

本稿は 1998 年 5 月 29 日、東京のヤクルトホールで開催された日本環境変異原学会主催の第 9 回公開シンポジウム「モデル DNA 損傷と変異機構」(企画: 根岸和雄, 早津彦哉) で発表された (座長: 菊川清見)。

ピリミジン 2 量体の変異作用

紙谷 浩之¹, 紙谷(村田) 尚子¹, 大塚 栄子²

¹産業医科大学産業生態科学研究所 〒 807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1

²北海道大学大学院薬学研究科 〒 060-0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目

Mutagenesis by pyrimidine dimers

Hiroyuki Kamiya¹, Naoko Murata-Kamiya¹ and Eiko Ohtsuka²

¹Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health

1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan

²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
Kita-12, Nishi-6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan

Summary

Ultraviolet (UV) light damages biologically important molecules including DNA, and the damage to DNA appears to be involved in the process of skin cancer through the mutagenic activation of proto-oncogenes and/or the inactivation of tumor suppressor genes.

In this paper, we review the mutational properties of UV-induced DNA lesions, and in particular, those of photoproducts at thymine-thymine sites.

(This paper, chaired by Kiyomi Kikugawa, was presented to the 9th JEMS Annual Symposium, "Synthetic Models for DNA Damage and Mutagenesis", organized by Kazuo Negishi and Hikoya Hayatsu, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at Yakult Hall, Tokyo, May, 29, 1998.)

Keywords : ultraviolet, cyclobutane thymine dimer, pyrimidine (6-4) pyrimidone photodimer, mutation

緒 言

紫外線は、以前からヒトの皮膚癌の危険因子として知られていたが、近年のオゾン層の破壊に伴う地上線量の増加により、その作用が一層着目されている。紫外線による発癌機構としては、DNA に損傷を与えて変異を誘発することにより、(原)癌遺伝子の活性化や腫瘍抑制遺伝子の不活性化をもたらすことが大きく寄与していると思われる。

紫外線によって生ずる DNA 損傷には、さまざまなも

のが報告されているが、主要な損傷として、隣接ピリミジン部位 (T-T, T-C, C-T, C-C) に生ずるシクロブタン型ピリミジンダイマーと (6-4) ピリミジン-ピリミドン光産物があげられる。

本稿では、紫外線によって生ずる DNA 損傷、シクロブタン型チミンダイマーと (6-4) チミンダイマー (Fig. 1) が哺乳動物細胞中で誘発する変異を中心に、紫外線誘発変異について述べる。

1. *ras* 遺伝子中のシクロブタン型チミンダイマーが誘発する変異

1) ヒト c-Ha-*ras* 遺伝子の全合成と部位特異的導入法を用いた DNA 損傷誘発変異の研究

ヒト c-Ha-*ras* 遺伝子は、ヒトの腫瘍から数多く単離

受付: 1998 年 7 月 9 日

受理: 1998 年 7 月 16 日

©日本環境変異原学会

される癌遺伝子であり、その活性化には *ras* 遺伝子の特定位置(コドン 12, 13, または 61)の塩基置換が原因であることが明らかにされている(Nishimura and Sekiya, 1987). 著者らは、蛋白質の大量調製を目的として、ヒト *c-Ha-ras* 遺伝子の化学合成を以前に行った(Miura et al., 1987). また、この合成 *c-Ha-ras* 遺伝子をラウス肉腫ウイルスの long terminal repeat の下流に導入すると、マウス由来の NIH 3 T 3 細胞で発現し、あらかじめ活性化部位とされるアミノ酸を変換しておいた *ras* 遺伝子の場合には、形質転換(トランスフォーメーション)を誘発することを見出した(Kamiya et al., 1989).

c-Ha-ras 遺伝子の設計の際に、DNA カセット変換法による遺伝子配列の変換が容易になるよう、内部に制限酵素認識部位を設けた(詳細については他の総説(大塚・紙谷, 1990)を参照されたい). そのため、DNA カセット変換法により損傷部位を含む二本鎖 DNA を *ras* 遺伝子中に、部位特異的に導入することが可能である. したがって、*ras* 遺伝子の活性化部位である、コドン 12, 61 に DNA 損傷を導入し、*ras* 遺伝子ベクターに組込んだ後に NIH 3 T 3 細胞にトランスフェクションすると、塩基置

換変異が生じてアミノ酸が変換された *ras* 遺伝子を持った細胞を、形質転換してフォーカスを形成したコロニーとして単離することができる. この発想により、著者らは、数種類の DNA 損傷の誘発変異を研究した. それを Table 1 に示す.

2) シクロブタン型チミンダイマーを導入した *c-Ha-ras* 遺伝子ベクターの構築

c-Ha-ras 遺伝子のコドン 61 は 5'-CAR-3' (R=A または G) という配列となっており、グルタミンをコードしている. 著者らは、5'-CAA-3' の相補鎖 3'-GTT-5' 配列中の TT 部位にシクロブタン型チミンダイマー(シス-シン異性体, csT=T およびトランス-シン異性体, tsT=T)を導入することにした. チミンダイマーを含むオリゴヌクレオチド(Fig. 2 の L 12)を化学合成し、高速液体クロマトグラフィーにより高純度に精製した. これを他のオリゴヌクレオチドとアニーリングし、DNA リガーゼにより連結させて DNA カセットを調製した. この DNA カセットは、末端に *Bcl*I, 内部に *Eco*RV 配列を有している(Fig. 2).

ベクターとして、合成 *c-Ha-ras* 遺伝子の *Eco*RV-*Bcl*I 領域(コドン 61 を含む)が終止コドンの導入等によりナンセンスな配列となっている pEB(Fig. 2)を用いた. まず、pEB を *Eco*RV, *Bcl*I で処理しナンセンス配列を除去した DNA にチミンダイマーを含む DNA カセットを *Bcl*I 部位で連結した. ついで、*Eco*RV 処理により内部の *Eco*RV 部位を露出させ、再び連結し、目的のベクターを構築した(Kamiya et al., 1993 a).

3) シクロブタン型チミンダイマーを導入した *c-Ha-ras* 遺伝子による NIH3T3 細胞のトランスフォーメーション

上述したように構築したベクターを NIH 3 T 3 細胞にトランスフェクションした. その結果を Table 2 に示す. 正常型アミノ酸であるグルタミン-61 をコードしている 3'-GTT-5' (sense 鎖は 5'-CAA-3') 配列を持つ *c-*

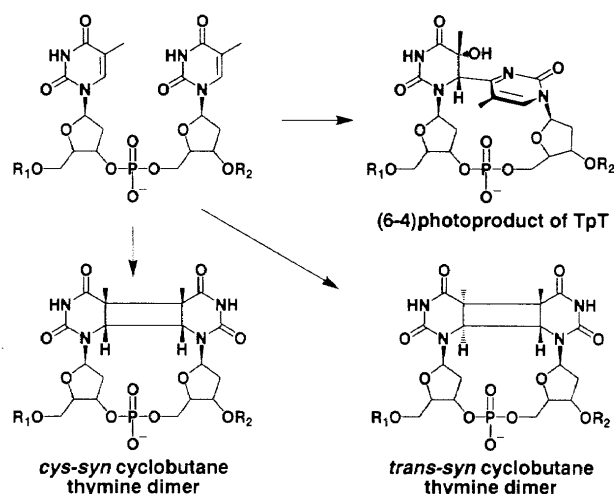


Fig. 1 Structures of DNA lesions formed by ultraviolet light.

Table 1 DNA lesions studied with *ras*-NIH3T3 system

DNA lesions	Mutation	Reference ^{a)}
<i>O</i> ⁶ -methylguanine	G → A	(1)
8-hydroxyguanine	G → T, flanking mutation	(2), (3)
8-hydroxyadenine	A → G, A → T, (A → C)	(4)
abasic site analogue	G → A, flanking mutation	(5)
abasic site	G → A, flanking mutation	(6)
hypoxanthine	A → G	(7)
xanthine	G → A	(8)

^{a)}(1) Kamiya et al., 1991; (2) Kamiya et al., 1992b; (3) Kamiya et al., 1995b; (4) Kamiya et al., 1995a; (5) Kamiya et al., 1992d; (6) Kamiya et al., 1993b; (7) Kamiya et al., 1992a; (8) Kamiya et al., 1992c.

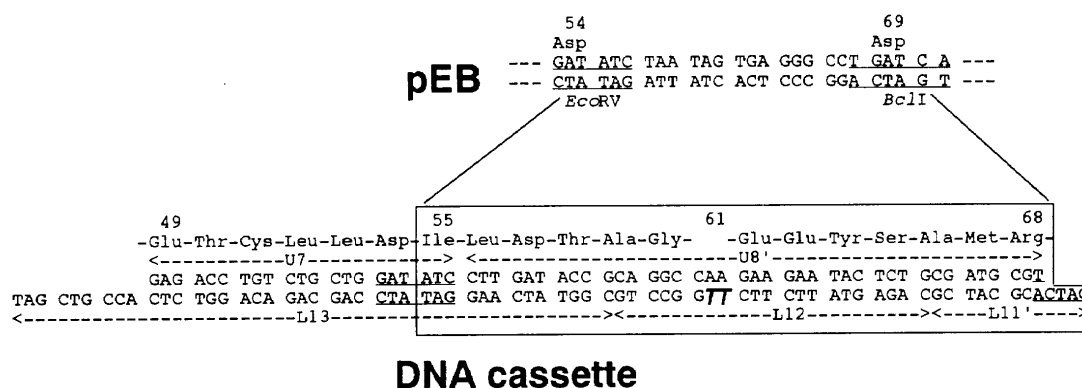


Fig. 2 Nucleotide sequence of the DNA cassette with a cyclobutane thymine dimer. The cassette was inserted into pEB digested with *EcoRV* and *BclI*. The thymine dimer are shown by TT.

Table 2 Number of foci induced by *ras* genes

<i>ras gene</i>	Codon 61 ^{a)}	Experiment No.			
		1 ^{b)}	2 ^{c)}	3 ^{d)}	4 ^{e)}
Gln-61 (normal)	3' GTT5'	0	5	0	4
csT=T	3' GT=T5'	2	49	6	15
tsT=T	3' GT=T5'	16	93	11	41
Lys-61 (activated)	3' TTT5'	37	512	88	360

^{a)}Sequences in the antisense strand are shown.

^{b)}30 ng of DNA was used.

^{c)}150 ng of DNA was used.

^{d)}20 ng of DNA was used.

^{e)}50ng of DNA was used.

Ha-*ras* 遺伝子の場合、低い形質転換能(フォーカス形成能)しか有していないことが観察された。このわずかな形質転換能は、数コピーの *ras* 遺伝子が導入されたことや、外来 DNA の導入操作の結果であると考えられる。一方、活性化型アミノ酸であるリジンをコードしている 3'-TTT-5' 配列を持つ c-Ha-*ras* 遺伝子の場合、著しい形質転換能(フォーカス形成能)が観察された。csT=T を有する *ras* 遺伝子の場合、Lys-61 *ras* 遺伝子の 4-10 % のフォーカス形成能を、tsC=C を有する *ras* 遺伝子の場合には 11-43 % のフォーカス形成能を示した。このことは、コドン 61 に導入したシクロブタン型チミンダイマーによって、変異が誘発されてアミノ酸置換が生じたことを示す。また、この結果から、tsT=T の方が csT=T よりも高い変異原性を有していることが明らかになった (Kamiya et al., 1993 a)。また、Lys-61 *ras* 遺伝子を 100 % とした際のフォーカス形成能は、各光産物の変異原性を示すものと考えられるが、*ras* 遺伝子が 1 細胞に数コピー入る場合もあるので、実際の変異率は得られた数字よりも若干低いものと思われる。

4) シクロブタン型チミンダイマーの誘発する変異

上記のようにして得られたフォーカスの細胞から染色体 DNA を抽出し、導入された c-Ha-*ras* 遺伝子の解析を行った (Table 3)。csT=T が誘発した変異としては、3'-T → A トランスバージョンが解析例の半数であった。この場合には、sense 鎖のコドン 61 の配列は 5'-CTA-3' となり、アミノ酸がロイシンに変換されたことによって *ras* 遺伝子が活性化されたと推定される。他に、5'-T、3'-T の塩基置換が見出されている。tsT=T が誘発した変異の半数は 5'-T → A トランスバージョンであった (Table 3)。また、5'-TT-3' が 5'-AA-3' とタンデムに置換していたものも多く検出された。

後述するように、大腸菌における変異スペクトルは、csT=T が 3'-T → A トランスバージョン、tsT=T が 5'-T → A トランスバージョンと報告されているので、類似の結果が得られたことになる。

2. 光産物の誘発する変異のシャトルベクターを用いた解析

1) チミンダイマーを導入したシャトルベクターの構築

最近、著者の一人は、サル由来の COS-7 細胞でプラスミドとして増殖するシャトルベクターを用いて、T(6.4) T および csT=T (Fig. 1) の誘発する変異の解析を行った (Kamiya et al., 1998)。このシャトルベクター (Fig. 3) は、SV 40 の複製起点を持ち、COS-7 細胞内でプラスミドとして複製される。また、ColE1 の複製起点を有し、COS-7 細胞から回収したプラスミドを大腸菌で増殖させて解析可能である。2 種類の DNA 損傷は、制限酵素 *Afl*II の認識部位である 5'-CTTAAG-3' の TT に導入することとし、垂リン酸アミダイト法を用いてオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドは高速液体クロマトグラフィーにより高純度に精製した。また、DNA 損傷はベクターの (+)-鎖または (-)-鎖のいずれかに導入した。損傷部位を含む領域は (+)-鎖がラギング

Table 3 Mutations detected in cells transformed by a *ras* gene with a thymine dimer

Thymine dimer	Sequence ^{a)}	Focus observed	Codon 61 (amino acid)
csT=T	5' <u>TA</u> 3'	8	CTA (Leu)
	<u>GT</u>	2	CAC (His)
	<u>AT</u>	1	CAT (His)
	<u>CA</u>	1	CTG (Leu)
	<u>TC</u>	1	CGA (Arg)
	<u>TA</u> + <u>TG</u>	1	CTA+CCA (Leu+Pro)
	<u>CT</u> + <u>GT</u> + <u>AT</u>	1	CAG+CAC+CAT (Gln+His)
tsT=T	5' <u>AT</u> 3'	9	CAT (His)
	<u>AA</u>	7	CTT (Leu)
	<u>TC</u>	1	CGA (Arg)
	<u>AA</u> + <u>TA</u> + <u>GA</u>	1	CTT+CTA+CTC (Leu)
	other ^{b)}	1	

^{a)}Mutated sites are indicated by underlines.

^{b)}Both sites were mixtures of T and A.

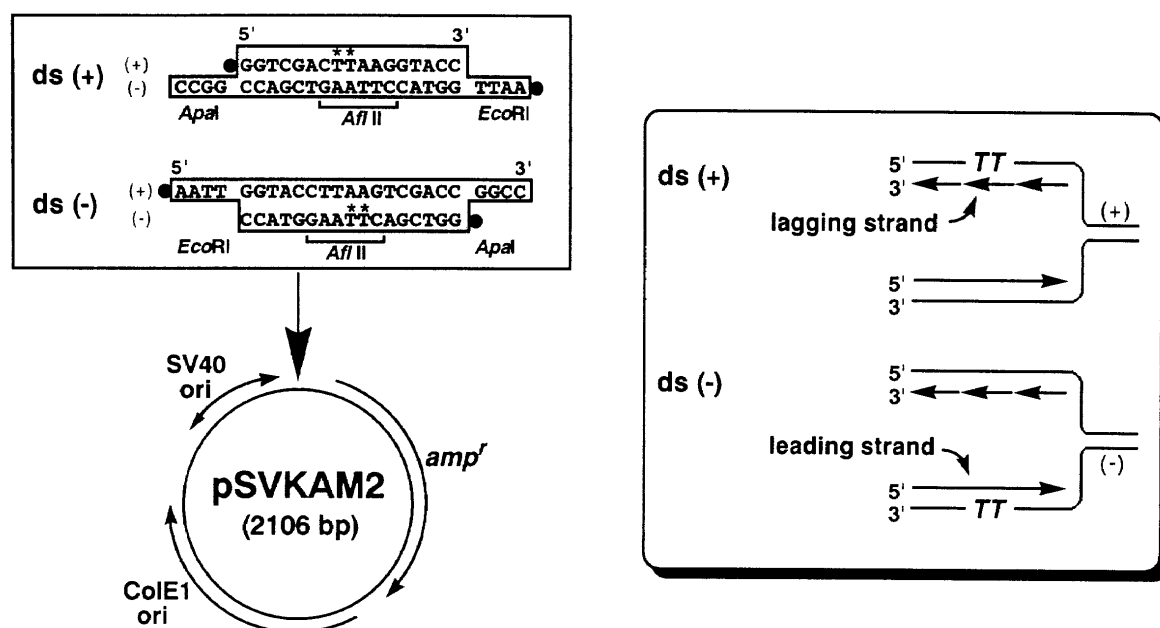


Fig. 3 Structure of double-stranded vectors with either T(6-4)T or csT=T (left) and schematic presentation of the replication of template strands containing T(6-4)T or csT=T (right). The SV40 origin and the ColE1 origin, which work in COS-7 cells and in *E. coli*, respectively, and the *E. coli* ampicillin resistance gene are shown. Closed circles represent 5'-phosphate groups. The TT with asterisks or the TT represents the photolesion.

鎖合成時に、(-)-鎖がリーディング鎖合成時に「読まれる」ように設計してあるので、複製時における読み誤り頻度の違いを調べることができる。

2) チミンダイマーの変異誘発能

T(6-4)T および csT=T を含むベクターを COS-7 細胞に導入し、細胞内から複製された DNA を回収した。回収した DNA を制限酵素 *AflII* で処理したものと処理しないものをそれぞれ大腸菌へとトランスフェクションし、変異率を求めた (Fig. 4)。変異率は、T(6-4)T の方が csT=T よりも高く、ラギング鎖合成時に 4.7%，リーディング鎖合成時に 2.3% であった。それに対して、

csT=T の変異率は 1% 以下であった。このアッセイ系の場合は、相補鎖 (DNA 損傷を含まない鎖) も複製されるために、実際の変異率は少なくとも得られた値の 2 倍であると推定される。また、いずれの場合もラギング鎖合成時の方がリーディング鎖合成時よりも変異率が高いという結果であった。csT=T の変異率が、上述した *ras* 遺伝子-NIH 3T3 細胞の系よりも低いのは、(1) *ras* 遺伝子の系では、コピー数の制御が困難であるために変異率を高く見積もる可能性があり、(2) シャトルベクターの系では、相補鎖の存在により DNA 損傷の変異率が 1/2 以下になることや、(3) 用いた配列が異なること等が原因であると思われる。(3) に関してであるが、*ras* 遺

伝子の系では、ピリミジンに富む配列と GC に富む配列のジャンクション部に csT=T がある (Fig. 2). DNA ポリメラーゼがヌクレオチドを挿入する際に、隣接塩基や、配列による二次構造の違いが原因で異なる結果が得られた可能性がある。他の可能性として、(4)サル (COS-7 細胞) とマウス (NIH 3 T 3 細胞) の DNA ポリメラーゼによる違いも考えられるが、この可能性は低いように思われる。

3) チミンダイマーの変異スペクトル

T(6-4)T の変異スペクトルは、3'-T → C が最も多く半数以上を占めている (Table 4)。他の変異としても 3'-T の塩基置換変異が多い。興味深いものとしては、T(6-4)T の 5'-隣接部位の C が T に置換されたものが 4 例見出されていることである。いずれもリーディング鎖

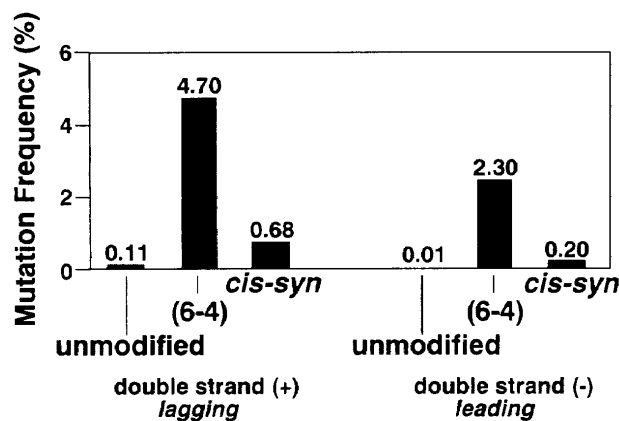


Fig. 4 Mutation frequencies of photoproducts in COS-7 cells.

合成時のものである。

一方、csT=T は幅広いスペクトルを示した (Table 4)。ラギング鎖合成時とリーディング鎖合成時で傾向が若干異なるが、3'-T → C または 3'-T → G や 5'-T → A などが見出されている。また、5'-TT-3' が 5'-AC-3' へとタンデムに変異したものも見出されている。ras 遺伝子-NIH 3 T 3 細胞の系では主であった 3'-T → A トランスポバージョンはほとんど見出されていない。これは、上述した配列の違いの影響が大きいと推定している。

3. 紫外線誘発 DNA 損傷の変異スペクトル

1) チミンダイマーの誘発変異の比較

上述したように、哺乳動物細胞で T(6-4)T, csT=T, tsT=T の 3 種のチミンダイマーはいずれも変異を誘発することが明らかになった。以上の 3 種類の光損傷については、他のグループにより大腸菌や出芽酵母中での変異スペクトルが調べられている (Table 5)。csT=T は大腸菌中で 3'-T → A トランスポバージョンや 3'-T → C トランジションを誘発するが、酵母ではあまり変異を誘発しないと報告されている。大腸菌で得られた結果は、ras 遺伝子-NIH 3 T 3 細胞の系で得られた結果と類似しているが、COS-7 細胞の系で得られたものとは異なっている。

tsT=T は大腸菌の系、酵母の系の両方で 5'-T → A トランスポバージョンや T の欠失変異を誘発すると報告されている。ras 遺伝子の系では 5'-T → A トランスポバージョンの誘発が観察されたのでこの点は一致している。しかし、ras 遺伝子の系では、TT → AA のタンデム変異が観察され、T の欠失変異は観察されていない。1 塩基欠

Table 4 Mutations induced by T(6-4)T and csT=T in COS-7 cells

Sequence ^{a)}	T(6-4)T		csT=T	
	double strand (+)	double strand (-)	double strand (+)	double strand (-)
	lagging	leading	lagging	leading
5' <u>T</u> C 3'	17	10	6	4
5' <u>T</u> G 3'	3	0	7	2
5' <u>T</u> A 3'	5	4	1	1
5' <u>C</u> T 3'	1	1	4	2
5' <u>G</u> T 3'	0	1	2	2
5' <u>A</u> T 3'	0	0	2	3
5' <u>A</u> C 3'	0	0	1	3
ΔT	0	0	2	2
ΔTT	0	0	0	1
+A	0	0	0	2 ^{d)}
others	0	4 ^{b)}	6 ^{c)}	2 ^{e)}

^{a)}Mutated sites are indicated by underlines.

^{b)}The C residue at the 5'-flanking position of TT changed to T (5' CTTA to TTTA).

^{c)}One clone has a 5' GTTA sequence and four clones have a 5' CTTT sequence. One clone has a sequence deleted at A (5' CTTA to CTT).

^{d)}These clones have a 5' CTATATA sequence.

^{e)}One clone has a 5' GTTA sequence and one clone has a 5' CTTT sequence.

Table 5 Mutations induced by UV lesions

DNA lesions	Organism	Mutation	Reference ^{a)}
csT=T	<i>E. coli</i>	3'-T → A, 3'-T → C	(1)
	<i>E. coli</i>	3'-T → A, 3'-T → C	(2)
	<i>S. cerevisiae</i>	weakly mutagenic	(3)
tsT=T	<i>E. coli</i>	5'-T → A, ΔT	(1)
	<i>E. coli</i>	5'-T → A, ΔT	(2)
	<i>S. cerevisiae</i>	5'-T → A, ΔT	(3)
T(6-4)T	<i>E. coli</i>	3'-T → C	(4)
	<i>E. coli</i>	3'-T → C	(2)
	<i>S. cerevisiae</i>	3'-T → C	(5)
T(6-4)T (Dewar isomer)	<i>E. coli</i>	3'-T → C etc.	(4)
	<i>E. coli</i>	3'-T → C etc.	(2)
<i>cis-syn</i> cyclobutane TU dimer	<i>E. coli</i>	3'-U → T(C → T)	(6)
<i>cis-syn</i> cyclobutane TC dimer	<i>E. coli</i>	weakly mutagenic	(7)
TA dimer	<i>E. coli</i>	3'-A → T	(8)

^{a)} (1) Lawrence et al., 1990; (2) Smith et al., 1996; (3) Gibbs et al., 1993; (4) LeClerc et al., 1991; (5) Gibbs et al., 1995; (6) Jiang et al., 1993; (7) Hosfall et al., 1997; (8) Zhao and Taylor, 1996.

失変異は、*ras* 遺伝子の系では原理上検出できないので、実際にその変異が生じたか否かは明らかではないが、タンデム変異の誘発は *ras* 遺伝子-NIH 3 T 3 細胞での変異を大きく特徴づけるものといえる。

T(6-4)T は大腸菌、酵母中で 3'-T → C トランスジクションを誘発し、COS-7 細胞の系で得られた結果と一致する。この変異誘発には、T(6-4)T の 3'-T と G 塩基との水素結合が想定されており、T(6-4)T を含む二本鎖の熱力学的安定性のデータもこれを支持している (Fujiwara and Iwai, 1997)。

他に、著者らの研究では取り上げなかったが、T(6-4)T には 3'-T の構造が異なる、Dewar isomer が存在する。この損傷の誘発変異は大腸菌で調べられているが、3'-T → C など、幅広いスペクトルを示すと報告されている。

2) 他の紫外線誘発 DNA 損傷が引き起こす変異

これまでは、5'-TT-3'部位に生ずる DNA 損傷の変異について述べてきた。当然であるが、他の部位にも損傷は生ずる。著者らが用いたような部位特異的導入法による他の紫外線誘発 DNA 損傷が引き起こす変異の解析例としては、シス-シン シクロブタン型 T-U ダイマーがあげられる (Table 5)。これは、シクロブタン型ダイマー中の C 塩基は、5, 6-位が飽和結合となっているために脱アミノ化されやすいとの報告 (Tessman et al., 1994) に基づき、研究されたものである。これによると TU ダイマーはほとんど "TT" と読まれ、3'-U → T 変異を引き起こす。この U が T-C ダイマー由来と考えると C → T 変異を誘発すると解釈できる。しかし、シス-シン シクロブタン型 T-C ダイマーは、あまり変異原性が高くないと報告されており (Table 5)、まだ議論の余地が残っ

ている。化学構造が明らかになった損傷に T-A ダイマーがあるが、これは 3'-A → T 変異を誘発する (Table 5)。

3) 紫外線が誘発する変異スペクトル

Miller は、大腸菌に紫外線を照射し、*lacI* 遺伝子における変異を解析した。塩基置換変異は G・C → A・T が圧倒的に多く、ついで G・C → T・A が検出された (Miller, 1985)。Hauser らは、シャトルベクターに紫外線を照射し、サル CV-1 細胞中で誘発される変異を解析した。その結果、G・C → A・T が 61%、G・C → T・A が 13% と報告している (Hauser et al., 1986)。また、シャトルベクターを有するヒト培養細胞に紫外線を照射し、G・C → A・T 変異が 70% であることが報告されている (Calcagnile et al., 1996)。

紫外線を照射したプラスミドをヒトやサルの細胞抽出物中で複製させ、その変異を観察すると同様に G・C → A・T 変異が誘発された (Thomas and Kunkel, 1993; Carty et al., 1993)。さらに彼らは、誘発変異のほとんどはシクロブタン型ピリミジンダイマーが原因と報告している。

以上の結果は、C を含むシクロブタン型ダイマー中の C 塩基が脱アミノ化されて、G・C → A・T 変異を誘発するというモデルを支持する。しかし、上述したように、このメカニズムに否定的な結果も得られている (Table 5)。また、シクロブタン型ダイマー中の C 塩基の脱アミノ化反応の速度は大腸菌の複製速度に比較して遅いという報告 (Barak et al., 1995) もあり、少なくとも大腸菌に関してこの問題は未解決といえる。

根岸らは、一本鎖ファージ DNA に日光を照射し、大腸菌にトランスフェクションしたところ、G → C 変異、ついで G → T 変異を検出した (Negishi and Hao, 1992)。

この変異を誘発した DNA 損傷は、未知であるが、紫外線照射による活性酸素産生の寄与が考えられる。

結 語

以上、著者らの研究を中心に紫外線誘発 DNA 損傷が引き起こす変異について述べてきた。現状を振り返ると、紫外線によって誘発される変異の機構の詳細についてはいまだ不明な点が多い。今後も、さらなる研究によって、変異の実体の解明が必要である。

参 考 文 献

- Barak, Y., O. Cohen-Fix and Z. Livneh (1995) Deamination of cytosine-containing pyrimidine photodimers in UV-irradiated DNA, *J. Biol. Chem.*, 270, 24174-24179.
- Calcagnile, A., T. Basic-Zaninovic, F. Palombo and E. Dogliotti (1996) Misincorporation rate and type on the leading and lagging strands of UV-damaged DNA, *Nucl. Acids Res.*, 24, 3005-3009.
- Carty, M. P., J. Hauser, A. S. Levine and K. Dixon (1993) Replication and mutagenesis of UV-damaged DNA templates in human and monkey cell extracts, *Mol. Cell. Biol.*, 13, 533-542.
- Fujiwara, Y. and S. Iwai (1997) Thermodynamic studies of the hybridization properties of photolesions in DNA, *Biochemistry*, 36, 1544-1550.
- Gibbs, P. E. M., B. J. Kilbey, S. K. Banerjee and C. W. Lawrence (1993) The frequency and accuracy of replication past thymine-thymine cyclobutane dimer are very different in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 175, 2607-2612.
- Gibbs, P. E. M., A. Borden and C. W. Lawrence (1995) The T-T pyrimidine (6-4) pyrimidone UV photoproduct is much less mutagenic in yeast than in *Escherichia coli*, *Nucl. Acids Res.*, 23, 1919-1922.
- Hauser, J., M. M. Seidman, K. Sidur and K. Dixon (1986) Sequence specificity of point mutations induced during passage of a UV-irradiated shuttle vector plasmid in monkey cells, *Mol. Cell. Biol.*, 6, 277-285.
- Horsfall, M. J., A. Borden and C. W. Lawrence (1997) Mutagenic properties of the T-C cyclobutane dimer, *J. Bacteriol.*, 179, 2835-2839.
- Jiang, N. and J.-S. Taylor (1993) In vivo evidence that UV-induced C → T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of cis-syn cyclobutane dimers or their deamination products, *Biochemistry*, 32, 472-481.
- Kamiya, H., K. Miura, N. Ohtomo, T. Koda, M. Kakinuma, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1989) Transformation of NIH3T3 cells with synthetic c-Ha-ras genes, *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 200-203.
- Kamiya, H., K. Miura, N. Ohtomo, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1991) Transforming activity of a synthetic c-Ha-ras gene containing O⁶-methylguanine in codon 12, *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 997-1002.
- Kamiya, H., H. Miura, H. Kato, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1992a) Induction of mutation of a synthetic c-Ha-ras gene containing hypoxanthine, *Cancer Res.*, 52, 1836-1839.
- Kamiya, H., K. Miura, H. Ishikawa, H. Inoue, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1992b) c-Ha-ras containing 8-hydroxyguanine at codon 12 induces point mutations at the modified and adjacent positions, *Cancer Res.*, 52, 3483-3485.
- Kamiya, H., M. Shimizu, M. Suzuki, H. Inoue and E. Ohtsuka (1992c) Mutation induced by deoxyxanthosine in codon 12 of a synthetic c-Ha-ras gene, *Nucleosides and Nucleotides*, 11, 247-260.
- Kamiya, H., M. Suzuki, Y. Komatsu, H. Miura, K. Kikuchi, T. Sakaguchi, N. Murata, C. Masutani, F. Hanaoka and E. Ohtsuka (1992d) An abasic site analogue activates a c-Ha-ras gene by a point mutation at modified and adjacent positions, *Nucl. Acids Res.*, 20, 4409-4415.
- Kamiya, H., N. Murata, T. Murata, S. Iwai, A. Matsukage, C. Masutani, F. Hanaoka and E. Ohtsuka (1993a) Cyclobutane thymine dimers in a ras proto-oncogene hot spot activate the gene by point mutation, *Nucl. Acids Res.*, 21, 2355-2361.
- Kamiya, H., M. Suzuki and E. Ohtsuka (1993b) Mutation spectrum of a true abasic site in codon 12 of a c-Ha-ras gene in mammalian cells, *FEBS Lett.*, 328, 125-129.
- Kamiya, H., H. Miura, N. Murata-Kamiya, H. Ishikawa, T. Sakaguchi, H. Inoue, H., T. Sasaki, C. Masutani, F. Hanaoka, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1995a) 8-Hydroxyadenine (7,8-dihydro-8-oxoadenine) induces misincorporation in in vitro DNA synthesis and mutations in NIH3T3 cells, *Nucl. Acids Res.*, 23, 2893-2899.
- Kamiya, H., N. Murata-Kamiya, S. Koizume, H. Inoue, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1995b) 8-Hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in hot spots of the c-Ha-ras gene. Effects of sequence contexts on mutation spectra, *Carcinogenesis*, 16, 883-889.
- Kamiya, H., S. Iwai and H. Kasai (1998) The (6-4) photoproduct of thymine-thymine induces targeted substitution mutations in mammalian cells, *Nucl. Acids Res.*, 26, 2611-2617.
- Lawrence, C. W., S. K. Banerjee, A. Borden and J. E. LeClerc (1990) T-T cyclobutane dimers are misinstructive, rather than non-instructive, mutagenic lesions, *Mol. Gen. Genet.*, 222, 166-168.
- LeClerc, J. E., A. Borden and C. W. Lawrence (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. USA*, 88, 9685-9689.
- Miller, J. H. (1985) Mutagenic specificity of ultraviolet light, *J. Mol. Biol.*, 182, 45-68.
- Miura, K., H. Kamiya, M. Tominaga, Y. Inoue, M. Ikehara, S. Noguchi, S. Nishimura and E. Ohtsuka (1987) Overexpression of cellular and activated human c-Ha-ras proteins by mutating a synthetic gene, *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 4878-4882.
- Negishi, K. and W. Hao (1992) Spectrum of mutations in single-stranded DNA phage M13mp2 exposed to sunlight: predominance of G-to-C transversion, *Carcinogenesis*, 13, 1615-1618.
- Nishimura, S. and T. Sekiya (1987) Human cancer and cellular oncogenes, *Biochem. J.*, 243, 313-327.
- 大塚栄子, 紙谷浩之 (1990) c-Ha-ras 遺伝子の化学合成と大腸菌における発現, 蛋白質・核酸・酵素, 35, 2382-2390.
- Smith, C. A., M. Wang, N. Jiang, L. Che, X. Zhao and J.-S. Taylor (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, 4146-4154.
- Tessman, I., M. A. Kennedy and S.-K. Liu (1994) Unusual kinetics of uracil formation in single and double-stranded DNA by deamination of cytosine in cyclobutane pyrimidine dimers, *J. Mol. Biol.*, 235, 807-812.
- Thomas, D. C. and T. A. Kunkel (1993) Replication of UV-irradiated DNA in human cell extracts : Evidence for mutagenic bypass of pyrimidine dimers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7744-7748.
- Zhao, X. and J.-S. Taylor (1996) Mutation spectra of TA*, the major photoproduct of thymidylyl-(3'-5')-deoxyadenosine, in *Escherichia coli* under SOS conditions, *Nucl. Acids Res.*, 24, 1561-1565.