

B-41 ベンゼン代謝生成物による突然変異の分子生物学的評価

京都大学大学院工学研究科 ○中山亜紀
 同上 川西優喜
 京都大学大学院医学研究科 八木孝司
 京都大学大学院工学研究科 森澤眞輔

1.はじめに

ベンゼンは急性骨髄性白血病等の原因物質であるとされ、最近はその環境大気中濃度を減少させるためにベンゼンがガソリンから除去されつつある。ベンゼンは体内で活性を有する物質に代謝され、この代謝生成物が発がんのイニシエーションである突然変異を誘発する。ベンゼンについては、既に疫学調査データに基づいて発がんリスクが評価されている。またマウス等の動物を用いた発がん実験結果は、体重や体表面積などから、ヒトに外挿して、発がんリスクを推定するのに用いられるが、これにはヒトと実験動物との種差が考慮されていない。

本研究では、ベンゼンの代謝生成物であるパラベンゾキノンによって誘発される突然変異をマウス細胞を用いて明らかにした。現在は、さらにヒト細胞でも同様の実験を行っている。本研究の目的は、この二つの平行した実験より、細胞の種差が、突然変異の頻度や種類にどの程度影響するかを考察することを目的としている。この結果はベンゼンの発がんリスクを評価するための基礎データとなるだけではなく、マウスによる発がん実験の結果に基づき、種差の影響を考慮してヒトの発癌リスクを推定する枠組みを構築するための重要な知見となる。

2.実験方法

2-1. シャトルベクターによる突然変異の検出およびその解析

突然変異の解析に用いられるpZ189というシャトルベクターは、ヒト細胞で複製するものとしてよく知られているが、その突然変異ターゲット配列であるsupF遺伝子の塩基配列を簡単に自動シーケンスできるように改良したものが、シャトルベクターpMY189 (Matsuda et al., 1995) である。シャトルベクターpNY200は、このpMY189からヒト細胞で複製するために必要なSV40遺伝子を取り除き、かわりにマウス細胞で複製するのに必要な遺伝子を組み込んで作成したものである。

これらのシャトルベクターを水溶液中でパラベンゾキノンと反応させ、DNA損傷を生じさせてから、それぞれマウス細胞HL18とヒト細胞VA13に導入し、細胞内でDNA損傷の修復、突然変異の固定、複製をさせた。その後、細胞からシャトルベクターを回収し、インディケーター大腸菌に導入し、選択培地にまくと、変異シャトルベクターと正常シャトルベクターを選別することができる。この選択培地に生えたコロニーの数をカウントして、相対コロニー数すなわちシャトルベクターの生存率と突然変異の頻度を求めた。また変異シャトルベクターは、その塩基配列の変化をDNAシーケンサーで解析した。

2-2. DNA損傷の確認

パラベンゾキノンとDNAと付加体を形成することが、突然変異の原因となっているかどうかを確認するため、ポリメラーゼストップアッセイをおこなった。そこで、放射性ラベルしたプライマーを用いて、パラベンゾキノンの処理したpNY200のsupF領域をDNAポリメラーゼで複製させた。DNAポリメラーゼは、DNAの伸長反応に用いられる酵素である。しかし、DNAの伸長反応はDNA上に付加体があればそこでポリメラーゼの伸長反応が停止するため、シーケンスゲルで電気泳動した後オートラジオグラフィを行うと、ポリメラーゼが停止した場所にバンドを生じる。このバンドの濃度は付加体量と比例すると考えられるので、相対量をグラフ化することができる。

3.実験結果

3-1. パラベンゾキノンによる突然変異

パラベンゾキノンの処理したシャトルベクターpNY200の相対コロニー数すなわちシャトルベクターの生存率と突然変異の頻度を求めた(図1, 2)。この結果、パラベンゾキノンの濃度依存的にコロニーの形成率が低くなり、9.3mMのときにはコントロールの約1%程度にまで低下する。逆に突然変異誘発頻度は濃度依存的に上がり、9.3mMのパラベンゾキノンと反応させた場合の突然変異の頻度はとコントロールよりも約100倍に上昇した。

また全く同様の処理を行ったシャトルベクターpMY189をヒト細胞VA13に導入した後、同じく突然変異の頻度を求めた。突然変異の頻度はパラベンゾキノンの濃度依存的に上昇し、9.3mMのパラベンゾキノンと反応させた場合の突然変異の頻度は 5.2×10^{-3} であり、同濃度で処理した場合のpNY200の 2.2×10^{-3}

と大きな変化は見られなかった。

図3にパラベンゾキノンによって誘発された突然変異および自然突然変異の内訳と割合を示す。パラベンゾキノンによって誘発された変異には、塩基対置換が多く見られることがわかった。塩基対置換には隣合った2塩基が同時に置換するタンデム型の変異が多く見られ、また1から2個の塩基対がなくなるフレームシフトと呼ばれるものもいくつかみられることが特徴的である。図4に示す塩基対置換の内訳を見ると、パラベンゾキノンによる突然変異には、G:C塩基対に多くみられ、最も多いのがG:C塩基対からA:T塩基対へのトランジションの置換（同塩基対置換）が多く、次いでG:CからT:Aのトランスバージョン（異塩基対置換）が見られた。これらの突然変異のタイプは、自然突然変異のものとは全く異なることから、パラベンゾキノン特有の変異であると考えられる。

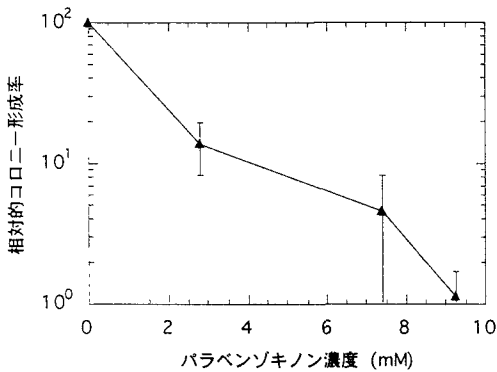


図 1 相対的コロニー形成率

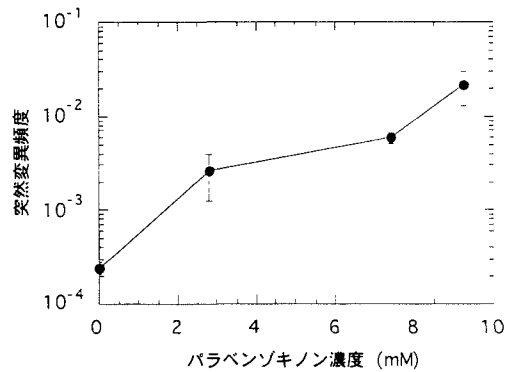


図 2 突然変異頻度

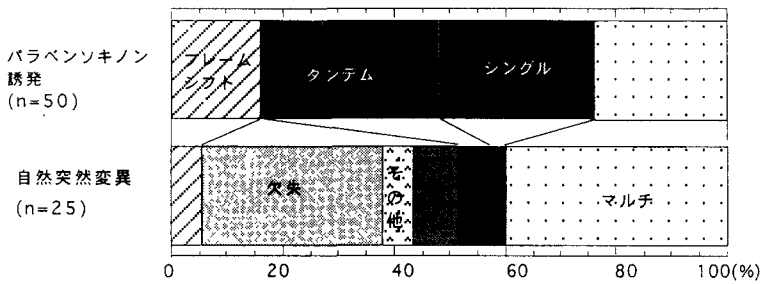


図 3 突然変異の内訳

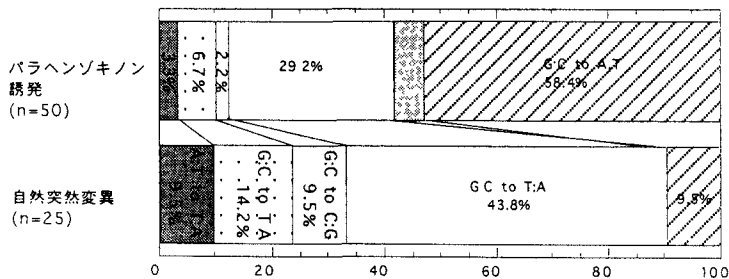


図 4 塩基対置換の内訳

3-3. パラベンゾキノンによる付加体形成と突然変異の分布

図5はポリメラーゼストップアッセイの結果から求めたsupF領域のDNA付加体の分布を突然変異の分布と合わせて示したものである。パラベンゾキノンによって変異が多く起きるホットスポットは

139,141,147,149,157,158番目の塩基対であることが分かった。(自然に誘発される突然変異のホットスポットは123番塩基対であることがすでに分かっている。)図5を見ると、突然変異が起きていない位置でも付加体は形成されているものの、突然変異が高頻度に行っているホットスポット、もしくはその近くに付加体が多く形成されており、突然変異は付加体の形成に起因するものと考えられる。また付加体が形成されている位置の塩基はC,A,Gであり、C,A,Gにパラベンゾキノンが付加体を形成するという、これまでの研究報告と一致している(Chenna et al., 1995; Chenna and Singer, 1995; Chenna and Singer, 1997)。

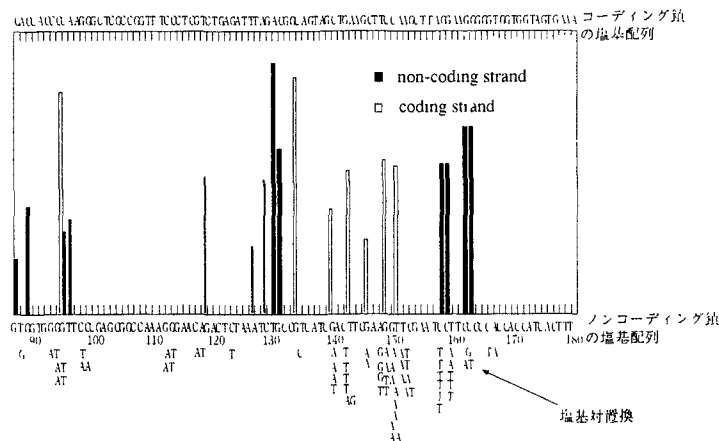


図5 supF遺伝子のDNA付加体と突然変異の分布

4. 結論

マウス細胞を用いて突然変異を検出するシャトルベクターpNY200は、環境変異原物質の検出に有用であるばかりでなく、ヒト細胞を用いるシャトルベクターpMY189と併用して突然変異に対する感受性を調べれば、マウスの発がん試験の結果をヒトへ外挿する際の重要な考察事項となりうる。

ベンゼンの代謝物のパラベンゾキノンによる突然変異の誘発頻度をこのpNY200を用いて調べたところ、9.3mMと反応させた場合にコントロールの約100倍の突然変異頻度を示した。またこの突然変異の解析の結果、パラベンゾキノン特有の変異を見ることができ、これらの突然変異はDNA塩基との付加体の形成によるものであることがわかった。相対コロニー数および突然変異の頻度の点ではパラベンゾキノンの処理に対して、マウス細胞とヒト細胞で感受性に相違はほとんどみられなかった。現在、ヒト細胞内で突然変異を固定した場合に起こりうる突然変異の解析に取り組んでいる。

参考文献

- Chenna, A., Hang, B., Rydberg, B., Kim, E., Pongracz, K., Bodell, W. J., and Singer, B. (1995). The benzene metabolite p-BQ forms adducts with DNA bases that are excised by a repair activity from human cells that differs from an ethenoadenine glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5890-4
- Chenna, A., and Singer, B. (1995). Large scale synthesis of p-BQ-2'-deoxycytidine and p-BQ-2'-deoxyadenosine adducts and their site specific incorporation into DNA oligonucleotides. *Chem Res Toxicol* 8, 865-74
- Chenna, A., and Singer, B. (1997). Synthesis of a benzene metabolite adduct, 3'' hydroxy-1,N2-benzetheno-2'-deoxyguanosine, and its site-specific incorporation into DNA oligonucleotides. *Chem Res Toxicol* 10, 165-71
- Hiraku, Y., and Kawanishi, S. (1996). Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. *Cancer Res* 56, 5172-8
- IARC. W. G. (1982). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Volume 29 (Lyon, France: IARC).
- Matsuda, T., Yagi, T., Kawanishi, M., Matsui, S., and Takebe, H. (1995). Molecular analysis of mutations induced by 2-chloroacetaldehyde, the ultimate carcinogenic form of vinyl chloride, in human cells using shuttle vectors. *Carcinogenesis* 16, 2389-94
- Reinhold, V. N. (1992). *Environmental Toxicants Human Exposure and Their Health Effects*. B. D. Goldstein and G. Witz, eds.