

# 環境変異原研究

Environmental  
Mutagen  
Research  
Communications

Vol.10 No.1 1988

# 環境変異原研究

第10巻 第1号 1988年

## 目 次

### 昭和62年度学会奨励賞受賞者論文

ショウジョウバエによる環境変異原  
検出系に関する研究

梁 治子 ..... 1  
藤川 和男 ..... 15

### 日本環境変異原学会第16回大会特別講演

活性酸素の生成と消去

浅田 浩二 ..... 27

### 日本環境変異原学会第16回大会シンポジウム

「突然変異の機構——環境変異原の見地から」

序論——ヒトにおける突然変異と発がん

武部 啓 ..... 39

ヒト細胞の突然変異

巽 紘一 ..... 43

SOS反応と突然変異

品川日出夫 ..... 53

アルキル化剤に対する適応応答と突然変異

関口 睦夫 吉開 友則 高野 京子 作見 邦彦

中村 崇規 穴井 元昭 于 成国 中別府雄作 ..... 63

酸素ラジカルによるDNA損傷と突然変異

葛西 宏 ..... 73

突然変異——劣性変異のホモ接合化は

原爆白血病の始発となりうるか 近藤 宗平 ..... 85

### 分科会などの報告

哺乳動物試験分科会（MMS分科会）ニュース

祖父尼俊雄 ..... 93

関連集会「第4回ショウジョウバエ変異原研究会」

の報告

井上 達生 ..... 96

「抗変異原研究会」からの報告と研究上の問題点

布柴 達男 ..... 98

日本学術会議だより ..... 102

### 付 記

日本環境変異原学会会則 ..... 108

日本環境変異原学会昭和63-64年評議員名簿 ..... 109

日本環境変異原学会申込書 ..... 110

日本環境変異原学会奨励賞受賞者一覧 ..... 112

### 編集後記



# ショウジョウバエによる環境変異原検出系に関する研究

大阪大学 医学部 梁 治子

## はじめに

突然変異研究の材料を、微生物からショウジョウバエに移した時、ショウジョウバエでの環境変異原検出の従来からの手法である、生殖細胞を処理対象とする“伴性劣性致死法”を用いて、methylmethanesulfonate の貯蔵効果に関する実験を行なった<sup>1)</sup>。当然のことながら、この手法は、処理したハエの子孫に現われる影響を調べるものであるから、結果は約1.5ヶ月後にしか得られない。さらに、そのための労力も大変であった。そこで、ハエの体細胞を処理対象にしようと、当時、紹介されたばかりの“体細胞の遺伝子突然変異検出系”<sup>2)</sup>に注目し、検出のための変異株を入手し(UZ株, Rasmuson 博士の好意による)、X線による体細胞突然変異の線量効果関係を検討することにした。すると驚いた事に、初めての実験であったにもかかわらずX線による体細胞突然変

異の頻度は直線にびたりと一致した。しかも、2～3度実験を繰返しても、常に同じX線の線量当り、全く同じ変異頻度を示した。のちになって、この事はUZ系の特徴とわかったのであるが<sup>3)</sup>、とにかく、この実験結果は、ショウジョウバエの体細胞突然変異を研究の対象にしようとした、きっかけを作ってくれた。

そもそも、動物個体の体細胞突然変異が発がんに起因するといわれているが、個体の体細胞突然変異に関する資料は少ない。本文では、ショウジョウバエを用いての体細胞突然変異研究を通じて、in vitro 系突然変異検出系ではみられなかった結果をとりあげてみた。また、ハエでの体細胞突然変異検出系を応用した、劣性発がん遺伝子をもったハエでの発がんテストの試みについて紹介する。

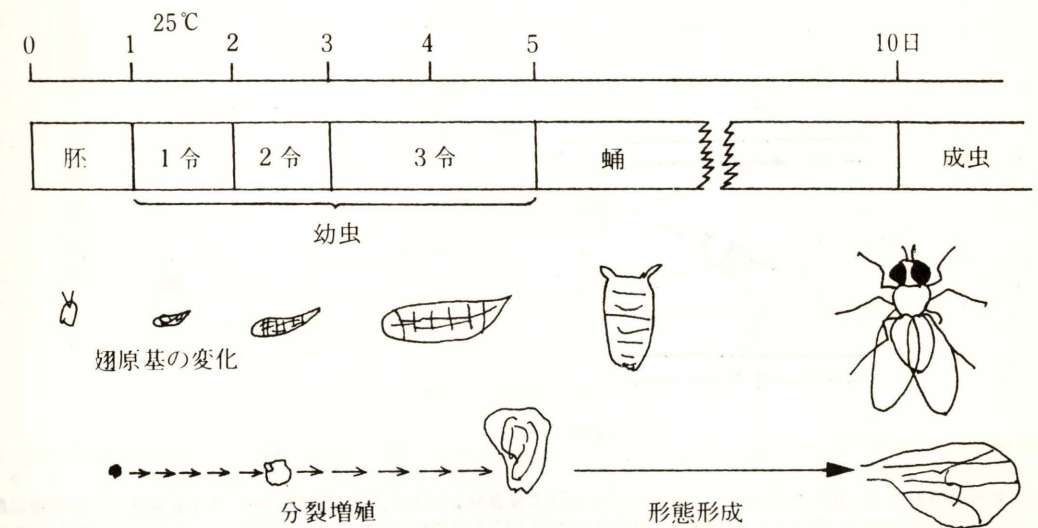


図1: ハエの発生と翅原基の変化 (25°C)



## 1 ショウジョウバエの発生と翅原基の変化

図1に示したハエの発生は25℃でのものである。将来、成虫の器官になる幹細胞は（成虫原基という）、胚期に形成され、幼虫期になると分裂増殖し、蛹期に変態して成虫の器官になる。図1に翅原基の変化を例に示した。ハエの体細胞の特徴は、体細胞が分裂しているのは、胚、幼虫期、蛹期の一部で、成虫期は体細胞は分裂していない点である。

## 2 ショウジョウバエの体細胞突然変異

ハエの体細胞突然変異は、幼虫の成虫原基細胞の1個が変異細胞になったものを、成虫の体表面の異常斑として検出する。本文では、眼色や、翅毛形を指標とした体細胞突然変異検出系を用いた

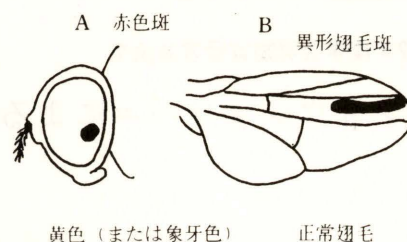


図2：体細胞突然変異によって生じる変異斑。A：眼色系、黄色又は象牙色眼色の中に赤色斑が生じる。B：翅毛系、正常翅毛の中に異常形翅毛斑が生じる。

（図2）。眼色系の $w^i$ 系とU $Z$ 系は、遺伝子突然変異のみを検出する系であり、翅毛系は主に体細胞の染色体組換え変異を検出する。体細胞染色体組換えの原理については図12を参照にされたい。

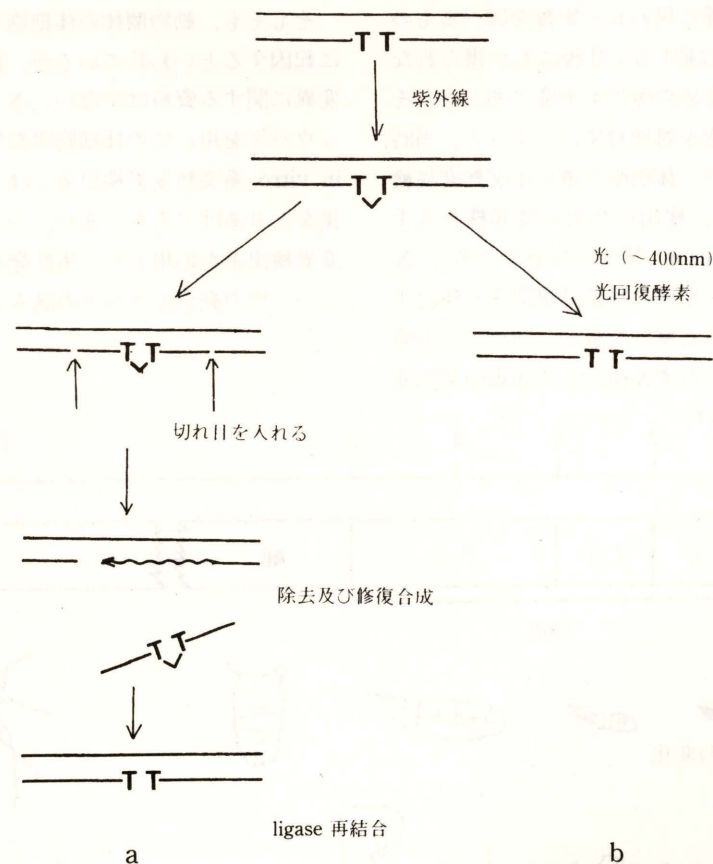


図3：紫外線照射により生じたピリミジンダイマーの(a)除去修復および(b)光回復の過程。(a)ピリミジンダイマー近傍に酸素により切れ目が入り、ダイマーを含むオリゴヌクレオチドは除去され、除去された部分はポリメラーゼで修復合成され、最後に ligase によって再結合される。(b)ピリミジンダイマーは $\sim 400\text{nm}$ の波長の光と、光回復酵素により、モノマーにもどる。

さらに、これらの系の詳細は、文献4) 5) 6) 7) を参照されたい。体細胞の突然変異率はふつう、ハエ（または眼や翅）当りの異常斑の数で、相対的に表わす。

## 3 幼虫の DNA 修復能

幼虫が備えている DNA 修復能力を調べた。調べた修復能は、紫外線の DNA 損傷に働く除去修復能と光回復能である。紫外線の DNA 損傷の主

要であるピリミジンダイマーは、図3のように除去修復<sup>8)</sup>や光回復で酵素的に修復され、もとのモノマーにもどる<sup>9)</sup>。

### (A) 1 令幼虫の除去修復能力

ショウジョウバエの第2染色体の劣性の突然変異  $mus201$  をホモにもつハエは、除去修復過程の第1段階、ピリミジンダイマーの近傍 DNA 鎖(図3)に切れ目をいれることが全くできない<sup>10)</sup>。  $mus201/mus201$  幼虫の紫外線による体細胞突然

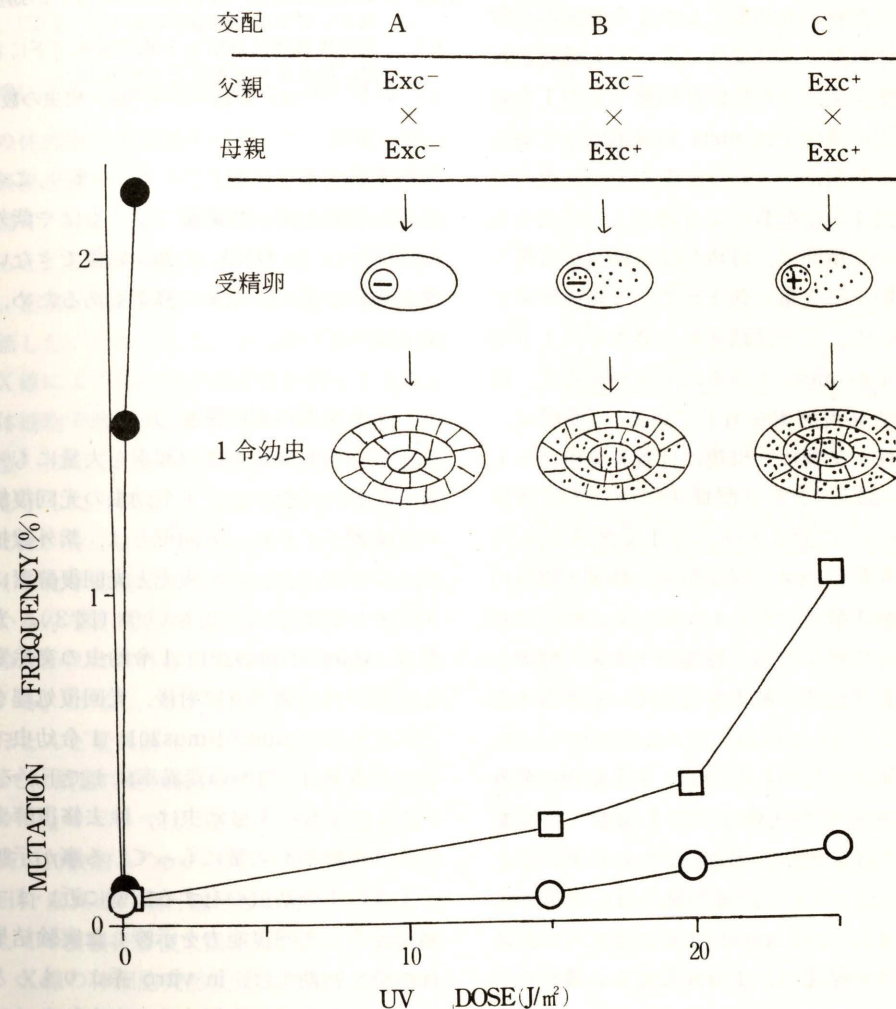


図4：除去修復欠損変異株、 $mus201/mus201$  (●)、 $mei9/Y$  (□)、と正常 (○) 株の1令幼虫に紫外線を照射した時の眼色系 (U $Z$  系) の体細胞突然変異、および親株の交配様式と、その受精卵と幼虫の除去修復特性の模型。 $mus201/mus201$  幼虫 (●) は交配Aより、 $mei9/Y$  幼虫 (□) は交配Bより、正常幼虫 (○) は交配Cより得た。親株の除去修復能の有 (Exc<sup>+</sup>)、無 (Exc<sup>-</sup>)。受精卵の除去修復正常遺伝子型は+、欠損型は-で示す。くろい小さな点は除去修復酵素。



変異感受性を正常幼虫の感受性と比較することで、正常幼虫の除去修復能力を調べた(図4)。図1で用いた幼虫は、発生初期段階の1令幼虫である。図4に示すように、*mus201/mus201* 1令幼虫は微量の紫外線で突然変異が著増するのに対し、正常幼虫では変異誘発はほとんどみられない(統計的有意差なし)<sup>11)</sup>。つまり、正常な1令幼虫は低線量の紫外線に対し、完璧近くまで除去修復能力を備えている。正常幼虫の優れた除去修復能は、もうひとつのX染色体上の除去修復能を全く欠く変異 *mei9*<sup>10)</sup> を特別な状態でもつ1令幼虫の、紫外線による体細胞変異感受性によっても確認された。*mei9* 変異遺伝子を特別な状態でもつ1令幼虫とは、幼虫の遺伝子は *mei9* 変異遺伝子であるのに、核や細胞質に除去修復酵素をもつ幼虫のことであり、図4の交配Bにより得ることができる。交配Bからの受精卵は、母親が除去修復正常株であるため、卵子に大量に含まれている修復酵素をうけついでいる。この受精卵から発生した1令幼虫は、遺伝子が *mei9* であるにもかかわらず、母親由来の除去修復酵素を有している。(交配は、*mei9* 変異株を父親に、母親に付着X染色体をもつ株を用いるが、この交配様式については藤川——本号中——に詳しい)。図4交配Aからの *mus201* ホモ型幼虫は、両親が除去修復欠損株のため、除去修復酵素は全くもたないし、正株幼虫は、両親が正常株のため、母親卵子由来の酵素と、修復正常遺伝子由来の酵素をもっている(図4交配C)。

前述の交配より得られた *mei9* 1令幼虫の紫外線による体細胞突然変異は、20 J/m<sup>2</sup>までの線量域では、正常1令幼虫の場合のように変異はほとんど上昇しないが、25 J/m<sup>2</sup>の紫外線で急激に上昇する(図4)。この *mei9* 1令幼虫にみられる変異高抵抗性の結果は、1令幼虫のもつ優れた除去修復能力が、幼虫の修復遺伝子によるのではなく、母親の卵子由来の修復酵素によることを示している。25 J/m<sup>2</sup>の紫外線でも正常幼虫は突然変異を誘発しないのに対し、この *mei9* 幼虫の変異は急増した。このことは、両者の幼虫の除去修

表1 *mus201/mus201* 1令幼虫の紫外線による眼色(UZ系)突然変異に対する、光回復の効果

| 紫外線線量 (J/m <sup>2</sup> ) | 光回復の有無              | 突然変異率 (%) c)  |
|---------------------------|---------------------|---------------|
| 0                         | dark <sup>a)</sup>  | 0.08 (5/6036) |
|                           | light <sup>b)</sup> | 0 (0/1218)    |
| 1                         | dark <sup>a)</sup>  | 1.5 (68/4441) |
|                           | light <sup>b)</sup> | 0.03 (1/2859) |
| 2                         | dark <sup>a)</sup>  | 2.2 (54/2486) |
|                           | light <sup>b)</sup> | 0.14 (1/724)  |

a) : 紫外線照射後、光回復をさけるため幼虫を純黄色ランプ下または暗所におく。  
b) : 光回復処理は幼虫を1時間蛍光灯下におき、成虫になるまで蛍光灯下で飼育した。  
c) : ( ) は、赤色スポット数/成虫の数。

復酵素量の差を反映している。つまり、この *mei9* 幼虫が母親由来の酵素量では、もはや紫外線25 J/m<sup>2</sup>照射によるDNAの傷を修復できないが、正常幼虫には遺伝子由来の酵素もあるため、修復可能となっている。

#### (B) 1令幼虫の光回復能力

1令幼虫が母親由来の酵素を大量にもっていることがわかったので、1令幼虫の光回復能力についても調べてみた。光回復とは、紫外線損傷のピリミジンダイマーが可視光と光回復酵素により、モノマーにもどることをいう(図3)。光回復効果は、*mus201/mus201* 1令幼虫の突然変異に対して調べた。紫外線照射後、光回復処理をすることによって、*mus201/mus201* 1令幼虫での体細胞突然変異は、対照の変異率にまで下がる(表1)<sup>11)</sup>。ここでも、1令幼虫は、除去修復酵素と同様に光回復酵素も大量にもっている事が示唆される。

上述の1令幼虫の有する完璧に近いまでの除去修復能力と光回復能力を示唆した実験結果は、個体の発生初期では、*in vitro* 系よりもっとすぐれたDNA修復能を発揮することを知らせてくれた。さらに、1令幼虫の除去修復酵素は、誘導されるものでなく、構成的に生産されたものであるといえる。

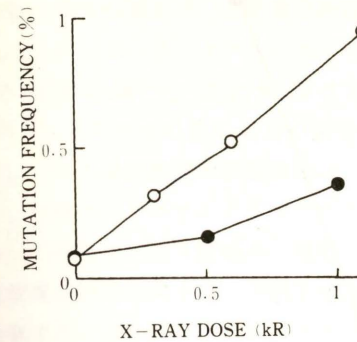


図5: X線を1令幼虫に照射した時の、眼色系細胞突然変異。UZ系(○)とw系(●)をプロット。

#### 4 X線による体細胞突然変異とDNA修復

ハエの体細胞突然変異を利用して、修復正常幼虫で変異原を検出しようとしても、紫外線による変異(図4)のように、変異原に変異抵抗性を示すとなると、変異原検出系には使用できない恐れがある。正常幼虫にこだわるのは、変異原の危険度を評価したいためである。そこで、紫外線と対称的なX線による体細胞突然変異を調べてみたところ、体細胞突然変異は、紫外線でみられた“しきい値型”でなく、X線の線量にしたがって直線の上昇を示した(図5)。X線の傷は、完全に修復されてはいないようである。すると、X線型の傷をつくる化学変異原なら変異検出は可能である。事実、いろんな変異原が体細胞突然変異を誘発した。このなかには紫外線類似物質の4NQOも含まれている。ただし、B(a)Pと2AAFは正常幼虫ではほとんど変異誘発をおこさなかったが<sup>12)</sup>、*mei9*株では微量で変異誘発を示した。

ショウジョウバエでは、X線に高致死感受性を示す変異が10数個みつがっている。このうちのひとつ *mei41* 変異は、紫外線や類似物質のDNA損傷に対する複製後修復欠損変異である<sup>6)</sup>。*mei41* 変異は、X線の体細胞突然変異を抑制する効果を示した(図6A)<sup>6)</sup>。これは、大腸菌のRecA-UmuC(本号一品川)にみられるように、ハエにおいてもX線によるDNA損傷の修復誤りで突然変異がおこり修復誤りの段階に *mei41* 遺伝子が関与していると思われる。*mei41* 以外の複

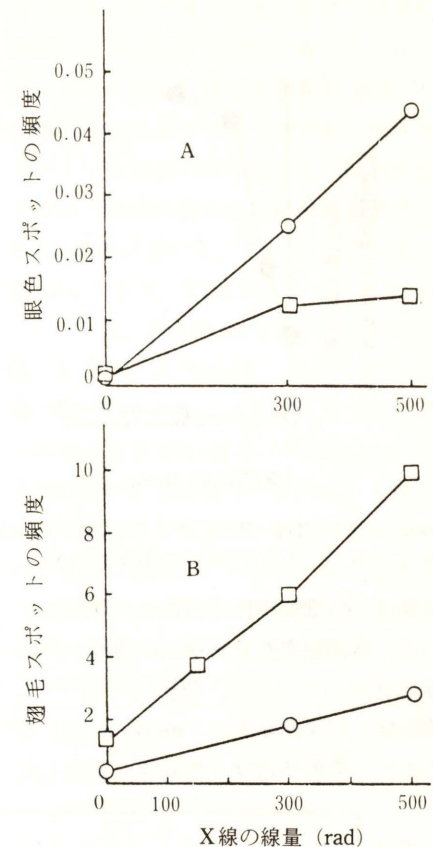


図6: X線による体細胞の遺伝子突然変異(A)(w<sup>i</sup> 眼色系)と、染色体組換え突然変異(B)(翅毛系)に対する、複製後修復欠損変異 *mei41* の効果。X線は3令幼虫に照射。正常株(○)、*mei41* 変異株(●)。

製後修復欠損変異によってもX線、紫外線、アルキル化剤による変異も抑制される<sup>11) 13)</sup> ので、*mei41* 関連の遺伝子は、X線損傷に限らず一般に遺伝子突然変異の生成過程での修復誤り段階に働く遺伝子といえる。これまでに述べた体細胞突然変異は、遺伝子突然変異である。*mei41* 変異は、X線による染色体組換え型突然変異(図6B)に対して、遺伝子突然変異に及ぼす効果とは全く正反対に、変異を増強する効果を示した<sup>6) 14)</sup>。*mei41* 変異のX線高致死感受性の原因がわかっていない事<sup>10)</sup>、染色体組換えのメカニズムの鮮明な説明がなされていない事もあって、*mei941* 変異のX線による染色体組換え変異増強効果は説明しがたい。しかし、少なくとも、遺伝子突然変異と染色体組換え突然変異は異なる機構であるといえる。



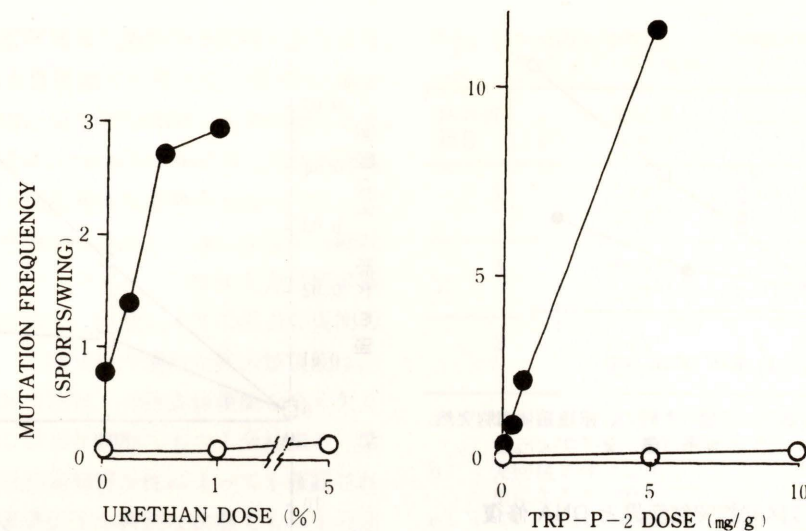


図7: urethane および Trp-P-2 による正常株 (○) と、mei9mei41 変異株 (●) における翅毛系体細胞突然変異。urethane と Trp-P-2 は3令幼虫に短期投与した。

mei41 変異は、体細胞染色体組換えの頻度を上昇させるので、体細胞突然変異検出の感度の高めるのには役に立つ。ウレタン、Trp-p-2<sup>15)</sup> による染色体組換えの突然変異は、mei9. mei41 の二重変異により、染色体組換え型変異は著増した

(図7)。  
5 ヘテロサイクリックアミンのハエでの変異力とマウスでの発がん力の関連  
焼けこげ変異原のヘテロサイクリックアミンは、

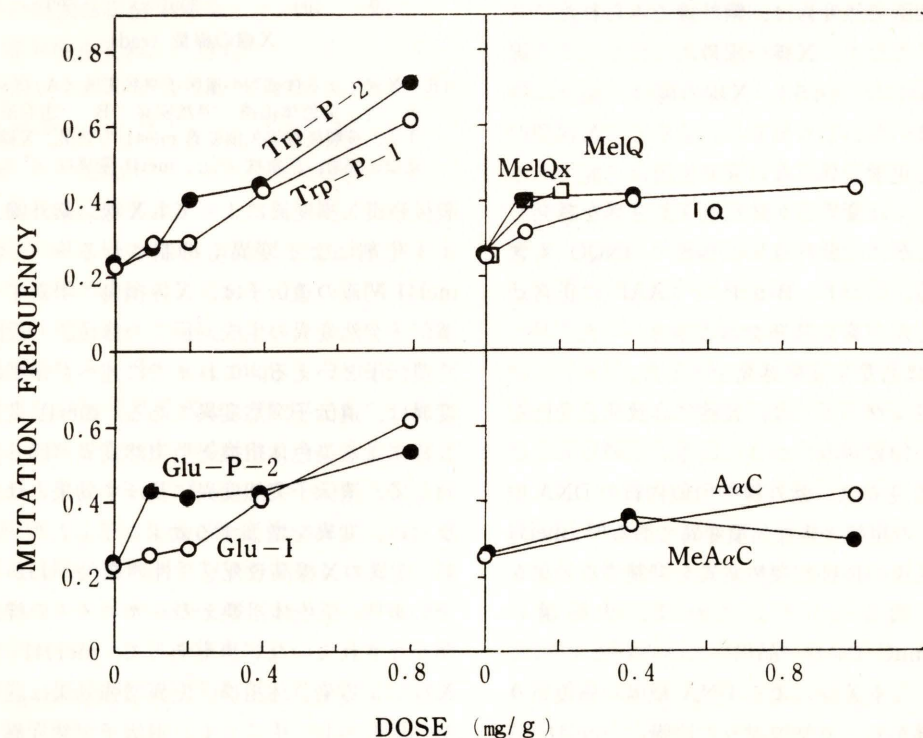


図8: 9種のヘテロサイクリックアミンによる翅毛系体細胞突然変異。“小シングルスポット”を変異の指標にした。

日本で最も研究が進んでいる変異原物質である。これらヘテロサイクリックアミンのハエでの変異原性の強さを調べ、既に報告されている<sup>16) 17) 18) 19)</sup> マウスでの発がん力の強さと比較してみた。ハエの体細胞突然変異検出は、翅毛系で行った。9種のヘテロサイクリックアミンは、翅系において検出される3種類の“翅毛スポット”(環境変異原研究 Vol.1.6 と Vol.1.9 参照)をすべて誘発する。図8は“小シングルスポット”に対する、ヘテロサイクリックアミンの用量効果曲線である。9種ヘテロサイクリックアミンの幼虫への処理は、検体を餌にまぜて、経口投与する方法で行った。図8から、9種のヘテロサイクリックアミンは、同じような検体用量によって、ほぼ同じ程度の体細胞突然変異率を示している事がわかる。この事を、確認しようと、変異原の強さを

次のようにして表わした。まず、図8の用量効果曲線より回帰直線を求め、そこから10%変異を誘発する時の検体の餌中の濃度を MD<sub>10</sub> (mg/g) とする。比較するマウスでの9種ヘテロサイクリックアミンの発がん力の強さは、肝がんを50%誘発する時の検体の餌中の濃度を概報より求め TD<sub>50</sub> とし、規準に用いる。すると、MD<sub>10</sub> は、0.06~0.31mg/g となり、TD<sub>50</sub> は、0.19~0.59mg/g となった。ただし、MeIQ の TD<sub>50</sub> は未定であり、MeIQx の TD<sub>50</sub> (0.30mg/g) はラットでの資料<sup>19)</sup> に基づく。ヘテロサイクリックアミン9種について、ハエでの変異原の強さ (1/MD<sub>10</sub>) の値は、マウスでの発がん力の強さ (1/TD<sub>50</sub>) とほぼ同様な値をとるという、大変よい相関が認められた<sup>20)</sup>。この大変よい相関は、ハエでの突然変異の指標を、“小シングルスポット”にした為ではない。翅毛

表2 ショウジョウバエの遺伝子由来の腫瘍の特性

| 腫瘍の特性                              | 変異座位                    | 細胞増殖の様相             |                  | in vivo 培養時の形態 | 移植による宿主への致死力 |
|------------------------------------|-------------------------|---------------------|------------------|----------------|--------------|
|                                    |                         | in situ             | in vivo 培養       |                |              |
| 悪性の視神経芽細胞腫瘍<br>[脳腫瘍と略す]<br>(幼虫に発病) | I(1) 2                  | 悪性 <sup>a)</sup>    | 悪性 <sup>b)</sup> | 疎性の細胞集団        | +            |
|                                    | I(1) 2269               | "                   | "                |                | +            |
|                                    | I(2) gl                 | "                   | "                |                | +            |
|                                    | I(2) gd                 | "                   | "                |                | +            |
|                                    | I(2) 1542               | "                   | "                |                | +            |
|                                    | I(3) gl                 | "                   | "                |                | +            |
| 成虫原基の良性腫瘍<br>(幼虫に発病)               | I(1) 2                  | 良性 <sup>c)</sup>    | 良性 <sup>c)</sup> | 固型で丸い塊         | +            |
|                                    | I(1) 2269               | "                   | "                |                | +            |
|                                    | I(2) gl                 | "                   | "                |                | +            |
|                                    | I(2) 1542               | "                   | "                |                | +            |
|                                    | I(3) gl                 | "                   | "                |                | +            |
|                                    | I(1) d.lg.-1            | 良性・悪性 <sup>c)</sup> | "                |                | +            |
|                                    | I(1) d.lg.-2            | "                   | "                |                | +            |
| リンパ節の血球の悪性腫瘍<br>(幼虫に発病)            | I(1) mbn                | 悪性                  | 悪性               | 疎性の細胞集団        | +            |
|                                    | I(2) mbn                | "                   | 非増殖              |                | -            |
|                                    | I(3) mbn                | "                   | "                |                | -            |
| 良性卵巣腫<br>(成虫に発病)                   | fs(2) B                 | 良性                  | 良性               | 固型             | -            |
|                                    | fu                      | "                   | "                |                | -            |
| 胚腫瘍<br>(胚に発病)                      | Df(1) Notch             | -                   | 悪性               | 疎性の細胞集団        | +            |
|                                    | shibire <sup>ts-1</sup> | -                   | "                |                | +            |
| 良性の生殖細胞腫瘍<br>(成虫に発病)               | b(2) gcn                | 良性                  | 良性               | 固型             | +            |

a) 近傍に浸潤増殖, b) 体内広く浸潤増殖, c) 浸潤増殖をしない, d) 中枢神経系に隣接した成虫原基は中枢神経系に向かって浸潤増殖するが、ほかの部位の成虫原基は浸潤性を示さない。



表3 脳腫瘍細胞の移植培養に伴う染色体の変化

| 移植世代<br>数 <sup>b</sup>                       | 染色体の分類 <sup>a</sup> (%) |            |                       |                       |                       |                       |                       | 観察し<br>た細胞<br>数 |
|--|-------------------------|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|
|  | 正常                      | 数の異常       |                       |                       |                       | 形の異常                  |                       |                 |
|  | 2 <i>n</i>              | 4 <i>n</i> | 2 <i>n</i> ± <i>d</i> | 4 <i>n</i> − <i>d</i> | 4 <i>n</i> + <i>d</i> | 2 <i>n</i> ± <i>c</i> | 4 <i>n</i> ± <i>c</i> |                 |
| <i>l</i> (2) <i>g</i> <sup><i>h</i></sup> の脳 | 98                      | 2          | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 98              |
| TRG <sub>1</sub>                             | 78                      | 9          | 2                     | 2                     | 1                     | 6                     | 2                     | 182             |
| TRG <sub>2</sub>                             | 63                      | 10         | 2                     | 9                     | 6                     | 4                     | 6                     | 172             |
| TRG <sub>3</sub>                             | 52                      | 9          | 2                     | 5                     | 19                    | 4                     | 9                     | 247             |
| TRG <sub>4</sub>                             | 51                      | 5          | 7                     | 16                    | 2                     | 8                     | 11                    | 221             |

a ; dとcは異数性の指標,  $d \geq 1$ ,  $c \geq 0$ 。

b ; TRG<sub>1</sub>…TRG<sub>4</sub> は培養1代…4代

系の他の2種の翅毛スポットを指標にしても、同様なMD<sub>10</sub>値を示すし、眼色系での、Trp-P-2とIQに関しても、同程度のMD<sub>10</sub>値になる(劉：私信)。ハエの体細胞突然変異検出系は、変異原の発がん性の強さの予測に役立つと思われる。さらに多くの変異原について検討する必要がある。

## 6 ショウジョウバエにおける発がん

野性型のハエに発がん剤を投与しようが、しまいが、ハエをどんなに長く飼っても(25℃の平均寿命は約40日)、がんをみつけることはできない。その理由は、ハエの体細胞が分裂しているのは、胚期、幼虫期、蛹期の一部を含む、たった5日間であり、成虫の体細胞は分裂を停止しているからである。しかし、発がん変異遺伝子をもつハエならば、がんを見い出すことはできる。Gateff はハエの発がん変異株を次のようにして分離した<sup>21)</sup>。彼女は、自然又はEMSで誘発で得た、劣性致死変異のホモ又はヘミ接合幼虫のなかに、がんを生じて死ぬ幼虫が存在すると思った。なぜなら、ハエで“がん”をみつけることができるとすれば、体細胞分裂のさかんな幼虫期に限ると考えられるからである。そこで多くの劣性致死変異のヘミ又はホモ接合型幼虫を解剖して調べてみると、がんと思われる組織を発見することができた。その組織をがんであるとするGateffが考えた判定法は、がんと思われる組織を成虫の腹腔内に移

植した時、増殖して宿主を殺すかどうかである。このような方法で24個のがんの変異遺伝子が発見された(表2)<sup>22) 23)</sup>。これらの発がん変異はそのうちのひとつでもヘミ又はホモ接合になると、幼虫期に100%死ぬという強力ながん変異遺伝子である。このうちのひとつ“脳腫瘍”変異遺伝子(*l(2)gl*<sup>4</sup>)は、最初に発見された変異である<sup>22)</sup>。

(A) 遺伝子由来の神経芽細胞腫瘍(脳腫瘍と略す)

表3の*l(2)gl*<sup>4</sup>の*l(2)*とは、第2染色体の劣性致死の意味で、*gl*というのは、この変異をホモにもつ幼虫が巨大化する(giant larvae)ためである。背字の4は、*gl*変異のうち特定の対立遺伝

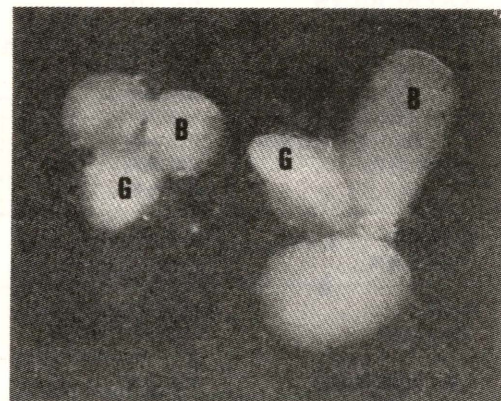


図9：ハエの3令幼虫の脳。左は正常株の脳、右が *gl*<sup>4</sup>/*gl*<sup>4</sup> 株の脳。G：神経節、B：脳の片方の1球。神経節は *gl*<sup>4</sup>/*gl*<sup>4</sup>でも正常、脳のみが異常型。

子をさす。以下本文では*l(2)gl*<sup>4</sup>を*gl*と略す。脳腫瘍遺伝子をホモにもつ幼虫は、正常幼虫が蛹期に入る時間でも、幼虫のまま大きくなり続け、透明度も増してやがて死ぬ。幼虫の死ぬ前に、体内を調べてみると、奇型化し、巨大化した脳と成虫原基(成虫の器官になる幹細胞群)がみられる(図9)。巨大化した脳の一部(どの部分でもよい)を成虫腹腔内に移植すると、浸潤増殖し、1~2週間で宿主を殺す。脳腫瘍細胞は、成虫腹腔内で増殖するので、移植された宿主が死ぬ前に腹腔内の脳腫瘍細胞を新しい宿主へ移植してやれば、in vivoで培養することができる。表3は、*gl*<sup>4</sup>/*gl*<sup>4</sup>幼虫の脳と、継代後の脳腫瘍細胞の染色体の変化を、継世代ごとに調べたものである<sup>24)</sup>。脳腫瘍細胞の染色体は、脳の細胞として存在する時は、正常であるのに、わずか一代の移植で数や構造の異常(図10)が現われ、継代が進むにつれ異常の頻度が増した。脳腫瘍細胞の移植にともなう変化は染色体異常ばかりでなく、①幼虫奇型脳には存在しないレトロウィルス様粒子が大量生産されていた、②奇型脳を幼虫に移植した時、宿主を殺す力が増し

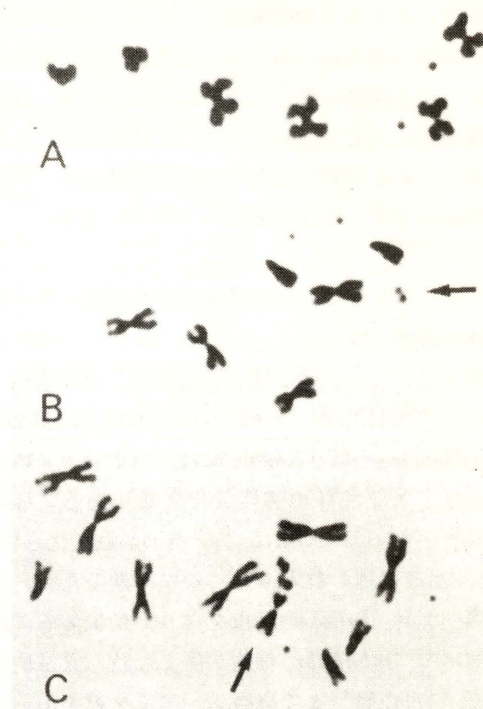


図10：ハエの脳腫瘍細胞の染色体。(A)：正常な染色体、(B)：端部欠失をもつ、(C)：構造異常を伴う異数性染色体。

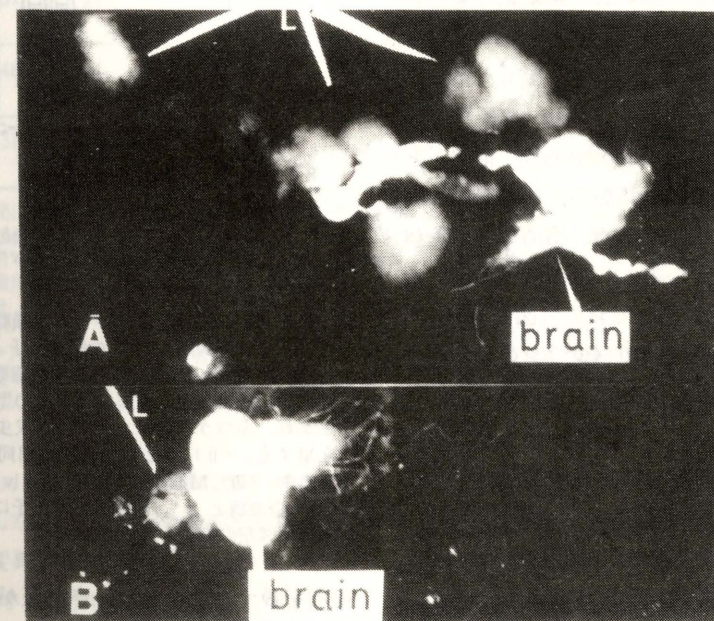


図11：ハエ3令幼虫のリンパ節。(A) 正常株、(B) 白血病変異株(*mbn/Y*)。リンパ節(L)は脳の近くにあり、小さな5個の丸い細胞群からできている。正常株(A)では、ひとつにかさなったようにみえるが、(B)では5個それぞれが巨大化している。



た<sup>24)</sup>、の変化も現われた。このような脳腫瘍細胞の移植にともなう劇的变化は、とうてい突然変異では説明できない。むしろ、脳腫瘍細胞が腹腔内という全く環境の異なる場所におかれた為、遺伝子発現がいっせいに起こって、大変化をおこしたと考えられる。がん細胞の悪性化の進行は、がん細胞をとりまく環境の変化が一因といえる。

# (B) ショウジョウバエの劣性発がん変異ヘテロ接合体の発がん性

表1の“リンパ節血球の悪性腫瘍”変異遺伝子のひとつ *l(1) mbn* (*mbn*: malignant blood cell neoplasia)——以下 *mbn* 又は“白血病”と略す——は、X染色体の劣性致死変異である。*mbn* 変異をヘミにもつ幼虫は、リンパ節が巨大化し(図11)、血液細胞の数もふえ、幼虫後期で死ぬ。白血病ヘテロ(*mbn/+*)幼虫を作り、幼虫体内に白血病ホモ(*mbn/mbn*)細胞が生じた時、異常増殖して、“白血病”まで発展し、宿主を殺すかどうかを試した。*mbn* ヘテロ(*mbn/+*)接合幼虫体内に、*mbn* ホモ接合を生じさせるのには、X線1KRを*mbn*ヘテロ幼虫に照射して体細胞の染色体組換えをおこさせることで行った。*mbn/+* 幼虫の体細胞に *mbn/mbn* 細胞が誕生しても、宿主を殺さず成虫になったとしても、*mbn* は観察で識別されるマーカーでないから、*mbn/mbn* 細胞がどれだけの頻度で生じたのかわからない。染色体組換えの頻度をモニターするため、相同なX染色体の *mbn* 変異をもたない方に、目でみて識別できる優性変異 *w<sup>DZL</sup>* をもたせておく(図12)。*w<sup>DZL</sup>* とは、成虫の正常な赤色眼色(*w<sup>+</sup>*)を黄眼色化する優性変異でX染色体の先端にのっている。[*w<sup>+</sup> mbn / w<sup>DZL</sup> +*]型成虫は、黄眼色を呈している。この幼虫の眼原基の細胞に染色体組換えが生じると、[*w<sup>+</sup> mbn / w<sup>+</sup> mbn*]細胞と[*w<sup>DZL</sup> + / w<sup>DZL</sup> +*]細胞が生じ、前者の細胞が分裂増殖して、黄眼色成虫の眼に、赤色斑を形成する。それゆえ、赤色斑の出現頻度を求めれば、染色体組換えの頻度、すなわち *mbn/mbn* ホモ型細胞誕生の頻度も推定できる。しかしながら、この項の最初に記し

た、発がんテストで、*w<sup>+</sup> mbn / w<sup>DZL</sup> +*ヘテロ幼虫体内で、*mbn/mbn* 細胞が生じた時、ヘテロ幼虫が白血病に発展して死ぬとしたら、赤色斑をもつ幼虫は出現しないことになる。そこで、赤色斑の現われる頻度を、問題となる *mbn/+*ヘテロ幼虫と正常(*+/+*)幼虫で比較した(表4-A)<sup>23)</sup>。赤色斑の大きさは、幼虫個体のどの発育段階で染色体組換えがおこったかもモニターしてくれる。つまり、大きい赤色斑は幼虫の発生初期に、小さい赤色斑は発生後期に、染色体組換えが眼原基でおこったという事である。図4-Aから、X線照射時に幼虫が発生初期にあったものに限って(図4-Aの30以上の赤色斑を生じる条件の幼虫)、ヘテロ成虫の方が、正常成虫より、赤色斑の出現頻度が低下した。この結果は、ハエの発生初期に限って、白血病細胞(*mbn/mbn*)が誕生した時、

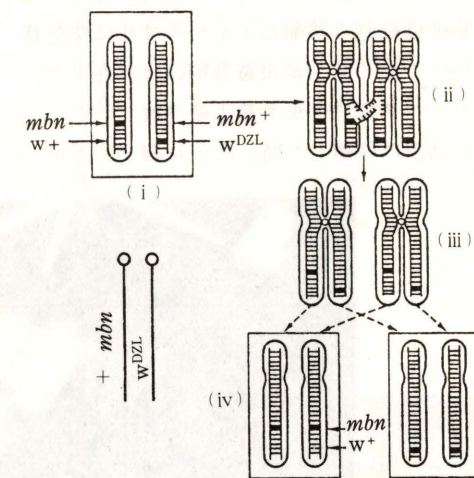


図12: 染色体組換えにより、ヘテロ型細胞からホモ型細胞が生じる模様図。(i) 白血病遺伝子 *mbn* と優性黄眼色遺伝子 *w<sup>DZL</sup>* についてヘテロ型細胞。X染色体のみを图示。使用する幼虫は、本来この型の細胞をもって生まれ、ふつうは発がん率0で、成虫になると黄眼色を呈する。(ii) G2期における相同染色分体の組換え途中。(iii) M期。組換え終了。(iv) 細胞分裂後に、*mbn* 白血病と *w<sup>+</sup>* (赤眼)の遺伝子に関して、ホモ型細胞(図左の細胞)が生じる。

宿主を殺すようになり、赤色斑が出現しにくくなったと考えれば説明できる。*mbn*ヘテロ成虫でみられる大きな赤色斑の出現は、①*mbn/mbn*細胞による宿主死は不完全、②眼原基で *mbn/mbn*

表4 キイロショウジョウバエの幼虫に1 kradのX線を照射したときの体細胞における染色体組換え頻度: 癌遺伝子ヘテロ接合体と正常個体の比較

| 実験番号 | 幼虫の <sup>a)</sup><br>発育令<br>(時間) | 癌<br>遺伝子                 | 癌<br>遺伝子の<br>有無 | 染色体組換え頻度 (%) <sup>b)</sup>         |                                 |                                 |
|------|----------------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|      |                                  |                          |                 | X線照射時期の幼虫の発生進行の程度                  |                                 |                                 |
|      |                                  |                          |                 | 発生後期群 <sup>c)</sup><br>[5-16個]     | 中間群 <sup>c)</sup><br>[17-29個]   | 初期群 <sup>c)</sup><br>30個以上      |
|      | control <sup>d)</sup>            | <i>mbn</i> <sup>e)</sup> | ヘテロ<br>正常       | 0.94 (30/2515)<br>0.94 (30/3205)   | 0.08 (2/2515)<br>0.12 (4/3205)  | 0.12 (3/2515)<br>0.19 (6/3205)  |
| #78  | 11.5-16                          | <i>mbn</i>               | ヘテロ<br>正常       | 3.2 (31/966)<br>1.9 (22/1161)      | 0.10 (1/966)<br>0.86 (10/1161)  | 0.93 (9/966)<br>3.8 (44/1161)   |
| #78  | 16-22.5                          | <i>mbn</i>               | ヘテロ<br>正常       | 2.3 (25/1074)<br>2.2 (23/1054)     | 0.19 (2/1074)<br>0.38 (4/1054)  | 0.74 (8/1074)<br>1.7 (18/1054)  |
| #103 | 28.5-44                          | <i>mbn</i>               | ヘテロ<br>正常       | 13 (164/1270)<br>12 (273/2300)     | 1.5 (19/1270)<br>4.9 (110/2300) | 1.7 (22/1270)<br>6.3 (45/2300)  |
| #103 | 44-53                            | <i>mbn</i>               | ヘテロ<br>正常       | 32 (126/389)<br>32 (113/356)       | 1.3 (5/389)<br>6.7 (24/356)     | 0.5 (2/389)<br>2.0 (7/356)      |
| #130 | 24-48                            | <i>mbn</i>               | ヘテロ<br>正常       | 14.5 (205/1416)<br>13.0 (162/1246) | 3.0 (42/1416)<br>5.0 (61/1246)  | 2.2 (22/1416)<br>9.1 (114/1246) |
| #130 | 24-31                            | <i>mbn</i>               | ヘテロ<br>正常       | 5.2 (58/1116)<br>4.8 (30/621)      | 1.7 (19/1116)<br>3.1 (19/621)   | 1.6 (18/1116)<br>5.2 (32/621)   |
|      | control <sup>d)</sup>            | <i>gl</i> <sup>f)</sup>  | ヘテロ<br>正常       | 0.72 (8/1108)<br>0.32 (3/936)      | 0.36 (4/1108)<br>0 (0/936)      | 0 (0/1108)<br>0 (0/936)         |
| #133 | 24-31                            | <i>gl</i>                | ヘテロ<br>正常       | 2.7 (35/1363)<br>2.4 (39/1652)     | 1.6 (22/1363)<br>1.8 (30/1652)  | 3.7 (51/1363)<br>3.4 (56/1652)  |
| #133 | 24-48                            | <i>gl</i>                | ヘテロ<br>正常       | 4.5 (63/1395)<br>4.7 (65/1371)     | 2.8 (39/1395)<br>3.4 (47/1371)  | 4.7 (65/1395)<br>4.6 (63/1371)  |
| #131 | 24-31                            | <i>gl</i>                | ヘテロ<br>正常       | 4.5 (14/310)<br>2.9 (7/241)        | 3.9 (12/310)<br>2.1 (5/241)     | 2.6 (8/310)<br>3.7 (9/241)      |

a) : 表に示す時間は、X線照射に用いた幼虫の産卵後の時間で、これら幼虫集団は、ある発育時期の幼虫をピークに、その前、後の発育期の幼虫を含んでいる。b) : 図12に示したように、優性黄眼色変異遺伝子 *w<sup>DZL</sup>* のヘテロ接合型幼虫を用いるので、染色体組換えがおこると、*w<sup>+</sup>*ホモ接合型細胞が生じ、成虫の黄眼色中に赤色斑が出現する。組換え頻度は、黄眼色雌成虫当りの赤色斑の数。c) : [ ]内は赤色斑を占める個眼の数。この数が大きい赤色斑ほど、早い時期に生じた *w<sup>+</sup>*ホモ接合型細胞に由来するクローンである。d) : X線を照射しない場合。e) : ヘテロ: *w<sup>+</sup> mbn / w<sup>DZL</sup> +*, 正常: *w<sup>+</sup> mbn / w<sup>DZL</sup> +*(図12参照)。f) : ヘテロ: *w<sup>+</sup> / w<sup>DZL</sup> ; gl<sup>+</sup> / Cy*, 正常: *w<sup>+</sup> / w<sup>DZL</sup> ; Cy / +*。後者を正常とみなすのは、*Cy*と書いた第2染色体は逆位をもっているが、癌遺伝子 *gl*をもたないからである。逆位は第2染色体間の染色体組換えを抑制するが、本実験で調査したX染色体の組換えには影響しない。

細胞が誕生しても、造血とは無関係な器官であるため、異常増殖しない、などの理由が考えられる。

前項の脳腫瘍変異 *gl<sup>+</sup>*についても、*gl<sup>+</sup> / +*ヘテロ幼虫を作り、同じようにX線を照射して *gl<sup>+</sup> / gl<sup>+</sup>*ホモ型細胞を生じさせ、発がんテストを行った(表4-B)。しかし、脳腫瘍ヘテロ株においても、正常株においても幼虫の発生初期に組換え

のおこる条件(30以上の赤色斑出現の区)下で、赤色斑の出現頻度は同じであった<sup>23)</sup>。

*gl<sup>+</sup>*遺伝子は最近クローニングされ、分子レベルの解明がなされた。その結果、*gl<sup>+</sup>*遺伝子は、がん抑制遺伝子であり、その発現は発生の初期胚で最も多い事がわかった<sup>25) 26) 27)</sup>。また Gateff の発見した、脳腫瘍変異の温度感受性株は<sup>22)</sup>、胚を



許容温度 (22℃) に12時間 (胚期の前半) 以上おくと、脳腫瘍化しない。これらの報告された実験結果は、*gll*<sup>+</sup> ヘテロ幼虫内で *gll/gll* ホモ細胞が誕生しても、宿主の死を示唆する証拠は得られなかったことは、*gll/gll* 細胞の誕生時期がおそすぎた事が1つの原因と思われる。もうひとつの説明は、幼虫脳に誕生した *gll/gll* 細胞の囲りのがんでない (*gll*<sup>+</sup>)細胞と密着して存在するため、正常細胞から出るがん化抑制因子が *gll/gll* がん細胞に、容易に到達し、その異常増殖を防げると解釈される。他方、白血病 (*mbn/mbn*)細胞が、リンパ節や血液細胞中に誕生しても、正常 (*mbn*<sup>+</sup>)細胞も白血病細胞も互いに独立しているため、がん抑制因子は白血病細胞に到達しにくいので白血病細胞の増殖の妨げにならないと考えている。

白血病ヘテロ幼虫での発がんテストで、白血病細胞の誕生による個体死を示唆する証拠を得た。発がんテストを行って約3000匹の幼虫を調べたが、白血病遺伝子をホモ (*mbn/mbn*)接合幼虫にみられるような重症の白血病症状を示す幼虫は、発見できなかった。おそらく体内に白血病細胞が生じても、ハエの幼虫期は短かすぎて (約5日)、白血病に発展するひまがないためと解釈している。したがって、発がんテストで示唆された幼虫の個体死は、白血病以外の原因による死と思われる。

#### おわりに

ハエは一見、哺乳動物と違ってみえる。しかし、以外にも、ヘテロサイクリックアミンの変異原性試験から、マウスと代謝経路が似ているらしい事が示唆された。もうひとつは、ハエの劣性がん遺伝子についてである。最近、ヒトの劣性がん遺伝子の存在が明らかになりつつあり、これらは、発がん抑制遺伝子に分類されている<sup>28)</sup>。網膜芽腫を例にとると<sup>29) 30)</sup>、13番目の染色体上 (13q14) にある *rb* 遺伝子座が欠損している *rb* 遺伝子をヘテロ (*rb/rb*<sup>+</sup>)個体で、*rb*<sup>+</sup> 遺伝子に体細胞突然変異 (主に欠失) がおこり、*rb/rb*<sup>-</sup> のヘミ接合型細胞が、さかんに増殖している網膜芽細胞に生じた時、その細胞が増殖し、発癌に発展するという

ものである。*rb*<sup>+</sup> 遺伝子は、網膜芽細胞を網膜に分化させ、分化後は、分裂を停止するように働きかける。変異遺伝子をホモ又はヘミにもつ網膜芽細胞は、分裂停止がおこせないため、増殖をしつづけ、発癌に至る。つまり *rb*<sup>+</sup> 遺伝子を発がん抑制遺伝子と考える。ショウジョウバエの劣性がん遺伝子も、それをホモ (又はヘミ) にもつ幼虫は、それぞれのがん遺伝子に対応する器官にのみ、腫瘍が現われる。つまり、特定の器官の正常な発生と分化に必要な遺伝子である点で、ヒトの劣性がん遺伝子と似ている。しかし、ヒトでは、体細胞の突然変異によって発癌に至るが、がん遺伝子をホモにもつ個体はみつからない (おそらく発生初期の死)。逆に、ハエでは、劣性がん遺伝子をホモ (又はヘミ) にもつ個体の発がんはみとめられるが、体細胞突然変異によっては発がんに発展しなかった。両者の発がん現象のちがいは、発生のしくみと寿命の時間的差が原因と思われる。

このたびの奨励賞受賞に当たり、ショウジョウバエの体細胞突然変異研究を通じて、常に適切な御助言を下さいました近藤先生、野村先生をはじめ教室員の皆様の变らぬ御励し、御助言に感謝します。またショウジョウバエの遺伝学に関して御指導を下さいました藤川博士、餌の調整、器具洗浄に御協力下さいました西野智恵子さんにも感謝します。

Abbreviations : Trp-p-1, 3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido (4, 3-b) indole ; Trp-p-2, 3-amino-1-methyl-5H-pyrido (4, 3-b) indole ; Glu-p-1, 2-amino-6-methyldipyrido (1, 2-a, 3', 2'-d) imidazole ; Glu-p-2, 2-aminodipyrido (1, 2-a, 3', 2'-d) imidazole ; IQ, 2-amino-3-methylimidazo (4, 5-f) quinoline ; MeIQ, 2-amino-3, 4-dimethylimidazo (4, 5-f) quinoline ; MeIQx, 2-amino-3, 8-dimethylimidazo (4, 5-f) quinoline ; AαC, 2-amino-α-carboline ; MeAαC, 2-amino-3-methyl-α-carboline ; 4NQO, 4-nitro-

quinoline-1-oxide ; B(a)P, benzo(a)pyrene ; 2-AAF, 2-acetylaminofluorene

#### 参考文献

- 1) Ryo, H., Ito, K., and Kondo, S. : Increment kinetics of recessive lethal mutations and dominant lethals in offspring of *Drosophila melanogaster* on strage of methylmethanesulfonate-treated sperm in females. *Mutation Res.*, 83 : 179-190 (1981) .
- 2) Rasmuson, B., Svahlin, H., Rasmuson, Å., Montell, I., and Olofsson, H. : The use of a mutationally unstable X-chromosome in *Drosophila melanogaster* for mutagenicity testing. *Mutation Res.*, 54 : 33-38 (1978) .
- 3) Ryo, H., Yoo, M.A., Fujikawa, K., and Kondo, S. : Comparison of somatic reversions between ivory allele and transposon-caused mutant allele at the *white* locus of *Drosophila melanogaster* after larval treatment with x-rays and ethylmethansulfonate. *Genetics*, 110 : 441-445 (1985) .
- 4) 藤川和男, 梁 治子, 近藤宗平 : ハエの翅毛スポットテスト。環境変異原研究, 6 : 107-113 (1984) .
- 5) 梁 治子 : ショウジョウバエのスポットテスト。環境変異原研究, 9 : 55-65 (1987) .
- 6) 梁 治子, 劉 美愛, 藤川和男, 近藤宗平 : ショウジョウバエの体細胞突然変異, トキシコロジーフォーラム, 8 : 587-596 (1985) .
- 7) Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., and Kale, P.G. : Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutag.*, 6 : 153-188 (1984) .
- 8) 山本和男 : DNA 修復遺伝子のクローニング。実験医学, 4 : 220-226 (1986) .
- 9) Goodgal, S.H., Rupert, C.S., and Herriott, R.M. : Photoreactivation of *Haemophilus influenzae* transforming factor for strep-

- 10) Boyd, J.B., Harris, P.V., Osgood, C.J., and Smith, K.E., : Biochemical characterization of repair-deficient mutants of *Drosophila*. In : DNA repair and mutagenesis in eukaryotes. (ed. by W.M. Generoso, M.D. Shelby, and F.J. de Serres), Plenum Press, N.Y., p.p.209-221 (1980) .
- 11) Ryo, H., and Kondo, S. : Photoreactivation rescue and hypermutability of ultraviolet-irradiated excisionless *Drosophila melanogaster* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 3366-3370 (1986) .
- 12) Fujikawa, K., Ryo, H., and Kondo, S. : Somatic eye-color reversion assay in *Drosophila melanogaster* using the unstable white-zeste system incorporated with repair-deficient mutation. In : Evaluation of Short-term tests for carcinogens. Cambridge Univ. Press., in Press
- 13) Fujikawa, K., and Kondo, S. : DNA repair dependence of somatic mutagenesis of transposon-caused *white* alleles in *Drosophila melanogaster* after treatment with alkylating agents. *Genetics*, 112 : 505-522 (1986) .
- 14) Yoo, M.A., Ryo, H., and Kondo, S. : Differential hypersensitivities of *Drosophila melanogaster* strains with *mei-9*, *mei41* and *mei9mei41* alleles after larval X irradiation. *Mutation Res.*, 146 : 257-264 (1985) .
- 15) 近藤宗平, 梁 治子, 劉 美愛 : ショウジョウバエにおける DNA 修復と環境変異原, 日米医学協力研究会, 突然変異・がん原部会報告集, p.p.77-80 (1985) .
- 16) Matsukura, N., Kawachi, T., Morino, K., Ohgaki, H., and Sugimura, T. : Car-



- cinogenicity in mice of mutagenic compounds from tryptophan pyrolysate. Science, 213 : 346-347 (1981) .
- 17) Ohgaki, H., Matsukura, N., Morino, K., Kawachi, T., Sugimura, T., and Takayama, S. : Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from glutamic acid and soybean globulin pyrolysates, Carcinogenesis, 5 : 815-819 (1984) .
- 18) Ohgaki, H., Kusama, K., Matsukura, N., Morino, K., Hasegawa, H., Sato, S., Takayama, S., and Sugimura, T. : Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds, cooked beef and beef extract. Carcinogenesis, 5 : 921-934 (1984) .
- 19) 高山昭三 : 2-Amino-3, 8-dimethylimidazo (4, 5-f) quinoline (MeIQx) のラット発がん実験, 日米医学協力研究会, 突然変異・がん原部会報告集, p.p.65-67 (1986) .
- 20) Yoo, M.A., Ryo, H., Todo, T., and Kondo, S. : Mutagenic potency of heterocyclic amines in the *Drosophila* wing spot test and its correlation to carcinogenic potency. Jpn. J. Cancer Res., 76 : 468-473 (1985) .
- 21) Gateff, E. : Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. Science, 200 : 1448-1459 (1978) .
- 22) Gateff, E. : Cancer, Genes and Development : The *Drosophila* case. Adv. Cancer Res., 37 : 33-74 (1982) .
- 23) 近藤宗平, 梁 治子, 柴 忠義, 西田育巧 : ショウジョウバエを用いた発癌研究, 蛋白質, 核酸, 酵素, 32 : 285-291 (1987) .
- 24) Ryo, H., Shiba, T., Fukunaga, A., Kondo, S., and Gateff, E. : Chromosomal aberrations and retrovirus-like particles produced by *in vitro* transplantation in neoplastic brain cells of a *Drosophila* mutant strain. Gann, 75 : 22-28 (1984) .
- 25) Mechler, B.N., McGinnis, W., and Gehring, W.J. : Molecular cloning of *lethal*(2) giant larvae, a recessive oncogene of *Drosophila melanogaster*. EMBO J., 4 : 1551-1557 (1985) .
- 26) Oppen, M., Schuler, G., and Mechler, B.M. : Hereditary suppression of *lethal*(2) giant larvae malignant tumor development in *Drosophila melanogaster*. Oncogene, 1 : 91-96 (1987) .
- 27) Jacob, L., Oppen, M., Metzroth, B., and Mechler, B.M. : Structure of *l*(2) *gl* gene of *Drosophila* and delimitation of its tumor suppressor domain. Cell, 50 : 215-225 (1987) .
- 28) Klein, G. : The approaching era of the tumor suppression gene. Science, 238 : 1539-1545 (1987) .
- 29) Benedict, W.F. : Recessive human cancer susceptibility genes (Retinoblastoma and Wilms' loci). Adv. Viral Oncol., 7 : 21-34 (1987) .
- 30) Knudson, A.G. : A two-mutation model for human cancer. Adv. Viral Oncol., 7 : 1-17 (1987) .

環境変異原研究10 : 15-25 (1988)

昭和62年度学会奨励賞受賞者論文

## ショウジョウバエによる環境変異原検出系に関する研究

武田薬品工業株式会社 中央研究所 藤 川 和 男

### 1. はじめに

ショウジョウバエには、生殖細胞で生ずる遺伝子突然変異や染色体突然変異を、標識遺伝子の表現型を継代追跡するだけで、確実に検出できるテスター株とそれらを駆使する交配技術が豊富に備わっている。この利点を生かすところに、環境変異原研究におけるショウジョウバエの意義があった。とりわけ、Basc と呼ばれている逆位X染色体システムを利用する伴性劣性致死法は、他に比類がない程、高感度な生殖細胞突然変異検出法として重宝されてきた(文献22参照)。当然、ショウジョウバエによる環境変異原研究は、少数の専門家の独壇場であった。

ところが、最近、適当な標識遺伝子を担う幼虫を検体に暴露し、成虫の体表面で体細胞突然変異によるスポットを観察するだけで、検体の変異原性の有無を調べることができる方法が、ショウジョウバエによる新しい環境変異原検出法として注目され、実際に使われ始めた(文献37参照)。我が国においても事情は同じで、いくつかの研究機関においては、ショウジョウバエ遺伝学のトレーニングを受けた経験はおろか、いかなる *in vivo* 実験の経験も無い研究者達によってショウジョウバエの体細胞テストが実施されている。環境変異原の人体影響の研究は学際的にならざるをえない性質のものだから、誰にでも使える短期 *in vivo* 試験として、ショウジョウバエの体細胞テストが登場してきた意義は大きい。私もこの変化に無縁ではなかった。

### 2. AF-2 事件と体細胞テスト

合成殺菌剤として使われていた AF-2

(furylfuramide) は、培養細胞で染色体異常を大腸菌やイーストやカイコで遺伝子突然変異を誘発することが、1973年の環境変異原学会で報告され、その翌年にマウスで発癌性が認められ、使用禁止となった(文献32参照)。

この物質がショウジョウバエでも変異原性を示すかどうかを調べるため、Blijlevenら<sup>2)</sup> は、幼虫を100~1000ppm の AF-2 を含む培地上で生育させたり(表1), 成虫に120~500 ppm の AF-2 を含むショ糖液を給餌したりして、雄生殖細胞を対象に伴性劣性致死試験を行った。しかし、いずれの処理でもショウジョウバエにおける AF-2 の変異原性を証明する結果は得られなかった。Inoue と Watanabe<sup>20)</sup> は、AF-2 を200ppm 含む培地でショウジョウバエを20代にわたって飼育し、Cy/Pm法と呼ばれている巧妙な手法を用いて第2染色体上に蓄積した有害変異を調べたが、雄生殖細胞でも雌生殖細胞でも AF-2 の遺伝毒性を示唆する証拠は得られなかった。私は、カイコの卵母細胞で AF-2 が特定座位突然変異を起こすという Tazima と Onimaru の報告<sup>33)</sup> にヒントを得て、成虫雌に対して AF-2 を300ppm 経口投与し、次世代で dumpy 座の劣性可視突然変異(表1)と Minute 座の優性可視突然変異の検出を試みたが、結果は陰性であった<sup>5)</sup>。

ところが、AF-2 を50~100ppm 含む培地上で、眼色変異系統 unstable white-zeste (UZ)<sup>26)</sup> の幼虫を成虫期まで成育させると、複眼中に復帰変異による赤色スポットを有するハエの頻度が用量依存的に有意に上昇し(表1), ショウジョウバエにおいても AF-2 は遺伝子突然変異誘発作用を有することを難なく確認することができ



表1. AF-2の生殖細胞テストと体細胞テスト

| 指標／処理対象／標的細胞<br>A F - 2 用量 <sup>a</sup>       | 調べた<br>ハエの数 | 変異頻度<br>(%) | 判定 <sup>b)</sup> |
|---|-------------|-------------|------------------|
| ( I ) 生殖細胞テスト                                 |             |             |                  |
| 特定座位突然変異／成虫／卵母細胞 <sup>c)</sup>                |             |             |                  |
| 0 ppm   | 136376      | 0.007       | —                |
| 300 ppm                                       | 34355       | 0.006       |                  |
| 伴性劣性致死突然変異／幼虫／精原細胞～精母細胞 <sup>d)</sup>         |             |             |                  |
| 0 ppm   | 2024        | 0.24        | —                |
| 100～1000 ppm                                  | 2194        | 0.18        |                  |
| 伴性劣性致死突然変異／成虫／精原細胞～精母細胞 <sup>e)</sup>         |             |             |                  |
| 0 ppm   | 4193        | 0.05        | +                |
| 1000 ppm                                      | 4430        | 0.52        |                  |
| 相互転座／成虫／精原細胞～成熟精子 <sup>e)</sup>               |             |             |                  |
| 0 ppm   | 95352       | 0.002       | —                |
| 10000 ppm                                     | 4626        | 0.000       |                  |
| ( II ) 体細胞テスト                                 |             |             |                  |
| 赤色スポット <sup>g)</sup> ／幼虫／複眼原基細胞 <sup>c)</sup> |             |             |                  |
| 0 ppm   | 8196        | 0.10        | +                |
| 50 ppm  | 3412        | 0.41        |                  |
| 100 ppm                                       | 1793        | 0.73        | +                |
| 翅毛スポット <sup>h)</sup> ／幼虫／翅原基細胞 <sup>f)</sup>  |             |             |                  |
| 0 ppm   | 105         | 1.9         | +                |
| 100 ppm                                       | 115         | 13.0        |                  |
| 200 ppm                                       | 114         | 25.4        |                  |

a, 培地中の濃度

b, Fisher's exact test による (+,  $P < 0.05$ ; -,  $P > 0.05$ )

c, 文献5より

d, 文献2より

e, 文献35より

f, 文献13と未発表データより

g, Unstable white-zeste (UZ)系で検出される復帰突然変異

h, mwh/flr系で検出される体細胞染色体組換え

た<sup>5)</sup>。mwh/flr系<sup>17)</sup>の幼虫を用いて、体細胞染色体組換えによる翅毛スポットの検出実験を行っても、明瞭な陽性結果が得られ<sup>13)</sup>、AF-2が、TonomuraとSasakiのヒト培養細胞による先駆的研究<sup>34)</sup>から予測されるように、染色体突然変異誘発能も有することが明らかになった(表1)。ショウジョウバエの生殖細胞におけるAF-2の遺伝子突然変異誘発能を示唆する証拠は、最近になって、Valenciaら<sup>35)</sup>によって得られた。彼らは成虫雄のいろいろな発育段階にある生殖細胞を10000ppmという高濃度のAF-2で経口的に処理し、伴性劣性致死法を用いて突然変異の検出を行い、還元分裂期から精子細胞期までの細胞に対する有意な処理効果を認めた(表1)。彼らは、同様な処理条件下で、第2染色体と第3染色体の間の相互転座を指標にして染色体突然変異の検出

実験も行ったが、このテストではAF-2の変異原活性は認められなかった(表1)。

焼けこげ変異原としてみつかった発癌物質のTrp-P-1とTrp-P-2も、伴性劣性致死法による生殖細胞テストよりもUZ系やmwh/flr系を用いる体細胞テストで、はるかに明瞭な変異原性効果を示した<sup>9,13)</sup>。AF-2のように、体細胞テストで比較的顕著な変異原性を発揮する発癌物質は稀な例外ではなかったのである。体組織と性腺で外来異物の毒性に対する防御機構とか薬物の代謝活性化能がかなり違っているものと思われる。

### 3. 赤色スポットは本当に突然変異か?

Fahmy夫妻の研究においても、いろいろな発癌物質が、伴性劣性致死法による生殖細胞テストよりも、UZ系による体細胞テストで、はるかに

顕著な活性を示した<sup>4)</sup>。しかし、彼らは、このような結果と別のデータに基づいて、発癌物質によって誘発されたUZ系の赤色スポットは、伴性劣性致死法で検出されるような真の突然変異とは全く異なるもので、遺伝情報の発現の転写レベルの変化によると主張した。

問題のUZ系はX染色体上のzeste座の劣性変異 $z^1$ とwhite座のトランスポゾン挿入変異 $w^{+ (TE)}$ のセットのことである<sup>26,27)</sup>。 $z^1$ は、white座が正常であれば、雌で( $z^1 w^+ / z^1 w^+$ の状態)この座の機能を抑制し黄眼色をもたらし、雄では( $z^1 w^+ / Y$ の状態では)そのサプレッサ効果を発揮せず、野生型の赤眼色を発現させる。ところが、UZ系では、雄でも黄眼色を発現させる。これは、UZ系のwhite座が単価接合の状態でも $z^1$ のサプレッサ効果を受けつけた結果で、 $w^{+ (TE)}$ を特徴づける性質の一つである。UZ系で標識された雄幼虫をEMSなどの変異原に暴露すると、黄色を呈する成虫複眼中に赤色スポットが出現することをみつけ、この系を変異原検出系として用いることを提唱したのはRasmusonら<sup>27)</sup>である。彼らは、このスポットを、幼虫の複眼原基の細胞で $w^{+ (TE)}$ が変異して $z^1$ のサプレッサ効果をうけつけ

なくなった結果生じたものと説明していた。

論より証拠。UZ系といろいろなDNA修復能欠損変異を組み合わせて作成した株と正常な修復能を有するUZ株の幼虫をEMSで処理し、成虫複眼中の赤色スポットの出現頻度を比較した<sup>10,14)</sup>。その結果、表2にまとめているように、EMSによる赤色スポットの出現頻度は、修復能欠損変異の存在下で、正常株以上に以下にも変化することがわかった。正常株以上に変化させたmei-9<sup>a</sup>は除去修復能欠損変異で、正常株以下に変化させた変異はいずれも複製後修復の欠損をもたらしものであった。変化の方向が欠損している修復系のタイプによって全く異なるということは、修復能欠損変異の赤色スポットの誘発に対する影響はDNAレベルの現象であることを強く示唆する。換言すれば、赤色スポットが、もとをただせば幼虫の複眼原基細胞で生じた $w^{+ (TE)}$ のDMA損傷で、スポット自体は復帰変異コロニーであれば説明がつく現象である。UZ系の赤色スポットの誘発に対してみられた各種修復能欠損変異の影響が、 $w^{+ (TE)}$ に特異的な現象でないことは、 $w^{+ (TE)}$ とは別の変異遺伝子 $w^{+ R61e19}$ を利用するwhite-zeste系(SZ)をテスターとして同様な

表2. Ethylmethanesulfonate 誘発突然変異の出現頻度におよぼす各種DNA修復能欠損変異の影響

| 修復遺伝子                   | DNA修復能 <sup>a)</sup> |     | 相対頻度                      |                           |                          |
|-------------------------|----------------------|-----|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                         | 除去                   | 複製後 | UZ系 <sup>b)</sup> の赤色スポット | SZ系 <sup>c)</sup> の赤色スポット | 伴性劣性致死突然変異 <sup>d)</sup> |
| 野生型                     | +                    | +   | 1                         | 1                         | 1                        |
| mei-9 <sup>a</sup>      | -                    | +   | 1.2                       | 1.3                       | 1.4                      |
| mus(2)201 <sup>D1</sup> | -                    | +   | 1.0                       | 1.0                       | - <sup>e)</sup>          |
| mus(3)306 <sup>D1</sup> | -                    | +   | 1.0                       | 1.1                       | -                        |
| mus(3)308 <sup>D1</sup> | -                    | -   | 0.4                       | 0.4                       | -                        |
| mus(1)101 <sup>D1</sup> | +                    | -   | 0.7                       | 0.8                       | 0.7                      |
| mei-41 <sup>D5</sup>    | +                    | -   | 0.5                       | 0.6                       | 0.6                      |
| mei-41 <sup>104</sup>   | +                    | -   | 0.3                       | 0.3                       | 1.0                      |

a, UV損傷の修復能(+, 正常:-, 異常)。文献3より。

b, 文献10と12より(UZ, 眼色変異 $w^{+ (TE)}$ と $z^1$ のセット)c, 文献10と未発表データより(SZ, 眼色変異 $w^{+ R61e19}$ と $z^1$ のセット)

d, 文献16より

e, 未決定



EMS 処理実験を行って確認した (表2)。

Grafら<sup>16)</sup>は、精子の DNA で生じた前突然変異損傷は、受精後、卵の細胞質中の (母親が産生した) 修復酵素の基質となると考え、EMS で処理した成虫雄を正常な修復能を有する雌と交配した場合と修復能欠損系統の雌と交配させた場合で、精子における伴性劣性致死突然変異の出現頻度がどのように変わるかを調べた。表2にまとめている彼らのデータから明らかなように、伴性劣性致死突然変異の誘発率も、*mei-9<sup>a</sup>*によって増加し、*mus(1) 101<sup>D1</sup>*や*mei-41<sup>D5</sup>*によって減少するのである。また、増加の程度も減少の程度も、赤色スポットでみられたのとほぼ一致する。これらの結果は、赤色スポットとして発現する体細胞復帰変

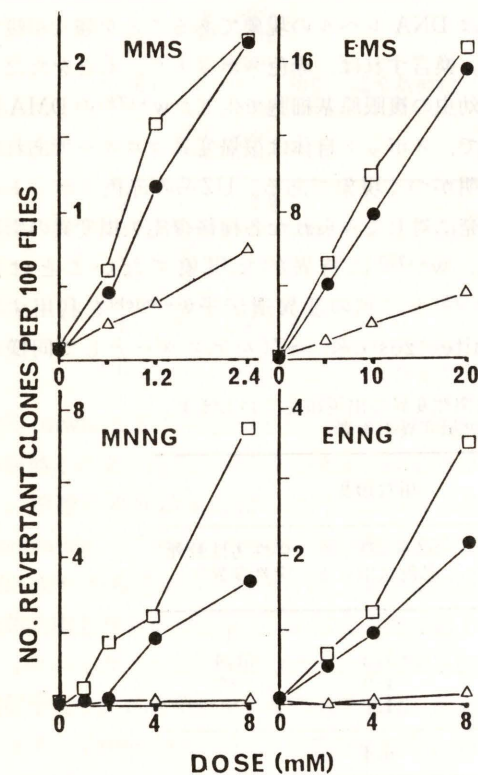


図1: UZ株 (●), UZ *mei-9<sup>a</sup>* (□) および UZ *mei-41<sup>104</sup>* 株 (△) のアルキル化剤に対する体細胞突然変異反応 (文献10より)  
横軸は1令幼虫が生育している培地上に滴下した検体濃度、縦軸はハエ100個体当りの赤色スポット数  
MMS, methylmethanesulfonate  
EMS, ethylmethanesulfonate  
MNNG, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine  
ENNG, N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

異が生殖細胞で生ずる遺伝子突然変異と本質的には同じであることを示唆する。ただ、*mei-41<sup>104</sup>* が赤色スポットの誘発に対しては著しい抑制効果を示したのに、Grafらの研究で伴性劣性致死突然変異の誘発には無効であったのは謎である。

ともあれ、UZ系の赤色スポットが遺伝子突然変異であるか否かはもはや問題ではなくなった。そこで、EMS でみられたような、DNA 修復と体細胞復帰突然変異生成の密接な関係が他のアルキル化剤を用いた場合でも成立するかどうかを確かめる実験を行った<sup>10)</sup>。得られた結果の一部を図1に示している。MMS, ENNG, MNNG のいずれの処理でも、EMS 処理の場合と同様に、UZ株において、*mei-9<sup>a</sup>*は *mutator* 効果を、*mei-41<sup>104</sup>*は *antimutator* 効果を示した。RyoとKondoの研究<sup>29)</sup>で、*mei-41<sup>104</sup>*はX線や紫外線 (UV) による復帰変異の生成も抑えることが明らかになった。*mei-9<sup>a</sup>*の効果は、正常株の DNA に生じた前突然変異損傷の一部が*mei-9<sup>a</sup>*遺伝子の支配する修復系で誤りなく取り除かれることを示唆する。一方、*mei-41<sup>104</sup>*の効果、例えば、ENNGやMNNGの変異原性の発現をほぼ完全に抑えたことは、正常株でこれらのアルキル化剤で誘発された復帰変異のほとんどすべてが、*mei-41<sup>104</sup>*遺伝子の支配下にある修復系におけるDNA損傷の修復エラーの結果であることを示唆する。事実、性質の異なるいろいろな変異原による突然変異の生成を阻害するという点で、*mei-41<sup>104</sup>*は大腸菌の「誤りがち修復」欠損変異*recA<sup>-</sup>*と共通の性質を有している<sup>11)</sup>。

かように、UZ系は、遺伝子突然変異の検出系としてじゅうぶんに信頼がおけるばかりでなく、いろいろな修復能欠損変異と併用することによって、生体側の突然変異反応のしくみの理解に役立つことがわかった。実用面では、バクテリアの復帰変異試験と同様に、ショウジョウバエの復帰変異試験でも除去修復能欠損変異 (*Exc<sup>-</sup>*) 株が使えるめどが立った。

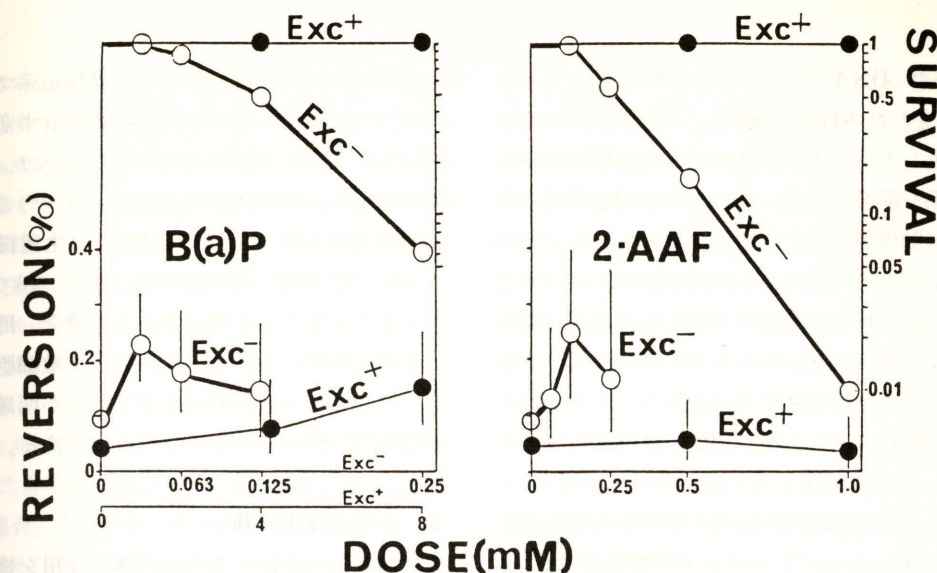


図2: UZ株 (*Exc<sup>+</sup>*), UZ, *mei-9<sup>a</sup>* 株 (*Exc<sup>-</sup>*) 幼虫の B(a)P あるいは 2-AAF に対する致死反応と体細胞突然変異反応 (文献15より)

横軸は培地中の検体濃度、左縦軸はハエ100個体当りの赤色スポット数  
右縦軸は対照区に対する処理区の生存個体数の相対値

#### 4. 高感受性遺伝子突然変異検出系

UZ *mei-9<sup>a</sup>*株を用いていろいろな発癌物質や制癌剤の変異原性試験を行った<sup>14,15,31)</sup>。その結果、図2に示しているように、この*Exc<sup>-</sup>*株は B(a)P と 2-AAF にきわめて高感受性であることがわかった<sup>6,15)</sup>。すなわち、*Exc<sup>-</sup>*株の幼虫を B(a)P を含む培地上で成虫期まで飼育して、赤色スポットの出現頻度を調べたところ、わずか 0.03mM の濃度でその変異原性効果を確認することができたが、ほぼ同程度の効果を*Exc<sup>+</sup>*株で確認するためには、8mM の濃度を要した。*Exc<sup>-</sup>*株は、アルキル化剤に対しては*Exc<sup>+</sup>*株よりもせいぜい2倍高い突然変異感受性を有しているにすぎないが (図1, MNNG), B(a)P に対しては約300倍高い感受性を示したのである。同様に、*Exc<sup>-</sup>*株に対する 2-AAF 処理は、0.13mM で陽性結果をもたらしたが、*Exc<sup>+</sup>*株に対しては 1mM でも無効であった。

これらの結果は、「ショウジョウバエでは B(a)P に代表される発癌性 polycyclic hydrocarbon 類や 2-AAF に代表される発癌性 aromatic amine 類の変異原性の検出が非常に困難である」という古くからの問題 (文献24と36参照) の克服に、*Exc<sup>-</sup>*株を利用する眼色復帰変異試験が有効であ

ることを示唆する。しかし、*Exc<sup>-</sup>*株の B(a)P 処理実験でも 2-AAF 処理実験でも、幼虫の検体に対する高い致死感受性が限定要因となって、処理区で観察された復帰変異頻度は対照レベルのせいぜい2倍強にすぎず (図2)、突然変異感受性の上昇が突然変異検出効率の増加を伴わなかったことは問題である。B(a)P にしろ 2-AAF にしろ、その処理効果は、復帰変異よりも個体致死としてより明瞭に発現したのである。この致死誘発効果が検体の DNA 毒性によることは、*Exc<sup>-</sup>*株に対するよりもはるかに高い用量域でも、*Exc<sup>+</sup>*株の幼虫の生存率がほとんど影響されなかったことが証明する。したがって、遺伝子突然変異誘発作用を検証する目的でなければ、発癌性 polycyclic hydrocarbon 類や aromatic amine 類に係わる上述の問題に対しては、それらの*Exc<sup>-</sup>*株や他の修復能欠損株に対する致死作用を調べる方が、復帰変異誘発作用を調べるよりは、はるかに有効であろう。DNA 修復試験を思いついた<sup>6)</sup>。

テスター株の復帰変異検出効率を高めるには、ゲノム当りの標的遺伝子の数を増やせばいい。変異遺伝子はいくら増やしても変異遺伝子に変わりはないが、そのうち1つでも野生型に復帰すれば、表現型は野生型になるはずである。実際には、



white座の DNA の一部 (2.9kb) が重複したため<sup>21)</sup> に生じた劣性変異 white-ivory ( $w^i$ ) を4コピー重複してもつX染色体を利用する眼色復帰変異試験系を開発した<sup>18)</sup>。この  $w^i$  の体細胞復帰変異が生殖細胞復帰変異と同様に重複している 2.9kb の DNA 片の欠失によるものであることは、赤色スポットが出現した複眼の DNA を直接調べて確認した。X線やいろいろな化学変異原の処理実験で、 $w^i$  四重複系統が  $w^i$  をゲノム当たり1コピーしかもたない系統よりも、高い頻度で体細胞復帰変異をもたらすことを確かめた。 $w^i$  をゲノム当たり1コピーもつ系統はUZ系統とほぼ同程度の突然異変感受性を有している<sup>30)</sup> ので、 $w^i$  四重複系はUZ系

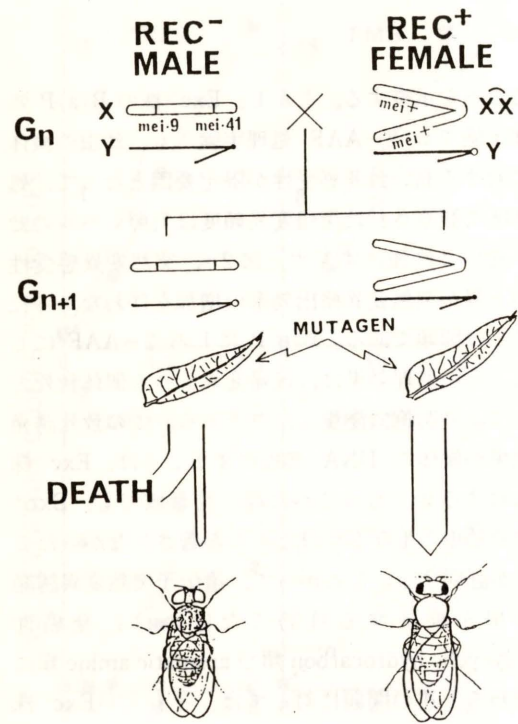


図3: 組換え能欠損 ( $Rec^-$ ) 二重変異体  $mei-9^a mei-41^{D5}$  を利用する DNA 修復試験の原理  
X,  $Rec^-$  変異 ( $mei-9^a mei-41^{D5}$ ) と眼色を黄色にするUZ系で標識されているX染色体  
Y, Y染色体  
 $\widehat{XX}$ , 体色を黄色にする yellow 変異で標識されている付着X染色体

よりも効率のいい遺伝子突然変異検出系である。ただ、この系とUZ系で陽性効果を示す変異原のスペクトラムに違いがあるのかどうかは、今後の問題である。現時点で明らかもう一つの利点は、 $w^i$  四重複系を用いると、UZ系では生殖細胞における  $w^{+ (TE)}$  の高い自然復帰率 ( $10^{-3} \sim 10^{-4}$  / 遺伝子/世代) のため不可能であった研究、即ち、同一処理条件下における、体細胞と生殖細胞の変異原に対する突然変異反応を分子性状が明確な同一の指標で比較できる<sup>8)</sup> ということである。

### 5. DNA 修復試験

化学物質の遺伝子突然変異誘発作用を検出しその強度を定量する目的で試験を行うのであれば、UZ系あるいは  $w^i$  四重複系の使用は当然である。しかし、単に変異原としての性質を有しているかどうかを問題にするのであれば、 $Exc^-$  株や他の修復能欠損株が変異原に対して高い致死感受性を示す事実を利用する試験の方がはるかに簡便であるし、すでに述べたように、検体によっては、はるかに有効である。この場合、致死感受性が高ければ高い程、変異原検出効率は良くなる。また、利用する修復能欠損変異は、X染色体に関連しているものが、後述するように、扱いやすく都合である。修復能欠損X染色体系統の中で、X線、UV、MMS、nitrogen mustard のいずれに対しても、最も高い致死感受性を示すのは、 $Exc^-$  変異体の  $mei-9^a$  と複製後修復能欠損変異体の  $mei-41^{D5}$  である。このような考えから、Nguyen ら<sup>23)</sup> は  $mei-9^a mei-41^{D5}$  二重変異体を利用する DNA 修復試験を提唱していた。私たちは、前述した  $Exc^-$  株を利用する B(a)P と 2-AAF の体細胞テストの経験から、彼らが提唱した試験系を発展させ実用化することにした。なお、 $mei-9^a$  と  $mei-41^{D5}$  は還元分裂期の組換え能欠損をもたらすという共通した性質<sup>1)</sup> をもつので、これらを  $Rec^-$  と略称する。

図3に示しているように、 $Rec^-$  二重変異体は雄系統として維持できる。パートナーとして  $Rec^+$  で正常な修復遺伝子を持つ  $\widehat{XXY}$  型の雌を使用

すればいい。 $\widehat{XX}$  は2本のX染色体がくっついてあたかも1本の染色体のごとくふるまうようになったもので付着X染色体と呼ばれている。 $\widehat{XXY}$  型の雌と正常な性染色体組成 (XY) を持つ雄からなる株では、雄のX染色体は常に雄に、雌の付着X染色体は常に雌に伝わる (図3)。このようなペアから生ずる4種の接合子 (XY, YY,  $\widehat{XXY}$ ,  $\widehat{XXX}$ ) のうち、YYと  $\widehat{XXX}$  は生存できないからである。

私たちが作成した株 (図3) の雄のX染色体は  $Rec^-$  二重変異に加えてUZ系で標識されている。この場合、UZ系は、眼色復帰変異検出系としてではなく、雌の赤眼色に対して、雄の眼色を黄色にするために役立っている。一方、雌の付着X染色体は、体色を黄色にする変異 yellow で標識されている。このマーカーは雄の野生型体色 (茶褐色) と区別するものに役に立つ。

この株は10代以上にわたる個別交配で選抜を繰り返して、自然状態における雄/雌の比を1付近で安定させたものでもある。したがって、その幼虫は、同じ発育段階にある  $Rec^-$  個体と  $Rec^+$  個体がほぼ同数混在する集団である。このような幼虫集団に、DNA 毒性を有する検体を投与すると、

$Rec^-$  個体の方が死にやすいので (図3)、成虫になった段階で、 $Rec^-$  個体の  $Rec^+$  個体に対する数の比は、無処理対照群における比 ( $\sim 1$ ) よりも低くなる。ただし、この比は雄/雌なので、 $Rec^-$  とか  $Rec^+$  に関係なく、単に致死感受性の性差をみている可能性がある。そこで、このような可能性を検証するため、雄も  $\widehat{XXY}$  型の雌も  $Rec^+$  である株も作成した。この株の雌雄も一目で区別できるようにし、性比も1付近で安定させた。[ $Rec^-$  雄・ $Rec^+$  雌] 株を処理した場合に限って、性比が対照区レベル以下に用量依存的に減少すれば、被験物質に DNA 毒性ありと判定することにした。

この判定基準に基づいて、多種多様な細胞毒性を被験物質として評価研究を実施した。表3にまとめているように、この研究で陽性結果をもたらした検体は、放射線、アルキル化剤、クロスリンク剤、インターカレート剤、問題の polycyclic hydrocarbon 類や aromatic amine 類を含む UV 型変異原、DNA 前駆体合成阻害剤等々と幅広いスペクトラムを示した。また、バクテリアでは不活性な発癌物質 urethane や HMPA も陽性効果を示した。これらの結果は、 $Rec^-$  二重変異体を利用する DNA 修復試験が in vivo 変異原性試験

表3 各種細胞毒物に対するDNA修復試験系の反応<sup>a)</sup>

|             |   |
|-------------|---|
| (I) 陽性      |   |
| 放射線         | : X線、紫外線  |
| アルキル化剤      | : EMS, MMS, MNNG, ENNG, Diethylnitrosamine  |
| クロスリンク剤     | : Mitomycin C, Diepoxybutane, Cyclophosphamide  |
| インターカレート剤   | : 9-Aminoacridine, Daunomycin, ICR-191  |
| UV型変異原      | : 4NQO, AF-2, Aflatoxin B <sub>1</sub> , 癌原性 aromatic amines <sup>b)</sup> , 癌原性 polycyclic hydrocarbons <sup>b)</sup> , Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, IQ |
| (焼けこげ変異原)   | : 5-Fluorouracil, Methotrexate, Hydroxyurea   |
| DNA前駆体合成阻害剤 | : Procarbazine, Bleomycin, Neocarzinostatin, o-Toluidine  |
| その他         | : Hexamethylphosphoramide (HMPA), Urethane  |
| (バクテリア非変異原) |   |
| (II) 陰性     |   |
| 塩基アナログ      | : 6-Mercaptopurine, Bromodeoxyuridine   |
| RNA合成阻害剤    | : Actinomycin D   |
| トポイソメラーズ阻害剤 | : Nalidixic acid, Oloxacin, Norfloxacin, Piromidic acid   |
| タンパク合成阻害剤   | : Cycloheximide   |
| 紡錘体毒        | : Vincristine sulfate, Vinblastine sulfate, Demecolcin  |
| その他         | : Benzene, p,p'-DDT, 非癌原性 polycyclic hydrocarbons <sup>b)</sup>   |

a, 1987年環境変異原学会発表データより

b, 図4参照



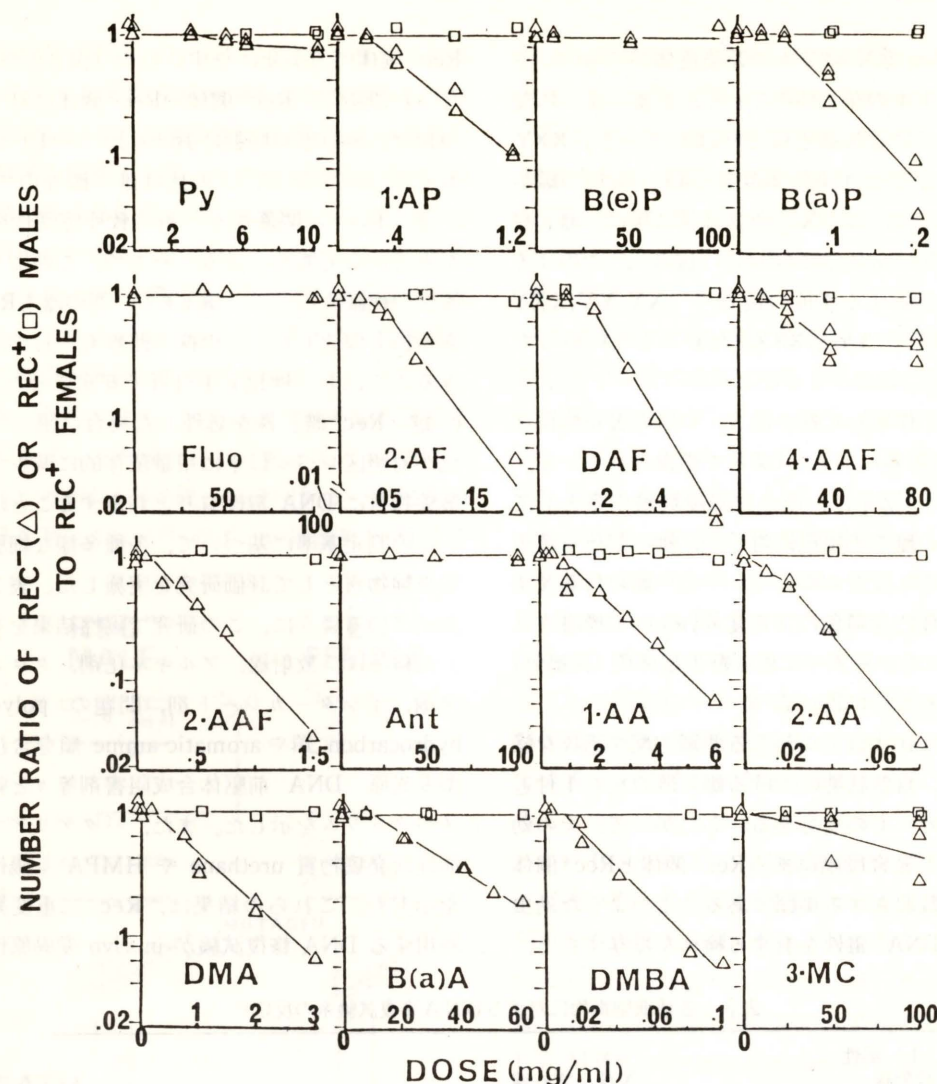


図4：各種 aromatic amine と polycyclic hydrocarbon の DNA 修復試験系における用量-活性関係 (1986年環境変異原学会発表データより)  
横軸の用量は3令幼虫が生育している培地上に滴下した検体の濃度 (溶媒は2% エタノール / 1% Tween-80 混液)

Py, Pyrene  
B(a)P, Benzo(e)pyrene  
Fluo, Fluorene  
DAF, 2,7-Diaminofluorene  
2-AAF, 2-Acetylaminofluorene  
1-AA, 1-Aminoanthracene  
DMA, 9,10-Dimethylanthracene  
DMBA, 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene

1-AP, 1-Aminopyrene  
B(a)P, Benzo(a)pyrene  
2-AF, 2-Aminofluorene  
4-AAF, 4-Acetylaminofluorene  
Ant, Anthracene  
2-AA, 2-Aminoanthracene  
B(a)A, Benz(a)anthracene  
3-MC, 3-Methylcholanthrene

としての資格を有していることを保障する。一方、actinomycin D, benzene, p,p'-DDT などの発癌物質で得られた陰性結果は、これらが翅毛スポットテストでは陽性検体であること<sup>19,37)</sup> も考慮すると、利用しているRec<sup>-</sup>変異の性質、あるい

は、検体の DNA に対する毒性の発現メカニズムに対応して、この試験における発癌物質検出の準備範囲はきちんと定まっていることを示唆する。

図4に、「ショウジョウバエでは polycyclic hydrocarbon 類や aromatic amine 類の変異原性

の検出がきわめて困難」という問題はすでに過去のものとなった証拠を詳しく提示している。Py と B(e)P を除いて、サルモネラ菌 / S-9Mix 系で変異原性を示す12検体のいずれも、Rec<sup>-</sup>幼虫に対して明瞭な選択的致死効果を発揮したこと (図中△印の用量依存的減少) がその証拠である。さらに興味あることに、このテスト系における構造-活性関係が、B(e)P << B(a)P, Fluo << 2-AF, 4-AAF << 2-AAF, 1-AA << 2-AA, B(a)A << DMBA となり、マウスやラットにおける構造-発癌性関係と一致した。DNA 付加体による障害を in vivo 系で定量的に比較し、同族化合物間の発癌力の強弱関係を予測する研究の重要性は言うまでもない。Rec<sup>-</sup>二重変異体を利用する DNA 修復試験のもう一つの用途を知った。

#### 6. おわりに

DNA 修復試験系と眼色復帰変異検出系に、本稿で詳しく述べなかった翅毛スポットテスト系を加えると、ショウジョウバエの in vivo 体細胞における DNA, 遺伝子, 染色体の各レベルに対する化学物質の毒性を検出し定量できる体制は、すでに整ったといえる。これらのテスト系をうまく使えば、環境変異原を正當に怖がるのに役立つことを示唆する証拠もいくつか得られている (文献7と28参照)。その一部は本稿でも紹介した。適当な DNA 修復能欠損変異と併用すると、生体側の突然変異反応のしくみの理解が可能となることも例示した。しかし、問題はこれからである。環境変異原研究はヒトをも短期 in vivo 系として扱う段階にまで進歩している (例えば、文献25)。変異原に被曝した人体内で DNA, 遺伝子, 染色体の各レベルで生ずる障害の説明とその機構の解明に、ショウジョウバエの体細胞テスト系を利用する研究がどの程度役に立つかによって、テスト系自体の真価とそれを扱う研究者の能力が問われるものと覚悟している。

#### 参考文献

1) Baker, B. S., Boyd, J. B., Carpenter, A. T.

- C., Green, M. M., Nguyen, T. D., Ripoll, P., Smith, P. D.: Genetic controls of meiotic recombination and somatic DNA metabolism in *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 4140-4144 (1976) . 1976) .
- 2) Blijleven, W. G. H., Hortselius, M. J. H., Kramers, P. G. N.: Mutagenicity testing of H-193, AF-2 and furazolidone in *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.* 56: 95-100 (1977)
- 3) Boyd, J. B., Harris, P. V., Presley, J. M., Narachi, M.: *Drosophila melanogaster*: a model eukaryote for the study of DNA repair, In: *Cellular Response to DNA Damage* (Friedberg, E. C., Bridges, B. A., eds.) Alan R. Liss, New York, pp. 107-123 (1983) .
- 4) Fahmy, O. G., Fahmy, M. J.: Intervening DNA insertions and the alteration of gene expression by carcinogens, *Cancer Res.* 40: 3374-3382 (1980) .
- 5) Fujikawa, K.: Mutagenicity of furylfuramide in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*, *Jpn. J. Genet.* 57: 569-574 (1982) .
- 6) 藤川和男: ショウジョウバエの除去修復能欠損系統 mei-9<sup>a</sup> の体細胞における benzo (a) pyrene と 2-acetylaminofluorene の変異原性, 環境変異原研究 8: 69-73 (1986) .
- 7) 藤川和男: ショウジョウバエを用いる化学変異原検出法の新たな展開, 食衛誌 29: 115-124 (1988) .
- 8) Fujikawa, K., Ayaki, T., Ryo, H.: Comparative induction of somatic and germinal reversions of white-ivory allele in *Drosophila melanogaster* after larval X-ray treatment, *J. Rad. Res.* 29: 72 (1988) .
- 9) Fujikawa, K., Inagaki, E., Uchibori, M., Kondo, S.: Comparative induction of somatic eye-color mutations and sex-linked recessive lethals in *Drosophila melanogaster*



- by tryptophane pyrolysates, *Mutation Res.* 112: 315-320 (1983).
- 10) Fujikawa, K., Kondo, S.: DNA-repair dependence of somatic mutagenesis of transposon-caused white alleles in *Drosophila melanogaster* after treatment with alkylating agents, *Genetics* 112: 505-522 (1986).
  - 11) 藤川和男, 梁治子: ショウジョウバエの体細胞突然異変とDNA修復, 細胞 17: 459-463 (1985).
  - 12) Fujikawa, K., Ryo, H., Kondo, S.: Somatic mutagenesis induced in *Drosophila melanogaster* in relation to DNA repair, *Rad. Biol. Res. Com.* 17: 64 (1982).
  - 13) 藤川和男, 梁治子, 近藤宗平: ハエの翅毛スポットテスト-近ごろ注目されている短期試験法, 環境変異原研究 6: 107-113 (1984).
  - 14) Fujikawa, K., Ryo, H., Kondo, S.: The *Drosophila* reversion assay using the unstable white-zeste eye color system, In: *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens* (Ashby, J., de Serres, F. J., et al., eds.) Elsevier, Amsterdam: 319-324 (1985).
  - 15) Fujikawa, K., Ryo, H., Kondo, S.: Somatic eye-colour reversion assay in *Drosophila melanogaster* using the unstable white-zeste system incorporated with a repair deficient mutation, In: *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens* (Ashby, J., de Serres, F. J., et al., eds.): in press, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
  - 16) Graf, U., Green, M. M., Würzler, F. E.: Mutagen-sensitive mutants in *Drosophila melanogaster*. Effects on premutational damages, *Mutation Res.* 63: 101-112 (1979).
  - 17) Graf, U., Würzler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., Kale, P. G.: Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.* 6: 153-188 (1984).
  - 18) Green, M. M., Todo, T., Ryo, H., Fujikawa, K.: Genetic-molecular basis for a simple *Drosophila melanogaster* somatic system that detects environmental mutagens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6667-6671 (1986).
  - 19) 井上裕章, 梁治子, 藤川和男: ショウジョウバエにおける DDT の殺虫作用と変異原性, 日本環境変異原学会第16会大会(京都)要旨集 p. 138 (1987).
  - 20) Inoue, Y., Watanabe, T. K.: Toxicity and mutagenicity of cadmium and furyl furamide in *Drosophila melanogaster*, *Jpn. J. Genet.* 53: 183-189 (1978).
  - 21) Karess, R. E., Rubin, G. M.: A small tandem duplication is responsible for the unstable white-ivory mutation in *Drosophila*, *Cell* 30: 63-69 (1982).
  - 22) Lee, W. R., Abrahamson, S., Valencia, R., von Hall, E. S., Würzler, F. E., Zimmering, S.: The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.* 123: 189-279 (1983).
  - 23) Nguyen, T. D., Boyd, J. B., Green, M. M.: Sensitivity of *Drosophila* mutants to chemical carcinogens, *Mutation Res.* 63: 67-77 (1979).
  - 24) Nix, C. E., Brewen, B., Epler, J. L.: Microsomal activation of selected polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic amines in *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.* 88: 291-299 (1981).
  - 25) Randerath, E., Avitts, T. A., Reddy, M. V., Miller, R. H., Everson, R. B., Randerath, K.: Comparative <sup>32</sup>P-analysis of cigarette smoke-induced DNA damage in human tissues and mouse skin, *Cancer Res.* 46: 5869-5877 (1986).
  - 26) Rasmuson, B., Rasmuson, Å., Nugren, J.: Eye pigmentation changes in *Drosophila melanogaster*, a sensitive test for mutagenesis, In: *Handbook of Mutagenicity Test Procedure*, 2nd eds. (Kildy, B.J., Legator, M. et al., eds.) Elsevier, Amsterdam, PP. 603-613 (1983).
  - 27) Rasmuson, B., Svahlin, H., Rasmuson, A., Montell, I., Olofsson, H.: The use of a mutationally unstable X-chromosome in *Drosophila melanogaster* for mutagenicity testing, *Mutation Res.* 54: 33-35 (1987).
  - 28) 梁治子: ショウジョウバエのスポットテスト, 環境変異原研究 9: 55-65 (1987).
  - 29) Ryo, H., Kondo, S.: Photoreactivation rescues and hypermutability of ultraviolet-irradiated excisionless *Drosophila melanogaster* larvae, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3366-3370 (1986).
  - 30) Ryo, H., Yoo, M. A., Fujikawa, K., Kondo, S.: Comparison of somatic reversions between the ivory allele and transposon-caused mutant alleles at the white locus of *Drosophila melanogaster* after larval treatment with X rays and ethyl methanesulfonate, *Genetics* 110: 441-441 (1985).
  - 31) 坂本豊, 藤川和男, 永藪治, 山本清, 鮫島頭二: 複合試験系による抗腫瘍性の検討, 武田研究所報 44: 96-116 (1985).
  - 32) Tazima, Y.: consequences of the AF-2 in -cidence in Japan, *Environ. Health Perspective* 29: 183-187 (1978).
  - 33) Tazima, Y., Onimaru, K.: Results of mutagenicity testing for some nitrofurans derivatives in a sensitive system with silkworm oocytes, *Mutation Res.* 26: 440 (1974).
  - 34) Tonomura, A., Sasaki, M. S.: Chromosome aberrations and DNA repair synthesis in cultured human cells exposed to nitrofurans, *Jpn. J. Genet.* 48: 291-294 (1973).
  - 35) Valencia, R., Mason, J. M., Woodruff, R. C., Zimmering, S.: Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. III. Results of 48 coded compounds tested for the National Toxicology Program, *Environ. Mutagen.* 7: 325-348 (1985).
  - 36) Vogel, E. W., Zijlstra, J. A., Blijleven, W. G. H.: Mutagenic activity of selected aromatic amines and polycyclic hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.* 107: 53-77 (1984).
  - 37) Würzler, F. E., Vogel, E. W.: In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*, in: *Chemical Mutagens* (de Serres, F. J., ed.) Plenum, New York, Vol. 10, pp. 1-72 (1986).



第16回大会特別講演

# 活性酸素の生成と消去

京都大学食糧科学研究所 浅田 浩 二

## 1 はじめに

今から46億年前に地球が太陽系惑星の一つとして微粒子、そして微惑星が集まって誕生したとき、その重力によって太陽系星雲の中にあった気体も保持されていたはずである。しかし、現在の地球大気に含まれる希ガス含量は、最近の探査衛星による分析によれば金星、火星のそれも、太陽系での組成に比べれば極端に低く ( $10^{-7} \sim 10^{-11}$ )、これらのことから惑星の原始大気は何らかの原因で地球誕生後1億年以内に宇宙空間に失われたと考えられている。地球大気は地球内部からの脱ガスによって生じたが、この中に酸素分子がなかったことは現在の火山からの噴出ガスの分析からも容易に推定できる。

しかし、水の紫外線分解によって酸素分子が生成することから、らん藻 (Cyanobacteria) が出現して酸素を地球大気に供給するようになる迄にも僅かの酸素があったと推定される。これについて先カンブリア期の鉄の酸化状態から Holland らは  $0.00003 \text{ bar}$ 、すなわち現在の大気の  $1.4 \times 10^{-4}$  の酸素を含んでいたとしている。生物による酸素発生の考えられない金星、火星にも探査衛星による分析の結果、 $0.0062$ ,  $0.000075 \text{ bar}$  の酸素分子が認められているので、光合成生物による酸素発生以前にも僅かではあるが地球大気に酸素が含まれていたとしてよいであろう<sup>1)</sup>。

この僅かの酸素が含まれる環境下で化学進化によって生じた有機物を基として嫌気性菌が出現し

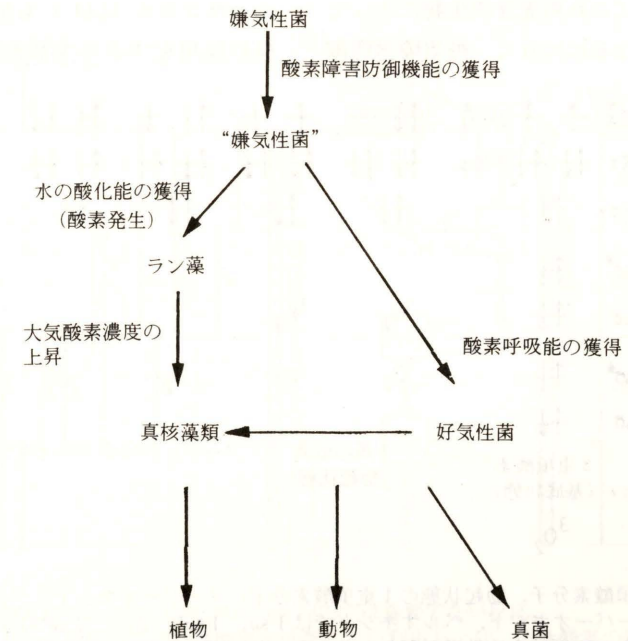


図1: 生物による酸素障害防御機能、水の酸化能、酸素呼吸能の獲得



たが、この嫌気性菌にとって僅かに含まれている酸素はストレスにならなかったであろうか？ 最も古いとされる発酵嫌気性菌でさえ酸素ストレスに対処する上で欠かすことのできないスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) をもつ菌があり、ほとんどの嫌気性菌がSODをもっていることからみて、現在の約 $10^{-4}$ 濃度の酸素も生物にとってはストレスになったことを示している<sup>2)</sup> このように酸素ストレスによる障害を防御する機能はラン藻が $H_2O$ を電子供与体として光合成を行い $O_2$ を放出するようになる以前に生物にすでに獲得されていたと考えられる。ラン藻自体も $H_2O$ を電子供与体として利用するためには酸素障害を防御する機能をもっていなければ自らが発生する酸素によって死滅したはずであり、この点からも光合成によってラン藻が酸素を大気に蓄積する以前に生物は酸素障害に対する防御機構を獲得していたと考えられる。

以上のように生物は、まず水の紫外線分解によって生ずる現在の $10^{-4}$ 程度の濃度の気体酸素に“耐えられる”酸素障害防御能をまず獲得し、この機能をもつ“嫌気性菌”から酸素を発生するラン藻が進化し、さらにこれら光合成生物によって大気酸素濃度が高くなるにつれて、酸素障害防御

能をもつ“嫌気性菌”から、逆に酸素を利用して酸素呼吸、酸素添加酵素反応、酸化酵素反応のできる現在の生物が進化してきたと考えられる (図-1)。このようにほとんどすべての生物にとって酸素障害を防御する機構はその生存に不可欠であり、ここでは生物の酸素障害防御を(1)活性酸素の生成抑制、(2)活性酸素の消去、(3)損傷を受けた標的分子の修復、(4)損傷を受けた標的分子の de novo 合成に分けて考えてみたい。

## 2 活性酸素の生成抑制

酸素分子 ( $^3O_2$ ) は基底状態で3重項の電子配置をもつため酸化還元電位は高いにもかかわらずスピン禁制のため細胞成分との反応性は高くない (図-2)。しかし、酸素の還元分子種であるスーパーオキシドラジカル ( $O_2^-$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシルラジカル ( $HO\cdot$ )、および、励起1重項酸素分子 ( $^1O_2$ ) は $^3O_2$ に比べ反応性が高く、これらをまとめて活性酸素とよんでいる。さらに細胞内で生成することの多い脂質ラジカル ( $L\cdot$ )、脂質ペルオキシドラジカル ( $LOO\cdot$ )、脂質ヒドロペルオキシド ( $LOOH$ )、脂質アルキルラジカル ( $LO\cdot$ ) も生理的には活性酸素と同様の作用をするので活性酸素とよぶことが多い

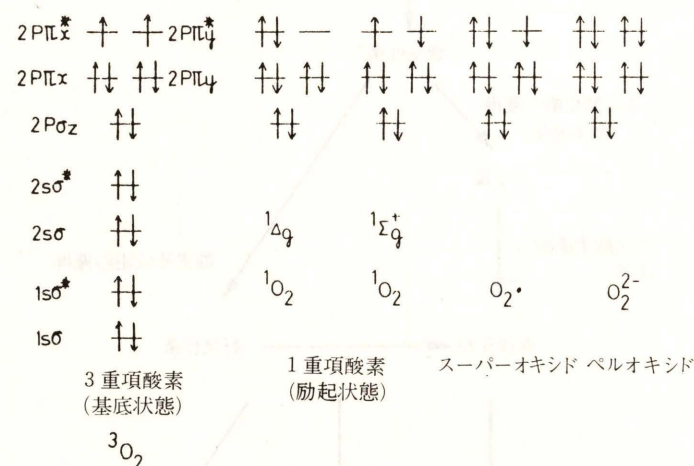


図2：基底状態の3重項酸素分子、励起状態の1重項酸素分子、スーパーオキシド、ペルオキシドの電子構造。1重項酸素分子、スーパーオキシド、ペルオキシドでは $1s\sigma$ 、 $1s\sigma^*$ 、 $2s\sigma$ 、 $1s\sigma^*$ の分子軌道を省略。 $^1\Delta_g O_2$ で電子対は $2P\pi x^*$ 、 $2P\pi y^*$ の反結合性軌道の何れかに入る。スーパーオキシドでは電子対と孤立電子は $2P\pi x^*$ 、 $2P\pi y^*$ の何れかに入る。

(図-3)。

生物の酸素障害は標的分子の酸化によって生ずるが、上記の酸素分子の性質から酸素障害をもたらす細胞標的分子の酸化は活性酸素によって進行する。そのため生物は活性酸素ができるだけ生じないようにするため次のような生理的、生化学的機能をもっている。

### 1) 細胞内酸素濃度

酸素分子は、疎水性が高いため水に対する溶解度は低く、大気と平衡にあるとき25℃で0.25 mM しか溶けない (酸素は非極性溶媒にはよく溶け、細胞内でも生体膜の方が濃度が高い)。さらに拡散は細胞レベルの近い距離に対しては有効であるが (50  $\mu m$  の拡散には0.6秒しか必要でないが、1 mmの拡散には4分必要)、多細胞になると拡散は有効ではない。そのため多細胞生物は循環系で酸素を送りこんでいるが、それでもシトクロムc酸化酵素などをプローブとする肝臓細胞内の酸素濃度の測定結果は、少なくともミトコンドリア周辺ではこの酵素の酸素に対する $K_m$ 値に近い0.1  $\mu M$ のオーダーである<sup>3)</sup> このようにミトコンドリアの酸素呼吸は酸素濃度が低くても進行

し、そのため細胞内の酸素濃度が低くても生化学エネルギーを生産できる。植物は葉の細胞で自ら酸素を発生するため細胞内酸素濃度が高く<sup>4)</sup>、動物に比べこの点ではきびしい環境にさらされていることになる。

### 2) 活性酸素を遊離しない $H_2O$ 、 $O_2$ の利用

植物が $H_2O$ を4電子酸化して酸素を発生するとき、そして動物が $O_2$ を4電子還元して $H_2O$ にするとき中間体となる酸素の還元分子種 ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO\cdot$ ) は酵素から遊離しない。 $H_2O$ -酸化酵素 (Mn)、シトクロムc酸化酵素 (Fe, Cu) の反応のときには、酵素の金属に $H_2O$ または $O_2$ が配位し、酸化錯体のままで電子移動が進行する。従って中間体となる酸素の還元分子種は金属に配位したままの“隠れた” (Crypto) 中間体となって活性酸素を遊離せず4電子移動反応が終了して初めて $O_2$ 、または $H_2O$ を酵素から遊離する (図-3)。

$H_2O$ を電子供与体利用できる能力を獲得することによって光合成生物は周りに無限にある $H_2O$ を利用でき、また、 $O_2$ を電子受容体とする酸素呼吸能を獲得することによって単位基質当りの

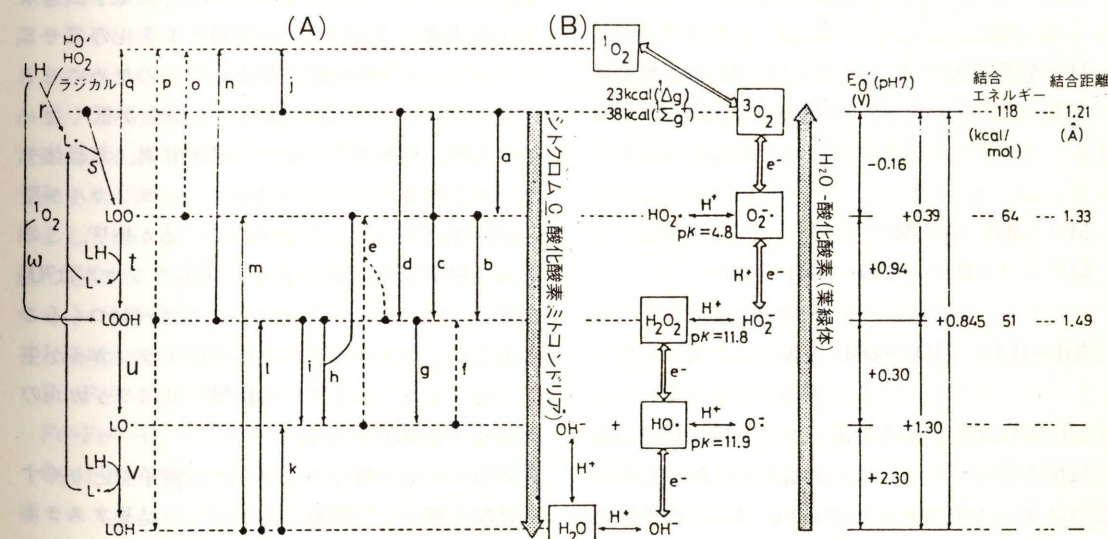


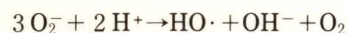
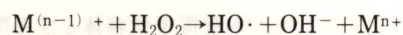
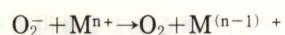
図3：活性酸素の生成反応と性質  
A: 活性酸素の生成とその相互作用。点線の反応は余り細胞内では重要でない反応。  
B:  $O_2$ 、 $H_2O$ のミトコンドリア、葉緑体での活性酸素を遊離しない利用および、活性酸素の物理化学的性質。活性酸素の箱の中の形は中性pHでの主要な存在形態。酸化還元電位は $1MO_2$ での値を示した。



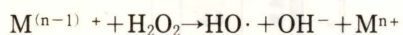
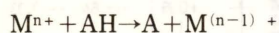
生化学エネルギー生産能が格段に高くなり、これらを獲得した生物は共に進化の上で有利な地位を占めることができるようになった。しかし、活性酸素を生成する可能性の高い $H_2O$ 、 $O_2$ の利用には最初大きなリスクがあったはずであり、進化の間に獲得された2つの酵素の巧妙な機構によってそのリスクがほとんど完全に避けられている。シトクロムc酸化酵素がペルオキシダーゼ活性<sup>5)</sup>を $H_2O$ -酸化酵素がカタラーゼ活性<sup>6)</sup>を示すが、酸素障害の観点からみてこれらの酵素は実際上その反応サイクルの間に活性酸素を遊離しない。

### 3) 遷移金属の存在状態

$H_2O$ を放射線照射すると $HO\cdot$ が $H_2O$ のイオン化によって直接生成するが、細胞反応で $HO\cdot$ を直接生成することはない。活性酸素のうち反応性の高い $HO\cdot$ は細胞内で次の反応で $O_2^-$ から遷移金属(M)イオンの触媒によって生成する。



$M^{n+}$ を還元できるアスコルビン酸など還元剤(AH)が共存するときは $H_2O_2$ から $HO\cdot$ が生成する。



これらの反応を遷移金属イオン(Fe, Cuなど)が触媒できるかどうかは、金属が何に配位しているかによって決まる。一方、Fe, Cuなどは生物にとって必須元素であり、酸素と同様に遷移金属は生物にとって両刃の剣である。細胞内でこれら金属は上記の反応を触媒しないフェリチン、トランスフェリン、セルロプラスミンのような形で貯

蔵、移動されているが、何らかの原因で遷移金属イオンが遊離の状態になり、上記の反応を触媒しやすい状態に配位すると $HO\cdot$ の生成が増加し酸素障害をもたらすようになる<sup>7)</sup>。実際に細胞内で金属がどのような成分に配位したとき $HO\cdot$ 生成をもたらすかは同定されていないが、例えば、 $ADP-Fe$ キレートは上の反応を触媒する。水が配位できるFe-キレートは $HO\cdot$ を生成しやすく、水が配位できないと $HO\cdot$ 生成を触媒できない<sup>8)</sup>、種実や血液にある inositol hexa(penta)phosphate-Feは $HO\cdot$ 生成を触媒できない<sup>9)</sup>。

### 4) ラジカルの生成抑制、消去

$^3O_2$ はその電子配置から上述のように細胞成分の大部分である1重項分子との反応性は低いが、ラジカル(2重項)との反応性は高く、 $O_2^-$ を生成する。生体反応はいくつかの例外を除き2電子反応でありラジカルが反応産物ではない。しかしセミキノン、チロシン、チール、アスコルビン酸ラジカルなどが細胞内で酵素反応によって、また、非酵素的反応によって生成する<sup>10)</sup>。生物は次のような機構でラジカルの生成や酸素との反応を抑えている。

ユビキノン、プラストキノンなどが電子伝達系で1電子還元されても巧妙なQサイクルの“セミキノンラジカル酸化還元酵素作用”のためにセミキノンラジカルが $^3O_2$ と反応する機会が低くなっている<sup>10)</sup>。リボスクレオチド還元酵素、葉緑体チラコイド系II反応中心ではチロシンラジカルが反応中間体となることが示されているが<sup>11,12)</sup>、この場合も酵素蛋白質のチロシン残基ラジカルは $^3O_2$ と反応せず、また、チロシンダイマーをつくることもない。以上のように生体反応でラジカルが生じて“安全”にしている機構と共にラジカルの消去をする酵素がある。

アスコルビン酸はラジカルから電子をとりやすく抗酸化剤として機能するが、その結果アスコルビン酸ラジカルが生成する<sup>10)</sup>。このラジカルを直接アスコルビン酸に還元するFADをもつアスコルビン酸ラジカル還元酵素があり、NAD(P)Hを電子供与体としてアスコルビン酸を再生す

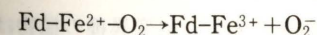
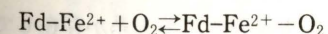
る<sup>13)</sup>。この他細胞内で生ずるチールラジカルなどを消去する酵素があるかどうかはこれからの興味ある研究課題である。

DTジアホラーゼはErnsterによって見いだされたビタミンKなどキノンをキノールにNAD(P)Hによって2電子還元する酵素であるが、その生理機能は長い間疑問であった。この酵素はキノンが細胞内に遊離したときセミキノンラジカルを生成しないようキノールに速かに2電子還元し、グルタチオン抱合機構で排泄するための機能をもっていると考えられ<sup>14)</sup>、これもラジカルの生成を抑制する機構の一つである。

細胞内でラジカルを生成しやすいバラクオート、細胞内で代謝をうけてラジカルになりやすい $CCl_4$ 、キノン、ベンツ[a]ピレンなどの毒性はすべて活性酸素による障害である。これら外からの物質によって生成するラジカルに対して生物はその生成抑制や消去機能をもたないため活性酸素による細胞障害を与えることが多く、変異原にもなることが多い。

### 5) 細胞成分の低い自動酸化性

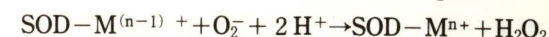
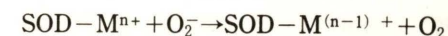
上述のように $^3O_2$ は酸化還元電位の低い化合物、ラジカルによってのみ還元される。嫌気性菌の酵素や電子伝達体は $^3O_2$ によって酸化、失活をうけるものが多いが、これは“自動酸化”による。しかし、“自動酸化”の速度(反応性)は酸化還元電位によるのみでなく、種々の化学的要因によって決まり、例えば、前述のバラコートと電子の担体として働くフェレドキシン(Fd)は同じ酸化還元電位(-0.44V)をもつが、還元型フェレドキシンの自動酸化はバラクオートラジカルに比べると極端に低い。



$O_2^-$ は上の機構で生成するが空気飽和の酸素濃度での $k_{obs}$ は $0.081s^{-1}$ にすぎず<sup>15)</sup>、細胞内で低い酸化還元電位の反応を行う電子担体蛋白質の構造には低い自動酸化性の選択圧があったことを示している。

酵素反応で低い自動酸化性が重要なものに

SODがある。SODは反応中心の金属( $M^{n+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{3+}$ の何れか)の次に示す酸化還元サイクルで $O_2^-$ の不均化反応を触媒する。



最初の反応で $O_2^-$ によって金属が還元され、還元型SODとなり、これが $O_2^-$ を $H_2O_2$ に還元する。この反応は共に $2 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ の拡散律速に近い速度で進行するが、この効率の高い反応を保証しているのは還元型SODの自動酸化性が低いことである( $0.4 M^{-1}s^{-1}$ )<sup>16)</sup>。SODの酸化還元電位は+0.3Vであるが<sup>17)</sup>、それでも還元型SODが自動酸化によって2~3桁高い速度で酸化されると、細胞内酸素濃度は上述のように低くても $O_2^-$ よりは少なくとも2~3桁高いのでSODの $O_2^-$ の不均化速度は自発的な不均化反応と変わらない<sup>18)</sup>。このことは細胞内の $O_2^-$ を効果的に消去するためSODの構造に自動酸化性の低い選択圧がかかってきたことを示している。

フェレドキシン、SODがどのような化学的機構で $O_2^-$ との反応が抑制されているかはまだ充分に解明されていないが、ヒドロゲナーゼで示されている酵素の分子表面に塩を形成させると酸素の溶解度が低下し(塩析)、自動酸化速度が低下するため失活が抑制されるとする機構は興味がある<sup>19)</sup>。酸化酵素や酸素添加酵素以外の蛋白質の分子進化に自動酸化性を抑制する選択圧がかかってきたことは明らかであり、この観点から蛋白質の分子進化をみることも必要であろう。

### 3 活性酸素の生成反応

以上のように活性酸素は細胞内でできるだけ生じないようにする機構をもっているが、それでも細胞内には図-3に示した多くの種類の活性酸素生成反応がある。この中にはNADPH酸化酵素のようにこれによって生成する活性酸素が生体防御に関与している場合もある。図-3は生成反応と活性酸素の相互反応を示したがその詳細については<sup>20)</sup>を参照。



#### 4 活性酸素の生成, 消去, 標的分子の細胞内での位置

活性酸素の生物作用を考えると, 生じた活性酸素の寿命, 消去分子, 標的分子の細胞内での位置関係が重要であり, ここではこれらの相互関係について考えてみよう。

1 次反応的に速度定数  $k$ , で消滅する活性酸素の平均拡散距離  $d$  は, 拡散定数を  $D$  (活性酸素のような低分子については  $\sim 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) とすれば,

$$d = \sqrt{2D/k}$$

と考えられる。 $^1\Delta_g\text{O}_2$  の水の中での消滅は  $k = 3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  で進行するので (平均寿命  $2 \times 10^{-6} \text{ s}$ ),  $^1\text{O}_2$  の水の中での  $d$  は 82 nm となる。 $\text{HO}\cdot$  は, ほとんどの細胞成分と拡散律速に近い速さ ( $\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) で反応し,  $[\text{HO}\cdot] \ll [\text{細胞成分濃度}]$  であるため, ( $2 \text{ HO}\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ ) の反応はほとんど生じない。 $\text{HO}\cdot$  と反応する細胞成分濃度を 100 mM とすれば擬 1 次反応の  $k$  は  $\sim 10^8 \text{ s}^{-1}$  となり  $\text{HO}\cdot$  の平均寿命は  $10^{-8} \text{ s}$ ,  $d$  は 45 nm となる。

$\text{O}_2^-$  の自発的不均化反応による消滅は 2 次反応であるため上式で SOD のないときの寿命を求められないが,  $\text{O}_2^-$  が  $1 \mu\text{M}$  のとき  $d$  は 80,000 nm となる。細胞顆粒には SOD が  $10 \mu\text{M}$  の濃度で存在し,  $\text{O}_2^-$  と SOD は  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  の速度で反応し  $\text{O}_2^-$  は不均化反応をうけるので (擬) 1 次反応定数は  $2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  となり, これから  $10 \mu\text{M}$  SOD が存在するところでの  $\text{O}_2^-$  の平均寿命は  $5 \times 10^{-5} \text{ s}$ ,  $d$  は 320 nm となる。

実際の細胞中には蛋白質などが高濃度で存在するため (葉緑体では 20~30%) 粘度が高く  $D$  の値が低くなり, 拡散距離も上の計算例より短いに違いない。さらに  $\text{H}_2\text{O}_2$  は膜を透過できるが,  $\text{O}_2^-$  は透過しにくいことも考慮する必要がある。膜を隔てて SOD が存在していても,  $\text{O}_2^-$  を消去することはできず<sup>21)</sup>,  $\text{O}_2^-$  生成部位に SOD が存在していなければ  $\text{O}_2^-$  の生物作用—— $\text{O}_2^-$  およびこれに由来する活性酸素による標的分子の酸化——を抑制できない。ミトコンドリア, 葉緑体など活性酸素の生

成しやすいところには, 進化の間に獲得された消去系があり, そこで発生した活性酸素はその場で消去され, これら顆粒が障害をうけないようにしている。實際上, これらの顆粒の活性酸素は, 例えば細胞核の DNA を標的とすることはないと考えてよい。従って DNA を攻撃する活性酸素は核の周辺で生成したものに限られ, ミクロゾームなどで生成した活性酸素が DNA にとって危険である。

標的分子が蛋白質, DNA のように高分子では分子のどの部位で活性酸素が生成するかによって酸化される部位が異なる。例えばグルタミン合成酵素に Fe イオン—アスコルビン酸 (またはチオール) を加えると 2—3) の機構で  $\text{HO}\cdot$  が生成し, 酵素が失活する。このとき酵素のカチオン結合部位である —Met—His—Cys—His—Met— に Fe が結合し, ここで  $\text{HO}\cdot$  が生成する。そのため, この配列に含まれる His 残基が酸化分解をうけ失活するが, 他の His 残基は酸化されない<sup>22)</sup>。DNA の特定位置に EDTA—Fe がくるように, 例えば相補的なポリヌクレオチドに EDTA—Fe をつないでアニールさせる。これを  $\text{H}_2\text{O}_2$  で処理すると, EDTA—Fe が存在する配列で  $\text{HO}\cdot$  が上と同様の機構で生じ, その近くの塩基のみが分解される<sup>23)</sup>。このように,  $\text{HO}\cdot$  は生成した部位から拡散することではなく, その部位の近くにある残基のみを酸化する。同様のことは寿命の短い  $^1\text{O}_2$  でもみられ, 光増感反応で  $^1\text{O}_2$  が生成するとき光増感剤のある部位に存在する分子のみが光酸化される。 $^1\text{O}_2$  を消去するカロチノイドは葉緑体では  $^1\text{O}_2$  を最も生成しやすい, クロロフィルの多いチラコイド膜に結合して存在し, 生成した  $^1\text{O}_2$  を直ちに消去する。これは生成場所に消去系が存在している一例であり, カロチノイド欠変異種の植物は光障害をうけやすく, 成育できない<sup>24)</sup>。

#### 5 活性酸素の消去

2 で述べた活性酸素生成の抑制機構によって好気性生物は消費する酸素のうち大部分を “安全” に利用しているが, 1% 程度は活性酸素となって

細胞内に放出される。この僅かの活性酸素が消去されなければ細胞に障害を与えることは次の例から理解できよう。

ヒトの組織では 1 日当り 2,500 cal の食物の酸化のため, 1 日, g 組織当り  $2 \times 10^{20}$  分子の  $\text{O}_2$  を消費する。呼吸で還元される  $\text{O}_2$  のうち 1% が  $\text{O}_2^-$  になると仮定すると  $2 \times 10^{18}$  分子  $\text{O}_2^-/\text{g 組織}/\text{日}$  の生成量となる。 $\text{O}_2^-$  から  $\text{HO}\cdot$  が生成するとすれば  $\text{HO}\cdot$  の生成量は この 1/3 となる。一方, 偶発ガンの倍加線量 (6.4—32 rad/年), および  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  の G 値などから計算すると, この線量によって生ずる活性酸素は  $\sim 10^{10}$  分子/g 組織/日である<sup>25)</sup>。4 で述べたように放射線と生体反応で生ずる活性酸素生成場所の相異, それらと標的分子 (DNA) の位置などを考慮する必要があるが, これを無視し, 単純に考えると生体反応で生

ずる活性酸素  $10^{18}$  分子/g 組織/日を  $10^{10}$  分子/g 組織/日に消去によって低下させなければヒトはすべてガンにおかされることになる。

表—1 に活性酸素やラジカル消去に機能していると考えられる酵素, 抗酸化性化合物をまとめて示したが, これら消去系は進化の長い間に, 恐らくは酸素発生能や呼吸能を獲得する以前に, 獲得したと考えられる。これらは一般に活性酸素が生成しやすい部位に局在し, 生成した活性酸素を直ちに消去する。4 で SOD の場合について  $\text{O}_2^-$  をどの程度消去しているかの例を示したが, これら消去系の協同作用によって活性酸素による標的分子の酸化を抑えている。 $\text{HO}\cdot$  についてはその反応性から上述のように生成部位の近くの分子に作用するため, これを消去する特定の化合物は見い出されていない。生物は 2 で述べた金属の存在状態,

表—1 活性酸素ラジカルの消去系

| 活性酸素   | 消去酵素, 抗酸化化合物   | 反応  |
|--|--|---|
| $\text{O}_2^-$ (スーパーオキシド)                                | スーパーオキシジスムターゼ (SOD)  | $2 \text{ O}_2^- + 2 \text{ H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$   |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ (過酸化水素)                           | カタラーゼ<br>ペルオキシダーゼ<br><br>$\text{AH}_2$ : グルタチオン (哺乳動物)<br>アスコルビン酸 (植物)<br>シトクロム c<br>NAD(P)H<br>ペルオキシダーゼ<br>$\text{AH}_2$ : グルタチオン | $2 \text{ H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$<br>$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{A}$ |
| LOOH (脂質ヒドロペルオキシド)                                       | ?  | $\text{LOOH} + \text{AH}_2 \rightarrow \text{LOH} + \text{A} + \text{H}_2\text{O}$  |
| $\text{HO}\cdot$<br>$^1\text{O}_2$ (励起 1 重項酸素分子)         | カロチノイド<br>トコフェロール  | $^1\text{O}_2 \rightarrow \text{熱} + ^3\text{O}_2$  |
| L·<br>LOO·<br>LOOH<br>LO·<br>その他ラジカル ( $\text{R}\cdot$ ) | $\text{H}_2\text{O}$<br>トコフェロール<br>フラボノイド<br>グルタチオン<br>アスコルビン酸<br>ユビキノン<br>尿素<br>フェノール<br>カロチノイド<br>ビリルビン<br>アスコルビン酸ラジカル<br>還元酵素   | $\text{L}\cdot, \text{LOO}\cdot, \text{LO}\cdot, \text{LOOH} + \text{AH} \rightarrow \text{L}, \text{LOOH}, \text{LOH} + \text{A}$                            |
| アスコルビン酸ラジカル ( $\text{AsA}\cdot$ )                        |  | $2 \text{ AsA}\cdot + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{AsA} + \text{NAD(P)}$  |



SODによる $O_2^-$ 消去によって $HO\cdot$ をできるだけ生成しないようにする方法をとっているように思われる。

最近、チオール-Feによる酵素の失活を抑制する27kDaの蛋白質が見い出された<sup>26)</sup>。この蛋白質は $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ に対する反応、すなわちカタラーゼ、SOD活性などを示さないが、酵素の失活を抑制することができ、酵母、哺乳動物などに存在する。生物は酸素障害を防御するため表-1に示した以外の酵素や抗酸化剤をもっていると予想されるが、このように活性酸素による障害防御を指標とすることによってさらに新しい蛋白質や低分子化合物が見い出されていくと思われる。

## 6 酸化された標的分子の修復, de novo 合成

以上述べてきた防御機構を逃れた活性酸素が標的分子を酸化したとき障害をもたらすが、さらにもう一つの防御機構として酸化された標的分子を修復, de novo 合成する機能がある。DNAの修復機構はよく知られているが、蛋白質もアミノ酸残基が酸化されたときこれを修復する系をもっている。フェレドキシン-チオレドキシン還元酵素<sup>27)</sup>は蛋白質の酸化によって生じたジスルフィドのチオールへの還元を、メチオニンスルホキシド還元酵素<sup>28)</sup>はMet残基に還元する。蛋白質はCys, Met残基以外にも活性酸素によって酸化されるが、他の残基についてはその酸化機構の研究がようやく始められたばかりで、その修復酵素の研究にまでは至っていない。

蛋白質は活性酸素によって損傷を受けるとプロテアーゼによる加水分解を一般に受けやすくなり、分解される。葉緑体チラコイド膜では光化学系IIの反応中心蛋白質, D1, が光による分解を受けやすい。D1蛋白質は葉緑体で合成されるが、強光下ではこの合成が促進され、8ヶ以上の蛋白質から構成されている系IIの超分子構造の中でD1のみがde novo 合成された蛋白質で置きかえられる。これはde novo 合成が光酸化による障害を防御している例であるが、この過程の詳細については<sup>30)</sup>を参照。

## 7 酸素ストレスに対する適応

空气中に生存している生物は上述のように活性酸素が生成する危険にさらされ、それに対する防御機構をもっている。その意味では生物は常に酸素ストレスをうけているが、しかし、環境の変動その他のため生物にとって酸素ストレスが常に一定ではない。高い酸素濃度、強光(可視)、紫外線、放射線、活性酸素を生成しやすいxenobioticsなどは酸素ストレスを増加させ、その他組織が傷を受けたときにも細胞の酸素との接触が増加して酸素ストレスが増加する。また、種々の原因で動物組織の虚血が生じたとき、(例えばストレスによっても)、再灌流時に酸素障害をうける。これはキサンチン脱水素活性を示していた酵素が $O_2^-$ を生成するキサンチン酸化活性をもつように虚血の間に变化するなど、主に2で述べた活性酸素の生成を抑えていた機構が虚血の間にこわされ、その結果再灌流によって酸素が供給されると活性酸素が多量に生ずるための障害と考えられる。

このような高い酸素ストレス下におかれたとき生物は適応的にこれまで述べてきた活性酸素による障害防御機能を高め酸素障害を回避しようとする。以下、それぞれの防御機能について述べよう。

植物を強光下におくと、アンテナクロロフィルを含む蛋白質の合成が低下するなど、光エネルギー過剰条件下で活性酸素の生成を抑えるようになる<sup>31)</sup>。このように2.で述べた抑制機構もストレス下ではそれをさらに抑制するように作用する。

活性酸素を消去するSOD, カタラーゼ, ペルオキシダーゼ, アスコルビン酸, グルタチオンなどは酸素ストレス下でその合成が誘導され、これらが実際にストレスで生ずる活性酸素の消去に機能していることを示唆する生物学的な証拠となる。この誘導合成は、動植物を通してみられるが、*Escherichia coli*ではFe-SOD, Mn-SODのうち好気培養によってMn-SOD合成のみが誘導される<sup>32)</sup>。

DNA修復に関与するエンドヌクレアーゼIVの

合成が*E.coli*にバラクオート添加で $O_2^-$ 生成を増加させると誘導される<sup>33)</sup>。このことは酸素ストレスによってDNAが損傷を受けやすくなることを示唆すると共にDNA修復が*E.coli*にとって必須であることを示している。ヒトの色素性乾皮症がDNA修復系の欠損によることはよく知られている例である。酸素ストレス下で損傷を受けた蛋白質のde novo 合成が促進されるのは、5で述べた強光下でのチラコイド膜のD1蛋白質がその例である<sup>30)</sup>。

以上のように酸素ストレスに適応するために生物が多様な戦略をとっていることから、適応のために多種類の蛋白質がストレス下では誘導合成される。細菌でさえ酸素ストレス( $H_2O_2$ 添加, バラクオート添加, 好気培養)によって20~30種の蛋白質が誘導合成されることが示されている<sup>35)</sup>。これらの中には上記機能の何れかを持つものが同定されているが、機能が解明されていない蛋白質が大部分である。これらの中から酸素ストレス適応のための機能をもつ新しい蛋白質が見い出される可能性が高い。

SODを*E.coli*にクローニングし、菌体内でSODのみを多量に(10~20倍)合成させた*E.coli*細胞は予想に反し却って酸素ストレスに弱いことが示されている<sup>36)</sup>。このことは酸素ストレスを防御する生物の機構はSODのみでなく、上記のように多数の蛋白質の協同によって行われているので、 $O_2^-$ の消去能のみが高くなっても酸素ストレスに対し適応できない。このようにまだ未知のものが多く酸素ストレス適応に関与する酵素, 抗酸化化合物合成に関与する酵素蛋白質がバランスをもって誘導合成されたときに初めて生物として適応できると考えられ、この面の研究がこれからさらに重要となるであろう。

一方、酸素ストレス下では熱ストレス下で合成されるのと同じ種類の蛋白質も誘導合成されることが示されている<sup>35)</sup>。一方、SODが熱ストレスによって誘導合成される<sup>37)</sup>。熱ストレスと酸素ストレスが共通の適応機能をもつことは興味があり、熱ストレスが細胞内で酸素ストレスをもたらすよ

うに作用するかなど、ストレス間の相互作用を考える上でこれらの結果は重要であろう。

最後に酸素ストレスのシグナルがどのような分子的機構で上記の蛋白質の誘導合成をもたらすかについては解析がようやく始められたばかりである。この機構の分子生物学的な理解が進むことによって将来、生物にとって避けることのできない活性酸素による障害に抵抗性の高い生物の“育種”も可能になるであろう。

## 8 おわりに

図4に活性酸素の生成, 消去, 作用, 活性酸素による生体防御, 生体反応, さらに酸素ストレスに対する生物適応, これらの相互関係をまとめて示した。DNAの損傷に、活性酸素が関与していることは明らかであり<sup>34)</sup>, xenobiotics 中の変異原に活性酸素を細胞内で生成するものが多く<sup>38)</sup>, 放射線などの環境要因も活性酸素を生成する。抗変異原性を示す化合物に活性酸素の消去など、酸素ストレス除去に関与しているものが多いと予想される。この小文が、DNAが標的化合物であるときの活性酸素の作用についていくらかの参考になれば幸いである。

## 参考文献

- 1) 小嶋 稔 (1987) 地球史入門 岩波書店
- 2) 浅田 浩二 (1986) 酸素障害防御機構の進化, 続分子進化学入門(今堀, 木村, 和田編) pp. 195-226, 培風館
- 3) Wittenberg, B. A. and Wittenberg, J. B. (1985) Oxygen pressure gradients in isolated cardiac myocytes. J. Biol. Chem., 260: 6548-6554.
- 4) Steiger, H. M. and Beck, E. (1976) Oxygen concentration in isolated chloroplasts during photosynthesis. Plant Physiol., 60: 903-906.
- 5) Orii, Y. (1982) The cytochrome c peroxidase activity of cytochrome oxidase. J. Biol. Chem., 257: 9246-9248.



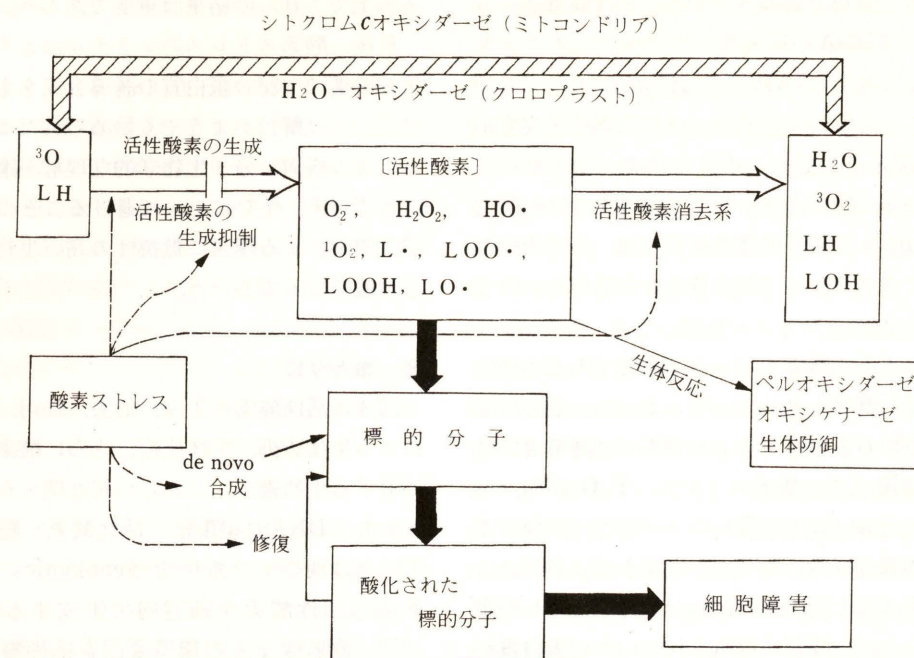


図4：活性酸素の生成、消去、作用

- 6) Mano, J., Takahashi, M. and Asada, K. (1987) Oxygen evolution from hydrogen peroxide in photosystem II: Flash-induced catalytic activity of water-oxidizing photosystem II membranes. *Biochemistry*, 26: 2495-2501.
- 7) Aruoma, O. I. and Halliwell, B. (1987) Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *Biochem. J.*, 241: 273-278.
- 8) Graf, E., Mahoney, J. R., Bryant, R. G. and Eaton, J. W. (1984) Iron catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.*, 259: 3620-3624.
- 9) Graf, E., Empson, K. L. and Eaton, J. W. (1987) Phytic acid. A natural antioxidant. *J. Biol. Chem.*, 262: 11647-11650.
- 10) 浅田 浩二 (1987) 細胞成分のラジカル生成とその消去“活性酸素—その臨床医学への応用”(荻田, 大浦編) pp. 23-40, 共立出版
- 11) Sahlin, M., Graslund, A., Ehrenberg, A. and Sjöberg, B. M. (1982) Structure of the tyrosyl radical in bacteriophage T4 induced ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.*, 257: 366-369.
- 12) Barry, B. A. and Babcock, G. T. (1987) Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen evolving system. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84: 7099-7103.
- 13) Hossain, M. A. and Asada, K. (1985) Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *J. Biol. Chem.*, 260: 12920-12926.
- 14) Lind, C., Hochstein, P. and Ernster, L. (1982)

- DT—Diaphorase as a quinone reductase: A cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation., *Arch. Biochem. Biophys.*, 216: 178-185.
- 15) Hosein, B. and Palmer, G. (1983) The kinetics and mechanism of oxidation of reduced ferredoxin by molecular oxygen and its reduced products. *Biochim. Biophys. Acta*, 723: 383-390.
- 16) Klug-Roth, D., Fridovich, I. and Rabani, J. (1973) Pulse radiolytic investigation of superoxide catalyzed disproportionation. Mechanism for bovine superoxide dismutase. *J. Am. Chem. Soc.*, 95: 2786-2790.
- 17) Barrette, W. C., Sawyer, D. T., Fee, J. A. and Asada, K. (1983) Potentiometric titration and oxidation-reduction potentials of several iron superoxide dismutases. *Biochemistry*, 22: 624-627.
- 18) Czapski, G. and Goldstein, S. (1988) The uniqueness of superoxide dismutase—Why cannot most copper compounds substitute SOD in vivo?, *Free Rad. Res. Commun.*, 4: 225-229.
- 19) Klibanov, A. M., Kaplan, N. O. and Kamen, M. D. (1978) A rationale for stabilization of oxygen labile enzymes: Application to a clostridial hydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75: 3640-3643.
- 20) 浅田 浩二 (1987) 活性酸素の生成, “活性酸素—化学, 生物学, 医学—”(二木, 島崎編) pp33-63, 医歯薬出版
- 21) Takahashi, M. and Asada, K. (1982) Superoxide anion permeability of phospholipids membranes and chloroplast thylakoids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 226: 558-566.
- 22) Farber, J. M. and Levine, R. L. (1986) Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidase. *J. Biol. Chem.*, 261: 4574-4578.
- 23) Moser, H. E. and Dervan, P. W. (1987) Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science*, 238: 645-650.
- 24) Asada, K. and Takahashi, M. (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. “Photoinhibition”, Edited by Kyle, D. J., Osmond, C. B. and Arntzen, C. J., pp. 227-287, Elsevier, Amsterdam.
- 25) Totter, J. R. (1980) Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77: 1763-1767.
- 26) Kim, K., Kim, I. H., Lee, K-Y., Rhee, S. G. and Stadtman, E. R. (1988) The isolation and purification of specific “protection” protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixed function oxidation system., *J. Biol. Chem.*, 263: 4704-4711.
- 27) Droux, M., Jasquot, J. P., Miginac-Maslow, M., Gadal, P., Huet, J. C., Crawford, N. A., Yee, B. C. and Buchanan, B. B. (1987) Ferredoxin-thioredoxin reductase, an iron-sulfur enzyme linking light to enzyme regulation in oxygenic photosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 252: 426-439.
- 28) Brot, N. and Weissbach, H. (1983) Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 223: 271-281.
- 29) Davies, K. J. A. and Goldberg, A. L. (1987) Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 262: 8220-8226.
- 30) 浅田 浩二 (1987) 生物の酸素障害防御機構——標的分子 (チラコイド Q<sub>b</sub> タンパク質) の de novo 合成による防御, 京大原子炉 Tech. Rep. 295: 11-21.



- 31) Anderson, J. M. and Osmond, C. B. (1987) Shade-sun responses: Compromises between acclimation and photoinhibition. "Photoinhibition", Edited by Kyle D. J., Osmond, C. B. and Arntzen, C. J., pp. 1-38, Elsevier, Amsterdam.
- 32) Schiavone, J. R. and Hassan, H. M. (1988) The role of redox in regulation of manganese containing superoxide dismutase biosynthesis in *Escherichia coli* J. Biol. Chem., 263: 4269-4273.
- 33) Chan, E. and Weiss, B. (1987) Endonuclease IV of *Escherichia coli* is induced by paraquat. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84: 3189-3193.
- 34) 米井 脩治 (1987) 活性酸素によるDNA損傷と修復, 京大原子炉 Tech. Rep. 295: 22-33.
- 35) Morgan, R. W., Christman, M. F., Jacobson, F. S., Stotz, G. and Ames, B. N. (1986) Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83: 8059-8063.
- 36) Scott, M. D., Meshnick, S. R. and Eaton, J. W. (1987) Superoxide dismutase-rich bacteria. Paradoxical increase in oxidant toxicity. J. Biol. Chem., 262: 3640-3645.
- 37) Privalle, C. T. and Fridovich, I. (1987) Induction of superoxide dismutase in *Escherichia coli* by heat shock. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84: 2723-2726.
- 38) 石館 基 (1988) 変異原の作用と活性酸素, "活性酸素-生物での生成, 消去, 作用の分子機構" (中野, 浅田, 大柳編) 印刷中, 共立出版

環境変異原研究10: 39-41 (1988)

シンポジウム「突然変異の機構——環境変異原の見地から」

## 序論—ヒトにおける突然変異と発がん

京都大学医学部 武部 啓

### 1. ヒトを対象とした突然変異研究の重要性

環境変異原の研究は、ヒトにおける遺伝子損傷を定性的および定量的に明らかにすることをその大きな目標の一つにしている。ヒトを実験的研究の対象にはできないから、ヒトについての研究は疫学的手法によるか、ヒトの培養細胞を用いた実験に基くことになる。がん研究に疫学が大きく寄与しているのにくらべ、突然変異を疫学的に研究することは不可能に近い。たとえば、ある遺伝病について疫学的研究を試みようとしても、一般に遺伝病の頻度は著しく小さいので、対象とする集団（たとえば何らかの環境汚染にさらされた）の子孫に遺伝病の頻度が有意に増大することが検出されるとは考えにくい。いわゆる遺伝病は大部分常染色体性劣性であり、それは次の世代において検出できない。患者の出現には近親婚の頻度が大きく影響するし、集団は一般に閉鎖的でなく、他の集団と遺伝的に交雑があるから、たとえ劣性遺伝が検出できる4世代以上追跡しても、よほど大きい集団が対象である場合を除き疫学的に検出できないであろう。

現在、唯一のヒトの集団における突然変異の調査としては、原子爆弾被ばく者の、血漿たんぱく質の酵素の電気泳動で検出した変異があるが、被ばく者の子供約13,000人に各30種、合計約70万遺伝子の変異を調べて3例の突然変異がみつかった<sup>1)</sup>。この調査では対照区でも、ほぼ同数の人で3例みつかり、有意の差はみられなかった<sup>1)</sup>。この研究は、ヒトの自然突然変異頻度に、はじめてデータに基いた推定値を示したという点で、きわめて重要な意義を有する。と同時に、ヒトの突然変異の疫学的研究が予期通りきわめて困

難であることを実証したのであった。今後DNAレベル（たとえば制限酵素断片の長さの多型性=RFLP）でより多くのマーカーを使った研究も可能となろうが、一般に環境汚染などによる調査対象集団は小さいことを考えると、実際に適用され得る例は少ないであろう。

一方ヒト培養細胞を用いた研究は、本シンポジウムで、筆者の研究室の巽紘一によって詳しく論じられるが、きわめて信頼度の高いデータを得るのに適している。従来は、培養したヒト細胞を用いた、いわゆるin vitro系であったが、近年、人体内における突然変異を直接定量的に検出する方法が、T-リンパ球の長期培養法の開発によって可能となった。この方法は、突然変異頻度に個人差が大きいことや、技術的にまだまだ問題点も多いなど完成された手法ではないが、私達の研究室では組換えDNA法で作られたT細胞増殖因子(IL-2)を用いて再現性を高めている<sup>2)</sup>。

私達が、ヒトを直接対象とすることを重視するのは、同じような手法でヒト材料を用いることが可能ならば、たとえばマウスの細胞よりもヒトの細胞の方が、当然のことながらヒトへの適用（外挿）に問題点が少ないからである。したがって、多少技術的に困難であっても、ヒト材料でできるならば、その方が望ましいと考えている。それに加えて、ヒトには、いくつかの、変異原高感受性遺伝病があり、その患者由来の細胞を用いることができる。そしてそれらの遺伝病は、一般に高発がん性遺伝病であることから、がんと突然変異の関係の研究につながるのである。

しかしヒトについてはまだまだ研究上の困難な点も多い。分子レベルの研究が急速に進歩しつつ



表1. ヒトの高発がん遺伝病におけるDNA損傷と発がんおよび突然変異

| 病 名             | 欠 損        | 発がん | 突然変異 (作用原)          | 主ながん     |
|-----------------|------------|-----|---------------------|----------|
| 色素性乾皮症          | 除去修復       | +++ | +++ (UV, ある種の化学物質)  | 皮膚がん     |
| アタキシア・テランジェクタシア | DNA合成(?)   | +++ | -* (UV, $\gamma$ 線) | 白血病、リンパ腫 |
| ブルーム症候群         | リガーゼ(?)    | +++ | ++ (自然)             | 各臓器がん    |
| ファンコニー貧血症       | 架橋損傷の修復(?) | +++ | +++ (ジエポキシブタン)      | 白血病      |

\*UVでは正常と同じ、 $\gamma$ 線では生存当りで正常以下  
 +++: 著しく高頻度、++: かなり高頻度  
 (いずれも正常細胞に対する相対比)

ある今日でも、たとえばDNA損傷とその修復については、大腸菌にくらべるとほとんどわかっていない状態にある。

本シンポジウムでは、突然変異の機構について、ヒトでどこまでわかってきたか、そして、大腸菌などで解明されてきたことが、ヒトにどこまで適用できるのかを論じ考えたい。

## 2. ヒトにおける突然変異と発がんの関係

上述のようにヒト個体——集団レベルの突然変異のデータはきわめて乏しいし、今後も入手しにくいであろうから、私達は高発がん性遺伝病患者由来の細胞を用いて、突然変異とがんの関連性を調べている。詳細は、次に異絃一によって論じられるので、ここでは基本的な問題点を検討したい。

色素性乾皮症の場合は、一番わかりやすい。色素性乾皮症患者のがん多発は、主に皮膚でみられ、その原因が太陽光中の紫外線であることがはっきりしている。したがって、突然変異が紫外線によって高頻度に起きるかどうかを調べればよい。事実それは証明され<sup>3)</sup>、私達の研究室でもより詳細に解析した<sup>4)</sup>。

色素性乾皮症以外の高発がん性遺伝病については、表1に常染色体性劣性遺伝様式の3疾患、アタキシア・テランジェクタシア、ブルーム症候群、ファンコニー貧血症をあげたが、いずれも高発がん性の原因も機構もわかっていない。そこで逆に、

突然変異を高めるような環境要因がみつければ、それが、これらの疾患の患者にがんを多発させる原因であるかもしれないと考えた。

アタキシア・テランジェクタシア細胞は、X線、ガンマ線などの電離放射線に対して致死効果は高感受性であるが、ガンマ線による突然変異誘発は、線量当りにして正常細胞とほぼ同じであり、生存率当りではむしろ低くなった<sup>5)</sup>。このことは少なくとも次の2つの可能性を示唆する。その第一は、実験で検出している突然変異はHPR T遺伝子の変異による6-チオグアニン抵抗性であり、直接がんの要因となる遺伝子(もしあるとして)の突然変異ではないから、必ずしも発がん性の突然変異を反映していないのかもしれない。第2に、アタキシア・テランジェクタシアの発がんは、電離放射線あるいはそれに類似した作用の要因で起るのではないと考えることができる。これは環境中に存在する放射線は、アタキシア・テランジェクタシアの高感受性を考慮しても、高頻度の発がんをもたらすほどではないと推定されるので、電離放射線が原因でないとの結論になっても無理はない。これに対する反論としては、いわゆる点突然変異では高くなくても、染色体異常が高く起ることによって、遺伝子再構成が高まり、発がんを高めることが指摘されよう。事実アタキシア・テランジェクタシア細胞は、電離放射線による染色体異常誘発頻度が、正常細胞より高く、この説は

十分検討せねばならない。

ブルーム症候群細胞については、誘発突然変異のデータは不十分であるが、自然突然変異が高いことが示されている<sup>6)</sup>。ブルーム症候群患者の高発がん性は、多種のがんにみられる点で、他の高発がん性遺伝病と異なる。

ファンコニー貧血症患者細胞で、私達は、DNA架橋物質であるジエポキシブタンが、著しく高い突然変異誘発能を示すことを見出した<sup>7)</sup>。その分子機構は不明であるが、ファンコニー貧血症細胞は、マイトマイシンCをも含めてDNA鎖間架橋剤にきわめて高感受性であるので、そのような物質は環境中にわずかな量しか存在しなくても、突然変異、発がんの原因となり得るのかも知れない。

このように、私達のアプローチは、ヒト細胞の変異体(遺伝病由来)を用いることによって、その病気の患者の発がんを高めている原因を突然変異誘発能を指標に探し求めようとするものである。当然のことながら、突然変異の機構の解明をもめざしている。作用原によって機構が違つか、遺伝子座によって、変異の分子レベルの型が違つか、などが当面の研究課題である。機構としては、DNA損傷とその修復に注目し、プラスミド上の遺伝子のDNA損傷が、いろいろな遺伝病細胞(修復系が変化していると考えられる)の中のどのような突然変異となって発現されるかを調べている。いずれも着手したばかりの研究であるが、分子レベルからヒトまでの一貫した体系として解明をめざしたい。

## 謝 辞

本研究は教室員の異絃一、八木孝司、立花章、宮越順二、有田泉、豊田万里子の諸君との共同研究の成果である。本研究には文部省科研費(がん特別研究、重点領域研究=バイオがん、人間環境系)および日産科学振興財団の援助を受けたことを感謝する。

## 参 考 文 献

- 1) 佐藤千代子, 郷力和明, 藤田幹雄, 浅川順一, 高橋規郎, 迫 龍二, Neel, J. V. 変異蛋白質質をマーカーとする原爆放射線の遺伝的影響の評価, 放射線生物研究, 20, 297-309, 1985。
- 2) Miyakoshi, J., Tatsumi, K. and Takebe, H. Radiation sensitivity of T-lymphocytes grown with recombinant human interleukin-2. Mutation Res., 192, 163-167, 1987。
- 3) Maher, V. M., Dorney, D. J., Mendrala, A. L., Konze-Thoams, B. and McCormick, J. J. DNA excision-repair processes in human cells can eliminate the cytotoxic and mutagenic consequences of ultraviolet irradiation. Mutation Res., 62, 311-323, 1979。
- 4) Tatsumi, K., Toyoda, M., Hashimoto, T., Furuyama, J., Kurihara, T., Inoue, M. and Takebe, H. Differential hypersensitivity of xeroderma pigmentosum lymphoblastoid cell lines to ultraviolet light mutagenesis. Carcinogenesis, 8, 53-57, 1987。
- 5) Tatsumi, K. and Takebe, H. Gamma-irradiation induces mutation in ataxia-telangiectasia lymphoblastoid cells. Gann, 75, 1040-1043, 1984。
- 6) Vijayalaxmi, Evans, H. J., Ray, J. H. and German, J. Bloom's syndrome: Evidence for an increased mutation frequency in vivo. Science, 221, 851-853, 1983。
- 7) Takebe, H., Tatsumi, K., Tachibana, A. and Nishigori, C. High sensitivity to radiation and chemicals in relation to cancer and mutation. in Radiation Research (Proc. 8th Intern. Cong. Radiat. Res.) Fielden, F. M. et al., Eds., Vol. 2, Taylor and Francis, London, 443-448, 1987。



## ヒト細胞の突然変異

京都大学医学部 異 紘一

### 1 はじめに

染色体DNAの存在様式が全く異なる細菌などの原核細胞だけでなく、哺乳動物培養細胞として従来から変異原検定試験によく用いられてきた嚙歯類動物とヒトとの間でも、ピリミジン・ダイマー<sup>1)</sup>や、O<sup>6</sup>アルキルグアニン<sup>2)</sup>の修復を初めとして変異原によるDNA傷害の除去修復能が異なる場合のあることが判ってきた。したがって、ヒトに対する環境変異原の危険度を評価するための資料としては、やはりヒト細胞における突然変異が採択されるべきであり、その一般的特徴や生成機構を明らかにすることが重要である。ところが倍加数が有限であるヒト線維芽細胞初代培養では、変異試験に必要な大量の細胞を準備することが著しく困難なこともあって、突然変異の検索は限られた研究室でしか行われていない<sup>3,4)</sup>。私達はBリンパ球をEBウィルス感染で無限増殖化することによって大量の細胞供給を可能にしたリンパ芽球様細胞をヒト体細胞材料に選び、マイクロウェルプレート上で限界希釈に基づく彷徨試験<sup>5)</sup>を

行って、十分に高い推計学的精度の下に in vitro 突然変異の頻度を測定することができるようになった。これによって変異原高感受性遺伝病の患者由来細胞の突然変異特性を検討し、ヒト細胞を用いる変異原2次スクリーニングにおける高感度検出株としての有用性を評価した。

多数の被検者から体細胞試料を入手する場合にも、皮膚生検と比べて採血はより簡単で、試料提供について被検者の協力を得やすい。IL-2の発見<sup>6)</sup>によってコロニー形成が可能となったTリンパ球を用いて、ヒトの体内で生じた突然変異体を検出し、末梢血におけるその存在頻度を求めることができるようになった<sup>7,8)</sup>。In vivo 短期検索法としてヒトTリンパ球を用いるこの方法は未だ開発途上にあるが、その確立を目指して私達も検討を続け、若干の観察結果を得ている。

このようにヒト体細胞材料としてのリンパ球のいくつかの利点に着目し、環境変異原の危険度評価の基礎となるべき遺伝子突然変異の定量的検出をヒト・リンパ球について行おうとするのが私達

表1. ヒト・リンパ球を用いる突然変異検出

#### USE OF HUMAN LYMPHOCYTES IN MUTATION STUDIES

##### (A) IN VITRO MUTAGENESIS...B cell

(EBV transformed lymphoblastoid cells)

Secondary screening of mutagens

##### (B) IN VIVO MUTAGENESIS...T cell

(IL-2 dependent T cells)

Monitoring of environmental mutagenesis



の目論見(表1)である。

## 2 Bリンパ芽球様細胞の突然変異体頻度測定

これまでにリンパ芽球様細胞でよく用いられてきた軟寒天コロニー形成法に代えて、Furthらにより開発されたマイクロタイトレーションプレートを用いる彷徨試験<sup>5)</sup>を採用して生存率解析を行い、これに6チオ・グアニン抵抗性(TG<sup>r</sup>)、ウアバイン抵抗性(OUA<sup>r</sup>)、さらにチミジンカイネース座位異型接合体のTK6細胞ではトリフルオロチミジン抵抗性(TFT<sup>r</sup>)を指標とする薬剤選択を組み合わせて変異体存在比を算定した。

予め実験に供する細胞はTG<sup>r</sup>およびTFT<sup>r</sup>を指標とする時にはHAT(ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン)処理、OUA<sup>r</sup>ではリクロニングによりbackgroundを十分に下げておく。少なくとも100個の変異体が生存するのに必要な細胞数と生存率を与える条件下で変異原処理

を受けたcultureを変異指標と細胞株の種類によって最大発現までの適当な期間培養して維持する。その後非選択プレートには0.67-20/ウェル、選択プレートには $1 \times 10^4 - 4 \times 10^4$ /ウェルの細胞を播種し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で2-3週培養の後、コロニーを含む陽性ウェルと含まない陰性ウェルをプレート・ミラー(図1)または検鏡により判別する。プレート上の96ウェルへの細胞播種はランダム事象だから各ウェルでのコロニー形成はポアソン分布に従う。今、播種した全ウェル数nに対する陰性ウェル数xの比、即ち陰性ウェルの確率をP(0)とすると、ウェル当りの平均コロニー形成単位 $\lambda = -1 \ln [P(0)]$ で与えられ、これをウェル当り平均播種細胞数mで除した値 $\lambda/m$ が平板効率PEである。突然変異頻度は選択プレート上の平板効率PE<sub>s</sub>と非選択プレート上の平板効率PE<sub>o</sub>の比、PE<sub>s</sub>/PE<sub>o</sub>であらわされる。被処理cultureの生存率は

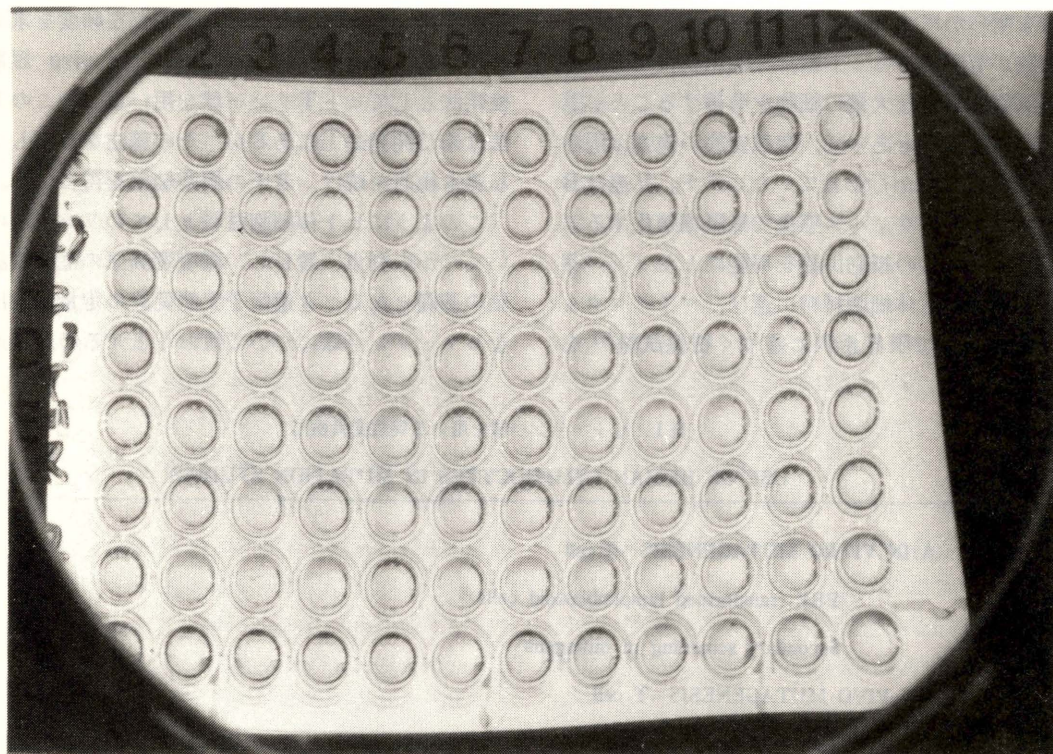


図1: 倒立ミラーにてコロニー形成判定中の96穴マイクロタイター・プレート。  
(三日月〜半月状の細胞増殖を示すものが陽性ウェルでPH低下のため黄色調で、赤色の陰性ウェルとは容易に判別できる。)

処理後の経時的細胞数算定に基づき作成した増殖曲線の指数増加部分をDay 0へ外挿して求めた。

## 3 変異原致死作用に感受性が高い遺伝病患者由来リンパ芽球様細胞の突然変異特性

### (1) 色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum: XP)

相補性A群XP患者由来XP7NI及びC群XP患者由来XP3BEは対照の正常人由来細胞HH4に比べて生存率曲線のD<sub>0</sub>値でそれぞれ約10倍及び3.7倍高感受性であった(図2)。XP3BE(C群)とHH4の比較ではUV誘発TG<sup>r</sup>突然変異頻度は照射線量増加に伴って共に上昇するが、XP3BEはより低線量で変異頻度が高値を示した(図3)。これに対しXP7NI(A群)では非照射のTG<sup>r</sup>頻度(自発変異頻度) $2 \times 10^{-6}$ が $1.1 \text{ J/m}^2$ で $2 \times 10^{-4}$ 、 $3.3 \text{ J/m}^2$ で $1.1 \times 10^{-3}$ と500倍以上の上昇が認められ、XP3BEやHH4と比べて極端なUV誘発変異高感受性を示した<sup>4)</sup>(図4)。絶対線量に代えて

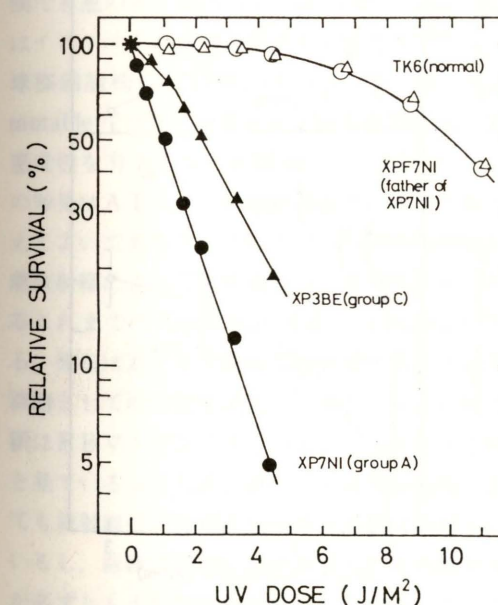


図2: リンパ芽球様細胞の紫外線致死作用に対する感受性<sup>9)</sup>。

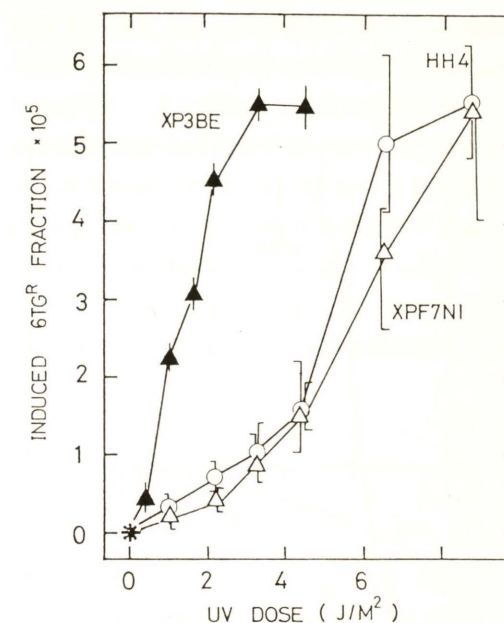


図3: ヒト・リンパ芽球様細胞のUV誘発TG<sup>r</sup>突然変異<sup>9)</sup>。  
(縦線は95%信頼限界)

等しい生存率を与えるUV線量(equitoxic dose)で比較すると、XP3BEとHH4はTG<sup>r</sup>頻度がほぼ同一線上に重なるのに対し、XP7NIではHH4、XP3BEより少なくとも2倍以上の高値であった(図5)。他のA群XPリンパ芽球様細胞であるXP2OS、XP15OSでもXP7NIと同様のUV致死高感受性とUV誘発変異高感受性が見られ、初めにXP7NIで見いだされたUV誘発変異超高感受性はこの細胞株に特有ではなくA群XPリンパ芽球様細胞の一般的特性と考えられた。また別のC群XP患者由来細胞XP1BE、XP3KA細胞のUV誘発変異もXP3BEの場合と同様であった。さてOUA<sup>r</sup>を指標にした場合もUV誘発変異感受性はXP7NI > XP3BI > HH4の順であったが、相対比はTG<sup>r</sup>の場合よりは小さかった。TG<sup>r</sup>のHPR T-変異では塩基置換のみならず欠失やフレームシフトも検出できるのに対し、優性変異のOUA<sup>r</sup>は点突然変異に特異的で、例えば電離放射線による誘発はみられないことが知られている。



A群XPとC群XPおよび正常細胞とでは突然変異の頻度だけでなく型や部位も異なっている可能性が推測される。

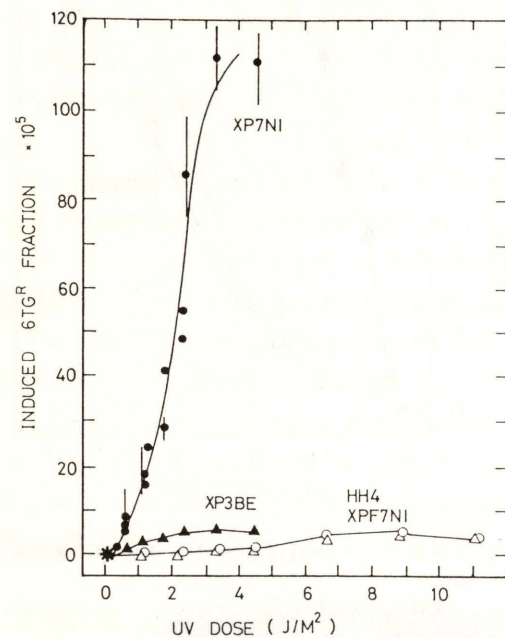


図4：A群XP7NI細胞のUV誘発TG<sup>+</sup>突然変異に対する超感受性<sup>9)</sup>。(XP3BE, HH4および保因者XPF7NIは図3と同じデータを参考のために転写した)

次にA群XPリンパ芽球様細胞株が変異原2次スクリーニング検定株として有用かを確かめる目的で、化学物質による突然変異に対する感受性を観察した。アミノ酸加熱分解物中より分離・同定された発がん性ヘテロサイクリックアミンの一つであるTrp-P-2は、正常人由来リンパ芽球様細胞TK6 (チミジンカイネース座位ヘテロ欠損株) においてS9mix存在下、37℃3時間のインキュベーションにより濃度に依存して6チオ・グアニン抵抗性、トリフルオロチミジン抵抗性およびウアビン抵抗性の突然変異を誘発した。至適S9mixの濃度は細胞致死作用、突然変異誘発作用共に10% (終濃度0.2mg/ml)で、S9mix非存在下ではTrp-P-2は細胞致死作用のみを示し、何れのマーカーでも突然変異を誘発しなかった。一方、XP7NIはS9mix存

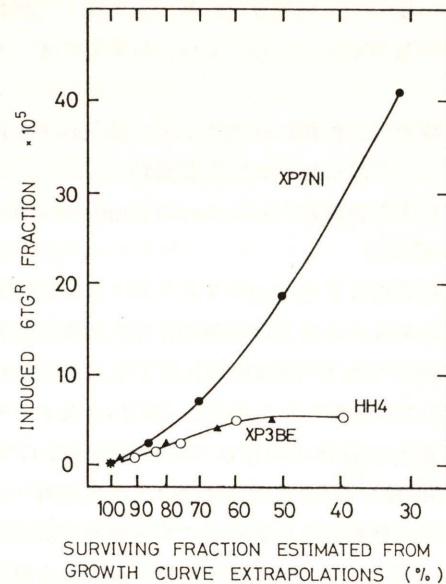


図5：等しい生存率を与える線量におけるTG<sup>+</sup>誘発突然変異頻度の比較。<sup>9)</sup>

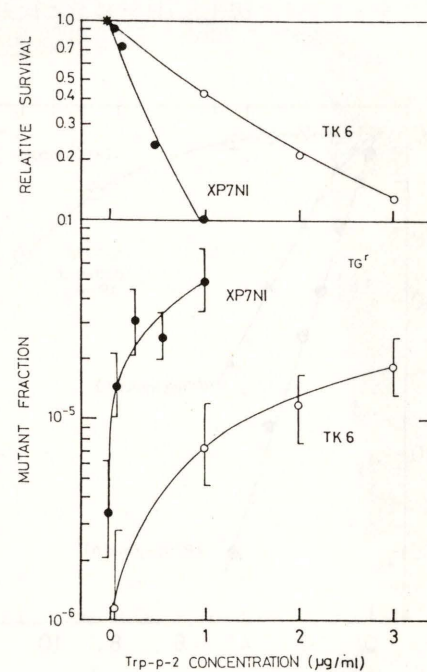


図6：Trp-P-2の細胞致死作用 (上パネル) とTG<sup>+</sup>突然変異誘発 (下パネル)。(Tatsumi, K. et al. 未発表)

在下Trp-P-2の細胞致死作用に対して4倍TK6より感受性が高かった。XP7NIは0.1 μg/mlの低濃度処理でも自然変異頻度 $2 \times 10^{-6}$ が $8 \times 10^{-6}$ に上昇し、Trp-P-2の6チオ・グアニン抵抗性突然変異誘発作用に対しても少なくとも4倍以上感受性が高いことが判明した (図6)。このほかS9mix存在下0.1 μMの低濃度ベンズピレン (BP) によってもXP7NI細胞のTG<sup>+</sup>頻度は $2 \times 10^{-6}$ が $3.5 \times 10^{-5}$ に上昇し、TK6と比較して約3倍以上高感受性であることを観察している。

## (2) 末梢血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia: AT)

日本人のAT患者由来細胞株AT1-1では対照の正常人由来細胞株TK6と同様に、<sup>137</sup>Cs線源から4.4 Gy/分の線量率で照射されたγ線によりTG<sup>+</sup>突然変異が誘発される。すなわちAT1-1細胞はTK6細胞に比べると、γ線の細胞致死作用にたいしてはほぼ2.3倍より感受性が高いが、TG<sup>+</sup>変異誘発の用量反応曲線では両細胞株間で有意の差を認めなかった (図7)。先に私達はイスラエルの患者に由来する他のATリンパ芽球様細胞株GM2783がやはりγ線に対してim-mutableではなく対照正常人由来細胞と同じ変異感受性を有することを観察している<sup>10)</sup>ので、この知見はATリンパ芽球様細胞の一般的性質と考えてよいであろう。この点でAT線維芽細胞が電離放射線によって突然変異の誘発を受けないとするこれまでのArlettらの報告<sup>11)</sup>とは異なっている。彼らはあくまで線維芽細胞初代培養がAT体細胞としての形質を具現しており、私達の得た成績はEBVトランスフォーメーションによる結果と見ているようだが、Bリンパ芽球様細胞であっても放射線致死作用高感受性の形質は保持されているし、線維芽細胞における彼らの変異誘発実験が必ずしも十分な細胞量を用いて行われていない点が問題である。いずれにしても本当に線維芽細胞とBリンパ芽球様細胞での誘発変異が違う場合があるかどうか、同一患者材料での比較が必要で

あろう。絶対線量に代えて生存率当りで誘発TG<sup>+</sup>を比較すると、AT細胞は正常人由来細胞にくらべて突然変異誘発には低感受性のようにもみさせるが、AT細胞のγ線致死高感受性の成因がTG<sup>+</sup>突然変異の成因と互いに独立であるか、逆にAT細胞で欠損しているDNA修復機構がerror-proneであるか、両方の可能性が推測される。ほぼ同様の結果が制がん剤のネオカルチノスタチンについても得られているが、突然変異高感受性検定株としてのATリンパ芽球様細胞の有用性は少ない。

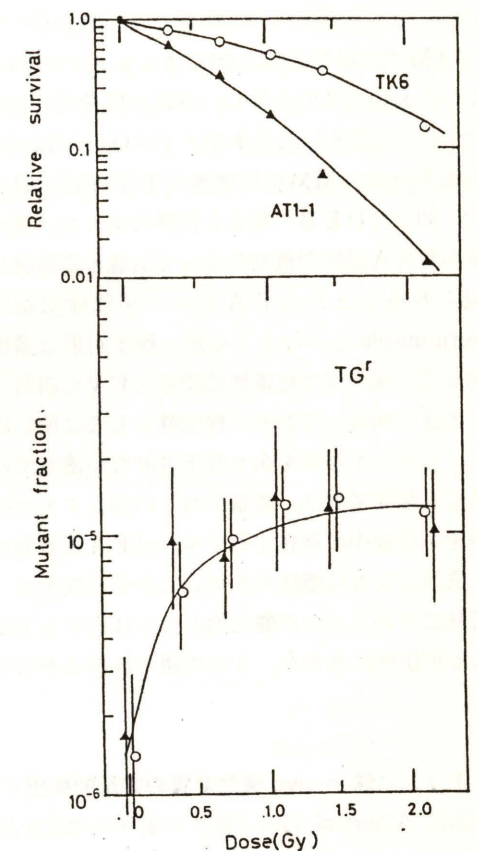


図7：ヒト・リンパ芽球様細胞のγ線致死作用 (上パネル) とTG<sup>+</sup>変異誘発作用 (下パネル) に対する感受性の比較。(Tatsumi, K. et al. 未発表) (○:TK6 ▲:AT1-1)



### (3) ファンconi貧血症 (Fanconi's anemia ; FA)

FA患者由来Bリンパ芽球様細胞株HSC72, HSC99についてDNA鎖間架橋剤のdiepox-ybutane (DEB) 及び mitomycin C (MMC) の細胞致死作用と突然変異誘発作用を検討し、対照の正常人由来細胞TK6の場合と比較した。TK6ではMMC, DEB共に用量依存性にTG<sup>r</sup>, OUA<sup>r</sup>を誘発する。HSC72, 99両株はD<sub>0</sub>値の比較で、TK6に比べ約8倍DEBの細胞致死作用に高感受性であるが、1μM以上ではTG<sup>r</sup>は新たに誘発されるところか非処理対照より低下した。ところが生存率に殆ど影響しないDEB 0.01-0.3μMではHSC72, 99では4 x 10<sup>-6</sup>のbase lineが3 x 10<sup>-5</sup>まで上昇し、特異な用量反応曲線を示した<sup>12)</sup> (図8)。同じ条件下ではOUA<sup>r</sup>は誘発されなかった。MMC処理後のTG<sup>r</sup>頻度もHSC72, 99ではDEBの場合と同様であった。極低濃度のDNA鎖間架橋剤によって有意の変異誘発が見られることからFAリンパ芽球様細胞はhypermutableとみなしうるが、検出可能な濃度範囲がごく狭い点で色素性乾皮症とUVの組合せとは大きく異なっており、検定株としては使いにくい。しかし生存率を余り低下させない濃度での突然変異頻度増加は、微量でもこの様なタイプの作用原が環境中に存在するとすればFA患者発がんの原因となる可能性が大きいことを示唆する。DEBはブタジエンの酸化物として体内でも生成される可能性はあるが、まだ代謝の詳細は不明である。

### 4. Tリンパ球 in vivo 突然変異の定量的検出

検出はAlbertiniらの方法<sup>7)</sup>に若干の改変を加えて行った。末梢血または臍帯血より分離したリンパ球を48-72時間PHA添加培養の後、Bリンパ芽球様細胞の場合と同様に、限界希釈法にならない、ウェル当たり平均1個の条件でランダムに96ウェル・マイクロプレートの1/2または1枚の各ウェルに分注し、他の1/2または1枚にはTG存在下で平均100,000個/ウェルとなるように

分注する。20%インターロイキン2 (IL2) を含む牛胎児血清加RPMI 1640培地で10-14日間培養し、検鏡、およびトリチウム標識チミジン添加18時間後の転入放射線活性から各ウェルにおけるコロニー形成の有無を判定する。TG<sup>r</sup>変異体

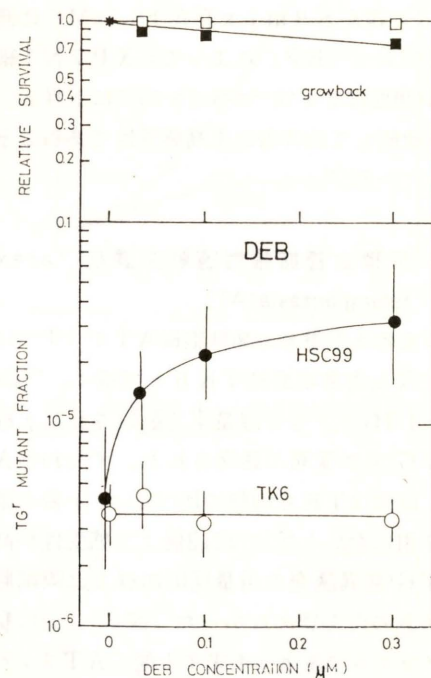


図8: 極低濃度ジエポキシブタンの細胞致死作用 (上パネル) とTG<sup>r</sup>変異誘発 (下パネル) <sup>12)</sup>。

存在頻度はTG含有選択プレートと非選択プレートにおけるPEの比から算出できる。(図9)

この方法で出現したTリンパ球コロニーを選択プレート、非選択プレート各々からリクローンし、さらに増殖させてから、HAT培地に対する感受性と<sup>14</sup>C標識ヒポキサンチンの核酸への転入を調べてphenocopyの可能性を除外し、健康成人末梢血と新生児臍帯血中にTG<sup>r</sup>変異体が存在することを確認した。

さらにTリンパ球変異体存在頻度の測定に際して起こり得るbiasの原因の一つとして、Tリンパ球の特定のサブセットが変異体として特に回収され易いか否かを検討した。平板効率測定用の非

選択プレート及び薬剤選択プレートから分離し、IL2添加培地にて増殖せしめた野生および変異体クローン各々9個についてOKシリーズ・モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーにより表面マーカーの解析を行った。野生クローン、変異体クローン共にT8が各1個、他は全てT4であった。私達の実験条件下では、インデューサー/ヘルパーT細胞がサブプレッサー/傷害性T細胞よりもコロニーを作り易いことが明らかになったが、選択プレート、非選択プレート間ではその出現頻度にはほとんど差異のないことからTG<sup>r</sup>変異体の頻度測定に際し算定の大きな妨げとはならないと考えた。

32例の新生児臍帯血ではTG<sup>r</sup>変異体の存在頻度が0.05-21.6 (平均2.4) x 10<sup>-6</sup>を示し、これに対して研究室周辺の健康成人23例 (平均年齢31歳) では2.0-38.1 (平均7.7) であった。図10は

これを対数目盛に表したもののだが、共に分布の幅が広い。これが真に個人差を反映しており技法上の問題によるのではないことの確認と、同一被検者の繰返し測定における変動の幅を明らかにすることが今後の課題である。臍帯血で成人に匹敵する高値をとる例では母胎を通しての変異誘発の可能性も考えられる。

化学療法および放射線療法によって寛解に導入され現在寛解維持中の悪性リンパ腫患者9例 (表2) では9.8-95.9 (平均34.9), またアルキル化剤melphalanの維持投与寛解行われている多発性骨髄腫患者6例 (表3) では9.4-44.3 (平均26.7) と高値を示すものが多かった (図11)。両グループとも放射線と化学療法の併用や多剤併用療法が行われている症例が多く、個々の治療法との関連は明かでないが、制がん治療が生体内で体細胞の遺伝子突然変異を誘発する可能性を強く示唆して

### METHOD TO QUANTIFY IN VIVO OCCURRING MUTANT LYMPHOCYTES

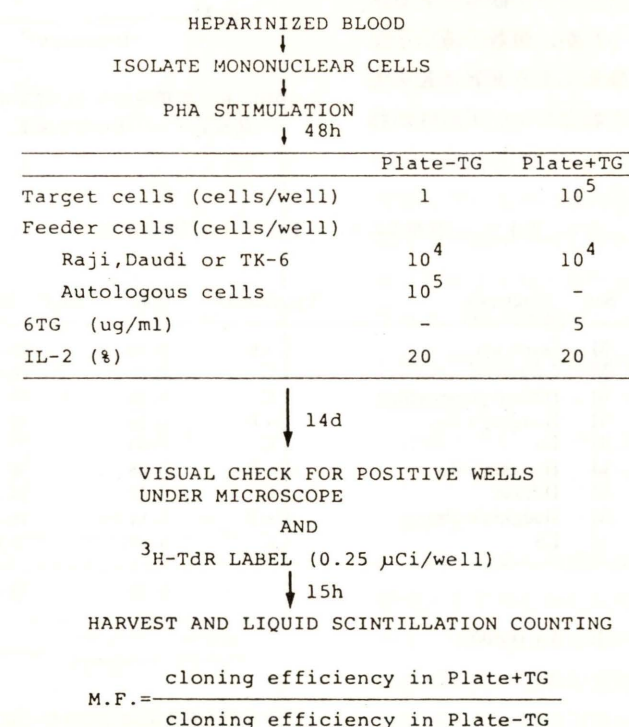


図9: Tリンパ球6チオ・グアニン抵抗性変異体存在頻度測定法。



いる。ただしこれらの担がん患者ではTリンパ球の平板効率自体の低い場合がしばしば見受けられ、いわゆる reconstruction 実験が行えない本法では真に変異体存在頻度が高いのかどうか断定的ではないことが問題である。

## 5. おわりに

リンパ芽球様細胞を材料として、XPおよびFA患者由来細胞では特定の作用原による突然変異誘発が高頻度であることが明かとなり、正常ヒト細胞にはそれらの変異を抑制する機構が備わっていることが示唆された。得られた6チオ・グアニン抵抗性変異細胞のHPR T遺伝子についてcDNAをプローブとするサザン・ブロットなどの構造解析を行うことによって、ヒト細胞に誘発される突然変異の量的差異だけでなく質的差異が検討可能である。現在のところこれら遺伝病細胞でチミジンカインース（染色体17番）異型接合体やAPRT（染色体16番）異型接合体は得られていないので、ウバイン抵抗性だけが観察できる常染色体上のマーカーであったが、複数の遺伝子座位に及ぶ大きい欠失や組換えによる変異はX染色体上のHPR T座位では回収されない可能性が強い。

表2. 悪性リンパ腫患者におけるTG<sup>r</sup>Tリンパ球存在比。

|    | Age | Sex | Diagnosis          | Treatment* | P.E. | M.F. (x10 <sup>-6</sup> ) |
|----|-----|-----|--------------------|------------|------|---------------------------|
| YY | 53  | M   | Giant foll.        | C+R        | 0.23 | 95.9                      |
| AO | 76  | M   | Large cell         | C          | 0.20 | 62.8                      |
| EK | 61  | M   | Diffuse pleomorph. | C          | 0.39 | 55.4                      |
| HT | 60  | M   | Hodgkin's dis.     | C+R        | 0.10 | 40.0                      |
| MT | 67  | F   | LS                 | C          | 0.43 | 39.6                      |
| ST | 44  | M   | Hodgkin's dis.     | C+R        | 0.38 | 36.1                      |
| RM | 66  | M   | Diffuse            | C          | 0.43 | 24.6                      |
| ST | 49  | M   | Hodgkin's dis.     | C+R        | 0.11 | 16.6                      |
| SO | 63  | M   | LS                 | C          | 0.09 | 9.8                       |
| m  | 60  |     |                    |            | 0.26 | 34.9                      |

(\*C:化学療法、R:放射線治療)

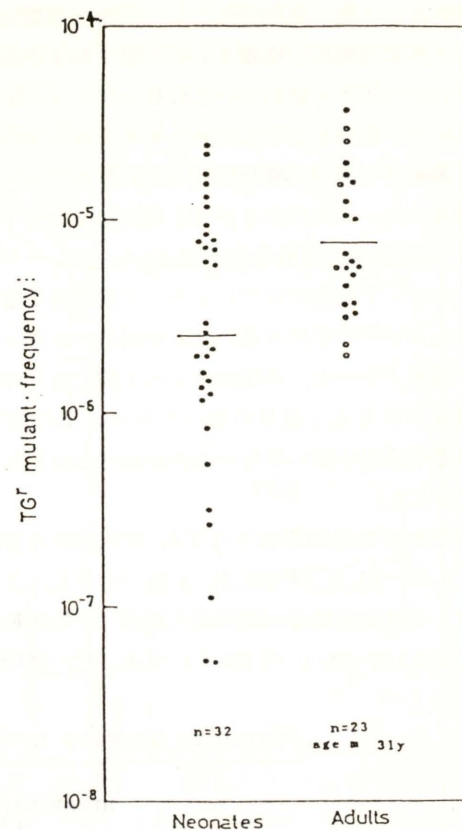


図10: 新生児臍帯血および健康成人末梢血中のTG<sup>r</sup>変異体Tリンパ球の存在頻度。

表3. 多発性骨髄腫患者におけるTG<sup>r</sup>Tリンパ球存在比

|    | Age | Sex | Type   | Treatment* | Duration** | P.E. | M.F. (x10 <sup>-6</sup> ) |
|----|-----|-----|--------|------------|------------|------|---------------------------|
| YM | 54  | M   | IgG(k) | MEVAP, MP  | 5y         | 0.23 | 44.3                      |
| MK | 51  | F   | BJp(k) | MEVAP, MP  | 7y         | 0.18 | 42.9                      |
| TT | 56  | M   | IgG(k) | MP         | 1y         | 0.11 | 34.1                      |
| TT | 61  | F   |        | MP         |            | 0.23 | 32.7                      |
| KS | 56  | F   | IgG(1) | MEVP       | 1.5y       | 0.41 | 18.5                      |
| MN | 31  | F   | IgG(1) | MP         | 1.5y       | 0.94 | 9.4                       |
| m  | 52  |     |        |            |            | 0.35 | 26.7                      |

\*M:メルファラン E:エンドキサン V:ビンクリスチン A:アドリアマイシン  
P:プレドニン

\*\*発症（治療開始）より検査時までの治療期間

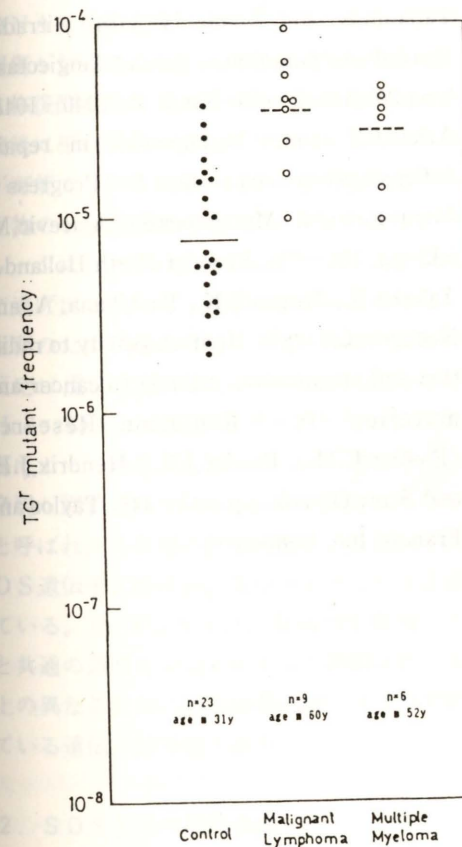


図11: 悪性リンパ腫、多発性骨髄腫患者末梢血中のTG<sup>r</sup>Tリンパ球存在頻度。

く、従ってなるべく多くの新しい常染色体上マーカーがヒト細胞でも適用可能となることが望まれる。

末梢血中のTリンパ球に6チオ・グアニン抵抗性変異体が存在することは確実であり、臍帯血ではその存在頻度は低く、制がん治療を受けた患者では高い例が見られた。しかしながら私達が測定できる末梢血中の変異体存在頻度が、事象としてのin vivo突然変異の発生頻度と果してどの様に対応しているかはまだ十分に明かとは言えない。Tリンパ球サブセットがいろいろな病態で変化することはよく知られており、これにともなう変異Tリンパ球の挙動や、一旦上昇した存在頻度がどの様な時間経過で推移するかなどが、in vivo短期検索法としてヒトTリンパ球を用いるこの方法の評価に先だって検討されるべき点である。

## 〔謝辞〕

本稿に紹介した実験結果は下記の諸氏との共同研究として得られたものであり、ここに協力を謝する。本研究は文部省科学研究費補助金、日産科学振興財団の援助を受けた。

共同研究者: 豊田万里子, 立花 章, 有田 泉, 井田憲司, 宮越順二, 内山 卓, 福原資郎, 武部 啓



## 参 考 文 献

- 1) Yagi, T., Nikaido, O., and Takebe, H. (1984) Excision repair of mouse and human fibroblast cells. *Mutat. Res.*, 132: 101-112.
- 2) Yagi, T., Yarosh, D.B., and Day, R.S. (1984) Comparison of repair of O<sup>6</sup>-methylguanine produced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse and human cells. *Carcinogenesis*, 5: 593-600.
- 3) Kuroda, Y. (1974) Mutagenesis in cultured human diploid cells. II. Chemical induction of 8-azaguanine-resistant mutations. *Jpn. J. Genet.*, 49: 389-398.
- 4) Maher, V., McCormick, J.J., Grover, P.L., and Sims, P. (1977) Effect of DNA repair on the cytotoxicity and mutagenicity of polycyclic hydrocarbon derivatives in normal and xeroderma pigmentosum human fibroblasts. *Mutat. Res.*, 43: 117-138.
- 5) Furth, E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981) Quantitative assay for mutation in diploid human lymphoblasts using microtiter plates. *Analyt. Biochem.*, 110: 1-8.
- 6) Morgan, D.A., Ruscetti, F.W. and Gallo, R. (1976) Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*, 193: 1007-1008.
- 7) Albertini, R.J., Castle, K.L. and Borchering, W.R. (1982) T-cell cloning to detect the mutant 6-thioguanine resistant lymphocytes present in the peripheral blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 79: 6617-6621.
- 8) Morley, A.A., Trainor, K.J., Seshadri, R.S. and Ryall, R.G. (1983) Measurement of in vivo mutations in human lymphocytes. *Nature*, 302: 155-156.
- 9) Tatsumi, K., Toyoda, M., Hashimoto, T., Furuyama, J., Kurihara, T., Inoue, M. and Takebe, H. (1987) Differential hypersensitivity of xeroderma pigmentosum lymphoblastoid cell lines to ultraviolet light mutagenesis. *Carcinogenesis*, 8: 53-57.
- 10) Tatsumi, K. and Takebe, H. (1984)  $\gamma$ -irradiation induces mutation in ataxia-telangiectasia lymphoblastoid cells. *Gann*, 75: 1040-1043.
- 11) Arlett, C.F. (1981) Mutagenesis in repair-deficient human cell strains. In: *Progress in Environmental Mutagenesis* (Alacevic, M. ed.) pp. 161-174, Elsevier-North Holland.
- 12) Takebe, H., Tatsumi, K., Tachibana, A. and Nishigori, C. (1987) High sensitivity to radiation and chemicals in relation to cancer and mutation. In: *Radiation Research* (Fiedler, E.M., Fowler, J.F., Hendrix, J.H. and Scott, D., eds.) pp. 443-448, Taylor and Francis, Inc. London.

環境変異原研究10: 53-62 (1988)

シンポジウム「突然変異の機構——環境変異原の見地から」

## SOS反応と突然変異

大阪大学・微生物病研究所 品川 日出夫

### 1. SOS反応とは

大腸菌にDNA損傷を与えたり、DNA合成を停止させると、種々の生理的反応が誘導される<sup>1) 2)</sup>。主なものを挙げると、1) DNA損傷を修復する機能の誘導、2) 突然変異をおこす機能の誘導、3) プロファージの誘発、4) 細胞分裂の一時停止、などある。これ等の反応によって、DNAに損傷を受けて複製が停止すると、細胞は損傷が修復される迄、細胞分裂を停止させ、DNA修復酵素の生産を誘導して修復を行わせる。修復後に細胞分裂を再開すれば、正常な染色体分配が可能で、無核細胞の出現などを防ぐことができ、生物のもつ適応機構の一つと考えられる。溶源ファージにとっては、傷ついた宿主から誘発によって逃げ出して、より健康な宿主に寄生するための生存のための適応機構と考えられる。これ等の諸反応は遺伝学的には、すべて、*recA* や *lexA* (Ind-) 株では全て誘導がおこらない。DNA損傷によって誘導され、*recA*, *lexA* 遺伝子によって発現が調整されているこれ等諸反応はSOS反応と呼ばれ、これ等の反応に関与する遺伝子は、SOS遺伝子と呼ばれ、SOSレギュロンを形成している。(レギュロンは、共通の生理的シグナルと共通の調節タンパクによって調節され、染色体上の異なる位置にある複数の遺伝子より形成されている遺伝学的単位である)

### 2. SOS反応の調節機構

SOS遺伝子群は、その調節領域にSOSボックスと呼ばれている18塩基対より成るコンセンサス配列、CTGTatataataCAGをもち、DNA損傷を受けていない状態では、

*LexA* レプレッサーがこれに結合して、転写を抑制している。SOSボックスは、多くのオペレーターと同様に、二回転対称の構造をもち、大文字で表した塩基は特によく保存されている。DNAに損傷を受けると、細胞内にSOS誘導のシグナルが生成され、それが *RecA* タンパクをプロテアーゼとして活性化して、*LexA* の切断による不活化を促進し、SOS遺伝子群の誘導(脱抑制)がおこる。*In vitro* で *RecA* は単鎖DNAとATPの存在下で、*LexA* およびラムダファージのレプレッサーをほぼ中央で切断して不活化させる事が証明されている<sup>3) 4)</sup>。従って、損傷を受けたDNA上に水素結合できない部分がつくられて、それ等が*RecA* 活性化のシグナルになる可能性も考えられるが、誘導シグナルに関しては多くの未解決の問題が残されている。各々のSOS遺伝子のSOSボックスは少しずつ異なりそのため*LexA* との結合能に差があるので、構造的に発現しているレベルも各遺伝子で異なり、DNAの損傷の程度に応じて*LexA* レプレッサーの不活化がおこり、そのため*LexA* との結合能の低い遺伝子から順番に発現が誘導される。この機構によって、DNAの損傷の程度に対応して、その損傷を修復するのに必要な機能をコードする遺伝子だけが主に誘導されるようになっているようである<sup>5)</sup>。

SOS反応が誘導されると、DNA上の損傷がSOS遺伝子産物の働きによって種々の機構で修復され、細胞内のSOS誘発のシグナルが減少し、*RecA* タンパクが再び不活性型にもどる。従って*LexA* レプレッサーの不活化がおこらなくなると、細胞内に一定の濃度に達して、SOS遺伝子群が再び抑制されるようになる。*lexA* 遺伝子はSOS



ボックスを2個もっていて、細胞内のLexAのレベルをモニターしながら自己制御を行って、細胞内のレプレッサー濃度を動的に一定レベルに維持している<sup>6)</sup>。recA遺伝子もSOSボックスをもっていてLexAの調節を受けているので<sup>7)</sup>、RecAタンパクはDNA損傷によって産生量が増えるとともに、プロテアーゼとしての活性化もおこり、量的にも質的にも変化して、損傷を受けた細胞内での、SOS誘発の役割と、修復酵素としての多面的な需要に対処している。

### 3. SOS遺伝子の機能

SOS反応の調節機構の大筋は解明され、SO

修復に関与するSOS機能とそれ等に関係のある遺伝子について述べる。

#### 3-1. 除去修復 (Excision Repair)

UV照射や多くの変異原等によるDNA損傷の修復に重要な役割を果たしているのが除去修復と組換え修復の二つの機構である。除去修復機能はrecA株やlexA(Ind<sup>-</sup>)株でもかなり検出出来るし、構成的にも発現しているので以前はSOS反応ではないと考えられていた。その後除去修復酵素複合体をコードしている3つの遺伝子のうちでuvrA、uvrBはSOS調節を受けることが証明された。しかしuvrCについては相反する結論が出

表1. SOSレギュロンを形成している遺伝子群

| 遺伝子            | 地図 | 機能                                |
|----------------|----|-----------------------------------|
| lexA           | 91 | SOSレギュロンのレプレッサー                   |
| recA           | 58 | LexA, UmuD の切断を解媒<br>組換え, SOS突然変異 |
| uvrA           | 92 | 除去修復                              |
| uvrB           | 17 |                                   |
| phr            | 16 | 光回復酵素                             |
| uvrD           | 85 | 修復, 組換え<br>(DNAヘリケースII)           |
| ruvA           | 41 | 修復, 組換え (recF経路)                  |
| ruvB           | 41 |                                   |
| recN           | 58 | 修復, 組換え (recF経路)                  |
| recQ           | 85 | 組換え (recF経路)                      |
| umuD           | 25 | SOS突然変異                           |
| umuC           | 25 |                                   |
| sulA<br>(sfiA) | 22 | 細胞分裂の阻害                           |
| ssb            | 92 | DNA合成, 組換え<br>(単鎖DNA結合タンパク)       |

S反応の研究の重点は各SOS遺伝子の機能の解明に移ってきている。現在迄に20個近いSOS遺伝子が同定されたが年々増えているので、未だ増加することが予想される。表1に、現在知られているSOS遺伝子を整理してみた。この他に全然機能はわからないが、SOS調節を受ける遺伝子としてdinA、B、D、Fがある<sup>8)</sup>。dinはdamage inducibleの略である。この章では、主にDNA

されているが、大勢は否定的である。

uvrA、B、C遺伝子がクローニングされ、それ等の産物の多量生産が成功して精製したタンパクが得られて、in vitroでのピリミジン二量体の除去修復の機構が研究された<sup>9)</sup>。UVRA、B、Cの3つのタンパクが複合体を形成し、二量体の5'側7塩基上流のジェステル結合と3'側3~4塩基下流のジェステル結合を切断して、12~13ヌク

レオチドの断片が切り出されることが示された。古いモデルでは、UVR酵素が二量体の5'側に切れ目を入れて、DNAポリメラーゼIが二量体を含むDNA鎖をはがしながらいわゆる nick translation の機構で修復を行うと考えられていたので訂正する必要がある。最近の実験ではuvrD遺伝子の産物であるDNAヘリケースIIが切れ目の入った二量体を含むDNA断片の切り出しを促進することが示された。切り出された後のDNA上のギャップはDNAポリメラーゼIで埋められ、リガーゼでシールされて修復が完了する。uvrD遺伝子はSOS調節を受けることが証明されているが、ligやpolA遺伝子については不明である。

UVR系による除去修復は二量体の他にT-C(6-4)附加体、アフラトキシン附加体等、塩基間の水素結合を阻害するような比較的大きな損傷の修復に関与している<sup>2)</sup>。除去修復は鋳型DNAをコピーするので正確な修復が行われ、突然変異をおこさない。UVR系による除去修復としては上記の比較的短い修復合成(short patch repair)を伴うものが大部分(99%)であるが、その他に1500スクレオチド以上の長い修復合成(long patch repair)を伴うものがある(1%)。後者の機能の発現はSOS調節を強く受けている。両者の修復する損傷がどのように異なるかはわかっていない。

#### 3-2. 光回復酵素による修復

phr遺伝子にコードされている光回復酵素はUV照射によって形成されたピリミジン二量体を切断してもとの一量体にもどす。除去修復と異なって基質特異性が強く二量体以外の他のDNA損傷には働かない。この光回復の機能の他、この酵素は暗所でも、UVRABC酵素による除去修復の活性を高める機能があることが示された<sup>10) 11)</sup>。

phrの遺伝子の発現はUV照射によって誘導され、recA、lexA遺伝子によって調節されることが示されたので、SOS遺伝子であると考えられる<sup>12)</sup>。ピリミジン二量体はUVによる主な損傷産

物であるので、それを修復する酵素がUVによって誘導されることはまことに合目的である。

#### 3-3. DNA組換えとSOS反応

接合や形質導入での相同なDNA間の組換えにはrecA遺伝子の機能が必須である。組換えにはRecBCD経路と、RecF経路の二つがあり、どちらにもRecAの機能を必要とする<sup>13)</sup>。recA又はrecC株は組換え能が欠けていると同時にUVやマイトマイシンCなどに感受性を示す。recB recC二重変異株でも野生株の1%程度の組換え能がある。この株からマイトマイシンC抵抗性のサブレッサー変異がとられ、この株recBC sbcBは、ほぼ野生型菌のレベルの組換え能を回復していた。recBC sbcB株より種々の組換え欠損株が単離された。recF、recJ、recNはこのようにして単離され、同定された。recQ、ruvはチミン餓餓抵抗性変異<sup>14)</sup>、UV感受性変異<sup>15)</sup>としてそれぞれ単離されて、後にRecF経路の組換えに関与することが示された。

RecBCDは、複合体としてエキソヌクレアーゼVを形成し、ATP依存性の二重鎖エキソヌクレアーゼ活性とDNA巻きもどし活性をもっている。RecF経路の遺伝子の産物の機能に関しては未だ全くわかっていない。私達はruvをクローニングし、DNA配列を決定したところ、ruv領域はAとBの二つの遺伝子がSOS調節をうけるオペロンを形成し、各々37kDa、22kDaのタンパクをコードしている事がわかった(品川、牧野、雨村、木村、中田;論文投稿中)。更にRuvBタンパクはATP結合領域のコンセンサス配列をもっていることがわかったので、精製して調べたら、ATP結合活性をもっていた(岩崎、中田、品川;未発表)。

RecBCD経路はSOS調節を受けないと考えられている。RecF経路のうち、recN、recQ、ruvA、BはSOS調節を受けることが証明されているがrecF、recJについてはわからない。DNA損傷によって組換え能が向上することが昔から知られており、特に二重鎖切断を伴う組換えはSOS調節



を受けることがわかっている。従ってRecF 経路のこれ等の遺伝子がSOS組換え反応に関与する事は間違いないだろうが、その機構の解明は今後の課題である。recB, C株ではUVによるSOS誘発はおこるが、ナリディキシン酸 (DNA gyraseの阻害剤) によってはおこらない<sup>2)</sup>。recF株ではこの逆でナリディキシン酸ではおこるがUVでは十分におこらない。これ等の遺伝子はSOS誘発のシグナル形成 (RecAの活性化) にも関与しているらしい。これ等の他に、DNA合成、組換え機能に必要な単鎖DNA結合タンパク (ssb遺伝子産物) もSOS誘発のシグナル形成には必要である<sup>2)</sup>。

#### 4. DNA複製を正確に行わせる機構

突然変異は複製や修復のエラーによっておこるので、生物はDNA合成の正確さを高める種々の機構をもっている。これ等の機構は突然変異生成の機構と密接な関わりをもっているので、SOS突然変異について考える上で重要である。

##### 4-1. DNAポリメラーゼの校正機能 (Proofreading)

ポリメラーゼは鋳型DNAに相補的な塩基を正しく対合させ、DNA鎖を伸長させていくが、その際に相補的でない塩基を入れてしまう場合がある。相補的でない塩基を認識して3'→5'エキソヌクレアーゼで切り出してエラーを正す機能を校正機能と呼んでいる。染色体複製に関与するDNAポリメラーゼIIIは多くのサブユニットから構成されている複合体で、polC(dnaE)にコードされているαタンパクがヌクレオチドの重合活性を持ち、dnaQにコードされているイプシロン (ε) タンパクが校正機能のエキソヌクレアーゼ活性をもっている<sup>16)</sup>。dnaQ突然変異株の1つであるmutD株はミューターで自然突然変異の頻度が1000倍以上も高いので、正常なεの働きで、エラーが1/1000にもなるように「校正」されていると考えられる。

DNAの修復合成に関与しているポリメラーゼ

Iは単一のペプチドで、ポリメラーゼが活性と3'→5'と5'→3'の両方のエキソヌクレアーゼ活性をもっている。polA株も突然変異頻度が高いので3'→5'エキソヌクレアーゼが校正機能に関与していると考えられる。DNAポリメラーゼIIは5'→3'エキソヌクレアーゼ活性がなく、その欠損株もUVなどに感受性にならないので、修復に関与していないようにみえるが、あまり深く研究されていない。

##### 4-2. 誤対合塩基修正 (mismatch repair)

校正機能によっては修正されないか、その監視の目を逃れて誤対合を含んだまま合成されたDNAの新しく合成された方のDNA鎖を認識して、切り出して修復する機構 (mismatch repair) が大腸菌に存在する<sup>17) 18)</sup>。DNA複製は半保存的 (semiconservative) 機構で行われるので、遺伝情報が正確に複製されるためには鋳型となる親鎖とそれをコピーした娘鎖を見分け、誤対合があった場合は新しく合成された娘鎖を見分けて、そちらを含むDNA鎖断片を切り出して、もう一度、正しい対合をもつような複製を行って修正するのがmismatch repairの機構である。DNA鎖の親娘の識別は、GATC塩基配列のアデニンのメチル化の有無によって行われる。dam遺伝子にコードされるDNAアデニンメチル化酵素は細胞内に少量しか存在しないため、DNAが合成されてもメチル化はすぐにはおこらず、そのため親鎖のGATCはメチル化されているが新しく合成されたDNA鎖の方はしばらくメチル化されていない状態が続くので、親娘鎖はメチル化の有無によって基本的には識別される。mismatch repairの欠損突然変異は自然突然変異が野性株の100倍ほど高く、ミューターとして単離され、前述のdamの他にmutH, mutL, mutS, mutU(uvrD)がある。In vitroでmismatch repairを行わせる系が確立され、その系を利用して、MutHタンパクがメチル化されていないGATCを認識して、DNA鎖に切れ目を入れ、MutSタンパクが誤対合を認識してそこに結合する機能があることが証明された。

mutUはuvrD, recLと同じでヘリケースIIをコードしている。mismatch repairは、遺伝的組換えの中間体であるheteroduplex上のミスマッチ部分の修正にも関与して、組換え頻度が遺伝子マーカー間の距離に比例しない現象であるnegative interferenceの原因ともなっている<sup>17)</sup>。

遺伝的安定性を保ち突然変異をおこさせないための機構として他にアルキル化剤に対する適応応答の機構があるが、それについては、本シンポジウムで関口氏が書いているので参照されたい。

#### 5. SOS突然変異

突然変異生成には主に二つの機構が考えられている。UV照射や、マイトマイシンC, 4NQOなど、比較的大きなDNA損傷を与える変異原による突然変異は、その損傷部位が鋳型としての機能を果さなくなる (non-informatonal) と考えられる。このような場合、DNA合成が継続するためには、新たな機能の誘導が必要であり、その誘導された機能による複製はエラーを伴うものであって、SOS突然変異はこのようにしておこると考えられている。EMSやMNNGなどのアルキル化剤によってつくられる塩基の修飾は、本来の塩基と異なる特異性をもつようになって、誤対合の頻度が高まる。2APなどの塩基アナログのような物質による突然変異も同様で、これ等の変異原による突然変異にはSOS機能は関与しない<sup>19)</sup>。

##### 5-1. recA, umuD, C 遺伝子

UVや多くの化学変異原による突然変異が組換え欠損突然変異株として単離されたrecA株でおこらないことが古くから知られていた。加藤等<sup>19)</sup>はrecAやlexAの調節を受けて、突然変異生成に関与する遺伝子が他に存在すると考えて、UVや4NQOによってHis<sup>+</sup>復帰突然変異が誘発されないミュータントを単離し、recAやlexAと異なる位置にマップされる新たな突然変異をumuCと名づけた<sup>20)</sup>。umuC遺伝子はその後クローニングされ、実はumuDとumuCの二つの遺伝子がS

OS突然変異に関与していてオペロンをつくっていることがわかった<sup>21) 22)</sup>。umuDとumuCの塩基配列が決定され各々、15kDaと48kDaのタンパクをコードしていることが示された<sup>23) 24)</sup>。

##### 5-2. RecAの活性化が突然変異誘発に必要である。

突然変異誘発におけるRecAタンパクの役割は、umuD, C遺伝子などのSOS遺伝子の発現をおこさせることだとしばらく前迄は考えられていた。しかしlexA(Def)株ではSOSレギュロンは構成的に発現しているが、自然突然変異の頻度も高くないし、UV照射したファージに突然変異をおこさせる能力も野性株に比べて高くなっていない。突然変異能が誘導されるためには、SOSレギュロンの発現に加えて、RecAがプロテアーゼとして活性化される条件が必要であった<sup>25) 26)</sup>。In vivoでRecAはUVやマイトマイシン処理などによって活性化され、又recA730遺伝子の産物はDNA損傷なしでも、LexAやラムダレプレッサーを切断するプロテアーゼ活性をもっている。どちらの条件下でも突然変異誘発能は高まっていた。これ等の結果は、RecAはLexAレプレッサーを切断して、SOS発現を誘発する他に、少なくとも、もう一つの機能を突然変異誘発のためにもっている事を示している。

##### 5-3. UmuD タンパクは活性化されたRecAによって切断されて活性化される。

私達は以前マキシセル法でumuD遺伝子産物を同定した時、17kDaと14kDaの二種類のサイズのタンパクを見つけ、17kDaがプロセッシングを受けて14kDaに変換されたと考えた<sup>22)</sup>。従って活性化されたRecAの突然変異誘発でのもう一つの機能は、UmuDの切断による活性化であるという考えを私達はもつようになった。更にWalker等<sup>24)</sup>は、UmuDタンパクがRecAによって切断されるLexAやラムダのレプレッサーのC末端側半分と30%近くホモロジーをもつことを見出した。これ等のレプレッサーの切断部位は



Ala-Gly 間であるが、それらに相当すると考えられる UmuD の配列は Cys24-Gly25 である。φ80 ファージのレプレッサーの切断部位は Cys-Gly 間であることが最近小川等によって証明された<sup>27)</sup>。これ等のデータによって私達は、増々上記の仮説に自信をもち検証してみた<sup>28)</sup>。

*In vivo*での UmuD タンパクの変化を追跡するために、UmuD に対する抗血清をつくって、免疫学的方法で調べることにした。そのため *lacZ'*-*'umuD* 融合遺伝子を作成し、その産物であるキメラタンパクは、β-ガラクトシダーゼ活性をもつので、基質アフィニティクロマトグラフィーで簡単に多量に精製することができた。これを用いて免疫して得た抗血清は、UmuD タンパクとβ-ガラクトシダーゼと特異的に反応する抗体を含んでいた。この抗血清を用いた実験により、UmuD は*in vivo*で変異原処理によって 17kDa から 14kDa にプロセッシングされ、この反応は、RecA がプロテアーゼとして活性化された状態でのみおこった<sup>28)</sup>。更に *umuD* 遺伝子に合成 DNA を用いて部位特異的突然変異を導入して Cys24-Gly25 のアミノ酸を変えるようにした。これ等の突然変異型 *umuD* 遺伝子をもつ菌での突然変異能と UmuD のプロセッシングを調べた。その結果 Cys24-Gly25 又は Ala24-Gly25 ではプロセッシングはおこり、Cys24-Asp25, Ala24-Asp25 ではおこらなかった。プロセッシングがおこった場合のみ突然変異能がみられた<sup>29)</sup>。更に Cys24迄の N 端側24個のアミノ酸を欠く UmuD タンパク (プロセスされた UmuD に相当するもの) をコードする *umuD* 遺伝子をもつ菌も、正常な突然変異能をもつことが示された<sup>29)</sup> <sup>30)</sup>。従って、UmuD は活性化された RecA によって切断され、切断は Cys24-Gly25 間でおこり、切断された UmuD が突然生成の反応に関与する活性型分子であると考えられる。Walker 等<sup>30)</sup> も種々の *umuD* 変異を作成して、それらの突然変異能を調べた実験から同じ結論に達した。更に彼等は、切断されたタイプの UmuD をコードする *umuD* 遺伝子は *recA*430 株では突然変異能を示すが、*recA*

欠失株では示さなかった。*recA*430 株では野性型の *umuD* 遺伝子をもつ菌は、UmuD タンパクが RecA430 タンパクではプロセスされないため、突然変異能がないと考えられた<sup>29)</sup>。これ等の結果は、RecA タンパクは突然変異誘発において、(1) LexA の切断 (2) UmuD の切断に加えて、第3の未知の機能をもっている事を示唆している<sup>30)</sup>。

UmuD タンパクは Echols 等によって精製され、RecA タンパクによって単鎖 DNA と ATP の存在下で、*in vitro* で切断されることが証明された<sup>31)</sup>。この *in vitro* 切断の条件は、LexA やラムダファージレプレッサーの場合と同じである。

#### 5-4. LexA レプレッサーと UmuD タンパクはプロテアーゼである

これ迄話を単純化するために、RecA タンパクがプロテアーゼとして、LexA および UmuD を切断すると説明してきた。しかし Little は *in vitro* では、RecA がなくて、LexA だけで、アルカリ条件下 (pH9.5) では、自己消化によって、RecA タンパク存在下と同じ Ala84-Gly85 間で切断されることを示した<sup>32)</sup>。従って、LexA 自身がプロテアーゼで、RecA タンパクはその自己消化を促進するだけで、プロテアーゼではないと考えられる。UmuD も同様にアルカリ条件下で、RecA 存在下と同じ部位で切断されることが示されたので、同様に考えられる<sup>31)</sup>。しかし RecA が LexA や UmuD の切断反応において、共有結合を伴う反応中間体形成に関与しなくても、生理的条件下では *in vivo*, *in vitro* とともに切断反応に必須である。従って酵素をタンパク質性の触媒として広義に考えれば、RecA もプロテアーゼと呼べるし、SOS 突然変異を考える上で、従来通りプロテアーゼとして扱っても、本質的には、ストリーは変わらない。

#### 5-5. SOS 突然変異と DNA ポリメラーゼ

突然変異は DNA 合成のエラーによっておこるので、大腸菌に存在する3種類の DNA ポリメラーゼのどれが SOS 突然変異に関与しているの

であろうか? ポリメラーゼ I は *polA* 遺伝子にコードされていて、*polA* 株は種々の DNA 損傷に感受性になり、通常の状態では染色体の複製には必須でないので DNA 修復合成が主要な機能であると考えられる。種々の *polA* 株で SOS 突然変異は十分誘発されるので、ポリメラーゼ I は関与しないと考えられる。*polB* 遺伝子によってコードされているポリメラーゼ II の機能は、ほとんどわかっていない。*polB* 株は特に UV などに感受性になっていないので修復合成への関与も不明である。*polC* (*dnaE*) はポリメラーゼ III の α サブユニットをコードしている。ポリメラーゼ III は多くのサブユニットで構成されているが、重合反応を行うのは α サブユニットである<sup>33)</sup>。SOS 突然変異の誘発にポリメラーゼ III の機能が必要であることは *polC* 温度感受性 (*polCts*) 株を用いた実験によって示された。Bridges 等<sup>34)</sup> は、*polCts* 株を UV 照射後、低温 (34°C) で数時間培養した後光回復を行わせても突然変異は誘導されるが、高温 (43°C) で培養した後、光回復を行わせると突然変異がおこらなくなることを示した。つまりピリミジン二量体を含む DNA が複製されて、突然変異として固定されるためにはポリメラーゼ III の働きが必要である事を示唆している。Moses 等は、*polCts* 株が *pcbA1* 変異をもつと高温でもポリメラーゼ I に依存して DNA 複製ができて、増殖可能になることを発見し、この二重変異株を UV 照射後、高温で培養すると突然変異がおこらないことを示した<sup>35)</sup>。

Echols 等は RecA タンパクが UV 照射した DNA に特異的に結合し、プロテアーゼとして活性化されると共に、DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素および、イプシロンのもつ 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性を阻害することを *in vitro* で示した<sup>36)</sup>。従って SOS 突然変異において RecA タンパクはポリメラーゼ III の 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性を阻害して、校正機能を阻害している可能性が考えられる。

#### 5-6. レプリゾームの再活性化と RecA, UmuD, UmuC

染色体 DNA の複製は *polC* 産物など10種類ほどのタンパクがの複合体で行われ、この複合体は replisome と呼ばれている<sup>33)</sup>。UV 照射後、DNA 合成は一時的に止るが、野性型株では30分後再び、DNA 合成が再開される。これを replisome の再活性化というが、この過程に RecA タンパクと UmuDC タンパクの機能に関与していることが最近の研究で示された<sup>37)</sup>。replisome の再活性化は新たなタンパク合成を必要とする SOS 機能の1つと考えられる。

#### 6. SOS 突然変異の機構のモデル

SOS 突然変異の機構について現時点での知見をもとにモデルを考えてみよう。UV 照射によって、ピリミジン二量体や TC (6-4) 附加体などがつくられ、これ等損傷部位においては、本来相補的であった両 DNA 鎖の塩基間で、水素結合ができなくなり、部分的に、単鎖 DNA になり、RecA タンパクが、これ等損傷部位に結合して、プロテアーゼとして活性化される。活性化された RecA によって LexA レプレッサーが切断され、突然変異生成に必要な *umuD*, *C* 遺伝子を含む SOS 遺伝子群の発現がおこり、UmuD タンパクは RecA によって切断されて活性化される。DNA 合成はピリミジン二量体等の損傷部位で停止し、SOS 誘発後に、活性型 RecA や UmuD, C 等が DNA ポリメラーゼ III の機能を修飾して、損傷を乗り越えるような DNA 合成を再開させる (レプリゾームの再活性化)。水素結合をつくり得ないような損傷塩基に対しては、挿入された塩基は直ちに、ε サブユニットの校正機能によって切られるのでアイドリングがおこって DNA 鎖の延長はおこらない<sup>38)</sup>。RecA は ε サブユニットの校正機能を阻害するので、損傷塩基の反対側に種々の間違った塩基が挿入される<sup>36)</sup>。しかしこの水素結合をしていない塩基対を更に伸長して DNA 合成を行わせるためには、UmuD, C タンパクの機能が必要である<sup>39)</sup>。従って突然変異の生成過程で、



RecA は non-informational な損傷塩基の反対側に、塩基の挿入を促進する働きをもつので、エラーの頻度を高め、UmuDC はそれ等を突然変異として固定化する働きがあると考えられる。UmuDC タンパクは、DNA ポリソラーゼⅢと複合体を形成して、レプリゾームの機能を修飾すると私は考えている。

UmuD タンパクは切断されてどのように活性化されるのであろうか？ UmuD タンパクは LexA と同様に潜在的にプロテアーゼ活性を持っている<sup>31</sup>。N末端側の24アミノ酸のペプチドによって、前駆体 UmuD はプロテアーゼ活性がマスクされていて、RecA による切断がプロテアーゼが機能を露出させる可能性を私は考えている。プロテアーゼとしての UmuD はレプリゾームを構成しているタンパクの1つを切断して、機能を修飾すると考える。血液凝固因子の活性化やトリプシンなどのプロテアーゼ活性化のカスケードなどとのアナロジーである。又は UmuD のN端側のペプチドの切断除去によって、UmuD の活性中心や、他のタンパクとの相互作用をするドメインが露出されると考えてもよい。

私達は既に UmuD, UmuC 両タンパクに対する抗血清をつくり、両タンパクの増産もできたので、ごく近い将来、これ等のタンパクを精製して、生化学的性質を研究できようし、上記のモデルの検証もできるであろう。

#### 参 考 文 献

- 1) Little, J. W. and Mount, D. W. (1982) The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. Cell 29 : 11-22.
- 2) Walker, G. C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 48 : 60-93.
- 3) Phizicky, E. M., and Roberts, J. W. (1981) Induction of SOS functions : regulation of proteolytic activity of *E. coli* RecA protein by interaction with DNA and nucleoside

triphosphate. Cell 25 : 259-267.

- 4) Little, J. W., Edmiston, S. H., Pacelli, L. Z. and Mount, D. W. (1980) Cleavage of the *Escherichia coli* *lexA* protein by the *recA* protease. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 77 : 3225-3229.
- 5) Little, J. W. (1983) The SOS regulatory system : control of its system by the level of *recA* protease. J. Mol. Biol. 167 : 791-808.
- 6) Brent, R. and Ptashne, M. (1981) Mechanism of action of the *lexA* gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 : 4204-4208.
- 7) Little, J. W., Mount, D. W., and Yanisch-Perron. (1981) Purified *lexA* protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 : 4199-4203.
- 8) Kenyon, C. J. and Walker, G. C. (1980) DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77 : 2819-2823.
- 9) Sancar, A. and Rupp, W.D. (1983) A novel repair enzyme : UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cut a DNA strand on both sides of the damaged region. Cell 33 : 249-260.
- 10) Yamamoto, K., Satake, M. and Shinagawa, H. (1984) A multicopy *phr*-plasmid increases the ultraviolet resistance of a *recA* strain of *Escherichia coli*. Mut. Res. 131 : 11-18.
- 11) Sancar, A., Franklin, K. A. and Sancar, G. B. (1984) *Escherichia coli* DNA photolyase stimulates Uvr ABC excision nuclease *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 : 7397-7401.
- 12) Ihara, M., Yamamoto, K. and Ohnishi, T. (1987) Induction of *phr* gene expression by irradiation of ultraviolet light in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 209 :

200-202.

- 13) Smith, G. R. (1988) Homologous Recombination in Prokaryotes. Microbiol. Rev. 52 : 1-28.
- 14) Nakayama, H., Nakayama, K., Nakayama, R. Irino, N., Nakayama, Y. and Hanawalt, P.C. (1984) Isolation and genetic characterization of a thymineless death-resistant mutant of *Escherichia coli* K12 : identification of a new mutation (*recQ1*) that blocks the RecF recombination pathway. Mol. Gen. Genet. 195 : 474-480.
- 15) Otsuji, N., Iyehara, H. and Hideshima, Y. (1974) Isolation and characterization of an *Escherichia coli* *ruv* mutant which forms nonseptate filaments after low doses of ultraviolet light irradiation. J. Bacteriol. 117 : 337-344.
- 16) Scheuerman, R., Tam, S., Burgers, P. M. J., Lu, C. and Echols, H. (1983) Identification of the  $\epsilon$ -subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme as the *dnaQ* gene product : a fidelity subunit for DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80 : 7085-7089.
- 17) Radman, M. and Wagner, R. (1986) Mismatch repair in *Escherichia coli*. Ann. Rev. Genet. 20 : 23-38.
- 18) Modrich, P. (1987) DNA mismatch correction. Ann. Rev. Biochem. 56 : 435-466.
- 19) Kato, T. Ise, T. and Shinagawa, H. (1982) Mutational specificity of the *umuC* mediated mutagenesis in *Escherichia coli*. Biochimie 64 : 731-733.
- 20) Kato, T. and Shinoura, Y. (1977) Isolation and Characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light. Mol. Gen. Genet. 156 : 121-131.
- 21) Elledge, S.J., and Walker, G.C. (1983) Proteins required for ultraviolet light and

chemical mutagenesis : identification of the products of the *umuC* locus of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 164 : 175-192.

- 22) Shinagawa, H. Kato, T., Ise, T., Makino, K. and Nakata, A. (1983) Cloning and characterization of the *umu* operon responsible for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*. Gene 23 : 167-174.
- 23) Kitagawa, Y., Akaboshi, E., Shinagawa, H., Horii, T., Ogawa, H. and Kato, T. (1985) Structural analysis of the *umu* operon required for inducible mutagenesis in *Escherichia coli* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82 : 4336-4340.
- 24) Perry, K. L., Elledge, S. J., Mitchell, B. B., Marsh, L. and Walker, G. C. (1985) *umuDC* and *mucAB* operons whose products are required for UV light-and chemical-induced mutagenesis : UmuD, and LexA proteins share homology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82 : 4331-4335.
- 25) Witkim, E. M. and Kogoma, T. (1984) Involvement of the activated form of RecA protein in SOS mutagenesis and stable DNA replication in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 : 7539-7543.
- 26) Ennis, D. G., Fisher, B., Edmiston, S. and Mount, D. (1985) Dual role for *Escherichia coli* RecA protein in SOS mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82 : 3325-3329.
- 27) Eguchi, Y., Ogawa, T. and Ogawa, H. (1988) Cleavage of  $\phi 80$  CI repressor by RecA protein. J. Mol. Biol. (in press).
- 28) Shinagawa, H., Iwasaki, H., Kato, T. and Nakata, A. (1988) RecA protein-dependent cleavage of UmuD protein and SOS mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 : 1806-1810.
- 29) Iwasaki, H., Shiba, T., Nakata, A. and Shinagawa, H. (1988) Activation of UmuD



- protein for SOS mutagenesis by proteolytic processing mediated by RecA\*. In UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology: Mechanisms and consequences of DNA damage processing. Eds. Friedberg, E. C. and Hanawalt, P. C. Alan R. Liss, Inc., New York. (in press).
- 30) Nohmi, T., Battista, J. R., Dodson, L. A. and Walker, G. C. (1988) RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: Mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 1816-1820.
- 31) Burckhardt, S. E., Woodgate, R., Scheuerman, R. H. and Echols, H. (1988) UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli*: Overproduction, purification, and cleavage by RecA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 1811-1815.
- 32) Little, J. W. (1984) Autodigestion of *lexA* and phage  $\lambda$  repressors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 1375-1379.
- 33) Kornberg, A. (1988) DNA replication. J. Biol. Chem. 263: 1-4.
- 34) Bridges, B. A., Mottershead, R. P. and Sedgwick, S. G. (1976) Mutagenic DNA repair in *Escherichia coli*. III. Requirement for a function of DNA polymerase III in ultraviolet-light mutagenesis. Mol. Gen. Genet. 144: 53-58.
- 35) Hagensee, M. E., Timme, T. E., Bryan, S. K. and Moses, R. E. (1987) DNA polymerase III of *Escherichia coli* is required for UV and ethyl methanesulfonate mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 4195-4199.
- 36) Lu, C., Scheuermann, R. H. and Echols, H. (1986) Capacity of RecA protein to bind preferentially to UV lesions and inhibit the editing ( $\epsilon$ ) of DNA polymerase III: A possible mechanism for SOS-induced targeted mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 619-623.
- 37) Witkin, E. M., Roegner-Maniscalco, V., Sweasy, J. B. and McCall, J. O. (1987) Recovery from ultraviolet light-induced inhibition of DNA synthesis requires *umuDC* gene products in *recA718* mutant strains but not in *recA+* strains of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 6805-6809.
- 38) Villani, G., Boiteux, S. and Radman, M. (1978) Mechanism of ultraviolet-induced mutagenesis: Extent and fidelity of *in vitro* DNA synthesis on irradiated template. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 3037-3041.
- 39) Bridges, B. A., and Woodgate, R. (1985) Mutagenic repair in *Escherichia coli*: products of the *recA* gene and of the *umuD* and *umuC* genes act at different steps in UV-induced mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 4193-4197.

環境変異原研究10: 63-71 (1988)

シンポジウム「突然変異の機構——環境変異原の見地から」

## アルキル化剤に対する適応応答と突然変異

九州大学医学部生化学教室 関口睦夫, 吉開友則, 高野京子,  
作見邦彦, 中村崇規, 穴井元昭,  
于成国, 中別府雄作

アルキル化剤は強力な突然変異誘起作用をもつが、細胞に対して致死効果を示し、動物に対しては発がん作用をもつことが知られている。このようなアルキル化剤の生物学的効果は主としてアルキル化剤によるDNAの修飾に基づくと考えられている。実際比較的単純なアルキル化剤であるメチルニトロソウレアで細胞を処理した場合、DNAに10種以上のアルキル化塩基やホスホトリエステルが生じることが明らかにされている。一方細胞はこのようなアルキル化塩基やホスホトリエステルからアルキル基を取り除いて修復する機構をもっており、特に微生物ではそのような修復系が比較的低濃度のアルキル化剤で誘導されることが明らかにされている。この機構は一般に適応応答とよばれるが、我々は大腸菌を用いてその機構を明らかにすべく研究を進めてきた。その結果大腸菌の適応応答において中心的な役割を演じているのは分子量39,000のAdaタンパク質であることが明らかになった。このタンパク質は分子内に2つのメチル基受容部位をもち、それぞれ異なる損傷の修復に与かるとともに、メチル化されたAdaタンパク質が*ada*遺伝子の転写を促進して、その結果適応応答全体の発現をコントロールする役割を果たしている。クロール化した*ada*遺伝子やその転写調節領域に人工変異を導入して解析した結果をもとに、適応応答の分子機構について述べたい。

### ada 遺伝子とメチルトランスフェラーゼ

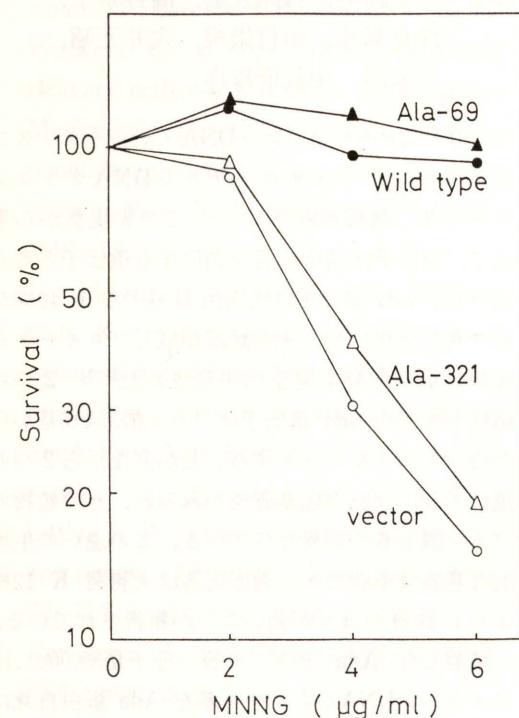
ada 変異株はアルキル化剤に特異的に高感受性

で、 $O^6$ -メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼと3-メチルアデニンDNAグリコシラーゼIIの誘導能を欠く<sup>1-3)</sup>。この表現型から考えて、遺伝子は適応応答を調節する遺伝子と考えられた。*ada*遺伝子は大腸菌B株及びK12株からクローン化され、その翻訳領域とプロモーター領域の塩基配列も完全に決定された<sup>4-7)</sup>。2つの菌株ともその*ada*遺伝子はアミノ酸354残基からなるタンパクをコードする。しかしながら2つの遺伝子間には25の塩基置換がみられ、その産物のアミノ酸も6つが異なっている。この違いの生理的な意義は不明だが、適応応答は大腸菌K12株よりもB株のほうが強いことが報告されている。

精製したAdaタンパク質(分子量39,000)はアルキル化DNAからメチル基をAda蛋白自身に転移する活性、すなわちメチルトランスフェラーゼ活性をもつ。Teoら<sup>8,9)</sup>はAdaタンパク質が2つのメチル基受容部位をもち、それぞれ $O^6$ -メチルグアニンおよびメチルホスホトリエステルからのメチル基を受けとることを示した。Adaタンパク質のカルボキシル末端に近い321番目のシステイン(Cys 321)が $O^6$ -メチルグアニンのメチル基を、一方アミノ末端近傍のシステイン(Cys 69)がアルキル化DNA中の2種のメチルホスホトリエステル立体異性体の1つからメチル基を受けとる。最近、高野ら<sup>10)</sup>はそれぞれのシステインに対応するコドンアラニンのコドンに置換した変異遺伝子を作成し、それからつくられる変異Adaタンパク質の活性を解析したが、その結果は上の考えを支持するものであった。またこ



れら2つの変異 *ada* 遺伝子をもつ大腸菌の N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG) による致死および突然変異誘起を調べたところ、0<sup>6</sup>-メチルグアニン（もしくは0<sup>4</sup>-メチルチミンも含む）が修復されなかった場合突然変異を誘起するだけでなく細胞死をも



果は、それ自身0<sup>6</sup>-メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼ活性をもつ Ada タンパク質が、Ada タンパク質そのものの合成および他の *ada* レギュロン (*ada* 遺伝子により支配される遺伝子群をさす) に属する遺伝子の発現に正の調節因子として働くことを示唆する。

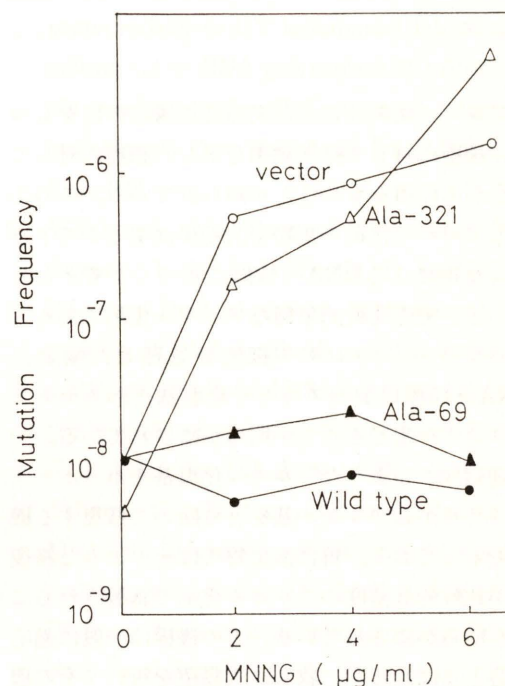


図1

たらずことが明確に示された (図1)。一方メチルホスホトリエステルの修復は細胞致死性および突然変異誘起とは直接関係がないことがわかった。

#### 適応応答と Ada タンパク質

トランスポゾンの挿入や部分欠失により *ada* 遺伝子を不活性化すると、大腸菌細胞はアルキル化剤による致死および突然変異誘起に対する適応応答を誘導できなくなる<sup>5,6,11</sup>。このような *ada*<sup>-</sup>細胞では *ada* 遺伝子産物のメチルトランスフェラーゼのみならず *alkA* 遺伝子産物の3-メチルアデニングリコシラーゼも誘導されない。この結

クロン化した *ada*<sup>+</sup>遺伝子をもつ多コピープラスミドを *ada*<sup>-</sup>株に導入すると、MNNGによる突然変異誘起は野生株のレベルまで抑制される。アルキル化剤を含まない培地中でも、DNAメチルトランスフェラーゼと3-メチルアデニンDNAグリコシラーゼのレベルは、*ada*<sup>+</sup>プラスミドをもつ *ada*<sup>-</sup>あるいは *ada*<sup>+</sup>細胞の方が有意に上昇している。つまり、Ada タンパク質が増産されるとアルキル化剤が存在しなくても *ada* および *alkA* 遺伝子の発現は効率よく誘導されると考えられる。しかしながら、これら2つの遺伝子が十分に発現するにはアルキル化剤の存在が必要と思

われる。

プライマー伸張によるcDNA合成や S1 スクレアーゼマッピングにより *ada* と *alkA* 遺伝子の転写開始点が決定された<sup>12</sup>。この実験から、メチル化剤で処理した細胞では多量の *ada* および *alkA* に由来するRNAが合成されるが、正常細胞ではこのようなRNAはほとんど合成されないことが明らかになった。以上の事実は、適応応答が翻訳レベルではなく転写のレベルで調節されることを示している。

#### Ada タンパク質による転写調節

これまでの研究から、*ada* 遺伝子や *alkA* 遺伝子の発現は Ada タンパク質それ自身によって転写レベルで調節されているという考えが強くなった。我々はこの適応応答の分子機構をさらに理解するために、*ada* および *alkA* プロモーターを含むDNA断片を鋳型として転写を行う試験管内転写系の再構成を行った<sup>12</sup>。図2は代表的な結果を示したものである。*ada* および *alkA* プロモーターはRNAポリメラーゼホロ酵素のみではほとんど転写されないが、Ada タンパク質を共存させると効率よく2つのプロモーターからの転写が活性化される。ところで Ada タンパク質はメチル化DNAからのメチル基をそれ身に転移する酵素活性を有するが、このようにしてメチル基を受容したメチル化 Ada タンパク質は、*ada* プロモーターからの転写を、メチル化されていない Ada タンパク質よりも数十倍強く活性化したのである。一方、*alkA* プロモーターからの転写は Ada タンパク質のメチル化の有無にかかわらず同程度であった。最近、Teo<sup>8)</sup> も同様の結果を報告しているが、彼らの場合 *alkA* プロモーターからの転写にも Ada タンパク質のメチル化が必要であった。彼らはさらに、Ada タンパク質の転写活性因子としての働きは、0<sup>6</sup>-メチルグアニンよりもメチルホスホトリエステルからのメチル基転移によって活性化されることを示している。高野<sup>10)</sup> の作成した0<sup>6</sup>-メチルグアニンからのメチル基は受容できないがメチルリン酸トリエステルのメチ

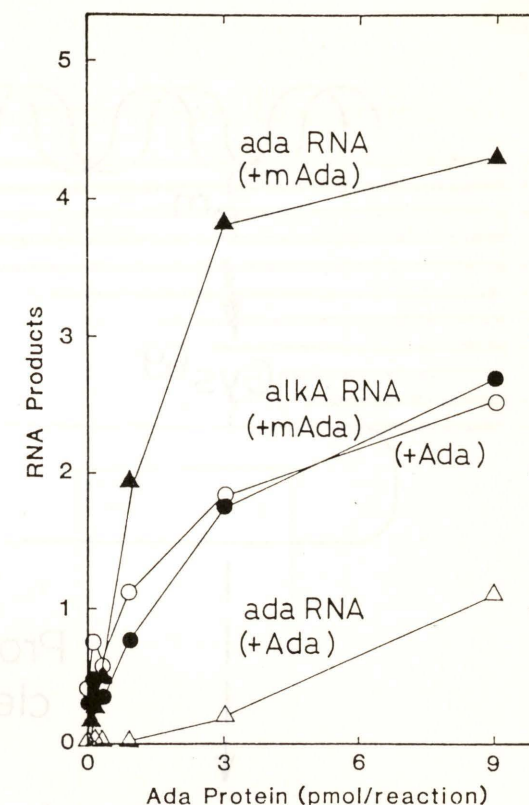


図2

ル基は受容できる変異 Ada タンパク質は、メチル化によって野生型の Ada タンパク質と同レベルまで活性化される。以上のことから、Ada タンパク質はメチルリン酸トリエステルからのメチル基を69番目のシステインに転移し、その結果転写因子として活性化されると結論できる (図3)。

さてメチル化DNA中のメチルホスホトリエステルからのメチル基をうけとり活性化された Ada タンパク質は *ada* プロモーターにどのように働くのであろうか。一つの可能性は Ada タンパク質がプロモーター領域内の特定の塩基配列を認識して結合し、それによってRNAポリメラーゼがプロモーターへ結合するのを助けるということが考えられる。事実 Teo<sup>8)</sup> は DNaseI フットプリンティングの実験から、メチル化 Ada タンパク質が *ada* プロモーターと *alkA* の両者に保存された領域に結合することを報告している。そこで上の可能性を確かめるために *ada* プロモ



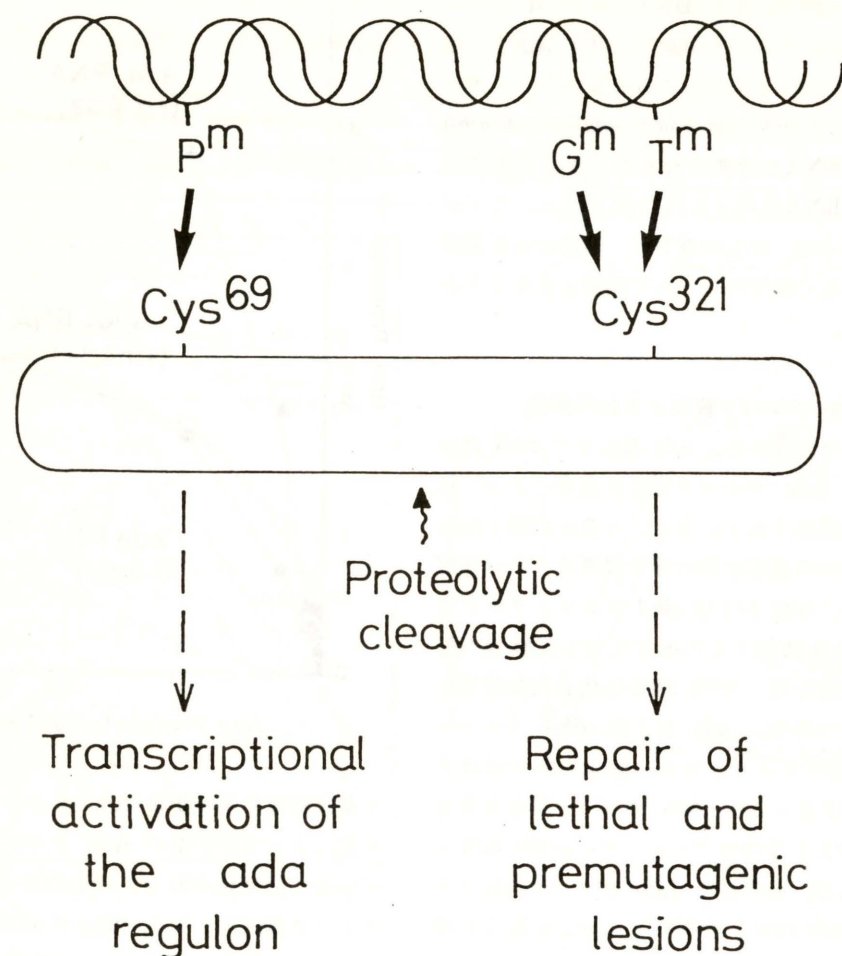


図3

ター内に人為的に変異を導入し、それによってメチル化 Ada タンパク質のプロモーターへの結合および *ada* 遺伝子の発現がいかに影響されるか調べた。この実験では *ada* プロモーターの下流に *lacZ* 遺伝子 ( $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子)をつなぎ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を測定することによって遺伝子の発現の程度を調べた。

図4はそのような実験の結果の一部を示したものである<sup>13)</sup>。この図の最上部には *ada* 遺伝子のプロモーターの塩基配列を転写開始点から約80塩基上流まで示してある。この領域内にRNAポリメ

ラーゼが結合する-35配列と-10配列が存在するが、それぞれの配列は共通配列から相当離れており、また両配列間の距離も20塩基あって(普通は17塩基)、非常に弱いプロモーターであるといえる。-35配列の上流には△と▲で示した配列が存在するが、このような配列は *alkA* 遺伝子のプロモーター領域にも存在しており、両者のいずれか、あるいは両方ともがこれらの遺伝子の発現の調節にかかわっている可能性が高い。そこで Bal 31ヌクレアーゼを作用させて *ada* 遺伝子のプロモーターの上流から削り、その下流に結合した *lacZ*

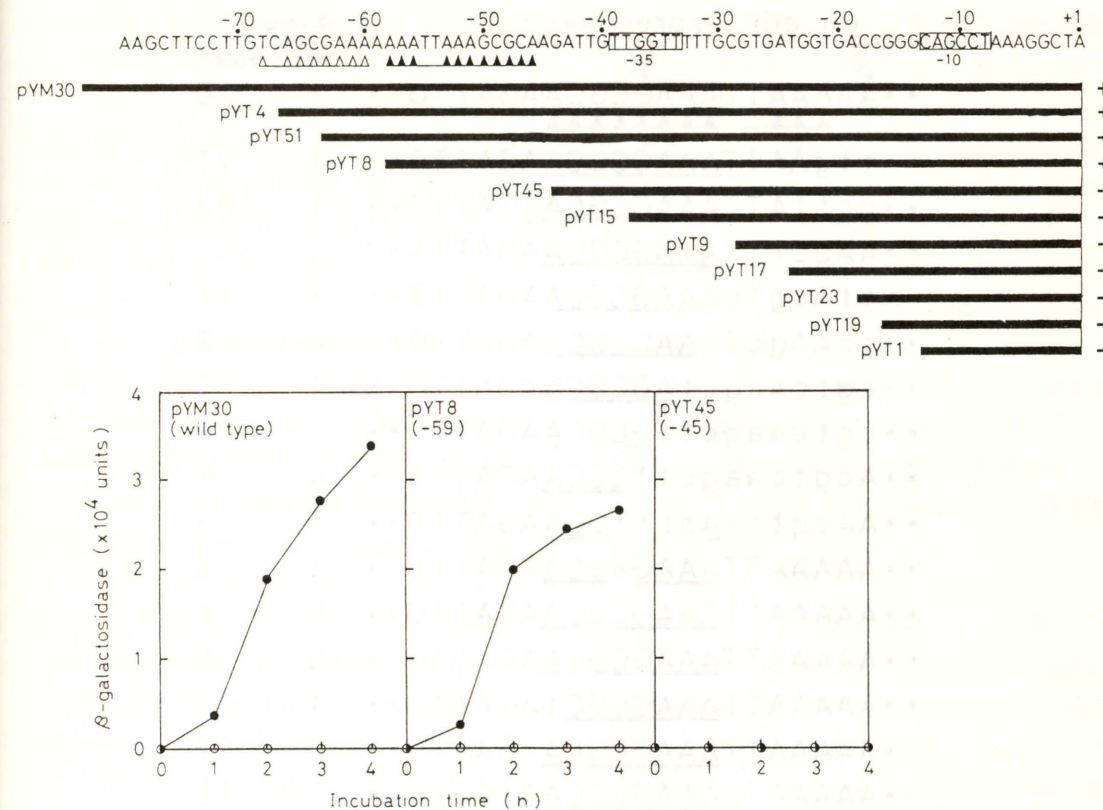


図4

遺伝子の発現の程度を調べた。その結果は図4に示す通りで、-59まで欠失したものでは野生型と同じくアルキル化剤処理によって $\beta$ -ガラクトシダーゼは誘導されるが、-45まで欠失したものでは誘導は全くおこらなかった。この結果は-46から-58の間に存在する共通配列(▲で示す)は調節的発現に必要であるが、それより上流に存在する配列(△で示す)は必ずしも必要でないことを示している。

そこで次に問題になるのは、-50付近に存在する配列のすべてが発現に必要なか、その一部だけでもよいかということである。その点を明らかにするため、その配列の上流から一塩基ずつ欠失したミュータントをつくり、それぞれのミュータント

での *lacZ* 遺伝子の発現を調べた。図5はその結果をまとめて示したものである。共通配列の8ヶの塩基よりなる配列 AAAGCGCA に変異が導入された時にアルキル化剤(MMS)による遺伝子発現の誘導はおこらなくなる。このことはこの8塩基の配列が *ada* 遺伝子の発現調節に必須の配列であることを示している。最近作見ら(未発表)はこのようなミュータント配列をもつプロモーターにはメチル化 Ada タンパク質が結合できず、その結果RNAポリメラーゼもプロモーターに結合できないことを示した。

#### 適応応答の分子機構

以上の知見に基づいて、我々は大腸菌のアルキ



# Effects of deletions and base substitutions on ada expression

|   | $\beta$ -gal |      |
|---|--------------|------|
|   | -MMS         | +MMS |
| $\begin{array}{c} -60 \qquad \qquad -50 \qquad \qquad -40 \\ \bullet \bullet \text{AAAAATTAAAGCGCAAGATTG} \bullet \bullet \\ \quad \quad \quad \blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle \end{array}$ | 1            | 100  |
| $\bullet \bullet \text{ttgAATTAAAGCGCAAGATTG} \bullet \bullet$  | 1            | 71   |
| $\bullet \bullet \text{gcttATTAAAGCGCAAGATTG} \bullet \bullet$  | 1            | 103  |
| $\bullet \bullet \text{AAgctTTAAAGCGCAAGATTG} \bullet \bullet$  | 1            | 37   |
| $\bullet \bullet \text{ttAcgTcAAAGCGCAAGATTG} \bullet \bullet$  | 1            | 65   |
| $\bullet \bullet \text{tcAAgcTtAAGCGCAAGATTG} \bullet \bullet$  | 4            | 2    |
| $\bullet \bullet \text{cgtcAagctAGCGCAAGATTG} \bullet \bullet$  | 1            | 7    |
| $\bullet \bullet \text{cgtcAagcttGCGCAAGATTG} \bullet \bullet$  | 1            | 4    |
| $\bullet \bullet \text{AcgtcaagcttCGCAAGATTG} \bullet \bullet$  | 4            | 4    |
| $\bullet \bullet \text{AAcgtcaAgcttGCAAGATTG} \bullet \bullet$  | 1            | 3    |
| $\bullet \bullet \text{AAAAATTAAAGaGCAAGATTG} \bullet \bullet$  | 1            | 5    |
| $\bullet \bullet \text{AAAAATTAAAGCcCAAGATTG} \bullet \bullet$  | 0            | 5    |
| $\bullet \bullet \text{AAAAATTAAAGCGgAAGATTG} \bullet \bullet$  | 0            | 0    |
| $\bullet \bullet \text{AAAAATTAAAGCGCtAGATTG} \bullet \bullet$  | 1            | 1    |
| $\bullet \bullet \text{AAAAATTAAAGCGCAcGATTG} \bullet \bullet$  | 0            | 22   |
| $\bullet \bullet \text{AAAAATTAAAGCGCAAtATTG} \bullet \bullet$  | 1            | 18   |
| $\bullet \bullet \text{AAAAATTAAAGCGCAAGtTTG} \bullet \bullet$  | 1            | 81   |
| $\bullet \bullet \text{AAAAATTAAAGCGCAAGaATG} \bullet \bullet$  | 1            | 93   |

図5

ル化剤に対する適応応答の分子機構について次のようなモデルを提出した。(1)正常の細胞では *ada* 遺伝子や *alkA* 遺伝子とはごく弱くしか発現されないで、細胞中には Ada タンパク質や AlkA タンパク質はごくわずかしか存在しない。(2)細胞がメチル化剤にさらされるとDNAがすみやかにメチル化され、Ada タンパク質はそのメチル基の一部を自らのシステイン残基へ転移する。(3)メチル化された Ada タンパク質は *ada* プロモーターに結合し、RNAポリメラーゼによる転写を促進する。(4)このようにしていったん Ada タンパク質が増産されると、Ada タンパク質はそのメチ

ル化の有無にかかわらず *alkA* 遺伝子のプロモーターからの転写を促進する。その結果、Ada タンパク質 ( $0^6$ -メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼ) や AlkA タンパク質 (3-メチルアデニンDNAグリコンラーゼII) が増産される。これらの酵素の働きにより、突然変異や細胞致死の原因となるDNA上の種々の傷が修復され、細胞はアルキル化剤に対し抵抗力を獲得することになる。

大腸菌がアルキル化剤に対して獲得した抵抗性は、アルキル化剤がなくなると2~3時間で消失する<sup>14)</sup>。これは細胞分裂によって Ada タンパク質

が希釈されるためか、あるいは Ada タンパク質が失活するためにおこると考えられる。Ada タンパク質は大腸菌のプロテアーゼによって特異的に分解されることが知られており<sup>7,8)</sup>、おそらくこのプロテアーゼが適応応答の消失に関与しているのだろう。Ada タンパク質を特異的に分解するプロテアーゼはかなり精製も進んでおり、種々の生化学性質も明らかにされている(吉開ら、未発表)。

## 枯草菌における適応応答

同じような適応応答は枯草菌でもみつかっている。大腸菌の場合と同じく、低濃度の MNNG や MMS の存在下で増殖した枯草菌は、高濃度のアルキル化剤による突然変異誘起や致死作用に抵抗性を獲得し、またこのように適応した細胞では  $0^6$ -メチルグアニンメチルトランスフェラーゼの活性が増加している。諸星ら<sup>15)</sup> は MNNG に対する適応応答能を欠く変異株を分離しているが、これらの変異株は2つのグループに大別できる。1つのグループは応答能を完全に欠いており、もう一つのグループは単に  $0^6$ -メチルグアニンメチルトランスフェラーゼを誘導できないだけである。最初のグループ (*ada*-1 グループ) は大腸菌の *ada* 変異株に相当するが、第2のグループ (*ada*-4 グループ) に相当するものは大腸菌ではみつかっていない。

枯草菌では、メチル化DNAからメチル基を受けとるタンパク質は3種類存在する<sup>16)</sup>。分子量20kdのタンパク質は *ada*+株のみならず *ada*-株にも構成的に存在し、 $0^6$ -メチルグアニンからのメチル基を受容する。もう1つのメチルトランスフェラーゼ (分子量22kd) は *ada*+株を適応処理した時に誘導されるが、*ada*-株では両グループとも誘導されない。分子量27kdのメチル基受容タンパク質は、メチル化した仔牛胸線DNAよりメチル化したポリd(T)からメチル基をよりよく受容することから、メチルホスホトリエステルDNAメチルトランスフェラーゼに相当すると思われる。このタンパク質は *ada*-4 グ

ループの変異株では適応時に誘導されるが、*ada*-1 グループの変異株では誘導されない。このような結果は27kdのタンパク質が大腸菌の Ada タンパク質同様転写調節因子として働くことを示唆している。

最近これらの遺伝子のうち構成的に存在する酵素の遺伝子がクローニングされた<sup>17, 18)</sup>。塩基配列を調べたところこの酵素は165のアミノ酸からなり、Ada タンパク質のC末端側の配列と共通するところが多いことがわかった(児玉ら、未発表)。一方最近大腸菌からも構成的に存在するメチルトランスフェラーゼの遺伝子がクローニングされ、その塩基配列が明らかにされた<sup>19)</sup>。そのアミノ酸配列は枯草菌の構成的な酵素と類似性が高く、これらの酵素の起原、生理的機能に関して興味深い問題をなげかけている。

## おわりに

以上 Ada タンパク質の役割を中心に適応応答の調節機構を論じてきたが、環境の変化に対応した遺伝子発現として適応応答をとらえると、この系は誘導のシグナルからその伝達および転写装置の活性化、そして誘導された酵素群の生理作用まで全体像が分子レベルで解明された数少ない例といえよう。特にタンパク質の不可逆的なメチル化を介したシグナルの伝達および Ada タンパク質の活性化機構は今後の興味深い課題である。

なおこの問題に関して最近いくつかの綜説がでていたので、興味のある方はそれらを参照していただきたい<sup>20-22)</sup>。

## 参考文献

- 1) Evensen, G., Seeberg, E.: Adaptation to alkylation resistance involves the induction of a DNA glycosylases, *Nature*, 296: 773-775 (1982).
- 2) Jaggo, P.: Isolation and characterization of *E. coli* K-12 mutants unable to induce the adaptive response to simple alkylating agents, *J. Bacteriol.*, 139: 783-791 (1979).



- 3) Mitra, S., Pal, B.C., Foote, R.S.:  $O^6$ -methylguanine - DNA methyltransferase in wild type and *ada* mutants of *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 152 : 534 - 537 (1982).
- 4) Demple, B., Sedgwick, B., Robins, P., Totty, N., Waterfield, M. D., Lindahl, T. : Active site and complete sequence of the suicidal methyltransferase that counters alkylation mutagenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82 : 2688 - 2692 (1985).
- 5) Lemott, P.K., Walker, G. C. : Induction and autoregulation of *ada*, a positively acting element regulating the response of *E. coli* K-12 to methylating agents, J. Bacteriol., 161 : 888 - 895 (1985).
- 6) Margison, G. P., Cooper, D. P., Brennand, J. : Cloning of the *E. coli*  $O^6$ -methylguanine and methylphosphotriester methyltransferase gene using a functional DNA repair assay, Nucleic Acids Res., 13:1939-1952 (1985).
- 7) Nakabeppu, Y., Kondo, H., Kawabata, S., Iwanaga, S., Sekiguchi, M. : Purification and structure of the intact Ada regulatory protein of *E. coli* K12,  $O^6$ -methylguanine - DNA methyltransferase, J. Biol. Chem., 260 : 7281 - 7288 (1985).
- 8) Teo, I., Sedgwick, B., Kilpatrick, M. W., McCarthy, T. V., Lindahl, T. : The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*, Cell, 45 : 315 - 324 (1986).
- 9) Sedgwick, B., Robins, P., Totty, N., Lindahl, T. : Functional domains and methyl acceptor sites of the *Escherichia coli* Ada protein : J. Biol. Chem., 263:4430-4433 (1988)
- 10) Takano, K., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M. : Functional sites of Ada regulatory protein of *Escherichia coli* : Analysis by amino acid substitutions, J. Mol. Biol., 201 : 261-271 (1988).
- 11) Kataoka, H., Sekiguchi, M. : Molecular cloning and characterization of the *alkB* gene of *E. coli*, Molec. Gen. Genet., 198 : 263 - 269 (1985).
- 12) Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M. : Regulatory mechanisms for induction of synthesis of repair enzymes in response to alkylating agents : Ada protein acts as a transcriptional regulator. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 83 : 6297 - 6301 (1986).
- 13) Nakamura, T., Tokumoto, Y., Sakumi, K., Koike, G., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M. : Expression of the *ada* gene of *Escherichia coli* in response to alkylating agents : Identification of transcriptional regulatory elements, J. Mol. Biol., 202 : 483 - 494 (1988).
- 14) Samson, L., Cairns, J. : A new pathway for DNA repair in *E. coli*, Nature, 267 : 281 - 282 (1977).
- 15) Morohoshi, F., Munakata, N. : Two classes of *Bacillus subtilis* mutants deficient in the adaptive response to simple alkylating agents, Mol. Gen. Genet., 202 : 200 - 206 (1986).
- 16) Morohoshi, F., Manakata, N. : Multiple species of *Bacillus subtilis* DNA alkyltransferase involves in the adaptive response to simple alkylating agents, J. Bacteriol., 169 : 587 - 592 (1987).
- 17) 諸星文子, 宗像信生, 林健志 : 枯草菌の構成的DNAメチルトランスフェラーゼを支配する遺伝子のクローニング, 第10回日本分子生物学会年会, 京都, 1987年12月.
- 18) 児玉顕一, 中別府雄作, 関口睦夫 : 大腸菌DNA修復酵素欠損株を用いた異種生物DNA修復酵素遺伝子のクローニング, 第10回日本分子生物学会年会, 京都, 1987年12月.
- 19) Potter, P. M., Wilkinson, M. C., Fitton, J., Carr, F. J., Brennand, J., Cooper, D. P., Margison, G. P. : Characterization and nucleotide sequence of *ogt*, the  $O^6$ -alkylguanine - DNA - alkyltransferase gene of *E. coli*, Nucleic Acids Res., 15 : 9177 - 9193 (1987).
- 20) Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y. : Adaptive response : induced synthesis of DNA repair enzymes by alkylating agents, Trends in Genetics, 3 : 51 - 54 (1987).
- 21) Lindahl, T., Sedgwick, B., Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y. : Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents, Ann. Rev. Biochem., 57 : 133 - 157 (1988).
- 22) 高野京子, 関口睦夫 : 蛋白質工学による多機能蛋白の研究——転写調節とDNA修復を行う Ada 蛋白の解析, 実験医学, 6 : 518-522 (1988).



## 酸素ラジカルによるDNA損傷と突然変異

国立がんセンター研・生物 葛西 宏

はじめに

がんを予防するためには環境中の変異原の正体を明らかにしそれらを除去することが必要である。その目的を達成するための1つの有効な方法はAmes試験を手掛かりに変異原を分離し、同定することであろう。実際にこの手法により加熱食品から強力なフレームシフト型変異原であるIQ, MeIQ, MeIQxなどが発見されている<sup>1)</sup>。しかしこの方法であらゆるタイプの環境変異原が高感度に検出されるとは限らない。様々な異った手法を用いて環境変異原を見出す努力が必要である。

我々は変異原の作用機作がDNA塩基に対する化学反応である事に着目し、そのDNA損傷反応を手掛かりに変異原の検索を試みた。加熱して焦がした糖やデンプンによるDNA損傷を調べたところ、8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)という新しいタイプの塩基修飾が起っていることを見出した<sup>2)</sup>。その後の研究からこの修飾反応は酸素ラジカルにより引き起こされていることがわかった<sup>3)</sup>。この発見がきっかけで我々は酸素ラジカルによるDNA損傷と突然変異に関して興味を持つようになった。

環境中には酸素ラジカルを発生する一群の化合物が存在する。これらの変異原性は一般に弱い、種類が多く、また量的にも多い。酸素ラジカルが突然変異を起こし、また発がん性を示すことは放射線の例から明らかであるが、環境変異原としての酸素ラジカルの研究はまだ歴史も新しく、Amesがその重要性を指摘してから初めて注目されるようになった<sup>4)</sup>。

今回、環境変異原学会第10回大会シンポジウムで発表した「酸素ラジカルによるDNA損傷と突

然変異」について論文として書く機会が与えられたので我々の8-OH-dGの結果も含めて今までにわかっている事実を中心に整理してみた。これらのほとんどが放射線を用いた研究結果であるが、環境中の酸素ラジカル発生物質を研究する上でも大いに参考になると思われる。

### 酸素ラジカルによるDNA損傷とその修復

酸素ラジカルによるDNA損傷は鎖切断と塩基損傷に分けられる。さらに鎖切断は1本鎖切断と2本鎖切断とに分けられる。切断様式には5'末端にOHが残る切れ方と3'末端にOHが残る切れ方の2通りがある。後者の方が多く生成する<sup>5)</sup>。1本鎖切断は比較的容易に修復されるが2本鎖切断は遺伝子の欠損(deletion)や転座(translocation)などの原因になると考えられる。

DNAの塩基損傷については特にチミンに関する研究が多く放射線の照射により30以上もの産物が生成することが知られている<sup>6)</sup>。それらの多くが5,6位の二重結合が還元型となり平面性を失ったものである。その一部を図1に示す<sup>7)</sup>。これらの有機化学的研究は放射線による突然変異や発がんのメカニズムを考える上で出発点となる重要な研究であるが、これまでに放射線照射後に細胞内DNA中に明確に検出されていて論文によく見られるのはチミングリコール(TG)<sup>8)</sup>、および5-ヒドロキシメチルウラシル(HMU)<sup>9)</sup>の2つのみである。これら以外にもTGがさらに分解して生じる尿素やプリンイミダゾール環が開いたホルムアミドピリミジン(FAPyr)誘導体<sup>10)</sup>(図2)などもそれらに対する修復酵素が存在することから<sup>11)</sup> *in vivo*でも生じていると思われる。また



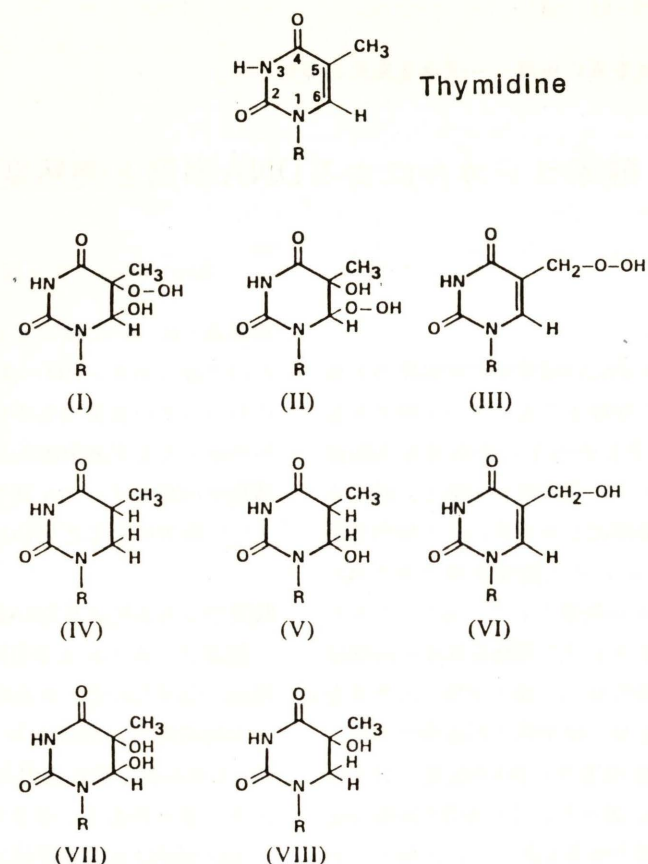


図1：酸素ラジカルによるチミンの損傷

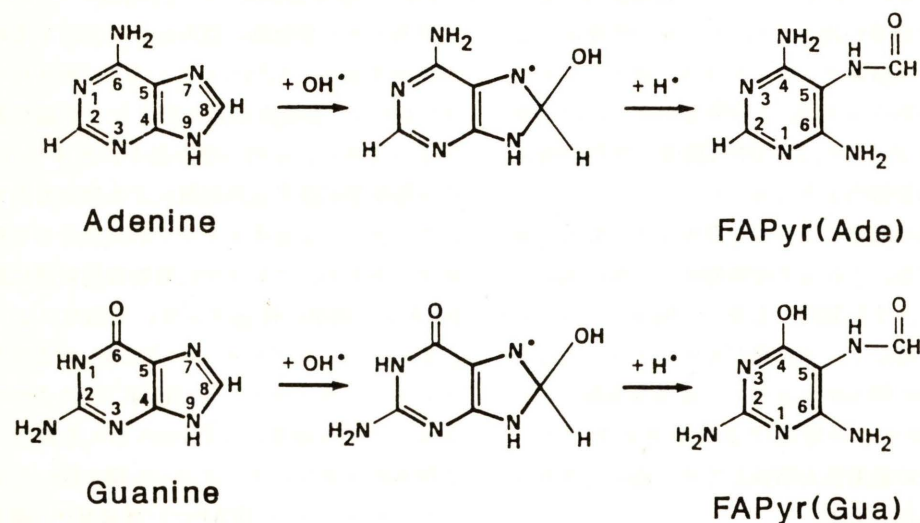


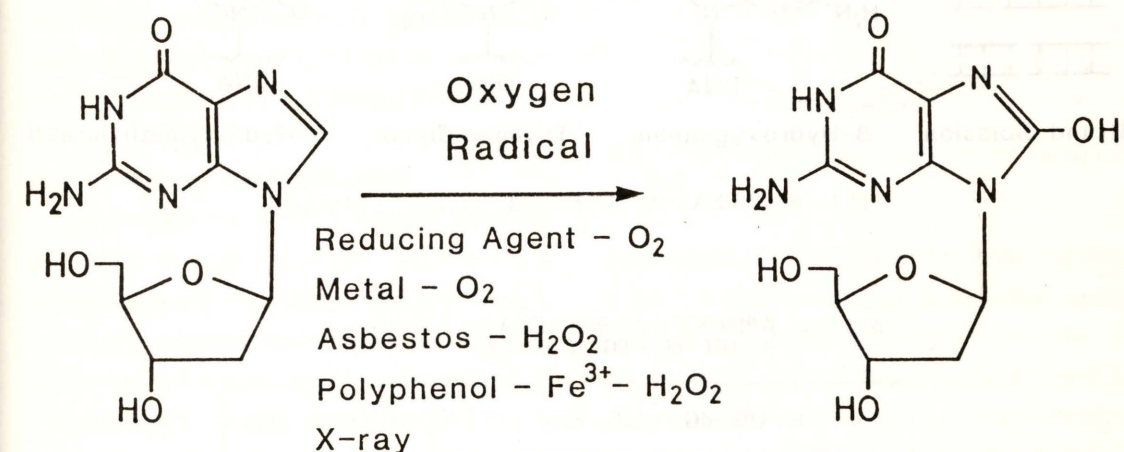
図2：酸素ラジカルによるプリン損傷：FAPyrの生成

DNAに放射線を照射するとAP部位 (apurinic, apyrimidic site) を生じる<sup>12)</sup>。これには $\cdot\text{OH}$ が直接グリコシド結合に作用する場合と、塩基部分の修飾 (特にチミンの5, 6-ジヒドロ型) の結果としてグリコシル結合が弱くなり、塩基がはずれる場合とがある。

次に我々の見出した8-OH-dGについて述べたい。8-OH-dGはX線<sup>13)</sup>や $\gamma$ 線<sup>14)</sup>などの放射線の他、アスベスト+ $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>15)</sup>、ポリフェノール

の場合はFenton タイプのHaber-Weiss 反応により生じる $\cdot\text{OH}$ が8-OH-dGの生成に関与していると考えられる。8-OH-dGは*in vivo*でも検出されている。例えばマウスに放射線を照射した場合に肝臓内DNA中に8-OH-dGが生成する<sup>20)</sup>。またサルモネラ菌に対し $\text{H}_2\text{O}_2$ 処理を行うとDNA中に8-OH-dGが生成する<sup>20)</sup>。

酸素ラジカルにより細胞内で生じる様々なDNA損傷 (図4) は、それぞれどの位の比率で



## Deoxyguanosine

## 8-Hydroxy-deoxyguanosine

図3：酸素ラジカルによる8-OH-dGの生成

+ $\text{Fe}^{3+}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>16)</sup>などの酸素ラジカル発生因子によりDNA中に生じる (図3)。またタバコの煙成分<sup>17)</sup>や噛みタバコの成分<sup>18)</sup>でも生じる。我々はデオキシアノシンからの8-OH-dGの生成を検出する簡単なassay 法により加熱デンプン中の酸素ラジカル発生物質を分離、精製し、それらがメチルレダクチン酸およびヒドロキシメチルレダクチン酸であることを明らかにした<sup>19)</sup>。これらの化合物は変異原性 (サルモネラ菌) またはSCE活性 (ヒトNL-3細胞) を示した。放射線によるDNA中の8-OH-dGの生成はエタノールの添加により抑えられること、またメチルレダクチン酸による8-OH-dGの生成はカタラーゼ、SOD、マニトール、EDTAにより抑えられることから、前者の場合には水から生じた $\cdot\text{OH}$ が、また後者

生成しているのであろうか。それぞれの損傷に対する検出法がまちまちで、しかも実験法がかなり厄介であるために、全体を比較した論文はほとんど見当たらない。DNA鎖切断はショ糖密度勾配遠心分離、アルカリ溶出法、アガロースゲル電気泳動などにより定量され、チミングリコールはアセトール断片に分解して定量する方法やモノクロナル抗体法が用いられる。またHMUはHPLCで分離し、UV検出器で測定している。我々の見出した8-OH-dGはHPLCで分離した後、電気化学 (EC) 検出器により極めて高感度に、また特異的に検出される<sup>21)</sup>。一つの試みとして放射線による細胞内DNA中の8-OH-dGの生成に関する我々のデータとLeadon とHanawalt<sup>8)</sup>によるTGのデータを比較してみたところ (表1)、両



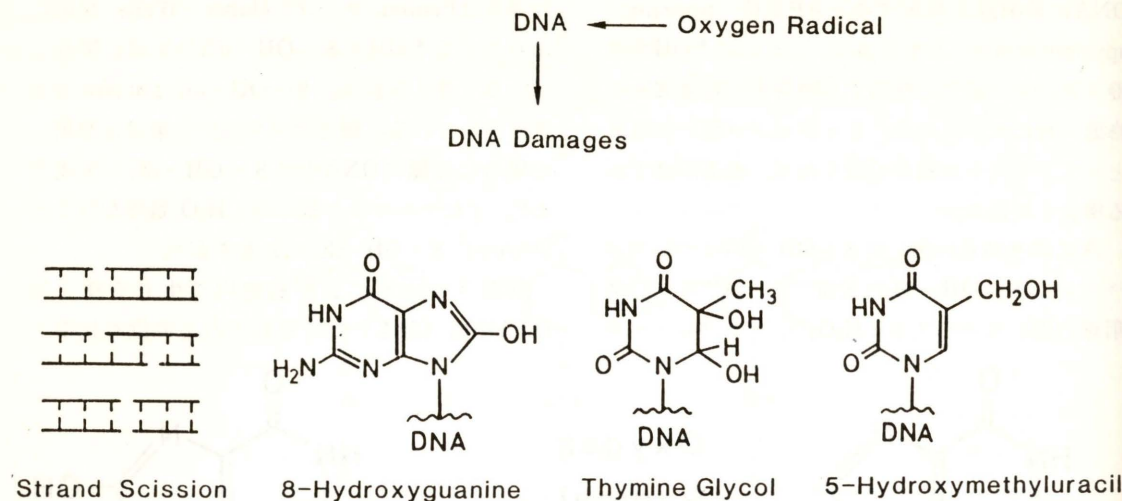


図4：細胞内DNAに見いだされた酸素ラジカルによるDNA損傷

表-1, 放射線照射により細胞内DNA中に生成する8-OH-dGとTGの収量の比較

| 8-OH-dG/10 <sup>7</sup> dG/Krad |                            |                           | TG/10 <sup>7</sup> T/Krad   |
|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Mouse Liver<br>0.13 Krad/min    | Mouse Liver<br>14 Krad/min | HeLa Cell<br>0.4 Krad/min | BS-C-1 Cell<br>1.5 Krad/min |
| 0.8                             | 3.2                        | 2.0                       | 3.4                         |

者の生成量に極端な差が無いことがわかった。8-OH-dGは上記検出法の中で最も容易に、また高感度に検出できるので、細胞内DNAが酸素ラジカルによりどの程度損傷を受けているかを知るための良いマーカーになると思われる。

さて酸素ラジカルにより細胞内DNAにこれらの塩基損傷が起った場合どのような機構で修復されるのだろうか。最も重要なのは、グリコシラーゼと呼ばれる酵素によりグリコシル結合を切断することにより修飾塩基をDNAから除去する機構である。上記のTG, 尿素, HMU, FAPyr(Ade)などはこのメカニズムにより除去、修復される<sup>11)</sup>。大腸菌および哺乳動物細胞において、TGグリコシラーゼ、尿素グリコシラーゼおよびAPエンドヌクレアーゼなどが精製されたがこれらは後に同

一の酵素であることがわかった。すなわちTGおよび尿素に関してグリコシラーゼの特異性はみられず、またAPエンドヌクレアーゼ活性はグリコシラーゼに付随したものであることがわかった。この結果生じるAP部位はさらにエンドヌクレアーゼによりその3'側でまず切れ目が入り、引き続き5'側でも切断が起こり、次いでDNAポリメラーゼによりギャップが埋められ、最終的にはDNAリガーゼによる鎖結合により修復は完結すると考えられる。

HMUグリコシラーゼは哺乳動物細胞から精製されているが、TGグリコシラーゼとは異った酵素であり、またAPエンドヌクレアーゼ活性をもたない<sup>22)</sup>。グリコシラーゼにより遊離したTG<sup>23)</sup>が正常のヒトおよびラットの尿中に見いだされてい

ることから、これらの機構がヒトやラットで実際に存在すること、また酸素ラジカルが細胞内でDNA損傷を起していることがわかる。

FAPyrはグリコシラーゼ以外にプリン-イミダゾール環(PurIR)シクラーゼにより修復される<sup>24)</sup>。すなわち開いたイミダゾール環を閉じるという最も簡単な機構により修復される。PurIRシクラーゼは大腸菌から精製されている。

8-OH-dGの修復については、マウスに放射線を照射後、肝DNA中に生じた8-OH-dGが時間の経過と共に減少することがわかっているだけで詳細な修復メカニズムは不明である<sup>13)</sup>。

#### 酸素ラジカルによる突然変異の機構

これまで酸素ラジカルにより生成するDNA損傷と修復について述べてきたが、これらのうちどれが突然変異や発がんに関連して重要なのであろうか。個々のDNA損傷が突然変異に及ぼす影響についてはあまりわかっていないのが実情である。それは放射線などの酸素ラジカル発生因子により様々な損傷が同時に起こるため個々の影響をみるのは難しいからである。

Amesらは酸素ラジカルを高感度に検出するサルモネラ菌の変異株TA102を開発した<sup>25)</sup>。この株はヒスチジン遺伝子の1ヶ所(*hisG428*)がC→Tに変化したために終止コドン(ochre)となりヒスチジンが合成されないようなプラスミドpAQ1を30コピーもっている(図5)。従ってT→Cの変化により野生型に戻ればヒスチジンが合成されるようになる。そこで酸素ラジカルはAT塩基対のところで損傷を起し、それが原因で突然変異が起こると考えられた。DNA塩基の中ではチミンの損傷が化学的に多く研究されていたこともあって、チミンの損傷(例えばチミングリコール)が突然変異を起こす主要要因であると考えられた。その後Amesらにより自然誘発変異株のDNAの解析から*hisG428*の突然変異のメカニズムが研究され、7種のタイプに分類されることがわかった<sup>26)</sup>。すなわちAT塩基対における突然変異3種[TAA(ochre)→CAA(Gln),

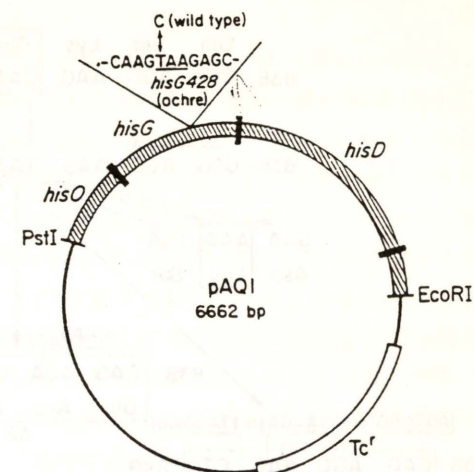


図5：サルモネラ菌TA102中のプラスミドpAQ1の構造

TAA→AAA(Lys), TAA→TTA(Leu)] および3ないし6塩基対のdeletionによりochre codonを取り除くような突然変異4種(△1~△4)が見いだされた(図6)。酸素ラジカルを発生することが知られているブレオマイシンおよびX線によりTA102に引き起こされる突然変異の大半が(それぞれ76%および50%)この小さなdeletionによるものであることがわかった。またこれら以外にかなりの頻度でヒスチジン遺伝子とは全く関係ないochre サプレッサーによる機構も見いだされた。以上の結果から酸素ラジカルによるTA102の突然変異の機構としてAT塩基対への損傷以外にDNA鎖切断が主要な原因となっていることが示された。しかしこれらの結果は必ずしもGC塩基対における突然変異の可能性を否定するものではない。

1つの系だけを見ていると本質的機構を見誤ることもあるので、もう少し他の例に目を向けて全般的に酸素ラジカル(特に放射線)による突然変異を眺めてみよう。

まず大腸菌にγ線を照射した時の*lacI*遺伝子のamber突然変異のタイプは表2に示したように分類されGC塩基対における突然変異がかなりの比率になる<sup>27)</sup>。これは注目した遺伝子の中に突然変異を起こし得るGCおよびAT塩基対の数



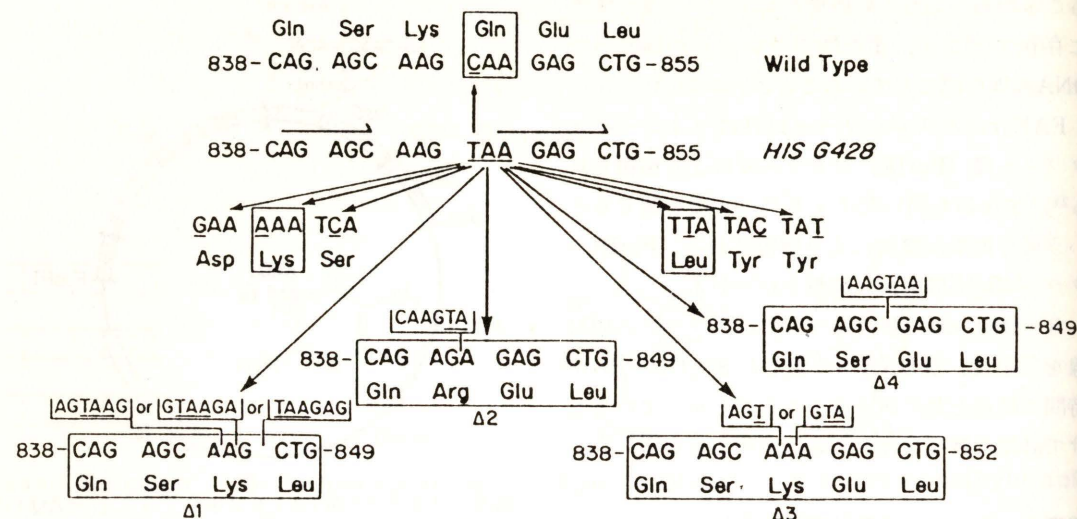


図6: *hisG* 428の突然変異のメカニズム

(available site) がどの位存在するかにもよるが明らかにGC塩基対のところが高頻度に突然変異を起こしている。

またアカパンカビにX線を照射して得られた変異株に種々の試薬によりreversionを起こさせ突然変異のタイプを調べたところ、GCおよびAT塩基対の両方で突然変異を起こしていることがわかった(表3)<sup>28)</sup>。

一方、哺乳動物細胞を用いた例について述べると、CHO細胞の変異株D422にγ線を照射して生じるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの変異株(SPRT-)のうち、Southern法により検出される大きなDNA断片(>50bp)の欠

表2, γ線(30Krad)照射後に見いだされた大腸菌の *lac I* 遺伝子におけるamber突然変異<sup>27)</sup>

| Type of Mutation | Sites Available | No. of Mutants |
|------------------|-----------------|----------------|
| GC→AT            | 14              | 75             |
| GC→TA            | 10              | 35             |
| AT→TA            | 5               | 8              |
| AT→CG            | 4               | 13             |
| GC→CG            | 3               | 4              |
|                  |                 | 135            |

失および転座によるものが全体の16%, 点突然変異が84%であった<sup>29)</sup>。点突然変異を起こした株16ヶについてその内訳を調べると表4のようになりこの系でもGCおよびATの両方で突然変異が起っていることがわかった<sup>30)</sup>。

またγ線照射により発生したマウス腫瘍のK-rasおよびN-ras発がん遺伝子ではコドン12にGC→ATの突然変異が起っている<sup>31)</sup>。

以上述べた様に色々な系を用いて放射線による突然変異のタイプが解析されているが結果は様々である。大きなDNA断片の欠失、挿入、転座(>50bp), 小さな欠失(<50bp), フレームシフト、塩基置換ではGCおよびATにおけるtransi-

表3, X線照射によりアカパンカビに誘導された突然変異<sup>28)</sup>

| Type of Mutation | No. of Mutants |
|------------------|----------------|
| GC→AT            | 10             |
| AT→GC            | 32             |
| +/-              | 38             |
| SP               | 15             |
| NON              | 6              |
|                  | 101            |

+/- : insertion or deletion  
SP : spontaneous reversion  
NON: nonreversible

tion およびtransversion などである。すなわち突然変異のタイプには際立った特徴が見られない。AmesのTA102においても酸素ラジカル発生因子による突然変異の頻度が高いのはpAQ1プラスミドのコピー数が多いため(30コピー)DNA損傷のターゲットが多くなったことが大きな要因となっており、必ずしもATの損傷がGCの損傷より重要であるという結論にはならない。

さて個々のDNA塩基損傷と突然変異との関係についての研究も全く無いわけではない。例えばHMUに目を向けてみよう。この修飾塩基は*B. subtilis* フェージSP01のDNA中にチミンの代りに存在しているが、この修飾によりDNA合成中に読み誤りは認められないのでHMUは突然変異を起こさないと考えられた。しかし最近5-ヒドロキシメチルデオキシウリジン(dHMU)をサルモネラ菌の培地中に加えるとdHMUがDNA中に取り込まれ突然変異を起こす事が示された<sup>32)</sup>(図7)。また哺乳動物細胞がHMUに対する修復酵素を持つことも、DNA中のHMUが細胞にとって有害であることを示している。

TGに関しては、KMnO<sub>4</sub>処理によりDNA上に特異的につくることができるが、TGを含むDNAをテンプレートにして大腸菌DNAポリメラーゼ(Klenowフラグメント)によりDNA合成させる

表4, CHO D422細胞のγ線照射により誘導された点突然変異<sup>30)</sup>

| Type of Mutation | No. of Mutants |
|------------------|----------------|
| Small Deletion   | 5              |
| Transition       |                |
| GC→AT            | 3              |
| AT→GC            | 4              |
| Transversion     |                |
| TA→GC            | 3              |
| AT→TA            | 2              |
| CG→GC            | 1              |
| GC→CG            | 1              |
|                  | 16             |

とTGのところでchain terminationを起こしたためこの系ではTGによる塩基の読み間違いは証明

できなかった<sup>33)</sup>。

我々の見いだした8-OH-dGについては、in vitroでDNA合成中に塩基の読み間違いを起こすことが示されている。すなわち8-OH-dGを特定の位置に含むオリゴデオキシヌクレオチドを化学合成し、それをテンプレートにしてKlenowフラグメントによりジデオキシヌクレオチドの存在下でDNA合成させると8-OH-dGの位置およびその前後で高頻度の読み間違いを起こした<sup>34)</sup>(図8)このことは8-OH-dGが突然変異を起こす可能性をもつDNA損傷の1つであることを示唆している。

またAP部位はSOSを誘導した大腸菌において様々なタイプの突然変異を起こす<sup>35)</sup>。テンプレートDNAのAP部位に対応して合成DNAではアデニンが最も入りやすいことがわかっている。従って酸素ラジカルにより生成した修飾チミンの遊離により生じたAP部位は突然変異を起こしにくいことになる。

この様に酸素ラジカルによる個々の損傷と突然変異とを関連づけるデータはあまり多くないのが現状である。従って8-OH-dGによる読み間違いに関する我々の結果は貴重なものと言えよう。

おわりに

Mullerは1927年に放射線が突然変異の頻度を高める事を見いだした<sup>36)</sup>。突然変異を起こす環境因子として最初に確認されたのがこの放射線である。この発見は酸素ラジカルによる突然変異に関する研究の原点でもある。そして本稿で述べたように酸素ラジカルによるDNA損傷と突然変異に関するこれまでの研究のほとんどが放射線を用いて行われてきた。

私達はDNA損傷反応を手掛りに環境変異原の検索をしようと思い、まず手始めに加熱した糖について実験を行ったところ、その最初の実験でグアニンのC-8位水酸化反応を見いだした<sup>2)</sup>。この実験による8-OH-dGの発見には2つの意味がある。第1に8-OH-dGが酸素ラジカルによりできる新しいタイプのDNA損傷であったとい



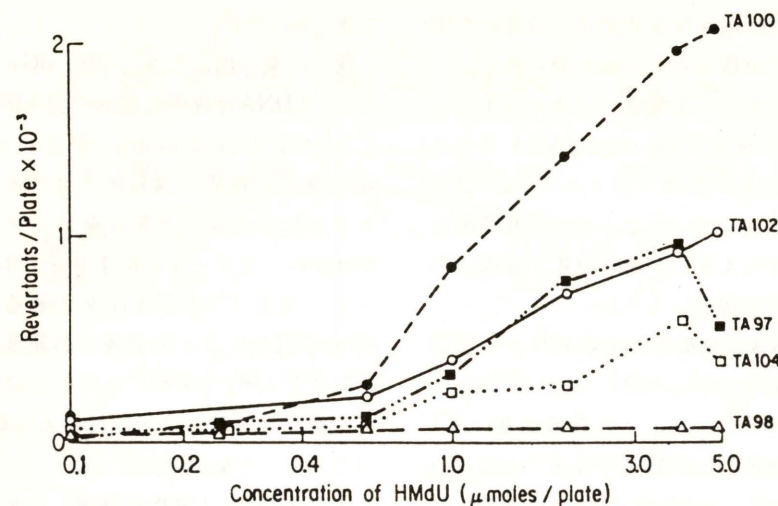


図7 : dHMUの変異原性

うこと。第2にDNA損傷を引き起こす環境因子として酸素ラジカルは重要なものの1つであろうということである。この第2の意義は「環境中の酸素ラジカル発生因子およびその阻害物質がヒト発がんを考える上で重要である」というAmesらの仮説<sup>4)</sup>と一致する。

酸素ラジカルは環境因子による生成のみならず細胞内で酸素の代謝により生成することも考え合わせると酸素ラジカルによるDNA損傷は老化や自然発がんとも関係するかも知れない。また発がんプロモーター処理により白血球やマクロファージから酸素ラジカルが発生しTG<sup>37)</sup>, HMU<sup>38)</sup>, 8-OH-dG<sup>21)</sup>などのDNA損傷が起こることも知られている。

酸素ラジカルによる突然変異の機構に関しては、これまでチミンの損傷について多く研究されていたことやAmesの株TA102においてA・T塩基対における突然変異が示されたことなどから、(酸素ラジカル→チミンの損傷→突然変異)の図式がしばしば書かれるようになった。しかし先入感なく過去の文献に目を通してみるとその図式が必ずしも適切でないことがわかった。そして我々の研究結果はDNA中のチミンの損傷だけではなく8-OH-dGのようなグアニンの損傷も突然変異や発がんに関っている可能性を示唆した。

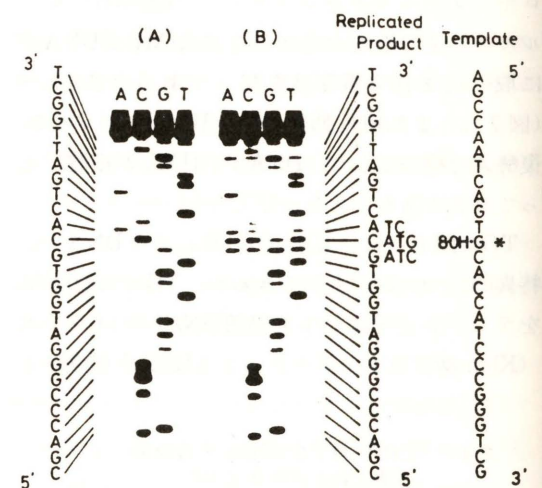


図8 : DNA中の8-OH-dGによる塩基の読み間違い  
(A)コントロールDNA, (B)8-OH-dGを含むDNA

酸素ラジカルによる突然変異の機構はこれまで述べた通りまだ明らかになっていない。今後の研究課題としてまず第1にさらに詳細なDNA損傷に関する化学的研究が必要であろう。我々のDNA損傷検索の最初の実験で8-OH-dGという新しいタイプのものが見つかったことから、酸素ラジカルによるDNA損傷については今後さらに多数見つかる可能性が考えられる。放射線によるDNA塩基損傷に関する化学的研究の

ほとんどが20年前のものであり、最新の分析技術で見直す必要がある。第2に化学合成により個々のDNA損傷を特定な位置に含むDNAを合成し、それを用いて*in vivo*でのsite specificな突然変異の機構を解析する必要がある。その研究により酸素ラジカルによるDNA損傷の中で突然変異や発がんに関連してどれが一番重要であるかがわかるであろう。その意味で我々の見出した8-OH-dGに関する研究が1つの突破口になれば幸いである。

#### 参考文献

- 1) 葛西宏 : 加熱食品中の強力な変異原イミダゾキノリン及びイミダゾキノキサリンの発見, 環境変異原研究, 6 : 21-25 (1984) .
- 2) Kasai, H. and S. Nishimura : Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives, Nucl. Acids Res., 12: 2127-2136 (1984) .
- 3) Kasai, H. and S. Nishimura : Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, Nucl. Acids Res. 12: 2137-2145 (1984)
- 4) Ames, B. N.: Dietary carcinogens and anticarcinogens : oxygen radicals and degenerative diseases, Science, 221: 1256-1264 (1983)
- 5) Lennarts, M., T. Coquerelle, A. Bopp and U. Hagen : Oxygen-effect on strand breaks and specific endo-groups in DNA of irradiated thymocytes, Int. J. Radiat. Biol., 27, 577-587 (1975)
- 6) Teoule, R., C. Bert and A. Bonicel : Thymine Fragment damage retained in the DNA polymucleotide chain after gamma irradiation in aerated solutions, Radiat. Res., 72: 190-200 (1977)

- 7) Friedberg : DNA repair, p55, Ron Newcomer & Associates, San Francisco (1984)
- 8) Leadon, S. A. and P. C. Hanawalt : Monoclonal antibody to DNA containing thymine glycol, Mutat. Res., 112: 191-200 (1983)
- 9) Teebor, G. W., K. Frenkel and M. S. Goldstein : Ionizing radiation and tritium transmutation both cause formation of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in Cellular DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 318-321 (1984)
- 10) Friedberg : DNA repair, p57, Ron Newcomer & Associates, San Francisco (1984)
- 11) Breimer, L. H. and T. Lindahl : Enzymatic excision of DNA bases damaged by exposure to ionizing radiation or oxidizing agents, Mutat. Res., 150: 85-89 (1985)
- 12) Dunlap, B. and P. Cerutti : Apyrimidinic sites in gamma-irradiated DNA, FEBS Lett., 51: 188-190 (1975)
- 13) Kasai, H., H. Tanooka and S. Nishimura : Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation, Gann, 75: 1037-1039 (1984)
- 14) Dizdaroglu, M.: Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on  $\gamma$ -irradiation in aqueous solution, Biochemistry, 24: 4476-4481 (1985)
- 15) Kasai, H. and S. Nishimura : DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide, Gann, 75: 841-844 (1984)
- 16) Kasai, H. and S. Nishimura : Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion, Gann, 75: 565-566 (1984)
- 17) Kasai et al, 未発表データ
- 18) Nair, U. J., R. A. Floyd, J. Nair, V.



- Bussachini, M. Friesen and H. Bartsch : Formation of reactive oxygen species and of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA in vitro with betel quid ingredients, *Chem.-Biol. interactions*, 63: 157-169 (1987)
- 19) Kasai et al, 投稿中
- 20) Kasai, H., P. F. Crain, Y. Kuchino, S. Nishimura, A. Ootsuyama and H. Tanooka : Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair, *Carcinogenesis*, 7: 1849-1851 (1986)
- 21) Floyd, R. A., J. J. Watson, J. Harris, M. West and P. K. Wong : Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoyl phorbolacetate, *Biochem. Bio phys. Res. Commun.*, 137: 841-846 (1986)
- 22) Hollstein, M. C., P. Brooks, S. Linn and B. N. Ames : Hydroxymethyluracil DNA glycosylase in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 4003-4007 (1984)
- 23) Cathcart, R., E. Schwieters, R. L. Saul and B. N. Ames : Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine : A possible assay for oxidative DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 5633-5637 (1984)
- 24) Chetsanga, C. J. and C. Grigorian : *In situ* enzymatic reclosure of opened imidazole rings of purines in DNA damaged by  $\gamma$ -irradiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 633-637 (1985)
- 25) Levin, D. E., M. Hollstein, M. F. Christman, E. A. Schwire and B. N. Ames : A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A•T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 7445-7449 (1982)
- 26) Levin, D. E., L. J. Marnett and B. N. Ames : Spontaneous and mutagen-induced deletion : Mechanistic studies in *Salmonella* tester strain TA102, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 4457-4461 (1984)
- 27) Glickman, B. W., K. Rietveld and C. S. Aaron :  $\gamma$ -Ray induced mutational spectrum in the *lac I* gene of *Escherichia coli* : Comparison of induced and spontaneous spectra at the molecular level, *Mutat. Res.*, 69: 1-12 (1980)
- 28) Mallng, H. V. and F. J. de Serres : Genetic alterations at the molecular level in X-ray induced *ad-3B* mutants of *Neurospora crassa*, *Radiat. Res.*, 53: 77-87 (1973)
- 29) Grosovsky, A. J., E. A. Drobetsky, P. J. de Jong and B. W. Glickman : Southern analysis of genomic alterations in gamma-ray-induced APRT<sup>-</sup> hamster cell mutants, *Genetics*, 113: 405-415 (1986)
- 30) Grosovsky, A. J., J. G. de Boer, P. J. de Jong, E. A. Drobetsky and B. W. Glickman : Base substitutions, frameshifts, and small deletions constitute ionizing radiation-induced point mutations in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 185-188 (1988)
- 31) Guerrero, I. and A. Pellicer : Mutational activation of oncogenes in animal model systems of carcinogenesis, *Mutat. Res.*, 185: 293-308 (1987)
- 32) Shirnamé-Moré, L., T. G. Rossman, W. Troll, G. W. Teebor and K. Frenkel : Genetic effects of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine, a product of ionizing radiation, *Mutat. Res.*, 178: 177-186 (1987)
- 33) Rouet, p. and J. M. Essigmann : Possible role for thymine glycol in the selective inhibition of DNA synthesis on oxidized DNA templates, *Cancer Res.* 45: 6113-6118 (1985)
- 34) Kuchino, Y., F. Mori, H. Kasai, H. Inoue, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka and S. Nishimura : Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues, *Nature*, 327: 77-79 (1987)
- 35) Loeb, L.A. : Apurinic sites as mutagenic intermediate, *Cell*, 40: 483-484 (1985)
- 36) Muller, H. J. : Artificial transmutation of the gene, *Science*, 66: 84-87 (1927)
- 37) Lewis, J. G. and D. O. Adams : Induction of 5, 6-ring-saturated thymine bases in NIH-3 T3 cells by phorbol ester-stimulated macrophages : role of reactive oxygen intermediate, *Cancer Res.*, 45: 1270-1275 (1985)
- 38) Frenkel, K., K. Chrzan, W. Troll, G. W. Teebor and J. J. Steinberg : Radiation-like modification of bases in DNA exposed to tumor promoter-activated polymorphonuclear leukocytes, *Cancer Res.*, 46: 5533-5540 (1986)



## 突然変異——劣性変異のホモ接合化は原爆白血病の始発となりうるか

近畿大, 原研 近 藤 宗 平

### I. ヒトにおける突然変異の誘発

変異原でヒトの体細胞に突然変異が起こる確証は、放射線でえられている。先端のバイオ技術を駆使することによって、赤血球の変異頻度が、原爆放射線の被爆量に比例して上昇していることが最近分かった<sup>1)</sup>。他方、被爆二世の遺伝的影響では、被爆による有意の上昇は見つかっていない<sup>2,3)</sup>。

### II. 精原細胞と体細胞の変異感受性比較

In vitro 試験で陽性の化学変異原をマウスの精原細胞に与えても、ほとんどは陰性である<sup>4,5)</sup>。例外的に陽性を示す変異原は、体細胞にたいして直線型の頻度用量反応を示す<sup>6)</sup>のに、精原細胞にたいしてはシグモイド型の反応をしめす<sup>4-6)</sup>。ショウジョウバエでも、化学変異原による変異誘発反応は、精原細胞でシグモイド型、体細胞で直線型である（藤川和男ら未発表）。精原細胞は体細胞より格段に優れた DNA 修復力を持つようである<sup>5)</sup>。

### III. 人の体細胞突然変異と好発癌体質

人の一生の間に約 $10^{16}$ 回の体細胞分裂が起こると推定されている<sup>7,8)</sup>。塩基対置換変異率は約 $10^{-9}$ /bp/複製であるから、例えば ras 癌遺伝子だけでも約 $10^7$ 回発生する。半数以上の人は、癌にならないのだから、優性癌変異は発癌の主因ではないだろう<sup>8)</sup>。事実、優性癌遺伝子の発癌は一般に弱い<sup>9)</sup>。これに反し、劣性癌遺伝子は、それをホモ/ヘミ接合にもつ細胞に強い発癌力を発揮する。これは始めショウジョウバエで見え<sup>10,11)</sup>、最近では、ヒトの網膜芽腫<sup>12)</sup>、Wilms

腫<sup>12)</sup>、横紋筋肉腫<sup>13)</sup>、肺癌<sup>14)</sup>、家族性大腸癌<sup>15)</sup>などで見つかった。劣性癌遺伝子は、癌抑制機能をもつ遺伝子（ここでは antioncogene; 抗癌遺伝子と呼ぶ）が存在していて、その欠失変異に由来すると考えられる。Russell の7個の特定遺伝子の自然劣性変異も大部分は欠失変異で、 $8 \times 10^{-6}$  (/locus/generation) の平均頻度で起こる<sup>5,23)</sup>。このように、塩基置換より発生率の高い欠失変異の例は多い。

劣性癌変異を、片親から受け継ぐか自発変異として、ヘテロに持つ人では、もう1個の劣性突然変異により、劣性癌変異についてホモ/ヘミ接合細胞が始めて誕生し、それが癌化の始発となる。これが、Knudson<sup>12)</sup>の「二重突然変異による癌化説」である。本稿では、この考えにはば従って理論式をつくり、原爆白血病の線量反応を説明できるかどうか検討する。

### IV. 劣性癌変異のホモ接合化による癌化始発模型

#### 1) 造血系幹細胞の突然変異と線量の関係

広島原爆を浴びた人の末梢血中の赤血球の調査によってつぎのことが分かった<sup>1)</sup>。グリコフォリン A (赤血球膜表面糖タンパク) の対立遺伝子 M と N についてヘテロ接合型 (M/N) の人では、M/O (N 遺伝子の欠失変異)、N/O (M 遺伝子の欠失) および M/M (M 遺伝子が2倍量; 体細胞組換えによる変異) の3種の変異が定量でき、それは、ほぼ次式で表される<sup>1)</sup>：

$$y = a + bx, \quad (1)$$

$$a = 12 \times 10^{-6} \text{ (/locus) ; M/O か N/O の欠失変異にたいして,} \quad (2)$$

$$a = 9 \times 10^{-6} \text{ (/chromosome pair) ; M/M 変異(体}$$



細胞組換え)にたいして, (3)

$b=5 \times 10^{-7}$  (/locus/rad) ; M/Oか N/O の欠失変異にたいして, (4)

$b=3 \times 10^{-7}$  (/chromosome pair/rad) ; M/M 変異 (体細胞組換え) にたいして, (5)

ここに,  $y$  は末梢血中の変異細胞の頻度,  $x$  は被爆量 (rad単位),  $a$  は自然変異率,  $b$  は放射線 1 rad 当たりの変異誘発率である。式 (4) と (5) の  $b$  値は, 新しい線量推定法 (DS86) に基づき, シングルビーム細胞探査法でえられたもの<sup>16)</sup>で, もとの値<sup>1)</sup>の約 2 倍である。上述の変異は, 被爆後 40 年もたつて検出されたものであるから, 被爆直後造血系の多分化機能をもつ根元的幹細胞<sup>17)</sup>に変異が起こって, その変異幹細胞が現在まで生き続け, 変異赤血球クローンを作り続けているものを, 検出したものである<sup>1)</sup>。このような幹細胞の総数  $N_s$  は,  $10^6 - 10^7$  個と見積られている<sup>1)</sup>。ここではこの中間の値を採用する:

$$N_s = 5 \times 10^6 \text{ (個/人)} \quad (6)$$

## 2) 前癌細胞の発生頻度の理論式

癌化の標的細胞の数を  $s$  (個/人) とする。自然に劣性癌変異が発生する頻度を  $a'$  とすると, 人体内には,  $sa'$  個のヘテロ接合細胞が発生する。この中から, 体細胞組換え (その自然頻度を  $a''$  と仮定) によって, ホモ接合型の前癌細胞が 1 個発生する頻度は,  $sa' \times a''$  となる。体細胞組換えが放射線で誘発される場合は, 被爆量  $D$  のとき組換え頻度は  $b'' D$  ( $b''$  は 1 rad 当たりの組換え率) となるので, ホモ接合型前癌細胞の発生頻度は,  $sa' \times b'' D$  となる。劣性癌変異が放射線で誘発された場合 (その頻度を  $sb' D$  と仮定) は, そのあとで自然体細胞組換え ( $a''$  の頻度) が起こり,  $sb' Da''$  の頻度でホモ接合細胞が生まれる。したがって, 被爆量  $D$  (rad) の人に発生する前癌細胞の頻度  $F$  は次式で与えられるだろう:

$$F = s(a'a'' + a'b''D + b'Da'') + s(a'a'' + a'b'D) / 2 \text{ (precancerous cell/body)}. \quad (7)$$

式の最後の 2 項は, (1) 自然に劣性癌変異が 2 回起こったためと, (2) 自然と放射線誘発劣性

変異が 1 回ずつ起こったため, 前癌細胞が発生するのに対応する。2 で割ったのは, 最初の欠失変異が起こる標的遺伝子座 (antioncogene locus) は体細胞当たり 1 対 (2 個) であるが, 2 番目の欠失変異が起こるときの標的遺伝子座は, 1 個に半減していることを考慮した補正因子である。

## 3) 前白血病細胞発生の線量反応式

具体例として, 白血病の発生を考える。すると, 癌化の標的細胞は, 幹細胞である可能性が高い<sup>7,8,17,18)</sup>から, 式 (7) の  $s$  値としては, 造血系幹細胞総数  $N_s$  (式 (6) の値) を採用する。式 (7) の残りのパラメータ値としては, 実際の赤血球変異に関する観測値 (式 (2) - (5)) を次のように採用する:

$$a' = 2 \times 10^{-6}, \quad a'' = 9 \times 10^{-6}, \quad (8)$$

$$b' = 2 \times 5 \times 10^{-7}, \quad b'' = 3 \times 10^{-7},$$

ここで,  $a'$  と  $b'$  の値の中に因子 2 を入れたのは, 体細胞 1 個当たり 2 個の相同な標的遺伝子座 (相同抗癌遺伝子座) が存在することを考慮したためである。これらの仮定を採用すると, 式 (7) は次ぎの形になる:

$$F = 2.52 \times 10^{-3} + 1.44 \times 10^{-4} D \text{ (preleukemic cell/person)}. \quad (9)$$

## V. 実際の白血病頻度と理論の比較

仮定: "体内に 1 個の前白血病細胞が発生しただけで, それが発達して遂には白血病死へ導く"。この仮定を用いると, 式 (9) は, そのまま白血病死の頻度を与える式になる。実際の疫学調査 (1950-1986) の結果は, 個人の平均生存 29 年間<sup>19)</sup>の平均年間癌死亡率  $f$  と被爆量  $D$  の関係として発表されている<sup>20)</sup> (図 1)。従って, 式 (9) を 29 で割って,  $f$  にたいする理論式を次ぎに示す:

$$f = 0.87 + 0.050 D \text{ (leukemia mortality rate/10}^4 \text{ person} \cdot \text{years)}. \quad (10)$$

この式は, 図 1 の LEUKEMIA のパネルに鎖線で示したように, 実際の白血病の線量効果曲線と意外によい一致をしめす。しかし, この一致は, 次ぎにのべる理由によって, 偶然による可能性が

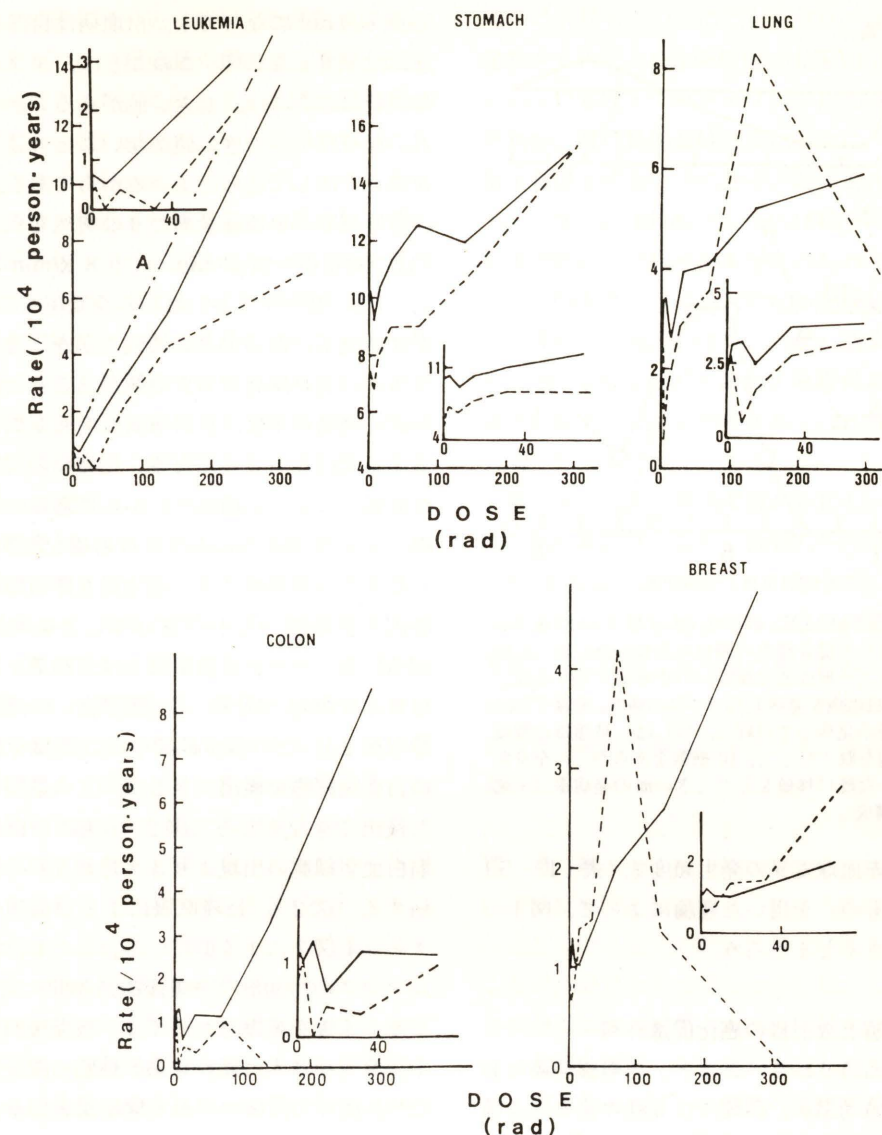


図 1: 年間癌死亡率と原爆放射線被爆量の関係, 実線 (—): 広島, 点線 (.....): 長崎 (Shimizu et al<sup>20)</sup> の原図に少し修飾を加えて引用). LEUKEMIA 図の中鎖線 (---) A は, 理論直線で, 本文中の式 (10) より作成したものである。

残っている。

マウスに 300 rad 照射した実験によると, 前白血病細胞の 30% しか実際には白血病を発生させない<sup>21)</sup>。原爆を浴びたのは 40 年以上前であるから, 劣性癌変異の自然発生率  $a'$  の値は, ここで採用した最近の観測値 (式 (8) を見よ) より小さかったに違いない。これら 2 項目とも, 理論式が過大評価を与えていることを示唆する。他方, 実際

の抗白血病遺伝子の数は, ゲノム当たり 1 個 (式 (9) と (10) で仮定した数) より多い可能性が高い。放射線の 2 ヒットで生じる劣性変異ホモ接合体出現頻度 ( $sb'b'D^2/2$  の項) を理論式 (7) では無視した。これらは理論式が過小評価を与えていることを示唆する。さらに, 理論と長崎の白血病頻度曲線の不一致が大きい。理論が本当に白血病頻度曲線を説明できるものなら, 長崎原爆放



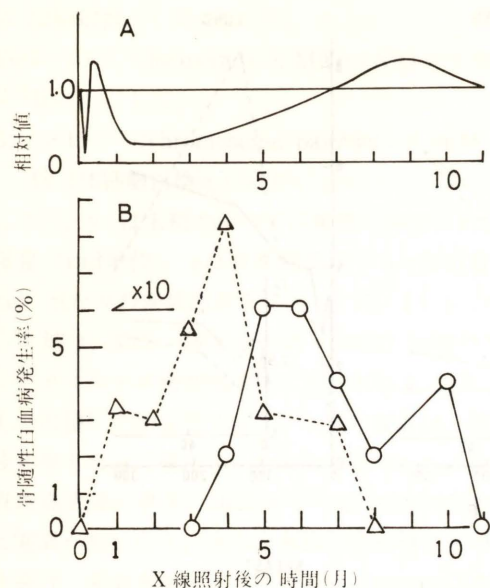


図2: マウス (RFM/MsNrs 系の雄) の被爆 (300R) 後の経時変化。A) 大腿骨髄内の顆粒球系幹細胞の数 (試験管内のコロニー形成能で検定) の正常値に対する比。B) 骨髄性白血病を発病したマウスの頻度。実線 (○印) は、被爆雄の発病率で点線 (△印) は、被爆雄の脾臓内の幹細胞を取りだして、 $10^7$ 細胞をあらかじめ全身照射しておいた雌に移植をしたときの雌の発病率 (平嶋<sup>25)</sup>より再構成)。

射線による赤血球変異の発生頻度式 (式 (1-5) に対応するもの) を用いた理論によって、図1の不一致は小さくなるだろう。

## VI. しきい値と放射線の癌化促進作用

図1を額面通りにうけると、放射線発癌におけるしきい値効果が、長崎では5種の癌の内4種に、広島でも5種の癌のうち3種に現れている。しかし、いずれのしきい値も観測点の統計的誤差が大きいので、しきい値がほんとうにあるかどうか、疫学的調査だけから結論をだすことはできない。そこで、マウスやラットを用いた実験放射線発癌の結果から、しきい値の問題を考えてみる。

### 1) 骨髄性白血病の実験

放射線による骨髄性白血病は、ふつうのマウスでは起こりにくい、RFM 系統では、よく起こり、例えば、300 rad で約30%の頻度である<sup>21,22)</sup>。ただし、これは高線量率の照射のときで、低線量率 0.5-5 rad/day で照射すると総線量が

300-600 rad になっても、白血病は自然率より有意には上昇しない<sup>22)</sup>。このことは、マウスの放射線誘発白血病には、しきい値があることを意味する。なぜなら、しきい値がないことの証拠は、つぎのようにしてえられているからである。マウスの精原細胞の単位線量当たりの突然変異誘発率は、X線の線量率を90 R/min から0.8 R/min に下げると、1/3に低下するが、さらに線量率を下げても、変異誘発率は低下しないで同じ値をとる<sup>17,23)</sup>。マウスの白血病誘発でしきい値があるとなれば、放射線の発癌作用は、前白血病性突然変異を誘発するからではないことになる。なぜなら、放射線突然変異にはしきい値がないからである。別所と平嶋<sup>21)</sup>は、次のようにして、放射線を300 rad 被爆したマウスの体内には、癌化促進作用をもつ宿主要因が長期間つくりだされることを実証した。RFM 系マウスの骨髄組織では、約7ヶ月間、顆粒球系幹細胞 (CFU-C 型細胞) の減少がつづく (図2)。この減少期間中に、脾臓を調べると前白血病細胞を検出できるが、この期間をすぎると検出できなくなる (図2)。実際の白血病は、前白血病細胞の出現より3ヶ月おけて個体に発病する (図2)。長崎原爆による白血病の発生パターンも図2によく似ている。ただし、発病期間がマウスの約30倍 (被爆後約25年間) である<sup>24)</sup>。ビキニ水爆を被爆した人では、被爆後24年たっても、9人中3人に顆粒球系幹細胞の減少がみられた<sup>25)</sup>。従って、マウスの実験結果と併せて考えると、中程度以上の線量を全身被爆すると、造血系細胞社会の混乱 (細胞交代機能の障害) がかなり長期間おこり、この期間中は白血病の発病を促進する宿主要因がつくりだされていると思われる<sup>25)</sup>。なぜなら、図2でわかるように、造血系細胞社会の混乱 (CFU-C 型細胞の減少) がなくなると、白血病は発病しなくなるからである。

### 2) 放射線誘発固形癌の実験

人の皮膚癌は、1回の被爆ではなかなか起こらないが、繰り返し被爆では、多発する。このことは、マウスでも同じであることを、大津山と田ノ岡<sup>26)</sup>は、実証した。一定量のベータ線を皮膚の

局所に一定間隔で繰り返し照射した実験によると、発癌に有効なのは、総線量の増加よりも繰り返し回数の増加である<sup>26)</sup>。このとき、1回の照射量はある値 (しきい値) 以上でないと発癌力をもたないことを示唆する結果もえられた<sup>26)</sup>。マウスまたはラットの胃、腸も1回照射だと、高線量を標的部位に局所照射しないと発癌しないが、繰り返し照射では中程度の線量でもかなり多発する<sup>27)</sup>。これらの上皮組織では、造血組織に比べて、細胞間結合が強いので、放射線の殺細胞力でその結合を壊すには、繰り返し照射が必要なのであろう。

### 3) 癌化促進の要因: 細胞社会の秩序崩壊と細胞の epigenetic 変化

組織を構成している細胞社会の秩序崩壊がなぜ癌化の要因になりうるのか? 全身機能を正常に維持するためには、組織内の構成員である細胞は、絶対利他主義の規則に従うようプログラムされている<sup>8)</sup>。従って、各細胞は、自由に増殖したり、好きかってに分化をすることができない。構成細胞の一部が死んで細胞社会の秩序が崩壊すると、“増殖と分化”に課せられた抑制が一部なくなり、細胞はある程度自由に増殖し自由に遺伝子を発現できるようになり、同じ状態が長期間つづくと、多様に変化した細胞が現れても、不思議ではない。その中から、細胞社会の秩序が回復しても、利己主義を主張し同族繁殖を続けうるまでに進化した細胞クローンが出現すれば、それは癌細胞の出現である。癌化と生物進化の過程は類似点が多い<sup>7,28,29)</sup>。

細胞は、自由に増殖できる別の *in vivo* 環境へ移植しただけで、なんら変異原を外から与えなくても、染色体異常や遺伝子の発現異常を起こす。その実例をのべよう。ショウジョウバエの劣性癌遺伝子 1 (2) g 1 に関して、ホモ接合の幼虫は、幼虫末期に、その脳が腫瘍で肥大奇形化して死ぬ<sup>10,11)</sup>。死ぬまえに、その腫瘍の一部をとって浮遊細胞状にして、それを成虫ハエの腹の中へ移植すると、約2週間で宿主を殺すので、その前に他のハエに継代移植を続ける。最初の一代で染色体異常が約10%も発生する<sup>11)</sup>。継代を続けると異常

頻度は上昇し、ついにはレトロウイルス様粒子が発生する<sup>11)</sup>。ハエの染色体の DNA 内には、*copia* という内在性トランスポゾンがたくさん存在する。それが、継代移植を続けている中に、間違っって遺伝子発現をするようになる。転写された RNA が中心になって RNA ウイルス様粒子がつくられる。粒子内には、逆転写酵素があるため、それによって、cDNA がつくられて *copia* DNA となり、宿主の DNA に組み込まれ、*copia* 遺伝子が増幅される<sup>11)</sup>。染色体異常と遺伝子発現異常さらには遺伝子増幅まで起こったのだから、これは典型的エピゼネティック変化である。

細胞をとりまく体内環境が変化し、組織の地域的抑制が解除されると、細胞内外の内因性諸因子 (endogenous factors) が活性化され、それらがいろんな遺伝子に働きかけるため、遺伝子の多種多様な変化が起こるものと考えられる。このようにして起こるエピゼネティック変化は、細胞が癌化の方へ発展する (プログレス) 主因の1つと考えられる。

## VII. 考察

短期変異原試験法によってえられた結果とマウスなどによる発ガン試験の結果の間の相関が悪いことが、最近とりあげられている。しかし、マウスの発癌試験の結果と人に実際癌を起こす作用原との相関も同じくらい悪いと言われている。そこで、開きなおって、体細胞の劣性突然変異をホモ接合型に持つ細胞が出現したときが、癌化の initiation であるか否かを、原爆放射線誘発癌で直接検討してみた<sup>30)</sup>。ここでその一部を紹介したように、白血病にかんする限り、意外によい一致がえられた。しかし、偶然の一致の可能性も残っている。別の方向からの検討によって、中程度以上の放射線の全身照射は、とくにそれが繰り返しおこなわれると、殺細胞作用をとうして、癌化を促進するような宿主要因を体内につくりだすことが結論された<sup>30)</sup>。変異原性化学物質も、それがマウスなどに繰り返し与えられるとき、発癌作用が強いという経験方則も、化学変異原の癌化促進



作用を反映しているものと思われる。マウスでは、癌化の標的細胞である幹細胞数がヒトの1/1000くらいにすぎないから、マウスの発癌実験では、特別の好発癌系統を使うのでなければ、劣性癌変異の誘発が投与した変異原で起こる可能性は無視できると思われる。しかし、人では、変異原が放射線のように体内深く浸透するならば、劣性癌変異の誘発を無視できるとは言い切れない。他方、図1に示唆されているように、放射線の低線量域では、発癌率の低下(低線量放射線の有益効果)が、少なくともある種の癌では、ほんとうである可能性もでてきた<sup>30)</sup>。従って、少しくらいの環境変異原には、ヒトはかなり強いと言えるのかも知れない。しかし、変異原を正しく怖がるための確実な結論をうるまでには、まだ研究すべきことが山ほどある。

謝辞：この論文をまとめるにあたって、田ノ岡宏、加藤寛夫、清水由起子、中村典、京泉誠之、平嶋邦猛諸氏に御教示御批判いただいたことを深謝する。この仕事の一部は近畿大学からの研究助成金によっている。

#### 参 考 文 献

- 1) Langlois, R.G., Bigbee, W. L., Kyoizumi, S., Nakamura, N., Bean, M.A., Akiyama, M. and Jensen, R.H. Evidence for increased somatic cell mutations at the glycophorin A locus in atomic bomb survivors. *Science*, 236, 445-448 (1987).
- 2) Schull, W. J., Otake, M. and Neel, J. V. Genetic effects of the atomic bombs: A reappraisal. *Science*, 213, 1220-1227 (1981).
- 3) Neel, J.V., Satoh, C., Goriki, K., Asakawa, J., Fujita, M., Takahashi, N., Kageoka, T. and Hazama, R. Search for mutations altering protein charge and/or function in children of atomic bomb survivors: Final report. *Am. J. Hum. Genet.*, (in press).
- 4) Russell, W.L. Dose response, repair and no-effect dose levels in mouse germ-cell mutagenesis. In "Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis", ed. Y. Tazima, S. Kondo and Y. Kuroda, pp.153-160 (1984), The Environmental Soc. of Japan, Mishima.
- 5) 近藤宗平：環境変異原のヒトへの危険度評価「環境と人体Ⅱ」(中馬一郎, 近藤宗平, 武部啓編) 東大出版, pp.153-163 (1983)
- 6) 一ツ町晋也：マウス スポットテスト 環境変異原研究 9, 67-72 (1987)
- 7) Cairns, J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, 255, 197-200 (1975).
- 8) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. "Molecular Biology of the Cell." (1983), Garland Publishing Inc., New York.
- 9) Newmark, P. Oncogenes and cell growth—News and Views—. *Nature*, 327, 101-102 (1987).
- 10) Gateff, E. Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 200, 1448-1459 (1978).
- 11) 近藤宗平, 梁 治子, 柴 忠義, 西田育巧：シヨウジョウバエを用いた発癌研究 蛋白質・核酸・酵素 32 285-291 (1987).
- 12) Knudson, A.G. Genetics of human cancers. *Ann. Rev. Genet.*, 20, 231-251 (1986).
- 13) Scrable, H.J., Witte, D.P., Lampkin, B.C. and Cavenee, W.K. Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping. *Nature*, 329, 345-347 (1987).
- 14) Naylor, S.L., Johson, B.E., Minna, J.D. and Sakaguchi, A. Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. *Nature*, 329, 451-454 (1987).
- 15) Bodmer, W.F., Bailey, C.J., Bodmer, J., Bussey, H.J.R., Ellis, A., Gorman, P., Lucibello, F.C., Murday, V.A., Rider, S.H., Scambler, P., Sheer, D., Solomon, E. and Spurr, N.K. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*, 328, 614-616 (1987).
- 16) 京泉誠之, 秋山實利, 中村 典, 箱田雅之, R.H. Jensen: シングルビームソータによる突然変異赤血球の検出と in vivo 体細胞突然変異頻度の測定 第30回放射線影響学会 (1987)
- 17) 近藤宗平：「人は放射線になぜ弱いのか」ブルーバックス, 講談社, 第2刷 (1986)
- 18) Kondo, S. Carcinogenesis in relation to stem-cell-mutation hypothesis. *Differentiation*, 24, 1-8 (1983).
- 19) Preston, D.L. and Pierce, D.A. The effect of changes in dosimetry on cancer mortality risk estimates in the atomic bomb survivors. *RERF Technical Report* 9-87, pp. 1-50 (1987). Radiation Effects Research Foundation, Hiroshima.
- 20) Shimizu, Y., Kato, H., Schull, W.J., Preston, D. L., Fujita, S. and Pierce, D.A. Life span study report 11, Part 1. Comparison of risk coefficients for site-specific cancer mortality based on the DS86 and T56DR shielded kerma and organ doses. *RERF Technical Report* 12-87, pp.1-56 (1987). Radiation Effects Research Foundation, Hiroshima.
- 21) Bessho, M. and Hirashima, K. Experimental studies on the mechanism of leukemogenesis following the hemopoietic stem cell kinetics. *Acta Haematol. Jpn.*, 46, 1296-1306 (1982).
- 22) Upton, A.C., Randolph, M.L., and Conklin, J.W. Late effects of fast neutrons and gamma-rays in mice as influenced by the dose rate of irradiation: induction of neoplasia. *Radiat Res.*, 41, 467-491 (1970).
- 23) Russell, W.L. and Kelly, E.M. Specific-locus mutation frequencies in mouse stem-cell spermatogonia at very low radiation dose rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 539-541 (1982).
- 24) Kato, H. Cancer mortality. In "Cancer in Atomic Bomb Survivors," Shigematsu, I. and Kagan, A. (eds), pp.53-74, (1986). Japan Sci. Soc. Press, Tokyo.
- 25) 平嶋邦猛：造血幹細胞からみた白血病発症機序, 「血液幹細胞——その動態と分化——」(妹尾左知丸編), 福武書店, 岡山, 375-399 (1982)
- 26) Ootsuyama, A. and Tanooka, H. 100% tumor induction in mouse skin after repeated beta irradiation in a limited dose range. *Radiat. Res.* (in press).
- 27) Watanabe, H., Ito, A. and Hirose, F. Experimental carcinogenesis in the digestive and genitourinary tracts. In "Radiation Carcinogenesis," ed. A.C. Upton, E. Albert, F.J. Burns and R.E. Shore, pp.233-244 (1986). Elsevier, New York, Amsterdam, London.
- 28) Cairns, J. The origin of human cancers. *Nature*, 289, 353-357 (1981).
- 29) 近藤宗平：発がんの仕組みを考える。「生物科学の新しい展開」(「科学」編集部編, pp.210-217 (1987) 岩波書店
- 30) Kondo, S. Mutation and cancer in relation to the atomic-bomb radiation effects. *Jpn J. Cancer Res.* 79, 785-799 (1988).



## 哺乳動物試験分科会 (MMS分科会) ニュース

国立衛生試験所・変異原性部 祖父尼俊雄

哺乳動物試験分科会 (Mammalian Mutagenicity Study Group) (略称:MMS分科会) の生い立ちや昭和60年度までの活動状況については既に報告してある<sup>1, 2)</sup> ので、その後の経過を含めて最近の活動状況を紹介する。

61年度と62年度は恒例のように定例研究会を年2回づつ、計4回行った。末尾にその発表内容を示してある。分科会会員による発表に加えて、会員以外の方々を招いて、より市広い討論を行った。第9回研究会では、大阪大学医学部の野村大成先生、第10回と第11回研究会では名古屋大学工学部吉村功先生、第12回研究会では京都大学放射線生物研究センター佐々木正夫先生にそれぞれ特別講演をして頂き、さらに充実した研究会となった。

MMS分科会の重要な活動の1つとして共同研究が挙げられる。これまで小核試験についての共同研究が勢力的に行われ、2つのテーマ“性差”並びに“系統差”については、既に *Mutation Research* に発表した<sup>3, 4)</sup>。第3のテーマとして“投与経路差”についての共同研究が行われ、予備試験の結果については本学会第16回大会において発表した<sup>5)</sup>。目下、本実験の結果が集積され、第17回大会での発表準備が進められている。同時に、*Mutation Research* への投稿論文の作製も行われている。前の2つのテーマについては、1つの論文としてそれぞれまとめられたが、今回のテーマについては、化学物質毎に担当者が論文を作製すると共に、世話人が結果を総括した論文を1つまとめるという方針で原稿の作製が進められている。

マウスのスポットテストについての共同研究も既に2回行われ、“雌マウスの系統差”について

は第16回大会において発表した<sup>6)</sup>。目下、次の共同研究のテーマについて検討中である。

MMS分科会の活動の1つとしてワークショップの開催が検討されてきたが、ようやく61年8月に“染色体異常の分類と判定”に関するワークショップを開催した。当初30名前後で2日間行う計画であったが、応募者が60名と2倍になったため、急拠日程を3日間に延長して、初日は60名全員2日目と3日目はそれぞれ30名づつに分けて行った。テキストの作製、インストラクターの打ち合せ、デモンストレーションのための器材の準備、顕微鏡観察用の標本作製など、その準備にはかなりの時間を要した。しかし、実行委員全員の一致協力で、好評のうちに無事に終了することができた。ご支援を頂いた本学会に感謝申し上げる。

ワークショップ終了後の反省会の際に、様々な意見の中に、染色体異常の写真集に対する強い要望が出され、具体的な計画立案に着手した。61年末に“化学物質による染色体異常アトラス(仮題)”を発刊するという基本案を作製し、編集会議で討議を重ねると共に、本学会からの支援を得て、ようやく具体化された。主な方針としては、*JEMS・MMS分科会編*とし、B5版でおおよそ150頁、朝倉書店より発刊し、価格は8000円前後とすることなどである。

62年8月末におおよそ1000枚の写真が集められ、これから精選したおおよそ180枚の写真について、それぞれの異常の種類を詳細に記載し、必要があれば異常生成の模式図も付けた。さらに、ヒト、チャイニーズ・ハムスター、マウス、ラットの核型やチャイニーズ・ハムスター細胞株 (CHL, CHO, V79, Don) の核型 (分染法も含む) を収



載した。染色体異常の記載については編集者会議でも議論が多く、そのため会議も長時間にわたった。最終原稿は63年2月中旬に朝倉書店へ渡し、目下印刷の段階で、近々出版の運びとなる予定である。

MMS分科会では62年9月12日に、米国NIEHSのDr. B. H. Margolinを招いて、医薬安全性研究会と共催セミナーを開催した。最初に、東京大学大橋靖雄先生が、“Statistical procedures for genetic toxicity assays”について、次いでDr. Margolinが“Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays”について講演した。多数の出席者の方々からの熱心な討論が続けられ、他の研究会の方々との交流にもなった。今後もこのような共催セミナーの開催について積極的に取り組みたい。

現在MMS分科会の会員数はおよそ100名で、小核共同研究の参加機関も34にのぼり、益々活動が活発となっている。今後も哺乳動物試験系の基本的な問題について取り組み、試験系の確立、普及のために多角的に活動を続けていきたい。引き続き本学会会員の皆様方のご支援をお願い申し上げる。

#### 参 考 文 献

- 1) 環境変異原研究, 7(1): 69-72 (1985)
- 2) 環境変異原研究, 8(1): 83-84 (1986)
- 3) Mutation Res., 172: 151-163 (1986)
- 4) Mutation Res., 204: 307-316 (1988)
- 5) 環境変異原研究, 9(2): 80 (1987)
- 6) 環境変異原研究, 9(2): 83 (1987)

#### 定例研究会概要

##### 第9回研究会

日時: 昭和61年5月26日(月)9:00~17:00

場所: ホテル大阪ガーデンパレス 401号室

1. 小核共同研究グループの検討会  
「系統差」についての成績について
2. 総会  
(1)幹事会報告, (2)会計報告
3. 共同研究結果の概要報告  
(1)小核試験, (2)スポットテスト
4. 研究発表  
(1)in vivo-in vitro UDS法——臓器特異性を利用した癌原性物質のin vivo短期検索法  
降旗千恵(東大・医科研)  
(2)“特別講演”  
発癌性変異の垂直伝達  
野村大成(阪大・医・放基)  
(付: 前日18:30~21:00生殖細胞に関する勉強会: “精原細胞の分化と見分け方, Epithelial cycle とは” 栗下昭広(武田薬品・中研)が行われた)

##### 第10回研究会

日時: 昭和61年10月3日(金)17:00~21:00

場所: 社会文化会館(東京), 3階第一会議室

1. 研究発表  
「エリスロポエチンを用いる小核試験」  
(1)in vivo 試験法  
鈴木勇司(慈恵医大・公衛)  
(2)in vitro 試験法  
仁藤新治(田辺製薬・安研)
2. 事務連絡
3. パネルディスカッション  
「変異原性試験における統計的手法の問題点」  
(1)in vitro 染色体異常試験  
笠原義典(帝人)  
(2)マウススポットテスト  
佐々木有(残農研)  
(3)マウス小核試験

林 真(国立衛試)

##### (4)“特別講演”

変異原性試験の統計的諸問題

吉村 功(名大・工・応用)

##### (5)総合討論

##### 第11回研究会

日時: 昭和62年4月25日(土)9:30~16:30

場所: 静雲荘(箱根)

1. 総会  
(1)会計報告, (2)幹事選出
2. 共同研究経過報告  
(1)小核試験, (2)スポットテスト
3. パネルディスカッション  
「マウス小核試験における統計的手法の問題点」  
(1)各研究機関の背景データについて  
佐藤精一(日本たばこ)  
(2)標準的解析法について  
林 真(国立衛試)  
(3)“特別講演”  
変異原性試験の統計的諸問題その2  
吉村 功(名大・工・応用)

##### (4)総合討論

(付: 前日13:00~21:00小核共同研究グループによる試験結果の検討会が行われた)

##### 第12回研究会

日時: 昭和62年10月26日(月)14:00~18:00

場所: 同志社大学寧静館(京都), 4階会議室

1. 事務報告
2. 共同研究経過報告  
(1)小核試験, (2)スポットテスト
3. 研究発表  
(1)経口投与時における小核出現率におよぼす絶食の影響  
鈴木修三, 直 弘, 畠山義朗(実中研)  
(2)放射線感受性変異体 wasted マウスにおけるガンマ線誘発染色体異常の組織特異性

手塚英夫, 井上 正(遺伝研)

##### (3)“Mouse Hemoglobin Mutation Assay”について

室田哲郎, 宮川 誠, 井上由紀,  
長池一博, 吉川那衛(三菱化成)

##### 4. “特別講演”

染色体異常による Population monitoring

——可能性と限界——

佐々木正夫(京大・放生研)

##### 哺乳動物試験分科会(MMS分科会)

会長: 土川 清

幹事: 乾 直道, 大島稔彦, 菊池康基, 渋谷 徹, 島田弘康, 須藤鎮世, 祖父尼俊雄, 林 真, 一ツ町晋也

事務局: 国立衛生試験所・変異原性部

(03-700-1141 Ext435)



## 関連集会「第4回ショウジョウバエ変異原研究会」の報告

残留農薬研究所 井上達生

この研究会は翅毛スポット試験の具体的な実験法を紹介する目的で、近藤宗平先生が呼びかけて開いた大会会場での昼食会がはじまりでした。その後、興味をもった参加者の熱意に励まされ、また大会準備委員会のご協力やお世話で、大会にあわせて集まりをもち数を重ねて参りました。4年目を迎えた京都大会では関連集会に取り上げて頂いたり、梁先生、藤川先生がショウジョウバエの研究で学会奨励賞を受賞したことで、ショウジョウバエの試験系に対する関心が一層高まった大会であったと思います。また、会ではお二人が先頭に立ってご自分の研究結果をそのまま披露し、指導されたところが大きいのですが、この機会に雑務などのお手伝いをしてきた一人として、本集会のようすとこれまでの活動などを紹介させていただきます。

大会の発表演題のうちショウジョウバエの試験系を扱ったものは9つにのぼった(過去5年をふりかえると、1982年から3, 6, 4, 8, 4とふえてきた)。その中から3人が集会で話題を提供した。

1. 「in vivo DNA 修復テスト体験談」 井上裕章(三菱化成)は阪大医学部ではイエバエの遺伝学的研究に長くかかわったが、奇しくも入ったときと出るときはショウジョウバエと顔を突き合わせてしまった。はじめは伴性劣性致死試験で生殖細胞を用いたが、おわりに体細胞を用いる試験系をはじめて経験した。大会の口演ではなかなか話せない苦労や要領を聞かせてくれた。生存曲線を求める方法では、幼虫の数を正確に知るには、1) カットびんの培地に産卵させるか、2) 20%砂糖水に浮き上がった幼虫を数えた。少し雑な方法と

して小さな匙を考案し、一定数の幼虫をすくって投与用の培地などに分配した(匙加減法)が、これが意外とうまくいった。この方法を用いて、DDT 耐性の系統として古くから分離されているHikone R, 正常のCanton S, および修復欠損株のmei9a, mei41Dの3系統のDDTに対する生存曲線をもとめた。

また、DNA 修復テストの方法をやさしく解説した。

修復欠損株 (mei-9, mei-41)

雌はいつも野生型 (repair+)

雄はいつも修復欠損 (repair-)

対照株

雌雄はともに野生型 (repair+)

まず両株に検体を投与して、羽化してくる成虫を数え、雌雄の比を求める。修復欠損株においてひずみ( $\delta < 0$ )が生じ、対照株でひずみが無ければ( $\delta = 0$ )、遺伝子 (repair-) の違いを反映して、薬剤によるDNA 損傷が起きていると考えられる。対照株でもひずみが生ずれば、単に性差による違いと考えられる。たとえば、DDT では後者の結果であった。紡錘体阻害剤 (Vinblastine) では、両株ともにひずみが無く、DNA 損傷はみとめられない。

経験から実験規模を比較してみると、DNA修復テストでは飼育そのものができればよく、飼育びんは20本~30本で足りる。翅毛スポット試験では、飼育びんは数本でよいが、翅標本の作製や顕微鏡観察が必要となる。試験期間ではDNA修復テストはわずか約1週間で結果がでるが、伴性劣性致死では2ヶ月間を要する。

2. 「翅毛スポットテスト体験談」 高木優子(名

城大・薬学部)は飼育で培地のカビの除去に苦勞したが、バイアルの早い植え継ぎで克服した。Tween80などの溶媒の影響をなくするために工夫したところは、1) 標準寒天培地の表面に検体を含む寒天培地を重層した (Ames test のように)。2) 70%エタノールに検体を溶解し培地に入れて固めた。ほかに、用量設定ではAmes test の用量を参考にできないかと考えたが、相関は認められなかった。これに対してベテランから、「End point は同じではないが、マウスのLD50 (経口) の値 (mg/kg) をそのままmg/ml (ハエの培地) にあてはめるのも一方法だ。」また、「思い切って、100mg/ml から10倍希釈で、DNA 修復テストを先におこなうのもよい。」など助言があった。

以上2題はひそかに「初体験報告」と呼んできたものです。上記昼食会の案内ビラ「ハエ翅毛スポットテストSMART勉強会」に書かれた「(1)動物個体を扱った経験が全くない人の懷疑と不安、(2)これから始めようとしている人の不安、(3)すでに実施している人の経験、等々を話し合う会を開きます。」という主旨が凝縮した形になっており、これまで毎年、初心者が話題を提供してきた。その方々を翅毛スポット試験の、もはや、先人として列挙しておく。この人たちが研究室をたずねれば親切な助言を受けることができることと思う。

84年東京：坂本 豊(武田薬品)、劉 美愛(大阪大・医学部)

85年秋田：吉川邦衛(三菱化成)、津田弘久(日本たばこ産業)、原 巧(食品薬品安全センター)、水田満里(広島県衛生研究所)

86年東京：根岸友恵(岡山大学・薬学部)、土屋真喜(麻布大・獣医学部)、蒲谷京子(三菱化成)

さらに今回は、新しい研究の方向を示すものとしてショウジョウバエの薬物代謝の研究に関心が寄せられた。

3. 「ショウジョウバエのP-450の検索」 宮田昌明(三菱化成)はショウジョウバエの薬物代謝に関して、生化学的な方法で研究をはじめた。ハエが小さいので(1匹1mg)材料を大量に集める

のに手間を要したが、成虫・幼虫からP-450を含んだミクロゾーム分画を得ることができた。また、4つの代謝酵素の比活性をHikone-R と white-ivory の系統およびラットで比較した。今後、薬剤代謝酵素の系統差が明らかになってくれば、それらの誘発突然変異の強さがどういう関係にあるか興味深いところである。期待を込めた質問や討論が展開された。

今回もショウジョウバエを扱った話題に終始したが、ショウジョウバエでの経験のあるなしや長短に関係なく、ショウジョウバエの試験系に興味をもったいろいろな分野の専門家が参加して意見や討論を交わし、学際的領域として刺激的で楽しい雰囲気を作ってきたつもりです。これまで4回の勉強会に参加した人はのべ200名、実数100人をこえ、当初の目的は達成できたかもしれない。私個人としては先生がたとえお話しができ、得るところが多く感謝している。



## 「抗変異原研究会」からの報告と研究上の問題点

同志社大学 生化学研究室 布柴達男

### はじめに

変異原性を減少させる因子、すなわち抗変異原性に対する内外の関心が高まっている。1985年10月6～10日、米国カンザス州ローレンスに於て、第一回抗変異原・抗発がん機構国際会議(IC-MAA; International Conference of Mechanism of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis)が開催され、約20ヵ国から250人が参加した。また、1988年12月4～9日には日本において、第二回の国際会議が開催される。

日本環境変異原学会でも、ここ数年、抗変異原性に関する研究発表が増えつつあり、1987年の第16回大会(京都)では21題を数え、抗変異原に関心を抱く研究者が確実に増加していることを示している。しかし、この分野の研究の歴史は未だ浅く、研究を進めるにあたり、多くの問題点を抱えている。そこで、これらの問題点を提起し、情報を交換し、時間をかけてより深い討論を行うことなどを目的とした研究会を持とうという意見が持ち上がり、次に示すように「第一回抗変異原研究会」が開催されることになった。

ここでは当日行われた研究会の内容を簡単に紹介し、私なりに考えている抗変異原研究における問題点を以下に述べて、諸学兄姉のご批判を仰ぎたい。

### 1 第一回抗変異原研究会

「第一回抗変異原研究会」は昭和62年10月29日、日本環境変異原学会16回大会の翌日、京都、同志社大学、寧静館会議室で以下のようなプログラムで開催された。当初、30～40名の参加者があれば、と考えていたが、約100名の参加者数となり、抗

変異原研究に対する関心の高さがうかがえた。また、今後もこの抗変異原研究会を続けることが同意され、当分は、同志社大学工学部生化学研究室がそのお世話することになった。

1. 抗変異原性とは何か：西岡 一(同志社大、生化研)
2. 抗変異原性研究のこれから：早津彦哉(岡山大、薬)
3. 抗変異原性研究と賀田博士：定家義人(遺伝研)
4. 各研究室の研究紹介

既に抗変異原の研究を行ってきた人、これから始めようとする人、あるいは関心を持つ人たちの顔合せというような和やかな雰囲気の中に、西岡先生の司会によってプログラムが進められた。初めの三つのプログラムでは、それぞれ20分の講演で必ずしも十分な時間ではなかったが、それぞれ興味深い話題が提供された。

#### 1. 「抗変異原性とは何か」

西岡先生からは「抗変異原性」の一般的な定義が示され、変異原不活化(Mutagen-inactivation)と変異抑制(Mutation-inhibition)に大別されることが述べられ、例を挙げて説明された。また、考えられる機構が紹介され、さらに研究を行う上での問題点が指摘された。ここで述べられたことを踏まえて、私の考えている問題点について、2で述べたい。

#### 2. 「抗変異原性研究のこれから」

早津先生からは、ポルフィリン類縁化合物による変異原不活化の研究が紹介され、抗変異原研究における機構解明の重要性が指摘された。例に挙げられた研究では、その機構が見事に解明されて

おり、研究の進め方に大いに参考になった。

### 3. 「抗変異原性研究と賀田博士」

抗変異原研究の先駆者であり、指導的役割を果たされた故賀田恒夫先生の思い出が、定家先生から話された。抗変異原研究に携わる研究者は誰もが、何らかの形で賀田先生の影響を受けており、いまさらのようにその偉大さに触れ、一同哀悼の念を強くした。

### 4. 各研究室の研究紹介

既に、抗変異原の研究を行っている各研究室の方々からその研究内容が紹介された。そのぞれ10分程度で簡単に紹介して頂く予定であったが、話をする方も聞く方も熱が入り、つい長くなってしまった。今後もこのような研究室紹介が継続されるとよいと思う。

## 2 抗変異原研究の問題点

ここでは、抗変異原の定義、検索方法、作用機構などを整理し、問題点について、筆者が研究を行う際、日頃から感じていること、研究室でしばしば議論(主として、西岡先生と)する点について述べる。至らぬ点も多いと思うが、何らかの参考、または討論の材料となれば幸いである。

### 1. 抗変異原の定義

抗変異原(Antimutagen)とは、変異原や発がん物質の変異原性を抑制する、あるいは低下させる物質または因子をいう。これらはその作用機構から、変異原不活化因子：Mutagen-inactivator(Desmutagen)と変異抑制因子：Mutation-inhibitor(Bio-antimutagen)の二つのカテゴリーに分けられる。

前者は変異原がDNAに損傷を与えるまでに、変異原に直接作用して何らかの反応を経て、その変異原性を減少させるものである。これに属するものとしてこれまでに、ヒト唾液、血清、これらに含有されるペルオキシダーゼなどの生体成分、クロロフィル・ヘミンや銅フタロシアニンなどのポルフィリンおよびその類縁化合物、還元剤や抗酸化剤、不飽和脂肪酸、野菜繊維などが知られている。これらの因子は、対象となる変異原に特異

的に作用するが、環境中から変異原を除去あるいは消去するという具体的な応用が期待される。

一方後者は、変異原によりDNA損傷を受けた細胞に働いて、突然変異の誘発を抑制するものである。これに属するものとして、亜ヒ酸ナトリウム、セレン化合物、塩化コバルト、二酸化ゲルマニウムなど金属化合物、シンナムアルデヒド、バニリン、クマリン、タンニン酸などの植物成分、胎盤や生薬、緑茶、コーヒーなどの植物の抽出物などの報告がある。これらの場合、必ずしも変異原に特異的に働くのではなく、DNA損傷のタイプや修復機構、またはその変異誘発機構が類似している変異原に対して同様の抑制効果を示すと考えられる。

### 2. 検索法

これまで環境や植物の成分などから、多くの抗変異原が見いだされ、報告されている。抗変異原の検索には変異原性の検出と同様、サルモネラ菌や大腸菌のアミノ酸要求性から非要求性への復帰変異が指標とされることが多い。しかし、Ames法のようにstandardとなるべき方法があるわけではないので、実験方法、使用菌株が異なり、同じ抗変異原に関する実験でも結果に相違が見られることがある。いずれにしても、その抗変異原の機構が、変異原不活化によるものか、変異抑制によるものかを明確にできるような方法を用いる必要がある。

#### 2-1. 変異原不活化因子の検索法と問題点

変異原不活化因子は変異原に特異的なもので、その検索法も報告により異なっているが、基本的には変異原と試料を前処理した後、変異原性試験にかける方法が一般的である。しかしこの場合、試料が培地に導入されることになり、不活化と抑制のいずれの因子によって抗変異原性を示すのかを判定できないことがある。不活化であることを示すためには、同時に変異抑制作用を調べ、それが陰性であることを示す必要がある。さらにどのような機構によって不活化されたのかを、何らかの方法で直接的に示すことも重要である。

#### 2-2. 変異誘発抑制因子の検索法と問題点



この場合は、比較的、共通な方法を用いることが可能である。一般的には、変異原で処理した細胞を、あらかじめ試料を添加した突然変異検出用培地にspreadする方法と、細胞と試料をtop agarに加え、培地に重層する方法があるが、いずれの場合も結果に大差はない。いずれにしても重要なことは、変異原と試料とが共存し、影響し合わないことである。変異原がUVや $\gamma$ 線など、照射する場合は問題はないが、化学変異原の場合は、適当な処理時間の後、遠心分離などによって、変異原を除去することが必要である。細胞内で代謝活性化されて変異原性を示すもの場合は、さらに代謝活性化反応の阻害や、活性化体の不活化の可能性も考慮しておかねばならない。

### 2-3. Standard assay system と陽性対照

変異原性検出におけるAmes法のように、抗変異原性の検索の場合にもstandard assay systemがあればよいと思う。しかし、不活化や抑制の機構にはなお不明な部分が多く、現時点は、これを要求するのは無理かも知れない。既知の抗変異原物質を陽性対照として確保し、試験法が正しいことを確認することも重要である。筆者の場合、抑制の実験で、陽性対照として、筆者らの見いだした抗変異原、亜ヒ酸ナトリウムやセレン化合物を用いている。但し、実験法が異なる状況では、共通的な陽性対照は望めない。しかし、各々の実験法で陽性対照を確保することはもっと行われて良いのではないだろうか。これまでの多くの抗変異原性研究では陽性対照が示されていないので、試験法が適正なものかがわからないことがある。

いずれにしても抗変異原研究においては、実験方法の違いが結果を左右することがあることに留意すべきである。

### 3. 作用機構

これまでに報告された抗変異原の中には、濃度によっては、逆に、DNA損傷性や変異原性を示すものがある。またDNAやタンパク質の合成を遅延させたり、阻害して、増殖阻害や細胞毒性を示すものがある。この場合、細胞の生存に不利なことが生じ、結果として変異原性を抑制したと

しても、これを抗変異原性として考えて良いかは疑問である。このことは特に変異抑制の場合に問題がある。以下にこれまでに考えられてきた作用機構をいくつか掲げる。

#### 3-1. 変異原不活化の機構

変異原不活化の機構としては、主に、化学反応、酵素反応、物理的吸着が考えられている。これまでに報告されているものを分類すると、還元剤や抗酸化剤による化学反応、ヘミンや銅フタロンアニンなどは化学反応による吸着、ペルオキシダーゼなどは酵素反応、唾液（一部は酵素反応による）や野菜繊維などは物理的な吸着がある。また、不飽和脂肪酸はその炭素数によって作用機構が異なるとされている。

#### 3-2. 変異抑制の機構

変異抑制の機構としては、除去修復や組換え修復などのerror-free repairの促進、逆にSOS反応の一つとして誘導されるSOS mutagenesis (error-prone repair)の阻害などが考えられる。タンニン酸や没食子酸などは除去修復に、シンナムアルデヒド、バニリンなどは組換え修復に、また亜ヒ酸ナトリウムは両方を促進して、変異抑制を行うと考えられている。

また、SOS反応の誘導を測定する方法として、*umuC*、*sulA*、*recA*などのSOS遺伝子と $\beta$ -galactosidaseの構造遺伝子の*lacZ*との融合遺伝子を持つ細菌を用い、変異原処理により誘導される $\beta$ -galactosidase活性を指標とする方法がある。この方法を応用して、誘導されるべきSOS遺伝子の発現の阻害されるレベルを調べることができる。亜ヒ酸ナトリウムや亜セレン酸ナトリウム、コーヒー抽出物が、これを抑制することが知られている。

#### 4. 擬似抗変異原性

変異原性を低下させる物質が見つかった場合、これを抗変異原と判定するためには、さらに以下に示す事項に注意を払う必要がある。

##### 4-1. 細胞致死作用

細胞と調べようとする試料が接触する場合、常に試料の細胞への影響を調べておく必要がある。

特に、変異抑制因子の検索の際に一般に採用される実験法では、両者が培地中で48時間共存するので、試料の毒性に注意しなければならない。従って、抗変異原性の検索と同時に、同じ条件下での生菌数を調べ、生菌数の減少がほとんど認められない濃度範囲での効果を評価する必要がある。

##### 4-2. 細胞増殖遅延作用

培地中に試料が添加されている場合、生菌数の減少が認められなくても、コロニーの大きさが、コントロールのそれに比べて、かなり小さいことがある。この場合、細胞分裂やDNA複製が阻害され、増殖遅延が起り、結果として変異が抑制されたかのように見える可能性がある。試料の増殖遅延作用が特に強い時は、変異コロニーが小さくて見落とすこともあろう。いずれにせよ、生菌コロニーや変異コロニーが、コントロールより小さく観察される時は、注意を要する。

##### 4-3. S9mixの消費、またはS9mixによる代謝活性の阻害

S9mixによる代謝活性化を必要とする間接変異原に対する不活化因子を調べる場合、試料とS9mixが試験管内あるいは培地中で共存することがある。その場合には試料によるS9mixの消費や代謝活性化の阻害を考慮する必要がある。このような場合はS9mixで代謝活性化させて得られる活性化体を用いることによって問題は解決する。例えばTrp-P-2の場合は、その活性体、N-OH-Trp-P-2を用いることが行われている。しかし、活性体が容易に獲られないことも多く、そのような場合、何らかの方法でそのチェックが必要である。

##### 4-4. 変異コロニーに対する増殖阻害

抗変異原の検索には、アミノ酸要求性から非要求性への復帰変異試験を用いることが多い。しかしこの場合、非要求性に変異した細胞のアミノ酸合成系に試料が作用して、変異細胞の増殖を阻害する場合がある。4-2の細胞増殖遅延に類似しているが、厳密には異なる。従って、自然あるいは誘発突然変異コロニーを、レプリカなどにより、試料を添加し、しかも当該アミノ酸を含まない培地に移し、この培地でも増殖状態が変わらないこ

とを確認することが必要である。

#### おわりに

これまで、様々な抗変異原がスクリーニングされてきたが、その中には、その物質の細胞への有害作用（毒性）のため、結果として突然変異が低下するもの（擬似抗変異原）が少なくないと思われる。前述のようにこれらを抗変異原として取り扱って良いかは疑問である。

抗変異原の研究の問題点は、決してここに示したものがすべてではなく、他にも様々な問題がある。また疑問を抱きながら実験する研究者も多いと思われる。そのような問題点や疑問点について、時間をさいて十分に討論するためには、抗変異原研究会のような小さなグループが必要であり、若手研究者の一人として、その活動に期待するものである。

注 次回の「抗変異原研究会」は1989年春頃に開催の予定です。前回ご出席の方々には、ご案内をお送りいたします。



## 「脳死に関する見解」採択される

## — 医療技術と人間の生命特別委員会報告 —

昭和62年11月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、去る10月21日から23日まで第103回総会（第13期・6回目）を開催しました。今回の「日本学術会議だより」では、今総会で採択された勧告を中心として、同総会の議事内容をお知らせします。本会議の第13期も、余すところ9か月となり、各委員会は、期の活動の取りまとめに向けて一層活発に審議を進めています。

## 総 会 報 告

総会第1日目の午前中には、会長からの経過報告、各部・各委員会報告に続き、勧告・対外報告等4つが提案され、そのうちの2件が可決された。そのほかの2件に関しては、同日午後には各部会で審議が行われ、第2日目の午前中に1件が、第3日目の午前中に1件が可決された。

なお、総会前日の20日午前には連合部会が開催され、これらの案件の予備的な説明、質疑が行われた。また第2日目午後には「食糧生産と環境」についての自由討議（詳細別掲）が、第3日目の午後には常置委員会、特別委員会が開催された。

第1日目午前。まず、利根川進氏のノーベル生理学・医学賞受賞に対し日本学術会議第103回総会の名において祝電を呈することが提案され、全員一致で可決された。

次に日本学術会議の行う国際学術交流事業の実施に関する内規の一部改正についての提案がなされ、これも賛成多数で可決された。この改正は、第14期の当初3か月間における、国際学会への研連委員の代表派遣について、必要な経過措置を講ずるものである。

続いて、高齢化社会特別委員会提案の「日本高齢社会総合研究センター（仮称）の設立について」（勧告）（詳細別掲）の提案説明と質疑応答が行われた。さらに、医療技術と人間の生命特別委員会報告「脳死に関する見解」を「日本学術会議の運営の細則に関する内規」に定める対外「報告」として認めることに関する提案が行われた。これは同特別委員会がその発足以来2年間にわたって審議を重ねてきたものであり、前回4月の総会では討論の過程でさらに検討する必要があるとして同特委により取り下げられたものである。その後、委員定数を増加するなどして審議を重ね、今総会に再度提案されたものであるが、批判的意見を背後に含む多くの質問が出された。

第2日目午前。前日提案された「日本高齢社会総合研究センター（仮称）の設立について」（勧告）が、賛成多数で採択され、直ちに内閣総理大臣始め関係諸機関等に送付された。同じく前日提案の「脳死に関する見解」は、前日の部会審議で異論が続出したため、抜本的に書き改められたものが提案されたが、なおいくつかの疑問が示され、採決には至らなかった。

第3日目午前。再度修正された「脳死に関する見解」が提案された。国民的合意の形成、医学界における少数意見の存在などに関して、なお理解の不一致があり、質問討論が行われた。これら若干の点に関する討論者間の相互了解を遂げた後、数名の発言者から再度の修正を経ることによ

って本報告は異なった専門分野のいずれからみてもおおむね満足できるものになった、当初に危惧した点が除かれた、などの意見が述べられた。こうして多少の曲折はあったが、最後に本提案がほぼ全員一致で採択された。（見解の内容は別項参照）

## 日本高齢社会総合研究センター（仮称）の設立について（勧告）

急速な高齢社会への移行という厳しい問題をまえにして、日本学術会議は既に昭和55年（1980年）11月1日「国立老化・老年病センター（仮称）の設立について」の勧告を内閣総理大臣あてに行った。しかし現在にあっては、さらにこれに加えて、高齢社会をめぐる新しい理論的研究と政策開発の推進が緊急の課題となっている。そこで、このような課題を解決するために、日本学術会議は下記構想のごとき「日本高齢社会総合研究センター（仮称）」の設立をここに勧告するものである。この研究センターは、「老化・老年病センター」と緊密な連携を保ちつつ、高齢社会・高齢層・高齢者問題の総合研究を目指す、人文・社会科学中心の全国的なネットワーク型の研究センターである。

「日本高齢社会総合研究センター」（仮称）の構想

「日本高齢社会総合研究センター法（仮称）」という法律に基づく独立性の高い法人とし、国の出資による基金を基礎として設立される。なお、所管官庁の選定に当たっては、21世紀の重要な国民的課題たる高齢者政策の総合性を考え、特定の行政分野に偏ることなく、全行政分野が連携を保ち得るような所管の在り方が望まれる。

総合研究センターの運営は以下を行う。

(1) 本研究センターは、国の出資による基金を基礎として設立されるが、さらにまた一般寄付、並びに研究受託費を加えて、弾力的に運営されるところの公的で全国的なネットワーク型の研究センターとする。(2) 本研究センターの運営を統括する理事会を構成する理事の半数は研究者をもって充てる。(3) 研究課題の選択は、関連学会（例えば、日本学術会議の選定による）から推挙され、一定の任期をもつ30名前後の「研究評議員会」で行うことによって研究の総合性を図るとともに、また研究評価をも行う。(4) 専任研究員制度（一定の任期を設ける）を置き、それにより総合研究センターの研究の組織化並びに相互調整を行う。各プロジェクト毎に専任研究員を中心に流動研究員（客員研究員、出向研究員等）やその他の研究者を募ってこれに加え、常時300名程度の研究者が活動している状態が望ましい。（詳細は、日本学術会議月報11月号を参照されたい。）

## 脳死に関する見解

## — 医療技術と人間の生命特別委員会報告 —

最近の医療技術の発展に伴って生きてきた人間の生命とその尊厳にかかわる諸問題のうち特に脳死の問題は末期医療、臓器移植等をめぐって大きな社会的問題となっている。医療の現場では脳死の状態に陥った多くの患者をめぐって、日夜その家族や医師が苦悩に満ちた対応を迫られつつある。脳死の問題は、必ずしも心臓や肝臓などの臓器移植との関連においてだけでなく、むしろ現実的には多くの場合、末期医療の現場において深刻化している。このような現状にかんがみ、脳死にかかわる諸問題を様々な角度から十分に議論し、問題の所在を考察して、その解決への展望を示したものである。これが本特別委員会の今回の報告である。

本報告は脳死を医学的に、法的にそして心理的、倫理的及び社会的側面から考察した。全脳の機能が不可逆的に喪失した状態と定義される脳死は、医学的にみて個体の死を意味する。これは第7部会員の一致した意見であり、医学界の大勢と判断されるが、医学界の中にも少数ながら疑義を持つ者もある。脳死を人の死と認めるか否かについては、法的にはこれを肯定、否定する見解が対立している。否定している場合にも脳死になった際、人工呼吸器を外してはならないということだけでなく、事情によっては違法性阻却ないし、責任阻却事由があり得ることまで否定するものではない。

人の死は単なる医学的現象ではなく、その人の人格、社会的存在にもかかわるものである。したがってその取扱いについては、本人の生前の意思、家族の感情、一般の倫理観、習俗、社会的慣習等を尊重しなければならない。しかし脳死をめぐる三徴候に基づく伝統的な死の概念にとらわれることなく、深刻化している医療の現状に対処して新しい死の概念の確立に努めるべきであろう。このため関係方面において脳死をめぐる諸問題が検討され、速やかな解決への展望が開かれることを希望する。

以上の見解を第103回総会の承認を得て対外報告としてこれを公表することとした。

（詳細は、日本学術会議月報11月号を参照されたい。）

## 自由討議—食糧生産と環境—

この自由討議は、今期設置された「生物資源・食糧と環境特別委員会」のメンバーが主となり、個人の立場で、食糧生産と環境の問題について意見を発表したものである。会長近藤次郎（食糧に対する環境からのアプローチ）、第6部、生物資源特委委員長阪本楠彦（食糧問題の展望）、第6部（以下すべて特委委員）武田友四郎（環境変化が農業生態系に及ぼす影響）、第5部岩佐義朗（水資源の立場から）の各会員がそれぞれに付記したサブテーマについて問題を提起した。これに続いて第3部大石嘉一郎（経済学の立場から）、第1部石川栄吉（数量主義の反省）、第6部水間豊（畜産学の立場から）、第2部及川伸（食糧管理制度について）、第6部福場博保（栄養面から見た食糧資源開発問題）、第1部水津一朗（歴史地理学の立場から）、第7部小泉明（人口と食糧・環境）の各会員から関連発言があり、質疑応答が行われた。

1973～81年頃のいわゆる「世界食糧危機」は既に去り、今や食糧の輸出競争が激化している。しかしアフリカ等の飢餓問題が解消したわけでは決していない、開発途上国の所得増から来る食糧需要は決して樂觀を許さない。まるで、栄養過剰の大国に「追いつき、追い越そう」としているかのようでさえある。

生産の面でも、自然の節理を無視した増産が進められている。森や山に住む神々への迷信的な怖れを失った後、自然破壊に対してかけるべき有効な抑制力を、人類はまだ見出せずにいる。破壊された自然の復旧（砂漠の緑化など）もまだほとんどできないままである。（この自由討議は日学双書5刊として出版されます。）

## 日本学術会議月報

日本学術会議は、その日常的な活動の状況を科学者や学術研究団体を始め関係諸機関・団体等に広く理解してもらうため、毎月1回、「日本学術会議月報」（B5版・6～12ページ）を発行し、無料で配布している。

その内容は、総会の決定事項、運営審議会の審議事項、研究連絡委員会の開催状況、関係学術研究団体と共同主催する国際会議の開催状況、後援する国際会議及び研究連絡委員会等が主催するシンポジウム・講演会のお知らせ等を中心として、その折々のトピック事項を掲載している。また、会員の随筆なども取り入れ、なるべく読み易い紙面となるよう努めている。

現在、当「月報」を送付している機関・団体等は、次のとおりである。

大学・短期大学、関係国・公・私立研究機関、公立図書館、関係省庁、関係報道機関、日本学術会議広報協力学術団体\*等

\* 本会議活動の周知を図るとともに、各学術研究分野との緊密な連絡・協力関係を維持・強化するため、本会議の広報活動に協力してもらう学・協会

## 第14期日本学術会議会員選出のための登録学術研究団体の概況

本会議では、現在第14期（昭和63年7月22日～昭和66年7月21日）会員（定員210人）選出のための手続きが進められているが、先頃6月末日を締切期限として、学術研究団体からの登録申請が受け付けられた。その後日本学術会議会員推薦管理会で審査が行われたが、結果は次のとおりであった。

学術研究団体の登録申請の審査結果

申請団体数……………900団体

登録団体数……………836団体

\* 日本学術会議会員推薦管理会に登録した836団体名は「日本学術会議月報」11月号に掲載されるので、ご参照願いたい。

## 日学双書「高度情報社会の展望と課題」

日本学術会議第101回総会における自由討議「高度情報社会の展望と課題」の記録及び「高度情報社会特別委員会」のヒアリングを編集し、日学双書No. 3として刊行されました。

日学双書No. 3「高度情報社会の展望と課題」

1部 1,000円（送料250円）

（問い合わせ先）

〒106東京都港区西麻布3-24-20

交通安全教育センター内

（財）日本学術協力財団

郵便振替

（口座番号）東京4-27458

（財）日本学術協力財団あて

多数の学術研究団体の御協力により、「日本学術会議だより」に掲載していただくことができ、ありがとうございます。

なお、御意見・お問い合わせ等がありましたら下記までお寄せください。

〒106 港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会

（日本学術会議事務局庶務課）

電話 03 (403) 6291











# 日本環境変異原学会会則

- 第1条 本会は日本環境変異原学会(The Environmental Mutagen Society of Japan) と称する。
- 第2条 本会は人間環境における突然変異原、とくに公衆の健康に重大な関係を有する突然変異原の研究を推進することを目的とする。
- 第3条 本会の会員は、正会員および賛助会員とする。正会員は本会の趣旨に賛同し、環境変異原の研究に必要な知識と経験を有し、定められた会費を納入した者、賛助会員はこの学会の事業を後援し、定められた会費を納入した個人または法人とする。
- 第4条 本会に入会を希望するものは、1名以上の評議員の推せん書とともに所定の申込書に記入の上、本会事務所に申込むものとする。
- 第5条 会員は毎年会費を納入しなければならない。次年度の年会費の額は評議員会において審議し総会において定める。
- 第6条 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。
1. 年1回大会を開催し、学術上の研究成果の発表および知識の交換を行う。
  2. 奨励賞を設け、環境変異原の分野ですぐれた研究を行い、将来の成果が期待される研究者(原則として会員)に授与する。
  3. Mutation Research 誌の特別巻を特価で購入配布する。
  4. 国際環境変異原学会連合に加入し、国際協力に必要な活動を行う。
  5. その他本会の目的を達成するために必要な活動を行う。
- 第7条 本会に次のとおり役員および評議員を置く。

会 長 1名 庶務幹事 1名  
会計幹事 1名、国際交流幹事 1名、  
編集幹事 1名、会計監査 2名、および評議員若干名。

評議員は正会員の投票により選ぶ。  
会長は評議員の互選によって定める。  
庶務幹事、会計幹事、国際交流幹事、編集幹事および会計監査は会長が委嘱する。  
この他会長は必要な場合には会員の中より若干名を指名し総会の承諾を得て、評議員に加えることができる。  
役員および評議員の任期は2年とする。  
役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。

第8条 評議員会は会員を代表し、事業計画、経費の収支、予算決算およびその他の重要事項について審議する。

第9条 本会は年1回総会を開く。  
総会において会則の改廃制定、予算・決算の承認、その他評議員会において審議した重要事項の承認を行う。

第10条 本会の事務執行機関は会長および4名の幹事をもって構成する。  
会長は執行機関の長となり、また本会を代表する。

第11条 本会の事務は暦年による。

第12条 本会に名誉会員をおく。

## 附 記

1. 本会則は昭和61年1月1日より施行する。
2. 本会は事務所を静岡県三島市谷田1,111番地に置く。
3. 正会員および賛助会員の会費はそれぞれ年額3,000円および1口20,000円とする。ただし、Mutation Research 誌の特別巻の配布を希望するものは、会費の他に別途定める購読料を本会へ前納するものとする。

# 日本環境変異原学会昭和63～64年度評議員名簿

(五十音順)

| 氏 名       | 所 属                |
|-----------|--------------------|
| 石 館 基     | 国立衛生試験所            |
| 乾 直 道     | 日本たばこ産業(株)生物実験センター |
| 大 西 克 成   | 徳島大学医学部            |
| 加 藤 隆 一   | 慶応大学医学部            |
| 菊 池 康 基   | 武田薬品工業(株)中央研究所     |
| 黒 木 登 志 夫 | 東京大学医科学研究所         |
| 黒 田 行 昭   | 国立遺伝学研究所           |
| 近 藤 宗 平   | 近畿大学原子力研究所         |
| 佐 々 木 正 夫 | 京都大学放射線生物研究センター    |
| 定 家 義 人   | 国立遺伝学研究所           |
| 佐 藤 茂 秋   | 富山県衛生研究所           |
| 渋谷 徹      | (財)食品薬品安全センター秦野研究所 |
| 島 田 弘 康   | 第一製薬(株)中央研究所       |
| 白 須 泰 彦   | (財)残留農薬研究所         |
| 祖父 尼 俊 雄  | 国立衛生試験所            |
| 田ノ 岡 宏    | 国立がんセンター研究所        |
| 土 川 清     | 国立遺伝学研究所           |
| 常 盤 寛     | 福岡県衛生公害センター        |
| 長 尾 美 奈 子 | 国立がんセンター研究所        |
| 西 岡 一     | 同志社大学工学部           |
| 早 津 彦 哉   | 岡山大学薬学部            |
| 松 島 泰 次 郎 | 東京大学医科学研究所         |
| 吉 川 邦 衛   | 三菱化成工業(株)総合研究所     |



# 日本環境変異原学会入会申込書

昭和 年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしたく評議員の推薦を添えて申し込みます。

|          |       |     |  |
|----------|-------|-----|--|
| フリガナ     |       |     |  |
| 氏 名      | ㊟     |     |  |
| ローマ字つづり  |       |     |  |
| 生年月日, 性別 | 年 月 日 | 男 女 |  |

|                   |         |  |  |
|-------------------|---------|--|--|
| 所属機関<br>部局<br>職名  | (和)     |  |  |
|                   | (英)     |  |  |
|                   |         |  |  |
|                   |         |  |  |
| 所属機関<br>所在地       | 〒 電話 内線 |  |  |
|                   | (和)     |  |  |
|                   | (英)     |  |  |
|                   |         |  |  |
| 自宅<br>住所          | 〒 電話    |  |  |
|                   | (和)     |  |  |
|                   | (英)     |  |  |
|                   |         |  |  |
| 会誌送付先 ① 所属機関 ② 自宅 |         |  |  |

|   |       |      |   |
|---|-------|------|---|
| 学 部   | 学部学校名 | 卒業年次 | 年 |
| 歴 大学院   | 課程学校名 | 修了年次 | 年 |
| 学 位   | 取得年 年 |      |   |
| 研究領域 (下記にあてはまる項の2, 3を○で囲んでください)   |       |      |   |
| 1. 変異原    2. 検出系    3. 毒性    4. 発生異常    5. 汚染<br>6. 疫学    7. 遺伝    8. がん    9. 微生物    10. 高等動物<br>11. 高等植物    12. 食品    13. 気体・粉じん    14. 医薬品    15. 農薬<br>16. 代謝    17. 分子機構    18. その他 (    ) |       |      |   |
| 研究歴 (現在行っている研究の動向や興味の点について数行記入のこと)  |       |      |   |
| 加入学会名 (本学会以外の)  |       |      |   |

|                       |
|-----------------------|
| 推薦者 (日本環境変異原学会評議員)    |
| 氏 名 (署名) ㊟            |
| 入会申込者との関係 (数行ご記入ください) |



# 日本環境変異原学会奨励賞受賞者

- 第1回 昭和54年度  
長尾美奈子 「食品の変異因子に関する研究」
- 第2回 昭和55年度  
石館 基 「環境変異原及び癌原物質の染色体異常によるスクリーニング」  
常盤 寛 「大気中の変異原性汚染物質の実態と研究」
- 第3回 昭和56年度  
賀田 恒夫 「環境変異原検出に関する Rec-assay の開発とその応用」
- 第4回 昭和57年度  
松島泰次郎 「変異原性検出による化学物質の発癌性評価についての研究」  
早津 彦哉 「環境中の変異原物質の作用機作に関する化学的研究」
- 第5回 昭和58年度  
葛西 宏 「加熱食品中の強力な変異原イミダゾキノリンおよびイミダゾキノキサリンの発見」
- 第6回 昭和59年度  
大西 克成 「環境中のニトロピレン類の検出及び代謝に関する研究」
- 第7回 昭和60年度  
若林 敬二 「食品中の新しい変異原前駆物質の研究」
- 第8回 昭和61年度  
林 真 「in vivo 小核試験法の基礎と応用に関する研究」  
森本 兼曩 「ヒト末梢リンパ球における姉妹染色分体交換 (SCE) 誘発に関する研究」
- 第9回 昭和62年度  
梁 治子 「ショウジョウバエによる環境変異原検出系に関する研究」  
藤川 和男 「ショウジョウバエによる環境変異原検出系に関する研究」

## 編集後記

本号は、昭和62年10月27日～29日、京都で開催された日本環境変異原学会第16回大会の特集号として編集いたしました。本大会で発表された研究の中から、学会奨励賞受賞講演、特別講演、シンポジウム、さらに分科会、関連集会からの報告などを収録いたしました。

学会奨励賞受賞講演は、大阪大学医学部の梁治子、武田薬品(株)の藤川和男両先生の「ショウジョウバエによる環境変異原検出系に関する研究」で、それぞれのご研究をまとめてご寄稿いただきました。

特別講演は、変異原研究に重要な関わりがある「活性酸素の生成と消長」について、京都大学食糧科学研究所の浅田浩二先生にお話いただきましたが、その内容をここにまとめていただきました。

シンポジウムは、京都大学医学部の武部啓先生のご尽力で「突然変異の機構—環境変異原の見地から」のタイトルの下、強力なメンバーによって行われ、各先生方のご研究を収録いたしました。

各関連集会について、その活動状況をここに報告していただきました。特に「抗変異原研究会」は、前会長、故賀田恒夫博士のメモリアルとして開催し、一同、在りし日の先生を偲びました。ここに賀田先生のご冥福をお祈り致します。

ご執筆いただいた諸先生には、ご多用の所、本号のために貴重な時間をさいてご寄稿をいただいたことを厚くお礼申し上げます。

西 岡 一

## 環境変異原研究 第10巻 第1号 1988年

昭和63年9月30日 発行

発行者 日本環境変異原学会

編集責任者 西 岡 一

同志社大学工学部生化学研究室

〒602 京都市上京区烏丸今出川

TEL 075-251-3919

印刷所 サツキ印刷株式会社

〒572 大阪府寝屋川市石津南町8-2

TEL 0720-28-0171



ISSN 0910—0865