

学位論文題名

Molecular cloning of *p53* cDNA of Mongolian Gerbil
and Establishment of Yeast *p53* Functional Assay System(スナネズミ *p53* 遺伝子のクローニングと
その Yeast Functional Assay 法の確立)

学位論文内容の要旨

(背景・目的)

近年ヒト胃癌の発生に多段階的な遺伝子異常が関わっていることが明らかとなりつつある。分化型胃癌では癌遺伝子 *ras*、*c-erbB-2* の他、癌抑制遺伝子 *p53*、*APC* などの異常が認められる。また未分化型胃癌では *k-sam*、*c-met* などの癌遺伝子の発現異常が報告されている。なかでも *p53* 遺伝子異常は分化型胃癌で高頻度に認められ、早期、進行胃癌とも 40% 前後と報告されている。また胃腺腫や異型上皮巢などの前癌病変においても約 60% に *p53* 遺伝子異常を認める。*p53* 遺伝子産物の生物学的に重要な機能は DNA が損傷を受けたときに *p21*、*GADD45*、*Bax* などの標的遺伝子の転写を活性化し細胞周期抑制、DNA 修復、アポトーシスを誘導し癌化を阻止することである。したがって *p53* の転写活性の喪失により細胞の異常増殖、異常な DNA の蓄積、アポトーシスの抑制による細胞の不死化が起こり癌化に関与するものと考えられる。また、これまで様々な疫学的、病理組織学的検討においてヒト胃癌の発症に *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染が関与していることが示唆されている。また一方で、*H. pylori* 単独感染および発癌物質との併用で Mongolian gerbil (スナネズミ) に胃癌を発症することが報告されている。今後はこのモデルにより、胃癌発症のメカニズムが解明されることが期待されるが、これまでスナネズミの研究に利用できる分子生物学的な情報は *p53* 遺伝子を含めほとんど得られていない。スナネズミの *p53* 遺伝子の構造を決定し、その役割を解析することはヒト胃癌発症の機序の解明に大きく貢献すると考えられる。

Iggo らにより開発されたヒト *p53* yeast functional assay 法は *p53* の機能的変異を鋭敏かつ簡便に検出できる方法である。この方法では *p53* の転写活性の異常を酵母コロニーの色の変化で識別できる。組織より抽出した RNA より RT-PCR (Reverse Transcribed Polymerase Chain Reaction) 法にて増幅した *p53* cDNA と、酵母内 *p53* 発現ベクターをレポーター酵母内に導入することにより、酵母菌体内で遺伝子相同組み換えが起こり、検体の *p53* cDNA がベクターに自動的に組み込まれ *p53* が蛋白として菌体内に発現する。発現した *p53* 蛋白は酵母染色体上に組み込まれた *p53* 認識配列に結合するが、野生型の場合は下流の *ADE2* 遺伝子 (phosphoribosylaminoimidazole carboxylase 遺伝子) の転写が活性化しアデニン産生がおこる。酵母の寒天培地は低アデニン無ロイシン培地のため、発

現したp53が変異型でADE2が発現しない場合はアデニン合成の中間代謝産物が酵母内に蓄積しコロニーが赤くなる。赤コロニー数の比率を算定すれば検体中の変異型p53 mRNAの比率を知ることができる。この方法の特性は、酵母菌体内でp53が蛋白に翻訳され、機能をもつp53のみが正常と判定されるため機能的な変異のみを検出できることにある。また、赤コロニーからプラスミドを回収することにより異常p53の塩基配列決定が容易である。

以上から筆者は1) スナネズミp53遺伝子の配列を決定すること。2) ヒトp53 yeast functional assay法を応用しスナネズミp53 yeast functional assay法を構築することを目的に研究を行った。

(結果・考察)

1) スナネズミp53cDNA塩基配列の決定

p53cDNAの種間保存領域にプライマーを設定し、スナネズミ正常肝組織より抽出したRNAを用いてRT-PCRとRACE(Rapid amplification of cDNA ends)法によりp53cDNAの全長配列を決定した。スナネズミp53 cDNAは全長で1173塩基対を持ち、391アミノ酸をコードしていた。ヒトp53cDNAとの相同性は塩基配列においては78.8%、アミノ酸においては76.2%であった。

2) スナネズミp53 yeast functional assay法の構築

ヒトp53 yeast functional assay法に用いられるp53発現ベクターを元にスナネズミ野性型p53の全長を組み込んだベクターpLSGp53を構築した。このベクターにDNA結合ドメインを中心とするコドン70-353にギャップを設けyeast functional assayに用いた。

3) 正常組織におけるp53 yeast functional assay

正常コントロールとして*H.pylori*非感染スナネズミ(生後10週)の腺胃、腎、肝、肺、筋、舌、小腸の各組織からRNAを抽出しRT-PCR法にてp53遺伝子のcDNAを得、yeast functional assayを行った。その結果、正常組織の総酵母コロニー数は約700~1600個、赤コロニーの割合は3.1-7.9%と10%以下であり、ヒト正常組織におけるp53 yeast functional assay法の結果と同等の結果であった。それぞれの組織の赤コロニーからベクターを回収し、スナネズミ正常検体のp53変異を解析した結果、clonal mutationは認められなかった。

4) スナネズミp53 yeast functional assay法の定量性

スナネズミp53 yeast functional assay法の定量性を確認するために野性型および変異型p53のPCR産物を種々の割合で混合しyeast functional assayを行った。変異型p53量の増加とともに赤色コロニー数は線形に増加し、決定係数 $r^2 = 0.9972$ の正の相関関係を示した。

(結論)

スナネズミp53cDNA塩基配列を初めて明らかにし、その変異解析法である yeast functional assay法を構築した。本法により*H.pylori*感染スナネズミモデルにおけるp53遺伝子の機能的変異の経時的な解析が可能となった。*H.pylori*感染により引き起こされる慢性萎縮性胃炎、腸上皮仮生などの組織学的変化における変異の解析と、*H.pylori*除菌による可逆性をp53遺伝子変異の面から解析できることはヒト胃癌発症の機序の究明、予防に役立つものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

Molecular cloning of *p53* cDNA of Mongolian Gerbil and Establishment of Yeast *p53* Functional Assay System

(スナネズミ *p53* 遺伝子のクローニングと
その Yeast Functional Assay 法の確立)

ヒト分化型・未分化型胃癌の発症に *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) 感染が関与していることが示唆されている一方、*H.pylori* 単独感染および化学発癌物質との併用で Mongolian gerbil (スナネズミ) に胃癌を発症することが報告されている。*p53* 遺伝子異常はヒト分化型・未分化型胃癌で高頻度に認められ、スナネズミ *p53* 遺伝子の構造を決定し、*H.pylori* 感染スナネズミモデルにおける *p53* の機能異常を解析することは、ヒト胃癌発症機序の解明に大きく貢献すると考えられる。本研究では、スナネズミ *p53* 遺伝子配列を解析し、その変異を簡便かつ鋭敏に検出するスナネズミ *p53* 酵母アッセイ法の構築を試みた。

スナネズミ *p53* cDNA は全長で 1173 塩基対を持ち、391 アミノ酸をコードしていた。ヒトとの相同性は塩基配列では 78.8%、アミノ酸では 76.2% であった。スナネズミ正常各組織 (胃、腎、肝、肺、筋、舌、小腸) における酵母アッセイの結果、赤コロニーの割合は 10% 以下でヒト正常組織における酵母アッセイのバックグラウンドと同等であり、クローナルな変異は認められなかった。*H.pylori* ATCC43504 株長期感染 (86-142 週) スナネズミ胃組織における酵母アッセイの結果、16 匹中 2 匹で *p53* の機能的変異を認めた。スナネズミ *p53* 酵母アッセイ法の定量性の検討の結果、変異型 *p53* PCR 産物の割合と赤色コロニー数の間には直線的な正の相関関係が示された。

口頭発表に当たり、副査の守内教授からは今回酵母アッセイで検出された *p53* 変異について genomic DNA の解析を行ったか、スナネズミ癌組織は入手可能か、スナネズミ以外の *H.pylori* 感染モデルについての質問があった。申請者は RNA 抽出後の遺残物を用いた genomic DNA 解析は困難であったことを説明し、スナネズミ胃癌モデルを開発・研究し

ている各施設に検体の供与を依頼していること、スナネズミ以外の*H.pylori*感染モデルとしてニホンザルやブタなどがあることを述べた。副査の浅香教授からはヒトの腸上皮化生におけるp53変異について、今回p53変異が検出されたスナネズミの年齢はヒトに換算すると何才相当か、スナネズミ分化型胃癌組織の酵母アッセイは行ったかについて質問があった。申請者は、ヒト腸上皮化生におけるp53変異についてPCRや免疫組織学的手法を用いた検討の報告があること、今回p53変異の検出されたスナネズミはヒトの100才程度に相当すると考えられること、スナネズミ胃癌組織の検討は行っていないことを述べた。主査の長嶋教授からは、スナネズミp53cDNAのNおよびC末端の変異は可能であるか、今回変異の認められた2匹のスナネズミ胃組織に胃癌は認められたか、スナネズミに脳腫瘍が発症した場合酵母アッセイでp53変異の検出は可能かについて質問があった。申請者は、ベクターと検体のp53cDNAが相同組み替えを起こす部分に変異が存在する場合は検出は困難であること、スナネズミ胃組織の病理組織学的検討は行っていないこと、脳腫瘍についてもRNA抽出が可能なら検討できることを説明した。

本研究はスナネズミp53cDNA塩基配列を初めて明らかにし、その変異解析法である酵母アッセイ法を構築した点が高く評価される。本法により*H.pylori*感染スナネズミモデルにおけるp53遺伝子の機能的変異の経時的な解析が可能となった。*H.pylori*感染により引き起こされる慢性萎縮性胃炎、腸上皮仮生などの胃粘膜病変におけるp53変異の解析と、*H.pylori*除菌による可逆性をp53遺伝子変異の面から解析できることはヒト胃癌発症の機序の究明、予防大きく貢献するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。