

がんの放射線・抗がん剤治療による末梢血リンパ球の突然変異と
DNA塩基配列変化

課題番号（07670992）

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金
基盤研究（C）研究成果報告書

平成9年2月

研究代表者 木村 博
(滋賀医科大学医学部教授)

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金（基盤C）
研究成果報告書

- 1 課題番号 07670992
- 2 研究課題 がんの放射線・抗がん剤治療による末梢血リンパ球の
突然変異誘発とDNA塩基配列変化
- 3 研究代表者 木村 博 （滋賀医科大学教授）
- 4 研究分担者 なし
- 5 研究経費 平成7年度 1,100 千円
平成8年度 1,200 千円
計 2,300 千円

6 研究発表
(1) 学会誌等

尾川博昭、西田一信、小矢光晴、柴原俊一、柿本幸司、木村博、坂田一矩、加藤安彦
大腸菌supF遺伝子における塩化コバルト(II)誘発突然変異. 環境変位原研究 16、
391-396 (1995)

Ikebuchi, M., Kimura, H., Hill, C. K., Aoyama, T. Are three forms of potentially
lethal damage expressed after X irradiation by treatment with hypertonic
solutions in Chinese hamster V79 cells? Radiat. Res. 141, 19-27 (1995)

Kimura, H., Terado, T., Komatsu, K., Nozawa, A., Ikebuchi, M., Aoyama, T.
Cultured cells from a severe combined immunodeficient mouse have a slower
than normal rate of repair of potentially lethal damage sensitive to hypertonic
treatment. Radiat. Res. 142, 176-180 (1995)

池淵誠、伏木雅人、木村博 PLDRはいくつあるか？ 放射線生物研究 31、
191-205 (1996)



木村博、池淵誠、青山喬、小松賢志 細胞の放射線傷害からの回復とその分子機構
最新医学 51、140-149 (1996)

Kimura, H., Ikebuchi, M., Fushiki, M., Komatsu, K. The scid mutation does not affect slowly repairing potentially lethal damage that is sensitive to 0.23 M NaCl, J. Radiat. Res. 37, 247-255 (1997)

(2) 口頭発表

木村博、池淵誠、青山喬、小松賢志 SCID細胞におけるはやいPLD修復と遅いPLD修復 第34回日本医学放射線学会生物部会(名古屋) 1995

Ikebuchi, M., Kimura, H., Ahmed, T., Aoyama, T. Damage produced by bleomycin and 0.5 M NaCl contains potentially lethal damage. 10th Int. Cong. Radiat. Res. (Wurzburg, Germany) 1995

Kimura, H., Ikebuchi, M., Komatsu, K., Aoyama, T. Potentially lethal damage repair in cells from severe combined immunodeficient mouse. 10th Int. Cong. Radiat. Res. (Wurzburg, Germany) 1995

Aoyama, T., Terado, T., Iyehara-Ogawa, H., Kato, Y., Kimura, H., Neocarzinostatin-induced mutations at hprt locus in CHO cells. 10th Int. Cong. Radiat. Res. (Wurzburg, Germany) 1995

寺戸勅雄、木村博、神宮義一、尾川博昭、加藤安彦、青山喬 HPRT遺伝子におけるネオカルチノスタチン誘発突然変異のDNA解析 第38回日本放射線影響学会(千葉) 1995

寺戸勅雄、尾川博昭、神宮義一、加藤安彦、木村博 ネオカルチノスタチンにより誘発されるCHO細胞のhprt遺伝子におけるDNA解析 第19回日本分子生物学会(札幌) 1996

尾川博昭、神宮義一、柴原俊一、柿本幸司、木村博、加藤安彦 大腸菌supF遺伝子における塩化コバルト(II)誘発突然変異 第19回日本分子生物学会(札幌) 1996

寺戸勅雄、木村博、青山喬、尾川博昭、加藤安彦 ネオカルチノスタチンにより誘発されるCHO細胞のhprt遺伝子における突然変異のDNA解析 第35回日本医学放射線学会生物部会(横浜) 1996

7 研究成果

研究目的

放射線や抗がん剤によるがん治療において、2次的な発がんの可能性は無視できないほどに大きい。特に近年のように治療成績の向上が著しく、また、治療後のQOLが重要になりつつある状況下では、この2次的な発がんの率がどの程度であるかを評価することは重要なことである。放射線治療では、全治療期間中に通常60 Gy程度の線量が局部に与えられる。このとき、対象となる局部以外に末梢血にも相当量の被曝が観察されている。この末梢血における被曝線量の評価にはリンパ球の染色体異常頻度がよく用いられ、その感度も悪くない。末梢血で被曝線量を評価する意義は以下の2点である。①染色体異常が比較的簡便に調べられる②特に放射線に感受性の高い血液系幹細胞に対する影響評価ができる。一方、抗がん剤治療による末梢血への影響はさらに直接的である。そこで、抗がん剤による2次発がん発生率の評価を行う際にこの末梢血への影響が基本的なデータとして蓄積される必要がある。このように、末梢血リンパ球を用いた染色体異常の研究は放射線・抗がん剤による2次発がん影響評価に有用である。しかし、染色体異常を調べる方法は生体にどれほどの放射線・抗がん剤影響が与えられたかの定量に向いてはいるが、それがほんとうに放射線・抗がん剤により誘発されたものかどうかについては情報を何も与えない。

それでは、2次的な発がんが起こった場合、それが確かに放射線治療や抗がん剤治療の結果であると結論づけるにはどうしたらよいのであろうか。いろいろな器官においてがん化した組織を調べると、p53がん抑制遺伝子に頻繁に突然変異の起こっていることがわかってきた。幾多の研究室で得られたこれらのデータを整理した報告がある。その報告の中で興味深い結論が導きだされている。たばこの煙の中に含まれるベンツピレンは発がん性物質である。ベンツピレンを細胞に与えると、この発がん性化学物質に特徴的な突然変異が生じることがわかっている。肺がん患者から摘出した組織と大腸がん患者からのものについて、p53遺伝子の突然変異を比較したところ、肺がんの場合に、その約50%にベンツピレンに特徴的な変異が存在するのに、大腸がんの場合にはこの変異はほとんど存在しなかったのである。このことは、肺がんのうち約50%が喫煙によるものであることを示唆している。つまり、ある薬剤、化学物質などにより、もし大変特徴的な変化が起これば、逆にその変化を検出したときにはその薬剤、化学物質に原因を求めても差し支えないといえる。そこで、2次的に発生したがん組織を得てp53遺伝子の変化を調べれば、それが治療の結果かどうかを推測することが可能となる。また、末梢血リンパ球の突然変異を調べることで、放射線・抗がん剤による生体に与えられた影響を質的に評価することができるのである。

われわれは、放射線によって誘発される突然変異を塩基レベルの変化として詳細に調べてきた（参考文献1～4）。半ば予想されたことではあるが、放射線による突然変異は自然突然変異によく似ていた。自然突然変異が自然放射線によって誘発されるのではないことは、放射線の突然変異誘発率から予測されることである。それならばなぜ自然突然変異は放射線誘発突然変異に似ているのであろうか。確固たる証拠はまだないがその答えらしきものが存在

する。DNAに対する放射線の影響は、そのかなりの部分が水のラジカル、主に水酸化ラジカルを介してであることがわかっている。一方、呼吸の結果生じる活性酸素は遷移金属（参考文献5）存在下で容易に水酸化ラジカルに変わる。つまり、放射線があたなくても、呼吸をしているだけで、放射線により生じる傷に似た傷がDNA上にできているらしいのである。それでは、これらのラジカルにより生じるDNA上の傷にはどんなものがあるのだろうか。放射線によってできる傷は千差万別といわれている。しかし、主なものはいくつかはなく、その中でもDNAの2本鎖切断が重要であるといわれている。そこで、われわれは2本鎖切断を修復することのできない突然変異マウスより樹立した細胞を用いて（参考文献6-10）、その突然変異を調べることで、2本鎖切断によりどのようなDNA塩基レベルの変化が起こるのかを調べようと試みてきた。残念ながら、現在のところこの細胞を用いた突然変異系が確立されるに至っていないので、データは未だない。しかしながら、2本鎖切断による突然変異がどんな種類のものであるかを探ることは大切なことである。つまり、自然突然変異の中でどれが2本鎖切断によるものなのかを知るために、また、放射線による2次的発がんがどの程度起こっているかを評価するのに役立つ可能性があるからである。

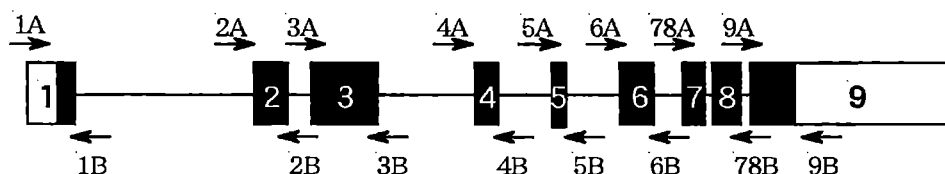
本研究では、2次的に発生したがんの原因を探るための手法を確立するのに必要な基礎データとして①培養系を用いて放射線や抗がん剤処理により特徴的な変化がDNAの塩基配列レベルで起こるかどうかを調べること、②個体レベルで抗がん剤を処理したマウス、あるいは抗がん剤投与を受けた患者よりリンパ球を得、どのようなDNA塩基配列変化が起こっているかを調べることが目的であった。今回、抗がん剤としてはネオカルチノスタチン(NCS)を用いた。その理由は、本薬剤が放射線類似作用物質であり、DNA 2本鎖切断を起こすが、切断の位置は放射線のようにランダムではなく特定の位置であり、特徴的な変化が期待でき、放射線の場合と比較できると考えたからである。①については以下の研究成果に示すようにほぼ達成されたと考えている。一方、②に関しては、①で80以上もの突然変異体についてそれぞれDNA塩基配列解析を行うことが予想以上に困難なものであったこと、マウスのリンパ球培養が始めての経験で予想以上に手間がかかっていること、のためデータを得るに至っていない。しかし、本学放射線科との共同実験を計画中であること、当初より①を確実にすすめることが主な目的であったことを考え、本研究の目的は一応達成されたと考えている。

研究結果

培養系の確立：われわれは以前からマウスBalb/c3T3系の細胞を用いて突然変異の研究を行ってきた。特に本研究での目的、放射線誘発突然変異（参考文献1-4）との比較を行う上でもこの系を使うことが望まれた。しかし、残念なことに、この細胞系の長期間の継代により、増殖能の低下をきたし、本研究の開始時には事実上使用不可能になっていた。一方、すでに「研究目的」でも述べたように放射線誘発2本鎖切断による突然変異を調べ、ネオカルチノスタチンとの比較を行うため、SCID (sever combined immunodeficient) マウスから培養系の確立を試みた。SCIDマウス由来の細胞はDNA依存性タンパク質リン酸化酵素 (DNA-PK) の触媒サブユニットを欠損する結果、DNA 2本鎖切断を修復できずに放射線感受性となっている。DNA-PKはリンパ球の成熟にも重要な役割を持っていて、この欠損のためマウスは免疫不全となることがわかっている。このSCID由来の細胞を放射線

やネオカルチノスタチンに曝すと、2本鎖切断を修復しないので、DNA上にできた多種類の傷の中で2本鎖切断の割合だけが極端に大きくなることが予想される。そこで、この細胞を用いて突然変異を調べれば2本鎖切断が原因の突然変異を調べることができるともくろんだのである。SCID変異をホモにもつ胎児から線維芽細胞を3T3法で樹立し、その放射線感受性、高張液依存性潜在性致死損傷回復について調べた（参考文献7-10）。また、それらを従来から存在する細胞と比較した（参考文献6）。その結果、樹立した細胞が確かに放射線感受性であり、DNA-PKを欠損していることが示唆された。そこで、この細胞の突然変異系を確立すべく6チオグアニン（6TG）感受性について調べた。ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（hprt）が存在すると細胞は細胞にとって毒となる6TGを取り込むので、この薬剤に感受性となる。一方、hprtを欠損した細胞は6TGを取り込むことがないので、薬剤耐性となる。そこで、6TG耐性になった細胞のhprt遺伝子を調べればそこに突然変異が生じているはずなのである。実験を行った結果、樹立した細胞は非常に6TG感受性であった。この細胞を6TGに曝しておいて突然変異体を得ようと試みたが、突然変異率があまりにも小さく耐性変異体はほとんど得られなかった。つまり、この細胞は事実上突然変異の研究には不向きであった。解析は行っていないが、これはおそらく細胞の樹立の過程でhprt遺伝子が倍加してしまい、その両方のhprt遺伝子に突然変異が同時に起こらない限り6TG耐性が得られないからだろうと考えられた。いづれにしても、これらの細胞が使用に耐えないことが判明したので、突然変異体が簡単に得られ一般にこの目的でよく用いられているチャイニーズハムスター卵巣由来の細胞（CHO細胞）を用いて以下の実験を行うことにした。

図1



ネオカルチノスタチン（NCS）の処理と6TG耐性突然変異体の選択：NCS

（40ng/ml）を1.0分間対数増殖期にある細胞に与えこれを10日間増殖させた。この濃度のNCS処理により細胞の生存率は約1/4に下がった。自然に突然変異を起こした変異体を選択するときにはこの処理は省き、直接次ぎに示す方法で変異体を選択した。このあと、細胞を5μg/mlの6TG溶液で2-3週間培養し、6TG耐性変異体を選択した。NCSによる突然変異率は用いた濃度で自然突然変異率の約5倍であった。このようにして自然突然変異体、NCS誘発突然変異体をそれぞれ40以上得た。そのそれぞれについて、以下に示すようにhprt遺伝子上のDNA塩基配列レベルの変化を調べた。

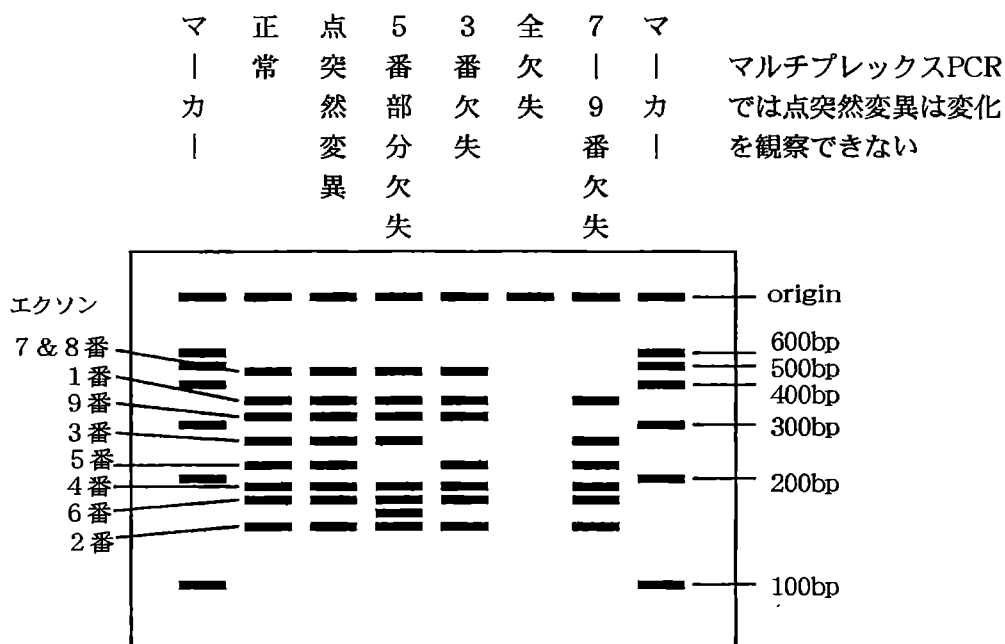
hprt遺伝子上に起こったDNA塩基配列変化の解析：以上のようにして得た80以上の変異体クローンについて、それぞれを増やし、DNA画分を調整した。チャイニーズハムスターのhprt遺伝子は、図1のように9つのエクソンからなり、その間にはイントロンが

存在している。それぞれのエクソンの外側にあるイントロンの特定の部位を選び、25-30塩基からなる16種類のプライマーを作製した(図2)。これらのプライマーを用いて、調整したDNA画分とともにPCR (polymerase chain reaction)を行い、アガロースの電気泳動にかけた結果が図3である。もしエクソンの一部あるいは全部が欠失していれば、そのバンドが短くなったり、そのバンドが消失することで検出できる。この方法はマルチプレックスPCRと呼ばれる。一方、各変異体から先ずRNA画分を調整し、ポリdTを用いて

図2 プライマー

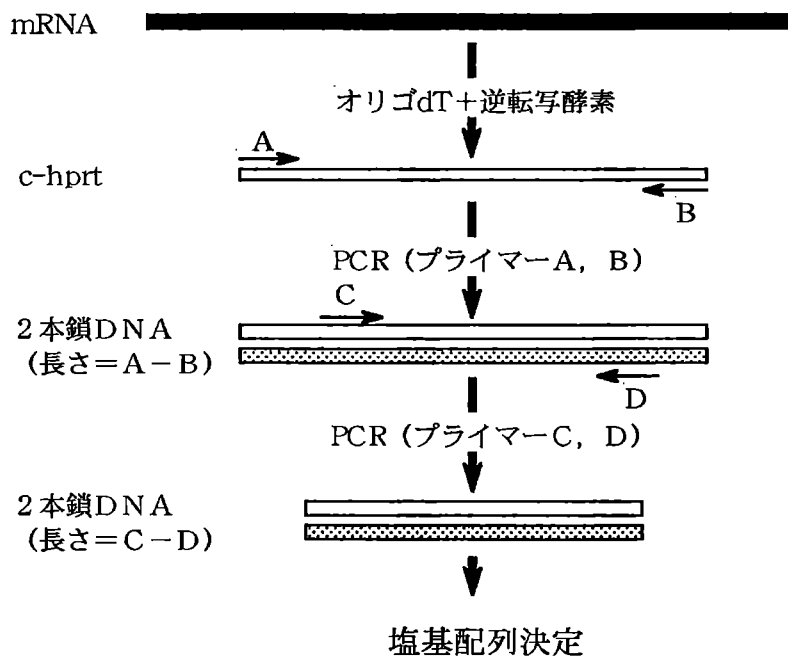
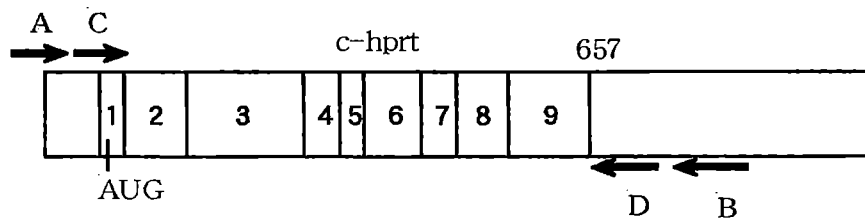
| | |
|------------------------------------|------------------------------------|
| 1A: TCTGCAGGCTTCCTCCTCACACCG | 5A: AACATATGGGTCAAATATTCTTTCTAATAG |
| 1B: ACATGTCAAGGCAACGCCATTTC | 5B: GCTGAGAAAATTTAACAGTATTTTAC |
| 2A: AGCTTATGCTCTGATTGAAATCAGCTG | 6A: ACTTACCACTTACCATTAAATACC |
| 2B: ATTAAAGATCTTACTTACCTGTCCATAATC | 6B: AAGCAATTGCTTATTGCTCCCAATG |
| 3A: CCGTGATTTTATTTTGTAGGACTGAAAG | 7A: GTTCTATTGTCTTCCCATATGTC |
| 3B: TACATACAAAAGTAGGATTGCCATATT | 7B: TCAGTCTGGTCAAATGACGAGGTGC |
| 4A: TGTTGTGATTCAAGAATATGCATG | 9A: CAATTCTCTAATGTTGCTCTTACCTCTC |
| 4B: CCAAGTGAGTGATTGAAAGCACAG | 9B: GACAATCTATCGAAGGCTCATAGTGC |

図3



cDNAを調整し、その後、図4のようにプライマーA、Bを用いてPCRを行い、c-hprtを増幅する。再度、図4のC、Dをプライマーとしてこの部分のDNAを増幅後、それぞれについて塩基配列を決定した。

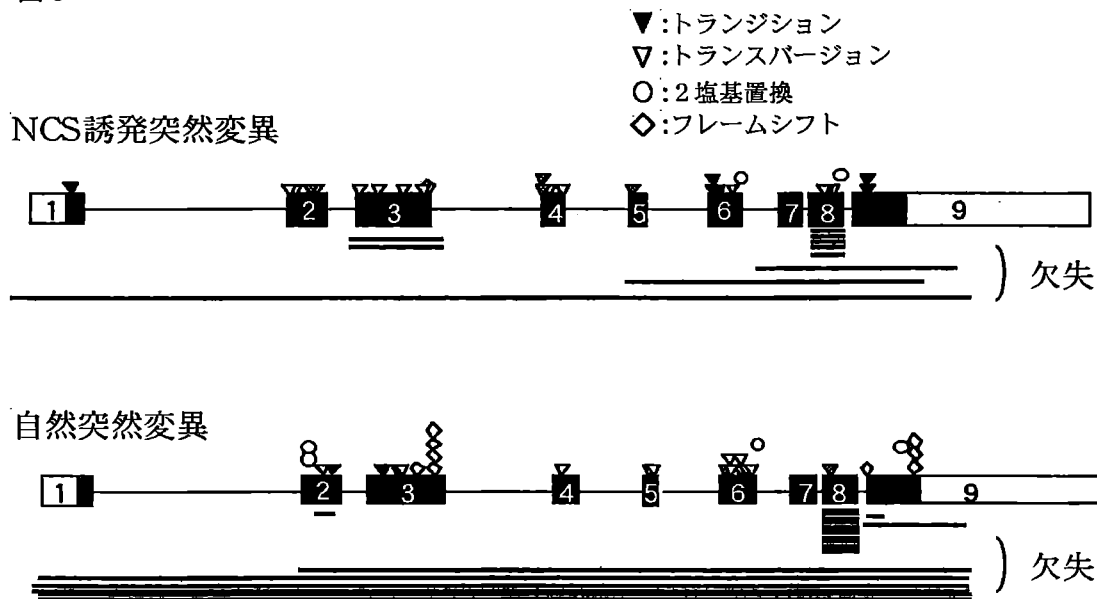
図4



プライマー
A: TGC GGGATCC CTCCTCACACCGCT
B: TGGTAATTTTACTGGGAACATG
C: CCGCCAGTCGACCGATTCCG
D: GCAGATTCAACTTGAATTCTCATC

自然突然変異とNCS誘発突然変異のhprt遺伝子上の分布：このようにして得られた突然変異のDNA塩基配列レベルの解析データをもとに、hprt遺伝子エクソンのどの部位に突然変異が起こったかを示したのが図5である。図からわかるように、自然突然変異とNCS誘発突然変異の両方で、特にどの部位でどの種類の突然変異が起きやすいといった傾向はみられなかった。

図5



自然突然変異とNCS誘発突然変異のスペクトル：次にこれらの突然変異がどのような種類の突然変異からなっているかを示したのが表1である。塩基置換はhprt上の一つの塩基が他の塩基に変わってしまった変異のことである。この中をさらにトランジションとトランスバージョンにわけると、前者はピリミジンからピリミジンあるいはプリンからプリンへの置換、後者はピリミジンからプリンあるいはプリンからピリミジンへの置換である。表中にG:C→A:Tなどと記してあるのは、塩基置換が起きた場合にGがAに変化したのかCがTに変化したのかを特定できないからである。フレームシフトは数塩基が欠失あるいは挿入され、結果としてアミノ酸を指定している3塩基からなるコード枠がずれてしまう変異である。そこで、3の倍数の塩基が欠失、挿入された場合は一般にフレームシフトとは呼ばずに小さな欠失あるいは挿入とよぶ。スプライスとあるのは、全エクソンが完全であるにもかかわらず、RT-PCRの結果、mRNAのあるエクソンの部分がまるごとぬけていることがわかった変異であり、スプライスドナーの部位かアクセプタ部位での突然変異であると考え

表 1

| 突然変異の種類 (扱った変異体数) | 自然突然変異 (53) | N C S 誘発突然変異 (40) |
|----------------------|----------------|----------------------|
| 点突然変異 | 33(62%) | 29(73%) |
| 塩基置換 | 22(42%) | 25(63%) |
| トランジション | 4 | 11 |
| G:C→A:T | 2 | 4 |
| A:T→G:C | 2 | 7 |
| トランスバージョン | 13 | 12 |
| G:C→T:A | 2 | 2 |
| G:C→C:G | 2 | 3 |
| A:T→T:A | 0 | 2 |
| A:T→C:G | 9 | 5 |
| 2塩基置換 | 5 | 2 |
| フレームシフト | 9(17%) | 2(5%) |
| 小さな欠失 | 2 | 0 |
| 大きな欠失 | 18(34%) | 11(28%) |
| エクソン1つの欠失 | 12 | 7 |
| エクソン2つ以上の欠失 | 1 | 3 |
| 全 h p r t 欠失 | 5 | 1 |
| スプライス異常 | 2 | 2 |

えられる場合である。欠失には小さなものから大きなものまでいろいろとあるが、表中の小さい欠失と表してあるのは、マルチプレックスPCR（図3）では欠失が小さすぎるため検出できなかったが、塩基配列決定でそうとわかった変異である。

ネオカルチノスタチン誘発塩基置換の特徴：表2、3はそれぞれ自然突然変異、ネオカルチノスタチン誘発塩基置換について、変異の部位と隣接する塩基を示したものである。右肩に星印の付記された塩基が変異を起こした塩基であって、起こす前の配列が左側、起こした後の配列が右側に示されている。変異を起こした部位以外の隣接している塩基には変異が起きていないので、左側と右側で塩基配列は同じである。ACTとAGC配列を四角で囲んで示したのは、考察に述べるようにそこがNC Sによる変異を起こしやすい箇所として報告されているからである。

表2

自然誘発変異

| 変異体 | 部位（エクソン番号） | 塩基置換変異 |
|-----------|------------|--|
| トランジション | | |
| S22 | 118(2) | CCTCA T G* G AGTGA → CCTCAT A* GAGTGA |
| S42 | 146(3) | AAAG A C T* T GCCCG → AAAGAC C* TGCCCG |
| S59 | 404(6) | TTGAA G A* C ATAAT → TTGAAG G* CATAAT |
| S78 | 551(8) | AAATC C C* AGACAA → AAATCC T* AGACAA |
| トランスバージョン | | |
| S24 | 95(2) | AGGAT T T* G GAAAA → AGGATT G* GGAAAA |
| S81 | 97(2) | GATTT G G* AAAAGG → GATTTG T* AAAAGG |
| S64 | 199(3) | CTCTG T G* T GCTGA → CTCTGT C* TGCTGA |
| S29 | 212(3) | AGGGG G G* C TATAA → AGGGGG T* CTATAA |
| S39 | 334(4) | TCAAC A G* G GGACA → TCAACA C* GGGACA |
| S62 | 386(5) | GAAAG A A* T GTCTT → GAAAGA C* TGTCTT |
| S43 | 389(5) | AGAAT G T* C TTGAT → AGAATG G* CTTGAT |
| S60 | 420(6) | CACTG G T* A AAACA → CACTGG G* AAAACA |
| S55 | 420(6) | CACTG G T* A AAACA → CACTGG G* AAAACA |
| S56 | 437(6) | AAACT C T* G CTTTC → AAACTC G* GCTTTC |
| S57 | 437(6) | CCCTG G T* C AAGCG → CCCTGG G* CAAGCG |
| S35 | 449(6) | AAACT C T* G CTTTC → AAACTC G* GCTTTC |
| S1 | 473(6) | AAATGG T* TAAGGT → AAATGG G* TAAGGT |

表3

NCS誘発変異

| 変異体 | 部位 (エクソン番号) | 塩基置換変異 |
|-----------|-------------|---|
| トランジション | | |
| N17 | 29(1) | TCGTG A T* T AGTGA → TCGTGA C* TAGTGA |
| N32 | 112(2) | TTGTT G A* G GACAT → TTGTTG G* GGACAT |
| N27 | 319(4) | TACTG T A* A TGATC → TACTGT G* ATGATC |
| N47 | 319(4) | TACTG T A* A TGATC → TACTGT G* ATGATC |
| N18 | 401(5) | TTGTT G A* G GACAT → TTGTTG G* GGACAT |
| N11 | 425(6) | GTAAA A C* A ATGCA → GTAAAA T* AATGCA |
| N23 | 425(6) | GTAAA A C* A ATGCA → GTAAAA T* AATGCA |
| N41 | 454(6) | GTCA A G C * GGTACA → GTCAAG T* GGTACA |
| N34 | 580(8) | GCCCT T G* A CTATA → GCCCTT A* ACTATA |
| N25 | 633(9) | TGAA A C T * G GGAAA → TGAAAC C* GGGAAA |
| N31 | 633(9) | TGAA A C T * G GGAAA → TGAAAC C* GGGAAA |
| トランスバージョン | | |
| N7 | 32(2) | TGATT A G* T GATGA → TGATTA C* TGATGA |
| N8 | 34(2) | ATTAG T G* A TGATG → ATTAGT T* ATGATG |
| N40 | 113(2) | TTATT C C* T CATGG → TTATT C A* TCATGG |
| N16 | 147(3) | AAAG A C T * TGCCCCG → AAAGAC G* TGCCCCG |
| N10 | 215(3) | GGGGC T A* T AAATT → GGGGCT T* TAAATT |
| N3 | 251(3) | TTAA A G C * A CTGAA → TTAAAG G* ACTGAA |
| N5 | 299(3) | ATTTT A T* C AGACT → ATTTTA G* CAGACT |
| N2 | 320(4) | ACTGT A A* T GATCA → ACTGTA T* TGATCA |
| N19 | 368(4) | ATCTC T C* A ACTTT → ATCTCT G* AACTTT |
| N44 | 476(6) | TGGTAA A* G GTTGC → TGGTAA C* GGTGTC |
| N9 | 578(8) | ATGCC C T* T GACTA → ATGCCC G* TGACTA |
| N52 | 581(8) | CCCTT G A* C T ATAA → CCCTTG C* CTATAA |

考察

培養細胞を用いた突然変異研究は、その簡便さから h p r t 遺伝子 (6 T G 耐性) を用いたものが多い。その中で 1985 年以前の研究は、DNA 技術の未熟さもあって、細胞レベルの話が多い。その後、シャトルベクターの開発により突然変異を DNA 塩基配列のレベルで調べられるようになった。しかし、シャトルベクターは一般にイントロンを含まないように作られたものがほとんどであり、また、場合によっては細胞の染色体に組み込まれず、染色

体外での突然変異をみているものも多く、必ずしもほ乳類細胞の染色体での突然変異を反映するものではない。近年、PCRの技術が改良され染色体での突然変異をDNA塩基配列レベルで調べられるようになって、たくさんの興味ある事実が明白になってきた。フレームシフトと呼ばれる小さな数塩基欠失、数塩基挿入や大きな欠失で、バクテリアからヒトまでその起こる共通のメカニズムが存在し、その突然変異が起こらないようにしている修復系を欠損するとがんが発生しやすくなり、また、この突然変異がある種の遺伝病の原因になっていることがあきらかにされた。このことは、ヒトのがん、遺伝的な変異のメカニズムを考える上でDNA塩基配列レベルの研究がいかに重要であるかを物語っている。

CHO細胞はhprt遺伝子の変異研究に最も頻繁に用いられる細胞のひとつである。最近この細胞を用いて自然に発生する突然変異についてDNA塩基レベルの研究結果が報告された。この報告にある突然変異のスペクトルをわれわれの結果(表1)と比較すると、基本的に似ていることがわかった。つまり、フレームシフトを含めた欠失はわれわれの系で少し多く、スプライス異常による変異はわれわれの系で少し少なかったが、塩基置換はどちらの場合も約40%であり、際だった差異はみられなかった。このことは、DNA塩基レベルで調べた突然変異の結果がよい再現性をもっていることを示している。

NCSによる突然変異をDNAの塩基レベルで調べた報告は、バクテリアでの2つの報告を除くとまだない。CHO細胞を用いて、aprt遺伝子についての報告は一件あるが、これは学会抄録のものであり、詳細が記載されていないので、われわれの結果と比較ができないのが残念である。表1に示されるようにNCS誘発突然変異のスペクトルはきわめて自然発生のスペクトルと似ているといえる。われわれはすでに他の系を用いて自然突然変異とX線誘発突然変異が互いに大変よくにていることを示している(参考文献1-3)。X線によるDNA損傷は水のラジカルを介しているものが主であるが、呼吸活動の結果生じる活性酸素種がこのX線により発生するラジカルと共通している部分が多く、両方の突然変異がよくにていることはむしろ自然であることを述べた。NCSはX線類似物質に分類されていて、その損傷は主としてDNA 2本鎖切断である。しかしながら、その切断部位はX線の場合がランダムであるのに比べ、NCSでは切れやすくなる塩基配列が存在し、切断もノンランダムであることが知られている。こう考えると、NCSの突然変異はX線ほどは自然突然変異に似ている理由はないのであるが、NCSによるDNA損傷形成はいづれにしてもラジカル反応を介していると考えられるので、知られている以上にいろいろな損傷がDNA上に形成されている可能性がある。これらについては今後の問題である。一方、表2、3に示すように塩基置換について自然変異とNCS誘発変異を比べてみると面白いことに気がつく。バクテリアにおいてNCSにより起こる変異のうち塩基置換について調べてみるとAGC配列が存在する部位のCの位置で変異が多いことがわかってきた。オリゴヌクレオチドとNCSの相互作用を詳細に調べた結果によるとNCSはAGC/TCGのA:TペアとG:Cペアの間に入り込みTの5'側に切断を入れ、AGCのCの部位が塩基を失う型の損傷を起こす。この実験においてはSOS誘導がかけられており、塩基を失ったCの部位を無視してSOS修復が起こる結果、このCの位置で突然変異が起こると結論されている。NCSは、このほかにもAGT/TCA部位でも同様な損傷を与えることがわかってる。これらのことをわれ

われの結果にあてはめてみると、起こった塩基置換のうちAGC/TCG、AGT/TCAの部位で起こった置換は、自然変異で一カ所、NCS変異で6カ所を数えることができる。つまり、バクテリアで観察された型の変異がほ乳類細胞においても割合は少ないにせよ観察された。これはNCS誘導突然変異の特異性を示すものであり、NCS由来の突然変異かどうかを判断するための指標のひとつとして使用可能なものであると考えられる。エクソン単位の欠失については塩基配列レベルでの解析は行われていないが、これらの変異においてもある割合でこのようなメカニズムで変異のおこっている可能性が否定できない。興味深い問題である。

おわりに

以上、本研究の当初の目的である、NCSにより誘導される突然変異のDNAレベルでの特異的な変異の有無を調べることに、について、一応の成果が得られたと思っている。今後は、これを生体系に応用することにより、実際にNCSによる突然変異が起こるかどうかを調べてゆく必要がある。そのための基礎実験がスタートしている。