The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	大腸菌のアルカリ性ホスファターゼの構成性突然変異を用いた正突然変異による癌原物質のスクリーニング法の研究
Author(s)	泉谷, 和子
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32668
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【2】

氏名・(本籍)	泉谷和子（いずたにかずこ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4885 号
学位授与の日付	昭和55年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**大腸菌のアルカリ性ホスファターゼの構成性突然変異を用いた正突然変異による癌原物質のスクリーニング法の研究**
論文審査委員	(主査) 教授 川俣 順一 (副査) 教授 松代 愛三 教授 近藤 宗平

論文内容の要旨

〔目 的〕

癌原物質の第一次スクリーニング法として微生物に対する変異原性を測定する方法が用いられている。そのうち現在最も広く用いられているのは，Amesらによって開発されたもので，*Salmonella typhimurium*の栄養要求性突然変異株から非要求性への逆突然変異を誘発する方法である。この方法では限られた種類の突然変異しか検出出来ない。これに対しあらゆる種類の変異を捉える事が出来る正突然変異の系として；大腸菌のアルカリ性ホスファターゼ（APase）の抑制性から構成性への突然変異を用いる方法を開発しようとした。

〔方法ならびに成績〕

大腸菌はリン酸を高濃度（20μgPi/mℓ以上）に含む培地中では抑制がおこってA Paseを産生しないが，調節遺伝子であるphoR，phoS，phoTのいずれか一つに突然変異がおこると高濃度のリン酸存在下でもAPase を産生するようになる。即ち構成性突然変異である。

上記の突然変異株を寒天培地上で選択的に検出する方法としてTris緩衝液を基にした合成培地に高濃度のリン酸とβ-グリセロリン酸（β-Gp）を加えた培地を用いる方法が報告されている。この選択培地にカザミノ酸（0.2%）とAPaseの指示薬である 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine saltを更に加えるように改良した。この寒天培地上に菌を広げると，カザミノ酸を炭素源として菌は一面にうすく増殖する。その中で構成性突然変異がおこってAPase を合成出来るようになった菌体はβ-Gpを分解し，グリセロールを炭素源として利用することが出来るようになるので大きな集落を形成する。そしてAPaseを合成している集落は指示薬によって青く染まるので容易に

見分ける事が出来る。

テストに用いる大腸菌の菌株としては，一般に突然変異の研究に用いられるAB 1157系統の一連の菌株を用いようと試みた。前記の選択培地上に菌を広げN-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine（MNNG）を含む濾紙のディスクを置くと，期待に反し生育阻止円の周辺に青い大きなAPase構成性突然変異の集落は現われなかった。そこで選択培地上でAPaseの構成性変異の集落を検出する事が出来た菌株W2252とAB1157由来の菌株とを接合させる事によって突然変異株を検出出来る性質を移したAB1157系の2株を得た。その一株はJMI（野生型）由来の菌株KI 101で，他はGC714由来の菌株KI201である。後者はthymine dimerの切り出した欠損のある*uvrA*突然変異，高温でSOS機能を発現する*tif-1*突然変異，および*tif*突然変異によっておこる細胞分裂の異常が正常に戻る*sfiA-11*突然変異を持っている。上記2株にさらにRプラスミド，pKM 101を導入したKI 111，KI 211株を得た。こうして選択培地上で定性的にAPase構成性突然変異を検出出来るようになった4個の菌株を作成した。

次にこれら4株を用いて，定量実験を試みた。すなわち，一定量の既知の変異原物質を菌液と混合して軟寒天と共に選択培地上に重層し，変異原物質の濃度と変異との相関を調べた。その結果，4株のうちKI 211（*tif, sfi, uvrA*, pKM 101）が他の株に比べ3種の変異原物質（MNNG, Methyl methanesulfonate, 4-Nitroquinoline-1-oxide）によって低い濃度で突然変異を検出する事が出来た。次でKI 201（*tif, sfi, uvrA*），KI 111（pKM 101），KI101（野生型）の順となった。

以上の結果から，癌原物質のスクリーニング方法として大腸菌のAPase構成性突然変異（正突然変異）による検出系を用いる事が出来るに至った。

〔総　括〕

癌原物質の一次スクリーニングの一つの方法として，大腸菌のアルカリ性ホスファターゼ構成性突然変異を用いる方法を開発した。

(1) 突然変異を検出する方法としてTris緩衝液を含む寒天培地中に高濃度（20 μg Pi/mℓ）のリン酸，β-グリセロリン酸，カザミノ酸，APase指示薬を加えておくと，突然変異をおこした集落は大きく，かつ青色に染まる。

(2) 突然変異の機構の研究によく用いられる菌株からAPase構成性突然変異を検出出来る菌株を得ることが出来た。（構成性突然変異を検出出来る性質を接合によって移すことが出来た）

(3) 既知の変異原物質を用いて本方法を試みたところ，得られた4個の菌株はKI 211（*tif, sfi, uvrA*, pKM 101）＞KI 201（*tif, sfi, uvrA*）＞KI 111（pKM 101）＞KI 101（野生型）の順に高い感受性を示した。

論文の審査結果の要旨

癌原物質の第一次スクリーニングとして微生物の変異原性を指標とする方法が用いられている。こ

れまでに考案された検出系のうちで正突然変異を検出する系は，その変異の的となる遺伝子内に，どんな種類の突然変異がおこっても捕捉出来るという長所を持っている。本研究は正突然変異の系として大腸菌のアルカリ性ホスファターゼの抑制性から構成性（非抑制性）への突然変異を検出する系を開発した。

さらに検定菌（大腸菌）に*tif*や*uvr* A遺伝子を組み込んだり，Rプラスミド pKM 101を導入する事によってこの系の感度が上がる事も証明した。未知の癌原物質のスクリーニングへこの系を応用することにより，従来の系では見落されたものも捕捉されることが考えられ将来への展開が期待される。

こうした新しい系を開発した点で本論文は学位に値するものと考える。