



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	c-Ha-ras遺伝子の活性化における塩基の損傷と変異の研究
Author(s)	紙谷, 浩之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬学)
Dissertation Number	乙第3963号
Issue Date	1991-09-30
DOI	https://doi.org/10.11501/3059245
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32602
Type	doctoral thesis
File Information	5217.pdf



c - H a - r a s 遺伝子の活性化における
塩基の損傷と変異の研究

紙 谷 浩 之

略語表

Ac	Acetyl
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
bp	base pair(s)
BPB	Bromophenol blue
BSA	Bovine serum albumin
CE	β -Cyanoethyl
CS	Calf serum
dAMP	2'-Deoxyadenosine 5'-monophosphate
dATP	2'-Deoxyadenosine 5'-triphosphate
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
dCMP	2'-Deoxycytidine 5'-monophosphate
dCTP	2'-Deoxycytidine 5'-triphosphate
dGMP	2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate
D'MEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMTr	Dimethoxytrityl
dTMP	(2'-Deoxy)thymidine 5'-monophosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetate
GDP	Guanosine 5'-diphosphate
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HPLC	High-performance liquid chromatography
I	Hypoxanthine
LTR	Long terminal repeat
NMU	N-Nitroso-N-methylurea
NPE	4-Nitrophenylethyl
8-OHG	8-Hydroxyguanine
$\text{Q}^6\text{-MeG}$	$\text{Q}^6\text{-Methylguanine}$
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
RNase	Ribonuclease
SDS	Sodium dodecylsulfate
SSCP	Single-strand conformation polymorphism
TEAA	Triethylammonium acetate
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethane
X	Xanthine
XC	Xylene cyanol

目次

序論	1
第1章 合成c-Ha- <u>ras</u> 遺伝子によるNIH3T3細胞のトランスフォーメーション	7
第1節 合成c-Ha- <u>ras</u> 遺伝子を有するベクターの構築	7
第2節 プラスミドの単離と塩基配列の確認	10
第3節 NIH3T3細胞へのDNAトランスフェクション	13
第2章 DNAカセット変換により構築したベクターを用いてのトランスフェクション実験	17
第1節 DNAカセットの構築とベクターへの組み込み	17
第2節 NIH3T3細胞へのトランスフェクション	23
第3章 O^6 -メチルグアニンを含むc-Ha- <u>ras</u> 遺伝子によるNIH3T3細胞のトランスフォーメーション	25
第1節 O^6 -MeGをコドン12に導入した合成c-Ha- <u>ras</u> 遺伝子を用いる実験（大腸菌コドン）	25
第2節 O^6 -MeGをコドン12に導入したc-Ha- <u>ras</u> 遺伝子によるNIH3T3細胞のトランスフォーメーション（ヒト配列）	29
第3節 トランスフォーマントのc-Ha- <u>ras</u> 遺伝子の配列分析	35

第4章	8-ヒドロキシグアニンを含むc-Ha- <u>ras</u> 遺伝子によるNIH3T3細胞のトランスフォーメーション	4 1
第1節	8-OHGをコドン12に導入した合成c-Ha- <u>ras</u> 遺伝子を用いる実験（ベクターの調製にpRSV-rgl2を用いた場合）	4 1
第2節	8-OHGをコドン12に導入したc-Ha- <u>ras</u> 遺伝子によるNIH3T3細胞のトランスフォーメーション	4 4
第5章	キサンチンを含むc-Ha- <u>ras</u> 遺伝子によるNIH3T3細胞のトランスフォーメーション	5 2
第1節	Xをコドン12に導入したc-Ha- <u>ras</u> 遺伝子によるNIH3T3細胞のトランスフォーメーション	5 2
第6章	ヒポキサンチンを含むc-Ha- <u>ras</u> 遺伝子によるNIH3T3細胞のトランスフォーメーション	6 1
第1節	Iをコドン61に導入したc-Ha- <u>ras</u> 遺伝子によるNIH3T3細胞のトランスフォーメーション	6 1
第2節	トランスフォーマントのc-Ha- <u>ras</u> 遺伝子の配列分析	6 9
結語		7 4
謝辞		7 5
実験の部		7 6
引用文献		1 0 7

序論

1976年、Bishop, Varmosのグループは綿密なハイブリダイゼーション実験を行い、トリ肉腫ウイルス（ASV）から発癌遺伝子v-src（vはウイルスを意味する）を単離することに成功した¹⁾。さらに、同様にハイブリダイゼーション法を用いて正常ニワトリ細胞中にsrc遺伝子と相同的な遺伝子が存在することを明らかにした²⁾。このsrc遺伝子と相同的な遺伝子は他の鳥類やマウス、ウシ、ヒトの細胞中にも発見されたことから、細胞性発癌遺伝子c-src（cは細胞を意味する）の存在が明らかとなった。また、src遺伝子をほとんど欠いたウイルスを正常細胞に感染させ、発癌遺伝子を持ったウイルスを回収するのに成功したという、花房のグループによる報告³⁾などから、c-src遺伝子がレトロウイルスに取り込まれてv-src遺伝子になったと考えられるに至り、発癌遺伝子の概念が確立された。

1979年、Weinbergらは3-メチルコラントレンでトランスフォームしたマウス線維芽細胞からDNAを得、それをマウスの培養細胞であるNIH3T3細胞にトランスフェクションし、フォーカスが形成されることを見出した⁴⁾。ヒトの発癌遺伝子をウイルスと関係なく検出する方法、DNAトランスフェクション法の確立によって多種類の発癌遺伝子が発見、同定され、その活性化についての知見が得られた。

現在まで明らかにされている発癌遺伝子の活性化機構にはいくつかのタイプがある⁵⁾。第一は、遺伝子の増幅により遺伝子産物が増加することが原因となっているタイプである。これにはerbB2遺伝子等が含まれる。第二は、遺伝子の再編成が生じる結果、活性化が生じるタイプで、myc遺伝子のように他の遺伝子の近傍に位置することによって発現量が増大する場合とabl、raf1遺伝子のように他の遺伝子産物との融合蛋白質を生じる場合とがある。第三のタイプは特定位置の点突然変異により活性化されるもので、ras系遺伝子がこれに相当する。

ヒトのras遺伝子は3種より構成されている^{6,7)}。そのうちの2種はマウス肉腫ウイルスゲノム中に発癌遺伝子として同定されたものと極めて近縁のものであり、その肉腫ウイルスの名前（Harvey, Kirsten）の頭文字からc-Ha-ras、c-Ki-rasと呼ばれている。第三のras遺伝子は神経芽細胞腫（neuroblastoma）より単離されたもので、N-rasと呼ばれる。これら3種のras遺伝子は互いにホモロジーの高い、188～189アミノ酸からなる、分子量21 × 10³の蛋白質（p21）をコードしている。先に述べたようにヒトの腫瘍から単離された活性化ras遺伝子は、いずれもp21のアミノ酸の1つに変

<u>ras gene</u>	Origin	Tumour	Mutation
<u>Ha-ras</u>	Bladder carcinoma	EJ,T24	12 Gly (GGC) $\Rightarrow$ Val (GTC)
	Mammary carcinoma	HS578T	12 Gly (GGC) $\Rightarrow$ Asp (GAC)
	Lung carcinoma	Hs242	61 Gln (CAG) $\Rightarrow$ Leu (CTG)
	Malignant melanoma	SK-2	61 Gln (CAG) $\Rightarrow$ Leu (CTG)
	Renal pelvic carcinoma	JPT26	61 Gln (CAG) $\Rightarrow$ Arg (CGG)
<u>Ki-ras</u>	Bladder carcinoma	A1698	12 Gly (GGT) $\Rightarrow$ Arg (CGT)
	Lung carcinoma	Calu-1	12 Gly (GGT) $\Rightarrow$ Cys (TGT)
		A427	12 Gly (GGT) $\Rightarrow$ Asp (GAT)
		PR310	61 Gln (CAA) $\Rightarrow$ His (CAT)
<u>N-ras</u>	Acute myelogenous leukaemia	—	12 Gly (GGT) $\Rightarrow$ Asp (GAT)
		AML1	13 Gly (GGT) $\Rightarrow$ Asp (GAT)
	Neuroblastoma	SK-N-SH	61 Gln (CAA) $\Rightarrow$ Lys (AAA)
	Lung carcinoma	SW1271	61 Gln (CAA) $\Rightarrow$ Arg (CGA)

表1 ヒト癌から検出された活性化 ras 遺伝子⁵⁾

換をもたらすような塩基の置換が生じており、その位置は12番目、13番目、または61番目のいずれかのコドンであることが明らかにされている(表1)^{5, 6)}。

このような特定位置のアミノ酸の変換が癌化の過程とどの様に関連しているのかは、正常型 ras 遺伝子産物の細胞内における役割が明らかにされていない現在、ほとんど解明されていない。しかしながら、p21がグアニンヌクレオチドと結合し⁸⁾、グアノシン三リン酸加水分解活性(GTPase活性)を有していること⁹⁾が報告されており、また、グアニンヌクレオチド結合活性を欠損した変異p21がNIH3T3細胞に対するトランスフォーメーション活性を失うこと^{10, 11)}からGTPやGDPがp21の作用に大きく関わっていることが示唆されている。一方、点突然変異により活性化されたp21が正常p21に比較して低いGTPase活性を示すこと^{8, 12-14)}が明らかにされている。さらに正常p21のエフェクター領域¹⁵⁾と相互作用し、GTPase活性を促進する蛋白質であるGAP(GTPase activating protein)^{16, 17)}が活性型p21のGTPase活性を促進しないことが報告されている。p21の性質はアデニレートシクラーゼの調節蛋白質群(Gs, Gi等)の性質とよく類似しており、p21は他のグアニンヌクレオチド結合蛋白質と同様に情報伝達の役割を担っているのではないかと考えられているが、突然変異体の場合、

GTP型（活性型）とGDP型（不活性型）のスイッチの切り替えが円滑に進行せずにGTP結合型の増大をもたらすと推測されている。また、近年、解明されたp21の立体構造は¹⁸⁻²¹⁾、活性化部位である12,61番目のアミノ酸が結合グアニンヌクレオチドのリン酸部分の近傍に位置していることを明らかにしており、この領域がグアニンヌクレオチドとの結合やGTPの加水分解に関与している可能性を支持している。

一方、このような突然変異がどの様に生じるかはもう一つの大きな問題である。発癌要因(carcinogen)のほとんどが突然変異要因(mutagen)であることから、発癌の過程にDNA・遺伝子の損傷が大きく関わっていることが推定されている。突然変異要因はDNAと相互作用して先に述べたような発癌遺伝子の活性化を生じると考えられており、このような突然変異要因の突然変異や癌化の過程との関連を解明するために多くの実験がなされてきた。その結果、ある特定のDNA損傷が突然変異と大きく関わっていることが明らかにされている。例えば、DNAをメチル化剤処理すると多くの部位に修飾を生じるが、その中でもグアニンのO⁶-位がメチル化されて生じるO⁶-メチルグアニン（図3-1参照）はG→Aの突然変異を誘導することが明らかにされている²²⁻²⁵⁾。このような突然変異要因（発癌要因）と発癌遺伝子とりわけras系癌遺伝子の活性化との関係を調べるために実験動物癌及びin vitroにおける実験が行われてきた。

Barbacidのグループは雌のラットにメチル化剤NMUを投与し、生じた乳癌から活性化c-Ha-ras遺伝子を検出した²⁷⁾。このc-Ha-ras遺伝子はコドン12番目の2番目の塩基がAに変化していた(GGA→GAA; Gly→Glu)。この変化は先に述べたO⁶-メチルグアニンがG→Aトランジションを引き起こすという結果とよく一致しており、NMUによってO⁶-メチルグアニンが生じてc-Ha-ras遺伝子を活性化したことを示唆している。動物実験癌におけるras系遺伝子の活性化を表2に示した²⁸⁾。この表から明らかなように用いる物質によって発生する癌の種類、活性化される発癌遺伝子の種類が異なり、また、組織と活性化される発癌遺伝子との間にある種のパターンが見られる。また、検出された突然変異は多くの場合、推定されるDNA損傷の性質と一致している。

一方、in vitroでc-Ha-ras遺伝子を修飾した後に、NIH3T3細胞にトランスフェクションし、どの様な活性化が生じるかを調べる実験も行われてきた。benzo[a]pyrene diol-epoxide^{29,30)}、N-acetoxy-2-acetylaminofluorene³¹⁾、活性化Glu-P-1³²⁾などで実験が行われ、コドン12または61に突然変異が検出された。また、Fassaoらはc-Ha-ras遺伝子を亜硫酸処理し、Rat-1細胞を用いて同様の実験を行い、コドン12,

動物	癌	化学発癌物質	活性化された 癌遺伝子	点突然変異の位置
ラット	乳癌	NMU	c-Ha- <i>ras</i>	12 Gly(GGA) → Glu(GAA)
"	"	DMBA	c-Ha- <i>ras</i>	61 Gln(CAA) → (CAN) ↘ (CNA)
マウス	"	DMBA	c-Ha- <i>ras</i>	61 Gln(CAA) → Leu(CTA)
ラット	肝細胞癌	IQ	c-Ha- <i>ras</i>	
"	"	Aflatoxin B ₁	c-Ki- <i>ras</i>	12 Gly(GGT) → Asp(GAT) ↘ Ser(AGT)
マウス	"	HOAAF	c-Ha- <i>ras</i>	61 Gln(CAA) → Lys(AAA)
"	"	VC	c-Ha- <i>ras</i>	61 Gln(CAA) → Leu(CTA) ↘ Arg(CGA)
"	"	DEN	c-Ha- <i>ras</i>	61 Gln(CAA) → Lys(AAA) ↘ Arg(CGA)
"	肝細胞腫	DEN	c-Ha- <i>ras</i>	61 Gln(CAA) → Lys(AAA) ↘ Leu(CTA)
"	肝細胞癌	HODE	c-Ha- <i>ras</i>	61 Gln(CAA) → Leu(CTA)
"	"	Furan	c-Ha- <i>ras</i>	61 Gln(CAA) → Lys(AAA) ↘ Arg(CGA)
"	"	Furfural	c-Ha- <i>ras</i>	61 Gln(CAA) → Lys(AAA) ↘ Arg(CGA) 13 Gly(GGC) → Val(GTC) ↘ Arg(CGC)
ヒラメ (Winter Flounder)	"	環境化学発癌 物質	c-Ki- <i>ras</i>	12 Gly(GGT) → Ser(AGT) ↘ Val(GGT) ↘ Cys(TGT)
マウス	パピローマ	DMBA/ TPA	c-Ha- <i>ras</i>	61 Gln(CAA) → Leu(CTA)
"	"	DBACR/ TPA	c-Ha- <i>ras</i>	61 Gln(CAA) → Leu(CTA)
ラット	線維肉腫	1,8-DNP	c-Ki- <i>ras</i>	12 Gly(GGT) → Cys(TGT)
マウス	"	MCA	c-Ki- <i>ras</i>	
"	リンパ腫	MCA	c-Ki- <i>ras</i>	
"	"	NMU	N- <i>ras</i>	61 Gln(CAA) → Lys(AAA)
				12 Gly(GGT) → Asp(GAT)
			c-Ki- <i>ras</i>	12 Gly(GGT) → Asp(GAT)
マウス	リンパ腫	γ線	c-Ki- <i>ras</i>	12 Gly(GGT) → Asp(GAT)
			N- <i>ras</i>	12 Gly(GGT) → Asp(GAT)
ラット	肺癌	TNM	c-Ha- <i>ras</i>	12 Gly(GGT) → Asp(GAT)
マウス	"	TNM	c-Ha- <i>ras</i>	12 Gly(GGT) → Asp(GAT)
ラット	腎癌	DMN	c-Ki- <i>ras</i> N- <i>ras</i>	

略号: NMU, *N*-Nitroso-*N*-methylurea; DMBA, dimethylbenz(*a*)anthracene; IQ, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline; HOAAF, *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene; VC, vinyl carbamate; DEN, *N*-nitrosodiethylamine; HODE, 1'-hydroxy-2'-3'-dehydroestradiol; DBACR, dibenz[*c,h*]acridine; 1,8-DNP, 1,8-dinitropyrene; MCA, 3-methyl cholanthrene; TNN, tetra-nitromethane; DMN, methyl(methoxymethyl)nitrosamine; TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate.

表2 動物実験癌における *ras*系遺伝子の活性化²³⁾

13、さらにはコドン59,63に突然変異を検出した³³⁾。

以上のことから ras 遺伝子の活性化機構は以下のように考えられる (図 1)。まず、ras 遺伝子の特定位置に塩基の修飾が生じる (この図では G の修飾と仮定し G^{*} で表してある)。通常は、DNA の損傷は細胞内の修復酵素 (群) により除去され、正常の塩基配列に回復するが (右側の矢印)、一部は修復系を逃れて未修復のまま複製が生じる (左側の矢印)。その際に誤ったヌクレオチド (図 1 では C 以外のヌクレオチドで、N で表してある) が取り込まれると、次の複製の後には塩基の置換された、活性型 ras 遺伝子が生じることになる。

今まで述べてきた実験動物癌や *in vitro* における実験は ras 遺伝子について多くの知見をもたらしたが、(1) 発癌要因 (突然変異要因) による DNA の修飾が塩基特異的ではない場合があり、(2) また、様々な修飾体が生じる場合、どの修飾体が突然変異や発癌に重要か明らかではなく、(3) さらに修飾される塩基の位置も特異的ではないといったいくつかの欠点がある。そこで、修飾によって生じる特定の DNA

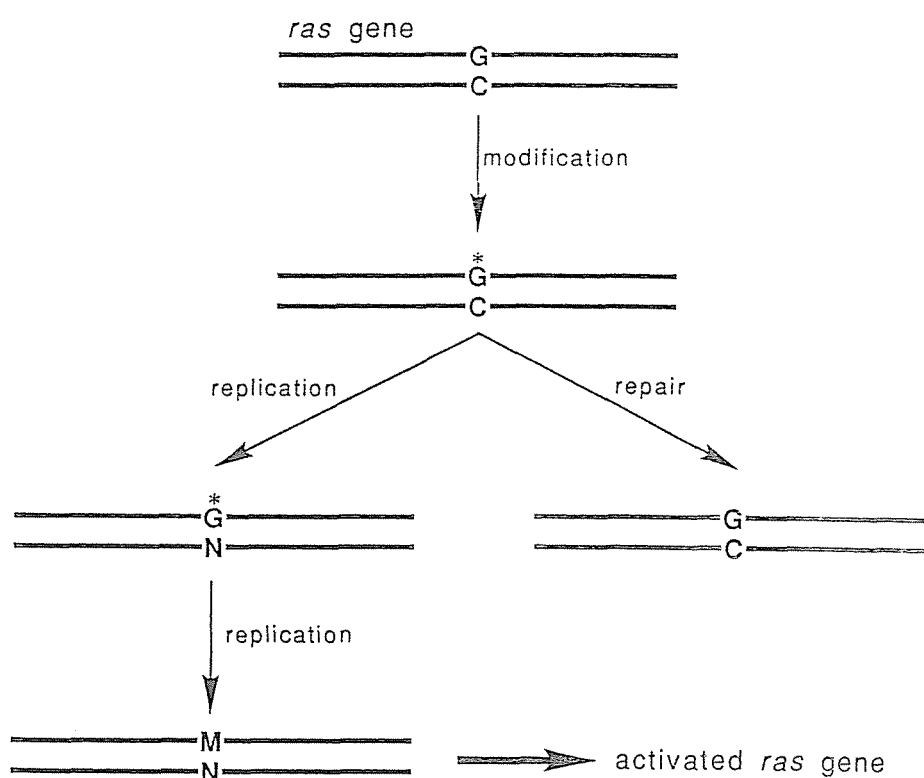


図 1 推定される ras 遺伝子の活性化機構

損傷体を位置特異的に ras 遺伝子に導入し、その活性化を調べることは ras 遺伝子の活性化機構をより詳細に知る上で極めて重要なことと思われる。そこで著者は、特定の DNA 損傷を c-Ha-ras 遺伝子の特定位置に導入し、その哺乳動物細胞（NIH3T3細胞）に対するトランスフォーム活性を調べることを計画した。

また、損傷DNAを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドを合成し、in vitroにおいて複製反応を行う実験が数多く報告されている。例えば、先に述べた O^6 -メチルグアニンを含むオリゴヌクレオチドはDNAポリメラーゼにより相補鎖にdCMPのみならずdTTPも取り込むことが明らかにされている^{22, 23)}。また、口野らは酸素ラジカルによって生じる8-ヒドロキシグアニンを含む鋳型DNAとKlenowフラグメントを用いて複製実験を行い、8-ヒドロキシグアニンに対応する位置と隣接するピリミジン部位にランダムなジデオキシヌクレオチドの取り込みが起こることを報告している³⁴⁾。さらに、これらのDNA損傷の大腸菌を用いるin vivoでの突然変異誘発能も研究されている^{24, 35, 36)}。c-Ha-ras遺伝子の活性化は突然変異によって生じるので、本研究はDNA損傷の哺乳動物細胞における突然変異誘発能、あるいは、DNAポリメラーゼの読み取りに関する実験と位置づけることが可能である。

第1、2章では合成c-Ha-ras遺伝子によるNIH3T3細胞のトランスフォーム活性について述べる。第3章以下ではコドン12に修飾塩基を導入したc-Ha-ras遺伝子のトランスフォーム活性について述べることとし、第3章では O^6 -メチルグアニンについて、第4章では8-ヒドロキシグアニンについて、第5章ではキサンチンを用いた実験についてそれぞれ述べる。第6章ではコドン61に修飾塩基を導入した例としてヒポキサンチンを含むc-Ha-ras遺伝子のトランスフォーム活性について述べる。

第 1 章

合成 c-Ha-ras 遺伝子による NIH 3T3 細胞のトランスフォーメーション

修飾塩基を導入した c-Ha-ras 遺伝子を用いる実験を行うための予備実験として、合成 c-Ha-ras 遺伝子を含むプラスミドを用いての NIH3T3 細胞のトランスフォーメーション実験について述べる。第 1 節では合成 c-Ha-ras 遺伝子を哺乳動物細胞内で発現させるためのベクターの構築について、第 2 節ではそのベクターと NIH3T3 細胞を用いた DNA トランスフェクション実験について述べる。

第 1 節 合成 c-Ha-ras 遺伝子を有するベクターの構築^{3,7)}

特定の修飾塩基を部位特異的に c-Ha-ras 遺伝子に導入するためには、DNA カセット変換が有力な方法となり得る。この方法はベクター中に存在する 2 種類のユニークな制限酵素部位を用いる方法であり、目的とする DNA 断片を効率よくベクターへ導入することが可能である（図 2-1 参照）。当教室では、大腸菌による c-Ha-ras 蛋白質の大量発現を目的として、c-Ha-ras 遺伝子の化学合成を行ってきた（図 1-1）^{3,8,39)}。この遺伝子は設計の際に、ユニークな制限酵素部位をいくつか導入しており、DNA カセット変換を容易に行うことが可能である。従って、特定の修飾塩基を c-Ha-ras 遺伝子中に導入するためには、合成 c-Ha-ras 遺伝子を用いるのが適当と思われる。そこで、合成 c-Ha-ras 遺伝子を哺乳動物細胞内で発現させるためのベクターを構築することにした。哺乳動物細胞で遺伝子を効率よく発現させるために、様々な発現ベクターが考案されている⁴⁰⁾。その中でも、pRSVneo は NIH3T3 細胞においてネオマイシン耐性遺伝子を効率よく発現させることで知られている^{41,42)}。このベクターはプロモーターとしてラウス肉腫ウイルス (RSV) の LTR を有しており、また遺伝子の下流に SV40 由来のスプライス配列やポリ A シグナルも有している（図 1-2 参照）。

今回、c-Ha-ras 遺伝子を組み込むベクターとして、pRSVneo からネオマイシン耐性遺伝子を除去した pRSVΔneo を用いることにした。このベクターは LTR の下流に SalI 部

```

      5          10          15          20
Clal Met-Thr-Glu-Tyr-Lys-Leu-Val-Val-Val-Gly-Ala-Gly-Gly-Val-Gly-Lys-Ser-Ala-Leu-Thr-
----- U1 ----- U2 ----- U3 -----
CGAT ATG ACC GAA TAC AAA CTG GTT GTA GTT GGC GCT GGT GGT GTA GGC AAA AGC GCG CTG ACC
TA TAC TGG CTT ATG TTT GAC CAA CAT CAA CCG CGA CCA CCA CAT CCG TTT TCG CCG GAC TGG
----- L19 ----- L18 ----- L17 -----
                                     BssH11
      25          30          35          40
Ile-Gln-Leu-Ile-Gln-Asn-His-Phe-Val-Asp-Glu-Tyr-Asp-Pro-Thr-Ile-Glu-Asp-Ser-Tyr-
----- U4 ----- U5 -----
ATT CAG TTG ATC CAG AAC CAC TTC GTA GAT GAG TAC GAC CCG ACT ATT GAA GAC TCT TAC
TAA GTC AAC TAG GTC TTG GTG AAG CAT CTA CTC ATG CTG GGC TGA TAA CTT CTG AGA ATG
----- L16 ----- L15 ----- L14 -----
      45          50          55          60
Arg-Lys-Gln-Val-Val-Ile-Asp-Gly-Glu-Thr-Cys-Leu-Leu-Asp-Ile-Leu-Asp-Thr-Ala-Gly-
----- U6 ----- U7 ----- U8 -----
CGT AAG CAG GTT GTT ATC GAC GGT GAG ACC TGT TTG CTG GAC ATC CTT GAT ACC GCA GGC
GCA TTC GTC CAA CAA TAG CTG CCA CTC TGG ACA AAC GAC CTG TAG GAA CTA TGG CGT CCG
----- L13 -----
      65          70          75          80
Gln-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ala-Met-Arg-Asp-Gln-Tyr-Met-Arg-Thr-Gly-Glu-Gly-Phe-Leu-Cys-
----- U9 -----
CAA GAA GAA TAC TCT GCT ATG CGT GAT CAG TAT ATG CGT ACC GGC GAA GGC TTC CTG TGC
GTT CTT CTT ATG AGA CGA TAC GCA CTA GTC ATA TAC GCA TGG CCG CTT CCG AAG GAC ACG
----- L12 ----- L11 -----
                                     Bcl1
      85          90          95          100
Val-Phe-Ala-Ile-Asn-Asn-Thr-Lys-Ser-Phe-Glu-Asp-Ile-His-Gln-Tyr-Arg-Glu-Gln-Ile-
----- U10 ----- U11 -----
GTT TTC GCT ATC AAC AAC ACC AAA TCT TTT GAA GAC ATC CAT CAA TAC CCT GAA CAG ATC
CAA AAG CGA TAG TTG TTG TGG TTT AGA AAA CTT CTG TAG GTA GTT ATG GCA CTT GTC TAG
----- L10 ----- L9 -----
      105          110          115          120
Lys-Arg-Val-Lys-Asp-Ser-Asp-Asp-Val-Pro-Met-Val-Leu-Val-Gly-Asn-Lys-Cys-Asp-Leu-
----- U12 ----- U13 ----- U14 -----
AAA CGT GTT AAA GAC TCT GAT GAC GTT CCG ATG GTT CTG GTT GGT AAC AAA TGC GAC TTG
TTT GCA CAA TTT CTG AGA CTA CTG CAA GGC TAC CAA GAC CAA CCA TTG TTT ACG CTG AAC
----- L8 -----
      125          130          135          140
Ala-Ala-Arg-Thr-Val-Glu-Ser-Arg-Gln-Ala-Gln-Asp-Leu-Ala-Arg-Ser-Tyr-Gly-Ile-Pro-
----- U14 ----- U15 -----
GCA GCG CGT ACT GTT GAA TCT CGT CAG GCT CAG GAT CTG GCT CGT TCT TAC GGA ATT CCG
CGT CGC GCA TGA CAA CTT AGA GCA GTC CGA GTC CTA GAC CGA GCA AGA ATG CCT TAA GGC
----- L7 ----- L6 -----
                                     EcoR1
      145          150          155          160
Tyr-Ile-Glu-Thr-Ser-Ala-Lys-Thr-Arg-Gln-Gly-Val-Glu-Asp-Ala-Phe-Tyr-Thr-Leu-Val-
----- U16 ----- U17 -----
TAC ATC GAA ACC TCT GCT AAA ACT CGT CAA GGC GTT GAA GAC GCT TTC TAC ACC TTG GTT
ATG TAG CTT TGG AGA CGA TTT TGA GCA GTT CCG CAA CTT CTG CGA AAG ATG TGG AAC CAA
----- L5 ----- L4 -----
      165          170          175          180
Arg-Glu-Ile-Arg-Gln-His-Lys-Leu-Arg-Lys-Leu-Asn-Pro-Pro-Asp-Glu-Ser-Gly-Pro-Gly-
----- U18 -----
CGT GAA ATC CGT CAG CAC AAG CTG CGT AAG CTT AAC CCG CCG GAC GAA TCT GGC CCA GGC
GCA CTT TAG GCA GTC GTG TTC GAC GCA TTC GAA TTG GGC GGC CTG CTT AGA CCG GGT CCG
----- L3 ----- L2 -----
                                     HindIII
      185
Cys-Met-Ser-Cys-Lys-Cys-Val-Leu-Ser-..... SalI
----- U19 ----- U20 -----
TGC ATG TCC TGC AAA TGC GTT CTG TCT TGA TAG G
ACG TAC AGG ACG TTT ACG CAA GAC AGA ACT ATC CAGCT
----- L1 -----

```

図 1 - 1 合成c-Ha-ras遺伝子の設計図（正常型）

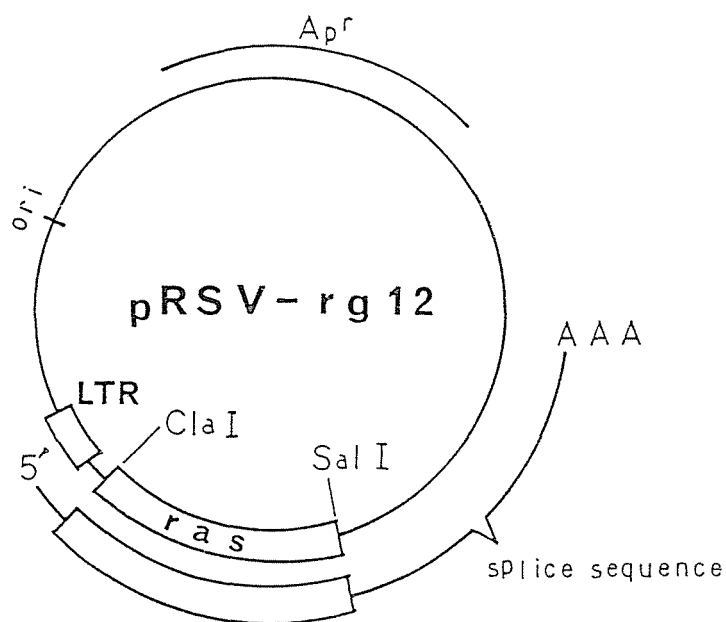


図 1 - 2 c-Ha-ras遺伝子を哺乳動物細胞内で発現させるためのベクター

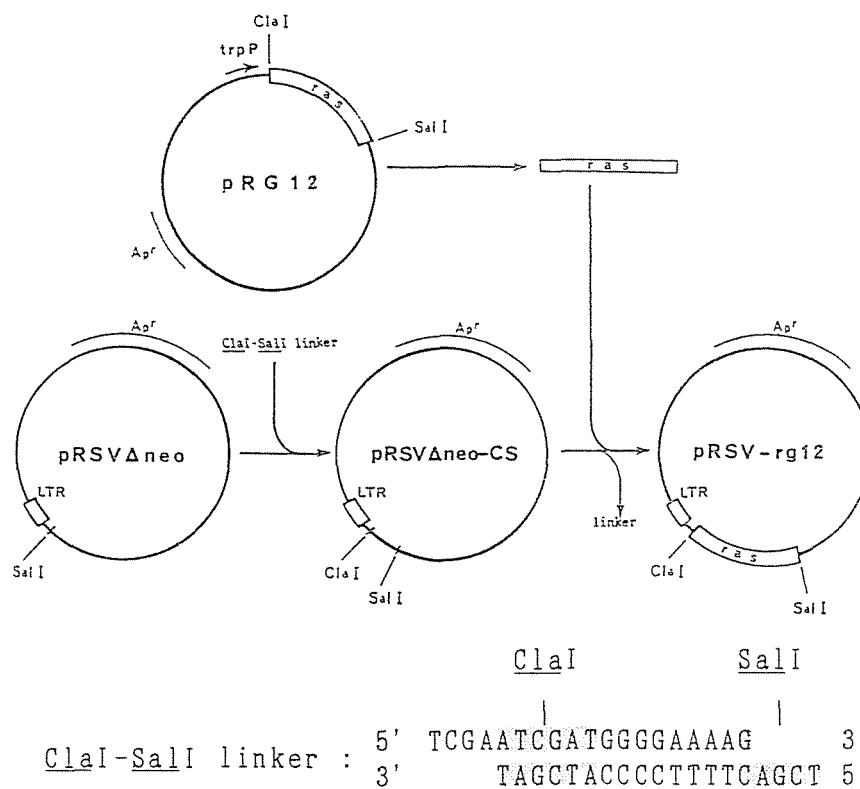


図 1 - 3 LTRの下流にc-Ha-ras遺伝子を有するプラスミドの構築

位を有しており、この位置に ClaI-SalI リンカーを挿入することにより c-Ha-ras 遺伝子を組み込むことが可能な pRSV Δ neo-CS が得られる (図 1-3)。当教室で作成されたこのベクターは、既に大腸菌にトランスフェクションされ、rapid boiling 法⁴³⁾でスクリーニングされており、また、プラスミドが精製されている。

このプラスミド pRSV Δ neo-CS を ClaI-SalI で消化し、ベクターとした。一方、トリプトファンプロモーター下流に c-Ha-ras 遺伝子を有するプラスミドを ClaI-SalI で消化し、両者をリガーゼによって連結させることにより目的のプラスミドを構築した。プラスミド構築の手順を正常 p21 をコードする c-Ha-ras 遺伝子を例にして図 1-3 に示した。

このプラスミドを大腸菌に導入し、rapid boiling 法⁴³⁾でスクリーニングを行った後、プラスミドを単離した。プラスミドはそれぞれ pRSV-rg12 (正常 p21 をコード)、pRSV-rv12 (Val-12 p21 をコード)、pRSV-rl61 (Leu-61 p21 をコード)、pRSV-rr61 (Arg-61 p21 をコード) と命名した。次節で述べるように、前二者は Maxam-Gilbert 法^{44, 45)}によって、後者二者はジデオキシ法^{45, 46)}によって、塩基配列を確認した。

第 2 節 プラスミドの単離と塩基配列の確認

(1) プラスミドの単離

プラスミドの調製は Norgard の方法⁴⁷⁾に準じて行った。第 1 節で述べたように、rapid boiling 法でスクリーニングした大腸菌を LB 培地で一晚培養し、500ml の M9CA 培地に植え継いだ。大腸菌の密度が大きくなる手前の 550nm における濁度が 0.7~0.8 になるまで培養し、クロラムフェニコールを終濃度 150 μ g/ml になるように加えた。さらに 19 時間培養を続け、プラスミドを選択的にかつ効率よく増幅させた後に集菌した。大腸菌を WL 緩衝液 (25mM Tris-HCl pH8.0/10mM EDTA) に懸濁し、よく洗浄してリボポリサッカライドを除去した。500ml の培地で約 1g の大腸菌を得た。

大腸菌をリゾチーム処理した後、Brij-58 とデオキシコール酸ナトリウムを加えて穏やかに溶菌すると、染色体 DNA を細胞外に溶出させることなく細胞抽出液を得ることができる。細胞残渣及び染色体 DNA を遠心により除去した後、除蛋白し、エタノール沈澱によりプラスミドを回収した。続いて 2M NaCl による分別沈澱により高分子 RNA を選択的に除去した。プラスミドを含む画分をエタノール沈澱で回収した後、さ

らにRNase処理を行い、粗プラスミド溶液を得た。

(2) ゲルろ過によるプラスミドの精製

プラスミドDNAには、環状二本鎖DNAが超らせん構造を形成している closed circular DNA(ccDNA)と超らせん構造が解消されている open circular DNA(ocDNA)という2種類の形態が存在する。プラスミドDNAを用いて、塩基配列を確認する場合、とりわけジデオキシ法^{45, 46)}によって塩基配列の確認を行う場合、ocDNAの割合が高いとエキストラバンドが生じ、塩基配列確認には不適當である。従って、できるだけccDNAの割合が高い必要がある。

ccDNAとocDNAは分子量は同じであるが高次構造に違いがあり、ccDNAとocDNAの分離はこの構造の違いに基づいて行われる。一般的にはインターカレーターの結合量の違いに基づく臭化エチジウム・CsClを用いた平衡密度勾配遠心法⁴⁸⁾が用いられるが、この方法は処理できるDNA量が少なく、コストも高く、又、臭化エチジウムと光によってDNA鎖の切断が生じ、ccDNAがocDNAに変化してしまう可能性がある。そこでプラスミドの調製には操作が簡単なゲルろ過法を用いることにした。また、この方法は細胞毒性のある臭化エチジウムを用いないという点においても、DNAトランスフェクションに用いるプラスミドの調製法として優れていると思われる。

担体としてTOYOPEARL HW-75S⁴⁹⁾を用い、カラムサイズ 1.8cm X 66cm の条件で先の粗プラスミド溶液（例としてpRSV-rg12）を分離した結果を図1-4に示した。各画分を1.0%アガロースゲル電気泳動により調べると、Fr.56以降にccDNAが溶出されており、そのうちFr.60以降を精製プラスミド溶液として回収することにした。

以上の方法により500mlの培地から約500~900 μ gのプラスミドを得ることができた。

(3) 塩基配列の確認

DNAの塩基配列確認法として主に用いられているものに、MaxamとGilbertによって開発された特異的化学分解法^{44, 45)}とSangerらによって開発されたジデオキシヌクレオチドによる鎖延長停止法^{45, 46)}が挙げられる。これらの方法はほぼ同じ頃に開発された方法で、それぞれ特色を有している。Maxam-Gilbert法は化学反応を利用しているので分解条件を正確に制御できる点で優れているが、標識材料の調製に手数がかかる。一方、ジデオキシ法は試料の調製が簡単であるが、配列により条件を設定し直すことが必要となることがある。

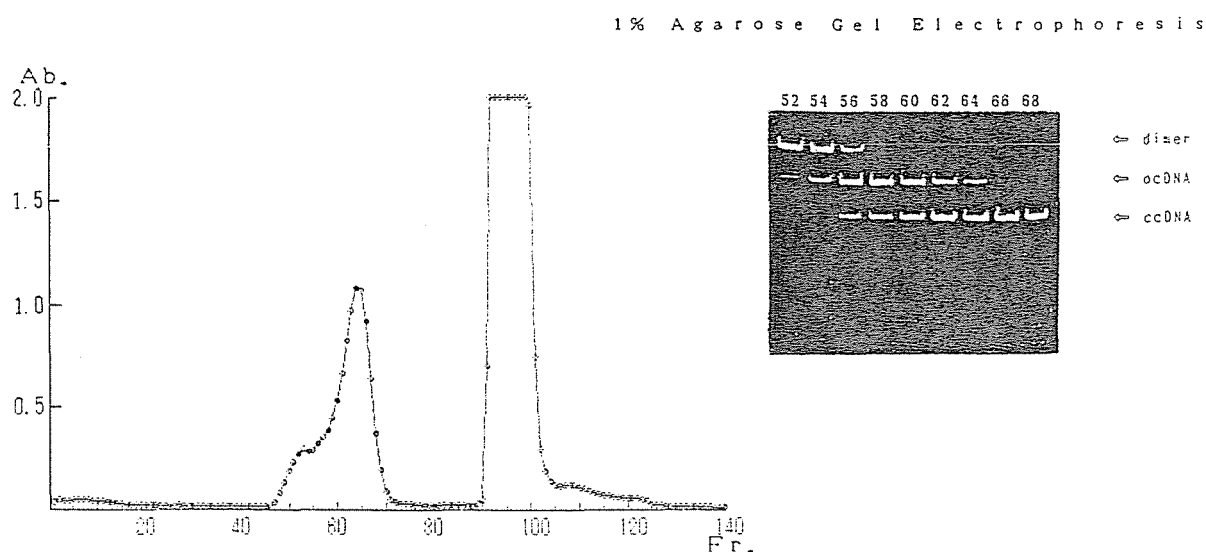


図 1 - 4 ゲルろ過によるプラスミドの精製

pRSV-rg12及びpRSV-rv12の塩基配列確認にはMaxam-Gilbert法を用いて行った^{44, 45)}。この方法を行うには特定部位での5'末端の³²P-標識が必要であるが、合成c-Ha-ras遺伝子には内部に制限酵素部位が導入されており、それを利用することが可能である。そこでBssHIIとHindIIIを用いることとした。まず、プラスミド2 μ gをBssHII（あるいはHindIII）で消化した。5'-リン酸をアルカリ性ホスファターゼで除去した後、[γ -³²P] ATPとT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'位を標識した。適当な鎖長の断片とするために、MluI（あるいはHpaI）で消化した後、2% 低融点アガロースゲル電気泳動により鎖を分離した。緩衝液中で加温することによってゲルからDNAを溶出させた後、エタノール沈澱によって回収した。

以上のようにして調製した標識DNAを用いて塩基特異的な化学反応を行わせた（ギ酸処理によりA+Gを、ジメチル硫酸+熱処理でGを、ヒドラジンでC+Tを、ヒドラジン+NaClでCを反応させた）。さらに1Mピペリジンで処理することにより、修飾を受けた部分で β -脱離反応を起こし、鎖を切断させた。その後、7M尿素を含むポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、オートラジオグラフィーにより塩基配列を決定した。

pRSV-rl61及びpRSV-rr61の塩基配列の確認には、ジデオキ法^{45, 46)}を用いた。二

本鎖DNAの塩基配列を確認する場合、変性させ、一本鎖とする必要があるが、今回はアルカリ変性法を用いた。

まず、プラスミド3 μ g(1pmol)をNaOHを含む溶液中で5分間放置した。2.5M AcONH₄とエタノールを加えた後、-80°Cに10分間放置し、遠心により回収した。70% エタノールで洗浄した後、乾固させて-20°Cで保存した。滅菌水9.5 μ lに溶解させ、0.5 pmolのプライマーと緩衝液中でアニーリングさせた後、[α -³²P]dCTPとKlenowフラグメントを加え、ジデオキシヌクレオチドを含む溶液中に分注した。37°Cで20分間インキュベートした後、チェース反応を行わせ、ホルムアミドを含む溶液を加えて反応を停止させた。7M尿素を含むポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、オートラジオグラフィーにより塩基配列を決定した。

第3節 NIH3T3細胞へのDNAトランスフェクション⁵⁷⁾

第1節では合成c-Ha-ras遺伝子を哺乳動物細胞内で発現させるためのベクターを構築したことを述べた。しかし、元来この遺伝子は大腸菌中での蛋白質の発現を効率よく行わせるために設計されたものであり、大腸菌の最適コドンを用いている。そのため、合成c-Ha-ras遺伝子が哺乳動物細胞内では発現しにくい、または、発現したとしても活性のある蛋白質が産生されない可能性がある。そのため、修飾塩基を導入したc-Ha-ras遺伝子によるトランスフェクション実験を行う前に、プラスミドを用いて合成c-Ha-ras遺伝子がNIH3T3細胞内で発現することを確認しておくことが必要である。

NIH3T3細胞へのDNAトランスフェクション実験は図1-5に示した手順で行った^{50, 51)}。NIH3T3細胞(8 X 10⁵)を一晩培養し、翌日培地を交換した、250 mMのCaCl₂を含むプラスミドとNIH3T3細胞DNA(30 μ g)溶液をリン酸を含む溶液に滴下し、DNAとリン酸カルシウムの共沈物を形成させた。続いて、これを培地に加えて、37°Cで5時間培養を続けた。培地を除き、17%グリセロールを加えて^{51, 52)}、DNAの取り込みを促進させた(グリセロールショック)。培地の添加によりグリセロールショックを停止させ、この後、3~4日ごとに培地を交換した。2~3週間培養を続け、生じたフォーカスを計測することによりトランスフォーム活性を測定した。

まず、Val-12 p21をコードしているpRSV-rv12とヒト癌細胞から単離された活性型

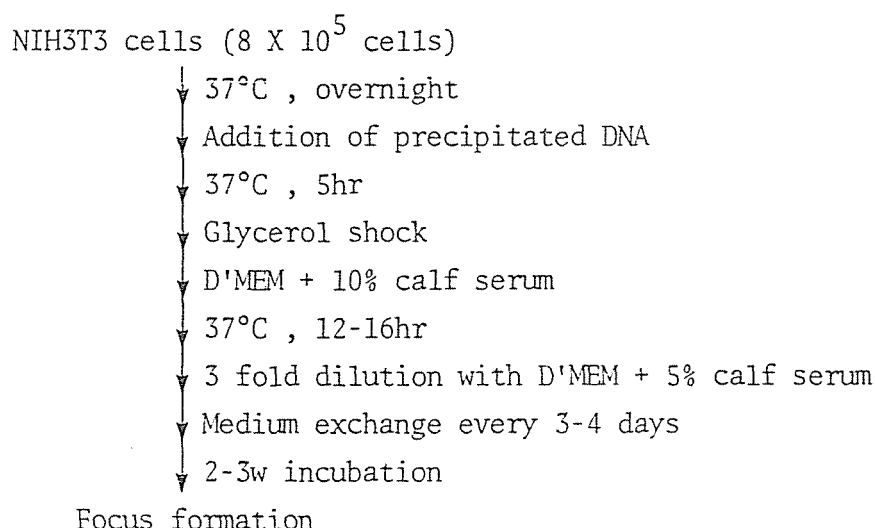


図 1 - 5 トランスフォーム活性の測定法⁵²⁻⁵³⁾

c-Ha-ras-1遺伝子を有するpT24⁵²⁾のトランスフォーム活性を比較することにした。pT24はジェノミックDNAに由来しているDNA断片を有しており、ヒトのプロモーターが上流に位置している。この活性型ras遺伝子はpRSV-rv12と同じく12番目のアミノ酸がバリンに変異したヒトのp21をコードしており、産生される蛋白質は同じアミノ酸配列を有する。

15ngのプラスミドDNAをトランスフェクションした結果を表1-1に示す。pRSV-rv12はpT24の約2倍のトランスフォーム活性を示した。pT24はpRSV-rv12の約2倍の塩基対を有するプラスミドであり、従って、一分子当りのフォーカス形成能はほぼ等しいと結論づけることができる。合成c-Ha-ras遺伝子は大腸菌の最適コドンを用いているために、翻訳の段階で不利に働く可能性がある。しかし、RSV-LTRという強力なプロモーターの制御下でmRNAが大量に産生されるためにその不利を補っていると考えることが可能である。

次に、正常c-Ha-ras遺伝子と3種類の活性型c-Ha-ras遺伝子をNIH3T3細胞にトランスフェクションした結果を示す(表1-1)。これは5ngのプラスミドDNAを用いた際の結果である。表から明らかなように、この条件下では、正常c-Ha-ras遺伝子

plasmid	amino acid at position in the Ha- <u>ras</u> -coded p21		transforming efficiency (foci/ng DNA)
	12	61	
pRSV-rv12 (synthetic)	Val	Gln	36.1 ^{a)}
pT24 (genomic)	Val	Gln	16.8 ^{a)}
pRSV-rg12	Gly	Gln	0 ^{b)}
pRSV-rv12	Val	Gln	37.4 ^{b)}
pRSV-rl61	Gly	Leu	22.0 ^{b)}
pRSV-rr61	Gly	Arg	28.2 ^{b)}

a) 15 ng of plasmid DNA was used

b) 5 ng of plasmid DNA was used

表 1 - 1 合成c-Ha-ras遺伝子によるNIH3T3細胞のトランスフォーメーション

がフォーカスを形成しないのに対し、3種の活性型c-Ha-ras遺伝子はいずれもフォーカスを形成した。フォーカスの形成は、NIH3T3細胞内でras蛋白質が産生されていることを示しており、大腸菌コドンの使用に関わらず、合成c-Ha-ras遺伝子はNIH3T3細胞を用いるトランスフェクション実験に適していることが、先の結果と併せて明らかとなった。また、データは示していないが、多量のプラスミド（250ngなど）を用いた場合には正常型合成c-Ha-ras遺伝子はフォーカス形成を誘導した。このことは、この実験で用いた正常c-Ha-ras遺伝子が誤った塩基配列を持つためにフォーカスを形成しないという可能性を否定するものであり、また、大量の正常p21が産生されればフォーカスが形成されるという従来⁵³⁾の報告と一致するものである。以上のことから、用いるDNAの量を調節することにより、正常c-Ha-ras遺伝子がフォーカスを形成せず、活性型c-Ha-ras遺伝子がフォーカスを形成する条件を設定することが可能であることが明らかとなった。

この実験で用いた合成c-Ha-ras遺伝子は、コードする蛋白質はヒトのp21であるが、

大腸菌の最適コドンを用いて設計されている。原核生物の遺伝子を真核生物細胞で発現させている例がいくつか知られている。Mulliganらは、大腸菌の gpt 遺伝子を動物細胞中で発現させることにより、この遺伝子を有する細胞のみを選択することに成功している⁵⁴⁾。また、Sugdenらは hph 遺伝子をBリンパ球中で発現させることに成功している⁵⁵⁾。今回、著者が用いた pRSV Δ neo は pRSVneo を改変したものであるが、これも大腸菌由来の遺伝子を真核生物細胞で発現させた例の一つである^{41, 42)}。これらは、コドン使用頻度の違いが発現の大きな障害となるものではない（あるいは、障害となるとは限らない）ことを示している。今回、著者が得た結果は、これを支持するものであり、合成 c-Ha-ras 遺伝子が哺乳動物細胞内で発現され、また、NIH3T3細胞を用いるトランスフェクション実験に用いることが可能であることを示している。合成 c-Ha-ras 遺伝子にはいくつかのユニークな制限酵素部位がいくつか導入されている。そのためDNAカセット変換によって、修飾塩基を含む遺伝子を構築することが可能となるだけでなく、様々な突然変異体を迅速に作成してそのトランスフォーム活性を測定することが可能となっている。このことは、発癌における c-Ha-ras 遺伝子や p21 の役割の解明にこの遺伝子が極めて有用であることを示している。さらに、この系をわずかに改変して、リボザイムをコードする遺伝子を発現させることも行われており⁵⁶⁾、この系が他の遺伝子の発現にも利用可能であることが明らかにされている。

第 2 章

D N A カ セ ャ ト 変 換 に よ り 構 築 し た ベ ク タ ー を 用 い て の ト ラ ン ス フ ェ ク シ ョ ン 実 験

前章では合成 c-Ha-ras 遺伝子が NIH3T3 細胞をトランスフォームさせることを確認し、この遺伝子が NIH3T3 細胞を用いるトランスフェクション実験に極めて有用であることを示した。この章では、修飾塩基を導入した c-Ha-ras 遺伝子を用いる実験の予備実験として行った、DNA カセット変換により構築したベクターを NIH3T3 細胞にトランスフェクションしてフォーカスの形成を確認した実験について述べる。第 1 節では、DNA カセットの構築とベクターへの組み込みについて、第 2 節では、NIH3T3 細胞へのトランスフェクションについて述べる。

第 1 節 DNA カセットの構築とベクターへの組み込み

修飾塩基をコドン 12 番目に導入する場合、正常型 p21 をコードする合成 c-Ha-ras 遺伝子を含むプラスミド pRSV-rg12 の ClaI 部位及び BssHII 部位（図 1 - 1 参照）を利用して DNA カセット変換を行うわけであるが、その予備実験として、同様な方法で構築した活性型 c-Ha-ras 遺伝子を用いた場合にフォーカスが形成されることと、正常型 c-Ha-ras 遺伝子を用いた場合にはフォーカスが形成されないことを確認することにした。

図 2 - 1 に DNA カセット変換の概略を示す。まず、pRSV-rg12 を ClaI 及び BssHII で消化し、短鎖断片を除去する。次に合成オリゴヌクレオチド 5 または 6 種から構築した DNA カセットをその代わりにベクターに組み込み、最後にそれを NIH3T3 細胞にトランスフェクションする。図 2 - 2 には今回の実験で用いる正常型及び活性型 c-Ha-ras 遺伝子を構築するための DNA カセットを示す。

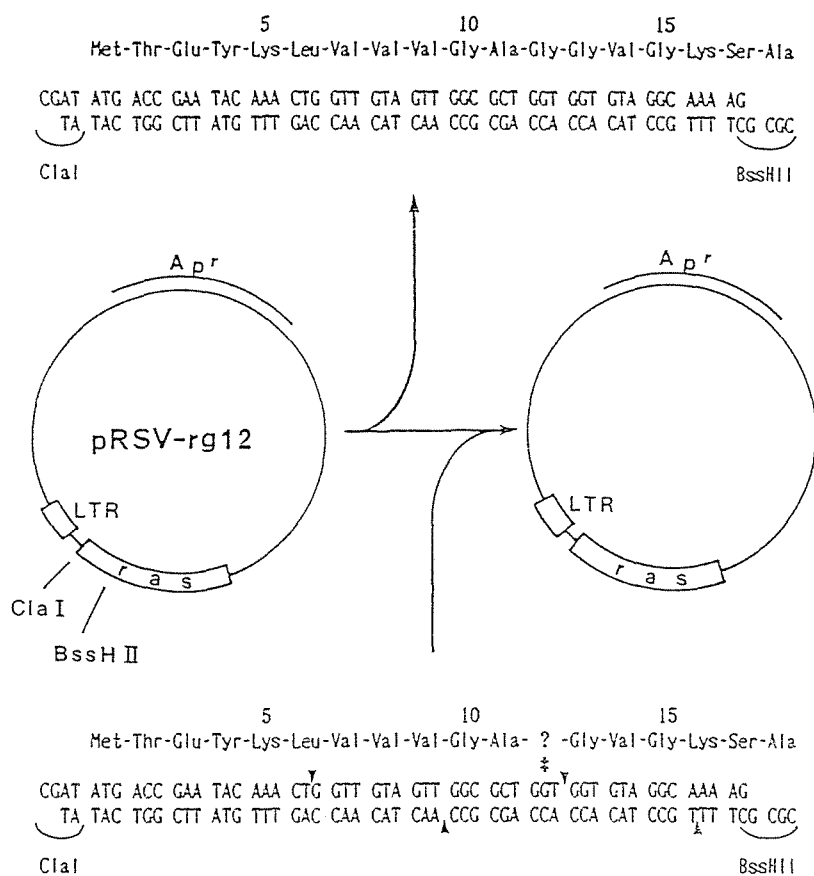


図 2 - 1 DNAカセット変換の概略

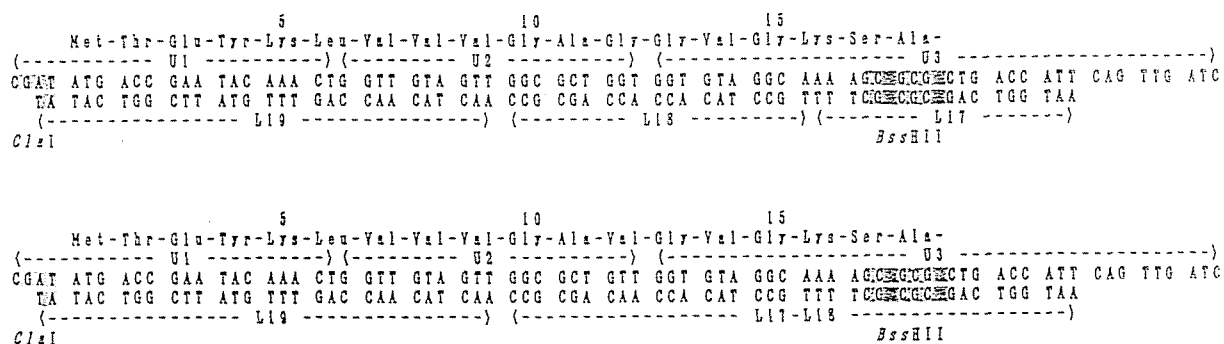


図 2 - 2 用いたDNAカセット

(1) オリゴデオキシリボヌクレオチドのリン酸化

DNAカセットを構築するためにはオリゴデオキシリボヌクレオチドを連結させるわけであるが、そのための第一段階として各オリゴデオキシリボヌクレオチドの5'末端をリン酸化することが必要である(図2-3)。ただし、upper strandとlower strandの両鎖の5'末端に相当するオリゴデオキシリボヌクレオチド(U1とL17またはL17-L18)はリン酸化を行わない。U1は制限酵素ClaI部位であり接着性末端を含み、リン酸化すると次に述べるライゲーションの過程で二量体を形成する可能性があるからである。また、L17やL17-L18は後に述べるように制限酵素BssHII処理を行うためリン酸化する必要性がないからである。

各オリゴデオキシリボヌクレオチド320pmolをエッペンドルフチューブに移し、減圧下(図2-5参照)で乾固させた。ATPとT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて37℃で30分間反応させた。その後、さらに酵素を加えて37℃でさらに30分間インキュベートした。

(2) 第1段階目のライゲーション

リン酸化の終了したオリゴデオキシリボヌクレオチドをエッペンドルフチューブに移した。緩衝液中で、まず90℃に加熱した後急冷して一本鎖とし、次に75℃に加熱した後、室温まで徐冷して塩基対を形成させた(アニーリング)。アニーリングが完了した後、2-メルカプトエタノールとT4 DNAリガーゼを加えて15℃で反応を行った。10% PAGEを行って目的の鎖長のバンドを確認し(図2-4、△で示した)。目的物のバンドを切り出し、透析チューブに入れ電気泳動法によりフラグメントをゲルから抽出した。フェノール抽出、クロロホルム抽出の後、エタノール沈澱によりDNAを回収した。

(3) DNAカセットのリン酸化

以上の操作により、コドン12を含むDNAカセットが得られたが、ベクターへ組み込むためにはその5'末端をリン酸化する必要がある。(1)で述べたようにlower鎖の5'末端はリン酸化する必要があるが、リン酸化しても特に問題は生じないと考えられるので、ClaI部位の選択的リン酸化は行わなかった。(1)-(3)の操作をまとめて図2-3に示した。

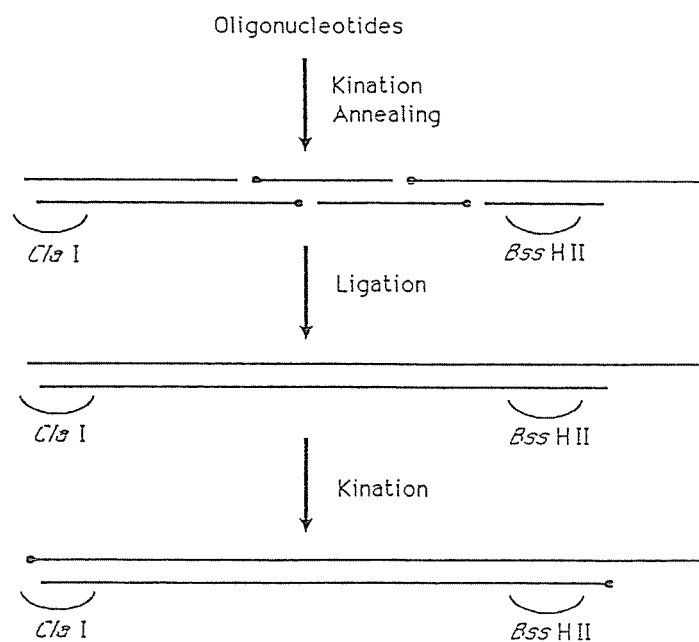


図 2 - 3 DNAカセットの構築

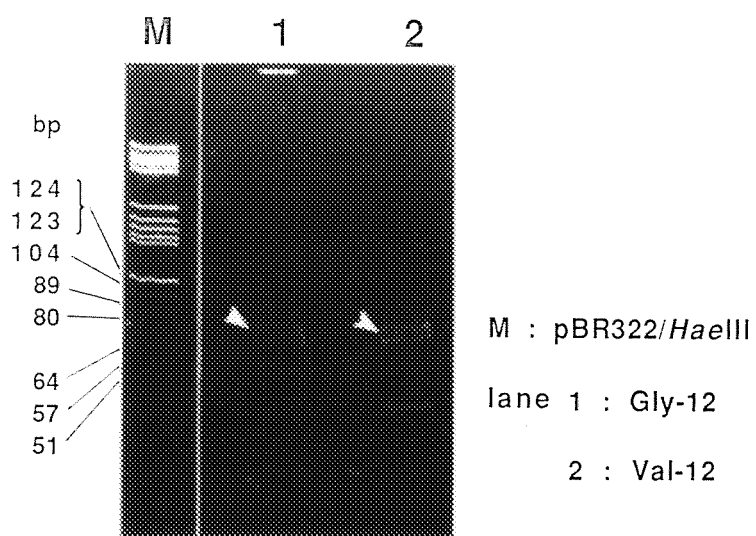


図 2 - 4 DNAカセットの10% PAGEによる精製

(4) pRSV-rg12の制限酵素処理

DNAカセットをベクターに組み込むための第一段階として、正常p21をコードする合成c-Ha-ras遺伝子をRSV-LTRの下流に含むプラスミドpRSV-rg12(第1章参照)のClaI、BssHII処理を行った(図2-5参照)。両酵素は同一の緩衝液(制限酵素用緩衝液)を用いるため、まず、塩(NaCl)濃度の低いBssHII処理を行い、引き続いてエタノール沈澱を行わずにClaI処理を行った。この酵素処理により長鎖(4.8kb)と短鎖(約60bp)の断片が生じるが、この両鎖を分離するために2%低融点アガロースゲル電気泳動を行った。長鎖に相当するバンドをゲルから切り出し、加温してゲルを融解させ、フェノール抽出、クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱によってDNAを回収した。

(5) DNAカセットとベクターのライゲーション

(3)で得られたDNAカセットと(4)で得られたベクターのライゲーションを行った。この両者はともに、ClaI末端(接着性末端)を含むのでClaI部位で選択的に連結する。この際の両者の比は、DNAカセットが確実にベクターへ組み込まれるように、3:1とした。次に、BssHII処理を行うと、DNAカセットの内部にあるBssHII部位で切断が生じ、BssHII末端(接着性末端)となる。さらに、ライゲーションを行うと、ベクター及びカセットのBssHII末端での選択的な連結が生じ、DNAトランスフェクションに用いるためのDNAが得られる(図2-5)。得られたDNAはエタノール沈澱の後、TE緩衝液(1mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5)に溶解した。濃度は臭化エチジウムによる蛍光を利用して見積った。

通常のDNAカセット変換では、2つの制限酵素部位の両者を同時にライゲーションする。今回著者が、この方法を用いなかった理由は、DNAカセットとベクターを確実に結合させるためにカセットを過剰に用いているが、

[1] 通常の方法では、カセット自身が結合してベクターとのライゲーションが、完結しない可能性がある(例えば、BssHII部位で連結してしまうと、ベクターのBssHII部位とは結合し得ない)

[2] カセットが三量体を形成すればベクターへの組み込みが行われるが、生じる遺伝子は機能し得る蛋白質をコードしていない

という2つによる。今回用いた方法でも[1]の可能性はあるが、それはClaI部位のみであり、一方、通常用いられている方法ではClaI部位とBssHII部位の両方である。

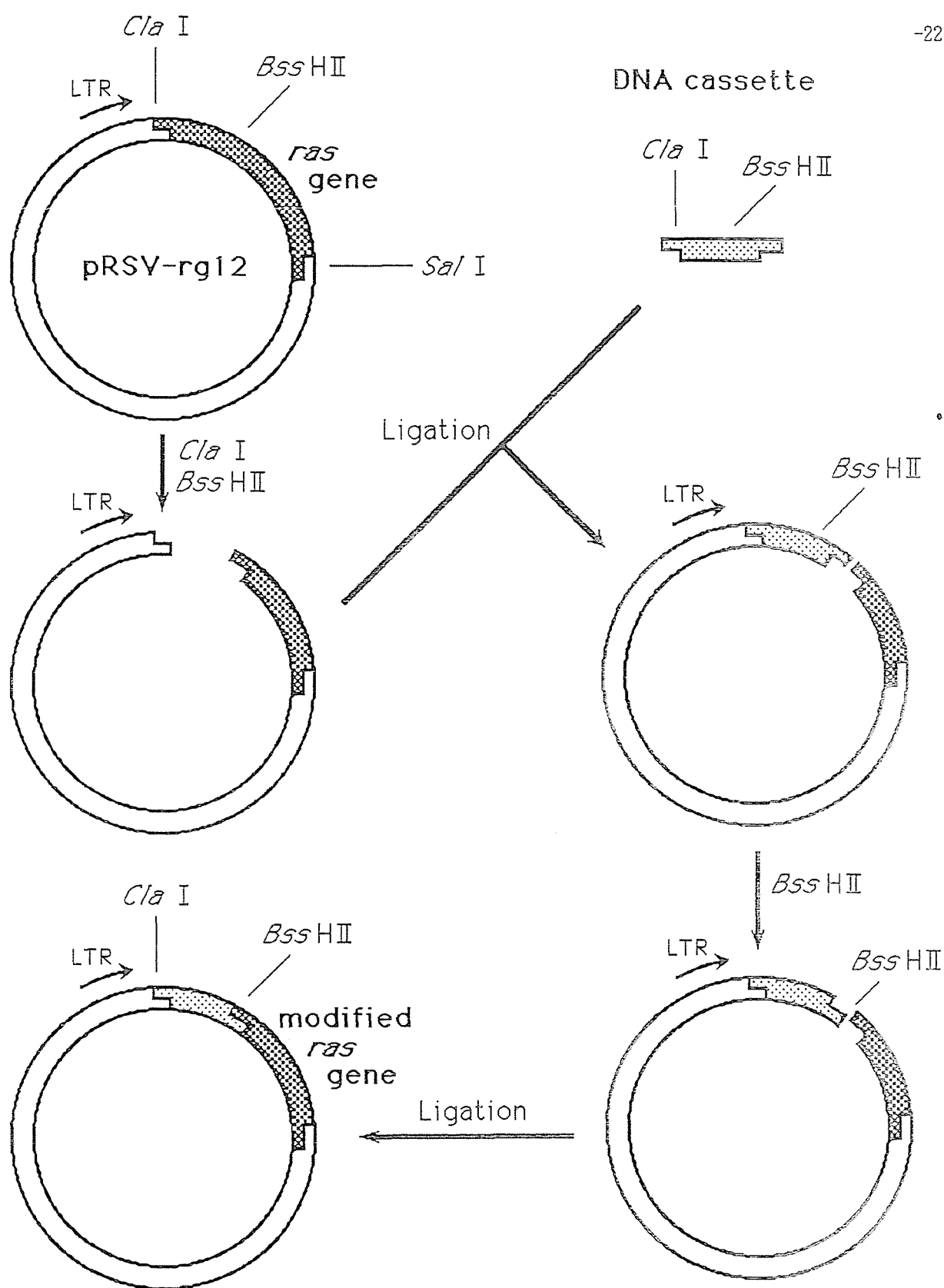


図 2 - 5 DNAカセットのベクターへの組み込み

カセット自身の連結反応を防ぐために、カセットの末端をリン酸化しない方法が大腸菌へのトランスフェクションで用いられることがあるが、哺乳動物細胞へのDNAトランスフェクションではニックが生じていると効率が著しく減少すると考えられる。今回、著者が用いた方法は、3段階の酵素反応があるため手間がかかり、また、エタノール沈澱の際のDNAの損失の可能性が増大するという欠点はあるが、導入すべきカセットを確実にかつ単量体として組み込むことができるという大きな利点を有している。

第2節 NIH3T3細胞へのトランスフェクション

前節で述べたように構築したc-Ha-ras遺伝子を含むベクターをNIH3T3細胞にトランスフェクションした。方法は第1章で述べた通りに行った。ただし、トランスフェクションに用いたDNA量は、20ng及び70ngとした。表2-1に結果（生じたフォーカスの数）を示した。いずれの場合も活性型p21(Val-12)をコードするc-Ha-ras遺伝子はフォーカスの形成を誘導した。一方、正常p21をコードするc-Ha-ras遺伝子は、20ng用いた場合にはフォーカスを形成しなかったが、70ngの場合は若干のフォーカス形成が観察された。これは、第1章でも触れた通り、正常p21が大量に発現されればフォーカスが形成されるという報告⁵³⁾と一致するものである。

以上の結果から、適切なDNA量を用いれば、正常c-Ha-ras遺伝子はフォーカスを形

	20 ng	70 ng
Gly-12 (normal)	0	1 0
Val-12 (activated)	6 3	3 6 3

表2-1 DNAカセット変換法で構築したc-Ha-ras遺伝子によって
形成したフォーカスの数

成せず、活性型c-Ha-ras遺伝子はフォーカスを形成する条件を見い出すことが可能であることが明らかとなった。従って、修飾塩基をc-Ha-ras遺伝子中に導入してNIH 3T3細胞へトランスフェクションし、フォーカスの形成によって突然変異を検出することはこの系を用いることにより可能であると思われる。

第3章以下では、実際に修飾塩基をDNAカセット変換により導入した、合成c-Ha-ras遺伝子を用いての実験について述べる。

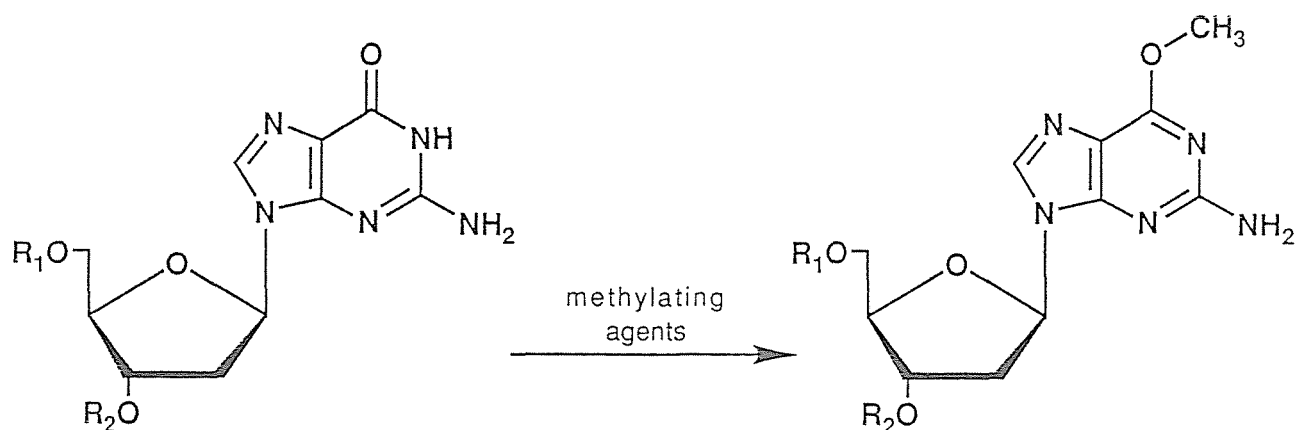
第3章 O^6 -メチルグアニンを含む c-Ha-ras 遺伝子による NIH 3T3 細胞のトランスフォーメーション

第1章、第2章では、合成c-Ha-ras遺伝子がNIH3T3細胞を用いるトランスフェクション実験に有用であることを示した。第3章では、修飾塩基の一つである O^6 -メチルグアニン (O^6 -MeG) をコドン12に導入したc-Ha-ras遺伝子を用いる実験について述べる。第1節では、大腸菌コドンを用いた合成c-Ha-ras遺伝子について、第2節ではDNAカセット部分をヒトc-Ha-ras-1遺伝子の塩基配列にした合成c-Ha-ras遺伝子を用いる実験について述べる。第3節では、得られたトランスフォーマントのc-Ha-ras遺伝子の塩基配列の分析について述べる。

第1節 O^6 -MeGをコドン12に導入した 合成c-Ha-ras遺伝子を用いる実験（大腸菌コドン）

前章では、DNAカセット変換によって構築した合成c-Ha-ras遺伝子が、NIH3T3細胞を用いるDNAトランスフェクション実験に有用であることを示した。そこで、修飾塩基の一つである、 O^6 -MeGをコドン12の2番目の部位に導入することにした。

O^6 -MeGは、 N -ニトロソ- N -メチルウレア(NMU)などのメチル化剤によってDNA中のグアニン塩基がメチル化されることによって生じる修飾塩基である（図3-1）⁵⁷⁾。メチル化剤によってDNA中の様々な部位がメチル化されることが明らかにされている。たとえば、グアニン塩基の N^7 -位、 O^6 -位、アデニン塩基の N^3 -位、ピリミジン塩基（シトシン及びチミン）の O^2 -位、チミン塩基の O^4 -位やリン酸部分がメチル化される。その中で、とりわけ O^6 -MeGが着目されているのは、この修飾塩基がグアニン塩基のエノール型（実際のグアニン塩基はケト型が優先している）に類似した構造を持つために、取り得る水素結合様式がグアニン塩基とは異なると考えられるためである（図3-1参照）。既に、いくつかのグループによって O^6 -MeGを含むDNAを用い

図 3 - 1 Q^6 -MeGの生成

での *in vitro*^{22, 23)} 及び *in vivo*²⁴⁾ でのデオキシヌクレオチドの取り込みが報告されている。それによると、 Q^6 -MeGに対応する位置にはdTMPが取り込まれることが明らかにされている。その結果、G→Aトランジションが生じる。また、Barbacidのグループは雌のラットにNMUを与え、生じた乳癌の細胞の癌遺伝子を分析したところ、c-Ha-ras-1遺伝子のコドン12の2番目の部分にG→Aトランジションが生じていたことを報告している²⁷⁾。これは、c-Ha-ras遺伝子中に Q^6 -MeGが生じた結果であると推定することができる。以上のことから、 Q^6 -MeGは突然変異やras遺伝子の活性化に大きく関わっていると考えられる。

Q^6 -MeGをc-Ha-ras遺伝子のコドン12の2番目の位置に導入するためのDNAカセットを図3-2に示した。図中、 G^* で表しているのが Q^6 -MeGである。 Q^6 -MeGに対応する位置は、Cとなっている。これはc-Ha-ras遺伝子のグアニン塩基がメチル化を受けた場合を想定しているためであり、また、相補鎖にC以外の塩基があれば Q^6 -MeGとは無関係にc-Ha-ras遺伝子を活性化してしまうためである。また、対照としてGly-12^{*}（正常）c-Ha-ras遺伝子（Gの位置がG）及びVal-12^{*}（活性型）c-Ha-ras遺伝子（Gの位置がT）を用いることとした。Val-12 p21をコードするc-Ha-ras遺伝子は、第2章とは

```

      5      10      15
Met-Thr-Gln-Tyr-Lys-Leu-Val-Val-Val-Gly-Ala- -Gly-Val-Gly-Lys-Ser-Ala-
(----- U1 -----) (----- U2 -----) (----- U3 -----)
CGAT ATG ACC GAA TAC AAA CTG GTT GTA GTT GGC GCT GGT GGT GTA GGC AAA AGC GCG GCG CTG ACC ATT CAG TTG ATC
TA TAC TGG CTT ATG TTT GAC CAA CAT CAA CCG CGA CCA CCA CAT CCG TTT TCG GCG GCG GAC TGG TAA
(----- L19 -----) (----- L18 -----) (----- L17 -----)
C121 BssH11

```

図 3 - 2 $\underline{Q}^6$ -MeGを含むDNAカセット

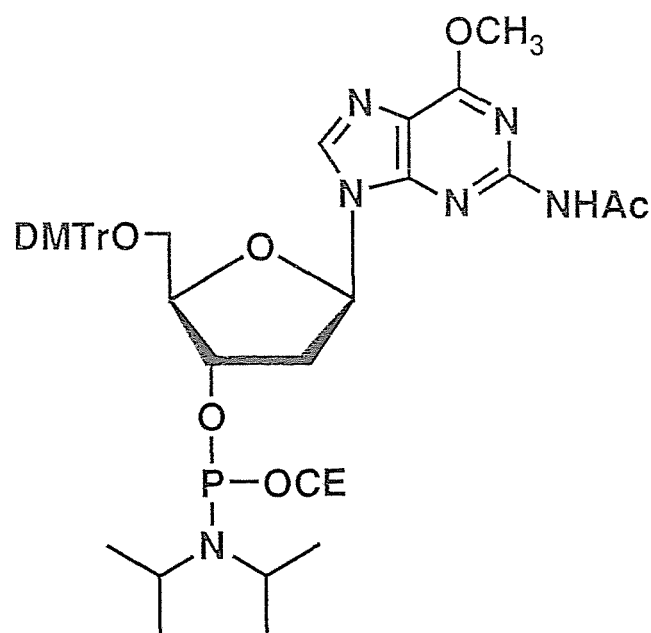


図 3 - 3 $\underline{Q}^6$ -メチルデオキシグアノシンホスホロアミダイト体⁵³⁾

異なり、コドン12の2番目の塩基対がT-C（ミスマッチ）となっている。これはDNAカセット構築の際の条件をできるだけ統一し、操作を簡便にするためであり、また、生じるフォーカスの数を比較しやすいと考えたためである。

（１） Q^6 -MeGを含むオリゴヌクレオチドの合成と精製

Q^6 -MeGを含むオリゴヌクレオチド、U2-35Me（35は開始コドンの1番目の塩基のAを1とした場合のコドン12の2番目の位置を表し、また、Meは Q^6 -MeGを示す）は当教室で合成されたホスホロアミダイト体（図3-3）をビルディングブロックとして、DNA自動合成機を用いる固相亜リン酸トリエステル法により合成し、高純度に精製されたものを用いた^{5,6)}。

（２） Q^6 -MeGを含むオリゴヌクレオチドの安定性の検討

DNAカセットを構築する前に、 Q^6 -MeGを含むオリゴヌクレオチドの安定性を以下の条件下で調べることにした。

- 〔１〕最初のリン酸化で用いる緩衝液中での安定性（37℃、60分）
- 〔２〕アニーリング、ライゲーションで用いる緩衝液中での安定性（加熱→急冷→加熱→徐冷→15℃、2時間）
- 〔３〕DNAカセットのリン酸化で用いる緩衝液中での安定性（37℃、60分）
- 〔４〕BssHII消化の際に用いる緩衝液中での安定性（50℃、3時間）

逆相カラムにより脱塩した後、逆相HPLCで分析したところ、他のピークが出現しなかったことから、 Q^6 -MeGを含むオリゴヌクレオチドはDNAカセットを構築する条件下で安定であることが明らかとなった。

（３）DNAカセットの構築とベクターへの組み込み

DNAカセットの構築とベクターへの組み込みは、第2章第1節で述べた方法に従って行った。ただし、最初のライゲーションの後の10% PAGEで副生成物が多数生成しているのが観察された（データは示さなかった）。

（４）NIH3T3細胞へのトランスフェクション

NIH3T3細胞へのトランスフェクションは、既に述べたように、リン酸カルシウム法により行った。用いたベクターの量は1回目は20ngと50ng、2回目は50ngと100ng

とした。活性型(Val-12)c-Ha-ras遺伝子はフォーカスを形成したのに対し、Q⁶-MeGを含むc-Ha-ras遺伝子は有意なフォーカス形成は観察されなかった。

第2節 Q⁶-MeGをコドン12に導入したc-Ha-ras遺伝子による NIH3T3細胞のトランスフォーメーション(ヒト配列)⁵⁹⁾

第1節では、合成c-Ha-ras遺伝子の既存のオリゴヌクレオチドを最大限利用してQ⁶-MeGを含むc-Ha-ras遺伝子を構築したが、有意なフォーカスの形成を観察することができなかったことを述べた。そこで、Q⁶-MeGを含むDNAカセットのヌクレオチド配列をヒトc-Ha-ras-1遺伝子の配列⁶⁰⁾とした。これは以下に示す理由による。

- [1] 図3-2に示したようにQ⁶-MeGはオリゴヌクレオチドU2の3'末端から2番目の位置にある。Q⁶-MeGはCとwobble塩基対を形成し得る⁶¹⁾(図3-10参照)が、その塩基対が不安定なため、または、Q⁶-MeG-C塩基対のために構造変化が生じ、ライゲーションの効率が著しく低くなった可能性がある。
- [2] 先に述べたようにライゲーションの過程で副生成物が数多く生じており、DNAカセットの再設計の必要がある。
- [3] 大腸菌のアンピシリナーゼ遺伝子を用いた実験により、Q⁶-MeGが修復されにくい部位のコンセンサス配列はGCTGGTCGCCAGGAGG(GはQ⁶-MeGを示す)であり、この配列はヒトやラットのc-Ha-ras遺伝子のコドン12番目を含む領域とホモロジーが高い(ヒトのc-Ha-ras-1遺伝子の場合、GgTGGgCGCC-GGcGGという配列を有しており、16塩基中12塩基が一致している。ここで大文字はコンセンサス配列と一致している部分を、小文字は一致していない部分を示しており、-は欠失を表し、 はコドン12を示す)⁶²⁾。これは大腸菌における結果を示したものであるが、これは大腸菌のQ⁶-MeG-DNA-メチルトランスフェラーゼ⁶³⁾により修復を受けにくい部位と解釈することが可能であり、同じ酵素作用を有するヒトのメチルトランスフェラーゼ⁶⁴⁻⁶⁶⁾やNIH3T3細胞中のメチルトランスフェラーゼでも同様であると考えられる。一方、大腸菌の最適コドンを用いて設計された合成c-Ha-ras遺伝子の場合、

その相当する配列はagTtGgCGCt-^{*}GGtGGであり、コンセンサス配列との一致の程度はヒトc-Ha-ras遺伝子に比較して小さい(16塩基中、9塩基)。従って、DNAカセットの配列をヒトのc-Ha-ras遺伝子の配列とした方が、修復されにくい可能性があり、フォーカスが形成しやすいと考えられる。

- [4] 相補鎖の $\text{Q}^5\text{-MeG}$ の対応する位置へのデオキシヌクレオチドの取り込みは、 $\text{Q}^5\text{-MeG}$ の3'-隣接部位の配列によって影響を受ける。3'-側がCの場合はdTMPの方がdCMPよりも数十倍取り込まれやすいが、Tの場合はdTMPとdCMPの取り込まれやすさは同程度と報告されている²³⁾。ヒトc-Ha-ras-1遺伝子の場合、コドン12の配列はGGCであり(Gは $\text{Q}^5\text{-MeG}$ を導入する位置)、大腸菌の最適コドンを用いている元来の合成c-Ha-ras遺伝子ではGGTである。従って、ヒトc-Ha-ras遺伝子の配列を用いた場合、相補鎖にdTMPが取り込まれやすい可能性があり、フォーカスが形成しやすいと考えることができる。

再設計したDNAカセットを図3-4に示す。コドン12を含むオリゴヌクレオチドHRU2は修飾塩基を導入する位置がオリゴヌクレオチドの中央付近になるように設計した。HRU2は、また、他の修飾塩基を(他の部位に)容易に導入することを可能とするために、合成と精製が簡便にできる比較的短鎖の12鎖長とした。

```

      1                               12
Met-Thr-Glu-Tyr-Lys-Leu-Val-Val-Val-Gly-Ala- -Gly-Val-Gly-Lys-Ser-
(-----HR U1-----) (---HR U2---) (-----HR U3-----)
CGAT ATG ACG GAA TAT AAG CTG GTG GTG GTG GGC GCC GGC GGT GTG GGC AAG A GCGCGC TGTAGG
TA TAC TGC CTT ATA TTC GAC CAC CAC CAC CCG CGG CCG CCA CAC CCG TTC T CGCGCG ACAT
(-----HR L2-----) (-----HR L1-----)
C1aI                                     BssHII

```

*
G = $\text{Q}^5\text{-MeG}$, G, A or T

図3-4 再設計したDNAカセット

(1) HRU2-35Meの合成と精製

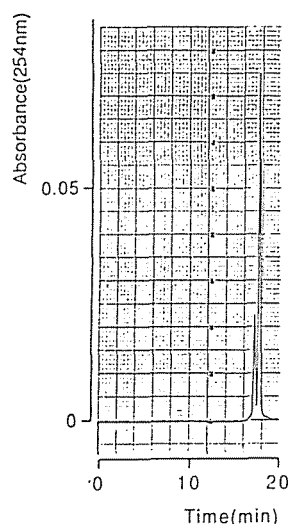
第1節では当教室で合成されたホスホロアミダイト体を用いたが、 $\underline{Q}^6$ -MeGを含むオリゴヌクレオチド、HRU2-35Meの合成の際にはAmerican Bionetics社から購入可能なホスホロアミダイト体を用いることにした。この化合物は、塩基部の保護にイソブチリル基を用いている点が図3-3に示した化合物と異なる。これをビルディングブロックとし、Applied Biosystems社380A DNA自動合成機を用いて固相亜リン酸トリエステル法によってHRU2-35Meの合成を行った。カップリング時間の延長等のプログラムの変更は特に行わなかった。

続いて、アンモニア水処理による塩基部の脱保護を行った。通常の場合(55~60℃、5~6時間)の加熱条件では $\underline{Q}^6$ -MeGのアミノ基を保護しているイソブチリル基は脱保護されない(参考: 50℃、16時間では不十分であることが報告されている⁶⁷⁾)。一方、65℃、72時間という条件では、イソブチリル基の脱保護は完全に進行するが、2,6-ジアミノプリン体の生成や脱メチル化反応によるグアニン体の生成が報告されている⁶⁸⁾。2,6-ジアミノプリンはそれ自身、極めて変異原性の高い塩基であり、 $\underline{Q}^6$ -MeGによる突然変異に関する実験の誤まった解釈をもたらす可能性がある。今回は、イソブチリル基の脱保護が不完全であっても2,6-ジアミノプリンが生成しないような穏やかな条件を用いることとし、62℃で50時間加熱した。

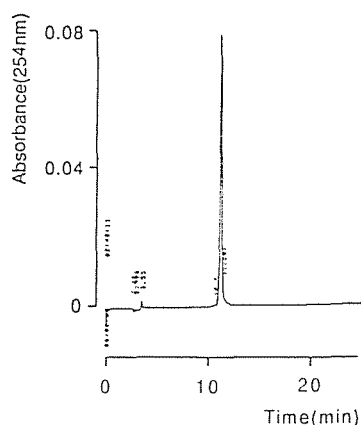
HRU2-35Meの精製は、通常のオリゴヌクレオチドと同様に行った。ジメトキシトリチル基を脱保護した後の逆相HPLCの溶出パターンを図3-5 aに示す。2本のピークが検出されたが、溶出時間が早いものはメチル基が除去されたオリゴヌクレオチド、溶出時間が遅いものは目的とする $\underline{Q}^6$ -MeGを含むオリゴヌクレオチド(HRU2-35Me)と思われた。 $\underline{Q}^6$ -MeGの代わりにグアニンを含むオリゴヌクレオチド(これは対照として用いる正常c-Ha-ras遺伝子の構築に用いる)と混合後に再び逆相HPLCで分析したところ、グアニンを35位に含むオリゴヌクレオチドのピークと溶出時間の早いピークが重なったことを確認した。従って、 $\underline{Q}^6$ -MeGを含むオリゴヌクレオチドは溶出時間の遅いピークに対応すると思われたので、この画分を分取した。また、データは示していないが、別の目的で作成した $\underline{Q}^6$ -MeGを含むオリゴヌクレオチドの場合、さらに溶出時間の遅いピークが検出された。これは、未確認ではあるが、イソブチリル基が脱保護されていないオリゴヌクレオチドと思われる。

分取したHRU2-35Meを再び逆相HPLCにより分析したところ、単一のピークとして観察され(図3-5 b)、また、さらにイオン交換HPLCでも単一ピークであった。従

a)



b)



a)カラム:YMC-AM324

溶出液 A:0.1M TEAA

B:25% CH₃CN,0.1M TEAA

グラジエント:30→60 B%(20分)

流速:2mℓ/分

b)カラム:YMC-AM303

溶出液 A: 5% CH₃CN,0.1M TEAAB:25% CH₃CN,0.1M TEAA

グラジエント:20→50 B%(20分)

流速:1mℓ/分

図 3 - 5 HRU2-35Meの逆相HPLCによる分析 a)分取前 b)分取後

って、 $\underline{Q}^6$ -MeGを含むオリゴヌクレオチドは極めて高純度に精製されたことが示された。また、ヘビ毒ホスホジエステラーゼ及び大腸菌アルカリ性ホスファターゼを用いる完全水解^{6,9)}後の逆相HPLCによる組成分析の結果、dG,dC,dT及び $\underline{Q}^6$ -メチルデオキシグアノシン以外の成分は検出されず(dAは含まれていない)、その比も理論値と一致することを確認した。

(2) $\underline{Q}^6$ -MeGを含むオリゴヌクレオチドの安定性の検討

第1節において、オリゴヌクレオチド中の $\underline{Q}^6$ -MeGは検討を行った条件下で安定であることを述べた。ここではさらに、フェノール抽出、クロロホルム抽出を行った場合でも安定かどうかを確認することにした。これは、DNAカセットの精製に10% PAGEの代わりに、より回収率の高いと思われる低融点アガロースゲル電気泳動を用いることを計画したが、その際には抽出操作が必要なためである。オリゴヌクレオチドを含む水層に対し、抽出操作を行った後、エーテル抽出を行ってフェノールを完全に除去し、逆相HPLCにより分析した。溶出位置に変化は観察されず、 $\underline{Q}^6$ -MeGを含むオリゴヌクレオチドはフェノール抽出、クロロホルム抽出に対しても安定であ

ることが明らかとなった。

(3) DNAカセットの構築とベクターへの組み込み

DNAカセットの構築とベクターへの組み込みは、既に述べた方法により行った。ただしアニーリングは2つのブロックに分けて行い、また、DNAカセットの精製には、(2)で述べたように10% PAGEに代えて5% 低融点アガロースゲル電気泳動を用いた(図3-6a)。図中➤で示したバンドがDNAカセットに相当するものである。いくつかの副生成物が観察されるが、目的の鎖長(65bp)のバンドがメインとなっている。再設計したDNAカセットは特にダイレクトリピートの除去などの操作⁷⁰⁾を行わずにヒトc-Ha-ras遺伝子の配列をそのまま用いているが、それがアニーリングの際に問題を引き起こしていないことを示している。また、アガロースゲル電気泳動により精製したDNAカセットを10% PAGEにより分析したところ、目的の鎖長の位置以外にバンドは観察されず、高純度に精製できたことが明らかになった(図3-6b)。

また、ベクターの定量には、InVitrogen社から購入したDNA DIPSTCKを用いた。

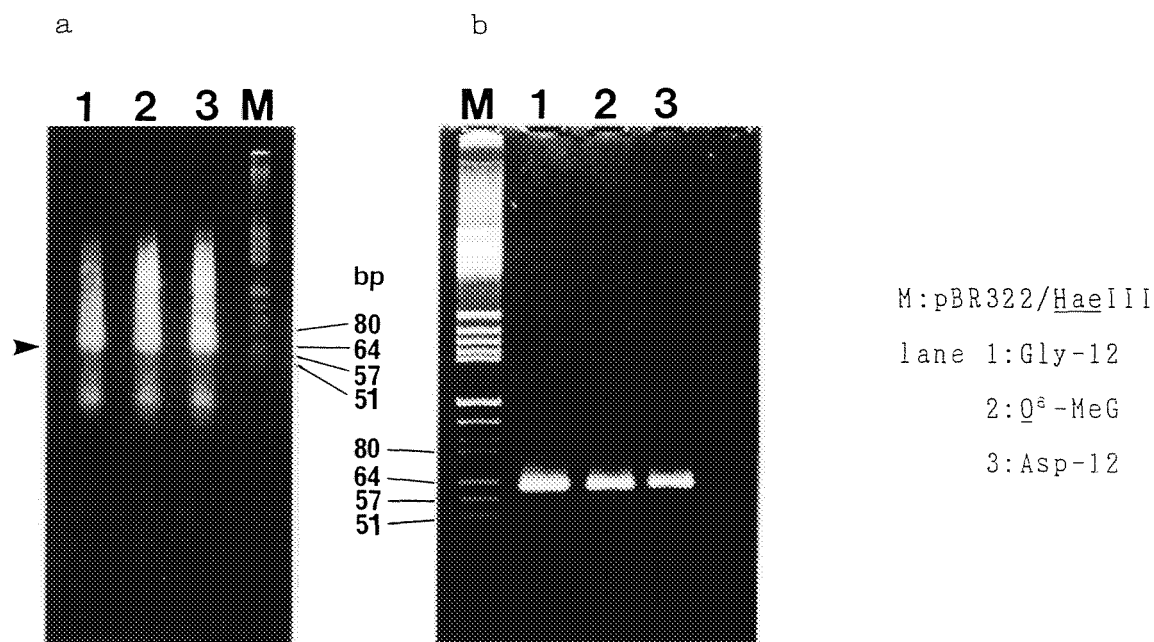


図3-6 DNAカセットの精製

- a 5% 低融点アガロースゲル電気泳動による精製
b 精製後のDNAカセットの10% PAGEによる分析

(4) NIH3T3細胞のトランスフォーメーション

構築したベクターを既に述べた方法によりNIH3T3細胞へトランスフェクションした。対照として、正常c-Ha-ras遺伝子（コドン12はGGC）、及び活性型のVal-12（コドン12はGTC）またはAsp-12（コドン12はGAC）p21をコードするc-Ha-ras遺伝子を用いた。トランスフェクションに用いたDNAの量は50ng及び150ngとした。その結果、 O^6 -MeGを含むc-Ha-ras遺伝子は、正常c-Ha-ras遺伝子に比較して多くのフォーカスを形成した（表3-1）。このことは、 O^6 -MeGによってc-Ha-ras遺伝子が活性化し得ること、すなわち、 O^6 -MeGの生成はc-Ha-ras遺伝子の活性化の直接的な原因となり得ることを示している。また、生じたフォーカスの数は対照として用いた活性型c-Ha-ras遺伝子（Val-12またはAsp-12）の数十分の一であった。 O^6 -MeGのメチル基を除去する、 O^6 -MeG-DNA-メチルトランスフェラーゼ⁶³⁾が知られている。この酵素はヒト⁶⁴⁻⁶⁶⁾を含む様々な生物から発見されており、 O^6 -MeGが細胞にとって除去すべき対象であることを示している。比較的低いフォーカス形成能は、NIH3T3細胞中において、導入した O^6 -MeGのほとんどがこの酵素により修復された結果と思われる。

次にフォーカスを形成したクローンを単離し、c-Ha-ras遺伝子コドン12付近の配列を分析することにした。

	Experiment 1		Experiment 2	
	50 ng	150 ng	50 ng	150 ng
Gly-12 (normal)	1	2	0	2
O^6 -MeG	6	6	2	4
Asp-12 (activated)	1 4 0	3 6 2	—	—
Val-12 (activated)	—	—	7 6	1 6 3

表3-1 c-Ha-ras遺伝子によって形成されたフォーカスの数

第3節 トランスフォーマントのc-Ha-ras遺伝子の配列分析⁵³⁾

点突然変異の検出法として、現在までに様々な方法が報告されている^{71)・72)}。オリゴヌクレオチドを用いてのハイブリダイゼーション⁷³⁾、ミスマッチを含む二本鎖のRNaseA処理^{74)・75)}や化学反応を用いるもの^{76)・77)}、さらにはDGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)法⁷⁸⁾、RFLP(restriction enzyme fragment length polymorphism)法⁷⁹⁾やライゲーション法⁸⁰⁾などが数多く用いられてきた方法である。最近、PCR⁸¹⁾と組み合わせてのダイレクトシーケンシングもいろいろ報告されている^{82)・83)}。また、第6章で述べるPCR-SSCP法⁸⁷⁾も簡便な点突然変異の検出法である。最近、LCR(ligase chain reaction)またはLDR(ligase detection reaction)という新しい方法も開発されている⁸⁸⁾。

今回、著者はPCRと制限酵素処理を組み合わせることにより突然変異の検出を行うことにした。Haliassosらはc-Ki-ras遺伝子のコドン12の突然変異の検出に、コドン11の3番目の塩基に変異を導入するプライマーを用いてPCRを行って制限酵素部位を作成し、コドン12の1または2番目の塩基に突然変異が生じた場合には切断が生じないことを利用して、突然変異の検出を行っている⁸⁹⁾。今回、著者は、特定の突然変異が生じた場合に、制限酵素部位を形成するような変異を導入するプライマーを用いてPCRを行い、制限酵素による切断の有無により突然変異の検出を行うことにした

(図3-7)。たとえば、コドン11番目の2番目の位置にC→Tの変異を導入するプライマーを用いた場合、Q⁵-MeGを導入した部位がAに置換しているとコドン11と12で--GTCGAC--という配列を生じる。これは制限酵素SalIの認識配列であり、SalI反応により切断が生じればコドン12の2番目の位置がAに置換していることになる。同様にQ⁶-MeGを導入した位置がT,Cに置換している場合に切断が生じるようなプライマーを用いることにより他の突然変異も検出が可能である。今回用いたプライマーの一部とコドン12付近の配列、及び切断を生じる酵素を図3-8に示した。Aへの変異の検出には既に述べたSalIを、Tへの変異の検出にはAatIIを、Cへの変異の検出にはNarIをそれぞれ用いることにした。また、c-Ha-ras遺伝子のコドン11と12は、制限酵素認識部位となっており(--GCCGGC--という配列であり、これはNaeIの認識部位である。また、CCGGという配列はHapII,HpaIIの認識部位である。)、変異を導入しないプライマーを用いてのPCR産物がこれらのいずれかの酵素により切断を受ければ変異を生じていない(正常型の)c-Ha-ras遺伝子を有していることが明らかとなる。

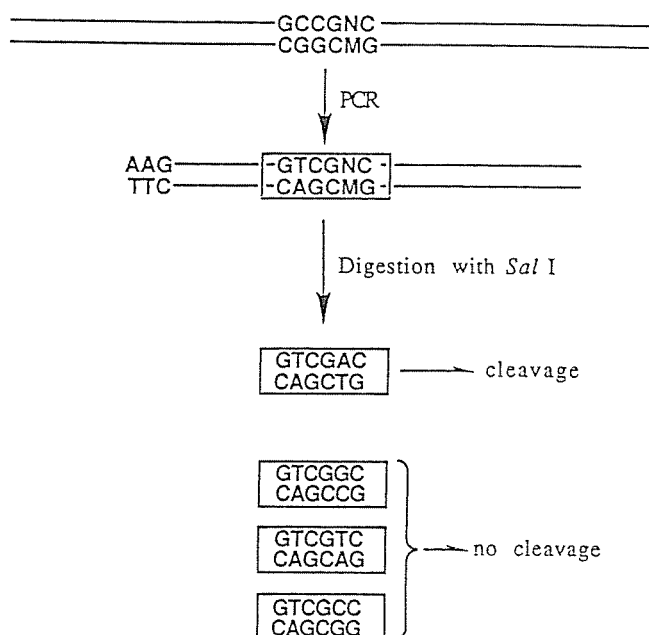


図 3 - 7 PCR-制限酵素法の原理



図 3 - 8 突然変異の解析に用いたプライマーと制限酵素

まず、コドン12番目の2番目の位置の塩基がG（正常型）、A、T、Cとなっているc-Ha-ras遺伝子断片を調製し、この方法による検出がその位置の塩基に特異的であることを確認することにした。その結果、制限酵素による切断は、図3-8に示したようなプライマーと酵素の組合せの時にのみ生じ、この方法による検出がコドン12の2番目の塩基に特異的であることを確認した。

次に、 O^6 -MeGを含むc-Ha-ras遺伝子によりトランスフォームした細胞中のコドン12の2番目の塩基の配列を調べることにした。ジェノミックDNAを抽出した後、PCRによりコドン12を含むc-Ha-ras遺伝子断片を増幅させた。2.5% 低融点アガロースゲル電気泳動により目的のDNA断片を精製した後、変異を導入するプライマーを用いてのPCRを行った。適当な制限酵素とインキュベートした後、8% PAGEを行って切断の有無を調べた。その結果を図3-9に示す。レーン1~12はSalI処理を行ったサンプルであり、レーンの番号はクローンの番号と一致している。SalIにより切断を受けたPCR産物は、先に述べたように、 O^6 -MeGを導入した位置がAに置換したものである。12クローンを分析したところ、8クローンに切断が観察された。一方、AatII（レーン13~15）やNarI（レーン16~18）処理を行った場合には切断が観察されなかった。このことは O^6 -MeGの導入によって、TやCへの変異が生じなかったことを示している。4クローン（クローン1,2,5,9）はいずれの酵素によっても切断を受けなかったことから、突然変異が起こっていない、正常型のc-Ha-ras遺伝子を含んでいるものと思われる。このことはHapII処理により切断が生じたことから支持される。また、いくつかのクローンは突然変異を起こしたc-Ha-ras遺伝子と正常c-Ha-ras遺伝子の両方を有していた。トランスフェクションの際に数コピーの遺伝子が導入されることは起こり得ることであり、この結果は1コピーのc-Ha-ras遺伝子の活性化によって細胞をトランスフォームさせることが可能であることを示している。

既に述べたように、 O^6 -MeGはNMUなどのメチル化剤によって生じる修飾塩基である。いくつかのグループによってin vitro^{22,23)}及びin vivo²⁴⁾での O^6 -MeGに対するデオキシヌクレオチドの取り込みに関する実験が行われており、 O^6 -MeGに対応する位置にdTTPが取り込まれることが示されている。最近、哺乳動物細胞を用いて O^6 -MeGの誘導する突然変異に関する研究が報告された^{25,26)}。いずれの場合も O^6 -MeGを導入した位置にG→Aトランジションが観察されている。今回著者が得た結果もこれと同じであり、大腸菌を用いての結果²⁴⁾と合わせて考えると、 O^6 -MeGのもたらす変異は種の違いに関わらずG→Aトランジションであると結論づけることが可能であ

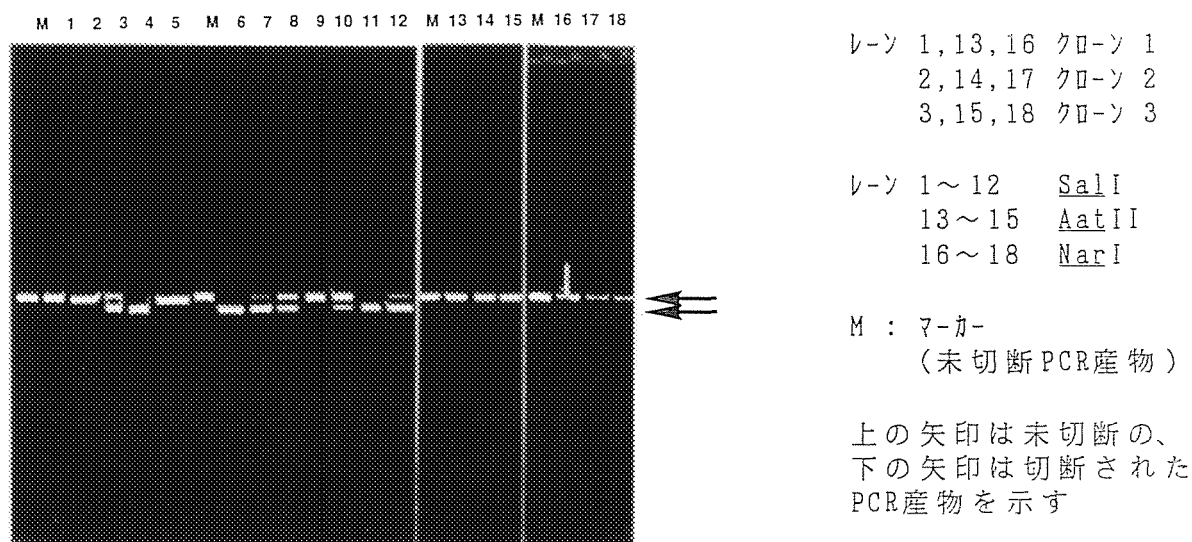
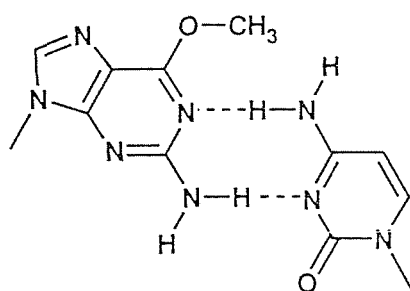


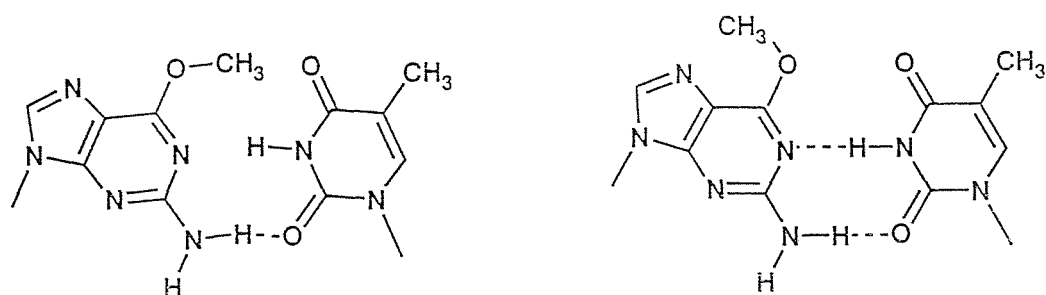
図 3 - 9 $\underline{Q}^{\delta}$ -MeGを導入した位置の制限酵素による解析

る。

*in vitro*における複製実験の結果、 $\underline{Q}^{\delta}$ -MeGに対応する位置にはdTMPだけではなくdCMPも相補鎖に取り込まれること、その割合は $\underline{Q}^{\delta}$ -MeGの3'-隣接部位のヌクレオチドによって影響を受けることが明らかにされている²³¹。 $\underline{Q}^{\delta}$ -MeGを含むオリゴヌクレオチドを用いて、 $\underline{Q}^{\delta}$ -MeG-C塩基対、 $\underline{Q}^{\delta}$ -MeG-T塩基対の熱的安定性⁹²⁾や二本鎖DNAの構造解析がなされている^{61, 91-93)}。それによると、 $\underline{Q}^{\delta}$ -MeGはCとwobble塩基対⁶¹⁾を、また、TとはWatson-Crick型の塩基対^{91, 92)}を形成する(図3-10)。熱的には、 $\underline{Q}^{\delta}$ -MeG-C対の方が $\underline{Q}^{\delta}$ -MeG-T対よりも安定である⁹³⁾。 $\underline{Q}^{\delta}$ -MeGに対応する位置にはdTMPが取り込まれることは、上記の実験結果と照らし合わせると極めて興味深いものである。すなわち、DNAポリメラーゼによる相補鎖へのヌクレオチド取り込みは、最終産物の熱的安定性だけで決定されるのではなく、新たに形成される塩基対の形(C1'-C1'間の距離や、リン酸ジエステル結合の形成しやすさなど)にも大きく依存していることを示している。 $\underline{Q}^{\delta}$ -MeG-T塩基対は熱的には不安定であるが、Watson-Crick型の塩基対を形成するために、dTMPが取り込まれやすいと思われる。



O^6 -MeG - C pair



O^6 -MeG - T pair

図 3 - 1 0 O^6 -MeG-C塩基対と O^6 -MeG-T塩基対^{51,91,92)}

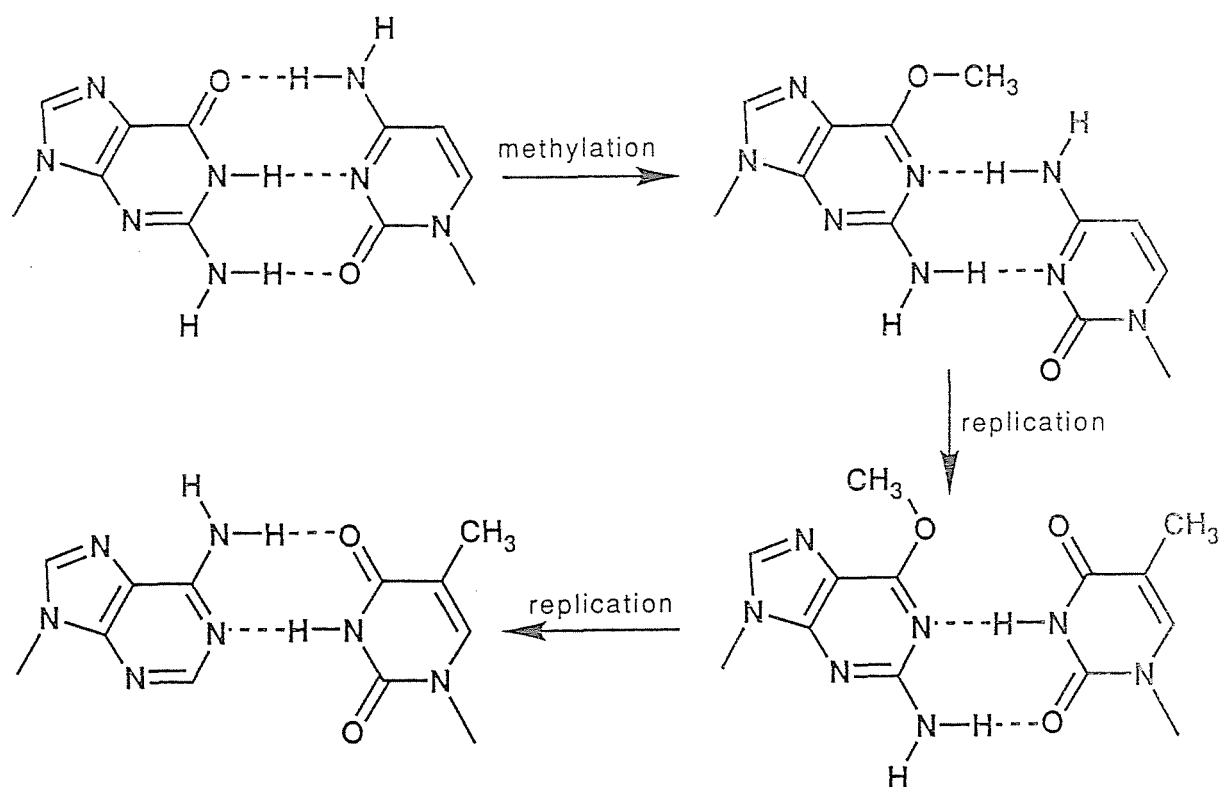


図 3 - 1 1 O^6 -MeGによるG→Aランジッジョン

図3-11には、 O^6 -MeGの生成によって生じるG→Aトランジションの機構のモデルを示した。Gがメチル化され O^6 -MeGが生じ、修復される前に複製が生じると、相補鎖にある割合でTが取り込まれる。次の複製の際にはそのTに対応する位置にAが取り込まれる結果、G→Aの変異が生じる（この図では O^6 -MeG-T対は二本の水素結合を持つように示してある）。この変化がc-Ha-ras遺伝子のコドン12の2番目の塩基に生じると、p21の12番目のアミノ酸がGlyからAspへと変化し、c-Ha-ras遺伝子を活性化させる。

最近、Mitraらは著者の用いた方法と類似の方法を用いて、c-Ha-ras遺伝子コドン12番目に導入した O^6 -MeGの誘導する突然変異について報告した²⁵⁾。彼らも著者と同様に O^6 -MeGによってG→Aトランジションが生じ、c-Ha-ras遺伝子を活性化することを示している。彼らの用いた実験系は、著者が用いた実験系と若干異なっている。第一に、彼らはラットのc-Ha-ras遺伝子を用いており、著者はコドン12付近がヒトの配列となっている合成c-Ha-ras遺伝子を用いている。すなわち、コドン12付近の配列は--GCT GGA GGC--（ラット）であるのに対し--GCC GGC GGT--（ヒト）となっている。第二に、彼らはラット由来のRat-4細胞を用いているのに対し、著者はマウス由来のNIH3T3細胞を用いている。しかしながら類似の結果が得られたことから、 O^6 -MeGによってG→Aトランジションが生じることは、生物種や3'-側の配列とは関わりなく一般的な現象であると思われる。

この章では、合成c-Ha-ras遺伝子が修飾塩基を用いるトランスフォーメーションの実験に有用であることを示した。しかし、正常c-Ha-ras遺伝子によってもNIH3T3細胞がトランスフォームしたことは、この系にはまだ改良の余地があることを示している。それについては次章で述べる。

第4章 8-ヒドロキシグアニンを含む c-Ha-ras遺伝子によるNIH 3T3細胞のトランスフォーメーション

前章では、O⁶-メチルグアニンをc-Ha-ras遺伝子に導入した実験について述べた。第4章では、修飾塩基として8-ヒドロキシグアニン(8-OHG)を用いた実験について述べる。第1節では前章と同様に、pRSV-rg12をベクターの調製に用いた場合のトランスフェクション実験について、第2節ではDNAカセット変換のための新しいベクターの構築について、第3節では新しいベクターを用いてのトランスフェクション実験について述べる。

第1節 8-OHGをコドン12に導入した合成c-Ha-ras遺伝子を用いる実験(ベクターの調製にpRSV-rg12を用いた場合)

8-OHGは、還元剤-O₂、金属イオン-O₂、ポリフェノール-H₂O₂-Fe³⁺、アスベスト-H₂O₂や放射線といった、酸素ラジカルを生じる様々な試薬によってDNA中のグアニン塩基の8位が水酸化されることによって生成する修飾塩基である⁹⁴⁻⁹⁸⁾(図4-1)。8-OHGは突然変異や発癌の過程、老化にも関係があると思われる^{99,100)}。口野らは8-OHGを含む鋳型DNAを調製し、Klenowフラグメントによる複製実験を行い、8-OHGに対応する位置にランダムなヌクレオチドが取り込まれることを見い出した³⁴⁾。さらに隣接ピリミジン部位に対応する位置にも読み間違いが起こることを報告しており³⁴⁾、極めて興味深い修飾塩基である。

著者は前章で述べた方法を用いて、8-OHGを合成c-Ha-ras遺伝子のコドン12の2番目の位置に導入し、NIH3T3細胞へトランスフェクションすることを計画した。DNAカセットは図3-4中のGが8-OHGであるものに相当する。

(1) 8-OHGを含むオリゴヌクレオチドの合成と精製

実験に用いた8-OHGを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドは当教室で合成された

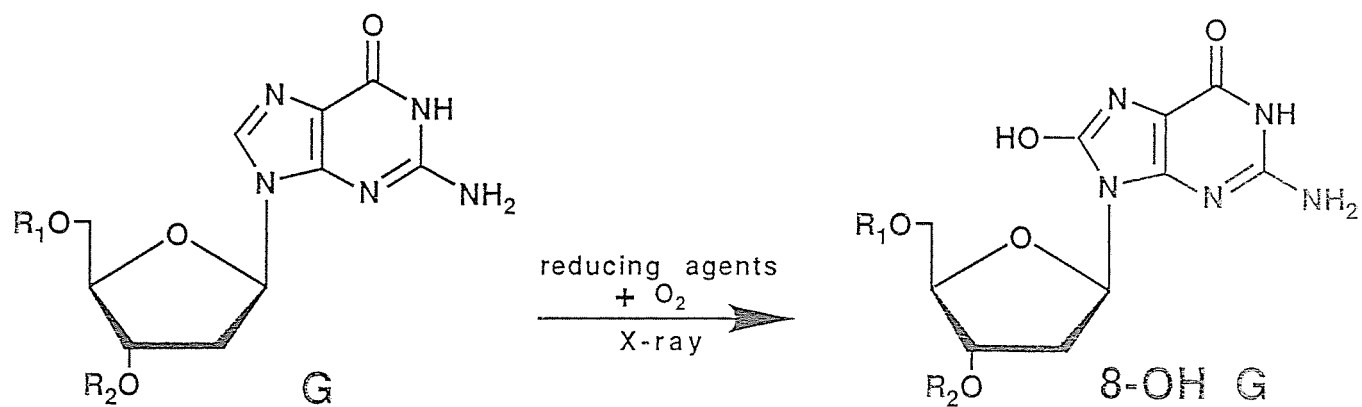
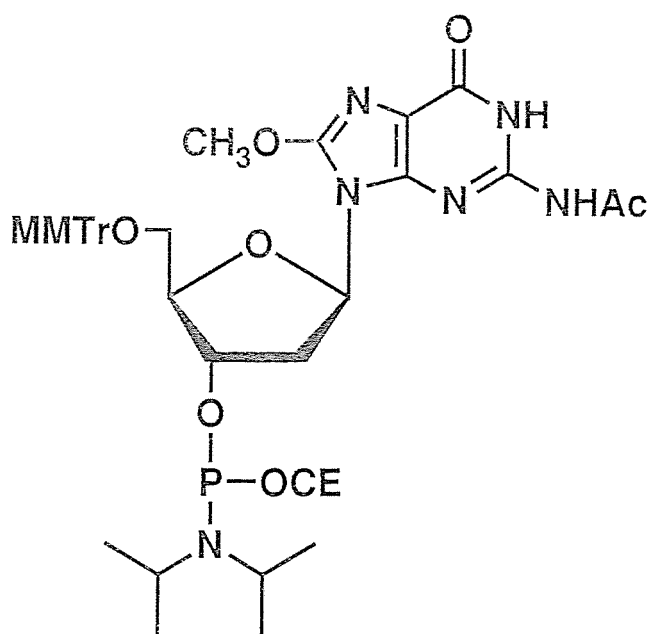


図 4 - 1 8-OHGの生成



MMTr : モノメトキシトリチル

図 4 - 2 8-メトキシデオキシグアノシンホスホロアミダイト体¹⁰¹⁾

ホスホロアミダイト体（図4-2）¹³¹⁻¹³³をビルディングブロックとしてDNA自動合成機により合成されたものである。このホスホロアミダイト体は、8-OHGがアルカリに対して不安定であることから¹³⁴、8-ヒドロキシ体ではなく8-メトキシ体となっている。また、5'-水酸基の保護基にはジメトキシトリチル基では酸に対して著しく不安定であるために、より安定なモノメトキシトリチル基を用いている。オリゴヌクレオチドは高純度に精製された後、8-メトキシ基をチオフェノール処理することにより8-ヒドロキシ体へと変換し、さらに精製されたものである。完全水解⁶⁹によりヌクレオシドの組成比及び純度を確認した。

（2）8-OHGを含むオリゴヌクレオチドの安定性の検討

第3章でも述べたように、DNAカセット構築の前に、8-OHGを含むオリゴヌクレオチドの安定性を調べることにした。特に、最初のリン酸化に用いる緩衝液のpHはかなりアルカリ性の9.5であり、とりわけ確認をする必要がある。調べた条件は第3章第1節及び第2節で述べた条件と同一である。HPLCで分析した結果、8-OHGはDNAカセット構築の条件下では安定であることが明らかとなった。

（3）DNAカセットの構築とベクターへの組み込み

DNAカセットの構築及びベクターへの組み込みは、既に述べた方法で行った（第2章、第3章参照）。

（4）NIH3T3細胞へのトランスフェクション

第1章、第2章で述べたようにリン酸カルシウム法によりトランスフェクションを行った。用いたベクターの量は、50ng及び150ngである。8-OHGを含むc-Ha-ras遺伝子は正常型c-Ha-ras遺伝子とほぼ同程度のトランスフォーム活性しか示さなかった（データは示していない）。また、得られたトランスフォーマント中のc-Ha-ras遺伝子の配列を分析したが、変異は検出されなかった。従って、8-OHGによるNIH3T3細胞のトランスフォーメーションはこの系では、検出できないようである。次節で述べるように、用いるベクターを改変することによってこの問題は克服される。

第2節 8-OHGをコドン12に導入したc-Ha-ras遺伝子によるNIH3T3細胞のトランスフォーメーション（新たに構築したベクターを用いた場合）¹²⁵⁾

（1）新しいベクターの構築

第1節で述べたように、修飾塩基として8-OHGを用いた場合には、得られるフォーカスの数が正常c-Ha-ras遺伝子と同程度でしかなかった。この点を考慮して、正常c-Ha-ras遺伝子によるフォーカスの形成（バックグラウンド）を減少させるように、用いるベクターを新たに設計し直すことにした。先に述べたように、正常c-Ha-ras遺伝子をトランスフェクションした場合でもフォーカスが生じる。この問題点自身は、正常p21の大量産生⁵³⁾やDNAトランスフェクションの操作自身のもたらすバックグラウンドとして考えることが可能である。しかし、正常c-Ha-ras遺伝子でトランスフォームした細胞のc-Ha-ras遺伝子を分析したところ、HapIIでは切断されるが、NaeIでは切断されないクローンがいくつか見いだされた。これは、ヒトc-Ha-ras遺伝子が--GCC GGC--という配列を持っていることと矛盾している結果である。しかし、もしベクターとして用いているpRSV-rg12のClaI-BssHII消化の際に未切断のDNAが残存しており、それが細胞中に取り込まれたと仮定すれば説明可能である。制限酵素法で用いる正常c-Ha-ras遺伝子検出用のプライマーの3'-末端はコドン11の3番目の塩基に相当する部位がCとなっており（図3-8）、本来pRSV-rg12に存在するc-Ha-ras遺伝子のコドン11,12の配列--GCT GGT--をPCRによる増幅の後には、--GCC GGT--に変化させる。その結果、HapII部位（~~~~で示した）が生じるために切断を受けるが、NaeI認識配列(GCCGGC)とは異なるためにNaeIによっては切断を受けないと考えられる。

バックグラウンドを減少させるためには、pRSV-rg12中のc-Ha-ras遺伝子が完全に除去されていることが望ましい。しかし、制限酵素による切断は100%進行するものではなく、また、pRSV-rg12を制限酵素で切断した後の精製に用いているアガロースゲル電気泳動では、未切断の鎖の分離は不可能であると思われる。一方、未切断のベクターが残っていても、ras蛋白質として機能しなければバックグラウンドは減少させることが可能であると思われる。そこで、新たに構築するベクターは、ClaI-BssHII領域が意味のある蛋白質をコードしないように設計した（図4-3）。このプラスミド(pCB)¹²⁵⁾はpRSV-rg12のClaI-BssHII領域をリンカーと交換することにより構築した。

(2) NIH3T3細胞へのトランスフェクション

DNAカセットの構築、ベクターへの組み込み、及びNIH3T3細胞へのトランスフェクションは既に述べた方法により行った。用いたDNA量は50ng,150ngであるが、3回目

pRSV-r g12

1

Met

ATCGAT ATG ACC GAA TAC AAA CTG GTT GTA GTT GGC GCT GGT GGT GTA GGC AAA AGC GCG CTG

TAGCTA TAC TGG CTT ATG TTT GAC CAA CAT CAA CCG CGA CCA CCA CAT CCG TTT TCG CGC GAC

*Cla*I

*Bss*HI

pCB

ATCGAT ATG GTG ATG ACC TAA TAG C GCG CTG

TAGCTA TAC CAC TAC TGG ATT ATC G CGC GAC

*Cla*I

*Bss*HI

図4-3 pCBの部分塩基配列 (25)

	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3		
	50 ng	150 ng	50 ng	150 ng	50 ng	150 ng	500 ng
Gly-12 (normal)	0	0	0	0	0	1	5
8-OHG	2	4	0	1	2	3	18
Asp-12 (activated)	92	303	27	97	162	304	672

表4-1 c-Ha-ras遺伝子によって形成されたフォーカスの数

の実験の場合にはさらに500ngでも行った。結果を表4-1に示す。ベクターを改良したことにより正常c-Ha-ras遺伝子によるバックグラウンドが減少したことがわかる。また、8-OHGを含むc-Ha-ras遺伝子は、正常c-Ha-ras遺伝子と比較してフォーカスの数が多いことも明らかである。この結果は、8-OHGの生成がc-Ha-ras遺伝子の活性化の直接的な原因となり得ることを示している。また、8-OHGを含むc-Ha-ras遺伝子によって生じたフォーカスの数は活性型(Asp-12)c-Ha-ras遺伝子と比較して1~2%程度である。これはQ⁶-MeGの場合にも述べたように、導入した8-OHGのほとんどが修復されていることを示している。既に、大腸菌¹⁰⁷⁾及びヒトの細胞¹⁰⁸⁾から8-OHGを修復する酵素が見い出されており、NIH3T3細胞中でも同様な修復酵素が作用しているものと思われる。

(3) トランスフォーマント中のc-Ha-ras遺伝子の解析

次に、8-OHGを含むc-Ha-ras遺伝子によってトランスフォームした細胞中のc-Ha-ras遺伝子の解析を行うことにした。既に述べたように、8-OHGは対応する位置のみならず、隣接した部位にも変異を引き起こすことが報告されている³⁴⁾。そこで、コドン12の1番目の位置(8-OHGの5'-隣接部位)に突然変異が生じているか否かも検討することにした(図4-4)。方法は第3章で述べたものと同一であるが、一部のクローンの分析にはNarIの代わりに同じ配列を認識するBbeIを用いた。

図4-5 aにあるクローンを分析した結果を示した。この場合、AatIIで切断を受けているが、他の制限酵素によっては切断が観察されなかった。これは8-OHGを導入した部位がTに置換されていること、すなわち相補鎖にdAMPを取り込んだことを示している。図4-5 bには別のクローンを分析した結果を示した。この場合、8-OHGを導入した部位には突然変異が観察されなかったが、隣接部位にG→Tトランスバージョンが見い出された。同様の方法により他の16クローンの分析も行った。検出された突然変異を表4-2にまとめて示した。18検体を分析したところ、14検体に変異が検出された。そのうち8-OHGを導入した部位に変異が検出されたものは12例、隣接部位(8-OHGの5'-側)に変異が検出されたものは2例であった。いずれの場合も塩基の置換はランダムに生じていることが明らかである。このうち、8-OHGを導入した部位がTに変異しているトランスフォーマントが18例中8例と比較的多いが、これはVal-12(コドン12がGTC)c-Ha-ras遺伝子のトランスフォーム活性が他の活性化c-Ha-ras遺伝子よりも強い¹⁰⁹⁾ため、生じたフォーカスの数が多かった可能性がある。従

a

b

M 1 2 3 4 5 6

1 2 3 4 5 6 M

M : marker
lane 1 : *Aat*II (35T)
2 : *Sal*I (35A)
3 : *Bbe*I (35C)
4 : *Stu*I (34T)
5 : *Msc*I (34A)
6 : *Apa*I (34C)

図 4-5 トランスフォーマントのc-Ha-ras遺伝子の解析

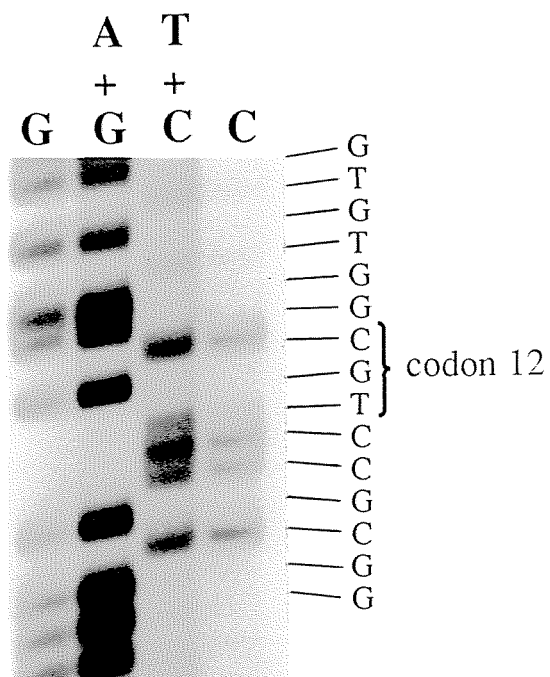


図 4 - 6 トランスフォーマントの c-Ha-ras 遺伝子の Maxam-Gilbert 法による分析

$G\overset{*}{G}$	→	GT	8 / 18
		GA	3 / 18
		GC	1 / 18
		TG	1 / 18
		AG	1 / 18

$\overset{*}{G}$ = 8-hydroxyguanine

表 4 - 2 8-OHGによって生じた突然変異

って、とりわけ相補鎖にdAMPを取り込みやすいと結論づけることはできないかもしれない。なお、8-OHGの3'-隣接部位（コドン12の3番目の塩基）の分析は行っていないが、これは隣接部位に変異が起こる頻度は低いのに加え、この部位に変異が生じても対応するアミノ酸は正常型のGlyのままであり、c-Ha-ras遺伝子の活性化につながらないためである。このようにランダムに突然変異が生じることは極めて興味深いことであり、これを確認するためにMaxam-Gilbert法^{44,45)}によって塩基配列の確認を行った。この際には一方の5'-末端のみを標識するために、PCRの際のプライマーの一方（標識しない5'-末端を含む）は5'-末端がアミノリンカーで「ブロック」されているものを用いた。その結果の一例を図4-6に示す。この検体は図4-5bに結果を示した、隣接部位に突然変異が検出されたクローンである。PCR-制限酵素法により分析した通り、隣接部位に突然変異が生じていることが明らかとなった。5検体（表4-2に示した5種類の突然変異に対応する5クローン）の塩基配列はいずれもPCR-制限酵素法により検出された変異と一致した。また、突然変異を検出する6種類の制限酵素（AatII, SalI, NarIまたはBbeI, StuI, MscI, ApaI）のいずれによっても切断されなかった4クローンについて制限酵素HapIIで分析したところ切断が観察され、このクローンは正常型c-Ha-ras遺伝子を有していることが明らかとなった。また、正常c-Ha-ras遺伝子によりトランスフォームした細胞についても分析を行ったが、突然変異が検出されなかった。

8-OHGを導入した位置のみならず、隣接部位にもランダムな変異が生じるという、今回著者が得た結果は、以前に口野らが報告した*in vitro*の結果³⁴⁾とよく一致している。ただし、口野らが報告している隣接部位はピリミジンの場合であり、Aの場合には読み間違いを起こさないとされている。著者の場合は突然変異が検出された隣接部位はGであり、*in vitro*の系では実験されていない。*in vitro*の系で、隣接G部位に読み間違いが起こるかどうかは興味深いことである。

最近、渋谷らは数種のDNAポリメラーゼを用いて*in vitro*の実験を行い、相補鎖にはdCMPとdAMPのみが取り込まれ、また、隣接部位には読み間違いが起こらないと報告した¹¹⁰⁾。dCMPとdAMPの取り込まれる割合は用いたDNAポリメラーゼの種類によって大きく異なっているようである。また、大腸菌を用いた*in vivo*の実験では、8-OHGを導入した部位にG→Tトランスバージョンのみが検出され、他の変異は検出されなかった^{35,36)}。

今回著者が得た結果は以前の口野らの報告と一致し、渋谷らの報告とは一致しな

い。この理由についての詳細は明らかではないが、用いているDNAの配列が結果に大きく影響する可能性があり、また、*in vitro*の場合と細胞内とではイオン濃度や他の成分が異なるため、異なる結果がでることは十分考えられる。さらに、原核生物と真核生物（細胞）とで異なる結果が得られることは有り得ることである。今後、他の細胞を用いたり、また、同一の塩基配列を有するDNA断片を用いての*in vitro*におけるヌクレオチド取り込みに関する実験¹¹¹⁾を行うことによりさらに検討する必要がある。

8-OHGによって、相補鎖の対応する位置及び隣接部位に変異が生じる機構については明らかではない。8-OHGは当初、図4-1に示した構造をとっていると考えられていたが、その後、デオキシ体¹¹²⁾、リボ体^{113, 114)}、及び9-エチル体¹¹⁵⁾の構造研究から、8-ケト型の構造が優先しており、また、グリコシド結合はsyn型をとっていることが示されている（図4-7）。また、8-OHG-C塩基対¹¹⁶⁾及び8-OHG-A塩基対¹¹⁷⁾を含む二本鎖DNAの構造も報告されている（図4-8）。8-OHG-G塩基対や8-OHG-T塩基対の構造については現在不明であるが、図4-8に示す構造をとることは可能であると思われる。詳細については今後の研究によって徐々に明らかにされていくと思われるが、8-OHGに対応する位置に誤ったデオキシヌクレオチドが取り込まれやすい可能性、あるいは誤ったヌクレオチドが取り込まれても8-OHGの存在によって

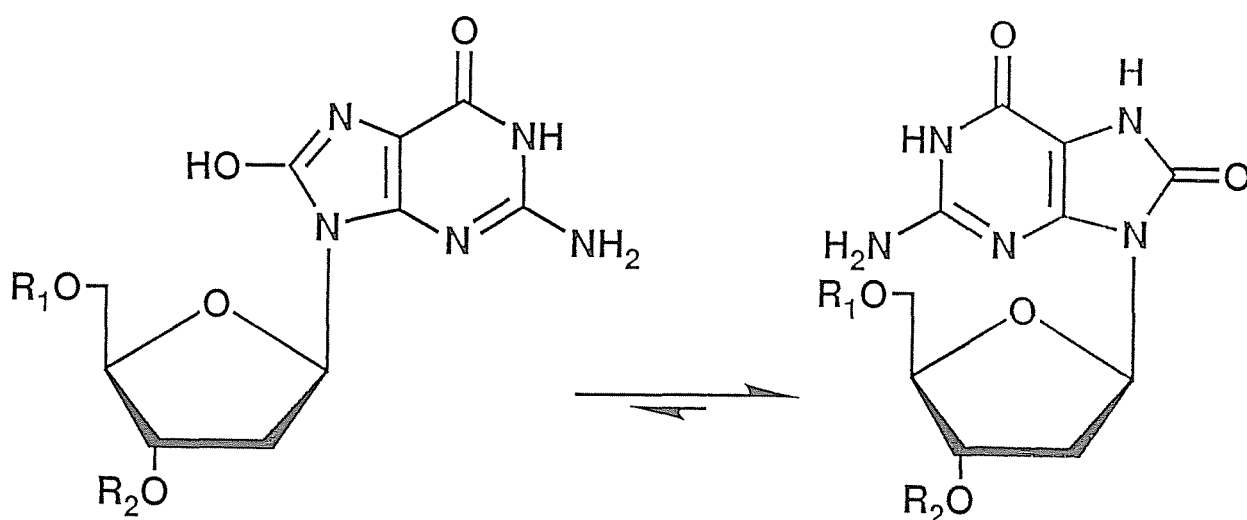
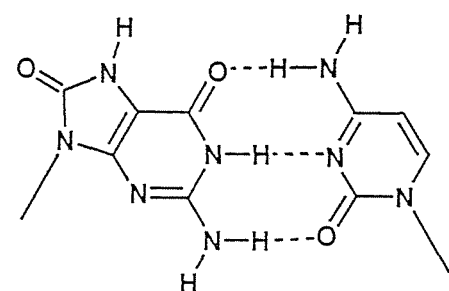
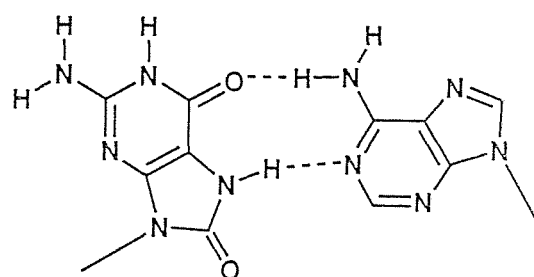


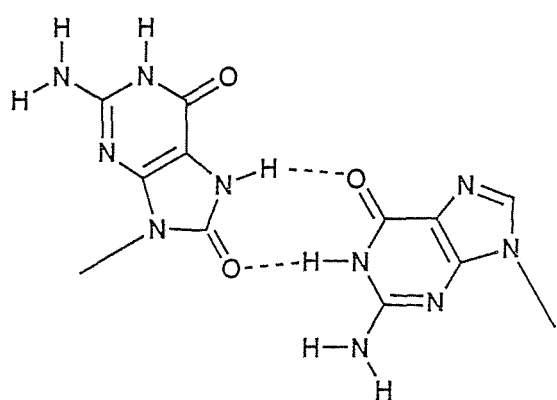
図4-7 8-OHGの構造



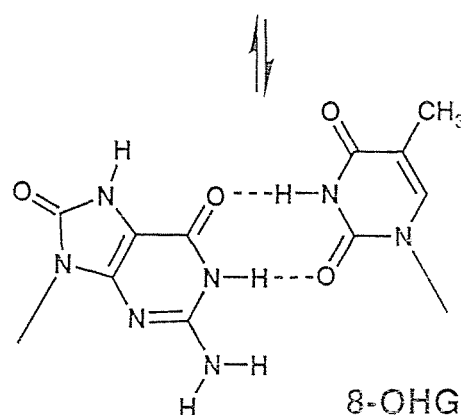
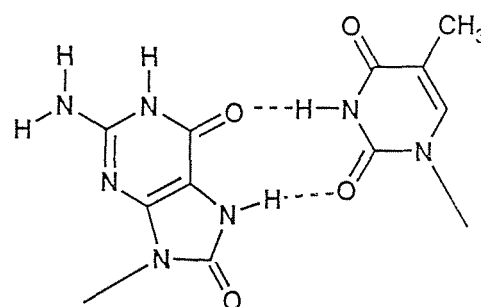
8-OHG - C



8-OHG - A



8-OHG - G



8-OHG - T

図 4 - 8 明らかにされた 8-OHG-C 塩基対¹¹⁶⁾と 8-OHG-A 塩基対¹¹⁷⁾の構造と
推定される 8-OHG-G 塩基対及び 8-OHG-T 塩基対の構造

校正作用が作用しにくい可能性などが考えられる。また、8-OHG-C 塩基対を有する二本鎖 DNA は大きな構造変化が観察されていないが¹¹⁶⁾、8-位に置換基があるために部分的な構造の乱れが生じることは考えられ、それが隣接部位にヌクレオチドが取り込まれる時に生じると誤ったヌクレオチドが取り込まれる可能性がある。

今回著者の得た結果は極めて興味深いものであり、今後は 8-OHG を含む DNA を用いて、様々な角度から実験が進められる必要があると思われる。

第 5 章 キサンチンを含む

c-Ha-ras 遺伝子による NIH

3T3 細胞のトランスフォーメーション

第 3 章、第 4 章でコドン 12 に 2 種類の修飾塩基を導入した c-Ha-ras 遺伝子について述べた。さらに第 5 章では、コドン 12 にキサンチン (X) を導入した c-Ha-ras 遺伝子について述べる。

第 1 節 X をコドン 12 に導入した c-Ha-ras 遺伝子による

NIH3T3 細胞のトランスフォーメーション^{1) 3) 5)}

X は、グアニンの脱アミノ化によって生じる修飾塩基である (図 5-1)。脱アミノ化は、自発的にも、また、亜硝酸の作用によっても起こる^{1) 3)}。Hirose らは DNA を亜硝酸処理した後、大腸菌に導入し、頻度は低いながらも G→A トランジクションを観察した^{1) 9)}。これは、亜硝酸によって G の脱アミノ化によって X が生じ、その結果突然変異が引き起こされたと解釈することが可能である。亜硝酸は、低 pH 条件下においてのみ存在可能となるが、そのような条件はヒトや動物の胃に存在する。従って、X の引き起こす変異を研究することは意義あることと言える。一方、Eritja らは全ての塩基 (A, G, C, T) と塩基対形成可能なユニバーサルベースの一候補として X の研究を行っている^{1) 20)}。彼らは、X を含むオリゴヌクレオチドの熱的安定性及び X に対するデオキシヌクレオチドの取り込み実験を行い、その結果、熱的には $X-T > X-G > X-A \approx X-C$ の順に安定であること、また *Drosophila* の DNA ポリメラーゼ α によって $T > C \gg A \approx G$ の順に取り込まれやすいことを見い出している^{1) 23)}。第 3 章で述べた O^6 -MeG の場合も同様であったが、熱的にあまり安定ではない C が X に対して取り込まれやすいことは興味深いことである。また、先に述べた亜硝酸による G→A トランジクションは相補鎖の X に対応する位置に T が取り込まれやすいということと一致している。

X のコドン 12 への導入は前章で述べた方法と同様に行うこととした。DNA カセット

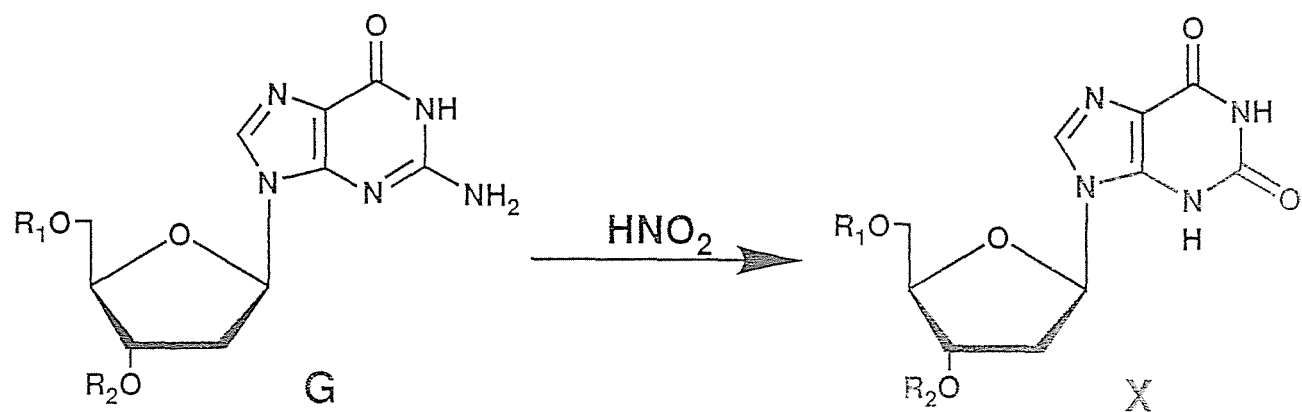


図 5 - 1 Xの生成

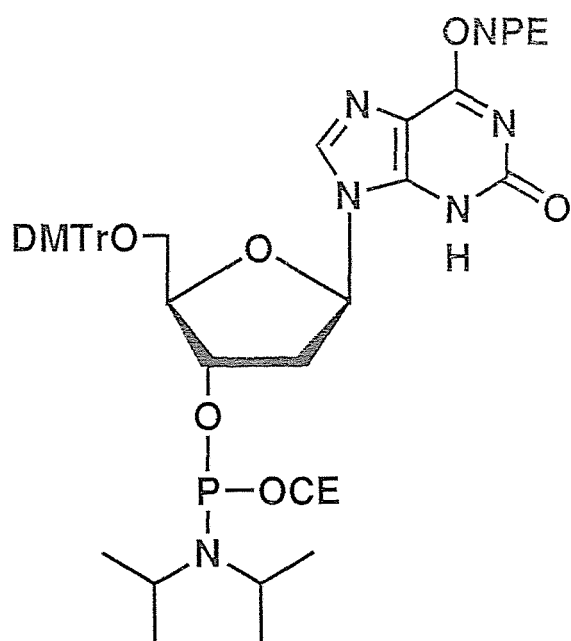


図 5 - 2 Xのホスホロアミダイト体¹²¹⁾

は図 3 - 4 中の G が X^{*}であるものに相当する。

(1) Xを含むオリゴヌクレオチドの合成と精製

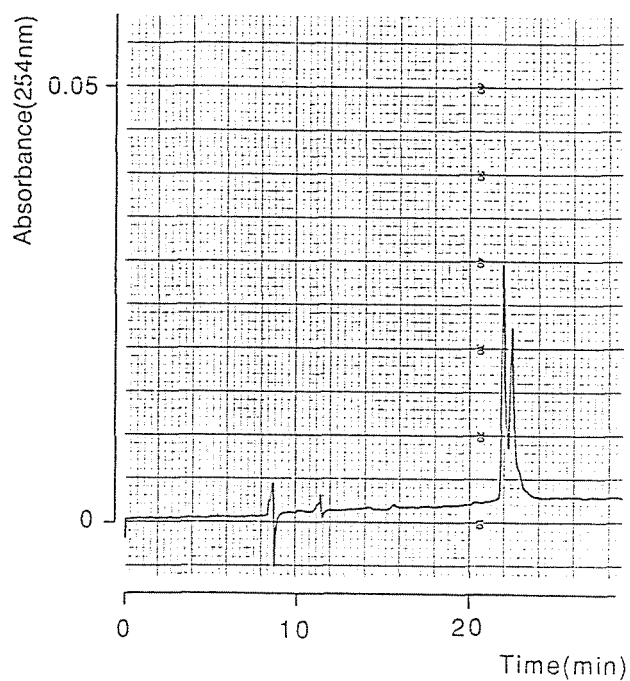
Xを含むオリゴヌクレオチドは当教室で合成されたホスホロアミダイト体 (図 5 - 2) をビルディングブロックとして DNA 自動合成機により合成したものである⁽¹²¹⁾。Xを含むオリゴヌクレオチドの合成は既に Eritja ら⁽¹²⁰⁾や他のグループ⁽¹²²⁾により報告があり、図 5 - 2 に示したホスホロアミダイト体は Eritja らの報告⁽¹²⁰⁾に準じて合成されたものである。ただし、Eritja らの場合はデオキシグアノシンから合成中間体である 6-O-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]-3',5'-di-O-acetyl 2'-deoxyguanosine への変換の際にアミノ基を保護しているが、今回はアミノ基の保護は行わなかった⁽¹²³⁾。

このホスホロアミダイト体を用いる際には、カップリング時間を通常の 60 秒から 20 分に延長した。正確に定量はしていないが、カップリング収率は低く、およそ 50 % であると思われた。この低収率の原因について明らかではないが、2 位の保護⁽¹²²⁾を行っていないことが一因である可能性がある。

Xを含むオリゴヌクレオチドの精製は、通常とほぼ同様に行った。ただし、6 位を保護している NPE 基を脱保護するための DBU 処理を、アンモニア水処理の後に行った。DMTr 基を脱保護した後の逆相 HPLC の溶出パターンを図 5 - 3 a に示す。2 本のピークが観察されたが、各々を分取して完全水解を行って分析したところ⁽⁸⁹⁾、先に溶出された画分が X を含むオリゴヌクレオチドであり、後ろのピークは X 以外の未知の成分を含むことが明らかになった。また、イオン交換 HPLC で分析した際には、X を含むオリゴヌクレオチドは X の代わりに G を含むオリゴヌクレオチド (正常 c-Ha-ras 遺伝子の構築に用いる) よりも遅れて溶出された (図 5 - 3 b)。これは、X の N-3 位のプロトンが解離しやすい^(124, 125)という報告と一致している。精製した X を含むオリゴヌクレオチド (HRU2-35X) は、先に述べたように完全水解⁽⁸⁹⁾によってその純度と組成比を確認した。

X 以外の成分を含むオリゴヌクレオチドの完全水解の結果、未知成分は X とは明らかに異なるが、逆相 HPLC 上ではかなり近い位置に溶出されることが明らかとなった (データは示していない)。この未知成分が何であるかは明らかではないが、一つの可能性としてイソグアニン体が考えられる。これは、DBU 処理を今回はアンモニア水処理の後に行っており (文献⁽¹²⁰⁾では DBU 処理を樹脂からの切り出しの前に行って

a)



カラム: YMC-AM324

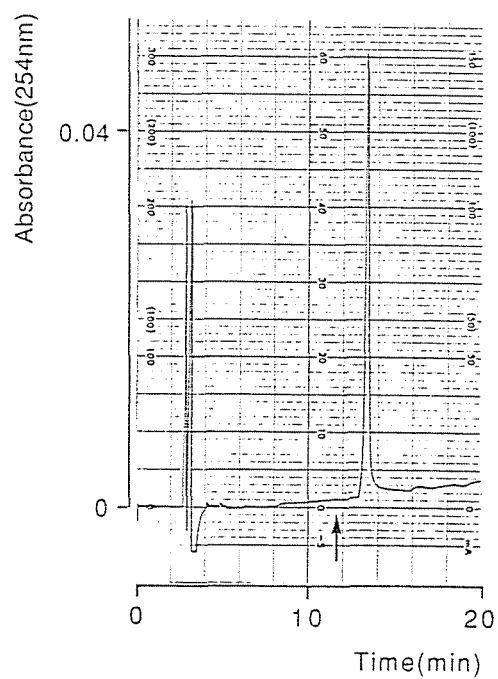
溶出液 A: 5% CH_3CN , 0.1M TEAA

B: 25% CH_3CN , 0.1M TEAA

グラジエント: 20 → 50 B% (20分)

流速: 2ml/分

b)



カラム: DEAE-2SW

溶出液 A: 20% CH_3CN

B: 20% CH_3CN , 2M HCOONH_4

グラジエント: 20 → 40 B% (20分)

流速: 1ml/分

矢印はXの代わりにGを含むオリゴヌクレオチドの溶出位置を示す。

図5-3 Xを含むオリゴヌクレオチドの精製 a)逆相HPLC b)イオン交換HPLC

いる)、プリン6位のp-ニトロフェニルエトキシ基が良い脱離基であるために、アンモニアによる置換反応を受けやすいことが原因であると考えられる。この副生成物の詳細については本研究の目的ではないので特に検討は行わなかった。

Xを含むオリゴヌクレオチドの安定性は第3章、第4章で述べた方法と同様に行った。HRU2-35XはDNAカセットやベクターを構築する条件下で安定であることが明らかになった。

(2) NIH3T3細胞へのトランスフェクション

DNAカセットの構築、ベクターへの組み込み、及びNIH3T3細胞へのトランスフェクションは既に述べた方法により行った。用いたDNA量は、50ng,150ngである。結果を表5-1に示す。Xを導入したc-Ha-ras遺伝子は、活性型(Asp-12)c-Ha-ras遺伝子の30~50%という極めて高いフォーカス形成能を示した。このことは、 O^6 -MeG、8-OHGの場合と同様に、Xがc-Ha-ras遺伝子の直接的な活性化の原因となり得ることを示している。また、極めて高いトランスフォーム活性から、NIH3T3細胞内ではXがあまり効率よく修復されてはいないことが示唆される。現在までのところ、Xを修復する酵素は知られておらず、Xに対する修復酵素があるかどうかは明らかではないが、少なくともNIH3T3細胞内では(あると仮定すれば)あまり活性は高くないように思われる。

	50 ng	150 ng
Gly-12 (normal)	0	0
X	1 2	2 7
Asp-12 (activated)	2 7	9 7

表5-1 c-Ha-ras遺伝子によって形成されたフォーカスの数

(3) トランスフォーマント中のc-Ha-ras遺伝子の解析

次に、フォーカスを形成したクローン中のc-Ha-ras遺伝子の解析を行った。既に述べたように、*in vitro*においては $T > C \gg A \approx G$ の順にヌクレオチドを取り込むことが報告されており¹²¹⁾、哺乳動物細胞内でどのヌクレオチドが取り込まれやすいか興味深いところである。用いた方法は第3章で述べたものと同様であるが、NarIの代わりにBbeIを用いた点異なる。

図5-4に分析例を示した。この図は、3クローンを分析した結果を示している。いずれの場合もSalIで消化を行った場合にのみ切断が観察された(レーン3,7,11)。このことは、Xを導入した位置にG→Aトランジションが生じていることを示している。すなわち、Xに対応する位置にdTMPが取り込まれたことを意味し、これは、*in vitro*の結果とよく一致している。合計17クローンを分析し、そのうちの16クローンにG→Aトランジションを、また、1クローンにG→Tトランスバージョンを観察した。

図5-1にはXを2,6-ジケト型として示しているが、実際には異なる構造をとっていると考えられている。それは、XのN-3位のプロトンが解離しやすく、また、解離した場合にはエノレート型を取りやすいという性質によるためである^{124), 125)}(図5-5)。リボ体の場合にはpKが5.7と報告されており¹²⁴⁾、DNA中のX残基の場合も同程度であると考えられる。すなわち、生理的条件下ではXは2-エノレート型で存在すると考えられている。これはXの塩基対の形成に大きな影響を与えていると考えられる。すなわち、X-C対の場合には、Watson-Crick型の塩基対を形成し得るが(図5-6)、Xの負の電荷が“裸”で存在しており、それがこの塩基対を不安定なものにしていると思われる。一方、X-T対の場合は、負の電荷が溶媒(水分子)又はTのイミノ基によって“保護”される結果、熱的に安定になると思われる。あるいは、X-C対の場合、負に荷電しているXの酸素原子と負電荷が局在しているCのカルボニル基の酸素原子が反発しているのに対し、X-T対にはその反発がないためにX-T対がX-C対よりも安定であるとも考えられる。DNA鎖伸長の際には、形成される塩基対の形が重要な要因になり得ることを第3章で述べた。Q⁶-MeGの場合、熱的には不安定ではあるがWatson-Crick型のQ⁶-MeG-T対が形成されやすい。Xの場合も、熱的には不安定であるがWatson-Crick型のX-C対が形成される。Xに対応する位置にdTMPとdCMPのどちらが取り込まれやすいかについてEritjaらは $T > C$ と報告しているが、当研究室でこれまでに得られている *in vitro* の実験(Tag DNAポリメラーゼあるいはラットDNAポリメラーゼβを用い、鋳型DNAとしてc-Ha-ras遺伝子のコドン12付近の配列をも

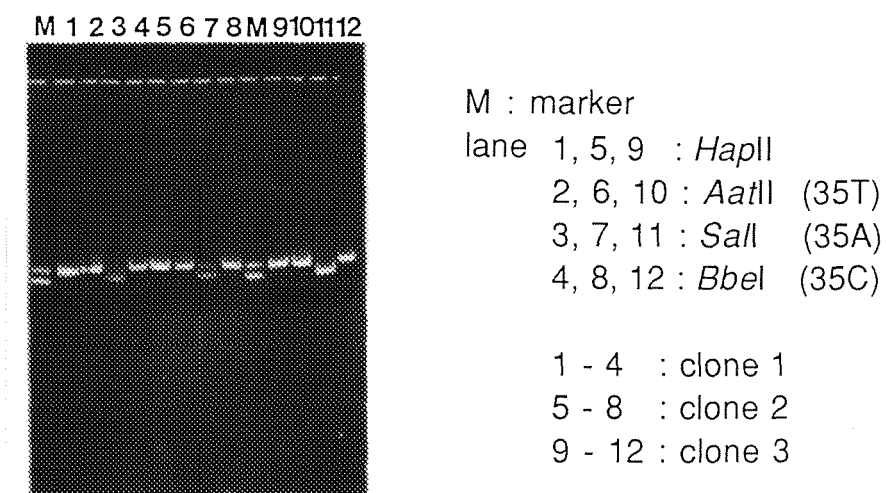


図 5 - 4 Xを導入した位置の制限酵素による分析

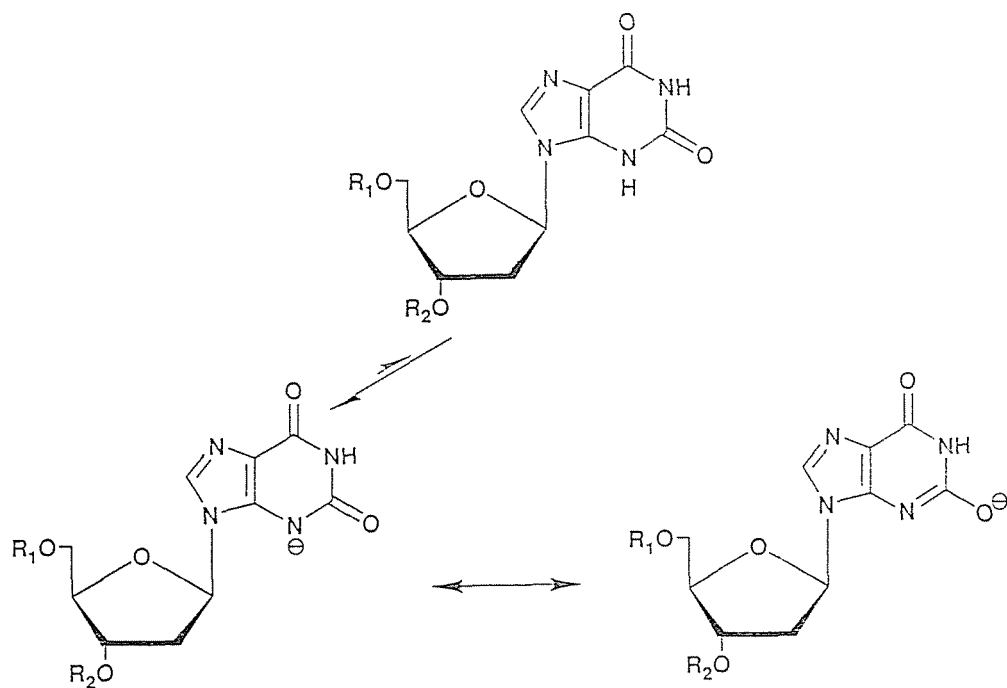


図 5 - 5 Xの構造

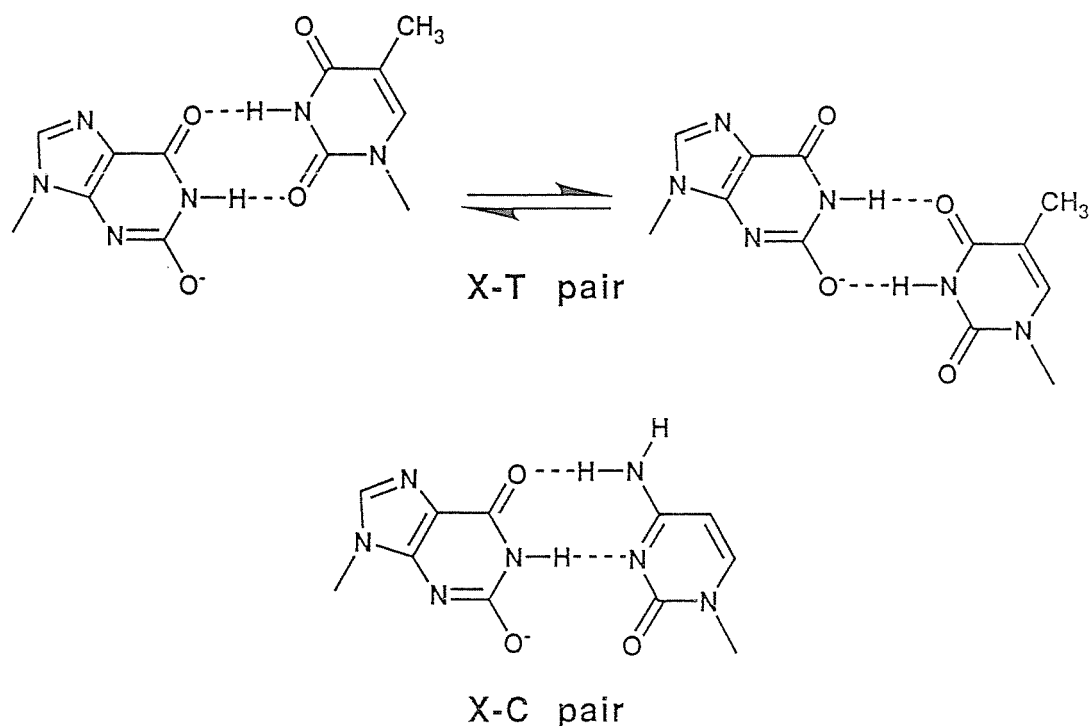


図 5 - 6 推定されるX-T塩基対とX-C塩基対の構造

一本鎖DNAを用いた場合)の結果では、dCMPのみの取り込みが観察されている¹¹¹⁾。いずれにせよ、この場合でも塩基対の形が重要であることが示されている。今回、著者は、Xを導入したc-Ha-ras遺伝子によって活性型c-Ha-ras遺伝子の30~50%のフォーカスが形成されたこと、また、トランスフォーマントのc-Ha-ras遺伝子はXを導入した位置がAに置換されていたことを明らかにした。このことは、NIH3T3細胞中においてもXに対応する位置にdTMPが取り込まれたことを示している。一方、どの程度dCMPが取り込まれたかは明らかではない。それは、dCMPが取り込まれてもc-Ha-ras遺伝子の活性化につながらないこと、また、導入したXがNIH3T3細胞内でどの程度修復されたのかがわからないことが原因である。もしかりに、Xが修復されていないとすれば、Xによるフォーカス形成能は取り込まれたdCMPとdTMPの割合を反映しているとも考えられる。

1クローンはG→Tトランスバージョンを有していることが明らかになった。これは、Xの相補鎖側にdAMPが取り込まれたと考えられる。あるいは、Xが脱プリン化を受けやすく、生じたアベシックサイトに対してdAMPが取り込まれた結果^{126,127)}とも

考えられる（もしXに対する修復酵素が存在し、その酵素がグリコシラーゼであるならば、同様にアベシックサイトが生じる）。

いずれにせよ、c-Ha-ras遺伝子のコドン12に導入したXは、Aへの変異をもたらすことによりc-Ha-ras遺伝子の活性化をもたらし、高頻度にフォーカスを形成することが明らかになった。

第3章から第5章まで、合成c-Ha-ras遺伝子を用いたDNAカセット変換によって、修飾塩基がc-Ha-ras遺伝子の活性化に大きく関わっていることを示した。今まで述べてきたのはいずれもグアニン塩基の損傷に相当する修飾塩基であり、合成c-Ha-ras遺伝子のClaI-BssHII部位を利用してコドン12に導入した例である。次章では、アデニン塩基の損傷に相当する修飾塩基を他の制限酵素部位を利用して導入する例について述べる。

第 6 章 ヒポキサンチンを含む c-Ha-ras 遺伝子による NIH 3 T 3 細胞のトランスフォーメーション

第 3 章から前章までは修飾塩基を合成 c-Ha-ras 遺伝子のコドン 12 番目の部位に導入したことを述べた。この章では、修飾塩基をコドン 61 に導入した例として、ヒポキサンチン(I)を用いた実験について述べる。第 1 節では、I をコドン 61 に導入した c-Ha-ras 遺伝子の構築と NIH3T3 細胞へのトランスフェクションについて、第 2 節では、フォーカスを形成した細胞中の c-Ha-ras 遺伝子の塩基配列の分析について述べる。

第 1 節 I をコドン 61 に導入した c-Ha-ras 遺伝子による NIH3T3 細胞のトランスフォーメーション¹²⁸⁾

I は第 5 章で述べた X と同様に DNA 中の塩基の脱アミノ化によって生じる修飾塩基である。ただし、X がグアニン塩基から生じるのに対し、I はアデニン塩基から生じる (図 6-1)。I の生成は、やはり自発的にも、あるいは、亜硝酸処理によっても生じる¹¹⁹⁾。第 5 章でも述べたが、亜硝酸は胃のような強酸性の組織中には存在し得る。さらに、I を特異的に認識して除去修復を行う酵素、ヒポキサンチン-DNA-グリコシラーゼ¹²⁹⁾ が知られており、このことは I が生物にとって除去すべき対象であることを示しており、I が DNA 中に少なからず存在していることを示唆している。

I はそのヌクレオシドを (デオキシ) イノシンという。イノシンは、tRNA 中にも存在するヌクレオシドであり、アンチコドン 1 字目のイノシンは mRNA コドン 3 字目のシチジン、アデノシン、及びウリジンと塩基対を形成すると考えられている¹³⁰⁾。またそのことから、I は全ての塩基と塩基対形成可能なユニバーサルベースとして DNA プローブ中に用いられている^{131, 132)}。I を含むオリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチドが合成されており、I を含む塩基対の熱的安定性が報告されている¹³³⁻¹³⁷⁾。その結果、I-C 及び I-A 対を含むオリゴヌクレオチドは安定な二本

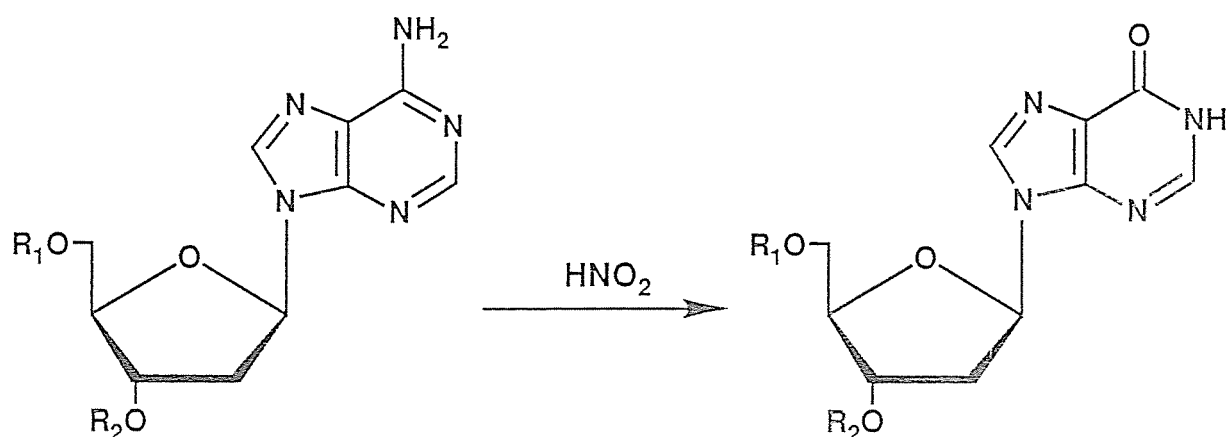


図 6 - 1 ヒポキサンチンの生成

鎖を形成すること、また、I-T及びI-G対は二本鎖を不安定にしないことが明らかにされている。以上のことから、DNA中にIが生じると、相補鎖にランダムなヌクレオチドを取り込む結果、ランダムな突然変異が生じる可能性がある。Iをコドン61に導入したc-Ha-ras遺伝子は以下の手順により構築し、NIH3T3細胞へトランスフェクションした。

(1) 制限酵素部位を追加したプラスミドの構築

正常c-Ha-ras遺伝子を含むプラスミドpRSV-rg12は、内部に4種類の制限酵素部位を有している(図1-1)。コドン12に修飾塩基を導入した場合には、c-Ha-ras遺伝子上流のClaI部位と内部のBssHII部位を利用したが、コドン61に導入する場合にはBssHII部位とBclI部位を利用することが考えられた。しかし、この場合には構築すべきDNAカセットが約150塩基対となり、用いるオリゴヌクレオチドの数も多くなるために、ライゲーションの回数や副生成物の増加が懸念される。著者は、61番目のアミノ酸がArgとなっているp21をコードしているc-Ha-ras遺伝子の合成を行った

が³⁹⁾、その際にはDNAカセット変換をより容易なものとするために制限酵素部位を新たに3種類追加した。また、このc-Ha-ras遺伝子をLTRの下流に組み込んだプラスミドも既に構築している³⁷⁾(pRSV-rr61、第1章参照)。このc-Ha-ras遺伝子のコドンで正常型アミノ酸のGlnをコードするものに変更することによって、DNAカセット変換を行うことが容易なプラスミドを構築することが可能であると思われる。そこで、まず、正常型c-Ha-ras遺伝子をコードし、かつ、制限酵素部位を増設した新しいプラスミドの構築を行った(図6-2)。MluI部位は合成c-Ha-ras遺伝子中のみならず、c-Ha-ras遺伝子上流側にも存在するため、直接的なDNAカセット変換は不可能であり、以下の手順に従って構築を行うことにした。

まず、Arg-61 c-Ha-ras遺伝子を含むプラスミドpRSV-rr61をEcoRV、SalIで消化した。生じた断片(長鎖断片と短鎖断片)の両者を低融点アガロースゲル電気泳動により分離、精製した。得られた短鎖断片をさらにMluIで処理し、MluI-SalI断片のみを回収した。一方、コドン61を含むDNAカセット(内部にMluI、EcoRV部位を含む)を既に述べた方法と同様にして構築し、さらにMluIで消化した。これと先のMluI-SalI断片とをライゲーションし、得られた断片をpRSV-rr61/EcoRV-SalI長鎖断片とSalI部位で連結させた。EcoRV処理と引き続くライゲーションを行い、pRSVrasを構築した。新たに構築した正常型c-Ha-ras遺伝子の塩基配列を図6-3に示す。コドン61はEcoRVとBclIの間にあり、構築すべきDNAカセットは約70塩基対となる。しかし、宿主をHB101にした場合にはdamメチラーゼの作用によりBclI部位中のアデニン(TGATCAの5'側から3番目のA)のN-6位がメチル化されるために、そこから得たプラスミドはBclIで切断されない。そこで、構築したプラスミドをdamメチラーゼ活性を欠損しているGW5100にトランスフェクションした。第1章第2節で述べた方法によりプラスミドを精製し、塩基配列をPCRとMaxam-Gilbert法^{44,45)}を組み合わせた方法により確認した。

(2) Iを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成と精製

既に述べたように、Iを含むプローブはハイブリダイゼーションにおいて多用されており、そのため、Iのホスホロアミダイト体が購入可能となっている。コドン61の2番目の部位にIを含むオリゴヌクレオチドは、Applied Biosystems社から購入したホスホロアミダイト体を用いてApplied Biosystems社380ADNA自動合成機により合成した(配列は図6-4に示した)。カップリング時間の変更は行わなかった。精製

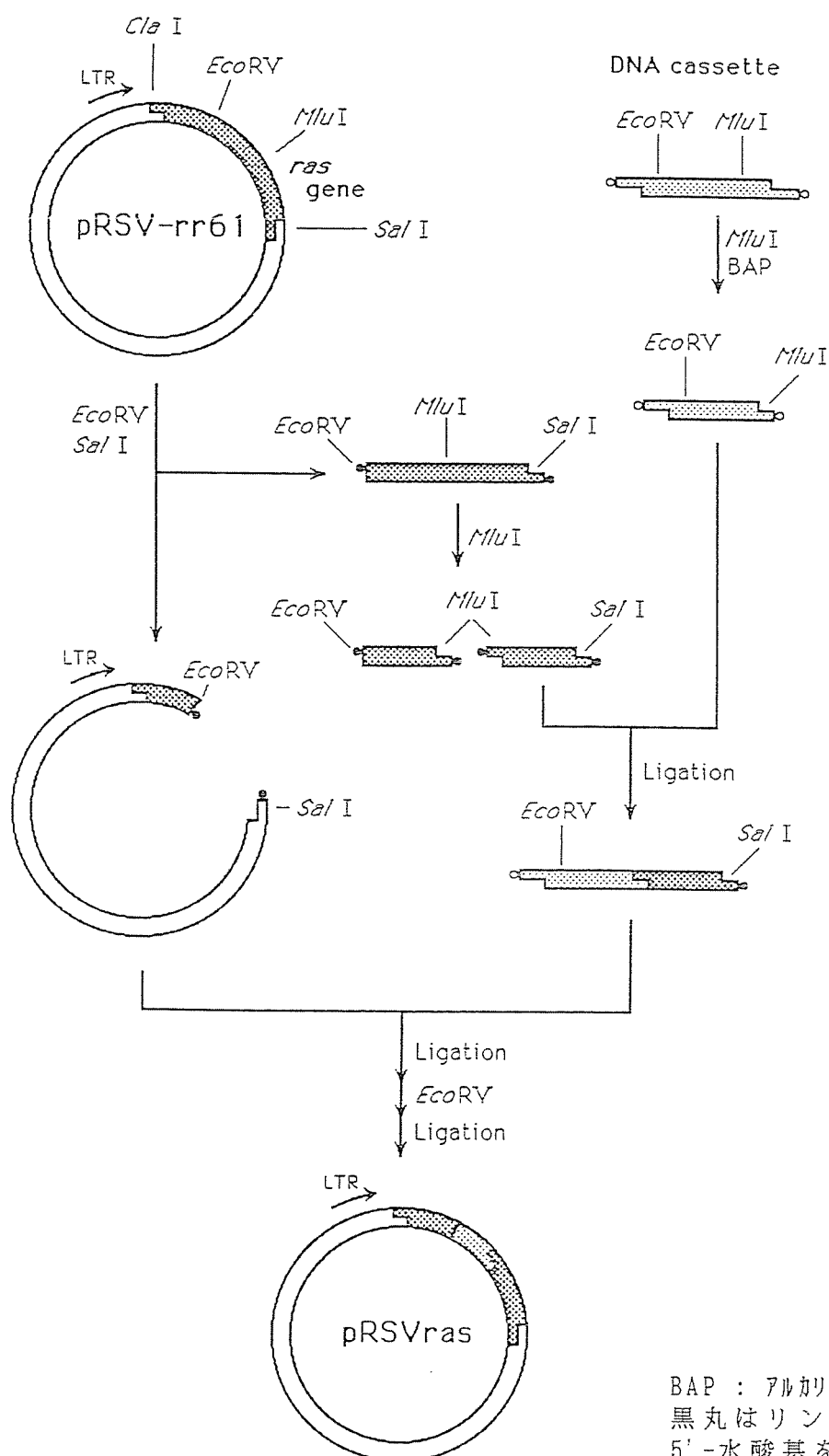


図 6 - 2 pRSVras の構築

```

5          10          15          20
ClaI Met-Thr-Glu-Tyr-Lys-Leu-Val-Val-Val-Gly-Ala-Gly-Gly-Val-Glu-Lys-Ser-Ala-Leu-Thr-
      U1          U2          U3
CGAT ATG ACC GAA TAC AAA CTG GTT GTA GTT GGC GCT GGT GGT GTA GGC AAA AGC GCG CTG ACC
TA TAC TGG CTT ATG TTT GAC CAA CAT CAA CCG CGA CCA CCA CAT CCG TTT TCG CGC GAC TGG
      L19          L18          L17

BssHII
25          30          35          40
Ile-Gln-Leu-Ile-Gln-Asn-His-Phe-Val-Asp-Glu-Tyr-Asp-Pro-Thr-Ile-Glu-Asp-Ser-Tyr-
      U4          U5
ATT CAG TTG ATC CAG AAC CAC TTC GTA GAT GAG TAC GAC CCG ACT ATT GAA GAC TCT TAC
TAA GTC AAC TAG GTC TTG GTG AAG CAT CTA CTC ATG CTG GGC TGA TAA CTT CTG AGA ATG
      L16          L15          L14

45          50          55          60
Arg-Lys-Gln-Val-Val-Ile-Asp-Gly-Glu-Thr-Cys-Leu-Leu-Asp-Ile-Leu-Asp-Thr-Ala-Gly-
      U6          U7          U8
CGT AAG CAG GTT GTT ATC GAC GGT GAG ACC TGT CTG CTG GAT ATC CTT GAT ACC GCA GGC
GCA TTC GTC CAA CAA TAG CTG CCA CTC TGG ACA GAC GAC CTA TAG GAA CTA TGG CGT CCG
      L13

EcoRV
65          70          75          80
Gln-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ala-Met-Arg-Asp-Gln-Tyr-Met-Arg-Thr-Gly-Glu-Gly-Phe-Leu-Cys-
      U9
CAA GAA GAA TAC TCT GCG ATG CGT GAT CAG TAT ATG CGT ACC GGC GAA GGC TTC CTG TGC
GTT CTT CTT ATG AGA CGC TAC GCA CTA GTC ATA TAC GCA TGG CCG CTT CCG AAG GAC ACG
      L12          L11

BclI
85          90          95          100
Val-Phe-Ala-Ile-Asn-Asn-Thr-Lys-Ser-Phe-Glu-Asp-Ile-His-Gln-Tyr-Arg-Glu-Gln-Ile-
      U10          U11
GTT TTC GCG ATT AAC AAC ACC AAA TCT TTT GAA GAC ATC CAT CAA TAC CGT GAA CAG ATC
CAA AAG CCG TAA TTG TTG TGG TTT AGA AAA CTT CTG TAG GTA GTT ATG GCA CTT GTC TAG
      L10          L9

NruI
105          110          115          120
Lys-Arg-Val-Lys-Asp-Ser-Asp-Asp-Val-Pro-Met-Val-Leu-Val-Glu-Asn-Lys-Cys-Asp-Leu-
      U12          U13
AAA CCG GTT AAA GAC TCT GAT GAC GTT CCG ATG GTT CTG GTT GGT AAC AAA TGC GAC TTG
TTT GCG CAA TTT CTG AGA CTA CTG CAA GGC TAC CAA GAC CAA CCA TTG TTT ACG CTG AAC
      L8

MluI
125          130          135          140
Ala-Ala-Arg-Thr-Val-Glu-Ser-Arg-Gln-Ala-Gln-Asp-Leu-Ala-Arg-Ser-Tyr-Gly-Ile-Pro-
      U14          U15
GCA GCG CGT ACT GTT GAA TCT CGT CAG GCT CAG GAT CTG GCT CGT TCT TAC GGA ATT CCG
CGT CCG GCA TGA CAA CTT AGA GCA GTC CGA GTC CTA GAC CCA GCA AGA ATG CCT TAA GGC
      L7          L6

EcoRI
145          150          155          160
Tyr-Ile-Glu-Thr-Ser-Ala-Lys-Thr-Arg-Gln-Gly-Val-Glu-Asp-Ala-Phe-Tyr-Thr-Leu-Val-
      U16          U17
TAC ATC GAA ACC TCT GCT AAA ACT CGT CAA GGC GTT GAA GAC GCT TTC TAC ACC TTG GTT
ATG TAG CTT TGG AGA CGA TTT TGA GCA GTT CCG CAA CTT CTG CGA AAG ATG TGG AAC CAA
      L5          L4

165          170          175          180
Arg-Glu-Ile-Arg-Gln-His-Lys-Leu-Arg-Lys-Leu-Asn-Pro-Pro-Asp-Glu-Ser-Gly-Pro-Gly-
      U18
CGT GAA ATC CGT CAG CAC AAG CTG CGT AAG CTT AAC CCG CCG GAC GAA TCT GGC CCA GGC
GCA CTT TAG GCA GTC GTG TTC GAC GCA TTC GAA TTG GGC GGC CTG CTT AGA CCG GGT CCG
      L3          L2

HindIII
185
Cys-Met-Ser-Cys-Lys-Cys-Val-Leu-Ser-..... SalI
      U19          U20
TGC ATG TCC TGC AAA TGC GTT CTG TCT TGA TAG G
ACG TAC AGG ACG TTT ACG CAA GAC AGA ACT ATC CAGCT
      L1

```

図 6 - 3 新たに構築した正常c-Ha-ras遺伝子

は通常のオリゴヌクレオチドの場合と同様にして行った。完全水解に用いる大腸菌由来のアルカリ性ホスファターゼにはアデニンをIに変換するアデノシンデアミナーゼ活性を伴う場合があるため、完全水解を行わず、限定水解による鎖長の確認を行うことにした。その結果、精製したオリゴヌクレオチドは目的の鎖長のものであること、及びIを導入した位置のヌクレオチドは酵素分解に抵抗性を示すことが明らかになった。従って、精製したオリゴヌクレオチドは、目的のものであることが支持された。

さらに、既に述べた方法によりDNAカセット構築時におけるオリゴヌクレオチドの安定性を調べ、Iを含むオリゴヌクレオチドは安定であることを確認した。

(3) NIH3T3細胞へのトランスフェクション

トランスフェクションに用いるベクターは、コドン12番目に修飾塩基を導入した場合とほぼ同様にして構築した。コドン61の2番目の位置(A)にIを導入するためのDNAカセットの塩基配列を図6-4に示す。相補鎖中のIに対応する位置は「正常型」のTとした。対照としてはGln-61(正常)c-Ha-ras遺伝子(Aの位置がA)及びLeu-61(活性型)c-Ha-ras遺伝子(Aの位置がT)を用いることとした。このDNAカセットは既に合成と精製が完了しているc-Ha-ras遺伝子断片を用いて構築することとし、コドン12の場合のように特に塩基配列をヒトのc-Ha-ras遺伝子のものにするとはしなかった。このカセットは下流側にBclI末端、上流側の内部にEcoRV部位を有して

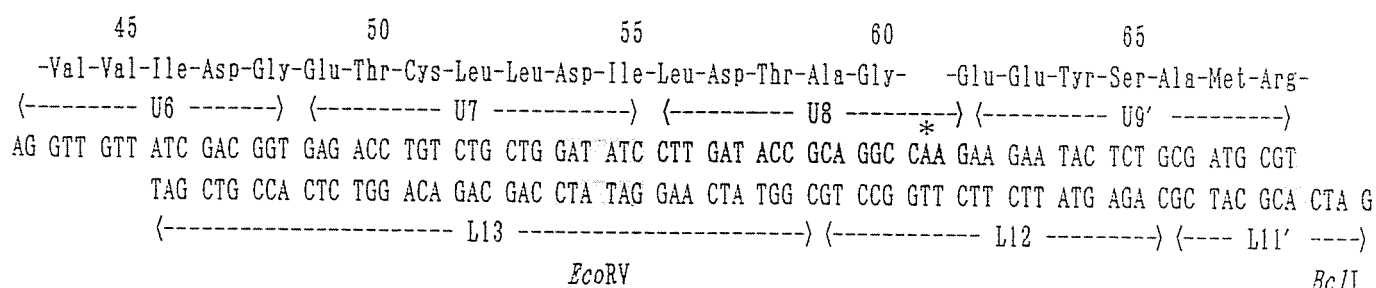


図6-4 コドン61の2番目の位置に修飾塩基を導入するためのDNAカセット

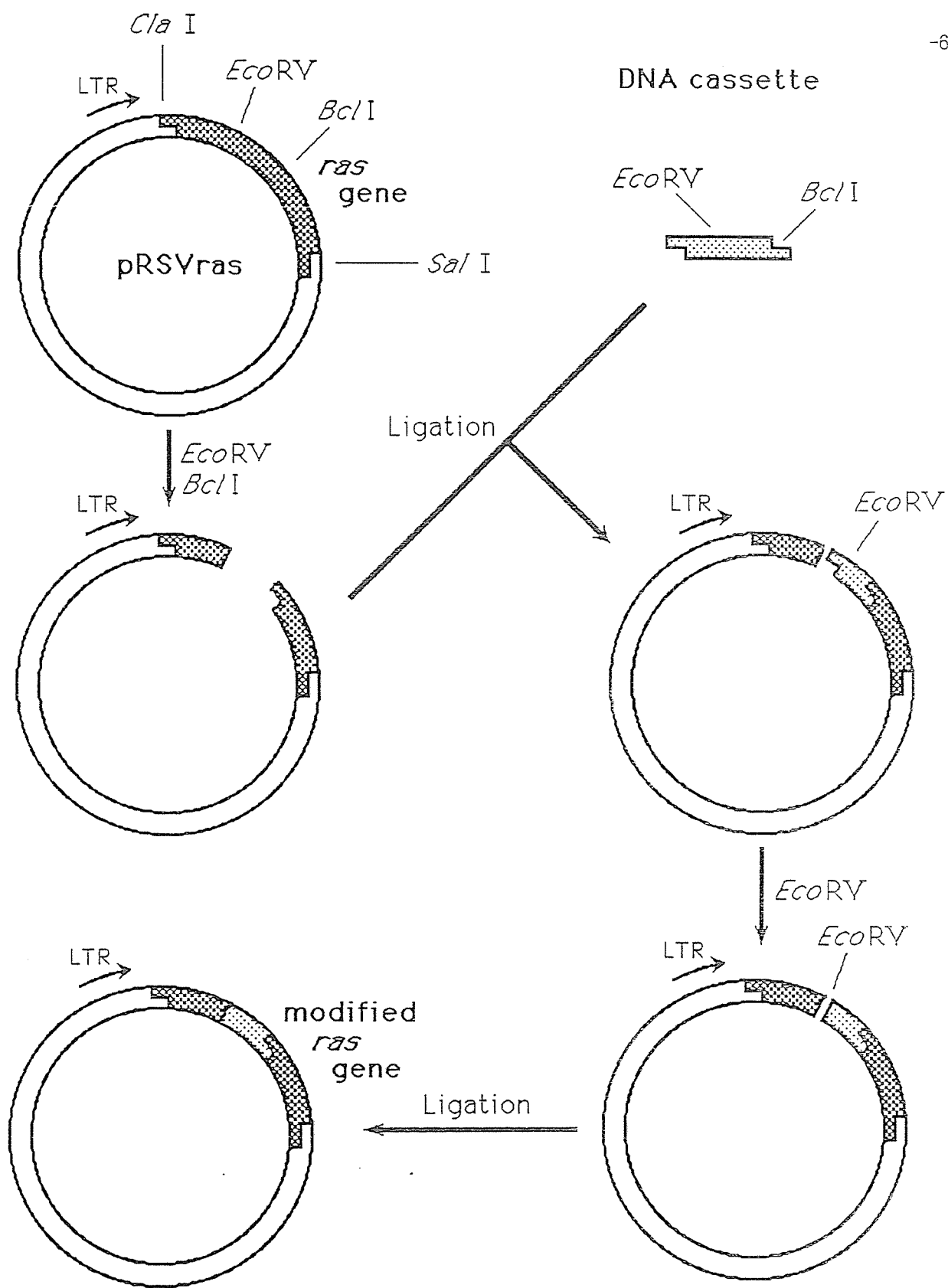


図 6-5 DNAカセットのベクターへの組み込み

いる。カセットは第2章で述べた方法と同様に構築した。ただし、理由は明らかではないが、L11'を加えてアニーリングを行うと副生成物が多く生成するため、L11'を除いてアニーリング、ライゲーションした後、L11'を加えて再びアニーリング、ライゲーションした。

ベクターへの組み込みの手順を図6-5に示した。(1)で述べた新しいベクター、pRSVrasをBclI、EcoRV消化し、低融点アガロースゲル電気泳動により精製した。DNAカセットをBclI部位で連結し、EcoRV処理、ライゲーションによりベクターを構築した。

続いて、NIH3T3細胞へのトランスフェクションを行った。用いたDNAの量は20ng及び100ngである。結果を表6-1に示す。正常(Gln-61) c-Ha-ras遺伝子がほとんどフォーカスを形成しなかったのに対し、Iを含むc-Ha-ras遺伝子は、活性化(Leu-61) c-Ha-ras遺伝子に比較して約40%のフォーカス形成能を示した。このことはIもまた、c-Ha-ras遺伝子の活性化の直接的な原因となり得ることを示している。用いているベクターや対照の活性化c-Ha-ras遺伝子が異なっているために正確ではないが、Iを含むc-Ha-ras遺伝子もXの場合と同様に、トランスフォーム活性が高いと言える。これは、先に述べたヒポキサンチン-DNA-グリコシラーゼ¹²⁹⁾がNIH3T3細胞ではそれほど活性が高くない可能性を示唆している。

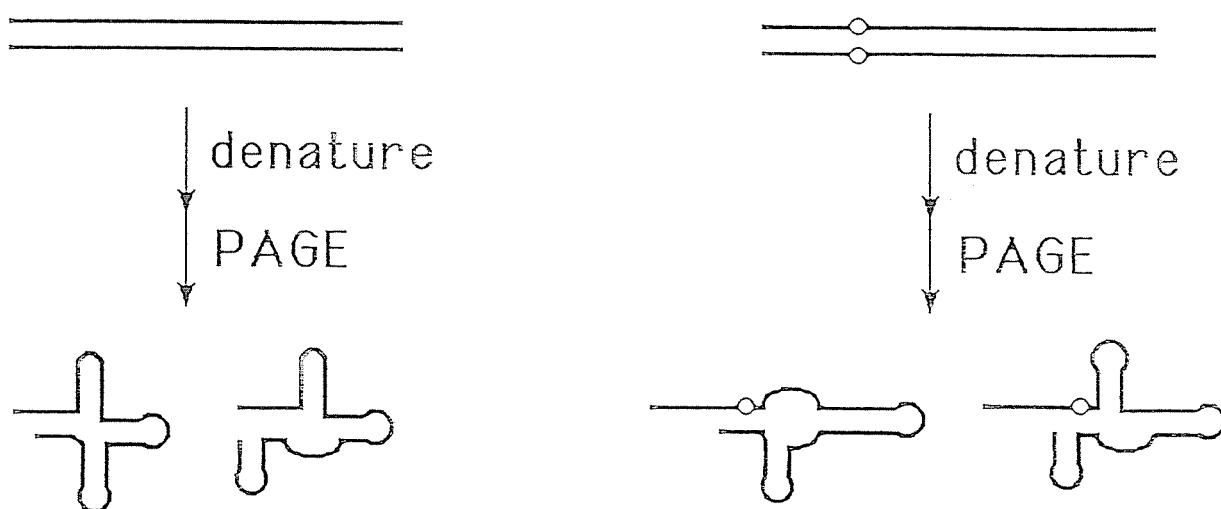
	Experiment 1		Experiment 2	
	20 ng	100 ng	20 ng	100 ng
Gln-61 (normal)	0	—	0	1
I	1 2	3 7	4	1 8
Leu-61 (activated)	2 4	—	9	4 8

表6-1 c-Ha-ras遺伝子によって生じたフォーカスの数

第2節 トランスフォーマントのc-Ha-ras遺伝子の配列分析¹²³⁾

Iを導入したc-Ha-ras遺伝子によってフォーカスを形成したトランスフォーマント中のc-Ha-ras遺伝子の解析を行った。この場合に用いた方法は、PCR-SSCP法⁸⁷⁾である。SSCP法は、一本鎖DNAがとる二次構造が、変異が生じることにより変化し、電気泳動上の移動度が変化することを利用する方法である¹³³⁾ (図6-6)。この方法により、点突然変異をも検出可能なことが報告されている。このSSCP法とPCR法を組み合わせるのがPCR-SSCP法であり、電気泳動の条件を適当なものに設定することが可能であれば、ある位置における3種類の点突然変異体と野生型DNAを一度に識別することができると思われる。

まず、標準品を用いて電気泳動条件の設定を試みた。標準品は、コドン61の2番目の位置に変異を導入するようなプライマーを用いて行ったPCRにより調製した。文献^{87, 133)}に従い、①室温、10% グリセロール、②4℃、10% グリセロール、③4℃、グリセロールなし、の3条件で行った。その際のプライマーとしてはU7とL9 (図6-3、4)を用い、通常のPCRの緩衝液中に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を添加し、反応を行わせた。その結



Shifts in electrophoretic mobility

図6-6 SSCPの原理

果、③の条件で電気泳動を行うとGと他の3種類の標準品を識別することが可能であることが明らかになった(図6-7)。5'-末端標識ではなく、[α - 32 P]dCTPによる標識であるために両鎖が検出される。

フォーカスを形成したクローンからジェノミックDNAを抽出し、PCR-SSCP法によりc-Ha-ras遺伝子の解析を行った。図6-7には3クローンを分析した結果を示した。これから明らかなように、分析したクローンには標準品の“G”と同じ挙動を示すDNAが含まれていた。いくつかのクローンのについてはMaxam-Gilbert法^{44,45)}により解析し、PCR-SSCP法で得られたものと同一の結果(Gへの変異)を得た(図6-8)。分析した20クローンの全てにGへの変異を認めた、1クローンはGに変異したc-Ha-ras遺伝子の他に、Tに変異したc-Ha-ras遺伝子を含んでいた。

これらの結果は、Iに対応する位置にdCMPが取り込まれたことを示している。既に述べたように、熱的安定性の実験から、IとCは安定な塩基対を形成することが明らかにされている¹³³⁻¹³⁷⁾。また、Klenowフラグメントを用いたin vitroにおける複製実験から、相補鎖にdCMPが取り込まれることも報告されている¹³¹⁾。今回著者が得た結果は、それらの結果と一致している。しかし、IはAとも安定な塩基対を形成し、また、GやTとの塩基対は二本鎖をそれほど不安定化させないと報告されている。今回著者が用いたコドン61の2番目の位置に修飾塩基を導入するというシステムは、GまたはTへの変異が検出可能である。それは、p21の61番目のアミノ酸がArg(Gへの変異に相当)とLeu(Tへの変異に相当)の場合には、培養細胞をトランスフォームさせることが明らかにされているからである¹³⁹⁾。一方、Cへの変異は61番目のアミノ酸を不活性型のProに置換することになるので、c-Ha-ras遺伝子を活性化しない。また、Aへの「変異」はc-Ha-ras遺伝子を活性化しないし、導入したIが修復されAに戻った場合と区別することが不可能である。従って、今回検出することが可能な突然変異はGとTのみであり、これはdCMPとdAMPが取り込まれたときに相当する。Iを用いた場合、取り込まれたヌクレオチドはdCMPがほとんどであった。

第3章で述べたように、デオキシヌクレオチドの取り込みの際には、最終生成物の熱的安定性だけではなく、形成される塩基対の形(C1'-C1'間の距離やリン酸ジエステル結合の形成しやすさ)が重要であると思われる。I-C塩基対はWatson-Crick塩基対を形成することが、NMRの測定により明らかにされている¹³⁶⁾(図6-9)。一方、I-A塩基対の場合には2種類が報告されている^{135,140)}(図6-9)。一つはNMR



図 6 - 7 PCR-SSCPによるc-Ha-ras遺伝子の解析

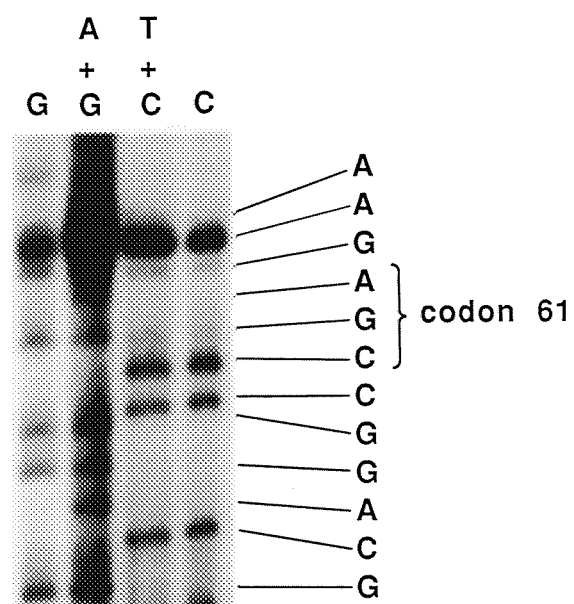


図 6 - 8 Maxam-Gilbert法によるc-Ha-ras遺伝子の解析

の測定により明らかにされたWatson-Crick型の塩基対である¹³⁵⁾。もう一つは結晶構造解析により明らかにされたHoogsteen塩基対である¹⁴⁰⁾。Watson-Crick型I-A塩基対の場合には、C1'-C1'間の距離(12.7Å)が通常のWatson-Crick対の場合(10.6Å程度)よりかなり大きなものになっている。一方、Hoogsteen対の場合には、C1'-C1'間の距離は11.2と10.5Åと報告されており、通常のWatson-Crick対の場合に近い。しかし、取り込まれるdATPのアデニン塩基がsyn型のコンホメーションをとる必要がある。また、いずれの場合も塩基対全体の形は通常の塩基対と異なっている。DNAポリメラーゼはC1'-C1'間の距離や異常な塩基対の形、またはその両方を認識している可能性がある。あるいは、ポリメラーゼはdAMPをdCMPと同程度に取り込んでも、校正機能がI-A塩基対を上記の理由により除去する可能性もある。I-C塩基対は、熱的にも安定な上、Watson-Crick塩基対であるために、dCTPがDNAポリメラーゼの非常に良い基質となるものと思われる。

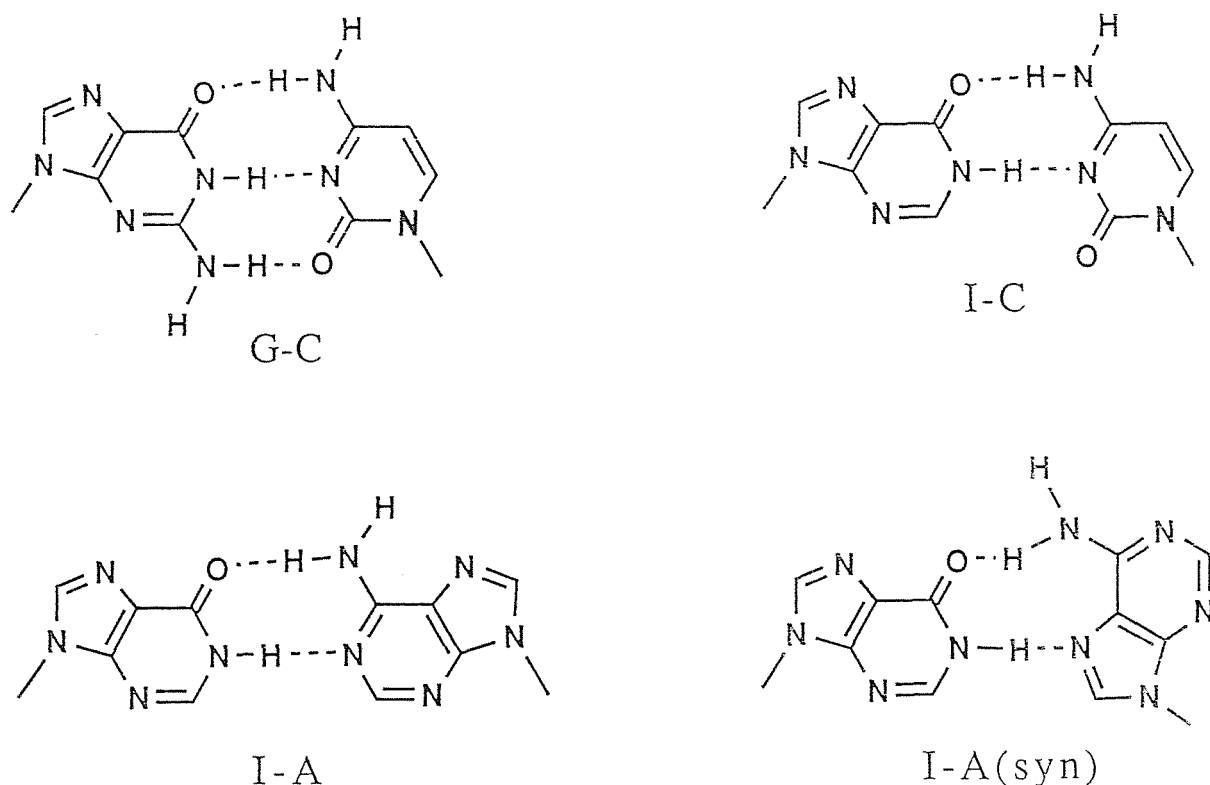


図 6 - 9 Iを含む塩基対の構造^{135, 140)}

あるいは、Arg-61 c-Ha-ras遺伝子の方がLeu-61 c-Ha-ras遺伝子よりトランスフォーム活性が非常に高いために、Gへ変異したc-Ha-ras遺伝子が検出されたと説明することも可能であるが、両変異体はほぼ等しいトランスフォーム活性を有しており^{37,139}、この説明は妥当ではない。

1クローンはTに変異したc-Ha-ras遺伝子を有していた。これはIに対応する位置にdAMPが取り込まれたことを示唆している。あるいは、ヒポキサンチン-DNA-グリコシラーゼ¹²⁹によって生じたアベシックサイトに対応する位置にdAMPが取り込まれた^{126,127}可能性もある。

いずれにせよ、コドン61の2番目の位置にIを導入したc-Ha-ras遺伝子は、高いトランスフォーメーション活性を示し、また、生じた変異はA→Gトランジッションであった。このことは、Iがc-Ha-ras遺伝子中に生じれば、c-Ha-ras遺伝子の活性化の直接的な原因となり得ることを示し、また、その活性化はIに対応する位置にdCMPが取り込まれることによることを示している。

第3、4、5章ではコドン12に修飾塩基を導入したc-Ha-ras遺伝子によるNIH3T3細胞のトランスフォーメーションについて述べた。第6章では、コドン61に修飾塩基(I)を導入したことを述べてきた。この章で明らかになったように、合成c-Ha-ras遺伝子はコドン12のみならず、コドン61に修飾塩基を導入する場合にも極めて有用であることが明らかになった。現在、当研究室の著者を中心としたグループにより、他のDNA損傷をコドン12または61に導入したc-Ha-ras遺伝子の解析が進行中である¹⁴¹⁻¹⁴⁴。また、コドン12,61以外にもras遺伝子の活性化部位がいくつか見い出されており^{5,6,33,145}、将来はこれらの部位への修飾DNAの導入も可能となろう。

結 語

著者は、c-Ha-ras遺伝子の活性化に特定のDNA損傷が関与しているのではないかと考え、4種類の修飾塩基をc-Ha-ras遺伝子のコドン12またはコドン61に導入した。その結果、以下の知見を得た。

- (1) 活性型の合成c-Ha-ras遺伝子はNIH3T3細胞をトランスフォームさせることを確認した。従って、この合成c-Ha-ras遺伝子は修飾塩基の部位特異的導入による変異の検出に有用であることを明らかにした。
- (2) O^6 -メチルグアニン、8-ヒドロキシグアニン、キサンチンの3種の修飾塩基をc-Ha-ras遺伝子のコドン12の2番目の位置に導入し、いずれの修飾塩基もc-Ha-ras遺伝子の活性化の直接的な原因となり得ることを明らかにした。
- (3) ヒポキサンチンをコドン61の2番目の位置に導入し、この修飾塩基もc-Ha-ras遺伝子の活性化の直接的な原因となり得ることを明らかにした。
- (4) O^6 -メチルグアニン、キサンチンはG→Aの、ヒポキサンチンはA→Gの突然変異を誘発することを明らかにした。また、キサンチンやヒポキサンチンはTへの変異をも誘発することを明らかにした。さらに、8-ヒドロキシグアニンは、修飾部位と隣接部位にランダムな突然変異を引き起こすことを明らかにした。
- (5) 以上のことから、carcinogenによるDNAの修飾は発癌遺伝子の活性化と密接に関わっていることを明らかにした。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導御鞭撻下さいました、北海道大学薬学部 大塚栄子教授に深く感謝致します。

適切な御助言を下さいました、国立がんセンター研究所 西村暹博士に厚く御礼申し上げます。

著者が発癌遺伝子研究を志す機会を与えて下さいました、関西新技術研究所 三浦一伸博士に深謝致します。

NIH3T3細胞に対するDNAトランスフェクション実験を御指導下さり、また、適切な御助言を頂きました、北海道大学免疫科学研究所 柿沼光明教授 並びに 幸田敏明博士に御礼申し上げます。

プラスミド pT24 を御供与下さいました、九州大学医学部 清水憲二博士 及び プラスミド pRSVΔneo を御供与下さいました、国立がんセンター研究所 下遠野邦忠博士に感謝致します。

著者が本研究を行うに際して御協力頂きました、北海道大学薬学部 井上英夫助教授、大友典子学士、石川博幸修士、清水美穂修士、加藤久代学士、三浦裕幸学士 並びに 鈴木理之学士に感謝致します。

常に討論に加わり、有益な御意見を下さいました、北海道大学薬学部 薬品有機化学講座の皆様感謝致します。

1991年

紙 谷 浩 之

実験の部

実験材料

〈同位体標識化合物〉

[γ - ^{32}P] ATP及び [α - ^{32}P] dCTPは Amersham International 社より購入した。

〈オリゴデオキシリボヌクレオチド合成試薬〉

O^6 -MeGホスホロアミダイト体（アミノ基がイソブチリル保護されたもの）は American Bionetics 社から購入した。ホスホロアミダイト体を溶解させるためのアセトニトリル（核酸合成用）は株式会社同仁化学研究所から購入した。その他の試薬は Applied Biosystems 社から購入した。

〈電気泳動関係〉

Agarose Type II (Medium EEO) は Sigma Chemical 社より、NuSieve GTG Agarose 及び SeaPlaque Agarose（低融点アガロース）は FMC Bioproducts 社よりそれぞれ購入した。

アクリルアミド、N,N'-メチレンビスアクリルアミド及び過硫酸アンモニウムは和光純薬工業株式会社より購入した。N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミンは半井化学薬品株式会社よりそれぞれ購入した。

〈クロマト担体〉

TOYOPEARL HW-75S、TSK-gel DEAE-2SW は東ソー株式会社より、Sephadex G-25、NAP-5 及び NICK Column は Pharmacia 社より、YMC-Pack AM-324 S-5 120A ODS 及び YMC-Pack AM-303 S-5 ODS は株式会社ワイエムシーより、C18 シリカゲルは Waters 社より、NENSORB は New England Nuclear 社よりそれぞれ購入した。Amrep は Amersham International 社より購入した。

〈制限酵素〉

BssHII は New England Biolab 社又は株式会社ニッポンジーンより、BclI 及び AatII は東洋紡績株式会社より、NarI は株式会社ニッポンジーンより、MscI は New England Biolab 社より、その他の制限酵素は宝酒造株式会社より購入した。

〈その他の酵素〉

T4ポリヌクレオチドキナーゼ、T4 DNAリガーゼ、アルカリ性ホスファターゼは宝酒造株式会社より、RNaseA、リゾチーム、proteinase KはSigma Chemical 社よりそれぞれ購入した。Taq DNA ポリメラーゼはPerkin Elmer Cetus 社から、ヘビ毒ホスホジエステラーゼはBoehringer Mannheim 社からそれぞれ購入した。

〈培養関係〉

アンピシリンとクロラムフェニコールはSigma Chemical 社より購入した。D'MEM はSigma Chemical 社より、トリプシンはBoehringer Mannheim 社より購入した。

〈Maxam-Gilbert法及びジデオキシ法関係〉

ジメチル硫酸はAldrich Chemical 社より、無水ヒドラジン及びホルムアミドはEastman Kodak 社より、ピペリジンは半井化学薬品株式会社より、ギ酸(99%)は和光純薬工業株式会社よりそれぞれ購入した。M13 Sequencing Kit Ver. 2.0 は宝酒造株式会社より購入した。

〈その他の試薬〉

Hepes 及び Tris はSigma Chemical 社より、臭化エチジウムはAldrich Chemical 社より、Giemsa液はMerck 社よりそれぞれ購入した。DNA DIPSTICK はInVitrogen 社より購入した。

〈X線フィルム〉

Kodak X-Omat RPフィルム、X線フィルム用増感紙はEastman Kodak 社より購入した。

〈フィルム〉

FP3000B(富士写真フィルム株式会社)を使用した。

〈機器〉

DNA合成機はApplied Biosystems model 380A 及び 381A を、HPLC は島津LC-3A、LC-6A 及び Gilson 302を、吸光度の測定には島津UV-240 または Beckman DU-65 Spectrophotometer を、放射活性の測定にはPackard TRI-CARB 460C を、PCR にはPerkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler をそれぞれ用いた。エッペンドルフチューブの遠心にはトミー精工MC-150を、エッペンドルフチューブの冷却遠心

にはトミー精工 MR-15Aを、その他の遠心にはBeckman J2-21M/E又は日立20PR-52Dを、超遠心操作にはBeckman L8-55をそれぞれ用いた。

一般的操作

〈オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成〉

Applied Biosystems 社 380A 又は 381A DNA自動合成機を用いて行った。

〈アンモニア水処理〉

60℃で5時間加熱した。

〈逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー〉

アンモニア水処理を行ったオリゴデオキシリボヌクレオチドからアンモニア水を留去した後、少量のA液（5% アセトニトリル, 50mM TEAA）に溶解し、あらかじめA液で平衡化しておいたC18シリカゲルカラム（ ϕ 0.7 X 14cm）に吸着させ、A液100mlとB液（35% アセトニトリル, 50mM TEAA）100mlによる直線濃度勾配により溶出した。

〈DMTr基の除去〉

逆相カラムクロマトグラフィーによって得られた目的物を含む画分の溶媒を留去し、水で3回共沸した。80% 酢酸 2mlを加えて室温で20分間放置した後、酢酸エチルで3回抽出してジメトキシトリタノールを除去した。水を留去し滅菌水600 μ lに溶解してミリポアフィルター（孔径0.45 μ m）でろ過した。

〈逆相HPLC〉

DMTr基を除去したオリゴデオキシリボヌクレオチド溶液を200 μ lに濃縮した。分析した後、最低2回に分けて分取した。溶出はA液（5% アセトニトリル, 0.1M TEAA）及びB液（25% アセトニトリル, 0.1M TEAA）による直線濃度勾配により行った。カラムは分取を行う場合には、YMC-Pack AM-324 S-5 120A ODS（ ϕ 10 X 300mm）を、分析のみの場合には YMC-Pack AM-303 S-5 ODS（ ϕ 4.6 X 250mm）を用いた。溶媒を留去し、水で3回共沸した後、滅菌水600 μ lに溶解してろ過した。

〈イオン交換HPLC〉

逆相HPLCで分取したオリゴデオキシリボヌクレオチド溶液を200 μ lに濃縮した。最初に分析し、必要なものは数回に分けて分取した。溶出はA液（20% アセトニトリル）

B液（20% アセトニトリル, 2M ギ酸アンモニウム）による直線濃度勾配により行った。カラムは TSK-gel DEAE-2SW (φ7.0 X 250mm)を用いた。

〈ゲルろ過による脱塩〉

イオン交換HPLCによって分取したオリゴデオキシリボヌクレオチド溶液を濃縮し、0.1M TEAB緩衝液で平衡化しておいたSephadex G-25カラム (φ1.3 X 40cm) にアプライし、同緩衝液で溶出し脱塩した。オリゴデオキシリボヌクレオチドを含む画分を集めて溶媒を留去した。水で3回共沸した後、滅菌水600 μ lに溶解しろ過した。

〈オリゴデオキシリボヌクレオチドの定量及び保存〉

精製したオリゴデオキシリボヌクレオチド溶液から水を留去し、適当量の滅菌水に溶解させた。必要のあるものは希釈し、水を対照として260nmにおける吸光度を測定し、OD₂₆₀単位を算出した。定量が終了したオリゴデオキシリボヌクレオチドは-20℃で保存した。

〈制限酵素によるDNAの切断〉

プラスミドDNAの切断の際には、1 μ gのDNAに対して2~3Uの酵素を用いた。DNAカセット及びPCR断片の切断には、各酵素のUの定義に従って計算を行い、酵素の量を調節した。特に記載していない場合には、酵素を入手した会社の推奨する緩衝液を用い、反応は50~100 μ lで行った。酵素を加える前には、反応温度で5~10分間予め加温（ブレインキュベーション）を行った。

〈フェノール抽出〉

TE飽和フェノール¹を試料溶液に対して等容加えて、よく攪拌した。遠心した後、水層を回収した。必要な時はフェノール層に滅菌水を加えて、逆抽出を行った。

¹TE飽和フェノール:TE緩衝液²を飽和させたフェノール

²TE緩衝液:10mM Tris·HCl(pH8.0)/1mM EDTA

〈クロロホルム抽出〉

試料溶液に等容のクロロホルムを加えて、よく攪拌した。遠心した後、水層を回収した。

〈フェノール-クロロホルム抽出〉

試料溶液に1/2容のTE飽和フェノール¹と1/2容のクロロホルムを加えて、よく攪拌した。遠心した後、水層を回収した。必要なときは有機層に滅菌水を加えて、逆

抽出を行った。

〈エタノール沈澱〉

終濃度が200mMとなるように4M NaClを加えた後、2.5倍容のエタノールを加えた。
-80℃で20～30分間放置し、遠心（12000rpm, 20分, 0℃）して沈澱を回収した。

〈PAGE〉

分析用のPAGEの場合は 22cm X 15cm X 5mm のガラス板2枚（1枚は rabbit ear type）と厚さ1mmのスペーサーを用いて装置を組み立て、以下の組成の液をガラス板の隙間に流し込んで調製した。

	【 3.5 % 】	【 5 % 】	【 8 % 】	【 10 % 】
40%アクリルアミド(29:1) ^{・3}	3.5mℓ	5mℓ	8mℓ	10mℓ
TBE(X10) ^{・4}	4mℓ	4mℓ	4mℓ	4mℓ
過硫酸アンモニウム	25mg	25mg	25mg	25mg
N,N,N',N'-テトラメチル エチレンジアミン	10μℓ	15μℓ	20μℓ	30μℓ
	40mℓ	40mℓ	40mℓ	40mℓ

泳動緩衝液にはTBE(X1)^{・4}を用い、定電圧で泳動した。

^{・3}40%アクリルアミド(29:1):アクリルアミド348gとN,N'-メチレンビスアクリルアミド12gを水に溶解し、全量を900mℓとした後、ろ過した。

^{・4}TBE(X10):Tris塩基108g、ほう酸55g、EDTA・2Na・2H₂O 9.3gを水に溶解し、全量を1ℓとした。オートクレーブすることによりほう酸を完全に溶解させた。

〈アガロースゲル電気泳動〉

〈PAGE〉の項で述べたガラス板を用いた。アガロースをTAE(X1)^{・5}に懸濁し、加熱またはオートクレーブすることにより均一にしてガラス板の隙間に流し込んだ。泳動用緩衝液にはTAE(X1)^{・5}を用いた。ただし、5% NuSieve GTG アガロースゲル電気泳動の場合はサブマリン型の電気泳動槽を用い、また、用いる緩衝液はTBE(X1)^{・4}とした。

^{・5}TAE(X10):400mM Tris・AcOH(pH8.3)/50mM AcONa/10mM EDTA

〈臭化エチジウムによるDNAの染色〉

電気泳動が終了したゲルを蒸留水の入ったステンレスのバットに移し、臭化エチジウム（5mg/ml）を25～50 μ l加えて混合した。5～10分後にバットの中の液を捨て、紫外線（366nm）によって検出した。

〈低融点アガロースゲルからのDNAの回収〉

UV吸収又は臭化エチジウムにより検出したDNAのバンドを切断した。予めTE-2緩衝液¹⁰ 300 μ lを入れておいたエッペンドルフチューブにゲル片を移し、4M NaCl 17 μ lを加えた後、70℃で10分間加熱した。ゲル片が融解したことを確認しTE飽和フェノール¹¹ 500 μ lを加えて迅速に攪拌した。フェノール抽出（必要時には2回抽出操作を行った）、逆抽出、フェノール-クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を行った後エタノール沈澱によりDNAを回収した。

¹⁰ TE-2緩衝液:1mM Tris·HCl(pH8.0)/0.1mM EDTA

第1章第1節の実験

〈pRSV Δ neo-CS〉

当教室の三浦一伸博士、大友典子学士により構築並びに精製されたものを用いた。

〈LTRの下流に合成c-Ha-ras遺伝子を有するプラスミドの構築〉

pRSV Δ neo-CS 9.3 μ l(10 μ g)、制限酵素反応緩衝液-2 (X5) ¹² 10 μ l、200mM NaCl 12.5 μ l、0.1% BSA 5 μ l、滅菌水11.7 μ lを混合して、30℃でブレインキュベートした。ClaI (9U/ μ l) 1.5 μ lを加え、30℃で2.5時間インキュベートした。エタノール沈澱によりDNAを回収した後、31.25 μ lの滅菌水に溶解し、制限酵素反応緩衝液 (X5) ¹³ 10 μ l、5M NaCl 1.75 μ l、0.1% BSA 5 μ lを加え37℃でブレインキュベートした。SalI (8U/ μ l) 2 μ lを加え、37℃で3時間反応させた。反応の後、エタノール沈澱によりDNAを回収し、20 μ lの滅菌水に溶解した。トリプトファンプロモーターの下流に合成c-Ha-ras遺伝子を有するプラスミド(pRG12,pRV12,pRL61又はpRR61)も同様にClaI、SalI処理を行った。次に、色素液B¹⁴を加えて2% 低融点アガロースゲル電気泳動を行って、目的のバンド（pRSVneo-CSの長鎖断片及びc-Ha-ras遺伝子断片）を切り出した後、ゲルから回収した。両者を混合し、滅菌水で35.5 μ lとした後、ライゲーション緩衝液 (X5) ¹⁵ 10 μ l、0.2M 2-メルカプトエタノール 2.5 μ l、T4 DNAリガーゼ (350U/ μ l) 2 μ lを加えて20℃で1.5時間インキュベートした。エタノール沈澱の後、20 μ lのTE緩衝液¹⁶に溶解した。

・⁷制限酵素反応緩衝液-2 (X5) : 50mM Tris·HCl(pH8.0)/35mM MgCl₂/35mM 2-メル
カプトエタノール

・⁸制限酵素反応緩衝液 (X5) : 50mM Tris·HCl(pH7.5)/35mM MgCl₂/35mM 2-メルカ
プトエタノール

・⁹色素液B:30% ショ糖/0.25% BPB/50mM EDTA

・¹³ライゲーション緩衝液 (X5) : 330mM Tris·HCl(pH7.6)/33mM MgCl₂/2.5mM ATP

〈大腸菌のCa²⁺処理¹⁴⁶⁾〉

大腸菌HB101株をLブローズ¹¹⁾ 5mlに接種し、37℃で一晩培養した。1mlをLブローズ100mlに植え継ぎ2時間培養した。30分間氷冷した後、遠心(7000rpm、2分間、4℃、ローターはBeckman JA-10)して集菌した。50mlの50mM CaCl₂に懸濁し、0℃で1時間放置した後、再び遠心して集菌した。10mlの50mM CaCl₂, 20% グリセリンに懸濁した後、400μlずつ分注して-80℃で保存した。

・¹¹Lブローズ:バクトトリプトン0.5g, 酵母エキス0.25g, NaCl 0.25g,
ブドウ糖50mg/50ml、pH7.2

〈大腸菌の形質転換¹⁴⁶⁾〉

予め氷冷しておいたDNA溶液10μlとCa²⁺処理した大腸菌100μlをエッペンドルフチューブに注ぎ、10分間氷冷した。42℃の水浴に60秒間浸した後、室温まで放置した。1mlのLブローズ¹¹⁾を加えて37℃で1時間インキュベートした後、遠心(1200rpm、5分間、4℃)し、得られた菌体を300μlのLブローズに懸濁した。アンピシリンを含む寒天培地¹²⁾に100μlずつ分注し、均一に広げた。液が吸収された後、37℃で一晩(およそ16時間)培養した。

・¹²寒天培地:Lブローズに、1.5%となるように寒天を加え、オートクレーブを行った。終濃度が30mg/lとなるようにアンピシリンを加えた後、シャーレに注いで固めた。

〈rapid boiling法による大腸菌のスクリーニング⁴³⁾〉

1枚の寒天培地¹²⁾に4つのコロニーを扇状に植え、37℃で一晩培養した。大腸菌の半分(シャーレの1/8)をかき取り、STET緩衝液¹³⁾ 500μlに懸濁した。リゾチーム溶液(10mg/ml) 20μlを加えて10分間室温に放置した。沸騰水浴中で1分間煮沸し、直ちに遠心(13000rpm、20分間、室温)して上清を回収した。上清に450μlのイソプロパノールを加えて-20℃で30分放置し、遠心(12000rpm、10分間、4℃)して沈澱を得た。沈澱を乾燥させた後、100μlのTE緩衝液²⁾に溶解し、160μlのイソプロパノールを加えて-20℃で30分放置し、遠心(12000rpm、10分間、0℃)して沈澱を得た。

ClaI-SalI消化する場合は以下の操作を行った。沈澱を23.2 μ lの滅菌水に溶解した後、制限酵素反応緩衝液^{・13}6 μ lと0.8 μ lのClaI (9U/ μ l)を加えて37℃で1時間反応させた。その後、1.2 μ lの5M NaClと1.2 μ lのSalI (10U/ μ l)を加えて37℃で90分間反応させた。0.2 μ lのRNaseA^{・14}を加え、37℃で30分反応させた。フェノール抽出、クロロホルム抽出の後、エタノール沈澱によりプラスミドを回収し、8 μ lの滅菌水に溶解させた。色素液A^{・15}7 μ lを加えた後、3.5% PAGE (250V定電圧、2時間30分)を行い、臭化エチジウムで染色してバンドを確認した。

・¹³STET緩衝液:50mM Tris·HCl(pH8.0)/50mM EDTA/8% ショ糖/5% Triton X-100

・¹⁴RNaseA:100mgのRNaseAを100mlの10mM Tris·HCl(pH7.5)/10mM NaCl緩衝液に溶解し、沸騰水浴中で15分間加熱した。-20℃で保存した。

・¹⁵色素液A:20% ショ糖/0.1% XC/0.1% BPB/1mM EDTA

第1章第2節の実験

〈大腸菌の培養〉

プラスミドを含む大腸菌HB101株をLB培地^{・16}10mlに植え、一晚37℃で振とう培養した。翌日、490mlのM9CA培地^{・17}に植え継ぎ、通気下37℃で培養を続けた。30分おきに550nmにおける濁度を測定し、濁度が0.7~0.8になった時点(約2時間後)でクロラムフェニコールのエタノール溶液(750mg/2ml)を加えた。さらに通気下37℃で培養を19時間続けた。培養液を氷冷し、遠心(8000rpm、15分間、4℃、ローターはBeckman JA-10又は日立RPR9-2)して集菌した後、大腸菌を50mlのWL緩衝液^{・18}に懸濁し、よく洗浄してから、再び遠心(3000rpm、10分間、4℃、ローターはBeckman JA-10又は日立RPR9-2)して集菌した。

・¹⁶LB培地:バクトトリプトン1g,酵母エキス0.5g,NaCl 0.5g,アンピシリン2mg/100ml、pH7.2

・¹⁷M9CA培地:M9 salt(X10)^{・18}10ml,カサミノ酸0.2g,水86mlを混合し、オートクレーブにより滅菌した後、0.2M MgSO₄,0.01M CaCl₂,20% ブドウ糖,塩酸チアミン(1mg/ml)1mlをそれぞれ加えた。

・¹⁸M9 salt(X10):Na₂HPO₄ 6g,KH₂PO₄ 3g,NaCl 0.5g,NH₄Cl 1g/100ml

・¹⁹WL緩衝液:25mM Tris·HCl(pH8.0)/10mM EDTA

〈プラスミドDNAの調製^{47・147)}〉

大腸菌を40mlのWL緩衝液^{・19}に懸濁し、氷冷した。これに8mlのリゾチーム溶液(0.5mg/ml)を加え、攪拌した。溶液がゆるやかなゲル状となった時点(約2~15分後)で

30mlの0.4%デオキシコール酸ナトリウムと30mlの4% Brij-58を加え、静かに攪拌した。これに10mlの1.2M NaClを加えて静かに攪拌した後、遠心(29000rpm、1時間、2°C、ローターはBeckman Type30)して、約120mlの抽出液を得た。

細胞抽出液に終濃度1Mとなるように6gのNaClを加えて溶解させた後、120mlのクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)を加え、激しく攪拌した。遠心(6000rpm、10分間、ローターはBeckman JA-10又は日立RPR9-2)して水層を得た。有機層に70mlのWL緩衝液を加えて逆抽出し、水層を集めた後、2倍量のエタノールを加えて一晚-20°Cで放置した。生じた沈澱を遠心(9000rpm、15分間、0°C、ローターはBeckman JS-13.1又は日立RPR-S10)して集め9.5mlのTE緩衝液^{1,2}に溶解させた。等量の4M NaClを加えて4°Cで一晩放置し、生じた沈澱を遠心(9000rpm、15分間、0°C、ローターはBeckman JS-13.1又は日立RPR-S10)して除去した。上清に2倍量のエタノールを加えて-80°Cに30分間放置した後、生じた沈澱を遠心(9000rpm、15分間、0°C、ローターはBeckman JS-13.1又は日立RPR-S10)して回収し、5mlの0.4% Sarkosyl-TE緩衝液に溶解した。40 μ lのRNaseA溶液^{1,4}を加えて37°Cで1時間インキュベートした後、450 μ lの4M NaClと5mlのTE飽和フェノール¹を加えて激しく攪拌した。遠心(8000rpm、10分間、ローターはBeckman JS-13.1又は日立RPR-S10)して水層を得た。有機層を2mlのTE緩衝液で逆抽出し、水層を合わせた。この水層に7mlのクロロホルムを加えて激しく攪拌した。遠心(8000rpm、10分間、ローターはBeckman JS-13.1又は日立RPR-S10)して水層を得た。有機層を2mlのTE緩衝液で逆抽出し、水層を合わせた。得られた水層に2倍量のエタノールを加え、-80°Cで30分間放置した。生じた沈澱を遠心(9000rpm、15分間、0°C、ローターはBeckman JS-13.1又は日立RPR-S10)して回収し、1mlのTE緩衝液に溶解させた。次のゲルろ過カラムにすぐアプライしない場合はエタノール沈澱の状態にしておき-20°Cで保存した。

〈ゲルろ過によるプラスミドの精製^{1,4,7}〉

粗プラスミド溶液(1ml)を、前もって10mM Tris·HCl(pH7.5)/0.1mM EDTA緩衝液で平衡化しておいたTOYOPEARL HW-75Sカラム(ϕ 1.8cm X 66cm)にアプライし、同緩衝液で溶出させた。1mlずつ分画し、各フラクションの260nmにおける吸光度を測定した。目的のプラスミドを含むと思われるフラクションについて1% アガロースゲル電気泳動(55V定電圧、5時間)を行い、ccDNAの割合の高いフラクションを1本ごとエッペンドルフチューブに移した。減圧下で水層を300 μ l以下に濃縮し、必要なときは滅菌水を加えて全量を300 μ lとした後、15 μ lの4M NaClと750 μ lのエタノールを加えて-20°Cで保存した。必要なフラクションは遠心(12000rpm、20分間、0°C)してプラスミドを沈澱として回収し、濃度が1 μ g/ μ lとなるようにTE緩衝液^{1,2}に溶解させた。

〈Maxam-Gilbert法による塩基配列確認のためのフラグメントの調製〉

プラスミド2 μ gをBssHII又はHindIII消化した。前者の場合はpRSV-rg12又はpRSV-rv12 2 μ l (2 μ g) に滅菌水25.75 μ l、制限酵素反応緩衝液^{・27}10 μ l、200mM NaCl 6.25 μ l、0.1% BSA 5 μ lを加え、37°Cでプレインキュベートした後、BssHII (4U/ μ l) 1 μ lを加えて50°Cで3時間インキュベートした。後者の場合はプラスミド2 μ l (2 μ g) に滅菌水22.5 μ l、制限酵素反応緩衝液^{・3}10 μ l、200mM NaCl 15 μ lを加えてプレインキュベートし、HindIII (12U/ μ l) 0.5 μ lを加えて37°Cで3時間反応させた。エタノール沈澱によりDNAを回収し、98 μ lのAP緩衝液^{・20}に溶解させた後、2 μ lのアルカリホスファターゼ (0.12U/ μ l) を加えて37°Cで1時間反応させた。フェノール-クロロホルム抽出 (2回)、クロロホルム抽出 (2回) した後、エタノール沈澱によりDNAを回収した。13.5 μ lの滅菌水に溶解し、4 μ lのリン酸化緩衝液A^{・21}、2 μ lの [γ -³²P] ATP (10 μ Ci/ μ l, 20 μ Ci)、0.5 μ lのT4ポリヌクレオチドキナーゼ (5.5U/ μ l) を加えて37°Cで3時間インキュベートした。エタノール沈澱によりDNAを回収した。BssHII消化したDNAは滅菌水37.5 μ lに溶解し、制限酵素反応緩衝液10 μ l、5M NaCl 1.5 μ l、MluI (5U/ μ l) 1 μ lを加えて37°Cで3時間反応させた。HindIII消化したDNAは滅菌水29.5 μ lに溶解し、制限酵素反応緩衝液10 μ l、1M KCl 5 μ l、0.1% BSA 5 μ l、HpaI (12U/ μ l) 0.5 μ lを加えて37°Cで3時間反応させた。エタノール沈澱によってDNAを回収し、50 μ lのTE緩衝液^{・6}に溶解させた。減圧下で濃縮し、パラフィルムに移して風乾させた。エッペンドルフチューブに50 μ lの滅菌水を加えて濃縮し、パラフィルムに移して風乾させた。この操作を繰り返すことにより、ほとんどの放射活性を回収できる。適当な量まで風乾させた後、2 μ lの40% ショ糖を加え、2% 低融点アガロースゲル電気泳動によりフラグメントを分離した。泳動終了後オートラジオグラフィーによってバンドを検出した。バンドに相当する部分を切りDNAを抽出した。ただし、エタノール沈澱の際にはcarrierとして5 μ gのtRNAを加えた。

^{・20} AP緩衝液: 1M Tris·HCl (pH8.0)

^{・21} リン酸化緩衝液A (X5): 250mM Tris·HCl (pH8.0)/50mM MgCl₂/25mM DTT

〈Maxam-Gilbert法による塩基特異的反応⁴⁵⁾〉

以上のように調製したDNAフラグメントをG、A + G、T + C、Cの反応に用いる量が1: 1.5: 1.5: 1となるように分け、それぞれ滅菌水を加えて全量を5 μ lとした。反応はすべてエッペンドルフチューブ内で行った。

(1) Gに特異的な反応

200 μ lのDMS緩衝液^{・22}に標識試料5 μ lを加えて氷冷下でジメチル硫酸1 μ lを加えて攪拌し、20°Cの水浴中で2分間反応を行った。反応後直ちに氷冷しDMS停止液^{・23}50 μ lと

エタノール750 μ lを加えて-80℃で30分間放置した。生じた沈澱を遠心(12000rpm、15分間、0℃)して集め、0.3M 酢酸ナトリウム(pH7.5)250 μ lに溶解し、エタノール750 μ lを加えて-80℃で15分間放置し、再び沈澱として回収した。沈澱に冷エタノール1mlを静かに加えた後、遠心(12000rpm、30秒、0℃)してDNAを回収した。

・²²DMS緩衝液:50mM カコジル酸ナトリウム(pH8.0)/10mM MgCl₂

・²³DMS停止液:1.5M 酢酸ナトリウム(pH7.0)/1M 2-メルカプトエタノール/
0.01% tRNA

(2) AとGに特異的な反応

40 μ lの滅菌水に標識試料5 μ lを加えて氷冷下で1Mギ酸5 μ lを加えて攪拌し、37℃で30分間反応を行った。反応後直ちに氷冷しヒドラジン停止液・²⁴200 μ lとエタノール750 μ lを加えて-80℃で30分間放置した。生じた沈澱を遠心(12000rpm、15分間、0℃)して集め、0.3M 酢酸ナトリウム(pH7.5)250 μ lに溶解し、エタノール750 μ lを加えて-80℃で15分間放置し、再び沈澱として回収した。沈澱に冷エタノール1mlを静かに加えた後、遠心(12000rpm、30秒、0℃)してDNAを回収した。

・²⁴ヒドラジン停止液:0.3M 酢酸ナトリウム(pH7.0)/0.1mM EDTA/0.0025% tRNA

(3) TとCに特異的な反応

20 μ lの滅菌水に標識試料5 μ lを加えて氷冷下でヒドラジン25 μ lを加えて攪拌し、20℃で15分間反応を行った。反応後直ちに氷冷しヒドラジン停止液・²⁴200 μ lとエタノール750 μ lを加えて-80℃で30分間放置した。生じた沈澱を遠心(12000rpm、15分間、0℃)して集め、0.3M 酢酸ナトリウム(pH7.5)250 μ lに溶解し、エタノール750 μ lを加えて-80℃で15分間放置し、再び沈澱として回収した。沈澱に冷エタノール1mlを静かに加えた後、遠心(12000rpm、30秒、0℃)してDNAを回収した。

(4) Cに特異的な反応

20 μ lの5M NaClに標識試料5 μ lを加えて氷冷下でヒドラジン25 μ lを加えて攪拌し、20℃で20分間反応を行った。反応後直ちに氷冷しヒドラジン停止液・²⁴200 μ lとエタノール750 μ lを加えて-80℃で30分間放置した。生じた沈澱を遠心(12000rpm、15分間、0℃)して集め、0.3M 酢酸ナトリウム(pH7.5)250 μ lに溶解し、エタノール750 μ lを加えて-80℃で15分間放置し、再び沈澱として回収した。沈澱に冷エタノール1mlを静かに加えた後、遠心(12000rpm、30秒、0℃)してDNAを回収した。

〈DNA鎖の切断〉

塩基特異的な反応を行わせた4種の試料に100 μ lの1M ピペリジンを加えて溶解し、

90℃で30分間加熱した。反応終了後冷却して凍結乾燥し、残渣に滅菌水20 μ lを加えて溶解し、再び凍結乾燥した。この操作をさらに最低1回繰り返した。3 μ lの色素液C²⁵を加えて溶解し、塩基配列分析用のポリアクリルアミドゲル電気泳動の試料とした。

²⁵色素液C:90% ホルムアミド/89mM Tris/89mM ほう酸/2.5mM EDTA/0.1% BPB/
0.1% XC

〈9% PAGE (7M 尿素含有、ゲル厚0.5mm)〉

40%アクリルアミド(19:1)²⁶27ml、TBE(X10)²⁴12ml、尿素50.5gを混合し、水を加えて全量を120mlとした。これに過硫酸アンモニウム80mgを加えて溶解した後、ろ過した。この溶液を減圧下で脱気した後、50 μ lのN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミンを加えて攪拌し、ガラス板(52cm X 30cm X 0.5mm)の隙間に流し込んで固めた。300Vで1時間、600Vで1時間、さらに900Vで一晩、前泳動を行い電流を一定にした。徐々に電圧を上げ、2000Vで30分間ほど泳動させて発熱させた。試料を沸騰水浴中で3分間加熱した後、直ちに氷冷し、アプライした。泳動は1800V定電圧でBPBがゲルの下端に達するまで約3時間行った。泳動が終了した後、オートラジオグラフィーを行った。

²⁶40%アクリルアミド(19:1):アクリルアミド190gとN,N'-メチレンビスアクリルアミド10gを水に溶解し、全量を500mlとした後、ろ過した。

〈ジデオキシ法による塩基配列の確認⁴⁵⁾〉

プラスミド(pRSV-rr61又はpRSV-rr61)3 μ l(3 μ g)に滅菌水13 μ l、2mM EDTA 2 μ l及び2N NaOH 2 μ lを加えて室温で5分間放置した。27 μ lの2.5M AcONH₄(pH4.5)と164 μ lのエタノールを加えて-80℃で10分間放置した。遠心(12000rpm、10分、0℃)し、70%エタノールによって洗浄した後、風乾させた。直ちに塩基配列の確認を行わない場合には、乾燥状態で-20℃で保存しておいた。

以下の反応は宝酒造株式会社から購入した、M13 Sequencing Kit Ver. 2.0を用いて行った。変性プラスミドを9.5 μ lの滅菌水に溶解させ、緩衝液(X10)1.5 μ lとプライマー(U6、U18又はL16、図1-1参照)1 μ l(0.5pmol)を加えた。75℃で20分間加熱した後、室温に下がるまで放置した。[α -³²P]dCTP 2 μ lと Klenow フラグメント(2U/ μ l)1 μ lをさらに加え、この溶液の3.2 μ lを予めdNTP-ddNTP混合液2 μ lを入れておいたエッペンドルフチューブに分注した。37℃で20分インキュベートした後、1 μ lのchase混合液を添加してさらに37℃で20分間インキュベートした。6 μ lのホルムアミド停止液²⁷を加えて反応を停止させた。

3 μ l を別のエッペンドルフチューブに移し、100℃で3分間加熱した後急冷し、9% PAGEにより塩基配列を確認した。

・²⁷ホルムアミド停止液:95% ホルムアミド/0.1% BPB/0.1% XC

第1章第3節の実験

〈NIH3T3細胞の培養〉

液体N₂中に保存されていたNIH3T3細胞(1X10⁶)を室温に戻し、適当量のPBS・²⁸を加えた後に遠心(1500rpm、10分間、4℃、ローターはBeckman JA-10)して上清を除き、ペレットをD'MEM+10% CS・²⁹に懸濁した後に再び遠心(1000rpm, 10', 4℃)して上清を除いた。ペレットを9mlの培地に懸濁し、あらかじめ7mlの培地を加えておいたシャーレに3mlずつ注ぎ培養した。

細胞数が増加してきたら(およそ3日後)以下の操作を行い継代した。まず培地を除いた後にPBS(約2ml)をシャーレに加え、すぐに遠心管に移した。今度はトリプシン(X1)・³¹を加えてしばらく放置した。細胞が剥れてきたら、ピペットで円を描くように洗い、細胞を含む溶液を遠心管に移した。(必要な時はもう1度PBSで洗った後に)遠心して上清を除き12mlの培地に懸濁した。あらかじめ9mlの培地を加えておいたシャーレ12枚に1mlずつ注ぎ、培養した。以上の操作をトリプシン処理という。

この操作では培地は1~2日ごとに交換した。

・²⁸PBS:135mM NaCl/15mM NaH₂PO₄/pH7.2

・²⁹培地:NIH3T3細胞の培地は以下の組成である。

	【5% CS】	【10% CS】	【無血】
D'MEM	9.98g	9.98g	9.98g
L-glutamine	0.15g	—	—
H ₂ O	950ml	950ml	950ml
PSF・ ³²	10ml	10ml	10ml
5% NaHCO ₃	40ml	40ml	40ml
2-メルカプトエタノール	3.5 μ l	—	—
Calf Serum	52.6ml	111.1ml	—

・³²PSF:ペニシリン100万単位, ストレプトマイシン1g, フンギゾン2.5mg/100ml

・³¹トリプシン(X10):トリプシン2.5g, EDTA・2Na・2H₂O 0.93g, NaCl 3.95g,
NaH₂PO₄・2H₂O 1.17g/500ml、pH7.2

〈DNAトランスフェクション実験のためのNIH3T3細胞の調製〉

NIH3T3細胞は上記の方法で調製した。トランスフェクションの実験には新たに培養し始めてから1週間以内に用いた。

トランスフェクションをする前日に細胞数を数え、1枚のシャーレあたり細胞が 8×10^5 ($5 \sim 10 \times 10^5$) となるようにした。

〈NIH3T3細胞DNAの調製⁵³⁾〉

上記した方法によりNIH3T3細胞を12枚のシャーレで培養した。細胞の数が多くなったら、トリプシン処理し遠心して上清を捨てた。PBSに懸濁し遠心(2000rpm、5分間、4℃)し上清を捨てた(直ちにDNAを抽出しない場合はペレットの状態で-20℃で保存)。ペレットをTNE³²5mlに懸濁し proteinase K (20mg/ml) 50 μ lと10% SDS 200 μ lを加えた。65℃で15~30分インキュベートした後、37℃で一晩インキュベートした。5mlのNTE³³を加えた後フェノール抽出を2~3回、フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール抽出(25:24:1)、クロロホルム-イソアミルアルコール抽出(24:1)を1回ずつ行い、水層に25mlのエタノールを加え、DNAをガラス棒に巻きとった。70%エタノールで2回、100%エタノールで2回洗った。DNAを乾燥させた後TE緩衝液-3³⁴5mlに溶解させた。

・³²TNE:10mM Tris·HCl(pH7.5)/10mM EDTA/150mM NaCl

・³³NTE:10mM Tris·HCl(pH8.0)/10mM EDTA/650mM NaCl

・³⁴TE緩衝液-3:1mM Tris·HCl(pH7.5)/1mM EDTA

〈ジフェニルアミン法を用いた、DNAの定量¹⁴³⁾〉

試料(を希釈したもの)を適当量(500 μ l未満)採り、同量の10% HClO₄を加えた。全量が1mlとなるように5% HClO₄を加えた後、1mlのジフェニルアミン溶液³⁵、50 μ lの0.3% CH₃CHOをそれぞれ加え、37℃で16時間インキュベートした。600nmにおける吸光度を測定し、試料に含まれるDNA量を決定した。

標準曲線は以下に述べる方法で調製したsalmon sperm DNAを用いて描いた。salmon sperm DNAを1mg/mlとなるように滅菌水に溶解させた。DNA溶液を50 μ l採り、1N NaOH 200 μ l、滅菌水750 μ lを加えた。260nmにおける吸光度を測定して濃度を決定した。

・³⁵ジフェニルアミン溶液:diphenylamine 1.5g, AcOH 100ml, H₂SO₄ 1.5ml

〈DNAトランスフェクション実験のためのDNA試料の調製〉

トランスフェクションに用いるDNA試料はシャーレの枚数に応じて調製した。1枚の場合、NIH3T3細胞DNA 30 μ g、及び、DNA必要量を含み、全量437.5 μ lとなるように滅

菌水を加え、2M CaCl_2 62.5 μl を更に加えて500 μl とした。2枚の場合はその倍量とした。

〈DNAトランスフェクション〉

シリコナイズしたガラス容器にHBS^{・36}500 μl を入れ、上記した様に調製したDNA試料を滴下した（シャーレ2枚の場合は倍量とした）。室温で30分放置した後、前もって培地を交換しておいたシャーレに加え（2枚の場合は980 μl ずつシャーレに加えた）、37°Cで培養した。5時間後培地を取り除き、17%グリセロール^{・37}約2mlを加え、1分40～45秒間放置した。D'MEM^{・29}10mlを加えてグリセロールショックを停止させ、培地をD'MEM+10%CSに交換した後、37°Cで12～16時間培養した。翌日トリプシン処理し、1枚のシャーレの場合は3枚に、2枚の場合は6枚にD'MEM+5%CS^{・29}を用いて広げた。

この操作では3～4日ごとに培地（D'MEM+5%CS）を交換した。

・³⁶HBS:NaCl 16.36g,Hepes 11.92g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.23g/ℓ、pH7.1

・³⁷17%グリセロール:グリセロール 170ml,NaCl 8.0g,Hepes 5.0g,KCl 0.37g,
ブドウ糖 1.0g/ℓ、pH7.0

〈ギムザ染色〉

フォーカスが十分大きくなった時点で培地を抜き、風乾させた。メタノールを加えて風乾させた後、ギムザ染色液^{・33}約5mlを加えて15～30分放置し、水洗の後、風乾させた。

・³³ギムザ染色液:Giemsa's solution 1.5～2drops,PBS 100 μl /ml

第2章第1節の実験

〈オリゴデオキシリボヌクレオチドのリン酸化〉

各オリゴデオキシリボヌクレオチドの320pmolに相当する量をエッペンドルフチューブに移し、減圧下で乾固させた。滅菌水6 μl に溶解し、リン酸化緩衝液B(X5)^{・39}2 μl 、10mM ATP^{・43}1 μl 、T4ポリヌクレオチドキナーゼ（10U/ μl ）1 μl を加えた。37°Cで30分反応させた後、T4ポリヌクレオチドキナーゼを1 μl 加え、さらに30分反応させた。滅菌水1 μl を加えた後、90°Cで3分加熱し、酵素を失活させた。U1とL17（又はL17-L18）は滅菌水12 μl に溶解した。

・³⁹リン酸化緩衝液B（X5）:250mM Tris·HCl(pH9.5)/50mM MgCl_2 /25mM DTT/
25% グリセロール

・⁴³10mM ATP:10mM Tris·HCl(pH7.6) 20mlにATP·2Na 110.2mgを溶解させた。

〈第1段階目のライゲーション〉

オリゴデオキシリボヌクレオチドを5 μ l採り、一本のエッペンドルフチューブにまとめた。ライゲーション緩衝液(X5)^{・13}20 μ lを加え、さらに滅菌水を加えて全量を93 μ lとした。90℃で3分加熱した後、氷水で急冷した。75℃で5分加熱した後、室温に達するまで放置し徐冷した。室温に達した後10分間氷冷し、0.2M 2-メルカプトエタノール5 μ lとT4 DNAリガーゼ(350U/ μ l)2 μ lを加えて15℃で2時間反応させた。ライゲーションで得られたフラグメントはエタノール沈澱の後、TE緩衝液^{・2}10 μ lに溶解した。

〈10% PAGEとゲルからの抽出〉

TE緩衝液^{・2}に溶解したDNAに色素液A^{・15}3 μ lを加えてゲルにアプライした。泳動は250V定電圧で行い、BPBがゲルの下端に達した時点で終了した。臭化エチジウムで染色した後、目的の鎖長と思われるバンドを切り、透析チューブに入れた、さらに0.5X TBE^{・4}200 μ lを入れて、75mA定電流で60分間泳動した(泳動液は0.5XTBE)。10分間逆方向に泳動した後、紫外線ランプでゲルからの溶出を確認して、エッペンドルフチューブに移した。チューブ内を200 μ lの0.5X TBEで洗浄し、エッペンドルフチューブに移した後、もう一度抽出操作を繰り返し、エタノール沈澱によりDNAを回収した。得られたDNAカセットは66.7 μ lのTE緩衝液^{-2・5}に溶解した。

〈DNAカセットのリン酸化〉

DNAカセット溶液4.8 μ l(計算上4.8pmolに相当)に滅菌水1.7 μ l、リン酸化緩衝液A(X5)^{・21}2 μ l、100 μ M ATP^{・41}1 μ l、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(10U/ μ l)0.5 μ lを添加し、37℃で60分間インキュベートした。

^{・41}100 μ M ATP:10mM ATP^{・42}を滅菌水で100倍希釈した。

〈pRSV-rg12のC1aI, BssHIIによる消化〉

pRSV-rg12溶液(1 μ g/ μ l)5 μ l、制限酵素反応緩衝液-2(X5)^{・7}10 μ l、200mM NaCl 6.25 μ l、0.1% BSA 5 μ l、滅菌水21.75 μ lを混合して、50℃でブレインキュベートした。BssHII(4U/ μ l)2 μ lを加えて、50℃で3時間インキュベートした。続いて、反応混合液に滅菌水15.25 μ l、制限酵素反応緩衝液-2(X5)10 μ l、200mM NaCl 8.75 μ l、0.1% BSA 5 μ lを混合して、30℃でブレインキュベートした。C1aI(12U/ μ l)1 μ lを加え、30℃で3.5時間インキュベートした。エタノール沈澱によりDNAを回収した後、10 μ lのTE緩衝液^{・2}に溶解し、色素液B^{・9}3 μ lを加え、2% 低融点アガロースゲル電気泳動(70V定電圧、1時間40分)を行った。臭化エチジウムで染色した後、目的のバンドを切りエッペンドルフチューブに移した。ゲルからDNAを抽出した後、エタノール沈

澱によりDNAを回収した。得られたDNAはTE緩衝液10 μ lに溶解した。

〈DNAカセットのベクターへの組み込み〉

ベクター5 μ l (約0.8pmol)、リン酸化したDNAカセット5 μ l (2.4pmolに相当)をエッペンドルフチューブに入れた。滅菌水174 μ l、ライゲーション緩衝液(X5) 140 μ l、0.2M 2-メルカプトエタノール35 μ l、T4 DNAリガーゼ(350U/ μ l) 1 μ lのカクテルを調製し、このカクテルを10 μ l加えて16°Cで2時間反応させた。エタノール沈澱の後、滅菌水27.75 μ lに溶解させた。制限酵素反応緩衝液-2(X5) 10 μ l、200mM NaCl 6.25 μ l、0.1% BSA 5 μ lを加えてブレインキュベートした後、BssHII (4U/ μ l) 1 μ lを加えて50°Cで3時間反応させた。エタノール沈澱の後、10 μ lのTE緩衝液-2に溶解させ、2% 低融点アガロースゲル電気泳動(70V定電圧、1時間45分)によりDNAを精製した。エタノール沈澱の後、10 μ lの滅菌水に溶解させた。滅菌水174 μ l、ライゲーション緩衝液(X5) 140 μ l、0.2M 2-メルカプトエタノール35 μ l、T4 DNAリガーゼ(350U/ μ l) 1 μ lのカクテルを調製し、このカクテルを10 μ l加えて16°Cで2時間反応させた。エタノール沈澱の後、TE緩衝液-3に20 μ lに溶解させた。

〈臭化エチジウムによる蛍光を利用したベクターの定量¹⁴³⁾〉

ベクター溶液を10倍希釈し、5 μ lをパラフィルム上にスポットした。2 μ g/mlの臭化エチジウムを含むTE緩衝液 5 μ lをパラフィルム上のベクター溶液に加え、ピペッティングにより混合した。標準品として既知濃度のpRSV-rg12溶液を用い、標準品の蛍光強度との比較により濃度を見積った。

第2章第2節の実験

〈DNAトランスフェクション〉

第1章第3節の実験の項で述べた通りに行った。

第3章第1節の実験

〈Q⁵-MeGを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成と精製⁵³⁾〉

大友典子学士によって合成及び精製されたものを用いた。

〈 Q^5 -MeGを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの安定性の検討〉

Q^5 -MeGを含むオリゴデオキシリボヌクレオチド(U2-35Me)を0.05A₂₈₀単位採り、滅菌水を加えて40 μ lとした後、以下の条件で処理した。①リン酸化緩衝液B(X5)^{・39} 10 μ lを加えて37℃で60分インキュベートした後、90℃で3分処理した。②ライゲーション緩衝液(X5)^{・13} 10 μ l、0.2M 2-メルカプトエタノール10 μ lを加え、90℃で3分加熱した後、急冷し、75℃で5分間加温した後、室温まで徐冷した。10分間氷冷し、15℃で2時間インキュベートした。③リン酸化緩衝液A(X5)^{・21} 10 μ lを加えて37℃で60分間インキュベートした。④制限酵素反応緩衝液-2^{・7} 10 μ lを加えた後、50℃で3時間インキュベートした。処理したオリゴヌクレオチド溶液をAmprepカラムで脱塩した後、逆相HPLCにより分析した。

〈DNAカセットの構築とベクターへの組み込み〉

第2章第1節の実験の項で述べた通りに行った。

〈DNAトランスフェクション〉

第1章第3節の実験の項で述べた通りに行った。

第3章第2節の実験

〈 Q^5 -MeGを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成と精製〉

合成は Applied Biosystems 社 380A DNA自動合成機により合成した。アンモニア処理は本文で述べた通り62℃で50時間行った。精製は一般的手法の項で述べた通りに行った。

〈完全水解⁵³⁾〉

オリゴヌクレオチド0.1 A₂₈₀単位を減圧下乾固させた。10 μ lの完全水解用緩衝液^{・42}に溶解させた。一方、完全水解用緩衝液10 μ lとアルカリ性ホスファターゼ(0.35 U/ μ l) 0.4 μ lを混合しておき、100℃で10分加熱しておいた。オリゴヌクレオチド溶液を37℃で10分間プレインキュベートした後、ヘビ毒ホスホジエステラーゼ1 μ l(2 μ g)及び、上記のように処理したアルカリ性ホスファターゼ10.4 μ lを加えて37℃で24時間反応させた。47 μ lのエタノールを加え、-20℃で一晩放置した。遠心(12000 rpm、20分、-10℃)して上清を別のチューブに移し、減圧下乾固させた。400 μ lの滅菌水に溶解し、フィルターでろ過した後、逆相HPLCにより分析した。

^{・42}完全水解用緩衝液:100mM Tris·HCl(pH8.2)/2mM MgCl₂

〈0°-MeGを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの安定性の検討〉

オリゴヌクレオチド0.05A₂₆₈単位を採り、加熱して融解させた4% NuSieve GTG アガロース {TBE (X1) ⁻⁴を含む} 100μlを加えた。室温まで放置して固化させた後、TE緩衝液-2°90μlを加えた。再び70°Cで10分加熱し、一般的手法の〈低融点アガロースゲル電気泳動からのDNAの回収〉の項に従って水層を得た。エタノール沈澱は行わずに、エーテル抽出を5回行い、減圧下で留去し、エーテルを除去した。逆相HPLCにより分析を行った。

〈オリゴデオキシリボヌクレオチドのリン酸化〉

各オリゴデオキシリボヌクレオチドの480pmol (HRU2は160pmol) に相当する量をエッペンドルフチューブに移し、減圧下で乾固させた。滅菌水5μlに溶解させ、リン酸化緩衝液B(X5) ^{-3°}2μl、10mM ATP ^{-4°}2μl、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (10U/μl) 1μlを加えた。37°Cで60分反応させた後、T4ポリヌクレオチドキナーゼを1μl加え、さらに60分反応させた。HRU3とHRL2はさらに滅菌水13μlを加えた。HRU1とHRL1は滅菌水24μlに溶解させた。

〈第1段階目のライゲーション〉

5種のオリゴヌクレオチドを一度にアニーリングせず、2つのブロックに分けた。まず、リン酸化したHRU2にHRL1及びHRU3を7.3μlずつ加えた。さらに滅菌水7.4μl、ライゲーション緩衝液 (X5) ^{-1°}10μlを加えた。一方、HRU1とHRL2を混合し、滅菌水80μlとライゲーション緩衝液 (X5) 32μlを加えた。この両者を90°Cで3分加熱し、急冷した。75°Cで5分加温した後、室温まで徐冷し、10分間氷冷した。HRU1とHRL1を含む溶液の50μlをHRU2、HRU3及びHRL1を含む溶液に加え、さらに0.2M 2-メルカプトエタノール5μlとT4 DNAリガーゼ (350U/μl) 2μlを加えて16°Cで2時間反応させた。エタノール沈澱を行った後、7μlのTE緩衝液-2°に溶解させた。

〈5% NuSieve GTG アガロースゲル電気泳動とゲルからの抽出〉

ライゲーションを行ったDNAに色素液B ⁻⁹3μlを加えてゲルにアプライした。泳動は100V定電圧で4時間行った。一般的操作の〈低融点アガロースゲルからのDNAの回収〉の項の操作に従い、DNAを回収し、10μlのTE緩衝液-2°に溶解した。その2μlを採り、10% PAGEにより鎖長及び純度の確認を行った。

〈DNAカセットのリン酸化〉

DNAカセット溶液2.1μl (計算上4.8pmolに相当) に滅菌水4.4μl、リン酸化緩衝液A (X5) ^{-2°}2μl、100μM ATP ^{-4°}1μl、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (10U/μl) 0.5μlを

添加し、37℃で60分間インキュベートした。

〈pRSV-rg12のClaI, BssHIIによる消化〉

pRSV-rg12溶液 (1μg/μl) 25μl、制限酵素反応緩衝液-2 (X5) 20μl、200mM NaCl 12.5μl、0.1% BSA 10μl、滅菌水25.5μlを混合して、50℃でブレインキュベートした。BssHII (4U/μl) 7μlを加えて、50℃で一晩インキュベートした。続いて、反応混合液に滅菌水27.5μl、制限酵素反応緩衝液-2 (X5) 20μl、200mM NaCl 37.5μl、0.1% BSA 10μlを混合して、30℃でブレインキュベートした。ClaI (10U/μl) 5μlを加え、30℃で14.5時間インキュベートした。エタノール沈澱によりDNAを回収した後、20μlのTE緩衝液-2[®]に溶解し、色素液B[®] 6μlを加え、2% 低融点アガロースゲル電気泳動を行った。泳動は70V定電圧で45分行った。ゲルをTLC板の上に置き、254nmの紫外線を照射するとDNAが検出される。目的のバンドを切りエッペンドルフチューブに移してゲルからDNAを抽出した後、エタノール沈澱によりDNAを回収した。得られたDNAはTE緩衝液-2[®] 50μlに溶解した。そのうちの2μlを採り、MluI, SalIによりDNAの切断 (用いた緩衝液はH) を行った後5% PAGEを行い、目的の鎖長のバンドが得られることを確認した。

〈DNAカセットのベクターへの組み込み〉

ベクター5.5μl (約0.8pmol)、リン酸化したDNAカセット5μl (2.4pmolに相当) をエッペンドルフチューブに入れた。滅菌水156.5μl、ライゲーション緩衝液 (X5) 140μl、0.2M 2-メルカプトエタノール35μl、T4 DNAリガーゼ (350U/μl) 1μlのカクテルを調製し、このカクテルを9.5μl加えて16℃で2時間反応させた。エタノール沈澱の後、滅菌水27.75μlに溶解させた。制限酵素反応緩衝液-2 (X5) 20μl、200mM NaCl 6.25μl、0.1% BSA 5μlを加えてブレインキュベートした後、BssHII (4U/μl) 1μlを加えて50℃で一晩反応させた。エタノール沈澱の後、10μlの滅菌水に溶解させた。滅菌水174μl、ライゲーション緩衝液 (X5) 140μl、0.2M 2-メルカプトエタノール35μl、T4 DNAリガーゼ (350U/μl) 1μlのカクテルを調製し、このカクテルを10μl加えて16℃で2時間反応させた。エタノール沈澱の後、フェノール抽出、フェノール-クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を行い、エタノール沈澱を行ってDNAを回収した。TE緩衝液-2[®] 20μlに溶解させた。

〈市販のキットによるベクターの定量〉

InVitrogen社より購入したDNA DIPSTICKを用いて行った。ベクター溶液を20倍希釈し、その1μlをスポットした。乾燥させた後、脱イオン水で洗浄し、溶液1に10分間浸した。脱イオン水で洗浄した後、溶液2に2分間浸した。さらに溶液3に10分間浸

し、脱イオン水で洗浄して乾燥させた後、発色を標準チャートと比較することにより濃度を求めた。

〈DNAトランスフェクション〉

第1章第3節の実験の項で述べた通りに行った。

〈トランスフォーマントのクローニング〉

他のフォーカスとあまり接近していない比較的大きなフォーカスを選択し、シャーレの裏側にマジックで印をつけ、培地を抜いた後、それを目標にしてシリコングリスをつけたペニシリンキャップをフォーカスにかぶせた。パスツールピペットに少量の培地を取りピペッティングして細胞を剥し4cmのシャーレ（コラーゲンでコーティングしてあるもの）に移し培養した。細胞が増加した後、10cmのシャーレに移し、さらに培養した。

第3章第3節の実験

〈トランスフォーマントからのジェノミックDNAの抽出〉

10cmのシャーレから培地を抜き、トリプシン処理して2mℓのチューブに移した。遠心（12000rpm、5分、4℃）して細胞を集めた後、PBS²³を1mℓ加えて攪拌し、再び遠心（12000rpm、5分、4℃）した。上清を捨て細胞を回収し、ペレットの状態のまま-20℃で保存した。迅速に室温まで戻し、TNE³² 500μℓに懸濁させた。5μℓのproteinase K（20mg/ml）5μℓと10% SDS 20μℓを加えた。65℃で15～30分インキュベートした後、37℃で一晩インキュベートした。25μℓの4M NaClを加えた後フェノール抽出、フェノール-クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱によりDNAを回収した。得られたDNAは500μℓのTE緩衝液²に溶解させた。

〈PCRによるc-Ha-ras遺伝子断片の増幅³¹⁾〉

ジェノミックDNA 5μℓに滅菌水65.2μℓ、PCR緩衝液（X10）⁴³ 10μℓ、10mM dNTP各2μℓ（合計8μℓ）、2% ゲラチン、プライマー溶液（HRU1及びL10、いずれも10pmol/μℓ）各5μℓを加えて98℃で10分間加熱した。氷水で急冷し、Taq DNAポリメラーゼ（5U/μℓ）0.8μℓを加えて穏やかに攪拌した。100μℓのミネラルオイルを重層し、PCRを行った。用いたプログラムは以下の通りである；94℃、30秒→55℃、1分→72℃、2分、45サイクル。水層を別のチューブに移しクロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱によってDNAを回収した。10μℓのTE緩衝液-2⁶に溶解させた後、色素液B³ 3μℓを加え

て、2.5% 低融点アガロースゲル電気泳動を行った（85V定電圧、2時間30分）。目的鎖長のバンドを切りゲルからDNAを抽出した。エタノール沈澱によってDNA（c-Ha-ras遺伝子断片）を回収し、1mlのTE緩衝液^{・2}に溶解させた。

^{・43}PCR緩衝液（X10）：100mM Tris・HCl(pH8.4)/500mM KCl/25mM MgCl₂

〈PCR-制限酵素法のための標準品の作成〉

第3章第2節の実験の〈オリゴデオキシリボヌクレオチドのリン酸化〉及び〈第1段階目のライゲーション〉の項に従い、コドン12を含むDNA断片を構築した。このDNA断片2 μ l（4.5pmol）に滅菌水25.75 μ l、制限酵素反応緩衝液-2（X5）^{・7} 10 μ l、200mM NaCl 6.25 μ l、0.1% BSA 5 μ lを加えてブレインキュベートした後、BssHII（4U/ μ l）1 μ lを加えて50℃で一晩反応させた。続いて46 μ lのAP緩衝液^{・22}と4 μ lのアルカリ性ホスファターゼ（0.35U/ μ l）を加えて37℃で1時間インキュベートした。フェノール-クロロホルム抽出（2回）、クロロホルム抽出（2回）を行った後、エタノール沈澱によりDNA断片を回収した。DNA断片は10 μ lの滅菌水に溶解させた。

pRSV-rg12（1 μ g/ μ l）10 μ lをHindIII 24Uで一晩消化した。エタノール沈澱の後、96 μ lのAP緩衝液に溶解させ、4 μ lのアルカリ性ホスファターゼ（0.35U/ μ l）を加えて37℃で1時間インキュベートした。フェノール-クロロホルム抽出（2回）、クロロホルム抽出（2回）を行った後、エタノール沈澱によりDNAを回収した。DNAは25.75 μ lの滅菌水に溶解させた。制限酵素反応緩衝液-2（X5）10 μ l、200mM NaCl 6.25 μ l、0.1% BSA 5 μ lを加えてブレインキュベートした後、BssHII（4U/ μ l）3 μ lを加えて50℃で一晩反応させた。エタノール沈澱の後10 μ lのTE緩衝液^{・25}に溶解させ、2% 低融点アガロースゲル電気泳動によりDNAを精製した。精製DNAを12 μ lの滅菌水に溶解させた。

コドン12を含むDNA断片10 μ l、pRSV-rg12/HindIII-BssHII 2.5 μ lを混合し、滅菌水1.5 μ l、ライゲーション緩衝液（X5）^{・13}4 μ l、0.2M 2-メルカプトエタノール1 μ l、T4 DNAリガーゼ（350U/ μ l）1 μ lを加えて16℃で2時間反応させた。980 μ lの滅菌水を加えて全量を1mlとした。その1 μ lを用い〈PCRによるc-Ha-ras遺伝子断片の増幅〉の項に従ってc-Ha-ras遺伝子断片を増幅させた（ただし、反応は20サイクル行った）。低融点アガロースゲル電気泳動による精製の後10% PAGEにより純度と鎖長の確認を行い、1mlの滅菌水に溶解させた。

〈PCR-制限酵素法による塩基配列の分析〉

c-Ha-ras遺伝子断片1 μ lに滅菌水6.02 μ l、PCR緩衝液（X10）^{・43}1 μ l、10mM dNTP各0.2 μ l、2% ゲラチン0.1 μ l、プライマー（L12及び変異を導入するプライマー、いずれも10pmol/ μ l）各0.5 μ l、Taq DNAポリメラーゼ（5U/ μ l）0.08 μ lを加え、ミネラルオイルを重層してPCRを行った。用いたプログラムは、〈PCRによるc-Ha-ras遺伝子

断片の増幅)で述べたものと同じであるが、20サイクルとした。水層(10 μ l)を別のチューブに移し、全量100 μ l、各制限酵素8~12Uを用いて切断を行った。エタノール沈澱の後10 μ lの滅菌水に溶解させ、その5 μ lを8% PAGE(200V定電圧、1.5時間)で分析した。

第4章第1節の実験

〈8-OHGを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成と精製〉

石川博幸修士によって合成、精製されたものを用いた。

〈完全水解〉

第3章第2節の実験の項で述べた通りに行った。

〈8-OHGを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの安定性の検討〉

第3章第1節及び第3章第2節の実験の項で述べた通りに行った。

〈DNAカセットの構築とベクターへの組み込み〉

第3章第2節の実験の項で述べた通りに行った。

〈DNAトランスフェクション〉

第1章第3節の実験の項で述べた通りに行った。

〈トランスフォーマントのクローニング〉

第3章第2節の実験の項で述べた通りに行った。

〈PCRによるc-Ha-ras遺伝子断片の増幅とPCR-制限酵素法による塩基配列の分析〉

第3章第3節の実験の項で述べた通りに行った。

第4章第2節の実験

〈プラスミドpCBの構築〉

オリゴヌクレオチド(5' dCGATATGGTGATGACCTAATAGC 3' 及び5' dCGCGCTATTAGGT-CATCACCATAT 3')各24pmol(計3 μ l)に滅菌水45 μ lを加え、75°Cで2分間加熱した後、

室温まで徐冷した。第3章第2節の実験の〈pRSV-rg12のClaI, BssHIIによる消化〉の項に従って調製した、ベクター溶液5 μ lと、アニーリングしたオリゴヌクレオチド溶液8 μ lとを混合し、滅菌水8 μ lを加えた。滅菌水156.5 μ l、ライゲーション緩衝液(X5)・1 μ l140 μ l、0.2M 2-メルカプトエタノール35 μ l、T4 DNAリガーゼ(350U/ μ l) 1 μ lのカクテルを調製し、その19 μ lを上記のDNA溶液に加えた。16°Cで2時間反応させた後、エタノール沈澱を行い、10 μ lの滅菌水に溶解させた。

〈大腸菌の形質転換〉

第1章第1節の実験の項に従って行った。

〈rapid boiling法による大腸菌のスクリーニング〉

第1章第1節の実験の項に従って行った。

〈プラスミドDNAの調製とゲルろ過による精製〉

第1章第2節の実験の項に従って行った。

〈DNAカセットの構築とベクターへの組み込み〉

第3章第2節の実験の項で述べた通りに行った。

〈DNAトランスフェクション〉

第1章第3節の実験の項で述べた通りに行った。

〈トランスフォーマントのクローニング〉

第3章第2節の実験の項で述べた通りに行った。

〈PCRによるc-Ha-ras遺伝子断片の増幅〉

第3章第3節の実験の項で述べた通りに行った。ただし、一部のクローンの場合にはプライマーにHRU1の代わりにseq1(5' dTTTTTTATCGATATGACGGAATATAAG 3'、最初の6T以外は合成c-Ha-ras遺伝子のClaI部位-コドン5に対応)を用いた。

〈PCR-制限酵素法のための標準品の作成〉

コドン12の1番目の位置に変異を有する標準品を、第3章第3節の実験の項で述べた通りに作成した。

〈PCR-制限酵素法による塩基配列の分析〉

第3章第3節の実験の項で述べた通りに行った。ただし、一部のクローンの場合 NarI の代わりに BbeI を用いた。

〈Maxam-Gilbert法によるトランスフォーマント中のc-Ha-ras遺伝子の解析〉

c-Ha-ras遺伝子断片1 μ lを第3章第2節の実験の〈PCRによるc-Ha-ras遺伝子断片の増幅〉の項で述べたように増幅した。プライマーにはseq1と5'-末端にアミノリンカーを結合させたプライマー {5' d NH₂-(CH₂)₅-④-ACGGTATTGATGGATGTCTTC 3'、④はリン酸基を表す} を用いた。低融点アガロースゲル電気泳動による精製の後、20 μ lの滅菌水に溶解させた。この10 μ lを採り、リン酸化緩衝液B (X5) $\cdot$ 3.3 μ l、[γ -³²P] ATP (10mCi/ μ l) 1 μ l、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (10U/ μ l) 1 μ lを加え、37°Cで60分間反応させた。70°Cで10分加熱し、NICKカラムにより精製した。減圧下乾固させ、放射活性を測定した。適当量の滅菌水に溶解し、tRNA (10mg/ml) 5 μ lを加えて、第1章第2節の実験の項で述べた手順に従って塩基配列を決定した。

第5章第1節の実験

〈Xを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成と精製〉

清水美穂修士により合成されたホスホロアミダイト体⁽²⁴⁾を用い、Applied Biosystems社380A DNA自動合成機により合成した。その際にはXのホスホロアミダイト体のカップリング時間を通常の60秒から20分に延長した。アンモニア処理の後、アンモニアを留去し、0.5M DBU ピリジン溶液1mlを加えて、室温で75分反応させた。脱イオン水を加えて留去し、さらに脱イオン水を用いての共沸を2回行った。その後、一般的操作の項で述べた手順に従って精製を行った。

〈完全水解〉

第3章第2節の実験の項で述べた通りに行った。

〈Xを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの安定性の検討〉

第3章第1節及び第3章第2節の実験の項で述べた通りに行った。ただし、Amprepの代わりにNAP-5を用いて脱塩を行った。

〈DNAカセットの構築とベクターへの組み込み〉

第3章第2節の実験の項で述べた通りに行った。

〈DNAトランスフェクション〉

第1章第3節の実験の項で述べた通りに行った。

〈トランスフォーマントのクローニング〉

第3章第2節の実験の項で述べた通りに行った。

〈PCRによるc-Ha-ras遺伝子断片の増幅とPCR-制限酵素法による塩基配列の分析〉

第3章第3節の実験の項で述べた通りに行った。NarIの代わりにBbeIを用いた。

第6章第1節の実験

〈pRSVrasの構築〉

pRSV-rr61 (1 μ g/ μ l) 10 μ lに滅菌水48.5 μ l、制限酵素反応緩衝液(X5)⁻³20 μ l、5 M NaCl 3.5 μ l、0.1% BSA 10 μ lを加えて37°Cでブレインキュベートした。EcoRV (10U/ μ l) 及び SalI (10U/ μ l) 各4 μ lを加えて37°Cで一晩反応させた。エタノール沈澱の後、10 μ lのTE緩衝液-2⁻⁶に溶解し、2% 低融点アガロースゲル電気泳動により、長鎖断片と短鎖断片を精製した。長鎖断片は10 μ lの滅菌水に溶解した。

短鎖断片は37.5 μ lの滅菌水に溶解し、制限酵素反応緩衝液(X5) 10 μ l、5M NaCl 1.5 μ lを加えて37°Cでブレインキュベートした。MluI (12U/ μ l) 1 μ lを加えて37°Cで一晩反応させた。エタノール沈澱の後、10 μ lのTE緩衝液-2に溶解し、2.5% 低融点アガロースゲル電気泳動により精製し、10 μ lの滅菌水に溶解した。

オリゴヌクレオチド U7、U8、U9、U10、U11、U12、L9、L10、L11、L12、L13の各320pmolをエッペンドルフチューブに採り、減圧下乾固させた。U7とL9を除くオリゴヌクレオチドは滅菌水6.7 μ lに溶解させ、リン酸化緩衝液A(X5)⁻²2 μ l、10mM ATP⁻⁴³1 μ l、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(10U/ μ l) 0.3 μ lを加えて37°Cで90分反応させた。90°Cで3分間加熱した後、12 μ lの滅菌水を加えた。U7とL9は滅菌水22 μ lに溶解させた。各オリゴヌクレオチド溶液9 μ lを1つのチューブに集めて、滅菌水40 μ l、ライゲーション緩衝液(X5)⁻¹³40 μ lを加えて90°Cで3分間加熱した。氷水で急冷後、再び75°Cで5分間加熱し、室温に下がるまで徐冷した。0°Cで10分間冷却した後、0.2M 2-メルカプトエタノール10 μ lとT4 DNAリガーゼ(350U/ μ l) 2 μ lを加えて16°Cで2時間反応させた。エタノール沈澱の後、10 μ lのTE緩衝液-2に溶解し、5% PAGEを行った。目的の鎖長のバンドを切り取り、エッペンドルフチューブに移し、TE緩衝液-2 500 μ lを加えて2時間攪拌した。遠心して上清を別のチューブに移し、ゲル片を滅菌水200 μ lで洗浄し、先の上清と合わせた。もう一度抽出操作を繰り返し、エタノール沈

澱によってDNAを回収した。回収したDNAは50 μ lのTE緩衝液-2に溶解させた。その10 μ lを別のチューブに移し、滅菌水62 μ l、制限酵素反応緩衝液(X5) 20 μ l、5M NaCl 3 μ lを加えてプレインキュベートした。MluI (12U/ μ l) 5 μ lを加えて37°Cで一晩反応させた。エタノール沈澱の後、AP緩衝液²³98 μ lに溶解させ、2 μ lのアルカリ性ホスファターゼ(0.12U/ μ l)を加えて37°Cで1.5時間反応させた。フェノール-クロロホルム抽出(2回)、クロロホルム抽出(2回)した後、エタノール沈澱によりDNAを回収し、10 μ lの滅菌水に溶解した。

構築したDNAカセット(MluIにより切断したもの) 10 μ lとpRSV-rr61/EcoRV-SalI 短鎖断片(MluIにより切断したもの) 10 μ lを混合し、滅菌水9 μ l、ライゲーション緩衝液(X5) 8 μ l、0.2M 2-メルカプトエタノール2 μ lを加えて氷冷した。T4 DNAリガーゼ(350U/ μ l) 1 μ lを加えて16°Cで2時間反応させた。エタノール沈澱の後、10 μ lのTE緩衝液-2に溶解し、2% 低融点アガロースゲル電気泳動により精製を行った。エタノール沈澱の後、13 μ lの滅菌水に溶解させた。1 μ lのpRSV-rr61/EcoRV-SalI 長鎖断片、ライゲーション緩衝液(X5) 4 μ l、0.2M 2-メルカプトエタノール1 μ lを加えて氷冷した。T4 DNAリガーゼ(350U/ μ l) 1 μ lを加えて16°Cで2時間反応させた。エタノール沈澱の後、10 μ lの滅菌水に溶解させた。滅菌水23 μ l、制限酵素反応緩衝液(X5) 10 μ l、5M NaCl 1.5 μ l、0.1% BSA 5 μ lを加えてプレインキュベートした後、EcoRV (12U/ μ l) 0.5 μ lを加えて37°Cで3時間反応させた。エタノール沈澱の後、14 μ lの滅菌水に溶解し、ライゲーション緩衝液(X5) 4 μ l、0.2M 2-メルカプトエタノール1 μ lを加えて氷冷した。T4 DNAリガーゼ(350U/ μ l) 1 μ lを加えて16°Cで2時間反応させた。エタノール沈澱の後、20 μ lのTE緩衝液-2に溶解した。

〈大腸菌の形質転換〉

第1章第1節の実験の項に従って行った。

〈rapid boiling法による大腸菌のスクリーニング〉

第1章第1節の実験の項に従って行った。

〈プラスミドDNAの調製とゲルろ過による精製〉

第1章第2節の実験の項に従って行った。

〈Maxam-Gilbert法によるpRSVrasの塩基配列の確認〉

第4章第2節の実験の〈Maxam-Gilbert法によるトランスフォーマント中のc-Ha-ras遺伝子の解析〉の項に述べた手順により行った。プライマーは5'-末端にアミノ

リンカーを結合させたプライマーを数種類用意し、もう一つのプライマーと適宜組み合わせ、PCRを行った。

〈Iを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成と精製〉

合成は Applied Biosystems 社 380A DNA自動合成機により合成した。精製は一般的手法の項で述べた通りに行った。

〈限定水解による鎖長の確認〉

Iを含むオリゴヌクレオチド200pmol(0.3 μ l)をエッペンドルフチューブに採り、滅菌水3 μ l、リン酸化緩衝液B(X5) $\cdot^{32}$ P 1 μ l、[γ - 32 P]ATP (5 μ Ci/ μ l) 0.2 μ l及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ (10U/ μ l) 0.5 μ lを加えて、37°Cで60分反応させた。NENSORBにより精製した後、放射活性を測定し、500 μ lの滅菌水に溶解させた。

リン酸化したオリゴヌクレオチド溶液5 μ lにキャリアーRNA (Tolura yeast RNA、100 A₂₆₀単位/ml) 3 μ l、VPDase緩衝液 $\cdot^{44}$ 2 μ l、ヘビ毒ホスホジエステラーゼ (1mg/ml) 0.2 μ lを加えて(以上の組成の溶液を2検体用意し、A及びBとした) 37°Cでインキュベートした。予め5mM EDTA 5 μ lを入れておいたチューブを用意し、適当な時間毎に反応液の2 μ lをEDTA溶液の入ったチューブに加えて100°Cで2分加熱した。反応時間は以下の通りである; A:2, 5, 10, 20, 30分、B:12, 15, 22, 32, 40分。A及びBから5 μ lを採り、滅菌水15 μ lを加えて全量を20 μ lとした後、5 μ lを20% PAGE (7M 尿素含有) にアプライした。

$\cdot^{44}$ VPDase緩衝液:250mM Tris·HCl(pH8.0)/50mM MgCl₂

〈20% PAGE (7M 尿素含有)〉

第1章第2節の実験の項の〈9% PAGE (7M 尿素含有)〉に準じてゲルを調製した。前泳動は1000Vから徐々に2500Vまで電圧を上げてゆき、試料アプライ後は2200Vで泳動を行った。

〈オリゴデオキシリボヌクレオチドのリン酸化〉

各オリゴデオキシリボヌクレオチドの400pmol (U8は80pmol) に相当する量をエッペンドルフチューブに移し、減圧下で乾固させた。滅菌水5 μ lに溶解させ、リン酸化緩衝液B(X5) $\cdot^{32}$ P 2 μ l、10mM ATP $\cdot^{44}$ 2 μ l、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (10U/ μ l) 1 μ lを加えた。37°Cで60分反応させた後、T4ポリヌクレオチドキナーゼを1 μ l加え、さらに60分反応させた。U8以外のオリゴヌクレオチドにはさらに滅菌水14 μ lを加えた。U6とL11'は滅菌水25 μ lに溶解させた。

〈第1段階目のライゲーション〉

リン酸化したU8 (11 μ l) にL11'以外の5種のオリゴヌクレオチドを5 μ lずつ加えた。さらに滅菌水34 μ l、ライゲーション緩衝液 (X5) 10^{-2} 20 μ lを加え、90°Cで3分加熱し、急冷した。70°Cで10分加温した後、室温まで徐冷し、10分間氷冷した。滅菌水2.5 μ l、0.2M 2-メルカプトエタノール6 μ lとT4 DNAリガーゼ (350U/ μ l) 1.5 μ lを加えて16°Cで2時間反応させた。エタノール沈澱を行った後、10 μ lの滅菌水に溶解させた。

〈第2段階目のライゲーション〉

ライゲーションしたDNA溶液10 μ lに、L20'溶液5 μ l、滅菌水15 μ l、ライゲーション緩衝液 (X5) 10^{-2} 10 μ lを加え、70°Cで5分間加温し、室温まで徐冷した。10分間氷冷した後、滅菌水1.25 μ l、0.2M 2-メルカプトエタノール3 μ lとT4 DNAリガーゼ (350U/ μ l) 0.75 μ lを加えて16°Cで2時間反応させた。エタノール沈澱を行った後、7 μ lのTE緩衝液-2 $^{\circ}$ に溶解させた。

〈5% NuSieve GTG アガロースゲル電気泳動とゲルからの抽出〉

ライゲーションを行ったDNAに色素液B 10 3 μ lを加えてゲルにアプライした。泳動は100V定電圧で8時間行った。ゲルからDNAを回収し、10 μ lのTE緩衝液-2 $^{\circ}$ に溶解した。その2 μ lを採り、10% PAGEにより鎖長及び純度の確認を行った。

〈DNAカセットのリン酸化〉

DNAカセット溶液6 μ l (計算上9pmolに相当) にリン酸化緩衝液A (X5) 10^{-2} 2 μ l、100 μ M ATP 11 1.5 μ l、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (10U/ μ l) 0.5 μ lを添加し、37°Cで60分間インキュベートした。

〈pRSVrasのEcoRV, BclIによる消化〉

pRSVras溶液 (1 μ g/ μ l) 6 μ lに滅菌水37 μ l、H緩衝液 (X10) 5 μ lを加えて37°Cでプレインキュベートした。EcoRV (10U/ μ l) 2 μ lを加えて、37°Cで一晩インキュベートした。エタノール沈澱の後、滅菌水6 μ lに溶解させ、滅菌水81.5 μ l、M緩衝液 (X10) 10 μ lを混合して、50°Cでプレインキュベートした。BclI (14U/ μ l) 2.5 μ lを加え、50°Cで一晩インキュベートした。エタノール沈澱の後、7 μ lのTE緩衝液-2 $^{\circ}$ に溶解させ、2.5% 低融点アガロースゲル電気泳動 (85V定電圧、3時間) を行った。目的のバンドを切りエッペンドルフチューブに移してゲルからDNAを抽出した後、エタノール沈澱によりDNAを回収した。以上の操作は平行して4本のチューブで行った。エタノール沈澱によりDNAを回収した後、まとめて14 μ lのTE緩衝液-2に溶解した。そのうちの1 μ lを採り、ClaI, SalIによりDNAの切断 (用いた緩衝液はH) を行った後、10% PAGEを

行い、目的の鎖長のバンドが得られることを確認した。

〈DNAカセットのベクターへの組み込み〉

ベクター $3\mu\text{l}$ (約 1pmol)、リン酸化したDNAカセット $2.8\mu\text{l}$ (4.5pmol に相当)をエッペンドルフチューブに入れた。滅菌水 $143.5\mu\text{l}$ 、ライゲーション緩衝液 (X5) $70\mu\text{l}$ 、 0.2M 2-メルカプトエタノール $17.5\mu\text{l}$ 、T4 DNAリガーゼ ($350\text{U}/\mu\text{l}$) $1\mu\text{l}$ のカクテルを調製し、このカクテルを $14.2\mu\text{l}$ 加えて 16°C で2時間反応させた。エタノール沈澱の後、滅菌水 $42.5\mu\text{l}$ に溶解させた。H緩衝液 (X10) $5\mu\text{l}$ を加えてブレインキューベートした後、EcoRV ($10\text{U}/\mu\text{l}$) $2.5\mu\text{l}$ を加えて 37°C で一晩反応させた。エタノール沈澱の後、 $14.9\mu\text{l}$ の滅菌水に溶解させた。ライゲーション緩衝液 (X5) $70\mu\text{l}$ 、 0.2M 2-メルカプトエタノール $17.5\mu\text{l}$ 、T4 DNAリガーゼ ($350\text{U}/\mu\text{l}$) $1\mu\text{l}$ のカクテルを調製し、このカクテルを $5.1\mu\text{l}$ 加えて 16°C で2時間反応させた。エタノール沈澱の後、フェノール抽出、フェノール-クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を行い、エタノール沈澱を行ってDNAを回収した。TE緩衝液 $-2\times 20\mu\text{l}$ に溶解させた。

〈DNAトランスフェクション〉

第1章第3節の実験の項で述べた通りに行った。

〈トランスフォーマントのクローニング〉

第3章第2節の実験の項で述べた通りに行った。

第6章第2節の実験

〈PCRによるc-Ha-ras遺伝子断片の増幅〉

第3章第3節の実験の項で述べた通りに行った。プライマーはU7とL9を用いた。

〈PCR-SSCP法のための標準品の作成〉

コドン61の2番目の位置に変異を導入するプライマー (5' dGAGACCTGTCTGCTGGAT-ATCCTTGATACCGCAGGCCNAGAAG 3'、NはG,C又はT) 又は U7 と L5 をプライマーとして、pRSVrasを鋳型としてPCRを行い、2% 低融点アガロースゲル電気泳動により精製したDNA断片を標準品とした。5% PAGEにより鎖長と純度を確認した。

〈PCR-SSCP法⁸⁷⁾によるc-Ha-ras遺伝子の解析〉

増幅c-Ha-ras遺伝子断片 $1\mu\text{l}$ に滅菌水 $5.7\mu\text{l}$ 、PCR緩衝液 (X10) $1\mu\text{l}$ 、 10mM dNTP溶

液各0.2 μ l (計0.8 μ l)、2% ゲラチン0.1 μ l、プライマー溶液 (U7及びL10、10pmol/ μ l) 各0.5 μ l、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 0.5 μ l、Taq DNAポリメラーゼ (5U/ μ l) 0.08 μ lを加え、PCRを行った。水層(10 μ l)を別のチューブに移し、990 μ lの滅菌水を加えた。この1 μ lを採り、2 μ lのホルムアミド停止液²⁷を加えた。加熱急冷し、PAGEを行った。泳動条件は本文中で述べた通りである。

〈Maxam-Gilbert法によるトランスフォーマント中のc-Ha-ras遺伝子の解析〉

第4章第2節の実験の項で述べた方法に準じて行った。プライマーにはU7と5'-末端にアミノリンカーを結合させたプライマー {5' d NH₂-(CH₂)₆-Ⓢ-GAACCAACTCGC-GAGGGGAT 3'、Ⓢはリン酸基を表す}を用いた。

引用文献

- 1) Stehelin, D., Guntaka, R.V., Varmus, H.E. and Bishop, J.M. (1976) J.Mol.Bol. , 101, 349
- 2) Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Vogt, P.K (1976) Nature , 260, 170
- 3) Hanafusa, H., Halpern, C.C., Buckhagen, D.L. and Kawai, S. (1977) J.Exp.Med. , 146, 1735
- 4) Shih, C., Shilo, B.-Z., Goldfarb, M., Dannerberg, A. and Weinberg (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 76, 5714
- 5) Nishimura, S. and Sekiya, T. (1987) Biochem.J. , 243, 313
- 6) Barbacid, M. (1987) Ann.Rev.Biochem. , 56, 779
- 7) 服部成介 (1988) 蛋白質核酸酵素 , 33, 24
- 8) Scolnick, E.M., Papageorge, A.G. and Shih, T.Y. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 76, 5355
- 9) McGrath, J.P., Capon, D.J., Goedel, D.V. and Levinson, A.D. (1984) Nature , 310, 644
- 10) Lacal, J.C., Anderson, P.S. and Aaronson, S.A. (1986) EMBO J. , 5, 679
- 11) Clanton, D.J., Hattori, S. and Shih, T.Y. (1986) Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 83, 5076
- 12) Sweet, R.W., Yokoyama, S., Kamata, T., Feramisco, J.R., Rosenberg, M. and Gross, M. (1984) Nature , 311, 273
- 13) Gibbs, J.B., Sigal, I.S., Poe, M. and Scolnick, E.M. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 81, 5704
- 14) Manne, V., Bekesi, E. and Kung, H.-F. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 82, 376
- 15) Sigal, I.S., Gibbs, J.B., D'Alonzo, J.S. and Scolnick, E.M. (1986) Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 83, 4725
- 16) Trahey, M. and McCormick, F. (1987) Science , 238, 542
- 17) Gibbs, J.B., Schaber, M.D., Allard, W.J., Sigal, I.S. and Scolnick, M. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 85, 5026
- 18) de Vos, A.M., Tong, L., Milburn, M.V., Matias, P.M., Jancarik, J., Miura, K., Ohtsuka, E., Noguchi, S., Nishimura, S. and Kim, S.-H. (1988) Science , 239, 888
- 19) Tong, L., Milburn, M.V., de Vos, A.M. and Kim, S.-H. (1989) Science , 245, 244
- 20) Milburn, M.V., Tong, L., de Vos, A.M., Brünger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. and Kim, S.-H. (1990) Science , 247, 939
- 21) Brünger, A.T., Milburn, M.V., Tong, L., de Vos, A.M., Jancarik, J., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Ohtsuka, E. and Kim, S.-H. (1990) Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 87, 4849
- 22) Snow, E.T., Foote, R.S. and Mitra, S. (1984) J.Biol.Chem. , 259, 8095
- 23) Singer, B., Chavez, F., Goodman, M.F., Essigmann, J.M. and Dosanjh, M.K. (1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 86, 8271
- 24) Loechler, E.L., Green, C.L. and Essigmann, J.M. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 81, 6271
- 25) Ellison, K.S., Dogliotti, E., Connors, T.D., Basu, A.K. and Essigmann, J.M. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 86, 8620
- 26) Mitra, G., Pauly, G.T., Kumar, R., Pei, G.K., Hughes, S.H., Moschel, R.C. and Barbacid, M. (1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA , 86, 8650
- 27) Zarbl, H., Sukumar, S., Arthur, A.V., Martin-Zanca, D. and Barbacid, M. (1985) Nature , 315, 382
- 28) 西村暹 (1989) 細胞癌化の分子機構 (豊島久真男, 吉田光昭 編) pp47 , 丸善

- 29)Marshall,C.J.,Vousden,K.H. and Phillips,D.H. (1983) Nature ,302,79
- 30)Marshall,C.J.,Vousden,K.H. and Phillips,D.H. (1984) Nature ,310,586
- 31)Vousden,K.H.,Bos,J.L.,Marshall,C.J. and Phillips,D.H. (1986) Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,81,4008
- 32)Hashimoto,Y.,Kawachi,E.,Shudo,K.,Sekiya,T and Sugimura,T. (1987) Jpn.J.Cancer Res.(Gann) ,78, 211
- 33)Passao,O.T.,Aldrich,T.,Tamanoi,F.,Taparowsky,E.,Furth,M. and Wigler,M. (1984) Proc.Natl.Acad. Sci.USA ,81,4008
- 34)Kuchino,Y.,Mori,F.,Kasai,H.,Inoue,H.,Iwai,S.,Miura,K.,Ohtsuka,E. and Nishimura,S. (1987) Nature 327,77
- 35)Wood,M.L.,Dizdaroglu,M.,Gajewski,E. and Essigmann,J.M. (1990) Biochem. ,29,7024
- 36)Moriya et al. Mut.Res. in press
- 37)Kamiya,H.,Miura,K.,Ohtomo,N.,Koda,T.,Kakinuma,M.,Nishimura,S. and Ohtsuka,E. (1989) Jpn.J. Cancer Res. ,80,200
- 38)Miura,K.,Inoue,Y.,Nakamori,H.,Iwai,S.,Ohtsuka,E.,Ikehara,M.,Noguchi,S. and Nishimura,S. (1986) Jpn.J.Cancer Res.(Gann) ,77,45
- 39)Miura,K.,Kamiya,H.,Tominaga,M.,Inoue,Y.,Ikehara,M.,Noguchi,S.,Nishimura,S. and Ohtsuka,E. (1987) Chem.Pharm.Bull. ,35,4878
- 40)榊佳之 (1986) ベクターDNA pp109 (講談社)
- 41)Gorman,C.M.,Merlino,G.T.,Willingham,M.C.,Pastan,I. and Howard,B.H. (1982) Proc.Natl.Acad.Sci. USA ,79,6777
- 42)Gorman,C.,Padmanabhan,R. and Howard,B.H. (1983) Science ,221,551
- 43)Holmes,D.S. and Quigley,M. (1981) Anal.Biochem. ,114,193
- 44)Maxam,A.M. and Gilbert,W. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,74,560
- 45)高浪満,大井龍夫 (1983) DNAシーケンス解析マニュアル pp41 (講談社)
- 46)Sanger,F.,Nicklen,S. and Coulson,A.R. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,74,5463
- 47)Norgard,M.V. (1981) Anal.Biochem. ,113,34
- 48)Clewell,D.B. and Helinski,D.R. (1969) Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,62,1159
- 49)吉永光一 (1982) 日本農芸化学会大会講演要旨
- 50)Perucho,M.,Goldfarb,M.,Shimizu,K.,Lama,C.,Fogh,J. and Wigler,M.(1981) Cell ,27,467
- 51)Hopkins,N.,Besmer,P.,DeLeo,A.B. and Law,L.W. (1981) Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,78,7555
- 52)Frost,E. and Williams,J. (1978) Virology ,91,39
- 53)Chang,E.H.,Furth,M.E.,Scolnick,E.M. and Lowy,D.R. (1982) Nature ,297,479
- 54)Mulligan,R.C. and Berg,P. (1981) Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,78,2072
- 55)Sugden,B.,Marsh,K. and Yates,J. (1985) Mol.Cell.Biol. ,5,410
- 56)小泉誠 (1991) 北海道大学博士論文
- 57)Singer,B. and Kusmieriek,J.T. (1982) Ann.Rev.Biochem. ,52,655
- 58)大友典子 (1987) 卒業論文
- 59)Kamiya,H.,Miura,K.,Ohtomo,N.,Nishimura,S. and Ohtsuka,E. (1991) Jpn.J.Cancer Res. ,in press
- 60)Capon,D.J.,Chen,E.Y.,Levinson,A.D.,Seeburg,P.H. and Goeddel,D.V. (1983) Nature ,302,33
- 61)Patel,D.J. and Shapiro,L. (1986) Biochem. ,25,1027

- 62)Topal,M.D,Eadie,J.S. and Conrad,M. (1986) J.Biol.Chem. ,261,9879
- 63)Lindahl,T.,Sedgwick,B.,Sekiguchi,M. and Nakabeppu,Y. (1988) Ann.Rev.Biochem. ,57,133
- 64)Tano,K.,Shiota,S.,Collier,J.,Foote,R.S. and Mitra,S. (1990) Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,87,686
- 65)Major,G.N.,Gardner,E.J.,Carne,A.F. and Lawley,P.D. (1990) Nucl.Acids Res. ,18,1351
- 66)Hayakawa,H.,Koike,G. and Sekiguchi,M. (1990) J.Mol.Biol. ,213,739
- 67)Gaffney,B.L. and Jones,R.A. (1982) Tetrahedron Lett. ,23,2253
- 68)Kuzmich,S.,Marky,L.A. and Jones,R.A. (1983) Nucl.Acids Res. ,11,3393
- 69)Fowler,K.F.,Büchi,G. and Essigmann,J.M. (1982) J.Am.Chem.Soc. ,104,1050
- 70)大塚栄子,紙谷浩之 (1991) 蛋白質核酸酵素 ,35,2382
- 71)Cotton,R.G.H. (1989) Biochem.J. ,263,1
- 72)Rossiter,B.J.F. and Caskey,C.T. (1990) J.Biol.Chem. ,265,12753
- 73)Wallance,R.B.,Johnson,M.J.,Hirose,T.,Miyake,T.,Hawashima,E.H. and Itakura,K. (1981) Nucl.Acids Res. ,9,879
- 74)Myers,R.M.,Larin,Z. and Maniatis,T. (1985) Science ,230,1242
- 75)Gibbs,R.A. and Caskey,C.T. (1987) Science ,236,303
- 76)Cotton,R.G.H.,Rodrigues,N.R. and Campbell,R.D. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,85,4397
- 77)Ganguly,A.,Rooney,J.E.,Hosomi,S.,Zeiger,A.R. and Prockop,D.J. (1989) Genomics ,4,530
- 78)Myers,R.M.,Lumelsky,N.,N.,Lerman,L.S. and Maniatis,T. (1985) Nature ,313,495
- 79)Greene,R.F.,Wilson,L.B.,Nallaseth,P.S.,Milner,P.F.,Bittner,M. and Wilson,J.T. (1981) Proc. Natl.Acad.Sci.USA ,78,5081
- 80)Landegren,U.,Kaiser,R.,Sanders,J. and Hood,L. (1988) Science ,241,1077
- 81)Saiki,R.K.,Gelfand,D.H.,Stoffel,S.,Sharf,S.J.,Higuchi,R.,Horn,G.T.,Mullis,K.B. and Ehrlich,H.A. (1988) Science ,239,487
- 82)Nakamaye,K.L.,Gish,G.,Eckstein,F. and Vosberg,H.-P. (1988) Nucl.Acids Res. ,16,9947
- 83)Olsen,D.B. and Eckstein,F. (1989) Nucl.Acids Res. ,17,9613
- 84)Higuchi,R.G. and Ochman,H. (1989) Nucl.Acids Res. ,17,5865
- 85)Gyllenstein,U.B. and Erlich,H.A. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,85,7652
- 86)Casanova,J.-L.,Pannetier,C.,Jaulin,C. and Kourilsky,P. (1990) Nucl.Acids Res. ,18,4028
- 87)Orita,M.,Suzuki,Y.,Sekiya,T. and Hayashi,K. (1989) Genomics ,5,874
- 88)Barany,F. (1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,88,189
- 89)Haliassos,A.,Chomel,J.C.,Grandjouan,S.,Kruh,J.,Kaplan,J.C. and Kitzis,A. (1989) Nucl.Acids Res. ,17,8093
- 90)Gaffney,B.L.,Marky,L.A. and Jones,R.A. (1984) Biochem. ,23,5686
- 91)Patel,D.J. and Shapiro,L. (1986) Biochem. ,25,1036
- 92)Leonard,G.A.,Thomson,J.,Watson,W.P. and Brown,T. (1990) Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,87,9573
- 93)Ginell,S.L.,Kuzmich,S.,Jones,R.A. and Berman,H.M. (1990) Biochem. ,29,10461
- 94)Kasai,H. and Nishimura,S. (1984) Nucl.Acids Res. ,12,2137
- 95)Kasai,H. and Nishimura,S. (1984) Gann ,75,565
- 96)Kasai,H. and Nishimura,S. (1984) Gann ,75, 841
- 97)Kasai,H.,Tanooka,H. and Nishimura,S. (1984) Gann ,75,1037

- 98) Kasai, H., Crain, P. F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A. and Tanooka, H. (1986) Carcinogenesis, 7, 1849
- 99) Harman, D. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7124
- 100) Ames, B. N. (1983) Science, 221, 1256
- 101) Inoue, H. et al. manuscript in preparation.
- 102) 田代優子 (1986) 卒業論文
- 103) 石川博幸 (1987) 卒業論文
- 104) 宗山敬 (1969) 北海道大学博士論文
- 105) Kamiya, H., Miura, K., Ishikawa, H., Inoue, H., Nishimura, S. and Ohtsuka, E. manuscript in preparation.
- 106) Kamiya, H., Shimizu, M., Suzuki, M., Inoue, H. and Ohtsuka, E. Nucleosides & Nucleotides, in press
- 107) Chung, M. H., Kasai, H., Jones, D. S., Inoue, H., Ishikawa, H., Ohtsuka, E. and Nishimura, S. (1990) Mut. Res. 254, 1
- 108) 山本富裕美, 鄭明熙, 山泉二郎, 葛西宏, 堀智勝, 西村暹 (1990) 第13回日本分子生物学会年会講演要旨
- 109) Seeburg, P. H., Colby, W. W., Capon, D. J., Goeddel, D. V. and Levinson, A. D. (1984) Nature, 312, 71
- 110) Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A. P. (1991) Nature, 349, 431
- 111) 坂口智己 (1991) 卒業論文
- 112) Culp, S. J., Cho, B. P., Kadlubar, F. F. and Evans, F. E. (1989) Chem. Res. Toxicol., 2, 416
- 113) Uesugi, S. and Ikehara, M. (1977) J. Am. Chem. Soc., 99, 3250
- 114) Holmes, R. E. and Robins, R. K. (1965) J. Am. Chem. Soc., 87, 1772
- 115) Kasai, H., Nishimura, S., Toriumi, Y., Itai, A. and Iitaka, Y. (1987) Bull. Chem. Soc. Jpn., 60, 3799
- 116) Oda, Y., Uesugi, S., Ikehara, M., Nishimura, S., Kawase, Y., Ishikawa, H., Inoue, H. and Ohtsuka, E. (1991) Nucl. Acids Res., 19, 1407
- 117) Kouchakdjian, M., Bodepudi, V., Shibutani, S., Eisenberg, M., Johnson, F., Grollman, A. P. and Patei, D. J. (1991) Biochem., 30, 1403
- 118) Shapiro, H. S. and Chargaff, E. (1966) Biochem., 5, 3012
- 119) Hirose, S., Takeuchi, K. and Suzuki, Y. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7258
- 120) Eritja, R., Horowitz, D. M., Walker, P. A., Ziehler-Maltin, J. P., Boosails, M. S., Goodman, M. F., Itakura, K. and Kaplan, B. E. (1986) Nucl. Acids Res., 14, 8135
- 121) Shimizu, M., Inoue, H. and Ohtsuka, E. (1991) Nucl. Acids Res. Symp. Series, in press
- 122) Van Aerschot, A., Mag, M., Herdewijn, P. and Vanderhaeghe, H. (1989) Nucleosides & Nucleotides, 8, 159
- 123) Shulz, B. S. and Pfeleiderer, W. (1985) Tetrahedron Lett., 26, 5421
- 124) Albert, A. (1953) Biochem. J., 54, 646
- 125) Roy, K. B. and Miles, H. T. (1983) Nucleosides & Nucleotides, 2, 231
- 126) Randall, S. K., Eritja, R., Kaplan, B. E., Petruska, J. and Goodman, M. F. (1987) J. Biol. Chem., 262, 6864
- 127) Takeshita, M., Chang, C.-N., Johnson, F., Will, S. and Grollman, A. P. (1987) J. Biol. Chem., 262, 10171
- 128) Kamiya, H., Miura, H., Kato, H., Nishimura, S. and Ohtsuka, E. manuscript in preparation
- 129) Sancar, A. and Sancar, G. B. (1988) Ann. Rev. Biochem., 57, 29
- 130) Crick, F. H. C. (1966) J. Mol. Chem., 19, 548
- 131) Ohtsuka, E., Matsuki, S., Ikehara, M., Takahashi, Y. and Matsubara, K. (1985) J. Biol. Chem., 260, 2605

- 132)Takahashi,Y., Kato,K., Hayashizaki,Y., Wakabayashi,T., Ohtsuka,E., Matsuki,S., Ikehara,M. and Matsubara,K. (1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,82,1931
- 133)Martin,F.H. and Castro,M.M. (1985) Nucl.Acids Res. ,13,8927
- 134)Kawase,Y.,Iwai,S.,Inoue,H.,Miura,K. and Ohtsuka,E. (1986) Nucl.Acids Res. ,14,7727
- 135)Uesugi,S.,Oda,Y,Ikehara,M.,Kawase,Y. and Ohtsuka,E. (1987) J.Biol.Chem. ,262,6965
- 136)Kawase,Y.,Iwai,S. and Ohtsuka,E. (1988) Chem.Pharm.Bull. ,36,118
- 137)Kawase,Y.,Koizumi,M.Iwai,S. and Ohtsuka,E. (1989) Chem.Pharm.Bull. ,37,2313
- 138)Orita,M.,Iwahana,H.,Kanazawa,H.,Hayashi,K. and Sekiya,T. (1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,86, 2766
- 139)Der,C.J.,Finkel,T. and Cooper,G.M. (1986) Cell ,44,167
- 140)Corfield,P.W.R.,Hunter,W.N.,Brown,T.,Robinson,P. and Kennard,O. (1987) Nucl.Acids Res. ,15, 7935
- 141)小松康雄 (1990) 卒業論文
- 142)菊地香苗 (1990) 卒業論文
- 143)三浦裕幸 (1991) 卒業論文
- 144)鈴木理之 (1991) 第14回日本分子生物学会年会講演要旨
- 145)Walter,M.,Clark,S.G. and Levinson,A.D. (1986) Science ,233,649
- 146)Morrison,D.A. (1979) Methods Enzymol. ,68,326
- 147)沢田石一之 (1985) 北海道大学博士論文
- 148)Burton,K. (1968) Methods Enzymol. ,12,105
- 149)Maniatis,T.,Fritsch,E.F.,Sambrook,J. (1982) Molecular Cloning pp468 (Cold Spring Harbor Laboratory)