

学位論文題名

酵母アッセイを用いたラット p53 癌抑制遺伝子の 転写スリップの解析

学位論文内容の要旨

I. 背景と目的

最近、大腸菌や哺乳類細胞で転写段階での塩基配列の変化(転写変異)により、鋳型 DNA の遺伝情報が修飾されて発現する現象が発見された。この転写変異の 1 つのタイプとして、アデニン (A) またはチミンが多数連続する部位において鋳型 DNA には存在しない余分な A またはウラシルが挿入されるものがある。低リポ蛋白血症と血友病 A の患者でみいだされたこの現象は、転写の伸長反応時に鋳型 DNA 鎖と RNA 鎖間に生じる“ずれ”すなわち転写スリップに起因すると考えられている。これらの患者では責任遺伝子に 1 塩基欠失がありフレームシフトが生じるが、転写スリップにより一部の mRNA では読み枠が正常に回復するため野生型蛋白が合成され症状が軽快することが報告されている。このことから、人為的に転写スリップを引き起こすことにより遺伝性疾患および癌の治療に利用できる可能性がある。そのためには、転写スリップがどのような遺伝子で、どのような原因で促進されるかを明らかにする必要がある。しかし哺乳動物においては、転写スリップ現象がほとんど解析されておらず、この現象の関与が示唆される遺伝性疾患の報告も極めて少ない。これは、転写スリップが DNA 複製に伴うスリップと区別することが困難であったこと、および転写スリップの *in vivo* モデルがなかったことによると考えられる。これらの問題を解決するために、著者は yeast functional assay とよばれる変異検出法と LEC 遺伝性肝炎ラットモデルを用いて、転写スリップの標的となるアデニンが 6 個連続した配列を翻訳領域に持つ p53 癌抑制遺伝子の転写スリップを解析した。さらに、この現象がどのような病理的状況下で促進されるかを調べた。

II. 方法

- 1) yeast functional assay : ①ラットの p53 発現ベクター pLSRP53 から p53 のコドン 68-345 を削除したギャップベクターを作製する。②組織ならびに培養細胞から全 RNA を抽出し RT-PCR 法により p53 cDNA を増幅する。これを p53 ギャップベクターとともにレポーター用酵母 yIG397 に導入する。③酵母に導入されたギャップベクターと PCR 断片は酵母内で遺伝子相同組み換えをおこし、被検 DNA 断片がベクターに組み込まれる。④形質転換された酵母を低アデニン添加プレート上で選択培養する。⑤この酵母内で野生型 p53 が発現すると、これが酵母染色体上に組み込んである p53 蛋白認識配列に結合し下流の ADE2 遺伝子の転写を活性化する。この結果、酵母コロニーは白くなる。一方、変異型 p53 が発現すると ADE2 遺伝子が転写されないためアデニン合成の中間代謝産物が蓄積し酵母コロニーが赤くなる。⑥総コロニー中の赤コロニーの割合を算定する。これはサンプル中の変異 RNA の比率を鋭敏に反映する。
- 2) exon 4-specific yeast assay : pLSRP53 の p53 exon 4 内のコドン 68-113 を削除したギャップベクターを作製する。次に組織ならびに培養細胞から抽出したゲノム DNA および全 RNA から PCR 法または RT-PCR 法により exon 4 部分を増幅し、これを exon 4 ギャップベクターとともに yIG397 に導入する。以下、上記の yeast functional assay と同様にして赤コロニーの割合を算定した。

III. 結果および考案

- 1) ラットの p53 には転写スリップの標的となる 6A 部位が 3 箇所(exon 4, exon 7, exon 8)ある. yeast functional assay の結果, 7 週令の LEC ラットの肝では赤コロニーが 8 % で, アデニンの挿入変異は 8 クローン中 1 クローンに認められた. これは全コロニーの 1 % に相当した. 一方, 70 週令以上の LEC ラットの胆管線維症, 肝細胞癌, および非癌部肝組織においてアデニンの挿入変異が全コロニーに占める割合はそれぞれ 7.4 %, 7.0 %, 9.0 % であった. また, これらのアデニンの挿入変異は exon 4 の 6A 部位に多数認められた.
- 2) この高頻度なアデニン挿入変異が p53 増幅過程における PCR や逆転写反応のアーチファクトでないことを以下の実験結果から証明された. ①プラスミドに組み込まれた野生型 p53 cDNA の PCR 産物の yeast functional assay を行った場合, 23 クローン中にアデニンの挿入はみられなかった. ②野生型 p53 cDNA を SP6 RNA polymerase を用いて in vitro で RNA に転写してから, RT-PCR により p53 cDNA を増幅し yeast functional assay を行った場合, アデニン挿入変異の頻度は全体の 1.6 % であり, 70 週令以上の LEC ラットにおけるアデニン挿入変異の頻度と比べると有意に低かった.
- 3) この LEC ラットの高頻度なアデニン挿入変異がゲノム DNA の変異か, mRNA に生じた変異かを調べるため, 2 匹の 72 週令の LEC ラットの肝について exon 4-specific assay を行った. 赤コロニーの頻度は DNA サンプル (1.8-2.4 %) に比べ RNA サンプル(7.2-7.7 %) で有意に高かった. アデニンの挿入変異は DNA サンプルからはほとんど検出されなかったが, RNA サンプルでは変異の 60 % 以上を占めた. 以上より, このアデニン挿入変異が転写スリップにより生じた転写変異であることが証明された.
- 4) yeast functional assay の結果, WKAH ラットでは加齢に伴い赤コロニーの頻度が増大した. 一方, LEC ラットでは, これに加え肝炎期に赤コロニーの頻度が増加する傾向がみられた. これらの赤コロニーの増加はアデニンの挿入変異の頻度の増加を伴っていた. LEC ラットの肝炎期では赤コロニーの比率と血清 GOT 活性値の間に高い正の相関関係 ($r = 0.98$) が認められた. しかし, 肝の銅ならびに 8-OHdG 含有量との間には相関関係は認められなかった. 以上より, 転写スリップは加齢とともに増加すること, また, LEC ラットの肝炎期の増加は肝細胞内の銅の過剰な蓄積や活性酸素の増加によるものではなく, 細胞傷害の程度に関係した現象であることが示唆された.
- 5) LEC ラットの肝細胞傷害が p53 の転写スリップを促進するかどうか確かめるため, LEC および LEA ラット由来の培養肝細胞株 93C13, 93A16 を 0-500 mM エタノールに暴露することにより細胞障害をおこさせた後, DNA と RNA を抽出し exon 4-specific assay を行った. 全ての DNA サンプルにおいて赤コロニー比率は 1.9-2.5 % の範囲であった. 一方, RNA サンプルの赤コロニー比率は LEC ラット由来の 93C13 で, 100-500 mM のエタノール負荷により 7.0 - 7.7 % となり, 93A16 の 3.8 - 4.1 % に比べ倍近くに増加した. また赤コロニーの 7/8 がアデニン挿入変異であった. 以上から, LEC ラットでは細胞障害の結果転写スリップが増加することが示唆された.

本研究では 酵母を用いた簡便かつ高感度な手法により転写スリップの解析を行い, 細胞障害や加齢に伴う細胞の老化が転写機構の忠実度を低下させる可能性を示した. しかし, 転写変異を引き起こす具体的な機構についてはまだ不明な点が多い. 転写スリップの制御による遺伝子病の治療の可能性に関しては, トランスジェニックマウスなどの遺伝病の動物モデルを用いて実験する価値は十分あると考えられる.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 細 川 真澄男

副 査 教 授 葛 巻 暹

学 位 論 文 題 名

酵母アッセイを用いたラット p53 癌抑制遺伝子の 転写スリップの解析

肝炎・肝癌自然発症モデルであるLECラットにおいて、p53癌抑制遺伝子に変異を持つ微小な細胞集団の有無を検索した。従来の方法では組織内に存在する少数の変異p53 mRNAを検出することが困難であるため、最近開発されたラットp53酵母アッセイ法を解析手段として用いた。この方法では、p53 mRNAに変異があれば酵母コロニーが赤くなり、しかもこの赤コロニーの比率は変異p53 mRNAの比率と極めて高い正の相関を示す。LECラットの肝癌期の肝臓からRNAを抽出して酵母アッセイを行ったところ、約8%の赤コロニーが出現した。解析の結果、p53変異の多くが第4エクソンで生じておりしかもアデニンが6個連続する箇所に余分なアデニンが1個挿入される変異であることが明らかになった。このアデニンの挿入変異はゲノムDNA上には見いだされず、cDNA上でのみ見いだされた。この現象がRT-PCRの過程で人工的に作られた変異でないことは、SP6 RNA polymeraseを用いたin vitro RNA transcriptionによって証明された。以上からこのアデニン挿入変異が転写スリップにより生じた転写レベルでの変異であることが明らかになった。さらに、1) この転写スリップによるp53変異は急性肝炎期に約20%にまで急増すること、2) 赤コロニーの比率と血清GOT活性値の間に高い正の相関関係 ($r = 0.98$) が存在すること、および3) 銅の蓄積量や酸化的DNA損傷の程度とは相関しないこと等から、肝細胞傷害がp53の転写スリップを促進することが示された。この他に、老化によっても転写スリップによるp53変異が増加することが証明された。本研究では酵母を用いた簡便かつ高感度な手法を用いて転写スリップの解析を行い、細胞障害や細胞の老化が転写機構の忠実度を低下させることを示唆する結果を得た。しかし、転写変異を引き起こす具体的な機構については今後の課題であると考えられた。

公開発表はおおよそ13名の聴衆の前で行われ、葛巻教授より、p53の転写スリップとLECラット肝癌の発生との関係、炎症の関与、エタノール投与による転写スリップ亢進の

機序等について質問があった。次いで、細川教授より、LECラット以外のラットでも転写スリップが起こるのか、転写スリップの生物学的意義等について質問があった。最後に守内教授より、転写スリップという現象が遺伝性疾患において有利に働く場合と不利に働く場合について質問があった。これらの質問に対して申請者は、豊富な実験データと文献的知識に基づいて明解に回答した。これらの質問の中で最も重要な問題は、急性肝炎期における転写スリップの亢進がLECラットの肝癌発生とどのように関わるのかという点であった。申請者はこの質問に対し、急性肝炎期に約20%のp53 mRNAに変異が挿入されることによってp53の機能が相対的に低下し、銅の過剰蓄積に伴う酸素ラジカルのDNA損傷の修復が阻害される可能性を述べた。

この論文は、野性型遺伝子に転写スリップが生じていることを初めて証明した論文として高く評価され、転写スリップを人為的に誘発することにより遺伝性疾患のフレームシフト変異をmRNAレベルで正常復帰させうる可能性を示唆した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。