

## DNA修復酵素を用いた突然変異特異的クローニング法の確立

●塚本 俊彦

北里大学薬学部生化学教室

### 〈研究の目的と進め方〉

癌においては多くの突然変異が起きているにもかかわらず、膨大な遺伝子群から、実際に、癌における新たな突然変異を発見することは、いまだに困難である。ところで、二群間の遺伝子発現の差をもとにcloningをおこなう subtraction cloning, differential display, SAGEなどの手法は、広く応用されており、病変特異的に発現の増加または減少する遺伝子の発見に貢献してきた。もし、塩基配列の差異をもとに網羅的に遺伝子を cloning することが可能ならば、これを、病変と正常組織で行えば somatic mutation が、また個体間で行えばポリモルフィズムを、発見、解析する強力な手法となり得ることが予測される。申請者は、正常と突然変異を持つ cDNA をハイブリダイズさせ、形成される heteroduplex を DNA 修復酵素を用いて pull down し、それを real-time PCR で定量することにより突然変異の有無を判定する手法を開発し、HNPCCの原因遺伝子である、hMSH2 と hMLH1 の突然変異を解析してきた。そこで、正常組織と癌組織よりPCR法を用いて作成した cDNA library をハイブリダイズさせ、形成される heteroduplex を DNA 修復酵素を用いて pull down し解析する手法による、突然変異を起こした遺伝子の網羅的クローニングを目的とした、“突然変異特異的クローニング法”の確立と、その high-throughput な系への移行を目的として研究を行った。

### 〈研究開始時の研究計画〉

1) Microsatellite Instability (MSI)陽性大腸癌の突然変異特異的クローニング法による解析

申請者は従来、DNA修復酵素の異常による microsatellite instability (MSI) 陽性大腸癌の臨床病理学的解析を行ってきた。これら mutator phenotypeを持つ病変では、タンパク質をコードする領域においても、著明に突然変異が多発することが知られており、この病変を用いれば、上記“突然変異特異的クローニング”により未知の突然変異を同定できる可能性が高く、突然変異の網羅的解析法の確立段階で試行するのに最適であると考え、microsatellite instability 陽性大腸癌のうち、40%以上の microsatellite で instability のある病変(MSI-H)を用い研究を計画した。まず、reverse transcriptase の terminal deoxynucleotidyl transferase活性を利用したstrand-switch法を用いて病変部位より cDNA library を作成し(Tumor)、隣接正常組織より同様に cDNA library を作成した(Normal)。これらをハイブリダイズさせ、大腸菌 MutS 組換えタンパク質と、これに対する抗体を用いて pull down する。Pull down した DNA を フェージベクターに連結しスクリーニングを行う。判定は wild type と mutant の両方が得られることで、陽性とする。

2) 大腸癌肝転移病巣における突然変異特異的クローニング法による解析

担癌患者血中には、腫瘍細胞が多数存在することが知られているが、ほとんどの腫瘍細胞は転移しない。転移をお

こした癌細胞は原発巣のごく一部の細胞がクローン化したものなのか、遺伝子発現が原発巣とは変化しているのか、さらに、転移特異的な遺伝子の突然変異があるかどうか疑問がもたれる。申請者は、現在、大腸癌肝転移巣と原発巣を用いて、遺伝子発現の変化を subtraction cloning にて解析しているが、同じサンプルを用いて、転移に特異的な遺伝子の突然変異があるかどうかを“突然変異特異的クローニング”での解析を計画した。

また、研究遂行の準備として、下記 1),2)を行ってきた。

1) 大腸癌および大腸前癌病変よりのゲノム資源の蓄積

大腸癌手術症例より、原発巣と、さらに、肝転移症例では原発巣と転移巣のサンプルを蓄積し、mRNA, genomic DNAの調製して、Microsatellite Instability と各種遺伝子の解析を行っている。

2) DNA修復酵素を用いた突然変異検出法の確立

大腸菌MutSタンパク質はDNAのミスマッチに結合する機能を持つDNA修復酵素であり、これらのタンパク質を、一部非相補的な塩基配列をもった2本のDNA鎖をアニールさせることにより形成される heteroduplex と反応させ、突然変異の解析を試みてきた。しかしながら、MutSは高度に不溶性であり、大腸菌での発現と精製が困難であった。ところで、mRNAキャップ形成に関与するhuman cap methyltransferase (hCMT1) をクローニングし、その構造・機能解析を行ってきたが、hCMT1において、MutSと一部構造の類似性のある活性部位は高度に不溶性であるが、N末端側(aa 1-150)のタンパク質間相互作用部位の存在が、このタンパク質全体の可溶性に関与していることをみいだした。そこで、hCMT1のこの領域をMutSのN末端側に融合させたタンパク質を作成し、大腸菌で発現させたところ、活性を保持したまま高度に可溶性なタンパク質を得ることができた。これを用いて、大腸癌の病変におけるK-ras遺伝子のexon 1を含む110 bpをPCRで増幅し、正常粘膜より増幅したものとハイブリダイズさせ、突然変異があれば形成されるheteroduplexをMutSの結合によるgel-shift assayにて解析し、突然変異の存在を検出することができた。しかしながら、500 bp以上のDNAの解析にはGel-shift assayは不可能であることと、ゲル電気泳動を用いない、high-throughputな方法への改良のために、DNA修復酵素にtagをつけ、heteroduplexをpull down しPCRで解析する系の構築を試みた。しかし、MutSやresolvaseは非特異的なDNA結合能があるので、通常のPCRによる半定量的な判定では解析不能であった。そこで、ABI 7700を用いたreal-time quantitative PCRを使用しpull-downされたDNA量を定量することにより、突然変異の有無を正確に判定することが可能となった。

### 〈研究期間の成果〉

まず、系の確立のために、塩基配列の変化が多いと予想される、DNA修復酵素の異常によるMicrosatellite instability 陽性大腸癌のうち、40%以上の microsatellite で

instability のある病変(MSI-H)を用い研究を開始した。ライブラリーの作成は、strand-switch method (oligo d(T)をprimerに用い、reverse transcriptase のもっている TdT 活性により付加された nucleotide 配列 CCCに相補的な配列 GGGを3'に持った strand-switch primerにより second strand を合成する)を用いて施行した。病変部位より cDNA library を作成し (Tumor), 隣接正常組織より同様に cDNA library を作成した(Normal)。これらをハイブリダイズさせ、大腸菌 MutS 組換えタンパク質と、これに対する抗体を用いて pull down した。そして、洗浄吸着したものを溶出させPCRで増幅これらの実験条件は先に確立した"DNA修復酵素, heteroduplex 形成, real-time PCR を用いた突然変異検出"を用いて行った。さらに、Pull down した DNA を フェージベクターに連結しプラークを形成させ、はじめは、Tumor/Normal のpull-downとコントロールとして Normal/Normal の pull-downよりプローブを作成し、differential hybridization によりスクリーニングを行い、得られたクローンを解析した。その後は、系の改良とともに、プラークをスクリーニングせずに、網羅的にクローンを解析した。判定は wild type と mutant の両方が得られることで、陽性とした。

その結果、

CEA (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5; Hs.220529) 3' UTR, 2780 A -> G; 2792-2798 (T)7 to (T)8 (GI:178676; CDS 97..2205).

CCNI (cyclin I; Hs.486360) 3' UTR, 1800 (A)10 to (A)9 (GI:13436391; CDS 544..1677).

PTMA (prothymosin, alpha; Hs.264317) 5' UTR, 142 T-> C; CDS, 228 T to C (GI:47938172; CDS 161..493).

SRI (sorcin; Hs.489040) CDS 488 A->G, Y159C (GI:4507206; CDS 13..609).

LGALS3 (lectin, galactoside-binding, soluble, 3; galectin 3; Hs.531081) CDS 774 A -> G, I250M (GI: 37589086; CDS 25..777).

RACK1 (GNB2L1, guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1; Hs.5662) CDS 288t->g, F65V, 304t->c, V70A (GI: 187701; CDS 96..1049).

UQCRQ (ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII, 9.5kDa; Hs.146602) CDS 227 t->C, F67S, (GI: 34784784; CDS 28..276)

などの, mutant clone と mutant と wild type のクローンを得た。

また、この新たに開発した"DNA修復酵素を用いた突然変異特異的クローニング法"を用いて、癌組織において、高率に塩基配列の変異が認められる新規遺伝子をクローニングすることができた。

この遺伝子は、構造上、thymidylate synthase (TS) と、その近傍に存在する、clusterin-like 1 (CLUL1) の、両方に対する natural antisense transcript (NAT) であることが示唆された。TSに対する NAT は、すでに 3' UTR に対するもの

が報告されているが、この NAT は exon 1 に対するものであり、TS mRNA の分解以外にも、TS mRNA の転写開始過程の競合にも関与する可能性があり、TS遺伝子発現においてより大きな制御機構を形成していることも否定できない。

また、さらにライブラリーをスクリーニングした結果、新たな, splice variant を得た。これは、TS に対する antisense 部分はもたず、CLUL1 のみに対する NAT の構造を有していた。

今回、"突然変異特異的クローニング法"でクローニングの標的となった、この新規 NAT の 3' UTR に存在する、高度に変異を持つ部分は、MFOLD (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>)を用いて構造を推定した結果、ループ形成の可能性が示唆され、配列には、RNA の分解や、タンパク質結合のコンセンサスはないが、今後、この変異とNAT mRNAの安定性を解析していきたい。

現在までに多くの大腸癌症例にて解析した結果、MSI陽性大腸癌の約半数にその変異がみられた。この新規 NAT mRNA レベルをreal-time RT-PCR を用いて解析した結果また、有意ではないが、その発現量は変異がある症例において高い傾向がみられた。現在、TS mRNAもふくめ、さらに詳細に解析中である。

#### <国内外での成果の位置づけ>

塩基配列の差異をもとにクローニングを行う手法は、未知の突然変異やポリモルフィズムを網羅的に単離できる可能性があることは知られていたが、heteroduplex に結合するタンパク質はいずれも in vitro では特異性が低く、長い DNA 断片(>500 bp)を用いると非特異的な結合により、point mutation の検出さえ困難となり、クローニングに応用して未知の突然変異を単離する効率よい系の実用化の報告はない。今回、改変した組換えタンパク質とそれに対する抗体の作成、検出方法の改良により、heteroduplex に対する特異性が高くなった結果、クローニングに応用可能となった。新たな分子病態解析法の開発として、この手法を確立し、突然変異の網羅的解析を行い、さらに、この系を high-throughput な系へ改善すること、また、この手法により新たな遺伝子変化の情報を蓄積していくことは、将来個々の患者の病態解析と、それをもとにしたオーダーメイド医療において、強力な武器となることが期待される。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

転移特異的な遺伝子変化の同定は現在も継続中であるが、まだ達成できていない。その理由は、系の改良を重ねながらクローニングを行っているために予想外に時間がかかっているためと思われる。今後はより効率的に進めたいと計画中である。

#### <今後の課題>

方法の改良を継続して行い、配列の異なる遺伝子のペアをDNA修復酵素を用いてpull downすることにより得ることが可能となった。しかしながら、得られたクローンのうち、PCRにてcDNAライブラリー作成中に形成された人工的な突然変異が少なからず物が含まれる。今後はよりfidelityの高いポリメラーゼを用い、cDNAライブラリーを作成する必要があると考えられる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

Furukawa, T., Konishi, F., Shitoh, K., Kojima, M. Nagai, H., and Tsukamoto, T. Densely methylated MLH1 promoter correlates with decreased mRNA expression in sporadic colorectal cancers. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 35, 1-10, 2002

Furukawa, T., Konishi, F., Shitoh, K., Kojima, M. Nagai, H., and Tsukamoto, T. Evaluation of screening strategy for detecting hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Cancer* 94, 911-20, 2002

Furukawa, T., Konishi, F., Shitoh, K., Tsukamoto, T., and Nagai, H. An early stage small bowel adenocarcinoma with microsatellite instability phenotype in a case of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.*, 18, 267-70, 2003

Sasaki, J., Konishi, F., Kawamura, Y, Kai., T., Takata, O., and Tsukamoto, T. Clinicopathological characteristics of colorectal cancers with loss of imprinting of insulin-like growth factor 2. *Int J Cancer*. in press 2005.

Tsukamoto, T., Iida, J., Dobashi, Y., Furukawa, T., and Konishi, F. Overexpression in colorectal cancer of two lysosomal enzymes, CLN2 and CLN1, involved in neuronal ceroid lipofuscinosis. *Cancer*, in press.

Takata, O., Kawamura, Y., Konishi, F., Sasaki, J., Kai, T., Miyakura, Y., Nagai, H., and Tsukamoto, T. cDNA array analysis for diagnosis of hepatic metastasis of colorectal carcinoma using tissue samples obtained from primary tumors. *Surgery Today*, in press.

Togashi, K., Konishi, F., Kojima, M., Nagai, H., and Tsukamoto, T. The majority of human aberrant crypt foci in the lower rectum are precursors of hyperplastic polyps. *Dis. Colon Rectum*, in press.