

発がん性N-ニトロソアミンの近紫外光による活性化と誘起される変異の解析

Analysis of mutations induced by *N*-nitrosoamine and near ultraviolet light irradiation

代表研究者 岡山大学薬学部助手

有元 佐賀 恵

Research associate, Faculty of pharmaceutical Sciences, Okayama University.
Sakae Arimoto

Previously we reported that a direct-acting mutagen can be formed from *N*-nitrosomorpholine (NMOR) on exposure to near-ultraviolet light (UVA, 320-400 nm). We have now studied the spectrum of mutations caused by NMOR plus UVA. M13mp2 phage suspended in a sodium phosphate buffer was treated with NMOR under UVA-irradiation and *E. coli* NR9099 was then infected with the phage. Mutations induced in the phage DNA *lacZα* region were analyzed. The majority (~50%) of the induced sequence changes were G to T transversions. This suggested that modifications in guanine residues were responsible for these transversions. We explored the formation of 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxodG) in the DNA. When the phage was treated with NMOR plus UVA, 8-oxodG/dG in DNA increased up to 12 fold over the value in untreated control. When a *mutM*-deficient mutant of *E. coli* CSH50 was used as the host, the mutation level was higher than that observed with CSH50. We conclude that 8-oxodG may be involved in mutations induced by NMOR plus UVA.

研究目的

これまで、太陽光線あるいは近紫外光(UVC,UVB及びUVA)単独による発がん性や変異原性については調べられてきた。また、環境中、特に食品や煙草の煙に多数のニトロソアミンの存在が報告されており、これらは肝臓の代謝酵素により活性化されて発がん性や変異原性を示すとされてきた。しかし、近紫外光とニトロソアミンの両者が共存した場合の複合的な効果については、これまで調べられていなかった。現実の環境中には両者が同時に存在しており、近紫外光は皮膚内部の毛細血管まで透過することが知られていることから、相互作用による新たな効果が生まれる可能性がある。

これまでに研究者は、近紫外光(UVA)照射によりジアルキルニトロサミン類がリン酸水溶液中で活性化されて、直接変異原物質にかかわるのを見い出した。また、活性化体がニトロソアミンの α -ヒドロキシ体のリン酸エステルと同定した。

この光活性化反応において、いかなる突然変異が引き起こされるのか、その詳細は不明である。そこでニトロソアミンの一

つ、*N*-ニトロソモルホリン(NMOR)を取り上げて研究することとした。すなわち、ファージM13mp2をNMOR+UVA処理して突然変異をおこさせ、DNA塩基配列変化を調べ、どのような突然変異を引き起こしているか調べる。また、SOS修復系や8-ヒドロキシグアニン(8-oxoG)修復系の欠損株を宿主に用いて、DNA修復の関与についても調べる。さらに、光反応過程において、活性ラジカルが関与していると考えられるので、詳細に検討すると共に、生成する酸化的損傷についても調べることを目的とした。

研究経過

突然変異の検出は次の方法によった。ファージM13mp2(一本鎖DNAファージ)及びNMORのリン酸緩衝溶液をプラスチックプレートに入れ、UVA照射した。この時、光源とプレートの間には軟質ガラスを置いてUVB領域以下(320 nm以下)の短波長の光をカットした。液面でのUVA強度は6 W/m²であった。同じ測定装置により直射日光中のUVAを計ったところ、15 - 25 W/m²であったので、実験したUVA条件は日常ありうる

強度と思われる。処理したファージを一部取り、宿主大腸菌に感染させて生じるプラークを観察した。ここで用いた宿主大腸菌はβ-ガラクトシダーゼのN末端の11番目から41番目までのアミノ酸に対応するコドンが欠失した*lacZ*遺伝子を有するので、不完全なβ-ガラクトシダーゼを発現する。

M13mp2ファージはDNA中に大腸菌のラクトースオペロンの一部(*lacZα*領域)を含んでおり、宿主大腸菌に感染後、β-ガラクトシダーゼのN末端の7番目から145番目までの正常なアミノ酸配列を持つペプチドを発現するので、この二つが同じ細胞内に共存することによりβ-ガラクトシダーゼ活性が再構成される。従って、突然変異が起こらなければβ-ガラクトシダーゼが培地中の5-

bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactose (X-gal)を分解し青色のプラークが生じるが、ファージの*lacZα*領域に突然変異の生じた変異体はβ-ガラクトシダーゼ活性が完全には再構成されないため、うす青または無色のプラークを生じる(Kunkel, 1985)。生じたプラーク総数を数えて無処理群と比較し、ファージの生存率を計算した。また、総プラーク数に対する突然変異プラークの割合から突然変異率を求めた。さらに、生じた突然変異ファージの*LacZα* geneの塩基配列変化を調べて、いかなる突然変異を誘起するかを解析した。

さらに、突然変異いたる機構解明のため、まずDNAの酸化的障害の可能性を調べた。酸化的障害の代表として、DNA中の8-oxoG生成を定量した。さらに、ファージM13mp2の宿主大腸菌から8-oxoG修復酵素である8-oxoGグリコシラーゼ遺伝子(*mutM* gene)を欠損させた株を作成した。この大腸菌にNMOR+UVA処理したファージを感染させ、突然変異率がどう変化するかを調べることにより、突然変異誘起におけるDNAの酸化的障害の関与を調べた。

研究成果

(1) NMOR+UVA処理により、NMOR用量ならびにUVA照射時間に依存して、ファージ

の生存率が減少し、突然変異率が上昇した。突然変異プラーク126個の*LacZα* 遺伝子の塩基配列を解析したところ、うち50個の変異体の塩基配列変化を検出した (Table I)。そのうち42個(92%)が塩基1個の置換であり、支配的であった。また、塩基置換のうち65%がG残基の置換で、24%がC残基の置換であった。G残基の置換のうちのほとんど(87%)はGからTへのtransversionであった。突然変異の起こりやすいホットスポットが2箇所みられ、いずれもGが2つ並んだ箇所であった。従って、G残基の修飾による突然変異が最も多いことが分かった。コントロールとして、UVA照射のみの場合も調べたが、ファージの生存率は低下せず、突然変異率も上昇しなかった。また、塩基配列変化にも特に特徴は見られず、ホットスポットも見られなかった。

Table I. 'NMOR + UVA' and 'UVA-alone' induced mutations in M13mp2^{a)}

Class of mutation	Mutants found	
	NMOR plus UVA	UVA
Base substitution		
Transversion		
G to T	26	8
C to A	2	0
G to C	2	4
A to C	0	1
Transition		
C to T	9	4
T to C	2	0
A to G	3	1
G to A	2	1
Insertion	1	0
Deletion	3	4
Total	50	23

a) NMOR was 36 mM, and UVA irradiation was for 2 hr. The host for phage was *E. coli* NR9099.

(2) NMOR+UVA処理したファージからDNAを抽出し、8-oxoG量を測定したところ、無処理と比べ5.8倍の8-oxoGが生じていることがわかった (Table II)。NMOR単独あるいはUVA単独処理では8-oxoG量はわずかし

昇しなかったので、NMOR+UVAの共同作用による光反応により生じたものと考えられる。同様に、突然変異率もNMOR+UVA処理したファージは無処理の5.9倍の変異率を示し、NMOR単独またはUVA単独処理では変異率は上昇しなかった。このデータから、NMOR+UVA処理によるDNA中の8-oxoG生成と突然変異誘起との間に関連があることが分かった。

Table II. Formation of 8-oxodG in DNA, and effect of D₂O on mutation frequency of phage M13mp2

	8-oxodG/10 ⁴ dG ^{a)}	Mutation frequency (x10 ⁻⁴) ^{b)}	
		in H ₂ O	in D ₂ O
Untreated	1.6	2.4	3.1
NMOR plus UVA	18.6	14.1	11.2
NMOR only	1.9	3.4	3.8
UVA only	2.2	3.6	4.3

a) Phage M13mp2 was suspended in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 36 mM NMOR. UVA irradiation was performed for 3 hr.

b) UVA irradiation was for 2 hr.

(3) NMOR+UVA処理による8-oxoG生成と突然変異誘起との関係をより明らかにするために、宿主大腸菌から8-oxoG修復酵素であるmutMタンパクを欠損したmutM変異株をP1トランスダクション法により作成し、MF67と名付けた。大腸菌MF67がmutM遺伝子を欠損していることを次の方法で確かめた。MF67、親株でmutM活性を持つCSH50, NR9099ならびにmutM欠損の供与菌YG5113の細胞抽出液を取り、8-oxoGを含む21-merのオリゴヌクレオチドとインキュベートしたところ、wildのCSH50とNR9099では8-oxoG部位でヌクレオチドを切断して10-merの断片を生じたが、mutM欠損のMF67とYG5113では、切断しなかった (Figure 1)。

(4) 宿主大腸菌にMF67を用て、NMOR+UVA

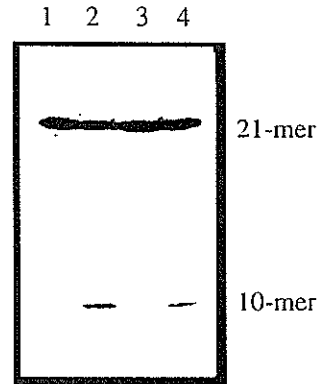


Fig. 1. The 8-oxoG DNA glycosylase assay for *E. coli* cell extracts. The assays were done with a duplex 21-mer oligonucleotide containing an 8-oxoG/C base-pair. Then formation of a 10-mer is the indication of the glycosylase activity. (Lane 1: MF67 (*mutM*), lane 2: NR9099 (wild), lane 3: YG5113 (*mutM*), lane 4: CSH50 (wild))

処理したM13mp2ファージの突然変異率を調べたところ、野生株を宿主としたときの約2倍に上昇した (Table III)。従って、この光反応による突然変異誘起の機構の一つとして、DNAへ酸化的障害が関与していることが分かった。

ニトロソピロリジンの酵素代謝による突然変異誘起については、大腸菌の*lacI*領域において主に、GCからATへのtransitionを起こすことが報告されている (Zielenskaら, 1990)が、今回のNMOR+UVAの光反応ではGCからTAへのtransversionがほとんどであり、反応機構ならびに反応分子種が異なると思われる結果を得た。一方、DNA中の

Table III. Mutation frequency of phage M13mp2 with different *E. coli* hosts

Host strain (E. coli)	Mutation frequency of M13mp2 (x10 ⁻⁴) ^{a)}	
	Untreated	NMOR plus UVA
MF67 (<i>mutM</i>)	3.5	24.4
NR9099 (wild)	3.9	13.8
CSH50 (wild)	3.8	13.4

a) Phage M13mp2 was suspended in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 36 mM NMOR. UVA irradiation was for 2 hr.

8-oxoGは、誤対合によりGCからTAへの transversion を起こすことが報告されており (Woodら, 1990)、NMOR+UVAにより8-oxoGがDNA中に生成し、突然変異率が上昇すること、GCからTAへの変異が主に生じることと符合している。

(5) これまでにメチレンブルーの光反応により、DNA中に8-oxoGが生成すること、その反応に活性酸素種の一つである一重項酸素の関与していることが報告されている (Macbrideら, 1992)。もし我々の光反応にも一重項酸素が関与しているなら、重水中で一重項酸素の寿命が約2倍に延びることが知られているので、突然変異率の上昇が期待される。しかし、Table II に示したように、重水中でも突然変異率は上昇せず、むしろ減少したので、一重項酸素の関与は考えにくい。

しかしながら、光反応中にN₂ガスを通気すると、ファージの生存率が回復し、突然変異率はコントロールレベル近くまで減少することがわかった (Table IV)。

Table IV. Effect of N₂ bubbling on the survival and mutation of M13mp2 treated with NMOR + UVA^{a)}

Host	Phage survival (%)		
	Untreated	NMOR + UVA	NMOR + UVA with N ₂ bubbling
CSH50	100	1.8	20
MF67	100	1.6	18

Host	Mutation frequency (x 10 ⁻⁴)		
	Untreated	NMOR + UVA	NMOR + UVA with N ₂ bubbling
CSH50	3.8	13.4	5.6
MF67	3.4	20.0	5.0

a) Conditions for phage treatment were the same as those given in Table III.

従って、溶存酸素が光反応に必要と考えられるので、なんらかの活性酸素種が関与していると思われる。また、スピントラップ

法によりESR測定したところ、シグナルを観察したがラジカル種の同定には至らなかった。

今後の課題と発展

今後の課題として、DNAに酸化的障害を及ぼす光反応生成物を同定することが挙げられる。また、酸化的障害以外のDNA障害、特に、アルキル化が関与しているかどうかを明らかにしたい。ニトロサミンの酵素代謝による活性化ではG残基のアルキル化が報告されており、光反応によっても起きている可能性がある。もしアルキル化が起きているならば、いかなる修飾塩基が生じているのか、酵素代謝と同じかどうかも含めて、明らかにしたい。今回はNMORに的を絞って研究したが、これ以外のニトロサミンについても同様の光反応についての研究を進めたい。

今後の発展として、培養細胞系などのより複雑かつ高等動物に近い系におけるニトロサミンとUVAの共同反応による細胞毒性および変異原性についても追及したい。また、ニトロサミン以外の変異原についても光活性化が起こりうると考えられるので追及したい。

発表論文リスト

- 1) Fujiwara, M., Honda, Y., Inoue, H., Hayatsu, H. and Arimoto, S. Mutations and oxidative DNA-damage in phage M13mp2 exposed to N-nitrosomorpholine plus near-ultraviolet light. 投稿中
- 2) Arimoto, S., Fujiwara, M., Honda, Y., Negishi, K. and Hayatsu, H. (1995) Mutation and DNA damage in M13mp2 phage exposed to ultraviolet-A in the Presence of N-nitrosomorpholine. *Abstract of the 6th Congress of the European Society for Photobiology.* 第6回ヨーロッパ光生物学会(1995年9月2日-10日イギリス、ケンブリッジ大学にて開催)に研究代表者(有元佐賀恵)が発表予定である。
- 3) 藤原美穂、有元佐賀恵、小野哲義、根岸和雄、早津彦哉. (1994) 発がん性ニトロサミンの近紫外光照射により引き起こされるM13ファージの突然変異における、酸化的DNA障害の関与。日本癌学会第53回総会(名古屋)講演要旨集、pp. 56。