
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

Shuttle vector system for the study of mutagenesis in cultured mouse cells

代表研究者	大阪大学医学部講師 Assist. Prof., Faculty of Med., Osaka Univ. Takesi KATO	加藤 武 司
協同研究者	大阪大学医学部助教授 Assoc. Prof., Faculty of Medi., Osaka Univ. Yutaka ISHII	石 井 裕
	京都大学理学部大学院生 Grad. Student, Graduate School of Sci., Kyoto Univ. Hironobu IKEHATA	池 畑 広 伸
	大阪大学医学部研究生 Res. Student, Faculty of Med., Osaka Univ. Keiko KATO	加 藤 敬 子

cDNA Of the human *hprt* gene was introduced into the *Bam*HI cloning site of the retroviral shuttle vector pZipNeoSV(X)1. The mouse cell line 2TGOR, a hypoxanthine phosphoribosyltransferase deficient derivative of Balb/c 3T3, was transformed with the vector and a few stably transformed HAT^rNEO^r clones were established. One of the clones, VH-12, contained a single integrated copy of the vector in a proviral form. Using the VH-12 clone, we were able to identify HPRT⁻ mutants arisen from mutations in the *hprt* gene by a single step of selection for the 6 TG^rNEO^r phenotype, recover efficiently the mutant *hprt* genes from the clonal population of the mutant cells by COS cell fusion, and identify mutational alterations in the mutant *hprt* genes by DNA sequencing. A relative small size of the *hprt* gene (700 base-pairs of the coding region) allowed quick sequencing of the entire gene, and mutated sequences of fifteen *hprt*⁻ genes have been determined. The properties of our shuttle vector system were particularly useful for analysis of the molecular mechanisms of mutational events in chromosomal DNA of mammalian cells.

I. 研究目的

生命体の基本的要素である遺伝子の特性は、その安定性と可変性にあり突然変異事象は遺伝子に無限の可変性を与える源泉として、生物進化の原動力となっている。それゆえ、突然変異生成機構の解明は、生命現象の理解に重要な知識をもたらすのみならず、現実的にはヒトの遺伝病はもとより、癌、老化などの要因となる遺伝子変異の解明に役立つ。

原核細胞の突然変異生成機構の研究は、遺伝子工学手技の導入によって、近年急速に進歩してい

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による研究は、変異生成機構の解明に重要な知見を提供している。真核細胞での突然変異生成機構の研究は系の複雑さのため、これまでほとんど手がつけられていない。本研究は、未開拓の真核細胞での突然変異生成機構を解明するため、昨年度の研究助成によって樹立したシャトルベクター系を用いて、マウス培養細胞での誘発突然変異を詳細に分析する。また使用した標的遺伝子、ヒト HPRT 遺伝子の変異はヒト遺伝病として知られる Lesch-Nyhan 症候群の病因

であり、得られた分析結果とヒト HPRTase 欠損症患者の変異 HPRT 遺伝子とを比較検討する。

II. 研究経過と成果

II-1. 研究経過の概要

昨年度の助成研究によって樹立した、シャトルベクターによる突然変異解析系について、以下概略を説明する（昨年度報告書参考）。

a) シャトルベクター PZipHprtNeo

ヒト HPRT 遺伝子の cDNA (0.7 kb) を突然変異検出用として、レトロウィルス由来のシャトル

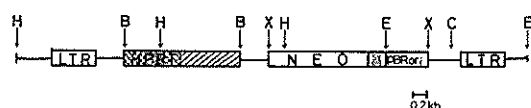


図 1. シャトルベクター pZipHprtNeo の構造。

レトロウィルス由来のシャトルベクター pZipNeoS(V) の *Bam*HI クローニング位置に 1.6 kb のヒト HPRT 遺伝子の cDNA を挿入した。HPRT 遺伝子のコーディング領域は約 700 bp、で選択マーカーとして NEO 遺伝子、培養細胞内で複製できるための SV40 ウィルスの複製起点、大腸菌での複製のため PBR 322 の複製起点を含む領域、およびレトロウィルスの LTR を含む。H, *Hind*III; B, *Bam*HI; X, *Xho*I; E, *Eco*RI; C, *Cl*aI。

ベクターに挿入したものを作成した (図 1)。このベクター DNA を、HPRT⁻ マウス培養細胞 (2TGOR) の染色体に安定に組み込んだ細胞クローンを選択し、実験系を樹立する。突然変異解析系として要求される条件は、(i) 標的遺伝子に生じた突然変異を容易に検出できること、(ii) 変異遺伝子分析のためベクターが回収できること、(iii) 変異部分の塩基配列が同定可能なこと、である。シャトルベクターを染色体に組み込んだ多数の細胞クローンの中から、上記条件を満たすものを選んだ。

b) ベクターを組み込んだクローン細胞の選択

HPRT⁻ マウス培養細胞に、HPRT⁺ 遺伝子をもつベクター DNA を導入することによって HPRT⁺ 形質となった細胞クローンは、i) ベクター DNA 単独感染、ii) ベクターとヘルパーウィルス DNA の同時感染、iii) 欠損ウィルスによる感染、の 3 法によって得た。HPRT⁺ と HPRT⁻ 形質細胞の選択は、それぞれ HAT 培地と 6TG 培地での生育の可否によって簡単に選択できる。多数の HPRT⁺ 細胞クローンのうち、HPRT⁺ → HPRT⁻ への自然誘発変異頻度が正常

Table 1. Characteristics of stably transformed HAT^rNEO^r clones.

Cell line ^{a)}	Spontaneous mutation frequency of HAT ^r or 6TG ^r /10 ⁵ cells	EMS-induced mutations of HAT ^r or 6TG ^r /10 ⁵ cells at 2 mM for 20 hr	Recovery of vector by COS fusion (NEO ^r /1 × 10 ⁶ cells) ^{c)}	φ ⁻ helper function HAT ^r c.f.u./10 ⁶ cells in culture medium ^{d)}
L5178Y	0.7	17	-	-
2TGOR	0.02 ^{b)}	0.05 ^{b)}	-	-
PH-1	12	19	15	-
PH-5	10	31	0	-
φ ⁻ /PH-62	20	168	25	1.5 × 10 ³
VH-1	9.5	25	63	-
VH-5	4	11	0	-
VH-12	6.5	88	227	-

^{a)} Cell lines designated pH, φ⁻/pH, and VH were derived from transfection with pZipHprtNeo DNA, transfection with pZipHprtNeo and pMOVφ⁻ DNAs, and infection with defective viruses, respectively.

^{b)} 2TGOR cells were not reverted to HAT^r spontaneously or by EMS treatment so far the indicated numbers of cells were examined.

^{c)} The amount of plasmid DNA recovered following COS fusion varied from experiment to experiment, the numbers shown are the maximum for repeated experiments.

^{d)} The φ⁻ helper function was expressed as the number of HAT^r colony forming units in 1 ml of culture medium supporting the growth of confluent cells in a 10 mm dish.

細胞の頻度に近く、かつ変異原 (EMS) 処理によって容易に HPRT⁻ 変異の誘発されることを指標に選択し、6 クローンを得た。その6 クローンのうち、2 クローン細胞からは COS 細胞との融合によるベクターの回収ができないことがわかった (表 1)。残りの 4 クローン細胞から DNA を抽出し、細胞の染色体に組み込まれているベクター DNA のコピー数をサザンブロッティングに

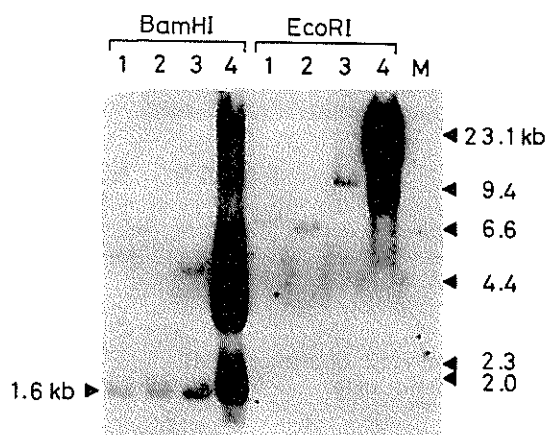


図 2. HAT'NEO^r クローン細胞染色体に組み込まれたベクターのコピー数。

安定な HAT'NEO^r 形質転細胞の染色体 DNA に組み込まれたベクターのコピー数を推定するため、細胞より抽出した DNA を *Bam*HI と *Eco*RI で分解し、HPRT 遺伝子を含む 1.6 kb の *Bam*HI 断片をプローブとしたサザンブロッティング。レーン 1, VH-1; レーン 2, VH-12; レーン 3, PH-1; レーン 4, ϕ^- /PH-62; レーン M, pZipHprtNeo DNA。

よって調べた結果 (図 2), VH-12 と PH-1 細胞は、それぞれ 1 コピーのベクター DNA, VH-1 は 2 コピー、 ϕ^- /PH-36 は複数個コピーのベクター DNA をもつことがわかった。この結果、PH-1 と VH-12 が本研究の目的に使用できることを示している。 ϕ^- /PH-36 は、複数個のベクターを染色体に組み込んでいるため、突然変異の研究には不適當であるが、ベクター RNA を欠損ウィルスとして培地中に常時放出しているの、HPRT⁻ 遺伝子の他細胞への簡単な導入系として利用できるクローンとして遺伝子転送研究に応用できる有用な系である。

c) ベクターの回収

前述の 6 クローン細胞について、ベクター DNA の回収効率、回収されたベクター DNA の構造、および回収過程で標的 HPRT 遺伝子に変異が生じていないことを確認した。

COS 細胞との融合によって、染色体に組み込まれているベクター DNA に含まれる SV 40 ori 遺伝子が COS 遺伝子機能によって活性化され、ベクター DNA が複製、増幅され細胞内にプラスミッドとして蓄積される。回収は、このプラスミッドを Hirt 法によって取り出すのであるが、表 2 に示すごとく回収効率は各クローンごとに異なる。詳細は不明であるが、多分ベクターの組み込まれた染色体上の位置が影響しているようである。回収されたベクター DNA の構造を調べるため、個々のベクターを大腸菌で増幅し、制限酵素分解によって分析した (図 3)。回収されてくる

Table 2. Structure of recovered plasmid DNA deduced from restriction enzyme digestion.

Cell line	Number of recovered NEO ^r plasmids ^{a)}	Number of plasmid DNAs examined	Structure of plasmid DNA ^{b)}		
			I	II	III
PH-1	16	13	6	1	6
PH-5	0	0	-	-	-
ϕ^- /PH-62	38	19	2	3	14
VH-1	117	11	6	4	1
VH-5	0	0	-	-	-
VH-12	365	40	22	10	8

^{a)} The sum of experiments repeated at least twice.

^{b)} Plasmid DNAs recovered were digested with *Bam*HI and *Eco*RI+*Hind*III, and the structure of DNA was deduced from the patterns of bands in agarose gel as described in the text.

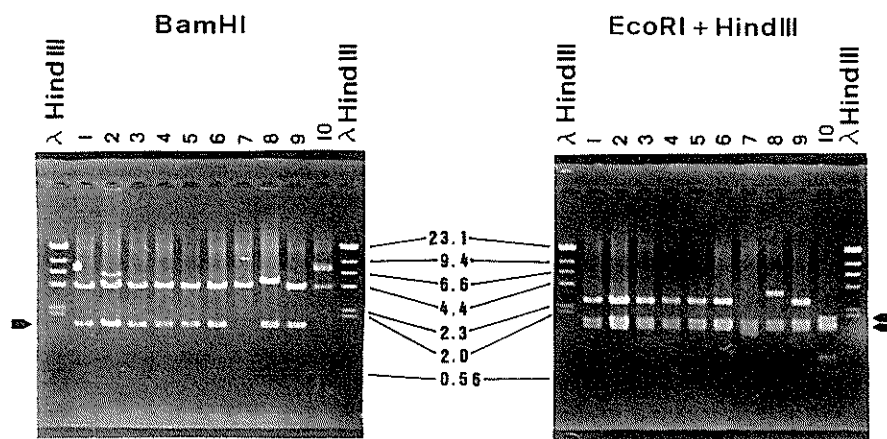


図3. ベクターの回収と構造解析.

COS細胞との融合によって、Hirt DNAとして回収されたベクターDNAを、大腸菌で増量した後、制限酵素分解によって構造を回折した。Hirt DNAによってNEO^rとなった大腸菌の培養液1.5 mlから、アルカリ抽出法によってプラスミッドDNAを抽出し、*Bam*HIおよび、*Eco*RI+*Hind*IIIによる分解の後、アガロース、ゲル電気泳動にかけた。泳動パターンの両端は、分子量マーカーであるλファージDNAの*Hind*III分解したもの、それぞれ表示した大きさのバンドを示す。

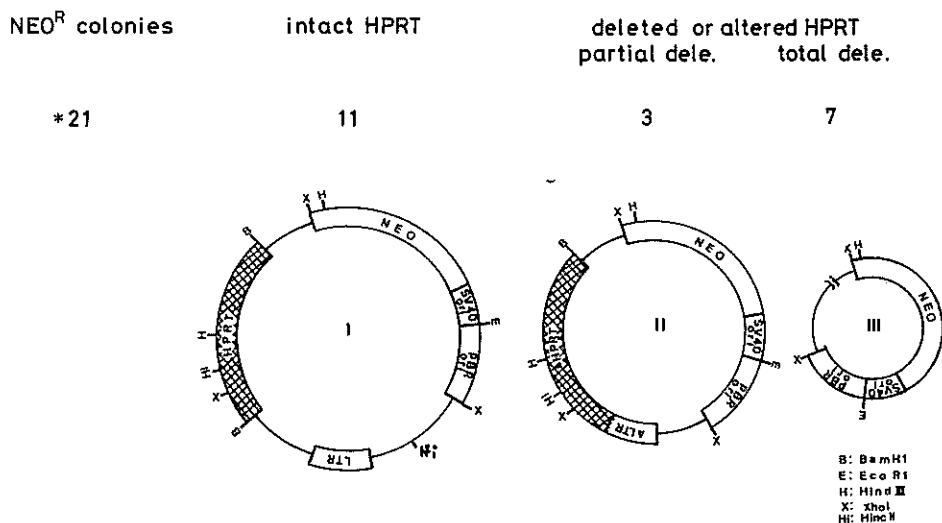


図4. 回収されたベクターの構造.

ベクターの構造は、*Bam*HIと*Eco*RI+*Hind*III分解によるバンドのパターンから、HPRT遺伝子が正常であるかどうかを目安に区分した。タイプIは元のベクターの構造を保ったもの、タイプIIはHPRT遺伝子の5'側に欠失(5'側*Bam*HI部位を失なった)をもつもの、タイプIIIはHPRT遺伝子を含む1.6 kbのフラグメント全体を失なっているもの。

ベクターDNAの構造は多種にわたるが、次の3種に分類した。Type Iは、元のベクターの構造をもつもの Type IIは、HPRT遺伝子の一部が欠失しているもの、Type IIIはHPRT遺伝子全

体を失ったもの、である(図4)。このように種々な構造をもつベクターDNAが回収されてくるのは、COS細胞との融合によって細胞内で増中される際に、組換えや再構成などが高頻度に生ずるた

Table 3. Frequencies of mutagen-induced 6TG^r and 6TG^rNEO^r mutations in the VH-12 cell line.

Mutagen	Frequency of induced mutations/10 ⁵ cells*		Ratio of 6TG ^r to 6TG ^r NEO ^r mutations
	6TG ^r	6TG ^r NEO ^r	
Spont.	9.0	2.5	3.6
ENS	100	30	3.3
UV	20	6.5	3.1
X-rays	200	15	13.3

* Frequencies of mutagen-induced mutations were those exposed at doses of 2 mM × 20 hr, 10 J/m² and 500 rad, respectively for EMS (ethyl methanesulfonate), UV (ultraviolet light) and X-rays. For the selection of 6TG^r and 6TG^r NEO^r mutants, 1×10⁵ cells from a sample of the treated culture was inoculated into 100-mm dishes containing 6TG or 6TG NEO medium, respectively. The frequency of mutations was corrected by the plating efficiency.

Table 4. Mutant *hprt*⁻ genes and the 6TG^r phenotype in VH-12 cells.

Number of 6TG ^r clones selected in 6TG medium		Number of the mutant clones in which the <i>hprt</i> and <i>neo</i> genes were detected by blot	Number of the mutant clones produced active Hirt DNA to transform <i>E. coli</i> to NEO ^r
49	32(NEO ^s)	1/7	0/7
	17(NEO ^r)	NT	7/7

めであるらしい。しかし、本研究の目的には、回収過程で変化を受けていない Type I のベクター DNA が 1 個回収できれば十分であり、また、Type I のベクターが 1 個でも回収されるということは、染色体に組み込まれたベクターが正常な構造をもったものであることを示している。

以上の結果から、我々は VH-12 細胞を突然変異解析系に最も適したクローンとして選んだ。

II-2. 研究成果

昨年度の研究によって、マウス培養細胞での突然変異解析のために必要な条件を満たすシャトルベクター系として、VH-12 細胞クローンを樹立できた。今年度は、この系を用いて変異原によって誘発された HPRT⁻ 突然変異の詳細な解析を行なった。

a) 変異原誘発 HPRT⁻ 変異細胞クローンの収集

VH-12 細胞を各種変異原で処理し誘発される HPRT⁻ 突然変異頻度は、表 3 に示すように 6TG 培地と、6TGNEO 培地で変異細胞を選択したとき 6TG 培地の場合、自然誘発、UV、EMS 処理のいずれも 6TG、NEO 培地で選択したときより数

倍高く、X 線誘発の場合は、その差はさらに高くなる。この現象は、我々の使用しているシャトルベクターが、レトロウィルス由来のベクターであること、標的遺伝子の HPRT⁻ 変異を 6TG 抵抗性形質として検出していること、の 2 点が原因として考えられるのでさらに詳細に検討した。

図 1 に示すように、使用したシャトルベクターはレトロウィルスの基本構造である LTR を両端にもつ。したがって一つの可能性は、変異原処理によって両端の LTR 間の組換えでベクター全体が抜け落ちる頻度が高いことが考えられる。もう一つの可能性は、HPRT と NEO 両遺伝子の転写は、5' 側 LTR にある同一プロモーターによる調節下であり、変異原処理によってその転写と調節の阻害を受けることである。いずれの場合も HPRT、NEO 遺伝子の発現はなく、6TG^R、NEO^S の形質を示すはずである。しかし前者の場合、HPRT、NEO 両遺伝子とも欠失しているが、後者の場合両遺伝子そのものは存在している。いずれの可能性かを検討するため、自然誘発 6TG^R クローン細胞、49 クローンについて NEO 抵抗性を調べると約 2/3 のクローンは NEO^S であった

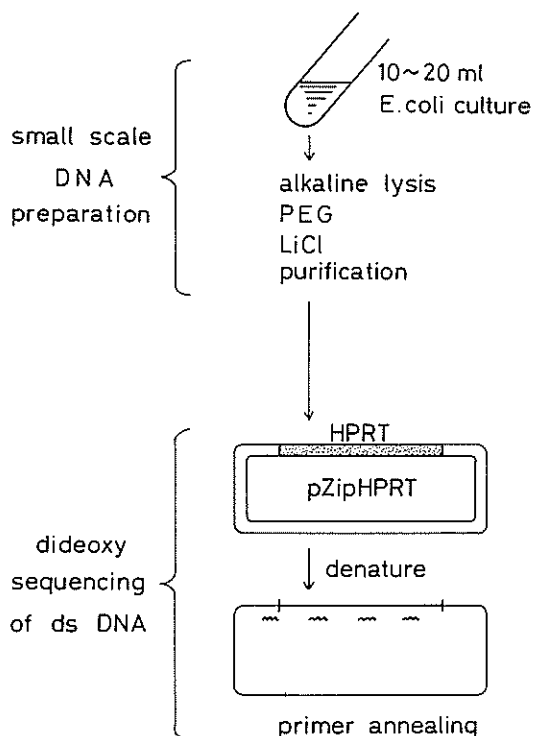


図5. HPRT 遺伝子のシーケンシング手順。
突然変異をもつ *hprt*⁻ 遺伝子をプラスミッド DNA として 15~20 ml の大腸菌から、アルカリ抽出法で精製する。HPRT 遺伝子の全体 (約 700 bp) をカバーするよう、4ヶ所 (約 200 bp 間隔) から合成プライマーによって二重鎖のまま、dideoxy 法でシーケンスする。

(表4)。それら 6TG^R NEO^S クローンのうちからランダムにクローンを探り、DNA を抽出し HPRT, NEO 遺伝子 DNA をプローブとしてサザン、ブロットを行なった結果、6 クローンでは両遺伝子とも検出されなかった。すなわち、6TG^R NEO^S クローン細胞の大半は、ベクター DNA 全体の欠失によることが確認された。一方、6TG^R NEO^S クローンから任意に採った7クローン全てから COS 融合によってベクターが回収でき、回収されたベクターの構造から、変異 HPRT 遺伝子が存在することがわかった。以上の結果から、VH-12 細胞では 6TG^R NEO^S 形質の選択によって得た HPRT⁻ 変異細胞クローンは、ベクターのもつ HPRT 遺伝子に変異を持つものであることが保証される。

b) 変異 HPRT⁻ 遺伝子の回収と変異 DNA 塩基配列の同定

VH-12 細胞から 6TG NEO 培地で選択した 6TG^R NEO^S 細胞は、ベクターの HPRT 遺伝子に変異をもつものであることが確認できたので、変異原処理によって誘発された 6TG^R NEO^S 変異細胞クローンを多数収集し、個々の変異クローンから Type I 型ベクター DNA を回収している。

現在、自然誘発 HPRT⁻ 変異遺伝子の変異部分の DNA 塩基配列変化を同定する作業が進行中で

Table 5. Spontaneous mutations detected in the c-DNA of HPRT gene, which was integrated as a part of shuttle vector in a chromosome of mouse cell line V12.

mutant gene	site	mutational change	altered sequence
STN-4	138-142	ACTGA TGAAC duplication CTGAA	GGACTGAACGTCTT → GGACTGAAC ^{ACTGA} TGAAC ^{CTGAA} GTCTT <i>ThrGluArgLeu</i>
STN-28	176	G → T	GGAGG ^G CCATCAC → GGAG ^T CCATCAC <i>GlyGlyHisHis</i> → <i>GlyValHisHis</i>
STN-26 STN-31 ST-21 ST-14	196-201	- TG or GT	CTCTG ^{TG} TGCTCAAG → CTCTG ^{GT} TGCTCAAG <i>LeuCysValLeuLys</i>
STN-3 ST-5	496	A → T	GTGAAAAGGACC → GTGTAAAGGACC <i>ValLysArgThr</i> → <i>ValNonArgThr</i>
STN-8	573	T → A	TATGCCCTTGAC → TAAGCCCTTGAC <i>TyrAlaLeuAsp</i> → <i>NonAlaLeuAsp</i>
ST-9 ST-19 STN-29 X500-TN-2	580	G → T	CCCTTGACTAT → CCCTTACTAT <i>LeuAspTyr</i> → <i>LeuTyrTyr</i>

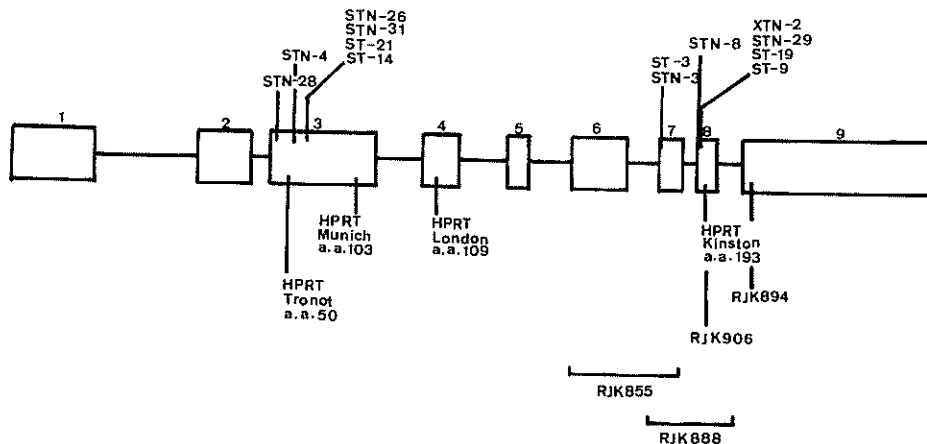


図6. cDNAでの自然誘発変異とゲーム遺伝子上の変異、位置。

シャトルベクター系で同定されたcDNAでの自然誘発突然変異の位置と、ヒトHPRTase欠損症患者で同定された突然変異の位置を示す。ゲームHPRT遺伝子は模式的に描かれ、イントロンの大きさは任意に変えてある。各エクソンの相対的大きさは実際のものに合せてある。上側に、cDNAで同定した突然変異、下側にゲーム遺伝子で同定された突然変異の位置を示した。

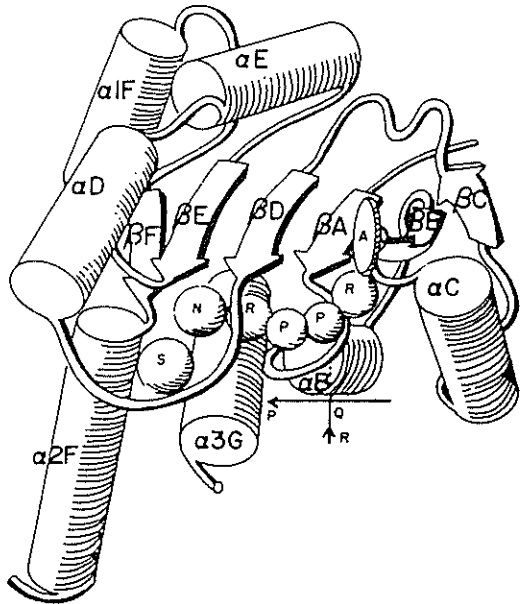


図7. HPRTaseの立体構造と機能部位推定図。

機能的に類似性をもつ、構造のよくわかった、小鯨乳酸脱水素酵素の基質結合ドメインの推定図。HPRTaseや、ATPase、PRaseなど機能的に類似した酵素のアミノ酸配列には、ホモロジーがみられ同様の機能部位の存在が示唆されている。(P. Argos, et al., *J. Biolo. Chemist.*, 258, 6450-6457 (1983) より転載)

あり、これまで17例について同定されている。DNA塩基配列の決定は、回収したベクターDNAを直接鋳型とし、HPRT遺伝子のコーディング領域を含む800~900塩基を解読できるよう、200塩基間隙に四つの合成プライマーを用いたdidoxy法で行なっている(図5)。変異原特異性を知るためには、一つの変異について少なくとも100列の誘発変異HPRT⁻遺伝子の解析が望まれる。17列の自然誘発HPRT⁻変異遺伝子の解析結果を表5に示した。例数不足のため結論的な記述はできないが2~3の興味ある知見が読みとれる。196-201番目のTGTGTG繰返し配列での-TG欠失と580番目塩基でのT→G塩基置換の高頻度誘発は、ホットスポットを想定させる。また、同定された突然変異の大半は塩基置換とまたは2塩基の欠失で、予想された大きい欠失はまだ見つかっていない。いずれにしろ詳細な検討はスペクトルの完成をまたねばならない。

c) HPRTase欠損症患者の突然変異との対比

HPRT欠損は、ヒトでは神経症状を伴うNesch-Nyhan症候群と痛風患者の一部にみられる。ヒトHPRT遺伝子はX染色体上にあり、長大なイントロンを含む9個のエキソンからなる35kbの大きさをもつ。これまで数例のHPR-

研究方法を継続発展させる。研究をより効率的に行なうため、シャトルベクターを改良する。具体的には、ベクターの回収過程をより簡単にするためマーカー遺伝子を追加することである。

ii) ヒト HPRTase 欠損症研究への応用: 突然変異検出に用いた標的遺伝子はヒト HPRT 遺伝子の cDNA であり、これまでに収集した多くの変異 HPRT 遺伝子は変異塩基配列も同定されているため、解析の困難なヒトの HPRTase 欠損症患者の遺伝子解析のためプローブとして貴重な研究材料となる。また、完成した突然変異スペクトルは、酵素分子のコンピューターによる構造解析データとともに、HPRTase 欠損症の研究に重要な知見を提供できる。

iii) 骨髓幹細胞への遺伝子導入: レトロウィルス由来のシャトルベクターは、ヘルパーウィルスによって欠損ウィルス粒子として他の細胞へ簡単に導入できる。この特徴を利用して遺伝子欠損をもつ個体の骨髓幹細胞への遺伝子導入が簡単に行なえる。ヒトやマウスの場合骨髓幹細胞への遺伝子導入が成功するには、約 $\sim 10^6$ 個の欠損ウィルス粒子が必要とされる。本研究の過程で、HPRT 遺伝子をもつ欠損ウィルス粒子を $\sim 10^5$ 常時産生する細胞クローンを得ているので、さらに多くの欠損ウィルス産生クローンを選択し、遺伝子導入の研究に使いたい。最近マウスの HPRT⁻変異体の入手が可能になったので我々の系を用いて遺伝子導入実験ができる。また、骨髓幹細胞への遺伝子導入では、骨髓移植の技術が必要となり骨髓移植の基礎研究にも役立つ。

謝 辞

本研究で確立した、真核細胞の突然変異解析系は、レトロウィルス由来のシャトルベクターのもつ特徴を有効に利用することによって突然変異の研究にとどまらず、多くの応用研究に役立つことを示すことができた。研究の胚芽的段階で助成い

ただいた日産科学振興財団、および関係者御一同に深甚なる感謝の意を表する。

文 献

口 頭 発 表

- 1) 池畑広伸, 石井 裕, 加藤武司: 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, II. ベクターの回収と解析, 第 29 回日本放射線影響学会大会 (昭和 61 年 10 月, 金沢).
- 2) 加藤武司, 石井 裕, 加藤敬子, 池畑広伸: シャトルベクターによる放射線誘発突然変異の解析 III, 変異 HPRT 遺伝子の解析, 第 29 回日本放射線影響学会大会 (昭和 61 年 10 月, 金沢).
- 3) 加藤致子, 石井 裕, 加藤武司: 骨髓細胞によるマウスへのヒト HPRT 遺伝子の導入, 第 29 回日本放射線影響学会大会 (昭和 61 年 10 月, 金沢).
- 4) 加藤武司, 石井 裕, 池畑広伸, 今井幸子: シャトルベクターを用いた, マウス培養細胞の突然変異解析系, 第 58 回日本遺伝学会年会 (昭和 62 年 10 月, 名古屋).
- 5) Ikehata, H., Y. Ishii and T. Kato. A shuttle vector system for the study of mutational specificity in mouse cells. The 6th International Sympo. of The Radiation Biology Center "Biotechnology in Radiationbiology". Nov. 25, 1986, Kyoto.

発 表 文 献

- 1) Kato, T. Inducible mutagenic repair processes in *E. coli*: An overview. Gamma Field Symposia 24. "Gene Structure and Mutation" 1-15, 1985. Institute of Radiation Breeding, Ohmiya, Japan.
- 2) 加藤武司: DNA 修復と突然変異, 遺伝 40(12) 特集号 "遺伝学の新しい展開" 88-94, (1986).
- 3) 加藤武司: 突然変異の分子機構, トキシコロジーフォーラム, 10(2), 69-79, (1987).
- 4) Shinagawa, H., H. Iwasaki, T. Kato and A. Nakata: RecA protein-dependent cleavage of UmuD protein upon SOS mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 1806-1810, (1988).
- 5) Ikehata, H., H. Kimura and T. Kato: Shuttle vector system for the analysis of mutational events in mammalian chromosomal DNA. *EMBO J.*, in press.