

# 自然突然変異の発生における損傷乗り越えDNA合成の役割

蟹江 聰  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科  
原核生物分子遺伝学講座（真木寿治教授）  
平成19年 1月29日提出

# 目次

## 第一部序論

- 1 自然突然変異の生物学的意義 . . . 3
- 2 自然突然変異の発生と抑制の分子機構 . . . 4
- 3 自然DNA損傷から細胞を守る機構 . . . 6
- 4 大腸菌染色体*rpsL*検出系 . . . 8
- 5 本研究の目的 . . . 11

## 第二部自然突然変異の発生における複製エラーの関与について

- 第一章 序論 . . . 12
- 第二章 結果と考察 . . . 15

## 第三部自然突然変異の発生における損傷乗り越えDNA合成の役割

- 第一章 序論 . . . 37
- 第二章 結果と考察 . . . 41

## 第四部複製エラーにおけるPol IV(DinB)の関与

- 第一章 序論 . . . 88
- 第二章 結果と考察 . . . 89

## 第五部材料と方法 . . . 92

総括 . . . 100

付録表 . . . 102

参考文献 . . . 111

謝辞 . . . 117

# 第一部 序論

## 1、自然突然変異の生物学的意義

### 1-1)生物における正確な遺伝情報の伝達

ひとつの細胞が分裂し、ふたつになるとき、自己の持つ遺伝情報を正確に伝える必要性がある。正確な遺伝情報の継代は、細胞の機能を維持する上で必須のプロセスである。また、個体レベルにおいても、細胞分裂の際に、母細胞から娘細胞に正確に遺伝情報を継代させるためには、遺伝物質であるDNAを正確に複製することが種の保存という観点から重要な命題となる。

フランシス・クリック (Francis Harry Compton Crick) によって1958年に提唱されたセントラルドグマが広く受け入れられているように、DNAはDNAの複製によってのみ増えていくことが知られている。DNA複製は、鋳型DNAをもとにし、DNAポリメラーゼにより、ワトソン・クリック型の塩基対合規則に従って新しいDNA鎖が合成されていく。通常、DNA複製は複製型DNAポリメラーゼによってDNA合成が行われる。複製型DNAポリメラーゼは、高い正確さ（フィデリティー）と連続的に重合する機能（プロセスィビティー）を有すると同時に、鋳型DNAに対応しない間違っただ塩基対合が生じた場合に、それを除去する校正機能を有している(Scheuermann et al 1984,, Kornberg, A. and Baker et al 1992)。複製型DNAポリメラーゼの働きにより、生物は正確かつ連続的なDNA合成が行われ、世代を越えた正確な遺伝情報の伝達を可能としている。

### 1-2)突然変異による不正確な遺伝情報の伝達

ヒトから細菌まで、全ての生物において、自己の遺伝情報を分子レベル、染色体レベルで正確に維持するために数々の分子機構が細胞内に存在している。それらの分子機構の働きにより、比較的短期的な期間（世代数）において、遺伝情報は非常に高い正確さが保証されている。しかし、稀に、これらの機構によって修復されなかったDNAの変化が固定されることにより、自然突然変異が生じる。突然変異による遺伝情報の変化によって、表現型形質に変化が生じると、発癌、発生異常などの原因となることが知られている。ヒトのp53は特異的DNA結合能をもつ転写因子であり、ガン抑制遺伝子として知られている。p53に変異が生じ、その機能に異常が生じると、細胞が異常な増殖をすることが示されている。また、遺伝情報の変化が固定されて子孫に継代されることにより遺伝性の疾患の原因となることも示されている。ヒトの遺伝病である色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum:XP) やコケイン症候群(Cockayne syndrome:CS)は責任遺伝子の変異が

塩基配列レベルで同定され、遺伝子レベルでの解析によりその全容が明らかにされつつある(Masutani et al., 1999; Johnson et al., 1999; Yuasa et al., 2000)。

自然突然変異の発生は、個体、およびその系統の機能が大きく失われる要因にもなりうる。しかし、もし仮に、遺伝情報が全く変化しない、つまりワトソン・クリック型の塩基対合規則の変化が全く存在しないと仮定した場合はどうなるであろうか。個体レベル、および比較的短期的な期間の世代においては、発癌、発生異常、遺伝病などが生じなくなるため、大きな利益となるかもしれない。しかし、遺伝情報の完全な普遍性は、長い地質年代が示してきたように、温度や大気などの環境要因が大きなレベルで変化した場合に必要な「生物の多様性、および環境適応性」が、全く得られないことを意味する。それどころか地球上の全ての生物は、30億年以上前に現れた初期の生物の姿のままであったであろう。現在、地球上に多様な生物種が存在することは、自然突然変異が利益と不利益の両方を与える役割を担っており、それは自己増殖と進化において、適切なレベルに制御されていると解することができる。後述する生物の持つ自然突然変異の抑制機構が、自然突然変異、および前変異損傷（DNAポリメラーゼの複製エラー、および紫外線や活性酸素などによって生じる自然DNA損傷）を極めて高い精度で除去していることが知られているが、細胞内に幾重にも張り巡らされた、自然突然変異の抑制機構をかいくぐってきた突然変異の発生頻度は、短期的には種を安定に維持するが、長期的には種の多様性を獲得する微妙なバランスを得ることができるものとなるのであろう。したがって、自然突然変異は、ゲノムの不安定性を引き起こすが、新たな形質獲得の可能性を与えることにより進化の原動力となっていると解することができる。

このように、自然突然変異の発生のメカニズムを明らかにすることは、遺伝病、発癌などにおける発生メカニズムの解明に大きく貢献するだけでなく、生物の進化の原動力のメカニズムを解明する上でも大きく貢献できると考えられる。

## 2、自然突然変異の発生と抑制の分子機構

放射線や化学変異原による人工的な誘発変異であれ、自然突然変異であれ、変異発生のプロセスはまず、DNA上に前変異損傷(premutagenic lesion)が生じ、DNA複製がその損傷部位を通過する課程で変異に固定されて完結する(真木., 2001)。

自然突然変異の発生率は、DNA複製の回数に依存することから自然突然変異の原因となる前変異損傷は、細胞に内在する要因によって生じることが予想されていた。つまり、

DNAポリメラーゼが稀に生じる複製エラー、および自然DNA損傷などの前変異損傷が主要な発生要因となって自然突然変異が引き起こされると考えられていた。In vitro DNA合成系における解析から、DNAポリメラーゼ自身の複製エラーの発生頻度は約 $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ /塩基対/複製と推定されている(Sloane et al., 1988)。しかし、実際の細胞における自然突然変異の発生頻度は $10^{-9}$ ~ $10^{-11}$ /塩基対/細胞分裂という極めて低いレベルに保たれている。これは、細胞内に幾重にも張り巡らされた自然突然変異の抑制機構が、効率よく複製エラーや自然DNA損傷を修復しているためと考えられている(Sheuermann et al., 1984; Brenowitz et al., 1991)。通常の細胞分裂時にDNA合成を行う複製型DNAポリメラーゼが生じた複製エラーは、複製型DNAポリメラーゼ自身のもつ3'→5'エキソヌクレアーゼによる校正機能、およびミスマッチ修復機構によって高い精度で除去される。校正機能はDNA複製中に生じたミスペアを極めて高い効率で除去していき、校正機能によって修復できなかったミスペアについても、ミスマッチ修復機構が、鋳型鎖と新生鎖を認識し、DNAポリメラーゼが間違っって挿入した新生鎖塩基を特異的に除去していく(Brenowitz et al., 1991; Friedberg et al., 1995; 梅津., 1994)。このように複製エラーは、二重の修復系によって極めて高い効率で抑制されている。

また、自然DNA損傷についても、細胞内の抑制機構によって除去されている。自然DNA損傷は、紫外線や生物自身の呼吸によって生じる活性酸素などによって生じていることが示されている。主に大腸菌などのミューテーター変異株による解析から、細胞には紫外線などによって生じたピリミジンダイマーなどを効率よく除去するヌクレオチド除去修復(Nucleotide excision repair:NER)や、グアニンが酸化されて生じる8-オキシグアニンを除去する塩基除去修復(Base excision repair:BER)などの自然DNA損傷を修復する機構が存在することが明らかにされている(Duncan et al., 1980; Hanawalt et al., 1993)。また、酸化されたヌクレオチドプール(自然ヌクレオチド損傷)を浄化するMutTなどの修復系タンパクも見出されており(Maki., 1992)、複製エラーと同様に自然DNA損傷も幾重に張り巡らされた修復機構が存在することが示されている(図1.1)。

複製エラーを特異的に修復する校正機能やミスマッチ修復機能を欠損させたミューテーター変異株の解析から、複製エラーの自然突然変異への関与の度合いが明らかになりつつある(蟹江., 2001)。しかし、近年、自然DNA損傷や自然ヌクレオチド損傷を修復除去する機構の解析から、自然突然変異の発生要因として、自然DNA損傷や自然ヌクレオチド損傷がきわめて重要な原因であることが示されている(Sakai et al., 2006; 沙魚川., 未発表)。

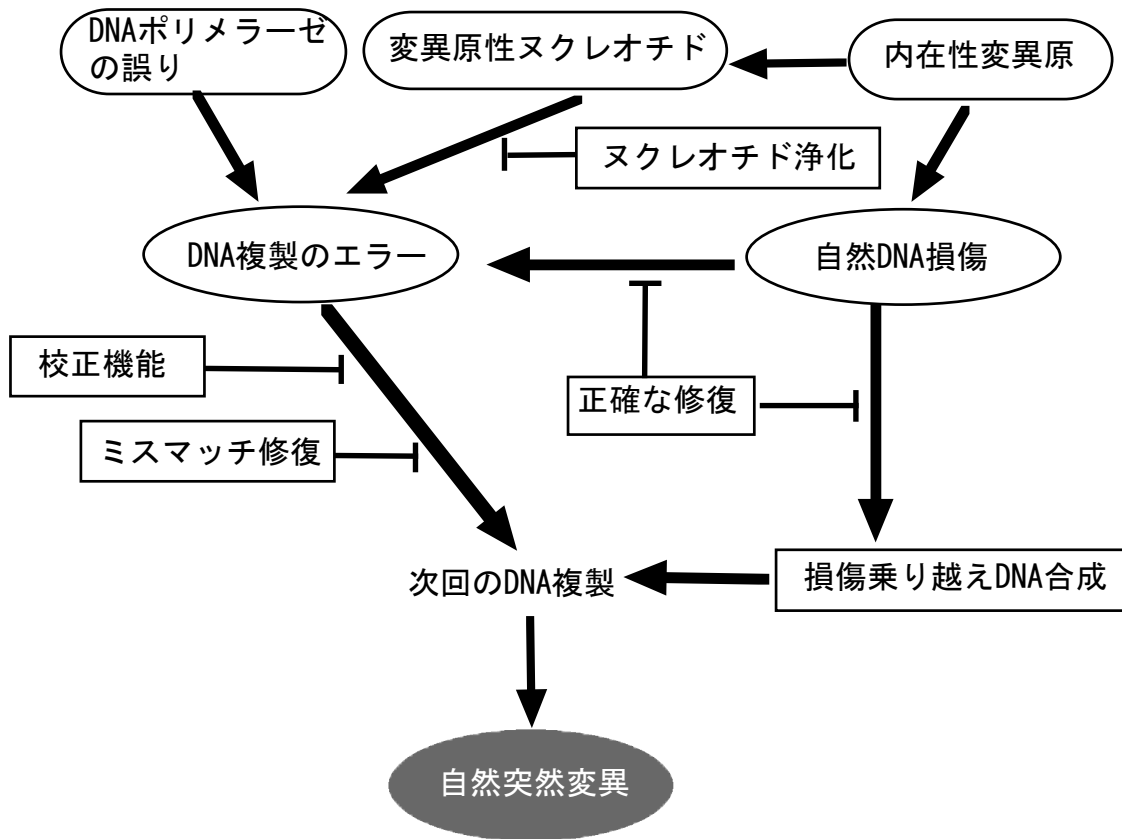


図1.1 自然突然変異の発生と抑制の分子機構

### 3、自然DNA損傷から細胞を守る機構

細胞は内的、および外的な要因によって、DNAに対し常に損傷を受けている (Kunkel., 1999)。外的要因とは、太陽光中に含まれる紫外線や環境中の化学物質などであり、かつては自然突然変異の主たる発生要因として考えられていた。しかし、近年、細胞の呼吸によって生じる活性酸素などによってDNAは常に損傷を受けているとの報告

があり、内在的な要因によって引き起こされるDNA損傷も重要視されてきている(Sakai et al., 2006)。これらのDNA損傷の多くは転写やDNA複製を阻害することが知られている。上述した全変異損傷の内、DNA複製のエラーとして、鋳型塩基に対し間違っただ塩基を挿入する塩基置換などは、場合によっては遺伝情報の変化を生じないケースもあり、必ずしも細胞死に直結しない。

しかし、鋳型DNA上に生じたDNA損傷の中には、複製フォーク阻害を引き起こすものもある。また、転写鋳型DNA上のDNA損傷によって、RNAポリメラーゼの進行が阻害されれば、RNA合成が妨げられる。これらの複製や転写の阻害は、細胞死に直結するため、生物にとって必ず回避をしなければならない重要な障害となる。そのため、生物は進化の過程において、DNA損傷から生体を守り、自己の細胞の死を回避すると同時に次世代に自己の遺伝情報を伝えるため、DNA複製を完了させるための機構を獲得してきた。DNA損傷によって複製フォークが停止した場合、互いに相同な二つのDNA分子間でDNAが組換わる反応は、細菌からヒトまで広く確認されている。この相同組換えの性質を用いて、多くのDNA損傷が正常な塩基配列との間で組換え修復される(岩崎、品川 2001)。また、DNA損傷による転写の阻害に関しては、転写と共役した修復(Transcription-coupled repair:TCR)が細菌からヒトまで、広く存在しており、NERがRNAポリメラーゼが行っている転写領域に存在するDNA損傷を優先的に除去、修復することが知られている(Bohr., 1985; Mellon., 1987)。

DNA複製においては転写の阻害を解消するTCRと異なり、損傷を乗り越えてDNA複製を継続させる「損傷乗り越えDNA合成」が広く原核生物から高等真核生物まで知られている (Johnson., 1999; Napolitano., 2000; Tang et al., 2001)。損傷乗り越えDNA合成を担う損傷乗り越え型DNAポリメラーゼは、通常の生育環境下で行われるDNA合成を担うプロセッシビティが高い複製型DNAポリメラーゼとは異なり、一般的にプロセッシビティが低く、3'→5'エキソヌクレアーゼによる校正機能などを持たないものが見出されている。これらの損傷乗り越え型DNAポリメラーゼが、DNA損傷によって阻害されたDNA複製を、損傷を乗り越えてひとまず完了させてしまうという機構である。In vitroにおける数々の解析から、損傷乗り越え型DNAポリメラーゼは、DNA鎖上の損傷を乗り越えることができる反面、鋳型DNA鎖に対し、相補的でない間違っただ塩基を挿入することが見出されており、突然変異を誘発する可能性が示唆されている(Tang et al., 2001)。また、鋳型DNA鎖上に損傷がない場合においても、複製型DNAポリメラーゼに比べ、相補的でない間違っただ塩基を挿入しやすいことが知られている(Wood et al., 1984)。特に、大腸菌においては、UVなどの強照射によって、鋳型DNA鎖上に損傷が生

じるとSOS応答と呼ばれるDNA修復関連遺伝子 (SOS gene)が強発現する細胞応答機構が存在している。大腸菌において、損傷乗り越え型DNAポリメラーゼをコードする遺伝子はSOS geneであることが知られており、突然変異の発生における関与が注目されている。

#### 4、大腸菌染色体*rpsL*検出系

*rpsL*遺伝子はリボソームのサブユニットの1つであるS12タンパクをコードしており、野生型の*rpsL*遺伝子を持つ細胞は抗生物質であるストレプトマイシン (Sm) に対し感受性を示す。*rpsL*遺伝子のSm感受性 (Sm<sup>s</sup>) は*rpsL*のミスセンス変異によるSm耐性 (Sm<sup>r</sup>) に対し優性である。従って、Sm<sup>r</sup>を指標にして*rpsL*遺伝子に変異を持つ細胞を選択でき、*rpsL*遺伝子を部分二倍体にすることにより上述したように極めて低頻度で発生する突然変異を検出することが可能である。

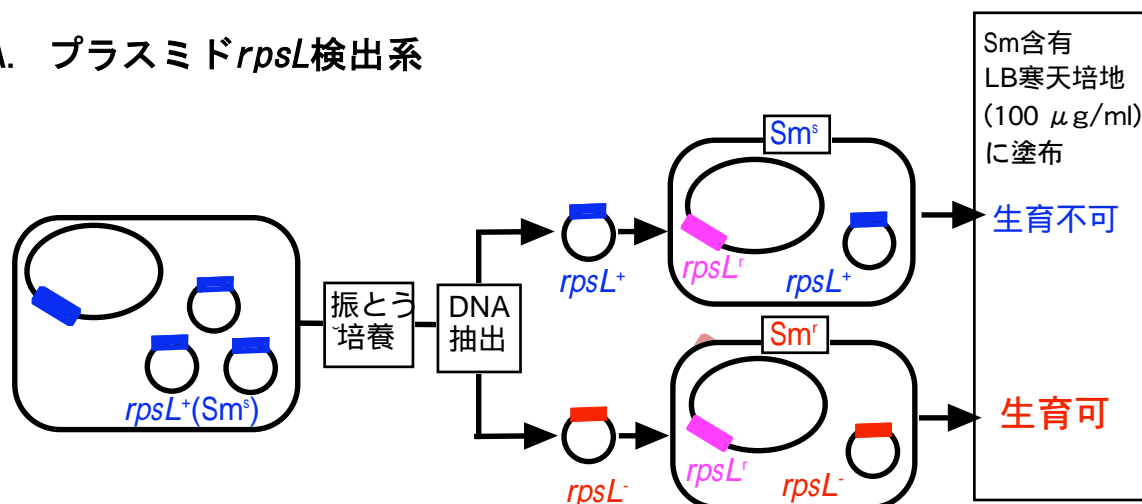
これまで当研究室では、プラスミド上に*rpsL*標的遺伝子を配置し、生じた変異を検出してきた(図1.2A)。しかし、プラスミドは染色体とでは、複製様式が異なる点、修復の効率やタイミングが異なる点などの相違点が考えられる。そのため、変異の発生頻度、発生部位に違いを生じている可能性が考えられる。そこで、当研究室の川野 (1998)、五十川 (1999) は染色体上にSm<sup>s</sup>とSm<sup>r</sup>の*rpsL*遺伝子を1つずつ、2コピー持つ部分二倍体株を作製し、*rpsL*検出系による変異の検出を試みた (図1.2B)。しかし、*recA*変異の導入により、Smの抵抗性が異常に上昇し、5 mg/mlという通常の50倍のSmを含む寒天培地上で*rpsL*遺伝子に変異を持つ細胞を特異的に選択することが困難であるという問題点が明らかになった。そこで、本研究ではゲノムプロジェクトで用いられたMG1655由来の菌株を用いて、*rpsL*部分二倍体株を作製し、染色体上に生じる自然突然変異の特異性を明らかにすることを目指した。MG1655株を用いた結果、プラスミド*rpsL*系で用いられていたSm濃度である100 μg/mlという通常の濃度で、突然変異を持つ細胞の選択が可能となり、以後、この菌株を大腸菌染色体*rpsL*系野生型株とした。

これまでの自然突然変異の研究では、プラスミド上に復帰変異を導入した標的遺伝子を用いた解析が主流であった(樋口., 1997、Yoshiyama., 2003)。しかし、本研究では、染色体上に導入した*rpsL*標的遺伝子を用いて前進突然変異を検出することができる。また、染色体*rpsL*前進突然変異検出系では、染色体上に配置されている2つの*rpsL*遺伝子間で2塩基の違いが存在しており、プラスミド検出系と異なり、2つの遺伝子間で生じた相同組換えが検出することができる。自然突然変異は制御機構は生物にとって基本的なメカニズムであり、普遍的な部分が多い。よって、本研究は高等生物を含めた生物種全般の自



然突然変異の発生、修復機構を明らかにするために大きな意味を持つと考えられる。

### A. プラスミド *rpsL* 検出系



### B. 染色体 *rpsL* 検出系

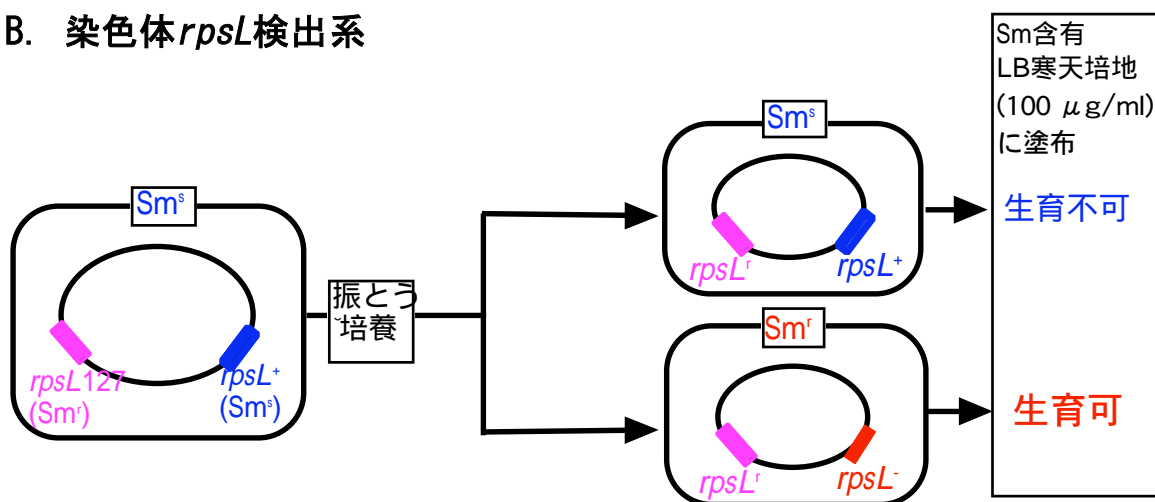


図1.2 *rpsL* 遺伝子を標的とした2種類の前進突然変異検出系

大腸菌の *rpsL* 遺伝子は、リボソームタンパク質をコードする必須遺伝子であり、野生型の *rpsL* 遺伝子を持つ細胞はストレプトマイシン感受性を示す ( $Sm^s$ )。 *rpsL127* ( $Sm^r$ ) と *rpsL^+* ( $Sm^s$ ) の2種類の遺伝子が同一細胞内に存在すると表現型形質は  $Sm^s$  となる。従って、 *rpsL* 標的遺伝子に変異が生じ、その機能が欠損した場合に  $Sm$  含有 LB 寒天培地で選択が可能となる。図中では、大腸菌の染色体DNAを楕円形、プラスミドDNAを円形で表した。 *rpsL* 遺伝子に関しては、野生型を青色、変異型を赤色あるいは緋色の長方形で表示した。

A. 標的 *rpsL* 遺伝子がプラスミド上に存在する *rpsL* 検出系の概要。 *rpsL* 標的遺伝子 (*rpsL*<sup>+</sup>) が複製フォークに対して順向きに配置されたプラスミド pMOL21 (マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を持つ) を調べたい菌株に導入し、一夜培養後、プラスミドDNAをアルカリ-SDS法で抽出した。この中から *rpsL* 遺伝子に変異を持つプラスミドを選択するために、染色体上の *rpsL* 遺伝子がすでに  $Sm^r$  に変化している変異検出用の大腸菌にプラスミドDNAを導入し、アンピシリンとストレプトマイシンの存在下で生育できる細胞を選択した。

B. 標的 *rpsL* 遺伝子が染色体上に存在する *rpsL* 検出系の概要。染色体上の *rpsL* 遺伝子がすでに  $Sm^r$  に変化している大腸菌に、野生型の *rpsL* 遺伝子とアンピシリン耐性マーカーを *cysJH* オペロン内に挿入した、 *rpsL* 部分二倍体細胞を材料とした。プラスミド *rpsL* 系と同様の原理で、アンピシリンとストレプトマイシンの存在下で *rpsL* 標的遺伝子上に変異が生じた大腸菌を選択することができる。

## 5、本研究の目的

本研究では大腸菌染色体*rpsL*前進突然変異検出系を用いて、野生型大腸菌の染色体上で生じる自然突然変異の特異性、およびその発生メカニズムを明らかにすることを目的とした。図1.1に示したように自然突然変異の発生要因として大きく注目されている複製型DNAポリメラーゼの複製エラー、および損傷乗り越えDNA合成を行う損傷乗り越え型DNAポリメラーゼが誘発する突然変異に注目し、自然突然変異の発生への関与を明らかにすることを目的とした。損傷乗り越え型DNAポリメラーゼは大腸菌からヒトまで、広く存在し、また、DNA損傷の種類によって、異なる乗り越えの能力を持つ複数の損傷乗り越え型DNAポリメラーゼが見出されている。In vitroにおける数々の解析の結果、損傷乗り越えDNA合成による突然変異誘発の詳細が明らかにされつつある。しかし、In vivoにおける自然突然変異の発生における損傷乗り越えDNA合成の関与はほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では簡便に遺伝子操作が行える大腸菌細胞を用い、様々な種類の突然変異を検出できる*rpsL*前進突然変異検出系を用いて、TLSの自然突然変異の発生への関与、および複製エラーへの関与を明らかにすることを目的とした。

## 第二部 自然突然変異の発生における複製エラーの関与について

### 第一章 序論

自然突然変異の発生には、細胞の内在的要因が大きく関与していることが明らかにされつつある(真木., 1997)。自然突然変異の発生において、細胞内で修復される前の変異である前変異損傷は複製エラーと自然DNA損傷の二つに大別される(図1.1)。その中でも大きな要因と考えられていたのはDNAポリメラーゼがDNA複製を行う際に生じる誤り、複製エラーと考えられていた。複製エラーを特異的に修復する校正機能、およびミスマッチ修復機構を欠損させたミューテーター変異株では自然突然変異頻度が極めて高いレベルに上昇するからである(真木., 2001)。In vitro DNA複製系の研究からDNA複製酵素であるDNAポリメラーゼ自身は約 $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ /塩基対/複製の発生頻度で塩基のミスペアを形成するといわれている(Sloane., 1988)。また、1塩基フレームシフト変異を引き起こすスリッページエラーも同レベルで起きていることが示された(Fujii *et al.*, 1999)。しかし、実際の細胞内から自然突然変異が検出される頻度は $10^{-9}$ ~ $10^{-10}$ /塩基対/細胞分裂程度であり、極めて低頻度に抑えられていることが示されている。

大腸菌の複製型DNAポリメラーゼであるDNAポリメラーゼIII(Pol III)ホロ酵素自身が持つεサブユニットは校正機能を担い、ミスペアや1塩基フレームシフトを認識して、前変異損傷である複製エラーの99~99.9%を修復する。また、ミスマッチ修復は校正機能が修復しきれなかった1塩基のミスペアや1塩基フレームシフト、4塩基までのループ構造を修復する(Freidberg *et al.*, 1995; 梅津., 1994)。大腸菌のミスマッチ修復機構は、1)ミスマッチの認識、2)新生鎖の切断、3)新生鎖の消化、4)DNA修復合成のステップで進行する(図2.1)。1~4塩基のミスペア、およびループ構造である標的に対し、MutSが結合する。ミスペア部位に結合したMutSにMutLが結合して複合体を形成し、そのミスマッチ結合活性を高める。近傍に存在するDamメチラーゼの認識配列(GATC)に結合したMutHと相互作用する。MutS-MutL複合体はMutHと結合し、MutHのエンドヌクレアーゼ活性で、メチル化されていない方のDNA鎖を新生鎖とみなして切断する。その後、DNAヘリケースII、エキソヌクレアーゼ(ExoI、ExoVII、RecJ)が協調的に働き、ミスペアをこえる部分まで新生鎖を除去し、DNAポリメラーゼIIIとDNAリガーゼが作用して修復が完了する(Lahue., 1989; 真木 等., 1996; Jiricny *et al.*, 1998)。また、プラスミド上標的遺伝子を用いた解析から、ミスマッチ修復機構は塩基置換や1塩基フレームシフトだけでなく、2~数塩基の短い配列置換変異の発生も抑制していることが示唆されている(Yoshiyama., 2003)。配列置換変異はもともとの配列が異なった配列に変化する変異であり、Pol IIIがテンプレートスイッチングすることにより生じる特殊な複製エラーと考えられている。ミスマッチ修復機構は数塩基の短い領域では、様々なタイプの複製エラーを抑制していると考えられている。

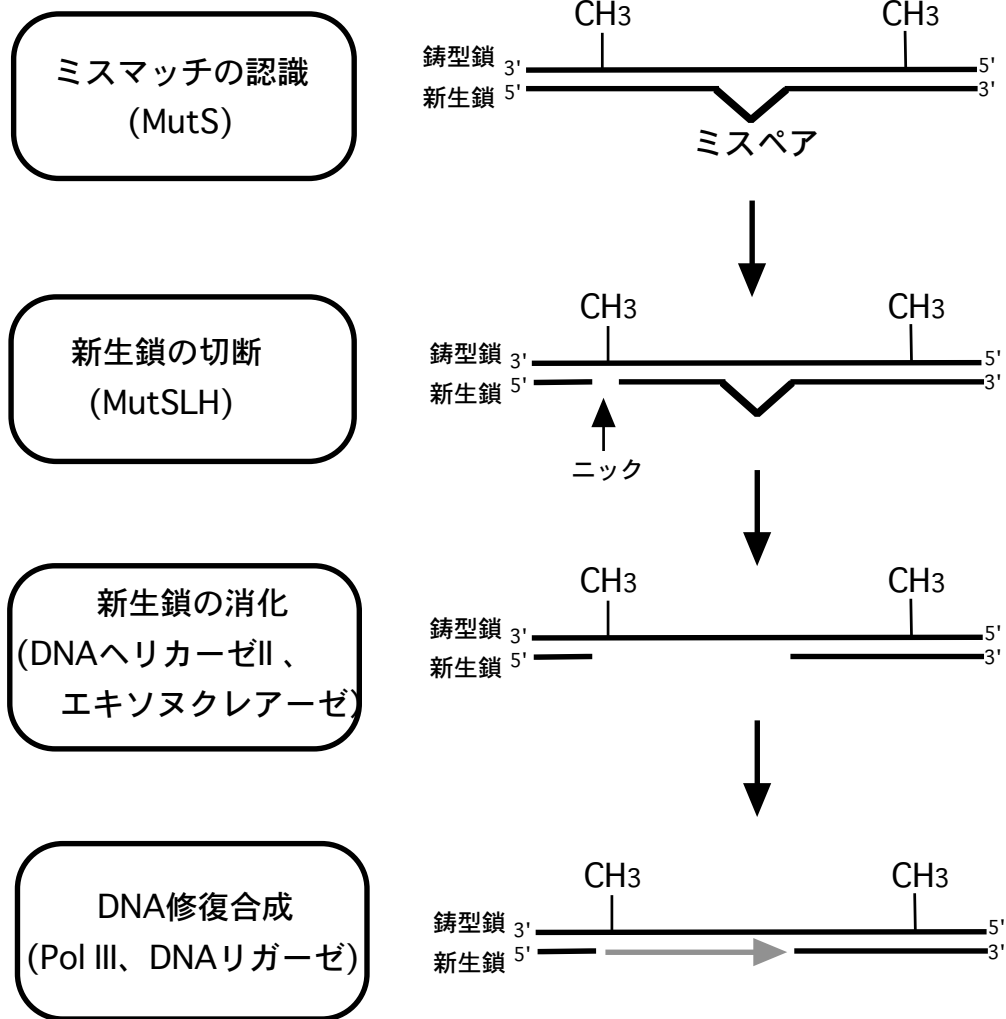


図2.1 大腸菌におけるミスマッチ修復機構

上述したように、DNAポリメラーゼ自身が引き起こす複製エラーは、ある程度の頻度で発生しているが、DNAポリメラーゼ自身の校正機能、およびミスマッチ修復機構によって極めて低頻度に抑えられている。しかし、細胞内に二重の修復機構が存在しても、修復し

きれなかった複製エラーがある可能性も否定できない。そこで本研究では、様々なタイプの前進突然変異を検出できる染色体上に配置した*rpsL*標的遺伝子を用いて、1)野生型大腸菌において、自然突然変異の発生パターンの解析を行うこと、2)ミスマッチ修復欠損株 (*mutS*変異株) を作製し、Pol IIIにおける複製エラーの発生パターンを明らかにし、野生型大腸菌における自然突然変異の発生パターンとの比較を行うことを目的とした。

## 第二部 自然突然変異の発生における複製エラーの関与について

### 第二章 結果と考察

#### 1、プラスミド*rpsL*系と染色体*rpsL*系の前進突然変異頻度の比較

本研究では大腸菌染色体上で生じる自然突然変異の特異性を明らかにするために、染色体に挿入した第二の*rpsL*遺伝子を標的遺伝子として用いて、塩基配列レベルでの解析を目指した。当研究室の川野（1997）および五十川（1998）も同様の目的で解析を進めていたが、彼らが用いた菌株では、Sm抵抗性が異常上昇し、さらに*recA*変異を細胞に導入した場合には*rpsL*遺伝子に異常が見られない大腸菌が5 mg/mlという高濃度でも生育可能になるという結果が生じた。この結果から、川野（1997）、五十川（1998）らが用いた系統の菌株では、染色体上に生じる*rpsL*前進突然変異を検出するのは困難であることが明らかとなった。その後、当研究室では、川野（1997）、五十川（1998）らが用いた菌株とは異なる菌株を用い前進突然変異検出を試みた。大腸菌K12株の標準としてゲノムプロジェクトで用いられたMG1655由来の野生型菌株の染色体上に*rpsL*標的遺伝子を配置し、*rpsL*前進突然変異の検出について検討が加えられた。その結果、この菌株では100  $\mu$ g/mlという低濃度でSm耐性株を用意に且つ明瞭に選択することができ、全体の突然変異頻度を測定することが可能であることが判明した（愿山,沼田,真木., 未発表）。

*rpsL*前進突然変異頻度を測定する際、MG1655の染色体*cysJIIH*に*rpsL*標的遺伝子を挿入した*rpsL*部分二倍体株MK811を野生株として用いた(表5.1)。また、複製エラーの発生頻度、及び発生部位の特異性を明らかにするために、ミスマッチ修復機構を欠損させる目的で、*mutS*変異株を用いた(表5.1)。*rpsL*標的遺伝子上に生じた*rpsL*前進突然変異頻度を表2.1に示した。本研究で用いた染色体*rpsL*系と当研究室で用いられてきたプラスミド*rpsL*系との比較のため、*rpsL*標的遺伝子を複製方向に対して順向きに配置したプラスミドにおける結果も、表2.1-Bにあわせて記載した(図1.2;青木., 未発表; 斉藤., 未発表; 愿山., 1997)。

野生株の細胞を用いた場合、*rpsL*標的遺伝子上での全体の突然変異頻度は、染色体*rpsL*系（MK811）では $0.42 \times 10^{-6}$ 、プラスミド*rpsL*系（MK426/pMOL21）では $1.5 \times 10^{-6}$ であり、染色体*rpsL*系での変異頻度が若干高いか、ほぼ同程度であることが示された。また、ミスマッチ修復欠損株である*mutS*変異株における変異頻度は染色体*rpsL*系（MK1381）では $32 \times 10^{-6}$ 、プラスミド*rpsL*系(MK511/pMOL21) では $37 \times 10^{-6}$ であり、ほぼ同程度の値であった。プラスミド*rpsL*系では、野生株に比べ*mutS*変異株では、

*rpsL*前進突然変異頻度が約76倍に上昇しており、染色体*rpsL*系では、37倍に上昇していた（表2.1）。プラスミド*rpsL*系と染色体*rpsL*系では、野生株と*mutS*変異株の上昇率は3倍程度の差しかなかった。*rpsL*前進突然変異検出系は様々なタイプの変異を検出できる実験系であるが、低頻度で発生した突然変異を塩基配列レベルで決定する必要があるため、大量実験区の解析が困難である（表5.1）。また、突然変異は発生に偶然性も関与する場合もあること、培養中は複数世代の細胞分裂があり、突然変異の生じた世代が分裂世代を1つでも早かった場合、大きな変異頻度の差が生じることから、同一の遺伝子型を有する菌株ですらも、各実験区で測定された変異頻度にある程度の差が生じる。これらの事情を考慮し、*rpsL*前進突然変異検出系では、各変異株で数倍程度の変異頻度の差に有意差を見いだすことはできない。したがって、表2.1に示した結果は、プラスミド*rpsL*系、染色体*rpsL*系ともに、野生株とミスマッチ修復欠損株では、大きな差は見いだされないと考えられる。ミスマッチ修復機構は野生型DNAポリメラーゼが引き起こす複製エラーをプラスミド上、染色体上ともに同程度の効率で抑制していることが示唆された。



表2.1. 染色体上とプラスミド上の*rpsL*標的遺伝子における  
前進突然変異頻度の比較

A. 染色体*rpsL*系での*rpsL*<sup>-</sup>前進突然変異頻度

菌株	変異頻度 ×10 <sup>-6</sup>	
	MK811 野生株	MK1381 <i>mutS</i> 変異株
	0.42 (1)	32 (76)

B. プラスミド*rpsL*系での*rpsL*<sup>-</sup>前進突然変異頻度

菌株	変異頻度 ×10 <sup>-6</sup>	
	MK426/pMOL21 野生株	MK511/pMOL21 <i>mutS</i> 変異株
	1.5 (1)	37 (25)

A. 染色体上に配置した*rpsL*標的遺伝子における前進突然変異頻度（当研究）。野生株（MK811）、および*mutS*変異株（MK1381）については独立した5実験区を用いて、その平均を示した。より詳細なデータに関しては、付録表Xを参照のこと。括弧の中の数値は野生株（MK811）の変異頻度を1とした時の相対値である。

B. プラスミドpMOL21上に配置した*rpsL*標的遺伝子における前進突然変異頻度（Fujii *et al.*, 1999、上向, 1999および真木, 未発表データより抜粋）。pMOL21は複製フォークに*rpsL*標的遺伝子が順向きに配置されているプラスミドである。各菌株ともに独立した6実験区を用い、その平均を示した。括弧の中の数値は野生株（MK426/pMOL21）の変異頻度を1とした時の相対値である。

## 2、染色体*rpsL*前進突然変異検出系における自然突然変異と複製エラーの特異性

大腸菌染色体上に配置した*rpsL*標的遺伝子上で生じている自然突然変異、および複製エラーの特異性を明らかにする目的で塩基配列レベルでの前進突然変異の詳細な解析を行った。解析には自然突然変異の特異性を明らかにする目的で野生株を、複製エラーの特異性を明らかにする目的でミスマッチ修復機構が欠損している*mutS*変異株を用いた。*rpsL*前進突然変異の測定には野生株において、独立した5実験区、*mutS*変異株には独立した9実験区を用い、Sm耐性株の中から、野生株においては各実験区240検体、*mutS*変異株においては各実験区96検体ずつ任意に選出した細胞からDNAを抽出し、PCR法によって*rpsL*標的遺伝子を増幅し、塩基配列を決定した。表2.2Aに示したように、*rpsL*前進突然変異頻度は野生株において、 $0.42 \times 10^{-6}$ 、*mutS*変異株においては $32 \times 10^{-6}$ であり、野生株比べて、約76倍の上昇示された。この結果から、大腸菌染色体上においてもミスマッチ修復機構が複製エラーを極めて高い効率で修復しており、およそ1/100までに減少させていることが示唆された。以下に大腸菌染色体上における塩基配列レベルで決定した自然突然変異、および複製エラーの特異性を述べる。

### 2.1 染色体*rpsL*系を用いた野生株における前進突然変異の特異性

#### a) 塩基置換

塩基置換はトランジション型 (transision) 塩基置換とトランスバージョン型 (transversion) 塩基置換に分けられる。トランジション型塩基置換は、プリミジンが別のピリミジンに、あるいはプリンが別のプリンに置換されたものである。つまり、ATペアがGCペアに置換され、またその逆も起こりえる。トランスバージョン型塩基置換はプリンがピリミジンに、ピリミジンがプリンに置換される塩基置換である。つまり、ATペアがTAペアまたはCGペアに、GCペアがTAペアまたはCGペアに置換される。点突然変異である塩基置換は、Pol IIIによる複製エラーをサブユニットのひとつである  $\epsilon$  サブユニットが担う校正機能によって修復され、校正機能によって修復されなかった塩基置換はミスマッチ修復機構によってさらに修復される。

野生株における組換え型以外の変異で、最も発生頻度が高かった変異が、塩基置換であった。染色体*rpsL*系の野生株において塩基置換の発生頻度は $0.21 \times 10^{-6}$ であり、*rpsL*前進突然変異頻度の50%を占めていた (表2.2A)。染色体*rpsL*系で見いだされる塩基置換のうち開始コドンから82番目のCがAに置換される変異と開始コドンから245番目のTがA、もしくはGに置換される変異が塩基置換変異の発生頻度の約52%を占めており、高頻

度に検出された。これらの塩基置換変異を本研究では塩基置換のhotspot部位とした

(82C→A部位、245T→A部位、245T→G部位) (表2.2AB、図2.3B)。82C→A部位の発生頻度は $0.17 \times 10^{-6}$ 、245T→A部位の発生頻度は $0.077 \times 10^{-6}$ 、245T→G部位の発生頻度は $0.013 \times 10^{-6}$ であり245T→A部位の発生頻度が最も高かった。hotspot部位の発生頻度の合計は $0.11 \times 10^{-6}$ であった。hotspot部位以外の塩基置換において、トランジション型塩基置換の発生頻度が $0.064 \times 10^{-6}$ 、トランスバージョン型塩基置換の発生頻度は $0.039 \times 10^{-6}$ であり、発生頻度に大きな違いはみられなかった(表2.2C)。

野生株における変異の特異性は自然突然変異の特異性を表していると考えられる。完全なDNA修復系を有する野生株において、幾重にも張り巡らされたDNA修復によって修復されなかった突然変異が自然突然変異として、染色体上に固定されるからである。野生株の変異スペクトラム解析から、大腸菌染色体上で見いだされる自然突然変異は塩基置換が最も多く、その多くがホットスポット部位に集中していることが見いだされた。この結果から、塩基置換のホットスポット部位は、複製エラーや酸化損傷などを部位特異的に高頻度に発生させる部位であるか、もしくは修復系タンパクが結合しにくく、DNA修復が完全に機能しない部位である可能性が考えられる。

## b)1塩基フレームシフト

染色体*rpsL*前進突然変異検出系野生株において、1塩基フレームシフトも見いだされた。1塩基フレームシフトは、1塩基の挿入、欠失が生じて*rpsL*標的遺伝子の機能が欠損する変異である。1塩基フレームシフトの発生頻度は $0.030 \times 10^{-6}$ であり、野生株の前進突然変異頻度の7.1%を占めており、塩基置換、組換え型変異、欠失について4番目に高い発生頻度であった(表2.2A)。1塩基の挿入は $0.0055 \times 10^{-6}$ の発生頻度で検出され、1塩基の欠失は $0.025 \times 10^{-6}$ で検出された。1塩基フレームシフトの発生頻度は1塩基の挿入に比べ欠失が4.5倍高く、野生株の1塩基フレームシフトは1塩基の挿入よりも欠失の方が高頻度で発生していることが示された(表2.2B)。*rpsL*標的遺伝子上で検出された1塩基フレームシフトはrun(同じ塩基が2つ以上並んだ部位)とrun以外(同じ塩基が2つ以上並んでいない部位)に分け、部位特異的発生頻度を解析した。その結果、1塩基の挿入において、runでの発生頻度は $0.0049 \times 10^{-6}$ 、run以外での発生頻度は $0.00059 \times 10^{-6}$ あり、run上での発生頻度が89%を占めていた。また、1塩基の欠失において、runでの発生頻度は $0.018 \times 10^{-6}$ 、run以外での発生頻度は $0.0068 \times 10^{-6}$ あり、run上での発生頻度が72%を占めていた。1塩基の挿入と欠失とも、run上の検出が大部分であったが、野生株においてrun以外での部位で1塩基フレームシフトがある程度の頻度で検出されることが

示された。

run配列とnon-run配列上での1塩基フレームシフトの発生頻度は、run配列の方がnon-run配列に比べて、挿入、欠失ともに発生頻度が高い。しかし、発生部位の比較を行うと、1塩基の挿入は、開始コドンから127番目のAが6つ並んだ部位に集中して見いだされたのに対し、1塩基の欠失は、non-run配列上にランダムな発生が見いだされている(図2.3A)。run配列上で発生する1塩基フレームシフトは、複製エラーとして生じた1塩基フレームシフトが校正機能によって除去され、新生鎖が鋳型鎖に再度結合する際、誤った結合をして、1塩基フレームシフトが生じるmelting modelが提唱されている(Brenwitz et al., 1991)。melting modelは再結合するときには新生鎖末端の塩基が、塩基対合規則によって結合する塩基でなければならないため、同一の塩基が並ぶrun配列上で1塩基フレームシフトが生じやすいことを示唆している。しかし、本研究で見いだされたnon-run配列上で見いだされた1塩基の欠失は、melting modelでは説明できない。この結果から、複数部位で見いだされた野性株におけるnon-run配列上での1塩基の欠失は、複製エラー以外の発生要因、たとえば酸化損傷などの自然DNA損傷が関与していることが考えられる。

### c) 組換え型変異(アリル間組換え)

本研究で用いた染色体*rpsL*系においては、遺伝的組換えの結果生じる組換え型変異が検出される(図2.2)。本研究で用いている大腸菌株は染色体上に*rpsL*遺伝子が2つ配置された*rpsL*部分2倍体株を解析に用いている。*rpsL127*(変異型*rpsL*遺伝子、Sm<sup>r</sup>)と*rpsL+*(野生型*rpsL*遺伝子(標的遺伝子)、Sm<sup>s</sup>)の間では2塩基の違いが存在するので、2つの*rpsL*遺伝子間で、図2.2のように遺伝的組換えが生じると*rpsL*標的遺伝子上で、1塩基(開始コドンから128番目のAがCに置換する)、もしくは2塩基(開始コドンから-22番目の塩基がGがAに128番目のAがCに置換する)の塩基置換が検出される(128番目のAがCに置換することによって*rpsL*標的遺伝子の機能欠損を生じる)。1塩基の組換えと2塩基の組換えは、組換え反応の際の鎖交換反応の長さによって生じる差異であると考えられる。本研究では、この2種類の塩基置換は、表のように大腸菌において組換えにおける鎖交換反応を担う*recA*遺伝子の変異を導入すると検出されなくなる。開始コドンから128番目のAがCに置換する1塩基の変異を1点型組換え型変異、始コドンから-22番目の塩基がGがAに128番目のAがCに置換する2塩基の変異を2点型組換え型変異と定義した。これらの変異が大腸菌染色体上に配置された2つの*rpsL*遺伝子間で遺伝的組換えの結果生じる塩基置換変異であることを明らかにするため、大腸菌において組換え反応における鎖交換反

応を担う *recA* 遺伝子を欠損させた変異株による解析を行った。その結果、野生株では  $0.092 \times 10^{-6}$  の発生頻度で見いだされた組換え型変異が、*recA* 変異株では見いだされなかったため、組換え型変異が *recA* 遺伝子による遺伝的組換えに生じることが示された。

野生株において、組換え型変異は  $0.092 \times 10^{-6}$  と塩基置換の発生頻度について2番目に高く、*rpsL* 前進突然変異頻度の22%を占めていた。この結果から野生株において、複製フォークの停止を引き起こすと考えられる障害がDNA鎖上に高頻度で生じることが示唆された。複製フォークの停止を引き起こす自然DNA損傷は、前進突然変異と同様に高頻度でDNA鎖上に生じることが示唆された。

表2.1. 染色体上とプラスミド上の*rpsL*標的遺伝子における  
前進突然変異頻度の比較

A. 染色体*rpsL*系での*rpsL*<sup>-</sup>前進突然変異頻度

菌株	変異頻度 ×10 <sup>-6</sup>	
	MK811 野生株	MK1381 <i>mutS</i> 変異株
	0.42 (1)	32 (76)

B. プラスミド*rpsL*系での*rpsL*<sup>-</sup>前進突然変異頻度

菌株	変異頻度 ×10 <sup>-6</sup>	
	MK426/pMOL21 野生株	MK511/pMOL21 <i>mutS</i> 変異株
	1.5 (1)	37 (25)

A. 染色体上に配置した*rpsL*標的遺伝子における前進突然変異頻度（当研究）。野生株（MK811）、および*mutS*変異株（MK1381）については独立した5実験区を用いて、その平均を示した。より詳細なデータに関しては、付録表1付録表2を参照のこと。括弧の中の数値は野生株（MK811）の変異頻度を1とした時の相対値である。

B. プラスミドpMOL21上に配置した*rpsL*標的遺伝子における前進突然変異頻度（Fujii *et al.*, 1999、上向, 1999および真木, 未発表データより抜粋）。pMOL21は複製フォークに*rpsL*標的遺伝子が順向きに配置されているプラスミドである。各菌株ともに独立した6実験区を用い、その平均を示した。括弧の中の数値は野生株（MK426/pMOL21）の変異頻度を1とした時の相対値である。

表2.2. 野生株における前進突然変異の特異性

A. 変異の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
組換え型 <sup>1)</sup>	0.127	0.062	0.093	0.080	0.099	<b>0.092</b> $\pm$ 0.024
塩基置換						
ホットスポット1(82C→A) <sup>2)</sup>	0.017	0.013	0.020	0.025	0.0083	<b>0.017</b> $\pm$ 0.0064
ホットスポット2(245T→A) <sup>2)</sup>	0.13	0.084	0.057	0.054	0.058	<b>0.077</b> $\pm$ 0.033
ホットスポット3(245T→G) <sup>2)</sup>	0.0058	0.040	0.0015	0.011	0.0055	<b>0.013</b> $\pm$ 0.015
上記以外	0.26	0.054	0.031	0.10	0.072	<b>0.10</b> $\pm$ 0.092
1塩基フレームシフト	0.029	0.060	0.010	0.028	0.023	<b>0.030</b> $\pm$ 0.018
2塩基フレームシフト	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> $<$ 0.00070
配列置換	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> $<$ 0.00070
欠失	0.101	0.005	0.019	0.019	0.022	<b>0.033</b> $\pm$ 0.0384
重複	0.0029	0.0048	0.0044	0.0000	0.0110	<b>0.0046</b> $\pm$ 0.0040
IS	0.0144	0.0586	0.0802	0.0540	0.0234	<b>0.046</b> $\pm$ 0.027
その他	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> $<$ 0.00070
変異なし	ND	ND	0.034	ND	0.0083	<b>0.0084</b> $\pm$ 0.015
Total	0.69	0.38	0.35	0.37	0.33	<b>0.42</b> $\pm$ 0.15

B. 1塩基フレームシフトの種類別変異頻度

Section No.	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Addition						
at run <sup>3)</sup>	0.0086	ND	0.0029	0.0062	0.0069	<b>0.0049</b> $\pm$ 0.0034
at non-run <sup>3)</sup>	ND	0.0016	ND	ND	0.0014	<b>0.00059</b> $\pm$ 0.00081
total	0.0086	0.0016	0.0029	0.0062	0.0083	<b>0.0055</b> $\pm$ 0.0032
Deletion						
at run <sup>3)</sup>	0.0058	0.051	0.0058	0.015	0.011	<b>0.018</b> $\pm$ 0.019
at non-run <sup>3)</sup>	0.014	0.0079	0.0015	0.0062	0.0041	<b>0.0068</b> $\pm$ 0.0049
total	0.020	0.059	0.0073	0.022	0.015	<b>0.025</b> $\pm$ 0.020
Total	0.029	0.060	0.010	0.028	0.023	<b>0.030</b> $\pm$ 0.018

独立した5実験区由来の合計1200クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表中には、各実験区ごとの変異頻度（#1から#5まで）および、それらの平均値（Ave.）を記載した。検出されなかった変異に関しては、実験区ごとの変異頻度ではND（Not detected）と表記しているが、平均値を算出する際には、その実験区の変異頻度を0として計算した。より詳細なデータについては、付録表1を参照のこと。

表2.2-続き. 野生株における前進突然変異の特異性

C. 塩基置換の種類別変異頻度

Section No.	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Transition						
A:T→G:C	ND	0.0048	ND	0.028	0.0028	<b>0.0071</b> $\pm$ 0.012
G:C→A:T	0.22	0.019	0.010	0.034	0.0069	<b>0.057</b> $\pm$ 0.089
total	0.22	0.024	0.010	0.062	0.0096	<b>0.064</b> $\pm$ 0.087
Transversion						
G:C→T:A	0.037	0.0048	0.0015	0.0093	0.018	<b>0.014</b> $\pm$ 0.014
G:C→C:G	ND	ND	0.0058	0.0031	0.029	<b>0.0076</b> $\pm$ 0.012
T:A→A:T	0.0029	0.0016	0.0044	0.020	0.012	<b>0.0083</b> $\pm$ 0.0078
A:T→C:G	0.0058	0.024	0.0088	0.0062	0.0028	<b>0.0094</b> $\pm$ 0.0083
total	0.046	0.030	0.020	0.039	0.062	<b>0.039</b> $\pm$ 0.016
Hot spot						
82C→A <sup>2)</sup>	0.017	0.013	0.020	0.025	0.0083	<b>0.017</b> $\pm$ 0.0064
245 T→A <sup>2)</sup>	0.13	0.084	0.057	0.054	0.058	<b>0.077</b> $\pm$ 0.033
245 T→G <sup>2)</sup>	0.0058	0.040	0.0015	0.011	0.0055	<b>0.013</b> $\pm$ 0.015
total	0.16	0.14	0.079	0.089	0.072	<b>0.11</b> $\pm$ 0.037
Total	0.42	0.19	0.11	0.19	0.14	<b>0.21</b> $\pm$ 0.12

1) 本来の位置に局在する変異型の*rpsL*遺伝子は、開始コドンから-22番目のA→G及び128番目のC→Aの2つの変異を持つ。この遺伝子と標的となる野生型*rpsL*遺伝子との組換えは、その位置により、前者のみ、後者のみ、あるいは両方の塩基置換を持つ遺伝子を産出する。このうち、当研究では、後者のみの変異、あるいは両方の変異を持つものが検出された。これらは塩基置換変異の結果である可能性は極めて低く、当研究では組換え型として別記した。

2) 染色体*rpsL*系では、*rpsL*標的遺伝子の開始コドンから82番目に位置するCがAに置換する塩基置換と、245番目のTがAもしくはGに置換する塩基置換が高頻度で観察され、塩基置換のホットスポットであると考えられた。他の塩基置換の割合を明確にするために、このホットスポット上で起こった塩基置換と他の塩基置換を分けて記載した。

3) 同一の塩基が2つ以上連続する部位をrunと呼ぶ。1塩基フレームシフトの変異頻度に関しては、runとrun以外とに分けて表示した。





図2.3A 野生株 (MK811) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフトの分布

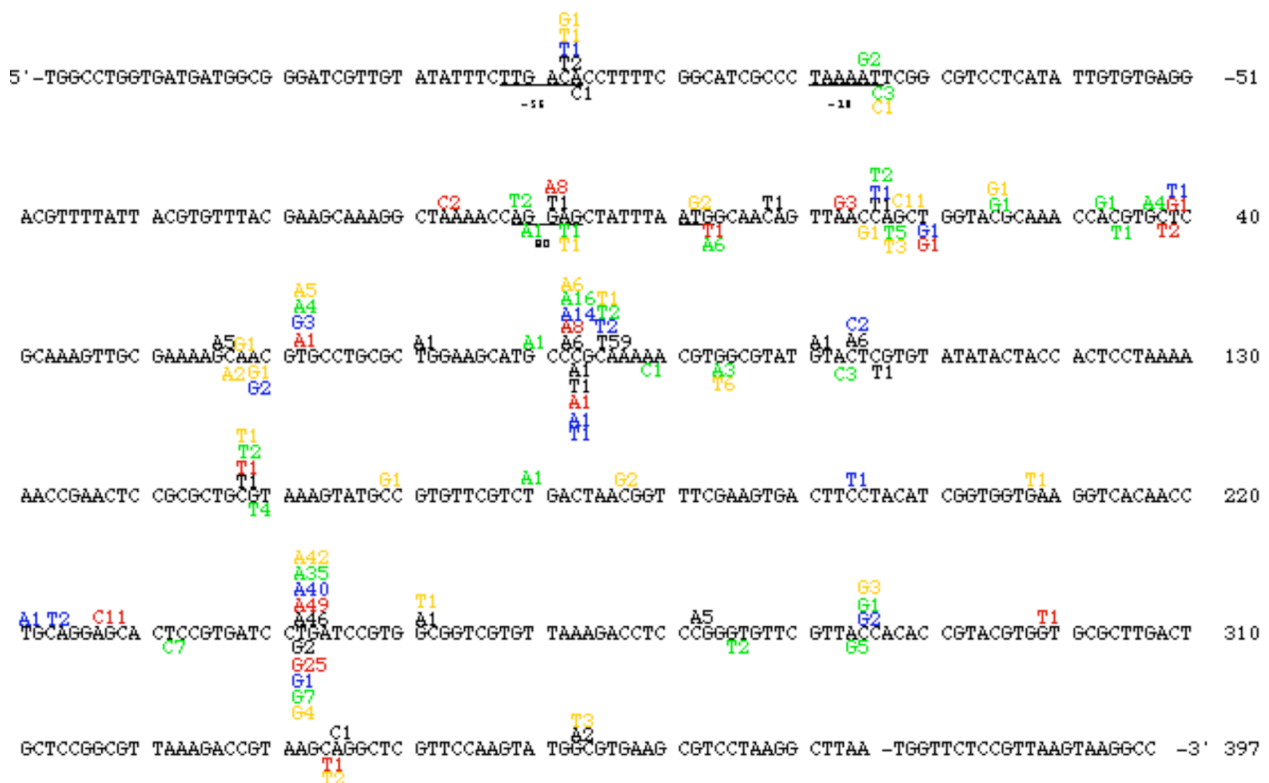


図2.3B 野生株 (MK811) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた塩基置換の分布

図2.3AB 野生株 (MK811) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフト (A) および塩基置換 (B) の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドンを1とした時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。図中のvは1塩基の挿入を意味し、▽は 1塩基の欠失を示す。塩基置換の場合は、元の塩基の上に置換した塩基を記した。これらの変異した塩基の後ろの数字は同じ実験区で同様の部位で見出された検出数を示す。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、実験区2、実験区3、実験区4、実験区5。

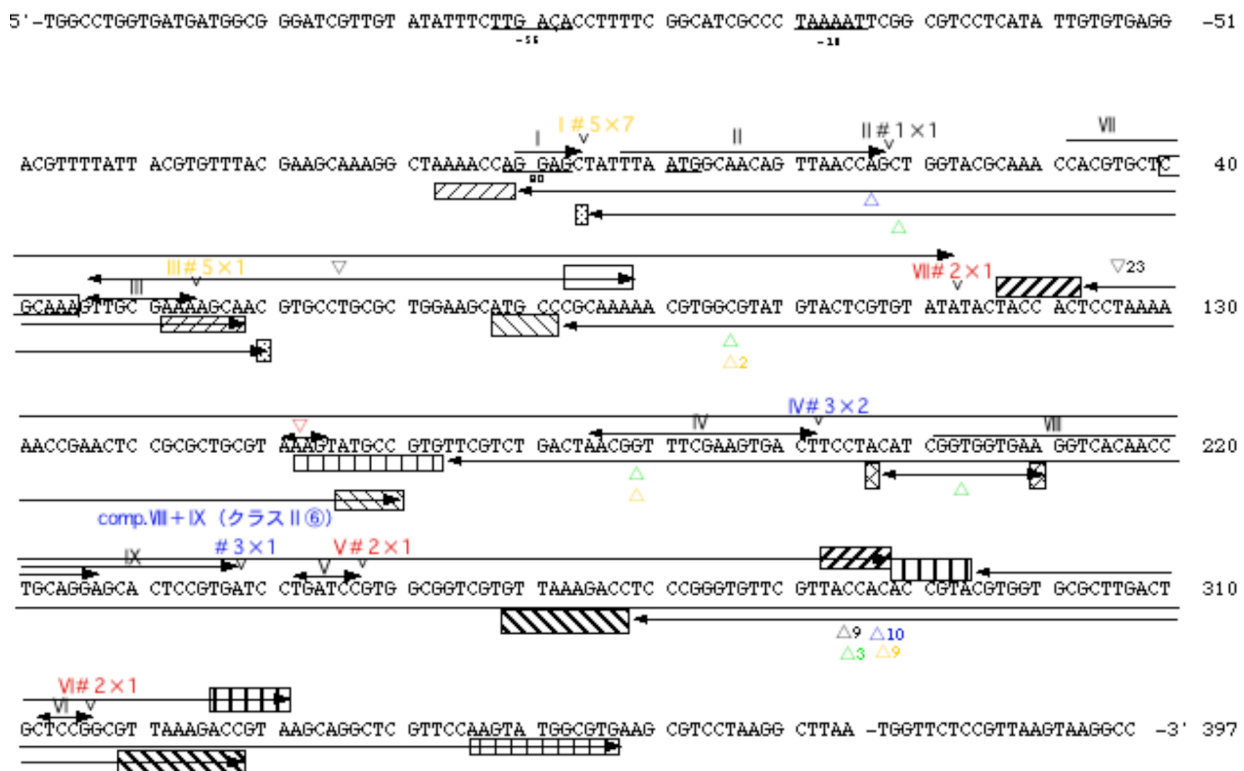


図2.3C 野生株 (MK811) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布

図2.3C 野生株 (MK811) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドンを1とした時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。図中のvは重複を、Δは欠失を表し、それらの範囲は矢印で示した。重複あるいは欠失の両端に相同領域がある場合は、その領域を同じ模様のボックスで記した。同じ実験区で同じ部位で同じ重複あるいは欠失が見つかった場合は、その検出数をvあるいはΔの後に示した。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、実験区2、実験区3、実験区4、実験区5。

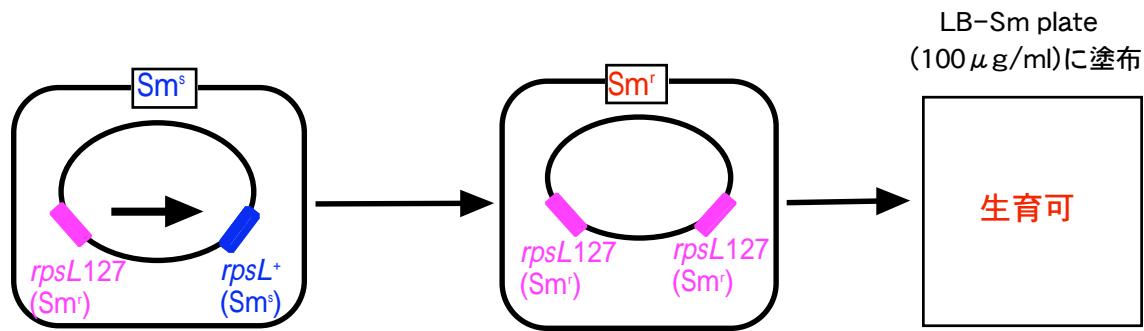


図2.2 染色体*rpsL*系で検出される組換え型変異

染色体*rpsL*系では、遺伝的組換えの結果生じるとされる変異が検出される。図中にある*rpsL*<sup>+</sup>、および*rpsL127*では2塩基の違い（開始コドンから-22番目の塩基が、*rpsL*<sup>+</sup>でG、*rpsL127*でA、開始コドンから128番目の塩基が、*rpsL*<sup>+</sup>でA、*rpsL127*でC;128番目の変異がミスセンス変異となる）が存在する。図中のような、遺伝的組換えの結果、*rpsL*標的遺伝子上において、開始コドンから128番目の1塩基の違い、もしくは開始コドンが-22番目と128番目の2塩基の違いが生じた塩基置換変異に関しては組換え型変異と定義した。

#### d) その他の変異

野生株において、塩基置換、1塩基フレームシフト、組換え型変異以外に見いだされた変異は2塩基以上の欠失、重複、IS(insertion sequence：挿入配列)であった。2塩基以上の欠失は、0.032の発生頻度であり*rpsL*前進突然変異頻度の7.6%を占めていた。重複は $0.0046 \times 10^{-6}$ の発生頻度であり*rpsL*前進突然変異頻度の1.1%を占めていた。また突然変異ではないが、挿入配列として見いだされるISは $0.045 \times 10^{-6}$ の発生頻度であった。

## 2.2 染色体*rpsL*系を用いた*mutS*変異株における前進突然変異の特異性

### a) 塩基置換

*mutS*変異株における塩基置換の発生頻度は $20 \times 10^{-6}$ あり、*rpsL*前進突然変異頻度の63%を占め、最も高い発生頻度であった。検出された塩基置換は、トランジション型塩基置換が $20 \times 10^{-6}$ の発生頻度であり、トランスバージョン型塩基置換で $0.52 \times 10^{-6}$ の発生頻度であった。また、hotspot型塩基置換（82C→A、245T→A、245T→G）において、82C→A、245T→Gのhotspot型塩基置換は見いだされず、見いだされた塩基置換は245T→Aのみであり $0.51 \times 10^{-6}$ の発生頻度であった（表2.4AC）。

野生株と*mutS*変異株の塩基置換の発生頻度を比較すると、*mutS*変異株における塩基置換の発生頻度は野生株の塩基置換の発生頻度に比べて34倍上昇することが示された（表2.5A）。この結果からミスマッチ修復機構は塩基置換を大幅に抑制していることが示された。これは誤対合によって生じた1～4塩基のループ構造を認識するMutSタンパクが、ミスマッチの認識を担っているため、ミスマッチ修復機構は点突然変異を主に修復する結果と一致する。また、塩基置換の種類別発生頻度では、*mutS*変異株は野生株に比べて、トランジション型塩基置換の発生頻度が310倍、トランスバージョン型塩基置換の発生頻度が13倍上昇していることが示された（表2.5C）。トランジション型塩基置換の発生頻度が大幅に上昇していることから、ミスマッチ修復機構は塩基置換のうちトランジション型塩基置換を修復していることが示された。また、野生株と*mutS*変異株において、塩基置換の発生部位に大きな差異が見いだされた。野生株では、*rpsL*標的遺伝子の開始コドンから62番目のTがAになる塩基置換と、83番目のCがAにかわる塩基置換が5実験区中、3実験区から見いだされている（図2.3B）。しかし、62T→A、および83C→Aの塩基置換は*mutS*変異株では検出されなかった（図2.4B）。この結果から62T→A、および83C→Aの部位はミスマッチ修復機構では直されない塩基置換である可能性が示唆された。また、*mutS*変異株では、開始コドンから-100番目のAがGに、-99番目のCがAに、-6番目のTがCに、23番目のTがCに、83番目のCがTに、157番目のGがAに、226番目のAがGに310番目のTがCにかわる塩基置換が高頻度に検出された（図2.4B）。これら*mutS*変異株での塩基置換のhotspotは野生株では検出されておらず、野生株と*mutS*変異株では塩基置換の高頻度発生部位が大きくなること示された。

野生株と複製エラーを修復するミスマッチ修復機構が欠損した*mutS*変異株で、塩基置換における変異スペクトラムが異なることから、複製エラーとして生じた塩基置換は、ミ

スマッチ修復機構によって非常に高い精度をもって修復されていることが示唆された。また、野生株において、*mutS*変異株と異なる塩基置換の発生部位が見いだされたことから、自然突然変異は複製エラーに起因しない別の原因によって生じている可能性が示唆された。特に野生株で見いだされた開始コドンから82番目のCがAに置換する部位と、245番目のTがAに置換する部位は、野生株で発生していた塩基置換の大部分を占めている。野生株で見いだされた塩基置換の発生部位は自然突然変異の発生部位であると考えられる。*mutS*変異株で開始コドンから82番目のCがAに置換する部位と、245番目のTがAに置換する部位の発生頻度が野生株比べて上昇していなかったことから、少なくとも*rpsL*標的遺伝子上で発生する自然突然変異のホットスポット部位の発生に複製エラーが関与していないことが強く示唆された。この結果から、自然突然変異のうち塩基置換に関しては、複製エラーではなく、自然DNA損傷や酸化損傷などの自然DNA損傷や、損傷乗り越えDNA合成などの複製型DNAポリメラーゼ以外のDNAポリメラーゼにより複製エラーが自然突然変異の発生に関与している可能性が考えられる。

#### b)1塩基フレームシフト

*mutS*変異株における1塩基フレームシフトの発生頻度は $7.7 \times 10^{-6}$ であり、*rpsL*前進突然変異頻度の24%を占め、2番目に高い発生頻度であった。1塩基フレームシフトにおいて、1塩基の挿入の発生頻度が $6.0 \times 10^{-6}$ 、1塩基の欠失の発生頻度が $1.6 \times 10^{-6}$ であり、1塩基の挿入が1塩基フレームシフトの発生頻度の78%を占めていた。1塩基の挿入は、同様の塩基が連続する部位であるrunでの発生頻度が $5.9 \times 10^{-6}$ 、run以外での発生頻度は $0.14 \times 10^{-6}$ であり、1塩基の挿入の発生頻度のうち98%がrun配列上で検出された。また、1塩基の欠失は、run上での発生頻度が $1.6 \times 10^{-6}$ 、run以外での発生頻度が $0.041 \times 10^{-6}$ であり、1塩基の欠失のうち99%がrun配列上で検出された。野生株と比べ*mutS*変異株は1塩基フレームシフトの発生頻度は260倍上昇し、1塩基の挿入が1100倍、1塩基の欠失が64倍上昇していた（表2.5B）。*mutS*変異株における1塩基フレームシフトはrun配列上に集中していることから、複製エラーとしての1塩基フレームシフトは同じ塩基が並んだ部位で生じる複製型DNAポリメラーゼによるスリッページエラーが原因として発生していると考えられる。また、スリッページエラーを引き起こした際、校正機能によって一度めくられた新生鎖の3'末端が鋳型と再結合する際にずれてしまうことによって生じることも考えられる。

*mutS*変異株で、1塩基フレームシフトの発生部位は開始コドンから86番目のAが5つ並んだrun配列と127番のAが6つ並んだrun配列に集中している。野生株においても、この

2つのhotspot部位は見いだされるが、*mutS*変異株と異なり、run以外の部位における1塩基の欠失が多く見いだされている（図2.3A、図2.4A）。野生株では開始コドンから39番目のT、69番目のG、93番目のT、122番目のC、230番目のA、257番目のG、294番目のA、313番目のTが欠失する1塩基フレームシフトが見いだされており、この部位に関して、*mutS*変異株では見いだされていない。

これらの結果から、ミスマッチ修復機構はrun上で高頻度に発生する複製エラーとしての1塩基フレームシフトを高頻度で修復しているが、自然突然変異として検出される1塩基の欠失は、複製エラーに起因しない別の原因によって生じる可能性が示唆された。自然突然変異のうち1塩基フレームシフトに関しても、複製エラーではなく、自然DNA損傷や酸化損傷などの自然DNA損傷や、損傷乗り越えDNA合成などの複製型DNAポリメラーゼ以外のDNAポリメラーゼにより複製エラーが自然突然変異の発生に関与している可能性が考えられる。

#### c) 組換え型変異（アリル間組換え）

遺伝的組換えの結果生じる組換え型変異の発生頻度は $3.1 \times 10^{-6}$ であり、*rpsL*前進突然変異頻度の9.7%を占め、3番目に高い発生頻度であった（表2.4A）。1点型（開始コドンから128番目のAがCに置換する）組換え型変異の発生頻度は $1.0 \times 10^{-6}$ であり、2点型（開始コドンから-22番目の塩基がGがAに128番目のAがCに置換する）組換え型変異の発生頻度は $2.1 \times 10^{-6}$ であった。

野生株に比べ*mutS*変異株は、組換え型変異の発生頻度が34倍上昇していた（表2.5A）。この結果からミスマッチ修復機構が遺伝的組換えを抑制していることが示された。近年、酵母における研究からミスマッチ修復タンパクが遺伝的組換えの制御に関わっていることが示されている。酵母における*mutS*ホモログであるMSH2は組換え中に生じるホリデイジャンクション（組換え中間体）に強く結合し（Kolodner et al., 1997）、相同性の低い（1%以上相同性が異なる）DNA鎖間で組換えが起こりそうな場合はホリデイジャンクションを解消させることで擬似相同組換えを抑制していることが示されている（Kolodner et al., 1994）。本研究の結果から、MutSタンパクがホリデイジャンクションに結合し、大腸菌染色体上においても、遺伝的組換えを抑制していることが強く示唆された。

#### d) その他の変異

*mutS*変異株で見いだされた塩基置換、1塩基フレームシフト、組換え型変異以外の前進突然変異はISのみであった。ミスマッチ修復機構は1~4塩基のDNAのループを認識して修復するため、重複、欠失などの大きな配列による変異の修復には関与していないことが考えられる。*mutS*変異株では、前述したように塩基置換と1塩基フレームシフトが多く検出されたため、発生頻度が野生株と変わらないと推測される重複や欠失は検出できなかったものと考えられる。また、ISの発生頻度は $0.075 \times 10^{-6}$ であり、野生株における発生頻度の1.6倍であった。野生株と発生頻度が大きく異ならなかった理由は、ISは挿入配列であるため複製エラーの修復を行うミスマッチ修復機構が何ら関与しないためであると考えられる。

表2.4. *mutS*変異株における前進突然変異の特異性

A. 変異の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$									ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	
組換え型 <sup>1)</sup>	3.3	1.6	2.6	4.0	3.2	1.8	3.3	4.3	3.6	3.1 $\pm$ 0.92074
塩基置換										
ホットスポット1(82C→A) <sup>2)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND < 0.074
ホットスポット2(245T→A) <sup>2)</sup>	ND	ND	0.24	1.5	0.35	0.91	0.60	ND	0.91	0.51 $\pm$ 0.53
ホットスポット3(245T→G) <sup>2)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND < 0.074
上記以外	22	22	15	18	18	18	16	19	34	20 $\pm$ 5.7
1塩基フレームシフト	10	8.8	5.0	6.2	5.0	8.2	8.8	12	5.0	7.7 $\pm$ 2.5
2塩基フレームシフト	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND < 0.074
配列置換	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND < 0.074
欠失	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND < 0.074
重複	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND < 0.074
IS	ND	ND	ND	0.31	ND	ND	0.30	ND	0.45	0.12 $\pm$ 0.18
その他	ND	ND	0.24	ND	7.8	ND	ND	ND	ND	0.89 $\pm$ 2.6
変異なし	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND < 0.074
Total	35	32	23	30	34	29	29	35	44	32 $\pm$ 5.8

B. 1塩基フレームシフトの種類別変異頻度

Section No.	変異頻度 $\times 10^{-6}$									ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	
Addition										
at run <sup>3)</sup>	9.1	5.6	4.0	3.4	4.6	5.7	6.0	10	4.5	5.9 $\pm$ 2.3
at non-run <sup>3)</sup>	ND	0.65	ND	0.31	ND	ND	0.30	ND	ND	0.14 $\pm$ 0.23
total	9.1	6.2	4.0	3.7	4.6	5.7	6.3	10	4.5	6.0 $\pm$ 2.2
Deletion										
at run <sup>3)</sup>	0.73	2.6	0.95	2.5	0.35	2.4	2.4	1.8	0.45	1.6 $\pm$ 0.95
at non-run <sup>3)</sup>	0.36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.041 $\pm$ 0.12
total	1.1	2.61	0.95	2.5	0.35	2.4	2.4	1.8	0.45	1.6 $\pm$ 0.92
Total	10	8.8	5.0	6.2	5.0	8.2	8.8	12	5.0	7.7 $\pm$ 2.5

独立した9実験区由来の合計864クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表中には、各実験区ごとの変異頻度（#1から#9まで）および、それらの平均値（Ave.）を記載した。検出されなかった変異に関しては、実験区ごとの変異頻度ではND（Not detected）と表記しているが、平均値を算出する際には、その実験区の変異頻度を0として計算した。より詳細なデータについては、付録表2を参照のこと。



表2.4-続き. *mutS*変異株における前進突然変異の特異性

C. 塩基置換の種類別変異頻度

Section No.	変異頻度 ×10 <sup>6</sup>									ave ± SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	
Transition										
A:T→G:C	16	11	9.0	11	11	12	11	13	22	<b>13</b> ± 4.0
G:C→A:T	4.7	9.8	5.5	6.5	6.0	5.1	4.8	4.7	11	<b>6.5</b> ± 2.3
total	21	21	14	18	17	18	15	18	33	<b>20</b> ± 5.6
Transversion										
G:C→T:A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.30	ND	ND	<b>0.034</b> ± 0.10
G:C→C:G	0.36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<b>0.041</b> ± 0.12
T:A→A:T	ND	0.33	0.47	ND	0.35	0.30	0.30	0.72	0.91	<b>0.38</b> ± 0.30
A:T→C:G	ND	ND	ND	ND	ND	0.30	ND	0.36	ND	<b>0.074</b> ± 0.15
total	0.36	0.33	0.47	ND	0.35	0.60	0.60	1.1	0.91	<b>0.52</b> ± 0.32
Hot spot										
82C→A <sup>2)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> < 0.074
245 T→A <sup>2)</sup>	ND	ND	0.24	1.5	0.35	0.91	0.60	ND	0.91	<b>0.51</b> ± 0.53
245 T→G <sup>2)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> < 0.074
total	ND	ND	0.24	1.5	0.35	0.91	0.60	ND	0.91	<b>0.51</b> ± 0.53
Total	22	22	15	19	18	19	17	19	35	<b>21</b> ± 5.8

1) 本来の位置に局在する変異型の*rpsL*遺伝子は、開始コドンから-22番目のA→G及び128番目のC→Aの2つの変異を持つ。この遺伝子と標的となる野生型*rpsL*遺伝子との組換えは、その位置により、前者のみ、後者のみ、あるいは両方の塩基置換を持つ遺伝子を産出する。このうち、当研究では、後者のみの変異、あるいは両方の変異を持つものが検出された。これらは塩基置換変異の結果である可能性は極めて低く、当研究では組換え型として別記した。

2) 染色体*rpsL*系では、*rpsL*標的遺伝子の開始コドンから82番目に位置するCがAに置換する塩基置換と、245番目のTがAもしくはGに置換する塩基置換が高頻度で観察され、塩基置換のホットスポットであると考えられた。他の塩基置換の割合を明確にするために、このホットスポット上で起こった塩基置換と他の塩基置換を分けて記載した。

3) 同一の塩基が2つ以上連続する部位をrunと呼ぶ。1塩基フレームシフトの変異頻度に関しては、runとrun以外とに分けて表示した。

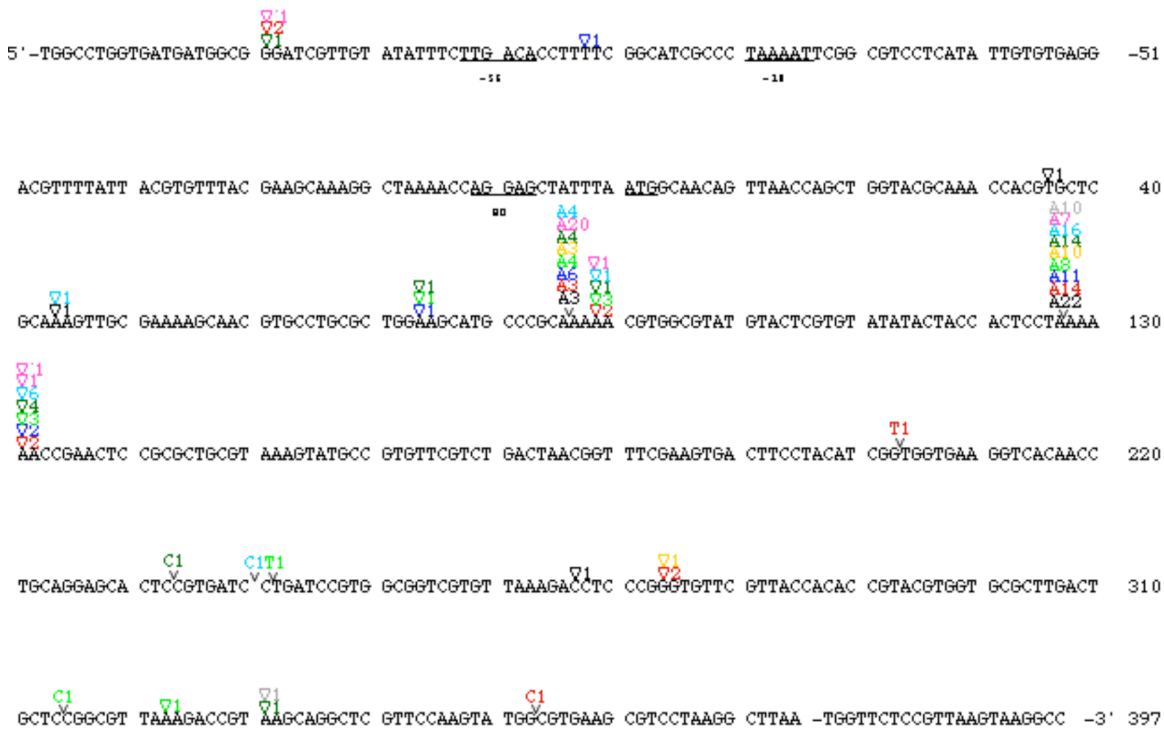


図2.4A *mutS*変異株 (MK1381) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフトの分布

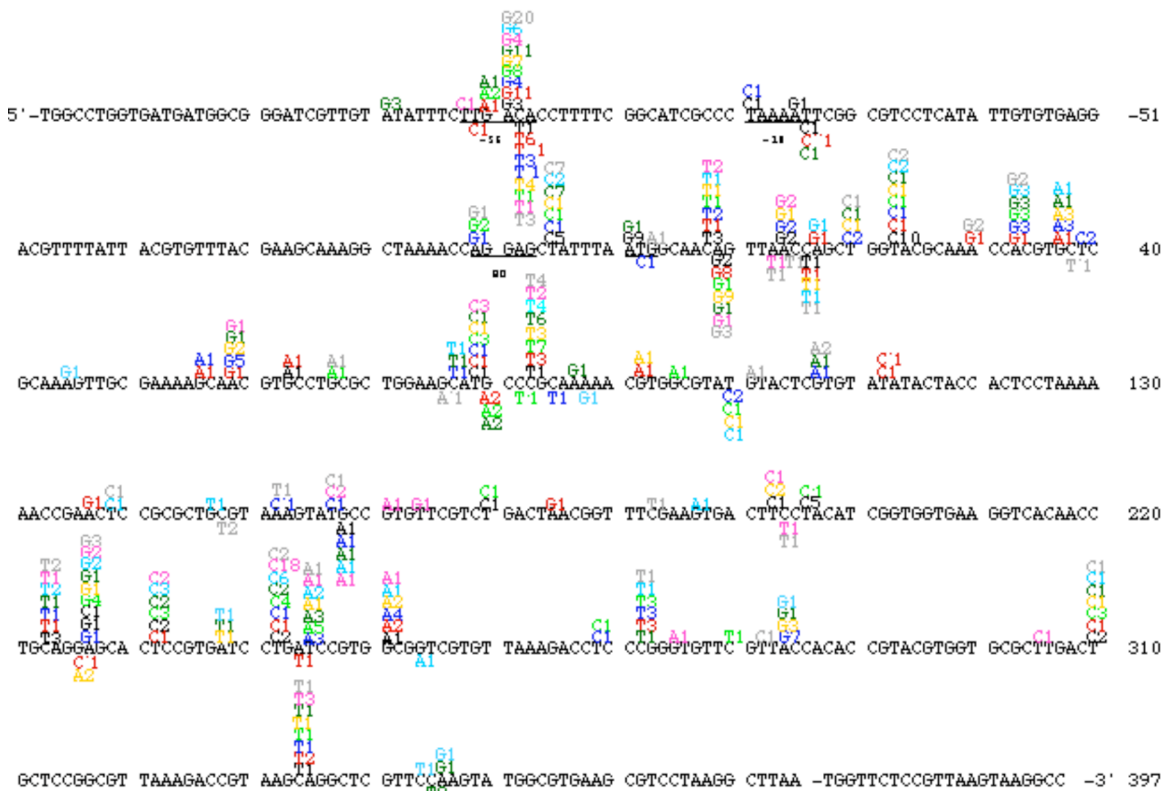


図2.4B *mutS*変異株 (MK1381) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた塩基置換の分布

図2.4AB *mutS*変異株 (MK1381) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフト (A) および塩基置換 (B) の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドンを1とした時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。図中のvは1塩基の挿入を意味し、∇は1塩基の欠失を示す。塩基置換の場合は、元の塩基の上に置換した塩基を記した。これらの変異した塩基の後ろの数字は同じ実験区で同様の部位で見出された検出数を示す。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、実験区2、実験区3、実験区4、実験区5、実験区6、実験区7、実験区8、実験区9。

表2.5 野生株と *mutS*変異株の前進突然変異特異性の比較

A. 変異の種類別変異頻度の比較

種類	変異頻度 $\times 10^{-6}$			
	野生株(MK811)		<i>mutS</i> 変異株(MK1381)	
組換え型 <sup>1)</sup>	0.092	(1)	3.1	(34)
塩基置換				
ホットスポット1 <sup>2)</sup> (82C→A)	0.017	(1)	ND<0.074	
ホットスポット2 <sup>2)</sup> (245T→A)	0.077	(1)	0.38	(4.9)
ホットスポット3 <sup>2)</sup> (245T→G)	0.013		ND<0.074	
上記以外	0.10	(1)	20	(200)
1塩基フレームシフト	0.030	(1)	7.7	(260)
2塩基フレームシフト	ND<0.00070		ND<0.074	
配列置換	ND<0.00070		ND<0.074	
欠失	0.032	(1)	ND<0.074	
重複	0.0043		ND<0.074	
IS	0.045	(1)	0.075	(1.6)
その他	ND>0.00070		0.89	
変異なし	0.0084	(1)	ND<0.074	
Total	0.42	(1)	32	(76)

B. 1塩基フレームシフトの種類別変異頻度の比較

種類	変異頻度 $\times 10^{-6}$			
	野生株(MK811)		<i>mutS</i> 変異株(MK1381)	
挿入				
at run <sup>3)</sup>	0.0049	(1)	5.9	(1200)
at non-run <sup>3)</sup>	0.00059	(1)	0.14	(1700)
Total	0.0055	(1)	6.0	(1100)
欠失				
at run <sup>3)</sup>	0.018	(1)	1.6	(88)
at non-run <sup>3)</sup>	0.0068	(1)	0.041	(6.0)
Total	0.025	(1)	1.6	(64)
Total	0.030	(1)	7.7	(260)

ミスマッチ修復の特異性を明らかにするために、*mutS*変異株 (MK1381) を用いて、独立した9実験区由来の合計864クローンの *rpsL* 標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。比較のために、野生株 (MK811) での結果もあわせて記載した。*mutS*変異株および野生株のより詳細なデータに関しては、それぞれ付録表1および付録表2を参照のこと。表中には平均値、及び、括弧内に野生株の変異頻度を1としたときの相対値を示す。検出されなかった変異に関しては、ND (Not detected) と表記し、さらにその右隣に当研究から推定された変異頻度の最大値を記した。

表2.5-続き. 野生株と *mutS* 変異株の前進突然変異特異性の比較

C. 塩基置換の種類別変異頻度の比較

種類	変異頻度 $\times 10^{-6}$			
	野生株(MK811)		<i>mutS</i> 変異株(MK381)	
Transition				
A:T→G:C	0.0071	(1)	13	(1800)
G:C→A:T	0.057	(1)	6.5	(110)
Total	0.064	(1)	20	(310)
Transversion				
G:C→T:A	0.014	(1)	0.034	(2.4)
G:C→C:G	0.0076	(1)	0.041	(5.4)
T:A→A:T	0.0083	(1)	0.38	(36)
A:T→C:G	0.0094	(1)	0.074	(7.9)
Total	0.039	(1)	0.52	(13)
Hot spot				
82C→A <sup>2)</sup>	0.017		ND<0.074	
245T→A <sup>2)</sup>	0.077	(1)	0.51	(6.6)
245T→G <sup>2)</sup>	0.013		ND<0.074	
Total	0.11	(1)	0.51	(4.6)
Total	0.21	(1)	21	(100)

1) 本来の位置に局在する変異型の *rpsL* 遺伝子は、開始コドンから-22番目のA→G及び128番目のC→Aの2つの変異を持つ。この遺伝子と標的となる野生型 *rpsL* 遺伝子との組換えは、その位置により、前者のみ、後者のみ、あるいは両方の塩基置換を持つ遺伝子を産出する。このうち、当研究では、後者のみの変異、あるいは両方の変異を持つものが検出された。これらは塩基置換変異の結果である可能性は極めて低く、当研究では組換え型として別記した。

2) 染色体 *rpsL* 系では、*rpsL* 標的遺伝子の開始コドンから82番目に位置するCがAに置換する塩基置換と、245番目のTがAもしくはGに置換する塩基置換が高頻度で観察され、塩基置換のホットスポットであると考えられた。他の塩基置換の割合を明確にするために、このホットスポット上で起こった塩基置換と他の塩基置換を分けて記載した。

3) 同一の塩基が2つ以上連続する部位をrunと呼ぶ。1塩基フレームシフトの変異頻度に関しては、runとrun以外とに分けて表示した。

### 第三部 自然突然変異の発生における損傷乗り越えDNA合成の役割

#### 第一章 序論

太陽光中の紫外線や環境中の化学物質などの外因性の要因、呼吸によって生じる活性酸素などの内因性の要因によってたえずDNAは損傷を受けている。前変異損傷の要因となりうる自然DNA損傷は、DNA複製時の障害となる前に、ヌクレオチド除去修復(NER)のGenome global repair(GGR)などの修復機構によって高い効率で除去される。転写時において、NERはRNAポリメラーゼの障害となるような転写鋳型鎖上のDNA損傷を優先的に除去することが知られており転写と共役した修復(Transcription coupled repair;TCR)と呼ばれている。このように転写時に優先的にDNA損傷を除去する修復機構は知られているが、DNA複製においては、TCRのような複製と共役したDNA損傷除去機構は見出されていない。

しかし、近年、複製フォーク停止を解消する機構が見出された。通常のDNA複製を行う複製型DNAポリメラーゼよりもはるかに高効率にDNA損傷を乗り越える「損傷乗り越え型DNAポリメラーゼ」が細菌からヒトまで広く見つかっている(Nelson et al., 1996ab; Reuven et al., 1999; Tang et al., 1999; Wagner et al., 1999; Jonson et al., 1999ab; Masutani et al., 1999)。これらの多くは3'→5'エキソヌクレアーゼによる校正機能を持たないY-family ポリメラーゼに分類されるDNAポリメラーゼであり(Ohmori., 2001)、複製型DNAポリメラーゼに比べ、はるかにfidelityが低い。その反面、鋳型DNA鎖上の損傷に複製フォークがぶつかった場合、複製型DNAポリメラーゼは、損傷で合成を停止するが、損傷乗り越え型DNAポリメラーゼは損傷乗り越え合成(Translesion DNA synthesis;TLS)を行う。また、一つの生物種において、複数のTLS型DNAポリメラーゼが見出されており、In vitro、In vivoの両方の解析から、DNA損傷のタイプによって、異なるTLS活性、および伸長活性が存在することが示されている(Tang.,2000; Ohashi., 2000; Guo., 2004)。

色素沈着、高頻度発癌などを特徴とする、ヒトの色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum;XP)の8つの遺伝的相補性群、XP-A~G、およびXP-Vのうち、XP-Vは、TLS型ポリメラーゼであるDNA pol  $\eta$  の遺伝的欠損であることが示されている(Masutani et al., 1999)。XP-Vは紫外線(UV)照射後のDNA複製において、進行阻害が顕著にみられる。このように、通常の生育環境下においても、TLSはゲノム安定性に大きく貢献する重要な機構であることが示されている。

本研究で用いている大腸菌細胞においても3つのTLS型ポリメラーゼが見出されている。*polB*にコードされるPol II、*dinB*にコードされるPol IV、および*umuDC*にコードされるPol Vであり、Pol IIはfidelityが高く校正機能を持つB-familyのDNAポリメラーゼに分類され、Pol IVおよびPol VはY-familyに属する(Ohamori ., 2001)。大腸菌には、紫外線などによって鋳型DNA鎖上に損傷が生じると少なくとも43以上のDNA修復関連タンパク質を発現誘導する細胞応答機構が存在しており、SOS応答と呼ばれる(Radman., 1975; Witkin., 1985; Walker., 1985)。

SOS応答は1)複製フォークの停止などによるssDNAの認識、2)RecAの活性化、3)活性型RecA(RecA\*)による、SOS遺伝子上のプロモーター領域に結合しているLexAタンパクの自己分解の促進、4)SOS遺伝子の強発現、のステップで進行する(図3.1)。

TLSポリメラーゼをコードする遺伝子(*polB*, *dinB*, *umuDC*)もSOS応答により強発現するSOS遺伝子であり、*polB*, *dinB*はSOS応答が誘導されると、直ちに強発現される(1分以内)(Bonner et al .,1988; Reuven et al., 1999; Tang et al., 1999; Wangner et al., 1999)。しかし、*umuDC*は発現後、RecA\*によってUmuDの自己分解が促進され、自己分解産物UmuD'が2分子、UmuCが1分子のUmuD'<sub>2</sub>C複合体となってTLS活性を持つことが示されており、細胞内ではUmuD'<sub>2</sub>C複合体ができるまでSOS応答が誘導されてから約40分の時間を有すると考えられている(図3.1、Woodgate., 1989; Bruck., 1996)。大腸菌細胞における3つのTLS型ポリメラーゼは複製型DNAポリメラーゼであるPol IIIに比べfidelityが低いことが示されている。その反面、DNA損傷で停止することなく乗り越えることが示されているが、TLSを行う際、鋳型DNAに対し相補的でない間違っ塩基を挿入する「誤りがち合成;Error-prone DNA synthesis」を行うことが示されている。人為的に鋳型DNA鎖上に損傷塩基を配置したIn vitro、およびIn vivoの実験から、Pol IIは発ガン性物質であるアセチルアミノフルオレン(AAF)を付加したGを乗り越える際、2塩基の欠失を生じることが示されている(Napolitano., 2000)。Pol IVは発ガン性物質であるベンゾピレン(BaP)を付加したGを乗り越える際に1塩基の欠失を生じることが示されている(Napolitano ., 2000)。また、Pol IVは細胞内で過剰発現することにより損傷塩基ではない鋳型DNA鎖上の同一の塩基が並んだrun配列上において1塩基の欠失を生じることが示されている(Wagber., 2000a)。同様にPol Vに関して、紫外線照射時に生じる6-4光産物(6-4PP)を乗り越える際に、鋳型DNA鎖上のTに対してGを挿入すること、および脱塩基部位(AP site)に対してAを挿入して乗り越えることが示されている(LeClerc., 1991; Smith., 1996)。このように、異なったタイプの損傷塩基に対し、異なったTLS型ポリメラーゼがTLS活性を持つことから、細胞内で生じる様々なDNA損傷に対し、異

なったTLS型ポリメラーゼを用いて、損傷塩基の乗り越えを行い、DNA複製を継続、完了させていると考えられている。

第二部で示したように野生株、およびmutS変異株の解析から、複製エラーの自然突然変異の発生への関与は大きくないことが示された。この結果から、複製エラー以外の自然突然変異の発生への関与を考察するに至った。第二部で示したように、プラスミド*rpsL*系と異なり染色体*rpsL*系では遺伝的組換えの結果生じる組換え型変異が検出される。組換え型変異は、TLSと同様に複製フォーク停止を回避する組換え修復の結果生じていると考えられ、野生株で*rpsL*標的遺伝子上で検出される*rpsL*前進突然変異のうち約1/3を占めている(表2.2)。この結果から、組換え修復で修復されるような複製フォークの停止などのイベントが通常生育下で高頻度に生じている可能性が考えられる。複製フォークの停止が引き起こされた場合、複製型DNAポリメラーゼであるPol IIIからTLS型ポリメラーゼにスイッチングが生じている可能性が疑われる。TLS型ポリメラーゼによる損傷乗り越えDNA合成は、前述したように、自然DNA損傷を乗り越える時に高頻度にエラーを生じることが示されている。そこで、野生株の*rpsL*前進突然変異のうち2/3にあたる自然突然変異の発生において、TLSのうち「誤りがち合成」が関与している可能性を検討するため、大腸菌において見出されている3つのTLS型ポリメラーゼを欠損させた変異株を作製し、*rpsL*標的遺伝子上で生じる突然変異において、塩基配列レベルの詳細、かつ、大量検体数を用いた大規模解析を行った。

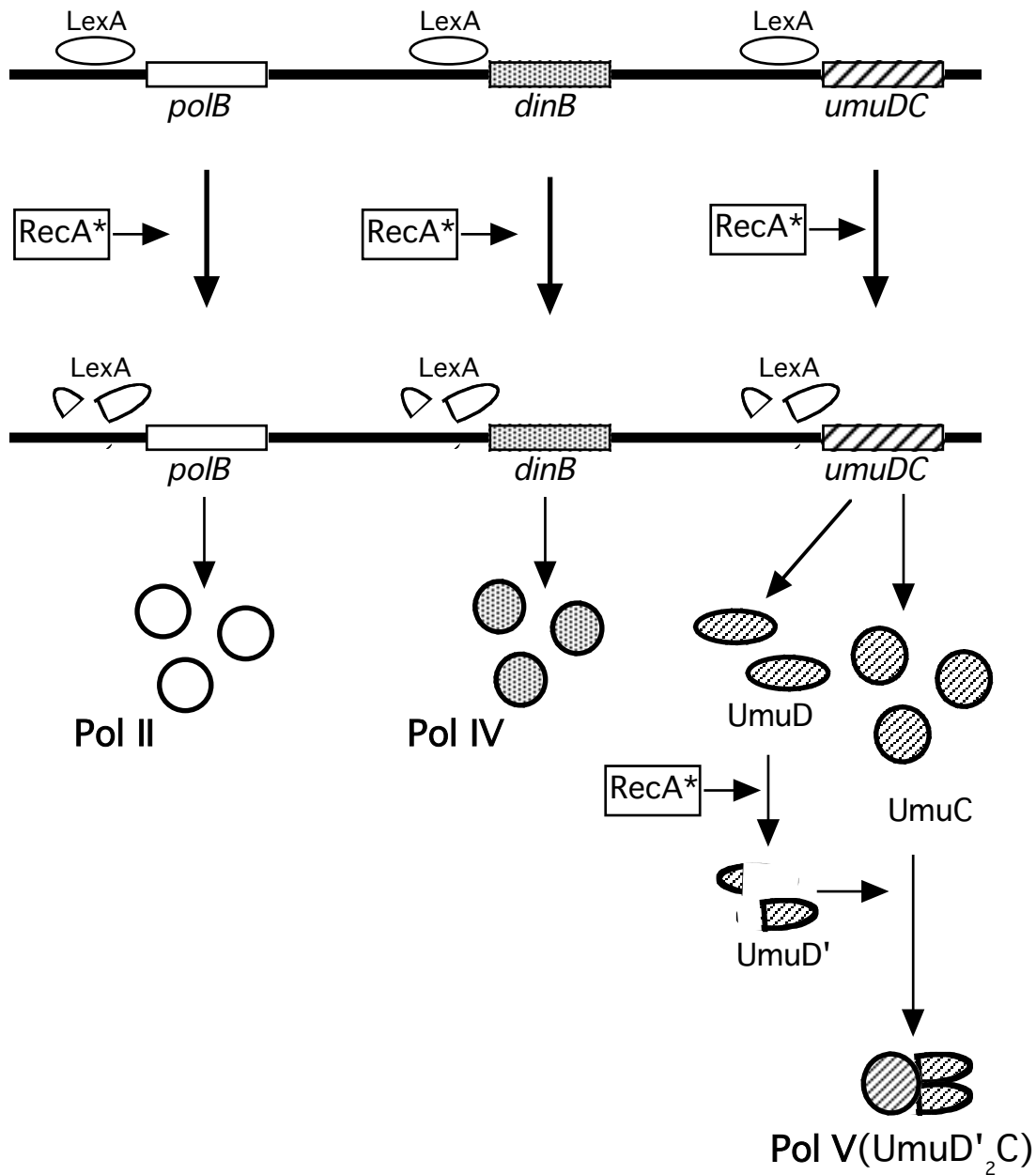


図3.1 大腸菌におけるSOS応答

DNA損傷によって、SOS遺伝子が強発現される細胞応答機構であるSOS応答の概要を示した。大腸菌染色体上には少なくとも43以上のSOS遺伝子が見出されており、TLSポリメラーゼをコードする遺伝子もSOS遺伝子である。図中のRecA\*は活性型RecAを、UmuD'はUmuDの自己分解産物を示している。



## 第二章 結果と考察

大腸菌において、DNAポリメラーゼは5つ見出されており、発見の順番によってPol I～Pol Vまで命名されている。5つのDNAポリメラーゼのうちPol IIは3'→5' エキソヌクレアーゼ活性と5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の両方を持ち、ニックトランスレーションを行うことが示されている。Pol IIIは通常のDNA複製を担う複製型DNAポリメラーゼであり、5つのDNAポリメラーゼの中で最もfidelityが高い。残る3つのDNAポリメラーゼ、Pol II、Pol IV、Pol Vは損傷乗り越え合成(Translesion DNA synthesis; TLS)を行うことが知られている。Pol IIIは校正機能を有するが、Pol IVとPol Vは校正機能を有しない (Tang., 2000; Goodman., 2002)。前述したように3つのTLS型ポリメラーゼは鋳型DNAに対し、相補的でない塩基を挿入する誤りがち合成を行うことが知られているため、自然突然変異におけるTLSの関与を明らかにするためにPol IIをコードする*polB*、Pol IVをコードする*dinB*、Pol Vをコードする*umuDC*を欠損させた変異株を作製した。*polB*、*dinB*、*umuDC*をそれぞれ1つずつ欠損させたsingle mutant(*polB*変異株、*dinB*変異株、*umuDC*変異株)、2つずつ欠損させたdouble mutant(*dinB polB*二重変異株、*dinB umuDC*二重変異株、*polB umuDC*二重変異株)、および3つ全てを欠損させたTLS完全欠損株(*dinB polB umuDC*三重欠損株)の合計7つの変異株を作製して*rpsL*標的遺伝子上に生じた突然変異の発生頻度、発生パターンを明らかにすることを試みた。

### 3.1 紫外線(UV)の強照射における突然変異誘発の確認

紫外線(UV)は、強照射によってDNA鎖上にピリミジン二量体(シクロブタン型ピリミジンダイマー;CPD、および6-4光産物;6-4PP)を生じることが示されている。CPD、および6-4PPが鋳型DNA鎖上に生じると複製フォークの停止が生じ、大腸菌の細胞応答機構であるSOS応答が生じる(図3.1)。SOS応答が誘導されると、突然変異頻度が上昇することが示されており、これは誤りがち合成を行うTLS型ポリメラーゼであるPol V(*umuDC*)が関与していることが示されている(Tang., 2000)。また、UVの強照射後、複製フォークの停止を解消するためにPol IIおよびPol IVが重要な関与をしていることが示されている(Rangarajan., 1999; Rangarajan., 2002)。そこで本研究で用いた*rpsL*部分二倍体株において、誤りがち合成による突然変異の誘発の確認を行う目的で、UVによる変異誘発の確認を行った。*rpsL*標的遺伝子を用いた場合、染色体*rpsL*系では、組換え修復の結果に生

じる組換え型変異が増加するため（データは示さない）、抗生物質であるリファンピシリン耐性を指標に選択が可能な*rpoB*標的遺伝子を用い変異頻度の測定を行った。その結果、野生株であるMK811において、300 J/m<sup>2</sup>のUVを強照射した場合、UV非照射時に比べ約130倍の変異頻度の上昇が確認された。しかし、*umuDC*を欠損させたMK1301に同じ強度のUVを照射した結果、わずか6.5倍の上昇が見られたのみであった。また、TLS完全欠損株と考えられる*dinB polB umuDC*三重変異株であるMK1371に200 J/m<sup>2</sup>のUVを強照射した場合も同様に4.5倍の上昇にとどまった(図3.2)。

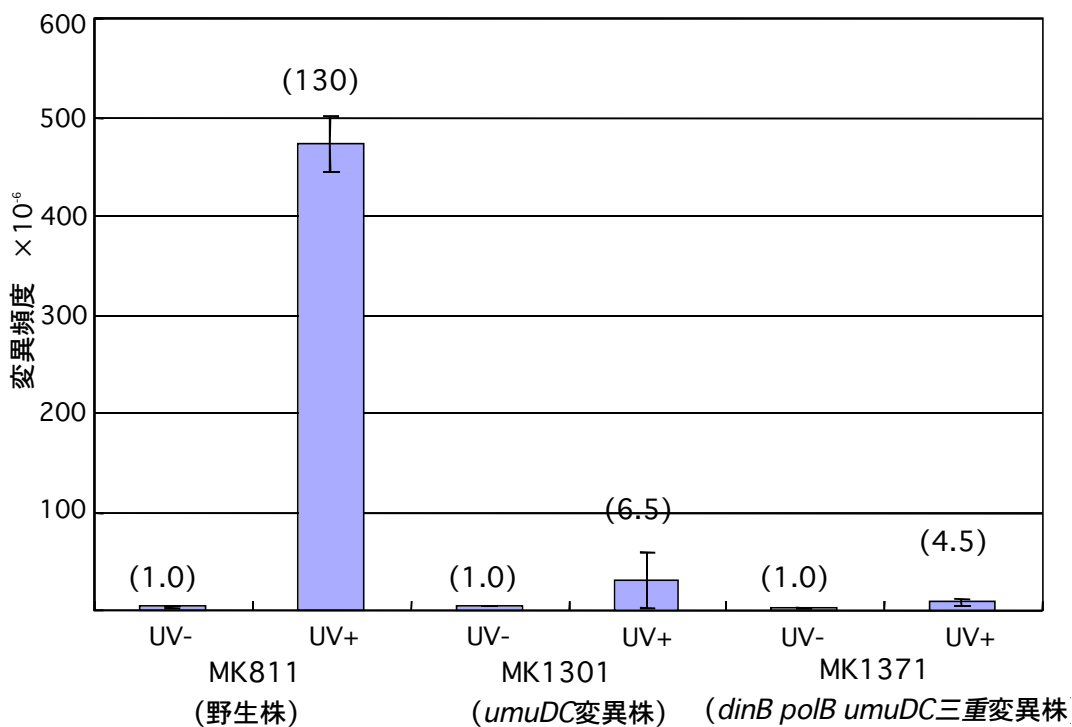


図3.2 紫外線(UV)照射時における突然変異誘発の確認

UVの強照射時における、*rpoB*標的遺伝子を用いた突然変異頻度を測定した。図中のUV-は非照射時、UV+はMK811、およびMK1301で300 J/m<sup>2</sup>、MK1371で200 J/m<sup>2</sup>の照射量のUVを照射したときの突然変異頻度を表す。括弧の数値は各菌株のUV-を1としたときの相対値を表す。

この結果から、本研究で用いた染色体*rpsL*部分二倍体株において、UVを強照射すると突然変異頻度が上昇することが示された。また、突然変異誘発の大部分に*umuDC*がコードするPol Vが関与していることが示された。したがって、染色体*rpsL*部分二倍体株においてもPol Vが少なくともDNA損傷を人為的に誘発した状態ならば、誤りがち合成を行うことが強く示された。

TLS完全欠損株であるMK1371においても、若干であるが突然変異頻度の上昇が見られた。UV損傷を除去する経路のうち、ヌクレオチド除去修復は、修復合成を複製型DNAポリメラーゼであるPol IIIではなく、Pol Iが担うことが知られている。この結果から、ヌクレオチド除去修復の際、修復合成を行うPol Iが突然変異を引き起こしている可能性が考えられる。また、Pol II、Pol IV、Pol V以外にピリミジンダイマーを乗り越える際に誤りがち合成を行う未知の第4のTLS型ポリメラーゼの存在の可能性も考えられる。

### 3.2 *dinB*変異株、*polB*変異株、*umuDC*変異株における変異スペクトラム解析

自然突然変異の発生におけるTLSの役割を明らかにする目的で、TLS型ポリメラーゼであるPol II(*polB*)、Pol IV(*dinB*)、Pol V(*umuDC*)をそれぞれ欠損させた*dinB*変異株(MK1201)、*polB*変異株(MK1311)、*umuDC*変異株(MK1301)を作製した(表)。作製した菌株を用いて、*rpsL*前進突然変異頻度を測定し、PCRを用いて*rpsL*標的遺伝子を増幅、塩基配列を決定して詳細な変異スペクトラム解析を行った。

#### a) *rpsL*前進突然変異頻度

染色体*rpsL*系を用いてSm抵抗性を指標に*rpsL*前進突然変異頻度を測定した結果、*dinB*変異株で $0.53 \times 10^{-6}$ 、*polB*変異株で $0.55 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.84 \times 10^{-6}$ であった(表3.1、表3.2、表3.3)。野生株における*rpsL*前進突然変異頻度は $0.42 \times 10^{-6}$ であるため、各TLS型ポリメラーゼ欠損株における*rpsL*前進突然変異頻度を野生株と比較した相対値は、*dinB*変異株で1.3倍、*polB*変異株で1.3倍、*umuDC*変異株で2.0倍であった(表3.4)。TLS型ポリメラーゼをひとつずつ欠損させた変異株は、野生株に比べ、*rpsL*前進突然変異頻度の顕著な上昇は見られないことが示された。

誤りがち損傷乗り越えDNA合成が、自然突然変異に大きく関与している場合、各TLSポリメラーゼを欠損させれば*rpsL*前進突然変異頻度の低下がみられるはずである。しかし、表3.4に示した通り、野生株に比べ、*dinB*変異株、*umuDC*変異株、*polB*変異株にお

いて*rpsL*前進突然変異頻度の低下はみられなかった。この結果から、損傷乗り越えDNA合成は自然突然変異の発生に大きく関与していない可能性が考えられる。しかし、TLS型ポリメラーゼがある変異の発生に関与し、また、ある変異の抑制に関与している可能性も考えられる。また、自然突然変異の発生に部位特異的にTLS型ポリメラーゼが関与している可能性も考えられる。そこで、以下、変異の種類ごとの詳細な発生頻度と発生部位の比較を行った結果を示す。

## b) 組換え型変異

組換え型には前述したように、遺伝的組換えが生じる範囲によって、1点型と2点型に分けられている。1点型と2点型の発生頻度の合計は、*dinB*変異株で $0.22 \times 10^{-6}$ であり、*polB*変異株で $0.16 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.24 \times 10^{-6}$ であった(表3.1、表3.2、表3.3)。野生株における組換え型における1点型、2点型の発生頻度の合計は $0.092 \times 10^{-6}$ であるため、各TLS型ポリメラーゼ欠損株における組換え型変異の発生頻度を野生株と比較した相対値は、*dinB*変異株で2.4倍、*polB*変異株で1.8倍、*umuDC*変異株で2.6倍であった(表3.4)。TLS型ポリメラーゼをひとつずつ欠損させた変異株における組換え型変異の発生頻度は野生株に比べ、若干の上昇が見られた。この結果から、大腸菌細胞の通常生育下においても自然DNA損傷などの要因によって、複製フォークの停止が引き起こされ、その解消のためにTLSが若干、関与している可能性が考えられる。しかし、各TLS欠損株での組換え型変異の頻度上昇は2倍程度にとどまっているため、大きな影響はないと考えられる。

組換え型変異を、1点型、2点型と分けて考えてみると、1点型の発生頻度は、野生株において $0.026 \times 10^{-6}$ 、*dinB*変異株で $0.11 \times 10^{-6}$ であり、*polB*変異株で $0.086 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.089 \times 10^{-6}$ であった(付属表3、付属表4、付属表5)。各TLS型ポリメラーゼ欠損株における1点型組換え型変異の発生頻度を野生株と比較した相対値は、*dinB*変異株で4.2倍、*polB*変異株で3.3倍、*umuDC*変異株で3.4倍であった。同様に2点型の発生頻度に関しては、野生株において $0.066 \times 10^{-6}$ 、*dinB*変異株で $0.10 \times 10^{-6}$ であり、*polB*変異株で $0.076 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.15 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は*dinB*変異株で1.5倍、*polB*変異株で1.2倍、*umuDC*変異株で2.3倍であった。(付属表3、付属表4、付属表5)。TLS型ポリメラーゼ欠損株において、2点型よりも1点型の方が、大きな発生頻度の上昇が示された。

## c) 塩基置換

塩基置換の発生頻度は*dinB*変異株で $0.20 \times 10^{-6}$ であり、*polB*変異株で $0.29 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.43 \times 10^{-6}$ であった。*rpsL*前進突然変異頻度が*dinB*変異株で $0.53 \times 10^{-6}$ であり、*polB*変異株で $0.55 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.84 \times 10^{-6}$ であるため、*rpsL*前進突然変異頻度に対する塩基置換の発生頻度の割合は、*dinB*変異株で37%、*polB*変異株で53%、*umuDC*変異株で51%であり、塩基置換変異の発生頻度は*dinB*変異株、*polB*変異株、および*umuDC*変異株においては最も発生頻度の高い変異であった(表3.1A、表3.2A、表3.3A)。同様に、野生株でも*rpsL*前進突然変異頻度が $0.42 \times 10^{-6}$ であり、その50%にあたる $0.21 \times 10^{-6}$ の発生頻度で塩基置換が見出されており、最も発生頻度が高かった(表2.2A)。塩基置換の発生頻度は野生株に比べ、*dinB*変異株は0.95倍、*polB*変異株は1.4倍、*umuDC*変異株は2.0倍であり、野生株と同程度の発生頻度であった(表3.4A)。この結果から、野生株と同様に各TLS欠損株でも発生頻度は同程度であり、最も発生頻度が高かった変異も塩基置換であることが示された。

塩基置換変異において、各TLS欠損株で245T→Aのホットスポット型塩基置換が最も発生頻度が高く、*dinB*変異株で $0.099 \times 10^{-6}$ 、*polB*変異株で $0.13 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.20 \times 10^{-6}$ であった(表3.1C、表3.2C、表3.3C、図3.3B、図3.4B、図3.5B)。野生株の245T→Aの発生頻度 $0.077 \times 10^{-6}$ に比べ、*dinB*変異株で1.3倍、*polB*変異株で1.8倍、*umuDC*変異株で2.6倍であった(表3.4C)。*polB*変異株や*umuDC*変異株において、野生株よりも若干の上昇が見られる可能性が考えられるが、大きな関与は考えられない程度であった。また、82C→A部位における発生頻度の比較を行うと、野生株の245T→Aの発生頻度 $0.017 \times 10^{-6}$ に比べ、*dinB*変異株で $0.0084 \times 10^{-6}$ 、*polB*変異株で $0.027 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.022 \times 10^{-6}$ であった(表3.1C、表3.2C、表3.3C、図3.3B、図3.4B、図3.5B)。野生株の82C→Aの発生頻度 $0.017 \times 10^{-6}$ に比べ、*dinB*変異株で0.50倍、*polB*変異株で1.6倍、*umuDC*変異株で1.3倍であった(表3.4C)。82C→A部位においても、各TLS欠損株の発生頻度は野生株と同様であると考えられる。染色体*rpsL*系における245T→Aのホットスポット部位は、野生株でも最も発生頻度が高く、*rpsL*標的遺伝子上で生じる自然突然変異の大部分を占めている。また、次いで発生頻度の高い82C→Aのホットスポット部位も同様に自然突然変異の発生に大きく関与していると考えられる。そのため、245T→A、および82C→Aの発生メカニズムを明らかにすることは、自然突然変異の発生機構を明らかにする上で重要な問題になってくると考えられるが、この各TLS欠損株の結果から、245T→Aのホットスポット部位において、自然DNA損傷などが鋳型DNA鎖上に生じやすく、複製フォークが停止し、それを解消する場合にTLS型ポリメラーゼが誤りがち合成を行って塩基置換を生じている可能性は否定的となった。245T→A部位と82C→A

部位は複製エラーが関与しないことがすでに示されているため（本稿第二部参照）、複製エラーでもなく、TLSでもなく別の要因によって、発生していることが示された。これらの結果から、酸化損傷のような複製フォークの停止を引き起こさないタイプの自然DNA損傷が245T→A部位、および82C→A部位の発生に関与していることが考えられる。

また、非ホットスポット部位における塩基置換の種類別の変異頻度を比較すると、トランジション型塩基置換の発生頻度は、*dinB*変異株で $0.050 \times 10^{-6}$ 、*polB*変異株で $0.059 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.12 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は、*dinB*変異株で0.78倍、*polB*変異株で0.92倍、*umuDC*変異株で1.9倍であった(表3.1C、表3.2C、表3.3C、表3.4C)。また、トランスバージョン型塩基置換の発生頻度は、*dinB*変異株で $0.034 \times 10^{-6}$ 、*polB*変異株で $0.063 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.053 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は、*dinB*変異株で0.87倍、*polB*変異株で1.6倍、*umuDC*変異株で1.3倍であった(表3.1C、表3.2C、表3.3C、表3.4C)。この結果から、トランジション型塩基置換、トランスバージョン型塩基置換ともに野生株と各TLS欠損株で大きな違いは見出されなかった。また、発生部位における大きな違いも見出されなかった(図2.3B、図3.3B、図3.4B、図3.5B)。

以上の結果から、自然突然変異におけるホットスポット部位、および非ホットスポット部位の塩基置換変異において、大腸菌で見出されているTLS型ポリメラーゼ、Pol II、Pol IV, およびPol Vが大きく関与している可能性は低いことが示唆された。

#### d)1塩基フレームシフト

1塩基フレームシフトの発生頻度は野生株で $0.030 \times 10^{-6}$ 、*dinB*変異株で $0.023 \times 10^{-6}$ 、*polB*変異株で $0.026 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.075 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は、*dinB*変異株で0.77倍、*polB*変異株で0.86倍、*umuDC*変異株で2.5倍であった(表3.1B、表3.2B、表3.3B、表3.4B)。1塩基フレームシフトの種類別変異頻度は、1塩基の挿入において、野生株で $0.0055 \times 10^{-6}$ 、*dinB*変異株で $0.0051 \times 10^{-6}$ 、*polB*変異株で $0.0068 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.048 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値*dinB*変異株で0.92倍、*polB*変異株で1.2倍、*umuDC*変異株で8.6倍であった。また、1塩基の欠失において、 $0.025 \times 10^{-6}$ 、*dinB*変異株で $0.018 \times 10^{-6}$ 、*polB*変異株で $0.019 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.027 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は*dinB*変異株で0.77倍、*polB*変異株で0.86倍、*umuDC*変異株で2.5倍であった(表3.1B、表3.2B、表3.3B、表3.4B)。以上の結果から、*dinB*変異株、*polB*変異株に関しては1塩基の挿入、欠失ともに、野生株と同程度の発生頻度であった。しかし、*umuDC*変異株において、1塩基の挿入の発生頻度は野生株に比べて8.6倍

と大幅に上昇している。この結果から、大腸菌細胞内で*umuDC*にコードされるPol Vが通常生育下で発生する1塩基の挿入を抑制している可能性が考えられる。しかし、*umuDC*変異株の解析において、実験区#5から、同一の部位から、38検体のGの挿入が見出されており、残りの4実験区の1塩基の挿入の発生検体数から比較すると姉妹細胞由来の変異である可能性が高い(図3.5A)。よって、*umuDC*変異株における実験区#5を除外して、1塩基の挿入の発生頻度を計算し直すと、 $0.014 \times 10^{-6}$ となり、野生株の発生頻度に比べて、2.5倍程度の上昇となる。この結果から、*umuDC*変異株においても1塩基の挿入において野生株と同程度の発生頻度となることが示された。発生部位においても、1塩基の挿入、欠失ともに、野生株、および各TLS欠損株において、大きな違いは見出されなかった(図2.3A、図3.3A、図3.4A、図3.5A)。野生株では、ミスマッチ修復欠損株と違い、1塩基の欠失がnon-run配列でランダムに見いだされている(図2.3A)。各TLS欠損株においても、野生株とどのようにランダムに見いだされていた(図3.3A、図3.4A、図3.5A)。

以上の結果から、各TLS型ポリメラーゼは自然突然変異における1塩基フレームシフトの発生頻度に関して大きく関与していない可能性が示唆された。塩基置換と同様に1塩基フレームシフトにおいても、損傷乗り越えDNA合成の関与が否定的となった。自然突然変異として生じる1塩基フレームシフトは、標的遺伝子中にランダムに生じている。部位特異的ではなく、広範囲に生じる自然DNA損傷などにより、1塩基フレームシフトが発生している可能性が考えられる。

## e)その他の変異

### e-1)欠失

2塩基以上の欠失の発生頻度は野生株で $0.033 \times 10^{-6}$ 、*dinB*変異株で $0.025 \times 10^{-6}$ 、*polB*変異株で $0.020 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.029 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は、*dinB*変異株で0.75倍、*polB*変異株で0.62倍、*umuDC*変異株で0.88倍であった(表3.1A、表3.2A、表3.3A、表3.4A)。欠失は開始点と終結点に存在するリピート配列の種類によってタイプ1~タイプ3まで分類されているが、野生株と同様に各TLS欠損株でも開始点と終結点にダイレクトリピートが存在するタイプ1が欠失変異の90%以上を占めていた。

### e-2)重複

重複の発生頻度は野生株で $0.0046 \times 10^{-6}$ 、*dinB*変異株で $0.0033 \times 10^{-6}$ 、*polB*変異株で $0.0071 \times 10^{-6}$ 、*umuDC*変異株で $0.0035 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は、*dinB*変異株で0.71倍、*polB*変異株で0.62倍、*umuDC*変異株で0.88倍であった。重複は3つのクラ

スに分類されている(表3.1A、表3.2A、表3.3A、表3.4A)。クラスⅠは直列反復配列を伴う単純な重複であり、クラスⅡは逆位と直列反復配列を伴う複雑なもので短いインバーティドリピートを含んでいる。クラスⅢは一見するとクラスⅠのような単純な重複のように見えるが、構造的に見るとクラスⅡと似ているものである。また、クラスⅡ、Ⅲの重複については、新たにパリンδροーム配列が複数見られるのも特徴である。重複変異においても、野生株と各TLS欠損株において大きな違いは見いだされなかった。



表3.1. *dinB*変異株における前進突然変異の特異性

A. 変異の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 ×10 <sup>-6</sup>					ave ± SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
組換え型 <sup>1)</sup>	0.28	0.18	0.14	0.16	0.32	<b>0.22</b> ± 0.078
塩基置換						
ホットスポット1(82C→A) <sup>2)</sup>	0.0065	0.0021	0.021	0.0020	0.010	<b>0.0084</b> ± 0.0079
ホットスポット2(245T→A) <sup>2)</sup>	0.026	0.14	0.050	0.046	0.23	<b>0.099</b> ± 0.087
ホットスポット3(245T→G) <sup>2)</sup>	0.0022	0.013	0.0071	0.010	0.0067	<b>0.0077</b> ± 0.0040
上記以外	0.074	0.10	0.017	0.12	0.11	<b>0.085</b> ± 0.042
1塩基フレームシフト	0.017	0.030	0.040	0.016	0.013	<b>0.023</b> ± 0.011
2塩基フレームシフト	ND	ND	ND	0.0040	ND	<b>0.00080</b> ± 0.0018
配列置換	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> <0.00070
欠失	0.054	0.013	0.026	0.0080	0.023	<b>0.025</b> ± 0.018
重複	ND	0.0064	ND	ND	0.010	<b>0.0033</b> ± 0.0047
IS	0.061	0.026	0.034	0.10	0.067	<b>0.058</b> ± 0.031
その他	ND	ND	ND	0.0020	ND	<b>0.00040</b> ± 0.00089
変異なし	0.0043	0.0043	0.0014	0.0020	0.0033	<b>0.0031</b> ± 0.0013
Total	0.52	0.51	0.34	0.48	0.80	<b>0.53</b> ± 0.17

B. 1塩基フレームシフトの種類別変異頻度

実験区	変異頻度 ×10 <sup>-6</sup>					ave ± SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Addition						
at run <sup>3)</sup>	0.0043	ND	ND	0.0040	0.0033	<b>0.0023</b> ± 0.0022
at non-run <sup>3)</sup>	0.0022	0.0021	0.0028	ND	0.0067	<b>0.0028</b> ± 0.0024
total	0.0065	0.0021	0.0028	0.0040	0.010	<b>0.0051</b> ± 0.0032
Deletion						
at run <sup>3)</sup>	0.011	0.021	0.037	0.0080	0.0033	<b>0.016</b> ± 0.013
at non-run <sup>3)</sup>	ND	0.0064	ND	0.0040	ND	<b>0.0021</b> ± 0.0030
total	0.011	0.028	0.037	0.012	0.0033	<b>0.018</b> ± 0.014
Total	0.017	0.030	0.040	0.016	0.013	<b>0.023</b> ± 0.011

独立した5実験区由来の合計1200クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表中には、各実験区ごとの変異頻度（#1から#5まで）および、それらの平均値（Ave.）を記載した。検出されなかった変異に関しては、実験区ごとの変異頻度ではND（Not detected）と表記しているが、平均値を算出する際には、その実験区の変異頻度を0として計算した。より詳細なデータについては、付録表3を参照のこと。

表3.1-続き. *dinB*変異株における前進突然変異の特異性

C. 塩基置換の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Transition						
A:T→G:C	0.024	0.0043	ND	0.010	0.033	<b>0.014</b> $\pm$ 0.014
G:C→A:T	0.020	0.083	0.0014	0.036	0.040	<b>0.036</b> $\pm$ 0.030
total	0.043	0.087	0.0014	0.046	0.073	<b>0.050</b> $\pm$ 0.033
Transversion						
G:C→T:A	ND	0.0021	0.0028	0.010	0.0033	<b>0.0037</b> $\pm$ 0.0038
G:C→C:G	0.015	0.0021	0.0043	0.0040	0.0067	<b>0.0064</b> $\pm$ 0.0051
T:A→A:T	0.0087	0.0085	0.0057	0.044	0.013	<b>0.016</b> $\pm$ 0.016
A:T→C:G	0.0065	ND	0.0028	0.018	0.013	<b>0.0081</b> $\pm$ 0.0074
total	0.030	0.013	0.016	0.076	0.037	<b>0.034</b> $\pm$ 0.025
Hot spot						
82C→A <sup>2)</sup>	0.0065	0.0021	0.021	0.0020	0.010	<b>0.0084</b> $\pm$ 0.0079
245 T→A <sup>2)</sup>	0.026	0.14	0.050	0.046	0.23	<b>0.099</b> $\pm$ 0.087
245 T→G <sup>2)</sup>	0.0022	0.0128	0.0071	0.0100	0.0067	<b>0.0077</b> $\pm$ 0.0040
total	0.035	0.15	0.078	0.058	0.25	<b>0.11</b> $\pm$ 0.088
Total	0.11	0.25	0.095	0.18	0.36	<b>0.20</b> $\pm$ 0.11

1) 本来の位置に局在する変異型の*rpsL*遺伝子は、開始コドンから-22番目のA→G及び128番目のC→Aの2つの変異を持つ。この遺伝子と標的となる野生型*rpsL*遺伝子との組換えは、その位置により、前者のみ、後者のみ、あるいは両方の塩基置換を持つ遺伝子を産出する。このうち、当研究では、後者のみの変異、あるいは両方の変異を持つものが検出された。これらは塩基置換変異の結果である可能性は極めて低く、当研究では組換え型として別記した。

2) 染色体*rpsL*系では、*rpsL*標的遺伝子の開始コドンから82番目に位置するCがAに置換する塩基置換と、245番目のTがAもしくはGに置換する塩基置換が高頻度で観察され、塩基置換のホットスポットであると考えられた。他の塩基置換の割合を明確にするために、このホットスポット上で起こった塩基置換と他の塩基置換を分けて記載した。

3) 同一の塩基が2つ以上連続する部位をrunと呼ぶ。1塩基フレームシフトの変異頻度に関しては、runとrun以外とに分けて表示した。

```

5'-TGGCCTGGTGATGATGGCG GGATCGTTGT ATATTTCTTG ACACCTTTTC GGCATCGCCT1 TAAAATTCGGT1 CGTCTCATA TTGTGTGAGG -51
                                     -11
ACGTTTTATT ACGTGTTCAC GAAGCAAAGG CTAAA1AAACCAG GAGCTATTTA ATGGCAACAG TTAT1ACCAGCT GGTACGCAAΔ4 CCACGTGCTC 40
                                     Δ3
GCAAAGTTGC GAAAAGCAAC GTGG1CCTGCGC TGGA1AAGCATG CCCGCAΔ8AAAAAΔ14 CGTGGCGTAT GA1TACTCGTGT ATATACTACCΔ2 ACTCCTAAAA 130
                                     Δ2
AACCGAACTC CGCGCTGCGT AAAGSTATGCC GTGCG1TTCGTCT GACTAACGGT TTCGAAAGTGA CTTCTACAT CGGTGGTGAA GGTCAΔ1CAACC 220
Δ1
Δ1
Δ2
Δ1
TGCAGGAGCA CTCC1CGTGATC CTGATCCGTG GCGGTCGTGT TAAAGACCTC CCGGGTGTTC GTTACCACAC CGTACGTGGT GCGCTTGACTC1 310
                                     G1
GCTCCGGCGT TAAAGACCGT AAGCAGGCTC GTTCCAAGTA TGGCGTGAAG CGTCTTAAGG CTTAA -TGGTTCTCCGTTAAGTAAGGCC -3' 397

```

図3.3A *dinB*変異株 (MK1201) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフトの分布

```

5'-TGGCCTGGTGATGATGGCG GGATCGTTGT ATATTTCTTG ACACCTTTTC GGCATCGCCC1 TAAAATTCGGC4 CGTCTCATA TTGTGTGAGG -51
                                     -11
ACGTTTTATT ACGTGTTCAC GAAGCAAAGG CTAT1AAACCAG GAGCTATTTA ATGGCAACAG TTAA1ACCAGCT GGTACGCAAT3 CCACGTGCTCA1 40
                                     Δ2 Δ6
GCAAAGTTGC GAAAAGCAAC GTGA3CCTGCGC TGGA1AAGCATG CCCGCAA3AAAAAA15 CGTGGCGTAT GA1TACTCGTGT ATATACTACCT11 ACTCCTAAAA 130
                                     A9 A2 A1 C3 C1 A1A3 C1 A1
TGCAGGAGCA CTCG1CGTGATC CTGATCCGTG GCGGTCGTGT TAAAGACCTC CCGGGTGTTC GTTACCACAC CGTACGTGGT GCGCTTGACTT1 310
                                     T1 T1 T9 G6G1
GCTCCGGCGT TAAAGACCGT AAGCAGGCTC GTTCCAAGTA TGGCGTGAAG CGTCTTAAGG CTTAA -TGGTTCTCCGTTAAGTAAGGCC -3' 397

```

図3.3B *dinB*変異株 (MK1201) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた塩基置換の分布

図3.3AB *dinB*変異株 (MK1201) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフト (A) および塩基置換 (B) の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドン(1)とした時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。図中のvは1塩基の挿入を意味し、▽は 1塩基の欠失を示す。塩基置換の場合は、元の塩基の上に置換した塩基を記した。これらの変異した塩基の後ろの数字は同じ実験区で同様の部位で見出された検出数を示す。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、実験区2、実験区3、実験区4、実験区5。



図3.3C *dinB*変異株 (MK1201) における *rpsL*標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布

図3.3C *dinB*変異株 (MK1201) における *rpsL*標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドンを1とした時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。図中のvは重複を、Δは欠失を表し、それらの範囲は矢印で示した。重複あるいは欠失の両端に相同領域がある場合は、その領域を同じ模様のボックスで記した。同じ実験区で同じ部位で同じ重複あるいは欠失が見つかった場合は、その検出数をvあるいはΔの後に示した。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、実験区2、実験区3、実験区4、実験区5。

表3.2. *polB*変異株における前進突然変異の特異性

A. 変異の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 ×10 <sup>-6</sup>					ave ± SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
組換え型 <sup>1)</sup>	0.10	0.22	0.20	0.19	0.097	<b>0.16</b> ± 0.058
塩基置換						
ホットスポット1(82C→A) <sup>2)</sup>	0.042	0.0048	0.0058	0.042	0.014	<b>0.022</b> ± 0.019
ホットスポット2(245T→A) <sup>2)</sup>	0.11	0.12	0.10	0.082	0.27	<b>0.13</b> ± 0.076
ホットスポット3(245T→G) <sup>2)</sup>	0.016	0.017	0.0019	0.016	ND	<b>0.010</b> ± 0.0084
上記以外	0.084	0.10	0.084	0.19	0.15	<b>0.12</b> ± 0.046
1塩基フレームシフト	0.044	0.019	0.019	0.019	0.028	<b>0.026</b> ± 0.011
2塩基フレームシフト	ND	0.0024	ND	ND	ND	<b>0.00048</b> ± 0.0011
配列置換	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> <0.00080
欠失	0.044	0.014	0.017	0.009	0.017	<b>0.020</b> ± 0.014
重複	0.020	0.0024	0.0058	0.0047	0.0028	<b>0.0071</b> ± 0.0073
IS	0.014	0.064	0.023	0.012	0.086	<b>0.040</b> ± 0.033
その他	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> <0.00080
変異なし	0.0060	ND	0.0038	ND	0.0083	<b>0.0036</b> ± 0.0037
Total	0.48	0.57	0.46	0.56	0.67	<b>0.55</b> ± 0.083

B. 1塩基フレームシフトの種類別変異頻度

実験区	変異頻度 ×10 <sup>-6</sup>					ave ± SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Addition						
at run <sup>3)</sup>	0.0020	ND	ND	0.0047	0.0028	<b>0.0019</b> ± 0.0020
at non-run <sup>3)</sup>	0.0040	0.012	0.0058	ND	0.0028	<b>0.0049</b> ± 0.0044
total	0.0060	0.012	0.0058	0.0047	0.0055	<b>0.0068</b> ± 0.0029
Deletion						
at run <sup>3)</sup>	ND	0.0024	0.0096	0.014	0.0028	<b>0.0057</b> ± 0.0058
at non-run <sup>3)</sup>	0.038	0.0048	0.0038	ND	0.019	<b>0.013</b> ± 0.016
total	0.038	0.0071	0.013	0.014	0.022	<b>0.019</b> ± 0.012
Total	0.044	0.019	0.019	0.019	0.028	<b>0.026</b> ± 0.011

独立した5実験区由来の合計1200クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表中には、各実験区ごとの変異頻度（#1から#5まで）および、それらの平均値（Ave.）を記載した。検出されなかった変異に関しては、実験区ごとの変異頻度ではND（Not detected）と表記しているが、平均値を算出する際には、その実験区の変異頻度を0として計算した。より詳細なデータについては、付録表4を参照のこと。

表3.2-続き. *polB*変異株における前進突然変異の特異性

C. 塩基置換の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Transition						
A:T→G:C	ND	0.0071	0.0077	0.0093	0.028	<b>0.010</b> $\pm$ 0.010
G:C→A:T	0.054	0.069	0.061	0.012	0.047	<b>0.049</b> $\pm$ 0.022
total	0.054	0.076	0.069	0.021	0.075	<b>0.059</b> $\pm$ 0.023
Transversion						
G:C→T:A	0.0020	ND	ND	0.0047	0.0028	<b>0.0019</b> $\pm$ 0.0020
G:C→C:G	ND	0.014	0.0038	ND	0.055	<b>0.015</b> $\pm$ 0.023
T:A→A:T	0.016	0.012	0.0077	0.16	0.014	<b>0.042</b> $\pm$ 0.066
A:T→C:G	0.012	0.0024	0.0038	0.0047	0.0028	<b>0.0051</b> $\pm$ 0.0039
total	0.030	0.029	0.015	0.17	0.075	<b>0.063</b> $\pm$ 0.063
Hot spot						
82C→A <sup>2)</sup>	0.042	0.0048	0.0058	0.042	0.014	<b>0.022</b> $\pm$ 0.019
245 T→A <sup>2)</sup>	0.11	0.12	0.10	0.082	0.27	<b>0.13</b> $\pm$ 0.076
245 T→G <sup>2)</sup>	0.016	0.017	0.0019	0.016	ND	<b>0.010</b> $\pm$ 0.0084
total	0.16	0.14	0.11	0.14	0.28	<b>0.17</b> $\pm$ 0.068
Total	0.25	0.24	0.19	0.33	0.43	<b>0.29</b> $\pm$ 0.094

1) 本来の位置に局在する変異型の*rpsL*遺伝子は、開始コドンから-22番目のA→G及び128番目のC→Aの2つの変異を持つ。この遺伝子と標的となる野生型*rpsL*遺伝子との組換えは、その位置により、前者のみ、後者のみ、あるいは両方の塩基置換を持つ遺伝子を産出する。このうち、当研究では、後者のみの変異、あるいは両方の変異を持つものが検出された。これらは塩基置換変異の結果である可能性は極めて低く、当研究では組換え型として別記した。

2) 染色体*rpsL*系では、*rpsL*標的遺伝子の開始コドンから82番目に位置するCがAに置換する塩基置換と、245番目のTがAもしくはGに置換する塩基置換が高頻度で観察され、塩基置換のホットスポットであると考えられた。他の塩基置換の割合を明確にするために、このホットスポット上で起こった塩基置換と他の塩基置換を分けて記載した。

3) 同一の塩基が2つ以上連続する部位をrunと呼ぶ。1塩基フレームシフトの変異頻度に関しては、runとrun以外とに分けて表示した。



図3.4A *polB*変異株 (MK1311) における*rpsL*標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフトの分布



図3.4B *polB*変異株 (MK1311) における*rpsL*標的遺伝子上で生じた塩基置換の分布

図3.4AB *polB*変異株 (MK1311) における*rpsL*標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフト (A) および塩基置換 (B) の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドン(1)とした時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。図中のvは1塩基の挿入を意味し、▽は 1塩基の欠失を示す。塩基置換の場合は、元の塩基の上に置換した塩基を記した。これらの変異した塩基の後ろの数字は同じ実験区で同様の部位で見出された検出数を示す。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、実験区2、実験区3、実験区4、実験区5。

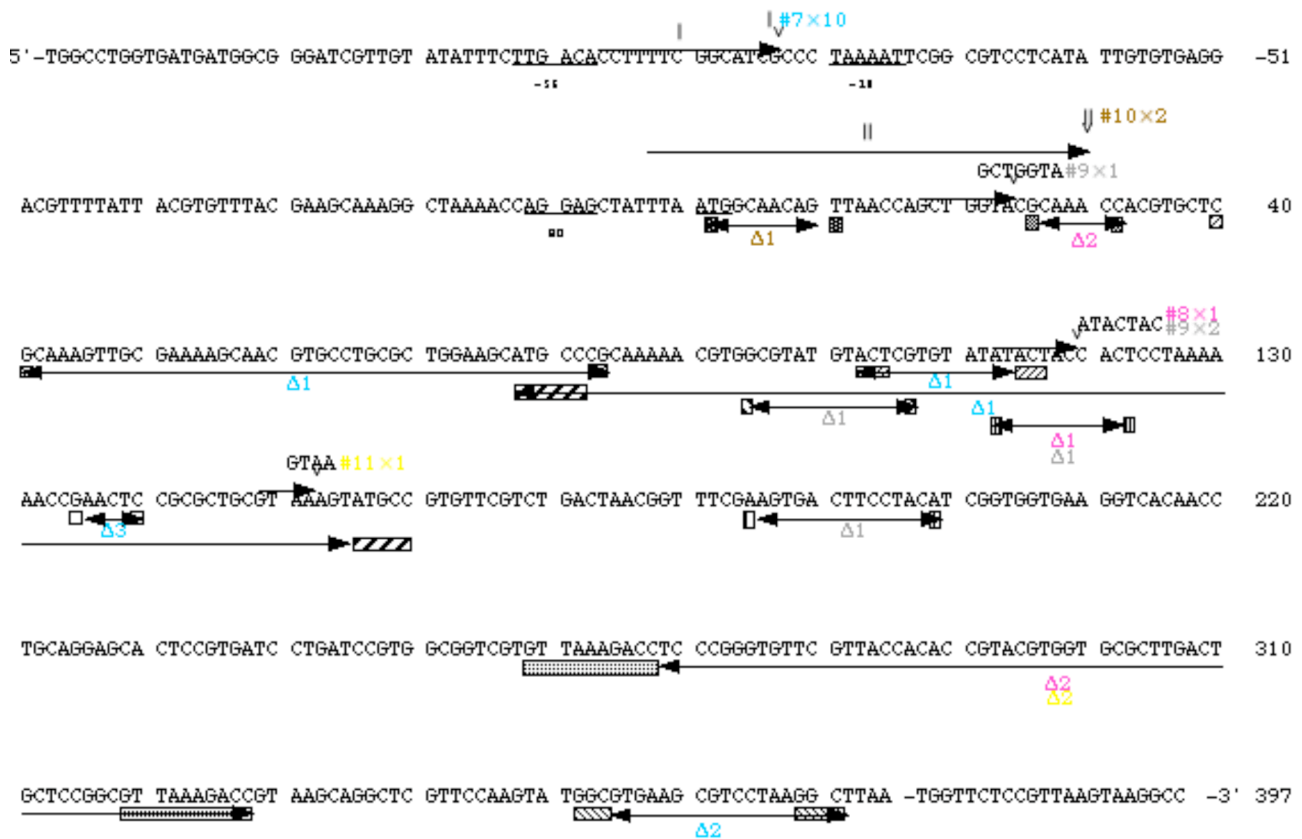


図3.4C *polB*変異株 (MK1311) における*rpsL*標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布

図3.4C *polB*変異株 (MK1311) における*rpsL*標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドンとして時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。図中のvは重複を、Δは欠失を表し、それらの範囲は矢印で示した。重複あるいは欠失の両端に相同領域がある場合は、その領域を同じ模様のボックスで記した。同じ実験区で同じ部位で同じ重複あるいは欠失が見つかった場合は、その検出数をvあるいはΔの後に示した。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、実験区2、実験区3、実験区4、実験区5。



表3.3. *umuDC*変異株における前進突然変異の特異性

A. 変異の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
組換え型 <sup>1)</sup>	0.26	0.45	0.04	0.24	0.19	<b>0.24</b> $\pm$ 0.15
塩基置換						
ホットスポット1(82C→A) <sup>2)</sup>	0.065	0.037	0.018	0.0046	0.011	<b>0.027</b> $\pm$ 0.024
ホットスポット2(245T→A) <sup>2)</sup>	0.20	0.34	0.081	0.14	0.24	<b>0.20</b> $\pm$ 0.099
ホットスポット3(245T→G) <sup>2)</sup>	0.0030	0.0046	0.011	0.12	ND	<b>0.028</b> $\pm$ 0.053
上記以外	0.11	0.11	0.061	0.48	0.11	<b>0.18</b> $\pm$ 0.17
1塩基フレームシフト	0.015	0.046	0.088	0.037	0.19	<b>0.075</b> $\pm$ 0.069
2塩基フレームシフト	ND	ND	0.0018	ND	ND	<b>0.00035</b> $\pm$ 0.00078
配列置換	ND	ND	0.0018	ND	ND	<b>0.00035</b> $\pm$ 0.00078
欠失	0.021	0.023	0.051	0.037	0.015	<b>0.029</b> $\pm$ 0.015
重複	ND	ND	0.0018	ND	ND	<b>0.00035</b> $\pm$ 0.00078
IS	0.024	0.087	0.063	0.046	0.11	<b>0.066</b> $\pm$ 0.033
その他	0.0030	ND	ND	ND	0.0036	<b>0.0013</b> $\pm$ 0.0018
変異なし	0.0030	ND	ND	ND	0.0036	<b>0.0013</b> $\pm$ 0.0018
Total	0.71	1.1	0.42	1.1	0.87	<b>0.84</b> $\pm$ 0.29

B. 1塩基フレームシフトの種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Addition						
at run <sup>3)</sup>	0.0059	0.0046	0.028	0.0046	0.18	<b>0.045</b> $\pm$ 0.077
at non-run <sup>3)</sup>	0.0030	ND	0.011	ND	ND	<b>0.0027</b> $\pm$ 0.0045
total	0.0089	0.0046	0.039	0.0046	0.18	<b>0.048</b> $\pm$ 0.076
Deletion						
at run <sup>3)</sup>	0.0059	0.037	0.0035	0.0091	0.0036	<b>0.012</b> $\pm$ 0.014
at non-run <sup>3)</sup>	ND	0.0046	0.046	0.023	0.0036	<b>0.015</b> $\pm$ 0.019
total	0.0059	0.041	0.049	0.032	0.0073	<b>0.027</b> $\pm$ 0.020
Total	0.015	0.046	0.088	0.037	0.19	<b>0.075</b> $\pm$ 0.069

独立した5実験区由来の合計1200クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表中には、各実験区ごとの変異頻度（#1から#5まで）および、それらの平均値（Ave.）を記載した。検出されなかった変異に関しては、実験区ごとの変異頻度ではND（Not detected）と表記しているが、平均値を算出する際には、その実験区の変異頻度を0として計算した。より詳細なデータについては、付録表5を参照のこと。

表3.3-続き. *umuDC*変異株における前進突然変異の特異性

C. 塩基置換の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Transition						
A:T→G:C	0.012	ND	0.011	0.25	0.0073	<b>0.056</b> $\pm$ 0.11
G:C→A:T	0.056	0.11	0.033	0.10	0.036	<b>0.066</b> $\pm$ 0.035
total	0.068	0.11	0.044	0.35	0.044	<b>0.12</b> $\pm$ 0.13
Transversion						
G:C→T:A	0.0030	ND	ND	0.0091	0.022	<b>0.0068</b> $\pm$ 0.0092
G:C→C:G	0.015	0.0046	0.014	0.059	ND	<b>0.019</b> $\pm$ 0.024
T:A→A:T	0.027	ND	0.0035	0.041	0.025	<b>0.019</b> $\pm$ 0.017
A:T→C:G	ND	ND	ND	0.018	0.022	<b>0.0080</b> $\pm$ 0.011
total	0.044	0.0046	0.018	0.13	0.069	<b>0.053</b> $\pm$ 0.049
Hot spot						
82C→A <sup>2)</sup>	0.065	0.037	0.018	0.0046	0.011	<b>0.027</b> $\pm$ 0.024
245 T→A <sup>2)</sup>	0.20	0.34	0.081	0.14	0.24	<b>0.20</b> $\pm$ 0.099
245 T→G <sup>2)</sup>	0.0030	0.0046	0.011	0.12	ND	<b>0.028</b> $\pm$ 0.053
total	0.27	0.38	0.11	0.26	0.25	<b>0.25</b> $\pm$ 0.097
Total	0.38	0.49	0.17	0.74	0.36	<b>0.43</b> $\pm$ 0.21

1) 本来の位置に局在する変異型の*rpsL*遺伝子は、開始コドンから-22番目のA→G及び128番目のC→Aの2つの変異を持つ。この遺伝子と標的となる野生型*rpsL*遺伝子との組換えは、その位置により、前者のみ、後者のみ、あるいは両方の塩基置換を持つ遺伝子を産出する。このうち、当研究では、後者のみの変異、あるいは両方の変異を持つものが検出された。これらは塩基置換変異の結果である可能性は極めて低く、当研究では組換え型として別記した。

2) 染色体*rpsL*系では、*rpsL*標的遺伝子の開始コドンから82番目に位置するCがAに置換する塩基置換と、245番目のTがAもしくはGに置換する塩基置換が高頻度で観察され、塩基置換のホットスポットであると考えられた。他の塩基置換の割合を明確にするために、このホットスポット上で起こった塩基置換と他の塩基置換を分けて記載した。

3) 同一の塩基が2つ以上連続する部位をrunと呼ぶ。1塩基フレームシフトの変異頻度に関しては、runとrun以外とに分けて表示した。



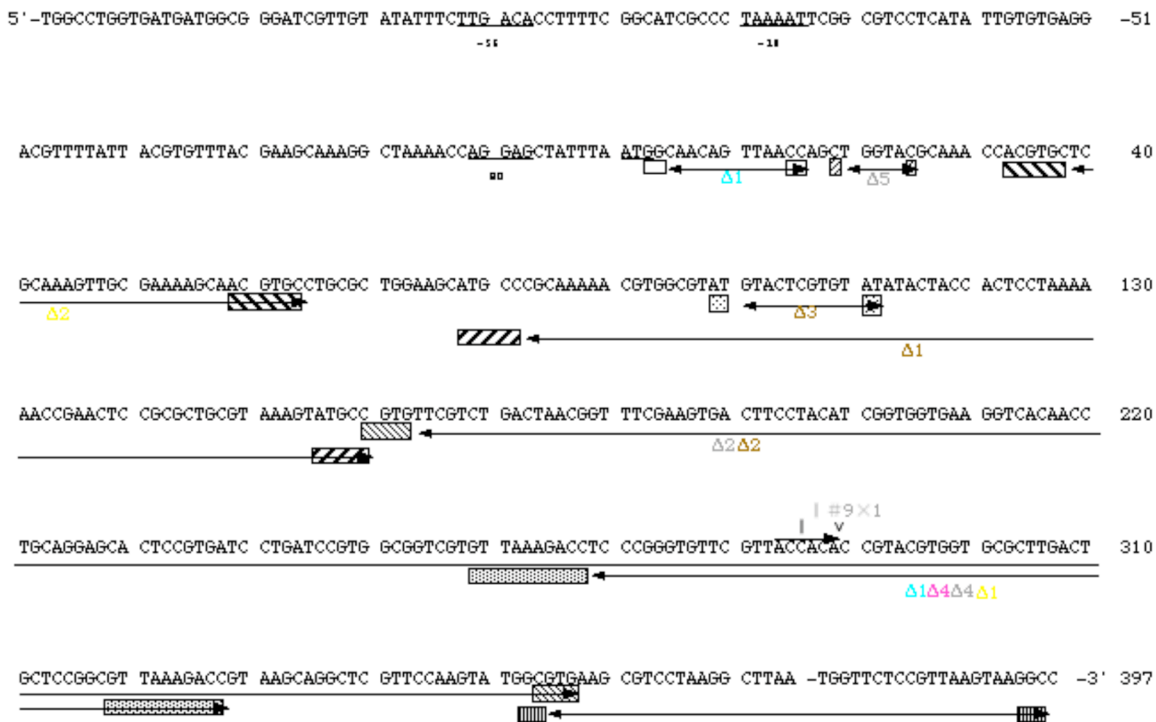


図3.5C *umuDC*変異株 (MK1301) における*rpsL*標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布

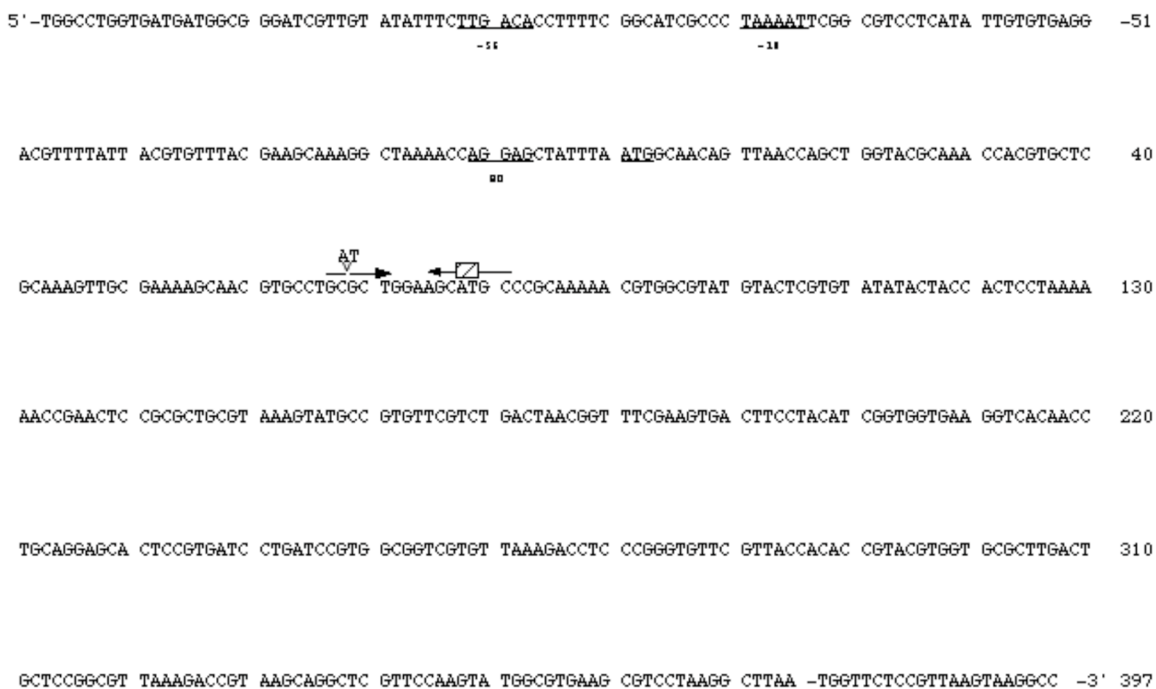


図3.5D *umuDC*変異株 (MK1301) における*rpsL*標的遺伝子上で生じた配列置換の分布

図3.5CD *umuDC*変異株 (MK1301) における*rpsL*標的遺伝子上で生じた欠失 (C) および配列置換 (D) の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドンを1とした時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。同じ実験区で同じ部位で同じ変異が見つかった場合は、その検出数を実験区番号の後に示した。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、実験区2、実験区3、実験区4、実験区5。(C) 図中のvは重複を、Δは欠失を表し、その範囲は矢印で示した。欠失の両端に相同領域がある場合は、その領域を同じ模様のボックスで記した。(D) 複数の塩基が全く違う塩基に置き換わることを配列置換と呼ぶ。実験区から2塩基の挿入が1例見つかった。配列置換の前後には偽逆向き繰り返し配列が存在し、それが配列置換により完全な逆向き繰り返し配列になる場合が多い。前後の繰り返し配列を矢印で、異なる塩基の部分ボックスで示す。

表3.4 野生株と *dinB*変異株、*polB*変異株、*umuDC*変異株の  
前進突然変異の比較

A. 変異の種類別変異頻度の比較

	Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )							
	MK811 野生株		MK1201 <i>dinB</i> 変異株		MK1311 <i>polB</i> 変異株		MK1301 <i>umuDC</i> 変異株	
組換え型 <sup>1)</sup>	0.092	( 1.0 )	0.22	( 2.4 )	0.16	( 1.8 )	0.24	( 2.6 )
塩基置換 <sup>2)</sup>	0.21	( 1.0 )	0.20	( 0.95 )	0.29	( 1.4 )	0.43	( 2.0 )
1塩基フレームシフト <sup>3)</sup>	0.030	( 1.0 )	0.023	( 0.77 )	0.026	( 0.86 )	0.075	( 2.5 )
2塩基フレームシフト	ND<0.00070		0.00080		0.00048		0.00035	
配列置換	ND<0.00070		ND<0.00070		ND<0.00080		0.00035	
欠失	0.033	( 1.0 )	0.025	( 0.75 )	0.020	( 0.62 )	0.029	( 0.88 )
重複	0.0046	( 1.0 )	0.0033	( 0.71 )	0.0071	( 1.5 )	0.00035	( 0.076 )
IS	0.046	( 1.0 )	0.058	( 1.3 )	0.040	( 0.86 )	0.065	( 1.4 )
その他	ND<0.00070		0.00089		ND<0.00080		0.0018	
変異なし	0.0084	( 1.0 )	0.0031	( 0.37 )	0.0036	( 0.43 )	0.0013	( 0.16 )
Total	0.42	( 1.0 )	0.53	( 1.3 )	0.55	( 1.3 )	0.84	( 2.0 )

B. 1塩基フレームシフトの種類別変異頻度の比較

	Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )			
	MK811 野生株	MK1201 <i>dinB</i> 変異株	MK1311 <i>polB</i> 変異株	MK1301 <i>umuDC</i> 変異株
Addition				
at run	0.0049 ( 1.0 )	0.0023 ( 0.47 )	0.045 ( 9.1 )	0.0019 ( 0.38 )
at non-run	0.00059 ( 1.0 )	0.0028 ( 4.7 )	0.0027 ( 4.6 )	0.0049 ( 8.2 )
total	0.0055 ( 1.0 )	0.0051 ( 0.92 )	0.048 ( 8.6 )	0.0068 ( 1.23 )
Deletion				
at run	0.018 ( 1.0 )	0.016 ( 0.91 )	0.012 ( 0.66 )	0.0057 ( 0.32 )
at non-run	0.0068 ( 1.0 )	0.0021 ( 0.30 )	0.015 ( 2.2 )	0.013 ( 1.9 )
total	0.025 ( 1.0 )	0.018 ( 0.74 )	0.027 ( 1.1 )	0.019 ( 0.77 )
Total	0.030 ( 1.0 )	0.023 ( 0.77 )	0.075 ( 2.5 )	0.026 ( 0.86 )

誤りがちDNA合成の特異性を明らかにするために、*dinB*変異株 (MK1201)、*polB*変異株(MK1311)、*umuDC*変異株(MK1301)を用いて、*rpsL*標的遺伝子上に生じた突然変異の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。比較のために、野生株 (MK811) での結果もあわせて記載した。*dinB*変異株 (MK1201)、*polB*変異株(MK1311)、*umuDC*変異株(MK1301)および野生株(MK811)のより詳細なデータに関しては、それぞれ付録表1、付録表3、付録表4、付録表5を参照のこと。表中には平均値、及び、括弧内に野生株の変異頻度を1としたときの相対値を示す。検出されなかった変異に関しては、ND (Not detected) と表記し、さらにその右隣に当研究から推定された変異頻度の最大値を記した。

表3.4-続き. 野生株と *dinB*変異株、*polB*変異株、*umuDC*変異株の  
前進突然変異の比較

C.塩基置換の種類別変異頻度の比較

	Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )							
	MK811 野生株		MK1201 <i>dinB</i> 変異株		MK1311 <i>polB</i> 変異株		MK1301 <i>umuDC</i> 変異株	
Transition								
A:T→G:C	0.0071	( 1.0 )	0.014	( 2.0 )	0.056	( 8.0 )	0.010	( 1.47 )
G:C→A:T	0.057	( 1.0 )	0.036	( 0.63 )	0.066	( 1.2 )	0.049	( 0.85 )
total	0.064	( 1.0 )	0.050	( 0.78 )	0.12	( 1.9 )	0.059	( 0.92 )
Transversion								
G:C→T:A	0.014	( 1.0 )	0.0037	( 0.26 )	0.0068	( 0.48 )	0.0019	( 0.13 )
G:C→C:G	0.0076	( 1.0 )	0.0064	( 0.85 )	0.019	( 2.5 )	0.015	( 1.9 )
T:A→A:T	0.0083	( 1.0 )	0.016	( 1.9 )	0.019	( 2.3 )	0.042	( 5.0 )
A:T→C:G	0.0094	( 1.0 )	0.0081	( 0.86 )	0.0080	( 0.85 )	0.0051	( 0.54 )
total	0.039	( 1.0 )	0.034	( 0.87 )	0.053	( 1.3 )	0.063	( 1.6 )
Hot spot								
82C→A <sub>2</sub> )	0.017	( 1.0 )	0.0084	( 0.50 )	0.027	( 1.6 )	0.022	( 1.3 )
245 T→A <sub>2</sub> )	0.077	( 1.0 )	0.099	( 1.3 )	0.20	( 2.6 )	0.13	( 1.8 )
245 T→G <sub>2</sub> )	0.013	( 1.0 )	0.0077	( 0.61 )	0.028	( 2.2 )	0.010	( 0.81 )
total	0.11	( 1.0 )	0.11	( 1.1 )	0.25	( 2.4 )	0.17	( 1.6 )
Total	0.21	( 1.0 )	0.20	( 0.95 )	0.43	( 2.0 )	0.29	( 1.4 )

1) 本来の位置に局在する変異型の *rpsL* 遺伝子は、開始コドンから-22番目のA→G及び128番目のC→Aの2つの変異を持つ。この遺伝子と標的となる野生型 *rpsL* 遺伝子との組換えは、その位置により、前者のみ、後者のみ、あるいは両方の塩基置換を持つ遺伝子を産出する。このうち、当研究では、後者のみの変異、あるいは両方の変異を持つものが検出された。これらは塩基置換変異の結果である可能性は極めて低く、当研究では組換え型として別記した。

2) 染色体 *rpsL* 系では、*rpsL* 標的遺伝子の開始コドンから82番目に位置するCがAに置換する塩基置換と、245番目のTがAもしくはGに置換する塩基置換が高頻度で観察され、塩基置換のホットスポットであると考えられた。他の塩基置換の割合を明確にするために、このホットスポット上で起こった塩基置換と他の塩基置換を分けて記載した。

3) 同一の塩基が2つ以上連続する部位をrunと呼ぶ。1塩基フレームシフトの変異頻度に関しては、runとrun以外とに分けて表示した。

3.3

## *dinB polB*二重変異株、*dinB umuDC*二重変異株、*polB umuDC*二重変異株、および*dinB polB umuDC*三重変異株における変異スペクトラム解析

本章3.2で示されたように3つのTLSポリメラーゼをそれぞれ欠損させたsingle mutantに関しては、*rpsL*標的遺伝子上で生じる自然突然変異の発生頻度と発生部位において、野生株と大きな差は見出されなかった。先に述べたように、大腸菌ではTLSポリメラーゼ (Pol II、Pol IV、Pol V) が3つ見出されており、これらのTLSポリメラーゼのうち、2つ、もしくは3つが協調的に、通常生育下で発生している損傷塩基の乗り越えに関与している可能性は否定できない。そこで、本研究では、*dinB polB*二重変異株、*dinB umuDC*二重変異株、*polB umuDC*二重変異株を作成し、自然突然変異の発生への関与を明らかにすることを試みた。また、*dinB polB umuDC*三重変異株を作成し、大腸菌におけるTLSポリメラーゼ完全欠損株を用いた同様の解析を行った。

### a) *rpsL*前進突然変異頻度

染色体*rpsL*系を用いてSm抵抗性を指標に*rpsL*前進突然変異頻度を測定した結果、*dinB umuDC*二重変異株で $0.57 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB*二重変異株で $0.50 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC*二重変異株で $0.50 \times 10^{-6}$ であった(表3.5A、表3.6A、表3.7A)。野生株における*rpsL*前進突然変異頻度は $0.42 \times 10^{-6}$ であるため、各TLS型ポリメラーゼ二重欠損株における*rpsL*前進突然変異頻度を野生株と比較した相対値は、*dinB umuDC*二重変異株で1.3倍、*dinB polB*変異株で1.3倍、*polB umuDC*変異株で1.2倍であった(表3.9A)。大腸菌において見出されている3つのTLS型ポリメラーゼを2つずつ欠損させた変異株は、野生株に比べ、*rpsL*前進突然変異頻度の顕著な上昇は見られないことが示された。また、大腸菌で見出されている全てのTLS型ポリメラーゼを完全欠損させたと考えられる*dinB umuDC polB*三重変異株における*rpsL*前進突然変異頻度は $0.64 \times 10^{-6}$ となり、野生株に比べて1.5倍の数値でありTLS型ポリメラーゼ二重欠損株と同様に顕著な上昇が見出されなかった。

Pol II、Pol IV、Pol Vの各TLSポリメラーゼが協調的に働き、自然突然変異の発生を引き起こしているのなら、各TLS二重変異株、TLS三重変異株において、変異頻度の低下がみられるはずである。しかし、*rpsL*前進突然変異頻度の測定から、野生株と同程度の発生頻度であった。これらの結果から、各TLS型ポリメラーゼが協調的に働き、突然変異を発生しているという考えは否定的となった。しかし、TLS型ポリメラーゼがある変異の発生に関与し、また、ある変異の抑制に関与している可能性も考えられる。また、自然突然変

異の発生に部位特異的にTLS型ポリメラーゼが関与している可能性も考えられる。そこで、以下、変異の種類ごとの詳細な発生頻度と発生部位の比較を行った結果を示す。

## b) 組換え型変異

遺伝的組換えの結果生じる変異である組換え型変異は、前述したように、1点型と2点型に分けられている。1点型と2点型の発生頻度の合計は、*dinB umuDC*二重変異株で $0.17 \times 10^{-6}$ であり、*dinB polB*二重変異株で $0.19 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC*二重変異株で $0.082 \times 10^{-6}$ であった(表3.5A、表3.6A、表3.7A)。野生株における組換え型の1点型、2点型の発生頻度の合計は $0.092 \times 10^{-6}$ であるため、各TLS型ポリメラーゼ二重欠損株における組換え型変異の発生頻度を野生株と比較した相対値は、*dinB umuDC*二重変異株で1.8倍、*dinB polB*二重変異株で2.1倍、*polB umuDC*二重変異株で0.88倍であった(表3.9A)。TLS型ポリメラーゼをふたつずつ欠損させた二重変異株における組換え型変異の発生頻度は野生株に比べ、ほぼ同程度か若干の発生頻度の上昇がみられた。また、TLS型ポリメラーゼを完全欠損させたと考えられる*dinB umuDC polB*三重欠損株における組換え型変異の発生頻度は、 $0.28 \times 10^{-6}$ であり、野生株に比べ、3.0倍の上昇がみられた。

組換え型変異を、1点型、2点型と分けて考えてみると、1点型の発生頻度は、野生株において $0.026 \times 10^{-6}$ 、*dinB umuDC*二重変異株で $0.062 \times 10^{-6}$ であり、*dinB polB*二重変異株で $0.074 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC*二重変異株で $0.043 \times 10^{-6}$ であった(付属表6、付属表7、付属表8、付属表9)。各TLS型ポリメラーゼ欠損株における組換え型変異の発生頻度を野生株と比較した相対値は、*dinB umuDC*二重変異株で2.3倍、*dinB polB*二重変異株で2.8倍、*polB umuDC*二重変異株で1.7倍であった。同様に2点型の発生頻度に関しては、野生株において $0.066 \times 10^{-6}$ 、*dinB umuDC*二重変異株で $0.11 \times 10^{-6}$ であり、*dinB polB*二重変異株で $0.14 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC*二重変異株で $0.038 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は*dinB umuDC*二重変異株で1.6倍、*dinB polB*二重変異株で2.1倍、*polB umuDC*二重変異株で0.58倍であった(付属表6、付属表7、付属表8、付属表9)。TLS型ポリメラーゼ二重欠損株においても、2点型よりも1点型の方が、発生頻度の上昇がある程度示された。

組換え型の発生頻度、および一点型、二点型の発生頻度が、野生株と各TLS二重変異株、TLS三重変異株とで大きく異なることから、野生株においても、TLS欠損株においても、複製フォークの停止を引き起こすような自然DNA損傷は同程度に生じており、それを同程度に組換え修復によって修復されていることが示唆された。



### c) 塩基置換

塩基置換の発生頻度は *dinB umuDC* 二重変異株で  $0.25 \times 10^{-6}$  であり、*dinB polB* 二重変異株で  $0.23 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC* 二重変異株で  $0.34 \times 10^{-6}$  であった(表3.5C、表3.6C、表3.7C)。*rpsL* 前進突然変異頻度が *dinB umuDC* 二重変異株で  $0.57 \times 10^{-6}$  であり、*dinB polB* 二重変異株で  $0.54 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC* 二重変異株で  $0.50 \times 10^{-6}$  であるため、*rpsL* 前進突然変異頻度に対する塩基置換の発生頻度の割合は、*dinB umuDC* 二重変異株で 43%、*dinB polB* 二重変異株で 42%、*polB umuDC* 二重変異株で 68% であり、塩基置換変異の発生頻度は *dinB umuDC* 二重変異株、*dinB polB* 二重変異株、および *polB umuDC* 二重変異株においては最も発生頻度の高い変異であった。同様に、野生株でも *rpsL* 前進突然変異頻度が  $0.42 \times 10^{-6}$  であり、その 50% にあたる  $0.21 \times 10^{-6}$  の発生頻度で塩基置換が見出されており、最も発生頻度が高かった。この結果から、野生株と同様に各 TLS 二重欠損株でも最も発生頻度が高かった変異は塩基置換であることが示された。

塩基置換変異において、各 TLS 二重欠損株で 245T→A のホットスポット型塩基置換が最も発生頻度が高く、*dinB umuDC* 二重変異株で  $0.12 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB* 二重変異株で  $0.16 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC* 二重変異株で  $0.19 \times 10^{-6}$  であった(表3.5C、表3.6C、表3.7C)。野生株の 245T→A の発生頻度  $0.077 \times 10^{-6}$  に比べ、*dinB umuDC* 二重変異株で 1.5 倍、*dinB polB* 二重変異株で 2.1 倍、*polB umuDC* 二重変異株で 2.0 倍であった。TLS 二重欠損株は、野生株よりも若干の上昇が見られる可能性が考えられるが、大きな関与は考えられない程度であった(表3.9C)。また、82C→A 部位における発生頻度は、*dinB umuDC* 二重変異株で  $0.016 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB* 二重変異株で  $0.0085 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC* 二重変異株で  $0.11 \times 10^{-6}$  であった(表3.5C、表3.6C、表3.7C)。野生株の 82C→A の発生頻度  $0.017 \times 10^{-6}$  に比べ、*dinB umuDC* 二重変異株で 0.96 倍、*dinB polB* 二重変異株で 0.50 倍、*polB umuDC* 二重変異株で 0.7 倍であった(表3.9C)。82C→A 部位においても 245T→A 部位と同様に発生頻度違いは見いだされなかった。

TLS 二重欠損株、および TLS 三重欠損株の詳細な解析からも、82C→A、245T→A のホットスポット部位における TLS 型 DNA ポリメラーゼが協調的に関与するという考えは否定的となった。TLS 型 DNA ポリメラーゼを完全欠損させた *dinB umuDC polB* 三重変異株における塩基置換の発生頻度は、 $0.28 \times 10^{-6}$  であり、*rpsL* 前進突然変異頻度の 43% を占めており最も高頻度に見いだされた変異であった(表3.8C)。*dinB umuDC polB* 三重変異株における塩基置換の発生頻度は野生株に比べ 1.3 倍であり、ほぼ同程度であった(表3.9C)。ホットスポットである 245T→A 部位における塩基置換が  $0.19 \times 10^{-6}$  の発生頻度で見いだされ、野生株に比べ、1.6 倍とほぼ同程度の発生頻度であった(表3.9C)。TLS 三重

欠損株の詳細な解析からも、245T→Aのホットスポット部位におけるTLS型DNAポリメラーゼの協調的に関与するという考えは否定的となった。

また、非ホットスポット部位における塩基置換の種類別の変異頻度を比較すると、トランジション型塩基置換の発生頻度は、*dinB umuDC*二重変異株で $0.060 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB*二重変異株で $0.016 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC*二重変異株で $0.026 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は、*dinB umuDC*二重変異株で0.94倍、*dinB polB*二重変異株で0.25倍、*polB umuDC*二重変異株で0.41倍であった(表3.5C、表3.6C、表3.7C、表3.9C)。また、トランスバージョン型塩基置換の発生頻度は、*dinB umuDC*二重変異株で $0.037 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB*二重変異株で $0.033 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC*二重変異株で $0.031 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は、*dinB umuDC*二重変異株で0.95倍、*dinB polB*二重変異株で0.85倍、*polB umuDC*二重変異株で0.79倍であった(表3.5C、表3.6C、表3.7C、表3.9C)。この結果から、トランジション型塩基置換、トランスバージョン型塩基置換ともに野生株と各TLS二重欠損株で大きな違いは見出されなかった。また、発生部位における大きな違いも見出されなかった(図3.6B、図3.7B、図3.8B)。TLS型DNAポリメラーゼが完全欠損していると考えられる*dinB umuDC polB*三重変異株におけるトランジション型塩基置換の発生頻度は $0.052 \times 10^{-6}$ であり、トランスバージョン型塩基置換の発生頻度は $0.024 \times 10^{-6}$ であった(表3.8C)。野生株に比べ*dinB umuDC polB*三重変異株はトランジション型塩基置換の発生頻度は0.81倍、トランスバージョン型塩基置換の発生頻度で0.61倍であった(表3.9C)。TLS三重欠損株においてもトランジション型塩基置換、トランスバージョン型塩基置換ともに野生株と発生頻度に大きな違いは見いだされなかった。また、発生部位における大きな違いも見出されなかった(図3.9B)

以上の結果から、自然突然変異におけるホットスポット部位、および非ホットスポット部位の塩基置換変異において、大腸菌で見出されているTLS型ポリメラーゼ、Pol II、Pol IV、およびPol Vが大きく関与している可能性は否定的であることが示唆された。

#### d)1塩基フレームシフト

1塩基フレームシフトの発生頻度は野生株で $0.030 \times 10^{-6}$ 、*dinB umuDC*二重変異株で $0.046 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB*二重変異株で $0.049 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC*二重変異株で $0.024 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB umuDC*三重変異株で $0.033 \times 10^{-6}$ であった(表3.5B、表3.6B、表3.7B、表3.8B)。野生株との相対値は、*dinB umuDC*二重変異株で1.5倍、*dinB polB*二重変異株で1.6倍、*polB umuDC*二重変異株で0.79倍、*dinB polB umuDC*三重変異株で1.1倍であった(表3.9B)。1塩基フレームシフトの種類別変異頻度は、1塩基の挿入の発生頻度

が、野生株で $0.0055 \times 10^{-6}$ 、*dinB umuDC*二重変異株で $0.0089 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB*二重変異株で $0.011 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC*二重変異株で $0.0061 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB umuDC*三重変異株で $0.018 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は*dinB umuDC*二重変異株で1.6倍、*dinB polB*二重変異株で1.9倍、*polB umuDC*二重変異株で1.1倍、*dinB polB umuDC*三重変異株で3.2倍であった（表3.5B、表3.6B、表3.7B、表3.8B、表3.9B）。また、1塩基の欠失の発生頻度は、野生株で $0.025 \times 10^{-6}$ 、*dinB umuDC*二重変異株で $0.037 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB*二重変異株で $0.038 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC*二重変異株で $0.018 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB umuDC*三重変異株で $0.015 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は*dinB umuDC*二重変異株で1.5倍、*dinB polB*二重変異株で1.6倍、*polB umuDC*二重変異株で0.72倍、*dinB polB umuDC*三重変異株で0.60倍であった（表3.5B、表3.6B、表3.7B、表3.8B、表3.9B）。*dinB*変異株、*polB*発生部位においても、1塩基の挿入、欠失ともに、野生株、および各TLS二重欠損株およびTLS三重欠損株において、大きな違いは見出されなかった。以上の結果から、各TLS型ポリメラーゼは自然突然変異における1塩基フレームシフトの発生頻度に関して大きく関与していない可能性が示唆された。また、発生部位における大きな違いも見出されなかった（図3.6A、図3.7A、図3.8A、図3.9A）。野生株では、ミスマッチ修復欠損株と違い、1塩基の欠失がnon-run配列でランダムに見いだされている（図2.3A）。各TLS欠損株においても、野生株とどのようにランダムに見いだされていた（図3.6A、図3.7A、図3.8A、図3.9A）。

## e)その他の変異

### e-1)欠失

2塩基以上の欠失の発生頻度は、野生株で $0.033 \times 10^{-6}$ 、*dinB umuDC*二重変異株で $0.039 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB*二重変異株で $0.012 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC*二重変異株で $0.0074 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB umuDC*三重変異株で $0.023 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は*dinB umuDC*二重変異株で1.2倍、*dinB polB*二重変異株で0.37倍、*polB umuDC*二重変異株で0.22倍、*dinB polB umuDC*三重変異株で0.64倍であった（表3.5A、表3.6A、表3.7A、表3.8A、表3.9A）。*dinB polB*二重変異株と*polB umuDC*二重変異株で、野生株に比べて若干の発生頻度の低下がみられるが、*rpsL*染色体系で見いだされる2塩基以上の欠失の検体数が少ないためと考えられ、野生株の発生頻度と大きく異ならないと考えられる（付録表7、付録表8）。

### e-2)重複

重複の発生頻度は、野生株で $0.0046 \times 10^{-6}$ 、*dinB umuDC*二重変異株で $0.0026 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB*二重変異株で $0.0032 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC*二重変異株では見いだされず、*dinB polB umuDC*三重変異株で $0.0021 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は*dinB umuDC*二重変異株で0.56倍、*dinB polB*二重変異株で0.69倍、*dinB polB umuDC*三重変異株で0.47倍であった（表3.5A、表3.6A、表3.7A、表3.8A、表3.9A）。重複に関してもTLS二重欠損株、TLS三重欠損株ともに野生株と大きく発生頻度は異ならないと考えられる。

#### e-3)IS

挿入配列であるISの発生頻度は、野生株で $0.046 \times 10^{-6}$ 、*dinB umuDC*二重変異株で $0.044 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB*二重変異株で $0.018 \times 10^{-6}$ 、*polB umuDC*二重変異株で $0.033 \times 10^{-6}$ 、*dinB polB umuDC*三重変異株で $0.021 \times 10^{-6}$ であり、野生株との相対値は*dinB umuDC*二重変異株で1.0倍、*dinB polB*二重変異株で0.40倍、*polB umuDC*二重変異株で0.72倍、*dinB polB umuDC*三重変異株で0.46倍であった（表3.5A、表3.6A、表3.7A、表3.8A、表3.9A）。ISの発生頻度においても野生株と同程度であった。

### 3.4 まとめ

大腸菌の複製型DNAポリメラーゼであるPol IIIによる複製エラーは自然突然変異の発生に大きく関与していないことが本研究で明らかにされた。そこで近年、突然変異への関与が示唆されている自然DNA損傷に注目し、自然DNA損傷を乗り越えるTLSの関与を明らかにする目的で、*rpsL*染色体系を用いた大規模解析を行った。前述したように大腸菌ではDNAポリメラーゼが5つ見いだされており、そのうちPol II、Pol IV、Pol Vの3つがDNA鎖上の損傷を乗り越える際、相補塩基対合規則とは異なった塩基を挿入する誤りがちDNA合成（error prone DNA合成）を行うことが示されている。Pol IIはDNA鎖上に人工的に導入したAAF(アセチルアミノフルオレン)を乗り越える際に、-2塩基のフレームシフトを生じることが示されている。Pol IVは発ガン性物質であるベンゾピレン（BaP）を付加したGを乗り越える際に1塩基の欠失を生じることが示されている(Napolitano., 2000)。Pol V(UmuDC)はDNA鎖上に配置された6-4光産物を乗り越える際に、Tに対してCを挿入するため、トランジション型塩基置換を生じながら乗り越え、脱塩基部位(AP site)に対してAを挿入して乗り越えることが示されている(LeClerc., 1991; Smith., 1996)。。本研究においてもPol V(UmuDC)がUV照射時に突然変異頻度を上昇させることが示されている（図3.2）。また、Pol Vが鋳型DNA鎖上の損傷を乗り越える際、SOS反応によって活性化されたRecAタンパクが、Pol Vと協調的に働き、乗り越え反応を促進

させていることも示されている (Pham .,2001,2002)。

近年の遺伝学的、生化学的解析から、TLS型DNAポリメラーゼは、複製型DNAポリメラーゼの動態とは異なり、細胞内でもDNA鎖上に発生したDNA損傷を乗り越える際にエラーを生じると考えられていた。しかし、本研究で、野生株とTLS欠損株での変異スペクトラム解析に大きな違いは見いだされなかった。TLSポリメラーゼが誤りがち乗り越え合成を行うという研究報告は主に鋳型DNA鎖上に人工的に損傷を配置するか、強度のUV (紫外線) を照射させた状態でのTLSポリメラーゼの乗り越えを調べている。本研究で用いた*rpsL*染色体突然変異検出系は、大腸菌の染色体上に生じた自然突然変異を塩基配列レベルで同定できる実験系である。DNA鎖上に人工的に配置した損傷や、UVを強照射しDNA損傷を人工的に生じさせた解析と異なり、本研究で用いた*rpsL*前進突然変異検出系での結果は、細胞が自然生育下で生じる自然突然変異の詳細を効率的に解析していると考えられる。したがって、本研究により自然生育下における自然突然変異の発生にTLS型DNAポリメラーゼは関与していないことが強く示唆された。

本稿の第二部、第三部の結果から、自然突然変異の発生経路に複製エラーを損傷乗り越えDNA合成が大きく関与していないことが示された。そのため、自然突然変異の新たな発生経路の探索が急務であると考えられる。当研究室の坂井 (2006) の研究において、染色体*rpsL*部分二倍体株を用いた同様の解析を、嫌気的条件下でおこなった。その結果、塩基置換のホットスポット部位である245T→A部位の塩基置換変異の発生頻度が好気的条件下に比べて低下することが示された。また、当研究室の沙魚川 (未発表) の研究において、ヌクレオチド除去修復 (NER) における修復合成の際に、突然変異を生じることが示されている。これらの結果から、複製フォークの停止を引き起こさないタイプの酸化損傷や、今までエラーフリーの修復経路と考えられていたNERの経路により、自然突然変異が発生している可能性が示唆されている。今まで、自然突然変異を抑制していたと考えられる他の修復経路によって自然突然変異が発生している可能性も考えられ、今後、さらなる解析が必要であると考えられる。また、本研究で用いたTLS完全欠損株はPol IIをコードする*polB*、Pol IVをコードする*dinB*、Pol Vをコードする*umuDC*を欠損させた菌株である。しかし、大腸菌において、これら3つのTLSポリメラーゼ以外にも未知のTLSポリメラーゼが存在する可能性も否定できない。大腸菌における新たなTLS型ポリメラーゼの探索も試みる必要があるかもしれない。

表3.5. *dinB umuDC*二重変異株における前進突然変異の特異性

A. 変異の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
組換え型 <sup>1)</sup>	0.12	0.10	0.22	0.25	0.16	<b>0.17</b> $\pm$ 0.062
塩基置換						
ホットスポット1(82C→A) <sup>2)</sup>	0.014	0.0051	0.049	0.0024	0.0092	<b>0.016</b> $\pm$ 0.019
ホットスポット2(245T→A) <sup>2)</sup>	0.14	0.075	0.19	0.10	0.071	<b>0.12</b> $\pm$ 0.050
ホットスポット3(245T→G) <sup>2)</sup>	0.012	0.014	0.023	0.015	0.034	<b>0.019</b> $\pm$ 0.0091
上記以外	0.085	0.070	0.039	0.077	0.21	<b>0.097</b> $\pm$ 0.067
1塩基フレームシフト	0.0060	0.038	0.010	0.044	0.13	<b>0.046</b> $\pm$ 0.051
2塩基フレームシフト	ND	0.021	ND	ND	0.0061	<b>0.0053</b> $\pm$ 0.0089
配列置換	0.0020	ND	ND	ND	0.043	<b>0.0090</b> $\pm$ 0.019
欠失	0.042	0.058	0.021	0.056	0.018	<b>0.039</b> $\pm$ 0.019
重複	ND	ND	0.013	ND	ND	<b>0.0026</b> $\pm$ 0.0058
IS	0.063	0.021	0.049	0.036	0.052	<b>0.044</b> $\pm$ 0.0162
その他	0.0081	ND	0.0052	0.0024	0.0061	<b>0.0044</b> $\pm$ 0.0032
変異なし	ND	0.0051	0.0026	ND	ND	<b>0.0015</b> $\pm$ 0.0023
Total	0.49	0.41	0.62	0.58	0.74	<b>0.57</b> $\pm$ 0.13

B. 1塩基フレームシフトの種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Addition						
at run <sup>3)</sup>	ND	0.022	ND	ND	0.0061	<b>0.0057</b> $\pm$ 0.0096
at non-run <sup>3)</sup>	0.0040	0.012	ND	ND	ND	<b>0.0032</b> $\pm$ 0.0052
total	0.0040	0.034	ND	ND	0.0061	<b>0.0089</b> $\pm$ 0.014
Deletion						
at run <sup>3)</sup>	ND	0.0034	0.0052	0.027	0.13	<b>0.032</b> $\pm$ 0.053
at non-run <sup>3)</sup>	0.0020	ND	0.0052	0.017	ND	<b>0.0048</b> $\pm$ 0.0071
total	0.0020	0.0034	0.010	0.044	0.13	<b>0.037</b> $\pm$ 0.052
Total	0.0060	0.038	0.010	0.044	0.13	<b>0.046</b> $\pm$ 0.051

独立した5実験区由来の合計1200クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表中には、各実験区ごとの変異頻度（#1から#5まで）および、それらの平均値（Ave.）を記載した。検出されなかった変異に関しては、実験区ごとの変異頻度ではND（Not detected）と表記しているが、平均値を算出する際には、その実験区の変異頻度を0として計算した。より詳細なデータについては、付録表6を参照のこと。

表3.5-続き. *dinB umuDC*二重変異株における前進突然変異の特異性

C. 塩基置換の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Transition						
A:T→G:C	0.024	0.0034	0.0078	0.015	0.16	<b>0.041</b> $\pm$ 0.065
G:C→A:T	0.026	0.010	0.016	0.017	0.025	<b>0.019</b> $\pm$ 0.0066
total	0.050	0.014	0.023	0.031	0.18	<b>0.060</b> $\pm$ 0.069
Transversion						
G:C→T:A	0.012	0.0017	ND	0.015	ND	<b>0.0057</b> $\pm$ 0.0071
G:C→C:G	ND	ND	0.0026	ND	0.021	<b>0.0048</b> $\pm$ 0.0094
T:A→A:T	0.018	0.048	0.0078	0.029	0.0061	<b>0.022</b> $\pm$ 0.017
A:T→C:G	0.0040	0.0068	0.0052	0.0024	0.0031	<b>0.0043</b> $\pm$ 0.0018
total	0.034	0.056	0.016	0.046	0.031	<b>0.037</b> $\pm$ 0.016
Hot spot						
82C→A <sup>2)</sup>	0.014	0.0051	0.049	0.0024	0.0092	<b>0.016</b> $\pm$ 0.019
245 T→A <sup>2)</sup>	0.14	0.075	0.19	0.10	0.071	<b>0.12</b> $\pm$ 0.050
245 T→G <sup>2)</sup>	0.012	0.014	0.023	0.015	0.034	<b>0.019</b> $\pm$ 0.0091
total	0.17	0.094	0.26	0.12	0.11	<b>0.15</b> $\pm$ 0.068
Total	0.25	0.16	0.30	0.20	0.33	<b>0.25</b> $\pm$ 0.068

1) 本来の位置に局在する変異型の*rpsL*遺伝子は、開始コドンから-22番目のA→G及び128番目のC→Aの2つの変異を持つ。この遺伝子と標的となる野生型*rpsL*遺伝子との組換えは、その位置により、前者のみ、後者のみ、あるいは両方の塩基置換を持つ遺伝子を産出する。このうち、当研究では、後者のみの変異、あるいは両方の変異を持つものが検出された。これらは塩基置換変異の結果である可能性は極めて低く、当研究では組換え型として別記した。

2) 染色体*rpsL*系では、*rpsL*標的遺伝子の開始コドンから82番目に位置するCがAに置換する塩基置換と、245番目のTがAもしくはGに置換する塩基置換が高頻度で観察され、塩基置換のホットスポットであると考えられた。他の塩基置換の割合を明確にするために、このホットスポット上で起こった塩基置換と他の塩基置換を分けて記載した。

3) 同一の塩基が2つ以上連続する部位をrunと呼ぶ。1塩基フレームシフトの変異頻度に関しては、runとrun以外とに分けて表示した。



図3.6A *dinB umuDC*変異株 (MK1221) における *rpsL*標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフトの分布

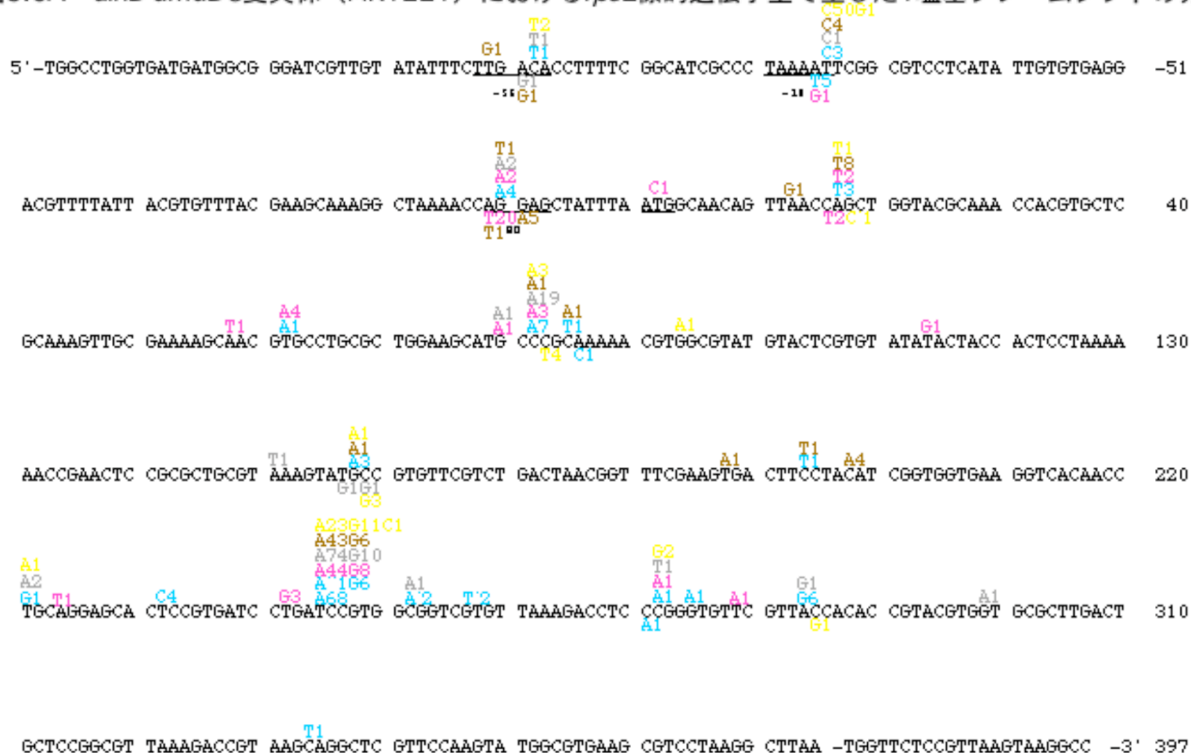


図3.6B *dinB umuDC*変異株 (MK1221) における *rpsL*標的遺伝子上で生じた塩基置換の分布

図3.6AB *dinB umuDC*変異株 (MK1221) における *rpsL*標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフト (A) および塩基置換 (B) の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドンとした時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。図中のvは1塩基の挿入を意味し、▽は1塩基の欠失を示す。塩基置換の場合は、元の塩基の上に置換した塩基を記した。これらの変異した塩基の後ろの数字は同じ実験区で同様の部位で見出された検出数を示す。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、実験区2、実験区3、実験区4、実験区5。



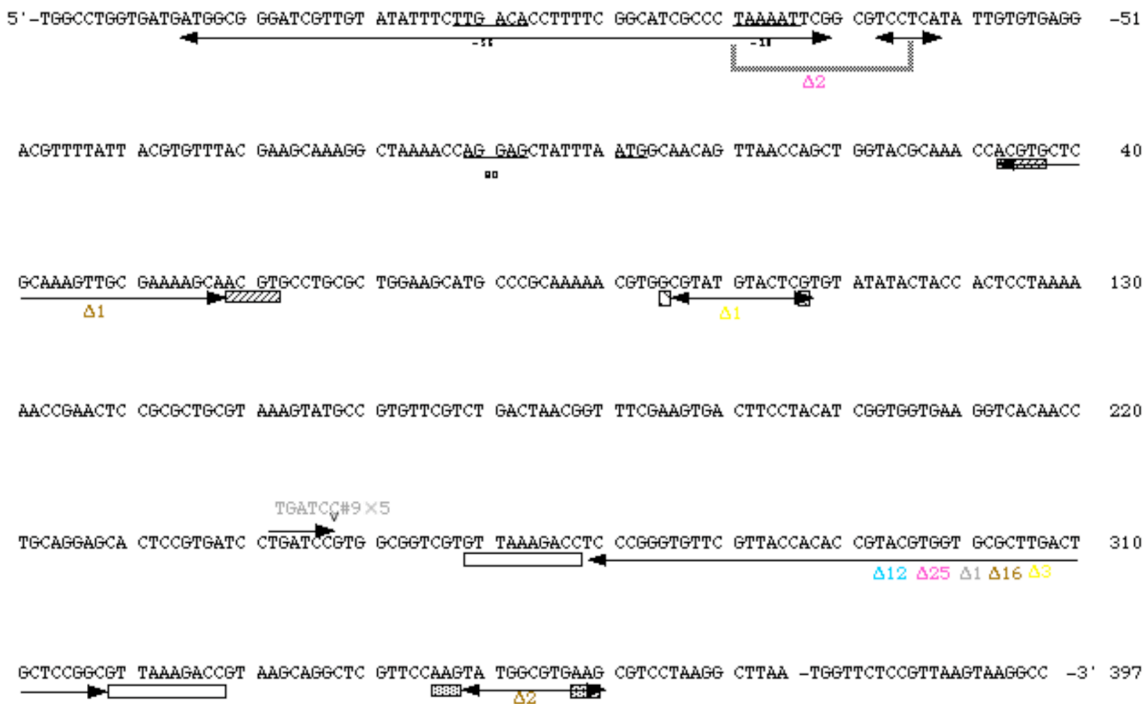


図3.6C *dinB umuDC*変異株 (MK1221) における *rpsL*標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布

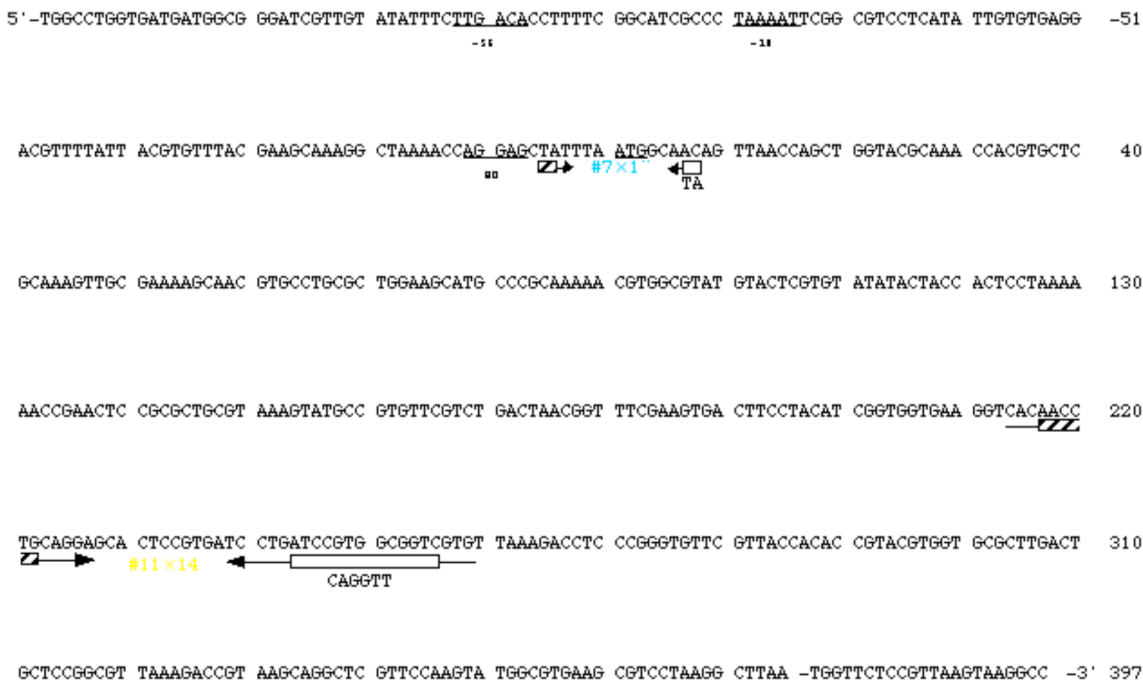


図3.6D *dinB umuDC*変異株 (MK1221) における *rpsL*標的遺伝子上で生じた配列置換の分布

図3.6CD *dinB umuDC*変異株 (MK1221) における *rpsL*標的遺伝子上で生じた重複及び欠失 (C) および配列置換 (D) の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドンを1とした時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。同じ実験区で同じ部位で同じ変異が見つかった場合は、その検出数を実験区番号の後に示した。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、実験区2、実験区3、実験区4、実験区5。

(C) 図中のvは重複を、Δは欠失を表し、その範囲は矢印で示した。欠失の両端に相同領域がある場合は、その領域を同じ模様のボックスで記した。(D) 複数の塩基が全く違う塩基に置き換わることを配列置換と呼ぶ。実験区から2塩基の挿入が1例見つかった。配列置換の前後には偽逆向き繰り返し配列が存在し、それが配列置換により完全な逆向き繰り返し配列になる場合が多い。前後の繰り返し配列を矢印で、異なる塩基の部分の部分をボックスで示す。

表3.6. *dinB polB*二重変異株における前進突然変異の特異性

A. 変異の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$						ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	
組換え型 <sup>1)</sup>	0.26	0.12	0.42	0.20	0.14	0.11	<b>0.21</b> $\pm$ 0.12
塩基置換							
ホットスポット1(82C→A) <sup>2)</sup>	0.010	0.012	ND	ND	0.016	0.013	<b>0.0085</b> $\pm$ 0.0068
ホットスポット2(245T→A) <sup>2)</sup>	0.13	0.35	0.17	0.18	0.19	0.044	<b>0.18</b> $\pm$ 0.099
ホットスポット3(245T→G) <sup>2)</sup>	0.031	0.025	ND	ND	ND	0.013	<b>0.011</b> $\pm$ 0.014
上記以外	0.051	0.025	0.051	0.010	0.13	0.031	<b>0.049</b> $\pm$ 0.041
1塩基フレームシフト	0.010	0.012	0.10	0.019	0.11	0.038	<b>0.049</b> $\pm$ 0.046
2塩基フレームシフト	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> $<$ 0.0038
配列置換	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> $<$ 0.0038
欠失	ND	ND	0.051	0.029	0.079	0.019	<b>0.030</b> $\pm$ 0.031
重複	ND	ND	ND	0.019	ND	ND	<b>0.0032</b> $\pm$ 0.0078
IS	ND	0.050	0.017	ND	0.095	0.031	<b>0.032</b> $\pm$ 0.036
その他	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> $<$ 0.0038
変異なし	ND	0.012	ND	ND	ND	ND	<b>0.0021</b> $\pm$ 0.0051
Total	0.49	0.61	0.81	0.46	0.76	0.30	<b>0.57</b> $\pm$ 0.19

B. 1塩基フレームシフトの種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$						ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	
Addition							
at run <sup>3)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	0.0063	<b>0.0010</b> $\pm$ 0.0026
at non-run <sup>3)</sup>	ND	ND	0.051	ND	ND	0.0063	<b>0.0095</b> $\pm$ 0.020
total	ND	ND	0.051	ND	ND	0.013	<b>0.011</b> $\pm$ 0.020
Deletion							
at run <sup>3)</sup>	0.010	ND	ND	ND	ND	0.025	<b>0.0059</b> $\pm$ 0.010
at non-run <sup>3)</sup>	ND	0.012	0.051	0.019	0.11	ND	<b>0.032</b> $\pm$ 0.043
total	0.010	0.012	0.051	0.019	0.11	0.025	<b>0.038</b> $\pm$ 0.039
Total	0.010	0.012	0.10	0.019	0.11	0.038	<b>0.049</b> $\pm$ 0.046

独立した6実験区由来の合計266クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表中には、各実験区ごとの変異頻度（#1から#6まで）および、それらの平均値（Ave.）を記載した。検出されなかった変異に関しては、実験区ごとの変異頻度ではND（Not detected）と表記しているが、平均値を算出する際には、その実験区の変異頻度を0として計算した。より詳細なデータについては、付録表7を参照のこと。

表3.6-続き. *dinB polB*二重変異株における前進突然変異の特異性

C. 塩基置換の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$						ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	
Transition							
A:T→G:C	ND	0.012	ND	ND	0.063	ND	<b>0.013</b> $\pm$ 0.025
G:C→A:T	0.020	ND	ND	ND	ND	ND	<b>0.0034</b> $\pm$ 0.0083
total	0.020	0.012	ND	ND	0.063	ND	<b>0.016</b> $\pm$ 0.025
Transversion							
G:C→T:A	ND	ND	ND	ND	0.016	ND	<b>0.0026</b> $\pm$ 0.0065
G:C→C:G	0.020	0.012	ND	0.0096	0.016	ND	<b>0.0097</b> $\pm$ 0.0083
T:A→A:T	0.010	ND	0.034	ND	0.016	0.031	<b>0.015</b> $\pm$ 0.015
A:T→C:G	ND	ND	0.017	ND	0.016	ND	<b>0.0055</b> $\pm$ 0.0085
total	0.031	0.012	0.051	0.0096	0.063	0.031	<b>0.033</b> $\pm$ 0.021
Hot spot							
82C→A <sup>2)</sup>	0.010	0.012	ND	ND	0.016	0.013	<b>0.0085</b> $\pm$ 0.0068
245 T→A <sup>2)</sup>	0.13	0.35	0.17	0.18	0.19	0.044	<b>0.18</b> $\pm$ 0.099
245 T→G <sup>2)</sup>	0.031	0.025	ND	ND	ND	0.013	<b>0.011</b> $\pm$ 0.014
total	0.17	0.39	0.17	0.18	0.21	0.069	<b>0.20</b> $\pm$ 0.10
Total	0.22	0.41	0.22	0.19	0.33	0.10	<b>0.25</b> $\pm$ 0.11

1) 本来の位置に局在する変異型の*rpsL*遺伝子は、開始コドンから-22番目のA→G及び128番目のC→Aの2つの変異を持つ。この遺伝子と標的となる野生型*rpsL*遺伝子との組換えは、その位置により、前者のみ、後者のみ、あるいは両方の塩基置換を持つ遺伝子を産出する。このうち、当研究では、後者のみの変異、あるいは両方の変異を持つものが検出された。これらは塩基置換変異の結果である可能性は極めて低く、当研究では組換え型として別記した。

2) 染色体*rpsL*系では、*rpsL*標的遺伝子の開始コドンから82番目に位置するCがAに置換する塩基置換と、245番目のTがAもしくはGに置換する塩基置換が高頻度で観察され、塩基置換のホットスポットであると考えられた。他の塩基置換の割合を明確にするために、このホットスポット上で起こった塩基置換と他の塩基置換を分けて記載した。

3) 同一の塩基が2つ以上連続する部位をrunと呼ぶ。1塩基フレームシフトの変異頻度に関しては、runとrun以外とに分けて表示した。

```

5'-TGGCCTGGTGATGATGGCG GGATCGTTGT ATATTTCTTG ACACCTTTTC GGCATCGCCC TAAAAATCGG CGTCCTCATA TTGTGTGAGG -51
                                     -54                                     -34

ACGTTTTATT ACGTGTTTAC GAAGCAAAGG CTAAAAACCAG GARCTATTTA ATGGCAACAG TTAACCAGCT GGTACGCAAA CCACGTGCTC 40
                                     **

GCAAAGTTGC GAAAAGCAAC GTGCCTGCGC TGGAAGCATG CCCGCAAAAA CGTGGCGTAT GTACTCGTGT ATATACTACC ACTCCTAAAA 130
                                     v2 v1 v1 v2 v1

AAACCGAACTC CGCGCTGCGT AAAGTATGCC GTGTTCGTCT GACTAACGGT TTCGAAAGTA CTCCTACAT CGGTGGTGAA GGTCACAACC 220

TGCAGGAGCA CTCCGTGATC CTGATCCGTG GCGGTCGTGT TAAAGACCTC CCGGGTGTTC GTTACCACAC CGTACGTGGT GCGCTTGACT 310
v6 v1 v1 v2 v2

GCTCCGGCGT TAAAGACCGT AAGCAGGCTC GTTCCAAGTA TGGCGTGAAG CGTCCTAAGG CTTAA -TGGTTCCTCCGTTAAGTAAGGCC -3' 397
v2 v1 C3

```

図3.7A *dinB polB*二重変異株 (MK1331) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフトの分布

```

5'-TGGCCTGGTGATGATGGCG GGATCGTTGT ATATTTCTTG ACACCTTTTC GGCATCGCCC TAAAAATCGG CGTCCTCATA TTGTGTGAGG -51
                                     -54                                     -34

ACGTTTTATT ACGTGTTTAC GAAGCAAAGG CTAAAAACCAG GARCTATTTA ATGGCAACAG TTAACCAGCT GGTACGCAAA CCACGTGCTC A1 40
                                     T1 T1 T1 T2 G1

GCAAAGTTGC GAAAAGCAAC GTGCCTGCGC TGGAAGCATG CCCGCAAAAA CGTGGCGTAT GTACTCGTGT ATATACTACC ACTCCTAAAA 130
                                     G1 A1 A1 A1 A1 A1 A1

AAACCGAACTC CGCGCTGCGT AAAGTATGCC GTGTTCGTCT GACTAACGGT TTCGAAAGTA CTCCTACAT CGGTGGTGAA GGTCACAACC 220
                                     G1 C1 G1 G1 C1

TGCAGGAGCA CTCCGTGATC CTGATCCGTG GCGGTCGTGT TAAAGACCTC CCGGGTGTTC GTTACCACAC CGTACGTGGT GCGCTTGACT 310
A7G2 A12 A19 A10 A27A'1G2 G3 A13 G1

GCTCCGGCGT TAAAGACCGT AAGCAGGCTC GTTCCAAGTA TGGCGTGAAG CGTCCTAAGG CTTAA -TGGTTCCTCCGTTAAGTAAGGCC -3' 397
T4

```

図3.7B *dinB polB*二重変異株 (MK1331) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた塩基置換の分布

図3.7 *dinB polB*二重変異株 (MK1331) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフト (A) および塩基置換 (B) の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドンを1とした時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。図中のvは1塩基の挿入を意味し、∇は1塩基の欠失を示す。塩基置換の場合は、元の塩基の上に置換した塩基を記した。これらの変異した塩基の後ろの数字は同じ実験区で同様の部位で見出された検出数を示す。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、**実験区2**、**実験区3**、**実験区4**、**実験区5**、**実験区6**。

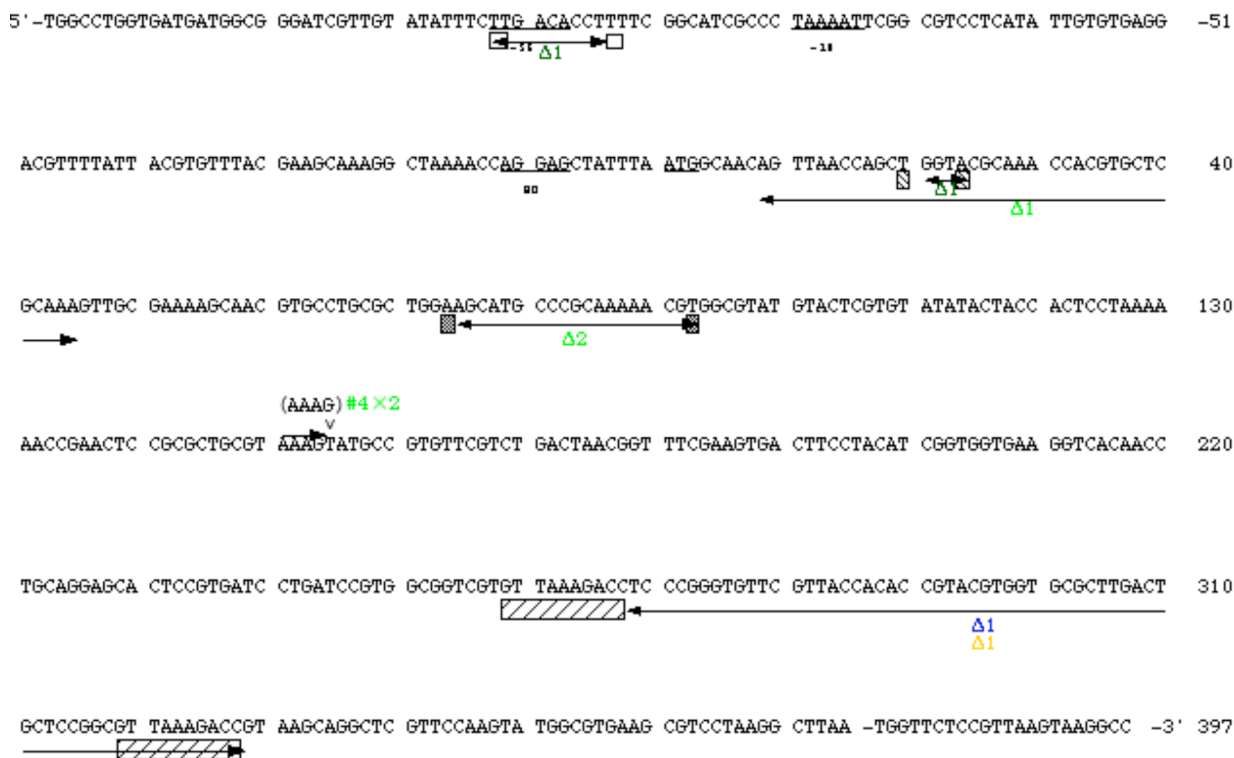


図3.7C *dinB polB*二重変異株 (MK1331) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布

図3.7C *dinB polB*二重変異株 (MK1331) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドンを中心とした塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。図中の□は重複を、△は欠失を表し、それらの範囲は矢印で示した。重複あるいは欠失の両端に相同領域がある場合は、その領域を同じ模様のボックスで記した。同じ実験区で同じ部位で同じ重複あるいは欠失が見つかった場合は、その検出数をvあるいは△の後に示した。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、実験区2、実験区3、実験区4、実験区5、実験区6。

表3.7. *polB umuDC*二重変異株における前進突然変異の特異性

A. 変異の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
組換え型 <sup>1)</sup>	0.15	0.066	0.060	0.076	0.058	<b>0.082</b> $\pm$ 0.038
塩基置換						
ホットスポット1(82C→A) <sup>2)</sup>	ND	ND	0.026	0.016	0.52	<b>0.11</b> $\pm$ 0.23
ホットスポット2(245T→A) <sup>2)</sup>	0.17	0.20	0.15	0.087	0.17	<b>0.16</b> $\pm$ 0.042
ホットスポット3(245T→G) <sup>2)</sup>	0.023	ND	0.0085	ND	0.058	<b>0.018</b> $\pm$ 0.024
上記以外	0.14	0.015	0.043	0.049	0.038	<b>0.056</b> $\pm$ 0.047
1塩基フレームシフト	0.011	0.0073	0.051	0.011	0.038	<b>0.024</b> $\pm$ 0.020
2塩基フレームシフト	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> $<$ 0.0034
配列置換	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> $<$ 0.0034
欠失	0.011	0.015	ND	0.011	ND	<b>0.0074</b> $\pm$ 0.0069
重複	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> $<$ 0.0034
IS	0.034	0.051	0.051	0.011	0.019	<b>0.033</b> $\pm$ 0.0183
その他	0.011	ND	0.017	ND	ND	<b>0.0057</b> $\pm$ 0.0081
変異なし	ND	ND	ND	ND	0.019	<b>0.0038</b> $\pm$ 0.0086
Total	0.55	0.35	0.41	0.26	0.92	<b>0.50</b> $\pm$ 0.26

B. 1塩基フレームシフトの種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Addition						
at run <sup>3)</sup>	0.011	ND	ND	ND	0.019	<b>0.0061</b> $\pm$ 0.0088
at non-run <sup>3)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
total	0.011	ND	ND	ND	0.019	<b>0.0061</b> $\pm$ 0.0088
Deletion						
at run <sup>3)</sup>	ND	ND	0.051	0.0054	0.019	<b>0.015</b> $\pm$ 0.022
at non-run <sup>3)</sup>	ND	0.0073	ND	0.0054	ND	<b>0.0025</b> $\pm$ 0.0035
total	ND	0.0073	0.051	0.011	0.019	<b>0.018</b> $\pm$ 0.020
Total	0.011	0.0073	0.051	0.011	0.038	<b>0.024</b> $\pm$ 0.020

独立した5実験区由来の合計240クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表中には、各実験区ごとの変異頻度（#1から#5まで）および、それらの平均値（Ave.）を記載した。検出されなかった変異に関しては、実験区ごとの変異頻度ではND（Not detected）と表記しているが、平均値を算出する際には、その実験区の変異頻度を0として計算した。より詳細なデータについては、付録表8を参照のこと。

表3.7-続き. *polB umuDC*二重変異株における前進突然変異の特異性

C. 塩基置換の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Transition						
A:T→G:C	ND	ND	0.0085	0.0108	ND	<b>0.0039</b> $\pm$ 0.0054
G:C→A:T	0.080	0.0073	0.017	0.0054	ND	<b>0.022</b> $\pm$ 0.033
total	0.080	0.0073	0.026	0.0163	ND	<b>0.026</b> $\pm$ 0.032
Transversion						
G:C→T:A	0.011	ND	ND	0.0054	ND	<b>0.0034</b> $\pm$ 0.0051
G:C→C:G	0.046	0.0073	ND	0.0054	ND	<b>0.012</b> $\pm$ 0.019
T:A→A:T	ND	ND	0.017	0.0108	0.038	<b>0.013</b> $\pm$ 0.016
A:T→C:G	ND	ND	ND	0.011	ND	<b>0.0022</b> $\pm$ 0.0048
total	0.057	0.0073	0.017	0.033	0.038	<b>0.031</b> $\pm$ 0.019
Hot spot						
82C→A <sup>2)</sup>	ND	ND	0.026	0.016	0.52	<b>0.11</b> $\pm$ 0.23
245 T→A <sup>2)</sup>	0.17	0.20	0.15	0.087	0.17	<b>0.16</b> $\pm$ 0.042
245 T→G <sup>2)</sup>	0.023	0.00	0.0085	ND	0.058	<b>0.018</b> $\pm$ 0.024
total	0.19	0.20	0.19	0.10	0.75	<b>0.29</b> $\pm$ 0.26
Total	0.33	0.21	0.23	0.15	0.79	<b>0.34</b> $\pm$ 0.26

1) 本来の位置に局在する変異型の*rpsL*遺伝子は、開始コドンから-22番目のA→G及び128番目のC→Aの2つの変異を持つ。この遺伝子と標的となる野生型*rpsL*遺伝子との組換えは、その位置により、前者のみ、後者のみ、あるいは両方の塩基置換を持つ遺伝子を産出する。このうち、当研究では、後者のみの変異、あるいは両方の変異を持つものが検出された。これらは塩基置換変異の結果である可能性は極めて低く、当研究では組換え型として別記した。

2) 染色体*rpsL*系では、*rpsL*標的遺伝子の開始コドンから82番目に位置するCがAに置換する塩基置換と、245番目のTがAもしくはGに置換する塩基置換が高頻度で観察され、塩基置換のホットスポットであると考えられた。他の塩基置換の割合を明確にするために、このホットスポット上で起こった塩基置換と他の塩基置換を分けて記載した。

3) 同一の塩基が2つ以上連続する部位をrunと呼ぶ。1塩基フレームシフトの変異頻度に関しては、runとrun以外とに分けて表示した。

```

5'-TGGCCTGGTGATGATGGCG GGATCGTTGT ATATTTCTTG ACACCTTTTC GGCATCGCCC TAAAAATCGG CGTCCTCATA TTGTGTGAGG -51
                                     -11                                     -11

ACGTTTTATT ACGTGTTTAC GAAGCAAAGG CTAAAACCAG GAGCTATTTA ATGGCAACAG TTAACCAGCT GGTACGCAA CCACGTGCTC 40
                                     00

GCAAAGTTGC GAAAAGCAAC GTGCCTGCGC TGGAAAGCATG CCCGCAAAAA CGTGGCGTAT GTACTCGTGT ATATACTACC ACTCCTAAAA 130
                                     C1
                                     v
                                     v1
                                     A1
                                     A1

AACCGAACTC CGCGCTGCGT AAAGTATGCC GTGTTCTCT GACTAACGGT TTCGAAAGTGA CTTCTACAT CGGTGGTGA GGTACACAAC 220
                                     v6
                                     v1
                                     v1

TGCAGGAGCA CTCCTGATC CTGATCCGTG GCGGTCTGT TAAAGACCTC CCGGTGTTC GTTACCACAC CGTACGTGGT GCGCTTGACT 310
                                     v1
                                     v15

GCTCCGGCGT TAAAGACCCT AAGCAGGCTC GTTCCAAGTA TGGCGTGAAG CGTCCTAAGG CTTAA -TGGTTCTCCGTTAAGTAAGGCC -3' 397
                                     v1

```

図3.8A *umuDC polB*変異株 (MK1351) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフトの分布

```

5'-TGGCCTGGTGATGATGGCG GGATCGTTGT ATATTTCTTG ACACCTTTTC GGCATCGCCC TAAAAATCGG CGTCCTCATA TTGTGTGAGG -51
                                     -11                                     -11

ACGTTTTATT ACGTGTTTAC GAAGCAAAGG CTAAAACCAG GAGCTATTTA ATGGCAACAG TTAACCAGCT GGTACGCAA CCACGTGCTC 40
                                     T1
                                     T1
                                     T2
                                     T1
                                     A6
                                     A6

GCAAAGTTGC GAAAAGCAAC GTGCCTGCGC TGGAAAGCATG CCCGCAAAAA CGTGGCGTAT GTACTCGTGT ATATACTACC ACTCCTAAAA 130
                                     G4
                                     A1
                                     A27
                                     A3
                                     A3
                                     A4
                                     G1
                                     T1

AACCGAACTC CGCGCTGCGT AAAGTATGCC GTGTTCTCT GACTAACGGT TTCGAAAGTGA CTTCTACAT CGGTGGTGA GGTACACAAC 220
                                     A1
                                     A1
                                     G1
                                     A9G3
                                     A16
                                     A19G1
                                     A27
                                     A6G1
                                     G2
                                     A15

TGCAGGAGCA CTCCTGATC CTGATCCGTG GCGGTCTGT TAAAGACCTC CCGGTGTTC GTTACCACAC CGTACGTGGT GCGCTTGACT 310
                                     T1
                                     A1
                                     A1
                                     G1
                                     G1

GCTCCGGCGT TAAAGACCCT AAGCAGGCTC GTTCCAAGTA TGGCGTGAAG CGTCCTAAGG CTTAA -TGGTTCTCCGTTAAGTAAGGCC -3' 397
                                     G2

```

図3.8B *umuDC polB*変異株 (MK1351) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた塩基置換の分布

図3.8AB *umuDC polB*変異株 (MK1351) における *rpsL* 標的遺伝子上で生じた1塩基フレームシフト (A) および塩基置換 (B) の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドンを1とした時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。図中のvは1塩基の挿入を意味し、▽は1塩基の欠失を示す。塩基置換の場合は、元の塩基の上に置換した塩基を記した。これらの変異した塩基の後ろの数字は同じ実験区で同様の部位で見出された検出数を示す。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、**実験区2**、**実験区3**、**実験区4**、**実験区5**、**実験区6**。



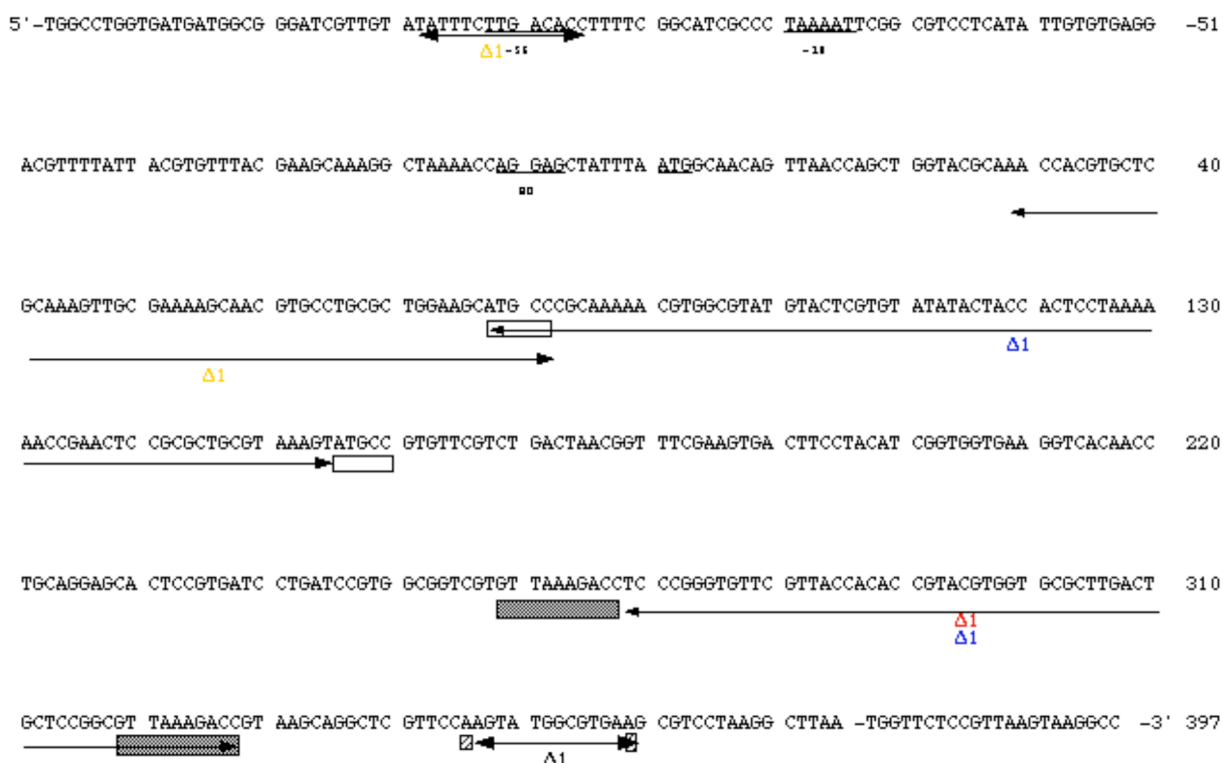


図3.8C *dumuDC polB*変異株 (MK1351) における *rpsL*標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布

図3.8C *umuDC polB*変異株 (MK1351) における *rpsL*標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドンを1とした時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。図中のvは重複を、Δは欠失を表し、それらの範囲は矢印で示した。重複あるいは欠失の両端に相同領域がある場合は、その領域を同じ模様のボックスで記した。同じ実験区で同じ部位で同じ重複あるいは欠失が見つかった場合は、その検出数をvあるいはΔの後に示した。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、**実験区2**、**実験区3**、**実験区4**、**実験区5**、**実験区6**。

表3.8. *dinB umuDC polB*三重変異株における前進突然変異の特異性

A. 変異の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
組換え型 <sup>1)</sup>	0.50	0.36	0.30	0.10	0.14	<b>0.28</b> $\pm$ 0.16
塩基置換						
ホットスポット1(82C→A) <sup>2)</sup>	0.018	0.0050	0.0024	0.014	0.0064	<b>0.0092</b> $\pm$ 0.0067
ホットスポット2(245T→A) <sup>2)</sup>	0.32	0.18	0.086	0.20	0.17	<b>0.19</b> $\pm$ 0.085
ホットスポット3(245T→G) <sup>2)</sup>	0.0046	0.0050	0.0095	ND	0.0064	<b>0.0051</b> $\pm$ 0.0034
上記以外	0.20	0.0076	0.036	0.054	0.081	<b>0.076</b> $\pm$ 0.075
1塩基フレームシフト	0.032	0.015	0.057	0.023	0.038	<b>0.033</b> $\pm$ 0.016
2塩基フレームシフト	ND	ND	ND	ND	0.0043	<b>0.00085</b> $\pm$ 0.0019
配列置換	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> $<$ 0.00086
欠失	0.018	0.0076	0.050	0.010	0.030	<b>0.023</b> $\pm$ 0.017
重複	ND	ND	0.0048	0.0017	0.0043	<b>0.0021</b> $\pm$ 0.0023
IS	0.0092	0.030	0.019	0.019	0.032	<b>0.022</b> $\pm$ 0.0093
その他	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b> $<$ 0.00086
変異なし	ND	ND	0.0024	ND	0.0021	<b>0.00090</b> $\pm$ 0.0012
Total	1.1	0.61	0.57	0.42	0.51	<b>0.64</b> $\pm$ 0.27

B. 1塩基フレームシフトの種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Addition						
at run <sup>3)</sup>	ND	ND	0.0071	0.0070	0.0021	<b>0.0032</b> $\pm$ 0.0036
at non-run <sup>3)</sup>	ND	0.0025	0.048	0.010	0.015	<b>0.015</b> $\pm$ 0.019
total	ND	0.0025	0.055	0.017	0.017	<b>0.018</b> $\pm$ 0.022
Deletion						
at run <sup>3)</sup>	0.014	0.013	0.0024	0.0035	0.017	<b>0.0098</b> $\pm$ 0.0065
at non-run <sup>3)</sup>	0.018	ND	ND	0.0017	0.0043	<b>0.0049</b> $\pm$ 0.0077
total	0.032	0.013	0.0024	0.0052	0.021	<b>0.015</b> $\pm$ 0.012
Total	0.032	0.015	0.057	0.023	0.038	<b>0.033</b> $\pm$ 0.016

独立した5実験区由来の合計1200クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表中には、各実験区ごとの変異頻度（#1から#5まで）および、それらの平均値（Ave.）を記載した。検出されなかった変異に関しては、実験区ごとの変異頻度ではND（Not detected）と表記しているが、平均値を算出する際には、その実験区の変異頻度を0として計算した。より詳細なデータについては、付録表9を参照のこと。

表3.8-続き. *dinB umuDC polB*三重変異株における

前進突然変異の特異性

C. 塩基置換の種類別変異頻度

実験区	変異頻度 $\times 10^{-6}$					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	
Transition						
A:T→G:C	0.032	ND	0.0071	0.0035	0.043	<b>0.017</b> $\pm$ 0.019
G:C→A:T	0.14	0.0076	0.012	0.0035	0.011	<b>0.035</b> $\pm$ 0.060
total	0.17	0.0076	0.019	0.0070	0.053	<b>0.052</b> $\pm$ 0.071
Transversion						
G:C→T:A	0.0046	ND	ND	0.030	0.0021	<b>0.0073</b> $\pm$ 0.013
G:C→C:G	0.0092	ND	ND	0.0087	ND	<b>0.0036</b> $\pm$ 0.0049
T:A→A:T	0.014	ND	0.0024	0.0087	0.023	<b>0.0096</b> $\pm$ 0.0094
A:T→C:G	ND	ND	0.014	ND	0.0021	<b>0.0033</b> $\pm$ 0.0062
total	0.028	ND	0.017	0.047	0.028	<b>0.024</b> $\pm$ 0.017
Hot spot						
82C→A <sup>2)</sup>	0.018	0.0050	0.0024	0.014	0.0064	<b>0.0092</b> $\pm$ 0.0067
245 T→A <sup>2)</sup>	0.32	0.18	0.086	0.20	0.17	<b>0.19</b> $\pm$ 0.085
245 T→G <sup>2)</sup>	0.0046	0.0050	0.0095	ND	0.0064	<b>0.0051</b> $\pm$ 0.0034
total	0.34	0.19	0.097	0.22	0.18	<b>0.21</b> $\pm$ 0.089
Total	0.55	0.20	0.13	0.27	0.26	<b>0.28</b> $\pm$ 0.16

1) 本来の位置に局在する変異型の*rpsL*遺伝子は、開始コドンから-22番目のA→G及び128番目のC→Aの2つの変異を持つ。この遺伝子と標的となる野生型*rpsL*遺伝子との組換えは、その位置により、前者のみ、後者のみ、あるいは両方の塩基置換を持つ遺伝子を産出する。このうち、当研究では、後者のみの変異、あるいは両方の変異を持つものが検出された。これらは塩基置換変異の結果である可能性は極めて低く、当研究では組換え型として別記した。

2) 染色体*rpsL*系では、*rpsL*標的遺伝子の開始コドンから82番目に位置するCがAに置換する塩基置換と、245番目のTがAもしくはGに置換する塩基置換が高頻度で観察され、塩基置換のホットスポットであると考えられた。他の塩基置換の割合を明確にするために、このホットスポット上で起こった塩基置換と他の塩基置換を分けて記載した。

3) 同一の塩基が2つ以上連続する部位をrunと呼ぶ。1塩基フレームシフトの変異頻度に関しては、runとrun以外とに分けて表示した。





図3.9C *dinB umuDC polB*変異株 (MK1371) における *rpsL*標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布

図3.9C *dinB umuDC polB*変異株 (MK1371) における *rpsL*標的遺伝子上で生じた重複および欠失の分布を示した。配列の右に記した数字は開始コドン=1とした時の塩基の番号を表す。配列中の下線はプロモーター領域 (-35配列、-10配列)、SD配列、開始コドン、終始コドンを示す。図中のvは重複を、Δは欠失を表し、それらの範囲は矢印で示した。重複あるいは欠失の両端に相同領域がある場合は、その領域を同じ模様のボックスで記した。同じ実験区で同じ部位で同じ重複あるいは欠失が見つかった場合は、その検出数をvあるいはΔの後に示した。各実験区は以下の色で識別した。実験区1、実験区2、実験区3、実験区4、実験区5。

表3.9 野生株と *dinB umuDC*変異株、*dinB polB*変異株、*polB umuDC*変異株の

A. 変異の種類別変異頻度の比較 進突然変異の比較

	Mutation frequency ( $\times 10^{-6}$ )									
	MK811 野生株		MK1221 <i>dinBumuC</i> 二重変異株		MK1331 <i>dinB polB</i> 二重変異株		MK1351 <i>polBumuDC</i> 二重変異株		MK1371 <i>dinBpolBumuDC</i> 二重変異株	
組換え型 <sup>1)</sup>	0.092	( 1.0 )	0.17	( 1.8 )	0.19	( 2.1 )	0.082	( 0.88 )	0.28	( 3.0 )
塩基置換 <sup>2)</sup>	0.21	( 1.0 )	0.25	( 1.2 )	0.23	( 1.1 )	0.34	( 1.6 )	0.28	( 1.3 )
1塩基フレームシフト <sup>3)</sup>	0.030	( 1.0 )	0.046	( 1.5 )	0.049	( 1.6 )	0.024	( 0.79 )	0.033	( 1.1 )
2塩基フレームシフト	ND<0.00070		0.0053		ND<0.0021		ND<0.0034		0.00085	
配列置換	ND<0.00070		0.0090		ND<0.0021		ND<0.0034		ND<0.00086	
欠失	0.033	( 1.0 )	0.039	( 1.2 )	0.012	( 0.37 )	0.0074	( 0.22 )	0.021	( 0.64 )
重複	0.0046	( 1.0 )	0.0026	( 0.56 )	0.0032	( 0.69 )	ND<0.0034		0.0021	( 0.47 )
IS	0.046	( 1.0 )	0.044	( 1.0 )	0.018	( 0.40 )	0.033	( 0.72 )	0.021	( 0.46 )
その他	ND<0.00070		0.0032		0.040		0.0081		0.0044	
変異なし	0.0084	( 1.0 )	0.0015	( 0.18 )	0.0021	( 0.68 )	0.0038	( 0.46 )	0.00090	( 0.11 )
Total	0.42	( 1.0 )	0.57	( 1.3 )	0.54	( 1.3 )	0.50	( 1.2 )	0.64	( 1.5 )

B. 1塩基フレームシフトの種類別変異頻度の比較

	MK811 野生株		MK1221 <i>dinBumuC</i> 二重変異株		MK1331 <i>dinB polB</i> 二重変異株		MK1351 <i>polBumuDC</i> 二重変異株		MK1371 <i>dinBpolBumuDC</i> 二重変異株	
	Addition									
at run	0.0049	( 1.0 )	0.0057	( 1.2 )	0.0010	( 0.21 )	0.0061	( 1.2 )	0.0032	( 0.66 )
at non-run	0.00059	( 1.0 )	0.0032	( 5.4 )	0.0095	( 16 )	ND<0.0034		0.015	( 25 )
total	0.0055	( 1.0 )	0.0089	( 1.6 )	0.011	( 1.9 )	0.0061	( 1.1 )	0.018	( 3.2 )
Deletion										
at run	0.018	( 1.0 )	0.032	( 1.8 )	0.0059	( 0.33 )	0.015	( 0.86 )	0.010	( 0.56 )
at non-run	0.0068	( 1.0 )	0.0048	( 0.71 )	0.032	( 4.7 )	0.0025	( 0.37 )	0.0049	( 0.71 )
total	0.025	( 1.0 )	0.037	( 1.5 )	0.038	( 1.6 )	0.018	( 0.72 )	0.015	( 0.60 )
Total	0.030	( 1.0 )	0.046	( 1.5 )	0.049	( 1.6 )	0.024	( 0.79 )	0.033	( 1.1 )

誤りがちDNA合成の特異性を明らかにするために、*dinB umuDC*変異株

(MK1221)、*dinB polB*変異株(MK1331)、*polB umuDC*変異株(MK1351)、*dinB polB umuDC*変異株(MK1371)を用いて、*rpsL*標的遺伝子上に生じた突然変異の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。比較のために、野生株(MK811)での結果もあわせて記載した。*dinB umuDC*変異株(MK1221)、*dinB polB*変異株(MK1331)、*polB umuDC*変異株(MK1351)、*dinB polB umuDC*変異株(MK1371)および野生株(MK811)のより詳細なデータに関しては、それぞれ付録表1、付録表6、付録表7、付録表8、付録表9を参照のこと。表中には平均値、及び、括弧内に野生株の変異頻度を1としたときの相対値を示す。検出されなかった変異に関しては、ND (Not detected) と表記し、さらにその右隣に当研究から推定された変異頻度の最大値を記した。

表3.9-続き. 野生株と *dinB umuDC*変異株、*dinB polB*変異株、*polB umuDC*変異株の前進突然変異の比較

C.塩基置換の種類別変異頻度の比較

	Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )									
	MK811 野生株		MK1221 <i>dinBumuC</i> 二重変異株		MK1331 <i>dinB polB</i> 二重変異株		MK1351 <i>polBumuDC</i> 二重変異株		MK1371 <i>dinBpolBumuDC</i> 二重変異株	
Transition										
A:T→G:C	0.0071	( 1.0 )	0.041	( 5.9 )	0.013	( 1.8 )	0.0039	( 0.55 )	0.017	( 2.4 )
G:C→A:T	0.057	( 1.0 )	0.019	( 0.33 )	0.0017	( 0.030 )	0.022	( 0.39 )	0.035	( 0.61 )
total	0.064	( 1.0 )	0.060	( 0.9 )	0.014	( 0.22 )	0.026	( 0.40 )	0.052	( 0.81 )
Transversion										
G:C→T:A	0.014	( 1.0 )	0.0057	( 0.40 )	0.0026	( 0.19 )	0.0034	( 0.24 )	0.0073	( 0.5 )
G:C→C:G	0.0076	( 1.0 )	0.0048	( 0.64 )	0.0081	( 1.1 )	0.012	( 1.5 )	0.0036	( 0.47 )
T:A→A:T	0.0083	( 1.0 )	0.022	( 2.6 )	0.018	( 2.2 )	0.013	( 1.6 )	0.0096	( 1.2 )
A:T→C:G	0.0094	( 1.0 )	0.0043	( 0.46 )	0.0055	( 0.58 )	0.0022	( 0.23 )	0.0033	( 0.35 )
total	0.039	( 1.0 )	0.037	( 0.93 )	0.034	( 0.87 )	0.031	( 0.77 )	0.024	( 0.60 )
Hot spot										
82C→A <sub>21</sub>	0.017	( 1.0 )	0.016	( 0.96 )	0.0085	( 0.51 )	0.11	( 6.7 )	0.0092	( 0.55 )
245 T→A <sub>21</sub>	0.077	( 1.0 )	0.12	( 1.5 )	0.16	( 2.1 )	0.16	( 2.0 )	0.19	( 2.5 )
245 T→G <sub>21</sub>	0.013	( 1.0 )	0.019	( 1.5 )	0.011	( 0.90 )	0.018	( 1.4 )	0.0051	( 0.40 )
total	0.11	( 1.0 )	0.15	( 1.4 )	0.18	( 1.7 )	0.29	( 2.7 )	0.21	( 1.9 )
Total	0.21	( 1.0 )	0.25	( 1.2 )	0.23	( 1.1 )	0.34	( 1.6 )	0.28	( 1.3 )

1) 本来の位置に局在する変異型の *rpsL* 遺伝子は、開始コドンから-22番目のA→G及び128番目のC→Aの2つの変異を持つ。この遺伝子と標的となる野生型 *rpsL* 遺伝子との組換えは、その位置により、前者のみ、後者のみ、あるいは両方の塩基置換を持つ遺伝子を産出する。このうち、当研究では、後者のみの変異、あるいは両方の変異を持つものが検出された。これらは塩基置換変異の結果である可能性は極めて低く、当研究では組換え型として別記した。

2) 染色体 *rpsL* 系では、*rpsL* 標的遺伝子の開始コドンから82番目に位置するCがAに置換する塩基置換と、245番目のTがAもしくはGに置換する塩基置換が高頻度で観察され、塩基置換のホットスポットであると考えられた。他の塩基置換の割合を明確にするために、このホットスポット上で起こった塩基置換と他の塩基置換を分けて記載した。

3) 同一の塩基が2つ以上連続する部位をrunと呼ぶ。1塩基フレームシフトの変異頻度に関しては、runとrun以外とに分けて表示した。

## 第四部 複製エラーにおけるPol IV(DinB)の関与

### 第一章 序論

本研究において、大腸菌の複製型DNAポリメラーゼであるPol IIIによる複製エラーは校正機能やミスマッチ修復機構によって高効率に修復されており、自然突然変異の発生に関与していないことが明らかになった(第二部参照)。また、誤りがち修復を行うTLS型DNAポリメラーゼ(Pol II、Pol IV、PolV)も自然突然変異の発生に関与していないことが強く示唆された(第三部参照)。

通常、TLSポリメラーゼやDNA修復関連タンパクは、DNA損傷などによって引き起こされるSOS応答によって強発現される(図3.1)。しかし、非SOS応答時におけるSOS遺伝子の発現数は抑えられている。polBにコードされるPol IIは非SOS応答時の細胞内での分子数はおよそ50分子以下であると示されている(Qiu 1997)。umuDCによってコードされるPolVも非SOS応答時における大腸菌細胞での分子数は15分子以下であることが示されている(Woodgate 1991)。大腸菌で見いだされている5つのTLSポリメラーゼのうち、dinBにコードされるPol IVは、非SOS応答時の発現分子数が細胞あたり250分子存在することが示されている(Kim 2001)。複製型DNAポリメラーゼであるPol IIIの細胞内で分子数は30分子程度であり(McHenry 1977)、Pol IVの分子数は、他のTLSポリメラーゼであるPol IIやPol Vより多いだけでなく、複製型DNAポリメラーゼであるPol IIIよりも細胞内の分子数が多い。

Pol IVは損傷のないDNA鎖上で突然変異を生じることが示されている。dinB遺伝子をコピー数の高いプラスミドにクローニング、大腸菌に導入することによって、大腸菌細胞内でPol IVを過剰発現させた場合、損傷のないDNA鎖上の同じ塩基が並んだrun配列上で-1塩基フレームシフトを生じることが示されている(Kim 1997)。また、UVを照射して、SOS応答を誘導した後の大腸菌に感染させたλファージのDNA上における突然変異(λファージのuntarget mutagenesis: λUTM)を解析した結果、dinB欠損株では、λUTMは起こらなかった。すなわち、損傷がないと思われるλファージDNA上で、SOS遺伝子であるdinBによって突然変異が生じている可能性が示唆された(Wood 1984)。そこで、通常生育下における他のDNAポリメラーゼよりも遙かに分子数が多く、かつ損傷のないDNA鎖上でエラーを生じるPol IVの複製エラーの関与を明らかにするため、複製エラーを修復するミスマッチ修復機構を欠損させた変異株に、dinB変異を導入し、複製エラーにおけるPol IVの関与を明らかにすることを試みた。



## 第二章 結果と考察

Pol IV(*dinB*)は、損傷のない鋳型DNA鎖上でエラーを生じることが示されている。そこで、Pol IV(*dinB*)の複製エラーの関与を明らかにする目的でミスマッチ修復機構を欠損させた大腸菌株(*mutS*変異株)に*dinB*変異を導入し、*dinB mutS*二重変異株を作成した。

自然突然変異における複製エラーの関与を明らかにする目的で解析したミスマッチ修復欠損株 (*mutS*変異株) および自然突然変異におけるTLSの関与を明らかにする目的で解析したTLS型ポリメラーゼ欠損株 (*dinB*変異株、*dinB umuDC*二重変異株、*dinB polB*二重変異株、*polB umuDC*二重変異株、*dinB umuDC polB*三重変異株) は染色体*rpsL*突然変異検出系を用いて解析を行った。染色体*rpsL*検出系は、1塩基フレームシフトや塩基置換などの点突然変異だけでなく欠失、重複、配列置換などの数十塩基から数百塩基に及ぶ変異を検出できる実験系である。また、*rpsL*標的遺伝子が大腸菌染色体上に配置されているため、通常生育下で発生する染色体上での自然突然変異を効率的かつ網羅的に解析することが可能となっている。しかし、染色体*rpsL*検出系では、発生頻度が低い変異の検出も行うため、同一実験区から、多数の検体の塩基配列レベルでの解析を行う必要性があった。1つの実験区から多数の検体を解析するため、各変異株間で発生した突然変異の発生頻度に差があるというには数倍～10倍以上の変異頻度の差が必要であった。Pol IVはTLSポリメラーゼであるため、自然生育下における複製エラーへの寄与度も不明である。そこで、本研究では、複製エラーを検出でき、かつ多数の実験区の解析が可能な標的遺伝子である*rpoB*遺伝子を用いて解析を行った。*rpoB*は大腸菌のRNAポリメラーゼβサブユニットをコードする遺伝子であり、抗生物質であるリファンピシリン (Rif) に対して感受性を示す。大腸菌*rpoB*上に生じる塩基置換変異とRif耐性が相関することが示されているため、複製エラーとして1塩基フレームシフトに次いで高頻度に生じる塩基置換を検出することにより、Pol IVの複製エラーへの関与を明らかにすることを試みた。

### 4.1 *rpoB*前進突然変異頻度の測定

Pol IVの複製エラーへの関与を明らかにするために、*rpoB*遺伝子上での前進突然変異頻度を測定した。*rpoB*遺伝子上での複製エラーの発生頻度を明らかにする目的で、ミスマッチ修復欠損株(*mutS*変異株)の解析を15実験区、複製エラーへのPol IVの関与を明らかにする目的で*dinB mutS*二重変異株の解析を15実験区行った。多数の実験区をもうけ、平均値と中央値を算出し、Pol IVの複製エラーへの関与を明らかにすることを試みた。その結果、野生株において、*rpoB*前進突然変異頻度の平均値は $0.42 \times 10^{-6}$ であり、中

中央値は $2.3 \times 10^{-6}$ であった。*mutS*変異株において、*rpoB*前進突然変異頻度の平均値は $3.2 \times 10^{-6}$ であり、中央値は $2.9 \times 10^{-6}$ であった。*dinB mutS*二重変異株においては、*rpoB*前進突然変異頻度の平均値は $1.9 \times 10^{-6}$ であり、中央値は $1.6 \times 10^{-6}$ であった。野生株に対する*mutS*変異株の*rpoB*前進突然変異頻度の平均値の相対値は、7.6倍であり、中央値の相対値は、13倍であった(表4.1)。この結果から、本研究でも*rpoB*遺伝子上で複製エラーが検出されていることが示された。

*mutS*変異株に対する*dinB mutS*二重変異株の*rpoB*前進突然変異頻度の平均値の相対値は0.61倍であり、中央値は0.55倍であった(表4.1、図4.1)。 *rpoB*標的遺伝子を用いて多数実験区の解析を行った結果、*dinB mutS*二重変異株は*mutS*変異株に比べて、塩基置換の発生頻度が中央値においておよそ半分に低下していた(図4.1)。この結果から、*dinB*によってコードされるPol IVが通常生育下で複製エラーを生じていることが示された。

#### 4.2 Pol IVの複製エラーへの関与について

*mutS*変異株の*rpoB*前進突然変異頻度に比べ、*dinB mutS*二重変異株の*rpoB*前進突然変異頻度はおよそ半分に低下していた。この結果から、*rpoB*遺伝子上で検出される塩基置換のうち、およそ半分がPol IVによって生じている可能性が示唆された。

前述したようにPol IVは非SOS応答時でも細胞内で250分子以上の存在が確認されており、また、損傷のない鋳型DNA鎖上で複製エラーを引き起こすことが示されている。複製型DNAポリメラーゼが何らかの原因で鋳型DNA鎖上から離れた際、分子数の多いPol IVが伸長鎖末端においてPol IIIとスイッチングをし、複製エラーを引き起こしている可能性が考えられる。

以上の結果から、Pol IVは複製エラーを生じていることが明らかになった。近年、*dinB*がadaptive mutationに関与していることも示されており(Slechta 2003)、Pol IVは、DNA鎖上の損傷がなくても突然変異に関与していることが示されている。Pol IVは他のTLSポリメラーゼと異なり、通常環境下で突然変異の発生に寄与している可能性が考えられる。損傷のないDNA鎖上で複製エラーを生じ、進化の原動力を生じさせることのできる*dinB*は、非SOS応答時における新しい個体の創出に寄与しているのかもしれない。

表4.1 野生株、*mutS*変異株、*dinB mutS*二重変異株における*rpoB*前進突然変異頻度

strain	Mutation Frequency( $\times 10^{-8}$ )															Ave $\pm$ SD	Median
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15		
MK811(野生株)	2.6	4.4	1.0	0.90	21	3.5	1.6	5.7	1.9	1.5	1.4	2.3	0.29	6.7	8.3	4.2 $\pm$ 5.2	2.3
MK1381 ( <i>mutS</i> 変異株)	23	48	24	25	47	23	30	46	30	38	45	28	27	29	19	32 $\pm$ 9.9	29
MK1391( <i>dinBmutS</i> 変異株)	15	29	16	27	17	13	18	25	25	39	15	13	15	12	13	19 $\pm$ 7.8	16

野生株、*mutS*変異株、*dinB mutS*二重変異株における*rpoB*前進突然変異頻度を測定した。測定には各菌株で独立した15実験区をもうけ、平均値と中央値を測定した。

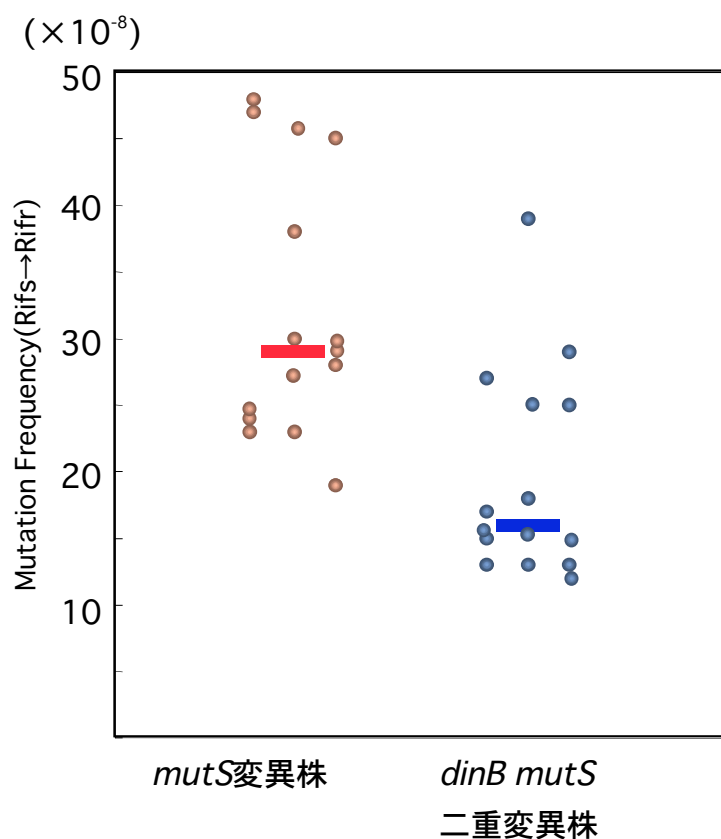


図4.1 *mutS*変異株、*dinB mutS*二重変異株における*rpoB*前進突然変異頻度

測定した*rpoB*前進突然変異頻度の*mutS*変異株、*dinB mutS*二重変異株における各実験区の分布と中央値を示した。図中の赤は*mutS*変異株の数値を示し、青は*dinBmutS*二重変異株の数値を示す。赤、および青の点は各実験区の変異頻度を表し、赤、および青の線は中央値を表す。

## 第五部 材料と方法

### 1. 菌株

本研究で用いた大腸菌は、全てゲノムプロジェクトで用いられたMG1655由来の菌株である。表1にそれらの遺伝子型および入手方法について記載した。

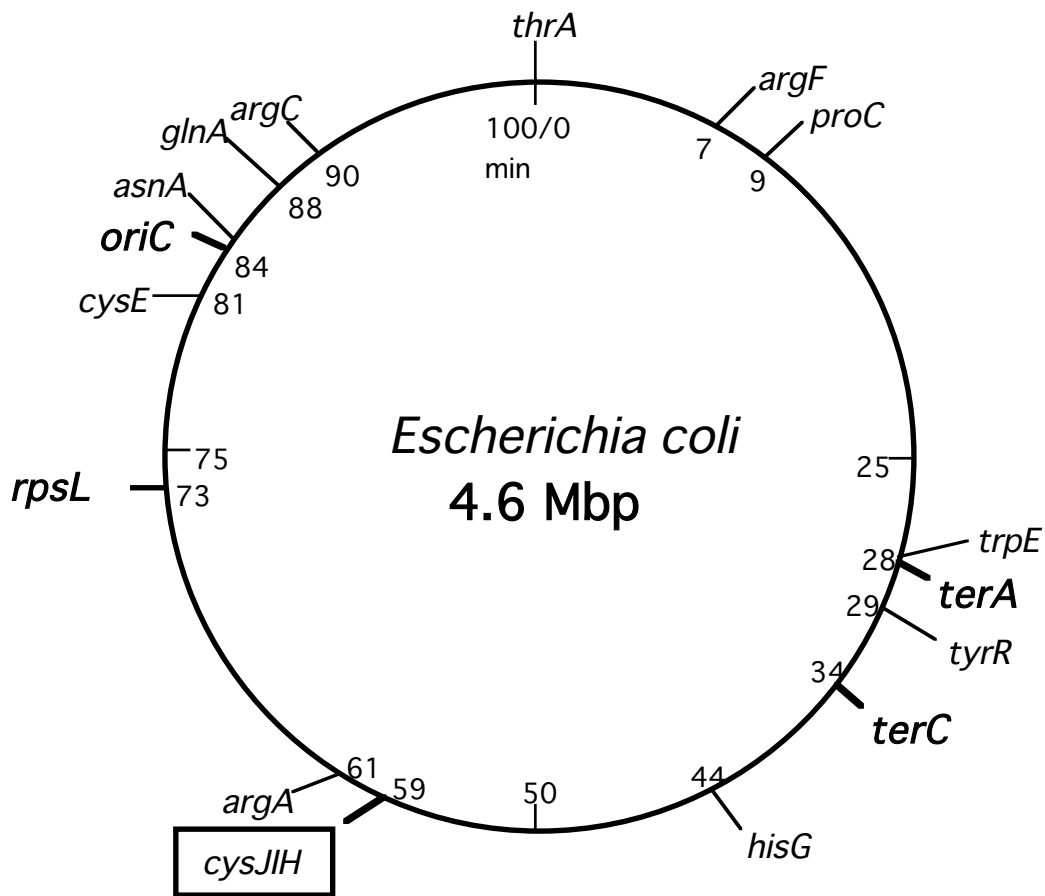
大腸菌MK811は、ストレプトマイシン (Sm) 耐性を示す変異型の*rpsL*遺伝子およびSm感受性を示す野生型の*rpsL*遺伝子を持つ*rpsL*部分二倍体である。本来の局在位置にある*rpsL*遺伝子では、開始コドンから128番目のAがGに変化することにより、コードするアミノ酸がlysからargに置換している。もう一つの*rpsL*遺伝子は、ゲノム上59分に位置する*cysJIH*オペロンのプロモーター部位に、転写終結因子である*rrnBT<sub>1</sub>T<sub>2</sub>*及びアンピシリン (Ap) 耐性遺伝子と共に挿入されており、ゲノムの複製方向に対して順向きに配向している (図5.1)。 *rpsL*遺伝子ではSm感受性の形質が優性であるため、MK811はSm感受性の表現型を示す。MK811は、MK1201、MK1311、MK1301、MK1221、MK1331、MK1351及びMK1371の野生型株である。

*polB*変異株を作成は、one step gene disruptionの方法を用いて行った (Wanner 2000)。作成した*polB*変異株(BW25113 $\Delta$ *polB*)からP1ファージを用いてMK811に導入した。BW25113 $\Delta$ *polB*から*polBD*は、カナマイシン (Km) 耐性遺伝子をマーカーとして持つため、この形質を第一の指標とした。得られた候補のうち、形質導入の確認のため、PCRによって変異導入の確認を行った。MK1331はyG7207から $\Delta$ *dinB*をP1ファージを用いてMK1311に導入した。 $\Delta$ *dinB*はカナマイシン (Km) 耐性遺伝子をマーカーとして持つため、この形質を第一の指標とした。MK1351はyG7209から $\Delta$ *umuDC*をP1ファージを用いてMK1311に導入した。 $\Delta$ *umuDC*はクロラムフェニコール (Cm) 耐性遺伝子をマーカーとして持つため、この形質を第一の指標とした。MK1371はyG7209から $\Delta$ *umuDC*をP1ファージを用いてMK1331に導入した。 $\Delta$ *umuDC*はクロラムフェニコール (Cm) 耐性遺伝子をマーカーとして持つため、この形質を第一の指標とした。MK811は本研究室の井田氏から、MK1201、MK1301、MK1221は本研究室の松尾氏から分与をうけた。MK1391は、yG7207から $\Delta$ *dinB*をP1ファージを用いてMK1381に導入した (表5.1)。

表5.1 菌株のリスト

菌株	遺伝子型	入手方法
MG1655	LAM <sup>-</sup> <i>rph-1</i>	当研究室のストック
ES1301	<i>lacZ53(Ap<sup>r</sup>) lambda mutS201::Tn5<sup>3</sup> thyA36</i> IN( <i>rrnD-rrnE</i> )1 <i>rha-5 metB1 deoC2?</i>	当研究室のストック
DB1318	<i>recA938::Tn9-200<sup>3</sup> recD1014 hsdR2 zji-202::Tn10</i>	当研究室のストック
MK801	<i>rpsL</i> <sup>4)</sup> であること以外はMG1655と同じ	井田慶子氏より分与
MK811 <sup>5)</sup>	<i>DcysJIH::rpsL</i> であること以外はMK801と同じ	井田慶子氏より分与
yG7207	$\Delta$ <i>dinB::Km</i> であること以外はAB1157と同じ	Fuchs氏より分与
yG7209	$\Delta$ <i>umuDC::Km</i> であること以外はAB1157と同じ	Fuchs氏より分与
BW25113	$\Delta$ ( <i>araD-araB</i> )567 $\Delta$ <i>lacZ4748 (::rrnB-4)</i> $\Delta$ <i>lacIp-4000 (lacI<sup>q</sup>) LAM<sup>-</sup> rph-1 <math>\Delta</math> (rhaD-rhaB)568</i> <i>hsdR514</i>	Wanner氏より分与
BW25113 $\Delta$ <i>polB</i>	$\Delta$ <i>polB::Km</i> 以外はBW25113と同じ	本研究
MK1201	$\Delta$ <i>dinB::Km</i> であること以外はMK811と同じ	松尾望美氏より分与
MK1301	$\Delta$ <i>umuDC::Cm</i> であること以外はAB1157と同じ	松尾望美氏より分与
MK1221	$\Delta$ <i>dinB::Km</i> $\Delta$ <i>umuDC::Cm</i> であること以外は MK811と同じ	松尾望美氏より分与
MK1311	$\Delta$ <i>polB</i> であること以外はMK811と同じ	本研究
MK1331	$\Delta$ <i>dinB::Km</i> $\Delta$ <i>polB::Km</i> であること以外はMK811と同じ	本研究
MK1351	$\Delta$ <i>polB::Km</i> $\Delta$ <i>umuDC::Cm</i> であること以外はMK811と同じ	本研究
MK1371	$\Delta$ <i>dinB::Km</i> $\Delta$ <i>polB</i> $\Delta$ <i>umuDC::Cm</i> であること以外は MK811と同じ	本研究
MK1381	$\Delta$ <i>mutS::tet</i> であること以外はMK811と同じ	本研究
MK1391	$\Delta$ <i>dinB::Km</i> $\Delta$ <i>mutS::tet</i> であること以外はMK811と同じ	本研究
BW25113	$\Delta$ ( <i>araD-araB</i> )567 $\Delta$ <i>lacZ4748 (::rrnB-4)</i> $\Delta$ <i>lacIp-4000 (lacI<sup>q</sup>) LAM<sup>-</sup> rph-1 <math>\Delta</math> (rhaD-rhaB)568</i> <i>hsdR514</i>	Wanner氏より分与
BW25113 $\Delta$ <i>polB</i>	$\Delta$ <i>polB::Km</i> 以外はBW25113と同じ	本研究

- 1) *dnaE*遺伝子から2分以内に位置する*Zae*遺伝子座にテトラサイクリン耐性遺伝子が挿入されている (*Zae-502::Tn10*)。
- 2) マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を持つ。
- 3) マーカーとしてクロラムフェニコール耐性遺伝子を持つ。
- 4) *rpsL*遺伝子の開始コドンから128番目のAがGに変化することにより、コードするアミノ酸がlysからargに置換している。MK801はストレプトマイシン耐性の表現型を指標としてMG1655から単離された。
- 5) ゲノム上59分に位置する*cysJIH*オペロンのプロモーター部位に、*rpsL*標的遺伝子を含むカセットが染色体の複製方向に対して順向きに挿入されている。このカセットは、野生型の*rpsL*遺伝子とともに転写終結因子である*rrnBT1T2*及びアンピシリン耐性遺伝子を持ち、プラスミドpMOL21-N1 (川野, 1997) にクローニングされている。アンピシリン耐性および*cys*要求性を指標として、P1ファージを用いてMG1655にこのカセットを挿入した。
- 6) P1ファージを用いてCAG18436から*Zae-502::Tn10*の形質をMK426に導入し、得られた細胞とMK811を接合させることにより、MK811に*dnaE173*の形質の導入を行った。



*rpsL*標的遺伝子挿入部位

図5.1 大腸菌染色体における*rpsL* 標的遺伝子挿入部位

染色体*rpsL*系で大腸菌染色体上の*rpsL*標的遺伝子の挿入部位を示した。図の遺伝子地図 (Bachmann, B. 1990) に記載された染色体上59分に位置する*cysJIIH*に*rpsL*標的遺伝子を挿入した。*cysJIIH*はアミノ酸シスチジン合成に関与する遺伝子であり、*rpsL*標的遺伝子が挿入されるとシスチジン要求性株となる。

## 2. 培地、酵素、試薬

NaClやKCl等の塩類、NaOH等のアルカリ、グルコース等の糖類、抗生物質等の一般的な粉末試薬に関しては、特に記載のない限り和光純薬工業の製品を使用した。HCl、グリセロール等の液体試薬についてはナカライテスク株式会社の製品を、agar、peptone、yeast extract等の培地成分にはDifco社製の製品を、塩基配列を決定するための試薬に関してはSigma Chemical Co.の製品を使用した。耐熱性DNAポリメラーゼについてはTAKARAの製品を用い、製造元の指示に従って使用した。

特に記載のない限り、各種培地を作成する際には脱イオン水を用い、その他の各種溶液についてはMilliQ水に溶解して調製した。%で表した濃度は、特に記載のない限りweight/volumeである。

基本的な操作に関しては、*Molecular cloning* (Sambrook *et al.*, 1989) の記載に従って行った。一般の大腸菌の培養にはLB培地 [1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl] を用いた。寒天培地として用いる場合には特に記載のない限り、1.5%の濃度でBacto agarを加えた。

培地に添加した抗生物質の最終濃度に関しては、Sm、Cm、Rifについては100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、Kmについては40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。抗生物質のストック溶液の濃度については、Smに関しては滅菌水に溶解して濃度を100 mg/mlとし、Cmに関しては99.8%のエタノールに溶解して濃度を100 mg/mlとし、Kmに関しては滅菌水に溶解して濃度を40 mg/mlとし、Rifに関しては99.5%のメタノールに溶解して濃度を25 mg/mlとした。Smに関してはLB培地を作製する際に、その都度調整した。Sm以外の抗生物質のストック溶液については $-20^{\circ}\text{C}$ で保存し、使用する直前に室温で融解した。各抗生物質を含む培地を作成する際には、オートクレーブ後のLB培地を $60^{\circ}\text{C}$ 程度まで冷やし、Rifに関してはストック溶液の1/500量を、その他の抗生物質についてはストック溶液の1/1000量を添加した。

P1ファージによる形質導入の際には、R-top ager [1% Bacto Trypton, 0.1% Bacto yeast extract, 0.8% NaCl, 0.8% Agar, オートクレーブ後20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1% glucose] 及びR-plate [R-top agerのAgarの濃度を0.8%から1.2%に変更したこと以外は同じ] を使用した。

## 3. 大腸菌の培養

大腸菌の培養に関しては、*Molecular cloning* (Sambrook *et al.*, 1989) の記載に従って行った。特に記載のない限り、一夜培養液とは、LB寒天培地で菌株のグリセロールス

トックを画線培養して得たシングルコロニーを、適当な抗生物質の入ったLB寒天培地に再度画線培養し、LB培地に植菌し、37℃で12時間（対数増殖後期から定常期）回転培養したものである。

#### 4. P1ファージによる形質導入

*A short course in bacterial genetics* (Miller, 1992) の記載に従って、P1ファージを用いた大腸菌への形質導入を行った。

##### a) P1溶菌液の調整

5 mM CaCl<sub>2</sub>を含む5 mlのLB培地に*mutSD*供与菌 (ES1301) あるいは*recAD*供与菌 (DB1318) の一夜培養液50  $\mu$ lを添加し、37℃でO.D.<sub>600</sub>=0.9~1.0に達するまで培養した。この培養液1 mlに $1.0 \times 10^7$  pfuのP1ファージを加え、37℃で20分間振とうして大腸菌にファージを感染させた。これに60℃に保温したR-top agarを2.5 ml加え、すぐにR-plate上に流し込んだ。37℃で12時間の静置培養を行った後、R-top agarおよび1 mlのLBでR-plateをリンスしたものを遠心管に回収した。これにクロロフォルムを5滴加えた後、vortexで30秒間攪拌し、遠心 (10000 rpm, 4℃, 15分間, Beckman) した。上清を新しい遠心管に回収してクロロフォルムを5滴加え、vortexで攪拌し、これをP1溶菌液とした。

##### b) P1溶菌液による形質導入

受容菌株 (MK811, MK832, MK1125あるいはMK1137) の1 mlの一夜培養液を遠心 (5000 rpm, 4℃, 5分間) し、沈殿に1 mlのMC buffer [0.1 M MgSO<sub>4</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>]を加えた。この懸濁液0.1 mlに、原液のP1溶菌液あるいは10倍に希釈したP1溶菌液を0.1 ml添加し、室温で2分間静置した後、0.2 mlの0.1 Mクエン酸緩衝液 (pH5.5) を加えた。このうち0.1 mlをKm含有LB寒天培地あるいはCm含有LB寒天培地に塗布し、37℃で12時間静置培養した。

#### 5. UV感受性試験

*recAD*の形質導入を確認する目的で、*Molecular cloning* (Sambrook *et al.*, 1989) の記載に従って、細胞のUVに対する感受性を調べた。一夜培養液の原液および10倍希釈液を2  $\mu$ lづつ3点に、LB寒天培地上にスポットした。コントロールとして*recA*<sup>+</sup>株の一夜培養液を同様にスポットした。アルミ箔張りのボール紙で寒天培地上の菌液のスポットの1つを覆い、UV Stratalinker (STRATAGENE) を用いて、15 mJ/cm<sup>2</sup>のUVを照射し



た。ボール紙をずらし、菌液のスポットを2つ覆った状態で再度15 mJ/cm<sup>2</sup>のUVを照射した。この一連の操作により、各菌株に関して30 mJ/cm<sup>2</sup>、15 mJ/cm<sup>2</sup>あるいは0 mJ/cm<sup>2</sup>の照射量の異なる3つのスポットが存在することになる。UV照射後、寒天培地を遮光した状態のまま37℃で20時間培養した（図1-A, B）。

## 6. polymerase chain reaction (PCR) による *rpsL* 標的遺伝子の増幅

### a) ボイル法による鋳型DNAの調整

寒天培地上より滅菌した爪楊枝を用いて拾い上げた大腸菌を、PCR チューブに分注した20  $\mu$ lのTE buffer [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH8.0] に懸濁した。これをGene Amp PCR System9600 (PERKIN ELMER社) あるいは同9700を用いて99℃で3分間加熱後、3000 rpmで5分間遠心し、上清をPCRの鋳型DNAとした。

### b) プライマー

dFOR21 (5'-CAGCCAGATGGCCTGGTG-3' 18 mer)

dREV21R (5'-ATGCCTGCAGGTCGACTCTAG-3' 21 mer)

プライマーの合成に関しては、日本製粉株式会社に製造委託をした。このプライマーセットを用いると、プロモーター領域から停止コドンまでを含む723 bpの *rpsL* 標的遺伝子領域を増幅することができる。

### c) 反応液の調整およびPCR反応

10×PCR buffer、dNTP mix、Taq polymeraseについては宝酒造株式会社の製品を用い、PCR反応にはGene Amp PCR System9600 (PERKIN ELMER社) あるいは同9700を使用した。反応液の組成は、10 mM Tris/HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP mix, 10 mM 各プライマー (dFOR21およびdREV21R) , 0.05 unit/ $\mu$ l Taq polymeraseである。この反応溶液19  $\mu$ lに鋳型DNA溶液を1  $\mu$ l加え、全量を20  $\mu$ lとした。PCRの条件としては、95℃ 1分間のDNA熱変性の後、95℃ 30秒間、60℃ 30秒間、72℃ 1.5分間の3段階を30サイクル繰り返して行った。

## 7. アガロースゲル電気泳動

*Molecular cloning* (Sambrook et al., 1989) の記載に従って、DNAのアガロースゲル電気泳動を行った。アガロースにはAgarose LO3 (TAKARA) を用い、0.7% のゲル濃度で使用した。bufferについてはTAE buffer [40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA (pH 8.0)] を用いた。泳動にはミュージッド泳動槽 (コスモ・バイオ社) を使用し、電圧100

Vで35分間通電した。泳動後、0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロマイド水溶液に浸し、30分間、振とうしながらDNAを染色した。UVトランスイルミネーター（ATTO社）を用いてゲルに紫外線を照射することによりDNAを観察し、得られた泳動像をCCDカメラで撮影した。

## 8. プライマーの除去

PCR産物からプライマーを除去するためには、ポリエチレングリコール（PEG）による精製（*Molecular cloning*）あるいはPCR Products Pre-Sequence Kit（USB.co）による精製を行った。

### a) ポリエチレングリコール（PEG）沈殿による精製

Applied Biosystems社製の373 DNA Sequencerを用いて塩基配列を決定する場合には、鋳型DNAの調整のために、PCR産物をPEG沈殿で精製した。PCR産物に最終濃度で8% PEG6000、0.98 M NaClを加え、遠心（14000 rpm, 4°C, 30分間）した。沈殿物に-20°Cで冷却した70%エタノールを加えて洗浄し、遠心（14000 rpm, 4°C, 10分間）し、上清を捨てた。真空乾燥機でDNAの沈殿物を乾燥させ、10  $\mu\text{l}$ の1/10濃度のTE buffer [1 mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA] に溶解した。

### b) PCR Products Pre-Sequence Kit（USB.co）による精製

PERKIN ELMER社製のBiosystem3700を用いて塩基配列を決定する場合には、PCR Products Pre-Sequence Kitを用い、製造元の指示に従ってPCR産物を精製した。Exonulcease(特)およびShirimp Alkaline PhosphataseについてはKit付属のものを用いた。反応液の最終濃度に関しては、Exonulcease(特)については0.0001875 unit/ $\mu\text{l}$ 、Shirimp Alkaline Phosphataseについては0.000375 unit/ $\mu\text{l}$ とした。37°Cで30分間の酵素反応を行った後、81°Cで30分間の熱処理を行うことにより酵素を失活させた。

## 9. DNA塩基配列の決定

塩基配列の決定には、ABI PRIZM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（PERKIN ELMER社製）を用いて、Big Dye Terminator Cycle Sequencing用reaction mixtureの量を半量にしたこと以外は付属のプロトコールに従って行った。プライマーを除去した50 ngから100 ngのPCR産物を、サイクルシーケンスのための鋳型DNAとして用いた。電気泳動、蛍光ラベルの検出および解析に関しては、Applied Biosystems社

製の373 DNA SequencerあるいはPERKIN ELMER社製のBiosystem3700を用いて行った。

## 10. 自然突然変異頻度の測定

突然変異の発生は非常に頻度の低い現象であり、しかもランダムな現象であるためポアソン分布に従うことが知られている (Luria and Delbruck, 1943)。従って、突然変異頻度の測定には完全に独立した複数の実験区を用いる必要がある。

突然変異頻度の測定を行う際には、毎回新鮮な菌株 (MK811、MK1201、MK1301、MK1311、MK1221、MK1331、MK1351、およびMK1371) をグリセロールストックから取り出し、LB寒天培地上にて37°Cで18時間の画線培養を行った。そのうちの1つのコロニー由来の菌体を5 mlのLB培地に植菌し、37°Cで18時間、回転培養した。この培養液をLB培地で $10^6$ 倍に希釈して、100  $\mu$ lをLB寒天培地に塗布した。37°Cで18時間の静置培養後に出現したコロニー数から、変異導入培養開始時における生菌数を測定した。また、この $10^6$ 倍に希釈した100  $\mu$ lの培養液を5 mlのLB培地に植菌し、37°CでO.D.<sub>600</sub>=1.0まで160 rpm/minの速度で振とう培養した。この培養液をLB培地で $10^6$ 倍から $10^4$ 倍に希釈して、50  $\mu$ lもしくは100  $\mu$ lをLB寒天培地に塗布し、37°Cで静置培養した。このコロニー数から変異導入培養後の生菌数を測定した。また同時に、原液、もしくはLB培地で10倍から $10^2$ 倍に希釈して、50  $\mu$ lあるいは100  $\mu$ lをSm含有LB寒天培地上に塗布した。37°Cで静置培養後、出現したコロニー数から変異体数を測定した。このLB寒天培地およびSm含有LB寒天培地、またはRif含有LB寒天培地の静置培養に関しては、野生型株を20時間静置培養した時の最大のコロニーの大きさと比較して、各変異株のそれが同程度になった時に培養を停止した。

### 1 1 .UV感受性の測定

各菌体の培養をLog phaseでとめ (OD<sub>600</sub>=0.2~0.3)、菌液を遠心して、上清を捨て、0.9%NaCl溶液に溶かした。滅菌した時計皿に菌液を移し、UV照射を行った。UV照射後、菌体をLB培地、およびRif含有LB培地に塗布し、20時間の静置培養した。以上の作業は暗室で行った。

# 総括

## 1. 自然突然変異の発生と抑制の分子機構

大腸菌ミューター遺伝子の解析から複製エラーを修復する校正機能やミスマッチ修復機構を欠損させた場合、突然変異の発生頻度 $\sim 10^6$ 倍の上昇がみられる。複製エラーを修復する遺伝子の欠損により劇的に変異頻度が上昇することから、複製エラーが自然突然変異の発生原因と考えられていた。しかし、近年の解析から、自然DNA損傷に由来する突然変異、特にDNA損傷を乗り越える際にエラーを生じる損傷乗り越えDNA合成の関与が示唆されていた。

## 2. 自然突然変異における複製エラーの関与

本研究で用いた染色体*rpsL*検出系は大腸菌の染色体上に発生する自然突然変異を網羅的に解析することができる実験系である。染色体*rpsL*検出系を用いて、染色体上に生じる自然突然変異の発生に対する複製エラーの関与を明らかにする目的でミスマッチ修復機構を欠損させた*mutS*変異株の解析を行った。自然突然変異の発生原因が複製エラーであり、複製エラーを校正機能やミスマッチ修復機構が修復しきれなかった前変異損傷が自然突然変異となるならば、野生株と*mutS*変異株の変異スペクトラムは一致するはずである。しかし、野生株と*mutS*変異株における塩基配列レベルで明らかにした前進突然変異の特異性は全く異なったものであった。この結果から、自然突然変異の発生原因が複製エラーであることという可能性は否定的となった。

## 3. 自然突然変異における損傷乗り越えDNA合成の関与

自然突然変異の発生原因が複製エラーではないことが強く示唆されたため、複製エラーと同様に前変異損傷の発生原因となる自然DNA損傷に注目した。自然DNA損傷は、DNA鎖上に生じる損傷である紫外線などの外的の要因のみならず、活性酸素などの内的な要因によっても生じることが知られている。近年、鋳型DNA鎖上に配置したDNA損傷を、誤った塩基を入れながら乗り越える「損傷乗り越えDNA合成」が突然変異の発生原因として注目されている。大腸菌においても、SOS応答時に発現する遺伝子の産物として、損傷乗り越えDNA合成を行うTLSポリメラーゼが3つ見いだされている。大腸菌のTLSポリメラーゼはPol II(*polB*)、Pol IV(*dinB*)、Pol V(*umuDC*)であり、他の生物のTLSポリメラーゼ同様、損傷乗り越えDNA合成を行うことが生化学的、遺伝学的に明らかに

されつつある。Pol IIはDNA鎖上のアセチルアミノフルオレン (AAF)を乗り越える際に、2塩基の欠失を生じることが示されている。Pol IVもDNA鎖上のベンゾピレン (BaP) を乗り越えるときに、1塩基の欠失を生じることが示されている。また、Pol Vは鋳型DNA鎖上に配置した6-4光産物を乗り越えるとき、Tに対してCを挿入して塩基置換を引き起こすことが示されている。しかし、大腸菌における自然突然変異への関与は明らかにされておらず、本研究で解析を試みた。大腸菌染色体*rpsL*系を用いて塩基配列レベルでの大量解析を行った結果、標的遺伝子上に生じる突然変異の特異性には野生株とTLS欠損株ではほとんど違いがみられなかった。人工的に配置した鋳型DNA鎖上の損傷を乗り越える際に、突然変異を生じるTLSポリメラーゼは、自然生育下で発生する自然突然変異にはなんら関与をしていない可能性が強く示唆された。

#### 4.複製エラーにおける*dinB*の関与

損傷を乗り越える際に突然変異を引き起こすTLSポリメラーゼは、通常生育下で発生する自然突然変異には関与していないことが示唆された。しかし、大腸菌の3つのTLSポリメラーゼのうち*dinB*遺伝子にコードされるPol IVは、損傷のない鋳型DNA鎖上でも突然変異を生じることが示されている。また、*dinB*は非SOS応答時において、他のTLSポリメラーゼや複製型DNAポリメラーゼであるPol III よりも5倍から15倍も分子数が多く、突然変異の発生に関与している可能性は否定できない。そこで、本研究では、Pol IVが複製エラーに関与しているのではないとか考えミスマッチ修復機構を欠損させた*mutS*変異株にPol IVをコードする*dinB*変異を導入して、Pol IVの複製エラーへの関与を明らかにすることを試みた。

*rpoB*標的遺伝子上に生じる塩基置換変異の測定を行ったところ、*mutS*変異株に比べ、*dinB mutS*二重変異株は、変異頻度の平均値、および中央値の両方が半分程度に下がっていた。この結果から、*dinB*は前変異損傷として、複製エラーを高頻度に生じている可能性が示唆された。*dinB*変異株における変異頻度は野生株と同程度であるため、*dinB*にコードされるPol IVは、DNA複製時に何らかの原因によって複製型DNAポリメラーゼであるPol IIIと置き換わり、複製エラーを生じてはいるが、ミスマッチ修復機構によって高効率に修復されていることが示唆された。

# 付録表1 野生株における変異の種類別変異頻度

A 変異の種類別変異頻度												
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
<b>組換え型</b>												
1点型(128A→C)	8	16	7	8	42	81	0.023	0.025	0.010	0.012	0.058	<b>0.026</b> $\pm$ 0.019
2点型(-22G→A,128A→C)	36	23	57	44	30	190	0.10	0.036	0.083	0.068	0.041	<b>0.066</b> $\pm$ 0.028
<b>塩基置換</b>												
ホットスポット1(82C→A)	6	8	14	16	6	50	0.017	0.013	0.020	0.025	0.0083	<b>0.017</b> $\pm$ 0.0064
ホットスポット2(245T→A)	46	53	39	35	42	215	0.13	0.084	0.057	0.054	0.058	<b>0.077</b> $\pm$ 0.033
ホットスポット3(245T→G)	2	25	1	7	4	39	0.0058	0.040	0.0015	0.011	0.0055	<b>0.013</b> $\pm$ 0.015
上記以外	91	34	21	65	52	263	0.26	0.054	0.031	0.10	0.072	<b>0.10</b> $\pm$ 0.092
1塩基フレームシフト	10	38	7	18	17	90	0.029	0.060	0.010	0.028	0.023	<b>0.030</b> $\pm$ 0.018
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
配列置換	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
<b>欠失</b>												
タイプ1(dr)	34	0	11	7	12	64	0.098	ND	0.016	0.011	0.017	<b>0.028</b> $\pm$ 0.039
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
タイプ3(rなし)	0	1	0	0	0	1	ND	0.0016	ND	ND	ND	<b>0.00032</b> $\pm$ 0.00071
未同定	1	2	2	5	4	14	0.0029	0.0032	0.0029	0.0077	0.0055	<b>0.0044</b> $\pm$ 0.0021
<b>重複</b>												
クラス1	1	3	2	0	8	14	0.0029	0.0048	0.0029	ND	0.011	<b>0.0043</b> $\pm$ 0.0041
クラス2	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.0015	ND	ND	<b>0.00029</b> $\pm$ 0.00065
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
<b>IS</b>												
IS1	3	33	36	8	7	87	0.0086	0.052	0.053	0.012	0.0096	<b>0.027</b> $\pm$ 0.023
IS5	1	1	14	11	7	34	0.0029	0.0016	0.020	0.017	0.0096	<b>0.010</b> $\pm$ 0.0083
1.2kIS	1	3	5	16	3	28	0.0029	0.0048	0.0073	0.025	0.0041	<b>0.0087</b> $\pm$ 0.0090
その他	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
変異なし	0	0	23	0	6	29	ND	ND	0.034	ND	0.0083	<b>0.0084</b> $\pm$ 0.015
Total	240	240	240	240	240	1200	0.69	0.38	0.35	0.37	0.33	<b>0.42</b> $\pm$ 0.15
<b>B 塩基置換の種類別検出数と変異頻度</b>												
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
<b>Transition</b>												
A:T→G:C	0	3	0	18	2	23	ND	0.0048	ND	0.028	0.0028	<b>0.0071</b> $\pm$ 0.012
G:C→A:T	75	12	7	22	5	121	0.22	0.019	0.010	0.034	0.0069	<b>0.057</b> $\pm$ 0.089
total	75	15	7	40	7	144	0.22	0.024	0.010	0.062	0.0096	<b>0.064</b> $\pm$ 0.087
<b>Transversion</b>												
G:C→T:A	13	3	1	6	13	36	0.037	0.0048	0.0015	0.0093	0.018	<b>0.014</b> $\pm$ 0.014
G:C→C:G	0	0	4	2	21	27	ND	ND	0.0058	0.0031	0.029	<b>0.0076</b> $\pm$ 0.012
T:A→A:T	1	1	3	13	9	27	0.0029	0.0016	0.0044	0.020	0.012	<b>0.0083</b> $\pm$ 0.0078
A:T→C:G	2	15	6	4	2	29	0.0058	0.024	0.0088	0.0062	0.0028	<b>0.0094</b> $\pm$ 0.0083
total	16	19	14	25	45	119	0.046	0.030	0.020	0.039	0.062	<b>0.039</b> $\pm$ 0.016
<b>Hot spot</b>												
82C→A	6	8	14	16	6	50	0.017	0.013	0.020	0.025	0.0083	<b>0.017</b> $\pm$ 0.0064
245 T→A	46	53	39	35	42	215	0.13	0.084	0.057	0.054	0.058	<b>0.077</b> $\pm$ 0.033
245 T→G	2	25	1	7	4	39	0.0058	0.040	0.0015	0.011	0.0055	<b>0.013</b> $\pm$ 0.015
total	54	86	54	58	52	304	0.16	0.14	0.079	0.089	0.072	<b>0.11</b> $\pm$ 0.037
Total	145	120	75	123	104	567	0.42	0.19	0.11	0.19	0.14	<b>0.21</b> $\pm$ 0.12
<b>C 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度</b>												
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
<b>Addition</b>												
at run	3	0	2	4	5	14	0.0086	ND	0.0029	0.0062	0.0069	<b>0.0049</b> $\pm$ 0.0034
at non-run	0	1	0	0	1	2	ND	0.0016	ND	ND	0.0014	<b>0.00059</b> $\pm$ 0.00081
total	3	1	2	4	6	16	0.0086	0.0016	0.0029	0.0062	0.0083	<b>0.0055</b> $\pm$ 0.0032
<b>Deletion</b>												
at run	2	32	4	10	8	56	0.0058	0.051	0.0058	0.015	0.011	<b>0.018</b> $\pm$ 0.019
at non-run	5	5	1	4	3	18	0.014	0.0079	0.0015	0.0062	0.0041	<b>0.0068</b> $\pm$ 0.0049
total	7	37	5	14	11	74	0.020	0.059	0.0073	0.022	0.015	<b>0.025</b> $\pm$ 0.020
Total	10	38	7	18	17	90	0.029	0.060	0.010	0.028	0.023	<b>0.030</b> $\pm$ 0.018

野生株 (MK811) において、各変異の種類別変異頻度と見いだされた各変異の検体数を示す。解析は、独立した5実験区由来の合計1200クローンの *rpsL* 標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表のAは変異の種類別変異頻度を、Bは塩基置換の種類別変異頻度を、Cは1塩基フレームシフトの種類別変異頻度を示す。



付録表3 *dinB*変異株における変異の種類別変異頻度

A 変異の種類別変異頻度												
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
<b>組換え型</b>												
1点型(128A→C)	38	30	62	42	75	247	0.082	0.064	0.088	0.084	0.25	<b>0.11</b> $\pm$ 0.077
2点型(-22G→A,128A→C)	89	54	40	40	22	245	0.19	0.11	0.057	0.080	0.073	<b>0.10</b> $\pm$ 0.054
<b>塩基置換</b>												
ホットスポット1(82C→A)	3	1	15	1	3	23	0.0065	0.0021	0.021	0.0020	0.010	<b>0.0084</b> $\pm$ 0.0079
ホットスポット2(245T→A)	12	65	35	23	70	205	0.026	0.14	0.050	0.046	0.23	<b>0.099</b> $\pm$ 0.087
ホットスポット3(245T→G)	1	6	5	5	2	19	0.0022	0.013	0.0071	0.010	0.0067	<b>0.0077</b> $\pm$ 0.0040
上記以外	34	47	12	61	33	187	0.074	0.10	0.017	0.12	0.11	<b>0.085</b> $\pm$ 0.042
1塩基フレームシフト	8	14	28	8	4	62	0.017	0.030	0.040	0.016	0.013	<b>0.023</b> $\pm$ 0.011
2塩基フレームシフト	0	0	0	2	0	2	ND	ND	ND	0.0040	ND	<b>0.00080</b> $\pm$ 0.0018
配列置換	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
<b>欠失</b>												
タイプ1(dr)	8	6	13	3	2	32	0.017	0.013	0.018	0.0060	0.0067	<b>0.012</b> $\pm$ 0.0058
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
タイプ3(rなし)	0	0	2	0	0	2	ND	ND	0.0028	ND	ND	<b>0.00057</b> $\pm$ 0.0013
未同定	17	0	3	1	5	26	0.037	ND	0.0043	0.0020	0.017	<b>0.012</b> $\pm$ 0.015
<b>重複</b>												
クラス1	0	3	0	0	3	6	ND	0.0064	ND	ND	0.010	<b>0.0033</b> $\pm$ 0.0047
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
<b>IS</b>												
IS1	21	12	22	16	5	76	0.046	0.026	0.031	0.032	0.017	<b>0.030</b> $\pm$ 0.011
IS5	7	0	2	19	6	34	0.015	ND	0.0028	0.038	0.020	<b>0.015</b> $\pm$ 0.015
1.2kIS	0	0	0	17	9	26	ND	ND	ND	0.034	0.030	<b>0.013</b> $\pm$ 0.018
その他	0	0	0	1	0	1	ND	ND	ND	0.0020	ND	<b>0.00040</b> $\pm$ 0.00089
変異なし	2	2	1	1	1	7	0.0043	0.0043	0.0014	0.0020	0.0033	<b>0.0031</b> $\pm$ 0.0013
Total	240	240	240	240	240	1200	0.52	0.51	0.34	0.48	0.80	<b>0.53</b> $\pm$ 0.17
<b>B 塩基置換の種類別検出数と変異頻度</b>												
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
<b>Transition</b>												
A:T→G:C	11	2	0	5	10	28	0.024	0.0043	ND	0.010	0.033	<b>0.014</b> $\pm$ 0.014
G:C→A:T	9	39	1	18	12	79	0.020	0.083	0.0014	0.036	0.040	<b>0.036</b> $\pm$ 0.030
total	20	41	1	23	22	107	0.043	0.087	0.0014	0.046	0.073	<b>0.050</b> $\pm$ 0.033
<b>Transversion</b>												
G:C→T:A	0	1	2	5	1	9	ND	0.0021	0.0028	0.010	0.0033	<b>0.0037</b> $\pm$ 0.0038
G:C→C:G	7	1	3	2	2	15	0.015	0.0021	0.0043	0.0040	0.0067	<b>0.0064</b> $\pm$ 0.0051
T:A→A:T	4	4	4	22	4	38	0.0087	0.0085	0.0057	0.044	0.013	<b>0.016</b> $\pm$ 0.016
A:T→C:G	3	0	2	9	4	18	0.0065	ND	0.0028	0.018	0.013	<b>0.0081</b> $\pm$ 0.0074
total	14	6	11	38	11	80	0.030	0.013	0.016	0.076	0.037	<b>0.034</b> $\pm$ 0.025
<b>Hot spot</b>												
82C→A	3	1	15	1	3	23	0.0065	0.0021	0.021	0.0020	0.010	<b>0.0084</b> $\pm$ 0.0079
245 T→A	12	65	35	23	70	205	0.026	0.14	0.050	0.046	0.23	<b>0.099</b> $\pm$ 0.087
245 T→G	1	6	5	5	2	19	0.0022	0.0128	0.0071	0.0100	0.0067	<b>0.0077</b> $\pm$ 0.0040
total	16	72	55	29	75	247	0.035	0.15	0.078	0.058	0.25	<b>0.11</b> $\pm$ 0.088
Total	50	119	67	90	108	434	0.11	0.25	0.095	0.18	0.36	<b>0.20</b> $\pm$ 0.11
<b>C 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度</b>												
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
<b>Addition</b>												
at run	2	0	0	2	1	5	0.0043	ND	ND	0.0040	0.0033	<b>0.0023</b> $\pm$ 0.0022
at non-run	1	1	2	0	2	6	0.0022	0.0021	0.0028	ND	0.0067	<b>0.0028</b> $\pm$ 0.0024
total	3	1	2	2	3	11	0.0065	0.0021	0.0028	0.0040	0.010	<b>0.0051</b> $\pm$ 0.0032
<b>Deletion</b>												
at run	5	10	26	4	1	46	0.011	0.021	0.037	0.0080	0.0033	<b>0.016</b> $\pm$ 0.013
at non-run	0	3	0	2	0	5	ND	0.0064	ND	0.0040	ND	<b>0.0021</b> $\pm$ 0.0030
total	5	13	26	6	1	51	0.011	0.028	0.037	0.012	0.0033	<b>0.018</b> $\pm$ 0.014
Total	8	14	28	8	4	62	0.017	0.030	0.040	0.016	0.013	<b>0.023</b> $\pm$ 0.011

*dinB*変異株 (MK1201) において、各変異の種類別変異頻度と見いだされた各変異の検体数を示す。解析は、独立した5実験区由来の合計1200クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表のAは変異の種類別変異頻度を、Bは塩基置換の種類別変異頻度を、Cは1塩基フレームシフトの種類別変異頻度を示す。



付録表4 *polB*変異株における変異の種類別変異頻度

A 変異の種類別変異頻度													
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave $\pm$ SD	
<b>組換え型</b>													
1点型(128A→C)	26	50	68	41	12	197	0.104	0.223	0.199	0.187	0.097	0.162	
2点型(-22G→A,128A→C)	26	44	36	39	23	168	0.052	0.10	0.069	0.091	0.064	<b>0.086</b> $\pm$ 0.042	
<b>塩基置換</b>													
ホットスポット1(82C→A)	21	2	3	18	5	49	0.042	0.0048	0.0058	0.042	0.014	<b>0.022</b> $\pm$ 0.019	
ホットスポット2(245T→A)	53	50	52	35	97	287	0.11	0.12	0.10	0.082	0.27	<b>0.13</b> $\pm$ 0.076	
ホットスポット3(245T→G)	8	7	1	7	0	23	0.016	0.017	0.0019	0.016	ND	<b>0.010</b> $\pm$ 0.0084	
上記以外	42	44	44	81	54	265	0.084	0.10	0.084	0.19	0.15	<b>0.12</b> $\pm$ 0.046	
1塩基フレームシフト	22	8	10	8	10	58	0.044	0.019	0.019	0.019	0.028	<b>0.026</b> $\pm$ 0.011	
2塩基フレームシフト	0	1	0	0	0	1	ND	0.0024	ND	ND	ND	<b>0.00048</b> $\pm$ 0.0011	
配列置換	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
<b>欠失</b>													
タイプ1(dr)	5	2	0	1	2	10	0.010	0.0048	ND	0.0023	0.0055	<b>0.0045</b> $\pm$ 0.0038	
タイプ2(ir)	3	3	3	0	0	9	0.0060	0.0071	0.0058	ND	ND	<b>0.0038</b> $\pm$ 0.0035	
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
未同定	14	1	6	3	4	28	0.028	0.0024	0.012	0.0070	0.0111	<b>0.012</b> $\pm$ 0.0097	
<b>重複</b>													
クラス1	10	1	3	2	1	17	0.020	0.0024	0.0058	0.0047	0.0028	<b>0.0071</b> $\pm$ 0.0073	
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
<b>IS</b>													
IS1	3	11	0	2	30	46	0.0060	0.026	ND	0.0047	0.083	<b>0.024</b> $\pm$ 0.035	
IS5	4	16	12	3	1	36	0.0080	0.038	0.023	0.0070	0.0028	<b>0.016</b> $\pm$ 0.015	
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
その他	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
変異なし	3	0	2	0	3	8	0.0060	ND	0.0038	ND	0.0083	<b>0.0036</b> $\pm$ 0.0037	
Total	240	240	240	240	242	1202	0.48	0.57	0.46	0.56	0.67	<b>0.55</b> $\pm$ 0.083	

B 塩基置換の種類別検出数と変異頻度													
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave $\pm$ SD	
<b>Transition</b>													
A:T→G:C	0	3	4	4	10	21	ND	0.0071	0.0077	0.0093	0.028	<b>0.010</b> $\pm$ 0.010	
G:C→A:T	27	29	32	5	17	110	0.054	0.069	0.061	0.012	0.047	<b>0.049</b> $\pm$ 0.022	
total	27	32	36	9	27	131	0.054	0.076	0.069	0.021	0.075	<b>0.059</b> $\pm$ 0.023	
<b>Transversion</b>													
G:C→T:A	1	0	0	2	1	4	0.0020	ND	ND	0.0047	0.0028	<b>0.0019</b> $\pm$ 0.0020	
G:C→C:G	0	6	2	0	20	28	ND	0.014	0.0038	ND	0.055	<b>0.015</b> $\pm$ 0.023	
T:A→A:T	8	5	4	68	5	90	0.016	0.012	0.0077	0.16	0.014	<b>0.042</b> $\pm$ 0.066	
A:T→C:G	6	1	2	2	1	12	0.012	0.0024	0.0038	0.0047	0.0028	<b>0.0051</b> $\pm$ 0.0039	
total	15	12	8	72	27	134	0.030	0.029	0.015	0.17	0.075	<b>0.063</b> $\pm$ 0.063	
<b>Hot spot</b>													
82C→A	21	2	3	18	5	49	0.042	0.0048	0.0058	0.042	0.014	<b>0.022</b> $\pm$ 0.019	
245 T→A	53	50	52	35	97	287	0.11	0.12	0.10	0.082	0.27	<b>0.13</b> $\pm$ 0.076	
245 T→G	8	7	1	7	0	23	0.016	0.017	0.0019	0.016	ND	<b>0.010</b> $\pm$ 0.0084	
total	82	59	56	60	102	359	0.16	0.14	0.11	0.14	0.28	<b>0.17</b> $\pm$ 0.068	
Total	124	103	100	141	156	624	0.25	0.24	0.19	0.33	0.43	<b>0.29</b> $\pm$ 0.094	

C 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度													
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )						
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	ave $\pm$ SD	
<b>Addition</b>													
at run	1	0	0	2	1	4	0.0020	ND	ND	0.0047	0.0028	<b>0.0019</b> $\pm$ 0.0020	
at non-run	2	5	3	0	1	11	0.0040	0.012	0.0058	ND	0.0028	<b>0.0049</b> $\pm$ 0.0044	
total	3	5	3	2	2	15	0.0060	0.012	0.0058	0.0047	0.0055	<b>0.0068</b> $\pm$ 0.0029	
<b>Deletion</b>													
at run	0	1	5	6	1	13	ND	0.0024	0.0096	0.014	0.0028	<b>0.0057</b> $\pm$ 0.0058	
at non-run	19	2	2	0	7	30	0.038	0.0048	0.0038	ND	0.019	<b>0.013</b> $\pm$ 0.016	
total	19	3	7	6	8	43	0.038	0.0071	0.013	0.014	0.022	<b>0.019</b> $\pm$ 0.012	
Total	22	8	10	8	10	58	0.044	0.019	0.019	0.019	0.028	<b>0.026</b> $\pm$ 0.011	

*polB*変異株 (MK1311) において、各変異の種類別変異頻度と見いだされた各変異の検体数を示す。解析は、独立した5実験区由来の合計1200クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体的変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表のAは変異の種類別変異頻度を、Bは塩基置換の種類別変異頻度を、Cは1塩基フレームシフトの種類別変異頻度を示す。

付録表5 *umuDC*変異株における変異の種類別変異頻度

A 変異の種類別変異頻度													
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD	
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5		
<b>組換え型</b>													
1点型(128A→C)	66	11	7	24	21	129	0.20	0.050	0.012	0.11	0.076	<b>0.089</b> $\pm$ 0.069	
2点型(-22G→A,128A→C)	22	88	18	28	32	188	0.065	0.40	0.032	0.13	0.12	<b>0.15</b> $\pm$ 0.15	
<b>塩基置換</b>													
ホットスポット1(82C→A)	22	8	10	1	3	44	0.065	0.037	0.018	0.0046	0.011	<b>0.027</b> $\pm$ 0.024	
ホットスポット2(245T→A)	69	74	46	30	65	284	0.20	0.34	0.081	0.14	0.24	<b>0.20</b> $\pm$ 0.099	
ホットスポット3(245T→G)	1	1	6	27	0	35	0.0030	0.0046	0.011	0.12	ND	<b>0.028</b> $\pm$ 0.053	
上記以外	38	24	35	105	31	233	0.11	0.11	0.061	0.48	0.11	<b>0.18</b> $\pm$ 0.17	
1塩基フレームシフト	5	10	50	8	52	125	0.015	0.046	0.088	0.037	0.19	<b>0.075</b> $\pm$ 0.069	
2塩基フレームシフト	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.0018	ND	ND	<b>0.00035</b> $\pm$ 0.00078	
配列置換	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.0018	ND	ND	<b>0.00035</b> $\pm$ 0.00078	
<b>欠失</b>													
タイプ1(dr)	1	4	11	6	4	26	0.0030	0.018	0.019	0.027	0.015	<b>0.016</b> $\pm$ 0.0089	
タイプ2(ir)	1	0	0	0	0	1	0.0030	ND	ND	ND	ND	<b>0.00059</b> $\pm$ 0.0013	
タイプ3(rなし)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
未同定	5	1	18	2	0	26	0.015	0.0046	0.032	0.0091	ND	<b>0.012</b> $\pm$ 0.012	
<b>重複</b>													
クラス1	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.0018	ND	ND	<b>0.00035</b> $\pm$ 0.00078	
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
<b>IS</b>													
IS1	1	2	14	9	19	45	0.0030	0.0092	0.025	0.041	0.069	<b>0.029</b> $\pm$ 0.027	
IS5	4	6	13	1	7	31	0.012	0.028	0.023	0.0046	0.025	<b>0.018</b> $\pm$ 0.0098	
1.2kIS	3	11	8	0	4	26	0.0089	0.050	0.014	ND	0.015	<b>0.018</b> $\pm$ 0.019	
1.3kIS	0	0	1	0	0	1	ND	ND	0.0018	ND	ND	<b>0.00035</b> $\pm$ 0.00078	
その他	1	0	0	0	1	2	0.0030	ND	ND	ND	0.0036	<b>0.0013</b> $\pm$ 0.0018	
変異なし	1	0	0	0	1	2	0.0030	ND	ND	ND	0.0036	<b>0.0013</b> $\pm$ 0.0018	
Total	240	240	240	241	240	1201	0.71	1.1	0.42	1.1	0.87	<b>0.84</b> $\pm$ 0.29	
<b>B 塩基置換の種類別検出数と変異頻度</b>													
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD	
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5		
<b>Transition</b>													
A:T→G:C	4	0	6	55	2	67	0.012	ND	0.011	0.25	0.0073	<b>0.056</b> $\pm$ 0.11	
G:C→A:T	19	23	19	22	10	93	0.056	0.11	0.033	0.10	0.036	<b>0.066</b> $\pm$ 0.035	
total	23	23	25	77	12	160	0.068	0.11	0.044	0.35	0.044	<b>0.12</b> $\pm$ 0.13	
<b>Transversion</b>													
G:C→T:A	1	0	0	2	6	9	0.0030	ND	ND	0.0091	0.022	<b>0.0068</b> $\pm$ 0.0092	
G:C→C:G	5	1	8	13	0	27	0.015	0.0046	0.014	0.059	ND	<b>0.019</b> $\pm$ 0.024	
T:A→A:T	9	0	2	9	7	27	0.027	ND	0.0035	0.041	0.025	<b>0.019</b> $\pm$ 0.017	
A:T→C:G	0	0	0	4	6	10	ND	ND	ND	0.018	0.022	<b>0.0080</b> $\pm$ 0.011	
total	15	1	10	28	19	73	0.044	0.0046	0.018	0.13	0.069	<b>0.053</b> $\pm$ 0.049	
<b>Hot spot</b>													
82C→A	22	8	10	1	3	44	0.065	0.037	0.018	0.0046	0.011	<b>0.027</b> $\pm$ 0.024	
245 T→A	69	74	46	30	65	284	0.20	0.34	0.081	0.14	0.24	<b>0.20</b> $\pm$ 0.099	
245 T→G	1	1	6	27	0	35	0.0030	0.0046	0.011	0.12	ND	<b>0.028</b> $\pm$ 0.053	
total	92	83	62	58	68	363	0.27	0.38	0.11	0.26	0.25	<b>0.25</b> $\pm$ 0.097	
Total	130	107	97	163	99	596	0.38	0.49	0.17	0.74	0.36	<b>0.43</b> $\pm$ 0.21	
<b>C 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度</b>													
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD	
	#7	#8	#9	#10	#11	Total	#7	#8	#9	#10	#11		
<b>Addition</b>													
at run	2	1	16	1	50	70	0.0059	0.0046	0.028	0.0046	0.18	<b>0.045</b> $\pm$ 0.077	
at non-run	1	0	6	0	0	7	0.0030	ND	0.011	ND	ND	<b>0.0027</b> $\pm$ 0.0045	
total	3	1	22	1	50	77	0.0089	0.0046	0.039	0.0046	0.18	<b>0.048</b> $\pm$ 0.076	
<b>Deletion</b>													
at run	2	8	2	2	1	15	0.0059	0.037	0.0035	0.0091	0.0036	<b>0.012</b> $\pm$ 0.014	
at non-run	0	1	26	5	1	33	ND	0.0046	0.046	0.023	0.0036	<b>0.015</b> $\pm$ 0.019	
total	2	9	28	7	2	48	0.0059	0.041	0.049	0.032	0.0073	<b>0.027</b> $\pm$ 0.020	
Total	5	10	50	8	52	125	0.015	0.046	0.088	0.037	0.19	<b>0.075</b> $\pm$ 0.069	

*umuDC*変異株 (MK1301) において、各変異の種類別変異頻度と見いだされた各変異の検体数を示す。解析は、独立した5実験区由来の合計1200クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表のAは変異の種類別変異頻度を、Bは塩基置換の種類別変異頻度を、Cは1塩基フレームシフトの種類別変異頻度を示す。

付録表6 *dinB umuDC*二重変異株における変異の種類別変異頻度

A 変異の種類別変異頻度												
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
<b>組換え型</b>												
1点型(128A→C)	17	28	64	14	9	132	0.034	0.048	0.17	0.034	0.028	<b>0.062</b> $\pm$ 0.058
2点型(-22G→A,128A→C)	42	33	20	88	42	225	0.085	0.056	0.052	0.21	0.13	<b>0.11</b> $\pm$ 0.067
<b>塩基置換</b>												
ホットスポット1(82C→A)	7	3	19	1	3	33	0.014	0.0051	0.049	0.0024	0.0092	<b>0.016</b> $\pm$ 0.019
ホットスポット2(245T→A)	69	44	74	42	23	252	0.14	0.075	0.19	0.10	0.071	<b>0.12</b> $\pm$ 0.050
ホットスポット3(245T→G)	6	8	9	6	11	40	0.012	0.014	0.023	0.015	0.034	<b>0.019</b> $\pm$ 0.0091
上記以外	42	41	15	32	69	199	0.085	0.070	0.039	0.077	0.21	<b>0.097</b> $\pm$ 0.067
1塩基フレームシフト	3	22	4	18	43	90	0.0060	0.038	0.010	0.044	0.13	<b>0.046</b> $\pm$ 0.051
2塩基フレームシフト	0	12	0	0	2	14	ND	0.021	ND	ND	0.0061	<b>0.0053</b> $\pm$ 0.0089
配列置換	1	0	0	0	14	15	0.0020	ND	ND	ND	0.043	<b>0.0090</b> $\pm$ 0.019
<b>欠失</b>												
タイプ1(dr)	11	25	1	19	4	60	0.022	0.043	0.0026	0.046	0.012	<b>0.025</b> $\pm$ 0.019
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
タイプ3(rなし)	0	2	0	0	0	2	ND	0.0034	ND	ND	ND	<b>0.00068</b> $\pm$ 0.0015
未同定	10	7	7	4	2	30	0.020	0.012	0.018	0.0097	0.0061	<b>0.013</b> $\pm$ 0.0058
<b>重複</b>												
クラス1	0	0	5	0	0	5	ND	ND	0.013	ND	ND	<b>0.0026</b> $\pm$ 0.0058
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
<b>IS</b>												
IS1	19	10	10	9	16	64	0.038	0.0171	0.026	0.022	0.049	<b>0.030</b> $\pm$ 0.013
IS5	12	2	9	6	1	30	0.024	0.0034	0.023	0.015	0.0031	<b>0.014</b> $\pm$ 0.010
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
その他	4	0	2	1	2	9	0.0081	ND	0.0052	0.0024	0.0061	<b>0.0044</b> $\pm$ 0.0032
変異なし	0	3	1	0	0	4	ND	0.0051	0.0026	ND	ND	<b>0.0015</b> $\pm$ 0.0023
Total	243	240	240	240	241	1204	0.49	0.41	0.62	0.58	0.74	<b>0.57</b> $\pm$ 0.13
<b>B 塩基置換の種類別検出数と変異頻度</b>												
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
<b>Transition</b>												
A:T→G:C	12	2	3	6	51	74	0.024	0.0034	0.0078	0.015	0.16	<b>0.041</b> $\pm$ 0.065
G:C→A:T	13	6	6	7	8	40	0.026	0.010	0.016	0.017	0.025	<b>0.019</b> $\pm$ 0.0066
total	25	8	9	13	59	114	0.050	0.014	0.023	0.031	0.18	<b>0.060</b> $\pm$ 0.069
<b>Transversion</b>												
G:C→T:A	6	1	0	6	0	13	0.012	0.0017	ND	0.015	ND	<b>0.0057</b> $\pm$ 0.0071
G:C→C:G	0	0	1	0	7	8	ND	ND	0.0026	ND	0.021	<b>0.0048</b> $\pm$ 0.0094
T:A→A:T	9	28	3	12	2	54	0.018	0.048	0.0078	0.029	0.0061	<b>0.022</b> $\pm$ 0.017
A:T→C:G	2	4	2	1	1	10	0.0040	0.0068	0.0052	0.0024	0.0031	<b>0.0043</b> $\pm$ 0.0018
total	17	33	6	19	10	85	0.034	0.056	0.016	0.046	0.031	<b>0.037</b> $\pm$ 0.016
<b>Hot spot</b>												
82C→A	7	3	19	1	3	33	0.014	0.0051	0.049	0.0024	0.0092	<b>0.016</b> $\pm$ 0.019
245 T→A	69	44	74	42	23	252	0.14	0.075	0.19	0.10	0.071	<b>0.12</b> $\pm$ 0.050
245 T→G	6	8	9	6	11	40	0.012	0.014	0.023	0.015	0.034	<b>0.019</b> $\pm$ 0.0091
total	82	55	102	49	37	325	0.17	0.094	0.26	0.12	0.11	<b>0.15</b> $\pm$ 0.068
Total	124	96	117	81	106	524	0.25	0.16	0.30	0.20	0.33	<b>0.25</b> $\pm$ 0.068
<b>C 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度</b>												
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
<b>Addition</b>												
at run	0	13	0	0	2	15	ND	0.022	ND	ND	0.0061	<b>0.0057</b> $\pm$ 0.0096
at non-run	2	7	0	0	0	9	0.0040	0.012	ND	ND	ND	<b>0.0032</b> $\pm$ 0.0052
total	2	20	0	0	2	24	0.0040	0.034	ND	ND	0.0061	<b>0.0089</b> $\pm$ 0.014
<b>Deletion</b>												
at run	0	2	2	11	41	56	ND	0.0034	0.0052	0.027	0.13	<b>0.032</b> $\pm$ 0.053
at non-run	1	0	2	7	0	10	0.0020	ND	0.0052	0.017	ND	<b>0.0048</b> $\pm$ 0.0071
total	1	2	4	18	41	66	0.0020	0.0034	0.010	0.044	0.13	<b>0.037</b> $\pm$ 0.052
Total	3	22	4	18	43	90	0.0060	0.038	0.010	0.044	0.13	<b>0.046</b> $\pm$ 0.051

*dinB umuDC*二重変異株 (MK1221) において、各変異の種類別変異頻度と見いだされた各変異の検体数を示す。解析は、独立した5実験区由来の合計1200クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表のAは変異の種類別変異頻度を、Bは塩基置換の種類別変異頻度を、Cは1塩基フレームシフトの種類別変異頻度を示す。



付録表8 *polB umuDC*二重変異株における変異の種類別変異頻度

A 変異の種類別変異頻度													
Section No.	Mutiation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD	
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5		
<b>組換え型</b>													
1点型(128A→C)	9	5	3	6	1	24	0.103	0.036	0.026	0.033	0.019	<b>0.043</b> $\pm$ 0.034	
2点型(-22G→A,128A→C)	4	4	4	8	2	22	0.046	0.029	0.034	0.043	0.038	<b>0.038</b> $\pm$ 0.0068	
<b>塩基置換</b>													
ホットスポット1(82C→A)	0	0	3	3	27	33	ND	ND	0.026	0.016	0.52	<b>0.11</b> $\pm$ 0.23	
ホットスポット2(245T→A)	15	27	18	16	9	85	0.17	0.20	0.15	0.087	0.17	<b>0.16</b> $\pm$ 0.042	
ホットスポット3(245T→G)	2	0	1	0	3	6	0.023	ND	0.0085	ND	0.058	<b>0.018</b> $\pm$ 0.024	
上記以外	12	2	5	9	2	30	0.14	0.015	0.043	0.049	0.038	<b>0.056</b> $\pm$ 0.047	
1塩基フレームシフト	1	1	6	2	2	12	0.011	0.0073	0.051	0.011	0.038	<b>0.024</b> $\pm$ 0.020	
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
配列置換	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
<b>欠失</b>													
タイプ1(dr)	1	2	0	1	0	4	0.011	0.015	ND	0.0054	ND	<b>0.0063</b> $\pm$ 0.0066	
タイプ2(ir)	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
タイプ3(rなし)	0	0	0	1	0	1	ND	ND	ND	0.0054	ND	<b>0.0011</b> $\pm$ 0.0024	
未同定	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
<b>重複</b>													
クラス1	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
<b>IS</b>													
IS1	3	7	4	2	1	17	0.034	0.051	0.034	0.011	0.019	<b>0.030</b> $\pm$ 0.016	
IS5	0	0	2	0	0	2	ND	ND	0.017	ND	ND	<b>0.0034</b> $\pm$ 0.0076	
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
その他	1	0	2	0	0	3	0.011	ND	0.017	ND	ND	<b>0.0057</b> $\pm$ 0.0081	
変異なし	0	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	ND	0.019	<b>0.0038</b> $\pm$ 0.0086	
Total	48	48	48	48	48	240	0.55	0.35	0.41	0.26	0.92	<b>0.50</b> $\pm$ 0.26	
<b>B 塩基置換の種類別検出数と変異頻度</b>													
Section No.	Mutiation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD	
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5		
<b>Transition</b>													
A:T→G:C	0	0	1	2	0	3	ND	ND	0.0085	0.0108	ND	<b>0.0039</b> $\pm$ 0.0054	
G:C→A:T	7	1	2	1	0	11	0.080	0.0073	0.017	0.0054	ND	<b>0.022</b> $\pm$ 0.033	
total	7	1	3	3	0	14	0.080	0.0073	0.026	0.0163	ND	<b>0.026</b> $\pm$ 0.032	
<b>Transversion</b>													
G:C→T:A	1	0	0	1	0	2	0.011	ND	ND	0.0054	ND	<b>0.0034</b> $\pm$ 0.0051	
G:C→C:G	4	1	0	1	0	6	0.046	0.0073	ND	0.0054	ND	<b>0.012</b> $\pm$ 0.019	
T:A→A:T	0	0	2	2	2	6	ND	ND	0.017	0.0108	0.038	<b>0.013</b> $\pm$ 0.016	
A:T→C:G	0	0	0	2	0	2	ND	ND	ND	0.011	ND	<b>0.0022</b> $\pm$ 0.0048	
total	5	1	2	6	2	16	0.057	0.0073	0.017	0.033	0.038	<b>0.031</b> $\pm$ 0.019	
<b>Hot spot</b>													
82C→A	0	0	3	3	27	33	ND	ND	0.026	0.016	0.52	<b>0.11</b> $\pm$ 0.23	
245 T→A	15	27	18	16	9	85	0.17	0.20	0.15	0.087	0.17	<b>0.16</b> $\pm$ 0.042	
245 T→G	2	0	1	0	3	6	0.023	0.00	0.0085	ND	0.058	<b>0.018</b> $\pm$ 0.024	
total	17	27	22	19	39	124	0.19	0.20	0.19	0.10	0.75	<b>0.29</b> $\pm$ 0.26	
Total	29	29	27	28	41	154	0.33	0.21	0.23	0.15	0.79	<b>0.34</b> $\pm$ 0.26	
<b>C 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度</b>													
Section No.	Mutiation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD	
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5		
<b>Addition</b>													
at run	1	0	0	0	1	2	0.011	ND	ND	ND	0.019	<b>0.0061</b> $\pm$ 0.0088	
at non-run	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>	
total	1	0	0	0	1	2	0.011	ND	ND	ND	0.019	<b>0.0061</b> $\pm$ 0.0088	
<b>Deletion</b>													
at run	0	0	6	1	1	8	ND	ND	0.051	0.0054	0.019	<b>0.015</b> $\pm$ 0.022	
at non-run	0	1	0	1	0	2	ND	0.0073	ND	0.0054	ND	<b>0.0025</b> $\pm$ 0.0035	
total	0	1	6	2	1	10	ND	0.0073	0.051	0.011	0.019	<b>0.018</b> $\pm$ 0.020	
Total	1	1	6	2	2	12	0.011	0.0073	0.051	0.011	0.038	<b>0.024</b> $\pm$ 0.020	

*polB umuDC*二重変異株 (MK1351) において、各変異の種類別変異頻度と見いだされた各変異の検体数を示す。解析は、独立した5実験区由来の合計240クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表のAは変異の種類別変異頻度を、Bは塩基置換の種類別変異頻度を、Cは1塩基フレームシフトの種類別変異頻度を示す。

付録表9 *dinB umuDC polB*三重変異株における変異の

種類別変異頻度

A 変異の種類別変異頻度												
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
<b>組換え型</b>												
1点型(128A→C)	88	122	90	29	39	368	0.40	0.31	0.21	0.051	0.083	<b>0.21</b> $\pm$ 0.15
2点型(-22G→A,128A→C)	20	21	38	26	25	130	0.092	0.053	0.090	0.045	0.053	<b>0.067</b> $\pm$ 0.022
<b>塩基置換</b>												
ホットスポット1(82C→A)	4	2	1	8	3	18	0.018	0.0050	0.0024	0.014	0.0064	<b>0.0092</b> $\pm$ 0.0067
ホットスポット2(245T→A)	70	71	36	116	80	373	0.32	0.18	0.086	0.20	0.17	<b>0.19</b> $\pm$ 0.085
ホットスポット3(245T→G)	1	2	4	0	3	10	0.0046	0.0050	0.0095	ND	0.0064	<b>0.0051</b> $\pm$ 0.0034
上記以外	44	3	15	31	38	131	0.20	0.0076	0.036	0.054	0.081	<b>0.076</b> $\pm$ 0.075
1塩基フレームシフト	7	6	24	13	18	68	0.032	0.015	0.057	0.023	0.038	<b>0.033</b> $\pm$ 0.016
2塩基フレームシフト	0	0	0	0	2	2	ND	ND	ND	ND	0.0043	<b>0.00085</b> $\pm$ 0.0019
配列置換	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
<b>欠失</b>												
タイプ1(dr)	1	2	8	4	6	21	0.0046	0.0050	0.0190	0.0070	0.0128	<b>0.0097</b> $\pm$ 0.0061
タイプ2(ir)	0	0	9	0	0	9	ND	ND	0.021	ND	ND	<b>0.0043</b> $\pm$ 0.0096
タイプ3(rなし)	1	0	0	0	3	4	0.0046	ND	ND	ND	0.0064	<b>0.0022</b> $\pm$ 0.0031
未同定	2	1	4	2	5	14	0.0092	0.0025	0.0095	0.0035	0.011	<b>0.0071</b> $\pm$ 0.0038
<b>重複</b>												
クラス1	0	0	2	1	2	5	ND	ND	0.0048	0.0017	0.0043	<b>0.0021</b> $\pm$ 0.0023
クラス2	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
クラス3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
<b>IS</b>												
IS1	1	5	6	11	7	30	0.0046	0.013	0.014	0.019	0.015	<b>0.013</b> $\pm$ 0.0053
IS5	1	7	2	0	8	18	0.0046	0.018	0.0048	ND	0.017	<b>0.0088</b> $\pm$ 0.0080
1.2kIS	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
その他	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
変異なし	0	0	1	0	1	2	ND	ND	0.0024	ND	0.0021	<b>0.00090</b> $\pm$ 0.0012
Total	240	242	240	241	240	1203	1.1	0.61	0.57	0.42	0.51	<b>0.64</b> $\pm$ 0.27
<b>B 塩基置換の種類別検出数と変異頻度</b>												
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
<b>Transition</b>												
A:T→G:C	7	0	3	2	20	32	0.032	ND	0.0071	0.0035	0.043	<b>0.017</b> $\pm$ 0.019
G:C→A:T	31	3	5	2	5	46	0.14	0.0076	0.012	0.0035	0.011	<b>0.035</b> $\pm$ 0.060
total	38	3	8	4	25	78	0.17	0.0076	0.019	0.0070	0.053	<b>0.052</b> $\pm$ 0.071
<b>Transversion</b>												
G:C→T:A	1	0	0	17	1	19	0.0046	ND	ND	0.030	0.0021	<b>0.0073</b> $\pm$ 0.013
G:C→C:G	2	0	0	5	0	7	0.0092	ND	ND	0.0087	ND	<b>0.0036</b> $\pm$ 0.0049
T:A→A:T	3	0	1	5	11	20	0.014	ND	0.0024	0.0087	0.023	<b>0.0096</b> $\pm$ 0.0094
A:T→C:G	0	0	6	0	1	7	ND	ND	0.014	ND	0.0021	<b>0.0033</b> $\pm$ 0.0062
total	6	0	7	27	13	53	0.028	ND	0.017	0.047	0.028	<b>0.024</b> $\pm$ 0.017
<b>Hot spot</b>												
82C→A	4	2	1	8	3	18	0.018	0.0050	0.0024	0.014	0.0064	<b>0.0092</b> $\pm$ 0.0067
245 T→A	70	71	36	116	80	373	0.32	0.18	0.086	0.20	0.17	<b>0.19</b> $\pm$ 0.085
245 T→G	1	2	4	0	3	10	0.0046	0.0050	0.0095	ND	0.0064	<b>0.0051</b> $\pm$ 0.0034
total	75	75	41	124	86	401	0.34	0.19	0.097	0.22	0.18	<b>0.21</b> $\pm$ 0.089
Total	119	78	56	155	124	532	0.55	0.20	0.13	0.27	0.26	<b>0.28</b> $\pm$ 0.16
<b>C 1塩基フレームシフトの種類別検出数と変異頻度</b>												
Section No.	Mutation scored						Mutation frequency( $\times 10^{-6}$ )					ave $\pm$ SD
	#1	#2	#3	#4	#5	Total	#1	#2	#3	#4	#5	
<b>Addition</b>												
at run	0	0	3	4	1	8	ND	ND	0.0071	0.0070	0.0021	<b>0.0032</b> $\pm$ 0.0036
at non-run	0	1	20	6	7	34	ND	0.0025	0.048	0.010	0.015	<b>0.015</b> $\pm$ 0.019
total	0	1	23	10	8	42	ND	0.0025	0.055	0.017	0.017	<b>0.018</b> $\pm$ 0.022
<b>Deletion</b>												
at run	3	5	1	2	8	19	0.014	0.013	0.0024	0.0035	0.017	<b>0.0098</b> $\pm$ 0.0065
at non-run	4	0	0	1	2	7	0.018	ND	ND	0.0017	0.0043	<b>0.0049</b> $\pm$ 0.0077
total	7	5	1	3	10	26	0.032	0.013	0.0024	0.0052	0.021	<b>0.015</b> $\pm$ 0.012
Total	7	6	24	13	18	68	0.032	0.015	0.057	0.023	0.038	<b>0.033</b> $\pm$ 0.016

*dinB umuDC polB*三重変異株 (MK1371) において、各変異の種類別変異頻度と見いだされた各変異の検体数を示す。解析は、独立した5実験区由来の合計1200クローンの*rpsL*標的遺伝子の塩基配列を決定し、全体の変異頻度と個々の変異の割合をもとに各変異の種類別変異頻度を算出した。表のAは変異の種類別変異頻度を、Bは塩基置換の種類別変異頻度を、Cは1塩基フレームシフトの種類別変異頻度を示す。

## 参考文献

Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall.

Cell. 40,359-69.

Bonner CA, Randall SK, Rayssiguier C, Radman M, Eritja R, Kaplan BE, McEntee K, Goodman MF.(1988) Purification and characterization of an inducible Escherichia coli DNA polymerase capable of insertion and bypass at abasic lesions in DNA.

J Biol Chem. 263.18946-52.

Brenowitz, S., Kwack, S., Goodman, M. F., O'Donnell, M., and Echols, H. (1991). Specificity and enzymatic mechanism of the editing exonuclease of Escherichia coli DNA polymerase III, J Biol Chem 266, 7888-92.

Bruck I, Woodgate R, McEntee K, Goodman MF.(1996) Purification of a soluble UmuD'C complex from Escherichia coli. Cooperative binding of UmuD'C to single-stranded DNA

J Biol Chem. 271.10767-74.

Datsenko KA., Wanner BL.,(2000) One-step inactivation of chromosomal genes in E.coli K-12 using PCR products

Proc Natl Acad Sci 6.6640-5

Friedberg E. C. (1995). DNA Repair and Mutagenesis, American Society for Microbiology, Washington, D. C. 407-593

Fujii.S, Akiyama. M, Aoki. K, Sugaya. Y, Higuchi. K, Hiraoka. M, Miki. Y, Saitoh. N, Yoshiyama. K, Ihara. K, Seki. M, Ohtsubo. E, Maki. H. (1999).DNA replication errors produced by the replicative apparatus of Escherichia coli. J Mol Biol. 289, 835-50.

Duncan, B. K., and Miller, J. H. (1980). Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA, Nature 287, 560-1.

Goodman MF. Related Articles, (2002) Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes.

Annu Rev Biochem. 71:17-50.

Guo D, Xie Z, Shen H, Zhao B, Wang Z.( 2004) Translesion synthesis of acetylaminofluorene-dG adducts by DNA polymerase zeta is stimulated by yeast

Rev1 protein.

Nucleic Acids Res. 32.1122-30.

Hanawalt P, Mellon I.(1993) Stranded in an active gene.

Curr Biol. 3,67-69

Jiricny. J, (1998). Replication errors: cha(lle)nging the genome. EMBO J . 17,6427-36.

Johnson RE, Kondratick CM, Prakash S, Prakash L.(1999a)

hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum.

Science. 285.263-5.

Johnson RE, Prakash S, Prakash L.(1999b) Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Poleta.

Science. 283.1001-4.

Kim SR, Matsui K, Yamada M, Gruz P, Nohmi T. Related Articles, (2001) Roles of chromosomal and episomal dinB genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in Escherichia coli.

Mol Genet Genomics. 266.207-15.

Kim SR, Maenhaut-Michel G, Yamada M, Yamamoto Y, Matsui K, Sofuni T, Nohmi T, Ohmori H.(1997) Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in Escherichia coli: an overexpression of dinB/dinP results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA.

Proc Natl Acad Sci 94.13792-7.

Kolodner RD, Hall NR, Lipford J, Kane MF, Rao MR, Morrison P, Wirth L, Finan PJ, Burn J, Chapman P. (1994) Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for msh2 mutations.

Genomics. 24.516-26

Kunkel TA. Related Articles,(1998) The high cost of living. American Association for Cancer Research Special Conference: endogenous sources of mutations, Trends Genet. 15,93-4.

Lahue RS, Au KG, Modrich P.(1989) DNA mismatch correction in a defined system. Science. 245.160-4.



LeClerc JE, Borden A, Lawrence CW.(1991)The thymine–thymine pyrimidine–pyrimidone(6–4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine–to–cytosine transitions in Escherichia coli.  
Proc Natl Acad Sci 88.9685–9.

Maki, H., and Sekiguchi, M. (1992). MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355, 273–5.

Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio K, Hanaoka F. (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta.  
*Nature*. 399. 700–704.

McHenry C, Kornberg A. Related Articles, (1977) DNA polymerase III holoenzyme of Escherichia coli. Purification and resolution into subunits.  
*J Biol Chem*. 252.6478–84.

Mellon I, Spivak G, Hanawalt PC. Selective removal of transcription–blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene.  
*Cell*.;51.241–9.

Napolitano R, Janel–Bintz R, Wagner J, Fuchs RP.(2000) All three SOS–inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis.  
*EMBO J*. 19.6259–65.

Nelson JR, Lawrence CW, Hinkle DC. (1996a) Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein.  
*Nature*. 382.729–31.

Nelson JR, Lawrence CW, Hinkle DC. (1996b)Thymine–thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta.  
*Science*. 272.1646–9.

Ohashi E, Ogi T, Kusumoto R, Iwai S, Masutani C, Hanaoka F, Ohmori H. (2000) Error–prone bypass of certain DNA lesions by the human DNA polymerase kappa.  
*Genes Dev*. 14.1589–94

Ohmori H, Friedberg EC, Fuchs RP, Goodman MF, Hanaoka F, Hinkle D, Kunkel TA, Lawrence CW, Livneh Z, Nohmi T, Prakash L, Prakash S, Todo T, Walker GC, Wang Z, Woodgate R. (2001) The Y–family of DNA polymerases.

Mol Cell. 8.7-8.

Pham P, Bertram JG, O'Donnell M, Woodgate R, Goodman MF(2001) A model for SOS-lesion-targeted mutations in *Escherichia coli*.  
Nature. 409.366-70.

Pham P, Seitz EM, Saveliev S, Shen X, Woodgate R, Cox MM, Goodman MF.(2002) Two distinct modes of RecA action are required for DNA polymerase V-catalyzed translesion synthesis.  
Proc Natl Acad Sci 99.11061-6.

Qiu Z, Goodman MF. Related Articles,(1997) The *Escherichia coli* polB locus is identical to dinA, the structural gene for DNA polymerase II. Characterization of Pol II purified from a polB mutant.  
J Biol Chem. 272.8611-7.

Rangarajan S, Woodgate R, Goodman MF.(1999) A phenotype for enigmatic DNA polymerase II: a pivotal role for pol II in replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli*.  
Proc Natl Acad Sci 96.9224-9

Rangarajan S, Woodgate R, Goodman MF(2002) Replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli* involving pols II, III, V, PriA, RecA and RecFOR proteins.  
Mol Microbiol. 43.617-28.

Reuven NB, Arad G, Maor-Shoshani A, Livneh Z.(1999) The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication.  
J Biol Chem.274.31763-6.

Sakai A, Nakanishi M, Yoshiyama K, Maki H. (2006)  
Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*.Sakai  
Genes Cells. 11,767-78.

Scheuermann, R. H., and Echols, H. (1984). A separate editing exonuclease for DNA replication: the epsilon subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme, Proc Natl Acad Sci 81, 7747-51.

Slechta ES, Bunny KL, Kugelberg E, Kofoid E, Andersson DI, Roth JR. (2003)

Adaptive mutation: general mutagenesis is not a programmed response to stress but results from rare coamplification of *dinB* with *lac*.

Proc Natl Acad Sci 100.12847–52.

Sloane, D. L., Goodman, M. F., and Echols, H. (1988) The fidelity of base selection by the polymerase subunit of DNA polymerase III holoenzyme.

Smith CA, Wang M, Jiang N, Che L, Zhao X, Taylor JS.(1996) Mutation spectra of M13 vectors containing site-specific Cis-Syn, Trans-Syn-I, (6-4), and Dewar pyrimidone photoproducts of thymidylyl-(3'-->5')-thymidine in *Escherichia coli* under SOS conditions.

Biochemistry. 35.4146–54.

Tang M, Pham P, Shen X, Taylor JS, O'Donnell M, Woodgate R, Goodman MF.(2000)Roles of *E. coli* DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis

Nature. 404.1014–8

Wagner J, Nohmi T. (2000a)*Escherichia coli* DNA polymerase IV mutator activity: genetic requirements and mutational specificity.

J Bacteriol. 182.4587–95.

Wagner J, Fujii S, Gruz P, Nohmi T, Fuchs RP.(2000b) The beta clamp targets DNA polymerase IV to DNA and strongly increases its processivity.

EMBO Rep. 1.484–8.

Walker GC. (1985) Inducible DNA repair systems.

Annu Rev Biochem. 54:425–57.

Witkin EM.(1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*.

Bacteriol Rev. 40.869–907.

Wood RD, Hutchinson F. (1984) Non-targeted mutagenesis of unirradiated lambda phage in *Escherichia coli* host cells irradiated with ultraviolet light.

J Mol Biol. 173.293–305.

Woodgate R, Ennis DG. Related Articles, (1991) Levels of chromosomally encoded Umu proteins and requirements for in vivo UmuD cleavage.

Mol Gen Genet. 229.10-6.

Woodgate R, Rajagopalan M, Lu C, Echols H.(1989) UmuC mutagenesis protein of Escherichia coli: purification and interaction with UmuD and UmuD'.  
Proc Natl Acad Sci 86.7301-5.

Yoshiyama K, Maki H.(2003) Spontaneous hotspot mutations resistant to mismatch correction in Escherichia coli: transcription-dependent mutagenesis involving template-switching mechanisms.  
J Mol Biol. 327.7-18.

Yuasa M, Masutani C, Eki T, Hanaoka F.(2000) Genomic structure, chromosomal localization and identification of mutations in the xeroderma pigmentosum variant (XPV) gene.  
Oncogene. 19. 4721-4728.

五十川亜紗子, 部分二倍体*rpsL*遺伝子を用いた変異検出系の問題点  
奈良先端科学技術大学院大学, バイオサイエンス研究科修士論文(1999)

岩崎博史、品川日出夫, 蛋白核酸酵素 46.995-1003(2001)

梅津桂子: 細胞工学, 13 673-682, (1994)

蟹江聡, 大腸菌染色体上に挿入した*rpsL*標的遺伝子上に生じる自然突然変異: 複製エラーとミスマッチ修復機構の特異性  
奈良先端科学技術大学院大学, バイオサイエンス研究科修士論文 (2001)

川野 光興, 大腸菌染色体DNAにおける自然突然変異の特異性  
奈良先端科学技術大学院大学, バイオサイエンス研究科修士論文,(1998)

樋口久美子, 自然突然変異における欠失変異の塩基配列特異性  
奈良先端科学技術大学院大学, バイオサイエンス研究科修士論文(1997)

真木寿治, 梅津桂子, 自然突然変異の制御機構と発癌, DNA複製・修復と発癌, 松影昭夫編, 羊土社, 118-30(1996)

真木寿治, DNA複製エラーの発生と抑制の分子機構, 生化学,69. 159-171(1997,)

真木寿治, 蛋白核酸酵素 46.1146-1154(2001)

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、様々なご指導を頂き、暖かく見守っていただいた真木寿治教授に、こころから厚く御礼申し上げます。秋山助教授、真木助手、梅津教授、中嶋秘書の研究環境の整備などのご尽力を頂き、たいへん感謝しております。実験を進めるにあたり、愿山郁氏、井田慶子氏からたいへんなご助力をいただきました。日頃から有意義な議論を頂いた同期の安島潤博士、多くの先輩後輩の皆様にも心より感謝いたします。学問を学ぶにあたり、博士後期課程まで援助をしてくれた母親と3年前に他界した父にも心より感謝します。

最後に、こんな私でも支えてくれた最愛の妻に感謝したいと思います。

皆さんの力でここまで来れました。ありがとうございました。

平成19年 2月

蟹江 聡