



|                     |                                                                                   |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 酵母アッセイを用いたラットp53癌抑制遺伝子の転写スリップの解析                                                  |
| Author(s)           | 巴, 一                                                                              |
| Description         | Running head: 酵母アッセイによる転写スリップの解析                                                  |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                             |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                            |
| Dissertation Number | 甲第4656号                                                                           |
| Issue Date          | 1999-03-25                                                                        |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.11501/3151338">https://doi.org/10.11501/3151338</a>   |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/51583">https://hdl.handle.net/2115/51583</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                   |
| File Information    | 000000336528.pdf                                                                  |





---

酵母アッセイを用いたラット p53 癌抑制遺伝子の  
転写スリップの解析

Analysis of Transcript Mutations Due to Transcriptional  
Slippage in Rat p53 Tumor Suppressor Gene with the Use of  
Yeast Functional Assay

---

---

巴 一

北海道大学大学院医学研究科病理系専攻癌研細胞制御部門

主任: 守内 哲也

---



①

酵母アッセイを用いたラット p53 癌抑制遺伝子の転写スリップの解析

北海道大学癌研究施設細胞制御部門

巴 一

英文タイトル

Analysis of Transcript Mutations Due to Transcriptional Slippage in Rat p53 Tumor Suppressor Gene with the Use of Yeast Functional Assay.

Yi Ba

Division of Cell Biology, Cancer Institute, Hokkaido University School of Medicine

Running head; 酵母アッセイによる転写スリップの解析

Key words; Transcriptional slippage, tumor suppressor p53, yeast assay, LEC rat



## Abstract

Transcriptional slippage was previously found in *Escherichia coli* during RNA elongation at runs of 10 or more As or Ts, resulting in the addition of untemplated A or U residues. To evaluate the incidence of transcriptional slippage *in vivo*, we employed a yeast functional assay, and analyzed the frequency and spectrum of mutations in mRNA of the tumor suppressor p53 in rat tissues. In this assay, yeast are transfected with p53 PCR products and a gapped p53 expression vector allowing homologous recombination *in vivo* and yielding a percentage of red colonies which reflects the proportion of mutant PCR products. Insertion mutations of single base of adenine (A) at stretches of 6As were frequently detected in the liver samples of LEC rats which develop spontaneous hepatitis and hepatocellular carcinoma. For excluding the possibility of artifacts, p53 cDNA was amplified by PCR from plasmids containing wild-type p53 and tested with the yeast functional assay, resulting in no A insertion after sequencing 23 mutant clones. Furthermore, *in vitro* transcript of wild-type p53 was synthesized by SP6 RNA polymerase, and then, reverse-transcribed, PCR-amplified, and tested with the yeast functional assay. The overall rate of A insertion was much lower than that in the LEC rat liver. Since A insertions were found predominantly at nucleotides 293-298 in exon 4, an exon 4-specific yeast functional assay was developed. A insertion was detected in 4.8 % of the PCR product of mRNA but 0-0.1 % from genomic DNA, which suggested that such A insertion was caused by transcriptional slippage *in vivo*. The A insertion rate was increased in acute hepatitis stage in the LEC rat liver, while the rate slowly increased by aging in control WKAH rat liver. It was suggested that cell damage and aging were primarily responsible for increased rate of transcriptional slippage.



## 緒言

遺伝子はその固有の機能を果たすためには、鋳型 DNA から mRNA への転写と mRNA から蛋白質への翻訳が正しく行われることが基本的に重要である。しかし細菌やウイルスの遺伝子については、転写段階での塩基配列の変化あるいは翻訳段階での読み枠のずれ(ribosomal frameshifting)により、鋳型 DNA の遺伝情報とは異なる蛋白質が産生される現象が知られている<sup>1,3)</sup>。最近、これらの現象が哺乳動物にも見られることが次第に明らかにされつつある。転写段階における塩基配列の変化は transcript mutation (転写変異) と呼ばれ、哺乳動物ではこれまでに2つのタイプが知られている。第一は、GA や CT などの2塩基繰り返し配列が mRNA に転写される際に GA あるいは CU が欠失するタイプである。この現象が報告されている遺伝子としては、ヒトの中枢神経系における $\beta$ -アミロイド前駆体蛋白遺伝子やユビキチン B 遺伝子および Brattleboro ラットにおける抗利尿ホルモン遺伝子がある<sup>4,5)</sup>。このタイプの転写変異は、加齢に伴いその頻度が増加することが知られており<sup>4,6)</sup>、前2者の変異はアルツハイマー病やダウン症候群の痴呆症状と関係があることが示唆されている。第二は、アデニン (adenine, A) またはチミン (thymine, T) が多数連続する部位において鋳型 DNA には存在しない余分な A またはウラシル (uracil, U) が挿入あるいは欠失するタイプである。これは RNA polymerase の伸長反応時に鋳型 DNA 鎖と RNA 鎖間に生じる”ずれ”すなわち transcriptional slippage (転写スリップ) に起因すると考えられている<sup>1)</sup>。この現象は、低リポ蛋白血症 (*apoB* 遺伝子) と血友病 A (*factor VIII* 遺伝子) の患者で証明されている<sup>7,8)</sup>。これらの患者の責任遺伝子には1塩基欠失があり、frameshift が生じるため重症な表現型が予測される。しかし、この1塩基欠失の結果、DNA 上にアデニンが多数連続する部位ができてしまい、ここで転写スリップが起こる。このため、一部の mRNA ではアデニン1塩基が付加されコドンの読み枠が正常に回復し野生型と同等の活性をもつ蛋白が産生されて症状が軽快することが報告されている。この転写スリップは、人



為的にこれを引き起こすことにより遺伝性疾患および癌の治療に利用できる可能性がある。このためには、転写スリップがどのような遺伝子で、どのような原因で促進されるかを明らかにする必要がある。

著者は肝炎・肝癌を高頻度に発症する Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットの癌抑制遺伝子 p53 の変異を yeast functional assay<sup>9,10)</sup>を用いて解析し、肝炎期の p53 mRNA の中に転写スリップによると考えられる A の挿入変異を高頻度に見いだした。LEC ラットは、生後 5 カ月より、急性肝炎を発症し、慢性肝炎、胆管線維症を経て、生後 18 カ月までに肝癌を発症する<sup>11-13)</sup>。LEC ラットには銅の輸送蛋白遺伝子 *Atp-7b* (ヒト Wilson 病の責任遺伝子 *ATP-7B* に対応するのラット遺伝子) に変異<sup>14,15)</sup>があるため、肝に銅が過剰蓄積して肝炎が発症することが証明されている<sup>16,17)</sup>。したがって、LEC ラットにおける p53 mRNA の高頻度なアデニンの挿入変異は、肝細胞障害に関連した現象であると考えられる。

mRNA の変異を証明するためには、従来法では極めて多数の cDNA クローンの塩基配列を決定する必要があった。この問題を解決するために、著者は酵母を用いた p53 cDNA の変異スクリーニング法を作製した。yeast functional assay では、p53 mRNA の逆転写-PCR 産物と発現ベクターを酵母に同時に導入するだけで、酵母の遺伝子相同組み換え機構により p53 cDNA は自動的に発現ベクターに組み込まれる。酵母内で発現した p53 蛋白が正常な転写因子として機能すれば酵母コロニーは白となり、異常であれば赤となる。この赤コロニーからプラスミドを回収することによって選択的に変異 p53 cDNA の解析を行うことが可能である。本研究では、1) ラット p53 mRNA の高頻度なアデニンの挿入変異が転写スリップに起因することの証明、2) この転写スリップに関与する因子の解析、および 3) 転写スリップを人為的に促進する試みを行った。



## 材料と方法

### 動物組織および培養細胞株

LEC ラットおよび WKAH ラットは北海道大学医学部附属癌研究施設病理部門で 7-107 週齢まで飼育したものをを用いた。ジエチルエーテル麻酔下にラットより肝および腎の組織を摘出し直ちに液体窒素にて冷却し-80℃で凍結保存した。7,12 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) 誘発ラット卵巣腫瘍は久留米大学西田敬博士より供与された。培養細胞株としてはラット肝細胞癌より樹立した cKDH-8, OWH, 及びラットの乳癌より樹立した細胞株 cSST-2 をを用いた。細胞傷害実験には SV40 large T 抗原でトランスフォームした LEC ラット由来肝細胞株 93C13, 同 Long-Evans Agouti (LEA) ラット由来肝細胞株 93A16<sup>18)</sup> (熊本大学遠藤文夫博士より供与) をを用いた。

### RNA のおよびゲノム DNA の抽出

培養細胞は  $1 \times 10^6$  個あたり 1ml の Trizol Reagent (Gibco-BRL, USA) で溶解し, また-80℃で凍結保存しておいたラット組織は 100mg あたり 2ml の Trizol Reagent と共にホモジナイザー (井内盛栄堂、大阪) で破碎し, 酸・グアニジウムチオシアネート/フェノール/クロロフォルム抽出法で全 RNA を抽出した。RNA は、エタノール沈殿させ、0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC) (WAKO, 大阪) 処理蒸留水に溶解した。DNA は RNA を抽出した残りの Trizol 分画からエタノール沈殿により抽出し, 10%エタノールを含む 0.1 M クエン酸ナトリウム溶液で洗浄した後, 8 mM 水酸化ナトリウム溶液に溶解した。

### 逆転写-PCR (reverse transcription-PCR: RT-PCR) およびゲノム DNA の PCR

全 RNA 3  $\mu$ g を, 65℃, 10 分間加熱処理後 5 分間水中にて急冷し, 200 単位の逆転写酵素 (M-MLV reverse transcriptase, Stratagene, USA), 同添付反応液, 7.5mM Dithiothreitol (DTT), 0.5mM  $MgCl_2$ , 0.5mM 各 dNTP および 0.5  $\mu$  M ラッ



ト p53 特異的プライマー RP53P1 (5'-AGCCCTAAAGTC-3') を加え, 37°C で 60 分間逆転写反応(reverse transcription: RT)を行った. これを 95°C 5 分間加熱処理後 5 分間水中にて急冷しラット p53 cDNA を得た.

この RT 産物を鋳型とし, Polymerase Chain Reaction (PCR) 法により p53 cDNA を増幅した. 5 倍に希釈した RT 産物 2  $\mu$  l に各プライマー 0.5  $\mu$  M と *Pfu* DNA ポリメラーゼ 1.25 単位 (Stratagene, USA), 同添付反応液, 75  $\mu$  M 各 dNTP を加え, 全量 20  $\mu$  l とし, Gene Amp PCR System 2400-R (Perkin Elmer, USA) により PCR を行った. 通常の yeast functional assay の場合プライマーとして FC2 (センスプライマー: 5'-CAGCGACAGGGTCACCTAAT-3'), RC2 (アンチセンスプライマー: 5'-TTTATGGCGGGACGTAGACT-3') を用いた (Fig.1-A). exon 4 specific assay の場合はプライマーとして FC2 と RC3 (アンチセンスプライマー: 5'-CGTGCACATAACAGACTTGGC-3') を用い (Fig.1-B), 鋳型には 5 倍希釈 RT 産物 2  $\mu$  l あるいはゲノム DNA 50 ng を用いた. PCR 反応条件は, いづれの場合も 95°C 40 秒, 63°C 20 秒, 78°C 60 秒を 35 サイクルとした. PCR 産物は, 1% アガロースゲル内電気泳動を行い確認した.

## プラスミド

ヒト野生型 p53 発現ベクター pLS72 (Swiss Institute for Experimental Cancer Research, R. D. Iggo 博士より供与) は, 1.6kb の *ADHI* プロモーターを含む DNA 断片, 両端に *HindIII* および *EagI* をもつヒト p53 cDNA 断片, さらにその下流に *CYC1* ターミネーター配列をこの順で酵母大腸菌シャトルベクター pRS315 に組み込んだものである<sup>19)</sup>. このベクターは酵母内で 1 コピーで維持されるための *cen/ARS* 配列, *LEU2* 遺伝子およびアンピシリン耐性遺伝子を有している. ラット p53 発現ベクター pLSRP53<sup>10)</sup> は, pLS72 を *HindIII* および *EagI* (TAKARA, 大津) で消化しヒト p53cDNA を削除した後, ここにラット p53 cDNA の全コーディング領域を含む断片を挿入して作製された. pLSRP53 を過剰量の *PstI* および *StuI* で切断し, ラット p53 のコドン 68 からコドン 345 をコードする cDNA 断片を除去した線状プラスミド(ギャップベクター)を作製した. この線状プラ



スミドは1%低融点アガロース内電気泳動により分離・回収した後、Wizard PCR prep (Promega, USA)により精製した。さらに calf intestine alkaline phosphatase (TAKARA)により断端を脱リン酸化し、EDTAを加え65℃に加温し酵素を失活させた後、フェノール・クロロフォルム処理、エタノール沈殿により精製した。exon 4-specific yeast assay 用のギャップベクターには、pLSRP53 を PstI で処理し、コドン68から113に相当する領域を削除したものをを用いた。ギャップベクターは酵母アッセイ用に20 ng/ $\mu$ lとなるように調製した。

## ラット p53 の酵母アッセイ

### 1) 酵母株

p53 レポータープラスミド (RGC 配列: p53 のコンセンサス結合配列を持つフラグメント, *CYC1* minimal promoter, *ADE2* 遺伝子を含む) を染色体 DNA に組み込んだ *ADE2* 変異酵母株 yIG397<sup>9)</sup> (遺伝型: *MATa ade2-1, Leu2-3, 112trp1-1his3-11, 15can1-100ura3-1 URA3 3xRGC::pCYC1::ADE2*, 北海道大学医学部多田光宏博士より供与) を使用した。この酵母を野生型 p53 を発現するプラスミドで形質転換すると、*ADE2* 遺伝子が発現し、通常の白色コロニーを生じる。一方、変異型 p53 を持つプラスミドで形質転換すると、*ADE2* (phosphoribosylaminoimidazole carboxylase)が発現せず、アデニン合成の中間代謝産物 (phosphoribosyl aminoimidazole) が酵母内に蓄積し酵母は赤色コロニーを生じる<sup>9,20)</sup>。

### 2) yeast functional assay

yIG397 を十分量のアデニン (200  $\mu$ g/ml) を加えた YPD 培地 100ml 中で30℃にて振盪培養し、O.D.600 が0.8に達した時点で2,000rpm 5分間の遠心分離により集菌し、500  $\mu$ l の0.1M 酢酸リチウム, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA 溶液中に懸濁した。この酵母懸濁液 50  $\mu$ l に PCR 産物 50-100 ng (非精製 PCR 反応液にして1-3  $\mu$ l), 20ng のギャップベクター, 5  $\mu$ l の超音波処理一本鎖サケ精巢 DNA(10mg/ml)および、300  $\mu$ l の40% (W/V) polyethylen glycol (PEG) 4000 を含む0.1M 酢酸リチウム, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA 溶液



を加え、これを 30℃ で 30 分保温したのち、42℃ 15 分の熱ショックを与えた。この酢酸リチウム法により導入されたギャップベクターと PCR 断片は酵母内で遺伝子相同組み換えをおこし、被検 DNA 断片がプラスミドに組み込まれる<sup>21)</sup>

(Fig.1-A, B)。この結果プラスミドは再環状化し酵母内で維持される。酵母はこれによりロイシン栄養非要求性を獲得するとともにサンプル由来の p53 を恒常的に発現するようになる。この酵母内で野生型 p53 が発現すると、これが酵母染色体上に組み込んである p53 蛋白認識配列 (RGC 配列) に結合し下流の ADE2 遺伝子の転写を活性化し、この結果、アデニンが産生され酵母コロニーは白くなる。一方、変異型 p53 が発現すると p53 蛋白認識配列に結合できない異常な p53 蛋白が合成されるため、下流の ADE2 遺伝子が転写されない。このため、酵母コロニーが赤くなる。形質転換された酵母は低アデニン (5  $\mu$  g/ml) ・ロイシン無添加選択プレート上で 30℃ で 48 時間選択培養した。コロニー形成後、プレートを 4℃ で 24 時間保冷しコロニーの発色を増強させた後、1 プレートにつき 200 個以上のコロニーを数え、赤 (変異型 p53) と白 (野生型 p53) のコロニー数から、総コロニー中の赤コロニーの割合を百分率で算定した。

#### 酵母コロニーからのプラスミドの単離とその塩基配列の決定

プレート上に形成した酵母コロニーをアデニン (200  $\mu$  g/ml) を加えた YPD 培養液 10ml に接種し、30℃ で 14 時間振盪培養した。2,000rpm 5 分間の遠心分離により集菌し、zymolyase 100T (生化学工業) で 37℃ 60 分処理し細胞壁蛋白成分を消化した後、alkaline lysis 法 (QIAprep plasmid kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) によりプラスミドを抽出した。プラスミドを増幅するため、酵母より抽出したプラスミドを電気穿孔法 (The Electroporator II, Invitrogen, USA) により XL-1 blue 大腸菌に導入した。導入後、アンピシリン加 L-broth プレート上で 14 時間培養し、生じた大腸菌コロニーをアンピシリン加 L-broth 培養液に接種しさらに 14 時間培養した。その後、再度 alkaline lysis 法によりプラスミドを抽出し蒸留水に溶解した。プラスミド中の p53 の塩基配列は、DyeDeoxy Terminator kit (Perkin-Elmer, USA) を用いて ABI 373A automated sequencer (Applied Biosystem,



USA) で解析した. プラスミド中の p53 の塩基配列決定反応には以下のプライマーを用いた.

FC1: 5'-GGCAAGCTTCATGGAGGATTCACAGTCG-3'

S2: 5'-TTTCCCTCAATAAGCTGTTCTGCCAG-3'

S4: 5'-GCCCATCCTTACCATCATCACGCTG-3'

#### ラット **yeast functional assay** の定量性の解析

ラット培養細胞株 c-SST-2 (野生型 p53 を発現) と c-KDH-8 (変異型 p53 のみ発現) の p53 RT-PCR 産物を 1% アガロースゲルにて電気泳動を行い, 100ng/ml 臭化エチジウム溶液にて染色後, UV トランスイルミネーター (フナコシ) 上で写真撮影した. 写真上のバンドの濃度をデンストメータで測定した. この値と分光光度計で測定した PCR 産物の DNA 濃度をもとに, c-SST-2 細胞と c-KDH-8 細胞由来の PCR 産物をそれぞれ 100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 50:50, 0:100 の割合で混合し, 3 回ずつ酵母機能アッセイを行い, 赤コロニーの平均値を算出した.

#### p53 cDNA のクローニングと **in vitro transcription**

16 週齢の LEC ラットの肝より抽出した全 RNA から p53 特異的プライマー RP53-1 を用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した. これを鋳型として PCR により全コーディング配列を増幅した. PCR には以下のプライマーを用いた. RP53-2 (センスプライマー: 5'-CCCCTGAAGACTGGATAACTGT-3'), RP53-3 (アンチセンスプライマー: 5'-TGGGGACAGGATGCAGAGGCT-3'). これを TA クローニングキット (Invitrogen) により pCRII プラスミドにクローニングし, 独立した 4 クローンの塩基配列を決定した. p53 の *in vitro* transcription を行うために, 野生型 p53 をもつことが確認されたプラスミドを 5  $\mu$ g を *EcoRV* 消化により線状化し, フェノール処理し精製した. この線状化プラスミドを, 添付緩衝液中で SP6 RNA ポリメラーゼ (Riboprobe *in vitro* transcription system, Promega) とともに 37°C で 120 分間反応させた. 1ng の RNA を用いて RT-PCR を行い, yeast functional assay に供した.



### GOT, 銅, 8-hydroxydeoxyguanosine の測定

LEC ラットの血清 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase)活性は, 自動生化学分析装置 TBA-60R (Toshiba, 東京)により測定した. 肝の銅濃度は原子吸光法 (Z-5000, Hitachi, 東京)により測定した. 8-hydroxydeoxyguanosine(8-OH-dG)の量は, high-pressure liquid chromatography (HPLC)を用いた電子化学分析により測定し,  $10^5$ dG に対する比を算定した.

### エタノールによる細胞障害実験

93C13 および 93A16 を 10 % 熱非働化ウシ血清加 Williams' medium E (GIBCO)培養液で 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 条件下で培養した. これらの単層細胞を PBS でリンスした後, 0-500 mM のエタノールを含む完全 Williams' medium E で培養し, 3 日後に細胞上清および細胞を採取した. LDH cytotoxicity detection kit (TAKARA)により, LDH 活性を測定し, 以下の式に従い逸脱比を算定した.

$$\{ (\text{培養上清中の全 LDH 活性}) - (\text{コントロール培養液中の LDH 活性}) \} / \{ (\text{培養上清中の全 LDH 活性}) + (\text{細胞中の全 LDH 活性}) - (\text{コントロール培養液中の LDH 活性}) \}.$$
 また, 細胞からはゲノム DNA ならびに全 RNA を抽出し, exon 4-specific assay に供した.

### 統計学的処理

赤コロニーの比率の有意差は Student's *t* test により検定した. 酵母アッセイの赤コロニーの比率とサンプル中の変異 cDNA の比率の相関は回帰分析により評価した.



## 結果

### 1 yeast functional assay の感度の検討

ラットの yeast functional assay において赤コロニーの比率が変異 p53 mRNA の比率を反映するかどうかを検討するため、野生型 p53 を発現する細胞株 SST-2, および変異 p53 のみを発現する細胞株 cKDH8 から, RT-PCR によりそれぞれ p53 cDNA を増幅し, それぞれの cDNA を 100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 50:50, 0:100 の濃度比で混合したサンプルについて酵母アッセイを行った. この結果, 変異 mRNA と赤コロニーの比率の間に  $r = 0.99$  の高い直線的相関関係が認められた (Fig. 2).

### 2 yeast functional assay によるアデニン挿入変異の検出

ヒトやラットの yeast functional assay では 10 %以下の赤コロニーはバックグラウンドと考えられている<sup>10,22)</sup>.そこでまず初めに様々なラットサンプルについて yeast functional assay を行い, 10 %以下の赤コロニーを生じたものについて, 赤コロニーから回収したプラスミドの塩基配列を決定し転写スリップの標的となる3箇所の6A部位(exon 4: nt.293-298, exon 7: nt.865-870, exon 8: nt.952-957)でのアデニンの挿入変異 (Fig. 3) の頻度を解析した. 対象は7週齢のWKAHラットの肝2サンプル, 7週齢のLECラットの肝2サンプル, DMBA誘発卵巣癌5サンプル, および肝癌細胞株 OWHである. 結果はTable 1に示した. 7週齢のLECラットの肝では赤コロニーが平均8% (7-9%)で, アデニンの挿入変異は8クローン中1クローンに認められた. これは全コロニーの1%に相当した. LECラット以外のサンプルでは2.3-3.4%の頻度でアデニンの挿入変異が検出された. アデニン挿入以外の変異として, 31クローン中, exon 4 の6A部位のアデニン1塩基の欠失が1個, 6A部位以外での非特意的点変異が23個, 複数の塩基の欠失が6個, 他にベクターの self-ligation が1個であった.



### 3 LEC ラットの病的肝組織での検討

LEC ラットはおおまかに前肝炎期 (0-18 週), 急性肝炎期 (18-32 週), 慢性肝炎期 (28-70 週), 肝癌期 (70 週以降) に分けられる. 肝癌期には胆管線維症(CF)や肝細胞癌(HCC)が数多く出現する. そこで次に, 肝癌期の各種病変におけるアデニンの挿入変異の頻度を検討した. 70 週令以上の LEC ラットの CF 3 サンプル, HCC 3 サンプルおよび, 非癌部肝組織 4 サンプルについて, p53 の yeast functional assay を行い変異 p53 の塩基配列を決定した (Fig. 4). 赤コロニーは CF で平均 13.4% (11-16%), HCC で 13.9% (11-18%), 非癌部肝組織で 13.8% (12-17%) であった. これら 3 種類の組織での変異のほぼ半数以上をアデニンの挿入変異が占め, その全コロニーに占める割合は CF で 7.4 %, HCC で 7.0 %, 肝で 9.0 % であった. また, いずれの組織においてもアデニンの挿入変異は exon 4 の 6A 部位に多数認められた.

これが LEC ラットの p53 に特殊な変異もしくは DNA 多型などに由来するものではないことを確かめるため, LEC ラットの p53 の全コーディング配列を調べた. 16 週令の LEC ラットの肝から RT-PCR により p53 の cDNA を増幅し, TA cloning により pCRII にクローニングした. 得られた別個の 4 クローンの全てが野生型のラット p53cDNA<sup>23)</sup>と同一の塩基配列を示した.

### 4 RT および PCR のアーチファクトの影響の検討

yeast functional assay により検出された高頻度なアデニンの挿入変異が, 逆転写反応(RT)や PCR のアーチファクトによるものでないことを証明するために, 以下のコントロール実験を行った. まず, 野生型 p53 cDNA を含むプラスミド 0.001-10 ng を鋳型として FC2, RC2 プライマーを用いて 35 サイクル PCR を行い p53 cDNA を増幅し, yeast functional assay を行った. 赤コロニーの比率は 0.9 % (鋳型プラスミド DNA 10 ng), 2.4 % (鋳型プラスミド DNA 1 ng), 3.2 % (鋳型プラスミド DNA 0.1 ng), 4.2 % (鋳型プラスミド DNA 0.001 ng) であった. このうち 10 ng および 0.001 ng のプラスミドを鋳型として行った PCR 産物について得られた赤コロニーからプラスミドを回収し, それぞれ 8 および 23 クローン



についてその p53 の塩基配列を解析した。これらからはギャップベクターの self-ligation と非特異的な点変異が検出されたが、アデニンの挿入変異は1つも検出されなかった (Fig 4). 次に SP6 を用いた in vitro transcription により pCRII に組み込んだ野生型 p53 cDNA から一旦 RNA を合成し、これを鋳型として RT-PCR を行い、p53 cDNA を増幅した。yeast functional assay の結果、赤コロニーは 6.4 %であった。赤コロニーから回収したプラスミドの塩基配列を解析したところ、アデニンの挿入変異は 12 クローン中 3 クローンに認められた。これは全体の 1.6 % ( $6.4 \times 3/12$ ) に相当した。この頻度は肝癌期の LEC ラット肝組織を用いた場合のアデニンの挿入変異の頻度 (7.0-9.0 %) より低値であった (Fig.4).

#### 5 LECラットのゲノム DNA および RNA におけるアデニン挿入変異の検討

この LEC ラットの高頻度なアデニンの挿入変異が genomic DNA の変異か、mRNA に生じた変異かを調べるため、p53 exon 4 に特異的な酵母アッセイ (exon 4 assay) を作製した (Fig.1-B). これにより、70-76 週齢の LEC ラット肝 4 サンプル、CF3 サンプル、HCC 3 サンプル、腎 4 サンプルおよび 7 週齢の LEC ラットの肝 2 サンプルについて解析した。ゲノム DNA からは PCR で、また mRNA から RT-PCR でそれぞれ exon 4 部分を増幅した。これらの増幅産物の酵母アッセイを行い比較した。結果は Table 2 に示したように、DNA では赤コロニーの頻度が 2.3-3.5 % であるのに対し、RNA では 5.8-7.2 % で、各週齢組織ごとに比較して有意差 ( $p = 0.05 - p = 0.0002$ ) が認められた。

このうち、2 匹の 72 週齢の LEC ラットの肝について DNA 由来、RNA 由来それぞれ 15-22 個の赤コロニーからプラスミドを回収して塩基配列を決定した。DNA からはアデニンの挿入変異はほとんど検出されなかった。一方、RNA では変異の 60 % 以上がアデニンの挿入変異で、全コロニーに対する割合は sample 1, 2 とともに 4.8 % (sample 1: 7.7 %  $\times$  10/16 クローン ; sample 2: 7.2 %  $\times$  10/15 クローン) であった (Fig 5).



## 6 肝炎病期および週齢に応じた p53 変異頻度の変化の解析

様々な病変期の LEC ラット計 54 例の肝組織について通常の yeast functional assay を行なった。各週齢ごと、2-8 例の赤コロニーの平均値の変化を Fig. 6-A に示した。コントロールとして週齢を合わせた WKAH ラットを解析した。7 週令の LEC ラットと WKAH では、p53 変異の頻度はほぼ同じ(7.5 %)であった。WKAH ラットでは加齢につれて赤コロニーの頻度が増大する傾向が認められた。一方、雄の LEC ラットでは、急性肝炎期に赤コロニーの頻度が急激に増加し、32 週で 20 % 近くまで達し、その後は慢性肝炎期に一旦減少したのち、肝癌期になり漸増する傾向が見られた。雌では、赤コロニーの比率は雄と同様に急性肝炎期に増加したが、32 週では逆に低下し、肝癌期では雄とほぼ同程度であった。雄の腎ではこれと同様の傾向が示された。これらのうち LEC ラットの肝 3 サンプル、WKAH ラットの肝 2 サンプルについて変異 p53 の塩基配列を同定した。LEC ラットと WKAH ラットの両方でアデニンの挿入変異の頻度は yeast functional assay の赤コロニーの比率の増加とともに増大することが示された(Fig. 7)。

## 7 血清 GOT, 肝の銅ならびに 8-OH-dG 含有量と p53 変異の比率の相関の検討

LEC ラットの肝における p53 変異の頻度の増加が、肝細胞の障害の程度と相関するのか、それとも銅の蓄積や活性酸素の影響によるものかを明らかにするため、21-32 週の LEC ラットの肝の yeast functional assay における赤コロニーの比率と、血清 GOT 活性・肝の銅含有量・8-OH-dG 量との相関関係を解析した。この結果、赤コロニーと血清 GOT 活性値の間に高い正の相関関係 ( $r = 0.98$ ) が認められた(Fig. 8-A)。一方、銅ならびに 8-OH-dG とは相関が認められなかった(Fig. 8-B,C)。



## 8 エタノールによる人為的細胞障害

LEC ラットの肝細胞障害が p53 の転写スリップを促進するかどうか確かめるため、培養細胞をエタノールに暴露することにより細胞障害をおこさせた後、DNA と RNA を抽出し exon 4-specific assay により赤コロニー比率を比較した。全ての DNA サンプルにおいて赤コロニー比率は 1.9-2.5 % の範囲で変化が認められなかった。一方、RNA サンプルの赤コロニー比率は LEC ラット由来の 93C13 で、100-500 mM のエタノール負荷により 7.0 - 7.7 % となり、コントロールの 3.8 - 4.1 % に比べ倍近くに増加した (Table 3)。このうち 7.7 % の赤コロニーを得たサンプルにおける p53 変異を同定したところ、7/8 クローンがアデニン挿入変異であった。93A16 の RNA サンプルでは赤コロニーの明らかな増加は認められなかった。

## 考察

転写スリップ (transcriptional slippage) は遺伝情報を修飾する現象の一つとして注目される。特に塩基の挿入・欠失変異によって生じた酵素欠損型遺伝病においては、数%の転写スリップ産物の出現によって症状の著しい改善が見られる<sup>7,8)</sup>。これとは逆に、異常蛋白質の蓄積による遺伝病では転写スリップ類似の現象によって症状の増悪が示唆されている<sup>4)</sup>。したがって、転写スリップを人為的に制御することは、遺伝病の新しい治療手段となると考えられる。しかし哺乳動物においては、転写スリップ現象がほとんど解析されておらず、この現象の関与が示唆される遺伝性疾患の報告も極めて少ない。これは、転写スリップが DNA 複製に伴うスリップ (replication slippage) と区別することが困難であったこと、および転写スリップの in vivo モデルが無かったことによると考えられる。これらの問題を解決するために、著者は yeast functional assay とよばれる変異検出法と LEC 遺伝性肝炎ラットモデルを用いて、転写スリップの標的となるアデニン (A) が 6 個連続した配列を翻訳領域に持つ p53 癌抑制遺伝子の



転写スリップを解析した。さらに、この現象がどのような病理的状況下で促進されるかを調べた。

### 1 yeast functional assay の有用性の検討

ヒトや実験動物において転写スリップを調べるには、1) DNA の PCR 産物と mRNA の RT-PCR 産物をプラスミドにクローニングし、2) ランダムに多数のクローンの塩基配列を決定し、そして3) 両者の変異パターンを比較するのが従来の方法である<sup>7,8)</sup>。この方法では変異のあるクローンだけを解析することができず、野生型を含めた極めて多数のプラスミドクローンを解析する必要があった。本研究では、p53 遺伝子の yeast functional assay を用いて変異クローンだけを検出し、その割合を算定する方法を採用した。そこで最初に、yeast functional assay における赤コロニーの頻度がサンプル中の変異 p53 cDNA の比率を正確に反映するかどうかを確認した。野生型と変異型の p53 RT-PCR 産物を様々な比率で混合し yeast functional assay を行った結果、Fig. 2 に示したように両者の間に高い正の相関関係が証明された。従って、yeast functional assay における赤コロニーの比率は忠実に変異 mRNA の比率を反映することが示された。

次に、LEC ラット肝由来の p53 cDNA においてアデニンが6個連続する部位 (6A 部位) で高頻度にアデニンの挿入変異が検出されたが、これが p53 の増幅過程の逆転写反応および PCR のアーチファクトではないことを以下の2つのコントロール実験により証明した。

1) まず PCR による変異であるか否かを調べるため、プラスミドに組み込まれた野生型 p53 cDNA の PCR 産物の解析を行った。0.001ng のプラスミドを鋳型として用いた場合でも、23 クローン中アデニンの挿入は1つも検出されなかった。従って、アデニンの挿入は PCR のアーチファクトによるものではないことが明らかになった。2) 次に、逆転写反応のアーチファクトの影響を調べるため、TA クローニングベクターに組み込んだ野生型 p53 cDNA を SP6 RNA polymerase を用いて in vitro で RNA に転写し、RT-PCR により p53 cDNA を増幅し yeast



functional assay を行った。その結果、少数のアデニンの挿入変異が exon 7 と exon 8 の 6A 部位に検出され、その頻度は全体の 1.6 %であった(Fig. 4)。これは肝癌期 LEC ラットの組織におけるアデニンの挿入変異の比率 7.0-9.0 %と比べると有意に低かった。これより、LEC ラットにおける高率なアデニンの挿入変異は逆転写反応のアーチファクトによるものではないと考えられた。以上より、yeast functional assay はラット p53 mRNA の 6A 部位におけるアデニン挿入変異を鋭敏に検出できることが証明された。

## 2 exon 4-specific yeast assay による転写スリップの証明

このアデニンの挿入変異は exon 4 の 6A 部位に高頻度に見られるため、新たに exon 4 の変異を特異的に検出する yeast assay 用プラスミドを構築し、アデニンの挿入変異がゲノム DNA の変異か mRNA の変異なのかを調べた。2匹のラット肝の組織から同時に DNA と RNA を抽出して解析した結果、Fig.5に示されたように赤コロニーの頻度は DNA (2.4 %, 1.8 %)に比べ RNA(7.7 %, 7.2%)で明らかに高く、しかもこの差が mRNA の 6A 部位のアデニン挿入変異に由来することが示された。これにより、このアデニンの挿入変異が転写スリップによる mRNA の変異であることが証明された。同様な DNA・RNA サンプル間の赤コロニー比率の格差は CF や HCC、腎、肝炎発症前の LEC ラットの肝等においても認められ(Table 2)、これらの組織においても高頻度に転写スリップが起きていることが示唆された。

転写スリップの起きるメカニズムとして Wagner らは大腸菌において、転写の伸長反応の際に、鋳型 DNA と RNA 間の対合がずれるため 1 塩基余分に挿入されるという仮説を示している<sup>1)</sup>。転写の伸長反応の際には、転写された RNA 鎖と鋳型 DNA 鎖が数塩基対にわたり対合することが知られている<sup>24)</sup>。アデニンが多数連続する部位はこれと対合する鋳型 DNA はチミンの連続配列となるので RNA-DNA 間の結合エネルギーが最も少ない。従って、比較的簡単に対合が離れ 1 つずれた位置で再対合をおこす可能性が高い。事実、マウスの p53 にはアデニンおよびチミンがそれぞれ 6 個連続する部位があり、ここでも



yeast functional assay で高頻度に挿入変異が検出される (Tsunematsu et al., unpublished data). 一方, ラット p53 のグアニン(G)が6個連続する部位やヒトの p53 のシトシン(C)が6個連続する箇所ではGまたはCの挿入変異は検出されない<sup>22)</sup>. これらの事実は Wagner の仮説を支持するものである. しかし, 同じ6個のアデニンの連続配列でありながら, LEC ラットでアデニンの挿入変異の大半を占めるのは exon 4 の 6A 部位である. それ以外の exon 7 および exon 8 の 6A 部位でのアデニン挿入変異は少ない. その理由として, 1 つには, 6 個のアデニンの連続配列はそれだけでは転写スリップをおこすのには不十分で, 周囲の塩基を含めた 2 次構造が転写スリップに関与している可能性がある. 別の理由としては, nonsense-mediated RNA decay<sup>25)</sup>の影響が考えられる. 一般に premature stop codon を生じる変異 mRNA は不安定であることが知られているが, その中でもより 3' 側に終止コドンの生じた mRNA は細胞質で分解を受けやすい<sup>26)</sup>. ラット p53 では exon 4 のアデニン挿入変異は 130 番目のコドンに終止コドンを生じる. 他方 exon 7 と exon 8 のアデニン挿入変異では, 329 番目に終止コドンが生じる. このため, 後者では mRNA が分解されやすく, yeast functional assay 上の頻度が少なく見積もられる可能性がある.

### 3 転写スリップの増加に関与する要因

LEC ラット肝炎の経過に伴う yeast functional assay の赤コロニー比率の変化を調べた. その結果, 赤コロニーの平均値は急性肝炎期にピークがあり, 慢性肝炎期に一旦減少し, 肝癌期に漸増傾向を示した (Fig 6-A). そこで, これを文献上記載のある血清 GOT<sup>27)</sup>, 肝の銅<sup>28)</sup>ならびに 8-OH-dG 含有量<sup>29)</sup>等の生化学的パラメーターの変化のパターン (Fig. 6-B, C, D) と比較すると転写スリップの頻変化のパターンと類似していた. LEC ラットの肝では銅の含有量が急性肝炎期に著しく増加することが知られている<sup>28)</sup>. 銅は, 染色体上で DNA の塩基とくにグアニンに結合することが報告されており<sup>30,31)</sup>, 過剰な銅の蓄積は転写スリップを増加させる原因となる可能性がある. 48 週齢の LEC ラットの肝ではす



で銅の含有量が 70-180  $\mu\text{g/g}$  wet weight あり. 正常コントロールラット(5  $\mu\text{g/g}$  wet weight)に比べ異常に高いことが報告されている<sup>28)</sup>. しかし, 7週令の LEC ラットと WKAH ラットの肝ではアデニンの挿入変異の頻度に差は認められなかった. さらに, 急性肝炎期の個々の肝で銅の濃度と赤コロニーの間に相関は認められなかった (Fig. 8-B). 以上より, 肝への銅の過剰蓄積そのものは転写スリップの原因ではないことが示された.

細胞内の銅の過剰蓄積はその触媒作用により毒性の高い活性酸素種を産生する<sup>32)</sup>. LEC ラットの肝では活性酸素による DNA 障害の産物である 8-OH-dG や etheno-DNA adduct は急性肝炎発症の直前に最も増加し, その後減少する<sup>29,33)</sup>. しかし, Fig.5 に示した 2 匹の LEC ラットの肝の 8-OH-dG レベルを調べたところ, 8-OH-dG/10<sup>5</sup>dG 比にして sample 1 で 1.36, sample 2 で 0.76 で 8-OH-dG レベルに差があるにも関わらず exon 4 でのアデニン挿入変異の頻度は両者とも 4.8 %であった (Fig.5). また, 8-OH-dG レベルと赤コロニーの比率の間に相関関係は認められなかった (Fig. 8-C). 以上より, 活性酸素による DNA の障害が転写スリップの直接の原因となる可能性は低いと考えられる.

これに対して, 細胞傷害の指標である血清 GOT 活性は赤コロニーの比率と高い相関を示した (Fig. 8-A). また, LEC ラットの腎でも赤コロニーの比率が急性肝炎期に増加している. 急性肝炎期には腎尿細管が傷害を受けることが報告されており<sup>34)</sup>, これが原因で転写スリップが増加している可能性がある. 従って, LEC ラットにおける転写スリップの増加は, 細胞の傷害により転写機構が何らかの影響を受けた結果によるものと推測される.

細胞障害によって転写スリップが促進されることを証明するために, LEC および LEA ラット肝細胞由来の培養細胞にエタノールを与えて細胞傷害を人為的に引き起こした. LEC および LEA ラットはエタノール代謝酵素に異常があり, エタノール投与により, 肝障害をおこすことが知られている<sup>35,36)</sup>. この実験で LEC ラット由来の細胞株 93C13 において転写スリップが増加することが証明された (Table 3). しかし, LEA ラット由来の 93A16 細胞の RNA ではあ



まり赤コロニーが増加しなかった。このため、転写スリップが細胞傷害により促進される普遍的な現象なのか、それとも LEC ラットに特異的な現象なのかは判断できない。しかし、LDH 逸脱比で見ると 93C13 の方が 93A16 より傷害の程度が強かったので、細胞の傷害が一定レベルになると転写スリップが促進される可能性がある。この点に関しては、さらに詳細な検討が必要と考えられた。

これとは別に、コントロールとして用いた WKAH ラットの肝では加齢とともに赤コロニーの比率が増加する傾向が認められた。Fig. 7 で示されたようにこの増加分はアデニンの挿入によるものが多いので、加齢とともに転写スリップが増加することが示唆される。これはアルツハイマー病、ダウン症候群や Blattroboro ラットにみられる 2 塩基欠失型の転写変異の頻度が加齢によって増加するという現象<sup>4,6)</sup>と類似している。このように転写変異の頻度の増加が老化と関係した現象であることは、転写機構の忠実度 (fidelity) が加齢に伴って低下することを示唆している。

本研究では酵母を用いた簡便かつ高感度な手法により、転写スリップの解析を行い、細胞障害や加齢に伴う細胞の老化が転写機構の忠実度を低下させる可能性を示した。本実験では転写スリップの標的遺伝子として p53 癌抑制遺伝子を用いているが、p53 の転写スリップの結果生じた truncated protein が LEC ラットの肝癌発生に関与している可能性は今のところ不明である。転写変異を引き起こす具体的な機構、特に RNA polymerase II の役割についてはまだ不明な点が多い。転写スリップの制御による遺伝子病の治療の可能性に関しては、トランスジェニックマウスなどの遺伝病の動物モデルを用いて実験する価値は十分あると考えられる。

## まとめ

転写変異の 1 つである転写スリップについて、yeast functional assay という新しい検出法を利用して、モデル動物である LEC ラットの p53 遺伝子について検討した。この結果



- 1) yeast functional assay は p53 の転写変異の鋭敏な解析法として有用である.
- 2) LEC ラットにおいてアデニンの挿入変異が転写スリップによるものであることが証明された.
- 3) 転写スリップは, LEC ラットで急性肝炎期に最も増加し, その原因として細胞の障害そのものが関係することが示唆された.
- 4) また, 転写スリップは 加齢とともに増加することが示され, 細胞の老化によってもこの現象が促進されることが示唆された.

#### 謝辞

御指導と後校閲を賜りました北海道大学医学部癌研究施設細胞制御部門 守内哲也教授ならびに終始御指導御鞭撻いただいた北海道大学医学部癌研究施設病理部門 細川真澄男教授に深謝いたします. また本研究全般にわたり多大な御助言, 御協力をいただいた浜田淳一講師ならびに外木秀文助手はじめ北海道大学医学部癌研究施設細胞制御部門ならびに病理部門の諸先生, 教室員の皆様に感謝いたします.



## 文献

1. Wagner LA, Weiss RB, Driscoll R, Dunn DS, Gesteland RF (1990): Transcriptional slippage occurs during elongation at runs of adenine or thymine in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 18:3529-3535.
2. Atkins JF, Elseviers A, Gorini L (1972): Low activity of beta-galactosidase in frameshift mutations in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 69:1192-1195.
3. Jacks T, Varmus HE (1985): Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science* 230: 1237-1242.
4. van Leeuwen FW, de Kleijn DPV, van den Hurk HH, Neubauer A, Sonnemans MAF, Sluijs JA, Koycu S, Ramdjielal RDJ, Salehi A, Martens GJM, Grosveld FG, Burbach JPH, Hol EM (1998): Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science* 279:242-247.
5. Evans DAP, van der Kleij AAM, Sonnemans MAF, Burbach JPH, van Leeuwen FW (1994): Frameshift mutations at two hotspots in vasopressin transcripts in post-mitotic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6059-6063.
6. van Leeuwen F, van der Beek E, Seger M, Burbach P, Ivell R (1989): Age related development of a heterozygous phenotype in solitary neurons of homozygous Brattleboro rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6417-6420.
7. Linton MF, Pierotti V, Young SG (1992): Reading-frame restoration with an apolipoprotein B gene frameshift mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11431-11435.
8. Young M, Inaba H, Hoyer LW, Higuchi M, Kazazian HHJr, Antonarakis SE (1997): Partial correction of a severe molecular defect in hemophilia A, because of errors during expression of the factor VIII gene. *Am J Hum Genet* 60:565-573.
9. Flaman JM, Frebourg T, Moreau V, Charbonnier F, Martin C, Chappuis P, Sappino AP, Limacher JM, Bron L, Benhattar J, Tada M, van Meir EG, Estreicher A, Iggo RD (1995): A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood,



- and tumors. Proc Natl Acad Sci USA 92:3963-3967.
10. Nakata D, Tonoki H, Ba Y, Tsunematsu I, Kobayashi M, Hosokawa M, Moriuchi T (1997): Proc Jpn Cancer Assoc [abstract];56:306.
  11. Sasaki M, Yoshida MC, Kagami K, Takeichi N, Kobayashi H, Dempo K, Mori M (1985): Spontaneous hepatitis in an inbred strain of Long-Evans rats. Rat News Lett 14:4-6.
  12. Yoshida MC, Masuda R, Sasaki M, Takeichi N, Kobayashi H, Dempo K, Mori M (1987): New mutation causing hereditary hepatitis in the laboratory rat. J Hered 78:361-365.
  13. Masuda R, Yoshida MC, Sasaki M, Dempo K, Mori M (1988): High susceptibility to hepatocellular carcinoma development in LEC rats with hereditary hepatitis. Jpn J Cancer Res 79:828-835.
  14. Wu J, Forbes JR, Chen HS, Cox DW (1994): The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. Nat Genet 7:541-5
  15. Muramatsu Y, Yamada T, Miura M, Sakai T, Suzuki Y, Serikawa T, Tanzi RE, Matsumoto K (1994): Wilson's disease gene is homologous to hts causing abnormal copper transport in Long-Evans cinnamon rats. Gastroenterology 107:1189-92
  16. Li Y, Togashi Y, Sato S, Emoto T, Kang JH, Takeichi N, Kobayashi H, Kojima Y, Une Y, Uchino J (1991): Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis. A model of Wilson's disease. J Clin Invest 87:1858-1861.
  17. Togashi Y, Li Y, Kang JH, Takeichi N, Fujioka Y, Nagashima K, Kobayashi H (1992): D-penicillamine prevents the development of hepatitis in Long-Evans Cinnamon rats with abnormal copper metabolism. Hepatology 15:82-87.
  18. Nakamura K, Endo F, Ueno T, Awata H, Tanoue A, Matsuda I (1995): Excess copper and ceruloplasmin biosynthesis in long-term cultured hepatocyte from Long-



- Evans Cinnamon (LEC) rats, a model of Wilson disease. *J Biol Chem* 270: 7655-7660.
19. Ishioka C, Frebourg T, Yan YX, Vidal M, Friend SH, Schmidt S, Iggo R (1993): Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nat Genet* 5:124-129.
  20. Scharer E, Iggo R (1992): Mammalian p53 can function as a transcriptional factor in yeast. *Nucl Acids Res* 20:1539-1545.
  21. Orr-Weaver TL, Szostak JW, Rothstein RJ (1983): Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids. *Methods Enzymol* 101:228-245.
  22. Kashiwazaki H, Tonoki H, Tada M, Chiba I, Shindoh M, Totsuka Y, Iggo R, Moriuchi T (1997): High frequency of p53 mutations in human oral epithelial dysplasia and primary squamous cell carcinoma detected by yeast functional assay. *Oncogene* 15:2667-2674.
  23. Hulla JE, Schneider RP (1993): Structure of the rat p53 tumor suppresser gene. *Nucl Acids Res* 21:713-717.
  24. Nudler E, Mustaev A, Lukhtanov E, Goldfarb A (1997): The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell* 89:33-41.
  25. Maquat LE (1995): When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA* 1:453-465.
  26. Andreutti-Zaugg C, Scott RJ, Iggo R (1997): Inhibition of nonsense-mediated messenger RNA decay in clinical samples facilitates detection of human MSH2 mutations with an in vitro fusion protein assay and conventional techniques. *Cancer Res* 57: 3288-3293.
  27. Kang JH, Togashi Y, Kasai H, Hosokawa M, Takeichi N (1993): Prevention of spontaneous hepatocellular carcinoma in Long-Evans cinnamon rats with hereditary hepatitis by the administration of D-penicillamine. *Hepatology* 18:614-620.



28. Li Y, Togashi Y, Sato S, Emoto T, Kang JH, Takeichi N, Kobayashi H, Kojima Y, Une Y, Uchino J (1991): Abnormal copper accumulation in non-cancerous and cancerous liver tissues of LEC rats developing hereditary hepatitis and spontaneous hepatoma. *Jpn J Cancer Res* 82:490-492 .
29. Yamamoto F, Kasai H, Togashi Y, Takeichi N, Hori T, Nishimura S (1993): Elevated level of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA of liver, kidneys, and brain of Long-Evans Cinnamon rats. *Jpn J Cancer Res* 84:508-511.
30. Cantor KP, Hearst JE (1966): Isolation and partial characterization of metaphase chromosomes of a mouse ascites tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 55:642-649.
31. Kagawa TF, Geierstanger BH, Wang AH, Ho PS (1991): Covalent modification of guanine bases in double-stranded DNA. The 1.2-A Z-DNA structure of d(CGCGCG) in the presence of  $\text{CuCl}_2$ . *J Biol Chem* 266:20175-20184.
32. Li Y, Trush MA (1993): DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper: role for a Cu(II)/Cu(I) redox cycle and reactive oxygen generation. *Carcinogenesis* 14:1303-1311.
33. Nair J, Sone H, Nagao M, Barbin A, Bartsch H (1996): Copper-dependent formation of miscoding etheno-DNA adducts in the liver of Long Evans cinnamon (LEC) rats developing hereditary hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 56:1267-1271.
34. Tochimaru H, Akutsu Y, Nagata Y, Takekoshi Y, Matsumoto S, Takeichi N (1991): Acute tubular necrosis in LEC rats with hereditary hepatic failure - A new model of hepatorenal syndrome. In: *The LEC rat*, ed by Mori M, Yoshida MC, Takeichi N, Taniguchi, Springer-Verlag, Tokyo, pp103-113,.
35. Katsuki S, Kato J, Nakajima M, Inui N, Sasaki K, Kohgo Y, Niitsu Y (1996): Analysis of CA repeat in first intron of class I ADH gene in Long-Evans Cinnamon rats developing fatal intoxication after ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 20:33A-35A.



36. Najajima M, Kato J, Kohgo Y, Takeichi N, Niitsu T (1994): Point mutation of aldehyde dehydrogenase-2 gene in mutant strains of Long-Evans rats. *Alcohol* 29 Supple 1:39-43.

Figure 2. Correlation between percentages of red colonies and mutant p53 contents.

A positive correlation was observed between the content of mutant p53 PCR products and percentages of red colonies. A linear regression analysis was performed based on the formula as follows:  $y = 0.0001x + 0.0001$  ( $r = 0.99$ ). The bars indicate standard error.

Figure 3. A insertion at the GA stretches in the rat p53 cDNA.

A insertion was frequently detected in the p53 clones rescued from red colonies given by the yeast functional assay. Wild-type and mutant sequences at the GA tract in exon 4, 7, and 8 were determined.

Figure 4. Percentages of A insertions in PCR or RT-PCR products of cloned p53 cDNA, SP6-transcript, and mRNA of LEC rat liver tissues.

Percentages of red colonies and types of the p53 mutations were compared among PCR-amplified wild-type p53 cDNA from Hras<sup>SV40</sup> L-937 cell line, RT-PCR products of SP6-transcript of wild-type p53 cDNA, and mRNA from 7-week-old LEC rat liver, and 20-week-old LEC rat liver, cholangiocarcinoma (CFL), and hepatocellular carcinoma (HCC) rat liver.



## Figure Legends

### Figure 1. Structure of rat p53 expression vector pLSRP53.

pLSRP53 has restriction sites which can be used to create a gap between codons 68 and 345 for standard rat p53 yeast functional assay after digestion with *Pst* I and *Stu* I ( A ). For exon 4-specific yeast assay, a gap was created between codons 68 and 113 by *Pst* I digestion ( B ). Black boxes indicate sites of 6A tract. Gap repair of the plasmid with the PCR product results in expression of recombinant rat p53 cDNA. Clones that have repaired the gap are selected on the medium lacking leucine.

### Figure 2. Correlation between percentages of red colonies and mutant p53 contents

A positive correlation was observed between the content of mutant p53 PCR products and percentage of red colonies, which was evaluated by polynomial regression based on the formula as follows.  $y=8.5+0.90x$ , ( $r=0.99$ ).

The bars indicate means $\pm$ S.D.

### Figure 3. A insertions at the 6A stretches in the rat p53 cDNA.

A insertion was frequently identified in the p53 clones rescued from red colonies given by the yeast functional assay. Wild-type and mutant sequences at the 6A tracts in exon 4, 7, and 8 were demonstrated.

### Figure 4. Percentage of A insertions in PCR or RT-PCR products of cloned p53 cDNA, SP6-transcript, and mRNA of LEC rat liver tissues

Percentages of red colonies and types of the p53 mutations were compared among PCR-amplified wild-type p53 cDNA from 10 ng and 0.001 ng of plasmids, RT-PCR products of SP6 transcript of wild-type p53 cDNA, and RNAs from 7-week-old LEC rat liver, >70-week-old LEC rat liver, cholangiofibrosis (CF), and hepatocellular carcinoma



(HCC). The ordinate represents the percentage of red colonies (= frequency of mutation). Percentages of red colonies were higher in the samples from >70 week-old LEC rats than PCR or RT-PCR products of wild-type p53 clone mainly because of elevated frequency of A insertion mutation at 6A repeat in exon 4.

**Figure 5. Comparison of the frequencies of A insertion between PCR products of genomic DNA and mRNA templates.**

Exon 4 fragments were amplified from genomic DNA and mRNA derived from two liver tissues of 72-week-old female LEC rats and used for exon 4-specific yeast assay. Plasmids were rescued from individual red colonies given by each sample and p53 mutations were determined by sequencing. The ordinate represents the percentage of red colonies (= frequency of mutation) and the abscissa represents the samples from LEC rat liver. Number of individual red colonies was shown at the top of each bar.

**Figure 6. Chronological changes in the frequency of rat p53 mutations detected by yeast functional assay.**

Yeast functional assay was performed on total RNAs from LEC rats and age-matched control WKAH rats. (A): The ordinate represents mean percentages of red colonies (= frequencies of p53 mutation) and the abscissa represents ages of the rats. Each symbol represents the average value in samples (n=2-8). ● stands for male LEC rat livers, ○ for female LEC rat livers, ▲ for male LEC rat kidneys, ■ for male WKAH rat livers, and □ for female WKAH rat livers. Chronological changes in the frequency of p53 mutation were compared with those in biochemical data; (B): with serum levels of GOT (adapted from Ref. 27), (C): with copper concentrations in the liver (adapted from Ref. 28), and (D): with 8-OH-dG/5-OH-dG ratio in the liver (adapted from Ref. 29). In B, C and D, ● stands for male LEC rat, ○ for female LEC rat, and × for mixture of



male and female LEC rats.

**Figure 7. Changes in the frequency of A insertion in p53 mRNA.**

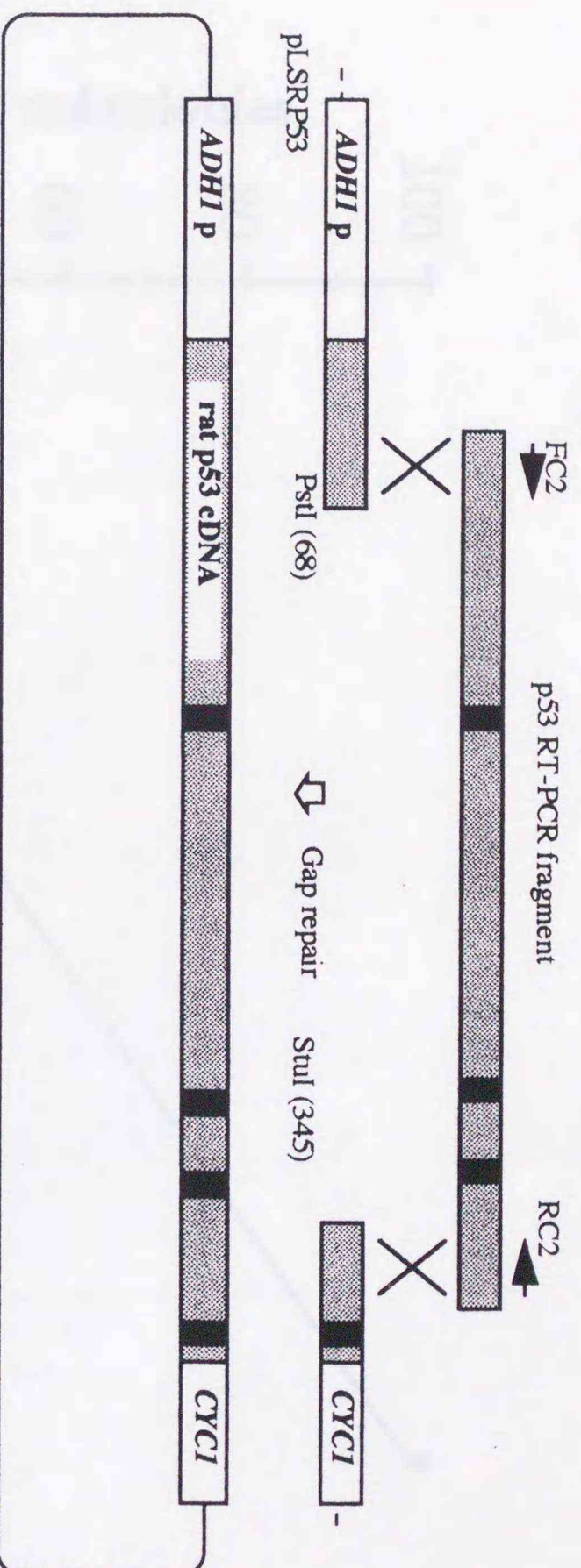
Yeast functional assay was performed in samples from male LEC rat livers at various pathological states (prehepatitis stage at 7 weeks old, early stage of chronic hepatitis at 32 weeks old, and hepatoma stage at 72 weeks old). As a control, liver samples from young (7 weeks) and old (86 weeks) male WKAH rats were also examined by yeast functional assay. Plasmids were rescued from 4 to 10 individual red colonies given by each sample and p53 mutations were determined by sequencing. The ordinate represents the percentage of red colonies (= frequency of mutation).

**Figure 8. Correlations of p53 mutation frequency with serum GOT activity, and the liver contents of copper and 8-hydroxydeoxyguanosine.**

Percentages of red colonies in the liver tissues from 21-32 weeks old LEC rats were compared with (A) the serum GOT levels, and (B) copper contents and (C) 8-hydroxydeoxyguanosine in the liver. Regression analysis revealed a highly significant correlation between p53 mutation frequency and the serum GOT activity ( $r = 0.98$ ,  $p < 0.001$ ).



### A standard rat p53 yeast assay



### B exon 4-specific yeast assay

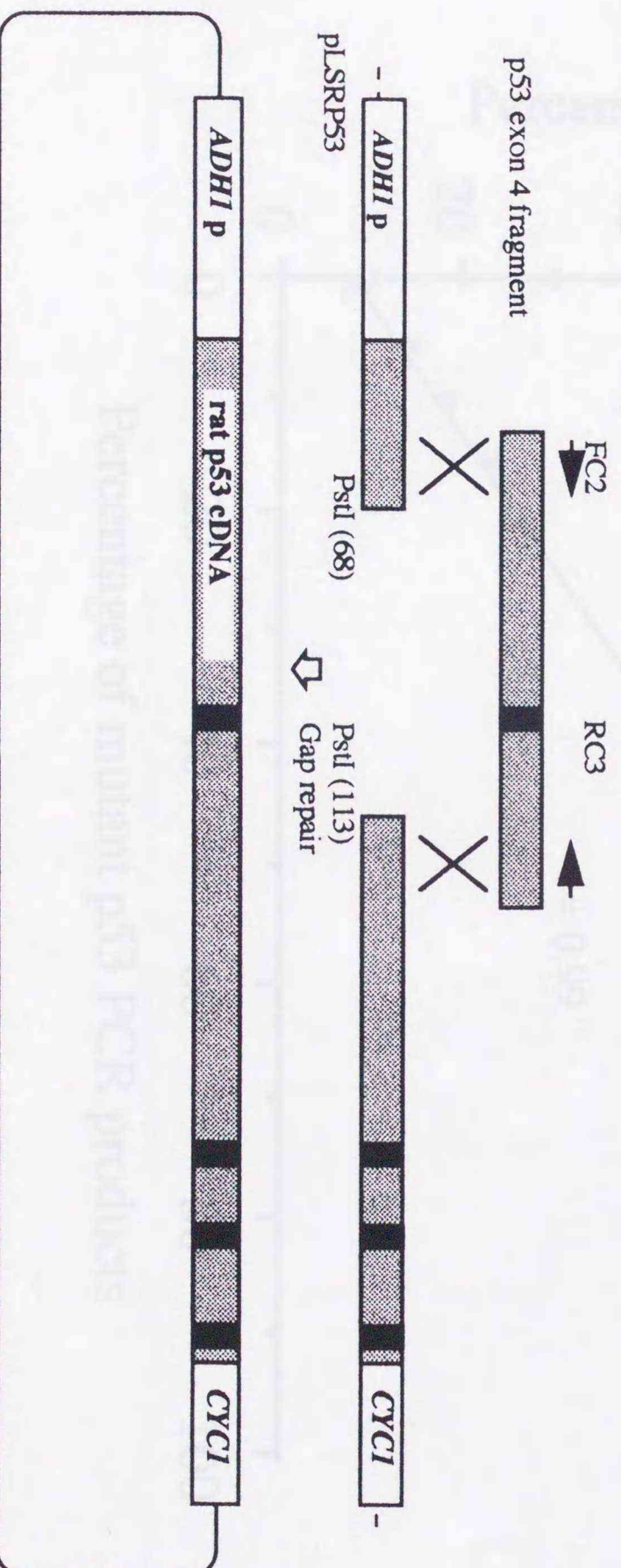


Fig. 1. Ba



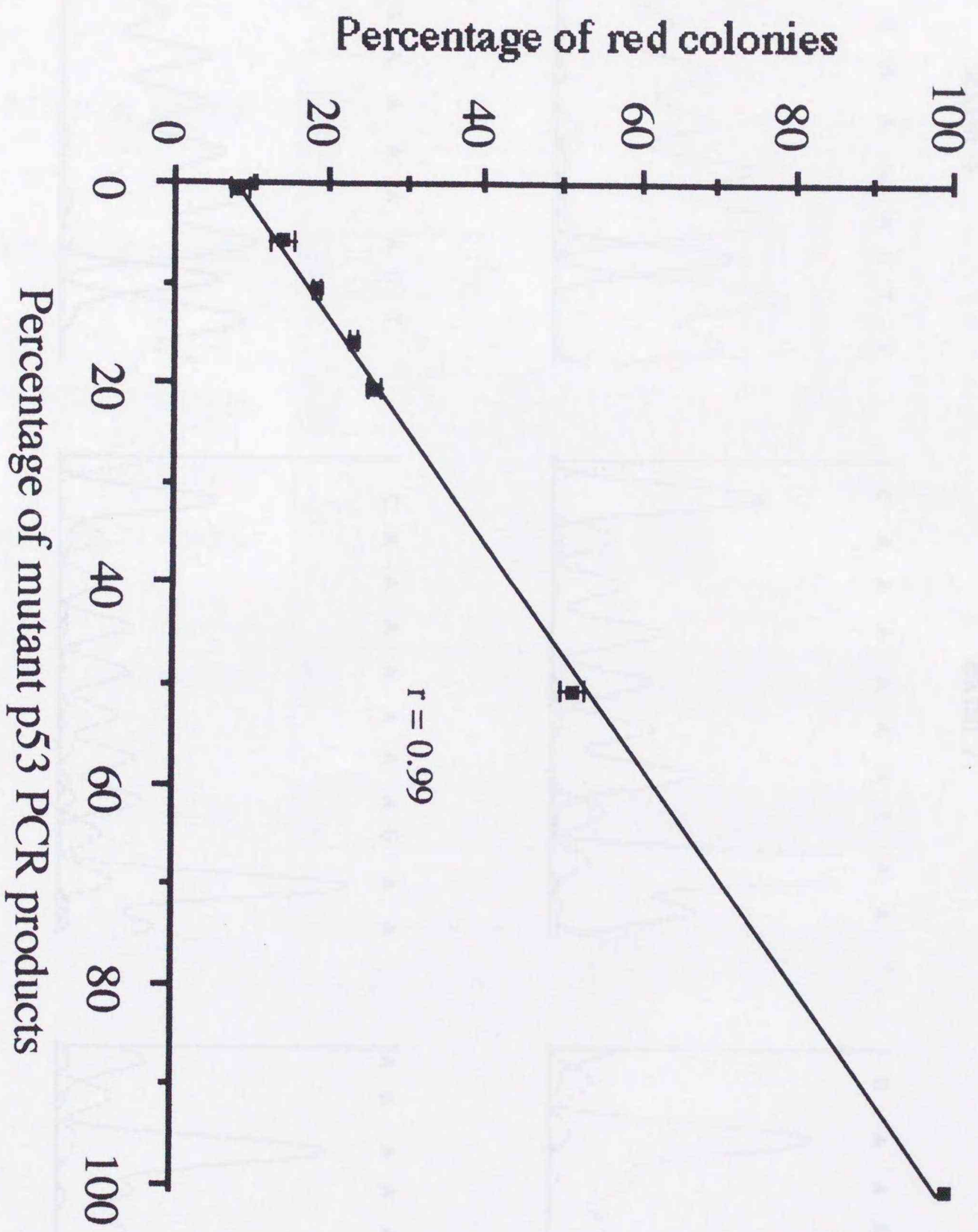


Fig. 2, Ba



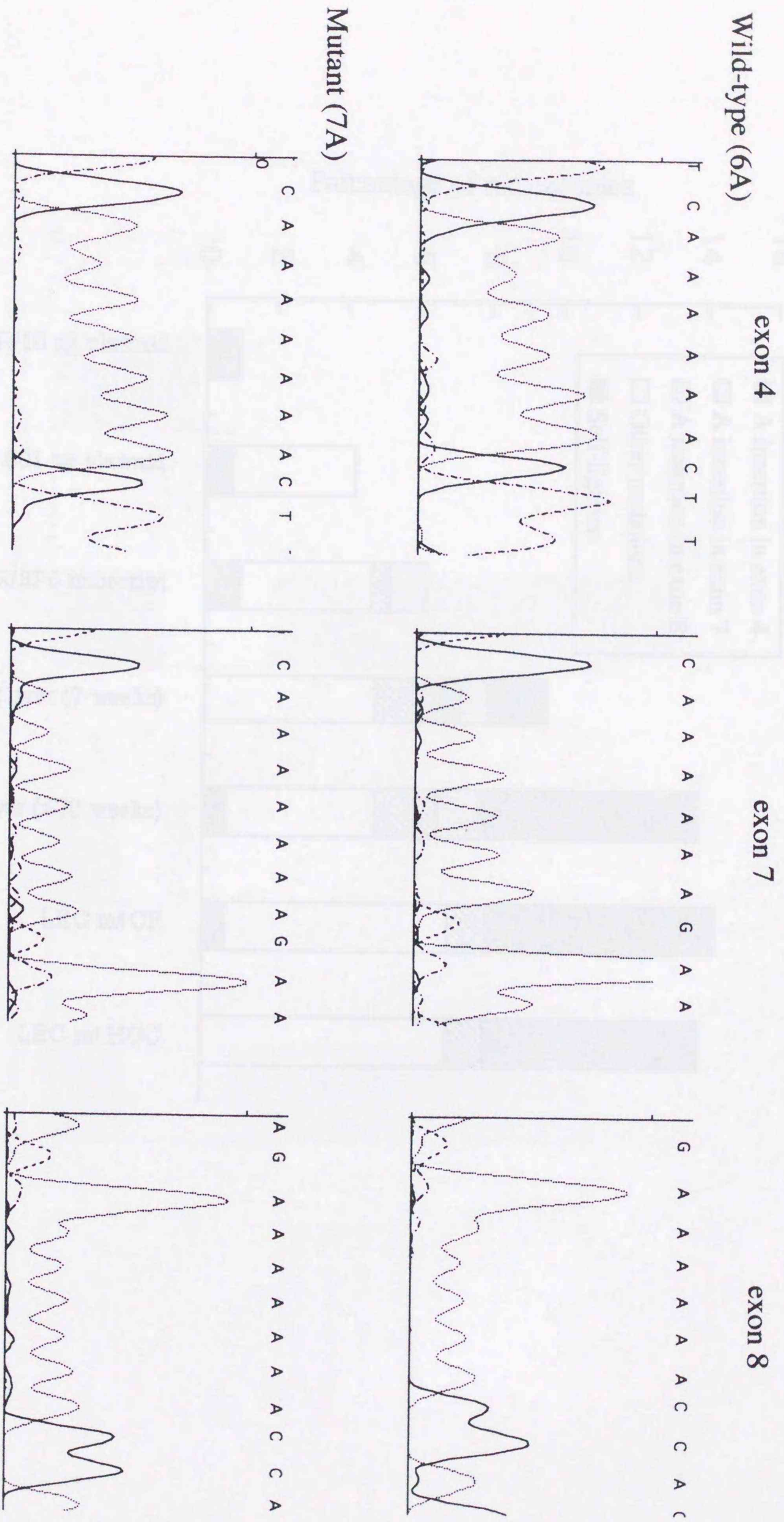


Fig. 3, Ba



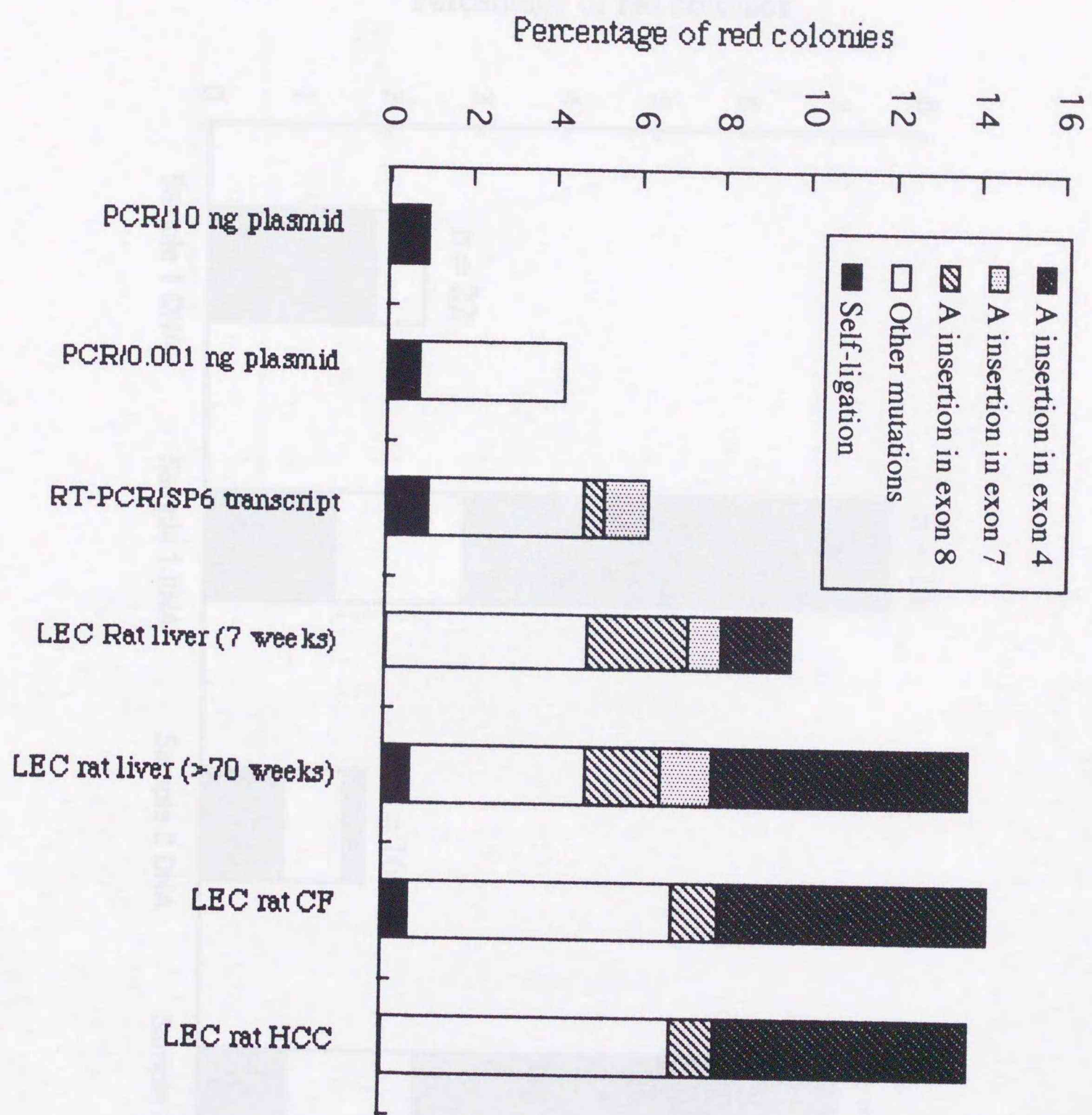


Fig. 4, Ba



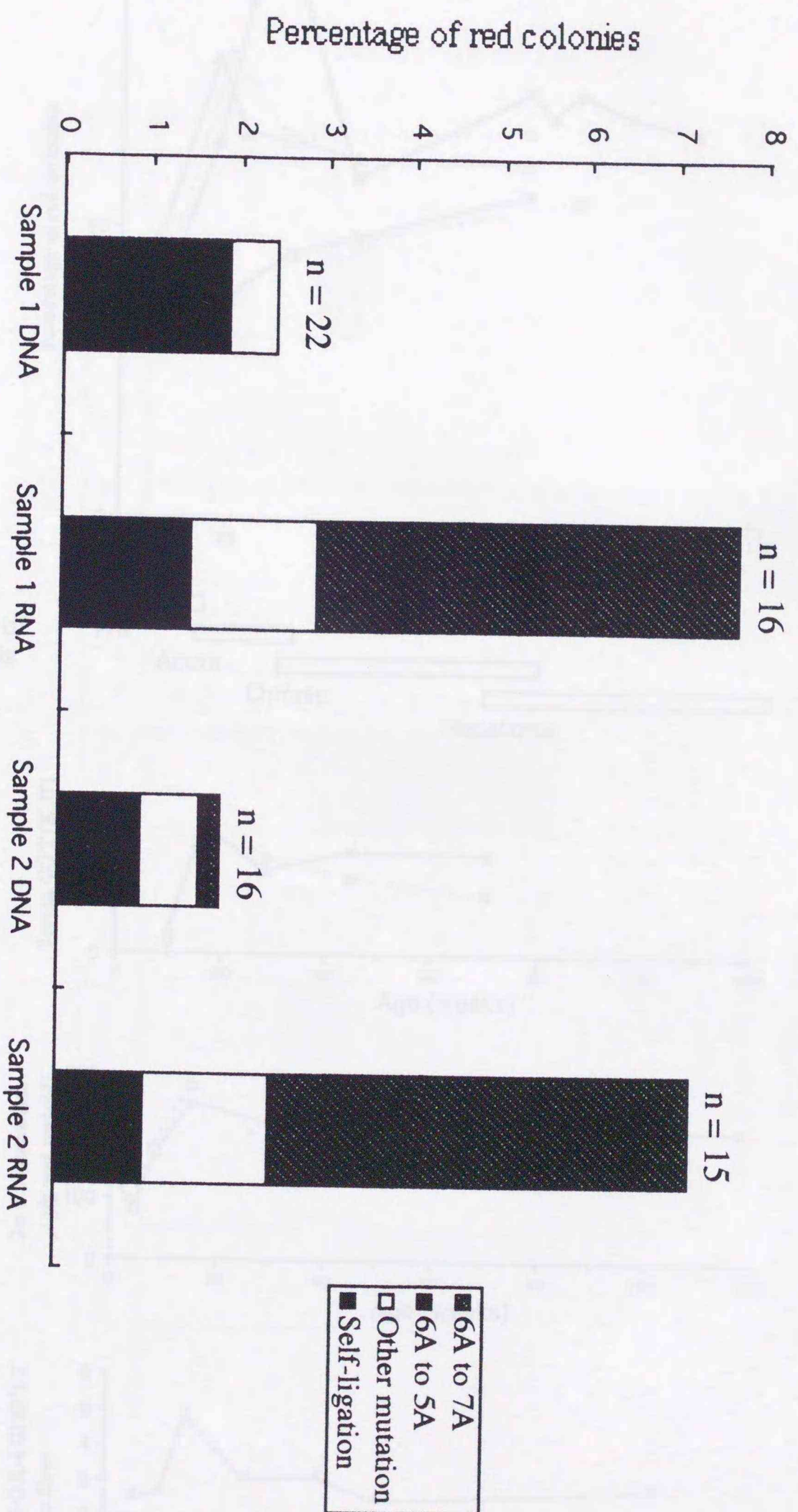


Fig. 5, Ba



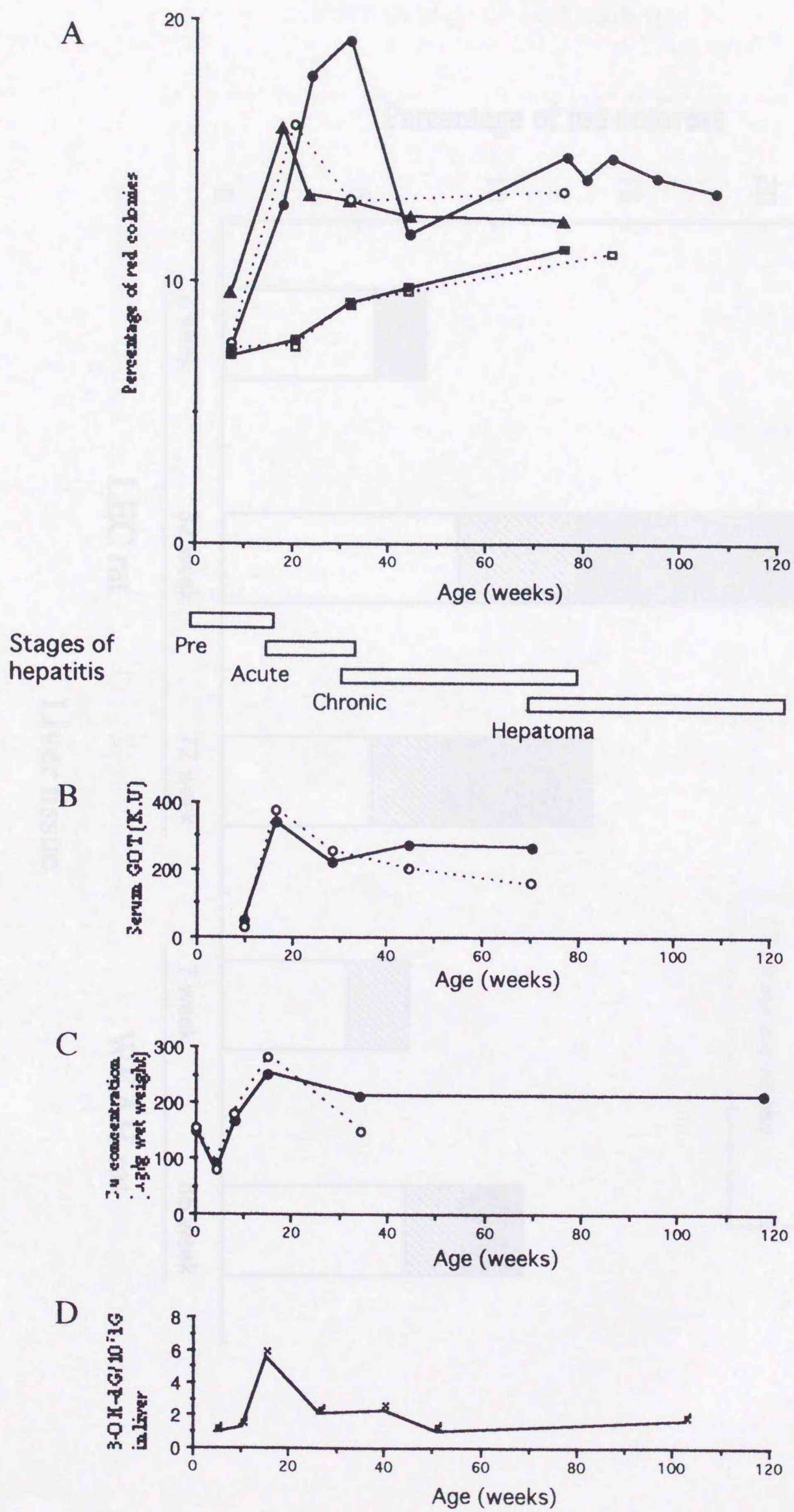


Fig. 6, Ba



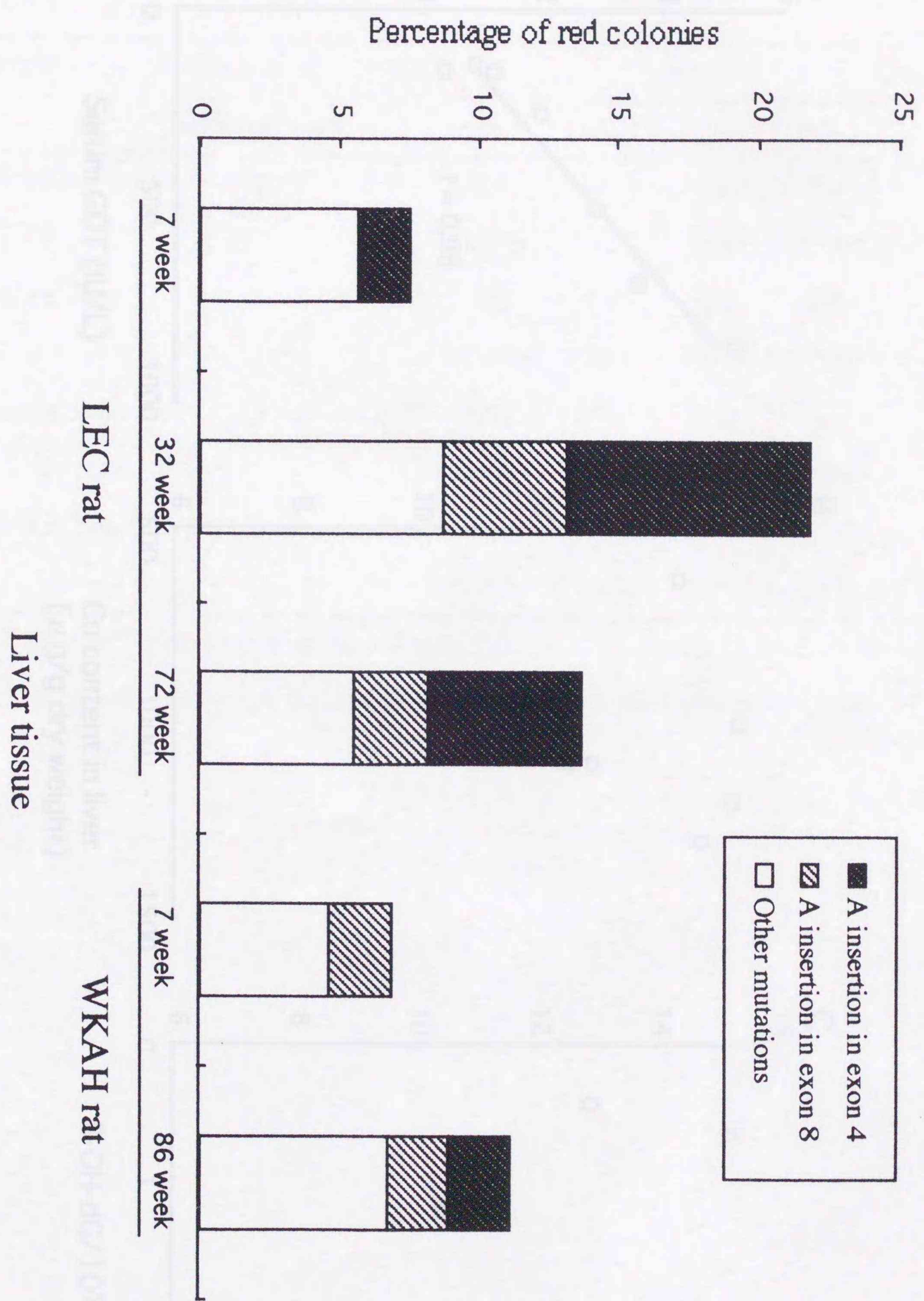


Fig. 7, Ba



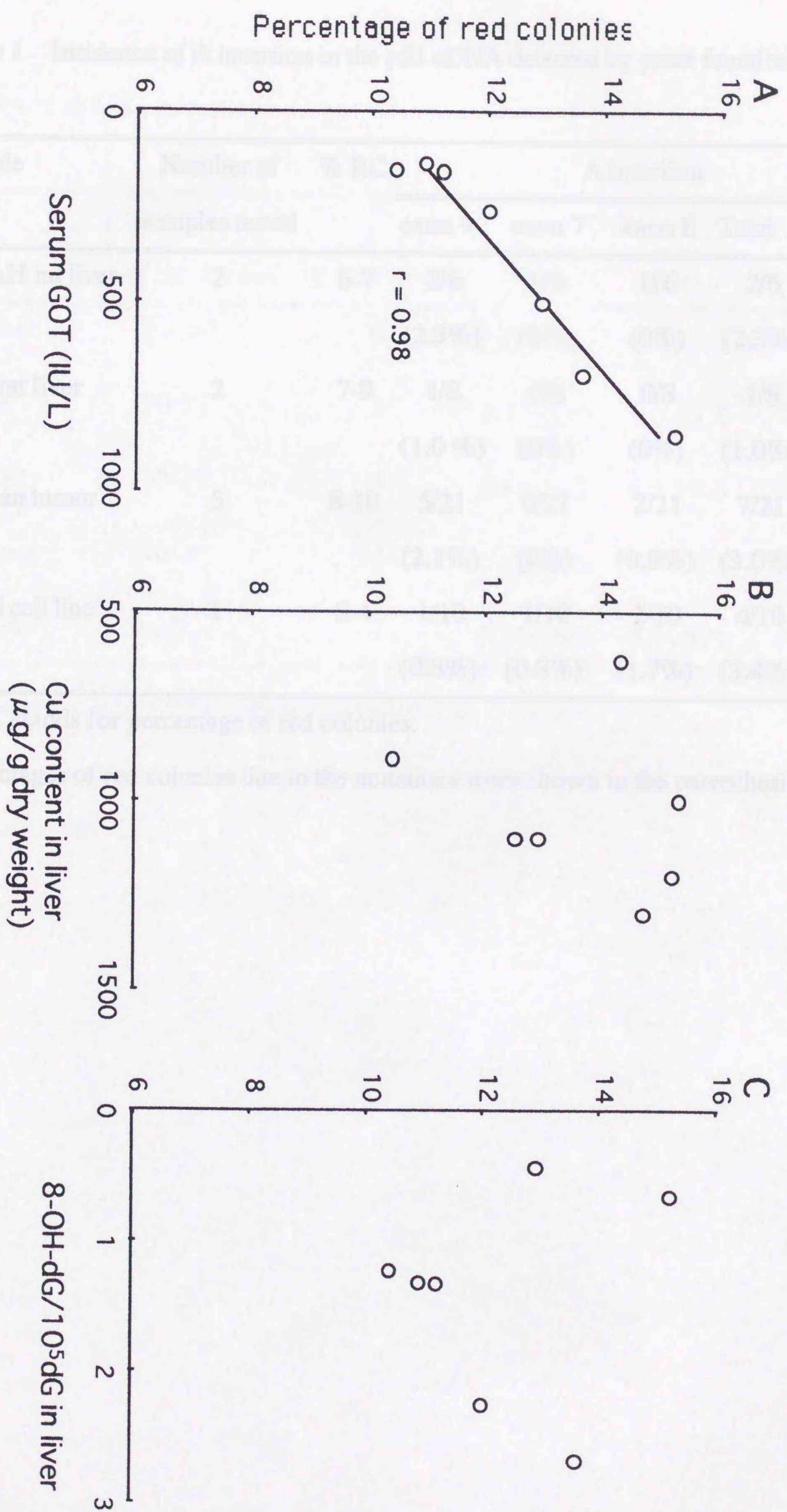


Fig. 8, Ba



Table 1 Incidence of A insertion in the p53 cDNA detected by yeast functional assay

| Sample         | Number of<br>samples tested | % RC | A insertion    |                |                |                | Other mutations |
|----------------|-----------------------------|------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
|                |                             |      | exon 4         | exon 7         | exon 8         | Total          |                 |
| WKAH rat liver | 2                           | 6-7  | 2/6<br>(2.3%)  | 0/6<br>(0%)    | 0/6<br>(0%)    | 2/6<br>(2.3%)  | 4/6<br>(4.5%)   |
| LEC rat liver  | 2                           | 7-9  | 1/8<br>(1.0 %) | 0/8<br>(0%)    | 0/8<br>(0%)    | 1/8<br>(1.0%)  | 7/8<br>(7.0%)   |
| Ovarian tumor  | 5                           | 8-10 | 5/21<br>(2.1%) | 0/21<br>(0%)   | 2/21<br>(0.9%) | 7/21<br>(3.0%) | 14/21<br>(6.0%) |
| OWH cell line  | 1                           | 8.4  | 1/10<br>(0.8%) | 1/10<br>(0.8%) | 2/10<br>(1.7%) | 4/10<br>(3.4%) | 6/10<br>(5.0%)  |

% RC stands for percentage of red colonies.

Percentages of red colonies due to the mutations were shown in the parenthesis.



Table 2. Comparison of percentage of red colonies between genomic DNA and RNA samples from LEC rat tissues

| Tissue | Age of rat (weeks) | # of samples | % RC       |           | P value* |
|--------|--------------------|--------------|------------|-----------|----------|
|        |                    |              | DNA        | RNA       |          |
| Liver  | 70-76              | 4            | 2.3 ± 0.37 | 7.3 ± 0.3 | 0.0002   |
| CF     | 70-76              | 3            | 2.7 ± 0.41 | 7.0 ± 1.6 | 0.01     |
| HCC    | 70-76              | 3            | 2.8 ± 0.95 | 6.3 ± 1.3 | 0.015    |
| Kidney | 70-76              | 4            | 3.5 ± 0.41 | 6.0 ± 1.2 | 0.025    |
| Liver  | 7                  | 2            | 3.0 ± 0.35 | 5.8 ± 0.1 | 0.05     |

%RC stands for percentage of red colonies (mean ± S.D.).

\*Percentages of red colonies given by DNA and RNA samples were compared with student's *t*-test.



Table 3. Result of exon 4-specific yeast assay of 93C13 and 93A16 cell lines treated with ethanol

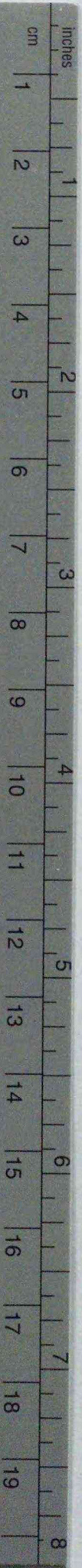
| Cell line | Ethanol concentration | Experiment 1    |                            |       | Experiment 2    |                            |      |
|-----------|-----------------------|-----------------|----------------------------|-------|-----------------|----------------------------|------|
|           |                       | LDH release (%) | Percentage of red colonies |       | LDH release (%) | Percentage of red colonies |      |
|           |                       |                 | DNA                        | mRNA  |                 | DNA                        | mRNA |
| 93C13     | 0                     | 0               | 2.4                        | 3.8   | 0               | 2.2                        | 4.1  |
|           | 100mM                 | 39.5            | 2.0                        | 7.7 * | 35.7            | 2.4                        | 7.4  |
|           | 500mM                 | 44.9            | 2.3                        | 7.0   | 47.2            | 2.1                        | 7.2  |
|           |                       |                 |                            |       |                 |                            |      |
| 93A16     | 0                     | 0               | 1.9                        | 3.9   | 0               | 2.2                        | 4.1  |
|           | 100mM                 | 22.8            | 2.5                        | 4.6   | 26.4            | 2.4                        | 4.2  |
|           | 500mM                 | 26.5            | 2.2                        | 4.4   | 25.7            | 2.3                        | 4.5  |
|           |                       |                 |                            |       |                 |                            |      |

\*: The plasmids were rescued from 8 red colonies and sequenced. A insertion mutation at nt 293-298 was identified in 7 of 8 clones .





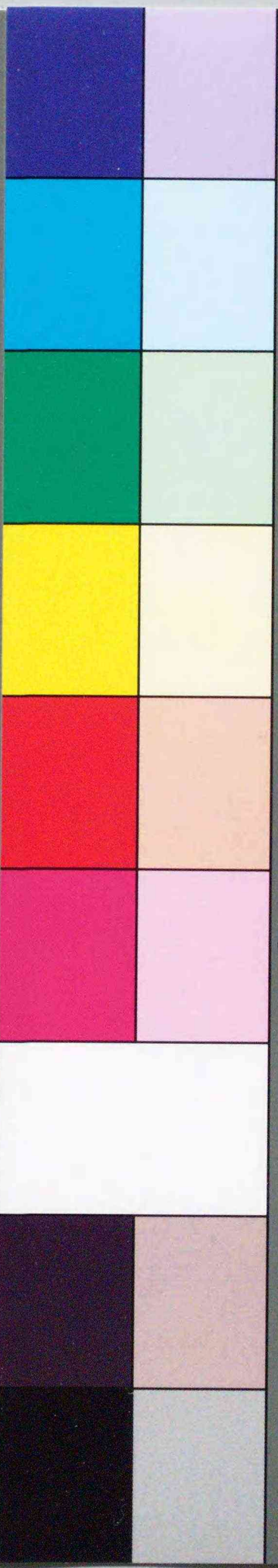




# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue      Cyan      Green      Yellow      Red      Magenta      White      3/Color      Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A**    1    2    3    4    5    6    **M**    8    9    10    11    12    13    14    15    **B**    17    18    19

