

環境変異原研究

**Environmental
Mutagen
Research**

環境変異原研究

Environmental Mutagen Research

目 次

特別企画「食品ならびに食品成分による抗変異原性作用」

「特別企画—食品ならびに食品成分による抗変異原性作用—」を企画するにあたって

矢嶋信浩	111
乳酸菌を用いた発酵乳の抗変異原性	
細野明義	113
発がん抑制性フードファクター：食によるがん予防を目指して	
大東 肇	123
抗変異原に関する研究	
木苗直秀，増田修一	129

第 13 回公開シンポジウム「環境変異原と遺伝子不安定性」

DNA Polymerase κ による DNA 損傷のバイパスと突然変異の誘発	
大森治夫	145
微生物由来のトランスリージョン DNA ポリメラーゼ	
能美健彦	153
は乳類細胞における DNA 二本鎖切断修復と，p53 によるゲノム安定化機構	
本間正充	161
ラットおよびヒト乳腺発がんにおける一塩基不安定性	
大河内江里子，牛島俊和	169

Letter to Editor

環境変異原研究の光と陰：これから進むべき道

鈴木孝昌	179
------	-----

Author Index	185
--------------	-----

Keyword Index	186
---------------	-----

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@muji.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

「特別企画—食品ならびに食品成分による抗変異原性作用—」を企画するにあたって

矢嶋 信浩*

雪印ラビオ株式会社開発研究所 〒485-0059 愛知県小牧市小木東3-45

Preface : Antimutagenicity by foods and foods containing materials

Nobuhiro Yajima

Research and Developmental Institute, SNOW BRAND LABIO CO., LTD.
3-45, Kokihigashi, Komaki, Aichi, 485-0059, Japan

「食品」はヒトが生きていくうえで毎日摂取しなければならないものであり、ヒトの健康にもっとも関わりのある「環境」のひとつといえる。本学会の創世も食品保存料AF2にあるとあって過言ではない。さらに、本邦の環境変異原研究の推進に多大な貢献を与えたものとして、食品の焼けこげ中に存在するヘテロサイクリック・アミンを否定する環境変異原研究者はいないと思われる。一方、変異原性物質の活性を低減化させる作用をもつ物質、即ち、抗変異原性物質が環境中に存在することが解り、食品あるいは食品成分に含まれる抗変異原性物質に関する研究も本学会における大きな潮流のひとつとなっている。

今回の特別企画では、これまでとは少し違った新しい切り口をもとめ、昔から普段よく口にしている食品や食品成分に含まれている抗変異原性物質、抗プロモーター物質、発ガン抑制物質などをテーマとした。また、このような企画を考案したもうひとつの背景に、抗変異原性や発ガン抑制物質の研究、特に食品関連のそれらの分野に携わる研究者で環境変異原学会の会員でない先生方の研究を紹介する目的もあった。したがって、著者の選択にあたって、本学会以外の場で抗変異原性や発ガン抑制の研究を長年続けられているお二人の先生を加えるとともに、本会を代表する立場から、前日本環境変異原学会会長に執筆を依頼した。

信州大学大学院の細野明義教授には「乳酸菌」を用いた発酵乳による抗変異原についてその歴史からひもとい

ていただき、化学物質ではない生きた乳酸菌の効用を抗変異原性の立場からレビューしていただいた。京都大学大学院の大東肇教授には、新しい概念としての「フード・ファクター」ならびに発ガン抑制物質を検出する斬新なスクリーニング法についてご紹介いただき、ラジカル産生抑制から発ガン抑制まで広い範囲に渡る最新の研究成果をご紹介いただいた。また、前会長である静岡県立大学の木苗直秀教授には、食品あるいは食品成分に含まれる抗変異原性活性について各種変異原性試験法を用いて証明した事例をご紹介いただき、「カテキン」や「フラボノイド」などについてはその抗変異作用機序まで言及していただいた。

近年、空腹を満たす機能、味覚を満たす機能に次ぐ、食品の第3の機能に対する関心が各方面から寄せられ、学術研究の対象としてばかりではなく、広く一般消費者からも興味をもたれている。特定保健用食品や栄養機能食品に加え、栄養補助食品にも関心が広がっている中で、誇大な表示や学術的根拠が薄いものも混在し、食品の機能を謳うことで、逆に誤解や混乱を与えるというマイナス面も浮き彫りにされている。学術的な根拠という意味では、抗変異原性を示す食品や食品成分に関する研究は歴史もあり、科学としてしっかりと学会内に根付いている。治療の世紀から予防の世紀へ移行し、食品ならびに食品成分に含まれる抗変異原性物質に関する研究分野が新たな視点から成長し、発展することを祈り、本特別企画を編纂した。「警告の科学から推奨の科学へ」を本特別企画へ寄せることばとしたい。

* E-mail : n-yajima@snowlabio.com

受付：2002年10月10日 受理：2002年10月15日

日本環境変異原学会

乳酸菌を用いた発酵乳の抗変異原性

細野 明義*

信州大学大学院農学研究科 〒399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村 8034

Antimutagenicity of fermented milk with lactic acid bacteria

Akiyoshi Hosono

Graduate School of Agriculture, Shinshu University
Nagano-Minamiminowa 399-4598, Japan

Summary

Fermented milk and lactic acid bacteria have been considered to provide potential health benefits to human beings. Milk containing casein has been shown to be highly antimutagenic, and fermentation by lactic acid bacteria produces various hydrolytic peptides which contribute to the high antimutagenicity of fermented milk. The antimutagenic property of fermented milk was dependent on the strains of lactic acid bacteria and the fermentation time. Not only the proteolytic products of casein, but polysaccharides, fatty acids and the bacterial cells all contributed to the antimutagenic properties. Lactic acid bacteria isolated from various fermented products of dairy and non-dairy origin, traditional fermented foods, and animal and human faeces have shown antagonism against the mutagenicity of known chemical mutagens and also to food-borne mutagens. Most of the anticancer studies with lactic acid bacteria showed that colon tumours can be controlled to some extent by the consumption of dairy products supplemented with lactic acid bacteria. By identifying the molecules of lactic acid bacterial cells involved in mutagen binding (as binding and antimutagenicity are well correlated and the bound mutagens were inactive), it may be possible to modify cell walls of lactic acid bacteria to enable inactivation of a wide spectrum of chemical mutagens and carcinogens.

Keywords : antimutagenicity, lactic acid bacteria, streptomycin-dependent strain, fermented milk, binding of mutagen

はじめに

今日、生活習慣病としてあげられている疾患には従来用いられてきた成人病と重複するものが多い。成人病という言葉には成人になってから気をつけられたいとする安易な気持ちを抱かせる反面、意欲を醸成させにくいとする語弊があった。その語弊を一掃させ、健康のうちに日常的に疾病予防を心がけていくことこそ最良の方策であるとして公衆衛生審議会成人病難病対策部会が1996年に「生活習慣病」という用語を定め、各人が意欲的に認識することの重要性を指摘した。このことの背景には、

我が国を含む先進国では栄養バランスのとれた健康的で豊かな食生活が可能になっている反面、食生活における栄養バランスが崩れ、多種多様の食品汚染物質や環境汚染物質が人体や生活環境を悪化させるという深刻な問題がある。特に、食物由来の変異原性物質や癌原性物質は人体に対して癌を惹起させる虞のあることから、食物の安全性の面から大きな関心が寄せられている。そのため、癌予防に効果のある食品（あるいは食成分）や微生物を日常的に摂取することは、癌予防や初期段階の癌の病状を改善させるうえで有効な手段と考えられている¹⁾。その中であって、我が国では発酵乳や乳酸菌飲料を積極的に求める傾向が強まり、またメーカー側も新しいタイプの製品を次々と市販している。それらの製品の中には、特定保健用食品の認可を受けた製品も数多く含まれるようになり、高い保健機能をもつ発酵乳や乳酸菌飲料の開

* E-mail : ahosono@gipmc.shinshu-u.ac.jp

受付：2002年6月10日 受理：2002年6月10日

日本環境変異原学会

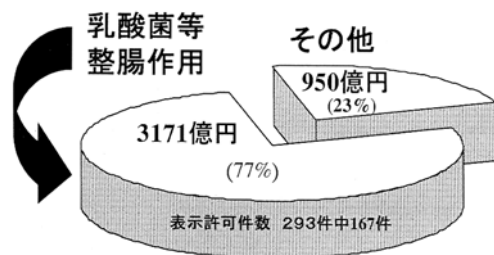


Fig. 1 平成13年度特定保健用食品の市場規模

発がますます盛んになってきている。(財)日本健康・栄養食品協会の調べによると、厚生労働省が平成13年度までに認可した293品目の特定保健用食品のうち乳酸菌関連のものが167品目で、特定保健用食品の売り上げ市場規模4121億円の77%を占めている²⁾ (Fig. 1)。

本稿では乳酸菌を用いた発酵乳の抗変異原性に関する最近の研究の動向を紹介し、乳酸菌がヒト健康に果たす役割について解説するものである。

1. 発酵乳の歴史

発酵乳についての記載は古い時代の伝記や聖書の中に見い出すことができる³⁾。ローマ皇帝 Elogabalum (A.D. 218～222) の伝記には二種類の発酵乳，“Opus lactorum”と“Oxygala”の製造が記されている。また、旧約聖書には三人の天使に凝乳でもてなしたアブラハムの善行が記されている（創世記18・1—10）。メソポタミア文明を生み出したシュメール人がB.C. 3000年頃に刻んだ石刻には搾乳、土器による集乳、牛乳の濾過とバター製造などの様子が描かれている（Fig. 2）。この地方では紀元前7,500年から5,500年位の間に農耕牧畜を基盤とする社会が生まれ、やがてメソポタミア文明を開花させた都市国家へと発展するのである。都市が形成されるにつれ、民族間の交流が盛んになり、それに伴って乳利用の様式や乳加工の技術が磨かれ、再びその技術が各地へ伝播されて今日各地に伝わるさまざまな乳製品がつくり出されていったが、やはりその中心をなすものが発酵乳（酸乳、凝乳）である⁴⁾。搾乳された生乳に細菌等が混入し、自然発酵によって酸乳や凝乳ができ上がったのが発酵乳の誕生であると推測しても誤りはないと思われる。酸乳や凝乳についての古い時代の記録が世界各地に分布しており、ウシやヒツジが飼育されていた所には酸乳が存在していたことがわかる。すなわち、発酵クリームはメソポタミアで紀元前1300年頃に、ロシアのクレーミスは紀元前4世紀にそれぞれ存在していたことが知られている⁵⁾。さらに、トルコのヨーグルトは8世紀、インドのバターミルクはB.C. 800～300年、ダヒはB.C. 800～300年、アイランは13世紀、ロシアのケーランは15世紀、ハンガリーのターホは14世紀にそれぞれすでに実在していたことが判明している⁵⁾。また、大和朝廷



Fig. 2 シュメール人の描いた石刻

に雅やかな華を添えた酥や醍醐は釈尊（B.C. 566～486）が入滅（涅槃）の前一昼夜の間に説かれたとして知られている大般若涅槃經に記されている⁶⁾。その中で醍醐は酥からつくられる滋養豊富な乳製品であり、これを服用すると衆病皆除の効ありと説明されている。発酵乳のこのような広範囲にわたる伝播の軌跡を辿ると、シルクロードが一大舞台になったことは事実である。シルクロードを経由して発酵乳中心の乳加工技術は中央アジアおよび内陸の遊牧生活を営む民族、例えば、コザック、キルギス、アルタイ、ヤクートといったトルコ民族、ブラジュス、カルムイク、ツビン、タタールといったモンゴル民族、それにアゼルバイジャン、タジクといった民族によって西アジアからモンゴル、インド、チベット方面へと伝播されていったものと考えられる⁷⁾。「東方見聞録」で有名なマルコポーロ（1254～1324年）もこのシルクロードを通り、その旅行記にダッタン人（モンゴル人）が酸乳飲用の習慣を有していることを伝えている⁸⁾。このように世界の各地に定着した発酵乳はそれぞれの地域の生活様式を表象しつつ長い歴史の流れの中に受け継がれて今日に至っている。その過程で消滅してしまった発酵乳がある反面、全世界に広まっていった発酵乳もいくつかある。その代表的なものがヨーグルトである。20世紀の初頭、メチニコフ（1845～1916）はブルガリア地方を旅し、ブルガリア菌と呼ばれる桿菌がヨーグルトの主叢をなすことを明らかにした⁹⁾。メチニコフはブルガリア人がブルガリア菌を多量に含有するヨーグルト（トラキア語でヨグは「固い」、ルトは「乳」を意味する）を常食しており、このことがこの地方の人達の長寿を保つ秘訣になっていると考えた。つまり、ヨーグルトに含有されるブルガリア菌を生菌の状態でも多量に摂取すると大腸で腐敗菌が抑制されて早期の老衰と短命を防止させるとするものである。この説はヨーグルトの価値を過大評価したものではあったが、ヨーグルトが当時のヨーロッパに広がるきっかけをつくった。メチニコフが出合ったヨーグルトと今日我々が口にしているヨーグルトの構成菌叢を比較することは当然できないにしても、メチニコフによる不老長寿説の提唱はヨーグルトの栄養・生理学的効用についての多彩な研究を促すきっかけにもなった。そして、世界中に販売されているヨーグルトの栄養・生理的効果を巡って本格的な科学的検証がなされ、優れた栄養効果に加えて整腸作用、抗コレステロール効果、抗変異原効果、抗腫瘍効果、降圧効果、抗鬱効果などの生理効果が次々と実証されつつあり、新たな展開を

Table 1 乳酸菌の一般的特性

グラム陽性
桿菌または球菌
カララーゼ陰性
運動性なし
嫌気性
内性胞子をつくらない
ブドウ糖から50%以上乳酸をつくる
従属栄養性

みせている^{10~18)}。

2. 乳酸菌の定義

乳酸菌とは、炭水化物（ブドウ糖、乳糖、蔗糖など）を発酵し、エネルギーを得て生育する一群の細菌類の総称である。明確な定義がなされているわけではないが、乳酸菌には形状から桿菌と球菌があり、乳酸桿菌として *Lactobacillus* 属、乳酸球菌として *Streptococcus* 属、*Lactococcus* 属、*Leuconostoc* 属などがあり、通称ビフィズス菌といわれる *Bifidobacterium* 属を含むこともある。*Streptococcus* 属の中には病原性のある乳酸菌も存在するが、一般にはそれらの菌種は乳酸菌という通称名で呼ばれることはない。乳酸菌の一般概念の中で、通常乳酸菌と呼ばれる細菌群は共通して Table 1 に示す特性を有している¹⁸⁾。

乳酸菌は乳酸を主要な酸として生成することから、乳酸菌のブドウ糖代謝、つまり乳酸発酵は特筆すべき事項である。乳酸菌の行う発酵は、その発酵様式からホモ乳酸発酵とヘテロ乳酸発酵とに大別される¹⁸⁾。ホモ乳酸発酵を行う乳酸菌をホモ発酵型乳酸菌といい、ブドウ糖からはほぼ100%に近い収量で乳酸が生成される。一方、ヘテロ乳酸発酵を行う乳酸菌をヘテロ発酵型乳酸菌といい、ブドウ糖から乳酸とエタノールおよび炭酸ガスを発生する。乳酸菌の仲間に入れられるビフィズス菌は上記のヘテロ発酵とは異なり、1モルのブドウ糖から1モルの乳酸と1.5モルの酢酸を生成する。

なお、仮性乳酸発酵することで知られる大腸菌はグルコースから乳酸、酢酸、エタノール、炭酸ガスそれに水素を生成する。

乳酸菌が生成する乳酸には L (+) 乳酸、D (-) 乳酸それにそれらの混合物（ラセミ体）があり、乳酸菌の種類によって生成される乳酸のタイプが異なる¹⁹⁾。Table 2 には主な乳酸菌が生成する乳酸のタイプを示した。乳酸菌の中には特殊な耐塩性や耐アルコール性をもつものが知られている。

3. Ames 株のストレプトマイシン依存性株

変異原性物質を検出するための種々の方法がここ30年間に開発されてきたが、大量の試料について変異原性を調べなくてはならない場合、微生物の変異を指標にするのがもっとも便利であり、その目的で広く用いられて

Table 2 発酵乳・乳酸菌飲料中にふくまれる L (+), D (-) 乳酸

製品の種類	総乳酸含量 (g/l)	乳酸の異性体 (%)	
		L (+)	D (-)
酸乳およびバターミルク	9	95-98	15->30
ヨーグルト 欧州	8->10	<70-85	
(プレーン) 日本	8-10	82-98	
乳酸菌飲料	5-6	30-98	
ケフィア	7-8	95-98	

いるのが Ames 株である。Ames 株はカリフォルニア大学の B. N. Ames ら²⁰⁾ によってつくられ、よく知られた株として *Salmonella typhimurium* TA1537, TA1538, TA100, TA98, TA97 などがある。とりわけ、TA1537 からつくり出された TA100 と、TA1538 からつくり出された TA98 が今日もっとも広く用いられている。しかし、TA100 と TA98 はヒスチジン要求性からヒスチジン非要求性への転換を指標にしていることから、ヒスチジンを含む試料に対しては操作が煩雑になる欠点を有している²¹⁾。この欠点を改善するために、Kada ら²²⁾ は TA100 および TA98 にストレプトマイシン依存性 (SMd) から非依存性 (SMind) への変異を指標に、試料の変異原性を判定し得る株を造成している。また、筆者ら²³⁾ は TA98 と TA100 からストレプトマイシン依存性株の造成を試み、それぞれの株から目的株 (SD510 と SD4) を得るのに成功した。SD510 株は食品由来の物質の変異原性試験に対してきわめて有用な指標菌であり、利用範囲の広いことが特筆される。また、SD510 株はネコやイヌの糞の温水抽出液のもつ変異原性²⁴⁾ や、硝酸ナトリウムと *m*-フェニレンジアミンとの反応により生成するレゾルシノール²⁵⁾ などを検出することも可能である。なお、動物糞の変異原性試験には *Escherichia coli* E/r WP2 trp- や *E. coli* B/r WR2 trp-hcr- の使用も可能であることを筆者らは認めているが²⁶⁾、実験操作としては SD510 株を用いたときのほうが遥かに簡便であるように思われる。

また、SD510 株は各種スパイス^{27~31)}、脂質加熱物³²⁾ それにタンパク質加熱物^{33,34)} の変異原性試験にはきわめて有用であり、検出スペクトルがかなり広い株であると判断される。さらに、アミノ酸の加熱分解物である Trp-P1, Trp-P2, Glu-P1 などによって SD510 株は敏感な復帰変異を起こすため、加熱タンパク質に対する変異原性試験に有用である。とりわけ、Trp-P1 を変異原性物質として用いた場合、SD510 株は S-9 mix の非存在下で抗変異原性試験ができることも操作の簡便化につながっている³⁵⁾。

なお、筆者³⁶⁾ らはタマネギ種子を用い、根長と染色体の増加、減少さらには染色体の転座、欠失、切断等の異常から変異原性を知る方法も確立したが、感度の点では SD510 株を用いた変異原性試験法が優れている。

Table 3 N-ニトロソジメチルアミン (NDMA), N-ニトロソピロリジン (NPYR) ならびにN-ニトロソピペリジン (NPIP) の変異原性に対する乳酸菌の減弱効果

	復帰変異コロニー／プレート		
	NDMA ^a	NPYR ^a	NPIP ^a
コントロール	1029	1041	1100
+ <i>Leu. paramesenteroides</i> R-62			
3mg	396 (61.52) ^b	1035 (0.58) ^b	1042 (5.27) ^b
5mg	263 (74.44)	1024 (1.63)	1000 (9.09)
7mg	215 (79.11)	1025 (1.54)	1000 (9.09)
+ <i>Leu. paramesenteroides</i> R-8			
3mg	375 (63.56)	1015 (2.50)	1046 (4.91)
5mg	298 (71.04)	962 (7.59)	1020 (7.27)
7mg	279 (72.89)	940 (9.70)	1023 (7.00)
+ <i>St. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> R-63			
3mg	659 (35.96)	1043 (-)	1013 (7.91)
5mg	419 (59.28)	984 (5.48)	989 (10.09)
7mg	295 (71.33)	985 (5.38)	991 (9.91)
+ <i>St. cremoris</i> R-48			
3mg	567 (44.90)	960 (7.78)	968 (12.00)
5mg	309 (69.97)	938 (9.89)	964 (12.36)
7mg	286 (72.21)	946 (9.13)	966 (12.18)

^a NDMA, NPYR, NPIP の量はそれぞれ 60, 50, 50

^b 括弧内数値は減弱率 (%)

4. 発酵乳の抗変異原性

Table 4 *Lactobacillus acidophilus* LA2を用いて製造した発酵乳をヒトに投与したときの大便の変異原性の変化⁵⁹⁾

被験者	復帰変位コロニー数 ¹				減少率(%)
	摂取前		摂取後		
	No./100g				
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	
1	140	13	36	3	74.3
2	345	12	50	4	85.5
3	203	12	19	2	90.6
4	99	11	55	3	44.4
5	59	7	45	3	23.7
6	62	7	50	3	19.4
$\bar{X}$	151.3		42.5**		71.9
SEM	100.2		12.5		

** 摂取前に対する摂取後の有意差 ($p < 0.01$)

¹ 発酵乳 100g を日に 3 回, 7 日間にわたり投与

Table 5 カゼインならびにアルブミンの抗変異原性⁴⁸⁾

試料	復帰変異コロニー数/プレート
コントロール (H ₂ O + コショウ)	2012
全カゼイン	844
α S1-カゼイン	1085
β -カゼイン	609
κ -カゼイン	1741
卵アルブミン	495
ウシ血清アルブミン	760

食品 (およびその成分) 中には変異原性物質や発癌物質に対してそれらの毒性を軽減させるものが多々見い出されている。変異原性物質を減弱させる物質 (抗変異原性物質) は通常次の二つに分けられる³⁷⁾。その一つは変異原性物質に直接作用し, その変異原性を減弱または不活化させる作用をもった変異原不活化因子 (desmutagen) であり, もう一つは細胞に作用して細胞の突然変異誘発を著しく低下させる作用をもった抗突然変異因子 (antimutagen) である。

ところで, 発酵乳の栄養生理的効用について多くの機能が知られており, 筆者らは主として抗変異原性効果を中心にした関連論文をこれまでに紹介してきた^{38~43)}。

具体的には, 各種乳酸菌を用いて調製した発酵乳が変異原性をもつ 4NQO や AF2^{44, 45)}, 各種アミノ酸加熱分解物^{46, 47)}, 各種スパイスエキス⁴⁸⁾, N-ニトロソ化合物^{49, 50)}, アフラトキシン⁵¹⁾, 加熱醤油^{52, 53)} 等に対し, 抗変異原性のあることを SD510 株や *E. coli* B/r WR2 trp-hcr-を指標菌に用いて明らかにしてきた。Table 3 はインドネシアのスマトラ地方に伝わる発酵乳, ダデイヒから分離した *Leuconostoc paramesenteroides* R-62 および R-8, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* R-62, *Lc. cremoris* R-4⁵⁴⁾ を用いて調製した発酵乳による N-ニトロソピロリジン (NPYR), N-ニトロソジメチルアミン (NDMA), ニトロソピペリジン (NPIP) に対する抗変異原性を調べ, カッコ内に抑制率 (%) を示した⁵⁰⁾。Table 3 から明らかなように, いずれの菌株を用いて調製した発酵乳においても NDMA, NPYR, NPIP に対する抑制率の高

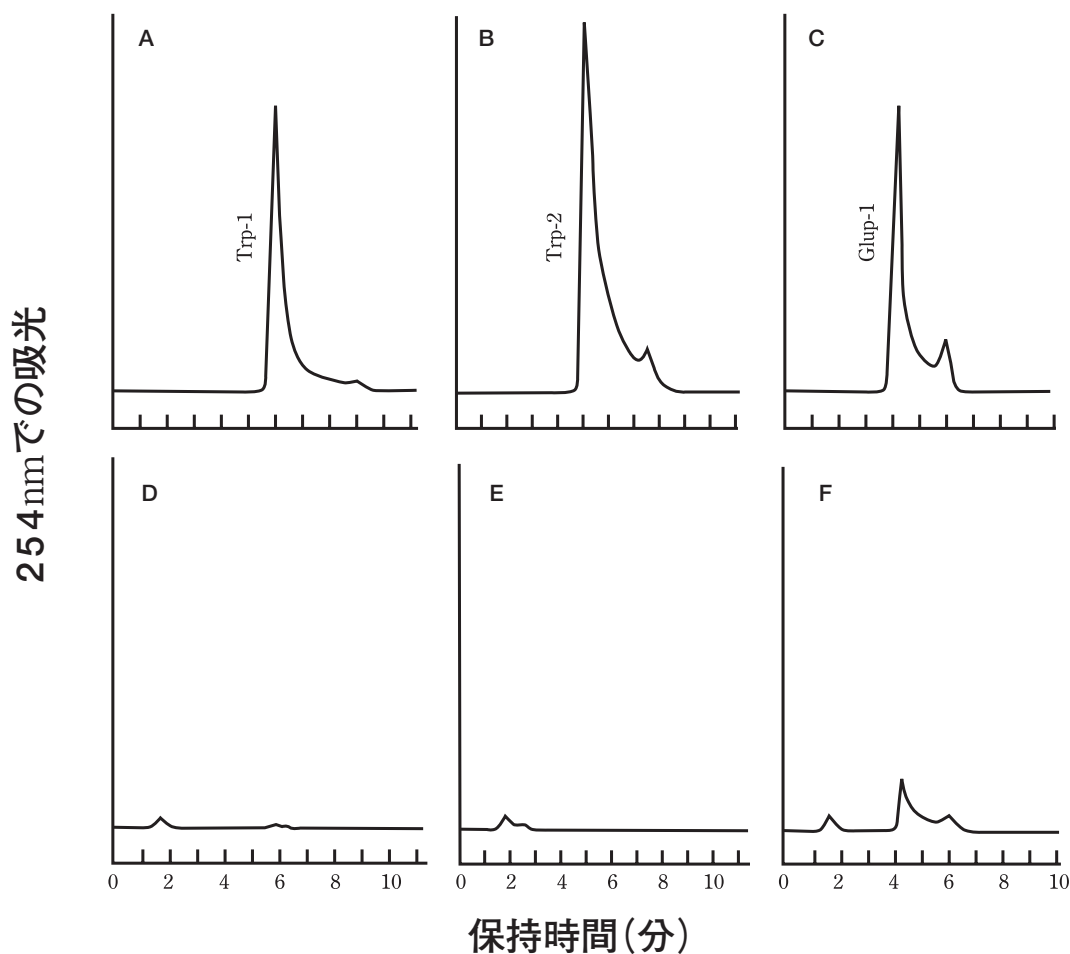


Fig. 3 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 菌体による Trp-P1 の結合⁶⁷⁾

いことが認められたが、とりわけ NDMA に対する抑制率が高い値を示した。この実験と併行して、筆者ら^{55~57)}は世界各地に伝わる種々の発酵乳より乳酸菌を分離し、それら分離菌株を用いて発酵乳を調製した後、SD510 株を指標菌に用いて種々の変異原性物質に対する抗変異原性を調べた。その結果、いずれの供試菌株を用いて調製した発酵乳にも強い抗変異原性のあることが認められた。

一方、発酵乳（乳酸菌）が *in vitro* のみならず *in vivo* でも抗変異原性を発揮していることの確認はきわめて重要と思われる。筆者ら⁵⁸⁾はまず、ラット（Wister 系雄、8 週齢）に Trp-P1 投与（一匹当たり 2mg）とともに、ダデイヒから分離した *Lb. casei* susp. *casei* R-52 菌体を市販飼料に添加（1%ないし 9%）して与え、投開始後 4 日目の糞と尿中の Trp-P1 の量を調べた。その結果、Trp-P1 投与後の糞便中の Trp-P1 の累積値は、コントロール群、1%乳酸菌添加群、9%乳酸菌群ともに 24 時間以内にほとんどが排泄され、24 時間および 48 時間の間ではわずかな量しか排泄されないことが確認された。一方、尿中の Trp-P1 の累積値では 9%乳酸菌添加によって Trp-P1 の排泄量が有意（ $p < 0.05$ ）に増加することも

同時に確認された。さらに、筆者ら⁵⁹⁾はヒト糞便から分離した *Lb. acidophilus* LA-2 を用いてつくった発酵乳（ 2.5×10^8 cfu/g）を健康な成人男子（平均年齢 32.6 歳）に 1 日 100g 摂取させ（その他の食事と水分の摂取は自由）、摂取後 5~7 時間に採取した糞便全量を用いて、発酵乳を摂取しなかったグループの糞便の示す変異原性と比較した。Table 4 に結果を示したとおり、発酵乳摂取によって糞便の示す個人差はあるものの変異原性は有意（ $p < 0.05$ ）に減少し、ヒトによっては 90%以上も減少していることが認められた。

一方、発酵乳の他にチーズにおいても抗変異原性のあることが一部のチーズで認められている^{60, 61)}。その結果、反応溶液へのチーズ試料の添加量により抗変異原性に違いがあるものの、熟成日数の経過に伴い抗変異原性が増加することが認められた。

抗変異原性の発現には乳酸菌の菌体と牛乳成分、特に乳タンパク質成分、またはその分解物に依存していることはいうまでもないが、乳酸菌菌体による抗変異原性の発現は生菌においてはスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）活性^{61, 62)}とも密接な関係がある反面、死菌においては後述するように変異原性物質の吸着の関与が考え

Table 6 *Lactobacillus gasseri* の菌体に対するアミノ酸加熱分解物（混合物）の結合⁷⁵⁾

	初発濃度 μg (IQ + Trp-P1 + Trp-P2)	IQ μg	Trp-P1 μg	Trp-P2 μg	(IQ + Trp-P1 + Trp-P2) μg
SBT0274	600	53.98 $\pm$ 20.19	119.57 $\pm$ 10.33	86.87 $\pm$ 9.24	260.42 $\pm$ 39.71
SBT1703	600	62.39 $\pm$ 28.73	132.87 $\pm$ 4.79	104.98 $\pm$ 2.89	300.24 $\pm$ 36.34
SBT10239	600	63.92 $\pm$ 13.25	141.24 $\pm$ 6.43	110.39 $\pm$ 8.61	315.55 $\pm$ 18.23
SBT10241	600	65.21 $\pm$ 16.83	137.11 $\pm$ 5.07	108.04 $\pm$ 6.54	310.36 $\pm$ 28.27

Glu-P1, Trp-P1, Trp-P2 をそれぞれ200を調製し、これに2mgの凍結乾燥菌体を加え、全量を1mlにして37℃で30分間インキュベーションした

Table 7 48時間培養の*Lactobacillus gasseri* 菌体のコレステロールとの結合⁸¹⁾

菌 株	結合率 (%) ¹
SBT10241	86.5 a
SBT10240	77.0 ab
SBT0278	74.3 abc
SBT0291	73.0 abc
SBT2055	67.6 abc
SBT10238	66.2 abcd
SBT1753	65.2 abcd
SBT0273	63.5 abcd
SBT10239	60.9 abcdef
SBT0311	59.5 abcdef
SBT0274	57.6 abcdef
SBT0270	56.8 abcdef
SBT0312	54.1 abcdef
SBT2056	52.7 abcdef
SBT0276	47.3 bcdefg
SBT0293	46.0 bcdefg
SBT1702	45.5 bcdefg
SBT0292	45.5 bcdefg
SBT0315	44.6 bcdefg
SBT0290	43.2 cdef
SBT0267	41.9 cdefgh
SBT2059	40.9 cdefgh
SBT2061	33.8 efg
SBT0299	32.4 fg
SBT0257	29.7 gh
SBT1703	28.8 gh
SBT2054	28.8 gh
SBT0317	6.0 h

a, b, c, d, e, f, g, h 異文字間で有意差あり ($p < 0.05$)

¹ 60%エタノール (100 mg/ml) に溶解したコレステロールを菌体10mgと結合

られる。また、乳タンパク質成分またはその分解物による抗変異原性の発現は用いる変異原性物質との関連性も大きい。筆者ら⁴⁸⁾はコショウのアルコール抽出液を試料にして牛乳タンパク質より、全カゼイン、 α s1-カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼインを調製し、これらタンパク質の抗変異原性を調べた。その結果、Table 5に示すように、全カゼインと β -カゼインに強い抗変異原性があることが認められた。 β -カゼインが強い抗変異原性を示すことの理由については不明な部分があるが、 β -カゼイン

はBigelowの平均残基疎水性が1330⁶⁴⁾と、タンパク質の中でもっとも高い値をもつことを考慮すると、 β -カゼインの疎水性が抗変異原性の発現に密接に関係しているのではないかと推測される。

5. 乳酸菌菌体による変異原性物質の結合

筆者ら^{65, 66)}は*Streptococcus faecalis* IFO 12965の細胞壁とアミノ酸加熱分解物であるTrp-P1, Trp-P2, Glu-P1とを混ぜた後、その上澄液中のTrp-P1, Trp-P2, Glu-P1の濃度が極端に減少する事実を認めた。この顕著な減少を詳細に検討することによって次のことが明らかになってきた。(1) 多くの細菌の細胞壁が変異原性物質（発癌性物質も含む）と結合する性質を有しているが、とりわけ乳酸菌の細胞壁にこの性質が顕著に見い出され、かつ結合能も他種細菌に比べて高い。(2) 細胞壁画分のうち、ペプチドグリカンにその性質がみられる。(3) 乳酸菌の死菌体でもその能力を有しており、生菌と死菌との間の結合能に有意な差が認められない。(4) 結合は瞬間的に起こり、かつ安定な結合を保つ。(5) 結合に際し、SDS (Sodium dodecyl sulfate) との拮抗性が認められる、などである。

筆者ら⁶⁷⁾はモンゴル地方に伝わるケフィアから分離した*Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *St. faecalis*, *Lacto-bacillus plantarum*, *Lb. brevis* それに*Leuconostoc dextranicum*の死菌体のTrp-P1, Trp-P2, Glu-P1に対する結合性を調べた結果、分離株のほとんどがTrp-P1, Trp-P2, Glu-P1に対して結合能力を有し、とりわけTrp-P1とTrp-P2に対する結合能力がきわめて高かったことを認めた。同様の結果が中国原産発酵乳、ナイゲダから分離した*Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *St. faecalis*, *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis*などの乳酸菌⁶⁸⁾、それに種々の発酵乳から分離した乳酸球菌^{69, 70)}や乳酸桿菌⁷¹⁾にも認められた。ちなみに、乳酸菌の菌体がTrp-P1, Trp-P2, Glu-P1に対して結合性を有していることを示す一例として*Lc. lactis* subsp. *lactis* T80の場合⁶⁷⁾について説明したい。Fig. 3は上記3種類のアミノ酸加熱分解物をT80株の死菌体と混ぜ、37℃で15分間放置した後、上澄液をHPLCにかけてTrp-P1, Trp-P2およびGlu-P1の上澄液中の残量を示したものである。Fig. 3から明らかなように、

上澄液中の各アミノ酸加熱分解物がほとんど、または全く検出されず、加えたアミノ酸加熱分解物が乳酸菌の細胞壁に吸着されてしまったことが理解される。

一方、アミノ酸加熱分解物として Trp-P1 を用いた場合、SDS の濃度を上げていくと、濃度依存的に TRP-P1 の菌体への結合が著しく阻止されることが認められた^{72, 73)}。このことは結合様式が疎水結合であることの可能性を強く示唆している。

筆者ら⁷⁴⁾ は 28 株の *Lb. gasseri* と 2 株の *Bifidobacterium longum* のアミノ酸加熱分解物に対する抗変異原性について調べ、2 株のビヒズス菌も *Lb. gasseri* に匹敵して高い抗変異原性を有していることを認められている。かつ、いずれの株の菌体も RNase ならびに DNase で精製処理することにより、Trp-P1 に対する結合性が際立って高くなることも認められた。さらに、*Lb. gasseri* SBT10293 菌体に Trp-P1、Trp-P2、Glu-P1、IQ、MeIQ を複合的に組み合わせて結合試験を行うと、Trp-P1 と他のアミノ酸加熱分解物とを組み合わせた場合にもっとも高い結合が起こることが確認された⁷⁵⁾ (Table 6)。同時に、*Lb. gasseri* 菌体と上記のヘテロサイクリックアミンとの結合において細胞壁を構成するタンパク質を含まない多糖体が関係していることも明らかになった⁷⁶⁾。

乳酸菌の菌体は死菌体であっても、生菌体と同様にアミノ酸加熱分解物のみならず N-ニトロソ化合物^{77, 78)} やアフラトキシン^{69, 79)} などの発癌物質とも結合する性質を有していることを述べてきた。近年、それら物質だけではなく、Table 7 に示すように、コレステロール^{80~83)} にも結合性を有していることが明らかになり、今後における乳酸菌の更なる有効利用が期待される。

おわりに

健康に対する国民の関心の高まりを反映して発酵乳の消費量は年ごとに増加の傾向をたどっている。それに呼応して発酵乳の製造における乳酸菌やビヒズス菌の菌数を高く維持させるための技術も向上した。高菌数を可能にさせた理由の一つに優れたプロバイオティックスの開発があげられる。例えば、ビヒズス菌に対し優れた増殖促進効果を発揮するフラクトオリゴ糖 (FOS) はその代表的なものである。プロバイオティックスは腸管内で分解されたり、吸着されたりしないことが重要であり、プロバイオティックスの増殖を促して、間接的に宿主に対する保健機構に寄与するものである。

今日、シンバイオティックス (synbiotics) という用語も盛んに用いられるようになった。シンバイオティックスとはプロバイオティックス (prebiotics) とプロバイオティックス (probiotics) を一体化させながらプロバイオティックスの機能を十分に発揮させようとするものであり、この考えのもとに乳児や老人に対し優れた効果を発揮したとする報告がなされている。今後、プロバ

イオティックスのヒト健康に対する機能性を高めるうえでシンバイオティックスの考え方がますます重要になってくるものと思われる。

乳酸菌は古来人類が発酵食品を通じて体内に入れてきた細菌群であり、経験的にみて安全性の高いことが保証されていることから、“GRAS (Generally Recognized As Safe) Bacteria” と呼ばれており、また保健上重要なプロバイオティックス^{84, 85)} の筆頭にあげられている細菌群である。発酵乳はそうした乳酸菌で発酵させてつくられることから、発酵乳のもつ機能性への追及は今日では学術上のみならず産業界においても大きな期待が寄せられている。

引用文献

- 1) 光岡知足 (2002) プロバイオティックスとプレバイオティックス、その意義と歴史的背景、ヘルシスト、25, 2-5.
- 2) 酪農乳業速報 (2002) トクホの市場規模、01 年度は 4121 億円、日刊酪農乳業速報、No. 7758, 1.
- 3) 細野明義 (1988) 東洋における発酵乳類、「発酵乳類の機能」(中沢勇二、細野明義編)、食品資材研究会、東京、pp. 309-320.
- 4) Rasic, J. L. and J. A. Kurmann (1980) 「ヨーグルト」(曾根敏磨監訳)、実業図書、東京、pp. 1-10.
- 5) 中尾佐助 (1970) 乳の加工、「料理の起源」(中尾佐助著) NHK ブックス、日本放送協会、東京、pp. 149-198.
- 6) 廣野 卓 (1995) 『魏志』倭人伝の世界、「古代日本のミルクロード」(廣野 卓著)、中公新書、中央公論社、東京、pp. 2-26.
- 7) 錫田文三郎 (1977) チーズ事始め、「チーズのきた道」(錫田文三郎著)、河出書房新社、東京、pp. 13-37.
- 8) 釣谷尚正 (1986) ヨーグルトの歴史、食の科学、96, 55-60.
- 9) Kosikowski, F. V. and V. V. Mistry (1997) Chapter 4 Fermented Milks, “Cheese and Fermented Milk Foods”, Vol. 1, (By Kosikowski, F. V. and V. V. Mistry), F. V. Kosikowski, L. L. C., Westport, pp. 57-74.
- 10) 細野明義 (1994) 発酵乳の歴史と種類、Health Digest, 9, 1-8.
- 11) 細野明義 (2000) 乳酸菌の機能と利用、乳技協資料、50, 92-116.
- 12) Klaenhammer, T. R. (1995) Genetics of intestinal *Lactobacilli*, Int. Dairy J., 5, 1019-1058.
- 13) Meer, R. V., I. M. J. Bovee-Oudenhoven, A. L. A. Sesink and J. H. Kleibeuker (1998) Milk products and intestinal health, Int. Dairy J., 8, 163-170.
- 14) 森地敏樹 (1997) 乳酸菌の特性と利用：最近の研究動向、ミルクサイエンス、46, 1-20.
- 15) Kailasapathy, K. and S. Rybka, (1997) *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.- their therapeutic potential and survival in yogurt. J. Dairy Tech., 52, 28-35.
- 16) Buttriss, J. (1997) Nutritional properties of fermented milk products. Int. J. Dairy Tech., 50, 21-27.
- 17) Naidu, A. S., W. R. Bidlack and R. A. Clemens (1999) Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Critical Rev. Food Sci. & Nutri., 38, 123-126.
- 18) 戸羽隆宏 (2000) 微生物の代謝、「畜産食品微生物学」(細野明義編)、朝倉書店、東京、pp. 50-69.
- 19) Sarra, P. G., L. Morelli and V. Bottazzi (1992) “1. Lactic microflora of fowl, “The Lactic Acid Bacteria” Vol. 1, (Ed. By Wood B. J. B), Elsevier Applied Science, London/New York, pp. 3-20.
- 20) Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for

- detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31, 347-364.
- 21) Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, 177-215.
 - 22) Kada, T., K. Aoki and T. Sugimura (1983) Isolation of Streptomycin-dependent strains from *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA100 and their use in mutagenicity tests. *Environ. Mutagenesis*, 5, 9-15.
 - 23) Hosono, A., E. Omote, Y., Izawa, F. Tokita and T. Kada, (1986) Isolation of spontaneous induced-streptomycin dependent mutants of *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains and desmutagenicity tests in vitro of cultured milk. *Lebensm. Wiss. und Technol.*, 19, 161-163.
 - 24) Hosono, A., A. Yoshimura and H. Otani (1987) Antimutagenic activity of cellular components of *Streptococcus faecalis* IFO 12965 Netherlands Milk and Dairy J., 41, 239-245.
 - 25) Hosono, A., K. Makino and H. Otani (1991) Mutagenicity of resorcinol formed by the reaction of *m*-phenylenediamine with sodium nitrite. *J. Agri. Food Chem.*, 39, 1817-1819.
 - 26) Hosono, A., S. Sagae and F. Tokita (1985) Mutagenicities of fecal extracts of various mammals. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 56, 274-278.
 - 27) Damhoeri, A., A. Hosono, T. Itoh and A. Matsuyama (1981) Mutagenicity assay of some spices using bacterial mutants. *Proceedings of the IPB-JICA, International Symposium of Agricultural Products, Processing and Technology* (Ed. by S. Fardias, A. Matsuyama and K. Abdulla) (Bogor), pp. 137-151.
 - 28) Damhoeri, A., A. Hosono, T. Itoh and A. Matsuyama (1985) *In vitro* mutagenicity tests on capsicum pepper, shallot and nutmeg oleoresins. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1519-1520.
 - 29) Hosono, A., H. Suzuki and H. Otani (1987) Mutagenicities of selected spices and desmutagenic compound in regard to spice-induced mutagenicity. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 58, 413-420.
 - 30) Shashikanth, K. N. and A. Hosono (1986) *In vitro* mutagenicity of tropical spices to streptomycin dependent strains of *Salmonella typhimurium* TA98. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2947-2948.
 - 31) Shashikanth, K. N. and A. Hosono (1987) Screening of streptomycin dependent strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* for in vitro detection of spice induced mutagenicity. *Lebensmit. Wiss. und Technol.*, 20, 91-94.
 - 32) Watanabe, K., R. Nakamura and A. Hosono (1988) Mutagenic activity of heat-induced cholesterol-degradation products. *J. Food Sci.*, 53, 1913-1914.
 - 33) Hosono, A., H. Suzuki and H. Otani (1987) Induction of mutagenicity in dry cured pork by heat treatment. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 58, 886-892.
 - 34) 山田正子・中沢勇二・細野明義 (1992) 「蘇」様牛乳加熱濃縮物の変異原性, 酪科食研, 41, A127-131.
 - 35) Hosono, A., Usman and R. Ohba (1997) Inhibitory activity of Maillard reaction products against Trp-P1 induced mutagenicity of the *Salmonella typhimurium* TA98 streptomycin-dependent strain assayed in the absence of S-9 mix. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 424-426.
 - 36) 細野明義・岡本美和子・大谷 元 (1990) タマネギ (*Allium cepa* L) 種子の発根を指標にした変異原性試験, 酪科食研, 39, 39-45.
 - 37) Clarke, C. H. and D. M. Shankel (1975) Antimutagenesis in microbial systems, *Bacteriol. Rev.*, 39, 33-53.
 - 38) Hosono, A., H. Kitazawa and T. Yamaguchi (1997) Antimutagenic and antitumour activities of lactic acid bacteria. "Probiotics 2" (Ed. by Fuller, R.), Chapman & Hall, London, New York, pp. 89-132.
 - 39) 細野明義 (1994) 機能性食品としての発酵乳, *Health Digest*, 9 (3), 1-8.
 - 40) 細野明義 (1990) カルシウムの供給源としての牛乳の機能 *New Food Industry*, 32 (8), 1-12, 32 (10), 58-64.
 - 41) 細野明義 (1988) N-ニトロソ化合物排除に対する乳酸菌の腸管での意義, 乳技協資料, 38 (3), 1-17.
 - 42) 細野明義 (1987) 発酵乳の抗変異原性, 乳技協資料, 37 (5), 19-32.
 - 43) 細野明義 (1990) 発酵乳の生理活性, 乳技協資料, 40, 207-224.
 - 44) Hosono, A., T. Kaishana and T. Kada (1986) Antimutagenic properties of lactic acid-cultured milk on chemical and fecal mutagens, *J. Dairy Sci.*, 69, 2237-2242.
 - 45) Hosono, A., S. Sagae and F. Tokita (1986) Desmutagenic effect of cultured milk on chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r WP2 Trp⁺-. *Milchwissenschaft*, 41, 142-145.
 - 46) Hosoda, M., H. Hashimoto, H. Morita, M. Chiba. and A. Hosono (1992) Studies on antimutagenic effect of milk cultured with lactic acid bacteria on the Trp-P2 induced mutagenicity to TA98 strain of *Salmonella typhimurium*, *J. Dairy Res.*, 59, 543-549.
 - 47) Hosono, A., H. Yamazaki and H. Otani (1989) Antimutagenicity of slimy substance separated from the cultures of *Brevibacterium linens*, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 60, 679-685.
 - 48) Hosono, A., K. N. Shashikanth and H. Otani (1988) Antimutagenic activity of whole casein on pepper induced mutagenicity to Streptomycin dependent strain SD510 of *Salmonella typhimurium* TA98, *J. Dairy Res.*, 55, 435-442.
 - 49) Hosoda, M., H. Hashimoto, H. Morita, M. Chiba and A. Hosono (1992) Studies on antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, *J. Dairy Sci.*, 75, 976-981.
 - 50) Hosono, A., R. Wardojo and H. Otani (1990) Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1639-1643.
 - 51) Hosoda, M., H. Hashimoto, F. He, K. Yamazaki and A. Hosono (1997) Inhibitory effect of milk cultured with *Lactobacillus* strains on the aflatoxin mutagenicity, *Animal Sci. Technol.*, 68, 555-562.
 - 52) 前田俊樹・細野明義 (1997) 加熱及び亜硝酸処理した醤油の変異原性の特性付けと, 乳酸菌及び脱脂乳の抗変異原性について, 日畜会報 北陸支部会報, No. 74, 60-64.
 - 53) Surono, I. S. and A. Hosono (1996) Anti-mutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria from Dadih against mutagenic Terasi, *Milchwissenschaft*, 51, 493-497.
 - 54) Hosono, A. and R. Wardojo and H. Otani (1989) Microbial flora in "dadih", a traditional fermented milk in Indonesia, *Lebensm. Wiss. und Technol.*, 22, 20-24.
 - 55) Hosono, A., Y. Izeki, H. Otani and F. Takahashi (1992) Identification of lactic acid bacteria in "Bayaz Peynir", a traditional cheese in Turkey, *Anim. Sci. and Tech.*, 63, 712-714.
 - 56) 橋本英夫・大根田啓二・中村昇二・細野明義 (1998) 高い抗変異原性を有する発酵乳用乳酸菌の選定に関する研究. *ミルクサイエンス*, 47, A-101-110.
 - 57) Thyagaraja, N. and A. Hosono (1993) Antimutagenicity of lactic acid bacteria from "Idly" against food related mutagens, *J. Food Prot.*, 56, 1061-1066.
 - 58) 川瀬 学・細野明義 (1996) ラットのトリプトファン加熱分解物 (Trp-P1 排泄に及ぼす乳酸菌菌体投与の影響). *日畜会報*, 67, 801-804.
 - 59) Hosoda, M., H. Hashimoto, F. He, H. Morita and A. Hosono (1996) Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on fecal mutagenicity and microflo-

- ra in the human intestine, J. Dairy Sci., 79, 745-749.
- 60) Yamada, M. and A. Hosono (1998) Desmutagenicity of commercial cheese against the Trp-P1 induced mutagenicity to Streptomycin-dependent strain SD510 of *Salmonella typhimurium* TA98, Animal Sci. Technol., 69, 359-364.
 - 61) Yamada, M., Y. Nakazawa, F. Tsukasaki and A. Hosono (1997) Antimutagenic activity of Camembert cheese on the Trp-P1 induced mutagenicity to streptomycin-dependent strain SD510 of *Salmonella typhimurium* TA98, Int. Dairy J., 7, 795-798.
 - 62) Hosono, A. and N. Satake (1993) Isolation and characterization of superoxide dismutase from *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* R-48, Anim. Sci. Tech., 64, 599-604.
 - 63) Hosono, A., R. Wardojo and H. Otani (1990) Binding of amino acid pyrolysates by lactic acid bacteria isolated from "dadih", Lebensm. Wiss. und Technol., 23, 149-153.
 - 64) Bigelow, C. C. (1967) On the average hydrophobicity and the relation between it and protein structure, J. Theoret. Biol., 16, 187-211.
 - 65) Hosono, A., A. Yoshimura and H. Otani (1988) Desmutagenic property of cell walls of *Streptococcus faecalis* on the mutagenicities induced by amino acid pyrolysates, Milchwissenschaft, 43, 168-170.
 - 66) Hosono, A., A. Yoshimura and H. Otani (1987) Antimutagenic activity of cellular components of *Streptococcus faecalis* IFO 12965, Netherlands Milk and Dairy J., 41, 239-245.
 - 67) Hosono, A., T. Tanabe and H. Otani (1990) Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolysates, Milchwissenschaft, 45, 647-651.
 - 68) Zhang, X. B., Y. Ohta and A. Hosono (1998) Antimutagenicity and binding of lactic acid bacteria from a Chinese cheese to mutagenic pyrolysates, J. Dairy Sci., 73, 2702-2710.
 - 69) Hosono, A. and S. Hisamatsu (1995) Binding of amino acid pyrolysates and aflatoxins to autoclaved cells of *Enterococcus faecalis* FK-23, Biosci. Biotech. Biochem., 59, 940-942.
 - 70) Kawase, M. and A. Hosono (1995) Binding stability of lactic acid bacterial cells with mutagenic tryptophan pyrolysates, Anim. Sci. Technol., 66, 430-435.
 - 71) Usman and A. Hosono (2001) Hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus gasseri* SBT0270 in rats fed a cholesterol-enriched diet, J. Dairy Res., 68, 617-624.
 - 72) Tanabe, T., K. Suyama and A. Hosono (1994) Effect of sodium dodecylsulphate on the binding of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* T-80 cells with Trp-P1, J. Dairy Res., 61, 311-315.
 - 73) Tanabe, T., K. Suyama and A. Hosono (1994) Effect of pepsin, trypsin or bile acid on the binding of tryptophan pyrolysates by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* T-80, Milchwissenschaft, 49, 438-441.
 - 74) Sreekumar, O. and A. Hosono (1998) Antimutagenicity and the influence of physical factors in binding *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium longum* cells to amino acid pyrolysates, J. Dairy Sci., 81, 1508-1516.
 - 75) Sreekumar, O. and A. Hosono (1998) Amino acid pyrolysates competitive and combination binding with *Lactobacillus gasseri* cells, Milchwissenschaft, 53, 73-76.
 - 76) Sreekumar, O. and A. Hosono (1998) The heterocyclic amin binding receptor of *Lactobacillus gasseri* cells, Mutation Res., 421, 65-72.
 - 77) Hosono, A., Y. Izeki, H. Otani and F. Takahashi (1992) Identification of lactic acid bacteria in "Bayaz Peynir", a traditional cheese in Turkey, Anim. Sci. and Tech. 63, 712-714.
 - 78) Hosono, A., R. Wardojo and H. Otani (1990) Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines, Agric. Biol. Chem., 54, 1639-1643.
 - 79) Thyagaraja, N. and A. Hosono (1993) Antimutagenicity of lactic acid bacteria from "Idly" against food-related mutagens, J. Food Prot., 56, 1061-1066.
 - 80) Hosono, A. and T. Tono-Oka (1995) Binding of cholesterol with lactic acid bacterial cells, Milchwissenschaft, 50, 556-560.
 - 81) Usman and Hosono, A. (1999) Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains, J. Dairy Sci., 82, 243-248.
 - 82) Usman and Hosono, A. (1999) Binding of cholesterol to the cells and peptidoglycan of *Lactobacillus gasseri*, Milchwissenschaft, 54, 495-498.
 - 83) Usman and Hosono, A. (2000) Effect of administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats, J. Dairy Sci., 83, 1705-1711.
 - 84) 光岡知足 (2001) プロバイオティックスとプレバイオティックス, その意義と歴史的背景, ヘルシスト, 25 (5), 2-5.
 - 85) 細野明義 (2001) プロバイオティックスによる生活習慣病の予防, ヘルシスト, 25 (5), 64-68.

発がん抑制性フードファクター：食によるがん予防を目指して

大東 肇*

京都大学農学研究科・食品生物科学専攻 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

Toward the cancer prevention by diet: exploration of promising food factors

Hajime Ohigashi

Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University
Oiwakecho, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Summary

Chemoprevention with food phytochemicals is currently regarded as one of the most promising avenues for cancer control. To search for chemopreventive food phytochemicals (FOOD FACTORS), the authors have hitherto carried out screening studies of dietary plants for their anti-tumor promoting properties. In the extensive screening test using an in vitro method, the Epstein-Barr virus (EBV) activation inhibition test, high potential was found in the plants from Southeast Asian countries. In particular, those in the families Zingiberaceae, Rutaceae, Labiatae, Cruciferae and Umbelliferae were shown to contain potent anti-tumor promoters at high proportion of species. More than 40 EBV activation inhibitors have thus far been identified. Of the inhibitors, 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) and zerumbone (ZER) from zingiberaceous plants and auraptene (AUR) and nobiletin (NOB) from citrus fruits were shown to be promising chemopreventors by a variety of animal model tests; e.g. skin, oral, oesophagus and colon carcinogenesis in mouse or rat. Inhibition of free radical generation including O_2^- and NO as well as the related biological and physiological activities were found to be the most striking biochemical characteristics of these 4 compounds. Thus, the inhibition of free radicals is thought, at least in part, to be one of the effective mechanisms for cancer prevention. An outline of our researches in this area is reviewed.

Keywords : chemoprevention, food factor, 1'-acetoxychavicol acetate, auraptene, zerumbone, nobiletin, superoxide, nitrogenoxide

緒 言

「がん」を克服するための一戦略として予防の重要性が叫ばれている。ヒトがんの多くはいわゆる化学発がんであり、食品成分をも含む環境中の化学因子が重要な鍵を握っている。したがって、この予防には、これら発がん因子の究明とその環境からの駆逐が重要であるが、他方では、発がんに抑制的に働く因子を積極的に取り入れてゆくことも考えられよう。この考え方は「Chemo-prevention」と呼ばれ、近年多様な予防候補成分が明らか

にされつつある。著者らは、ここ 10 余年、「食によるがん予防」を目標に、予防に期待できる食素材や食成分の探索・解析を行ってきた。本稿では、スクリーニング試験から出発し、活性因子の化学的究明、動物試験や作用性解析など、一連の研究のあらましについてまとめてみる。

1. エプスタイン・バーウイルス (EBV) 活性化抑制試験法による植物性食素材のスクリーニング試験

野菜や果物が種々のがん抑制的であることは多くの疫学研究で示されている。このような背景下、これまで、抗酸化性ビタミンやカロテノイド、さらにはフラボノイドなど、植物に普遍的に含まれる成分についての評価が

* E-mail : ohigashi@kais.kyoto-u.ac.jp

受付：2002年6月10日 受理：2002年6月10日

日本環境変異原学会

Table 1 Modify effects of ACA, AUR, NOB and ZER on carcinogeneses in animal model

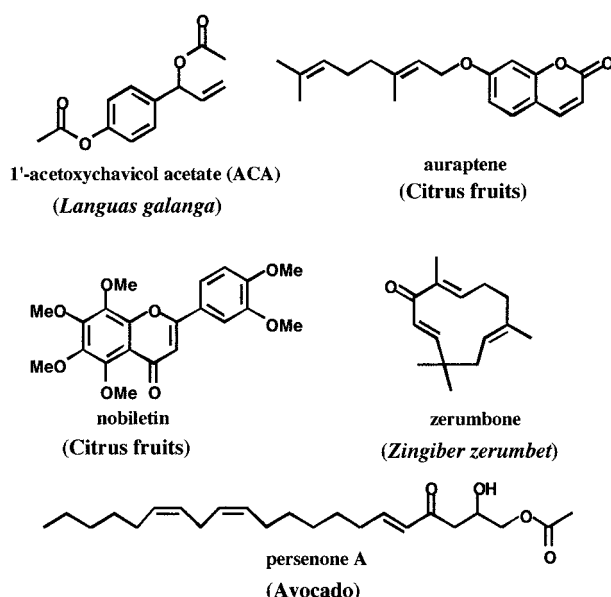
Type of carcinogenesis	Animal	Carcinogen ^a	Effect ^b			
			ACA	AUR	NOB	ZER
Skin	Mouse	DMBA/TPA	↓	↓	↓	↓
Oral-	Rat	4-NQO	↓	↓	NT	NT
Oesophagus	Rat	NMBA	↓	↓	NT	NT
Colon (ACF) *	Rat	AOM	↓	↓	↓	↓
Colon	Rat	AOM	↓	↓	NT	NT
Liver	Rat	CDAA diet	↓	↑**	↓↑**	NT
Cholangiocellular-	Hamster	BOP	↓	NT	NT	NT

^a DMBA/TPA: dimethylbenz[*a*]anthracene/12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, 4-NQO: 4-nitroquinoline 4-oxide, NMBA: *N*-nitrosomethylbenzylamine, AOM: azoxymethane, CDAA diet: choline-deficient (L)-amino acid defined diet, BOP: *N*-nitrosobis (2-oxopropyl)-amine

^b ↓: suppression, ↑: enhancement, ↓↑: no effect, NT: not tested

* short term method for colon cancer by detection of aberrant crypt foci formation

** unpublished data

**Fig. 1** Chemical structures of highly promising food factors for chemoprevention

行われてきたことは周知のところである。一方、著者らの着眼点は、各種疫学的示唆がこれら栄養素や食用植物中に普遍的に含まれる成分のみでは説明できないことから、特殊成分（フードファクター）に目を向けたことである。「フードファクター」はあいまいな語句であるが、著者らは生体に対して微量で生理機能を発揮する非栄養素成分と理解し、使用している。

さて、広く食用植物の発がん抑制効果を評価するためには簡便な試験管内試験法が必要となる。著者らは、がん予防においては化学発がんにおけるプロモーション過程の抑制が重要と考え、この抑制を検定する手段としてEBV 活性化抑制試験法を用いてきた (Ohigashi et al., 1994)。本試験法はTPAをはじめとする発がんプロモーターがBリンパ球細胞に潜伏感染したEBVを強力に活

性化する事実 (Ito et al., 1981) に基づいており、その抑制成分の多くは多様な発がん抑制動物実験で良好な結果を与えている。

このアッセイ法を用いて、まずはわが国においてよく食べられている野菜や果物120種余りについて活性を調べてみた。その結果、強くEBV 活性化を抑制した種は14種（全体の約12%）、以下、中程度に抑制した種が7種（6%）、弱いながらも抑制が認められた種が13種（10%）で、全体として4種に1種は何らかの抑制活性があるとの結果であった (Koshimizu et al., 1988)。一方、目を東南アジア諸国に転じると活性を示す種は大幅に増加し、強力な活性種のみ絞っても、日本のそれよりも倍以上の種数であった (大東 肇, 2002)。一連のスクリーニング試験で得られたもう一つの興味ある結果は、強力な活性を示す種がショウガ、セリ、コショウ、ミカン、シソ科など、一般的には薬味や調味用として、あるいは半薬用的利用があるなど、非栄養的に食べられる植物科に頻度高く分布していたことである。この事実は、がん予防において、非栄養性特殊成分の重要性を再認識させるもので、興味深い。

(亜) 熱帯地域の食用植物にこのように頻度高く強い活性が認められる決定的な理由は定かではないが、例えば強光下で生存するための植物側の化学戦略として、抗酸化性物質の高度な蓄積もその一因と考えられるのではないだろうか。

2. 発がん抑制性フードファクター：動物実験成績とその作用性の解析

広範なスクリーニング試験により選択された種より、著者らはこれまでに50種近いEBV活性化抑制成分を単離・同定し、また、その一部については動物実験にて発がん抑制効果を確認してきている。一方、他のグループからも種々のin vitro法にて多様な予防候補成分が提出され、これまでその数は数百にも及ぶ。しかしながら、

Table 2 In vitro and in vivo biological or physiological activities of ACA, AUR, NOB and ZER

Activity	Effect *			
	ACA	AUR	NOB	ZER
<i>Suppression of:</i>				
EBV activation	↓	↓	↓	↓↓
O ₂ ⁻ generation (NADPH oxidase system) ^a	↓	↓	↓	↓
O ₂ ⁻ generation (xanthine oxidase)	↓	—	—	—
NO generation (iNOS expression) ^b	↓↓	↓	↓	↓↓
Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression ^b	—	↓	↓	↓↓
PGE ₂ release ^b	—	↓	↓	↓↓
TNF-α release ^b	↓↓	↓	↓	↓
Edema formation (mouse ear)	—	—	↓	↓
Edema formation and H ₂ O ₂ production (mouse skin) ^c	↓↓* ¹	↓↓* ¹	↓* ²	NT
<i>Induction of:</i>				
GST activity (mouse liver)	—	↑	—	↑↑
P450 activity (mouse liver)	NT	—	NT	NT
GST & QR activity (rat liver & colon)	↑	↑	NT	NT

^a tested with DMSO-differentiated HL-60 cells, ^b tested with RAW or RAW264.7 cells stimulated with LPS or/and interferon-γ, ^c tested by a double TPA application experiment in mouse skin

↓↓*: strong suppression, ↓: suppression, ↑↑: strong enhancement, ↑: enhancement, —: no effect, NT: not tested

*¹ and *² inhibition of activation phase and both priming and activation phases, respectively, in a double TPA application experiment

動物実験を通してその効果が突き止められた成分は限られている。その理由は、動物実験は長期を要し、また大量の試料を必要とする点にあらう。著者らのケースも例外ではなく、発がん抑制性フードファクターとして現在まで生き残ってきた成分は Fig. 1 に示すショウガ科由来の 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) と zerumbone (ZER), およびミカン科由来の auraptene (AUR) と nobiletin (NOB) の 4 種である。

上記 4 種の成分について、これまで得られてきた動物実験結果を Table 1 にまとめた。ZER や NOB では現在進行中の試験が多いが、ACA や AUR ではすでに多くの成績が蓄積されてきている。これは、いずれも EBV 活性化抑制試験を初めとする in vitro 実験で優れた結果が認められたことのほか、合成的に、あるいは天然より大量入手が可能であったこと、さらには独特の優れた実験系をもった多数の共同研究グループに恵まれたことより進展させることができた結果である。個々の詳細については原著または総説等（大東 肇, 2002；大東 肇と村上 明, 2001；村上 明と大東 肇, 1998；大東 肇ら, 1998 など；原著論文についてはこれら総説中に示してあるので参照のこと）に譲るが、例えば ACA や AUR ではマウス皮膚二段階発がん、ラット口腔、食道、大腸発がんを有意に抑制するとの結果を得ている。ACA ではこの他、BOP によるハムスター胆管発がんを強力に抑制した (Miyauchi et al., 2000)。一方、AUR のコリン欠乏食ラットによる肝発がん実験系では促進効果が認められた（未発表；中江, 私信）。この理由として種々

考えられるが、著者らは AUR の代謝産物が関与しているのではないかと考えている。実際、AUR は肝酵素系で代謝され、側鎖のゲラニル基が切れ、水酸基に変換された umbeliferone になり、さらにクマリン環の数カ所が水酸化された数種の化合物 (esculetin や 3,7-dihydroxycoumarin など) が生まれることがわかっている (Murakami et al., 2000a)。これら代謝物のあるものには毒性をもつ化合物があるのかもしれない。いずれにしろ、化合物により標的となる組織・臓器があることは chemoprevention の観点からは重要なポイントであり、予防候補物質に関する多彩な動物実験的アプローチが必須となる。

上記 4 種の化合物については発がん抑制に関連する種々の in vitro および in vivo 活性をも検討してきた。試みた試験は多彩であるが、Table 2 にはそのうちいずれかに有意な活性が認められたものを取り上げ、まとめている。興味あることに、4 種に共通した活性として、細胞レベルでラジカル (スーパーオキシド (O₂⁻) や NO) の産生を抑える効果が認められた。例えば ACA では、従前に知られていたキサンチンオキシダーゼの阻害作用 (Noro et al., 1988) 以外に、分化 HL-60 細胞 (好中球様細胞) を TPA で刺激した際発生する O₂⁻ を極度に減少させること (Murakami et al., 1996)、また、リポ多糖 (LPS) またはインターフェロン-γ 刺激によるマウスマクロファージ RAW 細胞からの NO 産生を阻害する (Ohata et al., 1998) 活性などである。炎症性細胞である前者では NADPH オキシダーゼ系の阻害と思われ、また

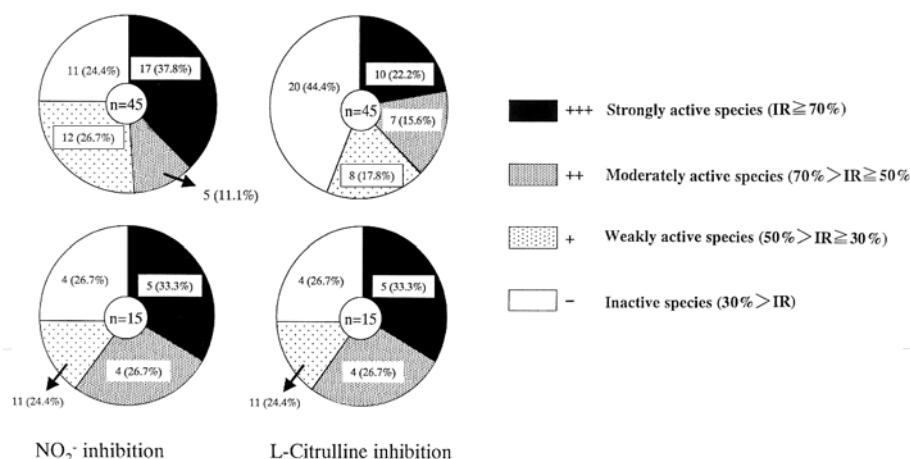


Fig. 2 Activity exhibiting pattern of edible plants in inhibition of NO generation

Plant species were divided into 4 ranks (+++ ~ -) according to their inhibitory activities (IR).

Top: Data tested at 200 µg/ml

Bottom: Data tested at 40 µg/ml

Left: Inhibitory effect determined by NO₂ level

Right: Inhibitory effect determined by L-citrulline level

後者では誘導性のNO合成酵素 (iNOS) のde novo合成阻害であり, これはその転写因子の一つであるNF-κBの活性化の阻害によることが明らかにされている (Ohata et al., 1998). de novoのiNOS合成阻害はZER (Murakami et al., 2002), AUR (Murakami et al., 2000b) およびNOB (Murakami et al., 2000c) で共通していた. 一方, ACAを除く3種では, マウス皮膚またはラット大腸で誘導性シクロオキシゲナーゼ (COX-2) の合成を阻害していることが明らかとなり (Murakami et al., 2002; 2000b; 2000c), 特にZERのCOX-2阻害は顕著であった (Murakami et al., 2002). 一方, 炎症性白血球から産生されたO₂⁻で負荷される酸化ストレスが各種化合物 (ZERは未試験) で抑制されることは, マウス皮膚レベルでの二段階炎症実験 (double TPA application experiment) にても実証された (Nakamura et al., 1998). マウス皮膚を適量のTPAで刺激すると, その塗布部から種々の炎症性サイトカインが放出され, 炎症性白血球細胞が患部に集積してくる. 24時間後に再度この部位をTPA処理すると, 集積した白血球から大量のO₂⁻が発生し, 過剰な酸化ストレスを招くことになる (Wei et al., 1993). 結果として炎症 (浮腫の形成) が起こるが, 炎症性白血球の集積段階はpriming期と, また炎症段階はactivation期と区別され, 前者はミエロパーオキシダーゼの活性で, また後者は組織中の過酸化水素発生量で判定できる. 興味あることに, ACAやAURはactivation期に特異的に, またNOBはprimingおよびactivation両期に作用する化合物であると特徴づけられた. ちなみに, priming期に特異的な発がん抑制物質としてgenisteinやpheophorbide aなど, 両期に作用するそれとしてcurcuminが指摘できた (Nakamura et al., 2000).

抑制とは逆に増強される活性として, in vivoでの代謝酵素の誘導がある. 部分的な結果ではあるが, ACA, AURおよびZERなど化合物によってはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) やキノノンレダクターゼ (QR) などの薬物代謝第2相酵素の誘導が見られた. 口腔や大腸発がん動物実験において, ACA (Ohnishi et al., 1996; Tanaka et al., 1997) やAUR (Tanaka et al., 1998a; 1998b) ではプロモーション期のみならずイニシエーション期の投与においても有意な抑制活性が確認できていた. この事実, これら第2相薬物代謝酵素の誘導活性で一部説明できるかもしれない.

以上示してきた種々の活性のうち, いずれが発がん抑制に直接関与しているのかについてはいまだ明確な結論は出せない. しかしながら, すべてではないとしても, 生体内のラジカル産生の制御が炎症に基づく発がんの抑制に繋がるものと推測される.

3. NO産生抑制活性スクリーニング試験

最近, iNOSによるNO産生と各種発がんとの関連が注目されている. しかしながら, 食成分のNO産生抑制を総合的に評価した例はなかった. そこで, 著者らは, われわれが日常的に摂取している野菜や果物48種 (60部位: 基本試験濃度は200µg/ml) について, マウスマクロファージRAW264.7細胞を用いた試験系でNO産生制御活性を総合的に評価してみた (Kim et al., 1998). RAW264.7細胞をリポ多糖とインターフェロン-γで刺激し, 基質L-arginineより生じるNO量をNO₂としてGriess法で定量し, 一方L-アルギニンより生じたL-citrullineの量をdiacetyl monoximeで誘導体化した後, 比色定量法により求めた. L-arginine → L-citrullineの反応

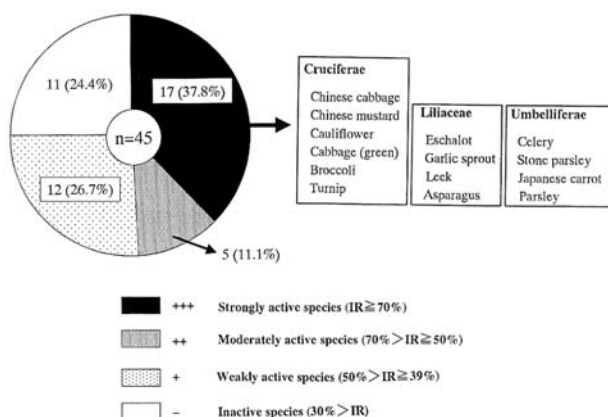


Fig. 3 Highly active plant families and the species in NO generation inhibition

Of the strongly active species (17), 6, 4 and 4 species belong to the plant families Cruciferae, Liliaceae and Umbelliferae, respectively

は1:1であるので、NO₂量とL-citrullineの量差は便宜的にNO消去活性とみなすことができる。抑制活性を4段階(++++~)で評価し、その活性発現パターンをまとめたのがFig. 2 (図の左はNO₂の量で検定した阻害、右はcitrullineの量で検定した阻害である)である。なお、標準的な試験濃度(200 µg/ml)では15種に細胞毒性が認められたので、これらについては試験濃度を40 µg/mlに下げ実施した(Fig. 2の下図)。試験した種のおよそ1/3に強い活性が認められ、NO産生に抑制的な野菜や果物をわれわれは頻度高く食していることがわかった。細胞毒性が低く、強いNO産生活性を示す17種を植物科に分けてみると、主にアブラナ科(Cruciferae)6種、ユリ科(Liliaceae)4種およびセリ科(Umbelliferae)4種に分布していた(Fig. 3)。これらの種の多くは、米国のデザイナーフーズプログラムにおいてがん予防食素材として高く評価されたものであり(大澤俊彦, 1999)、その対応性には興味もたれる。

NO産生抑制とEBV活性化抑制との間には相関は認められなかったが、著者らは最近、両試験で強い活性を示した種(アボカド)よりpersenone Aを初めとする脂肪酸類緑化合物を単離・構造決定した(Kim et al., 2000a)。これら化合物は、顕著なNO産生阻害性をもち、その作用はACAやAURと同様転写因子NF-κBの活性化阻害によるiNOSの誘導抑制によるものと示してきている(Kim et al., 2000a)。これらはまた、強力なEBV活性化抑制やO₂産生抑制、さらにはCOX-2誘導阻害活性を示し、マウス皮膚レベルでの二段階炎症実験において特にactivation期に阻害を示すなど、前記各種化合物とよく似た特性をもっている(Kim et al., 2000a)。また、persenone Aなどの合成法の確立により、構造-活性相関の究明を行い、各種の活性発現におけるエノン部や水酸基の意義を指摘できた(Kim et al., 2000b)。本化合物

については、現在、各種動物実験で発がん抑制効果を検討中である。

結 語

以上のように、本稿ではがん予防に期待できる植物性食素材やフードファクターについて紹介してきた。すでに述べたように、がん予防性食品成分については著者らのみならず他のグループによっても盛んに研究がなされ、特に抗酸化作用に基づいたそれらが多数報告されている。しかしながら、その多くはラジカルや活性酸素種の消去(捕足)型である。一方、ここで取り上げた化合物類はラジカル産生阻害型と特徴づけられる点で興味があろう。生体の酸化ストレスは、がんのみならず、動脈硬化や糖尿病など広く生活習慣病に関連していることが示されつつある。一方最近、抗酸化成分のプロオキシダント効果が問われており、このような観点からも、ラジカル産生抑制型発がん抑制物質に意義があるように思われる。

期待の大きい本分野の今後は、実際のヒト発がんに有効か否かであろう。時代は「ヒトでどうか?」を問うている。幸い、最近、「食品成分によるヒト発がん予防」の可能性を示唆する介入試験データが出つつある。種々難題はあろうが、著者らもこの目標に向かってさらに研究を進めてゆく所存である。

謝 辞

本稿は多数の共同研究者の協力のもとに進展してきた一連の成果を筆者が代表してとりまとめたものである。研究全般にわたって共同実施していただいた小清水弘一教授(近畿大学・生物理工学部)、村上 明博士(近畿大学・生物理工学部、現京都大学農学研究科)および中村 宜督博士(現名古屋大学生命農学研究科)たち、動物実験にて共同研究していただいた森 秀樹教授(岐阜大・医)、田中卓二教授(金沢医大)、小西陽一教授および中江 大博士(奈良県医大)、西川秋佳および広瀬雅雄両博士(国立衛試)たち、さらには作用特性解析につきご指導・ご示唆をいただいた若林敬二博士(国立がんセンター研)らに本紙面を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Ito, Y., S. Yanase, T. Fujita, T. Harayama, H. Imanaka (1981) A short-term in vitro assay for promoter substances using human lymphoblastoid cells latently infected with Epstein-Barr virus, *Cancer Lett.*, 13, 29-37.
- Kim, O.K., A. Murakami, Y. Nakamura, H. Ohigashi (1998) Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW264.7 cells, *Cancer Lett.*, 125, 199-207.
- Kim, O.K., A. Murakami, D. Takahashi, Y. Nakamura, K. Torikai, H.W. Kim and H. Ohigashi (2000a) An avocado constituent, persenone A, suppresses expression of inducible forms of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in macrophages, and hydro-

- gen peroxide generation in mouse skin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 2504-2507.
- Kim, O.K., A. Murakami, Y. Nakamura, H.W. Kim and H. Ohigashi (2000b) Inhibition by (-)-persenone A-related compounds of nitric oxide and superoxide generation from inflammatory leukocytes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 2500-2503.
- Koshimizu, K., H. Ohigashi, H. Tokuda, A. Kondo and K. Yamaguchi (1988) Screening of edible plants against possible anti-tumor promoting activity, *Cancer Lett.*, 39, 247-257.
- Miyauchi, M., A. Nishikawa, F. Furukawa, H. Nakamura, H.-Y. Son, A. Murakami, K. Koshimizu, H. Ohigashi and M. Hirose (2000) Inhibitory effects of 1'-acetoxychavicol acetate on *N*-nitrosobis (2-oxopropyl) amine-induced initiation of cholangiocarcinogenesis in Syrian hamsters, *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 477-481.
- Murakami, A., S. Ohura, K. Koshimizu and H. Ohigashi (1996) 1'-Acetoxychavicol acetate, a superoxide anion generation inhibitor, potently inhibits tumor promotion by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate in ICR mouse skin, *Oncology*, 53, 386-391.
- 村上 明, 大東 肇 (1998) 亜熱帯産野菜類: 発がん予防物質の新しい検索対象-東南アジア産野菜類 (1'-acetoxychavicol acetate を例として, 二木鋭雄, 吉川敏一, 大澤俊彦編「成人病予防食品の開発」, シーエムシー (東京), pp. 142-148.
- Murakami, A., K. Wada, N. Ueda, K. Sasaki, M. Haga, W. Kuki, Y. Takahashi, H. Yonei, K. Koshimizu and H. Ohigashi (2000a) In vitro absorption and metabolism of a citrus chemopreventive agent, auraptene, and its modifying effects on xenobiotic enzyme activities in mouse livers, *Nutr. Cancer*, 36, 191-199.
- Murakami, A., Y. Nakamura, T. Tanaka, K. Kawabata, D. Takahashi, K. Koshimizu and H. Ohigashi (2000b) Suppression by citrus auraptene of phorbol ester- and endotoxin-induced inflammatory responses: role of attenuation of leucocyte activation, *Carcinogenesis*, 21, 1843-1850.
- Murakami, A., Y. Nakamura, K. Torikai, T. Tanaka, T. Koshiba, K. Koshimizu, S. Kuwahara, Y. Takahashi, K. Ogawa, M. Yano, H. Tokuda, H. Nishino, Y. Mimaki, Y. Sashida, S. Kitanaka and H. Ohigashi (2000c) Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor-promotion in mice, *Cancer Res.*, 60, 5059-5066.
- Murakami, A., D. Takahashi, T. Kinoshita, K. Koshimizu, H.-W. Kim, A. Yoshihiro, Y. Nakamura, S. Jiwajinda, J. Terao and H. Ohigashi (2002) Zerumbone, a Southeast Asian ginger sesquiterpene, markedly suppresses free radical generation, proinflammatory protein production, and cancer cell proliferation accompanied by apoptosis: the α, β -unsaturated carbonyl group is a prerequisite, *Carcinogenesis*, 23, 795-802.
- Nakamura, Y., A. Murakami, Y. Ohto, K. Torikai, T. Tanaka and H. Ohigashi (1998) Suppression of tumor promoter-induced oxidative stress and inflammatory responses in mouse skin by a superoxide generation inhibitor 1'-acetoxychavicol acetate, *Cancer Res.*, 4832-4839.
- Nakamura, Y., H. Ohigashi and A. Murakami (2000) Search for naturally-occurring antioxidative chemopreventors on the basis of the involvement of leukocyte-derived reactive oxygen species in carcinogenesis, *Asian Pacif. J. Cancer Prev.*, 1, 115-120.
- Noro, T., T. Sekiya, M. Katoh, Y. Oda, T. Miyase, M. Kurayanagi, A. Ueno and S. Fukushima (1988) Inhibitors of xanthine oxidase from *Alpinia galanga*, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 244-248.
- Ohata, T., K. Fukuda, A. Murakami, H. Ohigashi, T. Sugimura and K. Wakabayashi (1998) Inhibition by 1'-acetoxychavicol acetate of lipopolysaccharide- and interferon- γ -induced nitric oxide production through suppression of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW264 cells, *Carcinogenesis*, 19, 1007-1012.
- Ohigashi, H., A. Murakami and K. Koshimizu (1994) Anti-tumor promoters from edible plants, In: C.-T. Ho, T. Osawa, M.-T. Huang and R.T. Rosen (Eds), *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II, Teas Spices and Herbs*, ACS Symposium Series 547, American Chemical Society, Washington DC, pp. 252-261.
- 大東 肇, 中村宜督, 村上 明 (1998) 熱帯アジアの食材の発がん抑制効果と活性成分, *FOOD Style* 21, 2, 31-35.
- 大東 肇, 村上 明 (2001) 熱帯産ショウガ科植物成分の生理機能的特性, *FOOD Style* 21, 5, 54-57.
- 大東 肇 (2002) がん予防に期待される(亜)熱帯東南アジアの食材とその活性成分, *日本農芸化学誌*, 76, 460-462.
- Ohnishi, M., T. Tanaka, H. Makita, T. Kawamori, H. Mori, K. Satoh, A. Hara, A. Murakami, H. Ohigashi and K. Koshimizu (1996) Chemopreventive effect of a xanthine oxidase inhibitor, 1'-acetoxychavicol acetate, on rat oral carcinogenesis, *Jpn. J. Cancer Res.*, 87, 349-356.
- 大澤俊彦 (1999) デザイナーフーズとファンクショナルフーズ, 大澤俊彦, 大東 肇, 吉川敏一監修「がん予防食品」, シーエムシー (東京), pp. 3-15.
- Tanaka, T., K. Kawabata, M. Kakumoto, H. Makita, K. Matsunaga, H. Mori, K. Satoh, A. Hara, A. Murakami, K. Koshimizu and H. Ohigashi (1997) Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by a xanthine oxidase inhibitor, 1'-acetoxychavicol acetate, *Jpn. J. Cancer Res.*, 88, 821-830.
- Tanaka, T., K. Kawabata, M. Kakumoto, K. Matsunaga, H. Mori, A. Murakami, W. Kuki, Y. Takahashi, H. Yonei, K. Satoh, A. Hara, M. Maeda, T. Ota, S. Odashima, K. Koshimizu and H. Ohigashi (1998a) Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by citrus auraptene in rat, *Carcinogenesis*, 19, 425-431.
- Tanaka, T., K. Kawabata, M. Kakumoto, A. Hara, A. Murakami, W. Kuki, Y. Takahashi, H. Yonei, M. Maeda, T. Ota, S. Odashima, T. Yamane, K. Koshimizu and H. Ohigashi (1998b) Citrus auraptene exerts dose-dependently chemopreventive activity in rat large bowel tumorigenesis; the inhibition correlates with suppression of cell proliferation and lipid peroxidation and with induction of phase II drug-metabolizing enzymes, *Cancer Res.*, 58, 2550-2556.
- Wei, H., L. Wei, K. Frenkel, R. Bowen and S. Barnes (1993) Inhibition of tumour promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein, *Nutr. Cancer*, 20, 1-12.

抗変異原に関する研究

木苗 直秀*, 増田 修一

静岡県立大学食品栄養科学部 〒422-8526 静岡市谷田52-1

Studies on antimutagens (A review)

Naohide Kinae and Shuichi Masuda

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

Summary

In recent years, because people have become more health and lifespan conscious, interest has increased over how to prevent life-style related diseases, including cancer, by consuming daily foods or supplements. It is well known that several mutagens play an important role in the early stage of carcinogenesis. Therefore, intake of antimutagens should be effective in reducing cancer incidence and mortality. In this article, many experimental studies on antimutagens are reviewed. These chemicals have been isolated mainly from vegetables and fruits, and their antimutagenic activity studied in vitro with bacteria, yeast, and cultured animal cells, and in vivo in rats and mice. The mechanism of action of antimutagens in inhibiting carcinogenesis is also discussed. As recommended by the World Cancer Research Fund and the American Institute for Cancer Research, proper intake of vegetables and fruits might be a useful and important means for prevention of cancers.

Keywords : antimutagen, mutagenesis, carcinogenesis, catechin, flavonoid

はじめに

我々の生活環境中にはおよそ8万種類の化学物質が存在するといわれており、それらの多くは大気、土壌、水、食品中に微量ながら混在している。近年、それら環境内化学物質の中で細胞の遺伝子に損傷を与える変異原物質や変異細胞を悪性腫瘍細胞に導く発がん物質、さらにホルモン作用を乱す内分泌攪乱化学物質、奇型を誘起する催奇形成物質などが注目されている。特に1975年に米国のAmes博士ら(1975)がサルモネラ菌を用いる復帰変異試験いわゆる「エームス試験」を開発して以来、環境中の変異原、がん原物質の検索とともにそれらの作用を阻害する抗変異原、抗発がん物質の分離、同定が急速に進められた。抗変異原に関する研究成果が1976年以降に急増したことはantimutagenを中心としたキーワー

ドを用いてMedline (Table 1) および STN system (Table 2) による文献検索の結果から十分に読み取ることができる。変異原物質はヒトのがん発生を惹起する第1段階に関与する化学物質である。Doll (1977) はヒトのがん発生の原因は日常食品が35%, 喫煙が30%, ウィルスが10%であると考えている。現在では全がんの70~80%が化学物質に由来すること、我が国では2001年のがん死亡者が30万600人で20年来死因の第1位(31.0%)を占めていること、さらに他の疾病の治療方法が改善されるとがんによる死亡率はさらに上昇すること、医療費の高騰などを考え合わせると、がんにかかりにくくするために個人個人が抗変異原物質を有効に摂取することが極めて重要になってくる。

本稿では変異原物質についてがん発生とのかかわりとともに天然物、主として野菜、果物から分離された抗変異原物質とそれらの作用機作について著者らの研究成果を含めて文献に記載されたものをここに紹介する。

* E-mail : kinae@fns1.u-shizuoka-ken.ac.jp

受付 : 2002年8月20日 受理 : 2002年8月20日

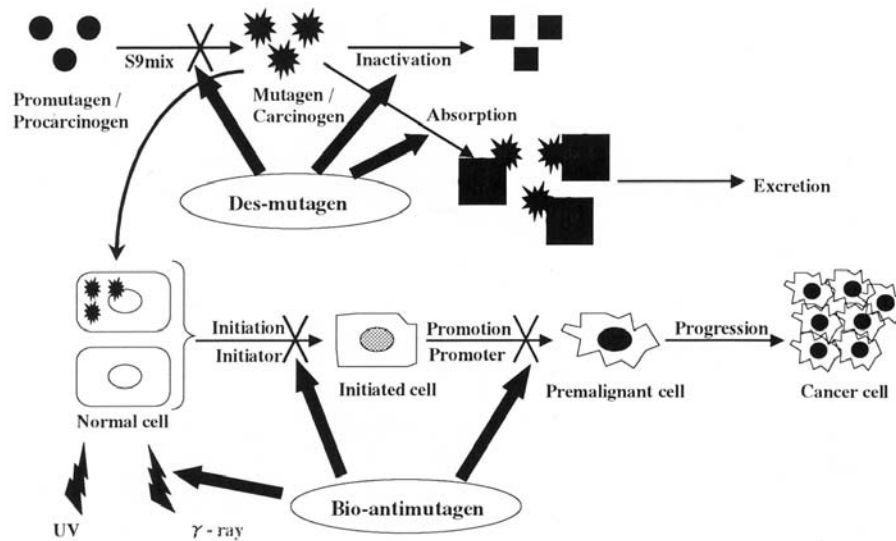
日本環境変異原学会

Table 1 The Number of articles in the literature (from Pub Med)

Keywords	Period		
	1976-1985	1986-1995	1996～
antimutagen	9	54	45
antimutagen-tea	1	0	2
antimutagen-catechin	1	1	1
antimutagen-polyphenol	0	0	1
antimutagen-vegetable	0	0	5
antimutagen-fruit	0	2	3
antimutagen-plant	0	16	12
antimutagen-vitamin	1	9	7

Table 2 The Number of articles in the literature (from STN)

Keywords	Period		
	1976-1985	1986-1995	1996～
antimutagen	78	313	333
antimutagen-tea	3	15	29
antimutagen-vegetable	2	19	24
antimutagen-fruit	0	15	24
antimutagen-dietary fiber	0	3	5
antimutagen-plant	9	43	36
antimutagen-vitamin	8	29	20

**Fig. 1** Multistep carcinogenesis and its inhibition by des-mutagen and bio-antimutagen

1. 変異原物質とがん発生とのかかわりおよび抗変異原物質の検索

細胞のがん化はFig. 1に示すように考えることができる。正常細胞が化学物質（変異原・発がん物質）、紫外線、放射線、ウイルス等に暴露されるとDNAが損傷を受け、遺伝情報が乱され突然変異が起こる（イニシエーション）。ついでその変異が固定され、潜在的ながん細胞の増殖を促進して前がん状態の腫瘍細胞に変化する（プロモーション）。さらに細胞が遺伝的な変化を受け、無制限な増殖を繰り返し、転移能も有する悪性腫瘍細胞を形成する（プログレッション）。大量暴露の場合を除くと1個の正常細胞が突然変異を起し臨床がんとして検知されるまでに10年から30年を要すると考えられている。それゆえ、がんを予防するにはできるだけ早い時期に変異原物質を分解、消去するか、変異した細胞を修復して正常細胞に戻すことなどが考えられる。そのために抗変異原物質の活用が必要とされるに至った。なお、食品中の変異原物質、発がん物質についてはvon Borstel (1998)やSugimuraら (1996)が、抗変異原物質、抗発

がん物質については下位ら (1991)、Hayatsuら (1993)、Fergusonら (1999)、Kumpulainenら (1999)がレビューしている。抗変異原作用については主としてある特定の化学物質または植物成分を加えることによって突然変異の頻度を減少させる場合と、細胞が有する遺伝的背景に変化をもたらせる場合、さらには細胞の内外で作用させる場合などに分類して説明されている。

我が国では、国立遺伝学研究所の故賀田恒夫博士が抗変異原に関する概念を述べており、それによると細胞外で作用する抗変異原をdesmutagen（消変異原）、細胞内で作用する抗変異原をbioantimutagen（生物的反変異原）と呼んでいる（Kada et al., 1981；黒田, 1995）。

発がんの進行過程における抗変異原物質の作用機構についてはDe FloraとRamel (1988)が詳細に提唱している（Table 3）。彼らは、細胞外で作用するもの、細胞内で作用するもの、イニシエーションを起した細胞またはがん細胞で作用するものに大別している。なお、抗変異原性の検定には従来変異原性の検定に用いられている遺伝子突然変異を指標とする試験（サルモネラ菌や大腸菌を用いる遺伝子突然変異試験、哺乳動物の培養細胞を用

Table 3 Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis^a

(De Flora and Ramel, 1988)

Classification	Examples ^b
1. Inhibitors of mutagenesis acting extracellularly ^c	
1.1. Inhibiting the uptake of mutagens or of their precursors	
1.1.1 Hindering their penetration	
1.1.1.1. Into the organism	Body shielding devices, washing
1.1.1.2. Into cells	Fatty acids, putrescin, aromatic amino acids, iodide
1.1.2 Favoring their removal	Fibers
1.2. Inhibiting the endogenous formation of mutagens	
1.2.1 Inhibiting the nitrosation reaction	Ascorbic acid, tocopherols, phenols
1.2.2 Modifying the microbial intestinal flora	Fermented dairy products
1.3. Deactivating mutagens	
1.3.1 By physical reaction	Maintenance of physiological pH in body fluids
1.3.2 By chemical reaction	Thiols, antioxidants
1.3.3 By enzymatic reaction	Vegetables with peroxidase activity
2. Inhibitors of mutagenesis acting intracellularly ^d	
2.1. Modulators of metabolism ^e	
2.1.1 Inhibiting cell replication	Retinols
2.1.2 Favoring sequestration of mutagens in non-target cells	Thiols
2.1.3 Inhibiting the activation of promutagens	Modulators of phase-I reaction
2.1.4 Inducing the detoxifying mechanisms	Phenols, thiols
2.2. Blocking reactive molecules ^e	
2.2.1. Reacting with electrophiles	
2.2.1.1 By chemical reaction	Sulfur compounds
2.2.1.2 By enzymatic reaction	Inducers of phase-II reactions
2.2.2. Scavenging reactive oxygen species	A variety of antioxidants
2.2.3. Protecting nucleophile sites of DNA	Ellagic acid, retinols
2.3. Modulators of DNA replication or repair ^f	
2.3.1. Increasing the fidelity of DNA replication	Cobaltous chloride, sodium arsenite
2.3.2. Favoring the repair of DNA damage	Cinnamaldehyde, coumarin, umbelliferone, vanillin, thiols
2.3.3. Inhibiting error-prone repair pathways	Protease inhibitors
3. Inhibitors acting on initiated or neoplastic cells ^g	
3.1. Modulators of tumor promotion	
3.1.1 Inhibiting genotoxic effects	See 1 and 2
3.1.2 Scavenging free radicals	A variety of antioxidants
3.1.3 Inhibiting cell proliferation	Retinoids, glucocorticoids, hyperthermia
3.1.4 Inducing cell differentiation	Retinoids, glucocorticoids, calcium, vitamin D ₃
3.1.5 Modulating signal transduction	Inhibitors of protein kinase C
3.2. Modulators of tumor progression	
3.2.1 Inhibiting genotoxic effects	See 1 and 2
3.2.2 Acting on hormones or growth factors	Hormonal treatments, dopamine antagonists, protease inhibitors
3.2.3 Acting on the immune system	Immunoregulators (e.g., retinoids, lipotropes), vaccines, monoclonal antibodies
3.2.4 Physical, chemical or biological antineoplastic agents	Radiation, antitlastic drugs, interferon
3.2.5 Modulating signal transduction	Inhibitors of protein kinase C

^a From De Flora (1987), modified.^b See text for more details and for references.^c Stage-1 inhibitors according to Ramel et al. (1986). Those acting in vitro outside target cells have also been referred to as desmutagens by Kada et al. (1985).^d Stage-2 inhibitors according to Ramel et al. (1986).^e Blocking agents according to Wattenberg (1981).^f Bioantimutagens or antimutagens in strict sense according to Kada et al. (1985).^g Suppressing agents according to Wattenberg (1981).

Table 4 Studies on antimutagenicity of tea polyphenols

(Kuroda, 1999)

Tea polyphenols	Mutagens	Test systems	References
ECG, EGCG	Trp-P-2, N-OH-Trp-P-2	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100	Okuda et al. [1984]
EGCG	B[a]P diol oxide	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100	Okuda et al. [1984]
EGCG	Spontaneous mutations	<i>B. subtilis</i> NIG1125	Kada et al. [1981]
Tannic acid	UV, 4NQO, γ -rays, MNNG	<i>E. coli</i> B/r WP2 WP2s	Shimoi et al. [1985]
EC, ECG, EGC, EGCG	UV, 4NQO, MNNG	<i>E. coli</i> B/r WP2 WP2s, ZA159	Shimoi et al. [1986]
Green and black tea extracts	MNNG	<i>E. coli</i> B/r WP2 <i>S. typhimurium</i> TA100	Jain et al. [1989]
Black and green tea extracts	PhIP	<i>S. typhimurium</i> TA98	Apostolides et al. [1996]
Polyphenols 60, 100, B	Aryl-and heterocyclic amines, AFB ₁ , B[a]P, DBE, 2-NP	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535	Weisburger et al. [1996]
Gallc acid, methyl gallate, catechins, TF, tannic acid	PhIP	<i>S. typhimurium</i> TA98	Apostolides et al. [1997]
Black tea TF, TF2A, TFDG	H ₂ O ₂	<i>S. typhimurium</i> TA104	Shiraki et al. [1994]
Black tea extract	IQ, B[a]P, AFB ₁ , Trp-P-1, Glu-P-1	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100	Shiraki et al. [1994]
ECG, EGCG	4NQO, EMS	Chinese hamster V79 cells, 6TGr mutation	Kuroda [1999]
Green tea extract	AFB ₁	Rat bone marrow cells, chromosome aberrations	Ito et al. [1989]
Green tea extracts	IQ, Glu-P-1, B[a]P, DMBA, 2AF, 2AA, 9AA, MNNG	<i>S. typhimurium</i> TA98	Bu-Abbas et al. [1994]

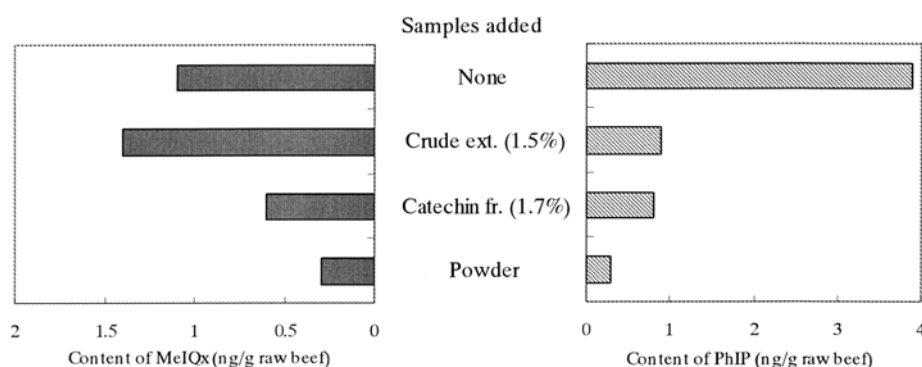


Fig. 2 Inhibitory effect of green tea samples on the formation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) in ham-burger.

Cooking conditions : 200 °C, 10min/side

いる遺伝子突然変異試験), 染色体異常を指標とする試験 (哺乳動物の培養細胞を用いる染色体異常試験, げっ歯類を用いる小核試験), DNA 損傷を指標とする試験 (哺乳動物の細胞を用いる不定期 DNA 合成や姉妹染色分体交換試験, コメットアッセイ) などが利用されている。

2. 食品あるいは食品成分の抗変異原性

1) 茶葉抽出物およびカテキン類の抗変異原性

緑茶抽出物の生理作用については多くの報告がある。なかでも茶カテキン類が抗酸化性, ラジカル捕捉活性な

どを有することから抗変異原活性, 抗発がん活性についても細菌, 培養細胞, 動物個体を用いて積極的に研究が進められている。なお, ヒトの緑茶摂取量と各種がんの発生率や死亡率との間に相関性が認められた場合 (Blot, 1996 ; Oguni, 2000 ; Nakachi et al., 2000) と相関性がみられなかった (Bushman, 1998 ; Tsubono et al., 2001) 場合があるなど矛盾した疫学調査の結果が報告されている。

Kuroda ら (1999) は茶ポリフェノールの抗変異原性と抗発がん性について総説としてまとめており, Table 4 に示すように特に緑茶や紅茶のカテキン類あるいはそ

Table 5 Contents of catechins, caffeine, ascorbic acid and phenolic compounds of various tea extracts (mg/g)
(Yen et al., 1996)

Tea samples	Green			
Pouchong Oolong	Black			
EC	23.50 ^{a,d}	16.58 ^b	17.30 ^b	4.54 ^c
ECG	12.58 ^a	8.68 ^b	10.63 ^c	3.47 ^d
EGC	153.62 ^a	77.37 ^b	137.89 ^c	59.94 ^d
EGCG	77.18 ^a	55.31 ^b	66.53 ^c	16.53 ^d
Total catechins	266.88 ^a	157.94 ^b	232.35 ^c	43.48 ^d
Caffeine	54.63 ^{a,d}	56.53 ^a	83.10 ^b	50.38 ^{c*}
Ascorbic acid	3.05 ^a	2.70 ^b	2.93 ^a	—
Phenolic compounds	285.46 ^a	281.28 ^a	323.94 ^b	88.97 ^{c*}

^a Values are means of three replicate analyses.

^b Tea (20g) was extracted with boiled water (400 ml) for 5 min and the filtrate was freeze-dried. The yields of tea extracts for green tea, pouchong tea, oolong tea and black tea were 4.09, 4.11, 5.27 and 3.86g, respectively.

^c Catechin content in tea leaf on a wet-weight basis.

^{c*} Content in tea leaf on a wet-weight basis.

の二次成績体に多環芳香族炭化水素の benzo (a) pyrene (B(a)P), 加熱食品由来の変異・がん原物質 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1), 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2), 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-*f*]quinoline (IQ), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) のほか UV, γ 線, 過酸化水素, Aflatoxin B₁, dimethylaminobenzanthracene (DMBA), *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) などの変異原性を減弱する作用があることなどが報告されている。Dhawan ら (2002) は紅茶などに含まれる単量体, 二量体カテキン類がヘテロサイクリックアミンで損傷を受けたヒトのリンパ球の DNA 損傷を軽減することをコメットアッセイを用いて見出している。Hernaes ら (1998) は緑茶や紅茶が IQ の活性体である 2-hydroxyamino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline の直接変異活性を阻害すること, この場合茶葉の浸出液の濃度とともに浸出時間 (1~2 分) により阻害活性が変化することを見出している。Metz ら (2000) は緑茶抽出物を投与した場合, 結腸粘膜における cyclooxygenase-2 活性を阻害し, アゾキシメタンで誘導された前がん病変が退縮することを見出している。このことは緑茶の化学予防と抗炎症作用に新しい情報を提供するものである。Jia (2001) らはラットに投与した 1,2-dimethylhydrazine による aberrant crypt foci が緑茶の飲用により抑制されることを報告している。Higashimoto ら (2001) は醤油より見出され, 亜硝酸処理後に変異原性を発現する 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -3-carboxylic acid の変異原性はハーブ茶やハーブ抽出物の添加で抑制され, さらにエタノールの添加により抑制作用が増強されることから飲酒ががんのリスクを軽減する可能性があることを指摘している。Weisburger (2002) は獣肉よりハンバーグを調理した場合, 茶ポリフェノール (polyphenon 60^R)

を添加することにより変異原活性が減少したことを報告している。著者ら (Kinae et al., 1997) もすでに緑茶の粗抽出物および粗カテキンを挽肉に添加してハンバーグを調理し, 変異活性の変化を調べた。その結果, 粗カテキン抽出物の方が粗抽出物より変異活性を低下すること, 特に 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) と比べて PhIP の生成量が無添加の場合に比べて 1/4~1/5 程度に減少していることを明らかにした (Fig. 2)。このことは還元糖とアミノ酸の間でメイラード反応が進行してピラジン類を生成する過程をカテキン類が抑制している可能性を強く示唆していた。茶葉中にはカテキン類のほかアスコルビン酸やトコフェロール, その他フラボノイドが含まれている。Constable ら (1996) はインスタントティー (緑茶, 紅茶) 抽出物を逆相 HPLC にかけたところカテキンとは異なる画分がヘテロサイクリックアミンの MeIQx, IQ, PhIP などの生成を抑制したことを報告している。また, Ohe ら (2001) は umu 試験を用いて緑茶, ウーロン茶, 紅茶, プール茶などがニトロアレン類の変異活性を阻害することを SOS 応答により明らかにした。さらに緑茶抽出物を分画したところ, 抗変異活性はカテキン類とは異なる画分が示していることを報告した。このように茶葉抽出物の抗変異活性の発現にはカテキン類とともに他の茶成分が関与していることが明らかになってきた。Standley ら (2001) は Rooibos 茶 (*Aspalathus linearis*) の抗変異原性, 抗酸化性について醗酵時間との関連で言及している。処理時間の延長がポリフェノールの減少を引き起こし, 両活性を低下させることを明らかにした。Yen ら (1996) は 4 種の茶葉抽出物中のカテキン類, カフェイン, アスコルビン酸, フェノール化合物を定量し (Table 5), さらに IQ, Trp-P-1, 2-amino-6-methyldipyrrodo-[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1), B(a)P, AFB₁ に対する変異原性抑制

Table 6 Inhibitory effect of tea extracts on the activity of mutagens^a to *S. typhimurium* TA98 and TA100
(Yen et al., 1996)

Tea extracts	His ⁺ revertants/plate ^b (% of inhibition) ^c				
	IQ	B[a]P	AFB ₁	Trp-P-1	Glu-P-1
TA98					
Control ^d	1739	380	448	1737	911
Green tea	1287 (26.7)	230 (45.3)	203 (61.4)	1319 (21.8)	369 (62.9)
Pouchong tea	1564 (10.4)	215 (49.8)	170 (69.7)	1278 (27.2)	406 (58.6)
Oolong tea	1568 (10.1)	209 (51.7)	243 (51.4)	1144 (35.1)	690 (25.6)
Black tea	1642 (5.7)	255 (37.8)	335 (28.3)	1341 (23.5)	742 (19.6)
Spontaneous revertants ^e	49				
TA100					
Control	911	797	388	534	596
Green tea	378 (69.8)	443 (54.5)	275 (46.9)	487 (12.1)	274 (71.7)
Pouchong tea	505 (53.1)	332 (71.5)	186 (83.8)	495 (10.1)	282 (69.9)
Oolong tea	442 (61.4)	295 (77.2)	230 (65.6)	419 (29.7)	263 (74.2)
Black tea	815 (12.6)	346 (69.4)	253 (56.0)	505 (7.5)	455 (31.4)
Spontaneous revertants	147				

^a Mutagen was preincubated with tea extracts (0.35 mg/plate) at 37 °C for 20 min before antimutagenicity assay.

^b Data presented are the means of three experiments.

^c Inhibition (%) = $1 - \frac{\text{number of His}^+ \text{ revertants in the presence of tea extracts}}{\text{number of His}^+ \text{ revertants in the absence of tea extracts}} \times 100 \%$

The number of spontaneous revertants was subtracted from the numerator and denominator.

^d The number of control was determined without tea extract.

^e The number of spontaneous revertants was determined without tea extract and mutagen.

Table 7 Correlation between antimutagenicity toward *S. typhimurium* TA98 and TA100 and ascorbic acid, caffeine, phenolic compounds and catechins contents of tea extracts
(Yen et al., 1996)

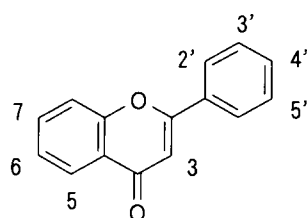
	IQ	B[a]P	AFB ₁	Trp-P-1	Glu-P-1
TA98					
Ascorbic acid	0.604 ^a	0.873	0.879	0.360	0.653
Caffeine	-0.152	0.728	0.124	0.943	-0.334
Phenolic compounds	0.466	0.939	0.825	0.523	0.520
EC	0.827	0.671	0.829	0.082	0.759
ECG	0.789	0.702	0.753	0.199	0.637
EGC	0.768	0.494	0.413	0.206	0.339
EGCG	0.752	0.749	0.789	0.239	0.646
Total catechins	0.765	0.696	0.686	0.253	0.553
TA100					
Ascorbic acid	0.985	-0.144	0.204	0.507	0.996
Caffeine	0.451	0.600	0.201	0.991	0.549
Phenolic compounds	0.951	0.030	0.284	0.634	0.995
EC	0.982	-0.447	-0.066	0.334	0.917
ECG	0.989	-0.370	-0.115	0.477	0.925
EGC	0.850	-0.389	-0.444	0.594	0.732
EGCG	0.997	-0.320	-0.041	0.489	0.950
Total catechins	0.976	-0.333	-0.163	0.551	0.908

^a Correlation coefficients.

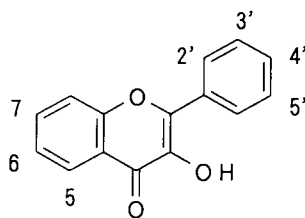
Table 8 Chemical structure of flavonoids

(Shimoi et al., 1994)

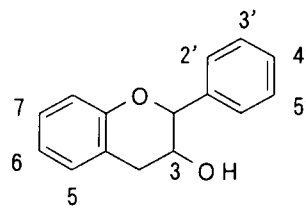
Chemicals	Substituents						
	3	5	7	2'	3'	4'	5'
Flavone							
Luteolin		OH	OH		OH	OH	
Flavonol							
Quercetin	OH	OH	OH		OH	OH	
Quercetin (OMe) ₄	OCH ₃	OH	OCH ₃		OCH ₃	OCH ₃	
Kaempferol	OH	OH	OH			OH	
Morin	OH	OH	OH	OH		OH	
Rutin	O-Rut	OH	OH		OH	OH	
Fisetin	OH		OH		OH	OH	
Myricetin	OH	OH	OH		OH	OH	OH
Flavanol							
Epicatechin	OH	OH	OH		OH	OH	
Isoflavone							
Genistein		OH	OH		OH		
Flavanone							
Eriodictyol		OH	OH		OH	OH	



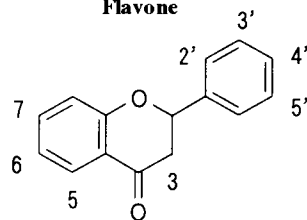
Flavone



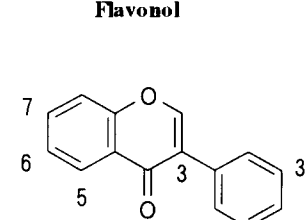
Flavonol



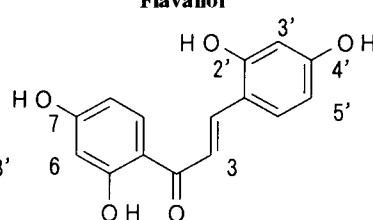
Flavanol



Flavanone



Isoflavone

Chalcone
(Phloretin)

効果をAmes法により検定した (Table 6). その結果, 用いる変異原の種類により抗変異活性は変化しており, green tea > pouchong tea > oolong tea > black tea の順であった. また, 抗変異活性と各化学成分含量との関連を調べたものを Table 7 に示した. サルモネラ TA100 において IQ や Glu-P-1 の変異原性に対する抑制効果はカテキンやアスコルビン酸量に比例していた. また, TA98 と TA100 を用いて Trp-P-1 に対する抗変異活性は茶葉粗抽出物により差がみられた. このことは茶葉抽出物中の化学成分の組成が異なることに帰因するものと考えられた.

2) フラボノイド

フラボノイドは植物中に広く存在する C₆-C₃-C₆ (左より A, C, B 環と呼称) 骨格を有するポリフェノール化合

物で B 環の結合部位, C 環の二重結合の有無などによりフラボン, フラボノール, フラバノール, イソフラボン, フラバノン, カルコンなどに分類されている (Table 8). これらフラボノイドは植物の種子中では遊離型アグリコンとして存在しているが, 植物体ではグルコースやラムノースが結合した配糖体としては存在している (下位ら, 1997). フラボノイドの多くがカテキンと同様に抗酸化性やラジカル捕捉活性など多様な生理作用を有することがすでに報告されている. ここでは抗変異活性について述べる. Edenharder ら (1997) は IQ のサルモネラ菌 TA98 に対する変異原性についてフラボノイド類の抑制効果と構造活性相関を検討している. その結果, Table 9 に示すようにフラボン, フラボノール, フラバノン, カルコン類の中に強い抗変異原性を示す成分が存在する

Table 9 Antimutagenic effects of flavonoids on the S105-mediated mutagenicity of IQ^a induced in *S. typhimurium* TA98
(Edenharder et al., 1997)

Flavonoid ^b	IC ₅₀ (nmol/ml top agar)	% Inhibition at 500 nmol/plate ^b	Antimutagenic potency
Flavones			
Flavone	1.89	91.1	+++
6-Hydroxyflavone	19.9	84.1	+
6-Methoxyflavone	2.19	88.4	+++
Apigenin	2.19	95.5	+++
Luteolin	2.64	88.4	+++
Tangeretin	4.61	83.5	+++
Flavonols			
Flavonol	2.85	90.6	+++
Kaempferol	2.40	92.0	+++
Fisetin	10.8	85.5	++
Morin	20.0	76.3	+
Robinetin	32.3	77.2	+
Myricetin	25.2	70.2	+
Flavanones			
Flavanone	3.55	98.2	+++
2'-Hydroxyflavanone	10.4	88.9	++
Naringenin	23.7	80.7	+
Hesperetin	6.00	80.8	++
Isoflavones			
Genistein	-	20.2	-
Biochanin A	17.9	80.7	+
Chalcone and related compounds			
Chalcone (benzylideneacetophenone)	5.04	88.1	+++
Benzylideneacetone	26.7	75.2	+

IC₅₀ is the concentration of a flavonoid in nmol/ml top agar required to inhibit the mutagenic activity of IQ by 50 %, calculated from corresponding dose-response curves. +, weak; ++, moderate; +++, strong antimutagenic potency; -, inactive.

^a 25 ng IQ/test produced 659 ± 47 revertants/plate.

^b Mutagenic activity was not completely eliminated, but reduced, as indicated.

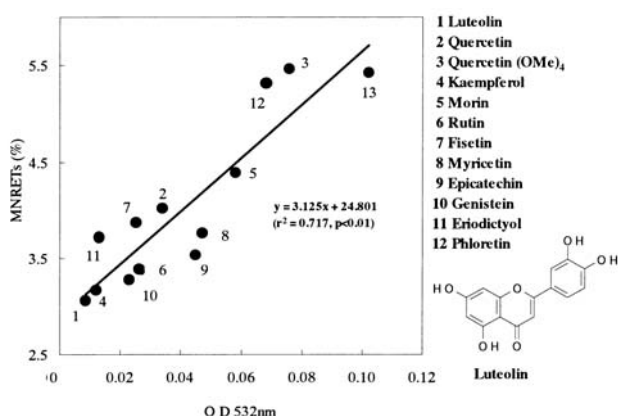


Fig. 3 Relationship between antioxidant activity (OD532nm) and anticlastogenic activity (MNRETs, %) of flavonoids. The dose of flavonoids used for determination of both activities was 0.2 μ mol/ml and 5 μ mol/kg, respectively. A simple linear regression analysis was performed on all data. Closed circle represents mean value of each group. Quercetin (OMe)4 : quercetin-3,7,3',4'-tetramethylether.

ことを確認した。フラボノイドは強力な抗酸化性を有するが、その作用機構としてはフリーラジカルの捕捉作用、金属イオンとのキレート形成作用、脂質過酸化連鎖反応の停止作用などが考えられる。Shimoi ら (1994) は 12 種の既知フラボノイドを用いてフェントン試薬 ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) によるリノール酸メチルの過酸化抑制効果と γ 線照射によるマウス末梢血網赤血球中の小核誘発頻度の抑制効果を検討した。その結果、Fig. 3 にみられるように脂質の過酸化の度合い (OD532nm) と小核の誘発頻度が正の相関性 ($r^2 = 0.717$) を示すことを確認した。さらに γ 線照射 2 時間前にルテオリンをマウスに経口投与したのち骨髄と脾臓における脂質過酸化度を調べると有意に抑制されることがわかった。これらの結果からフラボノイド類が生体内でも抗酸化性を発現していることが示唆された。Win ら (2002) は Φ X-174 プラスミド DNA を用いて活性酸素を介した DNA 一本鎖切断に対する genistein と resveratrol の作用を検討した。その結果、genistein が $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cu}(\text{II})$ により生成する活性酸素が引き起す DNA 損傷を抑制するのに対して resvera-

trolではDNAの一本鎖切断を促進した。このようにフラボノイド類は化学構造によりDNAに対して作用が全く相反する場合が存在することが示された。Lautraiteら(2002)はフラボノイド、ケルセチン、アピゲニン、クリシンのIQやB(a)Pの遺伝毒性に対する影響をチャイニーズハムスターV79細胞を用いて検討した。ヒトのCYP1A2を発現する細胞系ではIQによる遺伝毒性はケルセチンで抑制された。CYP1A1を発現する細胞ではB(a)Pで処理した場合アピゲニンやクリセンで抑制されたが、ケルセチンは影響を与えなかったと報告している。

3) フェノール化合物

Rompelbergら(1995)はeugenolのcyclophosphamide, mitomycin C, ethylmethansulfonate, B(a)Pに対する抗変異活性をマウス骨髄を用いた小核試験を適用して調べた。eugenolの経口投与によりcyclophosphamideによる小核誘発頻度が有意に減少したことからin vivoの利用が期待できると考えた。しかし、他の変異原に対しては効果が認められなかった。de Mejiaら(1999)はサルモネラYG1024株を用いて1-NPおよびB(a)Pに対するタチナタマメ(*Phaseolus vulgaris*)抽出物の抗変異活性を調べた。マメ抽出物とellagic acidは両変異原に対して用量作用曲線を有する明瞭な抗変異活性を示した。

Loarca-Pinaら(1996; 1998)は穀物や豆類に寄生するカビの代謝産物であるAflatoxin B₁に対するエラゲ酸などの抗変異活性を調べた。その結果、エラゲ酸は複合体を形成し変異活性の低下を引き起こした。飲料中のポリフェノールについてもいくつかの報告がある。ビール1L中には総ポリフェノールが50-500mg存在しておりアントシアノゲンやケルセチン、ケンフェロール、キサントクモールなどが代表的なものである(佐久間, 2000)。コーヒー中にはカフェ酸、フェルラ酸などの桂皮酸誘導体とともにクロロゲン酸が存在しており、Trp-P-1, 2-aminodipyrido[1, 2-a:3', 2'-d]imidazole (Glu-P-2), AF-2などに抗変異活性を示している(西澤ら, 2000)。ワインにはカテキン類のほか、プロトシアニジン、フラボノールとともにresveratrolが白ワインで0.12ppm、赤ワインで1.04ppm存在しているという(佐藤, 2000)。緑茶や紅茶にはカテキン類とともにその二次成績体が存在するが、甜茶ではガーリック酸、エラゲ酸、エラグタンニンが、またウイスキーではバニリン酸、シリングアルデヒド、2-フェニルアルデヒド等が存在することが確認されている(幹, 2000)。レモンやライム中のポリフェノールとしてはeriocitrin, neocriocitrin, hesperidin, neohesperidin, narirutin, narinjin, diosmin類縁体が含まれている(三宅, 2000)。さらにカテキン類の果汁中にはnobiletin, luteolinがそれぞれグレープフルーツやパレンシアオレンジに含まれている。Yenら(2001)は薬草

の*Mesona procumbens*の水、メタノール、酢酸エチルの各抽出物を用いてB(a)PやIQに対する抗変異活性を調べたところ、用量作用曲線が得られ、その活性はポリフェノールとアスコルビン酸量に比例することを報告している。

4) 含硫化合物

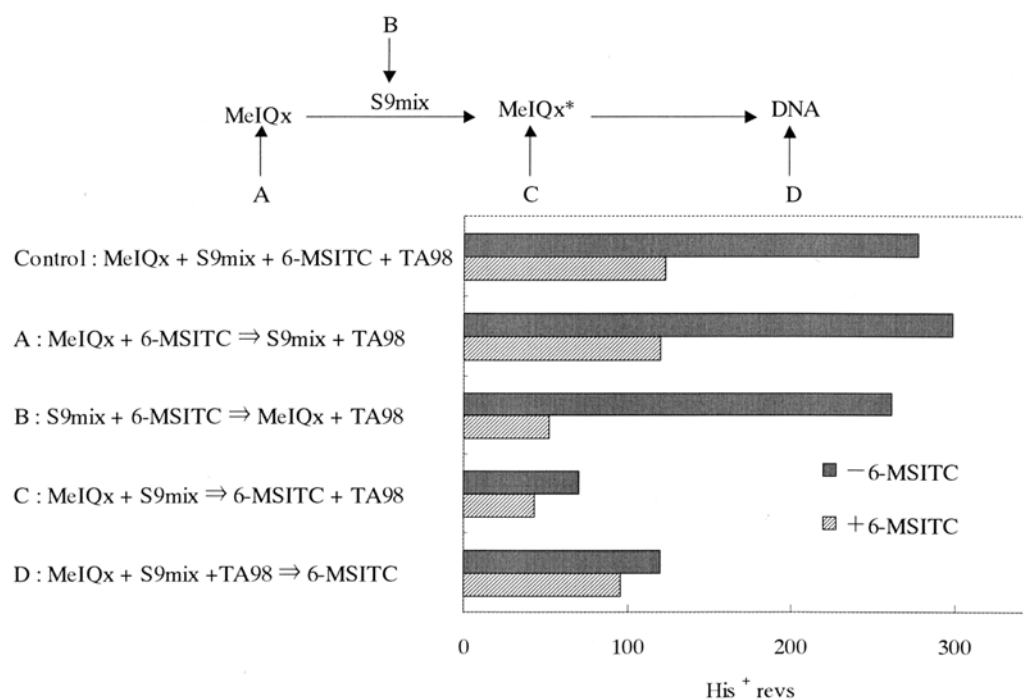
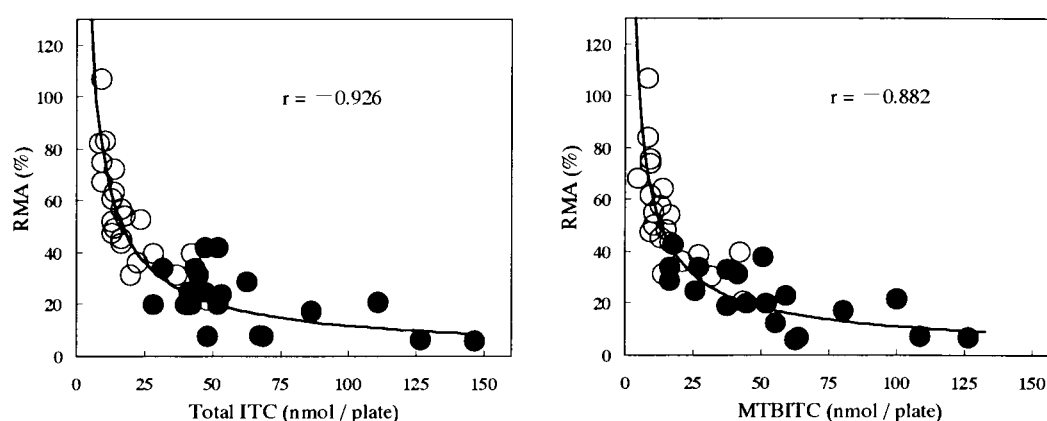
Morseら(1989)はアブラナ科の植物に含まれるphenethyl isothiocyanateを飼料に混合してラットに投与すると、肺におけるDNAのメチル化が有意に低下すること、Wargovichら(1988)は、ニンニクやタマネギに含まれるdiallyl sulfideがN-ニトロソメチルベンジルアミンのラットにおける食道がん誘発実験で食道表皮細胞の核異常の誘発頻度を低下すること、Zhangら(1992)はブロッコリーに含まれる(-)-1-isothiocyanato-(4R)-(methylsulfinyl)butaneが薬物代謝第2相酵素のglutathione-S-transferaseを誘導することなどを報告している。これらの実験から含硫化合物は薬物代謝におけるP-450が関与する第1相反応を抑制し、第2相反応を促進しているものと推測している。

Nakamuraら(1993; 1996)はカリフラワー抽出物からS-methyl methanethiosulfonateを分離し、本化合物が紫外線照射した大腸菌B/r wp2に対する変異原性を抑制することを報告した。その後、当該物質が十字花科(*Cruciferae*)やユリ科(*Liliaceae*)などの植物ホモジネート中にも存在し、前駆体がS-methyl-L-cysteinesulfoxideであることを明らかにしている。著者ら(Kinae et al., 2000)は沢ワサビの根茎や葉、西洋ワサビや中国ワサビの根茎抽出物が間接変異原のMeIQxやTrp-P-1、直接変異原の3-chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2 (5H)-furanone (MX)に対して変異原性抑制活性を有することを報告した(Table 10)。また市販のチューブ入りワサビにも抗変異活性を認めた。現在までにワサビの透析画分より3種の抗変異原(-)-(R)-methylsulfinylalkyl isothiocyanate (CH₃SO-(CH₂)_n-NCS, n=5-7, MSITC)を分離した。代謝機構についてはFig. 4に示すようにA~Dの作用点を想定した。Ames試験で検討した結果、Bの代謝酵素(S9mix)を阻害していることが明らかになった。さらにNakamuraら(2001)は大腸菌B/r wp2に紫外線を照射した場合に誘発される変異を大根のn-ヘキサン抽出物が抑制することを見出し、活性本体が4-(methylthio)-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC)であること、さらに微量ながらphenethyl isothiocyanateの存在を確認した。彼らは全isothiocyanate (total ITC)量と抗変異原性が相関することを示している(Fig. 5)。最近、Fahmyら(2002)は重クロム酸カリウムで誘発される骨髄や精子の染色体異常が解毒剤として用いられているthiola (2-mercaptopropionylglycine)や大豆抽出物の投与により抑制されることをマウスを用いた実験で証明しており、大豆の場合、含まれるprotease inhibitorが活性

Table 10 Inhibitory effect of wasabi samples against mutagens

(Kinae et al., 2000)

Sample	MX (TA100, -S9mix)			MeIQx (TA98, +S9mix)			Trp-P-1 (TA98, +S9mix)		
	1	1/2	1/10	1	1/2	1/10	1	1/2	1/10
Sawa-wasabi root	99	98	90	96	82	29	89	68	31
Sawa-wasabi leaf	74	67	31	61	33	0	67	32	8
Horseradish root	98	88	38	94	82	29	88	72	47
Chinese wasabi root	96	96	66	98	96	72	100	99	77
Commercial wasabi	-	-	-	79	59	13	88	73	35

**Fig. 4** Mechanism of antimutagenic activity of 6-methylsulfinylhexyl-isothiocyanate (6-MSITC)**Fig. 5** Correlation between antimutagenicity and isothiocyanate contents:

(○) 0.1 g of daikon extract; (●) 0.3 g of daikon extracts. For quantification of total ITC, 50 μ L of the diluted n-hexane extracts was reacted with 50 μ L of 8 mM 1,2-benzenedithiol at 65 $^{\circ}$ C for 1 h, and then the absorption of the reactant was calculated at 365 nm.

MTBITC was analyzed with FID-GC. The correlation plots were applied with two site binding hyperbola.

The correlation was observed between RMA and total ITC content ($r = -0.926$) or MTBITC content ($r = -0.882$).

Each point represents the mean of duplicate plates in one experiment.

Table 11 Effects of antimutagens on bleomycin, cisplatin, cyclophosphamide, and doxorubicin
(Gentile et al., 1998)

Antitumor agent	Antimutagen	Effect	In vivo	In vitro	Endpoint
Bleomycin	β -carotene	enhancement		+	micronucleus
	vitamin C and E	no effect		+	salmonella
	vitamin C	inhibition		+	chrom. aberration
	vitamin C and E	inhibition	+		micronucleus
	galangin	inhibition		+	chrom. aberration
	cysteine	enhancement		+	chrom. aberration
	13- <i>cis</i> -retinoic acid	inhibition	+	+	chrom. aberration
	taurine	inhibition		+	salmonella
Cisplatin	3-aminobenzamide	no effect	+		drosophila
	prostacyclin	inhibition	+		chrom. aberration
	sodium thiosulfate	inhibition	+		drosophila
	diallyl trisulfide	enhancement		+	hepatocyte UDS
	unsaturated fatty acids	inhibition		+	chrom. aberration
Cyclophosphamide	stobadine	inhibition	+		micronucleus
	β -carotene	inhibition	+		chrom. aberration
	ethoxyquine	inhibition	+		chrom. aberration
	amifostine	inhibition	+		mouse HGPRT
	diallyl trisulfide	inhibition		+	hepatocyte UDS
	vitamin C	inhibition	+		mouse SCE
	chlorophyllin	inhibition	+		chrom. aberration
	myrcene	inhibition		+	lymphocyte SCE
	eugenol	inhibition	+		micronucleus
	carboxymethylglucan	inhibition	+		micronucleus
Doxorubicin	phenethyl isothiocyanate	inhibition	+		chrom. aberration
	chlorophyllin	inhibition		+	micronucleus
	ascorbic acid	inhibition		+	micronucleus
	ascorbic acid	inhibition		+	salmonella
	saponin	inhibition		+	micronucleus
	desferrioxamine	inhibition	+		micronucleus
	taurine	inhibition		+	salmonella
	captopril	inhibition	+		micronucleus
	chitin/chitosan	inhibition		+	sce

Only articles which identified the active antimutagenic component were used as references for this table.

Those papers which showed the effect of complex mixtures against these antitumor agents were not included.

本体の可能性が高いとしている。このように含硫成分が抗変異原として有効であることが報告されつつある。

5) ビタミン

Brockmanら(1992)は、各種変異原、発がん物質に対する retinol, retinoic acid, retinol acetate, retinal, retinol palmitate, β -carotene などの抗変異活性についてレビューしている。これら retinoide が in vitro, in vivo で姉妹染色分体交換や染色体異常を指標とした場合に抗変異活性を示していることを述べている。Rauscher ら(1998)はアンズ、オレンジ、キャベツ、ニンニク、トウガラシ、トマトから有機溶媒で抽出したものについて Aflatoxin B₁, B(a)P, IQ, cyclophosphamide に対する抗変異原性を Ames 法により検定した。その結果, carotenoid (α , β -carotene, lycopene), xanthopyll (β -cryptoxanthin, lutein), carotenolester を含む画分が陽性を示しており抗変異活性を確認できた。なお、小核試験においても同様の活性

を認めている。de Mejia ら(1998)はメキシコ人が1日に40gのトウガラシを摂取していることに注目して β -カロテンやビタミンAの源として重要な5種類の green pepper の抽出物を用いて 1-nitropyrene, 1, 6-dinitropyrene, 1, 8-dinitropyrene に対する抗変異原性を調べた。いずれも抗変異原性を示し、相乗効果を認めた。Nefic(2001)は、cisplatinで誘導されたヒトの末梢リンパ球の染色体異常がビタミンCの投与により有意に抑制されることを報告した。またビタミンCはcisplatinの細胞毒性の緩和作用を示した。Gentileら(1998)は制がん剤である cyclophosphamide, blomycin, doxorubicin, cisplatin に対するビタミンC, クロロフィル, (+)-カテキンなどの抗変異活性を小核試験, 染色体異常試験, 姉妹染色分体試験, Ames 試験などで検定した結果をレビューしている (Table 11)。 β -カロテン, ビタミンC, ビタミンEなどが in vivo, in vitro で抗変異活性を示した。Aly

Table 12 The effects of various chlorophylls on AFB₁-DNA adduction and tumorigenicity when co-injected into rainbow trout embryos^a (Dashwood et al., 1998)

Chlorophyll	Dose (μg)	pg AFB ₁ /mg DNA ^b	Inhibition (%)	Tumor incidence (%) ^c
None	—	170 ± 25	0	105/144 (73 %)
CHL	10	103 ± 24	39	21/42 (50 %)
	100	117 ± 11	31	21/43 (49 %)
	1000	47 ± 4	72	[21/25]
Chlorine ₆	10	138 ± 9	19	24/44 (55 %)
	100	142 ± 24	17	[12/20]
	1000	97 ± 14	43	[12/28]
Chlorophyll a	10	142 ± 24	17	32/49 (65 %)
	100	164 ± 16	4	[8/9]
	1000	143 ± 10	16	[8/9]

^a For details of the methodologies for assessing AFB₁-DNA adducts and liver tumor incidence

^b Mean ± SD.

^c Square brackets indicate groups with poor survival.

Table 13 Effects of Chl-chitosan on Trp-P-2-adduct formation in mice lung (Sugiyama et al., 2002)

Group Treatment	DNA adduct (per 10 ⁷ nucleotides)
	Mean ± S.D. (Found)
1. 0.01 % Trp-P-2	7.40 ± 2.8 (7.9, 4.4, 10.0)
2. 0.01 % Trp-P-2 +1 % Chl-chitosan	2.50 ± 0.29 ^a (2.3, 2.8, 2.3)
3. 0.01 % Trp-P-2 +2 % Chl-chitosan	0.50 ± 0.09 ^b (0.60, 0.43, 0.46)
4. 0.01 % Trp-P-2 +3 % Chl-chitosan	0.16 ± 0.1 ^c (0.11, 0.28, 0.10)

a) Difference tendency from group 1 ($p=0.094$). b) Difference tendency from group 1 ($p=0.051$). c) Significantly different from group 1 at $p<0.05$.

ら (2002) は結核治療薬である rifampicin をマウスに投与後遺伝毒性を調べた。rifampicin は染色体異常を誘発したが、ビタミンCを投与するとその染色体異常能は低下した。ビタミンCの繰り返し投与実験で、染色体異常はさらに低下した。しかし、ビタミンEの場合は高濃度でのみ効果を認めた。

6) クロロフィルを含むポルフィリン化合物

Odin (1997) らはクロロフィルやヘミン、ヘモグロビンなどを含むポルフィリン化合物の抗変異原性についてレビューしている。彼らは細菌、酵母を用いた実験とともにポルフィリンとヘテロサイクリックアミンの結合様式が抗変異原性の発現に関与していることを報告している。Dashwood ら (1998) は chlorophyll の AFB₁ に対する抗発がん作用および抗変異原作用をニジマスを用いて検討している。ニジマスやラット肝酵素を用いた

Ames 実験において chlorophyllin がヘテロサイクリックアミンや多環芳香族炭化水素、アフラトキシンなどに対して抗変異活性を示した。その場合、特に DNA との付加体形成を阻害していることが明らかになった (Table 12)。Sugiyama ら (2002) はクロロフィリンがヘテロサイクリックアミンやアフラトキシン B₁ など多環化合物の変異原性や発がん性を抑制することに着目してクロロフィリンとキトサンを結合させた Chl-chitosan を調製した。Chl-chitosan をマウスに投与すると Trp-P-2 DNA 付加体の肝臓や肺での形成が有意に減少することを確認した。それゆえ、本物質がヒトのがん予防にも有効であるとしている (Table 13)。

7) その他の抗変異原

Camoirano ら (1994) は 90 種の化学物質について直接変異原性を示す 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) と S9mix を必要とするタバコ主流煙に対する抗変異活性を検定している。その結果、6-mercaptoethanol, 1, 4-dithiothreitol, cysteamine, L-cysteine, N-acetyl-L-cysteine, disulfiran, glutathione, spermidine, curcumin, myricetin, bilirubin が 4NQO に対して抗変異活性を示した。また、タバコ主流煙に対しては disulfiran, phenyl isothiocyanate, phenethyl isothiocyanate, butylated hydroxytoluene, curcumin, caffeic acid, vannillin, gallic acid, myricetin, rutin, catechin, bilirubin, chlorophyllin, riboflavine, trans-β-carotene, ethoxyquin, oleic acid などが抗変異活性を示した。

Stadler ら (1994) はコーヒーには H₂O₂ が含まれ直接変異原性を示すが、抗酸化性と抗変異原性も有することを報告している。ポリフェノールを含むコーヒー抽出液は t-butylhydroperoxide で誘導される変異原性を抑制し、さらに 2'-deoxyguanosine から 8-oxo-2'-deoxyguanosine

への水酸化も抑制した。Bakalinsky ら (1996) はヨーグルトの抗変異原性について検討し、アセトン抽出物中の palmitic acid が MNNG に対する抗変異原であることを見出した。Motohashi ら (1997) は ショウガ (*Zingerber officinalae*) に含まれる dehydrozingerone 類縁体の抗変異原性を UV 照射した大腸菌 WP2S (uvrA) を用いて検定した。benzalacetone と 4-phenyl-3-butyne-2-one が変異原抑制作用を示したことから環の置換位置よりも二重結合、三重結合を有するカルボニル基の存在が重要であることを明らかにした。トウガラシ中の辛味成分である capsaicin がリンパ球に対して小核や姉妹染色分体交換を誘発することが報告されている (Marques, 2002)。しかし一方で、capsaicin を含む辛味成分が抗変異原性、抗発がん性を有することも次第に明らかにされ、トウガラシやショウガ中の辛味成分の抗変異・抗発がん作用についてレビューがある (Surh et al., 1998)。Sun ら (2000) は薬用植物より anthraquinone, emodin, chrysophal, rhein を見出し、anthraquinone が CYP1A1 の抑制により Trp-P-2 の N-水酸化を阻害することを見出している。Nakahara ら (2001) は食用タイ植物 *Oroxylum indicum* Vent のメタノール抽出物が Ames 試験で Trp-P-1 の変異原性を強く阻害しており、bicaein は慢性肝炎に用いられる小柴胡湯の有効成分でもあり、フリーラジカル捕捉能をもつことから Trp-P-1 の N-水酸化を抑制したものと考えている。有元 (2002) はビール中の抗変異原物質の検索を行った。サルモネラ TA98, TA100 株を用いる Ames 法により、Trp-P-2 (NHOH), Glu-P-1 (NHOH), 2-chloro-4-methylthiobutanoic acid (CMBA), MNNG, benzo(a)pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide (BPDE) に対する変異原性抑制能を検定した。その結果、ferulic acid, caffeic acid, p-hydroxyphenethyl alcohol が強い抗変異原性を示した。また、vanillic acid, syringic acid, gallic acid, p-coumaric acid, phloroglucitol にも活性を認めた。これらの化合物が Trp-P-2 (NHOH) の代謝を抑制し、肝臓における DNA 付加体形成を阻害したものと推定している。Idaomar ら (2002) はショウジョウバエを用いる wing spot test により 3 種の生薬 (*Helichrysum italicum*, *Ledum groenlandicum*, *Ravensara aromatica*) の精油成分の抗変異原性を明らかにした。また、それら 3 種の精油を混合すると相乗効果を示した。作用メカニズムとしてはチトクローム P-450 系酵素との相互作用により変異原の活性体生成を抑制するためであるとしている。Villasenor ら (2002) はハッカのクロロホルム抽出画分がテトラサイクリンに対して抗変異原性を示すことから、活性成分の検索を行い、6, 7-bis (2, 2-dimethoxyethene)-2, 11-dimethoxy-2Z, 4E, 8E, 10Z-dodecatetraendioic acid を単離した。それ自身には変異原性がみられないことから、その利用方法が検討されている。

ま と め

すでに述べたように野菜、果物などの植物には多くの抗変異原物質が存在することが明らかとなった。本稿では割愛したが、香料、香辛料、薬草にも多くの抗変異原物質の存在が確認されており、さらに金属イオンや、食物繊維も変異・発がん物質の活性を抑制することが報告されている (黒田, 1995)。我々は、常に抗変異原物質を食品として摂取しているが、食品とともに体内に取り込まれた変異原・発がん物質のいくつかを生体成分の唾液 (Nishioka, et al., 1986) やヘミンを含む血液成分 (Hayatsu, et al., 1999) がそれらの毒性を低減するいわゆる抗変異原物質としての活性を保有しているのも確かである。また、調理、加工された日常食品中には抗酸化性やラジカル捕捉活性を有するものが化学成分として数多く分離されている。それら抗変異原物質が実際にヒトの発がん抑制に寄与するか否かについても多くの総説がある (Hayatsu, et al., 1993; Ferguson, 1999; 黒田, 1995; 大澤俊彦ら, 1995; 1999; Kumpulainen, et al., 1999)。しかし、食品の中には変異原と抗変異原を同時に共存しているものが多く、実際にそれらががん発生にどのように関わっているのかは不明な点が多い。米国では 1990 年から 5 年間、米国国立がん研究所によるデザイナーフードプログラムが実施され、ニンニクや茶葉を含むおよそ 40 種の植物性食品についてがん予防効果を認めている。さらに 1997 年にはアメリカがん研究財団と世界がん研究基金はがん予防 15 カ条を提唱し、「Five a day」1 日 5 種類以上の野菜と果物を摂取することを奨めている。我が国においてはがん研究振興財団が「がんを防ぐための 12 カ条」を、文部科学省が「健康日本 21」をそれぞれ提唱し、同様に野菜、果物を積極的に摂取することががんの一次予防になるとしている。最近、抗変異原作用を有する食品が医薬品の副作用の軽減作用や免疫能賦活作用を有することが明らかにされてきた。それゆえ、抗変異原の研究がさらに発展することを期待している。

参考文献

- Aly, F. A., S. M. Donya (2002) In vivo antimutagenic effect of vitamins C and E against rifampicin-induced chromosome aberrations in mouse bone-marrow cells, *Mutat. Res.*, 518, 1-7.
- Ames, B. N., J. McCann, E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 31, 347-364.
- Apostolides, Z., D. A. Balentine, M. E. Harbowy, J. H. Weisburger (1996) Inhibition of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) mutagenicity by black and green tea extracts and polyphenols, *Mutat. Res.*, 359, 159-163.
- Apostolides, Z., D. A. Balentine, M. E. Harbowy, Y. Hara, J. H. Weisburger (1997) Inhibition of PhIP mutagenicity by catechins, and by theaflavins and gallate esters, *Mutat. Res.*, 389, 167-172.
- 有元佐賀恵 (2002) ビール及びその他の醗酵飲料中の抗変異原物質, *FFI ジャーナル*, 200, 5-11.

- Bakalinsky, A. T., S. R. Nadathur, J. R. Carney, S. J. Gould (1996) Antimutagenicity of yogurt, *Mutat. Res.*, 350, 199-200.
- Blot, W. J., W. H. Chow and J. K. McLaughlin (1996) Tea and cancer : a review of the epidemiological evidence, *Eur. J. Cancer. Prev.*, 6, 425-438.
- Brockman, H. E., H. F. Stack, M. D. Waters (1992) Antimutagenicity profiles of some natural substances, *Mutat. Res.*, 267, 157-172.
- Bu-Abbas, A., M. N. Clifford, R. Walker, C. Ioannides (1994) Selective induction of rat hepatic CYP1 and CYP4 proteins and of peroxisomal proliferation by green tea, *Carcinogenesis*, 15, 2575-2579.
- Bushman, J. L. (1998) Green tea and cancer in humans: a review of the literature, 31, 151-159.
- Camoirano, A., R. M. Balansky, C. Bennicelli, A. Izzotti, F. D'Agostini, S. De Flora (1994) Experimental databases on inhibition of the bacterial mutagenicity of 4-nitroquinoline 1-oxide and cigarette smoke, *Mutat. Res.*, 317, 89-109.
- Constable, A., N. Varga, J. Richoz, R. H. Stadler (1996) Antimutagenicity and catechin content of soluble instant teas, *Mutagenesis*, 11, 189-194.
- Dashwood, R., T. Negishi, H. Hayatsu, V. Breinholt, J. Hendricks, G. Bailey (1998) Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B₁ : A review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout, *Mutat. Res.*, 399, 245-253.
- De Flora, S., C. Ramel (1988) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview, *Mutat. Res.*, 202, 285-306.
- De Jong, U. W., N. Breslow, J. G. Hong, M. Sridharan, K. Shanmugaratnam (1974) Aetiological factors in oesophageal cancer in Singapore Chinese, *Int. J. Cancer*, 13, 291-303.
- de Mejia, E. G., A. Quintanar-Hernandez, G. Loarca-Pina (1998) Antimutagenic activity of carotenoids in green peppers against some nitroarenes, *Mutat. Res.*, 416, 11-19.
- de Mejia, E. G., E. Castano-Tostado, G. Loarca-Pina (1999) Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans, *Mutat. Res.*, 441, 1-9.
- Dhawan, A., D. Anderson, S. de Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga, M. N. Clifford, C. Ioannides (2002) Evaluation of the antigenotoxic potential of monomeric and dimeric flavanols, and black tea polyphenols against heterocyclic amine-induced DNA damage in human lymphocytes using the Comet assay, *Mutat. Res.*, 515, 39-56.
- Doll, R. (1977) Strategy for detection of cancer hazards to man, *Nature*, 265, 589-596.
- Edenharder, R., R. Rauscher, K. L. Platt (1997) The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure-activity relationship study, *Mutat. Res.*, 379, 21-32.
- Fahmy, M. A., H. M. Shoman, E. E. Hassan (2002) The protective role of thiol and soybean seeds against the genotoxicity induced by potassium dichromate in mice, *Mutat. Res.*, 517, 1-12.
- Ferguson, L. R. (1999) Natural and man-made mutagens and carcinogens in the human diet, *Mutat. Res.*, 443, 1-10.
- Gentile, J. M., S. Rahimi, J. Zwiesler, G. J. Gentile, L. R. Ferguson (1998) Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of anti-tumor agents, *Mutat. Res.*, 402, 289-298.
- Gonzalez de Mejia, E., A. Quintanar-Hernandez, G. Loarca-Pina (1998) Antimutagenic activity of carotenoids in green peppers against some nitroarenes, *Mutat. Res.*, 416, 11-19.
- Hayatsu, H., T. Negishi, S. Arimoto (1993) Dietary inhibitors against mutagenesis and carcinogenesis, *Basic Life Sci.*, 61, 387-418.
- Hayatsu, H., C. Sugiyama, S. Arimoto-Kobayashi, T. Negishi (1999) Porphyrins as possible preventers of heterocyclic amine carcinogenesis, *Cancer Lett.*, 143, 185-187.
- Hernaez, J. F., M. Xu, R. H. Dashwood (1998) Antimutagenic activity of tea towards 2-hydroxyamino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline : Effect of tea concentration and brew time on electrophile scavenging, *Mutat. Res.*, 402, 299-306.
- Higashimoto, M., Y. Akada, M. Sato, Y. Yamada, T. Kuwahara and Y. Ohnishi (2001) Inhibitory effects of herbal teas and herb extracts on the mutagenicity of 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid upon treatment with nitrite in the presence of ethanol, *Environ. Mutagen Res.*, 23, 1-7.
- Idaomar, M., R. El-Hamss, F. Bakkali, N. Mezzoug, A. Zhiri, D. Baudoux, A. Munoz-Serrano, V. Liemans, A. Alonso-Moraga (2002) Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.*, 513, 61-68.
- 幹 渉 (2000) ウーロン茶・甜茶・ウイスキー中のポリフェノールとその関連成分, *Food Style* 21, 4(1), 56-58.
- Ito, Y., S. Ohnishi, K. Fujie (1989) Chromosome aberrations induced by aflatoxin B₁ in rat bone marrow cells in vitro and their suppression by green tea, *Mutat. Res.*, 222, 253-261.
- Jain, A. K., K. Shimoi, Y. Nakamura, T. Kada, Y. Hara, I. Tomita (1989) Crude tea extracts decrease the mutagenic activity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in vitro and in intragastric tract of rats, *Mutat. Res.*, 210, 1-8.
- Jia, X., C. Han (2001) Effects of green tea on colonic aberrant crypt foci and proliferative indexes in rats, *Nutr. Cancer.*, 39, 239-243.
- Kada, T., T. Inoue, M. Namiki, and E. J. Klekowsky, Jr. ed. (1981) Environmental mutagenesis and plant biology, p134, ed. by Klekowsky, Jr., Praegen Scientific, New York, pp. 132-151.
- Kada, T., K. Kaneko, S. Matsuzaki, T. Matsuzaki, Y. Hara (1985) Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. A case of the green tea factor, *Mutat. Res.*, 150, 127-132.
- Kinae, N., M. Furugori, H. Takemura, M. Iwazaki, K. Shimoi and K. Wakabayashi (1997) Inhibitory effects of tea extracts on the formation of heterocyclic amines during cooking of hamburger, in: H. Ohgashi, T. Osawa, J. Terao, S. Watanabe, T. Yoshikawa (Eds.), *Food Factors for Cancer Prevention*, Springer Tokyo pp. 142-146.
- Kinae, N., H. Masuda, I. S. Shin, M. Furugori, K. Shimoi (2000) Functional properties of wasabi and horseradish, *Biofactors*, 13, 265-269.
- Kumpulainen, J. T. and J. T. Salonen (1999) Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health, and disease, Royal Society of Chemistry.
- 黒田行昭 (1995) 抗変異原・抗発がん物質とその検索法, 講談社サイエンスフィック.
- Kuroda, Y., Y. Hara (1999) Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols, *Mutat. Res.*, 436, 69-97.
- 黒田行昭, 原 征彦 (1999) 茶カテキン類の抗変異原性および抗発がん性 (I), 環境変異原研究, 21, 1-10.
- 黒田行昭, 原 征彦 (1999) 茶カテキン類の抗変異原性および抗発がん性 (II), 環境変異原研究, 21, 85-94.
- Lautraite, S., A. C. Musonda, J. Doehmer, G. O. Edwards, J. K. Chipman (2002) Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1, *Mutagenesis*, 17, 45-53.
- Loarca-Pina, G., P. A. Kuzmicky, E. G. de Mejia, N. Y. Kado, D. P. Hsieh (1996) Antimutagenicity of ellagic acid against aflatoxin B₁

- in the Salmonella microsuspension assay, *Mutat. Res.*, 360, 15-21.
- Loarca-Pina, G., P. A. Kuzmicky, E. G. de Mejia, N. Y. Kado (1998) Inhibitory effects of ellagic acid on the direct-acting mutagenicity of aflatoxin B₁ in the Salmonella microsuspension assay, *Mutat. Res.*, 398, 183-187.
- Marques, S., N. G. Oliveira, T. Chaveca, J. Rueff (2002) Micronuclei and sister chromatid exchanges induced by capsaicin in human lymphocytes, *Mutat. Res.*, 517, 39-46.
- Metz, N., A. Lobstein, Y. Schneider, F. Gosse, R. Schleiffer, R. Anton, F. Raul (2000) Suppression of azoxymethane-induced preneoplastic lesions and inhibition of cyclooxygenase-2 activity in the colonic mucosa of rats drinking a crude green tea extract, *Nutr. Cancer*, 38, 60-64.
- 三宅義明 (2000) レモン・ライム中のポリフェノールの作用, *Food Style* 21, 4(1), 72-74.
- Morse, M. A., C. X. Wang, G. D. Stoner, S. Mandal, P. B. Conran, S. G. Amin, S. S. Hecht, F. L. Chung (1989) Inhibition of 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced DNA adduct formation and tumorigenicity in the lung of F344 rats by dietary phenethyl isothiocyanate, *Cancer Res.*, 49, 549-553.
- Motohashi, N., Y. Ashihara, C. Yamagami, Y. Saito (1997) Antimutagenic effects of dehydrozingerone and its analogs on UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, 377, 17-25.
- 村上 明, 大東 肇 (2000) カンキツ果汁に特異的なフラボノイド, *Food Style* 21, 4(1), 75-77.
- Nakachi, K., S. Matsuyama, S. Miyake, M. Suganuma, K. Imai (2000) Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease : epidemiological evidence for multiple targeting prevention, *Biofactors*, 13, 49-54.
- Nakahara, K., M. Onishi-Kameyama, H. Ono, M. Yoshida, G. Trakontivakorn (2001) Antimutagenic activity against Trp-P-1 of the edible Thai plant, *Oroxylum indicum* vent, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 2358-2360.
- Nakamura, Y., T. Matsuo, K. Shimoi, Y. Nakamura, I. Tomita (1993) S-methyl methanethiosulfonate, a new antimutagenic compound isolated from *Brassica oleracea* L. var. botrytis, *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 207-209.
- Nakamura, Y. K., T. Matsuo, K. Shimoi, Y. Nakamura, I. Tomita (1996) S-methyl methanethiosulfonate, bio-antimutagen in homogenates of *Cruciferae* and *Liliaceae* vegetables, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 1439-1443.
- Nakamura, Y., T. Iwahashi, A. Tanaka, J. Koutani, T. Matsuo, S. Okamoto, K. Sato, K. Ohtsuki (2001) 4-(Methylthio)-3-butenyl isothiocyanate, A principal antimutagen in daikon (*Raphanus sativus*; Japanese white radish), *J. Agric. Food. Chem.*, 49, 5755-5760.
- 南条文雄 (2000) 緑茶ポリフェノールの機能性, *Food Style* 21, 4(1), 52-55.
- Nefic, H. (2001) Anticlastogenic effect of Vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures, *Mutat. Res.*, 498, 89-98.
- Nishioka, H., T. Nunoshiba (1986) Role of enzymes in antimutagenesis of human saliva and serum, *Basic Life Sci.*, 39, 143-151.
- 西澤千恵子, ゲン・ヴァン・チュエン (2000) コーヒー中のポリフェノールの作用, *Food Style* 21, 4(1), 65-67.
- Odin, A. P. (1997) Antimutagenicity of the porphyrins and non-enzyme porphyrin-containing proteins, *Mutat. Res.*, 387, 55-68.
- Oguni, I., K. Nasu, S. Yamamoto, T. Nomura (1988) On the antitumor activity of fresh green tea leaf, *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1879-1880.
- Oguni, I., K. Nasu, S. Kanaya, Y. Ota, S. Yamamoto, T. Nomura (1989) Epidemiological and experimental studies on the antitumor activity by green tea extracts, *Japan, J. Nutrition*, 47, 98-102.
- Oguni, I. (2000) Epidemiological and experimental studies on protection against cancer risk by green tea, *Proceedings of the Fourth Shizuoka Forum on Health and Longevity*, pp. 142-146.
- Ohe, T., K. Marutani, S. Nakase (2001) Catechins are not major components responsible for antigenotoxic effects of tea extracts against nitroarenes, *Mutat. Res.*, 496, 75-81.
- Ohno, Y., K. Wakai, K. Genka, K. Ohmine, T. Kawamura, A. Tamakoshi, R. Aoki, (1995) Tea consumption and lung cancer risk : a case-control study in Okinawa, Japan, *J. Cancer Res.*, 86, 1027-1034.
- Okuda, T., K. Mori, H. Hayatsu (1984) Inhibitory effect of tannins on direct-acting mutagens, *Chem. Pharm. Bull.*, 9, 3755-3758.
- 大澤俊彦 (1995) がん予防食品の開発, シーエムシー.
- 大澤俊彦, 大東 肇, 吉川敏一 (1999) がん予防食品, シーエムシー.
- Rauscher, R., R. Edenharder, K. L. Platt (1998) In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids, *Mutat. Res.*, 413, 129-142.
- Rompelberg, C. J., W. H. Stenhuis, N. de Vogel, W. A. van Osenbruggen, A. Schouten, H. Verhagen (1995) Antimutagenicity of eugenol in the rodent bone marrow micronucleus test, *Mutat. Res.*, 346, 69-75.
- Sadakata, S., A. Fukao, S. Hisamichi (1992) Mortality among female practitioners of Chanoyu (Japanese 'tea-ceremony'), *Tohoku J. Exp. Med.*, 166, 475-477.
- 佐久間修三 (2000) ビール中のポリフェノールの作用, *Food Style* 21, 4(1), 83-85.
- 佐藤充克 (2000) ワイン・ポリフェノールの生理機能, *Food Style* 21, 4(11), 78-81.
- Shimoi, K., Y. Nakamura, I. Tomita, T. Kada (1985) Bio-antimutagenic effects of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r, *Mutat. Res.*, 149, 17-23.
- Shimoi, K., Y. Nakamura, I. Tomita, Y. Hara, T. Kada (1986) The pyrogallol related compounds reduce UV-induced mutations in *Escherichia coli* B/r WP2, *Mutat. Res.*, 173, 239-244.
- 下位香代子, 富田 勲 (1991) 生活環境中の変異原及び抗変異原, *衛生化学*, 37, 149-178.
- Shimoi, K., S. Masuda, M. Furugori, S. Esaki, N. Kinae (1994) Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in gamma-ray irradiated mice, *Carcinogenesis*, 15, 2669-2672.
- 下位香代子, 木苗直秀 (1997) 食事由来のフラボノイド類の消化管吸収と生体内抗酸化性, 環境変異原研究, 19, 171-177.
- Shiraki, M., Y. Hara, T. Osawa, H. Kumon, T. Nakayama, S. Kawakishi (1994) Antioxidative and antimutagenic effects of theaflavins from black tea, *Mutat. Res.*, 361, 179-186.
- Stadler, R. H., R. J. Turesky, O. Muller, J. Markovic, P. M. Leong-Morgenthaler (1994) The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity, *Mutat. Res.*, 308, 177-190.
- Standley, L., P. Winterton, J. L. Marnewick, W. C. Gelderblom, E. Joubert, T. J. Britz (2001) Influence of processing stages on antimutagenic and antioxidant potentials of rooibos tea, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 114-117.
- Sugimura, T., M. Nagao, K. Wakabayashi (1996) Carcinogenicity of food mutagens, *Environ Health Perspect.*, 104, 429-433.
- Sugiyama, C., N. Nakandakari, H. Hayatsu, S. Arimoto-Kobayashi (2002) Preventive effects of chlorophyllin fixed on chitosan towards DNA adduct formation of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole in CDF1 mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 520-522.

- Sun, M., H. Sakakibara, H. Ashida, G. Danno, K. Kanazawa (2000) Cytochrome P4501A1-inhibitory action of antimutagenic anthraquinones in medicinal plants and the structure-activity relationship, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 1373-1378.
- Surh, Y. J., E. Lee, J. M. Lee (1998) Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger, *Mutat. Res.*, 402, 259-267.
- Tsubono, Y., Y. Nishino, S. Komatsu, C. C. Hsieh, S. Kanemura, I. Tsuji, H. Nakatsuka, A. Fukao, H. Satoh, S. Hisamichi (2001) Green tea and the risk of gastric cancer in Japan, *N. Engl. J. Med.*, 344, 632-636.
- Villasenor, I. M., D. E. Echegoyen, J. S. Angelada (2002) A new antimutagen from *Mentha cordifolia* Opiz, *Mutat. Res.*, 515, 141-146.
- von Borstel, R. C., J. A. Higgins (1998) Janus carcinogens and mutagens, *Mutat. Res.*, 402, 321-329.
- Wargovich, M. J., C. Woods, V. W. Eng, L. C. Stephens, K. Gray (1988) Chemoprevention of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats by the naturally occurring thioether, diallyl sulfide, *Cancer Res.*, 48, 6872-6875.
- Weisburger, J. H., Y. Hara, L. Dolan, F. Q. Luo, B. Pittman, E. Zang (1996) Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens, *Mutat. Res.*, 371, 57-63.
- Weisburger, J. H., E. Veliath, E. Larios, B. Pittman, E. Zang, Y. Hara (2002) Tea polyphenols inhibit the formation of mutagens during the cooking of meat, *Mutat. Res.*, 516, 19-22.
- Win, W., Z. Cao, X. Peng, M. A. Trush, Y. Li (2002) Different effects of genistein and resveratrol on oxidative DNA damage in vitro, *Mutat. Res.*, 513, 113-120.
- Yen, G. C., H. Y. Chen (1996) Relationship between antimutagenic activity and major components of various teas, *Mutagenesis*, 11, 37-41.
- Yen, G. C., P. D. Duh, Y. L. Hung (2001) Contributions of major components to the antimutagenic effect of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl.), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5000-5004.
- Zhang, Y., P. Talalay, C. G. Cho, G. H. Posner (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli : isolation and elucidation of structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 2399-2403.

DNA Polymerase κ による DNA 損傷の バイパスと突然変異の誘発

大森 治夫*

京都大学ウイルス研究所遺伝子情報解析研究分野 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53

Bypass of DNA lesions and induction of mutations by DNA Polymerase κ

Haruo Ohmori

Laboratory of Gene Information Analysis, Institute For Virus Research, Kyoto University
53, Shogoin-Kawaracho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

Summary

We have identified Pol κ as a mammalian homologue of the *Escherichia coli* DinB protein (=DNA polymerase IV). We overproduced and purified a truncated form of Pol κ lacking the C-terminal 310 amino acids, which exhibited a very similar enzymatic activity with the intact form (870 amino acids). Pol κ is unable to bypass UV-induced T-T cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4) photoproduct, but it can bypass benzo[a]pyrene (B[a]P)-adducted guanine efficiently and accurately. We isolated mutants defective for the Pol κ function from a mouse embryonic stem cell line. The Pol κ -defective mutant cells are highly sensitive both to killing and mutagenesis induced by B[a]P. The spectrum of B[a]P-induced mutations in the Pol κ -defective mutant cells is different from that in the wild-type cells, which suggested that Pol η might be involved in error-prone bypass of B[a]P-adducted guanines in the absence of Pol κ . Thus, our results provide strong evidence that Pol κ plays a crucial role in protecting cells from the genotoxic effects of B[a]P, and by implication of other polycyclic aromatic hydrocarbons.

Keywords : DNA polymerase κ , translesion synthesis, benzo[a]pyrene, mutation, cancer

緒 言

DNA 損傷によって突然変異が誘発されるメカニズムの研究はここ数年のうちに急速な展開を遂げた。大腸菌においてそのような突然変異の誘発に関わる遺伝子として *umuDC*, *dinB* などが知られていたが、1999 年になってそのいずれもが DNA 損傷部位を乗り越えて DNA 合成を続ける新たな DNA ポリメラーゼ（それぞれ Pol V, Pol IV と呼ばれる）であることが明らかにされた。それと

ほぼ同時期にヒト色素性乾皮症バリエーション型の原因遺伝子も同様な酵素 (Pol η) をコードすることが明らかになった (Goodman, 2002 の総説を参照)。筆者らはこれらの構造的に類似し、機能的にも関連した一連の DNA ポリメラーゼを Y-family と呼ぶことを提唱した (Ohmori et al, 2001)。それまで DNA ポリメラーゼの分類は大腸菌の Pol I, Pol II, Pol III を代表例とする A-, B-, C-family と、哺乳類において塩基除去修復に関わる Pol β を代表例とする X-family の 4 群に分けられていた (Ito and Braithwaite, 1991)。哺乳類において染色体の複製に関わる Pol α , Pol δ , Pol ϵ は B-family に分類され、ミトコンドリア DNA の複製に関わる Pol γ は A-family に分類さ

* E-mail : hohmori@virus.kyoto-u.ac.jp

受付：2002 年 10 月 13 日 受理：2002 年 10 月 13 日

日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第 13 回公開シンポジウム「環境変異原と遺伝子不安定性」で発表された。
This paper was presented at the 13th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 25th, 2002. The symposium entitled "Environmental Mutagens and Genomic Instability", was organized by Minako Nagao and Hitoshi Nakagama and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

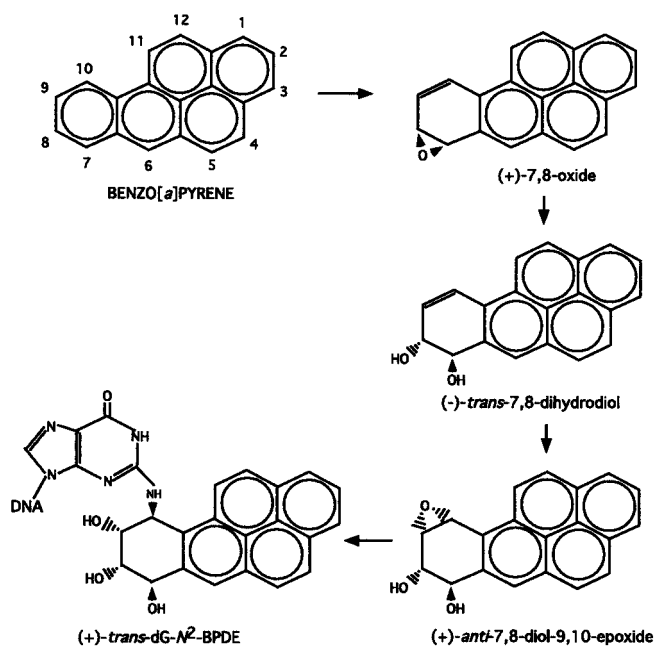


Fig. 1 Activation of B[a]P

れる。ヒトやマウスにおいてはY-familyに属する酵素として上記のPol ηの他に、Pol ι, Pol κ, そしてREV1蛋白が存在する。さらにはB-familyに属するPol ζ, X-familyに属するPol λ, Pol μなどもin vitroでDNA損傷をバイパスする活性を示すことが報告されている (Nelson et al., 1996b; Duvauchelle et al., 2002; Maga et al., 2002; Zhang et al., 2002c)。損傷バイパス (以下, translesion synthesisを略してTLSとする) 型のDNAポリメラーゼは通常の複製型DNAポリメラーゼとは異なり3'-5'エクソヌクレアーゼによる校正機能を持たないので複製の忠実度は低く, エラーを発生しやすい (Ohashi et al., 2000b)。したがって, 突然変異の発生を低く抑えておくためには, これらのTLS酵素が必要な場合にのみその機能を発揮するように制御されていると考えられる。それでは, なぜ我々の細胞はこのようなエラーを起こしやすいDNAポリメラーゼを数種類も持っているのだろうか。本稿ではPol κに関する筆者らのグループの研究を中心に概説する。

1. ベンゾピレンによる発癌とDNA損傷

ベンゾピレン (benzo[a]pyrene, 以下BaPと略す) と発癌の関連を探る研究の歴史は非常に古い (Friedberg et al., 1995)。約200年以上も以前に煙突掃除に従事する人たちの間には陰嚢癌が多く発生することが指摘され, そのためデンマークの煙突掃除人組合は風呂に毎日入ることを奨励したところ, 陰嚢癌の発生率は顕著に減少したという。日本においては1915年に山際らがウサギの耳にコーラルを数ヵ月にわたって塗り続けるこ

とによって癌が発生することを報告している。その後, コールタールの主要な発癌原因物質が芳香族炭化水素 (Polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) であり, なかでもBaPが最も強い発癌作用を持つことが明らかになった (Phillips, 1983の総説を参照)。現在でもBaPはタバコの煙ばかりでなく, 車の排気ガス中などからも大気中に多量に放出されているので非喫煙者といえども絶えずBaPに暴露されている。BaPなどのPAHは肺癌の主要原因物質であると考えられている。

BaPを含むPAHそのものは反応性が低く, 発癌作用は持たない。BaPは生体内においてP450蛋白による代謝反応を受けてその大部分は細胞の外に排出されるが, 一部が核内に入ってDNA, 主にグアニンのN2の位置, そして低頻度でアデニンのN6の位置で共有結合をすることにより, 発癌作用を示す (Fig. 1, 参照)。BaP-7,8-diol-9,10-epoxide (略してBPDE) は最終発癌物質 (ultimate carcinogen) と呼ばれる。BaPなどのPAHは細胞内に侵入するとまずAhR (Arylhydrocarbon Receptor, dioxinとも強く結合することからdioxin receptorとも呼ばれる) と結合する。BaPなどのリガンドと結合したAhRはHSP90との複合体から離れて核内に移行しArnt (AhR nuclear translocator) と複合体を形成する。AhR-Arnt複合体は特定の遺伝子のpromoter領域に存在するXRE (Xenobiotic Responsive Element) と呼ばれるDNA配列に結合して, それらの遺伝子の発現を活性化する (Sogawa & Fujii-Kuriyama, 1997の総説を参照)。マウスのCyp1a1遺伝子はそのようにして発現が活性化される遺伝子として最もよく研究されてきた遺伝子である。こ

の遺伝子は、cytochrome P450 蛋白の一つである Cyp1A1 をコードしており、この蛋白が BaP などの PAH の代謝反応に重要な役割をはたす。また、*AhR* 遺伝子欠損マウスでは BaP 処理しても癌が起らないことが示されている (Shimizu et al., 2000)。

2. ヒト Pol κ の同定とその発現制御

筆者らのグループは大腸菌 DinB のホモログをコードするヒトおよびマウスの cDNA を同定して、それぞれの遺伝子を *DINB1* および *Dinb1* と命名した (Ogi et al., 1999)。後にヒトの *DINB1* 遺伝子産物をバキュロウイルスの系を利用して過剰生産させて精製し、それが in vitro 反応系において DNA ポリメラーゼ活性を持つことを示した (Ohashi et al., 2000a)。その酵素は HUGO 遺伝子命名委員会の認証を受けて Pol κ と呼ばれることになったので、*DINB1*, *Dinb1* という遺伝子名は *POLK*, *Polk* に改称された。マウスの *Dinb1*-cDNA (= *Polk*-cDNA) をマウス培養細胞中で一過的に過剰発現させると突然変異の発生率が約 10 倍程度上昇することを見出した (Ogi et al., 1999)。筆者らはそれ以前に、大腸菌の *dinB* 遺伝子を過剰発現させるだけで、DNA に損傷を与えるような処理無しにでも突然変異、取り分け同一塩基が並んで存在する配列でのフレームシフト変異の発生率が顕著に上昇することを報告していた (Kim et al., 1997) が、こうして哺乳類の DinB ホモログは大腸菌 DinB と突然変異の誘発という活性の面においても類似していることが明らかになった。逆にこのことから、突然変異の発生を防ぐためには Pol κ をコードする遺伝子の発現は厳密に制御されているはずであると推測された。我々はヒト *POLK*, マウス *Polk* 遺伝子の発現を制御するメカニズムに明らかにするために、ゲノム配列の解析に着手した。当時すでに HUGO によりヒトゲノム配列の解析が進められており、その結果が公表されるのを待つことも選択肢の一つではあったが、それがいつになるかは全く予測できなかった。ヒト *POLK*, マウス *Polk* 遺伝子の発現制御に関わる領域の DNA 塩基配列を自分達で決定した。また、並行してそれらの mRNA の転写開始点の位置を決定したところ、両遺伝子の promoter 領域には先述の XRE のコンセンサス配列に類似した配列が二個存在することが明らかになった (Ogi et al., 2001)。実際、マウスの配列は精製した AhR-Arnt 複合体と in vitro で結合すること、および PAH の一つであり、BaP と構造的に類似した 3-methylcholanthrene (3-MC) をマウス腹腔内に注射すると *Polk* の発現が一時的に上昇することが、当時東北大学理学部の藤井教授らとの共同研究により明らかになった (Ogi et al., 2001)。

3. ヒトの損傷バイパスにおける特異性

一方、我々は精製したヒト Pol κ 蛋白を用いた in vitro 反応系において、Pol κ は紫外線照射によって生じる cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) や (6-4) photo-product, あるいは cisplatin によって隣接したグアニン塩基が架橋された損傷はバイパスできないが、塩基部分を欠落した abasic site や acetylaminofluorene (AAF) がグアニンの C8 の位置に結合した損傷をバイパスすることを報告した (Ohashi et al., 2000a ; Suzuki et al., 2001)。しかし、Pol κ による abasic site, AAF 損傷のバイパス合成は高頻度にエラーを伴うことから、それらの損傷をバイパスすることが Pol κ の本来の機能であるとは考えられなかった。上述のように、3-MC 投与により Pol κ の発現が誘導されるという実験結果からその酵素の本来の機能の一つとして活性化された PAH によって生じた DNA 損傷をバイパスする活性を持つことが予想された。日本国内で BPDE による損傷を持つような DNA を入手することは非常に困難であるが、アメリカでは NCI の一機関が活性型の BPDE を大量に作って研究者に分与するというシステムが確立している。New York 州立大学の渋谷博士らのグループとの共同研究により、Pol κ が in vitro においてグアニンの N2 の位置に付加した損傷を比較的効率良く、しかもその向側にシトシンを挿入してエラーフリーにバイパスすることが明らかになった (Suzuki et al., 2002)。同様なことは他のグループからも報告されている (Zhang et al., 2000a, 2002b ; Rechtkoblit et al., 2002)。

4. *Polk* 欠損マウス ES 細胞株の作製とその表現型

しかしながら、ある DNA ポリメラーゼが in vitro 反応系において特定の DNA 損傷をバイパスするからといって、それが in vivo においてもそのような機能をはたしているとは限らない。また逆にそのような酵素が in vitro 反応系において特定の DNA 損傷をバイパスしないからといって in vivo においてもその酵素が同じ損傷のバイパスに全く関与しないとも限らない。in vitro での実験はきわめて限定された条件下でなされたものであり、そこで得られた結果が in vivo の状況を忠実に反映しているという保証はどこにも無いからである。例えば、in vivo では補助因子の作用がある場合にのみ、ある DNA 損傷のバイパスにその酵素が関わるという可能性を否定できない。また、in vivo ではある DNA 損傷には別な DNA ポリメラーゼが選択的にリクルートされて、その酵素が損傷箇所にアクセスできないかもしれない。したがって、in vitro, in vivo の結果が一致する場合にのみ、我々は本来の機能（その一端）を窺い知ることが可能となる。我々は in vivo における Pol κ の機能を探るべ

く、同じ京大ウイルス研の眞貝博士らの協力を得て *Polk* 遺伝子のノックアウトマウスの作製に着手した。まず、Y-family DNA ポリメラーゼにおいて共通に存在するモチーフ配列 III, IV をコードする exon 5, 6 の部分を neomycine 耐性遺伝子と置換したマウス ES 細胞を作製し、それを用いて *Polk*^{+/+}-マウスを得た。そのようなヘテロマウスの交配によって *Polk*^{-/-} のホモマウスが Mendel 遺伝の予想通りの割合 (1/4) で得られた。*Polk* ノックアウトマウスは一見して野生型マウスとの差はみられなかった。*Polk* 遺伝子は多くの組織で発現されているが、特に精巣で発現が高い (後述参照) ことから精子形成に関与することも考えられたが、*Polk*^{-/-}-遺伝子型を持つ雄 (および雌) のマウスは生殖能力を保持していた。

我々は *Pol κ* の本来の機能の一つとして BPDE による DNA 損傷をバイパスすることであると考えていたので、上記の *Polk* 遺伝子のうち片方のコピーを破壊したマウス ES 細胞からもう一方のコピーも破壊して *Polk* 完全欠損変異 ES 細胞株を樹立し、BaP その他に対する感受性を調べた (Ogi et al., 2002)。対照として、さまざまな DNA 損傷の除去修復に働く *Xpa* 遺伝子を破壊した ES 細胞株を用いて実験を行った。その結果、*Polk*^{-/-}-変異 ES 細胞株は *Xpa*^{-/-}-変異 ES 細胞株に比べると低い、明確な BaP 感受性を示した。*Polk*^{-/-}-変異 ES 細胞株は DNA 二重鎖切断を引き起こす X 線照射に対する感受性においては野生型 ES 細胞と何らの差も認められなかったが、紫外線照射に対しては弱い感受性を示した。この弱い紫外線感受性は、*Pol κ* 単独による in vitro 反応系において CPD や (6-4) photoproduct をバイパスできないという in vitro の実験結果から考えると意外であった。最近になって、Prakash らのグループは T-T CPD の 3'-T の向側に挿入された dG, dA を効率良く延長できることを報告している (Washington et al., 2002)。彼らの in vitro の結果と我々の in vivo の結果を組み合わせると、*Pol κ* は細胞内では紫外線照射によって生じる DNA 損傷にも関わっていると結論される。取り分け *Pol η* が欠損したような細胞などでは *Pol κ* の紫外線損傷のバイパスへの寄与はより大きくなると考えられる。

さらに我々は、BaP 処理によって 6-thioguanine (6-TG) 耐性になった *Hprt* 遺伝子の突然変異の発生率は *Polk*^{-/-}-変異 ES 細胞株においては親株と比較して 10 倍ほど高いことを見出した。次に、*Polk*^{-/-}-変異 ES 細胞株およびその親株を BaP 処理して得られた 6-TG 耐性突然変異体を多数分離し、*Hprt*-cDNA を RT-PCR により増幅して DNA sequencing によりそれらに生じた突然変異の位置を決定した。その結果、親株ではさまざまなタイプの塩基置換変異が見つかるのに対して、*Polk*^{-/-}-ES 細胞株では G-T 変異が圧倒的に大多数 (28/35) であった。これまでの in vitro の結果から、BPDE-N2-dG 損傷の向側に *Pol κ* が

シトシンを挿入するのに対して *Pol η* はアデニンを最も選択的に挿入することが明らかにされている (Zhang et al., 2000b; Chiapperino et al., 2002; Rechkoblit et al., 2002)。一方、*Pol ι* や出芽酵母の *Pol ζ* は BPDE-N2-dG 損傷の向側にどの塩基も挿入することができない (Rechkoblit et al., 2002)。我々の突然変異スペクトラムの解析結果をこのような in vitro の実験結果と組み合わせて考えると、*Pol κ* が存在しない場合には *Pol η* が BPDE による主要産物である BPDE-N2-dG 損傷のバイパスに関わることであり、結果としてその向側に主にアデニンを挿入するために G-T 塩基置換変異が頻発すると結論される。一方、*Pol κ* が存在する場合には、それが BPDE-N2-dG 損傷のバイパスにおいて主要な役割をはたし、その向側にシトシンを挿入してバイパスするために突然変異の発生率が低いと考えられる。

色素性乾皮症バリエーション型 (XP-V) 患者が日光に当たると皮膚癌を起こしやすい理由として、そのような患者においては紫外線による DNA 損傷箇所エラーフリーにバイパスする *Pol η* が欠損しており、その結果他の TLS 酵素がエラーを起こしながらバイパスするために突然変異を誘発するためであると説明される。上述のように、*Polk*^{-/-}-ES 細胞株が弱いながらも紫外線感受性を示すことは *Pol κ* が細胞内では何らかの形で紫外線損傷のバイパスに関わっていることを示唆しており、おそらくその関与はエラーを伴うと考えられる。一方、そのような *Pol κ* 欠損変異株においては BaP による突然変異率が上昇し、しかもそのような変異が *Pol η* によるものであると考えられることは、まさに XP-V 患者における紫外線による損傷のバイパスのケースとはまさに裏返しに関係にあるといえよう。

5. 細胞内における BaP による DNA 損傷のバイパスのメカニズム

上述の議論は紫外線による DNA 損傷のうち除去修復機構によって取り除かれるのが遅い CPD のバイパスには *Pol η* が、BaP による主要産物である BPDE-N2-dG の付加体のバイパスには *Pol κ* が主たる役割をはたすと要約される。しかし、BaP による DNA 損傷のバイパスの in vivo におけるメカニズムはそう簡単に割り切ってしまうことはできないようである。

出芽酵母の REV1 は TLS 酵素の中で最初にその in vitro での活性が明らかにされた酵素である (Nelson et al., 1996a)。出芽酵母では塩基部分が欠落したような損傷である AP サイトの向側にはシトシンが多く挿入されることが明らかにされていたが、C. Lawrence らのグループは精製した REV1 は in vitro で AP サイトの向側にシトシンを挿入してそこで DNA 合成を停止する dCMP transferase 活性を持つことを明らかにした。この出芽酵母由来の REV1、あるいはそのヒトおよびマウスのホモログ

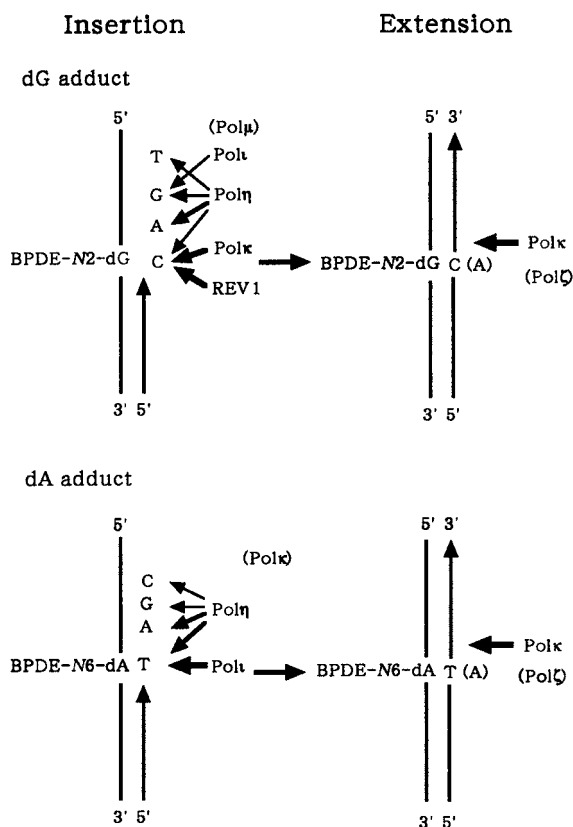


Fig. 2 A model for bypass of BPDE-adducts

は通常のDNAポリメラーゼとは違い、基質としては主にdCTPしか利用しないという特徴を持っている(Masuda et al., 2001, 2002). 損傷を受けていないグアニンあるいはdUの向側にもdCMPを挿入する. 最近, Z. WangらのグループはヒトREV1がBPDE-N2-dG付加体の向側にもdCMPを効率良く挿入することを明らかにした(Zhang et al., 2002a). また彼らはその場合にもREV1によるDNA合成は通常そこで止まってしまうが, その後の伸長反応はPol κが存在すると鋳型の端まで合成されることを示した(Zhang et al., 2002b). したがって, BPDE-N2-dG付加体のバイパス合成はFig. 2に示したようなメカニズムで行われていると考えられる. BPDE-N2-dG付加体の向側にPol κあるいはREV1がdCMPを挿入し, その後の伸長反応はPol κが行う. Pol ηはBPDE-N2-dG付加体の向側にdCMPよりもむしろdAMP (あるいはdGMP, dTMP) をより高頻度で挿入するが, そのようなミスペアを伸長させずにそこで反応を停止してしまいやすいと考えられる. Pol κあるいはPol ζがそのようなミスペアも伸長させてしまうと突然変異が発生する. Pol κはdC/BPDE-N2-dGを他のミスペアよりも効率良くバイパスするので, Pol ηによる誤挿入の影響を軽減するが, それが存在しない場合にはPol ζがミスペアも区別なく伸長させてしまうので突然変異が発生しやすいと考えられる.

BPDEは主に(90%以上)グアニンのN2の位置に付加体を作るが, 一部はアデニンのN6の位置にも付加体を作る. どのTLS酵素がBPDE-N6-dA付加体をバイパスするかin vitro系を用いて調べられた結果, Pol ιがその向側にチミンを効率良く挿入してそこで反応を停止することが明らかになった. この場合にもPol κが存在すると伸長反応が促進された(Frank et al., 2002). Pol κやPol ηがBPDE-N6-dA付加体の向側に塩基を挿入する効率は非常に低い(Rechko et al., 2002).

ヒト肺癌患者から手術により摘出された癌組織由来の細胞でのPol κの発現は同じ患者からの周辺正常組織からの細胞よりも29例中21例において上昇していることが明らかになった(O-Wang et al., 2001). *POLK*遺伝子の発現亢進と喫煙歴との間には有意な関係はみつかっておらず, 肺癌発生との因果関係は不明である. 一つの解釈として次のようなシナリオを想像することができる. タバコの煙あるいは大気中のBaPその他のPAHを吸引し続けることによって肺におけるPol κの発現誘導が起こり, 次に過度のPAHによるDNA損傷によって突然変異が誘発され, その結果として癌抑制遺伝子の一部に変異が起こる. 特にそのような癌抑制遺伝子が*POLK*遺伝子の発現の制御に関わっていれば, それに変異が生じると発癌に至ると*POLK*遺伝子の発現は亢進され続けることになる.

6. Pol κの本来の機能は何か

上に述べた結果からはPol κはBaPなどのPAHによる損傷を突然変異の発生を抑えるようにしてバイパスするのに必要であると結論される. 現在*Polk*欠損マウスにBaP処理をして, その癌発生率を野生型と比較する実験が進行中である. 当然そのような化学発癌実験はBaP以外の発癌物質, 特にin vitroでPol κがエラーフリーにバイパスするようなDNA損傷をもたらし化学物質についても拡大していく計画である. しかしながら, ヒトあるいはマウスなどはそのような外部からの化学物質によるDNA損傷をバイパスする機能のためだけに複製忠実度の低いPol κを保存してきたとは考えにくい. おそらく, Pol κは体内で発生する内在的なDNA損傷のバイパスに機能していると考えられる. Friedbergらのグループは, 活性酸素によって発生するthymine glycolsをPol κがエラーフリーにバイパスすることを報告している(Fischhaber et al., 2002). 筆者らはBaPと構造的類似性を持つ女性ホルモンがやはりBaP同様にグアニンのN2およびアデニンのN6の位置に付加体を形成する(Terashima et al., 1998)ことから, そのようなDNA損傷のバイパス合成にPol κが関与する可能性を検証したいと考えている. マウスの*Polk*遺伝子の発現は精巣で取り分け発現が高いが, むしろ減数分裂を終えたような細胞でも発現されていることが明らかになった(Ogi et

al., 2001). なぜ Pol κ は DNA が精子核に閉じ込められるような時期に発現されるのであろうか. 筆者は Pol κ が DNA とともに精子核に含まれて卵子にまで運ばれ, 受精卵においてその機能を発揮するのではないかと想像している.

マウス *Polk* 遺伝子の発現は精巣においては幾重に渡って固有の制御を受けている (Ogi et al., 2001). まず, 転写開始点は二カ所存在し, 上流のものは多くの組織で使われるが, 下流のものは精巣特異的である. また *Polk*-mRNA の精巣特異的な alternative splicing が観察され, 抗 Pol κ 抗体を使った Western blotting には他の組織でも共通な大きさのバンド以外に精巣固有のバンドが検出される. さらに精巣で最も強く発現されている *Polk*-mRNA は約 3 kb であり, それ以外に他の組織にも共通の 5 kb の長さのものも観察される. これは転写開始点の違いによるのではなく, 異なる位置で PolyA 化が起こるためであると考えられる. 多くの組織で発現されている 5 kb の *Polk*-mRNA はその 3' 非翻訳領域に ARE と呼ばれる mRNA を不安定にすることが知られている配列が 10 回繰り返して存在する (Gerlach et al., 1999). 一方, 精巣特異的な 3 kb の *Polk*-mRNA は 3' 非翻訳領域に ARR 配列を全く持たない. これは精巣においては PolyA 化が通常のコンセンサス配列と異なる配列がシグナルとして用いられ, ARE 配列を全く持たないように翻訳終始コドンのすぐ下流で行われているためである. その結果として, 3 kb の *Polk*-mRNA は安定であるために, それが蓄積するので *Polk* 遺伝子の発現が精子では高いようにみえる.

精巣では *Polk* 以外の遺伝子の mRNA も他の組織においてよりも短くなっていることが知られている (Fujii et al., 2002). また PolyA 化において AAUAAA 配列を認識に重要な働きを持つ CstF-64 蛋白が精巣では減数分裂の一時期においてはバリエーション型に置き換わることが知られている (Wallace et al., 1999). このバリエーション型は AAUAAA とは異なる配列を認識すると想定されている. 通常の組織では不安定であることが望ましい mRNA が精巣でその機能を十分に発揮するための手段としてその mRNA を安定化させるメカニズムが存在し, CstF-64 バリエーション型がそのために機能するのであろう. 精巣では精子が成熟するに伴い DNA は精子核の中に包み込まれていくので, 遺伝子の転写は制限されるようになる. したがって, 精子形成の後期に機能を発揮するような遺伝子の mRNA やその翻訳産物である蛋白は安定であることが望ましい. *Polk*-mRNA の精巣特異的な発現制御はその他の多くの組織で Pol κ がはたす機能に加えてもう一つ別な機能を持つことを示唆している.

結 語

本稿において Pol κ についての in vitro, in vivo の機能について概説し, 最後には想像をたくましくした筆者自身の作業仮説を述べた. 大腸菌ゲノム配列のコンピュータ解析から始まった大腸菌 *dinB* 遺伝子の解析から, 数年間の間に哺乳類におけるそのホモログの解析にまで発展させることができたのは多くの優れた共同研究者たちに恵まれたお陰である. 取り分け, 筆者以外には院生がたった二人だけというきわめて小さいグループでもここまでの成果が挙げられたのは荻朋男, 大橋英治両君の非凡な能力と不断的努力に負うところがきわめて大きい. 二人のうちどちらかが欠けても我々のグループは熾烈な国際競争の中でサバイバルすることはできなかったであろう.

参考文献

- Chiapperino, D., H. Kroth, I.H. Kramarczuk, J.M. Sayer, C. Masutani, F. Hanaoka, D.M. Jerina and A.M. Cheh (2002) Preferential misincorporation of purine nucleotides by human DNA polymerase η opposite benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide deoxyguanosine adducts, *J. Biol. Chem.*, 277, 11765-11771.
- Duvauchelle, J.-B., L. Blanco, R.P.P. Fuchs and A.M. Cordonnier (2002) Human DNA polymerase μ (Pol μ) exhibits an unusual replication slippage ability at AAF lesion, *Nucleic Acids Res.*, 30, 2061-2067.
- Fischhaber, P.L., V.L. Gerlach, W.J. Feaver, Z. Hatahet, S.S. Wallace and E.C. Friedberg (2002) Human DNA polymerase κ bypasses and extends beyond thymine glycols during translesion synthesis in vitro, preferentially incorporating correct nucleotides, *J. Biol. Chem.*, 277, 37604-37611.
- Frank, E.G., J.M. Sayer, H. Kroth, E. Ohashi, H. Ohmori, D.M. Jerina and R. Woodgate (2002) Translesion replication of benzo[a]pyrene and benzo[c]phenanthrene diol epoxide adducts of deoxyadenosine and deoxyguanosine by human DNA polymerase ι , *Nucleic Acids Res.*, in press.
- Friedberg, E.C., G.C. Walker and W. Siede (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM press, Washington, D.C.
- Fujii, T., K. Tamura, K. Masai, H. Tanaka, Y. Nishimune and H. Nojima (2002) Use of stepwise subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is up-regulated during spermiogenesis, *EMBO Rep.*, 3, 367-372.
- Gerlach, V.L., L. Aravind, G. Gotway, R.A. Schultz, E.V. Koonin and E.C. Friedberg (1999) Human and mouse homologs of *Escherichia coli* DinB (DNA polymerase IV), members of the UmuC/DinB superfamily, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11922-11927.
- Goodman, M.F. (2002) Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes, *Ann. Rev. Biochem.*, 71, 17-50.
- Ito, J. and D.K. Braithwaite (1991) Compilation and alignment of DNA polymerase sequences, *Nucleic Acids Res.*, 19, 4045-4057.
- Kim, S.-R., G. Maenhaut-Michel, M. Yamada, Y. Yamamoto, K. Matsui, T. Sofuni, T. Nohmi and H. Ohmori (1997) Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 13792-13797.

- Maga, G., G. Villani, K. Ramadan, I. Shevelev, N. Tanguy Le Gac, L. Blanco, G. Blanca, S. Spadari and U. Hubscher (2002) Human DNA polymerase λ functionally and physically interacts with proliferating cell nuclear antigen in normal and translesion DNA synthesis, *J. Biol. Chem.*, in press.
- Masuda, Y., M. Takahashi, N. Tsunekuni, T. Minami, M. Sumii, K. Miyagawa and K. Kamiya (2001) Deoxycytidyl transferase activity of the human REV1 protein is closely associated with the conserved polymerase domain, *J. Biol. Chem.*, 276, 15051-15058.
- Masuda, Y., M. Takahashi, S. Fukuda, M. Sumii and K. Kamiya (2002) Mechanisms of dCMP transferase reactions catalyzed by mouse Rev1 protein, *J. Biol. Chem.*, 277, 3040-3046.
- Nelson, J.R., C.W. Lawrence and D.C. Hinkle (1996a) Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein, *Nature*, 382, 729-731.
- Nelson, J.R., C.W. Lawrence and D.C. Hinkle (1996b) Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase ζ , *Science*, 272, 1646-1649.
- Ogi, T., T. Kato, Jr., T. Kato and H. Ohmori (1999) Mutation enhancement by DINB1, a mammalian homologue of the *Escherichia coli* mutagenesis protein DinB, *Genes Cells*, 4, 607-618.
- Ogi, T., J. Mimura, M. Hikida, H. Fujimoto, Y. Fujii-Kuriyama and H. Ohmori (2001) Expression of human and mouse genes encoding pol κ : testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription, *Genes Cells*, 6, 943-953.
- Ogi, T., Y. Shinkai, K. Tanaka and H. Ohmori. Pol κ protects mammalian cells against the lethal and mutagenic effects of benzo[a]pyrene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, in press.
- Ohashi, E., T. Ogi, R. Kusumoto, S. Iwai, C. Masutani, F. Hanaoka and H. Ohmori (2000a) Error-prone bypass of certain DNA lesions by the human DNA polymerase κ , *Genes Dev.*, 14, 1589-1594.
- Ohashi, E., K. Bebenek, T. Matsuda, W.J. Feaver, V.L. Gerlach, E.C. Friedberg, H. Ohmori and T.A. Kunkel (2000b) Fidelity and processivity of DNA synthesis by DNA polymerase κ , the product of the human *DINB1* gene, *J. Biol. Chem.*, 275, 39678-39684.
- Ohmori, H., E.C. Friedberg, R.P. Fuchs, M.F. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkle, T.A. Kunkel, C.W. Lawrence, Z. Livneh, T. Nohmi, L. Prakash, S. Prakash, T. Todo, G.C. Walker, Z. Wang and R. Woodgate (2001) The Y-family of DNA polymerases, *Mol. Cell*, 8, 7-8.
- O-Wang, J., K. Kawamura, Y. Tada, H. Ohmori, H. Kimura, S. Sakiyama and M. Tagawa (2001) DNA polymerase κ , implicated in spontaneous and DNA damage-induced mutagenesis, is overexpressed in lung cancer, *Cancer Res.*, 61 5366-5369.
- Phillips, D.H. (1983) Fifty years of benzo[a]pyrene, *Nature*, 303, 468-472.
- Rechtkoblit, O., Y. Zhang, D. Guo, Z. Wang, S. Amin, J. Kreminsky, N. Louneva and N.E. Geacintov (2002) *trans*-Lesion synthesis past bulky benzo[a]pyrene diol epoxide N^2 -dG and N^6 -dA lesions catalyzed by DNA bypass polymerases, *J. Biol. Chem.*, 277, 30488-30494.
- Shimizu, Y., Y. Nakatsuru, M. Ichinose, Y. Takahashi, H. Kume, J. Mimura, Y. Fujii-Kuriyama and T. Ishikawa (2000) Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the arylhydrocarbon receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, 779-782.
- Sogawa, K. and Y. Fujii-Kuriyama (1997) Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor, *J. Biochem.*, 122, 1075-1079.
- Suzuki, N., E. Ohashi, K. Hayashi, H. Ohmori, A.P. Grollman and S. Shibutani (2001) Translesional synthesis past acetylaminofluorene-derived DNA adducts catalyzed by human DNA polymerase κ and *Escherichia coli* DNA polymerase IV, *Biochemistry*, 40, 15176-15183.
- Suzuki, N., E. Ohashi, A. Kolbanovskiy, N.E. Geacintov, A.P. Grollman, H. Ohmori and S. Shibutani (2002) Translesion synthesis by human DNA polymerase κ on a DNA template containing a single stereoisomer of dG-(+)- or dG-(-)-*anti*- N^2 -BPDE (7,8-dihydroxy-*anti*-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene), *Biochemistry*, 41, 6100-6106.
- Terashima, I., N. Suzuki, S. Itoh, I. Yoshizawa and S. Shibutani (1998) Mutagenic specificity of model estrogen-DNA adducts in mammalian cells, *Biochemistry*, 37, 8803-8807.
- Wallace, A.M., B. Dass, S.E. Ravnik, V. Tonk, N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, N.G. Copeland and C.C. MacDonald (1999) Two distinct forms of the 64,000 Mr protein of the cleavage stimulation factor are expressed in mouse male germ cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96, 6763-6768.
- Washington, M.T., R.E. Johnson, L. Prakash and S. Prakash (2002) Human *DINB1*-encoded DNA polymerase κ is a promiscuous extender of mispaired primer termini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99, 1910-1914.
- Zhang, Y., F. Yuan, X. Wu, M. Wang, O. Rechtkoblit, J.-S. Taylor, N.E. Geacintov and Z. Wang (2000a) Error-free and error-prone lesion bypass by human DNA polymerase κ in vitro, *Nucleic Acids Res.*, 28, 4138-4146.
- Zhang, Y., F. Yuan, X. Wu, O. Rechtkoblit, J.-S. Taylor, N.E. Geacintov and Z. Wang (2000b) Error-prone lesion bypass by human DNA polymerase η , *Nucleic Acids Res.*, 28, 4717-4724.
- Zhang, Y., X. Wu, O. Rechtkoblit, N.E. Geacintov, J.-S. Taylor and Z. Wang (2002a) Response of human REV1 to different DNA damage : preferential dCMP insertion opposite the lesion, *Nucleic Acids Res.*, 30, 1630-1638.
- Zhang, Y., X. Wu, D. Guo, O. Rechtkoblit and Z. Wang (2002b) Activities of human DNA polymerase κ in response to the major benzo[a]pyrene DNA adduct : error-free lesion bypass and extension synthesis from opposite the lesion, *DNA Repair*, 1, 559-569.
- Zhang, Y., X. Wu, D. Guo, O. Rechtkoblit, J.-S. Taylor, N.E. Geacintov and Z. Wang (2002c) Lesion bypass activities of human DNA polymerase μ , *J. Biol. Chem.*, in press.

微生物由来のトランスリージョンDNA ポリメラーゼ

能美 健彦*

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

Translesion DNA polymerases from microorganisms

Takehiko Nohmi

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

Summary

DNA is continuously exposed to endogenous and exogenous genotoxic agents. To counteract genotoxicity, cells rely on a number of defense mechanisms, such as DNA repair. However, if DNA is damaged more than the capacity of defense mechanisms, damaged DNA will be used as a template for DNA replication. Bypass replication across DNA lesions is referred to as translesion DNA synthesis, which has been regarded as a key mechanism of mutagenesis. However, since most DNA polymerases responsible for chromosome replication have poor ability to bypass the lesions, the mechanism of how lesions are bypassed has remained enigmatic. Recent discovery of Y-family DNA polymerase offered clues to the molecular basis of mutagenesis : this family of DNA polymerases efficiently bypasses a variety of DNA lesions, and appears to be involved in mutagenesis and DNA damage tolerance. Here, I report the roles of DNA polymerase IV (DinB), a proto-type of Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli*, in targeted and untargeted mutagenesis, and discuss the possible mechanism by which DNA polymerase IV promotes mutagenesis.

Keywords : Y-family DNA polymerase, DNA polymerase IV, *dinB*

緒 言

我々はさまざまな内因性、外因性の変異原、がん原物質に曝されながら毎日を過ごしている。私たちの体をつくる細胞は、こうした状況下でその遺伝情報を正確に複製し、次世代、次細胞に伝えなければならない。このため細胞には遺伝子DNAを変異原から防御し、複製のエラーを低減するさまざまな工夫がこらされている。しかし、変異を防ぐこうしたシステムの容量を超えて遺伝子損傷が起これば、突然変異や細胞死が誘発される。本シ

ンポジウムのタイトルは「環境変異原と遺伝子不安定性」であるが、この環境因子によって誘発される遺伝子の不安定性に、DNAポリメラーゼはきわめて重要な働きをしている。本稿ではDNA上の傷を乗り越えてゆくポリメラーゼについて、微生物のDNAポリメラーゼ、特に大腸菌のDinB (DNAポリメラーゼIV) に焦点を絞って研究の現状を紹介する。

1. 突然変異の誘発とDNAポリメラーゼ

突然変異の起こる仕組みを大きく2つに分類すると、DNA上の傷のところに起こる変異と、傷とは無関係に起こる変異に分けられる (Fig. 1)。紫外線や発がん物質によってDNAに付加体や脱塩基部位ができると、多く

* E-mail : nohmi@nihs.go.jp

受付 : 2002年10月3日 受理 : 2002年10月8日

日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第13回公開シンポジウム「環境変異原と遺伝子不安定性」で発表された。
This paper was presented at the 13th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 25th, 2002. The symposium entitled "Environmental Mutagens and Genomic Instability", was organized by Minako Nagao and Hitoshi Nakagama and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

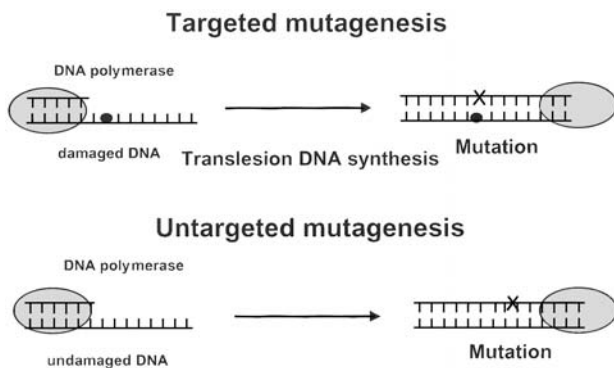


Fig. 1 Two major pathways of mutagenesis. Targeted mutations occur when DNA polymerases bypass DNA lesions and make sequence changes across them. The bypass DNA synthesis is referred to as translesion DNA synthesis. Untargeted mutations occur without exogenous treatments to damage DNA.

の場合DNAポリメラーゼによる複製はブロックされる。しかし、YファミリーDNAポリメラーゼ（後出）などにより、損傷部位を乗り越えてDNA複製が起こり、もし損傷部位の向かい側に誤った塩基が取り込まれると、新しい塩基配列は次の複製で固定され突然変異体が生ずる。このように損傷部位で起こる変異をtargeted mutagenesisと呼び、損傷部位を乗り越えて進むDNA合成をトランスレージョンDNA合成と呼ぶ（Friedberg et al., 1995）。これに対し、損傷部位に局限されない配列変化をuntargeted mutagenesisと呼ぶ。DNAポリメラーゼの複製エラーによる自然突然変異がこれに当たる。しかし意図的にDNAに損傷を与えなくとも遺伝子には内因性変異原による傷がつくため、自然突然変異が本当にuntargeted mutagenesisであるかについては容易に判断できない。いずれにせよDNAポリメラーゼは、変異誘発においてきわめて重要な役割を果たしている。

DNAポリメラーゼはこれまで5つのファミリー（A, B, C, D, X）に分類されてきた（Ito and Braithwaite, 1991；Braithwaite and Ito, 1993）。大腸菌 *polA* にコードされたDNAポリメラーゼIに相同性を持つDNAポリメラーゼのファミリーをAファミリーと呼び、このファミリーにはTaqやT7DNAポリメラーゼが含まれる。大腸菌 *polB* にコードされたDNAポリメラーゼIIに相同性を持つDNAポリメラーゼはBファミリーDNAポリメラーゼと呼ばれ、この中にはT4 DNAポリメラーゼや哺乳類のDNAポリメラーゼ δ 、酵母のREV3（これは現在DNAポリメラーゼ ξ と呼ばれる）が含まれる。Cファミリーは大腸菌 *polC* にコードされた α サブユニットを持つ大腸菌のDNAポリメラーゼIIIとそのホモログが含まれる。Dファミリーには古細菌のDNAポリメラーゼ、例えば *Pyrococcus furiosus* のDNAポリメラーゼIIが含まれる（Cann et al., 1998）。Xファミリーは、DNA損傷部位

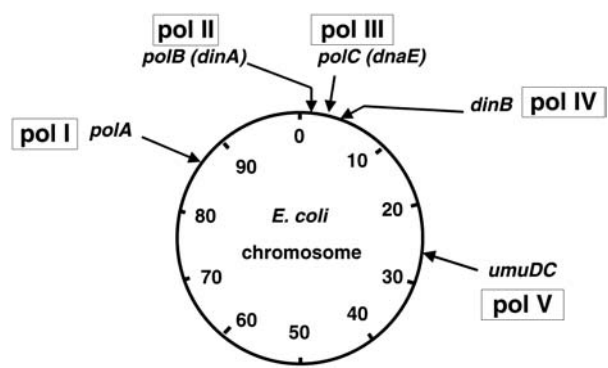


Fig. 2 The map position of five DNA polymerases in the chromosome of *E. coli*. DNA pol IV and V encoded by *dinB* and *umuDC*, respectively, are members of Y-family DNA polymerases. DNA pol II encoded by *polB* as well as DNA pol IV and V is an SOS-inducible DNA polymerase.

の修復に関与する哺乳類のDNAポリメラーゼ β や鋳型DNAなしに末端にdNMPを付加するterminal deoxytransferase（TdT）が含まれる。

本稿で紹介するDNAポリメラーゼは、複製よりも修復や突然変異誘発に関与し、しかもDNAポリメラーゼ β とはホモロジーを持たないことから、現在ではYファミリーとして分類されている（Ohmori et al, 2001）。YファミリーDNAポリメラーゼには少なくとも4つのサブファミリー（DinB/UmuC/RAD30/REV1）が存在する（Johnson et al., 1999a；Goodman and Tiffin, 2000）。DinBサブファミリーには、大腸菌のDinBのほか、好熱古細菌のホモログであるSso DNA pol Y1（DBHあるいはDpo4）、マウスやヒトのDNAポリメラーゼ κ が含まれる。DinBサブファミリーは、出芽酵母には存在しないが、大腸菌からヒトまでホモログが広く存在している点に特徴がある。これに対しUmuCサブファミリーは大腸菌を含む前核生物にのみ存在し、RAD30サブファミリーやREV1サブファミリーは出芽酵母からヒトまで真核生物にのみ存在している。ヒトの色素性乾皮症バリエーション（XP-V）の原因遺伝子XPVがコードするDNAポリメラーゼ η は、RAD30サブファミリーの代表である（Masutani et al., 1999；Johnson et al., 1999b）。

2. 大腸菌に存在する5種類のDNAポリメラーゼ

大腸菌や酵母などの微生物は、遺伝学的手法を用いることができるため、古くから「遺伝子不安定性」研究のモデル生物として使われてきた。実際、自然突然変異の起こる頻度は1塩基当たり $10^{-9} \sim 10^{-10}$ といわれており、このきわめてまれな現象を定量的に測定するためには遺伝学的な選択法が必須である（Friedberg et al., 1995）。大腸菌に存在するDNAポリメラーゼは、これまで3種

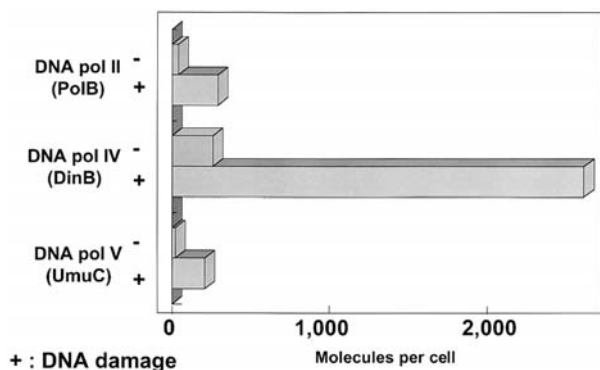


Fig. 3 Cellular contents of DNA pol II, DNA pol IV and DNA pol V of *E. coli*. The content of DNA pol IV was measured by western blot analysis (Kim et al., 2001). The contents of DNA pol II and DNA pol V are based on the reports of Qiu and Goodman, 1997 and Woodgate and Ennis, 1991, respectively.

類だけだと考えられてきた (Fig. 2) (Kornberg and Baker, 1992). DNA ポリメラーゼ I は, DNA ポリメラーゼとして最初に見出されたものであり, 現在では DNA 修復や岡崎フラグメントのプロセッシングに関与することが知られている. DNA ポリメラーゼ II は, DNA 損傷により発現が誘導される点に特徴があるが, その生理的意義は余りよくわかっていない. *polC* あるいは *dnaE* にコードされた α サブユニットは, DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素の触媒サブユニットであり, このホロ酵素が大腸菌の染色体複製を担当している.

1999 年, 我々はフランスのグループと共同で大腸菌 *dinB* 遺伝子 (*din* は *damage inducible* の略である) の産物に新規な DNA ポリメラーゼ活性を見出し, これを 4 番目に見つけられた大腸菌の DNA ポリメラーゼという意味で DNA ポリメラーゼ IV と命名した (Wagner et al., 1999). ほぼ時を同じくして, *umuC* 遺伝子の産物にも DNA ポリメラーゼ活性が検出され DNA ポリメラーゼ V と命名された (Tang et al., 1999; Reuven et al., 1999). 5 つのポリメラーゼのうち, DNA ポリメラーゼ IV, ポリメラーゼ V は Y ファミリーに属し, その他のポリメラーゼはそれぞれ A, B, C ファミリーに属す. そして DNA ポリメラーゼ II, IV, V の 3 つは, DNA 損傷によりその発現が誘導される, いわゆる SOS 型の DNA ポリメラーゼである. DNA 損傷により 3 種のポリメラーゼは, その発現量が 7 から 10 倍増大するが, 発現の絶対量は DNA ポリメラーゼ IV が最も高く, ついで DNA ポリメラーゼ II, DNA ポリメラーゼ V の順である (Fig. 3). SOS 誘導型ではない DNA ポリメラーゼ I, DNA ポリメラーゼ III の細胞内分子数は, それぞれ 400, 10-20 といわれている (Kornberg and Baker, 1992). DNA ポリメラーゼ IV が DNA 損傷なしに比較的高い発現量を示すのは, DNA 損傷を受けていない条件下でも DNA ポリメラーゼ IV が何

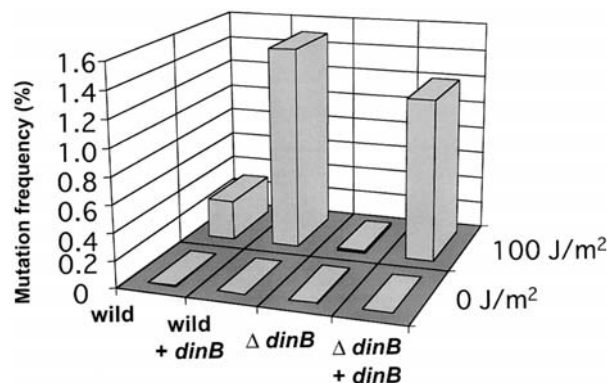


Fig. 4 λ phage untargeted mutagenesis. When the host *E. coli* cells are pre-irradiated with UV at 100 J/m², the mutation frequency of λ phage that is not exposed to UV increases about 100 fold (wild). However, this increase is only several folds in the *dinB* mutant (Δ *dinB*). The deficiency can be complemented by the introduction of low-copy-number plasmid carrying *dinB* (Δ *dinB* + *dinB*). The introduction of the plasmid enhances the fold increase of untargeted mutagenesis in the wild-type strain (wild + *dinB*). See Kim et al., 1997.

らかの働きをしていることを示唆していると思われる. 実際, DNA ポリメラーゼ IV は DNA 損傷に基づく targeted mutagenesis 以外に, DNA 損傷処理を行わない条件下での untargeted mutagenesis にも関与している (Kim et al., 2001).

3. 大腸菌 *dinB* 遺伝子と untargeted mutagenesis

dinB 遺伝子は大腸菌の染色体上に存在する damage inducible な遺伝子群の 1 つとして 1980 年に同定された (Kenyon and Walker, 1980). 同定された当時は, *dinB* の塩基配列も生理的機能も明らかではなかったが, その 6 年後, *dinB* は λ ファージの untargeted mutagenesis に関与することが明らかにされた (Brotcorne-Lannoye and Maenhaut-Michel, 1986).

では, λ ファージの untargeted mutagenesis とはどのような現象なのであろうか. λ cI857 ファージが大腸菌に感染すると溶菌斑 (プラーク) を作るが, この中にはプラークが透明に抜けた変異体 (clear mutant) が検出される. Clear mutant は, λ ファージの DNA が大腸菌の中で複製する際に生ずる複製エラーを反映していると考えられる. 興味深いことに, あらかじめ宿主の大腸菌に紫外線を照射しておくと, ファージには照射しなくとも clear mutant の出現頻度が増大する. これは紫外線照射により大腸菌の中に誤りがちの複製系が誘導され, ファージの複製エラーが増大した結果と考えられる. ファージには紫外線を照射していないので, この変異は DNA 損傷には基づかない変異, すなわち untargeted mutagenesis

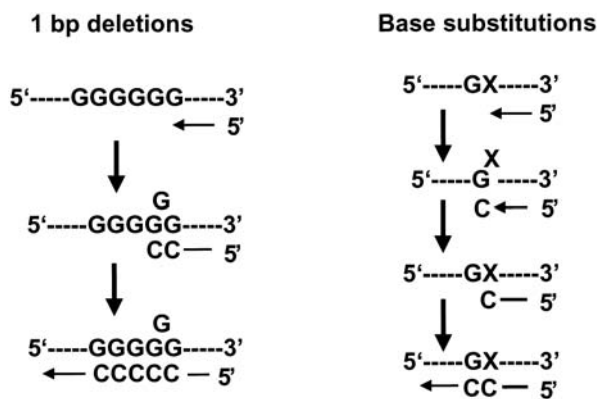


Fig. 5 Possible mechanisms of mutagenesis promoted by DNA pol IV (DinB). Template G in runs of G6 is looped-out during DNA synthesis across the region, thereby promoting -1 frameshift mutagenesis (1 bp deletions). For base substitution, X represents the base that is substituted. C is correctly inserted opposite G when X is looped out. Then, X pairs with C and another C is inserted opposite next G. The primer can be extended from terminal G:C pairs because it is a correctly matched terminus (base substitutions). In either case, template strands tend to be looped out (or in) in the catalytic center of DNA pol IV (Wagner and Nohmi, 2000b).

nesisにあたる。Fig. 4に示すように、野生型株にあらからじめ紫外線照射を行ってから、非照射のλファージを感染させると約100倍変異頻度が增大する (Kim et al., 1997)。しかし *dinB* 欠損株に同じ紫外線照射を行ってから非照射のλファージを感染させても、変異頻度は数倍しか上昇しない。一方、欠損株に *dinB* 遺伝子を持つ low-copy-number plasmid pYG768を導入すると、野生型株にこのプラスミドを導入した場合と同様、きわめて高い変異頻度が観察される。以上の結果は、*dinB* がλファージの untargeted mutagenesis に関与していることを示唆している。

dinB により促進される変異がどのようなタイプの変異であるかを明らかにするため、*dinB* を高発現させた宿主の大腸菌にλファージを感染させ *cII* 遺伝子をレポーターに *dinB* により促進される変異のスペクトルを明らかにした (Wagner and Nohmi, 2000b)。野生型株と *mutS* ミスマッチ修復欠損株を宿主に300以上の変異体を解析した結果、*dinB* の発現増大は、Gが6個並んだ配列から1つ抜けるフレームシフト変異が最も多いこと、そしてフレームシフトの約半分の頻度で、塩基置換も促進されることを明らかにした (Fig. 5)。塩基置換の場合、その約70%は 5'-GX-3' という配列で起こっていた。フレームシフト変異は、いわゆるスリップ・モデルによって説明できるが、塩基置換の場合は、まず鋳型鎖側のXがループアウトし、ついでXの隣にあるGの向かいにCが正しく挿入された後、鋳型鎖が延びてCがXと対合し、その後新たにXの隣のGの向かいにCを入れてプライマ

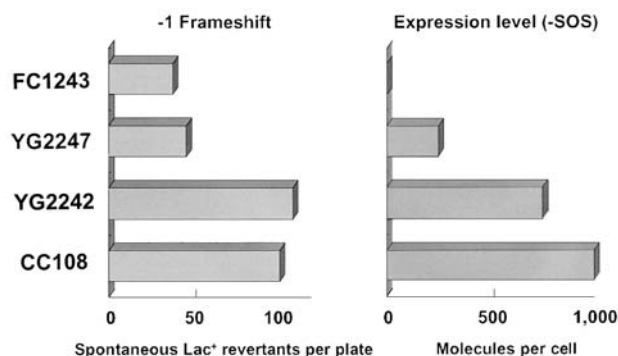


Fig. 6 Relationship between spontaneous Lac⁺ revertants per plate and cellular contents of DNA pol IV. CC108 is a strain of *E. coli* whose phenotype, i.e., Lac⁻, can be reverted to Lac⁺ by -1 frameshift in G6 runs in the *lacZ* gene on F' plasmid. This strain carries two copies of *dinB* on chromosome and F' plasmid. YG2242 is the same as CC108 but is Δ chromosomal *dinB*. YG2247 is a derivative of CC108 and its *dinB* on F' plasmid is deleted. FC1243 lacks both *dinB* genes on the chromosomal and F' plasmid. The *dinB* genes on the chromosome and F' plasmid express 250 and 750 molecules, respectively, of DNA pol IV per cell without SOS induction (Kim et al., 2001).

ー鎖を延長した可能性が考えられる。すなわち、スリップエラーの場合も含めて、DinBによる変異は鋳型鎖がループアウトすることにより生ずる場合が多いと考えられる。いずれにせよ、これらの結果は、*dinB* の発現増大がフレームシフト変異を主体とした untargeted mutagenesis の促進につながることを示唆している。同様の結果は、F'プラスミド、大腸菌染色体上の遺伝子をレポーターにした場合にも得られている。

発現を増大させた時ばかりでなく、*dinB* 遺伝子を欠損させその発現量を減少させた場合にも、*dinB* は大腸菌の自然突然変異頻度に影響を与える。Fig. 6は大腸菌 CC108株の自然突然変異頻度と、細胞当たりのDinB発現量をまとめたものである。CC108株は染色体上に *dinB* 遺伝子を持っているのみならず、*lacZ* の乗ったF'プラスミド上にも *dinB* 遺伝子を持っている。これは *lacZ* と *dinB* の染色体上での位置が近いために、F'上に *lacZ* が移った際に *dinB* もいっしょに移ったためと考えられる。そこで染色体上の *dinB*、F'上の *dinB* を破壊し、その発現量を測定するとともに、*lacZ* 変異を指標に自然突然変異頻度を測定した (Kim et al., 2001)。この株ではGが6個並ぶ配列から一つGが抜けるフレームシフト変異を観察している。その結果、両方の *dinB* を破壊した場合には-1Gのフレームシフト自然突然変異頻度が、約1/3に減少することが明らかになった。この結果から、高発現した場合だけでなく、通常発現レベルの *dinB* も大腸菌で起こる自然突然変異の促進に関与しているものと結論した。また、定常期にある大腸菌のF'プラスミ

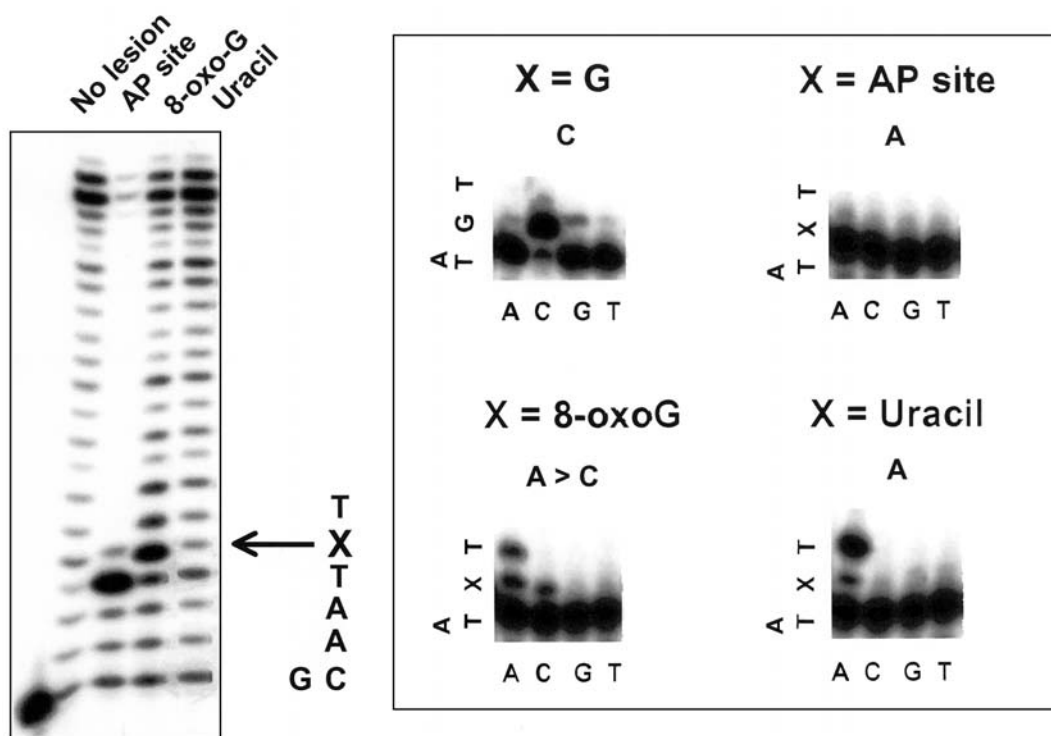


Fig. 7 Translesion bypass reactions by DNA pol IV of *E. coli*. A is predominantly inserted opposite abasic (AP) site and uracil in DNA. A followed by C is inserted opposite 8-oxoguanine (8-oxoG) in DNA.

ド上で起こるフレームシフト型自然突然変異に *dinB* が関与することが報告されている (McKenzie et al., 2001)。

4. 大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV による トランスリージョン DNA 合成

DinB の生化学的機能について研究を始めた当時、DinB は deoxynucleotidyl transferase 活性を持つ酵母の Rev1 (Nelson et al., 1996) と弱いアミノ酸配列上のホモロジーを示すのみで、生化学的機能を示唆する有力な証拠はなかった。Rev1 の活性への類推から、DinB も同様なプライマー伸長活性を持つのではないかと考え、DinB 蛋白質を精製し *in vitro* で活性測定を行った。その結果、DinB 蛋白質は鋳型 DNA の配列に基づきプライマー DNA を末端まで伸長させる DNA ポリメラーゼ活性のあることが判明した (Wagner et al., 1999)。このポリメラーゼは 3'-5'校正機能を欠いており、 β サブユニットの不在下では連続的な DNA 合成を行わず、比較的短い DNA 鎖の合成に関与していることが示唆された。この校正機能の欠如や、連続的な DNA 合成を行わない低いプロセッシビティー、そして複製の誤りが多いという点は、Yファミリー DNA ポリメラーゼに共通する性質である。

DNA ポリメラーゼ IV と targeted mutagenesis との関係を明らかにするため、DNA 損傷を持った DNA を鋳型

に *in vitro* にてトランスリージョン DNA 合成を行った。Fig. 7 は精製した DNA ポリメラーゼ IV を用いて *in vitro* でトランスリージョン DNA 合成を行った結果を示したものである。DNA 損傷は、自然条件下でできる損傷を選び、脱塩基部位、8-oxoguanine, uracil を用いた。Uracil, 8-oxoguanine 部位では、DNA ポリメラーゼ IV は DNA 合成を停止せず鋳型鎖の末端までプライマーを伸長した。一方、脱塩基部位では、DNA 合成は強く阻害されたものの一部は末端までプライマーを伸長した (Gruz et al., 2001)。損傷部位にどのような塩基が挿入されたかを見ると、G に対しては C が挿入されたが、脱塩基部位には A、8-oxoguanine には A あるいは C が、uracil に対しては A が挿入された。こうした結果から、DNA ポリメラーゼ IV はある種の DNA 損傷を乗り越えて DNA 合成を行い、傷に基づく突然変異 targeted mutagenesis を促進する可能性が示された。4-nitroquinoline *N*-oxide や, benzo[*a*]pyrene で起こる -1 フレームシフトは、*dinB* により促進されることが大腸菌を用いた *in vivo* の実験で明らかにされている (Kim et al., 2001 ; Napolitano et al., 2000)。

5. DNA ポリメラーゼ IV の活性を 修飾する因子

DNA ポリメラーゼ IV の特徴の一つは、大腸菌 DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素の連続的な DNA 合成を保証す

る β サブユニットの存在下で活性が増大するという点である。 β サブユニットは2量体でドーナツのような構造をとり、DNAをその中空部分に通してDNA上をスライドし、DNAポリメラーゼが鋳型DNAから脱落することを防いでおりsliding clampとも呼ばれている(Hingorani and O'Donnell, 2000)。真核生物ではproliferating cell nuclear antigen (PCNA) がsliding clampとして β サブユニットと同様の機能をはたしている。ただしPCNAは3量体であり、 β サブユニットとはアミノ酸配列上の相同性は示さない。pUC118 由来の環状一本鎖DNAあるいは90merの直鎖状鋳型鎖にプライマーをアニールさせ、各種条件下でプライマーの伸長を比較したところ、どちらの鋳型鎖を用いた場合にも、 β サブユニットとそのローディング(β サブユニットをDNA上に乗せること)に関与する γ コンプレックスさらにSSBが存在する場合に顕著な活性の増大が観察された(Wagner et al., 2000a)。

これとよく似た結果は、好熱古細菌*Sulfolobus solfataricus*由来のYファミリーDNAポリメラーゼSso P1 DNA pol Y1 (別名をDBH)を用いた場合にも得られている(Gruz et al., 2001)。古細菌はその名のごとく細菌であるが、その複製に関係する蛋白質の多くは前核生物よりも真核生物と相同性を持っている。古細菌のPCNAは大腸菌の β サブユニットとはホモロジーを持たず、真核生物のPCNAと相同性を示す。また興味深いことに*S. solfataricus*には複数のPCNA分子が存在する(De Felice et al., 1999)。PCNAによる活性の増大は、酵母のDNAポリメラーゼ η (Haracska et al., 2001a)、ヒトのDNAポリメラーゼ η , ι , κ (Haracska et al., 2001b ; 2001c ; 2002)についても報告されている。 β サブユニットやPCNAは、DNA修復酵素や他のDNAポリメラーゼなど多様な分子と相互作用することが知られており、大腸菌DNAポリメラーゼIVや古細菌のSso P1 DNAポリメラーゼY1だけでなく、多くのYファミリーDNAポリメラーゼの活性調節に重要な役割をはたしているかもしれない。酵母のPCNAについては、DNA損傷を受けた際にユビキチンやSUMO (small ubiquitin-related modifier) により修飾されることが報告されており(Hoege et al., 2002)、こうしたPCNAの修飾とトランスリージョン型DNAポリメラーゼの関係は今後追求されて行くべき課題であろう。

結 語

以上、大腸菌のDNAポリメラーゼIVを中心に、微生物のYファミリーDNAポリメラーゼ研究の一端を紹介した。本稿の中に出てきた*S. solfataricus*は、イタリアのベスビオス火山付近にある熱水中から単離された古細菌であり、その生育至適温度は摂氏80度といわれている。微生物は多様な環境下で生育しており、急激な環境

の変化に対応するためには、突然変異によって遺伝的な多様性を高め、いずれかの子孫が環境に適応して生き延びてゆく方策を採っている可能性が考えられる(Friedberg et al., 2002)。定常期のF'プラスミドで起こる変異も、F'プラスミドの上で変異体を作り、その変異が環境への適応にとって有利な時には、変異遺伝子を染色体へ取り込んで適応能力を高めるという方策なのかもしれない。進化が突然変異を抜きにして進まないことは明らかであり、微生物の進化、環境への適応にYファミリーDNAポリメラーゼがどのように関与しているかは、きわめて興味深い課題である。

一方、ヒトを含めた真核生物に誤りの多いDNAポリメラーゼが存在することは、「遺伝情報の恒常性の維持」という点から考えると矛盾しているようにも見える。しかしYファミリーDNAポリメラーゼの特徴は「複製の誤りが多い=変異を起こす」ということよりも、通常のDNAポリメラーゼでは複製を続けることのできにくい損傷部位や二次構造領域において「複製を続けることができる」という点にあるように思う。真核生物ではゲノムの99%以上はイントロンであり、この領域に起きたDNA損傷に対しては、たとえ複製エラーにつながったとしても「複製を続け」DNA鎖切断を起こさないことが重要なのではないだろうか。真核生物のYファミリーDNAポリメラーゼは、大腸菌のYファミリーDNAポリメラーゼよりも、細胞の生存すなわちDNA damage toleranceに深く関与しているのかもしれない。

環境変異原との関連についていえば、多種多様な変異原によるDNA損傷を複数あるDNAポリメラーゼのうちのどれが複製するのか、そしてどのような配列で起こるトランスリージョンDNA合成が突然変異につながるのかは重要な問題である。薬物代謝の分野では多様なCYP (P-450) が、さまざまな薬物、化合物の代謝に関わっており、同じCYPであっても、ある場合には解毒に働き、またある場合には活性化(毒性の増大)に働く。同じDNAポリメラーゼであっても、DNA損傷の構造やDNA配列(シークエンス・コンテキスト)により、異なった(誤りがちの複製と誤りの無い複製)役割をはたすのではないだろうか。新しく見出されたYファミリーDNAポリメラーゼの研究は、環境変異原の研究においてきわめて重要な基盤的知見を提供すると考えられ、多くの学会員がこの研究に参加されることを希望する。本稿がその一助となれば幸いである。

謝 辞

推敲にあたり助言をいただいた国立医薬品食品衛生研究所の山田雅巳主任研究官に感謝します。

参考文献

- Braithwaite, D.K. and J. Ito (1993) Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases, *Nucleic Acids Res.*, 21, 787-802.
- Brotcorne-Lannoye, A. and G. Maenhaut-Michel (1986) Role of RecA protein in untargeted UV mutagenesis of bacteriophage lambda : evidence for the requirement for the *dinB* gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 3904-3908.
- Cann, I.K., K. Komori, H. Toh, S. Kanai and Y. Ishino (1998) A heterodimeric DNA polymerase : evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 14250-14255.
- De Felice, M., C.W. Sensen, R.L. Charlebois, M. Rossi and F.M. Pisani (1999) Two DNA polymerase sliding clamps from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*, *J. Mol. Biol.*, 291, 47-57.
- Friedberg, E.C., G.C. Walker and W. Siede (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C.
- Friedberg, E.C., R. Wagner and M. Radman (2002) Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations, *Science*, 296, 1627-1630.
- Goodman, M.F. and B. Tiffin (2000) The expanding polymerase universe, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1, 101-109.
- Gruz, P., F.M. Pisani, M. Shimizu, M. Yamada, I. Hayashi, K. Morikawa and T. Nohmi (2001) Synthetic activity of Sso DNA polymerase Y1, an archaeal DinB-like DNA polymerase, is stimulated by processivity factors proliferating cell nuclear antigen and replication factor C, *J. Biol. Chem.*, 276, 47394-47401.
- Haracska, L., C.M. Kondratieck, I. Unk, S. Prakash and L. Prakash (2001a) Interaction with PCNA is essential for yeast DNA polymerase eta function, *Mol. Cell*, 8, 407-415.
- Haracska, L., R.E. Johnson, I. Unk, B. Phillips, J. Hurwitz, L. Prakash and S. Prakash (2001b) Physical and functional interactions of human DNA polymerase eta with PCNA, *Mol. Cell Biol.*, 21, 7199-7206.
- Haracska, L., R.E. Johnson, I. Unk, B.B. Phillips, J. Hurwitz, L. Prakash and S. Prakash (2001c) Targeting of human DNA polymerase iota to the replication machinery via interaction with PCNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 14256-14261.
- Haracska, L., I. Unk, R.E. Johnson, B.B. Phillips, J. Hurwitz, L. Prakash and S. Prakash (2002) Stimulation of DNA synthesis activity of human DNA polymerase kappa by PCNA, *Mol. Cell Biol.*, 22, 784-791.
- Hingorani, M.M. and M. O'Donnell (2000) Sliding clamps : a (tail) ored fit, *Curr. Biol.*, 10, R25-R29.
- Hoeghe, C., B. Pfander, G.L. Moldovan, G. Pyrowolakis and S. Jentsch (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO, *Nature*, 419, 135-141.
- Ito, J. and D.K. Braithwaite (1991) Compilation and alignment of DNA polymerase sequences, *Nucleic Acids Res.*, 19, 4045-4057.
- Johnson, R.E., M.T. Washington, S. Prakash and L. Prakash (1999a) Bridging the gap : A family of novel DNA polymerases that replicate faulty DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 12224-12226.
- Johnson, R.E., C.M. Kondratieck, S. Prakash and L. Prakash (1999b) *hRAD30* mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum, *Science*, 285, 263-265.
- Kenyon, C.J. and G.C. Walker (1980) DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 2819-2823.
- Kim, S.R., G. Maenhaut-Michel, M. Yamada, Y. Yamamoto, K. Matsui, T. Sofuni, T. Nohmi and H. Ohmori (1997) Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli* : an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 13792-13797.
- Kim, S.R., K. Matsui, M. Yamada, P. Gruz and T. Nohmi (2001) Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genomics*, 266, 207-215.
- Kornberg, A. and T.A. Baker (1992) *DNA Replication* 2nd Ed., Freeman, New York.
- Masutani, C., R. Kusumoto, A. Yamada, N. Dohmae, M. Yokoi, M. Yuasa, M. Araki, S. Iwai, K. Takio and F. Hanaoka (1999) The XPD (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta, *Nature*, 399, 700-704.
- McKenzie, G.J., P.L. Lee, M.J. Lombardo, P.J. Hastings and S.M. Rosenberg (2001) SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification, *Mol. Cell*, 7, 571-579.
- Napolitano, R., R. Janel-Bintz, J. Wagner and R.P. Fuchs (2000) All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis, *EMBO J.*, 19, 6259-6265.
- Nelson, J.R., C.W. Lawrence and D.C. Hinkle (1996) Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein, *Nature*, 382, 729-731.
- Ohmori, H., E.C. Friedberg, R.P.P. Fuchs, M.F. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkle, T.A. Kunkel, C.W. Lawrence, Z. Livneh, T. Nohmi, L. Prakash, S. Prakash, T. Todo, G.C. Walker, Z. Wang and R. Woodgate (2001) The Y-family of DNA polymerases, *Mol. Cell*, 8, 7-8.
- Qiu, Z. and M.F. Goodman (1997) The *Escherichia coli* *polB* locus is identical to *dinA*, the structural gene for DNA polymerase II. Characterization of Pol II purified from a *polB* mutant, *J. Biol. Chem.*, 272, 8611-8617.
- Reuven, N.B., G. Arad, A. Maor-Shoshani and Z. Livneh (1999) The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication, *J. Biol. Chem.*, 274, 31763-31765.
- Tang, M., X. Shen, E.G. Frank, M. O'Donnell, R. Woodgate and M.F. Goodman (1999) UmuD'₂C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 8919-8924.
- Wagner, J., P. Gruz, S.-R. Kim, M. Yamada, K. Matsui, R.P.P. Fuchs and T. Nohmi (1999) The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis, *Mol. Cell*, 4, 281-286.
- Wagner, J., S. Fujii, P. Gruz, T. Nohmi and R.P. Fuchs (2000a) The beta clamp targets DNA polymerase IV to DNA and strongly increases its processivity, *EMBO Rep.*, 1, 484-488.
- Wagner, J. and T. Nohmi (2000b) *Escherichia coli* DNA polymerase IV mutator activity : genetic requirements and mutational specificity, *J. Bacteriol.*, 182, 4587-4595.
- Woodgate, R. and D.G. Ennis (1991) Levels of chromosomally encoded Umu proteins and requirements for *in vivo* UmuD cleavage, *Mol. Gen. Genet.*, 229, 10-16.

ほ乳類細胞における DNA 二本鎖切断修復と, p53 によるゲノム安定化機構

本間 正充*

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

Double strand breaks DNA repair in mammalian cells and maintenance of genomic integrity mediated by p53

Masamitsu Honma

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

Summary

Chromosomal double strand breaks (DSBs) occurring in mammalian cells can initiate genomic instability. They are usually repaired through either of two pathways : end-joining (EJ) or homologous recombination (HR), and their misrepairs result in deletion, amplification, and translocation, which are common in human tumors. The tumor suppressor protein p53 is involved in maintaining genomic stability. We demonstrate here that the deficiency of wild-type p53 protein may allow unrepaired DSB to initiate chromosomal instability, and mutant-type p53 protein promotes illegitimate recombination leading to translocation. These results support a model in which p53 protein contributes to the maintenance of genomic integrity through recombinational repair. We also developed a system to trace the fate of DSBs occurring in a single copy gene of human genome using restriction endonuclease *I-SceI*. DSBs at the *I-SceI* site were repaired 100 times more frequently by EJ than HR. This system should be useful for understanding of mechanisms of DSB repair as well as serving as a model for DNA damage induced by low-dose irradiation.

Keywords : genomic instability, p53, double-strand break (DSB) , end-joining (EJ) , homologous recombination (HR)

緒 言

生物はあらゆる種類の DNA 損傷に対抗するため、さまざまな修復経路を進化させてきた。ヒトにおけるそれら修復経路の異常は、遺伝子突然変異を起因とする遺伝病やがんなどを引き起こすことが知られており、その修復経路の恒常性の維持はゲノム安定化の中心的役割をも

つものと考えられる。多くの DNA 損傷の中で DNA の二本鎖切断 (double strand break ; DSB) は、もっとも危険性が高いように思われる (Khanna and Jackson, 2001)。電離放射線等によってほ乳類細胞の染色体上に誘発された DSB は、主として End-Joining (EJ)、または相同組換え (Homologous Recombination ; HR) によって修復される (Harber, 2000 ; van Gent et al., 2001)。HR はエラーフリー型の修復機構で、基本的に染色体の構造変化や、遺伝情報の消失を伴わない。一方、EJ は必ず染色体の部分欠失や転座をもたらすエラー発生型の修復機構

* E-mail : honma@nihs.go.jp

受付 : 2002 年 10 月 3 日 受理 : 2002 年 10 月 3 日

日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第 13 回公開シンポジウム「環境変異原と遺伝子不安定性」で発表された。
This paper was presented at the 13th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 25th, 2002. The symposium entitled "Environmental Mutagens and Genomic Instability", was organized by Minako Nagao and Hitoshi Nakagama and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

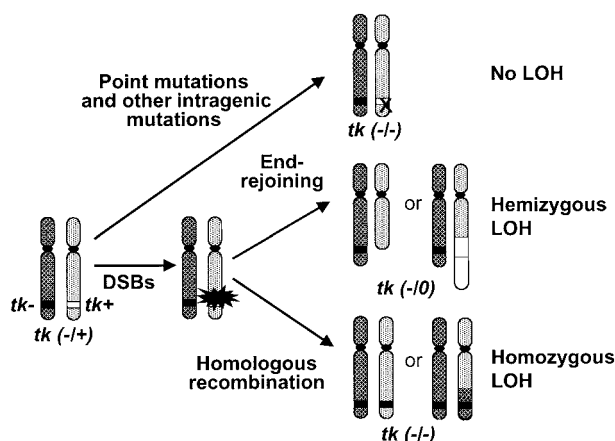


Fig. 1 A general model of recessive mutations in the *tk* locus. The human *tk* gene is located on chromosome 17q and is heterozygous (*tk*-/+) in TK6 cells. DSBs occurring within or near the functional *tk* locus are usually repaired by either of two pathways : end-rejoining (EJ) or homologous recombination (HR). EJ brings about hemizygous LOH, accompanied by interstitial deletions or translocations, while HR brings about homozygous LOH, but no apparent changes in chromosome structure.

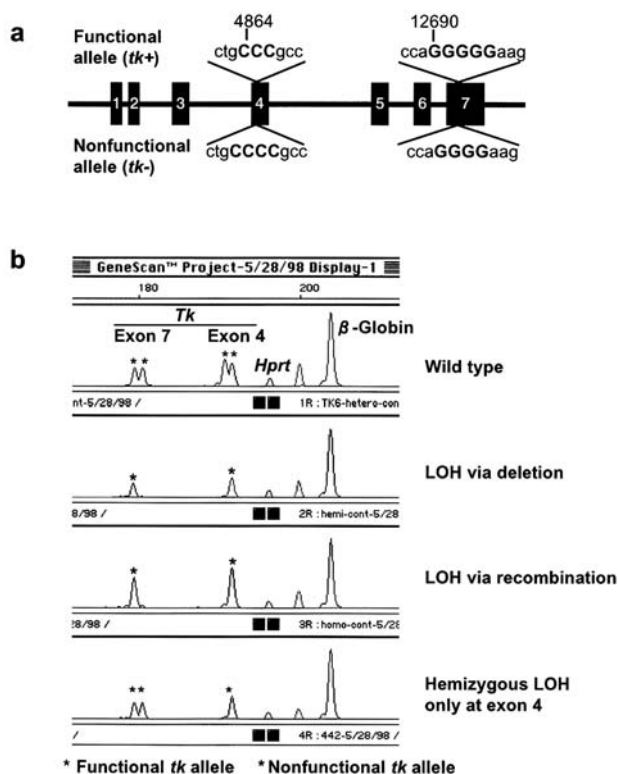


Fig. 2 Mutations at the heterozygous *tk* locus. (a) Schematic diagram of the *tk* locus and location of frame-shift dimorphism in TK6 cells. (b) Representative examples of LOH in TK-deficient mutants analyzed with an ABI 310 genetic analyzer. The mutants lacking peaks corresponding to functional alleles should have LOH, becoming either hemizygous or homozygous for the nonfunctional allele ; these can be distinguished by comparing the ratio of the peak area of the nonfunctional *tk* allele.

である。一般的にHRはバクテリアや酵母などの下等生物での主たる修復機構であり、ほ乳類細胞においては、DSBの大部分はEJによって修復されと考えられている (Lin et al., 1999 ; Tremblay et al., 2000)。しかしながら、その正確な寄与率に関しては明らかではない。このような基本的なDSB修復経路に関する研究については、本稿の最後に述べる。

近年、DSB修復に関する理解が高まり、修復のメカニズムやそれに関与するタンパクの役割などが解明されつつある。詳しくは他の総説に譲るが (Jeggo, 1998 ; Pierce et al., 2001 ; Jackson, 2002), ATM, H2AX, p53などの分子はDNA損傷を認識し、その後、切断部位においてRad50-NBS1-MRE11複合体が形成される。EJによって修復される場合はKu70, Ku80, DNA-PK, Xrcc4, DNAリガーゼなどが働き、HRによって修復される場合はRad51を中心とするそのパラログの複合体がその役割を担っていると考えられている。このように非常に多くの分子がDSB修復に関与し、ゲノムの安定化に寄与していると考えられているが、その破綻と発がんとの関係は明らかではない。そもそも、DNA修復の破綻による遺伝的不安定には2つのタイプがあり、1つは修復機能の欠損により細胞が致死性、もしくはDNA損傷に対して感受性となるタイプ、もう一方は修復機能の不完全性のため突然変異を誘発する、いわゆる mutator phenotypeを示すタイプである。DSBに関与する上記タンパクを欠損する細胞の多くは前者のタイプを示すため、発がんには直接繋がらないものと考えられる。一方、後者の例としてはp53の異常があげられ (Livingstone et al., 1992 ; Lu and Lane, 1993), また、DSB修復以外にはミスマッチ修復系の破綻などが知られている (Reitmaier et al., 1997)。これら遺伝子の異常は実際に大腸がんを始めとする多くのヒトがん組織で観察されることから発がん性との関係は強い。本稿では遺伝的不安定を後者のタイプに定義し、主にp53変異、もしくは欠損細胞がもたらす mutator phenotypeの特徴と発がんとの関係について、我々の研究結果をもとに述べる。

1. DSB二本鎖切断モデルとしてのTK 遺伝子突然変異

染色体ゲノムにおけるDSB修復機構を解析するためのモデル系としては、常染色体上の劣性型遺伝子突然変異を利用した系が有用である (Liber et al., 1989)。ヒトリンパ芽球細胞株TK6は17番染色体長腕上に存在するthymidine kinase 遺伝子 (*tk*) をヘテロにもつため (*tk*+/-), この *tk*+ アリルをターゲットとした遺伝子突然変異の検出が可能である (Fig.1)。TK欠損の変異細胞はトリフルオロチミジン (TFT) 抵抗性細胞として回収できるが、*tk*+ アリルにDSBが生じ、それがEJ、もしくは相同染色体間のHRによって修復されると、活性型 *tk*

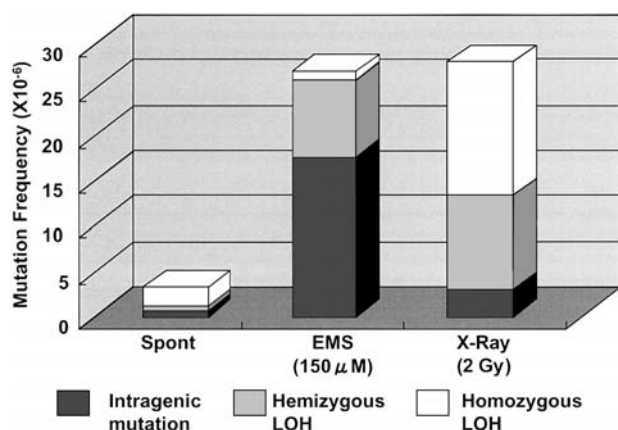


Fig. 3 Mutation frequencies and spectra of the mutations spontaneously occurring and induced by EMS (150 μM) and X-ray (2 Gy) at the *tk* locus in TK6 cells. The mutations are classified into 3 types: intragenic mutations, hemizygous LOH, and homozygous LOH.

アリルが消失した変異体、いわゆる LOH (loss of heterozygosity) 型の突然変異体をもたらす (Yandell et al., 1986). この場合、EJ によって活性アリルの欠失が生じた場合はヘミ型 LOH、HR によって不活化アリルがホモになった場合はホモ型 LOH となる。これら LOH 解析は *tk* 遺伝子内に存在する多型性部位を利用することで可能である。TK6 細胞の *tk* 遺伝子の exon4 と 7 にはフレームシフト型の突然変異が存在する (exon4 のフレームシフトが *tk* 不活化の原因) (Giver et al., 1995) (Fig. 2a). この領域を PCR で増幅し、DNA シークエンサーによりフラグメント解析することにより、両アリルを区別でき LOH を容易に判定できる (Fig. 2b). また、PCR を定量化することにより、ヘミ型とホモ型を区別することもできる。

Fig. 3 に TK6 細胞の自然および、EMS (150 μM)、X 線 (2 Gy) 誘発 *tk* 遺伝子突然変異のスペクトルを示す。自然誘発に関しては、全体の突然変異の 20% が点突然変異で、残り 80% が LOH であり、その大部分が HR に起因していた (Honma et al., 1997a). 一方、EMS はアルキル化剤であるため、変異のほとんどは LOH を伴わない点突然変異が主であり、X 線では誘発される変異の大部分は DSB に由来するため LOH 型の変異が多い。興味深いことに X 線による損傷でもその多くはホモ型の LOH をもたらす。このことは、ほ乳類細胞においても DSB の修復に、HR が重要な役割をはたしていることを示すものである。ただし、この結果から単純にヒト細胞での突然変異は DSB に由来する損傷が主であり、その多くは HR によって修復されるといえることはできない。突然変異スペクトルと突然変異メカニズムとの関係については後述するが、常染色体性劣性型突然変異検出系では HR によって LOH を引き起こす DSB は必ずしも *tk* 遺伝子内に生じる必要がなく、組換え型 LOH が検出

しやすい系であることを理解しておく必要がある。しかしながら、癌抑制遺伝子である Rb や p53 のヒトがん組織での LOH 頻度や、その機構はここで観察されたものと一致しており、本検出系は DSB 修復のモデル系であると同時に、細胞のがん化過程における遺伝子変化のモデルであることは確かである (Li et al., 1992). LOH は EJ もしくは HR 以外に、遺伝子変換、非相同型組換え、染色体不分離等のメカニズムによっても起こりうる。これらメカニズムは染色体や、*tk* 近傍の遺伝マーカー等を解析することにより分類することができる (Honma et al., 2001). LOH 発生のメカニズムを解明することは、ヒト細胞における DSB 修復機構だけでなく、細胞癌化を制御する因子の解明にもつながるものと考えられる。

2. p53 による遺伝的安定化機構

がん抑制遺伝子である p53 はヒトがん組織において最も高頻度に変異が観察される遺伝子であり (Hollstein et al., 1991), その役割として、損傷した DNA を認識し、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導を行うことにより損傷を受け細胞を排除し、ゲノムの安定化に寄与していると考えられている (Kastan et al., 1991; Ko et al., 1996). しかしながら、これら機構の破綻だけでは p53 変異細胞のもつ遺伝的不安定性やがん細胞としての特性を完全に説明することはできないため、DNA 修復機構への関与も指摘されている。

我々は、p53 が関与する DNA 修復機構と、p53 の異常によってもたらされる遺伝的不安定性の特徴を明らかにするため、p53 欠損細胞、もしくは変異細胞を用い、そこで生じる遺伝子突然変異頻度や特徴を p53 正常細胞と比較した。TK6 細胞は p53 正常細胞であるが、TK6 と同一起源をもつ isogenic 細胞である WTK-1 細胞は p53 遺伝子のコドン 237 にホモに突然変異をもつ p53 変異細胞である。また、TK6 細胞にヒトパピローマウィルスの E6 タンパクを発現させた TK6-E6 細胞、およびベクターのみを導入した TK6-20C 細胞が樹立されている。E6 タンパクは野生型 p53 タンパクと結合しすみやかに分解するため、TK6-E6 細胞は機能的に p53 を欠損している (Yu et al., 1997). したがって、WTK-1、TK6-E6 細胞は TK6 と遺伝的バックグラウンドを共通とする p53 変異、欠損細胞と見なすことができる。Table 1 に各細胞の *hprt*, *tk* 遺伝子座における自然突然変異頻度を示す。*Tk* 遺伝子座における WTK-1、TK6-E6 細胞での突然変異頻度は p53 正常細胞である TK6 細胞に比べて、それぞれ 30 倍、10 倍高く、p53 変異、欠損細胞とも遺伝的に不安定であり、mutator phenotype を示すことが示唆された。

p53 を欠損する TK6-E6 細胞で生じる突然変異の特徴を明らかにするため *tk* 変異体の LOH 解析を行ったところ、p53 正常細胞である TK6 では生じる変異の大部分がホモ型の LOH だったのに対して、TK6-E6 ではそのほと

Table 1 Spontaneous mutation frequencies of TK6 and related cell lines

Cell lines	p53 status	Mutation frequency ($\times 10^6$; mean $\pm$ SD)	
		HPRT	TK
TK6	Wild-type	2.1 ± 2.0	3.3 ± 1.1
WTK-1	Mutant	17.4 ± 5.9	101.1 ± 6.8
TK6-E6	Deficient	2.3 ± 1.8	33.5 ± 9.8
TK6-20C	Wild-type	3.8 ± 4.0	3.8 ± 1.0

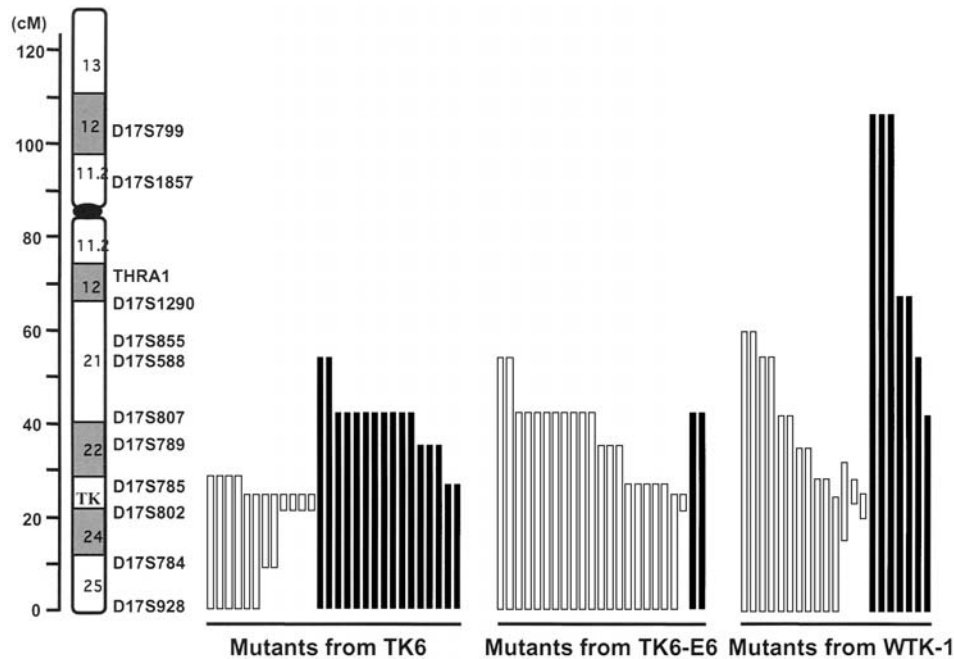


Fig. 4 Extent of loss of heterozygosity (LOH) in the TK-deficient mutants from TK6, TK6-E6 and WTK-1 cells. Twelve microsatellite loci on chromosome 17 that are heteromorphic in these cell lines were examined. The approximate position of each locus is mapped on the right of the schematic chromosome 17. The human *tk* locus is mapped on 17q23.2. Open and closed bars represent hemizygous LOH and homozygous LOH mutants, respectively. Length of bars indicates the extent of LOH.

んどがヘミ型LOHを示した。このことはTK6-E6細胞ではHRが起こらないためDSBの大部分はEJによって修復されることを示している。このLOHの範囲をマイクロサテライトマーカーを用いて17番染色体上にマッピングした (Fig. 4)。p53正常細胞 (TK6) 由来の欠失型LOHのほとんどは*tk*遺伝子に局限するinterstitial deletionか、*tk*より末端までのterminal deletionであり、染色体の変化が最小限となっているのに対して、p53欠損細胞 (TK6-E6) のほとんどの変異体には、染色体広範にわたるterminal deletionが起きていた。また、このような広範なLOHはp53正常細胞ではすべて組換え型LOHとして観察されることから、本来HRによって修復されるべきDSBが、p53欠損細胞ではEJによって修復され、その結果、大きな染色体異常をもたらしているものと考えられた。実際、TK6-E6由来のLOH変異体をクロモゾームペイント法により解析すると、17番染色体

の部分欠失、転座、増幅等の構造異常が同一クローン中にモザイクとして観察された。このような染色体異常は、G2期において切断された染色分体間の自己融合 (chromatid fusion) が原因と考えられる。chromatid fusionは、一時的には安定であるが、細胞分裂を迎えると引きちぎられ、再び2本鎖切断が生じる。そしてこれがDNA複製を経て、再びchromatid fusionが繰り返される、いわゆるBreakage-Fusion-Bridge (BFB) cycleを引き起こす (Coquelle et al., 1997; Pipiras et al., 1998)。このように、p53欠損細胞が遺伝的に不安定である、その要因は、すみやかに修復されないDSBであり、これがBFBサイクルの引き金となって、種々の染色体異常を引き起こすものと考えられる (Honma et al., 2000)。

一方、p53変異細胞であるWTK-1に由来する*tk*変異体を解析すると、ヘミ型だけでなく、ホモ型のLOHの頻度も増加していた。このことからWTK-1細胞では

Table 2 Yield of spontaneous mutation frequencies at *tk* locus in TK6 cells

Type of mutation	Target size (kb)	Mutat. Freq. ($\times 10^6$)	Mutat. Freq./kb ($\times 10^8$)
Intragenic mutation (including small interstitial deletion)	11	1.17	10.65 (1805)
Recombinational LOH	35,000	2.01	0.0059 (1)
Gene Conversion	11	0.06	0.51 (86)

TK6-E6細胞と異なり、組換え修復能は保持されているものと考えられた (Honma et al., 1997a). LOH 変異体の染色体を解析すると (Fig. 4), 組換え型と思われた変異体の染色体には転座を伴うものが多く, その転座は変異体にクローナルに観察されたことから WTK-1 細胞では組換え修復は起こるが, その fidelity が低いために非相同 (illegitimate) 性の組換えにより, 他の染色体部位との転座を誘発するものと考えられた (Honma et al., 1997b). また, WTK-1 細胞では染色体不分離による aneuploid も高頻度に観察され, 変異型 p53 は組換え修復の異常に伴う染色体の構造的変異をもたらすだけでなく, 細胞分裂や染色体分離機構にも影響を与え, 染色体の数的異常も導くものと考えられた (Cross et al., 1995 ; Fukasawa et al., 1996 ; Honma et al., 2001).

以上のことから p53 による遺伝的安定化機構として, ゲノム中に生じた DSB の相同組換え修復への関与を提唱する. p53 欠損細胞ではこの相同組換えがすみやかに働かないため, 修復を免れた DSB は BFB サイクルを介して転座, 欠失, 増幅等のさまざまな染色体異常をもたらす (Livingstone et al., 1992 ; Agapova et al., 1996). また, p53 変異細胞では組換え修復能は保持されているものの, その正確さが低いため逆に染色体転座を誘発する. このように p53 の欠損, もしくは異常による遺伝的不安定性は点突然変異のような小さな遺伝子変異よりも染色体レベルの大きなゲノム変化に関与している. 多段階発癌過程におけるゲノム変化を考えると, p53 の異常は, 相同, 非相同性の組換えを介して, ゲノム中に LOH 型の突然変異や染色体異常の蓄積を促しているものと考えられる.

3. I-SceI 発現系を利用したほ乳類細胞における DSB 修復機構

Tk 遺伝子における突然変異スペクトルの結果からヒト細胞で起こる突然変異の大部分は DSB に由来し, その多くは HR により LOH をもたらしことが示唆された. しかしながらこの結果は, これまでの遺伝子突然変異研究で常識とされてきた突然変異の大部分は外来性の変異原や, DNA の複製, 修復のエラーによって生じる点が突然変異が主であるということと矛盾するものである. また, 冒頭でも述べたが, DSB の修復においても, ほ乳類細胞において EJ と HR のどちらが優先的に働くのか

という問題に関してもこれまでの多くの研究結果と相反するものである. この問題を理解するためには突然変異スペクトルと, 突然変異のメカニズムの関係を正しく認識する必要がある. 突然変異スペクトルは必ずしもゲノム中で起こるすべての突然変異のイベントを正確に反映するものではなく, その突然変異検出系に強く依存する. たとえば, *hprt* や, トランスジェニックマウスの *LacZ* 遺伝子などをターゲットとした突然変異検出系では HR や, 大きな遺伝子の欠失を伴う EJ を検出することはできず, その変異はもっぱら点突然変異が対象となるため, 当然バイアスが生じる (Ikehata and Ono, 2001). 同様に, *tk* 遺伝子突然変異検出系でもそのスペクトルにはバイアスが存在する. この系は点突然変異だけでなく, EJ や HR による LOH 型突然変異を検出できることが最大の特徴であるが, 点突然変異は *tk* 遺伝子内の損傷を対象とするのに対して, LOH は 17 番染色体上のかなりの部分で生じる DNA 損傷から由来することが Fig.4 から理解される. また, LOH でも EJ 型と HR 型ではその範囲はかなり異なる. このことは, Fig.3 で示したスペクトルにおける各イベントの突然変異のターゲットサイズが違うことを示しており, これを大まかにターゲットサイズ当たりで補正すると, 点突然変異の方が圧倒的に頻度が高くなり, これまでの常識と矛盾がない (Table 2). このように突然変異スペクトルから, 突然変異のメカニズムを論じるにはきわめて注意が必要である.

DSB の修復メカニズムを細胞レベルで理解するために, 放射線のような外来性の変異原によりゲノム中にランダムに DSB を発生させて, 特定の遺伝マーカーの変異スペクトルをレトロスペクティブに解析しても上記の理由からあまり意味はない. 一つの DSB のたどる運命を完全にトレースすることができてこそ, この目的は達成される. 我々は, DSB の発生モデルとして制限酵素 I-SceI に注目している. I-SceI は出芽酵母のミトコンドリア DNA にコードされている酵素で, その認識部位は 18bp の非パリンドローム構造をもつ (Jasin, 1996). ヒトゲノム中にはこの配列は 1 つも存在しないため, この DNA 配列を特定のゲノム部位に挿入し, I-SceI 酵素を発現させることにより, その部位に確実に DSB を発生させることができる (Taghian and Nickoloff, 1997). 我々はこの I-SceI 部位を, TK6 細胞の *tk* 遺伝子内にジーンターゲット法により挿入することに成功し, この部

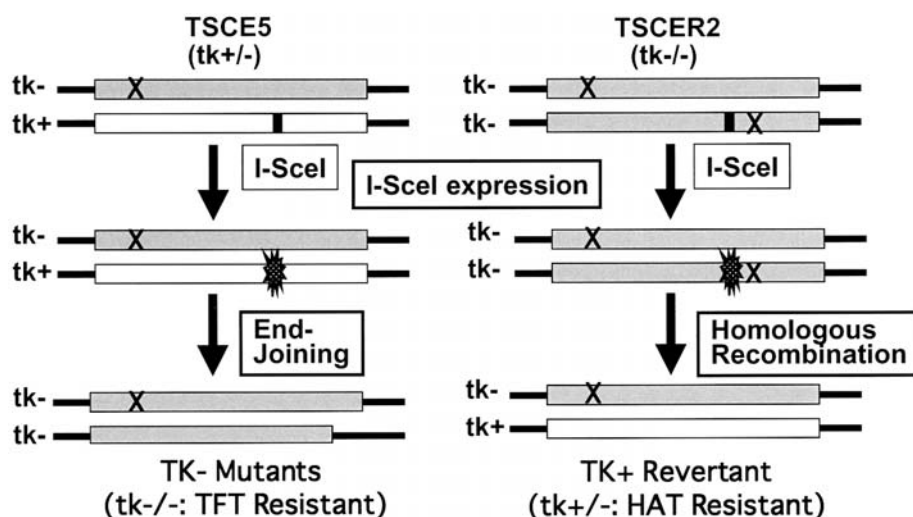


Fig. 5 Schematic representation of the experimental system to detect EJ and HR. Open and closed rectangles represent the wild and mutant type of the *tk* gene, respectively. When a DSB occurring at the *I-SceI* site is repaired by EJ and causes a deletion, TK-deficient mutants are isolated from TSCE5 cells in TFT medium. When HR repairs it, on the other hand, TK-proficient revertants are generated from TSCER2 cells under HAT selection.

位に生じたDSBの運命を定性、定量的に解析できる系を確立した。*Tk*ヘテロのTSCE5細胞では*I-SceI*部位で生じたDSBがEJによって修復されると*tk*遺伝子の一部が欠失し、細胞は*tk* (-/-)の変異体として回収される。一方、コンパウンドヘテロに変異をもつ*tk* (-/-)のTSCER2細胞では、生じたDSBが染色体間のHRによって修復されると*tk* (-/+)のリバートantとなる (Fig. 5)。これら細胞に*I-SceI*の発現ベクターをトランスフェクションすると、変異体、リバートantの出現頻度はそれぞれ40倍、100倍増加した。このことはDSBが直接EJおよびHRを誘発することを示している。しかしながら、両者の絶対頻度はEJの方がHRの約100倍高く、このことはDSBの99%以上はEJによって修復されることを示している。本系はヒトゲノム中で生じたDSBの運命を公正にトレースすることができるため、DSB修復のメカニズムや、その関与するさまざまな生体内因子の研究に利用されることが期待できる (Honma et al., 投稿中)。

おわりに

ここ最近、DSBの修復に関する研究分野は大きく進歩し、ほ乳類細胞におけるDSBの認識から修復に至る一連のカスケードと、それに関与するタンパク因子の役割についてはほぼ解明されつつある。しかしながら、DSB修復の基本的な生物学的役割については不明点が多い。どのような場合DSBは修復され、また、修復されずその細胞はアポトーシスによって排除されるのか？ 修復される場合、なぜ、エラー発生型のEJが優先的に働くのであろうか？ これはゲノム安定性を考慮

すると生体にとって不利ではないのか？ また、EJとHRの修復経路はどのように使い分けられているのか？ それらは競合したり、互いに相補するのか？ EJやHR以外の修復機構（たとえばsingle strand annealing）は、どの程度関与しているのか？ これら問題の解決には、従来の分子生物学的、生化学的手法だけでは困難のように思われる。今後、これらの問題を解明のために新しい細胞遺伝学的手法を用いたBreakthroughを目指したい。

参考文献

- Agapova, L., G. V. Ilyinskaya, N. A. Turovets, A. V. Ivanov, P. M. Chumakov, and B. P. Kopnin (1996) Chromosome changes caused by alteration of p53 expression, *Mutat. Res.*, 354, 129-138.
- Coquelle, A., E. Pipiras, F. Toledo, G. Buttin, and M. Debatisse (1997) Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplifications, *Cell*, 89, 215-225.
- Cross, S. M., C. A. Sanchez, C. A. Morgan, M. K. Schimke, S. Ramel, R. L. Idzerda, W. H. Raskind, and B. J. Reid (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint, *Science*, 267, 1353-1356.
- Fukasawa, K., T. Choi, R. Kuriyama, S. Rulong, and G. F. V. Woude (1996) Abnormal centrosome amplification in the absence of p53, *Science*, 271, 1744-1747.
- Giver, C. R., S. L. Nelson Jr., M. Y. Cha, P. Pongsaensook, and A. J. Grososky (1995) Mutational spectrum of X-ray induced TK-human cell mutants, *Carcinogenesis*, 16, 267-275.
- Haber, J. E. (2000) Partners and pathways repairing a double-strand break, *Trends Genet.*, 16, 259-264.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C. C. Harris (1991) p53 mutations in human cancer, *Science*, 253, 49-53.
- Honma, M., M. Hayashi, and T. Sofuni (1997a) Cytotoxic and mutagenic responses to X-ray and chemical mutagens in normal and p53-mutated human lymphoblastoid cells, *Mutat. Res.*, 374, 89-98.
- Honma, M., L.-S. Zhang, M. Hayashi, K. Takeshita, Y. Nakagawa, N.

- Tanaka, and T. Sofuni (1997b) Illegitimate recombination leading to allelic loss and unbalanced translocation in p53-mutated human lymphoblastoid cells, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 4774-4781.
- Honma, M., M. Momose, H. Tanabe, H. Sakamoto, Y. Yu, J. B. Little, T. Sofuni, and M. Hayashi (2000) Requirement of wild-type p53 protein for maintenance of chromosome integrity, *Mol. Carcinog.*, 28, 203-214.
- Honma, M., M. Momose, T. Sofuni, and M. Hayashi (2001) Spindle poisons induce allelic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction, *Mutat. Res.*, 493, 101-104.
- Ikehata, H. and T. Ono (2001) In vivo mutation analysis with transgenic mouse (Japanese), *Prot. Nuc. Acid & Enz.*, 46, 1171-1180.
- Jackson, S. P. (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks, *Carcinogenesis*, 23, 687-696.
- Jasin, M (1996) Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases, *Trend Genet.*, 12, 224-228.
- Jeggo, P. A. (1998) Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells, *Radiat. Res.*, 150 (Suppl.), S80-S91.
- Kastan, M. B., O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, and R. W. Craig (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage, *Cancer Res.*, 51, 6304-6311.
- Khanna, K. K. and S. P. Jackson (2001) DNA double-strand breaks : signaling, repair and the cancer connection, *Nat. Genet.*, 27, 247-254.
- Ko, L.J. and C. Prives (1996) p53 : puzzle and paradigm, *Gene & Devel.*, 10, 1054-1072.
- Li, C.-Y., D. W. Yandell, and J. B. Little (1992) Molecular mechanism of spontaneous and induced loss of heterozygosity in human cells in vitro, *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18, 77-87.
- Liber, H. L., D. W. Yandell, and J. B. Little (1989) A comparison of mutation induction at the *tk* and *hprt* loci in human lymphoblastoid cells ; quantitative differences are due to an additional class of mutations at the autosomal *tk* locus, *Mutat. Res.*, 216, 9-17.
- Lin, Y., T. Lukacsovich, and A. S. Waldman (1999) Multiple pathways for repair of DNA double-strand breaks in mammalian chromosomes, *Mol. Cell Biol.*, 19, 8353-8360.
- Livingstone, L. R., A. White, J. Sprouse, E. Livanos, T. Jacks, and T. D. Tlsty (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53, *Cell*, 70, 923-935.
- Lu, X., and P. Lane (1993) Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation : Defects in chromosome instability syndrome?, *Cell*, 93, 765-778.
- Pierce, A. J., J. M. Stark, F. D. Araujo, M. M. Moynahan, M. Berwick, and M. Jasin (2001) Double strand breaks and timorogenesis, *Trends in Cell Biol.*, 11, S52-S59.
- Pipiras, E., A. Coquelle, A. Bieth, and M. Debatisse (1998) Interstitial deletions and interchromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome, *The EMBO J.*, 17, 325-333.
- Reitmair, A. H., R. Risley, R. G. Bristow, T. Wilson, A. Ganesh, A. Jang, J. Peacock, S. Benchimol, R. P. Hill, T. W. Mak, R. Fishel, and M. Meuth (1997) Mutator phenotype in Msh2-deficient murine embryonic fibroblasts, *Cancer Res.*, 57, 3765-3771.
- Taghian, D. G. and J. A. Nickoloff (1997) Chromosomal double-strand breaks induce gene conversion at high frequency in mammalian cells, *Mol. Cell Biol.*, 17, 6386-6393.
- Tremblay, A., M. Jasin, and P. Chartrand (2000) A double strand break in a chromosomal LINE element can be repaired by gene conversion with various endogenous LINE elements in mouse cells, *Mol. Cell Bio.*, 20, 54-60.
- van Gent, D. C., J. H. Hoeijmakers, and R. Kanaar (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection, *Nat. Rev. Genet.*, 2, 196-206.
- Yandell, D. W., T. P. Dryja, and J. B. Little (1986) Somatic mutations at a heterozygous autosomal locus in human cells occur more frequently by allele loss than by intragenic structural alterations, *Somat. Cell Mol. Genet.*, 12, 255-263.
- Yu, Y., C.-Y. Li, and J. B. Little (1997) Abrogation of p53 function by HPV 16 E6 gene delays apoptosis and enhances mutagenesis but does not alter radiosensitivity in TK6 human lymphoblast cells, *Oncogene*, 14, 1661-1667.

ラットおよびヒト乳腺発がんにおける 一塩基不安定性

大河内 江里子*, 牛島 俊和

国立がんセンター研究所発がん研究部 〒104-0045 東京都中央区築地5-1-1

Single nucleotide instability in rat and human mammary carcinogenesis

Eriko Okochi and Toshikazu Ushijima

Carcinogenesis Division, National Cancer Center Research Institute
5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

Summary

Genomic instability plays important roles in carcinogenesis. To analyze point mutation rates (MRs) in rat mammary carcinomas, we established two cell lines from those induced in *lacI*-transgenic rats by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. The two cell lines showed 6-8 fold increases in the spontaneous point MRs of the endogenous *hprt* gene and 12-15 fold increases in the *lacI* transgene. Since the cell lines lacked microsatellite instability (MSI) and were capable of G/T mismatch-binding, the increase of spontaneous point MRs was considered to be due to a mechanism(s) different from mismatch repair insufficiency, and this type of genetic instability was termed as single nucleotide instability (SNI). SNI in the rat mammary carcinoma cell lines was characterized by an elevation of A:T to C:G transversions, which were rarely observed in normal mammary epithelial cells. The elevation of the A:T to C:G transversions was also present in the *lacI* gene of the primary carcinomas of the two cell lines, which suggested that the molecular abnormality present in the cell lines was already present in their primary carcinomas. Spontaneous point MRs of the *hprt* gene were measured in six human breast cancer cell lines, and an increase was found in five of them. These human breast cancer cell lines were reported to lack MSI, and were proficient in G/T mismatch binding. Therefore, it was shown that SNI existed also in five of the six human breast cancer cell lines. Inactivation of *Mth1*, the mammalian homologue of *E. coli* the *MutT* gene, and overexpression of the *DNA polymerase κ* , both of which were known to cause increases of A:T to C:G transversions, were analyzed in the rat mammary carcinoma cell lines and their primary carcinomas. However, neither of them was present. Considering that MSI is infrequent in human and rat mammary carcinomas, a wide role of SNI in the development of such tumors was suggested.

Keywords : genomic instability, mutation rate, breast cancer, point mutation, *hprt*

緒 言

がんは、複数の突然変異が多段階的に蓄積することにより発生する遺伝子の病気である。しかし、細胞分裂に

伴う自然突然変異の発生頻度では、ヒトの一生の間に、1つの細胞の中にせいぜい2個か3個の突然変異しか起こらないと計算される (Loeb, 1998)。発がんのためには6-10個の突然変異の蓄積が必要であることから、ほとんどのがんには突然変異の発生頻度が高くなる‘ゲノム不安定性’が関与していると考えられている (Fig. 1) (Jackson and Loeb, 1998 ; Loeb, 1991)。これまで、ゲ

* E-mail : eokochi@ncc.go.jp

受付：2002年10月2日 受理：2002年10月2日

日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第13回公開シンポジウム「環境変異原と遺伝子不安定性」で発表された。

This paper was presented at the 13th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 25th, 2002. The symposium entitled "Environmental Mutagens and Genomic Instability", was organized by Minako Nagao and Hitoshi Nakagama and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

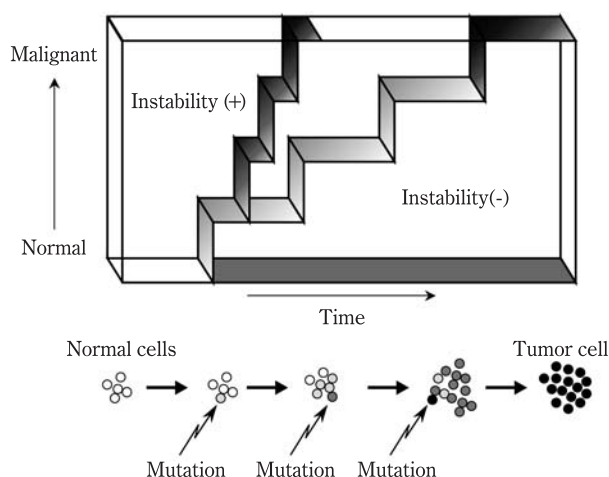


Fig. 1 Multi-step carcinogenesis and genomic instability. Genomic instability is considered to be involved in a wide variety of tumors so that multiple mutations can accumulate in a single cell and multi-step carcinogenesis will be completed (Jackson and Loeb, 1998 ; Loeb, 1991).

ノム不安定性は主に、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability ; MSI) と染色体不安定性 (chromosomal instability ; CIN) に大別されてきた。MSIは、ミスマッチ修復系遺伝子の異常により、マイクロサテライト変異および点突然変異が増加するものである (Lengauer et al., 1998)。ヒト大腸がん、胃がんおよび膵臓がんでは、高頻度に観察されるのに対し、乳がんではほとんど認められない (Anbazhagan et al., 1999 ; Speicher, 1995)。CINは、*MAD2*や*BUB1*などの細胞分裂チェック機構に関与する遺伝子の異常により、染色体異常が増加するものである (Lengauer et al., 1998 ; Orr-Weaver and Weinberg, 1998)。

多くのがん遺伝子やがん抑制遺伝子の突然変異は、マイクロサテライト配列のような反復配列中ではなく、ランダムな塩基配列中での点突然変異によって生じている。したがって、がんにおけるゲノム不安定性を研究するうえでは、ランダムな配列中では起こる点突然変異そのものを指標にして解析した方が良いと考えられる。また、大多数のゲノム不安定性の研究においては、腫瘍に蓄積した突然変異の数だけを解析している。しかし、本来は突然変異の蓄積速度を比較する必要があり、細胞分裂の回数を考慮した突然変異、すなわち突然変異率 (mutation rate ; MR) を算出することが重要である。しかし、点突然変異率の解析は、その煩雑さゆえに、これまではほとんどなされてこなかった。

我々は、ヘテロサイクリックアミンの一つである2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) で誘発したラット乳がんから細胞株を樹立し、点突然変異率を測定した。PhIPにより誘発した乳がんでは、マイクロサテライト変異が非常に少ないことが知られ

(Toyota et al., 1996)、MSIとは異なるタイプのゲノム不安定性を解析するのに適切と予測された。その結果、MSIを伴わずに点突然変異のみを特異的に上昇させる、新たなタイプのゲノム不安定性をラット乳がん細胞株において見出し、「一塩基不安定性 (single nucleotide instability ; SNI)」と名付けた。さらに、SNIは、ラットのみならずヒトの乳がん細胞株でも認められ、乳腺発がんに関与していることが示唆された。本稿では、SNIを見出した経過を概説し (Okochi et al., 2002c)、SNIの分子機構解明に関する現在までの成果について紹介したい。

ラット乳がん細胞株の樹立とそれらでの点突然変異率の上昇

1. ゲノム不安定性を評価するうえでの細胞株を用いる重要性

ゲノム不安定性に関する従来の多くの研究は、腫瘍に蓄積した突然変異の数を解析しているものである。しかし、ある細胞が同じ突然変異率を示す場合でも、多くの細胞分裂を経てから観察すれば、たくさんの突然変異が蓄積しているし、細胞分裂をあまり経ないで観察すれば、突然変異はあまり蓄積していない。つまり、突然変異がどの程度起こりやすいのかを調べるうえでは、1回の細胞分裂あたりの突然変異が起こる確率、すなわち、MRを算出する必要がある (Lengauer et al., 1998 ; Luria and Delbrück, 1943)。腫瘍そのものにおいては、腫瘍細胞として遺伝子変異が完成した時点からゲノム不安定性を解析するまでの間に、何回の細胞分裂が起こっているのかは不明である。一方、細胞株を用いれば、一定期間培養している間に生じている細胞分裂回数は計算することができる。

また、発がん物質により誘発された腫瘍では、発がん物質そのものによって誘発された突然変異と、ゲノム不安定性によって誘発された突然変異との両者が検出される。一方、細胞株では、培養中には発がん物質に暴露していないため、ゲノム不安定性によって誘発された突然変異だけを検出できる。これら二つの理由から、腫瘍におけるゲノム不安定性は、細胞株を用いて解析することが重要と考えた。

2. ラット乳がん細胞株の樹立

6週齢の雌 (*lacI*-transgenic F344 Big Blue® × SD) F₁ ラット 33 匹に、PhIP・HCl 75 mg/kg/day を、週 5 回 2 週間、計 10 回強制胃内投与した。コントロール群 14 匹には、同量の蒸留水を強制胃内投与した。10 回投与後、両群ともに 23.5 % 高脂肪食を与え、56-69 週目に屠殺解剖した (Okochi et al., 1999)。2 個の乳がん (両者とも adenocarcinoma) から、2 系統の細胞株、PhIP12-1 および PhIP7-4 を樹立した (Watanabe et al., 2001a)。両細胞

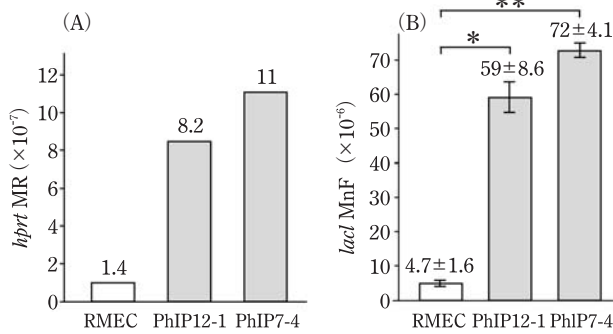


Fig. 2 Increase of *hprt* MRs(A) and *lacI* corrected MnFs(B) in the two PhIP-induced mammary carcinoma cell lines. *hprt* MRs and *lacI* MnFs in the two mammary carcinoma cell lines were increased, compared with that in RMEC. Mean $\pm$ SE. * $P = 0.0001$, ** $P = 0.0000001$.

株とも、中性脂肪およびカゼインの産生から乳腺由来の細胞であることを確認し、ヌードマウスにおける造腫瘍能も陽性であった。核型は、PhIP7-4は染色体数が42と正常であったのに対し、PhIP12-1は染色体数が69-102と、高倍数性の変異を高頻度に認めた。

3. ラット乳がん細胞株における *hprt* MRsの増加

樹立した2系統のラット乳がん細胞株における内在性遺伝子 *hprt* のMRsを、以下の方法で測定した(Watanabe et al., 2001a)。対照にはラット正常乳腺上皮初代培養細胞(RMEC)を用いた。

対数増殖期の細胞 10^2 個を、約 10^6 個まで増殖させた後、全細胞数を計測した。実際の細胞数から開始の細胞数 (10^2 個) を減じ、観察した細胞分裂回数とした。約 10^6 個の全細胞を96-wellプレート1枚に(約 10^4 個/well)接種し、24時間後に1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の6-thioguanine (6-TG) を添加した。約6-8週間後に、6-TG耐性コロニーを計測し、*hprt* 突然変異体数とした。各細胞株について、この操作を24回繰り返した。MRsはLuria-Delbrückの8式(Luria and Delbrück, 1943)を用いて算出した。*hprt* MRsは、PhIP12-1とPhIP7-4およびRMECでは、それぞれ 8.2×10^{-7} 、 11×10^{-7} および 1.4×10^{-7} 変異/*hprt* 遺伝子/細胞分裂であり (Fig. 2A)、2系統のラット乳がん細胞株では、RMECに比べ、*hprt* MRsが6-8倍増加していた(Watanabe et al., 2001a)。

4. ラット乳がん細胞株における *lacI* MnFsの増加

本実験では*lacI*-transgenic Big Blue[®]ラットを用いているため、樹立した細胞株には、マーカー遺伝子である*lacI*が外来遺伝子として組み込まれている。これを利用して、内在性遺伝子である*hprt*だけでなく外来性遺伝子である*lacI*を指標にして、点突然変異の蓄積速度を以下の方法で測定した(Watanabe et al., 2001a)。

対数増殖期の細胞 10^2 個を、約 10^7 個まで増殖させた後、全細胞数を計測した。実際の細胞数から開始の細胞数 (10^2 個) を減じ、観察した細胞分裂回数とした。回収した細胞からフェノール抽出法によりゲノムDNAを抽出し、*lacI*突然変異体を常法に従って検出した(de Boer et al., 1996; Suzuki et al., 1996)。各細胞株について、この操作を6回繰り返した。得られた*lacI*突然変異体はすべて塩基配列を決定し、独立な突然変異数から突然変異頻度 (mutation frequency; MnF) を算出した。この*lacI*突然変異の検出法では、検体試料すべての細胞について解析しているわけではなく、試料のごく一部のDNAについて測定しているに過ぎない。したがって、Luria-Delbrückの8式(Luria and Delbrück, 1943)によるMRsは求めることができない。そこで本研究では、求めた突然変異体の数からMnFを算出し、さらにこの値を、観察した細胞分裂回数で標準化したMnFを求めた。この方法で算出したMnFは観察した細胞分裂回数を考慮したものであり、突然変異の蓄積速度を正確に反映している。*lacI* MnFは、PhIP12-1とPhIP7-4およびRMECでは、それぞれ $59 \pm 8.6 \times 10^{-6}$ 、 $72 \pm 4.1 \times 10^{-6}$ および $4.7 \pm 1.6 \times 10^{-6}$ (mean $\pm$ SE) であり (Fig. 2B)、樹立した2系統の乳がん細胞株はRMECに比べて12-15倍高い値を示し、これは統計的にも有意であった(PhIP12-1; $P = 0.0001$, PhIP7-4; $P = 0.0000001$) (Watanabe et al., 2001a)。

5. ラット乳がん細胞株で誘発される *lacI* 突然変異の種類

検出された*lacI* 遺伝子の突然変異を分類してTable 1にまとめた(Watanabe et al., 2001a)。2系統の乳がん細胞株では、RMECに比べてすべてのタイプの突然変異が増加していた。なかでもA:TからC:Gへのtransversionsは、RMECでは検出されなかったのに対し(0%; 0/6)、PhIP12-1とPhIP7-4では高頻度に観察された(PhIP12-1 25%; 6/24, PhIP7-4 24%; 6/25)。A:TからC:Gへのtransversionsは、自然突然変異としては非常に低率にしか認められない。ラットの正常乳腺組織(0%; 0/34)においても全く検出されていない(Okochi et al., 1999)。A:TからC:Gへのtransversionsは、*hprt* 遺伝子でも、PhIP12-1とPhIP7-4とで、それぞれ15% (10/67)と21% (19/92)と高頻度に観察され(Watanabe et al., 2001a)、これらの細胞株でのSNIに特徴的と思われた。

Single Nucleotide Instability (SNI)

1. マイクロサテライト変異とG/Tミスマッチ結合能

ミスマッチ修復系の異常があると、マイクロサテライト変異だけでなく、点突然変異も増加が認められることが知られている(Glaab and Tindall, 1997; Lengauer et

Table 1 Classification of *lacI* mutations in two rat mammary carcinoma cell lines and their primary carcinomas

	RMEC	Cell line		Primary carcinoma		Normal mammary tissue
		PhIP12-1	PhIP7-4	12-1#1	7-4#1	
Total	6 (100)	24 (100)	25 (100)	38 (100)	33 (100)	34 (100)
Base substitution						
G : C to T : A	1 (17)	4 (17)	2 (8)	6 (16)	3 (9)	7 (21)
C : G	2 (33)	5 (21)	4 (16)	5 (13)	6 (18)	0 (0)
A : T	2 (33)	7 (29)	8 (32)	9 (24)	6 (18)	17 (50)
A : T to C : G	0 (0)	6 (25)	6 (24)	6 (16)	8 (24)	0 (0)
T : A	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	2 (6)	3 (9)
G : C	1 (17)	1 (4)	1 (4)	4 (11)	1 (3)	3 (9)
Single base pair deletion						
G : C	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5)	3 (9)	0 (0)
T : A	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	1 (3)	1 (3)
Other mutations	0 (0)	1 (4)	3 (12)	5 (13)	3 (9)	3 (9)

No. of mutations observed (%).

This table was modified from Watanabe et al., 2001a.

al., 1998 ; Loeb, 2001). 我々が樹立したラット乳がん細胞株では点突然変異率の明らかな上昇が認められたが、これがミスマッチ修復系の異常により引き起こされている可能性が考えられた。そこで、ラット乳がん細胞株における MSI の有無を解析した (Watanabe et al., 2001a)。2 系統のラット乳がん細胞株、PhIP12-1 および PhIP7-4 のゲノム DNA (各 6 クローンの DNA)、そして原発巣 12-1#1 および 7-4#1 から得たゲノム DNA を用いて、21 座位のマイクロサテライト変異を解析した。しかし、いずれの検体においても、21 座位すべてで変異は 1 個も検出されなかった。

さらに、ラット乳がん細胞株の核蛋白質について、ゲルシフト解析により G/T ミスマッチ結合能の有無を調べた。ミスマッチ修復系において、MSH2 と GTBP による G/T ミスマッチの認識と結合は重要である。しかし、いずれの乳がん細胞株でも、G/T ミスマッチ部分への特異的結合によるバンドを検出できた。このことから、これら乳がん細胞株は G/T ミスマッチ結合能には異常がないと考えられた。

以上の結果から、本研究で樹立した 2 系統のラット乳がん細胞株は、MSI は認められないと結論した。

2. SNI の存在

2 系統のラット乳がん細胞株では、MSI が認められないにもかかわらず、自然点突然変異率の明らかな上昇を認めた。すなわち、従来、広く研究されてきたゲノム不安定性の一つである MSI とは異なる機構によるゲノム不安定性の存在が明らかとなった。そこで、我々はこの新たなタイプのゲノム不安定性を「一塩基不安定性 (single nucleotide instability ; SNI)」と名付けた。

SNI と同じ現象は、ヒトの大腸がん細胞株において認められていることがすでに報告されている。Eshleman

らは、9 種類のヒトの大腸がん細胞株を用いて *hprt* MRs の値を詳細に解析している (Eshleman et al., 1998 ; Eshleman et al., 1995 ; Eshleman et al., 1996)。これらの多くは、MSI を伴い点突然変異率が高い細胞株と、MSI を伴わず点突然変異率が低い細胞株に分類されたが、唯一、V410 のみは MSI がないにもかかわらず、*hprt* MRs の 10 倍の上昇を認めた (Eshleman et al., 1995)。この細胞も A : T から C : G への transversions が高頻度に検出されており (Eshleman et al., 1998)、我々が調べたラット乳がん細胞株と同一の現象を示している点が興味深い。

3. 原発巣での SNI の存在

ゲノム不安定性を評価するうえで、細胞株を用いることの重要性は前述した通りである。しかし、細胞株で観察している現象はあくまでも *in vitro* のものであり、原発巣そのもので起きている現象を観察していない可能性がある。つまり、今回認められたゲノム不安定性は、株化したことにより獲得しただけに過ぎないのではないかと危惧される。そういう点から、原発巣で SNI の存在を証明することは、きわめて重要なことである。

原発巣では細胞分裂回数は測定できないため、点突然変異の蓄積速度を求めることはできない。しかし、本研究では *lacI* トランスジェニックラットに誘発した腫瘍を用いているため、マーカー遺伝子である *lacI* 遺伝子の突然変異を解析することが可能である。乳がん細胞株の樹立に用いた原発巣、12-1#1 および 7-4#1 では、A : T から C : G への transversions を、それぞれ 16 % (6/38) および 24 % (8/33) と、いずれも高頻度に認められた (Table 1)。通常は認められない A : T から C : G への transversions が原発巣でも高頻度に観察されたことから、原発巣と細胞株とで共通の突然変異増加機構が働いていることが示唆された。すなわち、SNI が株化したこ

とにより獲得された異常ではなく、原発巣の段階からすでに存在していたと考えられた。

一方、PhIPにより誘発される特徴的な突然変異として、G:C欠失が知られている (Kakiuchi et al., 1995 ; Okochi et al., 1999 ; Okonogi et al., 1997) 。 G:C欠失は乳がん細胞株では全く検出されていなかったが、原発巣では5-9%検出されていた。このことは、原発巣で認められる突然変異はPhIPの影響を強く受けているのに対し、細胞株での突然変異はPhIPの影響を受けていないことを示唆した。

ヒト乳がん細胞株における SNI

実験動物モデルを利用すると、発がん物質の投与経路、遺伝的背景、生活環境要因等の均一化が可能で、その結果、誘発された腫瘍は比較的均一であるという利点がある。一方、ヒト腫瘍は、遺伝的背景が複雑で腫瘍での二

次的変化も多いため、きわめて多種多様である。したがって、新たな現象を動物モデルで見出し、その現象をヒト腫瘍で確認するというアプローチは、合理的かつ効率的と考えられる。ヘテロサイクリックアミンへの暴露はヒト乳がんの誘発に関与していることが示唆されており (Sinha et al., 2000 ; Sugimura et al., 2000 ; Zheng et al., 1998) , PhIPで誘発したラット乳がん細胞株で認められたSNIが、ヒト乳がん細胞株においても認められるか否かを検討した。

MSIが認められないことが報告されている6系統のヒト乳がん細胞株 (Anbazhagan et al., 1999) について、ラット乳がん細胞株のときと同様の方法で *hprt* MRs を測定した (Watanabe et al., 2001b) 。 対照にはヒト正常乳腺上皮細胞 (HMEC) を用いた。解析した6系統のヒト乳がん細胞株のうち、5系統でHMECと比べてMRsの上昇が認められた (Fig. 3) 。 *hprt* MRsの上昇が、がん細胞では非特異的に認められる可能性を否定するために、MSIを欠くヒト大腸がん細胞株SW480でもMRを測定し、上昇を認めないがん細胞もあることを確認した。ゲルシフト解析により、用いた乳がん細胞株ではG/Tミスマッチ結合能は正常であった (Watanabe et al., 2001b) 。 以上の結果から、少なくとも5系統のヒト乳がん細胞株では、MSIを伴わずにMRsが上昇しており、SNIが存在することが示された。

hprt MRsに関して、Eshlemanらのヒトの大腸がん細胞株における解析結果 (Eshleman et al., 1995) と、我々の解析結果 (Watanabe et al., 2001a ; 2001b) を統合すると、興味深いことがわかる (Fig. 4) 。 MSIが存在する場合には、MRの著しい上昇が認められる。一方、MSIが存在しない場合には、大腸がん細胞株ではMRは上昇しないが、乳がん細胞株ではMRが増加している。この、MSIが存在するとき程ではないが明らかなMRの上昇が、SNIという現象である。大腸がん細胞株でも、

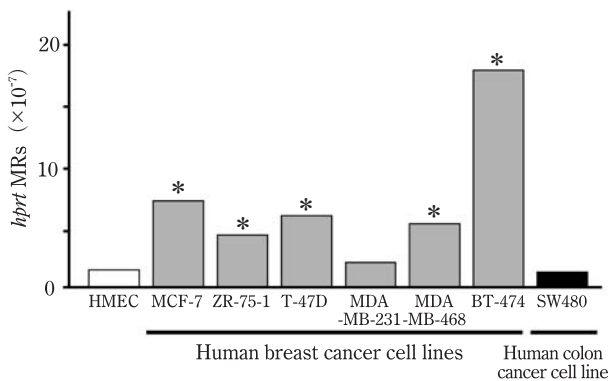


Fig. 3 *hprt* MRs in HMEC, six human breast cancer cell lines and a human colon cancer cell line. Five of the six breast cancer cell lines showed 2.9-12 fold increases in the *hprt* MRs, compared with HMEC and the colon cancer cell line negative for MSI, SW480. * $P < 0.01$. Modified from Watanabe et al. (Watanabe et al., 2001b).

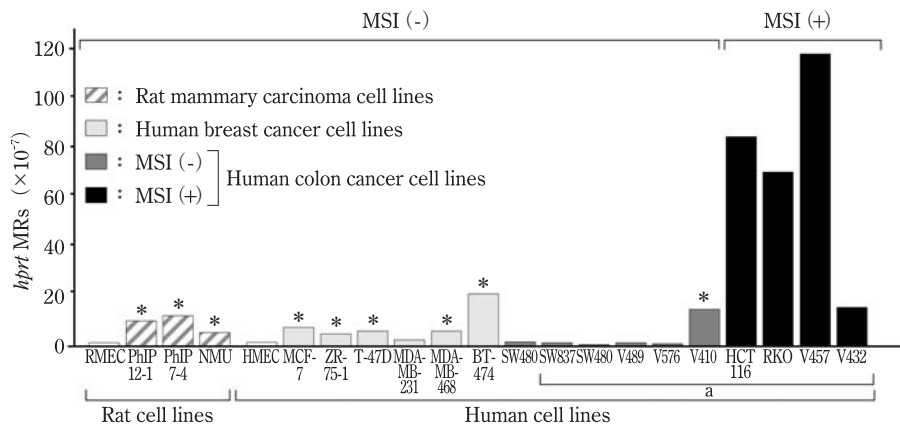


Fig. 4 *hprt* MRs in rat and human cancer cell lines. * SNI-positive cell lines. ^aData from Eshleman et al. (Eshleman et al., 1995).

V410のみはSNIを示すと考えられる。大腸がんではMSIが広く関与しているため、V410が示した現象は例外的とされた。しかし、乳がんではMSIがほとんど認められないことを考えると(Anbazhagan et al., 1999; Speicher, 1995), SNIが重要な役割をはたしているのかもしれない。腫瘍が発生する臓器間で、関与しているゲノム不安定性のタイプが異なる可能性が示唆された。

乳腺発がんにおけるSNIの役割

MSIのようなゲノム不安定性は、発がんの初期過程で起こっていると考えられている(Loeb, 2001)。一方、SNIについては、少なくとも動物モデルの原発巣では存在している可能性が高い。一般に、動物の腫瘍はヒトの比較的初期の腫瘍に相当すると考えられ、SNIも発がんの比較的早期に誘発されていることが示唆される。我々は現在のところ、ラット乳腺発がんにおけるSNIの役割を、以下のように考えている。PhIPへの暴露は、細胞ごとにさまざまな遺伝子の不活性化を誘発するが、なかには、SNIを誘発するような遺伝子が不活化された細胞が出現する。その細胞ではSNIが誘発され、ゲノム全体の遺伝子の状態が不安定となることによってがん遺伝子やがん抑制遺伝子に突然変異が入ったクローンが出現し、がん化に至る。

「SNIを誘発する遺伝子」に関しては、次項で述べる。SNIによって誘発された突然変異により活性化・不活化されるがん関連遺伝子は、現在まだわかっていない。PhIPにより誘発した乳がんにおいては、Ha-rasの突然変異が10-40%検出され、p53の突然変異がまれに認められる。しかし、これまでにさまざまながん関連遺伝子の突然変異が広く調べられてきたが、突然変異が検出された遺伝子の報告はほとんどない(Dashwood et al., 1998; Roberts-Thomson and Snyderwine, 1997; Ushijima et al., 1994; Yu et al., 2000)。本実験で用いたラットの乳がんでは、p53の突然変異は検出されていない(Watanabe et al., 2001a)。

SNI誘発の分子機構の探索

SNIがどのような分子機構により誘発されているのかは、きわめて重要な問題である。そのヒントとなると思われたのが、SNIをもつラット乳がん細胞株で認められた高頻度のA:TからC:Gへのtransversionsであった。我々はまず、このタイプの突然変異の増加を引き起こす可能性のある二つの遺伝子に着目したが、残念ながら、関与は認められなかった。現在、Brca1蛋白の発現低下を見い出しており、これがSNIに関与する可能性についても考慮している。

1. Mth1遺伝子の不活性化

Mth1遺伝子は、大腸菌*MutT*のmammalian homo-

logueであり、ヌクレオチドプール中の酸化的損傷を受けた8-OH-dGTPを加水分解する酵素をコードしている(Maki and Sekiguchi, 1992; Sekiguchi, 1996)。大腸菌では*MutT*ミューター株が存在し、A:TからC:Gへのtransversionsが100倍から10,000倍に上昇する(Fowler and Schaaper, 1997)。Mth1ノックアウトマウスは、ES細胞のレベルで突然変異率が野生型に比べ、2倍上昇している(Tsuzuki et al., 2001)。そこで、SNIを示した細胞株でMth1の不活化の有無を解析した(Okochi et al., 2002a)。PhIPで誘発したラット乳がんおよび樹立した乳がん細胞株について、ラットMth1遺伝子のPCR-SSCP解析を行った(Fig. 5A)。エクソン1と3ではバンドの移動度変化は認められず、突然変異は検出されなかった。エクソン2では数個の腫瘍で移動度の変化を認めるバンドを検出したが、塩基配列を調べた結果、アミノ酸変化を伴わない変異であった。これは、本実験で用いたラットが(*lacI*-transgenic F344 Big Blue® x SD) F₁ラットであるため、アウトブリードであるSDラットのコロニー由来の多型であると考えられた。さらに、Mth1遺伝子のmRNA発現レベルが低下している可能性もあり、解析した。定量的リアルタイムRT-PCR法では、腫瘍における発現低下は認められず、むしろ上昇傾向にあった(Fig. 5B)。以上により、Mth1遺伝子の不活化はSNIの原因ではないと結論した。

2. DNA polymerase κ の発現増加

SNI誘発の原因となる他の候補遺伝子として、error-prone DNA polymeraseの一つであるpolymerase κ (Pol κ)に着目した。Pol κ は、*in vitro*においてTからGへの突然変異を上昇させる(Ohashi et al., 2000)。そこで、SNIを示した細胞株において、Pol κ の過剰発現の有無を検討した(Okochi et al., 2002a)。PhIPで誘発したラット乳がん9個、および、樹立した乳がん細胞株2系統について、Pol κ mRNAの発現量を定量的リアルタイムRT-PCR法により調べた。しかし、解析した乳がんおよび乳がん細胞株のいずれにおいても発現上昇は認められず、むしろ発現レベルは低下していた(Fig. 6)。この発現低下の原因は不明だが、少なくともPol κ の過剰発現によりSNIが誘発されているわけではないと考えられた。

3. Brca1の不活性化

BRCA1遺伝子は、ヒト若年性乳がん家系の連鎖解析により家族性乳がんの原因遺伝子としてその存在が明らかにされ、クローニングされた(Hall et al., 1990; Miki et al., 1994)。その突然変異は、家族性乳がんでは高頻度に認められるが(Castilla et al., 1994; Inoue et al., 1995; Martin and Weber, 2000)、散発性乳がんではほとんど検出されない(Futreal et al., 1994; Khoo et al.,

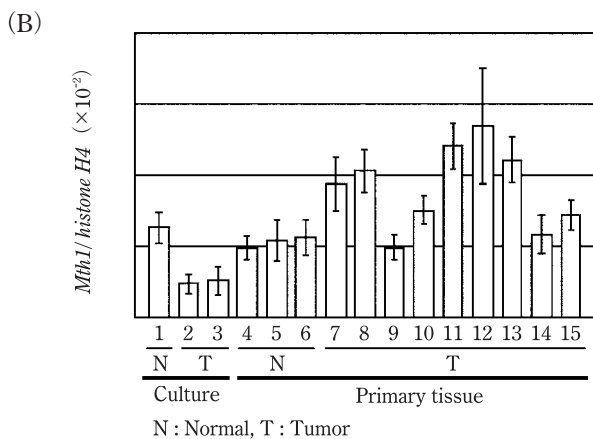
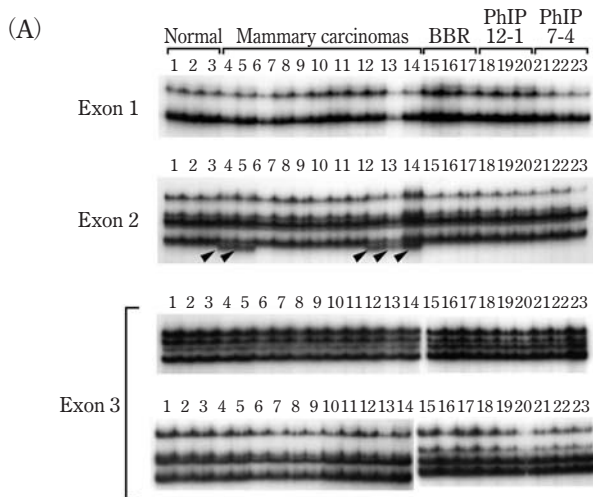


Fig. 5 Mutation and expression analysis of the *Mth1* gene in the PhIP-induced mammary carcinoma cell lines and the primary carcinomas.

(A) *Mth1* PCR-SSCP analysis. Lanes 1-3, DNA from normal liver of SD, Big Blue[®] rat and their F₁ rats; lanes 4-14, 11 primary mammary carcinomas; lanes 15-17, Big Blue[®] Rat 2 (BBR) fibroblast cell lines (triplicate); lanes 18-20, mammary carcinoma cell line PhIP12-1 (triplicate); lanes 21-23, mammary cancer cell line PhIP7-4 (triplicate). In exon 2, shifted bands (shown by arrowheads) were observed in five primary mammary cancers, and found to be a polymorphism without amino acid changes.

(B) Real-time RT-PCR analysis of *Mth1* mRNA. mRNA levels were normalized to *histone H4*, which reflects the number of cells in the S-phase (Lee et al., 1996). The RT-PCR was repeated five times, and the resultant averages $\pm$ SE are shown. No. 1, RMEC; no. 2 and 3, mammary cancer cell line, PhIP7-4, PhIP12-1; no. 4-6, normal mammary glands obtained from three non-treated, age-matched rats; no. 7-15, primary mammary carcinomas. Modified from Okochi et al. (Okochi et al., 2002a).

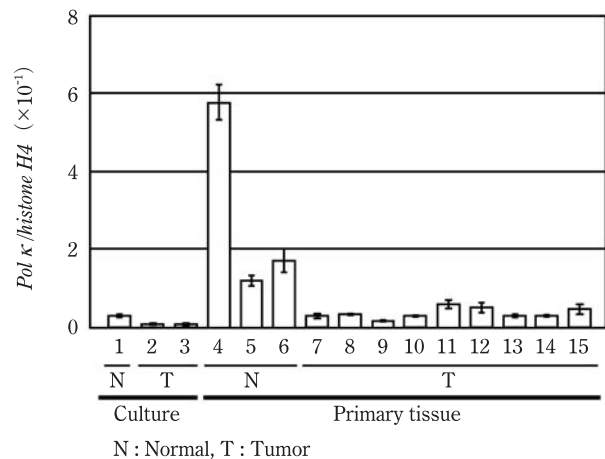


Fig. 6 Expression of *Pol kappa* mRNA in rat mammary carcinoma cell lines and primary tissues. mRNA levels were normalized to *histone H4*. Samples are the same with those in Fig. 5 (B). Modified from Okochi et al. (Okochi et al., 2002a).

1999). しかし、散発性乳がんにおいても、蛋白質レベルではBRCA1の発現が低下しているという報告がある (Miyamoto et al., 2002; Wilson et al., 1999; Yoshikawa et al., 1999)。

我々は、PhIPで誘発したラット乳がんにおいて、ラット *Brca1* 蛋白質の発現、*Brca1* mRNAの発現、プロモーター領域のDNAメチル化の状態、さらに、*Brca1* 翻訳領域の突然変異の有無を調べた (Okochi et al., 2002b)。ラット *Brca1* と交叉する二種類の抗ヒトBRCA1抗体を用いた免疫組織染色では、同一切片上の正常乳腺部分と比較して腫瘍部分での明らかな染色性の低下が認められ (Fig. 7A)、検索した乳がん17個のうち、ほとんどすべての乳がんでは *Brca1* 蛋白質の発現が著明に低下していた。この *Brca1* 蛋白質の発現低下は、ウェスタンブロットでも確認された (Fig. 7B)。一方、プロモーター領域の過剰メチル化および翻訳領域の突然変異は認められず、mRNAの発現は保たれていた。したがって、PhIP誘発ラット乳がんでは、*Brca1* mRNAの翻訳効率の低下または *Brca1* 蛋白質の安定性の低下が生じていると考えられた。ヒトにおいても、*BRCA1* mRNAの発現低下を伴わずにBRCA1蛋白質の発現低下を示す散発性乳がんが存在しており (Miyamoto et al., 2002)、PhIPで誘発したラット乳がんは、このタイプのヒト乳がんの良いモデルとなると思われる。

BRCA1は、BRCA2とともにDNA修復に関与する遺伝子であることが知られ、その機能欠損によって、ゲノム不安定性、特にCINが起こることが知られている (Venkitaraman, 2002)。最近、*Brca2*を欠損したマウスでは、点突然変異頻度が2.3倍上昇していることが報告された (Tutt et al., 2002)。BRCA1の機能喪失が点突然変異にどのような影響を及ぼすかについての報告は現在のところないが、BRCA1の機能欠損により点突然変異

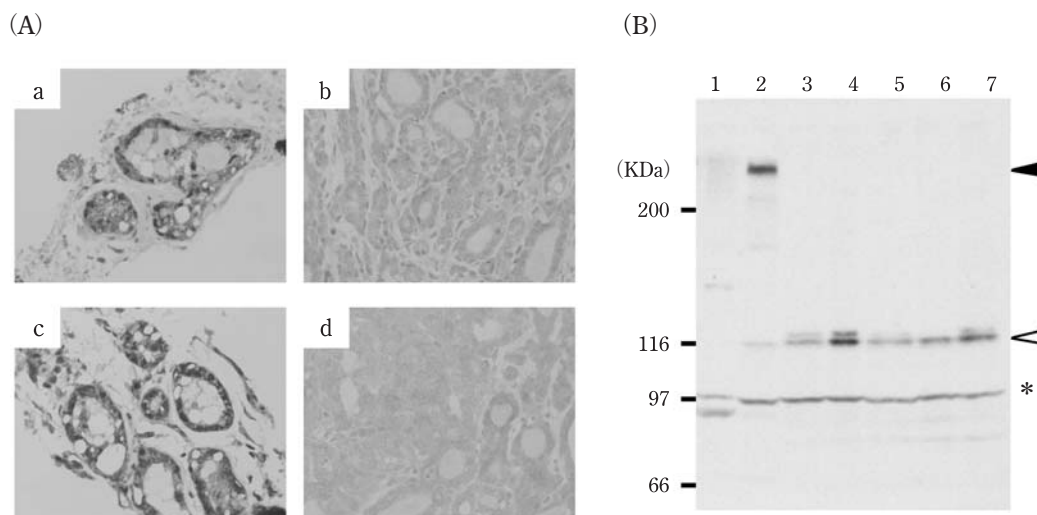


Fig. 7 Reduced Brca1 protein expression in PhIP-induced mammary carcinomas.

(A) A representative immunohistochemical analysis of Brca1 protein. Using an antibody that recognizes the carboxyl terminal domain (a, b) and one that recognizes the amino terminal domain (c, d) of human BRCA1, a PhIP-induced mammary carcinoma (b, d, $\times 180$) and the normal mammary glands (a, c, $\times 180$) within the same specimens were stained. Immunoreactivity was clearly observed in mammary glands while it was absent in carcinoma cells.

(B) Immunoblot analysis of Brca1 protein. Lane 1 : rat normal skeletal muscle as a negative control ; lane 2, RMEC ; lanes 3-7, PhIP-induced mammary carcinomas. A band for 220 KDa Brca1 protein (closed arrow head) was detected in RMEC, while it was not detected in the five mammary carcinomas tested. A band for 116 KDa Brca1, a splice variant without exon 11, was also detected (open arrow head). * A non-specific band. Modified from Okochi et al. (Okochi et al., 2002b).

率が上昇する可能性も否定はできない。SNIが多くの乳がんに関与していることと、BRCA1蛋白の発現低下が多くの乳がんで認められることは符合する点である。

4. 今後のアプローチ

近年、cDNAマイクロアレイ等を用いることで、遺伝子発現レベルをゲノムワイドに調べることが容易になった。したがって、SNIを示すがん細胞と示さないがん細胞での遺伝子発現レベルの相違を探索するアプローチが考えられる。しかし、がん細胞での遺伝子発現は多岐に渡り、単純にがん細胞同士を比較しただけではさまざまな違いが見つかり、SNIの原因遺伝子を探るのはきわめて困難である。SNIの原因遺伝子同定のためには、遺伝的背景等が同一で、しかも、SNIの有無がはっきりとしているがん細胞株を複数樹立し、それらのがん細胞株間で遺伝子発現レベルを比較する必要がある。一方、DNA複製時におけるfidelityの低下やDNA修復系の異常が、SNIの原因である可能性は高い。これらに関与する遺伝子のうち、がんへの関与が考えられるものを一つずつ丁寧に解析することで、何らかの手がかりが得られる可能性もある。

結 語

ラットおよびヒト乳がん細胞株において、ミスマッチ修復系の異常とは異なる機構により点突然変異のみを増加させる、新たなタイプのゲノム不安定性の存在を見出し、「一塩基不安定性 (Single nucleotide instability ; SNI)」と命名した。ラット乳がん細胞株で特徴的に認められたA:TからC:Gへの変異の増加は、原発巣でも観察され、SNIは原発巣の段階から存在することが示唆された。SNIは、ヒトおよびラット乳腺発がん幅広く関与する可能性があり、その分子機構の解明が今後の重要な課題である。

謝 辞

本研究の発展に多大な貢献を頂いた国立がんセンター研究所発がん研究部の渡邊直子博士に感謝致します。ラット乳がん原発巣および細胞株移植腫瘍の病理組織診断は、名古屋市立大学の高橋智博士にご協力頂きました。正常乳腺上皮細胞の分離および乳がん細胞株の樹立は、放射線医学総合研究所の島田義也博士、国立がんセンター研究所の柳原五吉博士に、それぞれご指導頂きました。細胞株の核型分析は吉田勉弘博士にご協力頂きました。このほか、共立薬科大学望月正隆学長をはじめ、本研究

にお力添えを頂いた多くの先生方に深謝致します。また、実験を遂行するうえで、貴重なご助言を賜りました杉村隆博士、長尾美奈子博士に心から感謝致します。

参考文献

- Anbazhagan, R., Fujii, H., and Gabrielson, E. (1999) Microsatellite instability is uncommon in breast cancer. *Clin Cancer Res.*, 5, 839-844.
- Castilla, L. H., Couch, F. J., Erdos, M. R., Hoskins, K. F., Calzone, K., Garber, J. E., Boyd, J., Lubin, M. B., Deshano, M. L., Brody, L. C., et al. (1994) Mutations in the *BRCA1* gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. *Nat. Genet.*, 8, 387-391.
- Dashwood, R. H., Suzui, M., Nakagama, H., Sugimura, T., and Nagao, M. (1998) High frequency of β -catenin (*ctnnb1*) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat. *Cancer Res.*, 58, 1127-1129.
- de Boer, J. G., Erfle, H. L., Walsh, D., Holcroft, J., and Glickman, B. W. (1996) The use of *lacI* transgenic mice in genetic toxicology. In *Technologies for detection of DNA damage and mutations*, G. P. Pfeifer, ed. (New York, Plenum press), pp. 411-429.
- Eshleman, J. R., Lang, E. Z., Bowerfind, G. K., Parsons, R., Vogelstein, B., Willson, J. K., Veigl, M. L., Sedwick, W. D., and Markowitz, S. D. (1995) Increased mutation rate at the *hprt* locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene*, 10, 33-37.
- Eshleman, J. R., Markowitz, S. D., Donover, P. S., Lang, E. Z., Lutterbaugh, J. D., Li, G. M., Longley, M., Modrich, P., Veigl, M. L., and Sedwick, W. D. (1996) Diverse hypermutability of multiple expressed sequence motifs present in a cancer with microsatellite instability. *Oncogene*, 12, 1425-1432.
- Eshleman, J. R., Donover, P. S., Littman, S. J., Swinler, S. E., Li, G. M., Lutterbaugh, J. D., Willson, J. K., Modrich, P., Sedwick, W. D., Markowitz, S. D., and Veigl, M. L. (1998) Increased transversions in a novel mutator colon cancer cell line. *Oncogene*, 16, 1125-1130.
- Fowler, R. G., and Schaaper, R. M. (1997) The role of the *mutT* gene of *Escherichia coli* in maintaining replication fidelity. *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 43-54.
- Futreal, P. A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L. M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y., et al. (1994) *BRCA1* mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, 266, 120-122.
- Glaab, W. E., and Tindall, K. R. (1997) Mutation rate at the *hprt* locus in human cancer cell lines with specific mismatch repair-gene defects. *Carcinogenesis*, 18, 1-8.
- Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B., and King, M. C. (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250, 1684-1689.
- Inoue, R., Fukutomi, T., Ushijima, T., Matsumoto, Y., Sugimura, T., and Nagao, M. (1995) Germline mutation of *BRCA1* in Japanese breast cancer families. *Cancer Res.*, 55, 3521-3524.
- Jackson, A. L., and Loeb, L. A. (1998) The mutation rate and cancer. *Genetics*, 148, 1483-1490.
- Kakiuchi, H., Watanabe, M., Ushijima, T., Toyota, M., Imai, K., Weisburger, J. H., Sugimura, T., and Nagao, M. (1995) Specific 5'-GGGA-3' $\rightarrow$ 5'-GGA-3' mutation of the *Apc* gene in rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 910-914.
- Khoo, U. S., Ozcelik, H., Cheung, A. N., Chow, L. W., Ngan, H. Y., Done, S. J., Liang, A. C., Chan, V. W., Au, G. K., Ng, W. F., Poon, C. S., Leung, Y. F., Loong, F., Ip, P., Chan, G. S., Andrulis, I. L., Lu, J., and Ho, F. C. (1999) Somatic mutations in the *BRCA1* gene in Chinese sporadic breast and ovarian cancer. *Oncogene*, 18, 4643-4646.
- Lee, P. J., Washer, L. L., Law, D. J., Boland, C. R., Horon, I. L., and Feinberg, A. P. (1996) Limited up-regulation of DNA methyltransferase in human colon cancer reflecting increased cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 10366-10370.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396, 643-649.
- Loeb, L. A. (1991) Mutator phenotype may be required for multi-stage carcinogenesis. *Cancer Res.*, 51, 3075-3079.
- Loeb, L. A. (1998) Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv Cancer Res.*, 72, 25-56.
- Loeb, L. A. (2001) A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.*, 61, 3230-3239.
- Luria, S. E., and Delbrück, M. (1943) Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28, 491-511.
- Maki, H., and Sekiguchi, M. (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature*, 355, 273-275.
- Martin, A. M., and Weber, B. L. (2000) Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 92, 1126-1135.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck, E. D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W., et al. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science*, 266, 66-71.
- Miyamoto, K., Fukutomi, T., Asada, K., Wakazono, K., Tsuda, H., Asahara, T., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2002) Promoter hypermethylation and post-transcriptional mechanisms for reduced *BRCA1* immunoreactivity in sporadic human breast cancers. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 32, 79-84.
- Ohashi, E., Bebenek, K., Matsuda, T., Feaver, W. J., Gerlach, V. L., Friedberg, E. C., Ohmori, H., and Kunkel, T. A. (2000) Fidelity and processivity of DNA synthesis by DNA polymerase kappa, the product of the human *DINB1* gene. *J. Biol. Chem.*, 275, 39678-39684.
- Okochi, E., Watanabe, N., Shimada, Y., Takahashi, S., Wakazono, K., Shirai, T., Sugimura, T., Nagao, M., and Ushijima, T. (1999) Preferential induction of guanine deletion at 5'-GGGA-3' in rat mammary glands by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Carcinogenesis*, 20, 1933-1938.
- Okochi, E., Ichimura, S., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2002a) The Absence of *Mth1* Inactivation and DNA Polymerase κ Overexpression in Rat Mammary Carcinomas with Frequent A : T to C : G Transversions. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93, 501-506.
- Okochi, E., Miyamoto, K., Wakazono, K., Shima, H., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2002b) Reduced Brca1 protein expression in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine-induced rat mammary carcinomas. *Mol. Carcinog.*, 34, 211-218.
- Okochi, E., Watanabe, N., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2002c) Single Nucleotide Instability : a Wide Involvement in Human and Rat Mammary Carcinogenesis ? *Mutat Res.*, in press.
- Okonogi, H., Ushijima, T., Zhang, X. B., Heddle, J. A., Suzuki, T., Sofuni, T., Felton, J. S., Tucker, J. D., Sugimura, T., and Nagao, M. (1997) Agreement of mutational characteristics of heterocyclic amines in *lacI* of the Big Blue mouse with those in tumor related genes in rodents. *Carcinogenesis*, 18, 745-748.
- Orr-Weaver, T. L., and Weinberg, R. A. (1998) A checkpoint on the road to cancer. *Nature*, 392, 223-224.
- Roberts-Thomson, S. J., and Snyderwine, E. G. (1997) Effect of

- dietary fat on codon 12 and 13 Ha-*ras* gene mutations in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine-induced rat mammary gland tumors. *Mol. Carcinog.*, 20, 348-354.
- Sekiguchi, M. (1996) MutT-related error avoidance mechanism for DNA synthesis. *Genes. Cells*, 1, 139-145.
- Sinha, R., Gustafson, D. R., Kulldorff, M., Wen, W. Q., Cerhan, J. R., and Zheng, W. (2000) 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, a carcinogen in high-temperature-cooked meat, and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1352-1354.
- Speicher, M. R. (1995) Microsatellite instability in human cancer. *Oncol. Res.*, 7, 267-275.
- Sugimura, T., Nagao, M. and Wakabayashi, K. (2000) How we should deal with unavoidable exposure of man to environmental mutagens : cooked food mutagen discovery, facts and lessons for cancer prevention. *Mutat. Res.*, 447, 15-25.
- Suzuki, T., Hayashi, M., Ochiai, M., Wakabayashi, K., Ushijima, T., Sugimura, T., Nagao, M. and Sofuni, T. (1996) Organ variation in the mutagenicity of MeIQ in Big Blue *lacI* transgenic mice. *Mutat. Res.*, 369, 45-49.
- Toyota, M., Ushijima, T., Weisburger, J. H., Hosoya, Y., Canzian, F., Rivenson, A., Imai, K., Sugimura, T., and Nagao, M. (1996) Microsatellite instability and loss of heterozygosity on chromosome 10 in rat mammary tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Mol. Carcinog.* 15, 176-182.
- Tsuzuki, T., Egashira, A., Igarashi, H., Iwakuma, T., Nakatsuru, Y., Tominaga, Y., Kawate, H., Nakao, K., Nakamura, K., Ide, F., Kura, S., Nakabeppu, Y., Katsuki, M., Ishikawa, T. and Sekiguchi, M. (2001) Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the *MTH1* gene encoding 8-oxo-dGTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11456-11461.
- Tutt, A. N., van Oostrom, C. T., Ross, G. M., van Steeg, H. and Ashworth, A. (2002) Disruption of *Brca2* increases the spontaneous mutation rate *in vivo* : synergism with ionizing radiation. *EMBO Rep.*, 3, 255-260.
- Ushijima, T., Kakiuchi, H., Makino, H., Hasegawa, R., Ishizaka, Y., Hirai, H., Yazaki, Y., Ito, N., Sugimura, T., and Nagao, M. (1994) Infrequent mutation of Ha-*ras* and *p53* in rat mammary carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Mol. Carcinog.*, 10, 38-44.
- Venkitaraman, A. R. (2002) Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108, 171-182.
- Watanabe, N., Okochi, E., Hirayama, Y., Shimada, Y., Yanagihara, K., Yoshida, M. C., Takahashi, S., Mochizuki, M., Sugimura, T., Nagao, M., and Ushijima, T. (2001a) Single nucleotide instability without microsatellite instability in rat mammary carcinomas. *Cancer Res.*, 61, 2632-2640.
- Watanabe, N., Okochi, E., Mochizuki, M., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2001b) The presence of single nucleotide instability in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.*, 61, 7739-7742.
- Wilson, C. A., Ramos, L., Villasenor, M. R., Anders, K. H., Press, M. F., Clarke, K., Karlan, B., Chen, J. J., Scully, R., Livingston, D., Zuch, R. H., Kanter, M. H., Cohen, S., Calzone, F. J., and Slamon, D. J., et al. (1999) Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. *Nat. Genet.*, 21, 236-240.
- Yoshikawa, K., Honda, K., Inamoto, T., Shinohara, H., Yamauchi, A., Suga, K., Okuyama, T., Shimada, T., Kodama, H., Noguchi, S., Gazdar, A. F., Yamaoka, Y. and Takahashi, R. (1999) Reduction of BRCA1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and its frequent loss in *BRCA1*-associated cases. *Clin. Cancer Res.*, 5, 1249-1261.
- Yu, M., Ryu, D. Y., and Snyderwine, E. G. (2000) Genomic imbalance in rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-*b*)pyridine. *Mol. Carcinog.*, 27, 76-83.
- Zheng, W., Gustafson, D. R., Sinha, R., Cerhan, J. R., Moore, D., Hong, C. P., Anderson, K. E., Kushi, L. H., Sellers, T. A. and Folsom, A. R. (1998) Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90, 1724-1729.



環境変異原研究の光と陰：これから進むべき道

鈴木 孝昌*

(国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部)

この原稿は、今年の7月に淡路島で開かれたMMS研究会第31回定例会での特別講演をもとに作成したものです。これまで、10年以上にわたり国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部において、環境変異原研究に携わってきましたが、この4月に部を移動になり、環境変異原研究とは今後少し距離を置かざるを得なくなりました。この機会に自分としても一歩離れた立場からこれまで歩んできた道を振り返り、少し大胆に提言をさせていただきたいと考え、「環境変異原研究の光と陰」というタイトルで講演をさせていただきました。講演後の反響もあり、内容に関する問い合わせもいただいたことから、今回環境変異原研究の原稿として、まとめ直させていただきました。これがきっかけとなり、環境変異原研究の方向性に関する議論が盛り上がることを期待します。

AF2 事件と環境変異原研究

これまでに、変異原研究に光があてられたとすれば、それはおそらくAF2の問題にまでさかのぼることができる。ご存じのように、ソーセージ等の防腐剤として使われていたAF2に、バクテリア等で強い変異原性が確認されたことより、その安全性が社会的な問題となり、発がん性が再検討された結果、ラットの前胃にがん原性があることが確認され、結局その使用が禁止になったという事件である(杉村, 1982)。それが発端となり、変異原性試験の重要性が認められ、当時の国立衛生試験所に変異原性部が誕生した。現在では、がんは、がん遺伝子等の突然変異の蓄積が原因となる遺伝子の病気であることが明らかになっているが、当初は突然変異の発がんにおける意味合いもまだはっきりしておらず、この間にAmes試験を初めとしてさまざまな変異原性試験の開発を通じて、発がん物質が一般的に遺伝子傷害を示すことを明らかにしてきたことは、まさに変異原研究の光の部分ともいえる。私自身も、10年以上にわたり、トランスジェニックマウスを用いた新しい変異原性試験に従事

し、それなりの研究成果を残すことができた。しかし、それと同時に、少しずつ現在の変異原性研究に関する疑問も生じてきていた。その疑問が拡大したのは、まさに光の部分であったAF2をこのトランスジェニックマウスを用いて試験した結果であった。

ご存じのように、AF2はAmes試験において代謝活性化なしに強い変異原性を示し、陽性対照物質としても使われている。よってトランスジェニックマウスを用いた試験でも陽性結果が期待されたわけであるが、意に反し、発がん標的臓器である前胃を始めすべての臓器において陰性であった。単純に考えると、トランスジェニックマウスの試験の感度が低いという理論が成り立つようでもあるが、Ames試験での活性の強さを考えれば、当然陽性になっていてもいいはずである。そこで見方を変え、発がん性自体は当初陰性であり、再試験ではかなりの高用量を投与してやっと発がんした訳でもあるので、in vivoにおける遺伝子傷害性は低くてもおかしくないとも考えられる。すなわち、バクテリアでの活性の高さが異常な訳である。元々抗菌剤であり、ニトロ基の還元能を介して菌に対して選択的に働くメカニズムからすると、マウスに対しては遺伝子傷害性が低くても不思議はない。

変異原性と発がん性の定量的相関

このことが発端となり、発がん性と変異原性の定量的な相関について検討を行ってみた(小原, 2002)。Fig. 1に示すように、Ames試験と発がん性の相関は良くないのは明らかである。一方トランスジェニックマウスの結果は比較的良い相関を示している(Fig. 2)。これまでは、比較的陽性か陰性かという結果のみが取りざたされ、発がん物質を何割検出できるかという議論がなされてきたが、このような定性的な結果の積み重ねでは本質を見落とす危険性もあり、これからはより定量的な議論が重要になると考える。

このFig. 2の中でAmes試験の相関を乱している物質として、ヘテロサイクリックアミン類が注目される。ヘテロサイクリックアミンはご存じのように、国立がんセンターの杉村博士らにより、魚などの焼けこげ中に存在

* E-mail : suzuki@nihs.go.jp

受付 : 2002年9月7日 受理 : 2002年9月26日

日本環境変異原学会

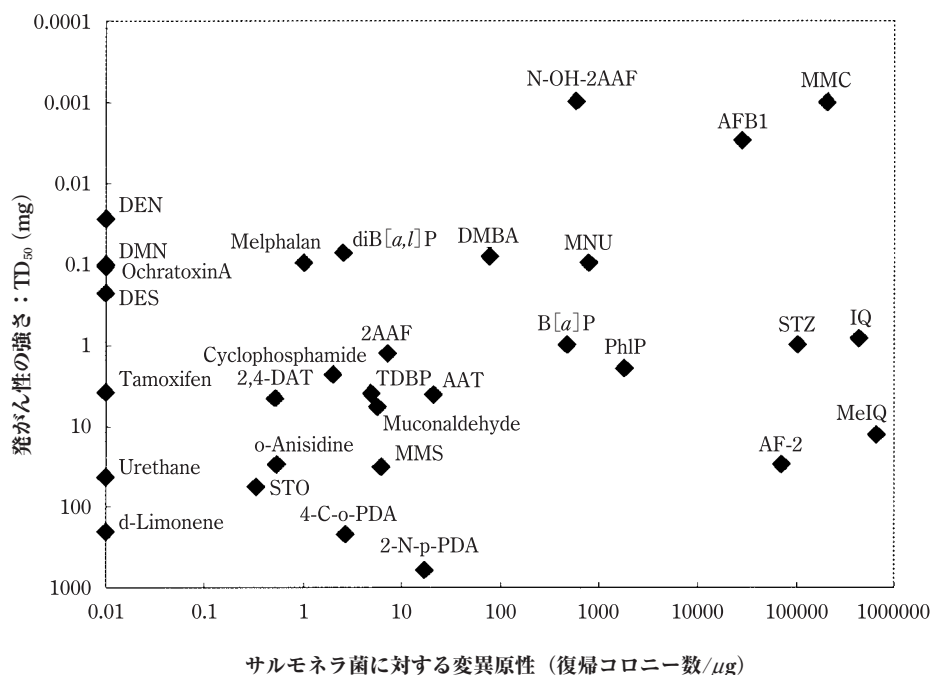


Fig. 1 Ames 試験での変異原性と発がん性の強さの比較

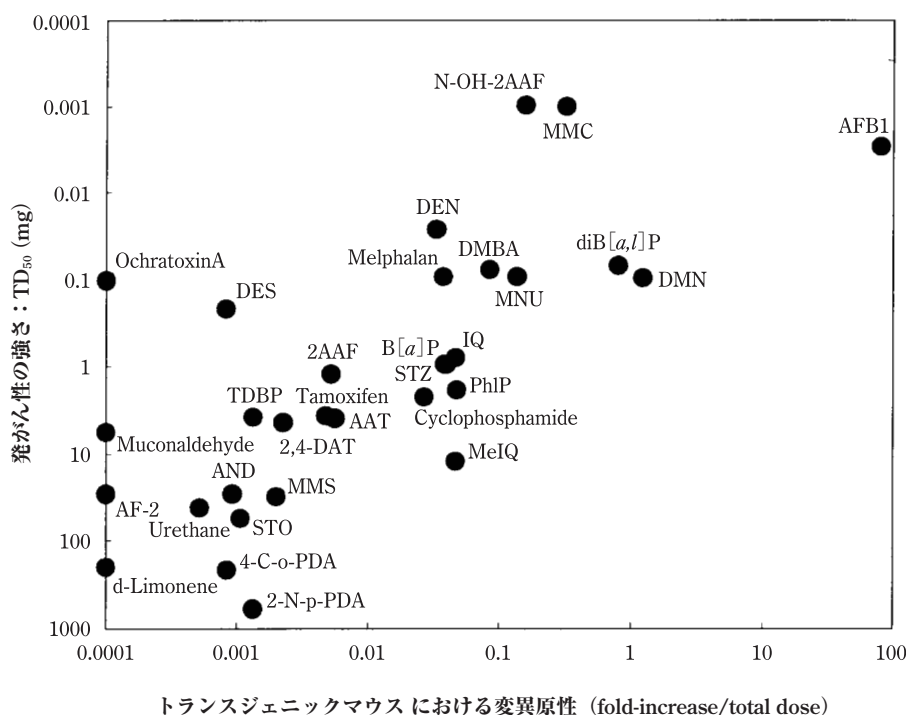


Fig. 2 トランスジェニックマウスでの変異原性と発がん性の強さの比較

する強力な変異原性物質として単離，構造決定がなされた物質群であり，まさに日本の環境変異原研究の光の部分ともいえる．我々の日常接する物質の中に強力な変異原性物質があったことは脅威であり，動物における発がん性も認められたものの，幸いその強さはAmes試験の

結果から比べて，かなり弱いものであった．

Ames試験は短期スクリーニング系として非常に有用であるが，前述のように得られた結果の解釈には注意が必要である．より多くの発がん物質を陽性に検出するため改良が加えられたこともあり，大変感受性は高められ

ている。除去修復能欠損、誤りがちな複製系の発現、膜透過性の亢進などがあり、この結果を人でのリスクの評価に当てはめるなら、色素性乾皮症の患者がさらに重篤な危険因子を兼ねあわせた状態での危険度ということもできる。Hazard identificationとしては意味はあるが、risk evaluationとしてはその結果を鵜呑みにするわけにはいかないだろう。しかし現状では、各種ガイドラインをはじめ、ある程度リスク評価に使われていることは事実である。

これまでの毒性学における問題点

これまで、変異原性を含め毒性学の分野においては、リスクはなるべく排除するという立場で、危険性を過大評価する傾向にあったと考える。特に人工的に作られた化学物質の安全性に関しては過敏であったともいえる。L.L. Smith (2001) は“Key challenges for toxicologists in 21st century”と題した論文の中で、これまでの毒性試験のあり方に次のような疑問を投げかけている。

- 少数の動物への大量投与により、少量が曝露される多数の人間への毒性を評価している。
- NTPで試験された50%以上もの化合物が最大耐量にて発がん性を示した。
- 安全性と環境への蓄積性の問題からDDTの使用が中止されたが、それによってマラリアの患者が急増した。
- 動物実験からの外捜に際し安全係数として100～1000という値が用いられるが、日常ヒトが摂取する量が1000倍になっても毒性を現す化合物は少ないのではないか。

NTPのデータに関しては、発がん性の疑いのあったものが選ばれているためという指摘もあるが、最近の報告では、食品添加物に関しても47%が発がん性ありという結果になっている点が注目される (Johnson, 2002)。そもそもそんなに発がん物質はたくさんあるものなのだろうか？ やはり、これまでの発がん実験の結果に関しても、その解釈を見直す必要があると思われる。また、その結果を絶対のものとして、それを漏れなく変異原性試験で検出しようとしたこれまでの我々の方向性に関しても見直すべき時期が来ているのであろう。ちなみに、NTPで試験された食品添加物のうちAmes試験で陽性となったのはわずか10%であった。

Ames博士の主張

最近読んだR. N. Procter著(2000)の「がんをつくる社会」という本の中で、Ames試験の開発者であるB. N. Ames博士の主張が紹介されており、大変共感を覚えた。当初Ames試験により化学物質の危険性を主張して環境

保護派であった博士は、途中から立場を変え化学物質は思ったほど危なくないという理論を展開し、議論を呼んだ。同じ環境変異原研究を行ってきた立場からも、考えさせられることも多いので、以下にこの本で引用されていたAmes語録を紹介する。

- 毎日コップ一杯のビールを飲んで子供に先天異常を引き起こす危険性は、「1ppmのダイオキシンに汚染された泥を毎日1キログラム食べる」のに匹敵する。
- われわれは一杯のコーヒーで一日に摂取するすべての残留農薬よりも多くの発がん物質を取り入れている。
- 「人々の目はみな」人工化学物質ががんを多く発生させるという方向に向いているが、「科学」は実際には「まったく違った見方」をしている。
- 人間は人工有毒物質の一万倍もの量の天然有毒物質を接種しており、生物学的影響はいずれの場合も最大許容量をもとに推測した動物実験によって誇張されている。
- 環境中の汚染物質が10億分の1レベルでも一般の健康に影響があるかどうか定かでないだけに、米国が公害の減少と抑制に年間800億ドルも費やしているのが、果たして賢明なことであろうか？
- 少数の人に対する小さいリスクよりも、多数の人に対する大きなリスクを問題にすべきだ。
- もし政府がまじめに効率よくがんを減らしたいのであれば、喫煙を減らす努力を大いにしなければならない。タバコの恐ろしさの前では、がんの危険はほとんど影が薄くなってしまう。
- 何よりも重要なことだが、ほとんどの発がん物質におそらくこれ以下なら実際に安全という被爆の閾値があるのではないか。

多少誇張された表現もあるかもしれないが、いずれも重要な指摘である。さらに、Ames博士(1997)は、“Environmental Pollution, Pesticides, and the Prevention of Cancer: Misconceptions”という論文の中で、以下のような多くの誤解があると指摘している。

- 誤解1：がんの発生率は上昇している。
- 誤解2：環境中の合成化学物質はヒトがん発生の重要な要因である。
- 誤解3：農薬を減らすことは、食物由来のがん発生を抑えるための効果的手段である。
- 誤解4：ヒトが曝露される発がん物質等の有害物質は、主に合成された化学物質である。
- 誤解5：ヒトへの発がんリスクは、標準的な高用量動物試験により評価できる。

- 誤解6：合成化学物質は天然化学物質よりも大きな発がんリスクを持つ。
- 誤解7：合成化学物質の毒性は天然化学物質の毒性とは異なる。
- 誤解8：農薬や他の合成化学物質はヒトのホルモン作用を攪乱している。
- 誤解9：低用量で仮定されるリスクを規制することは、公衆衛生の向上につながる。

合成物質であれ、天然物質であれ、ヒトが実際に摂取する量に基づいた定量的なリスク評価が大切であるという主張である。これに対しては、科学的な根拠に乏しいという反対意見も出されているが (Tomatis et al., 2001)、既成の概念を見つめ直すという意味においては重要な主張であり、かなり本質をついていると思う。これまでは危険と思われていたものに対する安全性の評価が進めば、今までの概念からはそれほど危険なものではなく、有用性の面が再評価される可能性もある。

環境変異原研究における9つの誤解

前述のAmes博士の9つの誤解にならって、変異原性試験に関する9つの誤解なるものを個人的意見としてやや大胆にまとめた。

- 誤解1：変異原性試験は発がん性の短期スクリーニング試験である。
- 誤解2：発がん実験の答えは絶対的である。
- 誤解3：いわゆる non-genotoxic carcinogen も検出した。
- 誤解4：新規の変異原性物質がまだたくさん存在する。
- 誤解5：生殖細胞での変異原性は体細胞を使って評価できる。
- 誤解6：感度が高くより多くの発がん物質を検出できる試験が望ましい。
- 誤解7：変異原性が陽性ならば危険なので開発をストップする。
- 誤解8：ネガティブを保証することが重要である。
- 誤解9：トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験は感度が低い。

そもそも変異原学会というものは、経世代的ないわゆる遺伝毒性というものに重きが置かれてスタートしたはずであるが、試験法の難しさもあってかやがて関心は、発がん性を短期にスクリーニングするという観点に完全に移行し、現在では癌学会の分科会的要素も否めない。これまでは、発がん性のデータが絶対的なものであるという前提から、いかにもれなくこれを予測できる試験バッテリーを作るかということに注意が払われてきたように思う。その結果、いわゆる“non-genotoxic carcinogen”

の重要性が高まり、それに焦点を当てた研究も多くなされてきた。最終的には non-genotoxic carcinogen も何らかの遺伝子傷害を起こして発がんに結びつくと考えればこれも重要かもしれないが、そもそもこうした発がん物質の重要性には疑問を持っている。一般的に、発がん試験では比較的高用量を長期間にわたって投与されるため、ふつうの状態ではあり得ない量を投与される場合も多く、いわゆる non-genotoxic carcinogen には高用量でのみ陽性になるものが多い点には注意が必要である。変異原性研究者の立場からすれば、そのようなものも何とか検出しようとするのではなく、そのようなものは重要ではないという主張を展開すべきではなかったのだろうか？ 発がん実験の結果は我々にとって絶対的なものではなく、発がん性ありとされたいくつかの物質は、実は我々にとってさほど危険でないのではないのか？ しかし、逆に発がん性のない変異原物質、つまり、“genotoxic non-carcinogen” があるとすれば、その危険度には注意が払われる必要がある。なぜなら、発がんだけが結果として起きる毒性ではなく、その他多くの病気に遺伝子傷害が深く関わっている可能性も高いからである。今後は、がん以外のヒトの病気にいかに遺伝子傷害が関わっているかを研究していくことも、癌学会ではできない、変異原学会独自のテーマとして重要であると考え。

これから進むべき道

これからの環境変異原研究の方向性として、これまでの hazard identification から脱却し、risk evaluation を意識した研究なり、評価系が重要だと考える。たとえば、Ames 試験であれば、より正常な状態に近い感度の低い菌株を使用することを推奨したい。また、ニトロ還元酵素活性も低い株が望ましい。こうした低感受性の株で陽性結果が得られれば、その結果の意味 (level of concern) は高いと評価できる。さらに、最近のヒト S9 を用いた研究や、ヒトの代謝酵素を組み込んだ菌株の利用は今後重要な課題であると考え。染色体異常試験においては、陽性率が高いため、陽性結果が得られたとしてもただちに危険だとはいえず、死んでしまう運命にある細胞での現象を観察しているにすぎないという指摘もある。生殖細胞および受精卵における染色体異常は、流産や奇形の原因としても重要であるが、がんにおいてはどうか？ 結果としてがん細胞には染色体異常が多く観察されるが、これらはどの程度原因となりうるのであろうか？ 確かに、染色体の転座や LOH という現象は重要な意味を持つので、これら viable なタイプの染色体異常の検出は意味があると考えられる。こうした異常にまとを絞る、たとえばヒトの培養細胞を使って chromosome painting 法により転座を検出することなどは今後重要である。

この他にも、in vivo 試験としてのトランスジェニック

マウス試験は、標的が導入遺伝子であるものの、エンドポイントの持つ意味がはっきりしており、またメカニズムの解析にも役立つため、リスク評価を考えるうえでは重要な試験となるだろう。また、*in vivo*のコメットアッセイに関しては、操作が簡便であるという利点があり、*hazard identification*としては優れているが、リスク評価を考える場合、定量的な相関性の問題と何をとらえているのかという本質的な疑問を解決しなければならない。

さらに、今後重要と考えられるテーマとして、ヒトサンプルを用いた遺伝毒性試験法の開発があげられる。臨床試験や、*population monitoring*を通じて得られる試料をもとに、遺伝子傷害性を直接評価可能な系は、ヒトでのリスクを評価するうえで重要である。LC-MSなどを利用したアダクトの検出や、分子疫学的研究も今後の発展が期待される。

これまでは、比較的定性的な発がん性の予測を目指した議論がなされてきたが、今後はよりリスク評価を念頭に置いたより定量的な議論がなされることを期待したい。また、メカニズムに基づいた毒性の評価が重要だと思われる。そのためには、メカニズムの解析に迫れる試験系が望ましい。現在関心が払われているマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析は、こうした観点からも、今後重要視すべきテーマであると考えられる。数年前の学会で、こうした研究の重要性を指摘したものの、残念ながらトキシコロジー学会などに比べると新しい試験系への取り組みは出遅れたといえる。今後こうした研究を通じて、一般的な毒性学や病理学と遺伝毒性との境界線が取り払われていくことが予想され、入り込む余地がなくならないためにも、こうした新しい研究を活性化していくことも大事であろう。

これまで、会社の安全性部門というのは、開発をストップする側に働く、*negative*な役割を担っていたようであるが、これからは毒性があるものをいかに世の中に出すかという *positive*な役割を担うべきであるとも感じている。既存の変異原性試験で陽性になったり、発がん性試験で陽性になったら開発が中止される訳であるが、たとえばAmes試験でやや陽性になったぐらいで開発をやめてしまうとすれば、むしろ有益な薬が世に出なかったという意味で残念な結果だともいえる。本当に必要であれば、トランスジェニックマウスを使った試験なりの追加試験を行ったり、メカニズムに基づいた議論をすることで、その陽性結果の重要性 (*level of concern*) を落とす努力をしてもいいのではないか。もちろん行政側としても、きちんとした検討がなされている場合には、多少の陽性結果を受け入れる姿勢は重要である。なるべく安全な薬をという発想であまり効かない薬を世に出すよりは、多少危険な薬でも、それをうまく使うことがより利益をもたらすのではないだろうか。サリドマイドやソリブジンのような副作用例もあるが、そもそも使い方を

間違えなければ、非常に有用な薬であったはずだ。こうした薬が、世の中から消えてしまうのはもったいない気がする。

この話題と関連して現在トキシコジェノミクスプロジェクトが目指す目標として、これまで毒性があつて製品化できなかった薬を世に出すことも含まれている。おそらく、臨床試験で100人に1人でも重篤な障害がおきたとすれば、その開発はストップするのであろうが、もしそれがSNPに基づくヒトの個体差によるもので、事前に感受性なヒトを遺伝子診断で予測できるのであれば、そうした重篤な副作用を回避し、通常のヒトには有益な薬として使用することができるはずである。たとえば、*uvr*株でのみ陽性を示した薬は、色素性乾燥皮症患者には使わないということは、すでにあるデータからでも簡単に応用できる事項である。大事なことは、*uvr*株で陽性になったらやめるのではなく、どのように注意するかである。すでに研究は始まっているが、修復酵素や薬物代謝酵素の多型という問題もこの学会で取り組むべき課題であろう。SNPに関しても、その由来は生殖細胞におきた突然変異であるので、本来本学会にて取り組むべきテーマであると考えられる。

最 後 に

最近ふと不安になることがある。これまで一生懸命変異原性試験を行ってきて、少しでも危険度のある物質は規制するなり、世に出さない努力をしてきたが、それが存在したときと比べ、どれだけ我々の暮らしに貢献したのでしょうか。AF2を禁止したことでがんにならなかったヒトは何人いたのか。これは非常に難しい問題であるが、ワラビを食べることを禁止した方がよっぽど効果的だったかもしれない。さらにいえば、たとえがんが増えたとしてもそれは人類にとって悪影響を及ぼすのか。小児のがんを除けば、ヒトがある程度の年齢になってがんになって死ぬのは、自然の摂理かもしれない。ここまでいうと極論かもしれないが、このような立場にたった場合には、危険をなるべく回避するという姿勢でなく、危険をある程度受け入れ、それとうまく対処していくことが今後は重要になると考える。ただし、環境変異原が経世代的に遺伝的悪影響をもたらすとすれば、それは人類にとって危険度は高い。その意味では、発がん物質よりも、変異原物質の方が重要であるといえる。今こそ、環境変異原学会がスタートした時の遺伝的影響という原点に戻って、新しい試験系の開発なりを行っていくことが重要であろう。これに関連して、最近放射線等による経世代的な突然変異の伝播や、*untargeted mutation*に関する報告が相次いでなされている点は注目される。(Niwa and Kominami, 2001; Barber et al., 2002; Shiraishi et al., 2002)

最後に、このごろ気になることとして、若い女性の喫煙者が急増している点がある。発がん性の観点からすれば、あれほど危ないものはない。また、最近は男性も含め髪をカラフルに染める人も増えているが、結構過激な処理をしているようなので心配である。たばこを吸っていても肺がんにはならないヒトも多いので、ヒトは結構丈夫にできているものだと感心させられるが、遺伝的な影響は大丈夫であろうか？ 今後、新生児の流産や奇形の発生率が上昇しないことを願うが、喫煙の遺伝的影響をきちんと評価して警鐘を鳴らすのもこの学会としての今後の役割の一つではないだろうか。

参考文献

- Ames, B. N. and L. S. Gold (1997) Environmental pollution, pesticides, and the prevention of cancer: misconceptions, FASEB J., 11, 1041-1052.
- Barber, R., M. A. Plumb, E. Boulton, I. Roux and Y. E. Dubrova (2002) Elevated mutation rates in the germ line of first- and second-generation offspring of irradiated male mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99, 6877-6882.
- Johnson, F. M. (2002) How many food additives are rodent carcinogens? Environ. Mol. Mutagen., 39, 69-80.
- Niwa, O. and R. Kominami R. (2001) Untargeted mutation of the maternally derived mouse hypervariable minisatellite allele in F1 mice born to irradiated spermatozoa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 98, 1705-1710.
- Shiraishi, K., T. Shimura, M. Taga, N. Uematsu, Y. Gondo, M. Ohtaki, R. Kominami and O. Niwa, (2002) Persistent induction of somatic reversions of the pink-eyed unstable mutation in F1 mice born to fathers irradiated at the spermatozoa stage, Radiat. Res., 157, 661-667.
- Smith, L. L. (2001) Key challenges for toxicologists in the 21st century, Trends Pharmacol. Sci., 22, 281-285.
- Tomatis, L., R. L. Melnick, J. Haseman, J. C. Barrett and J. Huff (2001) Alleged misconceptions' distort perceptions of environmental cancer risks, FASEB J., 15, 195-203.
- Proctor, R. N. (著) 平沢正夫 (翻訳) (2000) がんをつくる社会, 共同通信社, 東京.
- 小原有弘 (2002) 化学物質の構造の特徴と遺伝子突然変異の相関～発がん原因物質の予測を目指した遺伝子突然変異のパターン解析～, 名古屋市立大学学位論文.
- 杉村 隆 (1982) 発がん物質, 中央公論社, 東京.

Author Index (Vol. 24)

A		Klongpanichpak, S.	24 ; 37	Sofuni, T.	24 ; 48
		Kuboniwa, H.	24 ; 1	Sugimura, T.	24 ; 63
Aoki, T.	24 ; 29	L		Sutou, S.	24 ; 43
Apibal, S.	24 ; 37			Suwannatrai, M.	24 ; 37
Arai, F.	24 ; 23	Lohman, P. H. M.		Suzuki, T.	24 ; 179
F		M		T	
Fujita, R.	24 ; 45	Maemura, S.	24 ; 1	Temcharoen, P.	24 ; 37
H		Masuda, S.	24 ; 129	Toskulkao, C.	24 ; 37
Hayashi, M.	24 ; 48	Mori, H.	24 ; 46	U	
Hayashi, T.	24 ; 23	Morimoto, S.	24 ; 17	Ushijima, T.	24 ; 169
Hayatsu, H.	24 ; 43, 61	N		W	
Hiramoto, K.	24 ; 91	Nagase, H.	24 ; 29	Wakata, A.	24 ; 99
Honma, M.	24 ; 17, 47, 161	Nohmi, T.	24 ; 44, 75, 153	Waters, M.D.	24 ; 45
Hosono, A.	24 ; 113	O		Y	
I		Ohigashi, H.	24 ; 123	Yajima, N.	24 ; 111
Ikushima, T.	24 ; 47	Ohmori, H.	24 ; 145	Yanagisawa, T.	24 ; 1
Imaeda, A.	24 ; 29	Ohnishi, Y.	24 ; 81	Yatagai, F.	24 ; 17
K		Okochi, E.	24 ; 169		
		S			
Katami, M.	24 ; 1				
Kinae, N.	24 ; 43, 69, 129	Shibuya, T.	24 ; 46		

Keyword Index (Vol. 24)

A		DNA polymerase IV	24 ; 153
		DNA polymerase κ	24 ; 145
1'-acetoxychavicol acetate	24 ; 123	double-strand break (DSB)	24 ; 161
Ames test	24 ; 1	E	
antimutagen	24 ; 129		
antimutagenicity and anticarcinogenicity	24 ; 81	end-joining (EJ)	24 ; 161
antimutagenicity	24 ; 113	F	
antioxidant	24 ; 29		
asbestos	24 ; 23	fermented milk	24 ; 113
asbestos substitute	24 ; 23	flavonoid	24 ; 129
auraptene	24 ; 123	fluvastatin	24 ; 29
B		food factor	24 ; 123
		G	
benzo[<i>a</i>]pyrene	24 ; 145		
binding of mutagen	24 ; 113	genomic instability	24 ; 161, 169
breast cancer	24 ; 169	genotoxicity	24 ; 1, 75
C		H	
cancer	24 ; 145	heterocyclic amine	24 ; 69
carbon-centered radical	24 ; 91	heterocyclic amine mutagen	24 ; 91
carcinogenesis	24 ; 129	homologous recombination (HR)	24 ; 161
catechin	24 ; 129	<i>hprt</i>	24 ; 169
chemoprevention	24 ; 81, 123	<i>HPRT</i> (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) mutation	
chlorofuranone (MX)	24 ; 69		24 ; 17
chromosomal aberrations	24 ; 23	human lymphoblastoid cell	24 ; 17
cultured Chinese hamster cells	24 ; 99	HUVEC	24 ; 29
cytokinesis-block method	24 ; 99	I	
D			
		intestinal bacteria	24 ; 81
<i>dinB</i>	24 ; 153		
DNA damage	24 ; 91		

J	
Japanese traditional herbal medicines (Kampo)	24 ; 1
K	
Kuralon®RM182	24 ; 23
L	
lactic acid bacteria	24 ; 113
M	
Maillard reaction	24 ; 91
micronucleus test	24 ; 1, 37, 99
multiplex PCR (polymerase chain reaction) analysis	24 ; 17
mutagen	24 ; 69
mutagenesis	24 ; 129
mutagens	24 ; 81
mutation	24 ; 145
mutation rate	24 ; 169
N	
nitrogenoxide	24 ; 123
nobiletin	24 ; 123
1-nitropyrene	24 ; 81
O	
oxidative DNA damage	24 ; 29
P	
p53	24 ; 161
point mutation	24 ; 169
PVA fiber	24 ; 23
pyrazine cation radical	24 ; 91

R	
rats	24 ; 99
reactive oxygen species	24 ; 91
risk assessment	24 ; 69
rodent bone marrow cell	24 ; 37
S	
single cell gel electrophoresis assay	24 ; 29
stevioside	24 ; 37
streptomycine-dependent strain	24 ; 113
superoxide	24 ; 123
T	
transgenic assays	24 ; 75
translesion synthesis	24 ; 145
tumor induction	24 ; 69
U	
unscheduled DNA synthesis test	24 ; 1
X	
X-ray exposure	24 ; 17
Y	
Y family DNA polymerases	24 ; 75, 153
Z	
zerumbone	24 ; 123

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：	㊟	
Name（ローマ字つづり）		
生年月日（性別）	年 月 日	（男・女）
所属機関名：		
住 所：〒		
TEL：		FAX：
電子メール：		
Affiliation Address Belong		
自 宅 住 所：		
電 話：		
Home address		
学会誌送付先：	①所属機関	②自 宅
学 位：	年取得	
研究領域（複数可）		
加入学会名：		

_____の本学会への入会を推薦致します。 日本環境変異原学会評議員 (署名) 日付 印

入会申込書の送付先：〒 170-0003 東京都豊島区駒込 1-43-9 駒込 TS ビル
 (財)口腔保健協会内 日本環境変異原学会事務局
 TEL 03-3947-8891 FAX 03-3947-8341

日本環境変異原学会 学生会員申込書

[1年間（翌年の3月31日まで）のみ有効です]

年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

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

フリガナ：	
氏 名：	㊦
Name（ローマ字つづり）	
生年月日（性別）	19 年 月 日 （男・女）
校名／学部：	
住 所：〒	
TEL：	FAX：
電子メール：	
Affiliation Address Belong	
自 宅 住 所：	
電 話：	
Home address	
学会誌送付先：	①大 学 ②自 宅
研究領域（複数可）	
指導教官名：	
連 絡 先：	

_____の本学会への学生会員としての入会を推薦致します。	
指導教官	
（署名）	
日付	印

入会申込書の送付先：〒170-0003 東京都豊島区駒込 1-43-9 駒込 TS ビル
（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

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」、「原著」、「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。

「原著」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することがある。ただし、著作者自身が自分の記事、論文などの一部の複製、翻訳などの形で利用することを妨げるものではない。しかし、著作者自身であっても、全文を複製の形で他の著作物に利用する場合には、事前に文書にて学会長に申し出を行い、許諾を求めなければならない。

6. 校正

著者校正は原則として原稿に対する誤植の訂正に限る。原稿にない加筆・変更はしないこと。

7. 著者負担金

- 1) 投稿料は無料とする。ただし頁数の超過分や多額の経費を要する図表の実費は著者負担とする場合がある。
- 2) カラー印刷等の特殊印刷のため付加的に発生する費用は著者負担とする。
- 3) 別刷りはすべて著者負担とする。別刷り希望者は著者校正時に添付する申込書に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く思います。どんな些細なことでも結構ですから、学会誌に関することでコメント、提案等がありましたら、編集委員までE-mailにてお知らせください。編集委員一同

環境変異原研究 執筆規定

1. 用語は日本語または英語とする。
2. 原稿は原則としてワープロを用いて作成する。
日本文の原稿：
原稿は A4 判用紙に 1 行約 40 字，1 頁 30 ～ 31 行で印字する（刷り上がりの約 1/2 頁に相当する）。ただし，要約は英文（300 語以内）とする。また，別に題名，著者名（フルネーム），所属機関名ならびに所在地を英文で付ける。
英文の原稿：
原稿は A4 判用紙にダブルスペースで印字（12 ポイント）する。1 頁 25 ～ 27 行を標準とする。原稿は著者の責任において英語の添削訂正を受けたものに限る。
3. 論文の記述は，第 1 頁は表題，著者名，所属および所在地，第 2 頁は英文の要約（Summary）およびキーワード（英文 5 語以内，固有名詞や遺伝子名などで大文字の使用が必要な場合を除き，原則として小文字表記とする），第 3 頁以下，緒言（Introduction），実験材料および方法（Materials and Methods），結果（Results），考察（Discussion）または結果および考察，結語（Conclusion），謝辞（Acknowledgments），参考文献（References），表，図の説明および図の順序とする。ただし，総説の記述は，第 3 頁以下，緒言，1. ……，2. ……，結語，謝辞，参考文献，表，図の説明および図の順序とする。なお図と表の説明文はすべて英文とする。
4. 学名，遺伝子記号などはイタリックとし，その他まぎらわしい記号については原稿に適宜指示を与える。
5. 化学物質名は原則として英語とし，一般名を用いる。また，化学物質の CAS 登録番号を記載する。文中に用いる英語の単語あるいは句は固有名詞を除いて小文字で書きはじめる（文頭の場合は大文字）。
6. 数字は算用数字を用い，単位は慣用による省略記号を用いる。
7. 略語を使用するときは，論文中にはじめて使用するときに完全な語とその略語を括弧内に示す。
8. 句読点はカンマ（,）およびピリオド（.）とする。
9. 表，図は本文と別にし，それらの挿入箇所を本文の右余白に明示する。グラフ，写真，線画等はすべて図とし，一連の番号 Fig. 1, 2, …を付し，説明文（英文）を別紙に添える。
10. 図と写真は原図またはキャビネ大の光沢写真版とし，裏面に Fig. 1, 2, …および上下を鉛筆書きする。
11. 表は上部に一連の番号 Table 1, 2, …と英文の表題を記入する（文頭のみ大文字）。脚注を要するときに表示の語句の右肩に a, b, c, …を付記し，表の下欄外にそれぞれの説明を記す。
12. 本文中の文献引用は著者名および年号をもってする。
13. 参考文献は筆頭著者名のアルファベット順に配列し，雑誌の省略名は Chemical Abstracts の記載方法に従う。記載順序は著者氏名，（年），題名，雑誌名，巻，頁（単行本の一部引用の場合は著者氏名，（年），題名，編者名，書名，発行所，発行地，頁）の順とする。単行本そのものを引用する場合は，編者名あるいは著者名，（年），書名，発行所，発行地の順とする。文献の記載方法は下記の例に従う。
Ames, B.N., J. 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）

投稿論文チェックリスト

論文ご投稿の際、この用紙に必要事項をご記入のうえ、添付してください。

論文名（日本語）：

（英 語）：

窓口著者名：

連絡先（住所）

（TEL）

（FAX）

（E-mail）

分類（該当するものに印をつけてください）

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

送付前のチェック項目

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

編集後記

本号の特別企画は前編集委員長の時に立案した。海外にも著者を求めたが、期限の関係から快諾が得られなかった。しかし出来上がってみると、この分野の最新情報を凝集することが出来たと思う。4年間に渡り編集委員を務め他の委員の足手まといにならぬようお手伝いしてきたつもりだったが、結果はインテルナ出版の方々に随所で助けて戴いた。学会誌編集に携わり痛感したことは原稿の集まり難さであった。会員の皆様のご投稿をお待ち致しております。

担当編集委員 矢嶋 信浩

編 集 委 員

森田 健 (委員長) (2002-)

〒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

若栗 忍 (2002-)

〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5
財団法人 食品薬品安全センター・秦野研究所
細胞毒性試験班
Tel : 0463-82-4751 Fax : 0463-82-9627
E-mail : wakuri.s@fdsc.or.jp

高橋 和彦 (2002-)

〒467-8603 愛知県名古屋市中瑞穂区田辺通3-1
名古屋市立大学大学院薬学研究科
医薬品代謝解析学分野
Tel & Fax : 052-836-3780
E-mail : takahasi@phar.nagoya-cu.ac.jp

評 議 員

赤沼 三恵	荒木 明宏	宇野 芳文	大澤 浩一	太田 敏博
大塚 雅則	大西 克成	葛西 宏	鎌滝 哲也	川西 正祐
木苗 直秀	後藤 純雄	佐々木 有	島田 弘康	清水 英佑
下位香代子	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	糠谷 東雄	布柴 達男
根岸 和雄	根岸 友恵	能美 健彦	林 真	早津 彦哉
藤川 和男	降旗 千恵	本間 正充	松元 郷六	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24巻 第3号 2002年

平成14年11月13日 印刷

平成14年11月20日 発行

発行者 日本環境変異原学会

発行責任者 林 真

製作 インテルナ出版

目 次

特別企画「食品ならびに食品成分による抗変異原性作用」

「特別企画—食品ならびに食品成分による抗変異原性作用—」を企画するにあたって

矢嶋信浩 111

乳酸菌を用いた発酵乳の抗変異原性

細野明義 113

発がん抑制性フードファクター：食によるがん予防を目指して

大東 肇 123

抗変異原に関する研究

木苗直秀，増田修一 129

第13回公開シンポジウム「環境変異原と遺伝子不安定性」

DNA Polymerase κ によるDNA損傷のバイパスと突然変異の誘発

大森治夫 145

微生物由来のトランスリージョンDNAポリメラーゼ

能美健彦 153

ほ乳類細胞におけるDNA二本鎖切断修復と，p53によるゲノム安定化機構

本間正充 161

ラットおよびヒト乳腺発がんにおける一塩基不安定性

大河内江里子，牛島俊和 169

Letter to Editor

環境変異原研究の光と陰：これから進むべき道

鈴木孝昌 179

Author Index 185

Keyword Index 186

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