開シンポジウムの特集号です。シンポジウムのオーガナイザーでありました布柴達男先生の多大なご尽力により、すべての先生方に執筆していただくことができました。活性酸素の影響について多方面からのアプローチが最新の知見と共に紹介されています。執筆いただいた先生方、布柴先生に謝意を表します。

本学会の発展には本雑誌の充実が欠かせません。皆様のご投稿ならびに雑誌に対するご意見をお待ちしています。

担当編集委員 赤沼 三恵

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

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 (ext 2266)
Fax: 03-5472-7526
E-mail: suzuki@jikei.ac.jp

森田 健 (1998-)
〒151-8566 東京都渋谷区千駄ヶ谷4-6-15 GSKビル
グラクソ・スミスクライン株式会社
Tel: 03-5786-5067 Fax: 03-5786-5223
E-mail: takeshi.5.morita@gsk.com

矢嶋 信浩 (1999-)
〒485-0059 愛知県小牧市小木東3-45
雪印ラビオ株式会社・開発研究所
Tel: 0568-77-3235 Fax: 0568-76-1046
E-mail: n-yajima@snowlabio.com

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

若田 明裕 (2001-)
〒174-8511 東京都板橋区小豆沢1-1-8
山之内製薬株式会社・安全性研究所
Tel: 03-5916-2177 Fax: 03-3960-5141
E-mail: wakata@yamanouchi.co.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	鎌瀧 哲也	川西 正祐	菊池 康基
木苗 直秀	後藤 純雄	佐々木 有	瀧谷 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23巻 第3号 2001年

平成13年12月15日 印刷
平成13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

第12回公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」

酸素ストレスの分子病態学	菊川清見	137
活性酸素による突然変異誘発機構－大腸菌の鉄の取り込み調節機構とその活性酸素防御としての役割－	布柴達男	147
ヒトヌクレオチド除去修復機構によって修復されるDNA酸化損傷とその生物学的意義	倉岡 功	159
哺乳類の酸化損傷塩基修復酵素NTH1とOGG1の基質特異性と作用機序	井出 博	167
酸化ストレス発がんの分子機構とその標的遺伝子	豊國伸哉	177
Mechanisms protecting genomic integrity from damage caused by reactive oxygen species :		
Implications for carcinogenesis and neurodegeneration		
.....Nakabeppu Y, Tominaga Y, Tsuchimoto D, Ide Y, Hirano S, Sakai Y, Sakumi K and Furuichi M	183	
ミトコンドリア遺伝子変異の蓄積と老化	田中雅嗣	197
環境因子による酸化的DNA損傷とがん, 老化	及川伸二, 村田真理子, 平工雄介, 川西正祐	207

一般論文

Exposure to a power frequency magnetic field (50 Hz, 40 mT) did not cause point mutation in bacteria		
.....Ikehata M, Takashima Y, Suzuki Y, Shimizu H, Miyakoshi J and Koana T	215	
Comparison of mutation spectra induced by ethylating agents in DNA-alkyltransferase-deficient		
mutants of <i>E. coli</i>	Ohta T, Hanao K, Tokishita S and Yamagata H	223
Author Index		229
Keyword Index		230

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

投稿規定
執筆規定