

本稿は1998年5月29日、東京のヤクルトホールで開催された日本環境変異原学会主催の第9回公開シンポジウム「モデルDNA損傷と変異機構」(企画:根岸和雄, 早津彦哉)で発表された(座長:太田敏博)。

シトシンアナログによる塩基の誤対合と変異

根岸 和雄

岡山大学遺伝子実験施設 〒700-8530 岡山市津島中 1-1-1

Mutagenic cytosine analogs: Mispairing and mutagenesis

Kazuo Negishi

Gene Research Center, Okayama University, Tsushima, Okayama 700-8530, Japan

Summary

We have found two highly mutagenic cytosine analogs, *N*⁴-aminocytidine and P-nucleoside. Inside cells, these analogs are metabolized to the triphosphates, which can be incorporated into DNA by the replication machinery. Due to their ability to pair with guanine and adenine, they can induce replicational errors which would result in mutations. There seems to be two reasons for their high mutagenic potency. First, their efficient incorporation and low tautomeric constants cause high error rates in replication. Second, the analogs are retained in DNA because the cellular repair systems cannot remove these incorporated analogs efficiently.

(This paper, chaired by Toshihiro Ohta, was presented to the 9th JEMS Annual Symposium, "Synthetic Models for DNA Damage and Mutagenesis", organized by Kazuo Negishi and Hikoya Hayatsu, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at Yakult Hall, Tokyo, May, 29, 1998.)

Keywords: *N*⁴-aminocytidine, P-nucleoside, methoxyamine, hydrazine, replicational errors, transition mutation

1. 変異原性ヌクレオシドアナログとは

核酸構成成分によく似た物質を細胞に与えれば、細胞の核酸代謝と関わって、生体にさまざまな影響を与える可能性があることは容易に想像される。正常のヌクレオシドではないが、これによく似た構造を持ち、正常ヌクレオシドと同様に代謝される物質をヌクレオシドアナログという。そのアナログがDNA複製の際にエラーを引き起こせば、変異が誘導される。このような性質を持つ化合物が変異原性ヌクレオシドアナログ、あるいは変異原性塩基アナログであり、長い間多くの研究が行われてきた(Negishi et al., 1994; 根岸和雄, 早津彦哉, 1995)。自然突然変異の原因の一つは塩基が互変異性を起すこと

であると信じられてきた。ピリミジン塩基を考えると、シトシンは通常のアミノ型の他にイミノ型を取ればアデニンと塩基対を形成しうるし、チミンがエノール型を取れば、グアニンと塩基対を形成する可能性がある(ただし、実際に変異の原因となるだけの割合で, rare form が存在するかどうかは問題である)。変異原性アナログとはこの互変異性定数が正常の塩基よりずっと大きい化合物と考えられてきた。Freese は、5-プロモウラシルや2-アミノプリンによる変異のメカニズムとして、取込みエラーと複製エラーによる変異のメカニズムを提出した(Freese, 1959 a, b)。すなわち、アナログが取込まれる際に対合する塩基と、取込まれた後に鋳型となる際に対合する塩基が、異なっていれば、変異の誘導が起きる(Fig. 1に後述のdPの例を示した)。5-プロモウラシルの場合、KatritzkyとWaring(1962)による有名な実験があり、エノール型の存在比率がウラシルよりもずっと大きいという推定がなされているが、この測定は濃い酸の中

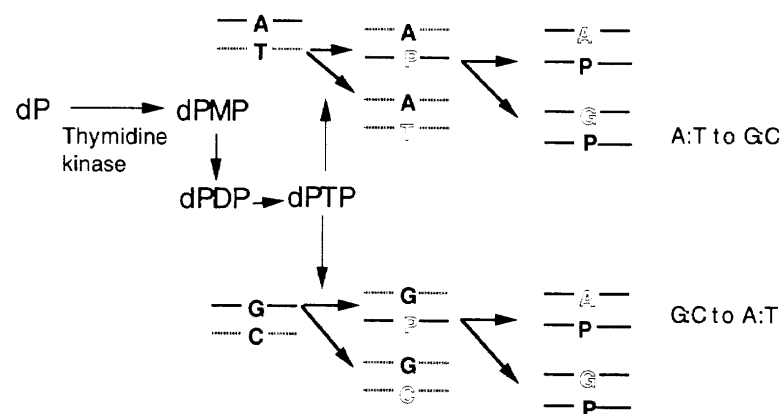


Fig. 1 Probable pathway of dP mutagenesis in *E. coli*.

で行われており、生理的な中性条件下でもこの数値が正しいかどうかは判断がむずかしい。一方、Brown らはヒドロキシルアミンとシトシンの反応で生じる N^4 -ヒドロキシシトシンやヒドラジンとシトシンとの反応で生じる N^4 -アミノシトシンについて、アミノ型に固定された誘導体とイミノ型に固定された誘導体をそれぞれの化合物について合成し、それらの pKa から、 N^4 -ヒドロキシシトシン (N^4 -Coh) ではアミノ型：イミノ型が 1：10、 N^4 -アミノシトシン (N^4 -Cam) では 30：1 と推定した (Brown et al., 1968)。この値から単純に計算すると、もし DNA にこれらの塩基が取込まれれば、 N^4 -Coh ひとつにつき 10%， N^4 -Cam ひとつにつき 3% の確率で変異が生じることになる。

2. アナログの DNA への取込みと変異誘導

Brown のグループは実際にこれらの塩基アナログやそのデオキシリボシドに変異原性があることを見出した (Chu, et al., 1974)。一方われわれは、亜硫酸イオン触媒下のヒドラジンとシチジンとの反応を研究していたが、その反応生成物である N^4 -アミノシチジンの変異原性に興味を持ち、その変異原性を調べたところ、大腸菌やサルモネラ菌でデオキシ体に比べ非常に強い変異原性を持つことがわかった (Negishi et al., 1983)。これは大腸菌やサルモネラ菌がデオキシシチジンをリン酸化するデオキシシチジンキナーゼを持っていないことによると考えられる。ただし、デオキシシチジンキナーゼを持っている枯草菌でも N^4 -アミノシチジンの方が N^4 -アミノデオキシシチジンより変異原性が強い理由は不明である。 N^4 -アミノシチジンはウリジン・シチジンキナーゼによりリン酸化され、核酸代謝系に入り、デオキシ体となった後、トリリン酸体になり DNA に取込まれると考えられる。培養細胞や大腸菌を N^4 -アミノシチジンを含む培地で培養すると、 N^4 -アミノデオキシシチジンが DNA 中に観察される (Nomura, et al., 1987；Negishi, et al., 1988)。ただし、大部分の N^4 -アミノシチジンは代謝のどこかの段階で脱アミノ化を受け、ウリジン型の化合物に

変化する。5 位をトリチウムで標識した N^4 -アミノシチジンを大腸菌に取込めると、DNA 中の放射活性の大部分はデオキシシチジンに取込まれている。これは、一度、 N^4 -アミノシチジンまたはその代謝物がウリジン誘導体となった後、デオキシシチジン合成に用いられたものと考えられる。また、取込みのメカニズムから考えて、RNA に DNA よりも高い含量で取込まれている可能性もあり、現在分析中である。このようにヒドラジン型のシトシンアナログは高い変異原性を持つことがわかった。一方、ヒドロキシルアミン型のシトシンアナログもよく研究されてきた (Janion and Glickman, 1980；Śledziewska-Gójska and Janion, 1982；Bębenek and Janion, 1985)。 N^4 -ヒドロキシシチジンの場合も、リボ型の方がデオキシ型よりもずっと変異原性が大きい。構造がイミノ型に近い N^4 -ヒドロキシデオキシシチジンの場合、チミジンキナーゼによる取込みも十分に考えられるが、その効率は高くないようにみえる。 N^4 -ヒドロキシシチジンも細菌内で代謝されるが (Popowska and Janion, 1975；Popowska and Janion, 1977)、その詳細はよくわかっていない。ヒドロキシルアミンの代りにメトキシアミンをシチジンに働かせると、 N^4 -メトキシシチジンを生じる。その類縁体として、Brown らのグループは新たなデオキシリボヌクレオシドアナログを作り、P-ヌクレオシド (dP) と名付けた。この化合物の変異原性を調べたところ、強い活性を持つことがわかった。そこで、これに興味を持ち、その変異メカニズムを研究した (Negishi et al., 1997)。この化合物は前述のシトシンアナログとは異なり、チミジンキナーゼによりリン酸化されて核酸代謝系に入るらしい (Fig. 1)。チミジンキナーゼを欠く変異体大腸菌では、ほとんど変異原性を示さない。また、リボ P-ヌクレオシド (rP) はほとんど変異原性を示さないが、これは、ウリジンシチジンキナーゼが 5 位置換ピリミジンをリン酸化しないためと思われる。大腸菌 dP を含む培地に添加すると、少なくともチミジン 1000 分子に対して dP 1 分子までは、加えた dP 量に比例して DNA 中の dP 量が増加する。

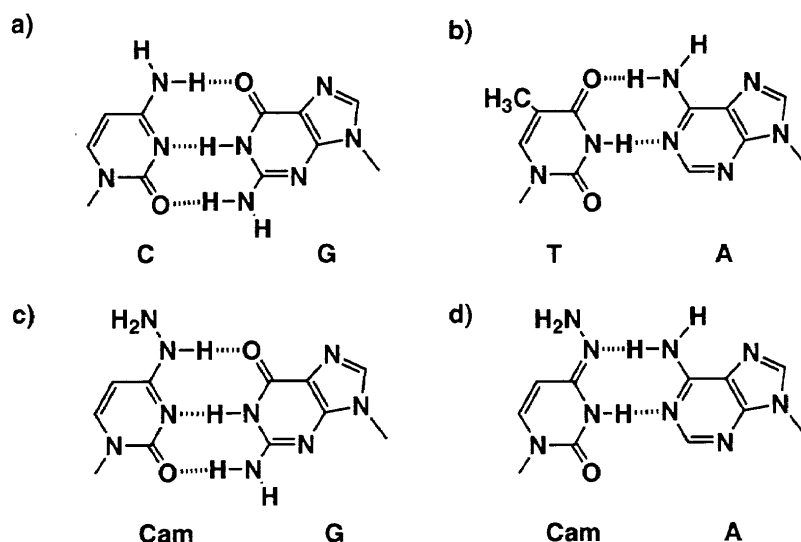


Fig. 2 Normal base-pairs (a, b) and models of Cam-G pair (c) and Cam-A pair (d). An amino form of Cam is close to C not only in its ability to hydrogen-bond with G, but also in its shape. Its imino form is close to T in its shape as well as in its ability to hydrogen-bond with A.

3. 複製エラー誘導の機構

N^4 -アミノデオキシシチジン dCam のトリリン酸体, dCamTP (Negishi et al., 1985) や dP のトリリン酸体, dPTP (Zaccolo et al., 1996; Negishi et al., 1997) がグアニンの相手にもアデニンの相手にも取込まれることは, 生化学的に証明することができる. 鋳型中に含まれる場合については, dP を含むオリゴヌクレオチドの合成に成功し, dATP と dGTP を取込むことが証明されている. dCam がヒドラジン化合物としての反応性を持っているため, 分解物を含まないで dCam を含むオリゴヌクレオチドの合成は困難である. そこで, dCamTP を取込ませた DNA を大腸菌に導入したときの変異を解析することにより, 間接的に証明している (Matsumoto et al., 1992).

それでは, なぜこれらのアナログはグアニンともアデニンとも塩基対を形成できるのだろうか. その理由としては, 最初に述べた互変異性による説明がまず考えられる. 正常塩基であるシトシンはほとんどがアミノ型で存在しているが, N^4 -アミノシチジンの場合, NMR で分析すると, 2セットのシグナルが観察され, その量比は 7:3 である. X線結晶構造解析の結果から結晶中の形がアミノ型であることがわかっている. また, 紫外吸収がシチジンによく似ていること, Brown らによる誘導体の実験 (Brown et al., 1968) からアミノ型が大部分であることは間違いない. そこで, アミノ型が約 70%, イミノ型が約 30% 水溶液中で存在していると考えられる. DNA 合成における取込みの実験では, dCamTP は dCTP の 1/2 の効率でグアニンの相手として, dTTP

の 1/20 の効率でアデニンの相手に取込まれる. アミノ型がグアニンの相手に, イミノ型がアデニンの相手に取込まれるとすれば, イミノ型の取込み効率はアミノ型より低いことになる. 最近米国の Kool らは, チミジンと分子の形はよく似ているが全く塩基対形成能を持たないジフルオロトルエン誘導体が, 選択的にアデニンの相手として取込まれることを報告し, 水素結合が DNA 合成の際の塩基の選択に必須ではないことを報告している (Moran et al., 1997). もしこれが一般的に当てはまるとすれば, アミノ型, イミノ型はそれぞれグアニン, またはアデニンと水素結合を形成できるからではなく, シトシン, またはチミン (ウラシル) に格好が似ているゆえにそれらの代りに取込まれるということになる (Fig. 2). このことは今後の興味深い問題と考えられる.

N^4 -アミノシチジンはリボヌクレオチドとして核酸代謝系に入る. このことは, リボヌクレオチドである N^4 -CamTP が細胞内で生じている可能性が大きいことを示している. dP の場合には, デオキシ体であるので, リボヌクレオチド PTP が dP から生じる可能性は少ないが, このようなリボヌクレオチドアナログが複数の塩基と塩基対を形成して, RNA に取込まれるかどうかは興味深い問題である. そこで, PTP を合成し, その取込みをモデル系で調べたところ, CTP の代りとしても, UTP の代りとしても働くことから, アデニンともグアニンとも塩基対を形成できることがわかった (Moriyama et al., 1998). 効率は, CTP の代りとして働く場合, CTP の 25 分の 1, UTP の代りとして働くとき, UTP の 5 分の 1 である. もし, 細胞内で PTP ができれば, 転写や翻訳のプロセスでエラーを起すことが予想される.

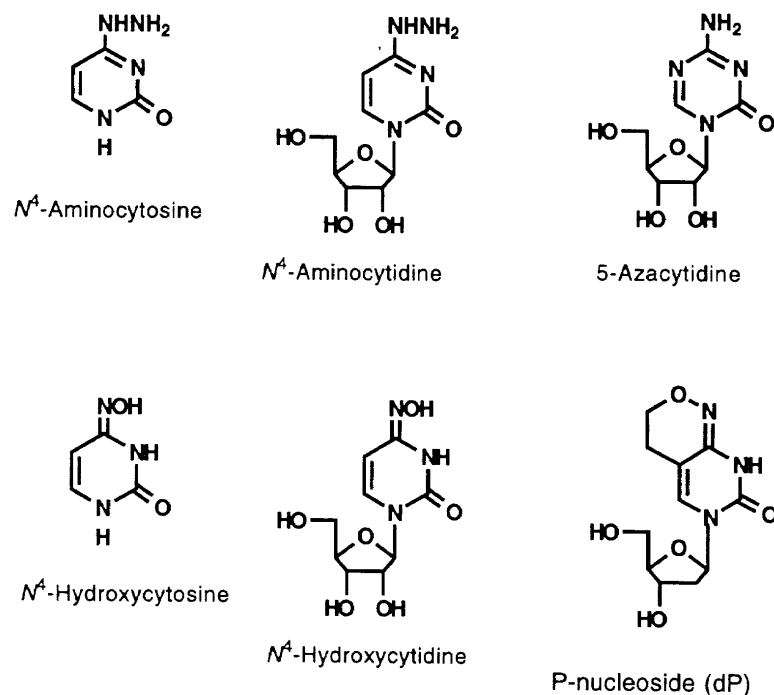


Fig. 3 Mutagenic cytosine analogs.

4. *N*⁴-アミノシチジンや P-ヌクレオシドの変異原性はなぜ高いか

その原因の一つ目は、取込みの効率がよいことが考えられる。いずれも、少なくとも数千ヌクレオチドに一つ程度までは、ほとんど毒性も示さず取込まれる。このような効率で異常塩基が含まれていても、バクテリアが増殖し続けられるのは不思議な気もするが、これは培地にアナログを加えて培養するとすぐにアナログを使い果たしてしまい、DNA 中の相対的な割合が減ってしまうという可能性が考えられる。実際、P-ヌクレオシドを加えた培地で大腸菌を培養すると、1 時間程度で最大となった後含量はどんどん減少していく。おそらく観察されている変異の大部分は、培養の比較的初期に起こっているものと考えられる。他の変異原性アナログの場合、5-プロモウラシルを除けば、変異をみるような条件で DNA 中の含量が計られた例は、筆者の知る限りない。これはおそらく含量が少なすぎるためと考えられる。5-プロモウラシルは条件によっては 100 % チミンと置き換えることができるが、変異誘導能は高くない。たとえばエームズテストでは全く活性を示さない。われわれの酵母の実験でも、5-プロモウラシルを染色体 DNA に導入しても、変異誘導は全く観察されなかった (Noskov et al., 1994)。5-プロモウラシルが変異を起すためには、ヌクレオチドプールがアンバランスになっている必要があるといわれている (Kaufman, 1988)。アミノシチジンや P-ヌクレオシドの場合、このようなヌクレオチドプールを乱すことによる促進効果があるかどうかは、まだ明らかで

はないが、培地中に加えたアナログの濃度、DNA 中の量、変異頻度の三者が比例関係にあることから、プールの影響はあまりなく、単純に複製エラーにより変異が起きている可能性が高い (Negishi et al., 1988; Negishi et al., 1997)。

もう一つの可能性としては修復との関係が考えられる。細胞の修復系により修復されにくければ、DNA 中に変異原性アナログが長くとどまることになり、変異頻度も高くなることが予想される。*uvrABC* 除去修復系の有無で比べると、アミノシチジンの場合、この修復系を欠いた *uvrA* 変異株での DNA 中の dCam の含量は、野生型のものに比べ、約 50 % 高く、変異頻度は 3 倍程度にすぎない。ミスマッチ修復系の有無でアミノシチジンによる変異頻度を比較すると、その比は 2—4 倍であった。ヒドロキシシチジンの場合、比は数十倍になるので、ヒドロキシシチジンの方がずっと効率良くミスマッチ修復系で修復されることがわかる (Negishi et al., 1988)。このような修復系のほかに、DNA ポリメラーゼ自身に異常ヌクレオチドを排除する機構が備わっているらしい。その機能が強まった変異株、すなわちアンチミューター株がいくつか分離されている。あるアンチミューター株では、アデニンのアナログであるヒドロキシアデニンがほとんど変異原性を示さない。一方、アミノシチジンではその比は最高 6.5 倍で、ずっと小さい (Schaaper and Dunn, 1998)。P-ヌクレオシドでもその比はたかだか 7 倍程度である。このように、アミノシチジンや P-ヌクレオシドは細胞の異常塩基排除機構の効率があまりよくなさそうにみえる。このことも、変異

原性の強さの原因と考えられる。

Fig. 3 に、今までに知られている変異原性シトシン(シチジン)アナログを示す。変異原性のシチジンアナログとして他と性質が異なるようにみえるものに5-アザシチジンがある。この化合物は、もともと動物細胞 DNA 中の5-メチルシトシンをシトシンに戻す物質として有名である(Jost and Saluz, 1993)が、このものは変異原性も示すことが知られている(Podger, 1983; Zimmermann and Scheel, 1984; Katz, 1985; Podger and Grigg, 1986; Schmuck, 1986; McGregor et al., 1989; Katoh et al, 1993; Stopper, 1993)。この化合物が興味深い点は、GC 塩基対から CG 塩基対へのトランスバージョンを引き起こすことである。複製エラーモデルに従えば、このアナログは、通常のグアニンとの塩基対形成に加え、シトシンとも塩基対を形成する必要がある。これは互変異性では説明することができない。このアナログによる動物細胞における変異がメチル基転移酵素との反応によるという説が最近出されている(Jackson-Grusby et al., 1997)。しかし、これで大腸菌や酵母の変異メカニズムまで説明できるとは考えにくいので、依然として興味深い未知の問題と思われる。

参考文献

- Brown, D. M., M. J. E. Hewlins and P. Schell (1968) The tautomeric state of *N*(4)-hydroxy-and *N*(4)-amino-cytosine derivatives, J. Chem. Soc.(C), 1925-1929.
- BÇebenek, K. and C. Janion (1985) Ability of base analogs to induce the SOS response: effect of a dam mutation and mismatch repair system, Mol. Gen. Genet., 201, 519-524.
- Chu, B. C. F., D. M. Brown and M. G. Burdon (1974) *N*(4)-Amino-and *N*(4)-hydroxycytosines as base analogue mutagens, Mutat. Res., 23, 267-273.
- Freese, E. (1959a) The difference between spontaneous and base-analogue induced mutations of phage T4, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 45, 622-633.
- Freese, E. (1959b) The specific mutagenic effect of base analogues on phage T4, J. Mol. Biol., 1, 87-105.
- Jackson-Grusby, L., P. W. Laird, S. N. Magge, B. J. Moeller and R. Jaenisch (1997) Mutagenicity of 5-aza-2-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 94, 4681-4685.
- Janion, C. and B. W. Glickman (1980) *N*⁴-Hydroxycytidine: A mutagen specific for AT to GC transitions, Mutat. Res., 72, 43-47.
- Jost, J. P. and H. P. Saluz (1993) (Eds) DNA methylation: Molecular biology and biological significance, Birkhäuser Verlag, Basel.
- Kaufman, E. R. (1988) The role of deoxyribonucleotide metabolism in 5-bromo-2'-deoxyuridine mutagenesis in mammalian cells, Mutation Res, 200, 149-155.
- Katoh, Y., M. Maekawa and Y. Sano (1993) Effects of 5-azacytidine on somatic mutation in a soybean test system, Mutat. Res., 300, 49-55.
- Katrizky, A. R. and A. J. Waring (1962) Tautomeric azines. Part I. The tautomerism of 1-methyluracil and 5-bromo-1-methyluracil, J. Chem. Soc., 1540-1544.
- Katz, A. J. (1985) Genotoxicity of 5-azacytidine in somatic cells of *Drosophila*, Mutat. Res., 143, 195-199.
- Matsumoto, K., T. Yashiki, T. Bessho, K. Negishi and H. Hayatsu (1992) Analysis of phage M13mp2 mutants produced from transfection of phage DNA having *N*⁴-aminocytosines at defined sequence positions, Mutat. Res., 268, 59-64.
- McGregor, D. B., A. G. Brown, P. Cattanaach, W. Shepherd, C. Riach, D. S. Daston and W. J. Caspary (1989) TFT and 6TG resistance of mouse lymphoma cells to analogs of azacytidine, Carcinogenesis, 10, 2003-2008.
- Moran, S., R. X.-F. Ren and E. T. Kool (1997) A thymidine triphosphate shape analog lacking Watson-Crick pairing ability is replicated with high sequence selectivity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 10506-10511.
- Moriyama, K., K. Negishi, M. S. J. Briggs, C. L. Smith, F. Hills, M. J. Churcher, D. M. Brown and D. Loakes (1998) Synthesis and RNA polymerase incorporation of the degenerate ribonucleotide analogue rPTP, Nucleic Acids Res., 26, 2105-2111.
- Negishi, K., C. Harada, Y. Ohara, K. Oohara, N. Nitta and H. Hayatsu (1983) *N*⁴-Aminocytidine, a nucleoside analog that has an exceptionally high mutagenic activity, Nucleic Acids Res., 11, 5223-5233.
- Negishi, K., T. Bessho and H. Hayatsu (1994) Nucleoside and nucleobase analog mutagens, Mutat. Res., 318, 227-238.
- 根岸和雄, 早津彦哉 (1995) ヌクレオチドアナログによる塩基対合異常と突然変異, 蛋白質 核酸 酵素, 40, 1564-1571.
- Negishi, K., M. Takahashi, Y. Yamashita, M. Nishizawa and H. Hayatsu (1985) Mutagenesis by *N*⁴-aminocytidine: induction of AT to GC transition and its molecular mechanism, Biochemistry, 24, 7273-7278.
- Negishi, K., K. Tamanoi, M. Ishii, M. Kawakami, Y. Yamashita and H. Hayatsu (1988) Mutagenic nucleoside analog *N*⁴-aminocytidine: Metabolism, incorporation into DNA, and mutagenesis in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 170, 5257-5262.
- Negishi, K., D. M. Williams, Y. Inoue, K. Moriyama, D. M. Brown and H. Hayatsu (1997) The mechanism of mutation induction by a hydrogen bond ambivalent, bicyclic *N*⁴-oxy-2'-deoxycytidine in *Escherichia coli*, Nucleic Acids Res., 25, 1548-1552.
- Nomura, A., K. Negishi, H. Hayatsu and Y. Kuroda (1987) Mutagenicity of *N*⁴-aminocytidine and its derivatives in Chinese hamster lung V79 cells: Incorporation of *N*⁴-aminocytosine into cellular DNA, Mutat. Res., 177, 283-287.
- Noskov, V., K. Negishi, A. Ono, A. Matsuda, B. Ono and H. Hayatsu (1994) Mutagenicity of 5-bromouracil and *N*⁶-hydroxyadenine studied by yeast oligonucleotide transformation assay, Mutat. Res., 308, 43-51.
- Podger, D. M. (1983) Mutagenicity of 5-azacytidine in *Salmonella typhimurium*, Mutat. Res., 121, 1-6.
- Podger, D. M. and G. W. Grigg (1986) Enhancement of frameshift mutagenesis in *Salmonella typhimurium* derivatives of *hisC3076* by 5-azacytidine and other agents, Mutagenesis, 1, 283-286.
- Popowska, E. and C. Janion (1975) The metabolism of *N*⁴-hydroxycytidine-a mutagen for *Salmonella typhimurium*, Nucleic Acids Res., 2, 1143-1151.
- Popowska, E. and C. Janion (1977) *N*⁴-Hydroxycytidine

- reduction system in toluenized cells of *Salmonella typhimurium*, Acta Biochim. Pol., 24, 197-205.
- Schaaper, R. M. and R. L. Dunn (1998) Effect of *Escherichia coli* dnaE antimutator mutants on mutagenesis by the base analog *N*⁴-aminocytidine, Mutat. Res., 402, 23-28.
- Schmuck, G., R. Pechan, D. Wild, D. Schiffmann and D. Henschler (1986) SOS-dependent mutagenic activity of 5-azacytidine in *Salmonella*, Mutat. Res., 175, 205-208.
- Stopper, H., C. Körber, D. Schiffmann and W. J. Caspary (1993) Cell-cycle dependent micronucleus formation and mitotic disturbances induced by 5-azacytidine in mammalian cells, Mutat. Res., 300, 165-177.
- Zimmermann, F.K. and I. Scheel (1984) Genetic effects of 5-azacytidine in *Saccharomyces cerevisiae*, Mutat. Res., 139, 21-24.
- Zaccolo, M., D. M. Williams, D. M. Brown and E. Gherardi (1996) An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues, J. Mol. Biol., 255, 589-603.
- Śledziwska-Gójska, E. and C. Janion. (1982) Effect of proof-reading and *dam*-instructed mismatch repair systems on *N*⁴-hydroxycytidine-induced mutagenesis, Mol. Genet., 186, 411-418.