

氏 名	やま だ とおる 山 田 徹
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 642 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	<i>gpt</i> シャトルベクターを用いた突然変異検出系に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 市 川 厚	教 授 川 寄 敏 祐	教 授 河 合 明 彦
--------	--------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

農業や医薬品をはじめとする各種化合物の安全性評価の中で、発癌性の評価は非常に重要な位置を占めている。長期間かつ莫大な費用を要する発癌性試験の代わりとして、変異原性試験が発癌性を予測するスクリーニング試験として汎用されている。現在、多くの変異原性試験系が確立されているが、いずれも一長一短があり、複数の変異原性試験を組み合わせる総合的に評価することが一般的である。

既存の変異原性試験の持つ欠点を克服した新しい系の確立を目指す手段として、著者はシャトルベクターの技術に着目した。シャトルベクターは細胞から、大腸菌などの細菌に回収できる外来 DNA である。シャトルベクター上の標的遺伝子に生じた突然変異は、回収した細菌の獲得形質の変化を指標として検出可能である。また、シャトルベクター上の標的遺伝子の塩基配列を決定することで、突然変異を分子レベルで容易に解析することができる。シャトルベクターはこのような長所がある一方、既存の系は、解析の煩雑さや判定方法が主観的であるといった問題点があった。

そこで著者は解析が容易で客観的に判定できるシャトルベクター系を開発すべく研究を行った。その結果、大腸菌 *E. coli* 由来の *gpt* 遺伝子およびコスミドベクターを用いた pCGK シャトルベクターを作製し、6-チオグアニン耐性を指標とする新規突然変異検出系を確立した。このシャトルベクター系を CHL/IU 細胞およびトランスジェニックマウスに導入して新しい試験系を開発し、その有用性を検証した。

In situ において、突然変異ベクターが定量的に検出でき、Ethyl methanesulfonate で誘発した突然変異が検出可能なことを確認した。その後、pCGK シャトルベクターを、マーカーである pSV2neo とともに CHL/IU 細胞に導入し、G-418 耐性を指標にクローンを採取した。PCR 法により *gpt* 遺伝子の導入が確認されたクローンに対し、シャトルベクターの挿入コピー数、回収効率および *gpt* 遺伝子の自然突然変異率について検討を行った。その結果、自然突然変異率が他のクローンに比べて著しく低値であり、回収効率が良好な KN63 細胞株を樹立した。変異原性化合物 *N*-Methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) を用いて試験を行ったところ、KN63 細胞は MNNG の突然変異および染色体異常誘発作用を鋭敏に検出できた。KN63 細胞の感受性について更に検討するため、5 種類の変異原性化合物 Methyl methanesulfonate (MMS), Ethyl-*N*-nitrosourea (ENU), Mitomycin C (MMC), Vincristine sulfate (VIN), C. I. basic red 9·HCl (CIB) を用いて評価を行った。その結果、MMS, ENU および MMC は突然変異および染色体の構造異常を誘発した。また、VIN は染色体の数的異常のみを誘発した。KN63 細胞はこれらの変異原性物質に対し、既存の細胞株とはほぼ同程度の感受性を有していた。また、採取した突然変異体よりシャトルベクターを回収し、*gpt* 遺伝子の変異の解析を行った。自然突然変異体では *gpt* 遺伝子の欠損ないしは再配列が主な変異であった。一方、MNNG 誘発変異体では G : C → A : T の塩基転位が主要な変異であり、既知の MNNG 誘発変異パターンと一致した。以上のことより、KN63 細胞は *in vitro* における突然変異と染色体異常の同時解析に有用な細胞株であると考えられた。

次に、pCGK シャトルベクターを CD-1 マウスの受精卵に導入し、トランスジェニックマウスの作製を行った。5 匹のトランスジェニックマウスが誕生し、4 匹を系統化した。4 系統のトランスジェニックマウスについて、シャトルベクター

の挿入コピー数、回収効率および自然突然変異率について検討を行った。その結果、挿入コピー数および回収効率が他の系統に比べて高く、自然突然変異率が低値であった#128系統を選抜した。#128トランスジェニックマウスの感受性を調べるため、変異原性物質であるENUを、250 mg/kgの1回投与または50 mg/kg/dayの5日間投与し、肝臓、脾臓および骨髄における突然変異を検討した。その結果、ENUの投与により、いずれの組織においても溶媒対照群に比較して3.0~6.8倍の有意な突然変異率の上昇が確認された。また、採取した突然変異体について、*gpt* 遺伝子の変異の解析を行った。自然突然変異体では *gpt* 遺伝子の欠損ないしは再配列が主要な変異であった。一方、ENU誘発変異体では A : T → T : A の塩基転換および G : C → A : T の塩基転位が主要な変異であった。これらの変異はENUの既知誘発変異パターンと一致し、#128トランスジェニックマウスの変異体解析の有効性を示唆するものであった。以上より、#128トランスジェニックマウスは *in vivo* 突然変異の検出とその機構解析に有用な系であると考えられた。

以上の検討により、解析が容易であり、客観的な判定が可能な *in vitro* および *in vivo* 変異原性試験系を開発することができた。*In vitro* の試験系で遺伝子突然変異と染色体異常の2つの指標を解析できること、並びに *in vitro* と *in vivo* の両者の試験系で同じ標的遺伝子 *gpt* に対する突然変異作用が比較できること、の2つの利点を生かして今後の変異原性研究において有効性を発揮すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、農業や医薬品などの化合物の安全性評価の中で、特に重要な評価である発癌性に関して、従来から汎用されている各種変異原性試験が生物種差、客観的判定などにおいて問題点があることに着目し、それに代わるものとして高感度かつ簡便なシャトルベクター試験法を開発し、その有効性について論じたものである。

シャトルベクター試験法は、突然変異を検出する標的遺伝子を含んだ外来DNAを哺乳動物細胞に導入し、細胞から大腸菌を回収するとともに、標的遺伝子に生じた突然変異を大腸菌の獲得表現形質の変化から検出するものである。この方法では、シャトルベクターの感度と効率性および試験法の簡便さが鍵となる。著者は、種々検討の結果、それらの条件を満たす最適のものとして、大腸菌由来の *gpt* 遺伝子およびコスミドベクターを用いた pCGK シャトルベクター系を見出した。次に、本シャトルベクター系を用いた簡便な試験系を確立した。まず、pCGK シャトルベクターを培養細胞である CHL/IU 細胞に導入し、自然突然変異率が低く回収効率の高い細胞株 (KN63 株と命名) を選別した。そこで、この細胞を用いて、変異原性化合物である MNNG, MMS, ENU, MMC の突然変異および染色体異常誘発作用が従来にない高感度で検出されることを見出した。さらに、突然変異体からシャトルベクターを回収し、*gpt* 遺伝子に生じた変異を解析したところ、各変異原性化合物に特徴的な突然変異が起きていることがわかった。これらのことから、この試験系は遺伝子突然変異および染色体異常という2つの変異原性の指標を同時に解析でき、しかも突然変異を分子レベルで解析することができる有用なものであると結論づけた。次に、この pCGK シャトルベクターを用いて、変異原性化合物が示す発癌性を試験するのに必要なトランスジェニックマウスを作製した。著者は、pCGK シャトルベクターを CD-1 マウスの受精卵に導入し、常法に従ってトランスジェニックマウス (#128系統と命名) を作製した。このマウスに変異原性化合物を投与すると、肝臓、脾臓、骨髄の各組織における発癌の頻度が著しく増加した。さらに、骨髄由来の DNA からシャトルベクターを回収すると *gpt* 遺伝子が検出できた。これらの事実から、著者は、このトランスジェニックマウスは変異原性化合物による発癌を効率よく検出できることを明らかにした。この方法は、従来の発癌性試験において問題とされていた低い解析効率と判定法の客観性の不足において大きな改善を行ったものとして評価できる。

以上、本研究は、解析が容易であり、客観的な判定が可能な *in vitro* および *in vivo* 変異原性試験系を開発したものである。本方法は2つの利点がある。1つは、*in vitro* 試験系で遺伝子の突然変異と染色体異常の2つの指標を解析できることであり、もう1つは、*in vitro* と *in vivo* の両者の試験系で同じ標的遺伝子 *gpt* に対する突然変異作用が比較できることである。これらの成果は、今後の変異原性研究において有効性を発揮すると考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成13年2月5日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。