大腸菌 WP3101P～WP3106P 株を用いた突然変異 誘発スペクトルの解析に関する共同研究

—前培養培地の影響—

石原 啓美^{1*}, 荒木 明宏², 小林 孝子³, 池畑 政輝⁴,
中川 慎也⁵, 尾崎 正康⁶, 加藤 雅之⁷, 鐘尾 美江子⁸,
須井 哉⁹, 坂田 武¹⁰, 島田 弘康¹¹

日本環境変異原学会・微生物変異原性試験研究会 (JEMS・BMS)

¹ コニカ (株) 環境安全推進室 〒191-8511 東京都日野市さくら町1番地

² 日本バイオアッセイ研究センター変異原性試験部 〒257-0015 神奈川県秦野市平沢2445

³ キヤノン (株) 化学安全部 〒146-8501 東京都大田区下丸子3-30-2

⁴ (財) 鉄道総合技術研究所環境工学研究部 〒185-8540 東京都国分寺市光町2-8-38

⁵ 大正製薬 (株) 安全性研究室 〒331-9530 埼玉県さいたま市北区吉野町1-403

⁶ (株) ホゾリサーチセンター第2研究部 〒412-0039 静岡県御殿場市竈1284

⁷ (株) 日本生物化学センター遺伝毒性部 〒369-1211 埼玉県大里郡寄居町赤浜2078-1

⁸ 広栄テクノサービス (株) 安全性試験グループ 〒536-0011 大阪市城東区放出西2丁目12番13号

⁹ (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5

¹⁰ (株) 富士バイオメディックス試験研究部 〒408-0044 山梨県北巨摩郡小淵沢町10221番地

¹¹ 第一製薬 (株) 安全性管理部 〒103-8234 東京都中央区日本橋3-14-10

A collaborative study on the analysis of mutational specificity with *E. coli* WP3101P- WP3106P tester strains — Effect of preculture medium —

Hiromi Ishihara¹, Akihiro Araki², Takako Kobayashi³, Masateru Ikehata⁴,
Shinya Nakagawa⁵, Masayasu Ozaki⁶, Masayuki Kato⁷, Mieko Kanao⁸, Hajime Sui⁹,
Takeshi Sakata¹⁰ and Hiroyasu Shimada¹¹

JEMS・BMS

¹Environment and Safety Department, Konica Corporation, No.1 Sakura-machi, Hino-shi, Tokyo 191-8511, Japan, ²Japan Bioassay Research Center, ³CANON Inc., ⁴Railway Technical Research Institute, ⁵Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., ⁶BOZO Research Center Inc., ⁷Genetic Laboratory, JBS, Inc., ⁸KOEI Techno Service Co., Ltd., ⁹Hatano Research Institute/Food and Drug Safety Center, ¹⁰Fuji Biomedix Co., Ltd., ¹¹DAIICHI PHARMACEUTICAL Co., Ltd.,

Summary

Lac⁺ reversion assay with the *E. coli* strains WP3101P-WP3106P, derivatives of WP2uvrA/pKM101, have been used to determine mutational specificity of mutagens. A minimal glucose medium supplemented with tryptophan (MGT) is used as a preculture medium in the Lac⁺ reversion assay. Nutrient broth (NB), on the other hand, is usually used for Trp⁺ reversion assay with the strain WP2uvrA/pKM101. To improve the test procedure using a common preculture medium, we investigated the sensitivity of tester strains

* E-mail : Hiromi.Ishihara@konica.co.jp

⁶ 現：日本たばこ産業株式会社所属

受付：2002年9月17日 受理：2003年2月12日

© 日本環境変異原学会

WP3101P-WP3106P against 11 kinds of mutagens when they were precultured in NB or MGT medium. In the Lac⁺ reversion assay, cells grown in MGT were as sensitive to MNNG, ENNG, EMS, and N⁴-aminocytidine as those grown in NB. However, mutagenicities of MMS, captan, 5-diazouracil, and Na-azide were scarcely detected with NB-cultured cells. In contrast, cells grown in MGT were less sensitive to several mutagens in the Trp⁺ reversion assay than cells grown in NB. Therefore the use of a common preculture medium is not recommended for the Lac⁺ and Trp⁺ reversion assays.

Keywords : mutational specificity, *E. coli* strains WP3101P-WP3106P, Lac⁺ reversion assay

緒 言

変異原性試験に用いる標準試験菌株の一つである大腸菌 WP2uvrA 株および WP2uvrA/pKM101 株は *trpE65* マーカーを持ち、Trp⁺ 復帰変異試験によって塩基対置換型の変異原を高感度で検出できる。*trpE* 遺伝子はトリプトファン合成系のアントラニル酸シンターゼの構造遺伝子で、*trpE65* 変異では N-末端から 4 番目のアミノ酸であるグルタミンのコドン (CAA) がオーカー終止コドン (TAA) に変異している。自然突然変異で生じた Trp⁺ 復帰変異株の解析から、野生型のグルタミン (CAA) に戻る場合以外にも、リジン (AAA)、ロイシン (TTA)、セリン (TCA)、グルタミン酸 (GAA)、チロシン (TCA, TAT) に変異したものが存在していることがわかった (Ohta et al., 2002)。したがって、チロシン tRNA 遺伝子、リジン tRNA 遺伝子、グルタミン tRNA 遺伝子のアンチコドン部位に生じたオーカーサプレッサー変異 (各々 GTA → TTA, TTT → TTA, TTG → TTA の変異) によっても酵素活性が回復して Trp⁺ の表現型になると考えられる。このような特性から *trpE65* マーカーを持つ大腸菌株は G : C → C : G 以外の 5 種類の塩基対置換変異のいずれかを誘発する変異原の検出に有効であり、A : T 塩基対だけでなく G : C 塩基対に作用する変異原にも高感受性を示す。しかし個々の復帰変異コロニーにおいて上記のどの塩基対置換が起こっているかを調べることは容易ではなく、変異スペクトルの解析にはむかない。

そこで変異スペクトルを解析する目的で、大腸菌の F' プラスミド上の *lacZ* 変異遺伝子に生じる特定の型の塩基対置換変異 (Cupples and Miller, 1989) によってのみ Lac⁺ に復帰突然変異が起きることを指標にして、変異原の突然変異スペクトルを解析する 6 菌株のセット WP3101P, WP3102P, WP3103P, WP3104P, WP3105P および WP3106P が開発されている。WP3101P 株は A : T → C : G 変異, WP3102P 株は G : C → A : T 変異, WP3103P 株は G : C → C : G 変異, WP3104P 株は G : C → T : A 変異, WP3105P 株は A : T → T : A 変異, そして WP3106P 株は A : T → G : C 変異の誘発を特異的に検出することができる (Ohta et al., 1999, 2000)。これらの菌株は、WP2uvrA 株由来で (*pro-lac*) 遺伝子部分が欠失した変異株 WP2000 に F' プラスミド (*lacI*⁻,

lacZ461, *proAB*⁺) と pKM101 (*mucAB*⁺, Ap^r) が導入されたもので、Trp⁺ 復帰変異に関しては WP2uvrA/pKM101 株と同等の感受性を示す。

WP3101P ~ WP3106P 株の標的遺伝子は F' プラスミド上に存在するため、増殖中にこの F' プラスミドが脱落した菌の割合が高くなると、菌株の感受性が低下する。F' プラスミドが脱落した菌はプロリン要求性となることを利用して、通常プロリンを含まない最少グルコース培地で前培養を行っている。しかし、培養時間が 14 ~ 16 時間と長いために、Nutrient broth (NB) を用いる Trp⁺ 復帰変異試験用の菌株の前培養 (8 時間) と同一振盪培養機・同一振盪速度で行うことが困難である。一方、WP3101P ~ WP3106P 株を NB 培地に接種して 1 晩培養する方法では F' プラスミドの脱落が起き得るが、接合によって再び F' プラスミドの獲得も起きるので、実際的には実験結果に大きな影響はでないと思われる。そこで BMS 研究会では Lac⁺ 復帰変異試験の汎用性を高めるため、WP3101P ~ WP3106P 株の前培養に Nutrient broth を用いた場合の変異検出の感受性に与える影響を検討し、試験法の改良を行うことを目的に 2000 ~ 2001 年度に共同研究を行った。

実験材料および方法

菌株と培地

大腸菌 WP2uvrA/pKM101 [*uvrA155*, *trpE65*/pKM101 (*mucAB*⁺, Ap^r)]、および WP3101P ~ WP3106P [*uvrA155*, *trpE65*, Δ (*lac-pro*) /F' (*lacI*⁻, *lacZ*⁻, *proAB*⁺), pKM101 (*mucAB*⁺, Ap^r)] を用いた。菌株の前培養には nutrient broth (NB) 培地 (25 mg/mL Oxoid nutrient broth No. 2) および MGT 培地 (Vogel-Bonner E medium, 0.5 % glucose, 50 μg/mL tryptophan) を用いて、OD₆₆₀ の値が 1.0 以上になるまで培養した。Lac⁺ 復帰変異試験では、最少ラクトース寒天 (ML) プレート (Vogel-Bonner E medium, 0.5 % lactose, 1.5 % agar) と炭素源として微量のニュートリエントブロスを含む NBT-トッパアガー (500 μg/mL Oxoid nutrient broth No. 2, 500 μg/mL tryptophan, 0.5 % NaCl, 0.6 % agar) を用いた。また、Trp⁺ 復帰変異試験では、最少グルコース寒天 (MG) プレート (Vogel-Bonner E medium, 2 % glucose, 1.5 % agar) と Trp-トッパアガー (10 μg/mL

tryptophan, 0.5 % NaCl, 0.6 % agar) を用いた。

変異原

11 種の変異原を用いて検討を行った。2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2 ; CAS No. 3688-53-7), *N*-(trichloromethylthio)-4-cyclohexane-1, 2-dicarboximide (Captan ; CAS No. 133-06-2) は和光純薬工業 (東京) より購入した。Methyl methanesulfonate (MMS ; CAS No. 66-27-3), 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO ; CAS No. 56-57-5) は東京化成工業 (東京) より, *N*^d-aminocytidine (CAS No. 57294-74-3) はフナコシ (東京) より, また, Na-azide (CAS No. 26628-22-8) は半井化学 (京都) より購入した。5-Azacytidine (CAS No. 320-67-2), ethyl methanesulfonate (EMS ; CAS No. 62-50-0), *N*-ethyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG ; CAS No. 4245-77-6), *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG ; CAS No. 70-25-7) はAldrich Chemical (WI, USA) から購入した。5-Diazouracil (CAS No. 2435-76-9) はSigma Chemical (MO, USA) より入手した。*N*^d-Aminocytidine, 5-azacytidine, 5-diazouracil, Na-azide は滅菌水に溶かし, 他の変異原はdimethylsulfoxide (DMSO ; 和光純薬工業) に溶解させた。

Lac⁺復帰変異試験

WP3101P~WP3106Pの6種類の保存菌をMGT培地, および, NB培地に接種して37℃で1晩振盪培養した。培養した菌液は遠心分離による洗浄を行わず, そのまま試験に供した。小試験管に菌液0.1 mL, 変異原溶液0.1 mL, 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液0.5 mLを分注し, 37℃で20分間振盪しながらブレインキュベーションを行った。溶解して45℃に保温しておいたNBT-トップアガーを2 mL加えてよく混ぜた後, MLプレートにまいた。37℃で2日間培養後, Lac⁺復帰変異コロニーを数えた。各々の変異原について1~3研究機関で実験を行った。

Trp⁺復帰変異試験

WP2uvrA/pKM101株をMGT培地, および, NB培地に接種して, 37℃で1晩振盪培養した菌液を使用した。Lac⁺復帰変異の場合と同様の操作でブレインキュベーションを行い, Trp-トップアガー2 mLを加えてMGプレートにまき, 37℃で2日間培養後, Trp⁺復帰変異コロニーを数えた。5-AzacytidineとNa-azideの変異原性はTrp⁺復帰変異試験ではほとんど検出されないことが知られているため, この2化合物を除いた9種の変異原について検討した。

Table 1 Stability of F' plasmid in cells which were cultured overnight with nutrient broth medium

Strain	MG plate + Trp, Pro	MG plate + Trp	%
WP3101P	325 ± 11	315 ± 17	96.9
WP3102P	292 ± 17	266 ± 18	91.1
WP3103P	212 ± 11	197 ± 8	92.9
WP3104P	146 ± 23	135 ± 13	92.5
WP3105P	301 ± 20	300 ± 22	99.7
WP3106P	343 ± 11	341 ± 16	99.4

(Mean ± SD, n = 4)

0.1 mL portions of the 10⁶-fold diluted cell suspension were plated on minimal glucose medium (MG) plates containing Trp with or without Pro. Plates were incubated at 37 °C for 48 hr and the number of colonies was counted.

結果および考察

F'プラスミド保持率の測定

まず, NB培地で前培養した菌液のF'プラスミドの保持率を調べた。MGT培地で培養した凍結保存菌液をNB培地に接種し8時間振盪培養を行った。培養液を10⁻⁶希釈して, その0.1 mLをTrp添加MGプレートとTrp, Pro添加MGプレートにまいた。37℃で2日間培養後, コロニーを数えて生菌数を算出した (Table 1)。いずれの試験菌株においてもF'プラスミドの保持率は91%以上であり, NB培地で前培養することに大きな支障がないことが判った。そこで, 共同研究では, 最少グルコース (MGT) 培地とNB培地のそれぞれで前培養を行った菌液を用いて, 各種変異原に対する感受性を比較検討した。

Lac⁺復帰変異試験菌株の感受性に対する前培養培地の影響

アルキル化剤であるMNNG, ENNG, EMS, 塩基アナログの*N*^d-aminocytidineで特異的に誘発されるG:C→A:TおよびA:T→G:Cトランジション変異では, NB培地による前培養菌の方がMGT培地による前培養菌よりも誘発されたLac⁺変異コロニー数が多い傾向がみられたが, 感受性に根本的な差はないものと考えられた。しかし, その他の7種の変異原ではMGT培地による前培養菌を用いた方が高感受性を示し, 特にMMS, captan, 5-diazouracil, Na-azideなどではこの傾向が顕著であり, NB培地による前培養菌では変異がほとんど検出できない場合があった (Fig. 1)。今回の共同研究の結果, Lac⁺復帰変異試験における菌の前培養培地としてNBの使用は適切ではないと判断された。

NB培地による前培養菌において91%以上の菌はF'プラスミドを保持していることから, F'プラスミドの脱落が感受性低下の原因とは考えられなかった。さらにMNNG, ENNGなどのように培地の違いによる影響が

Fig. 1 The effect of preculture medium in the Lac⁺ reversion assay

Results on 8 mutagens were presented. Each figure, except *N*⁷-aminocytidine, included data from two different laboratories. 4-NQO and Na-azide, G : C → A : T transitions detected in WP3102P ; 5-azacytidine, G : C → C : G transversions detected in WP3103 ; AF-2, G : C → T : A transversions detected in WP3104P ; captan, A : T → C : G transversions detected in WP3101P ; *N*⁷-aminocytidine, A : T → G : C transversions detected in WP3106P ; MMS and 5-diazouracil, A : T → T : A transversions detected in WP3105P. The tester strains were precultured overnight with NB medium (○, □) or MGT medium (●, ■). Two set of data, (○, ●) and (□, ■), were derived from different laboratories.

Fig. 2 The effect of preculture medium in the Trp⁺ reversion assay with WP2uvrA/pKM101. Representative results on 4 mutagens, 4-NQO, *N*⁺-aminocytidine, MMS, and AF-2, were presented. Similar results were obtained on other mutagens in all laboratories. WP2uvrA/pKM101 was precultured overnight with NB medium (△) or MGT medium (▲).

少ない変異原も存在することから、富栄養培地で生育させた菌がラクトースを唯一の炭素源とするプレートにまかれた場合に、細胞の糖代謝系の適応に時間がかかり、突然変異の固定に至る過程で関与するタンパクの発現量、発現時間に影響を与えている可能性も考えられるが、詳細について現時点では不明である。

Trp⁺復帰変異試験菌株の感受性に対する前培養培地の影響

Lac⁺復帰変異試験においては前培養培地にNB培地を用いるとMGT培地を用いた場合よりも変異検出に対する感受性が著しく低下するという結果は予想外であった。次に、このような現象はLac⁺復帰変異に特有のものか、あるいはTrp⁺復帰変異についても同様であるのかという疑問を検討するため、Trp⁺復帰変異試験に用いられているWP2uvrAおよびWP2uvrA/pKM101株を使って、同様に前培養培地の影響について調べた。

Trp⁺復帰変異においては、いずれの試験菌株を用いた場合でも、Lac⁺復帰変異で観察されたような培養培地の違いによる大きな影響はみられないものの、全般的にNB培地で前培養した菌液を用いた方が良好な結果を示す傾向にあった (Fig. 2)。特にAF-2においてはNB培地

の方が明らかに高感受性を示した。したがって、Trp⁺復帰変異試験ではMGT培地を用いるよりも通常採用されているNB培地による菌の前培養がより適切であると思われる。

今回の共同研究で、WP3101P～WP3106P株を用いたLac⁺復帰変異試験はその手法が基本的にTrp⁺復帰変異試験と同様であることから新たな機器類を必要とせず、変異原性試験実施施設において簡単に導入することができた。前培養条件も通常のAmes試験と共通化できればさらに汎用性が高まると考えNB培地の使用を検討したが、Lac⁺復帰変異試験での前培養培地はMGT培地の方が適しており、現時点での共有化は不可能なことが明らかになった。また、この試験では最少ラクトース寒天プレートの調製が必要であるが、今後Trp⁺復帰変異を指標にした突然変異スペクトルの解析菌株が開発されれば、変異原性試験用の最少グルコース寒天プレートが利用できるため、さらに汎用性が高まると期待された。

参考文献

Cupples, C.G. and J.H. Miller (1989) A set of *lacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base

- substitutions, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 5345-5349.
- Ohta, T., M. Watanabe-Akanuma, S. Tokishita and H. Yamagata (1999) Mutation spectra of chemical mutagens determined by Lac⁺ reversion assay with *Escherichia coli* WP3101P-WP3106P tester strains, Mutat. Res., 440, 59-74.
- Ohta, T., M. Watanabe-Akanuma and H. Yamagata (2000) A comparison of mutation spectra detected by the *E. coli* Lac⁺ reversion assay and the *S. typhimurium* His⁺ reversion assay, Mutagenesis, 15, 317-323.
- Ohta, T., S. Tokishita, R. Tsunoi, S. Ohmae and H. Yamagata (2002) Characterization of Trp⁺ reversions in *E. coli* strain WP2uvrA, Mutagenesis, 17, 313-316.