

## 学位論文内容の要旨

c-Ha-ras遺伝子の活性化における塩基の損傷と変異の研究

紙谷 浩之

ヒトの発癌遺伝子であるc-Ha-ras遺伝子は、分子量21,000の蛋白質p21をコードしている。ヒトの様々な腫瘍細胞から検出された活性化c-Ha-ras遺伝子は、p21の12,13または61番目のアミノ酸の変換をもたらす点突然変異が生じていることが明らかにされている。また、carcinogenによって発生した実験動物癌においても同様な突然変異がc-Ha-ras遺伝子に生じていることが明らかにされている。これは、carcinogenによってDNAが修飾を受けた結果であると考えられる。

著者は、c-Ha-ras遺伝子の活性化に特定の修飾塩基が関与している可能性があると考え、4種類の修飾塩基[ $O^6$ -メチルグアニン( $O^6$ -MeG)、8-ヒドロキシグアニン(8-OHG)、キサンチン(X)及びヒポキサンチン(I)]をc-Ha-ras遺伝子の特定位置に導入し、NIH3T3細胞におけるトランスフォーメーション活性と生じる突然変異の解析を行うことを計画した。

特定の修飾塩基を部位特異的にc-Ha-ras遺伝子に導入するためには、ユニークな制限酵素部位を数種類有し、DNAカセット変換を行うことが容易な合成c-Ha-ras遺伝子を用いるのが適当と思われる。しかし、この遺伝子は大腸菌の最適コドンを用いて設計されており、哺乳動物細胞内では発現にくい、または、活性のある蛋白質が産生されない可能性がある。そこで、最初に、合成c-Ha-ras遺伝子がNIH3T3細胞内で発現することを確認することにした。ラウス肉腫ウィルスのLTRの下流に合成c-Ha-ras遺伝子を有するプラスミドを構築し、NIH3T3細胞へトランスフェクションしたところ、3種の活性化c-Ha-ras遺伝子(Val-12, Leu-61, Arg-61)のいずれもフォーカス形成を誘導した。一方、正常c-Ha-ras遺伝子はフォーカスの形成を誘導しなかった。従って、合成c-Ha-ras遺伝子はNIH3T3細胞内で効率よく発現したこと、及び、この系は修飾塩基を導入したc-Ha-ras遺伝子を用いる実験に有用であることが明らかになった。

次に、メチル化剤によって生じる修飾塩基である $O^6$ -MeGを合成c-Ha-ras遺伝子のコドン12の2番目の位置にDNAカセット変換によって導入した。NIH3T3細胞へトランスフェクションした結果、正常c-Ha-ras遺伝子に比較して有意なフォーカス形成が観察された。さらに、フォーカスを形成した細胞のDNAを抽出し、c-Ha-ras遺伝子の配列を解析した結果、G→Aトランジションが生じていることを明らかにした。

続いて酸素ラジカルによって生じる修飾塩基、8-OHGを含むc-Ha-ras遺伝子を作成し、NIH3T3細胞にトランスフェクションした。その結果、8-OHGの導入によってc-Ha-ras遺伝子は活性化されることと、それは導入した位置または隣接した部位のランダムな突然変異によることを明らかにした。この結果は、以前に報告された*in vitro*の結果と一致しており、極めて興味深いものである。

グアニン塩基がspontaneousに、または亜硝酸などによって脱アミノ化されると、Xが生じる。このXをコドン12に導入したc-Ha-ras遺伝子を構築し、NIH3T3細胞にトランスフェクションした。その結果、Xを含むc-Ha-ras遺伝子は、高頻度にフォーカスを形成した。さらに突然変異の解析を行ったところ、17例中16例にG→Aトランジション、1例にG→Tトランスバージョンを観察した。

最後に、アデニンの脱アミノ化によって生じるIをコドン61の2番目の位置に導入した。Iを含むc-Ha-ras遺伝子は活性化c-Ha-ras遺伝子(Leu-61)の約50%のフォーカス形成能を示し、高頻度に突然変異が生じたことが明らかになった。c-Ha-ras遺伝子の解析を行ったところ、分析した全てのクローンでA→Gトランジションが観察された。1例はGに変化したc-Ha-ras遺伝子とTに変化したc-Ha-ras遺伝子の両方を有していた。

以上のことから以下の結論が導かれる。

- (1) 合成c-Ha-ras遺伝子はNIH3T3細胞をトランスフォームさせることを確認した。
- (2) Q<sup>o</sup>-MeG、8-OHG、Xの3種の修飾塩基をc-Ha-ras遺伝子のコドン12の2番目の位置に導入し、いずれの修飾塩基もc-Ha-ras遺伝子の活性化の直接的な原因となり得ることを明らかにした。
- (3) Iをコドン61の2番目の位置に導入し、この修飾塩基もc-Ha-ras遺伝子の活性化の直接的な原因となり得ることを明らかにした。
- (4) Q<sup>o</sup>-MeG、XはG→Aの、IはA→Gの突然変異を誘発することを明らかにした。また、8-OHGは、修飾部位と隣接部位にランダムな突然変異を引き起こすことを明らかにした。
- (5) 以上のことから、carcinogenによるDNAの修飾は発癌遺伝子の活性化と密接に関わっていることを明らかにした。

## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

|     |       |         |
|-----|-------|---------|
| 主 査 | 教 授   | 大 塚 栄 子 |
| 副 査 | 教 授   | 松 田 彰   |
| 副 査 | 教 授   | 有 賀 寛 芳 |
| 副 査 | 助 教 授 | 井 上 英 夫 |

申請者は、ヒト発癌遺伝子であるc-Ha-ras遺伝子の変異による活性化の研究を行っていたが、今回、損傷塩基を合成遺伝子の特定部位に導入することにより、塩基の損傷が癌化の引き金となる変異と関連していることを明らかにした。

ヒトの発癌遺伝子であるc-Ha-ras遺伝子は、分子量21,000の蛋白質p21をコードしている。ヒトの様々な腫瘍細胞から検出された活性化c-Ha-ras遺伝子は、p21の12,13または61番目のアミノ酸の変換をもたらす点突然変異が生じていることが明らかにされている。また、carcinogenによって発生した実験動物癌においても同様な突然変異がc-Ha-ras遺伝子に生じていることが明らかにされている。これは、carcinogenによってDNAが修飾を受けた結果であると考えられている。

申請者は、c-Ha-ras遺伝子の活性化に特定の修飾塩基が関与している可能性があると考え、4種類の修飾塩基[Q<sup>6</sup>-メチルグアニン(Q<sup>6</sup>-MeG)、8-ヒドロキシグアニン(8-OH G)、キサンチン(X)及びヒポキサンチン(I)]をc-Ha-ras遺伝子の特定位置に導入し、NIH3T3細胞におけるトランスフォーメーション活性と生じる突然変異の解析を行った。

特定の修飾塩基を部位特異的にc-Ha-ras遺伝子に導入するために、ユニークな制限酵素部位を数種類有し、DNAカセット変換を行うことが容易な合成c-Ha-ras遺伝子を用いた。まず、ラウス肉腫ウイルスのLTRの下流に合成c-Ha-ras遺伝子を有するプラスミドを構築し、NIH3T3細胞へトランスフェクションしたところ、3種の活性化c-Ha-ras遺伝子(Val-12, Leu-61, Arg-61)のいずれもフォーカス形成を誘導した。一方、正常c-Ha-ras遺伝子はフォーカスの形成を誘導しないことを確かめた。従って、合成c-Ha-ras遺伝子はNIH3T3細胞内で効率よく発現したこと、及び、この系は修飾塩基を導入したc-Ha-ras遺伝子を用いる実験に有用であることが明らかにした。

次に、メチル化剤によって生じる修飾塩基であるQ<sup>6</sup>-MeGを合成c-Ha-ras遺伝子のコ

ドン12の2番目の位置にDNAカセット変換によって導入し、NIH3T3細胞へトランスフェクションした結果、正常c-Ha-ras遺伝子に比較して有意なフォーカス形成が観察された。さらに、フォーカスを形成した細胞のDNAを抽出し、c-Ha-ras遺伝子の配列を解析した結果、G→Aトランジッションが生じていることを明らかにした。

続いて酸素ラジカルによって生じる修飾塩基、8-OHGを含むc-Ha-ras遺伝子を作成し、NIH3T3細胞にトランスフェクションした。その結果、8-OHGの導入によってc-Ha-ras遺伝子は活性化されることと、それは導入した位置または隣接した部位のランダムな突然変異によることを明らかにした。この結果は、以前に報告されたin vitroの結果と一致していた。

グアニン塩基がspontaneousに、または亜硝酸などによって脱アミノ化されると、キサンチン(X)が生じる。これをコドン12に導入したc-Ha-ras遺伝子を構築し、NIH3T3細胞にトランスフェクションしたところ、Xを含むc-Ha-ras遺伝子は、高頻度にフォーカスを形成し、17例中16例にG→Aトランジッション、1例にG→Tトランスバージョンを観察した。

最後に、アデニンの脱アミノ化によって生じるIをコドン61の2番目の位置に導入したところ、高頻度に突然変異が生じ、分析した全てのクローンでA→Gトランジッションが観察された。1例はGに変化したc-Ha-ras遺伝子とTに変化したc-Ha-ras遺伝子の両方を有していた。

以上の実験から合成した活性c-Ha-rasはNIH3T3細胞をトランスフォームすること、これを用いることにより損傷塩基が変異の原因となることを明らかにし、変異原物質がDNAの変異を起こし、癌化と密接に関連している可能性を示した。この研究は博士(薬学)の学位を受けるに充分値するものと認めた。