

16 - 7 新規化学発がん要因の検索とその生物活性

主任研究者 京都薬科大学 渡 辺 徹 志

研究成果の要旨

強い変異原性を示す大阪府の表層土壌から新たに強変異原物質である 5,9-ジニトロベンゾ[ghi]ペリレン(DNBghiP)と5,10-DNBghiPを検出した。また、3,6-ジニトロベンゾ[e]ピレンを大阪府内2市および愛知県内2市の公園の表層土壌から検出した。生体内メイラード反応を想定した、L-トリプトファン、グルコースおよびFenton試薬の反応液から変異原物質を単離し、機器分析により、その化合物をピリドアクリジン誘導体と推定した。この化合物の反応液の変異原性に対する寄与率は約20%であった。炎症部位で生成する窒素種である一酸化窒素とデオキシアデノシンが中性水溶液中で反応することにより、塩基対置換型突然変異を誘発する新規化合物デオキシアデノシン-ジアゾエイト誘導体を生成することを明らかにした。都市大気中に存在する発がん物質である3-ニトロベンズアントロンのDNA付加体がSOS応答で誘導されるポリメラーゼにより損傷乗越えDNA合成され、GからTへのトランスバージョンを誘発することを明らかにした。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
渡 辺 徹 志	京都薬科大学 助教授	新規ニトロアレーン化合物の検索と生物活性
糠 谷 東 雄	静岡県立大学薬学部 助教授	生体内メイラード反応モデル系で生成する変異原物質の検索
高 村 岳 樹	国立がんセンター研究所 研究員	生体内メイラード反応で生成する変異原物質の生物活性
寺 尾 良 保	静岡県立大学環境科学研究所 教授	新しい変異原・発がん物質の構造証明と発生メカニズムの解明
鈴 木 利 典	就実大学薬学部 助教授	内因性窒素酸化物の検索
川 西 優 喜	大阪府立大学先端科学研究所 助手	新規変異原物質の変異誘発機構

総括研究報告

1 研究目的

ヒト発がんの多くが環境因子および内因性因子によるものであることが指摘されており、これまでに多数の変異・がん原物質が食品中や環境中から単離・同定されてきた。しかし、環境中の主要な変異・がん原物質の多くは未だ構造が明らかにされていないと考えられている。

また、生体内において生成する未知の内因性発がん物質の存在も示唆されている。本研究の目的は、食品などを含め、環境中に存在したり生体内において生成したりする主要な新しい変異・がん原物質を検索し、分離・同定するとともにそれらの生物活性や発生機構等を解明する

ことである。また、それらの発生や曝露を防止するための基礎的資料を得ることで、ヒトがん発生の予防に貢献する。

2 研究成果

これまでに京阪神地域の表層土壌の変異原活性と発がん物質であるジニトロピレン(DNP)量との間に強い正の相関性があり、表層土壌の変異原性の約 25%がDNP類により説明可能であることを明らかにしてきた。また最近、3,6-ジニトロベンゾ[e]ピレン(3,6-DNBeP)を主要な変異原物質として大阪府高槻市の表層土壌中からはじめて検出した。今年度は 3,6-DNBePが高槻市以外の表層土壌中にも存在するか否かを明らかにするとともに、その他の主要な変異原物質を分離・同定することを目的として検討を行った。大阪府(泉大津市、高石市)および愛知県(名古屋市、碧南市)において採取した表層土壌のアセトン-ソックスレー抽出物は*S. typhimurium*TA98 に対し、S9 mix非存在下において抽出物 1 mgあたり 5280、6980、14460 及び 1240 revertants (rev.)の変異原性を示した。各土壌抽出物をSephadex LH-20 カラムおよびシリカゲル中圧カラムにより分画して得た強変異原性画分をODS中圧カラムにより分画した。その結果、各土壌抽出物の溶出液は類似した変異原性強度のパターンを示し、それぞれをFr. 1~5 に分画できた。各土壌抽出物の変異原性に対する寄与率が約 30%であったFr. 3 をCOSMOSIL 5C₁₈-AR-IIカラムを用いてHPLC分画した結果、3,6-DNBePの保持時間に相当する画分のみに非常に強い変異原性が認められた。この強変異原性画分をさらにLuna 5 µ Phenyl-Hexylカラムにより分画した結果、3,6-DNBePの保持時間に相当する画分に 3,6-DNBePのUV吸収スペクトルを示す単一物質によるピークが認められ、その画分のみが強い変異原性を示し、検討を行ったすべての土壌から 3,6-DNBePが検出された。泉大津市、高石市、名古屋市及び碧南市の土壌抽出物のS9 mix非存在下でのTA98 に対する変異原性への 3,6-DNBePの寄与率は 24%、27%、22%及び 29%であった。高槻市の表層土壌抽出物を同様にSephadex LH-20 カラムおよびシリカゲル中圧カラムにより分画して得た強変異原性画分をODS中圧カラムにより分画して得たFr. 4 およびFr. 5 をCOSMOSIL 5C₁₈-AR-IIカラム、Luna 5 µ Phenyl-HexylカラムおよびCOSMOSIL 5PYEカラムを用いて分画することにより、非常に強い変異原性を示すCompound 1 および 2 を単離した。Compound 1 及び 2 は、別途合成の結果、それぞれ 5,9-ジニトロベンゾ[ghi]ペリレン(DNBghiP)及び 5,10-DNBghiPと同定できた。

5,9-DNBghiPは新規化合物であり、これらDNBghiP類の環境中からの検出は本研究がはじめてであった。(渡辺)

メイラード反応はタンパク質またはアミノ酸のアミノ基と還元糖のカルボニル基が非酵素的に反応し、シッフ塩基を経由してアマドリ転位生成物に至る反応であり、生体内でも同様の反応が起こることが知られている。そこで、生体内におけるメイラード反応に由来する変異原物質の検索を行う目的で、アミノ酸、グルコースおよびラジカル発生試薬の混合液中に生成する変異原物質の単離・同定を試みた。トリプトファンおよびグルコースの溶液にフェントン試薬を加え、一週間、37 °Cの条件で反応させた(反応液A)。反応液Aのブルーレーヨン抽出物は1,100,000 rev./g相当の変異原性を示した。この抽出物をSephadex LH-20 で分離したところ変異原性を示す画分B, C, Dを分離することが出来た。活性の最も高い画分B (260,000 rev.相当)をODSを固定層とする逆相HPLCにより分離し、化合物Iを単離した。化合物Iは機器分析の結果、C₁₆H₁₁N₃O₂の分子組成であり、アミノ基とカルボン酸を有するピリドアクリジン骨格であることが推定された。この化合物は*S. typhimurium* YG1024 に対し、S9 mixの存在下で 1,400 rev./µgの活性を示した。この活性は加熱食品中に含まれる変異・がん原物質 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP: 1,200 rev./µg)のそれと同程度であった。現在、更なる構造解析を行うため化合物Iおよびそのアセチル化体の単結晶育成を試みている。一方、化合物Iの誘導体であるカルボン酸を有していない化合物アミノピリドアクリジンの反応系内の存在が推定されるため、この化合物の反応系内の分析をLC-MSにより行ったが、明瞭なピークは確認されなかった。また活性画分Cの活性本体の単離を行ったが、最終的なHPLCでは、活性画分には、はっきりとしたUV吸収ピークは認められなかった。そのため極めて微量なサンプルが強い変異原性を示している可能性が示唆された。この活性画分には既知の変異原性ヘテロサイクリックアミン(HCA)が存在している可能性があることから 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1) や、3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2)とHPLCの保持容量の比較を行ったが、活性画分Cの変異原性画分はこれらのHCAとは違う位置に溶出し、活性画分Cの変異原物質はこれらのHCAではないことが分かった。(高村)

加熱食品中に存在する変異原物質、ヘテロサイクリックアミン及び河川水中の変異原物質、ベンゾトリアゾール誘導体(PBTA)等の研究から、フレイムシフト型の変

異発現には遊離アミノ基が必須であり、かつ分子の平面構造も寄与することが明らかになってきた。メイラード反応によって生成したピリドアクリジン誘導体の推定構造式には、アミノ基とカルボキシル基の存在が予想されたが、注目される変異原活性発現には、遊離アミノ基の存在が必須であると予想される。そこで、今年度は、変異原性発現に対するアミノ基の関与について明らかにするためピリドアクリジン誘導体を合成し、変異原性試験を行うこととした。3,5-Dinitroaniline を無水酢酸によってアセチル化し、ニトロ基の部分還元によって3-amino-5-nitroacetanilide(1)合成した。1をSkraupのキノリン合成法によって5-(acetylamino)-7-nitro-4-phenylquinoline (2)に変換した。次に2のアセチルアミノ基を加水分解し、5-amino-7-nitro-4-phenylquinoline (3)とした後、希塩酸中亜硝酸ナトリウムと処理してジアゾニウムを生成させ、さらにアジド化して5-azido-7-nitro-4-phenylquinoline (4)を得た。4からアクリジン環を生成させ、ピリドアクリジンの5-nitro誘導体(5)を得た。5を還元することにより、5-amino誘導体(6)へと変換した。5-Amino誘導体(6)、5-nitro誘導体(5)及び別途合成した4-methyl誘導体(7)についてS9 mix存在下、YG1024に対する変異原性を試験した。その結果、5-nitro誘導体(5)および5-amino誘導体(6)は1μgあたり、それぞれ630および260 rev.を誘発したが、4-methyl誘導体(7)は変異原性を示さなかった。これらのことからピリドアクリジン誘導体の変異原性発現にアミノ基あるいはニトロ基が必要であることがわかった。メイラード反応によって生成した化合物は、同様の変異原性試験で6よりやや活性が強く現れるが、この化合物ではアミノ基以外にカルボキシル基が結合していることが推定されており、カルボキシル基の影響とも予想された。(寺尾)

トリプトファンおよびグルコースの溶液にフェントン試薬を加えた生体内メイラード反応モデル系において生成する変異原物質の検索の過程で構造的に興味ある3種の化合物が単離された。これらには変異原性は無かったが、その構造から生成経路を類推した結果、生成中間体として3-indolylglyoxal、isatin、anthranilic acid等が予想され、このモデル系にこれらの中間体の存在することが推定された。そこで、isatinと各種アミノ酸を1ヶ月間反応し、反応生成物の変異原性を試験した。その結果、lysineとの反応系で最も高い変異原性を示し、その強さはlysine 5 μmolあたり452 rev.であった。isatinとlysineの反応液をブルーレーヨン処理したと

ころ、変異原性はブルーレーヨン吸着部、非吸着部の両画分に認められた。そこで、吸着部に含まれる変異原物質を分離するため吸着物をSephadex LH-20カラムを用いて分画した。その結果、変異原性はKd値1.4~1.8の溶出画分に集中した。この変異原性画分をODSカラムを用いてHPLCで分取し、変異原性試験を行ったところ、保持時間20分付近に溶出するピークに変異原性が集中した。そこで、このピークに相当する化合物Compound Aを多量収集した。Compound Aは質量分析から分子量が200であり、分子式を $C_{12}H_{12}N_2O$ と推定した。UVスペクトルが長波長側に伸びていることより、isatinより共鳴の伸びた構造が示唆された。また、各種NMRスペクトルより、4つの芳香族プロトン、2つの窒素に結合したプロトン、3つ連続したメチレンプロトンなどの部分構造が推定されたが、構造を決定するには至らなかった。最終的には、Compound Aをエタノールより結晶化し、X線結晶構造解析を行った。その結果、Compound Aの構造を(3Z)-3-8pyrrolidin-2'-ylidene)oxindoleと決定した。HPLCにより分取したCompound A画分を再結晶し、結晶画分と母液画分に分け、再結晶前の画分と共に、それぞれの変異原性を調べた。その結果、変異原性は結晶画分には全く認められず、母液画分のみ認められ、変異原性の強さも、2分の1以下の収量に見合う強さで、再結晶前の2倍以上であった。すなわち、Compound Aは変異原物質ではなく、真の変異原物質は再結晶母液中に含まれている微量成分であるとの結論に至った。(糠谷)

慢性炎症は、様々な器官で発がんの頻度を高めることが知られている。炎症部位では一酸化窒素合成酵素が誘導され、数種の活性窒素種が生成する。これら活性窒素種は、ニトロソ化合物など種々の変異原物質を生成させ、核酸に障害を引き起こす。本年度は、これまでに明らかにされていない発がん機構を見出すことを目的とし、デオキシアデノシンと一酸化窒素の反応について検討を行った。デオキシアデノシン(dAdo)の中性水溶液に一酸化窒素ガスを吹き込むと、脱アミノ化合物であるデオキシイノシン(dIno)に加え、新規化合物が生成することを逆相HPLCで確認した。この化合物は、酸性条件下でデオキシアデノシンに亜硝酸イオンを作用させた場合にも生成した。この新規化合物は、デオキシアデノシンをTHF中 $NaNH_2$ 存在下で亜硝酸アミルを作用させることで、ほぼ定量的に合成することができた。この合成した化合物を逆相HPLCで分離・精製し、種々の機器分析を行った。その結果、この新規生成物をデオキシアデノシンのジアゾエイト誘導体(dAdo-diazoate)と同定できた。この化合物

を生理的条件下 (100 mMリン酸緩衝液、pH 7.4、37℃) で温置すると徐々に分解して最終生成物のデオキシイノシンが生成したが、一部は出発物質のデオキシアデノシンとなった。この時の半減期は約5日であり、比較的安定な化合物であることがわかった。また、このジアゾエイト誘導体はTA100 に対し変異原性を示した。現在まで、一酸化窒素や酸性条件下の亜硝酸イオンとデオキシアデノシンの反応でジアゾエイト中間体が生成することは報告されていない。本研究の結果は、生体中のデオキシアデノシンが一酸化窒素や酸性条件下の亜硝酸イオンと反応し、この変異原性をもつこのジアゾエイト誘導体を生成させていることを示唆する。(鈴木)

近年、付加体など損傷を乗り越えてDNA合成(Translesion DNA synthesis: TLS)する一群のポリメラーゼが発見され、誤りがちな複製によって突然変異を生ずることがわかった。これらTLSポリメラーゼの生化学的特徴は、酸化的損傷や紫外線損傷、アセチルアミノフルオレン付加体など、少数の代表的と考えられるDNA損傷を用いて研究がなされてきた。本年度は、環境中に存在する汚染物質由来のDNA損傷がDNA中に1分子存在するときの、大腸菌におけるTLSの頻度と突然変異誘発率(塩基変化率)を明らかにするため、3-ニトロベンズアントロン(NBA)を被験化合物として検討を行った。3-NBAはディーゼル排出粒子および大気浮遊粒子中に存在する強力な変異原物質であり、ラットに対して発がん性を示すことが明らかにされている。まず、2種類の3-NBAのdG付加体を化学合成し、部位特異的にプラスミドに組込んだ。これを大腸菌内で複製させ、3-NBA付加体の乗り越えDNA合成(TLS)および突然変異スペクトルを解析した。その結果、どちらの3-NBA付加体もDNA複製を強く阻害し、SOS応答で誘発されるポリメラーゼによってTLSされることが示唆された。TLSしたプラスミドの塩基配列を調べた結果、一方の付加体では3.4%の確率でGからTへのトランスポージョンを誘発したが、他方の付加体の場合はすべてError FreeのTLSであった。SOS誘導ポリメラーゼであるPol II、Pol IV (UmuD' C)、Pol V (DinB)のいずれかを欠損する大腸菌株を用いた実験から、両付加体はPol IV (UmuD' C)でTLSされることが分かった。(川西)

3 倫理面への配慮

動物実験を実施する場合やヒト由来試料等を使用する場合には、各研究者が所属する研究機関の倫理委員会の承認を得たのち行った。また、組換えDNA実験を行う場

合には、各研究者が所属する研究機関の委員会の承認を得たのち規定に従って実施した。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Sugiyama, H., Watanabe, T., et al., Formation of 1,3-, 2,4-, 1,2-, 1,6-, 1,8- and 1,7- Dinitropyrenes in Metallic Oxides as Soil Components in the Presence of Indoor Air with 1-Nitropyrene and Sodium Chloride Under Xenon Lamp Irradiation, *Journal of Health Science*, 50: 66-74, 2004.
2. Murahashi, T., Watanabe, T., et al., Detection of Mutagenic 1-Chloro-3-, -6-, and -8-Nitropyrenes in Surface Soil Collected in Kyoto, Japan, *Journal of Health Science*, 50: 625-633, 2004.
3. Ohe, T., Watanabe, T., et al., Mutagens in surface waters: a review, *Mutation Research*, 567: 109-149, 2004.
4. Watanabe, T., et al., Detection of a Novel Mutagen, 3,6-Dinitrobenzo[e]pyrene, as a Major Contaminant in Surface Soil in Osaka and Aichi Prefectures, Japan, *Chem. Res. Toxicol.*, 18: 283-289, 2005.
5. Masuda, S., Watanabe, T., Nukaya, H., Terao, Y., Takamura, T., et al., Genotoxicity of 2-[2-(acetyl amino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole(PBTA-6) and 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitro-biphenyl (ADDDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay, *Mutation Research*, 560: 33-40, 2004.
6. Umbuzeiro, G. de A., Watanabe, T., Terao, Y., et al., The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River, *Chemosphere*, in press.
7. Tabata, A., Terao, Y., et al., The effect of bisphenol A and chlorinated derivatives of bisphenol A on the level of serum vitellogenin in Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Water Science & Technology*, 50: 125-132, 2004.
8. Kuruto-Niwa, R., Terao, Y., et al., Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 121-130, 2005.
9. Takemura, T., Terao, Y., et al., In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A, *Toxicology*, 207: 215-221, 2005.

10. Suzuki, T., et al., Nitration and nitrosation of *N*-acetyl-L-tryptophan and tryptophan residues in proteins by various reactive nitrogen species, *Free Radical Biol. Med.*, 37: 671-681, 2004.
 11. Suzuki, T., et al., Epigallocatechin gallate markedly enhances formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in reaction of 2'-deoxyguanosine with hypochlorous acid, *Free Radical Biol. Med.*, 36: 1087-1093, 2004.
 12. Kaneda, A., Takamura-Enya, T., et al., Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation, *Cancer Sci.*, 95: 58-64, 2004.
 13. Watanabe, M., Takamura-Enya, T., et al., Enzymatic properties of pierisin-1 and its N-terminal domain, a guanine-specific ADP-ribosyltransferase from the cabbage butterfly, *J. Biochem.*, 135: 471-477, 2004.
 14. Takamura-Enya, T., et al., Mono(ADP-ribosyl)ation of the N2 amino groups of guanine residues in DNA by pierisin-2, from cabbage butterfly, *Pieris brassicae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323: 579-582, 2004.
 15. Nishigaki, R., Takamura-Enya, T., et al., Identification of cytochrome P-450s involved in the formation of APNH from norharman with aniline, *Mutation Research*, 562: 19-25, 2004.
 16. Kawanishi, M., Takamura-Enya, T., Watanabe, T., et al., Detection of Genistein as an Estrogenic Contaminant of River Water in Osaka, *Environ. Sci. Technol.*, 38: 6424-6429, 2004.
 17. Savelle, K., Kawanishi, M., et al., Polycyclic aromatic hydrocarbons of diesel and gasoline exhaust and DNA adduct detection in calf thymus DNA and lymphocyte DNA of workers exposed to diesel exhaust, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 24: 451-65, 2004.
 18. Kawanishi, M., et al., Translesion DNA synthesis across mono ADP-ribosylated dG by Y-family DNA polymerases., Columbus, F., et al. (eds), *Progress in Mutation Research*, Nova Science Publishers (New York, USA), in press.
- の結果 -、環境変異原研究 26: 9-22、2004.
2. 川西優喜ら、大気汚染物質 3-ニトロベンズアントロン由来 DNA 付加体の損傷乗り越え DNA 合成、放射線生物研究 39: 373-381、2004.

日本語論文

1. 遠藤 治、渡辺徹志ら、大気浮遊粒子、河川水および土砂の変異原性モニタリング - 7 年間(1996 ~ 200 年)