

氏名・(本籍)	中 田 大 地 (大阪府)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	甲 第60号
学位授与の日付	平成10年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	出芽酵母を用いたラットにおける癌抑制遺伝子p53の 機能的変異検出法 (Yeast functional assay) の確立
論文審査委員	主 査 教 授 有 末 眞 副 査 教 授 市 田 篤 郎 副 査 教 授 賀 来 亨

論 文 内 容 の 要 旨

【背景と目的】

細胞のライフサイクルから見ると、癌は細胞の増殖を制御する遺伝子の異常により増殖を停止する機能が失われ、細胞の分化やアポトーシスが抑制された状態にあると考えられる。種々の増殖制御遺伝子のなかでも特に癌抑制遺伝子p53は、「遺伝子の番人」として細胞周期のG1後期のチェックポイントにおいて、遺伝子変異を防ぐ重要な役割を果たしている。このp53の遺伝子変異がヒト口腔癌を始めとする数多くの癌の発生、悪性化進展に主要な因子として関与していること、また癌の診断・治療・予後の判定マーカーとして有用であることが明らかになってきている。一方、発癌機構の解明・癌の診断・治療の研究のためには実験動物モデルによる解析が不可欠であるが、従来ラットやマウス等実験動物のp53変異はSSCP (single-strand conformation polymorphism) 法や直接塩基配列決定法、免疫組織化学的検査法などによって検索されてきた。これらの方法では発癌初期の少数細胞に存在するp53の変異の検出や治療実験の過程でp53変異細胞の数をモニターすることは困難であった。最近、出芽酵母を用いたヒトp53の機能的変異検出法が開発され、高感度なアッセイ系として注目されている。この方法は、1) p53蛋白がレポーター遺伝子のエンハンサーに結合する能力を指標としており、2) レポーター遺伝子である酵母のアデニン代謝酵素遺伝子ADE2の転写が起こるか否かによってp53の機能を酵母の色の变化で判定できるものである。このため、3) 変異p53のmRNAが少ない細胞や組織においてもp53の変異が検出

可能であり、4) 多数のサンプルを簡単・迅速・鋭敏に調べることができる。この方法は、動物の発癌モデル等の実験にも極めて有用な方法と考えられるが、ヒト以外の動物に使用できるp53の機能的変異検出法は未だ作製されていない。そこで本研究では、発癌・悪性化進展および癌の治療・予防モデルとして頻用されているラットにおける癌抑制遺伝子p53の機能的変異検出法を確立し、その有用性について検討した。

【方法と結果】

正常ラット (WKA) の肝組織から全RNAを抽出し、RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法によりラットp53 cDNA (約1.2kb) を増幅した。一方、酵母内ヒトp53発現プラスミドpLS72を制限酵素で消化ヒトp53 cDNAを除去した。これにラットp53 cDNAを組み込み、ラットp53発現プラスミドpLSRP53を構築した。このプラスミドが酵母内で正常にラットp53蛋白を発現し、正常な酵母コロニーの色 (白) となるか否かを確認するため、これを酵母に導入した。その結果、全て正常の白色コロニーとなった。次にラットp53 cDNAの中央にあるDNA結合ドメイン (約800bp) を制限酵素で除去し、ギャップを有する線状プラスミドを作製し、1) ラットp53に人為的変異を起こさせたPCR産物と共に、あるいは2) 正常ラット肝由来p53のPCR産物と共に酵母に導入した。酵母内では遺伝子の相同組換えによるギャップ修復が起こり、p53 cDNAが組み込まれた環状プラスミドが自然に再構築される。それにより、発現したp53蛋白が酵母染色体上のp53認識DNA配列

(RGC)に結合し、下流のADE2遺伝子の転写を活性化するかどうかをコロニー色(赤:変異型p53/白:野生型p53)で判定した。この実験により1)では98%のコロニーが赤色、2)では91%のコロニーが白色になり、アッセイ系の特異性が実証された。次に、このアッセイのバックグラウンドおよび検出感度について検討を行った。ラット各正常組織(9種類)から全RNAを抽出後、RT-PCR法にてp53 cDNAを増幅し、酵母機能アッセイを行った。この結果、赤コロニーの割合がすべてにおいて10%以下であり、ヒトの系と同様のバックグラウンドレベルであった。また、検出感度の解析において正常p53(正常組織由来)と変異p53(癌細胞由来)のPCR産物を種々の比率で混ぜ合わせて酵母機能アッセイを行ったところ、変異p53産物の比率は赤コロニーの比率とほぼ完全な相関を示した。そこで、30種類のラット培養癌細胞株についてこの方法を用いてp53の変異の解析を行った。また、赤コロニーからプラスミドを回収し、p53の遺伝子変異の同定を行った。その結果、赤コロニーの割合がバックグラウンドレベルのものは20例、50%前後レベルのものが3例、100%前後レベルのものが7例とな

り、大きく3群に別れた。100%前後レベルのものについてはLOH(ヘテロ接合性の消失)を伴う変異型p53を持つ細胞株と考えられたが、50%前後のものについてその遺伝型を調べるため、その細胞株から得られた29サブクローンの酵母機能アッセイとgenomic DNA sequencingを行った。この結果、これらの細胞株は野生型/変異型のヘテロ接合体であることが示された。以上より、この研究で確立したラットp53の酵母を用いた機能的変異検出法が単に機能的異常を見出すのに有用であるばかりでなく、p53の遺伝型をも簡便に決定するのに有用であることが示された。

【ま と め】

ラットp53遺伝子の生物学的に意味のある機能的変異を検出するバイオアッセイ法を確立した。このアッセイ系は酵母を用いた新しい分子生物学的手法であり、細胞株においては簡便にp53の遺伝型を解析する上でも有用である。また、感度、特異性に優れており、発癌実験系への応用にも可能である。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

p53遺伝子は癌関連遺伝子中で最も変異が報告されている癌抑制遺伝子の一つである。最近開発されたヒトp53の酵母アッセイ系は、p53の機能的変異を酵母コロニーの色彩の変化でスクリーニングできる非常に優れた解析法として注目されている。一方、癌研究において実験動物をもちいた研究は不可欠であり、発癌、転移機構の解明や癌治療の開発等に用いられ、遺伝子レベルでの検索も行われているが、実験動物に応用できる酵母アッセイ法は未だ確立されていない。そこで本研究は、実験動物であるラットのための酵母アッセイ法を確立し、その特異性・検出感度・定量性およびp53遺伝型の解析法としての有用性について検討した。

研究結果は以下のごとくである。

1. 1)ラット正常肝臓よりRT-PCR法によりラットp53 cDNAのクローニング、2)酵母内ラットp53発現ベクター(pLSRP53)の作成、3)レポーター用酵母に対す

る導入実験を行い、これらより本アッセイ法は、野生型p53:白コロニー、変異型p53:赤コロニーの色の変化により判明できる特異性を得た。

2. 本アッセイ法のバックグラウンドレベルは10%以下であり、ヒトの系とほぼ同様な結果であった。また、検体中に含まれる変異型p53 cDNAの比率と酵母アッセイの赤コロニーの比率は高い正の相関関係を示した($r^2=0.999$)。このことより本アッセイ法が鋭敏な検出感度、優れた定量性があることが示された。

3. 培養細胞株においてp53の解析を本アッセイ法をもちいて試みたところ、赤コロニー率がバックグラウンドレベル、50%前後レベル、100%レベルの3者に示され、それぞれ野生型のホモ、野生型と変異型のヘテロ、ヘテロ接合性の喪失を伴う変異型3通りの遺伝型に対応することが証明された。