

トランスジェニックマウス *gpt delta* を用いた 点突然変異と欠失突然変異の検出

能美 健彦, 増村 健一

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Detection of the point mutations and deletions using *gpt delta* transgenic mouse

Takehiko Nohmi and Ken-ichi Masumura

Div. of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

A novel transgenic mouse, named *gpt delta*, has been developed for the efficient detection of mutations *in vivo*. A feature of the assay system is the incorporation of two distinct positive selections for the detection of two different types of mutations, *i.e.*, point mutations and deletions. The first selection is 6-thioguanine selection, which uses the *gpt* gene of *E. coli* as a reporter and mainly detects point mutations such as base substitutions and frameshifts. Since the coding region of the *gpt* gene is 456 base pairs (bp), it is convenient for the identification of mutations by DNA sequencing. The second selection is Spi^- selection, which uses the *red/gam* genes of λ phage as a reporter and preferentially detects deletion mutations with the molecular sizes from 1 bp to about 10,000 bp. The results of the mutation assay with ethylnitrosourea and gamma-ray irradiation are presented.

Keywords : *gpt delta* mouse, 6-thioguanine selection, Spi^- selection, deletion mutation

緒 言

変異原のヒトに対するリスクを評価するためには、動物個体を用いた *in vivo* の突然変異検出系が重要である。しかし、*hprt* や *dlb-1* などの内在性遺伝子を指標とした *in vivo* 突然変異検出系は、検索できる組織が限定されてしまう点や、塩基配列レベルの詳細な解析が困難であるなどの問題を抱えている。近年、大腸菌やファージの遺伝子をレポーター遺伝子として組み込んだトランスジェニックマウスを用いて遺伝子突然変異を検出し分子レベルで解析することが可能になりつつある。体細胞

すべてにレポーター遺伝子のコピーを持っているため、個体の全組織を対象に変異原性の検索を行うことが可能である。このことは、変異原への暴露形態のみならず、発癌の臓器特異性や薬物代謝、さらに加齢や生殖細胞への影響などを考慮した変異原性評価を可能にする点で意義が大きい。現在商業的に入手できるものには大腸菌 *lacZ* 遺伝子をレポーターとする Muta™ Mouse (Gossen et al., 1989), *lacI* 遺伝子をレポーターとする Big Blue® mouse (Kohler et al., 1990; Kohler et al., 1991a) がある。しかし、既存のトランスジェニックマウス突然変異検出系は必ずしも普及しているとはいえない。原因としては、変異体の検出や変異部位の同定に要するコストの問題や、放射線等で誘発される欠失変異の検出に効果的な系がないなどの点があげられる。われわれはこ

受付：2000年5月18日 受理：2000年5月22日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第28回大会シンポジウムII「新しい変異原検出法へのアプローチ」で発表された。
This paper was presented to the symposium II "The approach to novel detection systems for environmental mutagens" at the 28th JEMS annual meeting, 1999.

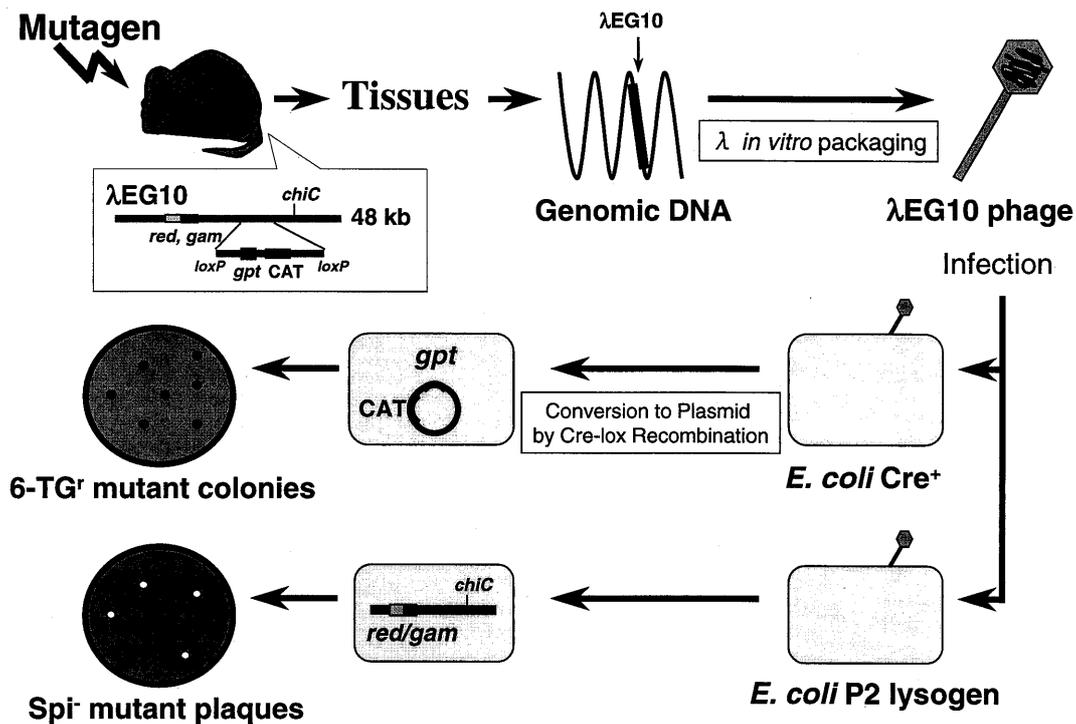


Fig. 1 Summary of *gpt* delta transgenic mouse mutagenicity assay.

うした点を改善するため、 λ EG 10 DNA を組み込んだトランスジェニックマウス *gpt* delta を開発した (Nohmi et al., 1996). このマウスは、2つの検出法によって異なるタイプの突然変異を効率よくポジティブセレクションできる特徴を持っている。①大腸菌 *gpt* 遺伝子をレポーターとする 6-thioguanine セレクションは、主に点突然変異 (塩基置換変異とフレームシフト) を検出する。② λ ファージの *red/gam* 遺伝子をレポーターとする Spi⁻ セレクションは、主に欠失変異を検出する。本稿では *gpt* delta マウスを用いた突然変異検出系について解説する。

1. トランスジェニックマウスの作製

われわれは、点突然変異検出用の標的遺伝子である大腸菌 *gpt* 遺伝子と欠失変異検出用の標的遺伝子である λ ファージ *red/gam* 遺伝子を持つトランスジーン λ EG 10 を構築した (Fig. 1). λ EG 10 は、chloramphenicol 耐性遺伝子 (CAT)、大腸菌 *gpt* 遺伝子、pBR 322 由来の複製開始部位 (*ori*) と一対の *loxP* 配列を持ったプラスミドを直鎖状にし、 λ 2001 DNA の *Hin*-dIII 部位に挿入して作製された。 λ EG 10 DNA をマイクロインジェクション法によりマウス受精卵に導入し、トランスジェニックマウス産仔 (C 57 BL/6 J および BDF 1) を得た。これらのマウスについて PCR によって *gpt* 遺伝子の導入を確認した。導入された λ EG 10 の *in vitro* パッケージングによる回収効率を測定し、高い回収効率を得られた系統についてさらにサザンプロット法に

より導入遺伝子コピー数を概算したところ、ハプロイドあたりの導入コピー数は BDF 1 由来の # 21 マウスで約 30 コピー、C 57 BL/6 J 由来の # 30 マウスで約 80 コピーと算出された。

2. 6-TG セレクションによる点突然変異の検出

大腸菌 *gpt* 遺伝子は、purine サルベージ回路に関わる guanine phosphoribosyltransferase をコードしている。この酵素はグアニンのフォスホリボシル化を触媒し、グアニンの DNA への取り込み過程を担っている。一方でこの酵素は 6-thioguanin (6-TG) も基質とする。6-TG は DNA に取り込まれることで毒性を示すため、野生型の *gpt* 遺伝子を持った大腸菌は 6-TG を含む培地上で生育することができず、*gpt* 遺伝子に変異を持った大腸菌のみが 6-TG を含む寒天培地上で生育しコロニーを作る。これが *gpt* 遺伝子を用いたポジティブセレクションの原理である。大腸菌 *gpt* 遺伝子はバクテリアや培養細胞の系でも突然変異検出の標的遺伝子として用いられてきており、コード領域が 456 bp と小さいためシーケンス解析による変異の同定も比較的容易である。

実験方法の概略を Fig. 1 に示す。変異原で処理したマウスから組織 DNA を抽出し、*in vitro* パッケージングによってトランスジーン λ EG 10 をファージ粒子として回収する。回収したファージを Cre 組み換え酵素を発現している大腸菌 YG 6020 株に感染させると、 λ EG 10 上にある一組の *loxP* 配列に挟まれた領域が Cre 組み換

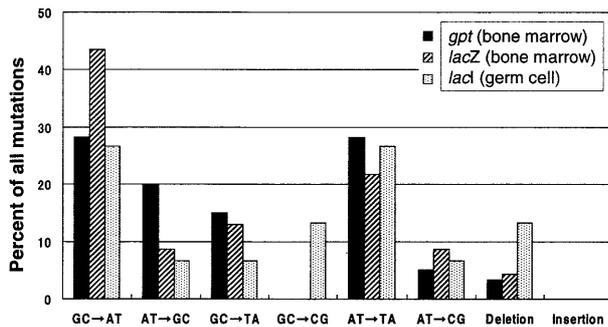


Fig. 2 ENU-induced mutation spectra analyzed by several transgenic mice systems. Bars represent the percentage of a particular type of mutation among total mutations identified. The source of the data is as follows: 60 *gpt* mutants from *gpt* delta mice in bone marrow (Masumura et al., 1999a); 23 *lacZ* mutants from the *lacZ* transgenic mouse strain 40.6 in bone marrow (Mientjes et al., 1998); 15 *lacI* mutants from *lacI* transgenic Big Blue™ mice in germ cells (Kohler et al., 1991b).

え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後の YG 6020 菌液を 6-TG と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で培養すると、プラスミド上の *gpt* 遺伝子が不活化している変異体のみが 6-TG を含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cm を含む M9 寒天培地にまいて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率が求められる。したがって、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除して突然変異体頻度を算出する。

無処理および ethylnitrosourea (ENU) で処理したマウスにおける *gpt* 遺伝子突然変異体頻度を測定した結果を示す。トランスジーンをヘテロに持つ #21 系統マウス (BDF 1) の雄個体に ENU を単回腹腔投与 (150 mg/kg body weight) し、7 日後に骨髄を回収した。ENU 処理群における *gpt* 突然変異体頻度は $2.1\text{--}2.3 \times 10^{-4}$ であり、無処理群の骨髄と比較して変異体頻度は約 4–7 倍に上昇した。さらに、得られた変異コロニーからプラスミド上の *gpt* 遺伝子領域を PCR で増幅し DNA シークエンシングによって解析したところ、ENU 処理群では GC → AT 変異 (17/60)、AT → TA 変異 (17/60) が多くみられた (Fig. 2) (Masumura et al., 1999 a)。同様の特徴は *lacI*, *lacZ* 遺伝子をレポーターとしたトランスジェニックマウスや哺乳類培養細胞の *hprt* 遺伝子を用いた実験データからも得られている (Jansen et al., 1994; Kohler et al., 1991 b; Mientjes et al., 1998)。一方、無処理群においては GC → AT を主とした塩基置換変異およびフレームシフト変異がみられたが、大腸菌の自然突然変異で高頻度にみられる IS1 の挿入は観察されず、大腸菌における変異スペクトラムとは明らかに異なっていた。このことは、レポーター遺伝子上の突然

変異がマウス個体内で固定されていることを示している。

3. Spi⁻ selection による欠失突然変異の検出

トランスジェニックマウス *gpt* delta は Spi⁻ セレクションを用いて欠失変異の検出が可能である。トランスジーンに λEG 10 には *red/gam* 遺伝子および *chi* 配列が存在する。λ ファージの *red/gam* 遺伝子は、ファージが感染した大腸菌の *recBC* 遺伝子機能を抑制し、自身の DNA が大腸菌の exonuclease により分解されるのを防ぐ。その結果ファージは増殖し寒天培地上にプラークを作る。しかし P2 溶原菌では、λ ファージの侵入により *recBC* 遺伝子が不活化されると P2 ファージの持つ Old 蛋白により宿主大腸菌を殺すので、結果的に λ ファージの増殖は抑止されプラークを生じない。この野生型 λ ファージの P2 溶原菌に対する表現型を Spi⁺ (sensitive to P2 interference) と呼ぶ。一方、*red/gam* 両遺伝子機能が不活化している変異体ファージは P2 溶原菌に対してもプラークを形成することができる (Spi⁻)。Spi⁻ ファージの増殖には宿主大腸菌が *recA*⁺ であること、ファージ遺伝子に *chi* 配列が存在することが必要である。Spi⁻ 表現型は *red/gam* 両遺伝子機能の不活化によりもたらされるため、Spi⁻ 変異体は主に欠失型の変異を持つと考えられる。*red, gam* 遺伝子にそれぞれ独立した点突然変異が同時に生じる確率は非常に低いと考えられるためである。Spi⁻ セレクションが検出できる欠失変異の大きさは *in vitro* パッケージングを阻害しない範囲 (約 10 kb) が上限と考えられるが、λEG 10 がマウスゲノム上にタンデムに挿入されていることから、複数のユニットにまたがった大きな欠失変異も理論的には検出可能と思われる。

Spi⁻ セレクションの実験方法の概略を Fig. 1 に示した。*In vitro* パッケージングによって λEG 10 を回収する段階までは 6-TG セレクションと共通である。回収されたファージを P2 溶原菌に感染させた後、λトリプティック寒天培地にまいて 37°C で一晚培養し、Spi⁻ 変異体プラークを得る。また、非溶原菌に感染させると全ファージが溶菌してプラークを作るので、ファージの回収効率が求められる。したがって、変異プラーク数を回収ファージ数で除して突然変異体頻度が算出される。

今回測定された無処理マウスの Spi⁻ 突然変異体頻度は #30 マウス (C57 BL 6/J) の骨髄で 0.14×10^{-5} 、#21 マウス (BDF 1) の精子で 0.11×10^{-5} であった (Nohmi et al., 1996)。この値は、*gpt* 遺伝子や *lacI*, *lacZ* 遺伝子をレポーターにしたトランスジェニックマウスにおける自然突然変異体頻度と比較して一桁ほど低い。#21 系統の雄マウスに γ線 5, 10, 50 Gy を照射し、3 日後に臓器を回収したところ、脾臓における Spi⁻ 突然変異体頻

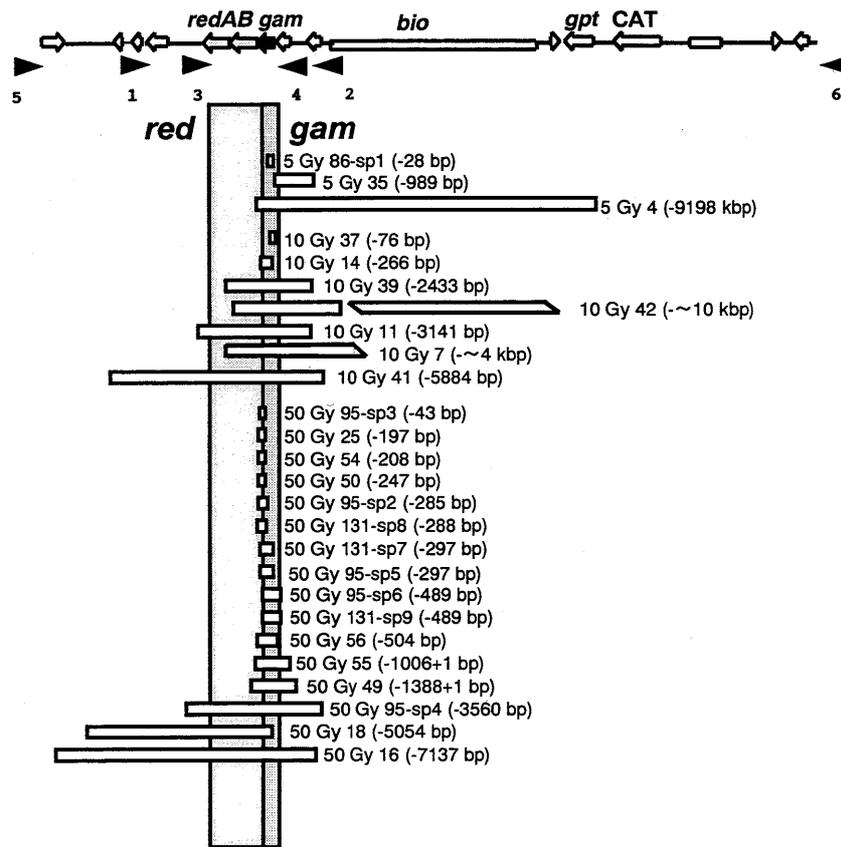


Fig. 3 A partial genetic map of the lambda EG10 transgene and the recovered Spi^- mutants from gamma-ray-irradiated mice. Gray columns represent the *gam/red* region. Arrows represent the position of PCR primers for the analysis of mutants.

度はそれぞれ 0.7×10^{-5} , 1.2×10^{-5} , 2.0×10^{-5} であり, 明らかな上昇が認められた (Nohmi et al., 1999). 照射マウス由来の Spi^- 変異体について欠失部位を解析したところ, 最大で約 9 kb に及ぶさまざまな大きさの欠失変異が同定された (Fig. 3). γ 線照射により生ずる Spi^- 変異の多くは二重鎖切断を起こした DNA 末端同士が非相対的組換えにより連結して生じたものと考えられる.

非照射マウス由来の Spi^- 変異体は, いずれも *gam* 遺伝子内の同一塩基が繰り返している配列 (repetitive sequence) 中で 1 bp のフレームシフトを起こしていた (*). これは *gpt*, *lacI*, *lacZ* 遺伝子などの突然変異スペクトルとは大きく異なっている. これらのマウスの無処理群で観察される変異の多くは, CpG 部位で起こる G:C \rightarrow A:T トランジションや, G:C \rightarrow T:A トランバージョンであり, こうした塩基置換は 5-メチルシトシンの脱アミノ化や DNA の酸化的損傷により起こるものと考えられる (Bird, 1986; Moriya, 1993; Sagher and Strauss, 1983). しかし Spi^- セレクションでは *gam* と *red* の両方の遺伝子機能が不活化した変異を選択するため, 1 bp の塩基置換は Spi^- 変異体を誘発することができない. Spi^- セレクションのこの特異性が, 他のセレク

ションに比べ自然突然変異頻度が低い原因と考えられる. Big Blue mouse や Muta mouse などのトランスジェニックマウスでは欠失変異は検出されにくいといわれているが (Suzuki et al., 1993; Tao et al., 1993), その原因の一つは, 塩基置換の自然突然変異頻度が高いために低い頻度でしか起きない欠失変異を検出にくいことにあると考える. 塩基置換を検出しない Spi^- セレクションの特異性が, 低い自然突然変異頻度と欠失変異の効率的な検出の原因と考えられる.

(*) *gam* の終始コドンと *red* の開始コドンの間は 5 bp しか離れておらず, 両遺伝子の転写は連続していると考えられる. *gam* に 1 塩基の欠失が生じると, フレームシフトによって変異 *gam* の終始コドンが *red* のコード領域内にずれ込む. このため翻訳レベルでは Gam だけでなく Red 産物も機能的に不活化すると考えられる. したがって, Spi^- セレクションでは *red/gam* 両遺伝子にまたがる欠失変異に加え, *gam* 内での 1 塩基欠失を含むフレームシフト変異が検出される (Nohmi et al., 1999).

結 語

トランスジェニックマウスを用いた突然変異検出系は個体全組織を解析対象とする *in vivo* 試験系であり、臓器特異性や代謝能を反映した変異原性の検索と解析を可能にした点でその意義は大きい。近年はポジティブセレクションの導入などにより実験操作の効率化が進んでいる。λ ファージの *cII* 遺伝子を用いた系なども、既存の *Muta mouse*, *Big Blue mouse* に適用できる点やコード領域が約 300 bp と短く塩基配列の解析が容易なことなどから注目されている (Jakubczak et al., 1996)。効率の良い検出系の開発ならびにコストの軽減は今後も課題であろう。

今回開発された *gpt delta* マウスは、同一サンプルから2つの検出法によって点突然変異 (塩基置換とフレームシフト) と欠失変異を選択的にポジティブセレクションし、得られた変異体を塩基配列レベルで解析できる特徴を持っている。現在 *gpt delta mouse* は C57BL/6/J 系統のホモ体で維持されており、FISH 解析によって17番染色体上に λEG10 DNA の導入が確認されている (Masumura et al., 1999 a)。ゲノムへの導入コピー数は約 160 コピーとなる (ハプロイドあたり約 80 コピー)。ホモ化された *gpt delta mouse* を用いて、加熱食品に含まれるヘテロサイクリックアミンや、紫外線等により誘発される突然変異の解析が進んでいる (Horiguchi et al., 1999; Masumura et al., 1999 b; Okada et al., 1999)。また、ノックアウトマウスとの交配による遺伝子機能の解析にも用いられている (Minowa et al., 2000)。

トランスジェニックマウスを用いた突然変異検出系は、変異原性の検索に加え、発がんや DNA 修復に関連した遺伝子を欠損させたマウスと交配させることで、個体における発がんや DNA 修復メカニズムの解明に重要な役割を果たすものと考えられる。また、Spi⁻ セレクションは欠失変異を選択的に検出するユニークな検出系であり、放射線をはじめとした DNA の切断や組換えが関与するタイプの変異原の検出および解析に有効と考えられる。従来のシステムではみることのできなかつた新しい突然変異生成機構の解明に寄与するものと期待される。

参 考 文 献

- Bird, A. P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation, *Nature*, 321, 209-213.
- Gossen, J. A., W. J. de Leeuw, C. H. Tan, E. C. Zwarthoff, F. Berends, P. H. Lohman, D. L. Knook and J. Vijg (1989) Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutations *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86, 7971-7975.
- Horiguchi, M., K. Masumura, H. Ikehata, T. Ono, Y. Kanke, T. Sofuni and T. Nohmi (1999) UVB-induced *gpt* mutations in the skin of *gpt delta* transgenic mice, *Environ. Mol. Mutagen.*, 34, 72-79.
- Jakubczak, J. L., G. Merlino, J. E. French, W. J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996) Analysis of genetic instability during mammary tumor progression using a novel selection-based assay for *in vivo* mutations in a bacteriophage lambda transgene target, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 9073-9078.
- Jansen, J. G., C. M. van Teijlingen, G. R. Mohn, A. A. van Zeeland and H. Vrieling (1994) AT base pairs are the main target for mutations at the *hprt* locus of rat skin fibroblasts exposed *in vitro* to the monofunctional alkylating agent *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, *Mutagenesis*, 9, 417-421.
- Kohler, S. W., G. S. Provost, P. L. Kretz, A. Fieck, J. A. Sorge and J. M. Short (1990) The use of transgenic mice for short-term, *in vivo* mutagenicity testing, *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7, 212-218.
- Kohler, S. W., G. S. Provost, A. Fieck, P. L. Kretz, W. O. Bullock, J. A. Sorge, D. L. Putman and J. M. Short (1991a) Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the *lacI* gene in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88, 7958-7962.
- Kohler, S. W., G. S. Provost, A. Fieck, P. L. Kretz, W. O. Bullock, D. L. Putman, J. A. Sorge and J. M. Short (1991b) Analysis of spontaneous and induced mutations in transgenic mice using a lambda *ZAP/lacI* shuttle vector, *Environ. Mol. Mutagen.*, 18, 316-321.
- Masumura, K., M. Matsui, M. Katoh, N. Horiya, O. Ueda, H. Tanabe, M. Yamada, H. Suzuki, T. Sofuni and T. Nohmi (1999a) Spectra of *gpt* mutations in ethylnitrosourea-treated and untreated transgenic mice, *Environ. Mol. Mutagen.*, 34, 1-8.
- Masumura, K., K. Matsui, M. Yamada, M. Horiguchi, K. Ishida, M. Watanabe, O. Ueda, H. Suzuki, Y. Kanke, K. R. Tindall, K. Wakabayashi, T. Sofuni and T. Nohmi (1999b) Mutagenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP) in the new *gpt delta* transgenic mouse, *Cancer Lett.*, 143, 241-244.
- Mientjes, E. J., A. Luiten-Schuite, E. van der Wolf, Y. Borsboom, A. Bergmans, F. Berends, P. H. Lohman, R. A. Baan and J. H. van Delft (1998) DNA adducts, mutant frequencies, and mutation spectra in various organs of lambda *lacZ* mice exposed to ethylating agents, *Environ. Mol. Mutagen.*, 31, 18-31.
- Minowa, O., T. Arai, M. Hirano, Y. Monden, S. Nakai, M. Fukuda, M. Itoh, H. Takano, Y. Hippou, H. Aburatani, K. Masumura, T. Nohmi, S. Nishimura and T. Noda (2000) Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 4156-4161.
- Moriya, M. (1993) Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-> T.A transversions in simian kidney cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 1122-1126.
- Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996) A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi⁻ and 6-thioguanine selections, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 465-470.
- Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999) Spi(-) selection: An efficient method to detect gamma-ray-induced deletions in transgenic mice,

- Environ. Mol. Mutagen., 34, 9-15.
- Okada, N., K. Masumura, T. Nohmi and N. Yajima (1999) Efficient detection of deletions induced by a single treatment of mitomycin C in transgenic mouse *gpt* delta using the Spi(-) selection, Environ. Mol. Mutagen., 34, 106-111.
- Sagher, D. and B. Strauss (1983) Insertion of nucleotides opposite apurinic/apyrimidinic sites in deoxyribonucleic acid during *in vitro* synthesis: uniqueness of adenine nucleotides, Biochemistry, 22, 4518-4526.
- Suzuki, T., M. Hayashi, T. Sofuni and B. C. Myhr (1993) The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction by mitomycin C *in vivo* using *lacZ* transgenic mice, Mutat. Res., 285, 219-224.
- Tao, K. S., C. Urlando and J. A. Heddle (1993) Comparison of somatic mutation in a transgenic versus host locus, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 10681-10685.