

称号及び氏名	博士（理学）西田 裕
学位授与の日付	平成21年 3月31日
論文名	「A study on DNA damage and mutations induced by 3-nitrobenzanthrone (3-ニトロベンズアントロンによるDNA損傷と突然変異の研究)」
論文審査委員	主査 八木 孝司 副査 森 展子 副査 児玉 靖司

## 論文要旨

### 第1章 序論

突然変異や発がんは内的・外的さまざまな要因によってひきおこされる。これらの要因の1つにニトロ多環芳香族炭化水素(nitrated-PAH)等の大気汚染物質によるDNA損傷、すなわちDNA塩基付加体が挙げられる。生体は細胞死やがん化を回避するため、DNA損傷に対応する修復系を備えている。しかし、何らかの要因でDNA修復系をすり抜け、損傷を保持したままDNA複製が開始された場合、複製フォークの進行は阻害される。近年、これらの損傷に対する生体の防御機構として、損傷乗り越えDNA合成(Translesion DNA Synthesis; TLS)の存在が明らかになり、それに関わる一群のDNAポリメラーゼ(TLS型ポリメラーゼ)が相次いで発見された。TLSは、細胞にとって致命的な複製フォークの停止よりも、忠実度を犠牲にしてDNA合成を優先、進行させる機構であり、TLS型ポリメラーゼはしばしばerror-proneである。DNA損傷による突然変異の種類や誘発機構、TLS、それに関わるDNAポリメラーゼは、損傷ごとに大きく異なる。しかし、現在のTLSに関する知見は、少数の主要なモデル損傷でしか明らかにされていない。環境汚染物質の発がん機構を解明するためには、多種多様な物質を個々に研究することが重要である。とりわけ、未知の部分が数多く残されているTLS機構の全容解明には、個々の環境汚染物質による損傷DNAを用いた研究が役立つ。

本研究では、ディーゼル排気微粒子等に含まれるニトロ芳香族ケトン、3-ニトロベンズアントロン(3-nitrobenzanthrone;3-NBA)に着目した。3-NBAは1997年、Ames試験において強力な変異原性を示す物質として初めて報告された。その変異原性は既知化合物で最強の1,8-dinitropyreneに匹敵する。その後DNA鎖切断活性、小核誘導能といった遺伝毒性や、*in vitro*・*in vivo*両方でDNA付加体を形成すること、ラットに対する発がん性をもつこと等が明らかにされた。それゆえ3-NBAはヒトに対して発がん性をもつことが疑われている。Nitrated-PAHは体内に取り込まれると様々な酵素による代謝活性化を受け、DNA塩基と共有結合する。この結合は窒素原子と炭素原子の結合(N-C結合)であることが多い。ところが興味深いことに、3-NBA由来の塩基付加体のうち、dG付加体の1つはC-C結合という稀なものであった。また、3-NBAは結合様式・結合塩基の異なる様々な塩基付加体を生じる。現在までに構造決定されている付加体は実に12種に及ぶ。

このように 3-NBA の DNA 損傷に関する研究や、代謝活性化に関わる生体酵素からアプローチした研究も多い。しかしながら 3-NBA 由来 DNA 損傷の修復や突然変異に関する研究は少ない。そこで本学位論文では 3-NBA の突然変異誘発機構を明らかにすることを目的に、3-NBA の活性中間体 *N*-acetoxy-3-aminobenzanthrone (*N*-Aco-ABA) を用いて、大腸菌やヒト細胞を対象に以下の研究を行った。本学位論文が明らかにしようとするのは、多種の 3-NBA 由来塩基付加体の化学構造と、突然変異誘発能の関係である。

## 第 2 章 Polymerase stop assay

3-NBA が付加体を形成する部位を明らかにするため *in vitro* polymerase stop assay を行った。突然変異解析の標的である *supF* 遺伝子を持つプラスミド pMY189 と *N*-Aco-ABA を試験管内で直接反応させ、プラスミド上にランダムに付加体を形成した。続いて、放射性標識したプライマーを用いて、*supF* 領域を PCR 用 DNA ポリメラーゼに複製させた。DNA 付加体が存在するとその部位で伸長反応が停止する。ポリアクリルアミドゲル電気泳動とオートラジオグラフィーを行うことで停止位置をバンドとして検出し、付加体生成部位を決定した。その結果、ポリメラーゼ伸長反応はほとんど (92%) がグアニンで停止していた。このことから *N*-Aco-ABA は主にグアニン付加体を形成することが示唆された。

## 第 3 章 Mutation assay

*N*-Aco-ABA がヒト細胞において誘発する突然変異を、前章で用いたプラスミドを用いて調べた。すなわち *N*-Aco-ABA と反応させた pMY189 をヒト培養細胞株に導入し複製させ、娘プラスミドを回収し解析した。また、一般に PAH による大きな DNA 付加体はヌクレオチド除去修復機構 (NER) で修復される。そこで、突然変異誘発に対する NER の関与を調べるため NER 欠損ヒト細胞でもプラスミドを複製させた。その結果、いずれの細胞でも *N*-Aco-ABA の濃度依存的に *supF* 遺伝子の突然変異頻度は上昇し、プラスミドの複製率は低下した。NER 欠損株でその傾向がより強くみられたことから *N*-Aco-ABA 由来の DNA 付加体も NER で修復されることが示唆された。突然変異の内訳は、両細胞共に塩基置換型変異が大多数を占めた。この変異の多くが G:C 箇所で行われており、第 2 章で明らかにした *N*-Aco-ABA が主としてグアニン付加体を形成するという結果と矛盾しない。突然変異の起こりやすいホットスポットが数カ所見つかつたが、これは付加体生成部位とはあまり一致しなかつた。また NER 欠損株では A:T 箇所での変異が正常細胞に対して優位に多かつた。このことはアデニン付加体が、グアニン付加体と比べ NER による修復を受けやすい可能性を示している。第 2 章の結果からアデニン付加体生成量はきわめて少ないと考えられる。しかし NER 欠損株では A:T 箇所でも多くの変異を確認した。これは、アデニン付加体 1 分子あたりの突然変異誘発能がグアニン付加体より高い可能性を示唆している。

## 第 4 章 TLS assay

前章で、付加体毎に突然変異誘発能が異なることが示唆された。そこで部位特異的に一箇所のみ特定の付加体をもつ持つプラスミドを作製し、これを大腸菌に複製させることで付加体 1 分子あたりの突然変異誘発能や TLS 頻度を付加体間で比較した。本章では、*N*-Aco-ABA に由来するアデニン付加体 1 種、グアニン付加体 3 種を部位特異的に 1 つだけ持つプラスミド、すなわち dA-*N*<sup>6</sup>-ABA, dG-C8-C2-ABA, dG-C8-*N*-ABA, dG-*N*<sup>2</sup>-ABA をもつ 4 種のプラスミドを作製した。まずこれらプラスミドを大腸菌内で複製させ、TLS 割合を算出した。その結果、dA-*N*<sup>6</sup>-ABA は DNA 合成をほとんど阻害しないことがわかつた。dG-C8-*N*-ABA は DNA 合成を若干阻害した。dG-*N*<sup>2</sup>-ABA と dG-C8-C2-ABA は DNA 複製を強力に阻害した。これらのことは *N*-Aco-ABA の付加する塩基や、付加体の結合様式の違いが TLS に影響することを示している。

次に、TLS に関わる各種ポリメラーゼを欠損した大腸菌を用いて、これら付加体を乗り越えて複製するポリメラーゼの特定を試みた。大腸菌では通常 Pol I, Pol III が発現しており、

SOS応答誘導時にTLS型ポリメラーゼ (Pol II, Pol IV, Pol V) が発現する。dA-N<sup>6</sup>-ABA, dG-C8-N-ABA, dG-C8-C2-ABA付加体のTLSは、単一のDNAポリメラーゼが行うのではなく、いくつかのポリメラーゼが行う可能性を示唆する結果が得られた。すなわちdA-N<sup>6</sup>-ABA付加体のTLSには複製型のPol I, IIIの関与が、dG-C8-N-ABA, dG-C8-C2-ABA付加体はTLS型のPol II, IV, Vの関与が示唆された。dG-N<sup>6</sup>-ABA付加体は、Pol IV, V二つのポリメラーゼの関与が示唆された。しかしながらdG-N<sup>6</sup>-ABAはSOS応答誘導条件下でもほとんどTLSされないことがわかった。

続いて、各付加体につき 96 個の複製プラスミドの塩基配列を解析しTLSしたプラスミドの突然変異率を算出した。解析結果は、dG-C8-N-ABAはG→Tの塩基置換型突然変異を1つのみ、dA-N<sup>6</sup>-ABA, dG-C8-C2-ABAについては突然変異を誘発しないことがわかった。前章の結果は、dA付加体の突然変異誘発能が高い可能性を示していたがそれを裏付けることはできなかった。一方、dG-N<sup>6</sup>-ABAの突然変異率は他の付加体とは異なり 13%と高かった。また、そのうちの多くがG→Tトランスポージョンであり、大腸菌とヒト細胞の違いはあるが、3章の結果を支持する結果となった。dG-N<sup>6</sup>-ABAはSOS応答誘導時でもほとんどTLSされない。したがってこの付加体は、TLSされないばかりか、運良くTLSされても高い確率で変異を誘発すると考えられる。3-NBAによる変異誘発に占めるこの付加体の寄与度は大きいと考えられる。

## 第5章 総括

本研究により、大気汚染物質 3-NBAが誘発する突然変異の生成機構の詳細が明らかとなった。すなわち、①3-NBAは主にDNAのグアニン塩基と付加体を形成し、それがG→Tのトランスポージョンをひきおこすこと、②これらの付加体はNERにより修復されること、③付加体によってDNA複製効率が異なること、④形成するグアニン付加体のうち、dG-N<sup>6</sup>-ABAが突然変異に対する寄与度の高い付加体であること、⑤dG-N<sup>6</sup>-ABAは*E. coli* Pol IV, VでTLSされること、である。③④⑤については、大腸菌での結果であるが、ヒト細胞を用いた同様の解析が望まれる。今後これらの結果と、ヒト細胞で実際に形成される付加体個々の生成量やその修復効率とを、総合的に評価することで、NBAによる発がん機構の詳細が明らかになることが期待される。

## 審査結果の要旨

学位論文審査委員は申請者より提出された学位申請論文を検討し、その内容が最新の分子生物学的手法を用いた、質・量共にレベルの高い優れた研究であると判断した。さらに2009年2月23日に、論文内容についての公聴会を開催し、質疑応答を約30分行なった。申請内容について審議を行なった結果、博士の学位を授与するに値すると最終的に判断した。

本研究は、都市大気中に含まれる新規物質 3-ニトロベンズアントロン (3-NBA) によるヒト細胞における突然変異の性質を調べ、さらに大腸菌を用いて種々の3-NBA付加体ごとの突然変異頻度を求め、突然変異を生じさせる損傷乗り越え (TLS) DNAポリメラーゼの同定を試みたものである。3-NBAによるヒト細胞の突然変異の研究は世界で初めてであり、本研究の意義は大きい。大腸菌を用いた研究には時間がかかる緻密な方法が使われている。本研究により、ヒト細胞と大腸菌の突然変異機構には一致しない点が多いことがわかり、今後の更なる研究の発展性を示した。本研究の一部はすでに国際誌である *Genes and Environment* と *Mutation Research* に掲載され、さらに残りの部分は投稿準備中である。

本論文は博士の学位を与えるに足る高い内容であると判断した。