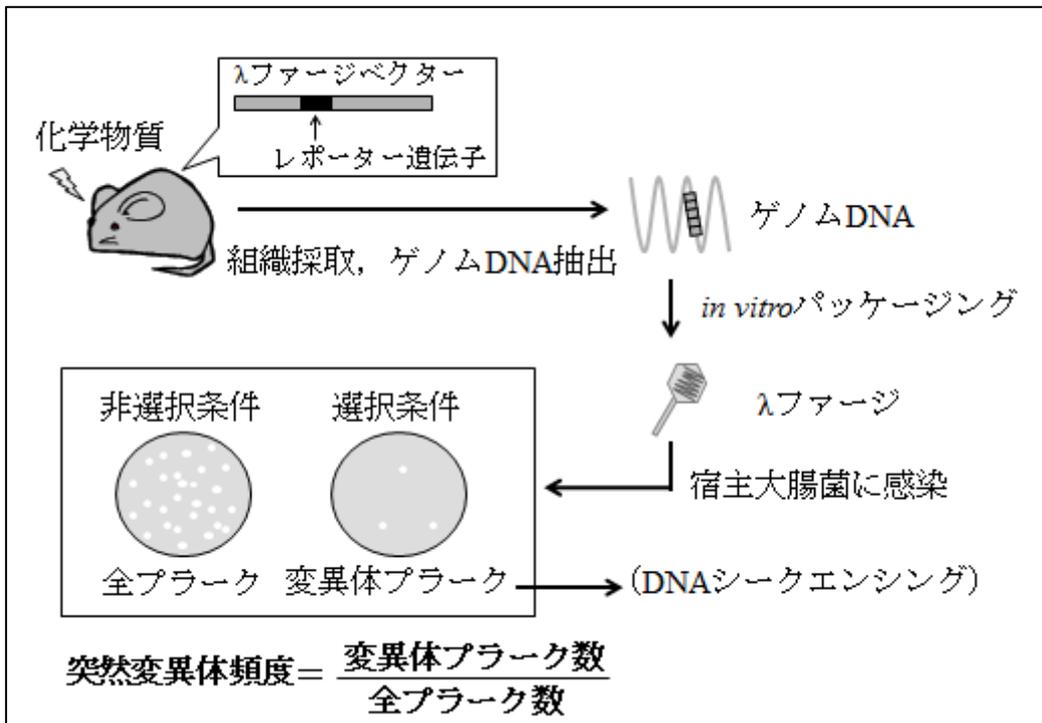


トランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異試験の開発・改良 (2014. 03. 25)

トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験は、突然変異検出用のレポーター遺伝子をゲノム中に導入した遺伝子組換えマウスやラットを使用する *in vivo* 遺伝子突然変異試験である。小核試験が染色体異常誘発性を検出する試験であるのに対して、本試験は遺伝子突然変異を検出する試験であり、遺伝毒性試験バッテリーにおいて有用な選択肢となる。原理的には個体のあらゆる組織で突然変異を検出可能であり、個体における曝露経路、発がん標的臓器、代謝等を考慮した評価に有用である。また、任意の組織において突然変異を測定することができることから、発がん標的臓器で遺伝毒性を評価できる試験系として有用である。トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験は、1990年代に複数のモデルが開発された。その後、遺伝毒性試験に関する国際ワークショップ (International Workshop on Genotoxicity Testing: IWGT) において試験法の評価とガイドライン化の検討が行われた (文献 1, 2)。2011年には OECD テストガイドライン TG488 (Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays) が公開されている (2013年に一部改訂)。

〔試験の原理〕

トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験で用いられるのは主としてマウスおよびラットである。これらのトランスジェニック動物のゲノムには、 λ ファージ DNA またはプラスミド DNA をベクターとして、突然変異を検出するためのレポーター遺伝子が多コピー導入されている。レポーター遺伝子は λ ファージまたはバクテリア由来であり、動物個体内では発現せず遺伝子機能による選択圧を受けないため、遺伝的に中立であると言える。通常の試験では、動物個体を化学物質等に曝露させた後、任意の臓器・組織からゲノム DNA を抽出する。ゲノム DNA に組み込まれた導入遺伝子を、*in vitro* パッケージングによって λ ファージ粒子として回収する。回収した λ ファージを宿主大腸菌に導入することで、突然変異を持ったレポーター遺伝子を λ ファージまたは大腸菌の変異体として検出する。検出された変異体の数を、回収したレポーター遺伝子の数 (λ ファージまたは大腸菌の総数) で除して、突然変異体頻度 (mutant frequency) を算出する。既存の動物モデルにおける陰性対照群の突然変異体頻度は、使用する検出系によって異なるが、概ね $10^{-5} \sim 10^{-6}$ である。必要に応じて、突然変異体からレポーター遺伝子を PCR で増幅し、DNA シークエンシングによって塩基配列変化の情報を得ることができる。得られた突然変異スペクトルは、化学物質が誘発する突然変異の特徴を分析するために有用である。



トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験の概略図

〔試験の方法〕

トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験は、任意の組織において突然変異を測定することができることから、曝露の方法、組織採取時期および解析対象の選択等の自由度が高いという特徴がある。安全性試験の一環として実施する際には、ガイドライン等を参考に投与方法や用量群の設定を行うことが望ましい。動物への投与経路は、ヒトの予想曝露経路を考慮して選択する。強制経口投与が一般的だが、他の曝露経路を選択することも可能である。突然変異は投与ごとに蓄積することから、反復投与が推奨される。DNA 損傷が点突然変異として固定されるには DNA 複製が必要であり、組織の細胞分裂速度の影響を受けるため、突然変異の検出に適した曝露期間を設けることが必要である。投与期間後の試料採取時期は突然変異の固定に必要な期間によって決まる。増殖の早い組織と遅い組織での測定を両立させるために、OECD テストガイドラインでは 1 日 1 回 28 日間の反復投与と最終投与後 3 日目の試料採取を推奨している。生殖細胞については特に、発生過程を考慮して異なる採取時期が必要としている。試験群は、1 群 5 匹以上の動物（通常は雄）を用いて、陰性対照群、3 用量の処理群および陽性対照群を設ける。最高用量は最大耐量（MTD）または限度用量（28 日間投与の場合は 1000 mg/kg 体重/日）とする。採取した組織は-70℃以下で長期間保存可能である。突然変異を測定する組織の選択は、被験物質の投与経路、毒性学的所見、発がん標的等の考察に基づいて行う。2 種類以上の組織を解析することが望ましく、肝臓、骨髄、消化管等が候補とな

る。いずれかの組織で突然変異体頻度の増加（陰性対照群と比較して明らかな増加，または用量依存性のある増加）が認められた場合に陽性と判断されるが，結果を解釈する際はまず生物学的意義を考慮する。統計学的解析は動物個体を単位として行う。

〔検出される突然変異の特徴〕

本試験系は，動物個体内でレポーター遺伝子上に固定された *in vivo* 突然変異を検出するものである。ファージの回収過程，および宿主大腸菌内での複製または修復過程で生じる *in vitro* および *ex vivo* 変異の混入は比較的まれである。ポジティブセレクション法においては，野生型のレポーター遺伝子を持ったファージ・大腸菌は選択条件下で増幅・生育できないため，DNA 損傷を持ったレポーター遺伝子が宿主大腸菌内で複製される過程で突然変異に固定される余地は限定的である。

レポーター遺伝子に生じた突然変異の表現型への影響（遺伝子産物のアミノ酸変化，酵素活性の変化，毒性等の選択圧）は一律ではなく，検出される突然変異の特徴には用いたレポーター遺伝子に固有のバイアスがかかっている。しかしながら，点突然変異を検出するレポーター遺伝子 (*lacZ*, *lacI*, *cII*, *gpt*) の突然変異の特徴は，遺伝子サイズや検出系の違いにかかわらず共通の特徴を示すことが知られている。また，これらの特徴は内在性 *Hprt* 遺伝子でみられるものと同様である。このことは，本試験系の普遍性と堅牢性を示している。一方で，回収されるレポーター遺伝子やファージベクターのサイズを超えるような大きな変異，特に染色体レベルの欠失・組み換え等の変異はこの試験では検出することができない。

本試験系では，遺伝子突然変異を λ ファージや大腸菌の変異体として検出するため，評価の指標として突然変異体頻度 (*mutant frequency*) を用いる。この方法では，個体内で突然変異が生じた後にその細胞が分裂して見かけの変異数が増えた場合，実際に起こった突然変異の数を過大評価する可能性がある。変異体のシーケンス解析を行うと，独立した突然変異の数に補正した突然変異頻度 (*mutation frequency*) を算出することができる。すなわち，同一個体由来のサンプルから同一変異を持つ変異体が複数検出された場合は1個の変異として計算する。この方法は，あるサンプルが著しく高い変異体頻度を示した時などに，クローン性の変異の影響を除くために有効である。ただし，複数のレポーター遺伝子に同一の突然変異が独立に起こることもあるので解釈には注意を要する。複数の個体で同一の突然変異が高頻度にみられた場合，このような突然変異のホットスポットは化学物質が誘発する特徴的な変異を反映している可能性がある。

〔*gpt delta* トランスジェニックマウス、ラットモデル〕

国立衛研の能美らによって開発された、大腸菌 *gpt* 遺伝子および λ ファージの *red/gam* 遺伝子をレポーターとした λ EG10 ファージベクターをゲノムに導入して作出されたトランスジェニックマウスおよびラットである（文献 3, 4）。17 番染色体に約 80 コピーの

導入遺伝子が挿入された *gpt delta mouse* (C57BL/6), 4 番染色体に 5~10 コピーの導入遺伝子が挿入された *gpt delta rat* (Sprague-Dawley, Fisher 344, Wistar Hannover) がある。*gpt delta* の特徴は, 2 種類のポジティブセレクション法を用いて, 点突然変異と欠失変異を選択的に検出する点である (文献 5)。

第 1 は, 大腸菌 *gpt* 遺伝子をレポーターに用いた *gpt assay* であり, 点突然変異 (塩基置換とフレームシフト) を検出する。培地に添加された 6-thioguanine は *gpt* 遺伝子がコードする guanine phosphoribosyltransferase によって DNA に取り込まれる形になり毒性を示すため, *gpt* が不活化した変異体のみが寒天培地にコロニーを作る。λEG10 ファージベクターには *gpt* とクロラムフェニコール (Cm) 耐性遺伝子を含むプラスミド DNA が組み込まれており, *in vitro* パッケージング法によって回収したファージベクターを Cre 組換え酵素を発現する宿主大腸菌に感染させると, *lox* 配列に挟まれた領域が切り出されてマルチコピーのプラスミドとして保持される。6-thioguanine と Cm を含む寒天培地で生育する *gpt* 変異体コロニーの数を, Cm のみを含む寒天培地で生育した形質転換コロニーの総数で除して突然変異体頻度を算出する。*gpt* 遺伝子は 456 bps であり, シークエンス解析は容易である。

第 2 は, λファージの *red/gam* 遺伝子をレポーターに用いた *Spi assay* であり, 欠失変異を検出する。*Spi* とは sensitive to P2 interference の略であり, λファージが P2 ファージ溶原菌に対して溶菌プラークを作れない (*Spi*⁺) のに対して, *red* と *gam* 両遺伝子が不活化した変異ファージは P2 ファージ溶原菌にも溶菌プラークを作る (*Spi*⁻) という性質を利用して, *Spi* 変異体プラークを検出する。非溶原菌に感染させると全てのファージがプラークを作るので, *Spi* 変異体頻度が算出できる。2 つの遺伝子それぞれに独立して点突然変異が起こる確率は低いため, 2 つの遺伝子が同時に不活化することは, 通常, 両遺伝子を含む領域に欠失変異が起こったことを意味する。*Spi*⁻ assay で検出可能な欠失サイズは 1 bp~約 10 kb である。*red* と *gam* は隣接しており連続して転写, 翻訳されるため, 上流側の *gam* 遺伝子内のフレームシフト変異は *red* の正常な翻訳を妨げ, *Spi* 変異として検出される。また, λEG10 の長さは 48 kb であり, 10 kb を超える欠失変異は *in vitro* パッケージングの障害となり検出できない。得られた *Spi* 変異体は, PCR とシークエンス解析によって欠失部位の塩基配列を決定することができる。

国立衛研変異遺伝部では, これまでに *gpt delta* マウスおよびラットを用いて化学物質、放射線、紫外線等が誘発する点突然変異および欠失変異について研究しており, 自然突然変異および誘発突然変異の特徴は総説等にまとめられている (文献 6,7)。

【その他の主なレポーター遺伝子と動物モデル】

1. *lacZ* (MutaTMMouse)

大腸菌 *lacZ* 遺伝子をレポーターとした λgt10*lacZ* ファージベクターをマウスゲノムに導入して作出された, 最初のトランスジェニックマウスである (文献 8)。後に, 3 番染

色体に約 40 コピーの導入遺伝子が挿入されたマウスが樹立され、MutaTMMouse と呼ばれる。当初、変異検出には X-gal 培地を用いたカラーセクション法が用いられたが、その後、P-gal 培地を用いるポジティブセクション法が開発された（文献 9）。*lacZ* 遺伝子の大きさは約 3kb である。

2. *lacI* (BigBlue^R)

大腸菌 *lacI* 遺伝子をレポーターとした λ LIZ α ファージベクターを用いて作出されたトランスジェニックマウスおよびラットである（文献 10, 11）。4 番染色体に約 40 コピーの導入遺伝子が挿入された BigBlue^RMouse と、10 数コピーの導入遺伝子がゲノムに挿入された BigBlue^RRat がある。変異検出には X-gal 培地を用いたカラーセクション法を用いる。*lacI* 遺伝子の大きさは約 1 kb であり変異体のシーケンス解析は比較的容易だが、カラーセクション法は実験が煩雑であり、現在ではあまり用いられない。BigBlue^R マウスおよびラットにおいては、*cII* 遺伝子を用いたポジティブセクション法が使用可能である。

3. *cII* (MutaTMMouse, BigBlue^R)

MutaTMMouse および BigBlue^R マウス・ラットで使用可能なポジティブセクション法であり、 λ ファージの *cII* 遺伝子をレポーターとして用いる（文献 12）。*cII* および *cI* は λ ファージの溶原化に関わる遺伝子であり、*hfl* 宿主大腸菌において *cII* 変異を持ったファージのみが溶菌して寒天培地にプラークを作る性質を利用している。*cII* 遺伝子は 294 bps と小さく、シーケンス解析が容易である。なお、*gpt delta* マウス・ラットに用いられている λ EG10 ファージベクターは、Spi⁻ assay に必要な *chiC* 変異を *cII* 遺伝子内に持ち、*cI* 領域が欠失しているため、*cII* ポジティブセクション法を使用できない。

文献

- 1) Thybaud, V. *et al.*: *Mutat.Res.*, **540**, 141 (2003)
- 2) Lambert, I.B. *et al.*: *Mutat.Res.*, **590**, 1 (2005)
- 3) Nohmi, T. *et al.*: *Environ. Mol. Mutagenesis*, **28**, 465 (1996)
- 4) Hayashi, H. *et al.*: *Environ. Mol. Mutagenesis*, **41**, 253 (2003)
- 5) Nohmi, T. *et al.*: *Mutat.Res.* **455**, 191 (2000)
- 6) Masumura, K.: *Genes and Environment*, **31**, 105 (2009)
- 7) Nohmi, T. *et al.*: *Environ. Mol. Mutagenesis*, **45**, 150 (2005)
- 8) Gossen, J.A. *et al.*: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **86**, 7971 (1989)
- 9) Mientjes, E.J. *et al.*: *Mutat.Res.*, **360**, 101 (1996)
- 10) Kohler, S.W. *et al.*: *Environ. Mol. Mutagenesis*, **18**, 316 (1991)
- 11) Dyaico, M.J. *et al.*: *Mutat.Res.*, **307**, 461 (1994)
- 12) Jakubczak, J.L. *et al.*: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **93**, 9073 (1996)