

## 生化学部門 Department of Biochemistry

生命の存続は永い進化の過程を経て遺伝情報の維持を通して行なわれてきた。ヒトをはじめとした酸素に依存する好氣的生物にとって、遺伝情報を担う DNA やその前駆体であるヌクレオチドがミトコンドリア内での呼吸や酸化還元反応の過程で発生する活性酸素によって酸化されるのは避けられない宿命である。活性酸素によって DNA 並びにヌクレオチド中に生じる酸化型グアニン残基である 8-オキシグアニン (8-oxo-G) は、DNA 複製の過程で通常のシトシン残基のみならず同程度の効率でアデニン残基とも対合し、結果的に AT→CG 及び GC→TA のトランスポージョン型変異を引き起こすことから、自然突然変異の主要な原因と考えられている。ヒト細胞内での 8-オキシグアニンの含量は、老化に伴い核並びにミトコンドリアの DNA 中で蓄積的に増加することが示され、老化の主要な原因の一つと認識されるようになった。老化に伴うヒト疾患の中で、癌は遺伝子に生じる突然変異が原因であることが明らかにされているが、多くの発癌が DNA の酸化に起因する突然変異による可能性も考えられる。さらに脳・神経系の疾患であるパーキンソン病やアルツハイマー病などについても、活性酸素による細胞傷害に伴う神経細胞の変性死が原因であると考えられる。

生物がこのような DNA やヌクレオチドの酸化に起因する DNA 傷害を防止あるいは修復する精緻なシステムを保持していることは、自然突然変異の頻度が上昇した大腸菌のミューター遺伝子の研究から明らかにされてきた。当部門ではヒト及び哺乳動物における「酸化的 DNA の傷害の防止と修復機構」の解明、並びにこれら機構の異常がもたらす分子病態の解明を目指して研究を進めている。これまでにヒトをはじめとする哺乳動物から 3 つの遺伝子 (*MTH1*, *MYH*, *OGG1*) をクローン化し、その遺伝子産物の機能解析を進めるとともに、標的遺伝子組換えの手法を用いて各遺伝子の欠損マウスを作出し、遺伝子異常に伴う分子病態の解析を進めている。さらにヒトの老化に伴う遺伝子疾患の原因解明の観点から、臨床系の研究室とも共同してヒト集団における遺伝子の異常のスクリーニングを広範囲に進めている。

この他、突然変異を引き起こす様々な DNA 損傷の中でアルキル化 DNA 損傷についても、ミスマッチ修復、組換え修復さらには DNA 損傷度認識・排除機構との相互作用を視野に入れた分子生物学的解析から欠損マウスの作出・分子病態の解明に至る広範な研究を展開している。平成 8 年度から 2 年間、文部省より国際学術共同研究として「標的遺伝子組換えの迅速・簡便法の開発」が採択されたのを機会に、カナダのカルガリー大学医学部医化学教室の Derrick E. Rancourt 博士、並びにオタワ大学医学部薬理学教室の George S. Robertson 博士らのグループと共同研究を進めている。

人事異動は次の通りであった。平成 8 年 3 月 31 日付で、当部門の主任教授関口睦夫が停年退

官した（現所属：福岡歯科大学）。また同日付で事務補佐員の河手朋子，実験補助員の川畑万寿代が退職した。臨床系大学院生の河手久弥（第3内科），武富紹信（第2外科）が医学博士の学位を取得し退学した。河手久弥は4月1日付で研究生として入学後，8月1日付で非常勤研究員に採用され当部門で引き続き研究を進めている。学術振興会特別研究員の白石明子は3月31日で満期を迎え，4月1日付で研究生として入学した。雨宮真美が4月1日付で事務補佐員に採用された。中国からの訪問研究員である蔡剣平が6月1日付でSRLに就職した，5月1日から福岡歯科大学生物学教室助手の下川英俊，伊東理世子の両名が，また同教室講師の真田正幸が9月17日から共同研究員として当部門の研究に加わった。10月から臨床系大学院生西岡憲一（第2外科），理学部生物学科4年生松田修が当部門において共同研究に従事している。フランスのストラズブルにあるCNRSに留学中の古市正人は，4月から米国テキサス大学MDアンダーソン癌研究所に移り研究を継続中である。

## A. 酸化的 DNA 傷害の防止と修復機構

### a. 哺乳動物の MTH1 蛋白質，遺伝子の発現の解析

#### (1) MTH1 遺伝子の発現と細胞内局在の制御機構

これまでのヒト培養細胞株を用いた解析から，ヒト *MTH1* 遺伝子は5つの主要なエクソンからなり，エクソン1が1aと1b，エクソン2が2a，2b，2cの3つのセグメントから構成され，これらの択一的スプライシングにより7種類の mRNA をコードすることを明らかにしてきた（論文投稿中）。このうち3種類の mRNA の5'-領域には上流に in frame で新たな翻訳開始コドンが2つ存在し，それぞれの mRNA の *in vitro* 翻訳で3つのポリペプチド（18，20，23kDa）が翻訳された。以前クローニングした *MTH1* cDNA にコードされる 18kDa の MTH1 蛋白質に対する抗体を用いたヒト細胞抽出液のイムノプロットティングや免疫沈降によっても同じサイズの3つのポリペプチドが検出されることから，上流の ATG から翻訳されるポリペプチドが *in vivo* で実際に発現していると考えている。量的には 18kDa の蛋白質が9割程度を占める。MTH1 蛋白質は主に細胞質とミトコンドリアに局在するが，ミトコンドリア局在の機構は不明である。これら上流の ATG から翻訳されるポリペプチドの持つリーダーペプチドのいずれかが細胞内局在の制御に関与する可能性を考え現在解析を進めている。

#### (2) ヒト癌患者で見られる変異 MTH1 蛋白質の機能異常の解析

MTH1 蛋白質の機能異常はヌクレオチドプール中の 8-oxo-dGTP 含量の増加をもたらし，突然変異ひいては発癌頻度の上昇につながる事が予想される。我々は *MTH1* 遺伝子の異常が発癌の遺伝的要因の1つになり得ると考え，ヒト *MTH1* 遺伝子の構造解析を進めるとともに健康人および癌患者を対象に *MTH1* 遺伝子異常のスクリーニングを行っている。昨年までに *MTH1* 遺伝子の構造解析を中心に進め，*MTH1* 遺伝子がおもに5つのエクソンからなること，エクソン3，4，5がコーディングエクソンであることを明らかにした。さらに，その塩基配

列に基づいてエクソン 3, 4, 5 の異常を PCR-SSCP 法で検索するシステムを構築した。

今年度は肝細胞癌患者104例, 肺癌患者186例の癌部および非癌部組織から調製したゲノム DNA と, 健常人400例の血液から調製したゲノム DNA を用いて PCR-SSCP-塩基配列決定により *MTH1* 遺伝子異常のスクリーニングを実施した。その結果 *MTH1* 蛋白質の83番目のアミノ酸が異なる2つの *MTH1* 対立遺伝子 *Val*<sup>83</sup> (GTG) と *Met*<sup>83</sup> (ATG) を見出した。それぞれの *MTH1* 対立遺伝子の頻度は, 健常人で (*Val*<sup>83</sup>:*Met*<sup>83</sup>=0.909:0.091), 肝細胞癌患者 (*Val*<sup>83</sup>:*Met*<sup>83</sup>=0.880:0.120), 肺癌患者 (*Val*<sup>83</sup>:*Met*<sup>83</sup>=0.911:0.089) であった。健常人400名 (男性:254名, 女性:117名, 不明:29名) 中3名が *Met*<sup>83</sup> のホモ接合体であったが, それぞれ36歳 (男性), 38歳 (男性), 42歳 (女性) であった。一方肝細胞癌患者104名 (男性:84名, 女性:20名) 中に2名 (女性:57歳, 65歳), 肺癌患者186名 (男性:125名, 女性:6名) 中に2名 (男性:70歳, 68歳) の *Met*<sup>83</sup> のホモ接合体が検出された。肝細胞癌及び肺癌患者の年齢分布は, 9割以上が50歳以上であった。健常人グループには50歳以上の男性94名, 女性50名 (計144名, 36%) が含まれるが, この年齢層には *Met*<sup>83</sup> のホモ接合体は検出されていない。以上から *Met*<sup>83</sup> のホモ接合体は高齢において高発癌リスクを示す可能性が示唆されるが, この可能性を証明するにはさらに大規模のスクリーニングが必須と考える。肝細胞癌患者の場合20名の女性患者中の10%に当たる2名が *Met*<sup>83</sup> のホモ接合体であるが, *Met*<sup>83</sup> のホモ接合体の女性は特に肝細胞癌のリスクが高い可能性が示唆される。

*Met*<sup>83</sup> のホモ接合体癌患者の癌組織で発現する *MTH1* 蛋白質は, SDS-PAGE での移動度の異なるヘテロな分子種として検出され, ヒト細胞では *Met*<sup>83</sup>-*MTH1* 蛋白質の発現あるいは修飾が変化している可能性が示唆された。また *Met*<sup>83</sup>-*MTH1* 蛋白質の非癌部組織での発現レベルは *Val*<sup>83</sup>-*MTH1* の発現レベルよりかなり低く, *Met*<sup>83</sup>-*MTH1* 蛋白質は不安定である可能性が示唆された。*Met*<sup>83</sup>-*MTH1* 蛋白質を大腸菌で発現, 精製した後その酵素活性, 二次構造の安定性について解析を進めた。*Met*<sup>83</sup>-*MTH1* 蛋白質はその高次構造および活性ともに *Val*<sup>83</sup>-*MTH1* 蛋白質に比較して熱に不安定であることが明らかになった。*Met*<sup>83</sup> のホモ接合体は 8-oxo-dGTP の浄化能が低下している可能性が示唆され, その結果自然突然変異率が上昇し発癌リスクを押し上げている可能性が考えられる。

この他, 肺癌患者からアミノ酸配列の変化を伴う新しい2つの *MTH1* 遺伝子の生殖細胞系列での変異を見出した。1つの変異 *MTH1* 遺伝子では, 開始コドン ATG が GTG に変化していた。もう一つの変異 *MTH1* 遺伝子ではエクソン4での18塩基の重複が見られ, 6アミノ酸 (65-70) が重複した変異 *MTH1* 蛋白質がコードされる。これらの変異蛋白質についても, その構造と活性について解析を進める必要がある。

### (3) *MTH1* 蛋白質の構造と機能解析

大腸菌からヒトに至るまで生物界には 8-oxo-dGTPase 活性を有する MutT/*MTH1* 蛋白質が広く存在することが明らかになってきた。これまで調べられた MutT/*MTH1* 蛋白質には種

を越えてアミノ酸配列が保存されている領域（23個のうち10個のアミノ酸配列が同一）があり、酵素活性にとって重要な役割を果たすと予想される。我々は、このような一次配列構造が酵素の機能にとってどの程度重要であるのかを明らかにする目的で、ヒトの MTH1 蛋白質に関して変異蛋白質を作製して解析を進めた。我々は大腸菌の MutT 遺伝子変異株にこのような変異蛋白質をコードする cDNA を導入し、ミューテーター表現型を抑制する活性をモニターすることで変異蛋白質の機能を解析するシステムを構築した。このシステムを用い、特定の 1 アミノ酸置換により機能を喪失した変異蛋白質をコードする cDNA の変異部位に再度新たな変異を導入し、結果として機能回復につながる復帰変異を単離して詳細に解析した。今回調べた 4 つのアミノ酸（Lys-38, Glu-43, Arg-51, Glu-52）については、ヒトの 8-oxo-dGTPase 活性にとっては必須の配列であることが明らかになった。現在この他の種を越えて保存されたアミノ酸配列等についても解析を行っている。

#### （4）マウス *MTH1* 遺伝子の解析

マウスの *MTH1* 遺伝子の塩基配列を決定し（D88355, D88356）、プロモーター領域の解析を行った。プロモーター活性を有する最小領域並びに転写開始部位を同定し、第 1 イントロン内にエンハンサー活性を有する配列が存在することを認めた。

#### b. 酸化的 DNA 傷害の修復酵素の解析

自己のゲノム DNA とその遺伝情報の安定な維持のために、生物は DNA やヌクレオチドの酸化に起因する DNA 損傷を防止あるいは修復するシステムを備えていることが、自然突然変異頻度の上昇した大腸菌のミューテーター変異株の研究から明らかにされてきた。*mutM*, *mutY* ミューテーターの研究から、DNA 中の 8-oxo-G : C 対合を認識して 8-oxo-G を除去する MutM 蛋白質と、8-oxo-G : A 対合を特異的に認識してアデニンを除去する MutY 蛋白質が、ゲノム DNA 中に生じた 8-oxo-G の関与する G:C→T:A トランスバージョンを抑制することが明らかにされている。これら 2 つの蛋白質は、原核生物では広範に存在していることがゲノムプロジェクトから明らかにされており、我々は高等植物（シロイヌナズナ）で少なくとも MutM ホモログが存在することを cDNA およびゲノム遺伝子のクローニングから証明した。しかしながら、酵母では MutM とはホモロジーのない酵素が同様の修復活性（8-oxo-G DNA glycosylase : OGG）を持つことが報告され、真核生物では複数の異なる修復系が機能している可能性が示唆されている。

我々は、哺乳動物細胞における酸化的 DNA 損傷の修復に関わる酵素系として、(1) DNA 中の 8-oxo-G : C 対合を認識して 8-oxo-G を除去する 8-oxo-G DNA glycosylase (OGG) と、(2) 8-oxo-G : A 対合を特異的に認識してアデニンを除去する adenine DNA glycosylase (MYH) に集中して研究を進めている。これまでにヒト培養細胞株においてこれら 2 つの DNA 修復酵素活性の存在を確認、現在精製を進めそれぞれの機能分子の大きさを 60kDa, 45kDa と求めて

いる。さらに大腸菌や酵母の遺伝子とのホモロジーに基づいたスクリーニングを行い、MYH 蛋白質 (MYH: MutY Homologue) をコードするヒト cDNA クローンと、OGG 蛋白質をコードするヒト cDNA を複数単離した。それぞれスプライシングの違いからアミノ末端やカルボキシ末端のアミノ酸配列が異なる複数の蛋白質がコードされる。現在これらの cDNA のコードする蛋白質とヒト細胞から精製された酵素の修復活性について解析を進めている。また、すでにマウス cDNA と遺伝子もクローニングしており、標的遺伝子組換えによる遺伝子欠損マウスの作製を進めている。

### c. 遺伝子変異と発癌との関連に関する解析—*MTH1* 遺伝子欠損マウスの樹立と解析

これまでの研究の結果、酸素による遺伝子 DNA 上の傷害の中で、活性酸素によって生じる 8-オキシグアニンが自然突然変異の生起に大きく影響し、それを防止する 8-oxo-dGTPase (遺伝子名: *MTH1*) 等の酵素系が哺乳動物においても DNA 上の傷害防止に極めて重要な役割を果たしていることを明らかにした。活性酸素に伴う DNA 上の傷と自然突然変異および発癌の関連を明らかにし、その過程を分子レベルで解明することを目的に、標的遺伝子組換えの手法により *MTH1* 遺伝子の変異細胞・変異マウス系統を樹立して解析することを進めている。マウスの染色体 DNA を単離してターゲティング・ベクターを構築し、マウス ES 細胞に導入後ポジティブ・ネガティブ選別で生えてきたコロニーを解析し、目的とする複数の細胞クローンを得た。これら細胞株をマウスの胚盤胞に導入し、キメラマウスを経て変異マウスを樹立した。得られた変異マウス系統 (ヘテロ・ホモ) は外見上明らかな異常は認められないが、現在自然観察 1 年 6 ヶ月の時点でマウス個体 (*MTH1*<sup>-/-</sup> マウス雌雄各 40 匹, *MTH1*<sup>+/+</sup> マウス雌雄各 25 匹を対照群として) における発癌の解析を進めている。

## B. アルキル化 DNA 損傷の修復機構

環境中に存在する物質や生体内の正常な代謝過程で生じる物質の中には、DNA をメチル化しそれが突然変異や発癌を引き起こす原因となり得るものがある。DNA 中に生じたアルキル化塩基の中でグアニンの 6 位の酸素がメチル化された O<sup>6</sup>-メチルグアニンは複製の際にシトシンのみならずチミンとも塩基対を形成するために、G:C→A:T のトランジション型の突然変異を誘発することが知られている。このような損傷に対して生物は修復酵素 O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT) を保持して対処している。この酵素は DNA 中の O<sup>6</sup>-メチルグアニンを特異的に認識し、そのメチル基を酵素の活性部位に存在するシステイン残基に転移することにより、一段階の反応で修復を完了することができる。メチル基を受け取った酵素分子は不可逆的に不活化されるので、この機構による修復の効率性は細胞内の酵素分子の数に依存することになる。またヒトの癌由来の細胞株の約 20% は、このメチルトランスフェラーゼ活性を欠き、アルキル化剤に対して高感受性であることが知られており (Mer<sup>-</sup>),

この修復酵素欠損と発癌の関連が注目されている。

突然変異と発癌抑制におけるこの酵素の意義を明確にするために、標的遺伝子組換えの手法を用いてこの酵素を欠く細胞株並びに変異マウス系統を樹立し研究を進めた。

#### a. 遺伝子変異と発癌との関連に関する解析

##### (1) *MGMT* 遺伝子のターゲティング

マウスの ES 細胞由来の遺伝子ライブラリーから単離した染色体 DNA を用いて、*MGMT* 遺伝子の第 2 エクソンの翻訳領域内に G418 耐性のマーカーを挿入するターゲティング・ベクターを構築した。これをマウス ES 細胞に導入後、ポジティブ・ネガティブ選別で生えてきたコロニーの DNA をサザンブロット法で解析し、目的とする複数の細胞クローンを得た。この時のターゲティングの効率は約 20% であった。

##### (2) *MGMT* 遺伝子欠損マウスの樹立

得られた ES 細胞（ヘテロ接合体：*MGMT*<sup>+/-</sup>）をマウスの胚盤胞に導入することによりキメラマウスを作製した。生殖系列細胞への変異の伝播を確認後、交配により *MGMT* 遺伝子の対立遺伝子の片方（ヘテロ接合体：*MGMT*<sup>+/-</sup>）あるいは両方（ホモ接合体：*MGMT*<sup>-/-</sup>）に変異をもつマウス系統を樹立した。ヘテロ接合体同士の交配で得られた 96 匹中ホモの遺伝子型を有する個体は 23 匹で、この数はメンデルの遺伝様式から予測される値にほぼ近いものであった。*MGMT* 遺伝子欠損マウス（ホモ接合体：*MGMT*<sup>-/-</sup>）はほぼ正常に生育するが、生後 6 週目において平均体重で正常型マウス（*MGMT*<sup>+/+</sup>）が 22.6g であるのに対して、遺伝子欠損マウスでは 19.2g と約 85% であった。

##### (3) *MGMT* 遺伝子欠損マウスのアルキル化剤に対する感受性の解析

*MGMT* 遺伝子欠損マウスは、アルキル化剤に対して高感受性を示し、50mg/kg 体重のメチルニトロソウレア（MNU）の腹腔内投与によって 17 日以内に死亡した。一方、正常な *MGMT* 遺伝子を持つマウスに同じ量の MNU を投与した場合は、少なくとも 90 日間は全部のマウスが生存している。このことはマウス個体がアルキル化剤によって引き起こされる DNA 傷害の除去に対して、如何にメチルトランスフェラーゼに依存しているのかを示しているものと思われる。*MGMT* 遺伝子欠損マウスでは、MNU 投与後数日のうちに脾臓・胸腺の萎縮、骨髄の空洞化と血液中の白血球・血小板の著明な減少が認められた。MNU の投与により *MGMT*<sup>-/-</sup> マウスにおいて血球系・免疫系の細胞を供給する幹細胞が障害を受け骨髄抑制を来し、「免疫」能の低下を伴って個体の死の原因になっていると考えることができる。また小腸・大腸 2 つの消化管で MNU による粘膜の顕著な変化として、腺窩膿瘍（crypt abscess）や nuclear atypia（不定形の核）を認め、栄養不良も死因の一つと考えられた。現在樹立した *MGMT* 遺伝子欠損マウスを用いて、DMNA 処理並びに低濃度の MNU 処理によるアルキル化剤誘導発癌について解析を進めている。

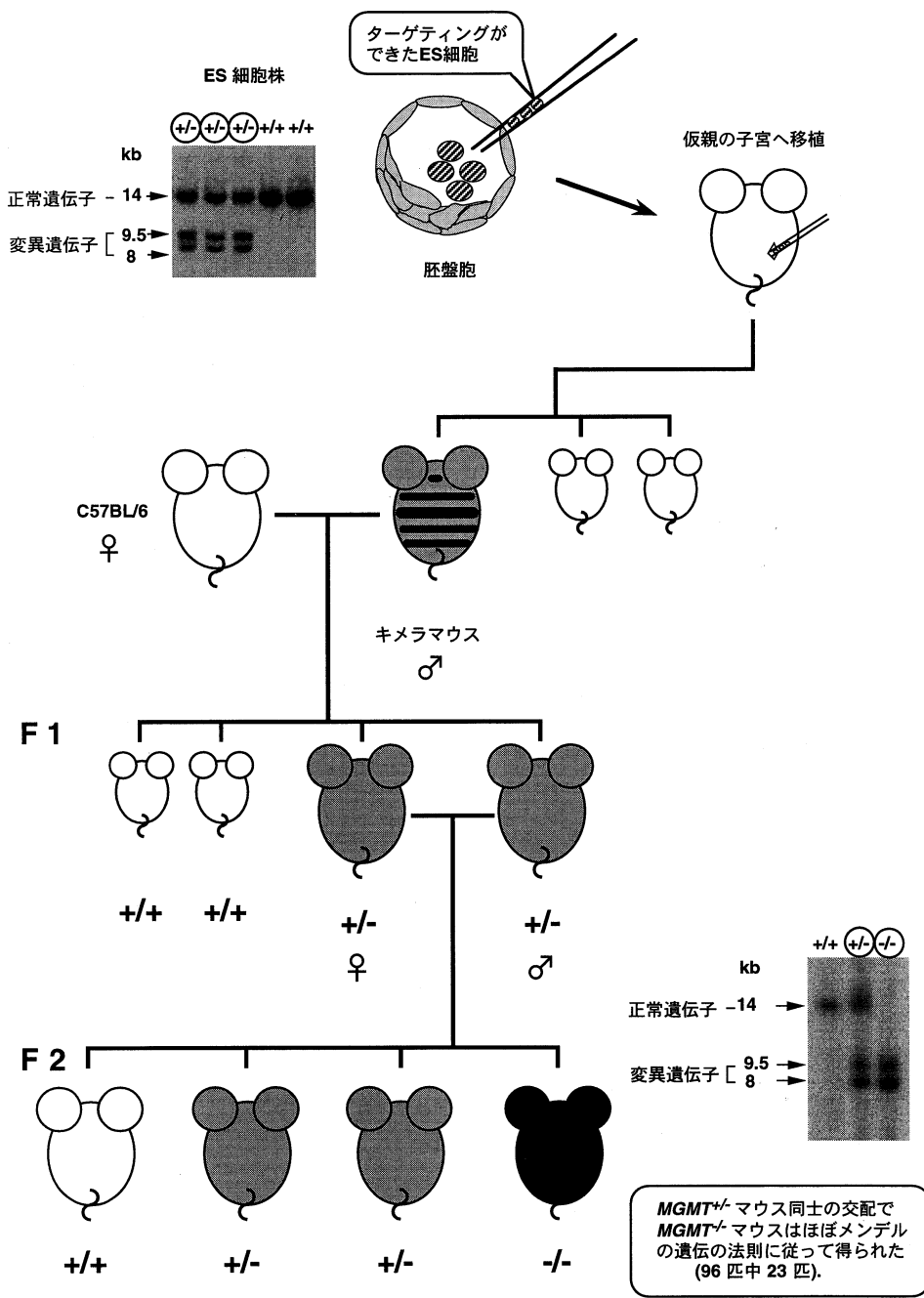


図 B1 *MGMT* 遺伝子欠損マウスの樹立

## b. MGMT 遺伝子欠損細胞の樹立と解析

a. (1) で得られた細胞株（ヘテロ接合体）を用いて、G418 の濃度を上昇させて得られる高濃度耐性細胞をスクリーニングし、ホモ接合体（ダブルノックアウト： $MGMT^{-/-}$ ）細胞株を樹立した。DNA 中に  $O^6$ -メチルグアニンを生ずるアルキル化剤である MNU 並びに MNNG に対する感受性を調べた結果、正常細胞・ヘテロ細胞株と比較してホモ細胞株はこれら薬剤に対して極めて高い感受性を示した。更に *hprt* 遺伝子座での突然変異頻度（6-TG 耐性コロニーの出現頻度）を解析し、低濃度の MNNG 処理によりホモ細胞株では正常細胞株に比べて約30倍の突然変異頻度の上昇を観察した。さらにホモ接合体細胞では、アルキル化剤処理後2回目の G2-M 期でアポトーシスのプロセスによる細胞死が起こることを認めた。

## C. 組換え修復、ミスマッチ修復、DNA 損傷度認識・排除処理機構との相互作用

### a. Rad51 遺伝子欠損マウスの解析

遺伝的組換え機構に関する研究はこれまで大腸菌の系で詳しく解析がなされており、RecA 蛋白質が最も重要な役割を担っている。RecA 蛋白質、酵母の RAD51 蛋白質は相同な塩基配列を有する2本の DNA 鎖の対合と鎖交換反応を ATP 存在下で触媒している。DNA 修復や組換え反応に重要な役割を果たしていると予想される哺乳動物の RAD51 蛋白質の個体レベルでの役割を明らかにする目的で、*Rad51* 遺伝子欠損マウスの作出を試みた。マウスの *Rad51* 遺伝子は10のエクソンから成るが、ATP 結合モチーフ配列に対応する第5エクソン部分を欠失させるタイプのターゲティング・ベクターを作製し、標的遺伝子組換えの方法により遺伝子欠損マウス系統の樹立を試みた。原核生物の大腸菌、並びに真核生物の酵母においては、*Rad51* 遺伝子と相同な遺伝子を欠損させても細胞は生存可能であることが知られている。相同染色体の片方に目的とする遺伝子欠損を持つマウス個体（ヘテロ： $Rad51^{+/-}$ ）同士の交配では、野生型（ $Rad51^{+/+}$ ）、ヘテロ（ $Rad51^{+/-}$ ）がそれぞれ期待値に近い  $1/4$ 、 $2/4$  の割合で生まれてくるのに対して、ホモ（ $Rad51^{-/-}$ ）個体は1匹も生まれてこなかった。雌雄共に生殖系列の分化に異常がないことから、ホモ（ $Rad51^{-/-}$ ）個体が発生段階の途上で致死的可能性を考え発生初期の胎児解析を行った。

### b. MSH2 遺伝子欠損マウスの樹立

ヒトの癌細胞株の中にはメチルトランスフェラーゼ活性を欠くもの（ $Mer^{-}$ ）が多く存在しており、それらはアルキル化剤に対して高感受性である。樹立した *MGMT* 遺伝子欠損マウスがアルキル化剤に対して高い感受性を示す（B. a. 参照）ことは、細胞並びに個体においてメチルトランスフェラーゼの有無がアルキル化剤に対する感受性を規定していることを明確に示唆する。近年  $Mer^{-}$  細胞において、さらにミスマッチ修復系を欠くことでアルキル化剤の致死作用に対して抵抗性を示す（メチル化寛容）ことが認められている。このようなミスマッチ修



復系欠損細胞におけるアルキル化剤に対する抵抗性の獲得が、真にミスマッチ修復系のみ欠損に起因するとすると、メチルトランスフェラーゼを欠く細胞ではDNA中のO<sup>6</sup>-メチルグアニンとチミンの誤対合がミスマッチ修復系によってプロセスされる結果、細胞死が引き起こされる可能性が考えられる。突然変異抑制機構としてのメチルトランスフェラーゼとミスマッチ修復系との関わりについては、樹立したMGMT遺伝子欠損マウスにミスマッチ修復遺伝子の欠損を導入し、ミスマッチ修復系の喪失がアルキル化剤による細胞死あるいは個体死に及ぼす影響を調べることにより明らかにできると考え、ミスマッチ修復系の一つであるMSH2遺伝子の欠損マウスを樹立した。

### c. p53遺伝子欠損マウスとの交配による二重変異マウスの解析

生物は複数のDNA修復系により突然変異を回避している一方、多細胞生物においては、修復不可能と判断した損傷細胞を積極的に排除する機構が存在する。動物個体での発癌は、DNA修復系・損傷細胞排除系などの生体防御系をまぬがれた細胞でのDNA損傷に起因する突然変異によるものと考えられる。本研究ではDNA修復系欠損マウスと、細胞周期のチェックポイントにおいて重要なp53蛋白質の欠損マウスを交配して得られる二重欠損マウスを用いて、アルキル化DNA損傷が引き金となる細胞死、DNA損傷度のモニタリングによる生体防御の機構を明らかにすることを目指して研究に着手した。DNA修復メチルトランスフェラーゼ欠損並びにp53遺伝子欠損（東京大医科学研究所勝木教授より分与）をもつ二重欠損マウスを用いて、アルキル化剤誘導並びに自然発癌を調べることにより、アルキル化剤投与並びに内因性アルキル化反応によるDNA損傷に起因する突然変異及び発癌を個体レベルで直接解析することができる。メチルトランスフェラーゼ単独欠損マウスでの自然発癌という表現型は、それ程早期には認められていない。メチルトランスフェラーゼ欠損マウスでは異常な細胞の大部分が細胞死の機構で排除されている可能性が考えられ、メチルトランスフェラーゼとp53の二重欠損マウスでは、アルキル化DNA損傷による自然発癌が高くなることが考えられる。そのようなマウスにおける腫瘍での突然変異を解析することで、内因性のアルキル化DNA損傷による個体レベルでの発癌を知る上で有用な情報が得られる。同様な解析手法により活性酸素等の内因性DNA損傷を持つ細胞の排除による生体防御系の役割についても明らかにでき、DNA損傷と発癌・老化の関係を考察できると考えている。

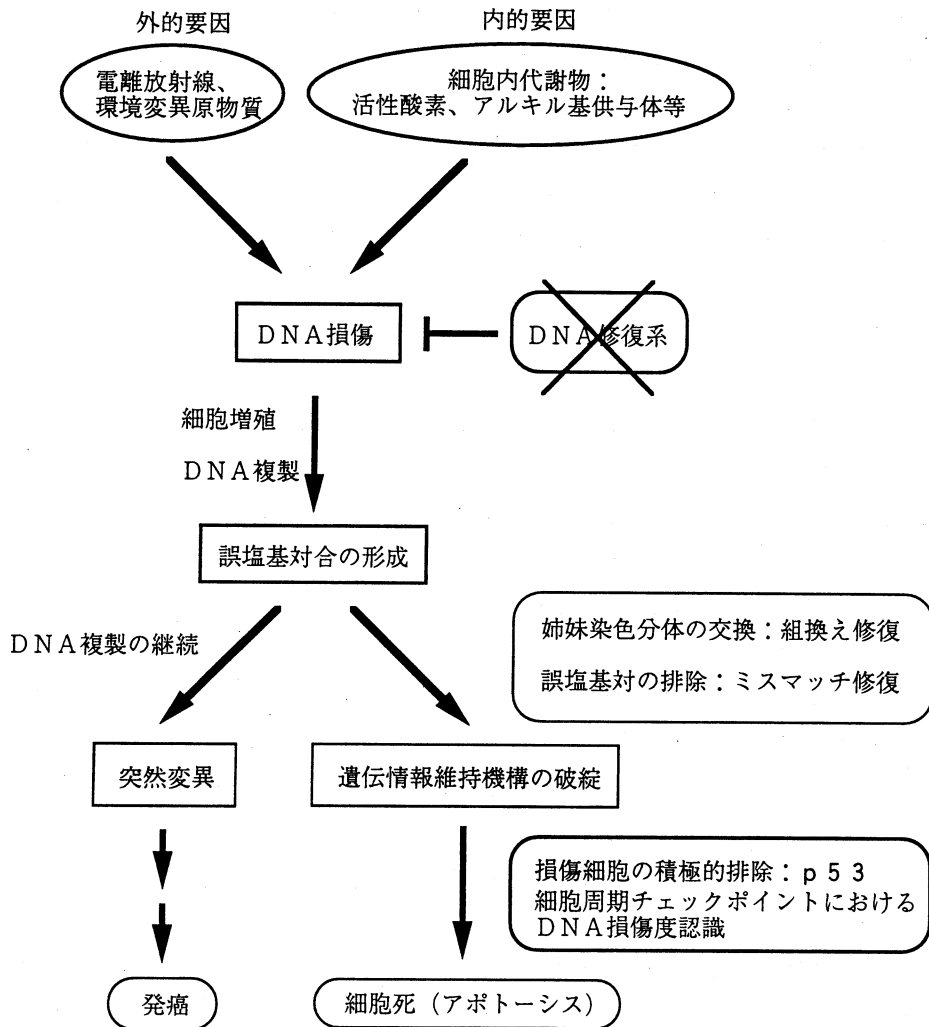


図 C1

#### D. Jun/Fos 核内転写因子の解析

Fos 蛋白質は、塩基性領域とロイシンジッパー (bZIP) 構造を持つ転写因子であるが、同じく bZIP 蛋白質である Jun とロイシンジッパーを介してヘテロダイマーを構成し、古典的な転写因子 AP-1 (Activator Protein-1) として機能する。Fos ファミリー蛋白質には 5 つのメンバー (c-Fos, FosB, ΔFosB, Fra1, Fra2) が存在し、また Jun にも 3 つのファミリーメンバー (c-Jun, JunB, JunD) が存在する。それぞれの Fos, Jun ファミリーメンバー間で多様なヘテロダイマーを形成するが、その転写制御活性は Fos メンバーによって調節されている。Jun, Fos とヘテロダイマーを形成する bZIP 蛋白質は Jun, Fos ファミリー以外にも存在し、かなり

複雑な転写制御ネットワークが存在する。

我々は、FosファミリーのFosBとそのスプライシングバリエーションΔFosBを血清飢餓下のRat1A細胞に過剰発現させると、細胞は増殖サイクルへ移行する事を見出した、この時、AP-1としての転写活性化能を抑制的に制御するΔFosBが、転写活性化能を持つFosBよりも効率よく増殖サイクルへの移行を活性化した。しかし、ΔFosBによる細胞増殖は一回のみで、その後p53の発現上昇をともなって細胞は死滅した。ΔFosBの発現に伴い、細胞はサイクリンE/CDK2のレベルを増加したが、その発現はmRNAの安定化に由来するもので、転写レベルの増加は観察されなかった。ΔFosBが如何なるメカニズムでこのようなmRNAの安定化を導くのか、今後の課題である。一方、FosBはc-Fosと同じようにゆっくりとした細胞の増殖と形態の変化（トランスフォーメーション）を誘導した。ΔFosBによるトランスフォーメーションはFosBやc-Fosより効率が低い、これはアポトーシスの誘導が原因と考えられる。

c-Fos/c-Junにより発現が制御される標的遺伝子は、すでに数多く同定されているが、直接細胞の癌化に関与するものはまだ明らかではない。興味あるのは、c-Mycの標的であるODC遺伝子がc-Fos蛋白質によっても誘導されることである。その発現誘導の機構は不明であるが、細胞のタイプによって誘導されないものもあり、c-Fosによる細胞の癌化に必須かどうかは明らかにされていない。さらに、c-Fos、FosBそしてΔFosBもfosファミリーの*fra1*遺伝子の発現を強く誘導する。c-FosやFosBの場合、*fra1*遺伝子のイントロン1にあるAP1結合配列に依存するようであるが、ΔFosBについては不明である。Fralは、その過剰発現で細胞をトランスフォームする能力をもち、また多くのヒト癌でも発現レベルが高い事が知られている。*fra1*遺伝子の発現がFosファミリーによる癌化に必須かどうか明らかにする必要がある。

#### a. *fosB* 遺伝子の神経系での発現

我々は、核内転写因子Jun、Fosの生理的機能を明らかにする目的で、マウスやラット個体レベルでの発現とその機能について解析を進めてきた。その中で、神経変性においてFosBとΔFosB蛋白質の発現が大きく変化することを発見した。6-ハイドロキシドーパミンやMPTPは線状体の黒質緻密層に存在するドーパミン産生神経に特異的に取り込まれミトコンドリアの酸化障害を引き起こすことによりドーパミン産生神経細胞死を引き起こす。このような黒質緻密層の神経細胞死はパーキンソン病で見られるものと良く似ており、6-ハイドロキシドーパミンやMPTPによって引き起こされる神経細胞死そしてその後の神経機能傷害はパーキンソン病のモデルと考えられている。我々は、FosBとΔFosB蛋白質特異的な抗体を作製し、これを用いた神経組織の免疫染色とイムノブロットングより6-ハイドロキシドーパミン投与ラットの線状体-黒質ニューロンの中でD2ドーパミンレセプターを持つニューロンにFosファミリー蛋白質の中でΔFosB蛋白質のみが長期発現することを発見した。このD2レセプターを発現する神経細胞は6-ハイドロキシドーパミンで変性するドーパミン産生神経の支配下にあり、

ドーパミンにより抑制的に制御されている。そのためドーパミンが枯渇した状態では逆にこの神経は興奮状態にある。恐らく D2 ドーパミンレセプターを持つニューロンの慢性的興奮が  $\Delta$ FosB 蛋白質の発現を引き起こすシグナルとなるようである。MPTP の投与で生じるサルのパキンソン病モデルでも同様に  $\Delta$ FosB の長期発現亢進が見られた。一方、このようなラットに同じく線状体-黒質ニューロンの中でドーパミンで興奮性に制御されている D1 ドーパミンレセプターを持つ神経細胞に D1 アゴニストを長期投与すると、運動機能の異常を引き起こす。この時にも  $\Delta$ FosB の長期発現亢進が見られた。 $\Delta$ FosB の長期発現亢進は神経細胞の長期興奮と関連すると期待される。

#### b. *fosB* 遺伝子発現改変マウスの樹立

*fosB* 遺伝子は、スプライシングの違いにより 2 つの蛋白質をコードする。この 2 つの蛋白質は生物学的機能に関連するものとして、細胞増殖の促進、アポトーシスの誘導、神経系における発現などで顕著な違いが見られる。それぞれの *fosB* 遺伝子産物の個体レベルでの機能を明らかにするために、FosB のみ、あるいは  $\Delta$ FosB 蛋白質のみを発現するようなマウスを標的遺伝子組換えを応用して作製中である。さらに、*fosB* 遺伝子の発現をレポーター遺伝子の発現で簡便にモニターできるようなマウスの作製も進めている。

### E. 標的遺伝子組換えの迅速・簡便法の開発

標的遺伝子組換えの有用性は手法が開発されて 10 年にも満たない現時点で、既に生命科学分野の重要課題である発生・発癌・免疫・神経系など多くの基礎的研究、医学的応用面での研究にも大きく貢献してきている。現在ではレポーター遺伝子の挿入や微細な変異の導入も可能となりさらに応用の幅が広がっているが、標的遺伝子組換えの最初の段階であるターゲティング・ベクターの構築はいまだに時間的な制約となっている。この点を解決しさらに系統的かつ簡便に点突然変異などの微細変異の導入を目的としたターゲティング・ベクターを構築するシステムを開発することを目的に研究を進め、ネガティブ選択マーカーを組み込んだファージ-プラスミドのベクター系を開発した。具体的な応用としては、*fosB* 及び  $\Delta$ *fosB* 遺伝子の発現改変ベクターの作製に着手した (D. b. 参照)。

## 業績目録

### 原著論文

1. Bridges, B.A., Sekiguchi, M. and Tajiri, T. 1996.  
Effect of *mutY* and *mutM/fpg-1* mutations on starvation-associated mutation in *Escherichia coli*: Implications for the role of 7,8-dihydro-8-oxoguanine.  
Mol. Gen. Genet. 251, 352-357.
2. Iwakuma, T., Shiraishi, A., Fukuhara, M., Kawate, H. and Sekiguchi, M. 1996.  
Organization and expression of the mouse gene for DNA repair methyltransferase.  
DNA Cell Biol. 15, 863-872.
3. Otsuka, M., Abe, M., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M. and Suzuki, T. 1996.  
Polymorphism in the human *O<sup>6</sup>*-methylguanine-DNA methyltransferase gene detected by PCR-SSCP analysis.  
Pharmacogenetics 6, 361-363.
4. Taketomi, A., Nakabeppu, Y., Ihara, K., Hart, D.J., Furuichi, M. and Sekiguchi, M. 1996.  
Requirement for two conserved cysteine residues in the Ada protein of *Escherichia coli* for transactivation of the *ada* promoter.  
Mol. Gen. Genet. 250, 523-532.
5. Tsuzuki, T., Sakumi, K., Shiraishi, A., Kawate, H., Igarashi, H., Iwakuma, T., Tominaga, Y., Zhang, S., Shimizu, S., Ishikawa, K., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M. and Sekiguchi, M. 1996.  
Targeted disruption of the methyltransferase gene renders mice extraordinary sensitive to alkylating carcinogens.  
Carcinogenesis 17, 1215-1220.
6. Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y. and Morita, T. 1996.  
Targeted disruption of the *Rad51* gene leads to lethality in embryonic mice.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6236-6240.
7. Yamagata, Y., Kato, M., Odawara, K., Tokuno, Y., Nakashima, Y., Matsushima, N., Yasumura, K., Tomita, K., Ihara, K., Fujii, Y., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M. and Fujii, S. 1996.  
Three-dimensional structure of a DNA repair enzyme, 3-methyladenine DNA glycosylase II, from *Escherichia coli*.  
Cell 86, 311-319.

8. Doucet, J.-P., Nakabeppu, Y., Bedard, P.J., Hope, B.T., Nestler, E.J., Jasmin, B.J., Chen, J.S., Iadarola, M.J., St.-Jean, M., Wigle, N., Blanchet, P., Groundin, R. and Robertson, G.S. 1996.  
Chronic alteration in dopaminergic neurotransmission produce a persistent elevation of  $\Delta$  FosB-like protein (s) in both the rodent and primate striatum.  
Eur. J. Neurosci. 8, 365-381.
9. Vahid-Ansari, F., Nakabeppu, Y. and Robertson, G.S. 1996.  
Contrasting effects of chronic clozapine, seroquel TM (ICI204, 636) and haloperidol administration on  $\Delta$  FosB-like immunoreactivity in the rodent forebrain.  
Eur. J. Neurosci. 8, 927-936.
10. Shimizu, R., Komatsu, N., Nakamura, Y., Nakauchi, H., Nakabeppu, Y. and Miura, Y. 1996.  
Role of *c-jun* in the inhibition of apoptosis through the erythropoietin receptor.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 222, 1-6.

## 総 説

1. Sekiguchi, M. 1996.  
MutT-related error avoidance mechanism for DNA synthesis.  
Genes to Cells 1, 139-145.
2. Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y., Sakumi, K. and Tsuzuki, T. 1996.  
DNA-repair methyltransferase as a molecular device for preventing mutation and cancer.  
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122, 199-206.
3. 中別府雄作 1996.  
細胞の癌化とミューター変異.  
化学と生物, 34, 715-724.
4. 織田信弥, 中別府雄作 1996.  
細胞増殖の制御と初期応答遺伝子.  
蛋白質核酸酵素, 41, 1725-1731.
5. 白石明子, 関口睦夫 1996.  
DNA修復機構からみた発癌.  
血液・腫瘍科, 32, 357-363.
6. 関口睦夫 1996.  
ゲノム安定性とがん.  
現代化学, 11, 26-31.

## 著 書

1. Maki,H., Nakabeppu,Y. and Sekiguchi,M. 1996.  
DNA Replication and Transcription.  
"Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine" pp.86-96.  
VCH Publishers. Inc., New York.
2. 中別府雄作 1996.  
癌遺伝子と転写制御.  
転写のしくみと疾患 (村松正實編) pp.96-113, 羊土社, 東京.

## 学会発表

1. Nakabeppu,Y., Oda,H., Taketomi,A., Yakushiji,H., Ohtsubo,T. and Sekiguchi,M.  
(1996, 1/12).  
Structure and polymorphism of human *MTH1* gene encoding 8-oxo-dGTPase for prevention of A:T to C:G transversion.  
The First Korea-Japan Cancer Research Meeting, Tokyo.
2. 續 輝久 (1996, 1/22-1/23).  
DNA 修復メチルトランスフェラーゼ欠損マウスの樹立と解析：アルキル化剤感受性を支配する遺伝子のターゲティング。  
重点領域研究公開シンポジウム「遺伝情報維持の分子機構」, 大阪。
3. Sekiguchi,M., Tsuzuki,T., Sakumi,K., Shiraiishi,A., Kawate,H., Igarashi,H., Iwakuma,T., Tominaga,Y., Nakamura,K., Nakao,K., Katsuki,M., Zhang,S., Shimizu,S. and Ishikawa, T. (1996, 2/19-2/21).  
Biological significance of the DNA repair methyltransferase as revealed by targeted disruption of the gene. The International Workshop "Molecular and Cellular Biology of Man", Osaka.
4. Nakabeppu,Y., Oda,H., Taketomi,A., Yakushiji,H., Ohtsubo,T. and Sekiguchi,M. (1996, 6/30).  
Structure and polymorphism of human *MTH1* gene encoding 8-oxo-dGTPase for prevention of A:T to C:G transversion.  
Gordon Research Conference.
5. 續 輝久 (1996, 7/5).  
DNA 修復メチルトランスフェラーゼ欠損マウスの作製と解析：アルキル化剤感受性を支配する遺伝子のターゲティング。  
北海道癌談話会春季シンポジウム, 旭川。

6. 藤井喜充, 作見邦彦, 富永洋平, 中尾和貴, 續 輝久, 関口睦夫, 松代愛三, 吉村康秀, 森田 隆 (1996, 7/29-7/31).  
*Rad51* 遺伝子変異マウスの作製と解析.  
 第11回遺伝的組換えとその制御ワークショップ, 神奈川.
7. 藤井喜充, 作見邦彦, 富永洋平, 中尾和貴, 續 輝久, 関口睦夫, 松代愛三, 吉村康秀, 森田 隆 (1996, 8/26-8/30).  
*Rad51* 遺伝子変異マウスの作製と解析.  
 第69回日本生化学会・第19回日本分子生物学会合同年会, 札幌.
8. 作見邦彦, 白石明子, 河手久弥, 岩熊智雄, 續 輝久, 関口睦夫 (1996, 8/26-8/30).  
 DNA 修復メチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*MGMT*) ノックアウトマウスの解析.  
 第69回日本生化学会・第19回日本分子生物学会合同年会, 札幌.
9. 松崎洋一郎, 福原正生, 中別府雄作, 関口睦夫, 吉田光昭 (1996, 8/26-8/30).  
 HTLV-1 感染細胞における *O*<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現抑制.  
 第69回日本生化学会・第19回日本分子生物学会合同年会, 札幌.
10. 阿部真佐子, 井上 亮, 中別府雄作, 関口睦夫, 鈴木友和 (1996, 8/26-8/30).  
 ヒト *O*<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼの変異蛋白質の性質について.  
 第69回日本生化学会・第19回日本分子生物学会合同年会, 札幌.
11. 都 研一, 康 東 天, 田尻達郎, 中別府雄作, 関口睦夫, 竹重公一朗 (1996, 8/26-8/30).  
 大腸菌 MutM, MutY 蛋白質に対する感受性を利用したミトコンドリア DNA の酸化的障害の解析.  
 第69回日本生化学会・第19回日本分子生物学会合同年会, 札幌.
12. 大坪俊夫, 中別府雄作, 関口睦夫 (1996, 10/3-10/5).  
 真核生物の *mutM* Homologue 遺伝子のクローニングと解析.  
 日本遺伝学会第68回大会, 名古屋.
13. 蔡 劍 平, 河手久弥, 井原健二, 薬師寺浩之, 中別府雄作, 續 輝久, 関口睦夫 (1996, 10/3-10/5).  
 自然突然変異をコントロールするヒト MTH1 蛋白質の解析.  
 日本遺伝学会第68回大会, 名古屋.
14. 白石明子, 作見邦彦, 河手久弥, 岩熊智雄, 續 輝久, 関口睦夫 (1996, 10/3-10/5).  
*O*<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子ノックアウトマウスの解析.  
 日本遺伝学会第68回大会, 名古屋.
15. 作見邦彦, 白石明子, 河手久弥, 岩熊智雄, 續 輝久, 関口睦夫 (1996, 10/10-10/12).  
*O*<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子ノックアウトマウスの解析.



- 第55回日本癌学会総会，横浜。
16. 岩熊智雄，作見邦彦，河手久弥，五十嵐久人，白石明子，續 輝久，関口睦夫(1996, 10/10-10/12).  
DNA 修復メチルトランスフェラーゼ欠損マウスにおける DMNA 誘発発癌。  
第55回日本癌学会総会，横浜。
17. 小田尚伸，中別府雄作，古市正人，関口睦夫 (1996, 10/10-10/12).  
選択的スプライシングによるヒト *MTH1* 遺伝子転写の多様性と臓器別発現。  
第55回日本癌学会総会，横浜。
18. 富永洋平，白石明子，河手久弥，續 輝久，関口睦夫 (1996, 10/10-10/12).  
アルキル化剤によって誘導される細胞のアポトーシス。  
第55回日本癌学会総会，横浜。
19. 續 輝久，五十嵐久人，富永洋平，作見邦彦，関口睦夫 (1996, 10/10-10/12).  
*MTH1* 遺伝子欠損マウス系統並びに欠損 ES 細胞株の樹立と解析。  
第55回日本癌学会総会，横浜。
20. 松崎洋一郎，福原正夫，中別府雄作，関口睦夫，吉田光昭 (1996, 10/10-10/12).  
HTLV-1 感染細胞における O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現抑制。  
第55回日本癌学会総会，横浜。
21. 中別府雄作，武富紹信，丸山理一郎，杉尾賢二，竹中賢治，杉町圭蔵，鈴木友和，関口睦夫 (1996, 10/10-10/12).  
突然変異制御遺伝子 *MTH1* の多型と発癌リスク。  
第55回日本癌学会総会，横浜。
22. 薬師寺浩之，中別府雄作，高橋正行，大坪俊夫，関口睦夫 (1996, 10/10-10/12).  
ヒト *MTH1* 蛋白質の多型とその突然変異抑制活性。  
第55回日本癌学会総会，横浜。
23. 中別府雄作 (1996, 11/16).  
酸素ラジカルによる自然突然変異とその抑制機構：発癌との関連。  
第 6 回別府ハーバー国際シンポジウム，別府。
24. 中別府雄作，大坪俊夫，薬師寺浩之，西岡憲一，小田尚伸，富永洋平，下川英俊，関口睦夫 (1996, 12/17-12/20).  
ヒトおよび哺乳動物における酸化的 DNA 損傷の防止と修復機構の解析。  
ワークショップ「DNA Repair and Mutagenesis '96」，仙台。
25. 續 輝久，五十嵐久人，岩熊智雄，富永洋平，作見邦彦，関口睦夫 (1996, 12/17-12/20).  
標的遺伝子組換えによる *MTH1* 遺伝子欠損マウスの樹立と解析。

- ワークショップ「DNA Repair and Mutagenesis '96」, 仙台.
26. 作見邦彦, 續 輝久, 藤井喜充, 白石明子, 森田 隆, 関口睦夫 (1996, 12/17-12/20).  
*Rad51*遺伝子欠損マウスの作製と解析.
- ワークショップ「DNA Repair and Mutagenesis '96」, 仙台.