

# ウイルス挿入変異による血液疾患原因遺伝子の網羅的スクリーニング

●鈴木 健之

京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構

## 〈研究の目的と進め方〉

研究代表者は、これまでマウスをモデル動物として用いて、レトロウイルスによる挿入変異実験を行ない、発症した血液腫瘍からウイルス挿入を目印に、疾患関連遺伝子の候補を網羅的に単離してきた。この従来の実験系では、挿入変異により発現や機能が活性化されて発症に関わるドミナントな遺伝子が主に単離され、がん抑制遺伝子としての機能を期待される劣性遺伝子の候補はほとんどとれなかった。そこで、分裂組み換えを頻発する変異体マウスを用いて、挿入変異を行なうことにより、両方のアレルへの変異導入効率を高めて、がん抑制遺伝子を優先的に単離するシステムの構築を試みた。本課題は、ウイルス挿入という第一の変異と、第二の変異が起りやすいゲノム不安定性を組み合わせることで、これまで難しかった劣性表現型を示す疾患原因遺伝子の網羅的スクリーニングを目指している。

## 〈研究開始時の研究計画〉

ゲノム不安定性（分裂組み換えおよびLOH頻度の上昇）を示すブルーム症候群モデルマウス（Blm遺伝子変異マウス）と、白血病ウイルスにより血液腫瘍を引き起こすAKxDマウスを交配し、目的の疾患モデルマウスAKxD.Blmを作製する。発症した腫瘍のゲノムDNAからInverse PCR法を用いて、ウイルス挿入部位を含むゲノム断片を増幅し、その塩基配列を決定して、マウスゲノム上にマッピングする。複数の検体に由来する共通挿入部位（コモンサイト）の遺伝子が、疾患の発症に重要である。そのうち、遺伝子の翻訳領域を壊す形のウイルス挿入をもつものをがん抑制遺伝子の候補として注目し、機能解析を行なう。

## 〈研究期間の成果〉

まず、Blm遺伝子ホモ変異体マウスが野生型マウスより早期に血液腫瘍を発症することがわかった。腫瘍由来のウイルス挿入部位の解析から、新たに疾患関連遺伝子の候補を多数同定し（1,2）、疾患関連遺伝子データベースとしてウェブ上で公開した（3,4）。特に複数症例でウイルスが翻訳領域の内部に挿入している遺伝子（劣性表現型を示す疾患原因遺伝子の候補）を十数個発見することに成功した。由来した腫瘍での両アレルの変異が確認されたものには、網膜芽細胞腫Rb関連遺伝子、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子、ファンconi貧血原因遺伝子など既知の有力な候補が含まれており、目的の実験系が樹立できたことが確認された。現在、新しく同定された候補遺伝子の機能解析を進行しており、Jumonji(JmjC)ドメインという共通構造をもつBCIS1(Fbx110)遺伝子とBCIS2(3110005o21Rik)遺伝子が、DNAミスマッチ修復に関与してゲノムの恒常性を維持する新しいがん抑制遺伝子の候補であることを明らかにした。さらに、Fbx110が癌遺伝子産物BCL6の転写因子としての機能を調節していることを示唆する結果も得ている。Fbx110はヒストン脱メチル化酵素の活性を持つことが最近報告されており、DNA修復や転写制御とクロマチン構造変化の関係に注目してその作用機構を調べている。

## 〈国内外での成果の位置づけ〉

ゲノムワイドに挿入変異を導入するレトロウイルスは、ポストゲノムの網羅的遺伝子解析の重要なツールのひとつである。特に、観察する表現型を限定でき、原因遺伝子の特定が容易であることから、個人研究の規模での解析に適している。こうした〈表現型〉から〈遺伝子〉への順遺伝学的アプローチは、新規遺伝子の機能発見や遺伝子間の新しい相互作用の証明に貢献が期待されている。ゲノム不安定性を利用したENU変異やトランスポゾン挿入変異は、国内外で注目され研究計画が進行しているが、個体レベルで発症した疾患から、劣性表現型を示す疾患原因遺伝子の候補の単離に成功したのは、現在のところ、レトロウイルスを用いた本研究だけである。

## 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

米国留学から帰国し、独立研究を開始したばかりなので、研究スタッフおよび研究費の不足や、搬入したマウスのSPF化などから、課題の進行が遅れていたが、今ではそれも解消された。

## 〈今後の課題〉

新規の候補遺伝子をできるだけ多く単離し、その機能や疾患への関与を解析すること、さらにヒト血液疾患での変異や発現抑制を調べることを計画している。また、ウイルス挿入部位や候補遺伝子は、すべて疾患関連遺伝子データベースとして公開しており、関連分野の研究者との積極的な連携をはかり、研究を効果的に発展させたい。BCIS1とBCIS2については今後、相互作用する分子の探索、作用機構の解明およびノックアウトマウスを用いた個体レベルでの機能解析を計画している。既に、FLAGやHisタグを融合した遺伝子産物を恒常的に発現する細胞株を樹立しており、また、遺伝子ターゲットニング用のベクターの構築も完了している。さらに最近、6番および8番染色体にマップされる2つの新しい候補遺伝子(BCIS3、BCIS4)が、DNA二重鎖切断修復に関与する可能性を見いだしており、詳細な機能解析をはじめていきたい。

## 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Shin MS., Fredrickson TN., Hartley JW., Suzuki T., Akagi K., and Morse HC., High-throughput retroviral tagging for identification of genes involved in initiation and progression of mouse splenic marginal zone lymphomas, *Cancer Research*, 64, 4419-27 (2004).
2. Warming S., Suzuki T., Yamaguchi TP., Jenkins NA., and Copeland NG., Early B-cell factor associated zinc-finger gene is a frequent target of retroviral integration in murine B-cell lymphomas, *Oncogene* 23, 2727-31 (2004).
3. Akagi K., Suzuki T., Stephens RM., Jenkins NA., and Copeland NG., RTCGD: retroviral tagged cancer gene database, *Nucleic Acids Res.* 32, D523-7 (2004).
4. RTCG Database (<http://rtcg.ncicrf.gov/>)