

染色体DNAを保存するシステムに関与する遺伝子群の、ヒトの多型性の機能評価

●武田俊一

京都大学医学研究科放射線遺伝学

＜研究の目的と進め方＞

研究目的は、ゲノム構造を維持する機構（DNA修復とチェックポイント）に関与する遺伝子で見つかった変異を機能解析することである。そのために、変異ヒト遺伝子cDNAを、その遺伝子のノックアウト細胞（ニワトリBリンパ細胞株、DT40）発現し、発現によってどの程度表現型が正常化するかを解析する。我々の研究の強みは、この研究分野で唯一のIsogenic mutantsのコレクションをもつ点にある。ゲノム構造を維持する機構の破綻は、細胞培養の実験系でも放射線感受性や染色体ロスなどを調べることで高感度解析しうる。SNIPの機能解析をたくさん遺伝子で系統的に行いうる唯一の研究分野であろう。

＜研究開始時の研究計画＞

本プロジェクトは、フランス国立人類遺伝研究所の松田研と共同で進める。

フランスの松田研でSNPs解析が終わった遺伝子のリスト：BLM #、BRCA1 #、BRCA2 #、ERCC5 (XPG) #、ERCC6 (CSB)、FANCA、FANCC #、MSH6 #、LIG1、MDM2、MGMT、MLH1、MSH2 #、MSH3、NNMT、OGG1、PCNA、PMS1、PMS2、PNMT、POLa、POLb #、POLd1、POLd2、POLe2、POLg、POLh #、RPA1、TDG、UGT2B、UNG #、XRCC1、XRCC2 #、XRCC3 #、XRCC4、XRCC5、APEX

[DT40でノックアウトされた遺伝子に#でマークをつけた]

作製したもしくは譲渡*してもらったDT40ノックアウト細胞の遺伝子（上の#でマークした遺伝子を除く）

相同DNA組み換え：Rad51、Rad52、Rad52/XRCC3 2重欠損、Rad54、Rad54B、Rad54/Rad54B 2重欠損、Rad51B、rad51C、rad51D、Mre11、Rad50

相同DNA組み換えに間接的に関与するファンconi遺伝子群：FANCD2*、FANCG*

RecQヘリカーゼ：Blm、Wer、Blm/Wer 2重欠損

非相同末端結合：Ku70、DNA-Pkcs、Ku70/DNA-Pkcs 2重欠損、Ligase IV*

2重鎖DNA切断の修復経路（非相同末端結合および相同DNA組み換え）を制御：Poly [ADP ribose] polymerase
DNA修復に関与するDNAポリメラーゼとその制御因子：POL 1、POL k、POL z、POL k/POL z 2重欠損、Rad18、Rad18/ Rad54 2重欠損

ヌクレオチド除去修復：XPA、XPF（一部の相同DNA組み換えにも関与）

損傷チェックポイント：Atm、Nbs1（相同DNA組み換えにも関与）、ヒストンH2AX

今回、修復遺伝子の中で、相同組換えに関与するXRCC2、XRCC3、RAD51のCaucasian にみられるSNPを選び、発現ベクター(CMV promoter-ires-GFP)にクローニングし、それぞれXRCC2-/-、XRCC3-/-、RAD51-/- DT40細胞に導入した。まずGFPの発現で発現陽性株をスクリーニ

ングしたのち、RT-PCRまたはWestern blot法により、野生型と同程度の遺伝子または蛋白発現株を複数樹立し、細胞増殖を液体培地で、抗ガン剤シスプラチンに対する感受性を半固形培地中のコロニー形成率で測定し、野生型のそれと比較した。

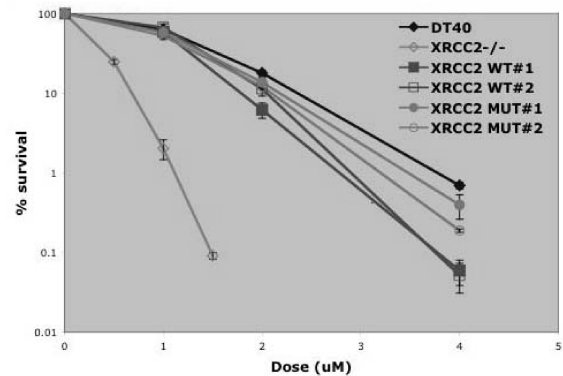
＜研究期間の成果＞

今回は、相同組み換えに関与する遺伝子のSNIPsについて機能解析した。解析した遺伝子とそのSNIPS（変異アレルの割合）は、RAD51 Pro56Ser (1.7%)、XRCC2 Arg188His (8.6%)、XRCC3 Thr241Met (31.7%) である。RAD51とXRCC3については、機能上、野生型と変わりなかった。一方、XRCC2 Arg188Hisは、野生型XRCC2よりも、むしろ、よりよく機能することが示唆された。

下に代表的実験例を示す。本実験では、野生型DT40細胞、XRCC2-/-細胞、XRCC2-/-細胞に野生型ヒトXRCC2を発現した2クローン、XRCC2-/-細胞にヒトXRCC2 Arg188Hisを発現した2クローンをそれぞれ解析した。下のX軸は1時間処理するシスプラチン（DNAに共有結合して複製をブロックすることによって増殖細胞を殺す抗癌剤、主に相同組み換えによって複製ブロックが修復される）の濃度、Y軸はコロニー形成率（シスプラチン処理しないとコロニー形成率は100%）を示す。XRCC2 Arg188Hisを発現した細胞の生存曲線は、傾きが小さいので、相同組み換えによるDNA修復がよく機能してことがわかる。

図1 XRCC2 Arg188Hisを発現したDT40 XRCC2-/-細胞 (MUT#1, #2)の方がシスプラチンにより耐性になる

ヒトXrcc2を発現したXRCC2-/-細胞の、抗癌剤、シスプラチン感受性



＜国内外での成果の位置づけ＞

本研究のように、SNIPsの機能に与える影響を定量的に解析できた例はない。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

＜研究期間の全成果公表リスト＞

この研究成果は、現在、論文作成中である。

＜今後の課題＞

他のDNA修復遺伝子のSNIPsを継続して解析する。