

【目的】 DNA複製時の誤ったヌクレオチドの取り込みにより生じるミスマッチは突然変異を引き起こし細胞の死やがん化の原因となるが、ミスマッチ修復 (MMR) により修復され遺伝情報が正しく維持される。本研究では、MMRの欠損により起こるリンチ症候群の診断のためのスクリーニングに応用することを最終的な目標とし、蛍光色素とクエンチャー (消光剤) を付けたミスマッチを含むプラスミドを蛍光プローブとして用いる細胞の MMR 能の蛍光検出法を開発することを当初の目的とした。しかし、期待どおりの実験結果が得られなかったため、既に成功している蛍光タンパク質遺伝子の発現系を用いた MMR の検出法を改良して、より確実な方法とすることを新たな目的とした。

【方法】 2本鎖を形成させた時に1ヶ所にミスマッチが生じる配列を有し蛍光色素 (フルオレセイン) とクエンチャー (ダブシル) を塩基部に付けたオリゴヌクレオチドをプライマーとし、1本鎖環状 DNA にハイブリダイズさせて DNAポリメラーゼと DNAリガーゼにより図 B に示すプラスミドを作製した。Lipofectamine 2000 を使ってこれを HaLa 細胞ならびに MMR が欠損した LoVo 細胞に入れ、蛍光顕微鏡で観察した。遺伝子発現系を用いる蛍光検出においては、偽陰性の結果が出ることを防ぐために、図 A の EGFP (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子発現プラスミドに tdTOMATO (赤色蛍光タンパク質) 遺伝子発現系を入れ (図 C)、HaLa 細胞ならびに LoVo 細胞での遺伝子発現を調べた。

【結果】 以前の報告と同様の方法で pBSII KS(-) FQMM (図 B) を調製し、超遠心により精製した。これを HeLa 細胞と LoVo 細胞に入れて蛍光顕微鏡で観察したが、HeLa 細胞において期待された MMR による蛍光が検出されず、実験を複数回繰り返したが結果は同じであった。期待どおりの結果が得られない原因として、蛍光色素とクエンチャーが MMR で働くエキソヌクレアーゼ I (Exo I) による分解を阻害したかもしれないので、プライマーとして用いたそれらが付いたオリゴヌクレオチドを Exo I で処理したが、分解による蛍光が検出されたためその可能性は否定された。それ以外にも可能性がいくつか考えられるがいずれも検証に時間を要するため、蛍光タンパク質遺伝子の発現系を用いた MMR の検出法 (図 A) を改良することにした。この方法で問題となるのはトランスフェクションの失敗のため MMR が正常な細胞において蛍光が検出されない場合があることで、tdTOMATO 遺伝子の発現によりトランスフェクションを確認することができるプラスミド (図 C) を作製し、HaLa 細胞と LoVo 細胞を使ってその有用性を示した。

ミスマッチ修復の蛍光検出法

