

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

強い変異原性を示した大阪府内および愛知県内の表層土壌中の主要な変異原物質が 3,6-dinitro[e]pyrene (DNBeP) など数種の化合物である可能性が高いことを明らかにした。また、3,6-DNBeP は複数地域の大气粉じんからも検出され、環境中に広く分布していることが示唆された。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、pyridoacridine 誘導体と推定した。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、変異原性を有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がわかった。Ames 試験において極めて強い活性を示す 3,6-DNBeP がヒト肝がん由来細胞株 HePG2 に対し強く姉妹染色分体交換 (SCE) 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 助手	新規変異原物質の変異誘発機構

総合研究報告

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

はま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 研究方法

大阪府および愛知県において採取した表層土壌のソックスレー抽出法物について変異原性を指標として、各種カラムを用い分画後、HPLCにより変異原物質を単離した。表層土壌中および大気分じん中の3,6-DNBePの精製条件ならびにオンライン還元後HPLC分析する条件を検討した。本精製法および分析法を用い3,6-DNBePの定量分析を行った。(渡辺) L-トリプトファンおよびD-グルコースの溶液にフェントン試薬を加え、一週間、37℃の条件で反応させた反応液から液々分配法および各種カラムを用い変異原物質を単離した。単離した変異原物質から単結晶を得、機器分析を行った。本変異原物質の各種試料からの抽出・精製条件ならびにエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析(ESI/MS/MS)での分析条件を検討した。(高村) フェントン試薬存在下、L-トリプトファンとD-グルコースから生成する変異原物質だと予想されたprydoacridine誘導体合成のため、その基本骨格の合成ルートを検討するとともに、さらに臭素化および臭素置換基のカルボキシル基への変換により目的化合物を合成する条件について検討した。(寺尾) 中性条件下、37℃でアミノ酸と各種カルボニル化合物を一定時間反応させた後、反応物の変異原性を試験するとともに各種カラムクロマトグラフィーにより変異原物質の分離・同定を試みた。(糠谷) 種々の核酸構成分子と一酸化窒素およびパーオキシナイトライトとの反応性について解析するとともに反応生成物についてHPLC等により分析した。また、機器分析により生成した変異原物質の構造解析を行った。

(鈴木) 2種類の3-nitrobenzanthrone(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のち、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。3,6-DNBePのgenotxocityについて明らかにするため、チャイニーズハムスター野生型細胞(CHO AA8)とそのヌクレオチド除去修復欠損細胞(CHO UV135 (ERCC1 欠損))およびヒト肝がん由来細胞株HepG2細胞に対する姉妹染色分体交換(SCE)誘発性を指標に調べた。(川西)

3 研究成果

大気中には多種類の変異・がん原物質が存在するが、それらはやがて地表面に降下することから、変異・がん原物質による大気汚染が進行している地域では表層土壌もそれらによる汚染が進んでいると考えられる。強い変異原性を示した大阪府及び愛知県の表層土壌の抽出物について各種カラムクロマトグラフィーを用い検討した結果、含まれる主要な変異原物質は共通であると推測され、強力な変異原物質である1,8-dinitropyreneと3,6-dinitro[e]pyrene(DNBeP)が検出された。また、3,6-DNBePの分布状況および発生源の解明を最終的な目的として、表層土壌および大気分じん中の3,6-DNBePの分析法について検討を行った。その結果、各抽出物中の3,6-DNBePをカラムクロマトグラフィーで精製後、オンライン還元し、蛍光-HPLCを用いることにより高感度で分析可能であることがわかった。本分析法を用い京都府および大阪府の表層土壌を分析したところ、すべての試料から検出され(355~5,004 pg/g)であり、それら抽出物の変異原性に対する3,6-DNBePの寄与率は17~31%であった。また、京都市、大阪市および東京で採取した大気分じんすべてから検出され、137~1,238 fg/m³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、強い変異原性を示したトリプトファン、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。その結果、主要な変異原物質として*S. typhimurium* YG1024に対しS9 mixの存在下で1,400 revertants/μgの活性を示す化合物Iを単離することができた。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)のそれと同程度であった。また、ヒト尿中などの化合物Iの分析法の開発を試みた結果、HPLCにより精製後、ESI/MS/MSを用いることにより、非常に高感度で化合物Iを定量分析できることがわかった。(高村)

フェントン試薬存在下、L-トリプトファンとD-グルコースとの反応により生成した化合物Iの別途合成経路を確立するため、その基本構造であるprydoacridine誘導体の全合成法について検討するとともにその6位へカルボキシル基の導入法について検討を行った。その結果、3,5-dinitroanilineを合成原料としてprydoacridineの

5-amino誘導体を効率よく合成することが可能となった。また、5-amino誘導体についてS9 mix存在下、YG1024 に対する変異原性を試験した結果、260 revertant/ μ gの変異原性を示した。臭素-ジオキサン複合体による臭素化により、5-amino-6-bromo誘導体を効率よく合成できることがわかった。遊離アミノ基をアセチルアミノ基としたのち、CO / Pd(OAc)₂ / MeOHの系によりカルボキシルへの変換を試みたが化合物Iに相当する化合物を合成するには至らなかった。今後、他の合成方法を検討する必要がある。(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反応中間体として3-indolylglyoxal、anthranilic acid、isatin等が生成したことが予想されたことから、isatinと各種アミノ酸の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た。isatinとlysineの反応液をブルーレーヨン処理後、Sephadex LH-20カラムによる分画、さらにODSカラムを用いてHPLCで分取し、変異原性試験を行った結果、変異原物質は強い活性を持った微量成分であることがわかった。また、生体内メイラード反応モデル系として、中性条件下、37°CでL-トリプトファンと4種類のカルボニル化合物(D-フルクトース、DL-グリセルアルデヒド、グリコールアルデヒド、メチルグリオキサール)について反応を行った。その結果、DL-グリセルアルデヒドとグリコールアルデヒドのL-トリプトファンとの反応物により変異原物質が生成することがわかった。(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。炎症部位では各種免疫細胞が活性化され、一酸化窒素合成酵素やNADPHオキシダーゼなど様々な酵素が誘導される。その結果、炎症部位では活性酸素種に加え、一酸化窒素やパーオキシナイトライトなど種々の活性酸素種が生成する。これら活性酸素種は生体内に存在する種々のアミノ化合物と反応するため慢性炎症による発がんリスク増加の一因であると考えられる。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、種々の活性酸素種と生体内に存在する低分子化合物の反応を解析した。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結果、新規変異原物質であるデオキシアデノシンのジアゾエイト誘導体が生成することがわかった。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。亜硝酸イオンは直接食品から摂取されるばかりでなく、一酸化窒素合成酵素により生じた一酸化

窒素の自動酸化により生体内で生成される。紫外線に暴露すると皮膚細胞中の一酸化窒素合成酵素が活性化されることが報告されており、ヒトが太陽光を浴びたときには、皮膚細胞中の亜硝酸イオン濃度は上昇していると考えられる。亜硝酸イオンが太陽光線により引き起こすDNA分解反応について検討するため仔牛胸腺DNAのリン酸緩衝液(pH 7.4)を6時間太陽光に曝した。ヒト皮膚細胞中と同濃度の亜硝酸イオンの添加により、マロンジアルデヒド、アデニン、グアニン、シトシンおよびチミンの生成が非添加時と比べ著しく増加することがわかった。これらの結果は、亜硝酸イオンと太陽光の共存がDNA損傷に関与することを示唆するものである。(鈴木)

近年、付加体など損傷を乗り越えてDNA合成(Trans-lesion 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。ディーゼル排出粒子、大気粉じんおよび表層土壌中から検出された強力な変異原物質である3-nitrobenzanthrone (NBA)がDNA中に1分子付加した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)について検討を行った。2種類の3-NBAのdG付加体について調べた結果、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PoI IV (UmuD' C)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へのトランスバ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。強い変異原性を示した大阪府の表層土壌中から、主要な変異原物質として分離・同定された3,6-DNBePは新規化合物であり生物活性など全く明らかにされていなかった。そこで、3,6-DNBePのgenotoxicityについて明らかにするため、3,6-DNBePがほ乳類細胞に対する姉妹染色分体交換(SCE)誘発性を調べた。その結果、3,6-DNBePはヒト肝がん由来細胞株HepG2に対し、濃度依存的にSCE数が上昇し、有意に($P < 0.01$)染色体異常を引き起こすことがわかった。(川西)

4 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。