

氏 名 (本籍) なが しま ふみ お
長 島 文 夫

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 博 第 1 4 5 0 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 10 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科
(博 士 課 程) 内 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine
(MNNG) 耐 性 CHO 細 胞 の ミ ス マ ッ チ 修 復 欠 損

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 豊 田 隆 謙 教 授 小 野 哲 也

教 授 安 井 明

論文内容要旨

研究目的

チャイニーズハムスター卵巣由来細胞を用いて MNNG 耐性細胞からミスマッチ修復欠損株を単離、同定し、その性質を解析する。

方法および結果

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 由来の 43-3B 株 (ヌクレオチド除去修復欠損株) を用いて MNNG 耐性細胞を多数単離した。無作為に選んだ 13 の MNNG 耐性細胞はアルキル化剤である ACNU に対して抵抗性を示さないことからアルキル化グアニンの修復酵素であるアルキルトランスフェラーゼの活性亢進による MNNG 耐性ではないと考えられた。そこで以下の検討を行った。(a) ミスマッチ DNA 結合活性をみるためにゲルシフトアッセイを行うと、N5-2 株は GT ミスマッチ DNA と 3 ベースループ DNA に結合する MutS α に相当するバンドのみが欠損していたため、MutS α を構成する GTBP 蛋白 (MSH6 の産物) が欠損していることが示唆された。H5-1 株は 3 ベースループ DNA に結合する MutS β に相当するバンドのみが欠損しており、MutS β を構成する MSH3 蛋白が欠損していることが示唆された。(b) ミスマッチ修復能を測定するために、Kunkel の方法を用いて MNNG 耐性細胞のミスマッチ修復活性を測定した。親株の 43-3B 細胞のミスマッチ修復活性値が 70% であるのに対し、解析した MNNG 耐性細胞でミスマッチ修復活性値が 0~47% と低下していた。(c) CA 繰り返し配列の変異頻度を調べるために、CA 繰り返し配列を含むプラスミドを作製し、MNNG 耐性細胞に導入してその変異を検出する系を構築した。親株では突然変異頻度が 9% であるのに対し、MNNG 耐性細胞では 19.1~41% と親株に比べて上昇していた。(d) 点突然変異頻度を調べるために、MNNG 処理で変異を誘発し、ウアバイン耐性に変異した細胞の出現をコロニー形成能で調べた。親株では点突然変異頻度の上昇率は 1.5 倍であった。H5-1 株では 1.7 倍とほとんど変化がみられないが、それ以外の MNNG 耐性株では 2.1 倍~76.2 倍と高くなっていた。これらの結果から解析した 13 の MNNG 耐性細胞ではミスマッチ修復過程に異常があることが強く示唆され、ミスマッチ DNA 結合能が正常である変異株も存在することが示唆された。

また、単離したミスマッチ修復欠損株同士を融合させて MNNG 感受性の回復を指標として、相補性群に分類しようと試みると、その一部が相補性群を形成していた。

ゲルシフトアッセイの結果から N5-2 株は GTBP 蛋白 (MSH6 の産物) が欠損していると考えられたため、抗 GTBP 抗体を用いて発現を検出するとシグナルは見られず、GTBP 蛋白欠損が

確認された。ヒト GTBP 遺伝子の発現コンストラクトを作り、この株に導入したが、導入細胞のミスマッチ DNA 結合活性と MNNG 感受性は回復しなかった。しかし、GTBP 蛋白の発現はみられ、*in vitro* のミスマッチ修復活性も 16% から 88% までに回復した。これはミスマッチ修復欠損細胞に正常な遺伝子を導入して相補した初めての例である。

また、単離した細胞の紫外線感受性を調べると、親株と変わらないかあるいは感受性の亢進がみられた。シスプラチンに対しては細胞株によって、親株と比べて感受性の亢進がみられたもの、変化ないもの、低下したものと様々な変化がみられた。GTBP 欠損の N5-2 株では紫外線感受性が亢進していた。これらの結果は、ミスマッチ修復が紫外線やシスプラチンの損傷を基質として働き、生存率に影響を与えていることを示唆している。

ま と め

- (1) 単離して解析を行った 13 の MNNG 耐性細胞はミスマッチ修復過程に欠損がある。
- (2) 単離したミスマッチ修復欠損細胞にはミスマッチ DNA 結合能が正常であり、結合後のプロセスに異常がある新しい変異株が存在することが示唆された。
- (3) N5-2 株は GTBP 欠損であることを同定し、ヒトの GTBPcDNA を導入してミスマッチ修復活性が相補されることを初めて示した。
- (4) ミスマッチ修復およびヌクレオチド除去修復の欠損株（二重欠損株）を用いることでミスマッチ修復が紫外線による損傷を基質としていることが示唆された。

審査結果の要旨

本研究はチャイニーズハムスター卵巣（CHO）由来細胞を用いて MNNG 耐性細胞からミスマッチ修復欠損株を単離，同定し，その性質を解析したものである。ヒトを含む真核生物ではミスマッチ修復のメカニズムに関しては不明な点が多い。これを解明するためには，哺乳動物細胞から多くのミスマッチ修復欠損細胞を単離し，系統的に修復欠損細胞を解析する必要があると考えられる。ミスマッチ修復に関しては，これまでに HNPCC 患者由来の細胞を中心に欠損細胞が樹立され研究に用いられてきたが，系統的にミスマッチ修復欠損細胞が単離，解析されたことはない。そこで，CHO 由来の 43-3B 株（ヌクレオチド除去修復欠損株）を用いて，MNNG に耐性となる変異株を単離することとした。単離した MNNG 耐性細胞の細胞抽出液によるミスマッチ DNA 結合活性（ゲル移動度シフト法），*in vitro* ミスマッチ修復活性（Kunkel の方法），突然変異頻度を調べると，解析を行った 13 の全ての MNNG 耐性細胞はミスマッチ修復過程に何らかの欠損があることがわかった。そのうち 2 株はミスマッチ DNA 結合活性が欠損しており，その 1 株は GTBP（GT mismatch binding protein）欠損であった。この GTBP 欠損株にヒトの GTBP cDNA を導入することにより，*in vitro* ミスマッチ修復活性が相補できた。これはミスマッチ修復欠損細胞に正常な遺伝子を導入して相補したはじめての例である。単離したミスマッチ修復欠損細胞にはミスマッチ DNA 結合活性が正常であり，結合後のプロセスに異常があると考えられる新しい変異株が存在することが示唆された。さらに，単離したミスマッチ修復欠損細胞同士を融合させて MNNG 感受性の回復を指標として，相補性群に分類しようと試みると，その一部が相補性群を形成していた。また，単離，同定したミスマッチ修復欠損細胞はヌクレオチド除去修復とミスマッチ修復の二重欠損細胞となり，これまでに，このような株は単離されたことはない。GTBP 欠損が確認されたこの変異株では紫外線感受性が亢進していることから，ミスマッチ修復にも紫外線損傷の修復能力があることが示唆された。以上の内容から，本研究は独創的な手法を取り入れたもので，新しい知見を得ており，学位論文に値すると考えられる。