道衛研所報 Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health, 59, 85-89 (2009)

ラット肝S9フラクション(S9)とヒトシトクロームP450 1A1(CYP1A1)にて活性化した多環式芳香族炭化水素類により処理されたpUC19-*lacZ*C[141] DNAの標的塩基配列における突然変異について

Mutations on the Target Nucleotide Sequences in pUC19-*lacZ*C[141] DNA after Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Activated with Rat Hepatic S9 Fraction (S9) and Human Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)

加藤　芳伸　　小川　廣

Yoshinobu KATOH and Hiroshi OGAWA

Key words：pUC19-*lacZ*C[141] DNA；target nucleotide sequences（標的塩基配列）；polycyclic aromatic hydrocarbons（多環式芳香族炭化水素類）；mutations（突然変異）

著者らは，発がん性物質の高感度評価法の開発の一環として，化学物質の変異原性を解析するための試験法pUC19-*lacZ*C[141] DNA reversion assay systemを作成した[1)]．これは，pUC19-*lacZ*C[141] DNAプラスミドを化学物質にて処理した後，宿主の大腸菌に導入して，プレート上に現れる*β*-ガラクトシダーゼ活性の復帰した青色コロニーの発生率より化学物質の変異原性を評価する試験法である．pUC19-*lacZ*C[141] DNA reversion assay systemは，化学物質に応じて試験条件を適宜調節することができる．また，様々な性質を持った宿主菌が使用できるため，DNAの損傷による突然変異の修復機構についても解析を行うことが可能である．さらに，*lacZ*-DNAの141番目から143番目のグアニンが連続した標的塩基配列(GGG)にて誘導される突然変異の様相を明らかにすることができる．

先に，著者らは大腸菌BMH71-18 *mut*Sを宿主菌としてpUC19-*lacZ*C[141] DNA reversion assay systemを行い，18種類の多環式芳香族炭化水素（PAH）類の変異原性を検討した．そして，ヒトシトクロームP450 1A1（CYP1A1）にて前処理した場合には，ラット肝S9フラクション（S9）前処理のように特定のPAH類に高い変異原性を誘導するのではなく，18種類のPAHに一様に変異原性が誘導されることを明らかにした[2)]．今回は，S9とCYP1A1にて8種類のPAHを代謝活性化し，SOS-DNA損傷修復に関与する*rec*A遺伝子欠損大腸菌JM109及びヌクレオチド除去修復に関与する遺伝子*umu*Cと*uvr*C欠損大腸菌SURE®を宿主菌として[3,4)]，pUC19-*lacZ*C[141] DNA reversion assayを行った．本報ではpUC19-*lacZ*C[141] DNA標的塩基配列（GGG）にて誘導される突然変異について報告する．

方　　法

1．試　薬

pUC19-*lacZ*C[141] DNA reversion assayによる変異原性試験には，8種類のPAHを用いた．8種類のPAHは以下のとおりである．

アントラセン類として，アントラセン（Ant），1,2-ベンゾアントラセン（1,2-BA），2,3-ベンゾアントラセン（2,3-BA），ジベンゾ[*a,c*]アントラセン（DB[*a,c*]A），ジベンゾ[*a,h*]アントラセン（DB[*a,h*]A），ピレン類として，ピレン（Pyr），ベンゾ[*a*]ピレン（B[*a*]P），ベンゾ[*e*]ピレン（B[*e*]P）．

これらのPAHは，和光純薬工業㈱，Aldrich社製の特級試薬を購入して使用した．各々のPAHは，ジメチルスルフォキシド（DMSO）に溶かして10 μg/mL濃度の原液を調製した後，原液を適宜希釈して，Aroclor 1254で処理したラットの肝組織より調製されたS9（和光純薬工業㈱製）またはCYP1A1（第一化学薬品㈱製）にて前処理を行って，pUC19-*lacZ*C[141] DNAと反応させた．

2．pUC19-*lacZ*C[141] DNAの調製

二本鎖に直接変異を導入するSite-directed mutagenesis法を用いてpUC19-*lacZ*C[141] DNAを作成，調製した[1,2)]．このpUC19-*lacZ*C[141] DNAは滅菌蒸留水に溶かし，1 ng/μL濃度になるように希釈・調製して，PAHとの反応に使用した．

3．ラット S9 及びヒト CYP1A1 による PAH の前処理

Aroclor 1254 で処理したラットの肝組織より調製された S9（0.5 mg microsomal protein）（和光純薬工業㈱製）による PAH の前処理は Jerina の方法に準じて行った[5]．また，S9 前処理した PAH による pUC19-*lacZ*C[141] DNA の処理及び PAH・pUC19-*lacZ*C[141] DNA の調製は先報の方法に従って行った[2]．さらに，PAH・pUC19-*lacZ*C[141] DNA は滅菌蒸留水 50 μL に溶解して reversion assay に供した．

次に，ヒト CYP1A1 cDNA の遺伝子が導入されているヒト B リンパ芽球様細胞株 AHH-1 から調製された CYP1A1 ミクロソーム（25 pmol CYP1A1/mg microsomal protein）（第一化学薬品㈱製）を用いて使用マニュアルに従って PAH を前処理した．PAH・pUC19-*lacZ*C[141] DNA は S9 処理の場合と同様の方法にて調製して reversion assay に供した．

4．pUC19-*lacZ*C[141] DNA reversion assay

pUC19-*lacZ*C[141] DNA reversion assay は Ogawa らの方法に従って行った[1]．本実験には，コンピテント細胞として大腸菌 JM109 及び SURE® 株を使用した．プラスミドを導入するためのコンピテント細胞の調製は，塩化カルシウム法に従って行った[1]．reversion assay には JM109：1.0×10^6 transformants/μg pUC19，SURE®：0.9×10^5 transformants/μg pUC19 の形質転換能を持つコンピテント細胞を使用した．

pUC19-*lacZ*C[141] DNA reversion assay は Ogawa らの報告に記載されている方法に従って実施した[1]．

5．*lacZ* DNA の塩基配列の決定

プレート上に形成された青色コロニーの一部を採取し，培養した．大腸菌からのプラスミドの抽出・精製には，QIAGEN Plasmid Tip-20（Qiagen 社製）を用いた．精製した pUC19-*lacZ* DNA は，滅菌蒸留水 20 μL に溶かし，シーケンシングに使用した．*lacZ* DNA の塩基配列は，Dye-terminator cycle sequencing FS kit（Applied Biosystems 社製）を用いて決定した．*lacZ* DNA の塩基配列は，ABI-PRISM377 DNA シーケンサ（Applied Biosystems 社製）により決定し，GeneWorks Ver. 2.5.1（帝人社製）を用いて解析した．

結果及び考察

pUC19-*lacZ*C[141] DNA reversion assay により PAH 類の突然変異を解析した．8 種類（Ant，1,2-BA，2,3-BA，DB[*a,e*]A，DB[*a,h*]A，Pyr，B[*a*]P，B[*e*]P）の PAH は，S9 と CYP1A1 により前処理を行った後，pUC19-*lacZ* C[141] DNA と反応させた．このプラスミドを大腸菌 JM109 及び SURE® に導入して突然変異誘発率を調べた．PAH 類による突然変異誘発率は Table 1 と 2 に示した．S9 で前処理した場合，1,2-BA と DB[*a,e*]A に特に高い

Table 1　Mutagenesis of *lacZ*⁻ Hosts Transformed with pUC19-*lacZ*C[141] DNA Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Pretreated with Hepatic S9 Fraction from Aroclor 1254-induced Rats

Host	Chemical (0.25 μg)	Number of transformants screened	Number of revertant	Mutant frequency
JM109				
	Control	8.6×10^5	1	0.1×10^{-5}
	Anthracene	28.4×10^5	13	0.5×10^{-5}
	1,2-Benzanthracene	28.9×10^5	28	1.0×10^{-5}
	2,3-Benzanthracene	29.3×10^5	10	0.3×10^{-5}
	Dibenz[*a,e*]anthracene	19.8×10^5	32	1.6×10^{-5}
	Dibenz[*a,h*]anthracene	23.6×10^5	10	0.4×10^{-5}
	Pyrene	28.9×10^5	21	0.7×10^{-5}
	Benz[*a*]pyrene	29.0×10^5	17	0.6×10^{-5}
	Benz[*e*]pyrene	29.4×10^5	13	0.4×10^{-5}
SURE®				
	Control	7.0×10^5	1	0.1×10^{-5}
	Anthracene	9.0×10^5	20	1.7×10^{-5}
	1,2-Benzanthracene	5.9×10^5	27	4.5×10^{-5}
	2,3-Benzanthracene	8.5×10^5	14	1.6×10^{-5}
	Dibenz[*a,e*]anthracene	4.3×10^5	49	11.4×10^{-5}
	Dibenz[*a,h*]anthracene	8.5×10^5	15	1.8×10^{-5}
	Pyrene	8.5×10^5	16	1.8×10^{-5}
	Benz[*a*]pyrene	8.7×10^5	22	2.5×10^{-5}
	Benz[*e*]pyrene	9.1×10^5	13	1.4×10^{-5}

pUC19-*lacZ*C[141] DNA not exposed to the polycyclic aromatic hydrocarbons was used as control.

Table 2 Mutagenesis of *lacZ*$^{-}$ Hosts Transformed with pUC19-*lacZ*C^{141} DNA Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Pretreated with Human Cytochrome P450 1A1

Host	Chemical (0.25 μg)	Number of transformants screened	Number of revertant	Mutant frequency
JM109				
	Control	8.6×10^5	1	0.1×10^{-5}
	Anthracene	8.9×10^5	15	1.7×10^{-5}
	1,2-Benzanthracene	5.7×10^5	8	1.4×10^{-5}
	2,3-Benzanthracene	9.4×10^5	8	0.9×10^{-5}
	Dibenz[*a,e*]anthracene	8.9×10^5	12	1.3×10^{-5}
	Dibenz[*a,h*]anthracene	9.5×10^5	12	0.3×10^{-5}
	Pyrene	8.8×10^5	15	1.7×10^{-5}
	Benz[*a*]pyrene	9.5×10^5	9	0.9×10^{-5}
	Benz[*e*]pyrene	11.0×10^5	5	0.5×10^{-5}
SURE®				
	Control	7.0×10^5	1	0.1×10^{-5}
	Anthracene	9.0×10^5	20	1.6×10^{-5}
	1,2-Benzanthracene	5.9×10^5	27	3.9×10^{-5}
	2,3-Benzanthracene	8.5×10^5	14	2.2×10^{-5}
	Dibenz[*a,e*]anthracene	4.3×10^5	49	7.3×10^{-5}
	Dibenz[*a,h*]anthracene	8.5×10^5	15	2.6×10^{-5}
	Pyrene	8.5×10^5	16	2.7×10^{-5}
	Benz[*a*]pyrene	8.7×10^5	22	3.5×10^{-5}
	Benz[*e*]pyrene	9.1×10^5	13	4.8×10^{-5}

pUC19-*lacZ*C^{141} DNA not exposed to the polycyclic aromatic hydrocarbons was used as control.

Table 3 Analysis of Nucleotide Changes in the Target Sequences of pUC19-*lacZ*C^{141} DNA Transformed into *E. coli* JM109 and SURE® Strains after Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Pretreated with Hepatic S9 Fraction from Aroclor 1254-induced Rats

Chemicals	Substitution			Deletion	Insertion
	G→A	G→T	G→C	G	G
JM109					
Control	1	-	-	-	-
Anthracene	4	1	-	2	-
1,2-Benzanthracene	13	1	-	7	1
2,3-Benzanthracene	7	-	-	1	-
Dibenz[*a,e*]anthracene	3	1	1	12	-
Dibenz[*a,h*]anthracene	4	-	-	3	-
Pyrene	13	1	-	3	-
Benz[*a*]pyrene	11	-	1	3	-
Benz[*e*]pyrene	7	1	2	2	-
SURE®					
Control	1	-	-	-	-
Anthracene	3	-	-	9	4
1,2-Benzanthracene	3	-	-	12	-
2,3-Benzanthracene	1	-	-	7	3
Dibenz[*a,e*]anthracene	-	-	-	21	-
Dibenz[*a,h*]anthracene	2	-	-	6	-
Pyrene	7	-	-	4	1
Benz[*a*]pyrene	4	-	-	10	1
Benz[*e*]pyrene	5	-	-	5	1

pUC19-*lacZ*C^{141} DNA not exposed to the polycyclic aromatic hydrocarbons was used as control.

Table 4 Analysis of Nucleotide Changes in the Target Sequences of pUC19-*lacZ*C141 DNA Transformed into *E. coli* JM109 and SURE® Strains after Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Pretreated with Human Cytochrome P450 1A1

Chemicals	Substitution			Deletion	Insertion
	G → A	G → T	G → C	G	G
JM109					
Control	1	-	-	-	-
Anthracene	4	1	-	2	-
1,2-Benzanthracene	1	2	-	4	-
2,3-Benzanthracene	2	-	1	1	-
Dibenz[*a,e*]anthracene	5	-	-	2	-
Dibenz[*a,h*]anthracene	5	-	-	3	-
Pyrene	4	-	-	2	-
Benz[*a*]pyrene	3	-	-	2	-
Benz[*e*]pyrene	2	-	-	1	-
SURE®					
Control	1	-	-	-	-
Anthracene	-	-	-	3	-
1,2-Benzanthracene	3	-	-	11	-
2,3-Benzanthracene	1	-	-	7	-
Dibenz[*a,e*]anthracene	-	-	-	13	-
Dibenz[*a,h*]anthracene	-	-	-	3	-
Pyrene	2	-	-	8	1
Benz[*a*]pyrene	2	-	-	7	1
Benz[*e*]pyrene	4	-	-	14	-

pUC19-*lacZ*C141 DNA not exposed to the polycyclic aromatic hydrocarbons was used as control.

突然変異誘発率が認められたが，CYP1A1による前処理では1,2-BA，DB[*a,e*]Aと同様にPyrやB[*e*]Pなど他のPAHにも高い突然変異誘発率が認められた．これは，CYP1A1が一様にPAH類を変異原に活性化するとの報告を支持するものと考える[2]．しかしながら，EndoらはB[*a*]PなどのPAH類の変異原性を調べる場合，CYP1A1による代謝物をさらに代謝活性化する共役酵素系が必要であるとの知見を示している[6]．このことは，CYP1A1処理にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）のような酵素処理を共役させることで，PAH類の変異原性は著しく異なる可能性を示唆している[6]．今後，CYP1A1/GST系等を用いて変異原試験を行う必要があると考える．

Table 3と4には，8種類のPAHによる標的塩基配列に誘導された突然変異を示した．JM109を宿主菌とした場合，S9とCYP1A1で前処理したPAHにより誘導された突然変異の約70%は塩基置換によるものであり，突然変異の30%近くがフレームシフト型変異であった．一方，SURE®では，フレームシフト型変異が80%以上を占めていた．また，これらの塩基置換変異は，G→A変異が90%以上を占め，フレームシフト型変異もグアニン1塩基の欠失によるものが約70%を占めていることが認められた（Table 3, 4）．

*lacZ*C141 DNAの標的GGG配列で誘発された塩基置換変異の誘導は，PAHによる*N*-アルキルグアニンが形成されたために，G→A塩基置換が優先的に誘導されたものと推察される[7,8]．一方，グアニン1塩基の欠失は，同様にグアニンのN基に結合したPAHがDNAの二重らせんの溝に入り，歪みを生じさせたためにフレームシフトが誘導され，欠失が生じたものと思われる[9,10]．最近，*N*-アルキルグアニンが形成されたとき，5′側に存在する塩基配列が変異の誘発に強く関与することが報告されている[11,12]．例えば5′側にTG配列が存在すると，DNAトポイソメラーゼによりTとGの間で開裂が生じてグアニンに結合したPAHが塩基配列構造の中に容易に挿入できるようになる[11]．PAHによりフレームシフト型の突然変異が優先的に誘導されるのは，標的塩基の5′側の塩基配列の影響を強く受けたためと考える．

上記の知見から，S9とヒトCYP1A1により前処理されたPAH類がGGG連続配列のグアニンに結合する場合，グアニンの2位のN基に優先的に結合して，G→Aトランジッション型塩基置換及びフレームシフト型変異を誘発することが推察された．

文　　献

1) Ogawa H, Ohyama T, Katsura E, Katoh Y：Mutation Res., 394, 141-151 (1997)
2) 加藤芳伸，小川　廣：道衛研所報，58，1-9（2008）

3) Chamber RW, Gojaka ES, Hojat SH, Borowski, HB : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 7173-7177 (1985)
4) Bhanot OS, Ray A : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 7348-7352 (1986)
5) Jerina DM : *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1976, p.159
6) Endo K, Uno S, Seki T, Ariga T, Kusumi Y, Mitsumata M, Yamada S, Makishima M : Toxicol Appl. Pharmacol., **230**, 135-143 (2008)
7) Frank EG, Saver JM, Kroth H, Ohashi E, Ohmori H Jerina DM, Woodgate R : Nucleic Acid Res., **30**, 5284-5292 (2002)
8) Craziewicz MA, Saveer JM, Jerina DM, Copeland WC : Nucleic Acid Res., **32**, 397-404 (2004)
9) Suh M, Ariese F, Small GJ, Jankowiak R, Hewer A, Phillips DH : Carcinogenesis, **16**, 2561-2569 (1995)
10) Bauer J, Xing G, Yagi H, Sayer JM, Jerina DM, Ling H : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **104**, 14905-14910 (2007)
11) Pommier Y, Kohlhagen G, Laco GS, Kroth H, Sayer JM, Jerina DM : J. Biol. Chem., **277**, 13666-13672 (2002)
12) Jonson AA, Sayer JM, Yagi H, Patil SS, Debart F, Maier MA, Corey DR, Vasseur JJ, Burke TR Jr, Marquez VE, Jerina DM, Pommier Y : J. Biol. Chem., **281**, 32428-32438 (2006)