

P-035

Detection and analysis of UV-induced mutations in plant genomeMunehisa Nakamura¹, Kozo Makino¹, Tatsuo Nunoshiba², Keiichiro Hiratsu¹¹Department of Applied Chemistry, National Defense Academy,²College of Liberal Arts, International Christian University

Compared to other species, the factors involved in mechanisms of mutation remain to be investigated in plants. Therefore, we established a *supF*-based system for detection of mutations in the chromosomal DNA of *Arabidopsis thaliana*. In this study, we evaluated mutations induced by UVC (1 kJ/m²) irradiation. The result that strong preference of G:C to A:T transition (43%) at cytosine in 5'-PyPy-3', and the hot spots observed were consistent with those of other species such as *E.coli* and mammalian cells. On the other hand, we found novel type of mutations (12%) that appears to be a trinucleotide sliding to 3'-direction. To examine whether these mutations are responsible for typical UV-induced lesions such as CPD and (6-4)PP, we investigate the UVC-induced mutations without preventing photoreactivation because of *A. thaliana* containing both CPD and (6-4)PP photolyases. Based on latest data, we will discuss the profile of mutations induced by UVC in plants.

植物ゲノムに生じる紫外線 (UV-C) 誘発変異の検出と変異スペクトル解析中村 宗久¹、牧野 耕三¹、布柴 達男²、平津 圭一郎¹¹防衛大学校 応用化学科、²国際基督教大学 教養学部

私たちは植物の突然変異に関わるメカニズムの解明を目的として、他の生物種で実績のある *supF* 変異検出系をシロイヌナズナへ導入した変異検出用植物を開発した。本研究では紫外線が植物ゲノムに及ぼす影響を調べるため、植物体への紫外線照射による誘発変異の検出及び解析を行った。UV-C (254nm) 1 kJ/m² を播種後 10 日目の変異検出用植物 100 株に照射後に 24 時間遮光（光回復防止）し、さらに 18 日間生育して実験サンプルとした。精製したゲノム DNA を用いて変異検出実験を行った結果、主要な変異スペクトル (G:C → A:T, 43%) やホットスポットの位置等は、他生物種の実験報告と概ね共通の傾向を示したが、これまでの報告例がない 3 塩基単位がスライドした様な変異も 12% 検出された。シロイヌナズナはピリミジンダイマーと 6-4 光産物に対してそれぞれ光回復酵素を有しており、UV-C 照射後に遮光しない光回復サンプルの変異スペクトルを調べることで、今回検出した変異が上記の紫外線特異的 DNA 損傷に起因するものかを検証できる。現在光回復サンプルの変異検出実験を実施しており、これらの結果を合わせて報告、検証する。

P-036

Live cell imaging of the effect of S-phase inhibitors on cell cycle progression of mouse m5S cells visualized with PCNA

Ai Kawakita, Kaori Murata, Kenji Sugimoto

Live Cell Imaging Institute, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University

We constructed mouse m5S cell-line in which PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen) was ectopically expressed as a fusion to green fluorescent protein (EGFP). Using live cell imaging, we observed “replication foci,” the dots periodically appeared around in S-phase in the cell cycles, although we have not yet characterized the precise relationship between the timing of dot formation and DNA synthesis in this cell-line. We then treated the cells with S-phase inhibitors (Daunorubicin, Camptothecin, Aphidicolin) at ECC_{1.5} to elongate the cell cycle by 1.5-fold, and analyzed their effect on the molecular behavior of replication foci in the subsequent cell cycles. The cells treated with Daunorubicin and Camptothecin, known as mutagens, elongated the period without replication foci before mitosis, while Aphidicolin, not known as a mutagen, elongated the entire period of interphase. It may be useful to examine the exact timing of mutagen treatment in the cell cycle and the mechanism of subsequent MN formation.

PCNA を用いたマウス m5S 細胞の細胞周期進行の可視化と S 期阻害剤作用のライブセルイメージング解析

川喜多 愛、村田 香織、杉本 憲治

ライブセルイメージング研究所、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

小核形成する際、変異原物質が細胞周期のどの時期に作用するのかを調べるため、増殖核抗原 PCNA に注目し、生細胞での細胞周期進行の可視化を試みた。マウス胎児皮膚線維芽細胞由来 m5S 細胞を用い、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 融合型 PCNA を発現する細胞株を取得した。PCNA の動態をライブ観察により追跡したところ、S 期に相当する時期に核中にドットが見られた。そこで S 期阻害剤である Daunorubicin、Camptothecin、Aphidicolin を細胞倍加時間が 1.5 倍に遅延する濃度で処理し、PCNA の核内ドット形成に及ぼす影響を経時的に観察した。変異原性が知られている Daunorubicin と Camptothecin ではドットが消失してから分裂期に入るまでの期間が長くなったが、変異原性はないとされる Aphidicolin ではドット形成期間を含めた間期全体が長くなった。今後、PCNA のドット形成時期と S 期との対応関係を詳細に調べる必要があるものの、今回作成した S 期可視化細胞を用いることで、変異原物質の作用時期とその後の小核形成能との関係について新たな知見が得られるものと期待される。