

P-11

モンシロチョウ属 (*Pieris*) 由来アポトーシス誘導蛋白質、ピエリシンによる突然変異誘発のシャトルベクターを用いた分子解析

○松川和樹¹、川西優喜¹、高村(塩谷)岳樹²、戸塚ゆ加里²、杉村隆²、若林敬二²、八木孝司¹ (¹大阪府大・先端研、²国立ガンセ・がん予防)

Molecular analysis of mutations induced by pierisin, apoptosis-inducing protein derived from *Pieris* butterflies.
Kazuki MATSUKAWA¹, Masanobu KAWANISHI¹, Takeji TAKAMURA-ENYA², Yukari TOTSUKA², Takashi SUGIMURA², Keiji WAKABAYASHI², Takashi YAGI¹
(¹Res. Inst. Adv. Sci Tech., Osaka Pref. Univ., ²Div. Cancer Prevention, Natl. Cancer Inst.)

(目的) モンシロチョウ (*Pieris rapae*) は、変態期に強力な細胞傷害活性を示すピエリシンと呼ばれるタンパク質を高発現する。ピエリシンはヒト細胞にアポトーシスを誘導し、さらに ADP リボシルトランスフェラーゼ活性を持ち、NAD を基質として DNA 中の主にグアニンに ADP リボシル化を引き起こす。そこで、我々はピエリシンが哺乳動物細胞内で突然変異を誘発するかどうかを検討した。

(方法) この解析には、哺乳動物細胞と大腸菌のシャトルベクターである pMY189 を用いた。pMY189 は突然変異に対するターゲット遺伝子 supF (大腸菌サブプレッサー tRNA 遺伝子) を持つ。これにピエリシン及び β-NAD を加え、37°C、1 時間インキュベートした後、プラスミドをヒト線維芽細胞株に導入した。72 時間後、ヒト細胞よりプラスミドを回収し、supF に生じた変異をインディケイター大腸菌 KS40/pKY241 で検出した。そして、その変異を自動 DNA シークエンサーにより解析した。

(結果) ピエリシンの濃度に依存した突然変異頻度の上昇が認められ、ヒト正常細胞では G:C から T:A、G:C、A:T への一塩基置換、および GG:CC から、CA:TG、CT:AG へのタンデム塩基置換が多くみられた。この結果はピエリシンが主にグアニンを ADP リボシル化するという事実と矛盾しない。さらに、ヌクレオチド除去修復を欠損したヒト色素性乾皮症細胞では、ピエリシンによるプラスミドの生存率が正常細胞における頻度の 1/12 であったことから、ADP リボシル化グアニンはヌクレオチド修復機構によって修復されることが示唆された。

P-12

Scid マウスにおける自然発生及び azoxymethane 誘発の欠失型突然変異の解析

○落合雅子¹、小林悠子¹、瀬尾友子¹、飯塚祐子¹、上田乙也²、鈴木宏志²、増村健一³、能美健彦³、杉村 隆¹、中釜 斉¹ (¹国立がんセンター・研・生化学、²中外製薬、³国立衛研・変異遺伝)

Analysis of spontaneous and azoxymethane-induced deletion mutations in Scid mice
Masako OCHIAI¹, Yuko KOBAYASHI¹, Yuko SEO¹, Yuko IIZUKA¹, Otoy UEDA², Hiroshi SUZUKI², Ken-ichi MASUMURA³, Takehiko NOHMI³, Takashi SUGIMURA¹, Hitoshi NAKAGAMA¹
(¹Biochemistry Div., Natl. Cancer. Ctr. Res. Inst., ²Chugai Phar. Co., Ltd., ³Div. Genet. and Mutagen., NIHS)

Scid マウスは DNA 依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニットに点突然変異 (scid 変異) を持ち、DNA2 本鎖切断の修復障害を有する。Scid マウスでは azoxymethane (AOM) による大腸発がん性が、親系統である C.B-17 マウスに比較し有意に高い (Ochiai et al., Carcinogenesis, 2001)。Scid 変異の存在が発がんに促進的に働いている可能性がある。DNA2 本鎖切断の修復障害が発がん過程に及ぼす影響を解明するため、Scid マウスと変異検出用のレポーター遺伝子 (λEG10) を組み込んだトランスジェニックマウスとの交配マウスを作製し、scid 変異の有無が *in vivo* での欠失型突然変異に及ぼす影響を解析した。scid 変異のホモ接合体 (scid/scid) と野生型 (+/+) の雌マウスに AOM (10 mg/kg, *i.p.*, 1/w, x4) を投与し、大腸粘膜より DNA を抽出した。欠失変異が検出可能な Spi⁻ selection により突然変異体頻度を算出すると、AOM 投与群では、scid/scid は +/+ よりも高い傾向が認められた (10⁶ 当り 6.7 ± 4.1 及び 3.0 ± 2.2)。非投与群では、両者に差はなかった。非投与群で生じた変異体では、1 kb 以上の欠失変異は、scid/scid で 17 個中 4 個、+/+ で 11 個中 2 個であり、scid 変異による自然突然変異の欠失サイズへの有意な影響はなかった。さらに個体数を増やして解析している。また AOM 誘発突然変異で生じた変異体についても併せて検討している。