

学位論文題名

# Development of a Yeast Stop Codon Assay Readily and Generally Applicable to Human Genes

(任意のヒト遺伝子に即時適用可能な酵母ストップコドンアッセイの開発)

## 学位論文内容の要旨

### 背景、目的

ヒト遺伝子 DNA に生じる変異は特殊なものを除けば塩基置換、欠失・挿入が大部分をしめる。さらに塩基置換のうちではナンセンス変異が、欠失・挿入においてはフレームシフト変異となることが多い。このようなナンセンス変異やフレームシフト変異を酵母を用いて効率的に診断する方法が報告され、さらにレポーターの改良でコロニーの色彩で容易に変異を判定することが可能である。この酵母ストップコドンアッセイは優れた遺伝子診断法であるがひとつの対象遺伝子領域に対して専用のベクターが必要なため、新たな対象をアッセイするときはベクターの作成からおこなわねばならず時間、労力、費用を要する。そこでこの酵母ストップコドンアッセイの利点を損ねず、かつひとつのベクターで多数の遺伝子に対応できる汎用型のストップコドンアッセイ(ユニバーサルストップコドンアッセイ)の開発を試みた。

### 材料、方法および結果

従来の *ADE2* をレポーターとしたストップコドンアッセイを改良した。その改良、工夫の要点は、相同組み換えに必要なベクター断端部 24bp の塩基配列を両端につけた形で対象遺伝子領域を PCR 増幅し、汎用型線形化ベクターを再環状化することである。

ユニバーサルストップコドンアッセイの概要は以下のとおりである。対象遺伝子領域をこの新たな方法で PCR 増幅し、汎用型線形化ベクターとともに酵母内に導入、形質転換する。この際、被検遺伝子領域を *ADE2* 遺伝子の上流に in-frame 挿入し *ADE2* とのキメラ蛋白として *ADE2* 欠損酵母株に発現させる。選択培地で培養し *ADE2* 遺伝子発現があれば正常に発育し白いコロニーに、被検遺伝子領域のナンセンス変異やフレームシフト変異により発現がなければ adenine 合成経路の中間代謝産物が蓄積し赤いコロニーとなる。

この方針のもとにバックグラウンドレベルに影響する自己再環状化の少ない専用ベクターの作成と被検(c)DNA の PCR 増幅法を工夫した。

酵母は発芽酵母 *S. cerevisiae* 株である yPH857 を使用した。(遺伝子型[MATa *ura3-53 lys2-801 ade2-101 his3-Δ200 trp1-Δ63 leu2-Δ1 cyh2R*])

ベクターは *URA3* マーカー遺伝子と *CEN/ARS* 配列、*Amp* および *ColE1 Ori* を持ち、*CYC* プロモータで駆動され *ADE2* を発現する酵母/大腸菌シャトルベクター pLS381 を改良した。被検遺伝子が入る部分での線形化ベクターの自己再環状化を最小限に抑えるのを目的に *CYC* プロモーターと *ADE2* 遺伝子の間の切断部位を平滑末端として本アッセイに用いる線状化ベクター pMT18 を作成した。

対象遺伝子領域の増幅は nested PCR でおこなった。1st PCR で目的部位を含む領域を、2nd PCR で相同組み換えのための pMT18 の両端 24bp と同じ配列を付加するプライマーで増幅した。DNA polymerase には校正機能を持つ Pfu TURBO polymerase (Stratagene) を、hot start 法で 1st PCR は 10cycle、2nd PCR は 30-35cycle でおこなった。

乳癌細胞株 MCF-7 や ZR-75-1 などより抽出した genomicDNA を用いて *BRC1* 遺伝子の exon11(codon224-1365) を前約 2/3 (2.2kb)、後約 2/3 (2.2kb)、中間部約 1/3 (1.0kb) に分けて対象遺伝子としてアッセイをおこない、ベクターの自己再環状化の頻度、バックグラウンドレベルの設定、相同組み換えの精度、相同組み換え部の至適サイズ、アッセイ可能な対象遺伝子の大きさ、変異検出の定量性の有無などを検討した。

自己再環状化の頻度は粘着末端の pSL381 と比較し減少した。

バックグラウンドレベルは 20%未満で、おおくは 10%以下であった。

選択培地上の任意の白コロニー 40 個のすべて (95%信頼区間 0.911-1.000) に目的の遺伝子領域が組み込まれており十分な相同組み換えの精度であった。

相同組み換えのための至適塩基数を決めるため 18bp、24bp、30bp、39bp の場合で検討したところバックグラウンドレベルでは差はなかったが、目的の遺伝子領域がベクターに組み込まれているか否かを調べた結果、39bp の場合でその精度は低下していた。非特異的 PCR 産物や PCR 増幅不良が原因であった。この結果より本法では相同組み換え用の塩基数を 24bp とした。

対象遺伝子領域の大きさを 1.0kb と 2.2kb で検討したがいずれも問題なかった。

野生型のアリルと人工的に導入した変異アリルを種々の比率で混合した検体をアッセイし、赤コロニーの比率を検討すると直線に回帰でき  $r=0.99$  と高い相関を示した。

以上の手法で *APC* 遺伝子の exon15 の codon1113-1493 について大腸癌細胞株および切除大腸癌組織をアッセイし、既存の *APC* のストップコドンアッセイと比較したところ同様の結果を得た。

さらに *hMSH6* 遺伝子の codon170-402 を大腸癌細胞株より抽出した mRNA からの cDNA でアッセイし、HCT15 の一塩基欠失の変異を見いだした。

次に *E-cadherin* 遺伝子全体を一部オーバーラップさせて 3 分割し同様にアッセイを行ったところ第一の領域において赤コロニーと判別が困難なピンク色のコロニーが多数出現した。目的の遺伝子領域は組み入れられておりかつ変異はみられなかった。この原因として ADE2 を含むキメラ蛋白の高次構造の影響で ADE2 の酵素活性が十分に発揮できなかったためと考えられた。そこで高次構造の変化をねらい、*E-cadherin* と ADE2 との間に tag 配列である FLAG を挿入した pMT18flag を新たに作成し、選択培地の adenine 量を増量することによりコロニーの色彩判別が可能となった。

#### 考察、まとめ

任意のヒト遺伝子に即時適用可能な酵母ストップコドンアッセイを開発した。新たな対象遺伝子領域の増幅のためのプライマー設計から数日でアッセイが可能で、しかもいちどに多数の検体を処理できるためスクリーニング法として有用とおもわれる。

本アッセイの開発においては酵母内での線形化ベクターの被検遺伝子による再環状化の際の相同組み換えのための塩基数が、従来型での 100-200bp は必ずしも必要ではなく 18-24bp で十分であることが確認できたこと、さらにその相同組み換え用の配列を被検遺伝子の両端に付加して増幅する PCR 法を確立できたことが重要であった。

*E-cadherin* 遺伝子で新たに pMT18 の一部改変などが必要であったが、これは本ユニバーサルストップコドンアッセイに限らず従来型の酵母ストップコドンアッセイでも共通の問題である。今後さらに対象とする遺伝子が増せば新たな問題が生じるかもしれない。また、

PCR 増幅に難渋する遺伝子配列もあろうが、本アッセイは対象遺伝子領域を容易に変えることができるため従来型よりも対応しやすいとおもわれる。

さらに、本法は約 2kb までの遺伝子断片をクローニングする方法としても有用で、たとえば白コロニーからの野生型のライブラリー作成やミスセンス変異の同定に利用することも考えられる。

ポストゲノム時代においての有用なアッセイのひとつとなりうるものとおもわれる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 守 内 哲 也  
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

## Development of a Yeast Stop Codon Assay Readily and Generally Applicable to Human Genes

(任意のヒト遺伝子に即時適用可能な酵母ストップコドンアッセイの開発)

ヒト遺伝子 DNA にストップコドンが生じるナンセンス変異やフレームシフト変異を効率的に診断する酵母ストップコドンアッセイは優れた遺伝子診断法であるが、ひとつの対象遺伝子領域に対して専用のベクターが必要という欠点があった。この酵母ストップコドンアッセイの利点を損ねず、かつひとつのベクターで多数の遺伝子に対応できる汎用型のストップコドンアッセイ（ユニバーサルストップコドンアッセイ）の開発を試みた。

切断部位を平滑末端とした汎用型線形化ベクター pMT18 と相同組み換えに必要なベクター断端部 24bp の塩基配列を両端に付加する nestedPCR で増幅した対象遺伝子領域を発芽酵母である yPH857 内に導入、形質転換する。この際、被検遺伝子領域を *ADE2* の上流に挿入し *ADE2* とのキメラ蛋白として発現させる。選択培地で培養し *ADE2* 発現があれば正常に発育し白いコロニーに、被検遺伝子領域のストップコドンとなる変異により発現がなければ adenine 合成経路の中間代謝産物が蓄積し赤いコロニーとなり、変異の有無がコロニーの色彩で容易に判別できる。アッセイの信頼性、有用性、実用性を検討するためベクターの自己再環状化の頻度、バックグラウンドレベルの設定、相同組み換えの精度、相同組み換え部の至適サイズ、変異検出の実際などを調べた。

自己再環状化の頻度は数%以下、バックグラウンドレベルは 20%未満で、おおくは 10%以下であった。選択培地上の任意の白コロニーで目的の遺伝子領域の組み込みを調べ十分な相同組み換えの精度であることを確認した。相同組み換えのための至適塩基数を決めるため相同組み換え部の塩基数が 18bp、30bp、39bp の場合でも検討し 24bp を適当とした。野生型のアリルと変異型アリルを種々の比率で混合した検体をアッセイし、変異型アリルの比率と赤コロニーの比率を検討すると直線に回帰でき高い相関を示した。*APC* について大腸癌細胞株および大腸癌組織をアッセイし、既存の *APC* のストップコドンアッセイと比較したところ同様の結果を得た。さらに大腸癌細胞株 HCT15 の *hMSH6* の一塩基欠失の変異を見いだした。*E-cadherin* のアッセイで野生型遺伝子領域が赤コロニーおよび赤コロニーと判別が困難なピンク色のコロニーが多数出現したことにたいしては *ADE2* の前に tag

配列である FLAG を挿入した pMT18flag を新たに作成し、選択培地の adenine 量を増量することによりコロニーの色彩判別が可能となった。以上より、任意のヒト遺伝子に即時適用可能な酵母ストップコドンアッセイ（ユニバーサルストップコドンアッセイ）の開発が確認された。

審査にあたって副査の守内教授より *E-cadherin* でのアッセイにおけるその蛋白構造の影響、選択培地のアデニン量、異常のあった癌組織の人種などについて、遺伝子クローニングへの応用の具体例について、従来の APC 用の酵母アッセイとの簡便さの比較についての質問があった。申請者は *E-cadherin* の  $\beta$ -sheet 構造、アデニン量の 50%増量、外国の症例であること、酵母内へのクローニングであること、PCR ではやや作業が増えることなどを回答した。副査の藤堂教授より癌の発生、悪性度、治療などと遺伝子異常のかかわり、本法のはたす役割についての質問があり、申請者は遺伝子構成の変異はいまなお重要な異常であり本法により腫瘍の構造面のキャラクターを明らかにすることができると回答した。最後に主査の浅香教授よりバックグラウンドレベルの設定について、HCT15 の *hMSH6* の赤コロニー率の意味について、PCR でのアニーリング温度について、マウス、ラットは対象となりうるかとの質問があった。申請者は切除組織では正常細胞の混入の程度で変わりうるので一律には困難かもしれないこと、HCT15 は一方の対立遺伝子のみの変異であること、対象遺伝子固有のプライマー部を主とした条件設定が重要であること、マウスなどでは経験がないが可能とおもわれることを回答した。

この論文で示されたユニバーサルストップコドンアッセイはストップコドンとなる遺伝子変異を酵母を用い簡便に、迅速に、省力化しスクリーニングできる手法でアッセイとして確立されたと認め、今後有用な方法としてひろく用いられるものと期待される。

審査員一同はこの成果を高く評価し、研究歴と併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。