

環境変異原研究

Environmental
Mutagen
Research
Communications

賀田恒夫博士 追悼号

Vol.8 No.2 1986

環境変異原研究

第8巻第2号 1986年

目 次

序	松島泰次郎.....	1
賀田恒夫博士に捧ぐ	黒田 行昭.....	3
「講演・討論の会」の案内	5
環境変異原: DNA医学と毒性評価	7
変異原性ヌクレオシド, N ⁴ -アミノシチジンの作用機構	早津 彦哉.....	9
SOS 変異原性の機構	加藤 武司.....	13
アルキル化剤による DNA の損傷とその修復	関口 瞳夫.....	19
がん遺伝子	寺田 雅昭 他	25
突然変異と発がんの関係	武部 啓.....	29
発癌プロモーターの毒性評価	藤木 博太.....	33
変異原物質の疾患要因としての評価 ——特に加齢性病変の促進について—	林裕造, 高橋道人.....	37

序

故賀田恒夫博士は、日頃温めておられた構想を実行に移されて、日本環境変異原学会会長の最後の年の昭和 60 年 12 月 23 日に講演・討論の会「環境変異原: DNA 医学と毒性評価」を開催されました。年の暮れがせまっていたにもかかわらず、全国から多数の方が参加されて、非常に盛大で実り多い会でした。

賀田博士は、その会の記録を *Proceedings* として出版する準備を進めておられましたが、病に倒れ、その取りまとめを気にしつつ、ついに果たすことがかないませんでした。

「環境変異原研究」の 1 号として出版することをお願いしていた関係から、資料を引き継いで整理、出版の準備を進めていましたが、種々の事情で出版が延び延びになってたいへん遅れてしまいました。賀田博士が学会としてエポックメイキングなすばらしい会を実行されたことを記録にとどめておくため、出版がたいへん遅れて内容的には古くなりましたが、ここに「環境変異原研究」Vol. 8, No. 2 号として出版し、賀田博士の靈前に捧げます。

松 島 泰 次 郎

賀田恒夫博士に捧ぐ



(昭和 59 年 4 月国立遺伝学研究所にて)

賀田恒夫博士略歴

(フランス国家博士・国立遺伝学研究所教授)

昭和 2 年(1927 年)8 月、東京に生まれる。旧制第一高等学校より東京大学農学部農芸化学科に進み、昭和 25 年 3 月同大学を卒業。同年 4 月理化学研究所研究員となり、昭和 31 年 9 月より 8 年間、フランスのパリ大学理学部ラジウム研究所、アメリカのテキサス大学癌研究所、フランスのパストール研究所などに留学。昭和 42 年 10 月、国立遺伝学研究所変異遺伝部長。昭和 59 年 4 月、同研究所が国立大学共同利用機関に改組されたのに伴い同研究所教授、分子遺伝研究系主幹(変異遺伝研究部門担当)。

細菌からマウス、培養細胞などを材料として、放射線や化学物質による突然変異の生成機構や DNA 修復機構の遺伝学的研究を行い、枯草菌を用いた Rec assay 法の開発や反変異原物質・抗変異原物質の研究など独創的な研究を展開した。発表した著書 32 編、研究論文 288 編におよぶ。

これらの成果により、昭和 55 年に第 17 回読売農学賞、日本農学賞、翌昭和 56 年には第 3 回日本環境変異原学会奨励賞を受賞した。

日本環境変異原学会では、昭和 47 年に研究会として発足した当時より 10 年間にわたって庶務幹事を務め、学会の基礎固めに大きく貢献し、昭和 57~61 年には同学会会長を務めた。また、昭和 56 年 8 月、東京・三島・京都で開催された第 3 回国際環境変異原学会(3rd ICEM)では Secretary General として、杉村 隆会長を補佐して同会議を成功に導いた。また、フルートを愛し、駿河管弦楽団団長およびフルート奏者として音楽の振興にも寄与した。昭和 61 年 11 月 14 日食道癌のため癌研究会癌研究所附属病院にて死去した。享年 59 才。

(黒田行昭 記)

昭和60年11月22日

日本環境変異原学会会員各位

皆様ご健勝のこととお慶び申し上げます。

基礎的問題の勉強のため、下記のような会合を企画しました。振るって御参加下さるようお誘い申し上げます。

日本環境変異原学会
会長 賀田 恒夫



講演・討論の会

環境変異原：

DNA医学と毒性評価

昭和60年12月23日(月)

日仏会館ホール(東京・お茶の水駅より徒歩5分) tel 03-291-1143

10:00-12:00 DNA修復・突然変異の誘発と抑制の分子機構

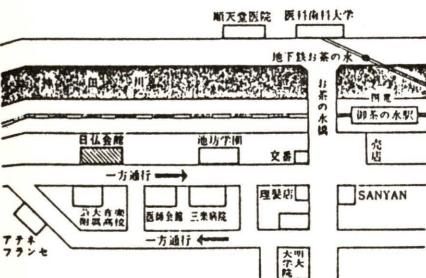
討論・司会 賀田 恒夫(国立遺伝研)
話題提供 早津 彦哉(岡山大・薬)
加藤 武司(阪大・医)
関口 陸夫(九大・医)

13:00-15:00 哺乳動物における遺伝子発現の制御

討論・司会 松島泰次郎(東大・医科研)
話題提供 寺田 雅昭(国立がんセンター・研)
武部 啓(京大・医)
森脇 和郎(国立遺伝研)

15:20-17:20 毒性評価

討論・司会 杉村 隆(国立がんセンター・研)
話題提供 藤木 博太(国立がんセンター・研)
林 祐造(国立衛試)
佐藤 茂秋(国立がんセンター・研)



主催 日本環境変異原学会

問合せ先 黒田 行昭(国立遺伝研)
tel 0559-75-0771 ex 261

環境變異原：

DNA 医学と毒性評価

1. DNA 修復・突然変異の誘発と抑制の分子機構

変異原性ヌクレオシド、N⁴-アミノシチジンの作用機構

早津彦哉（岡山大・薬）

SOS 変異原性の機構

加藤武司 (大阪大・医)

アルキル化剤による DNA 損傷とその修復

関口睦夫（九州大・医）

2. 哺乳動物における遺伝子発現の制御

がん遺伝子

寺田雅昭, 坂本裕美, 吉田輝彦,
宮川 清 (国立がんセンター研)

突然変異と発がんの関係

武部 啓 (京都大・医)

3. 毒性評価

発癌プロモーターの毒性評価

藤木博太（国立がんセンター研）

変異原物質の疾患要因としての評価

林 裕造、高橋道人（国立衛試）

変異原性ヌクレオシド、N⁴-アミノシチジンの作用機構

岡山大学 薬学部 早 津 彦 哉

N^4 -アミノシチジン(図1)は、従来知られている変異原性スクレオシドのうち最も強い変異活性を Ames テストで示す(Negishi ら, 1983)。すなわち、*S. typhimurium* TA100 に対し、-S9 で 50,000 His⁺ revertants/ μ mol で、これは陽性对照として用いた N -ニトロソメチルウレア 6500 revertants/ μ mol よりも強い。また N^4 -アミノシ

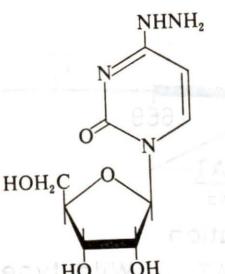


図1. N⁴-アミノシチジン (C^{am})。

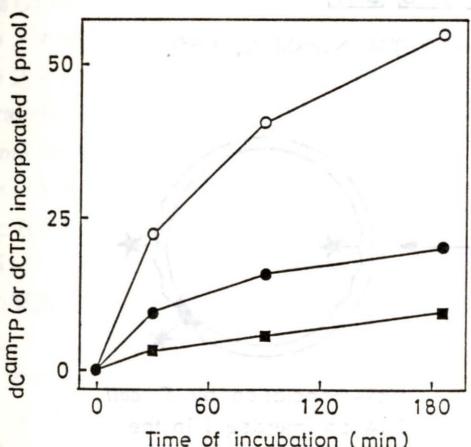


図2. dC^{am}TP が dCTP の代りに、DNA にとり込まれる (Negishi ら, 1985).

Activated calf thymus DNA に対し, dNTP 混合物と *E. coli* DNA polymerase I large fragment を働かせた。

—○—; [^3H]dCTP+dT-, dG-, dA-TP
 —●—; [^3H]dC^{am}TP+dT-, dG-, dA-TP
 —■—; [^3H]dC^{am}TP+dC-, dT-, dG-, dA-TP

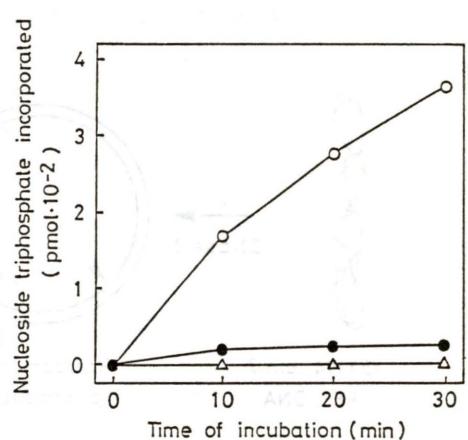


図3. dC^{Am}TP が dTTP の代りにとり込まれる (Negishi ら 1985)

Poly(dA)-oligo(dT)₁₂₋₁₈を鋳型プライマーとして用いた実験。

—○—; [^3H]dTTP
 —●—; [^3H]dC am TP
 —△—; [^3H]dCTP

3) 従って N^4 -アミノシトシン塩基は、グアニン(G)とも、アデニン(A)とも塩基対を形成しうると考えられる。さらに、 N^4 -アミノシトシンが鑄型DNA中にあるときは、正常塩基シトシンと同じ効率でポリメラーゼに読みとられ、相手としてGがとり込まれることがわかった(このときAも少しばかり込まれると期待されるが、検出が困難であった)。以上の実験結果から、 N^4 -アミノシチジンはAT→GCおよびGC→ATのトランジション変異を起こすと予想された。

バクテリオファージ $\phi X174 am3$ が復帰突然変異して野生株に戻る系を用い、 N^4 -アミノシチジンの作用を調べたところ、高頻度で復帰変異が起

こった。変異して得られたファージコロニー8個をランダムに選び、それこれからDNAを抽出し、 $am3$ siteの塩基配列変化を調べた。可能な変化は、A→G、A→T、A→Cの3種であるが、8株とも予期通りA→Gの変化が起きていることがわかった(図4)(Negishiら, 1985)。一方、別の実験で、大腸菌に菌体外から N^4 -アミノシチジンを働かせた後、DNAを調べ、 N^4 -アミノシトシン残基が確かにDNA中に存在することを証明した(Negishiら, 1988)。

次に、DNA中に N^4 -アミノシトシンを入れ、そのDNAに変異誘起能力があることを示す実験をした。 $\phi X174 am3$ の複製型二本鎖DNA(RFI)

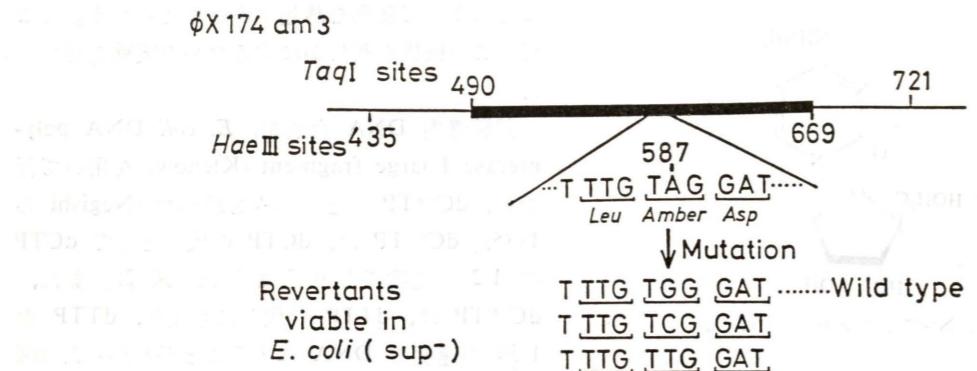


図4. N^4 -アミノシチジンによる amber コドンの変異 (Negishiら, 1985)。

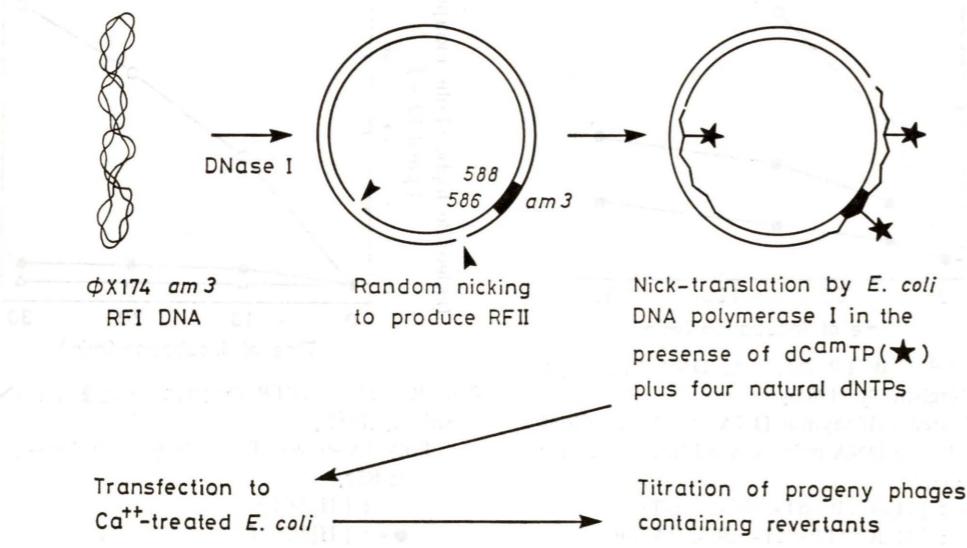
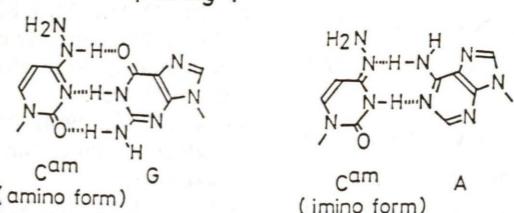


図5. In vitro mutagenesisによる $\phi X174 am3$ の復帰変異 (Takahashiら, 1985)。

Ambiguous base pairing :



Mutagenesis :

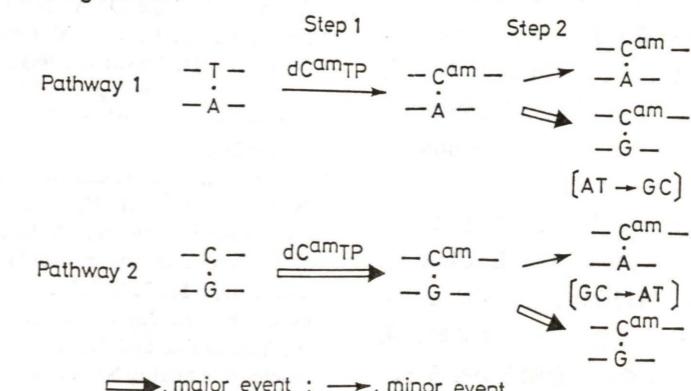
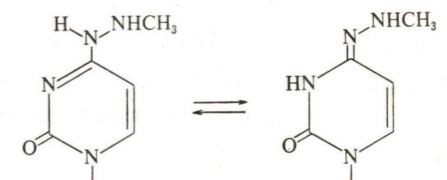


図6. N^4 -アミノシトシンによる突然変異の機構 (Negishiら, 1985)。

に切断点を作り、dC^{am}TPと他の四種の正常ヌクレオシドトリリン酸(dATP, dGTP, dTTP, dCTP)の存在下、*E. coli* DNA polymerase Iを働かせて、いわゆるnick translationを行なう。すると $am3$ siteに、ある程度dC^{am}TPがとり込まれるはずである。このDNAを大腸菌にtransfectionして、生産されるファージを集め、 $am3$ から野生型への復帰変異率を調べたところ、コントロールに比べ10倍以上の変異率が得られた(図5)(Takahashiら, 1985)。この結果から、 N^4 -アミノシトシンがAT→GCトランジションの原因であることは、ほぼ間違いないものになった。

次に、何故 N^4 -アミノシトシン残基はGのみならずAとも塩基対形成が可能なのか、という問題がある。これは、 N^4 -アミノシトシンの N^4 位がアミノ型とイミノ型の互変異性変化をする(Brownら, 1968)ことで説明できる(Negishiら, 1985)。このことを支持する実験事実として、 N^4 -アミノ基のアルキル置換体の変異原性の有無があげられる。すなわち、アミノ=イミノ互変異性が可能な、 N' -アルキル- N^4 -アミノシチジンが細胞内ケトン体(例えビルビン酸)

Mutagenic:



Nonmutagenic:

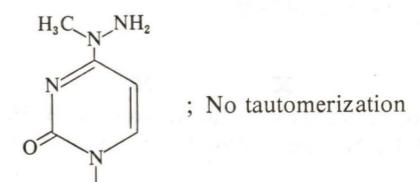


図7. アルキル置換 N^4 -アミノシチジンでの互変異性禁止。

チジンは変異活性があるが、この互変異性が不可能である N -アルキル- N^4 -アミノシチジンは活性が全くない(Nomuraら, 1985)。さらに、これらアルキル置換体での実験結果は、 N^4 -アミノシチジンが細胞内ケトン体(例えビルビン酸)

ヒドロゾンを形成して有効となる、という可能性を排除している。すなわち、N⁴-アミノシトシン塩基そのものが変異誘起に関わっていると考えられる。

次に、N⁴-アミノシチジンが GC→AT のトランジションを起こすことを証明しようとした。先に述べた φX174 am3 の復帰変異は、GC→AT が検出できる系ではない。ファージ M13 に大腸菌 β-ガラクトシダーゼ遺伝子の α 部位ならびにプロモータ部位を組込んだもの (M13 mp2) を用い、ガラクトシダーゼ α 部位欠損大腸菌への complementation テストで、もし M13 mp2 中の α 部位またはプロモータ部位に変異が起きると、complementation が成立しなくなることを利用して変異を検出する方法がある (Le Clerc ら, 1982; Kunkel, 1984)。M13 mp2 を大腸菌に感染させ、菌内でファージが増殖しつつある時、菌体の外から N⁴-アミノシチジンを働かせると、M13 mp2 の変異が起こると期待される。実際これは高率 (>10⁻³; 無処理群, 10⁻⁵) で起こり、β-ガラクトシダーゼの complementation を成立させ得なくなった変異ファージ株が多数得られた。これら変異 M13 mp2 の DNA を sequencing することにより、AT→GC のみならず GC→AT も起きていることが証明された (Bessho ら, 1989)。

N⁴-アミノシチジンは、強い変異原性を持つとともに、その作用機構がほぼ明らかであるゆえに、部位特異的変異を人工的に起こす手段として有用であると期待され、プロテインエンジニアリングなどへの応用が考えられる。

文献

Bessho, T., K. Matsumoto, A. Nomura, H. Hayatsu and K. Negishi (1989). Spectrum of N⁴-amino-

- cytidine mutagenesis, *J. Mol. Biol.*, **205**, 659-664.
 Brown, D. M., M. J. E. Hewlins and P. Schell (1968), The tautomeric state of N⁴-hydroxy- and N⁴-amino-cytosine derivatives, *J. Chem. Soc. C*, 1925-1929.
 Kunkel, T. A. (1984), Mutational specificity of depurination, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **81**, 1494-1498.
 Le Clerc, J. E. and N. L. Istock (1982), Specificity of UV mutagenesis in the lac promoter of M13 lac hybrid phage DNA, *Nature*, **297**, 596-598.
 Negishi, K., C. Harada, Y. Ohara, K. Oohara, N. Nitta and H. Hayatsu (1983), N⁴-Aminocytidine, a nucleoside analog that has an exceptionally high mutagenic activity, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 5223-5233.
 Negishi, K., M. Takahashi, Y. Yamashita, M. Nishizawa and H. Hayatsu (1985), Mutagenesis by N⁴-aminocytidine. Induction of AT to GC transition and its molecular mechanism, *Biochemistry*, **24**, 7273-7278.
 Negishi, K., K. Tamanoi, M. Ishii, M. Kawakami, Y. Yamashita and H. Hayatsu (1988), Mutagenic nucleoside analog N⁴-aminocytidine: Metabolism, incorporation into DNA, and mutagenesis in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **170**, 5257-5262.
 Nomura, A., K. Negishi and H. Hayatsu (1985), Direct-acting mutagenicity of N⁴-aminocytidine derivatives bearing alkyl groups at the hydrazino nitrogens, *Nucleic Acids Res.*, **13**, 8893-8899.
 Nomura, A., K. Negishi, H. Hayatsu and Y. Kuroda (1987), Mutagenicity of N⁴-aminocytidine and its derivatives in Chinese hamster lung V79 cells. Incorporation of N⁴-aminocytosine into cellular DNA, *Mutat. Res.*, **177**, 283-287.
 Takahashi, M., K. Negishi and H. Hayatsu (1985), Induction of mutation *in vitro* in phage φX174 am3 by N⁴-aminodeoxycytidine triphosphate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 1277-1283.
 Takahashi, M., M. Nishizawa, K. Negishi, F. Hanaoka, M. Yamada and H. Hayatsu (1988), Induction of mutation in mouse FM3A cells by N⁴-aminocytidine-mediated replication errors, *Mod. Cell. Biol.*, **8**, 347-352.

環境変異原研究 **8**: 13-18 (1986)

SOS 変異原性の機構

大阪大学 医学部 加藤 武司

突然変異誘発機構を DNA 分子のレベルで考察できるようになった転起は、修復機構の発見であった (Witkin, 1967)。大腸菌で多数の修復欠損株が分離、研究され多様な DNA 修復機構の存在が明らかになるとともに、修復欠損株を用いて突然変異誘発が調べられた。突然変異が DNA 修復過程での“エラー”によって生じるのではないかというアイデアを最初に具体的に示したのは、放射線高感受性株で突然変異が全く誘発されないものがあることを見出した Witkin (1967) であった。その後、修復欠損株の遺伝的、生化学的研究の進展によって修復の分子機構がより詳細となり、組換修復に関する recA 遺伝子の機能が突然変異誘発に必要であることが明確にされ“組換修復エラー”仮説が有力になった (Witkin, 1969; Kondo ら, 1970)。一方、組換機構の研究を行なっていた Clark (1973) 等によって多数の組換欠損株が分離され、仮説の正否をテストできる系を提供することになった。テストの結果 (Kato ら, 1977a) は、組換修復エラー仮説の否定を示唆するものであったため、あらたに突然変異誘発欠損株の分離を試み新しい遺伝子 umuC を見つけた (Kato ら, 1977b)。

ここでは、umuC 遺伝子の発見とその構造解析、誘発突然変異の特異性分析の経過を主体に SOS 変異原性機構研究の現状と問題点を述べる。

1. “SOS 誘発”仮説

新しく見い出された umuC 遺伝子の機能と、recA-lexA 両遺伝子の変異誘発機能はどういう関連しているのであろうか。われわれが umuC-変異株を分離した頃、Radman (1975) と Witkin (1976) は、recA と lexA 遺伝子による突然変異誘発と、他の多くの誘発事象を統一して説明する“SOS 誘発”仮説を提唱した。その骨子は、i) 個々

の誘発事象それに対応する遺伝子が存在する、ii) recA-lexA 遺伝子は、それら一群の遺伝子の発現を制御する、iii) LexA 蛋白は、個々の SOS 遺伝子のリプレッサーであり、細胞が SOS 刺激を受けると RecA が LexA リプレッサーを不活化する活性をもつよう修飾され (RecA*), SOS 遺伝子群が発現される、とする。この SOS 誘発仮説は、これまで断片的に集積されてきた recA- と lexA- 株のもつ突然変異誘発を含めた多面形質発現機能をうまく説明できるものであった (図 1)。その後、多くの研究によって仮説の正当性は実証され、recA-lexA 遺伝子による SOS 誘発機構の詳細がほぼ明らかにされた (堀井ら, 1984; Walker, 1984)。

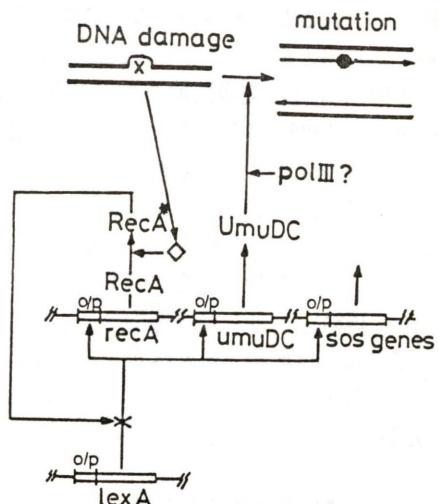


図 1. SOS 応答系の模式図

SOS 応答遺伝子群は、通常では LexA 蛋白 (リプレッサー) で抑制されている。細胞が DNA 合成阻害状態になると誘発シグナル因子 (◇) が生成され、RecA 蛋白を活性化しリプレッサー分子を分断不活化する RecA* となり SOS 遺伝子群が発現される。SOS 変異原性は umuDc 遺伝子の発現によって生ずる。

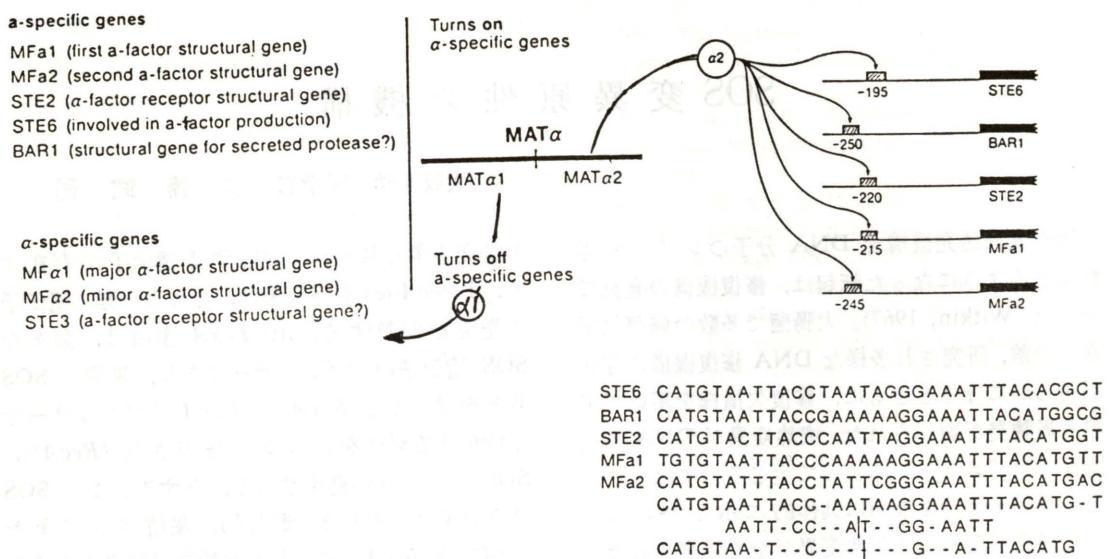


図2. 酵母の接合型支配遺伝子 MAT α 2 による遺伝子発現調節機構と SOS 応答の類似性。MAT α 2 蛋白はリプレッサーとして、 α タイプ接合型細胞特異的遺伝子群の発現を調節している。

大腸菌で発見された、SOS 応答系は少数の制御遺伝子による多数の類似機能遺伝子群の発現調節機構のモデルとしてユニークなものである。最近 SOS 応答系と似た遺伝子発現調節系が酵母の接合型支配遺伝子の発現調節系で見い出された (Johnson ら, 1985; 図2)。また接合型支配遺伝子には、ショウジョウバエの発生に重要な役割をもつホメオティク遺伝子群の一部に相同性の高い配列 (ホメオ・ボックス) がみられ、それらはマウスやヒトまで含めた動物細胞に広く存在している (Gehring, 1985)。これら動物細胞のホメオティック遺伝子の解析は始められたばかりであり、今後どのような展開をみせるか予見はできないが、SOS 応答系の調節との関連から興味がある。

2. *umuDC* 遺伝子の構造と発現

umuC⁻ 変異株の特性からみて、*umuC* 遺伝子機能による変異誘発は *recA*-*lexA* による発現制御を受ける SOS 誘発遺伝子群の一つであることが予想されたが、遺伝子のクローニング (Shinagawa ら, 1983; Elledge ら, 1983), その解析 (Kitagawa ら, 1985; Perry ら, 1985) によって

確かめられた。

クローニングされた *umuC* 遺伝子領域の解析から、i) 二つの蛋白 UmuD と UmuC をコードする遺伝子が連続して存在し、両遺伝子は上流の一つのプロモーターによって発現制御される、ii) プロモーター領域には LexA 蛋白が結合する配列 (SOS ボックス) がみられ、精製した LexA 蛋白が強く結合する、iii) *umuD*, *umuC* 両遺伝子の転写は単一プロモーターの転写シグナルから開始され、LexA 蛋白の結合によって強く阻害されることがわかった。これらの結果は、変異誘発機能をもつ遺伝子 *umuDC* が SOS 遺伝子群の一つであることを明確にした (表1)。

3. SOS 変異原性の機構

遺伝子構造の解析から、*umuDC* 遺伝子が SOS 応答系遺伝子であることが明らかになったが、発現された *umuDC* 遺伝子による突然変異が生ずる機構についてはまだ充分わかっていない。変異誘発機構を調べる方法として、変異原によってどのようなタイプの変異がどれくらいの割合で誘発されるか (特異性) を解析することによって、ある

表1. SOS 遺伝子にみられるプロモーター領域の “SOS ボックス”。

Gene	Sequence of operator/promoter region	Kd (nM)
<i>recA</i>	ATTTCTACAAAACACTTGATACTGTATGAGCATACAGTATAATTGCTTCACAGAACATATTGACTATCC TAAAGATGTTTGTGAACTATGACATACACTCGTATGTCAATTACGAAAGTTGTCTTGATAACTGATAGG +1	2
<i>lexA</i> ^{a)}	TGGTCCAAAATGCCTTGTCTATATACACAGCTAACTGTATATACACCCAGGGGGGGAATGAA ACCAAGGTTTAGCGAAACGACATATATGAGTGTGTTATTGACATATATGTGGTCCCCCCTTACT +1	20
<i>uvrA</i> (ssb)	AACTGTATATACACCCAGG TTGACATATATGTGGTCC +1	
<i>uvrB</i>	CAGAAATATTATGGTGTGAACTGTTTTTATCCAGTATAATTGTTGGCATAATTAAGTACGACGAGT GTCTTATAATACCACTACTTGACAAAAAAATAGGTCAATTAAACACCGTATTAATTGCTGCTCA +1	
<i>uvrD</i>	TCGCTGATATAATCAGCAAATCTGTATATACCCAGTTTGGCGAGGGCGTTGCGCTTCTCCGCC AGCGACTATATTAGTCGTTAGACATATATGGTCGA AAAACGCCCTCCCGCAACGCGAAGAGGGGG +1	
<i>umuDC</i>	TCTGCTGGCAAGAACAGACTACTGTATATAAAACAGTATAACTTCAGGCAGATTATTGTTGTTATC AGACGACCCTCTGTCTGATGACATATATTTGTCATATTGAAGTGTGCTAATAACACAAATAG +1	0.2
<i>coleE1</i> ^{a)}	TGCAGCGCGTAGCTTTATGCTGTATATAAAACAGTGTGTTATATGTACAGTATTGTTAACTTAT ACGTCGCCGCATCGAAAATACGACATATATTTGTCACCAATATACATGTCAATAACAAATTTGAATA +1	0.4
<i>sulA</i> ^{b)}	CAGTGGTTATATGTACAGTA GTCACCAATATACATGTCA +1	
<i>cldF13</i> ^{b)}	TCTTTGTTGTCAGTGGATGACTGTACATCCATACAGTAACTCACAGGGCTGGATTGATTGTACACT AGAAAACAAGTGACCTACATGACATGTAGGTATGTCAATTGAGTGTCCCGACCTAACTAATCATGTGA +1	
consensus	TACTGTATATATACAGTAA ATGACATATATATGTCA +1	

程度まで推定することができる (Miller, 1982)。

代表的変異原数種について、それぞれ *umu*⁺ と *umuDC*⁻ 株での変異誘発頻度をみたのが表2である。EMS や ENU のようなアルキル化剤による変異誘発には *umuDC* 遺伝子機能を必要としないが、UV や 4NQO などによる変異誘発には *umuDC* 遺伝子機能を必要とする (Shinoura ら, 1983b)。変異原の誘発変異特異性を調べるために、サブレッサー分析法を考案し (Kato ら, 1980), 応用した。このサブレッサー分析法は、検出精度があまりよくないので得られる情報に限界があるが、比較的簡単なため多数の変異原について調べることができる利点もある。結果は表3に示す

ように興味のあるものであった (Shinoura ら, 1983a)。結果を要約すると、i) EMS や (oh)⁴Cy のような *umuDC* 非依存性変異原は特定の種類の塩基置換のみ誘発する、ii) UV や γ 線のような *umuDC* 依存性変異原は個々の変異原の特異性も認められるが、いろいろなタイプの塩基置換も同時に誘発することである。最近、DNA 塩基配列の分析手技が進歩し変異遺伝子の塩基配列を直接調べることが可能となり、特異性についてより詳細な情報が得られるようになった (たとえば、Wood ら, 1984)。それら最新の知見をも含め、変異原特異性からみた *umuDC* 遺伝子による突然変異誘発機構のモデルを図3に示した。*umuDC* 非

表2. 各種変異原の *umuDC* 遺伝子機能依存性。
Survival and Mutagenesis in *umuC⁺* and *umuC⁻* Strains of *E. coli*

Mutagen	Strain	Dose giving 37% survival (D_{37}) ^b	His ⁺ revertants per 10 survivors at D_{37} ^a
UV	AB1157 (<i>umuC⁺</i>)	34 J/m ²	52
	TK712 (<i>umuC⁻</i>)	29 J/m ²	1.4
γ -Rays	AB1157 (<i>umuC⁺</i>)	4.5 krad	7.1
	TK712 (<i>umuC⁻</i>)	4.1 krad	ND ^c
4NQO	AB1157 (<i>umuC⁺</i>)	125 μ M h/ml	155
	TK712 (<i>umuC⁻</i>)	100 μ M h/ml	16
MMS	AB1157 (<i>umuC⁺</i>)	1.8 mM h/ml	56
	TK712 (<i>umuC⁻</i>)	1.5 mM h/ml	13
EMS	AB1157 (<i>umuC⁺</i>)	56 mM h/ml	970
	TK712 (<i>umuC⁻</i>)	56 mM h/ml	1050
MNNG	AB1157 (<i>umuC⁺</i>)	62 μ g h/ml	320
	TK712 (<i>umuC⁻</i>)	60 μ g h/ml	325
MNU	AB1157 (<i>umuC⁺</i>)	0.6 mg h/ml	430
	TK712 (<i>umuC⁻</i>)	0.65 mg h/ml	410
ENU	AB1157 (<i>umuC⁺</i>)	1.1 mg h/ml	720
	TK712 (<i>umuC⁻</i>)	1.1 mg h/ml	685

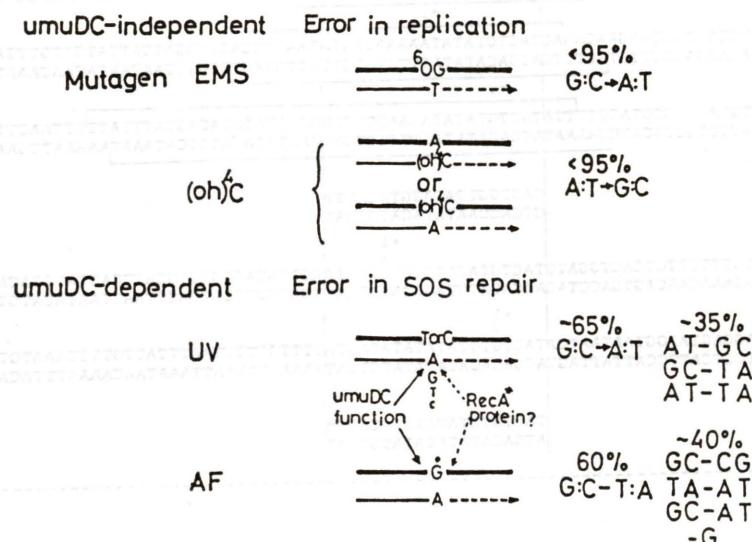


図3. 変異原の誘発変異特異性から分類できる塩基置換誘発機構。

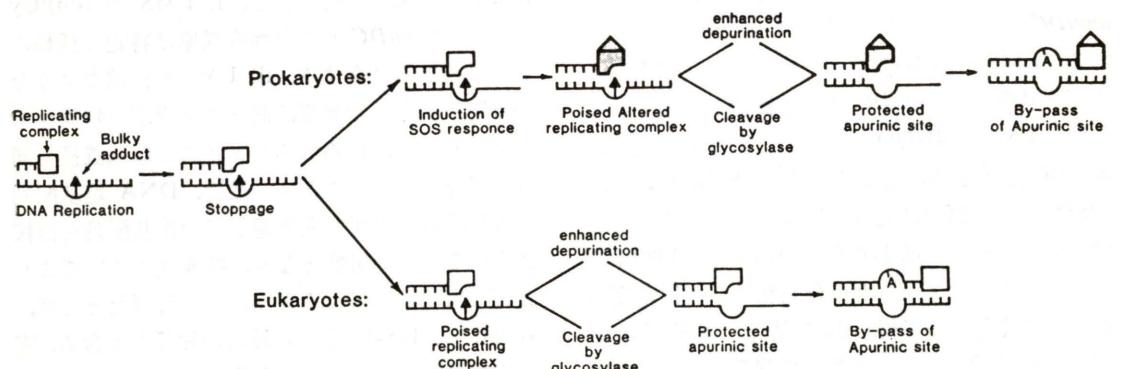


図4. SOS 変異原性の“バイパス修復エラー”モデル (文献 Loeb, L. A., 1985 より)。

表3. 各種変異原の誘発塩基置換特異性
Mutagen Specificity as Determined by Suppressor Analysis of the Strain AB1157

Treatment	Total number of His ⁺ mutants examined	Relative occurrence of base substitutions ^a	
		Transitions (%)	
		G: C → A: T	A: T → G: C
Spontaneous	139	13	80
(oh) ⁴ Cyd	247	0	99.6
ICR191	250	0	98
MNNG	228	93	5
MNU	290	93	5
ENU	289	95	2
EMS	294	93	3
MMS	250	52	15
UV	179	72	17
γ -ray	156	16	41
4NQO	223	76	3

^a Base-substitution specificity was determined according to the T4 ochre (UAA) suppression patterns of His⁺ revertants

Frameshift by the *umuDC* function

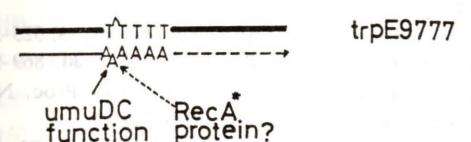


図5. SOS 変異原性機構によって生成され得る 1 塩基欠失、又は挿入によるフレームシフト。(詳細は文献 Shinoura ら, 1983 a, b. 参照)。

依存性の変異誘発は、特定の種類の塩基置換のみ生ずることから、DNA 合成過程で変異原により修飾を受けた塩基位置での対合エラーによるものと考えられる。*umuDC* 依存性 (SOS) 機構による誘発は、個々の変異原による損傷塩基の特異性を反映したものと、非特異的なもののまじった塩基置換スペクトルになる。例えば、UV の場合 60~70% が G: C → A: T トランジションで、残りはいろいろな塩基置換が生じ、AF (アミノフローレン) では約 60% が G: C → T: A トランスバージョン、残りはいろいろなタイプの塩基置換が生じる (Bichara ら, 1985)。

このような塩基置換の誘発は、Loeb ら (1985) によって提唱されている不対合性損傷をもつ DNA のバイパス合成に伴うエラー (バイパス合成には UmuDC 蛋白が必要で、A 塩基を誤挿入

する頻度が高くなる) 仮説でよく説明できる (図 4)。たとえば、UV の場合不対合損傷は TT と TC ダイマーで、相手側での A 誤挿入によって生ずる塩基置換は G: C → A: T であり、AF による不対合損傷 AF-グアニン、アダクト (G) の相手側での A 誤挿入では、G: C → T: A が生ずることになる。また他の種類の塩基置換も生じていることは、UV や AF による不対合塩基損傷がピリミジン・ダイマーや、AF-グアニン・アダクト以外にも生成される (例えば、脱塩基) ためなのか、あるいは A 塩基以外の誤挿入が頻度は低いが生じる (Kunkel, 1984) かのどちらかであろう。同一塩基の連続した配列位置では、類似の機構で 1 塩基挿入、又は欠落型のフレームシフトが生ずることも考えられる (Kato, 印刷中)。SOS 変異原性機構の in vitro での研究が、DNA 合成酵素 pol III*, UmuDC と RecA* 蛋白を用いて研究が進められている (Bridges ら, 1985; Ennis ら, 1985; Richard ら, 1986)。

まとめ

大腸菌では、UV 等多くの変異原に高感度に反応する突然変異生成機構が存在する。それは *recA*-*lexA* 遺伝子によって発現が制御される SOS 誘発系に属し、*umuDC* 遺伝子によってコ-

どされる蛋白が変異生成に重要な役割をしている。UmuD UmuC 蛋白の突然変異生成機能の詳細はまだわかっていないが、*umuDC* 依存性誘発変異の特異性解析の結果は、“バイパス修復におけるエラー”仮説でうまく説明できる。

文 献

- 引用する文献を最少限に抑えるため、筆者らのものを中心には他の多くの文献は関連する総説で代用した。
- Bichara, M., and R. P. P. Fuchs (1985), *J. Mol. Biol.*, **183**, 341-351.
- Bridges, B. A. and R. Woodgate (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **82**, 4193-4197.
- Clark, A. J., et al. (1972), *Ann. Rev. Genet.*, **7**, 67-86.
- Edledge, S. J. and G. C. Walker (1983), *J. Mol. Biol.*, **164**, 175-192.
- Ennis, D. G., et al. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **82**, 3325-3329.
- Gehring, W. J. (1985), *Cell*, **40**, 3-5.
- 堀井俊宏, 小川英行 (1984), 蛋白質, 核酸, 酵素, **29**, 841-852.
- Johnson, A. D. and I. Herskowitz (1985), *Cell*, **42**, 237-247.
- Kato, T., et al. (1977a), *Genetics*, **87**, 1-18.
- Kato, T. and Y. Shinoura (1977b), *Mol. Gen. Genet.*, **156**, 121-131.
- Kato, T., et al. (1980), *Molec. Gen. Genet.*, **180**, 283-291.
- Kato, T., et al. (1986), *Proc. XXIV Gamma Field Symp. on Radiation Biology and Biophysics*, 1986, 1-10.
- Symp., in press.
- Kitagawa, Y., et al. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **82**, 4336-4340.
- Koffel-Schwartz, N., et al. (1984), *J. Mol. Biol.*, **177**, 33-51.
- Kondo, S., et al. (1970), *Genetics*, **66**, 187-217.
- Kunkel, T. A. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **81**, 1494-1498.
- Loeb, L. A. (1985), *Cell*, **40**, 483-484.
- Miller, J. H. (1983), *Ann. Rev. Genet.*, **17**, 215-238.
- Perry, K. L., et al. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **82**, 4331-4335.
- Radman, M. (1975), in: P. Hanawalt and R. Setlow (Eds.), *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*, Part A, Plenum Press, New York, pp. 355-367.
- Richard, C. L., et al. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **83**, 619-623.
- Shinagawa, H., et al. (1983), *Gene*, **23**, 167-174.
- Shinoura, Y., et al. (1983a), *Mutation Res.*, **111**, 43-49.
- Shinoura, Y., et al. (1983b), *Mutation Res.*, **111**, 51-59.
- Walker, G. C. (1984), *Microbiol. Rev.*, **48**, 60-93.
- Witkin, E. M. (1967), *Brookhaven Symp. Biol.*, **20**, 17-55.
- Witkin, E. M. (1969), *Ann. Rev. Genet.*, **3**, 525-552.
- Witkin, E. M. (1976), *Bacteriol. Rev.*, **40**, 869-907.
- Witkin, E. M. and T. Kogoma (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **81**, 7539-7543.
- Wood, R. D., et al. (1984), *J. Mol. Biol.*, **173**, 237-291.

○環境変異原研究 **8**: 19-24 (1986)

アルキル化剤による DNA の損傷とその修復

九州大学 医学部 生化学教室 関 口 瞳 夫

アルキル化剤は強力な発癌剤であり、突然変異誘起作用をもつことが知られている。これはアルキル化剤がDNAに作用し、その塩基をアルキル化することによると考えられる。この関係を明確に示すものとしては Barbacid らの実験があげられる (Sukumar ら, 1983)。ラットに N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を 1 回注射すると約 60 日後に乳癌ができるが、彼らはその癌組織から DNA を抽出し、DNA トランスフェクション法を用いてそれから活性癌遺伝子を分離した。その塩基配列を調べると、それは c-H-ras-1 の変異型で、正常の遺伝子との違いは一塩基の置換であった (図 1)。その部位は第 1 エキソンの 12 番目のコドン (GGA) の中央のグアニンで、変異型ではそれがアデニンに変化していた。その結果 H-ras-1 遺伝子の産物である p21 タンパクの N 末端から 12 番目のグリシンがグルタミン酸に変化するが、この部位のアミノ酸の変化はまさにヒトの膀胱癌などでも見られたものと同様であった。

そこで MNU は DNA に作用して O⁶-メチルグアニンをつくることが知られているが、O⁶-メチルグアニンはチミンとも対応し得るので、その結果 GC→AT トランジション変異を生じる。ここで示された結果は、まさにこの反応が生体内でおこり、それが発癌の原因になることを強く示唆している。

アルキル化塩基の修復酵素

このようにアルキル化塩基は突然変異や癌を起こす原因となる DNA の傷であるが、生体はこの傷をなおす機構をもっている。大腸菌からヒトに至るまで、調べられたほとんどすべての生物の細胞にはアルキル化塩基を修復する酵素系が存在する。私たちはその酵素系の働きを大腸菌を用いて解析した。

3-メチルアデニン DNA グリコシラーゼ I (Tag I) はメチルメタンスルфон酸 (MMS) や MNU で処理された DNA 中に存在する 3-メチルアデニンを特異的に DNA からとり除く (Riazuddin と Lindahl ら, 1978)。大腸菌は別に 3-メチルアデニン DNA グリコシラーゼ II (Tag II) という酵素ももっており、これは 3-メチルアデニンの他に 3-メチルグアニン、7-メチルグアニン、O²-メチルシトシン、O²-メチルチミンをアルキル化 DNA から遊離する (Thomas ら, 1982)。この結果生じた DNA 中の脱塩基部位 (AP 部位) には AP エンドスクレアーゼが働き、さらに除去修復の後半の過程を経て完全な DNA に修復される。tag と alkA はそれぞれ Tag I と Tag II の構造遺伝子であるが、これらの遺伝子に欠損をもつミュータントは MMS などに高い感受性をもつことが示されている。

大腸菌はこの他に O⁶-メチルグアニン DNA メ

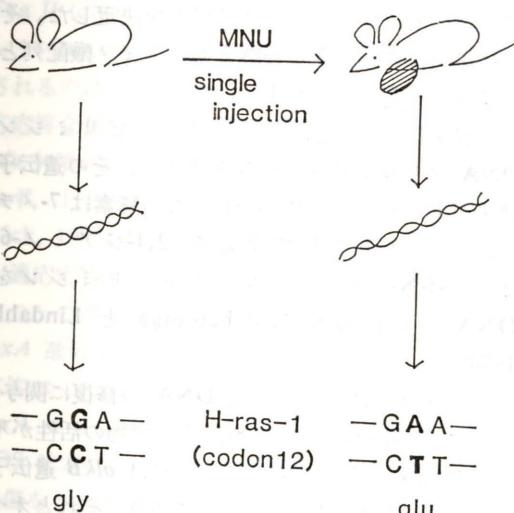


図 1. MNU の注射によって生じたラット乳癌中にみられる癌遺伝子の変異。

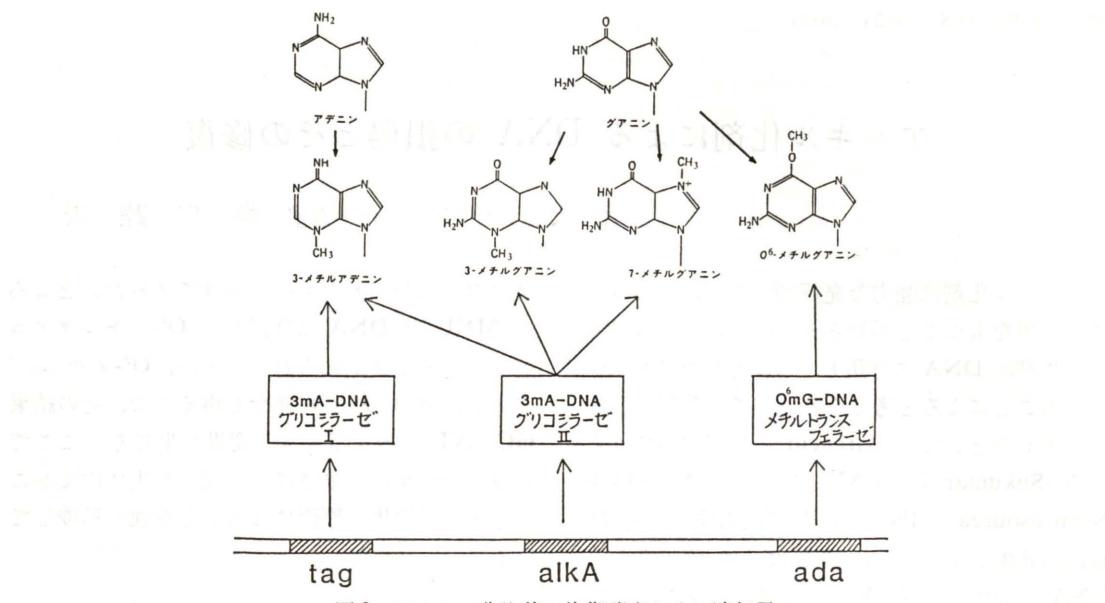


図2. アルキル化塩基の修復酵素とその遺伝子。

表1. アルキル化DNAの修復に関与する遺伝子とその産物。

遺伝子	遺伝子のコーディング領域のヌクレオチド数	蛋白質の分子量	蛋白質の活性
alkA	864	31,400	3-メチルアデニンDNAグリコシラーゼII
ada	1,062	39,385	O ⁶ -メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼ
tag	561	21,100	3-メチルアデニンDNAグリコシラーゼI
alkB	648	23,900	?

チルトランスフェラーゼをもっている(OlssonとLindahl, 1980)。この酵素はDNA中のO⁶-メチルグアニンやメチルホスホトリエステルのメチル基を酵素蛋白自体のシステイン残基へ転移する。その結果DNAは一挙に修復されるが、酵素活性は失活する。後に述べるようにメチル化された蛋白はadaレギュロンの転写を活性化させる。メチルトランスフェラーゼはada遺伝子でコードされている。図2にこれらの修復酵素の作用と遺伝子の関係を示す。

私たちはこれら3つの遺伝子をクローニングし、その構造を明らかにした(Nakabeppeら, 1984, 1985; Dempleら, 1985; Sekiguchiら, 1986; Sakumiら, 1986)。またクローン化した遺伝子を適当な発現ベクターにのせて発現させ、その産物である蛋白質を大量に調製し、アミノ酸組

成やN末端付近のアミノ酸配列を決定した。その結果上に述べた3つの酵素の全アミノ酸配列と分子量が確定した(表1)。

大腸菌にはこの他にホルムアミドピリミジンDNAグリコシラーゼが存在するが、その遺伝子は未だ明らかにされていない。この酵素は7-メチルグアニンが開裂して生じる2,4-ジアミノ-6-オキシ-5-N-メチルホルムアミドピリミジンをDNAから遊離する(ChetsangaとLindahl, 1974)。

それとは逆にアルキル化DNAの修復に関与することがわかっているが、その産物の活性が不明な遺伝子が2つ存在する。一つはalkB遺伝子で、これはada遺伝子の下流にあり、それとオペロンをついている。最近この遺伝子もクローニングされ、ヌクレオチド配列も決められた(Kata-

okaとSekiguchi, 1985; Kondoら, 1986)。alkBミュータントはMMSに高感受性で、MMS処理したファージを再活性化することができない。アルキル化産物の除去修復に関与しているのではないかと考えられるが、蛋白質自体の活性は不明である。最近AlkB蛋白は均一な段階まで精製されたので、その作用機構の解明へと一步近づいた。もう一つの遺伝子aidBについては遺伝学的方法で染色体上の位置が決められただけで、未だ詳しいことはわかっていない(VolkertとNggen, 1984)。

アルキル化剤に対する適応応答

大腸菌を低濃度のアルキル化剤で処理すると、その後比較的高濃度のアルキル化剤に暴露しても抵抗性を示すようになり、アルキル化剤によって誘導される突然変異の頻度も減少する。この現象はCairnsらによってはじめて見出され、適応応答(adaptive response)と名づけられた(SamsonとCairns, 1977)。同様な現象はラットの培養細胞などでもおこることが報告されている(LavalとLaval, 1984)。

その後の研究の結果、アルキル化剤処理によってアルキル化DNAの修復に関与する酵素が誘導され、それが適応応答の基礎になっていることが明らかになった。誘導されたのは前に述べたTag II(alkA遺伝子の産物)とメチルトランスフェラーゼ(ada遺伝子の産物)である。ここで注目されるのはada遺伝子の機能であって、これは適応応答全体の調節遺伝子の役割も果している。ada欠損ミュータントでは2つの酵素とも誘導されず、したがって適応応答おはこらない(Sedgwick, 1983; Nakabeppeら, 1985)。

適応応答は、よく知られているSOS応答にくつかの点で異なっている。SOS応答はrecAとlexA遺伝子でコントロールされているが、適応応答はこれらの遺伝子とは無関係で、recAやlexAミュータント中でも正常におこる。またSOS応答は紫外線やガンマ線、さらにDNAに損傷を与える多くの化学物質で誘導されるが、適応応答はアルキル化剤によって特異的に誘導される。適応応答の誘導にはメチル化剤が最も効果的

で、エチル化剤によっても誘導されるが、それ以上側鎖の長くなったものではほとんど誘導されない。SOS応答はメチル化剤によっても誘導されるが、適応応答の方がはるかに低い濃度で誘導される。

図3はその関係を示す実験結果である(Otsukaら, 1985)。クローン化したalkA遺伝子の転写調節領域と5'末端の構造遺伝子の部分をβ-ガラクトシダーゼをつくるlacZ遺伝子の5'末端を欠く部分に翻訳のフレームがあうように結合すると、両者の融合したハイブリッド蛋白がつくられる(図4)。この蛋白はβ-ガラクトシダーゼ活性をもっているので、その活性を測定することによってalkAの転写がどの程度おこったかを推定することができる。このようなプラスミド(pMCP 1000)をもつ菌(Alac)をごく低濃度のN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)で処理すると、図3に示すようにβ-ガラクトシダーゼの誘導がおこる。エチル化剤であるN-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(ENNG)でも誘

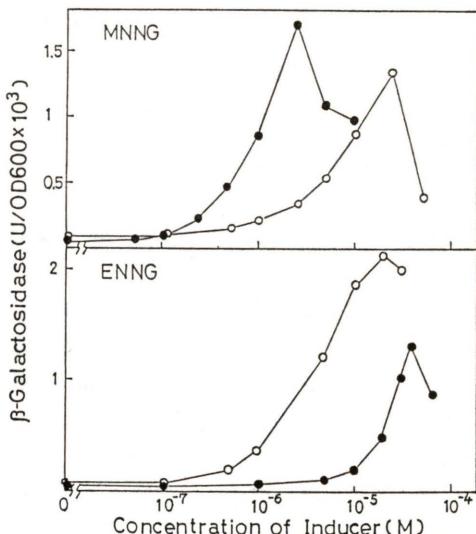


図3. MNNGとENNGによるalkAとumuC遺伝子の発現。

alkA'-lacZ'融合遺伝子をもつプラスミドpMCP 1000保持菌(●)とumuC'-lacZ'融合遺伝子をもつプラスミドpSK1002保持菌(○)を種々の濃度のMNNGまたはENNG存在下で37°Cで2時間培養し、そのβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

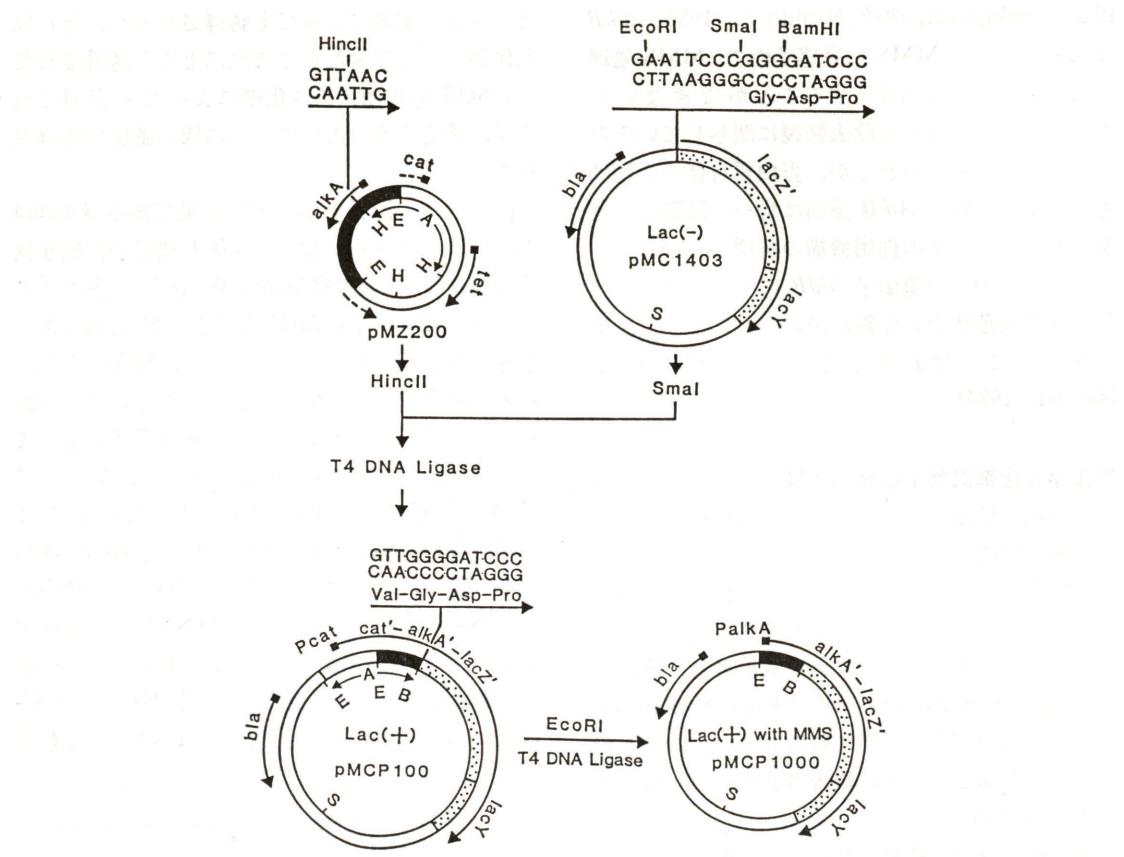


図 4. *alkA'-lacZ'* 融合遺伝子をもつプラスミド pMCP1000 の作製。

導がおこるが、それには高い濃度が必要である。それに対し、SOS 応答をする *umuC* 遺伝子では、その誘導はメチル化剤とエチル化剤で変りなくおこる。

recA と *lexA* による SOS 応答の制御はネガティブコントロールであるが、*ada* 遺伝子による適応応答はポジティブコントロールである。*ada* 欠損ミュータントでは適応応答はおこらず、それに正常の *ada* 遺伝子をもつプラスミドを入れてやると適応応答する能力は回復する。興味あることは大量の *ada* 遺伝子を導入するとアルキル化剤処理なしに酵素の誘導がおこることである。これは *Ada* 蛋白質が大量に細胞内に存在すると、それによって *alkA* や *ada* 遺伝子の発現がおこることを示唆する。

適応応答の機構を明らかにするため、私たちは *in vitro* 転写系をつくって調べた (Nakabeppu と

Sekiguchi, 1986)。その結果 *Ada* 蛋白は確かに *ada* と *alkA* 両遺伝子のプロモーター領域からの転写を促進することがわかった。特に注目されることは、メチル化された *Ada* 蛋白は *ada* 遺伝子の転写を促進する能力が正常の *Ada* 蛋白に比べて高いことである。Lindahl らも独立にほぼ同じような結果を得ている (Teo ら, 1986)。ただ両グループの間には *alkA* の転写促進に関しては若干の違いがある。私たちの結果では、*alkA* 遺伝子の転写にはメチル化、非メチル化 *Ada* 蛋白はほぼ同レベルの転写促進を示した。彼らは *alkA* の転写においてもメチル化 *Ada* 蛋白がより効果的であると報告している。

以上の結果をもとに私たちはアルキル化剤に対する適応応答について、図 5 に示すようなモデルをつくることができた (Sekiguchi ら, 1986)。まず細胞がアルキル化剤で処理されると、その

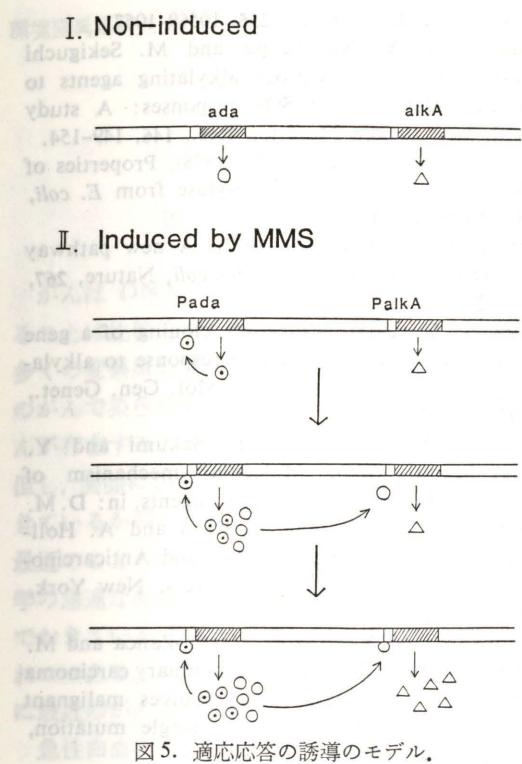


図 5. 適応応答の誘導のモデル。

Sequence of *alkA* promoter region

-240	-230	-220	-210	-200	-190	-180	-170	-160	-150		
ACGGCTTGGCGC	AAAGCATTA	GAAAGGCAGC	AGCGTGCTG	TGTTTC	CATT	TTAGCA	AAATGCGG	TTACCGT	CACGCC	ACTGAACAGTT	
MluI											
-140	-130	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50		
GCTGTACCGT	AAATCAAAC	AAATAAC	CGAAATA	ATCCCATG	CGGGTGAAGA	AGGGGCGTGA	CTTAGCGAAATG	TTAGCG	AAATG	TCGGTCCG	GACAACCGGAATA
-40	-30	-20	-10	+1	+10	+20					
TGAAAGCAA	ECGCAG	CGTCTGAATAACGTT	TATGCT	GAAAGCGGATGAAT	AGGAGATCGG	ATG TAT AC					
▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲					

Sequence of *ada* promoter region

-70	-60	-50	-40	-30	-20	-10	+1	+10	+20		
AAGCTTCTTGT	CAGCGAAA	AAATAAAC	GGCAAGAT	TGTTGGTT	TGCGT	GATGGTGAC	GGGCAGCC	AAAGGCT	ATCCTAAC	ACCAGEGAGCTGATT	ATG
HindIII	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	▲▲▲▲▲	EcoRI
+30	+40	+50	+60	+70	+80	+90	+100				
AAA AAA	CCC ACA	TGC TTA	ACT GAC	GAT CAA	CGC TGG	CAA TCT	GTC TTA	GCC CCC	GAC CGG	AAT GCC GGC	GAA TTC

図 6. *alkA* 遺伝子と *ada* 遺伝子の転写調節領域の塩基配列。

矢印は S1 マッピングおよびプライマーエクステンション法で決められた転写の開始点と方向を示す。
[Met] は翻訳開始シグナル。囲んだ塩基配列は 5' 側からそれぞれプロモーターの -35 領域、-10 領域、シャインダルガノ配列を示す。両遺伝子に共通する配列を黒と白の三角形で示す。

DNA 中に種々のアルキル化塩基やメチルホスホトリエステルができる。細胞内には比較的少数 (約 20 分子) の *Ada* 蛋白が存在するが、そのメチルトランスフェラーゼの作用によって DNA 中の O⁶-メチルグアニンやメチルホスホトリエステルのメチル基が *Ada* 蛋白に移される。メチル化された *Ada* 蛋白は *ada* 遺伝子の転写を促進し、その結果多量の *Ada* 蛋白が細胞内に蓄積する。そこで *Ada* 蛋白はさらに *alkA* 遺伝子の転写促進を行う。このようにしてできた *Ada* 蛋白 (メチルトランスフェラーゼ) や *AlkA* 蛋白 (Tag II) はアルキル化 DNA からほぼ完全に傷害部分をとり除く。

このようにして適応応答の機構の大筋はほぼ明らかにされたが、未だ多くの問題が残されている。その一つは *Ada* 蛋白によっていかにして転写促進が行われるか、その機構を明らかにすることである。DNA のプロモーター領域に *Ada* 蛋白と RNA ポリメラーゼが結合することはわかっているので、その特異性が何によって決まるかまず問題になる。図 6 に示すように *ada* と *alkA* の転写調節領域には共通の塩基配列があり、それ

が何らかの役割を果している可能性が高い。メチル化によって Ada 蛋白の構造がどのように変化し、それがどう転写促進に結びつくかも解かなければならぬ問題である*。いずれにせよアルキル化 DNA の修復の問題は、蛋白質のメチル化を介する転写調節機構の解明へと新しい展開をみせつつある。

本研究は文部省科学研究費および日本学術振興会国際共同研究の援助をうけて行った。

文 献

- Chetsanga, C. J. and T. Lindahl (1979), Release of 7-methylguanine residues whose imidazole rings have been opened from damaged DNA by a DNA glycosylase from *Escherichia coli*, Nucleic Acids Res., **6**, 3673-3684.
- Demple, B., B. Sedgwick, P. Robins, N. Totty, M. D. Waterfield and T. Lindahl (1985), Active site and complete sequence of the suicidal methyltransferase that counters alkylation mutagenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), **82**, 2688-2692.
- Kataoka, H. and M. Sekiguchi (1985), Molecular cloning and characterization of the *alkB* gene of *Escherichia coli*, Mol. Gen. Genet., **198**, 263-269.
- Laval, F. and J. Laval (1984), Adaptive response in mammalian cells: Crossreactivity of different pretreatments on cytotoxicity as contrasted to mutagenicity, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), **81**, 1062-1066.
- Nakabeppu, Y., T. Miyata, H. Kondo, S. Iwanaga and M. Sekiguchi (1984), Structure and expression of the *alkA* gene of *Escherichia coli* involved in adaptive response to alkylating agents, J. Biol. Chem., **259**, 13730-13736.
- Nakabeppu, Y., Y. Mine and M. Sekiguchi (1985), Regulation of expression of the cloned *ada* gene in *Escherichia coli*, Mutation Res., **146**, 155-167.
- Nakabeppu, Y., H. Kondo, S. Kawabata, S. Iwanaga and M. Sekiguchi (1985), Purification and structure of the intact Ada regulatory protein of *Escherichia coli* K12, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, J. Biol. Chem., **260**, 7281-7288.
- Nakabeppu, Y. and M. Sekiguchi (1986), Regulatory mechanism for induction of synthesis of repair enzymes in response to alkylating agents: Ada protein acts as a transcriptional regulator, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), **83**, 6277-6301.
- Olsson, M. and T. Lindahl (1980), Repair of alkylated DNA in *E. coli*. Methyl group transfer from O⁶-methylguanine to a protein cysteine residue, J. Biol. Chem., **255**, 10569-10571.
- Otsuka, M., Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1985), Ability of various alkylating agents to induce adaptive and SOS responses: A study with *lacZ* fusion, Mutation Res., **146**, 149-154.
- Riazuddin, S. and T. Lindahl (1978), Properties of 3-methyladenine-DNA glycosylase from *E. coli*, Biochemistry, **17**, 2110-2118.
- Samson, L. and J. Cairns (1977), A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*, Nature, **267**, 281-283.
- Sedgwick, B. (1983), Molecular cloning of a gene which regulates the adaptive response to alkylating agents in *Escherichia coli*, Mol. Gen. Genet., **191**, 466-472.
- Sekiguchi, M., H. Kondo, K. Sakumi and Y. Nakabeppu (1986), Molecular mechanism of adaptive response to alkylating agents, in: D. M. Shankel, P. E. Hartman, T. Kada and A. Hollaender (Eds), Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms, Plenum Press, New York, pp. 219-229.
- Sukumar, S., V. Natario, I. Martin-Zanca and M. Barbacid (1983), Induction of mammary carcinoma in rats by nitromethylurea involves malignant activation of *H-ras-1* locus by single mutation, Nature, **306**, 658-661.
- Teo, I., B. Sedgwick, M. W. Kilpatrick, T. V. McCarthy and T. Lindahl (1986), The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*, Cell, **45**, 315-324.
- Thomas, L., C.-H. Yang and D. A. Goldthwait (1982), Two DNA glycosylases in *E. coli* which release primarily 3-methyladenine, Biochemistry, **21**, 1162-1169.
- Volkert, M. R. and D. C. Nggen (1984), Induction of specific *Escherichia coli* genes by sublethal treatments with alkylating agents, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), **81**, 4110-4114.

* 本稿提出後この問題に関して大きな進展があった。以下代表的な論文を記す。

- Takano, K., Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1988), Functional sites of Ada regulatory protein of *Escherichia coli*: Analysis by amino acid substitutions, J. Mol. Biol., **201**, 261-271.
- Nakamura T., Y. Tokumoto, K. Sakumi, G. Koike, Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1988), Expression of the *ada* gene of *Escherichia coli* in response to alkylating agents: Identification of transcriptional regulatory elements, J. Mol. Biol., **202**, 483-494.
- Sakumi, K. and M. Sekiguchi (1989), Regulation of expression of the *ada* gene controlling the adaptive response: interaction with the *ada* promoter of the Ada protein and RNA polymerase, J. Mol. Biol., **205**, 373-385.

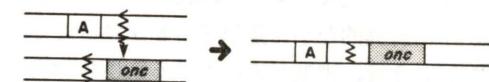
がん遺伝子

国立がんセンター研究所血清部 寺田雅昭, 坂本裕美, 宮川 清, 吉田輝彦

1. 転座

がん遺伝子がもともと存在する染色体の位置から染色体転座により移動し、活性化された遺伝子の近傍に移ったり、または他の遺伝子との融合蛋白質を作ったりすることがある。たとえば、バーキ

Translocation: Burkitt lymphoma, CML



Amplification: Neuroblastoma, Promyelocytic leukemia



Mutation: Various malignancies



図 1 Types of Changes of Oncogenes in Cancer

表 1. Transforming Gene from Human Cancers

Transforming gene	Remarks
c-Ha-ras	More than 50 cases have been reported from various types of cancers
c-Ki-ras	B cell lymphoma
N-ras	Chemically transformed osteosarcoma cell line
Blym	Colon cancer
met	Melanoma, related to ras
Onc D	Mammary cancer (nude mouse assay)
mel	Mammary cancer (nude mouse assay)
mcf 2	Diffuse B cell lymphoma
mcf 3	T cell lymphoma
dbl	Stomach cancer, glioblastoma
ret	Stomach cancer, glioblastoma
raf	Stomach cancer, glioblastoma
hst	Stomach cancer
ica	Hepatocellular cancer

表 2. Amplification of Oncogenes in Human Cancers

Oncogene	Cancer
N-myc	Neuroblastoma, Retinoblastoma Small cell lung cancer
c-myc	Stomach cancer, Pancreatic cancer (patient) Small cell lung cancer, Large cell lung cancer (Lu65) Colon cancer (COLO 320), Breast cancer (SK BR-3) Promyelocytic leukemia (HL-60)
c-myb	AML (ML 1, 2, 3), Colon cancer (COLO 201, 205)
N-ras	Breast cancer (MCF-7), Stomach cancer
Ha-ras	Bladder cancer (patient), Melanoma
Ki-ras	Large cell lung cancer (Lu65) Pancreatic cancer (patient)
erb B-1	Glioblastoma, Epidermoid cancer (A431)
c-abl	CML (K562)

ットリンパ腫においては、第 8 染色体に存在する *c-myc* 遺伝子が第 14 染色体に存在する免疫グロブリンの H 鎮の遺伝子の近傍に転座し、そのため *c-myc* の発現の正常の制限が行われない状態になっている (Leder et al., 1983)。また、慢性骨髓性白血病に於いてはその 90% 以上にフィラデルフィア染色体が存在することがわかつていている。この染色体は第 9 染色体と第 22 染色体との転座によるものである。その結果、第 9 染色体の *c-abl* が第 22 染色体に存在する *bcr* 遺伝子領域に転座し、*c-abl* と *bcr* の融合蛋白質が出来ることが明らかとなった (Shtivelman et al., 1985)。他の固型がんにおいては技術的な困難さもあり、染色体分析も進んでおらず、従って、また、夫々のがんに特異的ながん遺伝子の転座は研究されていない。今後、固型がんにおける染色体分析が進むにつれ、夫々の固型に特異的ながん遺伝子の転位が見出されていくものと期待される。

2. 増幅

がん遺伝子は haploidあたり 1 個存在する。がんによっては、がん遺伝子が数コピーから 100 コピーに至る迄増幅している場合がある (表 2)。神経芽腫においては *N-myc* の増幅がしばしば認められる (Brodeur et al., 1984)。この場合はがんの進行状態、段階と *N-myc* の増幅がよく一致する。すなわち、進行した Stage III, IV では *N-myc* の増幅が認められ Stage I, II では *N-myc* の増幅は認められない。但し、他のがんではがん遺伝子の増幅が認められること稀である。例えば我々の研究室で行った胃がんにおける *c-myc*, *ras family* 遺伝子の増幅に関する検索でも、ヌードマウス移植胃がん株 14 株において、2 株に *c-myc* の 10 倍に及ぶ増幅、1 株に *N-ras* の 30 倍に及ぶ増幅が認められたが、30 例に及ぶ手術摘出胃がん組織において、これらの遺伝子の増幅は認められなかつた。これらのがん遺伝子の増幅はしばしば double minute (DM) 染色体、または染色体中の homogeneous staining region (HSR) を伴うことが多く、これら DM, HSR に増幅したがん遺伝子が存在する。がん遺伝子の増幅はがんの発生のイニシエーションに関与するものではなく、がん

のより悪性化に関与しているものと考えられる。

3. 点突然変異

活性化したがん遺伝子は NIH3T3 細胞をトランスポームする遺伝子として把握される。すなわち、がん細胞より DNA を抽出し、リノ酸カルシウム法により NIH3T3 細胞に導入すると約 10% のがんより抽出した DNA が NIH3T3 細胞を悪性形質転移 (トランスポーム) することがわかつていている。このトランスポーミング遺伝子をクローニングするとその大部分は *c-Ha-ras*, *c-Ki-ras*, *N-ras* のいわゆる *ras Family* 遺伝子の第 12, 第 13 または第 61 のアミノ酸をコードする塩基配列が点突然変異をおこしたものであることがわかつた (Varmus, 1984)。

NIH3T3 細胞に対するトランسفェクションにより見出される活性化されたがん遺伝子は *ras* 遺伝子のみではない。我々はヒト胃がん組織 21 例、リンパ節転移巣 16 例、非がん胃粘膜組織 21 例より DNA を抽出し NIH3T3 細胞に導入してそのトランスポーミング活性を検索したところ胃がん、リンパ節転移巣、非がん胃粘膜の 3 つのサンプルにトランスポーミング遺伝子が存在することが明らかとなった。このトランスポーミング遺伝子の cDNA 及びゲノムの一部をクローニングしたところ、全く新しいがん遺伝子であることがわかり新しく *hst* と命名した。3 つの活性のあった DNA サンプルのトランスポーミング遺伝子は全てこの *hst* 遺伝子によるものであることもはじめて明らかにした。*hst* 遺伝子の産物の機能等につき現在研究を進めている。

以上がんにおけるがん遺伝子の変化について述べてきた。がんにおいてはこれらのがん遺伝子以外にも重要な遺伝子の変化がおきている。がん遺伝子、とくに活性化したがん遺伝子は優性に働く遺伝子である。一方古典的な細胞融合の研究結果では、がん細胞と正常細胞を融合させると形質として正常になり、がん細胞の遺伝子は劣性である。また例えば網膜芽腫においては第 13 染色体の一部が欠失しており、腫瘍においては両方の染色体のこの部分が欠失しており、homozygote になっている。現在、世界中の研究室でこの網膜芽

腫の遺伝子を分離・同定しようと努力がされている。

いずれにしてもがんはまさに DNA の病氣であり、今後ますます発展する DNA 医学の進歩により、がんの本態が分子レベルで解明されると共に慢性骨髓性白血病でみられるように新しい診断法の開発、またがんに特異的な遺伝子の変化を解明することにより新しい治療法の開発が大いに期待されるところである。

文 献

Bishop, J. M. (1983), Cellular oncogenes and retroviruses, Ann. Rev. Biochem., 52, 301-354.

Brodeur, G. M., R. C. Seeger, M. Schwab, H. E. Varmus and J. M. Bishop (1984), Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage, Science, 224, 1121-1124.

Leader, P., J. Battey, G. Lenoir, C. Moulding, W. Murphy, H. Potter, T. Stewart and R. Taub (1983), Translocations among antibody genes in human cancer, Science, 222, 765-771.

Shtivelman, E., B. Lifshitz, R. P. Gale and E. Canaani (1985), Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia, Nature, 315, 550-554.

Varmus, H. E. (1984), The molecular genetics of cellular oncogenes, Ann. Rev. Genet., 18, 553-612.

突然変異と発がんの関係

京都大学医学部 分子腫瘍学、放射能基礎医学教室 武 部 啓

1. はじめに

突然変異と発がんには共通性がある、ということは今日では常識になりつつある。発がん物質のスクリーニングに微生物の突然変異を利用することを不思議に思う人はほとんどなくなった。一方定量的に調べると、両者が一致しない例が多いことも、わが国での研究などからわかってきた。また発がんはマウスなどで見るのに対し、代謝活性系を加えているとはいって、突然変異を細菌で調べることとのギャップの大きさを認識することはやはり重要であろう。かといって哺乳動物を用いた突然変異誘発実験は量的に大変である。この小論では、主にヒトの培養細胞を用いた研究から、ヒトについて突然変異の研究がいかに進んでいるか、それと発がんの関係がみられるかを論じたい。

2. 高発がん性遺伝病患者の細胞

遺伝的に発がんしやすい素質があることは確実であるが、その中でも患者の多数が発がんする高発がん性遺伝病の細胞における突然変異を調べてみた。色素性乾皮症患者(XP)由来の細胞は、紫外線による突然変異が、正常細胞にくらべて著しく生じやすいことはよく知られている(Maherら, 1975)。このことは、大腸菌の除去修復欠損株と共に性質であり、機構も同様であることが推察される。しかし大腸菌での紫外線誘発突然変異がSOS反応で起こることが確実なのに対し、ヒトを含む哺乳動物細胞でのSOS反応はまだ不確実なデータしか得られていない(Sarasin, 1979)。同じく高発がん性遺伝病の一つであるアタキシア・テランジエクタシア(AT)患者由来の細胞は、X線、ガンマ線に対して高い感受性を示すが、X線、ガンマ線による突然変異誘発はほとんどみられないとされていた。われわれは、リンパ芽球

様細胞を用いることにより、AT細胞でもガンマ線によって確実に突然変異が生じることを確認したが、図1にみられるように生存率当りに直してみると、AT細胞は正常細胞にくらべ突然変異が起きにくい(Tatsumi and Takebe, 1984)。XP細胞は生存率当りに直すと正常細胞と一致するか、一部の株は正常細胞よりも紫外線誘発突然変異が起きやすい。われわれが調べたXP細胞の一つ(XP7NI)は極度に誘発されやすいが、特に著しい発がんはみられない(Tatsumi et al., 1987)。

このようにATとXPでは突然変異誘発の反応が異なるが、XP患者の発がんが、太陽光中の紫外線が原因であることが確実であるのに対し、ATの発がん原因は、X、ガンマ線とは考えられないことも一つの問題点であろう。ATの主な発がん原因があるとすればそれによる突然変異を調べないと比較できない。このほかにも突然変異を

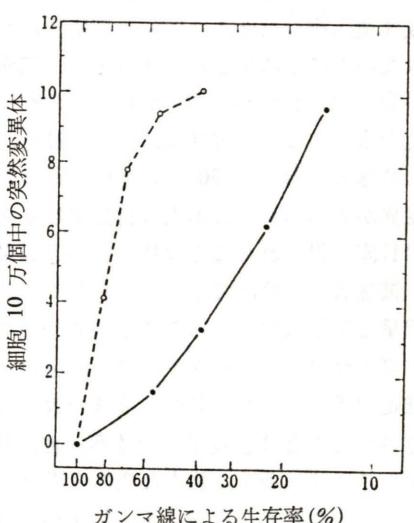


図1. 永久継代可能なリンパ芽球を用いたガンマ線誘発突然変異。
---○---: 正常細胞
—●—: アタキシア・テランジエクタシア細胞

表1. 発がんしやすい素質を有する疾患と、その患者由来の細胞の突然変異の関係 (Takebe et al., 1987).

	発がん	突然変異
色素性乾皮症	++	++ (UV, 一部の化学物質)
アタキシア・テランジェクタシア	++	- (UV, ガンマ線)
ブルーム症候群	++	+ (自然)
ファンコニー貧血症	++	++ (ジエボキシブタン)
家族性大腸ポリポーシス	++	+ (4NQO, MNNG)
ワーナー症候群	+	+ (自然)
ダウン症候群	+	- (UV)

++: 著しく高い, +: かなり高い, +: 確実に高い, -: 正常人と同じか低い

HPRT 遺伝子 (6TG 耐性) でみるのではなく、がん遺伝子 (oncogene) でみなければならないであろうし、AT 細胞では染色体異常が、突然変異よりも、より重要な要因の可能性もある。

いずれにせよ、ヒト細胞における突然変異のデータは乏しい。表1はわれわれの研究を中心にまとめたものであるが、空白の多いことがわかるし、同一原因による高発がん性と、突然変異の起こりやすさの関連性は、XP 以外では見られていない (Takebe et al., 1987)。

3. ヒトとマウスの突然変異

ヒトの発がんデータは、がんという疾患であるため豊富にあるが、ヒトの突然変異の研究は皆無に等しい。ヒトにも突然変異が生じていることは、優性遺伝病（たとえば網膜芽細胞腫）が親にみられないのに子に生じること（その遺伝病の浸透度が高いにもかかわらず）からわかるが、正確な頻度を求めるることは容易ではない。最近、原子爆弾の被爆者における30種の血漿タンパク質の突然変異が調べられ、日本人の自然突然変異率についての目安が得られたことは特筆すべき成果であった。被爆者と対照区で差がみられなかったことは、線量と対象人数から考えて予期通りであったが、従来のマウスのデータや、培養細胞のデータから推定（予期）された頻度とほぼ一致しているが確認されたことは意義深い（佐藤他, 1985）。一方マウスでは、多くの強力な突然変異原でも個体レベルの突然変異がみられず、わずかにENUが明確な誘発がみられた (Russell, 1984)。RussellはENU以外の物質に対しては、精原細胞できわめて効率のより修復がなされるためと考えてい

る。こうなると、これらの物質の中には発がん性が確認されているものも多いので、ここでも発がんと突然変異は一致しないことになる。おそらくヒトについても、突然変異を狭義に生殖細胞に限定すれば、同じことが予期されるであろう。

4. おわりに

この小論は、突然変異と発がんが無関係であるというつもりではなく、ヒト細胞およびヒト個体レベルにおける突然変異のデータがまだまだ乏しいこと、また実験的に容易でなく、問題点も多いことを、われわれの実験と、文献の考察から論じたものである。

文 献

- Maher, V. M., R. D. Curren, L. M. Ouellette and J. J. McCormick (1976), Effect of DNA repair on the frequency of mutation induced in human cells by ultraviolet irradiation and by chemical carcinogens, in: P. N. Magee et al. (Eds.), Fundamentals in Cancer Prevention, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, pp. 362-382.
- Russell, W. L. (1984), Dose response, repair, and no-effect dose levels in mouse germ-cell mutagenesis, in: Y. Tazima et al. (Eds.), Problems of Threshold in Chemical Carcinogenesis, The Environmental Mutagen Soc. Japan, pp. 153-160.
- Sarasin, A. (1979), The use of DNA viruses as probe for studying DNA repair pathways in eucaryotic cells, in: S. Okada et al. (Eds.), Radiation Research, (Proc. 6th Intern. Cong. Radiation Research, Tokyo), Maruzen, Tokyo, pp. 462-470.
- 佐藤千代子, 郷力和明, 藤田幹雄, 津川順一, 高橋規郎, 追龍二, J. V. Neel (1985), 変異蛋白質をマークとする原爆放射線の遺伝的影響の評価, 放射線生物研究, 20, 297-309.

- Takebe, H. and K. Tatsumi (1986), Genetically high risk population for cancer and mutation by environmental mutagens, in: Proc. 4th Intern. Conf. Environm. Mutagens, Stockholm, in press.
- Takebe, H., K. Tatsumi, A. Tachibana and C. Nishigori (1987), High sensitivity to radiation and chemicals in relation to cancer and mutation, in: E. M. Fielden et al. (Eds.), Radiation Research 2 (Proc. 8th Intern. Cong. Radiation Research, Edinburgh), Taylor and Francis, London, pp. 443-448.
- Tatsumi, K. and H. Takebe (1984), γ -irradiation induces mutation in ataxia telangiectasia lymphoblastoid cells, Gann, 75, 1040-1043.
- Tatsumi, K., M. Toyoda, T. Hashimoto, J. Furuyama, T. Kurihara, M. Inoue and H. Takebe (1987), Differential hypersensitivity of xeroderma pigmentosum lymphoblastoid cell lines to ultraviolet mutagenesis, Carcinogenesis, 8, 53-57.

発癌プロモーターの毒性評価

国立がんセンター研究所 藤木博太

1. はじめに

発癌プロモーターはイニシエーターと異なり、DNA には直接作用しないと考えられてきた。しかし、最近の研究によると、発癌プロモーターは、遺伝子増幅、DNA 鎮切断、小環状 DNA の出現、姉妹染色体交換等を誘導することが報告された。本稿では、発癌プロモーターの毒性評価を上述のような DNA への影響の評価と捕えずに、むしろ発癌プロモーション活性の評価と解釈した。発癌プロモーション活性は、更にいろいろな因子の影響を受けることもあるので、それを含め簡単に記述する。

2. 発癌プロモーター

古典的な発癌プロモーターである 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) と構造が異なる発癌プロモーターを私共は、環境中から見い出した。これら“新しい発癌プロモーター”を TPA のレセプターへの結合性の有無により 2 つに分類した(表 1)。TPA と同様に同一のレセプターに

表 1. 新しい発癌プロモーター

TPA タイププロモーター	non-TPA タイププロモーター
Teleocidin class	Palytoxin
Dihydroteleocidin B	Thapsigargin
Teleocidin A (Lyngbyatoxin A)	
Teleocidin B	
Des-O-methylolivoretin C	
(-)-Indolactam-V	
N-Geranyl-(±)-indolactam-V	
Aplysiatoxin class	
Debromoaplysiatoxin	
Aplysiatoxin	
Bromoaplysiatoxin	
Dibromoaplysiatoxin	
Oscillatoxin A	
Anhydrodebromoaplysiatoxin	

結合し、プロテインキナーゼ C を活性化するものを TPA タイププロモーターと呼び、teleocidin と aplysiatoxin のクラスのプロモーターが含まれる。それに対し、レセプターに結合せず、しかもプロテインキナーゼ C を活性化しないものを non-TPA タイププロモーターと呼び、このタイプのプロモーターには palytoxin と thapsigargin の 2 つの化合物が含まれる。したがって、TPA タイプと non-TPA タイプのプロモーターは、全くその作用機構を異にすると考えられる(Fujiki and Sugimura, 1986)。

3. ODC 誘導と発癌プロモーション活性との相関

TPA タイプの発癌プロモーターは、マウスの皮膚にオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) を誘導する。Dihydroteleocidin B は teleocidin B-4 の還元体であるが、TPA と同様に強力なプロモーション活性を示した。ODC を誘導する dihydroteleocidin B の量には至適量が存在する。例えば、マウスの皮膚に 1.25 μg, 2.5 μg と 5.0 μg の 3 つの異なる量を塗布した場合、2.5 μg が最高の活性を誘導した。この至適量の 2.5 μg が、発癌プロモーション活性に於いても最適の条件であるか検討するために発癌二段階実験を行った。表 2 に示すように、2.5 μg を塗布した群では最も高い腫瘍発生頻度を示し、腫瘍の平均個数も 4.9 個と最も多かった。更に、50% の腫瘍発生頻度に達するまで塗布した dihydroteleocidin B の総量 D₅₀ は 0.12 μmol で最小量であった。しかも興味あることに 1.25 μg の dihydroteleocidin B を塗布した群の D₅₀ と等量であることも見い出された。したがって、この実験系では、ODC 誘導は発癌プロモーション活性とよく相関している。更に、考えを進めると、20 μg あるいは 50 μg の dihydro-

表2. Tumor promoting activity と ODC 誘導に対する Dihydroteleocidin B の dose-response

Promoter ($\mu\text{g}/0.1\text{ ml} \times 2/\text{week}$)	Maximal cumulative tumor incidence (%)	Tumor yield	Latent period t_{50} (week)	D_{50} (μmol)	Induction of ODC* (nmol CO_2/mg protein)
Dihydroteleocidin B					
5.0	80.0	2.1	14.7	0.32	1.21
2.5	86.7	4.9	10.5	0.12	1.27
1.25	60.0	1.6	23.6	0.13	0.55
TPA					
2.5	100	15.6	6.6	0.05	1.33

表3. Teleocidin 合成前駆体とその生物活性

	N-methyl-L-valyl-L-tryptophanol	(-)-Indolactam-V	Teleocidin A	
マウス耳発赤テスト	—	—	■	
プロテインキナーゼCの活性化	—	+	■	
レセプターへの結合	—	+	■	
プロモーション活性	n.t.	+	■	

n.t. 未測定

teleocidin B では ODC 活性は誘導されないことから、プロモーション活性は証明できなかったと考えられる (Suganuma *et al.*, 1982)。

4. Teleocidin 合成前駆体 (-)-indolactam-V

Streptomyces には teleocidin の合成前駆体と考えられる化合物が含まれている。N-methyl-L-valyl-L-tryptophanol と (-)-indolactam-V である。(-)-Indolactam-V の C-7 にモノテルペノイド鎖が入り teleocidin A が合成される。表 3 に示すように、N-methyl-L-valyl-L-tryptophanol は TPA のレセプターに結合せずプロテインキナーゼ C を活性化しない。しかし、(-)-indolactam-V は teleocidin A に比較するとその活性はやや弱いが同様な活性を示した。この際、(-)-indolactam-V は $1\ \mu\text{g}$ 塗布してもマウス耳の発赤は (-) であるのに対し、teleocidin A は (■) であった。従来、私共が用いているスクリーニング法によれば、(-)-indolactam-V はプロモーターと考えられなかつたかも知れない。しかし、合成

前駆体であるとの考えに基づき (-)-indolactam-V のプロモーション活性を証明した。このように弱い発癌プロモーターの検索は容易ではない (Fujiki *et al.*, 1985)。

5. 発癌プロモーターと transforming growth factor (TGF) との相互作用

TGF α は 50 個のアミノ酸からなるポリペプチドで EGF のレセプターに結合して作用する。TGF β は 112 個のアミノ酸からなり、血小板等の正常組織にも含まれる。ラット肝細胞に TPA を作用させた場合、6-keto-PGF 1α の産生が見られるが、この効果は TGF α によって synergistic に促進される。しかし、TGF β は効果がない。一方、non-TPA タイプの palytoxin を用いた場合は TGF α 及び TGF β 共に、synergistic にその合成は亢進した。このように、発癌プロモーターの生物活性がいろいろな growth factor の影響を受けることが見出された (Ohuchi *et al.*, Levine and Fujiki, 1985)。

まとめ

発癌プロモーション活性の証明には、TPA タイプと non-TPA タイプに分けて考える必要がある。TPA タイプのプロモーターは ODC 誘導が発癌プロモーション活性とよく相関しているが、この ODC 誘導は non-TPA タイプでは認められない。両タイプのプロモーターに共通する生物活性の一つとして、プロstagランジン E $_2$ の産生がある。このような共通の生物活性は、今後発癌プロモーションの毒性評価にとっても重要な指標となろう。

文 献

Fujiki, H., M. Suganuma, H. Hakii, M. Nakayasu, Y. Endo, K. Shudo, K. Irie, K. Koshimizu and T. Sugimura (1985), Tumor promoting activities

of new synthetic analogues of teleocidin, Proc. Japan Acad., 61, Ser. B, 45-47.

Fujiki, H. and T. Sugimura (1987), New classes of tumor promoters: Teleocidin, aplsiatoxin and palytoxin, Advances in Cancer Res., 49, 223-264.

Levine, L. and H. Fujiki (1985), Stimulation of arachidonic acid metabolism by different types of tumor promoters, Carcinogenesis, 6, 1631-1634.

Ohuchi, K., M. Watanabe, K. Yoshizawa, S. Tsurufuji, H. Fujiki, M. Suganuma, T. Sugimura, L. Levine (1985), Stimulation of prostaglandin E $_2$ production by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-type and non-TPA-type tumor promoters in macrophages and its inhibition by cycloheximide, Biochim. Biophys. Acta., 834, 42-47.

Suganuma, M., H. Fujiki and T. Sugimura (1982), Existence of an optimal dose of dihydroteleocidin B for skin tumor promotion, Gann, 73, 531-533.

変異原物質の疾患要因としての評価

—特に加齢性病変の促進について—

国立衛生試験所病理部 林 裕造, 高橋道人

1. はじめに

変異原性試験は、本来、「被験物質が、それぞれの試験系に用いられている細胞の遺伝子もしくは遺伝子座に変化を与えるか否かを知ることを目的」としているので、それだけでは疾患要因としての評価にはなり得ない。ある変異原物質が遺伝子の変化に由来する特定の疾患 D を誘発する可能性を推定するためには、先ず D 自身あるいは D の発生に直接関連のある何らかのパラメーターを指標とした試験系を設定し、それによる評価が必要である。

遺伝子の変化が関与していると予想される疾患もしくは病変として、癌、化生、酵素変異病変、各種遺伝性疾患等が挙げられているが、近年、細胞あるいは器官の老化もそのひとつに数えられている。現在、癌及びその関連病変の誘発性については、国際的に認められる方法があり、生殖細胞の遺伝子変化にもとづく疾患の評価法に関しても種々の検討が加えられている。一方、老化の促進については、このような試験法を設定する段階に達していないのが現状である。

2. 老化の指標

老化は最終的に生体の死につながると言う観点から死亡率曲線を指標として解析する方法が考えられるが、生体の死には様々な要因が関与しているので、この指標は単細胞生物、培養細胞等の単純な実験系以外には適用しがたい。一方、老化の機序に基づいた生化学的あるいは生理学的パラメーターを指標とする方法が理想であるとしても、その目的のためには現在の知見は十分と言えない。従って、現時点では、老化に伴なって起こってくる器官及び細胞の形態的並びに機能的変化を

指標とする解析が適切であるように思われる。

記述生物学によると、生体の器官及び細胞は老化（厳密には加齢）に伴い、次のような変化を示すことが知られている (Kohn, 1971)。

- 1) 実質細胞の減少を伴う器官の萎縮並びに機能の低下。
- 2) 実質細胞の変性と消耗色素の増加、胞体の大小不同、核の形態変化、多倍体の増加、異常分裂像の出現。
- 3) 更に、上記変化が加齢と共に着実に進行する点を強調する必要がある。

では遺伝子に変化を与える物質の投与によって、上記変化が実際に起こり得るか?、又、その変化が、投与した物質による標的細胞の遺伝子障害に由来するとみなし得るか?。これらの点について、2つの実験例を示したい。

3. 4HAQO による神経障害

4-ヒドロキシアミノキノリン 1-オキシド (4HAQO) は強力な変異原物質で、動物に投与すると皮膚、脾、肺、胃、腸等に腫瘍を発生させる (Mori and Ohta, 1967; Hayashi ら, 1972)。この物質は生体内で代謝を受け N がアシル化されて活性型に転換する事実が知られており、DNA と結合する証拠として、アデニンおよびグアニンとの付加体が同定されている。4HAQO を培養細胞に作用させると核小体に極めて特徴的な変化を起こす。この変化は核小体分離 (nucleolar segregation) と呼ばれ、核小体内で営まれている RNA 合成が何らかの原因で阻害されている事の形態表現と言わわれている (Reynolds ら, 1964)。しかし、RNA 合成阻害は RNA ポリメラーゼの阻害、テンプレートである DNA の変化等様々な原因で起

Table 1. Pathological Alterations of the Lung in Rats after a Single Subcutaneous Injection of 60 mg/kg of Monocrotaline.

Weeks after inj.	Group	Number of rats examined	Body weight (g)	Lung weight (g)	S_u	Hem- orrhage	Number of rats with				
							Swelling of alveo- lar walls	Capillary thrombi	Necrosis of alveo- lar walls	Arterial hyalinosis	Arteritis
1	Control	10	197.6 ± 10.2	0.95 ± 0.06	1377 ± 239	0	0	0	0	0	0
	Treated	10	179.9* ± 10.5	1.13* ± 0.09	1164* ± 243	0	9	5	0	0	0
2	Control	10	253.6 ± 13.2	1.05 ± 0.06	1306 ± 224	0	0	0	0	0	0
	Treated	10	229.5* ± 21.3	1.46* ± 0.11	1070* ± 305	1	10	9	2	0	0
3	Control	10	309.5 ± 17.5	1.11 ± 0.06	1227 ± 189	0	0	0	0	0	0
	Treated	10	259.1* ± 39.2	2.03* ± 0.23	964* ± 295	10	10	10	4	0	0
4	Control	10	353.1 ± 24.8	1.18 ± 0.03	1354 ± 204	0	0	0	0	0	0
	Treated	10	236.6* ± 40.7	2.08* ± 0.26	972* ± 232	10	10	10	10	9	2

S_u , alveolar surface area per unit volume of the lung (cm^2/cm^3) Statistical difference from the paired control (* $P < 0.01$).

こり得るので、核小体分離を起こしたと言うだけでは、その物質がどのような機序で細胞に作用したかは推定し得ない。一方、4HAQO の場合の様に、DNA と結合する事実が予め分かっていると核小体分離はその物質が細胞の DNA に作用した事の証拠として受け止められる。そこで 4HAQO の標的細胞を知る目的で 4HAQO をラットに投与し、色々な組織を電子顕微鏡で調べる実験を行った所、その過程でこの物質が脊髄神経節、三叉神経節等の末梢神経節の神経細胞に核小体分離を起こす事実が判明した (Hayashi ら, 1971)。

Post-mitotic cell である神経細胞の DNA に発癌物質が作用した場合、その後どのような現象が起こるか? この問題を調べる目的で雄ラットに 4HAQO 5 mg/kg (LD 50: 12 mg/kg) を週 1 回ずつ、計 8 回静注した。注射を終了した時点では、動物の一般状態に著しい異常は見られなかったが、その後 5 週目から、後肢に知覚麻痺が現れ、その程度と頻度は時間の経過と共に著しくなった。麻痺を起こした動物の延髄と脊髄を調べてみると、知覚の伝導路である Goll 索と Burdach 索の神経線維に軸索変性が認められた。次いで、病変の発生と進展の状況を経時的に追及した結果、軸索変性は必ずしも神経線維の末端に起こり、その後、徐々に細胞体の方向に波及していく事が分かった (Hayashi ら, 1988)。詳細は省略するが、このような形式の軸索変性の源は細胞体の変化にある事が知られている。そこで神経節内の細胞体を電子顕微鏡で調べてみると、殆どすべての神経細胞に胞体の萎縮、消耗色素の増加、核膜の彎入、neurofibril の乱れが認められ、これらの変化が注射終了後 30 週間の全観察期間に亘って着実に進行していく事が分かった (Hayashi ら, 1988)。これらの変化は前述の老化に伴う器官及び細胞の形態変化の基準に適合する。従って、4HAQO の生化学的作用機序及び核小体分離に関する知見を考え合わせると、4HAQO による神経細胞の DNA 障害がこれら一連の変化の trigger になっていると判断し得る。

4. モノクロタリンによるラットの肺障害

モノクロタリンは *Crotalaria spectabilis* の種

子に含まれるピロリジンアルカロイドである。この物質はピロール型に転換して DNA の親核部分に結合する事が知られており、生物作用として、変異原性と染色体異常誘発性が認められている。一方、モノクロタリンの発癌性が明らかになったのは、近年になってからの事である (Hayashi ら, 1971b)。発癌性が不明であった理由は極く単純で、モノクロタリンが実験動物（特にラット）の肺に強い毒性を有し、癌が発生する前に動物を死亡させてしまうからである (Hayashi ら, 1967)。

若いラットにモノクロタリン 40~60 mg/kg を 1 回投与すると、最初の 2 週間の間は、著しい症状を示さずに成長を続けるが、1 ヶ月頃になると急に呼吸困難を起こして死亡する。死亡動物の肺は病理学的に間質性肺炎の像を呈し、特記すべき変化として、肺胞腔及び肺胞管の著しい拡張、即ち肺気腫の像が認められる (Hayashi ら, 1984) (Table 1)。肺気腫は加齢性肺病変に数えられる変化である。次にモノクロタリンの投与により肺気腫が発生する理由について考えてみたい。

肺胞の壁は肺胞上皮細胞 (I 型, II 型) が一層に配列して作られた薄い膜と、基底膜を挟んでこれに接する毛細血管網と、これらの間をうめる極めて僅かな間質から構成されている。これら構成細胞のいずれか、あるいはすべてが何らかの原因で広汎に障害されると肺胞壁は崩壊し、その結果、肺気腫が発生する。興味ある事に、一連の実験からモノクロタリンの 1 回投与後、時間の経過と共に肺胞構成細胞特に肺胞上皮細胞が、広範囲に、徐々に、しかも着実に変性、壊死に陥り、その結果、細胞壁の崩壊を来たす事が分かった。しかも、変性に陥った細胞を見ると、核が異常に大きくなり、加齢性変化にしばしば伴う多倍体の形をとり、核の輪郭も著しく変形する。これらの事実から、肺胞上皮細胞がモノクロタリンの標的細胞のひとつと推定された。そこで、モノクロタリンが肺胞上皮細胞に対しどのように作用するかを見るために、モノクロタリン投与後数時間~24 時間目のラットの肺を電顕で検索した所、I 型, II 型のいずれの肺胞上皮細胞にも核小体分離の像が認められた (Hayashi and Hasegawa, 1969)。從

って、前述の 4HAQO の場合と同様の論法で、モノクロタリンは肺胞上皮細胞の DNA に作用して、肺気腫の誘発を起こすと推察される。

5. おわりに

4HAQO 及びモノクロタリンを例として、DNA 障害が老化に類似した器官の変化を起こす事実を述べた。アミノメチル- α -カルボリンによる唾液腺や脾臓房の萎縮も同様の機序によるものと推定される (Takayama ら 1985; Yamashita ら, 1986)。しかし、現時点では、このような病変の発生が DNA のどの部分の修飾に関与しているか不明である。

従来、老化の機序に関して多くの説が述べられているが、DNA 障害に関連のある説として、プログラム説と突然変異蓄積説が挙げられる。プログラム説は細胞の遺伝子に予め老化に関するプログラムが設けられていると言う考え方で、単細胞生物や一年生植物の生活環の説明にはよくあてはまる。一方、突然変異蓄積説は細胞の DNA にランダムに変化が起り、その程度がある限界に達すると老化を招くると言う考え方で、外因性老化要因の量と老化の発生率との関係、即ち用量作用関係の説明には適切かもしれない。しかし、ランダムに起った DNA 変化がそのまま共通の形質変化としての加齢性病変を引き起こす事は考え難く、中間の過程として、予め設定されているプログラムの障害あるいは老化遺伝子の活性化等が介在すると想定される。

老化の機序には未だ不明の点が多いとしても、遺伝子が関与した現象であるとすれば、DNA 障害を起こす外因性因子は老化にも影響を及ぼし得ると考えるべきである。その意味で、環境変異原物質の疾患要因としての評価に際して、発癌と並んで、老化促進の面も考慮する必要があろう。

文 献

Hayashi, Y., J. F. Hussa, J. J. Lalich (1967), Cor pulmonale in rats, *Lab. Invest.*, **16**, 875.

Hayashi, Y., T. Hasegawa, K. Toyoshima (1971a), Nucleolar alterations of peripheral nerve cells in rats following administration of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide, *Experientia*, **27**, 925.

Hayashi, Y., M. Shinada, H. Katayama (1971b), Experimental Insuloma in rats after a single administration of monocrotaline, *Toxicol. Letters*, **1**, 41.

Hayashi, Y., H. Fukukawa, T. Hasegawa (1972), Pancreatic tumors in rats by 4-nitroquinoline 1-oxide derivatives, in: W. Nakahara, S. Takayama, T. Sugimura and S. Odashima (Eds.), *Topics in Chemical Carcinogenesis*, Univ. Tokyo Press, Tokyo, pp. 53.

Hayashi, Y., T. Kokubo, M. Takahashi, F. Furukawa, H. Otsuka, K. Hashimoto (1984), Correlative morphological and biochemical studies on monocrotaline-induced pulmonary alterations in rats, *Toxicol. Letters*, **21**, 65.

Hayashi, Y., M. Takahashi, T. Hasegawa (1988), Systemic degenerative disorders of primary sensory neurons in rats induced by 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide, In "Monographs on Pathology of Laboratory Animals", T. C. Jones, U. Mohr, R. D. Hunt (eds), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 92-98.

Kohn, R. R. (1971), *Principles of Mammalian Aging*, Prentice-Hall Inc., 1st Ed., Englewood Cliffs, NJ.

Mori, K., A. Ohta (1967), Carcinoma of the glandular stomach of mice by 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide, *Gann*, **58**, 551.

Reynolds, R. C., P. O'B. Montgomery, D. H. Karney (1964), Nucleolar caps-A morphological entity produced by the carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide, *Cancer Res.*, **23**, 535.

Takayama, S., Y. Nakatsuru, H. Ohgaki, S. Sato, T. Sugimura (1985), Atrophy of salivary glands and pancreas of rats fed on diet with amino-methyl- α -carboline, *Proc. Jpn. Acad.*, **61**, Ser. B, 277.

Yamashita, K., S. Takayama, M. Nagao, S. Sato, T. Sugimura (1986), Amino-methyl- α -carboline-induced DNA modification in rat salivary glands and pancreas detected by 32 P-postlabelling method, *Proc. Jpn. Acad.*, **62**, Ser. B, 45.

Hayashi, Y., T. Hasegawa (1969), Nucleolar alterations of alveolar epithelial cells in rats following a single injection of monocrotaline, *Acta. Path. Jpn.*, **19**, 315.

Hayashi, Y., T. Hasegawa, K. Toyoshima (1971a), Nucleolar alterations of peripheral nerve cells in rats following administration of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide, *Experientia*, **27**, 925.

Hayashi, Y., M. Shinada, H. Katayama (1971b), Experimental Insuloma in rats after a single administration of monocrotaline, *Toxicol. Letters*, **1**, 41.

Hayashi, Y., H. Fukukawa, T. Hasegawa (1972), Pancreatic tumors in rats by 4-nitroquinoline 1-oxide derivatives, in: W. Nakahara, S. Takayama, T. Sugimura and S. Odashima (Eds.), *Topics in Chemical Carcinogenesis*, Univ. Tokyo Press, Tokyo, pp. 53.

Hayashi, Y., T. Kokubo, M. Takahashi, F. Furukawa, H. Otsuka, K. Hashimoto (1984), Correlative morphological and biochemical studies on monocrotaline-induced pulmonary alterations in rats, *Toxicol. Letters*, **21**, 65.

Hayashi, Y., M. Takahashi, T. Hasegawa (1988), Systemic degenerative disorders of primary sensory neurons in rats induced by 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide, In "Monographs on Pathology of Laboratory Animals", T. C. Jones, U. Mohr, R. D. Hunt (eds), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 92-98.

Kohn, R. R. (1971), *Principles of Mammalian Aging*, Prentice-Hall Inc., 1st Ed., Englewood Cliffs, NJ.

Mori, K., A. Ohta (1967), Carcinoma of the glandular stomach of mice by 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide, *Gann*, **58**, 551.

Reynolds, R. C., P. O'B. Montgomery, D. H. Karney (1964), Nucleolar caps-A morphological entity produced by the carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide, *Cancer Res.*, **23**, 535.

Takayama, S., Y. Nakatsuru, H. Ohgaki, S. Sato, T. Sugimura (1985), Atrophy of salivary glands and pancreas of rats fed on diet with amino-methyl- α -carboline, *Proc. Jpn. Acad.*, **61**, Ser. B, 277.

Yamashita, K., S. Takayama, M. Nagao, S. Sato, T. Sugimura (1986), Amino-methyl- α -carboline-induced DNA modification in rat salivary glands and pancreas detected by 32 P-postlabelling method, *Proc. Jpn. Acad.*, **62**, Ser. B, 45.

環境変異原研究

第 8 卷 第 2 号 1986 年

平成元年 11 月 25 日 印 刷

平成元年 12 月 1 日 発 行

発 行 者 日本環境変異原学会

編集責任者 松 島 泰次郎

東京大学医科学研究所

癌生物学研究部

〒108 東京都港区白金台 4-6-1

T E L 03-443-8111 内 506

印 刷 所 三造写真工業株式会社

〒105 東京都港区新橋 5-23-7

T E L 03-433-1869

ISSN 0910-0865