

---

## シャトルベクターを用いた真核細胞での突然変異スペクトルの解析

A shuttle vector system for the study of mutational specificity  
in cultured mouse cells

代表研究者	大阪大学医学部講師 Lecturer, Fac. of Medic., Osaka Univ. Takashi KATO	加藤 武司
協同研究者	大阪大学微生物病研究所助手 Instr., Institute for Microbial Diseases, Osaka Univ. Hideo SHINAGAWA	品川 日出夫
	大阪大学医学部助手 Instr., Fac. of Medic., Osaka Univ. Yutaka ISHII	石井 裕
	大阪大学医学部研究生 Resercher, Fac. of Medic., Osaka Univ. Keiko KATO	加藤 敬子

We have developed a shuttle vector system for the study of mutational specificity of mutagens in culture cells. The 1.6 kb *Bam*HI-*Pst*I fragment of the plasmid pLPL, which contains 0.7 kb cDNA of the human HPRT gene, was ligated to the *Bam*HI cloning site of a retroviral shuttle vector pZipSVX1. A packaging mutant of Moloney murine leukemia virus was constructed by replacing the fragment of the left LTR region of plasmid pML-48 with the *Cla*I-*Bal*I fragment of pP8-2, which deletes a part of the packaging signal sequence  $\psi$  of M-MuLV. The mouse HPRT<sup>-</sup> cell 2TGOR (BALB/c 3T3) was transformed to HPRT<sup>+</sup> with pZipSVHPRT vector by following three ways; i) transfection with pZipSVHPRT DNA, ii) cotransfection with DNAs of pMOV $\psi^-$  and pZipSVHPRT, and iii) infection with the defective virus pZipSVHPRT produced from cells cotransfected with pMOV $\psi^-$  and pZipSVHPRT DNAs. Several tens of resulting HPRT<sup>+</sup> (HAT<sup>R</sup>) NEO<sup>R</sup> transformed clones of 2TGOR were selected. A few HAT<sup>R</sup> NEO<sup>R</sup> clones arised from cotransfection with pMOV $\psi^-$  and pZipSVHPRT DNAs release continuously defective virus particles packed vector RNA into culture medium. The HAT<sup>R</sup> NEO<sup>R</sup> transformed clones of 2TGOR were selected further for their stability of integrated vector DNA, which was judged from frequencies of spontaneous and EMS induced HPRT<sup>+</sup> to HPRT<sup>-</sup> mutations. Finally, six HAT<sup>R</sup> NEO<sup>R</sup> transformed clones (two from pZipSVHPRT DNA transfection, one from cotransfection with pMOV $\psi^-$  and pZipSVHPRT DNAs and three from infection with defective viruses) have ben established. The integrated vector pZipSVHPRT was recovered as Hirt DNA from these cell lines by COS cell fusion, and was amplified in *E. coli* BH101. The structure of the recovered NEO<sup>R</sup> plasmid DNA was examined by restriction enzyme digestion. More than 50% of the recovered plasmids found to retain unaltered structure of pZipSVHPRT and the remainders were partial or total deletions extending from the HPRT to LTR. DNA sequencing analysis of the mutant HPRT<sup>-</sup> genes are currently in progressing.

---

### 研究目的

突然変異には、塩基置換、欠失、フレームシフト

トなどの種類があり、変異原による誘発突然変異は変異原とDNAとの相互作用、細胞の修復作用

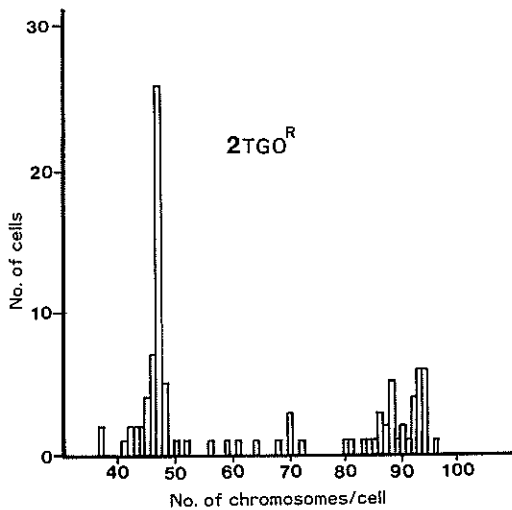


図 1. 2TGOR の細胞当たりの染色体数.

などを反映し特定のタイプの突然変異を特異的に誘発することが知られている。問題とする変異原がどんな種類の突然変異を、どんな割合で誘発するかがわかれば、突然変異生成機構を知るうえで重要な知見となる。原核細胞での突然変異生成機構の研究は、最近、遺伝子工学手技を応用して急速な発展をみせている。とりわけ突然変異を DNA 塩基配列の変化として同定する方法、変異原特異性を分析する研究は変異生成機構の解明に重要な知見を提供している。真核細胞の突然変異の研究は、系の複雑さもあって遅れており、変異原特異性の研究は緒についたばかりである。この研究では、これまで我々が手がけてきた大腸菌での突然変異生成機構の研究成果に基づき、研究の遅れている真核細胞での変異原特異性を解析する実験系を確立することにある。

#### 研究方法

この研究で目的とする多数の突然変異遺伝子の塩基配列変化を同定するためには、突然変異検出の容易な形質をもち、できるだけ小さい遺伝子であることが望ましい。また、検出される突然変異が普通の細胞でみられる一般的な突然変異事象を反映したものであることが望ましい。これらの事項を考慮して、突然変異検出に用いる遺伝子はクローンされたヒト HPRT (hypoxanthine phos-

phoribosyltransferase) 遺伝子の c-DNA を用いることとした。この HPRT 遺伝子は、0.7 kb と小さいこと、HPRT<sup>+</sup>→HPRT<sup>-</sup> の変異細胞の撰択は培地を HAT から 6TG 培地に変えることで容易に検出できること、および遺伝子は X 染色体にあることでこの研究に適した性質をもつ。この遺伝子を染色体に安定に組み込み発現させ、HPRT<sup>-</sup> 変異誘発後、分析のため回収する必要がある。そのためマウス由来のレトロウイルス (M-MuLV) をベースとしたシャトルベクター、pZipSVXI のクローニング部位に HPRT 遺伝子を挿入したものを、BALB/c マウスの 3T3 細胞由来の HPRT<sup>-</sup> 細胞に導入し、目的とする性質をもつ細胞株を樹立する。

#### 研究成果

##### i) マウス HPRT<sup>-</sup> 細胞 2TGOR の核型

使用するシャトルベクターが、マウス由来のレトロウイルスであるので、BALB/c マウス由来の 3T3 細胞で HPRT 遺伝子の一部欠失がわかっている 2TGOR を用いた。この細胞は、HPRT 遺伝子に欠失をもつため、HPRT<sup>-</sup> から HPRT<sup>+</sup> への復帰変異はみられず、その性質は安定している。また、核型 (カリオタイプ) も図 1 に示すように正常細胞の核型と極端な片寄りみられず突然変異の研究に使用できる。

##### ii) シャトルベクターおよびヘルパーウイルスの作製

ヒト HPRT 遺伝子の c-DNA をもつプラスミッド (pLPL) から、1.6 kb の HPRT 遺伝子を含む *Pst*-*Bam*HI DNA 断片を切り出し、*Bam*HI リンカーをつけてレトロウイルス由来のシャトルベクター pZipSVXI の *Bam*HI クローニング部位に挿入した (図 2, a)。このベクターは、選択マーカーとして原核、真核両細胞で使用できるネオマイシン抵抗性遺伝子 (NEO) と、大腸菌で複製させるための pBR322 プラスミッドの複製起点部分および SV 40 ウイルスの複製起点部分の DNA 断片が挿入されている。そのため、このシャトルベクターを染色体に組み込んだ細胞を、SV 40 ウイルスの増殖できる COS 細胞と融合させることによって、ベクター DNA が細胞質因子として簡

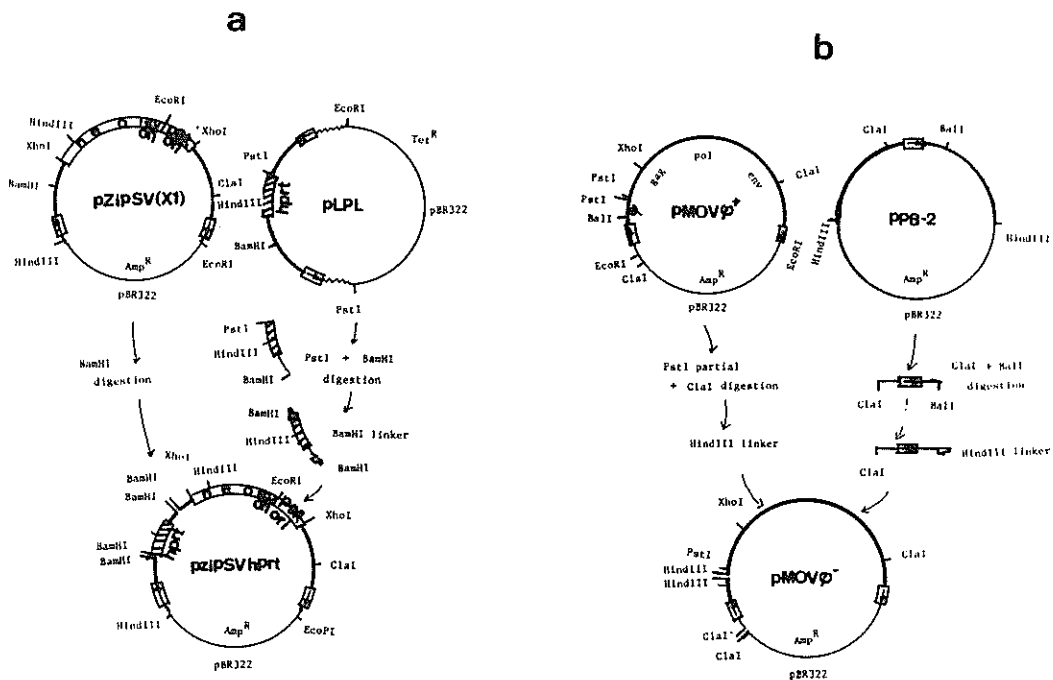


図 2. シャトルベクター, pZipSVHPRT (a) と  $\phi^-$  ヘルパーウイルス pMOV $\phi^-$  (b) の作製手順.

単に回収でき、それを大腸菌で増量できる。レトロウイルスの  $\phi$  遺伝子は、ウイルス RNA 外被コートへの組み入れ機能に関与し、 $\phi^-$  変異をもつウイルスは空のウイルス粒子を産生する。 $\phi^-$  ウイルスを  $\phi^+$  ではあるが、ウイルス複製に必要な遺伝子を欠く。欠損型ウイルスと同じ細胞に感染させると、 $\phi^-$  の産生する外被コートに欠損ウイルス RNA が組み込まれた感染性をもつ欠損ウイルス粒子が放出される。 $\phi^-$  変異ウイルスのこの特性を利用すると、シャトルベクター RNA をコートタンパクに取り込んだ欠損ウイルスが定常的に産出する細胞クローンを得ることができる。 $\phi^-$  ヘルパーウイルスは、モロニー白血病ウイルス DNA をもつプラスミッド pMOV $\phi^+$  から  $\phi^+$  シグナル配列を欠失させた pMOV $\phi^-$  を作製した (図 2, b)。

iii) シャトルベクターを組み込んだ細胞株の樹立

HPRT $^-$  細胞 2TGOR ベクター DNA pZipSV-HPRT により、HPRT $^+$  に形質転換させたクロー

ンを得るため、Ca $^{2+}$  法によるベクター DNA 感染と、ヘルパーウイルス  $\phi^-$  機能による欠損ウイルス感染法 (図 3) によって HAT $^R$  (HPRT $^+$ ) 細胞を選択した。ベクター DNA 単独感染から、35 株、 $\phi^-$  ウイルス DNA と共同感染から 65 株、欠損ウイルス感染法から 9 株の HAT $^R$  細胞クローンが得られ、そのうち NEO $^R$  形質を示すものが、それぞれ、19, 35, 6 細胞株であった (表 1)。 $\phi^-$  ウイルス DNA と共同感染によって得られた HAT $^R$  NEO $^R$  クローンのうち、 $\phi^-$  ヘルパー機能を示すもの (欠損ウイルス産生株) が 7 株あった。

これら HAT $^R$ , NEO $^R$  クローンについて、さらに自然誘発、および EMS 誘発 HPRT $^-$  変異の頻度を調べ EMS で誘発され、自然誘発頻度は正常細胞に近いものを選択し、6 個の細胞株が得られた (表 1)。これら細胞のクローンについて、この研究の目的に必要な性質、すなわち組み込まれたベクターの安定性、回収の可否、自然および誘発突然変異頻度、 $\phi^-$  ヘルパー機能について調べた。結果、表 2 に示すように、いずれの方法から

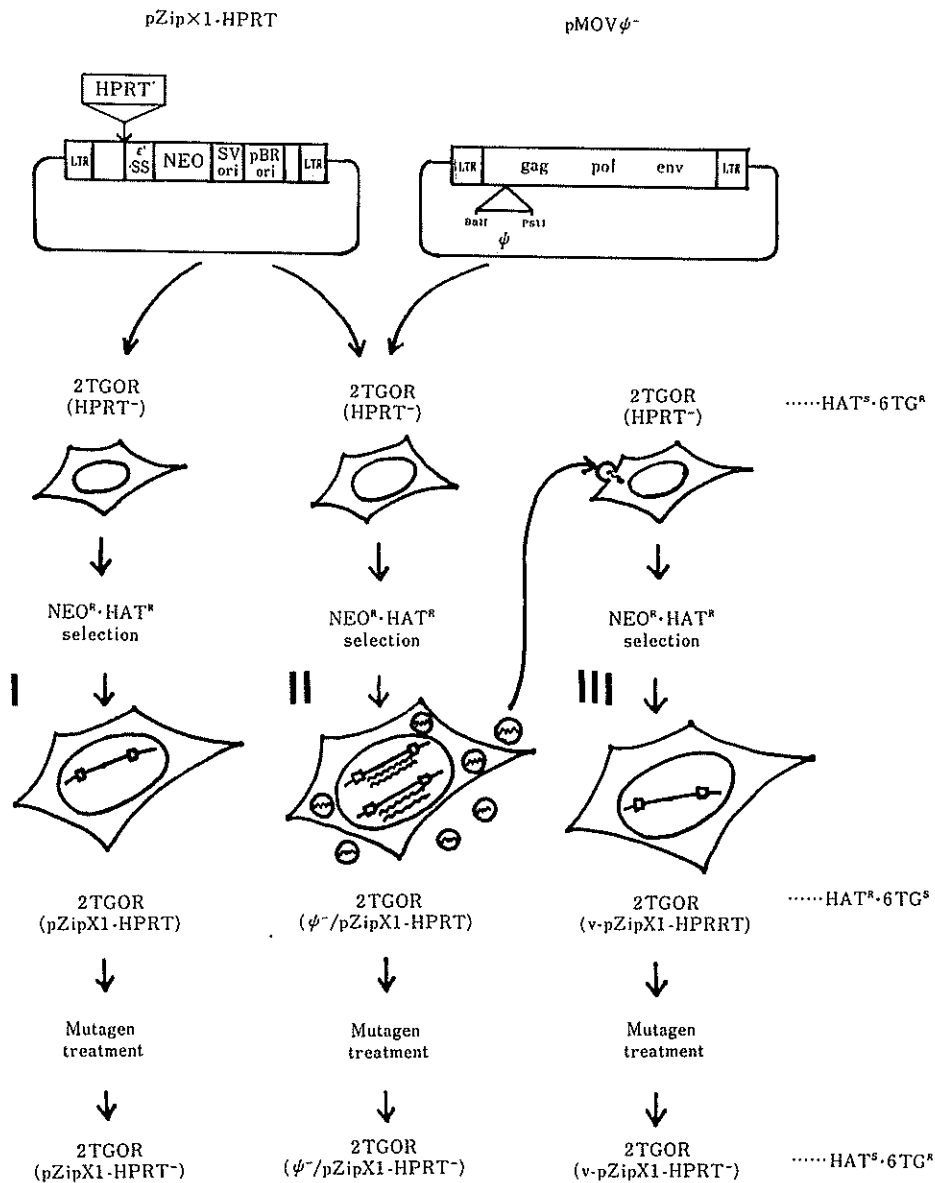


図 3. HPRT<sup>-</sup> 細胞 (2TGOR) のヒト HPRT 遺伝子 c-DNA による形質転換; I. シャトルベクター pZipSVHPRT の DNA による導入, II. ψ<sup>-</sup> ウィルス DNA, pMOVψ<sup>-</sup> とシャトルベクター DNA による重感染, III. 欠損型ウィルス感染による導入.

も目的とする細胞クローンが得られたが、欠損ウイルス感染法が最も効率良く、安定な形質転換細胞が得られるようである。

iv) ベクター DNA の回収

これまでに得られた、安定な HAT<sup>R</sup> 形質転換細

胞から COS 細胞との融合によるベクター DNA の Hirt 法による回収を調べた。一部まだ結果が得られていないが、COS 細胞との融合によってベクター DNA の回収が可能である (表 3)。回収されたベクター DNA の構造を制限酵素による分

**Table 1.** Preliminary characterization of the HAT<sup>R</sup> transformants of 2TGOR transfected with pZipSVHPRT

Mode of transformation	Number of transformants		The HAT <sup>R</sup> NEO <sup>R</sup> clones producing defective viruses	The HAT <sup>R</sup> NEO <sup>R</sup> clones with normal level of spont. 6TG <sup>R</sup> mutations
	HAT <sup>R</sup> (selected)	HAT <sup>R</sup> NEO <sup>R</sup> (unselected)		
Cotransfection with $\Psi^-$ and pZipSVHPRT DNAs	65	35	7	1
Transfection with pZipSVHPRT DNA	35	19	—	2
Infection with defective viruses	9	6	—	3

**Table 2.** Characteristics of the stably transformed HAT<sup>R</sup> cell clones

Cell line	Spont. mutation frequency HAT <sup>R</sup> or 6TG <sup>R</sup> /10 <sup>5</sup> cells	EMS induced mutations HAT <sup>R</sup> or 6TG <sup>R</sup> /10 <sup>5</sup> cells at 2 mmol. 16 hr.	Recovery of vector by COS fusion NEO <sup>R</sup> /5 × 10 <sup>5</sup> cells	$\Psi^-$ helper function HAT <sup>R</sup> c.f.u./10 <sup>6</sup> cells cultured medium
L5178Y	0.7	17	—	—
2TGOR	<0.02	<0.05	—	—
2TGOR/pZipSVHPRT-1	12	19	15	—
2TGOR/pZipSVHPRT-5	10	31.1	0	—
2TGOR/ $\Psi^-$ /pZipSVHPRT-43	900	—	29	1.5 × 10 <sup>3</sup>
2TGOR/ $\Psi^-$ /pZipSVHPRT-62	20	168	25	1.0 × 10 <sup>3</sup>
2TGOR/pZipSVHPRTv-1	9.5	25	63	—
2TGOR/pZipSVHPRTv-5	4	11.1	0	—
2TGOR/pZipSVHPRTv-12	6.5	88	227	—

**Table 3.** Structure of recovered vector DNAs deduced from restriction enzyme digestion

Cell line	Number of recovered NEO <sup>R</sup> vector plamids	Vector DNAs examined	Structure of vector DNA		
			I	II	III
2TGOR/pZipSVHPRT-1	16	13	5	1	6
2TGOR/pZipSVHPRT-5	0	0	—	—	—
2TGOR/pZipSVHPRT-31	31	21	11	3	7
2TGOR/ $\Psi^-$ /pZipSVHPRT-43	55	24	8	3	13
2TGOR/ $\Psi^-$ /pZipSVHPRT-62	38	19	2	3	14
2TGOR/pZipSVHPRTv-1	119	11	6	4	1
2TGOR/pZipSVHPRTv-5	0	0	—	—	—
2TGOR/pZipSVHPRTv-12	356	40	22	10	8

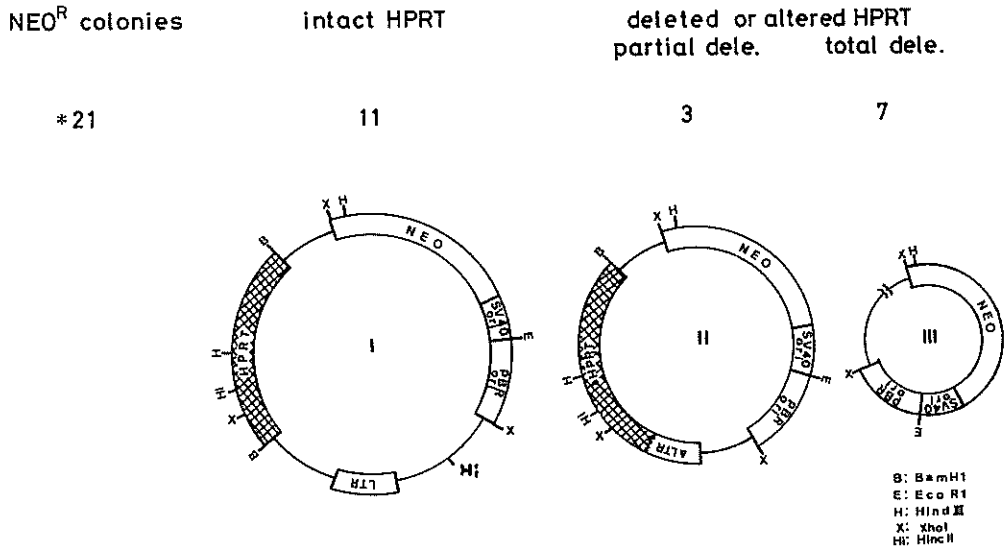


図 4. COS 細胞融合法によって回収されたベクター DNA の構造, 2TGOR/pZipSVHPRT-31 細胞と COS 細胞との融合によって回収された, 21 個の NEO<sup>R</sup> プラスミッド DNA を制限酵素による分解によって構造を調べた. 11 個は正常型 (I), 3 個は部分欠失型 (II), 7 個は HPRT 全欠失型 (III) であった.

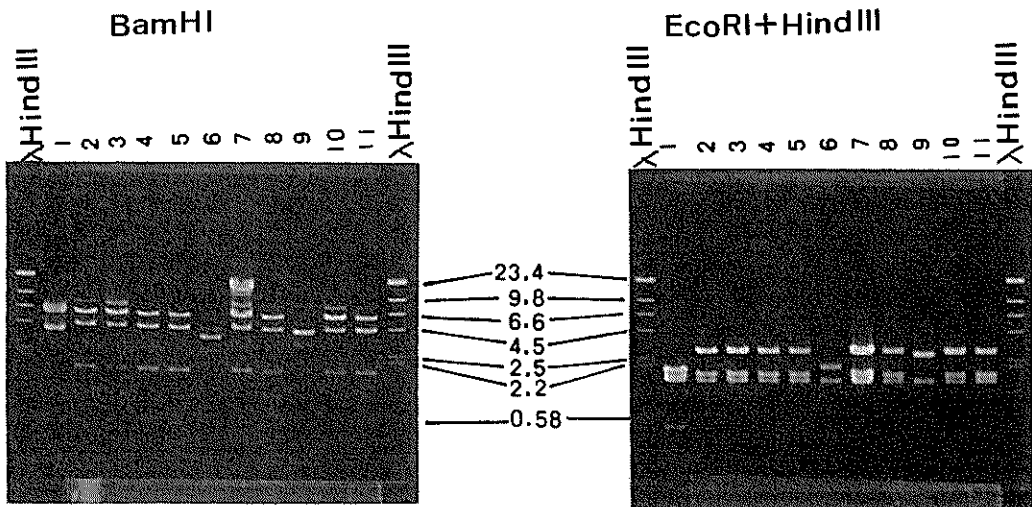


図 5. 回収されたベクター DNA の構造の制限酵素による分解パターンから判断する. 図の左側は, BamHI による分解, 右側は EcoRI と HindIII による分解の場合であり, この 2 種類の酵素による分解でタイプ I, II, III の構造判別が可能である.

解で調べると, 一部に欠失をもつものが回収されてくることがわかった (図 4, 5) その原因は COS 細胞との融合によって染色体に安定に組み込まれているベクター DNA が, SV 40 ウイルスの複製

系によって細胞質中で複製されると起きる組換え, または再構成によって生ずる, 回収されたベクターの 50% 以上は, 正常な構造 (タイプ I) を示した. 本研究の目的には, 正常な構造のベク

ター DNA が1つでも回収できればよいわけであるが、変異原処理した場合、HPRT 遺伝子に大きな欠失を伴う変異が生じ、正常型ベクター DNA が全く回収されない場合もあるので、無処理細胞から正常型ベクターの回収される頻度を詳しく調べておく必要がある。

#### v) ヒト HPRT 遺伝子の c-DNA 塩基配列

この研究で使用している HPRT 遺伝子は、すでに塩基配列がわかっている。突然変異特異性を調べるために、多数の異変 HPRT<sup>-</sup> 遺伝子について塩基配列を調べる必要があり、実験的に最も手間のかかる過程である。できるかぎり効率よく、変異部分の塩基配列を調べるため、回収したベクター DNA (二重鎖 DNA) をそのまま鋳型 DNA として、4 個の合成プライマーで HPRT 遺伝子の塩基配列を読み取る方法を現在実施中である。

#### 今後の課題

上記成果から、本研究が目的とした培養細胞での変異特異性の分析系は、ほぼ確立された。現在、この細胞系を用いて自然および X 線誘発の HPRT<sup>-</sup> 変異細胞クローンを多数収集中であり、それら変異 HPRT<sup>-</sup> 遺伝子の塩基配列を調べる予定であり、成果が期待できる。今後の課題として、次の2点について検討している。

(i) シャトルベクター改良; 現在のベクターでは、回収の過程で HPRT 遺伝子に生じる構造変化は、回収したベクター DNA の構造を制限酵素による分解パターンを調べないとわからない。X 線のように欠失変異を高頻度で誘発する変異原の場合には、とくにこの“偽の変異”と真の変異 HPRT 遺伝子の判別が重要になる。回収過程で生ずる、組換えなどによる偽の変異を簡単にチェックするため、HPRT 遺伝子の両側にマーカーとして NEO と SupF 遺伝子をもつベクターに改良する予定である。

(ii)  $\phi^{-}$  ヘルパーウイルス機能の活用; 本研究の当初から考慮していた  $\phi^{-}$  ヘルパーウイルス機能は、突然変異の特異性分析にはあまり重要な意味をもたないことが判明した。しかし、この研究で樹立した  $\phi^{-}$  細胞株 (ZTGOR/ $\phi^{-}$ /pZipSV-HPRT-62 および -43) は、定常的に欠損型ウイル

ス (pZipSVHPRT) を放出しているの、培地中の欠損ウイルスを感染させるだけで細胞への遺伝子導入が簡単に行なえるので役に立つ。現在この細胞を使って、マウス骨髄幹細胞への HPRT 遺伝子導入実験に使用しており、遺伝子治療への応用できる可能性がある。

#### 発表論文

Kato, T., Y. Oda and B. W. Glickman: Randomness of base substitution mutations induced in the *lacI* gene of *E. coli* by ionizing radiation. *Radiation Res.*, **147**, 101, 402-406 (1985).

Kitagawa, Y., E. Akaboshi, H. Shinagawa, T. Horii, H. Ogawa and T. Kato: Structural analysis of the *umu* operon required for inducible mutagenesis in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 4336-4340 (1985).

Oda, Y., S. Nakamura, I. Oki, T. Kato and H. Shinagawa: Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Res.*, **147**, 219-229 (1985).

Kato, T.: Inducible mutagenic repair processes in *E. coli*. An overview. Proceedings of the XXIV Ganna Field Symp., Ohmiya, Japan, 1985, in press.

Makino, K., H. Shinagawa and A. Nakata: Regulation of the phosphate regulon of *E. coli* K-12: Regulation and role of the regulatory gene *phoR*. *J. Mol. Biol.*, **184**, 231-240 (1985).

Ishii, Y., and M. Watatani: Cell-stage dependence of the formation of SCEs and chromosomal aberrations. In "Sister Chromatid Exchanges" Eds., R. R. Tice and A. Hollander, Plenum Press, pp. 173-180 (1984).

加藤武司: 突然変異の分子機構, *Radioisotopes*, **34** (6), 334-343 (1985).

加藤武司, 北川義徳: *umuc* 依存性変異誘発機構. "放射線による遺伝損傷とリスク" 第15回放射シンポジウム報文集, pp. 41-52 (1985).

品川日出夫, 中田篤男, 小田善光, 中村清一, 加藤武司: *umu*-テストによる環境変異原の検出, *トキシコロジーフォーラム*, **8**(5), 580-856 (1985).

#### 口頭発表

加藤武司, 石井 裕, 今井幸子: シャトルベクターによる放射線誘発突然変異の特異性分析. I: 系の特性, 日本放射線影響学会 (奈良), 昭和60年10月.

加藤武司, 今井幸子: 変異原特異性と変異誘発機構, 日本環境変異原学会 (秋田). 昭和60年9月.

Kato, T., S. Nakamura, Y. Oda and H. Shinagawa: Evaluation of *umu*-test for the detection of

environmental mutagens and carcinogens.  
U. S.-Japan Cooperative Medical Science Pro-  
gram. 14th Joint Conference on "Deployment

of Short-term Test for Environmental Muta-  
gens and Carcinogens", May 1986 (Nikko).