

平成 21 年 4 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 年度～2008 年度
 課題番号：19710058
 研究課題名 (和文) ヒト細胞を用いたディーゼル排気由来 DNA 付加体による突然変異の定量的解析
 研究課題名 (英文) Quantitative analysis on mutation induced by DNA adducts derived from diesel emission using human cells
 研究代表者
 川西 優喜 (KAWANISHI MASANOBU)
 大阪府立大学・産学官連携機構・助教
 研究者番号：70332963

研究成果の概要：

アミノビフェニル(ABP)に由来する DNA 付加体を部位特異的に 1 箇所もつプラスミドを作製し、ヒト細胞内で複製させた。複製プラスミドを解析し、損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) の頻度と突然変異パターンを明らかにした。その結果、付加体周辺の塩基配列が TLS 頻度と変異誘発率に影響を与えることがわかった。また ABP 付加体を TLS する際に働くポリメラーゼの種類も配列によって異なることが分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境質定量化、核酸、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ディーゼル排ガスが主たる発生源である都市大気浮遊粒子中には幾多の変異原性・発がん性をもつ多環芳香族が存在し、その多くが代謝活性化をうけ DNA 付加体を形成し、突然変異誘発や発がんに関わると考えられている。また現在増加しつつある肺がんの原因として大気浮遊粒子の寄与は大きいと考えられている。

環境中に存在するこれら人工化学物質の突然変異誘発リスク評価のために申請者は、究極的にはあらゆる化合物に対し統一され

た、例えば放射線防護で用いられているシーベルト[Sv]に相当する単位を算出することが望ましいと考える。各化合物のリスクを相対化し定量的に扱って初めて包括的かつ合理的なリスク管理が可能となる。しかし放射線と異なり多種多様な化学物質の作用は一樣ではないため、このような「等価線量」の導入は困難である。

結局現時点では、化学物質ごとに生体内外での分子反応から個体・集団への影響までの各レベルで定量的な解析をし知見を統合する必要があると申請者は考えた。

2. 研究の目的

そこで申請者は汚染物質の突然変異リスク評価の立場から、実際に環境中に存在する汚染物質が原因のDNA付加体を用いて、それら付加体の変異を誘発する過程を、ヒト細胞を用いて定量的に比較解析する必要があると考えた。本課題では、重要な工業原料でありタバコ煙にも含まれるアミノビフェニル(ABP)に由来するDNA付加体(dG-ABP)、ディーゼル排ガスに含まれる変異原物質3-ニトロベンズアントロン(NBA)に由来する付加体(dG-N2-C2-ABA)を対象にした。これらDNA付加体を部位特異的に1箇所もつプラスミドをそれぞれ作製し、ヒト細胞内で複製させた。複製プラスミドを解析し、TLSの頻度と突然変異パターンを明らかにした。そして、あるDNA付加体がDNA中に1分子存在するときの突然変異誘発率(塩基変化率)を算出し、汚染物質ごとに比較を試みた。

3. 研究の方法

DNA付加体を1つ含む13merオリゴヌクレオチドを、15merのギャップをもつシャトルベクタープラスミドにハイブリダイズ/ライゲーションする。用いるプラスミドは*LacZ*遺伝子中1箇所付加体、その反対側にDNA鎖マーカースとして2塩基のふくらみをもつ。またこのプラスミドは大腸菌*ori*と、SV40T抗原配列とSV40の*ori*をもつ。作製したプラスミドをヒト培養細胞(NER欠損色素性乾皮症患者由来)にそれぞれ導入し複製させる。細胞からプラスミドを回収し、複製しなかったプラスミドをメチル化パターンの違いを利用し制限酵素*DpnI*で消化して除き、複製したプラスミドを大腸菌(DH5 α 等 β -Galカラーセクション可能な株)に導入してコロニーの青白でDNA付加体部位のTLSを解析する。プラスミドは、娘プラスミドにおいて付加体箇所ではTLSが起こっていると*LacZ*遺伝子の読み枠が正しく青、フレームシフト型TLSの場合は読み枠がずれ白、反対側の鎖が複製されていると(Damage Avoidance: DA)白いコロニーを生じ、DAプラスミドは制限酵素*Bgl* II サイトをもつよう設計されている。これら表現形の違いを利用しTLSの割合を算出する。更にTLSプラスミドの塩基配列を決定し、TLSに際しどの塩基が対合したかを解明する。

4. 研究成果

dG-ABP付加体を、実際の膀胱癌で見つかるp53遺伝子変異ホットスポットに似せた配列に組み込んだ。つまり、p53配列を模した13merオリゴヌクレオチドにdG-ABPを付加し

た。これをプラスミドに組み込み部位特異的修飾プラスミドを得た。次いでこれをヒト培養細胞で複製したところ、変異ホットスポット(codon 248)に組み込んだABP付加体はホットスポットではない配列(codon 249)のものに比べ、有意に高い突然変異率を示した。また、TLS率はcodon 248の方が低かった。付加する場所が変異誘発に影響を与えることが分かった。次に、TLSポリメラーゼの一つであるpolHを過剰発現した細胞で同様の複製実験を行った。その結果、codon 248におけるTLS率は、野性株に比べ低くなり、変異率は上昇した。Codon 249ではTLS率、変異率とも野性株からの変化は無かった。これらのことから、codon 248と249上の付加体は異なるポリメラーゼによりTLSされており、polHはcodon 248上のABP付加体を誤りがちにTLSすることが示唆された。

現在dG-N2-C2-ABAを対象に同様の実験を実施中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

① Genotoxicity of 3,6-dinitrobenzo[*e*]pyrene, a novel mutagen in ambient air and surface soil, in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. Masanobu Kawanishi, Tetsushi Watanabe, Soichiro Hagio, Sayaka Ogo, Chiaki Shimohara, Rika Jouchi, Saori Takayama, Tomohiro Hasei, Teruhisa Hirayama, Yoshimitsu Oda, Takashi Yagi, *Mutagenesis*, **24**(3): 279-284, 2009年, 査読有

② Mutagenic specificity of *N*-nitrosotaurocholic acid in *supF* shuttle vector plasmids. Masanobu Kawanishi, Hiroshi Nishida, Yukari Totsuka, Koichi Nishimura, Keiji Wakabayashi, Takashi Yagi, *Genes and Environment*, **31**(1): 9-14, 2009年, 査読有

③ Establishment of a method for analyzing translesion DNA synthesis across a single bulky adduct in human cells. Tomoko Sawai, Masanobu Kawanishi, Takeji Takamura-Enya, Takashi Yagi, *Genes and Environment*, **31**(1): 24-30, 2009年, 査読有

④ Validation of a new yeast-based reporter assay consisting of human estrogen receptors alpha/beta and coactivator SRC-1: Application for detection of estrogenic activity in environmental samples. Wai-Ling Chu, Kazuhiro Shiizaki, Masanobu Kawanishi,

Takashi Yagi, *Environmental Toxicology, in press*, 2009年, 査読有

⑤ Omeprazole alleviates Benzo[a]pyrene cytotoxicity by inhibition of CYP1A1 activity in human and mouse hepatoma cells, Kazuhiro Shiizaki, Seiichiroh Ohsako, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi, *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, **103**(5): 468-475, 2008年, 査読有

⑥ Construction of a reporter yeast strain to detect estrogen receptor signaling through aryl hydrocarbon receptor activation. Masanobu Kawanishi, Mami Kondo, Kazuhiro Shiizaki, Wai Ling Chu, Yuichi Terasoma, Takashi Yagi, *Environmental Science and Technology*, **42**(18): 468-475, 2008年, 査読有

⑦ Mutagenic specificity of N-acetoxy-3-aminobenzanthrone, a major metabolically activated form of 3-nitrobenzanthrone, in shuttle vector plasmids propagated in human cells. Hiroshi Nishida, Masanobu Kawanishi, Takeji Takamura, Takashi Yagi, *Mutation Research*, **654**(1): 82-87, 2008年, 査読有

⑧ Structural identification of DNA adducts derived from 3-nitrobenzanthrone, a potent carcinogen present in the atmosphere. Takeji Takamura-Enya, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi, Yoshiharu Hisamatsu, *Chemistry An Asian Journal*, **2**(9): 1174-1185, 2007年, 査読有

⑨ DNA adduct formation in human hepatoma cells treated with 3-nitrobenzanthrone: analysis by the ³²P-postlabeling method. Takaharu Kanno, Masanobu Kawanishi, Takeji Takamura-Enya, Volker M. Arlt, David H. Phillips, Takashi Yagi, *Mutation Research*, **634**(1-2): 184-191, 2007年, 査読有

[学会発表] (計 14 件)

① 大気汚染物質 3-ニトロベンズアントロンによるDNA付加体の生成とTLS・突然変異, 川西優喜, 西田裕, 石井宏, 菅野毅治, Robert Fuchs, 松田知成, 高村岳樹, 八木孝司, 日本分子生物学会第 31 回大会, 神戸, 2008 年 12 月 12 日

② Agonistic and Antagonistic Activities of various Chemicals in Reporter Yeasts Expressing Estrogen Receptors α and β , Wai-Ling Chu, Kazuhiro Shiizaki, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi, 日本環境変異原学会第 37 回大会, 沖縄, 2008 年 12 月 4 日

③ Significance of DNA Adductome Analysis in In Vitro Microcucleus Test, Kyoko Kato, Eiji Yamamura, Masanobu Kawanishi,

Takashi Yagi, Tomonari Matsuda, Akio Sugiyama, Yoshifumi Uno, 日本環境変異原学会第 37 回大会, 沖縄, 2008 年 12 月 4 日

④ Efficiency and Fidelity of Translesion DNA Synthesis across 3-nitrobenzanthrone-DNA-adducts, Hiroshi Nishida, Masanobu Kawanishi, Takeji Takamura, Takashi Yagi, 日本環境変異原学会第 37 回大会, 沖縄, 2008 年 12 月 4 日

⑤ Quantitative Analysis of Translesion DNA Synthesis across Site-specific 4-Aminobiphenyl Adducts in Human Cells, Tomoko Sawai, Masanobu Kawanishi, Takaharu Kanno, Takeji Takamura-Enya, Takashi Yagi, 日本環境変異原学会第 37 回大会, 沖縄, 2008 年 12 月 4 日

⑥ Evaluation of Endocrine Disruptors Using Reporter Yeasts Expressing Human Androgen Receptor and Thyroid Hormone Receptor, Shingo Ebata, Shota ASAI, Kazuhiro Shiizaki, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi, 日本環境変異原学会第 37 回大会, 沖縄, 2008 年 12 月 4 日

⑦ Evaluation of Genotoxicity of 3,6-Dinitrobenzo[e]pyrene in Human Cell Line, Soichiro Hagio, Sayaka Ogo, Masanobu Kawanishi, Tetsushi Watanabe, Yoshimitsu Oda, Takashi Yagi, 日本環境変異原学会第 37 回大会, 沖縄, 2008 年 12 月 4 日

⑧ TCDD Represses Benzo[a]pyrene-DNA Adduct Formation in HepG2 cell, Kazuhiro Shiizaki, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi, 日本環境変異原学会第 37 回大会, 沖縄, 2008 年 12 月 4 日

⑨ Genotoxicity of Nanomaterials, Sayaka Ogo, Masanobu Kawanishi, Yukari Totsuka, Keiji Wakabayashi, Takashi Yagi, 日本環境変異原学会第 37 回大会, 沖縄, 2008 年 12 月 4 日

⑩ Mutations produced by N-nitrosotaurocholic acid in the supF target gene replicated in human cells, Hiroshi NISHIDA, Masanobu KAWANISHI, Yukari TOTSUKA, Keiji WAKABAYASHI, Takashi YAGI, 1st Asian/36th Japanese conference on environmental mutagens, Kokura, Japan, 2007 年 11 月 29 日

⑪ Consequence of Translesion DNA Synthesis across Site-specific 4-Aminobiphenyl Adducts in Human Cells, Tomoko SAWAI, Masanobu KAWANISHI, Takaharu KANNO, Takeji TAKAMURA-ENYA, Takashi YAGI, 1st Asian/36th Japanese conference on environmental mutagens, Kokura, Japan, 2007 年 11 月 29 日

⑫ Establishment of reporter assay yeast expressing intact human nuclear receptor,

Kazuhiro SHIIZAKI, Shouta ASAI, Shingo EBATA, Mabel CHU, Takashi YAGI, Masanobu KAWANISHI , 1st Asian/36th Japanese conference on environmental mutagens, Kokura, Japan, 2007年11月29日

⑬ Construction of Reporter Yeast for Estrogen Receptor Signalling Activity through Aryl hydrocarbon Receptor Activation, Masanobu Kawanishi, Mami Kondo, Kazuhiro Shiizaki Yuichi Terasoma, Mabel Chu and Takashi Yagi , 1st Asian/36th Japanese conference on environmental mutagens, Kokura, Japan, 2007年11月29日

⑭ バイリング (*Pleurotus nebrodensis*) 由来のlaccaseによるエストロールの除去 (題目), 新谷香代, 上田光宏, 仲西亜希子,

中澤昌美, 辻山彰一, 川西優喜, 八木孝司, 宮武和孝, 日本きのこ学会第11回大会, 旭川市, 2007年09月18日

〔図書〕 (計1件)

① みんなのくらしと放射線、分担執筆 pp74-77、「みんなのくらしと放射線」知識普及実行委員会編、大阪公立大学共同出版会、総ページ数202、2008年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川西 優喜 (KAWANISHI MASANOBU)
大阪府立大学。産学官連携機構・助教
研究者番号：70332963