

## DNA ミスマッチ修復遺伝子 MLH1 及び MSH3 の 転写制御機構の解明

[1] 組織

代表者：逸見 仁道

(東邦大学医学部医学科)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

菅野 新一郎

(東北大学加齢医学研究所)

有田 通恒

(東邦大学医学部医学科)

研究費：物件費 30 万円

[2] 研究経過

腫瘍細胞における DNA 修復異常の研究は、近年ますますその重要性を増している。本共同研究では、DNA ミスマッチ修復遺伝子である MLH1 を中心に転写制御に関わる因子群を明らかにするとともに低酸素時の動態を調べることを目的とした。

我々は hMLH1 遺伝子の転写重要領域に間接的ないしは直接結合する因子として SYF2/p29 および CXXC5 を単離同定し、さらに前年度の共同研究により、これら因子と複合体を形成するパートナータンパクとして hnRNPH1 を同定した。本年度はこの hnRNPH1 を含む複合体の転写制御活性や低酸素感受性などを中心に研究を進めた。本研究の研究計画の概略と方向性は昨年度の詳細な打ち合わせで決定しており、研究の進捗状況から計画に大きな変更が必要ないことから、随時 e-Mail にて行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第 1 に、hnRNPH1 が hMLH1 遺伝子の転写制御に関与していることを見出した。即ち、hnRNPH1 siRNA を用いて hMLH1 発現を mRNA およびタンパクレベルで調べたところ、mRNA で 40%程度、タンパクで 20-30%抑制が見られた。この結果は、hnRNPH1 が SYF2/p29 および CXXC5 同様 hMLH1 遺伝子の転写活性

化因子として働いていることを示唆する。

第 2 に、これら 3 因子のうち、CXXC5 および hnRNPH1 は DNA 結合能を有していることを実験的に証明した。CXXC5 は抗 FLAG 抗体を用いた ChIP 法で、hnRNPH1 は FP3-CAT145 配列(-103~-79) を含む oligonucleotide を用いた pull-down 法で確認した。また、SYF2/p29 には既知の DNA 結合モチーフはなく、DNA 結合能も確認されていない。

第 3 に、低酸素下での hMLH1 転写抑制にこれら 3 因子が関与していることを見出した。即ち、低酸素下で SYF2/p29 タンパク量は経時的に減少した。SYF2/p29 mRNA 発現が影響を受けないことと合わせて考えると、タンパク分解が亢進していることが考えられた。hnRNPH1 発現も mRNA およびタンパクレベルで、また、CXXC5 mRNA も経時的に減少したことから、3 因子ともに低酸素下での hMLH1 転写抑制に関与していると結論づけた。

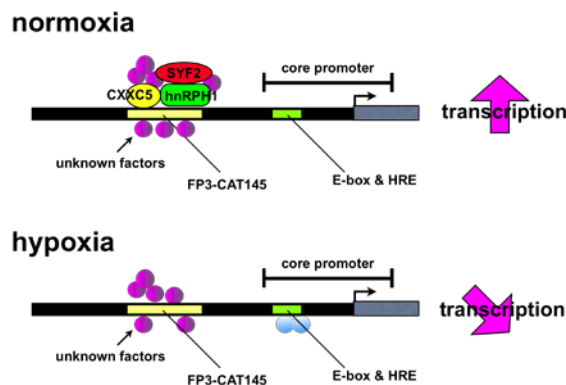


図 1. hMLH1 遺伝子の FP3-CAT145 を介した転写制御機構の概略  
酸素存在下では CXXC5 および hnRNPH1 が FP3-CAT145 site に結合し、SYF2/p29 は hnRNPH1 と結合しており、更に、hnRNPH1 は CXXC5 と結合している。この状態で hMLH1 遺伝子は発現している。  
低酸素状態ではこれら 3 因子が減少し、その結果、hMLH1 発現が転写レベルで低下する。

第 4 に、hMSH3 の転写制御領域と低酸素下での転写抑制に関与する領域を明らかにした。hMSH3 は hMLH1 同様、典型的な TATA-box less 遺伝子であり、core promoter 領域には Int と downstream promoter element (DPE) が存在する。レポータープラスミド

を用いた実験から、この領域に加えて、-2658〜-2480の間に、enhancerが存在することが明らかになった。低酸素下ではp53依存性の発現抑制様式が見られた。即ち、p53変異細胞では緩慢な抑制が、p53正常細胞では抑制が全く起こらないかあるいは急激な抑制が起こるかのどちらかであった。抑制の初期段階ではp53の状態に関わらず、HIF-1依存性であった。hMSH3の転写制御領域にはhypoxia response element (HRE)が2カ所存在する。これらのHREがともに働いていることをレポータープラスミド実験から明らかにした。より遠位にあるHRE1はenhancerのある領域と重なっているが、HRE1に変異を入れた実験からHRE1とenhancerは重なっていないことが分かった。

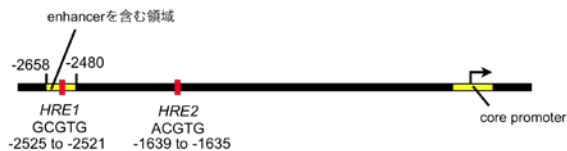


図2. hMSH3のpromoterとenhancer領域

### (3-2) 波及効果と発展性など

(大型プロジェクトへの発展・国際会議(シンポジウム)への発展・学外研究者との交流、共同研究による効果・研究者ネットワークの拡大・若手研究者の育成・新研究領域の開拓・成果の他分野への応用・萌芽的研究への発展等)

腫瘍細胞におけるDNA修復遺伝子、ことにDNAミスマッチ修復遺伝子の発現抑制は大腸がんや卵巣が

んなど多くの悪性腫瘍の進展に関与していることが近年次第に明らかになりつつある。発現異常の分子機構として従来型の遺伝子変異やメチル化などの化学修飾に加えて、低酸素下での発現抑制の重要度も増している。ことに、DNA修復機構の異常に起因するゲノム不安定性の誘導には細胞増殖が必須で、DNA修復遺伝子の発現抑制と増殖関連遺伝子の活性化が同時に起こると考えられる。低酸素-酸素再供給を繰り返すことで、腫瘍細胞がより悪性度を増す能力を獲得すると思われる。このような観点から、本共同研究の結果は最新の知見を更に分子レベルで解析可能とする可能性を含んでおり、がんの悪性度や腫瘍幹細胞マーカー検索などへの応用にも発展する可能性を秘めている。また、本共同研究で明らかになった新規候補因子のDNA修復遺伝子発現における役割を解明する研究は新しい研究領域を開拓する可能性を秘めており、このような新領域の研究でこれら因子の機能が明らかになれば、新たな遺伝子発現抑制経路の解明へと発展することが期待される。

### [4] 成果資料

研究成果については、現在のところ未発表であるが、以下の論文を投稿予定である。

- 1) Arita M, Kanno S, et al. SYF2, CXXC5, and hnRPH1 corresponding regulators for downregulation of human MutL homolog 1 expression in hypoxia.
- 2) Li J, Arita M, et al. Downregulation of MutS homolog 3 under hypoxic condition in human colorectal cancer cells.