

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月18日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤(C)

研究期間：平成22年度～平成24年度

課題番号：22570010

研究課題名（和文）なぜマイクロサテライトは変化するのか？

研究課題名（英文）Why are microsatellites unstable?

研究代表者

織田 信弥 (ODA SHINYA)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他の部局等・その他

研究者番号：40333372

研究成果の概要（和文）：本研究では、真核生物ゲノムで保存されてきたマイクロサテライト配列が、正常個体集団間で多様性を生む分子機序、さらには病的細胞機能下、とくに腫瘍において変化する分子機序を総合的に解明し、真核生物ゲノム編成のひとつの特徴であるショートタンデムリピートの動態とその病因論的意義を明らかにすることを目的とした。まず、正常細胞機能下におけるマイクロサテライト配列変化として、種間、個体間のマイクロサテライト配列多様性について、また、病的細胞機能下におけるマイクロサテライト配列変化としては、とくに、ミスマッチ修復異常およびDNAポリメラーゼ校正機能の異常下におけるマイクロサテライト変化について、重点的に解析を行った。このような解析の結果、とくに注目されたのが、1塩基繰り返し（mononucleotide）マイクロサテライト配列の動態であった。Mononucleotideマイクロサテライトがヒト集団間で著しく多型に乏しいことが見出されたのである。このことは、極めて多型に富む2塩基繰り返し（dinucleotide）マイクロサテライトと好対照をなしている。この結果を受け、ミスマッチ修復能およびポリメラーゼ校正機能に既知の異常をもつ株化培養細胞を用いて解析を進めた結果、2つの細胞機能の働きのちがいによる、それぞれのマイクロサテライトの固有の動態が明らかになった。現在、ミスマッチ修復能およびポリメラーゼ校正機能を欠くマウス胎児線維芽細胞を樹立し、その解析をおこなっている。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to understand the molecular mechanisms that underlie the diversity of microsatellites in human populations and the instability of those in the pathological conditions, particularly, in tumour cells, and, consequently, to elucidate the *bona fide* dynamics of microsatellites and its pathogenic significance in higher eukaryotic organisms. First, we observed the extreme paucity of polymorphisms in mononucleotide microsatellites among human populations, which makes a remarkable contrast to the dinucleotide microsatellite dynamics. We next analysed mononucleotide and dinucleotide microsatellite alterations under various genetic backgrounds and, consequently, found that the dynamics of these two categories of microsatellites are distinctive depending on the defects in DNA mismatch repair (MMR) and DNA polymerase proofreading (PPR). Analyses using mouse embryo fibroblasts lacking both MMR and PPR are now underway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 24 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム構築・再編・維持、ゲノム不安定性、癌、DNA 修復

1. 研究開始当初の背景

マイクロサテライトとは、真核生物のゲノム上、遺伝子間に散在するショートタンデムリピート（STR）の一種で、1 ないし数塩基対といったもっとも短い繰り返し単位をもつカテゴリーの総称である。このマイクロサテライト配列は集団間で多型に富んでいるために、今日では個人識別やリンケージ解析などに多用される。しかしながら、いかに個人差に富む配列とはいえ、個体の一生といった短い時間では、これらマイクロサテライトは微動だにしないものと考えられていた。ところが、遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC) 患者に発生した腫瘍では、マイクロサテライト配列長が、正常組織にくらべ著明に変化していた。この現象はその後、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability, MSI) と呼ばれるようになった。

1 回の DNA 複製には、ヒトでは 6.0×10^9 塩基対もの合成が必要となるが、これを担う DNA ポリメラーゼの精度には限界がある。ポリメラーゼがおかす誤りには 2 種類がある。ヌクレオチドの入れ間違いによる塩基ミスマッチ (base mismatch) とリピート配列部における繰り返し単位の合成回数の誤りに起因する DNA 鎖ミスアラインメント (strand misalignment) である。これらは、放置されると、1 回の複製を経て、それぞれ塩基置換変異 (base substitution) と挿入・欠失変異 (insertion/deletion) とに固定されてしまう。これらの複製エラー (replication error) は実際には、ポリメラーゼ複合体に含まれ、3' エキソヌクレアーゼ活性をもつドメインによる校正 (proofreading) 機能と DNA ミスマッチ修復 (DNA mismatch repair, MMR) と呼ばれる DNA 修復機構との 2 つにより取り除かれ、突然変異の発生は強力に抑制されている。HNPCC の責任遺伝子として最初に見出された

MSH2 は、この MMR 系を構成する遺伝子のひとつであった。爾来、ヒト腫瘍でしばしば観察される MSI は MMR 異常によるものと考えられている。

MSI はとくに腫瘍学の分野で注目され、文献には膨大なデータが集積された。しかし、各々の疾患におけるその頻度となると、報告によって極めてまちまちであることがわかる。実は MSI 解析は技術論的に未解決な問題が少なくない。研究代表者のグループは、これらの技術論的問題をほぼすべて解決した高精度マイクロサテライト解析系を 1997 年に報告した、この系を用いた多面的な解析をおこなったところ、ヒト腫瘍にみられる MSI には、実は質的に異なる 2 つのモード、すなわち Type A と Type B が存在することを明らかになった。MMR 遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析から、MMR 異常を十分条件として生じる MSI は Type A であることが明らかとなった一方、Type B は、HNPCC に生じた腫瘍も含め、多くのヒト腫瘍で観察されている。このように、MMR 異常とヒト腫瘍における MSI との関係は、これまで考えられてきたように単純ではない。

マイクロサテライト配列がその長さを変化させる分子機序には、元来以下のような複数のメカニズムが想定される。

- A. DNA ポリメラーゼの複製エラー
- B. DNA ポリメラーゼの校正機能の異常
- C. DNA ミスマッチ修復の異常
- D. Okazaki フラグメント処理の異常
- E. 2 重鎖切断修復の異常

マイクロサテライトの配列変化は、これまで MMR 異常からのみ説明されてきたが、マイクロサテライトが変化する分子機序を総合的に解明し、その動態とその病因論的意義を明らかにすることがもとめられている。

2. 研究の目的

本研究では、以下の問題群に解答することを目標とした。

- A. 正常細胞機能下におけるマイクロサテライト配列変化
 - a) 種間、個体間のマイクロサテライト配列の多様性
 - b) DNA ポリメラーゼはマイクロサテライト配列をどのように複製するか
- B. 病的細胞機能下におけるマイクロサテライト配列変化
 - a) ミスマッチ修復異常とマイクロサテライト変化
 - b) 他の分子機能 (DNA ポリメラーゼ校正機能、Okazaki フラグメントプロセッシング、遺伝子変換 etc) の異常とマイクロサテライト変化
- C. マイクロサテライト配列変化の細胞機能への影響
 - a) マイクロサテライト変化がミューター形質を反映する場合
 - b) マイクロサテライト変化が遺伝子を破壊する場合
 - c) マイクロサテライト変化がクロマチン制御を妨害する場合

3. 研究の方法

本研究では、上に掲げたそれぞれの問題に対して以下のような解析をおこなうものとした。

- A. 正常細胞機能下におけるマイクロサテライト配列変化
 - a) 種間、個体間のマイクロサテライト配列の多様性：ゲノムデータベースの活用
 - b) DNA ポリメラーゼはマイクロサテライト配列をどのように複製するか：組換え体や精製標品を用いた *in vitro* アッセイ
- B. 病的細胞機能下におけるマイクロサテライト配列変化
 - a) ミスマッチ修復異常とマイクロサテライト変化：腫瘍細胞 DNA における MSI 解析
 - b) 他の分子機能 (DNA ポリメラーゼ校正機能、Okazaki フラグメントプロセッシング、遺伝子変換 etc) の異常とマイクロサテライト変化：それぞれの分子機能を担う遺伝子の構造解析、発現解析
- C. マイクロサテライト配列変化の細胞機能への影響
 - a) マイクロサテライト変化がミューター形質を反映する場合：腫瘍細胞 DNA における癌遺伝子、癌抑制遺伝子の構造解析
 - b) マイクロサテライト変化が遺伝子を破壊する場合：リピートを ORF にもつ遺伝子の構造解析、発現解析
 - c) マイクロサテライト変化がクロマチン

ン制御を妨害する場合：MSI を呈する細胞に対する発現マイクロアレイ解析、定量的 RT-PCR 解析

4. 研究成果

研究開始当初は、正常細胞機能下におけるマイクロサテライト配列変化として、種間、個体間のマイクロサテライト配列多様性について、また、病的細胞機能下におけるマイクロサテライト配列変化としては、とくに、MMR 異常および DNA ポリメラーゼ校正機能 (DNA polymerase proofreading, PPR) の異常下におけるマイクロサテライト変化について、重点的に解析を行った。このような解析の結果、とくに注目されたのが、1 塩基繰り返し (mononucleotide) マイクロサテライト配列の動態であった。mononucleotide マイクロサテライトがヒト集団間で著しく多型に乏しいことが見出されたのである。このことは、極めて多型に富む 2 塩基繰り返し (dinucleotide) マイクロサテライトと好対照をなしている。この結果を受け、MMR 能および PPR 機能に既知の異常をもつ株化培養細胞を用いて解析を進めた結果、2 つの細胞機能の働きのちがいによる、それぞれのマイクロサテライトの固有の動態が明らかになった。すなわち、dinucleotide マイクロサテライトは MMR の異常のみにより不安定化するのに対し、mononucleotide マイクロサテライトは MMR 異常に加え、PPR の異常によっても不安定化することが示唆された。このことは、両細胞機能の役割分担が垣間見られた点で、大変興味深い。現在、MMR 能および PPR 機能を欠くマウス胎児線維芽細胞 (PPR-変異型 DNA ポリメラーゼ遺伝子をトランスジーンとして導入した MMR 遺伝子ノックアウトマウス細胞) を樹立し、その解析をおこなっている。

このようにマイクロサテライト配列の安定化に寄与する PPR の異常がヒト腫瘍にどの程度観察されるかについてもアプローチした。ヒト大腸癌約 80 症例において、PPR 機能を担う複製型 DNA ポリメラーゼの校正機能ドメインをコードする遺伝子領域を解析したところ、1 例に有害な変異が見出された。PPR 異常は MSI につながる分子異常であるものの、MMR 異常のようにヒト腫瘍において比較的高頻度に観察される分子異常ではないことがわかった (Yoshida R *et al.* Eur J Hum Genet 2011)。

また、研究の後半からは、cell free システムをもちいた観察の必要性を感じ、生理的な DNA 複製が観察可能な *in vitro* 系の構築に着手、これを完成させた (Nakao S *et al.* Biochimie 2013)。このシステムをもちいて、リピート配列部に生じる複製エラーに対する詳細な観察を開始した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yoshida R, Miyashita K, Inoue M, Shimamoto A, Zhao Y, Egashira A, Oki E, Kakeji Y, Oda S, Maehara Y: Concurrent genetic alterations in DNA polymerase proofreading and mismatch repair in human colorectal cancer. **Eur J Hum Genet** 19: 320-325, 2011 (査読有)
DOI: 10.1038/ejhg.2010.216
- ② Nakao S, Zhang S, Vaara M, Syvaoja JE, Lee MY, Tsurimoto T, Karran P, Oda S: Efficient long DNA gap-filling in a mammalian cell-free system: A potential new in vitro DNA replication assay. **Biochimie** 95: 320-328, 2013 (査読有)
DOI: 10.1016/j.biochi.2012.09.031

[学会発表] (計 4 件)

- ① 吉田倫太郎、宮下要、井上真由子、島本章義、趙岩、掛地吉弘、織田信弥、前原喜彦：ヒト大腸癌における DNA ポリメラーゼ校正機能およびミスマッチ修復の遺伝学的並存変化 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 5 日 名古屋
- ② 織田信弥：ヒトがんにみられる DNA ポリメラーゼ校正機変異 日本人類遺伝学会第 56 回大会 2011 年 11 月 11 日 千葉
- ③ 中尾精希、織田信弥：2 本鎖環状 DNA 基質と哺乳動物細胞粗抽出液をもちいた DNA 複製効率の定量化 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 15 日 横浜
- ④ 中尾精希、織田信弥：細胞粗抽出液中で長い単鎖領域に誘導される DNA 合成反応の性質と in vitro DNA 複製系としての可能性 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 14 日 福岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.ia-nkcc.jp/rinsho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

織田 信弥 (ODA SHINYA)
独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他の部局等・その他
研究者番号：40333372

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

倉岡 功 (KURAOKA ISAO)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授
研究者番号：60335396