

大腸菌 WP2 *uvrA* 株を用いた突然変異スペクトル解析系の開発

太田 敏博^{*1}, 赤沼 三恵², 石原 啓美³, 北 陽子³, 島村 万紀³,
川口 泰史³, 時下 進一¹, 志賀 靖弘¹, 山形 秀夫¹

¹ 東京薬科大学生命科学部 環境分子生物学研究室 〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1

² (財)残留農薬研究所毒性部 毒性第三研究室 〒187-0011 東京都小平市鈴木町2-772

³ コニカ株式会社環境安全推進室 安全性試験センター 〒191-8511 東京都日野市さくら町1

A set of tester strains for the determination of mutational specificity in *E. coli* WP2*uvrA* with and without pKM101

Toshihiro Ohta¹, Mie Watanabe-Akanuma², Hiromi Ishihara³, Yoko Kita³,
Maki Shimamura³, Yasushi Kawaguchi³, Shin-ichi Tokishita¹, Yasuhiro Shiga¹,
and Hideo Yamagata¹

¹ School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science,
1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392 (Japan)

² Institute of Environmental Toxicology, Suzuki-cho 2-772, Kodaira, Tokyo 187-0011 (Japan)

³ Environmental and Safety Department, Konica Corporation, No. 1 Sakura-machi,
Hino, Tokyo 191-8511 (Japan)

Summary

Two sets of useful tester strains (WP3101-WP3106 and WP3101P-WP3106P) derived from *E. coli* WP2*uvrA* were constructed for the detection and classification of mutagens. Six kinds of F' plasmid (*lacI*⁻, *lacZ*⁻, *proAB*⁺) in strains WP3101-WP3106 carried a different *lacZ*⁻ allele. Assays for transitions and transversions are based upon Lac⁺ reversion of a specific mutation located within the *lacZ*⁻ gene on an F' plasmid in the strains. Plasmid pKM101 was further transferred to each strain to make a set of strains WP3101P-WP3106P. In any strain the *trpE65* (*ochre*) allele is available for the Trp⁺ reversion assays which is commonly used for mutagenicity test with the WP2*uvrA* strain.

Using the new tester strains, the mutational specificities of 1,2-dibromo-3-chloropropane and cumene hydroperoxide were investigated. In the presence of S9mix, 1,2-dibromo-3-chloropropane specifically induced G:C → A:T transitions. Cumene hydroperoxide induced two types of transversions, G:C → T:A detected in WP3104 and A:T → T:A detected in WP3105, with G:C → T:A predominating. In pKM101-carrying strains, all 6 types of base substitutions were induced by cumene hydroperoxide with different efficiencies. The frequency of predominant G:C → T:A transversions was not affected by the introduction of pKM101, while that of other types of transitions and transversions were markedly increased.

Keywords : transition, transversion, mutational specificity, pKM101, *E. coli* WP2*uvrA*

受付: 1998 年 4 月 16 日

受理: 1998 年 5 月 9 日

* Tel.: 0426-76-7093; Fax: 0426-76-7081

E-mail: ohta@ls.toyaku.ac.jp

©日本環境変異原学会

緒 言

近年、変異原性試験に用いる標準試験菌株の選定について、*hisG* 46 マーカーを持つ従来のサルモネラ菌 TA 1535 株、TA 100 株に加え、*hisG* 428 マーカーを持つサルモネラ菌 TA 102 株、あるいは *trpE* 65 マーカーをもつ大腸菌 WP 2 *uvrA* 株、WP 2 *uvrA*/pKM 101 株の有用性が議論されている (Wilcox et al., 1990; Gatehouse et al., 1994; Watanabe et al., 1996). これらの菌株の変異原に対する特異性や感受性は、対象とするマーカーにおける復帰可能な突然変異パターンの種類と各々の誘発頻度によって決まると考えられる。

hisG 遺伝子はヒスチジン合成系の ATP ホスホリボシルトランスフェラーゼの構造遺伝子であり、*hisG* 46 マーカーは 69 番目のアミノ酸ロイシン (CTC) がプロリン (CCC) に置き変わったミスセンス変異である (Barnes et al., 1982). プロリンから元のロイシンに戻る場合のほか、セリン (TCC), アラニン (GCC), ヒスチジン (CAC), スレオニン (ACC) に変化しても酵素活性は回復するため、いずれの場合でも His⁺ の表現型となる (Miller and Barnes, 1986; Koch et al., 1994). したがって *hisG* 46 マーカーを持つ菌株は G:C → T:A, G:C → A:T, G:C → C:G の 3 種類の変異のいずれかを誘発する変異原、すなわち G:C 塩基対に作用する変異原の検出に有効である。一方、*hisG* 428 マーカーや、大腸菌の *trpE* 65 マーカー (*trpE* はトリプトファン合成系のアントラニル酸シンターゼの構造遺伝子) ではアミノ酸の一つが終始コドン (TAA) に変異している。*hisG* 428 の場合、元のグルタミン (CAA) に戻る場合のほか、リジン (AAA), ロイシン (TTA), セリン (TCA) に変化しても酵素活性が回復する。さらに、チロシン tRNA 遺伝子、リジン tRNA 遺伝子、グルタミン tRNA 遺伝子のアンチコドン部位に生じたサプレッサー変異 (各々 GTA → TTA, TTT → TTA, TTG → TTA の変異) によっても酵素活性が回復して His⁺ の表現型になる (Levin and Ames, 1986). 大腸菌の Trp⁺ の復帰変異の場合は *trpE* 65 の変異の位置が報告されていないため、対応する野生型の元のコドンは不明であるが、復帰変異の基本パターンは *hisG* 428 の場合と同様である。したがって *hisG* 428 や *trpE* 65 マーカーを持つ菌株は G:C → C:G 以外の 5 種類の変異パターンのいずれかを誘発する変異原の検出に有効であり、G:C 塩基対だけでなく A:T 塩基対に作用する変異原も検出できる。

このように変異原が誘発する突然変異の特異性を明らかにすることは、変異原性試験における有用な菌株の開発や、突然変異生成や DNA 修復のメカニズムを知るうえでも重要であると考えられる。われわれはこれまで大腸菌の F' 因子上の *lacZ* 遺伝子に生じる特定の型の復帰突然変異を指標にして、変異原の突然変異スペクトル

を解析してきた (Watanabe and Ohta, 1993; Watanabe et al., 1994 a, b; Watanabe-Akanuma et al., 1997). 用いた大腸菌株は K-12 株系統の 6 菌株、CC 101~CC 106 株 (Cupples and Miller, 1989) で、DNA 修復能や膜透過性については野生型であったため、試験菌株に除去修復欠損変異 (*uvrA*) やリポ多糖類合成欠損変異 (*rfa*) を導入して試験菌株の改良を図ってきた (Watanabe-Akanuma and Ohta, 1994). 改良により変異原に対する菌株の感受性は向上したが、それでも大腸菌 B 株系統の WP 2 *uvrA* 株を用いた Trp⁺ 復帰変異試験で検出される弱い変異原について調べると解析が困難な場合が多かった。これは K-12 株と B 株の外膜構造の違い (Nikaido and Vaara, 1987) による感受性の差が一因と考えられた。そこで変異原性試験で一般的に用いられている大腸菌 WP 2 *uvrA* 株に上記の F' 因子を導入して、従来の Trp⁺ 復帰変異試験に加え、Lac⁺ 復帰変異による突然変異スペクトルを解析することのできる菌株を作製した (Ohta et al., in press). 今回、これらの菌株にさらにプラスミド pKM 101 を導入した新たな菌株のセットを作製し、その有用性と突然変異スペクトルに対する pKM 101 の影響について調べた。

実験材料および方法

1. 菌株の作製

菌株の遺伝子型と由来は Table 1 に示した。P1 ファージを用いて CSH 26 株の Δ (*pro-lac*) 欠失変異を WP 2 *uvrA* 株に形質導入した WP 2000 (*trpE*, Δ (*pro-lac*), *uvrA*) 株を作製した。WP 2000 株の分離には MacConkey 寒天プレート上で Lac⁻ 菌を選択し、この中から Pro⁻ となっている形質導入菌をレプリカ法で選んだ。K-12 株系統の CC 101~CC 106 株の F' 因子 (*lacI*⁻, *lacZ*⁻, *proAB*⁺) を直接 B 株系統の WP 2000 株に接合で移すための適当な選択マーカーがなかったので、まず、CC 101~CC 106 株の F' 因子を接合により K-12 株系統の AB 1157 (*hisG*, *argE*, Δ *proA*, *thr*, *leuB*, *lacY*, *thi*, Sm^r) 株に移した。LB 培地で一晚掛け合わせを行い、100 μ g/ml streptomycin 含有の最少グルコース寒天プレート (His, Arg, Thr, Leu, V. B₁ 添加) にまいて、Pro⁺, Sm^r 選択を行って AB 101~AB 106 株を分離した。次に AB 101~AB 106 株から F' 因子を接合伝達により WP 2000 株に移した。LB 培地で一晚掛け合わせた菌液を最少グルコース寒天プレート (Trp 添加) にまいて、Pro⁺, His⁺, Arg⁺, Thr⁺, Leu⁺ 選択を行って WP 3101~WP 3106 株 (*trpE*, Δ (*pro-lac*), *uvrA*/F' (*lacI*⁻, *lacZ*⁻, *proAB*⁺)) を分離した。

プラスミド pKM 101 (Ap^r) の導入は WP 3101~WP 3106 株とサルモネラ菌 TA 100 株 (*hisG*, pKM 101) を LB 培地で一晚掛け合わせ、10 μ g/ml ampicillin 含有の最少グルコース寒天プレート

Table 1 Bacterial strains

Strain	Genotype	Source	Reference
<i>Escherichia coli</i> K-12			
CC101-CC106	F'(<i>lacI</i> , <i>lacZ</i> , <i>proAB</i> ⁺)/ <i>ara</i> , Δ (<i>lac-pro</i>)5	J. H. Miller	Cupples and Miller (1989)
AB1157	F ⁻ , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>hisG4</i> , <i>argE3</i> , Δ (<i>gpt-proA</i>)62, <i>thi-1</i> , <i>lacY1</i> , <i>ara-14</i> , <i>rpsL31</i>	T. Kato	Bachmann (1972)
AB101-AB106	F'(<i>lacI</i> , <i>lacZ</i> , <i>proAB</i> ⁺)/ <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>hisG4</i> , <i>argE3</i> , Δ (<i>gpt-proA</i>)62, <i>thi-1</i> , <i>lacY1</i> , <i>ara-14</i> , <i>rpsL31</i>	CC101-CC106×AB1157	Ohta et al. (in press)
CSH26	F ⁻ , <i>ara</i> , Δ (<i>lac-pro</i>), <i>thi</i>	A. Nishimura	Miller (1972)
<i>Escherichia coli</i> B			
WP2uvrA	F ⁻ , <i>uvrA155</i> , <i>trpE65</i> , <i>malB15</i> , <i>lon-11</i> , <i>sulA1</i>	T. Kada	Witkin and George (1973)
WP2000	F ⁻ , <i>uvrA155</i> , <i>trpE65</i> , <i>malB15</i> , <i>lon-11</i> , <i>sulA1</i> , Δ (<i>lac-pro</i>)	WP2uvrA×P1(CSH26)	Ohta et al. (in press)
WP3101-WP3106	F'(<i>lacI</i> , <i>lacZ</i> , <i>proAB</i> ⁺)/ <i>uvrA155</i> , <i>trpE65</i> , <i>malB15</i> , <i>lon-11</i> , <i>sulA1</i> , Δ (<i>lac-pro</i>)	AB101-AB106×WP2000	Ohta et al. (in press)
WP3101P-WP3106P	F'(<i>lacI</i> , <i>lacZ</i> , <i>proAB</i> ⁺)/ <i>uvrA155</i> , <i>trpE65</i> , <i>malB15</i> , <i>lon-11</i> , <i>sulA1</i> , Δ (<i>lac-pro</i>)/pKM101(<i>mucAB</i> , Ap ^r)	WP3101-WP3106×TA100	this study
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2			
TA100	<i>hisG46</i> , Δ (<i>uvrB-bio</i>), <i>rfa</i> /pKM101(<i>mucAB</i> , Ap ^r)	T. Kada	Maron and Ames (1983)

(Trp 添加) にまいて His⁺, Ap^r 選択を行って WP 3101 P~WP 3106 P 株を分離した。

2. 培 地

菌の掛け合わせに用いた LB 培地の組成は 1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 1 % NaCl で、最少グルコース培地は Vogel-Bonner E medium (Maron and Ames, 1983) に 0.5 % glucose を加えたものを基本とし、必要に応じてアミノ酸を 50 μ g/ml, ビタミンを 1 μ g/ml, agar を 1.5 % の濃度で添加した。WP 3101~WP 3106 株の前培養には 50 μ g/ml (250 μ M) tryptophan を加えた最少グルコース培地 (MGT 培地) を用いた。ラクトースオペロンの転写は培地中のグルコースによって抑制されるので、菌の前培養に用いる MGT 培地のグルコース濃度は 0.5 % とした。このグルコース濃度は大腸菌の培養で一般的に用いられる濃度であり、菌の生育には十分な量である。WP 3101 P~WP 3106 P 株の前培養にはさらに 5 μ g/ml の ampicillin を加えた。Lac⁺ 復帰変異の測定には、最少ラクトース寒天プレート (Vogel-Bonner E medium, 0.5 lactose, 50 μ g/ml tryptophan, 1.5 % agar) と NB-トップアガー (0.5 mg/ml Oxoid nutrient broth No. 2, 0.5 % NaCl, 0.6 % agar) を用いた。一方、Trp⁺ 復帰変異の測定には、WP 3101 株および WP 3101 P 株を nutrient broth 培地 (25 mg/ml Oxoid nutrient broth No. 2) で前培養した菌液、最少グルコース寒天プレート (Vogel-Bonner E medium, 2 % glucose, 1.5 % agar) と TP-トップアガー (10 μ g/ml (50 μ M) tryptophan, 100 μ g/ml proline, 0.5 % NaCl, 0.6 % agar) を用いた。

3. 試 薬

3-Amino-1-methyl-5 *H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp

-P-2, CAS No. 72254-58-1), 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP, CAS No. 96-12-8), dimethylsulfoxide (DMSO) は和光純薬工業より購入した。5-Azacytidine (CAS No. 320-67-2), N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG, CAS No. 4245-77-6), 2-aminoanthracene (CAS No. 613-13-8), および cumene hydroperoxide (80 %, CAS No. 80-15-9) は Aldrich Chemical Co. (WI, USA) から入手した。また、4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO, CAS No. 56-57-5) は東京化成工業より、N⁴-aminocytidine (CAS No. 57294-74-3) はフナコシより購入した。5-Azacytidine と N⁴-aminocytidine は滅菌した純水 (Milli-Q, Ultra-Pure Water system, Millipore Ltd.) に溶解させた。その他の変異原は DMSO を溶媒として用いた。代謝活性化には、オリエンタル酵母工業より購入した S 9 分画とコファクター A を 1:9 の割合で混合した S 9 mix を用いた。

4. 突然変異スペクトルの解析: Lac⁺ 復帰変異

保存菌を MGT 培地に接種して 37°C で一晩振盪培養した。MGT 培地で培養した菌液は遠心分離による洗浄を行わず、そのまま試験に供した。小試験管に菌液 0.1 ml, 変異原溶液 0.01-0.1 ml, 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) または S 9 mix 0.5 ml を分注し、37°C で 20 分間、緩やかに振盪しながらプレインキュベーションを行った。溶解して 45°C に保温しておいた NB-トップアガーを 2 ml 加えてよく混ぜた後、最少ラクトース寒天プレートにまいた。37°C で 48 時間培養後、Lac⁺ 復帰変異コロニーを数えた。

5. Trp⁺ 復帰変異試験

WP 3101 株または WP 3101 P 株を nutrient broth 培地に接種して、37°C で一晩振盪培養した菌液を使用し

Table 2 *lacZ* reversion events required to restore Lac⁺ phenotype in tester strains, and base substitutions detected.

Strain		Reversion event at Glu-461 codon (Amino acid change)			Base substitution	
<i>uvrA</i>	<i>uvrA</i> pKM101					
WP3101	WP3101P	AAT <u>T</u> AG TCA	→	AAT <u>C</u> AG TCA (Stop → Glu)	A : T → C : G	transversion
WP3102	WP3102P	AAT G <u>G</u> G TCA	→	AAT G <u>A</u> G TCA (Gly → Glu)	G : C → A : T	transition
WP3103	WP3103P	AAT <u>C</u> AG TCA	→	AAT <u>G</u> AG TCA (Gln → Glu)	G : C → C : G	transversion
WP3104	WP3104P	AAT G <u>C</u> G TCA	→	AAT G <u>A</u> G TCA (Ala → Glu)	G : C → T : A	transversion
WP3105	WP3105P	AAT G <u>T</u> G TCA	→	AAT G <u>A</u> G TCA (Val → Glu)	A : T → T : A	transversion
WP3106	WP3106P	AAT <u>A</u> AG TCA	→	AAT G <u>A</u> G TCA (Lys → Glu)	A : T → G : C	transition

All the strains contain *trpE65* (*ochre*), which is available for a Trp⁺ reversion assay, and are of Trp⁻, Lac⁻ phenotype.

た、Lac⁺ 復帰変異の場合と同様の操作でブレインキュベーションを行い、TP-トッパアガー 2 ml を加えて最少グルコース寒天プレートにまき、37°C で 48 時間培養後、Trp⁺ 復帰変異コロニーを数えた。菌を nutrient broth 培地で培養するため、F' 因子が脱落した菌も増殖するので、トッパアガーにプロリンを加えることによってその影響を除いた。

結 果

1. 菌株の特性と試験法

作製した WP 3101~WP 3106 株および WP 3101 P~WP 3106 P 株において検出できる復帰変異のパターンを Table 2 に示した。F' 因子上の *lacZ*⁻ 遺伝子の変異位置はβ-ガラクトシダーゼ蛋白の N 末端から 461 番目のグルタミン酸に対応する GAG コドンである。この位置のグルタミン酸はβ-ガラクトシダーゼの酵素活性に必須であり、他のどのアミノ酸に変わっても活性を失うことが知られている (Cupples and Miller, 1989)。したがって、いずれの菌株もグルタミン酸のコドン (GAG) に変異した場合のみ Lac⁺ となる。この原理をもとに、Lac⁺ 復帰変異コロニーを数えることによって WP 3101 株と WP 3101 P 株は A:T → C:G 変異、WP 3102 株と WP 3102 P 株は G:C → A:T 変異、WP 3103 株と WP 3103 P 株は G:C → C:G 変異、WP 3104 株と WP 3104 P 株は G:C → T:A 変異、WP 3105 株と WP 3105 P 株は A:T → T:A 変異、そして WP 3106 株と WP 3106 P 株は A:T → G:C 変異の誘発を特異的に検出することができる。

菌株を nutrient broth 培地や LB 培地に直接接種して一晩培養すると、F' 因子が脱落した菌の割合が高くなり (80 % 以上になることもある) 試験に用いるには不適切な状態になる。F' 因子が脱落した菌はプロリン要求性となるので、プロリンを含まない MGT 培地で生育させることで F' 因子を維持することができる。試験法に関してはこれまで、MGT 培地で一晩前培養した菌液を LB 培地に 1/50 容量接種して 3~4 時間振盪培養し、得られ

た対数増殖期後期の菌液を遠心分離による洗浄を行った後、緩衝液に懸濁したものを試験に用いていた (Ohta et al., in press)。しかしその後、洗浄して緩衝液に懸濁した菌液を用いると塩基アナログなどの変異原に対する感受性が著しく低下することがわかった。今回、N⁴-aminocytidine, ENNG, 4-NQO, 5-azacytidine を用いての検討の結果、MGT 培地で培養した菌液を洗浄せずにそのまま用いた場合が、相対的に良好な結果を与えた。この場合、培地中のグルコースがラクトースオペロンの発現を抑制することが懸念されたが、試験に用いる菌培養液 0.1 ml に含まれる MGT 培地中のグルコースの残存量は、突然変異誘発頻度でみるかぎりでは *lacZ* 遺伝子の発現には影響しなかった。なお、NB-トッパアガーの方にはトリプトファンを添加する必要はなく、添加しても突然変異誘発頻度での結果に差は認められなかった。

2. 陽性対照

WP 3101~WP 3106 株の陽性対照として用いることのできる変異原の種類と用量の一例を Table 3 に示した。ENNG は WP 3103 株以外の 5 菌株に Lac⁺ 復帰変異を誘発し、4-NQO は WP 3102, WP 3103, WP 3104 の 3 菌株に Lac⁺ 復帰変異を誘発する。また、塩基アナログの N⁴-aminocytidine は WP 3102 と WP 3106 の 2 菌株に、5-azacytidine は WP 3103 株だけに特異的に Lac⁺ 復帰変異を誘発する (Ohta et al., in press)。なお本菌株を用いた Lac⁺ 復帰変異の場合、塩基アナログの変異原性はブレインキュベーション法よりもプレート法の方が感受性が高い傾向があり、同一の培養液を用いて比較したとき、プレート法で数倍多い Lac⁺ 復帰変異コロニーが出現した。一方、S 9 mix 存在下で変異原性が検出される陽性対照としては、2-aminoanthracene (WP 3102 株) や Trp-P-2 (WP 3104 株) などがある (Table 3)。S 9 mix の酵素活性を確認するための陽性対照なので、どれか一菌株を用いて調べればよいと考えられる。

Table 3 Examples of mutagens which could be used as positive controls for tester strains WP3101-WP3106.

Compound	Dose (μ g/plate)	S9 mix	Lac ⁺ revertants/plate						Trp ⁺ revertants/plate
			WP3101 (A:T $\rightarrow$ C:G)	WP3102 (G:C $\rightarrow$ A:T)	WP3103 (G:C $\rightarrow$ C:G)	WP3104 (G:C $\rightarrow$ T:A)	WP3105 (A:T $\rightarrow$ T:A)	WP3106 (A:T $\rightarrow$ G:C)	WP3101
N ⁴ -Amino- cytidine	0	-	*	9	*	*	*	3	24
	0.01	-	*	232	*	*	*	-	-
	0.1	-	*	-	*	*	*	116	188
5-Azacytidine	0	-	*	*	0	*	*	*	*
	5	-	*	*	110	*	*	*	*
4-NQO	0	-	*	11	0	7	*	*	18
	0.2	-	*	134	18	317	*	*	206
ENNG	0	-	1	9	*	5	2	2	24
	0.2	-	-	262	*	-	-	-	119
	5	-	45	-	*	41	48	60	-
2-Amino- anthracene	0	+	*	11	*	7	*	*	42
	5	+	*	333	*	32	*	*	138
Trp-P-2	0	+	*	9	*	6	*	*	47
	2	+	*	69	*	128	*	*	396

* Negative response (less than 3-fold increase over the control)

Table 4 Examples of mutagens which could be used as positive controls for pKM101-carrying tester strains WP3101P-WP3106P.

Compound	Dose (μ g/plate)	S9 mix	Lac ⁺ revertants/plate						Trp ⁺ revertants/plate
			WP3101P (A:T $\rightarrow$ C:G)	WP3102P (G:C $\rightarrow$ A:T)	WP3103P (G:C $\rightarrow$ C:G)	WP3104P (G:C $\rightarrow$ T:A)	WP3105P (A:T $\rightarrow$ T:A)	WP3106P (A:T $\rightarrow$ G:C)	WP3101P
N ⁴ -Amino- cytidine	0	-	*	11	*	*	*	3	107
	0.01	-	*	270	*	*	*	-	-
	0.1	-	*	-	*	*	*	183	744
5-Azacytidine	0	-	*	*	1	10	*	*	93
	2	-	*	*	287	-	*	*	-
	5	-	*	*	1037	106	*	*	292
4-NQO	0	-	*	8	1	12	5	*	93
	0.05	-	*	-	-	403	-	*	552
	0.2	-	*	266	148	>2000	22	*	-
ENNG	0	-	2	7	1	5	2	4	87
	0.2	-	-	301	-	-	-	-	285
	5	-	138	-	26	184	145	720	-
2-Amino- anthracene	0	+	*	19	2	16	13	*	165
	5	+	*	146	22	330	199	*	674
Trp-P-2	0	+	2	20	1	17	12	*	140
	2	+	46	210	18	1136	252	*	1126

* Negative response (less than 3-fold increase over the control)

Table 4 には、pKM 101 を導入した WP 3101 P ~ WP 3106 P 株の陽性対照となる変異原の種類と用量の一例を示した。pKM 101 上の *mucAB* 遺伝子は突然変異誘発頻度を高める作用があるが (McCann et al., 1975; Walker, 1984), 同時に突然変異スペクトルも大きく変えることが知られている (Watanabe et al., 1994 b)。一般的な傾向としては、G:C $\rightarrow$ A:T 変異は pKM 101 の導入による影響が少なく、WP 3102 株と WP 3102 P 株で突然変異頻度に大きな差は生じなかった (Tables 3, 4)。一方、G:C $\rightarrow$ T:A 変異と A:T $\rightarrow$ T:A 変異は pKM 101 導入菌株 (WP 3104 P, WP 3105 P) で突然変異の増強効果が強く現れた。また、A:T $\rightarrow$ C:G 変異 (WP 3101 P 株) や G:C $\rightarrow$ C:G 変異 (WP 3103 P 株) も検出されやすくなった。5-Azacytidine は Trp⁺

復帰変異で調べると、WP 3101 株では変異原性が検出できないが pKM 101 を導入した WP 3101 P 株では変異原性が検出された。これは pKM 101 を導入したことにより G:C $\rightarrow$ C:G 変異以外に G:C $\rightarrow$ T:A 変異も誘発 (Table 4) されるように変化したためと解釈された。

3. 1,2-Dibromo-3-chloropropane (DBCP) の突然変異スペクトル

DBCP は WP 2 *uvrA* 株で変異原性が検出され、変異原性発現のためには代謝活性化が必要な変異原である (Moriya et al., 1983)。Table 5 には DBCP で誘発される突然変異のスペクトルを示した。S 9 mix の存在下では WP 3102 株で G:C $\rightarrow$ A:T 変異がきわめて高頻度で誘発されることがわかった。また、G:C $\rightarrow$ T:A 変異は

Table 5 Mutation spectra of 1,2-dibromo-3-chloropropane in the presence and absence of the S9 metabolic activation in tester strains WP3101-WP3106.

Compound	Dose (μ g/plate)	S9 mix	Lac ⁺ revertants/plate						Trp ⁺ revertants/plate
			WP3101 (A:T $\rightarrow$ C:G)	WP3102 (G:C $\rightarrow$ A:T)	WP3103 (G:C $\rightarrow$ C:G)	WP3104 (G:C $\rightarrow$ T:A)	WP3105 (A:T $\rightarrow$ T:A)	WP3106 (A:T $\rightarrow$ G:C)	WP3101
DBCP	0	-	2	9	0	3	1	0	23
	10	-	0	6	0	2	2	0	30
	20	-	2	6	0	1	0	0	31
	50	-	2	7	0	2	1	0	27
	100	-	0	10	0	9	1	0	20
DBCP	0	+	1	15	0	7	4	0	47
	1	+	-	49	-	-	-	-	-
	2	+	-	123	-	-	-	-	-
	5	+	-	238	-	-	-	-	-
	10	+	1	886	0	5	6	0	58
	20	+	0	>2000	0	10	3	0	91
	50	+	2	-	1	17	9	0	125
	100	+	1	-	0	28	9	2	223

WP 3104 株で高用量でわずかに誘発されていた。その他のタイプの変異は検出されなかった。

4. Cumene hydroperoxide の突然変異スペクトルと pKM 101 の影響

Cumene hydroperoxide によって誘発される突然変異のタイプを WP 3101~WP 3106 株と WP 3101 P~WP 3106 P 株を用いて解析した結果を Fig. 1 にまとめて示した。pKM 101 を持たない菌株では、G:C $\rightarrow$ T:A 変異が最も多く誘発され、ついで A:T $\rightarrow$ T:A 変異がわずかに誘発された。一方、pKM 101 導入菌株では6種類すべてのタイプの変異が誘発され、G:C $\rightarrow$ T:A 変異に加えて G:C $\rightarrow$ A:T 変異、A:T $\rightarrow$ T:A 変異もほぼ同程度の頻度で誘発された。この化合物の変異原性は Trp⁺ 復帰変異で調べると、WP 2 *uvrA* 株よりも WP 2 *uvrA*/pKM 101 株でより強く検出されることが報告されているが (Kato et al., 1994)、これは WP 2 *uvrA* 株において誘発されていた G:C $\rightarrow$ T:A 変異が pKM 101 導入によって単純に増強されたのではなく、その他のタイプの変異が高頻度で誘発されるようになったためと考えられた。

考 察

突然変異スペクトルを研究するための手法としては、DNA シークエンサー等により塩基配列変化を直接解析する方法の他、コロニープローブハイブリダイゼーションによる解析法 (Miller and Barnes, 1986; Cebula and Koch, 1990) が開発されている。

これらの手法では、塩基対置換だけでなく数塩基の付加や欠失によるフレームシフトも同時に調べられる利点がある。しかし、解析できるサンプル数に現実的な限界があるため、誘発された突然変異体の中での存在比が 1 %

以下しかないような発生頻度の低いタイプの変異の場合には、自然突然変異によるものか変異原で誘発されたものかを区別、定量することは困難である。ここで用いた復帰突然変異を指標とする解析方法では、塩基対置換だけを解析の対象にしても6菌株のセットが必要になるが、各々のタイプの変異を個別に定量できるため、発生頻度が低いタイプのものでも用量相関のデータを容易にとることができる。この目的のための菌株がこれまでに大腸菌 (Cupples and Miller, 1989) とサルモネラ菌 (Gee et al., 1994) で開発されている。前者の大腸菌株は F' 因子上の *lacZ* 遺伝子の変異を指標としているため、F' 因子を他の菌株に比較的容易に移すことができる。今回われわれは変異原性試験で広く用いられている WP 2 *uvrA* 株および WP 2 *uvrA*/pKM 101 株に移した菌株のセットを作製した。作製した菌株の表現型はいずれも Lac⁻ である以外は元の株と変わらず、したがって Trp⁺ 復帰変異試験も従来と同じ方法で培地やプレートの種類も変更せずに実施できる。このため、Trp⁺ 復帰変異試験で変異原性が検出された変異原については、Lac⁺ 復帰変異試験で突然変異スペクトルを調べることにより直接的な比較が可能になった。K-12 株由来の F' 因子を B 株に移したため、当初プラスミドの安定性が心配されたが、プロリン無添加の最少グルコース培地で継代培養を繰り返すことでかなり安定なクローンを得た。

塩基アナログやアルキル化変異原については特異的なタイプの突然変異が誘発され (Table 3)、これらの結果は K-12 株で得られたデータ (Watanabe et al., 1994 b) とよく一致したことから、作製したテスト菌株の中で F' 因子が維持され、機能していることが明らかとなった。

WP 3101~WP 3106 株を用いた突然変異スペクトルの解析から、各種の変異原で誘発される突然変異の特異性のほか、DNA 付加体形成における塩基配列依存性の

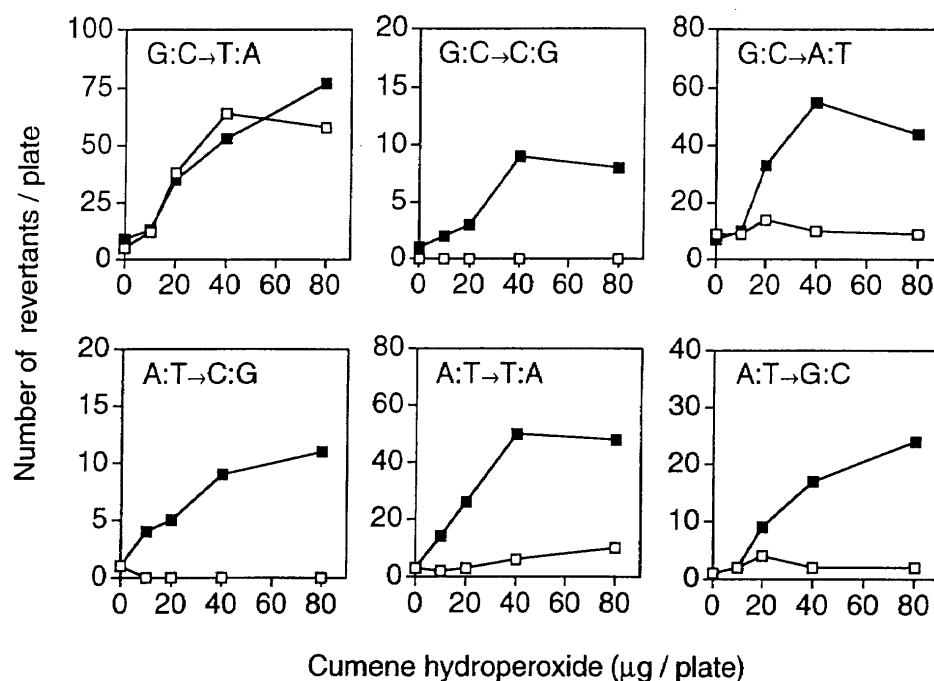


Fig. 1 Base substitutions induced by cumene hydroperoxide and the effect of *mucAB* genes in pKM101 on the mutational specificity. Each type of transition and transversion was assayed in strains WP3101-WP3106 (□) and pKM101-carrying strains WP3101P-WP3106P (■).

ことも明らかとなってきた。変異原性試験の陽性対照物質としてしばしば用いられる furylfuramide (AF-2) を Lac^+ 復帰変異で調べたところ、WP 3104 株で G:C → T:A 変異のみがわずかに増加傾向である以外は突然変異の誘発は観察されなかった (Ohta et al., in press)。しかし、同一菌株で行った Trp^+ 復帰変異試験では、親株の WP 2 *uvrA* 株と同程度に AF-2 の強い変異原性が検出された。AF-2 はグアニン塩基に付加体を形成し主に G:C → T:A 変異を誘発するが、なかでも 5'-TGC 配列中の G が AF-2 誘発突然変異のホットスポットであることが報告されている (Lambert et al., 1991)。ところで、G:C → T:A 変異を検出するための WP 3104 株における *lacZ* 遺伝子の標的塩基 (GCG) の前後の配列をみると、5'-AATGCGTCA となっている (Table 2)。この菌において Lac^+ 復帰変異が生じるためには GCG → GAG の塩基対置換が必要であるが、5'-TGC 配列が含まれているため、GCG の真ん中の C よりも 5'側の G の変異の方が起きやすいと考えられる。この変異に隠されてしまうため、 Lac^+ 復帰変異が生じにくくなり、AF-2 の変異原性が WP 3104 株でわずかしき検出されなくなったと推察された。DNA 付加体形成における塩基配列依存性の問題は、復帰変異を指標にしている突然変異スペクトルの解析系にとっては結果に大きな影響を与える重大な問題であり、菌株の開発、改良にあたっては慎重に検討していく必要がある。

突然変異スペクトルは pKM 101 プラスミド (*mucAB*

遺伝子) の導入により大きく変化することが報告されている (Watanabe et al., 1994 b; Gee et al., 1994; Szekeres et al., 1996)。Cumene hydroperoxide の例 (Fig. 1) でも明らかなように、pKM 101 プラスミドの導入によって突然変異頻度が著しく上昇するものと、ほとんど変わらないものがある。このことは *mucAB* 遺伝子様の機能を持たないとされる哺乳動物細胞において変異原で誘発された突然変異の特異性を、微生物細胞で得られた結果と比較する際には、pKM 101 プラスミドを持たない菌株での解析結果を用いたほうがより適切なのかもしれない。しかし一方では、変異原のスクリーニングを目的とした変異原性試験には、大腸菌株も含め pKM 101 プラスミドを持つ菌株を用いることが一般的になってきている。今後種々の変異原の突然変異スペクトルを pKM 101 の影響も含めて明らかにしていくことで、関与している DNA 修復機構や突然変異生成機構の理解も深まると考えられる。さらには変異原性試験に有用な菌株の開発にも役立つものと期待される。

参考文献

- Bachmann, B. J. (1972) Pedigree of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12, *Bacteriol. Rev.*, 36, 525-557.
- Barnes, W., E. Tuley and E. Eisenstadt (1982) Base-sequence analysis of His^+ revertants of the *hisG46* missense mutation in *Salmonella typhimurium*, *Environ. Mutagen.*, 4, 297.
- Cebula, T. A. and W. H. Koch (1990) Analysis of spontaneous and psoralen-induced *Salmonella typhimurium hisG46*

- revertants by oligo-deoxyribonucleotide colony hybridization: Use of psoralens to cross-link probes to target sequences, *Mutation Res.*, 229, 79-87.
- Cupples, C. G. and J. H. Miller (1989) A set of *lacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5345-5349.
- Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, T. Ohta, S. Venitt and E. Zeiger (1994) Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutation Res.*, 312, 217-233.
- Gee, P., D. M. Maron and B. N. Ames (1994) Detection and classification of mutagens: A set of base-specific *Salmonella* tester strains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 11606-11610.
- Kato, T., M. Watanabe and T. Ohta (1994) Induction of the SOS response and mutations by reactive oxygen-generating compounds in various *Escherichia coli* mutants defective in the *mutM*, *mutY*, or *soxRS* loci, *Mutagenesis*, 9, 245-251.
- Koch, W. H., E. N. Henrikson, E. Kupchella and T. A. Cebula (1994) *Salmonella typhimurium* strain TA100 differentiates several classes of carcinogens and mutagens by base substitution specificity, *Carcinogenesis*, 15, 79-88.
- Lambert, I. B., T. A. Chin, D. W. Bryant, A. J. E. Gordon, B. W. Glickman and D. R. McCalla (1991) The mutational specificity of 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide (AF2) in the *lacI* gene of *Escherichia coli*, *Carcinogenesis*, 12, 29-34.
- Levin, D. E. and B. N. Ames (1986) Classifying mutagens as to their specificity in causing the six possible transitions and transversions, *Environ. Mutagen.*, 8, 9-28.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and B. N. Ames (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 5135-5139.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Miller, J. K. and W. M. Barnes (1986) Colony probing as an alternative to standard sequencing as a means of direct analysis of chromosomal DNA to determine the spectrum of single-base changes in regions of known sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1026-1030.
- Moriya, M., T. Ohta, K. Watanabe, T. Miyazawa, K. Kato and Y. Shirasu (1983) Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems, *Mutation Res.*, 116, 185-216.
- Nikaido, H. and M. Vaara (1987) Outer membrane, In: F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (Eds), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, Vol. 1, American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 7-22.
- Ohta, T., M. Watanabe-Akanuma, S. Tokishita, Y. Shiga and H. Yamagata, Development of new tester strains derived from *E. coli* WP2 *uvrA* for the determination of mutational specificity, *Mutation Res.*, (in press).
- Szekeres, E. S. Jr., R. Woodgate and C.W. Lawrence (1996) Substitution of *mucAB* or *rumAB* for *umuDC* alters the relative frequencies of the two classes of mutations induced by a site-specific T-T cyclobutane dimer and the efficiency of translesion DNA synthesis, *J. Bacteriol.*, 178, 2559-2563.
- Walker, G. C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*, *Microbiol. Rev.*, 48, 60-93.
- Watanabe, K., K. Sakamoto and T. Sasaki (1996) Comparisons on chemically-induced mutagenicity among four bacterial strains, *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638, and *Escherichia coli* WP2/pKM101 and WP2 *uvrA*/pKM101: collaborative study I, *Mutation Res.*, 361, 143-155.
- Watanabe, M. and T. Ohta (1993) Analysis of mutational specificity induced by heterocyclic amines in the *lacZ* gene of *Escherichia coli*, *Carcinogenesis*, 14, 1149-1153.
- Watanabe, M., T. Nohmi and T. Ohta (1994a) Effects of the *umuDC*, *mucAB*, and *samAB* operons on the mutational specificity of chemical mutagenesis in *Escherichia coli*: I. Frameshift mutagenesis. *Mutation Res.*, 314, 27-37.
- Watanabe, M., T. Nohmi and T. Ohta (1994b) Effects of the *umuDC*, *mucAB*, and *samAB* operons on the mutational specificity of chemical mutagenesis in *Escherichia coli*: II. Base-substitutional mutagenesis. *Mutation Res.*, 314, 39-49.
- Watanabe-Akanuma, M. and T. Ohta (1994) Effects of DNA repair deficiency on the mutational specificity in the *lacZ* gene of *Escherichia coli*, *Mutation Res.*, 311, 295-304.
- Watanabe-Akanuma, M., R. Woodgate, and T. Ohta (1997) Enhanced generation of A:T → T:A transversions in a *recA730 lexA* (Def) mutant of *Escherichia coli*, *Mutation Res.*, 373, 61-66.
- Wilcox, P., A. Naidoo, D. J. Wedd and D. G. Gatehouse (1990) Comparison of *Salmonella typhimurium* TA102 with *Escherichia coli* WP2 tester strains, *Mutagenesis*, 5, 285-291.
- Witkin, E. M. and D. L. George (1973) Ultraviolet mutagenesis in *polA* and *uvrA* derivatives of *E. coli* B/r: evidence for an inducible error-prone repair system, *Genetics*, 73, 91-108.