

Pig-a遺伝突然変異検出系の開発・改良

1. Pig-a遺伝突然変異検出系 (Pig-aアッセイ) の原理

新規*in vivo*遺伝毒性試験であるPig-aアッセイは、Pig-a遺伝子(Phosphatidylinositol glycan, class a)を標的遺伝子としています。Pig-a遺伝子産物は、GPIアンカー生合成の第一段階で機能することが知られています(図1)。また、ほとんどの哺乳類において、Pig-a遺伝子はX染色体上に座位していることが知られています。つまり、雄では元々X染色体は1つのみであり、また、雌ではX染色体の片側アレルが不活性化していることから、これらの哺乳類ではPig-a遺伝子産物は1コピーの遺伝子アレルからのみ発現しています。これらのことを踏まえて、1コピーのPig-a遺伝子上に、その機能を失うような前進突然変異が生じた場合、細胞内ではGPIアンカーの生合成が起こらず、結果として細胞膜上にGPIアンカー結合型膜タンパク質が提示されなくなります(図2, 3)。これらの原理に基づいて、Pig-aアッセイでは組織サンプルの中でも比較的簡便に採取可能な赤血球を標的組織として赤血球細胞膜上のGPIアンカー型膜タンパク質欠損頻度を求めることで遺伝毒性評価をおこないます。また、従来研究が進められている全赤血球を標的としたPig-aアッセイに加えて、より高感度な幼若赤血球を標的としたPig-aアッセイであるPIGRET法なども開発されています。

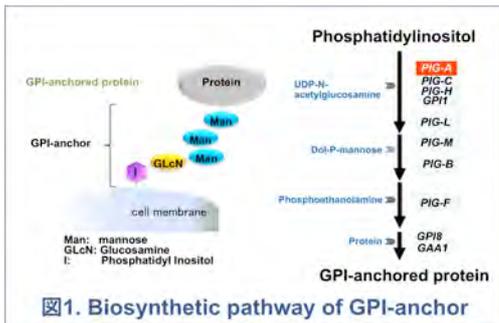


図1. Biosynthetic pathway of GPI-anchor

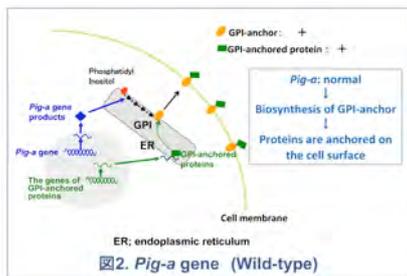


図2. Pig-a gene (Wild-type)

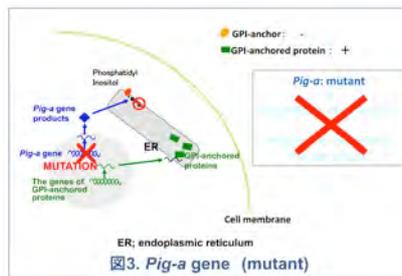


図3. Pig-a gene (mutant)

2. フローサイトメーターを用いた解析

Pig-aアッセイでは、赤血球細胞膜上のGPIアンカー型膜タンパク質の有無を、蛍光抗体およびフローサイトメーターを用いた赤血球の実測値により、Pig-a遺伝子変異体頻度を測定します。末梢血サンプルを蛍光標識された抗赤血球抗体および抗GPIアンカー型タンパク質抗体で染色し、フローサイトメーター解析ソフト上で各血液細胞を分画し、赤血球画分中のGPIアンカー型タンパク質蛍光強度の違いにより、Pig-a遺伝子変異体頻度を計測します(図4, 5)。通常、100万から500万個の赤血球を測定します。

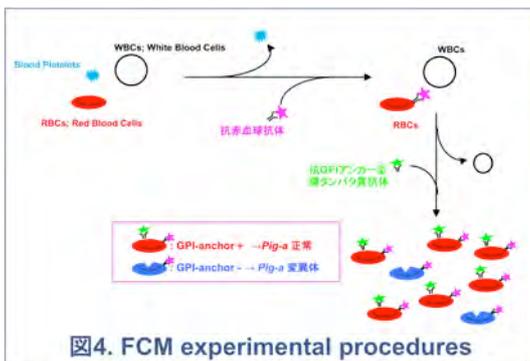


図4. FCM experimental procedures

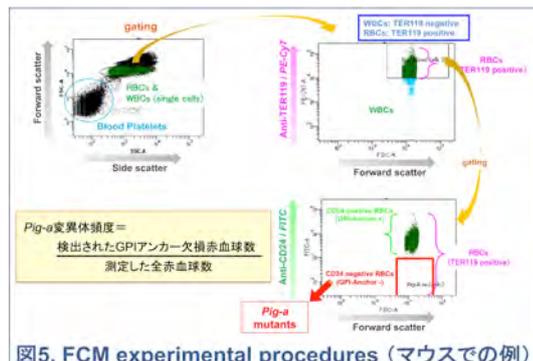


図5. FCM experimental procedures (マウスでの例)

3. Pig-aアッセイの有用性

遺伝毒性試験としてのPig-aアッセイのメリットは、大きく分けて以下の点に集約されます。

- 遺伝毒性の蓄積性が検出できると考えられている。
- 解析組織は微量の末梢血であるため、実験動物を屠殺する必要がない。
- 野生型動物を使用できる（トランスジェニック動物不要！）。
- フローサイトメーターを使用したハイスループットな解析が可能。
- ヒトにも応用できる！

これらのことを踏まえて、Pig-aアッセイの一般毒性試験への組み込みや国際ガイドライン化に向けた取り組みが関係各機関により実施されています。現状では、第6回遺伝毒性試験国際ワークショップ（6th International Workshop on Genotoxicity Testing）のPig-aアッセイワーキンググループ内において、いくつかの項目についての国際合意が得られています（変異遺伝部ホームページ内、“IWGT報告 Pig-a”を参照）。

4. 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部での取り組み

変異遺伝部においては、変異遺伝部第3室が中心となり、以下の項目についてPig-aアッセイに関する研究を実施しています。

- ラットおよびマウスを用いたPig-aアッセイおよびPIGRETアッセイとトランスジェニック変異試験の組み合わせ試験
- Pig-aアッセイの胎仔を含めた週齢および性差に関する開発研究
- Pig-aアッセイによる低線量放射線遺伝毒性評価
- ヒトPIG-Aアッセイの確立
- 日本環境変異原学会哺乳動物試験研究会（JEMS/MMS）共同研究の実施
- 他、Pig-aアッセイを用いた化学物質やナノマテリアルの遺伝毒性評価など。。

5. Pig-aアッセイに関する主要な研究発表

1. Horibata, K., A. Ukai, T. Kimoto, T. Suzuki, N. Kamoshita, K. Masumura, T. Nohmi and M. Honma (2013). "Evaluation of in vivo genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea, benzo[a]pyrene, and 4-nitroquinoline-1-oxide in the Pig-a and gpt assays." *Environ Mol Mutagen* 54(9): 747-754.
2. Kimoto, T., K. Horibata, S. Chikura, K. Hashimoto, S. Itoh, H. Sanada, S. Muto, Y. Uno, M. Yamada and M. Honma (2013). "Interlaboratory trial of the rat Pig-a mutation assay using an erythroid marker HIS49 antibody." *Mutat Res* 755(2): 126-134.
3. Horibata, K., A. Ukai, N. Koyama, A. Takagi, J. Kanno, T. Kimoto, D. Miura, A. Hirose and M. Honma (2011). "Fullerene (C60) is negative in the in vivo Pig-A gene mutation assay." *Genes and Environment* 33(1): 27-31.
4. Kimoto, T., S. Chikura, K. Suzuki, X. m. Kobayashi, Y. Itano, K. Horibata, M. Honma, V. N. Dobrovolsky, R. H. Heflich, D. Miura and Y. Kasahara (2011). "Further development of the rat Pig-a mutation assay: Measuring rat Pig-a mutant bone marrow erythroids and a high throughput assay for mutant peripheral blood reticulocytes." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 52(9): 774-783.