



Probing the chromosome 9p21 region susceptible to DNA double strand breaks in human cells in vivo by restriction enzyme transfer

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐藤, 正範 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/276

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 4 6 号	学位授与年月日	平成 1 7 年 7 月 2 2 日
氏 名	佐 藤 正 範		
論文題目	Probing the chromosome 9p21 region susceptible to DNA double strand breaks in human cells in vivo by restriction enzyme transfer (染色体 9p21 領域における、制限酵素導入によるヒト生細胞内での DNA 二本鎖切断感受性部位の同定)		

博士(医学) 佐藤 正 範

論文題目

Probing the chromosome 9p21 region susceptible to DNA double strand breaks in human cells *in vivo* by restriction enzyme transfer

(染色体9p21領域における、制限酵素導入によるヒト生細胞内でのDNA二本鎖切断感受性部位の同定)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

がん細胞では染色体切断がしばしば特定のゲノム領域に集中して起っていることから、ヒト染色体上にはDNA二本鎖切断(DSB)に感受性の高い領域が存在すると予想される。そこで、ヒト染色体におけるDSB感受性領域の同定を目的として、制限酵素蛋白質*MspI*を導入することで、生細胞内に特異的にDSBを生じさせる実験系を開発した。

〔材料ならびに方法〕

Chariot試薬を用いて、HeLaまたはH1299細胞に*MspI*蛋白質を導入した。導入後2時間後に、リン酸化ヒストン蛋白質である γ -H2AXに対する抗体による蛍光免疫組織化学解析によりDSB発生を確認すると共に、導入細胞から回収したDNAに対するサザンブロット、linker-mediated PCR、Linker-Mediated-Capture (LMC)解析を行い、DSB感受性について解析した。

〔結果〕

γ -H2AXを指標にDNA切断発生について検討した。蛍光免疫組織化学解析では、制限酵素の容量依存的に、 γ -H2AX焦点を示す細胞の割合、細胞内焦点数の増加が観察された。すなわち、HeLa細胞を4～16U/ μ lの*MspI*で処理したとき、80%以上の細胞において*in vivo*でDSBが誘導された。

制限酵素導入によって生じるDSBが、酵素の認識配列特異的に生じているか否かを検討した。サザンブロット解析を用いて*p16*がん抑制遺伝子座の切断について解析した結果、*MspI*処理を行った細胞でのみ約1.7～2.0kbのバンドが検出され、染色体DNAが*MspI*認識配列で切断されたことが示唆された。この切断が*MspI*認識配列で生じていることを高解像度で解析するために、linker-mediated PCR法を行った結果、*p16*プロモーター内の4カ所の*MspI*認識配列での切断が確認された。

次に、*p16/p14ARF/p15*遺伝子を含む9p21領域について、サザンブロット法を用いて*MspI*切断に対する感受性を検討した。その結果、HeLa細胞では、遺伝子間・イントロン領域に比べ上記3遺伝子のプロモーター領域で*MspI*感受性が高いこと、*p16*遺伝子領域が過メチル化されている肺がん細胞H1299では*p16*遺伝子のプロモーター領域の切断感受性が低いことが明らかになった。

ゲノム上において相対的な*MspI*切断感受性をより大きな解像度で評価するため、PCRを基調とした定量方法であるLMC法を開発した。LMCによる*MspI*切断感受性を、HeLa細胞の*p16/p14ARF/p15*遺伝子を含む60-kbの領域に適応すると、前述3遺伝子のプロモーター領域で*MspI*感受性が高いことが示された。このLMC法による解析は、サザンブロット解析と矛盾しない結果であった。

我々の以前の研究で様々なヒトがん細胞における*p16*遺伝子座を含む9p21染色体欠失の切断点がマップされていた。そこで、*in vivo*での*MspI*切断感受性を示す部位がヒトのがん発生においてDSBを来しやすい

部位に合致するのかどうかを調べるために、染色体欠失の切断点のマップを*MspI*感受性マップに併記し、切断点が*MspI*高感受性領域上に存在するかどうかを検討した。全部で55個の切断点が前述の60-kbの領域にマップされ、そのうち17個がリンパ性白血病で38個がその他のがんであった。特にリンパ性白血病では16(94%)の切断点が*MspI*高感受性領域に存在した。一方その他のがんにおいても、欠失の切断点は*MspI*高感受性領域に有意に多く存在した。

〔考察〕

生細胞内での染色体DNAの切断は、発現下にある遺伝子プロモーター領域で切断感受性が高いことが示され、クロマチン構造に影響されることが示唆された。染色体欠失の切断点が*MspI*高感受性領域上に多く存在したことは、*in vivo*での*MspI*切断感受性が、ヒトの細胞内で染色体異常の引き金となるDSBをおこしやすさを反映していることを示唆している。特にリンパ性白血病では、染色体欠失の原因となるDSBは、VDJ組換えにおける組み換えシグナル配列に似た配列を持つゲノム部位で引き起こされることがわかっており、RAG蛋白の関与が示唆される。今回の我々の結果はRAG蛋白のaccessibilityが影響しているのかもしれない。

〔結論〕

HeLa細胞では、*p16/p14ARF/p15*遺伝子のプロモーター領域が*MspI*切断感受性であった。H1299細胞ではHeLa細胞に比べて、*p16*遺伝子のプロモーター領域での切断されにくくなっており、*MspI*切断感受性はクロマチン構造に影響されることが示唆された。様々なヒトがん細胞で認められた9p21染色体欠失の切断点は、*MspI*によってDSBsを受けやすい部位に多く存在した。この結果は、ヒト細胞では、DNA傷害を受けやすいゲノム領域が存在し、染色体欠失のきっかけとなるDNA切断はそのような領域で生じやすいことを示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

がん細胞では染色体切断がしばしば特定のゲノム領域に集中して起っていることから、ヒト染色体上にはDNA二本鎖切断(DSB)に感受性の高い領域が存在すると予想される。申請者はヒト染色体におけるDSB感受性領域の同定を目的として、制限酵素蛋白質*MspI*を導入することで、生細胞内に特異的にDSBを生じさせる実験系を開発した。

〔材料と方法〕

Chariot試薬を用いて、HeLaまたはH1299細胞に*MspI*制限酵素を導入した。導入2時間後に、リン酸化ヒストン蛋白質である γ -H2AXに対する抗体による蛍光免疫組織化学解析によりDSB発生を確認すると共に、導入細胞から回収したDNAに対するサザンブロット、Linker-Mediated PCR(LM-PCR)、およびLinker-Mediated-Capture(LMC)解析を行い、DSB感受性について解析した。

〔結果〕

γ -H2AXを指標にDNA切断発生について検討したところ、HeLa細胞を4～16U/ μ lの*MspI*で処理したとき、80%以上の細胞において*in vivo*でDSBが誘導されていることを蛍光抗体法で示すことができた。この

制限酵素導入によって生じるDSBが、酵素の認識配列特異的に生じているか否かを検討するため、サザンブロット解析を用いて*p16*がん抑制遺伝子座の切断について解析した結果、*MspI*処理を行った細胞でのみ約1.7~2.0kbのバンドが検出され、染色体DNAが*MspI*認識配列で切断されたことが示唆された。さらにこの切断が*MspI*認識配列で生じていることを高解像度で解析するために、LM-PCR法を行った結果、*p16*プロモーター内の4カ所の*MspI*認識配列での切断が確認された。

次に、*p16/p14ARF/p15*遺伝子を含む9p21領域について、*MspI*切断に対する感受性を検討した。その結果、HeLa細胞では、遺伝子間・イントロン領域に比べ上記3遺伝子のプロモーター領域で*MspI*感受性が高いこと、*p16*遺伝子領域が過メチル化されている肺がん細胞H1299では*p16*遺伝子のプロモーター領域の切断感受性が低いことが明らかになった。

以上の結果を申請者のグループの以前の研究結果と比較し、ヒトの種々の腫瘍でみられる染色体切断点が*MspI*高感受性領域上に高頻度に存在すること、つまり55個の切断点が前述の60-kbの領域にマップされ、そのうち17個がリンパ性白血病で38個がその他のがんであり、特にリンパ性白血病では16(94%)の切断点が*MspI*高感受性領域に存在することを示した。一方その他のがんにおいても、欠失の切断点は*MspI*高感受性領域に有意に多く存在していた。

申請者はこれらの観察、すなわち、以前から報告されている染色体欠失の切断点が今回*in vivo*で明らかにした*MspI*高感受性領域上に多く存在したことを、ヒトの細胞内で染色体異常の引き金となるDSBのおこしやすさを反映していると解釈し、特にリンパ性白血病で推定されているようなV(D)J組換えに似た機構を想定すると、RAG蛋白のaccessibilityの影響も考えられるといった推測も加えた。

〔結論〕

まとめると申請者の主張は*MspI*切断感受性は細胞ごとに異なりおそらくはクロマチン構造に影響されるであろうというものである。これにより様々なヒトがん細胞で認められた9p21染色体欠失の切断点は、*MspI*によってDSBsを受け易い部位に多く存在したことを説明した。ヒト細胞では、DNA傷害を受けやすいゲノム領域が存在し、染色体欠失のきっかけとなるDNA切断はそのような領域で生じやすいことを示唆するものである。

この研究に対し審査委員会では以下の質問をおこなった。

- 1) *p16*をふくむ9p21のbreakpointの同定法について
- 2) 9p21に注目した理由について
- 3) 欠失部位の表示方法について
- 4) DSBをつくる方法にはどのようなものがあるか
- 5) *p14ARF*とはどのような遺伝子か
- 6) 用いる制限酵素にblunt endを切るものを使った場合はどうか
- 7) 制限酵素を導入した細胞内では修復がおこるのか
- 8) 用いたChariot試薬の原理は
- 9) コントロールとしたGAPDHの場合、*MspI*切断感受性はどう評価したのか
- 10) 細胞内でリガーゼはどのように働くのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文

にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	梶	村	春	彦	
	副査	小	出	幸	夫	副査 三 浦 直 行