

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2009～2011

課題番号：21510037

研究課題名（和文）蛍光タンパク質遺伝子を導入した形質転換マウスを用いる新しい変異原評価手法の開発

研究課題名（英文）Development of the new mutagenicity evaluation technique using the transgenic mouse introduced the fluorescence protein gene

研究代表者

久松 伸 (HISAMATSU SHIN)

麻布大学、生命・環境科学部、講師

研究者番号：10198997

研究成果の概要（和文）：哺乳動物に対する変異原性を調べる目的で、変異原を感受する塩基配列と蛍光タンパク質遺伝子を利用したコンストラクトの作成を試みた。その結果、各種の変異が検出できる塩基配列と1種類の蛍光タンパク質遺伝子を連結したプラスミドができたため、現在そのコンストラクトをマウスに導入し、形質転換マウスの作出を行っている。

研究成果の概要（英文）：In order to assay for mutagenicity test against mammal, we have attempted to assemble some constructs that used target sequence for mutagenesis and fluorescence protein gene. As a result, since the plasmid that connected the sequence for detection of mutation and a fluorescence protein gene was obtained, the construct is introduced into a mouse now.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：環境学、環境影響評価・環境政策

キーワード：影響評価手法

1. 研究開始当初の背景

化学物質の変異原性試験方法としては、迅速に評価が行える微生物を用いた Ames 試験が主流である。この Ames 試験は現在世界的に最も信頼性が置かれている優れた評価手法であり、塩基置換や挿入・欠失など様々な変異の種類にも対応している。

一方、微生物と哺乳動物では代謝活性に違いがあることから、直接被験物質を試験に用いても評価が困難な場合もある。このような場合には、被験物質にラットなどの代謝活性酵素 (S9) を加えて Ames 試験を行い、より哺乳動物に対する影響が反映される検査法も利用されている。また、微生物を利用せず、直接哺乳動物の培養細胞を利用した試験方法（小核試験法、染色体異常試験法、コメットアッセイ法）も良く用いられている。これらの方法は、直接哺乳動物を利用している点では Ames 試験に比べよりヒトでの影響を検出しやすいことが考えられるが、細胞の形態などの異常を検出することから、使用する細胞或いは組織が被験物質に対して感受性が高い必要もある。更に形質転換マウス個体を用いた方法も開発されている。この方法は、

個体トータルとしての影響評価ができる点で優れていると考えられるが、マウスに組み込んだ外来遺伝子を微生物に取り込ませて評価するなど労力を要することから、より操作が簡便で迅速且つ精度の高い方法として改良させることが望ましいと考えられる。

変異原試験に動物個体を使用するには、微生物や培養細胞では困難な組織特異的影響を評価が可能であること、個体トータルの代謝活性をもって試験が可能であること、経口、経皮、経気など様々な被験物質の投与形態を用いることが可能であること、変異原試験以外の影響も同時に調べることができ、経時的な影響を調べることが可能であること、さらには次世代の影響をも調べることが可能であることなど様々な利点がある。

今後、新規化学物質の開発が進む中、安心・安全な環境を確保するためには、これら化合物そのものの変異原性試験ばかりでなく、土壌や水、或いは大気など様々な環境試料の変異原性も調べる必要があり、さらに一度の実験で様々な情報が得られる新しい安全性試験方法の開発も必要であると考えられる。

2. 研究の目的

変異原試験に利用するモニター遺伝子（変異原性を感じず塩基配列と複数種の蛍光タンパク質を連結した遺伝子）の構築を行い、構築した遺伝子を導入した培養細胞を作成する。このモニター遺伝子を導入した培養細胞を用いて、その有効性を評価したうえで、最終年度でモニター遺伝子を導入した形質転換マウスの作出を行う。

3. 研究の方法

DNAの変異は、紫外線影響によるピリミジンダイマーの形成、塩基置換、或いは塩基の挿入・欠失があるため、それぞれの変異が検出できるよう合成オリゴDNAを用いて標的配列を調製した。ピリミジンダイマーの検出用のDNAは、ATGの開始コドン直下にC及びTのみで構成される54塩基長の配列を付けて構築した。また、塩基置換検出用のDNAは、ATGの開始コドン直下に、3塩基のコドンの内、一つの塩基が他の塩基に置換されるとストップコドンとなるような57塩基長の配列とした。さらにATGの開始コドン直下にピリミジンダイマー検出用配列と塩基置換検出用配列を連結することによって、その間に塩基の挿入・欠失が起こるとフレームシフトも検出できる。これらの変異原検出用配列の直下に開始コドンを含まないGFP遺伝子を連結した。更に、フレームシフトが起こると異なる蛍光タンパク質が翻訳されるよう、複数の蛍光タンパク質（GFP、DsRed-monomer及びYFP）遺伝子を連結するコンストラクトの設

計のために、GFP及びDsRed-monomer遺伝子がフレームシフトしてもストップコドンが生じない遺伝子の構築も行った。これらの遺伝子を構築するために、長鎖の合成オリゴDNAとPCR法を用いて改変GFP及びDsRed-monomer遺伝子の全合成を行った。得られたコンストラクトは、制限酵素による消化で得られるDNA断片の長さを確認した後、シーケンスの確認を行った。設計通りのシーケンスとなったプラスミドは、外部委託で形質転換マウスの作成に利用した。

4. 研究成果

今回の課題では、変異原を感じず標的配列を2種類構築した。まず、哺乳動物で一般的に使用されているCMVプロモータを用いて蛍光タンパク質であるAcGFP遺伝子が連結されているClonetech社のpAcGFP-N1を利用し、まず、このプラスミドのマルチプルクロニングサイト及びAcGFP遺伝子の開始コドンを取り除いたプラスミド（pMC-G）を調製した。このpMC-GのCMVプロモータ下流に、シャイン・ダルガノ配列及びATGの開始コドンを含むコサック配列の直下にC及びTがリッチな配列を連結したピリミジンダイマー検出用の標的サイトを連結してプラスミド（pMC-TG）を調製した。このプラスミドを動物細胞に導入すれば、その細胞は、正常な状態でAcGFPの蛍光が観察できる。一方、その細胞に紫外線などが照射されてC及びTがリッチな配列中でピリミジンダイマーが形成されれば、AcGFP遺伝子の転写が行われなため、ピリミジンダイマーが形成された細胞は、AcGFPの蛍光が消失する。従って、このプラスミドを利用すれば、ピリミジンダイマーの形成という変異を効率的に検出できる。

一方、塩基置換の変異を検出するために、pMC-GのCMVプロモータ下流に、シャイン・ダルガノ配列及びATGの開始コドンを含むコサック配列の直下に、トリプレットコドンの1塩基が置換されることでストップコドンが生じる配列を連結したプラスミド（pMC-BG）も調製した。このプラスミドを動物細胞に導入すれば、その細胞は、正常な状態でAcGFPの蛍光が観察できるが、その細胞に化学物質を暴露して塩基置換標的配列中に塩基置換が起これば、AcGFPの翻訳が行われなため、AcGFPの蛍光が消失する。従って、このプラスミドを利用すれば、塩基置換という変異を効率的に検出できる。

更に、pMC-TGのピリミジンダイマー検出用配列の直下に、トリプレットコドンの1塩基が置換されることでストップコドンが生じる配列を連結して、ピリミジンダイマーの形成及び塩基置換が両方検出できるプラスミド（pMC-TBG）の調製も行った。このプラスミドを導入した動物細胞を変異原試験に用い

れば、ピリミジンダイマーの形成及び塩基置換を検出できるばかりではなく、それらの変異を検出するための標的配列中に塩基の挿入や欠失が生じ AcGFP 遺伝子のフレームがずれることで AcGFP の蛍光が消失するため、フレームシフト型の変異も検出できるなどの利点がある。

ただし、pMC-TG 及び pMC-BG の各変異原検出用の配列内に塩基の挿入や置換が起こっても、pMC-TBG 同様、AcGFP の蛍光が生じる。従って、これら 3 つのプラスミドをそれぞれ導入した動物細胞に対して、各種の化学物質を暴露し、AcGFP の蛍光の有無を比較することで、その化学物質は、どのようなタイプの変異を誘発するのかを判断できると予想される。また、これら 3 つのプラスミドに対し、標的配列の向きを逆向きに導入したプラスミドもそれぞれ構築したため、これらのプラスミドを導入した動物細胞が得られれば、それらの動物細胞にも変異原物質を暴露し、pMC-TG、pMC-BG 及び pMC-TBG の有効性を検証できると考えられる。

今回調製した pMC-TBG は、シーケンスを確認した上で、外部委託によって形質転換マウスの作出を試みることにした。本課題の最終年度終了時点では、マイクロインジェクション法を用いてマウスに導入したが、その結果、産仔 78 個体が得られた。そこで、その産仔をサザンブロット解析したところ、形質転換体は 1 個体のみしか得ることができなかったことから、現在、再びマイクロインジェクションを行い、形質転換体の作出を試みているところである。

一方、本研究課題で計画していたコンストラクト他にもある。そのコンストラクトは、上記の各種変異原性を AcGFP の蛍光の消失のみで判断するのではなく、塩基の挿入や欠失と言ったフレームシフト型の変異の場合は、翻訳される蛍光タンパク質が異なるように設計したものである。このコンストラクトは、上述の pMC-TBG 中の AcGFP 遺伝子の終止コドンを除き、その遺伝子の下流に任意の塩基を 1 塩基を連結し、更に AcGFP と蛍光色が異なる DsRed-monomer 遺伝子（開始コドンと終止コドンを除いた遺伝子）を連結したうえで、同様に 1 塩基と AcGFP 及び DsRed-monomer と蛍光が異なる YFP 遺伝子を連結したプラスミドである。このプラスミドを導入した動物細胞は、ピリミジンダイマー及び塩基置換型の変異が AcGFP 蛍光の消失で検出できるばかりでなく、フレームシフトが起これば、異なる蛍光タンパク質の ORF が合致するように設計していることから、細胞から発する蛍光色の違いによってフレームシフト型と他の変異を別々に判断できる特徴を持っている。しかしながら、通常の AcGFP 及び DsRed-monomer 遺伝子を用いた場合は、フレームシフトを起

こすことで、それらの遺伝子の配列中でストップコドンが生じてしまい、フレームシフトが起こって下流の遺伝子に ORF が合致してもその遺伝子の翻訳産物が得られないことになってしまう。そこで、AcGFP 及び DsRed-monomer 遺伝子が、フレームがずれてもストップコドンが生じない遺伝子をそれぞれ構築することにした。構築は、各遺伝子を約 10 種類の合成オリゴ（それぞれ約 100 塩基長）を用いて、PCR 法で全合成を行った。まず、AcGFP 遺伝子の改変については、ExTaq DNA ポリメラーゼを用いて実験を行い、得られた PCR 産物のシーケンスを行ったが、設計通りの配列になっていない所が何カ所も生じていた。エラーの少ない他の DNA ポリメラーゼをいくつか用いて実験を行ったが、やはり設計通りの配列になっていなかった。そこで、現在、PCR に用いる合成オリゴの配列を見直し、再実験を行っている最中である。一方、DsRed-monomer 遺伝子の改変についても同様の方法で構築を試みたが、やはり、一部の配列で設計とは異なる塩基配列となっていた。従って、この DsRed-monomer 遺伝子の改変についても、AcGFP 遺伝子の改変と同様、用いる合成オリゴの塩基配列を見直し、再実験を行っている最中である。

本研究課題では、当初予定していた研究計画に対して、遅れを生じた結果となった。この遅れの原因として、研究計画を立案した段階で利用しようと考えていた GFP 遺伝子は Clontech 社製の遺伝子であったが、その Clontech 社が従来の GFP 遺伝子から由来の異なる AcGFP 遺伝子に全ての商品を変更したため、我々の研究でも AcGFP 遺伝子を用いることに変更したため、フレームシフトを起こしてもストップコドンを生じない改変 AcGFP 遺伝子の構築に労力を注ぐことになった。また、原理的にも確立されている PCR 法を利用して改変 AcGFP 及び DsRed-monomer 遺伝子の構築をする計画で実験を進めていた。しかしながら、理論的には短期間でこれらの遺伝子が得られるはずであったが、実際実験を行うと出来上がった遺伝子は、設計とは異なる配列（多くは遺伝子の欠失）となり、何度も繰り返して実験を行うことになり、結果として研究計画に遅れが生じてしまった。

更に、研究期間中に学部等の建て替えがあり、研究室の引っ越しのため、数ヶ月間、実験を行うことができなかったことも、研究の進捗に大きく影響してしまった。現在、研究室での実験も滞りなく行えるように整備できている。

ところで本研究課題の期間中には、未だに日本を揺るがしている震災が起こったが、この震災で生じた環境破壊は、DNA にも変異を及ぼす放射能ばかりでなく、様々な化学物質が環境中に放出されていると考えられてお

り、今後も甚大な影響を及ぼし続けていくと予想されている。本研究課題は、このような変異原物質による環境影響を評価する上でも重要な知見が得られる技術となると思われるため、引き続き、研究を続けていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久松 伸 (HISAMATSU SHIN)

麻布大学・生命・環境科学部：講師

研究者番号：10198997

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

後藤 純雄 (GOTO SUMIO)

麻布大学・生命・環境科学部：講師

研究者番号：30112890

柏崎 直巳 (KASHIWAZAKI NAOMI)

麻布大学・獣医学部：教授

研究者番号：90298232

猪股 智夫 (INOMATA TOMO)

麻布大学・獣医学部：教授

研究者番号：10147978