

# MLH1 変異による Notch シグナル伝達経路の HES1 発現と大腸がん細胞の増殖・転移に 及ぼす影響の解明

SATテクノロジー・ショーケース2025

## ■ はじめに

MLH1遺伝子はミスマッチ修復(MMR)システムの一部として重要な役割を果たす遺伝子であり、細胞複製時のDNAポリメラーゼによる新生鎖形成において生じる塩基対エラーのMMRに関与する。MLH1遺伝子のエクソン3はMLH1タンパク質のATPaseドメイン等、MMR機構に重要な領域を含んでおり、MLH1タンパク質の機能に大きな影響を与える変異(ミスセンス変異やスプライス変異)が集中していることが知られている。大腸がん細胞においてHES1を始めとしたNotchシグナル伝達経路の構成要素の過剰発現が報告されている。しかし、HES1の発現異常ががん細胞の増殖や転移にどのように影響を与えるのかについての詳しいメカニズムは明らかではない。また、MLH1変異がNotchシグナル伝達経路のHES1発現にどのように影響を及ぼすのか不明である。

本研究ではMLH1変異がNotchシグナル伝達経路のHES1発現に与える影響を解明し、がん細胞の増殖や転移にどのように影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。

## ■ 活動内容

### 1. 原理

Notchシグナル伝達経路は多細胞生物の発生過程や生体組織の恒常性維持において重要な役割を果たす経路である。Notchシグナル伝達経路が活性化されると、リガンド(DeltaやJagged等)がNotch受容体に結合し、 $\gamma$ セクレターゼによるNotch受容体の切断を介して、活性型Notch細胞内ドメイン(NICD)が生成される。 $\gamma$ -セクレターゼがTMからNICDを放出することで、NICDは核内に移行し、CSL(CBF-1 / Suppressor of the hairless / LAG1)転写因子と結合して複合体を形成し、HESファミリー(HES1、HES3等)の発現を誘導する。

### 2. 実験方法

#### (1)細胞増殖実験

本実験ではヒト大腸がん由来細胞株であるcolo205細胞を用いて、DNA抽出に必要な細胞数( $50 \times 10^4$ cells/ml)まで増殖させ、どのくらいの日数で増殖するのか算出した。結果として、2日目に目的の細胞数まで増殖させることができた。この実験は3回繰り返し、再現性を得た。結果は表1に示した。

#### (2)gRNAの作成

MLH1遺伝子からエクソン3を欠失させ、colo205細胞にMLH1変異を導入するためのgRNAを作成した。

まず、NCBIでMLH1遺伝子の配列情報を取得し、先行研究で用いられているプライマーとPrimer-BLASTで作成したプライマーを使って、エクソン3を欠失させるようなgRNAをCRISPRでデザインした。

F: 5'-AATATGTACATTAGAGTAGTTG -3'

R: 5'-CCCATCCTTCTCGTGGCTTT-3'

#### 3. 今後の展開

PCR とアガロース電気泳動を行い、目的のバンドが見られるか確認し、MLH1遺伝子のエクソン3が欠失しているか検証する。

MLH1変異を導入したCOLO205細胞からRNAを抽出し、ddPCRを用いてHES1のmRNA発現量を定量する。また、同細胞からタンパク質を抽出し、HES1に対する抗体で染色し、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターでHES1タンパク質の発現を確認する。

MLH1遺伝子のエクソン3を欠失させた細胞と未処理の細胞それぞれの増殖速度を算出・比較して、HES1の発現異常ががん細胞の増殖に与える影響を検討する。

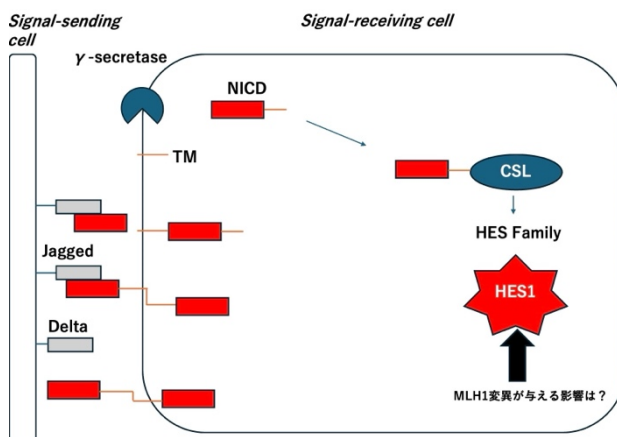


図1 Notch シグナル伝達経路の概略図

| Day/Sample | ①    | ②    | ③  | M   | SD   |
|------------|------|------|----|-----|------|
| 0          | 9    | 7.5  | 9  | 8.5 | 0.87 |
| 1          | 32.5 | 31.5 | 29 | 31  | 1.8  |
| 2          | 64.5 | 63   | 61 | 63  | 1.76 |

表1 総細胞数の経時変化( $\times 10^4$ cells/ml)

代表発表者 渡邊 一史(わたなべ かずし)  
所 属 千葉工業大学 先進工学部生命科学科  
遺伝子制御学研究室  
問合せ先 〒275-0016 千葉県習志野市津田沼 2-17-1  
TEL:047-478-0414

■キーワード: (1) 大腸がん  
(2) MLH1遺伝子  
(3) Notch シグナル伝達経路