

染色体構造異常を利用した疾患関連遺伝子群の解析法の開発

●磯部 正治

富山大学工学部物質生命システム工学科生命工学

＜研究の目的と進め方＞

ヒトゲノム計画の進展によってゲノムDNAの塩基配列の大半が決定された現在、塩基配列に書き込まれたゲノム情報の具体的理解が次の重要な課題である。ゲノム情報の中でもとりわけ、ヒト疾患を引き起こす遺伝子の同定ならびにその機能解析は、各種疾患の分子レベルでの理解を促進するのみならず、病気の診断、治療にも多大な貢献をもたらす。ゲノム情報を利用した疾患関連遺伝子の探索には、連鎖解析や、発現プロファイルからのアプローチなどがあるが、何れにも一長一短が存在する。連鎖解析には、数多くの罹患者系が必要で、連鎖解析による連鎖がある領域に絞られた後でも、目的の遺伝子に行き着くには、大変な労力を必要とする。また発現プロファイルの変化を指標とした場合には、どの遺伝子発現の変化が疾患の直接の原因であるかを特定することが困難である。そこで本研究では、様々な疾患で、染色体異常が疾患関連遺伝子の破壊もしくは脱制御化等を引き起こし、発症に結びつくことに着目し、染色体の構造異常を指標とするヒト疾患関連遺伝子の効率的探索法の開発を目的に研究を行った。

具体的戦略としては、図1に示すように、1) まず、患者に認められる染色体異常の領域を蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)法を用いて系統的に解析することによって、転座切断点を明らかにし、2) 次にサザンブロット法を用いて染色体転座等によって生じた遺伝子再配列を検出する。3) その遺伝子再配列をクローン化し、構造解析を行い、相手方の染色体領域にたどり着き、4) それぞれの染色体転座切断点近傍の詳細なゲノム解析ならびに遺伝子発現領域の探索を進め、染色体転座等によ

って影響を受ける遺伝子を同定し、疾患関連遺伝子の単離に至るという手法である。この4段階のなかでも、特に第3段階の転座切断点のクローン化では、患者ごとにゲノムライブラリーを作製し、転座切断点を含むクローンをスクリーニングすることが必要で、多大な労力を要するとともに、貴重な試料を多く消費するという点に、従来大きな問題があった。この点を克服して微量試料から染色体異常領域の構造解析を行うため、特殊な配列を有するアダプターを用いる新規アダプター付加PCR(AL-PCCR)法の開発を行った(論文7)。また染色体転座切断点の構造解明に続く課題は、染色体転座によって影響を受ける、転座切断点近傍に存在する転写領域の解析である。この解析を迅速化するため新しい迅速3'RACE Walking法を開発した(論文8)。

これら新しく開発した手法の有用性を確認するため、各種白血病患者ならびに先天性異常患者に認められた染色体転座切断点の構造解析ならびにその転座によって影響を受ける遺伝子の同定を行い、各種疾患関連遺伝子ならびに候補疾患関連遺伝子を明らかにした(論文1, 3, 5, 6, 9, 11, 12)。さらにこのアダプター付加PCR法は、ウイルスのヒト染色体への挿入部位の解析にも有用であることが予測されたので、日本人に多発する成人T細胞白血病(ATL)の原因ウイルスとされるHTLV1ウイルスの染色体挿入部位の解析にも応用した。その結果、これらの方法論の有効性が確認された(論文7)。

またゲノム解析技術を総合的に向上させるため、酵母ツーハイブリッド法の効率化に役立つ酵母凍結コンピテント細胞調整法の開発(論文4)、ゲノム解析による薬用植物の起源同定(論文2)ならびにマウスの遺伝解析に

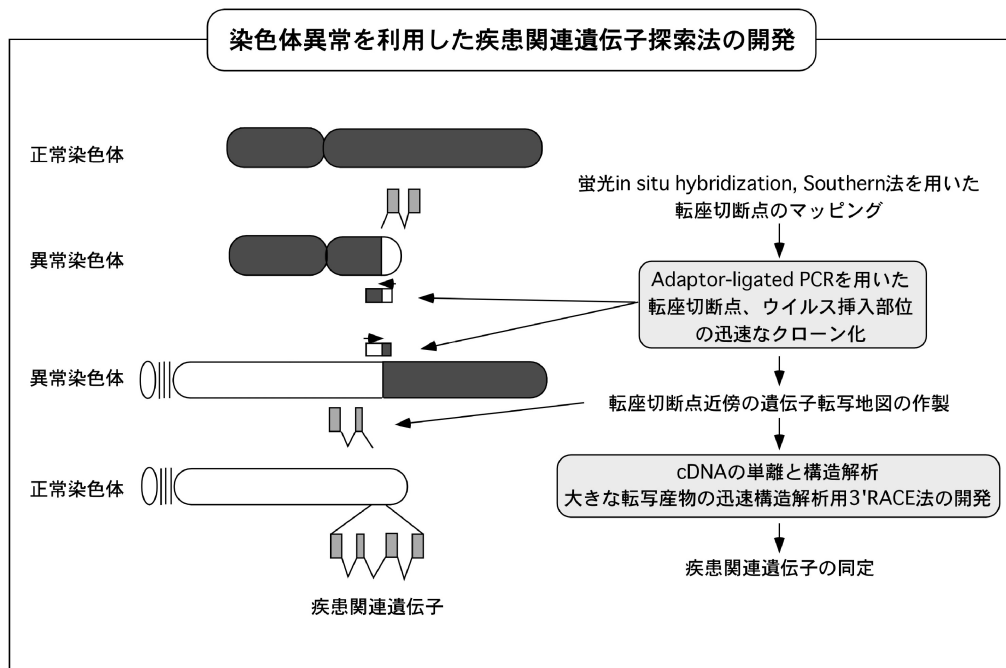


図 1

よる疾患関連遺伝子座の推定も行った（論文10）。

＜研究開始時の研究計画＞

1) 染色体転座切断点の迅速構造解析法の開発

転座切断点の解析には、用いる試料ごとにゲノムライブラリーを作製し、スクリーニングを行い、転座切断点を含むクローンを単離することが必要で、従来から多大な労力を要してきた。そこで、このステップを迅速化し、さらに貴重な試料の消費をできるだけ抑制して解析を進めるため、アダプター付加PCR法(AL-PCR法)を応用した転座切断点の迅速解析法を開発する。この方法は、染色体転座切断点の構造解析のみならず、レトロウイルスの染色体挿入部位の解析にも応用する。

2) 染色体切断点近傍に存在する転写産物の迅速構造解析法の開発

染色体転座切断点の構造解析に続く課題として、その切断点近傍に存在する遺伝子転写領域の解析が、疾患関連遺伝子の同定に必須である。転写産物の構造解析をより迅速化するため、3' RACE法の改良等を行う。

上記方法論の有効性を調べ、さらに新たな実用的な方法論の開発を行うため、以下の課題を中心に実証研究を行う。

3) 染色体異常に基づく成人T細胞白血病関連遺伝子の探索

成人T細胞白血病(ATL)は、四国、九州、沖縄などの西南日本に住む50才を越す成人に多発する、非常に予後の悪い白血病である。ATL患者のほとんど全ての症例でHTLV-1と呼ばれるレトロウイルスの感染が証明されることから、このウイルスは重要な白血病発症原因のひとつであると考えられている。日本には100万人を越すHTLV-1感染者が存在し、毎年1,000人程度のATL患者が新たに発生し、命を落としている。

しかし、1) ウイルス感染から白血病の発症までに50年以上という長い歳月を要すること、2) 年間あたりのATL発症率はウイルス感染者のたかだか0.1%に過ぎないこと、3) 患者の白血病細胞中にウイルス由来の遺伝子発現がほとんど検出されないこと、4) 染色体に挿入されたHTLV-1は、しばしば5'側の領域を大きく欠失していること、などの事実からウイルス感染だけでは、白血病の発症に不十分で、長い年月の間に、種々の細胞内遺伝子の発現変化が蓄積することにより、はじめて白血病化が引き起こされると考えられる。しかしATLの発症に関与する細胞内遺伝子は、未だ十分に明らかにされたとはいえない。特に問題なのは、現在までの所、ATLの発症機構を説明できる共通の細胞内遺伝子変化が全く知られていない点にある。

そこで本研究では、ATL発症に関わる可能性がある遺伝子をできるだけ多く単離し、その中から発症に共通して関与する遺伝子を探し出すことを目指して研究を行う。

ATLの発症に関わる細胞内遺伝子を探索する戦略として2種類の方法を計画している。1つ目は、HTLV-1の染色体挿入部位近傍からの遺伝子同定で、2つ目は、ATL患者に好発する染色体異常の集積領域からの遺伝子同定である。

[1] HTLV-1の染色体挿入部位近傍からの遺伝子同定

マウスでは、レトロウイルスのゲノムが宿主染色体に挿入される際、ウイルス由来のプロモーターや、エンハ

ンサーの活性を介して、挿入部位近傍に存在する宿主遺伝子の脱制御化がしばしば引き起こされる。実際にマウスの白血病細胞を解析するとウイルスの挿入による、がん遺伝子の活性化や、がん抑制遺伝子の不活化などが数多く認められる。これは、増殖優位性もたらす遺伝子に脱制御化が起こった細胞の方が、白血病化し易くなるためだと解釈される。逆に考えると、既に増殖優位性を獲得した白血病細胞においてウイルス挿入部位近傍の遺伝子を解析すれば、そのような白血病化に関連する遺伝子を同定できる可能性が高いと考えられる。

HTLV-1においても同様の仮説に基づきウイルス挿入部位の解析が行われてきた。しかし、従来の報告は、株化した白血病細胞株を用いた例か、極めて小規模に患者由来のウイルス挿入部位を解析した例しか報告されていない。株化した白血病細胞株を用いた研究の問題点は、培養中にウイルスの再活性化と再導入が引き起こされ、通常患者由来白血病細胞には1コピーのウイルスの挿入しか観察されないのに対しATL由来の培養細胞株では、4~10コピーの挿入が通常観察される点にある。つまり、このようなウイルス挿入部位は、生体内における選択圧を受けていないため、培養条件下では、増殖優位性に関与しているかもしれないが、必ずしも生体内での増殖優位性と関連しない可能性が高いからである。また従来の患者解析例では、ゲノム情報が十分解明されていなかったため、例えウイルスの挿入部位が分かっても、その近傍に存在する遺伝子との関連は、ほとんど調査されていない。

そこで、本研究では、近年蓄積されたゲノム情報を基に、患者由来の白血病細胞におけるウイルス挿入部位の大規模解析を行い、果たして、ウイルスの挿入されやすいゲノム領域が存在するのか、その近傍に遺伝子が存在するのか、その挿入部位は、遺伝子の中なのか、外なのか、ウイルスの挿入によって近傍の遺伝子の発現に影響が出るのか、またどのくらいの頻度でウイルスの挿入による細胞内遺伝子の脱制御化が引き起こされるのかについて明らかにする。さらにその結果を、ATL関連遺伝子の同定につなげる。

[2] ATL患者に好発する染色体異常の集積領域からの遺伝子同定

多くの白血病では特異的な染色体転座に着目し、その転座切断点近傍から多数の癌関連遺伝子が単離されている。しかしながらATLで観察される染色体異常は非常に複雑で、たかだか数症例について解析を行っただけでは、その共通性を抽出することができず、現在までのところだれもこの手法によってATL関連遺伝子を単離する事に成功していない。われわれはATLにおける複雑な染色体異常の中から疾患に共通する染色体異常部位を見いだすために、50症例におよぶ患者試料の詳細な核型解析を行った。その結果、ヒト14番染色体q11ならびに14番染色体q32領域（以下14q11、14q32領域と略す）に、それぞれ約10%の頻度で染色体異常が観察されることを見いだした。そこで、本研究では、この染色体異常集積部位のゲノム解析ならびに分子細胞遺伝学的解析を進め、染色体構造を明らかにする。さらに、これらの領域から染色体転座切断点を単離し、その近傍に存在する遺伝子の解析を通して、ATL関連遺伝子の単離を行う。

14q11領域にマップされるT細胞受容体 α/δ (TCR α/δ)遺伝子座は、ATL以外のT細胞白血病における染色体転座の好発地点として知られている。しかし、長年の多くの研究者の試みにもかかわらず、ATLでは、未だTCR

α / δ 遺伝子座が、染色体転座に関わることを示す直接的証明がなされていない。そこで、本研究では、14q11領域に染色体異常を持つATL患者についてTCR α / δ 遺伝子座の詳細な解析を行い、果たしてATLにおいてTCR α / δ 遺伝子座が染色体転座の好発領域となっているのかどうか、ならびにその構造上の特徴を明らかにする。加えて、ATL関連遺伝子の同定を試みる。

14q32領域には、前リンパ性白血病細胞(T-PLL)に特徴的に認められるt(14;14)(q11;q32)染色体転座あるいは、inv(14)(q11q32)染色体逆位に関連する、染色体転座切断点の一方の集積領域が存在する。この14q32領域は、しばしば他方の染色体転座集積領域である14q11領域に存在するTCR α / δ 遺伝子座との間で染色体転座を引き起こす。数多くの症例解析からこの14q32領域に位置する染色体転座集積領域は、約200kbの距離を置いて2カ所存在し、それらの集積領域に挟まれる領域に、染色体転座によって脱制御化を受ける遺伝子が存在する。われわれはそのような遺伝子を見だし、それぞれをTCL1ならびにTML1遺伝子と命名した。本研究では、この領域のゲノム解析をさらに進め、他に白血病発症と関連する遺伝子座がこの領域に残されていないかどうか解析を行う。

さらに、14q32領域に見いだされたATL患者に好発する染色体転座の集積領域が、このTCL1遺伝子座と、どのような関係にあるかを明らかにし、ATL関連遺伝子の同定へとつなげる。

4) t(5;14)染色体相互転座切断点の解析と疾患関連遺伝子の探索

文部省のゲノムプロジェクトの遺伝病家系研究推進委員会では、多数の均衡型構造異常を示す遺伝疾患患者由来の細胞株を樹立しているが、その中の一つJHGP24細胞株は染色体相互転座t(5;14)(q21;q32)を有する小頭症、特異顔貌、精神遅滞を発症した患者に由来する。この染色体相互転座は、細胞遺伝学的にこの患者に認められる唯一の染色体異常であることから、この転座切断点の単離と、その近傍のゲノム解析を行い、この疾患に関連する遺伝子の単離を目指す。

〈研究期間の成果〉

1) 染色体転座切断点ならびにウイルス挿入部位の迅速な構造解析のためのアダプター付加PCR法 (AL-PCR法) の開発

染色体転座切断点の迅速構造解析ならびにプロウイルスの挿入部位の同定を行うため、図2に示すようなアダプター付加PCR法 (AL-PCR法) を開発した。

具体的には、解析対象となるゲノムDNAを4塩基認識の制限酵素でまず切断し、部分的に切断部分をクレンジング酵素で埋めた後、特殊な構造を持つ、アダプターと結合させPCRの鋳型を調整する。この鋳型に対し、増幅させたい領域に由来するプライマーとアダプターの一部に由来するプライマーの間で、Nested PCRを行う。その結果、増幅させたい領域の一方の側の配列情報だけで、任意のDNA断片の増幅を行うことが可能となった。

この方法の特徴として、アダプター1にGCに富む配列を配置し、アダプター2には3'側がミスマッチする構造をとらせている。これらの特徴的な構造をもたせることで、両側にアダプター配列を有する非特異的PCR産物の増幅を効果的に防ぐことができるようになった。またアダプターとゲノムDNAの結合の際に生じるインサート同士のコンカテマー形成を防止するため、Sau3AIなどの制限酵素による切断後、5'突出端を部分的に埋めてからア

ダプターの結合を行っている。

実際、ATL患者由来のDNAを用いた場合、ほとんどの症例でサブクローニングを行うことなしにダイレクトシーケンス法によってプロウイルス挿入部位周辺の塩基配列の解析を迅速に行うことができた。図2には8症例のATL患者由来DNAを用いて行ったプロウイルス挿入部位増幅産物のアガロース電気泳動法の結果を示している。いずれの試料を用いた場合にも特異的なPCR産物を得ることができた。また、この方法を適用するのに必要なDNA量は、たかだか100ng程度なので、貴重な試料を節約して解析することができるようになった。さらに操作に要する時間も、DNAの状態から始めて、プロウイルスの挿入部位や、染色体切断部位の構造情報が得られるまでの期間を数日以下にまでに短縮することが可能となった。

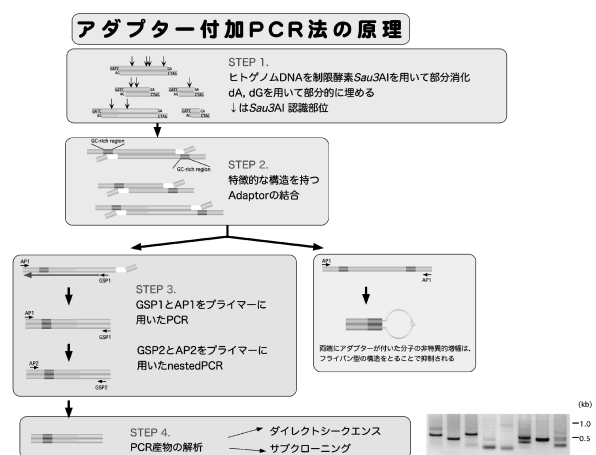


図2

2) 転写産物の迅速な構造解析のための段階的3'RACE Walking法の開発

3'RACE法は、構造不明の遺伝子の3'側の情報を得るために広く用いられている。従来の3'RACE法では、全てのmRNAが共有するポリA鎖をcDNA合成開始の共通出発点として利用している。すなわちPCR用プライマー結合部位 (以下アンカープライマー結合部位と呼ぶ) を持つオリゴdTプライマーを用いmRNAを鋳型として一本鎖cDNAの合成を行った後、このcDNAを鋳型として遺伝子の下流に向いて2段階に配置した遺伝子特異的プライマー (GSP) と上流に向かうアンカープライマーとの間でネステッドPCR増幅を行うことで遺伝子の3'側の情報を得てきた。しかしながら、遺伝子特異的プライマーを設定するための構造既知の5'側領域がポリA鎖から離れていたり、鋳型となるcDNAにGC配列に富む領域が存在しPCR法による増幅に問題が生じる場合には、従来の3'RACE法による解析は、非常に困難であった。

20Kbに及ぶ大きな転写産物の構造解析のための3'RACE Walking法の開発

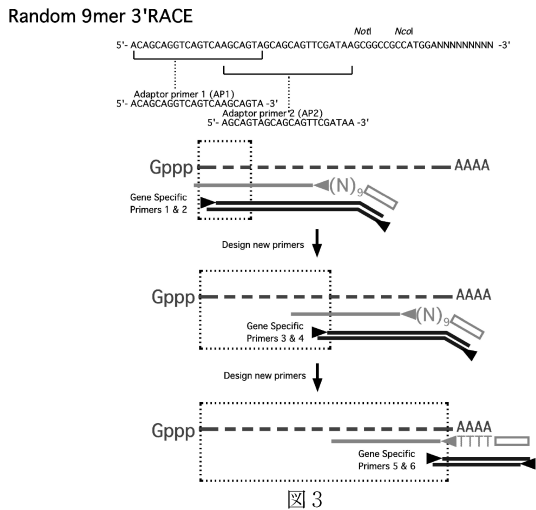


図3

これらの問題を解決するために、図3に示すような、非常に大きな転写産物の構造解析を容易にする段階的3'RACE Walking法を開発した。この方法は、サブプレッションPCR法の原理を応用したランダム9merアダプターを用いて、cDNAの合成を行う点に特徴がある。この手法を応用したことで非特異的産物の増幅が最小限に抑制され、多くの場合、得られたPCR産物をクローン化することなく、ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を直接決定することができるようになった。

本方法の有効性を実証するために、我々は約20kbの長さを有するmicrotubule-actin crosslinking factor 1 (MACF1) 遺伝子の転写産物を5'側から漸次的に増幅させるモデル実験を行なった。図4に示すように、クローン化なしにダイレクトシーケンス法だけで上流から下流に向かって構造解析を行うことに成功した。この段階的3'RACE法は、CpGアイランド近傍に存在する遺伝子のように5'側の情報があるが3'側の構造が不明の大きな転写産物の構造解析に、非常に役に立つと期待される。

20Kbに及ぶ大きな転写産物の構造解析のための3'RACE Walking法の開発

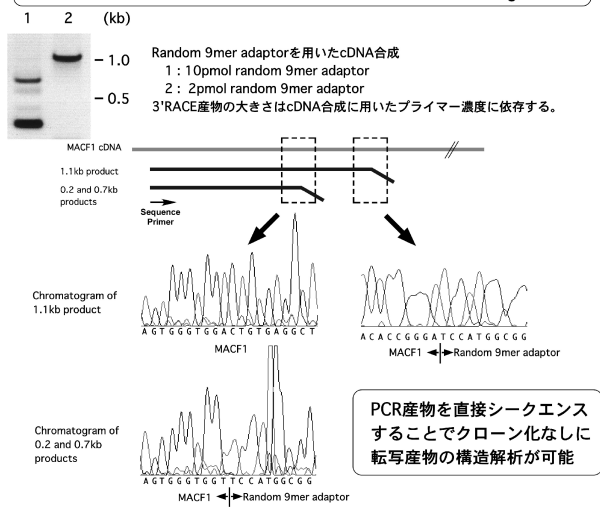


図4

3) ATL患者におけるHTLV-1挿入部位の同定と挿入部位近傍の遺伝子同定

[1] HTLV-1 プロウイルスの染色体局在

AL-PCR法を適用し、33症例のATL患者より35箇所、5

種類のATL細胞株より23箇所のHTLV-1挿入部位を同定した。これらのHTLV-1挿入部位の塩基配列を用いてNCBIデータベースに対して相同性の検索を行った結果、ATL患者に由来する35箇所の挿入部位のうち32箇所、ATL細胞株に由来する23箇所の挿入部位のうち21箇所について、染色体上の位置を決定できた。残りのATL患者由来の3箇所、ATL細胞株由来の2箇所については、得られた配列が短すぎるもしくは、反復配列中にウイルス挿入部位が存在したためにゲノム上の位置を特定することができなかった。

HTLV-1 プロウイルス挿入部位とゲノム上の分布とを比較した結果、図5に示すように挿入部位はゲノム全体に広く分散し、統計的に有意な偏りは観察されなかった ($p>0.05$)。これに対し、ゲノムの構成要素と挿入部位との関係を詳細に検討した結果、図6に示すように、ゲノム上にウイルス挿入部位を特定できたATL患者由来の挿入部位37箇所のうち22箇所 (59.5%) において、ウイルス挿入はイントロンを含めた遺伝子転写領域内で生じていた。この遺伝子転写領域に偏ったウイルス挿入が統計的に有意であるか否かを、2群の比率の差の検定手法によって統計解析した。その結果統計的に有意な偏りが観察され ($p<0.02$)、HTLV-1の挿入は遺伝子転写領域で、より発生し易いことが明らかとなった。

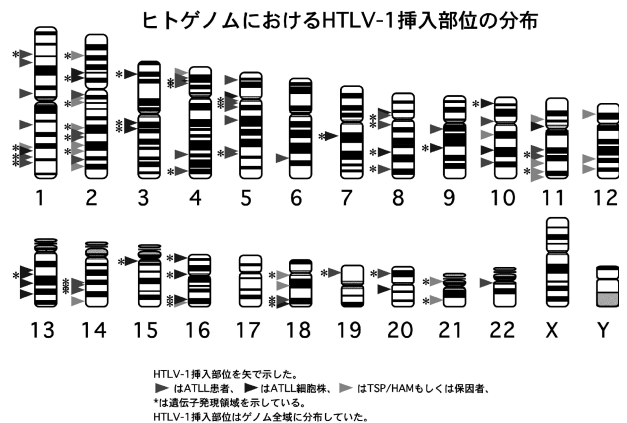


図5

Chromosomal Feature	Chromosomal Features Associated with HTLV-1 Integration Sites		
	No. of HTLV-1 Integration Site (total No.)	Percent at Integration Site (<i>p</i> value)	Percent in Human Genome
Matches to Genomic sequences	37 (42)		
No Matches to Genomic sequences	5 (42)		
Transcription units	22 (37)	59.5% (<i>p</i> < 0.02)	~33%a
SINES			
Alu	2 (42)	4.8% (<i>p</i> = 0.40)	10.60%
MIR	1 (42)	2.4% (<i>p</i> = 1.0)	2.20%
DNA elements	1 (42)	2.4% (<i>p</i> = 1.0)	2.80%
LTR elements (HERV)	2 (42)	4.8% (<i>p</i> = 0.65)	8.30%
LINE	6 (42)	14.3% (<i>p</i> = 0.57)	20%
Satellite			
alpha Satellite	0 (42)	0.0%	UN
beta Satellite	0 (42)	0.0%	UN

The integration sites studied included those mapped to unique locations on the genome and those in identifiable repeats.
p values are for comparison of each integration site population to the human genome (2-sample test for equality of proportions, see statistical analysis).
 Abbreviation: UN, unknown.
 a Estimated value

図6

[2] HTLV-1 の挿入によって起こった遺伝子の脱制御化

ATL患者におけるプロウイルスの挿入は、遺伝子がコードされる領域で、より高頻度に見いだされた事から、これらの遺伝子座が、はたしてウイルスの標的細胞であるTリンパ球において発現しているか否かについて興味もたれた。そこで各遺伝子についてRT-PCR法を用いて

Summary of HTLV-1 integration sites in ATLL patients

Samples	qPCR samples	Chromosome	Gene (Accession No.)	Expression	Location	Direction of HTLV-1
ATLL case 1		5q31	fis (XM_114430)		intron 4	parallel
ATLL case 2		1p34	MACF1 (NM_012090)		intron 1	parallel
ATLL case 3		2q31	-			parallel
ATLL case 4		4q34	Predicted (XM_116174)			
ATLL case 5		6q25	-			
ATLL case 6		not identified	-			
ATLL case 6		1p13	-			
ATLL case 7	+	5q11	fis (NM_019087)	→	intron 1	parallel
ATLL case 8		5q11	Predicted (XM_174756)			
ATLL case 9		10p11	-			
ATLL case 10		20p12	C20orf13 (NM_017714)		intron 11	parallel
ATLL case 10		1q42	NVL (NM_002533)		exon 20 ac	parallel
ATLL case 11	+	1q23	-			
ATLL case 12	+	14q23	GPHN (NM_020806)	↑	intron 8	reverse
ATLL case 13	+	22q11	-			
ATLL case 14	+	2q35	Predicted (XM_297665)			
ATLL case 15	+	5q31	ARAP3 (NM_022481)	→	intron 22	parallel
ATLL case 16		4q31	-			
ATLL case 17	+	5p15	-			
ATLL case 18		5q12	-			
ATLL case 19	+	8p11	ANK1 (NM_020476)	↑	intron 7	reverse
ATLL case 20	+	2q31	fis (NM_024770)	→	intron 3	reverse
ATLL case 21	+	10q25	Predicted (XM_295686)			
ATLL case 22		4p15	-			
ATLL case 23	+	5q14	Predicted (ENST00000331887)			
ATLL case 24	+	1q32	MCP (NM_002389)	→	intron 4	parallel
ATLL case 25		2p12	-			
ATLL case 26	+	not identified	-			
ATLL case 27	+	18q22	DNAM1 (NM_006566)	→	intron 4	parallel
ATLL case 28	+	14q24	SPTLC2 (NM_004863)	→	intron 2	reverse
ATLL case 29	+	8q12	SDCBP (NM_005625)	→	intron 6	parallel
ATLL case 30	+	4p15	-			
ATLL case 31	+	11q14	-			
ATLL case 32	+	not identified	-			
ATLL case 33	+	9q12	-			
ATLL case 34		14q24	Predicted (XM_303773)			
ATLL case 35		not identified	-			
ATLL case 36		8q24	Predicted (XM_299738)			
ATLL case 37		11q22	fis (NM_152433)		intron 1	parallel
ATLL case 38		1p32	-			
ATLL case 39		19p13	LDLR (NM_000527)		intron 1	reverse
ATLL case 40		not identified	-			

ATLL cases 1-33 are our original data, ATLL cases 34-40 are from previously reported data. at the corresponding gene; ↑ :over expression, →: normal expression.

解析を行った結果、ウイルスの挿入が観察された既知遺伝子は、全てTリンパ球における発現が検出された。この結果から、遺伝子の転写活性が高いオープンクロマチン領域に、より選択的にウイルスの挿入が生じる可能性が示唆された。

次にHTLV-1の挿入によって近傍の遺伝子が脱制御化を受けるか否かを調べる目的で、ウイルスの挿入が認められた9種類の遺伝子について、定量PCR法を用いて発現量の解析を行った。定量PCRには、20症例のATL患者由来のリンパ球（このうちの9症例で既知の遺伝子に挿入が起こっていた）、CD3+のTリンパ球、ならびに増殖刺激を加えた、もしくは加えていないCD4+/CD8-のT細胞由来の試料を用いた。図7に示すように、遺伝子にウイルスの割り込みが起こっていた9症例のうち7症例では、ウイルスの挿入の有無にかかわらず、遺伝子発現量には差異が認められなかったが、残りの2症例のATL患者では、該当遺伝子にウイルスの挿入を持たない他のATL患者、CD3+のTリンパ球、ならびにCD4+のT細胞と比較し、該当遺伝子の発現量の有意な上昇が認められた。該当遺伝子に割り込みが起こっていない他のATL患者の平均値と比べ、ATL12症例ではankyrin-1 (ANK-1)が4.4倍に、ATL19症例ではgepherin (GPHN)遺伝子の発現が75倍にも増加していた。特にGPHN遺伝子は他の白血病におい

て、染色体転座によってMLLとの融合遺伝子を生じることが既に報告されていることから、この手法を用いてATL関連遺伝子を単離できる可能性が示唆された。

また、今回の解析により、HTLV-1プロウイルスの挿入が、遺伝子内に起きた場合には、近傍の遺伝子の脱制御化が、約20%の頻度で引き起こされることが明らかとなった。

4) 染色体転座切断点の解析による白血病関連遺伝子の探索

[1] 急性単球性白血病細胞に認められた染色体転座t(6;11) (q27;q23)の転座切断点と疾患関連遺伝子の解析

急性単球性白血病細胞の染色体解析を行ったところ、染色体転座t(6;11) (q27;q23)を有することが明らかとなった。この染色体転座切断点近傍にマップされるMLL遺伝子座に由来するDNAプローブを用いてサザン解析を行ったところ、遺伝子再配列を検出した。そこで、この遺伝子再配列をクローン化し、構造解析を行った結果、6q27領域に存在するAF6遺伝子との転座を起こしていることを証明した。さらに転写産物の解析により、MLLとAF6との融合転写産物が存在することを明らかにした。

[2] ヒト14番染色体q32.1領域に存在する全リンパ性T細胞白血病(T-PLL)の染色体集積領域からのTCL6候補がん遺伝子の単離同定

T細胞性白血病や、リンパ腫において、ヒト14番染色体q32.1領域は、しばしばT細胞受容体遺伝子座との染色体転座を引き起こす。図8に示すように、この14q32領域に存在する染色体好発領域には、2カ所の転座集積領域が存在し、その転座集積領域に挟まれた領域から既にTCL1遺伝子ならびにTML1/TCL1bを同定してきた。この領域について、さらに詳細なゲノム解析を行ったところ、染色体転座によって発現上昇が引き起こされる新規遺伝子を同定し、TCL6遺伝子と命名した。

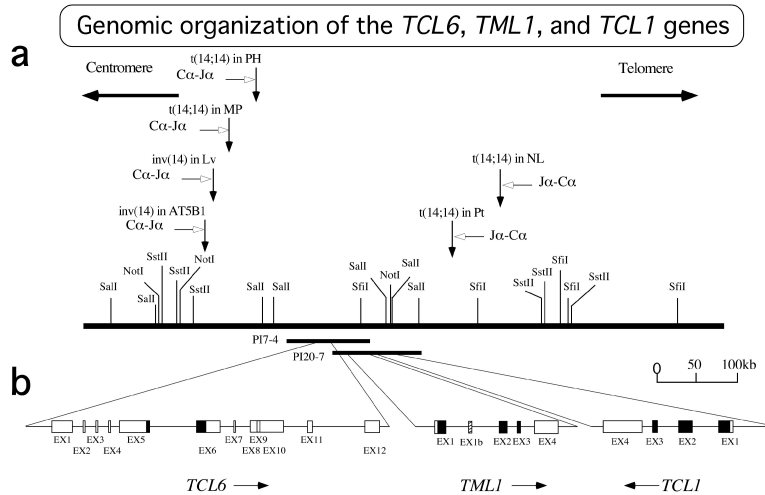
このTCL6遺伝子は、図9に示すように、非常に複雑

なスプライシング様式を示し、12個のエクソンが様々な組み合わせでスプライシングを行い、少なくとも5種類のタンパク質翻訳領域をもたらすことを明らかにした。その中の一つのタンパク質翻訳領域はTML1遺伝子のエクソン4内に、異なるフレームを使用して存在した。さらにこれらのタンパク質翻訳領域が、哺乳動物細胞で機能的なタンパク質を発現することを証明した。

[3] ATL患者に好発する14q11領域における染色体異常の分子遺伝学的解析

(i) ATL患者に見いだされたTCR α 遺伝子座の異常遺伝子再配列

われわれはATL発症に関わる遺伝子探索を目標に14番染色体q11領域に異常を持つ1症例のATL患者由来白血病



(a) Restriction map of the *TCL6*, *TML1*, and *TCL1* loci on chromosome 14q32.1. Vertical arrows, cloned breakpoints in the literature. Horizontal arrows with open arrowheads, orientation of TCR region with respect to breakpoints. Horizontal bars, positions of P1 clones 7-4 and 20-7. (b) Organization of twelve exons of the *TCL6* gene, five exons of the *TML1* gene, and four exons of the *TCL1* gene. Arrows, direction of those transcripts. □, 5' and 3' untranslated regions; ■, coding sequences. Shaded box represents an exon only utilized by a fusion transcript between *TCL6* and *TML1*.

図8

TCL6遺伝子は、複雑なスプライシングフォームを有し多様な蛋白質をコードする

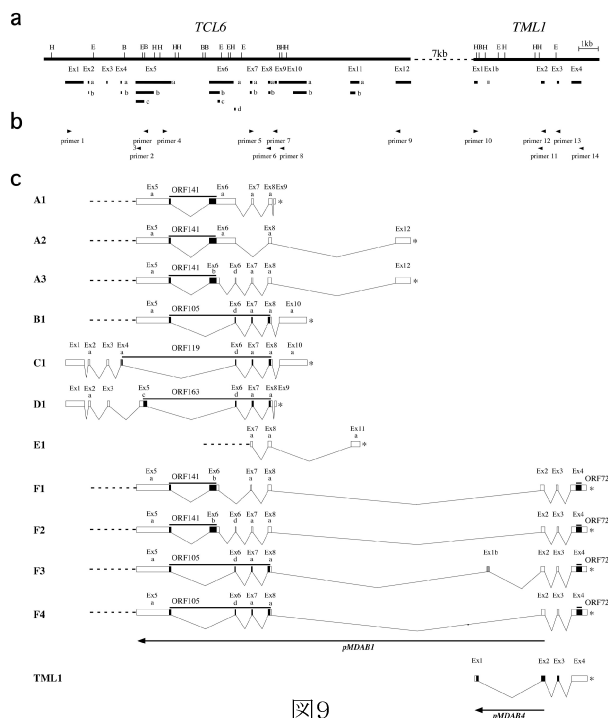


図9

細胞における、TCR遺伝子座の解析を行った。用いた試料は、染色体転座der(12)t(12;14)(q24;q11)を有するATL患者に由来し、常法にしたがってTCR α 遺伝子座の中でも特にJ α 領域を中心に遺伝子再配列の解析を行った。その過程で、J α 領域における複雑な遺伝子再配列の存在を見いだした。解析の結果、図10に示すように、この遺伝子再配列は、染色体転座によって引き起こされた遺伝子再配列ではなく、ハイブリッド結合とよばれる、V遺伝子あるいは、Jセグメントとシグナル配列間で引き起こされた異常な遺伝子再配列であることを見いだした。このようなハイブリッド結合は、マウスの免疫グロブリン重鎖遺伝子座とヒトTCR δ 遺伝子座でのみ報告されていたが、本研究によりT細胞受容体 α 遺伝子座においてもこのようなハイブリッド結合が生じることを初めて証明した。

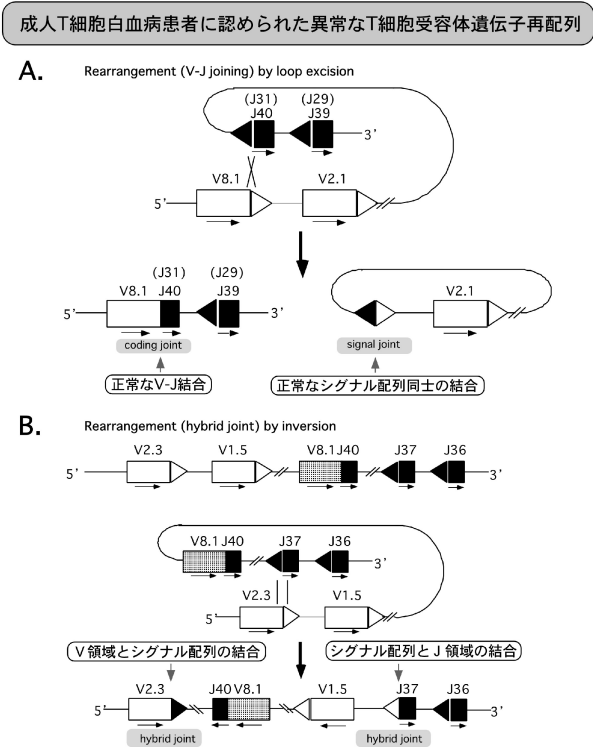


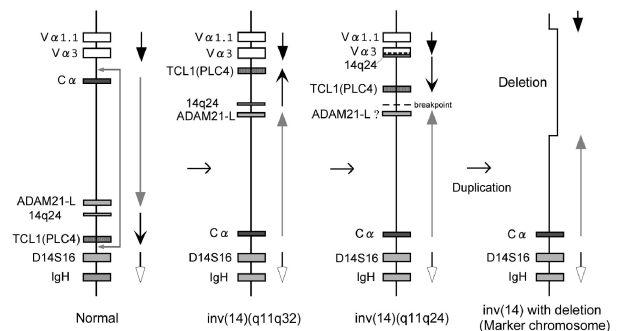
図 1 0

(ii) ATL患者に見いだされた逆位染色体inv(14)(q11q24)の染色体切断点は、TCR遺伝子座のV α 領域内に存在する

TCR α / δ 遺伝子座の位置する14q11領域は、ATL以外のT細胞白血病では、染色体転座の好発部位として知られる。T細胞の分化過程で引き起こされるTCR遺伝子座のV-J遺伝子再配列の誤りとして、時として他の染色体領域との染色体転座を生じ、がん遺伝子や、がん抑制遺伝子の脱制御を引き起こし、白血病化を引き起こすことが知られている。しかし、ATLでは約10%の症例において、何らかの14q11異常が観察されるにもかかわらず、TCR遺伝子座の関与を直接的に証明することが誰は、これまで誰も成功していない。それは、他のT細胞白血病の染色体転座は、TCR遺伝子座のなかでもJ領域と呼ばれる約100kbの領域に局限して起こっているのに対し、ATLではJ領域内に染色体転座切断点が見いだせなかったからである。そこで、われわれはATLの染色体転座切断点は、J以外の領域すなわち、V領域にあるのではないかと考え、TCR α / δ 遺伝子座の中で約1 Mbにおよぶ領域を占めるV α 領域に着目し解析を行った。まずこの領域をカバー

するコスミドあるいはBACクローンからなるコンテイングを完成させた。得られたクローンをプローブとして逆位染色体inv(14)(q11q24)を有するATLの1症例についてFISH解析を行ったところ、染色体逆位に関する切断点の正確な位置に存在するを見いだした。そこで、定法に従って転座切断点に関連する遺伝子再配列を検出し、AL-PCR法を用いて、転座切断点のクローン化を行った。その結果、V α 3 遺伝子が14番染色体q24領域に存在する、ADAM21偽遺伝子とアノテーションされた遺伝子から数kbの離れた地点との間で染色体逆位を起こしているを見いだした。このADAM21偽遺伝子とされた遺伝子が果たして発現しているかどうか、さらには蛋白質をコード可能かどうか調べるため、この遺伝子に対応するcDNAを単離し、COS7細胞中で強制発現を行った。その結果、この蛋白質は、たしかに蛋白質をコードしており、主として細胞質に局在することが明らかとなった。そこで、われわれは、この遺伝子をADAM21 like (ADAM21L)と命名した。このADAM21LのATL患者における発現量を解析したところ、この逆位を持つ患者、有意に発現が低下していた。これは、染色体逆位の過程で、ADAM21Lの欠失が生じたことを考えると、矛盾しない結果であった。さらにADAM21LはADAM21に含まれる膜貫通ドメインを欠き、主として細胞質と核内に発現が認められた。

今回のATL患者における14q11異常とTCR α / δ 遺伝子座との関連に関する研究の結果、ATLでは、染色体転座の好発部位が他のT細胞白血病とは異なり、V α 領域内に存在することが明らかとなった。TCR遺伝子座の関与する染色体転座では、主としてV-J結合の誤りとして転座が引き起こされると、他のT細胞白血病では考えられている。これに対してATLは成熟したT細胞を標的としてHTLV-1が腫瘍化を引き起こさせるため、既にV-J遺伝子再配列が終了しており、その結果、成熟したT細胞でも依然として能力が検出される、V-V置換の誤りを介して、染色体転座が引き起こされた可能性が強く示唆される。



成人T細胞白血病患者に認められたinv(14)染色体逆位におけるT細胞受容体遺伝子座の関与

図 1 1

[4] ATL患者に好発する14q32領域における染色体異常の分子遺伝学的解析

ATLでは、14番染色体長腕q32領域における染色体異常が約10%前後の頻度で観察される。この染色体異常が前リンパ性白血病に多発するTCL1 遺伝子座で起こっているのかどうかを調べるために、TCL1 遺伝子座に由来するコスミドクローンをプローブとして用い、染色体切断点のマッピングを行った。その結果、ATLにおける染色体転座切断点は、TCL1 遺伝子座よりも、さらに長腕の末端側に集積しているを見いだした。3症例のATL患者についてサザン解析により、染色体転座に由来する

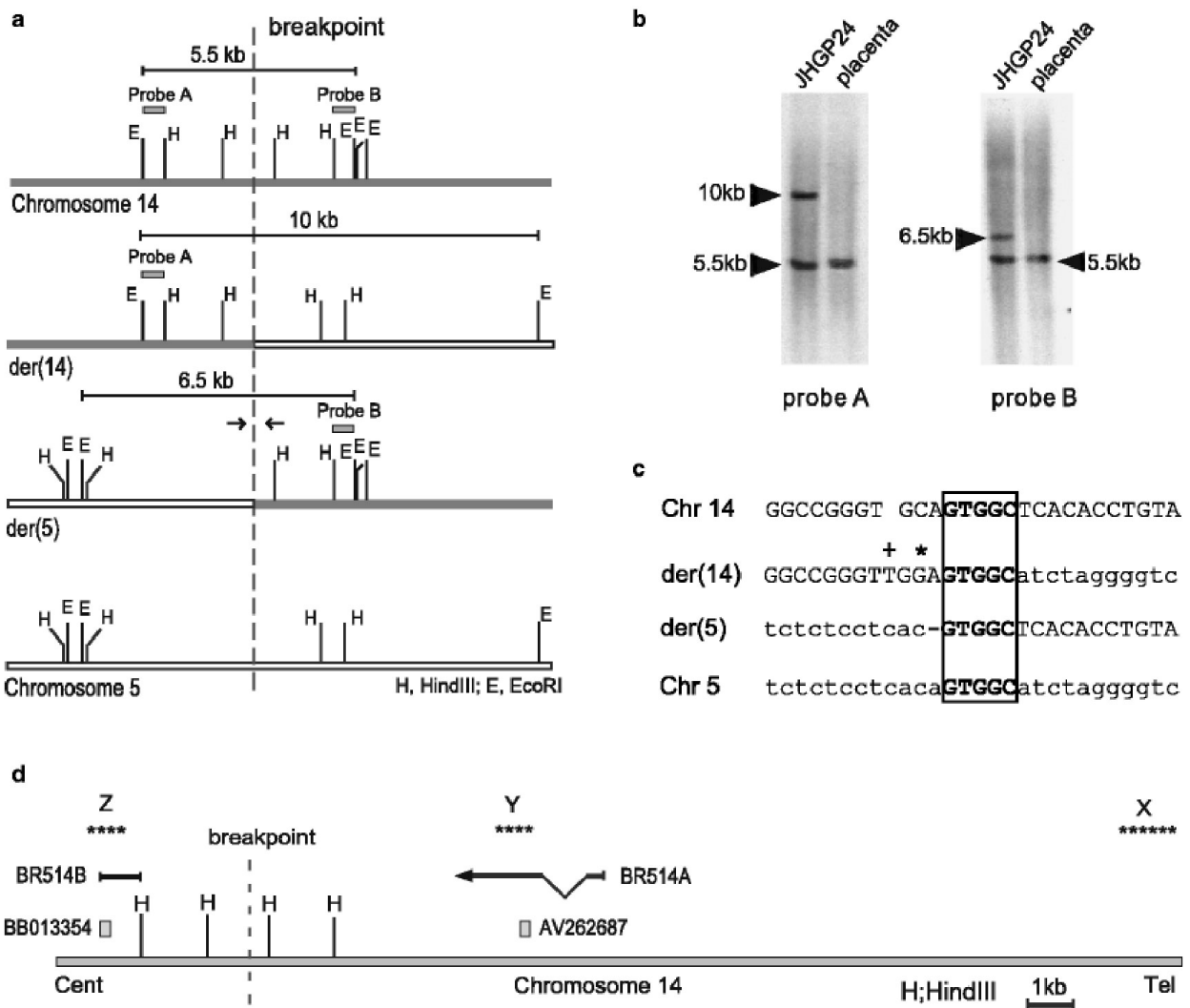
と推定される遺伝子再配列を検出し、次いでAL-PCR法を用いてこの領域を単離し、その構造を解析した結果、確かに転座切断点が含まれていることを見いだした。そこでこの転座切断点近傍に存在する遺伝子を同定し、ATL1と命名した。

ATL患者における発現量を調べたところ、染色体転座を有するATL患者において発現低下が認められたのみならず、この遺伝子領域に染色体異常を有しない残りの約9割のATL患者の大半において、ATL1の顕著な発現低下が認められた。興味深いことに、ATL1遺伝子を強制発現させることにより、Hela細胞株のヌードマウスに対する造腫瘍性が顕著に減少し、腫瘍抑制遺伝子としての機能を有していた。したがって、ATL患者では、このATL1遺伝子が、染色体転座もしくは、メチル化などの機構によって発現抑制が引き起こされATLの発症に結びついている可能性が強く示唆された。これまでのところATLに共通する発症機構を説明できる細胞内遺伝子の発現変化は全く知られていない。したがって、この遺伝子は、ATLに共通する発症機構を説明するための、現在まで知られている遺伝子の中では最も有力な候補であると考えられる。

5) t(5;14)染色体相互転座切断点の解析と疾患関連遺伝子の探索

染色体相互転座t(5;14)(q21;q32)を有し、小頭症、特異顔貌、精神遅滞を発症した患者に由来するJHGP24細胞株の染色体標本作製し、これに対し、14番染色体q32領域に由来する一連のBACクローンを系統的にプローブとして用いFISH解析を行った。その結果、その内の1クローンをを用いた時に、正常な14番染色体に加え、染色体転座によって生じたder(14)染色体とder(5)染色体の両者にシグナルを与えるBACクローンを見いだした。このクローンのカバーする領域内に染色体転座切断点の存在が強く示唆されたことから、切断点のさらなる限局化を行うため、BACクローンをコスミドベクターにサブクローン化し、得られたコスミドクローンをを用いてFISH解析を行い、転座切断点をまたぐコスミドクローンを単離した。このコスミドクローンから単離したDNA断片を用いて、サザン解析を行い、染色体転座に由来する遺伝子再配列を見いだした。この遺伝子再配列を示す領域をクローン化し、その構造を解析した。その結果、図12cに示すように転座切断点にGTGGCという配列を見いだした。正常な5番ならびに14番染色体にも、同一の配列が存在したことから、この染色体転座は、この5塩基を介した相同組換

JHGP24に認められた染色体転座切断点の構造と近傍の遺伝子



えによって生じたことが強く示唆された。

この転座切断点近傍の遺伝子転写領域を探索した結果、転座切断点の周辺10kb以内にマウス由来ESTと高い相同性を示す領域を2カ所見いだした(図12d)。マウス精巢由来のESTは、この染色体転座切断点をまたぐようにこの保存された領域をカバーしていた。そこで、この転写産物のヒトホモログを単離するため、この保存された領域に由来するプライマーを用いて、5'ならびに3'RACE法を適用し、遺伝子の単離を行った。その結果、ヒトでも、これらの保存された領域を含む転写産物が存在することが明らかとなった。しかし、単離されたcDNAの構造解析を行ったところ、この転写産物には蛋白質翻訳領域が見いだされなかった。

興味深いことに、この転座切断点周辺100kbの塩基配列を用いて、Harr Plot解析を行ったところ、マウスとヒトで保存されている領域は、図12dにX、Y、Zで示す、この転座切断点周辺の3カ所の領域のみであった。さらに、このマウスとヒトで保存されている領域の蛋白質翻訳領域を検索したが、いずれの種に置いても、有意な翻訳領域は、見いだせなかった。この領域は、哺乳動物間で良く保存されていたことから、non-coding RNAとして発生の過程で重要な役割を担っている可能性が強く示唆された。そこで、この遺伝子をBR514と命名した。

6) その他のゲノム解析

[1] 各種人参類生薬の起源の同定

漢方薬として用いられる各種人参類生薬の起源を同定するため、18SリボソームRNA遺伝子とmatK遺伝子の構造解析を行った。人参、竹節人参、広東人参は、それぞれ原植物と考えられるオタネニンジン、チクセツニンジン、アメリカニンジンの構造と高い一致を認めた。しかし、市販されている三七人参は、当初の予想に反して外形的には区別できないにもかかわらず、二種類の種が混在していることが明らかとなった。

[2] 老化促進マウスSAMP8の老化に伴う記憶学習障害に関連する表現型の遺伝的解析

老化促進マウスSAMP8の老化に伴う記憶学習障害に関連する表現型の遺伝的背景をJF1系統との交配によって解析した。その結果4カ所の遺伝子座が発症に関与していることが明らかとなった。また、雄よりも雌の発症頻度が高く、雄を去勢することにより、雌に近い発症頻度が観察されたことから、男性ホルモンに発症予防効果があることが示唆された。

<国内外での成果の位置づけ>

われわれの開発したAL-PCR法は、再現性良く染色体転座切断点の構造解析や、ウイルス挿入部位の解析に幅広く利用できるため、この手法の詳細に関する問い合わせが、国内外から数多く寄せられた。

HTLV-1とATLの関係は、長年にわたり、多くの研究者によって解析が進められてきた。これまでの大半の研究がウイルスのコードする遺伝子機能の解析から、ATLの発症機構に迫ろうとしてきたのに対し、われわれの研究は、細胞内遺伝子の発現変化をウイルス挿入部位ならびに染色体好発部位の観点から検出しようとした点にユニークさが存在する。特に染色体好発部位の観点からATLの発症機構に迫る研究は、世界的にもほとんど行われておらず、本プロジェクトの目的としては、的を得たものであると考えられる。

本プロジェクトの成果として、われわれは、AL-PCR法

を駆使して、数多くの染色体転座切断点や、ウイルス挿入部位の構造解析を行い、TCL6, ADAM21L, Gopherin, ANK1, ATL1, BR514などの候補疾患関連遺伝子を単離同定した。特にわれわれは、ATL1遺伝子がATLの共通の発症機構を説明する代表的遺伝子となる可能性を強く信じており、現在精力的な機能解析を進めている。染色体異常部位の構造解析の迅速化によってこれらの成果が得られたことを考慮すると世界的にもユニークな試みであったと考えられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

当初の計画は、概ね達成された。

<今後の課題>

染色体転座切断点からの遺伝子単離法は、直接原因遺伝子に到達できるという点で、大変優れていると考えられる。しかし、いまだ、サザン解析レベルでの転座切断点の限局化に時間を要するという問題点が残されている。この点を克服できれば、がん細胞に多発する染色体異常の包括的解析が飛躍的に進むと考えられる。

<研究期間の全成果公表リスト>

- 1) 論文
 1. 0602062109
Akao, Y., and Isobe, M., Molecular analysis of the rearranged genome and chimeric mRNAs caused by the t(6;11)(q27;q23) chromosome translocation involving MLL in an infant acute monocytic leukemia, *Genes Chromosomes Cancer*, 27(4), 412-417 (2000).
 2. 0602062138
Fushimi, H., Komatsu, K., Namba, T., and Isobe, M., Genetic heterogeneity of ribosomal RNA gene and matK gene in *Panax notoginseng*, *Planta Med*, 66(7), 659-661 (2000).
 3. 0602062152
Saitou, M., Sugimoto, J., Hatakeyama, T., Russo, G., and Isobe, M., Identification of the TCL6 genes within the breakpoint cluster region on chromosome 14q32 in T-cell leukemia, *Oncogene*, 19(23), 2796-2802 (2000).
 4. 0602062204
Suga, M., Isobe, M., and Hatakeyama, T., Cryopreservation of competent intact yeast cells for efficient electroporation, *Yeast*, 16(10), 889-896 (2000).
 5. 202262220
Saitou, M., Sadamori, N., and Isobe, M., Identification of an aberrant type of rearrangement in the T-cell receptor alpha/delta locus in adult T-cell leukemia, *J Hum Genet*, 46(12), 706-711 (2001).
 6. 303061459
Ihara, Y., Kato, Y., Bando, T., Yamagishi, F., Minamimura, T., Sakamoto, T., Tsukada, K., and Isobe, M., Allelic imbalance of 14q32 in esophageal carcinoma, *Cancer Genet Cytogenet*, 135(2), 177-181 (2002).
 7. 0404022317
Ozawa, T., Itoyama, T., Sadamori, N., Yamada, Y., Hata, T., Tomonaga, M., and Isobe, M., Rapid isolation of viral integration site reveals frequent integration of HTLV-1 into expressed loci, *J Hum Genet*, 49(3), 154-165 (2004).

8. 0404022342
Ozawa, T., Kondo, M., and Isobe, M., 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) walking for rapid structural analysis of large transcripts, *J Hum Genet*, 49(2), 102-105 (2004).
 9. 0602062228
Ishii, H., Inageta, T., Mimori, K., Saito, T., Sasaki, H., Isobe, M., Mori, M., Croce, C.M., Huebner, K., Ozawa, K., and Furukawa, Y., Frag1, a homolog of alternative replication factor C subunits, links replication stress surveillance with apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(27), 9655-9660 (2005).
 10. 0602062242
Tomobe, K., Isobe, M., Okuma, Y., Kitamura, K., Oketani, Y., and Nomura, Y., Genetic analysis of learning and memory deficits in senescence-accelerated mouse (SAM), *Physiol Behav*, 84(4), 505-510 (2005).
 11.
Haider, S., Hayakawa, K. Itoyama, T. Sadamori, N. Kurosawa, N., and Isobe, M., TCR variable gene involvement in chromosome inversion between 14q11 and 14q24 in adult T-cell leukemia, *J Hum Genet*, in press (2006).
 12.
Haider, S., Matsumoto, R., Kurosawa, N., Wakui, K., Fukushima, Y., and Isobe, M., Molecular characterization of a novel translocation t(5;14)(q21;q32) in a patient with congenital abnormalities, *J Hum Genet*, in press (2006).
- 2) 特許申請
1. ヒト GRXL-1 遺伝子と GRXL-1 タンパク質 (特願 2003-024626) 2003年1月31日出願