

酸化ストレスによるクラスターDNA損傷機構と その変異における役割

及川 伸二*, 大西 志保, 村田 真理子,
平工 雄介, 川西 正祐

三重大学医学部衛生学講座 〒514-8507 三重県津市江戸橋2-174

Mechanism of clustered DNA damage induced by oxidative stress and its role in mutagenesis and carcinogenesis

Shinji Oikawa, Shiho Ohnishi, Mariko Murata, Yusuke Hiraku and Shosuke Kawanishi

Department of Environmental and Molecular Medicine, Mie University School of Medicine
2-174 Edobashi, Tsu, Mie 514-8507, Japan

Summary

Reactive oxygen species generated by environmental factors, such as radiation, UV and chemicals can cause sequence-specific DNA damage and play important roles in mutagenesis and carcinogenesis. We have investigated sequence specificity of oxidative stress-mediated DNA damage by using ^{32}P -labeled DNA fragments obtained from the human *c-Ha-ras-1*, *p53* and *p16* genes. Free hydroxyl radicals cause DNA damage with no marked site specificity. Copper-hydroperoxo complex caused DNA damage at thymine, cytosine and guanine residues. $^1\text{O}_2$ preferentially induces lesions at guanine residues. Benzoyloxyl radical specifically causes damage to the 5'-G in GG sequence; this sequence is easily oxidized because a large part of the highest occupied molecular orbital of this radical is distributed on this site.

Recently, we demonstrated that BP-7,8-dione, a metabolite of carcinogenic benzo[a]pyrene (BP), strongly damaged the G and C of the 5'-ACG-3' sequence complementary to codon 273 of the *p53* gene in the presence of NADH and Cu(II). BP-7,8-dione also caused preferential double base lesion at 5'-TG-3' sequences. Since clustered DNA damage is poorly repaired, it is speculated that induction of the double base lesions in DNA might lead to activation of proto-oncogene or inactivation of the tumor suppressor gene. Therefore, oxidative DNA damage induced by BP-7,8-dione, especially double base lesions, may participate in the expression of carcinogenicity of BP in addition to DNA adduct formation. Here, we discuss the mechanisms of sequence-specific DNA damage including clustered DNA damage in relation to mutagenesis and carcinogenesis.

Keywords: reactive oxygen species, DNA damage, double base lesions, carcinogenesis, hotspot

緒 言

酸化ストレスによるDNA損傷は、付加体形成と同様に、突然変異の導入や発がん過程に重要な役割を果たし

ている。放射線および紫外線の暴露、食餌性因子、たばこ、ライフスタイル等の様々な環境因子によって細胞内にフリーラジカルが生成されたとき、DNAが酸化的に損傷される。活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)の一つである superoxide (O_2^-) の不均化反応により生成された過酸化水素 (H_2O_2) は重金属と反応して活性の強いフリーヒドロキシルラジカル (free hydroxyl radical;

* E-mail: s-oikawa@doc.medic.mie-u.ac.jp

受付: 2004年6月7日 受理: 2004年6月7日

©日本環境変異原学会

•OH)や金属—酸素錯体(metal-hydroperoxo complex; metal-OOH)を生成し、DNAを塩基配列特異的に損傷する(Kawanishi et al., 2001; 2002)。 H_2O_2 が生体内重金属の鉄(Fe(II))と反応したときは、•OHを生成する。•OHは非常に大きな酸化還元電位をもっているため、ほとんど全ての塩基を損傷し多様な分解生成物を産生する。また糖—磷酸結合とも反応してDNA鎖を切断する。金属—酸素錯体では金属によってDNAとの結合状態が異なるため、それぞれ特定の配列でDNAに損傷を与えると考えられる。 H_2O_2 が生体内重金属の銅(Cu(I))と反応したときは、銅—酸素錯体が生成され、T、C、Gを損傷する(Oikawa and Kawanishi, 1998a)。一方、環境中に存在する発がん性6価クロム化合物は、 H_2O_2 の存在下で•OHを生成し全ての塩基を損傷する(Kawanishi et al., 1986a)。また、同じく発がん性が示されているニッケル化合物は H_2O_2 の存在下で金属—酸素錯体を形成しC、T、Gを塩基配列特異的に損傷する(Kawanishi et al., 2002)。発がん性が指摘されているコバルトはGをやや強く損傷する(Kawanishi et al., 1989)。これらの結果から、川西らは金属発がんの活性酸素説を世界に先駆けて提唱している。その他、ペルオキシラジカル(peroxyl radical; ROO•)やアルコキシラジカル(alkoxyl radical; RO•)、一重項酸素(1O_2)等もDNAを酸化的に損傷する(Oikawa et al., 2003; Kawanishi et al., 1999)。酸素中心ラジカル(RO•, ROO•)は5'-GGG-3'のようなポリG配列中の5'側のGを損傷し(Oikawa et al., 1998b)、 1O_2 はGを特異的に損傷する(Kawanishi et al., 1986b; Ito et al., 1993)。4つの塩基(A、G、C、T)中Gの酸化電位が最も低く、特にGGやGGG等のポリG配列は容易に酸化されやすい。従って、ラジカルの酸化還元電位が高ければA、G、C、T、4つの塩基全てが損傷されるが、酸化還元電位が低くなるに従い酸化されやすいGが、次いでGG、GGGが特異的に損傷される。

これらの活性酸素種により酸化的損傷を受けた塩基は通常修復されるが、修復されない酸化損傷塩基は突然変異を引き起こし、発がんや老化をはじめとする様々な疾病に関与する。がん原遺伝子やがん抑制遺伝子には酸化ストレス等により非常に変異されやすい部位“ホットスポット”が存在する。現在までに、ホットスポットの位置や置換される塩基、またその修復酵素について多数研究がなされている。その中で、なぜその部位がホットスポットになるのかという問題が最も重要である。K-rasのホットスポットのコドン12は付加体が形成されやすく、また、修復されづらいことが報告されている(Feng et al., 2002)。酸化的損傷では一塩基の損傷は修復されやすいことから、いくつかの塩基が連続して損傷(クラスターDNA損傷)を受けていることが考えられる。本総説では、環境因子と生体内物質(微量金属や還元物質)の共存下において生成される各種活性酸素種による塩基配列

特異的DNA損傷について、クラスターDNA損傷に注目し詳細に解析を行った結果から得られた最近の知見を報告する。

1. 発がん性ベンゾ[a]ピレンの代謝物による2塩基連続DNA損傷

ベンゾ[a]ピレン(BP)は、数多くの強力な発がん性芳香族炭化水素中で最もよく知られたものの一つである。BPは、大気汚染物質であり、タバコの煙にも含まれている。BPの発がん性は種々の実験動物において示されており、IARCではグループ2A(ヒトに対して発がん性を示す可能性が高い)として評価されている(IARC Working Group, 1983)。BPのDNA損傷機構として、付加体形成がよく知られている(Yang et al., 1977)。BPは、生体内でシトクロムP-450により7,8-エポキシド(7,8-epoxide)に代謝され、エポキシドヒドロラーゼ(epoxide hydrolase)によって7,8-ジオール(7,8-diol)、その後再びシトクロムP-450で7,8-ジオール-9,10-エポキシド(7,8-diol-9,10-epoxide)まで代謝される。この7,8-ジオール-9,10-エポキシドは、発がん性の活性本体であることが湾領域エポキシド理論から説明されている。湾領域エポキシドは、他の非湾領域エポキシドと比較すると、アルキル化剤としてより安定なベンジル位(BPでは10位)カルボニウムイオンを形成し易い。そのため、BP-7,8-ジオール-9,10-エポキシドのC10位は、グアニンの2位のアミノ基に結合しDNAに付加体を形成する(Fig. 1)。一方、別の代謝経路としてベンゾピレンジヒドロジオールが、ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼによってカテコール型になり、自動酸化してベンゾピレン7,8-ジオン(BP-7,8-dione)に代謝されることが報告されている(Flowers et al., 1996)。本研究ではこのBP-7,8-dioneによる酸化的DNA損傷機構を明らかにした。

方法は、 ^{32}P で標識したヒトがん関連遺伝子(c-Ha-ras-1がん原遺伝子やp53、p16がん抑制遺伝子)の単離DNA断片を用い、金属イオン、生体内還元物質NADHおよびBP-7,8-dioneと反応させ、ピペリジンあるいはFpg酵素(ホルムアミドピリミジングリコシラーゼ)で処理して電気泳動を行い、DNA損傷性とその塩基特異性を検討した。また、牛胸腺DNAを用いて酸化的DNA損傷の指標となるグアニン酸化物8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine(8-oxodG)を高感度電気化学検出器付HPLC(HPLC-ECD)にて定量した。

^{32}P で標識したDNA断片を用いた結果、BP-7,8-dioneのみではDNA損傷は認められなかったが、2価の銅イオン(Cu(II))と生体内還元物質NADH両方の存在下でBP-7,8-dioneはDNAを濃度依存的に損傷した。また牛胸腺DNAを用いて8-oxodGを測定した結果においてもBP-7,8-dioneはCu(II)とNADHの存在下で濃度依存的に酸化的DNA損傷を引き起こした。DNA損傷の塩基配列

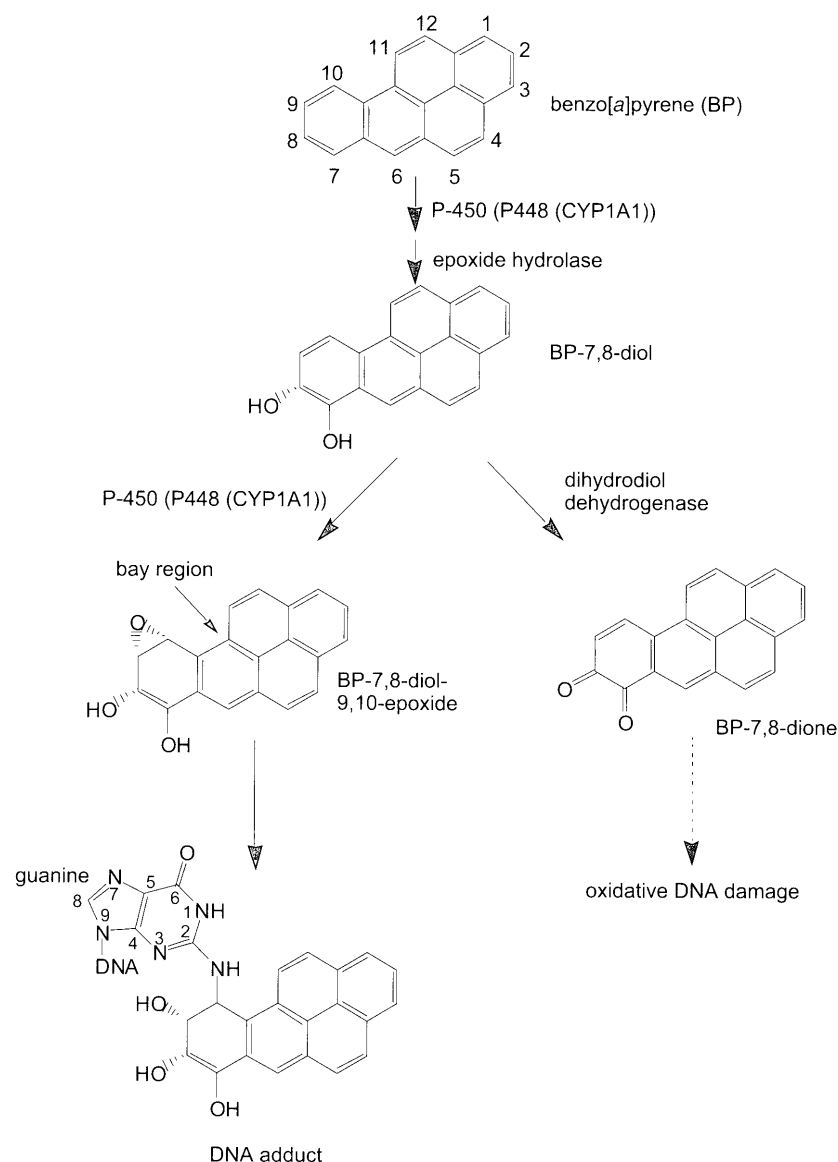


Fig. 1 Mechanisms of DNA damage by metabolites of carcinogenic benzo[a]pyrene

特異性については、5'側からTGと並んだ配列において、ピペリジン処理ではTがよく損傷され、Fpg酵素処理ではそれに加えて隣のGが損傷され、連続した2塩基が損傷していることが示された。同様に、Cが連続した配列においても著しい損傷が認められた。我々は、修復酵素AlkAとFpg酵素を用いてTG配列の2塩基連続損傷機構を解析した結果、Gの損傷がTの損傷に先駆けて起こることを認めている。4つのDNA塩基の中ではGが最も酸化されやすいことから、Gが先に酸化されたのちに、隣のピリミジン残基Tが酸化される。その機構として、 $\bullet\text{OH}$ や金属-酸素錯体によりグアニンが一電子酸化されグアニンラジカル (guanine radical cation) が生成されると、このラジカルが次いでチミン残基の5-メチル基を損傷すると考えられる。さらにp53のホットスポットとしてよく知られているコドン273の相補対のGとCも2塩基連続して損傷された (Fig. 2)。コドン273の変異

は肺癌患者の中でも喫煙者に特異的に見られることから、タバコに含まれるBPが原因の一つと考えられる。コドン273の配列もGの隣がピリミジン残基(C)であることから、活性酸素によって損傷を受けやすいと考えられる。

さらに、DNA損傷機構を検討するために、各種活性種消去剤を用いてDNA損傷の抑制効果を検討した。BP-7,8-dioneによるDNA損傷は、カタラーゼで抑制されたことから過酸化水素の関与が示唆された。さらに、Cu(I)キレート試薬であるバソキュプロインによっても抑制されたことからCu(I)の関与も示された。一方、フリーOHラジカル($\bullet\text{OH}$)スカベンジャーであるマンニトールとギ酸ナトリウムでは抑制が認められなかった。以上の結果からBP-7,8-dioneはキノン部分がNADHによってセミキノンラジカルに還元され、それが自動酸化して7,8-dioneに戻る過程で過酸化水素(H_2O_2)を生成し、

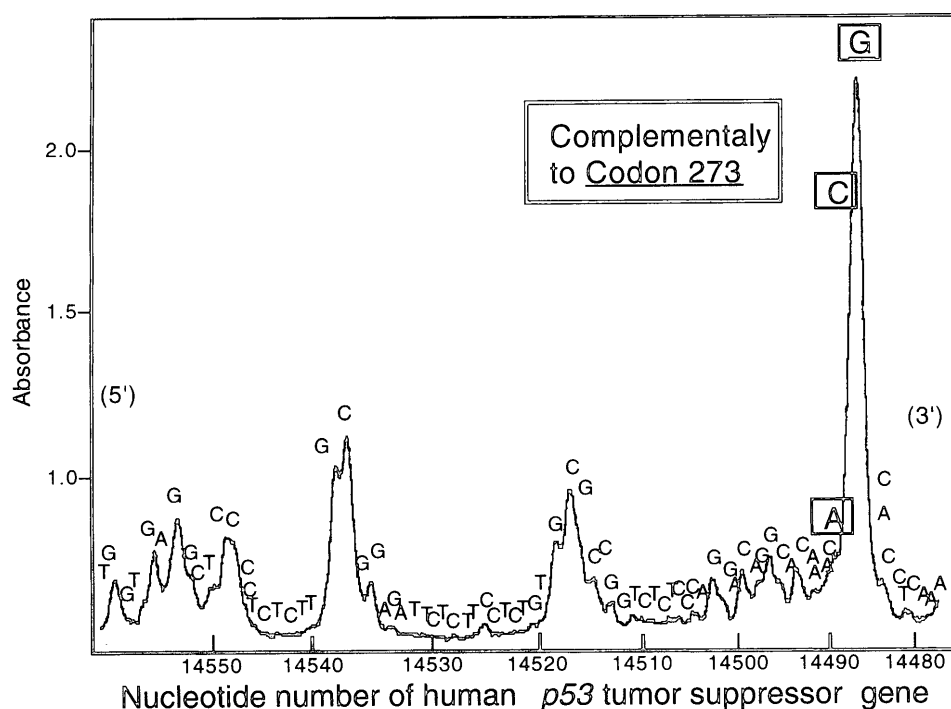


Fig. 2 Site specificity of DNA damage induced by BP-7,8-dione in the presence of NADH and Cu(II). The reaction mixture containing 32 P-5'-end-labeled 443-bp DNA fragment, 0.5 μ M BP-7,8-dione, 100 μ M NADH and 20 μ M CuCl_2 in 10 mM phosphate buffer (pH 7.8) containing 5 μ M DTPA incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min. After Fpg protein treatment, the DNA fragment was electrophoresed on an 8% polyacrylamide/8 M urea gel and the autoradiogram was obtained by exposing x-ray film to the gel.

銅イオン存在下で $\cdot\text{OH}$ 類似の活性種(銅-酸素錯体)が生成され、酸化的にDNAを損傷すると考えられる。

これまでBPはジオールエポキシドに代謝されたのち、DNA付加体を形成してDNAを損傷すると考えられてきた。本研究ではBPの別の代謝物であるBP-7,8-dioneが、8-oxodGの生成も含めて、酸化的DNA損傷を起こすことを示した。また、TG, CG, CCで連続した2塩基の損傷が見られ、*p53*のホットスポットのコードン273でも活性酸素による2塩基連続損傷が認められた。このような連続した2塩基の損傷は修復されにくいことから、本研究で示した酸化的DNA損傷も付加体形成に加えBPの発がんに重要な役割を果たしていると考えられる(Ohnishi and Kawanishi, 2002)。

2. ビスフェノール A による 2 塩基連続 DNA 損傷とタンパク質の変動

ビスフェノール A (BPA) は、エポキシレジンやポリカーボネートプラスチックの製造に広く使用され、内分泌攪乱作用が疑われている。さらに、BPA は経口投与により雌雄ラットに白血病を起こすことから、発がん性を有すると考えられている(National Toxicology Program, 1982)。BPA による発がん機構を解明するため、我々は ^{32}P で標識したがん関連遺伝子のDNA断片を用いてBPA

代謝物 3-ヒドロキシビスフェノール A (3-OH-BPA) の DNA 損傷機構と塩基配列特異性を検討し発がん機構を解明した。

その結果、3-OH-BPA は Cu(II) の存在下において DNA を損傷した。その損傷は生体内還元物質 NADH により著しく増強された。牛胸腺 DNA を用いて 8-oxodG の生成量を検討した結果、NADH 存在下で 3-OH-BPA は 0.05 μM という非常に低濃度で酸化的 DNA 損傷を引き起こした。損傷の塩基配列特異性は、ペパリジン処理では T と C が、また 8-oxodG 除去修復酵素である Fpg 処理では G が強く損傷され、5'-TG-3' や 5'-CG-3' 配列において 2 塩基連続損傷が認められた。特に、がん抑制遺伝子 *p53* の hotspot の一つであるコードン 273 の相補対で、CG の連続した 2 塩基が強く損傷された(Fig. 3)。3-OH-BPA による DNA 損傷は、カタラーゼと Cu(I) キレート剤であるバソキュプロリンにより抑制されたことから H_2O_2 および Cu(I) の関与が示唆された。以上より、BPA の発がん性には代謝物による修復されづらい 2 塩基連続酸化的 DNA 損傷が関与している可能性が示唆された。

さらに、BPA による遺伝毒性作用に関連するタンパクを同定するため、BPA で処理したヒト培養細胞(HL-60)について比較プロテオーム解析を行った。プロテオーム解析には二次元電気泳動後、Coomassie blue にて染

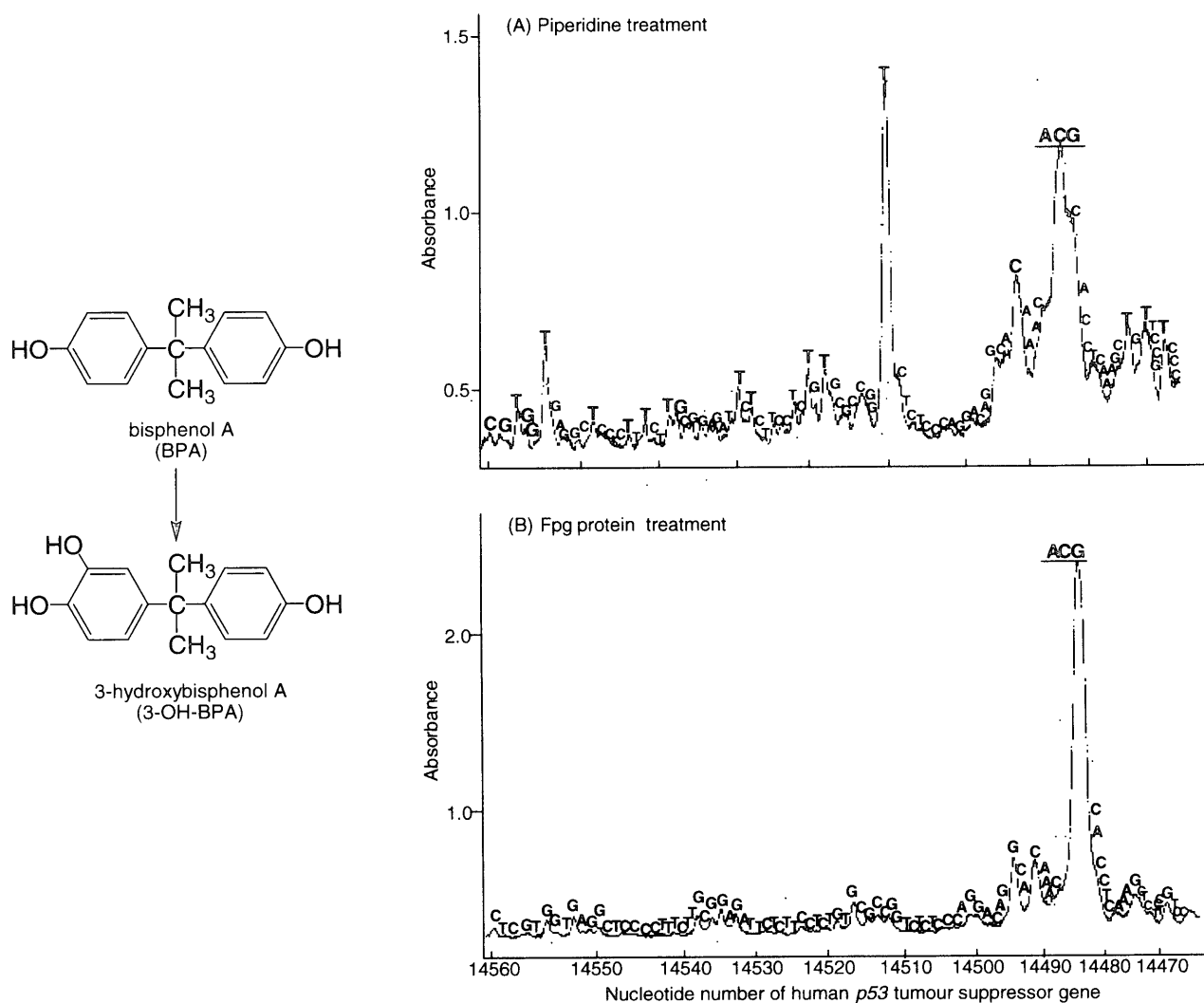


Fig. 3 Site specificity of DNA cleavage induced by 3-OH-BPA and NADH in the presence of Cu(II). Reaction mixtures containing the 32 P-5'-end-labeled 443-bp DNA fragment, 20 μ M/base of calf thymus DNA, 20 μ M CuCl_2 and 1 μ M 3-OH-BPA and 100 μ M NADH in 10 mM phosphate buffer (pH 7.8) containing 5 μ M DTPA were incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 60 min. After piperidine treatment (A) or Fpg protein treatment (B), the DNA fragments were analyzed by the method described in the legend to Fig. 2.

色を行い、発現に増減のあったタンパク質を matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) とデータベース検索によりペプチドマスフィンガープリンティング法で同定した。HL-60細胞を用いBPAによる細胞毒性を解析した結果、BPA処理24時間後に有意に生存率の減少とアポトーシスの増加が認められた。細胞毒性に関連するタンパク質を解析するため、HL-60細胞をBPAで12時間処理後、プロテオーム解析を行った。その結果、がん抑制遺伝子産物(14-3-3 protein等)が減少し、ストレスに应答するタンパク質(glutathione S-transferase P1等)が増加していることが明らかになった。その中で特に、14-3-3 protein epsilonの遺伝子は、がん抑制遺伝子の候補の一つと考えられていることから、このタンパク質の減少はBPAによる発がん重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

3. 過酸化ベンゾイルによるGの連続配列の損傷

過酸化ベンゾイル(BzPO)は食品添加物やアクネ(acne)の治療薬、プラスチックの重合剤等に広く用いられている。BzPOは発がん過程においてプロモーターやプロゲレサラーとしての活性を示すことが報告されている(Slaga et al., 1981)。本研究において、BzPOによる発がんプロモーター作用のメカニズムを明らかにするため、BzPOによる酸化的DNA損傷機構について詳細に検討を行った。

1価の銅イオン(Cu(I))存在下においてBzPOは濃度依存的に 32 Pで標識したDNA断片を損傷した。このDNA損傷の塩基特異性は、Gが2つ以上隣接している配列(poly G配列)中の5'側のGが強く損傷された。興味深いことに、がん抑制遺伝子*p53*のホットスポットの一つで

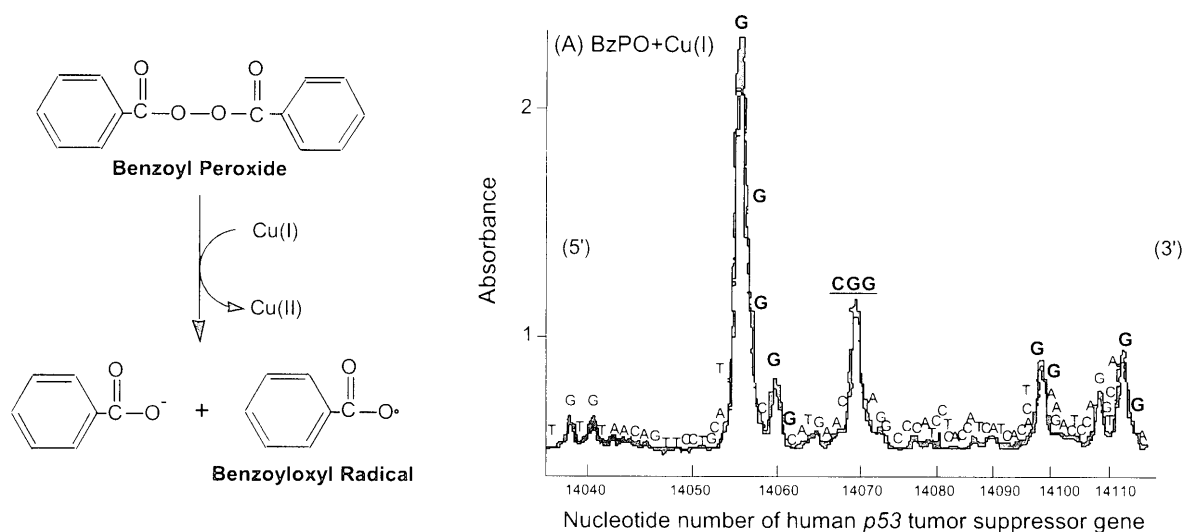


Fig. 4 Site specificity of DNA cleavage by BzPO in the presence of Cu(I). The reaction mixture contained the ^{32}P -5'-end-labeled 211-bp fragment, 20 μM /base of calf thymus DNA, 15 μM CuCl, and 50 μM BzPO in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.8 containing 2.5 μM DTPA. After incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 60 min, followed by the piperidine treatment, the DNA fragments were analyzed by the method described in the legend to Fig. 2.

あるコドン 248 の CGG 配列中の GG 配列を 2 塩基連続して損傷することが認められた (Fig. 4). また, Cu(I) 存在下における BzPO と H_2O_2 の DNA 損傷の塩基配列特異性を比較した結果, BzPO は poly G を, H_2O_2 は主に C や T を損傷したことから BzPO の DNA 損傷の活性種は銅—酸素錯体とは異なっていると考えられた. DNA 損傷の活性種を検討するために, 各種消去剤を用いて損傷の抑制効果を検討した. BzPO と Cu(I) による DNA 損傷は dimethyl sulfoxide では抑制されたが, H_2O_2 消去剤であるカタラーゼでは抑制されなかった. また, 前骨髄性白血病細胞 HL-60 とそのカタラーゼ過発現株の HP100 を用いて細胞内 8-oxodG 量を測定した結果, HL-60, HP100 ともに濃度依存的に 8-oxodG 量が増加し, HL-60 と HP100 間では有意な差が認められなかった. これらの結果から, BzPO による酸化的 DNA 損傷には, H_2O_2 の関与は非常に低いものと考えられる.

さらに, 電子スピン共鳴法 (ESR) を用いて活性種の同定を試みた. スピントラップ剤に PBN (α -phenyl-*N*-tert-butyl nitron) を用いて解析した結果, BzPO と Cu(I) の反応からフェニールラジカル ($a_{\text{N}} = 1.57 \text{ mT}$, $a_{\text{H}} = 0.35 \text{ mT}$) が生成していることが認められた. しかし, 現在までの研究において BzPO と Cu(I) の DNA 損傷の塩基特異性とフェニールラジカルによる塩基特異性は異なっていることが示されている. Swauger らは, BzPO からベンゾイルオキシラジカルが生成し, その後脱炭酸されフェニールラジカルが生成されることを報告している (Swauger et al., 1991).

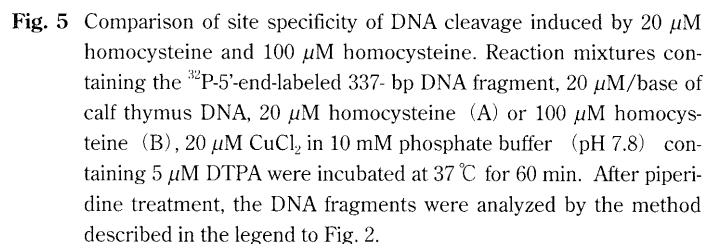
本研究から, BzPO は Cu(I) 存在下において酸化的に DNA 中の poly G 配列を損傷することが明らかになり,

その活性種はベンゾイルオキシラジカルと考えられる (Kawanishi et al., 1999). 以上のことから, BzPO のプロモーター作用にはラジカルによる酸化的な連続した G の損傷が重要な役割を果たしていることが示唆された. 特に, 本研究において, がん抑制遺伝子 *p53* のホットスポットの一つであるコドン 248 の GG 配列が 2 塩基連続して損傷していることが明らかになった. *p53* のコドン 248 の変異はヒトにおける色々なタイプのがんに広く認められている (Greenblatt et al., 1994). さらに, *p53* の 7 つのホットスポットのうち, 4 つにおいて GG の連続配列が存在する. BzPO による GG の 2 塩基連続損傷が *p53* 等のがん抑制遺伝子に変異をもたらし, 発がんのプロモーションやプログレッションに関与していると考えられる.

4. 天然アミノ酸ホモシステインによる銅—酸素錯体と $^1\text{O}_2$ を介した DNA 損傷

ホモシステインは天然アミノ酸の一種で, その血中濃度は食品因子の摂取量によって変化する. 葉酸やビタミン B 類の欠乏により血中のホモシステイン量が増加することが報告されている. 高ホモシステイン血症は動脈硬化を引き起こす. さらに, 最近, 血中ホモシステイン濃度の上昇は, 染色体損傷の危険因子となることが報告されている (Wu and Wu, 2002). 本研究では, ホモシステインによる酸化的 DNA 損傷とその機構を検討した.

Cu(II) 存在下においてホモシステインは 20 μM と 100 μM で DNA を損傷した. この損傷はピペリジン処理により増強されたことから, DNA 鎖の切断とともに糖や塩基の損傷も起こることが明らかになった. DNA 損傷



ったがメチオナルによって抑制されたことから、 $\bullet\text{OH}$ に類似した活性酸素種(銅—酸素錯体)の関与が示唆された. 一方, $100\ \mu\text{M}$ ホモシステインによるDNA損傷は, カタラーゼでは抑制されなかったことから, 過酸化水素を介さない活性種の生成経路の存在が示唆された. さらに, $100\ \mu\text{M}$ ホモシステインによる活性種を明らかにするため, 一重項酸素消去剤や化学発光法を用いて検討した結果, $^1\text{O}_2$ の関与が示唆された.

前骨髄性白血病細胞 HL-60 とそのカタラーゼ過発現株の HP100 を用いて細胞内 DNA 損傷性と活性種の解析を HPLC-ECD を用いて 8-oxodG を指標に行った。HL-60 においてホモシステインによる 8-oxodG の有意な増加が

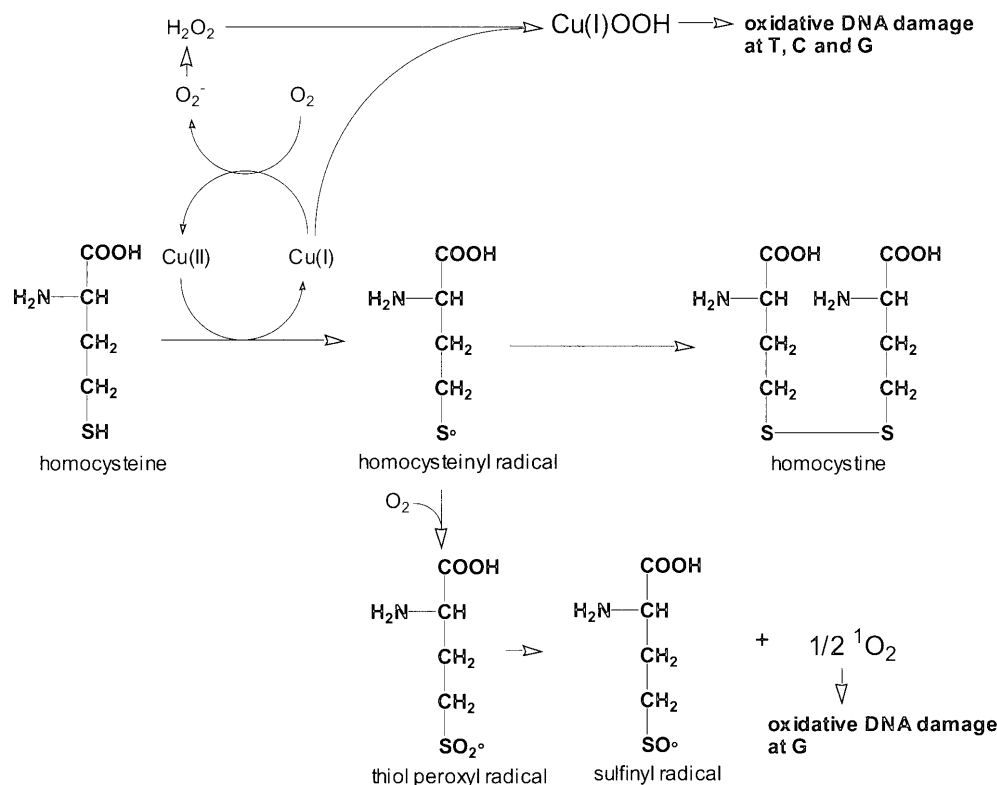


Fig. 6 Possible mechanisms of oxidative DNA damage induced by homocysteine plus Cu(II)

認められたが、HP100では認められなかった。従って、ホモシステインによる細胞内8-oxodGの生成にはH₂O₂が関与していることが示唆された。以上の結果から、低濃度のホモシステインによるDNA損傷には、H₂O₂とCu(I)から生成される金属-酸素錯体のようなクリプトOHラジカルが関与していることが示された。一方、比較的高濃度のホモシステインは¹O₂を生成し酸化的なDNA損傷をもたらすことから、ホモシステインによるDNA損傷には少なくとも2つの経路が存在することが明らかになった (Fig. 6) (Oikawa et al., 2003)。細胞内のDNA損傷には、過酸化水素の方がより重要な役割を果たしていると考えられる。我々はチロシンやトリプトファンなどアミノ酸代謝が原因となる発がん過程に酸化的DNA損傷が重要な役割を果たしていることをすでに報告している (Hiraku et al., 1998)。従って、ビタミン類などの欠乏により上昇したホモシステインが生体内の金属存在下で酸化的にDNAを損傷し発がんに関与する可能性が示唆されたため、さらなる研究が必要と思われる。

結 語

酸化ストレスによる発がんにおいて活性酸素や各種ラジカル類は、がん関連遺伝子(がん原遺伝子やがん抑制遺伝子)のホットスポットを損傷することにより突然変異を導入し潜在的ながん細胞を生じさせると考えられる。発がんに重要な役割を果たしているp53がん抑制遺伝子は肺癌組織中においてG→Tトランスポージョンが

変異全体の1/3を占め、そのうち約60%に酸化されやすいGG連続配列において点突然変異が認められている (Saito et al., 1996)。本研究では、発がんプロモーター過酸化ベンゾイルが、がん抑制遺伝子p53のホットスポットの一つであるコドン248のGG配列を2塩基連続して損傷することを明らかにした。さらに、我々は、太陽紫外線UVAによる電子移動を介したDNA損傷の塩基配列特異性として5'-GG-3'配列の5'側のGに著しく8-oxodGが生成していることを認めている。渋谷ら (Shibutani et al., 1991)は8-oxodG生成による突然変異のスペクトルとしてG→Tのトランスポージョンを報告している。これらのことから、ヒト皮膚腫瘍でのras遺伝子の変異のうちGG→TGの変異はこれまでUVBによる相補対のCCでのピリミジン光産物の生成によるとされてきたが、我々はUVAと生体内光増感分子による5'-GG-3'配列の5'側のGに生成した8-oxodGによるGG→TGのトランスポージョンの可能性も十分にありうると考えている。発がん物質ベンゾ[a]ピレンの代謝産物の一つであるbenzo[a]pyrene-7,8-dioneも、p53がん抑制遺伝子のホットスポットコドン273の相補的配列5'-ACG-3'のCとGを損傷するという非常に興味深い知見を得た。この連続二塩基の損傷(double base lesions)は、ビスフェノールA等の活性酸素を介する多くの発がん物質によるDNA損傷においても認められている。連続した二塩基損傷は修復されにくいことから、この様な酸化ストレスによるクラスターDNA損傷は、ホットスポットの生成など発

がん過程に重要な役割を果たしていると考えられる。

現在、膨大な化学物質の中から発がん物質を迅速かつ高精度に同定し、そのリスクを評価することが強く求められているが、未だ最適な方法はない。我々は、環境化学物質とその代謝物によるDNA損傷の塩基配列特異性の解析を行い、クラスターDNA損傷に注目しその機構解明を行っている。これらの研究に基づいて、環境化学物質とその代謝物によるクラスターDNA損傷性を定量化し、発がん性の強さとの相関性を求め、迅速かつ高精度なリスク評価法の構築を目指している。

謝 辞

この研究を遂行するに当たり、修復酵素AlkAは広島大学 井出 博教授に、BPAの代謝物3-OH-BPAは広島国際大学 吉原新一教授に提供していただいた。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- Feng, Z., W. Hu, J.X. Chen, A. Pao, H. Li, W. Rom, M.C. Hung and M.S. Tang (2002) Tang preferential DNA damage and poor repair determine ras gene mutational hotspot in human cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, 94, 1527-1536.
- Flowers, L., W.F. Bleczynski, M.E. Burczynski, R.G. Harvey and T.M. Penning (1996) Disposition and biological activity of benzo [*a*]pyrene-7,8-dione. A genotoxic metabolite generated by dihydrodiol dehydrogenase, *Biochemistry*, 35, 13664-13672.
- Greenblatt, M.S., W.P. Bennett, M. Hollstein and C.C. Harris (1994) Mutations in the *p53* tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis, *Cancer Res.*, 54, 4855-4878.
- Hiraku, Y., M. Yamasaki and S. Kawanishi (1998) Oxidative DNA damage induced by homogentisic acid, a tyrosine metabolite, *FEBS Lett.*, 432, 13-16.
- IARC Working Group (1983) In IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to humans; Polynuclear aromatic compounds, part 1, Vol. 32, pp. 33-91, 211-224, IARC, Lyon.
- Ito, K., S. Inoue, K. Yamamoto and S. Kawanishi (1993) 8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin, *J. Biol. Chem.*, 268, 13221-13227.
- Kawanishi, S., Y. Hiraku, M. Murata and S. Oikawa (2002) The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis, *Free Radic. Biol. Med.*, 32, 822-832.
- Kawanishi, S., Y. Hiraku and S. Oikawa (2001) Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging, *Mutat. Res.*, 488, 65-76.
- Kawanishi, S., S. Inoue and S. Sano (1986a) Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate(VI) in the presence of hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.*, 261, 5952-5958.
- Kawanishi, S., S. Inoue, S. Sano and H. Aiba (1986b) Photodynamic guanine modification by hematoporphyrin is specific for single-stranded DNA with singlet oxygen as a mediator, *J. Biol. Chem.*, 261, 6090-6095.
- Kawanishi, S., S. Oikawa, S. Inoue and K. Nishino (2002) Distinct mechanisms of oxidative DNA damage induced by carcinogenic nickel subsulfide and nickel oxides, *Environ. Health. Perspect.*, 110 Suppl 5, 789-791.
- Kawanishi, S., S. Oikawa, M. Murata, H. Tsukitome and I. Saito (1999) Site-specific oxidation at GG and GGG sequences in double-stranded DNA by benzoyl peroxide as a tumor promoter, *Biochemistry*, 38, 16733-16739.
- Kawanishi, S., K. Yamamoto and S. Inoue (1989) Site-specific DNA damage induced by sulfite in the presence of cobalt (II) ion. Role of sulfate radical, *Biochem. Pharmacol.*, 38, 3491-3496.
- National Toxicology Program (1982) Carcinogenesis bioassay of bisphenol A (CAS No. 80-05-7) in F344 rats and B6C3F1 mice (feed study), *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.*, 215, 1-116.
- Ohnishi, S. and S. Kawanishi (2002) Double base lesions of DNA by a metabolite of carcinogenic benzo [*a*]pyrene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290, 778-782.
- Oikawa, S. and S. Kawanishi (1998a) Distinct mechanisms of site-specific DNA damage induced by endogenous reductants in the presence of iron (III) and copper (II), *Biochim. Biophys. Acta.*, 1399, 19-30.
- Oikawa, S., K. Murakami and S. Kawanishi (2003) Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis, *Oncogene*, 22, 3530-3538.
- Oikawa, S., K. Nishino, S. Oikawa, S. Inoue T. Mizutani and S. Kawanishi (1998b) Oxidative DNA damage and apoptosis induced by metabolites of butylated hydroxytoluene, *Biochem. Pharmacol.*, 56, 361-370.
- Saito, M., S. Takahashi, Y. Uesaka and K. Enomoto (1996) *p53* gene mutations in the human lung carcinoma, *Nippon Rinsho.*, 54, 497-502.
- Shibutani, S., M. Takeshita and A.P. Grollman (1991) Grollman Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, 349, 431-434.
- Slaga, T.J., A.J. Klein-Szanto, L.L. Triplett, L.P. Yotti and K.E. Trosko (1981) Skin tumor-promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical-generating compound, *Science*, 213, 1023-1025.
- Swauger, J.E., P.M. Dolan, J.L. Zweier, P. Kuppusamy and T.W. Kensler (1991) Role of the benzoyloxyl radical in DNA damage mediated by benzoyl peroxide, *Chem. Res. Toxicol.*, 4, 223-228.
- Wu, L.L. and J.T. Wu (2002) Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker, *Clin. Chim. Acta.*, 322, 21-28.
- Yang, S.K., D.W. McCourt, J.C. Leutz and H.V. Gelboin (1977) Benzo [*a*]pyrene diol-epoxides: mechanism of enzymatic formation and optically active intermediates, *Science*, 196, 1199-1201.