

# 癌原性化学物質 (MNNG, 4 NQO 等) 処理培養ヒト細胞の修復 DNA 合成に關与 する DNA ポリメラーゼの研究

岡山大学医学部癌源研究施設生化学部門 (指導: 小田琢三教授)

細 木 宣 男

(昭和59年 5 月25日受稿)

**Key words:** 癌原性化学物質, 修復 DNA 合成  
DNA ポリメラーゼ, 培養ヒト細胞,  
aphidicolin, MNNG, 4 NQO

## 緒 言

細胞は常に、放射線、化学物質等による DNA 損傷の危険にさらされている。そこで細胞には損傷された DNA の修復機構が備わっており、これによって遺伝的連続性が保たれている。しかし何等かの理由で、損傷された DNA の修復が完全におこなわれなないか、あるいは誤った修復がおこなわれ固定された時は、場合場合によってこれが細胞の死、突然変異(あるいは癌化)、老化、進化等と関係することが知られている。このように DNA 損傷の修復は生命にとって本質的機構であるにもかかわらず、殆んど解明されておらず、これにあずかる DNA ポリメラーゼの分子種も同定されていない。哺乳類細胞の DNA ポリメラーゼは DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の 3 種に大別されているが<sup>1-4)</sup>、修復 DNA 合成にあずかるのは、ポリメラーゼ  $\alpha$ <sup>5-16)</sup>、 $\beta$ <sup>17-25)</sup> あるいは  $\alpha$  と  $\beta$ <sup>26-32)</sup> であると報告されている。このようにまちまちな結果がえられている理由として細胞の違い、DNA 損傷の違い、測定法の違い等があげられている。

これまでの研究は紫外線で誘導した修復 DNA 合成についての研究が主体であったが、本研究では癌原性化学物質で損傷された DNA の修復にあずかる DNA ポリメラーゼの分子種を明らかにし、また DNA 損傷剤の違いによって關与するポリメラーゼの違いがあるかどうかを明ら

かにする目的で、培養ヒト細胞に N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), 4-nitroquinoline-1-oxide (4 NQO), methyl methanesulfonate (MMS), N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 等で誘導した修復 (不定期) DNA 合成にあずかる DNA ポリメラーゼの分子種を DNA ポリメラーゼの選択的、特異的阻害剤を用いて検討した。

## 材 料 と 方 法

チミジン (dThd), デオキシヌクレオシド・三リン酸 (dNTPs) と 2', 3'-dideoxythymidine-5'-triphosphate (ddTTP) は PL biochemicals Co. (Milwaukee, USA) から、<sup>[3H]</sup> dThd と <sup>[3H]</sup> dTTP はアマシャムジャパン株式会社 (東京) から買入した。N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), 4-nitroquinoline-1-oxide (4 NQO) は和光純薬工業株式会社 (大阪), methyl methanesulfonate (MMS) は東京化成工業株式会社 (東京), N-methyl-N-nitrosourea (MNU) は半井化学薬品株式会社 (京都), hydroxyurea (HU) は Nutritional Biochemical Corp. (Ohio, USA) また N-ethylmaleimide (NEM) は Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) から買入した。Aphidicolin は Imperial Chemical Industries (Cheshire, England) の Dr. A.H. Todd から恵与を受けた。他は国内市販試薬を使用した。

## 1) 細胞と培養

HeLa-S 3 細胞と HEP-2 細胞は当教室で液体窒素に保存されていたものをもどし使用した。これらの細胞は 5% CO<sub>2</sub>-飽和水蒸気中、37°C で 10% 牛血清添加イーグル MEM 培地 (日水製薬株式会社, 東京) で直径 100 mm のプラスチックペトリ皿に単層培養した。

以下の実験は特にことわらない限り、水中 (0°C) で操作した。

## 2) 生細胞の DNA 合成

植継ぎ後 3 日目に、細胞密度 70% 程度になったところで 0.25% trypsin-0.02% EDTA, 37°C で処理して細胞を単離し、新鮮な培養液に懸濁し、培養液で 1 回洗った後、新鮮な培養液に再び懸濁し細胞数を測定し、 $1 \times 10^6$  細胞ずつ試験管に移した。試験管を 2 つのグループに分け、一方は 0.59 ml の培養液、他方は 10 mM hydroxyurea を含む 0.59 ml の培養液に懸濁して 37°C, 30 分間 incubate した。そして癌原性化学物質、DNA 合成阻害剤、<sup>3</sup>H)dThd (1 μM, 5 Ci/mmol) を加えて終液量を 0.6 ml とし、さらに 37°C, 2~3 時間 incubate した。試験管を水中で冷却したのち、1000 xg, 10 分間遠心して培養液を除き、細胞を 0.6 ml の Triton-buffer B (0.0175% Triton X-100, 0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 6 mM 2-mercaptoethanol, pH 8.0) に懸濁、更に 2 ml の 7.5% trichloroacetic acid (TCA)-1% pyrophosphate (ppi) を加えた。酸不溶性画分を glass fiber filter (Whatman GF/C, 2.4 cm) に回収し、5% TCA 4 ml で 6 回洗滌したのち、フィルターを乾燥し、バイアルに入れ、トルエン・ベースのシンチレーターを加え、酸不溶性画分 (DNA) に取り込まれた <sup>3</sup>H 量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

## 3) Permeable 細胞の DNA 合成

修復 DNA 合成に関与する DNA ポリメラーゼの分子種を明らかにする目的で、ヌクレオチドや阻害剤の透過が容易な permeable 細胞を調製して検討した<sup>33)</sup>。さきのように trypsin-EDTA 処理で HeLa 細胞を回収し、新鮮な培養液で 1 回洗った後、対照群は新鮮な培養液に、実験群は 10 mM hydroxyurea と MNNG 100 μg/0.6

ml 含む培養液に  $1 \times 10^6$  cells/0.6 ml の細胞密度に懸濁し、37°C, 2 時間 incubate した後、冷却・遠心した。沈渣の細胞をさきの Triton-buffer B に懸濁して 1 回洗い、0.0117% Triton X-100, 0.167 M sucrose, 0.67 mM EDTA, 4 mM 2-mercaptoethanol, 40 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.08 M NaCl, 50 μM dATP, 10 μM dCTP, 50 μM dGTP と 2.5 μM [<sup>3</sup>H] dTTP (5 Ci/m mol) を含む液 (pH 8.0) 0.6 ml に懸濁し、37°C, 30 分間 incubate して DNA 合成を行なわせた<sup>26)</sup>。酸不溶性画分に取り込まれた <sup>3</sup>H 量はさきに述べたフィルター法で測定した。

## 4) 修復 DNA 合成のオートラジオグラフィ

プラスチック製ペトリ皿 (直径 50 mm) にカバーガラスを切って作った短冊 (10×30 mm) 3 枚を並べて入れ、その上に細胞を培養した。細胞密度が 70% 飽和程度に達したところで、培養液を除き、ペトリ皿を 2 群に分け、一群には新鮮な培養液を、他の群には 10 mM hydroxyurea を含む新鮮な培養液を 1.98 ml 加えて、37°C, 30 分間 incubate した。ついで癌原性化学物質、DNA 合成阻害剤および [<sup>3</sup>H] dThd (2.5 μCi/ml, 20 Ci/m mol) を加えて 37°C, 2~3 時間培養した。標識後、培養液を除き、りん酸緩衝生理的食塩水で洗い、酢酸・エタノール (1:3) 液で 10 分間固定後、細胞の生えているカバーガラス製短冊を取り出し乾燥した。過塩素酸の 2% 水溶液で 4 回洗って、酸可溶性のアイソトープを除き、よく水洗したのち乾燥した。短冊は細胞面を上にしてスライドガラスに貼りつけ、暗室でオートラジオグラフィ用写真乳剤 (サクラ NR-M2) で覆い、乾燥剤入りの暗箱に入れ、4°C で露出した。テスト現像で至適露出時間をきめ、本現像、定着、水洗を行ない、ギムザ染色をほどこして鏡検した。銀粒子数の計測は方眼接眼マイクロメーター (5 mm<sup>2</sup> 各 10 等分) を装着して行ない、一標本当り 100 細胞核について計測し、ヒストグラムを作製した。

## 実 験 結 果

## 1) MNNG 処理細胞の DNA 合成

MNNG 100 μg/ml (0.68 mM) と hydroxyurea 10 mM 存在下での [<sup>3</sup>H]dThd の HeLa

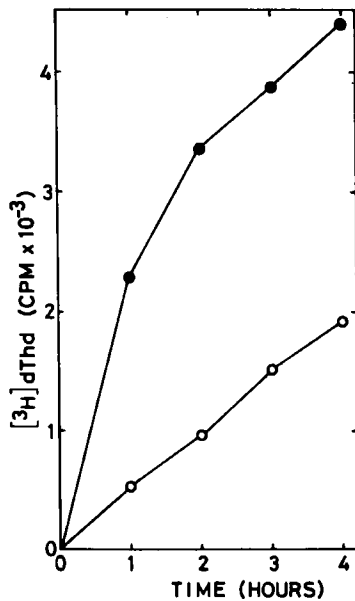


図1. MNNG 処理および非処理 HeLa 細胞の DNA 合成の経時的变化。DNA 合成は 10 mM hydroxyurea 存在下, [<sup>3</sup>H] dThd の酸不溶性画分への取込で測定した。MNNG は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶かした濃厚液を作成し 1/120 量添加した。対照には同量の DMSO を添加した。●, 100 μg/ml MNNG 処理細胞; ○, MNNG 非処理細胞。取込量は cpm/10<sup>6</sup> 細胞で示した。

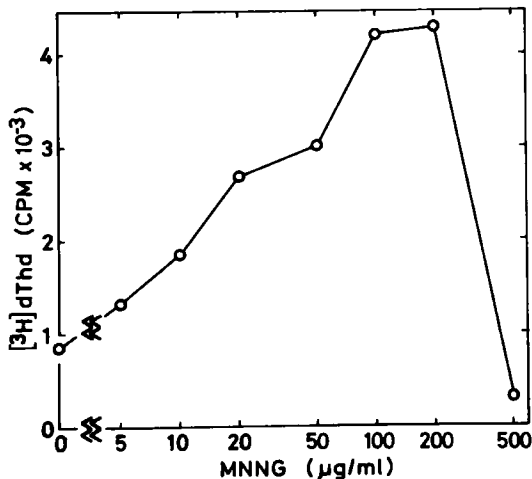


図2. MNNG の濃度と DNA 合成。投与する MNNG の濃度を図のように変えて, 10 mM hydroxyurea 存在下, HeLa 細胞 DNA への [<sup>3</sup>H] dThd の取込量 (cpm/10<sup>6</sup> 細胞/2 時間) を測定した。

細胞核 DNA への取込は, 図1 黒丸実線の如くで, 経時的に取込量の増加が認められた。Hydroxyurea 10 mM を添加した対照は白丸実線の如くであり, 図は MNNG 添加により, 明らかに DNA 合成量が増加することを示している。Hydroxyurea は複製的 DNA 合成を強く阻害し, 修復 DNA 合成を殆んど阻害しないので<sup>34)</sup>, 修復 DNA 合成を測定する目的で以下の実験においても使用した。図2は MNNG 濃度の [<sup>3</sup>H]-dThd 取込量に与える効果をみたもので, MNNG 100~200 μg で最大の取り込み活性を示した。その活性は MNNG を加えない対照の約 4 倍で, あとで述べるように複製的 DNA 合成活性が MNNG で強く抑制されることも考慮すると, 実測される MNNG 処理細胞の DNA 合成活性の 90% 以上が MNNG で誘導された修復 DNA 合成活性と考えられた。以下の実験では MNNG の濃度は 100 μg/ml とし, [<sup>3</sup>H]dThd による標識は 2 時間行なった。

2) 4 NQO, methyl methanesulphonate (MMS) の濃度と DNA 合成

Hydroxyurea 10 mM 存在下 HeLa 細胞の DNA 合成は図3, 4 で示されるように 4 NQO や MMS で促進された。最大活性は 4 NQO 10~50 μM, MMS 0.5~1 mM でえられ, 対照の 3~4 倍の活性を与えた。N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 1 mM でも同様な活性促進効果が認められた。あとで述べるように, これらの薬剤も MNNG 同様に, 複製的 DNA 合成を反って抑制するので, これら薬剤の最大活性を与える濃度での DNA 合成は大部分修復 DNA 合成と推定された。以下の実験では 4 NQO, MMS, MNU の濃度はそれぞれ 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-3</sup> M, 10<sup>-3</sup> M とし, [<sup>3</sup>H] dThd による標識は 3 時間行なった。

3) 癌原性化学物質処理および非処理細胞の DNA 合成の aphidicolin 感受性

Cephalosporium aphidicola の培養液から分離された tetracyclic diterpene-tetraol の aphidicolin は, 精製, 部分精製および生細胞の DNA ポリメラーゼ α を特異的に阻害し, DNA ポリメラーゼ β と γ は全く阻害しないことが知られている<sup>35,36)</sup>。複製的 DNA 合成は aphidicolin で

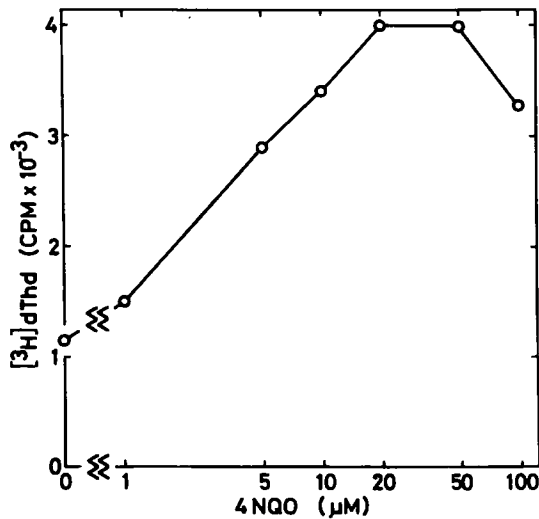


図3. 4NQOの濃度とDNA合成. 投与する4NQOの濃度を変えて, 10mM hydroxyurea存在下, HeLa細胞DNAへの(<sup>3</sup>H)dThdの取込量 (cpm/10<sup>6</sup>細胞/3時間)を測定した. 4NQOはethyl alcoholで120倍の濃厚液を作成して添加し, 対照には同量のethyl alcoholを添加した.

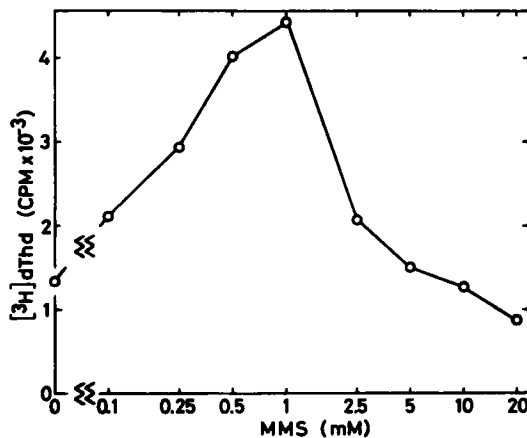


図4. MMSの濃度とDNA合成. 投与するMMSの濃度を変えて, 10mM hydroxyurea存在下, HeLa細胞DNAへの(<sup>3</sup>H)dThdの取込量 (cpm/10<sup>6</sup>細胞/3時間)を測定した. MMSは水溶液として使用した.

ほぼ完全に阻害され, 主としてDNAポリメラーゼαによって行なわれていることが知られている<sup>36)</sup>. そこで本実験では, 修復DNA合成のaphidicolin感受性を調べるにあたって複製的DNA合成を内部対照とした. 複製的DNA合成(表1の“control”)と癌原性化学物質で処

表1. DNA synthesis in carcinogen-treated or nontreated cells measured with or without hydroxyurea and aphidicolin

Cells	Condition	[ <sup>3</sup> H]dThd incorporated (cpm/10 <sup>6</sup> cells)			
		DMSO	Aphidicolin (10 μg/ml)	Hydroxyurea (10 mM)	
				DMSO	Aphidicolin
HeLa	MNNG (100 μg/ml)	4378	531	3757	816
	Control	74530	1255	1156	213
	MNNG-dependent			2601	603
	4NQO (10 μM)	21257	2146	4120	847
	Control	41778	953	793	209
	4NQO-dependent			3327	638
HEp-2	MNNG	4745	694	3337	1004
	Control	76321	1273	1924	445
	MNNG-dependent			1413	559
	4NQO	10592	2066	5886	2986
	Control	45002	732	992	242
	4NQO-dependent			4894	2744

表2. Aphidicolin-resistant fractions of replicative DNA synthesis and DNA synthesis in carcinogen-treated cells

Cells	Carcinogen (concentration)	Aphidicolin-resistant DNA synthesis (%)		
		Replicative DNA synthesis	DNA synthesis in carcinogen-treated cells	Carcinogen-dependent DNA synthesis
HeLa	MNNG (100 μg/ml)	1.7	21.7	23.2
	4NQO (10 μM)	2.3	20.6	19.2
	MMS (1 mM)	1.9	10.0	7.5
	MNU (1 mM)	1.6	18.1	18.3
HEp-2	MNNG (100 μg/ml)	1.7	30.1	39.6
	4NQO (10 μM)	2.3	50.7	56.1

DNA synthesis in carcinogen-treated cells was measured in the presence of 10 mM hydroxyurea. Aphidicolin was added at the concentration of 10 μg/ml (30 μM).

理した細胞のDNA合成のaphidicolin感受性は表1, 2の如くであった. 本実験でaphidicolinはdimethylsulfoxide (DMSO)に溶解した濃厚液を少量反応液に加え, 終濃度を10μg/mlとした. 対照には同量のDMSOを加えた. 本研究に用いた癌原性化学物質は, いずれもDNAを損傷することによって修復DNA合成を誘導したが, 同時に複製的DNA合成を抑制した. なかでもMNNGの複製的DNA合成の抑制は顕著であった. Hydroxyurea非存在下で測定された癌原性化学物質処理細胞のDNA合成は, 誘導された修復DNA合成と抑制を免れた複製的DNA合成の和を示している. 癌原性化学物質処理細胞の修復DNA合成活性は次の2方法で推定した. まず10mM hydroxyurea存在下で測定されたDNA合成活性は, 先にも述べたように大部分修復DNA合成活性と考えられるので, これを修復DNA合成活性とみなした. または10mM hydroxyurea存在下でえられた癌

原性化学物質処理細胞の DNA 合成活性から、非処理細胞のそれを差引いた値(表 1 の MNNG-dependent, 4NQO-dependent, 表 2 の carcinogen-dependent DNA synthesis) を修復 DNA 合成活性とみなした。表 2 はこのようにして求めた修復 DNA 合成活性と、複製的 DNA 合成活性の aphidicolin 10  $\mu$ g/ml (30  $\mu$ M) に対する抵抗性(感受性)を示している。Aphidicolin で、対照の複製的 DNA 合成は HeLa 細胞でも HEP-2 細胞でも一様に 98% 前後阻害された。一方、先の 2 方法で推定した癌原性化学物質処理細胞の修復 DNA 合成の aphidicolin 感受性は、方法間の差は少なくともほぼ一致し、複製的 DNA 合成の aphidicolin 感受性より明らかに低い値を示した。修復 DNA 合成の aphidicolin 感受性は、DNA 損傷を与える癌原性化学物質の種類によって、また細胞の種類によってかなりの差異が認められた。

#### 4) 修復 DNA 合成のオートラジオグラフィによる検討

前述のように DNA 合成活性測定の結果からも、修復 DNA 合成への複製的 DNA 合成混入の程度が推定可能であるが、細胞集団全体としての活性を測定しているため、厳密には細胞集団中の特定の細胞周期にある細胞の活性だけを反映している可能性を除外できない。先のような方法で誘導される修復 DNA 合成は、細胞周期にかかわらず、全ての生細胞に誘導されることが知られている。そこでこれを確かめることにより、測定している活性が修復 DNA 合成であることを明らかにし、更に複製的 DNA 合成混入の程度を知る目的で、オートラジオグラフィによる検討を行なった(図 5, 6)。またオートラジオグラムから、標識銀粒子数-標識細胞(%) のヒストグラムを作成した(図 7, 8)。図 7, 8 で核当りの銀粒子数が 0-10 (MNNG

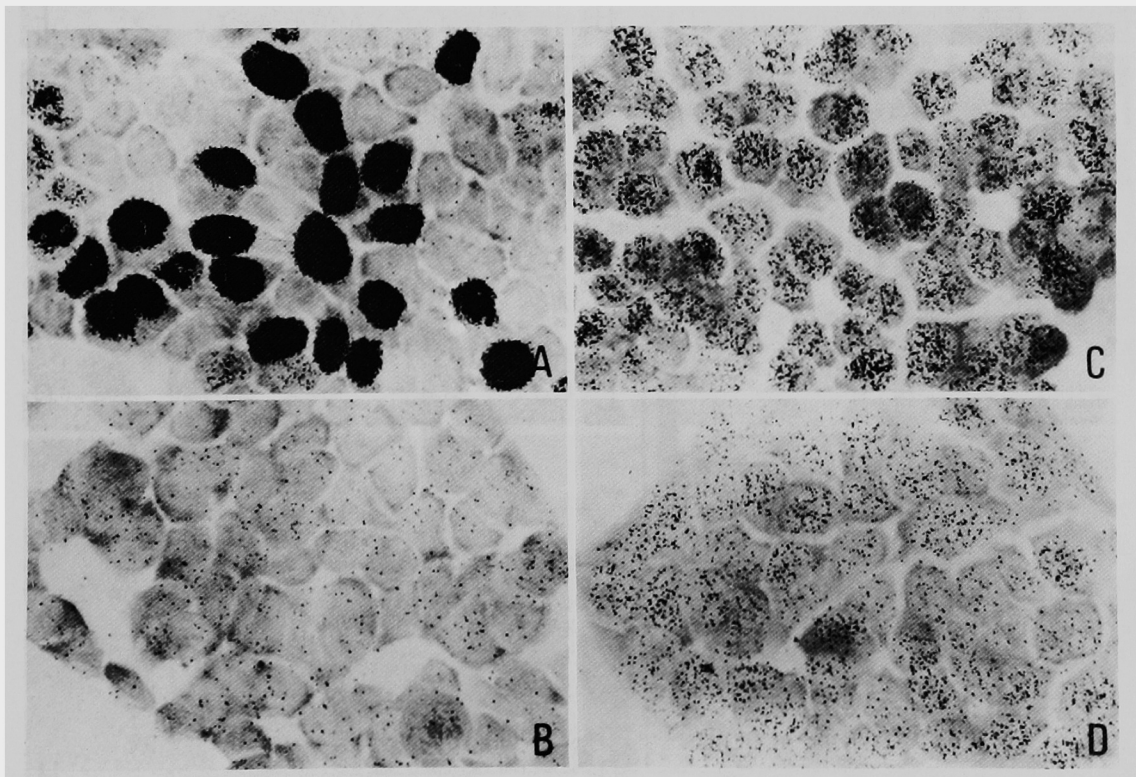


図 5. MNNG 誘導修復 DNA 合成のオートラジオグラム。A, B; MNNG 非処理対照 HeLa 細胞 DNA 合成(複製的 DNA 合成); C, D; 100  $\mu$ g/ml MNNG 処理 HeLa 細胞 DNA 合成。A と C には DNA 合成阻害剤を添加せず、B と D には 10mM hydroxyurea と 10  $\mu$ g/ml aphidicolin を添加して、方法の項で記したように DNA 合成を行なさせた後オートラジオグラムを作成した。

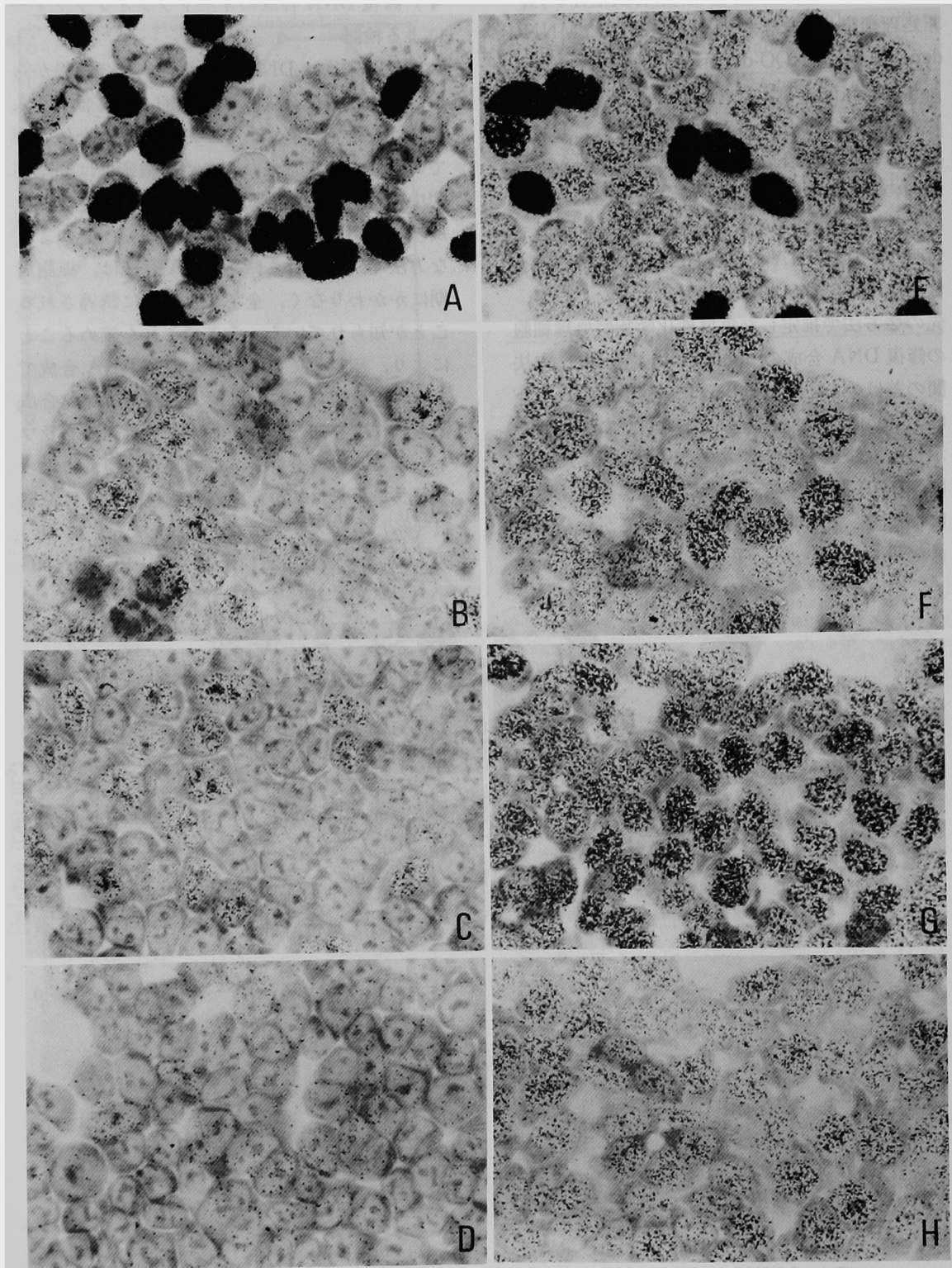


図6. 4NQO誘導修復DNA合成のオートラジオグラム。A, B, C, D; 4NQO非処理対照HeLa細胞DNA合成(複製的DNA合成); E, F, G, H;  $10^{-5}$ M 4NQO処理HeLa細胞DNA合成。A, EにはDNA合成阻害剤を添加せず, B, Fには $10\mu\text{g}/\text{ml}$  aphidicolin添加, C, Gには $10\text{mM}$  hydroxyurea添加, D, Hには $10\mu\text{g}/\text{ml}$  aphidicolinと $10\text{mM}$  hydroxyureaを添加して, 方法の項で記したようにDNA合成を行なわせたのちオートラジオグラムを作成した。

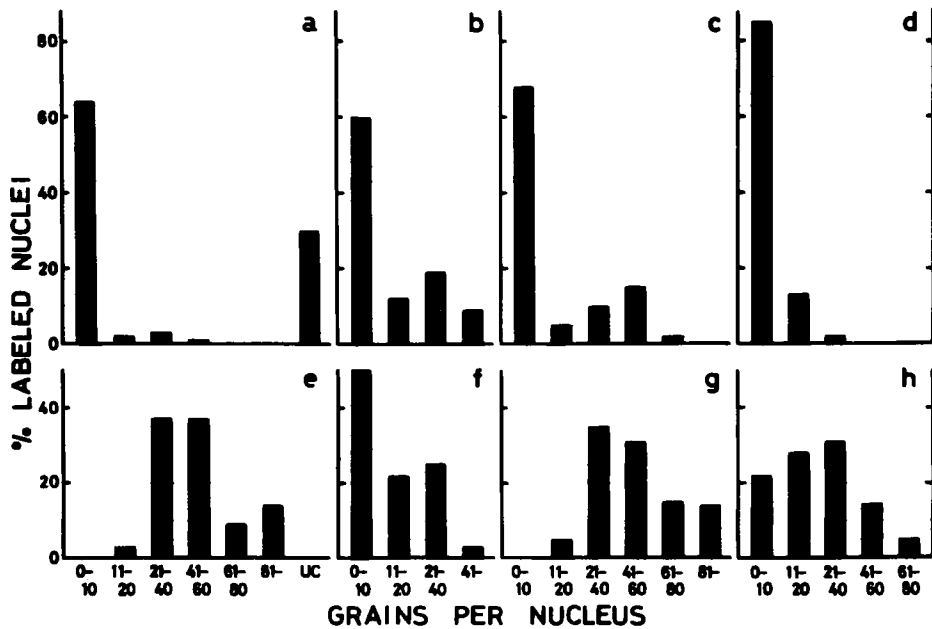


図 7, MNNG 誘導修復 DNA 合成のオートラジオグラフィーによる解析. a, b, c, d ; MNNG 非処理対照 HeLa 細胞 : e, f, g, h ; 100  $\mu$ g/ml MNNG 処理 HeLa 細胞. a と e には DNA 合成の阻害剤を添加せず, b と f には 10  $\mu$ g/ml aphidicolin 添加, c と g には 10 mM hydroxyurea 添加, d と h には 10  $\mu$ g/ml aphidicolin と 10 mM hydroxyurea を添加した. 銀粒子が多く計測できない細胞の比率は "UC" column に示した.

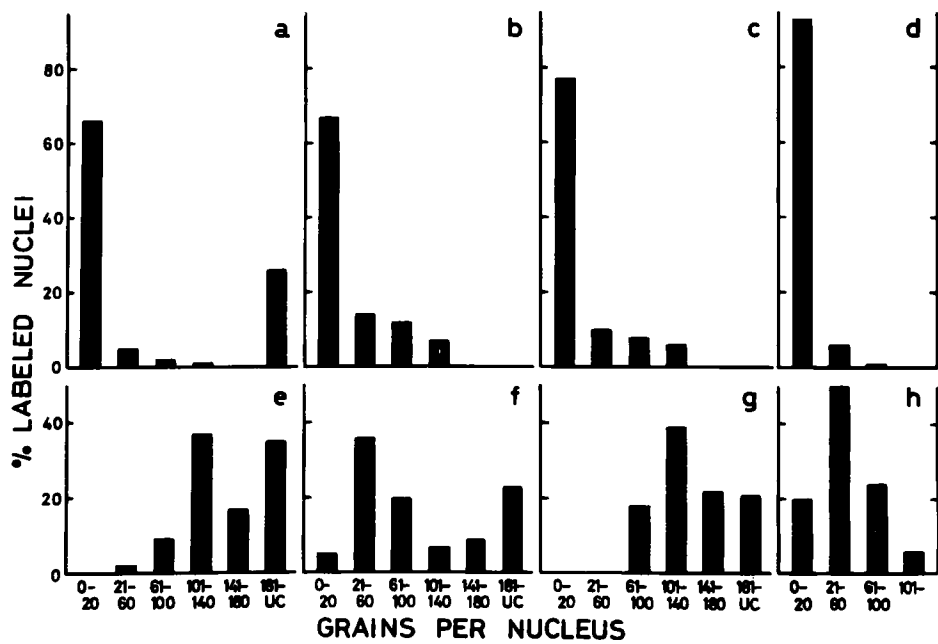


図 8, 4NQO 誘導修復 DNA 合成のオートラジオグラフィーによる解析. a, b, c, d ; 4NQO 非処理対照 HeLa 細胞 : e, f, g, h ; 10<sup>-5</sup>M 4NQO 処理 HeLa 細胞. DNA 合成阻害剤 (hydroxyurea と aphidicolin) は図 7 と同様に添加した.

表3, Effects of combination of inhibitors on unscheduled DNA synthesis (UDS) in HeLa cells permeabilized after pretreatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in vitro

Inhibitor			UDS (cpm per 10 <sup>6</sup> cells)	% Activity to control
ddTTP (20 μM)	Aphidicolin (30 μM)	NEM (1 mM)		
-	-	-	3273	100
+	-	-	2939	90
-	+	-	673	21
-	-	+	198	6
+	+	-	334	10
+	-	+	17	1
-	+	+	239	7

More than 83 % of the DNA synthesis depended on the MNNG pretreatment.

の実験)あるいは0—20(4 NQOの実験)はback groundのばらつき内にあり,このcolumnは有意に標識されていない細胞核の比率を示している。またUCで示すcolumnは,標識銀粒子数が多くて計測できない細胞核の比率を示している。図7a, 8aのUC columnは複製的DNA合成を行なっている細胞(S期細胞, 図5A, 6Aで強く標識されている細胞)の大体の比率を示している。図6Bおよび図7b, 8bは10 μg/ml aphidicolinで, また図6Cおよび図7c, 8cは10 mM hydroxyureaで複製的DNA合成が強く阻害されることを示している。このように癌原性化学物質非処理の対照はS期(約30%)の細胞のみが有意に標識されているが, MNNGあるいは4 NQO処理により, 修復DNA合成が誘導され(図5C, 6Eおよび図7e, 8e), S期と無関係に全ての細胞が有意に標識された。MNNG, 4 NQOは共に複製的DNA合成を阻害し, その阻害の度合はMNNGの方が強いことを活性測定で述べたが, その結果が図5C, 6Eおよび図7e, 8eに反映されている。Aphidicolin 10 μg/mlとhydroxyurea 10 mMで複製的DNA合成はほぼ完全に阻害されるが(図5B, 6Dおよび図7d, 8d), 癌原性化学物質で誘導された修復DNA合成の阻害は部分的で, 各細胞核当りの銀粒子数は減少しているが, 80%程度の細胞は有意に標識された(図5D, 6Hおよび図7h, 8h)。このように先の活性測定で得られた結果が, オートラジオグラフィ

によっても確認された。更にオートラジオグラフィの結果は, 修復DNA合成のaphidicolin抵抗性が細胞周期の一時期の細胞に局限したものでないことを示している。

#### 5) 修復DNA合成のpermeable cell法による解析

あらかじめ生細胞をMNNG 100 μg/mlで処理したのち, ヌクレオチドや阻害剤の透過可能なpermeable細胞を調製し, 4つのデオキシヌクレオシド・三リン酸(dNTPs)を含む適当な反応条件の下でDNA合成を行なわせると, MNNGに依存した修復DNA合成を行なわせることができる。表3に示した実験では, DNA合成活性の83%以上がMNNG前処理に依存していた。このDNA合成はDNAポリメラーゼβとγの選択的阻害剤であるddTTP<sup>37)</sup>で10%阻害され, DNAポリメラーゼαの特異阻害剤であるaphidicolinで79%阻害され, DNAポリメラーゼαとγの選択的阻害剤であるN-ethylmaleimide<sup>38)</sup>で94%阻害された。DNAポリメラーゼαとβを阻害する組み合わせ, すなわちaphidicolinとddTTPあるいはN-ethylmaleimideとddTTPの組み合わせで阻害が増すことから, この修復DNA合成にはDNAポリメラーゼαとβが共に関与していることが示唆された。

#### 考 察

哺乳類細胞のDNA合成に関与するDNAポリメラーゼはDNAポリメラーゼα, β, γの3種に大別されている<sup>1-4)</sup>。DNAポリメラーゼαは通常核に局在し, 多形性を示し複数種からなる可能性も示されている<sup>2,3,38)</sup>。特にそのクロマチン結合型は細胞周期に応じて変動し, S期に増加することから, 早くから複製的DNA合成に関与していることが示唆されていた<sup>2,38)</sup>。DNAポリメラーゼγは大部分ミトコンドリアに局在しており, ミトコンドリアのDNA合成に関与していることが示唆されてきた<sup>38,39)</sup>。一方DNAポリメラーゼβは核に局在しているが, 細胞周期でその量が殆んど変動せず, DNA損傷に引き続いて増量することが観察され<sup>17)</sup>。DNAポリメラーゼの99.2%がβ-ポリメラーゼでα-ポリメラーゼを含まない神経細胞が紫外線で誘導さ

れた修復 DNA 合成を行ないることなどから<sup>18)</sup>, DNA ポリメラーゼ  $\beta$  が修復 DNA 合成において主役を演じていることが示唆されてきた<sup>17-20)</sup>. ところが 1978 年 aphidicolin が DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の特異的阻害剤であることが見出され<sup>35)</sup>, これを用いて DNA ポリメラーゼの生理的役割が検討されるようになって以来, 修復 DNA 合成に関与するポリメラーゼについては,  $\alpha$ -ポリメラーゼとする報告と  $\beta$ -ポリメラーゼとする報告とが相対立するに至った<sup>5-16,21-25)</sup>. 最近では, DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  と  $\beta$  とが共に関与しているとする報告も散見されるようになった<sup>26-32)</sup>. このように多様な結果がえられる理由として細胞の種類と状態, 修復される DNA 損傷の種類と程度, 測定方法の違い等にもとづく可能性が示されている<sup>14,26,28-31)</sup>.

本研究では紫外線類似の修復 DNA 合成を誘導することが知られている 4NQO とイオン化放射線類似の修復 DNA 合成を誘導することが知られているアルキル化剤 (MNNG, MMS, MNU) を用いて, 培養ヒト細胞に誘導した修復 DNA 合成に関与する DNA ポリメラーゼの分子種を, まず DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の特異阻害剤である aphidicolin を用いて検討した. Aphidicolin は DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の基質結合部位の近傍に可逆的に結合して酵素反応を阻害すると考えられており, その阻害は DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の濃度と基質 dNTPs の濃度によって影響を受け, これらが高いと相対的に阻害度が低下することが知られている<sup>36)</sup>. またこの点が, aphidicolin 感受性で修復 DNA 合成に関与するポリメラーゼの分子種を検討したこれまでの研究が, まちまちな結果を与えている理由の一つとなっている<sup>14)</sup>. そこで本研究では, ポリメラーゼ  $\alpha$  に依存していることが明らかにされている複製的 DNA 合成を内部対照として, 修復 DNA 合成の aphidicolin 感受性を検討した. 使用した細胞の周期時間は 24 時間余りで, G<sub>2</sub> 期, M 期は短く, 大多数の細胞は G<sub>1</sub> 期か S 期にあった. DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の濃度も dNTPs の濃度も G<sub>1</sub> 期に比し S 期が高いことから<sup>2,3,40,41)</sup>, 全ての細胞に誘導される修復 DNA 合成が S 期細胞のみに惹起される複製的 DNA 合成よりも

明らかに aphidicolin 抵抗性であることは, この違いが DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  や dNTPs の濃度の差にもとづくのではなく, 修復 DNA 合成に  $\alpha$ -ポリメラーゼのみならず, non- $\alpha$ -ポリメラーゼも関与していることを示唆している. Aphidicolin による阻害の度合からみて, 修復 DNA 合成における  $\alpha$ -ポリメラーゼと non- $\alpha$ -ポリメラーゼの関与の比率は DNA 損傷の違い, 細胞の違い等によって変動することが示唆された. Non- $\alpha$ -ポリメラーゼの性状については, permeable 細胞を用いて検討した結果, DNA ポリメラーゼ  $\beta$  であることが示唆された.

我々はすでにプレオマイシンや紫外線で誘導した修復 DNA 合成に, DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  と  $\beta$  の 2 種のポリメラーゼが関与していることを示唆しており<sup>31,32)</sup>, 本研究の結果と総合すると, 哺乳類細胞の修復 DNA 合成は一般的にこれら 2 種のポリメラーゼによってになわれているものと推定される.

これまで修復 DNA 合成に関与する DNA ポリメラーゼの研究は, 主として紫外線で誘導された修復 DNA 合成についてなされてきた. これに対し, アルキル化剤で誘導した修復 DNA 合成についての研究は, 次の数グループの研究者によって報告されているに過ぎない. Ciarrocchi ら<sup>7)</sup>, Bermúdez<sup>9)</sup>, Yamada ら<sup>16)</sup> は, アルキル化剤で誘導した修復 DNA 合成は DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  によってになわれていると報告しており, Miller と Chinault は<sup>28)</sup>, 多分 aphidicolin 抵抗性の DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  が関与しているであろうと報告している. 本実験の結果は, 先にも述べたようにこれらと異なり,  $\alpha$ -ポリメラーゼと non- $\alpha$ -ポリメラーゼが共に関与していることを示唆したが, 最近 N-acetoxy-2-acetylaminofluorene と N-methyl-N-nitrosourea でヒト二倍体線維芽細胞に誘導した修復 DNA 合成について, 同様な結果が Dresler と Lieberman によって報告された<sup>30)</sup>. 4NQO で誘導した修復 DNA 合成についての検討は Ciarrocchi ら<sup>7)</sup> によってなされているが, 本実験の結果と異なり,  $\alpha$ -ポリメラーゼによって行なわれていることを示唆している. 彼等は複製的 DNA 合成と修復 DNA 合成の間に aphidicolin 感受性の差を認め

ておらず、この点本実験結果と明らかに異なるが、その理由は不明である。

以上本研究では癌原性化学物質で誘導した修復 DNA 合成に DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  と non- $\alpha$ -DNA ポリメラーゼ (DNA ポリメラーゼ  $\beta$  と思われる) が共に関与していることを示唆したが、両ポリメラーゼの修復合成における機能上の差異と相互関係を明らかにし、また DNA 修復の fidelity が両ポリメラーゼによってどのように保たれ、どのような要因によって低下させられるかを明らかにすることが今後の重要な課題と考えられる。

### 結 語

癌原性化学物質である N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 4-nitroquinoline-1-oxide, methyl methanesulfonate および N-methyl-N-nitrosourea 処理で培養ヒト細胞 (HeLa および HEP-2 細胞) に誘導した修復 DNA 合成に関与する DNA ポリメラーゼの分子種を検討した。

修復 DNA 合成活性の測定を生化学的方法とオートラジオグラフィの 2 方法によって行ない、DNA ポリメラーゼの選択的阻害剤 (aphidicolin, ddTTP, NEM など) を用いて解析した結果、これらの物質で誘導された修復 DNA 合成は、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  と non- $\alpha$ -DNA ポリメラーゼ (恐らくは DNA ポリメラーゼ  $\beta$ ) によって行なわれていることを明らかにした。また修復 DNA 合成に対する両ポリメラーゼ関与の比率は細胞の種類、癌原性化学物質の種類等で異なることを示唆した。

### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始、御指導と御校閲を賜りました恩師、小田琢三教授ならびに関周司助教授に深甚の謝意を表します。また多大な御協力をいただきました渡辺晰子助手、中村孝志技官、安井民枝さん、並びに教室の方々に心から御礼申し上げます。

### 文 献

1. Weissbach, A., Baltimore, D., Bollum, F., Gallo, R.C. and Korn, D.: Nomenclature of eukaryotic DNA polymerases. *Science* 190, 401—402, 1975.
2. Sarngadharan, M.G., Robert-Guroff, M. and Gallo, R.C.: DNA polymerases of normal and neoplastic mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 516, 419—487, 1978.
3. Weissbach, A.: The functional roles of mammalian DNA polymerase. *Arch. Biochem. Biophys.* 198, 386—396, 1979.
4. Lehman, A.R. and Karran, P.: DNA repair. *Intern. Rev. Cytol.* 72, 101—146, 1981.
5. Hanaoka, F., Kato, H., Ikegami, S., Ohashi, M. and Yamada, M.: Aphidicolin does inhibit repair replication in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 575—580, 1979.
6. Berger, N.A., Kurohara, K.K., Petzold, S.J. and Sikorski, G.W.: Aphidicolin inhibits eukaryotic DNA replication and repair — implications for involvement of DNA polymerase  $\alpha$  in both processes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89, 218—225, 1979.
7. Ciarrocchi, G., Jose, J.G. and Linn, S.: Further characterization of a cell-free system for measuring replicative and repair DNA synthesis with cultured human fibroblasts and evidence for the involvement of DNA polymerase  $\alpha$  in DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 7, 1205—1219, 1979.
8. Snyder, R.D. and Regan, J.D.: Aphidicolin inhibits repair of DNA in UV-irradiated human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99, 1088—1094, 1981.
9. Bermúdez, E.: The inhibition of DNA repair in primary rat hepatocyte cultures by aphidicolin: evidence for the involvement of alpha polymerase in the repair process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109, 275—281, 1982.

10. Bohr, V. and Køber, L.: The effect of aphidicolin on DNA repair in resting and mitogen stimulated human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 797—803, 1982.
11. Collins, A.R.S., Squires, S. and Johnson, R.T.: Inhibitors of repair DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* **10**, 1203—1213, 1982.
12. Dresler, S.L., Roberts, J.D. and Lieberman, M.W.: Characterization of deoxyribonucleic acid repair synthesis in permeable human fibroblasts. *Biochemistry* **21**, 2557—2564, 1982.
13. Hanaoka, F., Yamada, K., Kato, H. and Yamada, M.: Enhancement of ultraviolet-induced unscheduled DNA synthesis in HeLa cell lysate by aphidicolin *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 1—5, 1982.
14. Snyder, R.D. and Regan, J.D.: Differential responses of log and stationary phase human fibroblasts to inhibition of DNA repair by aphidicolin. *Biochim. Biophys. Acta* **697**, 229—234, 1982.
15. Van Zeeland, A.A., Bussmann, C.J.M., Degraasi, F., Filon, A.R., Van Kosteren-van Leeuwen, A.C., Palitti, F. and Natarajan, A.T.: Effects of aphidicolin on repair replication and induced chromosomal aberrations in mammalian cells. *Mutation Res.* **92**, 379—392, 1982.
16. Yamada, K., Kato, H., Hanaoka, F. and Yamada, M.: Unscheduled DNA synthesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in HeLa cells. *Gann* **73**, 63—69, 1982.
17. Bertazzoni, U., Stefanini, M., Noy, G.P., Giulotto, E., Nuzzo, F., Falaschi, A. and Spadari, S.: Variations of DNA polymerases- $\alpha$  and - $\beta$  during prolonged stimulation of human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 785—789, 1976.
18. Waser, J., Hübscher, U., Kuenzle, C.C. and Spadari, S.: DNA polymerase  $\beta$  from brain neurons is a repair enzyme *Eur. J. Biochem.* **97**, 361—368, 1979.
19. Hübscher, U., Kuenzle, C.C. and Spadari, S.: Functional roles of DNA polymerases  $\beta$  and  $\gamma$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 2316—2320, 1979.
20. Castellot, J.J.Jr., Miller, M.R., Lehtomaki, D.M. and Pardee, A.B.: Comparison of DNA replication and repair enzymology using permeabilized baby hamster kidney cells. *J. Biol. Chem.* **254**, 6904—6908, 1979.
21. Seki, S., Oda, T. and Ohashi, M.: Differential effects of aphidicolin on replicative DNA synthesis and unscheduled DNA synthesis in permeable mouse sarcoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **610**, 413—420, 1980.
22. Giulotto, E. and Mondello, C.: Aphidicolin does not inhibit the repair synthesis of mitotic chromosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**, 1287—1294, 1981.
23. Hardt, N., Pedrali-Noy, G., Focher, F. and Spadari, S.: Aphidicolin does not inhibit DNA repair synthesis in ultraviolet-irradiated HeLa cells. *Biochem. J.* **199**, 453—455, 1981.
24. Spadari, S., Sala, F. and Pedrali-Noy, G.: Aphidicolin: a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **7**, 29—32, 1982.
25. Smith, P.J. and Paterson, M.C.: Effect of aphidicolin on de novo DNA synthesis, DNA repair and cytotoxicity in  $\gamma$ -irradiated human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **739**, 17—26, 1983.
26. Seki, S., Ohashi, M., Ogura, H. and Oda, T.: Possible involvement of DNA polymerases  $\alpha$  and  $\beta$  in bleomycin-induced unscheduled DNA synthesis in permeable HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 1502—1508, 1982.
27. Mattern, M.R., Paone, R.F. and Day, III, R.S.: Eukaryotic DNA repair is blocked at different steps by inhibitors of DNA topoisomerases and of DNA polymerases  $\alpha$  and  $\beta$ . *Biochim. Biophys. Acta* **697**, 6—13, 1982.

28. Miller, M.R. and Chinault, D.N.: The roles of DNA polymerases  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  in DNA repair synthesis induced in hamster and human cells by different DNA damaging agents. *J. Biol. Chem.* **257**, 10204—10209, 1982.
29. Cleaver, J.E.: Structure of repaired sites in human DNA synthesized in the presence of inhibitors of DNA polymerases alpha and beta in human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **739**, 301—311, 1983.
30. Dresler, S.L. and Lieberman, M.W.: Identification of DNA polymerases involved in DNA excision repair in diploid human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **258**, 9990—9994, 1983.
31. Seki, S., Hosogi, N. and Oda, T.: Participation of DNA polymerases  $\alpha$  and  $\beta$  in unscheduled DNA synthesis in mammalian cells. *Acta Med. Okayama* **37**, 213—225, 1983.
32. Seki, S., Hosogi, N. and Oda, T.: Differential sensitivity to aphidicolin of replicative DNA synthesis and ultraviolet-induced unscheduled DNA synthesis in vivo in mammalian cells. *Acta Med. Okayama* **38**, 227—237, 1984.
33. Seki, S. and Oda, T.: DNA synthesis in detergent-treated mouse ascites sarcoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **476**, 24—31, 1977.
34. Smith, C.A. and Hanawalt, P.C.: Repair replication in human cells; simplified determination utilizing hydroxyurea. *Biochim. Biophys. Acta* **432**, 336—347, 1976.
35. Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H. and Mano, Y.: Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- $\alpha$ . *Nature* **275**, 458—460, 1978.
36. Huberman, J.A.: New views of the biochemistry of eukaryotic DNA replication revealed by aphidicolin, an unusual inhibitor of DNA polymerase  $\alpha$ . *Cell* **23**, 647—648, 1981.
37. Wagar, M.A., Evans, M.J. and Huberman, J.A.: Effect of 2', 3'-dideoxythymidine-5'-triphosphate on HeLa cells in vitro DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* **5**, 1933—1946, 1978.
38. Sheinin, R. and Humbert, J.: Some aspects of eukaryotic DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 277—316, 1978.
39. Zimmerman, W., Chen, S.M., Bolden, A. and Weissbach, A.: Mitochondrial DNA replication does not involve DNA polymerase  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **255**, 11847—11852, 1980.
40. Skoog, K.L., Bjursell, K.G. and Nordenskjöld, B.A.: Cellular deoxyribonucleotide triphosphate pools levels and DNA synthesis. *Adv. Enzyme Regul.* **12**, 345—354, 1974.
41. Reichard, P.: From deoxynucleotides to DNA synthesis. *Fed. Proc.* **37**, 9—14, 1978.

**Studies on DNA polymerases involved in repair (unscheduled)**

**DNA synthesis in cultured human cells treated with  
carcinogens, such as MNNG and 4NQO**

**Nobuo HOSOGI**

**Department of Biochemistry, Cancer Institute, Okayama University Medical School**

**(Director: Prof. T. Oda)**

DNA polymerases involved in carcinogen-induced repair (unscheduled) DNA synthesis in HeLa and HEp-2 cells were studied by using selective inhibitors (aphidicolin, 2', 3'-dideoxythymidine-5'-triphosphate and N-ethylmaleimide) for DNA polymerases. DNA synthesis was analyzed biochemically and autoradiographically in intact cells and in permeable cells. To measure repair DNA synthesis with minimum interference of replicative DNA synthesis, carcinogens were used at the concentration inducing maximum repair DNA synthesis with each drug and also repair DNA synthesis was measured in the presence of 10 mM hydroxyurea which preferentially inhibits replicative DNA synthesis. The maximum induction of repair DNA synthesis in HeLa cells in the present assay conditions was obtained at 100-200  $\mu\text{g/ml}$  (0.68-1.4 mM) of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), 10-50  $\mu\text{M}$  of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO), 0.5-1 mM of methyl methanesulfonate and approximately 1 mM of N-methyl-N-nitrosourea (MNU). Carcinogen-induced repair DNA synthesis was partially inhibited by a polymerase  $\alpha$ -specific inhibitor, aphidicolin. The aphidicolin-resistant unscheduled DNA synthesis in permeable cells was sensitive to 2', 3'-dideoxythymidine-5'-triphosphate which preferentially inhibits DNA polymerases  $\beta$  and  $\gamma$ . The present results indicated that both aphidicolin-sensitive and -insensitive DNA polymerases, e.g.  $\alpha$ -DNA polymerase and a non- $\alpha$ -DNA polymerase (possibly DNA polymerase  $\beta$ ) were involved in repair DNA synthesis induced by these carcinogens in human cells. The participation of  $\alpha$ - and non- $\alpha$ -DNA polymerases in repair DNA synthesis was suggested to differ depending on cell types and carcinogens used for the induction of repair DNA synthesis.