
学位申請論文

LION FILE

池畑広伸

マウス培養細胞における突然変異特異性の
研究

池畑広伸

目次

要旨	1
序論	2
材料と方法	4
細胞／培養条件／プラスミド／DNAトランスフェクション／ウイルス粒子の回収と細胞への感染／ベクターDNAの回収と解析／サザン解析／突然変異誘発／自然突然変異細胞の単離／DNA塩基配列の決定	
結果	9
I. シャトルベクターpZipHprtNeoを利用した突然変異解析系の開発	9
pZipHprtNeo DNAの作製／安定なpZipHprtNeo形質転換細胞の分離／VH-12細胞におけるベクターDNAの安定性／VH-12細胞に組み込んだhprt cDNAの塩基配列の決定	
II. 自然突然変異の解析	15
自然突然変異細胞の分離とベクターDNAの回収／6TG耐性細胞から回収したhprt cDNA塩基配列の決定／自然突然変異特異性／各突然変異の特徴	
考察	20
pZipHprtNeo系／自然突然変異特異性／自然突然変異の各種の変異型／自然突然変異の発生機構モデル／pZipHprtNeo系の応用	
謝辞	29
文献	30
表	37
図の説明	44

要旨

哺乳類細胞における突然変異の特異性を容易にDNA塩基配列レベルで解析できるようにするため、突然変異の標的遺伝子としてヒトのhprt cDNAを組み込んだシヤトルベクターpZipHprtNeoを作製した。このレトロウイルス型ベクターは染色体中に組み込まれるのでゲノムDNA上で起こる事象を忠実に反映することが期待できる。pZipHprtNeoを細胞当たり1コピーだけ安定に組み込んだマウス細胞VH-12株を分離し、突然変異研究に利用できるかどうか検討した。BTG-G418二重選択法を採用することにより、ベクターDNAの異常なゲノムからの脱落を排除しゲノム遺伝子とほぼ等しい自然突然変異頻度を実現できた。またCOS細胞融合法による全hprt cDNA断片を含むベクターDNAの回収の効率もよかった。

更にVH-12細胞を用いてマウスの自然突然変異特異性の解析を行った。結果は塩基の欠落を中心とするフレームシフト型変異が最も多く約4割を占め、塩基置換がそれに次いだ。また欠失、倍加なども見られ、新しい型の変異として欠失-挿入型突然変異も同定した。突然変異の発現部位にはしばしば短い反復配列から成り立つコンセンサス構造がみられたが、これはマウス細胞の自然突然変異の発現機構にDNA合成のエラーが関与していることを示唆している。

序論

これまで哺乳類細胞では、その遺伝子が一般に大きく構造も複雑で簡単にこれをクローニングすることができないために、突然変異特異性の塩基配列レベルでの解析が困難だった。代替法としてサザン法による分析が主に行われたが、50塩基対 (bp) 以下の変化は一般に検出は困難であった (1)。遺伝子工学の発展とともにシャトルベクターを利用した解析系が登場した (2)。SV40ウィルスのDNA複製起点 (SVori) と large T抗原の遺伝子を持つ自律複製型シャトルベクターが主流であったが、細胞に導入するときベクターDNAが損傷を受け高頻度で突然変異が発生するために、本来の突然変異の特異性のデータが乱されるという問題が生じた (3-5)。

自律複製型のものが持つこうした問題を回避するため、レトロウイルス型シャトルベクター pZipNeoSV(X)1 (6) を利用して、哺乳類細胞の突然変異特異性の解析系を開発することにした。この種のベクターは染色体DNAに組み込まれ安定に細胞から細胞へ受け継がれるので、細胞のクローンを選択することによって細胞導入時の損傷による異常な変異を持つベクターDNAは排除することができる。また染色体DNA上で起こる事象を直接反映することが期待される。細胞からのベクターDNAの回収もCOS-1細胞との融合により可能である (7)。このベクターにのせる突然変異の標的遺伝子にはヒト hprt cDNA (8) を採用した。この遺伝子の正常形質と変異形質の両者が選択培地を使い分けることによって容易に選択できることと、構造遺伝子部分が657 bpで全塩基配列の決定も比較的容易であることが利点である。また突然変異研究の結果得られるであろう変異ヒポキサンチンリン酸リボシル基転移酵素 (Hprtase) の情報はLesch-Nyhan症などの遺伝病研究にも寄与すると考えられる。更にヒト hprt cDNAを持つレトロウイルスベクターは将来の遺伝子治療の

基礎研究にも利用できる。

開発したシャトルベクター系を使って哺乳類細胞の自然突然変異の解析を行うことにした。自然突然変異特異性の研究は大腸菌の lacI 遺伝子の系で遺伝的解析法 (11) や塩基配列決定法 (12) を用いて詳細に行われているが、哺乳類細胞では近年までサザン法を用いてチャイニーズハムスター (13-19) とヒト (20) で行われたものぐらいしかなかった。最近になってシャトルベクターを利用して自然突然変異の塩基配列を解析したものがいくつか報告された (21-23)。このうち自律複製型ベクターで行われたもの (21, 22) は DNA 導入時の変異が混入していると考えられ、突然変異頻度もゲノム遺伝子のものより高く、また染色体 DNA 上の事象を反映しているという保証もない。もう一つの報告は当研究と同じ pZipNeoSV(X)1 を用い、大腸菌 gpt 遺伝子でマウス細胞のものを調べたものだった (23)。なお、酵母でもシャトルベクターを使って自然突然変異の特異性が解析されている (24, 25)。この他、チャイニーズハムスターの adprt 遺伝子で突然変異遺伝子を直接クローニングして塩基配列を決定したのも報告されている (26-29)。

材料と方法

細胞

マウス繊維芽細胞BALB/c3T3-A31株(30)由来のHPRTase欠損株2TGOR(31)はH.L.Ozer博士より供与して頂いた。マウス白血病細胞株L5178Y(32)とSV40でトランスフォームしたサル細胞株COS-1(33)は佐藤弘毅博士(放射線医学総合研究所)より供与して頂いた。

培養条件

使用した哺乳類細胞の基本培地にはDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Flow Laboratories 社、米国)に新生仔牛血清(Irvine Scientific 社、米国)を10%加える。選択培地用の薬剤は、HPRTase欠損株選択用に6-チオグアニン(6TG; 東京化成)を5 ng/lとなるように、HPRTase正常株選択用に50×HAT溶液(Sigma 社、米国)を20 ml/lとなるように、また薬剤耐性遺伝子neoを発現している細胞の選択用にGENETICIN(G418; Gibco Laboratories 社、米国)を800 ng/lとなるようにそれぞれ加える。培養は5%CO₂大気下37℃で行い、3日毎に培地交換を行う。細胞の継代はトリプシン(阪大微生物病研究会)処理により行う。

プラスミド

ヒトhpert遺伝子のcDNA(8)を組み込んだプラスミドpLPL(34)はA.D. Miller博士より供与して頂いた。このプラスミドではhpert cDNAのポリA部位がレトロウイルス由来の断片と置換してある。レトロウイルス型シヤトルベクターpZip-NeoSV(X)1(6)はC.L.Cepko博士より供与して頂いた。また自らのゲノムをパッケ

ージするのに必要な領域に欠失のある変異Moloney murine leukemia virus (Mo-MuLV) のゲノムを組み込んだプラスミドpMOVψ (35) は本庶佑博士 (京都大学) より供与して頂いた。

DNAトランスフェクション

マウス細胞へのベクターDNAのトランスフェクションはリン酸カルシウム法 (36) により行った。2TGOR細胞 2×10^5 個を10 cm培養シャーレに植える。翌日培地交換して2-5時間後、DNA-リン酸カルシウム共沈澱懸濁液を1 ml加える。DNAは導入したいDNA 1 μ gにキャリアーとして15 μ gのサケ精子DNAが混ぜてある。次の日ハンクス液で洗った後、新しい培地を加える。更に二日後HAT選択培地に交換し、1-2週間培養を続ける。

ウイルス粒子の回収と細胞への感染

2TGOR細胞にpZipHprtNeo DNAとpMOVψ DNAと一緒にトランスフェクトし、pZipHprtNeoをゲノムとして持つウイルスの産生細胞株を分離する (35)。この細胞株を10 cmシャーレにいっぱいになる少し前まで培養し、培地交換して培地を15 mlに減らす。別にウイルスを感染させる細胞として2TGORを 1×10^5 個、10 cmシャーレに植えておく。翌日2TGOR細胞も培地を交換し15 mlとし、4-5時間培養を続ける。この培養にPolybrene (Sigma 社、米国) を4 μ g/mlに加え、更に0.45 μ mフィルターで濾過したウイルス産生細胞の培養液を適量加える。3時間培養後、新しい培地を9 ml加える。二日後HAT選択培地に交換し、耐性コロニーが適当な大きさに増殖するまで培養する。

ベクターDNAの回収と解析

文献34に従い、COS-1細胞と融合することによって細胞ゲノムからのベクターの回収を行った(COS細胞融合法)。ベクターDNAを回収する細胞を25 cm² フラスコにいっぱいになるまで培養し、トリプシン処理ではがしてから5 × 10⁵ 個のCOS-1細胞と混ぜ10 cmシャーレに植える。密集状態になる少し手前まで培養したのち、無血清培地(DMEM)で一回洗う。ポリエチレングリコール1000(キシダ化学)を50%、ジメチルスルホキシドを10%含む無血清培地3 mlを穏やかに加え、50秒処理後直ちに除去する。無血清培地で穏やかに2回洗った後、通常培地で二日間培養を続ける。融合細胞からのベクターDNAの抽出はB.Hirtの方法(37)により行う。D.Hanahanの方法(38)にしたがって抽出DNAを大腸菌DH1株に導入し、得られたネオマイシン耐性(neo^r)細菌クローンから簡便法(39)によりプラスミドDNAを回収する。回収DNAを制限酵素BamHIで処理し、アガロースゲル電気泳動により切断パターンを解析する。

サザン解析

細胞10⁷個から常法(39)により調製したゲノムDNAを適当な制限酵素で完全に切断し、1レーンあたり10 μg量ずつ0.8%アガロースゲルの電気泳動にかける。常法(39)に従って、泳動したDNAをナイロン膜(Pall Ultrafine Filtration社、米国)に移し取り、適当なプローブDNAを用いてハイブリダイゼーション反応を行う。プローブとしては、pZipHprtNeo DNA由来のhprt cDNAを含む1.6 kb BamHI断片、またはneo遺伝子を含む2.3 kb XbaI断片をニックトランスレーションキット(宝酒造)により[α-³²P]-dCTPでラベルしたものを使う。反応後、ナイロン膜をオートラジオグラフィーにかける。

突然変異誘発

pZipHprtNeo形質転換細胞はHAT-G418培地で、L5178YはHAT培地で、2TGORは6TG培地で、それぞれ培養しあらかじめ変異細胞を排除しておく。調べたい変異原で処理した後、または自然突然変異の場合はそのまま、生存細胞が約 $1-2 \times 10^5$ 個ずつとなるように25 cm²フラスコに植える。変異原処理したときは、別に生存率決定用として通常培地を含む6 cmシャーレに相当数の処理細胞をまく。フラスコの細胞は非選択下で約一週間培養して突然変異を発現させた後、突然変異細胞の選択培地（6TGまたは6TG-G418培地、但し2TGORのみHAT培地）を含む10 cmシャーレに細胞 10^5 個ずつを植える。同時に平板効率決定用に細胞200個ずつを通常培地またはG418培地を含む6 cmシャーレにまく。突然変異細胞選択用、生存率決定用、平板効率決定用の各シャーレは約2-3週間培養した後、メタノールで固定しギムザ染色をしてコロニー数を数える。突然変異頻度は選択培地に植えた細胞数に平板効率を乗じて得られる値で選択培地中の耐性コロニー数を除することによって算出する。

エチルメタンサルホン酸（EMS）処理は、前日25 cm²フラスコあたり $2-4 \times 10^5$ 個で植えておいた細胞を、EMS添加培地で交換し20時間培養することによって行う。紫外線（UV）照射は、前日RERMANOX 60x15 mm CONTUR DISH（LUX scientific）にシャーレあたり 5×10^5 個で植えておいた細胞に、254 nm殺菌灯を用いて $1 \text{ J/m}^2 \cdot \text{s}$ の線量率のUVを当てて行う。X線は東芝KXC-18-2A形深部治療X線装置を用いて行う。

自然突然変異細胞の単離

6TG-G418培地で変異原未処理のVH-12細胞から得られた耐性コロニーを自然突然変異クローンとして分離する。6TG培地を含む25 cm²フラスコに植え

継ぎ密集状態になるまで培養後、細胞を回収し凍結保存する。但し得られる突然変異クローンの独立性を保証するため、一つの突然変異発現用フラスコに由来する耐性コロニーの内から一個だけを探るようにする。

DNA塩基配列の決定

ベクターを導入したneo^r大腸菌の培養40 mlからクロラムフェニコールで増幅させた(39)プラスミドDNAを松原らの方法(40)で回収し、塩化セシウム密度勾配遠心法(39)により精製する。環状二本鎖DNAのまま塩基配列を決定するため、プラスミドDNAをアルカリ変性させ、あらかじめ作製しておいた合成DNAをプライマーとしてアニールさせる。7-DEAZAシーケンスキット(宝酒造)と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (Du Pont NEN Products 社、米国)を用いてジデオキシ法による反応を行う。反応後、既成の電気泳動用8%尿素-ポリアクリルアミドゲル、FUJI GENSOR GEL SHEET(200 mm x 400 mm, 富士写真フィルム)2枚に反応液を重層し、2500 V定電圧でそれぞれ1時間及び2時間電気泳動を行う。両者でほぼ200塩基長をカバーできる。泳動後、ゲルをろ紙に移し取り、真空乾燥させオートラジオグラフィーにかける。

合成プライマーは17merのものを両方のDNA鎖にたいして計7種類作製する。センス鎖を鋳型とする時は41-57, 226-242, 426-442, 611-627の各部位(番号づけは文献8による)に対応するプライマー(センス鎖プライマー)を使用し、アンチセンス鎖を鋳型とする場合は657-641, 417-401, 217-201の各部位に対応するもの(アンチセンス鎖プライマー)を用いる。通常はセンス鎖プライマー4種のみを使って塩基配列の決定を行う。

結果

I シャトルベクターpZipHprtNeoを利用した突然変異解析系の開発

pZipHprtNeo DNAの作製

プラスミドpLPL(8)から切り出したヒトhprt cDNAを含む1.6 kbのPstI-BamHI断片を、BamHIリンカーをつないだ後、pZipNeoSV(X)1ベクターDNA(6)のBamHIクローニング部位に組み込みpZipHprtNeoを作製した(図1)。このシャトルベクターは両端にMoloney白血病ウイルス由来のLTRを持つレトロウイルス型のものであるため、リン酸カルシウム法や電気穿孔法以外にウイルス感染法によっても細胞内に導入でき、しかも染色体DNAに安定に組み込まれてしまう。このベクター上にはhprt cDNAの他に薬剤耐性遺伝子neoも存在し、しかも両者は左LTRに転写開始点を持つ単一の転写RNAから二者択一スプライシングにより別々のmRNAとして発現される。またSV40ウイルスの複製開始部位(SVori)を持つので、SV40のlarge T抗原を発現するサル細胞COS-1と融合するCOS細胞融合法により、染色体DNAに組み込まれた状態からプラスミドDNAの状態にして回収できる。回収したプラスミドはpBR322の複製起点(pBRori)とneo遺伝子を持つので、大腸菌の中で選択、増幅させることができる。

安定なpZipHprtNeo形質転換細胞の分離

HPRTaseを欠損しているマウス細胞株2TGORに3つの方法でpZipHprtNeo DNAの導入を試みた。ひとつはpZipHprtNeo DNA単独のリン酸カルシウム法によるトランスフェクションであり、ひとつはpMOVψ DNAとの同法による同時トランスフェクション

である。後者ではpZipHprtNeoをゲノムとして持つウイルス粒子の産生細胞の作製も狙った。残りもうひとつはこの産生細胞を利用してウイルス粒子として感染させる方法である。結果として全部で109個のHAT耐性クローンを分離できたが、その内訳を表1に示す。これらのうちG418耐性も保持していたのは全部で60クローンであった。

得られたHAT-G418耐性細胞のうち入ったベクターDNAが不安定なものを排除するため、ベクター上のhprt cDNAに由来するHPRTase活性が自然に失活する頻度を6TG耐性獲得を指標に調べた。全60クローンのうち 10^{-4} 前後以下の比較的低い自然失活頻度を示したのは、単独トランスフェクション法ではPH-1, PH-5の2クローン、同時トランスフェクション法では ψ^{-} /PH-62の1クローン、そしてウイルス感染法ではVH-1, VH-5, VH-12の3クローンで、最後の方法が安定な形質転換細胞を最も得易かった(表1)。

HPRTaseを安定に発現していると思われるこれら6クローンについて突然変異研究への利用に適しているかどうか評価するために、更に詳細な解析を行った(表2)。まず突然変異能について検討したところ、6TG耐性自然突然変異頻度は各クローンとも $0.4 - 2 \times 10^{-4}$ の範囲にあり対照のL5178Y細胞のゲノムhprt遺伝子のそれよりやや高かった。EMS誘発6TG耐性突然変異頻度はL5178Yと同程度か少し高かった。なお対照として2TGOR細胞でもHAT耐性への自然及びEMS誘発復帰突然変異の実験を行ったが、全部で 10^7 個の細胞を調べても変異クローンは得られなかった。

次にCOS細胞融合法によるベクターDNAの回収性を調べたところ、回収物に大腸菌をネオマイシン耐性にする活性がみられたのは4クローンだけで、PH-5とVH-5では繰り返し試みても耐性菌は得られなかった。この段階でこの二つのクローンは突然変異研究用の候補から外した。残りの4クローンについて更に各々で得ら

れた耐性菌からプラスミドDNAの回収を試み、制限酵素BamHI, EcoRI, HindIIIによりその構造解析を行った(図1参照)。図2はそのうちの典型的な例である。結果として全ての回収プラスミドのクローンは、BamHIにより切断されバンドが2本生じるもの(図2左、レーン1-6, 8, 9)、1本だけ生じるもの(レーン7)、または全く切断されないもの(レーン10)のいずれかのパターンに分かれることがわかったので、それぞれのパターンに属するプラスミドをI群、II群、III群と便宜上分類することにした。pZipHprtNeo DNAからはBamHI切断によりhprt cDNAを含む1.6 kbの断片ができるが、I群プラスミドでもBamHIで同じ長さのバンドが必ず検出され、この群のものは完全長のhprt cDNA断片を保持していると考えられる。このことはEcoRI-HindIII二重切断によるパターンからも確認された(図2右)。またこの二重切断パターンから、回収解析したI, II, III群の全てのプラスミドDNAで正常な長さのneo遺伝子とSV40 oriが常に保持されていることも明らかとなった。これは両者がCOS細胞融合法による回収に必須であることとよく一致している。更にBamHI切断, EcoRI-HindIII二重切断の両結果から、II群プラスミドはhprt cDNAの上流側のBamHI部位を、III群はhprt cDNAとそれをはさむ二つのBamHI部位を、それぞれ欠失していることがわかった。したがってII群、III群の回収プラスミドはhprt cDNAの塩基配列決定には不適當で、I群だけがこれに使えることになる。pZip-HprtNeo形質転換細胞のうち3クローンではI群が回収プラスミドクローンの約半数を占めていたが、ψ/PR-62細胞ではI群の回収効率は極端に低かった(表3)。しかし少しでもI群プラスミドが回収できたということは、ほぼ完全な長さのベクターDNAが少なくとも1個は各細胞クローンのゲノム中に存在していることを示唆している。

ベクターDNAの回収が可能であった4クローンについて、更に細胞ゲノム中に組み込まれたベクターDNAのコピー数を、hprt cDNA断片をプローブとしてサザ

ン法により調べた(図3)。全クローンのBanHI切断ゲノムDNAで正常な長さのhprt cDNAが存在していることを示す1.6 kbバンドが検出された。ψ /PH-62ではそれが明らかに多コピーで存在していた(レーン4)。なおこのクローンで検出された3 kbのバンドはプローブに含まれるMo-MuLV由来の断片がゲノムDNA中に多コピーで組み込まれているpMOVψ DNAとハイブリダイズしたためである。PH-1(レーン3)ではもう一本約5 kbのバンドが検出されたことから構造変化の生じたベクターDNA断片も存在することが示された。EcoRI切断の場合ではψ /PH-62を除く3クローンで互いに大きさの異なるバンドが一本ずつ検出された(レーン1-3)。EcoRI切断部位はベクターDNA中に1カ所しかないので、この結果は、これら3クローンではベクターDNAが細胞当たり1コピーしか存在せず、しかも染色体上の異なる位置に組み込まれていると普通解釈されるが、PH-1の場合はBanHI切断の結果も考え合わせると、EcoRI部位を失った不完全なベクター断片を含む複数のベクター配列が一ヶ所に組み込まれていると考えた方がよい。ψ /PH-62ではpMOVψ DNA由来のシグナルと区別がつかないため情報を得ることはできなかったが(レーン4)、BanHIによる結果を考え合わせると多コピーのベクターDNAが細胞ゲノムに組み込まれていると思われる。

複数のhprt cDNAをゲノム中に持つPH-1とψ /PH-62は突然変異研究用には不適当なので候補から外した。最終的にVH-1とVH-12が残ったが、ベクターDNAの回収性がより優れていたVH-12(表2参照)を突然変異の研究用細胞クローンとして採用することに決定した。

VH-12細胞におけるベクターDNAの安定性

VH-12の6TG耐性自然突然変異頻度は約 10^{-4} で、他のpZipHprtNeoによる形質転換クローンに比べ最も低い部類に属するものであったが、それでもこれは細胞

のゲノム遺伝子におけるものと比べるとまだ一桁ほど高い。このことはベクターDNA上のhprt cDNAがゲノムhprt遺伝子よりも不安定であることを示唆している。そこで、このベクター上の遺伝子の不安定さの原因を検討した。

まず6TG選択培地でVH-12から得られた49クローンの6TG耐性自然突然変異細胞について、ベクター上の別の遺伝子であるneoの発現をG418耐性を指標に調べたところ、約6割に及ぶ30クローンがG418耐性を失っていた。これはVH-12でhprt cDNAとneo遺伝子の同時失活が起きやすいことを示すと考えられた。この原因として、ひとつは染色体DNAからベクターDNAが欠失しやすいためである可能性が挙げられる。また、hprt cDNAとneo遺伝子はひとつの転写単位に属していることを考えると、ベクター上での遺伝子転写が高い頻度で失活してしまうためであるのかもしれない。

そこでベクター上の二つの遺伝子の同時失活がみられた変異細胞から7クローンを選び、ゲノムDNA中のベクターDNAの存在の有無をサザン法により検討した(図4)。BamHIで切断した細胞DNAを、hprt cDNA断片をプローブに用いて調べたところ、6クローンでは全くバンドが検出されず(図4A)、少なくともhprt cDNAの全配列は細胞ゲノムから失われていることがわかった。これら6クローンではneo遺伝子を含む断片をプローブにしてEcoRIで切断した細胞DNAを調べてもバンドは検出されず(図4B)、neo遺伝子も完全にゲノムから失われていることが示され、結局、ベクター配列全体が染色体DNAから脱落していると推測された。ひとつだけ完全長のhprt cDNAを保存しているクローンがあった(図4A、レーン5)が、neo遺伝子用プローブで調べたところ、正常なneo遺伝子由来の6.4 kbバンド以外により短いバンドがいくつか検出され(図4B、レーン5)、hprt cDNA以外のベクターDNA部分に何らかの構造異常が生じていることが示唆された。以上の結果より、VH-12におけるベクター上の二つの遺伝子の同時失活の主な原因は、ベクタ

—DNA自体が細胞ゲノムから欠失しやすいためであることが明かとなった。

上述の6TG選択培地で得られた耐性細胞の約4割はG418耐性でneo遺伝子は正常に発現していたが、これらの細胞におけるHprtase失活の原因がベクター上のhprt cDNAの遺伝的変化によるものであることを確認してみた。6TG-G418二重耐性を示した細胞6クローンからCOS細胞融合法により回収したI群ベクターDNAプラスミドを、hprt欠損株2TGOR細胞にリン酸カルシウム法でトランスフェクションした。1 μ gの回収DNAを用い、約 2×10^6 個の細胞に導入してみたが、いずれのクローン由来のプラスミドDNAでもHAT耐性細胞は出現しなかった。対照としてpZipHprtNeo DNA 1 μ gをトランスフェクションした実験では、約70個のHAT耐性クローンが得られた。この結果から、G418耐性を示す6TG耐性獲得細胞のHprtase活性の喪失は、遺伝子発現の一時的・非遺伝的抑制ではなく、DNA上に生じた遺伝的変化に由来していることが示唆された。

6TG培地で得られる耐性細胞のうちG418感受性に变化したものでは、ベクターDNA自体が欠失するという本来の突然変異とは異なる事象が耐性獲得の原因となっていることがわかったが、実際にVH-12を用いて突然変異特異性を調べるときにはこれが障害となって解析結果の正確さを損なう恐れがある。ベクター固有の不安定さによって出現してくるこうした異常な突然変異体を排除するため、6TG培地に同時にG418を加えて変異コロニーを選択する6TG-G418二重選択法を採用し、その有効性について検討した。

代表的な変異原による突然変異頻度を二重選択法と6TG単独選択法とで比較してみた(表4)。自然突然変異頻度は二重選択法により6TG単独の場合の約3分の1に下がり、ほぼゲノム遺伝子の頻度に落ち着いた(表2参照)。EMS、UV、及びX線による誘発突然変異頻度のうち、EMSとX線では二重選択法で突然変異の誘発が単独法よりも抑えられた。これらの変異原はhprt cDNAとneo遺伝子の

両者にまたがる大きな突然変異を引き起こしやすいためと考えれば、このことを少なくとも部分的には説明できる。実際、X線では欠失が主要な突然変異型であることが知られている(41)。以上のように二重選択法の採用によりVH-12細胞の高い自然突然変異頻度を正常レベルまで下げられる見通しが立ったが、その一方で、この選択法により、neo遺伝子の発現まで抑えてしまうような変異、即ちneo遺伝子コーディング領域やプロモーターのある左LTRに影響する突然変異は検出できなくなることもX線とEMSの結果より示唆された。

VH-12細胞に組み込んだhprt cDNAの塩基配列の決定

VH-12細胞からCOS細胞融合法により回収したI群プラスミドのひとつについてそのhprt cDNAコーディング領域の全塩基配列を決定したが、D.J.Jollyらによって報告されたもの(8)と完全に一致し、ベクターDNAの細胞への導入後も正常な塩基配列が保存されていることが確認された。

II. 自然突然変異の解析

自然突然変異細胞の分離とベクターDNAの回収

非選択培地で約一週間培養したVH-12細胞から、6TG-G418二重選択法によってhprt cDNAに自然突然変異を生じたと思われる互いに独立な細胞を52クローン分離した。6TG耐性細胞の出現頻度は 1.8×10^{-5} であった。各変異クローンについてCOS細胞融合法によりベクターDNAの回収を試みたところ、全クローンで成功し、しかもひとつの例外を除いてI群プラスミドが平均約4割の率で得られた。これらのクローンについては回収したI群DNAをhprt cDNAの塩基配列決定

に用いた。6TG耐性クローンのひとつMS68細胞からはII群とIII群プラスミドしか回収できなかったため、更にBamHI以外の制限酵素による解析も併用したところ hprt cDNAの上流側のBamHI部位が初めから失われていることが推測される結果が得られた。そこで回収されたII群DNAのうちで最長のものを塩基配列決定用を選んだ。

6TG耐性細胞から回収したhprt cDNA塩基配列の決定

各6TG耐性細胞クローンから回収した塩基配列決定用プラスミドについて、HPRaseの構造遺伝子（100-756部位、番号付けは文献8による）を含むおよそ60から800の部位の間の塩基配列の決定をセンス鎖プライマーを用いて試みた。48クローンについてはそのまま塩基配列を決めることができたが、MS68, MS75, MS78の3クローンでは一つないし二つのプライマーからの伸長反応が全く見られず、またMS160では一つのプライマーからの伸長反応が異常を示し、いずれも完全な塩基配列の決定ができなかった。そこでこれら4クローンについてはアンチセンス鎖プライマーも用いてみたところ全塩基配列を決定するのに成功した。MS160では反復配列に富む比較的大きなDNA断片が挿入していることが明かとなり、この反復配列により形成される二次構造がセンス鎖における伸長反応阻害の原因と推測された。また残りの3クローンでは伸長反応の見られなかったセンス鎖プライマーに対応する配列部分で欠失が生じていた。

塩基配列決定の結果、一つを除く全ての6TG耐性クローンで一ヶ所ずつ突然変異が検出され、しかもその変異はhprt cDNAの構造遺伝子内か、少なくともその一部を含む領域に見つかった。突然変異発生部位はhprt cDNA上に分散しており、特に強いホットスポットも見られなかった（図5）。6TG耐性クローンSTN15では塩基配列を決定した範囲内で突然変異を検出することはできなかった。

自然突然変異特異性

検出された自然突然変異の特異性を表5にまとめた。最も多いのがフレームシフト型突然変異で、20クローンで検出され全体の約4割を占めた。しかも短い塩基配列の欠失によるものが圧倒的に多かった。ついで塩基置換型突然変異が多く、全体の4分の1に当たる13クローンあったが、トランスバージョン型のものがほとんどであった。全体の約2割に当たる10クローンでは欠失型突然変異が見られた。他に倍加型が4クローン、挿入型が1クローン見られた。またこれまでほとんど記載のない変異型として挿入を伴う欠失（欠失-挿入型突然変異）が3クローンで見つかった。この3クローンの突然変異はそれぞれ異なる部位で生じているにも関わらず、後述のごとく塩基配列の構造上共通した変化様式を持っており、一つの変異型にまとめることにした。

各突然変異型の特徴

a) フレームシフト型突然変異

表6に検出された全フレームシフト型変異を示す。大部分は欠失によって生じたもので、1、2または4塩基対の脱落が見られた。塩基対の挿入によるものは2ヶ所の部位で検出され、1ヶ所では1塩基対の挿入が見られ（MS54,MS85,MS186）、もう1ヶ所では一つのヌクレオチドが異なる二つのヌクレオチドと置換していた（STN57）。

欠失タイプのフレームシフトの変異発生部位には塩基配列上共通した構造が2種類見つかった。一つは、欠失する配列の両側に2-5 bpの短い順方向反復配列が存在するというもので（表6矢印）、変異後は反復配列が一つだけ残っていた。これはフレームシフト発生部位12ヶ所のうち6ヶ所で見られた。もう一つはチミン

-プリン-チミン (TPuT)、またはそれと相補的なアデニン-ピリミジン-アデニン (APyA) という配列の存在で (表6星印)、変異後はこれらの配列の中から2塩基が脱落していた。このような配列が6ヶ所のフレームシフト発生部位で見つかり、しかもこのうち3ヶ所はもう一つの共通構造である順方向反復配列がみられた部位と重なっていた。

b) 塩基置換型突然変異

表7に示すように9ヶ所で塩基置換が検出され、そのうち4ヶ所ではナンセンス突然変異が生じていた。塩基変化はトランスバージョン型が圧倒的でG→C以外の全てのタイプが見つかり、特に特定のタイプへの偏りは見られなかった (表8)。またトランジッション型はA→Gタイプが1例見つかったただだった (MS76)。あと並列型の塩基置換としてGT→AAの2塩基の同時置換を生じているクローンが1例あった (MS58)。

c) 欠失型突然変異

欠失型は8ヶ所で検出され、欠失配列の大きさは3 bp及び29-529 bpであった (表9)。全ての発生部位で欠失配列の両側に1-4 bpの短い順方向反復配列が見られ、フレームシフト型と同様に変異後には反復配列の一方のみが残っていた。欠失と同時に1塩基の置換も起こっていると見られる部位もあった (ST10, MS50)。hprt cDNAの構造遺伝子内から外側に伸びる欠失が3クローン (MS68, MS75, MS78) で見られたが、左LTR、neo遺伝子にまで達するものはなかった。

d) 倍加型突然変異

倍加型は4ヶ所で見つかり、倍加した配列は4-5 bpの大きさであった (表10)。特徴的な共通構造として倍加する配列の両側に5-6 bpの短い逆方向反復配列、または1-2 bpの極めて短い順方向反復配列が見られ、特に2ヶ所の発生部位ではこの両者が同時に存在していた。

e) 欠失-挿入型突然変異

欠失-挿入型は3ヶ所で検出され、6-25 bpの長さの欠失と同時に3-5 bpの短い配列の挿入が見られた(表11)。変異前の塩基配列には欠失部位の付近に5-8 bpの短い逆方向反復配列が存在し、その片方の反復配列に隣接した短い塩基配列が、突然変異配列にみられる挿入断片と相補的であることを発見した。このことは3発生部位全てに共通して見られた。

f) 挿入型突然変異

36塩基の配列が173-187の部位に挿入され、しかも挿入を受けた部位の15 bpが挿入配列の両側に順方向反復配列を形成している突然変異が見つかった(MS160、表12)。挿入された塩基配列の由来を調べたところ、これと相同な38 bpの配列がhprt cDNAコーディング領域の約130 bp下流に見つかった。

考察

pZipHprtNeo系

哺乳類細胞での突然変異特異性をDNA塩基配列レベルで容易に解析できるようにするため、レトロウイルス型シャトルベクターpZipHprtNeoを作製した。これをいくつかの方法でマウス細胞内に導入して得られた多数の形質転換細胞の中から、導入形質の発現が安定で、ベクターDNAの回収性が良く、しかも細胞当たり1コピーのベクターDNAが組み込まれ構造変化も見られないものを突然変異研究に適した細胞クローンとして選択し、最終的にVH-12を得た。このクローン選択を行うことによって細胞内導入時にベクターDNAに高率で生じる構造異常を排除することができた。また、ウイルス粒子として感染させ細胞内に導入する方法が、構造変化のないベクターDNAをゲノム当たり1コピーで組み込んだ、安定な形質転換細胞を得るのに最も優れていることがわかった。

VH-12細胞中ではベクター上のhprt cDNAの失活頻度がゲノムhprt遺伝子の自然突然変異頻度よりやや高かったが、その原因はベクターDNA全体が細胞ゲノムから欠失しやすいためであることがわかった。こうした異常な原因による変異クローンを排除するため6TG-G418二重選択法を採用し、VH-12の6TG耐性獲得頻度を通常 of 自然突然変異頻度にまで下げることに成功した。細胞に6TG感受性を与えるhprt cDNAとG418耐性をもたらすneo遺伝子はベクターDNA上で一つの転写単位を構成しているので、この二重選択法の採用により、プロモーター領域の突然変異や転写の一時的非遺伝的な不活化によるものは排除され、検出される突然変異はすべてhprt cDNAの構造遺伝子内かそれを含む領域に落ちることが期待される。実際、一つを除く解析した全ての6TG耐性クローンで塩基配列を決定した範

胞内に突然変異を検出することができ、効率よく変異塩基配列のデータを集めることができた。しかし一方では、二重選択法を用いたために、*hprt* cDNA領域を越え左L T Rやneo遺伝子にまで影響を及ぼす大きな突然変異は検出できなくなり、pZip-HprtNeo系の突然変異特異性の解析能が制限される結果となった。したがってここで得られた欠失型変異が自然突然変異の2割を占めるというデータ(表5)は過小評価であるかもしれない。

AshmanとDavidsonはレトロウイルスベクターを用いた同様の系を用いて自然突然変異の研究を行っているが、彼らは突然変異細胞の約4割でC O S細胞融合法によるベクターDNAの回収ができなかったと報告している(23)。一方、pZip-HprtNeo系では全ての突然変異細胞クローンからベクターの回収に成功した。これはpZipHprtNeo系が突然変異細胞の選択の段階でG 4 1 8選択を行っているのに対し、AshmanとDavidsonは突然変異を発現させる段階でG 4 1 8選択を用いていることが原因と考えられ、6 T G培地での選択の際にもゲノムDNAからのベクターの脱落が起きうることを示唆する。

C O S細胞融合法によってベクターDNAを回収する時にベクター上のSV-oriからDNA合成の増幅が起こるが、この時の合成の誤りによる変異がpZipHprtNeo系で検出される突然変異の中に混入して特異性の解析結果を混乱させる恐れがある。VB-12から得られた6 T G耐性細胞では*hprt* cDNA上に既に突然変異が少なくとも一ヶ所で生じているはずだから、もしベクターの回収時にも変異が生じたとするとそのベクターの*hprt* cDNA中には二ヶ所以上に突然変異が検出されるはずである。しかし、変異の見つからなかったSTN15を除く、解析した全ての6 T G耐性クローンで突然変異は*hprt* cDNA中に一ヶ所しか見つからなかった。また、いくつかの突然変異クローンでベクターの回収と塩基配列の決定を繰り返したが、常に同じ場所に同じ変異しか検出されなかった。従って、ベクター回収時に混入する可能性のある変

異の影響は、たとえあったとしても、無視できるものと考えられる。

自然突然変異特異性

哺乳類細胞における突然変異特異性の研究はこれまで主にサザンハイブリダイゼーション法を用いて行われてきたが(1)、チャイニーズハムスター細胞を用いた研究によると、自然突然変異については変化を検出することができないものがほとんどであった(13, 16)。これは塩基置換や短い欠失などの小さな突然変異が自然突然変異に主に寄与していることを示している。マウス細胞を用いたpZipHprt-Neo系では、自然突然変異として短い塩基配列の欠失によるフレームシフトが最も多く塩基置換がそれに次ぐという結果を得た。またAshmanとDavidsonも類似のシャトルベクターpZipGptNeo(42)を用いてマウス細胞の自然突然変異特異性を報告しているが(23)、短い欠失が主要な突然変異であるというpZipHprtNeo系と同様の結果を得ている。このようなマウス細胞の結果はサザン法を用いたチャイニーズハムスターの結果とよく一致している。最近、チャイニーズハムスター細胞のゲノムaprt遺伝子における自然突然変異の特異性がDNA塩基配列レベルで解析された(26, 29)。DeJongらによるものは塩基置換型がほとんどで、しかもその大部分はG→Aのトランジションだった。またNalbantogluらによるものも、やはり塩基置換型が多いことを報告している。これは短い欠失が多いマウス細胞のものとはやや異なっており、レトロウイルス型シャトルベクターを使用したことの影響である可能性は否定できないものの、生物種の違いを反映していると考えられる。いずれにせよ、哺乳類細胞ではサザン法で検出されないような小さな変異が自然突然変異の大部分を占めることになるが、大腸菌では、ホットスポットを除けば、塩基置換に加えて比較的長い欠失が自然突然変異の大きな部分を占めており(12)、真核細胞と原核細胞の差異が認められ、両者のゲノム構成や染色体構造などの相違

を反映しているのかもしれない。実際、同じ単細胞生物であるが真核細胞に属する酵母では塩基置換が自然突然変異に主に寄与していることが報告されている(24, 25)。このように自然突然変異は生物種によりその特異性に相違がみられたが、種としての遺伝的素質だけでなく生育環境の違いが影響している可能性にも注意する必要がある。

自然突然変異の各種の変異型

a) 塩基置換型突然変異

pZipHprtNeo系ではトランスバージョンが非常に多くG→C以外の全てのタイプが特に偏りなく見られた。酵母のURA3遺伝子でも同じような傾向が報告されている(25)。また、pZipGptNeo系(23)、酵母のSUP4-o遺伝子(24)、大腸菌のlacI系(12)ではトランジッションとトランスバージョンが同じくらい見いだされている。したがってトランスバージョンが自然塩基置換にかなりの寄与をしていることが示唆されるが、DeJongらのチャイニーズハムスターaprt遺伝子のデータではトランジッション、しかもG→Aが圧倒的に多く(28)、他と異なっている。しかし、同じ細胞株で解析しているNalbantogluらは、トランジッションに加え、トランスバージョンも相当多いことを報告しているので(29)、DeJongらの結果がこの生物種の特異性とは考えにくい。哺乳類細胞の自然塩基置換については、もっと多くのデータが集まるまで、まだはっきりしたことは言えない。

b) フレームシフト型突然変異

pZipHprtNeo系で得られたフレームシフトは数塩基の欠失によるものが大部分を占め、しかもその多くで短い順方向反復配列が欠失配列の両側にみられた。同じことはpZipGptNeo系でも報告されている(23)。またNalbantogluらも短い欠失の両側に短い順方向反復配列を見出している(27, 29)。一方、TPuTやAP₅A

の配列がpZipHprtNeo系の2塩基欠失の全てで見られたが、このような例は他の解析系では見つからず、その重要性は不明である。このような配列は塩基スタッキングの安定性に影響を与えるのかもしれない。

6 T G 耐性クローンMS54, MS85, MS186では1塩基の付加が見られたが、この変異によって不完全だった順方向反復配列5'-A T T T T-3'が完全なものになっていた。MS94でも同様のことが起こっており、変異後生じた3'-T G G A A G G-5'は下流の496-501の部位にも見られる。このような突然変異による反復配列の完全化は以前にも指摘されている(12)。また、STN57では変異後に5'-C T G-3'の順方向反復配列が新たに出現していた。同じことは塩基置換型に分類した並列2塩基の同時置換を持つMS58でも見られ、変異後5'-A A G-3'の順方向反復配列ができていた。これらの特徴は突然変異の発生における反復配列の重要性を示唆している。

c) 欠失型突然変異

欠失した配列の大きさに関係なくその両側に1-4 bpの短い順方向反復配列が見られ、フレームシフトと似た構造を示した。同様のことはpZipGptNeo系(23)、aprt遺伝子(26, 28)でも報告されている。一方、大腸菌のlacI遺伝子でも欠失に伴って順方向反復配列が見いだされているが、その長さは哺乳類細胞のものに比べ8 bp前後と長いものが多く(44, 12)、生物種の違いを反映しているのかもしれない。

d) 倍加型突然変異

検出されたのはいずれも短い配列の倍加であり、しかもその発生部位には短い逆方向反復配列と非常に短い順方向反復配列の少なくともどちらか一方が存在するというコンセンサス構造が見られた。同様の例はaprt遺伝子のデータの中にも見つけることができ(27, 変異クローンS79; 29, 変異クローンS53, S54, S101)、特にS27の場合は二重の倍加が見られる。

e) 欠失-挿入型突然変異

発生部位には短い逆方向反復配列が見られ、しかも挿入される短い断片は変異部位の近くに存在する配列と相補的であるという、興味深いコンセンサス構造が見つかった。互いに独立な三つの突然変異クローンで、しかも互いに異なる部位に見いだされたことから、このタイプの変異は、極めて珍しい特殊なものではなく、これまで明確に認識されていなかった一つの典型的な突然変異型として分類できる変異と考えられる。最近、M13ファージの*in vitro* DNA合成系で同類の突然変異が多数報告されたが(43)、これはこの型の突然変異の存在を支持している。実際、*in vivo*でも同様の突然変異は酵母のSUP4-0遺伝子のデータ中(24; 変異クローン160, Co-31-1)に見いだすことができ、AshmanとDavidsonのデータ(23)の中にもこの型に分類できそうな変異が一つ存在する。また、*aprt*遺伝子の突然変異クローンS51(29)では、欠失は見られないものの、挿入配列と相補的な配列が逆方向反復配列にはさまれて存在するという特異構造が変異発生部位に見いだされ、この型の突然変異の一画型と考えられる。一方、大腸菌では挿入を伴う欠失はこれまで*in vivo*で検出されたことはなく(44, 12)、この突然変異型が真核細胞特異的なものであることが示唆される。

自然突然変異の発生機構モデル

塩基置換を除く自然突然変異を構成する全ての変異型で反復配列からなる共通なコンセンサス構造が見られた。既にファージや大腸菌では、フレームシフトや欠失などの突然変異の生成に対する反復配列の関与について多くの考察がなされているが(44-49)、*pZipHprtNeo*系で見つかった反復配列の長さは短いものばかりであり、安定な二次構造を形成することは困難と考えられ、組換え酵素や修復酵素の基質とはなりにくいであろう。したがって、反復配列の関与する一時的な二次構造

の形成から瞬間的に突然変異が固定される過程を考えなければならない。in vitroでDNAポリメラーゼのDNA合成エラーを解析した研究から、DNA合成時に新生DNA鎖が部分的な相同性によって鋳型DNA上を滑り、そのまま合成が続行されたり、少しだけ合成をしたのち鋳型DNA上の元の位置に戻ってDNAの合成を再開したりすることによって、各種の突然変異が発生することが示唆されている(50, 51)。この場合、新生DNA鎖が鋳型DNA上を滑るのに必要な相同部分は必ずしも長くなくてよく、従って不安定でも誤り対合が生じ、連続してDNA合成が起これば変異として固定されると考えられる。このようなin vitroの研究で出てきた考え方はpZipHprtNeo系で得られたin vivoの自然突然変異の発生機構の説明にもあてはめることができる。

例えば、フレームシフトや欠失については、新生DNA鎖が順方向反復配列間を滑って誤り対合し、そのまま反復配列間の部分を読み飛ばしてDNA合成が続行され生じると説明できる。同様の考え方は以前にも提出されている(44, 46, 49)。この読み飛ばしは反復配列間の距離が短いほど起こりやすくなると予想されるが、欠失型よりフレームシフト型の方が多いというpZipHprtNeo系のデータはこれを支持している。しかし、両者のコンセンサス構造の相同性にも関わらず、失われるDNA断片の大きさは、3 bpの欠失を除くと、二つの変異型で大きな断層がある。フレームシフト型は1-4 bpの喪失であるのに対し、欠失型は約30 bp以上の喪失であり、この中間にくる変異体は得られなかった。このことは両変異型の発生機構に違いがあることを示唆しているのかもしれない。実際、欠失型の生成機構として単純に30 bp以上の読み飛ばしだけを考えるのは、反復配列の長さが短過ぎて無理がある。二つの反復配列を近接させるようなもう一つの因子が関与していることが予想される。

倍加型突然変異では新生DNA鎖が順方向反復配列間を滑って手前の反復配列

に戻り再び同じところを複製してしまえば、反復配列間の部分が倍加することになるが、ここに逆方向反復配列があれば、その間で対合しループアウトを形成することによって、新生DNA鎖が滑るのを容易にすることができる（図6A）。

また、欠失-挿入型では新生DNA鎖が逆方向反復配列を利用して鋳型DNA鎖を乗り換えそこで更に少しだけDNA合成を続けた後、本来の鋳型DNA鎖に戻ると考えると説明できる。この時鋳型DNA鎖の逆方向反復配列間でループアウトが生じることによって新生DNA鎖の鋳型乗り換えが促進されると思われる（図6B）。in vitro DNA合成系で同様の変異型を検出したPapnicolaouとRipleyも同様の仮説を提出している。

このようにフレームシフト、欠失、倍加、欠失-挿入の各型の変異発生部位に観察されるコンセンサス構造は自然突然変異がDNA合成エラーによっておもに発生していることを示唆するが、同じことは塩基置換型変異の発生機構にもあてはめられるかもしれない。

pZipHprtNeo系の応用

pZipHprtNeo系の開発によりマウス細胞で様々な変異原による誘発突然変異の特異性を容易に、しかも詳細に解析する一つの道が開かれた。pZipHprtNeoは染色体DNAに組み込まれるので、pZ189（52）に代表される自律複製型シャトルベクターを用いたものと違い、複製酵素や複製の周期も細胞のゲノムDNAと完全に同じであり、染色体DNA上で起こる本来の突然変異事象を忠実に反映することが期待できる（詳細は総説、文献53参照）。検出できる突然変異の大きさには上限があるので、主に塩基置換やフレームシフトのような小さな変異を起こしやすい変異原で効果を発揮すると考えられる。しかし、X線のように欠失などの大きな突然変異を主として誘発するものでも、小さな変異だけを選択して解析できるという利点があ

り、特定の変異原による塩基損傷の寄与の評価にも役立つと思われる。

謝 辞

本研究の機会を与え下さり、全体を通じてご指導して下さいました大阪大学医学部放射線基礎医学教室の加藤武司博士に、また私が本研究に従事することを御快諾下さった京都大学理学部動物学教室の加藤幹太教授と米井脩治博士に、心より深く感謝致します。

文献

1. Thacker, J. (1985) The molecular nature of mutations in cultured mammalian cells: A review. *Mutat. Res.*, 150:431-442.
2. Dubridge, R.B. and M.P. Calos (1987) Molecular approaches to the study of gene mutation in human cells. *Trends Genet.*, 3:293-297
3. Wake, C.T., T. Gudewicz, T. Porter, A. White and J.H. Wilson (1984) How damaged is the biologically active subpopulation of transfected DNA? *Mol. Cell. Biol.*, 4:387-398.
4. Razzaque, A., S. Chakrabarti, S. Joffe and M.M. Seidman (1984) Mutagenesis of a shuttle vector plasmid in mammalian cells *Mol. Cell. Biol.*, 4:435-441
5. Lebkowski, J.S., R.B. Dubridge, E.A. Antell, K.S. Greisen and M.P. Calos (1984) Transfected DNA is mutated in monkey, mouse, and human cells. *Mol. Cell. Biol.*, 4:1951-1960
6. Cepko, C.L., B.E. Roberts and R.C. Mulligan (1984) Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector *Cell*, 37:1053-1062.
7. Breitman, M.L., L.-C. Tsui, M. Buchwald and L. Siminovitch (1982) Introduction and recovery of a selectable bacterial gene from the genome of mammalian cells. *Mol Cell. Biol.*, 2:986-978.
8. Jolly, D.L., H. Okayama, P. Berg, A.C. Esty, D. Filpula, P. Bohlen, G. G. Jonson, J.E. Shively, T. Hunkapillar and T. Friedmann (1983) Isolation

- and characterization of a full length expressible cDNA for human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. Proc.Natl.Acad.Sci.USA,80:477-481
9. Seegmiller,J.E., F.M.Rosenbloom and W.W.Kelley (1967) Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. Science,155:1682-1684.
 10. Stout,J.T and C.T.Caskey (1985) HPRT: Gene structure, expression, and mutation. Annu.Rev.Genet.,19:127-148.
 11. Coulondre,C. and J.H.Miller (1977) Genetic studies of the lac repressor IV. Mutagenic specificity in the lacI gene of Escherichia coli. J.Mol.Biol.,117:577-606.
 12. Schaaper,R.M., B.N.Danforth and B.W.Glickman (1986) Mechanisms of spontaneous mutagenesis: An analysis of the spectrum of spontaneous mutation in the Escherichia coli lacI gene. J.Mol.Biol.,189:273-284.
 13. Fuscoe,J.C., R.G.Fenwick Jr, D.H.Ledbetter and C.T.Caskey (1983) Deletion and amplification of the HGPRT locus in Chinese hamster cells. Mol.Cell.Biol.,3:1086-1096.
 14. Thacker,J , P.G.Debenham, A.Stretch and M.B.T Webb (1983) The use of a cloned bacterial gene to study mutation in mammalian cells. Mutat.Res.,111:9-23.
 15. Debenham,P.G., M.B.T.Webb, A.Stretch and J Thacker (1988) Examination of vectors with two dominant, selectable genes for DNA repair and mutation studies in mammalian cells. Mutat.Res.,199:145-158.
 16. Stankowski Jr,L.F , K.R.Tindall and A.W.Hsie (1986) Quantitative and molecular analyses of ethyl methanesulfonate- and ICR191-induced muta-

- tion in AS52 cells. *Mutat.Res.*,160:133-147
17. Nalbantoglu,J., O.Goncalves and M.Meuth (1983) Structure of mutant alleles at the *aprt* locus of Chinese hamster ovary cells. *J.Mol.Biol.*, 167:575-594.
 18. Grosovsky,A.J., E.A.Drobetsky, P.J.de Jong and B.W.Glickman (1986) Southern analysis of genomic alterations in gamma-ray-induced *APRT*-hamster cell mutants. *Genetics*,113:405-415.
 19. Adair,G.M., K.A.Brotherman and P.A.Kimmitt (1985) Structural alterations of the *APRT* gene in 8-azaadenine-resistant mutants of CHO cells. *Genetics*,110:s17
 20. Yandell,D.W , T.P Dryja and J.B.Little (1986) Somatic mutations at a heterozygous autosomal loss in human cells occur more frequently by allele loss than by intragenic structural alterations. *Somat.Cell Mol Genet.*,12:255-263.
 21. Hauser,J , M.M.Seidman, K.Sidur and K.Dixon (1986) Sequence specificity of point mutations induced during passage of a UV-irradiated shuttle vector plasmid in monkey cells. *Mol.Cell.Biol.*,6:277-285.
 22. Bredberg,A., K.H.Kraemer and M.M.Seidman (1986) Restricted ultraviolet mutational spectrum in a shuttle vector propagated in xeroderma pigmentosum cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,83:8273-8277
 23. Ashman,C.R. and R.L.Davidson (1987) Sequence analysis of spontaneous mutations in a shuttle vector gene integrated into mammalian chromosomal DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,84:3354-3358
 24. Giroux,C.N., J.R.A.Mis, M.K.Pierce, S.E.Kohalmi and B.A.Kunz (1988)

- DNA sequence analysis of Spontaneous mutations in the SUP4-0 gene of Saccharomyces cerevisiae. Mol.Cell.Biol.,8:978-981
25. Lee,G.S.-F , E.A.Savage, R.G.Ritzel and R.C.von Borstel (1988) The base-alteration spectrum of spontaneous and ultraviolet radiation-induced forward mutations in the URA3 locus of Saccharomyces cerevisiae. Mol.Gen.Genet.,214:396-404
 26. Nalbantoglu,J., D.Hartley, G.Phear, G.Tear and M.Meuth (1986) Spontaneous deletion formation at the aprt locus of hamster cells: the presence of short sequence homologies and dyad symmetries at deletion termini. EMBO J ,5:1199-1204.
 27. Nalbantoglu,J., G.Phear and M.Meuth (1987) DNA sequence analysis of spontaneous mutations at the aprt locus of hamster cells. Mol.Cell. Biol.,7:1445-1449.
 28. de Jong,P.J , A.J.Grosovsky and B.W.Glickman (1988) Spectrum of spontaneous mutation at the APRT locus of Chinese hamster ovary cells: An analysis at the DNA sequence level. Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85:3499-3503.
 29. Phear,G., W.Armstrong and M.Meuth (1989) Molecular basis of spontaneous mutation at the aprt locus of hamster cells. J.Mol.Biol.,209:577-582.
 30. Aaronson,S.A. and G.J.Todaro (1968) Development of 3T3-like lines from Balb/c mouse embryo cultures: Transformation specificity to SV40. J Cell.Physiol ,72:141-148.
 31. Jha,K.K., M.Siniscalco and H.L.Ozer (1980) Temperature-sensitive mu-

- tants of Balb/3T3 cells. III. Hybrids between ts2 and other mouse mutant cells affected in DNA synthesis and correction of ts2 detected by human X chromosome. *Somat.Cell Genet.*,6:603-614.
32. Fisher,G.A. and A.D.Welch (1957) Effect of cirtoverum factor and peptones on mouse leukemia cells L-5178 in tissue culture. *Science*, 126:1018-1019.
33. Gluzman,Y (1981) SV40 transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*,23:175-182.
34. Miller,A.D., D.J.Jolly. T Friedmann and I.M.Verma (1983) A transmissible retrovirus expressing human hypoxanthine phosphoribosyltransferase(HPRT): gene transfer into cell obtained from human deficient in HPRT. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,80:4709-4713.
35. Mann,R., R.C.Mulligan and D.Baltimore (1983) Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell*,33:153-159.
36. Graham,F.L. and A.Van der Eb (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus DNA. *Virology*,52:456-467
- 37 Hirt,B. (1967) Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J.Mol.Biol.*,26:365-369.
38. Hanahan,D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J.Mol.Biol.*,166:557-580.
39. Maniatis,T , E.F.Fritsch and J.Sambrook (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

40. Matsubara, K., Y Takagi and T. Mukai (1975) In vitro construction of different oligomeric forms of dv DNA and studies on their transforming activities. *J Virol.*, 16:479-485.
41. Thacker, J (1986) The nature of mutants induced by ionizing radiation in cultured hamster cells. III Molecular characterization of HPRT-deficient mutants induced by γ -rays and α -particles showing that the majority have deletions of all or part of the hprt gene *Mutat. Res.*, 160:267-275.
42. Ashman, C.R., P Jagadeeswaren and R.L. Davidson (1986) Efficient recovery and sequencing of mutant genes from mammalian chromosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3356-3360.
43. Papanicolaou, C. and L.S. Ripley (1989) Polymerase-specific differences in the DNA intermediates of frameshift mutagenesis: In vitro synthesis errors of Escherichia coli DNA polymerase I and its large fragment derivative. *J. Mol. Biol.*, 207:335-353.
44. Farabaugh, P J., U. Schweissner, M. Hofer and J.H. Miller (1978) Genetic studies of lac repressor VII On the molecular nature of spontaneous hotspots in the lacI gene of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.*, 126:847-863
45. Streisinger, G., Y Okada, J. Emrich, J. Newton, A. Tsugita, E. Terzaghi and M. Inouye (1966) Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 31:77-84.
46. Albertini, A.N., M. Hofer, M.P. Calos and J.H. Miller (1982) On the formation of spontaneous deletions: The importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. *Cell*, 29:319-328.

47. Ripley, L.S. (1982) Model for the participation of quasipalindromic sequences in frameshift mutation. Proc.Natl.Acad.Sci.USA,79:4128-4132.
48. de Boer, J.G. and L.S.Ripley (1984) Demonstration of the production of frameshift and base-substitution mutations by quasipalindromic DNA sequences. Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:5528-5531.
49. Ripley, L.S., A.Clark and J.G.de Boer (1986) Spectrum of spontaneous frameshift mutations: sequences of bacteriophage T4 rII gene frameshifts. J.Mol.Biol.,191:601-613.
50. Kunkel, T.A. and K.Bebenek (1988) Recent studies of the fidelity of DNA synthesis. Biochim.Biophys.Acta,951:1-15.
51. de Boer, J.G. and L.S.Ripley (1988) An in vitro assay for frameshift mutations: Hotspots for deletions of 1 bp by Klenow fragment polymerase share a consensus DNA sequence. Genetics,118:181-191
52. Seidman, M.M., K.Dixon, A.Razzaque, R.J.Zagursky and M.L.Berman (1985) A shuttle vector plasmid for studying carcinogen-induced point mutations in mammalian cells. Gene,38:233-237
53. 池畑広伸, 加藤武司 (1989) シャトルベクターを利用した哺乳類体細胞の突然変異スペクトルの解析. 放射線生物研究, 24:1-19.

表1. マウス2TGOR細胞のpZipHprtNeo DNAによるHAT耐性形質転換細胞の予備分析

形質転換法	形質転換細胞クローン数 ^a		欠損ウイルス産生 HAT ^r G418 ^r クローン数	6TG ^r 自然突然変異頻度の 低いHAT ^r G418 ^r クローン数 ^b
	HAT ^r	HAT ^r G418 ^r		
単独トランスフェクション	35	19	-	2
pNOVψ ⁻ との 同時トランスフェクション	65	35	7	1
ウイルス感染	9	6	-	3

a) HAT^r G418^rクローンはHAT耐性形質転換細胞クローンの中からG418選択によって得られた。

b) 10⁻⁴ 前後以下の自然突然変異頻度を示したクローンの数。

表2. 安定にHAT耐性G418耐性を示す形質転換細胞の分析

細胞 ^a	HAT ^r または6TG ^r 自然突然 変異頻度 (×10 ⁵) ^b	HAT ^r または6TG ^r EMS誘発 突然変異頻度 (×10 ⁵) ^b	COS細胞融合法により 回収されたベクター数 (neo ^r /1 × 10 ⁶ cells) ^c
L5178Y	3 ^c	17	-
2TGOR	<0.02 ^d	<0.05 ^d	-
PH-1	12	19	15
PH-5	10	31	0
ψ ⁻ /PH-62	20	168	25
VH-1	9.5	25	63
VH-5	4	11	0
VH-12	11	88	227

a) 細胞クローン名にPH、ψ⁻/PH、VHがついたものはそれぞれ表1の単独トランスフェクション法、pNOVψ⁻との同時トランスフェクション法、ウイルス感染法で得られたクローンであることを示す。

b) 2TGORはHAT培地で、他の細胞は6TG培地で突然変異体を選択した。EMSは2 mMで20時間処理した。

c) 佐藤弘毅博士（放射線医学総合研究所）からの私信。

d) 2TGORは全体で約10⁷個の細胞を調べたが、自然にもEMSによってもHAT耐性に復帰しなかった。

e) 細胞1 × 10⁶個から回収した試料で得られた大腸菌DH1のneo^rコロニー数を示す。実験毎に回収されるプラスミドクローンの数は大きく変わるので、ここでは何回かの実験での最大値を示した。

表3. 制限酵素による回収プラスミドDNAの構造解析

細胞	回収プラスミド数 ^a	解析プラスミド数	プラスミドの構造 ^b		
			I	II	III
PH-1	16	13	6	1	6
ψ ⁻ /PH-62	38	19	2	3	14
VH-1	117	11	6	4	1
VH-12	365	40	22	10	8

a) neo^r細菌コロニーとして回収された数を示す。

b) プラスミドDNAをBamHIで切断後、アガロース電気泳動を行って得られたパターンより構造を推定した(図2、本文参照)。

表4. VH-12細胞の変異原誘発6TG^r突然変異頻度とG418選択の影響

変異原 ^a	突然変異頻度 ($\times 10^5$)	
	6TG ^r	6TG ^r G418 ^r
なし(自然突然変異)	1.1	3.7
EMS	100	30
UV	19	15
X線	200	15

a) VH-12細胞をEMSは2 mM x 20時間で、UVは10 J/m²で、X線は500 radでそれぞれ処理した。生存率は20~40%であった。

表5. マウス細胞におけるヒトhprt cDNAの自然突然変異特異性

突然変異型	突然変異細胞数
塩基置換型	13 (25%)
トランジクション	1
トランスバージョン	11
並列置換 ^a	1
フレームシフト型 ^b	20 (38%)
塩基喪失	18
塩基付加	2
欠失型	10 (19%)
欠失-挿入型	3 (6%)
倍加型	4 (8%)
挿入型	1 (2%)
未同定 ^c	1 (2%)

- a) 塩基配列上連続する2塩基以上が同時に塩基置換を生じているもの。
 b) 数塩基対以下の欠失または付加により構造遺伝子のコドンの読み枠がずれているもの。
 c) 構造遺伝子領域とその両側を含む約800 bpの塩基配列を決定したが、突然変異は検出されなかった。

表6. フレームシフト型突然変異

部位 ^a	塩基配列の変化 ^b	ヌクレオチド変化	発生回数	突然変異カロン
159-161	TGATTTAATTTG → TGATTTTATTTTG	+1 bp	3	MS54, MS85, MS186
231	ATGGACAGGACT → ATGGAAGGACT	-1 bp	1	MS94
295-300	CTCT ^{*****} GTGCTC → CTCT ^{***} GTGCTC	-2 bp	4	STN20, STN31, STN54, MS137
306-311	CAAG ^{*****} GGGCTA → CAAG ^{*****} GGGCTA	-1 bp	1	MS88
367-373	GTGATAGATCCA → GTGATCCA	-4 bp	2	MS81, MS114
368-370	GTGATAGATCCA → GTGAGATCCA	-2 bp	3	STN59, MS98, MS162
390	GACTGTAGATT → GACTGTCTGATT	+1 bp	1	STN57
396-398	ATTTTATCAGAC → ATTTTCAGAC	-2 bp	1	MS172
479-485	CTGGA ^{*****} AAGAATG → CTGGA ^{*****} AATG	-4 bp	1	MS107
503-507	GAAGAT ^{*****} AATAATT → GAAGAT ^{***} AATAATT	-2 bp	1	MS111
633-635	ACTTTG ^{***} TGGAT → ACTTTG [*] TGGAT	-2 bp	1	MS73
682-685	TGACTATA ^{*****} ATGA → TGACTA ^{**} ATGA	-2 bp	1	MS96

a) 塩基配列の番号付けは文献8に従い、hprt cDNAの最初の塩基を1とした。

b) 左右の塩基配列はそれぞれ変異前、変異後のものを示す。塩基配列の下の矢印は順方向反復配列を、上の星印はT P u T / A P y A配列を示す。

表7. 塩基置換型突然変異

部位	塩基配列の変化 ^a		ヌクレオチド変化	発生回数	突然変異カウ
164	TTTAT [*] TTTGCAT Phe	->	TTTAT [*] C [*] TTGCAT Ser	AT → GC	1 MS76
217	TCAT [*] TGGACTAAT Gly	->	TCAT [*] TGGACTAAT Non.	GC → TA	1 STN58
224	ACTAA [*] TTATGGA Ile	->	ACTAA [*] AGTATGGA Ser	AT → CG	1 MS205
256-257	AGAT ^{**} GTGATGAA Val	->	AGAT ^{**} AAGATGAA Lys	GC → AT AT → TA	1 MS58
583	CGCA [*] AGCTTGCT Ser	->	CGCA [*] CGCTTGCT Arg	AT → CG	1 MS115
595	GGT [*] GAAAAGGAC Lys	->	GGT [*] G [*] TAAAGGAC Non.	AT → TA	2 STN3, STN52
621	TGGAT [*] A [*] AAGCC Tyr	->	TGGAT [*] A [*] AAGCC Non.	AT → TA	1 MS144
672	AGGAT [*] ATGCCCT Tyr	->	AGGAT [*] AAGCCCT Non.	AT → TA	2 STN8, MS44
679	CCT [*] TGACTATAA Asp	->	CCT [*] T [*] TACTATAA Tyr	GC → TA	3 ST9, STN51, MS53

a) 塩基配列下の線と文字は塩基置換の生じたコドンと対応するアミノ酸を示し、上の星印は置換した塩基の位置を示す。

表8. 塩基置換型突然変異の特異性

塩基置換のタイプ	発生部位数	発生回数
トランジション		
AT → GC	1	1
GC → AT	0	0
トランスバージョン		
AT → TA	3	5
AT → CG	2	2
GC → TA	2	4
GC → CG	0	0
並列置換	1	1

表9. 欠失型突然変異

部位	塩基配列の変化*	ヌクレオチド変化	発生回数	突然変異クローン
5'-345	GAGT <u>CAAAA</u> -----ACAT <u>CAAAGC</u> → GAGT <u>CAAACC</u>	-529 bp	1	MS68
16-147	GGGG <u>GCTT</u> -----CAGG <u>TATGA</u> → GGGGG <u>TATGA</u>	-132 bp	1	MS78
162-194	GAT <u>TATTT</u> -----CGAT <u>TGGAA</u> → GAT <u>TTT</u> [*] <u>TGGAA</u>	-29 bp	2	ST10, MS50
206-287	AGGG <u>TCTTA</u> -----AT <u>TGTAGCCC</u> → AGGG <u>TGTAGCCC</u>	-82 bp	1	MS82
249-297	GTCT <u>TGCTCG</u> -----CT <u>GTGCTC</u> → GTCT <u>TGCGTCTC</u>	-49 bp	1	MS57
576-884	ATGGTCA <u>AGG</u> -----TT <u>ATCTCTT</u> → ATGGTCA <u>ATCTCTT</u>	-309 bp	1	MS75
635-637	GACT <u>TGTTGGATT</u> → GACT <u>TGGATT</u>	-3 bp	1	MS201
663-665	AAGT <u>TGTTGTAGGA</u> → AAGT <u>TGTAGGA</u>	-3 bp	1	MS100, MS181

a) 塩基配列の下の矢印は順方向反復配列を、上の直線は欠失した領域を示す。またST10, MS50における星印は欠失と同時に塩基置換が生じたと思われる部位を示す。

表10. 倍加型突然変異

部位	塩基配列の変化*	ヌクレオチド変化	発生回数	突然変異クローン
237-241	ACAGGAG <u>GAACGCTCTGC</u> → ACAGGAG <u>GAACGGAACGCTCTGC</u>	+5 bp	1	STN2
272-275	AGGAGAT <u>GGAAGCCATCA</u> → AGGAGAT <u>GCGAGGAGCCATCA</u>	+4 bp	1	MS70
447-450	TAAAAGT <u>TAATGGTGGAGA</u> → TAAAAGT <u>TAATTAATGGTGGAGA</u>	+4 bp	1	MS202
488-491	AAAGAAT <u>GCTTGATTGTG</u> → AAAGAAT <u>GCTTTCCTTGATTGTG</u>	+4 bp	1	MS168

a) 塩基配列の上下の矢印はそれぞれ順方向と逆方向の反復配列を示す。四角で囲んだ部分は倍加する単位配列を示す。

表 1 1. 欠失-挿入型突然変異

部位	塩基配列の変化*	ヌクレオチド変化	発生回数	突然変異名
538-562		-25, +5 bp	1	STN53
632-637		-6, +4 bp	1	MS80
640-653		-14, +3 bp	1	STN56

a) 塩基配列の下の矢印は逆方向反復配列を、上の横棒は欠失する領域を示す。突然変異後の配列の四角で囲んだ部分は挿入された配列を示し、変異前の塩基配列にはそれと相補的になっている配列部分を四角で囲んである。

表 1 2. 挿入型突然変異

部位	塩基配列の変化*	ヌクレオチド変化	発生回数	突然変異名
137-187		+51 bp	1	MS160

a) 挿入発生後、四角で囲んだ部分が挿入配列をはさんで倍加し、順方向反復配列を生じていた。また矢印も変異後にできた順方向反復配列を示す。塩基配列上の横棒で示される領域と全く同じ配列がこの下流に見つかった。

図の説明

図1. 染色体DNA中に組み込まれたシャトルベクターpZipHprtNeoの構造

シャトルベクターpZipNeoSV(X)1のBamHI部位にヒトhprt cDNA断片(斜線部分)を組み込み作製した。二重斜線部分はHPRTaseの構造遺伝子領域を、直線部分はMo-MuLVウイルスゲノムを、波線はマウスゲノムDNAをそれぞれ示す。LTR, Mo-MuLV由来long terminal repeat; HPRT, ヒトhprt cDNA; NEO, G418耐性遺伝子neo; SVori, SV40ウイルスのDNA複製起点; pBRori, プラスミドpBR322の複製起点。制限酵素切断部位: E, BamHI; H, HindIII; X, XhoI; C, ClaI。

図2. VH-12細胞より回収したプラスミドDNAの制限酵素切断パターン

VH-12細胞よりCOS細胞融合法により回収したDNAを大腸菌DH1に導入し、ネオマイシン耐性コロニーを得た。互いに独立ないくつかの耐性クローンからプラスミドDNAを回収し、BamHIまたはEcoRIとHindIIIで切断した後、0.8%アガロースゲルで電気泳動した(レーン1-10)。サイズマーカーとしてHindIII切断DNAを同時に流した(λHindIII)。中央の数字はマーカーDNA断片の大きさ(kb)を表す。矢印はBamHI切断パターンではhprt cDNAを含む1.6 kb断片を示し、EcoRI + HindIII切断パターンではneo遺伝子とhprt cDNAの一部を含む1.5及び1.6 kb断片を示す。

図3. 安定なHAT耐性G418耐性を示す形質転換細胞由来ゲノムDNAのサザン解析

細胞からゲノムDNAを回収し、BamHIまたはEcoRIで完全に切断した後サザン解析にかけた。プローブにはpZipHprtNeo DNA由来のhprt cDNAを含む1.6 kb BamHI断片を使用した。レーン1, 2, 3, 4の順にVH-1, VH-12, PH-1, ψ^- /PH-62。レーンMはBamHI切断pZipHprtNeo DNA。矢印と数字は並行して流したHindIII切断DNA断片の位置と大きさ(右側)、及びhprt cDNAを含むpZipHprt-Neo DNA由来BamHI断片の位置と大きさ(左側)を示す。

図4. 6TG選択法で得られたVH-12由来6TG耐性G418感受性変異クローン細胞のゲノムDNAのサザン解析

細胞から回収したゲノムDNAをBamHI (A) またはEcoRI (B) で完全に切断した後、サザン解析を行った。プローブにはpZipHprtNeo DNA由来のhprt cDNAを含む1.6 kb BamHI断片 (A)、またはneo遺伝子を含む2.2 kb XhoI断片 (B) を用いた。レーン1-7, 6TG選択法で得た互いに独立なVH-12由来6TG耐性G418感受性変異クローン細胞; レーンV, VH-12; レーンG, 2TGOR; レーンC, BamHI切断pZipHprtNeo DNA。右側の矢印と数字は並行して流したHindIII切断DNA断片の位置と大きさを表す。なおBで見られる約5 kbのバンドは全ての細胞に共通してみられるが、ベクターを持たない2TGOR (レーンG) でも見られることから、非特異的なシグナルと考えられる。

図5. マウス細胞におけるヒトhpert cDNA上の6TG耐性自然突然変異の分布

互いに独立な全51クローンの自然突然変異発生部位をpZiphpertNeo中のヒトhpert cDNA領域上に示す。帯の部分がヒトhpert cDNA部分を示し、直線部分はそれに隣接したベクターDNA領域である。帯の白抜き部分はHprtaseの構造遺伝子領域を示し、ローマ数字のついた各長方形はそれぞれゲノムhpert遺伝子上の各エクソン領域に対応している。下の数字は塩基の位置を示し、文献8に従ってcDNAの最初の塩基を1とし、それより上流の塩基は-1から順に負の数で表してある。図の下側の横棒は欠失した領域を示し、上側の横棒は挿入断片を示している。3 bpの欠失は他の欠失とともにIIで図の下に示してある。▽、フレームシフト； ▼、塩基置換； ○、欠失-挿入； ●、倍加。

図6. 自然突然変異で検出された倍加(A)及び欠失-挿入(B)の各変異型の発生機構モデル

図の最上段及び最下段はそれぞれ変異前と変異後の構造を示し、間の各段は変異発生の中間体を示す。各段の二本の実線は二本鎖DNAを示し、大小の矢印はそれぞれ逆方向反復配列、順方向反復配列を示す。白抜きの矢印と、斜線または黒の矢印が互いに相補的な配列になっている。Bの方形部分は挿入される配列を示し、中の矢印で方向性を表している。白抜きの方形と黒い(または網掛けの)方形とが互いに相補的である。波線で示した部分はその段階で新しく合成されるDNA鎖部分を意味する。

Figure 1

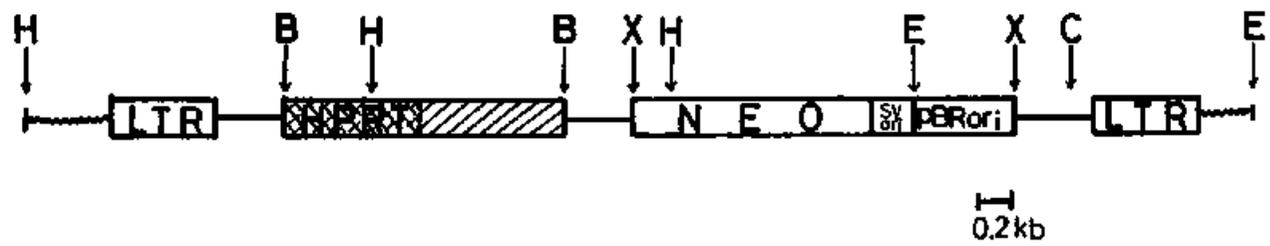


Figure 2

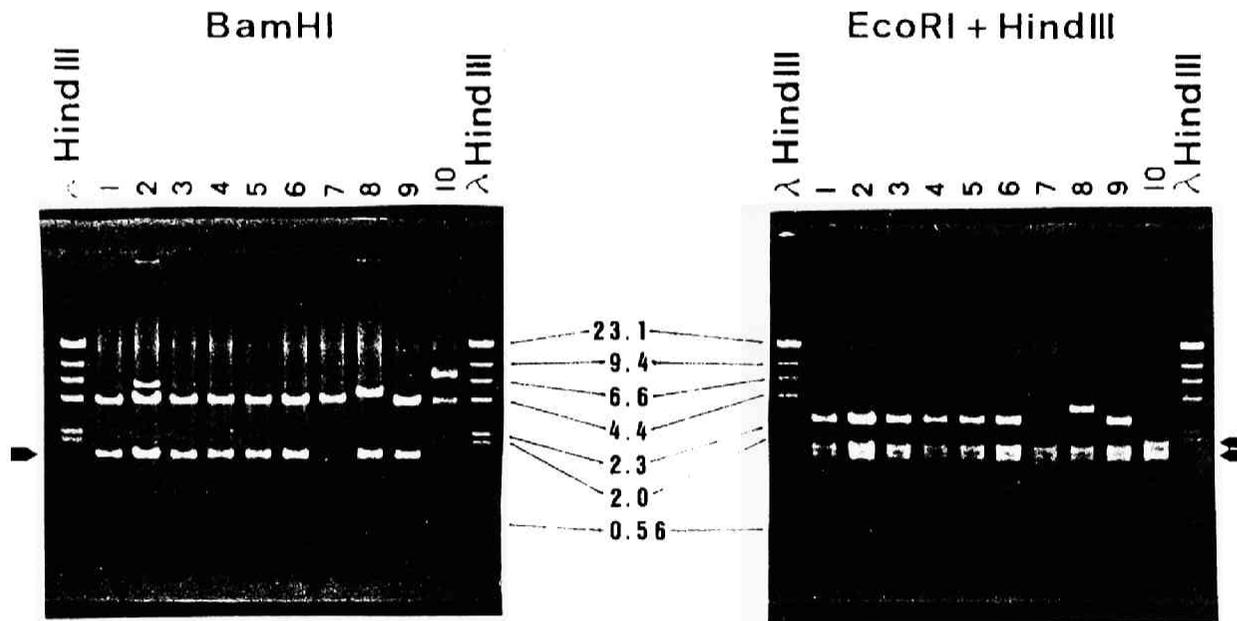


Figure 3

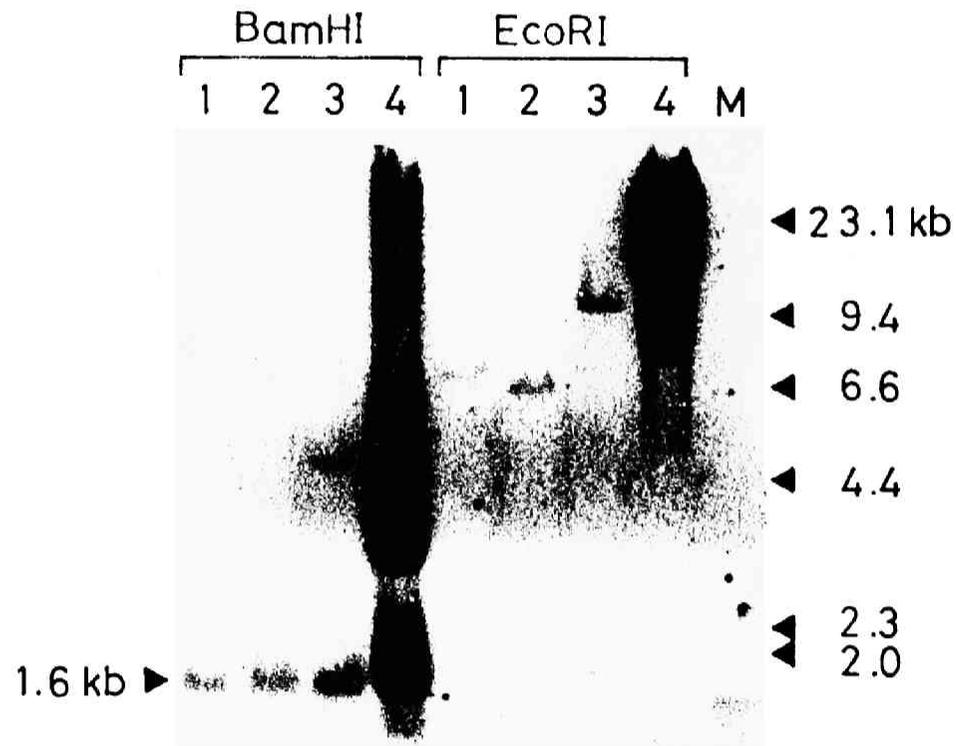
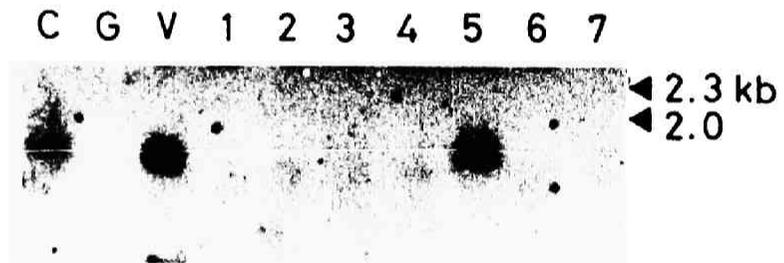


Figure 4

A



B

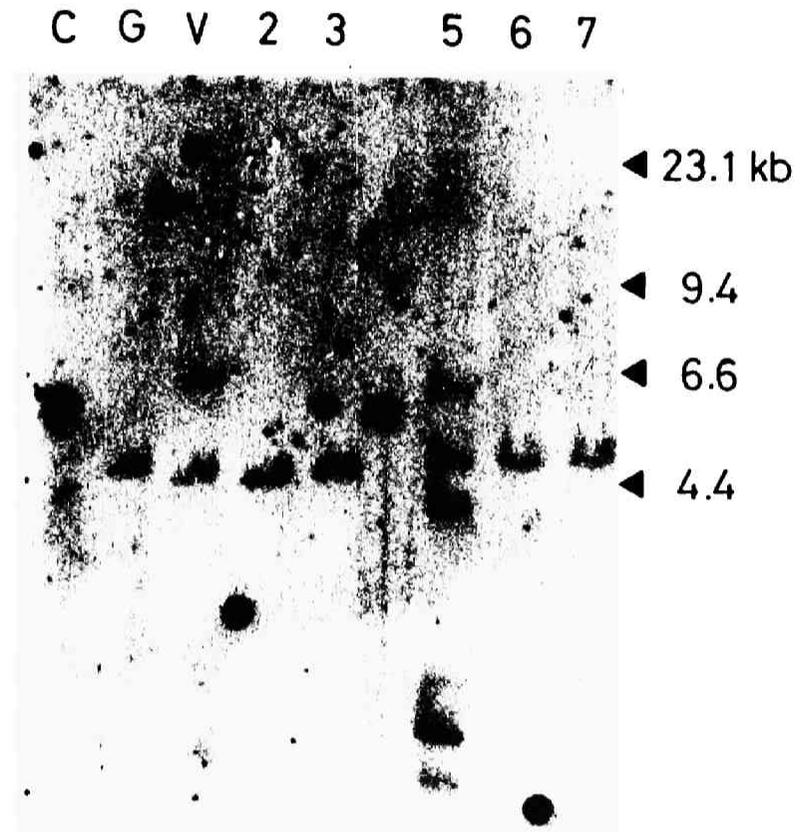


Figure 5

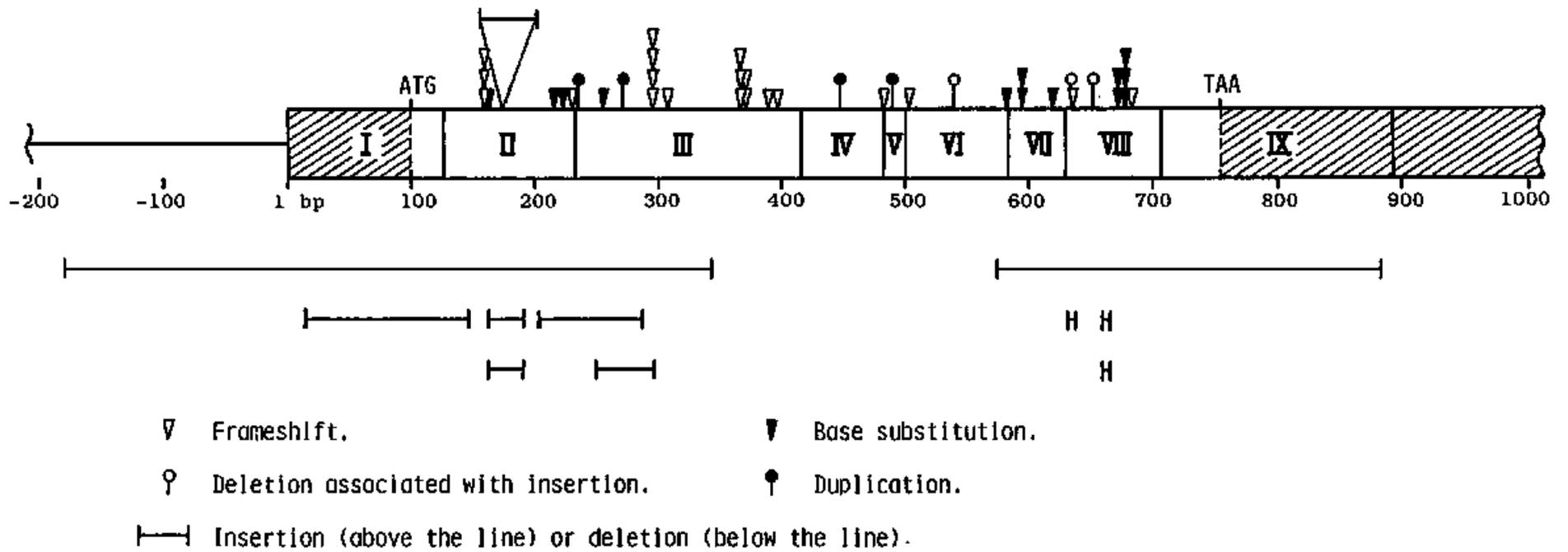


Figure 6

A. Duplication

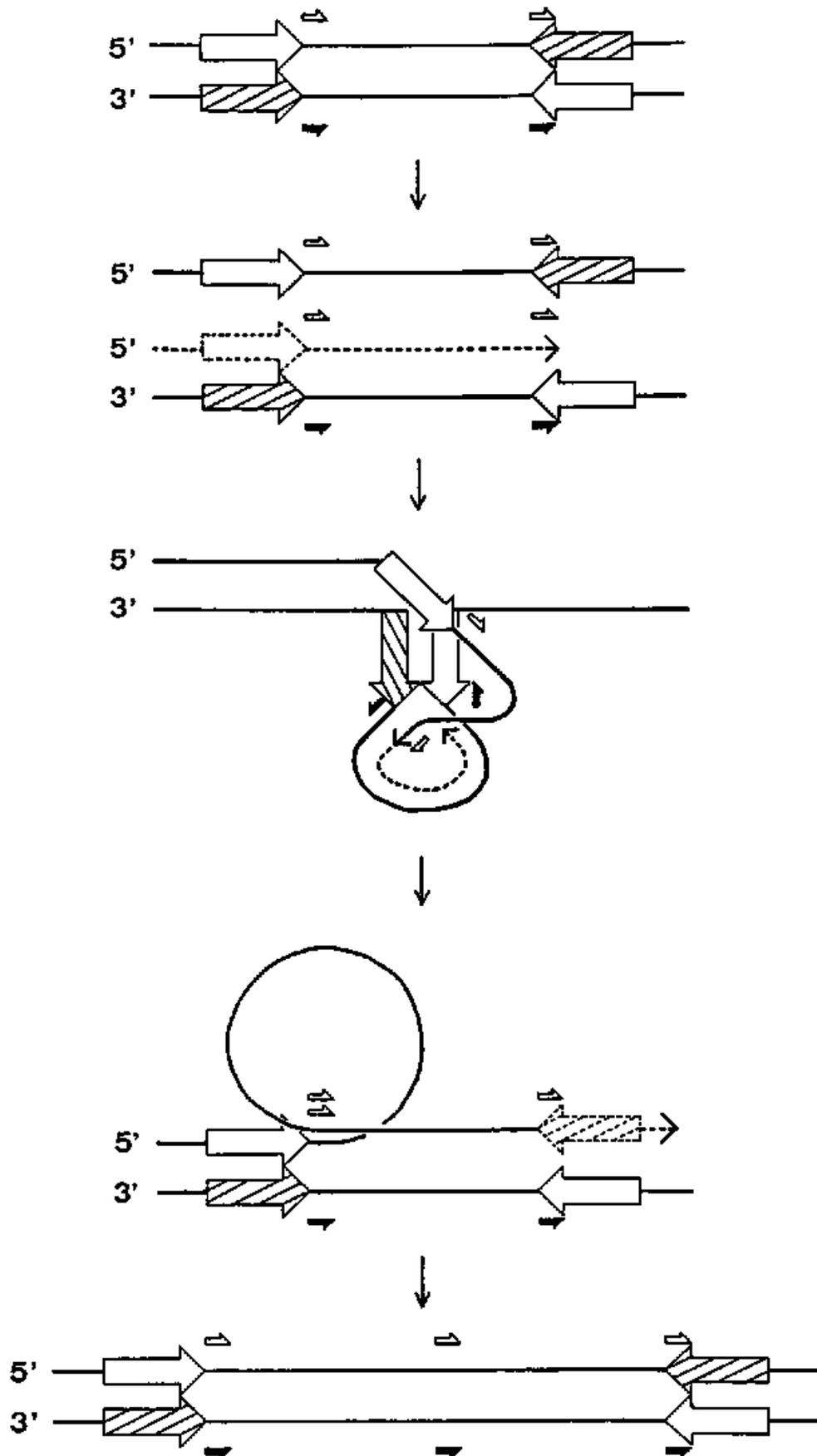


Figure 6

B. Deletion – Insertion

