

学位論文題名

マウスにおける p53 Yeast Functional Assay 法の確立とその p53 変異検出能の評価

学位論文内容の要旨

(背景・目的)

癌の発生、悪性進展の過程においては、癌原遺伝子の変異や過剰発現ならびに、癌抑制遺伝子の変異、欠失などが多段階的に起こり、悪性形質が獲得される。癌抑制遺伝子 p53 は、ヒトの悪性腫瘍において最も変異、欠失が多く報告される遺伝子であり、悪性腫瘍の半数以上で何らかの p53 の異常がみられる。p53 遺伝子産物は標的遺伝子である p21/waf1/cip1, Bax などの転写を活性化し、その結果細胞周期の停止、アポトーシスの誘導など癌化を抑制する機能を発揮する。従ってこのような p53 の機能の喪失は癌化と密接にかかわるものと思われる。

マウスを用いたモデル実験はこのような p53 の変異と癌化の関係を解析する上で有用である。マウスでは化学物質やウイルスによる発癌、さらに transgenic mouse における発癌実験などがなされており、これらの多くに p53 変異が見いだされている。ヒトと同様に p53 が癌の発生過程に重要な役割を果たしていることは、p53 のノックアウトマウスでは高率に癌が発生することからも明らかである。現在、マウス p53 の変異の解析は主に SSCP 法を利用した変異スクリーニングにもとづき行われている。しかし、この方法は手技に習熟を要し、また変異細胞の数がサンプル中に少ない場合や、変異が多様である場合は検出が困難であるといった問題がある。近年ヒト p53 の鋭敏な検出法として開発された yeast functional assay 法は、1) 変異 p53 の検体中での割合が赤コロニーの割合によって表現されるため、判定の再現性、客観性が高い、2) 検体中の変異 p53 の割合が低い場合でも、異常の検出が可能、3) p53 の機能的な変異のみを検出することが可能、4) 赤コロニーからプラスミドを回収することにより変異 p53 の塩基配列決定が容易である、など SSCP 法にない長所をもった優れた方法である。マウスにおける p53 yeast functional assay 法の確立は、p53 の役割の解析に大きく資するものと思われるが、それに成功したとする報告はない。そこで実際にマウスの p53 発現ベクターを構築し、yeast functional assay を行ったところ、正常検体での赤コロニーのバックグラウンドが異常に高く実用的でないことが判明した。著者はその問題点を解決し、より実用的なマウス p53 yeast functional assay 法を構築するべく以下の実験を行った。1) マウス p53 の yeast functional assay 用の発現ベクターのプロトタイプを作製し、assay 上の問題の原因を検証した。2) この結果に基づいて、バックグラウンドが低下するよう発現ベクターの改変を行った。3) この新しいベクターを用いたアッセイ法の感度を検討し、その有用性を検討するため、各種のマウス培養細胞ならびに紫外線照射 XPC (色素性乾皮症相補群 C) 遺伝子変異マウスの p53 変異を検索した。

(結果・考察)

1) ヒトp53 yeast functional assay に用いられるp53 発現ベクターをもとに、マウス野生型 p53 の全長を組み込んだベクターpLSMP53-1を構築した。このベクターのコードン66-343にギャップを設けて、マウス正常肝全RNAよりMMLV逆転写酵素を用いてRT-PCRにより増幅したp53 cDNA のyeast functional assay を行ったところ、 $25.8 \pm 2.8\%$ の赤コロニーが出現した。この赤コロニーは逆転写酵素のエラーおよび p53の偽遺伝子がPCRで増幅されることによるエラーであると考え、逆転写酵素をSuperScriptIIへ変更し、DNaseI処理の付加を行ったところ赤コロニーは $13.6 \pm 3.3\%$ まで有意に減少した。しかしヒト正常検体でのバックグラウンド赤コロニー $5.2 \pm 2.7\%$ より明らかに高率なので、赤コロニーからベクターを回収してマウス正常検体のp53変異を解析した。この結果、マウスp53 cDNA上の6-7個のアデニン(A)、または6個のチミン(T)が連続する部位(以下6A、7A、6Tと略す)でAまたはTが挿入・欠失する変異が赤コロニーの46.1%(全コロニーの6.3%)にみられた。このような部位は、ヒト p53 cDNA では1箇所しか存在せず、従ってマウスではこれらの部位での高率なエラーが yeast functional assay の高バックグラウンドの原因と考えられた。

2) マウスp53 cDNA上には6Aが2箇所、7A、6Tがそれぞれ1箇所ずつある。このうち、2箇所の6Aと6Tはp53の5'側に存在し、p53の変異集積部位であるDNA結合ドメイン外であるため、アッセイの評価領域から除外してもp53変異検出能は損なわれなかったと考えた。そこでpLSMP53-1ベクター上のp53にアミノ酸変異を伴わない変異を加え、制限酵素切断部位の変更を行った。これによりギャップ領域はコードン 66-343からコードン111-343となり、5'側の2箇所の6A、6Tはギャップ修復領域から除外された。この新たなベクターpLSMP53M1を用いてp53 yeast functional assay を行うと、マウス正常肝における赤コロニーのバックグラウンドは $8.0 \pm 1.4\%$ へと有意に低下した。またAまたはTが連続する部位での変異は赤コロニーの30.8%(全コロニーの2.5%)へと減少していた。以上より、低バックグラウンドのマウスp53 yeast functional assay が確立された。

3) 新しく確立されたマウスp53 yeast functional assayによって各種のマウス培養細胞株のp53変異を解析した。QR-32では51.7%の赤コロニー比率を呈し、R246Lの変異が、MethAでは93.4%の赤コロニーを呈し、C132Fの変異、およびE168G、M234Iの変異が同定された。B16、colon 26の各シリーズでは赤コロニーは10%以下でバックグラウンドレベルであり変異はないと判定された。本アッセイにより培養細胞株の変異を効率よく検出することが可能であった。

次に、ヌクレオチド除去修復機構の構成要素であるXPC遺伝子に変異をもつXPC遺伝子変異マウスについて検討した。紫外線を照射した部位に発生した皮膚癌組織では、88.1%の赤コロニーを呈し、R210Cの変異と、S238Pの変異が同定された。一方同一個体の紫外線非照射皮膚組織では、8.0%の赤コロニーを呈し、正常組織と差はなかった。また紫外線照射非腫瘍部皮膚組織では18.7%の赤コロニーを呈し、多様な変異が同定された。これらの変異の多くはdipyrimidine siteにおいてCがTに変異したもので、正常組織のバックグラウンドから同定される変異とは異なっていた。したがってこれらは 紫外線照射による変異であることが示唆された。赤コロニーの18.7%への増加はヌクレオチド除去修復の異常に起因する様々なp53変異の蓄積を反映しているものと思われる。

以上より、著者の確立したマウスp53 yeast functional assayは培養細胞株及びマウス腫瘍組織からp53変異を簡便に検出できるばかりでなく、さらに実験発癌モデルでの多クローン性変異の検出、およびその頻度の推定を可能とした。今後、様々な癌の動物実験系において yeast functional assayを用いて p53 の変異を解析することにより、p53 変異の発癌における役割がより明らかになることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

マウスにおける p53Yeast Functional Assay

法の確立とその p53変異検出能の評価

ヒトp53の簡便かつ敏感な変異検出法として、p53 yeast functional assay法が知られている。マウスにおける発癌系においてp53変異の検出をより容易に行う目的で、マウス p53 yeast functional assay法の樹立を試みた。まず、ヒトp53発現ベクター上の p53cDNAをマウスのそれと置換したベクターを作成し、マウス正常肝を用いてヒトと同様の方法でp53 yeast functional assay法を行ったところ、25.8%のバックグラウンド赤コロニーが出現した。逆転写酵素の変更、DNase I処理の付加によりバックグラウンド赤コロニーは13.6%まで減少したが依然高値であった。塩基配列決定により高いバックグラウンドの原因がp53遺伝子上のアデニンまたはチミンのリピート部位でのエラーであることを解明し、同部位をアッセイから除外して、バックグラウンドを8.0%まで低下させることができた。このようにして確立したアッセイを用い、種々のマウス培養細胞株のp53変異を検出した。また、XPC遺伝子変異マウスの紫外線誘起皮膚癌のp53変異を検出し、また紫外線照射非腫瘍部皮膚組織における多様なp53変異をも検出することができた。

公開発表にあたって、副査の第2病理長嶋教授より、検出範囲の縮小による検出感度の低下がどの程度みられるかについて質問があった。申請者は、検出感度の低下はある程度避けられないが、p53の変異集積部位であるDNA結合ドメインは検出範囲にすべて含まれるため、感度の低下は大きくないものと考えていると答えた。次に、本アッセイではp53のDNA結合能が保たれているものを正常と判定しているが、それ以外の機能を欠損したようなp53変異は本アッセイによっては検出できないのではないかという質問があった。申請者は、その可能性は否定できないが、実際にどのような変異が偽陰性になるかは検証がきわめて困難であり、またp53の機能としては四量体を形成してDNAに結合し下流の遺伝子を活性化する機能が最も重要であり、その中心となるDNA結合能を評価することが最も重要と考えこのアッセイを確立したと答えた。続いて、p53 yeast functional assay法のマウスへの応用は本論文以外に存在するかについての質問があった。申請者は、他施設でも試みは行われたが、応用に成功したのは本論文が初であると答えた。次に副査の癌研細胞制御守内教授から、ギャップ領域の縮小によって検出範囲を縮小したが、

実際の検出範囲はどの程度縮小されたか、それによる感度の低下は何％と見込まれるかという質問があった。申請者は、ギャップ修復領域には含まれないがPCRで増幅される領域については実際に検出が可能であるが、その領域での検出感度の低下を数量的に見積もることは困難であると答えた。続いて、アデニンまたはチミンのリピート部位でのエラーは、どのようにして生じたか、この現象は逆転写酵素のエラーによって生じたアーチファクトではないかという質問があった。申請者は、無細胞系によって合成したp53 mRNAを鋳型としてアッセイを行うとこのようなエラーの発生はほとんど発生しないことから逆転写のエラーではなく、mRNAへの転写時に起きた現象(transcriptional slippage)と考えられ、近年同様の現象がヒトApo B遺伝子や第Ⅷ因子遺伝子において生じることが報告されていると答えた。続いて、マウス培養細胞のアッセイでp53変異を持つ細胞が少ない理由について質問があった。申請者はマウスの培養細胞でp53変異を持つことが知られているのは、今回用いたMethA株や、Friend leukemia関連の白血病細胞株であり、報告が多くなく、入手した範囲ではこのような結果となったと答えた。最後に、主査の第3内科浅香教授から、マウスにおいてp53変異を検出するアッセイを開発した理由についての質問があった。申請者は、マウスでは化学発癌、ウイルス発癌、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの発癌など、多種多様な発癌実験が可能であり、ヒト癌のモデルとしての役割は今後も大きいと思われるため、そのような系においてp53変異を検出することはヒトの癌研究にも大きく資すると考えて本アッセイを開発したと答えた。さらに、今後どのような系に本アッセイを応用していくかという質問があった。申請者は、肝発癌のモデル動物として、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスのゲノムを導入したトランスジェニックマウスが最近樹立されており、それらのマウスにおいてp53変異の評価を行うことによりヒト肝発癌機構の解明につながるとと思われると答えた。

本研究は、今後 p53の発癌における役割および多段階発癌機構の解明に役立つことが期待されるため、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。