

第15回放医研シンポジウム報文集

放射線による遺伝損傷とリスク

— その生物医学的アプローチ —

放射線医学総合研究所



890000168



科学技術庁

放射線医学総合研究所

放射線による遺伝損傷とリスク

—その生物医学的アプローチ—

昭和59年3月15日～16日

編	集
中井	斌
佐藤	弘毅
戸張	巖夫
安田	徳一
田中	昭

シンポジウムを始めるにあたって

放医研で「放研シンポジウム」を始めて15回になります。10年1昔と申しますがもう15回になり、月日の経つのは早いものだという感慨がいたします。このシンポジウムは私どもの研究所の中で委員会を作りまして、いろいろの方のご意見を参考にしましてその折々に一番よいトピックスを選んでやってまいりました。

毎年内外の研究者、学者の方々のご協力を得まして段々盛大になっていると思います。

今年は「放射線による遺伝損傷とリスク—その生物医学的アプローチ—」という題で開催することになりました。放射線と遺伝とは関係が深いことは勿論ですが、放射線とか遺伝とかいいますと世間では悪いものという感じをもちがりであります。

原子力開発に伴い特に低線量の放射線の影響はどうかということが問題となってきました。この低線量のリスクということにつきましては、未解決の点もごさいますが、リスクの評価ということになりますと定量的に考えなければなりません。例えばがんにつきましては人間において観察されたデータから定量的なリスク推定が行われています。一方遺伝の方は、現在までの所人の観察結果からは、リスク推定に必要なはっきりしたデータは得られていないと言ってよいでしょう。しかし主として精密な動物によりまして遺伝リスクの推定を定量的に行うことが着実に進歩していると思います。

私も国連科学委員会に毎年出席していますが、今日お見えになっているサール先生などの遺伝グループにより、ポリティカルでなくアカデミックな議論をなされて、国連科学委員会の報告書の遺伝の部分ができ上っているのですが、その中でもリスクをどういうふうに評価していくのかということには、まだ問題があります。リスク評価に含まれている不確かさというものを科学的に解明して行こうというのが最近の傾向であろうかと思えます。

今日、明日とこのシンポジウムを通じましておそらく種々な議論が出るかと思いますが、その中から何が確かにここまで言えるのかということとを解明するのに一歩でも近づければ幸いですと思っております。

この放医研設立以来、27年になりまして、建物も老朽化し、この講堂自体も近代的なものとはいえませんが、どうかこのシンポジウムを組織した委員会のメンバーの熱意をおくみとりいただき、不十分な暖房をみなさまのホットな議論であたためていただきたいと思います。

必らずや実りある会ができることをお願いして私の御挨拶と致します。

昭和59年3月15日

放射線医学総合研究所長

熊取敏之

オルガナイザー

昭和59年3月15日(木)、16日(金)の両日〔放射線による遺伝損傷とリスク〕のテーマの下に、放射線医学総合研究所の講堂で第15回の放医研シンポジウムが開催されました。放射線による遺伝的リスクを科学的にいかにか明確にとらえるかが、本シンポジウムに課せられた究極的な課題です。しかし、この問への答えは容易ではありません。何故なら、放射線の被曝による遺伝損傷の誘発とその子孫における遺伝障害の発現との間には、極めて多くの生物学的過程が含まれるばかりでなく、社会的事象もまた関与するからです。本シンポジウムはこのような拡がりを持つ遺伝的リスクの課題に対し、ヒトの生命科学すなわち、生物医学(Biomedical Science)の立場より体系的なアプローチを試み、また、併せて放医研での特別研究の成果をも報告することを意図しました。

第1日は遺伝的リスクの出発点となる、放射線による遺伝損傷に関する算近の生命科学研究を取り扱っています。すなわちDNA損傷の修復の面から、遺伝子及び染色体のレベルにおける遺伝損傷の誘発機構(mutagenesis)を追求するとともに、ヒトの遺伝的リスクを推定する際、現在最も問題となっている遺伝損傷の動物種による特異性の問題に焦点を合わせてあります。第2日は遺伝的リスクを推定する際、直接基礎となる数量的な研究を取り扱っています。すなわち、代表的な実験動物であるマウス、サルを用いた我が国の最近の研究結果を、原爆被曝者による疫学研究の結果と対比し、これによってヒトの遺伝リスクの推定値の確からしさの程度と問題点を明らかにしたいと考えています。また遺伝的リスク、特に低レベル放射線の社会的評価を考える際、自然環境での遺伝損傷の実体を識ることが決定的意味をもつものと考えられますが、これについての最近の成果にもふれることにいたしました。

冒頭に述べたようにヒトのリスクの評価のためには、ひつきようするに”健康(安全)とは何か、病気(リスク)とは何か。”と言った、ヒトの生命活動の認識の科学が関って参ります。この課題に対処するためには、”ヒトの生命活動を遺伝子の働きを出発点として理解し、その全体像を認識する、”新しい立場の生命科学

(生物医学)の構築が不可欠の前提となって参ります。研究者にとってこのことは、個別の生命現象の原理を解析的に追求してきた、今までの生物科学研究のパラダイムに対し基本的な転換を求めているわけで、ここにリスク研究の真の困難性があると申せます。総合討論ではこのような認識の下に、敢えて無理は承知しつつも、異なった観点からのまた種々の局面からのリスク研究の問題点を提示することによって、リスク研究の全体像をうきぼりにし、いまや新しい時代に入りつつある生物医学の進展に役ださせたいと願っております。

中 井 斌

目 次

シンポジウムを始めるにあたって	熊取 敏之	iii
オルガナイザー	中井 斌	v
I 真核生物の遺伝損傷と修復機構のモデル		1
1. 真核生物の遺伝損傷と修復機構のモデル	賀田 恒夫	3
2. 修復・突然変異・組換の制御機構	小川 英行	5
3. 姉妹染色分体間の組換機構	中井 斌	19
4. 動く遺伝子による変異	池永 裕	33
5. <i>umu</i> 依存性変異誘発機構	加藤 武司	41
6. 大腸菌Rec A蛋白質に対する抗変異原物質の作用	井上 正	53
7. 酵母における psoralen における光付加による DNA cross-links の修復	佐伯 哲哉	59
II 哺乳類細胞の突然変異の機構は何が特徴的か		63
1. 哺乳類細胞の突然変異機構は何が特徴的か	岡田 重文	65
2. 哺乳類細胞の突然変異の特異性	中村 典	67
3. ヒト遺伝病細胞の突然変異特性	巽 絃一	81
4. 突然変異とトランスフォーメーションの誘発特性 の対比	二階堂 修	93
5. マウス FM3A 細胞から分離されたミューテーター 変異株	兵藤 昌雄	105
III 哺乳類細胞の遺伝損傷, 修復機構に種特異性は存在するか		109
1. 哺乳類細胞の遺伝損傷, 修復機構に種特異性は存 在するか	池永 満生	111
2. マウス放射線感受性細胞の修復特性	佐藤 弘毅	115
3. ヒト遺伝病細胞の修復欠損特性	藤原 美定	129
4. 修復遺伝子のマッピング	堀 雅明	147

5.	X線感受性変異細胞における奇妙なカフェインによる蘇生現象	内海 博司	155
6.	マウス白血病細胞(L5178Y)のマイトマイシンC高感受性変異株の性質ならびにファンコニー貧血症細胞との比較	稲葉 浩子	161
IV	染色体異常の誘発機構に放射線感受性要因はどうか		169
1.	染色体異常の誘発機構に放射線感受性要因はどうか関係するか(I)	佐々木正夫	171
2.	染色体異常の誘発機構に放射線感受性要因はどうか関係するか(II)	江島 洋介	175
3.	姉妹染色分体交換	辻 秀雄	189
4.	マウス白血球細胞(L5178Y)由来の変異原高感性突然変異株におけるガンマ線誘発染色体異常	高橋 永一	199
V	自然環境での遺伝損傷はどれだけあるか		205
1.	日本における遺伝病の地理的変異	安田 徳一	207
2.	極低線量域の放射線影響と自然突然変異率の変動	田野 茂光	217
VI	遺伝リスク評価のための生物学的, 疫学的アプローチ		223
1.	遺伝リスク評価のための生物学的, 疫学的アプローチ	近藤 宗平	225
2.	生殖細胞におけるDNA傷害の修復と染色体異常生成	田中 憲徳	226
3.	放射線の卵巣照射による卵子染色体異常と発生異常の誘発	美甘 和哉	243
4.	体外受精卵を用いた放射線誘発染色体異常に関する研究	松田 洋一	257
5.	マウス突然変異の線量効果とリスク推定	野村 大成	263
6.	サル染色体異常の線量効果とリスク推定	戸張 敏夫	277

7. 原爆被爆者による遺伝リスクの予測	大竹 正徳	287
8. 精子形異常による放射線の遺伝損傷の検出	北爪 雅之	315

I 真核生物の遺伝損傷と 修復機構のモデル

I-1

真核生物の遺伝損傷と修復機構のモデル

賀田恒夫*

このセッションで討議すべき目標は、次の通りであった。

1) 基礎生物学的研究の成果として、放射線による遺伝損傷と、その修復機構に関してこれまでに明らかにされた重要点は何か？ とくに原核細胞で得られた知見のうち、真核細胞に適用されて、ヒトにおける遺伝的影響の評価に役立つものは何か？

2) ここ10数年にわたって、微生物、とくに大腸菌に関する膨大なデータが在る。また最近では、遺伝子クローニングとDNA塩基配列の解析技術の進歩によって、DNA損傷の内容や、修復酵素の発現の調節などに関する細部が明らかにされつつある。まずこの現状についての認識が必要である。

3) 大腸菌と高等生物の橋渡しをする実験材料として、酵母があり、最近多くの研究者の注目するところとなった。ここには、大腸菌ではみられない染色体に特有な遺伝現象の解析がなされている。さらに、ショウジョウバエは、古典的な遺伝学の材料であるのみならず、最近ではそのトランスポソンの分子遺伝学的研究も盛んである。放射線とトランスポゾン誘発の突然変異との関係の論議も必要である。

× — × — ×

以上の知見に関する発表と討議を通じてとくに以下の点の追求がなされた。

a) 原核生物で解明されつつある Inducible および Adaptative 修復の誘発突然変異における意味。とくに SOS レギュロンは高等生物に存在するか否か。またこれによらず、DNAに直接的に生じる損傷による突然変異誘発(targeted mutations)との量的関係。

b) 原核細胞における解析に比して、有核細胞における今後アプローチの必要性が

* 国立遺伝学研究所変異遺伝部

浮彫りにされた。その一つは、前者においては、DNA修復および突然変異誘発に関与している機能分子（酵素）と、遺伝子構造間との対応がつきつつある。この点、有核細胞系においては、中井によって示されたように、遺伝的研究が非常に進んでいる酵母においてようやくその研究の緒が見られた。とくに、小川らによる、遺伝子RAD51, RAD52, RAD55のクローニングの成果は特筆されよう。

c) 動く遺伝子については、生物の進化の歴史において、レトロウイルスとの深い関係の存在があり、“さまよえる生命”の実体が示されたのは印象深かった。とくにDNA塩基配列のレベルで染色体からの脱離と挿入の機構が明らかにされた。しかし、誘発突然変異における動く遺伝子の役割については、論議する時間が無かった。

× — × — ×

以上、このセッションにおいて、突然変異誘発に関与する分子機構の全貌が示された。とくに、既知の諸事実と、未知の研究目標との関係が整理された。

I-2

修復・突然変異・組換の制御機構

小川 英行*

はじめに

生物と放射線とのかわり合いは、恐らく放射線が生物の誕生を促して以来のものと考えられている。しかしその後一担一つの完結した反応系を作り上げた生物には、以後は放射線はその系を乱すものとして主に働くことになる。そして生物にはその環境の中で生き残っていく仕組みが生れたに違いない。

生物の基本単位である細胞では、その生死を分ける標的物質は、遺伝子の集りであるDNA分子と考えられる。細胞が増殖し、その機能を維持していく上で、DNA分子は中枢的な働きをしており、その数は細胞当り真核生物で同じ分子が2個、原核生物ではそれが唯の1個しかない。このような掛替えの無い条件のもとで、生物が放射線による損傷に対して採った対応策は、DNA上に出来た損傷を修復するということであった。

DNA修復機能の中で最も良く研究されているものは、紫外線損傷に対する修復機能である。紫外線は、DNAに特異的に吸収されて、そこだけに損傷をつくるので、他の放射線損傷よりも解析が容易なためである。その修復機能は、機構の違いから大別して、光修復、切除修復、組換え修復の三つに分けられており、それぞれ特徴ある酵素が関与している。最近大腸菌で後の二つの修復機構に関与する酵素群は、DNA損傷が生じると、その合成が促進されるという、合目的な合成制御の下にあることがわかり、その仕組みが分子レベルで解析することができるようになった。ここでは、その制御機構を中心に述べ、併せて、真核生物の一つのモデル系になると思われる。酵母での修復、組換えに関与する遺伝子の形質発現制御についても触れるつもりである。この小論中の最近のわれわれの研究室の成果は、主に講師

* 大阪大学理学部

小川智子，大学院生恵口豊，同じく東研二によってなされたものである。

1. 大腸菌の SOS 反応系

大腸菌では，放射線や薬剤によって DNA に障害が生じたり DNA の複製阻害が起こると，DNA 分子の修復に関与している機能や突然変異を誘発する機能，細胞分裂を遅らせる機能などが一齐に発現する。また，大腸菌がプロフェージを持っていると，その誘発も起こる。このように細胞が緊急な事態に対処して誘導する反応のことを SOS 反応と呼んでいる。現在最も良く調べられている，その反応系の一つは，*recA* 遺伝子と *lexA* 遺伝子によって制御されている約 12 個の遺伝子からなる系である¹⁾。

(1) *recA* 遺伝子

recA 遺伝子は，大腸菌の雌株 (F⁻ 株) が雄株 (Hfr 株) と接合したときに，組換え体を形成できない変異株を解析して同定されたものである。この遺伝子に変異が起こると，同時に紫外線と X 線に対しても極めて高い感受性を示し，プロフェージの誘発や突然変異の誘発も起こらなくなることが知られている。遺伝学でいう，いわゆる多面形質発現遺伝子である。この遺伝子は一つのたんぱく質を作っていると予想されたが，どのような仕組みで多様な表現型をとることができるのか興味を持たれていた。解決の糸口は思い掛けないところからやってきた。Inouye と Pardee²⁾ は，大腸菌を抗生物質，マイトマイシン C で処理したり UV 照射したり，チミン飢餓の状態に置き DNA 合成を阻害すると，膜分面に在る，ある一つのたんぱく質が増加することを見出した (誘導合成)。この増加は，*recA* 遺伝子の変異株ではまったく見られなかった。彼らは，このたんぱく質を X たんぱく質と名づけた。この発見に続き，Gudas と Pardee は³⁾，X たんぱく質の誘導合成を，関連があると思われる他の遺伝子変異株を用いて調べ，先ずその当時 *tif* と呼ばれていた変異 (後に *recA* 遺伝子の変異であることが証明された。 *recA* 441) では高温 42℃ にするだけで X たんぱく質が同じように誘導合成されることを見出した。この様に X たんぱく質の誘導には *recA* 遺伝子の機能が直接に必要なことが明らかになった。またもう一つの発見は，*recA* たんぱく質の機能が欠損していても，*recA* たんぱく質の誘導合成を行う変異のあることを見つけ，この誘導合成制御の鍵を握るもう

一つの遺伝子の重要性を明らかにしたことである。それが *lexA* 遺伝子である。

後に *recA* 遺伝子をクローニングして、その遺伝子産物を調べてみると、それは X たんぱく質そのものであることがわかった。X たんぱく質 = *recA* たんぱく質、つまり DNA に障害が起こったときに誘導合成されたのは *recA* たんぱく質で、その誘導合成には *recA* たんぱく質自身が必要であることが明らかになったのである。精製された *recA* たんぱく質は分子量 37,800 の一本のポリペプチド鎖からなり、多彩な活性を持つたんぱく質であることがわかった。その中で生物学的に最も重要と思われる反応は 2 種類ある。一つは、二本鎖 DNA に、そのどちらかと相補的な一本鎖 DNA を巻き込んでいく反応である。これには ATP が必要で、それを分解しながら一本鎖の 5' 側から順次巻き込んで進行する。ATP を ATP- γ -S に置き換えるとその反応は進行しない。これと同様な反応は、相同な二本鎖 DNA 同志の間でも起こるし、一本鎖 DNA 同志の間でも良くおこる。これらの反応は、組換えの際の初期反応であろうと考えられている⁵⁾。この反応に必要な性質として、*recA* たんぱく質は、ATP があると一本鎖 DNA に強く結合することができる。また同時に ATP を分解する ATPase の活性をそのときを持つことになる。もう一つの反応は ATP と一本鎖 DNA の存在下で大腸菌の *lexA* たんぱく質や、 λ , P 22 などの細菌を溶原化するフェージのリプレッサーを切断不活化する反応である。切断部位は、それぞれのたんぱく質のほぼ中央に近い、ala-gly 配列の間で、ただ一個所である。切断の際には、ATP の分解は必須ではなく、ATP- γ -S で非常に効率良く起こる。

(2) *lexA* 遺伝子

lexA 遺伝子は X 線の照射に対して感受性になる変異として知られていた。*tif* 変異株から、高温にしても X たんぱく質の誘導合成のない変異を更にとると、*lexA* 遺伝子に変異を持つものが高頻度でとれて同じ性質を示した。そしてそれらは野生型に対して優性の性質を持っていた。(これは、*recA* たんぱく質で切断されない *lexA* 変異たんぱく質である。) この変異から放射線に抵抗性となった復帰変異をとるとその中に、高温にすると、*recA* たんぱく質の誘導合成が起こるものがあった。その変異株では、もとの変異はそのままに残っており、更に新しい変異が同じ *lexA* 遺伝子中に起きていて、*lexA* たんぱく質が温度感受性になっていた。つま

り *lexA* たんぱく質が *recA* たんぱく質の合成を制御していることが明らかになったのである。これらの事実に基づいて、モデルが作られた。つまり、*lexA* たんぱく質はリプレッサーで、*recA* 遺伝子の他に、種々の遺伝子の発現を同時に抑制している。DNAに障害が起こると *recA* たんぱく質が活性化され、*lexA* たんぱく質を失活化して、*recA* たんぱく質は勿論、抑制していた遺伝子を一揃に発現させると考えるものである。*recA* たんぱく質に欠損があると *lexA* たんぱく質を失活することが出来ないで誘導合成が起こらないと考える。このモデルは、*recA* 遺伝子の多面形質発現性もうまく説明できた。

(3) SOS 反応系の遺伝子

SOS 反応系に属する遺伝子は、*recA* と *lexA* 遺伝子の外にどのような遺伝子があるのだろうか。Kenyon と Walker⁴⁾ は巧妙な方法でそれらの遺伝子を探り当てた。Casadaban⁵⁾ が、Mu フェージ DNA の一方の端近くに、プロモーター部分のない大腸菌 *lac* 遺伝子を持つものを作っていた (Mud (*Amp^r*, *lac*) フェージ)。Mu フェージは大腸菌 DNA のどの部分にも、フェージ DNA の両端がそのまま挿入片の両端となって入り込むので、Mud (*Amp^r*, *lac*) フェージが挿入された個所に、大腸菌 DNA 部分から、流れ込む転写があると、それによって *lac* 遺伝子が転写され β -gal の発現が見られる。つまり挿入個所近くにあるプロモーターを検出することが出来るのである。Kenyon と Walker はこのフェージを大腸菌染色体の色々な場所に入れ、その中で、マイトマイシン C や UV で β -gal が誘導合成されるものを探した。つまり、SOS 反応を示す、プロモーターの検索を行なった。そして実際に 10 個程のそのようなプロモーターが探し当てられ、そのプロモーターを持つ遺伝子の同定が進められた (*din* 遺伝子群)。図 1 には、別に遺伝子のクローニングの結果判ったものなども含め、現在までに *lexA* 遺伝子によって制御されていることが知られている遺伝子 12 個を挙げてある。それらの遺伝子の遺伝子地図上の位置、遺伝子の機能、それにたんぱく質が同定されて分子量の判っているものはそれも一緒に示してある。主だった遺伝子としては、UV 照射によって DNA に出来るピリミジンダイマーの除去に関係する 3 つの遺伝子、*uvrA*, *B*, *C* ; 修復している間、細胞分裂を阻害しておく機能を持つ、*sulA* ; 突然変異を起こす *umuC* ; λ フェージ DNA の大腸菌 DNA への組込みのときに必要な宿主の因子と

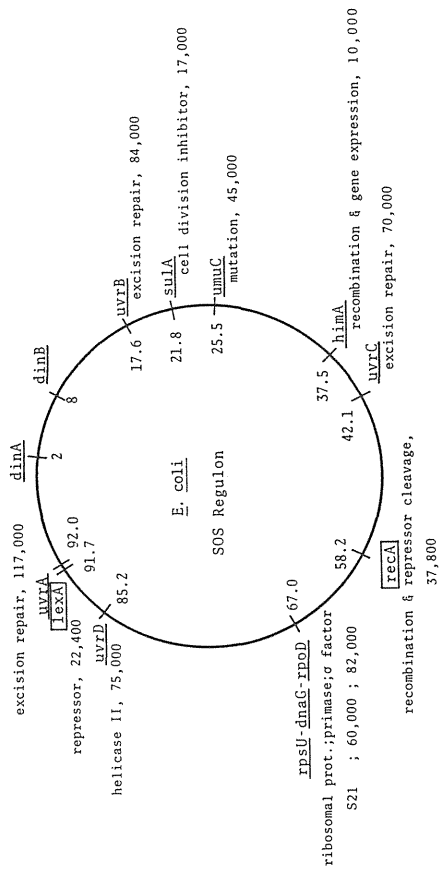


図 1 大腸菌の *lexA* 遺伝子によって発現が制御されている遺伝子群 — SOSレギュロン

円は、大腸菌の染色体地図を表わし、内側の数字は、各遺伝子の遺伝子地図上の位置を表わす。染色体全体の大きさは 100 である。円の外側には遺伝子名と機能、それから分子量が示してある。四角で囲んだ遺伝子が、リプレッサー遺伝子 (*lexA*) とそれを不活化する遺伝子 (*recA*) で、この系の発現調節をしている遺伝子である。

して見つかり、いくつかの遺伝子の発現に必要な *himA* ; リボゾームたんぱく質 S21, DNA複製開始に必要なプライマーゼ, RNAポリメラーゼのサブユニット σ で形成されている, *rpsU-dnaG-rpoD* オペロン; ヘリカーゼIIの *uvrD* ; その他まだ機能のわかっていない *dinA, dinB* などがある。

(4) *lexA*たんぱく質の結合する部位が各遺伝子の転写開始域にある

この制御系の可成りの遺伝子がクローニングされ、その塩基配列が決定されている。*recA* 遺伝子の塩基配列を決定したときに、転写開始領域に、17塩基対からなる二回回転対称の配列があることがわかり、それと非常に良く似た配列が *lexA* 遺伝子の転写開始領域にもあることがわかった。そして精製した *lexA* たんぱく質がこの配列を中心にして結合し、RNAポリメラーゼが転写するのを阻害することが試験管内の系で示された。*lexA* たんぱく質の結合する配列が明らかになった例が増えてきて、それら全部に共通な塩基配列がわかってきた。5'CTG(N)₁₀CAG3' が全てに共通して存在している。今までのところ唯一の例外は *uvrC* 遺伝子で (N)₁₁ となっている。(N)₁₀部分の塩基配列も、TATATA…… という配列が圧倒的に多い。図2には、現在までにわかっている *lexA* たんぱく質結合領域をまとめてある。また各位置の塩基の出現頻度も示してある。*lexA* 遺伝子自身も *lexA* たんぱく質で抑えられるという自己制御系になっているが、この場合、結合領域が二つある。二つある結合部位が *lexA* 遺伝子の形質発現をどのように制御しているのかはわかっていない。

(5) *lexA*たんぱく質の不活性化

精製した *lexA* たんぱく質(分子量, 22,700)は, *recA* たんぱく質, 一本鎖DNAとATPがあると, 分子量, 9000(もとのN末を持つ)と13,500の2つの断片に切断される。切断される部位は, N末から84番目のアミノ酸アラニン(Ala)と85番目のグリシン(Gly)の間である。バクテリオファージ λ のリプレッサー(分子量, 26,500)も同様な条件で切断され, 分子量12,500(もとのN末を持つ)と14,000に二分される。切断部位はやはりAla(N末から111番目)とGly(112番目)の間である。この同じ切断部位を揃えて, 両リプレッサーのアミノ酸配列を並べて比較してみると切断部位のN末端側に極めて似たアミノ酸

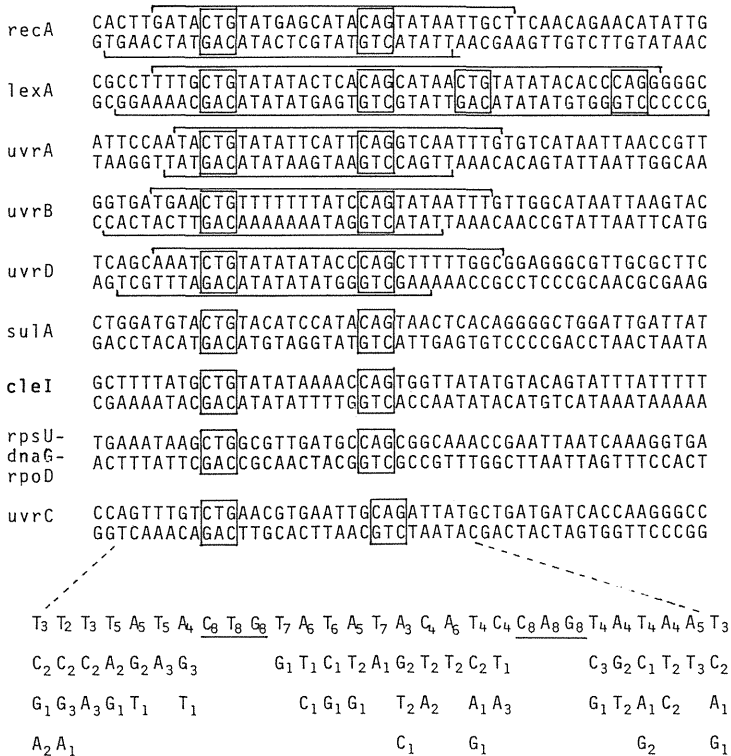


図2 *lexA* たんぱく質結合部位の共通塩基配列

四角で囲った塩基配列は全ての *lexA* たんぱく質結合部位に共通に見られる配列である。塩基配列の上部または下部に引いてある線の部分が、*lexA* たんぱく質が結合したときに、DNaseIによる分解から保護される部分である。共通塩基配列を揃えたときに、その周囲に並んでいる塩基の出現頻度を最下段に示してある。調べた遺伝子は8例である。

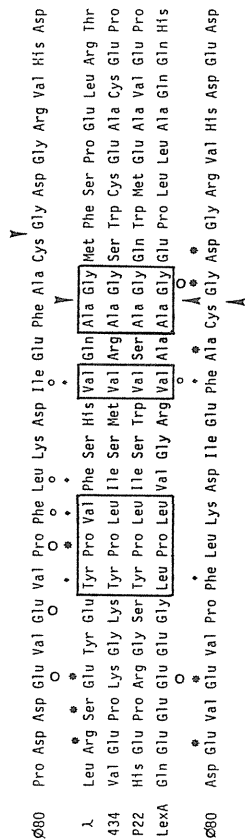


図3 recA たんぱく質によるリブレターの切断部位とその周辺のアミノ酸配列。

λファージ, 434ファージ, P22ファージおよびlexAリブレターについて切断部位(矢印で示してある)を揃えて並べてある。四角で囲んである部分が特に共通性の強い配列部分である。φ80リブレターについては, 切断部位を他のリブレターと合わせると, 特にlexAたんぱく質と良く似ていること, 切断部位よりN末端の配列を他のリブレターと合わせると, lexAとλリブレターに良く似ている。○と◦印はλリブレターと共通および同じ性質のアミノ酸, ＊と◆印はlexAリブレターとの共通および同じ性質のアミノ酸であることを示す。

配列があることがわかる。図3には、ファージ434とP22のリプレッサーの場合も一緒に比較して示してある。これらの特徴が切断反応にどのような役割をしているかはわかっていない。また切断反応にはATPの分解そのものは必要ではなく、ATP- γ SやdATPでその代りができる。SOS反応の起こらない*recA*₁変異の*recA*₁たんぱく質では、全くこの切断反応は起こらない。

(6) ϕ 80ファージリプレッサーの不活化の特異性

ϕ 80ファージは、 λ ファージと極めて良く似たファージであるが、UVによる誘発のされ方には幾つかの違いが見られる。まず誘発に必要な最適な線量が λ ファージの場合の約1/4である。また λ ファージの誘発が全く起こらない*recA*変異、*recA*430でも ϕ 80は誘発される。そして、 ϕ 80のC1遺伝子の塩基配列を決定し、それからリプレッサーのアミノ酸配列を推定してみると、それには、切断部位となる、Ala-Glyという配列は一個所も無いことがわかったのである。一体 ϕ 80リプレッサーは他のリプレッサーと同様に切断で不活化されるのだろうか？ 切断されるとしたらどんな配列の部分か？ そこは非常に切断され易い場所なのかもしれない等々、 ϕ 80リプレッサーの切断の様子を調べることによって、リプレッサー切断の分子機構がよりくわしく理解できると思われるので、 ϕ 80リプレッサーを精製し、その切断を調べた。

ϕ 80C1遺伝子の形質発現は自己制御系で、C1遺伝子産物が多くなると、転写開始領域に結合して発現を抑える。そこでリプレッサーを量産させて、精製に有利にするには、その制御領域を削って、別の転写開始領域につなげば良い。われわれは λ ファージのP_Lプロモーターを利用し、そのような操作を行ない量産系をつくった。分子量を目印にして精製を行い、26,300のたんぱく質がとれた。このたんぱく質のN末端5個のアミノ酸配列はNH₂-Ser-Ser-Ile-Ser-Gluで塩基配列から予想された配列と同じで、アミノ酸含量も塩基配列から予想される数値と非常に良く一致して、 ϕ 80リプレッサーであることが確認された。

さて、この ϕ 80リプレッサーを用い*recA*たんぱく質による切断反応を行なわせると、やはり二つに切断され、約13,000と14,000のポリペプチドになることがわかった。切断部位はCys(N末から110番目)とGly(111番目)の間であった。変異*recA*430たんぱく質では λ ファージリプレッサーは、全く切断され

なかったが、 $\phi 80$ リプレッサーと *lexA* たんぱく質は切断された。これは *in vivo* の誘発の結果と良く一致する。しかし、リプレッサーの切断反応を速度論的に調べてみると、補助因子が ATP- γ S の場合には、 λ リプレッサーと $\phi 80$ リプレッサーは、ほぼ同じ割合で切断が進行するが、ATP の場合には、 $\phi 80$ リプレッサーの切断は λ リプレッサーの約 1/10 に過ぎなかった。少なくとも今まで使われている条件では $\phi 80$ リプレッサーが λ リプレッサーより切断され易いということはない。われわれは、この様に切断反応が *in vivo* の誘発の結果と合致しないのは、切断反応を改善する必要があることを意味すると考えた。ここで思い当ることがあった。1978年に、大石道夫等は、 $\phi 80$ 溶原菌に原形質分離を起こさせ、オリゴヌクレオチドをその細胞内に入れ、dAG, dGG, dAGG 等が DNA への直接の障害なしに、 $\phi 80$ フェージを誘発することを報告していた。それらのオリゴヌクレオチドが直接リプレッサーの切断に関与するという事実はまったく無かったが、誘発に何らかの関与をしていることが明らかであった。そこで切断反応液に dGG を加えてみたところ、 $\phi 80$ リプレッサーの切断効率が飛跳的に増加することがわかった。補助因子が ATP の場合では、dGG 添加によって反応速度は約 400 倍に上昇する。この効果は、 λ リプレッサーや *lexA* たんぱく質の切断の場合には、全く現れなかった。recA430 たんぱく質でも dGG の効果が $\phi 80$ リプレッサーにだけ見られ、 λ フェージのリプレッサーがそれによって切れるようになることはなかった。原形質分離を起こさせた細胞を用いて、 $\phi 80$ を誘発する系では、dGA や dTG などは、効果がなかったが、われわれの *in vitro* の切断系でも、まったく効果を示さなかった。その意味で、*in vivo* の現象と *in vitro* の結果が非常に良く対応した。リプレッサーの切断にジヌクレオチドが大きな役割をするのは、切断部位が他のリプレッサーと異なっている、 $\phi 80$ リプレッサーにだけ特異的な現象なのか、他のリプレッサーの切断でも別の因子が同じように関与していて、もっと切断され易くなるのかは、まだわかっていない。また、ジヌクレオチドが、どこに作用してこのような効果が出るのかもわかっていない。

(7) SOS 反応の制御モデル

試験管内での *lexA* たんぱく質の DNA への結合と切断の仕組みの結果をもとに、SOS 反応の制御のモデルをつくると、およそ次のようになると思う。SOS 反応

を示す各遺伝子の転写開始領域にはすべて、5'CTG(N)₁₀CAG3'の配列があり、ここを中心にlexAたんぱく質が結合して、それぞれ転写を阻害している。この転写の阻害は、完全にその遺伝子の機能発現を抑えてしまうというのではなく、ある程度の発現を保障している。実際にrecAたんぱく質は組換えに必要な量はいつも存在しているし、切り出し修復に必要な酵素群も存在している証拠がある。lexA遺伝子自身はやはりlexAたんぱく質によって制御される自己制御系となっているが、他の遺伝子と異なりlexAたんぱく質の結合部位を2つ持っている理由は、この阻害の不完全さに起因するものとも考えられる。lexAたんぱく質濃度が、より増加したときに両方の部位に結合して、完全に転写を阻害するようになり、リプレッサー濃度が狭い範囲内に収められる様になっているのかもしれない。今もし、DNAに障害が起きて、その障害によって部分的なDNA鎖の開裂が起きるとか、その障害を除去する機能が働いて一本鎖が出来るかするとrecAたんぱく質が逸早くそこへ結合すると考えられる。これがDNA障害の認識である。一本鎖DNAに結合したrecAたんぱく質は、ATPやdATPが存在すると、lexAたんぱく質を切断するようになり、細胞内のlexAたんぱく質濃度を低下させる。このとき、φ80リプレッサーの切断のときのように、オリゴヌクレオチドがこの切断に大きな約制をしている可能性もある。濃度低下の結果lexAたんぱく質の結合によって抑えられていた遺伝子の転写が一掃に開始されることになる。勿論lexAたんぱく質の結合部位の塩基配列に依存する筈なので、厳密には、個々の遺伝子の形質発現する時期はそれぞれ異なる筈である。実際に、*uvrC*遺伝子はuv照射後90~120分後に形質発現が行なわれるといわれている。また形質発現した遺伝子には、それぞれまた独自の制御があるものと考えられる。*himA*遺伝子はhimAたんぱく質によって制御される自己制御遺伝子でもあるし、また*uvrB*のようにプロモーター部位が、lexAで制御されているもの以外に、その下流にもあるなど、それぞれ個性のある制御になっている。さて、形質発した遺伝子の多くはDNA修復に関与しているので、早速修復が進行しDNAの一本鎖部分も次第になくなって行く。したがって一本鎖に結合したrecAたんぱく質も少なくなり、lexAたんぱく質の切断も少なくなる。そこで再びlexAたんぱく質濃度が次第に増加して、各遺伝子の発現が抑えられ、また元の状態に戻ることになる。

さてこのようなSOS反応系は真核細胞にもあるのだろうか。われわれは、遺伝学

的に最も解析が進み、遺伝子操作が容易に行なうことが出来る酵母, *Saccharomyces cerevisiae*, を用いて、組換えとDNA修復に同時に関与している遺伝子の解析を始めたが、その中の一つ、*RAD52* 遺伝子の形質発現がアルキル化剤、メチルメタンスルホン酸(MMS)で誘導されることが明らかになった。

2. 酵母 *RAD52* 遺伝子の構造と発現

(1) 酵母のDNA修復系遺伝子

酵母のDNA修復に関与する遺伝子の変異は多数分離されて、現在図4のように分類されている。ピリミジンダイマーの除去に関与する*RAD3*のグループ、誤りがち修復(Error prone)の*RAD6*グループ、そして組換え修復の*RAD52*グループである。われわれは、電離放射線に特に感受性が高く、組換えも同時に出来なくなる*RAD52*グループに興味を持ち、このグループに属する遺伝子の機能とその発現を知る目的で、それぞれの遺伝子のクローニングを試みた。現在までに*RAD51*, *RAD52*そして*RAD55*遺伝子のクローニングに成功し、それらの解析が進行している。この中で*RAD52*遺伝子の解析が最も進んでおり、塩基配列の決定によって、

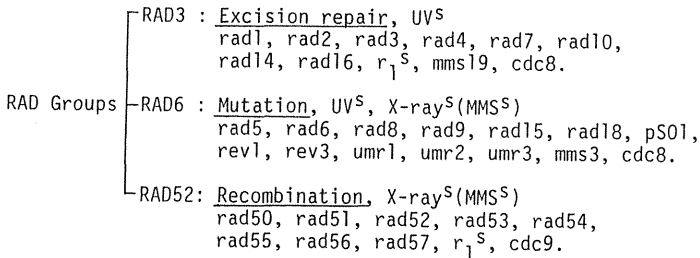


図4 酵母のDNA障害修復に関与する変異の分類

*RAD3*グループの遺伝子は、ピリミジンダイマーの切除修復に関与し、X線の障害には野生型と同じ感受性を示す。*RAD6*のグループの遺伝子は、紫外線とX線、メチルチタンスルホン酸(MMS)による障害の修復に関与し、突然変異の誘発を行う。*RAD52*グループの遺伝子は、X線、MMSの障害修復に関与し、組換えに関係している。

1,512塩基からなる領域 (open reading frame) が *RAD52* 遺伝子に対応することがわかってきた。この中に *rad52-1* 変異があって、ミス変異であること、この領域を転写するメッセンジャーRNAが存在すること、この遺伝子中にはイントロンが無いことなどが明確になっている。この遺伝子の発現を簡単な方法で知る目的で、予想される *RAD52* たんぱく質のN末側から約65%の位置に相当する場所に、試験管内の遺伝子操作で大腸菌の β -ガラクトシダーゼの遺伝子 *lacZ* をつなぎ、*RAD52* と *lacZ* の融合遺伝子を形成した。これから作られるたんぱく質は、*RAD52* たんぱく質のN末側を持った β -ガラクトシダーゼで、 β -ガラクトシダーゼの活性を保持していた。この活性を指標に *RAD52* 遺伝子の発現を調べることができた。

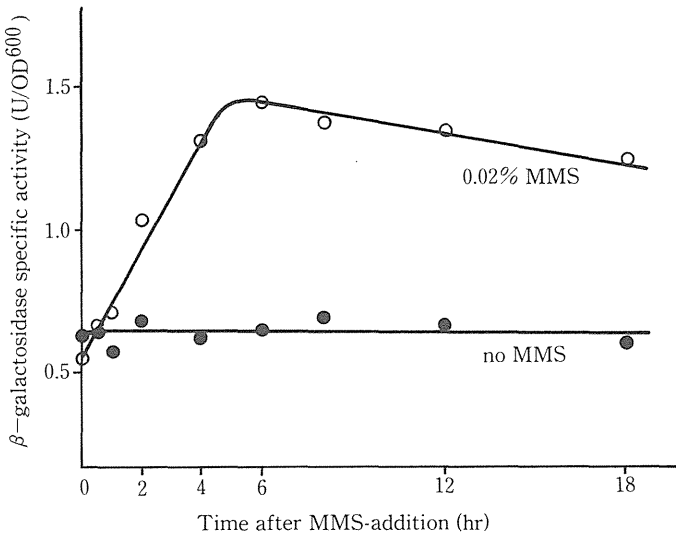


図5 *RAD52* 遺伝子のMMS添加による形質発現の誘導

RAD52 遺伝子と *lacZ* 遺伝子の融合遺伝子をつくり、*RAD52* 遺伝子の形質発現を、 β -ガラクトシダーゼの活性で追うことができるようにして、プラスミドに乗せたものを利用した。対数増殖期の酵母培養液にMMS濃度が0.02%になる様に加え、その後各時間毎に試料を取りその試料中の β -ガラクトシダーゼの比活性を定量した。

RAD52 遺伝子の機能が、DNA 障害によって誘導合成されるかどうかを調べた結果を、図 5 に示してある。DNA に障害を与えるのに電離放射線の代わりに、同じような効果のある、メチルメタンスルホン酸 (MMS) を用いた。*ARS 1-CEN 3-TRP 1* と *colE1* 複製領域と *Amp^r* を持つシャトルベクターに上記の誘合遺伝子をつないで作ったプラスミドを酵母の *RAD⁺* 株 D13-1A に持たせ、対数増殖期に 0.02% になるように MMS を加え、以後各時間毎に試料中の β -ガラクトシダーゼの比活性を追った。図の様に、MMS が無ければ、比活性は 18 時間まで変化しなかったが、MMS 存在下では、直ちに増加が始まり、5 時間後には、ほぼ 3 倍近くになり、以後はわずかに減少する傾向を示した。このように *RAD52* 遺伝子は MMS 処理で誘発することがわかった。現在、各種の *rad* 変異株中での誘発の様子や、他の *RAD* 遺伝子の発現も同様かどうか調べる準備をしている。

おわりに

大腸菌では、DNA 修復や変異誘発、組換えなどに関与する機能の発現制御の仕組みが、分子レベルで理解できるようになってきた。真核細胞でも同じような SOS 反応があることは間違いないことと思われる。少なくともわれわれの観察した酵母の *RAD52* 遺伝子は、その一つと考えられる。どの様な種類の遺伝子の機能がその外に誘導されるのか、その誘導の分子機構は大腸菌の場合と同じだろうか等々、すべてこれからの問題である。

参 考 文 献

- 1) Little, J. W. and Mount, D. W. (1982) *cell*, 29, 11
- 2) Inouye, M. and Pardee, A. B. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 5813
- 3) Gudas, L. J. and Pardee, A. B. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 2330
- 4) Kenyon, C. J. and Walker, G. C. (1980) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77, 2819
- 5) Casadaban, M. J. and Cohen, S. N. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76, 4530

I -3 姉妹染色分体間の組換機構

中井 斌*, 町田 勇*, 辻 さつき*

はじめに

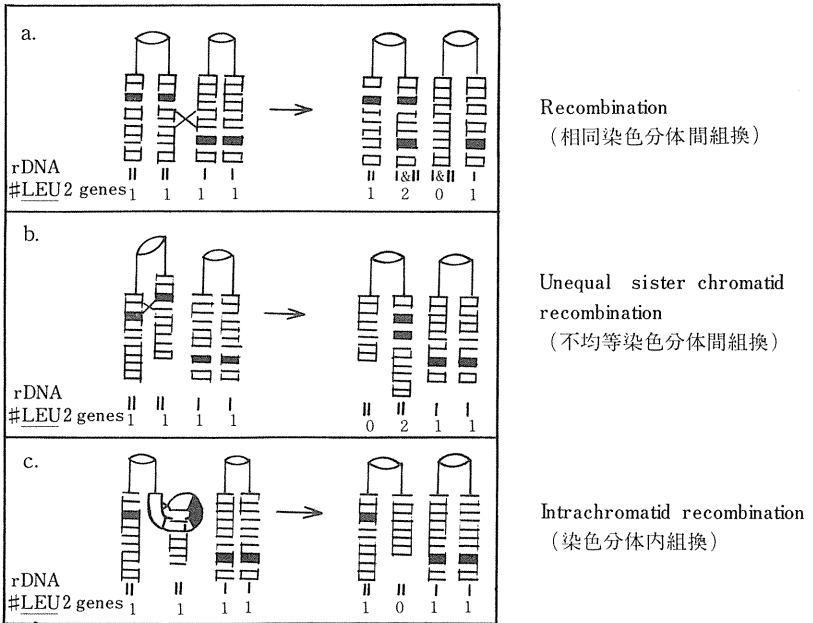
遺伝的組換は、染色体の切断と再結合によって、新しい遺伝子間の組み合わせを生じ、このため、その子孫に突然変異によらない遺伝的変異を生ずる。このことは生殖細胞の成熟分裂に伴う事象としてまず発見され、ついで体細胞の分裂に際にも低率ではあるが存在することも明らかとなったが、いずれも相同染色体間の組み換え事象に基づくものである(図1)。一方近年複製DNAの染め分けが可能となり、高等生物の姉妹染色分体間で部分交換が行われる sister chromatid exchange (SCE) の事象が発見されたが、その遺伝学的意義については今後の問題とされている。

最近の酵母 (*Saccharmyces cerevisiae*) の遺伝学の長足の進歩は、この SCE の遺伝的解析を可能にしつつある。すなわち、特定の遺伝子の有するプラスミドを染色体に導入した実験系によって、この遺伝子を標識にし姉妹染色分体間の遺伝子レベルの組換、sister chromatid recombination (SCR) の検出を行うものである(文献1-6)。現在までに得られた結果は次のように要約される。

- ① SCR の事象は tandem に配列した gene array で多発し、体細胞分裂、生殖細胞分裂の何れの場合にも生ずる。
- ② SCR に伴い遺伝子レベルでの増巾または欠損を生ずる。
- ③ 染色体上の hot spot は通常の染色体間組換と異なる。
- ④ 紫外線などの変異原によって SCR は誘発されるが、比較的低線量域(生存率約10%位)で飽和される。
- ⑤ SCR の誘発には、RAD52 修復遺伝子が関与する。

これらの結果から、真核生物の遺伝変異の機構として SCR が大きく浮びあがり、

* 放射線医学総合研究所遺伝研究部



Thomas D. Petes, Cell 19:765, 1980

図1 染色体組換の模式図

特に体細胞分裂に伴い、遺伝子レベルでの増巾、欠損を生じることは、分化、発がん機構にも関連することが示唆され、また遺伝の機構の問題としてもSCRの機構の解明は相同染色体間の組換機構と対比する意味において極めて注目される。

1. SCRの機構と実験システム

SCRの機構を解析するため我々の用いた実験システムを図2, 3に示してある(文献7)。すなわちCYH^S2, LEU2, URA3の野生型遺伝子をもつプラスミドpsZ430(12.5Kb)を酵母の第Ⅶ染色体に導入してある。この半数体の系統T948には同時にシクロヘキシミド抵抗性のcyh2, ロイシンおよびウラシル要求

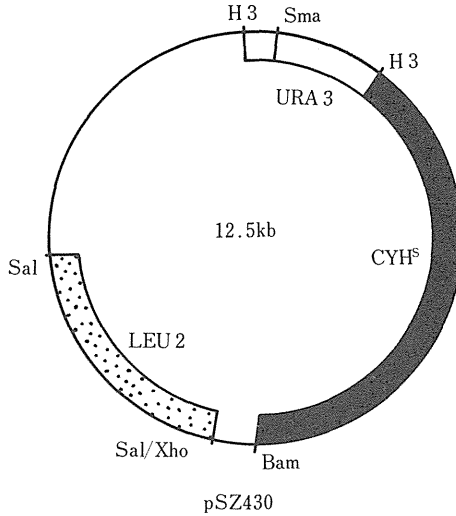


図2 プラズミド ps Z430 の分子構造

の leu 2-2, 112, ura 3 の劣性遺伝子が存在するが、プラズミド ps Z430 が導入されたために、表現型はシクロヘキシミド感受性ロイシンおよびウラシルも非要求性の野生型となる。この T948 の第 VII 染色体で姉妹染色分体組換 (SCR) を生じると、シクロヘキシミド培地上でコロニーを形成するようになる。図 3 で示すように、この場合三つの異なった機構によって SCR が生ずることが考えられる。すなわち、cyh 2 遺伝子が重複して存在するため、まず染色分体間の対合に誤りを生じ、その結果① CYH^S の遺伝子が、cyh 2 遺伝子によって遺伝子変換 (gene conversion) を生じる場合 (図 3 上段) と、② cyh 2 遺伝子の近傍で不等交叉 (unequal crossover) が生じる場合 (図 3 中段) と、また③ ps Z430 プラズミドが染色体

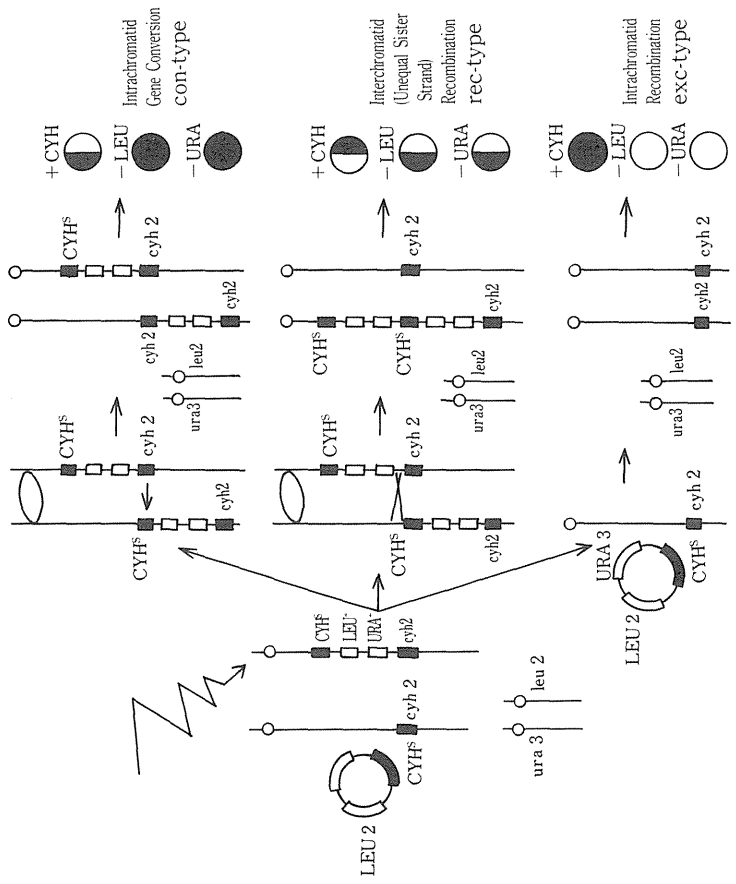


図3 S C Rの機構と実験系のモデル

より脱落する場合（図3下段）とである。この結果，シクロヘキシミド培地，ロイシンまたはウラシル非添加培地上では図3の右側に示すコロニーの形状をとることが期待される。すなわち，これら培地上の表現型から逆に誘発されたSCRの機構を推測することが可能となる。

2. 突然変異原によるSCRの誘発特性

我々は上述の実験系を用い，DNAの分子損傷の型とSCRの誘発機構が如何に関連するかについて研究を行った⁽⁷⁾。図4，5はその一例であって紫外線およびX

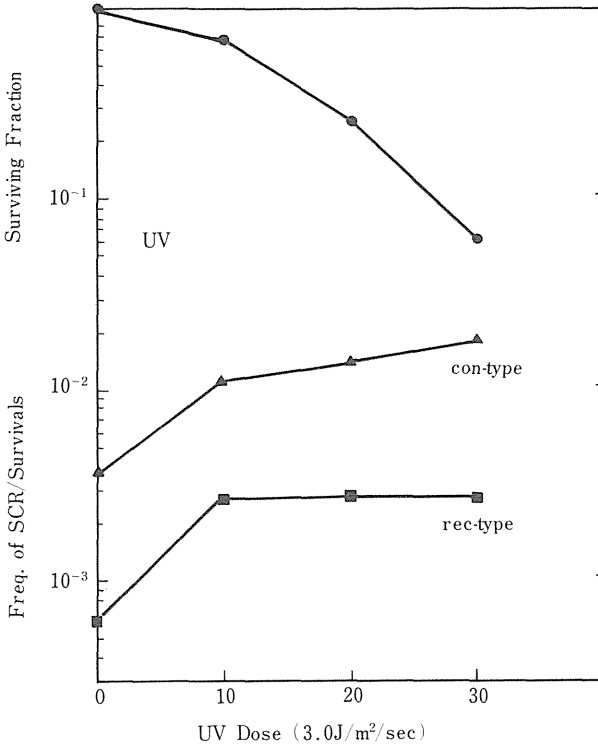


図4 紫外線によるSCR誘発の線量効果

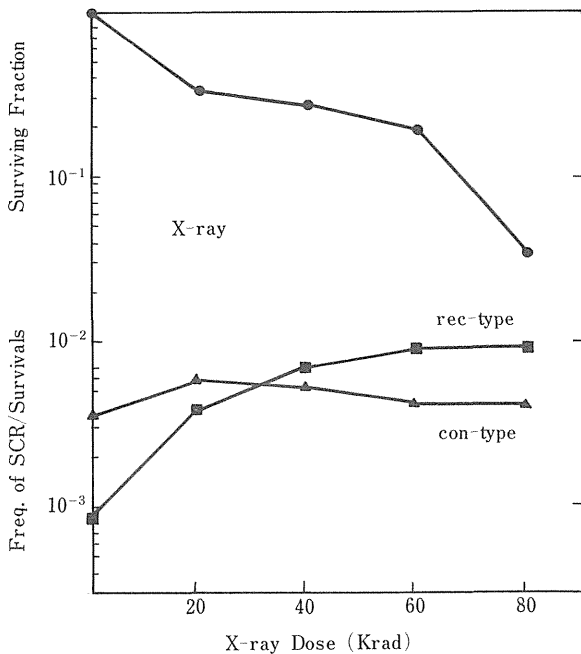


図5 X線によるSCR誘発の線量効果

線によるSCRの誘発特性を示してある。この図でわかるように、紫外線、X線の両者とも生存率10%以内の低線量域でSCRの誘発率は急昇し、飽和に達するが、特に著しいことは紫外線では遺伝子変換型が、またX線では組換型がほとんど優先的に誘発されることである。この関係を種々の変異原について調べると図6のようになる(文献8, 9)。この図で明らかなように、SCRの誘発のタイプは、変異原の特性により遺伝子変換型・組換型の比率が異なり、これらの型の誘発にはDNAの分子損傷の型に強く依存することが明らかである。

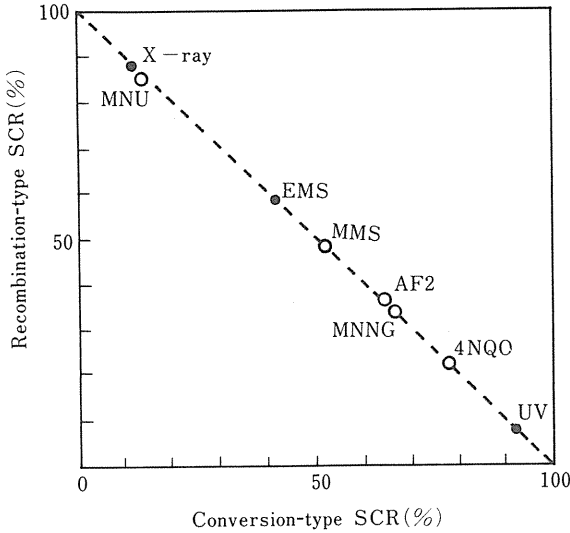
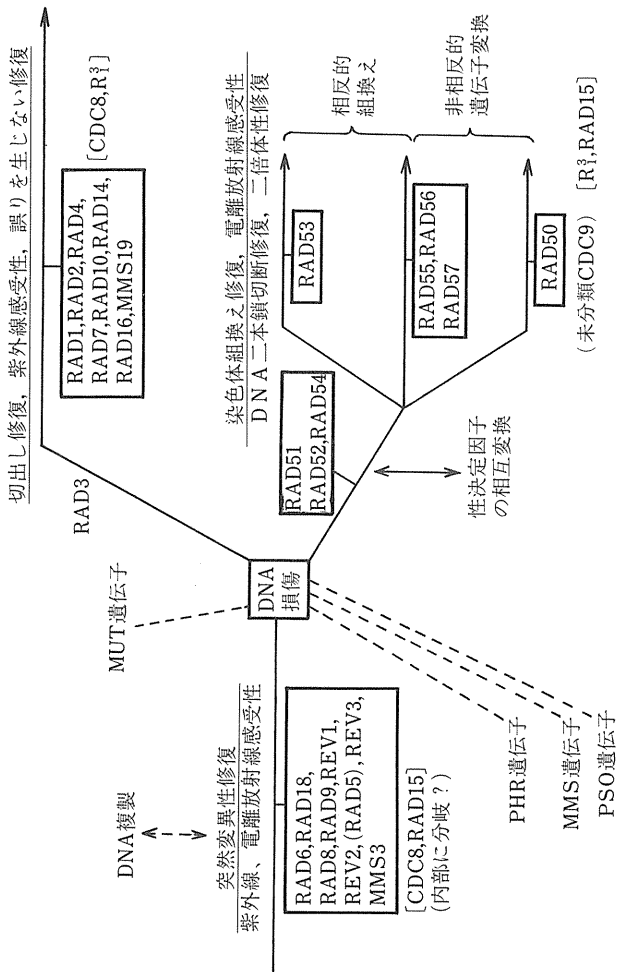


図6 各種変異原により誘発された遺伝子変換および組換型SCRの相対比率

3. DNA修復rad突然変異体とSCRの誘発特性

酵母では多くのDNA修復欠損突然変異体が知られており、(文献10,11)これらDNAの修復と突然変異・組換との関係もまた明らかにされている(図7)。すなわち、通常の相同染色体間組換はrad52系の修復系に依存していることが知られている。そこで我々はこれら修復欠損のrad突然変異体を用いてSCR誘発とDNA修復との関係について研究を行った。図8はこの結果を要約したもので○印は自然変異率●印は誘発率(生存率10%)を示してある。この図で明らかなように①相同染色体組換に関与するrad52系では、rad53などを除きSCRの誘発は著しく抑制される。②最も注目されるのはrad6系で相同染色体組換の場合と異なり、(文献11)rad18系を除きrad6, rad3ではSCRの誘発が抑制されることである。③除去修復系はSCRの誘発に関与しない。これらの結果は、SCRの誘発機構は相同染色体間組換と共通のものもあるがSCR独自の機構の存在す



[]内は二つの修復系に属する遺伝子

図7 酵母のDNA修復に関する遺伝子系

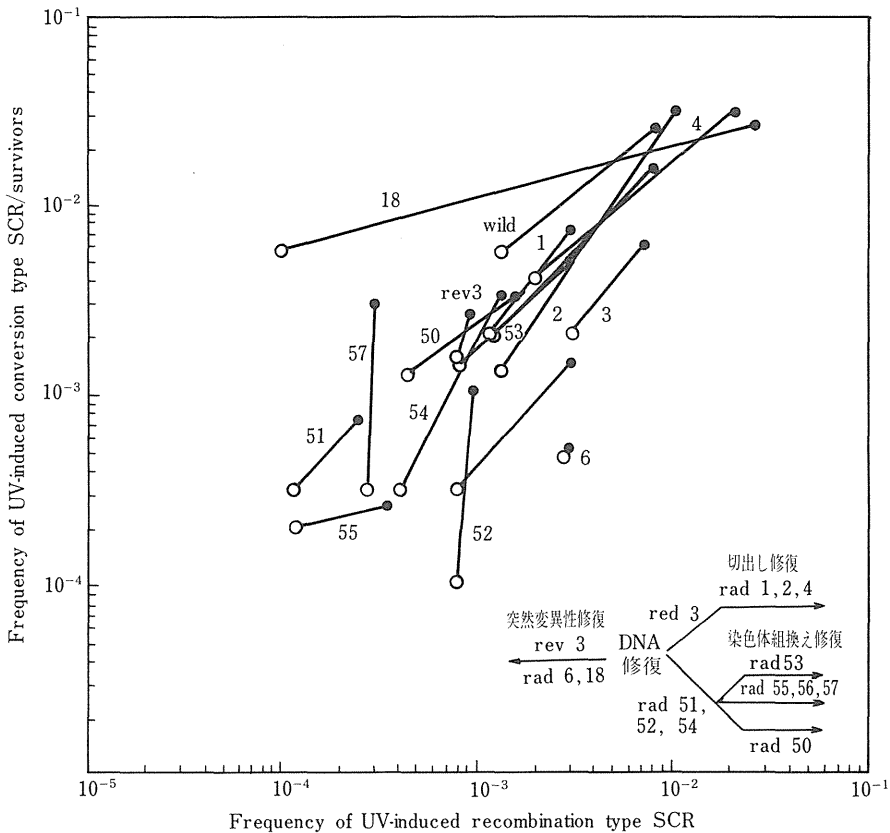


図8 Cad 突然変異体における遺伝子変換および組換え型SCRの紫外線による誘発率

ることを示している。

4. 細胞分裂温度感受性突然変異体のSCRの誘発特性

酵母ではHartwell らによって温度感受性突然変異体を用い、細胞分裂の進行を特異的に阻止するcdc突然変異体の解析が進んでいる(文献13)。我々はこのcdc突然変異体を用い、SCRの誘発と細胞分裂の時期との関係について詳しい解

析を行った。図9はこの結果の要約を示すもので(●○印は図8に同じ)次のことが明らかである。①予想されるようにDNA複製のS期の前後に関するcdc突然変異体のSCR誘発は強く抑制される。②ligase⁻のcdc9, TMP⁻のcdc21突然変異体のSCR自然誘発率は著しく高率となる。③cdc9とrad55, rad6の複突然変異体の結果から, cdc9の遺伝子の機能はrad55より, rad6の遺伝子機能は

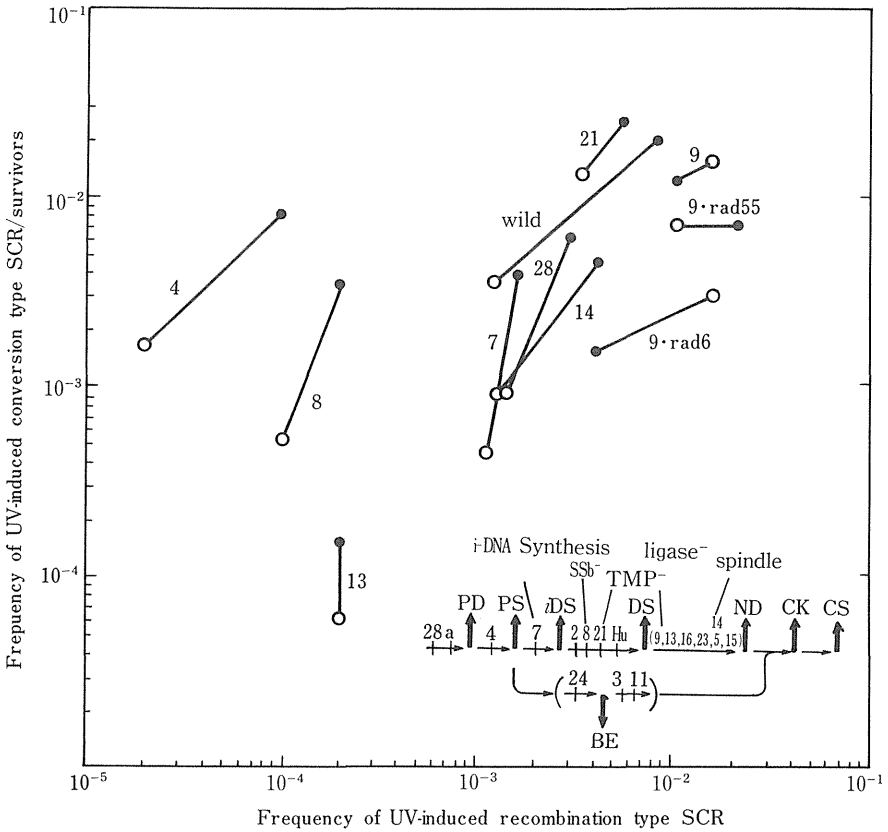


図9 cdc 突然変異体における遺伝子変換および組換え型SCRの紫外線による誘発率

表 1 各種突然変異体の S C R の誘発特性

Function	Mutant	Induction of recombination	
		Sister chromatid	Homologous chromosome
Initiation of DNA synthesis (Mutation induction)	cdc 7	con ⁻ rec ⁻	con ⁺ rec ⁺
Post replication repair (Mutation induction)	rad 6 (pso 1, rev 3)	con ⁻ rec ⁻	con ⁺ rec ⁺
Single strand break (Mutation induction)	cdc 8	con ⁻ rec ⁻	NT
Double strand break repair	rad 52 (rad 51, 54, 55, 56, 57)	con ⁻ rec ⁻	con ⁻ rec ⁻
DNA elongation (TMP ⁻)	cdc 21	con ⁻ rec ⁻	NT
DNA elongation (ligase ⁻)	cdc 9	con ⁻ rec ⁻ (spont inc.)	con ⁻ rec ⁻ (spont inc.)
Excision repair	rad 1 (rad 2, 3, 4)	con ⁺ rec ⁺	con ⁺

cdc 9 より上位にある。

これらの結果から S C R は DNA 複製後の S-G₂ に誘発されるものと推測され、また DNA 複製後の DNA 鎖の切断が S C R の誘発に強く関わることを示している。さらに S C R の誘発の制御には rad 6 - cdc 9 - rad 55 の各遺伝子によりこの順で関与するものと推測される。

以上の突然変異体の研究結果をまとめたものが表 1 である。

お わ り に

姉妹染色分体組換 (SCR) は相同染色体間の誘発機構と明らかに異なり、その誘発機構に関し、現在までに得られた知見を要約すると次のようになる。

- ① S C R の誘発は相同染色体間組換は大部分 G₁ 期に誘発されるのに反し、DNA 複製後 S-G₂ に誘発される。
- ② S C R の誘発には DNA 複製後の DNA 鎖の切断と再結合に関わる post

replication repair が関与する。(文献14)

③ S C R の誘発のタイプすなわち遺伝子変換あるいは組換型か否かはDNAの分子損傷の型に依存する。

以上の結果は、大腸菌など原核細胞での組換機構、酵母におけるmating typeの変異、また、原核・有核生物の両者にみられるトランスポゾンの組換機構とS C Rの誘発機構との類似性が強く示唆される(文献15, 16)。

現在組換機構の分子モデルについて種々の提案がなされており、(文献17) S C Rの分子機構についても二重鎖切断修復モデルが提出されているが(文献18-21), その解明は今後に残されていると言えよう。これとともに、これら異なった生物種(原核・有核生物を問わず)、組換機構の相互関連性、種特異性を明らかにすることが特に重要である。S C Rと修復機構の関係の研究はこの問題のモデルを提供するのみならず、直接、遺伝変異の特異性解明にも有力な手段を提供するであろう。このためには、これら組換機構の制御遺伝子の生物種間の相同性を今後直接遺伝子レベル研究を進める必要がある。

参 考 文 献

- 1) Jack W. Szostak & Ray Wu, Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. Nature 284 : 426-430, 1980
- 2) Thomas D. Petes, Unequal meiotic recombination within tandem arrays of yeast ribosomal DNA genes, Cell, 19 : 765-774, 1980
- 3) Hannah L. Klein and Thomas D. Petes, Intrachromosomal gene conversion in yeast, Nature 289 : 144-148, 1981
- 4) Louise Prakash and Patricia Taillon-Miller, Effects of rad 52 gene on sister chromatid recombination in *Saccharomyces cerevisiae*, current Genetics 3 : 247-280, 1981
- 5) Timothy J. Zamb and Thomas D. Petes, Unequal sister-strand recombination within yeast ribosomal DNA does not require the RAD 52 gene product, Current Genetics 3 : 125-132, 1981
- 6) Mikus M. D. and T. O. Petes, Recombination between genes located on nonhomologous chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*,

- Genetics, 101 : 269-404, 1982
- 7) S. Nakai and I. Machida, Induction of intrachromosomal recombination by radiations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Proc. 7 - th International Congress of Radiation Research. Amsterdam 1983
 - 8) 中井 斌, 町田 勇, 放射線により誘発される姉妹染色分体組換 (SCR) の特性, 日本放射線影響学会, 京都 1983
 - 9) 平野光一, 中井 斌, 酵母を用いた姉妹染色分体組み換え (SCR) による変異原試験, 日本環境変異原学会, 徳島 1983
 - 10) 佐伯哲哉, 中井 斌, 酵母の多様な修復系遺伝 34 ; 32-42, 1983
 - 11) Robert H. Haynes and Bernnard A. Kunz, DNA repair and Mutagenesis in yeast, Molecular Biology of the yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory 371-414, 1981
 - 12) Beth A. Montelone, Statya Prakash and Louse Prakash, Recombination and mutagenesis in rad 6 mutants of *Saccharomyces cerevisiae* : Evidence for multiple functions of the RAD 6 gene, Mol. Gen. Genet. 1842 : 410-415, 1981
 - 13) Leland H. Hartwell, Sequential function of gene products relative to DNA synthesis in the yeast cell cycle, J. of Molecular Biology 104 : 803, 1976
 - 14) Louise Prakash, Characterization of postreplication repair of *Saccharomyces cerevisiae* and effects of rad 6, rad 18, rev 3 and rad 52 mutations, Mol. Gen. Genet. 184 : 471-478, 1981
 - 15) George P. Livi and Vivian L. Mackay, Mating type regulation of methyl methansulfonate sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*, Genetics 95 : 255-271, 1980
 - 16) Jeffrey N. Strathern, Amar J. S. Klar, James B. Hicks, Judith A. Abraham, John M. Iuy, Klim A. Nasmyth and Carolyn McGill, Homothalic switching of yeast mating type cassettes is initiated by double-stranded cut in the Mat locus, Cell 31 :

183-192, 1982

- 17) Franklin W. Stahl, Special site in generalized recombination, *Ann. Rev. Genet.* 13 : 7-24, 1979
- 18) Terry L. Orr-Weaver, Jack W. Szostak and Rodney S. Rothstein, Yeast transformation A model system for the study of recombination, *Proc. Acad. Sci. U. S. A.* 78 : 6354-6358, 1981
- 19) Terry L. Orr-Weaver and Jack W. Szostak, Yeast recombination : The association between double-strand gap repair and crossing over, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 80 : 4417-4421, 1983
- 20) Neal Sugawara and Jack W. Szostak, Recombination between sequences in nonhomologous positions, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 80 : 5675-5679, 1983
- 21) Jack W. Szostak, Terry L. Orr-Weaver, Rodney J. Rothstein and Franklin W. Stahl, The double-strand break repair model for recombination, *Cell*, 33 : 25-35, 1983

I-4 動く遺伝子による変異

池 永 裕* 西 郷 薫**

はじめに

突然変異体を詳細に解析すると、染色体DNA上にあるユニットのようなものが挿入され、その結果変異が起こったと考えなければ説明できないような変異があることがわかってきた。これがBarbara McClintockによる“動く遺伝子”の発見であった。その後の研究によりこの動く遺伝子はバクテリアからヒトまですべての生物に存在しており、遺伝情報発現に重要な役割を果していることがわかってきた。特にこの因子が動くことによって変異を引き起しやすき条件は、通常の変異が起きやすき条件と一致しているので、放射線による遺伝損傷とリスクを考えるにあたりこの因子の特徴といったものを頭に入れておくことは有益なことであろう。

1. 動く遺伝子とは

動く遺伝子とは、染色体上の色々な地点に散らばって存在し、かつ時と場合に応じて動き出しその所在を変えることのできる遺伝的因子の総称である。この因子はバクテリアからヒトまで広く生物一般に存在していることが知られているが、その一般的構造は図1に示したようなものである。動く遺伝子は染色体DNA上の任意の地点に入り込めるわけであるが、その時標的とした染色体DNAの配列を重複し、因子の両端に同方向反復配列を生じる。一般に因子の両末端には逆方向反復配列が存在することが多い。この様な構造上の類似性は、動く遺伝子が転移し染色体上を動きまわる際の機構に共通のものがあるらしいことを想像させる。ところで動く遺伝子は染色体DNA上に組み込まれるだけでなく、そこから切り出されていく機構

* キリンビール株式会社開発科学研究所

** 九州大学医学部

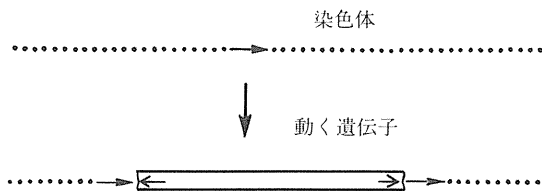


図1 動く遺伝子の染色体DNA挿入後の一般的構造

も存在する。一般に完全に元通りに修復されるが、相同組み換えや交差などにより、一部の断片を残していくようなことも起こる。また、動く際にまわりの遺伝子をともなって動くことがあることも知られており、動く遺伝子により染色体DNA構造は再編成されているといえる。ところで、動く遺伝子によりどのような変異が起こるのであろうか。遺伝現象への関与が比較的詳しく研究されているショウジョウバエを例としたい。ショウジョウバエではWhite locusと呼ばれる目の色の形成に関する遺伝子が最も詳しく調べられている。野生型のショウジョウバエは赤い眼の色をしているが、白色とか中間色の眼の色をした変異体がいくつか得られている。このような変異体ではWhite locus染色体上のどの様な場所にどの様な動く遺伝子が挿入されたのかについて、O'Hare ら¹⁾によってまとめられた。構造遺伝子の中に入り込むことによって遺伝情報を壊すこともあるが、構造遺伝子からかなり離れた場所に入っても遺伝子発現に影響を与えることがある。遺伝情報発現への影響の仕方はいろいろ考えられるようである。

2. ショウジョウバエのコピヤ様動く遺伝子とレトロウィルス

さて動く遺伝子についてさらに詳しく知るため、私たちが最近ショウジョウバエを材料に研究した結果について以下に記すことにしたい。ショウジョウバエ染色体中にはいくつかの種類 of 動く遺伝子が存在しており、すべてあわすと染色体DNA中の約20%は動く遺伝子で説明できるといわれている。これらの中で最も量が多いコピヤ様動く遺伝子は、図2上部に示すような構造をしており両端に数百塩基対ほどのLTR(long terminal repeat)と呼ばれる同方向反復配列を持つことが特徴

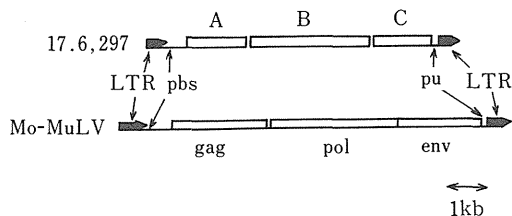


図2 ショウジョウバエのコピヤ様動く遺伝子
17.6, 297 とレトロウィルスMo-Mu
LV⁷⁾ のプロウィルス構造との比較

的である。この構造は酵母のTy因子や脊椎動物レトロウィルスが染色体に組み込まれたプロウィルス構造に非常に良く似ている。そのため以前からその類似性が議論されてきたが、私たちはショウジョウバエコピヤ様動く遺伝子の一つである17.6, 297の全塩基配列を決定し、レトロウィルスとの比較を試みた。ところで、この17.6, 297と呼ばれる因子は間に約2 Kbほど塩基配列レベルで50%と相同性の低い部分があるが、全体では70%程の高い相同性が認められ、親戚関係にある因子とって良いであろう。私たちは幸運にもこのような親戚関係にある二つの因子の塩基配列を決めることができたため、以下に述べる議論を非常に明確に行なうことができた。(Saigoら未発表)まずこれらの因子の中には三つのオープンリーディングフレーム(図中A, B, Cで示す。)を見出すことができた。図2に示すようにこれらはレトロウィルスのgag(コアタンパクをコードする遺伝子)、pol(逆転写酵素をコードする遺伝子)、env(外膜糖タンパクをコードする遺伝子)に相当すると考えられた。これらのタンパクを動く遺伝子17.6, 297が実際に作り、ショウジョウバエの中で機能しているであろうことは、アミノ酸に翻訳すると、17.6, 297の間ではコドンの3番目にあたる塩基の変異が多いことから推定された。次にレトロウィルスに特徴的なタンパクである逆転写酵素をコードすると考えられるpol遺伝子(B)について、アミノ酸に翻訳して比較したところ、Tohら²⁾により指摘されている逆転写酵素に特徴的な配列が見出された。またB遺伝子全体をみても、カリフラワーモザイクウィルス中の逆転写酵素とアミノ酸配列レベルで

30~40%程度の相同性を示し、さらにマウスのレトロウィルスであるMo-MuLV (Moloney murine leukaemia virus) やニワトリレトロウィルスであるALSV (Avian leukosis sarcoma virus)とも20~30%程度の相同性を示した。次にレトロウィルスのプロウィルス構造と良く似ている両端のLTRの塩基配列は、ニワトリレトロウィルスALSVと約60%程度の相同性が見出された。またレトロウィルスとして重要な転写開始シグナルや終結シグナルの位置、またRNAからの逆転写の際にtRNAが結合しプライマーとして利用されるための配列(pbs)やプラス鎖DNA合成の開始点であるプリンリッチ配列(Pu)の存在など、レトロウィルスとの高い相同性を認めた。一方この構造決定とは別にShibaらはショウジョウバエ培養細胞中にウィルス様粒子の存在することを示し³⁾、これがやはりショウジョウバエのコピヤ様動く遺伝子の一つcopiaのRNAを持つことを明らかにした。またcopiaは閉環状DNAとして、細胞内に存在することも証明されている⁴⁾。この様にショウジョウバエのコピヤ様動く遺伝子は限りなくレトロウィルスに近いものであり、昔は感染性を有したレトロウィルスであったのではないかと考えられた。つまり、図3に示すように、その祖先型レトロウィルスはショウジョウバエにもニワトリにも感染することができたようで、動く遺伝子というものが種を越えて遺伝情報を伝える役割を果たしてきたと想像するのはまちがってはいないであろう。ところでこのようなレトロウィルスの変化は、マウスのIAP (Intracisternal A particle) と呼ばれるウィルス様粒子中に含まれる遺伝要素についても同様と考えられる。

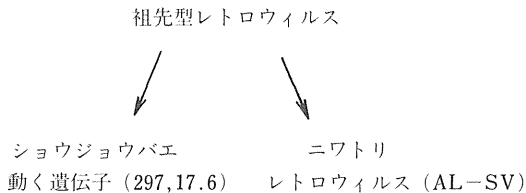


図3 レトロウィルスと動く遺伝子の関係

3. 動く遺伝子 17.6, 297 の挿入塩基特異性

ところで、動く遺伝子 17.6, 297 が染色体 DNA のどのような配列を標的にしているかを調べたところ、ショウジョウバエヒストン遺伝子中では両者とも TATA TA という配列であることがわかった。しかも 297 の場合この配列はまさに H3 ヒストン遺伝子の転写開始信号である Hogness ボックスであることがわかった⁵⁾。そこでこれら因子に挿入塩基特異性があるかどうかを知るため、ショウジョウバエ染色体遺伝子中に 17.6 が挿入されている位置を調べた。その結果は表 1 に示したが、全部で 11 カ所調べたが (T)ATAT という配列を認識して挿入されているのではないかと考えられた。(Inoue ら未発表) 297 についても Rubin らにより同様であると推定されているので、これら因子は挿入塩基特異性を持つと考えられた。ところで、なぜ 17.6, 297 はこのような塩基特異性を示すのであろうか。長い進化の過程でこのような性質が保存されたのは何か必然的理由があったと考えるのが適当であろう。そこでこの (T)ATAT という配列が、真核生物の転写開始信号と考え

表 1 ショウジョウバエコピア様動く遺伝子 17.6 の染色体 DNA 挿入に際する塩基特異性 (Inoue ら未発表)

←17.6→

1.	AAAGAAGAGGTTAATACAAAGATATATAGTG....CAATTATATATATTTATTTGTTCT
2.	TGTATTCTTACTTACATTTATACATATAGTG....CAATTATATACATGTGTATGCAGA
3.CAATTATATGTGTACTGATTTATT
4.	TCCATGTCTTCGCTACTAGATATATATAGTG....CAATTATATATATTTAGCTGCAA
5.	TCACCGTTTAAAGTGGCAAATATATATAGTG.....
6.	TAATAAAGTTATAATAATAATATATATAGTG....CAATTATATATATAATATAGCGAA
7.	AAATATGTGTGTTCAAAGTATATATATAGTG....CAATTATATATCGTAGTTAAGACC
8.GAATTCACATTTATATTGTG....CAATTATATACATATGTATGCAGC
9.CAATTATATATATATGCCATATGA
10.	TAACCACACCCCAATATATACATATATAGTG....CAATTATATACATATATACATAGC
11.	ATATATATACATACAGTTCATGTATATAGTG....CAATTATATGTATGTACG.....

(T)ATAT

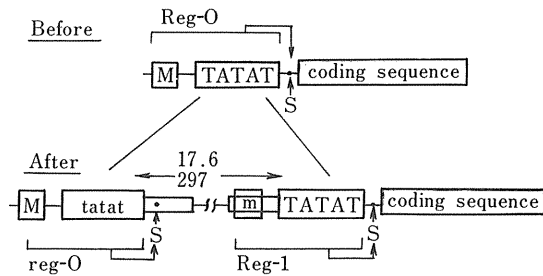


図4 ショウジョウバエコピー様動く遺伝子
17.6, 297の挿入にもなる遺伝子
の構造の変化

られている Hognessボックスの共通配列の一つであるということが重要な意味を持つのではないかと考えられた。具体的には図4に示されるように、17.6, 297は (T)ATATという配列を標的として染色体DNA中に挿入された後、そこが転写開始信号であるということを利用して自分自身を転写するのではないか。高等生物では Hognessボックス上流にさらに転写を調節する配列(図中Mと示した。)が存在することが知られているが、これらすべてを利用している寄生虫のような因子ではないかと考えられた。ところでこのような重要な場所に動く遺伝子が挿入されるとどのようなことが起こるのであろうか。Snyderら⁵⁾はショウジョウバエのククラタンパク遺伝子の Hognessボックスへコピー様動く遺伝子の一つである H.M.S. Beagle が挿入することによってククラタンパクの転写が完全に抑えられることを証明した。このように17.6, 297, H.M.S. Beagle といったような動く遺伝子は、転写開始信号部位に入り込むことにより遺伝子発現を抑え、突然変異を起こす可能性の非常に強い因子といえることができる。

おわりに

動く遺伝子は前項で述べたように転写開始領域に入り転写を妨害したり、構造遺伝子中に入って構造遺伝子を壊すことにより突然変異を誘発するだけでなく、非翻

訳領域のある地点に入ること、染色体DNAの高次構造を変えることや、動く遺伝子自身の転写開始信号を利用して付近の遺伝子の転写効率を上げるようなしくみで変異を起こすこともある。発癌におけるプロモーターインサージョンモデルはこの典型である。このように生物の遺伝情報発現は動く遺伝子により種々の影響を受けている。また動く遺伝子が動き出すのは突然変異を起しやすい条件、たとえば放射線を浴びた時の様に生物になんらかのダメージが与えられた時が多いことを考えあわせると、生物の種の保存とか進化といった大きな流れを理解するにはぜひ考慮に入れるべき存在と考えられる。さらに動く遺伝子について詳しく知りたい方はいくつかの総説⁸⁾を参考にしていきたい。

参 考 文 献

- 1) O'Hare, K., Levis, R., and Rubin, G. M. Transcription of the *white* locus in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 6917-6921, (1983).
- 2) Toh, H., Hayashida, H., and Miyata, T., Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature*, 305, 827-829, (1983).
- 3) Shiba, T., and Saigo, K., Retrovirus-like particles containing RNA homologous to the transposable element *copia* in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 302, 119-124, (1983).
- 4) Flavell, A. J. and Ish-Horowicz, D. Extrachromosomal circular copies of the eukaryotic transposable element *copia* in cultured *Drosophila* cells. *Nature*, 292, 591-595, (1981).
- 5) Ikenaga, H. and Saigo, K. Insertion of a movable genetic element, 297, into the T-A-T-A box for the H3 histone gene in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79, 4143-4147, (1982).

- 6) Snyder, M., Kimbrell, D., Hunkapiller, M., Hill, R., Fristrom, J. and Davidson, N. A transposable element which splits the promoter region inactivates a *Drosophila* cuticle protein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7430-7434, (1982).
- 7) Shinnick, T. M., Lerner, R. A. and Sutcliffe, J. G. Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus. *Nature*, 293, 543-548, (1981).
- 8) Mobile Genetic Elements, Ed. by Shapiro, J. A. Academic Press (1983).

細胞工学 特集転移性遺伝要素 I, II 1983年8月号, 9月号.

I -5

*umu*C 依存性変異誘発機構

加藤 武司* 北川 義徳**

はじめに

大腸菌の放射線誘発突然変異は *recA* - *lexA* 遺伝子系による SOS 誘発機能群の一つとして知られている^{1,2)}。SOS 誘発の分子機構については本編で小川、柴田等によって詳述されているので参照されたい。放射線等により DNA に損傷を受けた細胞では、SOS 制御系によって *umu*CD 遺伝子が誘発され、その遺伝子産物が突然変異の生成過程で重要な役割を持つ。*umu*CD 遺伝子による変異生成過程はまだ完全には解明されてはいないので、ここでは研究の現状を紹介する。

1. *umu*CD 遺伝子の構造

*umu*CD 遺伝子の塩基配列はほぼ決定され(図1)、D 遺伝子は 419 塩基 C 遺伝子は 1268 塩基からなり³⁾、それぞれ 18,000 と 46,000 の分子量の蛋白^{4,5)} をコードしている。D と C 遺伝子の上流に転写調節領域があり、いわゆる SOS box が存在し両遺伝子の発現を調節している³⁾。遺伝子の一次構造より推定されるように DNA 損傷を与える処理によって細胞中には、*umu*CD 遺伝子産物が確かに誘発されている(表1)。それは *umu*-*lacZ* 融合遺伝子を持つプラスミッドを導入した細胞を各種物質で処理した後誘発される β -Gal (*lacZ* の遺伝子産物)で調べることができる。*umu* 依存性変異誘発には D および C 両遺伝子産物が必要で、どちらが欠けてもその機能は欠損する^{4,5)}。

* 大阪大学医学部

** 大阪大学医学部(現在の所属:神戸大学理学部)

TGGCTATCTAGCCAGCGATTTCCGGAGGCGTTGTGAACCTTTGTGAGCTTACCAGCAGGCGATTTTGGCCCTTCATCGACTCGTGATCCCGTCATCCAGTACTTATGAGATG
 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 TCTTTGGCCGGCGATTCCTTTCTTCATTGTACTCATTCAATGACCAAAATACCGCTGGAGCAATTCGCTCGAACACCACACCTATCAGACTTTGGGTTCCCAAATCTTA
 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
 TCCGGCTATCCGTAAGTAGGTTTAAATACGCCGACTAAAACGGAGCGCTCGTGAATACCTCCGTTTAAAGCGACTTAACTCTTTTATGGTTTCATCAAAAGGCTGCCAGGGGATG
 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 ACGCTGACGAGATATTATTAAAGTCAATGCTCCATCCGCTGGTTTCGATTGCGTTTTTAACTACTTCCAGCTTTTTCGACAGCAATTCAGCTGATATCATCGCTTTTAAAT
 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 ATATAAATGTGATGAACCTCGCTTTTACATCAATTAATAAATTTACTTCATCAATTCATGTTAGCCGGCGGATCGCATGCTTTATTCTATTAAATGATAAATCAAA
 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 ACAATTTTAAATGTGCTATTCGGCAGTCTCTATTCTATTTTATTTAGCCGGGATGATTTTTCATTCGCTGGATGAGCGTCCGCCAAGAGGCGACGTGACCAAGATGAAGAA
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 CAAAAATCAGCAGCCTATCCAGCAGCAAAATTAATGACCTGAATCAATGATGCTGCGCAAGACAGACACTGATATATAGCCGCTTAAAGTTCAGCCGACATATGTTG
 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830
 PHE ILE PRO ALA ASP LEU ARG GLU ILE VAL THR PHE PRO LEU PHE SER ASP LEU VAL GLN CYS GLY PHE PRO SER PRO ALA ALA ASP
 TTT ATC AAG CYS CTG GCG GAT CTC CCG AAA ATT GTG ACT TTT CCG CTA TTT ACG GAT CTT GTT CAG TGT GGC TTT CCT TCA CCG GCA GCA GAT
 TYR VAL GLU GLN ARG LEU PHE LEU ASN GLN LEU LEU ILE GLN HIS PRO SER ALA THR TYR PHE VAL LYS ALA SER OLY ASP SER MET ILE
 TAC GTT GAA GCG GCG ATC GAT CPG AAT CAA CTC TTG ATC CAG CAT CCC AOC GCG ACT CAC AOC GCG ACT TTT CTC GTC AAA CCG AGT GGT GAT TCT ATT ATT
 ASP OLY GLY ILE SER ASP OLY ASP LEU LEU ILE VAL ASP SER ALA ILE THR ALA SER HIS OLY ASP ILE VAL ILE ALA ALA VAL ASP OLY
 GAT GGT GAA ATT AGT GAC GGT GAT TTA CTG ATT GTC GAT AOC GCT ATT ACC GCG AOC GAT GGT GAT ATT GTC ACT GCT GCT GGT GAT GCG
 GLU PHE THR VAL LYS LYS LEU LEU ARG PRO THR VAL GLN LEU ILE PRO MET ASN SER ALA TYR SER PRO ILE THR ILE SER SER GLU
 GAG TTT ACG GTG AAA AAT TTA CAA CTA CCG CCG AOC GTA CAG CTT ATT CCC ATT AAC AOC GCG TAC TCG CCC ATT ACC ACT AGT AGT GAA
 ASP THR LEU ASP VAL PHE OLY VAL ILE HIS VAL LYS ALA MET ARG **MET PHE ALA ILE CYS ASP VAL ASN ALA PHE TYR ALA
 GAT ACG CTG GAT CTC TTT GGT GTG ATC CAC CTC GTT AAG GCG ATG CCG TGATG TTT GCG TCT TGT GAT GTA AAC GCG TTT TAT GCG
 SER CYS GLU THR VAL PHE ARG PRO ASP LEU TRP OLY LYS PRO VAL VAL LEU SER ASN ASN ASP GAG OLY GLY ILE ALA ARG ASN ALA
 AOC TGT GAG ACG GTG TTA TCC CCT GAT TTA TGG GGT AAA CCG GTG GTT GTG CTA TCG AAT AAG GCG GGT TCG GTT ACT CCG AAC CCG
 GLU ALA LYS ALA LEU GLY VAL LYS MET GLY ASP PRO TRP PHE LYS GLN LYS ASP LEU PHE ARG ARG CYS OLY VAL VAL CYS PHE SER SER
 GAG GCA AAG GCG CTT GCG GTT AAA ATG GOC GAT CCC TG CCG TGC AAA CAA AAA GAT CTG TTT CCG CCG TGT GCG AGT GGT TCT TAT AOC
 ASN TYR LEU LEU TYR ALA ASP MET SER ASN ARG VAL MET SER THR LEU GLU GLU LEU ASP THR PRO ARG VAL GLU ILE TYR SER ILE ASP GLU
 AAT TAT GAG CTT TAC GCA GAC ATG AOC AAT CCG GTG ATG TCG ACG CTG GAA GAG CTA TCG CCC CCG CTC GAG ATT TAC AGT ATT GAT GAG
 ALA PHE CYS ASP LEU THR OLY VAL ARG ASN CYS ARG ASP LEU THR ASP PHE OLY ARG GLU ILE ARG ALA THR VAL LEU GLN ARG THR HIS LEU
 GCA TTC GCG GAT CTG ACA GGT GTG COT AAT TTT CCG GAT CTG ACT GAT TTT GCG AGA GAA ATT CCG GCA GAT GTO CTA CAA COT ACC CAT CTT
 THR VAL GLY VAL GLY ILE ALA GLN THR LYS THR LEU ALA LYS LEU ALA ASN HIS ALA LYS LYS TRP GLN ARG GLN THR GLY OLY VAL
 ACT GTT GGT GTG GGG ATC CCG CAG ACC AAA ACG CTG OCT AAG CTT GCC AAT CAT GCG GCA AAA AAA GAG CCG GCG ACG GGT GGG GTG
 VAL ASP LEU SER ASN LEU GLU ARG GLN ARG LYS LEU MET SER ALA LEU PRO VAL ASP ASP VAL TRP OLY ILE OLY ARG ARG ILE SER LYS LYS
 GTG ATG TTA TCA AAT CTG GAA CCG CAG COT AAA TTA ATG TCT GCT CTC CCG GTG GAT GAC GTC TGG GGG ATT GGA CCG GCG ACT AOC AAA
 LEU ASP ALA MET OLY ILE LYS THR LEU ASP LEU ASP LEU ASP THR ASP ILE ARG PHE ILE ARG HIS PHE ASN VAL THR VAL LEU GLU ARG ARG
 CTG GAC GCG ATG GGG ATC AAA ACC GTT CTC GAT TGT GCG GAT ACA GAT ACT CCG TTT ATC COT AAA CAT TTT AAT GTC GTG CTC GAA AGA ACG
 VAL ARG ALA MET OLY ARG OLY GLU PRO CYS LEU GLN LEU GLU PHE ALA PRO THR LYS GLN GLU ILE ILE CYS SER ARG SER PHE OLY GLU ARG
 GTG COT GAA CTG CCG GCG AAA CCG TGT TTT GAA CCG GAG TTT GCA CCG ACG AAG GCG AAG AAT ATC TGT TCC CCG TCG TTT GGT GAA CCG
 ILE THR ASP TYR PRO SER MET ARG GLN ALA ILE CYS SER TYR ALA ARG ALA GCG GCG GCG GAA AAA CTT GCG ACG GAG CAT CAA TAT TGT CCG TTT
 ILE SER THR PHE ILE LYS THR SER PRO PHE ALA LEU ASN GLU PRO TYR TYR OLY ASN SER ALA SER VAL LYS ARG THR VAL PRO THR GLN ASP
 ATC TCC ACG TTT ATT AAG ACG TCA CCA TTT GCG CTC AAT GAA CCT TAT TAC GCG AAT ACG GCG TCG GTA AAA GGT COT GCG CCC ACT GAG ACG
 SER ARG ASP ILE ILE ASN ALA ALA THR ARG SER LEU ASP ALA ILE TRP GLN ALA GLY HIS ARG TYR GLN ALA GLY VAL MET LEU OLY ASP
 ACG AAG GAT ATC ATT AAC GCT OCT ACG CGA TCT CTG GAT GCC ATC TGG CAA CCG GCG CAT COT TAC CAA AAA CCG GCG GTG ATG CTG GGG GAT
 PHE THR SER GLN GLY VAL ALA LEU LEU ASN LEU PHE ASP ASP ASN ALA PRO ARG PRO GLY SER GLU GLN MET THR VAL MET ASP THR LEU
 TTC AOT GCG GGA GTC CCG CAG CTC AAT TTA TTC GAT GAC AAC GCA CCG CCG CCG GGT OLY GAG CAA TTG ATG ATO GTA OTT GAT ACA CTG
 ASN ALA LYS OLY GLU ILE THR LEU PHE ALA ILE THR PHE ALA GLN GLY ILE GLN GLN GLN TRP GLN MET LYS ARG ALA MET LEU SER PRO ARG TYR
 PAT OCT AAA GAG GCG AGA GGA ACG TAT TTT GCG GGG CAG GGG ATC CAG CAA CAA TGG CAG AAT AAG CAA GCG AAT OCT TTA CCA CCG TAT
 THR THR ARG SER SER ASP LEU LEU ARG VAL LYS ***
 ACA ACG CGA AGT TCT GAT TTA CTG ACG GTC AAA TAA ATATATGCTGGCAGGAAAAACCGCTCCCGCAAGCAATGGATAGCGACCGACAGATCAGCTTTTTCGCTTTAA
 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2
 ACGCGTGGGAATCACCACACGCTGACCAATCAGTAGA GATAAAAATCCGAGCAGCCACTCGCGATTTCCAGCACTAAAAATCCCACTGACCTCGGCCGCAATCAAGAGCGACA
 600 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720
 AACACTTCCGGCAGCCACTTATCCAGGGCAGCAATTCGGCGAAACGAACTATAAATCACAGTGGCAACCGCAAGGATAGAGCGTAAGCACTGGTGTCTGCTAAAGT*
 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830

D遺伝子は834番目からはじまり，419塩基，C遺伝子は1253番目からはじまり，1687塩基よりなる。両遺伝子の上流にSOSbox(実線でかこった部分)とRNAポリメラーゼ認識部位，m-RNA開始点，リボソーム結合部位が確認される(北川，赤星，加藤，未発表データ)。

図1 umuCD遺伝子の1次構造

表1 変異原処理による *umuCD* 遺伝子の誘発

Mutagens	Dose	β -galactosidase (units/OD ₆₀₀)
None	—	54
MMC	0.5 μ g/ml	845
MNNG	0.25 μ l/ml	445
4NQO	10 μ g/ml	949
MMS	0.02 μ l/ml	312
UV	100 J/m ²	2560

umuCD-lacZ 融合遺伝子の持つプラスミドを細胞 (*umuC*⁻ 株) に導入し、各種変異原処理したとき誘導される β -galactosidase (*lacZ* 遺伝子の産物) を測定した。処理後1時間の培養後、Millerの方法で β -Gal の定量を行なった。

2. *umuCD* により誘発される突然変異の特異性

上述のように、*umuCD* 遺伝子の構造とその遺伝子産物は同定されているが、その遺伝子産物がどのように突然変異生成に関与しているのであろうか？ 現在のところその答は出ていない。以下これまでに報告された幾つかの試みについて紹介する。

(1) 誘発された変異の特異性：塩基置換

umuCD 遺伝子に依存する誘発変異の解析からその生成機構を知る試みが *lacI* 遺伝子系を用いて詳細に行なわれている（文献についてはMillerによる総説⁶⁾を参照されたい）。塩基置換変異について、加藤^{7,8)}等はAB1157の *his-4* → *His*⁺への復帰変異について各種変異原による誘発変異頻度および誘発された変異体の分析を行なった。その結果 *umuCD* 遺伝子機能を必要とする変異生成過程ではいろいろなタイプの塩基置換が生ずるのに対し、非依存性誘発では特定の塩基置換のみが誘発されることから、前者は修復誤り、後者では対合誤りによることを報告した（表2）。*lacI* 系では更に詳細な分析が可能で、*umuCD* 依存性変異生成過程では、(a)変異原特異的な塩基損傷（例えば、UVでは *py-C*）による特異的な塩基置換（*py-C*の場合は G:C → A:T）と、(b)非特異的な塩基置換（いろいろなタイプの塩基置換）が誘発されていること、(b)による塩基置換は脱塩基の相手側にアデニン

表2 塩基置換誘発の *umu*CD 依存性と誘発

Treatment	Total number of His ⁺ mutanis examined	Relative occurrence of base substitutions		
		Transitions(%)		Transversions(%)
		G:C→A:T	A:T→G:C	
Spontaneous	139	13	80	7
(oh) ⁴ Cyd	247	0	99.6	0.4
ICR191	250	0	98	2
MNNG	228	93	5	2
MNU	290	93	5	2
ENU	289	95	2	3
EMS	294	93	3	4
MMS	250	52	15	33
UV	179	72	17	11
γ-ray	156	16	41	43
4NQO	223	76	3	21

B

Mutagen	Strain	Dose giving 37% survival(D ₃₇)	His ⁺ revertants per 10 ⁸ survivors at D ₃₇
UV	AB1157 (<i>umu</i> C ⁺)	34 J/m ²	52
	TK712 (<i>umu</i> C ⁻)	29 J/m ²	1.4
γ-Rays	AB1157 (<i>umu</i> C ⁺)	4.5 krad	7.1
	TK712 (<i>umu</i> C ⁻)	4.1 krad	ND
4NQO	AB1157 (<i>umu</i> C ⁺)	125 μM h/ml	155
	TK712 (<i>umu</i> C ⁻)	100 μM h/ml	16
MMS	AB1157 (<i>umu</i> C ⁺)	1.8 mM h/ml	56
	TK712 (<i>umu</i> C ⁻)	1.5 mM h/ml	13
EMS	AB1157 (<i>umu</i> C ⁺)	56 mM h/ml	970
	TK712 (<i>umu</i> C ⁻)	56 mM h/ml	1050
MNNG	AB1157 (<i>umu</i> C ⁺)	62 μg h/ml	320
	TK712 (<i>umu</i> C ⁻)	60 μg h/ml	325
MNU	AB1157 (<i>umu</i> C ⁺)	0.6 mg h/ml	430
	TK712 (<i>umu</i> C ⁻)	0.55 mg h/ml	410
ENU	AB1157 (<i>umu</i> C ⁺)	1.1 mg h/ml	720
	TK712 (<i>umu</i> C ⁻)	1.1 mg h/ml	685

塩基置換スペクトル。(A)各種変異原で誘発された塩基置換の種類と相対頻度、(B)各変異原による塩基置換誘発頻度を *umu*C⁺ と *umu*C⁻ 株で比較した。*umu*C 依存性変異原では各タイプの塩基置換が誘発されるが、*umu*C 非依存性変異原では特異的な塩基置換のみが誘発されている。

(A) が特異的に挿入されることによって起きているらしいことが示されている^{6,9,10,11,12}。この仮説によっていろいろの変異原で誘発された *lacI*⁻ の塩基置換型変異の特性はかなりよく説明できる⁶⁾。

X線およびトリチウムβ線によって誘発された *lacI*⁻ の塩基置換変異の分析から、加藤等は、電離放射線で誘発される塩基置換はほとんど(b)のタイプ、すなわち脱塩基損傷によるらしいことを報告している^{13,14)}(図2)。

この仮説によれば、*umuCD* 遺伝子産物による変異生成は、修復DNA合成のとき損傷塩基(非対合塩基を生成する損傷)の相手側位置で停止する正常DNA合成に変わって、バイパス合成系が誘発され、その位置でアデニン(A)の選択的誤挿入が起りやすいとする機構が考えられる。この場合 *umuCD* 遺伝子産物の役割として、修復DNA合成酵素(*polI*?)と複合体を作りその校正機能を修飾するためとする仮説も可能である(後章参照)。

lacI 系によるこれら一連の成果について、注意しておかなければならない点は、*lacI* 系ではA:T→G:C置換型の検出ができないことでありこの型の置換は脱塩基-アデニン挿入仮説では起り得ないタイプである。事実、我々の *his-4* 系で

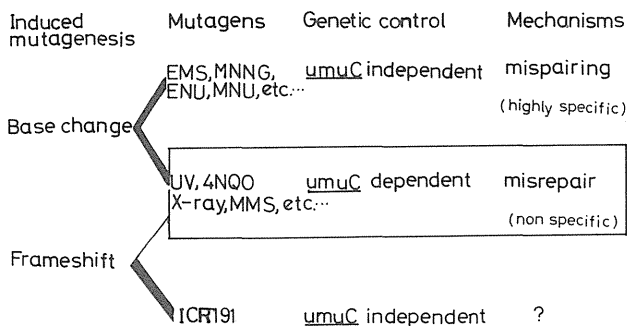


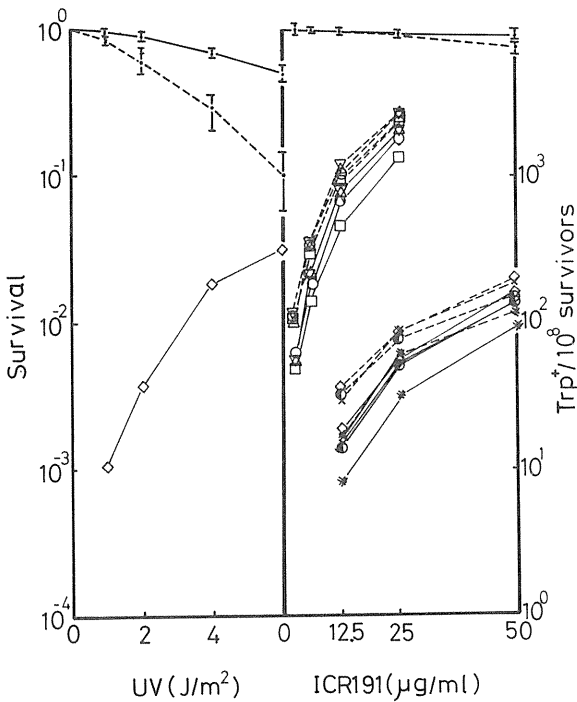
図2 *umuCD* 遺伝子機能による誘発変異の特性

塩基置換、フレームシフト変異誘発の *umuCD* 依存性と誘発された塩基置換の分析から、*umuCD* 機能は主として修復合成時における塩基の誤挿入を起こすと考えられる

は *umuCD* 依存性誘発変異では A:T → G:C 置換が G:C → A:T 型とほぼ同頻度で起きていることが示されている (表 2 参照)。したがって *lacI* 系のデータから提唱されている仮説が A:T → G:C 置換の生成をもうまく説明できるような仮説になったときかなりマトに近いものかもしれない。

(2) フレームシフト変異の特性

加藤等はフレームシフト変異誘発の *umuCD* 遺伝子挿能依存性を調べるため



umuC⁺と*umuC*⁻細胞にフレームシフト変異の *trp*⁻を導入し ICR191 と UV での復帰変異をみた。13 種の *trp*⁻ フレームシフト変異のうち 8 種は ICR191 で効率よく Trp⁺に復帰し、それは *umuC*⁻ 遺伝子機能に依存しない。2 種は UV でも復帰したが、他は UV では復帰しなかった。UV で復帰するフレームシフトは、*umuC*⁺ の場合のみである。(詳細は文献 8, 15 参照)

図 3 ICR191 による *trp*⁻ フレームシフト変異誘発と *umuCD* 遺伝子機能依存性

表3 *lacI* 遺伝子に各種変異原によって誘発される塩基置換、欠失、フレームシフト変異の割合

Mutagen	Total constitutive mutations	Nonsense (%)	O° (%)	Large deletions (%)	Small frameshifts (%)
Nono	140	1	~1	14	≥ 70
2AP	418	20	9	2+	10+
u.v.	217	20	<1	5.5	7+
NQO	120	27	<1	~1	8+
<i>mutT</i>	93	8	<1	0	3+

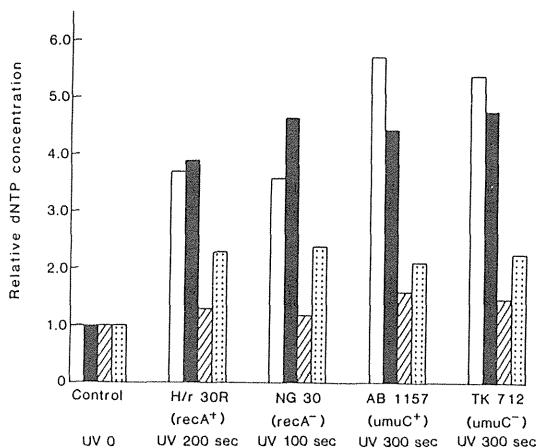
自然誘発の場合を除いて、誘発される変異は大半が塩基置換であることがわかる。自然誘発でフレームシフトが多いのはホットスポットの存在による(詳細は文献17参照)。

Yanofsky 等によって研究されている13種の *trp*⁻ フレームシフト変異の復帰変異について報告している^{8,15)}。フレームシフト変異原として知られる ICR191 では13個の *trp*⁻ フレームシフト変異は効率よく *Trp*⁺ に復帰するが、それらは *umuCD* 機能に依存しなかった。ICR191で復帰する *trp*⁻ のうち2個はUVでも復帰しそれは *umuCD* に依存する(図3)。このことは、大半のフレームシフト変異生成過程ではその遺伝子機能を必要としないことを示唆する。 λ ファージの *cI*⁻ 変異をシーケンスングによって調べた最近の報告¹⁶⁾でも低線量紫外線で誘発した *cI*⁻ 変異は大半が *umuCD* 非依存性であり、それはフレームシフト変異であった。このことは、*umuCD* 遺伝子機能によって誘発される変異では主として塩基置換であることを示唆する(図2参照)。ちなみに Miller 等¹⁷⁾ によって調べられたUVによる各タイプの変異誘発では塩基置換が大半を占めている(表3)。

3. *umuCD* 遺伝子機能の生化学的検索

umuCD 遺伝子産物を用いて直接変異生過程を *in vitro* で再現しその機能を調べた報告はまだない。前記 *in vivo* での解析から提唱されている仮説との関連で興味ある、2, 3の報告について以下に記す。

宮木等¹⁸⁾はUVによって菌体内でみられる核酸前駆体プールの変動を *recA* と *umuC* について野性株のそれと比較したところ、いずれの菌株でも dA が高く dT, dG の順で蓄積されることを見出した(図4)。しかしDNA障害を受けた細胞で



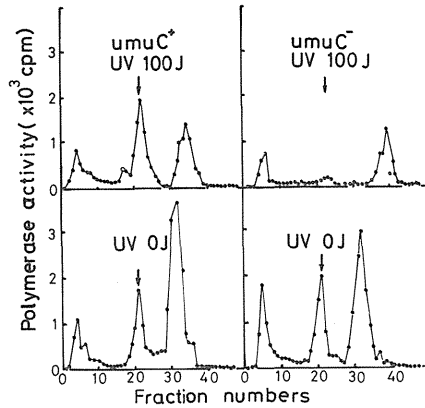
recA⁻, *umuC*⁻, 野性株にUV照射によって誘起された核酸前駆体プールの変化。

□ : dATp, ■ : dTTP, ▤ : dGTP,
 ▨ : dCTp。(文献18より)。

図4 UVによる核酸前駆体プールの変化

のバイパスDNA合成でアデニンの誤挿入が高まることの原因をこの前駆体プールの変動に関連づけるにはデータ不足である。Linn等¹⁹⁾は、UVによって菌体内に正常のDNAポリメラーゼIとは異なるフラクシオンに誘導されてくる修飾されたDNA *pol I*^{*}があることを見出し、*pol I*^{*}によるDNA合成では misincorporationが増加することを報告している。宮木等(未発表)は以前から変異原処理した菌体内に修飾されたDNA合成酵素活性の存在を報告しているが、UV照射した *umuC*⁻株と野性株との比較から野性株では *pol I*^{*}活性が相対的に増加するのに対して、*umuC*⁻株では著しく減少することを見出した(図5)。その酵素フラクシオンによる *in vitro* のDNA合成でもやはり misincorporationが増加している。

これらの知見が *umuCD* 遺伝子産物の機能とどう関係しているかについては今後の研究を待たねばならない。



$umuC^+$ と $umuC^-$ 細胞にUV照射後見られるDNA合成酵素活性を測定した。矢印のフラクションにみられる酵素活性は $umuC^-$ では消失している。このフラクションを用いて($umuC^+$ のUV照射後), misincorporation をみると, UV照射後のものでは増加している(宮木等, 未発表)。

図5 UV照射によって誘導されるDNA合成酵素活性

おわりに

大腸菌では, 放射線誘発突然変異は *recA* - *lexA* 遺伝子系による SOS 制御を受けている。*umuCD* 遺伝子は SOS 制御系によって誘発され, その遺伝子産物が突然変異誘発過程に直接関与する。この過程で生成される突然変異は塩基置換が大半を占め, フレームシフト変異の多くはその遺伝子機能に関係なく生成されている。遺伝子もクローンされたので, *umuCD* 依存性変異生成機構の詳細は間もなく明らかにされるであろう。

真核細胞でも同様な変異生成機構が存在するであろうか? SV40の宿主回復でみられる SOS 誘発類似性²⁰⁾が大腸菌でみられるものと同様な機構によるか否かについては議論のわかれるところである。それとの関連で興味ある報告が最近出されている。Ames test に使われている pKM101 と類似機能をもつプラスミッドをマウス白血球細胞に C_a^+ 共沈法で導入すると, 染色体にその遺伝子を取り込んだ細胞では紫外線抵抗性が増加する²¹⁾。その細胞での突然変異誘発に関してはまだ報告

がないが興味ある点である。

参 考 文 献

- 1) Kato, T., and Y. Shinoura. Isolation and characterization of the mutants *Escherichia coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light, *Molec. gen. Genet.*, *156*, 121-131, (1977).
- 2) Kenyon, C. J., R. Brent, M. Ptashne and G. C. Walker, Regulation of damage-inducible genes in *Escherichia coli*, *J. Mole. Biol.*, *160*, 445-457, (1982).
- 3) Kitagawa, Y., E. Akaboshi and T. Kato, 投稿準備中.
- 4) Shinagawa, H., T. Kato, T. Ise, K. Makino and A. Nakata, Cloning and characterization of the *umu* operon responsible for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*, *Gene*, *23*, 167-174, (1983).
- 5) Elledge, S. J., and G. C. Walker, Identification of the products of the *umuC* locus of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, *164*, 175-192, (1983).
- 6) Miller, J. H., Mutational specificity in bacteria, *Ann. Rev. Genet.*, *17*, 215-238, (1983).
- 7) Shinoura, Y., T. Kato and B. W. Glickman, A rapid and simple method for the determination of base substitution and frameshift specificity of mutagens, *Mutation Res.*, *111*, 43-49, (1983).
- 8) Shinoura, Y. T. Ise, T. Kato and B. W. Glickman, *umuC*-Mediated misrepair mutagenesis in *Escherichia coli*: extent and specificity of SOS mutagenesis, *Mutation Res.*, *111*, 51-59, (1983).
- 9) Foster, P. L., E. Eisenstadt and J. Cairns, Analysis of the frequency distribution of mutations, *Nature*, *299*, 365-367, (1983).

- 10) Schaaper, R. M., and L. A. Loeb, Depurination causes mutations in SOS-induced cells, Proc. Natl. Acad. Sci. US A., 78, 1773-1777, (1981).
- 11) Schaaper, R. M., T. A. Kunkel and L. A. Loeb, Infidelity of DNA synthesis associated with bypass of apurinic sites, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 487-491, (1983).
- 12) Strauss, B., S. Rabkin, D. Sagher and P. Moore, The role of DNA polymerase in base substitution mutagenesis on non-instructional templates, Biochemie, 64, 829-838, (1982).
- 13) Ise, T., T. Kato and B. W. Glickman, Spectra of base substitution mutations induced in *E. coli* by tritiated water and the decay of incorporated tritiated thymidine, Radiation Res., 97, 200-210, (1984).
- 14) Kato, T., Y. Oda and B. W. Glickman, Randomness of base substitution mutations induced in the *lacI* gene of *Escherichia coli* by ionizing radiation, Radiation Res., in press.
- 15) Kato, T., and E. Nakano, Effects of the *umuC36* mutation on ultraviolet-radiation induced base-change and frameshift mutations in *Escherichia coli*, Mutation Res., 83, 307-319, (1981).
- 16) Wood, R. D., and F. Hutchinson, Non-targeted mutagenesis of unirradiated Lambda phage in *Escherichia coli* host cells irradiated with ultraviolet light, J. Mole. Biol., 173, 293-305, (1984).
- 17) Miller, J. H. and U. Schmeissner, Genetic studies of the *lac* repressor X. Analysis of missense mutations in the *lacI* gene, J. Mol. Biol., 31, 223-248, (1979).
- 18) Suzuki, K., M. Miyaki, T. Ono, H. Mori, H. Moriya and T. Kato, UV-induced imbalance of the deoxyribonucleoside triphosphate pool in *E. coli*, Mutation Res., 122, 293-298, (1983).
- 19) Lackey, D., S. Krauss and S. Linn, Isolation of an altered

- form of DNA polymerase I from *Escherichia coli* cells induced for *recA/lexA* functions, Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 330 – 334, (1982).
- 20) Defais, M. J., H. C. Hanawalt and A. R. Sarasin, Viral probes for DNA repair, in Advances in Radiation Biology (Lett, Ehmann, and Cox, eds.), 10, 1 – 37, Academic Press, New York (1983).
- 21) Elli, R., L. Marcucci, R. Basi, C. Oppi, P. A. Battaglia and F. Gigliani The pRUV⁺ plasmid, transfected into mammalian cells, enhances their UV survival, Nucric Acids Res., 11, 3679 – 3686, (1983).

I-6

大腸菌 RecA 蛋白質に対する抗変異原物質の作用—特に塩化コバルトについて

井上 正*

はじめに

Ames 法に代表される種々の突然変異原性検出系により、我々をとりまく環境中には、極めて多数の変異原性物質が存在することが明らかになった。併し、同時に、突然変異生成を抑制する因子も数多く見出されてきた。化学物質による突然変異の抑制という現象は古くより観察されていたが、近年、ある種の抗突然変異原物質については、その作用機構が明らかにされつつあり、また、環境変異原の研究という側面からみても、これら抗突然変異原物質の研究は、重要な意味を持つと考えられるようになった。

本稿では、我々の研究グループで見出されたいくつかの抗突然変異物質の代表である塩化コバルトにつき、その作用機構を RecA 蛋白との関連から推定した結果につき述べる。

1. 大腸菌 RecA 蛋白

大腸菌の *recA* 遺伝子は、普遍的組換え、突然変異誘発、DNA 修復、細胞分裂制御、プロフェージ誘導等の多くの重要な細胞機能に関与する遺伝子であり、古くより、遺伝学的検討が加えられてきた。これらの多面的機能発現の機構の全貌が、精製された RecA 蛋白の *in vitro* の性質を検討することにより、近年明らかにされつつあり、いわゆる SOS 修復に於る RecA 蛋白の役割については、分子レベルの理解が完成したといってもよい段階にある。

RecA 蛋白の *in vitro* の機能は、様々の活性測定系を用いて、測定することができるが、それらは以下の三つに分類することができる。(a) 相同な DNA 同志を対合

* 国立遺伝学研究所

させる活性。この活性により、遺伝的組換え、あるいは組換え修復が生ずると考えられる。(b)種々のリプレッサー蛋白を分解不活化する蛋白分解酵素活性。recA 遺伝子が極めて多面的な遺伝子発現をする理由は、RecA 蛋白が、多くのリプレッサー蛋白を分解して、これらのリプレッサーにより制御されている遺伝子群——それらのうちの一つには、error-prone な修復を行う酵素の遺伝子もある——を発現させるからと考えられる。(c)上の二つの反応を触媒する為に必要なエネルギーを供給するATP分解活性。

これらの諸活性は、それぞれ独立に測定可能であり、特に(a)の相同DNAの対合反応は、いくつかの部分反応に分けて、詳細な解析がなされている¹⁾。

2. 塩化コバルトとRecA蛋白

塩化コバルトの抗突然変異原性は、MNNG処理をした大腸菌に対する効果として、最初に見出された²⁾。その後この金属化合物が、その他の種々の化学突然変異原や放射線で処理した細胞に対して、著明な抗変異原を示すことが明らかになり、また大腸菌のみならず枯草菌や培養動物細胞に対しても効果を持つことが示された。コバルトが、シアノコバラミンに含まれ、種々の酵素反応に関与することはよく知られている。また細胞中では、コバルトは色々な生体物質と錯体を形成しやすく、ある種の生体反応に於ては、 Mg^{2+} 等の二価金属とも置換可能であり、このことは、この金属イオンが種々の生理的效果をもちうることを示唆する。そこでRecA 蛋白の *in vitro* に於る諸活性に対する塩化コバルトの影響につき調べてみた。

最初に検討を加えたのは、RecA 蛋白の有する相同なDNAの対合反応に対する効果である。相同なDNAの対合反応の測定のためには、いくつかの系が開発されている。最も簡単な原理によるものは、熱処理等で変性したDNAを基質として、これを再びもとの二重鎖に戻す速度を測定するものである。あるいは、二重鎖DNAと、そのどちらかの鎖と相同な塩基配列をもつ一本鎖DNAを基質として、後者が前者の一部と置きかわって、いわゆるDisplacement loop (D-loop)を形成する速度を測定する方法もある。大腸菌RecA 蛋白によるD-loop形成反応の諸条件については、この蛋白の精製に成功したShibata等によって詳細な記述がなされているので³⁾、それらに順じて行った。実際に用いた基質は一本鎖DNAを有する大腸菌のファージ $\phi\times 174$ やfd から調製したDNAとそれらの2本鎖複製型である

閉環状二本鎖RFI DNA である。測定の原理は以下による。即ち、高塩濃度条件下では、二本鎖DNAはメンブランフィルターに吸着しないが、一本鎖DNAはトラップされる。よって、二本鎖DNAを ^3H 等で標識しておけば、D-loopを形成した二本鎖DNAのみが、一本鎖部分を有するので、フィルターにトラップされる。このトラップされた放射能の量を測定することにより、D-loopの形成量を測定できる。

D-loopの形成は Mg^{2+} 濃度に依存し、またRFI DNAを基質とした場合は、RecA蛋白によってD-loopの形成にひきつづいて、その解離もおこる為、複雑なKineticsを示すことが知られているが⁴⁾、この二つの反応は、反応液中のRecA蛋白濃度を適当に選択することにより区別することができる。極めて低い濃度のRecA蛋白を存在させ、D-loopの形成のみが起こり、解離が殆んど起こらないような条件下に、種々の濃度の塩化コバルトを加えたところ、コバルトの濃度に依存して、D-loop形成速度の上昇がみられ、1.5mMでは対照の3倍以上となることが観察された。次に、過剰のRecA蛋白存在下に、一度生成したD-loopが解離する過程に対するコバルトの効果をみたところ、この場合も、コバルトは、効果を示し、D-loopの解離を促進させた。以上のような実験を様々な条件下で行った結果、D-loop形成/解離に対して、1~2mMのコバルトが、RecA蛋白の比活性を2~3倍高めることが確認された。

ところで、RecA蛋白は、その機能を発現する為のエネルギー源として、ATPを分解するが、試験管内に於るRecA蛋白によるATPの分解は、一本鎖DNAに依存する条件と、RFI DNAに依存する条件の二つを互いに独立に選択することができる。そこで、これら二つの条件下に於るATP分解活性に対するコバルトの影響を検討してみたところ、RFI DNAに依存する活性は1.5mMのコバルトにより2倍程度上昇するのに反し、一本鎖DNAに依存する活性は約50%の阻害を受けることが判った。

RecA蛋白によるD-loopの形成に関するShibata等のモデル¹⁾によれば、RFI DNAに依存するATPの分解は、RFI DNAのまきもどしと深く関連しているとされている。RecA蛋白によりD-loopが形成される際には、RFI DNAはまきもどされねばならないので、上に述べた二つの実験結果、即ちコバルトによるD-loop形成/解離の促進とRFI DNA依存ATP分解の促進は、互いに支持しあう

と考えられる。

RecA 蛋白の試験管内の性質に関する上記の実験事実は、コバルトの抗変異原性が、RecA 蛋白を活性化して、error-free である組換え修復機能を促進することにより、発揮されているとの仮説を支持するが、もしそうならば、(修復機能が促進しているのだから)、突然変異原による致死効果はコバルトにより抑制されるはずである。実際に、例えば、突然変異誘発に用いられるよりずっと高い線量の紫外線を照射した大腸菌の生存率が、コバルトの後処理によって有意に上昇することが確認され、この抗突然変異原の作用機構の少なくとも一部は、RecA 蛋白による error-free な修復機構の促進によることが強く示された。

上述のように、コバルトはRecA 蛋白の機能を修飾することは、おそらく間違いないが、この両者が直接に関与しているか否かについては未だ不明であり、コバルトは実は、DNA と結合し、その結果、RecA 蛋白の機能が変化している可能性も否定できない。また、この金属イオンが、RecA 蛋白以外の突然変異生成に関与する蛋白質にも同時に作用している可能性ももちろんある。これらの疑問に対しては *in vivo*, *in vitro* の両面からのより深い検討が必要であろう。

参 考 文 献

- 1) Shibata, T., Makino, O., Ikawa, S., Ohtani, T., Iwabuchi, M., Shibata, Y., Maeda, H. and Ando, T. : Roles of processive unwinding in recombination reactions promoted by rec-A protein of *Escherichia coli* : A study using a monoclonal antibody. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 49 : in press, (1984).
- 2) Kada, T. and Kanematsu, N. : Reduction of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitsoguanidine-induced mutation by cobalt chloride in *Escherichia coli*. Proc. Jpn. Acad., 54 : 234-237, (1978).
- 3) Shibata, T., Osber, L. and Radding, C. M. : Purification of *recA* protein from *Escherichia coli*. Methods in Enzymology, 100 : in press, (1983).

- 4) Ohtani, T., Shibata, T., Iwabuchi, M., Nakagawa, K. and Ando, T. : Hydrolysis of ATP dependent on homologous double-stranded DNA and single-stranded fragments by recA protein of *Escherichia coli*. J. Biochem., 91 : 1767-1775, (1982).

I -7

酵母における psoralen 光付加による DNA cross-links の修復

佐伯哲哉*

はじめに

bifunctional の psoralen 誘導体は近紫外線照射により DNA の thymine-thymine 間の cross-links を作ることが知られている。酵母では psoralen の光付加に高感受性の *pso* 変異体が三種分離された¹⁾。このうち *pso2* 変異体は紫外線や X 線には感受性が低いが、psoralen 光付加に特異的な高感受性を示す。また野生型二倍体は psoralen 光付加に対して、半数体にくらべてきわめて高い抵抗性を示すが、*pso2* 変異体はこのような二倍体の抵抗性を示さない¹⁾。このような実験結果は「野生型二倍体のもつ psoralen 光付加に対する抵抗性をもたらす機構は染色体の二倍体性に依存する相同染色体間組換えによる修復である」という可能性を示唆する²⁾。換言すれば、*pso2* 変異体は組換え修復に欠損をもつ可能性がある。一方酵母の X 線高感受性変異体 *rad50*~*rad57* はいずれも体細胞組換え事象の誘発能に欠損を示し、なかでも *rad52* 変異体はこれまでに試験されたすべての変異原による組換え事象誘発能が欠損している^{2),3)}。そこで我々は *pso2* および *rad52* 変異体における psoralen 誘導体による体細胞組換え事象の誘発を検定した⁴⁾。

1. *pso2* 変異体の組換え事象誘発能

pso2 変異体は cross-links を生成する psoralen 誘導体, 8-methoxypsoralen (8MOP), psoralen および trioxalen 4-aminomethyl hydrochloride (AMT) の光付加による酵母の二種の組換え事象, 相互型組換え (*cyh2*/+ → *CYH*^R) および非相互型遺伝子変換 (*leu1-1/leu1-12* → *LEU*⁺), のいずれの誘発能にも欠損をもつ(表1)。しかしこの変異体は cross-links を作らず, もっぱら mono-

* 放射線医学総合研究所・遺伝研究部

表 1 *pso2-1* および *rad52-1* 変異体の体細胞組換え事象誘発能 (野生型との対比)

Agents	8 MOP, AMT, Psoralen +UVA	3Cps +UVA	HN 2	UV	γ -Rays
<i>pso2-1</i>	R	N	N	N	N
<i>rad52-1</i>	R	R	R	R	R

N : 野生型と同様の誘発能

R : 野生型に比べて減少した誘発能

(線量あたり, ならびに生残率あたりの誘発により判定)

adducts のみを生成する psoralen 誘導体の 3-carbethoxypsoralen (3Cps) の光付加や psoralen とは異なり guanine-guanine 間の cross-links を作る nitrogen mustard (HN2), あるいは紫外線や X 線などによる組換え事象の誘発については野生型と同様であった。

2. *rad52* 変異体の組換え事象誘発能

次に *pso2* 変異体に用いたと同様の諸変異原による *rad52* 変異体の組換え事象誘発能を検定した。*rad52* 変異体は用いたいずれの処理によっても組換え事象誘発能を全く示さなかった。この結果は *rad52* 変異体は *pso2* 変異体とは異なり, 広範囲の変異原による組換え事象誘発能を一貫して欠損していることを示し, *RAD52* 遺伝子の機能が一般的な組換え修復過程に作用するという従来の仮説を支持するものである。

3. *pso2* 遺伝子の機能

pso2 変異体は *rad52* 変異体とは対称的に, cross-links を生成する psoralen 誘導体の光付加による場合のみ体細胞組換え事象誘発能の欠損を示す。このような結果は「*pso2* 遺伝子は *RAD52* 遺伝子のように一般的な組換え修復過程に直接関与する遺伝子ではなく, おそらく cross-links, それも psoralen 誘導体の光付加による thymine-thymine cross-links の修復に特異的な機能をもつ」と解釈する方が妥当と思われる。

お わ り に

現在までの報告によると、二倍体酵母での psoralen cross-links 修復は、除去修復機能の存在に依存する DNA 二本鎖切断の生成と組換え修復を介する DNA 断片の高分子化とからなっている^{5),6)}。 *pso2* および *rad52* 変異体は DNA 二本鎖切断を生じるが、そのうち DNA 断片の高分子化を生じない⁶⁾。このような知見とここで得られた組換え事象誘発能についての情報から二倍体酵母での cross-links 修復は以下のような経過をとると考えられる。

- ① 先ず除去修復により cross-links を含む DNA 鎖の incision が生じる。
- ② 次いで *pso2* 遺伝子機能により DNA 鎖に残存する cross-links 中間体の除去もしくは修飾が生じ、その結果組換え修復の基質となりうる型の DNA 二本鎖切断が生成される。
- ③ そのうち組換え修復により DNA 二本鎖切断断片の高分子化が生じることにより修復が完了する。

参 考 文 献

- 1) Henriques, J. A. P. and Moustacchi, E. Isolation and characterization of *pso* mutants sensitive to photoaddition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 95, 273-288, (1980).
- 2) Saeki, T., Machida, I. and Nakai, S. Genetic control of diploid recovery after γ -irradiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, 73, 251-265, (1980).
- 3) Prakash, S., Prakash, L., Burke, W. and Montelone, B. A. Effects of the *RAD52* gene on recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 94, 31-50, (1980).
- 4) Saeki, T., Cassier, C. and Moustacchi, E. Induction in *Saccharomyces cerevisiae* of mitotic recombination by mono and bifunctional agents: Comparison of the *pso2-1* and *rad52* repair deficient mutants to the wild type. *Mol. Gen. Genet.*, 190, 255-264, (1983).

- 5) Jachymczyk, W., von Borstel, R. C., Mowat, M. R. A. and Hastings, P. J. Repair of interstrand crosslinks in DNA of *Saccharomyces cerevisiae* requires two systems for DNA repair : the *RAD3* system and the *RAD52* system. *Mol. Gen. Genet.*, *182*, 196–205, (1981).
- 6) Magaña-Schwenke, N., Henriques, J. A. P., Chanet, R. and Moustacchi, E. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA : Comparison of wild type and repair-deficient strains. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, *79* 1722–1726, (1982).

II 哺乳類細胞の突然変異の 機構は何が特徴的か

II-1

哺乳類細胞の突然変異の機構は

何が特徴的か

岡田重文

放射線による突然変異生成の標的分子がDNAであることは、バクテリアから哺乳動物ヒトまで共通した現象であるといつてよいだろう。しかしDNAに生じた傷害がどのようなプロセスを経て最終的に検出される突然変異になるかは、恐らく多種多様なメカニズムがはたらいていて生物種によりかなり異なっている可能性が高い。大腸菌を用いた多くの研究により明らかになったことは、多数の修復遺伝子が存在し、しかもそれらの中のかなりのものが $recA^+$, $lexA^+$ の誘導系により制御をうけていることである。しかし、そのような誘導系(いわゆる SOS 機構)が果たしてヒトをも含めた哺乳動物細胞全般にも存在するかどうかは、いくつかの試みはあるものの未だにはっきりとした結論は得られていないのが実状である。また、酵母やヒトの突然変異体の解析によれば、放射線感受性を左右する遺伝子はバクテリアよりも更に数が多く、しかもそれらが必ずしも全て修復酵素だけの問題ではないらしいところに真核生物における研究の複雑さがある。

以上のような状況をふまえて、哺乳類細胞の突然変異の機構について考えをめぐらせるならば、その特徴としてあげられる項目は、細胞当たりのDNA量がバクテリアよりも約1000倍も多いことと、染色体という大変高次の立体構造をとること、更には細胞分化という現象のために活性の高い遺伝子とほとんど発現されていない遺伝子とが同じ細胞内に共存していることなどがあげられるだろう。ではこのような哺乳類細胞が放射線照射を受けた場合に何が起こり易く何が起こりにくいと考えられるだろうか？

最近になって哺乳類細胞における突然変異についてクローン化DNAを用いた解析が可能になってきたが、それによるとイオン化放射線による変異の多くは何キロ塩

東京大学・医学部

基対といったレベルでの欠失が主のようである。従って、ヒトにおける放射線の遺伝的影響を考える上では、劣性形質に関する限りは塩基対置換のような変異の寄与は少ないとみてよいかもかもしれない。これはDNAが高度に凝縮していることが原因かもしれないしあるいは修復酵素の側に欠失を生じ易くする要因があるのかも分からない。この問題はいずれ近い将来明らかになってくるものと思われる。こうして書いてくると哺乳類細胞の突然変異は大体先が見えてきたように思われるかもしれないが、実は放射線により生じる優性の突然変異（骨格異常、白内障、癌になり易い性質など）という大変に厄介な問題が残っている。劣性突然変異は次世代ですぐに発現に結びつく可能性は低いですが、優性形質はそうではない。従って放射線による遺伝的影響を考える上でこれは避けては通れない大問題なのであるが、検出システムが特定座位法のように簡単でない場合が多く、しかも培養細胞系で定量できるようなシステムがほとんどない。そのようなわけで、この問題は未だに分子生物学的理解からは程速いのが実状である。

最後に、体細胞の突然変異と発癌の関係についてであるが、発癌の第1段階が突然変異であることに疑いの余地はないと思われる。しかし、試験管内発癌に限ってみても、その線量効果関係は突然変異のそれとは全く異なった反応を示すことはよく知られているところである。両者の関係を関連づけようとする試みはなされているがまだ明らかではない。また発癌遺伝子との関連性についてはようやく追求が開始されたところと言ってよいだろう。遺伝子発現という面から見ると優性突然変異と何か共通したメカニズムがあるのかもかもしれないが解明にはもう少し時間が要りそうである。

このような時代の背景を背負った我々が、どこに問題を解く糸口をみつけるか、これが現在放射線生物学を学ぶ者に課せられた大課題である。

II-2 哺乳類細胞の突然変異の特異性

中 村 典*

はじめに

哺乳動物、とくに rodents の細胞を用いた突然変異の研究はすでに 20 年近い歴史がある。しかしながら、定量性、再現性の良い方法が確立されたのはようやく 1970 年代後半になってからと言ってよいように思われる。新しい方法の確立に寄与したのはひとつはよい薬剤の選択であり、もうひとつは培養上の方法の改良であった。

ここでは replating 法による 6-チオグアニン (6TG) 耐性を指標としたイオン化放射線のデータを主に紹介する。そして哺乳類細胞の突然変異の特異性について考えてみたい。

1. 何故 6TG 耐性を指標に選ぶか？

多細胞生物には発生分化という現象がみられるので同じ遺伝子構成の細胞でも全く異った表現型を示すことは周知の通りである。従って、古くからの批判として、いまあるタンパク質を合成できなくなった細胞を分離できたとしても、それが全て特定の遺伝子の傷害に起因するという保障がない。定量性のことも考慮すれば、現在のところは 6TG 耐性のシステムが最も理想に近いといえよう。他の薬剤耐性マーカーの中には、genetic origin ではないものも含まれるように思われる例があるし、栄養要求性への変化は選抜法が複雑で定量性に難がある。

2. 急照射による細胞死と突然変異

培養細胞の中でよく使用されるチャイニーズハムスター V79, チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO), マウス白血病細胞 L5178Y およびヒト 2 倍体繊維芽

* 東京大学・医学部

細胞の6TG耐性突然変異のデータをまとめたものが図1である^{1,2,3)}。図には示していないが、細胞死についても同様に、用いる細胞により放射線感受性が大きく異っている。即ち放射線で死ににくい細胞は突然変異の誘発に関しても感受性が低い。Thacker & oxが示したように、誘発された突然変異頻度を生存率の対数に対して

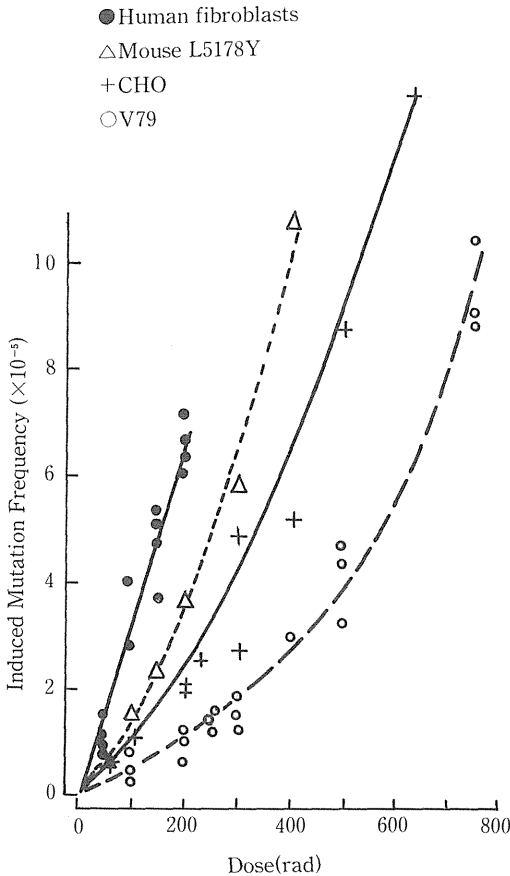


図1 種々の哺乳動物培養細胞における6TG耐性突然変異の線量効果関係(X, ガンマ線)

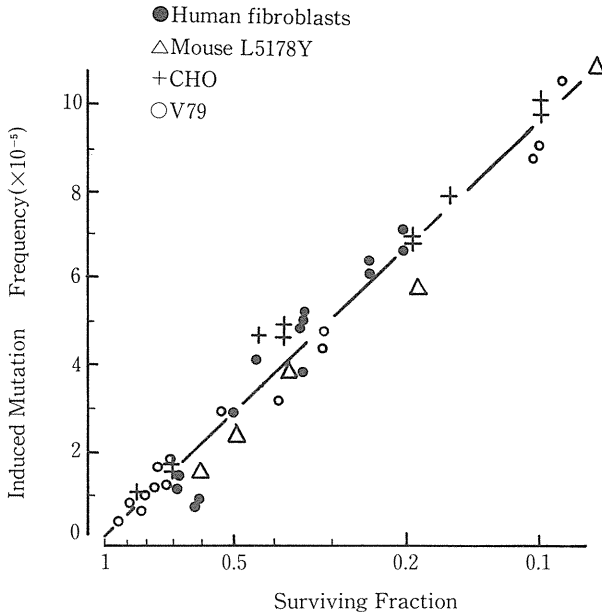


図2 種々の哺乳動物培養細胞における6 T G 耐性突然変異頻度と生存率の関係

プロットすると、すべてほとんど同じ1本の直線上に重なる(図2)。すなわち、突然変異は細胞当りの致死傷害の平均数に比例して生じるように思われる。(大体の目安として10%生存率で $\sim 10 \times 10^{-5}$ の頻度で突然変異を生じるとみてよい。)

3. 照射線量率の効果

突然変異の線量率効果について調べた研究は数が少ない。plateau phaseのV79細胞および対数増殖期のL5178Y細胞についての結果を図3に示す^{3,4)}。これらのデータをまとめてみると、細胞は異っても生存率当りの突然変異頻度は、線量率によらずほぼ同じになることが分る。対数増殖期にある細胞を用いて線量率効果を調べようとするとき細胞周期の影響が入ってくるがplateau phaseにある細胞と比べ

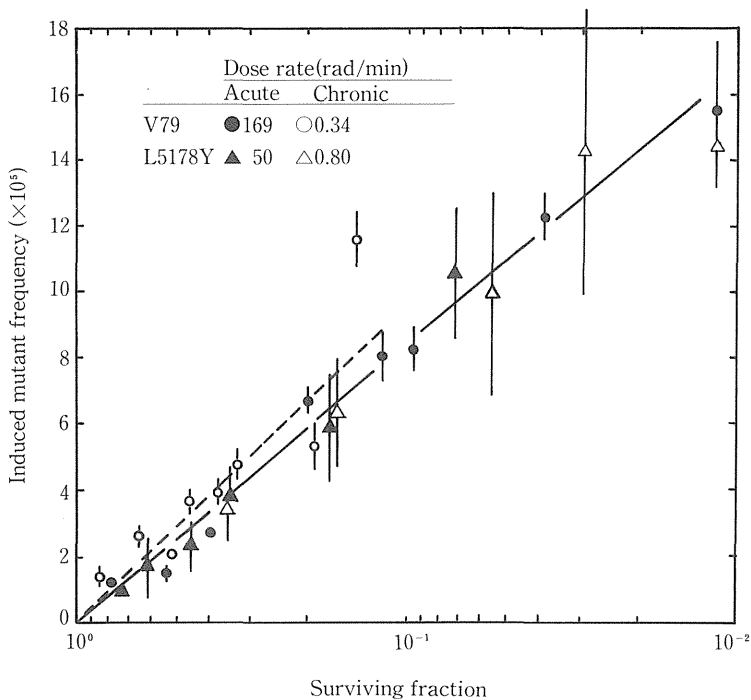


図3 線量率を変えて細胞を照射した場合の6TG耐性突然変異と生存率の関係。V79細胞はstationary phase, L5178Y細胞は対数増殖期のものを照射

てとくにちがいは認められないようである。

4. Potentially Lethal Damage からの回復 (PLDR) に伴う突然変異頻度の変化

6TG耐性以外のマーカーを用いた研究では、PLDRに伴って突然変異頻度も減少するという報告がいくつか見られる。例えば、Rao & Hopwood⁵⁾はstationary phaseにおいたCHO細胞にガンマ線を照射後、および6時間経ってからアッセイした。(この場合の突然変異の指標は8AG耐性である)。突然変異のちがいは4Gy以下では観察されないが高線量ではPLDRを行なわせた方が頻度が低くなる。

突然変異頻度を生存率の対数に対してプロットしてみると、どちらもほぼ同じ直線上に重なるように思われる。また鈴木ら⁶⁾は stationary phase においたチャニーズハムスター *hai* 細胞に 10Gy の X 線を照射後、24 時間まで時間をいろいろ変えてアッセイしているが PLDR に伴って突然変異頻度（この場合は栄養要求性への変化）も減少している。ところが最近 Thacker と Stretch⁴⁾ は、stationary phase の V79 細胞を用いて同様の実験を行ったところ、PLDR がほぼ完成する照射後 5 時間たっても、生存細胞当りの突然変異頻度はほとんど低下しないという結果を得た。もしも PLDR と平行して Potentially Mutagenic Damage の修復 (PMDR) も起るのであれば、生き残る細胞数は増加する一方で変異細胞数は減少することになるから変異細胞の割合は低下してよいはずである。にも不拘、これがもし変わらぬとすれば、PMDR が全く存在しないか、もしくは PMDR はあっても PLDR で生き

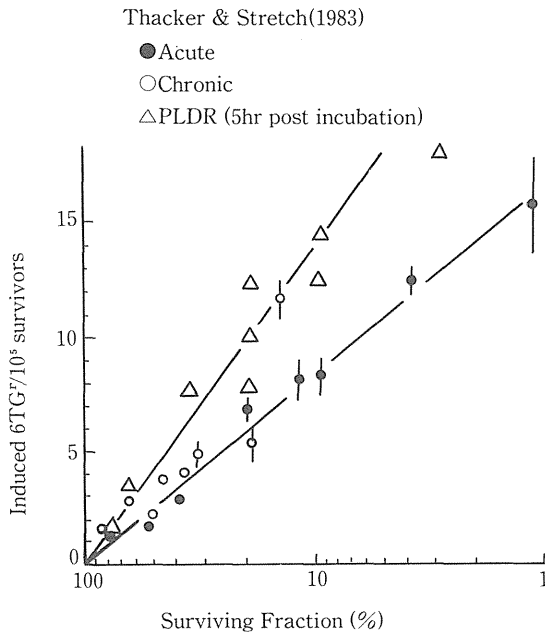


図4 Stationary phase の V79 細胞における PLDR と 6TG 耐性突然変異の結果を生存率に対して示したもの

返ってくる細胞中には変異細胞が相対的に多く含まれていて（誤りがちの修復？）結果的に突然変異頻度が一定に保たれるのではないかと考えられる。この場合に突然変異頻度を生存率の対数に対してプロットしてみると図4に示すようにPLDR 5時間群では直線の勾配が急になる。このことは *in vivo* における突然変異の頻度を考えるうえで大変重要な情報を内蔵していると思われる。ただあいにくと6TG耐性をマーカーにした研究は他にないので、他の細胞について確認が必要であろう。

5. 亜致死傷害からの回復 (SLDR) と突然変異

分割照射により突然変異率が低下するという報告がいくつかあるが、その逆は見当らない。鈴木らは、チャイニーズハムスター *hai* 細胞を用いて総線量として4, 8, 10, 16Gyを均等分割した⁶⁾。照射間隔を0~24時間までとって調べたところ、生存率が上昇する時には変異頻度（栄養要求性への変化）が低下し逆に生存率の低下する時には変異頻度も上昇することが示された。またArlett & Potter⁸⁾およびAsquith⁹⁾はチャイニーズハムスターV79細胞を用いて2.5時間および6時間の間隔をおいた分割照射実験を行った。線量効果関係は分割照射では変異頻度（8AG耐性）が低下した。しかしこれらのデータはいずれも大変に変異率が高くて、変異頻度と生存率の対数との関係が一定に保たれるかどうかを結論するのは難しい。もしはじめの照射により誤りがちな修復系が誘導されるとしたら、分割では点が一回照射よりも左側にずれることが予想されるが、図から見る限りはそのようなことはなさそうである。またJostes & Painter¹⁰⁾はCHO細胞を用いて6TG耐性を指標にした結果を報告しているが、この場合は生存率に対する変異頻度は分割により一回照射よりも右側にくるようである。もっともこのずれが有意かどうかは不明であるが、Radnerらは、6Gyを均等分割し照射間隔を0-10時間までとって6TG耐性変異を調べているが、この場合も6Gy 1回照射に比べて分割の方が頻度が高くなることはなかった¹¹⁾。

6. 高LET放射線と突然変異

英国のグループにより、重イオンを用いた研究が精力的になされており、それらをまとめたものが図5である¹²⁾。ヒト2倍体繊維芽細胞についても、チャイニーズハムスターV79細胞についても、細胞死についてのRBEよりも6TG耐性突然

変異のRBEの方が約2倍大きく(LETが100KeV/ μ m前後で),これは肩のないヒト繊維芽細胞についても,大きな肩のあるV79細胞(この場合のRBEは,final slopeをとっている)についてもあてはまる。従って,6TG耐性突然変異に関する限りはLETの増加に伴って,致死傷害に比べて突然変異傷害が相対的に生じ易くなっているように思われる(図5)。

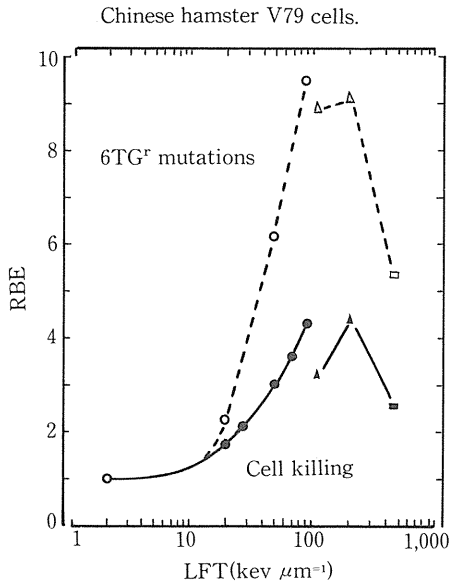


図5 V79細胞における6TG耐性突然変異と細胞死のRBEとLETの関係

しかし下等真核細胞の復帰変異系ではRBEはほとんど1かもしくは1より小さくなることが観察されており, L5178Y細胞でも速中性子線に対する6TG耐性突然変異のRBEが3~5という値をとるのに対してメソトレキセート耐性変異のRBEはほとんど1に近い¹³⁾。

7. 突然変異の性質

イオン化放射線により哺乳動物細胞による突然変異に関するデータをまとめてみると、恐らく大半のものは遺伝子内、もしくは近傍の遺伝子をも同時に含んだ欠失による可能性が大きい。まずマウスを用いた実験結果についてみれば、毛色突然変異体（C遺伝子座）は、自然に生じたものではホモ接合体で致死になるものは0/18であるのに対して、精原細胞照射によるものは16/51（約30%）が致死であった¹⁴。すなわちX線、 γ 線により生じた変異の1/3は、C遺伝子座の他に近傍の生存に必須な遺伝子も同時に不活性化していると考えられ、これは2つ以上の遺伝子座におよぶ欠失であろうと考えられる。最近の報告では極めて低い線量率下で照射した場合でも得られる変異体のホモ接合体致死の割合は急照射の場合と比べて特に少ないということにはなかった¹⁵。すなわち照射線量率はちがっても欠失の大きさに関する限りは生じる変異に差異は認められないということになる。

他方、培養細胞系の研究から明らかになったことは、紫外線やアルキル化剤で効率よく誘起されるウワバイン耐性突然変異は、X線 γ 線では生じないことがあげられる。ウワバイン耐性は膜ATPaseの質的变化によるものと考えられているので、この事実は、X線 γ 線によっては塩基対置換型の変異は通常用いられる線量範囲ではほとんど生じないことを示唆する。また最近では遺伝子クローニングの技術を用いて突然変異細胞の遺伝子変化を直接確かめられるようになってきた。その1例として、ハムスター細胞におけるdhfr（ジヒドロ葉酸還元酵素）遺伝子の活性を失った細胞についてみると、全て遺伝子の部分又は完全な欠失によるものであった¹⁶。

この項の最後に、in vivo と in vitro の系の比較をしてみよう。急照射の場合の線量効果関係は、突然変異に関しては、マウス精原細胞の場合には不幸にして線量が2点しかないので直線にも2次式にもあてはめられる。培養細胞の6TG耐性突然変異の場合にはヒト2倍体繊維芽細胞以外はたいてい上向きに折れ曲った線量効果関係を示す。線量率効果は両方の系で観察され、単位線量当りの突然変異誘発能力の減少はマウス精原細胞とL5178Y細胞とで大変よく似ている。また両システムとも、中性子線に対しては高いRBEを示す。誘発突然変異頻度と生存率の対数との関係が培養細胞ではcell lineによらずほぼ同じ直線上に重なることははじめに述べたが、ではマウス精原細胞のデータについて同様のプロットをするとどうなるであろうか？ As 精原細胞は約600Rで生存率が10%になるが¹⁷、その場

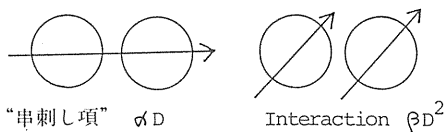
合の遺伝子座当りの平均変異頻度はおよそ 12×10^{-5} であり¹⁴⁾、これは stationary phase の V 7 9 細胞に PLDR を行なわせた場合のデータにかなり近い。線量率効果もよく似ていることを考えると、体細胞と生殖細胞との間に同じような修復機構がはたらいているのかもしれない。

8. 細胞死と突然変異生成のメカニズム

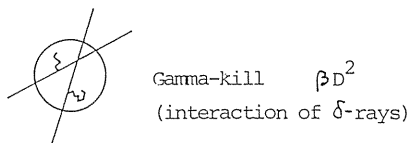
哺乳動物細胞における細胞死、突然変異のメカニズムについては種々のモデルが唱えられているが、ここではその中の代表的なものについて考察する。

まずかなり大きな site 内にエネルギーが付与され重致死傷害が相互作用を通じて致死になるという考え。線量と共に重致死傷害が蓄積してくると単位線量当りの

Dual radiation action (Kellerer & Rossi)



Track structure theory (Katz et al)



Molecular theory of Radiation action (Chadwick et al)

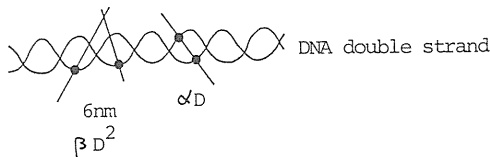


図 6 培養細胞の線量効果関係が折れ曲ることを説明しようとする代表的なモデル

相互作用の確率が高まるので線量効果関係がおれ曲ってくる(図6)。

Kellerer & Rossi による Dual radiation action や Katz らの Structure theory などがある。通常哺乳動物細胞でおれ曲りの観察される線量で亜傷害が十分蓄積するためには数100ミリマイクロンの大きさの site を考える必要がある。

他方小さな site を考えるものとしては, Chadwick & Leenhouts の molecular theory of radiation action とよばれるものがある。これはDNAの2重鎖切断が原因で細胞死や突然変異を生じるというものである。モードに2種類あって1本のトラックで2重鎖が同時に切れる場合と、2本の独立したトラックにより互いに近接して生じた1本鎖切断が結果的に2重鎖切断になる場合とを考える。従ってこの場合も線量効果関係は2次式であらわされる。

これらの仮説にはそれを支持するデータがあつてのことではあるが、ここでは紙面の都合上、仮説に矛盾すると思われるデータについて言及してみたい。なお以下の議論は、Goodhead らの論文をまとめたものなので詳しくは原論文を参照していただきたい^{18,19,20}。

まずアルミニウム(A1)と炭素(C)の特性X線を用いた研究によると、これはエネルギーが大変低くトラックの飛程はたかだか70 nm (A1), 7 nm (C) にすぎない。Kellerer & Rossi らの説に従えば、このような超軟X線は1ヒット型の作用(“串刺し項”)に関しては大変効率が悪いはずであり、線量効果関係は initial slope が極めて小さくそのあと主に2トラックによる項となる(即ち標的説で細胞当りの標的が2ケの場合を考えればよい)はずなのであるが、結果はそうでない。またKatz らの説も都合が悪いのは、このような超軟X線は低LET型の反応を示す(ヒトAtaxia細胞を用いたデータに基づく)にもかかわらずその効率は⁶⁰Co γ 線より低くはないからである。更にChadwickとLeenhoutsの考えでは、2本のトラックは約6 nm以上の距りをへだてて相互作用すると考えているがA1やCの超軟X線の数100ラド程度では、ひとつの細胞内に2本のトラックがそのように近接して生じる確率は 10^{-6} にも満たない。従ってそのような線量域では線量効果関係は曲らないはずということになるが、これも実際の結果とは合わないのである。

次に重イオンを用いた研究から明らかになったことは、生存率に対する誘発突然変異頻度は高LETの場合はX線、 γ 線と同じ線上には重ならないで勾配が急になることである。従って2重鎖切断が細胞死にも突然変異にも同様にはたらくと考

ると説明がつかない。

最後に、ヒト2倍体繊維芽細胞においては生存曲線も突然変異もほぼ直線的であり肩がみられない。通常のestablishされた細胞にみられる肩を亜傷害の蓄積で説明しようとする、このようなヒトの細胞には相互作用がないか、もしくは相互作用をするようなトラック1本でも効果を生じてしまうと考えなくてはならない。もしも相互作用がないとすればヒト2倍体繊維芽細胞は放射線に抵抗性であってよいはずだがそうではないし、もし後者だとすると高LET放射線ではRBEが1より大きくはならないはず(エネルギーの浪費が起るから)だが、これも実験結果とは合わない。

以上のようなわけでGoodheadらは“小さな傷害と修復モデル”を唱えるに至った。それは要約すれば、放射線の生物作用(致死と突然変異)は以下のメカニズムで生じるといふものである。

- ① ~3nmの距離の間に生じる100~300eVのエネルギー付与によるもので低LET放射線で主に起る。
- ② ~3nmの距離の間に生じる300eV以上(突然変異の場合は600eV以上)のエネルギー付与によるもので高LET放射線で主に生じる。
- ③ これらの傷害の一部もしくは全ては、修復可能であるが細胞の修復能力は線量の増加に伴い減少する。(飽和型の修復)。

linear quadraticモデルでは1ヒット(αD の項)は修復不能であるが、この修復モデルではその修復が可能になるところが最大のちがいである。すでにRussellは、マウス精原細胞の突然変異のデータをもとに、1ヒット型の傷害でも修復されるのではないかという考えを述べているが、今回のGoodheadらのモデルはそれに物理学的な検討を加えたものとして評価してよいと思われる。

9. 結論

従来放射線生物学の考えでは明らかに矛盾すると思われる新しいデータが生れつつある。新しいモデルがどこまで検証に耐えうるかは今後の我々の課題でもある。

なお放射線のリスクを考える上では、とくに体細胞の場合には後天的epigeneticな変化にも注意を払う必要があるかもしれない。例えばX線照射されて生き残った細胞は8MP+UV-Aに対して突然変異を生じ易くなっているという報告²¹⁾は、

もし本当ならば注目に値する。もっともこのような細胞はX線に対しては変異を生じ易くはなっていないようであったが。

参 考 文 献

- 1) Thacker, J. and R. Cox, Mutation induction and inactivation in mammalian cells exposed to ionizing radiation. *Nature* 258 ; 429 - 431, (1975).
- 2) Bernhart, B. J. and S. H. Cox, Mutagenicity and cytotoxicity of 4.4MeV α particles emitted by plutonium 238. *Radiat. Res.* 80 ; 542-548, (1979).
- 3) Nakamura, N. and S. Okada, Dose-rate effect of gamma-ray-induced mutations in cultured mammalian cells. *Mutation Res.* 83 ; 127 - 135, (1981).
- 4) Thacker, J. and A. Stretch, Recovery from lethal and mutagenic damage during postirradiation holding and low-dose-rate irradiation of cultured hamster cells. *Radiat. Res.* 96 ; 380-392, (1983).
- 5) Rao, B. and L. E. Hopwood, Modification of mutation frequency in plateau phase Chinese hamster ovary cells exposed to gamma radiation during recovery from potentially lethal damage. *Int. J. Rad. Biol.* 42 ; 501-508, (1982).
- 6) Suzuki, F., H. Hoshi and M. Horikawa, Repair of radiation-induced lethal and mutational damage in Chinese hamster cells in vitro. *Jpn. J. Genet.* 54 ; 109-119, (1979).
- 7) Laval, F., Effect of uncouplers on radiosensitivity and mutagenicity in X-irradiated mammalian cells. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 77 ; 2702-2705, (1980).
- 8) Arlett, C. F. and J. Potter, Mutation to 8-azaguanine resistance induced by γ -radiation in a Chinese hamster cell line. *Mutation Res.* 13 ; 59-65, (1971).

- 9) Asquith, J. C., The effect of dose fractionation on γ - radiation induced mutations in mammalian cells. *Mutation Res.* 43 ; 91–100, (1977).
- 10) Jostes, R. F. and R. B. Painter, Evidence for repair of pre-mutational damage from split X-ray doses. *Radiat. Res.* 84 ; 586–590, (1980).
- 11) Radner, B. S., P. M. Aebersold and A. R. Kennedy, Effects of split doses of radiation on mutation frequency in rodent cell lines. *Mutation Res.* 94 ; 397–403, (1982).
- 12) Cox, R., J. Thacker, D. T. Goodhead and R. J. Munson, Mutations and inactivation of mammalian cells by various ionizing radiations. *Nature* 267 ; 425–427, (1977).
- 13) Nakamura, N., S. Suzuki, A. Ito and S. Okada, Mutations induced by γ -rays and fast neutrons in cultured mammalian cells. *Mutation Res.* 104 ; 383–387, (1982).
- 14) Searle, A. G., Mutation induction in mice. *Adv. Radiat. Biol.* 4 ; 131–202, (1974).
- 15) Russell. W. L. and E. M. Kelly, Specific-locus mutation frequencies in mouse stem-cell spermatogonia at very low radiation dose rates. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79 ; 539–541, (1982).
- 16) Urlaub, G., E. Kas, A. M. Carothers and L. A. Chasin, Deletions of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell* 33 ; 405–412, (1983).
- 17) Oakberg, E. F., Differential spermatogonial stem-cell survival and mutation frequency. *Mutation Res.* 50 ; 327–340, (1978).
- 18) Goodhead, D. T., R. J. Munson, J. Thacker and R. Cox, Mutation and inactivation of cultured mammalian cells exposed to beams of accelerated heavy ions. *Int. J. Radiat. Biol.* 37 ; 135–167, (1980).
- 19) Cox, R., J. Thacker and D. T. Goodhead, Inactivation and

- mutation of cultured mammalian cells by aluminium characteristic ultrasoft X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 31 ; 561 – 576, (1977).
- 20) Goodhead, D. T., J. Thacker and R. Cox, Effectiveness of 0.3keV carbon ultrasoft X-rays for the inactivation and mutation of cultured mammalian cells *Int. J. Radiat. Biol.* 36 ; 101 – 114, (1979).
- 21) Frank, J. P. and J. R. Williams, X-ray induction of persistent hyper-sensitivity to mutation. *Science* 216 ; 307 – 308, (1982).

II-3 ヒト遺伝病細胞の突然変異特性

異 絃 一*

はじめに

DNA修復・複製・組換えといったDNA基本代謝に欠陥があり、このために患者由来の体細胞が放射線や化学物質の細胞致死作用に高感受性を示し、かつ患者に悪性腫瘍が高率に発生する一連の遺伝病疾患がある¹⁾。

これら遺伝病患者の培養体細胞について自発および誘発突然変異を検討し、その特性を明らかにすることはどのような意義を持つであろうか？ 先ず第1に、もし個体レベルでの高発癌が、細胞レベルでの放射線・化学物質の致死作用・突然変異誘発作用に対する高感受性とよく並行するならば、それぞれのDNA傷害に対するDNA修復が発癌防御機構として如何に重要であるかが明らかとなる。現在、「発癌の体細胞(点)突然変異説」にとり強力な間接的証拠である色素乾皮症の紫外線誘発突然変異高感受性と皮膚癌高発が好例である²⁾。第2に、種々の変異原に致死高感受性である遺伝病細胞は将来、ヒト細胞を用いた環境変異原2次スクリーニングにおいてtester cellとして有用となる可能性がある。従来、哺乳動物細胞突然変異試験によく使用されてきた嚙歯類細胞とヒト細胞とではDNA修復機構がかなり異なっていることが明らかにされており、放射線を含め環境変異原のリスク評価資料となる変異原性試験は、やはりヒト細胞で行われるべきであろう。

これまで遺伝病細胞の突然変異実験には主として線維芽細胞が使用されてきたが、倍加数が有限のヒト初代培養では大量の細胞を確保することが煩わしく、特に高発癌遺伝病の場合にはエイジングがかかっているために著しく困難なことが多い。そこで我々はEBウイルスによりトランスフォーム(無限増殖化)されたヒト・リンパ芽球様細胞を材料に選んだ。リンパ芽球様細胞の場合には突然変異率測定の推計学

* 京都大学放射線生物研究センター

的精度を満足させるのに必要な大量の細胞供給が極めて容易に行える。

1. マイクロ・タイトレーションプレートを用いたリンパ芽球様細胞の突然変異率測定

軟寒天コロニー形成法³⁾の場合と異なり、マイクロ・タイトレーションプレートのウェルにリンパ芽球様細胞浮遊液 0.2ml を播きこむだけで feeder layer なしに 2~3 週後に肉眼的コロニーが形成される⁴⁾。プレート上の 96 ウェルへの播種はランダム事象だからコロニー出現はポアソン分布に従う。播種した全ウェル数 n に対するコロニー陰性ウェル数 x の比、すなわち陰性ウェルの確率 $P(0)$ は $e^{-\lambda}$ (λ : ウェル当りの平均コロニー形成単位) で与えられるので、これから求めた $\lambda = -\ln(x/n)$ をウェル当り平均播種細胞数で除したものが平板効率である。非選択培地での播種細胞数は 0.67~20/ウェル、選択培地では 4×10^4 /ウェルとし、突然変異率 (M.F.) は

$$\text{M.F.} = \frac{\lambda_s}{\lambda_0} \times \text{dilution factor} \quad (\lambda_s: \text{選択培地上の平均コロニー}$$

形成単位, λ_0 : 非選択培地上の平均コロニー形成単位) で求められる。従って平板効率が 10% 以上ならば、96 穴プレート 2 枚の使用で通常 $2 \sim 4 \times 10^{-6}$ 以上の頻度である 6 チオグアニン耐性 (TG^r) 突然変異が測定でき、1 桁頻度の低いウアバイン耐性 (oua^r) についても 10~20 枚のプレートを使用すれば定量可能である。実験に供する細胞は TG^r では HAT 処理、oua^r ではリクローニングにより back ground を十分に下げおき、誘発突然変異についてはマーカーと細胞により処理後適当な発現時間を経てから選択培地に移しプレートする。何れの測定においても、突然変異誘発処理直後から最大発現までの間、常に少なくとも 100 個の生存突然変異細胞が確保される様に細胞量に留意する。

2. 色素性乾皮症

相補性 C 群の色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum ; XP) 患者由来の 2 倍体リンパ芽球様細胞 XPA3 とヌクレオチド経路除去修復の正常な 2 倍体リンパ芽球様細胞 HH4 を殺菌灯下 3 J/m²/分で 254 nm 紫外線 (UV) を照射し、直ちにマイクロ・タイトレーションプレートに low density plating を行って生存率を求めると、Do 値の比較で XPA3 は HH4 に比べ約 3.7 倍致死高感受性であった (図 1 上パネ

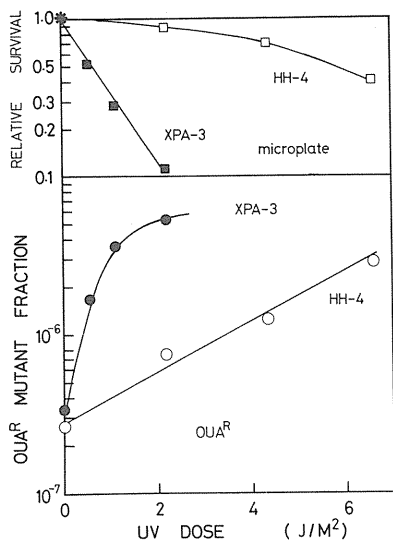


図1 紫外線照射に対する色素性乾皮症XPA-3細胞(■)と正常HH4細胞(□)のマイクロプレート・コロニー形成を指標にした致死感受性(上パネル)とウアバイン1 μ M耐性を指標にした紫外線誘発突然変異率(下パネル)の比較

ル)。BND-cellulose column chromatography により測定したUV誘発修復DNA合成においてもXPA3はHH4より遙かに低率で、XPA3は確かにXP細胞の性質を保持していた。UV照射後3日目1 μ Mウアバインで選択を行うと、XPA3、HH4ともにUV線量に応じてoua^r頻度が増加するが、XPA3は明らかに hypermutable であった(図1下パネル)。発現時間が14日と長い、5 μ g/ml 6TGで選択したHPRT⁻突然変異でも同様にXPA3はHH4に比しより低線量UVで誘発された(図2)。尚、リクローンしたTG^r cellsを 4×10^4 のTG^s wild type cellsと6TG存在下にplateするreconstruction実験で、HH4はrecoveryが1(100%)なのに対しXPA3では約2.7のpositive feeder effectが認められたので、図2中のXPA3のinduced mutant fractionはその補正をしてある。XPA3のマイクロタイトレーション・プレートにおける平板効率にはdensity effect

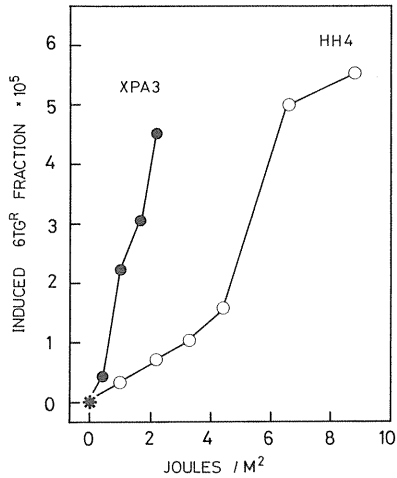


図2 紫外線線量増加に伴うXPA3細胞(●)とHH4細胞(○)における誘発6-チオグアニン耐性突然変異の増加。(自発突然変異率はともに 3×10^{-6})

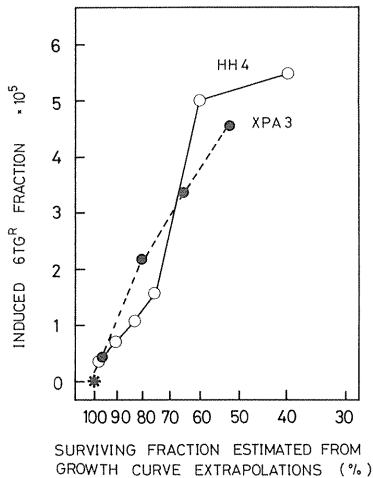


図3 Equitoxic dose 当りのXPA3細胞(●)とHH4細胞(○)の紫外線誘発6-チオグアニン耐性突然変異。紫外線照射後増殖曲線の指数増加部分の外挿から求めた生存率を絶対線量の代りに横軸にとり図2のデータをプロットしなおしたもの

があることが判ったので、代りに増殖曲線の指数増加部分の外挿から生存率を求め、これを横軸にとって図2をプロットしなおすと図3になる。すなわち生存率当りの誘発突然変異にはXPA3, HH4 両者で大きい差異がなく、8-アザ・グアニン耐性を指標にしたXP線維芽細胞についてのMaherらの既報⁵⁾と本質的に同じ結果がリンパ芽球様細胞でも得られた。ただし線維芽細胞のmutabilityの比較に関しては、生存率当りに補正してもXP細胞が正常よりなお hypermutable であるとする報告^{6), 7)}もある。またXPA3だけでなく、除去修復能の正常なHH4でもUV誘発TG「およびoua」突然変異にreverse shoulderが見られず、閾線量がない点(図2)もMaherらの報告⁵⁾とは異なっている。

3. 末梢血管拡張性運動失調症

若年のうちにリンパ網内系悪性腫瘍を高発し、患者細胞が電離放射線に致死高感受性を示す末梢血管拡張性運動失調症(ataxia telangiectasia; AT)は、進行性小脳性運動失調、眼球・皮膚の末梢血管拡張、免疫不全など極めて多彩な症状を呈する常染色体劣性遺伝病である⁸⁾。AT線維芽細胞ではX(γ)線致死高感受性ではあっても、突然変異生成は正常細胞と同等もしくはより低率であると報告されている^{6), 9), 10)}。しかし、AT線維芽細胞の平板効率が一般に極く低いこと、X線自体が強力な変異原ではないことから、AT細胞におけるX(γ)線誘発突然変異生成の有無は未だ結論を得るに至っていない。

¹³⁷Cs線源により4 Gy/minの線量率で γ 線照射したATリンパ芽球様細胞GM2783の生存率解析では、マイクロ・タイテーションプレート法でも増殖曲線指数増殖相の外挿でも、対照のHH4と比較して約2倍の致死高感受性が認められた(図4)。 γ 線照射1時間後から15分間の³H-TdRによるパルス標識を行ってDNA合成阻害を検討すると、GM2783では4 Gyまで阻害が見られないのに対し、HH4では2 Gyまでの阻害が顕著であった。この様にATリンパ芽球様細胞がEBVトランスフォーメーションを受けていても、AT線維芽細胞について報告されている特徴を具備していることが確認できた。このGM2783のマイクロ・プレートでの平板効率は2~5%で、TG「発現は17~19日とHH4より長く、またXPA3同様reconstruction experimentで約2.8倍のpositive feeder effectが認められた。少くとも1.46 Gyまでの γ 線照射によりGM2783では線量に応じた

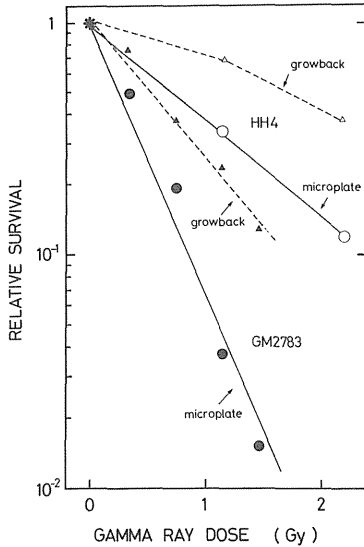


図4 末梢血管拡張性運動失調症細胞GM2783 (●, ▲)と正常細胞HH4 (○, △)の γ 線に対する致死感受性の比較。生存率は γ 線照射後増殖曲線の外挿 (growback) およびマイクロ・タイトレーションプレート法 (microplate) で求めたもの

TG^r 突然変異の増加が明瞭で、base line の約5倍まで上昇が見られた (図5)。正常リンパ芽球様細胞HH4 およびEB-NL-Haでも線量依存性に γ 線誘発TG^r 突然変異が認められたが、絶対線量に代えて生存率当りの誘発突然変異率の比較ではGM2783はHH4, EB-NL-Ha より低値を示した (図6)。oua^r 突然変異誘発は何れの細胞でも認められなかった。

以上の結果から少なくともATリンパ芽球様細胞は γ 線に対してimmutable ではないことが明らかになった。equitoxic dose での比較ではGM2783は正常細胞よりhypomutableかも知れないが、絶対線量当りでは正常細胞に匹敵する突然変異感受性を示すことから、ATで欠損しているDNA修復系路の認識する傷害はmuta-

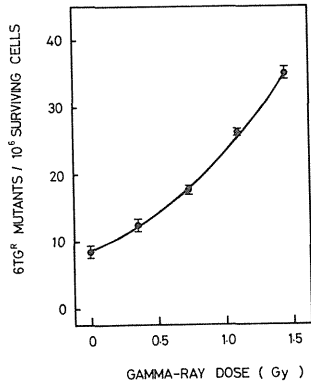


図5 γ 線照射による末梢血管拡張性運動失調症細胞GM2783の6-チオグアニン耐性突然変異の誘発（Iは95%信頼限界を示す）

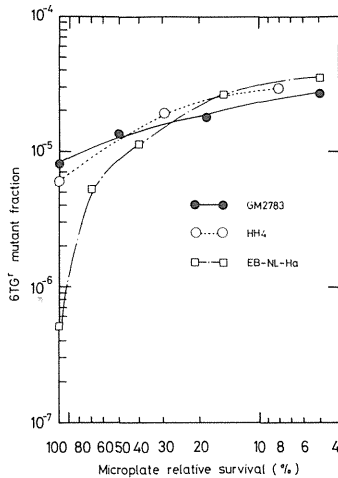


図6 γ 線の equitoxic dose における末梢血管拡張性運動失調症細胞GM2783(●)と正常細胞HH4(○)およびEB-NL-Ha(□)の6-チオグアニン耐性突然変異率

genic ではない、または A T で欠損しているかも知れない recombination は error free である、などの可能性が推論される。 γ 線の equitoxic dose 当りの比較で GM2783 が HH4 や EB-NL-Ha より hypomutable である事は、A T における高発癌が、X P の場合の様に突然変異高頻度により招来されるのではないことを強く示唆する。従って免疫不全による promotion, progression の促進や、染色体再配列の関与などが高発癌の機序として疑われる。事実 A T に見られる悪性腫瘍の種類は被爆者のそれとは異っており、また明らかに電離放射線が誘発したと考えるべき A T 患者での悪性腫瘍は未だ報告されていない。

お わ り に

ここで取り上げた X P, A T のほかに、ブルーム症候群細胞の高頻度自発突然変異^{11), 12)}, バリエント型 X P^{13), 14)}, コケイン症候群細胞⁶⁾の UV hypermutability, A T に類似の症状を示す 46 BR における UV, X (γ) 線 hypomutability¹⁰⁾ などが線維芽細胞について報告されている。

O⁶ アルキル・グアニン修復能の喪失¹⁵⁾ (mex⁻ 形質) やブルーム症候群リンパ芽球様細胞の SCE 正常化¹⁶⁾ など EB V トランスフォーメーションに伴う形質変化や選択の可能性があるのに加え、リンパ芽球様細胞と線維芽細胞の増殖動態の相違が mutability に影響する可能性も除外できない。従ってリンパ芽球様細胞の mutability について線維芽細胞と異なった結果が得られた場合の解釈は慎重を要する。しかしながら突然変異定量の推計学的精度を十分に満足させる細胞量で実験を行い得ることはリンパ芽球様細胞の大きな利点で、これを材料としてヒト遺伝病細胞の突然変異特性が一層明らかになることが期待される。

本研究は文部省科学研究費「がん」特別研究(I)および(II), 公益信託光久記念癌研究助成基金の援助を受けた。

参 考 文 献

- 1) Setlow, R. B. : Repair deficient human disorders and cancer. *Nature* 271 : 713-717, 1978.
- 2) Maher, V. M., Rowan, L. A., Silinskas, K. C., Kateley, S. A., and McCormick, J. J. : Frequency of UV-induced neoplastic transformation of diploid human fibroblasts is higher in xeroderma pigmentosum cells than in normal cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79 : 2613-2617, 1982.
- 3) Sato, K., Slesinski, R. S., and Littlefield, J. W. : Chemical mutagenesis at the phosphoribosyl transferase locus in cultured human lymphoblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69 : 1244-1248, 1972.
- 4) Furth, E. E., Thilly, W. G., Penman, B. W., Liber, H. L., and Rand, W. M. : Quantitative assay for mutation in diploid human lymphoblasts using microtiter plates. *Analyt. Biochem.* 110 : 1-8, 1981.
- 5) Maher, V. M., Curren, R. D., Ouellette, L. M., and McCormick, J. J. : Effects of DNA repair on the frequency of mutations induced in human cells by ultraviolet irradiation and by chemical carcinogenesis. In *Fundamentals of Cancer Prevention* (McGee, P. N., ed.), University Park Press, Baltimore, MD., pp. 363-382, 1976.
- 6) Arlett, C. F. : Mutagenesis in repair-deficient human cell strains. In *Progress in Environmental Mutagenesis* (Alacevic, M., ed.) Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 161-174, 1980.
- 7) Grosovsky, A. J., and Little, J. B. : Mutagenesis and lethality following S phase irradiation of xeroderma pigmentosum and normal human diploid fibroblasts with ultraviolet light. *Carcinoge-*

- nesis, 4 : 1389-1393, 1983.
- 8) Waldmann, T. A., Misiti, J., Nelson, D. L., and Kraemer, K. H. : Ataxia-telangiectasia : A multisystem hereditary disease with immunodeficiency, impaired organ maturation, X-ray hypersensitivity, and a high incidence of neoplasia. *Ann. Int. Med.* 99 : 367-379, 1983.
 - 9) Simons, J. W. I. M. : Studies on survival and mutation in ataxia-telangiectasia cells after X-irradiation under oxic and anoxic conditions. In *Ataxia-telangiectasia-A Cellular and Molecular Link between Cancer, Neuropathology, and Immune Deficiency*. (Bridges, B. A., and Harnden, D. G., eds.) John Wiley and Sons, London, pp. 155-167, 1982.
 - 10) Arlett, C. F., and Harcourt, S. A. : Variation in response to mutagens amongst normal and repair-defective human cells. In *Induced Mutagenesis : Molecular Mechanisms and Their Implications for Environmental Protection* (Lawrence, C. W., ed.) Plenum, New York and London, pp. 249-270, 1983.
 - 11) Gupta, R. S. and Golstein, S. : Diptheria toxin resistance in human fibroblast cell strains from normal and cancer-prone individuals. *Mutat. Res.* 73 : 331-338, 1980.
 - 12) Warren, S. T., Schultz, R. A., Chang, C. C., Wade, M. H., and Trosko, J. E. : Elevated spontaneous mutation rate in Bloom's syndrome fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 : 3133-3137, 1981.
 - 13) Maher, U. M., Ouellette, L. M., Curren, R. D., and McCormick, J. J. : Frequency of ultraviolet light-induced mutation is higher in xeroderma pigmentosum variant cells than in normal human cells. *Nature* 261 : 593-595, 1976
 - 14) Myhr, B. C., Turnbull, D., and DiPaolo, J. A. : ultraviolet mutagenesis of normal and xeroderma pigmentosum variant hu-

man fibroblasts. Mutation Res. 62 : 341-353, 1979.

- 15) Sklar, R., and Strauss, B. : Removal of O⁶-methylguanine from DNA of normal and xeroderma pigmentosum-derived lymphoblastoid lines. Nature 289 : 417-420, 1981.
- 16) Hashimoto, T., Gamo, S., Furuyama, J., and Chiyo, H. : Loss of high frequency of sister chromatid exchanges in Epstein-Barr Virus-established lymphoblastoid cell lines from two patients with Bloom's syndrome. Human Genet. 63 : 75-76, 1983.

II-4

突然変異とトランスフォーメーション の誘発特性の対比

二階堂 修*

1 序 論

細胞のトランスフォーメーション，すなわちがん化が細胞DNAの変異によるものとするいわゆる“がんの体細胞突然変異説”は魅力的な仮説であり¹⁾，がん細胞DNA中に存在するがん遺伝子の特定部位の塩基置換が悪性形質の発現に並行しているという最近の知見はこの仮説を支持しているかに見えた。しかしながら，細胞のがん化を定量的に把握し得る培養系における細胞がん化において，C-onc geneの塩基変化が生じて始めてがん化が招来されるという確実な証明は未だ得られていない。本稿では培養細胞で検出し得るある種の酵素欠損を示す突然変異細胞誘発の様式や頻度と細胞がん化誘発のそれらは全く異なっていることを我々がこれまでに行ってきた研究から指摘し，さらに突然変異のみならず，染色体の異常などの変化もまた細胞がん化を招来する可能性を持つことを，これまでに発表された多数の論文をもとに述べてみたい。

2 細胞がん化検出系

細胞に放射線や化学発がん剤を処理し，そのがん化の検出を行う系には大別して2つある。1はゲッ歯類由来の無限増殖をする細胞によるfocus-assay法を用いるもの^{2,3)}，他はハムスター胎児由来の正常細胞のコロニー形態の異常を指標とするものである^{4,5)}。いずれも得られたfocusあるいは異常な形態を示すコロニーを分離後対応する動物あるいはヌードマウス皮下に移植し，腫瘍の形成を見て初めて分離した細胞の悪性度が証明されるものである。

形質転換における線量効果関係を詳細に較べてみると，ハムスター胎児細胞のコ

* 金沢大学薬学部

コロニー形態の異常を指標とした系では 200 rad までの線量の照射によって、形質転換コロニーの出現頻度は指数関数的に上昇し、200 rad 照射で形質転換率は最高の 2×10^{-3} となり、それ以上の線量照射によりかえって低下を来す。ところが、C3H10T1/2 細胞を用いた系では 400 rad まで指数関数的に形質転換率は上昇し、600 rad 以上でプラトーに達する（最高値 $2 \sim 2.2 \times 10^{-3}$ ）

図 1 に示すように両細胞系において最高の形質転換率を示す線量が大きく異なっている。したがって、ゴールデンハムスター胎児由来正常細胞を用いたコロニーの形態異常を指標とする系は、マウス由来 C3H10T1/2 細胞株の Focus-assay 系に較らべ、より低線量域の放射線の影響を検出するのに適していると言えるであろう。

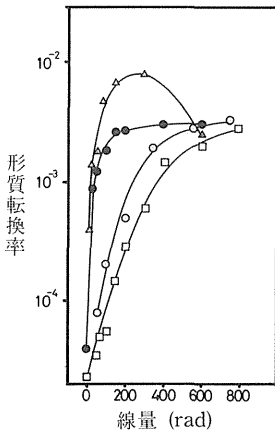


図 1 各種の細胞系における放射線々量と形質転換率の関係

- △ GHE, 文献 19
- GHE, 文献 11
- C3H10T1/2, 文献 20
- C3H10T1/2, 文献 21

以上

以上の Focus-assay, colony の形態変化を指標とするものの他、がん化の指標のひとつとしてよく用いられるものに、軟寒天やメチルセルロースという培地のなかでの細胞の中の細胞の生育し得るようになる基質非依存性獲得の現象がある⁶⁾。細胞のがん化には多段階の過程があることは知られているが、ゲツ齒類細胞のがん化においては、この基質非依存性生育 (anchorage independent growth) の獲得は、細胞の起源となった動物やヌードマウス皮下における造腫瘍性の前段階であると考えられる⁷⁾。一方、ヒト細胞のがん化において基質非依存性の生育の獲得ががん化の指標として用いられているが、前述

のゲツ齒類細胞で見られた Focus 形成や、異常形態を示すコロニーを指標とする形質転換定量系を確立したという報告はない。またゲツ齒類細胞系では、基質依存性生育の獲得を指標として、放射線の線量効果関係を求めた報告も見当たらない。

角永によれば細胞の試験管内がん化の過程は多段階であり、細胞の形態異常という指標はその最初の過程として把握されるものであるという⁷⁾。しかしながら、放射線照射によって形態の異常を示した細胞のすべてが、次の、より悪性の進行

した段階へと進行するものではないことに注意する必要がある。事実われわれの基礎実験においても、異常形態を示したコロニーのうち、わずかの細胞群のみが基質非依存性の生育を示すに至り、他の細胞群は培養途中で細胞老化のため失なわれてしまった。したがって本稿の最後に述べる形質転換と突然変異の誘発頻度の比較は、形質転換の指標としてどのような指標が用いられたかにより大きく変わるものであることを指摘しておきたい。

3 突然変異誘発系

哺乳類細胞における突然変異誘発に関しては多くの研究で主として 6-Thioguanine (6-TG)⁸⁾, 8-Azaguanine (8-AZG)⁹⁾ に関する抵抗性および Ouabain (Oua) に対する抵抗性¹⁰⁾ を指標として研究が行なわれている。6-TG および 8-AZG 抵抗性細胞は hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase (HGPRT) の活性を欠損し、培養液中に入れられたこれら purine 誘導体を細胞中にとりこまないと生存することが可能である。一方、Oua 抵抗性細胞は細胞膜中に存在する生存に必須な Na-K 依存 ATPase に異常が生じた突然変異体である。放射線照射直後から細胞を培養し、種々の時間に 6TG あるいは 8-AZG を培養液中に混入し培養を 10 日から 2 週間つづけると、抵抗性細胞がコロニーを形成する細胞が 2~3 回分裂を経過した時点で薬剤を混入すると得られる抵抗性細胞のクローン数が最高となる。この数をとって当該線量で生存細胞あたりに誘発された突然変異率とする。ところが Oua 抵抗性細胞は放射線や薬剤の処理直後から出現するという特徴を有する。また X 線などの電離放射線で誘起される 8-AZG, 6TG 抵抗性細胞の出現頻度に較べ Oua 抵抗性細胞は極めて誘発されにくい傾向を示すことが知られている。

4 放射線による突然異、形質転換誘発動態の差異

ハムスター胎児細胞における生存率、形質転換率および 8-AZG 抵抗性を指標とした突然変異誘発率曲線を一括して図 2 に掲げた。突然変異誘発率曲線は形質転換率曲線と異なり生存率曲線の肩にあたる 100 rad までの線量では有意の誘発率を示さないが 100~600 までの線量に対し指数関数的に上昇した¹¹⁾。すでに図 1 にも示したように、ハムスター胎児由来細胞系においては形質転換率は 100~

200 rad の照射線量で最高値に到達することから、形質転換率、突然変異率の誘

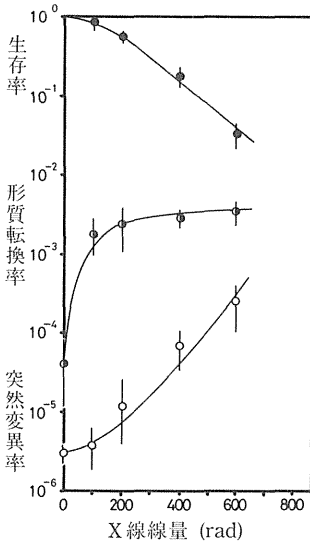


図2 GHE細胞における放射線
々量と生存率(●), 形質
転換率(◐), 突然変異率(○)
との関係

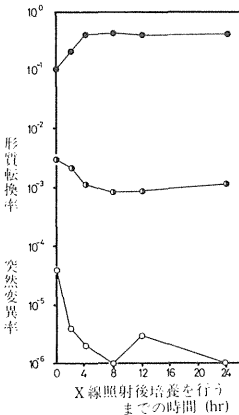


図3 潜在的致死損傷の修復と形
質転換率(◐), 突然変異率
(○)との関係

発動態の間には明らかな差が認められる。さらに突然変異誘発曲線は、細胞の生存率曲線と鏡像関係にあり、細胞致死に結びつく損傷が突然変異をも誘発するのにも働いている可能性を示唆するものである。一方、形質転換率曲線は生存率曲線の肩にあたる部分で、もっとも高値に推移することから、細胞の亜致死損傷の回復現象と何らかの相関をハムスター細胞系では有するものと思われる。

5 潜在的致死損傷の修復における突然変異、 形質転換率の変化

ハムスター胎児由来細胞を 5×10^5 ケの細胞を直径6cmのディッシュに植え、毎日培養液を交換し、CO₂ インキュベーター内で培養すると6~7日後に増殖を停止し、接触阻止状態に達する。この時点で細胞に放射線を照射し、照射直後あるいは種々の時間培養を続けた後に、細胞を希釈培養してコロニー形成を行わせると、400radの放射線を照射した場合6時間で図3に示すように生存率が最高値に達した。その際同時に8-AZG抵抗性細胞、形質転換細胞の出現率を見ると、生存率の上昇と鏡像関係をなすようにいずれも低下した。このことは、潜在的致死損傷が回復することにより、突然変異、形質転換細胞の出現がおさえられ、潜在的致死損傷の修復は誤りのない修復(error-free repair)であることを意味するものと考えられる。

6 亜致死損傷の修復と、突然変異、形質転換細胞の誘発動態

指数関数的に増殖している細胞に一定線量を種々の時間間隔をおいて2分割照射を行なうと、ハムスター胎児由来細胞では分割時間が長くなるにつれて生存率が上昇し、4時間以降ほぼ一定の値を示すようになる。同時に、形質転換率の時間的推移を見ると(図4)2時間で最低となるがそれ以降4~12時間にかけて形質転換

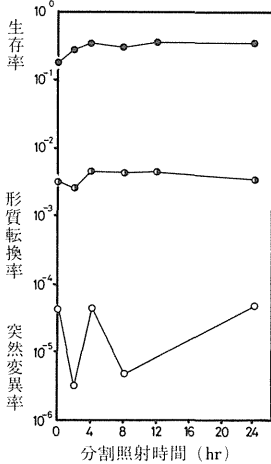


図4 2分割照射と形質転換率(●)、突然変異率(○)との関係

率は非分割(1回)照射時のそれよりも高値を示すように変化した。一方、突然変異細胞の出現率は分割時間によって大きく変動し2時間で最低となるが、4時間で最高値、つづいて12時間で再び最低となった。

亜致死損傷の修復は本図の生存率曲線からも明らかのように4時間以内にほぼ完成すると考えられる。2時間目に突然変異、形質転換細胞の出現率はいずれも低下していることを考えあわせると、この時期に働らく亜致死損傷の修復は *terror-free repair* といえることができる。しかしながら、4時間に第2回目の照射を行なうと、1回照射に較べ突然変異、形質転換率はいずれも上昇した。しかも、形質転換率の高値は4時間から、12時間にわたって持続するが一方突然変異率は急激に低下し、両者の動態が明らかに異なっていた。X線照射された細胞の3H-TdRのとりこみおよびオートラジオグラフィにより細胞の標識率を調べた研究から照射後4~6時間までに3H-TdRのとりこみは非照射群の水準に回復し、また標識細胞率は非照射率は非照射群の水準を保つ。以降両者とも急激に減少することが明らかになっている¹¹⁾。これらの結果を考慮するとS期にあった細胞が照射されて、細胞あたりのDNA合成量が低下し、再び回復する。4時間目に第2回の照射が行われると容易に形質転換、突然変異細胞が誘発されると考えられる。しかもS期の細胞は他の周期にある細胞に較べ放射線照射によって突然変異、形質転換を高頻度に誘発するという実験結果¹¹⁾はこの考えを支持するものである。6時間以降の突然変異率の低下は、より突然変異に感受性な細胞が減少したためと説明し得ようが、形質転換率の高値が4~12時間にわたって継続するものは現在のところ、い

くつかの仮説はあるものの十分な説明はなされていない。

7 ま と め

X線照射による形質転換細胞と突然変異細胞の出現率は大きく異なり、形質転換細胞は200 rad以下の低線量域で高頻度に出現するが、一方その線量域では突然変異細胞は有意に誘発されず、100 rad以上の線量照射によって指数関数的に誘発され、両者の線量効果関係に基本的な差異のあることが明らかになった。さらに、亜致死損傷の修復と関連した形質転換、突然変異誘発の動態は大きく異なり突然変異および形質転換の機構は互いに異なっていることを示唆する結果がこれまでに得られている。しかし、両者の誘発率はいずれもS期において高くかつ潜在的致死損傷の回復とともに両者の誘発率は低下を来した。

つぎに放射線のみならず、各種の化学薬剤によって培養細胞系においてどのように形質転換および突然変異が誘発されるかをこれまでに報告された論文より総括したものを表1に示した。形質転換、突然変異率は細胞の生存率のレベルによって大きく異なるが、論文によっては生存率が与えられていないものもあるため、ほぼ10%以上の生存率が与える投与量における両者の比較を試みたものである。

表1に明らかな力とは形質転換率と突然変異誘発率の比が、用いた細胞の種類と系、形質転換の判定に用いた指標によって大きく異なることである。特にハムスター胎児由来細胞における両者の比は無限増殖系である。C3H10T1/2細胞におけるそれよりも有意に高い。またヒト細胞のがん化の指標として基質非依存性を示したMaheerらの結果では両者の比はさらに低くなる傾向にある^{6,12)}。さらに、DNAに損傷を与えないとされるコルセミド¹³⁾、あるいはディエチルスチルベストロール¹⁴⁾では突然変異はまったく誘発されないにもかかわらず、表から明かなように高い地質転換率が得られることは注目に値するものと考えられる。これらの結果から、細胞の形質転換は、特定遺伝子座の突然変異によって生じるのみならず、染色体数の異常など広義の遺伝情報の変化によっても生じる可能性を示していると考えられる。角永らの提案したがん化のピラミッド仮説¹⁵⁾に従えば形質転換は多段階のがん化過程のなかでわれわれが感知し得る最初の過程であり、形質転換細胞のすべてがヌードマウス皮下において可移植性を示すがん細胞に移行するものではないと考えられる。このことを考慮すれば、がん化の多段階過程の最初の指標の発

現率と突然変異率との比は大きく、最終過程の指標に近づくと従いその比は小さくなるものと考えられる。それが1となる指標はヌードマウス等への可移植性であるのかどうか、今後の検討が必要と考えられる。

表 1

処理用量	細胞	生存率	10 ⁶ ヶ生存細胞あたりの形質転換率(T)	10 ⁶ ヶ生存細胞あたりの突然変異率	比	文献
			コロニ ー法	ATP ase (M _u)	T/M ₁	
			フナー カス法	HGPRT (M _u)	T/M ₂	
			軟 天 法			
Colcemid 0.1 μ g/ml	SHE ¹⁾	0.97	3100	<1	>3100	Tsutsui et al(13)
B(a)P 1.0 μ g/ml	SHE	1.03	6600	2.2	300	"
MNNG 5 μ M	SHE	-	9000	3.20	28.1	Barrett et al(16)
B(a)P 1 μ g/ml	SHE	-	2700	2.1	1.29	"
UV 6J/m ²	C3H10T $\frac{1}{2}$ ²⁾	-	-	2.5	1.2	Chan et al(17)
N-AcO-AAF 15 μ M	C3H10T $\frac{1}{2}$	-	-	4.03	4.0	Landolph et al(18)
B(a)P 3 μ M	C3H10T $\frac{1}{2}$	-	1300	88.5	1.5	"
UV 6J/m ²	正常比 線維芽細胞	0.3	-	-	-	Mahe et al(6)
X-ray 100rad	GHE ³⁾	0.89	2000	-	-	500
"	GHE	0.56	2400	1.4	-	171

- 1) SHE: Syrian hamster embryo 由来細胞
 2) C3H10T $\frac{1}{2}$: C3H系 mouse の embryo 由来株化細胞
 3) GHE: Golden hamster embryo 由来細胞

参 考 文 献

- 1) Bouk, N, and Mayorca, G. di, Somatic mutation as the basis for malignant transformation of BHK cells by chemical carcinogens. *Naturer*, **264**: 722-727 (1976).
- 2) Han, A., Hill, G.K., and Elkind, M. M., Repair of cell killing neoplastic transformation at reduced dose rates of 60 Co γ -rays. *Cancer Res.*, **40**: 3328-3332 (1980).
- 3) Little, J. B., Quantitative studies of radiation transformation with the A311-11 mouse BALB/3T3 cell line. *Cancer Res.*, **39**: 1474-1474 (1979).
- 4) Barrett, J. C., and Ts'o, P. O. P., Evidence for the progressive nature of neoplastic transformation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 3761-3765 (1978).
- 5) Watanabe, M., Horikawa, M. and Nikaido, O., Induction of oncogenic transformation by low doses of X-rays and dose-rate effect. *Radiation Res.*, **98**: 274-283 (1984).
- 6) Maher, V. M., Rowan, L. A., Silinskas, K. C., Kateley, S. A. and McCormick, J. J., Frequency of UV-induced neoplastic transformation of diploid human fibroblasts is higher in xeroderma pigmentosum cells than in normal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 2613-2617 (1982).
- 7) Kakunaga, T. Crow, J. D. and Augl, C., Comparative studies on the induction of mutation and malignant transformation in mouse and human cells.
- 8) Cleave, J. E., Induction of thioguanine and ouabain-resistant mutants and single-strand breaks in the DNA of Chinese hamster ovary cells by 3H-thymidine, *Genetics*, **87**: 129-138 (1977).

- 9) Arlett, C. F., and Potter, J., Mutation to 8-azaguanine resistance induced by γ -radiation in a Chinese hamster cell line. *Mutation Res.*, **13**: 59-65 (1974).
- 10) Thacker, J., Stephens, M. A., and Stretch, A., Mutation to ouabain-resistance in Chinese hamster cells ; Induction by ethyl methanesulphonate and lack of induction by ionizing radiation. *Mutat. Res.*, **51**: 255-270 (1978).
- 11) Watanabe, M., Suzuki, N., Sawada, S., and Nikaido, O., Repair of lethal, mutagenic and transforming damage induced by X-rays in golden hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, **5**: 1293-1299 (1984).
- 12) Silinskas, K. C., Kateley, S. A., Tower, J. E., Maher, V. M. and McCormick, J. J., Induction of anchorage-independent growth in human fibroblasts by propane sultone. *Cancer Res.*, **41**:1620-1627 (1981).
- 13) Tsutsui, T., Maizumi, H., and Barrett, J. C., Colcemid-induced neoplastic transformation and aneuploidy in Syrian Hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, **5**: 89-93 (1984).
- 14) Tsutsui, T., Maizumi, H., McLachlan, J. A., and Barrett, J. C., Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol : A possible chromosomal mechanism in carcinogenesis. *Cancer Res.*, **43**: 3814-3821 (1983).
- 15) Kakunaga, T., Crow, J. D., Leavitt, J. and Hamada, H., Cellular and molecular mechanisms of neoplastic transformation of human cells. 13th International Cancer Congress, Part B, Biology of Cancer (I) pp. 127-140 (1983) Alan R. Liss Inc. N. Y.
- 16) Barrett, J. C., and Ts'o, P. O. P., Relationship between somatic mutation and neoplastic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 3247-3301 (1978).

- 17) Chan, G. L., and Little, J. B., Induction of ouabain-resistant mutations in C 3 H10T1/2 mouse cells by ultraviolet light. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**: 3363-3366 (1978).
- 18) Landolph, J. R. and Heideberger, C., Chemical carcinogenes produce mutations to ouabain resistance in transformable C 3 H10T1/2 C118 mouse fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**: 930-934 (1979).
- 19) Borek, C. and Hall, E. J., Transformation of mammalian cells in vitro by low doses of X-rays. Nature, **243**: 450-453 (1973).
- 20) Han, A. and Elkind, M. M., Transformation of mouse C 3 H/10 T1/2 cells by single and fractionated doses of X-rays and fission-spectrum neutrons. Cancer Res., **39**: 123-130 (1979).
- 21) Terzaghi, M. and Little, J. B., X-radiation-induced transformation in a C 3 H mouse embryo-derived cell line. Cancer Res., **36**: 1367-1374 (1976).

II-5 マウス FM 3 A 細胞から分離された ミューテーター変異株

兵頭 昌雄*

我々は哺乳動物細胞の DNA 複製とその調節機構について興味を持っており、そのアプローチのためにこれらのプロセスに変異を持つ細胞株を分離し、その解析を行なうことを目的としている。DNA の複製機構に変異をもつ細胞株としては高温で増殖できなくなる温度感受性変異株 (ts 株) がまず考えられる。現に我々も DNA 複製に関する ts 株を分離することを数年にわたり試みてきた¹⁾。しかし我々の経験では大腸菌の dna 変異株に相当するような ts 株は得られなかった。さらに哺乳動物細胞の DNA 複製を *in vitro* で再現することのできる適当な系が未開発である現在では、たとえ良い ts 株が得られてもその後の解析は容易には進まないであろう。

DNA 複製に関する変異株として、こうした ts 株以外に考えられるものがミューテーター変異株である。DNA 複製の特徴の一つは DNA の塩基配列を正確にコピーすることにあるが、もし DNA ポリメラーゼあるいは複製に直接関与する他の機能に変異が生じると、コピーする際の忠実度 (fidelity) が失なわれいろいろな遺伝子に突然変異が多発する、すなわちミューテーターとなることが考えられる。こうした発想にもとづいてマウス FM3A 細胞からミューテーター変異株を分離する方法を開発した。

これまでも哺乳動物細胞からはミューテーター変異株が発見され、報告されている^{2,3)}。これらのほとんどのものは、DNA 複製の阻害剤で特に dNTP プールと拮抗的に作用する薬剤であるアフィディコリン、araC などに対する耐性株として分離されたものである。そしてこれらは dNTP プールの量的バランスに著しい異常を持つことが明らかにされている。たとえば Meuthら²⁾ が分離した araC 耐性株では dCTP が野生株の約 5-10 倍増加していた。このため当然 araC に耐性を示した

* 東海大学・医学部

わけであるが、同時にDNA複製の際に過剰のdCTPが存在することによる複製の誤りを生じるものと思われる。現に *in vitro* のDNA polymerase の反応においてdNTPのバランスを人為的に変化させると誤りが増加することが示されている⁴⁾。しかし我々はこうしたdNTPプールのバランスが原因で起こるミューテーターではなく、直接DNA複製の機能に変異を生じたミューテーターを分離することを目的としている。また得られたミューテーターの中にはDNA損傷の修復やその他のDNAの安定性を保つ機能などに変異を持つものがあるかもしれない。

ミューテーターを分離する方法については図1に略図として示した(兵頭, 投稿中)。プリンのサルベージ系の酵素であるHGPRTの変異に関して, HGPRT⁻株は6-チオグアニン耐性として, またHGPRT⁺株はHAT培地耐性として交互に分離されることを利用したものである。MNNG処理により多くのHGPRT⁻株を生じるが同時にミューテーター変異株も生じると考え, またこのときミューテーター変異株はHGPRT⁺であるとする。HGPRT⁻株を一度HAT培地で除いた後に短期間の培養の間にHGPRT⁺からHGPRT⁻に変異を起こす細胞を6-チオグアニン耐性として得れば, この中にはミューテーターが含まれているであろう。そこで図1の選択を生き残った細胞クローンについて次にウワバイン耐性の遺伝子座で突然変異頻度 (mutation frequency) を測定, さらに突然変異率 (mutation rate)

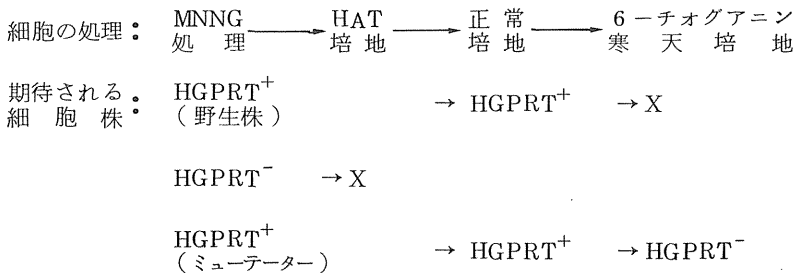


図 1

ミューテーター変異株を分離するためのプロトコール。
ミューテーター変異株は短期間の培養中にHGPRT⁺からHGPRT⁻に変異を起こすことが期待される

表1 ミューテーター変異株の突然変異率

細胞株	薬剤耐性遺伝子		
	ウワバイン	プラスチジンS	ツニカマイシン
F28-7 (野生株)	0.94	2.74	6.48
Fmut-1	38.6 (×41)	34.0 (×13)	62.0 (×9.6)
Fmut-2	6.72 (×7.1)	4.26 (×1.6)	2.99 (×4.6)
Fmut-3	4.68 (×5.0)	4.36 (×1.6)	67.2 (×10)

突然変異率は Luria と Delbruck⁵⁾ の fluctuation test により算定した。またここに示した薬剤に対する耐性は優性に発現されることが示されている。

表2 ミューテーター変異株における細胞内 dNTP プールの野生株に対する相対的濃度

細胞株	dCTP	dTTP	dATP	dGTP
Fmut-1	0.98	1.15	1.54	0.96
Fmut-2	1.85	0.90	0.71	1.51
Fmut-3	1.02	1.07	0.81	0.90

dNTP量は高速液体クロマトグラフィー法を用いて測定し、野生株の値を1.0として表した。

を決定することでミューテーター変異株を分離・同定した。

表1に3株のミューテーターについて3つの異なる遺伝子座(いずれも薬剤耐性変異)における突然変異率を示した。いずれのミューテーターも3つの遺伝子座に高い突然変異を起こすためミューテーターであると同定される。さらにこれらのミューテーターが上に述べたようなdNTPプールのバランスの変化であるかどうかについて、細胞内のdNTP量を高速液体クロマトグラフィーにより調べた。その結果は表2に示すとおりで、Fmut-1とFmut-2株ではややプールにかたよりが見られるもののFmut-3株では野生株と同じ値が得られた。またFmut-1, -2株の値もこれまで報告されている変化よりずっと小さいことから、これらの細胞株におけるミューテーター活性はプールの変動以外のところにあるのではないかと考えられる。

現状は以上に述べた通りであり、まだミューテーターの本態を明らかにするには

至っていないがこれらのミューテーターの解析をさらに進めていきたい。また図1に示した方法を改良し、より効率よくミューテーターを分離する方法を確立し、さらに7株のミューテーターを得ている。これらについても平行して研究を進めつつある。(この研究は一部文部省がん特別研究費および東海大学総合研究機構研究奨励補助金、東海大学医学部研究奨励金の援助により行なわれた。)

参 考 文 献

- 1) Hyodo, M., Suzuki, K. *Exp. Cell Res.* 137, 31-38, (1982).
- 2) Meuth, M., Heureux-Huard, N., Trudel, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 76, 6505-6509, (1979).
- 3) Weinberg, G., Ullman, B., Martin, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 78, 2447-2451, (1981).
- 4) Kunkel, T., Silber, J., Loeb, L. *Mutation Res.*, 94, 413-419, (1982).
- 5) Luria, L., Delbruck, M., *Genetics*, 28, 491-511, (1943).

III 哺乳類細胞の遺伝損傷， 修復機構に種特異性は存在するか

III-1 哺乳類細胞の遺伝損傷， 修復機構に種特異性は存在するか

池 永 満 生*

はじめに

放射線や種々の変異原による遺伝損傷には、分子レベルから染色体異常までかなり広範囲なものが含まれているが、ここではDNA損傷だけを取上げることにする。DNA損傷修復の分子機構が最もよく研究されているのは大腸菌である。すなわち、大腸菌には、(1)ヌクレオチド除去修復、(2)塩基除去修復、(3)複製後修復、(4)クロスリンク修復、(5)DNA鎖切断の修復、(6)適応修復および、(7)対合誤り塩基の修復、などの修復機構があり、それぞれの修復経路に関与する酵素(群)もかなりの程度まで明らかにされている¹⁾。一方、哺乳類細胞についてはどうであろうか。残念ながら、哺乳類細胞に関して最もよく研究されているヌクレオチド除去修復ですら、酵素レベルでの実体はそれ程明らかではない。ともあれ本稿では、現在までに明らかにされている実験事実に基づき、哺乳類細胞のDNA修復機構における種特異性の問題点について議論することにした。

1. ヌクレオチド除去修復能の種間差

正常ヒト細胞と比べると、嚙歯類の樹立細胞株(permanent line)がピリミジンダイマーの除去修復能が無いことは、CleaverによるXPの修復欠損の発見の以前から指摘されていた²⁾。その後Ben-Ishaiら³⁾は、マウス胎児の初代培養細胞ではUV損傷の除去修復活性が高いが、細胞の継代が進むにつれて修復能が無くなることを報告した。最近、八木⁴⁾は、3種類の異なるマウスの系統を用い、不定期DNA合成(UDS)で見た胎児由来細胞の除去修復能(この方法はnucleotide pool sizeの影響を受けるので注意を要する)は継代と共に変化するが、ウィルスの宿

* 京都大学放射線生物研究センター

主細胞回復能で判定した除去修復能は、3系統のいずれのマウスについても、A群のXP細胞と同じレベルにまで低下していることを明らかにした。

一方、コロニー形成能を指標にしてUVに対する致死感受性を見ると、マウスの細胞も正常ヒト細胞と同じ程度にUV抵抗性である⁴⁾。本誌の佐藤弘毅氏の稿でも議論されているように、除去修復能の低いマウス細胞がなぜUV抵抗性を示すのか、その理由は明らかでない。マウス細胞では複製後修復が正常ヒト細胞よりも活発であるという証拠もない。この問題は今後の重要な研究課題である。

発癌剤4NQOによるDNA損傷は、大腸菌やヒト細胞ではUV損傷と同じ機構で除去修復される。UV損傷の除去修復能がほとんど無いマウスの細胞(BALB/3T3)でも、4NQO損傷は効率よく除去修復されることは注目に値する⁵⁾。

2. クロスリンクの修復

大腸菌の場合には、クロスリンク修復の最初のステップ、すなわち第一段半切除を行っているのはUvrA, B, C蛋白(UV endonuclease)である¹⁾。ヒト細胞の場合には、UV endonucleaseが第一段半切除に働いている可能性は少ないと考えられる。その証拠に、Fanconi貧血症細胞はMMCによるクロスリンク修復の第一段半切除の機能を欠いているが、UVに対する致死感受性は正常である⁶⁾。また、クロスリンク生成に関与している塩基がグアニンか(MMC処理の場合)、またはチミンか(ソラーレンの場合)によっても修復機構の作動スイッチが切換えられている可能性がある(本誌、藤原美定氏の稿参照)。

ヒト細胞とは違って、嚙歯類の細胞ではUVとMMCの両方に交叉感受性を示す変異株が多数分離されている。ヒトと嚙歯類細胞のこの差異が何を反映しているかは大変興味深い。

3. 適応修復(adaptive repair)

微量(非致死量)のニトロソ化合物(MMNGやMNUなど)で前処理した場合に、その後の高濃度(challenging doseという)のニトロソ化合物による致死、突然変異誘発あるいはSCEの誘発などに対して抵抗性を示す現象を適応反応(修復)という¹⁾。これは、大腸菌の場合には、前処理によってO⁶-メチルグアニン(O⁶-MeG)からメチル基を除去する酵素、すなわちO⁶-MeG-メチル転移酵素が誘導されるた

めであることが分っている。このような一種の誘導修復 (inducible repair) がヒトに存在するか否かは、ニトロソ化合物のような環境変異原に対する遺伝的リスクを評価する際には、大変重要な問題である。

哺乳類細胞では、チャイニーズハムスター細胞で致死と SCE に関して適応反応の存在が報告されている⁷⁾。ヒトにおいても、末梢血リンパ球の SCE については適応反応が観察されている (本誌, 森本兼義氏の稿参照)。なかんずく、ラット肝臓由来の細胞は、致死、突然変異誘発、 O^6 -MeG-メチル転移酵素の誘導、のいずれの面においても、哺乳類細胞で今までに知られている中でも最高レベルの適応反応を示すことが報告されている⁸⁾。これが種特異性の反映なのか、臓器の特異性なのかは今後明らかにされるべき課題である。

お わ り に

放射線による遺伝的リスクを評価する際に、最も重要な因子の一つである電離放射線による DNA 損傷とその修復については、残念ながら種特異性を論じ得る程に多くのデータの集積がなされていない。複製後修復に関しても、ほぼ似たような状況にある。したがって、本稿では除去修復、クロスリンク修復および適応修復の三つだけを取上げて、それらにおける問題点を指摘した。専門の研究者にとっては周知のことかもしれないが、若手の研究者が今後の研究の方向を考える上で、何らかの参考になれば幸である。

参 考 文 献

- 1) 池永満生, DNA 修復の遺伝的支配。実験生物学講座, 第13巻, 遺伝生物学, pp. 227-275, 丸善出版, 1984.
- 2) Trosko, J. E. and Kasschau, M. R., Study of pyrimidine dimers in mammalian cells surviving low doses of ultraviolet irradiation. *Photochem. Photobiol.* 6, 215-219, 1967.
- 3) Ben-Ishai, R. and Peleg, L., Excision-repair in primary cultures of mouse embryo cells and its decline in progressive passages and established cell lines. In "Molecular Mechanisms for Re-

pair of DNA", (P. C. Hanawalt and R. B. Setlow, eds.), part B, pp. 607-610, Plenum Press, New York, 1975.

- 4) Yagi, T., DNA repair ability of cultured cells derived from mouse embryos in comparison with human cells. *Mutation Res.* 96, 89-98, 1982.
- 5) Ikenaga, M. and Kakunaga, T., Excision of 4-nitroquinoline 1-oxide damage and transformation in mouse cells. *Cancer Res.* 37, 3672-3678, 1977.
- 6) Fujiwara, Y., Tatsumi, M. and Sasaki, M. S., Cross-link repair in human cells and its possible defect in Fanconi's anemia cells. *J. Mol. Biol.* 113, 635-649, 1977.
- 7) Samson, L. and Schwartz, J. L., Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. *Nature* 287, 861-863, 1980.
- 8) Laval, F. and Laval, J., Adaptive response in mammalian cells: Cross-reactivity of different pretreatment on cytotoxicity as contrasted to mutagenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1062-1066, 1984

III-2 マウス放射線感受性細胞の修復特性

佐藤 弘毅^{*}， 稲葉 浩子^{*}， 堀 雅明^{*}，
塩見 忠博^{*}， 高橋 永一^{*}， 伊藤 陽美^{*}

はじめに

細胞の放射線感受性は細胞が静止状態にあるか増殖状態にあるか，あるいは細胞周期のどの時期にあるかなどによって変動し，また細胞の由来した組織によって，さらには同じ組織でも動物種によって感受性が異なることが報告されている。これらの感受性を規定する要素のうちで最も重要なものは細胞のもつ修復能であると考えられており，これについて動物種間の類似点と相違点を明らかにすることは実験動物で得られた結果をヒトに外挿する際の参考になり，ヒトにおける放射線のリスク推定に科学的根拠を提供する。このことを考えて実験動物として最も多く使用されているマウスにおける修復特性を知るため，マウス培養細胞を用いて修復欠損株

表 1 L5178 Y細胞から分離されたDNA障害要因感受性変異株

DNA障害要因	変異株数	相補性群
紫外線	62	4
X線	4	1
4NQO	1	1
MMC	26	2
MMS	2	2
EMS	4	ND

4NQO：4-ニトロキノリン-1-オキシド

MMC：マイトマイシンC

MMS：メチルメタンサルホン酸

EMS：エチルメタンサルホン酸

ND：未決定

* 放射線医学総合研究所 遺伝研究部

の分離を試みた。DNA障害要因感受性細胞の中には修復欠損株も含まれるはずであり、これまでに表1に示すような変異株がわれわれの研究室で得られている。ここでは紫外線感受性変異株とX線感受性変異株について野生株ならびにヒト細胞と比較しつつ述べる。

1. 紫外線感受性変異細胞

突然変異誘発処理をしたマウス白血病L5178Y細胞から細胞けん濁液スポット法を考案して56株の紫外線感受性変異株を分離した¹⁾。それ以外の方法でさらに6株が得られた。これらの株は相補性検定によって4相補性群に分類された(表1)。このいずれの群に属する株も4-ニトロキノリン-1-オキシド(4NQO)の致死作用に対して交叉感受性を示した。また最初に分離されたQ31株²⁾は相補性群Iに属し、この株について詳しく調べた。

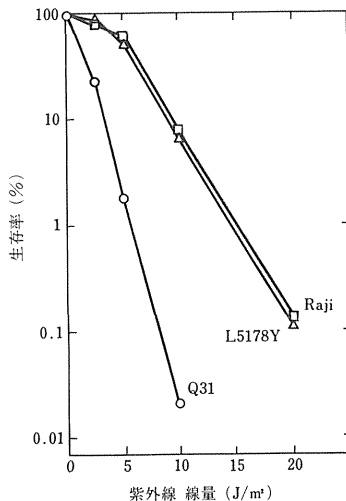


図1 ヒト・パーキットリンパ腫Raji (□), マウス白血病L5178Y (△)およびQ31 (○)細胞の紫外線生存曲線

(1) 突然変異誘発

変異株 Q 3 1 は親株である L 5 1 7 8 Y (野生株とする) に比べて紫外線感受性が高い (図 1) が, カフェインによる致死促進作用はそのまま保たれていた。すなわち生存曲線の最終勾配の比較では Q 3 1 株で 3.6 倍, L 5 1 7 8 Y 株で 4 倍促進が見られた³⁾。このことは Q 3 1 株ではカフェイン感受性修復系は正常に保たれていることを示している。

紫外線誘発 6-チオグアニン抵抗性突然変異について変異株と野生株を比較すると, まず突然変異形質の発現時間に差があった。すなわち野生株では 7 日間で最大の突然変異頻度が観察され, それ以後はそのレベルを保ってほぼ一定であったが, 変異株では最大発現までに 1 4 日間を必要とした。最大発現で比較すると, 同じ線量でも L 5 1 7 8 Y 株よりも Q 3 1 株の方がはるかに高い誘発突然変異頻度を示した (図 2)。ここで注目すべきは L 5 1 7 8 Y 株でも Q 3 1 株でも突然変異誘発のしきい

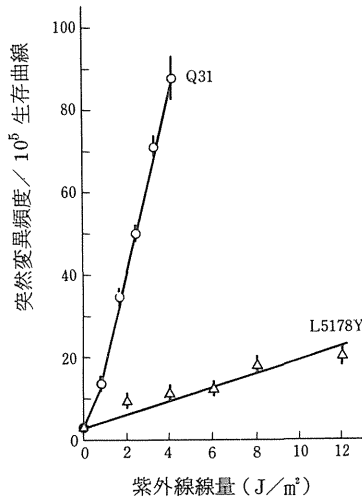


図 2 L 5 1 7 8 Y (△) および Q 3 1 (○) 細胞における紫外線誘発 6-チオグアニン抵抗性突然変異の線量効果関係

値が見られないことである。さらに同じ生存率を与える線量で比較しても、Q 3 1株の方が野生株よりも高い突然変異頻度を示した³⁾。このことはQ 3 1株では致死損傷よりも突然変異性損傷の方がより多く残っていることを意味するものと考えられる。ところがX線誘発突然変異については変異株と野生株との間で差がなかった。

染色体異常についても紫外線や4NQOはL5178 Y株に比べてQ 3 1株より多くの染色分体型異常を誘発する。たとえば2.4 J/m²の紫外線線量では染色分体切断が5倍、50 ng/mlの4NQOでは3-4倍多く見られた⁴⁾。

(2) 修復能

細胞のDNA上に誘発される紫外線損傷のうちで最も多いものはピリミジン2量体であり、この数は*Micrococcus luteus*由来の紫外線特異的エンドヌクレアーゼを用いて測定することができる。すなわち紫外線照射した細胞から抽出したDNAをこの酵素と保温すると2量体の所でDNA鎖の切断が起こり分子量が小さくなる。その程度をアルカリ蔗糖勾配遠心で測ってエンドヌクレアーゼ感受性部位(ESS)の数に換算する。この方法で調べたところ、同じ線量の紫外線によってL5178 Y, Q 3 1およびヒト・パーキットリンパ腫由来リンパ芽球Raji細胞にほぼ同数のESSが形成されることがわかった。たとえば10 J/m²では10⁸ダルトンのDNAあたり10-11のESSが生じる(表2)。照射された細胞を保温すると除去修復によって2量体が除かれESSが減少するはずである。その結果を表3に示す⁵⁾。この表から明らかなようにヒト細胞に比べてマウス細胞の除去修復能は低い(約30%)が、Q 3 1株では除去修復が欠如している。この修復の第1段階に働くと予想される紫外線特異的エンドヌクレアーゼ活性はQ 3 1株にもL5178 Y株と同じ程度に存在していた⁶⁾。この事実の解釈としては、ここで検出された活性は真の除去修復酵素ではない可能性と、検出系として ϕ X174ファージの複製型を使っているので、クロマチンでは別の成績が得られる可能性とが考えられる。

複製後修復は娘鎖修復とも言い、親鎖に除去されていない損傷が残っているにも拘らず、正常の大きさの娘DNA鎖を合成する能力である。これについて測定した成績は表3に示す。照射直後に新たに合成されるDNAは小さいが、保温によって大きなDNAが合成されるようになる。L5178 Y株に比べてQ 3 1株では照射直後のDNA鎖の大きさはやや小さいが、これは非照射の場合でも同様であった。し

表2 紫外線特異的エンドヌクレアーゼ法を用いて測定した除去修復

細胞	保温時間 (h)	ESS	除去修復*
L5178 Y	0	10.3	
	24	8.5	18
Q31	0	10.9	
	24	10.6	3
Raji	0	10.9	
	24	4.5	59

ESS: 10^8 ダルトン DNA あたりのエンドヌクレアーゼ感受性部位。

* 24 時間に除去された ESS の割合 (%)。

表3 10 J/m^2 の紫外線照射後の複製後修復

細胞	新生 DNA の大きさ	
	照射直後	2 時間後
L5178 Y	16	50
Q31	13	51
Raji	30	72

かし 2 時間後には変異株も野生株とほぼ同じ大きさの DNA を合成した⁵⁾。このことは変異株でも複製後修復は正常であることを示している。またヒト細胞はマウス細胞よりやや高い複製後修復を示した(表3)。

(3) DNA 合成阻害の回復

紫外線照射直後の DNA 合成率は線量依存性に減少する。さらにその減少の程度は Q31 株と L5178 Y 株とで差がなかった(図3)。しかし照射された細胞の保温による DNA 合成の回復をみると、図4に示すように野生株では 10 J/m^2 照射でも数時間後には非照射の 80% まで回復するのに対して、変異株では同じ線量で 22% まで低下して、24 時間後でも回復は観察されなかった⁷⁾。このことは Q31 株は除去修復を欠損しているだけでなく、紫外線照射後 DNA 合成阻害の回復にも欠陥のあることを示している。

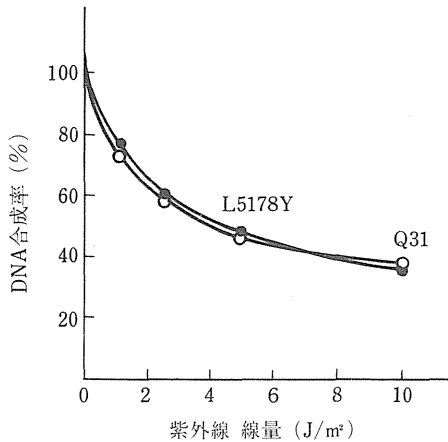


図3 L5178Y(●)およびQ31(○)細胞における紫外線照射直後のDNA合成

(4) 考察

ヒトの色素性乾皮症(XP)は9相補性群, 中国ハムスター細胞の紫外線感受性細胞は4相補性群⁸⁾, マウス細胞でも4相補性群¹⁾にそれぞれ分類されており, このことは紫外線損傷の修復には多数の遺伝子産物が働いていることを示している。XP細胞もマウスの紫外線感受性細胞も4NQOの致死作用に対して交叉感受性を示すので, 紫外線損傷と4NQO損傷は一部共通の修復過程によって処理されていると考えられる。

紫外線による突然変異誘発はヒトの繊維芽細胞では1.2-2J/m²までは起こらない, すなわちしきい値がある^{9,10)}。しかしXP細胞ではしきい値は認められず, 高い誘発率を示す。またヒト・リンパ芽球細胞では紫外線誘発変異にしきい値は見られない(巽, 本シンポジウム)。マウスL5178Y細胞でもしきい値が認められないが, それはこの細胞がリンパ系のためかもしれない³⁾。

マウス細胞はヒト細胞の3分の1以下の除去修復能しか持っていないにも拘らず, ほぼ同じ紫外線抵抗性を示す。この説明として, 細胞あたりのDNA合成, すなわ

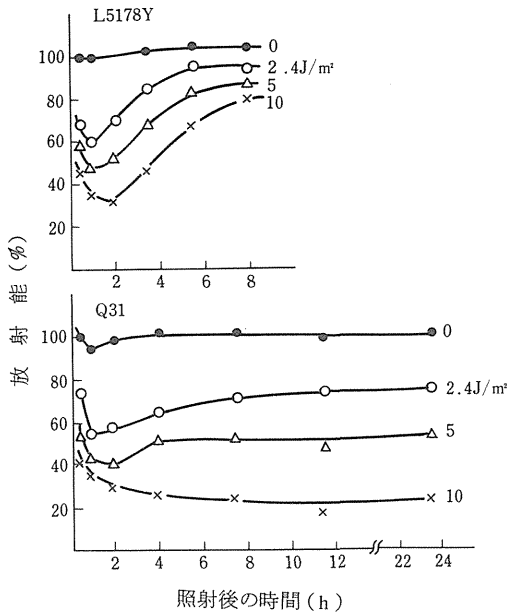


図4 L5178YおよびQ31細胞における紫外線のり2.4, 5, ならびに10 J/m²照射後の細胞あたりのDNA合成の回復

ち複製しているリブリコン数、の紫外線照射による減少の回復が細胞生存にとって重要であり、除去修復はゆっくり働いてもかまわないと考える。この回復はヒトでもマウスでも数時間で起こるが、XP細胞^{11,12,13}、コケイン症候群細胞¹⁴およびQ31株⁷では回復がほとんどないか、僅かにあっても著しく遅延する。これらのことから除去修復とDNA合成回復とは連動していると考えられ、XPバリエーションとコケイン症候群細胞ではDNA合成回復だけが障害されていると推定される。

2. 電離放射線感受性変異細胞

マウスL5178Y細胞を突然変異誘発剤で処理してから軟寒天培地平板に播き、生じた集落を2枚の平板の同じ位置に滅菌楊子を利用して移し、片方の平板をX線で照射する。1週間の培養後、照射平板で増殖が見られなかった位置の集落を非照射平板から回収してX線感受性変異株を得た¹⁵⁾。それ以外にメチルメタンスルホン酸感受性を指標として分離したM10株もX線感受性であった¹⁶⁾。この株はマイシニンCにやや感受性、4NQOとガンマ線に対して高い感受性を示した¹⁷⁾。図5にL5178Y, M10, ヒト細胞, および血管拡張性運動失調症(AT)細胞のX線生存曲線を示す。この図から明らかなように、ヒト細胞とマウスL5178Y細胞, AT細胞とM10細胞の生存曲線はそれぞれ類似している。

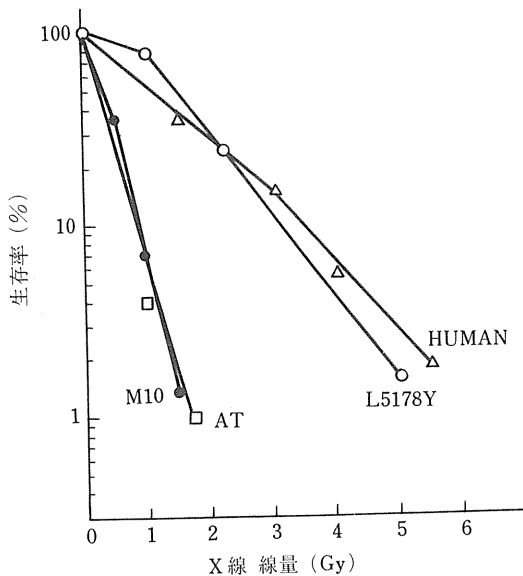


図5 ヒト (Human, △), L5178Y (○), 血管拡張性運動失調症 (AT, □) およびM10 (●) 細胞のX線生存曲線

(1) 突然変異誘発

L5178 Y株とM10株についてガンマ線誘発6-チオグアニン抵抗性突然変異を測定すると、L5178 Y株では3 Gyまでの誘発率は 2.8×10^{-5} /Gyであった。M10株では0.75 Gyまでの誘発率はほぼ線量に比例して増加し、その勾配は野生株の約4倍であった。しかし同じ生存率を与える線量では変異株と野生株とで誘発率はほとんど等しかった¹⁸⁾。

(2) 修復能

ガンマ線照射後の1本鎖DNA切断と再結合をアルカリ蔗糖勾配遠心法を用いて調べた。結果はM10株はL5178 Y株と同様に1本鎖切断を正常に修復することを示した。

ところがガンマ線照射によってM10株にはL5178 Y株に比べてはるかに多数の染色体異常が誘発され、しかも分裂遅延を伴っていた¹⁹⁾。このことはM10株では染色体切断の修復能が低下していることを意味しており、生化学的分析の結果とは一致しない。

(3) DNA合成阻害と回復

X線照射後のDNA合成をL5178 YとM10株について調べた²⁰⁾。照射直後の合成率は線量依存性に減少し、その程度は野生株と変異株とでほぼ同じであった。しかし保温によるDNA合成の回復については、M10株の方がL5178 Y株よりも最終回復レベルが高かった。

(4) 考 察

電離放射線損傷の修復がヒトとマウスで異っているかどうかについては判っていない。それを知る手掛かりとして放射線感受性変異細胞を比較してみた。マウスM10株とヒトAT細胞は図5に見られるように、ともにX線感受性であるという点と、自然ならびに誘発染色体異常が高い¹⁹⁾という点で類似しているが、以下の点では相違している。すなわち、

- ① 放射線誘発突然変異はAT細胞はヒト対照細胞とほぼ同じ(異、本シンポジウム)なのに対して、M10株はマウス野生株よりも4倍も高い⁸⁾。

- ② A T細胞と異なって、M 1 0株ではX線照射によって分裂遅延が生じる¹⁹⁾。
- ③ 放射線照射後のDNA合成はA T細胞では高線量でもあまり阻害されずに続くのに対して、M 1 0株では野生株と同じ程度まで線量依存性に阻害される²⁰⁾。しかしこれらの相違はヒトとマウスの種差に基づくよりも、むしろA T細胞とM 1 0細胞における突然変異の違いに由来するものと思われる。今後、A T細胞とM 1 0細胞の細胞雑種を作って放射線感受性について相補性があるかどうかを検討する予定であり、またM 1 0株に潜在致死損傷修復があるかどうかを調べることにより、ヒトとマウスにおける放射線損傷修復の特異性についての新しい情報が得られるものと考えられる。

お わ り に

ヒト細胞とマウス細胞は紫外線損傷の修復において異なっているが、紫外線抵抗性に関してはほぼ同じである。その説明としては、DNA合成阻害からの回復能がヒトとマウスで等しく、それが照射後短時間における細胞生存を規定していると考ええる。さらに除去修復欠損株は例外なくDNA合成回復が低下しているが、逆は必ずしも成り立たないので、この2機能は相互に密接な関係があることがわかるが、その実体の解明は今後の研究に待つ。

マウス細胞のX線感受性変異株における感受性の原因については不明だが、明確な事実として脂質過酸化防止機能の欠損があり²¹⁾、このことと致死感受性ならびに染色体感受性との関連は今後の課題である。

謝 辞

この報告は戸張巖夫、辻秀雄、塩見尚子、森明充興、湯川修身および中沢透（東邦大学、理学部）の諸氏の協力に負うものであり、ここに謝意を表します。また中井斌遺伝研究部長の激励と技術部の各氏の援助に感謝します。本研究は当研究所特別研究「低レベル放射線の人体に対する危険度の推定に関する調査研究」の一環として遂行されたものである。また本研究の一部は文部省科学研究費補助金の助成を受けた。

参 考 文 献

- 1) Shiomi, T., Hieda-Shiomi, N., and Sato, K. : Isolation of UV-sensitive mutants of mouse L5178Y cells by a cell suspension spotting method, *Somat. Cell Genet.*, 8, 329-345, 1982.
- 2) Sato, K., and Hieda, N. : Isolation of a mammalian cell mutant sensitive to 4-nitroquinoline-1-oxide, *Int. J. Radiat. Biol.* 35, 83-87, 1979.
- 3) Sato, K., and Hieda, N. : Mutation induction in a mouse lymphoma cell mutant sensitive to 4-nitroquinoline-1-oxide and ultraviolet radiation, *Mutation Res.*, 71, 233-241, 1980.
- 4) Takahashi, E., Tobari, I., and Sato, K. : Chromosomal hypersensitivity in mutant M10 and Q31 mouse cells exposed to ultraviolet radiation (UV) and 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO), *Mutation Res.*, 109, 207-217, 1983.
- 5) Sato, K., and Setlow, R. B. : DNA repair in a UV-sensitive mutant of a mouse cell line, *Mutation Res.*, 84, 443-455, 1981.
- 6) Morimyo, M., and Sato, K. : Presence of an endonuclease specific for ultraviolet light-irradiated deoxyribonucleic acid in an ultraviolet light-sensitive mouse cell mutant Q31, *J. Radiat. Res.*, 23, 399-402, 1982.
- 7) Hama-Inaba, H., Hieda-Shiomi, N., Shiomi, T., and Sato, K. : Recovery from post-irradiation inhibition of DNA synthesis in an ultraviolet-sensitive mutant mouse cell, *Mutation Res.*, 104, 305-309, 1982.
- 8) Thompson, L. H., Busch, D. B., Brookman, K., Mooney, C. L., and Glaser, D. A. : Genetic diversity of UV-sensitive DNA repair mutants of Chinese hamster ovary cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3734-3737, 1981.

- 9) Maher, V. M., and McCormick J. J. : Comparing the frequency of mutations induced in strains of diploid human fibroblasts with different capacities for DNA repair, *Banbury Report 2, Mammalian Cell Mutagenesis : The Maturation of Test Systems*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1979, pp. 351 – 358. Maher, V. M. and McCormick J. J. : Excision repair in diploid human cells can decrease the cytotoxic and mutagenic consequences of ultraviolet irradiation, *Proc. 6th Int. Cong. Radiat. Res.*, 584 – 588, Tokyo, 1979. *Radiation Research* (ed. Okada, S., Imamura, M., and Yamaguchi, H.)
- 10) Grosovsky, A. J., and Little, J. B. : Mutagenesis and lethality following S-phase irradiation of xeroderma pigmentosum and normal human fibroblasts with ultraviolet light, *Proc. 7th Int. Cong. Radiat. Res.*, B4–15, Amsterdam, 1983.
- 11) Rude', J. M., and Friedberg, E. C. : Semi-conservative deoxyribonucleic acid synthesis in unirradiated and ultraviolet-irradiated xeroderma pigmentosum and normal human skin fibroblasts, *Mutation Res.*, 43, 433–442, 1977.
- 12) Inoue, M., and Takebe, H. : DNA repair capacity and rate of excision repair in UV-irradiated mammalian cells, *Jpn. J. Genet.*, 58, 285–295, 1978.
- 13) Park, S. D., and Cleaver, J. E. : Recovery of DNA synthesis after ultraviolet irradiation of xeroderma pigmentosum cells depends on excision repair and is blocked by caffeine, *Nucl. Acids Res.*, 6, 1151–1159, 1979.
- 14) Ikenaga, M., Inoue, M., Kozuka, T., and Sugita, T. : The recovery of colony-forming ability and the rate of semi-conservative DNA synthesis in ultraviolet-irradiated Cockayne and normal human cells, *Mutation Res.*, 91, 87–91, 1981.
- 15) Sato, K., Hieda, N., and Hama-Inaba, H. : X-ray-sensitive

- mutant mouse cells with various sensitivities to chemical mutagens, *Mutation Res.*, 121, 281–285, 1983.
- 16) Sato, K., and Hieda, N. : Isolation and characterization of a mutant mouse lymphoma cell sensitive to methyl methanesulfonate and X rays, *Radiat. Res.*, 78, 167–171, 1979.
 - 17) Shiomi, T., Hieda-Shiomi, N., and Sato, K. : A novel mutant of mouse lymphoma cells sensitive to alkylating agents and caffeine, *Mutation Res.*, 103, 61–69, 1982.
 - 18) Shiomi, T., Hieda-Shiomi, N., Sato, K., Tsuji, H., Takahashi, E., and Tobari, I. : A mouse-cell mutant sensitive to ionizing radiation is hypermutable by low doses of γ -radiation, *Mutation Res.*, 83, 107–116, 1981.
 - 19) Takahashi, E., Tsuji, H., Shiomi, T., Sato, K., and Tobari, I. : Characteristics of γ -ray-induced chromosomal aberrations in mutagen-sensitive mutants of L5178Y cells, *Mutation Res.*, 106, 225–236, 1982.
 - 20) Hama-Inaba, H., Hieda-Shiomi, N., and Sato, K. : Inhibition and recovery of DNA synthesis after X-irradiation in radiosensitive mouse-cell mutants, *Mutation Res.*, 120, 161–165, 1983.
 - 21) Nakazawa, T., Yukawa, O., Nagatsuka, S., Matsudaira, H., and Sato, K. : Depletion of inhibitory factors against lipid peroxidation in cytosols of a radiation-sensitive mutant of L5178Y cells, *Int. J. Radiat. Biol.*, 42, 581–586, 1982.

III-3

ヒト遺伝病細胞の修復欠損特性

* 藤原美定

はじめに

DNA 損傷に対する修復関連細胞反応を DNA 修復，損傷耐容，回復とに分け，表 1 に示した。現在ヒト細胞で修復・耐容機構がかなり明らかにされ，原核細胞との相異も理解されるようになりつつある。しかし，イオン化放射線後の高次構造と関連する細胞回復 (SLDR, PLDR) の分子の基礎は依然模索的である。

表 1 DNA 損傷に対する修復細胞反応

1. DNA 修復
a 塩基損傷の回復
ピリミジン 2 量体の酵素的光修復
O ⁶ -メチルグアニンの脱メチル修復 (適応反応も含む)
b 塩基損傷の除去修復
ヌクレオチド除去修復
塩基切除修復
ミスマッチ修復
c 再結合修復
2. DNA 損傷の耐容 (tolerance)
複製後組換え修復 (原核)
経損傷合成 (原核の SOS 修復も含む)
哺乳類複製耐容
3. イオン化放射線損傷の細胞回復
亜致死損傷の回復 (SLDR)
潜在致死損傷の回復 (PLDR)

* 神戸大学医学部 放射線基礎医学教室

* 京都大学放射線生物センター核酸修復 (客員) 部門

表2 ヒト劣性修復遺伝病細胞の欠損特異性

遺 伝 病	相 補 群	特異的高感受性変異原	分 子 的 欠 損
色素性乾皮症 (XP)	A-I 9群 variant	UV, 4NQOなどのUV 型変異原	inc ⁻ , AP endo ⁻ (D群), 修復ギャップ結合遅延
ファンコ=貧血症 (FA)	2群(?)	鎖間クロスリン剤, と くくMMC, DEB 4NQO	half-exc ⁻ 不明
Dyskeratosis congenita(DC)			
コケイン症候群 (CS)	A-C 3群	UVおよびUV類似物 質	DNA(RNA)合成回復欠 損 lig ⁻ (confluent)
アタキシア(AT)	A-E 5群	X(γ), BLMなど	2本鎖切断修復欠損, DNA合成阻害反応欠損, プライマー活性化酵素欠 損, PLDR ⁻
ブルーム症候群 (BS)		EMS, MMC, ハロゲン 化ピリミジン	鎖切断修復欠損, mutator
免疫不全症 46BR		アルキル化剤, UV, X(γ)	lig II 変異(?) PLDR ⁻

色素性乾皮症(XP)でのピリミジン2量体(Py[^]Py)除去修復欠損の発見以来、哺乳類細胞のヌクレオドおよび塩基切除修復の生化学や分子機構の研究は進展している¹⁻³⁾。表2は比較的明らかなヒト劣性修復遺伝病細胞における修復欠損と損傷基質の特異性をまとめている。マウスやチャイニーズ・ハムスター確立細胞系でも、XP, FA(ファンコ=貧血), BS(ブルーム症)に類似するmutantsが分離されている。XPとFAはそれぞれinc⁻, half-exc⁻の分子欠損を示すので、ここで主として取り上げるが、ヒトなどの細胞における細胞修復反応をみると、クロマチン高次構造を排除しては考えられない。

1. DNA損傷・修復とクロマチン反応

哺乳類細胞の損傷後の分子・生物学的反応をみると主として次のことがわかる。

- (a) UV, アルキル化剤処理後, DNA合成開始の阻害は直後から2hにおこり, 6h頃にはほぼ回復する^{4,5)}(図1B)。
- (b) DNA鎖伸長の阻害は1~2hで最高となり, 対照分子量大のDNA合成の

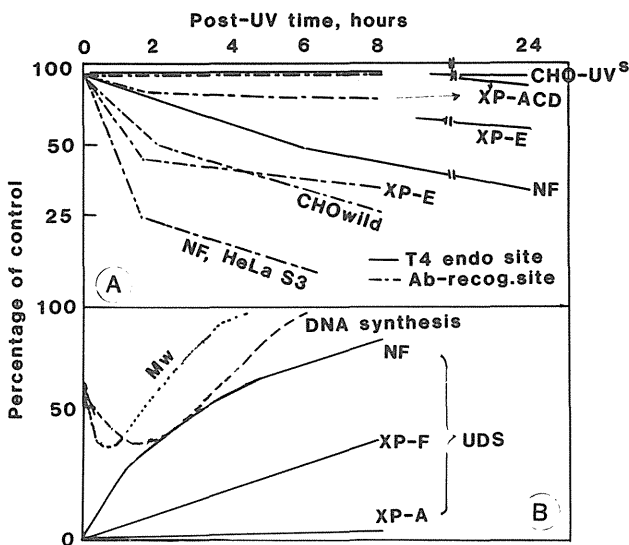


図1 ピリミジン2量体除去(A)と修復・複製反応(B)

ダイマー-抗体結合部位(----)に関するデータはClarksonら⁹⁾より引用, UDSデータはZelleら⁶⁾より引用, その他は著者のデータ。Mwは5J/m²後各時間での10分パルス値を示し, 非照射と比較したもの。

回復はほぼ4~6hにおこる^{3,4)}(図1B, Mw)。

- (c) UV後のUDSでは6hまでに顕著な修復(“速い修復”)が見られ, 遅い修復が後続する^{6,7)}(図1B)。XP-F群は前者のみを欠損し^{6,7)}, A, B, C, D, G群は両者とも欠損する⁶⁾(図1B)。
- (d) T4 endo部位測定では, Py[^]Pyは初期6hまでに半減期の短い速い修復を受け, それ以後の遅い修復と区別できる2相性を示す^{6,8)}(図1A)。
- (e) Py[^]Py 特異的抗体のDNA結合能は初期2h以内では速く消失し, その後ゆるやか消失が続く⁹⁾(図1A)。exc⁻細胞では勿論抗体結合部位は残存し, XP-E群は少し欠損する⁹⁾(図1A)。(抗体結合部位消失とT4 endo部位消失の一致しない理由はまだ明らかではないが, 除去プロセッシングやクロマチン構造内DNA変化なども考慮されている。)

(f) X(γ)線後のSLDRは ~ 2 hで、PLDRは6 hでほぼ完了する。

以上のように、哺乳類細胞に共通した細胞修復反応の時間軸において顕著な2屈曲点がある。即ち、一つは1 ~ 2 時間の速い変化とほぼ6 hを要する“速い修復”であり、クロマチン回復を包含するものであり、もう一つは4 ~ 6 h以後のクロマチン高次構造のrecondensationの後の“ゆっくり修復”である。これらは質的なクロマチン修復の変換点もしくは機能単位とみなせよう。UV照射後初期ではS1ヌクレアーゼによる修復分析をすると転写能をもつeuchromatinと不活性なheterochromatin分画でも修復は同様におこるので(加納・藤原:未発表), 初期にはクロマチンの脱凝縮の大変化が起るものと考えられる。図2にその様子をモデルとして示した。損傷による急激な核クロマチンの変化(preincisional decondensation)や解離(dissociation)が起り, 初期6 hまでに速い除去の分子修復がおこる。X線の場合, 核マトリックス・DNA複合体の早い損傷回復がおこるものと考えられる。6 h屈曲点以降の回復は核内クロマチン高次構造のほぼ完全な修復(chromatin

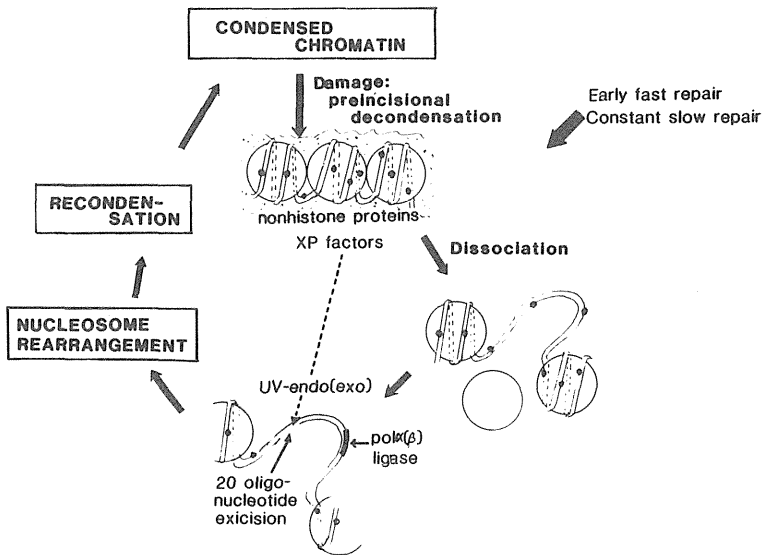


図2 DNA修復とクロマチン反応

recondensation)と考えられそうである。F群XPは初期修復のみを欠損するので、ゆっくり型修復因子は正常に働いている。核変化の1指標として、核タンパク修飾をおこすpoly(ADP-ribose)合成は損傷後2hで最高に活性化される¹⁰⁾。その阻害剤3-アミノベンツアミドはアルキル化剤による切断・修復の不均衡による切断増加をおこすが、ヌクレオチド除去修復を分子的には阻害しない¹⁰⁾。クロマチン構造の誘発変化は遺伝子発現変化をもひきおこすと考えられ、X線による10T1/2細胞の100%イニシエーション¹¹⁾を考える上でも重要であると思われる。

2. 色素性乾皮症(XP)と修復

(1) ヌクレオチド除去修復とXPの欠損

図2は修復モデルの図で、ヒト正常細胞の分子機構は、第一段はUVエンドヌクラーゼ(多分exoも含め)による約20オリゴヌクレチド除去と考えられ、多分patch-and-cat型ではないことが最近指摘されている¹²⁾。しかし大腸菌uvrABC

表3 XP相補群と修復特性

相補群	UDS (%)	T4 endo 部位消失 (%) ^a	AraC/HU 誘発切断 (正常の%) ^b	生存パラメータ			皮膚癌	神経症状	患者分布 (%) ^c
				n	Do, J/m ²	Do比			
A	<5 (10-36)	0	<5	1.0	<0.5	10	+	+	35 (-)
B*	-37	<5					+	+	<1
C	10-30	5-10	10-20	1.0	1.0-1.4	5	+	-(+)	20
D	10-55	~10		1.0	0.7-1.0	5-8	+	+	10
E	40-60	~60	60	1.2	2.0-2.4	2	+	-	3
F	10-20	50-60	~20	1.0	1.8-2.2	2-3	-	-	4
G	<5	<5	0	1.0	0.6	8	-	+	1
H*	30								<1
I	17								<1
Variant	80-100	100	140-200	1.2-1.5	2.5-4.5	2	+	-	30
Normals	100	100	100	1.5	5.0(4.5-5.3)				

a. 10J/m²後24時間での部位消失の正常に対する%(正常:70-80%消失)

b. 10J/m²後, 10μM araC+2mM HU 中で4hインキュベートしたときの excision breaks の正常に対する%。

c. 相補群決定世界例の分布

複合体の bulky lesions のオリゴヌクレオチド除去¹³⁾と同一かどうかはわからない。第二段階は主として pol α (pol β も部分的に作用) でギャップ充填をし、最後にリガーゼで連結する¹²⁾。

XP は \hat{Py} Py の初期 incision 活性を完全または部分欠損する 9 相補群と欠損しない XP variant 群に分かれ、それらの特徴を表 3 に要約している。 \hat{Py} Py (T4 endo 部位) 修復のかなりよい E, F 群はかなり UV 抵抗性でまだ癌発生も見られない (<40 才) が A, B, C, D, G 群ではほぼ完全に修復欠損を示し、致死高感受性で (図 3 A), 皮膚癌の高頻度病発とよく一致する。XP-A, C, D 群は UV に高突然変異性を示すが、哺乳類での修復研究が突然変異性 \hat{Py} (6-4) Pyo について進んでいないので、因果関係は明確でない。相補群の明らかな世界例分布から、A, C, D 群が 60-70% 頻度を占め、B 群と H 群 (コケイン症合併), E~I 群の頻度はまだ低く、前 3 群が修復欠損因子の研究に重要である (表 3)。

XP-A 群は 4NQO のプリン付加物のヌクレオチド除去修復を欠損し¹⁴⁾, A,

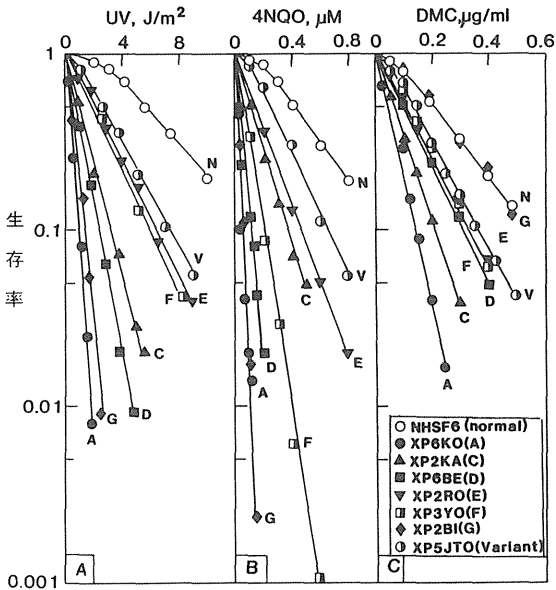


図 3 XP 各群の UV (A), 4NQO (B) および DMC (C) 生存曲線

B, C, D, Eの各群も4NQO損傷をPy[^]Py修復欠損と同じ程度に欠く¹⁵⁾。しかし、F群の4NQO感受性は、C群と逆転して、より高感受性であったり⁸⁾(図3B), A群同様にPy[^]Py欠損を示すG群(XP2BI)は、モノアダクトのみを作るデカバミルマイトマイシンC(DMC)致死に対し正常致死反応を示す⁸⁾(図3C)。アンジェリシン・モノ付加物とPy[^]Pyの24時間の除去は、A群でそれぞれ20%, 0%, D群で55%, 15%, E群で80%, 40%であり¹⁶⁾, XPでのPy[^]Py欠損からの解離現象が見られる。4NQO, DMC, angelicinなどの付加物の修復基質特異性やXP遺伝子産物の要求度など、より詳細な研究が要求される。

XP variantは30%頻度の意外と高い分布をし(表3), exci-nuclease活性は正常レベルもつが, araC/HUによる過剰鎖切断残存から, 修復重合・再結合段階に欠損があると判断される^{4,5)}(表3)。その上, XP variantは複製耐容のとき, 複製ブロックとそのcaffeine感受性が高く^{5,17)}(4-(1)項参照), 修復と複製の相互関連因子に欠損があるものと思われる。

(2) Incision の多因子によるクロマチン制御

9XP相補群(突然変異)因子が, 少なくともincisionに関与する。Mortelmanら¹⁸⁾(1976)はXP-A細胞抽出物が内因基質(未分画の全細胞ソニケート)からPy[^]Pyを除去しないが, 抽出DNAからは部分切除することを最初に示した。しかし, in vitro再構成系の不安定性や多量タンパクを必要とすることから, いくつかの追試にもかかわらず再現されなかった。われわれはかなり詳細にダイマー特異的なin vitro系の条件設定と開発を行った^{19,20)}。

一歩進め, 基質として, 核ソニケート, 分離クロマチン, 脱非ヒストン・クロマチン, 抽出DNAを用い, XPと正常細胞抽出物を酵素として, 特異的Py[^]Py除去を検討した。表4は結果を示し, A, C, G群の抽出物は少なくともそれぞれのクロマチンからPy[^]Py除去できないが, 脱非ヒストン・クロマチンや抽出DNAからは正常レベル除去できることがわかった。正常細胞とD群細胞の抽出物はどんな基質を用いても, この系では除去できる。このアッセイ系は, D群欠損因子検出には適さないが, D群の不可解な修復挙動とともにD群因子の核内での存在・作用のちがいが逆に示唆される。in vitro除去系という制限はあるが, 修復能力の低い

表4 正常およびXPクロマチンからの *in vitro* ダイマー除去

基 質 ^a (クロマチン, DNA)	粗抽出物 (mg/assay)	反応30分における ダイマー除去(%)
正常(NHSI-6, NHSF46)		
全細胞ソニケート	0.4-0.6	29-35
分離核ソニケート	0.5	36
クロマチン	0.4-0.6	28-40
抽出DNA	0.4-0.6	30-50
XP6KO(A)		
分離核ソニケート	0.4	0
分離クロマチン	0.4-1.2	3
部分脱蛋白クロマチン ^b	0.6	25
抽出DNA	0.5	30
XP2KA(C)		
分離クロマチン	0.4	0
部分脱蛋白クロマチン ^b	0.4	30
抽出DNA	0.4	38
XP2BI(G)		
分離クロマチン	0.5	0
部分脱蛋白クロマチン ^b	0.4-0.8	20-30
抽出DNA	0.4	30
XP6BE(D)		
分離クロマチン	0.5	20-28
部分脱蛋白クロマチン ^b	0.4	25
抽出DNA	0.4	30

a. 100 J/m² 照射した細胞から調整し, 5 μg DNA/assayの濃度を用いた。

b. 0.35 M食塩で非ヒストン・タンパクを除いたクロマチン。

A, C, D, G群ですら, UVエンドヌクレアーゼとエクソヌクレアーゼの両活性は存在するものと予想され, 図2に示すように非ヒストン分画関連XP因子(少くともA, C, G因子)はクロマチン制御因子として修復酵素の損傷部位接近やプロセッシングに関与すると考えたい現況である¹⁸⁻²⁰⁾。上記の基質特異的修復差もこの考えを支持する傍証ともなる。残念ながら, XP-A, G細胞へのDNA移入実験は

まだ十分に成功せず、上記仮説のクローン化遺伝子産物による実証には程遠い。

(3) CHO UV^S 変異株とXPとの比較

Thompson ら²¹⁾は 143 CHO UV^S mutants を分離し、雑種細胞生存率検定から 5 相補群を決定した。その特徴を表 5 にまとめてみた。UV 致死高受性 (D₀ 比で 3~8 倍だが、n=3~4 で耐容力はXPより大きい)で、hypermutable であり、元

表 5 CHO UV^S 修復欠損ミュータント (143 例) の相補群の特徴²¹⁾

相補群	代表株	分布		UV 生存パラメータ		MMC 感受性係数	AraC/HU 切断数の蓄積	UV 誘発突然変異
		変異体数	%	n	Do J/m ²			
1	UV-5	59	41	4	0.4	3.5	}<10% Hypermutable (10-fold)	
2	UV-20	76	53	4	0.4	100		
3	UV-24	5	~3	3	0.25	3.5		
4	UV-41	2	~1	3	0.25	100		
5	UV-135	1	<1	4	0.7	3.5		
Wild	AA8			1.8	2.0	1		

来低いPy⁺Py⁻修復(ヒトの20-30%)をさらに欠き、いずれも10%以下である。XP-A群はMMCにわずか高感受性であるが⁸⁾, CHO2, 4群は70~100倍MMC^{SS}を示し、XP+FAのような表現形質を示すので、XPとは解離する。Rubinら²²⁾のUV-20, UV-41 CHOにHeLa DNAを移入し、MMC選択で野生型UV抵抗性の多コピーヒトDNAをもつ転換株を得ている。極度に困難なXPへの移入に比し、この方面での刺激となっている。

3. Fanconi 貧血症 (FA) と鎖間クロスリンク修復

FA細胞は染色体不安定性とクロスリンク剤誘発の染色体異常に超高感受性を示す²³⁾。図4はFA細胞がMMC, TMP-NUV, cisPt(II), DEB(diepoxybutane)に致死高感受性であり、とくにMMC, DEBに超感受性であることを示す²⁴⁾。一方, XP-A細胞はTMP, cis-PtにFA様高感受性を示し(図4), FAとXP-Aとにおけるソラレン架橋の修復欠損²⁵⁾とよく符号する。FAとXP-Aを区別できる。

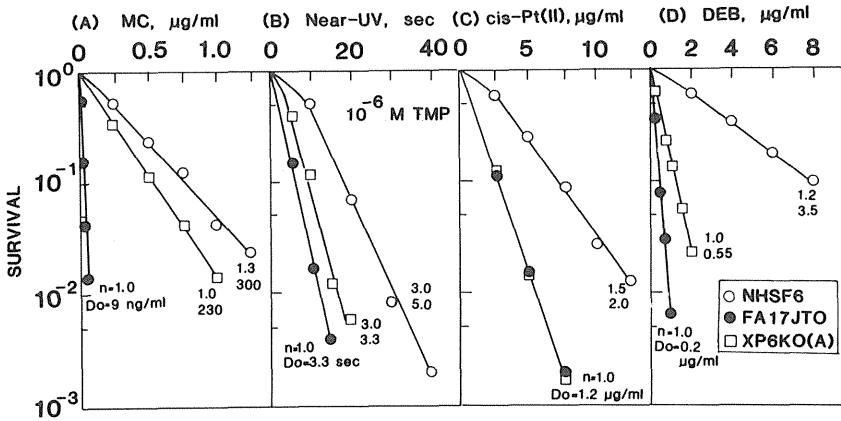


図4 FAとXP(A)のクロスリンク剤感受性

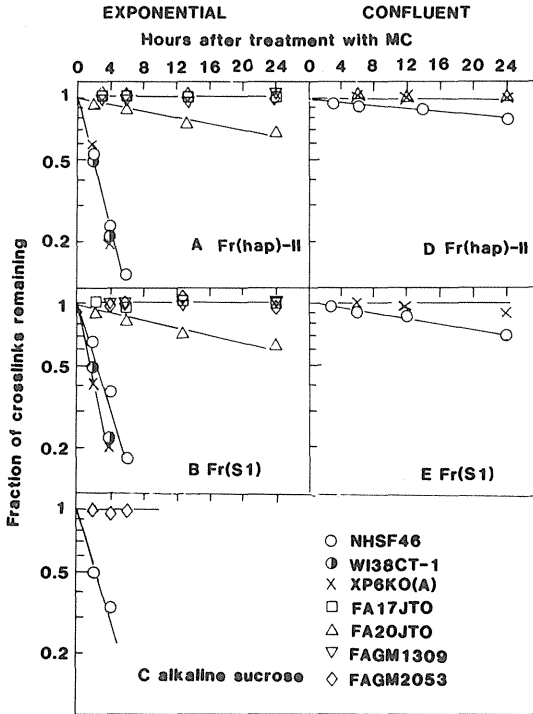


図5 MMC鎖間クロスリン第一段半切除

A, D: ハイドロキシアパタイト分析, B, D: S Iーヌク
 レアーゼ消化分析, C: アルカリ蔗糖遠心分析
 (詳細は文献26, 27参照)

CROSS-LINK REPAIR

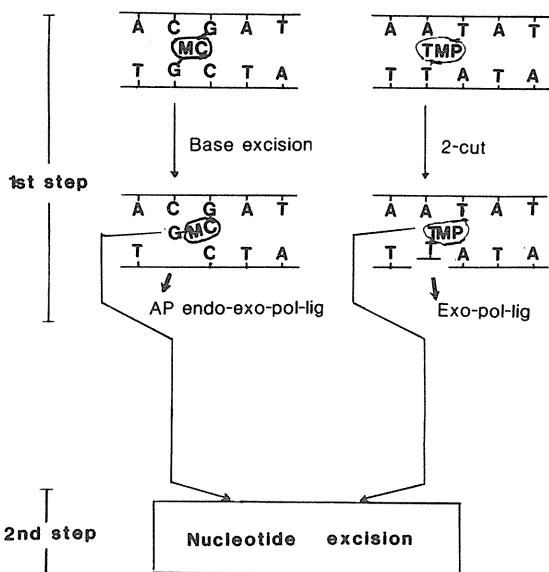


図6 クロスリンク修復の仮想モデル
(文献3のモデルを改良)

MMC^{26,27)} を用いると、FA細胞はMMC架橋の片腕の第一段半切除を完全に欠損するが、ヒト正常とXP-A細胞は2時間の半減期で速く修復する^{26,27)}(図5)。DMCモノ付加物をFAは修復し、XP-Aは欠損する²⁶⁾。一方、ソラレン架橋修復の半減期はMMC架橋修復半減期よりはるかに長く²⁵⁾、結合塩基と結合部位とともに、修復系や遺伝子産物の分子的関わりが大切と思われる。図5右半分に示すように、ヒト正常とXP-AでもコンフルエントGo期でMMC架橋半切除能を欠落し²⁷⁾、多分塩基切除型修復経路の関与が示唆される。

図6は以上の成績に基づき、クロスリンク2段修復の分子モデルを示したもので、第一段では基質のちがいに塩基切除もしくはヌクレオチド切除の機構が考え易

く、第二段では半切除付加物のヌクレオチド除去修復であろう。このような哺乳類機構は大腸菌 *uvr ABC* による第一段ヌクレオチド修復と第二段組換え修復と異なる。

4. ヒト細胞の複製耐容 (replicative tolerance)

(1) ヒト細胞での経損傷DNA複製

哺乳類細胞で bulky uncoding lesions のバイパスに関し、①translesion gap-filling, ②組換え修復, ③SOS-gap-filling, ④フォーク・鎖遊走バイパス, ⑤レプリコン融合, などの多くのモデルが出された。①-③は一応の実験傍証により考え難くなりつつある。④の新生鎖遊走モデルも HH-DNA が人工産物である可能性も強いが²⁸⁾, 損傷部位での複製ブロックの中間体の存在 (図8参照) を示唆し、とくに XP variant では HH-DNA が常塩濃度 DNA 抽出下でより多いので、ブロック中間体の特長的不安定性のあることを示唆している¹⁷⁾。

図7はレプリコンあたり平均2-4個のダイマーを作るUV線量照射直後に10

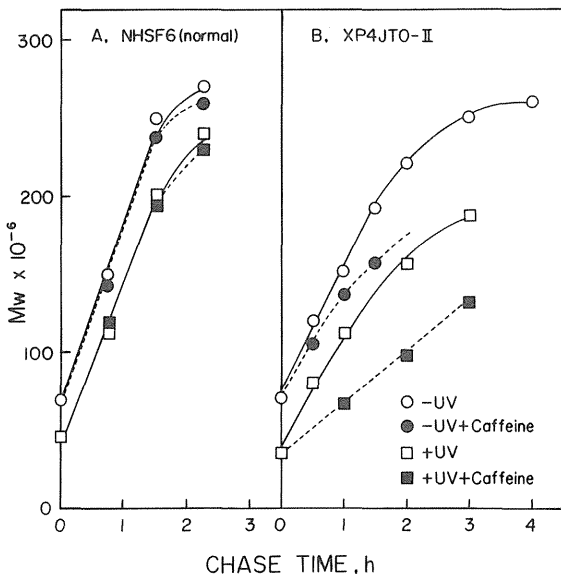
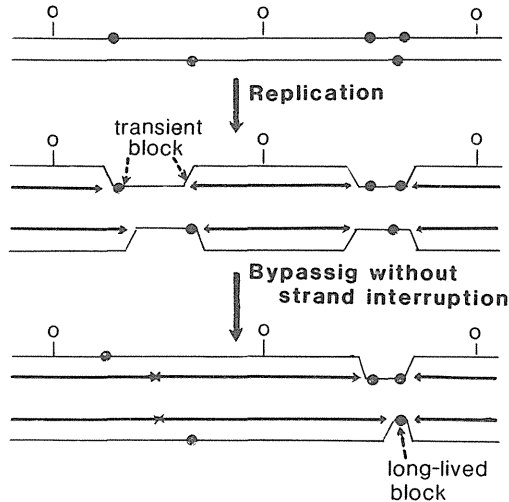


図7 正常およびXP variant (XP4J TO-II) のUV照射後のアルカリ黄糖遠心による分子量増加 (文献5より)

— 15分パルスラベルした分子量と Chase 時間による分子量増加（鎖伸長と数レプリコンの融合）を示している。正常NHSF6細胞（図7A）とXP-A（図示なし）ではパルス直後の一時的複製ブロック（ < 15 分）のため分子量は非照射に比し小さく， chase 時間とともに平行して分子量は増加するので鎖伸長とレプリコン融合は損傷によって障害をうけないし， 1 mM カフェインも効果はない^{3,5,29}。XP variant 細胞（図7B）では初期ブロックが大きく， ダイマー間分子量が直後に見られるが， chase 時間とともに平行増加し， より低い飽和分子量でとまる^{5,29}。したがって， いわゆる複製後修復における娘鎖ギャップの生成とその修復ではなく， transdimer 合成が一過性の初期ブロックののち， 以外に早く正常に進み， レプリコン融合をする。XP variant ではテンプレート損傷は正常細胞よりもより効果的

TRANS-LESION SYNTHESIS IN HUMAN CELLS

(1) Early time bypassing



(2) Later time bypassing

No block: norml-sized DNA

図8 ヒト細胞での経損傷複製耐容モデル

複製ブロックをおこし、caffeine は部分的に long-lived block をおこす^{5,29)} (図7B)と解釈される。

以上の結果より、ヒト細胞での経損傷複製耐容のモデルを図8に示した。これはわれわれの現在までの成果を再整理して得たものである。複製開始はレプリゾームで多点的に共通制御下でおこる。照射直後より2時間までの初期では開始されていたレプリコンは2方向性に鎖伸長し、最初のダイマー部位で一過性ブロック(<15分)を受け、複製ブロック中間体が生じる。その後娘鎖ギャップを残さず経損傷複製をし、レプリコン融合で耐える。照射後長時間では一過性ブロックもおこらない。最近、pol α 、pol β を用い、制限酵素断片をプライマーとする in vitro $\phi\times 174$ 複製系でも uncoding lesion (Py $\hat{\wedge}$ Py, AP 部位) でかなり効果的のブロックが損傷塩基1つ手前でおこり、relax 条件である確率のエラーを伴いながら、経損傷合成をすることが報告されている^{30,31)}。図7に示したように、細胞複製ドメインでは、in vitro と異り、translesion 合成はもっと効率よくスムーズにおこると考えられる。long-lived block は多分レプリコン融合ができないような複雑損傷が近位に存在したり、不安定複製中間体をもつ XP variant では caffeine によって可視化されるであろう。

(2) SOS型誘導修復は?

SV40, HSV-1 などのウイルス・プローブの高moi感染下で、生存率と突然変異の平行上昇が見られ、W回復が示唆されていた。しかし最近、極低moi感染でクリティカルに検討された結果、突然変異の誘導性上昇はおこらないこと、また生存率上昇はSV40などのウイルスゲノムの損傷誘発の組換えによることが報告され³²⁾、原核SOS機構とは解離しているようである。損傷による哺乳類細胞突然変異に相互作用のないこと、プロテアーゼ阻害剤も無効果であることも傍証である。突然変異性エラーは多分経損傷複製に基因するか、または染色体異常(欠損、組換え)によっておこるのかもしれない。

謝 辞

本研究は文部省科学研究費の援助によって遂行された。

参 考 文 献

- 1) Cleaver, J. E., DNA repair and its coupling to DNA replication in Eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 516 : 489 - 516, 1978.
- 2) Friedberg, E. C., Ehmann, U. K., Williams, J. I., Human diseases associated with defective DNA repair. *Adv. Rad. Biol.*, 8 : 85-174, 1979.
- 3) 藤原美定, 高等動物細胞における DNA 修復機構, 変異原と毒性, 4 : 57-71, 1981.
- 4) Park, S. D., Cleaver, J. E., Recovery of DNA synthesis after ultraviolet irradiation of xeroderma pigmentosum cells depends on excision repair and is blocked by caffeine. *Nucleic Acids Res.*, 6 : 1151-1159, 1979.
- 5) Fujiwara, Y., Satoh, Y., Age-dependent changes in fibroblast cultures from a xeroderma pigmentosum variant. *J. Invest. Dermatol.*, 76 : 215-220, 1981.
- 6) Zelle, B., Berends, F., Lohman, P. H. M., Repair of ultraviolet radiation damage in xeroderma pigmentosum cell strains of complementation groups E and F. *Mutat. Res.*, 73 : 157-169, 1980.
- 7) Hayakawa, H., Ishizaki, K., Inoue, M., Yagi, T., Segiguchi, M., Takebe, H., Repair of ultraviolet radiation damage in xeroderma pigmentosum cells belonging to complementation group F. *Mutation Res.*, 80 : 381-388, 1981.
- 8) Fujiwara, Y., Kano, Y., Paul, P., Goto, K., Yamamoto, K., Miyazaki, N., Excision and crosslink repair of DNA and sister chromatid exchange in cultured human fibroblasts with different repair capacities. *Gann Monogr. Cancer Res.*, 27 : 33 - 44, 1981.

- 9) Clarkson, J. M., Mitchell, D. L., Adair, G. M., The use of an immunological probe to measure the kinetics of DNA repair in normal and UV-sensitive mammalian cells. *Mutat. Res.*, 112 : 287-299, 1983.
- 10) Fujiwara, Y., Goto, K., Yamamoto, K., Ichihashi, M., Roles of poly (ADP-ribose) synthesis in repair and replication in normal human, Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum fibroblasts after UV irradiation, In : ADP-ribosylation, DNA repair and Cancer (eds., M. Miwa et al), Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo, pp. 209-218, 1983.
- 11) Kennedy, A. R., Cairns, J., Little, J. B., Timing of the steps in transformation of C3H 10T1/2 cells by X-irradiation. *Nature*, 307 : 85-86, 1984.
- 12) Cleaver, J. E., Completions of excision repair patches in human cell preparations : Identification of a probable mode of excision and resynthesis. In press.
- 13) Sancar, A., Rupp, W. D., A novel repair enzyme : uvrABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell*, 33 : 249-260, 1983.
- 14) Ikenaga, M., Takebe, H., Ishii, Y., Excision repair of DNA base damage in human cells treated with the chemical carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide. *Mutat. Res.*, 43 : 415-427, 1977.
- 15) Zelle, B., Bootsma, D., repair of DNA damage after exposure to 4-nitroquinoline-1-oxide in heterokaryons derived from xeroderma pigmentosum cells. *Mutat. Res.*, 70 : 373-381, 1980.
- 16) Cleaver, J. E., Gruenert, D. C., Repair of psoralen adducts in human DNA : Differences among xeroderma pigmentosum complementation groups. In Press.
- 17) Fujiwara, Y., Replicative repair in xeroderma pigmentosum variants. In : DNA Repair Mechanisms (eds. Friedberg et al.)

Acad. Press, New York, pp. 519-522, 1978.

- 18) Mortelmans, K., Friedberg, E. C., Slor, H., Thomas, G., Cleaver, J. E., Defective thymine dimer excision by cell-free extracts of xeroderma pigmentosum cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 73 : 2757-2761, 1976.
- 19) Fujiwara, Y., Kano, Y., Characteristics of thymine dimer excision from xeroderma pigmentosum chromatin, In : Cellular Responses to DNA Damage (eds., Friedberg, E. C., Bridges, B. A.), Alan R. Liss Inc., New York, pp. 215-224, 1983.
- 20) Kano, Y. Fujiwara, Y., Defective thymine dimer excision from xeroderma pigmentosum chromatin and its characteristic catalysis by cell-free extracts. Carcinogenesis, 4 : 1419-1424, 1983.
- 21) Thompson, L. H., Busch, D. B., Brookman, K., Mooney, C. L. Glacer, D. A., Genetic diversity of UV-sensitive DNA repair mutants of Chinese hamster ovary cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78 : 3734-3737, 1981.
- 22) Rubin, J. S., Joyner, A. L., Bernstein, A., Whitmore, G. F., DNA mediated gene transfer of a human DNA repair gene(s) into DNA repair deficient CHO cells. In : Cellular Responses to DNA Damage (eds. Friedberg, E. C., Bridges, B. A.), Alan R. Liss. Inc., New York, pp. 615-624, 1983.
- 23) Sasaki, M. S., Fanconi's anemia : a condition possibly associated with a defective DNA repair. In : DNA Repair Mechanisms (eds. Friedberg, et al), Acad. Press., New York, pp. 675-684, 1978.
- 24) Fujiwara, Y., Kano, Y., Yamamoto, Y., DNA interstrand cross-linking, repair, and SCE mechanism in human cells in special reference to Fanconi's anemia. In : Sister Chromatid Exchange (eds., Tice, R. R., Hollander, H.) Plenum Press,

New York, In press.

- 25) Gruenert, D. C., Cleaver, J. E., Repair of photoactivated 8-methoxypsoralen damage in human cells. Proc. 7th Int. Congr. Rad. Res., vol. B, B2-14, 1983.
- 26) Fujiwara, Y., Tatsumi, M., Sasaki, M. S., Cross-link repair in human cells and its possible defect in Fanconi's anemia cells. J. Mol. Biol., 113 : 634-649, 1977.
- 27) Fujiwara, Y., Defective repair of mitomycin C crosslinks in Fanoni's anemia and loss in confluent normal human and xeroderma pigmentosum cells. Biochim. Biophys. Acta, 699 : 217-225, 1982.
- 28) Tatsumi, K., Strauss, B., Production of DNA bifurcally substituted with deoxyuridine in the first round of synthesis : brnach migration during isolation of cellular DNA. Nucl. Acids Res., 6 : 331-347, 1978.
- 29) Park, S. D., Cleaver, J. E., Postreplication repair : Questions of its difinition and possble alterations in xeroderma pigmentosum cell strains. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76 : 3927 - 3931, 1979.
- 30) Moore, P. D., Bose, K. K., Rabkin, S. D., Strauss, B. S., Sites of termination of in vitro DNA synthesis on ultraviolet- and N-acetylaminofluorene-treated ϕ X174 templates by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78 : 110-114, 1981.
- 31) Kunkel, T. A., Schaaper, R. M., Loeb, L. A., Depurination-induced infidelity of DNA synthesis with purified DNA replication proteins in vitro. Biochemistry, 22 : 2378-2384, 1983.
- 32) Gentil, A., Margot, A., Sarasin, A., Effect of UV irradiation on genetic recombination of simian vittvirus 40 mutants. In : Cellular Responses to DNA Damage (eds., Frieberg, E. C., Bridges, B. A), Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 385-396, 1983.

III-4

修復遺伝子のマッピング

堀 雅 明*

はじめに

色素性乾皮症(XP)などの高発がん性遺伝疾患の研究から，細胞のDNA損傷に対する修復能が突然変異の生成および発がんと密接に関連していることが示唆されている。我々の研究室ではDNA修復に関与するヒト遺伝子の同定を目的として，マウス細胞より分離された突然変異原高感受性変異株を用いて，そのDNA修復欠損を補償するヒト遺伝子の染色体マッピングを試みている。ここでは紫外線(UV)感受性に関与する修復遺伝子の染色体マッピングの例を報告する。

マウス細胞(L5178Y)より分離されたUV高感受性突然変異株には現在までに4種類の相補性群が確認されている¹⁾。相補性群Iに属するQ31変異株²⁾はUV誘発DNA損傷の除去修復能をほぼ完全に欠損した劣性変異株である³⁾。このマウス細胞の劣性変異を補償するヒト遺伝子を検索するために，正常ヒト末梢血リンパ球とQ31細胞との体細胞雑種を細胞融合法によって作成し，ヒト染色体の特異的脱落に伴う紫外線感受性の分離を検討して補償性を担っている特定のヒト染色体を同定した⁴⁾。

1. 実験材料および方法

(1) 細胞融合

紫外線高感受性変異株Q31の6-チオグアニン(TG)耐性株Q31TG3と48時間培養のヒト末梢血リンパ球との細胞融合をポリエチレン・グリコール(PEG, 4000MW)法で行った。融合後直ちに細胞を培養用シャーレにプレートし，24時間培養後にHAT(100 μ Mヒポキサンチン/10 μ Mアメンズプリン/40 μ Mチミ

*放射線医学総合研究所 遺伝研究部

ジン)培地に移して3日間培養した。その後、HT(100 μ Mヒポキサンチン/40 μ Mチミジン)を含む5%寒天培地にプレートして雑種細胞のクローンを分離した。

(2) UV感受性の検定

① 質的検定

寒天培地上で生育した多数のクローンについて、それぞれ単一クローンの細胞浮遊液を2枚の寒天培地上に一層の細胞集団のレプリカとしてスポットし、一方のプレートにUV(4J/m², 0.4J/m²/sec)照射を行った。4~6日後、UV感受性の質的検定をして感受性と抵抗性のクローンをもう片方の非照射の寒天培地から分離した。

② 量的検定

UV感受性を生存曲線で量的に検定する際には、100~2000細胞を培養用シャーレ(60mm)の中央部に拡散させて2~12J/m²のUV照射を行い、コロニー形成能を算定した。

(3) オートラジオグラフィーによる不定期DNA合成(UDS)の検定

対数増殖期の細胞をUV(30J/m², 0.4J/m²/sec)で照射し、[³H]-チミジン(12.5 μ Ci/ml, 20Ci/m-mole)を含むEagle's MEMで3時間標識した。標識後細胞を低調液処理をし、メタノール/氷酢酸(3:1, V/V)で固定した後スライドガラス上に塗沫した。標本を冷5%TCAで処理した後、NRM2乳剤でコートした。暗箱内(4 $^{\circ}$ C)で4~7日間露光させた後、現像、定着して3%ギムザ液で細胞核を染色した。UDSの検定は銀粒子密度の低いS期以外の細胞核について、細胞当りの平均銀粒子数を算定することによって行った。

(4) 核型分析

マウス-ヒト雑種細胞の核型分析は、先ずアルカリ・ギムザ(Giemsa-11)染色法を用いてヒト染色体数と転座の有無を調べ、その後通常のG-バンド法により個々のヒト染色体を同定した。

(5) エステラーゼD活性の検出

細胞粗抽出液を澱粉ゲル(12%, 15×24 cm平板)中で電気泳動(リン酸緩衝液 pH 5.9, 4.5 V/cm, 1 8時間)し, 基質 4-methyl-umbelliferyl acetate と反応させた後, エステラーゼD活性の存在をUV照射による蛍光発色で検出した。

2. 実験結果と考察

(1) 雑種細胞のクローニングとUV感受性の分離の検定

最初に得られたHAT耐性の雑種細胞25株を検定したところ, 23株がUV抵抗性であった。その中から2株(HLQ3-1とHLQ3-2)を分離して, そのUV感受性を調べたところ図1 aに示すように野生株と同程度の生存曲線が得られた。これらの株は4倍体域のマウス染色体と7~16のヒト染色体をもっていた。このことはヒトのゲノムがマウス-ヒト雑種細胞でQ31の劣性のUV感受性変異を補償していることを示唆している。マウス-ヒト雑種細胞でのヒト染色体の消失に伴うUV感受性の分離を検定して, この補償性を担っている特定のヒト染色体を同定する目的でこれらの株からさらに分離検定をしてクローニングを続けた(表1)。表1に示すようにTG耐性の雑種細胞株もUV抵抗性を示している。このことは, この

表1 紫外線感受性に関する分離の検定

期	細胞	検定したクローン の数の数	HAT-または TG-耐性*	分離クローン数 ⁺	
				UV ^r	UV ^s
I	HLQ3-1	60	HAT ^r	58	2
		57	TG ^r	56	1
	HLQ3-2	60	HAT ^r	35	25
		79	TG ^r	40	39
II	HLQ3-1-1	150	TG ^r	25	125
	HLQ3-2-1	120	TG ^r	47	73
III	1R3	132	TG ^r	127	5
	1R5	260	TG ^r	258	2
	2R5	180	TG ^r	178	2
IV	1R5-R1	240	TG ^r	239	1

*, HAT^r, HAT-耐性; TG^r, TG-耐性 +, UV^r, UV-抵抗性
UV^s, UV-感受性

補償性にヒトのX染色体が関与していないことを示している。変異株Q31と野生株L5178Yとのマウス-マウス雑種細胞でもマウスのX染色体の関与は否定されている⁵⁾。第3期以後ではUV感受性株の分離頻度が低下している。これらの安定した時期で分離した13系統について以下の解析を行った。

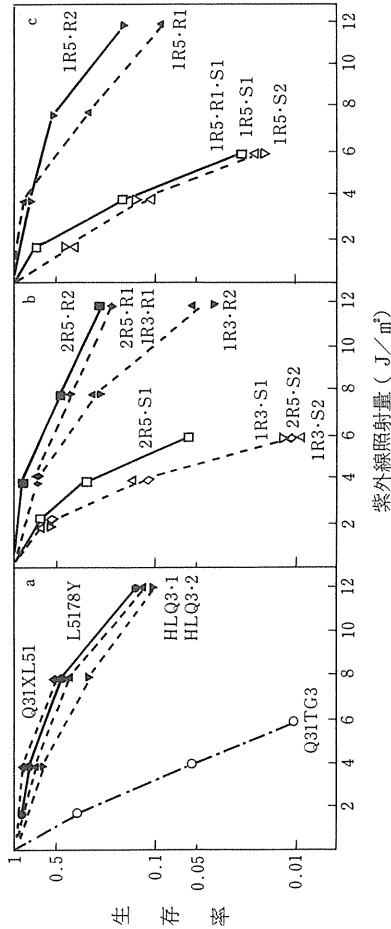


図1 紫外線照射に対する生存率曲線

(2) 雑種細胞のUV感受性の検討

UV感受性を質的検定 (4 J/m^2) で判定してクローニングしたそれぞれの感受性株と抵抗性株について、種々のUV線量 ($2 \sim 12 \text{ J/m}^2$) での生存率を比較した。図1b, cに示すように感受性の差は明らかで、質的検定の忠実性が示されている。抵抗性雑種株は野生株に、感受性雑種株はQ31にそれぞれ似かよった生存曲線を示している。Q31変異株はUV照射によって誘発される染色体異常に関しても高い感受性を示すことが知られているが⁶⁾、マウスーヒト雑種細胞の抵抗性と感受性株の間にも明らかな誘発染色体異常頻度の差がみられた(データは省略)。

表2 紫外線照射 (30 J/m^2) によって誘発された不定期DNA合成

細胞	細胞核当りの平均銀粒子数		
	UV-非照射	UV-照射	UV誘発*
UV-抵抗性			
Human lymphocytes	8.2 (1.2)	48.1 (1.2)	39.9
L5178Y	10.4 (1.5)	23.9 (1.2)	13.5
HLQ3-1	12.9 (1.8)	50.3 (1.5)	37.4
1R5-R1	11.2 (1.6)	52.8 (1.3)	41.6
UV-感受性			
Q31TG3	10.4 (1.5)	10.4 (0.4)	0.0
Q31(4X) ⁺	15.0 (2.1)	14.5 (0.6)	-0.5
1R5-R1-S1	9.3 (1.3)	11.2 (0.5)	1.9

*, UV誘発による増加分 +, Q31の4倍体細胞

(3) 除去修復能の検定

雑種細胞でみられたUV感受性の補償が除去修復能の回復によるかどうかを検討するため、UDS活性をオートラジオグラフィ法で調べた。表2に示すように感受性株ではUDS活性がほとんど検出されないが、抵抗性株ではその回復がみられた。ヒトの除去修復能がマウスーヒト雑種細胞で機能していることが示唆された。

(4) 雑種細胞の核型分析によるassignment検定

除去修復能の回復に伴うUV感受性の補償に関与しているヒト染色体を同定する

表3 核型分析による assignment 検定とエステララーゼD遺伝子座との synteny 検定の結果

細胞	検定した細胞数	特定のヒト染色体を含む細胞の頻度(%)										
		5	8	10	11	12	13	14	19	21	その他	
UV-抵抗性												
1R3-R1	18	0	0	0	0	0	100	83.3	88.9	100	0	
1R3-R2	25	0	28.0	0	0	0	80.0	72.0	48.0	100	0	
1R5-R1	25	0	92.0	0	0	0	100	96.0	100	92.0	0	
2R5-R1	22	90.9	0	95.5	100	95.5	95.5	95.5	86.4	95.5	0	
2R5-R2	16	100	0	92.8	100	87.5	100	100	100	93.8	0	
UV-感受性												
1R3-S1	25	0	12.0	0	0	0	0	88.0	88.0	100	0	
1R3-S2	22	0	0	0	0	0	0	90.9	86.4	100	0	
1R5-S1	25	0	92.0	0	0	0	0	100	96.0	96.0	0	
1R5-S2	25	0	100	0	0	0	0	88.0	92.0*	88.0	0	
1R5-R1-S1	25	0	96.0	0	0	0	0	100	96.0	0	0	
2R5-S1	20	95.0	0	95.0	100	100	0	100	100	95.0	0	
2R5-S2	15	100	0	100	100	93.3	0	93.3	93.3	100	0	
一致		R/+***	2	2	2	2	2	5(10)**	5	5	0	
		S/-	5	3	5	5	7(12)	0	0	0	5	
不一致		R/-	3	3	3	3	0(0)	7	7	7	7	
		S/+	2	4	2	2	2	0(0)	0	0	0	
%不一致			41.7	58.3	41.7	41.7	41.7	0	58.3	58.3	58.3	

*, 第19染色体がマウス染色体の動原体部に転座。

**, エステララーゼD活性との synteny 検定の結果が含まれている。

***, R, UV-抵抗性; S, UV-感受性; +と-, 特定のヒト染色体またはエステララーゼD活性の存否。

ために、抵抗性株と感受性株の核型分析をGiemsa-II法とG-バンド法を用いて行った。表3の上段にその結果が示されている。UV感受性の差がヒトの13番染色体の存否に依存しているのが明らかである。

(5) エステラーゼD遺伝子座との **synteny** 検定

assignment 検定の結果をさらに確認するために、ヒトの13番染色体上にその遺伝子座位がすでに決定されているエステラーゼDに注目して **synteny** 検定を行った。細胞融合に用いた末梢血リンパ球の供与者遺伝子型はEsD₂₋₁であった。マウスのエステラーゼD活性はヒトとは明瞭に区別できる。雑種細胞ではマウス酵素分子とヒト酵素分子間の雑種酵素の活性が明瞭に検出された。まず assignment 検定に使用した6系統を用いて検定したところUV感受性の差、13番染色体の存否、とヒトのエステラーゼD活性の有無の間に、完全な一致がみられることを確認した。さらに独立に分離した他の10株（抵抗性5株、感受性5株、ただし染色体構成は未決定）のエステラーゼD活性を調べたところ同様の結果が得られた。表3の下段にこれらの **synteny** 検定の結果を加えてヒト13番染色体とUV感受性の一致、不一致の関係が示されている。これらの結果からUV高感受性変異株Q31の劣性形質（除去修復能欠損）をマウス-ヒト雑種細胞で補償しているヒト遺伝子は、13番染色体に座位していると結論された。

おわりに

細胞の紫外線感受性は遺伝子の支配を受けており、その遺伝子は種々の生物種で共通の働きをしていると考えられる。ここではマウス細胞の除去修復欠損変異を補償する遺伝子がヒトの第13番染色体上に存在することを示した。今後、マウス細胞での各相補性群とヒトのXP細胞の各相補性群との遺伝的類似性を明らかにし、DNA損傷の修復機構に関する生物種差の知見を得ることは遺伝障害のリスク推定に不可欠の外挿過程に重要な資料となる。

参 考 文 献

- 1) Shiomi, T., Hieda-Shiomi, N., and Sato, K. : Isolation of UV-sensitive mutants of mouse L5178Y cells by a cell suspension spotting method. *Somat. Cell Genet.*, 8 : 329-345, 1980.
- 2) Sato, K., and Hieda, N. : Isolation of a mammalian cell mutant sensitive to 4-nitroquinoline-1-oxide. *Int. J. Radiat. Biol.*, 35 : 83-87, 1979.
- 3) Sato, K., and Setlow, R. B. : DNA repair in a UV-sensitive mutant of a mouse cell line. *Mutat. Res.*, 84 : 443-455, 1982.
- 4) Hori, T., Shiomi, T. and Sato, K. : Human chromosome 13 compensates a DNA repair defect in UV-sensitive mouse cells by mouse-human cell hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 5655-5659, 1983.
- 5) Shiomi, T., Hieda-Shiomi, N., and Sato, K. : Studies on three mutagen-sensitive mutants of mouse L5178Y cells. I. Characterization of the hybrids between L5178Y and mutagen-sensitive mutants. *Mutat. Res.*, 95 : 313-325, 1982.
- 6) Takahashi, E., Shiomi, T., Sato, K., and Tobar, I. : Chromosomal hypersensitivity in mutant M10 and Q31 mouse cells exposed to ultraviolet radiation (UV) and 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO). *Mutat. Res.*, 109 : 207-217, 1983.

III-5

X線感受性変異細胞における 奇妙なカフェインによる蘇生現象

内海博司*

はじめに

コーヒーとか茶の主成分として知られるカフェインは古くから修復機構を阻害する薬剤として，その作用機構は不明のまま，細菌から哺乳動物細胞にいたる種々の修復機構の研究に使用されてきた^{1,2)}。最近，筆者らの分離したX線感受性変異細胞（チャイニーズハムスターV79細胞由来）³⁾は，X線による細胞死がカフェインによって増感されずに，逆に蘇生されるという奇妙な現象を示した^{4,5)}。この奇妙なカフェインによる蘇生現象の研究を通じて，正常細胞では常に発現している修復機構の一つが変異細胞では制御遺伝子の何らかの変異で発現が抑制されており放射線感受性になっているが，この抑制がカフェインではずれ，その修復機構（組換え修復と思われる）が誘導されてくるため，放射線抵抗性になることが明らかになってきた。

1. カフェインによる蘇生現象

正常なチャイニーズハムスターV79細胞やCHO細胞，マウスのL5178Y細胞やL細胞，ヒトのHeLa細胞などは，X線照射後カフェイン添加で濃度に依存して増感されることが知られている（図1）。しかし，この変異細胞（V79-AL162/S-10）では低濃度のカフェインで生存率が上昇した（蘇生現象）（図2）。ただし高濃度では正常細胞と同じく増感された。興味あることには，最高に生存率が上昇しても正常親細胞の生存率までしか抵抗性にならなかったことと，X線照射前にカフェイン処理をした場合にも少し抵抗性になったことである。この蘇生現象は，変異細胞では発現していないが正常親細胞では発現している放射線抵抗性にする何ら

* 京都大学 放射線生物研究センター

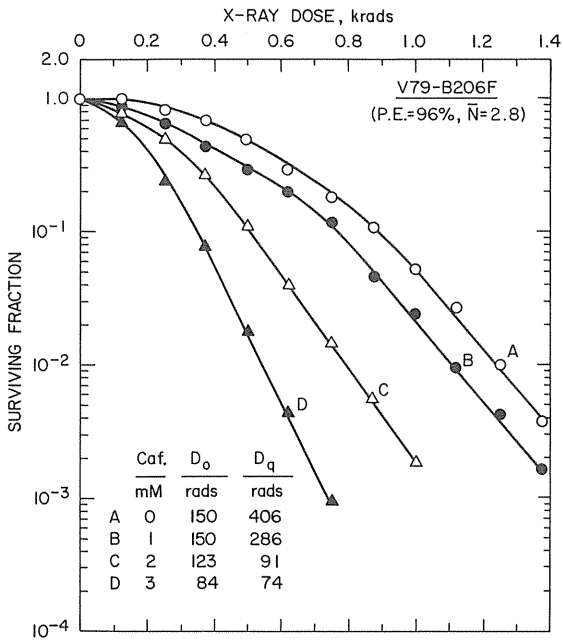


図1 正常V79細胞のX線生存率に及ぼすカフェインの影響

X線照射直後からコロニー形成期間中(7~10日間), カフェインは添加されたままで, その間培養液(α-最少培地, 10%ウシ胎児血清)の交換はない。方法の詳細は文献5)を参照。

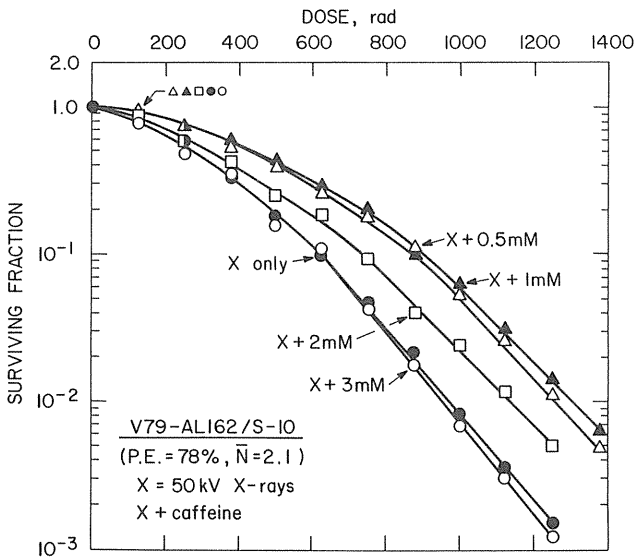


図2 変異細胞(V79-AL162/S-10)のX線生存率に及ぼすカフェインの影響

かの機構がカフェインで誘導されるためではないかと考えられた。そこで蘇生現象に対する蛋白質合成阻害剤（シクロヘキシミド、ピュロマイシン等）の影響を検討した。阻害剤はカフェインによる蘇生現象を完全に消失させた。但し DNA 合成阻害剤（過剰チミジン、アフディコリン等）では蘇生現象は阻害されず、これが誘導現象であることが明らかにされた。

2. DNA 鎖間架橋修復とカフェインの蘇生現象

DNA 損傷をつくる種々の物理化学的作用原（中性子線、紫外線、メチルメタンスルホン酸、マイトマイシンC等）について、その感受性とカフェインの蘇生現象との関連について検討した。その結果、特にマイトマイシンC等の DNA 鎖間架橋

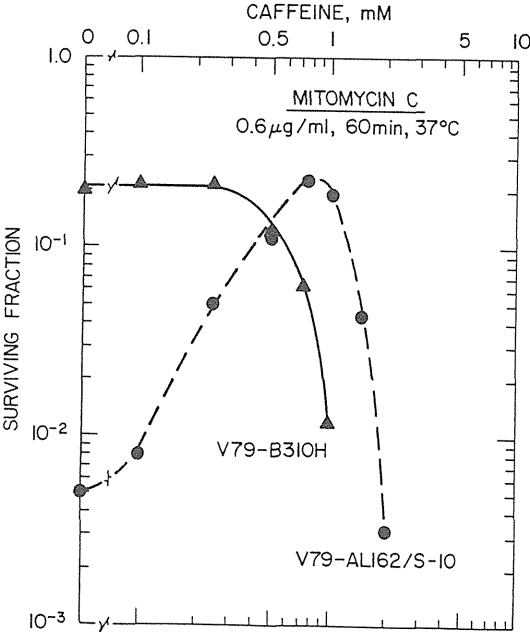


図3 正常および変異細胞のマイトマイシンC生存率に及ぼすカフェインの蘇生効果

マイトマイシンC (MMC) は、 $0.6 \mu\text{g/ml}$ で1週間処理した。カフェインはコロニー形成期間中入れたままである。

剤に対して高感受性で、且つカフェインの後処理によって正常細胞の生存率まで生き返る高い蘇生現象（図3）が示された。

お わ り に

DNA鎖間架橋修復に関して、原核細胞では除去修復と組換え修復の2段階修復であることがよく知られているが⁶⁾、哺乳動物細胞ではいまだにその機構は明らかではない。筆者らはカフェインが組換え修復を高めるといふ報告^{7,8)}などから、カフェインが修復機構を誘導するとすれば組換え修復がもっとも可能性の高いものと考えており、この奇妙な変異細胞が示すカフェインの蘇生現象はすなわち哺乳動物細胞のDNA鎖間架橋修復に組換え修復の段階が存在することの反映ではないかと考えている。

参 考 文 献

- 1) Kihlman, B. A. (ed): Caffeine and Chromosomes, Elsevier, Amsterdam (1977).
- 2) Timson, J, Caffeine. Mutation Res., 47, 1-52, (1977).
- 3) Utsumi, H., Hill, C. K., Ben-Hur, E., and Elkind, M. M., "Single-hit" potentially lethal damage: Evidence of its repair in mammalian cells. Radiat. Res., 87, 576-591, (1981).
- 4) 内海博司: 蛋白質・核酸・酵素, X線感受性変異株: カフェインは修復機構を誘導するか? 27, 2000-2011, (1982).
- 5) Utsumi, H. and Elkind, M. M., Caffeine-enhanced survival of radiation-sensitive, repair-deficient Chinese hamster cells. Radiat. Res. 96, 348-358, (1983).
Cole, K. S., Levitan, D. and Sinden, R. R., Removal of psoralen interstrand cross-links from DNA of Escherichia coli: Mechanism and genetic control, J. Mol. Biol., 103, 39-59, (1976).

- 7) Holliday, R., Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genet. Res., Camb.*, 2, 231-248, (1961).
- 8) Rosen, H., Rehn, M. M., and Johnson, B. A., The effect of caffeine on repair in *Chlamydomonas reinhardtii* I. Enhancement of recombination repair. *Mutation Res.*, 70, 301-309, (1980).

III-6 マウス白血病細胞(L5178Y)の マイトマイシンC高感受性変異株の性質 ならびにファンコニー貧血症細胞との比較

稲葉浩子* 塩見尚子*
塩見忠博* 佐藤弘毅*
吉田迪弘**

はじめに

ヒトの高発がん性遺伝疾患のひとつであるファンコニー貧血症¹⁾(FA)患者細胞は、マイトマイシンC(MMC)などのDNA鎖間に架橋を与える薬剤(要因)に極めて高い致死感受性を示し、染色体異常も高発されることから²⁾、DNA鎖間架橋の修復欠損を持つ遺伝病であると考えられている。FA細胞は、1価のアルキル化剤やX線、紫外線(UV)に対しては正常感受性を示すので、ヒト正常細胞では、大腸菌におけるDNA鎖間架橋の修復機構(除去修復—組換修復)³⁾⁴⁾とは異った哺乳類細胞特有の修復機構が働いていると考えられる。

我々は、哺乳類細胞におけるDNA架橋の修復過程の遺伝的支配を解明し、FA細胞の本質を知ることがを目的として、マウス白血病細胞よりMMC高感受性変異株(MC^S)を多数分離し、解析を行なったのでそれらについて概略する。

1. 高感受性株の分離と遺伝的相補群⁵⁾

L5178Y細胞をN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(1~1.5 $\mu\text{g/ml}$)、または、エチルメタンスルホン酸(400 $\mu\text{g/ml}$)で処理し、数日間液体培地中で形質発現させた後コロニーを形成させ、MMC(50 ng/ml)を含む寒天平板培地と含まないものと同じ位置に移して増殖を比較する(レプリカプレート法)。約2万のコロニーより安定なMMC感受性を示す26株を分離した。このうち25株はMMCに対して高感受性(D₃₇値で5~10倍)であり、UVならびにX線に正常感受性を示す類似した変異株であった。図1に独立実験より得られた5株の

* 放射線医学総合研究所・遺伝研究部

** 北大・理・染色体研

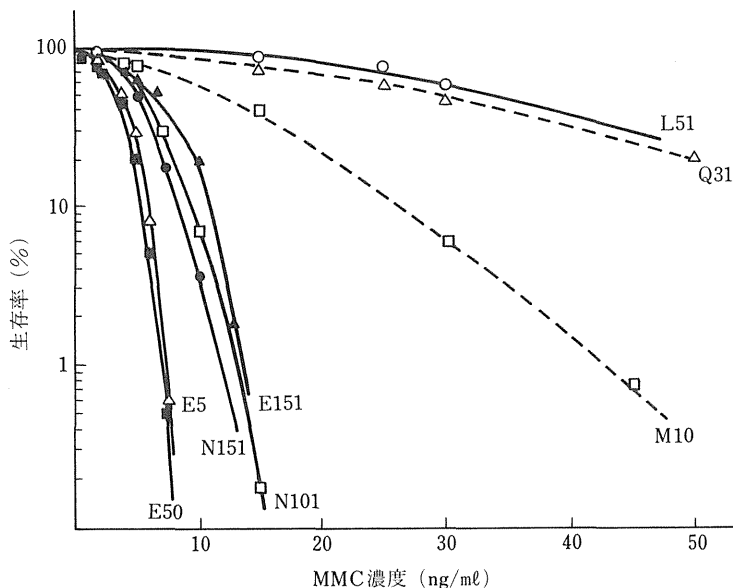


図1. マイトマイシンC (MMC) に対する致死感受性種々の濃度のMMCを含む軟寒天平板培地中での生存率を示す。

○: L51 (親株), △: Q31, □: M10, ▲: MCE151,
 □: MCN101, ●: MCN151, △: MCE5, ■: MCE50

MMCに対する生存曲線を示す。5株は感受性の上からほぼ二つの群に分かれるが、これらの遺伝的相補性を明らかにするために、それぞれの株より、6-チオグアニン抵抗性株 (TG^r) と5-ブロモ-2'-デオキシウリジン抵抗性株 (BU^r) を分離し、ポリエチレングリコールにより細胞融合を行ない、雑種細胞のMMC感受性を調べた。表1に示すように5株は二つの相補群に分かれた。すなわち、I群 (MC^S-I) として、MCE151, MCN151およびMCN101, II群 (MC^S-II) としてMCE5, MCE50とに分けられ、生存曲線による群と一致した (E5と MC^S-I との組み合わせはすべて不完全であるが、この株の特殊性と思われる)。この結果は、MMC高感受性は劣性形質であり、MMC感受性を支配する遺伝子は

表 1. マイトマイシン感受性変異株の相補性テスト

		TG ^r 株				
		MCN101	MCN151	MCE151	MCE5	MCE50
BU ^r 株	MCN101	—				
	MCN151	—	—			
	MCE151	—	—	—		
	MCE5	±	±	±	—	
	MCE50	+	+	+	—	—

+ : 相補性, — : 非相補性, ± : 不完全相補性

表 2. マイトマイシン感受性変異株の DNA 障害要因に対する致死感受性

細胞株	相補性 グループ	DNA 障害要因					
		MMC	DCMMC	MMS	4NQO	UV	X-ray
L5178Y	親株	—	—	—	—	—	—
N151	MC ^S -I	+++	++	—	—	—	—
E50	MC ^S -II	++++	++++	±	—	—	±
ファンコニー 貧血症細胞		++++	—	—	—~+	—~+	—~+

少なくとも 2 つあることを示している。

2. MMC 高感受性変異株の他の DNA 障害要因に対する致死感受性

表 2 に, MCN151 (MC^S-I) および MCE50 (MC^S-II) の種々の DNA 障害要因に対する致死感受性を載せた。MC^S-I, II 群ともに MMC ならびにその一価性誘導体デカルバモイル (DC) MMC に高感受性であるが, UV, X 線, 4-ニトロキノリン-1-オキシド (4NQO), メチルメタンスルホン酸 (MMS) には正常感受性であった。これを FA 細胞と比較してみると DCMMC に対する感受性のみが異なっている。そこでマウスの MMC 高感受性株は MMC 誘導体に特異的高感受性なのか, FA と同様に他の DNA 架橋剤に共通に高感受性なのかを明ら

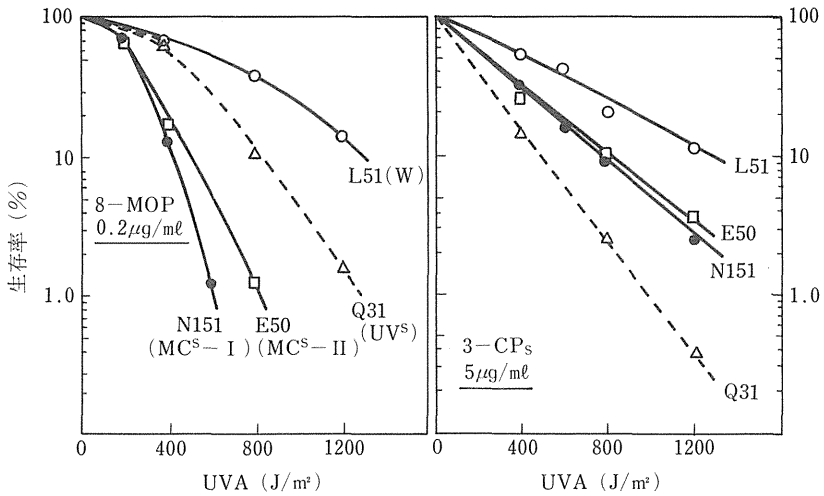


図2. ソラレン誘導体の光付加に対する致死感受性

- a : 8-メトキシソラレン $0.2 \mu\text{g/ml}$ とインキュベーション (30分) 後, ブラックライト (UVA) を種々の線量照射し, 軟寒地培地上での生存率を調べたもの。
 ○ : L51, △ : Q31, □ : MCE50, ● : MCN151
- b : 3-カルベトキシソラレン $5 \mu\text{g/ml}$ とインキュベーション (30分) 後, UVA を照射した時の生存率, 記号は2-aと同じ。

かにする必要がある。図2にソラレン誘導体の光 (365 nm) 付加に対する致死感受性を示した。2-aはDNA鎖間に架橋を形成し得る8-メトキシソラレン (8-MOP), 2-bは架橋を形成し出さない3-カルベトキシソラレン (3-CPs) の光付加に対するものである。MMCが主としてグアニンに結合するのに対し, ソラレン誘導体はチミジン環に結合する。図から明らかなようにMC^S株は8-MOPの光付加に対し感受性が高く3-CPsに対しては感受性が低い。ここでMC^S-I群がII群より高感受性であり, MMCの場合とは異なった点もある。この他, MC^S株は, I, II群とも, 他のDNA鎖間架橋剤であるシスプラチンにも高感受性である。これらの事実より, マウスMC^S株は, DNA二重鎖間の架橋修復のいずれかの過程に欠損を持つ可能性が高い。

3. ファンコニー貧血症由来細胞との遺伝的相補性の検討⁶⁾

マウスMC^S株は、I, II群ともにその感受性特性がFA細胞と類似していることから両者の変異遺伝子が相同性を示すのか、すなわち、FAとマウス変異株は同一機能を持つ遺伝子の欠損によるものかについて細胞融合法により検討を行った。マウスMC^S(N151, E50)細胞はFA細胞と同様に低濃度(10 ng/ml)のMMCで染色体異常が高発した。FA由来の培養線維芽細胞をマウス細胞N151またはE50細胞とポリエチレングリコールにより融合し、低濃度のMMC(10 ng/ml)で処理し、染色体標本を作成した。これらの雑種細胞は、それぞれの親細胞と同様に染色体異常を高発した。一方ヒト正常2倍体細胞とマウス変異株およびFA細胞とマウス野生株との雑種細胞においては、MMC誘発染色体異常出現頻度は正常であり、それぞれの遺伝欠損が雑種形成により正常化された。以上の結果より、FA細胞とマウスMC^S株間にMMC感受性に関する相補性はなく同一の遺伝欠損と考えられる。マウスのMC^S-I, II群とも同じFA細胞に相補しない理由、FAの遺伝的相補群の解明とマウスとの対応など、今後の問題として残されている。

おわりに

FA細胞はMMCによるDNA二重鎖間の架橋修復の半切除(架橋の一方をはずす)が欠損しているという報告がある⁷⁾。しかしまたFAのある細胞では、8-MOPの光付加による架橋を少くともある段階までは修復する⁸⁾という報告もあり、これらがFA細胞間による差なのか、架橋剤の特異性によるものか統一の見解は得られていない。マウスのMC^S細胞は、蔗糖勾配法によれば、8-MOPの光付加によるDNA架橋の修復をスタート出来るようであるが、結論を出すには他の方法でも検討する必要がある。修復能の有無の問題は、哺乳動物における架橋修復がどのような過程から成り立ち、また種特異性はどうかといった観点からとらえる必要がある。CHO細胞からは、FAやマウスのMC^S株とは異ったタイプのMMC高感受性株が得られている⁹⁾。UV20は、UVに高感受性であるとともにMMCに異常に高い(D₃₇値で約80倍)感受性を示す。このような表現型を示す遺伝子はCHO特有のものなのか、哺乳類細胞に共通に存在するが変異体として知られていないのか、興味ある問題である。もし一般的であるとすれば、DNA架橋修復の第一段階は、UV損傷の修復系と共通か、少なくとも共通因子を持ち、あるいは第

二段階以降に架橋に特異的な修復系が働く可能性はないであろうか。我々は、マウス細胞から、他のタイプのMC^S株を得る努力を続け、DNA架橋修復の遺伝的支配を明らかにしていく必要がある。また遺伝子クローニングなどの手段により、FAやマウス変異株の本質を明らかにしていきたいと考えている。

参 考 文 献

- 1) Fanconi, G., : Familiäre infantile perniciosaatige Anämie, Jb. Kinderheilk., 117, 257-280, 1927.
- 2) Sasaki, M. S., and A. Tonomure, : A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents, Cancer Res., 33, 1829-1836, 1973.
- 3) Rupp, W. D., C. E. Wilde, D. L. Reno and P. Howard-Flinders : Exchange between DNA strands in UV-irradiated Escherichia coli, J. Mol. Biol., 61, 25-44, 1971.
- 4) Cole, R. S. : Repair of DNA containing interstrand cross-links in Escherichia coli : Sequential excision and recombination, Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.), 70, 1064-1068, 1973.
- 5) Hama-Inaba, H., N. Hieda-Shiomi, T. Shiomi and K. Sato : Isolation and characterization of mitomycin-C-sensitive mouse lymphoma cell mutants, Mutation Res., 108, 405-416, 1983.
- 6) 吉田勉弘, 稲葉浩子, 佐藤弘毅, 佐々木本道 : Fanconi 貧血症由来培養細胞とマイトマイシンC高感受性マウス変異株細胞間における遺伝的相補性の検討, 日本癌学会総会記事第41回総会, P.180, 1982.
- 7) Fujiwara, Y., and M. Tatsumi : Cross-link repair in human cells and its possible defect in Fanconi's anemia cell, J. Mol. Biol., 113, 635-649, 1977.
- 8) Kaye, J., C. A. Smith and P. C. Hanawalt : DNA repair in human cells containing photoadducts of 8-methoxypsoralen or angelicin, Cancer Res., 40, 696-702, 1980.

- 9) Thompson, L. H., J. S. Rubin, J. E. Cleaver, G. F. Whitmore and K. Brookman : A screening method of isolating DNA repair-deficient mutants of CHO cells, *Somat. Cell. Genet.*, 6, 391-405, 1980.

IV 染色体異常の誘発機構に 放射線感受性要因はどう関係するか

IV-1

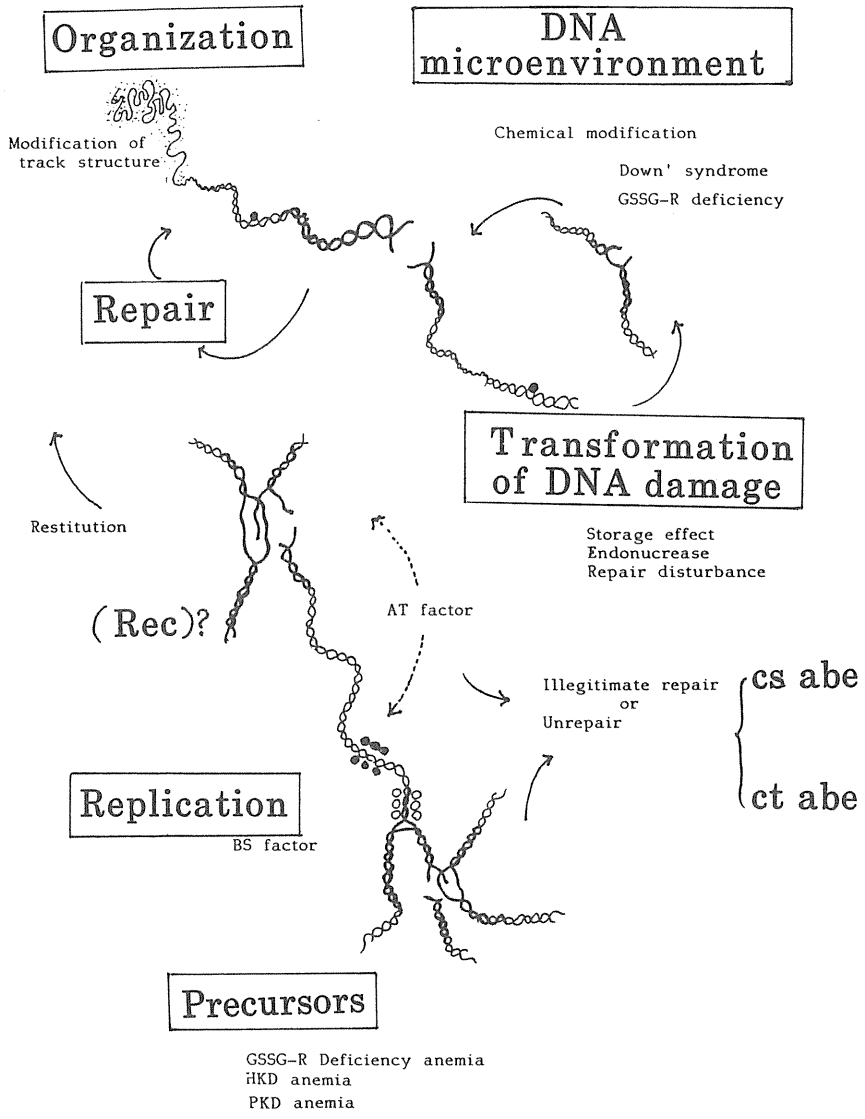
染色体異常の誘発機構に 放射線感受性要因はどう関係するか(I)

佐々木 正 夫*

1. 放射線感受性と染色体異常

染色体の構造異常の生成はそれ自身が放射線による致死障害の重要な部分を占める。従って、放射線による染色体異常の誘発と致死感受性要因との間には多くの共通点があるのは当然である。それは、染色体異常が原因となって機能的統一体としてのゲノムの均衡がくずれることが直接の原因となるからである。その出発点となる損傷は致死を指標とした場合、潜在的致死損傷(PLD)と呼ばれる抽象的概念で、その実体は何を細胞に作用させるかということと異なることは当然である。そして、PLDが致死損傷に固定されるという表現がとられる。紫外線や化学物質の場合、その固定にDNAの複製が重要な役割を果す。放射線の場合には固定は複製とは無関係にも起る。S期非依存性の固定であり、これを染色体側からみると修復されずに残存する損傷への固定(unrejoining, 仮に異常Aとする)と誤った修復(illegitimate rejoining, 仮に異常Bとする)という型の固定がある。これは必ずしも出発点となる傷に2種類があることを意味するものではないが、両者の生成には機構上かなりの差があり、また、細胞条件による反応にもかなりの違いがある。また、最近になり、放射線による突然変異にも欠失など遺伝情報のブロックごとの変化がかなりの部分を占めることも益々確実なものとなってきた。本質的にはこれもまた染色体の構造異常であり、生成機構上の共通点も多いと考えられる。致死は〔A〕と〔生存にかかわるB〕を含み、突然変異は〔Bの中の生存可能なもの〕に由来する。両者の間の関係には別に並行関係があってもよく、無くてもよい。〔A〕/〔B〕比が変らなければ並行関係があるだろう。初期損傷よりもその後の生物学的過程(クロマチン構造の変化、修復の進行など)に重要な意味がある。B効果を促

* 京都大学 放射線生物研究センター



進すれば両者が高感受性となる。Aを一定にし、Bを抑制すれば両者低感受性となり、B効果を抑制しAに移行させれば致死高感受性となる。染色体上の可視的表現でAが端部欠失の1部として表現され、BはDicentric, ring, minute, inversion, translocation など交換型異常として表現される。染色体異常の誘発の機構が放射線感受性の要因と一体のものである理由がそこにある。

2. DNAの存在様式とその微視環境

放射線はDNAに対して直接的だけでなく間接的にも働き染色体異常を作る。従って、DNAの核内における存在様式やそれを取り囲む構造的・生理的の微視環境が重要な決定要因の一つとなる。1飛跡事象による交換型異常の収率は核内のDNA密度に比例すると言われている。また細胞にSH剤等を与えることによりDNAを放射線の間接作用から防護することができ、この場合はB型異常にその防護効果が高い。

3. DNA修復機構

一方、染色体異常はDNAへの放射線作用に対する細胞側の生物学的な反応の結果として固定される。従ってDNAの複製、組換え、修復などの基本代謝が重要な決定要因となる。紫外線や化学物質の場合、ヒトでは色素性乾皮症やファンコニ貧血症などの変異個体があつてかなりよく調べられているが、電離放射線の場合、この関係を直接証拠立てる実験がない。ショウジュウバエ、植物、またヒトの減数分裂欠陥を示す変異体で染色体の放射線感受性に異常が指摘されているが、染色体異常の出発点となるDNA損傷およびその修復の機構が不明である現在、説明は推論の域を出ない。ダウン症患者の細胞ではDNA損傷の修復や染色体切断の再結合の速度が早く、B型異常の生成が高率に起る。

4. DNA損傷の型の移行

DNA損傷はその初期状態から時間と共に生物学的過程あるいは化学的過程によりその実体を変えて行く。これまであまり注目されていなかったが、これが染色体異常の形成のまた別の重要な要因となる。極端な例が精子にアルキル化剤を作用させた場合にみられる傷の変化で、受精までの間にX線で作つたと同じような傷に移

行し、受精して卵の修復酵素を使って出来る染色体異常はX線誘発と類似の異常である。生物学的な修復系を作動させないで傷を保持することによりこの現象を *in vitro* で再現することもできる。放射線がある種の初期損傷をどれだけ作るかということ以外にも、そのような傷は別の傷からも細胞の条件によっては流れ込むということを意味している。

5. DNAの複製

DNAが傷を持ったまま複製に入ると染色分体型の染色体異常として固定される。染色体異常の致死効果はS期非依存的に作られたものと大差はないと思われるが、娘細胞への異常染色体の分配が別な要素として加わり、初期損傷との定量的関係はさらに複雑となる。細胞は放射線を受けるとDNA複製に入るのを遅らせる反応を示す。DNA損傷が複製に持ち込まれる危険性を軽減させるように働く。ところが、ヒトの遺伝病である *ataxia telangiectasia* の患者の細胞にはこの反応機構が欠除している。この細胞がX線に対して高感受性であるのはこの複製開始の遅延がないため、傷が直接DNA複製に持ち込まれるためであるという説がある。

DNA損傷がDNAの複製に持ち込まれて生ずるもう一つの染色体変異がある。姉妹染色分体交換 (SCE) と呼ばれ、新生染色分体間の相同部位での相互乗り換えて、それ自身何ら遺伝的変異を意味するものではないが、不等乗り換え等の突然変異の可能性が注目されている。一般に電離放射線によるDNA損傷はSCEを誘発し難いが、最近では、 ^3H - β 線等で有意に誘発されるというデータがあり、放射線影響の一つとして注目される。

特に哺乳動物細胞におけるDNAに対する電離放射線の作用と染色体異常の生成の機構、あるいはそれと致死、突然変異、発癌の関係は、まだまだわからないことばかりであり、重要な点となると推論の域を出ないのが現状である。しかし、最近、哺乳動物細胞の培養系で放射線高感受性の突然変異株が分離されるようになってきた。これにより、近い将来この分野にも大きな発展があるものと期待される。

IV-2

染色体異常の誘発機構に 放射線感受性要因はどう関係するか(II) — 染色体異常 —

江島洋介*

はじめに

染色体異常は放射線や化学物質によって誘発され、遺伝物質の巨視的な構造変化として形態的に把握でき、細胞の死や突然変異などとも関係の深い重要な生物学的指標である。染色体異常の形成には標的物質DNAに与えられる分子損傷の種類に加えて、細胞側の要因としてDNA複製や修復などの代謝過程が関与していると考えられている¹⁾²⁾。そうした細胞側の要因のひとつとして遺伝的に規定された感受性要因が挙げられる。ヒトの場合にはこうしたDNA代謝系に欠損をもったある種の遺伝病の細胞の染色体が特定の変異原に対して特有の高感受性を示すことが知られている。中でも劣性遺伝病のxeroderma pigmentosum (XP) と ataxia-telangiectasia (A-T) とは *in vitro* の性質として紫外線 (UV) と電離放射線とに対してそれぞれ極めて高い致死感受性³⁾⁴⁾ と同時に染色体の高感受性を示す⁵⁾⁶⁾ 点で好対照をなしている。ここでは電離放射線による染色体異常の形成機構を考えるため、電離放射線に特有の高感受性要因をもつA-T細胞をとりあげて細胞側の要因を考察し、また細胞への作用原としてはX線に加えて、UVにDNA代謝阻害剤を併用することによる電離放射線様の作用をひとつのアプローチとしてとりあげ、染色体異常の起点となる分子損傷側の要因について考察したい。

1. A-T細胞の染色体の放射線感受性

劣性遺伝病のA-Tの細胞は *in vitro* で電離放射線に対して極めて高い感受性を示す⁴⁾。同じ劣性遺伝病でもXP細胞のUV高感受性がUV損傷の除去修復欠損によることが明らかにされている⁷⁾点と比べて、A-T細胞の放射線高感受性の機構

* 京都大学 放射線生物研究センター

には不明な点が多い⁸⁾⁹⁾。最近注目されているのがA-T細胞のDNA複製の放射線反応であって、A-T細胞にX線を照射した場合、正常細胞にみられるDNA複製の一時的阻害や遅延の程度が非常に小さい¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。これは組織や細胞種を問わず調べられたすべてのA-T細胞系に共通した性質としてとくに重要視されており、未修復のDNA損傷を担ったまま複製に入ってしまうことが致死に結びつくのではないかと考えられている¹³⁾。

それではA-T細胞の染色体は放射線に対してどういう反応を示すのか。図1はA-T細胞のX線による染色体異常の形成の様子を示している。一般に細胞に放射線を照射すると形成される染色体異常の型は照射時の細胞周期によって規定される。複製前のG1期に照射を受けると染色体型異常(chromosome-type aberrations)として現われ、染色体の複製の完了したG2期に照射を受けると染色分体型異常(chromatid-type aberrations)として現われる。また染色体の切断-再結合の図式に従えば、G1期に形成された切断端が切断されたまま複製にもちこまれると染色体型の欠失(chromosome deletion)となり、他の切断端と再結合し複製すると二動原体染色体(dicentricies)や環状染色体(rings)などの交換型の染色体異常となる¹⁴⁾。図1に端的に示されているようにG1期にX線を照射した場合、正常細胞では交換型の染色体型異常(dicentricies, rings)が線量依存的に形成されるが、染色体型欠失、染色分体型異常は有意には形成されない。それに対しA-T細胞では交換型染色体型異常がより高率に形成されるだけでなく染色体型欠失や染色分体型異常が極めて高率に形成される。

こうしたA-T細胞の染色体の反応から考えられることはまず、染色体型欠失と染色分体型異常が共に多いという点、未修復の切断あるいは損傷がS期開始の遅延がないためにより多く複製にもちこまれている結果のように見える。しかし実際A-T細胞では非照射の条件でもS期の開始が遅いため、照射をした場合の正常細胞の遅延を考慮しても、照射からS期の開始までの時間経過に差はなく、これだけの異常頻度の差を説明するには不十分である¹⁵⁾。また複製前に形成されると考えられる交換型染色体型異常の形成率もA-T細胞では高いという点は複製前の過程ですてになんらかの障害の差があることを推測させる。

また染色分体型異常は一般には染色体の複製後に照射をうけた場合に、また同じG1期処理でも非電離放射線型的作用原で処理した場合にのみ効率よく形成される異

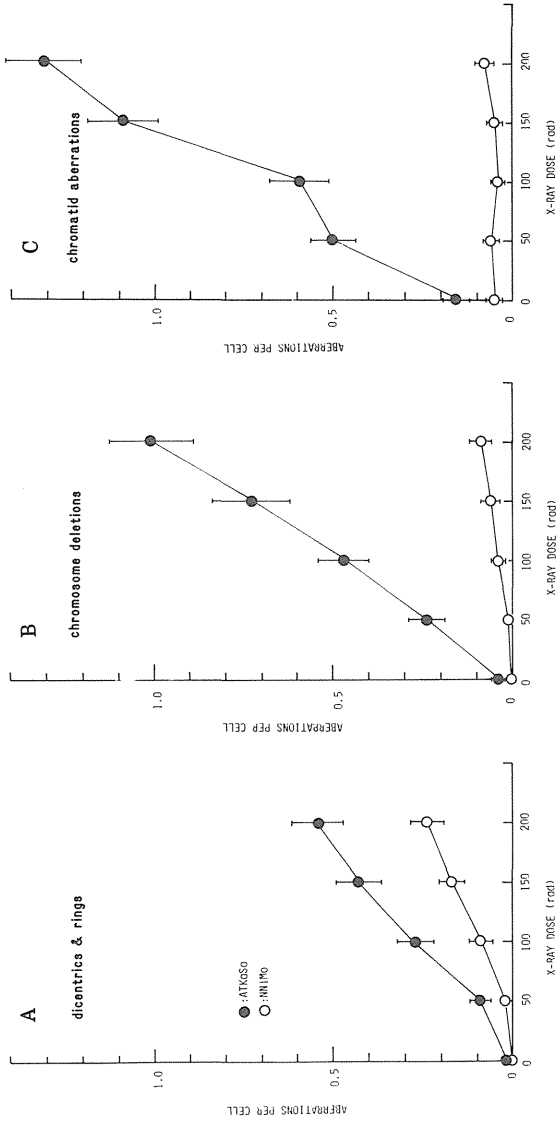


図1 Ataxia-telangiectasia 患者 (●) および正常人 (○) 由来の培養線維芽細胞での X 線誘発染色体異常。

軟 X 線 (50 kVp), 50 時間培養。A: 二動原体染色体と環状染色体, B: 染色体欠失, C: 染色分体型異常

常であるが、これがA-T細胞のG1期照射で高率に誘発される点は従来の図式¹⁶⁾からは単純に説明できずひとつの問題を提起している。

こうしたA-T細胞染色体の放射線反応の解釈として一方では、A-Tは2本鎖、1本鎖を含めたDNA鎖切断の修復能が低下しているという解釈がある。未修復の2本鎖切断が染色体型の交換と欠失に、未修復の1本鎖切断が染色分体型の異常にそれぞれ関係し、2本鎖、1本鎖両切断の相互作用に依るものと考えられる三放射型染色分体交換がA-T細胞に頻発しているのもひとつの状況証拠であるという解釈である¹⁷⁾。他方A-T細胞は放射線による塩基損傷の除去に欠損があるとする立場もある。複製にもちこまれた未修復の塩基損傷が染色分体型異常となり、また塩基損傷それ自身の不完全な修復過程の結果生ずる2本鎖切断がG1期では染色体型異常の原因となるというものである¹⁸⁾。このようにA-T細胞をDNA修復欠損という視点からみても染色体異常の出発点となる分子損傷をめぐる議論があり、とくに異なった型の染色体異常にそれぞれ別種の分子損傷が関与しているのかどうかという問題が残る。

2. 実験的検討

細胞側の要因として遺伝的な放射線感受性要因を持つA-T細胞においては、放射線で同様に照射しても染色体異常の形成のされ方が量的にも質的にも異ってくることを前述した。次に作用原としてX線とは異った方面から、しかもX線と同様の効果をひき出すひとつの手段として、UVとDNA代謝阻害剤のcytosine arabinoside (araC)とを用いた実験を行なった。UVそれ自身はいわゆる“S期依存型”の作用原¹⁹⁾であるからG1期に作用させても染色体型異常の原因とはならない。またA-T細胞もUVに対しては特に致死高感受性を示さない。一方araCはその作用のひとつとしてUV損傷の除去修復の修復合成の段階に阻害効果を示し、DNA鎖の切断を形成することがヒト細胞でも生化学的に確かめられている²⁰⁾²¹⁾。こうした過程で二次的に形成されるとおもわれるDNA鎖切断を想定し、はたして染色体異常の原因となるか、またA-T細胞はこれにどういう反応を示すのかと考えた。次のような実験を行なった。

細胞はA-T患者および正常人の皮膚由来の線維芽細胞で、接触阻止状態の細胞にUV(紫外線殺菌灯、254nm)を照射する。接触阻止状態の細胞は大半がG1期

にあると考えられる。照射後一部の試料については araC (5×10^{-5} M, 3時間) で後処理したあと培養液中に再播種する。この際培養液中には araC の希釈効果のため 2'-deoxy cytidine 1×10^{-4} M を含む²⁰⁾。

図2はG1期のUV+araC処理によって誘発されたA-T細胞での染色体異常の一例を示す。交換型の染色体型異常である dicentrics の他に染色体型欠失, 染色分体型異常も形成されており, あたかも電離放射線をうけた場合のような様相を呈している。このUV+araCによる染色体異常の形成を定量的に示したのが図3である。UV単独では形成されない交換型の染色体型異常がUV+araCによって正常細胞にもA-T細胞にも形成されるようになる。ところがこのUV+araCによる交換型染色体型異常の形成はUV損傷の除去修復能を欠くといわれるA群のXP細胞にはまったくみられない。またA-T細胞においてはUV+araCにより交換型染色体型異常が正常細胞より高率に形成されるだけでなく, 正常細胞では形成されない染色体型欠失と染色分体型異常が高率に形成される(図3)。UVのかわ

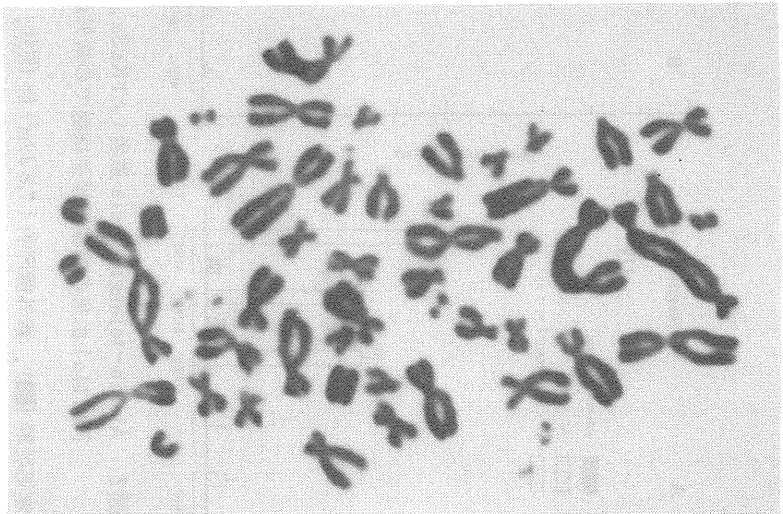


図2. 紫外線と cytosine arabinoside 処理により Ataxia-telangiectasia 患者由来の培養線維芽細胞に誘発された染色体異常

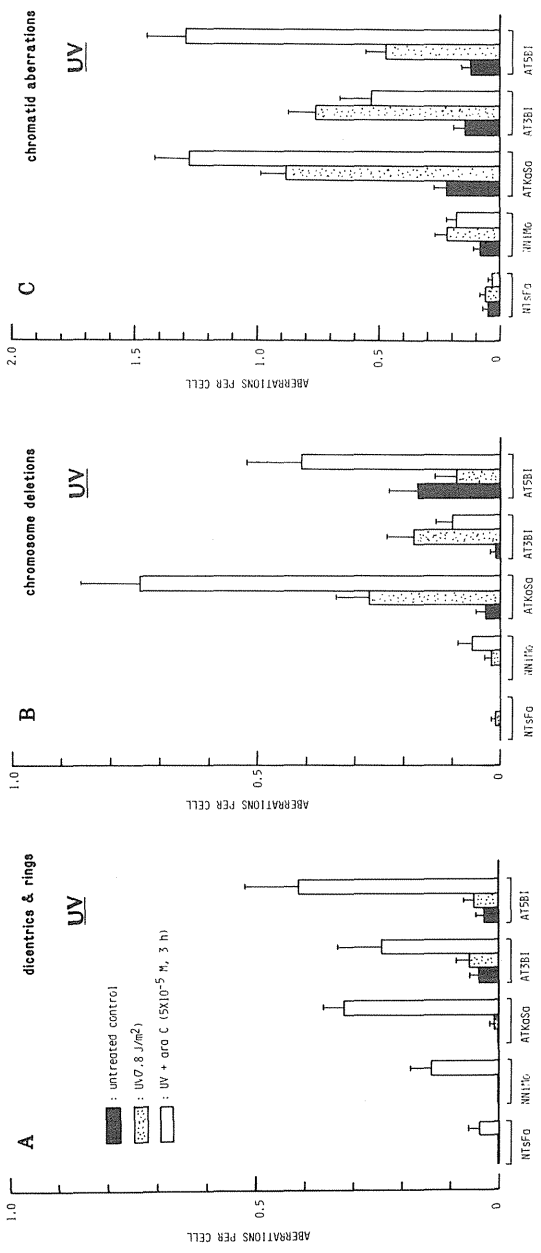


図3. Ataxia-telangiectasia 患者 (ATKaSa, AT3BI, AT5BI) および正常人 (NTsFa, NNI1Mo) 由来の培養線維芽細胞での紫外線 + cytosine arabinoside による染色体異常。
 無処理群 (■), 紫外線照射 (7.8 J/m² 群 (▨), 紫外線照射後 cytosine arabinoside 後処理 (5×10⁻⁵ M, 3時間) 群 (□) で比較。A: 二動原体染色体と環状染色体による染色体異常。
 B: 染色体分体異常。
 C: 染色体分体異常。

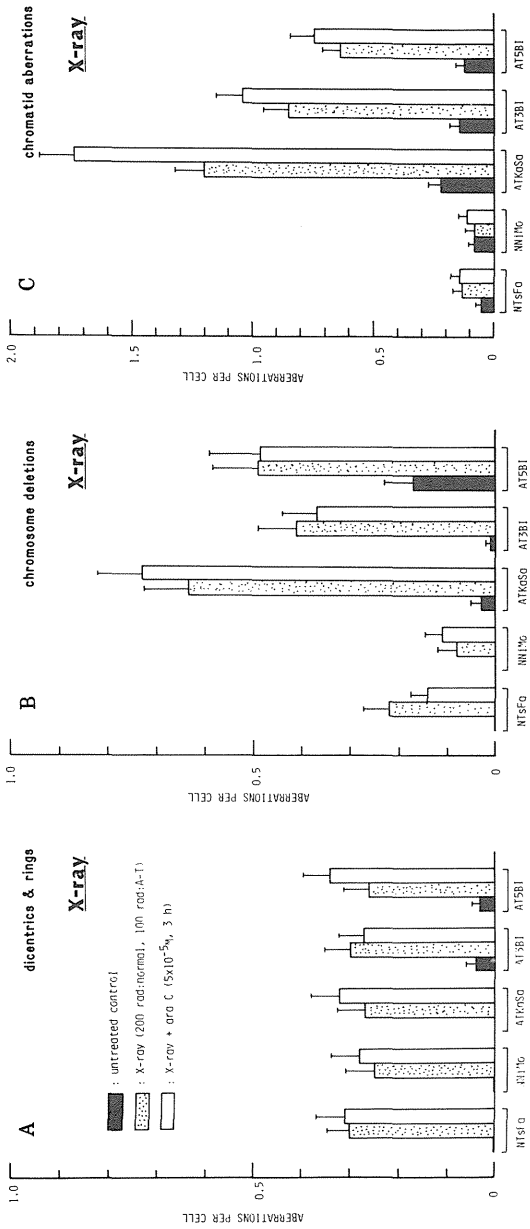


図4. Ataxia-telangiectasia 患者 (ATKaSa, AT3BI, AT5BI) および正常人 (NTsFa, NNIMo) 由来の培養線維芽細胞での X 線 + cytosine arabinoside による染色体異常。

無処理群 (■), 軟 X 線照射 (A T 患者: 100 rad, 正常人: 200 rad) 群 (▨), 軟 X 線照射後 cytosine arabinoside 後処理 ($5 \times 10^{-5} M$, 3 時間) 群 (□) で比較。A: 二動原体染色体と環状染色体, B: 染色体欠失, C: 染色分体型異常。

りにX線を用いた場合にはX線自身が染色体異常を誘発するからUVの場合ほど顕著ではないがaraCにより染色体異常の増大効果がみられた(図4)。ここで注目されるのはA-T細胞の中でもX線塩基損傷の除去修復能に欠損をもつとされる細胞(AT3BI)²²⁾にのみこの増大効果がみられない点で、これはUV+araCにおけるA群XP細胞の場合と類似している。

3. 考 察

こうした実験結果にみられるように、作用原としてUV+araCは染色体上の変化としてみる限りX線と同様の効果をひき起こす。除去修復能を遺伝的に欠損したA群XP細胞やAT3BIの細胞ではこうした効果がみられないことからaraCの作用機作は修復合成の阻害に伴うものであることが推測される。従ってこうした修復阻害の過程で二次的に形成されしかもX線誘発様の染色体異常の原因となるものは何かということが問題となる。G1期の処理で交換型の染色体型異常を誘発するという点でDNA2本鎖切断が関与している可能性が高いが、実際BradleyとTaylor²³⁾はUV+araCでDNA2本鎖切断が形成され時間と共に再結合するがA群XP細胞ではこの形成がみられないことをヒトの培養線維芽細胞で観察している。

また従来より、UVを照射したあとaraC、アフィディコリンなどの修復合成阻害剤を作用させるといわゆる切断の蓄積がおこり、修復合成能の定量化の一方法として使用されているが²⁴⁾、XPのA群をはじめとする修復能の低下した細胞においてはこうした切断の蓄積が低下あるいは欠如していること²¹⁾²⁵⁾が指摘されている。こうして分子レベルで想定された現象が、ここでは*in situ*の染色体上の変化として顕われたことになり、この効果から逆に修復能の差異を染色体上の変化として捕えられる可能性が考えられる。修復能を異にするA群以外の相補性群に属するXP細胞や他のUV致死高感受性を特徴とする細胞での実験的検討が必要であろう。

次に着目されるのは放射線高感受性要因を有するA-T細胞の染色体のUV+araCに対する反応である。G1期にX線照射すると正常細胞ではみられない染色体型欠失と染色分体型異常が誘発されるのはA-T細胞の特徴であるが、これと全く同様の現象がUV+araCでも観察される(図3, 表1)。前述したとおりA-T細胞にX線を照射した場合の染色体型と染色分体型の異常にそれぞれ別種の損傷

表 1. Ataxia-telangiectasia 患者および正常人由来の培養線維芽細胞での X 線および紫外線誘発染色体異常に対する cytosine arabinoside の効果

POTENTIATION OF X-RAY- OR UV-INDUCED CHROMOSOMAL ABERRATIONS BY CYTOSINE ARABINOSIDE IN NORMAL AND A-T CELLS

		Dicentric & Rings	Chromosome deletions	Chromatid aberrations
X-ray	Normal	+	-	-
	A-T	+	+/-	+
UV	Normal	+	-	-
	A-T	++	++	++

が関与している可能性も指摘されたが¹⁷⁾、UV+araC というまったく異った方面から与えた作用原がやはり同様の作用を有することから、X線損傷のうちとくにUV+araCの場合との共通項である単一の損傷(DNA 2本鎖切断か?)がA-T細胞における染色体型のみならず染色分体型異常の原因ともなっている可能性がある。言い換えると、染色体異常の出発点となるX線損傷はそれがG1期に形成されても潜在的には交換型の染色体型異常だけでなく染色体型欠失、染色分体型異常をも誘発する能力を有するが、正常細胞においては、A-T細胞には欠如しているなんらかの要因によって抑えられ、交換型の染色体型異常としてのみ顕われているといえる。

それでは正常細胞では交換型の染色体型異常の原因となり、A-T細胞では異なった型の染色体異常をも起こしうるX線損傷とは何かということが問題となる。前述したようにDNAの2本鎖切断である可能性は高いが、電離作用を直接、間接の起点とする切断と、修復阻害の過程でできる酵素的な切断とは性状を異にするであろう。実際おなじ電離放射線でも線質の異なる高LET放射線によると染色体型の交換と共に染色体型の欠失が比較的多く形成され²⁶⁾、切断端の微細構造が染色体異常形成の質的な側面に関与していることは確かである。言い換えると酵素的な過程

で形成される切断端の微細構造の検討²⁷⁾から逆に染色体異常の起点となる切断の性状が類推できるかもしれない。

ここで araC 阻害などによりいわば操作的に形成されたのと同様の DNA 鎖切断が阻害剤の非存在下でも UV 損傷の²⁸⁾あるいは X 線損傷²⁹⁾の修復過程で中間体として形成され、こうした二次的切断は照射後の時間と共に増加している²⁹⁾。X 線照射による染色体異常の起点となる切断としてむしろこうした二次的切断を重要視する立場もあり¹⁸⁾³⁰⁾、染色体異常誘発の特性からみた X 線と UV + araC の類似性もこの事に由来するのかもしれない。以上興味ある視点のひとつとしてつけ加えたい。

おわりに

放射線による染色体異常の形成機構を考えるためのひとつのアプローチとして、材料としては電離放射線への感受性要因をもった遺伝病の ataxia-telangiectasia の細胞を用い、この細胞が同じ放射線照射によっても正常細胞とは量的にも質的にも異った染色体異常を形成することをみてきた。また作用原として X 線とは異った側面からしかも X 線と同様の効果をひきだすひとつの手段として紫外線と cytosine arabinoside とを用いた実験を行ない、この作用原が X 線と全く同様の染色体上の変化を正常細胞にも A-T 細胞にも引きおこすことをみてきた。線質の異なった放射線や電離放射線様効果を有する化学物質などの各種作用原の選定とその効果の比較をも含め、ここで用いてきた材料と方法が電離放射線による染色体異常の形成の機構という課題を考える上での有効な実験的手法として寄与するよう今後検討を深めたい。

参 考 文 献

- 1) Evans, H. J. : Repair and recovery at chromosome and cellular level : Similarities and differences. *Brookhaven Symp. Biol.*, 20, 111-133, 1968.
- 2) Sasaki, M. S. : Radiation damage and its repair in the formation of chromosome aberrations in human lymphocytes., In "Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man" (H. J. Evans and D. C.

- Lloyd, Eds.), Edinburgh University Press, pp. 62–76, 1978.
- 3) Cleaver J. E. : Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature*, 218, 652–656, 1968.
 - 4) Taylor, A. M. R., D. G. Harnden, C. F. Arlett, S. A. Harcourt, A. R. Lehmann, S. Stevens and B. A. Bridges : Ataxia-telangiectasia. A human mutation with abnormal radiosensitivity. *Nature*, 258, 427–429, 1975.
 - 5) Sasaki, M. S. : DNA repair capacity and susceptibility to chromosome breakage in xeroderma pigmentosum cells. *Mutat. Res.*, 20, 291–293, 1973.
 - 6) Taylor, A. M. R., J. A. Metcalfe, J. M. Oxford and D. G. Harnden : Is chromatid type damage in ataxia telangiectasia after irradiation at G₀ a consequence of defective repair ? *Nature*, 260, 441–443, 1976.
 - 7) Cleaver, J. E. and D. Bootsma : Xeroderma pigmentosum : Biochemical and genetic characteristics. *Ann. Rev. Genet.*, 9, 19–38, 1975.
 - 8) Paterson, M. C. and P. J. Smith : Ataxia telangiectasia - An inherited human disorder involving hypersensitivity to ionizing radiation and related DNA-damaging chemicals. *Ann. Rev. Genet.*, 13, 291–318, 1979.
 - 9) Huang, P. C. and R. B. Sheridan, III : Genetic and biochemical studies with ataxia telangiectasia. *Hum. Genet.*, 59, 1–9, 1981.
 - 10) Houldsworth, J. and M. F. Lavin : Effect of ionising radiation on DNA synthesis in ataxia telangiectasia cells. *Nucleic Acids Res.*, 8, 3709–3720, 1980.
 - 11) Painter, R. B. and B. R. Young : Radiosensitivity in ataxia telangiectasia - A new explanation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7315–7317, 1980.

- 12) de Wit, J., N. G. J. Jaspers and D. Bootsma : The rate of DNA synthesis in normal human and ataxia telangiectasia cells after exposure to X-irradiation. *Mutat. Res.* 80, 221–226, 1981.
- 13) Zampetti-Bosseler, F. and D. Scott : Cell death, chromosome damage and mitotic delay in normal human, ataxia telangiectasia and retinoblastoma fibroblasts after X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 39, 547–558, 1981.
- 14) Evans, H. J. : Effects of ionizing radiation on mammalian chromosomes, In “Chromosomes and Cancer” (J. German Ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 191–237, 1974.
- 15) Sasaki, M. S., A. M. R. Taylor and D. G. Harnden : DNA replication response of normal human and ataxia-telangiectasia cells to X-ray irradiation., in preparation.
- 16) Bender. M. A., H. G. Griggs and J. S. Bedford : Mechanisms of chromosome aberration production. III. Chemicals and ionizing radiation. *Mutat. Res.*, 23, 197–212, 1974.
- 17) Taylor, A. M. R. : Unrepaired DNA strand breaks in irradiated ataxia telangiectasia lymphocytes suggested from cytogenetic observations. *Mutat. Res.*, 50, 407–418, 1978.
- 18) Preston, R. J. : The effect of cytosine arabinoside on the frequency of X-ray-induced chromosome aberrations in normal human leukocytes. *Mutat. Res.*, 69, 71–79, 1980.
- 19) Kihlman, B. A. : Caffeine and Chromosomes, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- 20) Hiss, E. A. and R. J. Preston : The effect of cytosine arabinoside on the frequency of single-strand breaks in mammalian cells following irradiation or chemical treatment. *Biochim. Biophys. Acta*, 478, 1–8, 1977.
- 21) Dunn, W. C. and J. D. Regan : Inhibition of DNA excision repair in human cells by arabinofuranosyl cytosine : Effect on nor-

- mal and xeroderma pigmentosum cells. *Mol. Pharmacol.*, 15, 367–374, 1979.
- 22) Paterson, M. C., B. P. Smith, P. H. M. Lohmann, A. K. Anderson and L. Fishman : Defective excision repair of gamma ray damaged DNA in human (ataxia telangiectasia) fibroblasts. *Nature*, 260, 444–447, 1976.
- 23) Bradley, M. O. and V. I. Taylor : Repair-induced DNA double strand breaks after ultraviolet-light and aphidicolin or 1- β -D-arabinofuranosylcytosine/hydroxyurea. *Carcinogenesis*, 4, 1513–1517, 1983.
- 24) Johnson, R. T., A. R. S. Collins, C. S. Downes and S. Squires : DNA-synthesis inhibitors and the analysis of UV repair. *Prog. Mutat. Res.*, 4, 357–373.
- 25) Waters, R. : Aphidicolin : An inhibitor of DNA repair in human fibroblasts. *Carcinogenesis*, 2, 795–797, 1981.
- 26) Sasaki, M. S. : Radiation-induced chromosome aberrations in lymphocytes : possible biological dosimeter in man. In “Biological Aspects of Radiation Protection” (T. Sugahara and O. Hug Eds.), Igaku Shoin Ltd. Tokyo and Springer, Berlin Heiderberg New York, pp. 812–90, 1971.
- 27) Cleaver, J. E. : Structure of repaired sites in human DNA synthesized in the presence of inhibitors of DNA polymerases alpha and beta in human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 739, 301–311, 1983.
- 28) Bradley, M. O. and V. I. Taylor : DNA double-strand breaks induced in normal human cells during the repair of ultraviolet damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3619–3623, 1981.
- 29) Ahnström, G. and P. E. Bryant : DNA double-strand breaks generated by the repair of X-ray damage in Chinese hamster cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 41, 671–676, 1983.

- 30) Preston, R. J. and P. C. Gooch : The induction of chromosome-type aberrations in G1 by methymethanesulfonate and 4-nitroquinoline-N-oxide, and the non-requirement of S-phase for their production. *Mutat. Res.*, 83, 395-402, 1981.

IV-3

姉妹染色分体交換 — 2つのSCE変異株について —

辻 秀雄*

はじめに

姉妹染色分体交換 (SCE) とは染色体を構成する2本の染色分体の相同位置での交換を意味し、体細胞、生殖細胞いずれにおいても、自然条件下で一定の頻度で生じる現象である。SCEは塩基類似物質であるブロモデオキシウリジン (Brd-Urd) で2細胞周期処理された染色体のギムザ分染像をもとに検出される¹⁾。SCEはDNAの切断、再結合を含む2本鎖交換と考えられ、DNAの再結合は同じ極性をもったDNA鎖の間で行なわれる²⁾。現在までの知見によるとSCEは細胞周期のS期に限って形成され、しかもDNA複製を行なっているDNA領域に集中して形成される³⁾。SCEの形成機構は不明な点が多いが、DNA複製中のDNA領域と複製後の領域との少くとも二つの領域で形成され、それぞれの形成機構は異なっていると考えられている⁴⁾。SCEは染色体異常と同様に種々の変異原によって誘発されるので⁵⁾、分子レベルの損傷がその形成に関与していると考えられる。しかし、誘発効率は変異原の種類によって異なり、染色体異常を誘発しやすい損傷とSCEを誘発しやすい損傷とがある⁶⁾⁷⁾。さらに、ヒト遺伝疾患患者由来細胞のSCE研究により、変異原誘発SCEの誘発頻度はその細胞の保持する修復能に強く影響されることがわかってきた⁸⁾。1974年にChagantiら⁹⁾によってブルーム症候群 (BS) 由来の細胞はSCE高誘発性を示すことが発見され、特定の条件ではあるが、BS細胞はDNA複製速度が遅く、新生DNA鎖の伸長が遅いことから¹⁰⁾、DNA複製の欠損とSCE高誘発性との関係が議論されてきた。SCEが染色分体の非同位で起これば (不均等SCE)、遺伝子の付加と欠失とが同時に起きることになり、SCEの形成が直接的に意味をなしてくるが、そのような例がショウジョウバエの

*放射線医学総合研究所・遺伝研究部

rDNA 遺伝子¹¹⁾ やヒトの免疫グロブリンの H 鎖¹²⁾ や κ 鎖遺伝子^{13,14)} で生じることが示唆されている。以上のように SCE について多くの重要な事実がわかってきているが、いずれについても未だ端緒的である。SCE と染色体異常や組換えなどの遺伝的現象との関係や、分子レベルの損傷が SCE に至る過程を調べる上で、SCE に関する突然変異細胞は多くの手がかりを提供すると考えられる。Thompson ら¹⁵⁾ はすでに CHO 細胞から自然発生 SCE 多発変異細胞 (EM9) を得ており、この細胞は EMS 高感受性で、X 線による DNA 鎖切断再結合欠損を示し、BrdUrd 誘発 SCE を多発し、BrdUrd 置換 DNA を鋳型とした新生 DNA の伸長が遅い¹⁶⁾ などの点が明らかにされている。ここでは、マウス白血病細胞 L5178Y より得られた高 SCE 変異細胞、ES4 と AC12 の 2 株について、特に BrdUrd の効果と各種変異原処理によって生じる染色体異常と SCE の関係について論じる。

1. 材料と方法

突然変異細胞：

通常の培養条件下で対数期にある細胞を $1 \mu\text{g/ml}$ の MNNG で処理し、5~6 日間正常培地で増殖させた。ES4 は EMS 高感受性変異株の中から分離された。軟寒天上につくられたコロニーを $200 \mu\text{g/ml}$ の EMS 含有寒天培地と無添加寒天培地上に楊枝で植えかえ、一週間後変異株を分離した。AC12 はアフィディコリン (AC) 弱耐性変異細胞として分離された。 $0.3 \mu\text{g/ml}$ の AC 添加軟寒天内に細胞を植えこみ、16 日後に生じたコロニーを分離した。

生存率の測定：

$1.5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4/\text{dish}$ で 5 cm シャーレに細胞を播き、化学変異原添加軟寒天培地に植えこみ、12-16 日後に生じたコロニー数を計数した。X 線照射は正常軟寒天培地に細胞を植えこんだ後、行なった。紫外線照射は PBS (-) に浮遊した細胞を $1 \times 10^6/0.2 \text{ml}$ で 10 cm シャーレに拡げ行なった。

SCE の検出：

姉妹染色分体の分染は細胞を 2 細胞周期 (L5178Y; 24 時間, ES4; 28 時間, AC12; 32 時間) BrdUrd で処理し、染色体標本を空気乾燥法で作成し FPG 法の変法¹⁷⁾で行なった。変異原誘発 SCE については、X 線、紫外線については照射後 BrdUrd 処理することによって、化学変異原については BrdUrd 処理の後半 1/4

時間処理を行なった。

BrdUrd の置換率の測定 :

Mazrimas と Stetka¹⁸⁾ の方法に従い, BrdUrd で 2 細胞周期処理して得られる 2 本鎖置換 DNA の CsCl 密度勾配遠心による浮上密度から Luk と Bick¹⁹⁾ の方法により置換率を計算した。

細胞内 DNA 前駆物質の測定 ; Skoog²⁰⁾ および Lindberg と Skoog²¹⁾ の方法に従って行なった。

2. 結果と考察

ES 4 は分離方法にあるように EMS に高感受性で, L5178Y に比べ D_{37} 値で約 9 倍感受性である²²⁾。AC12 は L5178Y に比べ AC に対し, D_{37} 値で約 1.4 倍抵抗性である。

SCE の検出に用いる BrdUrd はそれ自身で SCE を誘発するので, これら 変異細胞の SCE の BrdUrd 依存性について調べた (図 1)。親株の L5178Y では

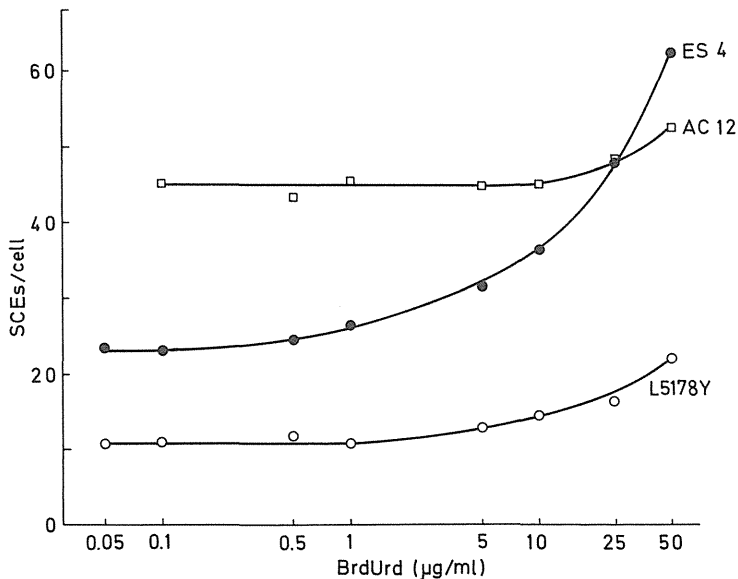


図 1. BrdUrd 濃度に対する SCE 頻度

1 $\mu\text{g/ml}$ 以下の BrdUrd で SCE 頻度は一定であり、それ以上の濃度で濃度依存的に増加した。AC12では10 $\mu\text{g/ml}$ までの BrdUrd 濃度で SCE 頻度は一定であったのに対し、ES4では、濃度依存的に SCE は顕著な増加を示した。従って ES4 は SCE 誘発性に関し、BrdUrd に高感受性である。BrdUrd の SCE 誘発性については DNA に取り込ませた BrdUrd による作用¹⁸⁾と BrdUrd のリボヌクレオチド還元酵素の活性阻害による作用²³⁾とが報告されているので、DNA への BrdUrd の取り込み量を比較した。BrdUrd の種々処理濃度で ES4 ではわずかに取り込み量が L5178Y より多く、AC12 ではわずかに少なかった。いずれの細胞も 25 $\mu\text{g/ml}$ の BrdUrd 濃度でほぼ 100% のチミジン残基が BrdUrd によって置換される。置換率と SCE 頻度との関係を調べると、L5178Y と AC12 では置換率が 90% まで SCE 頻度は一定であり、ES4 では、90% まで徐々に SCE 頻度は増加し、以後 BrdUrd の処理濃度の増加に伴って急激に増加した。この結果より、L5178Y と AC12 では DNA 中の BrdUrd は 90% 置換率までほとんど SCE 誘発性を持たないが、ES4 ではわずかな誘発性を持つと考えられる。SCE 曲線の直線部分を BrdUrd 0 値に外挿し、自然発生 SCE 頻度を求めた。L5178Y の約 11/cell/2cycle に対し、ES4 では 2 倍の約 23 であり、AC12 では約 4 倍の 43 であった。従ってこれら 2 株は自然発生 SCE の高い変異細胞といえる。その原因についてはまだ明らかでないが、ES4 では BrdUrd により SCE を多発し、BrdUrd とともに dC 処理すると SCE が有意に低下することから dC の代謝に関連した欠損と予想される。AC12 については細胞内 DNA 前駆体プールを測定したところ、dATP が 5 倍、dCTP が 1.5 倍上昇していた。これら 2 株の変異は異なった遺伝子欠損に由来することを雑種細胞を用いて調べた。雑種細胞はそれぞれの細胞の同質 4 倍体に比べ明らかに SCE 頻度が減少しており、異なった遺伝子欠損によることが明らかとなった。さらに、この結果は自然発生 SCE に二つ以上の遺伝子が関与することを示唆する。これら 2 株とヒトの遺伝病で高 SCE を示す BS 細胞との類似性について調べた。AC12 は細胞致死に関して MMC 感受性であり、X 線、EMS、UV、4NQO にはさほど感受性でなく、BS 細胞とよく似ている。他方、ES4 も MMC 感受性である。最近白石ら^{24,25)}は、BS 細胞の SCE は 2 回目の細胞周期に限定して生じ、SCE のほとんどは自然発生 SCE ではなく BrdUrd 誘発 SCE であると報告している。3 段階分染法を用いて各細胞周期で形成される SCE 頻度を 2 株について調べると、低濃度の Brd

Urd (0.5 μg/ml) で生じる SCE 頻度は L5178Y では 6.27 / cell / 1 cycle であり, ES4 と AC12 ではそれぞれ, 11.00, 22.00 / cell / 1 cycle である。この結果は, BrdUrd 置換率 0 値への外挿によって得られた結果とよく一致し, BS 細胞で観察される極端な BrdUrd の効果と対照的である。これら 2 株が BS 細胞と同じ遺伝子の欠損によるものか否かは雑種細胞における相補性試験によって決定されなければならない。

SCE を誘発する分子レベルの損傷を調べるために, 各種変異原で ES4 を処理し, 細胞死, 染色体異常, SCE を指標として感受性を比較した。表 1 にみられる

表 1

Relation between cell killing, chromosome aberration, and SCE

Cells	Sponta.	Sensitivity to mutagens				
		BrdU	UV	4NQO	EMS	MMC
L5178Y	Cell killing	—	—	—	—	—
	Chro. aber.	—	—	—	—	—
	SCE	—	—	—	—	—
ES4	Cell killing		+	++	+++	+
	Chro. aber.	+	++	++	+++	+++
	SCE	++	+++	—	—	+++

$$\text{Cell killing, } x = \frac{D_{37}(\text{wild})}{D_{37}(\text{mutant})} \quad \text{SCE, } x = \frac{\text{net increase}(\text{mutant})}{\text{net increase}(\text{wild})}$$

$$\text{Chro. aber. , } x = \frac{\text{net increase}(\text{mutant})}{\text{net increase}(\text{wild})}$$

— ; 1 ≤ x < 1.5	— ; 0.75 ≤ x < 1.25
+	± ; 1.25 ≤ x < 1.5
+	+ ; 1.5 ≤ x < 2
++ ; 1.5 ≤ x < 2.5	++ ; 2 ≤ x < 3
++ ; 2.5 ≤ x < 5	+++ ; 3 ≤ x
+++ ; 5 ≤ x	

ように、ES 4 は 4NQO, UV, MMC による損傷のうち、染色体異常を誘発する損傷の修復、および EMS による損傷のうち染色体異常と SCE の両方を誘発する損傷の修復に欠損があると考えられる。この結果は、分子レベルの損傷のうち、主に染色体異常を誘発する損傷と、染色体異常と SCE の両方を誘発する損傷のあることを示唆する。しかしながら、分子レベルの損傷の実体は明らかでなく、今後解明されなければならない。

お わ り に

上記の 2 株、ES 4 と AC 1 2 はいずれも自然発生 SCE 頻度が高く、それぞれ特徴ある SCE 反応を示すことが明らかとなった。既に自然発生 SCE の高い変異細胞は数株分雑されており、それらの株は DNA 切断の再結合の欠損¹⁵⁾とか、DNA 複製酵素のポリメラーゼ α の AC 耐性²⁶⁾とかの異常を示している。SCE 多発変異細胞の解析は、SCE に関わる分子損傷、酵素、修復過程、複製過程の解明にとって重要であり、SCE と他の遺伝的現象、染色体異常、組換、突然変異等との関係の研究にも利用できると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Latt, S. A., Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 70, 3395-3399, (1973).
- 2) Taylor, J. H., Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics*, 43, 515-529, (1958).
- 3) Kato, H., Possible role of DNA synthesis in formation of sister chromatid exchanges. *Nature* 252, 739-741, (1974).
- 4) Kato, H., Mechanisms for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma*, 59, 179-191, (1977).
- 5) Perry, P. and Evans, H. J., Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258, 121-

125, (1975).

- 6) Kato, H., Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BUdR-labeling method. *Int. Rev. Cytol.*, 49, 55-97, (1977).
- 7) Sasaki, M. S., Sister chromatid exchange as a reflection of cellular DNA repair, in *Sister Chromatid Exchange*, ed. by Sandberg. A. A., p. 136-161, Alan R. Liss, Inc., New York, (1982).
- 8) de Weerd-Kastelein, E. A., Keijzer, W., Rainaldi, G. and D. Bootsma, Induction of sister chromatid exchanges in xeroderma pigmentosum cells after exposure to ultraviolet light. *Mutation Res.*, 45, 253-261, (1977).
- 9) Chaganti, R. S. K., S. Schonberg and J. German, A many-fold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 71, 4508-4512, (1974).
- 10) Hand, R. and J. German, A retarded rate of DNA chain growth in Bloom's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)*, 72, 758-762, (1975).
- 11) Tartof, K. D., Unequal mitotic sister chromatid exchanges as the mechanism of ribosomal RNA gene magnification. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 71, 1272-1276, (1974).
- 12) Obata, M., T. Kataoka, S. Nakai, H. Yamagishi, N. Takahashi, Y. Yamawaki-Kataoka, T. Nikaido, A. Shimizu and T. Honjo, Structure of a rearranged $\gamma 1$ chain gene and its implication to immunoglobulin class-switch mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 78, 2437-2441, (1981).
- 13) Van Ness, B. G., C. Coleclough, R. P. Perry and M. Weigert, DNA between variable and joining gene segments of immunoglobulin κ light chain is frequently retained in cells that rear-

- range the κ locus. *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)*, 79, 262 – 266, (1982).
- 14) Höchtel, J., C. R. Müller and H. G. Zachau, Recombined flanks of the variable and joining segments of immunoglobulin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 79, 1383–1387, (1982).
 - 15) Thompson, L. H., K. W. Brookman, L. E. Dillehay, A. V. Carrano, J. A. Mazrimas, C. L. Mooney and J. L. Minkler, A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. *Mutation Res.*, 95, 427–440, (1982).
 - 16) Dillehay, L. E., L. H. Thompson, J. L. Minkler and A. V. Carrano. The relationship between sister-chromatid exchange and perturbations in DNA replication in mutant EM 9 and normal CHO cells. *Mutation Res.*, 109, 283 – 296, (1983).
 - 17) Tsuji, H. and H. Kato, Three-way differential staining of sister chromatids in M3 chromosomes. *Evidence for spontaneous sister chromatid exchanges in vitro. Exp. Cell Res.*, 134, 433 – 444, (1981).
 - 18) Mazrimas, J. A. and D. G. Stetka, Direct evidence for the role of incorporated BUdR in the induction of sister chromatid exchanges. *Exp. Cell Res.*, 117, 23–30, (1978).
 - 19) Luck, D. C., and M. D. Bick, Determination of 5'-bromodeoxyuridine in DNA by buoyant density. *Anal. Biochem.*, 77, 346 – 349, (1977).
 - 20) Skoog, L., An enzymatic method for the determination of dCTP and dGTP in picomole amounts. *Eur. J. Biochem.*, 17, 202–208, (1970).
 - 21) Lindberg, U. and L. Skoog, A method for the determination of dATP and dTTP in picomole amounts. *Anal. Biochem.*, 34, 152 –

160, (1970).

- 22) Tsuji, H., T. Shiomi and I. Tobari, High induction of sister chromatid exchange and chromosome aberration by 5-bromodeoxyuridine in an ethyl methanesulfonate-sensitive mouse lymphoma cell mutant (ES 4). in *Proc. Int. Sym. SCE*, in press.
- 23) Davidson, R. L., E. R. Kaufman, C. P. Dougherty, A. M. Ouellette, C. M. Difolco and S. A. Latt, Induction of sister chromatid exchanges by BUdR is largely independent of the BUdR content of DNA. *Nature* 284, 74-76, (1980).
- 24) Shiraishi, Y., T. H. Yoshida and A. A. Sandberg, Analysis of single and twin sister chromatid exchanges in endoreduplicated normal and Bloom syndrome B-lymphoid cells. *Chromosoma*, 87, 1-8, (1982).
- 25) Shiraishi, Y., T. H. Yoshida and A. A. Sandberg, Analyses of bromodeoxyuridine-associated sister chromatid exchanges (SC-Es) in Bloom syndrome based on cell fusion: Single and twin SC-Es in endreduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 80, 4369-4373, (1983).
- 26) Liu, P. K., C. C. Chang, J. E. Trosko, D. K. Dube, G. M. Martin and L. A. Loeb, Mammalian mutator mutant with an aphidicolin-resistant DNA polymerase α . *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 80, 797-801, (1983).

IV-4

マウス白血病細胞(L5178Y)由来の変異原高感受性突然変異株におけるガンマ線誘発染色体異常

高橋 永一*

はじめに

DNA損傷に起因する放射線の生物効果を知る上で染色体異常は極めて鋭敏な指標であり、遺伝的リスク評価や修復過程を理解するのに有効な手段である。ここではマウス白血病細胞(L5178Y)から分離した放射線高感受性突然変異株(M10およびQ31)を用いたガンマ線誘発染色体異常について述べる。

1. 材料及び方法

野生株、L5178Y細胞から分離した電離放射線高感受性株(M10)及び紫外線高感受性株(Q31)を用いた。培養液は10%牛血清を含むFischerである。対数増殖期の細胞に総線量1.0 Gyのガンマ線を照射し、経時的(3, 6, 9, 12, 15, 18, 21時間)に細胞を固定し、常法に従って染色体標本を作成した。

2. 結果及び考察

表1は各細胞系の一細胞周期における染色体異常である。培養開始初期では染色体型異常が多発し、徐々に低下する。一方染色体型異常は経時的に増加する。これは細胞周期の各時期におけるガンマ線による異常の生成機構の差を反映している。系統間の頻度を比較すると、Q31はL5178Yと大差はなく、ガンマ線に対して高感受性ではない。一方、M10はすべての異常が多発し、L5178Yに比べて4~7倍高く高感受性である。更に二動原体染色体の増加に伴って三放射状染色分体交換の出現は注目して値する。図1は染色体型異常(ギャップと切断の総数)の経時的頻度を示したものである。Q31はL5178Yと同じく3hで最高値を示し、徐

* 放射線医学総合研究所・遺伝研究部

表1. ガンマ線 (1.0 Gy) 照射による各細胞の一細胞周期における染色体異常

Cell strain	h	Nhmber of cells ^{a)}	D	CR	F	Iso-b	Number of cells	Dots		Iso-g	Tg	Tb	Ex.		
								chr.	ctd.				qua.	tri.	comp-lex
L5178Y	3	100	0	0	0	1	100	1	3	1	32	11	8	0	1
	6	100	1	0	0	3	100	2	1	0	9	7	5	0	0
	9	200	12	0	10	15	150	0	10	6	0	20	6	0	0
	12	200	28	0	25	26	150	0	13	10	3	7	9	2	0
	15	100	6	0	8	2	220	1	10	3	1	11	10	5	0
	3	30	2	0	0	3	100	0	4	24	1	104	183	30	0
	6	80	5	0	3	27	100	1	18	30	6	151	200	44	1
	9	95	8	0	6	89	100	0	18	21	4	55	86	44	4
	12	77	11	0	10	73	100	0	45	38	3	52	70	43	6
Q31	15	81	27	1	23	101	100	0	56	62	3	58	68	49	18
	18	100	55	1	56	223	100	0	40	36	2	23	32	31	17
	21	100	34	1	77	110	100	1	63	57	7	23	38	32	13
	3	200	0	0	0	6	180	0	0	0	4	119	43	12	0
	6	100	2	0	2	4	200	0	4	3	7	50	9	11	1
	9	200	8	0	11	10	200	0	2	1	11	43	10	7	0
	12	300	12	0	14	19	200	0	9	9	9	35	2	4	1
	15	200	27	0	30	16	200	1	21	7	5	33	9	1	0
	18	100	5	0	13	5	200	1	7	9	1	10	2	1	0

a) C-バンド法による。

表1の略語の説明

D : 二動原体染色体, CR : 環状染色体, F : 染色体断片, Iso-b : 同位染色体分体切断, A R : 無動原体環状染色体, Dots(chr) : 染色体型点状染色体, Dots(cfd) : 染色分体点状染色体, Iso-g : 同位染色分体ギャップ, Iso-b : 同位染色分体切断, Tg : 染色分体ギャップ, Tb : 染色分体切断, Ex (qua) : 四放射状染色分体交換, Ex (fri) : 三放射状染色分体交換, Ex (complex) : 三本の染色体による分体交換。

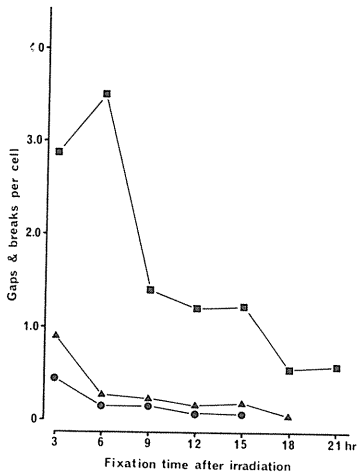


図 1. ガンマ線 (1.0 Gy) 照射による各細胞の染色分体ギャップと切斷の経時的頻度
 ●: L5178Y, ▲: Q31,
 ■: M10

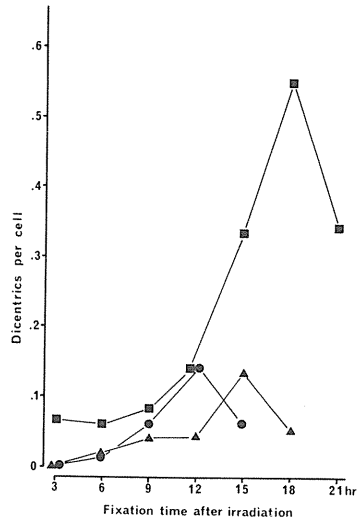


図 2. ガンマ線 (1.0 Gy) 照射による各細胞の二動原体染色体の経時的頻度
 ●: L5178Y, ▲: Q31,
 ■: M10

々に自然発生頻度に低下する。一方、M10は3h同様6hでも最高頻度を示し、分裂遅延を示唆している。その後頻度は徐々に低下するが、自然発生頻度までは低下せず、 G_1 期と考えられる時期でL5178Yの約6倍高く観察される。図2は染色体型異常(二動原体染色体)を指標にしたものである。L5178Yは12h、Q31は15h、M10は18hでその最高頻度を示している。この細胞時期はその生成機構から G_1 期と考えられ、最高頻度を示す時間がその一細胞周期の時間と思われる。非照射細胞での一周期はL5178Y: 11.8h、Q31: 14.0h、M10: 13.8hであることから、L5178YとQ31は大旨一致するが、M10は約3時間後にズレており、 G_2 期で分裂遅延が起っていることを示唆している。以上の結果から、M10がガンマ線に対して、高感受性である原因を探ってみる。 G_2 期におけるDNA

二重鎖切断は染色分体型として観察され、 G_1 期における切断はDNA合成期を経て染色体型異常となる。もし、ある細胞がDNA二重鎖切断を修復できないとすると、 G_2 期では染色分体型異常が、 G_1 期では染色体型異常が高頻度に出現するはずである。M10の結果は、両者共に高頻度に出現している。従って、この染色体での高感受性はガンマ線誘発DNA二重鎖切断の修復経路が機能していない結果によるものと考えられる。もう一つの特徴は三放射状染色分体交換の出現である。この異常はDNA単鎖切断と二重鎖切断との相互作用で生成される。もし単鎖切断に関与する修復経路に欠損があるならば、 G_1 期で染色分体型異常が高頻度に出現するはずである。実際、誘発された染色分体型ギャップ及び切断はL5178Y細胞の約6倍高く観察されている。これから、単鎖切断の修復経路にも欠損があると考えられる。紫外線高感受性Q31はガンマ線に対してL5178Yと同程度の感受性しか示さないことから、ガンマ線誘発DNA損傷の修復経路には欠損がないと考えられる。これらの変異株はataxia telangiectasiaやxeroderma pigmentosumと近似しており、ヒトを含む哺乳類の修復の本態を知る上で貴重な材料である。分子レベルおよび染色体レベル間での対応関係、更にそれらのギャップがどのようなものであるかを明らかにする必要があり、これらを解明することによってヒト遺伝病の原因や染色体異常生成機構について多くの情報が得られるものと考えられる。

参 考 文 献

- 1) Bridges, B. A. and D. G. Harnden (ed.) (1982) Ataxia-telangiectasia, A cellular and molecular link between cancer, neuropathology, and immune deficiency, John Wiley and Sons.
- 2) Parrington, J. M., J. D. A. Delhanty and H. P. Baden (1971) Unscheduled DNA synthesis, U.V. - induced chromosome aberrations and SV₄₀ transformation in cultured cell from xeroderma pigmentosum, Ann. Hum. Genet., 35, 149-160.
- 3) Sato, K. and N. Hieda (1979a) Isolation and characterization of a mutant mouse lymphoma cell sensitive to methyl methanesulfonate and X-rays, Radiation Res., 78, 167-171.

- 4) Sato, K. and N. Hieda (1979b) Isolation of a mammalian cell mutant sensitive to 4-nitroquinoline-1-oxide, Int. J. Radiat. Biol., 35, 83-87.
- 5) Takahashi, E., H. Tsuji, T. Shiomi, K. Sato and I. Tobari (1982) Characteristics of γ -ray-induced chromosomal aberrations in mutagen-sensitive mutants of L5178Y cells, Mutation Res. 106, 225-236.
- 6) Takahashi, E., I. Tobari, T. Shiomi and K. Sato (1983) Chromosomal hypersensitivity in mutant M10 and Q31 mouse cells exposed to ultraviolet radiation (UV) and 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO), Mutation Res., 109, 207-217.

V 自然環境での遺伝損傷は
どれだけあるか

V-1

日本における遺伝病の地理的変異

安田 徳一*

伊藤 綽子*

はじめに

ヒトの多様性は親から伝えられた遺伝情報を土台とし、各人の生存する環境からの情報との相互作用の結果として観察される。この多様性がいかに大きく、それ故に各人が一意的であるかは簡単な計算からも理解できる。遺伝情報は23対の染色体に格納されているが、化学的にDNA分子の4種類の塩基、アデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)の配列で定められている。細胞あたりのDNA量から計算すると約80億個の塩基が遺伝情報を構成している。これを英語のアルファベットに換算すると約34億字の文章に相当する。幾通りの可能性が考えられるか、いかに膨大であるかが窺える。その上、この遺伝情報の一部で作られた人体の一部の脳は中央情報処理室として五感を通じて絶えず入ってくる外界の入力データを処理し、ヒトの行動をコントロールしている。

こうしてみれば、人間が生存するためにはまず親伝来の遺伝的命令文があって、これに外界からの経験や学習による文化伝達等の情報が加わってはじめて人間らしい生活を営んでいるのである。しかもこの遺伝情報は生命の誕生以来35億年余の長い進化の歴史を経て作り上げられたものである。

そこで膨大な多様性の一面として、ヒトの遺伝病をとらえることは放射線の遺伝的影響を考える上で重要である。現在の環境では“健康”といっても、過去あるいは未来においても健康であるかは疑問の余地がある。とはいえ、我々は現在の地球環境に生きているのである。そこで、この環境で生存上なんらかの不利な状態が、健康に対して“病気”であり、その主たる要因が遺伝情報によるのであれば“遺伝病”となる。

* 放射線医学総合研究所・遺伝研究部

このように考えると、遺伝病の発生頻度に地理的変異が観察されても不思議ではない。民族的に“一様な日本人”は、日本列島に長く隔離の状態では生活を含み、しかも今日1億1千万余の人口をかかえており、世界に類がない。

この報告では劣性遺伝病、とくにヒスチジン血症の地理的変異が瀬戸内海をさへんで、中国・四国地方で高頻度、東北地方で低かった事実を示し、その要因としてヒスチジン遺伝子の機会的変動が重要であることを述べる。

1. 資料と方法

昭和52年度より全国的に行なわれている先天性代謝異常等検査実施状況資料（厚生省母子衛生課）を用いて、日本における常染色体劣性遺伝病の地理的分布を検討した。検査が軌道に乗ったと考えられる昭和54年度以降の3ケ年の間に延出生児4,708,874の94%が生後1週間以内にこの検査を受けている。その結果、ヒスチジン血症621名、フェニルケトン尿症72名、ガラクトース血症61名、ホモシスチン尿症31名が発見された。これらの数値は100万人当りにすると、それぞれ140,16,14,7になる（Yasuda,1984）。

地理的分布の一様性を確立するため、各先天性代謝異常症毎の(47)都道府県別の発生数 (x_i) が平均値 m_i のポアソン分布にしたがうとする。各都道府県における異常数が同じポアソン確率で得られたかどうか——つまり、異常者が各都道府県で同じように分布しているか——を検定する問題は「 $x (= x_1 + x_2 + \dots + x_{47})$ 個の玉を47個の箱にそれぞれ $(x_1, x_2, \dots, x_{47})$ のやり方で入れたが、玉がそれぞれの箱に入る確率は M_i である」ことを検定する問題と同等である。後者の問題は

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{47} \frac{(x_i - M_i x)^2}{M_i x}$$

が自由度46のカイ自乗分布に従う性質を利用して検定することが出来る。この方法で、母数 m_i が都道府県の検査数 (b_i) に比例すると考えれば、未知の定数 λ に対して、 $m_i = b_i \lambda$ 。したがって、 $m = \lambda (b_1 + b_2 + \dots + b_{47})$ だから

$$M_i = b_i / (b_1 + b_2 + \dots + b_{47})$$

となる。 $b_1 + b_2 + \dots + b_{47}$ は全国における総検査数だから、 M_i は各都道府県で

の検査数の日本全体での割合に相当する。未知の定数が消去されて M_i が実測値から求められるのがこの方法の特徴となっている。

2. 結 果

図1はヒスチジン血症の各都道府県別異常数(x_i)、100万人あたりの発生頻度(I_i)を示したもので、全国で適合度のカイ自乗値 $x^2=166.49$ は自由度46で有意である($P \ll 0.001$)。各都道府県については自由度1のカイ自乗値3.84をもって5%水準で有意の目安とした。異常数が期待値より低かったのは、秋田県、群馬県、東京都、山梨県、兵庫県、大分県、沖縄県の1都6県であり、一方異常数が期待値より高かったのは、大阪府、島根県、岡山県、広島県、徳島県、香川県、愛媛県の1府6県であった。大阪府を除き、6県は瀬戸内海を囲う中国・四国地方であることは大変印象的である(図1)。これらは統計的に有意である。

次はフェニルケトン尿症患者数(x_i)と100万人あたりの発生頻度(I_i)である。適合度のカイ自乗値は $x^2=72.90$ (自由度46)で統計的に有意である($P \approx 0.01$)。とくに京都府、福岡県で有意に高く出ているが、これは5%点を基準にしているためとも考えられる。これは40回に2度は差が出ることを予想して検定しているからで、47都道府県中2~3県で第一種の過誤が起り得ることの例証となっている。

ガラクトース血症、ホモシチン尿症については適合度のカイ自乗値はそれぞれ $x_{46}^2=175.93$ ($P \ll 0.001$)、 $x_{46}^2=55.76$ ($P \approx 0.15$)という値が得られたが、いずれも異常者数が少なく、地理的変異として確認するのは困難と考える。各都道府県別について言えば、岐阜県、岡山県、愛媛県でガラクトース血症が有意に多く、ホモシチン尿症では埼玉県、奈良県で有意となっている。

3. 考 按

瀬戸内海を囲む形で、中国・四国地方にヒスチジン血症の発生頻度が統計的に有意に高いのは大変興味深い事実である。

第1に考えられるのは「受検率の違いという人為的な偏りによる」という見方である。しかしながら、全国受検率が90%を越えていること、とくに東北地方で受検率が低く、中国・四国地方で受検率が高かったという傾向はなく、都市部で若

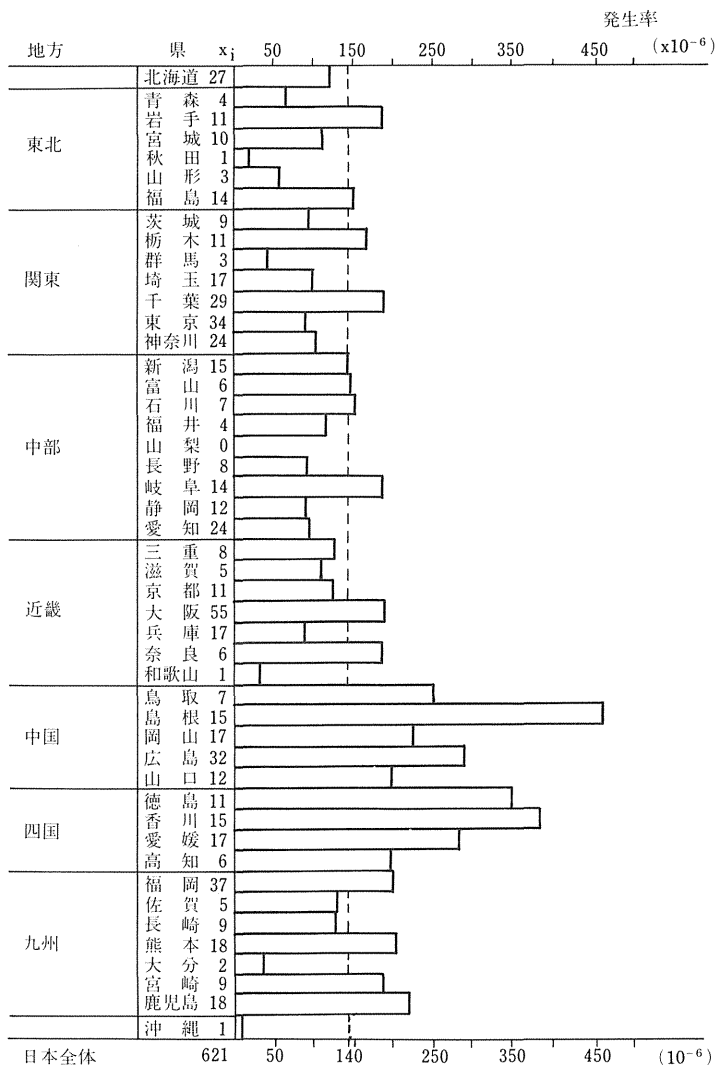


図 1. ヒスタジン血症の発生頻度
 x_i は患者数。発生率は 100 万出生当りである。

干受検率が低い傾向はみられたが、この場合の地理的集積性の要因とは考え難い。

第2の要因は「近親婚」である。ヒスチジン血症の遺伝様式は「常染色体劣性」なので、発生頻度と相関があれば、地理的集積性の一部を説明することができよう。先天性代謝異常等検査実施状況資料には当然のことながら近親婚についての記載はなく、止むを得ず昭和47年(1972)に行った全国調査(今泉他, 1975), および沖縄については、野原他(1976)の報告によるいとこ婚の地方別頻度を用いた。これは、いとこ婚は近親婚でも比較的容易に調査し得ること、あまり小地域のいとこ婚率では地域を代表しているのかの危惧を考慮したものである。本来なら約30年前昭和20年(1945)頃の親の近親婚頻度も知りたいのだが全国資料は望むべくもない。そこで“いとこ婚頻度の地方差は、昭和20年と昭和47年ではあまり変らない”と仮定し、ヒスチジン血症を始めとして、フェニールケトン尿症、ホモヒスチン尿症、ガラクトース血症、それぞれの発生頻度といとこ婚率との単純相関係数を計算してみた(表1)。フェニールケトン尿症では正の相関($r=0.41$)がみられたが、残りの3異常では負あるいは零相関である。まったく無関係の調査資

表1 地方別いとこ婚率(%)と先天性代謝異常症発生率

(百万人当たり)

地 方	いとこ婚率 (%)	発 生 率 (x10 ⁶)			
		1	2	3	4
北 海 道	1.37	122	9.0	4.5	0.
東 北	2.75	106	4.9	4.9	2.5
関 東	1.70	109	11.1	8.6	6.0
中 部	2.10	112	19.9	12.5	8.7
近 畿	1.83	137	18.6	22.6	12.0
中 国	1.37	272	13.1	26.2	6.6
四 国	0.96	301	18.4	30.7	18.4
九 州	3.97	174	32.0	14.2	3.6
沖 縄	2.05	16	0.	0.	0.
相関係数(r)*		-0.31	0.41	0.06	-0.39

1. ヒスチジン血症 2. フェニールケトン尿症 3. ガラクトース血症
4. ホモヒスチン尿症

*いとこ婚率と各異常症発生率の相関係数

料をつき合せているので、この相関係数が事実を正しく反映しているかどうかは疑問の余地が残る。しかし、この結果を形式的に解釈するなら、いとこ婚は、ヒスチジン症の地理的集積性の要因として考えられたとしても、一次的な要因ではなからう。この問題の解決には少なくともいとこ婚を含めた家族集積性の調査を、代謝異常症の高発生地区および低発生地区で行う必要がある。

第3に考えられる要因は「遺伝子頻度の機会的変動」である。巨視的に考えれば、日本人は列島にほぼ隔離された集団で、その中で移住をし、都道府県別の47“部分集団”を構成している。このような集団構成では、遺伝子頻度の機会的変動と部分集団間の移住も含めた突然変異による遺伝子頻度の変化とが平衡を保ち、劣性ホモ（代謝異常者）の発生率はガンマ分布であらわされることが知られている（Nei, 1968）。ただし、部分集団はある先祖集団からわかれたものとし、劣性遺伝子の頻度はあまり高くないとする。部分集団の有効な大きさをN、劣性遺伝子頻度をq、劣性ホモ（ここでは先天性代謝異常者に相当する）の淘汰係数をs、突然変異率をuとすると、発生率(I)のガンマ確率は

$$\phi(I) dI = \frac{A^B}{\Gamma(B)} I^{B-1} e^{-AI} \cdot dI$$

で表わされる。ただし $I = q^2$, $A = 2Ns$, $B = 2Nu$ 。ここで、発生率の期待値は B/A であることを指摘しておく。

このモデルでは $I = q^2$ の式からも明らかかなように任意婚を仮定している。すでに述べたように、近親婚と異常発生頻度とに相関が検出できなかったとは言え、現実の発生率は

$$I = q(q + \alpha + h)$$

に近いものであろう。ここに α は近親婚の程度を表わす集団近交係数で1972年の調査では $\alpha = 0.00179$ である。h はヘテロ個体が発症する割合であるが、ここでは $h = 0$ とする。したがって $q > \alpha$ であれば $I = q^2$ がほぼ成立し、前出のガンマ確率のモデルを資料に適用しても差し支えがなからう。

そこで、集団近交係数として、1972年調査の数値0.002と30年前頃の数値と考えられる0.005それぞれについて、方程式 $q^2 + \alpha q = I$ から遺伝子頻度qを、ヒスチジン血症、フェニルケトン尿症、ガラクトース血症、ホモシスチン尿

表2. 劣性遺伝病の遺伝子頻度の評価

異常症	発生率(I) ($\times 10^6$)	$q^2 + q\alpha = I$ の解としての 遺伝子頻度 (q)		
		($\alpha = 0$)	($\alpha = 0.002$)	($\alpha = 0.005$)
ヒスチジン血症	140	0.0118	0.0109	0.0096
フェニルケトン尿症	16	0.0040	0.0031	0.0022
ガラクトース血症	14	0.0037	0.0029	0.0020
ホモシスチン尿症	7	0.0026	0.0018	0.0014

α = 集団近交係数

表3. 先天性代謝異常症発生頻度のガンマ分布への適合検定

異常症	B ($=2Nu$)	$A \times 10^4$ ($=2Ns$)	発生率		適合度の カイ自乗値 (自由度)
			期待値 (B/A) $\times 10^6$	観察値 ($\times 10^6$)	
ヒスチジン血症	2.56 \pm 0.52	1.63 \pm 0.35	157 \pm 14	140	5.03 (7)
フェニルケトン尿症	2.72 \pm 0.70	0.11 \pm 0.03	26 \pm 4	16	8.75 (10)
ガラクトース血症	1.56 \pm 0.42	0.05 \pm 0.02	29 \pm 5	14	13.25 (16)
ホモシスチン尿症	2.56 \pm 0.75	0.14 \pm 0.04	18 \pm 4	7	17.98* (7) [6.84 (6)]#

N: 県あたりの平均的な集団の有効な大きさ

u: 突然変異率 (移住効果も含む)

s: 淘汰係数

* 5%水準で有意

発生率 ($5 \sim 15$) $\times 10^{-6}$ をプール

症について計算してみた (表2)。ヒスチジン血症だけが条件 $q > \alpha$ を充している。したがって、ガンマ確率への適合は、ヒスチジン血症では検定することができるが、他の3先天性代謝異常症については傾向を知るための計算にとどまる。

表3はその結果をまとめたものである。ホモシスチン尿症は発生頻度が低いため、若干統計的な修正を行う必要があったが、いずれにおいてもよく適合している。しかしながら、ヒスチジン血症を除き発生率において期待値と観測値とが一致していない。これは $q > \alpha$ の条件が成立していないことに依ると考えられる。図2は結果をグラフで表示したもので、横軸が代謝異常発生頻度、縦軸は特定の発生頻度の都道府県数で、曲線が期待度数、ヒストグラムは観測度数である。代謝異常者が発見

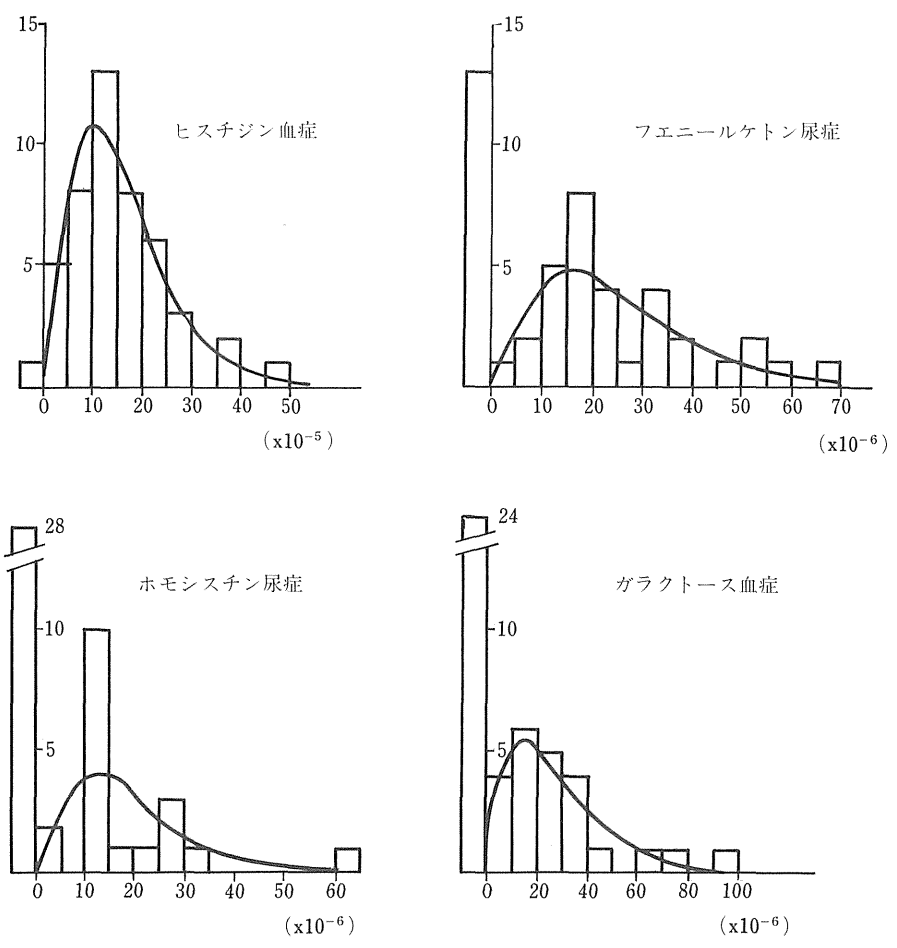


図 2. 日本における先天性代謝異常症の県別発生率のガンマ確率への適合

横軸は発生率、縦軸は特定発生率を示す県の数、ヒストグラムは実測値、曲線は期待値を表わす。患者が発見されなかった県数は最左端にヒストグラムで示してある。

されなかった都道府県の度数もあわせて縦軸の左側に示してある。ヒスチジン血症の観測値がガンマ模型に適合していることがわかるが、他の3異常症でも傾向としては一致している。

以上の考察から、ヒスチジン血症の発生頻度が、瀬戸内海を囲んだ中国・四国地方で高頻度であることの説明の一つとして、遺伝子頻度の機会的変動が関与していることが示唆される。

ヒスチジン血症の地理的集積性を説明する要因の第4として考えられるのは、淘汰の働きである。全国的スクリーニングが行なわれている先天性代謝異常症はいずれも放置すれば精神遅滞を伴うと言われ、その予防のための早期発見と、その早期治療を行うのがその主旨でもある。ところが、スクリーニング開始以前に出生し、精神遅滞となった成人にヒスチジン血症によると考えられる症例がほとんど発見されていないことから、100万人あたり140人ももの新生児の予後がどうなるのかは重大関心事である(和田義郎、私信)。先のガンマ模型での分析で、パラメータAは淘汰係数(s)を含んでいることから、4異常症の自然淘汰の作用の程度を知ることができる。集団の有効な大きさ(N)は同一集団について分析しているので、一定と考えてもよい。もちろん模型の前提条件に関する問題はあるが、表4からわかるように、ヒスチジン血症では $A = 1.63$ で、フェニルケトン尿症($A = 0.11$)、ガラクトース血症($A = 0.05$)、ホモシスチン尿症($A = 0.14$)に比較して1桁オーダーが高い。他の3異常症にくらべて、淘汰は緩やかと言えよう。緩やかだから他の異常症に比較してより遺伝子頻度の機会的変動の効果が検出できたのではなからうか。

いずれにせよ、地理的集積性の要因としての淘汰作用は現在のところわからない。

おわりに

先天性代謝異常症の一つヒスチジン血症の新生児における発生頻度が、瀬戸内海を囲む中国・四国地方で統計的に有意に高いことがわかった。一次的な要因として遺伝子頻度の機会的変動が考えられ、近親婚、淘汰作用はもし考えられたとしても二次的であろうと推論した。

参 考 文 献

- 1) Yasuda, N. : Geographical variations in inborn errors of metabolism in Japan. *Human Heredity* 34 : 1-8, 1984.
- 2) Imaizumi, Y., Shinozuka, N., Aoki, H. : Inbreeding in Japan : results of a nation-wide study. *Jpn. J. Hum. Genet.* 20 : 91-107, 1975.
- 3) 野原 年, 仲間智隆, 古庄敏行, 安田徳一 : 沖縄県地区における近親婚の集団遺伝学的研究, 日本人類遺伝学会第20回大会, 東京, 人類遺誌20 : 291, 1976.
- 4) Nei, M. : The frequency distribution of lethal chromosomes in finite populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 60 : 517 - 524, 1968.

V-2

極低線量域の放射線影響と 自然突然変異率の変動

田 野 茂 光 *

はじめに

環境レベルでの放射線の生物に与える影響については、微生物、動物、植物や培養細胞など多くの生物種を用いて実験が行われている。しかし、これらの実験結果から線量効果関係を正しく評価し、リスクの推定を行うためにはまだ多くの解決しなければならない問題がある。ここではそれらの問題の一つとして極低線量域での放射線の影響と自然突然変異率の変動とについて考えてみたい。

1. 極低線量域での放射線の線量効果関係

現在一般に低線量といわれる放射線の線量は数10 rad前後であり、多くの実験結果から誘発突然変異率は、高、中線量域で得られた直線上にのる線量効果関係があると考えられている。しかし、環境レベルの放射線量を対象とした極低線量域での突然変異誘発率は線量率を考慮した場合必ずしも直線的ではないという結果がある。

例えば、タバコの特異遺伝子座 (a_1^+ / a_1 a_2^+ / a_2) の復帰突然変異を指標として線量効果関係を検討するため、ウラン鉱床上でこのタバコを栽培して線量率をかえて行った実験では二相性の線量率効果が認められた(図1)⁽¹⁾。すなわち、線量率の高い部分では線量率の増加に対して突然変異誘発率は直線的に増加するが、低線量率部分では線量率の増加と変異率の増加とは無関係であった。この結果については統計的にはいくつかの直線のあてはめが可能であり、極低線量域においても線量効果関係を検討するには線量と同時に線量率も充分考慮しなければならない。ムラサキツユクサの変異検出系を用いた場合にも中性子照射で

* 東京大学農学部

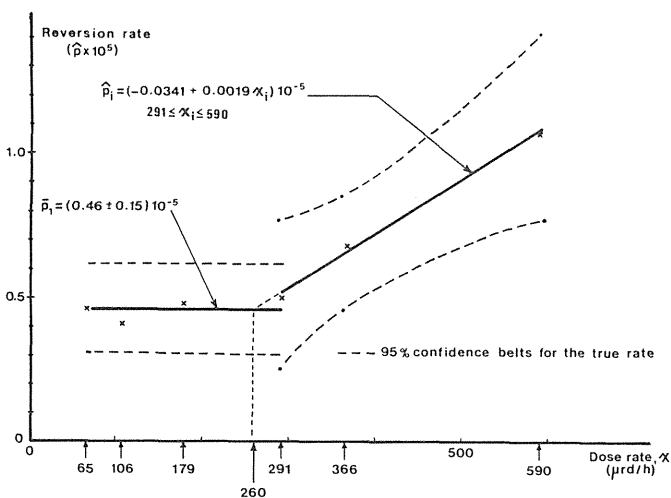


図 1. Dose-effect relationship over uranous outcrop
(Delpoux and Dalebroux, 1981)

線量率依存性のない二相性の線量効果関係が極低線量域で示唆される結果が得られている(未発表)。

2. 自然突然変異率の変動

生物は突然変異、染色体異常などについて固有の変異率をもっている。これは自然放射線は勿論、生存環境をとりまわっている種々の要因、例えば、温度、湿度、日射量その他の多くの物理的、生理的変動要因があり、完全に制御することは不可能である。従って環境レベルの放射線の生物学的影響をしらべるためにはできる限り環境条件を制御して実験をすることが要求されるが、さけられない変動要因をどのように取扱うか、また自然変異率の程度や変動幅などを充分考慮しなければならない。

自然突然変異率の変動について 1 例をあげると、ムラサキツユクサの雄しべ毛細胞を用いた突然変異検出系(雄しべ毛細胞の正常色である青色の発現に關与する遺

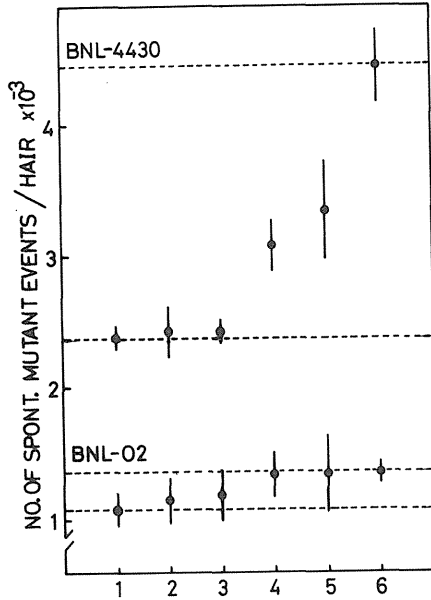


図2. Variation in spontaneous mutation rate in different clone of *Tradescantia*

伝子をヘテロにもつ系統で、遺伝子突然変異やこの遺伝子座の欠失などがおこると青色色素が生成されず、細胞は赤色になる)による実験結果は図2に示すように系統による自然突然変異率の差が明らかである。即ち、BNL-02系統(放射線高感受性)はBNL-4430系統(化学変異原高感受性)にくらべて自然突然変異率が低く、またその変動幅も小さい。逆にBNL-4430は変異率も高く、変動幅もはるかに大きい。同様な系統による差は他の生物種でもみられる。

また同一系統の場合でも、温度⁽²⁾、日長などの条件の制御下でなお年次による差が認められる⁽⁴⁾(表1)。5ヶ年の年次変動は最高 0.742×10^{-3} から最低 0.480×10^{-3} の幅があり、これは変異率の35%にも達している。さらにヒトの場合にも染色体異常の出現頻度は年令との関係で見ると、不安定型染色体異常が加齢とともに増加することが報告されている。このような加齢による自然突然率の変動はムラサキツユクサの雄しべ毛細胞の突然変異でも認められている⁽³⁾。この場合には、ヒトの染色体異常の結果とは逆に老化した植物体上の花におこる自然突然変異は若

表 1

Spontaneous Pink Mutation Frequencies by Year for Five Years for
Clone BNL-02

Date scored	No. of hairs per flower \pm S.E.	Total hairs scored	No. of pink mutant events	No. of pink events per hair \pm S.E. $\times 10^{-3}$
1971	321.0 \pm 8.53	971212	658	0.716 \pm 0.0421
1972	307.8 \pm 8.77	426058	322	0.742 \pm 0.0499
1973	319.3 \pm 6.80	200901	142	0.710 \pm 0.0821
1974	357.8 \pm 14.35	137512	82	0.580 \pm 0.0916
1975	368.5 \pm 19.07	293757	198	0.480 \pm 0.1507
1971-1975		2029440	1402	0.689 \pm 0.0309

(49 replicates)

(Underbrink, Unpubl.)

表 2

Spontaneous Pink Mutation Frequencies for Old and Young Plants and
Inflorescences of Clone BNL-4430 (*T. hirsutiflora* x *T. subacaulis*)

	No. of hairs per flower \pm S. E.	No. of cells per hair	Total hairs scored	Pink mutant events	Events per hair \pm S.E. $\times 10^{-3}$
Old plants					
Young infl.	362.9 \pm 7.40	-	113652	410	3.61 \pm 0.22
Old infl.	372.5 \pm 7.51	-	114576	364	3.19 \pm 0.23
Infl. combined	370.7 \pm 1.79	23.5	228228	774	3.40 \pm 0.16
Young plants					
Young infl.	367.4 \pm 12.74	-	112669	583	5.17 \pm 0.27
Old infl.	346.6 \pm 7.82	-	96119	508	5.25 \pm 0.31
Infl. combined	357.0 \pm 10.44	23.0	208741	1091	5.21 \pm 0.20

(Sparrow and Sparrow, 1976)

い植物体の花におけるよりも低かったが、それぞれの植物体上の花序の老若には関係がない(表2)。

染色体異常を含む自然突然変異率の変動は生物種により異なっているが、いずれも加齢が一つの要因として作用することは明らかであろう。

む す び

一、二の例をあげて述べたように自然突然変異率は種々の要因によりおこる変動幅をもっている。環境レベルの放射線による誘発突然変異を評価するためには、変異検出系として用いる生物種の選択、および変異検出指標の選択が実的な問題となる。さらに、それぞれの生物種は与えられた環境下で示す自然突然変異率に変動幅がある。従って自然突然変異率が低く、かつ変動幅の小さい高感受性の検出系を用いることが環境放射線による生物影響を評価し、リスクを推定するためには必要である。

参 考 文 献

- 2) DELPOUX, M. and M. A. DALEBROUX Genetic effects on the a_1/a_1 a_2/a_2 system of tobacco over a uranium outcrop in Lauragais (Aude, France). *Mutat. Res.* 83 : 375-382, 1981.
 - 3) MERICLE, L. W. and R. P. MERICLE Diurnal temperature difference as a modifier of mutagenesis. *Environ. Mutagen Soc. Newsl* 5 : 28-29, 1971.
 - 4) SPARROW, A. H. and R. C. SPARROW Spontaneous somatic mutation frequencies for flower color in several *Tradescantia* species and hybrid. *Environ. Expt. Botany* 16 : 23-43, 1976.
- UNDERBRINK, A. G., Unpublished data.

VI 遺伝リスク評価のための 生物学的，疫学的アプローチ

VI-1

遺伝リスク評価のため生物学的, 疫学的アプローチ

近藤 宗平*

このセッションでの話の中から, 放射線の遺伝的影響に関するものをひろってみる。

疫学的調査の結果は, 原爆被ばく者とそうでない人の次世代で, 遺伝性疾病の出現率に有意の差はない。しかし, 前者の群に多頻度の傾向があるので, しいて推定すれば, 倍加線量は, マウスのデータによる値の数倍になる(大竹)。染色体の相互転座の感受性は, サルの中でも種類によってことなる(戸張)。がんを誘発するポテンシャルをもっているような優性突然変異が, 親マウスのX線照射によって, 子孫にあらわれるが, その頻度は, 精原細胞や卵母細胞の被ばくが分割照射による場合, 著減する(野村)。チャイニーズハムスターの卵母細胞は成熟前にX線をあびてもほとんど染色体異常を起こさない(美甘)。

以上の発表は, これらの高等動物の性細胞には, 特有の放射線抵抗機能が存在することを強く示す。その機能は, 細胞内の修復例えばDNA修復とは次元が違うもので, 性細胞集団が個体の1器官としてふるまうために必須の特性 — 多細胞群団の集団防衛機能 — と考えられる。この耐性機能は, マウス, ハムスター, サル, ヒトによってもちかうことが, 本セッションで示唆された。マウスの遺伝的影響のデータを用いて, ヒトの遺伝的リスクを評価する手法では, この違いは大きな問題である。

* 大阪大学医学部

VI-2

生殖細胞における DNA 傷害の修復 と染色体異常生成

田 中 憲 穂*

はじめに

ヒトにおいて見い出される染色体異常（個体レベル）のうち、構造異常は親から受け継がれた場合も含めてその異常生成が配偶子形成過程のどの段階で生じたものかを推定することは不可能である。生殖細胞に生じた DNA 傷害が前核 DNA 合成期を経て、染色体異常として固定されると、その異常をもつ胚の大部分は初期胚、胎生期への過程で淘汰されてしまう。しかし一部安定型の転座とか比較的軽度な欠失や重複などの異常は淘汰をうけず個体として出産される。したがって個体レベルでの染色体異常誘発は、生殖細胞で生じた DNA 傷害が修飾や修復をうけ前核 DNA 合成期を介して固定される時の染色体異常のタイプと頻度に大きく左右される。ここでは生殖細胞のなかでも薬剤処理や放射線で高頻度に染色体異常を生じる精子細胞や成熟精子の時期について DNA 傷害の修飾や修復の面より染色体異常の生成を考えてみた。

1. 放射線に対するステージ感受性

染色体異常や優性致死誘発に関する減数分裂後の放射線感受性は図 1 に示すように、処理後 1 2 日目前後をさかいにして、その頻度が前期精子細胞では成熟精子期の約 2 倍と高くなる。

(1) UDS との関連

これを DNA 修復の面から考えてみると、不定期 DNA 合成 (UDS) 能のある前期精子細胞の時期に染色体異常が高く、逆に UDS のみられない後期精子細胞か

* 食品薬品安全センター・遺伝学研究室

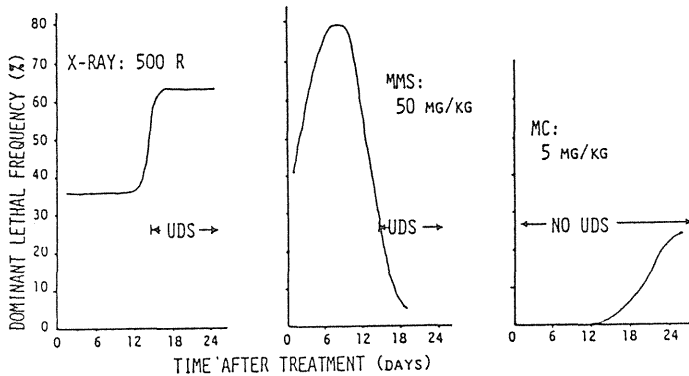


図 1. 放射線および化学物質に対する精子形成過程のステージ感受性

ら成熟精子の時期に染色体異常が低く生じていることになり UDS が DNA の初期傷害の修復の指標であることと矛盾する。傷害を受けた染色体間の rejoining が UDS のみられる前期精子細胞と受精後の前核期に起っていると仮定すれば、受精卵で見出される構造異常染色体のうち、修復誤りの結果と考えられる交換型異常のしめる頻度は前期精子細胞で高くなる事が考えられる。事実、交換型のみ頻度は前期精子細胞で 18%、成熟精子で 11% と高くなる傾向がみられ、X線傷害の修復には UDS も関与している事¹⁾が示唆された。

(2) 修復阻害剤の影響

X線により生じた DNA 傷害と染色体異常誘発の関連については、in vitro 条件下で cytosine arabinoside (Ara C) や aphidicolin (Ap) などの修復阻害剤を作用させることにより、その生成機構の研究がなされている²⁾³⁾。そこで本研究では前期精子細胞と成熟精子の感受性の差を修復の面からみるため次の実験を行った。除去修復の阻害を示すと考えられている Ara C と、DNA 傷害が生じた時にその活性が誘導される poly (ADP-Rib) polymerase の阻害剤⁴⁾⁵⁾である benzamide (BA) を X線照射前と前核形成時に処理することで優性致死率の変化をみた。

BDF₁・雄マウス(9週令)に 500 rad (93.6 r/min) の X線を照射した。

AraC (15mg/kg×2)は照射直前直後に、BA (50mg/kg×1)は照射直前に腹腔内投与し、照射後6-9日目(後期精子細胞)と15-18日目(前期精子細胞)に無処理雌マウスとそれぞれ交配した。交尾した雌マウスは前核形成期にあたる排卵推定時刻の6時間後より2時間おきにAraC処理群では10mg/kgを2回、BA処理群では50mg/kgを2回腹腔内投与した。これらのマウスは妊娠の12-13日目に開腹し優性致死率を調べた。その結果を表1と2に示した。X線照射した後期精子細胞および前期精子細胞いずれのステージにおいてもAraC処理あるいはBA処理による優性致死の増強効果はみられなかった。これは照射とほぼ同時に処理した場合でも、更に前核形成期に追加処理してもその影響はみられなかった。X線に対し感受性の異なる両ステージではそれぞれ異なる過程で染色体異常が形成されている可能性もある。とくにUDSのみられる前期精子細胞では修復阻害剤の影響により染色体異常が増加し優性致死率が高くなるのが推定されたが、その効果は本実験条件下では認められなかった。生体内代謝や到達性の問題もあり処理した阻害剤の投与量が修復に影響を及ぼすに充分でなかったことも考えられる。しかし修復能以外の要因、すなわち放射線による傷害は放射線エネルギーによる直接的傷害に加え、細胞側の二次的要因が加わった間接的傷害が大きなファクターとなっていることから、X線によるsingle-,double-strand breaks およびbase damageなどの傷害の生成が精子へと成熟していく過程の両ステージで質的、量的に異なっている可能性がある。

(3) 酸素効果について

OnoとOkada(1976,1977)⁶⁾⁷⁾は酸素下または低酸素下の*in situ*の精巣を用いた実験で生殖細胞に高線量(10krad-60krad)のγ線を照射し、精子形成過程の各細胞集団でのsingle strand breaks(ssb)の生成とそのrejoiningを調べた。その結果ssbに関する精子細胞の放射線感受性は他の正常組織に比べ有意に低く、更に生じたssbのrejoiningは成熟精子では精子細胞のそれに比べ明らかに未修復傷害が多いことを報告している。これらのことより、成熟精子と前期精子細胞での放射線感受性の差は修復能の有無に加え、精子成熟過程の組織環境の違いによる酸素条件に大きく起因していることが考えられる。従って、低酸素条件にあると思われる成熟精子よりも前期精子細胞では照射による活性酸素(OH,

表 1. X線とAraC併用処理による優性致死試験の結果

Group	Stages of irra.	No. of females with IMP	No. of [*] IMP	No. of [*] living embryos	No. of [*] dead embryos	DL (%)
X-ray	Lspt & spm	20	7.75	5.85	1.9	37.4
X-ray + AraC	"	20	9.1	7.15	1.95	23.5
X-ray + AraC + AraC**	"	20	8.9	6.6	2.3	29.4
+ AraC + AraC**	"	20	9.7	9.5	0.2	1.6

X-ray	Espt	18	7.16	3.5	3.6	62.5
X-ray + AraC	"	14	6.85	2.57	4.28	72.5
X-ray + AraC + AraC**	"	17	7.17	2.94	4.23	68.55
+ AraC + AraC**	"	16	9.68	9.43	0.25	0.85

* Per female with IMP ** AraC was injected in pronuclear stage again.

H_2O_2 , O_2^-) の生成が多く, それによって生じる base damage (塩基の修飾, 酸化, クロスリンク) や糖やリン酸部分の損傷による strand breaks が染色体異常や優性致死の頻度を高めている要因である可能性がある。そこで前期精子細胞と成熟精子の時期に γ 線を照射し, 同時に放射線増感剤もしくは放射線防御剤を処理することで両ステージの優性致死率に変化がみられるかを調べた。

表 2. X線と B A 併用処理による優性致死試験の結果

Group	Stages of irra.	No. of females with IMP	No. of IMP*	No. of living embryos*	No. of dead embryos*	DL (%)
X-ray	Lspt & spm	20	7.75	5.85	1.9	37.4
X-ray + BA	"	21	8.19	6.14	2.04	34.3
X-ray + BA + BA**	"	18	8.11	6.61	1.5	29.3
+BA+BA**	"	21	9.61	9.28	0.33	- 0.74

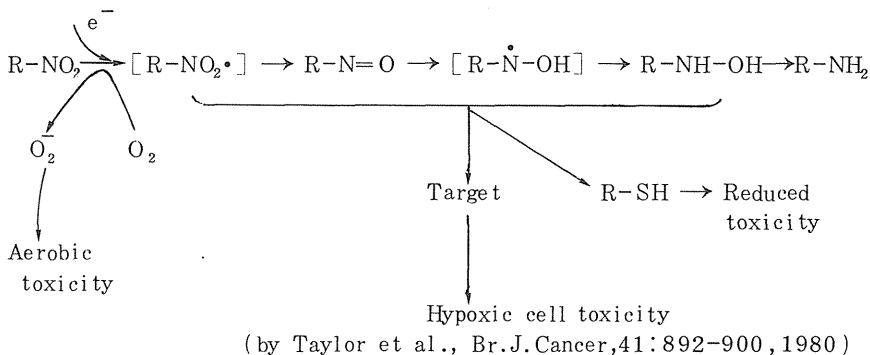
X-ray	Espt	18	7.16	3.5	3.6	62.5
X-ray + BA	"	15	6.46	2.53	3.93	72.9
X-ray + BA + BA**	"	21	7.23	3.14	4.09	66.4
+BA+BA**	"	21	10.19	9.61	0.57	2.78

* Per female with IMP ** BA was injected in pronuclear stage again.

放射線は ^{60}Co による γ 線 400 rad (173.4 r/min) を 9 週令の B D F₁ 雄マウスに照射した。放射線増感剤としては低酸素細胞での放射線治療に用いられ図 2 に示すように電子親和性物質である 2-nitroimidazole misonidazol (MIS) を照射 90 分前に 700mg/kg i.p. 1 回投与した。MIS は低酸素条件下で、①そのニトロ基の還元生成物が細胞内に生成蓄積され、これらの生成物やアミンへの中間体ラジカルが DNA に傷害を与える。②放射線傷害の修復を阻害するなどの作用が考えら

Radiosensitizer (放射線増感剤)

2-nitroimidazole misonidazol (Ro-07-0582, MIS) ; 700mg/kg, i.p.



Radioprotector (放射線防御剤)

2-aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide (AET) ; 300mg/kg, i.p.



図2. γ 線の優性致死試験に併用した放射線増感剤と放射線防御剤の作用

れている⁸⁾。一方、放射線防御剤としてはチオール誘導体で強力な scavenger として知られている 2-aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide (AET) を照射30分前に300mg/kgi.p. 1回投与した。 γ 線と薬剤処理した雄マウスは成熟精子期と前期精子細胞期に雌マウスと交配し前述と同様に優性致死試験を行なった。その結果を表3と4に示した。 γ 線照射の場合においても前期精子細胞期では成熟精子期の約2倍の優性致死誘発率を示した。より低酸素条件下にあると思われる成熟精子期では、MIS, AET いずれの処理においても有意な優性致死の変化はみられなかった。前期精子細胞期ではAET処理で優性致死の低減傾向が見られたが、統計的に有意なものではなかった。いっぽう、相反する効果が予期されるAET処理とMIS処理間では明らかな有意差が見られたもののMISによる増感効果は顕著ではなかった。

このようにMIS, AETともにその作用は本実験条件下で顕著でなかったが、前期精子細胞期では精子のそれに比べ間接的の傷害が増大していることが示唆された。

表3. γ 線とM I S又はA E T併用処理による優性致死試験の結果

Group	Stages of irra.	No. of females with IMP	No. of IMP [*]	No. of living embryos [*]	No. of dead embryos [*]	Dominant lethals (%)
γ -ray	Lspt & sperm	29	9.0	6.3	2.6	37.2
γ -ray + MIS	"	25	9.1	6.2	2.9	39.0
γ -ray + AET	"	25	8.5	6.3	2.2	37.8
MIS	"	25	9.0	8.8	0.2	13.1
AET	"	28	9.8	9.5	0.3	6.2
Control		23	10.5	10.1	0.3	

* Per fertile female with IMP

表4. γ 線とM I S又はA E T併用処理による優性致死試験の結果

Group	Stages of irra.	No. of females with IMP	No. of IMP [*]	No. of living embryos [*]	No. of dead embryos [*]	Dominant lethals (%)
γ -ray	Espt	27	8.1	3.2	4.8	68.1
γ -ray + MIS	"	17	8.1	2.7	5.4	73.5
γ -ray + AET	"	25	8.4	4.2	4.2	58.8
MIS	"	27	10.5	10.3	0.2	-1.5
AET	"	21	10.4	10.0	0.4	2.0
Control		24	10.6	10.2	0.4	

* Per fertile female with IMP

ここに用いた薬剤は *in vitro* の実験系ではその作用が明らかな物質であるが生体内では巧妙なその活性酸素防御能により明瞭な効果が見られなかったのかもしれない。M I S は ascorbic acid などの還元剤を併用するとその効果が増大する⁸⁾ことや、A E T ではより低線量で DNA 傷害を低減することが *in vivo* のマウスを用いた小核試験で報告⁹⁾されており、生体内でも実験条件によっては、薬剤の前処理に放射線による傷害をコントロールすることが可能であろう。

2. 化学物質に対するステージ感受性

これまで、EMS¹⁰⁾やTEM¹¹⁾などのアルキル化剤を精子形成過程に処理すると、F₁で転座個体が高頻度に生成されることが報告されている²⁵⁾(表5)。しかし、これが1細胞期で生じる染色体型異常に起因したものであるということが明らかにされた¹²⁾¹³⁾のは最近である。通常体細胞では、薬剤処理後の最初の分裂中期において染色体型の異常が生じることはないと言われてきたが、演者らはMMSを雄マウスの後期精子細胞や精子の時期に処理すると高率に染色体型異常が生じることを見出した。この時に生じた染色体異常の頻度は同じ用量で骨髓細胞に生じた頻度に比べても桁違いに高く、これは精子では傷害をもつものでもほとんどが受精してしまうためであろう。生じた異常にはdicentric, tracentrics など1個以上の動原体をもつpolycentricsが多くみられた。相互転座も効率よく生じ、これがF₁の転座個体として伝達生成されるものと考えられる¹⁴⁾。

(1) 染色体型異常生成の機構

染色体型異常がどのような機序で高頻度に生成されるかについては今のところ明らかでない。最近、SegaとOwen(1978, 1983)¹⁵⁾¹⁶⁾はEMSやMMSを精子形成過程に処理し副睪丸より回収したsperm中の蛋白とDNAのアルキル化を測定した。その結果、DNAのアルキル化は処理後数時間で最高になるのに対し、蛋白(プロタミン)のアルキル化は処理後8-11日目が見えピークで優性致死のピークとほぼ一致することを見出し、次のような事を推定した。通常の精子ではプロタミンが生成されるとシステイン中のSH基が互いに-s-s-結合し精子クロマチンとして凝縮する。しかし、MMSやEMS処理では-s-s-結合する部分の-SH基がアルキル化を受けクロマチン構造が不安定化するのに加えDNAの塩基や糖ーリン

表5 雌または雄マウス配偶子形成過程にMMSまたはMCを処理して得られた転座個体の誘発

化学物質	投与量 (mg/kg)	転座を誘因するF ₁ 雌マウスの数						
		精子形成過程			交尾後雌の生殖細胞 Sperm in ampulla & MI-MII oocytes	卵子形成過程		
		Spermatogonia	Early Spt	Lat Spt & sperm		Mature oocytes 6h	24h (排卵前の時間)	
MMS	20.0	-	-	1/90	-	-	-	
	50.0	-	-	17/152	-	-	-	
	100.0	-	-	-	16/118	0/174	0/226	
	6.25 × 14	←-----	4/96 ²	-----→	-	-	-	
	12.5 × 14	←-----	0/169 ³	←-9/73 ²	-----→	-	-	
	25.0 × 14	←-----	0/134 ³	-	-----→	-	-	
MC	3.0	-	-	-	1/100	-	-	
	4.0	-	-	-	1/143	2/178	0/206	
	5.0	-	0/176	-	-	-	-	
	7.0	-	2/175	-	-	-	-	
Control		1/832						

1. 薬剤は排卵6-7時間前の交尾した雌に投与した
2. 最後の投与から1週間以内に雌と交配した
3. 雌は最後の投与から8週経過後に雌と交配した(転座と欠失のモザイク個体を含む)

酸部分の修飾によりクロマチン構造にひずみが生じ結果的にdsbを生じると推定した。生化学的論拠に基づくこの考えは現時点で最も有力な仮説である。演者はMMS処理による染色体異常や優性致死の頻度に、処理から受精までの時間が長くなるにしたがって高くなること(表6)、さらに精子は受精に至る迄かなり長い間精管中に貯留していることをみた。他の生物種、ショウジョウバエ¹⁷⁾、カイコ¹⁸⁾、大麦の種子¹⁹⁾などで見られる貯蔵効果(storage effect)と同様の現象がマウスの精子においても生じている可能性がある。この精管中での貯留期間中にDNAの初期傷害が何らかの修飾変化をうけdsbへと発展していることが考えられる。このときSegaが¹⁶⁾示したようにアルキル化されたプロタミンが重要な働きをしていると思われる。

以上の現象は全ての化学物質にあてはめられるわけではなくMMSやEMSなどを後期精子細胞から精子にかけて処理した時のみ適用される。したがって前期精子細胞にのみ作用するようなマイトマイシンCの場合²⁰⁾など個々の薬剤のDNAに対

表 6. MMS 処理から受精までの時間と染色体異常誘発の関係

Time of treatment	Sites of sperm	Eggs karyotyped	Total aberrations	Aberrations per egg		
				0	5	10
(h)*						
7	} Ampulla	101	10	0.10		
0		89	30	0.38		
(days)**						
0-2	} Epididymis and testis	42	131	3.11	=====	
3-6		96	835	8.70	=====	
7-10		122	1005	8.24	=====	
11-14		57	159	2.79	=====	
15-18		99	77	0.78	=====	

* Time after ovulation ** Matings post-injection

する作用により別の生成機序を考えなければならない。

3. 受精卵での修復

(1) 交配実験より

配偶子に生じたDNA傷害が受精卵の前核期においても修復されることが報告されている。Generoso (1979)²¹⁾ は雄に変異原を処理し、交配した雌の系統を取り換えた時の優性致死率や染色体異常に差があることより、その原因を修復能の差によるものであるとした。この時、用いた薬剤で顕著に差がみられたのは iPMS のみで EMS, TEM, Benzpyren, X線ではあまり差がみられなかった。その後、EMS でも F₁ 転座個体の生成に差が見られる事を報告²²⁾ しているが、土川ら (1982)²³⁾ の KYF / 2 と BDF₁ マウスを用いた実験では EMS 処理で転座個体の生成に差はみられなかった。このように薬剤による DNA 傷害のタイプや組み合わせるマウスの系統により卵内修復が関与しない場合もあると考えられる。

(2) UDSの検出

Brandriff & Pedersen (1981)²⁴⁾は精子にUV照射すると受精後の前核においてUDSが生じることを報告した。演者はMMSを雄の後期精子細胞と受精直前の雌マウスに処理し、前核期にUDSがみられるかを調べた(表7)。しかしながら、UDSの存在を示す³H-チミジンのとり込みは全く検出できなかった。

表7. MMSを後期精子細胞期と受精直前の両配偶子に処理した場合の前核期のUDS

No. of mice treated	Sex of MMS-treated mice (50 mg/kg)	No. of eggs cultured*	Stages of treatment	Stages of culture	UDS capability
6	male	48	Late Spt. (7-10 days before mating)	Pronuclear formation	-
6	female	45	Fertilized egg (1 h after ovulation)	Pronuclear formation	-

* Eggs were collected from ampulla at 3 h after ovulation and cultured in MEM medium containing 10 μ Ci/ml of [³H]dT for 90 min at 37°C.

(3) 前核DNA合成時の修復

一方生体内でのDNA傷害の修復はUDSを指標とする除去修復のみならずいくつかの修復機構の存在が考えられる。そこで、Caffeinを前核DNA合成期に処理して優性致死試験を行い複製時修復能の変化をみた。

MMS (50 mg/kg) は後期精子細胞期に、MC (5 mg/kg) は前期精子細胞期に、iPMS (200 mg/kg) は後期精子細胞期にそれぞれ投与し、雌と交配した。Caffein (100 mg/kg × 2) は前核DNA合成の開始時(排卵推定6時間後と9時間後)に

表 8. Caffein の前核期処理による優性致死率の増強効果

Chemical*	No. of mated females	No. of females with implanted embryos	No. of implants	No. of living embryos (per female)	No. of dead embryos	Dominant lethal frequencies (%)
Control	39	37	332	322(8.7)	10	
Caffeine	44	39	355	327(7.4)	28	14.9
MMS	46	29	207	91(1.9)	116	78.1
MMS + caffeine	47	31	171	79(1.6)	92	81.6
MC	43	39	343	296(6.8)	47	21.8
MC + caffeine	50	42	314	254(5.0)	60	42.5
iPMS	44	42	324	165(3.7)	159	57.4
iPMS + caffeine	48	33	159	45(0.9)	114	89.6

* MMS: methyl methanesulfonate (50 mg/kg, Lspt), MC: mitomycin C (5 mg/kg, Espt), iPMS: iso-propyl methanesulfonate (200 mg/kg, Lspt), Caffeine was treated at the beginning of pronuclear DNA synthesis (100 mg/kg X 2)

2回投与した。その結果MCと iPMS 処理の群では有意な優性致死の増加がみられ MMS では差はみられなかった (表 8)。この結果は、MC や iPMS で生じた精子形成過程での傷害は受精卵の DNA 合成時に修復されている事を示すものであり、一方、MMS で生じた傷害は受精前の精管内で修復されにくい傷害へと変換している可能性を示している。以上の結果より精子に高率に生じる転座がどの修復系に関与して生じているのか不明であるが、染色体間の DNA rejoining は受精後の前核形成期に起っていると思われる。

お わ り に

生殖細胞の傷害により受精卵で生成された染色体異常が、胎生期を経てF₁ 個体へと伝達されるまでの過程について形態学的にかなりの部分が明らかにされてきた。にもかかわらずその出発点となるDNAの初期傷害が配子形成過程でどのように修飾や修復を受け染色体異常として固定されているのか不明な部分が多い。これには、生じた傷害に対する修飾や修復が生殖細胞のステージや用いる動物種や系統により多様であること。また実験手技的にも *in vitro* の系に持ち込みにくいことなどの生殖細胞特有の問題点があり、今後の解明がまたれる。

参 考 文 献

- 1) M. Katoh, N. Tanaka and S. Iwahara, X-ray-induced chromosome aberrations in postmeiotic stages of mice, *Jpn. J. Genet.*, 58, 337-344, 1983.
- 2) R. J. Preston, The effect of cytosine arabinoside on the frequency of X-ray-induced chromosome aberrations in normal human leukocytes, *Mutation Res.*, 69, 71-79, 1980.
- 3) R. J. Preston, The use of inhibitors of DNA repair in the study of the mechanisms of induction of chromosome aberrations, *Cytogenet. Cell Genet.* 33, 20-26, 1982.
- 4) A. Oikawa, H. Tohda, M. Kanei, M. Miwa and T. Sugimura, Inhibitors of poly (adenosine diphosphate ribose) polymerase induce sister chromatid exchanges, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 97, 1311-1316, 1980.
- 5) A. T. Natarajan, I. Csuks and A. A. van Zeeland, Contribution of incorporated 5-bromodeoxyuridine in DNA to the frequencies of sister-chromatid exchanges induced by inhibitors of poly-(ADP-ribose)-poly-merase, *Mutation Res.*, 84, 125-132, 1981.

- 6) T. Ono and S. Okada, Radiation-induced DNA scissions and their rejoining in testicular cells of mouse, *Mutation Res.*, 36, 213-222, 1976.
- 7) T. Ono and S. Okada, Radiation-induced DNA single-strand scission and its rejoining in spermatogonia and spermatozoa of mouse, *Mutation Res.*, 43, 25-36, 1977.
- 8) Y. C. Taylor and A. M. Rauth, Sulphydryls, ascorbate and oxygen as modifiers of the toxicity and metabolism of Misonidazole *in vitro*, *Br. J. Cancer*, 41, 892-900, 1980.
- 9) M. L. Garriott and D. T. Crowe, AET reduces the frequency of micronuclei in bone marrow cells of mice exposed to radiation, *Radiation Res.*, 93, 200-204, 1983.
- 10) B. M. Cattanach, C. E. Pollard and J. H. Isaacson, Ethyl methanesulfonate-induced chromosome breakage in the mouse, *Mutation Res.*, 6, 297-307, 1968.
- 11) B. M. Cattanach, The sensitivity of the mouse testis to the mutagenic action of triethylenemelamine, *Z. Vererbungslehre*, 90, 1-6, 1959.
- 12) 加藤基恵, 田中憲穂: 優性致死誘発機序に関する1細胞期胚染色体異常と不定期DNA合成, *Jpn. J. Genet.*, 55, 55-65, 1980.
- 13) N. Tanaka, M. Katoh and S. Iwahara, Formation of chromosome-type aberrations at the first cleavage after MMS treatment in late spermatids of mice, *Cytogenet. Cell Genet.*, 31, 145-152, 1981.
- 14) N. Tanaka, M. Katoh, S. Iwahara, K. Hashimoto and I. Wakisaka, Studies on chemical induction of chromosome aberrations in postcopulation germ cells and zygotes of female mice. II. Induction of heritable translocations, *Jpn. J. Genet.*, 58, 353-359, 1983.

- 15) G. A. Sega and J. G. Owens, Ethylation of DNA and protamine by ethyl methanesulfonate in the germ cells of male mice and the relevancy of these molecular targets to the induction of dominant lethals, *Mutation Res.*, 52, 87-106, 1978.
- 16) G. A. Sega and J. G. Owens, Methylation of DNA and protamine by methyl methanesulfonate in the germ cells of male mice, *Mutation Res.*, 111, 227-244, 1983.
- 17) S. Abrahamson, W. C. Kiriazia, and Sabol, E. M., A storage effect of ethyl methanesulfonate (EMS) on the induction of translocations in *Drosophila* sperm, *Drosophila Inform. Serv.*, 44, 110, 1969.
- 18) E. Inagaki, and Oster, I. I., Changes in the mutational response of silkworm spermatozoa exposed to mono- and polyfunctional alkylating agents following storage, *Mutation Res.*, 7, 425-432, 1969.
- 19) J. Veleminsky, S. Zadrazil, V. Pokornf, T. Gichner, and J. Svachvlova, Storage effect in barley. Changes in the amount of DNA lesions induced by methyl and ethyl methanesulfonates, *Mutation Res.*, 19, 73-81, 1973.
- 20) M. Katoh, N. Tanaka and S. Iwahara, Chromosome aberrations induced by mitomycin C treatment in early spermatids of male mice, *Jpn. J. Genet.*, 56, 357-363, 1981.
- 21) W. M. Generoso, K. T. Cain, M. Krishna and S. W. Huff, Genetic lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatids of mice are repaired in the egg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 435-437, 1979.
- 22) W. M. Generoso, K. T. Cain, M. Krishna, E. B. Cunningham, and C. S. Hellwig, Evidence that chromosome rearrangements occur after fertilization following postmeiotic treatment of male mice germ cells with EMS, *Mutation Res.*, 91, 137-140, 1981.

- 23) 土川 清, 田中憲穂, 加藤基恵, マウスにおける優性致死損傷に対する卵内修復の差異と相互転座ヘテロの生成との関係, 日本環境変異原学会, 第11回大会, 三島, 1982.
- 24) B. Brandriff and R. A. Pedersen, Repair of the ultraviolet-irradiated male genome in the fertilized mouse eggs, Science, 211, 1431-1443, 1981.
- 25) 田中憲穂, 動物個体における染色体異常の生成と検出, トキシコロジーフォーラム, 6, 224-235, 1983.

VI-3

放射線の卵巣照射による 卵子染色体異常と発生異常の誘発

美甘 和哉*, 上口勇次郎*, 舟木 賢治*
菅原 茂樹*, 小出 展久*, 立野 裕幸*

はじめに

放射線は哺乳類卵子の染色体を切断し、構造的染色体異常を誘発する。ただし、卵子染色体の放射線感受性は成熟分裂過程で甚しく変化するので、この影響を蒙る卵子の出現率は成熟段階に依存して劇的に変化する (Mikamo et al. 1981; Mikamo 1982)。

放射線はまた、染色体不分離も誘発するという考えがある。しかし、この点に関しては、はっきりした結論が得られていない。ヒト集団の疫学的研究でも、動物を用いた実験的研究でも、結果やその解釈はまちまちで、肯定的意見と否定的意見が相半ばしているのが現状である。この状態はすでに久しく、実験的研究においてさえ明快な答が得られないことの主な原因は研究の方法論的欠陥にある (Mikamo & Kamiguchi 1983)。この点に関しては、すでに第9回放医研シンポジウムで指摘した通りであるが (美甘, 1977), 現在でも相変わらず不備な研究法が繰り返されている感が深い。最近, Tease (1982) がマウスを用いて雌性前核染色体を分析し、放射線の卵子染色体不分離誘発能を証明したと報告しているが、染色体検索法に根本的欠陥があって、その主張を直ちに認めることはできない。その欠陥とは、Tease が band 法を用いずに分析を行ったことである。マウスの染色体はすべて acrocentric または telocentric であるため、通常染色のみでは染色体の同定は勿論、動原体の位置の確認さえ困難なことが多い。放射線卵巣照射後の受精卵の雌性前核では切断片が多発するので、それらと真の余剰染色体との区別を明確にするためには、少なくとも C-band 法を用いて動原体の有無を確かめておくべきであつたろう。我々の既発表論文には (Mikamo & Kamiguchi 1983), 放射線照

* 旭川医科大学 生物学教室

射後受精したマウス卵の雌性前核で、通常のギムザ染色では余剰染色体と判定されたものが、C-band 染色による再検討の結果、実は動原体を持たない切断片であったという実例を図示してある。Reichert は、より最近 (1984)、マウスで放射線の不分離誘発能を否定している。

我々はこれまでの方法論的欠陥を解消する目的で、実験動物と染色体検索法の改良を主体としたチャイニーズハムスターを用いる新しい実験系を確立した (Mikamo & Kamiguchi 1983)。ここではこの系を用いて行った放射線の卵子染色体と発生に及ぼす影響の検討結果を報告する。主な内容は、(1)染色体傷害率と優性致死率を指標として検討した卵子染色体放射線感受性の成熟段階依存性、(2)高感受期 (early diakinesis) における線量効果、(3)不分離によらない数的染色体異常の誘発、(4)被照射傷害卵の発生能と発生異常の誘発、の4点である。

1. 方 法

(1) 実験動物

実験動物としてチャイニーズハムスターを選んだ。理由は第一に、この種がゲッ歯類中最少の染色体数 ($n=11$) をもち、それぞれの染色体の形態が明瞭で判別し易いことである。第二に、その性周期が安定で初期発生の進行が個体間でよく同調していることである。特に、旭川医大生物学教室のクローズドコロニーは長年に亘る選択交配により、性周期が極めて安定な4日型を保ち、排卵数、産仔数も多く、発生異常の頻度の低い良質なコロニーとして十分に改良されている (Mikamo & Kamiguchi 1983)。従って、遅延排卵、遅延受精等の混入を避けることができ、さらに卵子成熟、初期発生の段階を正確に決定できる。この実験では、生後120~150日の未経産の成熟雌と生後150~200日の正常雄を用いた。また目的によっては、相互転座ホモ家系の雄を交尾用に用いた。

(2) X線照射

卵巣を含む下腹部に10~400 rad を目的に応じて照射したが、実験の大部分は200 rad を主体として行った。線量効果の測定実験では10, 25, 50, 100, 150, 200, 400 rad を用いた。照射は排卵時を遡る20日前から排卵直前2.5時間までの間の17段階で行った。それぞれの照射段階は表1に示す通りであり、

表 1 X線照射時の卵子の成熟段階と照射量及び染色体研究時期

Stage of irradi.	Time before ovulation	Phase of oogenesis	Dose(rad)	Stage of chromosome analysis	
A	20 days	dictyotene	50,100,200	M II	
B	12	dictyotene	50,100,200	M II	
C	I	4	dictyotene	50,100,200	M II
		70.5hrs	dictyotene	200	M II
	III	58.5	dictyotene	200	M II
	IV	46.5	dictyotene	200	M II
	V	34.5	dictyotene	200	M II
	VI	22.5	dictyotene	200	M II
	VII	18.5	dictyotene	200	M II
	VIII	16.5	dictyotene	200	M II
	IX	14.5	dictyotene	200	M II
	X	12.5	OBGV*	200	M II
	XI	10.5	early diakinesis	10,25,50	M II
				100	M II, 1-cell,8-cell
				150	M II,
				200	M II 1-cell
	XII	8.5	late diakinesis	400	M II
200				M II	
XIII	6.5	M I	100	M II, 1-cell,8-cell	
			200	M II, 1-cell	
XIV	4.5	late M I-anaphase I	100	M II, 1-cell,8-cell	
			200	M II, 1-cell	
XV	2.5	telophase-polar body I emission	200	M II, 1-cell	

* OBGV= onset of breakdown of germinal vesicle

更に各段階における卵子および濾胞の発達度を模式的に図1に示した。

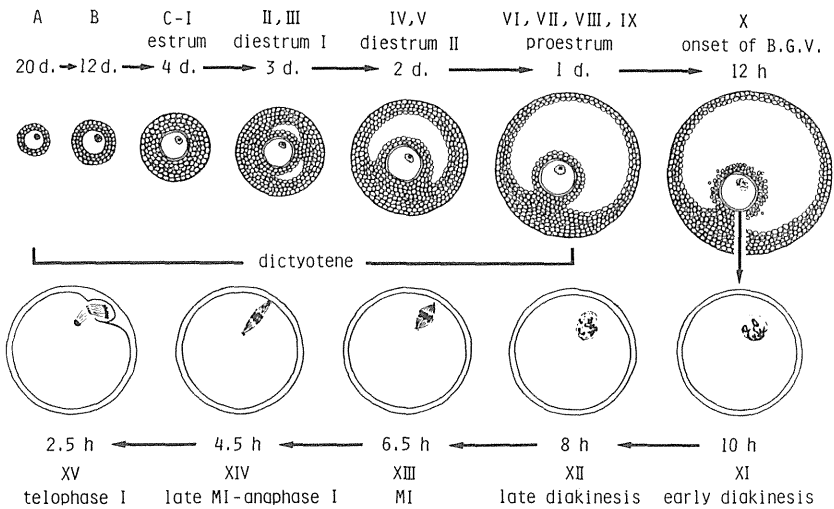


図 1. 各照射段階における濾胞発達及び卵母細胞の特徴。
日数と時間数は排卵までにかかる日数と時間数を
表わしている。

(3) 染色体分析および発生観察

照射後の染色体分析を行った成熟分裂期と受精後の発生段階は表 1 に示す通りである。また、それぞれの段階で卵の成熟度、発生状態が調査されたが、さらに妊娠 1 8.5 日に胎仔・胎盤の発達状態も検討された。卵子及び初期卵割胚の染色体標本は、我々が特に開発した方法によって作製された (Kamiguchi et al. 1976; Mikamo & Kamiguchi 1983)。その結果、標本の分析率は従来の報告より格段に高く、採取された卵の 95% に達した。また、第一卵割期の雌性前核の分析では雄性前核染色体との区別を正確にするために、相互転座ホモ家系 (CHAT5) から交尾用雄を選んだ (Tateno & Mikamo 1982)。

実験には総計約 5,300 頭の成熟雌が使用された。そのうち、3,900 頭を用いて約 31,000 卵の染色体分析が行われ、1,400 頭の母獣を用いて胎仔発生の観察が行われた。

2. 第二成熟分裂中期 (M II) 染色体における異常誘発率

図2に示す通り、排卵前20日から2.5時間までの期間 (Stage A, B, CI ~ VI) における照射 (200 rad) は数的異常も構造的異常も全く増加させていない。しかし、排卵前1.8.5時間 (Stage CVII) の照射群では構造的異常の増加傾向がみられる ($0.05 < P < 0.1$, χ^2 : Yates' correction)。以後 Stage CXI までの照射群では異常誘発率が急上昇し、異常染色体をもつ卵は43.6%の最高値に達した。

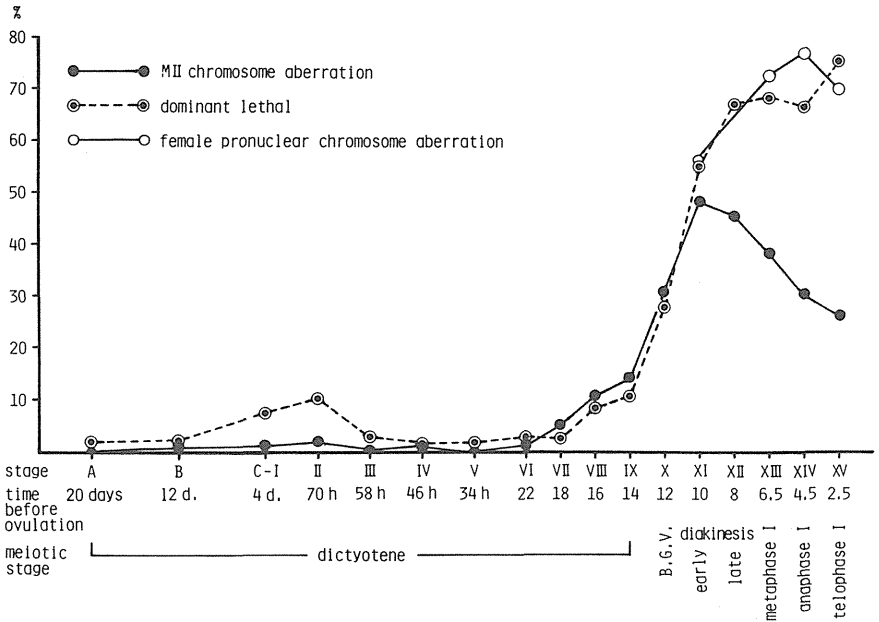


図2. 200 rad X線照射後の第2卵母細胞期, 1細胞期 (雌性前核) における染色体異常出現率, および優性致死率 (妊娠18.5日) の性周期内推移の比較。染色体異常出現率 (a) および優性致死率 (b) は次の式を用いて計算された。

$$a = \left\{ 1 - \frac{\text{正常核型をもつ卵数} / \text{分析卵数} (\text{照射群})}{\text{正常核型をもつ卵数} / \text{分析卵数} (\text{対照群})} \right\} \times 100$$

$$b = \left\{ 1 - \frac{\text{生存胎仔数} / \text{黄体数} (\text{照射群})}{\text{生存胎仔数} / \text{黄体数} (\text{対照群})} \right\} \times 100$$

これ以後 (Stage C XII~XV) の照射群では異常誘発率の低下は図 2 に示す通り急激なものであった。このMIIの染色体調査の結果だけから判断すると、初期移動期以後の卵子染色体は排卵時に向って放射線抵抗性を増すことになる。しかしこれは、後述するように事実ではない。

照射によって増加したMII染色体の異常はすべて染色体切断によって生じた構造的異常だけで、染色体不分離による数的異常の増加は全く認められなかった。観察された構造異常は染色分体型の切断、ギャップ、欠失、転座であった。

3. 雌性前核染色体における異常誘発率

排卵前 1 0.5 時間から 2.5 時間までの期間での四つの Stage (C XI, XIII, XV, XV) で照射した群を CHAT 5 の雄と交尾させ、1細胞期の雌性前核染色体を分析した。染色体異常の発生率は、MII期の調査結果と全く異なり、異常の増加はむしろ排卵に近づく程顕著であった (図 2)。誘発された異常はすべて構造的異常で、不分離による数的異常の増加がなかった点では先述のMII染色体研究の結果と同じであった。

雌性前核とMIIと二つの異なる成熟段階で調査した結果の間に生じた大きな矛盾は甚だ興味ある現象であるが、後述の優性致死率の検討結果 (図 2) とを合せ考えると、雌性前核で調査した結果の方が実態を示すものであることが明らかである。また、後述の8細胞期胚における検索結果もこの考えを支持するものであった。従って、MIIにおける検索が何らかの理由で染色体傷害誘発率を過小評価したことになる。しかも、この過小評価は図 2 でみる通り、late diakinesis以後に照射された群でのみ生じたものである。過小評価が生じた原因の一つには、成熟分裂期染色体がこの特定の期間において特殊な構造や性質を持っていて、実際に染色体 (DNA) に生じた傷を修復することなしに単にmaskしていたためと解釈することができる。その証拠に、一回のDNA複製を経過した時点 (雌性前核中期) では傷害が明瞭に現れ、傷害率が正当に評価できたのである。しかし、この現象は我々が初めて発見したもので (Mikamo, 1982)、傷害がmaskされる正確な機序は全く不明である。

4. 優性致死誘発率

妊娠 18.5 日において黄体数と生残胎仔数とを調査して優性致死率が評価された。結果は図 2 に示す通りで、排卵前 20 日から 18.5 時間までの期間では、200 rad の X 線照射が卵の発生能に影響を及ぼす可能性は極めて低かった。図 2 の Stage C I, II, で優性致死率がやや高くなっているが、これは見掛け上のもので優性致死の増加とは判断しなかった。理由は、性周期中の丁度この時期における高線量の X 線照射が過剰排卵を誘発する結果、着床障害や子宮内の胚の過密による発生停止が生ずるためである。性周期の特定の時期における高線量の卵巣照射が過剰排卵を生ぜしめる現象はラットでも知られているが、その機序は現在のところ解明されていない (Hahn & Ward 1967)。以上の理由から優性致死として取り扱うことは妥当ではない。

優性致死率は、Stage C XI 照射群まで、M II 染色体における異常誘発率と同様の率で増加する。ところが以降の群でも増加し続けて、M II 染色体を指標とした場合と甚しく矛盾する。しかし前述の通り、雌性前核期での染色体異常誘発率とはほぼ一致する。これが放射線の染色体傷害の実態で、M II での調査結果が Stage C XII 以降の群で見掛け上の異常率の低下を示す理由は先の項で論じた。従って、放射線の卵巣照射による優性致死の増加は、主として染色体傷害を原因とするものであるという従来の考えを支持する結果となった。

5. 高感受期における染色体傷害の線量効果

初期移動期 (early diakinesis, Stage C XI) は放射線による染色体傷害率が M II 期においても正しく評価できる時期であり、M II 期で表わされる傷害では最高値を示すことから、この時期を選んで線量効果を調べた。結果は、図 3 に示す通りである。構造異常をもつ卵母細胞の出現頻度は線量の増加に伴って直線的に増加し、400 rad 照射群では 90% 以上の卵が異常をもっていた (図 3 A)。また、卵母細胞当りの構造異常数は線量の増加に伴って二次曲線的に増加し、200 rad 照射群では卵の約 60% が 2 個以上の構造異常をもっていた (図 3 B)。これらの結果を、同じ初期移動期のマウス (NMR I 系) 卵母細胞に X 線照射した場合の線量効果 (Reichert et al. 1975) と比較すると、チャイニーズハムスター卵の放射線感受性はマウス卵の感受性の約 2 分の 1 であることがわかる。

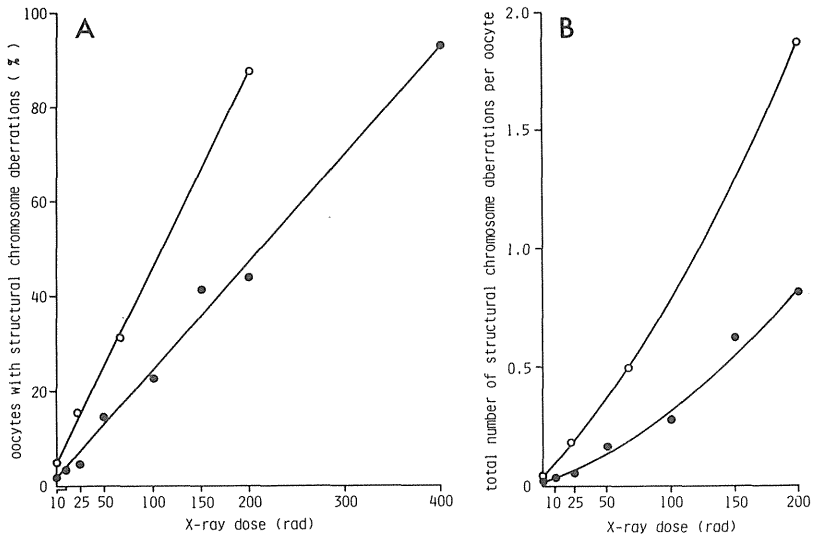


図3. 初期移動期のX線照射による構造的染色体異常誘発の線量効果。
 A. 染色体異常をもつ卵の出現率。
 B. 卵細胞当りの染色体異常出現率。

6. 卵割胚における染色体異常、特に不分離によらない数的異常の誘発

表2に示すように、受精後3回の体細胞分裂を経た胚においては、典型的なモノソミーやトリソミーの増加はみられなかった。従って、照射後の第一、第二成熟分裂及び卵割で、染色体不分離が誘発された可能性はない。先にも述べたように不分離誘発の可能性を支持する研究者もあるが、我々の結果から判断すると放射線が卵子の染色体に不分離を生ぜしめる可能性は殆んどないことになる。マウスを用いた場合、最近の報告でも前述の Tease (1982) と Reichert et al. (1984) の研究は全く相反する結論を導き出している。厳密な実験条件下に信頼性の高い染色体検索法をもって再検討を行なう必要がある。

一方、本研究では、不分離によらない別の機序による数的異常の増加が認められ

表 2. 放射線高感受期 (Stage C XI ~ XIV) に 100 rad X 線照射を受けた卵から発生した 8 細胞期胚における染色体異常出現頻度

	Control	Irradiated	χ^2 - test
No. of embryos	391	513	
Hyperploidy (%)	3 (0.8)	5 (1.0)	
Hypoploidy (%)	1 (0.3)	6 (1.2)	
Mosaic (%)	5 (1.3)	9 (1.8)	
Total (%)	9 (2.3)	20 (3.9)	0.1 < P < 0.2
Hyperploidy + struc. anom. (%)	0	3 (0.6)	
Hypoploidy + struc. anom. (%)	0	2 (0.4)	
Mosaic + struc. anom. (%)	4 (1.0)	11 (2.1)	
Total (%)	4 (1.0)	16 (3.1)	P < 0.05
Grand total (%)	13 (3.3)	36 (7.0)	P < 0.02

た。すなわち構造異常をもつ数的異常の増加がそれで (表 2) , 卵割の際, 染色体の構造的異常が仲介となって数の異常を生ぜしめたものである。特に低数性を含むモザイク卵の増加はこの解釈を支持する証拠の一つである。

最近, Reichert et al. (1984) はマウス 2 細胞期の研究で同じ結論を得ている。Reichert らの研究でも我々の M II , 雌性前核, 8 細胞胚における染色体研究の結果でも, 何れも, 放射線が直接に不分離を誘発する可能性のないことを示した。構造異常の仲介による数的異常は低数性や構造異常を伴うモザイクを主体とするはずであるから, 放射線がダウン症の様な典型的な不分離型のトリソミーを誘発するとは考えられない。

7. 放射線の成熟分裂, 受精, 発生に及ぼす影響

上述の M II 期, 前核期, 8 細胞期における染色体研究は, 同時に卵の成熟や初期発生に及ぼす放射線の影響を観察する機会を与えた。また, 18.5 日における優性致死の研究や, 特に加えられた胚盤胞期の発生観察は, 着床直前から後期胚発生に

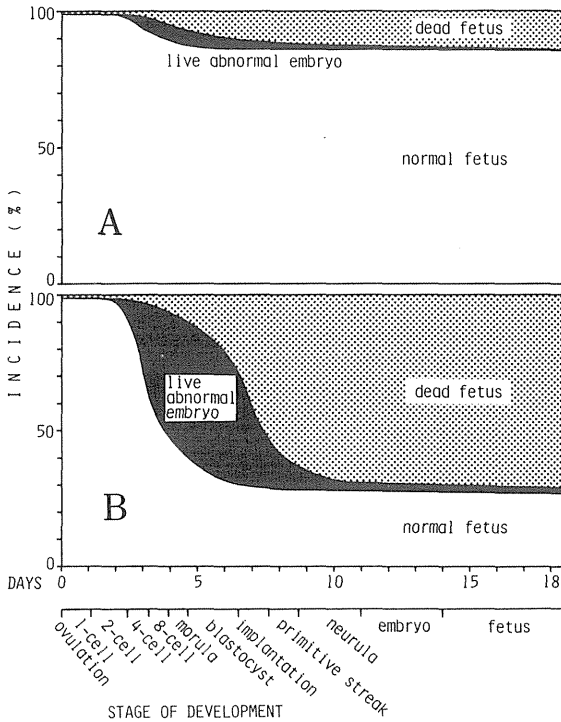


図4. 排卵4.5時間前(Stage CXN, late MI-anaphase I)に200 rad X線照射を受けた卵の受精後における発生運命。A: 対照群; B: 照射群

巨る間の晩発効果を明らかにした。図4は、Stage CXNにおける200 radの卵巢照射の発生への影響をまとめたものである。

重度の染色体傷害を蒙った卵子においても、第一、第二成熟分裂、極体放出等が抑制されることは全くなかった。また、排卵、受精、雌雄前核形成、前核融合、第一卵割紡錘体形成、さらに、第一卵割に至るまでのすべての過程が卵巢卵の照射によって障害されている証拠は全くみられなかった。すなわち、すべての卵は外見上は正常に2細胞期に達した。照射の影響が現われたのは、この期以後のみであった。このことは、放射線が透明帯、卵細胞質、表層顆粒、その他染色体以外の細胞内小器官には重大な傷害を及ぼしていなかったことを示している。放射線の卵子への影響

表3. 200 rad X線照射 (Stage C XI~XV) を受けた卵から発生した18.5日齢胎仔にみられる各種の外表面奇形及びそれらの出現頻度

	control	irradiated (200 rad)
No. of fetuses	559	316
Exencephaly	1 (0.2%)	
Agnathia		1 (0.3%)
Brachygnathia	1 (0.2%)	
Microphthalmia	1 (0.2%)	1 (0.3%)
Omphalocele	1 (0.2%)	10 (3.2%)
Edema		1 (0.3%)
Hemoperitoneum		1 (0.3%)
Underdevelopment	2 (0.4%)	6 (1.9%)
Total	6 (1.1%)	20 (6.3%)
χ^2 -test		$P < 0.001$

は、DNA傷害に殆んどしほられるような特異なもののようにであり、このことは先の優性致死の項で述べた通りである。

傷害を受けた卵の大多数は2細胞期から胚盤胞期の間には発生停止、遅延あるいは卵割異常を起し、着床後2~3日までに死亡し、その後は少数の胎芽、胎仔が徐々に淘汰された(図4)。しかし、出産間近い妊娠18.5日においても、なお異常胎仔が生残して、その全生存胎仔中における出現頻度は対照群と比べて数倍に達する有意な($P < 0.001$)増加であった(図4, 表3)。観察された奇形仔は脱脳症、臍帯脱腸、水腫症、極度の成長障害等であった(表3)。

おわりに

我々のチャイニーズハムスターの研究結果は、種々の点でマウスで得られた結果と異なるものである。これは先にも述べたように、実験系の設定の良否による場合を数多く含むが、種の差異を示すものも明らかに存在する。例えば、染色体切断誘発における種差である。これらが染色体の構造や、DNAの修復能の種差に係る

る可能性も強い。また、卵子の成熟段階による染色体の感受性の差においても、染色体の構造やDNA修復能の種差が背景となっていることが想像される。

特定の照射段階で第二成熟分裂期染色体上の傷がmaskingされる現象は本研究で初めて明らかにされ、他動物では全く知られていないが、放射線生物学上甚だ興味ある現象である。これが卵子成熟過程における特異的現象である可能性が強いこと、またその原因として成熟分裂期染色体の特殊な構造変化や、DNA修復能の成熟に伴う急激な変化等も考えられるので、今後多くの課題を提供する発見であった。

この研究で平行して行われた優性致死効果の調査の結果は、従来考えられてきたように、卵子の染色体傷害による発生能障害の実態をかなりよく示すものようである。ただし、実際に生じた染色体異常は2回の成熟分裂における極体の放出により卵子自体が正常に復帰することもあり得るし、また、その後の卵分割で染色体の切断片が一部の割球に集められる結果、受精卵全体としての発生能が殆んど犯されない場合なども起こり得ることが観察された。従って、厳密には、優性致死調査の結果は、第一成熟分裂染色体上に生じた傷害のすべてを反映するものではない。

この研究で得られた成果を女性のリスク評価に利用するにはなお慎重な検討を必要とする。しかし、排卵直前、特にLH（黄体形成ホルモン）の急増期に入る頃から卵子の感受性が甚だ高くなることは、マウスでも部分的に証明されているから、ヒトでも同様な現象が考えられる。LH放出によって第一成熟分裂が再開されることは哺乳類に共通の現象であり、放射線による染色体障害の修飾因子である染色体の構造的変化や不定期DNA合成能の低下などが、ヒトと他の哺乳動物との間で根本的に相異するとは考えられない。

この高感受期のうちとくに初期移動期（Stage XI）では、第二成熟分裂中期で染色体の構造的異常がほぼ正確に検出できること、また低線量領域においてもそれが可能であることはリスク評価上精度の高い情報を得ることを可能にするものである。我々の結果とマウスで得られた結果を比較してみると（図3）、マウスの方が約2倍の感受性を持つから、実験系さえ厳密にできれば、この点に関してはマウスを評価システムに使うことは有利である。

我々の結果からみて、放射線が成熟分裂の染色体不分離を直接誘発するとは考えられないが、構造異常を介して数的異常が生じ得ることは間違いない。このようにして生じた数的異常は、減数分裂期染色体不分離によるDown症のような典型的な

トリソミーとは異なるはずである。マウスでは、放射線による卵子染色体不分離誘発を主張する研究者がいるが、数的異常と構造異常との区別は、マウスでは染色体の形態的特性のため特に困難である。マウス染色体ではC-band法で動原体を確認できるから、確かな証拠を得るにはこの方法を用いた再検討を要する。

ここに発表した研究は、原子力安全研究協会「低線量放射線の生物への影響評価に関する試験研究」(昭和51年～57年度)および文部省科学研究費の特定研究(昭和51, 52年度), 試験研究(2)(昭和53, 54年度), 総合研究(A)(昭和56年度の補助金を受けたものである。

参 考 文 献

- 1) Mikamo, K., Kamiguchi, Y., Funaki, K., Sugawara, S. and Tateno, H. : Stage-dependent changes of chromosomal radiosensitivity in primary oocytes of the Chinese hamster. *Cytogenet. Cell Genet.* 30 : 174-178 (1981)
- 2) Mikamo, K. : Meiotic chromosomal radiosensitivity in primary oocytes of the Chinese hamster. *Cytogenet. Cell Genet.* 33 : 88-94 (1982)
- 3) Mikamo, K. and Kamiguchi, Y. : A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes of the Chinese hamster. In "Radiation-Induced Chromosome Damage in Man", pp. 411-432, Alan R. Liss, Inc., New York, 1983
- 4) 美甘和哉 : 放射線の卵巣照射は染色体不分離を誘発するか。第9回放医研シンポジウム報文集「発癌と遺伝障害—放射線のリスク評価をめざして」219-228頁 1977
- 5) Tease, C. : Similar dose-related chromosome non-disjunction in young and old female mice after X-irradiation. *Mutation Res.* 95 : 287-296 (1982)

- 6) Reichert, W., Buselmaier, W. and Vogel, F. : Elimination of X-ray-induced chromosomal aberrations in the progeny of female mice. *Mutation Res.* 139 : 87-94 (1984)
- 7) Kamiguchi, Y., Funaki, K. and Mikamo, K. : A new technique for chromosome study of murine oocytes. *Proc. Japan Acad.* 52 : 316-319 (1976)
- 8) Tatenno, H. and Mikamo, K. : Establishment of Chinese hamster stocks homozygous for a reciprocal translocation originally induced by testicular X-irradiation. *Cytogenet. Cell Genet.* 33 : 333 - 339 (1982)
- 9) Hahn, E. W. and Ward, W. F. : Increased litter size in the rat X-irradiated during the estrous cycle before mating. *Science* 157 : 956-957 (1967)
- 10) Reichert, W., Hansmann, I. and Röhrborn, G. : Chromosome anomalies in mouse oocytes after irradiation. *Humangenetik* 28 : 25-38 (1975)

VI-4

体外受精卵を用いた放射線誘発染色
体異常に関する研究

松田 洋一*

はじめに

最近の哺乳類受精卵培養法の発展に伴い、哺乳類初期胚に及ぼす放射線の影響を、母体内要因を除去して観察することが可能となった。なかでも山田ら¹⁾²⁾による体外受精法を用いることによって、成熟生殖細胞および受精卵への照射時期をより適確におさえることが可能となり、すでにマウス体外受精卵における胚盤胞形成を指標として、一細胞期胚の放射線感受性の経時的変動について精度の高い実験結果が得られている。今回、我々は体外受精法を用い、染色体異常を指標として、成熟精子、成熟卵子および前核期受精卵の放射線感受性を明らかにしたので報告する³⁾⁴⁾。方法としては、BC3F₁雌マウスにPMSGを注射し、48時間後hCGを注射して過排卵処理した後15時間後に卵管より卵を集め、あらかじめRFM雄マウスの精巢上体尾部から採取し、受精能を獲得させておいた精子と培養液中で混ぜ受精させた。受精直前の成熟精子、成熟卵子および受精後5時間後の前核期受精卵にX線を照射し、受精後15-17時間の2時間コルセミド処理し、一細胞胚中期の染色体を観察した(図1)。

1. 各照射群における一細胞期胚の発育と染色体異常

表1に示したように、40Rの照射によって対照、精子照射および卵子照射群に比べ、前核期照射群の一細胞期胚にステージ進行の大幅な遅延が見られた(中期: 48.0%)。さらに、雌雄前核の内、一方の核の染色体の凝縮が遅れた卵(全体の12.8%)が特異的に観察された。また図2に示したように、前核期照射群が最も高頻度の染色体異常を示した。また、受精後17-19時間のコルセミド処理によ

* 放射線医学総合研究所遺伝研究部

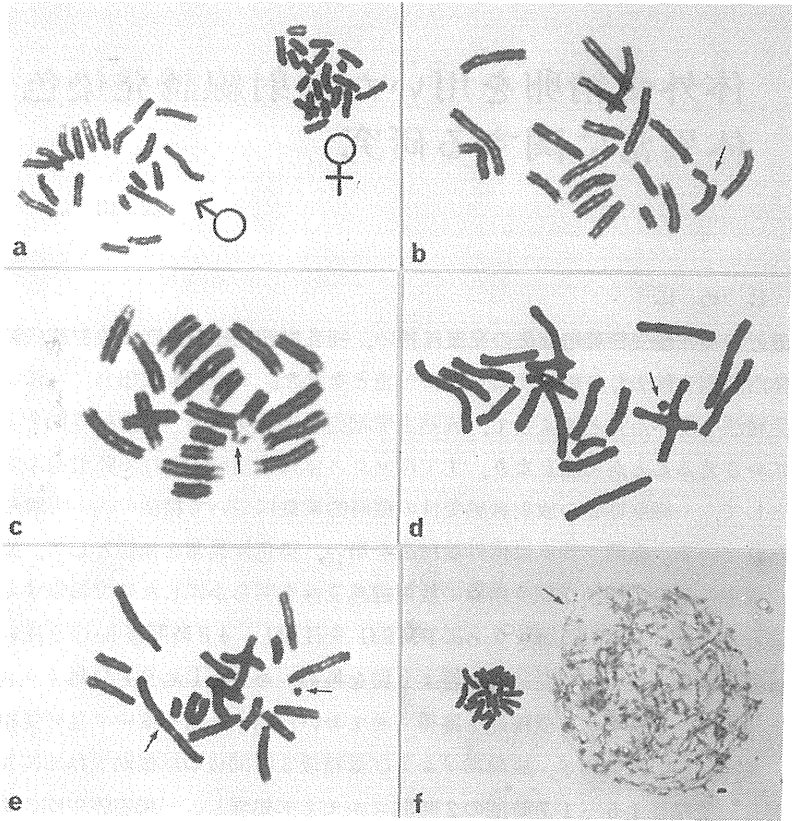


図1. 体外受精卵一細胞期胚にみられる染色体異常 a) 正常
 b) 染色分体切断, c) 染色分体交換, d) 染色体断片,
 e) 染色体交換, f) 一方の核の染色体凝縮の遅延

って中期像が観察される発育遅延卵では、15-17時間処理群に比べ有意に高い染色体異常を示し、発育遅延と染色体異常に顕著な相関がみられた。これらの結果は山田²⁾による胚盤胞形成を指標として得られた結果とよく一致した。

表 1. 40R X線照射した時の一細胞期胚のステージの進行程度

Stage of irradiation	interval of colchicine treatment	Number of eggs observed	Number of eggs in			Condensation delay of the other side nucleus (%)
			Pronuclei (%)	Prophase (%)	Metaphase (%)	
Control	15-17h	167	7 (4.2)	6 (3.6)	154 (92.2)	0 (0.0)
Sperm	15-17h	198	6 (3.0)	3 (1.5)	187 (94.4)	2 (1.0)
Unfertilized egg	15-17h	204	10 (4.9)	1 (0.5)	189 (92.6)	4 (2.0)
Fertilized (pronuclear)	15-17h	296	113 (38.2)	3 (1.0)	142 (48.0)	38 (12.8)

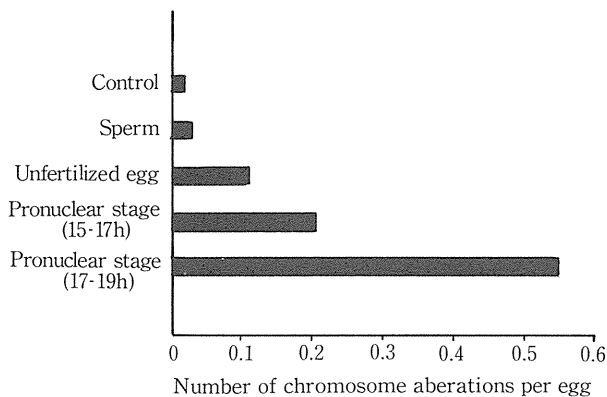


図 2. 40R X線照射をした時に観察される染色体異常の頻度の比較
()内は受精後のコルセミド処理時間を示す。

2. 線量効果と染色体異常

表 2 に精子由来の染色体異常のタイプと図 3 に精子と卵子にみられる染色体異常の線量効果関係を示した。精子由来の染色体異常はほとんどが染色体型の異常で、染色体断片が最も高頻度にみられ、交換型の異常は非常に低かった。この傾向は

卵子の場合も同様であった。線量効果関係は曲線性を示し、成熟卵子は成熟精子に比べ、約3～4倍の感受性を示した。

表2. 成熟精子に照射した時に観察される染色体異常の型と頻度

Exposure (R)	No. of metaphases observed	No. of metaphases with chromosome aberrations (%)	No. of chromosome aberrations (per egg)	No. of chromosome aberrations			Chromosome type			No. of polyspermic eggs (3n) (%)
				Gap and break	Chromatid type Fragment	Exchange	Gap and break	Fragment	Exchange	
0	223	2 (0.9)	2 (0.009)	2	0	0	0	0	0	17 (7.6)
50	225	10 (4.4)	11 (0.049)	3	0	0	3	5	0	6 (2.7)
100	230	21 (9.1)	22 (0.096)	3	0	0	2	16	1	7 (3.0)
200	231	36 (15.6)	38 (0.165)	2	1	1	3	28	3	15 (6.5)
300	261	70 (26.8)	79 (0.303)	11	2	5	7	51	3	14 (5.4)
400	247	95 (38.5)	116 (0.470)	10	5	3	8	81	9	4 (1.6)
Total	1417	234	268 (100.1%)	31 (11.6%)	8 (3.0%)	9 (3.4%)	23 (8.6%)	181 (67.5%)	16 (6.0%)	

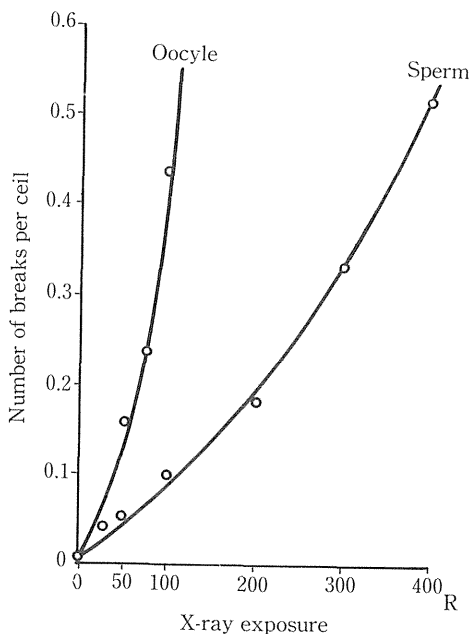


図3. 成熟精子および成熟卵子照射群における線量効果関係

おわりに

受精の時間を制御でき、受精後、正確な時間に照射を行なうことのできる体外受精法の利用は、従来の *in vivo* 系では困難であった種々の実験的アプローチを可能とするものである。しかし、試験管内受精胚を95%以上の高率で胚盤胞にまで培養できる系は最近確立されたばかりであり¹⁾²⁾、今後の研究の進展が期待される。

参考文献

- 1) Yamada, T., O. Yukawa, K. Asami and T. Nakazawa (1982) Effect of chronic HTO β or ^{60}Co γ radiation on preimplantation mouse development *in vitro*, Radiat. Res., 92, 359-369.
- 2) Yamada, T., O. Yukawa, Y. Matsuda and A. Ohkawa (1982) Changes in radiosensitivity of the *in vitro* fertilized mouse ova during zygotic stage from fertilization to first cleavage, J. Radiat. Res., 23, 450-456.
- 3) Matsuda, Y., T. Yamada, I. Tobar and A. Ohkawa (1983) Preliminary study on chromosomal aberrations in eggs of mice fertilized *in vitro* after X-irradiation, Mutation Res., 121, 125-130.
- 4) Matsuda, Y., T. Yamada and I. Tobar (1985) Studies on chromosome aberrations in the eggs of mice fertilized *in vitro* after irradiation. I. Chromosome aberrations induced in sperm after X-irradiation. Mutation Res. (in press).

VI-5

マウス突然変異の線量効果とリスク推定

野村大成*

はじめに

放射線により突然変異が誘発されることは、大腸菌等でよく知られている。しかし、哺乳動物での遺伝子突然変異となると、その資料は限られている。しかも、線量効果について調べたものと言えば、Russellらによるマウスの特定座位法による資料しかない。Russellのデータについては、あらためて述べる必要はない。ここでは、今まで手をつけられたことがなかった放射線による新しい突然変異——腫瘍、及び奇形突然変異——について、実験結果を報告したい。と言っても、生後まもなく発現するような通常の突然変異の検出にでも、数十万のマウスを必要としたのだから、長期間飼育して、やっと検出できる腫瘍について行うのは、全く気の遠くなるような話であることを念頭においてもらいたい。

1. 方法

雄又は雌 ICR マウスに X 線照射を行い一定の間隔において、非照射マウスと交配し F₁ での優性致死、奇形を出生前に帝王切開により胎仔をとり出し、調べた。致死的な奇形については、直ちに染色体標本を作成し、生存可能なものは、乳母により育て遺伝性を調べた。腫瘍、染色体異常等については、出生後 8 ヶ月で屠殺し調べた。

2. 精細胞、卵細胞での線量効果

雄マウスの成熟精子期（交配の 1～7 日前）、精子細胞期（15～21 日前）、及び精原細胞期（64～80 日前）に、36, 216, 及び 504 rad X 線照射した

* 大阪大学医学部 放射線基礎医学

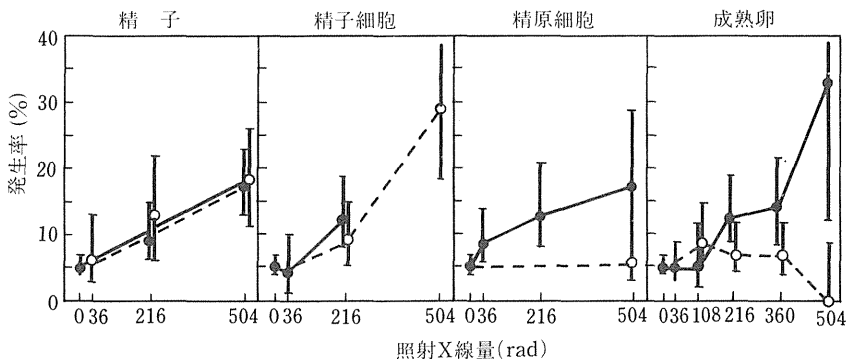


図 1. 精子期 (交配の 1-7 日前), 精子細胞期 (15-21 日前), 精原細胞期 (64-80 日前), 及び成熟卵 (排卵 1-7 日前) に, X線を急及び分割照射した時の F₁ での腫瘍発生。実線は急照射 (72 rad/min), 破線は分割照射 (36 radを2時間間隔) を示す。

場合の F₁ での腫瘍発生率を図 1 に示した。F₁ の腫瘍の 90% は肺に発生している。実線は急照射, 破線は分割照射 (36 rad, 2 時間間隔) である。成熟精子期, 及び精子細胞期に照射した場合は, 直線的に F₁ での腫瘍発生率は上昇し, 504 rad では約 30% の高値を示した。精原細胞に照射した場合も, 照射線量を増加すると, F₁ での腫瘍発生率は増加しているが, 減数分裂後の場合の約 1/2 である。リスク推定に重要な知見が 1 つある。分割照射した場合, 成熟精子期, 精子細胞期の場合には急照射と全く差がなかったが, 精原細胞では F₁ には有意に腫瘍は発生せず, 強い修復能の存在を示している (図 1)。卵細胞 (排卵 1-7 日前) に急照射した場合にも修復能の存在が示唆されている。即ち, 108 rad までは F₁ での腫瘍発生率は, 非照射群と大差ないのに, 216, 360, 504 rad と線量を上げると発生率は急上昇する (図 1)。成熟卵の場合も分割効果は明確であり, 修復能の存在を示している。だからと言って, 安全かと言うと決してそうではない。もっと若い卵細胞 (排卵 8-28 日前) に X 線を照射すると, べらぼうに高い頻度で F₁ に腫瘍が発生する。

F₁ での奇形に関しては, 図 2 に示した如く, 腫瘍の場合程, きれいな線量効果曲線は得られなかった。減数分裂後の精細胞に照射した場合は, 216 rad までは F₁

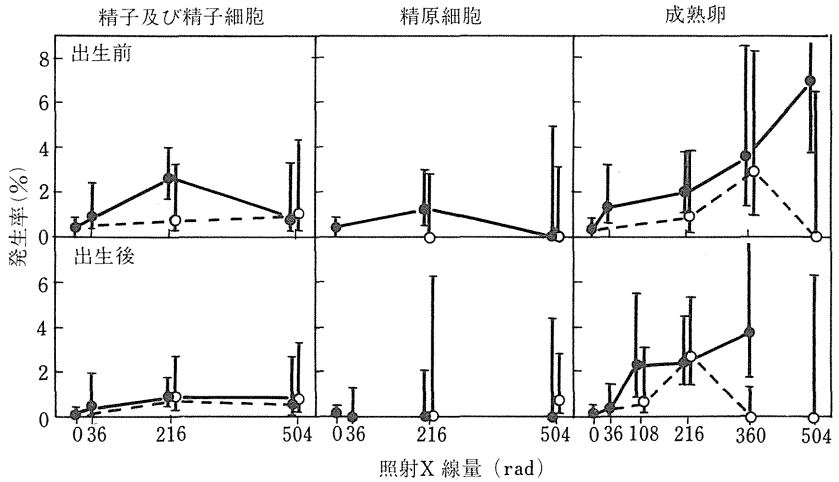


図2. 精子及び精子細胞期（交配1-21日前）、精原細胞期（64-8日前）、及び成熟卵（排卵1-7日前）にX線を急及び分割照射した時のF₁での奇形発生。上段は出生前に、下段は出生後に奇形を検出した場合を示す。実線は急照射、破線は分割照射。

での奇形の頻度は上昇しているが、504 rad ではむしろ下降している。精原細胞期に照射した場合は、F₁には非常に稀にしか奇形は発生していない。しかし、卵細胞に照射した場合は、きれいな線量効果がみられた。しかも、奇形の発生頻度は、精細胞照射に比べ、非常に高い（図2上段）。誘発された奇形のかなりの部分は致死的なものであり、生後7日目で調べた場合は、発生率が出生前に調べた場合よりも低くなっている（図2下段）。

3. 遺伝性³⁾⁴⁾

以上の結果を、表1にマウスでのX線誘発突然変異と比較して示した。放射線誘発突然変異に関しては、米国オークリッジ国立研究所のW.L. Russell 博士らによる膨大な資料を用いた⁵⁾⁶⁾。性細胞の照射時期と感受性の差、及び分割効果の有無をみても、F₁における放射線誘発腫瘍と突然変異は、極めて似ていることがわかる。

を行った。先ず、精子細胞期にX線5.04 radを一回照射し、正常メスと交配し、F₁を作成する。F₁には、当然ながら、高率に腫瘍が発生する。F₁を屠殺する前に、無作為にオス、メスを交配し前もってF₂を作っておく。F₂作成後、その親であるF₁を解剖し、肺腫瘍をもつかどうか調べた。F₂をも解剖してみると親(F₁)のいずれかが、肺腫瘍をもっている場合は、F₂に高率に肺腫瘍が発生しているが、親(F₁)のいずれもが肺腫瘍をもっていない場合は、F₂の肺腫瘍の頻度は低く、非照射の場合と有意の差がない。即ち、次世代に腫瘍を誘発する性細胞の変化は優性に遺伝していることがわかる。これは別に、X線に限られたことではない。化学物質であるウレタンや4NQO(4-nitroquinoline 1-oxide)を性細胞に作用させた場合でも、同じような結果となった。即ちウレタン及び4NQOをオスに作用させF₁を、F₁よりF₂を作成したところ、F₂には、親(F₁)のいずれかが肺腫瘍をもっていた場合のみ、20~25%の頻度で腫瘍が発生した。更に、F₂オスを正常のメスと交配しF₃を作ったところ、そのF₂が腫瘍をもっている場合のみ、約25%の頻度でF₃に腫瘍が発生している。以上の結果から、約40%の浸透率で優性に遺伝していることがわかった(表2)。自然発生肺腫瘍の場合は、例数が少ないが、7例をしらべたが、わずか1例だけが優性に遺伝していた。自然発生肺腫瘍の場合は、その系統自身が、すでにもっているもの(劣性遺伝子による)や体細胞レベルの変異によるのであろう。

表2. X線、ウレタン、4NQOの性細胞への作用によりF₁に誘発された腫瘍の遺伝性の解析⁴⁾。

親(F ₁)の形質	精子細胞への作用		
	X線	4NQO	ウレタン
+ × -	15/76(19.7)*	7/28(25.0)**	4/19(21.2)
- × -	4/69(5.8)	5/103(4.9)	9/113(8.2)

* P < 0.05

** P < 0.01

4. 腫瘍突然変異の性質^{3,4)}

性細胞におこった変化を調べると言っても生きた動物を使った研究である。そう簡単にはゆかない。まずはX線誘発遺伝障害と腫瘍の関係を調べてみた。X線は、腫瘍の他にF₁に奇形や染色体の転座を高率に誘発する。性細胞にX線を照射しておこった変化であるから、全身同じ変化をもっている。従って、直接の相関がわかる。そこで、性細胞の遺伝子変化の大きさを知るために、転座と腫瘍の関係をまとめたのが図4である。

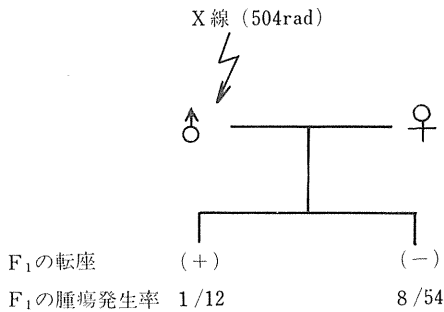


図4. 転座と腫瘍の相関

精子細胞期に504 radを急照射し、F₁での転座と腫瘍を検出したもの。

X線504 radを精子細胞期に一回照射し、F₁での腫瘍とF₁の性細胞での転座をしらべた。一般の予想に反し、転座をもったF₁でも、転座をもたないF₁でも、腫瘍発生率は全く差がなかった。性細胞での転座は、骨髓細胞ほど細かい解析は出来ないが、素人でも見まちがうことがない。どうも腫瘍突然変異の原因となる性細胞の変化は、染色体レベルの眼で見えるような大きな変化ではないようである。更に、この事実を支持するような結果が得られた。X線のみでなくウレタンも、性細胞に作用させるとF₁に腫瘍や奇形が同じように誘発されるのである。ところが、ウレタンではF₁に優性致死(大きな染色体損傷による)や転座は、全く誘発されないのである。このX線とウレタンの性細胞障害の差を、遺伝学的方法により、もっと客観的に調べてみた。ウレタンは、Amesテスト等*in vitro*の系では、どんなに細工をしても突然変異を誘発することができない。しかし、ウレタンは、ショウジョウバ

エでは、強力な変異原である⁷⁾。ウレタンガスをショウジョウバエのオスに吸入させ、メスと交配し、Muller-5法で、劣性致死突然変異を検出した。ウレタンガスの吸入時間を長くすると、それに比例して、突然変異の頻度も上昇する。その最大頻度は、実に γ 線の3000Rに相当する。ウレタン水溶液を飲ました場合でも同じ結果である。尚、ウレタンにより誘発された突然変異は、相補性試験により、全て1つのシストロンに限局したものであることがわかった。即ち、遺伝子突然変異と考えてさしつかえないと思う。マウスでも調べることができるとよいのだが、何しろ、数十万匹のマウスを必要とするので、不可能である。一応、マウス体細胞突然変異検出法で調べたのでは、強力な変異原性を示した⁸⁾。しかし、ショウジョウバエにX線、又は、ウレタンを作用させた後に、転座を遺伝学的方法で検出してみたところ、ウレタンガス吸入5.5時間と γ 線3000Rは大体同じ頻度(5%)で突然変異を誘発するのであるが、ウレタンは、X線の30分の1しか転座をおこさない⁷⁾。このように、ウレタンは、遺伝学的方法で調べても、染色体レベルの異常は起こさず、相補性試験の結果にあわせると少なくとも、ウレタンの作る傷の大きさは、X染色体0.1%以下である。顕微鏡下で見えなくても当然である。従って、X線とウレタンの性細胞への遺伝的作用の差からみても、次世代に腫瘍をつくった性細胞の変化は、大きな染色体異常によるものでなく、遺伝子突然変異(もちろん、小さなdeletionを否定するものではない)によるものだろう。

5. 突然変異だけががんになるか⁹⁾

もし、腫瘍突然変異が本当であるとすれば、性細胞に起こった変化であるから、マウスの全ての細胞が同じ変化をもっているはずであり、全身、腫瘍だらけになるはずである。しかし、肺でみると、 10^7 個も幹細胞があるのに、せいぜい1~2個の腫瘍ができるだけで非常に弱い造腫瘍効果しかもたない。しかも、浸透率も40%位しかない。浸透率は、マウスが年をとるとともに上昇することから考えて、腫瘍突然変異だけでは、がん化せず、生後、種々の環境因子や老化等が加わって初めてがん化すると思われる。この仮説を図5に模式化して示した。もし、この考えが正しければ、腫瘍突然変異の起こったマウスに、生後、発がん物質、又は、プロモーターと言われている物質を作用させれば、肺は腫瘍だらけになるはずである。事実、ウレタンを0.45mg/g・体重を生後21日目に皮下注射してみると、正

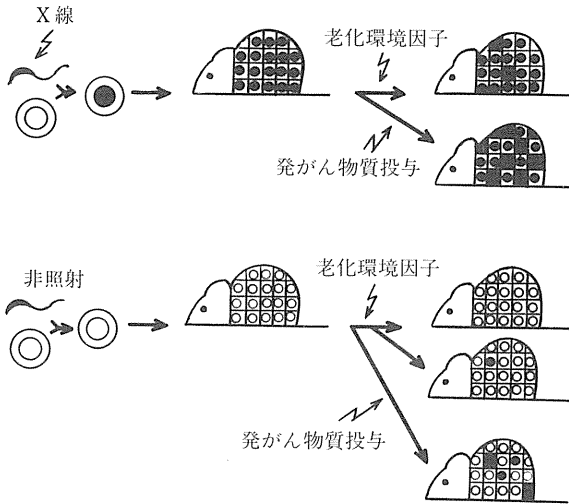


図 5. 腫瘍突然変異モデル

●は、腫瘍突然変異をおこした細胞。■は、腫瘍細胞。□は、正常細胞を示す。

常（腫瘍突然変異を誘発していない）マウスでは、平均約3個であるのに、性細胞にX線照射した場合は、 F_1 に平均約18個も腫瘍をもったマウスがあらわれる(表3)。しかも、その頻度が高く、X線照射のみで、ウレタン後処理をしなかった場合の2.4倍となっていた。即ち、ウレタン後処理により、浸透率が上昇し、腫瘍の“cluster”をもったマウスが出現したわけである。又、非照射群にウレタンを投与した場合は、clusterの出現率は自然発生率よりも低い。これは、前述した如く、自然発生肺腫瘍のうち優性腫瘍突然変異によるものがほんの一部であることを支持している。更に面白いことに、胎生15日目の雄性細胞にX線やウレタンを作用させても F_1 には腫瘍は誘発されない。性細胞の間で何らかのSelectionが働いたためか腫瘍突然変異がおこってなかったと考えられる。この F_1 にウレタンを注射してもclusterは全く出現しない。即ち、腫瘍突然変異そのものは、非常に弱い効果しかもたないが、これをなしでは、発がん物質を投与しても、腫瘍は、殆んど発生しな

表 3. 生後ウレタン投与による腫瘍突然変異の顕性化⁴⁾

性	被照射親マウス		生後ウレタン非投与群		生後ウレタン投与群		
	数	照射時 年令	F ₁ の数	肺腫瘍 発生率(%)	F ₁ の数	11以下及び12以上の肺腫瘍 をもったマウスの数 ^a	
						≤11	≥12
I 雄	80	成 熟	283	27 (9.5%) ^c	79 ^b (5.7±1.4)	67 (8.48%) (3.4±0.8)	12 (15.2%) ^c (18.1±3.0)
II 雌	42	成 熟	205	29 (14.1%) ^c	63 (5.3±2.1)	54 (85.7%) (3.3±1.2)	9 (14.3%) ^d (17.8±6.6)
III 雄	31	胎生15日	34	0 (0%)	19 (0.8±0.7)	19 (100%) (0.8±0.7)	0 (0%) —
IV 雌	18	胎生15日	27	2 (7.4%)	18 (8.3±3.8)	12 (66.7%) (3.4±2.0)	6 (33.3%) ^c (18.7±2.5)
V 雄	40	胎生9日	94	9 (9.6%)	29 (7.3±2.1)	22 (75.9%) (5.1±1.6)	7 (24.1%) ^c (14.9±2.1)
VI 非照射群	76 ^e		548	26 (4.9%)	71 (3.9±0.7)	69 (97.2%) (3.6±0.7)	2 (2.8%) (15.19)

a 95% confidence limit (11.5) により分類

b マウス当りの平均肺腫瘍の数±95% confidence limit

c, d χ^2 テスト c $p < 0.01$ d $p < 0.05$

e 生仔809匹中619匹を本実験に使用

いことを意味する。これは、正に、がん化のイニシエーションとプロモーションそのものをみているようである。

6. 他の突然変異との比較

先ず、腫瘍突然変異が一般的な現象であるか偶然 ICRマウスの肺だけのことなのかを知らねばならない。米、英、独で国家のプログラムとして追試が行われているが、我々も細々とこの仕事を続けている。ICRではF₁の肺に主に腫瘍が発生したが、N5を用いるとリンパ性白血病、肺腫瘍、卵巣腫瘍が、LTでは、やはり肺腫瘍がF₁に有意に誘発され、この発見が偶然でなかったことを示している。特定座位法の膨大な資料と比較してみても(表1)精細胞の照射時間による感受性の差、卵細胞が高線量に対し高感受性であること、更に、精原細胞、成熟卵に修復能が存在することなど、いずれをとっても極似している。では、今までわかっているマウスの突然変異と比較して、全く疑問は残らないのだろうか。まず倍加線量を比較してみる。図1より直接、倍加線量を計算してみると、精子及び精子細胞で平均90 rad、精原細胞で140 radとなった。LTの肺腫瘍、N5の肺腫瘍、卵巣腫瘍といずれも年月をへてゆっくりと発現する型の腫瘍では、精原細胞照射では、140~165 radと非常によく似た値を示している(表4)。しかし前述した如く、ウレタン等で発現を早め浸透率を上げてやると、ICR肺腫瘍では50 radとなり、表5

表4. 種々腫瘍突然変異の
みかけ上の倍加線量。

F ₁ の 腫 瘍 系 統	倍加線量 (R)
肺 腫 瘍 ICR	140 (50)
肺 腫 瘍 LT	150
リンパ性白血病 ICR	103
リンパ性白血病 N5	22
卵 巢 腫 瘍 N5	168

表5 他のマウス突然
変異との比較⁴⁾。

突 然 変 異	倍加線量 (R)
腫 瘍	25-50
奇 形	18*
半 不 妊	31
特 定 座 位	32
優 性 骨 格	26
劣性常染色体致死	51

* 精子及び精子細胞期照射

に示した Lünig と Searle¹¹⁾ のまとめた急照射での種々のマウス突然変異とよく一致している。又、N5のリンパ性白血病の場合は、ICRと異なり、3-6ヶ月で発病死亡する。この場合は、予想通り倍加線量は2.2 radとなる。腫瘍突然変異は、他の突然変異と比べて、決して畑違いのものを観ているとは思えない。奇形の場合も倍加線量は、他の突然変異と同じ値を示している(表5)。しかし、最も大きな違いは、腫瘍発生率である。これがべらぼうに高い。1 rad当りの誘発頻度で比較してみる。マウスでの突然変異の代表として優性骨格突然変異¹⁰⁾をえらんでみた。その1 rad当りの頻度は $2-4 \times 10^{-5}$ であり、腫瘍突然変異($3-5 \times 10^{-4}$)は約10倍の高率である。優性骨格突然変異の代わりに、特定座位劣性突然変異を例にとると、実に100倍も高いことになる。私の実験では、腫瘍の他に、奇形も観察しているのであるが、奇形の方の1 rad当りの頻度は優性骨格突然変異と全く同じであるから、腫瘍突然変異が特異的に頻度が高いことは、まちがいないようである。これは、放射線及び環境有害物質のヒトへの危険度推定には極めて重要な問題であると同時に、高感度遺伝障害検出法としての意味をもつことになる。何故頻度が高いかについては、多くの人が論評している。現時点では、根拠を持たぬ推測にしかすぎないが、腫瘍発生の本質に触れることなので、最後に私見を述べてみる。

お わ り に

我々の研究も含めて発がん研究全体を見わたしてみても、通常我々が行う発がん実験は、用いたマウスに自然発生する特定の腫瘍の頻度を増やしているだけである。たとえ、性細胞に遺伝的変化を誘発して、次世代に腫瘍を作ってみても、やはり発生してくる腫瘍の大部分は用いた系統独自のものであった。これは逆に、発がんの本質をついているとしか思えない。突然変異としては、頻度が高すぎることも含めて考えると、たとえ性細胞に作用させた場合ですら、外的要因はヒトを含め動物の種、及び系統に特異的に潜在するがん遺伝子の様なものの抑制を取り去ったと考えるのが妥当ではないか。おそらく、それらがん遺伝子と考えられるもの(本来細胞は無限に増殖するものである)をregulateする部位に関するDNA鎖のdeletion(DNAレベルの話で、染色体レベルの目で見える大きなものではない)が原因と

すれば、X線を性細胞に照射した時に高頻度に子孫に腫瘍の発生したこともうなずける。長い間、こう言う仕事をしていると、がんを好発する変異株も、いくつか誘発できた。しかし、これを維持し、系統化し、がんの本質を究めるまでにはまだ長い道のりがある。

本文中の未発表データは、文部省科学研究費、及び日産科学研究振興財団の援助を受けた。本研究の続行に対し、柴田桂子嬢の助力、及び執筆に際し、多田英子、田中佐和子嬢の協力を感謝する。

参 考 文 献

- 1) Nomura, T. Changed urethan and radiation response of the mouse germ cell to tumor induction. In : L. Severi (ed.), Tumors of Early Life in Man and Animals. pp. 873-891. Perugia Univ. Press, Perugia, 1978.
- 2) Nomura, T. Transmission of tumors and malformations to the next generation of mice subsequent to urethan treatment. *Cancer Res.*, 35: 264-266, 1975.
- 3) Nomura, T. Role of DNA damage and repair in carcinogenesis. In : T. Sugimura, S. Kondo and H. Takebe (eds.), Environmental mutagens and carcinogens. pp. 223-230. Liss, New York, 1982.
- 4) Nomura, T. Parental exposure to X rays and chemicals induces heritable tumors and anomalies in mice. *Nature (London)*, 296: 575-577, 1982.
- 5) Russell, W. L., Russell, L. B. and Kelly, E. M. Radiation dose rate and mutation frequency. *Science*, 128: 1546-1550, 1958.
- 6) Russell, W. L., Russell, L. B. and Kelly, E. M. Dependence of mutation rate on radiation intensity. *Int. J. Rad. Biol.*, (Suppl.): 311-322, 1960.

- 7) Nomura, T. Potent mutagenicity of urethan (ethyl carbamate) gas in *drosophila melanogaster*. *Cancer Res.*, 39, 4224-4227, 1979.
- 8) Nomura, T. Comparative inhibiting effects of methylxanthines on urethan-induced tumors, malformations, and presumed somatic mutation in mice. *Cancer Res.*, 43 : 1342-1346, 1983.
- 9) Nomura, T. X-ray-induced germ-line mutation leading to tumors, its manifestation in mice given urethane post-natally. *Mutation Res.*, 121 : 59-65, 1983.
- 10) Ehling, U. H. Dominant mutations affecting the skeleton in offspring of X-irradiated male mice. *Genetics*, 54 : 1381-1389, 1966.
- 11) Lüning, K. G. and Searle, A. G. Estimates of the genetic risks from ionizing irradiation. *Mutation Res.*, 12 : 291-304, 1971.

VI-6

サル染色体異常の線量効果とリスク推定

戸張巖夫*、松田洋一*、山極順二*、
宇津木豊子*、中井 斌*

はじめに

ヒトに対する放射線の遺伝的リスクを評価するために、ヒトに近縁な霊長類の精原細胞における放射線誘発染色体異常、特に相互転座の線量効果関係を明らかにすることが現在最も重要な課題の一つである。これまでに、マウス、ラット、テンジクネズミ⁽¹⁾およびヒトをはじめキヌザル⁽²⁾、アカゲザル⁽³⁾、⁽⁴⁾の3種の霊長類について研究が成されており、相互転座染色体の誘発頻度が最大値を示す線量は種によって著しく異なるが、いずれの場合にも山型(hump-shap)の線量効果曲線を示すことが報告されている。最も注目すべき知見は、アカゲザルで得られたX線誘発相互転座の頻度が、他の哺乳動物に比べて著しく低いことである。1980年の国連科学委員会報告書⁽⁵⁾では、アカゲザルで得られた相互転座誘発率から、親が1radの放射線を被曝(低線量, 低線量率)したとき、次代に生まれてくる先天性異常児の出現頻度は100万人出生当り1人またはそれ以下と推定している。この値は、ヒトおよびキヌザルから得た転座誘発率から推定した同種のリスク、100万人出生当り2人~10人と云う推定値よりはるかに小さい。この著しい差異が何によるかは解っていないが、相互転座に由来する遺伝的リスクを推定する上で、大きな問題を提示していることは事実である。

我々はアカゲザル(*Macaca mullata*)と同種のカニクイザル(*Macaca fascicularis*)を用いて、新たに開発した実験方法を用い、精原細胞に生じたγ線誘発相互転座の線量効果関係を調べ、遺伝的リスク推定のための信頼度の高い基礎資料を得る実験を行った。

* 放射線医学総合研究所遺伝研究部

1. 材料と方法

相互転座の自然発生率を調べる目的で、国立予防衛生研究所、武蔵村山分室で飼育されていた6頭のカニクイザル雄を用いた。また照射実験のためには当研究所、技術部開発室で飼育されていた11頭のカニクイザル雄を用いた。雄ザルの年齢は推定5歳以上で、全て野外（東南アジア）で捕獲、飼育されていたものである。

^{137}Cs γ 線局部（精巣）照射は春（5月）と秋（10月）の2回に分けて行われた。用いた線量は100, 200, 300 radで、線量率は25 rad/minであった。

幹精原細胞集団の放射線による障害の回復は、経時的に精子数を調べることによって確認された。

照射後の回復が充分であることが確認された後、精巣を摘出し今井ら（1981）⁽⁶⁾の方法を改良し、空気乾燥法によって精母細胞の染色体標本を作成し、C-バンド染色を行った。転座染色体をもつ精原細胞のクラスターによる実験誤差をできるだけ除くために、1つの精巣から10以上の組織片を採取し、1つの組織片について最大50の分裂細胞を観察し、総計500細胞を分析した。

2. 結 果

(1) 生殖細胞形成能の回復

γ 線照射から精巣摘出までの期間 — 生殖細胞形成能の回復に要する時間 — を表1に示してある。100~300 rad照射後、精子形成の回復は非常に遅いが、照

表 1

Recovery times of the germinal epithelium after γ -irradiation at different doses

Dose (rad)	Number of monkeys	Recovery time(month)	Mean recovery time(month)
100	4	8.7 - 9.7	9.0
200	3	8.7 - 9.7	9.4
300	3	10.2 -10.4	10.3

射後9～10ヶ月目に精子数はほとんど照射前のレベルにまで回復しており、このことは幹精原細胞集団および細胞分裂の活性は照射前の状態にもどっていることを示している。回復期間に関する季節的変動や個体間の差異はほとんどみられなかった。

(2) 相互転座

6頭の非照射雄ザルから10の精巢を摘出し、4700の精母細胞を観察した結果、4ケの相互転座が検出された。したがって自然発生頻度は0.09%と推定された。

γ 線照射による相互転座の誘発率は、100 radでは1.9%、200 radでは2.5%、300 radでは1.3%であった。線量効果関係はアカゲザルと同様に、200 radにてピークをもつ山型の曲線を示した(表2)。転座染色体の出現頻度に関する個体間の差異は、100 radでは1.4～2.1%、200 radでは1.9～3.3%、300 radでは1.4～1.6%とかなり小さく、また左右の精巢間の差異もほとんどなかった。さらに2回の反復実験の間にも有意差はなかった。

γ 線によって誘発された転座の染色体構成のタイプを分析した結果、観察された179の転座のうち155(86.6%)が環状型であり、18(10.1%)が鎖状型で、残りの6転座はX染色体と常染色体との間の転座であった。環状型と鎖状型の比は9:1であり、この比はアカゲザルにおける30:1と著しく異なるものであった。

表 2

Summary of frequencies of reciprocal translocations after γ -irradiation to stem-spermatogonia

Dose (rad)	No. of monkeys	No. of testes	No. of cells observed	No. of translocations		% translocation (\pm s.d.)
				Def.+Pos.	Def.	
0	6	10	4700	4	4	0.09 \pm 0.04
100	4	7	3500	67	65	1.86 \pm 0.23
200	3	6	3000	80	74	2.47 \pm 0.29
300	3	6	3000	45	40	1.33 \pm 0.21

3. 考 察

非照射雄カニクイザルから4700の精母細胞を分析し、相互転座の自然発生率は0.09%と推定された。この値はアカゲザルで得られた0.08%と近似しており、さらにこれまでに調べられた他の哺乳動物における自然発生率とも近似している(表3)。

カニクイザルで得られた γ 線誘発相互転座に関する線量効果関係は、同じマカカ属に属するアカゲザルと同様に、200 radに最大の誘発頻度を示す山型の線量効果曲線を示した(図1)。この様な山型の線量効果曲線は、実験動物の種類によって最大の頻度を示す線量は著しく異なっているが、他の数種の哺乳動物でも報告されている⁽¹⁾。もし放射線によって誘発された相互転座が、それが観察されるまでの間に、放射線高感受性の精原細胞の死滅によって除去されると考えれば、山型の線量効果曲線が期待されるであろう。照射後の精子形成能の回復に長時間(8~10ヶ月)を要したという事実は、カニクイザルの精原細胞が放射線による細胞死に高感受性であることを示唆している。

図1から明らかなように、カニクイザルにおける転座染色体の誘発頻度は、ヒト、キヌザルのそれよりは有意に低い、アカゲザルにおける誘発頻度より有意に高かった。この差は、もしX線を用いたとしたらさらに著しくなると予測される。この差の要因を究明するために我々の実験とアカゲザルの実験を比較したのが表4である。この表から次の点で差異があることが明らかである。

(1) アカゲザルの実験においては、精巣当りの観察細胞数に大きなバラつきがある。このことは用いた実験方法では分裂細胞の回収が良好でなかったか、あるいは個体間で精子形成能に著しい差があったことを示唆している。

(2) 我々の実験では染色体標本は全てC-バンド法によって動原体部位を特異的に染色し、転座染色体の検出を確実にしているが、アカゲザルの実験では一部C-バンド法による染色を行わずに顕鏡しているため見誤りの可能性がある。

(3) アカゲザルでは相互転座の誘発頻度に関して個体差がみられるが、カニクイザルではその差はかなり小さい。また2回の実験の間での差異はカニクイザルでは全くないが、アカゲザルでは有意な差がみられる(図2)。

これらの差異は両種の繁殖性の差異によってかなりよく説明できる。すなわちアカゲザルは季節繁殖性の動物であり、そのために精子形成能に季節の変動が存在す

表 3

Spontaneous frequencies of reciprocal translocations observed in primary spermatocytes of different mammalian species

Species	No. of individuals	No. of cells analyzed	No. of translocations	% translocation	References
Crab-eating monkey	6	4700	4	0.09	Present study
Rhesus monkey	32	5900	3	0.06	(Y. Matsuda et al., van Buul, P. P. W. (1983))
Man	2	200	0	0	Brewen, J. G. & " "
Marmoset	2	600	0	0	R. J. Preston (1975)
Mouse	6	600	0	0	" "
" (ddy/CSL)	136	31600	29	0.09	Muramatsu, S. (1974)
" (C57BL/6J)	40	8000	0	0	" "
Golden hamster	5	1013	1	0.10	Lyon, F. M. & B. D. Cox (1975)
Guinea pig	5	1406	2	0.14	" "
Rabbit	3	1117	1	0.09	" "

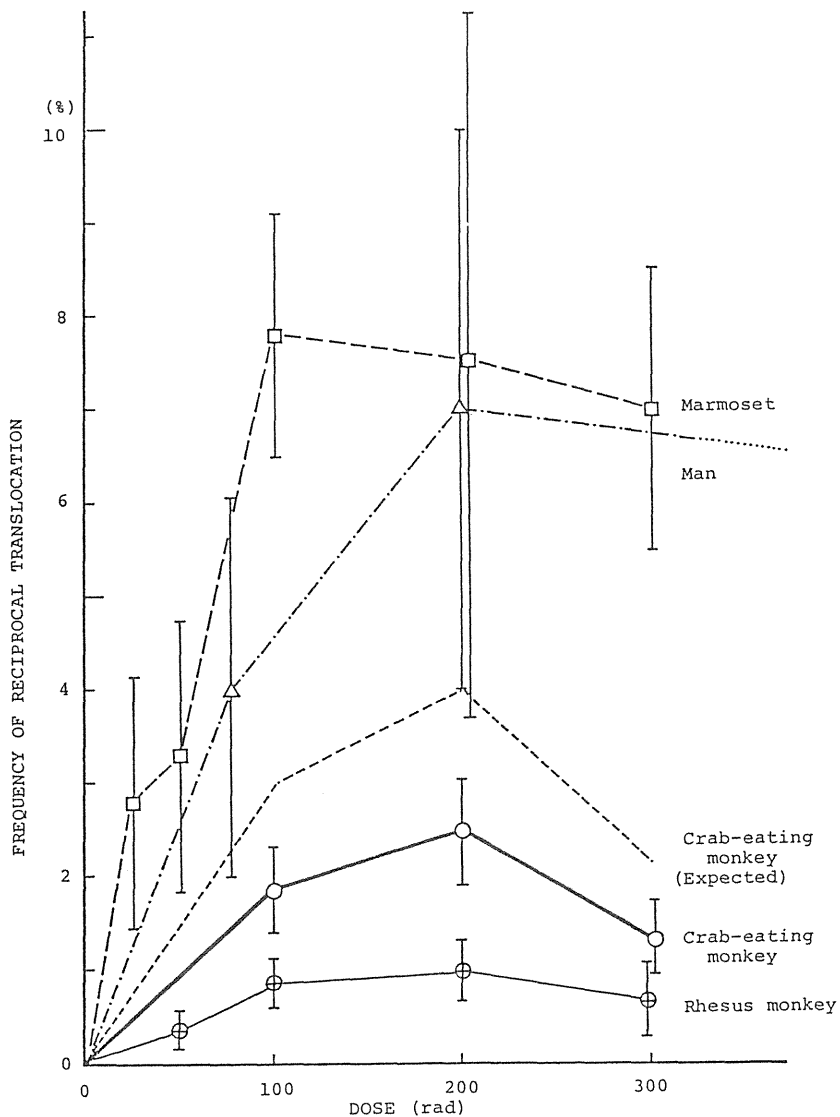


図1. 相互転座に関する線量効果曲線
縦線は95%信頼限界

表 4

	Crab-eating monkey	Rhesus monkey (van Buul, 1980)
	constant	variable
No. of spermatocytes scored / testes	All 500	100R : 200 - 1700 200R : 100 - 850 300R : 175 - 450
No. of spermatocytes scored / sample	≤ 50	no limit.
Staining	with C-banding	with or without C-banding
Inter-animal variation	100R : 1.4 - 2.1% (4) 200R : 1.9 - 3.3% (3) 300R : 1.4 - 1.6% (3)	0 - 3.3% (7) 0 - 1.3% (7) 0 - 1.8% (4)
Variation between experiments	-	++
	non-seasonal breeder	seasonal breeder

ると考えられる⁽³⁾。したがって相互転座の誘発頻度が低い原因の1つとして照射時における精子形成能が極めて不完全であったことが考えられる。一方カニクイザルはいずれの季節を問わず常に繁殖可能であり、精子形成能は一年中活潑に行われている。したがって照射を受けた幹精原細胞は全て活潑に分裂を行っていたものと考えられる。このため我々の実験においては個体間の差異も、また季節による差異も見出せなかったと思われる。繁殖性の差異と誘発相互転座の頻度との関係については季節繁殖性の明確なサル — 例えばニホンザル — を用いて詳細な実験を行うことが必要である。

今回得た実験結果は、ヒトに対する放射線のリスク評価のためには必ずしも十分なデータを提供したものは思われませんが、既に記した1980年国連科学委員会報告書による推定値との比較のために、我々が得たデータから漸定的に放射線誘発

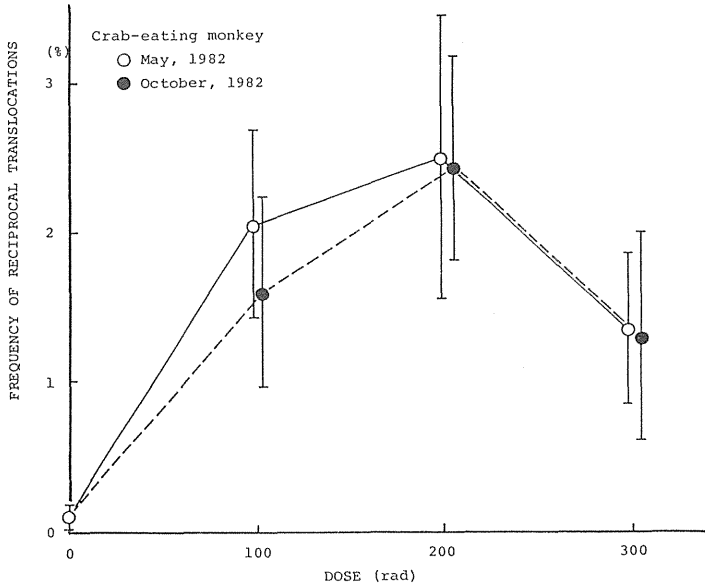
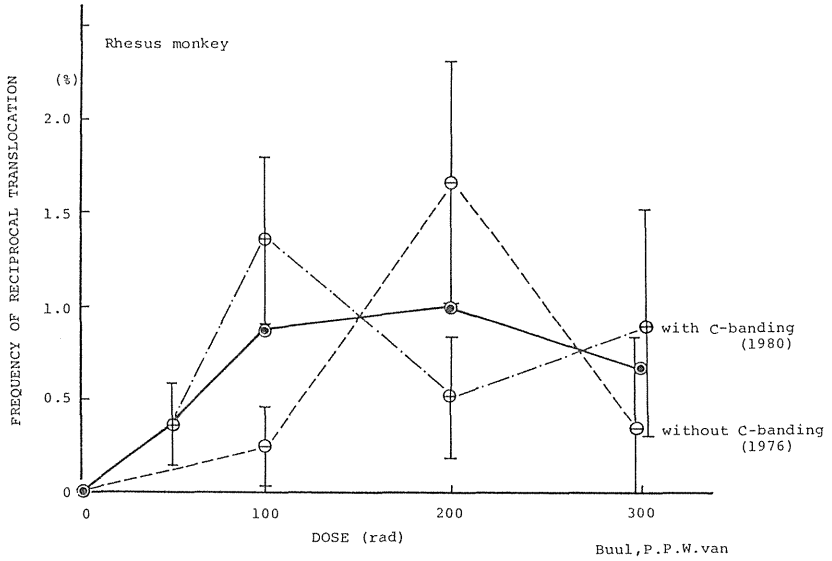


図 2. 相互転座に関する線量効果関係
縦線は 95% 信頼限界

染色体異常に由来する先天性異常児の出現頻度を推定すると、親が1 rad 被曝（低線量、低線量率）した時、次代に生まれてくる先天性異常児の出現頻度は100万人出生当たり1～5人と推定される。この値はヒトとキヌザルのデータ⁽²⁾から推定されたリスクの $\frac{1}{2}$ である。

上記のリスク推定のためにはマウスの実験から得られたいくつかのリスク係数——例えば線量率による減少係数（dose-rate reduction factor）——が用いられ、この係数が実際にヒトやサルにそのまま適応できるか否かが問題である。我々は γ 線の緩照射によって相互転座の誘発頻度が急照射のそれに比べてどの程度減少するかを知るために、現在低線量率（3 rad/day）照射実験を遂行中であり、この実験結果によりさらに正確なリスク推定が期待される。

4. 謝 辞

本研究のためにサルの精巢を提供して下さった国立予防衛生研究所、武蔵村山分室獣疫部の藤原徹先生に心から御礼申し上げます。

この実験に御協力下さった当研究所、技術部動植物管理課の方々、並びに線量測定に御協力下さった物理研究部、および技術部技術課の方々に深甚の謝意を表すると共に、今後の御協力をせつをお願いするものである。

参 考 文 献

- 1) Lyon, M. F. and B. D. Cox, The induction by X-rays of chromosome aberrations in male guinea pigs, rabbits and golden hamsters, III. Dose-response relationship after single doses of X-rays to spermatogonia, *Mutat. Res.*, 29, 409-422, 1975.
- 2) Brewen, J. G., R. J. Preston and N. Gengosion, Analysis of X-ray-induced chromosomal translocations in human and marmoset spermatogonial cells, *Nature (London)*, 253, 468-470, 1975.
- 3) Lyon, M. F., B. D. Cox and J. H. Marston, Dose-response data for X-ray induced translocations in spermatogonia of rhesus monkey, *Mutat. Res.*, 35, 429-436, 1976.

- 4) Buul, P. P. W. van, Dose-response relationship for X-ray-induced reciprocal translocations in stem cell spermatogonia of the rhesus monkey, *Mutat. Res.*, 73, 363-375, 1980.
- 5) UNSCEAR, *Genetic Effects of Radiation*, 1980.
- 6) H. T. Imai, Y. Matsuda, T. Shiroishi and K. Moriwaki, High frequency of X-Y chromosome dissociation in primary spermatocytes of F₁ hybrids between Japanese wild mice (*Mus musculus molossinus*) and inbred laboratory mice, *Cytogenet. cell Genet.*, 29, 166-179, 1981.

VI-7

原爆被爆者による遺伝リスクの予測

大竹正徳*

William J. Schull**

James V. Neel***

はじめに

1946年半ば以来, 広島・長崎で出生した子供は原爆の遺伝的影響に関する調査の基盤をなしている。本報告は最近34年間の調査の総括として, 原爆被爆者の子供を対象にまとめた結果から推定された遺伝リスクを提示する。特に, Schull, 大竹及びNeel[1]の内容を中心にヒトの遺伝的倍加放射線量の推定法及び推定値を紹介する。また, 最近の結果の一部[2]を補遺する。

ここに紹介する倍加線量は遺伝学的見地からみて一つの意義を認める。換言すると, 統計学的帰無仮説の下で所見が統計学的に有意でないとしても, 仮説について多くの検定が行なわれると, これらの検定のうち一つ又はそれ以上が偶然に有意な結果を示す可能性がある。このときの影響の大きさはおおむね過大評価される, これに代わる対立法として, 広範囲な実験の結果は放射線の遺伝的影響の存在を裏付けているので原爆被爆者に何らかの突然変異が誘発されたことは疑いの余地はない。これは被爆者に認められる染色体損傷[3]によっても示唆される。また, 発癌性物質や突然変異原物質への被爆者における白血病, その他の悪性腫瘍の増加との相関に関する資料[4]も同じく放射線の影響を示唆する。かかる状態下では仮説検定から存在すると推測される影響を推定する方向に考えても差し支えないであろう。ヒトの突然変異を調べるための放射線の倍加線量推定には当然に幾つかの仮定に基づいている。

実験遺伝学においても倍加線量の推定値は最終段階で変化したり, 処理時の生殖

* 放射線影響研究所

** Texas 大学集団遺伝

*** Michigan 大学人類遺伝

細胞の段階、処理から観察までの期間などにわたって変動する、ヒトの倍加線量の推定値は実験結果のような精度の高い推定値は得られないが、極めて異質な人口集団について放射線被曝後2年間に生まれた子供に基づいた統合的推定値を提供する。

1. 研究指標

原爆の遺伝的倍加線量推定については次の四つの指標について検討する。すなわち、1) 妊娠終結異常(死産あるいは主要な先天性障害や生後一週間以内の死亡)、2) 子供の死亡頻度、3) 性染色体異常数を有する子供の頻度及び4) 電気泳動上の変異体として現われる突然変異を有する子供の頻度について指摘する。他の一つの指標である性比についても簡単に結果を述べる。ここに利用されている指標の詳しい資料については文献[1, 2]を参照されたい。

2. 遺伝効果(生殖腺)の線量推定

この線量推定には二つの問題がある。すなわち、表皮と生殖腺との間に介在する組織による表皮線量の減弱をいかに評価するか、また、推定された線量中の中性子の相対的生物学的効果比(RBE)の問題をいかに対処するかである。第1の問題には人体モデルから確認されるように線量中のガンマ線と中性子線の減弱度の差によって問題が複雑となる。生殖腺線量を算定するのに、著者らは最近Kerr(5)が特に原爆から放出される放射線型をもとに発表した表を用いる。この表は中性子及びガンマ線の成人男女別生殖腺線量の減弱因子を示している。Kerrの成人を基盤にした表を用いることは一部の親たちが原爆時にはまだ子供であったので線量減弱が少ないことから控え目なやり方である。第2の問題である中性子のRBEの推定は調査資料を基盤にして求めるのが最良であるが、不幸にして統計学的に有意な所見がない場合は難しく実験資料の結果をも合わせて指針としなければならない。特定の座位検定方式でマウスの精原細胞及び成熟した卵母細胞に及ぼす50~100 radの急性中性子線量の遺伝的影響に関する調査ではRBE値として約5(6)が得られており、Neelら(7)は5を用いた。

マウス特有の座位検定方式から極めて低い中性子線量についての資料はないが、Grahnら(8)のマウスにおける、より一般の遺伝的形質発現に関する他の最近の研究

は5 rad未満の急性中性子線量では、RBEは2.0にもなることを示唆している。特定の仮定のもとでは、急性白血病[9]並びに白血球における染色体異常[10]などの体細胞“突然変異”の結果とも見られる幾つかの遺伝的形質に関する原爆体験から、低い中性子線量で同様な、又はより高いRBE値さえも得られる。最近の遺伝学的な状況及び一般的に低い中性子被曝線量についての資料にもかかわらず、著者らは中性子の遺伝的影響についてはRBE値5を与える。これは遺伝的倍加線量の算定に着手する段階では控え目な値となる。中性子線量のRBE推定は、線量をremで表わすことを可能にするので、低い線形エネルギー付与(L.E.T)放射線に関する倍加線量が得られている実験的調査との比較が可能である。

3. 統計学的モデル

上記の研究指標である妊娠終結異常、死亡及び男の出生を2項変数として扱い、一連の独立変数、すなわち、親の被曝線量並びに妊娠結果に影響を及ぼす無視できない随伴変数に関する観察値の回帰を行う。著者らは放射線被曝によって起る突然変異は“1-ヒット”放射線生物学的モデル：

$$P_{ij} = 1 - \exp \left[-\alpha_H(\alpha_N) - \sum_{k=1}^c \beta_k X_{ijk} - \sum_{k=c+1}^{\nu} \beta_k X_{ijk} \right] \quad (1)$$

に従うと考えている。ただし、 P_{ij} は ij 番目の被曝区分における期待率、 $\alpha_H(\alpha_N)$ は広島(長崎)に対応する定数、 β_k は ij 番目の区分における平均値が X_{ijk} である k 番目 ($= 1, \dots, \nu$) の独立変数と関連した回帰係数であり、 c 及び $(c - \nu)$ はそれぞれの随伴変数及び被曝変数の数を示す。(1)式をその極限のベキ級数で置き換え、第一項より高いベキ級数は無視可能と仮定すれば、この基本的な“1-ヒット”モデルは近似式、すなわち $P_{ij} = \alpha_H(\alpha_N) + \sum_{k=1}^c \beta_k X_{ijk} + \sum_{k=c+1}^{\nu} \beta_k X_{ijk}$ と簡単になる。この回帰モデルへの適用に際して、父母の被曝状態(非被曝, 0, 1-9, 10-99, 100+rem)によって、25被曝区分に分割される。この線量区分の特徴としては両親のガンマ線及び中性子の平均被曝線量のみならず、妊娠終結並びに初期の乳児生存に影響を及ぼすことが知られている多くの随伴変数、すなわち、出生年度、多胎児、近親交配、母の年齢(及びその2乗)父の年齢(及びその2乗)及び出生順位の影響について評価した。これらの随伴変

数及び被曝変数については種々異なる配列で検討している。

4. 倍加線量

一般に倍加線量は放射線による遺伝的障害を評価するために導入される概念であり、自然突然変異率と等しい突然変異量を誘発するのに必要な放射線量とされている。したがって、倍加線量の推定値は自然突然変異率を単位線量当りの誘発突然変異率で割って求める。

まず、1) 回帰による方法：

$$\text{倍加線量 (D)} = \frac{a}{b} \quad (2)$$

ただし、 a は前世代における点又は染色体突然変異のために出生児400人当たり1人が、成熟期に達するまでに死亡したと仮定し、 b は放射線の1 rad (rem) 当たりの誘発突然変異率で、ここでは放射線量に関連をもつ接合子の回帰係数を意味する。この400分の1の推定値は前回の200分の1[7]よりも誤差を控え目にするために、前回の半分の変異率に減らし、この推定値を生存率資料だけでなく、ここで検討する妊娠終結異常の資料にも適用する。換言すれば、この推定値は点又は染色体突然変異の結果を示す新生児の確立された頻度ばかりでなく、発育を抑制するか、知能遅滞を有するか、あるいは遺伝性と考えられるが、まだ、十分確立されていない種々の非家族性小児性症候群の頻度をも基盤にしたものである。

倍加線量は通常、配偶子線量として表わされる。突然変異への寄与は男女とも同じであると仮定すれば配偶子の倍加線量は接合子の半分になる。したがって、配偶子の倍加線量の下限推定値 (LD) は

$$LD (\text{rem}) = \frac{a}{2(b + t_{\alpha} \cdot S_b)} \quad (3)$$

によって計算される。ただし、 t_{α} は $\alpha\%$ 有意水準(片側検定)の t 値であり、 S_b は放射線量に関係をもつ回帰係数 b の標準誤差を表わす。

次に、2) 対照群と被曝群からなる 2×2 分割表による方法：

$$\text{倍加線量 (D)} = \frac{P_C}{(P_E - P_C) / M} \quad (4)$$

によって求められる。ただし、 P_C は対照群の突然変異率を表わし、 P_E は被曝群の突然変異率であり、そして、 M は被曝群の生殖腺平均線量 (rem) を示す。この差の分散は簡単に、 $V[(P_E - P_C)/M] = [V(P_E - P_C)]/M^2$ となる。突然変異への寄与は男女とも同じと仮定すれば接合子の半分の $D/2$ になる。

5. 結 果

(1) 妊娠終結異常の倍加線量

随伴変数の影響を除いたときの生殖腺量 100 rem 当たりの妊娠終結異常例数が 0.00182 増加することを示唆する結果を表 1 に示している。

表 1 RBE 値 5 の生殖腺被曝線量 100 rem 当たりの妊娠終結異常頻度の増減

変 数	回 帰 係 数	標 準 誤 差
両親合計線量	0.001824	0.003232
近親交配 +	0.009826	0.039437
多胎児 ++	0.2875	0.4071

+ 近親交配 1% 当たりの変化

++ 単胎児分娩に対する双胎児の危険増加率

表 1 から 1 rem の線量で妊娠終結異常を 0.0000182 ほど増加させるので、接合子の倍加線量は(2)式から $0.0025 / 0.0000182 = 137$ rem を得る。突然変異への寄与は、男女とも同じとすれば、配偶子の倍加線量は 69 rem となる。この配偶子倍加線量推定値の下限は(3)式から 18 rem を得る。

(2) 子供の死亡頻度に対する倍加線量

被曝者の子供の死亡頻度の増加は、親の生殖腺被曝線量 100 rem 当たり 0.00073 (表 2)。

表2. RBE値5の生殖腺被曝線量100 rem 当たりの被曝者の子供の死亡頻度の増減

変数	回帰係数	標準誤差
両親合計線量	0.000730	0.001390
出生年度 ⁺	-0.006207	0.000316

+ 出生率の1年当たりの変化

この表2の結果は1946~1980年間に死亡した3552例に基づいたものである[2], 両親からの寄与分が同じであると仮定すると接合子の倍加線量は(2)式から $0.0025 / 0.0000073 = 342$ rem となり, 配偶子の倍加線量は半分の171 remとなる。

この配偶子倍加線量推定値の下限は(3)式から41 remを得る。

(3) 細胞遺伝学調査及び性染色体異数体の倍加線量

1979年までの細胞遺伝学的調査では遠距離被曝者の子供5058例のうち, 性染色体異常を有する者13例[2, 11], 平衡常染色体構造再配列を有する者9例を認め, また両親の一方又は双方が近距離被曝者5762例のうち, 性染色体異常16例, 平衡再配列11例を認めている。

この両群間における頻度の差は仮説を採択する方向に沿っているが, 有意性からは程遠い。Kerr [5]の減弱表によれば一方又は双方が近距離被曝している両親の合計平均生殖腺線量の推定値はRBE値5で87 remである[1]。

平衡転座及び性染色体異数体のいずれも信頼できる資料が入手されているが, 該当する子供に関する家族調査はまだ完了しておらずこの倍加線量の推定の根拠を性染色体異数体のみ置くことにする。その理由は性染色体異数体が遺伝することはまれであり[12], その大部分は突然変異に由来すると考えて差し支えないであろう。遠距離被曝者の子供の頻度 (P_c) は $13 / 5058 = 0.00257$ であり, 近距離被曝者の子供の頻度 (P_E) は $16 / 5762 = 0.00278$ となる。従って, rem 当たりの増加率 $(P_E - P_c) / 87$ を考慮して, 接合子の倍加線量は(4)式から $0.00257 / 0.000024 = 1071$ rem と, 配偶子倍加線量は535 remを得る。

更に2項型を仮定して(4)式の差の分散を用いて, 5%水準(片側検定)で計算す

ると配偶子倍加線量推定値の下限は61 remとなる。

(4) 蛋白の表現型調査及び蛋白変異体の倍加線量

1980年までの近距離被爆者の子供については419666件、遠距離被爆者の子供については282848件の遺伝子座位検定が行なわれている[2]、Kerrの減弱表を用いて検査した座位当たりの親の平均合計生殖腺被曝線量は、RBE値5で59 remとなる[1,2]、細胞遺伝学的調査の平均生殖腺線量が高いのは、遺伝生化学調査の場合ほど多くの標本の処理設備に乏しいために、より高い線量を受けた被爆者の子供に集中したことによることを注意したい。

近距離被爆者の子供にはほぼ確実な突然変異が2例観察されているが、遠距離被爆者の子供では1例も認められていない。このように遠距離被爆者の子供に観察される突然変異率は0であり、近距離被爆者の推定突然異常率は 0.48×10^{-6} /座位/世代である。明らかに、この資料からはまだ倍加線量の推定値は得られないが、他の資料との一致について調べることは可能である。著者の1人であるNeel[14]は、米国人集団及びアメリカンインディアンについてそれぞれ105649件及び94796件の座位検定を行ったが、電気泳動では突然変異は全く認められなかったことを報告した。又、Harrisら[14]も英国人集団について同様に、113478件の座位検定を行ったが、突然変異を認めていない。しかし、突然変異率が0でないことは明らかである。TobariとKojima[15]、向井とCockerham[16]及びVoelkerら[17]がショウジョウバエを対象に行った調査による突然変異率は 0.2×10^{-5} を得ている。ヒトの倍加線量の推定値を得るには余りにも小さいが、得られた所見は仮説の主旨に沿っていることを示唆する。

(5) 性比資料による倍加線量推定の意義

母被爆・父非被爆の子供の男子出生率に対する回帰の結果は女性における伴性致死因子の誘発のみを基盤とするいかなる正統な仮説も相入れない。なぜならば、母親の被曝に関する性比は負の回帰を必要とするからである。この様な条件のもとで、抽出上の誤差が遺伝的期待値と一致する影響を不明確にしている確率を調べることが出来る。負の方向は明白なので、片側検定を適用して、この資料の最も大きい負の回帰係数と標準誤差を用いて求めると、 -0.00064 未満の回帰が95%の確率

で除外されていることが分かる (RERF TR1-81 の表7 を参照)。

従って伴性致死突然変異が誘発されていたとしてもこの資料は、期待された性比に及ぼす母親の放射線被曝の遺伝的影響を強く示唆しない。

6. 考 察

ヒトの遺伝的倍加線量の意義及び推定値について、五つの指標に関して検討した。このうち一つの指標である性比については理論的予測が容易に得られなかったが、残りの四つの指標については遺伝的影響が被曝によるものであるとすれば、近距離被曝者と遠距離被曝者の子供の差は期待される方向に沿っていたが、統計学的に有意な所見は全く認められない。しかし放射線の遺伝的影響に関する仮説が問題となるのではなく、一つの事実として考えられる。従って、原爆被曝者の子供の両集団におけるこれらの差を、この種の放射線の倍加線量に関する算定基礎に用いるに十分な根拠があると考えている。

今回の解析方法によれば第一世代の放射線影響の大きさについては、疫学者や遺伝学者ならばよく知っている近親交配や多胎児などの特定パラメータとの比較が可能である。妊娠終結異常とは、両親の一方又は双方が被曝し、その放射線量の合計が100 rem のときに、近親交配の1%の約 $\frac{1}{4}$ に相当する影響をもたらし、これは双胎児となる率よりもはるかに小さい。

ヒトの倍加線量の算定には幾つかの仮定をおく必要がある。この推定を行なう問題の誤差は自然発生及び誘発性突然変異率のいずれもヒトの率と異なるマウスの資料からヒトの資料への外挿を行う方法よりも現行の方法に基づく誤差は大きくないであろうといたい。

概して、ここでの仮定は控え目である。妊娠終結異常に関する資料は1948～1953年までの6年間のものに限定した。もしマウスの場合と同様[16,17]に、母親の放射線被曝後相当な期間を経て受胎した子供に突然変異の出現が被曝後間もなく受胎した子供に比べて少ないとすると、本調査の資料は母親の放射線被曝による全体的な遺伝的影響は過大となり、倍加線量の偏りは下向きに推定される。

ここに紹介した四つの指標のうち三つのみが倍加線量の推定に関与している。この三つの推定値は、互いに無関係ではない。例えば妊娠終結異常による死亡と被曝者の子供の死亡調査との間には幾らかの重複があるし、又性染色体異数体の頻度と

乳幼児期の生存率との間にも重複があるであろう。しかし、平均値に誤差項を設けなければ倍加線量に関する三つの推定値の平均は求められるだろう。このことは種々の遺伝的形質において実在する差異を隠すかも知れないが、各委員会の報告には、一つの指標を定めることについての先例は十分ある。従って、配偶子の三つの倍加線推定値の加重平均は147 remになる。但し、加重は各指標の調査対象者を用いた。急性の低LET放射線については、マウスの種々遺伝的形質の平均倍加線量は30～40 rem [18] であり、ヒトに関する推定値がないため、各種の委員会によってこの様な値がヒトの場合に慎重に適用される。両者の推定値における不正確性を全面的に許容するとしても、原爆の倍加線量推定値は有意に高いと思われる。

おわりに

広島、長崎の原爆被爆者の子供を対象に行った遺伝的影響の四つの指標に基づいた倍加線量の推定値とその下限推定値を求めた。この四つの指標のうち妊娠終結異常を除く子供の死亡率、性染色体異常数の頻度並びに、電気泳動変異体については資料の収集を継続している。これらの追加資料によって、ここに紹介した各種の遺伝的形質に関する遺伝的倍加線量の推定値は、将来改善されるものと思う。又、生殖細胞突然変異調査の為のよりよい技法の開発と重要な調査集団の発見も合せて期待したい。

参 考 文 献

- 1) Schull W. J., Otake M. and Neel J. V., Genetic effects of the atomic bombs: A reappraisal, Science 213, 1220-7, 1981. (RERF TR 7-81)
- 2) Schull W. J., Neel J. V., Otake M., Awa A. A., Sato C. and Hamilton H. B., Hiroshima and Nagasaki: Three and a half decades of genetic screening. Environmental Mutagens and Carcinogens. University of Tokyo Press, 687-700, 1982.
- 3) Awa A. A., Review of thirty years study of Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivors. II. Biological effects. G.

- Chromosome aberrations in somatic cells. *J. Radiat. Res. (Suppl)* 16 : 122-31, 1975.
- 4) Beebe G. W., Kato H. and Land C. E., Studies of the mortality of A-bomb survivors. 6. Mortality and radiation dose, 1950-74. *Radiat. Res.* 75 : 138-201, 1978. (RERF TR 1-77)
 - 5) Kerr C. D., Organ dose estimates for the Japanese atomic bomb survivors. *Health Phys.* 37 : 487-508, 1979.
 - 6) International Commission on Radiological Protection, The RBE for high-LET radiations with respect to mutagenesis. Oxford, Pergamon Press, 1972. ICRP Publ. No. 18.
 - 7) Neel J. V., Kato H. and Schull W. J., Mortality in children of atomic bomb survivors and controls. *Genetics* 76 : 311-26, 1974. (ABCC TR 9-73)
 - 8) Grahn D., Frystak B. H. and Lee C. H. R., Genetic effects of low dose neutron irradiation. *Environ. Mutagen* 1 : 159, 1979.
 - 9) Ishimaru T., Otake M. and Ichimaru M., Dose-response relationship of neutrons and γ rays to leukemia incidence among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki by type of leukemia, 1950-71. *Radiat. Res.* 77 : 377-94, 1979. (RERF TR 14-77)
 - 10) Otake M., Dose-response relationship of neutron and gamma rays to chromosomally aberrant cells among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki. *J. Radiat. Res.* 20 : 307-21, 1979. (RERF TR 19-78)
 - 11) Awa A. A., Honda T., Neriishi S., Shimba H., Amano T. and Hamilton H. B., An interim report of the cytogenetic study of the offspring of atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki. *Proc. 6th Int. Cong. Hum. Genet., Jerusalem, Isreal*, 1981.

- 12) Evans H. J., Chromosome anomalies among livebirths. *J. Med. Genet.* 14 : 309-12, 1977.
- 13) Neel J. V., Mohrenweiser H. W. and Meisler M. H., Rate of spontaneous mutation at human loci encoding protein structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77 : 6037-42, 1980.
- 14) Harris H., Hopkinson D. A. and Robson E. B., The incidence of rare alleles determining electrophoretic variants ; data on 43 enzyme loci in man. *Ann. Hum. Genet.* 37 : 237-53, 1974.
- 15) Tobari Y. N. and Kojima K. I., A study of spontaneous mutation rates at ten loci detectable by starch gel electrophoresis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 70 : 397-403, 1972.
- 16) Mukai T. and Cockerham C. C., Spontaneous mutation rates at enzyme loci in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 : 2514-7, 1977.
- 17) Voelker R. A., Schaefer H. E. and Mukai T., Spontaneous allozyme mutations in *Drosophila melanogaster* rate of occurrence and nature of the mutants. *Genetics* 94 : 961-8, 1980.

XV NIRS Symposium: Biomedical approaches towards radiation-induced
genetic damage and risk assessment

Perspective of genetic research toward risk assessment

A.G. SEARLE

MRC Radiobiology Unit, Harwell, Oxon OX11 ORD, United Kingdom

Although research directed towards the better assessment of human genetic risks has been in progress for over thirty years, we are still a long way from having an accurate idea of its true magnitude. This seems a good opportunity to attempt some general perspective on what we have learned about the genetic response of mammalian germ-cells to radiation and what we still need to know in order to gain a clearer picture.

To place the subject truly in perspective, we should consider first what is known about the magnitude of the different components of the human genetic load, so that we can see where radiation is likely to have its major effect. Human chromosomal anomalies are found in about 5% of recognizable conceptions, 40% of spontaneous abortions, 6% of stillborn and 0.6% of liveborn (Sankaranaryanan, 1982; UNSCEAR, 1982). No doubt nearly all the spontaneous abortions and stillbirths are the direct consequence of the chromosome anomalies carried (especially trisomies), while many of the very early unrecognized abortions will be the result of chromosomal monosomy. Of the liveborn with chromosome anomalies, about 20% suffer from autosomal trisomy (Down's syndrome etc.), about 40% from sex-chromosomal conditions such as Klinefelter's syndrome (XXY) while another 40% will carry various kinds of balanced or unbalanced structural anomaly, such as translocations or inversions. Only a small proportion of these

chromosome anomalies can be inherited, so the full impact of any increased mutation rate will be felt immediately.

It has been estimated (Carter, 1977; UNSCEAR, 1982) that about 1% of liveborn carry harmful dominant and sex-linked genes, while about 0.25% carry harmful autosomal recessives. There is much more doubt about the frequency of partly inherited harmful conditions, congenital anomalies and so on, although a figure of 9% has been used by UNSCEAR (1977) based on the Canadian survey of Trimble and Doughty (1974). Some of the commonest malformations they included were ventricular septal defect, cleft palate, undescended testicle and hypospadias, talipes cavus (club-foot) and congenital dislocation of the hip. Clearly, the extent to which the frequency of these conditions is likely to be influenced by increased levels of radiation is one of the major uncertainties in risk assessment.

Let us now consider the sorts of information we need in order to make accurate risk assessments (Table I). First, we need to know much more than at present about the nature of the genetic changes induced

Table I. Some of the information needed in order to make reliable assessments of genetic risk

1. Nature of induced mutations
2. Dependence of mutation rates on germ-cell stage
3. Effects of radiation dose, dose rate, LET
4. Mutation components in congenital malformations and conditions with irregular inheritance
5. Effects of structural changes and chromosome imbalance
6. Relative radiosensitivities of human and experimental germ-cells

by radiation, as compared with those responsible for harmful dominant human conditions, for instance. Of course we must have information on the rates of induction of various types of gene and chromosomal mutation, in relation to germ-cell stage and to radiation quality and especially at low doses and dose-rates. For the congenital anomalies and irregularly inherited conditions, we need to know much more about the magnitude of their mutational component as well as the effects of maternal vs. paternal irradiation. The effects of structural chromosome changes in both the balanced and unbalanced states need further investigation, especially in view of findings of higher frequencies of translocation carriers in mental institutions (see Sankaranaryanan, 1982) and the recent work of Dutrillaux et al. (1981, 1983) on the types of reciprocal translocation induced by irradiation of human lymphocytes and fibroblasts. There are other chromosomal problems too, for instance whether the "heritable fragile sites" now reported from a number of human chromosomes, at least one of which is now known to have harmful effects (Hecht et al., 1982), can be induced by irradiation. Finally, new methods must be found for comparing radiosensitivities of human and experimental organisms for mutation induction. Allied to this is the problem of whether there are especially radiosensitive groups in the human population, perhaps connected with heterozygosity for particular repair-deficient mutants.

Next, let us consider some of the radio-genetic information which has been accumulated over the years and which has been used to make tentative risk assessments (Table II). First, we have a good idea of the magnitude of the radiation doses which will lead to a mutation frequency which is double the spontaneous frequency, especially with irradiation of stem-cell spermatogonia, the germ-cells most at risk in

Table II. The main components of our present knowledge from genetic experiments for risk assessment

1. Doubling doses for acute and chronic irradiation (mice)
2. Effects of dose (except low acute in spermatogonia), dose-rate, LET on specific locus mutation frequencies in mouse germ-cells most at risk
3. Similar data for dominant visible mutations
4. Translocation induction rates in mice and other species (including some Primates)
5. Induction of chromosome losses and gains

the male. These estimates are more reliable for chronic exposures (Searle, 1977), because only with these exposures does one get a linear dose-response relationship. With the recent work on transposable elements as a source of spontaneous mutation in Drosophila (Green, 1980) and the suggestions that similar elements may be present in the genomes of man and mouse the validity of the doubling dose concept may be open to question, if many spontaneous mutations have an entirely different origin from induced mutations. However, I do not think the concept is seriously threatened if the proportion of spontaneous mutations which stem from transposable elements is approximately the same in both species.

Thanks to over 30 years of specific locus experiments at Oak Ridge and Harwell we now have a very good idea of the kinetics of induction of these recessive mutations in both male and female germ-cells by different qualities of radiation and at a wide range of dose-rates (see for instance Searle, 1974; Russell, 1977; Russell and Kelly, 1982). The main gap in our knowledge concerns the response of

A_s (stem-cell) spermatogonia to single X-ray exposures of less than 300 R. Will there be a concave type of dose-response as is found with mouse oocytes (Lyon et al., 1979)? Fractionation experiments (Lyon et al., 1972) suggests that this is probable, but it is very difficult to predict frequencies at low doses from those at higher ones because of the intervention of spermatogonial killing and germinal selection.

Dominant visible mutations show very similar responses to changes in dose, dose-rate, LET etc. as do specific locus mutations (Searle, 1974) and it seems safe to assume that the other types of dominant morphological mutation being studied (e.g. those involving the eye or skeleton) will behave likewise. However, more information on the induction of dominants in female germ-cells is clearly desirable.

The induction of reciprocal translocations has been studied extensively in male germ-cells of the mouse and other rodents, as well as in four Primates, including a limited amount of information from human male germ-cells. Recent results of Matsuda and co-workers on the crab-eating monkey (Tobari, this symposium) are of especial interest because significantly higher translocation frequencies were found than previously reported for the rhesus monkey by van Buul (1980). Effects of dose and dose-rate are generally very similar to those of specific locus mutations, but once again more data are needed from female germ-cells. Work on the induction of aneuploid conditions has been confined largely to the mouse, where chromosome loss is much more frequent than chromosome gain and where oocytes are definitely more sensitive than spermatogonia, in which cell selection may well eliminate aneuploidy. However, until recently, work has concentrated on X-chromosomal aneuploidy.

Table III. Approaches to determining
the nature of induced
mutations

1. Study of electrophoretic variants
2. Identification of deletions
3. Use of DNA probes
4. Further studies of dominants
5. Role of repair enzymes

Let us now consider how we can obtain more information on the nature of induced mutations (Table III). By looking for mutations at the biochemical level, by electrophoretic and other methods, we can find out if mutation is to a null allele, with no discernible activity, or just to a new allele with altered mobility, which might indicate a base-pair change in the DNA. Work on the induction of mutations at allozyme loci in *Drosophila* by chronic γ -irradiation (Racine et al., 1980) gave 8 independent null mutants, most of which seemed to be intragenic changes such as small deletions. However, little work of this type has yet been done in mice with radiation.

It is known from the work of L.B. Russell (1971) on mutations at the d and se loci that a number of specific locus mutations are small deletions, the proportion being substantial when more mature germ-cells are irradiated. However, these have only been studied in detail in two regions of the mouse genome, namely the c locus (Russell and Raymer, 1979) and the closely linked d and se loci (see above). In an attempt to widen the possibilities for studying deletions in the mouse genome we have recently produced a new specific locus stock which carries four pairs of closely linked genes (Searle, 1983) thus

allowing the study of deletions in four separate regions as well as mutations at 8 loci. Results obtained to date suggest that specific locus mutation frequencies per locus in this stock will be much lower than in the original 7-locus stock, in line with the findings of Lyon and Morris (1966).

With the remarkable advances over the last few years in molecular genetics and recombinant DNA technology it is clear that we are on the threshold of a new and direct method to study the nature of induced mutations, i.e. by the use of specific DNA probes followed by sequencing the region of interest in wild type and mutant. It will also be of interest, of course, to sequence across the joins between translocated and non-translocated parts of chromosomes, to find out to what extent translocations involve changes in nucleotide sequence.

Previous work on the induction of dominant visible mutations suggested that there were some differences in the spectrum of dominants between control and irradiated series, especially after fission neutron irradiation. This led to a marked preponderance of T locus mutations rather than those at the W locus which are commonest in the controls (Searle, 1974). Although there has been detailed work by Selby and Selby (1978) on the nature of dominant skeletal mutations induced by acute γ -irradiation there has as yet been no comparison with spontaneously arising dominants affecting the same system. In similar work on cataracts, Ehling et al. (1982) found none in over 8000 control progeny. In view of the importance of harmful dominants as part of the human genetic load further comparisons are needed of spontaneous and induced dominant mutations (especially with protracted exposures at low dose-rate), in experiments in which attempts are made to detect as many different kinds of dominants as possible. It seems

likely that numbers of dominant visible mutations detected can be markedly increased by including new categories. Thus, in an experiment with the deletion-testing stock mentioned above, we have kept a number of mice which were markedly smaller than litter-mates for testing. Out of 16 fully tested so far, six have proved to be inherited, though sometimes with reduced penetrance. Since 74 mice were classified as small at weaning age, one would expect that 3/8 of these, or 28 would have had a hereditary condition leading to growth retardation (Searle, unpublished). Of course, a number of these would die before breeding age, or be sterile.

Since processes of repair or misrepair are supposed to be involved in the production of radiation as well as chemically induced mutations it seems very desirable to find out more about the repair enzymes involved. It has long been postulated (Russell et al., 1958) that the dose-rate effect with specific locus mutations is connected with the more effective repair of premutational lesions after chronic than after acute irradiation, yet we still know nothing about which repair enzymes are involved or how they work.

Our next set of needs for more accurate risk assessment concerns mutation rate studies, especially at lower dose levels (Table IV).

Table IV. Further information needed on rates of induction of mutations and structural changes

1. Induction of mutations in mouse spermatogonia by <3 Gy
2. Mutation induction in non-mouse oocytes
3. Dominants acting on immature progeny
4. Induction of various types of tumour
5. Translocation induction in multi-metacentrics

Thus specific locus experiments are still needed where acute doses to stem-cell spermatogonia are less than 3 Gy, to determine the true shape of the dose-response curve at levels where there is little killing. Since the arrested mouse oocyte is so different from the human one, both in ultrastructure and radiosensitivity, it seem very desirable to obtain some more mutation rate estimates from mammalian oocytes (both immature and maturing) which more closely resemble the human one. Some useful work has been carried out by Caine and Lyon (1979) on dominant lethal induction in the female guinea-pig, in which post-implantation losses were higher three months after irradiation than at the first oestrus. This was in contrast to results in the female mouse, where immature oocytes are very sensitive to killing but very refractory to mutation induction. More work of this nature is needed, especially with chronic exposures.

Dominant mutations which are lethal in utero can be studied easily, as can congenital malformations acting around birth (with somewhat less ease) and various sorts of dominant which survive and breed. However, little work had been done on presumptive dominant mutations which are so severe that they kill between birth and weaning or lead to a failure to breed. It should be remembered that Schull et al. (1981) used lethality in the first 17 years of life as one of their indicators of genetic harm in their studies on the progeny of those exposed to atomic bombing at Hiroshima and Nagasaki. Thus it would be very useful to have more experimental data to cover a comparable time period. More studies on mortality between birth and weaning and on such factors as growth retardation, mentioned earlier, seem necessary. Foetal retardation is a comparatively common type of congenital malformation in late pregnancy (Kirk and Lyon, 1982).

Another important type of dominant mutation which has only been considered recently is that which gives rise to hereditary tumours. A large number of such conditions have been described in man, many acting in childhood (UNSCEAR, 1982). Nomura (1982, 1983) has reported that X-irradiation of both male and female ICR mice leads to a marked increase in the frequency of lung tumours in the progeny, tumours which were inherited as dominants with about 40% penetrance. This was enhanced by previous treatment with urethane. It seems very desirable to extend this work to different radiation regimes and different types of tumour, also to link the induction of hereditary tumours with those in the exposed animals themselves. In fact, Nomura (this symposium) is already working along these lines.

Although, as already mentioned, much research has been carried out on translocation induction in mice, one drawback in attempting extrapolation of these results to the probable situation in man has been the great differences in karyotype, mouse chromosomes being normally all acrocentric while human ones are mainly metacentric. This difference may be quite important, since Crocker and Cattanaeh (1981) have shown that irradiation of metacentric chromosomes leads to a distinct type of exchange, the so-called "intercentric translocation" which can have undesirable consequences. Since it is now quite feasible to construct a multimetacentric mouse karyotype, in view of the large number of Robertsonian translocations now discovered in the mouse it would be very useful to use such a stock in future experiments.

Severe congenital malformations are like dominant lethals in not being inherited, which often leads to difficulties in determining the extent to which they are genetic in origin. As Kirk and Lyon (1984)

point out, their study is of particular importance because they constitute one category of conditions which have uncertain or irregular inheritance, about which little is known. These authors confirmed and extended the pioneer work of Nomura (1978, 1982) who first showed that congenital malformations could be induced by irradiation of male and female mice. They found that, in X-irradiated female mice, the frequency of congenital malformations increased with dose and time interval, reaching a maximum after conceptions in the third week after treatment (Kirk and Lyon, 1982), while in males also the third week after treatment (early spermatids) seemed the most sensitive (Kirk and Lyon, 1984) while there were signs of an effect in spermatogonial stages also.

Many different facets of this work deserve further study. Since it is known that a number of trisomies in the mouse (Gropp, 1982) lead to congenital malformations (including retardation) of various types it will be interesting to find out to what extent the anomalies found are associated with chromosomal events and to what extent they should be regarded as presumptive dominants. In females, radiation-induced maternal effects on uterine physiology might spuriously increase the apparent genetic effect, but this complication can be overcome. Of course it would be of interest also to determine the response after protracted exposures.

There are a number of problems (Table V) still outstanding in connection with the induction of structural chromosome changes, which have been recovered after irradiation of practically all types of germ-cells in the mouse. In the balanced form they may sometimes have a visible phenotypic effect (Searle, 1981) or show male sterility or reduced fertility. However, the extent and magnitude of the adverse

Table V. Problems related to the induction and effects of reciprocal translocations

1. Effects of balanced translocation on fitness
2. Comparative studies on chromosome imbalance and its effects
3. Transmission of induced translocations
4. Proportion of imbalance surviving to birth
5. Restitution vs. repair

effects of balanced translocation heterozygotes in human populations are still not well known, although there is increasing evidence that they do have such effects (Sankaranaryanan, 1982). As far as chromosome imbalance is concerned, the studies of Breckon and Savage (1982) on structural changes in the Syrian hamster, which show that homozygosity for large deficiencies can be compatible with an apparently normal phenotype, are important in showing that the time of DNA replication must be taken into account when considering the likely effects of aneuploidy in particular regions. There is still some doubt on whether the 50% reduction in the expected transmission of induced translocations to the next generation found by Ford et al. (1969) is to be expected at all doses and dose-rates, but at least the work of Crocker (1982) has suggested a plausible reason why it should take place, namely a tendency for spermatocytes carrying translocations to take longer than others to pass through metaphase I. Thus it seems reasonable to incorporate this factor of 2 in relevant calculations. One particularly difficult cytogenetic problem is to find out what proportion of embryos with chromosomal imbalance would be expected to survive to become malformed newborn. Dutrillaux et al.

(1981, 1983) have studied the types of reciprocal translocation induced by γ -irradiation of human fibroblasts and fibroblasts. From their knowledge of human cytogenetics they concluded that about 40% of the translocations induced might lead to duplications and/or deficiencies of chromosomal material which would be compatible with survival to birth but which would usually have serious pathological effects. This is an important step forward but two questions remain to be answered:- (i) what proportions of the unbalanced products of particular translocations will be of the possibly viable type and (ii) what proportion of those embryos carrying the possibly viable type of imbalance will actually survive to birth? It is well known that the times of death of particular lethal or sub-lethal human karyotypes (e.g. trisomy-21 and the XO condition) is very variable. One final more fundamental problem is whether the restitution of chromosome breaks is essentially a process of repair, which can lead to "misrepair" with possibly undesirable effects. Further work at the molecular level will be needed to resolve this.

A final group of problems worth discussing (Table VI) are those

Table VI. Studies on relative radiosensitivity
which would help in genetic risk
assessment

1. Somatic mutation rates in vivo vs. in vitro
2. Somatic vs. germ-line mutability
3. Somatic mutation rates in different species
4. Structural vs. regulator genes
5. Radiosensitivities of different types of
dominant mutation

concerned with relative radiosensitivity. Several of these concern somatic mutations, since comparative work on mutabilities of somatic cells may prove the best route of extrapolation from mutation rates in experimental animals to those in man. The field of somatic cell genetics has expanded considerably in recent years, especially in vitro studies on mutation at the HGPRT (Lesch-Nyhan), ouabaine resistance and thymidine kinase loci (Sankaranaryanan, 1982). The few in vivo studies have mainly been on colour genes in the mouse (L.B. Russell and Major, 1957; Searle and Stephenson, 1982). However, Strauss and Albertini (1979) have described an autoradiographic method whereby human peripheral blood lymphocytes which are 6-thioguanine resistant and thus characteristic of the HGPRT deficient Lesch-Nyhan syndrome can be detected among large numbers of normal lymphocytes. This paves the way to in vivo mutation studies for comparison with the in vitro ones, which will give some idea of the latter's relevance for risk assessment. Somatic versus germ-line mutabilities after in vivo irradiation can be compared in the mouse because the same loci have been used for germ-line specific locus mutation studies and for somatic mutation studies in pigment cells. A third necessity is the comparison of somatic mutation rates in different species, either by the method of Strauss and Albertini (1979) or by that involving coat colour loci, if suitable colour variants are available in the species concerned.

Another necessity is the widening of the array of loci used in mutational studies. So far, these have fallen mainly into the category of structural genes, but perusal of the latest edition of Mouse News Letter shows that an increasing number of regulatory genes are becoming available for study. Nothing is known about the

mutabilities of these. The relative sensitivities of different types of dominant mutation also need further study, especially since Kohn and Melvold (1976) failed to find evidence for the induction of histocompatibility mutations after X-irradiation. No-one knows whether this applies to other types of immunological loci also.

This review of potentially useful lines of research to allow us to improve on genetic risk assessments has been of necessity very selective and with a great personal bias. However, I hope it shows fairly convincingly that there are still many gaps in our knowledge, some of which can be filled now while others will have to wait for further improvements in technique.

References

- Breckon, G. and J.R.K. Savage (1983) *Cytogenet. Cell Genet.* 33: 285-294.
- Buul, P.P.W. van (1980) *Mutation Res.* 73: 363-375.
- Caine, A. and M.F. Lyon (1979) *Mutation Res.* 59: 231-244.
- Carter, C.O. (1977) *J. med. Genet.* 14: 316-320.
- Crocker, M. (1982) *Mutation Res.* 103: 339-343.
- Crocker, M. and B.M. Cattanaach (1981) *Mutation Res.* 91: 353-357.
- Dutrillaux, B., E. Viegas-Pequignot, A. Aurias et al. (1981) *Mutation Res.* 82: 191-200.
- Dutrillaux, B., E. Viegas-Pequignot, M. Mouthuy et al. (1983) *Mutation Res.* 119: 343-350.
- Ehling, U.H., J. Favor, J. Kratochvilova and A. Neuhäuser-Klaus (1982) *Mutation Res.* 92: 181-192.
- Green, M.M. (1980) *Ann. Rev. Genet.* 14: 109-120.

- Gropp, A. (1982) *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* 395: 117-131.
- Hecht, F., P.B. Jacky and G.R. Sutherland (1982) *Amer. J. Med. Genet.* 11: 489-495.
- Kirk, K.M. and M.F. Lyon (1982) *Mutation Res.* 106: 73-83.
- Kirk, K.M. and M.F. Lyon (1984) *Mutation Res.* 125:75-85.
- Kohn, H.I. and R.W. Melvold (1976) *Nature* 259: 209-210.
- Lyon, M.F. and T. Morris (1966) *Genet. Res.* 7: 12-17.
- Lyon, M.F., R.J.S. Phillips and H.J. Bailey (1972) *Mutation Res.* 15: 185-190.
- Lyon, M.F., R.J.S. Phillips and G. Fisher (1979) *Mutation Res.* 63: 161-173.
- Matsuda, Y., I. Tobari, J. Yamagiwa *et al.* (1984) *Mutation Res.* (in press).
- Nomura, T. (1978) Pp. 873-891 of Tumours in Early Life in Man and Animals (ed. L. Severi) Perugia Quadrennial International Conferences on Cancer, Perugia, 1978.
- Nomura, T. (1982) *Nature* 296: 575-577.
- Nomura, T. (1983) *Mutation Res.* 121: 59-65.
- Racine, R.R., C.H. Langley and R.A. Voelker (1980) *Environ. Mutagen.* 2: 167-178.
- Russell, L.B. (1971) *Mutation Res.* 11: 107-123.
- Russell, L.B. and M.H. Major (1957) *Genetics* 42: 161-175.
- Russell, L.B. and G.D. Raymer (1979) *Genetics* 92: 205-213.
- Russell, W.L. (1977) *PNAS* 74: 3523-3527.
- Russell, W.L. and E.M. Kelly (1982) *PNAS* 79: 542-544.
- Russell, W.L., L.B. Russell and E.M. Kelly (1958) *Science* 128: 1546-1550.
- Sankaranarayanan, K. (1982) Genetic effects of ionizing radiation in

- multicellular eukaryotes and the assessment of genetic radiation hazards in man. Elsevier, Amsterdam.
- Schull, W.J., M. Otake and J.V. Neel (1981) *Science* 213: 1220-1227.
- Searle, A.G. (1974) *Adv. Radiat. Biol.* 4: 131-207.
- Searle, A.G. (1977) Pp. 133-145 of Proc. European symposium on rad equivalence. CEC Report EUR 5725e, Luxembourg.
- Searle, A.G. and D.A. Stephenson (1982) *Mutation Res.* 92: 205-215.
- Searle, A.G. (1983) Pp. 279-288 of Utilization of mammalian specific locus studies in hazard evaluation and estimation of genetic risk (ed. F.J. de Serres and W. Sheridan). Plenum, New York.
- Selby, P.B. and P.R. Selby (1978) *Mutation Res.* 50: 341-351.
- Strauss, G.H. and R.J. Albertini (1979) *Mutation Res.* 61: 353-375.
- Trimble, B.K. and J.H. Doughty (1974) *Ann. Hum. Genet.* 38: 199-223.
- UNSCEAR (1977) Report: Sources and effects of ionizing radiation.
United Nations, New York.
- UNSCEAR (1982) Report: Ionizing radiation, sources and biological effects. United Nations, New York.

VI-8

精子形異常による放射線の遺伝損傷の検出

北爪雅之^{*}, 岡本正則^{*}

中井 斌^{**}

はじめに

遺伝損傷をテストする方法には化学変異原のAmes法に代表される微生物を用いた方法と、ラッセルらの特定遺伝子座法に代表される哺乳類の個体を用いる方法とがある。しかし、前者はヒトへの適用性に問題があり、後者は膨大な数のマウスを必要とし、その実施は容易でない。それ故、これらの欠点を除く方法の一つとして哺乳類の配偶子、とくに精子を材料とする遺伝損傷のテスト方法が確立されるならば遺伝損傷検出の精度を格段に上昇させるものと期待される。

マウスの精子によるX線の影響の定量的研究はBruce & Wyrobek¹⁾らによって報告され、それ以後、Bruce & Heddle^{2),4),5)}らによって本方法による各種の変異原物質に関するテスト方法も報告されている。我々はマウス、ゴールデンハムスターおよびカニクイザルを用い、放射線照射による精子形態異常に関する定量的な実験を行ったのでその結果を報告したい。

1. 精子形態異常の型と分類

げっ歯類(マウス, ハムスターなど)の精子頭部は図1に示すように鉤状であるが、霊長類(ヒト, サルなど)の精子頭部は図2に示すように楕円形である。また、放射線照射後に出現した精子の形態異常の型は、頭部・頸部・複合(頭部+頸部)およびその他(中片部, 尾部など)の異常に分類される。

* 放射線医学総合研究所技術部

** 放射線医学総合研究所遺伝研究部

図1 ゴールデンハムスター精子の形態異常の種類

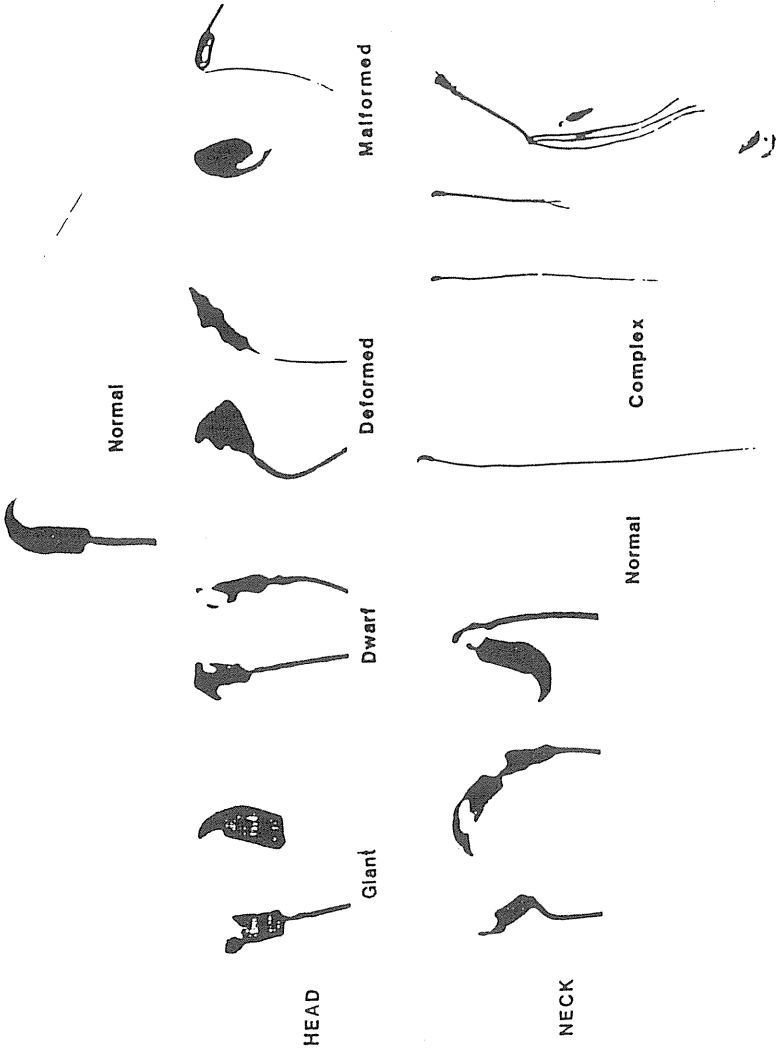
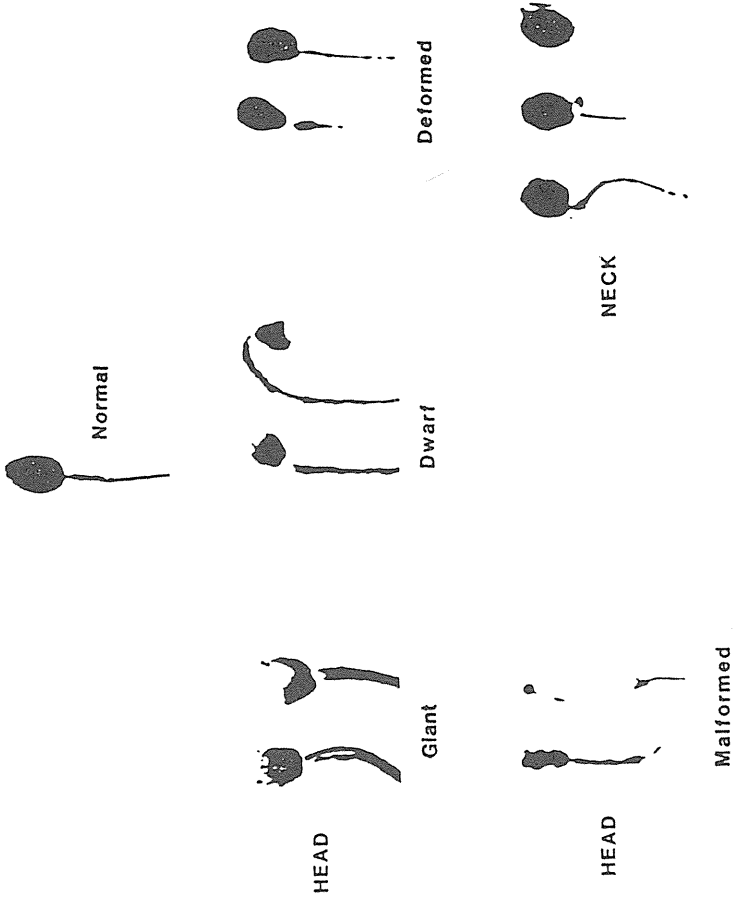


図2 カニクイザル精子の形態異常の種類



2. 精子形態異常の型と放射線感受期

マウス, ゴールデンハムスターに200 KVPのX線(線量率30 rad/min)およびカニクイザルに $^{137}\text{CS}\cdot\gamma$ 線(線量率30 rad/min)を精巣へ局部照射した。マウス, ゴールデンハムスターについては照射後一定期間毎に解剖して精巣上体尾部より精子を採取し, カニクイザルについては照射後一定期間毎に電気刺激法により精子を採取して観察を行った。その結果, 出現した精子形態異常の型のうち放射線に感受性なのは, 頭部および頸部の形態異常である。一方, 放射線に対する感受

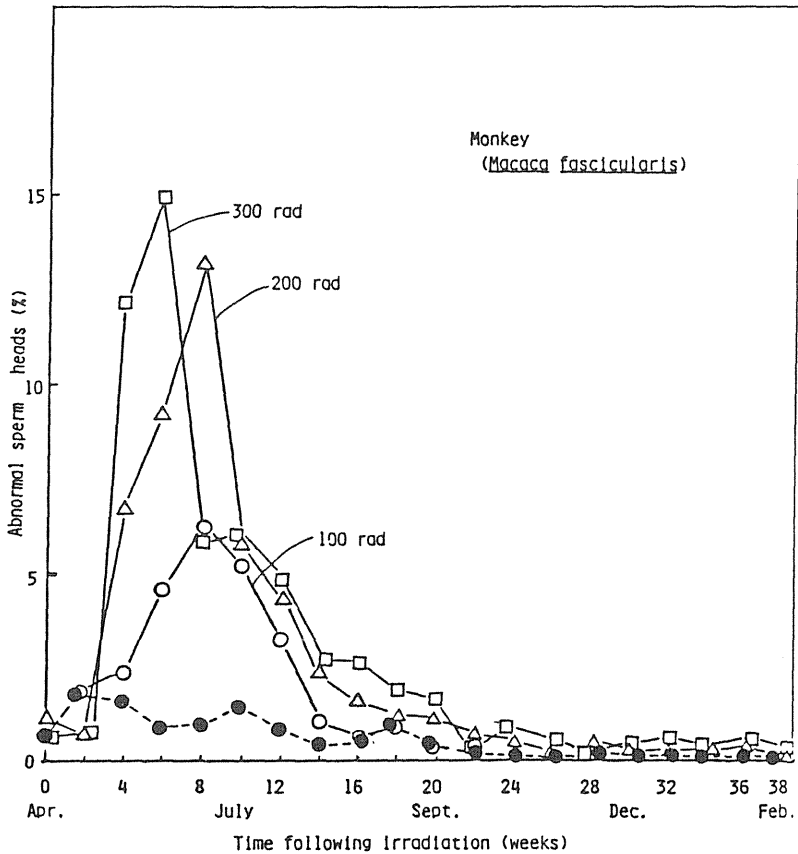


図3 放射線照射後における頭部形態異常精子の出現頻度

期は Bruce らによるマウスの結果¹⁾及びゴールデンハムスターおよびカニクイザルの結果^{6),7)}から、マウス、ゴールデンハムスターは照射後5~6週間、カニクイザルは照射後6週間(300 rad)および8週間(100, 200 rad)でピークが認められる(図3)。これらの時間的な差は精子形成期間の差の問題と思われるが、いずれにせよ精子形態異常の放射線感受期は精原細胞分裂後期ないし精母細胞の減数分裂前期にあるものと推定される。

3. 精子形態異常の線量効果

放射線を照射することにより誘発されるマウスの精子頭部形態異常の線量効果は Bruce¹⁾によると3/2の指数をもつ指数曲線で表わされ、その倍加線量は

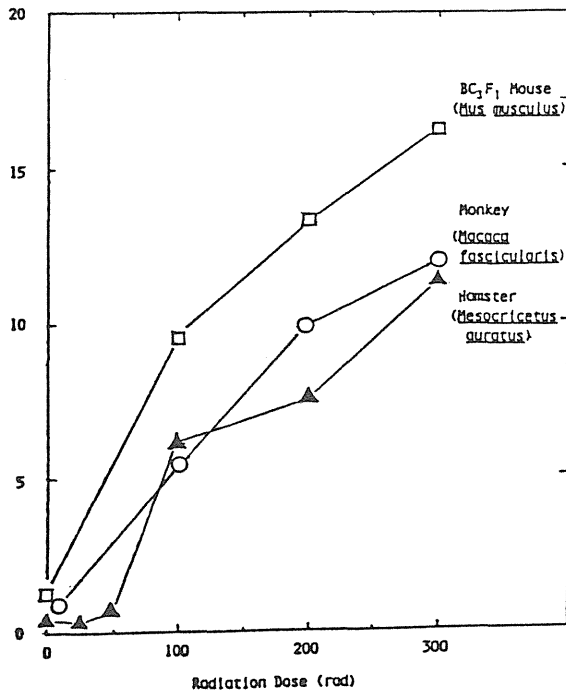


図4. 放射線照射による精子頭部形態異常の線量効果

30 rad とされている。ゴールデンハムスターの場合は、我々の実験結果から 100 rad までは線量に比例して直線的に増加する指数 2 の曲線であり、100 rad をこすと勾配はゆるくなる(図 4)。この場合の倍加線量は約 50 rad 付近と考えられる。このようにハムスターはマウスに比較して異常の発生率が低く、Lyon ら³⁾によって得られたマウス、ハムスターの相互転座の線量効果曲線に近似している(図 5)。一方、図 5 に示すようにカニクイザルの精子形態異常の線量効果はマウスよりも低く、むしろ、ハムスターに近い。この結果は松田⁸⁾らによって得られた

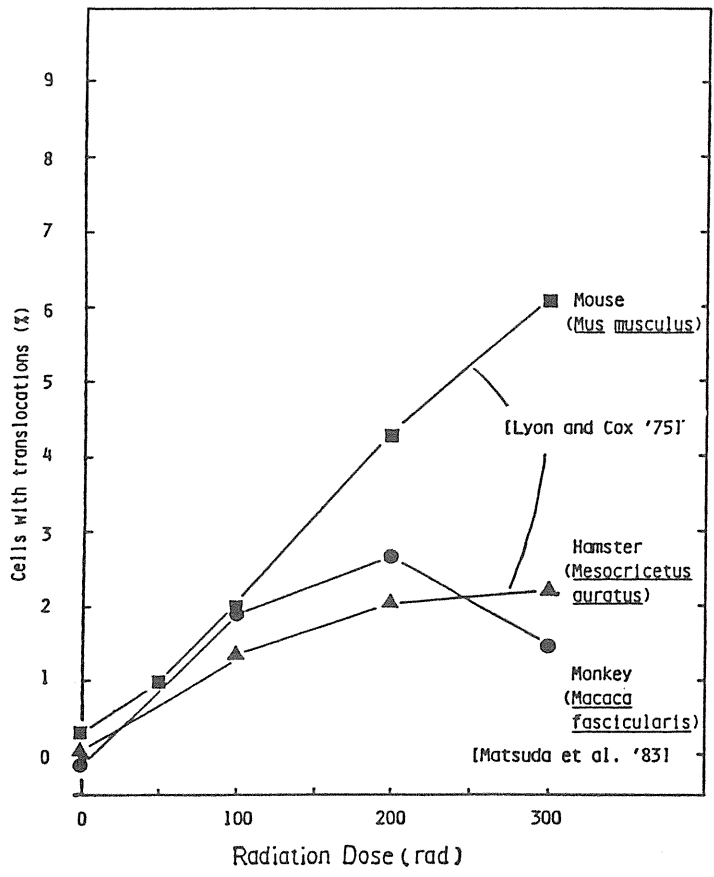


図 5. 放射線照射による相互転座の線量効果

カニクイザルの相互転座の誘発率はマウスと比較し低い報告とよく符号する。上述のように精子形態異常の感受期は主として精母細胞に、また相互転座の感受期は精原細胞を考えられ、感受期と観察する endpoint は異なっても両者の間に平行的な種特異性が見られることは興味深い。

お わ り に

放射線により誘発される遺伝損傷の指標として、精子形態異常とくに頭部形態異常の有効性は明らかである。しかしながら、精子形態異常の発生機構そのものについては未だ十分明らかではない。形態異常の原因として考えられるものは、1) 染色体異常 2) 遺伝子突然変異 3) 精子形成における遺伝情報の発現過程での損傷の三者⁹⁾であり、今後、これらについてさらに詳細な機構の解明が必要である。このように動物個体の配偶子、とくに精子を用い、遺伝損傷を直接検出する研究の進展によって将来ヒト精子を用い、ヒトの集団における遺伝障害のモニタリングを個人レベルで行うことも考えられよう。

参 考 文 献

- 1) Bruce, W. R., Furrer, R., Wyrobek, A. J. : Abnormalities in the shape of murine sperm after acute testicular X-irradiation, *Mutation Research*, 23 : 381-386, 1974.
- 2) Heddle, J. A., Bruce, W. R. : Comparison of tests for mutagenicity or carcinogenicity using assays for sperm abnormalities ; formation of micronuclei, and mutations in *salmonella*, *Origins of human cancer*, Cold Spring Harbor Laboratory : 1549-1557, 1977.
- 3) Lyon, M. F., Cox, B. D. : The induction by X-rays of chromosome aberrations in male guinea pigs, rabbits and golden hamster, III. Doseresponce relationship after single doses of X-rays to spermatogonia, *Mutation Research*, 29 : 407-422, 1975.
- 4) Bruce, W. R., Heddle, J. A. : The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, *salmonella*, and sperm ab-

normality assays, Can. J. Genet. Cytol., 21 : 319-334, 1979.

- 5) Heddle, J. A., Bruce, W. R. : On the use of multiple assays for mutagenicity, especially the micronucleus, *salmonella*, and sperm abnormality assays, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Progress in Genetic Toxicology : 265-274, 1977.
- 6) 北爪雅之, 岡本正則, 豊田 裕, 中井 斌 : ゴールデンハムスターおよびカニクイザル精子の形態異常におよぼす放射線の影響, 日本放射線影響学会第25回大会講演要旨集 : 245, 1982.
- 7) 北爪雅之, 岡本正則, 中井 斌 : カニクイザルの精子形態異常に及ぼす放射線の影響, 日本放射線影響学会第26回大会講演要旨集 : 185, 1983.
- 8) 松田洋一, 戸張巖夫, 山極順二, 宇津木豊子, 北爪雅之, 岡本正則, 中井 斌 : カニクイザル精原細胞における γ 線誘発染色体相互転座について, 日本放射線影響学会第26回大会講演要旨集 : 205, 1983.
- 9) 北爪雅之, 岡本正則, 中井 斌 : 精子形態異常による変異原性の検出, トキシコロジーフォーラム : 6 ; 214-223, 1983.

放医研シンポジウムシリーズ

1. 放射線障害の回復
100 P. 1972. B5.
2. プルトニウムによる内部被曝
91 P. 1973. B5.
3. 細胞の増殖とその制御—医学のあゆみ—
80. 229—374. 1974. B5.
4. 環境因子による生体の障害—医学のあゆみ—
84. 731—838. 1974. B5.
5. 移植免疫 最新医学別刷
29. 132 P. 1974. B5.
6. 腫瘍治療の生物学的基礎 癌の臨床 臨時増刊 別冊
21. 651—814. 1975. B5.
7. 加齢の生物学 癌の臨床 臨時増刊 別冊
22. 436—572. 1976. B5.
8. 加速器とその医学利用 癌の臨床 臨時増刊 別冊
23. 251—434. 1977. B5.
9. 発癌と遺伝障害
251 P. 1977. A5.
10. 医療被曝とその対策
266 P. 1979. A5.
11. 癌の集学的治療
345 P. 1981. A5.
12. 生物学, 基礎医学におけるアイソトープ実験技術の進歩と貢献
279 P. 1981. A5.
13. 医療のための画像工学
239 P. 1982. A5.
14. 発がん
270 P. 1983. A5.
15. 放射線による遺伝損傷とリスク
322 P. 1985. A5.
16. 粒子加速器の医学利用企画編集集中

第15回放医研シンポジウム準備委員会

委員長	中井 斌	(遺伝研究部長)
副委員長	石原 隆昭	(障害基礎研究部長)
委員	山口 武雄	(生物研究部)
"	佐藤 弘毅	(遺伝研究部)
"	戸張 厳夫	(遺伝研究部)
"	佐渡 敏彦	(生理病理研究部)
"	色田 幹雄	(薬学研究部)
"	稲葉 次郎	(環境衛生研究部)
"	館野 之男	(臨床研究部)
"	石原 照一	(管理部企画課)