

# がん抑制遺伝子 p53 の組換え修復を介した 遺伝的安定化機構

本間 正充

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 〒 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

## Recombinational DNA repair and maintenance of genomic integrity mediated by p53

Masamitsu Honma

National Institute of Health Sciences, Division of Genetics and Mutagenesis  
1-81-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

### Summary

Chromosomal double strand breaks (DSB) occurring in mammalian cells can initiate genomic instability and their misrepairs result in chromosomal deletion, amplification, or translocation, common findings in human tumors. The tumor suppressor protein p53 is involved in maintaining genomic stability. We demonstrate here that the deficiency of wild-type p53 protein may allow unrepaired DSB to initiate chromosomal instability. The human lymphoblastoid cell line TK6-E6 was established by transfection with HPV16 E6 cDNA into parental TK6 cells *via* a retroviral vector. Abrogation of p53 function by E6 resulted in an increase in the spontaneous mutation frequencies at the heterozygous thymidine kinase (*tk*) locus. Almost all TK-deficient mutants from TK6-E6 cells exhibited loss of heterozygosity (LOH) with the hemizygous *tk* allele. LOH analysis with microsatellite loci spanning the long arm of chromosome 17, which harbors the *tk* locus, revealed that LOH extended over half of 17q toward the terminal end. Cytogenetic analysis of LOH mutants by chromosome painting indicated a mosaic of chromosomal aberrations involving chromosome 17, in which partial chromosome deletions, amplifications and multiple translocations appeared heterogeneously in a single mutant. We speculate that spontaneous DSB triggers the breakage-fusion-bridge cycle leading to such multiple chromosome aberrations. In contrast, no chromosomal alterations were observed in TK-deficient mutants from TK6-20C cells expressing wild-type p53. In wild-type p53 cells, spontaneous DSB appear to be promptly repaired through recombination between homologous chromosomes. These results support a model in which p53 protein contributes to the maintenance of genomic integrity through recombinational repair.

**Keywords :** p53, genomic instability, double-strand break (DSB), recombinational DNA repair, loss of heterozygosity (LOH)

### 緒 言

染色体上に生じた DNA の 2 本鎖切断 (DSB) は、end-rejoining または相同組換えによって修復される。End-rejoining によって修復された場合は染色体の部分欠

失、もしくは転座をもたらす。一方、相同染色体間で組換え修復が起こった場合は、構造的変化を伴わない (Jeggo, 1998)。一般的に、組換え修復は酵母などでは高頻度に起こるが、ほ乳類細胞においてはまれであり、DSB の大部分は前者の end-rejoining によって修復されたと考えられている (Weaver et al., 1995)。しかしながら、遺伝的安定性を考えると、組換え修復の方が生体にとっては有利であるように思われる。がん抑制遺伝子で

受付：2001年4月25日 受理：2001年5月7日  
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第29回大会において発表された2000年度研究奨励賞受賞講演である。  
This paper is the lecture of the JEMS Achievement Award (2000) presented at the 29th JEMS annual meeting, 2000.

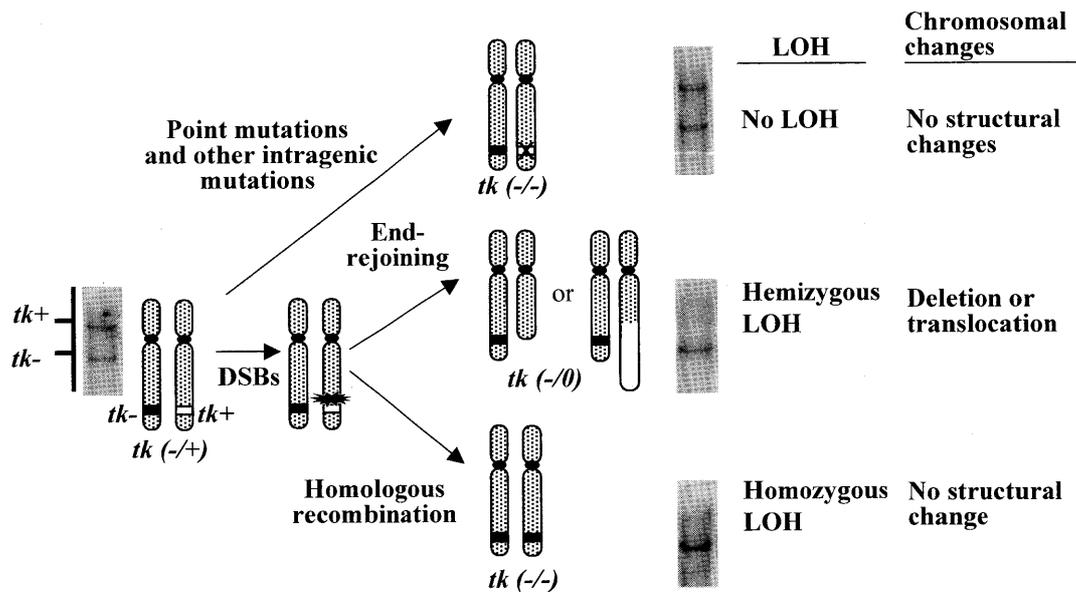


Fig. 1 A general model of recessive mutations in the *tk* locus. The human *tk* gene is located on chromosome 17q and is heterozygous (*tk*-/+) in TK6 cells. DSBs occurring within or near the functional *tk* locus are usually repaired by either of two pathways: end-rejoining or homologous recombination. End-rejoining brings about hemizygous LOH, accompanied by interstitial deletions or translocations, while homologous recombination brings about homozygous LOH, but no apparent changes in chromosome structure. The hemizygous LOH and homozygous LOH can be distinguished by the quantification of the *tk*-band.

ある p53 は「ゲノムの守護神」とも呼ばれ、ほ乳類細胞における遺伝的安定化に重要な役割を担っていると考えられている (Lane, 1992; Levine, 1997). 本稿では初めに、ほ乳類ゲノムにおける DSB 修復機構解析のためのモデル系として、チミジンキナーゼ遺伝子 (*tk*) をターゲットとした劣性型遺伝子突然変異検出系の有用性を紹介し、ほ乳類細胞においても組み換え修復機構が DSB の修復に重要な役割を持っていることを示す (本間ら, 1996). そして、p53 欠損および変異細胞を用いた遺伝子突然変異の研究から、p53 による組換え修復を介した新しい遺伝的安定化機構を提唱する (Honma et al., 2000).

## 1. 組換え修復と LOH 型突然変異

染色体ゲノムにおける DSB 修復機構を解析するためのモデル系としては、ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 の 17 番染色体長腕上にヘテロに存在するチミジンキナーゼ遺伝子 (*tk*) をターゲットとした劣性型の遺伝子突然変異検出系が有用である (Fig.1) (Liber et al., 1989). *tk* 遺伝子突然変異細胞はトリフルオロチミジン (TFT) 抵抗性の変異株として回収できるが、*tk* 活性アリルに DSB が生じ、それが end-rejoining, もしくは相同染色体間の組換えによって修復されると、活性型 *tk* アリルが消失した変異体、いわゆる LOH (loss of heterozygosity) 型の突然変異体をもたらす (Yandell et al., 1986). この場合、end-rejoining によって活性アリルの欠失が生じた場合はヘミ型 LOH, 相同組換えによって不活化アリルが

ホモになった場合はホモ型 LOH となる. LOH は p53 や Rb などの癌抑制遺伝子で観察される変異の一つであり、その多くは単純に遺伝子の欠失によるものと考えられてきた. しかしながら、最近では染色体解析等により LOH は相同組換えに起因することが多いことが示されている (Honma and Little, 1995; Moynahan and Jasim, 1997).

組換え修復が逆に劣性型の突然変異をもたらすことは奇妙に思えるかもしれない. これは、相同組換えはゲノム上のさまざまな部位で起き DSB の修復に寄与していると考えられるが、たまたま組換えのドナーとなる遺伝子に突然変異があると、その変異をホモ化するためである (本間, 1999a). このことは、癌抑制遺伝子の 2 段階ヒットにおける不活化機構を考慮する上でも重要である. 相同組み換え自体は突然変異をもたらさないが、第 1 ヒットとして点突然変異が存在するときに限り、第 2 ヒットとしての DSB が相同組換えを通じて劣性型の変異をもたらす. 多段階発癌過程における癌遺伝子や癌抑制遺伝子の段階的な変異の蓄積にはこのような変異のタイプとその順序が重要であり、点突然変異は癌化初期に、相同組換えによる LOH は中期以降の変異の蓄積に関与するものと考えられる.

LOH は欠失もしくは相同組換え以外に、gene conversion, illegitimate recombination, mitotic non-disjunction, chromosome duplication 等のメカニズムによっても起こりうる (Fig. 2). これらメカニズムは染色体や、*tk* 近傍の遺伝マーカー等を解析することにより分

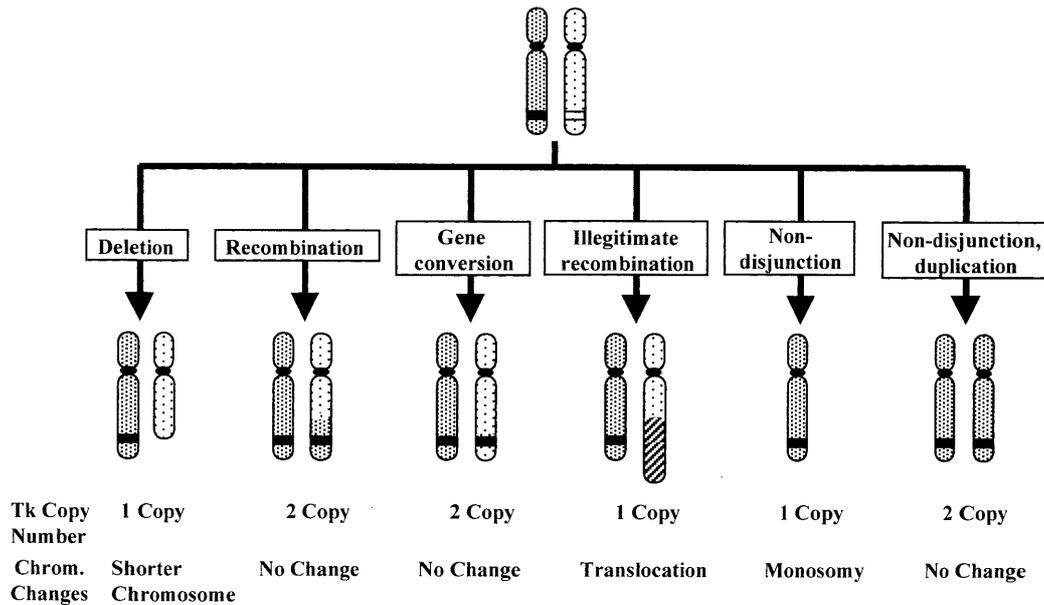


Fig. 2 A model for the mechanisms that generate LOH. Deletion, homologous recombination, gene conversion, illegitimate recombination, non-disjunction, and non-disjunction followed by chromosome duplication contribute to LOH. These mechanisms can be distinguished by molecular and cytogenetic analyses.

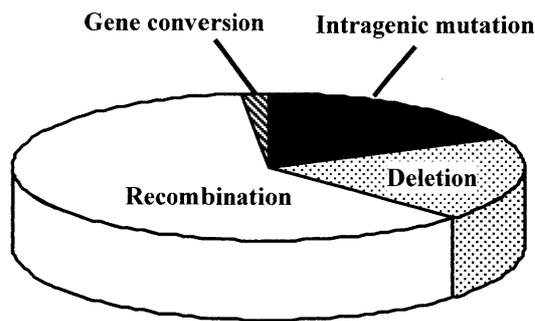


Fig. 3 Spectra of mutations at the *tk* locus spontaneously generating in TK6 cells. Deletion, recombination, and gene conversion are demonstrated as LOH.

類することができる。LOH発生のメカニズムを解明することは、ヒト細胞における組み換え修復機構だけでなく、細胞癌化を制御する因子の解明にもつながるものと考えられる (Honma et al., 2001)。

Fig. 3にTK6細胞の自然誘発 *tk* 遺伝子突然変異のスペクトルを示す。全体の突然変異の20%が点突然変異で、残り80%がLOHであり、その大部分が相同組換えに起因していた (Honma et al., 1997a)。このことは、ほ乳類細胞においてもDSBの修復に、組み換え修復が重要な役割を果たしていることを示すものである。ただし、この結果から単純にヒト細胞での自然突然変異は点突然変異よりも、組換えによるLOHの方が高頻度で起こっていると言いつけることはできない。常染色体性劣性型突然変異検出系では、組換えによってLOHを引き起こすDSBは必ずしも *tk* 遺伝子内に生じる必要がなく、ターゲットはセントロメアまでの上流領域まで含まれるた

め、組換え型LOHが検出しやすい系であることを理解しておく必要がある。しかしながら、癌抑制遺伝子であるRbやp53のヒトがん組織でのLOH頻度や、その機構はここで観察されたものと一致しており、本検出系はDSB修復のモデル系であると同時に、細胞のがん化過程における遺伝子変化のモデルとも考えることもできる (Li et al., 1992)。

## 2. p53欠損細胞における遺伝的不安定性の特徴

がん抑制遺伝子であるp53はヒトがん組織において最も高頻度に変異が観察される遺伝子であり (Hollstein et al., 1991)、その役割として、損傷したDNAを認識し、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導、DNA修復の促進を行うことによりゲノムの安定化に寄与していると考えられている (Kastan et al., 1991; Ko et al., 1996)。p53遺伝子の突然変異制御への役割を検討するため、p53欠損細胞、もしくは変異細胞を用い、そこで生じる遺伝子突然変異頻度や特徴をp53正常細胞と比較した。

TK6細胞にヒトパピローウイルスのE6タンパクを発現させたTK6-E6細胞、およびベクターのみを導入したTK6-20C細胞を樹立した。E6タンパクは野生型p53タンパクと結合し、すみやかに分解するため、TK6-E6細胞は機能的にp53を欠損した細胞とみなすことができる (Yu et al., 1997)。Fig.4にそれぞれの細胞株の *tk* 遺伝子突然変異頻度を示した。TK6-E6は約10倍の自然突然変異頻度の上昇が認められ、p53の欠損により細胞は遺伝的に不安定にあり、いわゆる mutator phenotype を示した (Honma et al., 2000)。

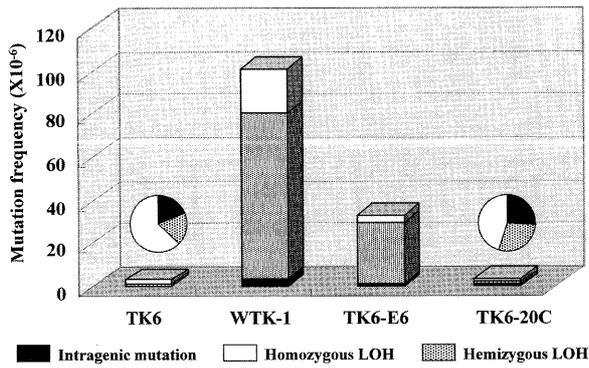


Fig. 4 Spontaneous mutation frequencies and spectra of the mutations at the *tk* locus in wild-type p53 cells (TK6, TK6-20C), p53-deficient cells (TK6-E6), and p53-mutated cells (WTK-1). The mutations are classified into 3 types; intragenic mutation, hemizygous LOH, and homozygous LOH.

TK6-E6細胞で生じる突然変異の特徴を明らかにするため *tk* 変異体の LOH 解析を行った (Fig. 4). Fig.3 に示したように p53 正常細胞である TK6 では生じる変異の大部分がホモ型の LOH だったのに対して, TK6-E6 ではそのほとんどがヘミ型 LOH を示した. このことは TK6-E6 細胞では組み換え修復が起こらないため DSB の大部分は end-rejoining によって修復されることを示している. この LOH の範囲をマイクロサテライトマーカーを用いて 17 番染色体上にマッピングした (Fig. 5). p53 正常細胞 (TK6) 由来の欠失型 LOH のほとんどは *tk* 遺伝子に

限局する interstitial deletion か, *tk* より末端までの terminal deletion であり, 染色体の変化が最小限となっているのに対して, p53 欠損細胞 (TK6-E6) のほとんどの変異体には, 染色体広範にわたる terminal deletion が起きていた. また, このような広範な LOH は p53 正常細胞ではすべて組換え型 LOH として観察されることから, 本来組換えによって修復されるべき DSB が, p53 欠損細胞では end-rejoining によって修復され, その結果, 大きな染色体異常をもたらしているものと考えられた. 実際, TK6-E6 由来の LOH 変異体をクロモゾームペイント法により解析すると, 17 番染色体の部分欠失, 転座, 増幅等の構造異常が同一クローン中にモザイクとして観察された.

これらの観察結果から, 以下のような p53 欠損細胞における遺伝的不安定性のメカニズムを提唱する (Fig. 6). 一般に, 染色体上におきた 2 本鎖切断は, まず end-rejoining に修復され, これは interstitial deletion をもたらず. そして, ここで修復されなかった 2 本鎖切断は, DNA 複製後, 相同染色分体間の組換えによって修復される. このように正常細胞では end-rejoining と組換え修復により, 染色体は比較的安定に保たれるものと考えられる. 一方, p53 欠損細胞では, 組換え修復ができないため, DNA 複製後の染色分体は, その安定性を確保するため互いに結合し, chromatid fusion を形成する. これは, 一時的には安定であるが, 細胞分裂を迎えると引きちぎられ, 再び 2 本鎖切断が生じる. そしてこれが

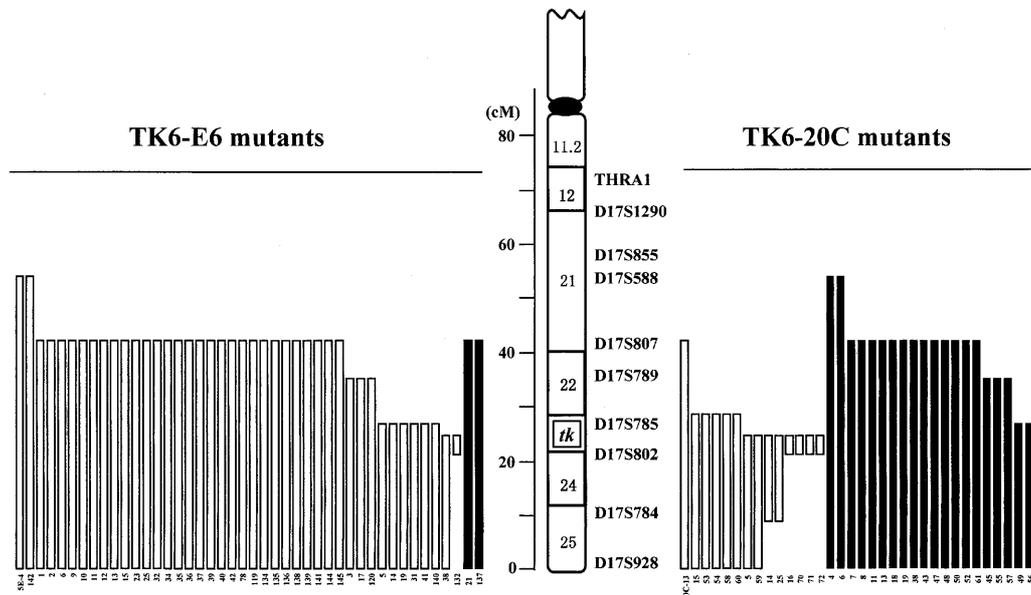
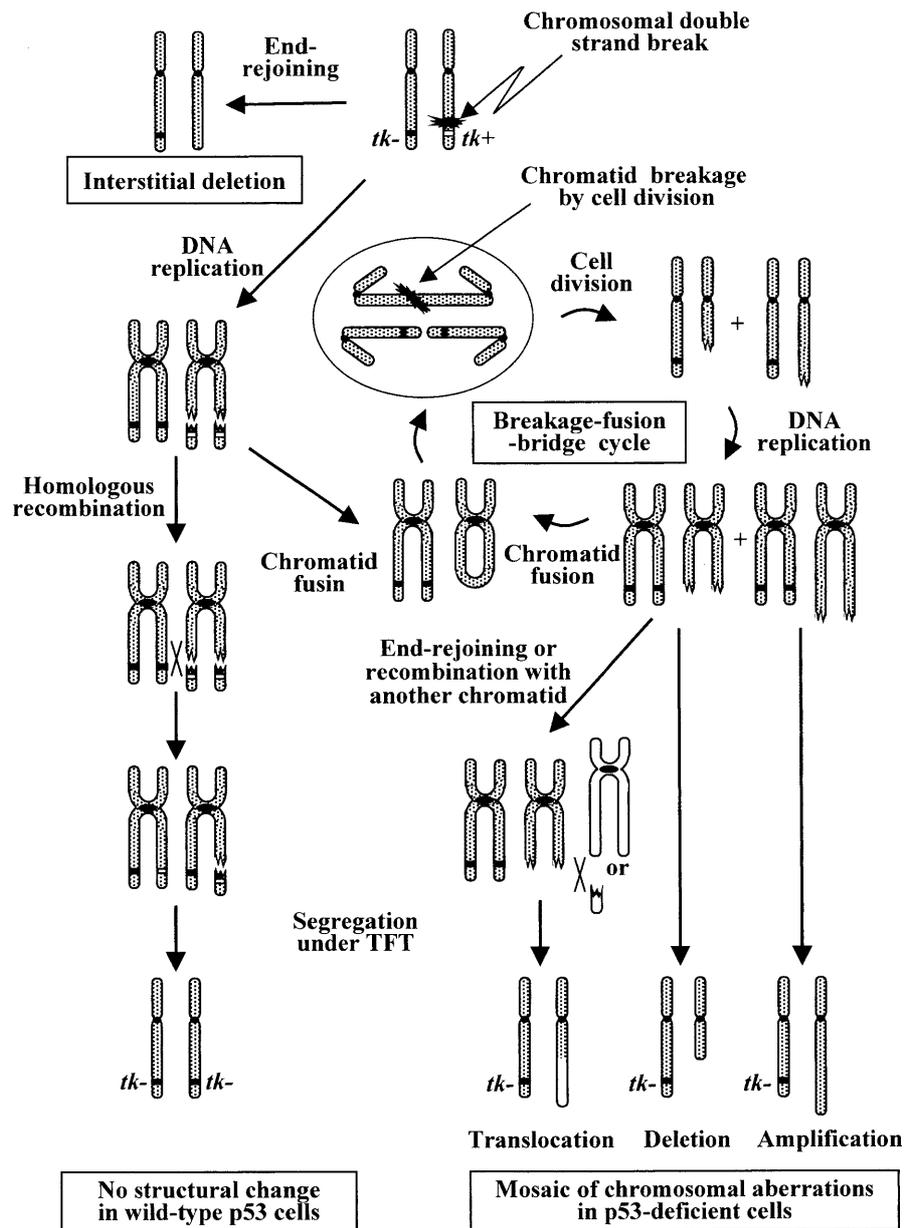


Fig. 5 Extent of loss of heterozygosity (LOH) in the TK-deficient mutants TK6-E6 and TK6-20C. Ten microsatellite loci on chromosome 17 that are heteromorphic in TK6 cells were examined. The approximate position of each locus is mapped on the right of the schematic chromosome 17q. The human *tk* locus is mapped on 17q23.2. Open and closed bars represent hemizygous LOH and homozygous LOH mutants, respectively. Length of bars indicates the extent of LOH. Forty-two hemizygous and 2 homozygous LOH mutants from TK6-E6 and 14 hemizygous and 20 homozygous LOH mutants from TK6-20C were analyzed.



**Fig. 6** A model for mechanisms eliciting DSBs repair in wild-type p53 cells and p53-deficient cells. DSBs spontaneously arising are primarily repaired by end-rejoining, resulting in interstitial deletions. After DNA replication, remaining DSBs were promptly repaired by homologous recombination resulting in homozygous LOH, but no apparent chromosomal changes. In p53-deficient cells, on the other hand, the DSBs are not subjected to recombinational repair. Broken chromosomes trigger the breakage-fusion-bridge (BFB) cycle, occasionally stabilized by the addition of a chromosome fragment with telomere through end-rejoining or recombination, and then finally lead to a mosaic of variegated chromosome aberrations.

DNA複製を経て、再びchromatid fusionを起こし、これが繰り返される。この現象をBreakage-fusion-bridge (BFB) cycleという (Coquelle et al., 1997 ; Pipiras et al., 1998)。このとき引きちぎられる染色体部位は必ずしもfusionした部位ではなく、fragile siteのような物理的に弱い部位で起きることが予想され、この場合、染色体はasymmetricに別れ、一方は長く、一方は逆に短くなり、さらにこの長さの変化は繰り返されることに増幅さ

れる。そしてこのサイクルは偶然に、別の染色体との組換えやend-rejoiningによって、末端部分にテロメア構造を獲得することによりストップする。最終的に変異体中に、染色体の欠失、転座、増幅といった異常をモザイク状にもたらす。このように、p53欠損細胞が遺伝的に不安定である、その要因は、すみやかに修復されないDSBであり、これがBFBサイクルの引き金となって、種々の染色体異常を引き起こすものと考えられる。

### 3. p53 変異細胞における遺伝的不安定性の特徴

p53 変異細胞として WTK-1 細胞を利用した。WTK-1 は TK6 と同一起源をもつ isogenic 細胞であるが、p53 遺伝子のコドン 237 にホモに突然変異をもつため、変異型 p53 タンパクが細胞内に多量に蓄積している。WTK-1 細胞においても tk 遺伝子座で TK6 細胞の 30 倍以上もの自然突然変異頻度の増加がみられ、mutator phenotype を示した (Fig. 4)。変異体を解析すると、WTK-1 細胞ではヘミ型 LOH だけでなく、ホモ型の LOH の頻度も増加していた。このことから WTK-1 細胞では TK6-E6 細胞と異なり、組換え修復能は保持されているものと考えられた (Fig. 4)。LOH 変異体の染色体を解析すると、組換え型と思われた変異体の染色体には転座を伴うものが多く、その転座は変異体にクローナルに観察されたことから WTK-1 細胞では組換え修復は起こるが、その fidelity が低いために非相同 (illegitimate) 性の組換えにより、他の染色体部位との転座を誘発するものと考えられた (Honma et al., 1997b)。また、WTK-1 細胞では染色体不分離による aneuploid も高頻度に観察され、変異型 p53 は組換え修復の異常に伴う染色体の構造的変異をもたらすだけでなく、細胞分裂や染色体分離機構にも影響を与え、染色体の数的異常も導くものと考えられた (Cross et al., 1995 ; Fukasawa et al., 1996 ; Honma et al., 2001)。

### 結 語

p53 による遺伝的安定化機構として、ゲノム中に生じた DSB の相同組換え修復への関与を提唱する。p53 欠損細胞ではこの相同組換えがすみやかに働かないため、修復を免れた DSB は BFB サイクルを介して転座、欠失、増幅等のさまざまな染色体異常をもたらす (Livingstone et al., 1992 ; Agapova et al., 1996 ; Mukhopadhyay et al., 1997)。また、p53 変異細胞では組み換え修復能は保持されているものの、その正確さが低いため逆に染色体転座を誘発する。このように p53 の欠損、もしくは異常による遺伝的不安定性は点突然変異のような小さな遺伝子変異よりも染色体レベルの大きなゲノム変化に関与している。多段階発癌過程におけるゲノム変化を考えると、p53 の異常は、相同、非相同性の組換えを介して、ゲノム中に LOH 型の突然変異や染色体異常の蓄積を促しているものと考えられる。

また、ここで示した BFB サイクルによるゲノム不安定化現象は正常細胞においても、放射線等の環境変異原によりゲノム中に多量の DSB が生じた場合にも起こる可能性があり、放射線による染色体の部分欠失、転座、増幅といった遅延型染色体異常誘発のメカニズムを合理的に説明することができる (本間, 1999b)。

### 謝 辞

本研究は林真博士、祖父尼俊雄博士他、国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部の皆様、ハーバード大学 J. Little 教授らのご協力や、有意義な議論によってなされたものです。ここに、感謝の意を表します。また、同じ tk の突然変異試験であるマウスリンフォーマ試験に関しては、製薬協の多くの人たちと共同研究を行い、ICH における遺伝毒性試験の改訂作業にも携わることができ、行政に関わる研究者として大きな経験を得ることができました。この共同研究に携わっていただいた多くの方にも感謝いたします。

### 参 考 文 献

- Agapova, L., G. V. Ilyinskaya, N. A. Turovets, A. V. Ivanov, P. M. Chumakov and B. P. Kopnin (1996) Chromosome changes caused by alteration of p53 expression, *Mutat. Res.*, 354, 129-138.
- Coquelle, A., E. Pipiras, F. Toledo, G. Buttin and M. Debatisse (1997) Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons, *Cell*, 89, 215-225.
- Cross, S. M., C. A. Sanchez, C. A. Morgan, M. K. Schimke, S. Ramel, R. L. Idzerda, W. H. Raskind and B. J. Reid (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint, *Science*, 267, 1353-1356.
- Fukasawa, K., T. Choi, R. Kuriyama, S. Rulong and G. F. V. Woude (1996) Abnormal centrosome amplification in the absence of p53, *Science*, 271, 1744-1747.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. C. Harris (1991) p53 mutations in human cancer, *Science*, 253, 49-53.
- Honma, M. and J. B. Little (1995) Recombinagenic activity of the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in human lymphoblastoid cells, *Carcinogenesis*, 16, 1717-1722.
- 本間正充, 林 真, 祖父尼俊雄 (1996) ヒトリンパ球細胞株の tk 遺伝子を利用した欠失型、組み換え型突然変異、環境変異原研究, 18, 107-111.
- Honma, M., M. Hayashi and T. Sofuni (1997a) Cytotoxic and mutagenic responses to X-ray and chemical mutagens in normal and p53-mutated human lymphoblastoid cells, *Mutat. Res.*, 374, 89-98.
- Honma, M., L.-S. Zhang, M. Hayashi, K. Takeshita, Y. Nakagawa, N. Tanaka and T. Sofuni (1997b) Illegitimate recombination leading to allelic loss and unbalanced translocation in p53-mutated human lymphoblastoid cells, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 4774-4781.
- 本間正充 (1999a) 内分泌攪乱化学物質がもたらす遺伝的不安定性、環境変異原研究, 21, 281-285.
- 本間正充 (1999b) 多段階発癌過程における組み換え修復異常と遺伝的不安定性, *放射線科学*, 42, 423-425.
- Honma, M., M. Momose, H. Tanabe, H. Sakamoto, Y. Yu, J. B. Little, T. Sofuni and M. Hayashi (2000) Requirement of wild-type p53 protein for maintenance of chromosome integrity, *Mol. Carcinog.*, 28, 203-214.
- Honma, M., M. Momose, T. Sofuni and M. Hayashi (2001) Spindle poisons induce allelic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction, *Mutat. Res.*, (in press).
- Jeggio, P. A. (1998) Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells, *Radiat. Res.* 150 (Suppl.), S80-S91.
- Kastan, M. B., O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein and R. W.

- Craig (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage, *Cancer Res.*, 51, 6304-6311.
- Ko, L.J. and C. Prives (1996) p53 : puzzle and paradigm. *Gene & Devel.*, 10, 1054-1072.
- Lane, D. P. (1992) p53, guardian of the genome, *Nature*, 358, 15-16.
- Levine, A. J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*, 88, 323-331.
- Li, C.-Y., D. W. Yandell and J. B. Little (1992) Molecular mechanism of spontaneous and induced loss of heterozygosity in human cells in vitro, *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18, 77-87.
- Liber, H. L., D. W. Yandell and J. B. Little (1989) A comparison of mutation induction at the *tk* and *hprt* loci in human lymphoblastoid cells ; quantitative differences are due to an additional class of mutations at the autosomal *tk* locus, *Mutat. Res.*, 216, 9-17.
- Livingstone, L. R., A. White, J. Sprouse, E. Livanos, T. Jacks and T. D. Tlsty (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53, *Cell*, 70, 923-935.
- Moynahan, M. E. and M. Jasin (1997) Loss of heterozygosity induced by a chromosomal double-strand break, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8988-8993.
- Mukhopadhyay, T., A. S. Multani, J. A. Roth, and S. Pathak (1997) Identification of additional complementation groups that regulate genomic instability, *Genes Chrom. Cancer*, 20,103-112.
- Pipiras, E., A. Coquelle, A. Bieth and M. Debatisse (1998) Interstitial deletions and interchromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome, *EMBO J.*, 17, 325-333.
- Weaver, D. T. (1995) What to do at an end : DNA double-strand-break repair, *Trend in Genet.*, 11, 388-392.
- Yandell, D. W., T. P. Dryja and J. B. Little (1986) Somatic mutations at a heterozygous autosomal locus in human cells occur more frequently by allele loss than by intragenic structural alterations, *Somat. Cell Mol. Genet.*, 12, 255-263.
- Yu, Y., C.-Y. Li and J. B. Little (1997) Abrogation of p53 function by HPV 16 E6 gene delays apoptosis and enhances mutagenesis but does not alter radiosensitivity in TK6 human lymphoblast cells, *Oncogene*, 14, 1661-1667.