

環境汚染に適応するヒトの進化機能

Evolutionary function adaptable to environmental contamination in human

研究代表者 千葉大学大学院医学研究院環境影響生化学 教授 鈴木信夫
Professor, Department of Environmental Biochemistry,
Graduate School of Medicine, Chiba University

和文アブストラクト

ヒト血清の変異誘導活性が生活習慣や住宅環境により変動を受けるか否か調査した。97名の健康人ボランティア中16名の血清で、血清処理あるいは血清処理後に紫外線照射した培養ヒト細胞におけるK-ras コドンの塩基置換変異の誘導が確認された。50歳代と70歳代のボランティアの血清でこの変異誘導活性が高かった。その要因として、コーヒー飲用の嗜好、日本茶飲用量の低下、変異原活性を示す飲用水の飲用、および喫煙が関わることを示唆された。また、シャペロン分子であるGRP78の発現量の低下が変異誘導に関わることは見出された。従って、GRP78を指標とし、飲用物と喫煙などの生活習慣を配慮した変異誘導調節活性の更なる調査が、日本人のがん化や老化の防止策に有用であることが示唆された。

Abstract

It is an intriguing problem whether living environments modulate the activity of human blood serum to enhance or suppress UV-induced mutagenicity in cultured cells. In the present study, we examined the modulating activity of serum from 97 healthy volunteers with and without habitual smoking, using a highly sensitive method to detect K-ras codon12 mutation. Drinking water and/or beverages were found to affect the enhanced activity. On the other hand, GRP78 was suggested to be involved in the suppression activity. Thus, our results suggest that cell mutability in a human body may be regulated by serum factors, possibly via chaperones.

1. 研究目的

ヒト遺伝子の塩基配列保持(情報保持)の不安定性は老化、癌化、各種の生活習慣病などの多因子疾患に関連し、そのメカニズムの解明が希求されている。私共は、遺伝子情報保持に必要な個体レベルでの新規の生理機能を見出している。この生理機能とは、ヒト個体において、遺伝子の変異が誘導される際、血清中のサイトカイン様因子により環境中の変異原因子曝露前に誘導の有り無しがあらかじめ調節されているというものである。ヒトの精神的あるいは肉体的ストレス状態
サイトカイン様血清因子 プロテアーゼの活性化 シャペロン分子などの細胞内タンパク質の統制 DNA 修復などの核酸代謝に關与する遺伝子の情報発現 変異誘導の調節という仮説である。本研究では、健康人がこのような生理機能を種々の環境下でどのように発揮しているか、誘導の抑制と促進どちらのレベルが高いか、それとも、両者のバランスはとれているかを明らかにし、調節活性の変動に大きな要因となる環境内容や生活習慣を推定することとした。

2. 研究経過

2.1 血清サンプルの採取と変異誘導調節活性の測定

血液サンプルの採取は、下記(A)の地域で健康講座などを開催してボランティアを集め行った。その際、下記(B)の項目に関するアンケート調査も同時に行った。本採取については、千葉大学大学院医学研究院倫理審査(No.128)で承認され実施した。

(A) 採血地域：北海道空知郡、秋田県仙北郡、埼玉県岡部町、東京都江東区、千葉県松戸市および千葉市、長野県梓川村、岐阜県土岐市、富山県富山市。

(B) アンケート調査項目：性別、生年月日、身長・体重、家族歴、居住歴、職歴、喫煙歴、運動量、睡眠時間、病歴、薬の服用歴、居住地域の環境、居住建造物(シックハウス)、飲用水、採血前日と当日の食事内容、食生活習慣(嗜好飲料、栄養補助食品、有機栽培食品、肉・肉加工品、魚・練り製品、卵、豆・豆製品、牛乳、海藻、緑黄色野菜、果物、芋類、ナッツ類、ご

ま、漬物、等々の平均摂取量)、ダイエットの試行歴。

血清および血清成分分画の画分液による変異誘導を調節する活性レベルの測定は、変異誘導作用を高感度で検出可能とする細胞株であるヒト RS 細胞を用いた。この細胞の培養液中へ血清あるいは画分液を 1/100 量の割合で添加し、その後、細胞に紫外線照射し、引き続き変異誘導の頻度を測定した。血清成分の分画については、Blue B カラムクロマトグラフィー法により行った。変異の検出法は、細胞から DNA を抽出し、K-ras コドン 12 の塩基置換変異を PCR-based differential dot-blot hybridization 法と Peptide nucleic acid (PNA) クランピング法により行った。

2.2 変異誘導調節に関わる除去修復能、およびシャペロンタンパク質とその遺伝子の発現解析

チミンダイマー除去活性の測定法は、チミンダイマーに対する特異抗体を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で解析した。

タンパク質については、血清あるいは血清成分処理細胞を溶解液で処理し、ウェスタンブロット法で検出した。

遺伝子については、ノーザンブロット法により発現レベルを解析し、一方、アンチセンスオリゴ法で機能阻害実験を行った。

2.3 飲料物の農薬含有量の測定と飲料水サンプルの前処理

試飲用飲料物(コーヒー、日本茶)の農薬含有量を厚生省食品化学課残留農薬簡易分析法開発委員会「一斉分析法 1994 年」に基づき測定した。43 種の農薬に関して定量下限値未満のものを試飲用に供した。

飲料水のサンプル採取：上記の採血地域で採取した水道水、井戸水、およびそれらの比較としての河川水を使用した。

水サンプルの前処理法：1)濃縮しないサンプルを調査する場合は、未濃縮の各水サンプルに細胞培養用の粉末培地を溶かして、その溶解液を無菌処理したものを細胞培養液として使用した。2)濃縮サンプルを調整する場合は、水サンプル中の有機化合物を Oasis HLB

カラムクロマトグラフィー法で濃縮した。

2.4 血清サンプルの変異誘導調節活性に関する調査結果

ボランティア 97 名中血清処理のみで変異誘導活性の見られたものが 13 名、紫外線照射を加えると変異誘導の見られたものが 12 名あった (Fig.1 で示す例に従い判定した)。この変異誘導に関わる活性が見られる症例(変異陽性症例)の要因検索を、アンケート調査結果との照合により行った。変異陽性症例に連動した項目は、嗜好飲料であった。コーヒー嗜好については、14 名のコーヒー嗜好例中 5 名(36%)が変異陽性症例であり、非嗜好例の 18 名中 3 名(17%)より高頻度であった。一方、日本茶の飲用習慣者 28 名中 7 名(25%)が変異陽性症例であった。その陽性症例の日本茶摂取量が 1 週間あたり 20 杯以下であるのに比し、陰性症例では 33 杯以上と多かった。

さらに、コーヒーと日本茶の飲用効果の有無を明らかにするため、飲用 30 分前と 1 時間後に摂取した血清における変異誘導活性を調査した。コーヒー飲用者 5 名中 2 名で、飲用後の血清による変異誘導の陽性化が見られた。一方、日本茶飲用者 6 名中 2 名で飲用後変異誘導の陰性化が見られた。

地域別に関する調査では、変異陽性症例数の多い 2 地域(8 例と 4 例)が認められた。年齢別に関する調査では、高年齢の変異陽性症例が多かった。地域別に、変異陽性症例の割合が 50% 以上を示した年代は、北海道空知郡で 70 歳代、および長野県梓川村で 50 歳代であった。なお、3 家族に関して、3 世代に渡っての血液サンプルを得たが、2 例以上変異陽性を示す家族は存在しなかった。

紫外線照射により産生するチミンダイマーの除去活性を変動させる血清が存在するか否か、変異陽性症例が多く見られた地域の 10 例について検討したところ、2 例で除去レベルの低下が認められた。一方、変異陽性者 1 例の飲用水(井戸水)の濃縮サンプルを、濃縮前のサンプル容量に換算して 10 倍量を加えた場合、変異誘導活性が検出された。

喫煙歴の有無が判明した 86 例の血清の解析結果を Table 1 にまとめた。喫煙者 33 名中 8 名(24%)で変異誘導(Fig. 1 の 2)が、5 名(15%)で紫外線による変異誘導促進(Fig. 1 の 1)が、3 名(9.1%)で紫外線による変異誘導の抑制(Fig. 1 の 4)が見られた。非喫煙者 53 名では、

変異誘導各々 5 名 (9.4%)、7 名(13%)、1 名 (1.9%)であった。

Table 1
Number of cases with and without serum containing mutation modulation activity.

Cases (Number tested)	Undetectable mutation	Detectable mutation	Enhancement of mutation	Suppression of mutation
Smokers (33)	17	8	5	3
Non-smokers(53)	40	5	7	1

最近の我々の研究成果から、小胞体ストレスタンパク質 GRP78 が、変異に防御的に作用していること、およびニコチンがアポトーシスを誘導しその誘導に HSP90 が関わることを示唆されている。そこで、喫煙者の血清による変異の発生の抑制メカニズムを明らかにするため、変異誘導活性が見られなかった重喫煙者の血清の画分液で処理した細胞の GRP78 と HSP90 の発現量を調べた。GRP78 の発現量については、4 番目の血清画分液処理による増大化が見られた (Fig.2)。なお、別のシャペロン分子である HSP27 の発現量には、差は見られなかった。

次に、GRP78 遺伝子の機能阻害実験により、GRP78 の変異抑制作用を明らかにすることとした。GRP78 のアンチセンス処理細胞では、GRP78 タンパクの発現量がオリゴヌクレオチド無処理 (Mock) の場合の 20% 以下に減少し (Fig.3)、このアンチセンス処理細胞では、紫外線照射による変異誘導が見られた (Fig.4)。ランダムオリゴ処理細胞では、80% 程度の発現量の減少を示したが (Fig.3)、変異誘導は見られなかった (Fig.4)。従って、GRP78 による変異発生の抑制作用が強く示唆された。

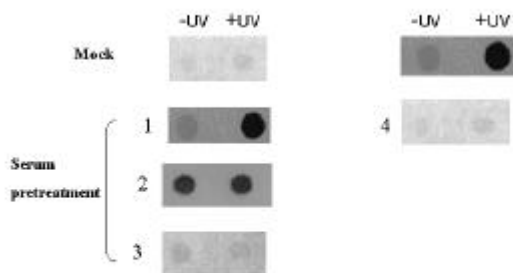


Fig. 1 Activity of serum to enhance or suppress UV-mutagenicity in human RS cells pretreated with the serum and then irradiated with UV. 1, Enhancement activity; 2, Mutagenic activity of serum itself; 3, Non activity; 4, Suppression activity.

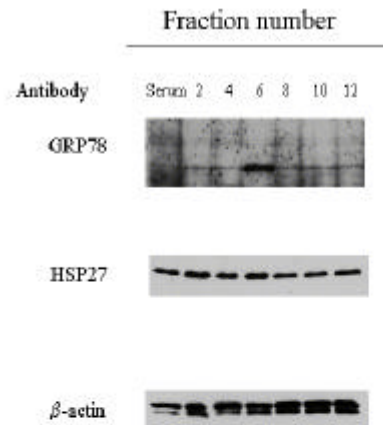


Fig.2 Expression profiles of chaperons in RS cells after treatment with serum and serum fractions.

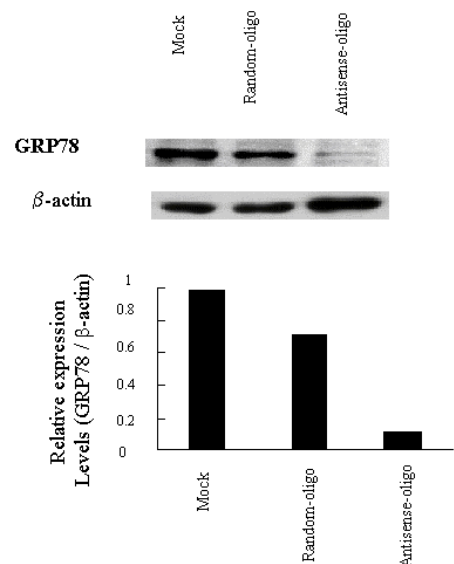


Fig.3 Expression levels of GRP78 in the oligonucleotides-treated RS cells.

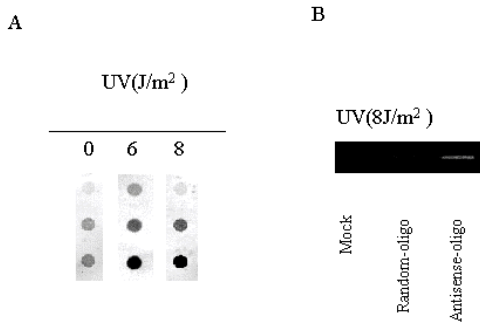


Fig.4 Analysis of K-ras codon 12 mutations in oligonucleotides-treated RS cells by Dot-blot (A) and PNA-mediated clamping (B).

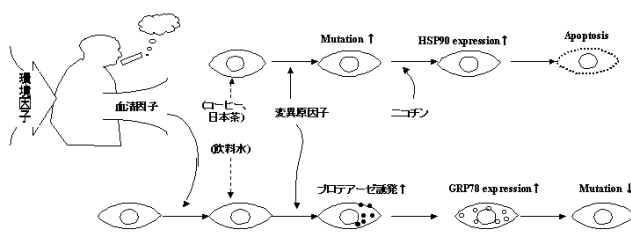
2. 5 まとめ

ヒト血清による変異の発生を高める要因としてコーヒーや日本茶などの飲用物の嗜好性ないし摂取飲料水が予測され、抑える要因としてGRP78 シャペロンの発現が関わることが示唆された。

3. 研究成果

従来知見も加え図式化すると次のようにまとめられるが、ヒトにおける変異発生を調節する生理メカニズムは、生活習慣や環境条件に対応していることが判明した。

これまでの研究成果から予測される
遺伝子変異の発生を抑制する分子生理メカニズム



4. 今後の課題と発展

今回は、東日本ないし北日本を解析し変異誘導活性レベルの高い年代層を有する地域特異性を見出したことから、西日本ないし南日本の調査をする必要性がでてきた。調査方法については、手間ひまのかかる変異の直接測定から、GRP78を標的とした測定法を開発する必要がある。GRP78のアンチセンスDNAを導入し、GRP78タンパク質の細胞内発現レベルを抑制した培養ヒト細胞を樹立開発したので、超高感度変異誘導細胞として活用したい。次なる研究基盤が得られた際、変異誘導調節に関わる飲料水と試行飲料物の作用を明確にするなど、研究の進展を試みたい。なお、変異原性を示したボランティアの生活圏の飲料水については、可能な限り、遺伝子毒性の調査を続行し変異原性の原因を究明したい。また、可能となれば、SARS ウイルス変異が叫ばれている中国本土での調査へと発展させる必要がある。

5. 発表論文リスト(本助成に関する謝辞入り論文)

- Kita K., Sugaya S., Zhai L., Wu YP., Wano C., Chigira S., Nomura J., Takahashi S., Ichinose M., Suzuki N. Involvement of Leu-13 in interferon-induced refractoriness of human RSa cells to X-ray cell killing. Radiat. Res. (in press)
- Hasegawa R., Kita K., Hasegawa R., Fusejima K., Fukuzawa S., Wano C., Watanabe S., Saisho H., Masuda Y., Nomura F., Suzuki N. Induction of apoptosis and ubiquitin hydrolase gene expression by human serum factors in the early phase of acute myocardial infarction. (2003) J. Lab. Clin. Med. 141, 168-178
- Wu Y-P., Kita K., Suzuki N. Involvement of human heat shock protein 90a in nicotine-induced apoptosis. (2002) Int. J. Cancer 100, 37-42
- Nomura J., Himeda J., Chen Z., Sugaya S., Takahashi S., Kita K., Ichinose M., Suzuki N. Establishment and characterization of GSA-1, a Human Cell Line Highly Susceptible to Apoptosis after Free-fall. (2002) J. Rad. Res. 43:Suppl., S251-S255
- Moriya T., Kita K., Sugaya S., Wano C., Suzuki N. Enhanced expression of the LDH-A gene after gravity-changing stress in human RSa cells. (2002) Biol. Sci. Space 16, 12-17
- Arase Y., Sugita K., Hiwasa T., Shirasawa H., Agematsu K., Ito H., Suzuki N. (2002) Effects of increased telomerase activity on radiosensitive human SCID cells. Int. Congress Series 1236, 335-339