

NIRS-M-97

放医研 図書室



8 0 1 9 9 4 0 0 9

放医研シンポジウムシリーズ No. 25

ヒト・マウス・ゲノム解析研究と 放射線生物学

堀 雅明 編

放射線医学総合研究所

放医研シンポジウムシリーズ No. 25

ヒト・マウス・ゲノム解析研究と 放射線生物学

堀 雅明 編

Human · Mouse Genome Analysis and Radiation Biology

Proceedings of the 25th NIRS Symposium
held at Chiba, November 18 – 19, 1993

Edited by
TADA – AKI HORI

1994
National Institute of Radiological Sciences
Chiba, Japan

開会の挨拶

本年で25回になる放医研シンポジウムで「ヒト・マウス・ゲノム解析研究と放射線生物学」と題し2日間にわたる研究発表と討論が行われるのは、誠に喜ばしくかつ心強いことです。

生物の細胞が放射線のエネルギーを吸収し、特定の染色体の位置にある遺伝子-DNA が損傷を受けた時、損傷の大部分はうまく修復され、大事にいたらずに済むわけですが、その一部は修復ミス、遺伝子組み替え、欠損、遺伝子の不安定化等を経て、がんや突然変異の出発点あるいは原因となると一般に考えられています。DNA の組成や構造の変化を検出する技術は最近非常に進歩しましたが、23対あるヒトの染色体上での局在まで考慮した10万もあるという遺伝子の変化としてとらえることは、いうならば至難の技です。それでも日常生活で我々が受ける位の量の放射線が何がしかの悪さをするのではないかなどという疑問に自信を持って答え得る為には、結局ゲノム解析研究に頼らざるを得ないのではないかと思ひそかに期待しています。

その意味で、ゲノム解析研究がどこまで進歩しているのかを知るのは非常に興味がありますし、放射線以外の研究に携わっておられる方々に放射線影響の研究者が何を考え何を悩んでいるのかを理解して戴くのは、良い機会であると思います。ただ、しっかりした研究成果が得られるのには、ひとつの機能を果たすのに複数の遺伝子が共同作業をしている様に、専門家の協力とそれに長い時間が必要ですので、本シンポジウムに参加された方々が将来ともできれば国際的なチームを組んで、それぞれの立場で協力しあい研究を進められることを希望します。

平成5年11月18日
放射線医学総合研究所
所長 松平 寛通

目 次

開会の挨拶	松平 寛通	v
座長一覧		viii
執筆者一覧		ix
I. マウス・ゲノム解析研究の現状		
1. Restriction landmark genomic scanning (RLGS) を用いた imprinted 遺伝子の系統的スクリーニング法とそれにより単離された新しい mouse imprinted 遺伝子 (<i>U2afbp-rs</i>)	林崎 良英	3
2. FISH 法を用いたマウスの遺伝子マッピングとその応用	松田 洋一	7
3. マイクロサテライトをマーカーとして用いたマッピングとその応用	木南 凌	17
II. 放射線感受性遺伝子		
1. 真核生物の組換え蛋白質の機能と構造	小川 智子	25
2. DNA 損傷修復遺伝子 ERCC5 とヒト遺伝性疾患	塩見 忠博	38
3. DNA 損傷誘導遺伝子	根井 充	46
4. 放射線応答のシグナル伝達路	佐々木正夫	56
III. 特別講演		
1. Comparative Mapping of Mouse RLGS Loci in the Human Genome	Verne M. Chapman	63
2. XPA 遺伝子のターゲティングにより樹立した DNA 除去修復欠損マウスの解析	田中亀代次	79
IV. 放射線発がんのゲノム変異		
1. 放射線反復照射によって誘発されたマウス腫瘍の p53 遺伝子の変化	大津山 彰	93
2. 放射線誘発マウス骨髄性白血病における遺伝子再編	石原 弘	99
3. 放射線誘発マウス胸腺リンパ腫の染色体転座とがん抑制遺伝子の変異	武藤 正弘	113
V. モデル・マウスと放射線生物学		
1. SCID マウスの放射線感受性とそれを相補するヒト染色体の同定	小松 賢志	133
2. トランスジェニックマウスを用いた突然変異検出法	勝木 元也	142
3. リンパ球の分化と癌化の遺伝的基礎	山村 研一	150
VI. ヒト・ゲノム解析研究の現状		
1. FISH 法によるヒトゲノムマップ	高橋 永一	161
2. 第 3 染色体の詳細な地図の作成と癌抑制遺伝子単離への応用	山川 和弘	168

- 3. インテグレイテッドトップダウンアプローチによる 11q13 領域の解析今井 高志 170
- 4. ヒト11番染色体 q23.3-q ter 領域の物理的地図の作成細田 文恵 179

VIII. がんの原因遺伝子

- 1. 消化器系腫瘍の発生における APC 遺伝子の異常の関与堀井 明 189
- 2. 急性骨髄性白血病における t (8;21) および t (16;21) 染色体転座部位の解析清水喜美子 191
- 3. 原爆被爆者白血病の分子・細胞遺伝学的解析結果鎌田 七男 199

VIII. 特別講演

- 1. Analysis of Human and Murine Chromosomes using Fluorescence in situ HybridizationD. C. Ward 211
- 2. The Genetic Changes in Treatment-Related Leukemia are Related to the Type of Prior TherapyJanet D. Rowley 213
- 3. ゲノム解析によって期待される21世紀の医療-治療する医療から予知・予防する医療へ中村 祐輔 222

IX. 動物突然変異

- 1. 脆弱X症候群に関連する動的突然変異山内 正剛 227
- 2. 筋緊張性ジストロフィー症の発症機構三木 哲郎 239

X. 突然変異検出法

- 1. PCR-SSCP 法とそのヒトゲノム研究への応用林 健志 247
- 2. 放射線被曝による体細胞突然変異の誘導とその検出秋山 實利 252
- 3. 原爆被爆者の子供の反復配列突然変異佐藤千代子 262
- 4. 体細胞分裂組換えと欠失突然変異の解析巽 紘一 272

- 編集後記堀 雅明 279
- 第25回放医研シンポジウム「ヒト・マウス・ゲノム解析研究と放射線生物学」プログラム 280
- 第25回放医研シンポジウム実行委員会委員一覧 281

座長一覧

(担当セッション順)

I. マウス・ゲノム解析研究の現状	木南 凌	新潟大学
II. 放射線感受性遺伝子	佐々木正夫	京都大学
III. 特別講演	村松 正実	埼玉医科大学
IV. 放射線発がんのゲノム変異	丹羽 太貫	広島大学
V. モデル・マウスと放射線生物学	山村 研一	熊本大学
VI. ヒト・ゲノム解析研究の現状	大木 操	国立がんセンター研究所
VII. がんの原因遺伝子	鎌田 七男	広島大学
VIII. 特別講演	堀 雅明	放射線医学総合研究所
IX. 動的突然変異	堀 雅明	放射線医学総合研究所
X. 突然変異検出法	異 紘一	放射線医学総合研究所

執筆者一覧 (発表順, 敬称略)

(所属は平成5年11月末現在)

林崎 良英	理化学研究所	高橋 永一	放射線医学総合研究所
松田 洋一	放射線医学総合研究所	山川 和弘	癌研究会癌研究所
木南 凌	新潟大学	今井 高志	癌研究会癌研究所
小川 智子	大阪大学	細田 文恵	国立がんセンター研究所
塩見 忠博	放射線医学総合研究所	堀井 明	癌研究会癌研究所
根井 充	放射線医学総合研究所	清水喜美子	国立がんセンター研究所
佐々木正夫	京都大学	鎌田 七男	広島大学
V. M. Chapman	RPMI	D. C. Ward	エール大学
田中亀代次	大阪大学	J. D. Rowley	シカゴ大学
大津山 彰	国立がんセンター研究所	中村 祐輔	癌研究会癌研究所
石原 弘	放射線医学総合研究所	山内 正剛	放射線医学総合研究所
武藤 正弘	放射線医学総合研究所	三木 哲郎	大阪大学
小松 賢志	長崎大学	林 健志	九州大学
勝木 元也	九州大学	秋山 實利	放射線影響研究所
山村 研一	熊本大学	佐藤千代子	放射線影響研究所
		巽 紘一	放射線医学総合研究所

I. マウス・ゲノム解析研究の現状

1. Restriction landmark genomic scanning (RLGS) を用いた imprinted 遺伝子の系統的スクリーニング法とそれにより単離された新しい mouse imprinted 遺伝子 (*U2afbp-rs*) 林崎 良英
2. FISH 法を用いたマウスの遺伝子マッピングとその応用 松田 洋一
3. マイクロサテライトをマーカーとして用いたマッピングとその応用 木南 凌他

1. Restriction landmark genomic scanning (RLGS) を用いた imprinted 遺伝子の系統的スクリーニング法とそれにより単離された新しい mouse imprinted 遺伝子 (*U2afbp-rs*)

林 崎 良 英*

An endogenously imprinted gene *U2afbp-rs* newly discovered
by systematic screening using restriction landmark genomic scanning (RLGS)

Yoshihide Hayashizaki

Gene Bank, Tsukuba Life Science Center, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

3-1-1 Koyadai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

Summary

A new imprinted gene has been discovered in mice using restriction landmark genomic scanning with methylation sensitive enzymes. Eight out of 3,100 strain-specific *NotI*- and *BssHIII*-spots were identified as imprinted in reciprocal F1 hybrids. Subsequently, we isolated a genomic clone for one locus on proximal Chromosome 11 near the *Glns* locus, an imprinted region in uniparental disomic mice and its corresponding cDNA clone. Expression of this transcript from paternal allele was established using RT-PCR of reciprocal F1 hybrid mice. The amino-acid sequence deduced from the cDNA showed significant homology to U2 small nuclear ribonuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit.

genomic imprinting (刷り込み現象) は、遺伝子が父方または母方由来でその発現が決定される現象で、哺乳類の単為発生の防止、発癌、一部の遺伝疾患の発現に関与していると考えられている。我々のグループでは、ゲノム上に散在する制限酵素のサイトを landmark として (restriction landmark)、ゲノムを高速にスキャンニングするシステムの開発を行っている (restriction landmark genomic scanning 法 (RLGS))。RLGS は、1) genomic DNA への直接標識法と、2) 高分解 2 次元ゲル電気泳動法を基本としており、そのスキャンニング能はきわめて高く、全ての生物ゲノムに適用でき、landmark のコピー数も spot の intensity より判定できるという理想的な特徴を有している。今回、本法を用いて、遺伝子の CpG island のメチル化を検出することにより遺伝子の発現の on-off をスクリーニングを行う方法を開発した。この方法により mouse genomic imprinting 遺伝子をマウスゲノムよりスクリーニング及びクローニング

*理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター (茨城県つくば市高野台3-1-1)

した結果、imprintingの法則に従って伝達する新規の遺伝子 (*U2afbp-rs*) を単離したので報告する。

1) 任意の生物ゲノムを高率的にスキャンニングするシステム - restriction landmark genomic scanning (RLGS) 法 - を開発した。

RLGS法は図1に示すように、次の7ステップよりなる。1) genomic DNAをrestriction landmarkとする制限酵素A (8塩基認識酵素、低頻度切断酵素)で切断、2) その末端に直接放射性標識、3) 制限酵素Aより頻度が高い制限酵素B (6塩基認識酵素)で切断、4) 1次元目アガロース電気泳動、5) 制限酵素Bより頻度が高い制限酵素C (4塩基認識酵素、高頻度6塩基認識酵素)でin gelにて切断、6) 2次元目ポリアクリルアミド電気泳動、7) オートラジオグラフィ、異常により図2のような画像が得られる。

図1に示す様に、制限酵素Aとして、DNAのメチル化感受性の制限酵素を用いるとゲノム上のDNAのメチル化の変化がわかる (restriction landmark genomic scanning using methylation sensitive restriction enzyme 法 (RLGS-M))。特に、*NotI* や *BssHIII* の様に認識配列がCG-richな酵素を選んだときは、そのメチル化が遺伝子の発現と相関しているとされる CpG island を特異的にスクリーニングできる。例えば、*NotI* landmarkのRLGSパターン上のスポットの内、90%が遺伝子そのものまたはその近傍の CpG island を検索していることになる。

2) マウス内在性インプリント遺伝子の系統的検出

マウス内在性インプリント遺伝子の系統的検出を目的とし、上記の方法を用いて、DBA/2 (D2) と C57BL/6 (B6) の reciprocal cross によりできた家系を解析した。restriction landmark として、*NotI*, *BssHIII*, *SaII*, *MluI* を用いて、3100種類の

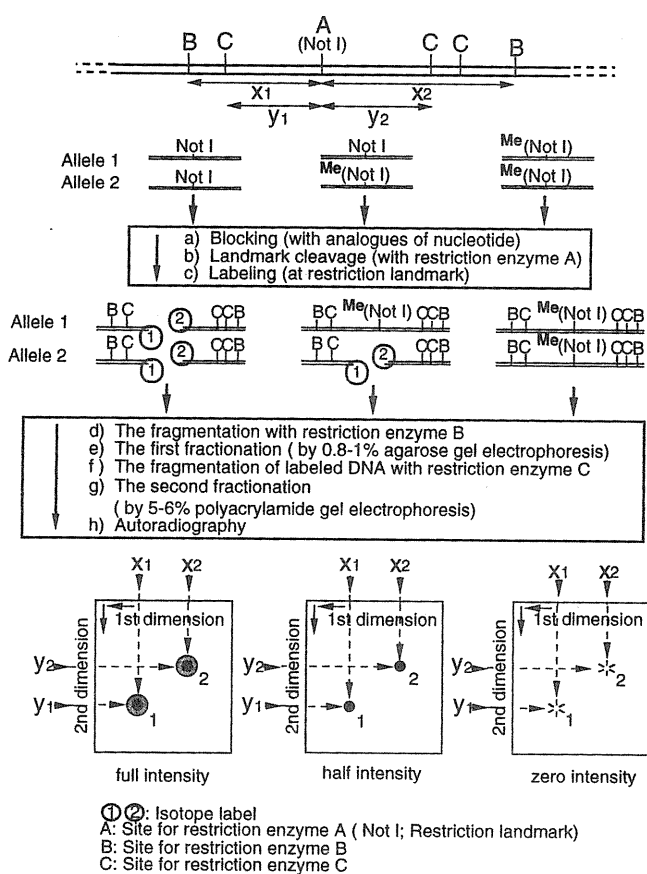


図1

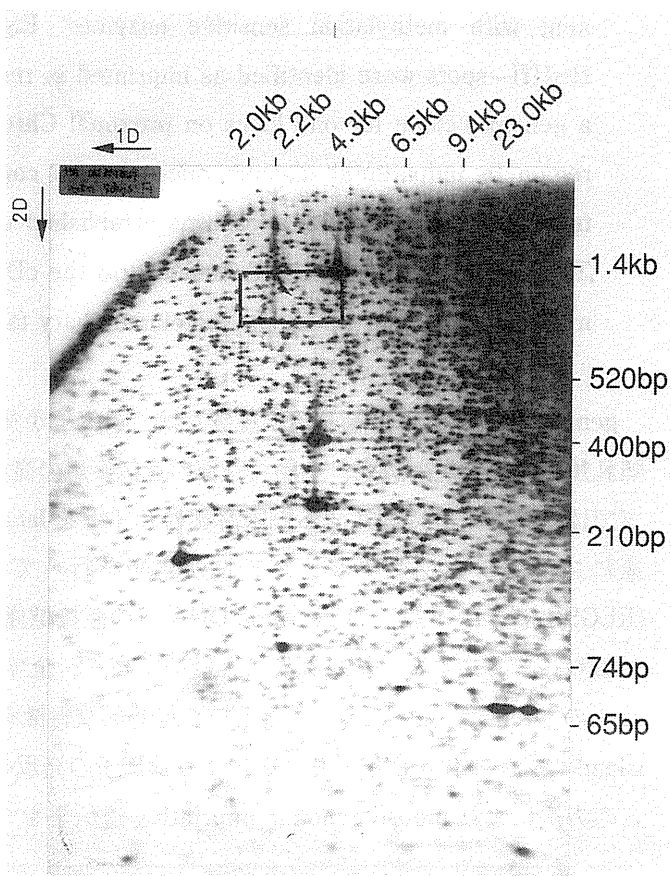


図2

I-1 Restriction landmark genomic scanning (RLGS) を用いた imprinted 遺伝子の系統的スクリーニング法とそれにより単離された新しい mouse imprinted 遺伝子 (*U2afbp-rs*)

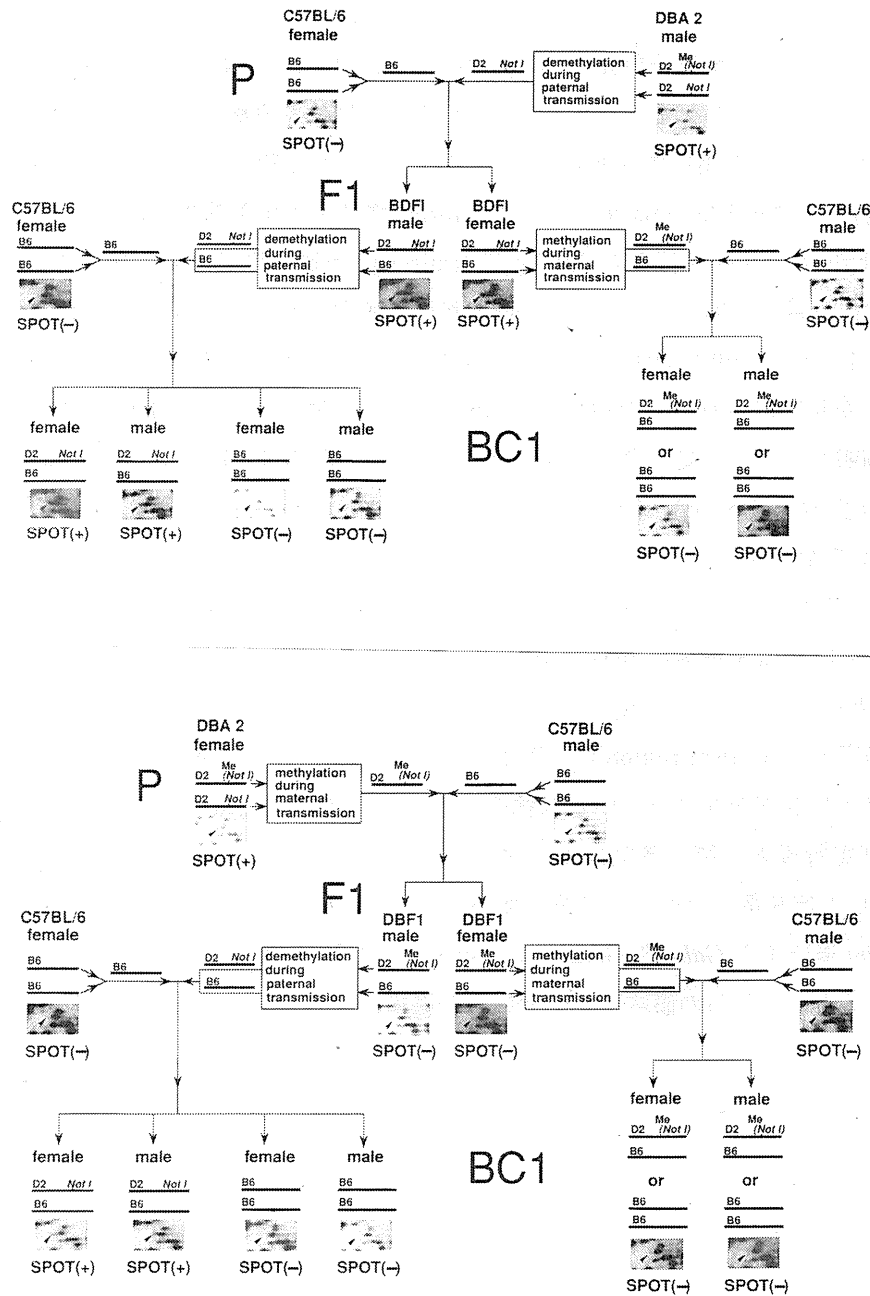


図 3

ポリモルフィックスポットを検索した所、両親の性によりその出現と消失が規定される RLGS パターン上のスポットを 8 個検出することができた。これらのスポットは、図 3 に示すように、その次の世代に伝達するときも imprint の法則に従っていることが確認された。

3) imprinted spot のゲノムマップ

上記のスクリーニングで発見された 8 個の imprinted spot のうち 3 個につき、BXD RI strain を用いてマッピングを行った。マッピングには RI Manager (K. Manly and R. Elliott) を用いて SDP パターンの解析を行った。この結果、B6 由来、D2 由来のスポットは、それぞれ第 11 染色体の proximal region 及び第 9 番染色体上の central region にマップされた。

4) imprinted 遺伝子のクローニング

上記のスポットのうち、第11染色体の proximal region にマップされた図3矢印で示す Spot CD(B)461 につき、RLGS パターン上のゲルよりスポットに相当する部位を直接切り出し、目的の DNA をクローニングした。そのクローンを用いて (B6xD2) F1、及び、(D2xB6) F1 の reciprocal cross を材料に Southern hybridization を行って *Not I* landmark における imprint 様メチル化を確認した。その genomic DNA を用いて Northern hybridization を行うと 3.0kbp の transcript が脳と肝臓で強く検出された。また、精巣及び腎臓では非常に少量ではあるが同じ長さの転写単位が検出された。そこで、 λ gt11 を用い、その cDNA をクローニングし、ほぼ full length の cDNA (Sp2-7) が得られた。Sequencing analysis の結果、Open Reading Frame が見いだされ、この cDNA は428個のアミノ酸からなる 51KDa の分子量の蛋白質をコードすることが判明した。この蛋白質は、splicing factor の U2AF 35kDa subunit に極めて強い Homology を示す新規遺伝子 (*U2afbp-rs*) であった。この遺伝子は intron がなく、また、その転写単位内の 5' 側には GGATAACT を基本 unit とする VNTR (*FokI* family) が 1kbp 以上の領域にわたって存在する。

前述の様に、*U2afbp-rs* 遺伝子 (Sp2-7) の遺伝地図によると、uniparental disomy assay で genomic imprinting を示す第11番染色体の pericentromeric heterochromatin 領域に位置し、ヒトでは第5番及び第2番染色体とのシンテニーの接合領域にあたる。spliceosome に存在し splicing factor であり、Prader-Willi 症候群の critical region に位置する *Snrpn* 遺伝子も imprinted 遺伝子で有ることは誠に興味深い。すでにタイピングがなされている32種のヒト-マウスの hybrid cell panel でヒト *U2afbp-rs* 遺伝子のマッピングを行うと、第5番染色体にマップされた。*U2afbp-rs* 遺伝子と *Gabra1* (GABA receptor subunit 1) とはヒト第5番-マウス第11染色体のシンテニーにマップされた一方、genomic imprinting され、かつ、*Snrpn* 遺伝子と *Gabra3* (GABA receptor subunit 3) とはマウス第7染色体の近い領域にマップされた事を考えると、これらの領域は imprinting の機構も含めて進化的に保存していると考えられる。

2. FISH 法を用いたマウスの遺伝子マッピング とその応用

松 田 洋 一*

Chromosomal mapping with fluorescence *in situ* hybridization (FISH) method
and its application in mouse genetics

Yoichi Matsuda

Division of Genetics, National Institute of Radiological Sciences,

Anagawa 4-9-1, Inage-ku, Chiba 263, Japan

Abstract

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is a very powerful method of localizing cloned DNA probes directly on metaphase chromosomes. Recently, human chromosomal mapping with FISH was significantly enhanced by using replication R-banded chromosomes in which the signals of hybridized, fluorescently-labeled probes and chromosomal bands were identified simultaneously. We applied this method to mouse chromosomes and established a direct R-banding FISH method of the mouse. With this method, we have already performed fine mapping of many mouse DNA clones or transgenes of the transgenic mouse lines, and applied this method to studies of mouse genetics as follows: (1) analysis of chromosomal rearrangements in wild mice with two-color FISH method, (2) centromere mapping with major satellite DNA probes, (3) analysis of chromatin structure in meiotic cells, and (4) application of FISH to studies on genetic divergence of wild *Mus* species.

はじめに

クローン化された cDNA またはゲノム DNA をプローブにして、染色体標本上に直接ハイブリダイズさせ、目的の DNA 配列の染色体上の位置を同定できる *in situ* hybridization は、遺伝子マッピングのための重要な技術のひとつである。近年、化学標識した DNA プローブを蛍光染色して、蛍光シグナルを蛍光顕微鏡下で観察する fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法が開発され、安全性、簡便性、正確性等の点で優れているため、従来の RI 法に代わり、現在ではこの方法がヒトの遺伝子マッピング技術の主

*放射線医学総合研究所遺伝研究部 (〒263 千葉市稲毛区穴川4-9-1)

流を占めるようになった¹⁻³⁾。さらに最近、高橋ら⁴⁾によってヒト染色体で replication R-band 法を用いた FISH (direct R-banding FISH) 法が開発されたことによって、ヒトの遺伝子マッピングの精度とスピードは飛躍的に向上した。

一方、マウスの遺伝子マッピングは、これ迄交配実験を中心に進められてきた(遺伝的連鎖地図)。現在では、数多くのリコンビナント系統マウスの利用、また遺伝的多型を容易に検出できる別亜種や別種マウスを用いた交雑系の利用によって迅速なマッピングが可能となっている⁵⁾。そのため、FISH を用いたマウスの細胞遺伝学的マッピング技術の開発は大幅に遅れていたが、最近ではようやく direct R-banding FISH 法がマウスでも活用されるようになり⁶⁾、染色体地図の作製に多大な寄与をもたらすとともに、実験動物としてのマウス特有の FISH の活用法が見出されつつある。

本稿では、FISH 法によるマウスの遺伝子マッピングの現状を紹介するとともに、筆者らの研究室で行われている研究を例にあげながら FISH 法の応用法についても述べてみたい。

I マウスにおける遺伝子マッピング

ヒトの場合と比較して遺伝子マッピングにおけるマウスの利点のひとつは、交配実験によって遺伝的連鎖地図を作製できることである⁷⁾。そのためマウスの細胞遺伝学的地図の作製はいまだほとんどなされておらず、これまでに、長年にわたる染色体異常マウス系統の核型分析によって明らかにされた染色体異常の切断部位の同定⁸⁾、もしくはラジオアイソトープを用いた *in situ* hybridization 法によってごくわずかの遺伝子のマッピングがおこなわれているに過ぎず、遺伝的連鎖地図と細胞遺伝学的地図との対応は十分についてはいない。また、マウス染色体 ($2n=40$) は全てアクロセントリック型であり、大きさの差異も連続的であるため、形態のみで各染色体を識別することが不可能であり、染色体の同定や目的の DNA 配列の詳細な位置を知るためには鮮明な染色体バンディングを行なう必要がある。これらの問題がマウスの細胞遺伝学的地図を作製するための障害となっていたが、現在ではマウスにおいても replication R-band 法^{8, 9)} (図 1, 2) を併用した direct R-banding FISH 法⁶⁾ を用いることによって、迅速かつ精度の高い細胞遺伝学的地図の作製が可能となり、今後、遺伝的連鎖地図と細胞遺伝学的地図のギャップは確実に埋められていくであろう。現在筆者らの研究室では、1.0kb の cDNA、2.0kb のゲノム DNA のような小さな DNA プローブでも十分マッピングが可能となっている (図 3)。

マウスの遺伝的連鎖地図の作製には、実験用近交系マウス (*Mus musculus domesticus*) 系統やリコンビナントマウス系統の他に、最近では RFLP が容易に検出できる別種マウスの *M. spretus* や別亜種マウスの *M. m. molossinus*、*castaneus*、*musculus* が主に使用されている。各染色体に 3~4 個のアンカーとなる遺伝子座を設定し、戻し交雑個体について遺伝子型を決めてパネルを作製しておけば、これらの戻し交雑個体の DNA を用いて、サザン法や PCR 法で目的の遺伝子や遺伝マーカーのマッピングを行うことができる。この戻し交雑個体のパネルを作製するには大変な労力が必要であるが、一度これを作製してしまえば遺伝子マッピングを迅速に行うことができる。しかし、このような既存の戻し交雑個体のパネルを利用できないトランスジェニックマウスのトランスジーンのマッピングに FISH 法は非常な威力を発揮する (図 3)。トランスジェニックマウスを用いた研究を進める過程で、導入遺伝子の発現が当初の予想と異なることがあったり、また、遺伝子導入によって、他の遺伝子の発現が大きく影響を受け、特異的な発現がみられることがしばしばである。このような場合、導入遺伝子の挿入部位を知っておくことが後の研究を進める上で必須の条件となる。

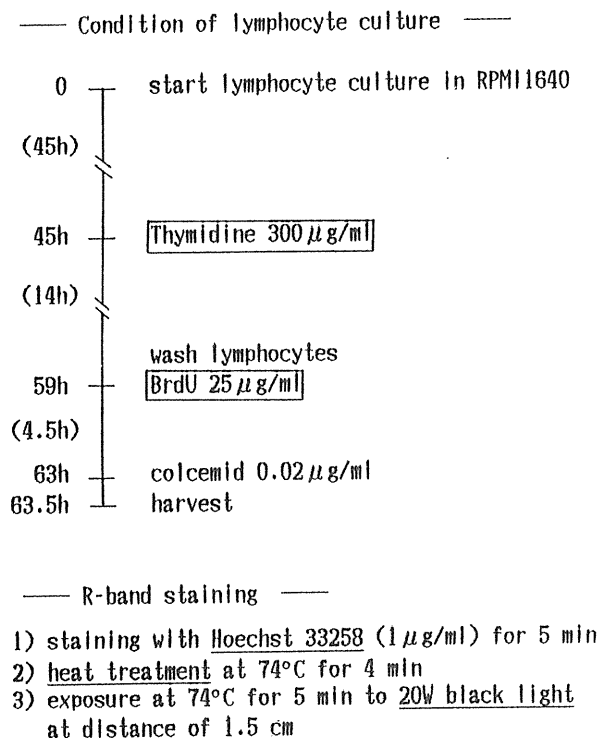


Fig. 1. Method of replication R-banding for direct R-banding FISH.

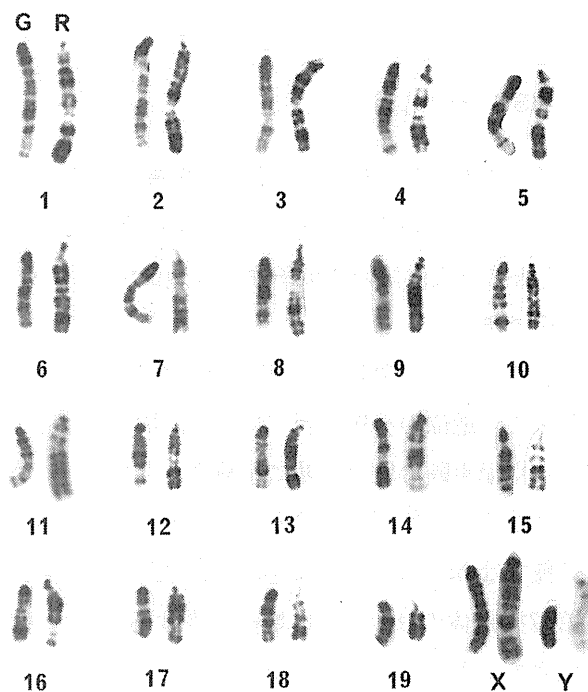


Fig. 2. Banding pattern of replication G-banded (left) and R-banded (right) chromosomes.

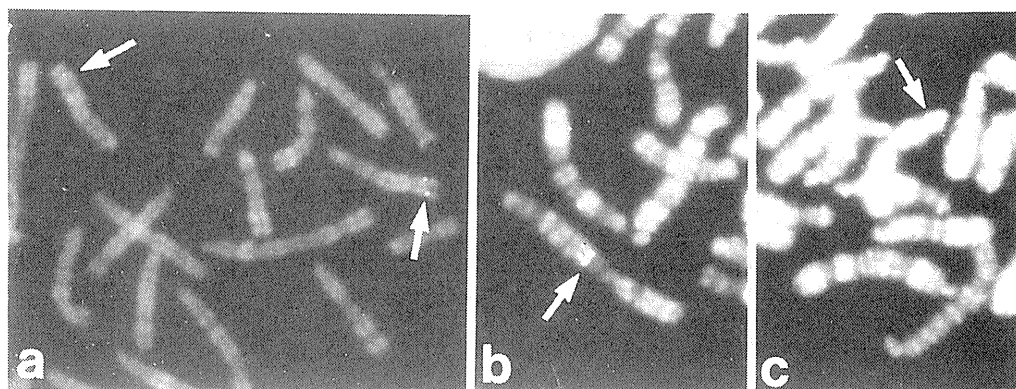


Fig. 3. Chromosomal mapping of mouse β_2 -glycoprotein I 1.1kb cDNA (a) and the transgenes in which 1.2kb cDNA of human polio virus receptor gene is introduced (b,c) (in collaboration with Dr. S. Natsume-Sakai, Kanazawa Univ., and Drs. S. Koike, H. Yonekawa and C. Taya, Tokyo Metropolitan Inst. Med. Sci., respectively).

FISH法によって目的のDNA配列の染色体上の位置が判明すれば、それらの詳細な遺伝的連鎖地図を迅速に作製することができる。我々の研究室では、FISH法による細胞遺伝学的地図を基に、以下のような方法で精度の高い遺伝的連鎖地図を作製している。FISH法を用いてまず目的の遺伝子DNAを染色体上にマップし、その位置情報を基にすでに作製されている遺伝的連鎖地図よりその近傍に存在するマイクロサテライトDNAマーカー¹⁰⁾を選択する。そして、実験用近交系マウス系統C57BL/6 (*M. m. domesticus*)とヨーロッパ産野生マウス*M. spretus*の種間戻し交雑個体のDNAサンプルを用いて、PCR法によってマイクロサテライトDNAのタイピングを行なうことによって、さらに詳細な位置を決定する。この場合、目的の遺伝子DNAの染色体上の詳細な位置がすでに判明しているため、戻し交雑マウスのマッ

ピングパネルを用意する必要はなく、わずかな遺伝マーカーを用いるだけで、容易に精度の高いマッピングを行なうことができる。

II FISH 法の応用

1) 多色標識 FISH 法による染色体変異の検出

いくつかの DNA プローブを異なる物質で標識し、異なる蛍光色素でシグナルを検出する多色標識 FISH 法は、染色体の遺伝子または遺伝マーカーの配列順序や互いの位置関係を検定するのに非常に有効な手段である。

我々は、マウス第17染色体上に存在する逆位に注目し、多数の野生マウス種を用いて 2 色標識 FISH 法によって、逆位の有無を調べている。図 4 に示したように、*t* ハプロタイプと野生型の間には 4 つの逆位の存在が交配実験の結果を基に示唆されているが^{11, 12)}、実際にそれらの染色体上の位置関係を詳細に調べた報告はなく、2 色標識 FISH 法が有効な分析手段となる。また、交雑実験を行なうことができない野生マウス種では *in situ* hybridization 法を用いなければ、その存在を知ることは不可能である。

第17染色体の *Inv* (2) 領域に存在する 2 つの遺伝マーカー、119 と *Tcp-1* の DNA プローブ (図 4) をビオチンとジゴキシゲニンでそれぞれラベルして FISH を行ない、FITC とローダミンでシグナルを検出して、2 つの遺伝マーカーの位置関係を調べた結果を表 1 に示した。*M. caroli*、*M. booduga* および *M. dunni* については、実験用近交系マウスと交配ができないため、FISH 法によってこの領域での逆位の有無が明らかにされた。

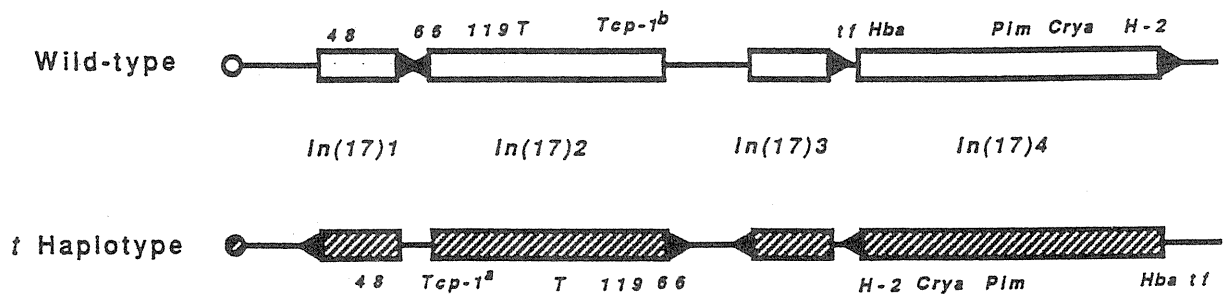


Fig. 4. Genetic maps of the wild type *M. m. domesticus* and *t* haplotype forms of the proximal region of chromosome 17.

Table 1. Order of 119 and *Tcp-1* decided by FISH

Centromere - 119 - <i>Tcp-1</i>	Centromere - <i>Tcp-1</i> - 119
<i>M. musculus domesticus</i>	<i>M. spretus</i>
<i>brevirostris</i>	<i>M. caroli</i>
<i>bactrianus</i>	<i>M. booduga</i>
<i>musculus</i>	<i>M. dunni</i>
<i>castaneus</i>	
<i>molossinus</i>	
<i>M. hortulanus</i>	
<i>M. macedonicus</i>	

2) 異種間雑種を用いた動原体マッピング

従来のマウス遺伝的連鎖地図では、動原体からの遺伝的距離を決定するために、動原体マーカーとして Robertson 型染色体転座が用いられてきた。しかし、この Robertson 型転座では動原体近傍の遺伝的組換えが抑制されるため、正確な値は得られていなかった。染色体の動原体近傍には反復配列の satellite DNA が存在する。ヒトでは数多くの染色体特異的 satellite DNA プロブが得られており、すでに商品化されていてマーカーとして用いられているが、マウスにおいては、未だそのような satellite DNA プロブが得られておらず、実用化には至っていない。しかし、異種間雑種を用いれば、動原体マッピングを容易に行うことができる¹³⁾。実験用近交系マウスでは Y 染色体を除く全ての染色体に多量の major satellite DNA が存在するのに対し、ヨーロッパ産野生マウス *M. spretus* ではそのコピー数が非常に少ないことを利用し、各々の戻し交雑個体について全ての染色体の動原体の遺伝子型を同定し、パネルを作製することが

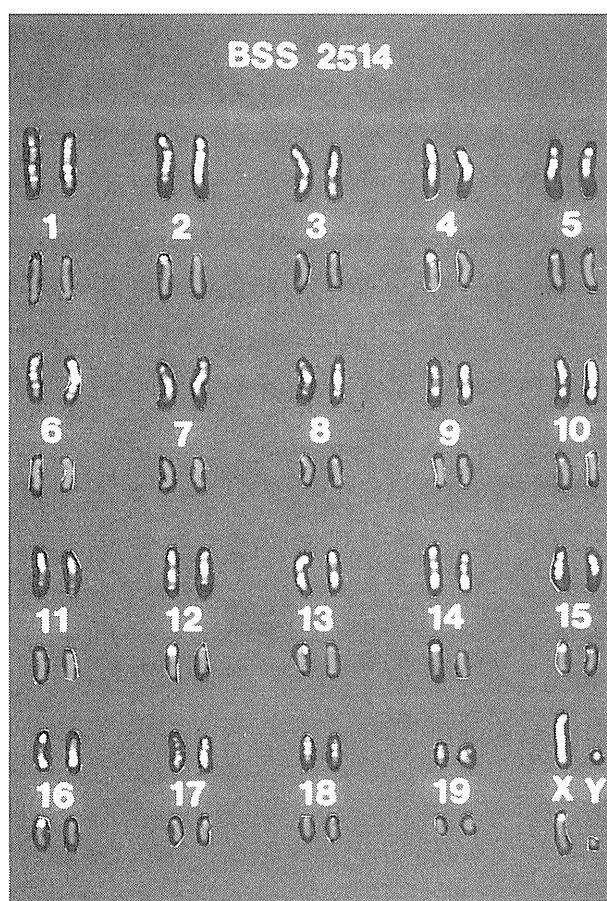


Fig.5. FISH pattern of major satellite DNA in the backcross progeny between (C57BL/6 x *M. spretus*)F₁ female and *M. spretus* male (in collaboration with Dr. V. M. Chapman, Roswell Park Cancer Institute). The analysis of major satellite DNA sequence differences between *M. spretus* and laboratory mice provide a method for analyzing the centromeric location for the genetic maps of each mouse chromosome. The pericentric region derived from *M. spretus* is easily identified by the low abundance of major satellite DNA sequences.

ができる (図5)。すでに筆者らは戻し交雑マウス150個体についてパネルを作製し、これらのマウス個体の DNA は詳細な遺伝子地図の作製に活用されている¹⁴⁾。また、各個体の各々の染色体動原体部位の遺伝子型の情報を基に、異種間マウスの戻し交雑時に生じる動原体近傍領域における分離ひずみの有無を調べることも可能である (図6, 7)¹⁵⁾。

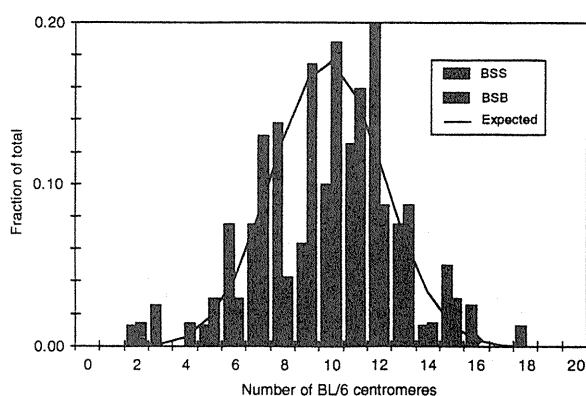


Fig.6. Histogram frequency distribution of number of labeled centromeres inherited from (C57BL/6 x *M. spretus*) F₁ female in backcross progeny from either *M. spretus* males (BSS) or C57BL/6 (BSB). The actual number of labeled centromeres in the BSB cross is increased by 20 in BSB females or 19 in BSB males, since the B6 Y chromosome is unlabeled but readily distinguished by its small size and predicted by phenotypic sex of the progeny. The expected frequency distribution is represented by the continuous curve, which shows the expected binomial distribution where the overall fraction of labeled centromeres is the observed average, 0.4928.

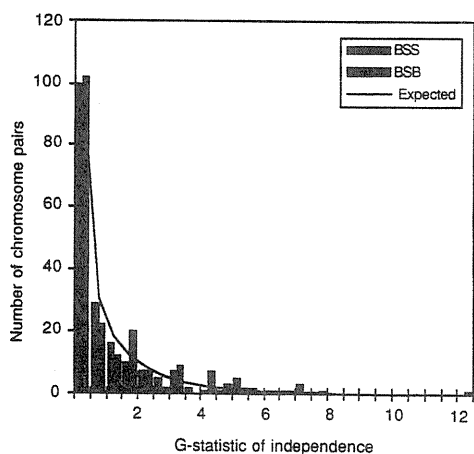


Fig. 7. Distribution of G-statistics derived from the pair-wise analyses of the assortment of labeled chromosomes in BSB and BSS compared with the expected χ^2 values. A Pascal computer program was written to calculate the G-statistic of independence for each pair-wise combination of chromosomes. The columns show the number of pairs of chromosomes that yielded G values in each of the 0.5 unit ranges. The continuous line shows the expected number, derived from the χ^2 distribution, which would be expected in each interval. Only one pair-wise combination (Chrs 2 \times 11) significantly differed from the expected distribution.

3) 減数分裂細胞を用いた FISH 法

FISH 法は体細胞のみならず、生殖細胞にも応用することができる。染色体組換えが生じるパキテン期の生殖細胞は、染色体コアの部分にシナプトネマ構造を介して対合し、コア部分を中心としてクロマチン DNA は分散した状態になっているため、染色体マッピングには適さないが、この時期のクロマチン構造や目的の DNA 配列の分布状態を知る上で FISH 法は有効である。一例として、図 8 にマウス minor satellite DNA の FISH 像を示す。この標本は界面展開法で作製されたものである。0.5% NaCl の水面上に精巣細胞の浮遊液を滴下して、細胞を展開し、スライドガラス上に細胞を拾い上げた後、パラフォルムアルデヒドで固定したものである。この方法を用いることによって細胞核は大きく拡がり、電子顕微鏡観察にも供することができる。多量のコピー数を有する *M. spretus* では satellite DNA が非常に分散して存在するのに対し、実験用近交系マウスではコピー数は少なく、非常に凝縮している。また sex vesicle を形成する X、Y 染色体は他の常染色体に比べて非常に凝縮した状態であることがわかる。

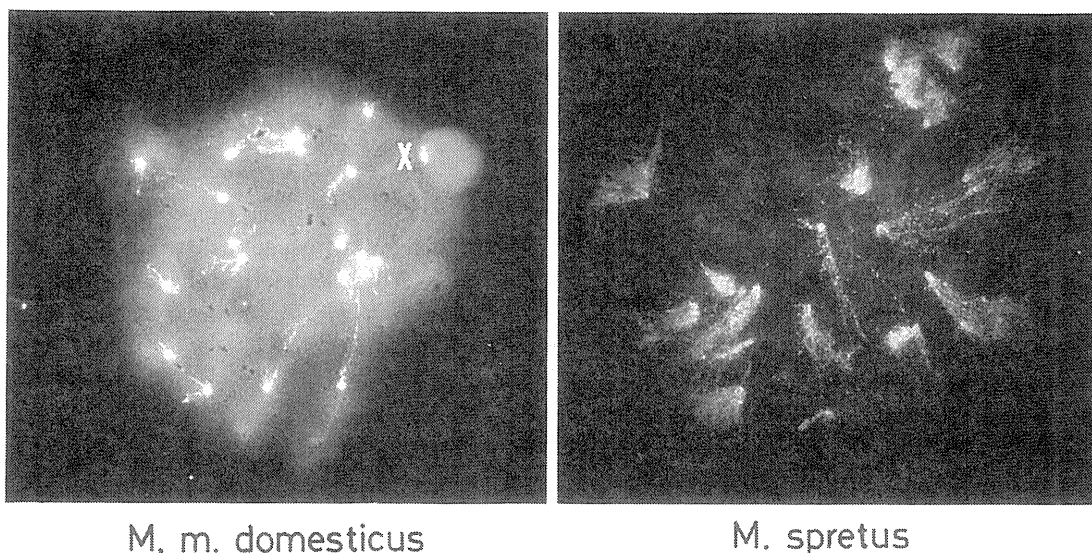


Fig. 8. FISH pattern of minor satellite DNA in spermatocytes at pachytene stage of C57BL/6 and *M. spretus* (in collaboration with Dr. P. B. Moens, York Univ. and Dr. V. M. Chapman, Roswell Park Cancer Inst.).

4) マウスの遺伝的分化の研究における FISH 法の応用

医学、薬学、生物学に含まれる幅広い研究領域で用いられている実験用近交系マウスは、ハツカネズミ種の *Mus musculus* 種に属し、主にヨーロッパ産野生マウス (*M. m. domesticus*) を起源としている。しかし、現存する近交系マウス系統は小さな遺伝的集団を起源としているため、遺伝的変異性は低く、広範な遺伝的解析を行うために、異なる亜種や種に属する野生マウス集団から変異遺伝子を導入する努力がなされている。現在、数多くの野生ハツカネズミ種が全世界的に分布し、生化学的標識遺伝子、免疫学的マーカー遺伝子、ミトコンドリア DNA、リボゾーム RNA 遺伝子、染色体 C-バンドなどの遺伝的多型を利用して、それらの遺伝的類縁関係が詳しく調べられている^{16, 17)}。

最近、FISH法を用いた我々の研究によって、satellite DNA 量やその他の反復配列のコピー数または染色体上の位置に種間または亜種間差異が存在することが判明し、FISH法をマウスの遺伝的分化を調べるための手段として利用することができる。

(1) major satellite DNA 配列の染色体上での分布の変異

実験用近交系マウスや多くの *Mus musculus* 種では、Y染色体を除くほぼ全ての染色体上に多量の major satellite DNA が存在するのに対し、ヨーロッパ産野生マウス *M. spretus* ではそのコピー数は非常に少ない。また、日本産野生マウス (*M. m. molossinus*) では染色体ごとにその分布が大きく異なる (図9)。このような大きな変異は、中国東北部や韓国産のマウスに顕著にみられ、major satellite DNA は日本産野生マウスとアジア東部のマウスの遺伝的類縁関係を示すよい遺伝的マーカーのひとつといえる。また、minor satellite DNA 配列の分布にも遺伝的変異が存在することが見出されている。

(2) リボゾーム RNA 遺伝子の染色体上での分布の変異

FISH法を用いることによって、銀染色で染色される仁形成部位だけでなく、18S-28S リボゾーム

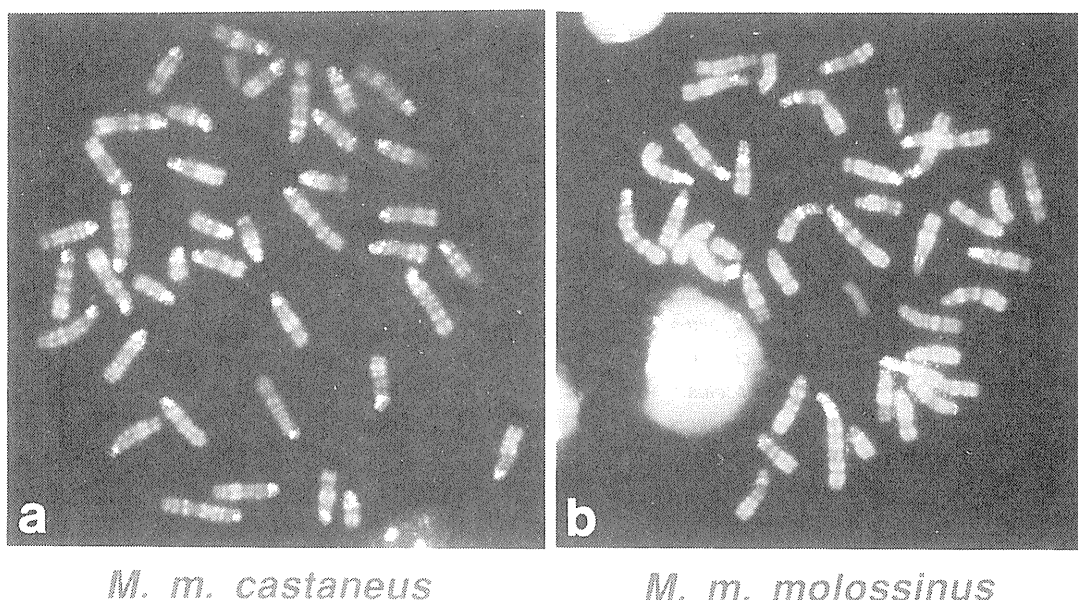


Fig. 9. Distribution pattern of major satellite DNA sequences in Asian *Mus musculus* subspecies (in collaboration with Dr. K. Moriwaki, Natl. Inst. Genet.). The large signals are located on all the chromosomes except for Y chromosome in *M. m. castaneus*, and the distribution of major satellite DNA sequences is various among chromosomes in *M. m. molossinus*.

RNA 遺伝子 DNA の存在位置を知ることができる。18S-28S リボゾーム RNA 遺伝子の染色体上の位置は *Mus* 種のみならず、*Mus musculus* 亜種間で大きく異なる。表 2 に代表的なマウス種における染色体上での分布を示した。注目すべき点は、*M. spretus* では 18S-28S リボゾーム RNA 遺伝子が 3 対の染色体の末端部に存在することである。我々がこれまでに 9 種の *Mus* 種、6 種の *M. musculus* 亜種について染色体上の分布を調べているが、*M. spretus* を除き、他は全て動原体近傍に存在する。

一方、5S リボゾーム RNA 遺伝子は 18S-28S の場合と異なり、8 種の *Mus* 種、6 種の *M. musculus* 亜種全てにおいて、第 8 染色体の末端部のみに存在し、染色体上の分布に変異は全くみられない¹⁸⁾。しか

Table 2. Distribution of 18S-28S rRNA sequences detected by FISH analysis.

Mice	Location	Chromosome
<i>Mus musculus</i>		
C57BL/6		12, 15, 16, 18, 19
<i>M. m. domesticus</i>	PAC (U.S.A.)	12, 15, 16, 18, 19
<i>M. m. brevirostris</i>	BFM (France)	12, 15, 16, 19
<i>M. m. musculus</i>	Pwk (Czechoslovakia)	11, 12, 16, 18, 19
<i>M. m. bactrianus</i>	Avz (Iran)	12, 15, 16, 18, 19
<i>M. m. castaneus</i>	Mal (Malaysia)	4, 11, 12, 15, 18, 19
<i>M. m. molossinus</i>	MSM (Japan)	1, 5, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19
<i>Mus musculus</i>	Bjn (China)	1, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19
subspecies	Shh (China)	1,10, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19
<i>Mus spretus</i> *	Spain	4, 13, 19
<i>Mus spicilegus</i>	Bulgaria	3, 9, 16, 19
<i>Mus hortulanus</i>	Yugoslavia	3, 4, 16, 19

* 18S-28S rRNA sequences are located in the telomeric region.

Table 3. Distribution of 5S rRNA-related microsatellite DNA sequences on the Y chromosome.

Mice	No. of Locations	5S rRNA probe	
		MOA 1.8kb	SEG 1.7kb
<i>Mus musculus</i>			
laboratory strains			
ICR		—	—
C57BL/6J		+	—
C3H/He		+	—
BALB/c		+	—
DBA/2J		+	—
<i>M. m. domesticus</i>	3	—	—
<i>M. m. brevirostris</i>	1	—	—
<i>M. m. bactrianus</i>	2	—	—
<i>M. m. musculus</i>	4	+	—
<i>M. m. molossinus</i>	5	+	—
<i>M. m. castaneus</i>	3	—	—
<i>Mus musculus</i>	China 3	+	—
subspecies	Korea 2	+	—
<i>Mus spretus</i>	1	—	—
<i>Mus spicilegus</i>	1	—	—
<i>Mus hortulanus</i>	1	—	—
<i>Mus macedonicus</i>	1	—	—
<i>Mus caroli</i>	1	—	—

し、スペーサー領域を含む DNA プローブを用いた場合、第 8 染色体のみならず Y 染色体の動原体部位にシグナルがみられるマウスが存在する。そして、Y 染色体上のシグナルは、BALB/c および日本産野生マウス *M. musculus molossinus* 由来のゲノム DNA プローブを用いた場合にみられ、*M. spretus* から得られた DNA プローブではこのシグナルは検出できない。おそらく、*M. spretus* の 5S リボゾーム RNA 遺伝子のスペーサー領域には含まれていない反復配列が、BALB/ および日本産野生マウスの 5S リボゾーム RNA 遺伝子のスペーサー領域および Y 染色体上に存在するものと考えられる。これらの結果を表 3 に示した。注目すべき点は、このシグナルが検出されるのは実験用近交系マウスと *M. m. musculus*、さら日本産野生マウス *M. m. molossinus* を含むアジア東部のマウスのみであることである。この結果は、ヨーロッパ産野生マウス *M. m. domesticus* より作製された現存の実験用近交系マウスに、アジア産マウスの遺伝的寄与が存在することを示す結果のひとつといえる。

[参考文献]

- 1) Pinkel, D., Straume, T. and Gray, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2934-2938 (1980).
- 2) Lawrence, J. B., Villnave, C. A. and Singer, R. H. Sensitive, high resolution chromatin and chromosome mapping *in situ* : presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 52: 51-61 (1988).
- 3) Trask, B. J. Fluorescence *in situ* hybridization : application in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet* 7: 149-154 (1991)
- 4) Takahashi, E., Hori, T., O'Connell, P., Leppert, M. and White, R. R-banding and nonisotopic *in situ* hybridization: precise localization of the human type II collagen gene (COL2A1). *Hum. Genet.* 86: 14-16 (1990).
- 5) Avner, P., Amar, L., Dandolo, L. and Guenet, J.-L. Genetic analysis of the mouse using interspecific crosses. *Trends Genet.* 4 : 18-23 (1988)
- 6) Matsuda, Y., Harada, Y. -N., Natsuume-Sakai, S., Lee, K., Shiomi, T. and Chapman, V. M. Location of the mouse complement factor H gene (*cfh*) by FISH analysis and replication R-banding. *Cytogenet. Cell Genet.* 61: 282-285 (1992).
- 7) Encyclopedia of Mouse Genome III. *Mammalian Genome* 4: S1-S283 (1993).
- 8) Searle, A. G. and Beechey, C. V. Maps of reciprocal translocations, inversions and insertions, in Lyon, M. F. and Searle, A. G. (eds) : *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Oxford University Press, Oxford, pp620-625 (1989).
- 9) Somssich, I. E. and Hameister, H. Standard karyotype of early replicating bands (RBG-banding), in Lyon, M. F. and Searle, A. G. (eds) : *Genetic Variants and Strains of the Laboratory mouse*, Oxford University Press, Oxford, pp580-581, (1989).
- 10) Dietrich, W., Katz, H., Lincoln, S. E., Shin, H.-S., Friedman, J., Dracopoli, N. and Lander, E. S. A genetic map of the mouse suitable for typing interspecific crosses. *Genetics* 131, 423-447 (1992).
- 11) Hammer, M. F., Schimenti, J. and Silver, L. M. Evolution of mouse chromosome 17 and the origin of inversions associated with *t* haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3261-3265 (1989).

- 12) Silver, L. M. The peculiar journey of a selfish chromosome : mouse *t* haplotypes and meiotic drive. *Trends Genet* 9, 250–254 (1993).
- 13) Matsuda, Y. and Chapman, V. M. *In Situ* analysis of centromeric satellite DNA segregation in *Mus* species crosses. *Mammalian Genome* 1: 71–77 (1991).
- 14) Ceci, J. D., Matsuda, Y., Grubber, J. M., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. and Chapman, V. M. Interspecific backcrosses provide an important new tool for centromere mapping in mouse. *Genomics* 19: 515–524 (1994).
- 15) Matsuda, Y., Manly, K. and Chapman, V. M. *In situ* analysis of centromere segregation in C57BL/6 x *M. spretus* interspecific backcrosses. *Mammal. Genome.* 4: 475–480 (1993).
- 16) Bonhome, F., Catalan, J., Britton–Davidian, J., Chapman, V. M., Moriwaki, K., Nevo, E. and Thaler, L. Biochemical Diversity and Evolution in the Genus *Mus*. *Biochem. Genet.* 22: 275–303 (1984).
- 17) Moriwaki, K., Miyashita, N., Suzuki, H., Kurihara, Y. and Yonekawa, H. Genetic features of major geographical isolates of *Mus musculus*, in Potter, M., Nadeau, J. H. and Cancro, M. P. (eds) : *Wild Mouse in Immunology, Current Topics in Microbiology and Immunology* 127, Springer Verlag, pp55–61 (1986).
- 18) Matsuda, Y., Moriwaki, K., Chapman, V. M., Hoi–Sen, Y., Akbarzadeh, J. and Suzuki, H. Chromosomal mapping of mouse 5S rRNA genes by direct R–banding fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 66: 246–249 (1994).

3. マイクロサテライトをマーカーとして用いたマッピングとその応用

木南 凌¹、高橋 由明¹、小柳 充¹、須田 剛士¹
桑原 克弘¹、林 達彦、若菜 茂晴²、金田 秀貴³
米川 博通³、城石 俊彦⁴、宮下 信泉⁴、森脇 和朗⁴

Gene mapping with newly isolated microsatellites and chromosome-end markers

Ryo Kominami¹, Yoshiaki Takahashi¹, Mitsuru Oyanagi¹, Takeshi Suda¹, Katsuhiko Kuwabara¹,
Tatsuhiko Hayashi¹, Shigeharu Wakana², Hidetaka Kaneda³, Hiromichi Yonekawa³,
Toshihiko Shiroishi⁴, Nobumoto Miyashita⁴, Kazuo Moriwaki⁴

1 1st Depart. of Biochemistry, Niigata Univ. School of Med., Asahimachi 1-757, Niigata 951,

2 Central Institute for Experimental Animals, Nogawa, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa 211,

3 Depart. of Experimental Animals, The Tokyo Metropolitan Institute of Med. Science, Honkomagome,
Bunkyo-ku, Tokyo 113,

4 Depart. of Cell Geneti., National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka 411, Japan

The usefulness of microsatellite markers has been verified, but more markers are required to construct high resolution maps of the mouse genome. Also, chromosome-end markers are of importance to place start points. We have isolated new 69 microsatellite markers, 49 of which show allelic size variations between C57BL/6 and MSM originating from *Mus m. molossinus*. With a combined use of these markers and others already published, we have made a mapping panel using inter-subspecific backcross mice. The panel allowed us to map two markers located at chromosome ends. An oligonucleotide complementary to MS-01, a variant of minor satellite, was located at the centromere of chromosome 2 and exhibited a distance of 1.5cM from D2Mit2. A PCR primer set, mo-2PA, amplified polymorphic fragments from a mo-2 repetitive sequence, which was present on the pseudoautosomal region of chromosomes X and Y and physically linked to the telomere. The mo-2PA was 4.6cM apart from DXMit5.

マウスを用いて遺伝学的解析を行うとき、詳しい染色体地図やゲノム解析のカタログを整備する必要がある。この染色体地図の作製、利用を考えると大切なことはマウスの交配系とプローブの種類である。

¹新潟大・医・第一生化、²実中研、³都臨床研・実験動物、⁴遺伝研・細胞遺伝

我々は日本の野生マウスに由来する MSM 亜種系統と C57BL/6 および DBA/2 系統との交配系を選び用いている。多型の検出頻度という点では MSM 系統は異種マウスである spretus 由来の系統に及ばないが、扱い易さや交配のし易さに長所がある。一方、マーカー座としてはマイクロサテライトが便利である。その多型を PCR 法を用いて簡便に検出することができるからである。一組のプライマーをマイクロサテライトを挟むように合成し、通常の PCR 反応を行うことで初心者でも利用できる。このシンポジウムでは我々が単離したマイクロサテライトと染色体末端に存在する多型マーカーについて述べるが、これらのマーカーの癌研究への利用法についても言及する。

(1) マイクロサテライトとその単離：マイクロサテライトは一般的には (CA/TG) n リピートからなるものをいうが、ゲノム DNA 中に散在し、遺伝的距離として 1cM (マウスでは塩基にして 1.6Mb にあたる) につき数10コピー存在すると言われている¹。興味深いことには、生物種の違いや個体間で、繰り返しの回数の違いが比較的高頻度に認められる。この反復配列が注目されるようになったのは、多型を示し遺伝学的解析のよいマーカーとなるという発見による。従来、多型はサザン法で制限酵素部位の多型 (RFLP) やミニサテライト座の多型を検出していた。しかし、サザン法は PCR 法と比べると操作が複雑である。一方、マイクロサテライトの鎖長はせいぜい300塩基程度であるので、その多型は PCR 産物をアクリルアミド (NuSieve アガロースでも一部可能であるが) を用いたゲル電気泳動法で分離するだけで簡単に検出することができる。この簡便性が応用範囲の増大と一般性をもたらしている。

マウスのマイクロサテライトについてはアメリカ MIT の Lander らやイギリスの Todd らが精力的にプライマー・プローブを開発し、現在約2000のプローブが利用できるようになっている²⁻⁴。私たちのグループでも独自にマウスのマイクロサテライトプローブの単離と、遺伝子・DNA 断片のマッピングを行ってきた。我々が単離したマイクロサテライト (Jpk マーカー) の約2/3は高率に多型を示し、染色体位置を決定することができた (未発表)。

ここで我々が行ったマイクロサテライトの単離の方法について簡単に述べる。DNA の MboI 消化物をシャロミドベクターもしくはプラスミドベクターに組み込み、ライブラリーを作製する。そこから CA (GT) リピートをプローブとしてマイクロサテライトを含むクローンを選択する。この過程は簡単である。問題はそれぞれのクローンの中に含まれるリピートのランキング配列を効率よく決定することにある。我々は 5' (CA) 7 (A, T, G) (A, T, G, C) 3' の混合プライマーを用い配列決定を行っている。反対鎖 (GT) の混合プライマーも同様に合成し利用している。この方法を用いると、クローンの約2/3で配列が決定できる。どちらかの鎖の配列が決定できるとその配列から F-プライマーを合成し、マイクロサテライト部分とその先のランキング配列を決定する。得られたその配列から PCR のための残りの R-プライマーを合成する。このようにして、F-と R-のプライマーセットが合成できると、それを用い B6 と MSM のマウス間で多型を示すかどうかを検定する。多型が検出できれば、それは有用なプローブとなる。

(2) マッピングのためのパネルの作成：新しく単離された遺伝子、DNA 断片、マイクロサテライトマーカーを染色体上にマッピングするためには、詳しい染色体の地図が必要となる。染色体地図には組換え頻度を距離で表現した遺伝地図と、遺伝子座間の距離を塩基数で表した物理地図がある。究極的には物理地図が必要であるが、現在では遺伝的地図が標準となっている。その地図をつくるためにはアンカーとなるマーカーが必要で、これまでは既知の遺伝子座のみでは少なすぎるため DNA レベルの多型マーカーが開

発されてきた。

そこで我々もマップ用のパネルを作製し、Jpk マーカーのマッピングを行った。実験用マウス (C57BL/6) と日本産野生マウス (MSM) の亜種間の戻し交配マウス・131頭を作製し、その DNA に対して Jpk マーカーと既存の67のマイクロサテライトマーカーをタイピングした。その結果をまとめると、図1に示すような染色体地図が作製された。この地図の基となるパネルは有用で、今後新しく単離される遺伝子の位置をこのパネルを用い簡単にマップできるという便利なものである。実際、このパネルを用い、数個の遺伝子、DNA 断片を現在までにマップしている^{5, 6}。

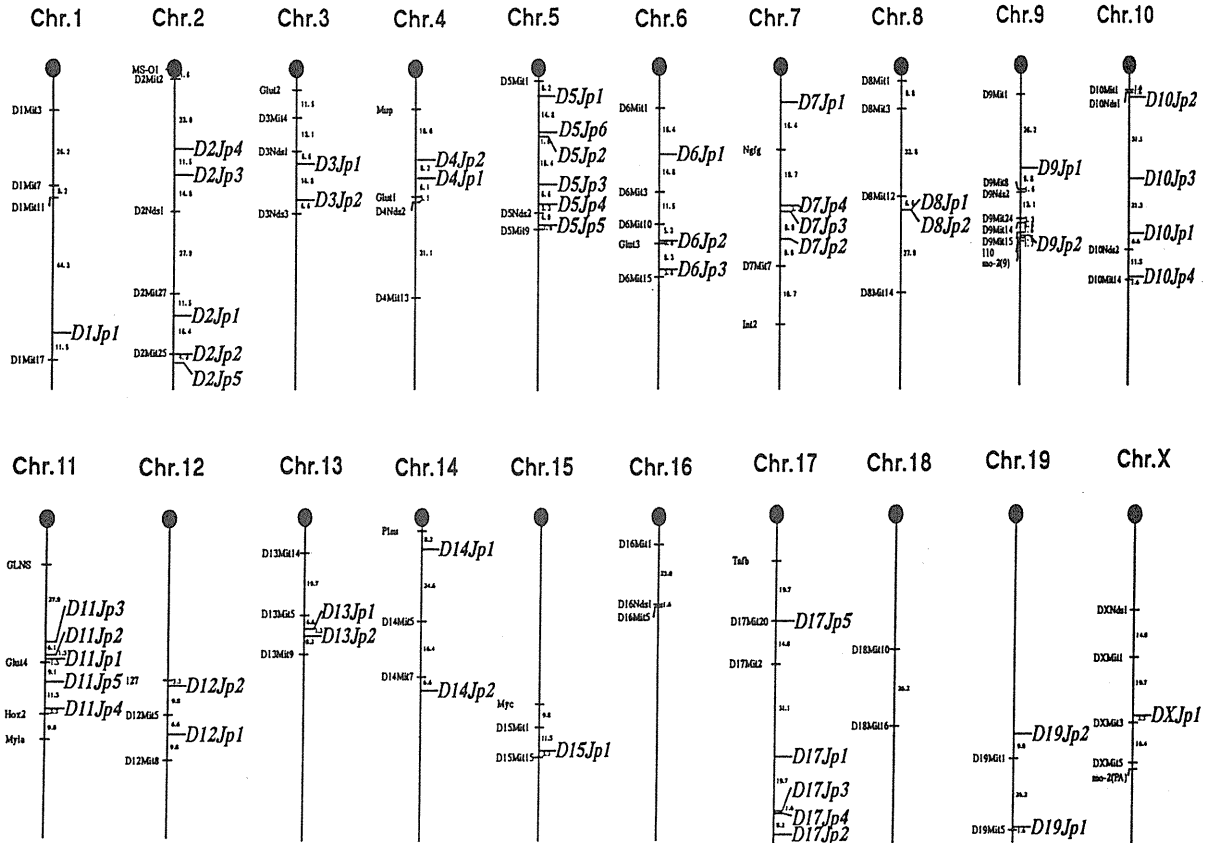


Fig. 1. Chromosomal location of Jpk markers.

(3) ヒトとマウスの相同性と遺伝性疾患：余談ではあるが、ここでマウスゲノム解析とヒトのそれとの関連性について述べておく。両者のゲノムの深い関連性は誰にも容易に想像されるが、その一つに遺伝子の配列順序の高い相同性 (synteny) がある⁷。例えば、マウスの第11番染色体はヒトの第17番染色体に対応する部分を約半分を含んでいる。全体の染色体平均では組換え率単位で7cMに及ぶ相同性領域があると言われている。このことは、マウスゲノム上で遺伝子座がマップされると、そこから対応するヒトの遺伝子座を同定できる可能性を示している。従って、マウスゲノムの解析はヒトゲノムのそれとお互いに情報を交換できる。

(4) 染色体末端マーカーの単離：染色体の正確な連鎖地図を作製するためには、染色体末端、すなわちスタート地点のマーカーを得る必要がある。そのため、染色体特異的な動原体、テロメアに隣接するマーカー

の単離を行った。

動原体に位置するマイナーサテライトをスクリーニングし、マイナーサテライトの共通保存塩基配列から8塩基を欠失した亜型のクローン (MS-01) を得た⁵。このMS-01の欠失部位を含むオリゴヌクレチドを作成し、ドット・ハイブリダイゼーションを行うと、MSMとC57BL/6との間で多型が検出された。この多型をマーカーとし、パネルを使って染色体位置を調べると、それは2番染色体のマーカーD2Mit2からセントロメア側に1.5cM離れた位置にあった(図2)。第二のマーカーとして、テロメアに隣接するmo-2マイクロサテライトの特定領域を利用した。mo-2は主に第9染色体とXY染色体の疑似常染色体(PAR)領域に位置することが分かっているが、PAR領域内のユニーク配列を見いだすことができたので、そこからPCR用のプライマーを選び合成した。このプライマーmo-2PA座はX染色体のマーカーDXMit5から4.5cMテロメア側にマップできた(図3)。これらのマーカーは2番染色体とX染色体の基準位置を決めるマーカーとして有用であると考えている。

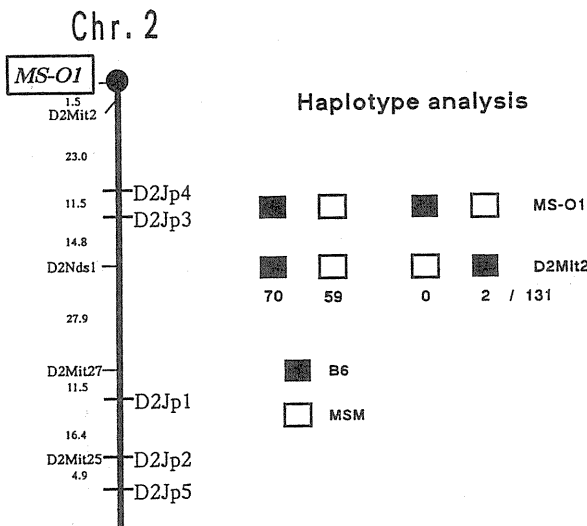


Fig. 2. Mapping of the MS-01 locus. Distribution of the haplotypes for 131 progeny from inter-subspecific backcross mice that were obtained by mating (C57BL/6 × MSM)F1 females to MSM males. The loci followed in the cross are indicated on the right. The filled squares represent the C57BL/6 allele and the open squares represent the MSM allele. Each column represents the chromosome identified in the progeny. The number of the progeny carrying each type of chromosome is listed at the bottom.

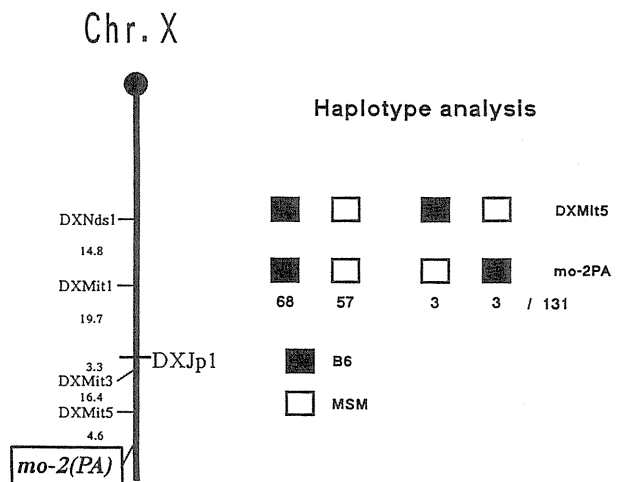


Fig. 3. Mapping of the mo-2PA locus. Distribution of the haplotypes for 131 progeny from inter-subspecific backcross mice that were obtained by mating (C57BL/6 × MSM)F1 females to MSM males.

(5) 癌研究への利用：種々の癌で染色体の脱落や部分欠失が高頻度に認められ、その欠失領域に癌抑制遺伝子が存在すると考えられている。実際、p53やRbなどいくつかの癌抑制遺伝子はその領域から単離されている。癌抑制遺伝子はその正常産物が細胞の分裂、増殖に対し抑制的に働く遺伝子で、この正常産物の消失が細胞の腫瘍化に関与すると考えられている。マイクロサテライトはこの部分欠損領域を同定する、いわゆるLOH (Loss of Heterozygosity) の検出に利用されている。

私たちがマウスを用いて腫瘍の進展に関わる遺伝子の探索を目標にしマイクロサテライトを使った LOH 検索を行っている。先程述べたような C57BL/6 と MSM との亜種間雑種マウスや C3H/He と C57BL/6 との F1 マウスに腫瘍を作製し、その腫瘍を cell line 化している。この中の一つの細胞系を皮下注あるいは静注し、より転移能の高い腫瘍株を作製した。このような高転移能を獲得する過程で特徴的な染色体の部分欠失が生じていないかを全染色体をカバーする数のマイクロサテライトプローブで検索してきた。現在までの結果では、マウスの染色体16番に癌転移能に関係数遺伝子が乗っているのではないかという結果を得ている⁸。

このように、マイクロサテライトは遺伝学的解析の重要なマーカーとして、また癌研究の有力な手法ともなってきた。

文 献

- (1) Hamada H. et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:6465-6469.
- (2) Love J.M. et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18:4123-4130.
- (3) Cornall R. J. et al. (1991) Nature 353-262-265.
- (4) Dietrich W. et al. (1992) Genetics 131:423-447.
- (5) Hayashi T. et al. (1993) Genomics 17:490-492.
- (6) Kuwabara T. et al. (1994) Genomics in press.
- (7) Nadeau J. H. and Taylor B.A. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:814-818.
- (8) Mafune Y. et al. (1994) Oncogene in press.

II. 放射線感受性遺伝子

1. 真核生物の組換え蛋白質の機能と構造

小川 智子

2. DNA 損傷修復遺伝子 ERCC5 と ヒト遺伝性疾患

塩見 忠博

3. DNA 損傷誘導遺伝子

根井 充 他

4. 放射線応答のシグナル伝達路

佐々木正夫

1. 真核生物の組換え蛋白質の機能と構造

小川 智子*

Functions and Structures of Eukaryotic Recombination Proteins

Tomoko Ogawa

Department of Biology, Faculty of Science, Osaka University

1-1, Machikaneyama, Toyonaka, Osaka, 560 Japan

Abstract

The *RAD51* gene of *S. cerevisiae* is a homologue of the *E. coli recA* gene and plays crucial roles in both mitotic and meiotic recombination and in repair of double strand breaks of DNA.

We have found that Rad51 and RecA Proteins form strikingly similar structures together with dsDNA and ATP. Their right handed helical nucleoprotein filaments extend the B-form DNA double helixes to 1.5 times in length and wind the helix. The similarity and uniqueness of their structures must reflect functional homologies between these proteins. Therefore, it is highly probable that similar recombination proteins are present in various organisms of different evolutionary states.

We have succeeded to clone *RAD51* genes from human, mouse, chicken and fission yeast genes, and found that the homologues are widely distributed in eukaryotes. The HsRad51 and MmRad51 or ChRad51 proteins consist of 339 amino acids differing only by 4 or 12 amino acids, respectively, and highly homologous to both yeast proteins, but less so to Dmcl. All of these proteins are homologous to the region from residues 33 to 240 of RecA which was named "homologous core. The homologous core is likely to be responsible for functions common for all of them, such as the formation of helical nucleoprotein filament that is considered to be involved in homologous pairing in the recombination reaction.

The mouse gene is transcribed at a high level in thymus, spleen, testis, and ovary, at a lower level in brain and at a further lower level in some other tissues. It is transcribed efficiently in

*大阪大学理学部 生物学教室 (〒560 大阪府豊中市待兼山1-1)

recombination active tissues.

A clear functional difference of Rad51 homologues from RecA was suggested by the failure of heterologous genes to complement the deficiency of *Scrad51* mutants. This failure seems to reflect the absence of a compatible partner, such as ScRad52 protein in the case of ScRad51 protein, between different species.

Thus, these discoveries play a role of the starting point to understand the fundamental gene targeting in mammalian cells and in gene therapy.

1. 緒言

生物は遺伝的組換え、染色体分配と変異により多様化を生じる。また、遺伝的組換えは傷害を受けた遺伝子の修復や遺伝子の発現制御にも関与し、遺伝子の正常な機能を保つための重要な機能を担っている。これまで、遺伝的組換え機構の分子レベルの解析はバクテリオファージと大腸菌で行われた。そして、これらの遺伝子とその蛋白質を用いた解析は組換えが遺伝子の編成替えのみならず、遺伝子発現の調節にも重要な役目を担っていることを明らかにした。一方、真核生物の遺伝的組換え機構の解析は、主に酵母を用いて行なわれ種々の組換え遺伝子の同定とその機能を遺伝学的、細胞学的な解析を中心にして進められている。特に減数分裂期組換え機構の解析では、減数分裂組換えのホットスポットに二重鎖 DNA 切断が入ること、その切断を修復する酵素が大腸菌 RecA 様の蛋白質であること、減数分裂を遂行するためにはシナプトネマ複合体の形成が必要であること、そしてこの複合体の形成は組換えで一番重要な過程である DNA 間の相同性の検索と対合に必須であるばかりでなく、染色体の分配にも関与していること等が明らかにされつつある。更に、高等真核生物の組換えは、減数分裂期の組換えの他に、抗体の多用性を決定する組換え、細胞が外界から受ける DNA 傷害の修復を行なう組換え、DNA 複製時に関与した組換え等、生命維持と種の保存に関わる重要な機構であり、今や、組換えの分子機構の解明は国際的レベルで注目されている。また、この解析は遺伝病の原因解明、その治療法の開発、育種や品種改良、染色体マッピング、ジーンターゲティング等の最新技術の開発の基礎ともなる。本論文は我々が行なってきた真核生物の組換えの中心的機能を担っていると考えられる *RAD51* と *RAD52* 遺伝子の単離とその性質、またこれらの蛋白質の性質について述べ、それらを、それぞれ大腸菌 *recA* 遺伝子の性質と、RecA 蛋白質の機能と比較検討した結果について述べる。

2. 大腸菌 RecA 蛋白質の機能

RecA 遺伝子は、1965年に組換えが出来ない変異株を単離して見つけられた¹⁾。1967年に小川と富沢は巧妙な解析法を考案し、DNAに取り込まれた³²Pの崩壊のあるものがDNA二重鎖切断を生じることを示した^{2, 3)}。そしてこの二重鎖切断の修復に RecA 機能が必要であることを示した⁴⁾。その10年後、我々は大腸菌 *recA* 遺伝子をクローニングし⁵⁾、塩基配列を決定し⁶⁾、蛋白質を精製した。そして、ssDNA 依存の ATPase 活性を見つけた⁴⁾。この発見はRecA蛋白質が行なう組換え活性と^{7, 8)}、SOS 応答反応誘導機構の分子レベルの解析⁹⁾を促進する導火線の役割を果たした。つまり、RecA 蛋白質は ATP と結合して活性型の構造に変わり、DNA に結合してヌクレオプロテインフィラメントと呼ばれる構造体を形成する¹⁰⁾。そして、この構造体はこの複合体に含まれる DNA と相同な塩基配列を持つ DNA 分子を10,000個に1個存在しても捜しだし、対合して、組換えを行なう能力を持っている^{8, 11, 12)}。また、大腸菌が外界から薬剤

や電離放射線の照射を受け、DNA が損傷して危機にさらされた時、大腸菌の SOS 遺伝子群の転写調節のリプレッサーである LexA 蛋白質^{13, 14}や溶原ファージのリプレッサー C1 蛋白質^{9, 15, 16}と結合して、リプレッサーの自己消化を促進する役割も担った、極めて基礎的な構造体であることが明らかになった^{17, 18}。

3. 出芽酵母 *RAD51* と *RAD52* 遺伝子の機能と大腸菌 *recA* 遺伝子機能の類似性

このように、大腸菌 *recA* 遺伝子がコードする RecA 蛋白質は352個のアミノ酸残基からなる1本のポリペプチドであるにも関わらず、多面的な形質発現をすることが解かった時、我々は真核生物の組換え機能が減数分裂期や抗体産生時、または DNA 傷害の修復時などに多面的に働くことに注目し、真核生物にも同じ様な組換え蛋白質が存在するのではないかと考えた。そこで、まず、出芽酵母ですでに単離されている *RAD* 遺伝子の変異株^{19, 20}の表現型について詳細に検討した。その結果 *S. cerevisiae* の *RAD52* グループに属する *RAD51* と *RAD52* 遺伝子の変異株が *recA* 変異と似た性質を示し、多面的形質発現性の遺伝子であることを見いだした。それらの性質の主なものを下記に示す。

(1) 大腸菌 *recA* 変異の示す表現型

- (a) 紫外線や X-線の照射やマイトマイシン-C等の薬剤処理に感受性である。
- (b) Hfr x F⁻ に掛け合わせや形質導入、形質転換等で遺伝的組換えができない。
- (c) RecA 蛋白質の合成は紫外線照射やマイトマシン処理により誘発されない。

(2) 出芽酵母 *rad51*、*rad52* 変異が示す性質

- (a) X-線、紫外線照射やメチルメタンスルホン酸 (MMS) 等の薬剤処理に感受性である。
- (b) 体細胞分裂期組換えや形質転換ができない。
- (c) Mating type の変換ができない。
- (d) 生存する胞子を形成できない。

4. 出芽酵母 Rad51 と Rad52 蛋白質の性質

そこで我々は *RAD51* と *RAD52* 遺伝子をクローニングして、その塩基配列を決定し、遺伝子がコードする蛋白質の構造を調べた^{21, 22}。その結果わかったことは *RAD51* 遺伝子がコードする蛋白質の C-末端側半分領域が RecA 蛋白質の30番目のアミノ酸から240番目のアミノ酸までの配列と同一アミノ酸で33%、相同なアミノ酸を加えると50%の相同性を持つということであった²¹。一方、*RAD52* 遺伝子がコードする蛋白質はこれまで単離されている遺伝子と相同性を示すものは見つからなかった²³。次に、これらの欠損変異株を作り、その遺伝的性質を調べたところ、*rad51*、*rad52* 変異株ともに MMS 処理に感受性を示し、体細胞分裂期組換え能が野生型の1%に低下し、減数分裂期では生存する胞子の形成能が野生株の1%であった。Rad51 と Rad52 蛋白質の MMS 処理による誘導を調べると、Rad51 蛋白質は RecA 蛋白質と同じように合成が誘発されるが²²、Rad52 蛋白質は誘導されなかった。一方、これらの両蛋白質は減数分裂期で誘導される²¹。

次に減数分裂期組換え能を、組換えホットスポットに生じる二重鎖 DNA 切断と組換え体形成で調べた。図1はその形成過程を *rad51* Δ 変異株で調べたものである。

染色体上に人工的に作った減数分裂期組換えのホットスポット *HIS4-LEU2*²⁴ 領域を持つ *rad51* または *rad52* 欠損変異株を減数分裂へ導入し、時間を追って細胞を採取し、調製した DNA を制限酵素で消化し、アガロース電気泳動した後、DNA をメンブレンに移し、Southern hybridization を行ない、ホットス

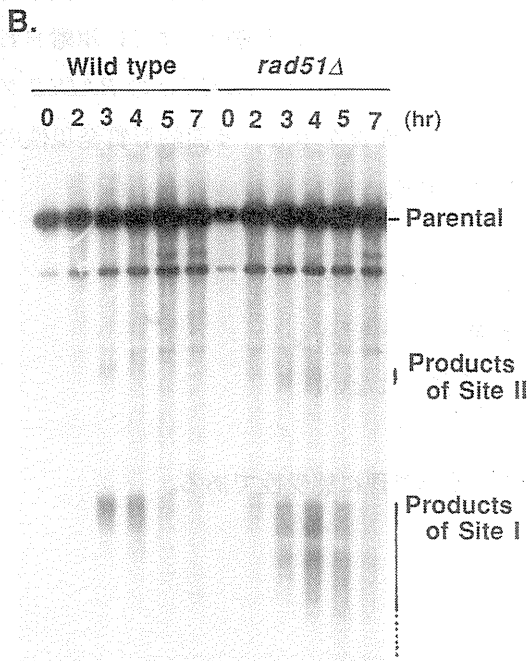
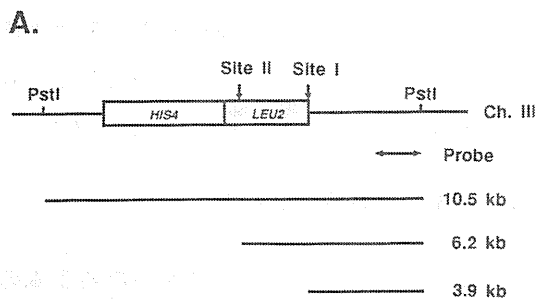


Figure 1. Meiotic DSBs are not repaired in the *rad51* Δ mutant. (A) A map around the *HIS4-LEU2* locus of chromosome III. The map shows two *PstI* cleavage sites and two meiosis-specific DSB sites. Each horizontal line below the map represents fragments detected with the probe. In the absence of DSBs, a 10.5kb *PstI* fragment is detected. Cleavage by DSBs at either site I or II yields a band having a maximum size of 3.9 or 6.2kb, respectively (Cao et al. 1990; Bishop et al. 1992). (B) Southern analysis of meiotic DSBs in wild-type and *rad51* Δ cells. Meiotic DNAs were prepared from the sporulating cultures of NKY1238/1240 (Cao et al. 1990) and its *rad51* Δ derivative at indicated times. Positions of the parental DNA as well as DSB products at site I and site II are indicated on the right. (Shinohara et al., 1992)

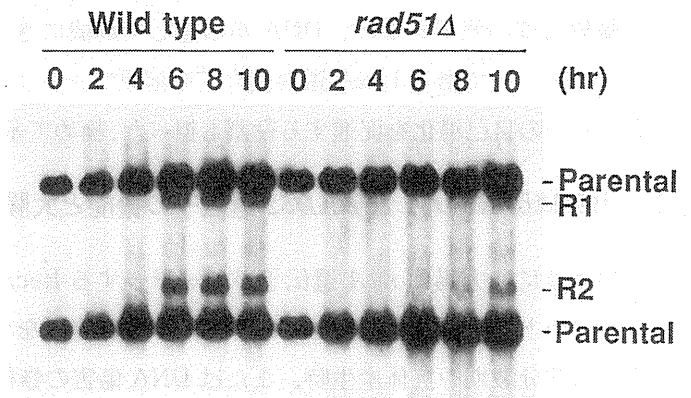


Figure 2. Physical recombinants in meiosis. The formation of recombination products parental DNAs in meiosis was monitored in wild-type and *rad51* Δ mutant by a Southern hybridization. Parental DNA yields 19.0 kb and 11.8 kb fragments marked "Parental", while reciprocal recombination yielded 16.3 and 13.2 kb fragments marked "R1" and "R2", respectively. The same DNA sample used in Figure 1 (b) was analyzed. For details, see Shinohara et al. (1992).

ポトに生じる二重鎖 DNA 切断 (図 1B) と形成される組換え体 (図 2) を調べた。二重鎖 DNA 切断は野生型では減数分裂期へ移行後 3 時間目から現われ、4 時間目にピークに達し、その後減少する。一方、変異株では二重鎖 DNA 切断の生じる時間は同じであったが、切断量は時間とともに増え続ける。そして生じた切断断片が時間経過と共にスメアなバンドになっていくのが観察される。これは切断点から DNA がスクリエースの消化を受けるため、変性ゲルを用いた解析から、このスクリエースの消化は二重鎖 DNA 切断点の 5' から 3' の方向へ生じることがわかった。一方、形成される組換え体量は、野生型で二重鎖 DNA が減少しはじめる時期から増加するが、これらの変異株では組換え体の検出される時間が遅れ、10 時間後でも野生型の 20% であった。同じ結果が *rad52* Δ 株を用いても得られている²¹⁾。これらの結果は *RAD51* と *RAD52* 遺伝子が二重鎖 DNA 切断を組換え体にする過程に働いていることを示唆している。つまり RecA 蛋白質と同じ様な機能、二重鎖 DNA 切断点に生じる単鎖 DNA を用いてホモロジーを検索し、DNA 分子を対合させ、ブランチマイグレーションを行なう活性を持つ蛋白質である可能性を示している。そこでこれ

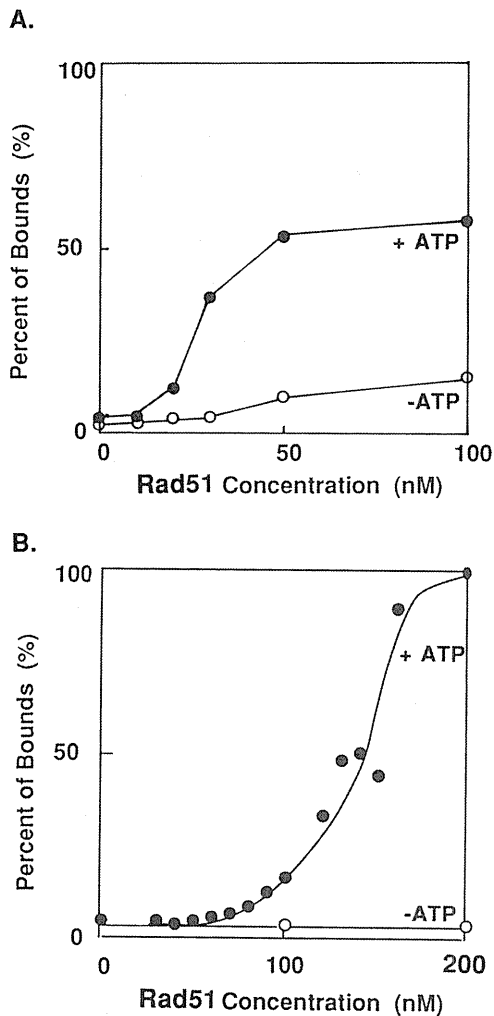


Figure 3. DNA Binding Activity of Rad51 Protein Produced in *E. coli*.

(A). Titration curve of ssDNA binding of Rad51 protein was obtained by nitrocellulose filter binding assay. 50 nM of ^{32}P labeled 956 nucleotide ssDNA was incubated in the presence of various concentration of Rad51 protein at 37 °C for 30 min. The ratio of the count on filter to input DNA was calculated. In this condition, the reactions are completed in 5 min. The binding are studied in the presence of 0.2 mM ATP (closed circle) and in the absence (open circle). (B). Titration curve of dsDNA binding of Rad51 protein was obtained as described in (A) except 400 nM 3.0 kb dsDNA (pBluescript KS+) was used as substrate instead of ssDNA. The reactions were carried out in the presence of 0.2 mM of ATP (closed circle) and in the absence (open circle) (Shinohara, et. al., 1992).

らの蛋白質を精製し、その活性の解析を行なった。

まず、Rad52 蛋白質は相補的一本鎖 DNA をアニールする強い活性を持っていた。また、環状単鎖 DNA にそれと相同な線状二重鎖 DNA から相補的な DNA 鎖を移行させる活性、DNA 鎖交換活性を、RecA 蛋白質の 1/20 ではあるが、持っていた²¹⁾。一方、Rad51 蛋白質はその構造が一部分 RecA 蛋白質と似ているにも関わらず、アニリング活性も、DNA 鎖交換活性も検出できなかった。しかし、Rad51 蛋白質の ssDNA または dsDNA との結合は図 3 に示されるように ATP に依存し RecA 蛋白質とよく似ていた²¹⁾。

RecA 蛋白質は ATP 存在下で DNA に結合して、DNA 間の相同性の検索と対合に必要な構造体スクレオプロテイン-フィラメントを形成する。そこで ATP 存在下で Rad51 蛋白質、または RecA 蛋白質を ϕ x174 II 型 DNA に結合させ、その複合体の構造を電子顕微鏡で観察した。図 4 に示される様に両蛋白質は非常に良く似た構造体を形成することがわかる。Rad51 蛋白質で形成された構造体を RecA 蛋白質で行なわれた方法で解析した結果、同じ様に右巻きラセンの構造を取り、ラセンのピッチも 99 Å と RecA 蛋白質 (95 Å) より僅かに長い非常に似ていた。また、フィラメントの中で B-型 DNA が 1.5 倍引き伸ばされ、ラセンが巻き戻されること、蛋白質 1 分子が 3 スクレオチドに結合すること等の性質は全て同じであった²⁵⁾。この結果は、Rad51 蛋白質が機能的にも RecA 蛋白質と似ていることを示唆している。

このような構造の類似性は RecA 蛋白質と Rad51 蛋白質の相同な部分で形成されると考えられるので、われわれはこの相同な領域を “Homologous core と名付けた (図 6 参照)。このように、Rad51 蛋白質は ATP に依存した DNA 結合活性を持ち、その複合体の構造も RecA 蛋白質に似ている。一方、Rad52 蛋白質の構造は RecA 蛋白質と似ていないが、弱いながらも RecA 蛋白質と同じ DNA 鎖交換活性を示した。更に、*rad51*、*rad52* 変異株は同じ表現型を示し、その表現型は *recA* 変異と非常に似ていた。これらの結果から、真核生物では Rad51 と Rad52 蛋白質が共同して RecA 様の働きをしているのではないかと考えた。

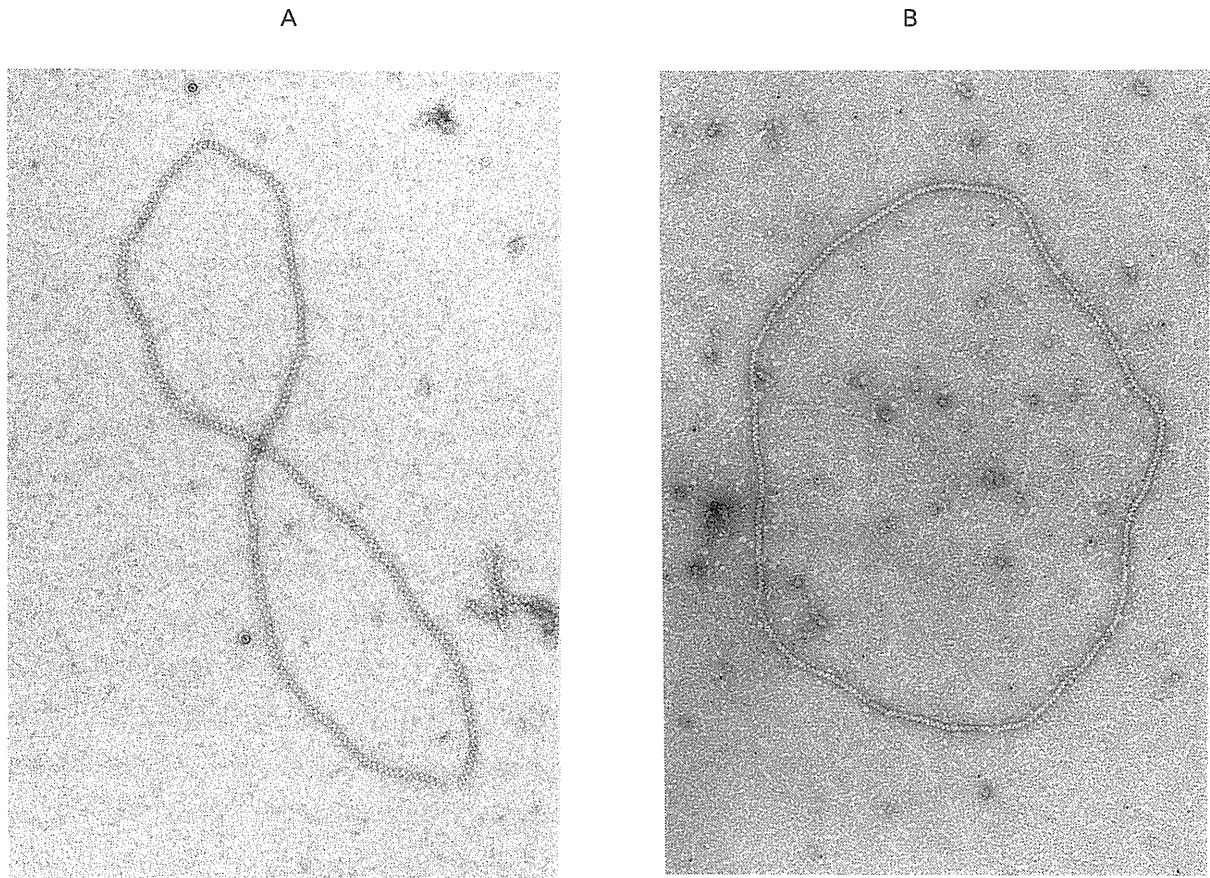


Figure 4. Electron micrographs of Rad51 or RecA protein polymerized on DNA. Complexes formed by Rad51 or RecA protein on dsDNA in the presence of ATP. Negative stained filaments of Rad51 (A) and of RecA protein (B) on ϕ X174 Form II DNA in the presence of ATP observed by conventional transmission electron microscopy. The conditions used were described previously except that the RecA complexes in this figure was formed in the presence of ATP (Ogawa et al. 1993).

そこで Rad52 蛋白質が Rad51 蛋白質と相互作用するかどうかを Rad52-affinity カラムに Rad51 蛋白質が吸着出来るかどうかで調べた。図 5 (A) は Rad52-affinity カラムに Rad51 と RecA, Rad52, BSA (牛血清アルブミン) 蛋白質を混合して流し、解析した結果を示してある。図 5 (B) はそのコントロールとして、BSA-affinity カラムを用いた時の結果を示している。Rad51 蛋白質のみが Rad52-affinity カラムにカラムに吸着し、0.5M NaCl で容出されることがわかる。

更に、詳細な解析を行ない、最終的に明らかになった *S. cerevisiae* RAD51 と RAD52 遺伝子の性質、また、これら蛋白質の機能について得られた結果を下記にまとめた。

- (1) Rad51 蛋白質の 1 次構造は RecA 蛋白質と相同性を示すが、Rad52 蛋白質はこれまで単離されている蛋白質のどれとも相同性を示さない。
- (2) 両遺伝子の完全欠失変異株は X-線照射や MMS 処理に対して感受性である。
- (3) 体細胞分裂期組換えが出来ない。
- (4) 孢子形成能が低下し、形成された孢子の生存が殆ど観察されない。
- (5) 減数分裂期組換えのホットスポットに生じる二重鎖 DNA 切断 (double stranded-breaks:DSBs) を調べると、DSBs は生じるが、野生型の様に修復されない。
- (6) 更に DSBs は二重鎖 DNA の 5' 側から生じ崩壊する。

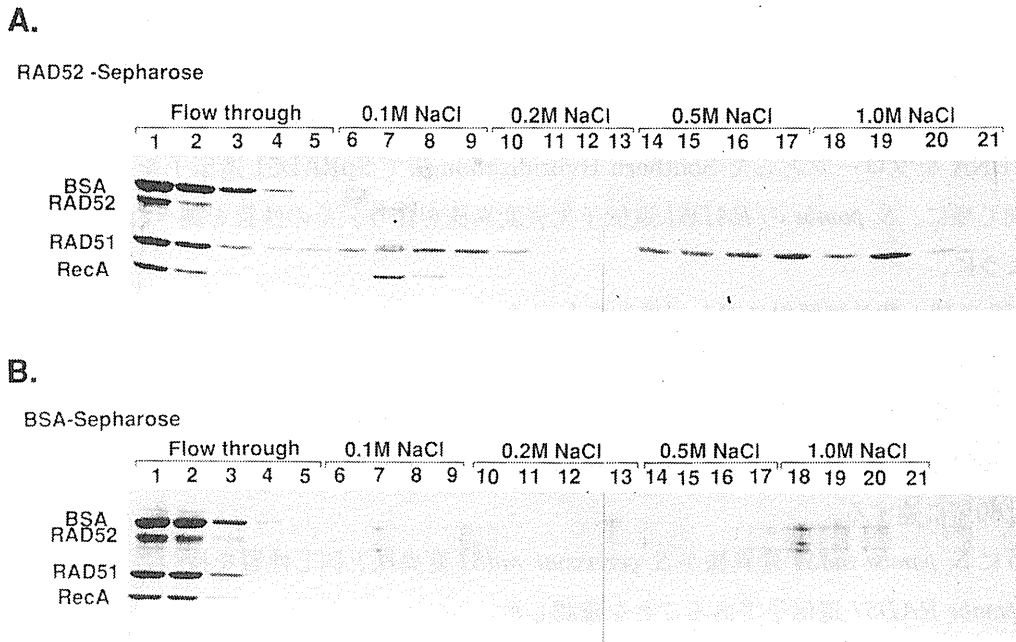


Figure 5. Interaction of Rad51 and Rad52 Proteins. (A). Rad52 affinity chromatography was carried out as described in Shinohara et al (1992). A protein mixture including of Rad51, Rad52, RecA and BSA proteins was applied onto Rad52-sepharose 4B column and fractionated by step wise elution with indicated concentration of NaCl. The fractions were analyzed with 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electrophoresis and visualized by staining with Coomassie blue. In the left, positions of BSA, Rad52, Rad51 and RecA proteins are indicated. (B). BSA affinity chromatography was performed as the same condition in (A) as a control experiment (Shinohara, et al., 1992).

(7) DNA レベルでホットスポットの組換え体形成を観察すると低下している。

Rad51 蛋白質は大腸菌 RecA 蛋白質と同じように、

(1) ATP 依存の DNA 結合性を持つ。

(2) ssDNA 依存の ATPase 活性をもつ。

(3) Rad51-ATP-dsDNA 複合体が RecA-ATP-dsDNA 複合体と同じ右巻きラセンの Nucleoprotein filament を形成し、その複合体の中で B-型 DNA は 1.5 倍に引き伸ばされ、二重鎖 DNA が巻き戻されている。

(4) この Nucleoprotein filament の形成は RecA 蛋白質が 2 つの DNA 間の相補性の検索と、相補性を認識して対合させるために必要な構造体であることから、Rad51 蛋白質が同じ機能を担った蛋白質であることが示唆される。

Rad52 蛋白質は RecA 蛋白質の持つ

(1) 相補的 ssDNA をアニールして二重鎖 DNA にする強い活性を持つが、その反応は ATP によって促進されない。

(2) Rad52 蛋白質を用いて作った affinity column は Rad51 蛋白質を特異的に吸着し、Rad51 と Rad52 蛋白質が直接相互作用する。

5. *Shizosaccharomyces pombe* RAD51 遺伝子の性質

組換えと DNA 傷害の修復は生物が多様性を持つためと、種の保存にとって重要な機構である。従って

高等真核生物にも同じような遺伝子が存在することは容易に推定される。

そこで、高等真核生物から RAD51 様遺伝子を単離するために、出芽酵母と高等真核生物の間に位置する分裂酵母 *S. pombe* の RAD51 遺伝子の単離を行なった^{21, 26)}。*S. pombe* の DNA ライブラリーから、ScRAD51 DNA をプローブとして Southern Hybridization 法で SpRAD51 遺伝子を分離した。分裂酵母の場合と同じ様に、*S. pombe* の RAD51 遺伝子欠失変異株を作り、その性質を調べた結果、Scrad51 変異株と同じように、

- (1) MMS 処理と紫外線照射に対して感受性を示す。
- (2) 組換え能も野生型の 1% に低下した。
- (3) 生存する孢子形成能も野生型の 2% に低下した。
- (4) SpRad51 蛋白質は ScRad51 蛋白質と 67% の同じアミノ酸配列を持ち、相同アミノ酸を加えるとその類似性は 80% に達する。

このように *S. pombe rad51* 変異株が *S. cerevisiae rad51* 変異株と同じ性質を持つことから、単離した遺伝子が *S. pombe RAD51* 遺伝子であることを確認した。

6. 高等真核生物 RAD51 遺伝子の単離

ScRad51 と SpRad51 蛋白質の相同部分の DNA 塩基配列を基に、PCR で RAD51 に特異的な DNA 断片を合成し、それをプローブとしてヒトの骨髄、マウスの脳、ニワトリのファブリキウス嚢由来の cDNA から RAD51 相同遺伝子を単離した^{21, 26, 27)}。それぞれの RAD51 遺伝子を *HsRAD51* (*Homo sapience*), *MmRad51* (*Mus muscurus*), *ChRAD51* (*chicken*) と命名し²⁶⁾、それぞれの遺伝子からコードされる蛋白質を *HsRad51*, *MmRad51*, *ChRad51* と記す²⁶⁾。*HsRad51* と *MmRad51* または *ChRad51* は、それぞれ 4 個又は 12 個のアミノ酸の違いがあるだけで、大きさも 339 アミノ酸残基からなる非常に良く似た蛋白質であった (図 6)。また、二種の酵母の遺伝子との相同性も高く、“Homologouse core” では同じアミノ酸で 76%、相同なアミノ酸を加えるとその相同性は 83% に達していた。

興味深いことに、Rad51 蛋白質は共通して RecA 蛋白質より、N 末端側に 120 から 90 アミノ酸残基長くなっており、逆に RecA 蛋白質 (すでに 23 種の細菌の RecA 蛋白質のアミノ酸配列が決まっている) では全て C 末端側に約 90 アミノ酸残基長くなっている。また、減数分裂期に特異的に働く *S. cerevisiae* Dmc1²⁸⁾ とユリの Lim15²⁹⁾ (ユリの Dmc1) は “Homologouse core” を持ち、RecA より 100 から 117 アミノ酸残基長い N-末端を持ち、約 90 アミノ酸残基短い C-末端を持つ、Rad51 蛋白質と似た構造を示した²¹⁾。これら Dmc1、Rad51、RecA 蛋白質が共通の “Homologous core” を持つことは、この “Homologous core” がある種の組換え蛋白質に共通な機能を担っていることを示しており興味深い。

更に、Rad51 蛋白質の長い N-末端側に Rad51 蛋白質間で 80 アミノ酸残基から成る共通領域の存在することがわかった²¹⁾。従って、Rad51 蛋白質は少なくとも 2 つのドメインからなる蛋白質である。また、Dmc1 のこの領域と C-末端の短い領域は Rad51 蛋白質との相同性が低く、Rad51 蛋白質と Dmc1 蛋白質の違いを示す領域である。

一方、この解析は RecA 蛋白質が短い N-末端領域と、“Homologous core” と C-末端領域の 3 つのドメインからなっていることを示した²¹⁾。この結果は、我々が *E. coli* と *S. typhimurium* の *recA* のキメラ遺伝子を用いて機能領域を解析した結果と良く一致していた³⁰⁾。また、この結果は RecA 蛋白質の X-線解析で得られたドメイン構造³¹⁾とも一致しており、遺伝的解析法が機能ドメインの解析ばかりでなく構造上のド

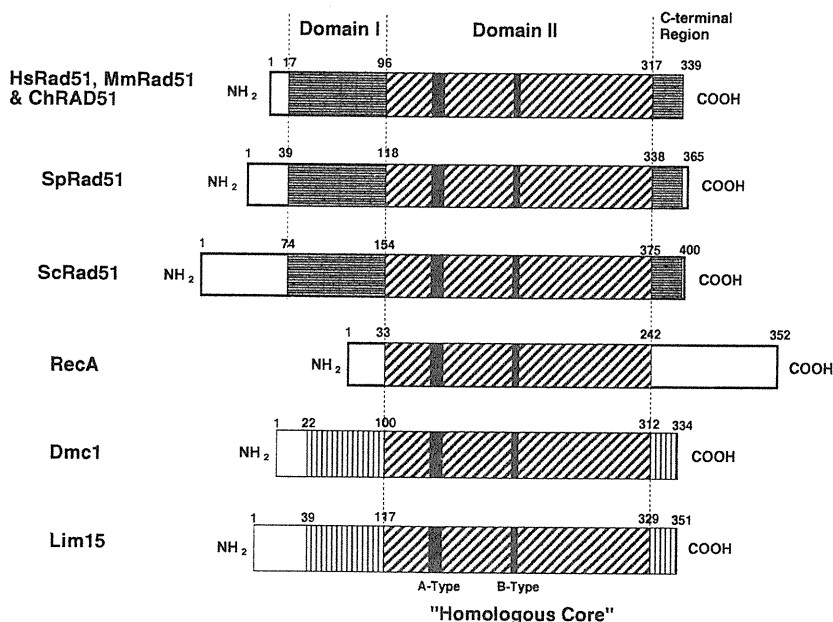


Figure 6. A diagrammatic representation of regions of amino acid homology found in the Rad51 homologues, RecA, Dmc1 and Lim15 proteins. Obliquely striped bars represent the "homologous core". Horizontally striped bars represent the region homologous to all Rad51 homologues, vertical striped bars represent the region homologous to Dmc1 homologues, white bars represent extra residues, and black bars represent ATP binding consensus sequences (Ogawa et al., 1994).

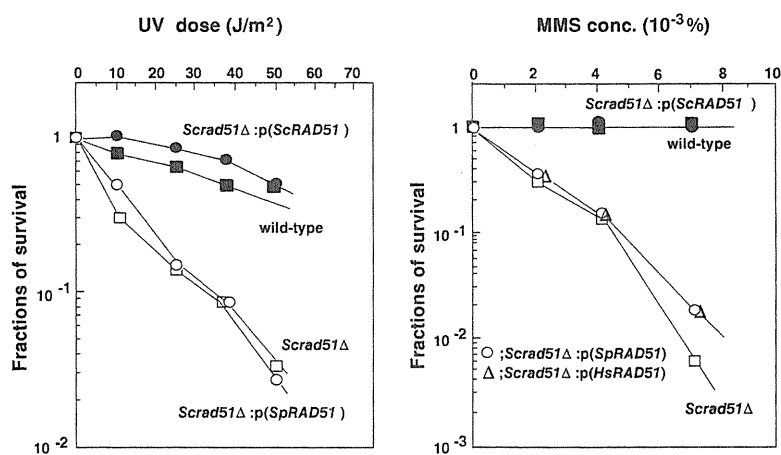


Figure 7. Complementation of the deficiency of *Scrad51* mutants with *GalII-ScRAD51*, *GalII-SpRAD51* and *GalII-HsRAD51* genes. Plasmids carrying *GalII-ScRAD51*, *GalII-SpRAD51* and *GalII-HsRAD51* genes were constructed as described previously (Shinohara et al. 1993). A *Scrad51* Δ mutant was transformed with a plasmid carrying each of these genes, and the UV and /or MMS sensitivities of these transformants were examined by plating of these stationary phase cells on SD-GAL plates with or without various concentrations of MMS. Open circles or open triangles represent the survival fractions of the *Scrad51* Δ mutant carrying a plasmid containing the *GalII-SpRAD51* or *GalII-HsRAD51* gene, respectively. Open squares for *Scrad51* Δ , black circles for *Scrad51* Δ mutant carrying a plasmid containing the *GalII-ScRAD51* gene and black square for *S. cerevisiae* wild-type cells. Transformants of *Scrad51-1* mutant with a plasmid carrying the *GalII-HsRAD51* gene or a plasmid carrying *HsRAD51* gene under the control of an authentic *ScRAD51* promoter showed the same survival as *Scrad51* Δ \cdot *p(GalII-HsRAD51)* cells after treatment with MMS (data not shown) (Ogawa et al., 1994).

メインの決定にも有力な手掛かりを与えることを示している。これまで、RecA 蛋白質の N-末端はオリゴマー形成に必須であり^{7, 32)}、C-末端側は DNA 結合の強さをコントロールする働き^{33, 34)}を持っていることがわかっている。

7. 組換え蛋白質の種特異性

このように Rad51 蛋白質は蛋白質間でホモロジーが高いにも関わらず、*HsRAD51*, *SpRAD51* 遺伝子は *Scrad51* 欠失株の紫外線照射や、MMS 処理に対する感受性を相補できなかった (図 7)。この結果は真核生物の組換えに Rad51 蛋白質以外の因子が関与していることを示唆している。上に述べた様に、出芽酵母の Rad51 蛋白質は Rad52 蛋白質と相互作用し、また、*rad51* と *rad52* 変異株の性質が非常に良く似ていることから、真核生物の組換えに関与する他の因子の一つとして Rad52 蛋白質が考えられる^{21, 26)}

8. マウス *Rad51* 遺伝子の発現

マウスの *Rad51* 遺伝子の発現を種々の組織で調べると、図 8 に示されるように、精巣、卵巣、脾臓、胸腺で肺、腎臓、心臓、肝臓の 20 から 30 倍合成されており、脳でも 5 倍量が合成されていた。また胚発生時でも 20 倍と高い²⁶⁾。この結果はマウスでも酵母で観察されたように、*RAD51* 遺伝子が減数分裂期組換えに関与していること、また、抗体産生の盛んな組織で高いことから、抗体の多用性を決定するときに行なわれる組換えに関与している可能性を示している。また細胞分裂の盛んな胚や卵巣で合成量が多いことは *RAD51* 遺伝子が DNA 複製時にも機能している可能性を示し、これは酵母の *RAD51* 遺伝子の mRNA が G1/S 期で誘導合成されること³⁵⁾、両酵母の *RAD51* 遺伝子の上流領域に G1/S 期の発現に必要である *Mul1 Cell Cycle Box (MCB)* と呼ばれる配列が 2 個存在することとよく一致している^{21, 22)}。更に、発現が低い組織の RNA の RT-PCR で mRNA の存在が確認されたことは、*RAD51* 遺伝子は全ての組織で恒常的に発現していることを示し、酵母と同じ様に DNA 傷害の修復や DNA 代謝に関与している可能性を示した。最後に、脳での発現が高いことは中枢神経でも組換え機能または DNA の代謝に関与する機能のあることを示唆し、今後の解析に興味を持たれる。

最後に *RAD51* 遺伝子の他の生物種での存在をマウス、ヒト *RAD51* DNA をプローブとして代表的な生物の DNA を Southern ハイブリダイゼーションで調べたところ、ブタ、ヘビ、カエル、カイ、ウニ、サカ

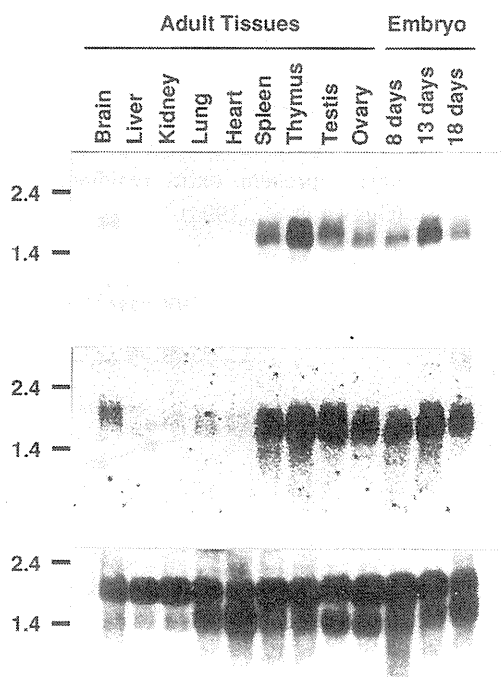


Figure 8. Northern blotting analysis of *MmRad51* RNA in different mouse tissues and embryos. Each lane contains 1.2 μ g of poly(A)⁺ RNAs from several tissues of adult mice and from different days of embryos. The membrane was analyzed by autoradiography (upper) and by BAS2000 (middle). The same membrane probed with *MmRad51* was stripped and reprobed with β -actin DNA (below). Positions of size maker RNA (BRL) are indicated on the left side of the figures (Shinohara et al., 1993).

ナ、ハエ、タバコ等に検出され²⁶⁾、RAD51 遺伝子機能が真核生物の色々な組換え機構に関与する共通の遺伝子であることを示し、今後の真核生物組換え機構の研究の突破口となったと考える。

参考文献

1. Clark, A. J. and D. Margulies. : Isolation and characterization of recombination-deficient mutants *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 53, 451-459, 1965.
2. Ogawa, H. and Tomizawa, J. : Breake of polynucleotide strands by disintegration of radiophosphorus atoms in DNA molecules and their repair. I. Single-strand breake by transmutation. *J. Mol. Biol.* 30, 1-6, 1967.
3. Tomizawa, J. and Ogawa, H. : Breake of polynucleotide strands by disintegration of radiophosphorus atoms in DNA molecules and their repair. II. Simultaneous breake of both strands. *J. Mol. Biol.* 30, 7-15, 1967.
4. Tomizawa, J. and Ogawa, H. : Breake of DNA in *rec*⁺ and *rec*⁻ bacteria by disintegration of radiophosphorus atoms in DNA and possible cause of pleiotropic effects of *recA* mutation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33, 243-351, 1968.
5. Ogawa, T., Wabiko, H., Tsurimoto, T., Horii, T., Masukata, H. and Ogawa, H. : Characterization of purified RecA protein and the regulation of its synthesis *in vivo*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43, 909-915, 1979.
6. Horii, T., Ogawa, T. and Ogawa, H. : Organization of the *recA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 77, 313-317, 1980.
7. Ogawa, H. and Ogawa, T. : General Recombination : Functions and structure of RecA protein. *Adv. Biophys.*, 121, 135-148, 1985.
8. Radding, C. M. Homologous Pairing and strand exchange promoted by *Escherichia coli* RecA protein. : In *Genetic Recombination*. Edited By Kucherlapati, R. and Smith, G. R., Washington American Society for Microbiology, 193-230, 1988.
9. Ogawa, H. and Ogawa, T. : Regulation in repressor inactivation by RecA protein. *Adv. Biophys.*, 26, 33-48, 1990.
10. Yu, X. and Egelman, E. H. : Structural data suggests that the active and inactive forms of the RecA filament are not simply interconvertible, *J. Mol. Biol.*, 227, 334-346, 1992.
11. Chow, S. A. and Radding, C. M., : Ionic inhibition of formation of RecA nucleoprotein networks blocks homologous pairing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, 5646-5650.
12. West, S. : Enzymes and Molecular Mechanisms of Genetic recombination, *Annu. Rev. Biochem.*, 61, 603-640, 1992.
13. Horii, T., Ogawa, T. and Ogawa, H. : Nucleotide Sequence of the *lexA* gene in *E. coli*. *Cell*, 23, 689-697, 1981.
14. Horii, T., Ogawa, T., Nakatani, T., Hase, T., Matsubara, H. and Ogawa, H. : Regulation of SOS functions: Purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. *Cell*, 27, 515-522, 1981.

15. Eguchi, Y., Ogawa, T. and Ogawa, H.: Cleavage of phage ϕ 80 repressor by RecA protein. *J. Mol. Biol.*, 202, 565–573, 1988.
16. Yu, X. and Egelman, E. H.: The LexA repressor binds with in the deep helical groove of the activated RecA filaments, *J. Mol. Biol.*, 231, 29–40, 1993.
17. Egelman, E. H. : What do x–ray crystallographic and electron microscopic structural studies of the RecA protein tell us about recombination. *Current Opinion in Structural Biology*, 3, 189–197, 1993.
18. Radding, C. M. : A universal recombination filament, *Current Biology*, 3, 358–360, 1993.
19. Game, J. C. and Mortimer, R. K.: A genetic study of X–ray sensitive mutants in yeast. *Mutat. Res.*, 24, 281–292, 1974.
20. Resnick, M. A. : Investigating the genetic control of biochemical events in meiotic recombination. In the *Meiosis* (ed. Moens, P. B.). 1987. Academic Press, New York, pp. 157–210.
21. Ogawa, T., Shinohara, A., Nabetani, A., Ikeya, T., Yu, X., Egelman, E. H. and Ogawa, H. : RecA–like Recombination Proteins in Eukaryotes: Functions and Structures of *RAD51* Genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58, 1994. 567–576.
22. Shinohara, A., Ogawa, H. and Ogawa, T. : Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA–like protein. *Cell* 69, 457–470, 1992.
23. Adzuma, K., Ogawa, T. and Ogawa, H. : Primary structure of the *RAD52* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 2735–2744, 1984.
24. Cao, L., Alani, E. and Kleckner, N. : A pathway for generation and processing of double–stranded breaks during meiotic recombinaton in *S. cerevisiae*. *Cell* 61, 1089–1101, 1990.
25. Ogawa, T., Yu X., Shinohara, A. and Egelman, E. H. : Similarity of the yeast Rad51 filament to the bacterial RecA filament. *Science*, 256, 1896–1988, 1993.
26. Shinohara, A., 1992. Ogawa, H., Matsuda, Y., Ushio, U., Ikeo, K. and Ogawa, T. : Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to *RAD51* and *recA*. *Nature Genetics*, 4, 239–243, 1993.
27. Bezzubova, O., Shinohara, A., Mueller, R. G., Ogawa, H. and Buerstedde, J–M. : A chicken *RAD51* homologue is expressed at a high level in lymphoid and reproductive organs. *Nucleic Acids Res.*, 21, 1577–1580, 1993.
28. Bishop, D. K., Park, D., Xu, L. and Kleckner, N. : *DMC1*: A meiosis–specific yeast homolog of *E. coli recA* required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69, 439–456, 1992.
29. Kobayashi, T., Hotta, Y. and Tabata, S. : Isolation and characterization of a yeast gene which is homologous with a meiosis specific cDNA from a plant. *Molec. Gen. Genet.*, 237, 225–232, 1993.
30. Ogawa, T., Shinohara, A., Ogawa, H. and Tomizawa, T. : Functional structure of the RecA proten found chimera analysis. *J. Mol. Biol.*, 226, 651–660, 1992.
31. Story, R. M., Weber, I. T. and Steitz, A. : The structure of *E. coil* RecA protein, *Nature*, 355, 318–325, 1992.
32. Horii, T. Ozawa, N. Ogawa, T. and Ogawa, H. : Inhibitory effects of N– and C–terminal truncated

- Escherichia coli recA* gene products on function of the wild-type *recA* gene. *J. Mol. Biol.*, 223, 105-114, 1992.
33. Benedict, R. C. and Kowalczykowski, S. C. : Increase of th DNA strand assimilation activity of RecA protein by removal of the C-terminus and structure-function studies of the resulting protein fragment. *J. Biol. Chem.* 263, 15513-15520, 1988.
 34. Tateishi, S., Horii, T., Ogawa, T. and Ogawa, H. : C-terminal truncated *Escherichia coli* RecA protein RecA5327 has enhanced binding affinities to single- and double-stranded DNAs. *J. Mol. Biol.*, 223, 115-129. 1992.
 35. Basile, G., Aker, M. and Mortimer, R. T., : Nucleotide sequence and transcriptional regulation of the yeast recombinational repair gene *RAD51*. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3235-3246, 1992.

2. DNA 損傷修復遺伝子 ERCC5 と ヒト遺伝性疾患

塩見忠博*

A Human Repair gene ERCC5 is Involved in Group G xeroderma pigmentosum

Tadahiro Shiomi

Division of Genetics, National Institute of Radiological Sciences

9-1, Anagawa 4-chome, Inage-ku, Chiba-shi, 263 Japan

Abstract

To preserve genetic information from the damaging effects of exposure to environmental radiation and chemicals, all living organisms have acquired repair pathways. Ultraviolet-induced DNA damage is repaired by nucleotide excision repair. In *E. coli*, such damage is removed by the coordinated action of UVR A, B, C, and D proteins (1). In *Saccharomyces cerevisiae*, more than ten genes have been reported to be involved in excision repair (2). The nucleotide excision repair pathway has been extensively studied in these organisms. However, little is known about the molecular mechanism of excision repair in mammalian cells. To facilitate studying nucleotide excision repair in mammalian cells, ultraviolet-sensitive rodent cell mutants have been isolated and classified into 11 complementation groups (9,10). The human nucleotide excision repair genes which complement the defects of the mutants have been designated as the ERCC (excision repair cross-complementing) genes; a number is added to refer to the particular rodent complementation group that is corrected by the gene. Recently, several human DNA repair genes have been cloned using rodent cell lines sensitive to ultraviolet. These include ERCC2 (3), ERCC3 (4), and ERCC6 (5), which correspond to the defective genes in the ultraviolet-sensitive human disorders xeroderma pigmentosum (XP) group D (6) and group B (4), and Cockayne's syndrome (CS) group B (7), respectively. The human excision repair gene ERCC5 was cloned after DNA-mediated gene transfer of human HeLa cell genomic DNA into the ultraviolet-sensitive mouse mutant XL216, a member of rodent complementation group 5

*放射線医学総合研究所 遺伝研究部 (千葉市稲毛区穴川4-9-1)

(11,12) and the gene was mapped on human chromosome 13q32.3–q33.1 by the replication R-banding fluorescence in situ hybridization method (13). The ERCC5 cDNA encodes a predicted 133 kDa nuclear protein that shares some homology with product of the yeast DNA repair gene RAD 2. Transfection with mouse ERCC5 cDNA restored normal levels of ultraviolet-resistance to XL216 cells. Microinjection of ERCC5 cDNA specifically restored the defect of XP group G cells (XP-G) as measured by unscheduled DNA synthesis (UDS), and XP-G cells stably transformed with ERCC5 cDNA showed nearly normal ultraviolet resistance.

緒言

紫外線は DNA (遺伝子) に損傷を誘発し、それが原因となって細胞死、突然変異の誘発、発ガンなどの影響を生物にもたらす。従って、地球上に生命が誕生して以来、生物は太陽からの紫外線の脅威にさらされ続けていると言える。生物は生命誕生のごく初期から DNA に書き込まれた遺伝情報を紫外線の影響から守るための防御系すなわち DNA 損傷修復系を発展させてきた。このような修復系は現存するほぼすべての生物に保存されるようになったと考えられる。このような系の発達なくしては、生物は長い進化の歴史を生き永らえることはできなかつたであろう。ヒトも生物の一種であるからにはその例外ではありえない。このような DNA 損傷を修復する術を身に付けている。このことは、修復能を測定する種々の方法が考案されるようになり、損傷修復能が欠損していると考えられるヒトの遺伝性疾患が存在することが明らかにされてきたことにより証明されるようになってきた。紫外線により誘発される DNA 損傷の修復能を欠損したヒト遺伝性疾患としては、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum, XP)、コケイン症候群 (Cockayne's syndrome, CS) が知られている。XP は、常染色体劣性遺伝様式で伝達され、4–25万人に1人の割合で発症するヒト遺伝性疾患である。XP 患者は日光露出部において急性皮膚炎の臨床症状を示す。これらの症状に加えて、知能低下等の精神神経症を合併する症例もある。XP 患者が日光過敏症を示し、DNA 損傷の除去修復能に異常があることが知られている。コケイン症候群 (CS) 患者は XP と同様日光過敏症や種々の神経症状を呈する。しかしながら XP のような高発癌性は認められていない。CS 細胞も紫外線に対して正常細胞より高い感受性を示す。細胞融合法を用いた遺伝的相補性試験の結果、XP には A から G 群それにバリエーションと呼ばれる 8 つの相補性群が存在し、CS には A と B の二つの相補性群が存在することが知られている。それぞれの相補性群の患者では、それぞれ異なった遺伝子の欠損が原因となり発症したと考えられている。これらの遺伝病細胞は DNA 損傷の修復能が欠損していることから、これらで欠損している遺伝子は損傷修復に関与する遺伝子であると考えられる。従ってこれらの疾患の原因遺伝子をクローン化することができるなら、それは修復の分子機構を知るための有用な情報を提供してくれるものと期待された。ところがこれらの遺伝病患者由来細胞は多くの場合増殖が悪い、あるいは外来性の DNA の取り込みが悪い等の欠点があり、原因遺伝子 (すなわち DNA 修復遺伝子) のクローニングはなかなか進まなかつた。

一方、すでに樹立されたマウスやチャイニーズハムスター由来細胞株から紫外線高感受性修復欠損変異株細胞の分離が試みられ、多数の変異株が分離されていた。さらにこれらの変異株はこれまで 11 群の遺伝的相補性群に分類されていた。これらの変異株細胞はヒト修復欠損遺伝病細胞に比べ取り扱いが容易であったため、ヒト修復遺伝子のクローニングに用いられいくつかの遺伝子がクローン化された。このよう

なげっ歯類細胞由来の変異株細胞の欠損を補う遺伝子は ERCC (Excision Repair Cross Complementing Rodent Deficiency) と総称され、それぞれの相補性群に属する変異株の欠損を補う遺伝子には ERCC の後にその相補性群の番号を付して名付ける。例えば相補性群 1 群の変異株の欠損を補う遺伝子は ERCC1 と名付ける。我々は、げっ歯類の相補性群第 5 群に属するマウス変異株細胞 XL216 の欠損を補う遺伝子のクローニングを試み、クローニングに成功した。本報告ではクローン化した ERCC5 遺伝子の諸性質について述べる。さらに、げっ歯類の紫外線高感受性変異株の表現形質はヒト紫外線高感受性遺伝病の XP や CS に類似しているため、クローン化した ERCC5 遺伝子を XP や CS の各相補性群細胞に導入することにより、これらの遺伝病の原因遺伝子 (その病気で欠損している遺伝子) であるか否かを検討した。

結果と結論

1. マウス修復欠損紫外線高感受性変異株細胞の欠損を補うヒト遺伝子のクローニング。

マウス紫外線高感受性変異株 XL216 は、げっ歯類の相補性群の第 5 群に属する。XL216 の欠損を補うヒト遺伝子のクローニングを以下のようにして行なった。制限酵素 EcoRI で部分分解したヒト HeLa 細胞 DNA (平均60kb) と EcoRI で切断したプラスミド pSV2neo をリガーゼで連結した後、リン酸カルシウム法で XL216 細胞に導入し、薬剤 G418 と紫外線の両方に抵抗性になった第一次形質転換細胞 (TSR1) を得た。さらに第一次形質転換細胞 DNA を XL216 細胞に導入し、G418 と紫外線で選択し、第二次形質転換細胞 (TS2RI) を得た。ヒト細胞 DNA には neo 遺伝子が連結されているから、第二次形質転換細胞中に保持されているヒト修復遺伝子 (第 5 群の欠損を補うから ERCC5 と名付ける) の近傍には neo 遺伝子が連結され存在するはずである。TS2RI DNA からコスミドライブラリーとランダムファージライブラリーを構築し、この neo 遺伝子を目印にしてコスミドライブラリーからヒト DNA を含むクローンを得た。ところがこれらのコスミドクローンは性質が不安定であったためコスミド DNA の一部断片をプローブにしてさらにファージライブラリーをスクリーニングし、ヒト由来の DNA 30kb を回収し、制限酵素地図を作製した (Fig. 1)。回収した DNA 断片は独立に分離した紫外線抵抗性形質転換細胞すべてに保持されていたことから、これが目的のヒト遺伝子 ERCC5 と考えられた。

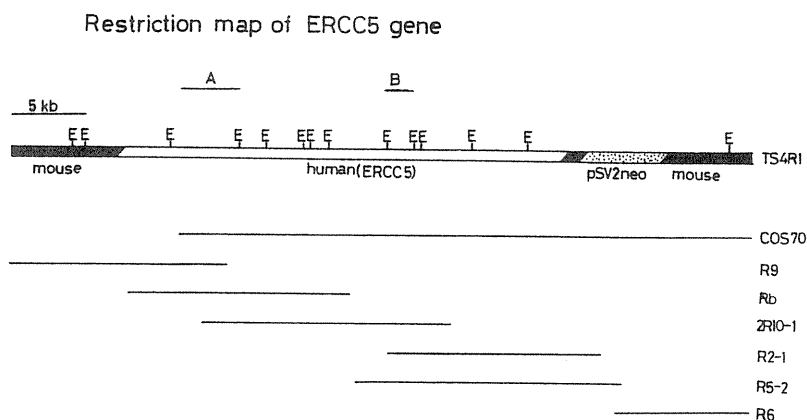


Fig 1. A restriction enzyme map of ERCC5 gene.

2. ERCC5 遺伝子 cDNA の分離。

ヒト ERCC5 遺伝子のエクソンを含む断片をプローブにして、pCD2 に構築した二つのヒト cDNA ライ

ブラリーをスクリーニングし、30個の陽性クローンを得た。これらの cDNA クローンを XL216 細胞に導入したがいずれのクローンも XL216 細胞の紫外線高感受性の性質を直すことができなかった。最長の cDNA は 3.2kb であったが、ノーザンプロット法で調べた ERCC5 の mRNA のサイズ (-3.8kb) に比べやや短く、制限酵素地図から判断すると、5' 側に欠損があると思われた。そこで未回収の 5' 側 cDNA 断片を RACE (Rapid Amplification of Complementary DNA End) 法により合成し、回収した。ヒト ERCC5 cDNA をプローブにして五種類のマウス cDNA ライブラリーをスクリーニングし 9 個の陽性クローンを得た。一つのクローンは 2.8kb の長さで 5' 側は完全であるが 3' 側に欠損があった。4 つのクローンは 5' 側と 3' 側の両方に欠損があった。残りの 4 つのクローンは 5' 側に欠損が見られるが 3' は完全であることがわかった。5' 側が完全なクローンと 3' 側が完全なクローンから得た cDNA を酵素的に連結して完全長の cDNA (少なくともオープンリーディングフレームは完全) を作成した。この cDNA を pSV2 の発現ベクターに挿入し pSVMER5 (Fig. 2) と名付けた。pSVMER5 の DNA を取り込んだ XL216細胞は紫外線に抵抗性になる (Fig. 3) ことから連結した cDNA は完全な ERCC5 蛋白質をコードすると考えられた。

3. ERCC5 cDNA の塩基およびアミノ酸配列。

ERCC5 cDNA の塩基配列を決定した (Fig. 4)。ERCC5 cDNA はポリ A 部位の 19塩基上流に典型的なポリ A シグナル (AATAAA) を有していた。ERCC5 cDNA は、塩基配列から類推して、1185アミノ酸からなる分子量132、519の蛋白質をコードしている。データベースをホモロジーサーチして、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の除去修復関連遺伝子 RAD2 のコードする蛋白質と ERCC5 蛋白質が有意に相同性が高いことがわかった。特に RAD2 の 1-110番目と、767-866番目のアミノ酸配列と ERCC5 の 1-110番目と 764-863番目のアミノ酸配列が特に相同性が高く、51%のアミノ酸残基が同一であった。さらに86%のアミノ酸残基が相同であった (Fig. 5)。ERCC5 蛋白質には二つの核移行シグナルらしいアミノ酸配列が認められているから、核内において働く蛋白質と考えられる。

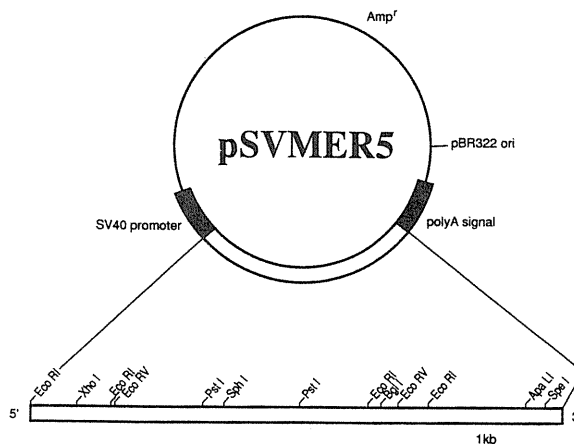


Fig 2. Structure of the plasmid pSVMER5

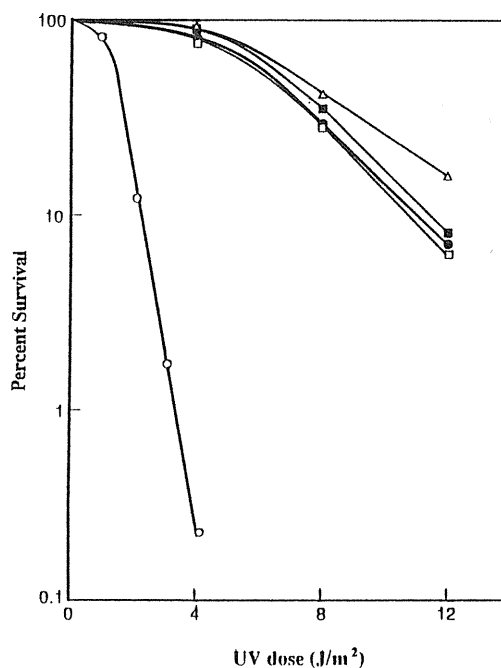


Fig 3. Ultraviolet-sensitivity of LTK⁻ APRT⁻ cells (●), XL216 cells (○) and ultraviolet-resistant XL216 cells transfected with pSVMER5 (□■ △). All the transformants are independent clones. Points are average values for duplicate dishes.

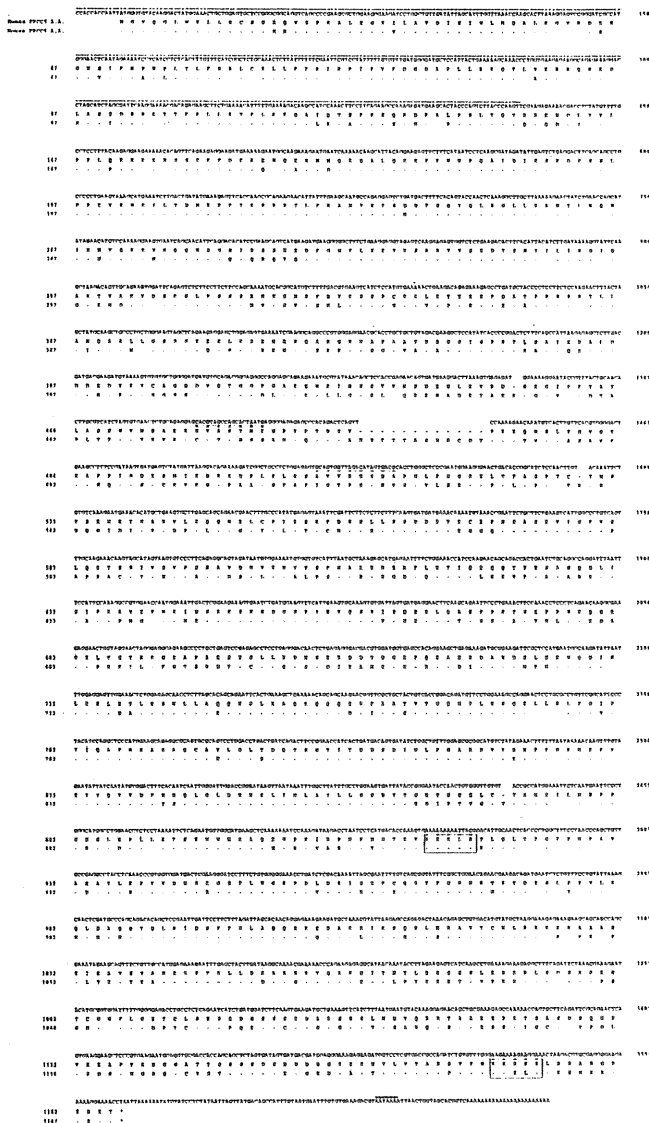


Fig 4. Composite nucleotide sequence of human ERCC5 cDNA and deduced amino acid sequence of the open reading frame. The amino acid sequence in the second row is that of the mouse ERCC5 protein. Dots in ERCC5 amino acid sequence indicate amino acids conserved in the human ERCC5 amino acid sequences. Nucleotide sequences of human ERCC5 cDNA obtained using the "rapid amplification of DNA ends (RACE) technique are overlined. Putative nuclear location signals are indicated by the box. The polyadenylation signal is indicated by a double overline.

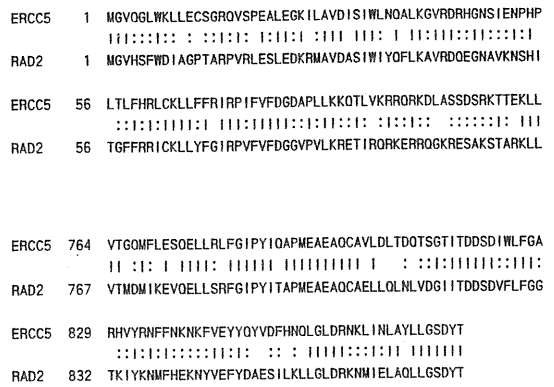


Fig 5. Amino acid sequence alignment between yeast RAD 2 and human ERCC5 gene products, where a vertical line represents amino acid identity and a colon represents amino acid similarity as defined the computer program using the default parameters.

4. ERCC5 cDNA は XP あるいは CS の欠損を相補するか。

げっ歯類の第 5 群の変異株細胞の形質は紫外線高感受性ヒト遺伝病 XP や CS の形質に似ている。そこでクローン化した ERCC5 cDNA を用いて、7 群 (A-G) の XP と 2 群 (A-B) の CS との相補性試験を行なった。各相補性群の遺伝病細胞の核内に ERCC5 の cDNA を導入後、XP 細胞では紫外線誘発不定期 DNA 合成 (UDS) の回復の有無、CS 細胞では紫外線照射後の RNA 合成抑制の回復の有無を指標にして相補性の有る無しを判定した。表 1 に示すように、ERCC5 cDNA は XP の G 群細胞の修復欠損を特異的に相補した。XP の他の群や CS の欠損は相補しなかった。ERCC5 cDNA を微量注入した XP-G 細胞の UDS はほぼ正常細胞レベルまで回復していた (図 6)。XP-G 細胞 (XP3BRSV) に ERCC5 cDNA

(pSVMER5) を導入し、紫外線抵抗性になった形質転換細胞を得た。このうち 2 つのクローン (XP3BRSVR1,2) について紫外線に対する生存曲線を作成した (Fig. 7)。2 クローンとも紫外線に対してはほぼ正常レベル近くまで抵抗性になっていた。ERCC5 遺伝子は XP-G 群の紫外線高感受性ならびに修復欠損を特異的に相補することから、XP-G 群で欠損している原因遺伝子であると考えられる。

Table 1. Complementation of XP and CS cells with ERCC5.

Cell (Complementation group)	Grains/Nucleus		Correction
	Non-injected	injected	
Kps4 (XP-A)	4±1	4±1	-
CRL1199 (XP-B)	6±1	6±1	-
GM3176 (XP-C)	31±2	30±3	-
Kps1 (XP-D)	35±2	33±3	-
GM2415 (XP-E)	72±5	74±5	-
Nps1 (XP-F)	25±2	25±3	-
Sps1 (XP-G)	6±2	93±7	+
GM3021A (XP-G)	7±2	90±7	+
Mps1 (CS-A)	122±11	127±13	-
CS1MO (CS-B)	115±11	111±13	-

Plasmid pSVMER5 DNA (0.1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) was microinjected into nuclei. In XP cells, the complementation assay was performed. In CS cells, recovery of RNA synthesis after ultraviolet-irradiation (26) was examined by autoradiography. For this, pSVMER5 was microinjected into nuclei of actively growing CS cells, and the cells were cultured for 20 hours. The cells were washed with PBS, irradiated with ultraviolet light at a dosage of 15 J/m² and cultured for 23 hours in the original medium. Then the cells were labelled with ³H uridine (20 $\mu\text{Ci} / \text{ml}$) for 1 hour in the medium and processed for autoradiography by the same method used for the UDS assay. Slides were exposed for 2 days. Average grain numbers of 20 cells are given. Correction of the defects in XP or CS cells was determined from the changes in grain numbers.

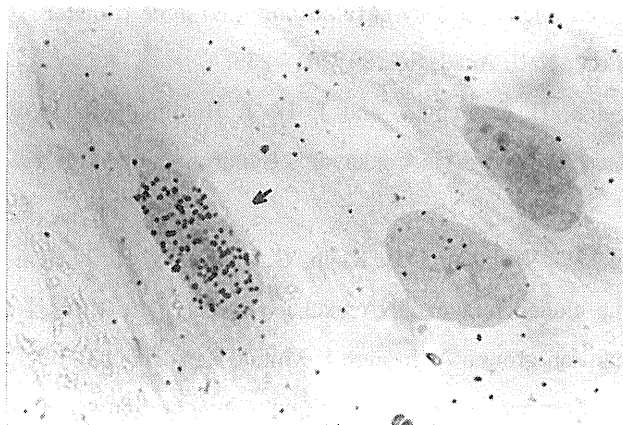


Fig 6. Restoration of UDS in XP-G cells after microinjection of ERCC5. Mouse ERCC5 gene was microinjected into XP-G cells, and UDS in these cells was examined by autoradiography. An arrow indicates a microinjected cell. Grain number of UDS in these cells is nearly normal.

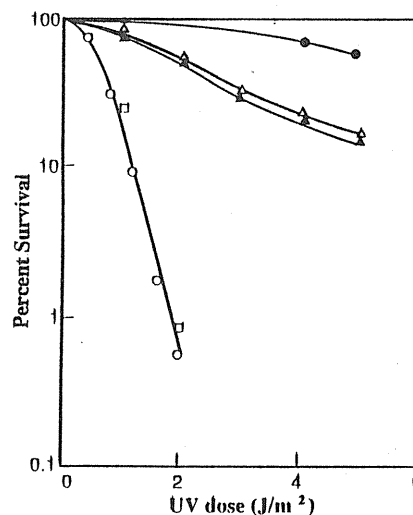


Fig 7. Ultraviolet sensitivity of HeLa (●), group G XP cell line, XP3BRSV (○) G418-resistant XP3BRSV (□) and ultraviolet resistant transformants, XP3BRSVR1,2 (△▲) cells.

5. XP 細胞における ERCC5 遺伝子の発現。

各相補性群に属する XP 細胞ならびにヒト HeLa 細胞からポリ A プラスの RNA を抽出し、ERCC5 cDNA をプローブとしてノーザンブロッティングを行なった。その結果、XP-G 細胞 (二種類) においても正常と変わらない大きさの mRNA を正常とほぼ同量合成していることがわかった。このことから調

べた XP-G 細胞の ERCC5 遺伝子に生じた突然変異は、その発現量や mRNA の長さに影響を及ぼすような大きなものではなく、恐らく点突然変異か、あるいは非常に小さな欠失のようなものであろうと推定される。XP-G 群患者細胞における ERCC5 遺伝子座での突然変異を同定することは今後に残された問題である。

参考文献

- 1) Grossman, L., P. R. Caron, S. J. Mazur, and E. Y. Oh. 1988. Repair of DNA containing pyrimidine dimers. *FASEB J.* 2: 2696–2701.
- 2) Friedberg, E. 1988. Deoxyribonucleic acid repair in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52: 70–102.
- 3) Weber, C. A., E. P. Salazar, S. A. Stewart, and L. H. Thompson. 1988. Molecular cloning and biological characterization of a human gene, ERCC2, which corrects the nucleotide excision repair defect in CHO UV5 cell. *Biol.* 8: 1137–1146.
- 4) Weeda, G., R. C. A. van Ham, W. Vermeulen, D. Bootsman, A. J. van der Eb, and J. H. J. Hoeijmakers. 1990. A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Cell* 62: 777–791.
- 5) Troelstra, C., H. Odijk, J. de Wit, A. Westerveld, L. H. Thompson, D. Bootsman, and J. H. J. Hdjmakers. 1990. Molecular cloning of the human DNA excision repair gene ERCC6. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5806–5813.
- 6) Fleiter, W. L., L. D. McDaniel, D. Johns, E. C. Friedberg, and R. A. Schults. 1992. Correction of xeroderma pigmentosum complementation group D mutant cell phenotypes by chromosome and gene transfer: Involvement of the human ERCC2 DNA repair gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 261–265.
- 7) Troelstra, C., A. van Gool, J. de Wit, W. Vermeulen, D. Bootsman, and J. H. J. Hoeijmakers. 1992. ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's Syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 71: 839–953.
- 8) van Duin, M., G. Vredeveltdt, L. V. Mayne, H. Odijk, W. Vermeulen, B. Klein, G. Weeda, J. H. J. Hoeijmakers, D. Bootsma and A. Westerveld. 1989. The cloned human DNA excision repair gene ERCC-1 fails to correct xeroderma pigmentosum compelementation groupo A through I. *Mutat. Res.* 217: 83–92.
- 9) Thompson, L. H., T. Shiomi, E. P. Salazar and S. A. Stewart. 1988. An eighth complementation group of rodent cells hypersensitive to ultraviolet radiation. *Somat Cell Mol. Genet.* 14: 195–203.
- 10) Stefanini, M. A. R. Collins, R. Riboni, M. Klaude, E. Botta, D. L. Mitchell and F. Nuzzo. 1991. Novel Chinese hamster ultraviole-sensitive mutants for excisin repair form complementation groups 9 and 10. *Cancer Res.* 51: 3965–3971.
- 11) Shiomi, T., N. Hieda-Shiomi, K. Sato, T. Yoshizumi and T. Nakazawa. 1988. Cell fushion mediated improvement in transfection competence for repair-deficient mutant of mouse T cell line. *Somat. Cell Mol. Genet.* 14: 195–203.
- 12) Thompson, L. H., A. V. Carrano, K. Sato, E. P. Salazar, B. F. White, S. A. Stewart, J. L. Minkler and M. J. Siciliano. 1987. Identification of nudeotide-excision repair genes on human chromosomes 2 and 13 by functional complementation in hamster-human hybrids. *Somat. Cell Mol. Genet.* 13: 539–551.

- 13) Takahashi, E., N. Shiomi, and T. Shiomi. 1992. Precise localization of the excision repair gene, ERCC5, to human chromosome 13q32.3-q33.1 by direct R-banding fluorescence in situ hybridization. *Jpn. J. Cancer Res.* 83: 1117-1119.
- 14) Yamaizumi, M., A. L. Horwich and F. M. Ruddle. Expression and stabilization of microinjected plasmids containing the Herpes simplex virus thymidine kinase gene and polyoma virus DNA in mouse cells. 1983. *Mol. Cell. Biol.* 3: 511-522.

3. DNA 損傷誘導遺伝子

根井 充* / 三田 和英** / 市村 幸子**

DNA - damage - inducible genes

Mitsuru Neno^{*}, Kazuei Mita^{**} and Sachiko Ichimura^{**}

^{*}Training School and ^{**}Division of Biology, National Institute of Radiological Sciences,
9-1, Anagawa-4-chome, Inage-ku, Chiba-shi, 263 Japan

Abstract

Ultraviolet (UV) lights, ionizing radiations and some chemical agents give rise to various kinds of DNA damages, such as pyrimidine dimers, DNA-strand scissions and base modification with bulky adducts. In response to the genotoxic stress caused by these DNA damages, a lot of mammalian genes are transcriptionally induced. Some of the induced genes have been identified to play important roles in cellular protection in association with DNA repair, G1/G2 checkpoint regulations or apoptosis. Ubiquitin, which has been revealed to be UV-inducible in cultured human cells (HeLa), has potential roles in cell cycle checkpoint activation and regulation of signal transduction pathway. In this article, we present the complete structure of a polyubiquitin gene CHUB2 isolated from the V79 Chinese hamster genome. The CHUB2 gene is characterized as a Chinese hamster equivalent to the human polyubiquitin gene UbC, which has been shown to be UV-inducible, because the nucleotide sequences in the 3' untranslated regions of both genes are highly homologous. Although the CHUB2 gene is not obviously induced by UV light, the structural characteristics in the 5' control region of the CHUB2 gene offers some hints concerning the human UbU gene regulation. In addition, we present a polymorphism which is attributable to the altered repeat number of the ubiquitin coding unit as has been similarly observed in the human UbC gene. The biological significance of this common feature to the CHUB2 gene and the human UbC gene will be discussed.

1. はじめに

環境中の様々な要因により DNA には種々の損傷が誘起される。紫外線は主として塩基にシクロブタン型および (6-4) photoproduct 型のピリミジンダイマーを誘起し、発癌物質などの化学薬剤は DNA のアルキル化等付加体を生じたりあるいは鎖間架橋を誘起する。また電離放射線は鎖切断を引き起こす (Fig. 1)。DNA 損傷が致死的でない場合、これに応答して細胞レベルでは損傷の修復、抵抗性の獲得あるいは

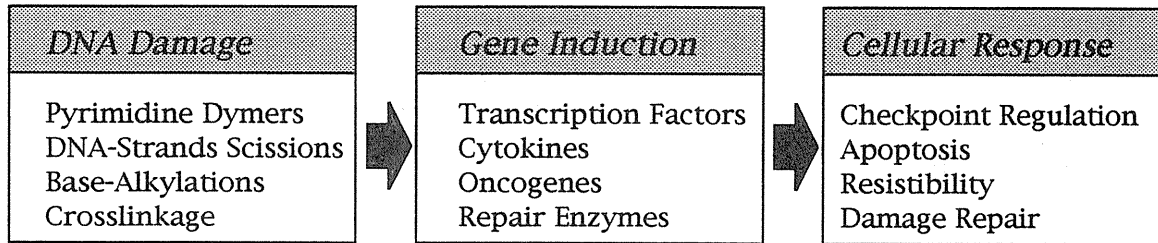


Fig. 1: Genetic and cellular response to DNA damage in mammalian cells.

はチェックポイント制御等のいわゆる適応応答機構が発現することが古くから知られていたが、最近これらの適応応答機構がある特定の遺伝子の活性に依存していることが明らかにされてきている。例えばチェックポイント制御の一つである G1 遅延の発現には癌抑制遺伝子 p53 の活性が必要であることが報告されており^{1), 2)}、また放射線照射後に発現するアポトーシスにはユビキチン遺伝子の誘導が必要であることが示されている³⁾。一方、これとは別に DNA の損傷に応答して転写活性が誘導される遺伝子がここ数年で数多く報告されてきた。これは種々の転写因子やサイトカインおよび癌遺伝子を多く含んでいる。しかしこれらの DNA 損傷誘導遺伝子が細胞レベルの適応応答においてどのような機能を担っているのか、また DNA 損傷に起因してどのようなシグナル伝達経路を介して誘導されるのかなどの点についてはまだまだ理解されていない部分が多い。

2. DNA 損傷誘導遺伝子

DNA 損傷に対する細胞の応答は非常に多くの遺伝子の活性化をとまなう複雑なものである。例えば酵母では全遺伝子の 1% 以上が DNA 損傷誘導性であると言われている⁴⁾。表 1 はこれまで報告されているは乳類の DNA 損傷誘導遺伝子について Fornace⁵⁾ がまとめたものに筆者ら⁶⁾ が検索したいくつかの遺伝子を加えて示した一覧表である。DNA 損傷誘発剤として、紫外線、X 線、DNA アルキル化剤および過酸化水素に分けて示してあるが、大部分の遺伝子の誘導は損傷の種類に特異性を示すことがわかる。またここに示してある遺伝子の中には極く限られた細胞においてしか誘導を示さないものもいくつか含まれている。一見してすぐわかることは、fos、jun、NF κ B 等の転写因子、IL-1 や α -IFN 等のサイトカイン、そしてプロテインキナーゼ C (PKC) や種々の成長因子等、細胞内および細胞間のシグナル伝達に機能する遺伝子が多く誘導されることである。細胞の適応応答に直接関与することが期待される遺伝子としては、放射線抵抗性をもたらすことが知られている癌遺伝子、myc と ras⁷⁾ があり、また β ポリメラーゼ、O6MT および MAG は DNA 損傷の修復酵素である。メタロチオネイン、コラゲナーゼおよび *spr2-1* 遺伝子は PKC を介する転写因子 AP1 の活性化 (PKC-AP1 経路、Fig.2) により誘導を受けていることが明らかにされている遺伝子である^{8), 9), 10), 11)}。

Table 1. DNA-damage-inducible genes identified in mammalian cells. (quoted from ref. 5 and 6)

Gene or gene product	Inducing agents				Gene or gene product	Inducing agents			
	UV	X-ray	Alk	H ₂ O ₂		UV	X-ray	Alk	H ₂ O ₂
<i>c-fos</i>	+	+	+	+	heme oxygenase	+	+		+
<i>c-jun</i>	+	+	+	+	<i>Nmo-1</i>		+	+	
<i>jun-B</i>	+	+		+	metallothioneins	+			
<i>jun-D</i>	+			+	collagenase	+	+	+	
<i>EGR1</i> (Krox24)		+			α tubulin		+		
<i>c-myc</i>	+			+	α β integrin		+		
NF κ B		+			uro-plasminogen activator	+			
<i>c-H-ras</i>	+				tis-plasminogen activator	+	+		
C-5 (trk-2 homologue)	+				omithine decarboxylase	+	+		+
<i>c-src</i>		+			sprI	+			
tumor necrosis factor α		+			sprII	+			
IL-1		+			<i>spr2-1</i>	+			
bFGF	+	+			RP-2, RP-8		+		
EGF receptor	+				<i>Myd118</i>			+	
α -IFN		+			ubiquitin	+	+	+	+
protein kinase C		+			hsp70			+	
HIV-1 LTR	+				hsp27	+		+	
Mo-MuSV LTR	+	+			hsp89 α and β			+	
RaL V	+				<i>grp78</i>			+	
SV40 promoter	+		+						
virus-like 30S element		+							
β -polymerase			+	+					
O6MT	+	+	+						
MAG		+	+						

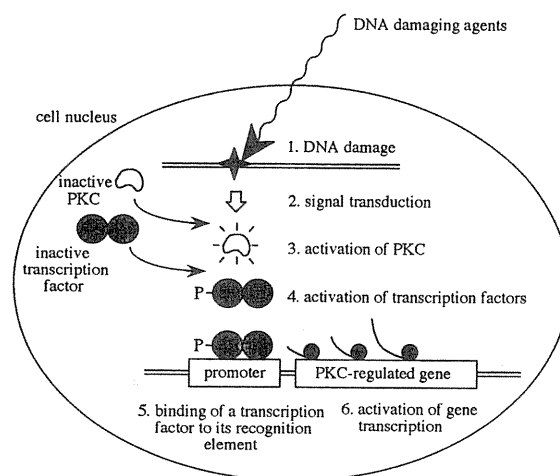


Fig. 2: Schematic representation of the PKC-mediated signal transduction pathway. DNA damage is an initial target for the signaling pathway that results in activation of transcription factors, such as AP1 and NF κ B, and induction of the associated genes.

ユビキチンは酵母において、DNA 損傷を含む様々なストレスに対する細胞の適応応答に際して重要な役割を果たしていることが示されている遺伝子であるが¹²⁾、筆者らはヒトの細胞 (HeLa) を用いてこれが紫外線に反応して誘導されることを示してきた¹³⁾ (Fig.3 (A) および (B))。ヒトには 4 つのユビキチン遺伝子、UbA52、UbA80、UbB および UbC が存在するが (UbA52 遺伝子と UbA80 遺伝子の転写産物はサイズがほとんど同じためアガロースゲルでは分離できず、一本のバンド (UbA) として観察される¹⁴⁾、

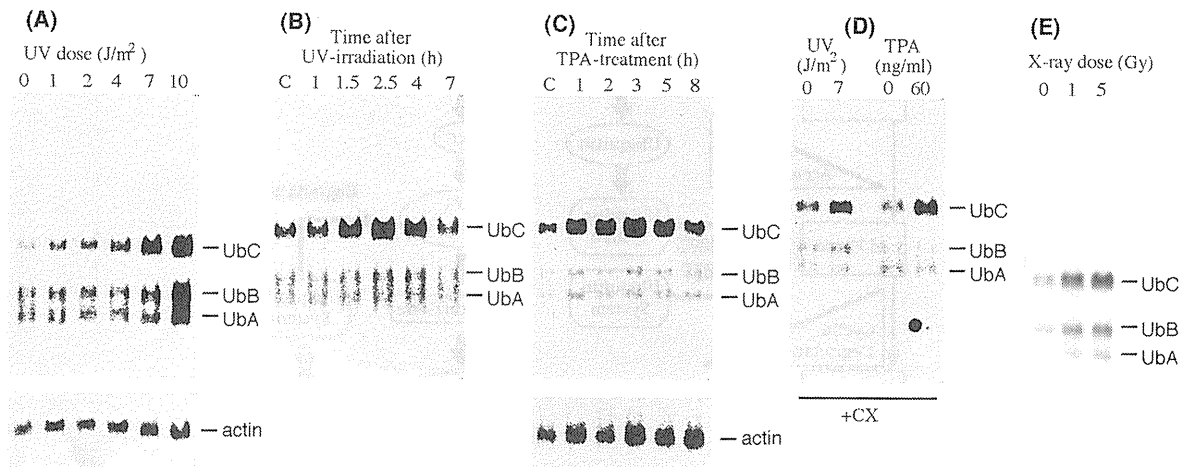


Fig.3: Northern analysis of induced accumulation of the ubiquitin gene transcripts in HeLa cells. (A); Cultures were exposed to 254nm UV light at the indicated doses. RNAs were isolated at 3h after irradiation, and electrophoresed, transferred on nylon membrane followed by hybridization with ubiquitin-specific probe or α -actin-specific probe as a control. (B); Cultures were exposed to 8J/m² of UV light, and subsequently incubated for the indicated time intervals. Then RNAs were isolated, and analyzed as in (A). (C); Cultures were treated with 60ng/ml of TPA for the indicated periods. Then RNAs were isolated, and analyzed as in (A). (D); Cultures were irradiated with UV light or treated with TPA in the presence of 10 μ g/ml of cycloheximide. After 2.5h (UV) or 3h (TPA) of postincubation, RNAs were analyzed as in (A).

これらのうち head to tail に連結した9つのユビキチンタンパク質をコードしているいわゆるポリユビキチン遺伝子UbCが特に紫外線照射により一過性に誘導されるのがわかる。そしてUbC 遺伝子は紫外線だけでなく、ホルボールエステル12-O-tetra-decanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) にも応答して誘導される (Fig.3 (C))。TPA も紫外線と同様に PKC-AP1 経路を活性化するが、その際新規のタンパク質合成を要しないことが知られている¹⁰⁾。UbC 遺伝子の紫外線および TPA による誘導は、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドで予め細胞を処理しておいた場合にも見られており (Fig.3 (D))、筆者らは UbC 遺伝子が PKC-AP1 経路で誘導を受けている可能性を示唆した。

3. ユビキチン

ユビキチンはすべての真核生物に見い出され、アミノ酸配列が進化的に極めて高度に保存されたタンパク質である^{15), 16)}。ユビキチンは細胞周期の間期にヒストン2A の約10%、ヒストン2B の約1%に可逆的に結合してクロマチンの構成部分となっている¹⁷⁾。またユビキチンは短寿命な調節タンパク質等を ATP に依存してリソゾームを介さずに分解するいわゆるユビキチンシステムの主要因子であることが明らかにされている¹⁸⁾。

DNA 損傷に応答して誘導されるユビキチンが、細胞の適応応答に際してどのような機能を果たしているのかという点については現在何もわかっていない。しかしこれまで明らかにされているユビキチンの機能についての知見から、いくつかの可能性が考えられる (Fig.4)。一つは G2 チェックポイント制御への関与である。通常細胞では、G2 期からM期への移行に際してサイクリンの蓄積が見られ、M期からG1 期に移行する時にサイクリンが分解される。G1 期へ移行する際のサイクリンの分解はユビキチンシステムによっていることが明らかにされているが¹⁹⁾、それからの類推で、DNA 損傷により誘導されるユビキチンが G2 期においてサイクリンを分解してM期への移行を遅延させている可能性が考えられる。事

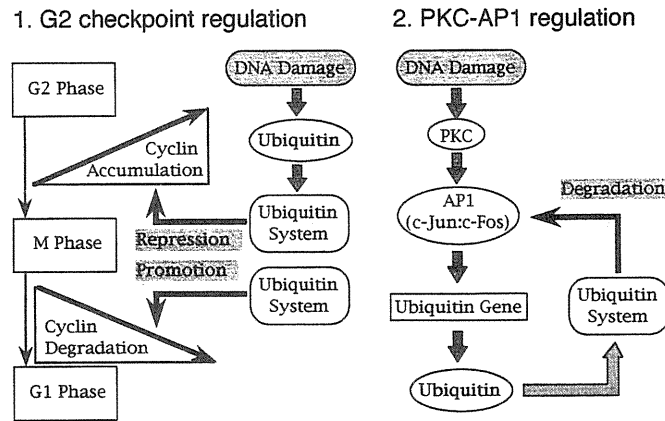


Fig. 4: Schematic representation of potential role of ubiquitin induced by DNA damages.

実、X線照射された HeLa 細胞では G2 期のサイクリンの蓄積が見られないことが報告されている²⁰⁾。もう一つの可能性として考えられることは、PKC-AP1 経路の制御への関与である。転写因子 AP1 は *Jun* と *Fos* のヘテロ 2 量体から構成されているが、これまで *Fos* がユビキチンシステムで分解され得ることが報告されている²¹⁾。従って誘導されたユビキチンは AP1 を分解することによって、細胞内の DNA 損傷が修復された後で速やかに PKC-AP1 経路が OFF になるよう機能している可能性が考えられる。

筆者らは現在ヒトの UbC 遺伝子の 5' 調節領域の構造解析を行いつつある。フットプリンティング法やゲルシフトアッセイ法、CAT アッセイ法などの手法を用いて UbC 遺伝子の誘導を制御している調節エレメントを検出できると考えている。一方これと平行してチャイニーズハムスターのユビキチン遺伝子の構造解析も行ってきた。チャイニーズハムスターには HeLa 細胞と異なり紫外線や TPA によるユビキチン遺伝子の誘導はあまり顕著に見られない。従ってチャイニーズハムスターのユビキチン遺伝子の 5' 調節領域を解析してヒト UbC 遺伝子のそれと比較することにより、UbC 遺伝子の誘導経路について重要な知見が得られるものと考えられる。

4. チャイニーズハムスターポリユビキチン遺伝子

筆者らは V79 チャイニーズハムスター細胞のゲノムライブラリーを作成して、2 個のユビキチン遺伝子、CHUB1 と CHUB2 の塩基配列を決定した (Fig.5)^{22), 23)}。CHUB1 遺伝子は 5 つのユビキチンをコードしているポリユビキチン遺伝子であり、5 番目のユビキチンコーディングユニットの 3' 側に 1 個の A

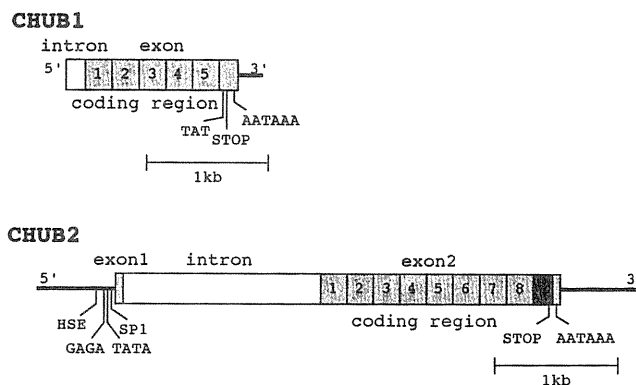


Fig. 5: Overall structure of Chinese hamster polyubiquitin genes, CHUB1 and CHUB2, revealed in ref. 22 and 23.

ミノ酸 (Tyr) をコードするコドン置いてストップコドンが現われる形をしていた。これはほとんどの真核生物で共通に見られる典型的なポリユビキチン遺伝子の構造である。一方 CHUB2 遺伝子も 8 つのユビキチンをコードしているポリユビキチン遺伝子であったが、8 番目のユビキチンコーディングユニットの後ろにはユビキチンとは異なる 161bp の配列が続き、その後始めてストップコドンが現われるという極めて特殊な構造をしていた (Fig.6)。3' 非翻訳領域の塩基配列をヒトのユビキチン遺伝子と比較

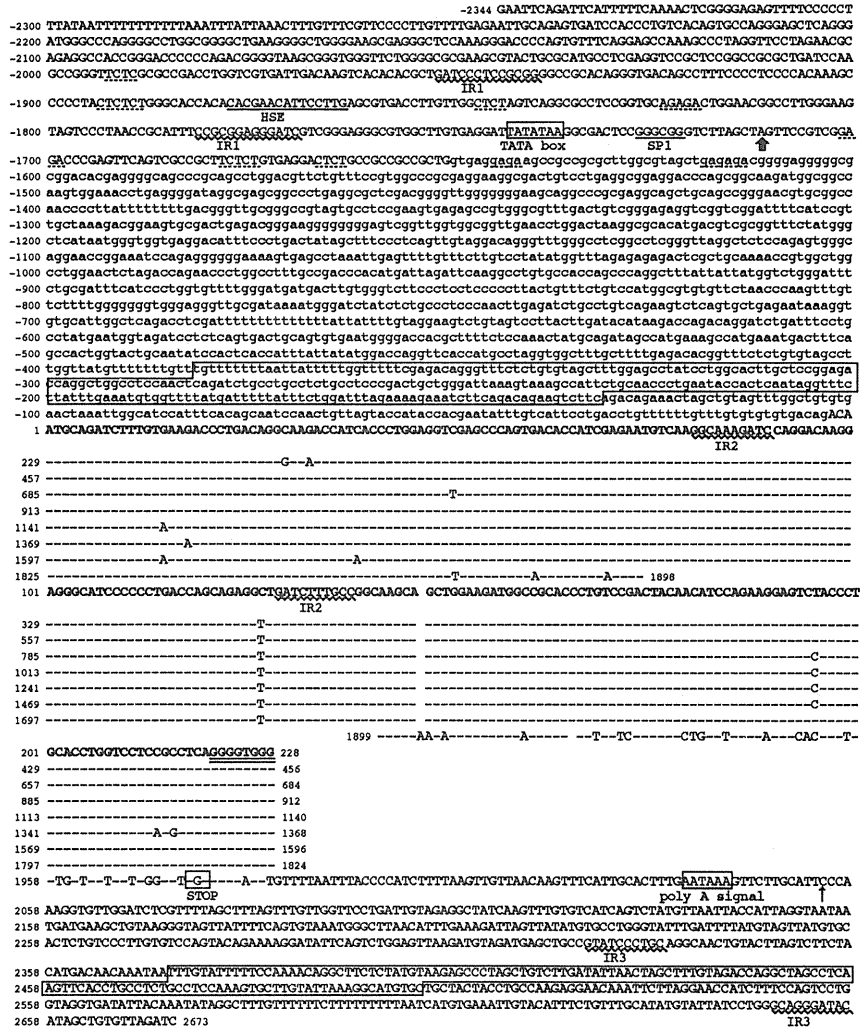


Fig.6: Nucleotide sequence of the V79 Chinese hamster polyubiquitin gene CHUB2. Sequences are numbered from the A of the first ubiquitin initiation codon. Negative numbers are used in the 5' untranslated region. The intron within the 5' untranslated region is typed in lower case. The nucleotide sequence of the first ubiquitin coding unit is given in full with a bold-face, and in the following repeats nucleotide identity with the first unit is indicated by a dash. The ubiquitin-like sequence (1825-1985) that follows the eighth repeat of ubiquitin coding unit is also given in parallel with the ubiquitin coding units to clarify the apparent deletion and mutations. The TATA box (-1743 to -1737), the stop codon (1975-1977) and the polyadenylation signal (2037-2042) are boxed, and the transcriptional initiation site (-1712) and a putative polyadenylation site (2054) are indicated by a thick arrow and a thin arrow, respectively. Regions containing an interspersed element, B1, are outlined. The Spl binding site (-1727 to -1722) and the potentially functional heat shock element (-1878 to -1864) are underlined. The inverted repeats are indicated by a wavy underline, designated as IR1, IR2 and IR3 in pairs. The GAGA sequences, and TCTC sequences as their equivalents, around the TATA box are indicated by a dashed underline. The recombinogenic consensus sequence "GNNGTGGG in the coding region (221-228 in the first coding unit) is doubly underlined.

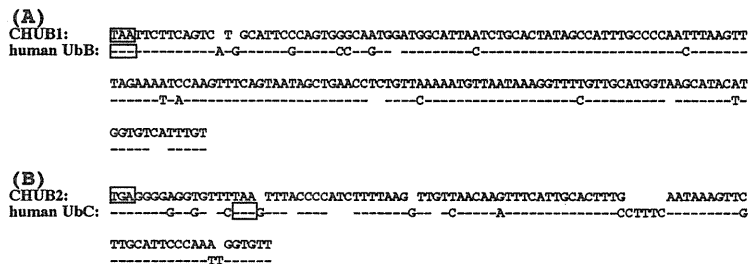


Fig.7: Comparison of the nucleotide sequence in the 3' untranslated region between the CHUB1 gene and the human polyubiquitin gene UbB (A) and between the CHUB2 gene and the human UbC gene (B). The stop codons are boxed. Gaps were introduced to maximize the homology between the compared sequences.

したところ、適当にギャップを導入することにより CHUB1 遺伝子は 3つのユビキチンをコードしているポリユビキチン遺伝子 UbB²⁴⁾ と 165bp 中 147bp で一致しており、CHUB2 遺伝子は UbC 遺伝子と 88bp 中 74bp で一致していることがわかった (Fig.7)。このことは CHUB1 遺伝子が UbB 遺伝子のホモログであり、CHUB2 遺伝子が UbC 遺伝子のホモログであることを示している。従って CHUB2 遺伝子の 5' 調節領域の構造がヒト UbC 遺伝子に保存されていると予想され、UbC 遺伝子の DNA 損傷誘導性に関連して、その構造が特に興味深い。CHUB2 遺伝子の転写開始部位の 25bp 上流に存在している TATA ボックスの周辺には、すぐ下流に Sp1 結合配列²⁵⁾ が、また 135bp 上流には Pelham 配列様の熱ショックエレメント (HSE)²⁶⁾ が存在していた。ヒト UbC 遺伝子もチャイニーズハムスター CHUB2 遺伝子も常時構成的に発現している一方で熱ショック応答性であり、このような性質をこれらの調節因子が付与していると考えられる。また有意に多くの GAGA 配列が TATA ボックスの周辺に見られたが、この配列がストレスに応答した遺伝子の調節に関与しているという報告がある^{27), 28)}。一方 TATA ボックスの周辺に AP1 結合配列¹⁰⁾ (TGA (G/C) TCA) は見当たらなかった。このことはチャイニーズハムスターのユビキチン遺伝子が紫外線や TPA によって顕著に誘導されないことと一致するが、果たしてヒトの UbC 遺伝子に AP1 結合配列が存在するか否かが大変興味深いところであり、現在解析中である。

最後にヒト UbC 遺伝子と共通に見られた CHUB2 遺伝子の特徴について述べる。UbC 遺伝子には、ユビキチンコーディングユニットのリピート数の違いに起因した遺伝的多型性が見られることが報告されているが²⁹⁾、似たような多型性が CHUB2 遺伝子にも観察された。Fig.8 は V79 チャイニーズハムスター細胞から抽出した mRNA を用いたノーザン解析の結果である。ユビキチンの翻訳領域に特異的なプローブ P2 を用いると 4本のバンド (4.2kb、2.6kb、1.8kb、0.6kb) が観察され、V79 細胞には少なくとも 4種のユビキチン遺伝子転写産物が存在していることがわかる。1.8kb の転写産物は CHUB1 遺伝子によってコードされていることがわかっているが²²⁾、CHUB2 遺伝子の非翻訳領域に特異的なプローブ P3、P4 および P1 を用いると 4.2kb と 2.6kb の両方の転写産物とハイブリダイズすることが観察された。さらに詳細に解析した結果、筆者らがクローンした CHUB2 遺伝子は 2.6kb の転写産物をコードしており、4.2kb の転写産物はユビキチンユニットが 5~7 個多い以外は CHUB2 遺伝子とほぼ同一の遺伝子によってコードされていることがわかった。従ってヒト UbC 遺伝子同様、チャイニーズハムスター CHUB2 遺伝子も遺伝的多型性を示すことが予想された。CHUB2 遺伝子とヒト UbC 遺伝子とともにユビキチンユニットのリピート数を容易に変化させ得る構造的機構を備えているように思われる。細胞が様々なストレスに対して適応応答する上でポリユビキチン遺伝子が本質的な機能を担っているということは酵母で示されてい

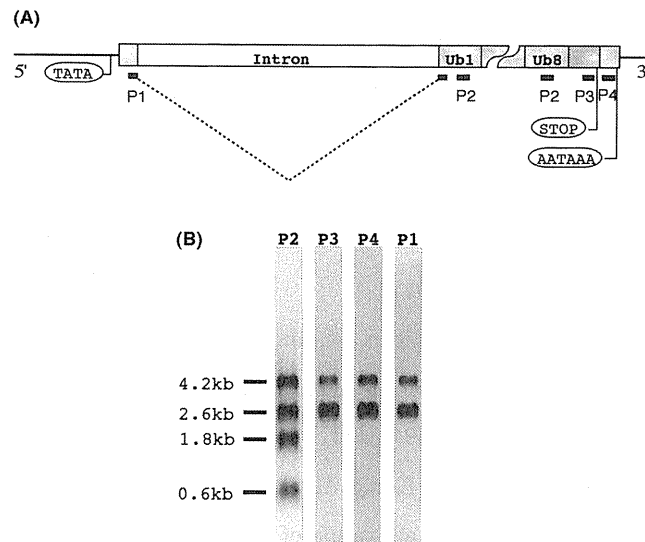


Fig.8: Northern hybridization analysis of poly(A)⁺ RNA from V79 cells. Probes used in this experiment are schematically represented in (A). In (B), RNAs were size-separated by electrophoresis on multiple lanes, and four identical Northern filters were prepared. Filters were hybridized with the oligonucleotide probes specific to ubiquitin coding unit-P2, the highly mutated region in the ubiquitin-like sequence-P3, the 3' untranslated region of the CHUB2 gene that is homologous to the human UbC gene-P4, and a region spanning exon1 to exon2 not including the intron sequence-P1. Sizes were estimated from the 18S and 28S rRNAs of simultaneously run poly(A)⁻ RNA.

る¹²⁾。進化の過程で細胞が新たなストレスにさらされた時、ポリユビキチン遺伝子のユビキチンユニットを増やしていけることがそれに適応するうえで有利に働いているのかも知れない。

5. おわりに

ユビキチンは通常の生理条件のもとでも常時活発に発現しており、タンパク質レベルでも細胞内に多量のユビキチンプールが存在する。従ってDNA損傷存在下で誘導されるユビキチンが果たす役割は、通常の生理状態でユビキチンが果たしている機能を昂進することによって生ずる生理的なバランスの変動に帰せられる微妙な過程であると思われる。DNA損傷に対する細胞の適応応答におけるユビキチンの機能の解明はこれからの重要な研究課題であるが、より慎重な定量的検討が要求されるものと考えられる。

参考文献

- 1) Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Craig, R. W.: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, 51, 6304-6311, 1991.
- 2) Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V. and Kastan, M. B.: Wild-type p53 is cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 7491-7495, 1992.
- 3) Delic, J., Morange, M. and Magdelenat, H.: Ubiquitin pathway involvement in human lymphocyte γ -irradiation-induced apoptosis. *Mol. Cel. Biol.*, 13, 4875-4883, 1993.
- 4) Ruby, S. W. and Szostak, J. W.: Specific *Saccharomyces cerevisiae* genes are expressed in response to DNA-damaging agents. *Mol. Cel. Biol.*, 5, 75-84, 1985.
- 5) Fornace, A. J.: Mammalian genes induced by radiation; Activation of genes associated with growth control. *Annu. Rev. Genet.*, 26, 507-526, 1992.

- 6) 根井充：紫外線によるユビキチン遺伝子発現誘導. 医学のあゆみ, 164, 639, 1993.
- 7) Ling, C. C. and Endlich, B.: Radioresistance induced by oncogenic transformation. *Radiat. Res.*, 120, 267–279, 1989.
- 8) Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. and Karin, M.: Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated *trans*-acting factor. *Cell*, 49, 729–739, 1987.
- 9) Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Steffen, A., Litfin, M. and Herrlich, P.: UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, *c-fos*, and metallothionein. *Mol. Cell Biol.*, 9, 5169–5181, 1989.
- 10) Kramer, M., Stein, B., Mai, S., Kunz, E., Konig, H., Loferer, H., Grunicke, H. H., Ponta, H., Herrlich, P. and Rahmsdorf, H. J.: Radiation-induced activation of transcription factors in mammalian cells. *Radiat. Environ. Biophys.*, 29, 303–313, 1990.
- 11) Gibbs, S., Lohman, F., Teubel, W., Van de Putte, P. and Backendorf, C.: Characterization of the human *spr2* promoter: induction after UV irradiation or TPA treatment and regulation during differentiation of cultured primary keratinocytes. *Nucleic Acids Res.*, 18, 4401–4407, 1990.
- 12) Finley, D., Ozkaynak, E. and Varshavsky, A.: The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperature, starvation, and other stresses. *Cell*, 48, 1035–1046, 1987.
- 13) Nenoï, M.: Induced accumulation of polyubiquitin gene transcripts in HeLa cells after UV-irradiation and TPA-treatment. *Int. J. Radiat. Biol.*, 61, 205–211, 1992.
- 14) Wiborg, O., Pedersen, M. S., Wind, A., Berglund, L. E., Marcker, K. A. and Vuust, J.: The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *EMBO J.*, 4, 755–759, 1985.
- 15) Hershko, A. and Ciechanover, A.: The ubiquitin pathway for the degradation of intracellular proteins. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 33, 19–56, 1986.
- 16) Jentsch, S., Seufert, W. and Hauser, H. P.: Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochim. Biophys. Acta*, 1089, 127–139, 1991.
- 17) Bonner, M. W., Hatch, C. L. and Wu, R. S.: Ubiquitinated histones and chromatin. in *Ubiquitin* (ed. Rechsteiner, M.), Plenum, New York, 1988, pp. 157–172.
- 18) Hershko, A.: Ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Biol. Chem.*, 263, 15237–15240, 1988.
- 19) Glotzer, M., Murray, A. W. and Kirschner, M. W.: Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 349, 132–138, 1991.
- 20) Muschel, R. J., Zhang, H. B., Iliakis, G. and McKenna, W. G.: Cyclin B expression in HeLa cells during the G₂ block induced by ionizing radiation. *Cancer Res.*, 51, 5113–5117, 1991.
- 21) Ciechanover, A., DiGiuseppe, J. A., Bercovich, B., Orian, A., Richter, J. D., Schwartz, A. L. and Brodeur, G. M.: Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 139–143, 1991.
- 22) Nenoï, M., Mita, K. and Ichimura, S.: Evolutionarily conserved structure of the 3' non-translated region of a Chinese hamster polyubiquitin gene. *Biochim. Biophys. Acta*, 1130, 247–252, 1992.

- 23) Nenoï, M., Mita, K., Ichimura, S. and Cartwright, I. L.: Novel structure of a Chinese hamster polyubiquitin gene. *Biochim. Biophys. Acta*, 1204, 271-278, 1994.
- 24) Baker, R. T. and Board, P. G.: The human ubiquitin gene family: structure of a gene and pseudogenes from the UbB subfamily. *Nucleic Acids Res.*, 15, 443-463, 1987.
- 25) Kadonaga, J. T., Carmer, K. R., Masiarz, F. R. and Tjian, R.: Isolation of cDNA encoding transcription factor Spl and function analysis of the DNA binding domain. *Cell*, 51, 1079-1090, 1987.
- 26) Pelham, H. R. B.: A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* HSP 70 heat shock gene. *Cell*, 30, 517-528, 1982.
- 27) Lu, Q., Wallrath, L. L., Allan, B. D., Glaser, R. L., Lis, J. T. and Elgin, S. C. R.: Promoter sequence containing (CT)_n (GA)_n repeats is critical for the formation of the DNaseI hypersensitive sites in the *Drosophila hsp26* gene. *J. Mol. Biol.*, 225, 985-998, 1992.
- 28) Gilmour, D. S., Thomas, G. H. and Elgin, S. C. R.: *Drosophila* nuclear protein binds to regions of alternating C and T residues in gene promoters. *Science*, 245, 1487-1490, 1989.
- 29) Baker, R. T. and Board, P. G.: Unequal crossover generates variation in ubiquitin coding unit number at the human UbC polyubiquitin locus. *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 534-542, 1989.

4. 放射線応答のシグナル伝達路

佐々木 正夫*

Signaling pathway of cellular response to radiation

Masao S. Sasaki

Radiation Biology Center, Kyoto University,
Yoshida-konoecho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

Abstract

Radioadaptive response of cells is the induction of resistance to the moderate or high doses of radiation by previous exposure to low doses (see Ref 1). The underlying mechanisms may have a considerable impact on the cellular defence mechanisms and radiation risk. I now show by chromosome aberration analysis that the cultured mouse cells respond differently to X-ray dose below and above 0.1 Gy; higher dose is not only incapable of inducing adaptation but also rapidly extinguishes the adapted condition already induced by lower doses. Tumor promoter phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and hydrogen peroxide, but not extracellular superoxide, mimicked X-rays in inducing adaptation. The over-exposure to PMA or inhibitors of protein kinase C (PKC) abrogates the adaptive response to X-rays, providing evidence for the involvement of PKC-mediated signaling pathway but distinct in its optimum dose from that for the transcriptional activation of some immediate early response genes (see Ref.3). The radioadaptive response is absent in the tumorigenic variant cells but can be restored when morphologically reverted by introducing human chromosome 11, suggesting altered signaling pathways in tumour cells and downregulation by signaling pathway-specific interference.

はじめに

最近になり、細胞は放射線をシグナルとして受けとめ、多様な生理活性を発現していることが明らかになってきた。放射線に対するこの細胞応答の現象は生物種を越えて認められ、生物進化の過程で保存され

*京都大学放射線生物研究センター (〒606 京都市左京区吉田近衛町)

てきた基本的な生体応答の細胞表現と考えられ、その分子機構の解明と放射線影響の再評価への関心が高まってきている。従来の DNA を標的としたヒット理論に基づく突然変異や発癌の線量効果関係を補完し、微量線量から高線量までを統一的に理解できる可能性も指摘されている。

低線量放射線に対する細胞応答を定量的に解析するのは必ずしも容易でない。そこで、我々は、最近 Olivieri et al.¹⁾ によって見いだされた染色体異常に対する適応的応答の現象を指標として放射線に対する細胞応答の機構を調べてきた。適応的応答とは、微量の放射線で前照射された細胞でその後の高線量放射線照射による染色体異常の形成が低減する現象である。従来の研究は、最初の論文がそうであったように、主としてヒトの培養リンパ球を用い、しかも G₂ 期の染色体異常を対象としてきた。この系では、PHA に対する T 細胞の賦活化の強度差、放射線による細胞周期のずれが定量解析を困難なものとしている。同じことは、対数増殖期にある培養細胞を用いた実験についても言える。事実、適応的応答の個人差や培養条件による差などが指摘されている。従って、この種の研究には、先ず定量解析が可能な実験系の確立が重要である。

1. 実験系の確立

定量解析を可能とするためにマウス細胞を用いた G₁ 期での実験系を確立した。G₁ 期応答はマウス胚由来の初代培養細胞でも観察されるが、安定した実験条件を確保するために樹立株であるマウス m5S 細胞²⁾ を用いた。m5S 細胞は、近 2 倍体の染色体数を保持したまま永久増殖系に入ったユニーク細胞株である。悪性形質へ転換しておらず、細胞増殖に接触阻止が働き、一層の細胞層で G₁ 期に止めることができる。本実験では、接触阻止により G₁ 期にある細胞に、前照射として 0.02Gy の X 線を照射し、その後 3Gy の X 線を照射することによって、3Gy による染色体異常を指標として前照射の効果を検討した。形成される染色体異常は全て定量性の高い染色体型の染色体異常である。

2. 低線量応答の時間経過と線量域

前照射の効果は 1 時間でも観察されるが、6–8 時間で最高に達し約 20 時間継続する (図 1a)。この持続時間は、ヒトのリンパ球などで観察される結果と同じである。また、前照射と後照射の時間間隔を 5 時間に一定し、前照射の線量を変えた場合、適応的応答は 0.01Gy でも観察されるが、0.1Gy では観察されなくなる (図 1b)。細胞が示す適応的応答は 0.1Gy 以下の極低い線量域に限定されていることが分かる。この線量域についても従来の他の系を用いた実験結果と同じである。

3. C キナーゼを介したシグナル伝達

注目すべきことは、この低線量前照射は低濃度の TPA (PMA) で置き換えることができることである。100ng/ml 以下の PMA であれば、低線量放射線による前照射と同じような効果が得られる (図 1c)。この PMA の効果は、PKC の阻害剤である H7 あるいは Calphostin C (UCN) で完全に阻止することができる (図 1c)。また H7 や UCN は低線量放射線による前照射の効果も完全に阻止することができる (図 1b)。このことは、低線量放射線に対する適応的応答に C キナーゼを介したシグナル伝達が関与していることを強く示唆している。

C キナーゼを介したシグナル伝達は、20Gy といった高線量放射線照射による c-jun や EGR1 などの初期応答遺伝子の発現誘導でも指摘されている³⁾。そこで我々は、c-jun の発現を調べた。その結果、

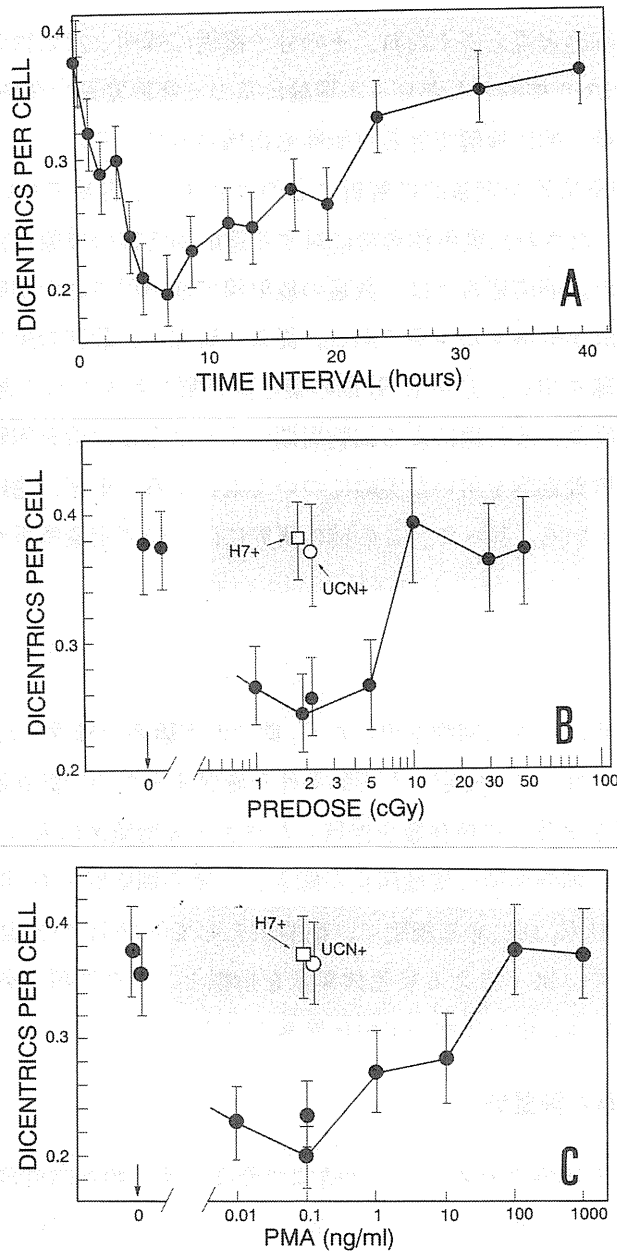


FIG. 1 The effects of pre-treatment on the frequency of dicentrics induced by challenge dose of X-rays (3 Gy) in the quiescent stages of mouse m5S cells. Vertical line shows the standard error of mean (SE). Shaded area is a range of mean \pm SE in cultures exposed to 3 Gy alone. [a], Effect of time intervals between predose (0.02 Gy) and challenge dose (3 Gy) of X-rays. [b], Effects of predose of X-rays (solid circles). [c], Effect of predose of PMA (solid circles). Time intervals between predose and challenge dose (3 Gy) was 5 hours. Open symbols represent the effect of PKC inhibitors, H7 (Seikagaku Kogyo Co., Tokyo) and UCN (Kyowa Medex Co., Tokyo). The inhibitors were dissolved in PBS and a 50 μ l solution was added to 5 ml culture medium 5 minutes prior to pretreatment (0.02Gy X-rays or 0.1 ng/ml PMA) to give a final concentration of 50 μ M H7 and 0.5 μ M UCN.

0.02Gy で c-jun の発現誘導が見られるが、1Gy では発現が誘導されないことが分かった。従って、低線量域と高線量域でのシグナル伝達は共に C キナーゼを介して行われるが、伝達路あるいは第 3 のメッセンジャーに違いがあると考ええる。

4. 高線量によるダウンレギュレーション

0.1Gy 以上の X 線あるいは 100ng/ml 以上の PMA では適応的応答は観察されない。高濃度の PMA で

適応的応答を示さなくなることは、シグナル伝達にダウンレギュレーションが働いていることを示唆している。そこで、0.02GyのX線照射後のいろいろな時間に0.2GyのX線を照射し、その後の3GyのX線による染色体異常の形成率を調べた(図2)。図2からも明らかなように、非適応的線量(0.2Gy)は、適応的線量(0.02Gy)の直後に与えても、また適応的応答が最高に達している時点(指標線量3Gyの30分前)に与えても、適応的応答は完全に阻害されることが分かった。適応的応答の阻害は、非適応的濃度(100ng/ml)のPMAでも同様に起こる。このことは、細胞は0.1Gy以下の放射線と0.1Gy以上の放射線を別の刺激として受けとめ、そのシグナル伝達には相互作用があることを示唆しているが、極めて短時間にダウンレギュレーションが観察されることから、微量放射線に対する適応的応答の機構が、従来から推論されているようなDNA修復遺伝子の発現誘導などではなく、持続性のあるリン酸化など蛋白質の修復である可能性が高いと推論される。

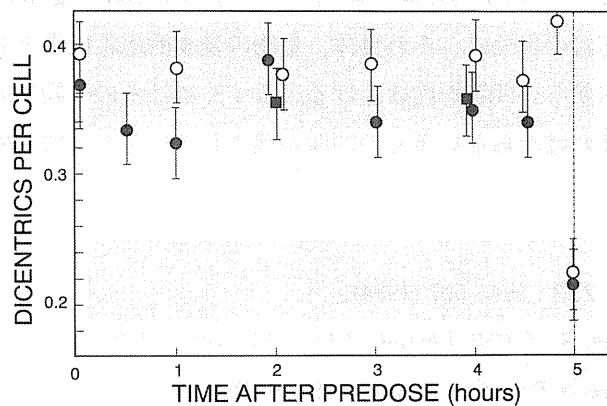


FIG. 2 Effects of non-adaptive doses of X-rays and PMA on the expression of adaptation by priming irradiation. The cultures were exposed to pre-dose of X-rays (0.02 Gy) 5 hours before challenge dose (3 Gy). During the incubation period, cultures were also exposed to 0.2 Gy X-rays (circles) or 100 ng/ml PMA (squares) at an indicated time after priming irradiation. Open circles are the results of separate experiment. Data points at 0 and 5 hours are irradiation with 3.22 and 3.2 Gy single dose, respectively. Shaded areas represent range of aberration yield expected for non-adapted (top) and adapted (bottom) conditions.

5. 悪性転換細胞株における適応的応答の消失

m5S細胞にX線照射をして悪性形質転換をしたクローン(clone-6110)は、近2倍体の染色体数を保持しているが、ヌードマウスに可移植性を示す⁴⁾。この細胞を用いて同様な実験を行った結果、低線量X線あるいは低濃度PMAによる適応的応答は観察されなかった。そこで、この細胞に微小核導入法によってヒトの単一染色体を導入すると、11番染色体を入れた場合にのみ適応的応答を示すようになった。その他の染色体(1番、2番、7番、12番、20番染色体)では適応的応答現象の復帰は認められなかった。11番染色体を導入された細胞は親株のm5S細胞のように細胞形態が扁平に復帰している。適応的応答の復帰ががん形質の消失が直接関係しているか今後確認しなければならないが、がん細胞ではCキナーゼを介したシグナル伝達路が正常細胞と異なることが指摘されており⁵⁾、clone-6110での適応的応答の消失もそのような機構で理解されることが考えられる。

おわりに

細胞が微量放射線から高線量の放射線にいたるまで、放射線を刺激として受けとめ、鋭敏に応答していることは確実である。しかも、その応答は一律でなく、少なくとも微量線量と高線量を別のシグナルとして据えていると考えられる。それぞれの線量域における応答の初期シグナルは何であるか、その初期シグナルに対するセンサーの分子機構、そしてシグナルの伝達の機構と細胞応答など、放射線生物作用の新しい側面が今後の重要な課題として問われている。特に、低線量放射線に応答している細胞では突然変異の単なる軽減のみでなく、突然変異の構造にも変化が及んでいることを示唆する実験結果もある⁶⁾。また、細胞は放射線に反応して多様な生理活性を発現するが、その中に細胞増殖に関する初期応答遺伝子が含まれていることは発がんを考える場合に見逃せない問題である。これまでの放射線影響は、主としてDNAを標的としたヒットと、そこに生じた傷の修復という遺伝子損傷の定量として進められてきたが、ここに述べたような放射線反応の現象は、それ自体、生物の基本的反応機構として興味があるが、同時に放射線影響の理解に対しても新しい問題を投げかける。今すぐにはその生物学的意味を影響評価に定量的に反映するには解明されなければならない多くの問題が残されているが、将来の発展に待ちたい。

参考文献

- 1) Olivieri, G. *et al.*: *Science*, 223 : 594–597 (1984).
- 2) Sasaki, M. S. and Kodama, S.: *J. Cell. Physiol.*, 131 : 114–122 (1987).
- 3) Hallahan, D. E., *et al.*: *Cancer Res.*, 51 : 4565–4569 (1991).
- 4) Kodama, S. and Sasaki, M. S.: *Jpn. J. Cancer Res.*, 78 : 372–381 (1987).
- 5) Franklin, C. C. *et al.*: *Cell Growth Differen.*, 4 : 377–385 (1993).
- 6) Rigaud, O., *et al.*: *Radiation Res.*, 133 : 94–101 (1993).

Ⅲ．特別講演

1．Comparative Mapping of Mouse RLGS Loci in
the Human Genome Verne M. Chapman

2．XPA 遺伝子のターゲッティングにより樹立した
DNA 除去修復欠損マウスの解析 田中亀代次

1 . Comparative Mapping of Mouse RLGs Loci in the Human Genome

Verne M. Chapman*

Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute
Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, USA

Abstract

Comparative genome maps between mammalian species are based largely on the relative location of functional gene sequences. Recent work by several laboratories indicates that the genomic DNA of 23 human autosomes are dispersed across the mouse genome in about 120 separate segments. The size of the conserved regions may vary substantially with some fragments as small as a few hundred kbp and some regions as large as 10s of cM. In addition, the genes of some of the conserved regions may not be strictly coaligned in the separate genetic maps as a consequence of localized intrachromosomal rearrangements that have occurred during the process of evolution of the mouse and the human genomes. The centromeric and distal telomeres of mouse chromosomes may be sites of especially significant rearrangement that reduces the size of homologous segments. We have collaborated in the genetic analysis of mouse restriction landmark genome scanning (RLGS) landmarks with Dr. Hayashizaki's group as a means of identifying loci that are associated with *NotI* sites in CpG islands. More than 1000 RLGs loci have been identified in interspecific backcrosses and RI strain analyses. The genetic analysis of interspecific backcrosses has resulted in a high density of genetic markers on each chromosome that have been ordered in mouse genetic maps using haplotype analyses. A high proportion of these loci represent expressed gene sequences that are conserved between the mouse and human genomes as well as other mammals. Southern analyses of human DNA using either *NotI* boundary or *NotI* linking clones that represent in-

*Department of Molecular and Cellular Biology

dividual mouse RLGS loci readily identify human sequences. Thus, it is possible to use RLGS methodologies to expand and refine the boundaries of comparative maps between the mouse and human genome. The RLGS methodology can be used to identify important features of gene regulation that are correlated with DNA methylation such as changes in gene expression in development, genomic imprinting of specific loci and genomic changes that occur during tumorigenesis. More importantly, it is possible to combine the genetic analysis of the RLGS method with the analysis of functional changes. Cloned probes for these genes can be recovered directly from the two-dimensional profile and these can be used to ask whether homologous human loci can be identified. These approaches have been used to characterize an imprinted gene that maps to mouse chromosome 11. Boundary clones for this locus have been recovered and these have been used to map and characterize human sequences. These have been mapped to the predicted homologous region of human chromosome 5q by somatic cell methods and preliminary work suggests that the human locus may be subject to genomic imprinting as well.

Comparative mapping of the mouse and human genomes.

During the past few years there has been a dramatic increase in the number of loci that are genetically mapped in the mouse genome to more than 3000 loci by the middle of 1993 (Mammalian Genome, vol 4 special issue, 1993). Most of these loci have been mapped using either recombinant inbred (RI) strain analyses or conventional crosses such as backcrosses or intercrosses. In the latter case it has been possible to take advantage of either the well-characterized common inbred strain resources maintained by the Jackson Laboratory or the increased genetic divergence available in *Mus* subspecies or species (Chapman and Nadeau, 1992). The latter have been particularly valuable for the identification of genetic variation associated with functional genes using Southern techniques. Using cDNA probes, it is possible to identify restriction fragment length variation between laboratory strains and divergent species such as *M. spretus* using as few as two or three common restriction endonucleases to cleave genomic DNA. As a consequence, the 3000 loci that have been mapped in the mouse genome include a large number of functional genes that have homologues in the genomes of other mammals. To date, more than 900 of these functional genes have been genetically mapped in a single interspecific backcross at the Frederick Cancer Center (Copeland and Jenkins, 1991 ; Copeland et al., 1993) and many additional crosses have been analyzed for specific chromosomes and chromosome regions.

Because these functional genes are homologous between species, it is possible to ask whether the genetic linkages observed in the mouse have been evolutionarily conserved in other mammals, particularly in the human genome. Using the homologous loci to make comparative maps it is possible to determine the relative proportion of the mouse genome that is identified by these homologous loci and to estimate the number and average size of homologous chromosomal segments. Overall, the 900 homologous genes identify 101 segments of conserved linkage homology that cover as much as 1200 cM of the mouse genome. These mouse chromosomal segments are dispersed in a relatively random

fashion across the human chromosomal maps in a manner that indicates that there were multiple chromosomal rearrangements that occurred in the chromosomal evolution of humans and mice since the time that they diverged from their common ancestor. These rearrangements included translocations, inversions and other complex alterations of chromosomal structures. The average size of the conserved mouse chromosomal segments is about 9.0 cM.

The comparative regions of the mouse chromosomal maps that are present in various human chromosomes is illustrated in a recent publication of the mouse genome maps in *Science* (Copeland et al., 1993). Using these maps it is possible to construct human chromosomal maps that show homologous regions of the mouse chromosomal maps (Figure 1). The human chromosomal maps show the comparable mouse chromosomal regions and the relative orientation of those mouse segments in the human chromosome. These maps can provide the human geneticist a direct indication of homologous mouse genome regions that might carry candidate loci that are responsible for inherited disorders and acquired diseases following somatic mutation. The human-to-mouse homologues represented in this figure should be used in conjunction with the integrated genetic maps of the mouse that are represented in the *Science Genome Maps IV* and with the Chromosome Committee reports that are published in *Mammalian Genome*. These data provide a more comprehensive view of all of the genetic markers that have been mapped in the mouse chromosomal maps including the simple sequence repeats (SSR) loci and loci identified with either anonymous probes or sequence amplification.

Restriction Landmark Genomic Scanning

Our laboratory has collaborated with Dr. Y. Hayashizaki of Gene Bank, RIKEN Human Genome Project to use RLGs as a method for genetic analysis in the mouse. We have used two basic approaches for these analyses, namely the RI strain series BXD and two interspecific backcrosses. Crosses of standard inbred strains with the divergent *Mus* species, *M. spretus* were used for these analyses including (C57BL/6Ros[B] x *M. spretus* [S])F₁ x *M. spretus* (BSS) and (C3H/HeJ [H] x *M. spretus* [S])F₁ x C3H/HeJ (HSH). The BSS cross (N=72) was analyzed with the restriction enzyme combination of *NotI* as the landmark enzyme cleavage that was endlabelled followed by digestion with *PvuII*. resulting *NotI*-*PvuII* fragments were separated by agarose electrophoresis and digested in gel with *PstI*. The resulting mixture of *NotI*-*pvuII* and *NotI*-*PstI* fragments were separated in a second dimension using acrylamide gel electrophoresis. The two-dimensionally separated landmark fragments were identified by autoradiography in the acrylamide slab gels. The HSH cross (N=35) was analyzed with the combination of *NotI*, *EcoRV* and *HinfI* in the same manner. The BXD RI strain series was analyzed with two combinations of restriction enzymes, namely *NotI*, *PvuII*, *PstI* and *NotI*, *EcoRV*, *MboI*. On average the parental strains of the BXD series C57BL/6J and DBA/2J showed 14% variation for spots in the two-dimensional RLGs profiles. In a sample of 378 spots we observed that 51 differed between these strains. By contrast, there was a four-fold increase in the levels of variation that were observed between B6 and *M. spretus*. In a sample of 369 spots there were 188 or 51% that differed between these mice.

Genetic analysis using RI strains is accomplished by determining the strain distribution pattern (SDP)

for a locus and comparing that SDP with SDPs of previously analyzed loci. In the case of RLGS loci, individual B-specific or D-specific spots were identified in the RLGS profiles for each of the BXC RI strains. B-specific spots were either present (B-type) or absent (D-type) while D-specific spots that were either present (D-type) or absent (B-type) were scored in the same manner. We observed 291 segregating spots with the enzyme combination *NotI*, *PvuII*, *PstI* and 196 segregating spots with enzyme combination *NotI*, *EcoRV*, *MboI*. The chromosomal distribution of these loci is summarized in Table 1 and the map assignments of these loci in the mouse genome has been determined using Map Manager© developed by Dr. Kenneth Manly at Roswell Park Cancer Institute (Manly, 1993). The aggregate maps of these loci in the mouse genome is published elsewhere (Hayashizaki et al., in preparation).

Table 1. Summary of the chromosomal distribution of RLGS loci and total loci mapped in two interspecific backcrosses (C57BL/6Ros x *M. spretus*)F1 x *M. spretus* (BSS) and C3H/HeJ x *M. spretus*)F1 x C3H/HeJ (HSH) and in RI strain analysis using two different restriction enzyme combinations (*NotI*, *PvuII*, *PstI* - Combination A) and (*NotI*, *EcoRV*, *MboI* - Combination C).

Chr	BSS			HSH			BXD Analyses Combination			RLGS Loci Mapped
	RLGS	Total	cM	RLGS	Total	cM	A	C	Total	
1	17	21	114	20	24	74	32	14	46	83
2	19	22	94	14	19	54	16	12	28	61
3	9	11	75	21	29	86	16	10	26	56
4	24	25	86	30	35	89	23	22	45	99
5	16	18	71	22	25	86	9	10	19	57
6	10	14	81	20	23	74	16	5	21	51
7	22	23	82	13	16	46	13	14	27	62
8	19	21	79	11	16	74	21	22	43	73
9	19	20	78	14	18	54	13	11	24	57
10	11	12	75	15	17	49	6	3	9	35
11	21	26	81	19	24	60	27	16	43	83
12	12	14	54	15	18	46	19	6	25	52
13	14	17	53	18	22	53	9	7	16	48
14	16	17	50	16	19	74	6	10	16	48
15	8	12	60	12	14	57	8	5	13	33
16	6	9	43	12	16	77	4	2	6	24
17	9	10	49	11	15	34	16	5	21	41
18	6	8	44	10	12	46	6	3	9	25
19	8	9	40	6	8	42	11	8	19	33
X	4	7	72	4	6	29	3	1	4	12
Total	270	316	1381	303	376	1204	274	186	460	1033

The analysis of B-specific RLGS loci has been accomplished in the BSS interspecific backcross. One enzyme combination has been used to date *NotI*, *PvuII*, *PstII* that identified 365 segregating loci in this cross. Of these, 327 loci have been mapped to individual chromosomes using the centromeric heterochromatin differences between *M. spretus* and B6 as a set of primary reference loci that anchor the genetic map of RLGS loci to the proximal centromere of each acrocentric mouse chromosome (Matsuda *et al.* 1993). The resulting genetic map in the BSS cross covers nearly 1400 cM of the mouse genome and contains 1000 recombination events. The chromosomal distribution of these loci is summarized in Table 1 and the genetic maps of for these loci are represented in aggregate genetic maps published elsewhere (Hayashizaki et al. in prep).

The analysis of RLGS loci in the BXD RI strains provides a simple method of identifying the linkage relationships of these loci in the mouse genome. The chromosomal and locus linkage relationships of these loci has been established at very high levels of confidence (greater than 99.9%). The exact order

of the RI strain analyzed RLGS loci is somewhat ambiguous. On average there are four opportunities for recombination between linked genes during the inbreeding process of creating RI strains. Thus, it is possible to obtain what would otherwise be double crossover events that would not occur in a single meiotic event of due to interference. By contrast, the genetic maps derived from the BSS backcross have been established by first, identifying the most stringent linkage association between an RLGS locus and either a specific chromosomal centromere or with another segregating RLGS spot using Map Manager. Second, once a linkage group has been identified with a chromosome, the order of loci on the chromosome was established with the centromeric heterochromatin as the most proximal locus for each chromosome. Map orders were determined by minimizing the number of multiple recombination events across a chromosome and by using maximum likelihood methods for multilocus combinations. The resulting genetic maps have a high probability of representing the best order of loci for genetic maps that span the entire mouse chromosome.

The combined analyses of RI strains and two separate backcrosses has identified than 1000 loci in the mouse genome in less than 6 months of laboratory work. The method is a highly efficient multiplex approach to genetic analysis that can be used to identify and map a large number of additional loci in the mouse genome with a relatively modest amount of expense effort. In addition, the RLGS methods can be used to address important issues of positional cloning and the analysis of complex genetic traits in a rapid and precise manner.

Features of RLGS loci

The method of RLGS method used in these studies employed *NotI* as the landmark site of cleavage and labelling. The use of *NotI* (GC/GGCCGC) is important because the enzyme is methylation sensitive and because these sites are frequently present in CpG islands that are typically associated with expressed genes. In the former case, the methylation of these sites may be an essential part of the regulation of genes during the process of development and they may represent genetic regulation associated with imprinting and gene dosage compensation as in the case of X chromosome inactivation. The association of *NotI* sites with CpG islands of functional gene suggests that these loci will be similar to the functional genes that are identified with cDNA sequences. Thus, the RLGS genetic maps that are based upon *NotI* landmarks a high probability that there will be human homologues for these loci and that there will be a conservation of these sites in comparative regions of the two genomes. Recently, it has become possible to recover the RLGS loci as cloned probes that can be used as reagents for comparative analysis between the genomes. RLGS loci can be recovered by direct spot cloning (Hayashizaki et al., 1993) or indirectly by using *NotI* linking clones that colocalize with RLGS loci in the two-dimensional profiles (Hayashizaki et al., 1992). We have used clones from both sources to address the issues of comparative genetic analysis between the mouse RLGS maps and the human chromosomal maps.

Comparative Genome Analysis Strategies – Sequence analysis

Sequence analysis of *NotI*-boundary spot clones provides a direct method of identifying a gene func-

tion associated with the RLGS clone that can be determined from either nucleic acid or peptide databases. Moreover, this approach establishes a sequence tagged site (STS) for this locus that provides universal access to this locus by other scientists. In those instances when a RLGS *NotI* boundary clones sequence shows a high correspondence to a known gene it is possible to ask whether the corresponding gene has been previously mapped in either the mouse or human genome. Moreover, where an RLGS map location is known, it is possible to ascertain whether the location of the RLGS locus is consistent with the established map location for the functional gene identified.

We examined the partial sequences of 6 *NotI* linking clones in a pilot study to determine whether we could identify expressed sequences from these clones and whether they corresponded to genes in the database. Of the six clones analyzed we observed that two of the clones gave sequences that were homologous to previously characterized gene products (Table 2). Sequences of a third clone showed a lower level of association with a known sequence and two of the clones did not correspond to previously characterized genes. This is a small sample but it demonstrates that it might be possible to identify the sequences of as many as a third to a half of the clones in such a fashion.

Table 2. Characterization of *NotI*-linking clones for housekeeping genes: identification of RFLPs between mouse strains or species using probes in Southern analysis; cross hybridization of mouse clones with human genomic DNA on Southern blots; and identified homologies between the *NotI*-linking clone sequences and Genbank nucleic and protein sequence databases.

Clone	Southern Analysis		Genbank - DNA	Genbank - Peptide	Comments
	RFLP in mouse	human DNA			
C5	?	?	HHCPB41 cDNA similar to Protein Phosphatase 2A (81%)	Human Protein Phosphatase PP2A (84%)	HHPB41 maps to Human Chr 4
C7	?	+	-	-	
C21	?	?	rRNA gene cluster, clone pMEB3 (92%)	-	277 bp internal <i>NotI</i> , fragment missing
C25	<i>PvuII</i> , <i>EcoRI</i>	+	Human mRNA, 64kD autoantigen (66%)	-	
C198	<i>EcoRI</i> , <i>PstI</i> , <i>PvuII</i>	+	-	-	
C255	<i>TaqI</i> , <i>PvuII</i>	+	-	-	

Comparative Genome Analysis Strategies – Somatic genetic analysis

We have also used a *NotI* boundary clone of the imprinted mouse gene, *U2afp1rs* from mouse chromosome 11 (Hayashizaki et al, 1993) to analyze the human genome for the homologous gene. In the first experimental approach we used a series of somatic cell hybrids provided by Dr. Thomas B. Shows to determine the concordant chromosome in the human genome. The RLGS spot clone cross hybridized with human genomic DNA and it was possible to identify a *PstI* restriction fragment difference between the mouse and human genes using Southern analysis. The Sp2-7 subclone identified that were concordant with the segregation of human chromosome 5 in 35 somatic cell hybrids examined (Table 3).

We also examined the cytogenetic localization of the same clone on human metaphase chromosomes using fluorescence in situ hybridization (FISH). In this instance, we were able to demonstrate the localization of fluorescence signals on human chromosome 5q23-31 (date not shown). Thus, the combin-

Table 3. Somatic genetic analysis of Sp2-7 in 35 cell hybrids derived from 18 unrelated human cell lines and 4 mouse host cell lines. The hybrids were characterized by karyotypic analysis and by mapped enzyme markers. The Sp2-7 clone DNA probe was hybridized to Southern blots of Pst I digested DNA from the human-mouse hybrids. The scoring was determined by the presence or absence of human bands in the hybrids on the blots. A 0% discordancy indicates a matched segregation of the DNA probe with a chromosome.

Chromosome	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
Concordant # of hybrids	17	18	22	19	35	14	19	20	17	16	15	21	18	18	21	19	14	19	18	19	20	16	18
Discordant # of hybrids	15	16	11	15	0	21	15	15	19	15	14	17	16	13	16	18	16	17	16	15	18	12	
% discordancy	47	47	33	44	0	60	44	43	47	54	50	40	49	47	38	46	56	46	49	46	43	53	40

ed results of the somatic cell and FISH analyses demonstrate that there are human DNA sequences that hybridize with the mouse boundary clone for the imprinted gene *U2afbp*rs and that they are localized to human chromosome 5. The localization of the FISH signals at human chromosome 5q23-31 is consistent with the predicted conserved homology between the mouse chromosome 11 and human chromosome 5.

Comparative Genome Analysis Strategies - Mouse genetic mapping

Finally, the fine mapping of RLGS loci in the mouse genome provides an important means of defining the relationship of these loci to other functional genes that will be characterized in the physical analysis of the mouse genome. The ordering of RLGS loci in the aggregate genetic maps of the mouse genome provides a more precise location of these loci relative to functional genes. Eventually, the RLGS loci can be directly mapped on the physical maps of the mouse genome by using YAC contigs to analyze RLGS profiles that show identity with progenitor genomic DNA. In the immediate future it will be possible to use a subset of the RLGS probes to map RLGS reference loci in some of the large public backcrosses such as the one at the Jackson Laboratory or that being developed by the European Community Interspecific Backcross (EUCIB). A detailed location of the RLGS loci relative to other reference markers in the mouse genome will provide an increased number of candidate loci for functional loci throughout the genome.

Conclusions

1. RLGS method provide a rapid method of identifying and genetically mapping loci that will be homologous between mouse and human genomes as well as the genomes of other mammals.
 - a) A backcross of 100 progeny can be efficiently analyzed with a new enzyme combination in less than two weeks of laboratory work.
 - b) The resulting genetic maps will be cumulative for a cross providing an average separation of 1 cM and a 95% probability of recombining loci that are 3.0 cM apart across the genome.
 - c) Additional loci such as SSRs can be analyzed in the same backcross to align the RLGS genetic maps with the aggregate genetic maps of the mouse genome.

- d) A selected subset of RLGS loci can be mapped in extended backcrosses under development at JAX and the European backcross to further align RLGS loci in other genetic crosses.
2. Efficient spot cloning strategies have been developed that will allow us to recover and characterize a large number of RLGS loci as *NotI* boundary clones.
- a) These can be sequence analyzed for comparison with DNA and protein databases and for use as STSs in genome analysis.
 - b) Spot clones can be used as hybridization probes for Southern analysis on somatic cell hybrid panels and other genome resources such as high density filters of large insert DNA.
 - c) Spot clones can be used as probes for FISH analysis on metaphase chromosomes.

Acknowledgements

I would like to acknowledge the very important contributions of my collaborators and colleagues. In my laboratory at Roswell Park, Dr. Christoph Plass and Dr. Iveta Kalcheva for comparative mapping of *U2afbp*s. Greg Kohler and Darla Miller for the preparation of the human chromosome showing the mouse genome homologous regions. In the Human Genetics Department, Dr. Thomas Shows, Dr. Sheila Jani-Sait and Roger Eddy, collaborators in the comparative analysis of the U2af locus in the human genome. In the Molecular and Cellular Biology Department, Dr. Rosemary Elliott and Dr. Kenneth Manly genetic analysis of RLGS loci in the mouse genome.

A very special acknowledgment of my interaction with several scientists in Japan: Dr. Yoshihide Hayashizaki and group (Gene Bank, The Institute of Physical and Chemical Research [RIKEN], Tsukuba, Japan) for their indispensable work on the analysis of RLGS of the mouse and for the characterization of the imprinted gene used in these analyses. Dr. Jun Kawai (Shionogi Research Laboratories, Japan) for the sharing of *NotI* linking clones that were used for sequence analysis in these studies. Dr. Yoichi Matsuda (National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Japan) for the cytogenetic analysis of interspecific backcross centromeric loci.

This work was supported in part by U.S. Public Health Service Grants HG00170 and GM33160 to Dr. Verne M. Chapman and by the New York State Department of Health, Albany, NY.

References

- Chapman, V.M. AND Nadeau, J.H. The mouse genome: an overview, *Current Opinions in Genetics and Development* 2, 406–411, 1992.
- Chromosome Coordinating Meeting (1992); Cuticchia AJ, Pearson PL, Klinger HP (eds): *Genome Priority Reports*, vol. 1, Basel, Karger, pp. 761–779, 1993.
- Coopeland, N.G. and Jenkins, N.A. Development and applications of a molecular genetic linkage map of the mouse genome. *Trends in Genetics* 7, 113–118, 1991.
- Copeland, N. G. Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Epping, J.T., Maltais, L.J., Miller, J.C., Dietrich, W.F., Weaver, A., Lincoln, S.E., Steen, R.G., Stein, L.D., Nadeau, J.H. and Lander, E.S. A genetic linkage map

of the mouse: Current applications and future prospects. *Science* 262, 57-66, 1993.

Hayashizaki et al., in preparation

Hayashizaki, Y. Hirotsune S., Hatada, I., Tamatsukuri, S., Miyamoto, C., Furuichi, Y. and Mukai, T. A new method for constructing *NotI* linking and boundary libraries using a restriction trapper. *Genomics* 14, 733--739, 1992.

Hayashizaki, Y., Hirotsune, S., Okazaki, Y., Hatada, I., Shibata, H., Kawai, J., Hirose, K., Watanabe, S., Fushiki, S., Wada, S., Sugimoto, T., Kobayakawa, K., Kawara, T., Sibuya, T. and Mukai, T. Restriction landmark genomic scanning method and its various applications. *Electrophoresis* 14, 251-258, 1993.

Hayashizaki, Y. Shibata, H., Hirotsune, S., Sugino, H., Okazaki, Y., Sasaki, N., Hirose, K., Imoto, H., Okuizumi, H., Muramatsu, M., Komatsubara, H., Shiroishi, T., Moriwaki, K., Katsuki, M., Identification and characterization of an imprinted *U2af³⁵* related gene on mouse chromosome 11 detected by efficient genomic screening using Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS-M). *Nature Genetics*, in press, 1993b.

Mammalian Genome, vol 4 Special Issue, 1993

Manly, K.F. A Macintosh program for storage and analysis of experimental genetic mapping data. *Mammal. Genome* 4 : 303-313, 1993

Matsuda, Y., Manly, K.F. and Chapman, V.M. In situ analysis of centromere segregation in C57BL/6 x *Mus spretus* interspecific backcrosses. *Mammalian Genome* 4, 475-480, 1993.

NIH/CEPH Collaborative Mapping Group. A comprehensive genetic linkage map of the Human Genome. *Science* 258, 67-86, 1992.

Figure 1. Diagrammatic representation of human chromosomes showing the regions of mouse chromosomes that are evolutionarily conserved. The loci in these diagrams are compiled from previously published mapping data from Copeland, *et al* and from the *Chromosome Coordinating Meeting* (1992). The human chromosome diagrams were downloaded and printed from the internet. They came from David Adler in the Dept. of Pathology, University of Washington. The loci were ordered on human chromosomes following the best available cytogenetic and map information. The chromosomal location of human loci is shown beside the human chromosome. In those cases where the human chromosomal order is not available we assumed a human order of genes from the mouse genetic map orders. Therefore blocks of loci are grouped and may be inverted from strict mouse order to best fit human order. The diagrams on the far right hand side are representative of the mouse chromosomal block of loci that are conserved on the human chromosome. The mouse chromosomal identity of the homologous blocks are indicated within the diagram and the mouse loci within the conserved region are listed in genetic map order on the side of diagram. The arrows denote the direction (from the centromere toward the telomere) the loci are ordered in the mouse. Dashed lines indicate a discontinuity in the human chromosome order from that observed in the mouse genetic map, but not a change in mouse chromosome.

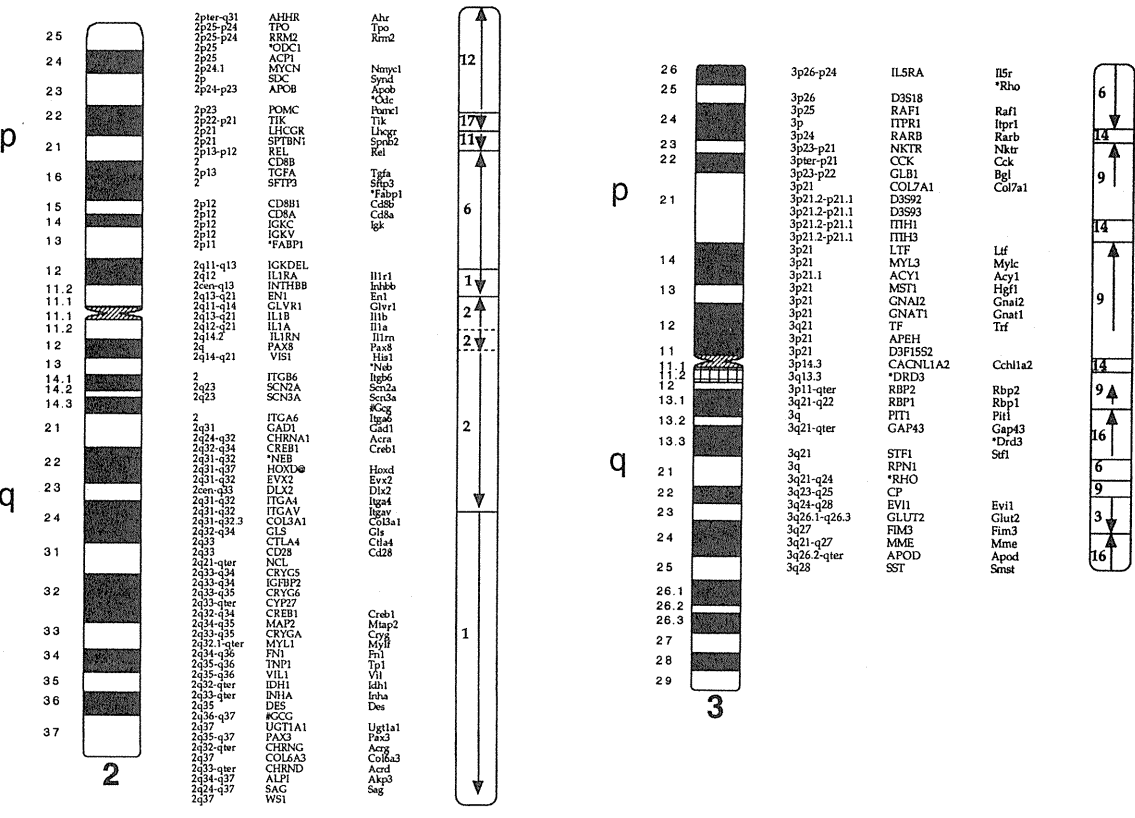
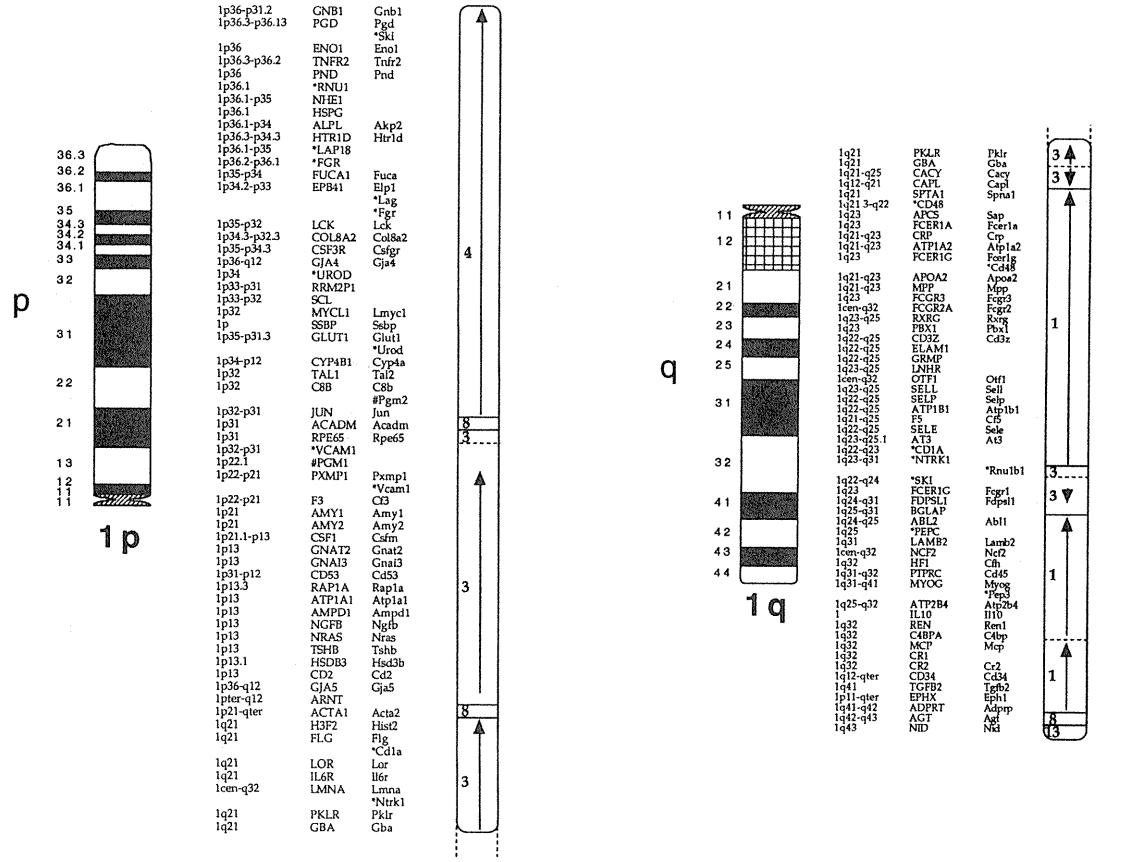
Two kinds of individual locus linkage discordancies were observed:

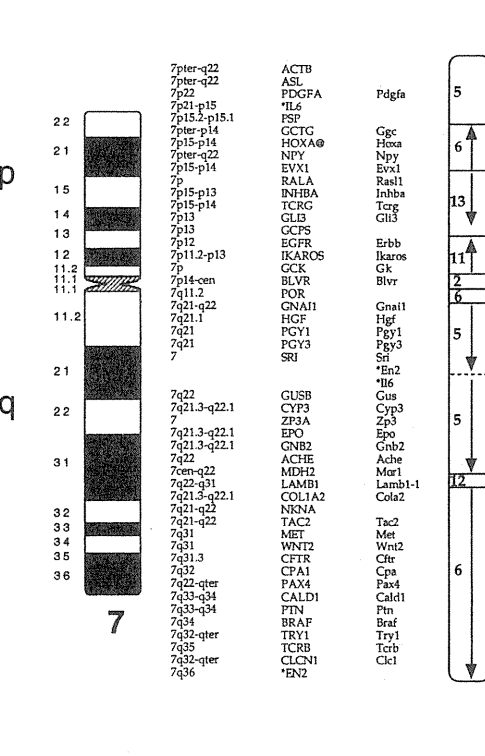
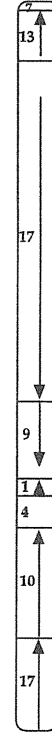
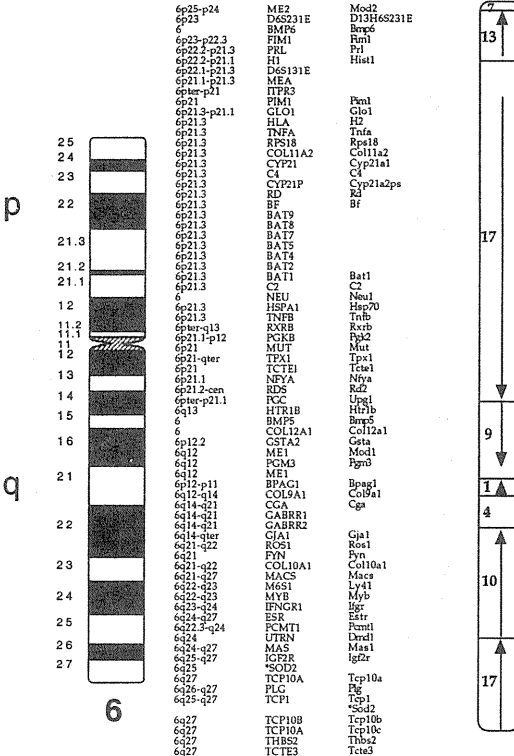
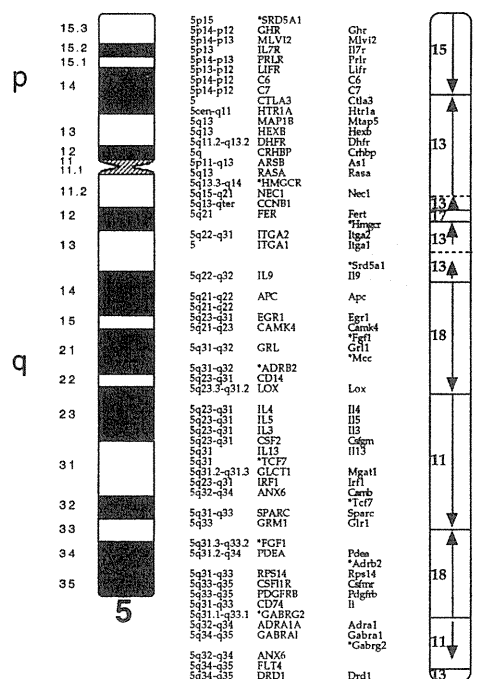
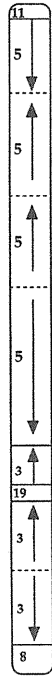
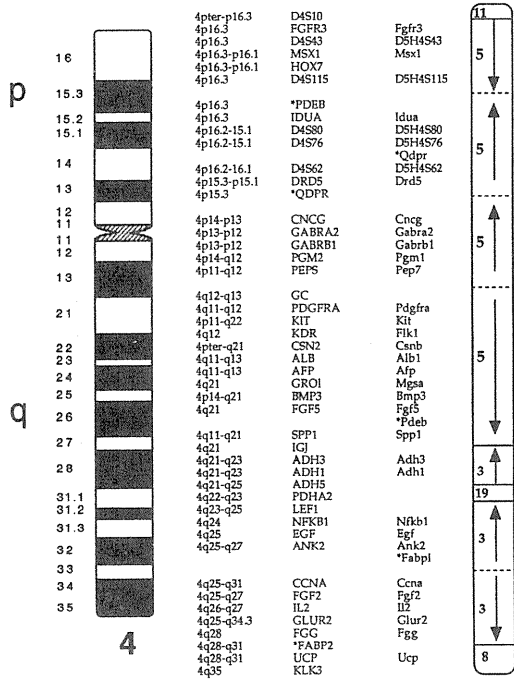
*1) Human and mouse synteny are preserved, but apparent orders differ. For example, UROD maps to human 1p34 between loci that map to mouse chromosome 4. However, the mouse Urod gene maps to a separate grouping of mouse chromosome 4 loci.

#2) Human and mouse synteny are not conserved. For example, human PGM1 maps with a group of loci that have homologous loci on mouse chromosome 3. However, Pgm2 maps to mouse chromosome 4, but within a group of loci that also map to human chromosome 1.

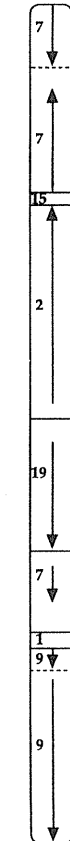
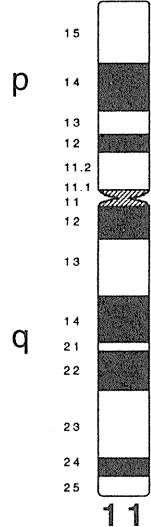
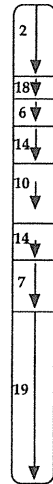
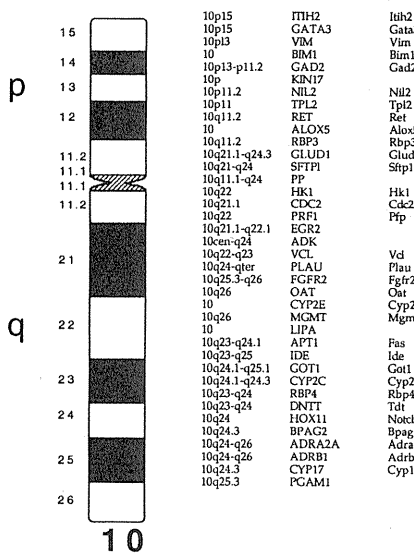
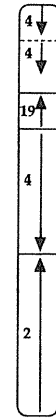
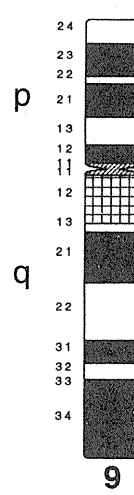
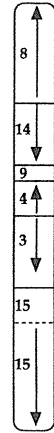
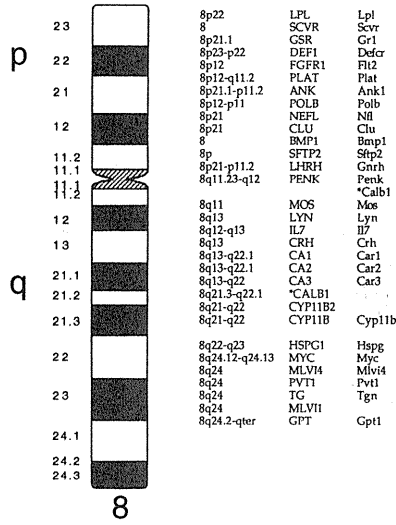
The comparative representation shown in this figure includes only a sampling of the total loci that have been mapped in the mouse. The relative positions of mouse-specific loci such as the simple sequence repeat (SSR) loci can be determined from the Chromosome Committee Reports, Volume 4, Special Issue of Mammalian Genome. Similarly, it is possible to identify the relative map orders of several of several of the mouse mutations and to identify the conserved region the human genome for the mutant chromosomal region.

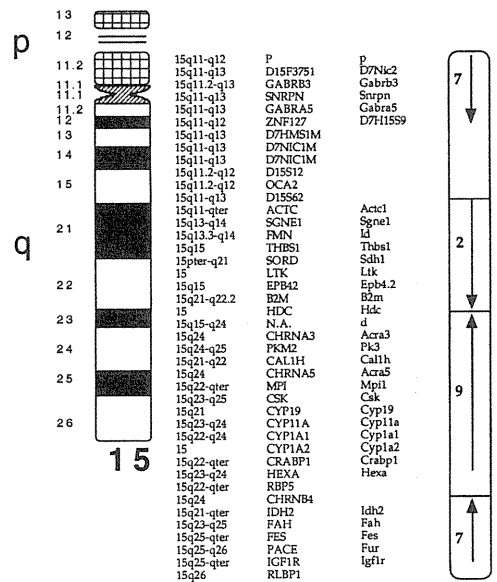
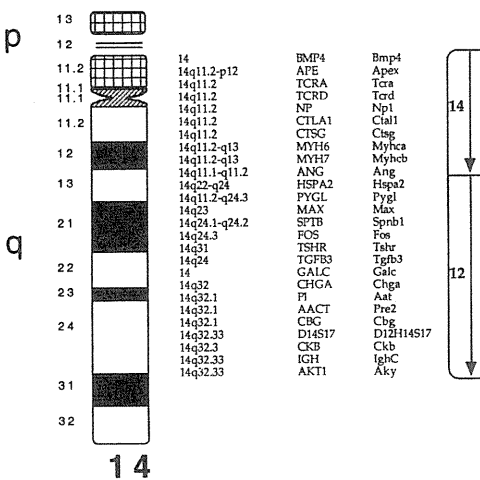
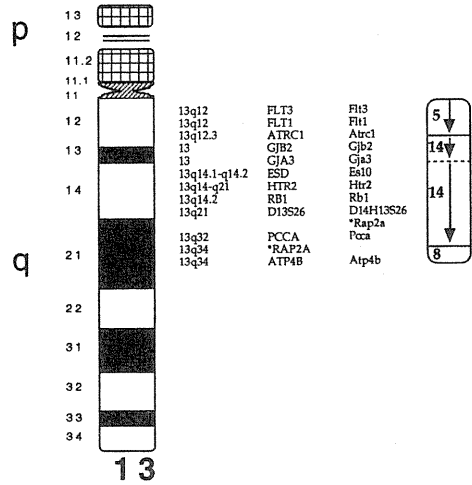
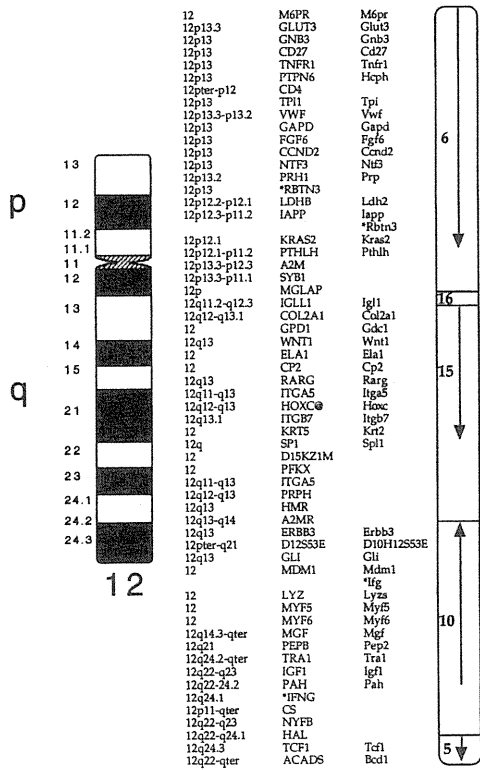
III - 1 Comparative Mapping of Mouse RLGS Loci in the Human Genome



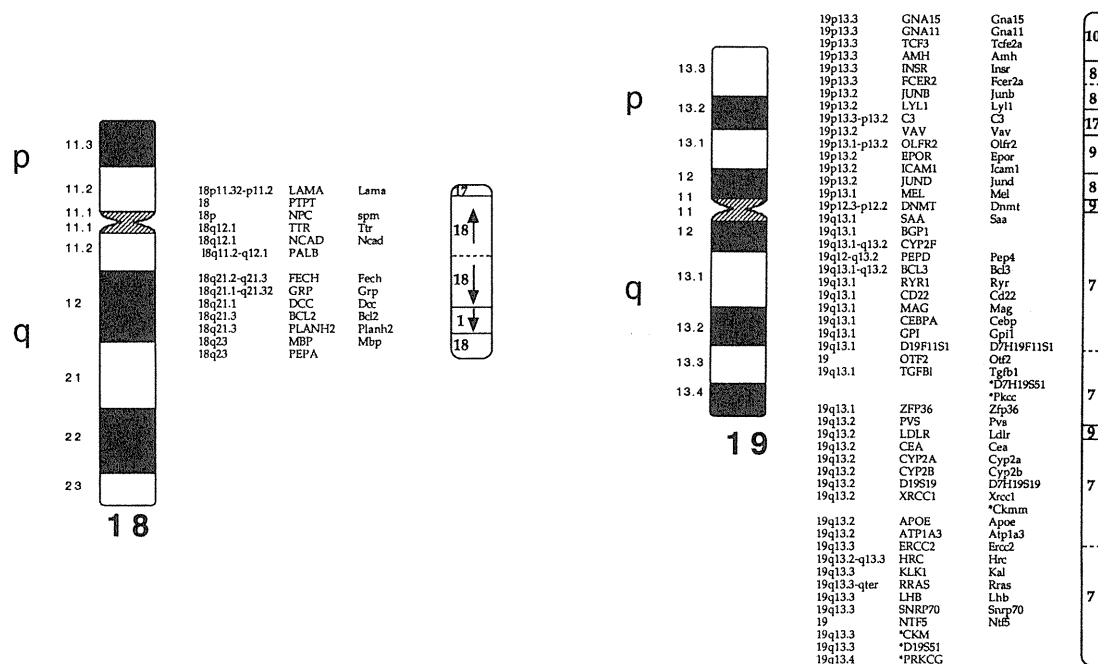
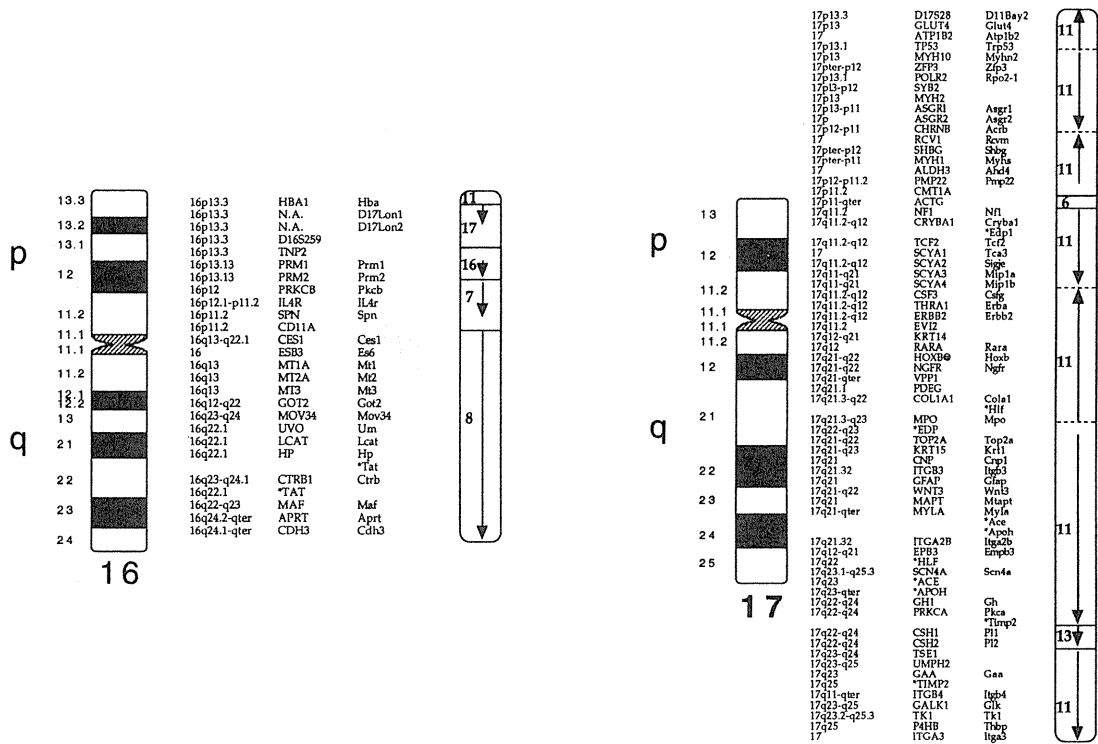


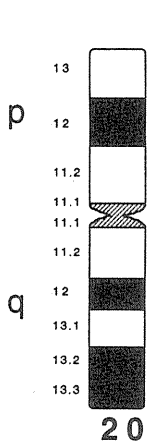
III - 1 Comparative Mapping of Mouse RLGs Loci in the Human Genome





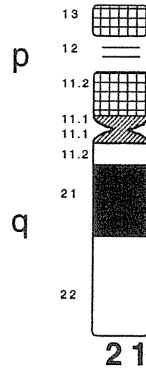
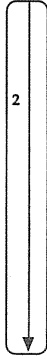
III - 1 Comparative Mapping of Mouse RLGS Loci in the Human Genome





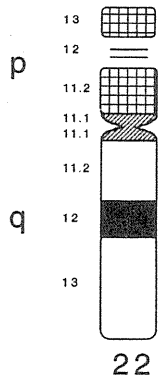
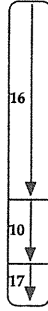
20pter-p12 PDYN
 20pter-p12 PPRNP
 20 SNRPB
 20p13 AVP
 20p13 OXT
 20p Oxt
 20p ITPA
 20pter-p12 PCNA
 20pter-p12 CHGB
 20pter-p12 SCG1
 20p12 BMP2
 20p11.2 NEC2
 20p11.2 FAX1
 20p12-cen THBD
 20p PYGB
 20q11-q12 HCK
 20p12 or 20q11.2-q12 GHRH
 20cen-q13.1 AHCY
 20q11.2-q13 SRC
 20q12-q13 RPN2
 20q12-q13.1 TOP1
 20q12-q13.1 PLC1
 20q12-q13.1 SEMG1
 20q12-q13.1 SEMG2
 20q12-q13.1 ADA
 20q13.1 CEBPB
 20q13.31 FCK1
 20q13.2-q13.3 GNAS1
 20 CHRNAS4

Pdyn
 Frn
 Strrb
 Avp
 Oxt
 Itp
 Pdna
 Chgb
 Bmp2
 Nec2
 Fax1
 Thbd
 Pygb
 Hck
 Ghf
 Ahcy
 Src
 Rpn2
 Top1
 Plg1
 Ada
 Cebpb
 Fck1
 Gnas
 Acr4



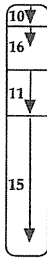
21q11 D21S16
 21q11 D21S52
 21q21.2 APP
 21q21.1-q22.1 GLUR5
 21q22.1 SOD1
 21q22.1-q22.2 D21S58
 21q22.1 GART
 21q22.1 IFNAR
 21q22.1 SON
 21 CBR
 21 PCP4
 21q22.3 ERG
 21q22.3 ETS2
 21q22.3 MXI
 21q22.3 MX2
 21q22.3 HMGA1
 21q22.3 COL6A1
 21q22.3 COL6A2
 21q22.3 S100B
 21q22.3 ITGB2
 21q22.3 PFKL
 21q22.3 CBS
 21q22.3 CRYAA
 21q22.3 D21S56

D16H21S16
 D16H21S52
 App
 Glur5
 Sod1
 D16H21S58
 Gart
 Ifc
 Son
 Cbr
 Pcp4
 Erg
 Ets2
 Mx1
 Mx2
 Hmg14
 Col6a1
 Col6a2
 S100b
 Itgb2
 Pfk1
 Cbs
 Crya1
 D17H21S56



22q11 BCR
 22q11.1-q11.2 GNAZ
 22q11.1-q11.2 IGLB
 22q11.1-q11.2 COMT
 22q11.21 VPREB1
 22q12 CAMK2B
 22q11.1-q13.1 LIF
 22q TCN2
 22q12.1-q13.1 NEFH
 22q13 IL2RB
 22q12-q13.1 LGALS1
 22q12.3-q13.1 PDGFB
 22q12.3-q13.1 MYH9
 22q12-q13.1 PVALB
 22q13.31-qter BZRP
 22q13.31-qter DJA1
 22q11.2-qter CYP2D
 22q13-qter ACIR
 22q13 ECCF1
 22q13.31-qter ARSA

Bcr
 Gnaz
 Igl
 Comt
 Camk2b
 Lif
 Tcn2
 Nfh
 Il2rb
 Lgals1
 Pdgfb
 Myh9
 Pva
 Bzrp
 Dia1
 Cyp2d
 Acr
 Pdgfc



2. XPA 遺伝子のターゲティングにより樹立した DNA 除去修復欠損マウスの解析

田 中 亀代次*

Analysis of a DNA excision repair-deficient mouse established by a targeting of the XPA gene

Kiyoji Tanaka

Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University

1-3 Yamada-oka, Suita, Osaka, 565 Japan

Abstract

Xeroderma pigmentosum (XP) is an autosomal recessive disease clinically characterized by a high incidence of skin cancer on sun-exposed areas and neurological complications. XP cells are hypersensitive to killing by ultraviolet light (UV) and other DNA damaging agents because of a defect in DNA excision repair. There are seven genetic complementation groups in XP, designated groups A through G. So far, groups A, B, C, D and G XP genes have been cloned. We cloned group A XP gene (XPA gene). XPA gene encodes a protein consisting of 273 amino acids with zinc-finger motifs. We showed that the XPA protein plays an important role in the recognition DNA damages during DNA excision repair process. However, we thought that the XPA protein may have important DNA repair function other than DNA damage recognition. We found that a truncated XPA protein with ⁴⁹Serine-²³⁵tryptophan amino acids retained a native DNA binding activity. N-terminal portion of the XPA protein contains nuclear localization signal and C-terminal portion is well conserved among XPA gene homologs. We speculated that the C-terminal portion of the XPA protein may have an ability to bind other proteins during DNA excision repair processes in vivo. Actually, we found that the XPA protein bound several proteins in vitro. These include PCNA, ERCC1 and XPB proteins which are known to be involved in the DNA excision repair. The interactions of the XPA protein with such proteins may be crucial in DNA excision repair in vivo. We found several types of mutations of the XPA gene in group A XP patients, suggesting the XPA gene is a causative gene of

*大阪大学細胞生体工学センター（大阪府吹田市山田丘1-3）

group A XP. In order to understand the pathogenesis of cancer-proneness and neurological complications in group A XP, we then proceeded to create a XPA-knocked out mouse by a gene targeting method in mouse ES cells. Fibroblasts from XPA-deficient mouse were hypersensitive to killing by UV and deficient in DNA excision repair. The mice developed papillomas more frequently and easily than normal mice after the treatment with DMBA which forms bulky DNA adducts. These results indicate that XPA-deficient mouse is a good animal model that reproduces at least cancer-proneness of XP.

緒言

生物が持つ遺伝情報 DNA は、絶えず細胞内部あるいは外部からの諸因子により傷害を受けている。生物はこれらの傷害を修復し DNA の情報を維持するために、種々の DNA 修復系を進化の過程で獲得してきた。DNA 修復に異常を持つ常染色体性劣性遺伝疾患、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum; XP) の患者が、日光に含まれる紫外線 (ultraviolet light; UV) により皮膚癌を多発し、精神発達遅延、小頭症、神経原性難聴等の種々の精神神経症状を合併する事からも、生命の正常な営みには DNA 修復が必須である事が示唆される。XP には A から G までの 7 つの遺伝的相補性群が存在する。そのいずれもが、DNA 除去修復過程の初期段階、すなわち、DNA 傷害を認識し、その近傍の両側で DNA 一本鎖切断をおこし、傷害部位を含むオリゴヌクレオチドを切り出す段階に異常を持つ。これまでに、A, B, C, D, G 群 XP 遺伝子がクローニングされた (XP, XPB, XPC, XPD, XPG 遺伝子)¹⁾⁻⁶⁾。さらに、XP 細胞と同様の UV 高感受性変異細胞が CHO 細胞等から多数分離され、11 個の遺伝的相補性群が存在する。その内の 5 つの相補性群の原因遺伝子がクローニングされ、ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC5, ERCC6 と名付けられた。そして、XPB=ERCC3, XPD=ERCC2, XPG=ERCC5 である事がわかった。XPB, XPD, ERCC6 は、DNA/RNA ヘリカーゼ活性を持つ事が cDNA の解析から予想されている。我々は、XPA 遺伝子をクローニングし、それが 273 個のアミノ酸からなり、C4 タイプの Zn フィンガーモチーフを持つ親水性蛋白をコードする事を明らかにした。一方、DNA 修復に関わる遺伝子は、酵母からヒトまでよく保存されているが、ERCC1 の酵母ホモログである RAD10 は RAD1 蛋白と強固な複合体を形成し、この蛋白複合体は一本鎖 DNA 特異的エンドヌクレアーゼ活性を持つようになる⁷⁾。ヒトでも RAD1 ホモログが存在するはずであり、その解析はヒトの除去修復の初期ステップを解明する上で大変重要だが、まだクローニングされていない。又、RAD10/RAD1 エンドヌクレアーゼは UV 傷害 DNA に対する特異性を持たない事も知られている。おそらく、RAD10/RAD1 ヒトホモログエンドヌクレアーゼは、XPA 蛋白等の傷害 DNA を認識できる蛋白と複合体を形成する事で、その特異性が出現するものと思われる。他方、XPB 蛋白は、基礎的転写因子 BTF2 (TFIIH) と同一である事が明らかになった⁸⁾。XPB 蛋白は、除去修復と転写と言う 2 つの事なる機構に独立して働くのか、あるいは、除去修復と転写には同一の機構 (DNA を巻き戻し、一本鎖 DNA とする) が働くのか、いずれにせよ、DNA 修復と転写との密接な関連が示唆され大変興味深い。BTF2 (TFIIH) は、転写過程において RNA ポリメラーゼ II や他の転写因子と複合体を形成する事が知られているが、XPB (BTF2) 蛋白が、転写や除去修復過程において、実際どのような蛋白と複合体を形成するのか?、XPA 蛋白や ERCC 蛋白とも複合体を形成するのか? 転写と修復ではそのパートナーが異なるのか同じか? 等を明らかにする事が重要である。この様に、ヒトの DNA 除去修復機構の解明には、傷害 DNA と修復蛋白間、修復蛋白と蛋白間の相互作用の解明がキーポイントに

なる。一方、マウス ES 細胞の遺伝子ターゲティング法により任意の遺伝子を破壊したマウスを作る事が可能になった。XP 遺伝子を破壊したマウスが樹立できれば、XP 遺伝子の *in vivo* での機能を解析出来ると共に、XP の病態を詳しく調べる事が出来、又、将来の XP の遺伝子治療の研究にも有用であろう。本講演では、XPA 遺伝子の DNA 修復機能の *in vitro* での解析と共に、遺伝子ターゲティング法により XPA 遺伝子を破壊した DNA 修復欠損マウスの樹立とその解析について我々のデータを紹介し、DNA 除去修復機構の一端を概説したい。

XPA 遺伝子のクローニングと cDNA の解析

XPA 遺伝子のクローニングはいわゆる functional cloning 法により行った¹⁾⁹⁾。即ち、紫外線 (ultraviolet light; UV) に高感受性を示す A 群 XP 細胞に、正常マウスのゲノム DNA を磷酸カルシウム法でトランスフェクションし、UV に抵抗性の XP トランスフェクタントを得て、そこから、マウス繰り返し配列 (R, Bam5, MIF, B1) をプローブにして、形質転換遺伝子 (DNA 修復遺伝子) をクローニングした。対応するマウス、ヒトの cDNA もクローニングした。この cDNA を XP 細胞にトランスフェクションし発現させると、A 群であればいずれの XP 細胞でもその DNA 修復機能を回復させる事が出来るが、他の相補性群 XP 細胞には無効であった。ヒト XPA 遺伝子は 9 番染色体 (9q34.1) に、マウス XPA 遺伝子は 4 番染色体 (4C2) にマップされた。ヒト XPAcDNA は、273個のアミノ酸残基からなる推定分子量 31KDa の親水性蛋白質をコードする。そして、C4 タイプ、H2C2 タイプの Zn フィンガーモチーフを持つ事が明らかになり (図 1)、したがって、XPA 蛋白は DNA 結合能を持つ事が予測された。

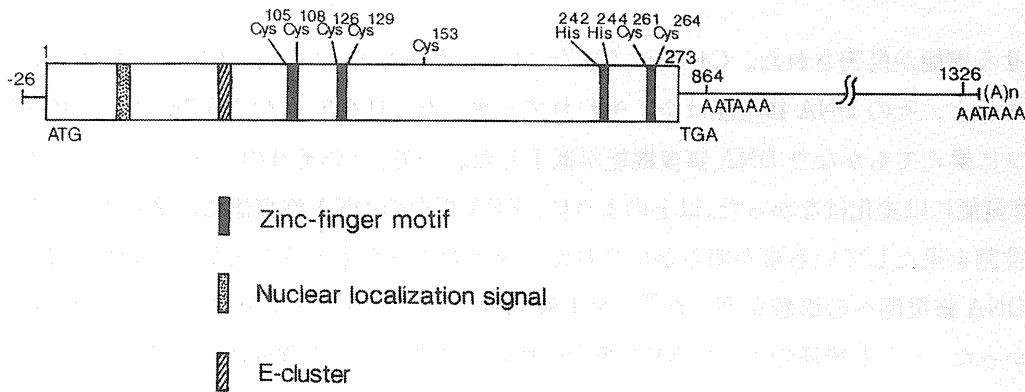


Fig. 1 Structure of the XPA cDNA.

部位特異的変異導入法による XPA 遺伝子の DNA 修復機能の解析

XPA 遺伝子の DNA 修復機能に Zn フィンガーモチーフが重要である事を明らかにするため、部位特異的変異導入法により、Zn フィンガーモチーフを構成するシステインをそれぞれセリンに置換した変異 XPAcDNA を作り、それを A 群 XP 細胞にトランスフェクションし発現させ、それぞれのトランスフェクタントの UV 感受性を調べた¹⁰⁾ (図 2)。XPA 蛋白は 7 つのシステインを有し、そのうちの 4 つは C4 タイプ Zn フィンガーを、2 つは C 末端部で H2C2 の Zn フィンガーモチーフを構成する。もう一つの 153 番目システインは Zn フィンガーの構成に関与しないと考えられる。C4 タイプ Zn フィンガーのいずれのシステインをセリンに換えても、UV 生存曲線でみる限り、かなり強く、A 群 XP 細胞の DNA 修復

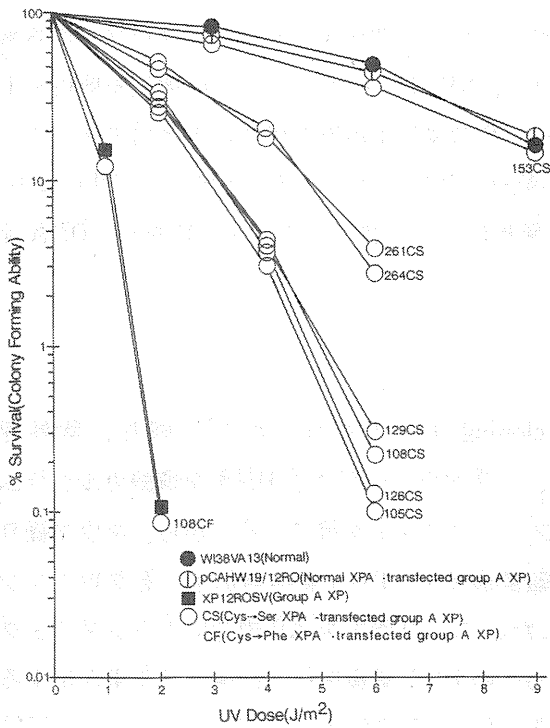


Fig. 2 UV-survivals of mutant XPA cDNA--transfected group A XP cells. For example, 108CS indicates a group A XP cells transfected with mutant XPA cDNA containing cysteine¹⁰⁸ to serine substitution.

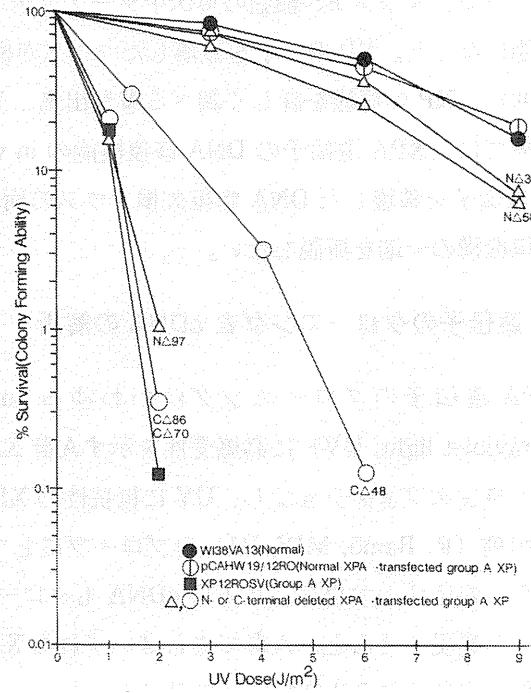


Fig. 3 UV-survivals of truncated XPA cDNA--transfected group A XP cells. For example, CΔ48 indicates a group A XP cells transfected with XPAC cDNA containing a deletion of C-terminal 48 amino acids.

能を回復させる機能が傷害された。C4 タイプの Zn フィンガーモチーフのシステインをフェニールアラニンに変換すると、その DNA 修復能は全く失われてしまった。H2C2 タイプの Zn フィンガーのシステインをセリンに換えてもかなり DNA 修復機能が低下した。一方、153番目のシステインをセリンに換えても DNA 修復能には変化はなかった。以上のように、XPA 蛋白の DNA 修復能には Zn フィンガーモチーフが重要な役割を果たしている事が明らかにされた。N 末および C 末部分を欠失させた変異 XPAcDNA も作成し、DNA 修復能への影響を調べた¹⁰⁾。N 末側58個のアミノ酸部分を欠失させても DNA 修復能には影響がなかった。しかし後述のように XPA 蛋白は核蛋白であり、この部分には核移行シグナルがあり、XPA 蛋白の核へのすみやかな移行に必須である。ただし、XPA 蛋白は 31KDa と小さいので、拡散によって細胞質から核へ少量なら移行する事ができ、そのため N 末58アミノ酸残基部分を欠失した cDNA をトランスフェクションした細胞は正常の DNA 修復能を示した。核移行に関し、³⁰Arg から ⁴²Arg を欠失させると核への能動移送が全く損なわれる事が解かった。N 末側97個のアミノ酸部分を欠失させた cDNA は DNA 修復能を完全に失っていた。一方、C 末側48アミノ酸部分を欠失させると、DNA 修復能は著明に低下し、それ以上削ると全く DNA 修復能が消失した¹⁰⁾ (図3)。

以上のデータより、XPA 蛋白は N 末側に核移行シグナルを持ち、その他の C 末側が DNA 修復能に必須である事が明らかになった。

XPA 遺伝子のホモログのクローニングと解析

我々は、ヒト、マウス以外に、ニワトリ、アフリカツメガエル、ショウジョウバエより XPA 遺伝子を

III-2 XPA 遺伝子のターゲティングにより樹立した DNA 除去修復欠損マウスの解析

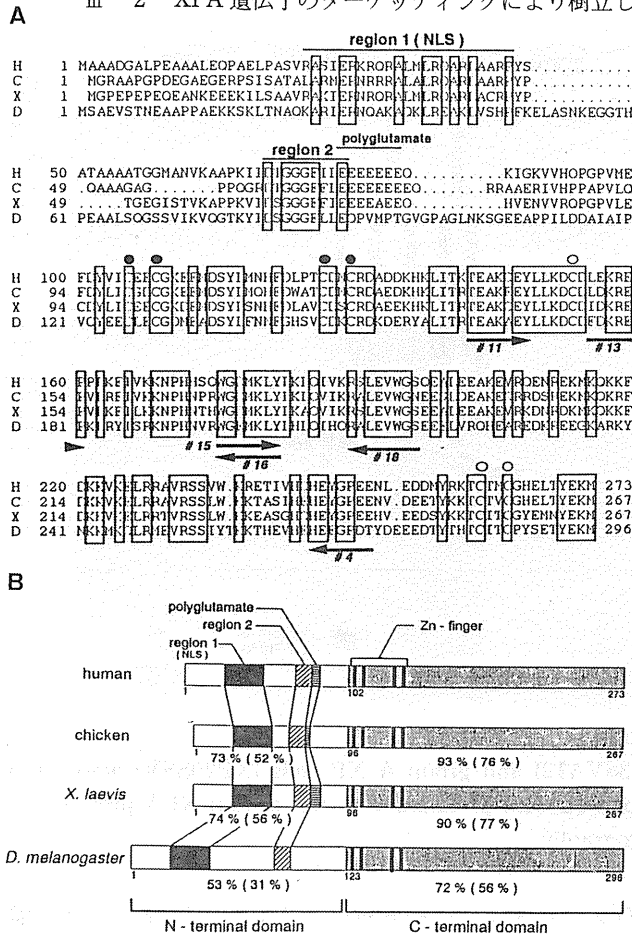


Fig. 4 Amino acid alignment of the XPA proteins of human (H), chicken (C), *X. laevis* (X), and *D. melanogaster* (D).

A. Amino acids that are identical in all four proteins are boxed. B. Diagram of the domains and regions revealed by sequence comparison. Numbers indicate percent similarity to the human XPA protein.

クローニングし、それぞれの塩基配列を解析した(図4)。その結果、全てのシステインはこれらのホモログで保存されている事がわかり、さらに、C末側が種間でよく保存されているのに対して、N末側は、核移行シグナル部分と、我々がE-クラスターとよんでいる領域以外、あまりよく保存されていない事が解かった¹¹⁾。これらの結果は、我々の部位特異的変異導入法による解析の結果とよく一致し、E-クラスター部分もなにか重要なドメインである事を示唆する。酵母のXPAホモログはRAD14である事が解かっているが¹²⁾、RAD14はE-クラスター部分を欠失している。ヒトXPAとRAD14蛋白の機能の違いを示唆する。

細胞内 XPA 蛋白の同定と性状解析

ヒト XPA cDNA を大腸菌内で発現させ、組換え XPA 蛋白を生成した。これをウサギに免疫し、抗 XPA 蛋白抗体を得た¹³⁾。この抗体を用いた間接蛍光抗体法では、正常ヒト細胞の核が染色されたが、A 群 XP 細胞では染色されなかった。免疫組織化学染色では、全ての組織において XPA 蛋白の生成が認められた。細胞粗抽出液を用いた免疫沈降法では、正常組織で 43KDa と 40KDa の 2 本のバンドが認められたのに対し、A 群 XP 細胞ではこれらのバンドは欠失していた(図5)。cDNA より推定された分子量 31KDa との食い違いは、N末にある幾つかのプロリンや酸性ドメインにより SDS-PAGE 上での移動が遅れるためと思われる。2本のバンドの意味合いについては現在のところ不明である。少なくとも、それ

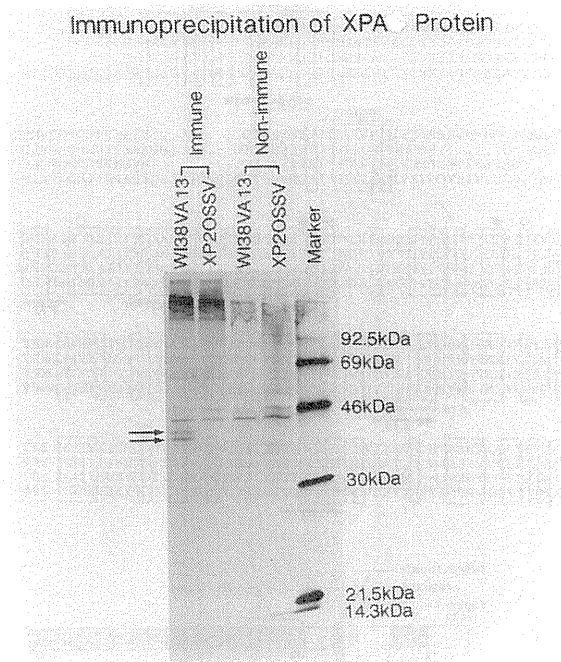


Fig. 5 Immunoprecipitation of the XPA protein.

Normal human cells (WI38VA13) and group A XP cells (XP20SSV) were metabolically labeled, solubilized, immunoprecipitated with preimmune serum or anti XPA protein serum, and analyzed by SDS-PAGE and fluorography.

が、N末端、あるいはC末端のプロセッシングや分解によるものではなく、リン酸化やグリコシル化などの修飾によるものでもない事がわかっている。ウエスタンブロットでも2本のバンドが認められる事より、いずれかがXPA蛋白に結合する蛋白である可能性もない。

XPA蛋白は細胞周期やUV照射によってもその量に変化は認められなかった。

組換え XPA 蛋白の機能と構造

上述のように、大腸菌で組換え XPA 蛋白を生成した。不溶性の封入体を形成したので、一旦これを塩酸グアニジンで変性後、透析により可溶化した。このサンプルをハイドロキシアパタイトカラムに通すだけで、90%以上の純度の XPA 蛋白が得られた。この XPA 蛋白をマイクロインジェクション法でA群XP細胞に注入すると、UV照射後の不定期DNA合成が正常化した。他の相補性群XP細胞には無効であった。次に、XPA蛋白のDNA結合能を、ゲルシフト法、ニトロセルロースフィルター結合法により調べた。XPA蛋白はDNAに結合するが、UV照射したDNAにより多く結合する事が明らかになった。さらに、UV照射のみならず、シスプラチンやOsO₄処理したDNAにもより多くのXPA蛋白が結合する事が解かった。XPA蛋白は、除去修復過程において、種々のDNA傷害を認識する機構に関わる蛋白である事が示唆された。一方、C4タイプのZnフィンガーモチーフを構成する108番目のシステインをセリンに置換したXPA蛋白(C108S)ではDNA結合能は認められなかった(朝比奈ら;未発表データ)。

XPA蛋白が実際にZnを配位するか否かを、原子吸光法により測定した。その結果、野生型XPA蛋白1分子には3個のZnが配位する事が解かった。C108S蛋白ではZnの数が1個と減少していた。さらに、UV-CDスペクトロスコピーにより、野生型XPA蛋白ではαヘリックス等の二次構造が認められたが、C108S蛋白ではこれらの構造が破壊されている事が明らかになった。以上より、XPA蛋白の構造と機能に、Znフィンガーを構成するシステインが重要な役割を担っている事が示唆された(朝比奈ら;未発表)

データ)。

次に、XPA 蛋白の DNA 結合ドメインを特定するため、野生型 XPA 蛋白を α キモトリプシンで部分消化し、それを SDS-PAGE にて分離後、ニトロセルロース膜にプロットし、 ^{32}P でラベルしたオリゴヌクレオチドをプローブにしてサウスウエスタンプロットし、そのサブフラグメントが DNA 結合能を持つかを調べた。その結果、約 30KDa (野生型 XPA 蛋白の約 3/4 の大きさ) のサブフラグメントが DNA 結合能を保持している事が解かった。このサブフラグメントのアミノ酸配列を決定し、DNA 結合ドメインは、C4タイプの Zn フィンガーを含む N 末側に存在し、C 末端部分は直接 DNA 結合に関与しない事を明らかにした。しかし、C 末端部は各種の XPA ホモログでよく保存されており、上述の様に、C 末端部を欠損した XPAcDNA の DNA 修復能は著明に低下した。従って、C 末端部は XPA 蛋白の DNA 修復能に重要なドメインと考えられる。我々は、この部分が、DNA 除去修復過程において、XPA 蛋白が他の蛋白と相互作用するのに必要な、蛋白結合ドメインではないかと推測した。その可能性を調べるため、GST--XPA 融合蛋白を生成し、これをグルタチオンビーズに不働化し、それに細胞粗抽出液を混ぜ、XPA 蛋白の有無を調べたところ、GST のみのビーズにも幾つかの蛋白が結合したが、GST-XPA ビーズにはより多くの蛋白が結合した。しかも、XPA 蛋白の C 末側で蛋白の結合がおこる事も明らかにした。さらに、XPA 蛋白と結合する蛋白の中には、UV 照射した DNA を反応中に介在させると、その結合が増強されるものも認められた。以上のデータより、in vivo においても、XPA 蛋白が何らかの蛋白と相互作用する事が強く示唆された (岩井ら; 倉岡ら; 未発表データ)。

A 群 XP 患者における XPA 遺伝子の突然変異

A 群 XP 患者が XPA 遺伝子にどのような異常を持つかを次に調べた^{1) 14)-17)} (図 6)。まず、ゲノムのサザンプロット解析を行なったが、異常は認められなかった。ノザンプロット解析では、正常ヒトや他の相補性群 XP 細胞では 1.3kb と 1.0kb の二本の XPA mRNA (ポリ A 付加部位の違いによる) が認められたが、大部分の A 群 XP 群患者では量、サイズともに減少した異常な XPA mRNA が認められた。興味ある事に、日本人 A 群 XP 患者は家系が異なっても同じ XPA mRNA の異常を示し、その突然変異は同じであることが示唆された。このような A 群 XP 患者 (XP2OS) および正常ヒトの XPA ゲノムをクロー

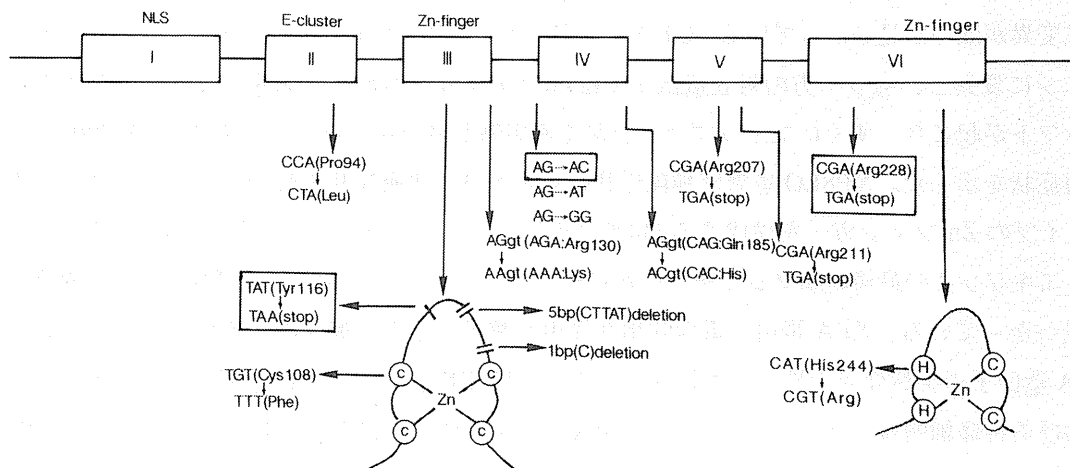


Fig. 6 Mutations of the XPA gene in group A XP patients.

I-VI indicate exons of the XPA gene. Mutations found in Japanese patients are boxed.

ニングし、そのエクソン（6つ）およびエクソン-イントロン接合部の塩基配列を解析したところ、XP2OS 患者では、イントロン3のスプライシング受容部位のAGがACにG-Cトランスバージョンし、スプライス異常が起こる事が明らかになった。このG-Cトランスバージョンによって、新しく制限酵素AlwNI部位が生じる。エクソン4と両側イントロンをPCRで増幅し、そのフラグメントがAlwNIで切断されるか否か（AlwNI RFLP）を調べる事で、このG-Cトランスバージョンの有無を容易に調べる事が出来る。この方法を用いて、21人の日本人A群XP患者のうち、16人がこの変異を両方の対立遺伝子に持つホモ接合体である事が解かり、4人が一方の対立遺伝子にこの変異を持ち、1人はこの変異を持たない事が解かった。一方、白人や黒人など他人種のA群XP患者にはこの変異は見つからず、いわゆる“創始者効果”が認められた。日本人A群XP患者には、他に、エクソン6あるいはエクソン3内のノンセンス突然変異が見つかった。これらの変異もそれぞれHphI, MseI RFLPにより診断が可能である。スプライス変異を持たなかった1例の日本人A群XP患者（XP39OS）は、エクソン6のノンセンス突然変異のホモ接合体である事がHphI RFLPにより診断された。母親はヘテロ接合体であった。父親は調べられなかったが、血族結婚である事より、同じヘテロ接合体である事が推測された。XP39OS患者では228番目のアルギニンからC末端のメチオニンまでの46個のアミノ酸が欠けた短いXPA蛋白が生成されている事も示した。XP39OS患者はA群であるにもかかわらず、皮膚症状は軽微で、神経症状もほとんどなく通常の高校へ通っている。C末46個のアミノ酸が欠けたXPA蛋白はDNA修復機能をかなり温存しており、そのために臨床症状が軽くなったと考えられる。一方、エクソン3内のノンセンス突然変異は、Znフィンガーのループ部分で蛋白が中断する事になり、そのDNA修復機能は全くないと思われる。また、スプライス異常の場合は、XPA mRNAが不安定になり細胞内の量が非常に少なくなる事、および、スプライス異常によって起こるエクソン4内でのフレームシフト、それに伴うXPA蛋白のC末欠失により、XPA蛋白の量は非常に少なく、たとえあってもその蛋白は機能を持たないと思われた。スプライス異常のホモ接合体、および、スプライス異常とエクソン3内のノンセンス突然変異を持つ複合ヘテロ接合体は、共に臨床症状は強く、典型的なA群XPの症状を示した。スプライス異常とエクソン6内のノンセンス突然変異を持つ複合ヘテロ接合体の臨床症状はやや軽微になる。エクソン3内のノンセンス突然変異を持つ患者は外国の症例には認められていないが、エクソン6のノンセンス突然変異を持つ患者はチェンジアで多数見つかっている（京都大学武部啓ら¹⁸⁾）。その他の外国人A群XP患者についてもXPA遺伝子の突然変異が幾つか見つかっている。C4タイプZnフィンガーモチーフのシステインの1つがフェニールアラニンに変異し、もう一方の対立遺伝子ではZnフィンガーのループ部分に5塩基の欠失を持ち、フレームシフトが起こり、すぐにストップコドンがくる症例が見つかった。この患者（GM2009）は強い神経、皮膚症状を示した。XP8LO患者は神経症状は殆ど示さず皮膚症状も軽微であるが、この患者では、H2C2タイプのZnフィンガーを構成する244番目のヒスチジンがアルギニンに変異し、他方の対立遺伝子では、エクソン4の最後のヌクレオチドGがCにトランスバージョンし、スプライシング異常が起こる変異が見ついている。XPA蛋白の蛋白間相互作用を解析する上で興味のある症例である。いずれにせよ、XPA遺伝子の突然変異の性状と神経症状を含めた臨床症状の程度とに相関が認められた。A群XP患者における神経細胞死がXPA蛋白の欠損に由来する事は明らかだが、それがXPA蛋白が欠損しDNA除去修復能が欠如するためにおこったものなのか、あるいは、XPA蛋白が複数の機能を持ち、それ自身で神経細胞の発育維持に重要な働きをするためかは不明である。また、DNA傷害によって神経細胞が損傷を受け、それを修復出来ない事が原因であるとすれば、そのDNA傷害はどのようなものであるかも今

後の課題である。

XPA 遺伝子のターゲティングにより樹立された DNA 除去修復欠損マウス

XP 患者の高発癌性や精神神経症状の発症機構をさぐるため、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) における XPA 遺伝子のターゲティング法により、A 群 XP と同様の DNA 修復異常を持つマウスの樹立を行なった (弓場ら; 未発表データ)。XPA 遺伝子のエキソン 4 内に neo 遺伝子を挿入し、XPA 遺伝子の末端に HSV-tk 遺伝子を接続した、置換型ターゲティングベクターを構築し、エレクトロポレーション法で ES 細胞に導入した。Capecchi らのポジティブ-ネガティブ選別法に添って、一方の XPA 対立遺伝子のエキソン 4 に neo 遺伝子が挿入された相同組換え体 ES 細胞を得た。それを、改変集合法で正常マウス 8 細胞期胚に注入しキメラマウスを得た。キメラマウスと正常マウスを交配し、一方の XPA 対立遺伝子がターゲティングされたヘテロ接合体を得た。さらに、ヘテロ接合体雌雄マウスの交配により、両方の XPA 対立遺伝子がターゲティングされたホモ接合体マウスを得た。ホモ接合体マウスは、形態上および行動上、正常マウスと変わらないが、ホモ接合体マウスより樹立した繊維芽細胞は、A 群 XP 細胞と同様に UV に高感受性を示し、DNA 除去修復能も欠損していた。この事は、XPA 蛋白の機能を欠損し DNA 除去修復能を欠如していても、正常に発生、分化し誕生する事を示唆する。事実、XPA 蛋白を殆ど発現していない A 群 XP 患者も誕生時に異常は認められない。一方、UV と同様な DNA 傷害を与える DMBA をこれらのマウスの皮膚に塗布したところ、ホモ接合体マウスにのみ、塗布 1 週間後に強い皮膚潰瘍が形成され、1 か月後にはその部分にパピローマが高頻度に出現した。正常およびヘテロ接合体マウスには、もっと後期の約 2 か月後に、TPA を塗布し続けて始めてパピローマの発生が認められた。以上のように、XPA 欠損マウスは、発癌物質に対して高い感受性を示し、これらの点において XP のよいモデル系になると思われる。他方、生後 6 か月と 1 年目にマウスを解剖し、脳を病理学的に解析したが、正常とホモ接合体マウスにおいて差は認められなかった。A 群 XP 患者に認められる神経細胞変性の原因が何に由来するのかは不明であるが、我々の XPA 欠損マウスの解析からは、それが、発生、分化異常によるという考え方は否定的である。A 群 XP の神経細胞変性が、内因性および外因性の DNA 傷害の修復欠損によるという仮説が他方にある。もしこの仮説が正しいとすれば、DNA 傷害が蓄積し、神経細胞変性がおこるまでにはある程度の時間が必要だと思われる。A 群 XP 患者においても、神経症状が顕著になるのは 5 才くらいからであり、年齢が進むにつれてそれはひどくなる。XPA 欠損マウスにおいてもさらに老化すれば何らかの神経細胞変性が認められるかもしれない。A 群 XP の精神神経症状発症の原因は後者の説の方が可能性が高いが、いずれにせよ、XPA 欠損マウスは、A 群 XP の神経病態を解析する上でも有用であろうと思われる。

結 論

XPA 遺伝子のクローニングとその機能と構造について、我々の研究を概説した。XPA 蛋白は、種々の障害 DNA を認識する機能のみならず、DNA 除去修復過程において、他の蛋白と相互作用する事が示唆された。XPB、XPC、ERCC1 蛋白も、それぞれ、未知のものも含めて幾つかの蛋白と複合体を形成する事が明らかになっており、それらの蛋白をコードする遺伝子を単離する事が DNA 除去修復過程を解析する上での最重要課題である。その上で、どの様な蛋白複合体が形成され、どの様な機能が生まれるのかを解析し、最終的には、in vitro で DNA 除去修復系を再構成する事が必要である。さらに、DNA 除去修復

は、DNA複製、転写、細胞周期とも密接な関連を持ち、複雑な制御機構が働いていると思われる。これらの相互作用の解析も今後の重要課題である。一方、DNA除去修復遺伝子をノックアウトしたマウスは今後数多く樹立されていくものと思われる。XPA欠損マウスとERCC1欠損マウスはその症状が大きく異なる¹⁹⁾。XPB、XPC、XPD、XPG欠損マウスもXPA欠損マウスとは異なる形質を示すであろう。それぞれの欠損マウスの樹立は、DNA除去修復遺伝子の個体レベルでの機能を解析する上で、さらに、XPの病態を詳細に明らかにする上で必須である。マウスでは交配が自由にできる事より、複数のDNA修復遺伝子を欠損したマウスを作る事も可能であり、どの様な形質を示すか興味を持たれる。

参考文献

- 1) Bootsma, D.: The genetic defect in DNA repair deficiency syndromes. *Eur. J. Cancer*, 29A, 1482–1488, 1993.
- 2) Tanaka, K., Miura, N., Satokata, I., Miyamoto, I., Yoshida, M. C., Satoh, Y., Kondo, S., Yasui, A., Okayama, H. and Okada, Y.: Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. *Nature*, 348, 73–76, 1990.
- 3) Weeda, G., van Ham, R. C. A., Vermeulen, W., Bootsma, D., van der Eb, A. J. and Hoeijmakers, J. H. J.: A presumed DNA helicase encoded by ERCC3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Cell*, 62, 777–791, 1990.
- 4) Legerski, R. and Peterson, C.: Expression cloning of a human DNA repair gene involved in xeroderma pigmentosum group C. *Nature*, 359, 70–74, 1992.
- 5) Weber, C. A., Salazar, E. P., Stewart, S. A. and Thompson, L. H.: ERCC2: cDNA cloning and molecular characterization of a human nucleotide excision repair gene with high homology to yeast RAD3. *The EMBOJ.*, 9, 1437–1447, 1990.
- 6) Scherly, D., Nospikel, T., Corlet, J., Ucla, C., Bairoch, A. and Clarkson, S. G.: Complementation of the DNA repair defect in xeroderma pigmentosum group G cells by a human cDNA related to yeast RAD2. *Nature*, 363, 182–185, 1993.
- 7) Tomkinson, A. E., Bardwell, A. J., Bardwell, L., Tappe, N. J. and Friedberg, E. C.: Yeast DNA repair and recombination proteins Rad1 and Rad10 constitute a single-stranded-DNA endonuclease. *Nature*, 362, 860–862, 1993.
- 8) Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H. J., Chambon, P. and Egly, J.: DNA repair helicase: A component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science*, 260, 58–63, 1993.
- 9) Tanaka, K., Satokata, I., Ogita, Z., Uchida, T. and Okada, Y.: Molecular cloning of a mouse DNA repair gene that complements the defect of group A xeroderma pigmentosum. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86, 5512–5516, 1989.
- 10) Miyamoto, I., Miura, N., Niwa, H., Miyazaki, J. and Tanaka, K.: Mutational analysis of the structure and function of the xeroderma pigmentosum group A complementin protein. *J. Biol. Chem.*, 267, 12182–12187, 1992.
- 11) Shimamoto, T., Kohno, K., Tanaka, K. and Okada, Y.: Molecular cloning of human XPAC gene homolog

from chicken, xenopus laevis and drosophila melanogaster. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 181, 1231-1237, 1991.

- 12) Bankman M., Prakash, L. and Prakash, S.: Yeast RAD14 and human xeroderma pigmentosum group A DNA-repair genes encode homologous proteins. *Nature*, 355, 555-558, 1992.
- 13) Miura, n., Miyamoto, I., Asahina, H., Satokata, I., Tanaka, K. and Okada, Y.: Identificatinon and characterization of xpac protein, the gene product of the human XPAC (xeroderma pigmentosum group A complementing) gene. *J. Biol. Chem.*, 266, 19786-19789, 1991.
- 14) Satokata, I., Tanaka, K, Miura, N., Miyamoto, I., Satoh, Y., Kondo, S. and Okada, Y.: Characterization of a splicing mutation in group A xeroderma pigmentosum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9908-9912, 1990.
- 15) Satokata, I., Tanaka, K., Miura, I., Narita, M., Mimaki, T., Satoh, Y., Kondo, S. and Okada, Y.: Three nonsense mutatons responsible for group A xeroderma pigmentosum. *Mutat. Res.*, 273, 193-202, 1992.
- 16) Satokata, I., Tanaka, K., Yuba, S. and Okada, Y.: Identification of splicing mutations of the last nucleotides of exons, a nonsense mutation, and a missense mutation of the XPAC gene as causes of group A xeroderma pigmentosum. *Mutat. Res.*, 273, 203-212, 1992.
- 17) Satokata, I., Tanaka, K. and Okada, Y.: Molecular basis of group A xeroderma pigmentosum: a missense mutation and two deletions located in a zinc finger consensus sequence of the XPAC gene. *Hum. Genet.*, 88, 603-607, 1992.
- 18) Nishigori, C., Zghal, M., Yagi, T., Imamura, S., Ridha, M. and Takebe, H.: High prevalence of the point mutation in exon 6 of the xeroderma pigmentosum group A complementing (XPAC) gene in xeroderma pigmentosum grup A patients in Tunisia. *Am. J. Hum. Genet.* in press.
- 19) McWhir, J., Selfridge, J., Harrison, D. J., Squires, S. and Melton, D. W.: Mice with DNA repair gene (ERCC1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. *Nature Genetics*, 5, 217-223, 1993.

Ⅳ．放射線発がんのゲノム変異

- 1．放射線反復照射によって誘発されたマウス腫瘍の p53 遺伝子の変化
大津山 彰他
- 2．放射線誘発マウス骨髄性白血病における遺伝子再編
石原 弘
- 3．放射線誘発マウス胸腺リンパ腫の染色体転座とがん抑制遺伝子の変異
武藤 正弘

1. 放射線反復照射によって誘発された マウス腫瘍の p53 遺伝子の変化

大津山 彰、田ノ岡 宏* / 長尾 美奈子、牧野 浩司**

Mutations of the p53 tumor suppressor gene in mouse tumors induced by repeated beta radiation

Akira OOTSUYAMA*, Hiroshi MAKINO**, Minako NAGAO** and Hiroshi TANOOKA*

*Radiobiol. Div., **Carcinogen. Div. Natl. Cancer Center Res. Inst.

Tsukiji 5-1-1, Chuo-ku Tokyo 104

Mutations in the p53 gene and its rearrangements have been found frequently in human cancers and seem to be an important factor in causing cancer. Some carcinogens including UV, induce specific mutation in the p53 gene. The most frequent type of mutations are base-pair substitutions, while deletions and insertions are very rare. Radiation carcinogenesis has been studied using the regimen of repeated beta radiation to the back skin (area of 2cm in diameter) of mice three times weekly throughout the life span. From this study, the following results were obtained, i. e., threshold-like response in tumor emergence with doses 0.5 to 11.8 Gy per exposure, clonal nature of the radiation induced tumors, and inhibition of the promotion effect of the repeat of irradiation by applying α -difluoromethylornithine, an inhibitor of tumor promoters. These findings indicate unique mechanisms of carcinogenesis are involved in the repeated irradiation.

In this study, we surveyed mutation of the p53 gene in 65 radiation-induced tumors, i. e., 17 squamous cell carcinomas, 2 basal cell carcinomas, 31 fibrosarcomas and 15 osteosarcomas. RNAs were extracted from tumors and reverse-transcribed into cDNAs. cDNA were analyzed by the PCR-SSCP method for the presence of mutation in the p53 gene, and then directly sequenced.

We found 10 deletions of the p53 gene due to loss of 1-24 bases, 3 insertions due to addition of 4-8 bases in exons 4 to 8, and 6 base-pair substitutions. Four of the base-pair substitutions occurred at the CpG dinucleotide, which might be produced by conversion of C to T by the methylation/deamination process. Deletions and insertions occurred randomly in the p53 gene. However, base-pair substitutions occurred in the evolutionarily conserved regions, except one. Three of the CpG mutations are located at

the same site, codon 122.

The above findings indicate a unique characteristic of tumors produced by repeated radiation.

はじめに

マウスの背部皮膚に、ベータ線を週3回の頻度で反復照射を行ない発がんをおこす系を用いて、放射線による発がん機構の解明を目的とした実験を行なってきた^{1,2,3)}。今回、これらの実験で得られた放射線誘発腫瘍について、人のがん細胞でもっとも高頻度に変異が認められている p53 がん抑制遺伝子の解析をおこなった。

人の p53 遺伝子では、それぞれの腫瘍に特異的な変異のタイプが存在すること⁴⁾、発がん物質・UV による特異的な DNA 損傷と密接な関連が示唆される変異があること^{5,6)}、変異発生部位にホットスポットがあること等が知られている^{4,7)}。また p53 遺伝子異常の多くは 2 コピーのうち 1 コピーの欠失と残ったコピーに突然変異が存在するという様式が一般的とされている^{7,8)}。変異の種類は 8～9 割が点突然変異で占められ、欠失、挿入やスプライシング異常による変異等の発生についての報告は少ない⁴⁾。

ところが、ウラン鉱山労働者に発生した肺がんの p53 遺伝子の調査では、欠失の発生率が他の肺がんの場合と比べると多いという報告がある⁹⁾。このことは、いくつかの発がん物質に関連した特有の p53 遺伝子変異タイプがみつけられているように、放射線誘発腫瘍にも特有の p53 遺伝子変異タイプが存在することを示唆している。

β線反復照射によるマウスの皮膚発癌

ICR 雌マウス（7 週齢）の背中の皮膚（直径 2 cm 円形部位）に週 3 回の頻度で ⁹⁰Sr-⁹⁰Y 線原から得られる β 線を照射した。照射は 1 回あたりの線量を 0.5 から 11.8 Gy までの 10 段階に分け（Table 1）、発癌するまであるいはマウスの寿命が尽きるまでおこなった。1 回あたりの照射線量が 1.0 Gy から 11.8 Gy を用いた実験群では、積算発がん率が照射開始後 500 日から 800 日で 100% となった。一方 1 回あたりの照射線量を 0.5 Gy にした群では、マウスの一生を通して照射を行なっても（1284 日）がんの発生はおこらなかった（Fig. 1）。この結果は、従来放射線発がんには存在しないとされてきた発がん閾値線量が、照射条件によって存在することを示している。

また同様の実験系を用いて、放射線で誘発した PGK（phosphoglycerate kinase）モザイクマウスの腫瘍が単クローン由来であることや¹⁰⁾、ODC（ornithine decarboxylase）阻害剤の DFMO（α-dif-

Table. 1. No. of mice in each group and dose per exposure

Dose per exposure	No. of mice
0	31
0.5	50
0.75	31
1.0	31
1.5	30
2.5	22
3.0	31
3.5	21
4.7	15
8.0	31
11.8	18

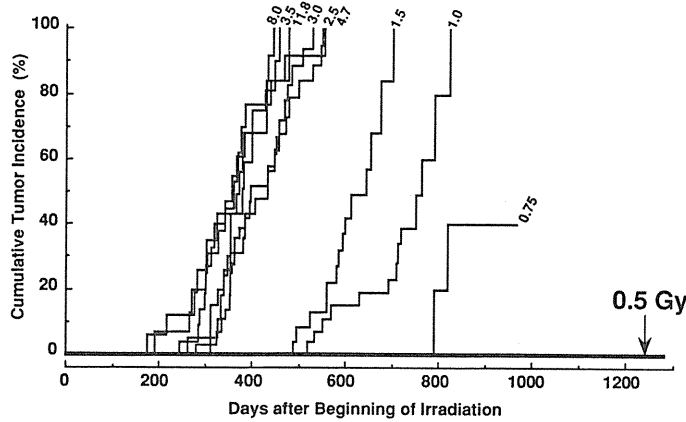


Fig. 1 Time courses of cumulative tumor incidence analyzed by the Kaplan-Meier method.

luoromethylornithine) を反復照射発がん実験中のマウスに投与し続けると、無投与群に比べ発がん時期が大幅に遅延することを観察し、反復照射することにプロモーション作用が存在することをみいだした¹¹⁾。

これら一連のβ線反復照射によるマウスの発がん癌実験の結果から、反復照射による放射線発がんには特有の機構が存在すると考えられた¹²⁾。

β線誘発腫瘍における p53 癌抑制遺伝子の変化の検索

さきの放射線発がん実験で147個の腫瘍を得ており、そのうち凍結保存していた65個の腫瘍（扁平上皮がん17個、基底細胞がん2個、線維肉腫31個、骨肉腫15個）について p53 遺伝子異常の検索を行なった。

これらの腫瘍からRNAを抽出してcDNAを合成したのち^{13,14)}、p53 マウス遺伝子（exon 2 から exon 11 まで）を Fig. 2 に示すように7つの領域（A-G）に分け、さらにCからF領域を2つずつに分けたプライマーの組み合わせを用いてPCR-SSCP法を行なった^{15,16)}。このSSCP泳動パターンにおいて移動度の異なったバンドを示す腫瘍が p53 遺伝子に変異を有するものとして選択した。これらの腫瘍の p53 遺伝子は直接シークエンスによって変異の場所と種類を同定した¹⁷⁾。

上記の方法で検索した結果、PCR-SSCP法によって65個のうち20個の腫瘍の p53 遺伝子に変異部位を見いだした（Fig. 3）。さらに直接シークエンスによって変異の内容は、欠失が11例、挿入が3例、塩基置換が6例であることを確かめた（Table 2）。これらの変異の発生部位は Fig. 4 に示したが、すべて exon 4 から exon 8 にかけて存在していた。挿入や欠失は系統学的な保存領域にはほとんど存在しておらず、また挿入の例ではすべてが繰り返し配列となっていた。一方塩基置換はほとんどが系統学的な保存

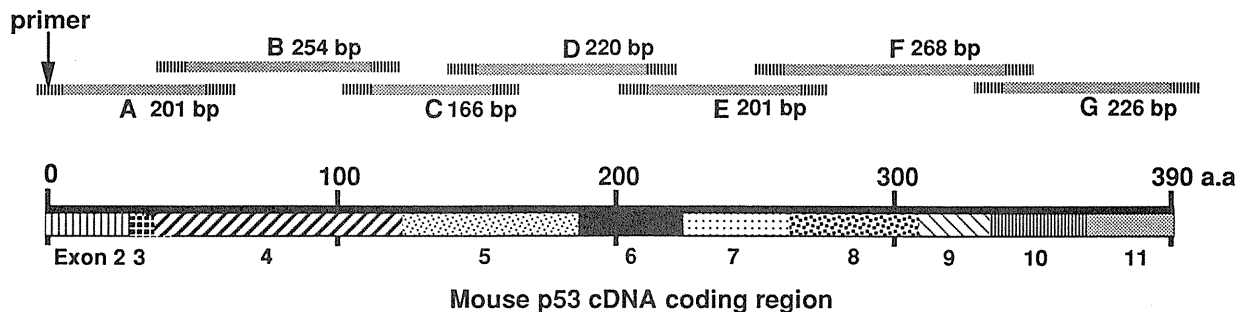


Fig. 2 Design of primers for PCR-SSCP analysis of mouse p53 cDNA.

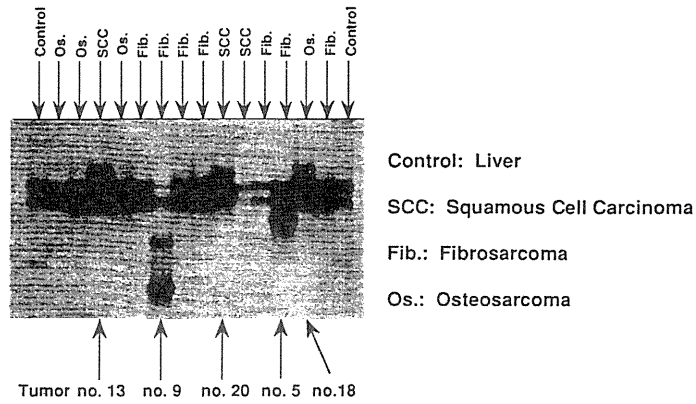


Fig. 3 Examples of PCR – SSCP between codon 208 to codon 289 of cDNA.

Table. 2. p53 mutations of mouse tumors induced by repeated radiation

	Sample number	Dose per exposure (Gy)	Tumor histology	Base(s) altered	Exon
Deletion	1	1.0	SCC	G GCC CC	4
	2	1.0	SCC	T CT	8
	3	1.5	FS	C GCC ACA CCT CCA GCT GGG AGC CG	5
	4	1.5	FS	G	5
	5	2.5	FS	CAC AG	6
	6	3.0	OS	GT GTC CGC GCC A	5
	7	3.0	SCC	T GGG AAC CTT CTG GGA CGG GAC AG	8
	8	3.5	FS	C TTA TCC GG	6
	9	4.5	FS	C AGC TTT GAG GTT	8
	10	8.0	FS	TAC TCT CCT CCC CTC AAT AAG	5
	11	8.0	OS	T GGA AG	6
Insertion (repeated sequence)	12	1.0	SCC	C CTT	8
	13	3.0	FS	TC TGC C	5
	14	3.0	SCC	A CTG GAA G	7
Base substitution	15	1.0	SCC	ACG -> ATG	4
	16	1.5	SCC	ACG -> ATG	4
	17	1.5	FS	ACG -> ATG	4
	18	2.5	OS	CGC -> TTC	7
	19	3.0	FS	CTT -> CCT	6
	20	3.0	SCC	GCC -> GAT	8

SSC: Squamous cell carcinoma, FS: Fibrosarcoma, OS: Osteosarcoma

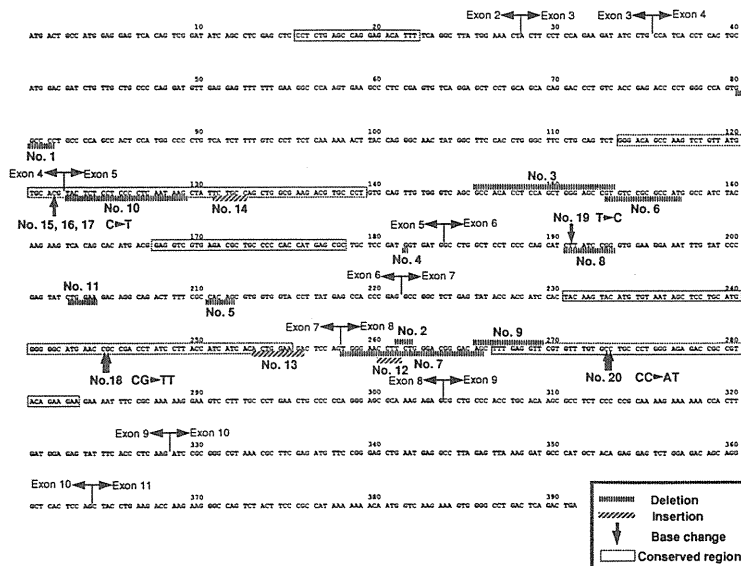


Fig. 4 Positions of mutations in p53 of mouse tumors by repeated radiation.

領域に存在していた。さらに塩基置換を起こした部位は 6 例中 4 例が CpG を含んでおり、そのうち 3 例は codon 122 の同一部位に生じていた。

まとめ

p53 遺伝子変異の部位が Exon 4 から Exon 8 にかけて存在することは⁷⁾、人の場合と同様の結果で、発がん過程におけるこれらの変異の役割は人の場合と同じような経過をたどるものと考えられる。欠損の中の 3 例と挿入の中の 2 例はフレームシフトを起こしており、no. 5 では変異部位からすぐに停止コドンとなり、正常の約 55% のたんぱくしかできていないと推定されるが、少なくともこの程度の長さの変異たんぱくが存在すれば発がんに関与すると思われる。

点突然変異の 6 例中 4 例には、人の場合と同じように突然変異の起こりやすい部位といわれている CpG に生じており¹⁸⁾、さらに 3 例は codon 122 のまったく同じ部位に生じていた。実験マウスの p53 遺伝子には疑似遺伝子が存在しているが¹⁹⁾、codon 122 の付近は欠失が起こっており、この位置はマウスの p53 における変異の hot spot であると考えられる。

p53 遺伝子の変異の半数以上が欠失および挿入によるという結果は、今まで報告されている人の p53 遺伝子変異のスペクトラムと大きく異なっている。マウスを用いた実験発癌における p53 遺伝子変異のスペクトラムに関しては、化学発癌剤誘発腫瘍の p53 遺伝子の変異はほとんどが点突然変異で占められており^{20, 21)}、UV 誘発腫瘍ではダイマー形成部位に一致した点突然変異の発生が見られるだけで^{22, 23)}、我々の実験でみられたような p53 遺伝子における欠失ならびに挿入の高頻度発生という報告はない。

さきに述べたウラン鉱山労働者にみられた肺がんが、塵埃だけでなく長期にわたる低線量の α 線被曝に起因すると考えると、今回のわれわれのマウスでの実験結果とあわせ p53 遺伝子にみられた欠失ならびに挿入の高頻度発生は、放射線の反復照射による発がん特有な現象であると考えられる。

参考文献

- 1) Ootsuyama, A. and Tanooka, H.: one hundred percent tumor induction in mouse skin after repeated beta irradiation in a limited dose range. *Radiat. Res.*, 115, 488-494, 1988.
- 2) Ootsuyama, A. and Tanooka, H.: Threshold-like dose of local beta irradiation repeated throughout the life span of mice for induction of skin and bone tumors. *Radiat. Res.* 125, 98-101, 1991.
- 3) Ootsuyama, A. and Tanooka, H.: Zero tumor incidence in mice after repeated life time exposures to 0.5 Gy of beta radiation. *Radiat. Res.*, 134, 244-246, 1993.
- 4) Hollstein, M. et al.: p53 mutation in human cancers. *Science*, 253, 49-53, 1991.
- 5) Bressac B. et al.: Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 350, 429-431, 1991.
- 6) Brash, D. E. et al.: A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 10124-10128, 1991.
- 7) Levine, A. J., Momand, J. and Finlay, C. A.: The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, 351, 453-456, 1991.
- 8) Nigro, J. M. et al.: Mutation in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature*, 342, 705-708, 1989.
- 9) Vahakangas, K. H. et al.: Mutations of p53 and ras genes in radon-associated lung cancer from uranium

- miners. *Lancet*, 339, 576–580, 1992.
- 10) Ootsuyama, A., Tanaka, K. and Tanooka, H.: Clonal origin of skin and bone tumors produced by repeated beta-irradiation in mosaic cell mice. *Jpn. J. cancer Res.* 83, 964–967, 1992.
 - 11) Ootsuyama, A. and Tanooka, H.: Effect of an inhibitor of tumor promotion, α -difluoromethylornithine, on tumor induction by repeated beta irradiation in mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 34–36, 1993.
 - 12) Tanooka, H. and Ootsuyama, A.: Threshold-like dose response of mouse skin cancer induction by repeated beta irradiation and its relevance to radiation-induced human skin cancer. *Recent Results in Cancer Research*, 128, 231–241, 1993.
 - 13) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156–159, 1987.
 - 14) Makino, R., Sekiya, T. and Hayashi, K.: Evolution of quantitative detection of mRNA by the reverse transcription-polymerase chain reaction. *Technique*. 2, 295–301, 1990.
 - 15) Makino, H. et al. in preparation.
 - 16) Orita, M. et al.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5, 874–879, 1989.
 - 17) Bienz, B. et al.: Analysis of the gene coding for the murine cellular tumor antigen p53, *ENBO J.*, 3, 2179–2183, 1984.
 - 18) Rideout III, W. M. et al.: 5-Methylcytosine as endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 gene. *Science*, 249, 1288–1290, 1990.
 - 19) Zakut-Houri, R. et al.: A single gene and a pseudogene for the cellular tumour antigen p53, *Nature*, 306, 594–597, 1983.
 - 20) Ruggeri, B. et al.: Alterations of the p53 tumor suppressor gene during mouse skin tumor progression. *Cancer Res.*, 51, 6615–6621, 1991.
 - 21) Ruggeri, B. et al.: Benzo[a]pyrene-induced murine skin tumors exhibit frequent and characteristic G to T mutations in the p53 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 1013–1017, 1993.
 - 22) Kress, S. et al.: Carcinogen-specific mutational pattern in the p53 gene in ultraviolet B radiation-induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cancer Res.*, 52, 6400–6403, 1992.
 - 23) Kanjilal, S. et al.: High frequency of p53 mutations in ultraviolet radiation-induced murine skin tumors: evidence for strand bias and tumor heterogeneity. *Cancer Res.*, 53, 2961–2964, 1993.

2. 放射線誘発マウス骨髄性白血病における 遺伝子再編

石原 弘*

Genomic Rearrangement in Radiation-induced Murine Myeloid Leukemia

Hiroshi Ishihara

Division of Chemical Pharmacology

National Institute of Radiological Sciences

After whole body irradiation of 3Gy Xray to C3H/He male mice, acute myeloid leukemia is induced at an incidence of 20 to 30% within 2 years. We have studied the mechanism of occurrence of this radiation-induced murine myeloid leukemia. Detection and isolation of genomic structural aberration which may be accumulated accompanied with leukemogenesis are helpful in analyzing the complicated molecular process from radiation damage to leukemogenesis. So, our research work was done in three phases.

First, structures of previously characterized oncogenes and cytokine-related genes were analyzed, and abnormal structures of *fms*(protooncogene encoding M-CSF receptor gene)--related and *myc*-related genes were found in several leukemia cells. Additionally, genomic structural aberration of *IL-3* gene was observed in some leukemia cells, so that construction of genomic libraries and cloning of the abnormal *IL-3* genomic DNAs were performed to characterize the structure. Secondly, because the breakage of chromosome 2 that is frequently observed in myeloid leukemia locates in proximal position of *IL-1* gene cluster in some cases, the copy number of *IL-1* gene was determined and the gene was cloned. Lastly, the abnormal genome of leukemia cell was cloned by in-gel competence reassociation method.

We discussed these findings and evaluated the analysis of the molecular process of leukemogenesis using these cloned genomic fragments.

*放射線医学総合研究所 薬理化学研究部 (〒263 千葉県稲毛区穴川4-9-1)

緒言

近年の分子生物学的解析の結果、ヒト癌のプロモーションや悪性化に寄与する遺伝子異常が発見され、これらの関与する分子機構が次第に明らかにされつつある。しかし、これらの研究は培養細胞や分離異常組織を使用せざるを得ないという実験の制約上、主に癌の後期過程や遺伝的要因の分析が主体となり、後天的要因により発生した腫瘍の初期から中期過程の分析は困難である。放射線障害により骨髄性白血病などの発生率の増加することは以前から知られてきたものの、放射線障害という確率的現象がいかに腫瘍発生に結びつくかという疑問に対する解答を見出すためには特定の腫瘍細胞におけるゲノム異常を同定し、これをマーカーとして同一の系に対して放射線照射を行ない、放射線障害との関連を見出すという研究方向が必要である。このためには実験動物を用いたモデル発癌系を使用することが必要である。

代表的な放射線晩発障害である骨髄性白血病はC3H等の近交系マウスを用いて人為的に発生させることができる。ヒトとマウスでは白血球等の分化に関与する細胞間伝達物質をはじめ分子機構に相違があるので、白血球の分化・増殖異常により発生する骨髄性白血病細胞をヒトとマウス間で単純に比較することはできないが、放射線障害を受けやすい造血組織が腫瘍化学するまでの過程に共通した事象の寄与することが予想される。

この放射線誘発マウス骨髄性白血病の発生系におけるゲノム構造・機能の異常を同定し、それを分離することができれば、放射線から白血病発生に至る過程の分子機構を研究することが可能になる。しかし、この腫瘍発生系における分子生物学的知見は著しく乏しいので、我々はまず遺伝子発現のパターンを検討し、ついで当該細胞におけるゲノム構造異常の検索に着手した。現在、この研究は中途段階であるが、すでに複数の白血病細胞から構造異常ゲノムを検出または分離した。本稿ではまず放射線誘発マウス骨髄性白血病の系における今までの一般的知見について考察・検討を加えた。実際の検索・分離は、既知のオンコジーン・サイトカイン遺伝子、インターロイキン (IL) - 1 遺伝子および異常ゲノムの直接分離という三方向から進めているので、各方向で現在までに得られている結果を報告する。

I. 放射線誘発マウス骨髄性白血病

C3H/He 系のマウスは2 - 3 年齢以降で肝腫瘍の発生率の増加することが知られているが、このマウスに3Gy 程の非致死線量の電離放射線を全身照射すると骨髄性白血病が20 - 30%の個体に発生する¹⁾。生成した白血病の種類は前骨髄性白血病が多く、その発生時期は肝腫瘍の発生時期より早い1 - 2 年がピークであるので、この実験腫瘍発生系では骨髄性白血病を主体に観察することができる。この系の腫瘍発生頻度を修飾するいくつかの要因が知られている。まず、個体への照射線量を低くしても、高くしてもその発生頻度はむしろ低下する。そして、抗炎症剤であるデキサメサゾン投与や逆に炎症の発生により発生頻度は増加する¹⁾。

これらことを含め、骨髄性白血病に至る過程を推定すると、まず、3Gy 程の電離放射線により放射線に感受性の高い、造血系細胞集団が大規模な損傷を受け、大多数の未分化造血幹細胞が死滅する。この程度の線量では障害の主体は核酸であり、ゲノム構造に多数の損傷の発生することが知られている。次いで、失われた造血組織を再生するために生残した造血系細胞が急激に増加するが、この細胞集団の内には放射線障害を確率的に受けなかった細胞や放射線障害を修復した細胞の他に、一定数の異常細胞が含まれると考えられる。実際、見かけ上の造血細胞総数は照射一日後で激減し、3 - 4 週後には回復しているものの、

その後数年間、白血病の発生の有無にかかわらず、一定数の細胞に染色体異常が見られる。このことはヒトの放射線障害でもしばしば観察される現象であることから、種を越えた染色体維持機能に由来すると考えられる。照射線量の低い場合は損傷細胞総数が減少し、また、線量が増加すると死滅細胞の比率が増加し、ともに白血病原因細胞の総数が減少することで発生率低減化するという結果をまねくと考えられる。また、炎症の発生や抗炎症剤投与によりマクロファージなどの骨髄系細胞の集団比の変化することが白血病発生率に影響すると考えられる。染色体異常の発生した細胞に限らず、多数の細胞でゲノム異常の発生していることが予想されるが、その中で骨髄性白血病になり得る『前骨髄性白血病』細胞がプロモーション・プログレッションすなわちゲノム異常の蓄積、集団内多用性の獲得、不死性の獲得、転移能の獲得を経て、1-2年後白血病細胞と化すものと考えられる。

このように放射線障害から白血病発生に至る過程にゲノムの構造異常が寄与することが示唆されるものの、その実態や寄与の程度などは全く不明である。一部のヒト白血病細胞ではプロトオンコジーン *abl-bcl* 融合²⁾ や *5q-*症候群³⁾ などのゲノム異常が観察されているが、これらはヒトの種に特有の遺伝的異常の反映と考えられるので、マウス骨髄性白血病の場合、この系に特有のゲノム異常を同定するところから分析を開始する必要がある。

一方、他の腫瘍と同様に、30%の個体で発生した骨髄性白血病細胞は相互に独立に生成したものであることから、発生過程はそれぞれ異なるとも考えられる。そして、それぞれの骨髄性白血病細胞のゲノム異常が相互に独立である可能性も否定できない。すなわち、ある特定の骨髄性白血病細胞におけるゲノム異常を同定しても、それが他の骨髄性白血病細胞でも見られる現象であるという保証はない。この腫瘍細胞の多様性が癌研究一般の難しさでもあり、これに対処するためには、それぞれ独立に発生した複数の白血病細胞に共通性の高いゲノム異常を同定、分離することが必要である。

他の多数の腫瘍において、*ras* や *p53* などの点突然変異が腫瘍形成の後期過程に共通して発生することが知られていることから、ある種の共通性の高い遺伝子異常が少なくとも白血病発生の後期過程以降に寄与すると考えられる。我々はすでに当該骨髄性白血病細胞の遺伝子発現について検討を重ねてきた。その結果、サイトカイン遺伝子発現のような表現形質パターンがそれぞれの骨髄性白血病細胞株相互で異なっていることに反して、プロトオンコジーン *fos* 等のような核内蛋白質遺伝子の持続性発現が顆粒球様の白血病において共通して見られる形質であることを明らかにした⁴⁾。現在までのところ、これをゲノム異常と関連づける直接的証拠はないが、このことは類似した組織化学的性質をもつ別種の白血病細胞の核内異常が共通し得ることを示唆しており、共通性のある遺伝的事象が一群の白血病細胞に発生していることが示唆される。

骨髄性白血病の染色体研究結果もまた、ゲノム異常にある程度の共通性を示唆している。C3H/He マウスで発生した白血病細胞では、他の組織や動物種由来の腫瘍細胞と同様に染色体の数に多様性がみられ、また多数の染色体に転座や脱落が発生している。特に、いずれの独立しに発生した白血病細胞でも第二染色体対の片方に脱落や転座が共通して見出だされている⁵⁾。これと同様の結果が CBA/H マウスにおける放射線誘発骨髄性白血病の系でも得られ⁶⁾、さらに放射線により切断を受け易い脆弱部位が第二染色体に存在し、その切断部位が白血病細胞染色体の転座の際の切断部位に一致するという報告もある⁷⁾。このことは、放射線脆弱部位に損傷を受けた造血細胞が将来白血病になるという可能性を示唆している。ただし、このことに対しては C3H/He マウスで放射線脆弱部位が検出されない⁸⁾ という知見もあり、放射線の急性障害についての検討も今後必要であろう。こうした第二染色体の切断パターンは数種類に収束してお

り^{5,6)}、すべてではないとしても複数の独立発生した白血病細胞に共通したゲノム異常の存在をも示唆している。

さらに、CBA/H マウスの系では、非メンデル遺伝するテロメア様配列の構造多型が4種類あり、ある種の多型をもつマウスにおける白血病発生頻度が高いという報告がある⁹⁾。この報告では膨大な数にのぼるテロメア様配列のうちの二つだけが多型をもち、これが実験上検出可能であることを示している。この非メンデル遺伝型テロメア様配列の制限酵素多型は、染色体維持やゲノムインプリンティングの機構に密接に関連することが予想され、放射線による染色体切断とその後作動する染色体維持機構が白血病発生に寄与する可能性もある。しかしながら、テロメア様配列については不明な点が多く、染色体維持の分子機構についても解析が進んでいない現状では、その因果関係を解析するための手段は限られ、今後の染色体研究を含めた研究の進展を待たねばならないであろう。このグループではマウス第二染色体の放射線脆弱部位の近傍に IL-1 遺伝子のクラスターが存在することを示しており¹⁰⁾、また、ヒト第二染色体q13-21に IL-1 遺伝子およびテロメア配列の逆方向に反復したものが存在することから、マウスにも同様な配列の存在することをおおわしており^{7,9)}、さらに CBA/H マウス細胞における切断された染色体断片が他の染色体末端に結合していることから切断により新生したテロメア様配列が染色体末端のテロメアと組換え現象を起こしていることを主張している⁹⁾。しかし、ヒトの第二染色体はサルからヒトに進化したときに染色体融合の結果生成したもので、この反復テロメア配列はその残滓であるとされており¹¹⁾、ヒトと同等の反復テロメア配列がマウスの第二染色体の IL-1β 近傍に存在するということは現状では考えにくい。また、テロメアを持つと核酸が核内で安定化して組換え現象を極めて起こしにくくなることは周知の事実である。したがって、IL-1β 遺伝子近傍に放射線脆弱部位があるとしても、現在の一般的知見ではこれをテロメア様配列と結び付けることはできないであろう。ただし、近交系内での多型現象が白血病に関与するという点は放射線照射した C3H/He および CBA/H マウスで放射線発生率が30%を越えないということを反映しているのかもしれない。そして、放射線照射間前に白血病化するマウスを予め選択し、発生率100%に近いマウス集団を実験材料として利用できるかもしれない。

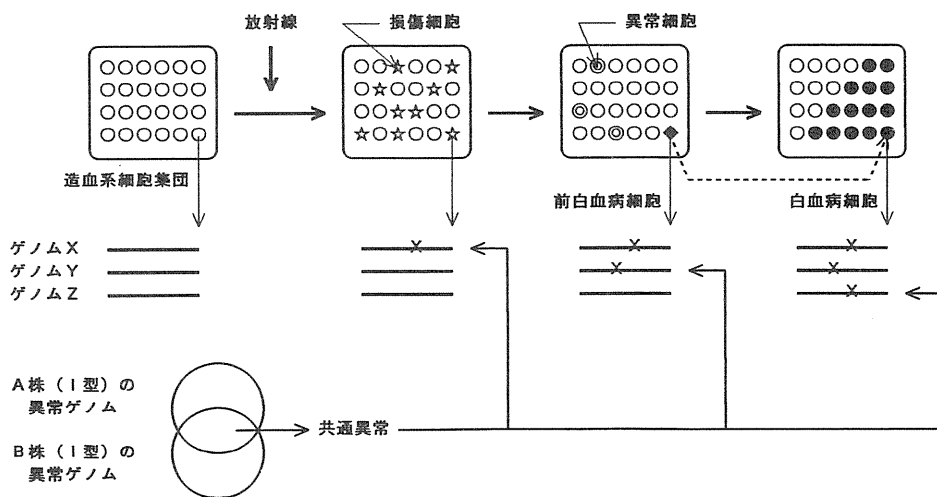


図1 放射線誘発マウス骨髄性白血病発生過程におけるゲノム異常の蓄積

3Gy 程の電離放射線によりマウス増血組織の正常細胞 (○) は損傷を受け、ゲノム構造異常を伴う損傷細胞が生ずる (☆)。その多くは死滅もしくは損傷を回復するが、修復が不完全な異常細胞 (◎) の集団が残る。そのいずれかが前骨髄性白血病細胞 (◆) であり、この後プロモーション・プログレッションおよびゲノム異常を蓄積し、20-30%の固体で1-2年後白血病細胞 (●) として増殖する。

類似した染色体異常を持つそれぞれ独立に分離した白血病細胞株のゲノム異常のうち、共通性の高い異常を分子として分離することができれば、その発生過程のインジケータ分子として過程の分析が可能になるであろう。

腫瘍発生の分子機構を効果的に解析するためには、インジケータとなる遺伝子異常を同定・分離することが必要である。我々は骨髄性白血病の発生過程を模式的に図1のようにみなした。すなわち、正常C3H/Heマウスの造血細胞集団は3Gy程の電離放射線でその一定集団が損傷を受ける。その時、いくつかのゲノム異常が発生しているはずである。損傷を受けた細胞は、損傷を修復するか細胞死することで照射後消失してしまう。しかし20-30%の個体では損傷細胞が持ち越され、これは前白血病細胞としてその後のプロモーション・プログレッションを経て異常ゲノムの総量はさらに増加すると考えられる。そして、1-2年後、白血病細胞として増加し始める。その段階では白血病細胞自身がクローン内多様性を獲得しているので異常ゲノムの総量はさらに増加し、これが腫瘍の悪性化に寄与するものと考えられる。

既に腫瘍化した白血病細胞では細胞の腫瘍化の記録としてゲノム異常がゲノム内に保存されている筈である。もし、この異常ゲノムを分子としてクローン化することができ、さらにこれが複数の独立に発生した骨髄性白血病細胞に共通性の高い異常であれば、その異常ゲノムをインジケータとして発生過程の研究が可能になる。他の腫瘍で行なわれている後期過程の解析のみならず、白血病発生までの1-2年間の追跡やこれに修飾を与える環境もしくは物質的要因の検索が可能になる。

このようなインジケータとなるゲノム異常はこの放射線誘発マウス骨髄性白血病系では皆無である。そこで我々は、多数の異常ゲノム分子を分離することを目的として以下の三方向から研究を行なった。まず、オンコジーンやサイトカイン遺伝子の異常発現が複数の独立発生骨髄性白血病細胞で観察されること⁴⁾からこれらのオンコジーンおよびサイトカイン遺伝子の構造異常の検索を行なった。第二に、IL-1遺伝子クラスター近傍に遺伝子構造異常の多発部位のあることに注目し、IL-1ゲノムDNAのクローニングおよびウォーキングに着手した。第三に白血病細胞におけるゲノム異常を効率的に分離するためのゲノムサブストラクション法のひとつであるIn gel competitive reassociation (IGCR) 法¹²⁾を行なった。

II. 実験

1. 白血病細胞

放射線誘発骨髄性白血病は8週齢のC3H/Heオスマウスに3GyのX線を全身照射した後、1-2年後に発生する¹⁾。白血病マウスの脾臓では白血病細胞が大多数を占めているので、脾臓から白血病細胞を分離し、原発白血病細胞とする。この細胞をメスC3H/Heマウスに注射すると、約1か月後、マウスは白血病になり、脾臓に白血病細胞が集中する。このin vivo passageを5回以上繰り返すと白血病細胞は集団として安定化するので、これを株化白血病と称した。また、一部の白血病細胞は既に樹立しており、これをライン化白血病細胞と呼称した。白血病細胞としての材料として、これらの原発白血病、株化白血病およびライン化白血病を使用した。これらの細胞材料は共同研究者である放医研生理病理研究部の吉田和子博士および根本久美恵が担当した。

これらの白血病細胞からのRNAおよびDNA調製、陽イオン化ナイロン膜を用いたノザンおよびサザンハイブリダイゼーション、プローブ調製は常法に従って行なった¹³⁾。また、定量分析の際は必要に応じてLSE法による定量的プロットィング^{14, 15)}を行ない、イメージング・プレートTMを感光させてそのPSL値をフジフィルムBAS2000システムで測定した。

2. プローブ

プローブとしてしようしたオンコジーンのうち、v-fos、v-abl、v-Ha-ras、v-rafはJapen cancer

research resources bank (JCRB)、マウス *c-fms* は Fred Hutchinson Cancer Research Center の Dr. R. Rohrschneider、マウス *c-myb* は Melbourne Tumour Biology Branch の Dr. T. J. Gonda、マウス *c-myc* は理化学研究所の戸所一雄博士から供給を受けた。マウス *jun* 遺伝子族は ATCC 由来のものを使用した。また、サイトカイン cDNA のうち、マウス G-CSF cDNA は大阪バイオ研の長田重一博士、マウス IL-1 α および β cDNA はヤクルト中研の大脇眞博士、マウス IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6 および IL-7 の cDNA は日本免疫学会などから放医研生理病理研究部の武藤正弘博士および障害・臨床研究部の鈴木元博士を介して供給を受けた。また、マウス M-CSF および GM-CSF の cDNA は公表された配列データを利用してクローニングした。コントロールに利用した β アクチン DNA は和光純薬工業の製品を使用した。これらは 200–500bq の DNA 断片としてランダムプライマー法で ^{32}P 標識し、 $10^8\text{cpm}/\mu\text{gDNA}$ 程度の比放射能を持つ DNA プローブとした。

3. ゲノムライブラリーの調製およびクローニング

ゲノム DNA ライブラリーは、C3H/He マウス肝臓、STS/H マウス肝臓、C57BL-B10 マウスの肝臓、ライン化白血病細胞 L-8704 および株化白血病細胞 L-8028 由来のゲノム DNA から調製した。50–200kbp のゲノムを制限酵素 MboI による部分切断、ショ糖密度勾配遠心法による分子量分画の後、 λ EMBL3 ベクターに連結し、GIGAPACK GOLDTM (Stratagene) を用いてインビトロパッケージングを行ない、大腸菌 P2-392 株で増幅してそれぞれから 10^6 – 10^7 独立クローンを含むライブラリーを得た。また、Balb/c マウスゲノム DNA ライブラリーは JCRB および Stratagene から 2 種類入手した。クローニングは通常のブランクハイブリダイゼーション法により行なった。また、サブクローニングにはプラスミドベクター pBluescript II KS+TM (Stratagene) を使用した。

4. ゲノムコピー数の決定

制限酵素切断した正常細胞および白血病細胞由来のゲノム DNA $10\mu\text{g}$ ずつを電気泳動分離し、アルカリプロベティングもしくは LSE 法でそれぞれ HybondN+TM (Amersham) もしくは OptiblotTM (IBI) 陽電荷ナイロン膜にトランスファーし、ベキキングにより結合させた。まず、 β アクチン DNA プローブを用いて通常のハイブリダイゼーションを行ない、正常細胞 DNA にハイブリダイズした β アクチン DNA 量を測定し、これを内部標準としてナイロン膜上の白血病細胞 DNA の相対比を求めた。この場合、分子量増加に従ってナイロン膜へのトランスファー効率の低下することがあるので、 β アクチン DNA プローブで生じた複数のバンド相互の放射線強度比を求め、分子量によるトランスファー効率の変動を測定するとともに定量に有効な分子量範囲を決定した。次に、ナイロン膜上の β アクチン DNA プローブを除去した後、目的とする DNA プローブを用いてリハイブリダイゼーションを行ない、対象バンドの放射能を測定した。更に当該プローブを除去して再び β アクチン DNA プローブでリハイブリダイゼーションを行なって放射能測定を行ない、ナイロン膜からの DNA の脱落による試料相互の相対比低下のないことを確認した。 β アクチン DNA プローブによる放射能あたりの目的プローブによる放射能を求め、正常マウスゲノム DNA の値を 1 コピー/半数体としてコピー数を算出した。Balb/c および C3H/He マウスのゲノムコピー数を比較し、精度が 10% 以下であることを確認した。

Ⅲ. 既知のオンコジーン・サイトカイン遺伝子の構造・機能の異常

多くの腫瘍細胞でオンコジーン myc、ras などの発現の亢進していることが知られている。そこで放射線誘発マウス骨髄性白血病細胞について遺伝子発現を検討した(表1)⁴⁾。その結果、他の多くの腫瘍細胞と同様にmyc、myb、Ha-rasのRNA発現がすべての白血病細胞株に共通して観察された。これは白血

表1 放射線誘発マウス骨髄性白血病細胞株におけるオンコジーンおよびサイトカイン遺伝子発現

株名	遺伝子発現 ¹⁾							
	myc	myb	fos	jun	ras ²⁾	fms	raf	IL-6
L-8313 ³⁾	+	+	±	±	+	-	+	-
L-8704 ⁴⁾	+	+	±	±	++	+	+	-
L-8065 ⁵⁾	++	++	-	-	++	+	++	-
L-8069 ⁵⁾	+	+	-	-	+	+	-	-
L-8072 ⁶⁾	++	++	++	++	++	±	+	+
L-8720 ⁶⁾	++	+	++	++	+	±	+	-
L-8726 ⁶⁾	+	+	+	++	+	±	-	-
L-8718 ⁷⁾	+	+	-	-	++	-	-	-
L-8929 ⁷⁾	++	++	-	-	+	-	-	-
L-8738 ⁷⁾	+	+	-	-	+	±	-	-

株名	IL-1α	IL-1β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	GM-CSF	G-CSF
L-8313 ³⁾	-	-	-	+	-	-	++	-
L-8704 ⁴⁾	-	+	-	-	+	-	-	-
L-8065 ⁵⁾	-	-	+	-	±	-	-	-
L-8069 ⁵⁾	-	-	-	-	-	-	-	-
L-8072 ⁶⁾	-	++	-	-	+	-	-	+
L-8720 ⁶⁾	-	-	-	-	±	-	-	-
L-8726 ⁶⁾	-	-	-	-	-	-	-	-
L-8718 ⁷⁾	-	-	-	-	-	-	-	-
L-8929 ⁷⁾	-	-	-	-	±	-	-	-
L-8738 ⁷⁾	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾ 遺伝子発現は通常のノザンプロットハイブリダイゼーションで行なった。RNA量に応じて-, ±, +, ++であらわした。

²⁾ Ha-ras

³⁾ T細胞系白血病細胞株(このタイプの発生率は著しく低い)

⁴⁾ マクロファージ様白血病細胞株

⁵⁾ 単球様白血病細胞株

⁶⁾ 顆粒球様白血病細胞株

⁷⁾ 単球顆粒球様白血病細胞株(このタイプの発生率が高い。)

病細胞集団に増殖過程にある細胞の多数含まれることを示しているものと考えられる。一方、fos、jun等の転写因子遺伝子をコードするオンコジーンの場合は、これらを発現していない株および持続的に発現している株の2種類の白血病細胞株があった。fosを発現していない細胞に血清やホルボレステルを添加すると、他の多くの細胞と同様に、一過性のfos発現が観察された。一方、fosを持続的に発現している株はいずれも組織化学的に顆粒球様白血病として分類されている白血病細胞株であった。この細胞にアクチノマイシンD等の転写阻害剤を添加しても変動が少ないことなどから、当該白血病細胞のfosRNAの持続的発現はfosRNAの細胞内プールの分解調節という、転写後調節の異常に起因することが示された。独立に発生した顆粒球様白血病細胞株に共通してこの性質がみられることから、持続性fos発現が白血病細胞の顆粒球様形質に寄与することまたは、顆粒球様白血病に共通した遺伝子機能異常のあることが示唆された⁴⁾。また、プロトオンコジーンrafやサイトカイン類の遺伝子は白血病細胞株によって発現しているものもあったが、共通性は見出されなかった。共通性のないということは白血病細胞株相互の多様性の反映であろうし、これらの遺伝子発現亢進は細胞の白血病化の一因とも結果とも考えられる。

本研究の目標である遺伝子構造異常を同定するために、これらの白血病細胞株および原発白血病細胞合計18独立クローンのゲノム DNA について5種類の制限酵素で切断して、サザンブロットハイブリダイゼーション分析を行なった。これらの細胞に特徴的なゲノム異常を示唆する知見が不足していたので、既知のオンコジーン、サイトカイン遺伝子およびサイトカイン受容体遺伝子について、検討した。分子生物学的手法で検出可能なゲノム異常には、ras や p53 などで見られる点突然変異、遺伝子コピー数増幅、遺伝子再編があるが、ここでは特に遺伝子再編とコピー数に注目して行なった。コピー数に関しては著しい増幅は検出されなかったが、myc および abl 等のコピー数が2倍程度に増幅している株もあった(表2)。しかし、この程度のオンコジーン増幅では腫瘍の寄与は低く、このことは白血病細胞の細胞集団内多様性を

表2 放射線誘発マウス骨髄性白血病細胞ゲノムにおける遺伝子コピー数

白血病細胞株名	遺伝子コピー数/半数体 ¹				
	IL-1 β	c-abl	c-myc	IL-3	GM-CSF
L-7926 ²	1.1	1.9	1.1	1.0	1.0
L-8002 ²	1.3	1.7	1.5	1.0	1.0
L-8028 ²	0.9	1.9	1.3	1.2	1.1
L-8032	1.6	2.0	1.2	1.0	0.9
L-8065	1.0	1.3	0.8	0.8	0.9
L-8072	1.3	1.6	1.1	1.1	1.0
L-8704	1.0	1.0	1.2	1.2	1.1
マウス系統					
C3H/He	1.0	1.1	1.1	1.0	1.0
Balb/c	1.0	0.9	1.0	1.0	1.1

¹ 本文の方法で半数体あたりのコピー数を決定した。

² I型の第二染色体脱落⁹⁾を持つ白血病細胞株

IL-1の存在部位である2F領域が第二染色体の片方で消失している。

反映しているものと考えられる。一方、M-CSF受容体をコードするオンコジーンであるfmsのキナーゼドメイン領域に相当するcDNA断片をプローブとしたところ、fms以外にも弱くハイブリダイズするfms類縁遺伝子が多数検出され、その内に構造異常が認められた。その本態を明らかにするためにこの類縁遺伝子のクローニングを試み、繊維芽細胞増殖因子(FGF)受容体遺伝子、血小板由来成長因子受容体遺伝子および5種類の未同定遺伝子を得たが、異常の原因となる遺伝子はこの内に存在しなかった。塩基配列分析の結果、得られた類縁遺伝子はいずれもfmsに似た構造を持ち、チロシンキナーゼドメインおよび膜貫通ドメインを所有するFGF受容体遺伝子族であった。白血病細胞ではこのFGF受容体遺伝子族に属する特定の遺伝子に再編の発生していることが示唆された。このような類縁遺伝子構造異常はオンコジーンmycを用いた際にも検出された。現在、我々はこれらの本態のクローン化を試みている。

また、IL-3遺伝子について検討したところ、ライン化白血病細胞L-8704ではIL-3遺伝子のコピー数の半減、白血病細胞株L-8028では上流領域の遺伝子再編が認められた。現在我々は、後者の再編領域のクローン化を行なっているが、再編領域はIL-3遺伝子の転写開始点近傍であり(図2)、一部のライン化白血病細胞にみられるIntracisternal A particle (IAP) 挿入¹⁰⁾に類似した現象がin vivoで誘発した骨髄性白血病細胞でも発生していることが判明した。このことは白血病発生過程でIL-3遺伝子上流の配列に機能的DNA断片が入り込んだことを意味しており、この機能的DNAのマウスゲノム内での挙動が白血病発生に寄与または同調している可能性もあるので、現在この機能的領域の構造および機能の解析

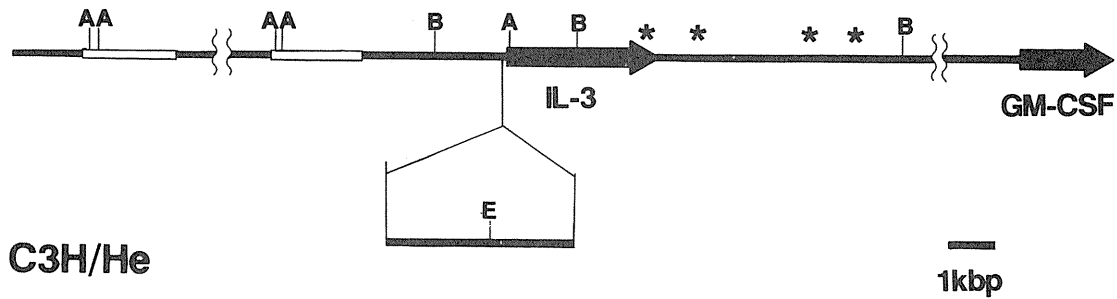


図2 C3H/He 正常マウスおよび白血病細胞における IL-3~GM-CSF ローカスの構造

IL-3 遺伝子から GM-CSF 遺伝子に至る領域には 2kbp 同方向反復配列（白ヌキ）に挟まれた大規模な遺伝子挿入および小規模の塩基置換や DNA 挿入による（*で示す部分）多数の制限酵素多型がある。いくつかの白血病細胞株では半コピーの IL-3 遺伝子調節部位に約 4kbp の DNA 挿入が発生している。（A : ApaI, B : BamHI, E : EcoRI による切断部位）

を行なっている。このような腫瘍細胞に特徴的な事象に限らず、IL-3 遺伝子近傍はマウス系統相互で制限酵素多型があり¹⁷⁾、比較的变化しやすい領域である。最も顕著な相違はその上流 5kb における組換え現象であり、Mus musculus musculus 内に 2 種類の多型がある。また、ゲノム下流でも小規模な重複、脱落による多型がある。IL-3 遺伝子下流には GM-CSF 遺伝子があり¹⁸⁾、両者の組織特異発現の調節領域やエンハンサーなどの領域はその構造遺伝子からかなり離れている¹⁹⁾。これらの発現調節機構にはまだ不明な点も多いが、この多型が全身レベルでの造血組織調節や白血病化細胞の特質にも影響を与え得る。また、造血系組織の分化増殖に重大な寄与をする IL-3 と GM-CSF は放射線急性障害後の造血系の回復にも影響を与えるので、骨髄性白血病の原因細胞出現が確率的事象ならばこの出現率の増減に IL-3 と GM-CSF が関与するとも考えられる。実際、放射線により骨髄性白血病の発生は一部の近交系マウスに限られており、この系統差に当該多型の関与する可能性がある。

IV. 第二染色体遺伝子、IL-1 β ゲノム DNA のクローニング

前述のように、第二染色体に白血病化に伴う切断部位が散在し、その一部は IL-1 α および IL-1 β 遺伝子からなる IL-1 遺伝子クラスター近傍に位置している¹⁰⁾。また、IL-1 遺伝子クラスターにもマウス系統間で制限酵素多型が存在し²⁰⁾、メチル化パターンに多型が生じているという報告¹⁰⁾ やマウス染色体の放射線脆弱部位もこの近傍に存在するという報告⁷⁾ もある。IL-1 遺伝子と放射線障害との関連を示す直接的な証拠はないものの、IL-1 遺伝子近傍に何等かの脆弱部位もしくは組換え多発部位が存在していることは事実であろう。その明確な距離は現在までのところ明らかにされていないが、IL-1 遺伝子からウォーキング・クローニングにより直接分離するという方策もある。いずれにしても、この領域の分子分析を行なうためには IL-1 遺伝子のゲノム DNA をある程度の範囲でクローニングする必要がある。そこで IL-1 β cDNA プロブを用いて IL-1 β ゲノム DNA 領域のクローニングを行ない、その結果、7kbp の IL1 β 遺伝子全長を含む 20kbp 領域をクローニングした（図 3）。この近傍に既報のような異常が実証され、そして異常点までの距離が 100kbp 程度であるならばウォーキングで分離し、白血病発生過程分析のための有用なインジケータとすることができるので、現在この DNA から分析のためのプロブを新たに作製し、白血病細胞ならびに放射線障害を受けた正常造血系細胞のゲノム分析に着手している。

また、第二染色体対の片方が脱落した C3H/He 由来の白血病細胞株は第二染色体切断もしくは転座に

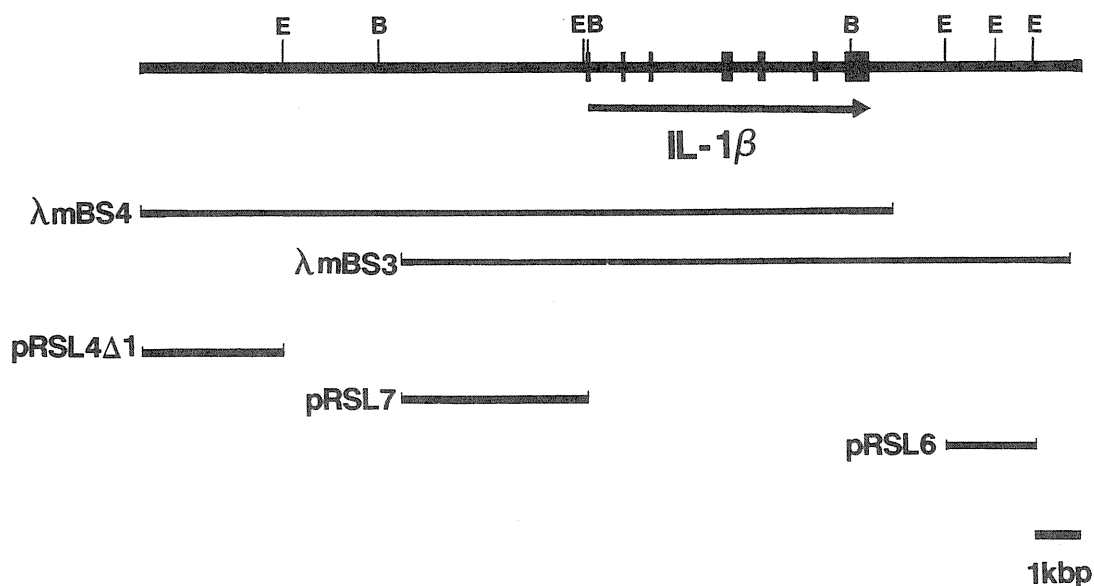


図3 マウス IL-1 β ゲノム DNA の制限酵素地図

上段はクローン化により構造の明らかとなった領域。B は BamHI、E は EcoRI による切断部位を示す。太線は IL-1 β のエクソンに相当する部位。クローン化した λ フェージクローン (λ mBS4 および 3)、およびゲノム分析に使用可能なプローブ領域 (pRSL4 Δ 1, pRSL6 および pRSL7) を示す。

7種類のパターンがあり、その内の一群の白血病細胞株は IL-1 遺伝子クラスターに相当する領域が消失しているという染色体分析結果が報告されている⁵⁾。染色体分析と分子生物学的分析が一致するならば、この株における IL-1 遺伝子のコピー数は正常細胞に比べて半減しているはずである。そこで3種類の当該白血病細胞株の IL-1 遺伝子コピー数を測定したが、いずれもコピー数の半減は認められなかった(表2)。この結果は、染色体分析で検出できない程度の規模で IL-1 ゲノムが転座もしくは重複していることを示唆している。一方、別の第二染色体遺伝子であるプロトオンコジーン c-abl は存在部位が IL-1 と異なり、これらの白血病細胞株で当該染色体領域の脱落は認められない。こちらのコピー数は1-2と正常細胞のそれより多いものがあった。このことは abl ローカスにも小規模な重複の発生していることを示唆している。これらの結果が白血病細胞集団内の染色体数多様性の反映である可能性も否定できないが、今回我々のクローン化した IL-1 β ゲノム DNA を用いれば FISH 法などの染色体分析でそれを直接検討することも可能であろう。

V. IGCR 法による構造異常ゲノムのクローニング

IGCR 法¹²⁾ を導入すれば骨髄性白血病細胞に特徴的なゲノム構造異常を直接分離することができる。すなわち、特定の白血病細胞株 DNA および正常マウス DNA を特定酵素で切断し、その後正常マウス DNA 断片のみをアルカリホスファターゼで末端リン酸基を除去して不活性化する。この正常細胞 DNA 断片と白血病細胞 DNA 断片をモル比 1/100 で混合した後にゲル電気泳動で分子量分画すると、白血病細胞由来の異常を持たない DNA 断片は正常マウス DNA 断片と同一の挙動をゲル内で示す。しかし、白血病細胞にごく僅か存在する異常 DNA 断片は正常マウス DNA 断片とサイズが異なるためにゲルの異なる部分にそれぞれ分画される。ゲルをアルカリ処理するとゲル内でこれらの DNA は変性して一本鎖になる。ゲルを中性にして一定条件で加温するとゲル内で DNA は再生し二本鎖になるが、その過程で白血病細胞由来の異常を持たない DNA 断片は100倍量多い正常マウス DNA 断片とハイブリダイズして不活性化し

てしまう。一方、異常 DNA はゲル内でその近傍にハイブリダイズする不活性化 DNA がいないために異常 DNA 同士が再結合し、結果として末端の活性化した DNA 断片を再生する。ゲル内の DNA を回収すると大多数の DNA 断片は不活性化しており、活性 DNA はおもに異常 DNA である。末端を脱リン酸化した等モル量のプラスミドベクターをこの DNA 混合物に加えて DNA リガーゼ処理すると、異常を持つ活性 DNA の半数は不活性ベクターと、残りは不活性正常マウス DNA と結合し、不活性のベクターや正常マウス DNA はそのまま残存する。この混合物を大腸菌に導入すれば、異常 DNA およびベクターからなる組換えプラスミドが優先的に得られる。

我々は白血病細胞 DNA 源としてライン化白血病細胞 L-8704 を、正常 DNA 源として C3H/He マウスの肝臓 DNA を使用した。両者の DNA を制限酵素 EcoRI 処理し、IGCR 法を行なった。なお、原報のハイブリダイゼーション条件はホルムアミド存在下42℃であるが、夾雑者や副反応によるクローニング効率低下を避けるため、ホルムアミド不在下65℃で行なった。また、内部標準として pUC19 プラミドベクターの EcoRI 断片を使用した。この内部標準 DNA は白血病細胞および正常マウスの DNA 混合物に加え、電気泳動、ゲル内での変性および再生を行なった後、ゲルからの回収して定量ハイブリダイゼーションで再生が完全であることを確認した。その結果、約100クローン組換えプラスミドを得た。このうち12クローンについて、それぞれの挿入 DNA 断片を分離し、プローブとしてゲノムの分析に使用した。EcoRI 処理した L-8704 および正常マウスの DNA をそれぞれ電気泳動し、トランスファーしたナイロン膜を使用してサザンプロットハイブリダイゼーションを行なったところ（図4）、6クローンはサテライトもしくは L1 配列などの多コピー配列を含むらしく、全 DNA 領域とハイブリダイズした。また、2クローンは多コピー配列を含むらしく、多数のバンドが見られた。1クローンは単一コピーゲノムと判断できたが、このゲノムは白血病細胞で異常化していなかった。しかし、3クローンは白血病細胞の相当ゲノム断片のサイズが正常細胞のそれと明らかに異なっており、構造異常ゲノムクローンであることが明らかになった。このことは、12クローンのうち少なくとも3クローンが異常構造ゲノムクローンであり、白血病細胞の異常ゲノム分離のために本方法が導入可能であることが示された。

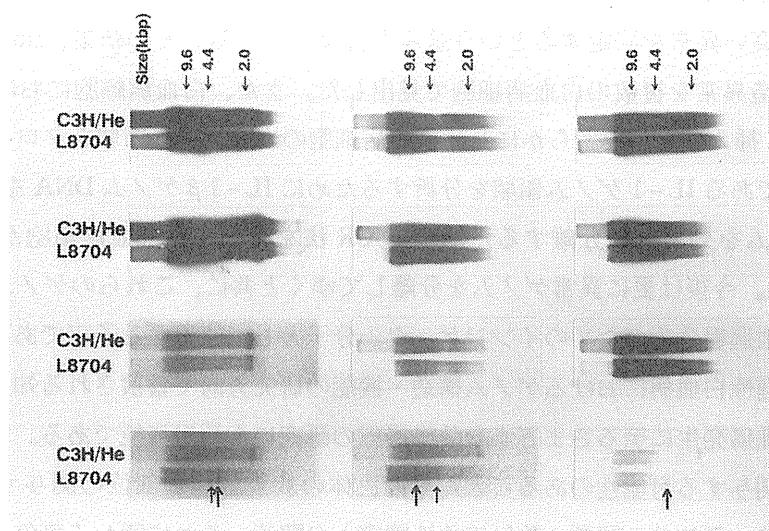


図4 IGCR 法で分離した白血病細胞由来 DNA を用いたサザンプロットハイブリダイゼーション L-8704 白血病細胞 DNA からIGCR 法で得られた組換え体のうち、12クローンをそれぞれプローブとして C3H/He マウスおよび L-8704 細胞のゲノムを分析した。

考察および結論

放射線による障害は染色体異常や多様な DNA 分子の切断パターンをまねくことからゲノム構造異常の発生が示唆されるものの、放射線障害後の核酸修復機能や染色体修復・維持機構など不明な点も多く、さらに細胞の死や放射線障害自体の確率性による集団の変動が通常分子生物学的手法では解析できないことなどもあいまって、分子レベルでの解析は進んでいない。

また、腫瘍の発生過程の分子機構はヒト大腸癌などの限られた系を除いては殆ど不明である。腫瘍発生の分子機構に関する知見は増加しているが、多くは *in vitro* の系を含め、腫瘍発生の後期過程に属し、その前期から中期過程の解析は殆ど進んでいない。これまでの一般的な手法ではこの後期過程に属するゲノム異常は分離可能であるが、初期から中期過程については分離・同定が困難である。これまでに多数のオンコジーンやサプレッサー遺伝子などの後期過程に関連するゲノム異常が同定・分離されているが、腫瘍の多様性ゆえに腫瘍に関連する遺伝子の構造・機能の異常は腫瘍それぞれに異なっており、それぞれの腫瘍発生系ごとに分析を進める必要がある。

放射線障害としての腫瘍研究は一般に確率的事象であるとされている初期の損傷から前腫瘍状態、そして腫瘍発生に至る過程をある程度分割して研究を進めて行く必要があるが、現在までのところそれを判定するためのインジケータすら存在しない。この過程で体細胞レベルでの遺伝的多様性の発生などゲノムの構造・機能が深く関与することが予想されているものの、実際に関与する遺伝子そのものや、修飾を受けたゲノム分子の例などの実例がないのが現状である。これを打開するためには既存のインジケータや知見を利用するだけでなく、新たなインジケータの同定・分離が必要であろう。たとえば、放射線から腫瘍に至る過程の分子分析は特定のモデル系を設定し、その系において共通性の高いゲノム異常を同定・分離することができれば、これらをインジケータとして過程を分割するとともにそれぞれの過程分析に適した方法を導入・開発し、分子機構の解析を進めることができる。

我々はこの放射線誘発マウス骨髄性白血病をモデルとして放射線障害から白血病発生に至る過程の分子機構を解析することを目的として、白血病化した細胞から異常ゲノムを分離・同定し、独立に発生した白血病細胞に共通性の高い異常を同定するという試みを行なっている。その結果、*fms* 類縁遺伝子および *myc* 類縁遺伝子の構造異常を複数の白血病細胞で見出した。また、白血病細胞における IL-3 遺伝子の脱落や上流への DNA 挿入の発生を明らかにし、白血病細胞の当該ゲノム領域をクローニングした。さらに第二染色体遺伝子である IL-1 ゲノム領域を分析するために IL-1 β ゲノム DNA をクローニングした。そして異常構造ゲノムを効率的に分離するために IGCR 法を行ない、白血病細胞から異常構造ゲノム DNA クローンを得た。今後は更に異常ゲノムを分離してゆくと共に、これらのゲノム異常の共通性の分析を行ない、腫瘍発生過程分析のためのインジケータ分子として使用する予定である。

この放射線誘発骨髄性白血病におけるゲノム構造・機能の研究方向で蓄積される知見は、細胞の腫瘍化に限らず放射線から腫瘍発生に至るさまざまな分子過程の研究にも活用可能である。すなわち、この系では発生率に個体差が関与する可能性のあること⁹⁾ や染色体の放射線脆弱部位の関与する可能性のあること⁷⁾ などから、系統差・個体差の問題、放射線急性障害との関連、それに関わる染色体維持機構の分子分析などの研究にもこれらのクローン化分子が活用可能であると考えている。

なお、本研究は主に平成 4 年度から放医研・薬理化学研究部で石原弘および田中泉が行なったものである。また、データおよび引用文献には平成 2 年度から平成 4 年度まで放医研・薬理化学研究分で石原弘、

常岡和子および色田幹雄が行なったプロジェクト研究で得られた結果を一部使用している。

- 1) Seki, M., Yoshida, K., Nishimura, M. and Nemoto, K. : Radiation-induced myeloid leukemia in C3H/He mice and the effect of predonisolone acetate on leukemogenesis. *Radiat. Res.*, 127, 146-149, 1991.
- 2) de Klein, A., van Kessel, A. G., Grasveld, G. : A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia. *Nature*, 300, 765-767, 1982.
- 3) Le Bieu, M. M., Pettenati, M. J., Lemons, R. S., Diaz, M. O., Westbrook, C. A., Larson, R. A., Sherr, C. J. and Rowley, J. D. : Assignment of the GM-CSF, CSF-1 and FMS genes to human chromosome 5 provides evidence for linkage of a family of genes regulating hematopoiesis and for their involvement in the deletion (5q) in myeloid disorders. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51, 899-909, 1986.
- 4) Ishihara, H., Yoshida, K., Nemoto, K., Tsuneoka, K., and Shikita, M. : Constitutive overexpression of the c-fos gene in radiation-induced granulocytic leukemia in mice. *Radiat. Res.*, 135, 394-399, 1993.
- 5) Hayata, I., Seki, M., Yoshida, K., Hirashima, K., Sado, T., Yamagiwa, J., and Ishihara, T. : Chromosomal aberrations observed in 52 mouse myeloid leukemias. *Cancer Res.*, 43, 367-373, 1983.
- 6) Silver, A. R. J., Breckon, G., Masson, W. K., Malowany, D., and Cox, R. : Studies on radiation myeloid leukemogenesis in the mouse. E. M. Fielden, et al. eds. *Radiation Research*, vol. 2, Taylor and Francis., London, 1987, pp494-556.
- 7) Breckon, G., Papworth, D., Cox, R. : Murine radiation myeloid leukemogenesis : A possible role for radiation-sensitive sites on chromosome 2. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 3, 367-375, 1991.
- 8) Hayata, I. personal commun.
- 9) Silver, A., Cox, R. : Telomere-like DNA polymorphisms associated with genetic predisposition to acute myeloid leukemia in irradiated CBA mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 1407-1410, 1993.
- 10) Sliver, A., George, A., Masson, W., Breckon, G., Adam, J., Cox, R. : DNA methylation changes in the IL-1 (2F) chromosomal region of some radiation-induced acute tyeloid leukemias carrying chromosome 2 rearrangements. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 3, 376-381, 1991.
- 11) Stephens, J. C. : Cytogenetic map of human genes. S. J. O'Brien ed., *Genetic Maps* 6th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1993, pp5.1-5.45.
- 12) Yokota, H. and Oishi, M. : Differential cloning of genomic DNA: Cloning of DNA with an altered primary structure by in-gel competitive reassociation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 6398-6402, 1990.
- 13) Maniatis, T., Sambrook, J., and Fritsch, E. F. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1982.
- 14) Ishihara, H., Shikita, M. : Electroblothing of double-stranded DNA for hybridization experiments : DNA transfer is complete within 10 minutes after pulsed-field get electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 184, 207-212, 1990.
- 15) Ishihara, H., Shikita, M. : Ultrarapid Northern blotting by the low salt concentration electroblotting (LSE) method. *Meth. Mol. Cell. Biol.*, 2, 37-40, 1990.
- 16) Ymer, S., Tucher, W.Q.J., Sanderson, C.J., Hapel, A.J., Campbell, H.D. and Young, I.G. : Constitutive synthesis of interleukin-3 by leukemia cell line WEHI-3B is due to retroviral insertion near th gene. *Nature*,

317, 255–258, 1985.

- 17) Campbell, H. D., Ymer, S., Fung, M. C. and Young, I. G. : Cloning and nucleotide sequence of the murine interleukin–3 gene. *Eur. J. Biochem.*, 150, 297–307, 1985.
- 18) Barlow, D. P., Bucan, M., Lehrach, H., Hogan, B. L. M., and Gough, M. : Close genetic and physical linkage between the murine haemopoietic growth factor genes GM–CSF and Multi–CSF (IL3). *EMBO J.*, 6, 617–623, 1987.
- 19) Nishida, T., Yoshida, M., Arai, K. and Yokota, T. : Definition of GC–rich motif as regulatory sequence of the human IL–3 gene: Coordinate regulation of the IL–3 gene by CLE/GC box of the GM–CSF gene in T cell activation. *Int. Immunol.*, 3, 245–254, 1991.
- 20) D'Eustachio, P., Jadidi, S., Fuhlbrigge, R. C., Gray, P. W., and Chaplin, D. D. : Interleukin–1 α and β gene : Linkage on chromosome 2 in mouse. *Immunogenetics* 26, 339–343, 1987.

3. 放射線誘発マウス胸腺リンパ腫の染色体
転座とがん抑制遺伝子の変異

武藤正弘*

Characterization of Preliminary Cells and Analysis of Initial
Events in Radiation-induced Thymic Lymphomas

Masahiro MUTO

Division of Physiology and Pathology, Natl. Inst. Radiol. Sci. Chiba 263.

Abstract

With a combined use of cell separation by cell sorter and intrathymic injection assay, we found that the main target cells for radiation-induced thymic lymphomagenesis are DN ($CD4^- CD8^-$), CD8SP ($CD4^- CD8^+$), and DP ($CD4^+ CD8^+$) cycling immature, J11d⁺ thymocytes. After leukemogenic irradiation, the thymocytes expressing TL-2 antigen, which is not expressed on normal thymocytes of the B10 mice, develop from these immature cycling thymocytes, and prelymphoma cells develop, albeit infrequently, from these TL-2⁺ cells. To analyze the clonality of prelymphoma cells, limited numbers of TL-2⁺ thymocytes from individual irradiated mice were injected into Thy 1 congenic mice intrathymically, and DNA from the donor type T cell lymphomas was examined by Southern blot analysis and the DNA sequences of the V-J junctional sites were investigated.

During the last decade, many oncogenes and tumor suppressor genes involved in neoplasia have been identified and the function of these genes have been investigated extensively. However, it is difficult to evaluate which genomic alteration plays an important role in the procedures of tumour initiation, promotion and progression in oncogenesis. Since the T cell receptor (TCR) rearrangement is a sequential process and unique to the progeny of each clone, a strategy for investigating the oncogenic processes is to compare the alteration of the genes from lymphomas derived from a single donor by intrathymic injection of limited number of

*放射線医学総合研究所 生理病理研究部 (〒263 千葉県稲毛区穴川4-9-1)

prelymphoma cells with the pattern of TCR rearrangements of these lymphomas.

To investigate the contribution of chromosome aberrations in radiation-induced lymphomagenesis, we analyzed the chromosome G-banded karyotypes of the donor type T cell lymphomas from above experimental system. Many numeral and structural aberrations were observed in the donor-derived T cell lymphomas. Interestingly, common aberrations including translocations almost in the lymphomas of each group were found. The results indicated that chromosome aberrations including translocations might be important candidates of initiating events in radiation-induced lymphomagenesis. The PCR-SSCP analysis of p53 and ras genes suggested that the mutations of the p53 gene might be late-occurring events during oncogenesis.

1. はじめに

放射線による発癌の機構を考える場合に、発がんの初期過程に、放射線がどの様に寄与しているのかを知ることは、発がんの予防やリスク評価を行なう上で大変重要なことである。最近の研究の進展により、がん化に伴って数多くのがん遺伝子、がん抑制遺伝子の変化や染色体転座が同定され、それに関係する遺伝子が分離されて来た。しかし、これらの変化が発がんの初期に生じたものか、後期に生じたものかを解明することは大変難しい問題である。

B10 系や C57BL マウスを、1 カ月令から 1.61Gy 4 回 8 日ごとに照射すると、その個体の胸腺に高率 (95%以上) に胸腺リンパ腫が生じる¹⁻²⁾。これらの実験系における発がんの分子レベルでの機構を解明するためには、腫瘍が発生する個体における細胞レベルでの知見が不可欠である³⁻⁵⁾。これまで B10.Thy 1 コンジェニックマウスを使用して放射線誘発胸腺リンパ腫の発生過程で、前がん細胞である前リンパ腫細胞が、照射後かなり早い時期 (4-8 日目) に胸腺内に生じ、照射後 21-31 日目には 63%以上の個体の胸腺に検出されることを明らかにしてきた⁶⁾。ここで述べた前リンパ腫細胞は、胸腺環境下では増殖してやがてリンパ腫になるが、腹腔では増殖出来ない細胞として定義した。これに対して胸腺リンパ腫細胞は、胸腺内や腹腔内いずれにおいても、自律性増殖を示す。

この論文では、セルソーターによる細胞分離と胸腺内移植法を使用して、前リンパ腫細胞を解析し、さらに照射個体の胸腺細胞中の前リンパ腫細胞の頻度を、限界希釈法を使用して分析した結果を、簡単に述べる。また T 細胞リセプターの種々の probe を使用して、Southern 法による遺伝子再配列の解析や VJ 結合領域の DNA 配列の分析を行なって、前リンパ腫細胞のクローナリティを解析した。この実験系を使用して、T 細胞リセプターの遺伝子再配列の分析と種々のがん化にともなう変化とを比較することにより、発がん過程においてそれらの変化が生じた時期を推定する実験系を考え、ras がん遺伝子突然変異、p53 がん抑制遺伝子や染色体異常の生じる時期について解析したので、これらの結果を中心に報告する。

(2) 材料と研究方法

(a) マウス : マウスは、B10f/Sn ♀ (Thy 1.2, H-2^b, 以後 B10.Thy 1.2 と呼ぶ) と B10.NRH.Thy-1^a ♀ (Thy 1.1, H-2^b, 以後 B10.Thy 1.1 と呼ぶ) を使用した。B10.Thy 1.1 マウスは、佐渡等によって、NRH/Nrs マウスからの Thy 1.1 マーカーを B10系マウスに反復戻し交配によって導入して育成されたマウスである。これらのマウスは、当研究所の動物生産施設で、コロニーから育成し、クリーンコンベンション

ナルの環境下で育成した。

(b) X線照射：全身照射は、信愛3号（島津製作所）を使用して、60R/min, (200KVp, 20mA, 0.5 mm Cu + 0.5mm Al フィルター、半価層1.24mm, 照射距離52cm) の条件で行なった。マウスは33±3日齢から、1.61Gy 8日ごとに、4回照射した。

(c) 抗体：ビオチン化抗 CD8 抗体、抗 Thy1.2 抗体およびビコエリスリン (PE) 標識ストレプトアビジンは、ベクトンディキンソン (Mountain View, CA) から購入した。FITC 標識された抗 Thy1.1 抗体、抗 CD8 抗体および抗 TL-2 抗体は、明治乳業 (東京) から購入した。抗 CD4 (GK1.5)¹⁰ と J11d 抗体⁹ は、ハイブリドーマを移植したヌードマウスの腹水から CMAffi. Gel Blue (バイオラド、CA) クロマトグラフィで抗体を精製し、FITC 標識やビオチン標識して、使用した⁹。

(d) 蛍光標識による分布とソーティング：胸腺細胞 (4X10⁶) を、FITC 標識した抗 CD4 抗体または抗 TL-2 抗体およびビオチン標識抗 CD8 抗体、または J11d 抗体で反応させ、洗浄後、PE 標識ストレプトアビジンで反応させた。細胞を洗浄した後、FACStar (ベクトンディキンソン) で分析し、または必要に応じてソーティングも行なった。

(e) 胸腺内移植および Thy 1 タイピング：胸腺内移植および Thy 1 タイピングは、論文⁸⁾に記載した方法に従って行なった。

(f) サーゼン法による解析：高分子 DNA を種々の細胞から抽出し、5 μg の DNA を 1% アガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロースフィルター上にトランスファした¹⁶⁾。プローブの標識やハイブリダイゼーションは、Molecular cloning¹¹⁾に記載された条件で行なった。

(g) PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism)：T細胞リセプターの V_{H4} や J_{H1} 遺伝子内の適当な primer および p53 の Exon 4 から Exon 9 までの両端の primer、さらに H-ras, K-ras, N-ras 遺伝子の codon 12 と codon 61 付近をはさむ 20-24 mer の primer を合成した。遺伝子増幅¹²⁾ は [α-³²P] dCTP 存在下で、94℃ 1分、アニーリング温度を 55-57℃ 2分、72℃ 2分のサイクルを 30回行ない、その後増幅した DNA を変性させた後、6% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行なった。

(h) 染色体標識の作成：リンパ腫細胞を PMA 10 ng/ml, Ionomycine 250 ng/ml, 5X10⁻⁵M 2-mercaptoethanol, 10% 胎児血清を含む RPMI 1640 培養液で 48時間培養し、その後、2時間 TN-16 (30 ng/ml) 処理を行なった。染色体標識の作成および Gバンドの検出は、宮下¹³⁾等の方法に従って行なった。

(3) 結果

1. 前リンパ腫細胞の特性

X線照射後、種々の時間後に胸腺細胞を調整し、抗 TL-2 抗体⁹⁾ と J11d 抗体⁹⁾ で 2重染色して、フローサイトメトリーで分析した (Fig. 1)。Fig. 1 に示すように正常の B10.Thy 1.1 マウスの胸腺細胞は、J11d⁺ TL-2⁻ と J11d⁻ TL-2⁻ 細胞集団から構成されているが、X線照射後 24日目や 115日目のマウスの胸腺細胞では、J11d⁺ TL-2⁻ と J11d⁻ TL-2⁻ 細胞以外に J11d⁺ TL-2⁺ 細胞集団が出現していることが明らかになった⁹⁾。前リンパ腫細胞の表面抗原の特性を調べるために、照射後 1カ月目の B10.Thy 1.1 マウスの胸腺細胞を抗 TL-2 と J11d 抗体で染色、セルソーターで J11d⁺ TL-2⁺, J11d⁺ TL-2⁻, J11d⁻ TL-2⁻ 細胞亜集団に分離した。これらの細胞 (10³ または 10⁴) を、3.78Gy 照射した B10.Thy 1.2 マウスの胸腺内に移植し、移植後 5~6カ月後に発生してきたリンパ腫について、抗 Thy 1.1 または抗

Thy 1.2 抗体で染色して分析し、供与者由来のT細胞リンパ腫の発生頻度を決定した。これらの結果から、前リンパ腫細胞は J11d⁺ TL-2⁺ 胸腺細胞の中に存在していることが明らかになった (Table 1)。同様に抗 CD4 抗体⁹⁾ と抗 CD8 抗体により照射個体の胸腺細胞を染色し、セルソーターで4つの細胞亜集団に

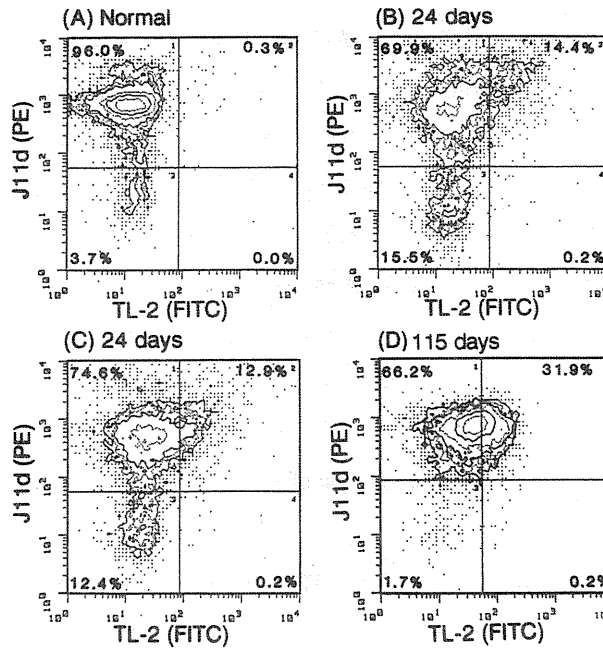


Fig. 1. Analysis of J11d vs TL-2 expression on thymocytes at various times after irradiation. Thymocytes recovered from mice on day 24 (B,C) and day 115 (D) after irradiation and from normal mice (A) were stained with against the J11d marker and TL-2 antigen. The percentages of cells contained in populations 1 through 4 are shown.

Table 1

Incidence of donor-type T cell lymphomas developing after intrathymic injection of thymocyte fractions with regard to the J11d marker and TL-2 antigen.

Sorted cells ^{a)}	Thymic lymphomas					
	Donor type			Host type		
	10 ⁴	10 ³	Total ^{b)}	10 ⁴	10 ³	Total ^{b)}
J11d ⁺ TL-2 ⁺	4/4	3/4	7/8 ^{c)}	0/4	0/4	0/8 ^{c)}
J11d ⁺ TL-2 ⁻	0/4	0/4	0/8	0/4	1/4	1/8
J11d ⁻ TL-2 ⁻	0/4	0/4	0/8	0/4	0/4	0/8

- a) Thymocytes were taken from B10.Thy 1.1 mice 1 mo. after split-dose irradiation and stained with mAb against J11d marker and TL-2 antigen. These stained cells were sorted into three fractions (J11d⁺TL-2⁺, J11d⁺TL-2⁻, J11d⁻TL-2⁻).
- b) These sorted cells (10⁴ or 10³ cells) were injected intrathymically into 3.78 Gy-irradiated B10.Thy 1.2 mice, after which the incidence of donor- or host-derived T cell lymphomas was determined.
- c) Number of T cell lymphoma-bearing mice / total number of mice tested.

分離し、宿主の胸腺に移植し、発生していた供与者由来T細胞リンパ腫の頻度を解析した。その結果、前リンパ腫細胞は、主に $CD4^- CD8^-$ と $CD4^- CD8^+$ 細胞に存在し、また割合は小さいが、 $CD4^+ CD8^+$ 細胞にも存在することが明らかになった。これらの結果から放射線誘発胸腺リンパ腫発生における主な標的細胞は、DN ($CD4^- CD8^-$)、CD8SP ($CD4^- CD8^+$)、および DP ($CD4^+ CD8^+$) で、しかも分裂の盛んな未熟な J11d 陽性の胸腺細胞であることが示された。そして1.61Gy 4回照射後、TL-2陽性細胞はこれらの未熟な分裂の盛んな細胞から発生してくるものと考えられ、さらに前の実験結果から前リンパ腫細胞は、これらTL-2陽性細胞の中から発生してくることが明らかになった。これを模式的に示したのが Fig. 2 である。

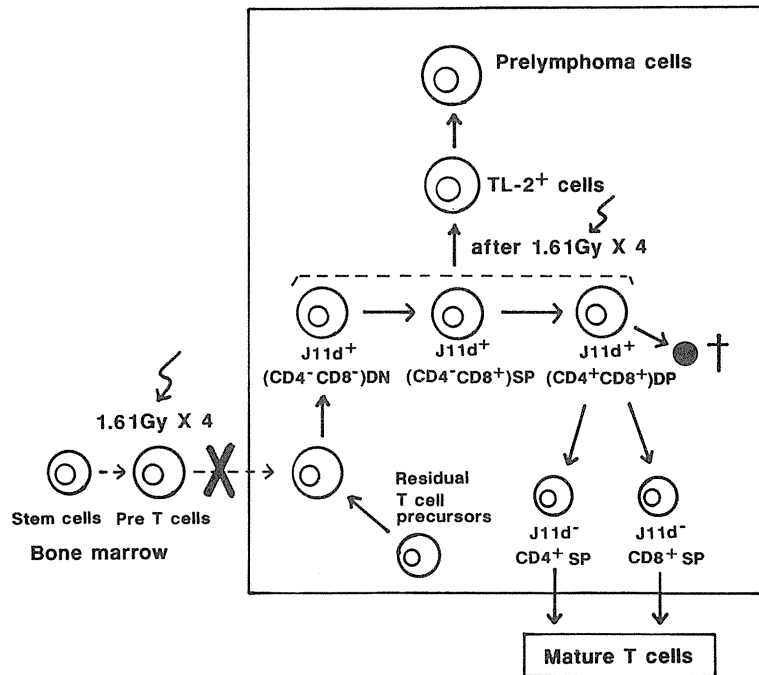


Fig. 2. Target cells for radiation-induced thymic lymphomagenesis and development of prelymphoma cells.

2. 照射個体の TL-2陽性胸腺細胞中の前リンパ腫細胞の頻度

これまでの結果から、照射個体の TL-2 陽性胸腺細胞の中に前リンパ腫細胞が含まれていることが明らかになってきたが、次に問題となるのは TL-2 陽性細胞すべてが、がん化のイニシエーションを生じているのかどうかということである。この問題を解析するために個体別に、照射後28日目の B10. Thy 1.1 マウスの胸腺細胞を抗 TL-2 抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析して TL-2 陽性細胞の割合を算定した。この TL-2 陽性細胞を限界希釈して、宿主 B10. Thy 1.2 マウスの胸腺に移植して、供与者由来T細胞リンパ腫の発生頻度を調べることで、TL-2 陽性細胞中の前リンパ腫細胞の頻度を解析した (Table 2)。この結果、A-H の 8 個体では、TL-2 陽性細胞中に $1/10^4 \sim 1/10^5$ の頻度で、前リンパ腫細胞が含まれていることがわかった。一方 No. 9~No. 14 では、前リンパ腫細胞は非常に頻度が低いか、あるいはほとんど含まれていないことが示された。このことは、すべての TL-2 陽性細胞は、がん化のイニシエーションを起こしているのではなく、TL-2 陽性細胞の中から頻度の低い確率で、何らかのがん化への変化が生じて前リンパ腫細胞になることを示している¹⁴⁻¹⁵⁾。

Table 2

Incidence of donor type T cell lymphomas developed in the recipient thymuses

Irradiated individual donor mice	No. of TL-2 ⁺ cells inoculated ^{a)}				Frequency of prelymphoma cells in TL-2 ⁺ cells
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	
No. 1 (D) (D1-D6)	0/4	2/4 (D5,D6)	4/4 ^{b)} (D1-D4)	ND	6.8 x 10 ⁻⁴
No. 2 (A) (A1-A7)	ND ^{c)}	ND	3/4 (A5-A7)	4/4 (A1-A4)	1.4 x 10 ⁻⁴
No. 3 (B) (B8-B10)	ND	ND	0/4	3/4 (B8-B10)	1.4 x 10 ⁻⁵
No. 4 (E) (E7-E11)	ND	ND	3/4 (E10,E11)	4/4 (E7-E9)	1.4 x 10 ⁻⁴
No. 5 (F) (F1-F4)	ND	ND	4/4 (F3,F4)	4/4 (F1,F2)	>6.8 x 10 ⁻⁴
No. 6 (G) (G5-G10)	ND	ND	2/4 (G9,G10)	4/4 (G5-G8)	6.8 x 10 ⁻⁵
No. 7 (H) (H11,H12)	ND	ND	0/4	2/4 (H11,H12)	6.8 x 10 ⁻⁶
No.8-No.14	ND	0/4	0/4	0/4	<6.8 x 10 ⁻⁷

a: Thymocytes were taken from individual B10.Thy 1.1 mice (No.1-No.14) 28 days after irradiation and stained with the anti TL-2 mAb. The TL-2⁺ cells (10²-10⁵) from individual mice were injected intrathymically into B10.Thy 1.2 mice.

b: Incidence of donor type T cell lymphomas was examined in a group of 4 recipient mice.

c: ND, not determined.

3. 前リンパ腫細胞のクローナリティ

次に発がんの機構を考える上で重要な点は、このようながん化のイニシエーションの生じる細胞は、1つの細胞から由来するのか、またはいくつかの細胞にがん化のイニシエーションが生じ、悪性の段階で選択されて単一クローンとなるのかという点である。

これを検証するため、Table 2 で示したA~Hの照射個体由来のT細胞リンパ腫36例からDNAを抽出分離し、種々のT細胞リセプターのprobeを使用して、Southern法で解析した。Fig. 3は、DおよびE照射個体マウス由来リンパ腫について、DNAをHind IIIで消化後J_{γ1}をprobeにして、サーザン法で解析したものである。J_{γ1}をprobeにした場合、J_{γ1}とJ_{γ2}にホモロジーが存在するため、Germ lineバンドとしては6.6kbと11.7kbの2本が生じる。KはKidney DNAであり、LはLiver DNAである。V_{γ4}とJ_{γ1}あるいはV_{γ2}とJ_{γ2}が遺伝子再配列を生じると、それぞれ1.4kbと3.6kbのバンドが生じる。同様の解析を他のリンパ腫について解析すると、すべてV_{γ4}J_{γ1}の遺伝子が遺伝子再配列を生じていることがわかった。クローナリティにつて、さらに詳しく調べるために、D由来のD1-D6の6例の供与者由来T細胞リンパ腫について、γ遺伝子再配列結合領域のDNAシーケンシングを行なった。その結果、V_{γ4}J_{γ1}

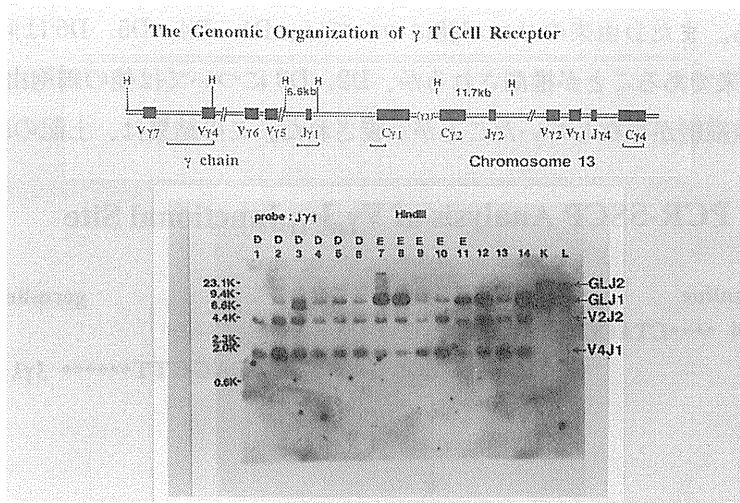


Fig. 3. The Genomic organization of γ T cell receptor and Southern blot analysis of TCR γ gene rearrangements. Donor type T cell lymphoma DNAs (D1–D6, E7–E11) were digested with Hind III and hybridized with the germline DNA probe $J_{\gamma 1}$.

Germline sequences	V γ 4	TACTGTTCTACGGCTAAAG cacagca.....	J γ 1cactgtg ATAGCTCAGGT	No. of Frame Clones
D1	-----	TT	-----	-----	+ 3
D2	-----	CCACTA	-----	-----	- 3
D3	-----	-GGAT	-----	-----	- 3
D4	-----	TT	-----	-----	+ 4
D5	-----	TT	-----	-----	+ 3
D6	-----	TT	-----	-----	+ 1

Germline sequences	V γ 2	TACTGTGCAGTCTGGATGAG 7mer.....	J γ 27mer ATAGCTCGGGCTT	No. of Frame Clones
D1	-----	GAT	-----	-----	- 3
D2	-----	T	-----	-----	- 3
D3	-----	G	-----	-----	+ 4
D3	-----	GT	-----	-----	- 2
D4	-----	GAT	-----	-----	- 1
D5	-----	GAT	-----	-----	- 3
D6	-----	GAT	-----	-----	- 3

Fig. 4. Nucleotide sequences of V γ 4–J γ 2 junctional sites from D1–D6 thymic lymphomas.

や V γ 2J γ 2 の結合領域では、6 例の内 2 例 (D2, D3) の結合領域の DNA 配列が、他 (D1, D4–D6) の DNA 配列と異なっていた (Fig. 4)。 β 鎖については、D2, D3 と D1, D4–D6 が異なった遺伝子再配列バンドを示していた。 α 遺伝子については、それぞれのリンパ腫から RNA を抽出し、cDNA を合成して、ライブラリーを作り、C α を probe にしてクローニングを行い、DNA 配列を決定した結果、それぞれのクローンは V α と J α の異なった組合せの配列をしていた¹⁷⁾。以上の結果は、照射後初期の γ T 細胞リセプター遺伝子再配列の生じる時期において、照射個体 D の胸腺中には少なくとも 3 クローン存在し、それが胸腺環境下で増殖していく過程で、1 つの前がん細胞が選ばれてそれが最終的に悪性の T 細胞リンパ腫クローンとなることが示された。他の個体由来 T 細胞リンパ腫についても、J γ 1 を probe にして Southern 法で解析した結果、全てのリンパ腫において、V γ 4J γ 1 遺伝子再配列が生じていることが示されたので、クローナリティを調べるために、V γ 4J γ 1 結合領域の両側の部分のプライマーを合成して PCR–SSCP 法で解析し、遺伝子再配列結合部位の DNA 配列の違いを解析した (Fig 5, Fig. 6)。その結果、A 由来の T 細胞リンパ腫 A1 – A7 については同じバンドを示しているため、これらのリンパ腫は、単一細胞由来で

あることが推定される。またD由来のリンパ腫については、D1, D4, D5, D6は同じバンドを示しているので、1つの細胞由来であることが推測されるが、D2, D3については他の細胞由来であると推定され、3クローン前リンパ腫細胞が存在していたことが示唆された。この結果は、上記の結合領域のDNAシー

PCR-SSCP Analysis of V γ_4 J γ_1 Junctional Site

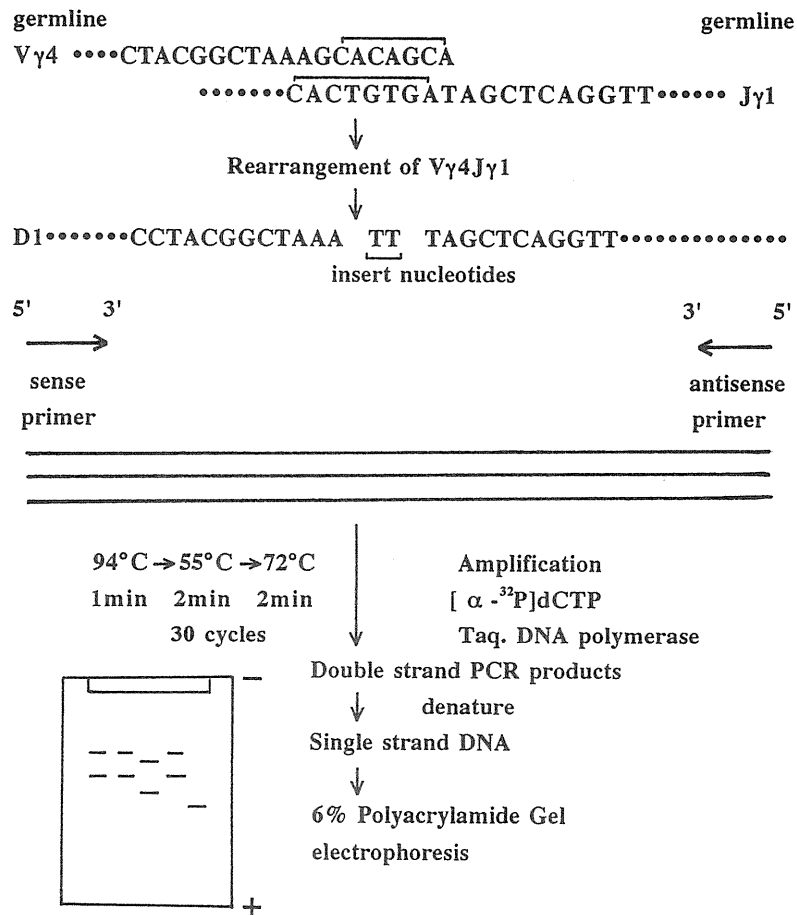


Fig. 5. Experimental system for PCR-SSCP analysis of V γ_4 -J γ_1 junctional sites.

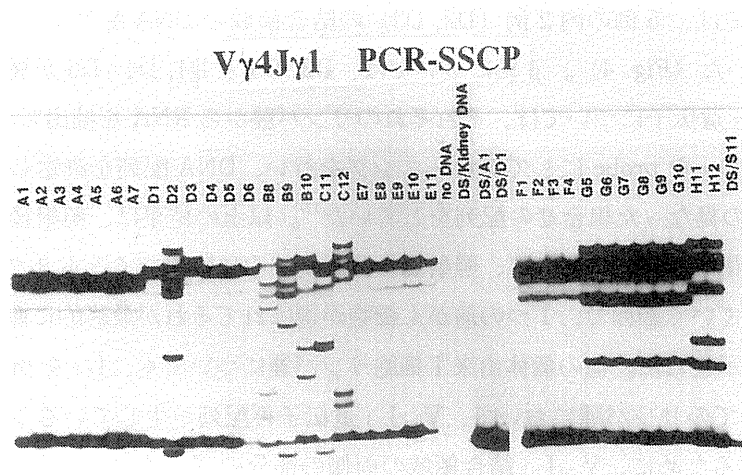


Fig. 6. PCR-SSCP analysis of V γ_4 -J γ_1 junctional sites.

クエンシングの結果にちょうど対応していることが示された (Fig. 4)。

また E, F, G, H 由来リンパ腫もそれぞれの群で同じバンドパターンを示しますので、単一細胞由来であることが示唆される。B, C, についてはバンドが異なるので、それぞれ 3 クローン、2 クローン由来であることが示唆される。これらの結果を Table 3 に示す。

Table 3.
Clonal Analysis of the Prelymphoma Cells by PCR-SSCP

	<i>Hind</i> III (J γ 1 probe)	Clonality of pre-neoplasia
A1	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	monoclonal origin
A2	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
A3	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
A4	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
A5	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
A6	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
A7	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
	(V γ 4J γ 1)	
D1	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)TT.....	3 clones
D2	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)CCTACTA.....	
D3	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)GGAT.....	
D4	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)TT.....	
D5	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)TT.....	
D6	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)TT.....	
B8	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	3 clones
B9	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
B10	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
C11	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	2 clones
C12	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
E7	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	monoclonal origin
E8	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
E9	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
E10	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
E11	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
F1	V γ 4J γ 1 (1.4kb)	monoclonal origin
F2	V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
F3	V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
F4	V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
G5	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	monoclonal origin
G6	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
G7	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
G8	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
G9	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
G10	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	
H11	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	monoclonal origin
H12	V γ 2J γ 2 (3.6kb), V γ 4J γ 1 (1.4kb)	

4. がん化の過程を解析する実験系の開発

これまでに数多くのがん関連遺伝子やがん抑制遺伝子が分離同定され、機能的研究や、がん化によるこれらの遺伝子変化の研究が多くなされて来ている。しかしながら、これらの変化が、がん化の初期に生じたものか、後期の悪性化の段階で生じたものかを同定するのは大変難しい問題である。これらの問題に挑戦する1つの方法は、前に示した1つの個体の前リンパ腫細胞から発生した donor 由来 T 細胞リンパ腫について、T 細胞リセプターの遺伝子再配列のパターンと、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変化等を比較

解析することである。

1つの例として、前に述べたDという1個体のマウス由来のT細胞リセプターについて考えてみると、D1およびD4-D6については、Fig. 4やFig. 5からもわかるように、 γ T細胞リセプターの遺伝子再配列パターンが一致していたので、これらは単一細胞由来であろうと推定される。この実験研究のD1からD6について、p53遺伝子やras遺伝子の変化および染色体の変化を調べた時に、もしそのがん化による変化が共通にあれば、がん化の初期に生じたものと推定されるし、D1, D4-D6のリンパ腫で共通で、D2やD3では異なっていれば、その変化は γ T細胞リセプター遺伝子再配列が生じた時期とかなり近い時期に生じた変化であると推定出来る。またD1-D6の間で、その変化がそれぞれ異なっていた場合は、がん化の後期で生じたものであると推定出来る。

5. rasがん遺伝子およびp53がん抑制遺伝子変異の解析

最近がんの発生・進展の過程が遺伝子レベルで解明されつつあり、細胞の増殖・がん化に対して、促進的に働くがん遺伝子と抑制的に働くがん抑制遺伝子の異常が複雑に重なりあって、がん細胞の性状を規定していることがわかってきた。

例えばRas蛋白質は、細胞膜の内側に存在していて、GTPをGDPへと加水分解する活性を持っていることが示され、rasがん遺伝子のcodon 12とcodon 61に突然変異が生じると、これにより変異したRas蛋白質は、この活性が非常に弱くなっていて、GTPが結合した状態のままになっていることが見いだされた。Ras蛋白質は、増殖因子のシグナル伝達に関与していると考えられていて、このGTPが結合したままのRas蛋白質の存在により、細胞を分裂に進ませ、がん化させると考えられている。

p53は細胞分裂のS期へ入る直前のG1期後期で、複製開始が起きないように抑制する働きをしていると考えられていて、この遺伝子に変異が生じることにより、細胞のがん化が生じると考えられている。またp53がん抑制遺伝子は、細胞周期やがん化にともなう遺伝子不安定性とも関係していることが最近解明されつつあり、がん化に関係する遺伝子として、p53は大変重要な遺伝子の内の1つである。

そこで今回は上記に述べた実験系で、がん化にともなって、rasがん遺伝子のcodon 12とcodon 61付近のDNA配列に突然変異が生じているかどうか、H-ras, K-ras, N-rasについて、primerを合成し、PCR-SSCP法で分析した。その結果、K-rasやH-rasについては、はっきりした突然変異は見いだされなかった。いくつかのリンパ腫で欠失が見いだされたが、これについては、現在さらに詳しい解析を行っており、またN-rasについても現在解析中である。これらの結果から、rasについては、それぞれの群で共通の突然変異は見いだされなかった。

またp53については、Exon 4からExon 9までについて、各Exonの両端において適当なprimerを合成し、PCR-SSCP法で、上記の実験系のdonor由来T細胞リンパ腫について変異が生じているかどうか解析した。Fig. 7はその代表的な例を示したものであるが、Exon 5では、B10やE7に突然変異が見いだされた。P-5はExon 5に突然変異が存在することが知られているマウスのがん細胞のpositive controlである。Table 4はdonor由来T細胞リンパ腫について、PCR-SSCPで分析した結果をまとめたものである。この結果はp53の突然変異は稀にしか生ぜず、一つの群の中で、共通に生じるような突然変異は生じていないことが示された。このことから、これらのp53の突然変異は、発がん過程の後期で生じたものであろうと推定される。

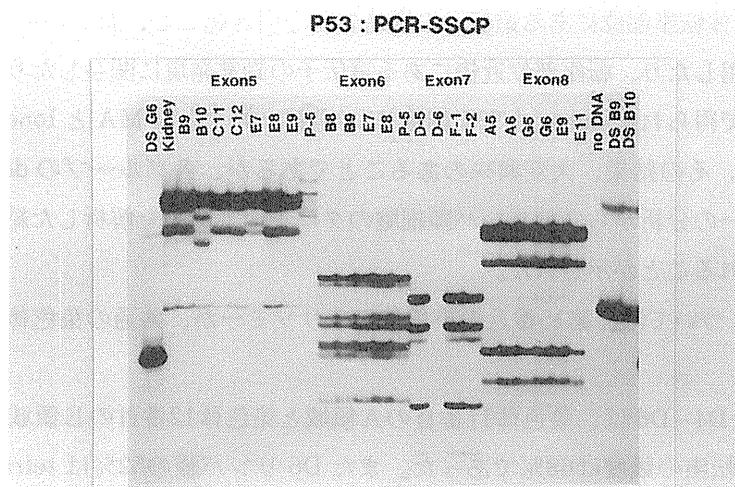


Fig. 7. Representative PCR-SSCP analysis of Exon 5-Exon 8 of p53 gene in the T cell lymphomas.

Table 4. Summary of PCR-SSCP analysis of p53 gene. (+) indicates mutation.

Irradiated Individual B10.Thy 1.1 mice (28 days after FX)	Donor type lymphomas (Thy 1.1 type)	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9
A	A1					
	A2					
	A3					
	A4					
	A5					
	A6					
	A7					
B	B8					
	B9					
	B10	+				
C	C11					
	C12					
D	D1					
	D2					
	D3					
	D4					
	D5					
	D6			+		
E	E7	+				
	E8					
	E9					
	E10					
	E11					
F	F1					
	F2					
	F3					
	F4					
G	G5				+	
	G6					
	G7					
	G8					
	G9					
	G10					

6. 染色体異常の解析

白血病における染色体異常は、染色体の数の異常（トリソミー、モノソミー）と構造的異常（転座、切断、逆位、挿入など）の二つのタイプがある。染色体数の異常は遺伝子の量的恒常状態を乱し、また染色体の欠失は他方のアレルの何らかの原因による不活性化に伴って、がん化に寄与すると考えられている。

一方、染色体転座は染色体転座部位にある遺伝子の構造変化を引き起こし、新しいキメラ遺伝子を形成し、細胞増殖の促進へと作用したり、転座部位近傍にある遺伝子の異常発現に関与したりしている。

ここでは上記実験系で得られた donor 由来 T 細胞リンパ腫について、PMA と Ionomycine で培養して、染色体異常を解析した。その結果、大変興味のあることであるが、各グループの donor 由来 T 細胞リンパ腫の T 細胞リセプターの分析から、前リンパ腫細胞のクローナリティを解析した結果と対応して、共通の染色体異常が観察されることが示された。

(a) A 群の A1–A7 については、第15番目の染色体のトリソミーが、共通の染色体異常として、観察された。

(b) D 群の D1, D3, D4–D6 は、染色体11番目の A 領域と染色体12番目の E 領域との間に、共通の転座が生じており、その転座の頻度は68%であった。また D6 リンパ腫の52%は tetraploid であった。D2 は染色体12番目の E 領域と他の同定出来ない染色体との間の転座が生じていることが示された。γ T 細胞リセプターの遺伝子再配列との比較分析により、D3 と D1, D4–D6 に生じた染色体 11A と 12E の転座は、γ T 細胞リセプターの遺伝子再配列の少し前の時期で生じたことが示唆された (Fig. 8)。

(c) E 群の E7–E10 は、染色体12番目の F 領域と染色体15番目の A 領域との間の共通の転座が観察された。この染色体異常の頻度は88%であった。しかし染色体の数は、このグループでは一様でなく、E7 のほとんどは tetraploid (64%) である。E8 と E10 は、diploid と triploid の間の aneuploid であった (47–53 chromosomes)。E11には、上記の染色体異常は見いだされず、正常核型を示していた。

(d) F 群の F1–F4 では、染色体7番目の F 領域と染色体10番目の C 領域との間に、共通の転座が存在し、また第15番染色体トリソミーと X 染色体モノソミーの共通の染色体異常が存在していた。これらの染色体異常の頻度は82%位であった (Fig. 9)。

(e) G 群の G5–G10 は、染色体1番目の A 領域と染色体13番目の D 領域との間の共通の転座が認められ、その転座の頻度は79%であった (Fig. 10)。

(f) H 群の H11, H12 は染色体6番目の A 領域と X 染色体の B 領域の転座が共通に認められた。その転座の頻度は87%であった。

(g) B 群 (B8–B10) と C 群 (C11, C12) のリンパ腫については、それぞれ異なった染色体の核型を示し、共通な染色体異常は認められなかった。γ T 細胞リセプターの $V_{HJ_{T1}}$ 遺伝子再配列の結合部位の PCR–SSCP 法による解析では、これらそれぞれのリンパ腫で異なったバンドを示し、それぞれ異なった前リンパ細胞由来であることが示唆されているので、それぞれのリンパ腫が異なった核型を示すことと対応していると考えられる。例えば B9 では、染色体15番目と18番目にトリソミーが68%認められるが、B8 や B10 では認められない。また

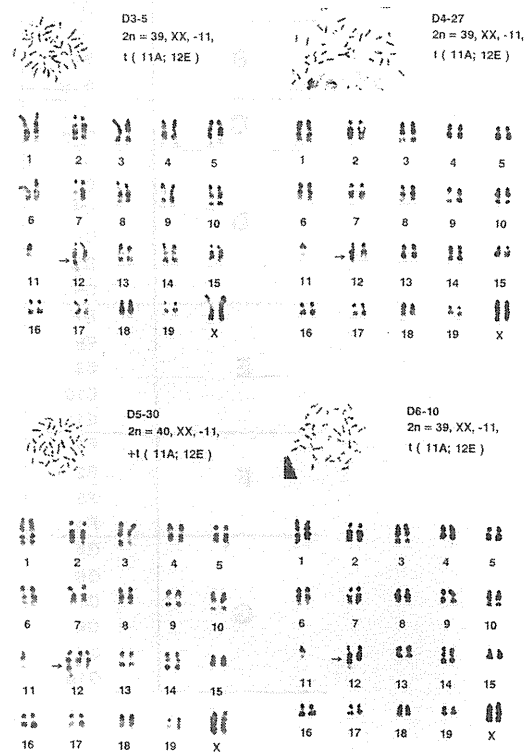


Fig. 8. G-banded karyotype of chromosomes prepared from the T cell lymphomas (D3–D6) of D group.

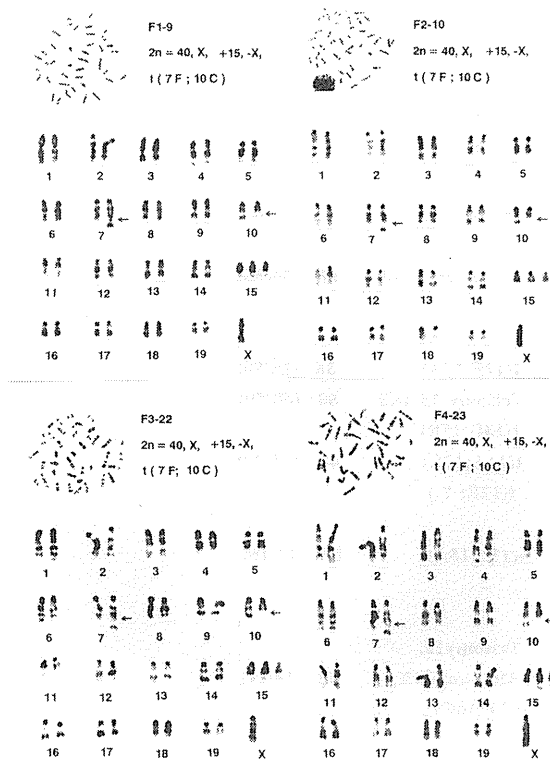


Fig. 9. G-banded karyotype of chromosomes prepared from the T cell lymphomas (F1-F4) of F group.

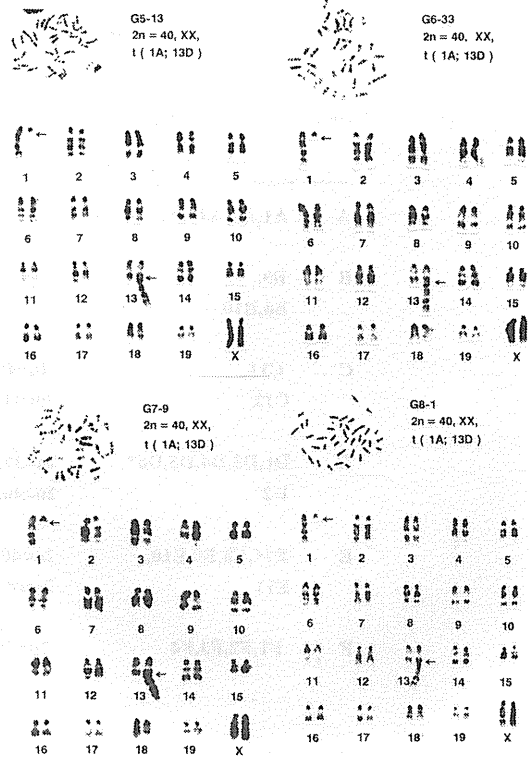


Fig. 10. G-banded karyotype of chromosomes prepared from the T cell lymphomas (G5-G8) of G group.

C11 では、染色体12番目のE領域と15番目のA領域に転座が生じていて、その頻度は36%であった。一方C2は染色体13番目のD領域と15番目のB領域との間で約80%に転座が認められ、また、15番トリソミーが観察された。

これらの結果をまとめたのが Table 5 である。これらの結果から、放射線誘発胸腺リンパ腫の場合、 γ T細胞リセプターの遺伝子再配列の生じる前後の比較的初期において、ある特定の転座をも含めた染色体異常が生じていることが示唆された。

(4) 考 察

放射線によって誘発されるがんの場合、放射線は、ある特定の標的細胞が、直接的あるいは間接的に不可逆的な損傷を受けるインシレーターとして作用していると考えられている。そしてその結果として、標的遺伝子に、特定の変異が生じることが、がん化の initiating events であることは、一般に認められていることである。しかしながら放射線によって、どのような標的遺伝子に、どのようなメカニズムで変異が生じるのかは、まだ解明されていない。

これまで我々は B10 系マウスを使用して、放射線によって高率に胸腺に T細胞リンパ腫が生じる系を使用して、放射線によって生じる初期の細胞レベルでの変化や前がん細胞である前リンパ腫細胞の発動態の解析を行なって来た。その結果、放射線誘発胸腺リンパ腫発生における主な標的細胞は、DN (CD4⁻ CD8⁻)、CD8SP (CD4⁻ CD8⁺)、および DP (CD4⁺ CD8⁺) で、しかも分裂の盛んな未熟な J11d 陽性の胸腺細胞であることが示された。そして 1.61Gy 4 回照射後、TL-2 陽性細胞はこれらの未熟な分裂

Table 5

The Frequency of Common Chromosome Aberrations in Lymphoma Cells of Each Group

Group	Lymphoma Cells	Basic Karyotype	Common Aberration	Frequency (%)
A	A1,A2,A3*,A5,A6,A7	2n=41,XX,+15	Trisomy 15	41 (245/600)
B	B9, B8,B10	2n=42,XX,+15,+18 2n=40,XX	Trisomies 15,18 -	68 (34/50)
C	C11, C12	2n=40,XX, t 2n=41,XX,+15,t	t(12F;15A) Trisomy 15 and t(13D;15B)	36 (18/50) 80 (40/50)
D	D1,D3,D4,D5,D6*, D2	2n=39,XX,-11,t 2n=40,XX, t	t(11A;12E) t(12E; ?)	68 (15/22)
E	E7*,E8,E9,E10, E11	2n=40,XX, t 2n=40,XX	t(12F;15A) -	88 (14/16)
F	F1,F2,F3,F4	2n=40,X, +15,-X,t	Trisomy15, Monosomy X, t(7F;10C)	82 (14/17)
G	G5,G6,G7,G8,G9,G10	2n=40,XX,t	t(1A;13D)	79 (237/300)
H	H11,H12	2n=40,XX,t	t(6A;XB)	87 (7/8)

*most of cells are tetraploids.

() aberration cells / total cells

の盛んな細胞から発生してくるものと考えられ、これまでの実験結果から前リンパ腫細胞は、これら TL-2 陽性細胞の中から発生してくることが明らかになった。

次に問題となるのは TL-2 陽性細胞すべてが、がん化のイニシエーションを生じているのかどうかということである。この問題を解析するために個体別に、照射後28日目の B10. Thy 1.1 マウスの胸腺細胞を抗 TL-2 抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析して TL-2 陽性細胞の割合を算定した。この TL-2 陽性細胞を限界希釈して、宿主の胸腺に移植して、供与者由来 T 細胞リンパ腫の発生頻度を調べた結果、TL-2 陽性細胞中に $1/10^4 \sim 1/10^5$ に頻度で、前リンパ腫細胞が含まれていることがわかった。また別の照射個体では、TL-2 陽性細胞がある割合で存在するにもかかわらず、前リンパ腫細胞は非常に頻度が低いか、あるいはほとんど含まれていないことが示された。このことは、すべての TL-2 陽性細胞は、がん化のイニシエーションを起こしているのではなく、TL-2 陽性細胞の中から頻度の低い確率で、何らかのがん化への変化が生じて前リンパ腫細胞になることを示している¹⁴⁻¹⁶⁾。

次に発がんの機構を考える上で重要な点は、このようながん化のイニシエーションの生じる細胞は、1 つの細胞から由来するのか、またはいくつかの細胞にがん化のイニシエーションが生じ、悪性化の段階で選択されて単一クローンとなるのかという点である。このために分割照射 (1.61Gy×4) 後、個体別に、28日目の B10.Thy 1.1 マウスの胸腺細胞を、抗 TL-2 抗体で染色し、照射個体の胸腺細胞の TL-2 陽性細胞 ($10^2 - 10^5$) を、宿主 B10. Thy 1.2 マウスの胸腺内に移植し、3-4ヶ月後、リンパ腫が発生した個体について、供与者由来かどうかを抗 Thy 1.1 と抗 Thy 1.2 抗体で検定した。この内 8 個体 (A-H) か

らの細胞から供給者由来のT細胞リンパ腫が36例生じた。そこでこれらのリンパ腫からDNAを抽出分離し、DNAを種々の制限酵素で消化し、種々のT細胞リセプターのprobeを使用して、Southern法で解析した。クローナリティについて、さらに詳しく調べるために、D由来のD1-D6の6例の供与者由来T細胞リンパ腫について、 γ 遺伝子再配列結合領域のDNAシーケンシングを行なった。その結果、 $V_{H4}J_{H1}$ や $V_{H2}J_{H2}$ の結合領域では、6例の内2例(D2, D3)の結合領域のDNA配列が、他(D1, D4-D6)のDNA配列と異なっていた(Fig. 4)。他の個体由来T細胞リンパ腫についても、クローナリティを調べるために、 $V_{H4}J_{H1}$ の部分のプライマーを合成し、PCR-SSCP法で解析し、遺伝子再配列結合部位のDNA配列の違いを解析した(Fig. 6, Table 3)。その結果、A由来のT細胞リンパ腫A1-A7については同じバンドを示しているため、これらのリンパ腫は単一細胞由来であることが推定された。

また、E, F, G, H由来リンパ腫もそれぞれの群で同じバンドパターンを示しますので、単一細胞由来であることが示唆された。B, Cについてはバンドが異なるため、それぞれ3クローン、2クローン由来であることが示唆された。

この実験系を使用して、T細胞リセプターの遺伝子再配列の分析と種々のがん化にともなう変化とを比較することにより、発がん過程においてそれらの変化が生じた時期を推定する方法を考え、rasがん遺伝子の突然変異やp53がん抑制遺伝子の変異、および染色体異常の生じる時期について解析した。その結果、rasについては、それぞれの群で共通の突然変異は見いだされなかった。またp53については、Exon 4からExon 9までについて、各Exonの両端において適当なprimerを合成し、PCR-SSCP法で、上記の実験系のdonor由来T細胞リンパ腫について変異が生じているかどうか解析した。Exon 5では、B10やE7に突然変異が見いだされ、またD6はExon 7に、G5はExon 8に突然変異が見いだされた。この結果はp53の突然変異は稀にしか生ぜず、一つの群の中で、共通に生じるような突然変異は生じていないことが示された。このことから、これらのp53の突然変異は、発がん過程の後期で生じたものであろうと推定される。

一方、染色体異常については、これらリンパ腫において、数の異常や転座をも含めた染色体異常が頻度高く見いだされた。さらに大変重要なことは、各照射個体由来T細胞リンパ腫のT細胞リセプターの分析から前リンパ腫細胞のクローナリティを解析した結果と対応して、共通の染色体異常が観察されたことである。例えば、A由来のリンパ腫A1-A7については、第15番目染色体のトリソミーが、共通の染色体異常として観察された。またD由来のリンパ腫D1, D3, D4-D6は、染色体11番目のA領域と染色体12番目のE領域との間に、共通の転座が生じており、その転座の頻度は68%であった。D2は染色体12番目のE領域と他の同定出来ない染色体との間の転座が生じていることが示された。 γ T細胞リセプターの遺伝子再配列の分析では、D3とD1, D4-D6は異なっていたが、上記のような共通の染色体異常が存在していた。この結果は、D1, D3, D4-D6に生じた染色体11Aと12Eの転座は、 γ T細胞リセプターの遺伝子再配列の少し前の時期で生じたことを示唆している。E由来のリンパ腫E7-E10は、染色体12番目のF領域と染色体15番目のA領域との間の共通の転座が観察された。さらにF由来のリンパ腫F1-F4では、染色体7番目のF領域と染色体10番目のC領域との間に、共通の転座が存在し、また第15番染色体トリソミーとX染色体モノソミーの共通の染色体異常が存在していた。これらの染色体異常の頻度は82%位であった。またG由来のリンパ腫G5-G10は、染色体1番目のA領域と染色体13番目のD領域との間の共通の転座が認められ、その転座の頻度は79%であった。H由来のリンパ腫H11, H12についても、染色体6番目のA領域とX染色体のB領域の転座が共通に認められた。その転座の頻度は87%であ

た。

これらの結果は、放射線誘発胸腺リンパ腫の場合、前リンパ腫細胞の生じる時期で、 γ T 細胞リセプターの遺伝子再配列の生じる前後の比較的初期において、ある特定の転座をも含めた染色体異常が生じることを示唆している。以上の結果を考え合わせると、放射線誘発胸腺リンパ腫の場合、転座をも含めた染色体異常が、initiating events として位置づけられ、p53 や ras の突然変異は promotion あるいは progression の段階で生じたものであろうと推定される。

一般的に考えられている放射線発がんの機構では、1本の放射線の飛跡が、最初のがん化を生じさせる突然変異の原因となる標的 DNA に交差する相対的確率を考えて、この値が大きい場合の変異が、発がんの初期過程に寄与していると考えられている。もしこのような考え方が正しいとすると、ras がん遺伝子の突然変異は、大きな遺伝子の中の codon 12 や codon 61 のみの変異によって活性化されるので、その突然変異の確率は大変小さいと考えられる。また、abl, bcl-2, c-myc のようながん遺伝子と相対的に特異的活性化している遺伝子との間の転座によるものでも、これも2つの特異的部位を考えねばならぬので、それによって生じる確率は減少し、小さいと考えられる。これに対して、p53 や Rb 等のがん抑制遺伝子は、点突然変異、小さな欠失や大きな欠失によって、がん化に寄与していると考えられ、標的サイズの大きさから考えると、100倍位確率としては、大きくなると考えられ、がん抑制遺伝子の突然変異は、放射線発がんにおける initiating events として重要な寄与をしていることになる。

しかし我々の結果は、これとは矛盾する結果を得ているが、これらの点に関してどのように考えたら良いのだろうか。これに関していくつかの問題点を挙げてみると、1つは、放射線によって引き起こされる細胞の反応と、その結果誘発される遺伝的不安定性の問題で、これに関しては、我々も実験事実を持っている。すなわち胸腺摘出し、照射したマウスに、照射していない新生児胸腺を胸部皮下に移植することにより、照射していない胸腺由来の T 細胞リンパ腫が生じ、しかも染色体異常が観察されたことである²⁾。

また最近注目されていることであるが、DNA 配列や構造が、放射線誘発突然変異や発がんに与える影響（たとえば Telomere-like sequence が放射線誘発染色体損傷や、骨髄性白血病の発生に重要な関係があるとか、レトロウイルス様 DNA 配列やトランスポゾンのような DNA 配列が放射線によって活性化され、DNA 中に挿入されたりすること）である。このような現象は、低線量でも生じる可能性があり、DNA に直接交差して突然変異が生じることと比べて、どの程度遺伝的变化に寄与しているか解析していく必要があると思われる。

今後は上記の実験系で得られたリンパ腫について、共通に生じている染色体転座について、パルス電気泳動やその他の分子生物学的手法を使用して、転座部位の同定や DNA 配列の解析を行なうとともに、p53 突然変異や発現について、さらに詳しい解析を行ない、さらに他のがん遺伝子やがん抑制遺伝子についても、解析を行なって行きたい。

(5) 謝 辞

ここに述べた研究は、久保あゆみ氏、佐渡敏彦博士（放医研、生理病理）、Mrs. Chen Ying（中国放射防護研究院）、松田洋一博士（放医研、遺伝）、山岸秀夫博士（京大、理）、清水建之博士（京大、理）との共同研究である。胸腺リンパ腫に関する我々の研究は、動植物管理課の協力のもとに放医研で育成、生産された B10. Thy 1 コンジュニクマウスを使用して行なったものである。本稿執筆の機会に、関係者の方々に心から謝意を表したい。

〔研究発表〕

- 1) Kaplan, H. S., and Brown, M. B. A quantitative dose-response study of lymphoid tumor development in irradiated C57 black mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 13, 185-208, 1952.
- 2) Muto, M., Sado, T., Hayata, I., Nagasawa, F., Kamisaku, H., and Kubo, E. (1983) Reconfirmation of indirect induction of radiogenic lymphomas using thymectomized, irradiated B10 mice grafted with neonatal thymuses from Thy 1 congenic donors. *Cancer Res.* 43: 3822-3827, 1983.
- 3) Muto, M., Kubo, E., and Sado, T. Cellular events during radiation-induced thymic leukemogenesis in mice: Abnormal T cell differentiation in the thymus and defect of thymocyte precursors in the bone marrow after split-dose irradiation. *J. Immunol.* 134, 2026-2031, 1985.
- 4) Defresne, M. P., Rongy, A. M., Greimers, R., and Boniver, J. Cellular aspects of radiation leukemogenesis in C57BL/Ka mice: Alterations to thymic microenvironment and lymphopoiesis. *Leukemia Res.* 10: 783-789, 1986.
- 5) Sado, T., Kamisaku, H. and Kubo, E. Bone marrow-thymus interactions during thymic lymphomagenesis induced by fractionated radiation exposure in B10 mice: Analysis using bone marrow transplantation between Thy 1 congenic mice. *J. Radiat. Res.* 32, Suppl. 2, 168-180, 1991.
- 6) Muto, M. Kubo, E. and Sado, T. Development of prelymphoma cells committed to thymic lymphomas during radiation-induced thymic lymphomagenesis in B10 mice. *Cancer Res.* 47: 3469-3472, 1987.
- 7) 武藤正弘、久保えい子、佐渡敏彦 (1988) 放射線誘発胸腺リンパ腫の研究、放射線科学、Vol. 31, No. 6, 178-186.
- 8) Muto, M. Kubo, E. Kamisaku, H. and Sado, T. Phenotypic characterization of thymic prelymphoma cells of B10 mice treated with split-dose irradiation. *J. Immunol.* 144, 849-853, 1990.
- 9) Crispe, I. N. and Bevan, M. J. Expression and functional significance of the J11d marker on mouse thymocytes. *J. Immunol.* 138: 2013-2018, 1987.
- 10) Dialynas, D. P., Quan, Z. S., Wall, K. A., Pierres, A., Quintans, J., Loken, M. R., Pierres, M. and Fitch, F. W. Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule. *J. Immunol.* 131: 2445-2451, 1983.
- 11) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. Molecular cloning. A Laboratory Manual. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press., p324-389, 1982.
- 12) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: p487.
- 13) 宮下信泉、鈴木恭子、栗原端之、森脇和郎、マウス免疫遺伝学-技法と展開、森脇和郎、D. W. Bailey 編、p217, ソフトサイエンス社 (1988)。
- 14) Muto, M. Kubo, E. Sado, T. Yamagishi, H. Characterization of thymic prelymphoma cells that develop during radiation-induced lymphomagenesis in B10 Mice. *J. Radiat. Res.*, Supplement 2, 156-167, 1991.
- 15) Muto, M. Kubo, E. Sado, T. Shimizu, T. and Yamagishi, H. Characterization and clonality of prelymphoma cells of B10 mice treated with fractionated X-irradiation (FX). *Proc. Int. Conf. Radiat. Effects and Protection*, 198-205, 1992.

- 16) Kubo, E. Muto, M. Sado, T. Takeshita, S. Shimizu, T. and Yamagishi, H. Novel TCR gene rearrangements and expression in radiation-induced thymic lymphomas. *J. Radiat. Res.*, 33, 227–242, 1992.
- 17) Shimizu, T., Muto, M., Kubo, E., Sado, T. and Yamagishi, H. Multiple pre-neoplastic events and clonal selection of radiation induced mouse thymic lymphomas shown by TCR gene rearrangements. *Leukemia Research*, 17, No. 11, 959–965, 1993.
- 18) Muto, M. Chen, Y. Kubo, E. Sado, T. Shimizu, T. and Yamagishi, H. Analysis of Initial Events by comparing T cell receptor (TCR) rearrangement patterns with oncogenic alterations in radiation-induced lymphomagenesis. In *Molecular Mechanisms in Radiation Mutagenesis and Carcinogenesis*. Eds. K. H. Chadwick, R. Cox, H. P. Leenhouts, J. Thacker. Published by the European Commission, 269–275, 1994.

V. モデル・マウスと放射線生物学

1. SCID マウスの放射線感受性とそれを相補する
ヒト染色体の同定 小松 賢志 他
2. トランスジェニックマウスを用いた突然変異検
出法 勝木 元也 他
3. リンパ球の分化と癌化の遺伝的基礎
山村 研一

1. SCID マウスの放射線感受性とそれを相補する ヒト染色体の同定

小松 賢志¹⁾ 太田 亨²⁾ 新川 詔夫²⁾
窪田 宜夫³⁾ 奥村 寛¹⁾

Hyper-radiation sensitivity of murine *scid* mutation and mapping
of the human homologue HYRC1 gene.

Kenshi Komatsu¹⁾, Tohru Ohta²⁾, Norio Niikawa²⁾, Nobuo Kubota³⁾, Yutaka Okumura¹⁾

1) Department of Radiation Biophysics and 2) Department of Human Genetics, Nagasaki University School of Medicine, Sakamoto-machi, Nagasaki 852. 3) Department of Radiology, Yokohama City University, Fukura, Yokohama 236.

Abstract

The murine severe combined immunodeficient mutation (*scid*) is characterized by a lack of both B and T cells, due to a defect in lymphoid variable-(diversity)-joining(V(D)J) rearrangement. *Scid* cells are highly sensitive to both radiation-induced killing and chromosomal aberrations. Present experiments also demonstrated the high sensitivity of *scid* cells to killing, because of a deficient repair of double strand breaks(DSB). *Scid* cells can repair only 60% of radiation-induced DSB for 3 hours, while normal cells repair 85% of the DSB. Significantly reduced D_{010} and n values were obtained from survival curves of *scid* cells and were similar to ataxia-telangiectasia (AT) cells (a unique human disease conferring whole body radiosensitivity). However, the kinetics of DNA synthesis after irradiation were different between the two cell types. In contrast with the radioresistant DNA synthesis of AT cells, DNA synthesis of *scid* cells was markedly inhibited after irradiation. The existence of different mutations was also supported by evidence of complementation in somatic cell hybrids between *scid* cells and AT cells. Using these hybrid cells, fragments of human chromosome 8 were introduced into *scid* cells HPRT mutant via X-irradiation and somatic cell fusion. The resulting hybrid clones contained human DNA fragment(s) which complemented the hyper-radiosensitivity of the *scid* cells. Alu-PCR products from these hybrids were used for chromosome painting using the technique of chromosome in situ suppression hybridization, allowing assignment of the human

1) 長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設放射線生物物理学部門 (〒852 長崎市坂本1-12-4)
2) 長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設先天異常部門 (〒852 長崎市坂本1-12-4)
3) 横浜市立大学医学部放射線医学 (〒236 横浜市金沢区福浦3-9)

HYRC1 (hyper-radiosensitivity of murine scid mutation, complementing1) gene, a candidate for a V(D)J recombinase gene, to human chromosome 8q11.

I. はじめに

マウス重症複合型免疫不全症（以下 SCID : Severe Combined Immune Deficiency）は1983年 Bosma によって発見されたB細胞およびT細胞の免疫不全を特徴とする劣性遺伝病である¹⁾。マウスの交配による連鎖解析からマウス16番染色体動原体近傍に遺伝子変異が知られている²⁾。SCID マウスではB細胞およびT細胞の前駆細胞は正常であり、正常マウスとほぼ同数の細胞が存在する。しかし、B細胞では pro-B から pre-B 細胞の過程、T細胞では $CD4^-CD8^-$ から $CD4^+CD8^+$ の分化過程に障害があり抗体およびT細胞レセプター産出に不全が見られる³⁾。この原因として V(D)J recombination の欠陥が指摘されている。正常マウスB細胞の免疫再構成では発現型 VDJ 遺伝子を作るのに各 V、D、J 遺伝子エクソン末端が結合する coding joint と、遺伝子再構成のシグナルからなる signal joint が形成される。SCID マウスでは正常な coding joint ができずに遺伝子末端が切断された DNA 二重鎖切断 (DSB) 状態になる。この結果として成熟B細胞の致死・消失が引き起こされると思われる⁴⁾。この VDJ 組換え過程で発生する DSB は免疫細胞に特異的でしかも DNA site specific な反応であり、無差別に誘発される放射線の DSB とは本質的に異なるものと予測されていた。最近、SCID 突然変異マウスが放射線高感受性であり、その原因として DNA 修復と免疫組換えが1つの酵素・因子を共有していると考えられるようになった。

II. 放射線感受性

図1-Aに SCID マウス肺の初期培養線維芽細胞の放射線感受性を示した⁵⁾。SCID 細胞の生存率は放射線線量とともにほぼ直線的に減少し、正常ヒト MRC5 細胞やマウス Balb/c 細胞よりも顕著に放射線高

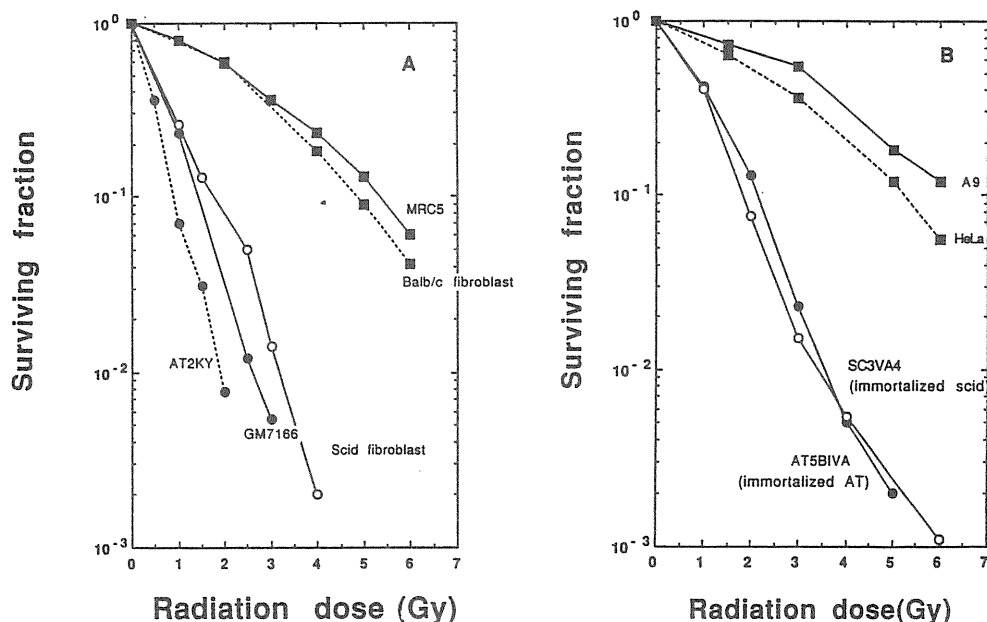


Figure 1. Survival curves of X-irradiated (A) primary culture of scid fibroblasts, Balb/c fibroblasts and AT2KY cells (A-T fibroblasts), GM7166 cells (NBS fibroblasts) and MRC5 cells (normal human fibroblasts). (B) SC3VA4 cells (SV40-transformed scid fibroblasts), AT5BIVA cells (SV40-transformed AT fibroblasts), A9 cells (mouse tumor cells), and HeLa cells (human tumor cells).

Table 1. Cultured used for experiments and cell survival parameters

	Culture cells	n	D ₀ (Gy)
Control cells	MRC5 cells (skin fibroblasts)	2.31 ± 0.24	1.68 ± 0.15
	Balb/c cells (lung fibroblasts)	2.35 ± 0.18	1.50 ± 0.09
	HeLa cells (human tumour cells)	2.61 ± 0.52	1.46 ± 0.20
	A9 cells (mouse tumour cells)	4.23 ± 0.75	1.69 ± 0.36
Ataxia-telangiectasia	AT2KY cells (skin fibroblasts)	1.03 ± 0.15	0.41 ± 0.02
	AT5BIVA cells (SV40-transformed)	1.29 ± 0.20	0.76 ± 0.04
Nijmegen breakage syndrome	GM7166 cells (skin fibroblasts)	1.12 ± 0.15	0.56 ± 0.02
Severe combined immunodeficiency	Scid cells (lung fibroblasts)	1.22 ± 0.27	0.66 ± 0.05
	SC3VA4 cells (SV40-transformed)	1.09 ± 0.11	0.72 ± 0.01

感受性であった。しかし、放射線感受性遺伝病として知られるアタキシア・テランジュクタシアおよびそのバリエーション患者由来の線維芽細胞それぞれ AT2KY や GM7166 との比較では感受性の程度がやや低かった。SCID 線維芽細胞を SV40 ウィルスでトランスフォームした SC3VA4 の放射線感受性を図 1-B に示した。SCID 細胞の放射線感受性はトランスフォームにより変化せず、ヒトおよびマウスの不死化細胞 A9 や HeLa に比較しても図 1-A と同様に放射線感受性であった。

各細胞の生存率曲線から得られる n 値と D₀ 値を表 1 に示した。SCID 細胞の D₀ 値は 0.66~0.72 Gy で正常細胞 D₀ 値の約 1/2 程度に低下していた。一方、SCID 細胞の n 値は 1 に近く、正常細胞の n 値 2.3~4.2 と比較して顕著に低下していた。このことは SCID 細胞では亜致死損傷の回復能力が低下していることを示唆している。我々の結果は Fulop 等が報告した SCID マウスの CFU-GM の結果と良く一致している。すなわち、正常マウスの D₀ 値 1.5 Gy に対して SCID マウスでは D₀ = 0.65 Gy であり、我々の求めた皮膚線維芽細胞 D₀ 値とほぼ同じである。

SCID 細胞は放射線類似の作用をするプレオマイシンに対しても高感受性を示すが、紫外線やアルキル化剤に対しては正常細胞と同様の応答を示すにすぎない⁶⁾。放射線およびプレオマイシンは DNA 二重鎖切断 (DSB) を高率に発生することから、SCID 突然変異は免疫再構成で生ずる DSB 同様に放射線誘発 DSB 再結合能力の欠損が原因で放射線高感受性と思われる。

III. DNA 修復

Lieber は V(D)J 再構成機構として Hairpin モデルを提案している⁷⁾。すなわち、組換えは coding 領域と signal 領域の結合部においてエンドヌクレアーゼによる一重鎖切断で開始する。続いて片方の一重鎖も切断されて、切断 coding 領域二重鎖同志が結合して Hairpin 構造をとる。シグナル領域は環化解離する。残った Hairpin 構造は再度エンドヌクレアーゼにより非選択的に開環した後、coding 領域のお互い相同性の高い部位での塩基対形成による配列を受け最終的にリガーゼにより再結合する。SCID 細胞では Hairpin 構造 DSB が観察されることから、Hairpin 形成以降の過程に欠陥があると推測される。一方、Hybrid joint と呼ばれる coding 末端がほかの signal 末端と交換結合する希な現象が SCID 細胞でも正常細胞同様に進行することから、Hairpin 開裂後の酵素反応に基本的な異常はない。これらの事実から、SCID では恐らく 2 つの Hairpin 構造が離れないようにつなぎ止める因子に欠陥があると思われる。このようにして生じた未結合 DSB が免疫不全のみならず、放射線高感受性をもたらすと思われる。

図 2 に SCID 細胞 SC3VA2 および正常放射線感受性細胞 RDI3B2 (後出) の DSB 修復能力を示した⁸⁾。

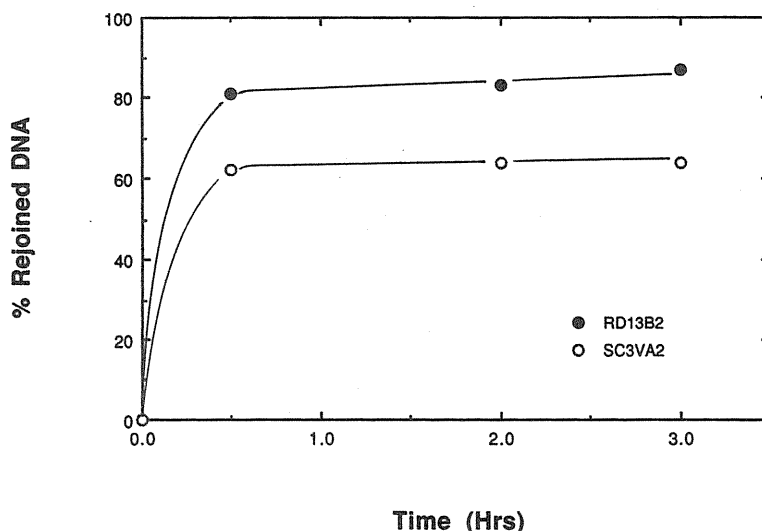


Figure 2. Kinetics of repair of DNA double-strand breaks after irradiation for SC3VA2 cells (SCID) and RD13B2 cells (normal cells) determined by elution methods. Cells were initially heated at 44°C for 15 min and then irradiated with 80 Gy at 4°C.

80Gyの放射線照射を受けた RD13B2 細胞の DNA は 2～3 時間後には 85% 程度再結合されるのに対して SC3VA2 細胞での再結合は 65% 程度である。残された未結合 DNA 鎖が両者の放射線感受性の差を反映していると思われる。図 2 はまた DSB の修復がある程度可能であることを示している。このことは、DSB 修復が完全に欠損したときに予想される $Do=0.025\text{Gy}$ よりも⁹⁾ 実際の SCID 細胞 Do 値ははるかに大きいことと一致する。これらの事実は SCID 因子による修復系と同じに、酵母で報告されている組み換え修復など他の修復系が正常細胞の修復に関与している可能性を示唆する。しかし、一方で SCID が不完全な突然変異の可能性もある。(1) SCID マウスのある群は低頻度ながら正常な V(D)J 組み換えを行う (この割合はマウスの加齢とともに増加して“Leaky”突然変異と呼ばれる¹⁰⁾)。 (2) SCID マウス骨髄性細胞の放射線感受性曲線が 2 相性を示す、らの事実によって支持される¹¹⁾。我々は最近、図 2 の SC3VA2 の DNA 再結合がハイパーサーミアによって顕著に阻害され、その結果放射線感受性が著しく増加することを報告した。SCID 突然変異体の性質と関連して興味深い⁸⁾。

IV. アタキシア・テランジェクタシアとの相補性

SCID マウスは骨髄性細胞や線維芽細胞だけでなく皮膚や腸上皮組織についても放射線高感受性である。この組織非特異性はリンパ球のある発生段階にだけ高感受性の Wasted マウスとは性質が異なる。一方、ヒト劣性遺伝病のアタキシア・テランジェクタシア (A-T) 患者でも同様の組織非特異性が知られている。表 1 に示したように、SCID 細胞の Do 値は A-T 細胞や A-T バリエーション細胞のそれと比較してやや高い。しかし、SCID 細胞の Do 値は報告されている A-T 細胞間の Do 範囲内であるので放射線感受性だけでは両突然変異の異質性について論じられない¹²⁾。A-T 細胞のもう 1 つの特徴は放射線抵抗性 DNA 合成である。図 3 に示したように、正常細胞 Balb/c では照射線量に応じて一時的に DNA 合成を中断する。しかし、A-T 細胞では DNA 合成停止の程度が減少しており、特に低線量に於ける顕著な DNA 合成阻害が見られない。SCID 細胞では正常細胞と同様の放射線照射後の DNA 合成停止が観測される⁵⁾。一方、DNA 合成阻害にみられる A-T と SCID 突然変異の異質性は両方細胞の体細胞融合による相補性

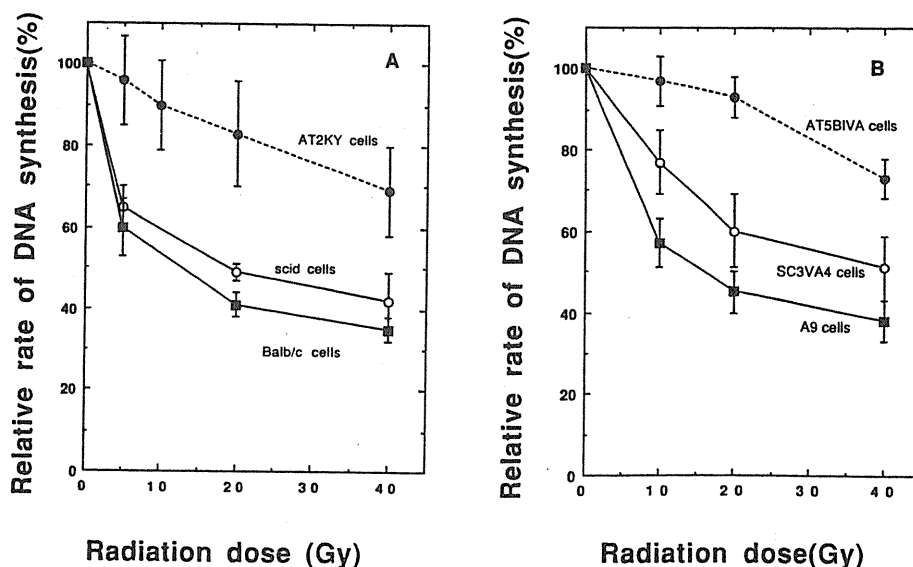


Figure 3. Dose-response curves for inhibition of DNA synthesis by X-rays in cells. (A) scid fibroblasts, Balb/c fibroblasts and AT2KY cells; (B) SC3VA4, A9, and AT5BIVA cells.

試験の結果とも一致する。A-T 樹立細胞株 AT5BIVA (遺伝的相補性群D) に pSV2neo をトランスフェクトしたあとに SC3VA4 細胞とポリエチレングリコールにて細胞融合を行った。ウアインと G418 培地により選別した融合細胞の放射線感受性を図 4 に示した。得られたすべての融合細胞クローンの放射線感受性は正常レベルに回復していわゆる遺伝的相補性を示した⁵⁾。すなわち、両遺伝病は異なる遺伝子部位の突然変異であり、SCID は従来唯一知られていた放射線感受性遺伝病 A-T とは異なる修復欠損型の突然変異である。

V. 遺伝子マッピング

SCID は V (D) J 再構成の主酵素 V (D) J リコンビナーゼ自身かあるいはそれに強く関連した因子の突然変異であり、その遺伝子単離は免疫再構成の機構を解明するものと期待される。遺伝子単離の試みは従来から行われていたが、SCID 遺伝子の適当な生物学的指標および選別方法がないために現在迄成功していない。我々は SCID 突然変異の放射線感受性を指標として、マウス SCID 遺伝子を相補するヒトの遺伝子 HYRC1 (Hyper-radiation sensitivity of murine SCID, Complementing の意味で Genome Data Base 登録) のマッピングを行ったので以下にそのデータを中心に述べる。

SCID と A-T の遺伝的相補性試験に用いられた体細胞融合ハイブリット (前出、図 4) では、継代培養を通じてヒト染色体が優先的に脱落する傾向が強い。そこで、このハイブリット細胞を低線量放射線照

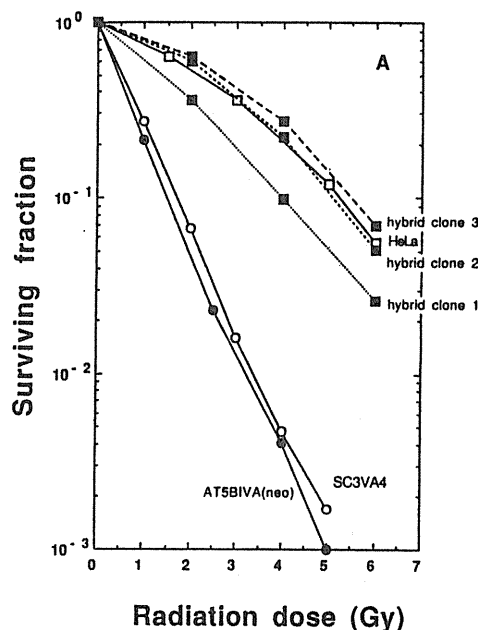


Figure 4. Survival curves for X-irradiated hybrid clones, parental AT5BIVA (neo) cells (pSVneo-tagged AT5BIVA) and SC3VA4 cells.

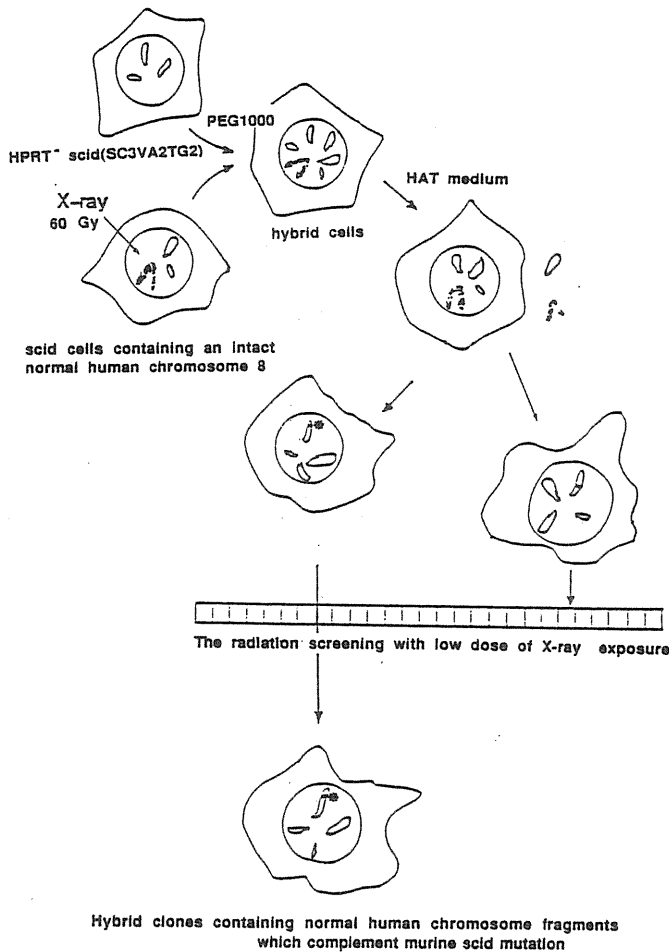


Figure 5. Protocols for radiation hybrid methods (see text).

射でスクリーニングした結果、生存した細胞にはすべてヒト8番染色体が存在することが伊藤らによって示された¹³⁾。このことは HYRC1 遺伝子が8番染色体上に位置することを意味する。我々は図5に示した放射線ハイブリット法を用いて HYRC1 遺伝子の詳細なマッピングを試みた¹⁴⁾。60Gy放射線照射したハイブリットと SCID 細胞の HPRT⁻ 突然変異体をポリエチレングリコールにて体細胞融合を行い、HAT培地により融合細胞を選別した。さらに、HYRC遺伝子領域を含むヒト染色断片を取り込んだSCID細胞を得る目的で低線量放射線照射のスクリーニングを行った。図6に示したように、得られたクローンはいずれも放射線感受性の回復がみられた。また、ヒト DNA をプローブとした fluorescence in situ hybridization (FISH) はすべてのハイブリット染色体断片がマウス染色体に取り込まれていることを示した。ヒト染色体断片が大きい場合には、さらにこのクローンを放射線照射することによって放射線ハイブリットを繰り返した。図6の RD15/5 クローンは RD13B2 クローンを再度放射線ハイブリットを行って得られたもので、このヒト染色体断片に HYRC1 遺伝子が存在すると思われる。

続いて、TC65 をプライマーとする Alu-PCR 法により RD15/5 クローン中のヒト DNA の増巾を行った。図7に示したように、RD15/5 クローンでは2本の主バンドが、またその親細胞である RD13B2 細胞では4本の主バンドがみられる。これらのヒト DNA 由来の PCR 産物をヒト正常リンパ球に chromosomal in situ suppression (CISS) hybridization を行った。この結果は、図8に示したように放射線ハイブリット細胞に存在するヒト DNA はヒト8番染色体動原体近傍に由来することがわかった。更にこの結果を確認するために RD15/5 クローンのコスミドライブラリーを作成した。Sau3AI の部分分解と

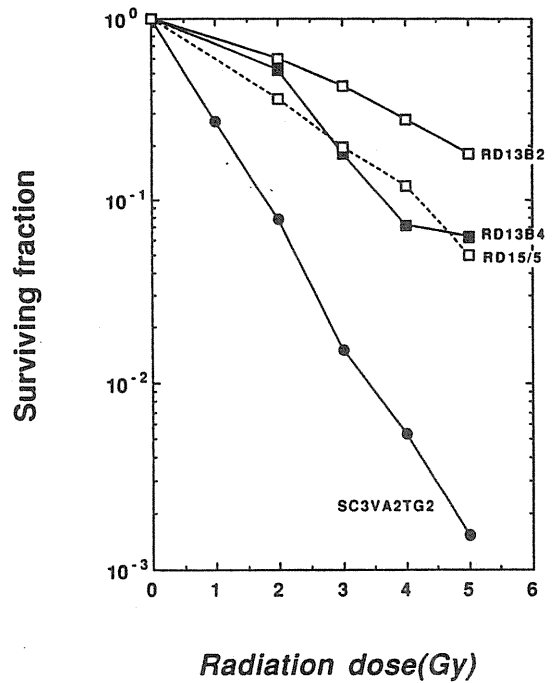


Figure 6. Survival curves of X-irradiated hybrid cells (RD13B2, RD13B4 and RD15/5) and the parental SV40--transformed murine scie fibroblast (SC3VA2 cells).

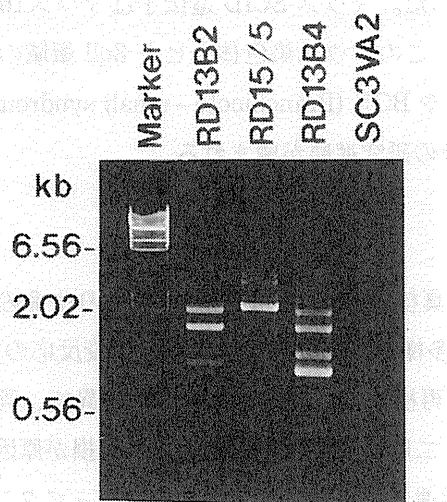


Figure 7. Agarose gel electrophoresis of amplification products obtained by Alu-PCR of various DNA sources. Several PCR products were generated from RD13B4 cells, RD13B2 cells and RD15/5 cells but no amplification products were seen when genomic DNA from scid cells was used as a template.

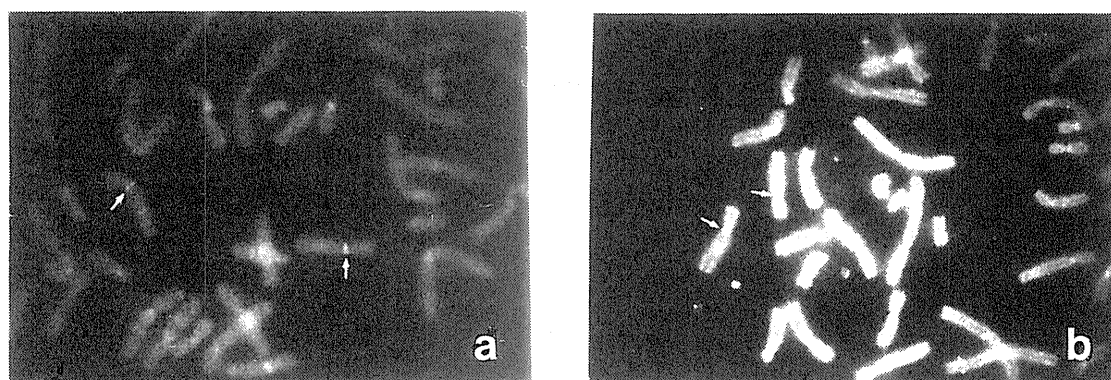


Figure 8. CISS-hybridization on metaphase spreads from normal human PHA-stimulated lymphocytes using biotinylated Alu PCR amplified probes from radiation hybrid cell RD15/5 (a) and using probes of cosmid DNA clones constructed from the inserted human DNA in RD15/5 cells (b).

pWE15ベクターによって調製された RD15/5 細胞 DNA のライブラリーの中からヒト DNA 由来のコスミドを選別するために、全ヒト DNA をプローブとするブランク hybridization を行った。このようにして得られたヒト由来コスミドを再度ヒトリンパ球に CISS-hybridization を行った結果、図 8 に示したようにすべてのコスミド DNA が 8q11 に由来することが分かった。続いて、これらのコスミドをカルシウム共沈法により SCID細胞にトランスフェクションした結果、ある特定の細胞クローンで放射線感受性の部分的な回復がみられた。すなわち、これらのコスミドには HYRC1 遺伝子が存在すると思われ、HYRC1 は 8q11 領域にマッピングされた。

HYRC1 遺伝子類似の機能を有するいくつかの遺伝子がすでに報告されている。DNA 二重鎖修復に関与する XRCC2 と XRCC4 (ヒト 7 番および 5 番染色体)¹⁵⁾、放射線感受性遺伝病 A-T(11番染色体)¹⁶⁾、正確な機能は不明であるが V (D) J 再構成をコントロールするとされる RAG1 と RAG2(11番染色体)¹⁷⁾、ヒト ADA-SCID (20番染色体)¹⁸⁾ である。我々のマッピング結果は HYRC1 遺伝子はこれらの報告さ

れている遺伝子と異なることを示した。マウス SCID 遺伝子はマウス16番染色体動原体近傍にマッピングされている。しかし、現在までにこのマウス染色体とヒト 8qll 領域の synteny は報告されていない。ヒト 8qll 領域には色素性盲膜炎¹⁹⁾ や BOR (Branchiooto-renal) syndrome²⁰⁾ の原因遺伝子が存在するとされており、この染色体領域の今後の研究進展が望まれる。

VI. おわりに

DNA 修復遺伝子は前核細胞から真核細胞迄よく保存されており生命の維持に不可欠なものである。また、V(D)J 再構成は 10^8 にもおよぶ多様な外来抗原を識別する免疫反応の主機構として重要なものである。マウス SCID は修復および V(D)J 再構成に欠損を有する突然変異で、両機構を解明する有力な材料として期待されている。本研究は DNA 二重鎖切断の再結合能力の欠損が原因で SCID は放射線高感受性であること、そしてヒト放射線高感受性遺伝病アタキシア・テランジュクタシアとは突然変異遺伝子および放射線高感受性機構が異なるらしいことを示した。また、放射線ハイブリット法により SCID 遺伝子を相補するヒト遺伝子 HYRC1 をヒト染色体 8qll にマッピングした。この領域の YAC を用いるならば将来 HYRC1 遺伝子単離も可能であり、より詳細な役割もまもなく明らかになるであろう。

参考文献

- 1) Bosma, G. C., Custer, R. P. and Bosma, M. J.: A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301, 527-530, 1983.
- 2) Bosma, G. C., Davisson, M. T., Ruetsch, N. R., Sweet, H. O., Shultz, L. D. and Bosma, M. J.: The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16. *Immunogenetics*, 29, 54-57, 1989.
- 3) Philips, R. A. and Fulop, G. M.: Pleiotropic effects of the scid mutation: Effect on lymphoid differentiation and on repair of radiation damage. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 152, 11-17, 1989.
- 4) Lieber, M. R., Hesse, J. E., Lewis, S. and Bosma, G. C.: Abnormal V(D)J recombination in murine severe combined immune deficiency: Absence of coding joints and formation of alternative products. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 152, 68-75, 1989.
- 5) Komatsu, K., Yoshida, M. and Okumura, Y.: Murine scid cells complement ataxiatelangiectasia cells and show a normal post-irradiation response of DNA synthesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 63, 725-730, 1993.
- 6) Fulop, G. M. and Phillips, R. A.: The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature*, 347, 479-482, 1990.
- 7) Lieber, M. R.: The mechanism of V(D)J recombination: a balance of diversity, specificity, and stability. *Cell*, 70, 873-876, 1992.
- 8) Komatsu, K., Kubota, N., Inoue, T., Gallo, M., Okumura, Y. and Lieber, M. R.: The scid factor on human chromosome 8 restores both V(D)J recombination and double-strand break repair. (in preparation).
- 9) Elkind, M. M.: Repair process in radiation biology. *Radiation Res.* 100, 425-449, 1984.
- 10) Carrol, A. M., Hardy, R. R., Petini, J. and Bosma, M. J.: T cell leakiness in scid mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 152, 117-123, 1989.
- 11) Taniguchi, S., Hirabayashi, Y., Inoue, T., Kanisawa, M., Sasaki, H., Komatsu, K. and Mori, K.: Hemop-

- oietic stem-cell compartment of the SCID mouse: Double-exponential survival curve after γ irradiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90, 4354-4358, 1993.
- 12) Komatsu, K.: Murine scie cells complement the radiosensitivity of human ataxia-telangiectasia cells. In: ataxia workshop V, eds. by Gatti, R. A. and Painter, R. B., Springer-Verlag, Heidelberg, H77, 155-161, 1993.
 - 13) Itoh, M., Hamatani, K., Komatsu, K., Araki, R., Takayama, T. and Abe, M.: Human chromosome 8(p12--q22) complements radiosensitivity in the severe combined immune deficiency (SCID) mouse. Radiation Res., 134, 364-368, 1993.
 - 14) Komatsu, K., Ohta, T., Jinno, Y., Niikawa, N. and Okumura, Y.: Functional complementation in mouse human radiation hybrids assigns the putative murine scid gene to the pericentric region of human chromosome 8. Human Molecular Genetics, 2, 1031-1034, 1993.
 - 15) 佐藤弘毅, 臨床科学, 26, 608-614, 1990.
 - 16) Komatsu, K., Kodama, S., Okumura, Y., Koi, M. and Oshimura, M.: Restoration of radiation resistance in ataxia telangiectasia cells by the introduction of normal human chromosome 11. Mutation Res., 235, 59-63, 1990.
 - 17) Gatti, R. A.: Speculation on the ataxia-telangiectssia defect. Clin. Immunol. Immunopathol., 61, S10-S15, 1990.
 - 18) Jhanwar, S. C., Berkvens, T. M., MEera, K. P., Valerio, D. and Breukel, C.: In situ localization of human ADA to chromosome 20q12-q13.11 regin. Cytogenet. Cell Genet., 46, 634-640, 1987.
 - 19) Blanton, S. H., Heckelively, J. R., Cottingham, A. W., Friedman, J., Sadler, L. A., Wegner, M., Friedman, L. H. and Daiger, S. P.: Linkage mapping of autosomal dominant retinitis-pigmentosa (RP1) to the pericentric region of human chromosome 8. Genomics, 11, 857-869, 1991.
 - 20) Kumar, S., Kimberling, W. J., Kenyon, J. B., Smith, J. H., Merres, H. A. M. and Cremers, C. W. R. J.: Molecular Genetics, 1, 4914-495, 1992.

2. トランスジェニックマウスを用いた 突然変異検出法

権藤洋一、塩山善之、中尾和貴、勝木元也

Detection of Somatic Mutations Using Transgenic Mice

Yoichi Gondo, Yoshiyuki Shioyama, Kazuki Nakao, Motoya Katsuki

Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University,

3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

Plasmid pML4 provides an easy access to detect mutations in the *E.coli* system. We have constructed transgenic mice carrying this plasmid (HITEC mice) as a shuttle vector. We are currently encompassing the feasibility of the use of those transgenic mice for studying frequencies and mechanisms of somatic mutations in mammal after the treatment of mutagens. In this system, it may become possible to perform a massive and efficient analysis of somatic mutations which are usually arisen in the mammalian organisms with extremely low frequencies. The transgene, pML4, was derived from pUC vector and contains the wild type of the *rpsL* gene of *E.coli*. The *rpsL* gene monitors the mutations. All somatic cells in the transgenic mice carry the wild type *rpsL* gene. We assume that the mutations arisen on the mouse genes are also equally accumulated on the *rpsL* gene as well. We isolate the transgenes from the transgenic mice; then, we study the expression of the *rpsL* gene in the *E.coli* system. The wild type *rpsL* gene transforms the streptomycin resistant *E.coli* cells to streptomycin sensitive, while the *E.coli* carrying a mutant *rpsL* gene remains streptomycin resistant. Thus, we can detect the accumulated mutations on the monitor gene in the transgenic mice as the streptomycin resistant *E.coli* colonies.

As a result, we observed a spontaneous mutation rate of about 5×10^{-5} /*rpsL* gene. After methylnitrosourea, MNU, treatment, the frequency increased more than ten-fold. It vindicates that the HITEC mice allow us to detect the somatic mutations very easily, quickly and efficiently. In addition, we are able to analyze the somatic mutations on each tissue at a specific

developmental stage under a specified genetic background by using the HITEC system.

要 旨

プラスミド pML4 は、大腸菌系で突然変異を容易に検出できる良いシャトルベクターである。変異原に対する哺乳動物の体細胞突然変異の頻度やその機構を調べることができないかと考え、このベクターをもつトランスジェニックマウスを作成した。この系を用いれば、通常は極めて稀にしか生じない哺乳類個体内での体細胞突然変異を迅速大量に解析できる。導入遺伝子 pML4 は pUC 由来のベクターに大腸菌の野生型 *rpsL* 遺伝子を突然変異のモニター遺伝子として持っている。pML4 を導入したトランスジェニックマウスは、全細胞に野生型 *rpsL* 遺伝子を持つことになり、そのようなマウス細胞の各ゲノムに生ずる突然変異は、このモニター遺伝子である野生型 *rpsL* 遺伝子にも同等に蓄積されると期待される。その導入遺伝子部分をマウスゲノムから回収後、大腸菌系に戻し、*rpsL* の発現をみる。野生型の *rpsL* はストレプトマイシン耐性の宿主大腸菌を感受性に形質転換する。もし、*rpsL* に突然変異が生じていると宿主の大腸菌は耐性のままとなる。すなわち、マウスゲノム内でモニター遺伝子に中立に蓄積した突然変異を、ストレプトマイシン耐性の大腸菌コロニーとして検出するわけである。この pML4 を導入したトランスジェニックマウス (HITEC マウス) の系を確立し、マウス個体のすべての体細胞を対象として、突然変異の発生頻度およびその種類の検討を行った。

その結果、自然突然変異率は、このシステムでは、約 5×10^{-5} /*rpsL* 遺伝子であることが解った。さらに、メチルニトロソウレア (MNU) 投与等によって、この値は数10倍に上昇した。

以上のことは、この HITEC マウスが、迅速かつ鋭敏に、しかも簡便にマウスの体細胞突然変異を検出できるシステムであることを示している。さらに、組織別、発生段階別、および、他の遺伝子の影響下での突然変異誘発性の違いなども検定できるなど、応用面も多い。

はじめに

環境変異原が我々の遺伝子に様々に影響を及ぼして突然変異を誘発する。また、がんは遺伝子の異常によって起る細胞の異常増殖であることが確実となって以来、発がんにおける突然変異の重要性も認識されている。がんをはじめとする遺伝子疾患の発症機構を研究するためには、自然発生を含めて、突然変異が、いつ、どこに、どのように生じるかを解明することが研究の基礎となる。しかし、われわれのもつゲノム遺伝子の莫大さと突然変異の低さとから、哺乳動物細胞に生じる体細胞レベルでの突然変異を鋭敏かつ迅速に体系だって検出解析する方法は、未だ確立されていない。一方、単細胞系では Ames Test (Amesら 1973) を用いて、バクテリア細胞での突然変異誘発率を簡便に検定する方法がある。そこで、真核細胞、とくに、哺乳動物細胞における突然変異をみるために、原核細胞、真核細胞の両方で複製できるシャトルベクターを哺乳動物細胞内において増殖し、突然変異の後、バクテリア細胞にて検出するという方法が近年開発された。たとえばシャトルベクターの例として、*lacI* (Calosら 1983; Millerら 1984; Lebkowskiら 1984, 1985)、*galK* (Razzaqueら 1983, 1984)、*supF* (Hauserら 1986, 1987) をふくむプラスミド DNA を哺乳動物由来の組織細胞内で核内プラスミドとして複製させ検定する方法や、レトロウィルスベクターを用いて *gpt* 遺伝子を実際に染色体に導入させて解析する方法 (Ashmanら 1986) が報告された。ところが、近年、腫瘍化に伴う突然変異の解析が進み、その頻度および塩基置換の種類が、組織や、他の遺伝子との相互作用によってことなることが示された。このような知見は、単細胞系では全く得られなかつ

たものである。このことから、哺乳類内の各組織で生ずる突然変異を鋭敏かつ迅速に分子レベルで解析する方法の開発が急務となっている。哺乳動物個体内で生じた真の意味での「生体内」での突然変異を解析するには、大腸菌などで簡単に突然変異の有無を検出できるシャトルベクターを導入したトランスジェニックマウスを用いる方法が最適である。マウス受精卵に注入された導入遺伝子は、染色体に組み込まれると、マウスゲノムの一部分として複製され、発生にともないその個体の全ての細胞に行きわたる。このとき、マウスゲノム DNA が各発生段階や各組織において曝されるのと全く同じ環境下に、その導入遺伝子も曝されることになる。すなわち、特定の組織、発生段階において、このトランスジェニックマウスに変異原を投与した後、各組織から効率よくシャトルプラスミド部分を回収し、宿主大腸菌にて突然変異を検出できれば、これが、生体内で生じた突然変異そのものの同定ということになる。導入遺伝子は生殖細胞にも行きわたり、通常、メンデルの法則に従って安定に子孫へと伝達されるので、トランスジェニックマウスの系統が確立されれば、その系統の維持や繁殖は一般のマウスと同様に行なえる。突然変異の検出にあたっては、変異原を投与し、母体から胎児への影響を見ることも可能であるし、さらには、他の遺伝的変異をもつ個体や、全く異なる近交系マウスと交配することによって、ほかの遺伝子や突然変異、ポリジーンとの相互作用に基づく突然変異の違いも解析できる。本研究では、大腸菌内で突然変異検出の容易な *rpsL* 遺伝子をもつ pML4 (真木寿治博士より分与) をシャトルプラスミドとして導入したマウスの樹立を第一の目的とした。最近、同様の目的で *lacZ* (Gossen ら 1989) や *lacI* (Kohler ら 1991) を導入したトランスジェニックマウスが開発されているが、いずれもラムダファージ遺伝子をモニター遺伝子としてもつものであり、取り扱いに大きな差があると思われる。

導入遺伝子 pML4 の特徴

導入遺伝子 pML4 は、Hashimoto-Gotoh ら (1986) によって開発された pUC 由来のベクターに大腸菌の野生型 *rpsL* 遺伝子を、突然変異のモニター遺伝子として持っている大腸菌プラスミド pHSG664 を改変して作られた全長 2706bp の大腸菌プラスミドである。図 1 に示すように、大腸菌の複製開始点 *ori* とカナマイシン耐性遺伝子 Km^R とストレプトマイシン感受性遺伝子である野生型の *rpsL* をもち、真核細胞で発現される遺伝子は全く存在しない。HB101 株のように、リボソームの小サブユニットタンパク質をコードする遺伝子の突然変異の 1 つである *rpsL* (= *strA*) をもつ大腸菌はストレプトマイシン耐性であるが、これを宿主大腸菌として、pML4 を導入すると、大腸菌はまず Km^R のためカナマイシン耐性となるとともに、ストレプトマイシン感受性に形質転換される。これは、野生型 *rpsL* のもつストレプトマイシン感受性形質が、突然変異型のストレプトマイシン耐性形質に対して優性であるためで、大腸菌そのものはストレプトマイシン耐性遺伝子 *rpsL* をもっているが、導入された pML4 の野生型 *rpsL* が生産されるために大腸菌は感受性となるのである。すなわち、この大腸菌コロニーは、カナマ

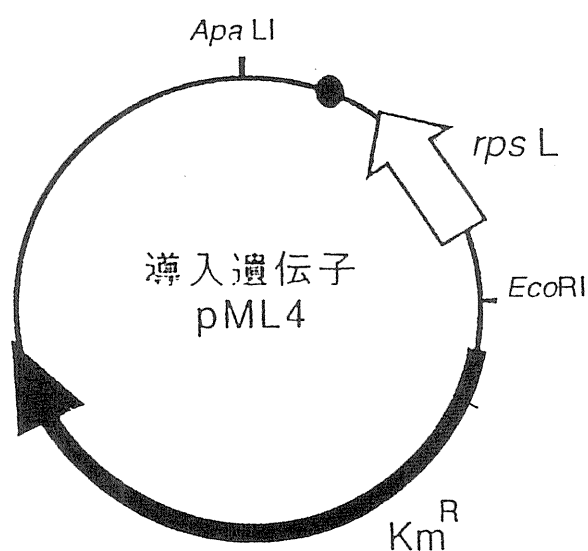
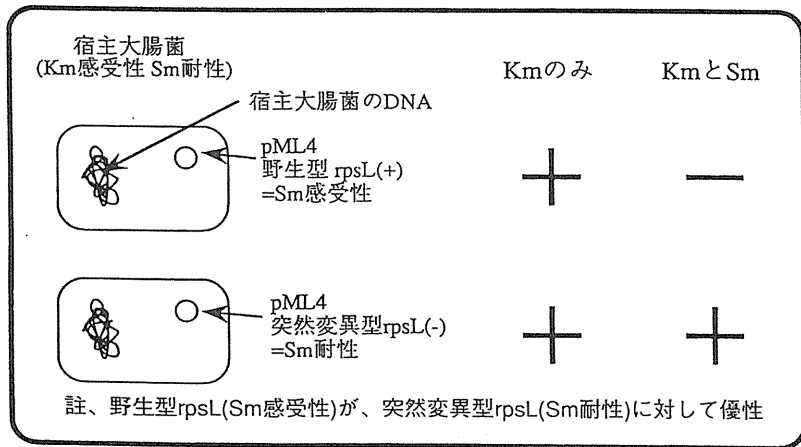


図1 MPL4 遺伝子の構造

イシン耐性、ストレプトマイシン感受性として検出できる。ところが、もし、pML4の野生型 *rpsL* に予め突然変異が生じていると、優性形質であるストレプトマイシン感受性は、もはや pML4 からはもたらされず、このような pML4 で HB101 株を形質転換してもストレプトマイシン耐性のままとなる。この場合の大腸菌コロニーはカナマイシン耐性、ストレプトマイシン耐性として認められることとなる。ところで、この形質転換実験において、プラスミドを導入されていない大腸菌 HB101 は、カナマイシン感受性、ストレプトマイシン耐性となるので、カナマイシンを含む培地を用いて取り除くことができる。さて、pML4 の *rpsL* に突然変異をもつものが、DNA 分子集団中に混在している場合、カナマイシンのみを含む培地とカナマイシンとストレプトマイシンの両方を含む培地に、それぞれ同量を播種すると、カナマイシンのみを含む培地では、pML4 分子を取り込んだ全ての宿主大腸菌がコロニーを形成し、一方、カナマイシンおよびストレプトマイシンの両方を含む培地では、*rpsL* に突然変異をもつ pML4 で形質転換された大腸菌のみがコロニーを形成する。すなわち、カナマイシンのみを含む培地に現れたコロニー数に対する、カナマイシンおよびストレプトマイシン両方を含む培地に現れたコロニー数が、その pML4 分子集団内で *rpsL* に突然変異をもつものの比となる (図2)。また、カナマイシンおよびストレプトマイシンの両方を含む培地に現れたコロニーは、*rpsL* に突然変異をもつ 1 分子の pML4 由来のクローンであり、このプラスミド DNA を抽出調製し *rpsL* 部分の塩基配列を決定すれば、既知の *rpsL* 配列と比較して、どこに、どのような突然変異が生じたかも分子レベルで解析できる。*rpsL* のコーディング配列は 375bp と短いので全塩基配列決定も容易である。実際にこの原理を用いて、大腸菌における突然変異のスペクトラムも解析されており、ストレプトマイシン耐性となる *rpsL* の塩基配列置換もかなりわかっている (真木寿治博士の私信)。以上のように、pML4 は大腸菌系において突然変異を鋭敏迅速に検出できるプラスミド DNA であり、突然変異を量的、質的の両面において効率よく簡便に解析できる。

検出方法の原理



プレート2枚による実際の検定

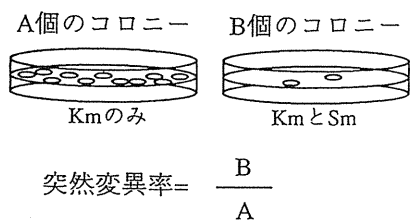


図 2

pML4 を導入したトランスジェニックマウスの作成

導入遺伝子として用いる pML4 を大量に調製し、ユニーク切断部位である *Hae*II (図 1) にて線状化し、マウス受精卵へ導入した。通常、導入遺伝子はタンデム (重連) に重複してゲノムにはいることが多く、得られたマウス DNA を *Ban*II にて切断後、サザン法によって解析した。図 1 に示すように、*Ban*II 認識部位も pML4 に 1 ヶ所のみ存在し、もし pML4 がタンデムに導入されていれば、*Ban*II で線状化した pML4 と同一の DNA 断片が、ゲノムより制限酵素断片として現れるはずである。また、1 ゲノムより切り出される pML4 断片数は、タンデムに 2 回重複していると 1 分子、さらに重複数が 1 つ増す毎に 1 分子ずつ増加することになり、サザン解析に適切な濃度標準を設定すれば、導入遺伝子のタンデム重複の回数 (導入コピー数) も推定できる。サザンプロット解析の結果、pML4 がゲノム中に存在することが確認された個体は 30 系統認められた。導入遺伝子のコピー数は、それぞれ異なり、多いものでは 750 や 350 と推定されるものも存在した。

また、遺伝子導入に際して、少なくともマウスゲノムの 1 ヶ所を切断し挿入されているはずであるが、その切断および挿入による生体機能への影響もないものと推測できる。すなわち、導入遺伝子は、マウス個体には、全く中立に働いていると思われる。このことは、突然変異を解析する系として最適である。なぜなら、突然変異がこの導入遺伝子の *rpsL* 部分に生じてもやはりマウス個体内では中立で、何等選択を受けることなく保たれると思われ、ゲノム中にランダムに生じてくる突然変異をそのまま蓄積するモニター遺伝子として優れているからである。

トランスジェニックマウスゲノムより導入遺伝子 pML4 の回収

突然変異モニター遺伝子であるトランスジェニックマウスゲノム中の *rpsL* に生じた突然変異を鋭敏かつ迅速に解析するための最大の課題は、いかに効率よく導入遺伝子をゲノムより回収し、*rpsL* の発現を宿主大腸菌においてどれだけ数多く検定できるかという点にある。そのためには、まず、導入遺伝子を最大限に回収しなければならない。その方法として、PCR を用いて導入遺伝子部分を特異的に増幅する方法と、*Ban*II にて切断後、導入遺伝子部分を直接抽出する方法の二つを検討した。PCR を用いると、わずかな量のゲノム DNA から短時間で導入遺伝子のみを増幅できる。もし、pML4 全長の 2.7kb を増幅できれば、それ以上の精製やクローニングは必要ない利点があり解析が速い。そのうえ、サイクル数などを調節して導入遺伝子を大量に増幅すれば、大腸菌の形質転換も大規模に行なうことが可能で、多数の形質転換コロニーに基く量的解析が可能である。しかし、PCR の過程における塩基置換がかなりの頻度で生じるという報告がある (Tindall と Kunkel 1988; Lundberg ら 1991)。もし、得られる突然変異のなかで、ゲノム中で起きたものではなく、その後の PCR 誤差によるものがかなりをしめるようになると、高精度の解析はできなくなる。その点、直接、切り出して回収する方法では、ゲノムそのものの導入遺伝子を検定するために、解析過程における誤差は最小にできる。ただし、導入遺伝子を回収するのに手間がかかり、また、回収量も限られるので、形質転換にて十分な数の大腸菌コロニーを得られるかどうかは鍵となる。

まず、マウスゲノム DNA の PCR 増幅を試みた。しかしながら、詳細は省くが、PCR 法で増幅したものには変異が多く認められるため、この検定法は適切でないことが判明した。

つぎに、直接ヘミ接合体のゲノム DNA からの pML4 の回収を行なった。理論的には、その最大回収率は、pML4 の大きさ (2706bp) と導入コピー数から 1 を引いた値 (切り出される pML4 分子数は、タ

ンデム重複数より1少ない。)との積の、ゲノム全体の大きさ (6×10^9 bp) に対する比となる。言い換えると、750コピーをもつヘミ接合体ゲノムにおいて切り出し可能な導入遺伝子の占める割合は：

$$\{2706\text{bp} \times (750\text{コピー} - 1)\} \div (6 \times 10^9\text{bp}) = 3.4 \times 10^{-4} \dots (1)$$

となり、かなりの高率であるといえる。

この方法を試み、現在のところ、自然変異率が約 4.5×10^{-5} 程度であることが解った。

考 察

大腸菌系で突然変異の検出が容易な野生型 *rpsL* をもつシャトルプラスミドを導入したトランスジェニックマウスの作成および系統確立に成功した。この突然変異モニター遺伝子であるトランスジェニックマウスゲノム中の *rpsL* に生じた突然変異を鋭敏かつ迅速に解析するための最大の課題は、いかに効率よく導入遺伝子をゲノムより回収し、*rpsL* の発現を宿主大腸菌においてどれだけ数多く検定できるかという点にある。このために、1) 導入遺伝子にはモニター遺伝子を含んだシャトルプラスミド全体を用いる。2) 制限酵素処理にて線状化した導入遺伝子を電気泳動後エレクトロエリューション法にて最大限に回収する。3) リガーゼで環状に復元した導入遺伝子をエレクトロポレーション法を用いて大腸菌に導入し、高効率の形質転換を行なう、という方針にて開発した。シャトルプラスミド全体を導入遺伝子としているため、モニター遺伝子である *rpsL* はトランスジェニックマウスのゲノムから回収後、ベクターへのクローニングは不必要で、自己環状化のみ行なうことで、大腸菌内で複製し、*rpsL* の発現を観察しうる分子構造となる。また、エレクトロエリューション法はバイオトラップ法を用いることで、短時間での DNA 回収および調製を可能とし、エレクトロポレーション法で形質転換を行なったので、Hanahan (1983) の方法による形質転換にくらべ約100倍以上の形質転換コロニーを得ることができた。現在、このトランスジェニックマウス系統に放射線や化学発がん剤を投与してその突然変異を解析することを検討している。

さて、*rpsL* を突然変異モニター遺伝子として用いた場合、最大の利点は突然変異をストレプトマイシン耐性として検出できることである。このために、突然変異検出が極めて容易鋭敏となる。*rpsL* に誘発される突然変異率は、分母としてストレプトマイシンを含まないカナマイシンのみを含む培地に生じる大腸菌コロニー数、分子としてストレプトマイシンとカナマイシン両方を含む培地に生ずる大腸菌コロニー数として、その比から推定する。すなわち、突然変異率の推定に必要な分母のコロニー数と分子のコロニー数を別のプレート上で行なうため、大腸菌の希釈度を変えて播種するだけで、少ないプレート数で、どのように微少な突然変異率でも検出できるはずである。ところが最終的に β -ガラクトシダーゼの発現で突然変異を検出する *lacZ* (Gossen ら 1989) や *lacI* (Kohler ら 1991) を導入したトランスジェニックマウスの系では、1枚のプレート上の Xgal 染色の違いで突然変異をみるため、1枚のプレートあたりスクリーンできるコロニー数によって検定数が限られ、精度の高い値を得るために多数のプレートと多量の Xgal を必要とする。また、モニター遺伝子 *rpsL* は全長 375bp と小さく、*lacZ* (3kb) や *lacI* (1kb) よりも全塩基配列決定が容易で突然変異のスペクトラム解析にも利点がある。

謝辞

東京大学分子細胞生物学研究所の真木寿治先生には pML4 の理論と、その取り扱いの実際とを御教示頂き、且つ、大腸菌における *rpsL* の突然変異スペクトラムを教えていただきました。また、京都府立医

科大学の橋本保先生にも貴重な御意見を頂きました。ここに感謝します。本研究は文部省科学研究費補助金がん特別研究(2)、重点領域研究(1)、厚生省がん補助金および対がん10カ年戦略研究事業の援助によるものです。

参考文献

- Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki and F. D. Lee (1973) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 2281–2285.
- Ashman, C. R., P. Jagadeesmaran and R. L. Davidson (1986) Efficient recovery and sequencing of mutant genes from mammalian chromosomal DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 3356–3360.
- Brilliant, M. H., Y. Gondo and E. M. Eicher (1991) Direct molecular identification of the mouse pink-eyed unstable mutation by genome scanning, *Science*, 252, 566–569.
- Calos, M. P., J. S. Lebkowski and M. R. Botchan (1983) High mutation frequency in DNA transfected into mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3015–3019.
- Calvin, N. M. and P. C. Hanawalt (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation, *J. Bacteriol.*, 170, 2796–2801.
- Chien, A., D. B. Edgar and J. M. Trela (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*, *J. Bacteriol.*, 127, 1550–1557.
- Church, G. M. and W. Gilbert (1984) Genomic sequencing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1991–1995.
- Dower, W. J., J. F. Miller and C. W. Ragsdale (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Res.*, 16, 6127–6145.
- Gossen, J. A., W. J. F. deLeeuw, C. H. T. Tan, E. C. Zwarthoff, F. Berends, P. H. M. Lohman, D. L. Knook and J. Vijg (1989) Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutations *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7971–7975.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.*, 166, 557–580.
- Hashimoto-Gotoh, T., A. Kume, W. Masahashi, S. Takeshita and A. Fukuda (1986) Improved vector, pML4, for direct streptomycin-resistance selection: cDNA cloning with G:C-tailing procedure and subcloning of double-digest DNA fragments, *Gene*, 41, 125–128.
- Hauser, J., M. M. Seidman, K. Sidur and K. Dixon (1986) Sequence specificity of point mutations induced during passage of a UV-irradiated shuttle vector plasmid in monkey cells, *Mol. Cell. Biol.*, 6, 277–285.
- Hauser, J., A. S. Levine and K. Dixon (1987) Unique pattern of point mutations arising after gene transfer into mammalian cells, *The EMBO J.*, 6, 63–67.
- Kohler, S. W., G. S. Provost, A. Fieck, P. L. Kretz, W. O. Bullock, J. A. Sorge, D. L. Putman and J. M. Short (1991) Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the *lacI* gene in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7958–7962.
- Lebkowski, J. S., R. B. DuBridge, E. A. Antell, K. S. Greisen and M. P. Calos (1984) Transfected DNA is mutated in monkey, mouse, and human cells, *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1951–1960.
- Lebkowski, J. S., S. Clancy, J. H. Miller and M. P. Calos (1985) The *lacI* shuttle: rapid analysis of the

- mutagenic specificity of ultraviolet light in human cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8606-8610.
- Lundberg, K. S., D. D. Shoemaker, M. W. W. Adams, J. M. Short, J. A. Sorge and E. J. Mathur (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*, Gene, 108, 1-6.
- Miller, J. H., J. S. Lebkowski, K. S. Greisen and M. P. Calos (1984) Specificity of mutations induced in transfected DNA by mammalian cells, The EMBO J., 13, 3117-3121.
- Razzaque, A., H. Mizusawa and M. M. Seidman (1983) Rearrangement and mutagenesis of a shuttle vector plasmid after passage in mammalian cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3010-3014.
- Razzaque, A., S. Chakrabarti, S. Joffe and M. Seidman (1984) Mutagenesis of a shuttle vector plasmid in mammalian cells, Mol. Cell. Biol., 4, 435-441.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, Science, 230, 1350-1354.
- Smith, M., J. Jessee, T. Landers and J. Jordan (1990) High efficient bacterial electrotransformation: 1×10^{10} E.coli transformants/ μ g, Focus, 12, 38-40.
- Tindall, K. R. and T. A. Kunkel (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase, Biochem., 27, 6008-6013.

3. リンパ球の分化と癌化の遺伝的基礎

山 村 研 一*

Genetic Basis for Differentiation and Malignant Transformation of Lymphocyte

Ken-ichi Yamamura

Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University School of Medicine,
Kuhonji 4-24-1, Kumamoto 862, Japan.

Abstract

Recent molecular biological studies revealed that at least two mechanisms, the activation of oncogene or inactivation of anti-oncogene, are involved in tumorigenesis. On the other hand, it is a well known fact that a wide variety tumors arise spontaneously or experimentally in inbred strains of mice and certain types of tumors appear in high frequencies in some inbred strains. These suggest that there is a genetic predisposition to tumor development. However, it is totally unknown how each genetic factor is involved. To elucidate the molecular basis of genetic predisposition, we initiated our studies by producing transgenic mice carrying *c-myc* gene activated by immunoglobulin heavy chain enhancer using two inbred strains of mice, C57BL/6 and C3H/HeJ. We observed the preferential development of T lymphomas in C3H/HeJ transgenic mice, whereas C57BL/6 transgenic mice mostly developed B lymphomas. The bone marrow transfer experiments using prelymphomatous transgenic mice suggest that environmental factors might influence the development of T lymphoma in C3H/HeJ mouse. Furthermore, average age of onset in our transgenic mice is much earlier than that reported by other investigators. All these results suggest that the genetic background can affect the cell-type specificity and frequency of tumor development.

Potter and Boyce generated plasmacytomas by intraperitoneal injection of mineral oil in BALB/c, but not in C57BL/6 mice. Indeed, we previously showed that IL-6 transgenic mice of C57BL/6 origin developed massive plasmacytosis but did not develop transplantable tumor. By

* 熊本大学医学部遺伝発生医学研究施設 (〒862 熊本市九品寺4-24-1)

backcrossing these transgenic mice with BALB/c mice, we observed the generation of transplantable monoclonal plasmacytosis with the chromosomal translocation t(12;15), suggesting that the genetic background is involved in the generation of plasmacytoma and specific chromosomal abnormality.

緒言

10年前までは、癌の原因として放射線、化学発癌物質、ウイルス、そして遺伝的なもの等が考えられ、相互に関連なきものとして据えられていた。しかし、現在では誘因は何であれ細胞内の遺伝子の異常によって癌が引き起こされることが明らかになっている。マウスにおいては、遺伝的に同一とされる近交系が存在することから癌研究に早くから用いられ、各系統間で発生する腫瘍の種類とその頻度が著しく異なることが明らかにされていた。たとえば、C3H マウスでは40%以上で乳癌が発生するがリンパ腫は発生しない。一方、C57BL/6 マウスは乳癌は発生しないが、リンパ腫は40%以上で発生する。このことは癌の発生に遺伝的素因が存在することを示唆している。

これまで、癌化に関与する遺伝子として、癌遺伝子と癌抑制遺伝子が単離同定されてきたが、この研究の中で培養細胞を用いた系の果たした役割は大である。しかし、癌は本来個体の中で正常な活動を行っていた細胞が遺伝的变化を生じ発生するということと、癌細胞が独立した環境下で発生するのではなく周囲の細胞の影響を受けながら癌化するので、個体の系による癌研究が必要である。このための手段としてトランスジェニックマウスは極めて有効である。この系を利用して、癌の遺伝的素因の分子機序を明らかにすることを最終目標として、まず遺伝的発啓が腫瘍発生に関与するかの解析を試みた。このために、分化過程が比較的良好に解析されており、細胞レベルでの解析が容易なリンパ球の腫瘍を選んだ。

リンパ球の腫瘍である白血病や悪性リンパ腫ではしばしば染色体の異常が観察される。その詳細な解析から、免疫グロブリン遺伝子の存在する第2番、14番、22番と癌遺伝子の一つであるc-mycが存在する第8番との間での転座が多いことが明らかとなっている (Fig. 1)。c-myc 遺伝子の活性化機序は発現調節の異常によると考えられている。たとえば、免疫グロブリンH鎖エンハンサーによる発現異常である。このような構造になったものを一般的に E μ -myc 遺伝子とよぶが、この遺伝子の導入により悪性リンパ

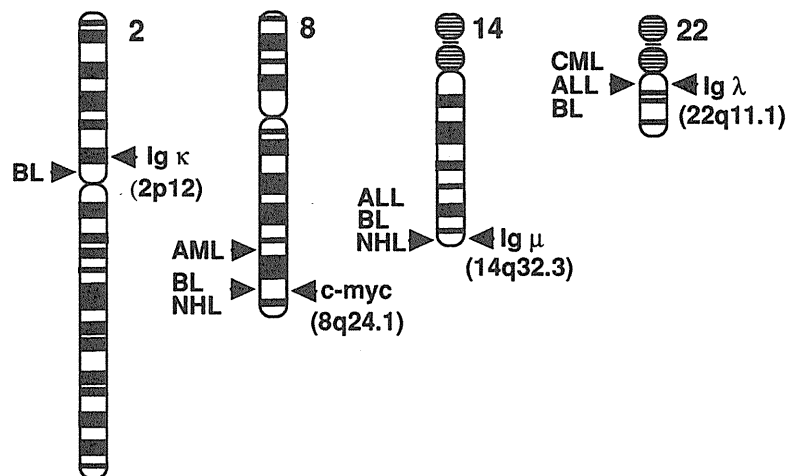


Fig. 1 Examples of chromosomal break point in tumors of lymphoid cell lineage.

BL: Burkitt lymphoma, NHL: non-Hodgkin lymphoma, ALL: acute lymphocytic leukemia, AML: acute myelocytic leukemia, CML: chronic myelocytic leukemia.

腫が起こることが示されている¹⁻⁴。しかしこのとき、腫瘍細胞の起源はモノクローナルであり、このことは E μ -myc 以外の 2 次的遺伝的変化が細胞の腫瘍化には必要であることを示唆している。この E μ -myc 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、癌化に關与する種々の要因を解析した。

一方、いくつかの疾患、例えば慢性関節リウマチでポリクローナルな形質細胞増多症が観察され、それが IL-6 の過剰産生に寄ることが明らかにされている。また、Potter と Boyce はパラフィンオイルを腹腔に投与することにより、BALB/c マウス等で形質細胞腫が生じることを示した⁵。この場合まず肉芽腫ができるが、ここで形質細胞腫の成長因子が産生されること、腫瘍細胞は肉芽腫の中の細胞に由来すること、この成長因子は IL-6 であること⁶ がほどなく明らかとなった。これらのことは形質細胞腫の発生に IL-6 が重要な役割を果たしていることを示唆している。このことを検討するため IL-6 トランスジェニックマウスを作製した。

材料と方法

1. E μ -myc 遺伝子

ヒトの non-Hodgkin 型のリンパ腫の患者より確立された Manca cell line では、第 8 番と第 14 番との相互転座が起こっている。組換えは c-myc 遺伝子側では第 1 イントロンのなかで、免疫グロブリン H 鎖遺伝子側では最後の J_H と免疫グロブリン H 鎖エンハンサーの間で生じている。5' 側同士が融合しているため c-myc 遺伝子のすぐ横に H 鎖エンハンサーが位置している (Fig. 2)。この遺伝子を E μ -myc Δ

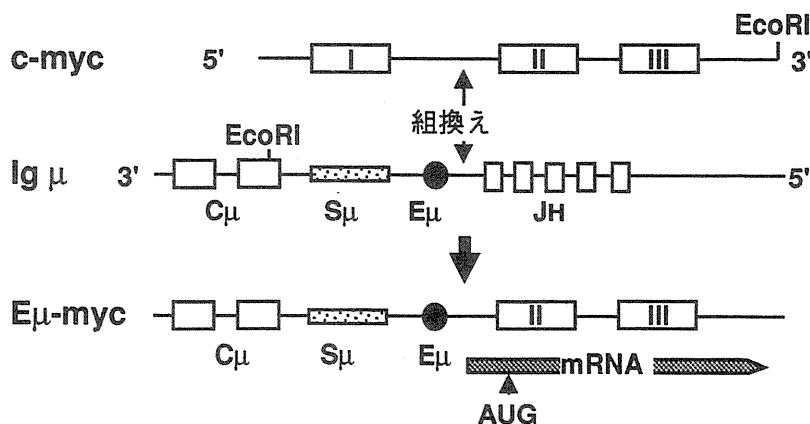


Fig. 2 Structure and expression of E μ -myc gene in Manca cell

The promoter and exon 1 of the c-myc gene was deleted due to the chromosomal translocation. Transcription of E μ -myc gene initiates from the cryptic promoter formed in the first intron.

と名付けた。c-myc 遺伝子の開始コドンは第 2 エクソン内にあるので、遺伝子産物は正常と同じである。c-myc 遺伝子の自身のプロモーターは失われているが、第 2 エクソンの上流約 630 塩基対付近にクリプティックプロモーターが生じており、H 鎖のエンハンサーの作用により B リンパ球内において転写が増大していることを、Hayday らが明らかにしている。一方、プロモーターと第 1 エクソンを含む c-myc 遺伝子を単純に H 鎖エンハンサーに接続した遺伝子も作製し、これを E μ -myc と名付けた。

2. IL-6 遺伝子

IL-6 遺伝子の 5' 側に E μ を接続し E μ -IL-6 遺伝子を構築した。また、マウス主要組織適合抗原クラス I の一種である。L^d 遺伝子のプロモーターを接続したもの (L^d-IL-6 遺伝子) も準備した。

3. トランスジェニックマウスの作製

$E\mu$ -myc Δ 遺伝子、 $E\mu$ -myc 遺伝子、 $E\mu$ -IL-6 遺伝子、 L^d -IL-6 遺伝子をそれぞれ約200コピーずつ C57BL/6 マウスあるいは C3H マウスの受精卵に注入した。生まれたマウスについて生後4週に尻尾の1部を切り取り、DNAを抽出しこれを用いて組み込みの有無をサザン法にて解析した。

4. 腫瘍細胞の解析

トランスジェニックマウスで発生してきた腫瘍細胞は、種々のリンパ球の細胞表面マーカーに対する抗体で染色し、FACSscanにて解析し細胞系を同定した。

5. S1 nuclease protection assay

総RNAを腫瘍細胞、前リンパ腫状態あるいは脾臓から調整し、S1 nuclease protection assay に用いた。

6. 骨髄移植または胎児肝移植

10^7 個の骨髄細胞または 5×10^6 個の胎児肝細胞を、致死量を放射線を照射した C57BL/6 または C3H マウスに移植した。

7. 染色体の解析

常法にしたがって、Gバンディング、Rバンディング、核型分析を行った。

結果及び考察

1. トランスジェニックマウスの臨床像

発症時の年齢を的確に推定するのはマウスの場合困難であるが、腹部の触診による脾腫やリンパ節腫脹を指標とすると、C57BL/6 および C3H マウスでは全例が生後4～6週頃に発症した¹⁾。剖検し得た例について4つの共通の所見が認められた。第1は、リンパ節腫脹であり、個体により最も腫大している部位が異なっており、それぞれ腸間膜リンパ節、そけい部、液窩等であった。頸部リンパ節の腫大はほぼ全例に認められたが軽度であった。第2は、脾腫であり著明なものから軽度まで種々であった。第3は、胸腺腫大であり全例に認められた。第4は、貧血および出血傾向等であった。

死亡時の年齢は追跡したものについては生後8週から15週であり、発症年齢が比較的一致しているのに比し死亡年齢は若干幅があった。

臨床像で興味ある事実は発症年齢がほぼ同時期なことであり、これは予想に反していた。なぜならばもし c -myc 以外の癌遺伝子の活性化が必要であるならば、そのような活性化がいつ生じるかは不明であり、おそらく細胞によってまちまちであろう。だとすると、各個体によって細胞が腫瘍化する時期も種々であるので、発症も大きくずれるに違いないと予想されたからである。個体により著明なリンパ節腫脹を呈する部位が異なる事実も興味深い。すなわち、もし活性化 myc のみで腫瘍化すると考えると、すべてのリンパ節がいっせいに腫大してくるはずである。一つのリンパ節のみが著明な腫大を示すことは、そのリンパ節内に存在したリンパ球が単クローン化に増殖したことを示唆している。各マウス個体により部位が異なることはこの節と合致する。いずれにせよ、この結果はもう一つの癌遺伝子の活性化を示唆している。これは、腫瘍細胞の免疫グロブリン遺伝子の再構成を解析することで結論がでた。

2. 腫瘍細胞の悪性度

発症したマウスを放置すれば死に至ることから、悪性腫瘍であることは間違いのないところである。移植可能かどうかを調べるために、 $10^3 \sim 10^5$ 細胞を同系である C57BL/6 マウスに静注したところ、移植後

全例が発症した。また容易に *in vitro* で培養可能であった。

3. 腫瘍細胞の clonality

前述したように活性化 *myc* のみで腫瘍化すると考えると、種々の B 細胞が腫瘍化する。一方、他の 2 次的な遺伝的変化を必要とするときは、それらの変化が起こる確立は低く単一クローンの腫瘍ができるのはずである。免疫グロブリン遺伝子の再構成パターンは個々の B 細胞に特異的である。したがって、腫瘍の細胞から DNA を抽出しその再構成パターンを解析すれば、起源が単一の時は 1 本の胚型と 1 本の再構成型のバンドが検出されるはずであり、起源が多数であればスメア一状になるので、この問題を解くことができる。解析の結果、モノクローナルかオリゴクローナルであることがわかった。このことは、腫瘍化には *myc* 遺伝子以外の遺伝的変化を必要とすることを示唆している。

4. 腫瘍化する細胞の種類とマウス系統

$E\mu$ -*myc*Δ 遺伝子を 2 つの異なる近交系マウスである C57BL/6J(B6) と C3H/HeJ(C3H) の受精卵に導入し、その表現型が変わりうるかを解析した。その結果、B6 では予測されたようにほとんどが B 細胞腫を発生した (Table 1)。一方、C3H では驚いたことにほとんどが T 細胞腫であった (Table 2)。 $E\mu$ -*myc* を導入した場合でも同じ結果であった。

この原因として 4 つの可能性が考えられた。第 1 は、*myc* 遺伝子の発現の違いである。すなわち B6 で

Table 1. Tumors developed in C57BL/6 $E\mu$ -*myc* mice

Mice	Age at onset (days)	Cell surface marker						Cell type
		B		T				
		B220	IgM	Thy1	TCR	CD4	CD8	
93	40	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	B
119	35	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	preB
139	42	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	preB
229	37	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	B
316	42	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	B
334	40	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	preB
339	36	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	B
346	39	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	B
225	35	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	T

Table 2. Tumors developed in C3H $E\mu$ -*myc* mice

Mice	Age at onset (days)	Cell surface marker						Cell type
		B		T				
		B220	IgM	Thy1	TCR	CD4	CD8	
169(M)	30	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	T
(M)		(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	T
(I)		(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	T
272	35	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	T
273	33	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	T
241	35	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	T
450	30	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	T
480	34	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	T
351	35	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	B

はB細胞で発現が高く、CH3 マウスではT細胞で発現が高いとの可能性である。各系統の前癌状態の胸腺と脾臓から及び癌を発生したマウスの腫瘍細胞から RNA を抽出し、S1 nuclease protection assay を行った。その結果、トランスジーン由来の発現は全てにほぼ同一レベルであることがわかった。このことは第1の可能性ではないことを示唆している。ただ面白いことに、腫瘍細胞におけるマウス内在性mycの発現は完全に抑制されていたが、前癌状態のマウスの細胞においては正常の約半分の発現レベルであった。これがどのような意味をもつのかは不明である。

第2の可能性は、mycの発現レベルが同じであっても細胞の活性化状態が異なっている可能性である。各系統の前癌状態のマウスの胸腺、脾臓、骨髄細胞を取り、いくつかの細胞表面マーカーに対する抗体で染色したセルソーターで解析した。その結果、B細胞に関しては、細胞が大きくなっており、H-2の発現レベルも上昇していたものの、系統間の差はなかった。T細胞に関しては、大きさ、CD4とCD8の陽性細胞の分布等正常と同じであった。これらの結果は、この可能性でないことを示唆している。

第3の可能性は、癌化に必要な遺伝的変化がB6ではB細胞に、CH3ではT細胞に起こりやすいという可能性である。このため、いくつかの癌遺伝子の活性化を調べたが、特に差は認められなかった。そこで、染色体を調べた。B6由来のB細胞腫では、染色体異常は観察され他ものの、共通してみられる特定の異常はなかった (Table 3)。CH3ではほとんど必ず第6番染色体の異常が観察された。しかし、これがT細胞腫と直接関連しているかどうかは現在のところ不明である。

第4の可能性は、B細胞やT細胞が育つ環境が腫瘍化と関与しているとするものである。すなわち、B6背景ではB細胞腫が、C3HではT細胞腫が発生しやすいとする可能性である。この点を解析するため、腫瘍発生以前のB6もしくはCH3トランスジェニックマウスから胎児肝細胞又は骨髄細胞を取り、致死量の放射線をあてたB6またはC3Hに移植し、どちらの腫瘍が発生するかを解析した。その結果、ドナーの細胞が由来する系統に拘らず、B6の背景ではB細胞腫とT細胞腫の比が1:1であった。一方、C3Hの背景ではその比は1:6であり、明らかにT細胞腫の頻度が増加していた (Table 4)。このことは、C3Hという環境下で育つとT細胞腫が発生しやすいことを示唆している。

Table 3. Chromosomal aberrations in B lymphoma developed in C57BL/6 E μ -myc mice.

Mice	Cell type	Modal karyotype
93	B	43XX, +1, +3, +17
119	preB	40XY, 3-, 11-, 16-
255	B	40XX,
264	B	40XX, 3-, 4-
334	preB	40XY, 2-, 15-
339	B	40XX, 4+, 6+
368	preB	41XX, +6
369	preB	41XY, +7, 10-, 14-, X+

Table 4. Cell types of lymphoma developed after bone marrow or fetal liver cells transplantation.

Donors	Tumors developed in C57BL/6 recipient				Tumors developed in C3H recipient			
	n	B	T	(-)	n	B	T	(-)
B6 Tg	8	4	4	0	6	1	3	2
C3H Tg	3	1	1	1	3	0	3	0
total	11	5	5	1	9	1	6	2

5. 発症年齢

E μ -myc Δ 遺伝子導入マウスでは、発症年齢が通常生後3~4週で、50%のマウスが発症する年齢は約50日であり、他の報告の130日と比べて早いことに気がついた。マウスの場合発症年齢を正確に知ることは難しいが、週2回の触診により、リンパ節腫大や脾腫を認めた時点を発症年齢とした。これまでの報

告例を Fig. 3 にまとめたがこれを根拠とすると、発症年齢の差が生じる可能性として、2つ考えられた。第1は、用いたマウスの系統の違いである。既に述べたように、我々は、近交系を用いている。他のグループにおいては、近交系ではなく交雑系をさらに交配したもの、例えば BDF1×BDF1 か、クローズドコロニー（例えば ICR）が混じったものであった。第2の可能性は、用いた遺伝子の構造である。我々は、最初 myc 遺伝子のプロモーター及び第1エクソンを欠失している $E\mu$ -myc Δ を用いた。他のグループでは、プロモーターと第1エクソンを正常に含んでいるか、もしくはプロモーターはSV40のものを用いていた。myc遺伝子の場合、プロモーターや第1エクソンは負の制御を受ける領域をもつといわれていること、またこの部分を欠くRNAは正常のものより安定であることから、 $E\mu$ -myc Δ 遺伝子がより活性を有すると考えられた。

そこで、プロモーターと第1エクソンをもつ $E\mu$ -myc 遺伝子を構築し、近交系マウスである B6 や C3Hに導入した。その結果、 $E\mu$ -myc Δ 遺伝子と同様発症は早いことが明らかになった (Fig. 4) ⁷⁾。このことは発症年齢も遺伝的背景によって影響されることを示唆している。

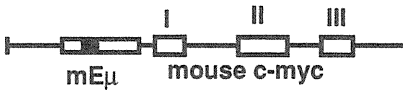
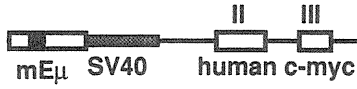
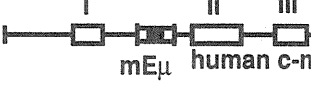
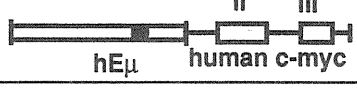
	Transgene structure	Strain	Age at onset
Adams et al		B6 X SJL	3 - 26 w
Suda et al		B6 X CD-1	8 - 34 w
Schmidt et al		B6 X CD-1	8 - 112 w
Yukawa et al		B6 C3H	4 - 9 w

Fig. 3 Comparison of transgene structure and mouse strain used for production of transgenic mice.

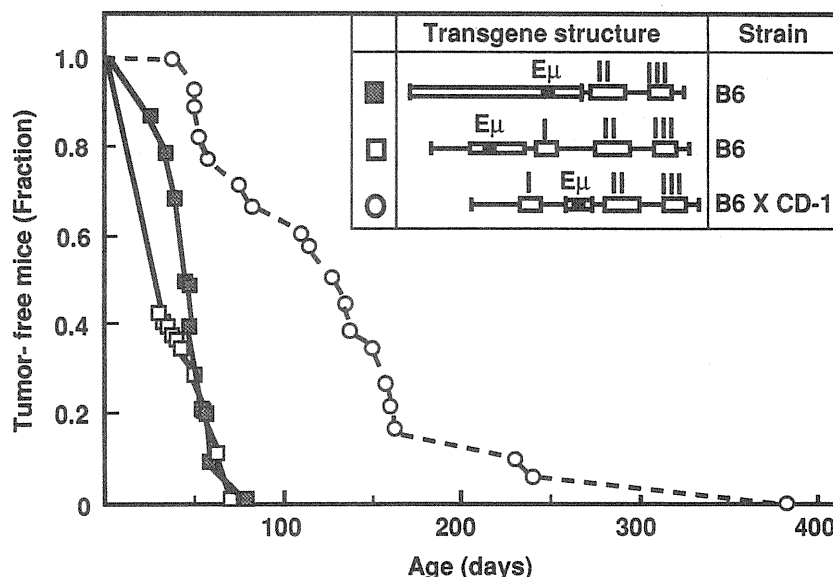


Fig. 4 Tumor incidence in $E\mu$ -myc transgenic mice

6. B細胞腫の分化段階とマウス系統

B6において発生したB細胞腫がどの分化段階にあるかを解析したところ、preBが42%、Bが58%であることがわかった。一方、他の近交系を用いていない報告を見ると、83%がpreBであった。この意義は明らかでないが、遺伝的背景が腫瘍化の分化段階にも関与していることを示唆しており興味深い。

7. IL-6トランスジェニックマウス

B細胞特異的にあるいは全身にIL-6を発現するためE μ を接続した遺伝子(E μ -IL-6)もしくはMHCクラスIに属するL^d遺伝子のプロモーターを接続したもの(L^d-IL-6)を導入してトランスジェニックマウスを作製した⁸⁾。最初は、C57BL/6マウスに導入した。これらのトランスジェニックマウスでは、各組織に形質細胞の浸潤が見られ、血中の免疫グロブリンの増加、特にIgG1が顕著に増加していた。しかし、血清の電気泳動ではモノクローナルなピークは見られず、また、免疫グロブリン遺伝子の再構成パターンもスメア状であり、形質細胞腫ではなく形質細胞増多症と考えられた。E μ -IL-6では比較的発症が早く、F1をとるのが困難であった。L^d-IL-6の方は発症が遅いものがあり、交配が可能であった。そもそも形質細胞腫はBALB/cマウスで発生しているので、この系統との戻し交配世代を作製した。その結果、9匹中3匹に腹水の発生が観察された。これをさらに解析したところ、IgAを産生する形質細胞腫が発生しており、移植可能な腫瘍細胞であること、12番と15番の転座染色体を有することが明らかとなった⁹⁾。これらのことは、IL-6が形質細胞増多症や形質細胞腫の直接原因であること、BALB/cの背景では染色体異常が生じ形質細胞腫が発生することを強く示唆している。

参考文献

- 1) Yukawa, K., Kikutani, H., Inomoto, T., Uehira, M., Bin, S. H., Akagi, K., Yamamura, K. and Kishimoto, T. Strain dependency of B and T lymphoma development in immunoglobulin heavy chain enhancer (E μ)-myc transgenic mice. *J. Exp. Med.* 170, 711-726, 1989.
- 2) Adams, J. M., Herris, M. A., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533-538, 1985.
- 3) Schmidt, E. V., Pattengale, P. K., Weir, L. and Leder, P. Transgenic mice bearing the human c-myc gene activated by an immunoglobulin enhancer: A pre-B-cell lymphoma model. *Proc. Natl Acad Sci. USA.* 85, 6047-6051, 1988.
- 4) Suda, Y., Aizawa, S., Hirai, S., Inoue, T., Furuta, Y., Suzuki, M., Hirohashi, S. and Ikawa, Y.. Driven by the same Ig enhancer and SV40 T promoter ras induced lung adenomatous tumors, myc induced pre-B cell lymphomas and SV40 large T gene a variety of tumors in transgenic mice. *EMBO. J.* 6, 4055-4065, 1987.
- 5) Potter, M. and Boyce, C. Induction of plasma cell neoplasms in strain Balb/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants. *Nature* 193: 1086-1087, 1962
- 6) Van Snick, J., Cayphas, S., Szikoro, J.-P., Renauld, J.-C., Van Roost, E., Boon, T. and Simpson, R. J. cDNA cloning of murine interleukin-HP1: homology with human interleukin 6. *Eur. Immunol.* 18: 193-197, 1988.
- 7) Akagi, K., Miyazaki, J. and Yamamura, K. Strain dependency of cell-type specificity and onset of lym-

- phoma development in Em - myc transgenic mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 83: 269-273, 1992.
- 8) Suematsu, S., Matsuda, T., Aozasa, K., Akira, S., Nakano, N., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T. and Kishimoto, T. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 7547-7551, 1989.
 - 9) Suematsu, S., Matsusaka, T., Matsuda, T., Matsuda, T., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T. and Kishimoto, T. Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. USA.* 89: 232-235, 1992.

Ⅵ. ヒト・ゲノム解析研究の現状

1. FISH法によるヒトゲノムマップ

高橋 永一

2. 第3染色体の詳細な地図の作成と癌抑制遺伝子 単離への応用

山川 和弘

3. インテグレイテッドトップダウンアプローチに よる11q13領域の解析

今井 高志

4. ヒト11番染色体 q23.3-qter 領域の物理的地図 の作成

細田 文恵

1. FISH 法によるヒトゲノムマップ

高橋 永 一*

Genome Mapping by FISH

Ei-ichi Takahashi

Division of Genetics, National Institute of Radiological Sciences,

4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba 263, Japan

A genome map is composed of two types of maps, a physical map and a genetic linkage map. A physical map, such as a cytogenetic map and contig map, allows access to the DNA structure of the genome, while the latter creates understanding for analyzing the function of the genome. These two types of maps are complementary to each other for the comprehensive understanding of the genome. High-resolution cytogenetic mapping with genes and DNA markers on chromosome bands is an indispensable step for the analysis of the genomes.

Recently developed techniques of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) have made it possible to localize DNA sequences (genes and DNA markers) on metaphase chromosomes and interphase nuclei. This model mapping system has overcome some of the problems associated with the use of isotopes (isotopic *in situ* hybridization); radiolysis of probes, long exposure time, uncertain localization of signals because of low resolution, and high background "noise". However, this current FISH has also had some deficiencies; 1) direct detection of signals on chromosome bands, 2) detection of single copy DNA sequences with inserts of less than 5kb, and 3) suppression of repetitive sequence (*Alu* and L1, etc) contained in genomic clones. Very recently, these problems have been solved with the following systems; 1) direct R-banding FISH, which is based on FISH combined with replicated prometaphase R-bands, 2) an amplification procedure of signals with goat anti-rabbit antibody and FITC anti-goat IgG, and 3) suppression hybridization procedures with total human DNA or human Cot-1 DNA. At present, these systems combined have been widely used for "metaphase mapping" of genes and DNA

* 放射線医学総合研究所 遺伝研究部 (千葉市稲毛区穴川 4-9-1)

markers. In this symposium, emphasis is placed on direct R-banding FISH technology and human genome mapping with genes and chromosome specific-cosmid markers.

[緒言]

ゲノムマップ（細胞遺伝学的地図及び遺伝的連鎖地図、本報告では前者を指す）の作製は生命現象の遺伝学的解析研究に欠くことのできない手段であり、遺伝子や染色体の構造と機能を含めた DNA 配列の解析には必須のものである。

トップダウン戦略におけるゲノム解析では、染色体特異的 DNA マーカー（コスミドクローン等）の平均マップ距離が 1Mb レベルの高精度の細胞遺伝学的地図作製が重要なステップとなる。この地図作製により、原因遺伝子の単離（positional cloning）のための RFLP 等による遺伝的連鎖地図作製が容易になる。更にこれらのマップデータは、コスミドや YAC クローン等による contig マップ作製のための良いランドマークとなる。また、単離された遺伝子については、染色体上にマップすることによって、ゲノム中での同一代謝系に属する遺伝子群や機能的に関連した遺伝子群等の分布状況を知ることが可能となり、ゲノムの構造と機能を把握する上で重要である。

遺伝子マッピングの方法は、ヒトでは体細胞雑種を用いた方法と *in situ* hybridization 法の二法が用いられている。前者では、ヒトとマウス等の雑種細胞において、ヒト染色体が一方的に消失していくことを利用し、ヒト染色体を様々な組合せでもつ雑種細胞を用いて目的の遺伝子が存在する染色体を決定する。しかし、この方法では 24 種のヒト染色体を網羅する一連の雑種細胞を用意する繁雑さがあるとともに、染色体上の詳細な位置を同定することが困難である。一方、cDNA またはゲノム DNA がクローン化されていれば、これらをプローブとして、染色体標本に直接ハイブリダイズさせる *in situ* hybridization 法を用いることによって、目的の DNA 配列の染色体上の位置を直接同定することが可能である。従来は DNA プローブをラジオアイソトープ (RI) で標識し、オートラジオグラフィによって目的の DNA 配列の存在位置を同定する方法 (isotopic *in situ* hybridization) が取られていたが、シグナルの局在部位が不確実、実験期間が長い、バックグラウンドノイズが高い等の欠点があった。最近の蛍光 *in situ* hybridization (FISH) 法は、それら体細胞雑種法やアイソトープ標識 *in situ* hybridization 法の難点を克服した方法で、短時間で高精度の結果が得られる利点がある⁽¹⁻⁴⁾。この方法は、プローブ DNA をビオチンで標識し、染色体にハイブリダイズさせ、ビオチンに親和性の高いアビジン-FITC (fluorescein isothiocyanate) で処理して、アビジンに結合した FITC をある特定の蛍光波長で発色させて、光のスポットとして蛍光顕微鏡で検出する方法である。しかし、この方法にも解決すべきいくつかの問題点、1) 染色体分染核型上での直接的マッピング、2) インサートサイズが 5kb 以下の単一コピー遺伝子の検出、3) ゲノミッククローンに含まれる反復配列の除去、が残されていた。現在、1) 複製前中期 R-バンドを用いた直接的マッピング (direct R-banding FISH)^(5, 6)、2) 二次抗体を用いたシグナル増幅 (amplification)⁽⁷⁾、3) ヒト全 DNA^(3, 4, 8, 9) あるいは Cot-1DNA⁽¹⁰⁾ による抑制 (suppression) で解決されている。本報告では、direct R-banding FISH による染色体特異的コスミドクローンを用いた細胞遺伝学的地図を中心に、遺伝子マップについても述べる。

[材料及び方法]

- 1) 染色体特異的コスミドクローンの単離 (癌研生化・中村祐輔先生らによる)

ヒト3番、5番、9番、および12番染色体について行なった。各染色体共に、ヒト染色体を含むゲッ
 菌類体細胞雑種から各々のライブラリー (cCI) を作製した。ヒト染色体由来の DNA を含む1000-6000
 個のコスミドを ^{32}P 標識ヒトゲノム DNA をプローブとして回収した。更に、常法に従って250-600クロー
 ンを精製し、FISH に供した。

2) 遺伝子の単離

我々の研究部及び他の研究機関の先生方により単離された DNA 修復遺伝子、がん遺伝子、DNA 複製
 に関する遺伝子についてマップを行なった。

3) R-バンド染色体標本作製

ヒト末梢リンパ球を用いて TC199培養液 (含10%牛血清、2%PHA) で常法通り培養を開始した。開
 始後48時間目にチミジン ($300 \mu\text{g}/\text{lml}$)、63時間目に2回の細胞洗滌後プロモデオキシウリジン (BrdU,
 $25 \mu\text{g}/\text{lml}$) を加え、コルヒチン処理の後に常法により標本を作製した。標本を Hoechst 33258 ($1 \mu\text{g}/\text{lml}$)
 で染色後、2XSSCあるいはゾーレンセンバッファーで封入し、水銀ランプあるいはブラックライ
 ト+75℃ホットプレートで BrdU 取り込み部位を崩壊した。標本は-80℃で保存した。

4) FISH

FISH は Lawrence ら (1988) の方法を基盤とし、それに改良を加えた方法により行なった。プローブ
 DNA をビオチン16-dUTP (ペーリンガー) でニックトランスレーションによりラベルした。エタノール
 沈殿後ホルムアミドに溶解し、75℃で変性した。染色体 DNA は70℃で熱変性し、アルコールで脱水、乾
 燥した。変性プローブ DNA をハイブリダイゼーション溶液に溶解し、染色体 DNA とハイブリダイズさ
 せ、50%ホルムアミド-2XSSC で洗滌後、アビジン-FITC (ベクター) で染色した。染色体の染色は
 プロピディアムアイオダイドで行なった。検出はニコン蛍光顕微鏡を用いて B-2A および B-2E フィル
 ターで行なった。反復配列の抑制にはヒト全 DNA あるいは Cot-1DNA で行なった。シグナルの増幅に
 はヤギ抗ビオチン抗体と FITC 抗ヤギ IgG を組み合わせた方法を用いた。

[結果および考察]

1) ヒト染色体特異的コスミドクローンによる染色体地図作製

ヒト全 DNA あるいは Cot-1DNA による抑制を行なって FISH を行なった。それらの量はクローンに
 含まれる反復配列の量に依存して変動した (3-100倍)。シグナルの検出効率及びサイズはクローン毎
 に異なった。ダブルットシグナルが最低5つ観察されたものについては局在部位を同定した。

- i) 3番染色体: 686クローンを供試し、484クローンをマップした (図1)。物理的大きさ (PS) は
 214Mb であるから、その平均マップ距離 (AMD) は 0.44Mb ($214/484$) となる⁽¹¹⁾。
- ii) 5番染色体: 220クローンを供試し、206クローンをマップした (図2)。PS は 194Mb であるか
 ら、その AMD は 0.94Mb ($194/206$) である⁽¹²⁾。
- iii) 9番染色体: 250クローンを供試し、203クローンをマップした (図3)。PS は 145Mb であるか
 ら、その AMD は 0.71Mb ($145/203$) である⁽¹³⁾。
- iv) 12番染色体: 230クローンを供試し、195クローンをマップした (図4)。PS は 143Mb であるか

ら、そのAMDは0.73Mb (143/195) である⁽¹⁴⁾。

【図版説明】 染色体特異的コスミドマーカーを用いたゲノムマップ。
番号はクローン示す。バーはそのマップ位置を示す。

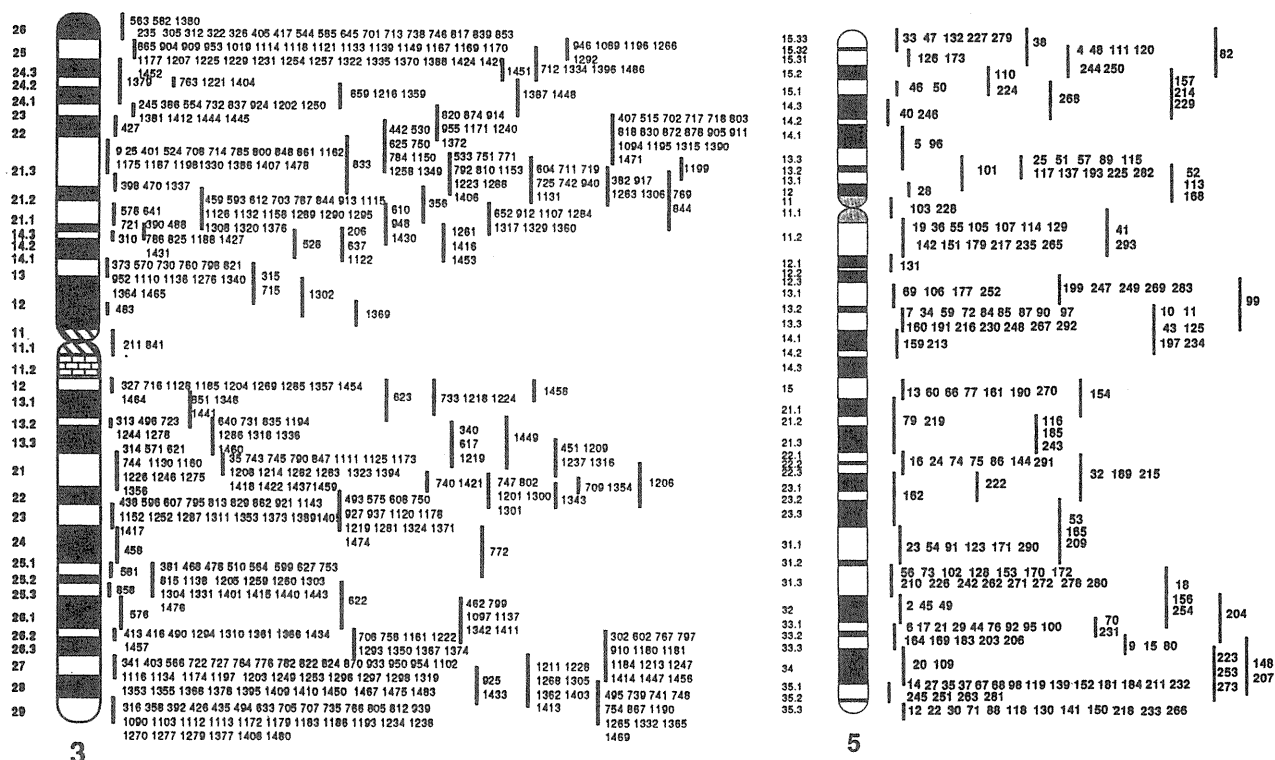


図1：ヒト3番染色体

図2：ヒト5番染色体

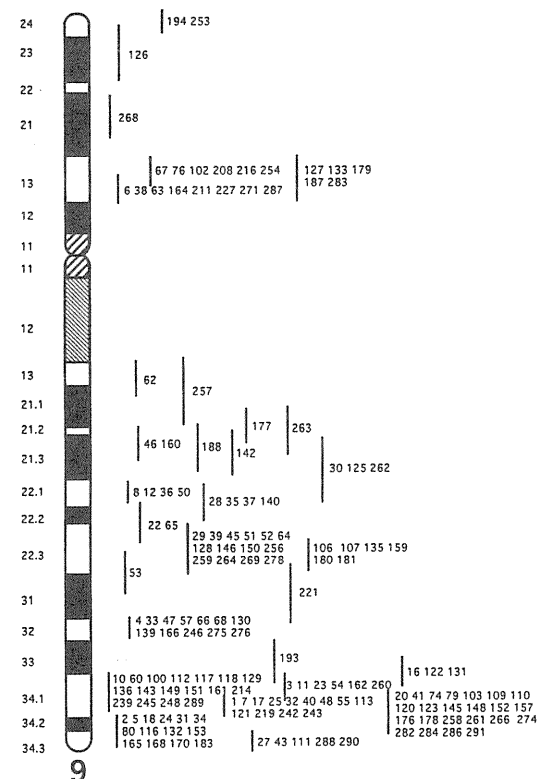


図3：ヒト9番染色体

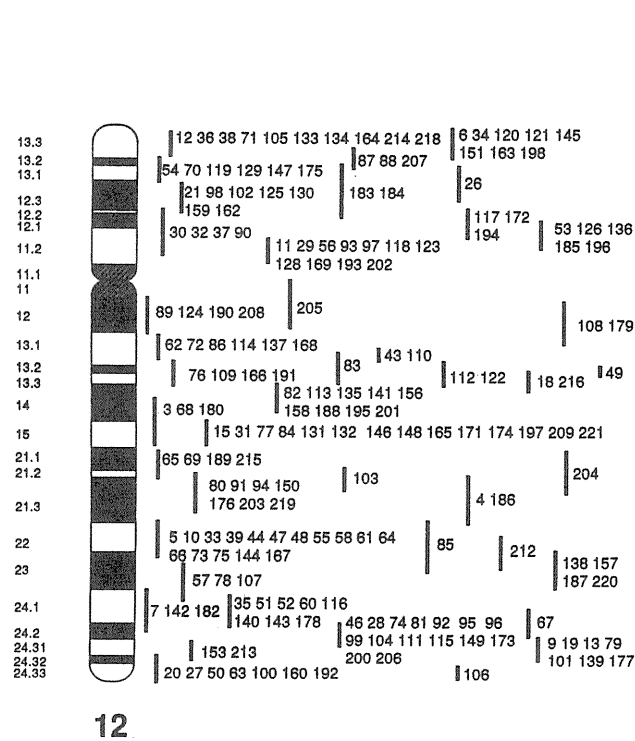


図4：ヒト12番染色体

各染色体におけるクローンの局在部位は染色体全体に位置するが、R-濃染バンドに集中する傾向が見られた。更にマップされたクローンの数はR-濃染バンドの物理的大きさに比例していた。この原因は、1) コロニーを選択する際に、プローブとしてヒト全DNAを用いており、*Alu*を含んだDNAを選択的に回収しているためか、2) 大腸菌ではR-淡染バンドDNAが増殖しない、ためであると考えられる。一方、染色体側の問題点として、R-淡染バンド領域ではハイブリダイゼーションが行なわれないという可能性が考えられるが、次の実験結果からそれは支持されない；1) ヒト全DNAをR-分染染色体にFISHを行なった場合、セントロメアとY染色体のヘテロクロマチン領域を除いてR-濃染、淡染バンド共にハイブリダイズする、2) セントロメアプローブはセントロメア領域（後期複製でAT-rich）にハイブリダイズする。3) チミジンとBrdUの処理を逆行なうとR-濃染バンドはG-淡染バンドとなる標本（複製G-分染）が得られるが、この標本にヒトコラーゲンII型遺伝子（COL2A1、GC-rich、R-濃染バンドにマップされている）をハイブリダイズした場合、そのシグナルの検出頻度は両ホモログでのダブルットシグナルが20%程度低下したが、全体の検出頻度は90%であり、R-分染標本を用いた頻度と同じであった。これらのことから、R-淡染バンドでは多少検出頻度は低下するという可能性は残されるものの、明らかに淡染バンドにハイブリダイズする。これらの問題を解決するには、G-分染標本を用いて、*Alu*およびL1選択クローンをR-とG-分染核型上に相互にハイブリダイズし、解析する必要がある。このマップではR-淡染バンドでのマップが欠けており、この領域でのマップを別の系（例えば、L1配列でコロニーを選択するか、染色体顕微切断法でその領域をクローン化するか、あるいはレーザーによる染色体ソーティングでライブラリーを作製する）で行なう必要がある。また、5Mbレベルでのオーダーリングは可能であったが、それ以下の距離のものについては不可能であり、それには休止核を用いた多色FISH法による解析や染色体 fragile site をランドマークとした解析が有効であろう。

ここに述べた染色体は勿論のこと他の染色体においても、がん抑制遺伝子、がん特異的染色体再配列に観察される切断点、染色体 fragile site、遺伝性疾患やDNA修復に関連する原因遺伝子が数多く報告されている。これらの遺伝子（あるいはDNA配列）を単離する（positional cloning）には、この高精度細胞遺伝学的地図は重要な資料を提供してくれる。更に究極のマップである contig map の作製のための重要なランドマークとなる。

2) 単離された遺伝子のマッピング

DNA修復 ERCC5 遺伝子（13q32.3-q33.1, 放医研：塩見忠博先生他）⁽¹⁵⁾、ヒトチミジン三リン酸合成酵素遺伝子（CTPS, 1p34.1-p34.4, 放医研：山内正剛先生他）⁽¹⁶⁾、MYC 遺伝子（8q24.12-q24.13）⁽¹⁶⁾、ユビキチン活性酵素 E1 遺伝子（UBE1, X p11.3-p11.23, 東大：鮎沢大, 遺伝研：瀬野悍二先生他）⁽¹⁷⁾、RECA 遺伝子（15q15.1, 大阪大：森田隆先生他）⁽¹⁸⁾、チミシル酸合成酵素遺伝子（TS, 18p13.2-p13.3, 東大：鮎沢大, 遺伝研：瀬野悍二先生他）⁽¹⁸⁾を挙げておく。これら一連の研究から、技術的にはcDNAでは1.1kb、ゲノミックDNAでは、2.1kbまでの遺伝子がサブバンドレベルでマップが可能であった。これらの遺伝子の局在部位はすべてR-濃染バンドであった。哺乳類では、前期複製のR-濃染バンドには増殖関連遺伝子が座乗していると言われており、これらの遺伝子は増殖に関連した遺伝子であることからこの知見と矛盾しない。

この様に、ここで述べた direct R-banding FISH は極めて有効なマップ法であり、この方法を用いてマップデータを蓄積する必要がある。

[参考文献]

- 1) Langer, P. R., Waldrop, A. A. and Ward, D. C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6633–6637 (1981).
- 2) Pinkel, D., Straume, T. and Gray, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2934–2938 (1986).
- 3) Landegent, J. E., Jansen in de Wal, N., Dirks, R. W., Baas, F. and van der Ploeg, M. Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive *in situ* hybridization. *Hum. Genet.* 77: 366–370 (1987).
- 4) Lawrence, J. B., Villave, C. A. and Singer, R. H. Sensitive high-resolution chromatin and chromosome mapping *in situ* : Presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 52 : 51–61 (1988).
- 5) Takahashi, E., Hori, T., O'Connell, P., Leppert, M. and White, R. R-banding and nonisotopic *in situ* hybridization : Precise localization of the human type II collagen gene (COL2A1). *Hum. Genet.* 86 : 14–16 (1990).
- 6) Takahashi, E., Yamauchi, M., Tsuji, H., Hitomi, A., Meuth, M. and Hori, T. Chromosome mapping of the human cytidine-5'-triphosphate synthetase (CTPS) gene to band 1p34.1–34.3 by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum. Genet.* 88 : 119–121 (1991b).
- 7) Viegas-Péquignot, E., Dutrillaux, B., Magdelenat, H. and Coppey-Moisan, M. Mapping of single-copy DNA sequences on human chromosomes by *in situ* hybridization with biotinylated probes : enhancement of detection sensitivity by intensified-fluorescence digital-imaging microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 582–586 (1989).
- 8) Hori, T., Takahashi, E., Ayusawa, D., Takeishi, K., Kaneda, S. and Seno, T. Regional assignment of the human thymidylate synthase (TS) gene to chromosome band 18p11.32 by nonisotopic *in situ* hybridization. *Hum. Genet.* 85 : 576–580 (1990).
- 9) Hori, T., Takahashi, E., Tokino, T. and Nakamura, Y. A high-resolution cytogenetic map of 168 cosmid DNA markers for human chromosome 11. *Genomics* 13: 129–133 (1992).
- 10) Lichter, P., Ledbetter, S. A., Ledbetter D. H. and Ward, D. C. Fluorescence *in situ* hybridization with *Alu* and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 6634–6638 (1990).
- 11) Takahashi, E., Yamakawa, K., Nakamura, Y. and Hori, T. A high-resolution cytogenetic map of human chromosome 3 : localization of 291 new cosmid markers by direct R-banding fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 13 : 1047–1055 (1992).
- 12) Takahashi, E., Hitomi, A. and Nakamura Y. A high-resolution cytogenetic map of human chromosome 5 : localization of 206 new cosmid markers by direct R-banding fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 17 : 234–236 (1993).
- 13) Takahashi, E., Koyama, K., Hitomi, A., Itoh, H. and Nakamura, Y. A high-resolution cytogenetic map of human chromosome 9 : localization of 203 new cosmid markers by direct R-banding fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 92 : 405–409 (1993).

- 14) Takahashi, E., Koyama, K., Hitomi, A. and Nakamura, Y. A high-resolution cytogenetic map of human chromosome 12 : localization of 195 new cosmid markers by direct R-banding fluorescence *in situ* hybridization. *Hum. Genet.* (1993 in press).
- 15) Takahashi, E., Shiomi, N. and Shiomi, T. Precise localization of the excision repair gene, ERCC5, to human chromosome 13q32.3-q33.1 by direct R-banding fluorescence *in situ* hybridization. *Jpn. J. Cancer Res.* **83**: 1117-1119 (1992).
- 16) Takahashi, E., Hori, T., O'Connell, P., Leppert, M. and White, R. Mapping of the MYC gene to band 8q24.12-q24.13 by R-banding and distal to fra (8) (q24.11), FRA8E, by fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **57** : 109-111 (1991).
- 17) Takahashi, E., Ayusawa, D., Kaneda, S., Seno, T. and Hori, T. The human ubiquitin-activating enzyme E1 gene (UBE1) mapped to band X p11.3-p11.23 by fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **59** : 268-269 (1992).
- 18) Takahashi, E., Matsuda, Y., Hori, T., Yasuda, N., Tsuji, S., Mori, M., Yoshiura, Y., Yamamoto, A., Morita, T. and Matsushiro, A. Chromosome mapping of the human (RECA) and mouse (*Reca*) homologs of the yeast *RAD51* and *Escherichia coli recA* genes to human (15q15.1) and mouse (2F1) chromosomes by direct R-banding fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* **19** : 376-378 (1994).

2. 第3染色体の詳細な地図の作成と 癌抑制遺伝子単離への応用

山 川 和 弘*

Fine Mapping of Human Chromosome 3 and its Application
for Isolation of Tumor Suppressor Genes

Division of Biochemistry, Cancer Institute

1-37-1 Kamiikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 170

肺癌、腎細胞癌、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、こう丸腫瘍など、複数の癌において第3染色体の特異的な欠失が報告され、この領域にこれらの癌の癌抑制遺伝子が存在すると考えられている。我々は、これらの癌抑制遺伝子の存在部位を同定し単離するため、先ず第3染色体の詳細な物理的地図および遺伝的地図を作成した。方法としては、ヒト第3染色体のみを有するヒト-マウス雑種細胞よりコスミドライブラリーを作成し、約6000の第3染色体特異のコスミドクローンを得た。さらに、これらのクローンをスクリーニングすることにより259のRFLPマーカーを得た。又、蛍光 in situ ハイブリダイゼーションにより484のコスミドクローンをマップし（放医研；高橋永一）、更に、41のRFLPマーカーを用いてCEPHより分与された40家計504人部のDNAのgenotypeを決定し、大型コンピュータで解析することにより遺伝的連鎖地図を作成した。これらの2つの地図は、良く一致し、相互の正しさを証明する結果となっている。又、物理地図においてはクローンがR-バンドに集中する傾向がみられ、連鎖地図ではテロメア付近で組み換え頻度が高くなっていること、女性では男性に比べて組み換え頻度が高くなっていることが確認された。続いて、正確にマップされたこれらのマーカーを用いて肺癌および腎細胞癌の欠失地図を作成した。先ず、肺癌および腎細胞癌の患者より癌組織および正常組織を得、それぞれよりDNAを抽出、精製した。これらのDNAより作成したサザンプロットに対し、約30のRFLPマーカーをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。相同染色体を区別できるという性質を利用することにより各マーカーに対応する染色体部位の欠失の有無を確認し、腎細胞癌では3p12-p14と3p21.3の2領域に、又、肺癌では3p14と3p21.3-p22の2領域に共通欠失領域を同定した。得られた領域は、2つの癌において互いに重なりありこれら2つの癌における癌抑制遺伝子は共通なものであることを示唆している。癌抑制遺伝子の存在が予想される領域を更に限定する為に、我々は36例の肺癌株化細胞について3p21.3-p22にマップされた

* (財) 癌研究会癌研究所・生化学部 (東京都豊島区上池袋1-37-1)

80のコスミドマーカを用いてサザン解析を行うことにより2つのマーカでホモ欠失領域を検出した。続いて、これら2つのマーカよりそれぞれ200kbと400kbの大きさを持つYACクローンを単離し、これらよりコスミドライブラリーを作成した。更に、一つのYACがホモ欠失領域の一方の端に達していたことを利用してホモ欠失領域の両端のコスミドクローンを単離し、これらについて蛍光in-situハイブリダイゼーションによる解析を行ったところ、この欠失領域は約2 megabaseの大きさを有することが明らかとなった。又、YACから単離されたコスミドクローンをを用いて再度肺癌株化細胞のサザン解析を行ったところ、別の細胞において9kbのホモ欠失領域を見出した。既に我々はこの欠失領域にまたがるcDNAを単離しており、現在、約190例の肺癌および約80例の腎癌についてサザン解析およびRNase protection法による解析を行い、変異の有無を確認中である。なお、本研究は愛知がんセンターの高橋隆先生と共同で進められている。

**3. インテグレイテッドトップダウンアプローチ
による 11q13 領域の解析**

今 井 高 志*

Mapping 11q13 Region by An Integrated Top-Down Approach

Takashi Imai

Department of Biochemisatry, Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research

Kami-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 170 Japan

Abstract

The construction of physical maps and ordered sets of overlapping DNA fragments for individual chromosomes will provide valuable information and resources for the study of human being and diseases. In our laboratory, human chromosome 11 was chosen as one of appropriate model chromosomes for evaluating multiple strategies for construction of fine genetic, physical and transcriptional maps. First of all, to obtain a large number of new DNA markers on chromosome 11, a cosmid library from Chinese hamster X human somatic hybrid cell line that contained only human chromosome 11 were constructed. Using a hybrid cell panel, 262 cosmid clones including 120 RFLP markers were assigned to one of 24 intervals of chromosome 11. To screen YAC libraries and to analyze radiation hybrid cells by PCR, 50 STSs were generated from these cosmid markers. Then our mapping effort has focused on chromosome 11q13 region which spans approximately 15 Mb. This region contains the gene responsible for MEN1 and the amplicon observed frequently in several types of malignant tumor. Twelve RFLP markers which were assigned into p11 to q13, were ordered by linkage analysis. To construct a physical map of this region, the restriction enzyme analysis of chromosomal DNA was performed by pulsed-field gel electrophoresis with 54 cosmid clones which were assigned to q13. Although continuity of the map was disrupted by some gaps, the map span nearly 14 Mb and the average distance between each markers was estimated at 300 kb. To cover q13 region with cloned DNA, YAC libraries were screened using a PCR-based method and/or Southern

* (財) 癌研究会癌研究所生化学部 (〒170 東京都豊島区上池袋1-37-1)

hybridization procedure with the DNA sequences delivered from the cosmid clones as probes. The end fragments of the insert DNA of some YACs were prepared to use as probes for isolation of linked clones further. Detailed analysis of the structure of the YACs and screening of the libraries with the end-specific probes are in progress. To identify genes in this chromosomal region, 15 cosmid clones in 11q13 were subjected to the exon amplification and zoo blot analysis. Fourteen DNA sequences presumed to be exons were isolated and ESTs which could produce parts of the expressed sequences by PCR were generated to analyze cDNA libraries which were constructed from several tissues. So far three types of cDNA clones were isolated from a brain cDNA library. Identification of such transcribed sequences on this locus would be useful to screen MEN1 responsible gene as well as to classify anonymous genes on this chromosome.

緒言

多発性内分泌腺腫瘍症 (multiple endocrine neoplasia, MEN) は神経冠 (neural crest) 由来の複数の内分泌臓器に腫瘍を生じる遺伝性の疾患であり、腫瘍を発生する臓器の違いにより 1 型、2a 型、2b 型に分類される。いずれも常染色体優性の遺伝形式を示し、リンケージ解析によってその原因遺伝子は 1 型が第11染色体 q13, 2a, 2b 型が共に第10染色体セントロメアから q11.2 領域にマップされている (表 1)。

表 1 MEN の 3 つのタイプの比較

	MEN 1	MEN 2 a	MEN 2 b
遺伝形式	常染色体性優性 (家族歴のないものも多い)	常染色体性優性	常染色体性優性
主な腫瘍を発生する臓器	脳下垂体 副甲状腺 膵臓 その他、副腎皮質や甲状腺 (過形成または腫瘍)	甲状腺(髄様癌) 副腎髄質(褐色細胞腫) 副甲状腺(過形成)	甲状腺(髄様癌) 副腎髄質(褐色細胞腫) 神経腫
原因遺伝子の染色体上の位置	第11染色体q13	第10染色体動原体近傍	第10染色体動原体近傍
腫瘍組織における染色体欠落	第11染色体長腕	第1染色体短腕 第22染色体 (第10染色体には変化なし)	?
RFLPによる出生前もしくは発症診断	可能	可能	可能

MEN1 や MEN2 でみられるのと同種の腫瘍では第11染色体においてヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity, LOH) が観察されることから、その原因遺伝子は癌抑制遺伝子であると考えられている。一方 MEN2a, 2b 型では、リンケージ解析でマップされた位置においては LOH が観察されないことから、異なるタイプの遺伝子が存在すると考えられている。しかしながら MEN2a でみられる褐色細胞腫や甲状腺髄様癌では第1染色体短腕、第22染色体において LOH がみられるという報告があり、これら遺伝子の関連性は非常に興味深い。また 2a 型と 2b 型では原因遺伝子の局在が同一で、腫瘍のタイプも重複しているため同一の原因遺伝子の異常が予想されるが、神経腫が 2b 型に特異的なのはなぜか、あるいは 2b 型の甲状腺髄様癌が 2a に較べて発症年齢が低く悪性度が高いのはどうしてなのかなど、興味深い問題が浮かび上がっている。最近 MEN2a の原因遺伝子はがん遺伝子のひとつである ret であることが報告された

のでこれらの問題へより直接的にアプローチが可能になったと思われる(1)。

我々は MEN1 の原因遺伝子を同定するために第11染色体において、RFLP マーカーの単離、遺伝地図の作成、物理地図の作成を行ってきた(2-5)。染色体地図作成の最初のステップでは、如何に多くのマーカーを単離するか、ということが重要で、高密度にマーカーを置くことができれば以後のステップを非常に促進することができる。時野らはまずヒト染色体として11番だけを持つチャイニーズハムスター雑種細胞よりコスミドライブラリーを作成し、ヒト DNA 由来のコスミド3,500個を単離した(2)。この数は11番染色体をカバーする大きさに等しい。このうち262個について RFLP を示すかどうかを調べ、122個が RFLP マーカーであることが解かった。またこれらのコスミドを11番染色体のそれぞれ一部だけを持つチャイニーズハムスター雑種細胞を使ったパネルに充て、11番染色体上の24領域にマップした(2、3)。

MEN1 は11番染色体 PYGM (Muscle glycogen phosphorylase) 遺伝子座にリンクしていることが報告されており(6、7)、前述した方法によって単離したこの近傍の RFLP マーカーを用いてさらに詳細なリンケージマップの作成が藤森らにより行われた(4)。まず CEPF の40家系を用いたタイピングにより各マーカー間の遺伝的距離を計算し染色体地図を作成した。次にこれら RFLP マーカーと MEN1 家系とのリンケージを調べるとマーカー cCI11-4、cCI11-288、cCI11-363、MCMP1 は MEN1 と組換え率 0 で LOD スコア 5.13、4.89、1.07、5.03 というデータが得られた。すなわち MEN1 はマーカー cCI11-4 または cCI11-319 と cCI11-254 に挟まれた 8cM のなかにある確率が高く、最も近接したマーカーは cCI11-4 であることが示された。

次に11番染色体 q13 領域のコスミドマーカーを使ったパルスフィールドゲル電気泳動法による物理地図が谷上らにより作成された(5)。このうち MEN1 遺伝子座では MCMP1、cCI11-4、cCI11-364、cCI11-247、cCI11-363、cCI11-254、cCI11-367 のマーカーがこの順序でセントロメア側からテロメア側へ並んでいることが解かった。この結果は上で述べたリンケージ解析の結果と矛盾しない。

ところで遺伝子産物が同定されていない、あるいはその機能の解かっている遺伝子を単離するためにはこれらの地図を作製しながら遺伝子の位置をつきとめる、ポジショナルクローニングの手法を使わざるをえない。それぞれの染色体地図作製法を単独で用いても遺伝子に迫ることができる場合はあるが、複雑なヒトゲノムのマッピングは一般的に容易ではなく、それぞれの地図の長所短所をうまく噛み合わせて総合的に正確な地図作製を行う必要がある。このような方法は最近インテグレイテッド トップダウン アプローチと呼ばれている。

図1に種々の解像度をもった染色体の解析方法を示す。リンケージ解析では減数分裂時の組換えの頻度

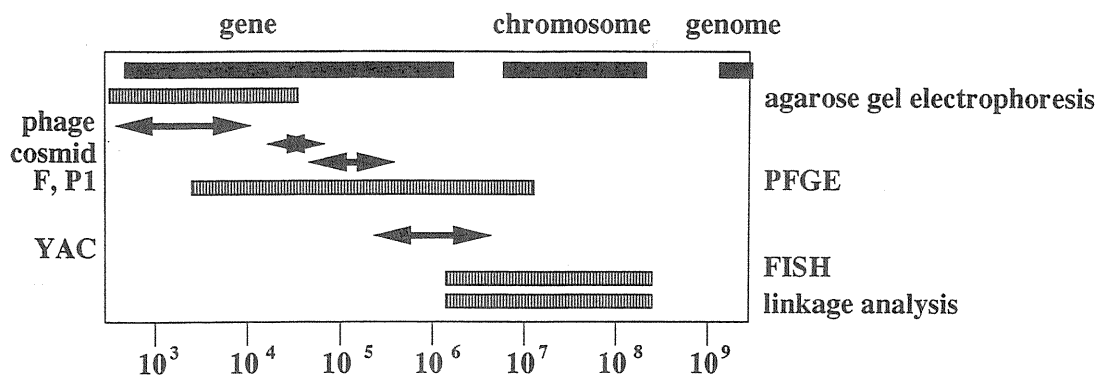


Fig. 1 Technologies for analysis of genome

によって染色体上のマーカーの順序、それらの間の距離をセンチモーガン単位で表す（遺伝地図）。in situ ハイブリダイゼーション法、ラジオイソトプハイブリッド法では物理的にマーカーの順序を決定することができるがこれらの方法の解像度は染色体分染による範囲、即ち 2-3 メガベース以上の解像度である。パルスフィールドゲル電気泳動法による物理地図は数十キロベース-数メガベースの解像度で作製することができる。これより解像度を上げるためには DNA をクローニングすることが必要である。クローニングできる DNA の大きさは、YAC 系で 50 キロベース~1 メガベース、コスミドで~40 キロベース、プラスミドで~10 キロベース位までである。最も解像度の高い染色体地図はもちろん DNA シークエンスそのものである。

我々の基本的な戦略は、まずこれら様々な解像度をもった染色体地図の作製を行い、その情報を互いに組み合わせることによって、より正確な染色体地図を完成させる（インテグレイテッド トップダウン アプローチ）。そしてこれらの地図の作製によって目的の遺伝子を挟む最も隣接したマーカーが同定できれば、マーカー間の DNA をクローニングすること、つまり DNA コンテイングの構築を行うことが必要である。そこで我々は数百キロベースサイズの DNA をクローニングできる YAC 系を中心にして MEN1 領域をカバーすることを試みた。また 11q13 にマップされたコスミド、YAC より遺伝子を同定して転写地図を作製することを試みた。

実験方法

I. STS マップの作製

染色体 11 番にマップされているコスミド 69 個のインサート末端をベクター pWEX15.5 上の T3 または T7 プライマーを用いてジデオキシ法によりシークエンスした。コンピューターを用いてゲノムデータベース（GenBank, EMBL など）をサーチし、コスミド末端の配列中に Alu や L1 などの反復配列が存在しないか検索した。反復配列が存在しないシークエンスデータをもとに次のような条件で PCR プライマーをデザインした。

Td (dissociation temperature) , 60°C

プライマーの長さ、 約 20bp

PCR 産物の長さ 80-500bp

3' 末端は C または G とするが、プライマーセットの中で相補的にならないようにする。

PCR は次のような系 (10 μ l) で行った。

10mM Tris-HCl (pH8.3) , 50mM KCl, 170 μ g/ml gelatin, 200 μ M dNTP,

2 μ M プライマー、0.5U Taqポリメラーゼ、25ng DNA

MgCl₂ 濃度: 1 - 4mM

サーマルサイクラー: GeneAmp 9600 (Perkin-Elmer Cetus)

変性: 92°C 10秒

アニール: 65°C または 55°C 1分

伸長: 72°C 1分20秒

サイクル数: 35

ヒト DNA を鋳型としてマグネシウム濃度を変えながらアニール温度 65°C で反応を行い、特異的な PCR 産物が得られるマグネシウム濃度を決定した。アニール温度 65°C で PCR 産物が得られない場合は

アニール温度55℃で最適のマグネシウム濃度を決定した。

PCR産物は10%ポリアクリルアミドゲル/15%グリセロール電気泳動により解析した。

II. エクソントラッピング

各コスミドを BamHI, BglIII またはこれらの両エンザイムで完全に切断し、Buckler らの開発したスプライシングベクター pSPL1 の BamHI 部位に導入した。この DNA を用いて大腸菌 HB101 の形質転換を行い、プラスミド DNA を回収した。エレクトロポレーション法を用いて cos7 細胞にプラスミドを導入し、2-3 日間の培養後 RNA を調製した。pSPL1 のグロビン配列からデザインしたプライマーを用いて RT-PCR を行ない、さらに内側のプライマーセットを用いて 2nd PCR を行ない、導入したコスミドに由来するエクソン部分を増幅した(8)。PCR 産物を pBSII にサブクローニングし、塩基配列を決定した。

III. zoo blot 解析

各コスミドを EcoRI で完全に切断し、アガロースゲル電気泳動後 EcoRI 断片を回収した。ヒト、ブタ、マウス、ニワトリの DNA 断片を固定したフィルターにそれぞれの EcoRI 断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行ない、種を超えて強くハイブリダイズする断片を同定した。これらは pBSII にサブクローニングし、塩基配列を決定した。

IV. ESTS

上で述べた方法によりオープンリーディングフレームが得られた場合にはその断片を特異的に PCR で増幅できるプライマーセットをデザインし、また PCR の条件を決定して ESTS とした。

V. cDNA ライブラリーのスクリーニング

このようにして得られた ESTS は遺伝子の一部であるとしても、その遺伝子はどの組織、どの細胞、あるいはどのステージ特異的に発現している遺伝子であるかは解からない。したがってどの細胞から作製された cDNA ライブラリーをスクリーニングするべきか決定するためにそれぞれの cDNA ライブラリーより DNA を抽出し、ESTS を用いて PCR を行なった。ESTS に由来する PCR 産物がえられたライブラリーを、PCR 産物をプローブとしてスクリーニングした。

VI. YAC ライブラリーのスクリーニング

PCR を用いて YAC ライブラリーのスクリーニングを行なうために図 2 のように、クローンがストックされているマイクロタイタープレートを立方体のように配置し、X, Y, Z 軸に添った面でクローンミックスを調整し、それぞれを PCR でアッセイして、その交点からクローンを同定するシステムを構築した (3D-PCR)。PCR 産物はアクリルアミドゲル電気泳動とエチジウムブロミド染色により検出した。また、PCR 産物の検出感度を上げ、さらに特異性を高めるために、PCR で合成される配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチドをデザインし、ドットプロットした PCR 産物をハイブリダイゼーション後ケルミネッセンス法により検出することを試みた。

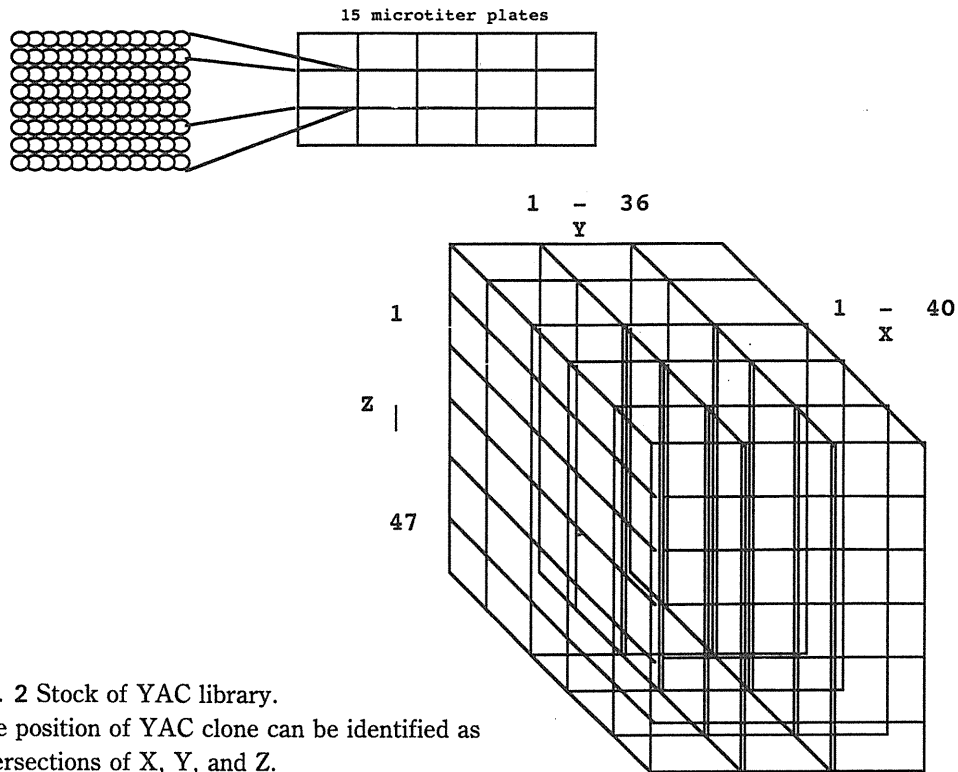


Fig. 2 Stock of YAC library.
The position of YAC clone can be identified as intersections of X, Y, and Z.

結果及び考察

I. STSマップ(9)

ハイブリッドセルパネルを用いて分類された11番染色体の24領域のうち13領域から合計69個のコスミドマーカを選び、それらの STS 化を試みた。コスミドのインサート末端を T3 または T7 プライマーを用いてシークエンスした。解読できた配列の長さは100bp - 300bp で、平均180bp であった。FASTA を用いた既知のシークエンスとの比較の結果は、合計87のシークエンスデータのうち27データが反復配列を含むもので13個が Alu 配列、2個が L1 配列、残りがその他の反復配列であった。

PCR はプライマーの Td を一定にしておいても反応液中のマグネシウム濃度、アニーリング温度により大きく左右される。そこで適当な条件を決定するためにまず、アニーリング温度は65℃に固定し、マグネシウム濃度を1.0から4.0mM まで0.5mM ずつ変化させて、特異的に目的とする産物が増幅される濃度を求めた。このアッセイで条件が決まらない場合はアニーリング温度を55℃に下げ同様にマグネシウム濃度を変化させ適当な条件を決定した。またこの時ここで決定した STS を使って YAC ライブラリーをスクリーニングすることを考慮しネガティブコントロールとして酵母の DNA を用いた。酵母とヒトで同じサイズの産物が増幅する場合は、プライマーの位置を変えて、ヒト特異的な産物が得られる配列を検索した。これらの結果より最終的に50箇所のマーカを STS 化した(表2)。なおこれらのマーカは放射線医学総合研究所の堀らにより蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法を用いてさらに高い解像度でマップされている(10)。

II. 転写単位の同定

染色体 11q13 にマップされた15個のコスミドより11個のエクソンを同定した。また、3個のコスミド

表2 染色体11番における Sequenced Tagged Sites

STS	LOCUS	PRIMER SEQUENCES	STS SIZE (bp)	PCR CONDITIONS	
				TEMP(°C)	Mg (mM)
S2-T194	D11S426	5'-GGTAATACTGGATTACAGGTGGG-3' 5'-GGAAATCTCTCTGGATTGG-3'	194	65	2
S9-T146	D11S430	5'-AGGAAGGTGCTGTCTGTGG-3' 5'-GACAGACTGAATGAGAAAACATGG-3'	146	65	2
S25-T152	D11S435	5'-CTCATGTTTGACCCGTTATCG-3' 5'-AACCAAGCCTATGCCTACAGC-3'	152	65	3
S36-T196	D11S439	5'-AAGGCCAGAGGAGGGTGAATTCTC-3' 5'-TTGAAAGGTATCAAAGCCAGTAAGGC-3'	196	65	2
S46-S141	D11S445	5'-GTAGGCTTTGAACAAGGCA-3' 5'-ATTTAGCTGGTCTGGAGCAA-3'	141	65	1
S202-T139	D11S446	5'-AGGAAAGCAGGCTGACCATC-3' 5'-TGAAGCCAGCAGCTACTGTGTC-3'	139	65	1
S215-T118	D11D448	5'-GCTAGAGAAAGGAGTTACAGG-3' 5'-GGAGCTAGAGCATATCTATCTG-3'	118	65	1
S220-S126	D11S450	5'-TACAGGCCTTAGGGTTCTTG-3' 5'-CATGGCCCTTGGTTCAGGTG-3'	126	65	1.5
S242-T118	D11S455	5'-CGTCAACAAAGAGGAGAGC-3' 5'-GGCTCCATCACTCAGCCTGCT-3'	118	65	2
S245T-125	D11S456	5'-TTACTAACAGCCAATGGTCAAGC-3' 5'-GGGTGATCCCTACATGTGTG-3'	125	65	3
S245VS-128	D11S456	5'-CCTTACTAAGGAGCTCCTG-3' 5'-GCTACCTATGATAAACTCTCTA-3'	128	65	3
S253-T178	D11S459	5'-TTGCTGGCGAACACATCCAAAC-3' 5'-GGTTCAAGCATCCTTGAATAGGA-3'	178	65	1.5
S259-T187	D11S461	5'-ATGGAGTGACACAAGAGG-3' 5'-TCCCTCAAGATCACTAG-3'	187	65	2.5
S289-T199	D11S470	5'-ATTCACACAGCCGTCGAAAGG-3' 5'-GTTAAGGAAGCCAGACAGAAAGC-3'	199	65	4
S304-T158	D11S474	5'-GAGGAAATCAGAGTACTCG-3' 5'-GAGAACTCTTACCTTTAAGAGTGC-3'	158	65	2
S310T-230	D11S475	5'-AAGCTCACTGGTGTTCAGCC-3' 5'-ACAAAGTCTTACATCTGACAGAG-3'	230	65	1
S314-T144	D11S477	5'-ATAGGGTCCAGGATCTGG-3' 5'-AGTGTGTTAGTGGTCACTGG-3'	144	65	1.5
S319-S168	D11S480	5'-GGTCCTTGGGCAATTTGAAC-3' 5'-CTATAACTGGTCTCACTAGC-3'	168	65	2
S330-T136	D11S483	5'-CAAGACATTTAATCTACAAATTAATG-3' 5'-CTGCCTCTATTTCTGAAAAG-3'	136	65	3
S357-T109	D11S486	5'-CCAGGAAATCAGCAAGCAAC-3' 5'-CTCAGCTGATGGAAGTGG-3'	109	65	2
S388-T132	D11S554	5'-CTGCTCACCAGAGCTTGT-3' 5'-TTCATCACTCCACACACC-3'	132	65	2
S394-T154	D11S555	5'-CCGTGTGAGATTAATTTGTTG-3' 5'-CCTGAAAGGAGTCCAGCT-3'	154	65	4
S396-S140	q13.1-13.3	5'-TAAAGACAGCCCAAGTGTGCC-3' 5'-CAACAGCAAGGCACTGCTTTC-3'	140	65	1.5
S404-T86	D11S558	5'-GSAATCTGGAACCTTAAATCAG-3' 5'-GCACACGCCAAAGCCCTTACT-3'	86	65	2
S419-T186	D11S564	5'-GAAGGTTACGTAAGCTCACTAG-3' 5'-TTTGCTTTGACACAGGATGTGC-3'	186	65	2.5
S421-T126	D11S567	5'-CATAGTGAGACCTTGTGTTAG-3' 5'-CTACAGCTACTCTGGTAAAC-3'	126	65	3
S422-T113	D11S565	5'-ATGTAAGAGAGCCAAATATC-3' 5'-TCCGATTCAGTCATGAGCTC-3'	113	65	2.5
S426-S170	D11S568	5'-AGTGGCGTGTCTCCTGAG-3' 5'-CAGTGCAGGTCAAGACAG-3'	170	65	1
S426-S111	D11S560	5'-TTTGCTACACAGATCAAGAGC-3' 5'-TTGSACTCCTGGTTAGGGTC-3'	111	65	1.5
S438-T100	D11S570	5'-GCGTGTATGCTGCATAC-3' 5'-GCAACACTGACACCTCACC-3'	100	65	1
S440-T117	D11S572	5'-GGTAAAGACTGCAAGTGAAGCCATGATTAC-3' 5'-GTACAATGAAAGAGCTGAGGGTGTCC-3'	117	65	1
S444-T207	D11S574	5'-TAAAGACTGAGGTCATGG-3' 5'-AGATAGCTAGTGAATCAGG-3'	207	65	1.5
S446-T137	D11S576	5'-GAACTGTCGGTTCATGATTGAGC-3' 5'-GTGTTGAGAGGAAATGCATGACAC-3'	137	65	2
S447-T107	D11S577	5'-TGTGCTCTTCTGCAGCCT-3' 5'-CACAACATTGAGACTCCCAC-3'	107	65	1
S449-T107	D11S566	5'-CAGGCTAGCTAGTTTAGCTC-3' 5'-GCTGGGAATCTTTGAGTCC-3'	107	55	1.5
S451-T136	D11S578	5'-GAACACAGCTATGCCTATGTTGC-3' 5'-GCCTGCTAAACCCCTTTTGTGAGG-3'	136	65	1
S453-T108	D11S579	5'-GTGGCTGCAGCTAATGTAAGACAC-3' 5'-CAGCAGAGCAATGGCTAAGTCC-3'	108	65	2
S465-T140	D11S581	5'-GTGATTCCTTACAGCAG-3' 5'-TTCCAGTAAAGGAAATGTC-3'	140	55	1
S467-S113	D11S678	5'-ATGGTACAGAGGAGGAAAG-3' 5'-GAAGGAAATCCTCCCTTTG-3'	113	65	2
S468-T120	D11S582	5'-CCAGCCAAAGGCTCTCATAG-3' 5'-TGAGAGGTGGAAGTGCAGTG-3'	120	65	1
S484-T220	D11S587	5'-GGAAGAGAGAGCTCTGTTAG-3' 5'-GTTGACCAAGCTGCTCCGTG-3'	220	65	2
S487-S129	D11S688	5'-GACTCACATCTCCAACCTGCC-3' 5'-GAACTGAGACAGGATGAGAAC-3'	129	65	1
S489-S141	D11S690	5'-CATGTACCAAATGCTCAGCTG-3' 5'-GTCTTGGCATGAGACATG-3'	141	65	1.5
S504-S190	D11S699	5'-CACCGTGAAGTGAATGATTC-3' 5'-GAACGTGGCTGATTTCTGTC-3'	190	65	3
S515-S166	D11S703	5'-GTGGACAGGCATAGCTGAGG-3' 5'-TGTCACTCTTCTGCCTGAC-3'	166	65	1
S572-S167	D11S734	5'-TCCCGTTGCCCTCGGTACA-3' 5'-TCCTGGCAGAAATCACTGTG-3'	167	65	1

より進化的に保存されている配列、反復配列を含まない DNA 断片を単離した。これらの配列を PCR で特異的に増幅できるように STS 化を行なった。この時興味深いことに単離した DNA 断片の全長にわたってオープンリーディングフレームをとることができる配列 3 種 (161bp, 365bp, 543bp) を見つけた。この長さのオープンリーディングフレームはエクソントラップ法で得られたフラグメント (80-150bp) より長く、遺伝子の一部を偶然ながら見つけた可能性がある。これらの STS を利用して 13 種の組織から作製された 15 の cDNA ライブラリーを解析したところ、すべての STS を少なくとも 1 つの cDNA ライブラリーで検出することができた。この領域で作製された物理地図上にこれら STS を重ね合わせて転写

地図を作製した。しかし得られた STS は遺伝子の一部でしかないので現在これらをプローブに完全長の cDNA の単離、解析を行なっている。

III. YAC ライブラリーのスクリーニング

上で述べたように MEN1 遺伝子座にマップされたコスミドクローンを用いて cDNA ライブラリーをスクリーニングするためのプローブを10個以上単離したが、これはおよそ 3cM にわたる領域の極く一部からプローブを取り出したにすぎない。この領域に存在する全ての遺伝子を網羅するためには現在この領域に点在しているコスミドマーカを線で繋ぐ、即ちこの領域を完全にカバーする DNA コンティグを作成し、遺伝子の単離のための材料をそろえなければならない。この長さの DNA コンティグを作成するにはコスミドなど大腸菌の宿主-ベクター系を用いたのでは非常に大変な労力を必要とするので、数百キロベースの DNA をクローニングできる YAC 系を利用した。これまでに 11q13 で作成された STS、またはユニークな配列をプローブとした Southern ハイブリダイゼーション法によるスクリーニングを行ない、得られたクローンについて解析中である。

以上述べたように我々は11番染色体 q13 領域において種々の解像度をもった染色体地図を作成している。このようなインテグレイテッドマップを作成することは、それぞれの地図の精度を高めるうえで重要である。我々の目的はこの11番染色体 q13 領域にマップされた MEN1 の原因遺伝子を同定することにあるが、転写地図の作成によって同定されるであろうこの領域の遺伝子は、他の疾病に関連した遺伝子を同定したり、また生物学的に重要な遺伝子を同定するうえでも有効である。

なおここで述べた11番染色体特異的なコスミドマーカ単離、遺伝的地図の作成、パルスフィールドゲル電気泳動による物理的地図の作成は、時野隆至、谷上信、藤森実各博士らを中心として作製されたものである。

文 献

- 1) Mulligan, L. M. et al.: Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*, 363, 458-460, 1993.
- 2) Tokino, T. et al.: Isolation and mapping of 62 RFLP markers on human chromosome 11. *Am. J. Hum. Genet.*, 48, 258-268, 1991.
- 3) Tanigami, A. et al.: Mapping of 262 DNA markers into 24 intervals on human chromosome 11. *Am. J. Hum. Genet.*, 50, 56-64, 1992.
- 4) Fujimori, M. et al.: Fine-scale mapping of the gene responsible for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Am. J. Hum. Genet.*, 50, 399-403, 1992.
- 5) Tanigami, A. et al.: A 14-Mb physical map of the region at chromosome 11q13 harboring the MEN1 locus and the tumor amplicon region. *Genomics*, 13, 16-20, 1992.
- 6) Larsson, C.: Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature*, 332, 85-87, 1988.
- 7) Nakamura, Y. et al.: Localization of the genetic defect in multiple endocrine neoplasia type 1 within a small

region of chromosome 11. *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 751–755, 1989.

- 8) Buckler, A. J. et al.: Exon amplification: A strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 4005–4009, 1991.
- 9) Miwa, T. et al.: Fifty sequenced–tagged sites on human chromosome 11. *Genomics*, 17, 211–214, 1993.
- 10) Hori, T. et al.: A high–resolution cytogenetic map of 168 cosmid DNA markers for human chromosome 11. *Genomics*, 13, 129–133. 1992.

4. ヒト11番染色体 q23.3 – qter 領域の 物理的地図の作成

細 田 文 恵*

Construction of the physical map of human chromosome 11q23.3 – qter region with *NotI* linking clones

Fumie Hosoda

Division of Radiobiology, National Cancer Center Research Institute

5-1-1, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, 114

Abstract

Human chromosome 11q23.3–qter is a pathologically important region where the causative genes for some kinds of leukemia and Ewing's sarcoma have been mapped. To clarify the physical structure of this region, we have applied a *NotI* linking clone mapping technique. The *NotI* linking clones were obtained by four successive methods: 1) Selection from chromosome11-specific cosmid library. 2) Construction of *NotI* boundary library from somatic hybrid cell. 3) Construction of chromosome11-specific *NotI* linking library. 4) Directional *NotI* jumping. These clones were sublocalized by mapping on a deletion hybrid cell panel. A *NotI* restriction map was generated with a total of 24 independent linking clones. Now we have completed a *NotI* restriction map from APOA1 gene on q23.3 to the terminus of 11q in 3 cell lines and peripheral blood cell. The physical length of this region was estimated as 19.1 Mb. A map containing *MluI* sites integrated in this *NotI* restriction map provides a more detailed physical map and allows precise mapping of given DNA markers. Up to now, 96 DNA markers were ordered in this integrated map. These ordered marker set contributes to construction of a cloned DNA map using YAC, P1 and other systems, as valuable landmarks.

I. はじめに

ヒト11番染色体は約130Mbの大きさをもつと考えられている。11番染色体上の遺伝子の分布と構成を明らかにしていくために、我々はまず正確かつ詳細な物理地図を作成するという目標を設定した。精度の

*国立がんセンター研究所 放射線研究部 (東京都中央区築地5-1-1)

高い物理地図は将来達成されるであろうヒトゲノムの全塩基配列決定へ向けて、クローン化 DNA の contig 作製のためにも重要な基盤となることが期待できるからである。

一般に物理的地図とよばれるものには、(1) *in situ* ハイブリダイゼーション法により、染色体上の特定座位にマーカーをのせた染色体地図 (2) 染色体の部分欠失をもつ一連の体細胞雑種パネルを用いて、マーカー存在の有無により領域別にマッピングする体細胞雑種地図 (3) radiation hybrid と呼ばれる X線で切断された染色体の一部だけをもつ雑種細胞を多数作製して、2つのマーカーが同時に保持されているかどうかによりマーカー間の距離を決める radiation hybrid 地図 (4) rare-cutter 制限酵素を用いてそれらの切断様式に基づく制限酵素切断地図、等がある。(4) の制限酵素切断地図にはマーカーののった切断断片の大きさの共通性からマーカーどうしの近遠を推定する物理的連関地図も含まれるが、我々はこれらの物理的地図の中でも最もマーカー間の距離と順序の正確な決定づけが可能な NotI リンキングクローンを用いた NotI 制限酵素地図を選択した。また、NotI 制限酵素地図の信頼性を高める目的で同時に MluI による切断地図も作成して距離の補正および確認を行った。この NotI, MluI 地図上に癌研、中村のグループにより分離され、染色体上の領域が決められた多数の DNA マーカーをのせていくことにより、詳細な地図の作成をめざした。今回完成した11番染色体長腕部テロメア領域の19.1Mb にわたる NotI および MluI 制限酵素地図の作成過程を中心に報告する。

II. NotI リンキングクローンによる NotI 制限酵素切断地図作成の理論

高等動植物のゲノム中では存在する CpG 配列の C の多くがメチル化を受けているが、制限酵素の中で^{Me}CpG を含むと切断できないものを特に rare-cutter 酵素と呼ぶ。NotI の認識配列は GCGGCCGC と CpG を 2 箇所含むため、ゲノム中で切断を受ける箇所は平均 1 Mb (メガ塩基対 = 10⁶bp) に 1 つと言われる程まれにしか存在しない。従ってこれらの NotI 切断断片は比較的大きなものとして得られるため、巨大ゲノムの解析に適用しやすい。またゲノム中で NotI により切断を受ける箇所には他の CpG 配列を含む rare-cutter 酵素の切断部位が密集している場合が多く、それは CpG アイランドと呼ばれる。ハウスキーピング遺伝子等の 5' 領域に位置することが知られており、遺伝子の分布と構成を探る上でも重要な指標となる。以上の理由からゲノム解析にはしばしば NotI という制限酵素が用いられる。

NotI リンキングクローンとは NotI によって切断を受ける GCGGCCGC 配列を含む周辺の DNA をクローン化したものである。ゲノム DNA を NotI で切断しパルスフィールドゲル電気泳動で分離したものに対して、NotI リンキングクローンをプローブにすると 2 本の NotI 切断断片が検出されるはずであり、この 2 本の断片はゲノム中でつながっていたことがわかる。逆に同じ NotI 断片を検出する 2 つの NotI リンキングクローンはゲノム上で隣り合っていたことがわかる。従って、完全なリンキングクローンのセットがあれば、この繰り返しによって連続した NotI 断片の並びが完成し、即ちそれが NotI 制限酵素切断地図となるのである。ただし、この場合パルスフィールドゲル電気泳動で分離して得られる大きさの値のみを判断基準とするため、厳密でかつ再現性よい分離条件を設定することに留意しなければならない。リンキングクローンの並びが真に正しいものかどうかを確認するには (1) 複数の培養細胞株を用い、メチレーションパターンの相違に基づく切断の有無を比較する、(2) 別の rare-cutter 酵素と組み合わせて切断様式を比較する、(3) NotI の部分切断反応を行う、(4) NotI ジャンピング法を用いる、等の方法の併用が考えられる。

リンキングクローンとジャンピングクローンをゲノム解析に応用するという考え方は Poustka と

Lehrach によって1986年に提出されたもの¹⁾ であるが、実際に広範囲のゲノムに対して適用した例は少なく、当研究室の市川らによってヒト21番染色体長腕部の40Mbについて作成された NotI 制限酵素地図²⁾ が代表的な一つの報告例である。

III. 研究方法

1. NotI リンキングクローンのランダムな分離

11q23.3-qter 領域に特異的な NotI リンキングクローンを以下の3つの方法により分離した。(1) ヒト11番染色体特異的なコスミドライブラリー³⁾ から NotI 切断部位を有し、かつ q23.3-qter 領域に属するクローンを選出した。(2) t(4;11)(q21;q23) ヒト白血病細胞由来の der4 染色体を1本もつヒト-ハムスター雑種細胞 R229-3A³⁾ DNA から、NotI バウンダリーライブラリーを作製し、11q23.3-qter 領域に特異的なクローンを選択した。このバウンダリークローンをプローブとしてλファージのヒトゲノミックライブラリーをスクリーニングして NotI リンキングクローンを得た。(3) Zabarovsky らの方法⁴⁾ の変法を用いてヒト11番染色体を1本もつヒト-ハムスター雑種細胞 J1-kc⁵⁾ DNA より NotI リンキングライブラリーを作製し、11q23.3-qter 領域に属するクローンを選出した。

(1) では3300個のコスミドクローン DNA について NotI で切断されるかどうかを調べ、さらにその部位が実際にゲノム中でも切断されるかどうかをゲノミックサザンハイブリダイゼーションにより調べた。(2) は R229-3A DNA を NotI と BamHI で切断したものを pBR322 ベクターの EagI と BamHI の間に挿入する形でクローン化し、Alu 配列 (+) の中から4番染色体ではなく、11番染色体由来のものを選択した。(3) では J1-kc 細胞 DNA をの Sau3AI で部分切断して約10キロ塩基対 (kb) から 15kb のサイズの DNA を分画し、これを一度環状化させた後、NotI で切断して切れたものだけをプラスミドベクターにクローン化して Alu 配列 (+) により一次選択した。いずれの場合も染色体上の領域特異性は、deletion hybrid cell パネルを用いたゲノミックサザンハイブリダイゼーションによって決定し、11番染色体上の5つの領域に区分けした。細胞株としては上記の J1-kc 株、R229-3A 株のほかに C. Jones のグループによって分離された一連のヒト11番染色体 deletion hybrid cell の中から、J1-44, J1-7 株⁶⁾ を、また constitutional t(11;22) 転座の der11 染色体をもつ雑種細胞 P3-27A 株³⁾ の計5株を用いた。この5株によっては [A] pter-p15.5, [B] p15.4-p11.2, [C] p11.2-q12, [D] q13-q14, [E] q21-q23.1, [F] q23.2--23.3, [G] q23.3-qter の7つの領域の中で [A] [C] [E] を分けることはできない。

2. NotI ゲノムジャンピング法による NotI リンキングクローンの分離

NotI リンキングクローン取得の最終段階においてはランダムな分離法では効率が極端に落ちるため、ゲノムジャンピング法に切り替えた。R229-3A 細胞 DNA を材料としたジャンピングライブラリーの作製は Zabarovsky らの⁷⁾ の方法に準じて行った。R229-3A DNA を NotI で切断し一旦環状化させた後、BamHI で切断したものを再び環状化させる。これを NotI で再切断して直線状になったものだけをクローン化してライブラリーとした。既存に NotI ハーフリンキングフラグメントをプローブとしてスクリーニングすることにより、ある距離を飛んだ先の NotI 切断部位のハーフリンキングフラグメントを単離した。これをプローブとしてヒトゲノミックライブラリーをスクリーニングして新規の NotI リンキングクローンを得た。

3. NotI リンキングクローンによる NotI 切断断片の検出

NotI リンキングクローンをプローブとして用いて、ヒト Namalwa 細胞、J1-kc 雑種細胞、R229-3A

雑種細胞の3種の培養細胞およびヒト末梢血細胞 DNA の NotI 切断断片の検出を行った。検出にあたっては可能な限り NotI リンキングクローンよりハーフフラグメントを分離し、それぞれ別々に用いた。パルスフィールドゲル電気泳動により分画した NotI DNA 断片のサイズを正確に計測し、同一サイズの断片を検出することを一つの判断基準として隣接する NotI リンキングクローンを同定した。

4. その他

NotI リンキングクローンを用いて作成した NotI 断片の並びが真に正しいものであり、正確な距離を表しているかどうかを確認する目的で、MluI, MluI+NotI の切断様式も合わせて観察した。結果として MluI 制限酵素地図が完成し、この NotI, MluI 地図上に癌研、中村のグループによって当該領域にマップされたコスミドクローン及び、その他既存の DNA マーカー等をマッピングする作業を行なった。

マッピングした DNA マーカーについては主にコスミドクローンについて、ベクター側の T3, T7 プロモーター配列をプライマーとしてシーケンシングを行なった。得られた塩基配列を基に STS 化を進めている。

YAC クローンライブラリーは CEPH で作製されたメガ YAC ライブラリー (約2300クローン、6ハプロイドゲノム相当) を使用した。スクリーニングは HDR (high density replica) メンブレンを作製し、コスミドクローンをプローブとして直接コロニーハイブリダイゼーションを行なった。二次確認には STS 化したプライマーセットを用いて、PCR 産物を調べるかまたは、サザンハイブリダイゼーションを行なった。

IV. 研究結果および考察

1. NotI リンキングクローンの分離

ヒト11番染色体 q23.3-qter 領域特異的な NotI リンキングクローンの分離は当初3つの方法によって行なったが、各々の結果は以下のとおりである。

(1) ヒト11番染色体特異的なコスミドライブラリー3300個から出発して NotI で切断を受けるものが約400個あった。deletion hybrid cell パネルを用いて染色体上の領域を調べたところ、領域の特定できたものが235クローンあり、その中で q23.3-qter 領域 ([F], [G] 領域) に属するクローンを40個選出した。このうち、ヒト Namalwa 細胞、J1-kc 雑種細胞、R229-3A 雑種細胞のいずれかにおいて NotI 部位がメチル化を受けておらず、リンキングクローンとして利用できるものは17個あったが、重複をのぞいて独立したものは11種であった。

(2) R229-3A 細胞 DNA 由来 NotI バウンダリークローンライブラリーから Alu (+) のクローン340個を調べて、NotI-BamHI 挿入断片の構造が独立しているらしいものを88個選んだ。4番染色体由来か11番染色体由来かは deletion hybrid cell パネルを用いて調べた。その結果、11q23.3-qter 領域 ([G] 領域) 由来の NotI バウンダリークローンを11個得た。この11個は各々独立したクローンであるが、一つの NotI 切断部位をはさんで片側ずつのクローンが2セット含まれていたため、独立した NotI 部位を認識するのは9個であった。さらにこの中で既存の (1) のコスミド由来 NotI リンキングクローンと重なるものが4個あり、従って新しい NotI リンキングクローンとして5個得られたこととなった。

(3) J1-kc 細胞 DNA から得られた Alu (+) の NotI リンキングクローン256個について、染色体上の領域特定を行なった。11q23.3-qter ([G] 領域) にマップされるものを19個得たが、重複を除くと9種であった。既存の (1) コスミド由来 NotI リンキングクローン及び (2) R229-3A NotI バウンダリークローン由

来のリンキングクローンとは異なる新しい NotI リンキングクローンとして5個を得た。

以上 (1) (2) (3) の方法により合計21個の独立した NotI リンキングクローンを得ることができた。各々の方法には一長一短があり、また Alu 配列を一次選択の指標としたためか方法毎に得られるクローンに偏りがあるようにみられた。しかしながら、単独の方法でこれとおなじ数のリンキングクローンを集めることは非常に難しいと考えられ、三者が相補った形となった。

2. NotI ゲノムジャンピング法、その他による新しい NotI 切断部位の分離

上記1.のように3つの異なる方法を駆使してもそれ以上新しいリンキングクローンを分離することが困難になった段階で、それまでの部分的な NotI 制限酵素地図の結果を基にゲノムジャンピングを行ない新しい NotI リンキングクローンの分離を試みた。この時点で R229-3A DNA においては NotI 断片のつながりが、I (0.41-0.05-0.15-0.23-0.02-0.38-2.9-0.23Mb)、II (0.20-0.19-1.5-0.04-0.40Mb)、III (0.38-0.80-3.6-0.35-4.2-1.2Mb) の3つの島に分かれており、間に2ヶ所のギャップが存在していた。そこでIとIIの間を埋めるためにIの末端に位置する NotI リンキングクローン (LB109) のハーフリンキングフラグメントを用いて0.23Mbのジャンピングを、またIIとIIIの間を埋めるためにIIIの末端リンキングクローン (LB20) から0.38Mbのジャンピングを行なった。I-II間0.23Mbのジャンピングにより J109 クローンを、II-III間0.38Mbのジャンピングにより J20クローンを分離し、これらのジャンピングクローンからリンキングクローンを拾った。リンキングクローン LJ109 は 0.23Mb と 0.20Mb の NotI断片を検出し、LJ20 は 0.40Mb と 0.38Mb の NotI 断片を検出した。従って、I-II間もII-III間もゲノム上で直接つながっていることが判明した。

また、11qter の最遠位に位置する NotI 切断部位については、それに近いと思われたコスミドクローン (S2995) およびポリモルフィックマーカー D11S968⁸⁾ をプローブとしてメガ YAC クローンライブラリーをスクリーニングして、3クローンを得ることができた。これらの YAC クローンからパルスフィールドゲル電気泳動で YAC DNA を分離精製し、全体をプローブとして用いた。これらのクローンが新しい NotI リンキングクローンであり、ヒト末梢血細胞においてはさらに複数の NotI 切断断片を検出することがわかった。

制限酵素地図作成に用いた3種の培養細胞株には最終的に 11q23.3-qter 領域に全部で27箇所の NotI 切断部位が存在することが明かとなったが、このうち24個所の NotI リンキングクローンをこれで分離したことになった。残る3箇所については未分離であるが、細胞間の NotI-RFLP によって NotI 断片の並びは明白であり、問題はないと考えている。

3. 11q23.3-qter 領域の NotI DNA断片の同定

NotI リンキングクローンによる NotI DNA 断片の同定は、ヒト Namalwa 細胞、ヒト11番染色体を1本持つ J1-kc 雑種細胞、t(4;11) 転座の der 4 染色体を1本持つ R229-3A 雑種細胞の3種およびヒト末梢血細胞を用いて行なった。各細胞においてヒト11番染色体の NotI 切断様式にかなりの違いがみられ、細胞間の NotI-RFLP が示された。また、J1-kc 細胞において q23.3 領域内に約300kbの欠失があることがわかった。つまり隣接する NotI リンキングクローンである LN361 の S フラグメントと LB109 の L フラグメントが、Namalwa 細胞と R229-3A 細胞においては 2.9Mb の NotI DNA を検出するのに対して、J1-kc 細胞ではともに 2.6Mb の NotI DNA を検出したことから判明した。これは派生株である J1-44, J1-7 株にもおなじ欠失が見られることから、J1-kc 株の11番染色体ソースであるヒト羊膜の細胞にたまたま欠失があったのか、あるいは培養株確立の時点または初期の段階で起こったかのどちらかである

と考えられる。この事実に何らかの意味があるかどうかは今のところ不明である。

t(4;11) 転座部位から qter 領域において、ヒト Namalwa 細胞では部分的切断を受ける箇所も含めて NotI 切断部位は16箇所、J1-kc 細胞では22箇所、R229-3A 細胞では20箇所存在していた。また t(4;11) 転座部位より近位には Namalwa 細胞でさらに3箇所(計19箇所)、J1-kc 細胞でさらに5箇所(計27箇所)存在していた。これらに比べてヒト末梢血細胞には少なくとも34箇所以上の NotI 切断部位があることが明らかになった。培養細胞より末梢血細胞の方が NotI でよく切断を受けることは確からしいが、q23.3-q24 領域では比較的違いが見られないのに対して、テロメアに近い q25 領域は切断様式が大きく違っていた。この切断様式の違いはおそらく CpG メチル化の程度の差を反映したものであると考えられるが、生細胞を培養系に移して維持すると、テロメア領域のメチル化を進行させるような特別な調節が働くのかもしれない。

4. コスミドクローン及び DNA マーカーのマッピング

NotI 制限酵素地図の信頼性を高め、また次段階の目的である遺伝子の単離・同定に有用な情報を得るために、癌研・中村のグループ³⁾⁹⁾ 及び放医研・堀ら¹⁰⁾ により当該領域にマップされたコスミドクローン及び、その他の DNA マーカー、単離遺伝子等¹¹⁾、Genethon/CEPH グループにより STS 化されているポリモルフィックマーカー⁸⁾ を NotI DNA 断片上へのせる作業を行なった。q23.3 近位の APOA1 遺伝子から qter 領域まで、現在96個のマーカーをマップすることができた。マッピングには、rare-cutter 酵素の一つである MluI を併用し、NotI 単独、MluI 単独、NotI+MluI の二重切断の様式を比較することでより詳細な領域の特定を行なった。この作業は同時に、NotI リンキングクローンによって検出した NotI 切断断片のサイズを再評価するよい機会となった。即ち、経験的に言ってパルスフィールドゲル電気泳動法による DNA の分離は、サイズがメガ塩基対のオーダーになればどうしても実験毎の誤差が生じてきて大ききの評価が不正確になることは避けられない。そこで、別の rare-cutter 酵素を用いて二重切断を行なえば多くの場合、サイズは小さくなるので正確な値を出しやすくなり、両者のデータを考慮することによって、精密度は格段にあがる。今回、我々の場合は MluI を使用したが、結果的に完全な MluI 制限酵素地図を得ることができた(厳密に言えば、リンキングクローンを用いていないので小断片の見落としは否定できないが、NotI 断片の総計との比較により大きな間違いはないはずである)。

現在、本地図上にマップしたリンキングクローン、コスミドクローン、遺伝子の中から順次一部の塩基配列を決定することによって STS 化を進めている。また、これらを利用して YAC クローンライブラリーのスクリーニングも開始したところである。

5. 物理的地図と遺伝的地図の比較

我々の作成した NotI、MluI 地図上にマップされた DNA マーカーの中で遺伝的連関地図にも用いられているマーカーについてはそれらの報告(NIH/CEPH Collaborative Mapping Group¹²⁾、J.Weissenbach ら⁸⁾)に基づいて、物理地図との比較を行なった。マーカーの順序についてはどちらともよく一致していた。NIH/CEPH グループの結果によれば、APO 遺伝子から ETS1 遺伝子までの q23.3-q24.1 領域は 38.7cM (センチモルガン) の遺伝的距離をもつが、我々の結果から物理的距離は 11.7Mb であり、1 cM あたりの物理的距離は 0.3Mb となる。また、ETS1 から最遠位の D11S387 までの q24.1-q25 領域は 39.9cM と示され、物理的距離が 6.1Mb であるから 1 cM あたりは 0.15Mb であった。Weissenbach らのデータは組み替え頻度 (θ) で表示されており、D11S924 から D11S912 (q23.3-q24.1) の組み替え頻度 0.17 は 9Mb に相当し、D11S912 から D11S968 (q24.1-q25) の組み替え頻度 0.18 は 6.3Mb に相当

していた。それぞれ0.01組み替え頻度あたりの物理的距離は 0.5Mb、0.35Mb であり、いずれの結果からもテロメアに近い方が遺伝的な距離は長くなり、即ち recombinogenic であることがわかった。11番染色体全体でみた場合、NIH/CEPH グループは性平均値として 245cM 値を出し、その中で q23.3-qter 領域は78.6cM と全体の32%を占めている。Weissenbach らの結果では全体の23%となり両者の値は少し違うが、いずれにせよ物理的な距離としてはせいぜい15%の範囲（11番染色体を 130Mb とした時）であるので、長腕部テロメア領域が高い組み替え頻度をもつことを示している。

V. 結 論

ヒト11番染色体長腕部テロメア領域に独立した NotI リンキングクローンを24個得て、総延長 19.1Mb に及ぶ NotI DNA 断片のつながりを明らかにした。NotI の制限酵素地図と同時に MluI の制限酵素地図も作成し、両者を統合することによって精度の高い物理地図が完成した。本地図上にマップした現時点 96個のコスミドクローンおよび DNA マーカーは重要な道標として今後、この領域の遺伝子検索や単離に役立つものと期待される。本研究の次段階としてこれらのマーカーを利用して、YAC の contig を作製していきたいと考えている。

VI. 参考文献

- 1) A. Poustka, H. Lehrach : Jumping libraries and linking libraries : The next generation of molecular tools in mammalian genetics, *Trends Genet.*, 2:174-179, 1986.
- 2) H. Ichikawa, F. Hosoda, Y. Arai, K. Shimizu, M. Ohira, M. Ohki : A NotI restriction map of the entire long arm of human chromosome 21, *Nature Genet.*, 4:361-366, 1993.
- 3) T. Tokino, E. Takahashi, E. Mori, A. Tanigami, T. Glaser, J. W. Park, C. Jones, T. Hori, Y. Nakamura : Isolation and mapping of 62 new RFLP markers on human chromosome 11, *Am. J. Hum. Genet.*, 48:258-268, 1991.
- 4) E. R. Zabarovsky, F. Boldog, T. Thompson, D. Scanlon, G. Winberg, Z. Marcsek, R. Erlandsson, E. J. Stanbridge, G. Klein, J. Sumegi : Construction of a human chromosome 3 specific NotI linking library using a novel cloning procedure, *Nucleic Acids Res.*, 18:6319-6324, 1990.
- 5) F. T. Kao, C. Jones, T. T. Puck : Genetics of somatic mammalian cells : Genetic, immunologic, and biochemical analysis with Chinese hamster cell hybrids containing selected human chromosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:193-197, 1976.
- 6) T. Glaser, D. Housman, W. H. Lewis, D. Gerhard, C. Jones : A fine-structure deletion map of human chromosome 11q : Analysis of J1 series hybrids, *Somatic Cell Mol. Genet.*, 15:477-501, 1989.
- 7) E. R. Zabarovsky, F. Boldog, R. Erlandsson, V. I. Kashuba, R. L. Allikmets, Z. Marcsek, L. L. Kisselev, E. Stanbridge, G. Klein, J. Sumegi, G. Winberg : New strategy for mapping the human genome based on a novel procedure for construction of jumping libraries, *Genomics*, 11:1030-1039, 1991.
- 8) J. Weissenbach, G. Gyapay, C. Dib, A. Vignal, J. Morissette, P. Millasseau, G. Vaysseix, M. Lathrop : A second generation linkage map of the human genome, *Nature*, 359:794-801, 1992.
- 9) A. Tanigami, T. Tokino, S. Takiguchi, M. Mori, T. Glaser, J. W. Park, C. Jones, Y. Nakamura : Mapping of 262 DNA markers into 24 intervals on human chromosome 11, *Am. J. Hum. Genet.*, 50 : 56-64, 1992.

- 10) T. Hori, E. Takahashi, A. Tanigami, T. Tokino, Y. Nakamura : A high-resolution cytogenetic map of 168 cosmid DNA markers for human chromosome 11, *Genomics*, 13:129–133, 1992.
- 11) C. Junien, V. van Heyningen : Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 11 in “Human Gene Mapping 11”, *Cytogenet. Cell Genet.*, 58 : 459–554, 1991.
- 12) NIH/CEPH Collaborative Mapping Group : A comprehensive genetic linkage map of the human genome, *Science*, 258:67–86, 1992.

VII. がんの原因遺伝子

1. 消化器系腫瘍の発生における APC 遺伝子の異常の関与 堀井 明
2. 急性骨髄性白血病における t (8;21) および t (16;21) 染色体転座部位の解析 清水喜美子
3. 原爆被爆者白血病の分子・細胞遺伝学的解析結果 鎌田 七男

1. 消化器系腫瘍の発生における APC 遺伝子の異常の関与

堀 井 明*

Involvement of APC Gene in Tumorigenesis in Digestive Organs

Division of Biochemistry, Cancer Institute

1-37-1 Kamiikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 170

我々は、1991年にポジショナルクローニングの手法を用い、家族性大腸ポリポシス症 (FAP) の原因遺伝子として APC 遺伝子をクローニングした。この遺伝子の異常を散発性の大腸癌についても調べたところ、非常に高頻度にその異常が検出されたため、APC 遺伝子の異常な FAP の原因でのみならず、一般大腸癌の発癌過程でも非常に重要な役割をはたしていることが判明した。さらに、大腸の発癌過程のどの時期に関与しているのかを調べるため、大腸癌の前癌病変である大腸腺腫についても APC 遺伝子の異常を検索したが、その結果、一般大腸癌と同様に非常に高頻度にその異常を検出し、大腸の発癌過程の初期のステップで APC 遺伝子の異常が重要な役割をはたしていることを明らかにした。また、大腸腺腫のうち、種々の大きさ、種々の異型度のものにおいて APC 遺伝子の異常を調べ、腺腫形成の非常に初期の段階で既に両 allele の APC 遺伝子に異常 (two-hit) が起きていることを発見し、APC 遺伝子の機能が完全に失われることにより腺腫の形成が始まることを明らかにした。次いで我々は、APC 遺伝子の異常が大腸以外の腫瘍発生にも関与するか否かを検討してみた。まず、APC 遺伝子が位置する第 5 染色体長腕の LOH が高頻度に報告され、しばしば FAP に合併する腫瘍である胃癌について APC 遺伝子の異常を調べ、超高分化型腺癌と印環細胞癌において高頻度にその変異が起きていることを発見した (それぞれ 7/17, 41%; 3/10, 30%)。そこで、今回、APC 遺伝子の異常がどのような臓器における腫瘍発生に関与するのかについてさらに検討してみた。対象は、脳腫瘍42例、肝癌5例、腎癌14例、肺癌55例、膀胱癌10例、食道癌50例、胃 flat adenoma 10例で、これらは、APC 遺伝子が高発現している臓器に発生した腫瘍、あるいは、APC 遺伝子の位置する領域の LOH が高頻度に報告された腫瘍、さらには腸型の胃癌の前癌病変である。これらの腫瘍のうち、脳腫瘍1例、肝癌と腎癌全例、肺癌7例、食道癌4例は APC の部位の LOH が確認された腫瘍であった。まず、腫瘍部と健常部より DNA を抽出し、PCR 法により APC 遺

* (財) 癌研究会癌研究所・生化学部 (東京都豊島区上池袋1-37-1)

伝子のエクソン部分を増幅した。遺伝子異常の有無は、この PCR 産物に対し RNase プロテクション法を一次スクリーニングとして用いて検索し、変異の見られたものについてはその塩基配列を決定した。その結果、膵癌と胃 flat adenoma において、それぞれ 4 例/10 例 (40%) で異常が検出されたが、その他の腫瘍では異常は検出されなかった。変異の内訳は、膵癌では全例が frame shift、胃 flat adenoma では frame shift が 2 例、nonsense mutation と missense mutation が 1 例ずつであり、ほとんどの変異は蛋白の合成を中断するものであった。これらの結果より、APC 遺伝子の異常は、大腸癌、胃癌以外に、膵癌の発生にも関与すること、および腸型の胃癌では、大腸癌と同様に、発癌の初期段階で APC 遺伝子の異常が重要な役割をはたしているものがあることが明らかとなった。さらに我々は、APC 遺伝子の 5' 非翻訳エクソンの alternative splicing によって 5 種類の mRNA が存在すること、APC 遺伝子から SRP19 遺伝子 (19kDa の signal recognition particle をコードする遺伝子) への alternative splicing が存在すること、さらに、これらの alternative splicing が臓器特異的に制御されていることなども明らかにしたが、そのことと癌化との関連において興味深い結果も得られたので、併せて報告する。

2. 急性骨髄性白血病における t (8;21) および
t (16;21) 染色体転座部位の解析

清水 喜美子*

Molecular Analyses of t(8;21) and t(16;21) Chromosomal Translocations
in Acute Myeloid Leukemias

Kimiko Shimizu

Radiobiology Division, National Cancer Center Research Institute

5-1-1, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, 105 Japan

Abstract

Chromosomal translocations are implicated as important events in the pathogenesis of hemetopoietic malignancies. Many protooncogenes involved in neoplastic processes have been isolated by analysis of translocation breakpoint using new technologies and many DNA markers isolated in the progress of human genome projects. The (8;21) (q22;q22) translocation is a non-random chromosome abnormality frequently found in acute myeloid leukemia with maturation (M2 subtype). Using chromosome 21 specific *NotI* linking clones and pulsed field gel electrophoresis, we detected a rearranged fragment of *NotI* digested leukemic cell DNA with t(8;21). The breakpoint was mapped about 13kb to 100kb proximal to the *NotI* site of LL263 *NotI* linking clone. We isolated the nobel gene, *AML1* which locates at the breakpoint on chromosome 21. We surveyed the cDNA libralies constructed from t(8;21) cell line and fetal brain and cloned the chimeric cDNAs, *AML1-MTG8* and normal *MTG8*. Sequence analysis revealed that both *AML1* and *MTG8* code putative transription factors. The (16;21) (q11;22) translocation is also non-random chromosome abnormality found in acute myeloid luekemias, which show variable cytomorphological features. Using somatic cell hybrids conteining the der(16) chromosome from leukemic cell with t(16;21), we mapped the breakpoint on the *NotI* restriction map of chromosome 21. Sothern blot analysis and subsequent polymerase chain reaction analysis showed that by the translocation, an *ERG*, *ets*-related gene was disrupted in the intron which locates at 5' upstream of ETS DNA binding domain.

*国立がんセンター研究所放射線研究部 (東京都中央区築地5-1-1)

はじめに

造血器腫瘍においては、高頻度に、染色体転座を含む染色体異常が見いだされるが、染色体転座部位を解析することにより、転座部位に存在して、発癌と密接に関係していると思われる多くの遺伝子が単離されている(1-3)。特に、急性リンパ性白血病やパーキットリンパ腫を代表とする悪性リンパ腫においては、その転座部位の片方の遺伝子が細胞機能と結びついた、免疫グロブリン遺伝子やT細胞レセプター遺伝子であることが知られており、分子レベルの解析が進んでいる。一方、骨髄性白血病においては、慢性骨髄性白血病の t(9;22) (q34;q11) において、*BCR-ABL* キメラ遺伝子の生成が知られて以来(4)、ヒトゲノム解析の進展に伴って、分子レベルの解析が急速に進んでいる。急性骨髄性白血病においても、t(15;17)-(q21;q21) における *PML*、*RAR α* 遺伝子(5,6)、t(6;9) (q23;q34) における *DEC*、*CAN* 遺伝子(7)、t(3;3) (q21;q26) や inv3 (q21;q26) における *EVII* 遺伝子(8) などが次々に単離されている。

我々のグループはヒトゲノム解析プロジェクトの一環として、ヒト21番染色体の物理地図 (*NotI* リンキングクローンマップ) を完成させており(9,10)、それと平行して、急性骨髄性白血病 (AML) の t(8;21) (q22;q22) および t(16;21) (q11;q22) 転座部位の解析を行なってきた。疾病遺伝子のポジショナルクローニングとしては、染色体転座部位にある遺伝子のクローニングは、比較的、容易なこととはいえ、既知のDNA マーカーから、転座切断点を正確に導きだすのは、たやすいことではない。この研究で重要な役割をはたしているのは、21番染色体上の正確なランドマークとなる *NotI* リンキングクローンのほとんど完全なセットがあったことと、必要な体細胞雑種が作製できたことである。

I. t(8;21) (q22;q22) 転座部位の解析

t(8;21) 転座は AML の FAB (French-American-British) 分類M2タイプの約50%をしめ、AML の中では t(15;17) 転座と並んで、最も高頻度に見られる染色体転座である。しかし、そのM2に占める割合には地理的な片寄りがあるとされている。白血病細胞の特徴としては、顆粒球系への分化傾向を持つこと(11)、しばしば性染色体の欠失を伴うこと、Auer 小体が見られること、比較的寛解に導入されやすいことなどが挙げられる。我々はまず、それまでに得られていた21番染色体の *NotI* リンキングクローン (*NotI* 制限酵素認識配列をもつ DNA 断片) を不均衡転座を持つ細胞を利用して 21q21 から 21q21.1 にマップされるものを選んだ。白血病細胞の DNA を *NotI* 消化したのちパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) で分画し、*NotI* リンキングクローンをプローブとしてサザンプロット解析を行なったところ、LL263クローンによって派生バンドが検出された。これは白血病細胞にのみ検出され、寛解時又は正常なサンプルでは検出されなかった。*NotI* リンキングクローンは対応する *NotI* 断片の末端に位置することから、マッピングに際して、エンドラベルと同様に利用できる。転座部位は、LL263 (LL103) からセントロメア方向へ 13kb 以上、100kb 以内に位置していることが判明した。その方向性は白血病細胞とマウス細胞とで作製した体細胞雑種からの情報によっている。マウスミエローマ細胞 (HPRT 欠損) と t(8;21) 白血病細胞とを融合させ der(8)、der(21) 染色体を持つ体細胞雑種を作製した。der(21) 染色体には LL263 は存在しないことから、切断点は LL263 よりセントロメア側にあることが判明した(12)。

NotI リンキングクローンの多くは CpG アイランドを含むと考えられ、事実 LL263 も CpG アイランドを含んでいることから、LL263 そのものが転座部位にまたがる遺伝子の 5' 部分である可能性が示唆された。そこで我々は、LL263 からセントロメア方向へ染色体ウォーキングし、さらに cDNA ライブラリーを検

索して切断部位にまたがる遺伝子 *AML1* の単離に成功した。この *AML1* 遺伝子は250アミノ酸からなるタンパクをコードしており未知の遺伝子であった。体細胞雑種からの情報より *AML1* の方向性はセントロメア側からテロメア方向へ 5'-3' であった(13)。*AML1* はショウジョウバエの体節遺伝子 *runt* (14)、およびマウスポリオーマエンハンサー結合因子 *PEBP2 α* (15) と高いホモロジーを有していた。

3例の複雑転座 t(8;V;21) および t(8;21) 白血病細胞株 kasumi-1 をふくむ多数の患者サンプルの切断点を詳しく解析すると、*AML1* 上の切断点は全てコーディングフレーム中の2つのエクソンにはさまれた約25kbのイントロン中にあり、例外は見つからなかった。この部位は *runt* ドメイン (図3参照) のC末直後であった。ただし、転座部位はイントロン中に散在しており、更に der(8)、der(21) 染色体の切断部位近傍の塩基配列を決定したが、その塩基配列からは特徴ある組換え機構を推定できなかった(16)。8番染色体上の切断点も限られた領域中にあることから、*AML1* は8番染色体上の切断部位にある遺伝子とキメラ遺伝子を作っていると推測された。kasumi-1細胞の mRNA をもちいて RT-PCR を行ない、キメラ遺伝子由来の8番染色体上の DNA 断片を得た(17)。kasumi-1細胞から cDNA ライブラリーを製作しキメラ cDNA クロノンを単離して、塩基配列を決定したところ、*AML1* は8番染色体上の未知の遺伝子 *MTG8* とつながってキメラタンパクをコードしていることがわかった。正常 *MTG8* 遺伝子はヒト胎児脳の cDNA ライブラリーからクローニングした。*MTG8* 遺伝子からは少なくとも2つの mRNA (*MTG8a*, *MTG8b*) が生成していることが確かめられた。*MTG8* も Zn フィンガードメインを有し、プロリンの多いドメインがあるなど、転写因子としての性格を示している。面白いことに、*AML1*-*MTG8* キメラタンパクの構造は *AML1* の *runt* ホモロジー領域をそっくり保持した形となっている。*AML1* は主として *PEBP2 α* の解析から得られた情報をもとにすると、*runt* ドメインが DNA への結合活性を有していると推測され、その下流に転写活性化ドメインがあると考えられる。*AML1*-*MTG8* キメラタンパクでは *AML1* の転写活性化ドメインが *MTG8* の転写活性化ドメインに置き変わっている(18)。一方、RT-PCR で *MTG8*-*AML1* キメラ mRNA は検出できず、複雑転座 t(8;V;21) の結果から推定されるように der(8) 上の *AML1*-*ATG8* キメラ遺伝子が癌化に重要な役割を果たしていると考えられる。ノザンプロット解析から、*AML1* は血球系の細胞株、および正常の末梢血で多量に発現されている他、マウスの組織では、発生初期の胚および肺で強く発現しているが、*MTG8* は脳でのみ高い発現パターンを示し、血球系ではほとんど発現していない。この結果が *AML1* もしくは *MTG8* の本来の役割とどのような関係があるかは不明である。

最近、急性骨髄性白血病における頻度の高い染色体転座の一つである inv16(p13;q22)のq22の切断部位に存在するのが *PEBP2 β* であることが報告され、*AML1* が *PEBP2 β* とヘテロ2量体を形成することと考え合わせると極めて興味深い。

II. t(16;21) (q11;q22) 転座部位の解析

t(16;21) 染色体単転座も骨髄性白血病に特異的な転座であるが、この白血病は t(8;21) 白血病などと異なり、細胞形態学的に様々な性状を呈し、FAB 分類も決まっていない。その頻度は低く、現在までに10数例の報告があるのみである。染色体レベルの解析では21番染色体上の切断部位は t(8;21)転座部位と区別できないが、我々は *AML1* 中には切断部位がないことを PFGE で確かめた。頻度が低く、解析に十分なサンプルを得ることが困難なことなどから、まず、白血病細胞とマウスまたはチャイニーズハムスターの *APRT* 欠損細胞との雑種細胞の作成を試みた。*APRT* 遺伝子は 16q24 に座位しているため、白血病細

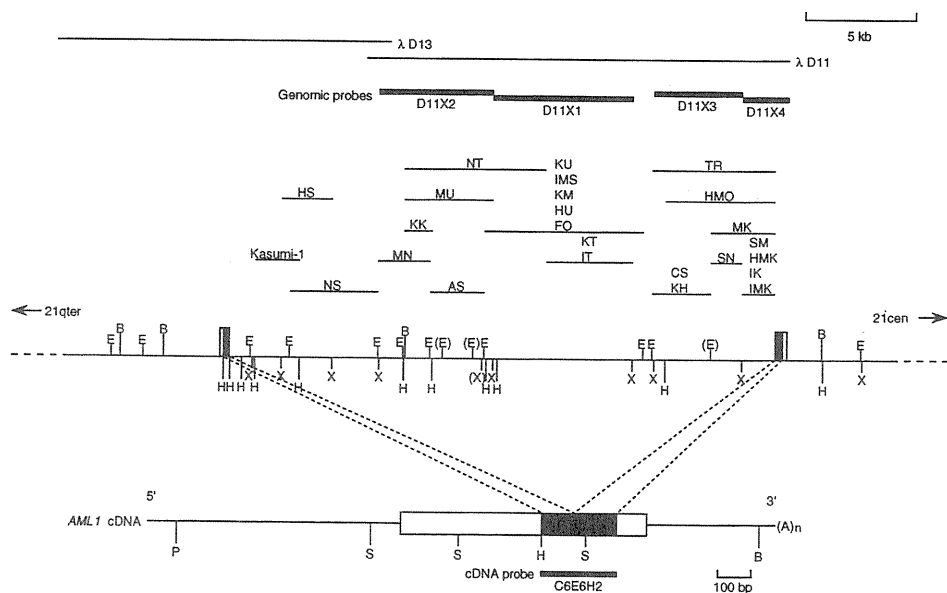


図1 AML1 遺伝子構造と t(8;21) 染色体転座部位のマッピング。
 この図の中に示してある cDNA プロブ C6E6H2 およびゲノミックプロブ D11X2 によって t(8;21) 転座部位のほとんどを検出することができる。

胞とこれら APRT 欠損細胞とを融合させた後、アザセリンおよびアデニンを含む選択培地で培養することにより、APRT ポジティブな細胞つまり16番染色体または der(16) 染色体を保持した細胞を残すことができる。DNA マーカー *D16S96*、*D16S160*、*D21S41*、*D21S41* をプロブとしてサザンブロット解析を行ない、der(16) 染色体のみを持ち、正常16番、正常21番、der(21) 染色体を持たない雑種細胞をえた。21番染色体の q22 領域に存在する *NotI* リンキングクローンおよび *D21S55* マーカー、*ETS2* 遺伝子をプロブとし、雑種細胞の DNA をサザンブロッ

ト解析したところ、*D21S55* および LL390 より、セントロメア側のリンキングクローンは検出されず *ETS2* および LL46SP よりテロメア側のリンキングクローンは検出された。したがって切断点は *D21S55* と *ETS2* の間にあることが判明した (図3)。患者の DNA サンプルを PFGE で分離し LL390 をプロブとしてサザンブロット解析すると、正常な 1.30Mb のバンドの他に 1.1Mb の派生バンドが検出された。*D21S55* と *ETS2* の間にあると考えられる *ets* がん遺伝子ファミリーの一つである *ERG* 遺伝子(19) に的をしぼり、雑種細胞 DNA で PCR 解析を行なったところ、der(16) 染色体には *ERG* の 5' 部分は存在するが *ERG* の 3' 部分は検出できず、切断点は *ERG* 遺伝子中にあると考えられた。21番染色体の P1 ライブラリーより *ERG* 遺伝子を含むクローンを単離し、4 例の患者の DNA サンプルを用いて解析したとこ

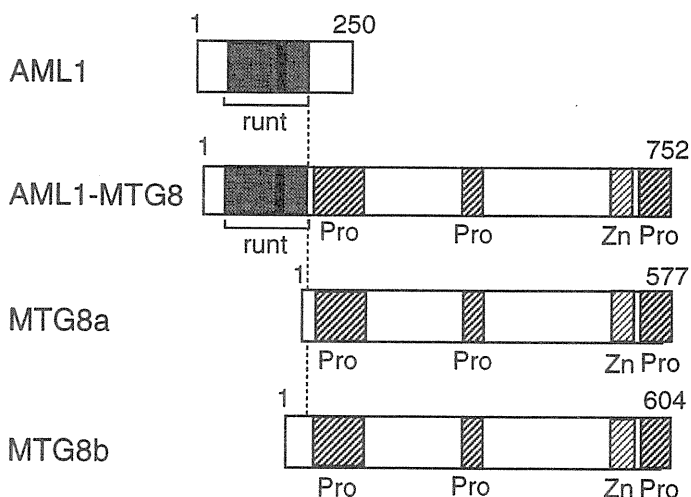


図2 AML1、AML1-MTG8、MTG8の構造。
 キメラ mRNA では AML1 は runt ドメインの直下流で MTG8 に切り替わっている。
 MTG8 はほとんど全ての部分が含まれる。

ろ、7.3kb の *Bam*HI 断片をプローブとした時、雑種細胞の DNA で1本の派生バンドを、3例の患者の DNA で2本の派生バンドが検出された。切断点は全て *ERG* の ETS ドメインの直前のイントロン中にあることがわかった。したがって、*ERG* と16番染色体上の未知の遺伝子との間でキメラ遺伝子を形成している可能性が強く示唆された。ノザンプロット解析を行なったところ、*ERG* の5'側のプローブを用いた時、kasumi-1細胞および Molt-4細胞では5.2kbと3.2kbの mRNA が検出されるが、t(16;21)細胞では2.0kbの mRNA が主に検出される。一方、*ERG* の3'側のプローブを用いると、白血病細胞でも5.2kbと3.2kbの強く発現している2種の mRNA を検出でき、これもキメラ mRNA である可能性が高い(20)。現在、16番染色体上の切断点にまたがる遺伝子を同定中である。

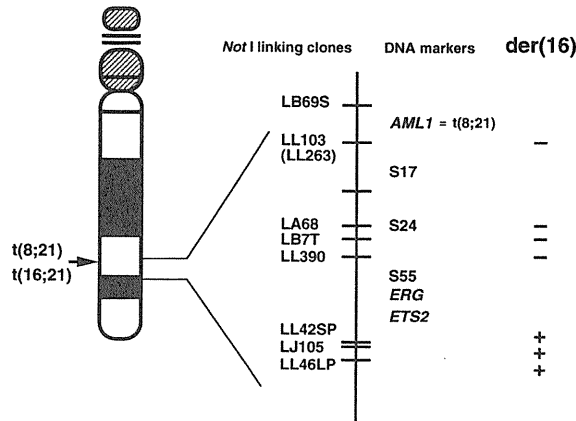


図3 21番染色体上の q22 付近にマップされる NotI リンキグクローンと DNA マーカーをプローブとした時の der(16) 染色体のサザンプロット解析の結果。

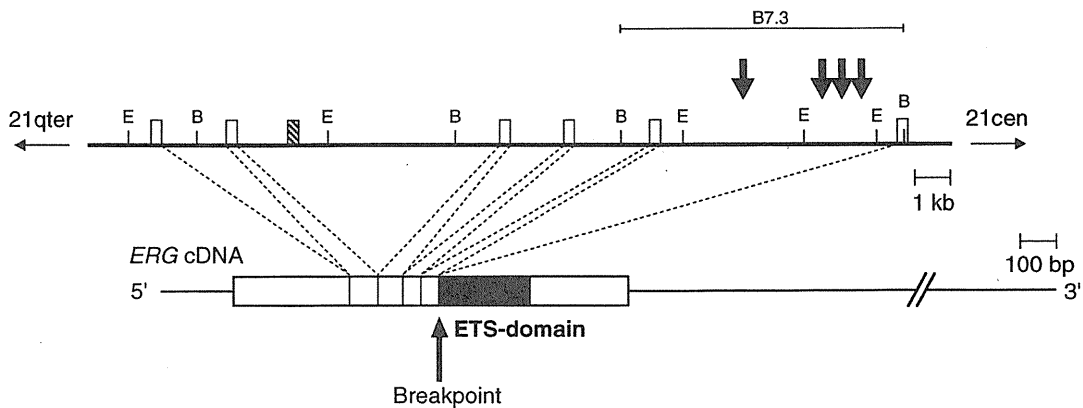


図4 *ERG* 遺伝子構造と t(16;21) 染色体転座部位のマッピング。
転座部位は ETS ドメインの直上流のイントロン中に集中している。

ets オンコジーンファミリーは鳥類の白血病ウイルスの *ets* 発癌遺伝子のホモログとして同定された数多くの遺伝子である(21)。特に、*ETS1* および *ETS2* はその座位が白血病の転座部位近傍にあることから、白血病との関連が疑われてきたが、今までそのような事実は発見されなかった。ところが、最近、*ets* オンコジーンファミリーの1つである *FLI1* が t(11;22) 転座を持つ Ewing 肉腫において、11番染色体上の転座部位の遺伝子として同定された(22)。*ERG* はオンコジーンファミリーのなかでも、特に *FLI1* と高いホモロジーを有しており、しかも両者の切断部位はほとんど一致とされている。Ewing 肉腫においては、*ETS* ドメインを持つ *EWS-FLI1* キメラ遺伝子が重要な役割を果たしているが、t(16;21) 白血病におい

でもやはり、der(21) 染色体上の染色体上の ETS ドメインを持つキメラ遺伝子が重要な役割を果たしているとは推定される。*ERG* は末梢血を含む正常組織では胸腺でわずかに発現しているだけで、ほとんど発現していない。したがって、白血病細胞で大量に発現している *ERG* の ETS ドメインそのものが癌化に何らかの役割を果たしている可能性も否定できない。

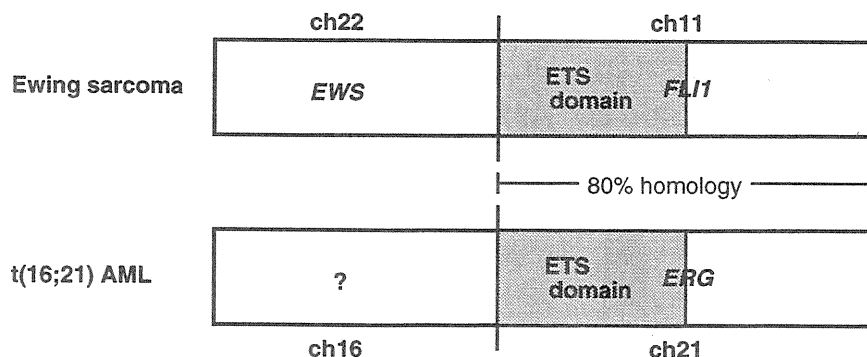


図5 t(11;22) 転座を持つ Ewing 肉腫におけるキメラ遺伝子と t(16;21) 転座を持つ骨髄性白血病におけるキメラ遺伝子の類似性。

おわりに

ここでのべたように、我々はヒトゲノムプロジェクトの一環として作成された21番染色体物理地図を有効に利用して、急性骨髄性白血病に見られる21番染色体上の2箇所の転座切断部位の遺伝子を同定した。この2つの遺伝子、*AML1*、*ERG* および *AML1* とキメラ遺伝子を形成する *MTG8* は全て転写因子であった。他の急性骨髄性白血病における *PML*、*EVII* など転写因子であることなどを考え合わせると、異常になった転写因子が本来、制御している遺伝子の発現を乱して、細胞を癌化させると推定される。*AML1* やリンパ系白血病の転座関連遺伝子である *LYT10* 遺伝子がシヨウジョウバエの発生を制御する遺伝子とホモロジーがあることから、各転写因子を解析することが血球系の細胞の分化のみならず、発生、分化の過程でどのような遺伝子を制御しているか、を知る手掛かりを与えるであろう。

参考文献

1. Solomon E. Borrow J. and Goddard A. D. (1991) Chromosome aberrations and cancer. *Science*, 254: 1153-1160
2. Rabbitts T. H. (1991) Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell*, 67: 641-644.
3. Mitelman, F., Kaneko, Y. and Trent, J. (1991) Report of the committee on chromosome changes in neoplasia. Human Gene Mapping 10. 5 (1990) *Cytogenet. Cell Genet.*, 58: 1053-1079.
4. Heisterkamp, N., Stephenson, J. R., Groffen, J., Hansen, P. F., de Klein, A., and Grosveld, G. (1985) Structural organization of the gene and its role in the Ph1 translocation. *Nature*, 315: 758-761.
5. de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991) The PML-RAR fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell*, 66: 675-684.
6. Kakizuka, A., Miller, Jr., W. H., Umesono, K., Warrell, Jr., R. P., Frankel, S. R., Murty, V. V. V. S.,

- Dmitrovsky, E. and Evans, R. M. (1991) Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR with a novel putative transcription factor, PML. *Cell*, 66: 619-622.
7. Morishita, K., Parganas, E., Iman, C. L., Whittaker, M. H., Drabkin, H., Oval, J., Taetle, R. and Ihle, J. N. (1992) Activation of Evi-1 gene expression in human acute myelogenous leukemias by rearrangements spanning 300-400kb in chromosome 3q26. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3937-3940.
 8. von Lindern, M., Fornerod, M., van Baal, S., Jaegle, M., de Wit, T., Buijs, A. and grosveld, G. (1992) The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, *dek* and *can*, and the expression of a chimeric, leukemia-specific *dek-can* mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 12: 1687-1697.
 9. Ichikawa, H., Shimizu, K., Saito, A., Wang, D., Oliva, R., Kobayashi, H., Kaneko, Y., Miyoshi, H., Smith, C. L., Canter, C. R., and Ohki, M. (1992) Long distance restriction mapping of the proximal long arm of human chromosome 21 with NotI linking clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 23-27.
 10. Ichikawa, H., Hodsoda, F., Arai, Y., Shimizu, K., Ohki, M., and Ohki, M. (1993) A NotI restriction map of the entire long arm of human chromosome 21. *Nature Genet.*, 4: 361-366.
 11. Berger, R., Bernheim, A., Daniel, M. T., Valensi, F., Sigaux, F., and Flandrin, G. (1982) Cytologic characterization and significance of normal karyotypes in t(8;21) acute myeloid leukemia. *Blood*, 59: 171-178.
 12. Shimizu, K., Ichikawa, H., Miyoshi, H., Ohki, M., Kobayashi, H., Maseki, N., and Kaneko, Y. (1991) Molecular assignment of a translocation breakpoint in acute myeloid leukemia with t(8;21). *Genes Chromosomes Cancer*, 3: 163-167.
 13. Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y., and Ohki, M. (1991) t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, *AML1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 10431-10434.
 14. Daga, A., Tighe, J. E., and Calabi, F. (1992) Leukemia/Drosophila homology. *Nature*, 356: 9.
 15. Ogawa, E., Maruyama, M., Kagoshima, H., Inuzuka, M., Lu, J., Satake, M., Shigesada, K., and Ito, Y. (1993) *PEBP2/PEA2* represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human *AML1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6859-6863.
 16. Shimizu, K., Miyoshi, H., Kozu, T., Nagata, J., Enomoto, K., Maseki, N., Kaneko, N., and Ohki, M. (1992) Consistent disruption of the *AML1* gene occurs within a single intron in the t(8;21) chromosomal translocation. *Cancer Res.*, 52 : 6945-6948.
 17. Kozu, T., Miyoshi, H., Shimizu, K., Maseki, N., Kaneko, Y., Asou, H., Kamada, N., and Ohki, M. (1993) Junctions of the *AML1/MTG8(ETO)* fusion are constant in t(8;21) acute myeloid leukemia detected by reverse transcription polymerase chain reaction. *Blood*, 82: 1270-1276.
 18. Miyoshi, H., Kozu, T., Shimizu, K., Enomoto, K., Maseki, N., Kaneko, Y., Kamada, N. and Ohki, H. (1993) The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an *AML1-MTG8* fusion transcript. *EMBO J.*, 12: 2715-2721.
with t(16;21) chromosomal translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
 19. Reddy, E. S. P., Rao, V. N., and Papas, T. S. (1987) The *erg* gene : A human gene related to the ets on-

- cogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6131–6135.
20. Shimizu, K., Ichikawa, H., Tojo, A., Kaneko, Y., Maseki, N., Hayashi, Y., Ohira, M., Asano, S., and Ohki, M. (1993) An ets-related gene *ERG* is rearranged in human acute myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90** : 10280–10284.
 21. Karim, F. D., Urness, L. D., Thummel, C. S., Klemsz, M. J., Mckercher, S. R., Celada, A., Van Beveren, C., Maki, R. A., Gunther, C. V., Nye, J. A., and Graves, B. J. (1990) The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes Dev.*, **4**: 1451–1453.
 22. Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmazc, C., Melot, T., Peter, M., Kover, H., Joubert, I., de Jong, P., Rouleau, G., Aurias, A., and Thomas, G. (1992) Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature*, **359**: 162–165.

3. 原爆被爆者白血病の分子・細胞遺伝学的解析結果

鎌田七男*、田中公夫*、江口真理子*

Cytogenetic and Molecular Genetic Analysis of Leukemias Found in Atomic Bomb Survivors

Nanao Kamada, Kimio Tanaka and Mariko Eguchi

Department of Hematology, Research Institute for Nuclear Medicine and Biology,
Hiroshima University, 2-3 Kasumi, 1-chome, Minami-ku, Hiroshima, 734 Japan

Abstract

Seventy five radiation-related leukemia patients in Hiroshima including 16 patients exposed to more than one Gray were cytogenetically examined. Statistical analysis of data on the frequencies of chromosomal aberrations in the survivor groups according to bone marrow doses by DS86 estimation revealed that the heavily exposed group tended to have significantly higher aberration rates compared to the non-exposed group. Furthermore, the chromosomal aberrations in the survivors were observed to be of a more complex nature and had the characteristic findings of secondary leukemia. These observations therefore suggest that patients with a history of heavy exposure to atomic bomb radiation had leukemic cells originating from a stem cell which had been damaged by irradiation at the time of the bombing as well as cells involved in complex chromosome abnormalities.

A higher incidence($p=0.06$) of 11q23 abnormality was found in acute leukemia patients who had a history of exposure to A-bomb and developed from 1986 to 1993. However, we could not detect rearrangement of MLL gene in these patients. Break point region on 11q23 of radiation induced leukemias may be different from the common 8.5 kb region.

Molecular biologic studies on RAS genes in acute and chronic leukemias and the BCR gene in chronic myelocytic leukemia were performed in exposed and non-exposed groups. So far, no distinctive differences have been observed in the frequency and sites of point mutations in N and K-RAS genes or in the rearrangement of the BCR gene. Further, retrospective analysis

*広島大学 原爆放射能医学研究所 血液学研究部門 (〒734 広島市南区霞1-2-3)

using DNA from leukemia patients who developed the disease in the early period from atomic bomb radiation exposure would be useful for elucidation of the mechanisms of radiation-induced leukemia.

はじめに

原爆被爆者にみられる白血病に関するこれまでの疫学的調査はいくつの特徴を明らかにしてきた。①白血病発生頻度のピークは被曝後7～8年にみられたこと、②また、被曝線量と強い相関のあること、③被曝時に若い年齢層の人ほど被曝後早期に白血病発生がみられたこと、④白血病病型は骨髄性が多く、特に慢性骨髄性白血病では長崎被爆者に比べて広島被爆者に高頻度に発生したこと、⑤最近の10年間では被曝時40才以上の年齢層に急性骨髄白血病がなお有意に発生しており、慢性骨髄性白血病は非被曝群と発生率では差のみられないこと、などである。また、細胞遺伝学的研究では1,500m以内の健常な被爆者でも5%から60%の細胞に異常がみられ、安定型染色体異常の頻度より当時の被曝線量を推定することも可能であること、また、骨髄細胞の経時的観察では異常クローン交替現象がみられることなどが明らかとなった¹⁾。

原爆被爆者白血病の遺伝子解析結果を述べるには、被爆者白血病の特徴やその染色体異常の特殊性を抜きにして論じられないので、本報告ではまず75名の急性骨髄性白血病および骨髄異形成症候群ならびに35名の慢性骨髄性白血病の染色体異常について述べ、次いで被爆者白血病における分子生物学的所見について非被曝群と比較した結果を述べる。

I. 被爆者白血病における細胞遺伝学的研究

1. 急性骨髄性白血病（骨髄異形成症候群を含む）

1962年9月より1989年3月までの27年間に1946年5月以前に出生した白血病336症例を染色体分析した。これらの白血病患者はT65D線量推定方法²⁾を用いて被曝線量が推定されていたが、DS86線量推定³⁾が完成したため再計算を行い、被曝の状況により5群に大別した。すなわち、骨髄線量1 Gray以上群、0.01～0.99 Gray群、0 Gray群、被曝線量非賦与群及び非被曝者群である。被曝線量を持つ症例は全て1950年に原爆障害調査委員会（現放射研）によって確立された寿命調査研究集団（LSS）に属するもので、被曝線量非賦与群は1.0km～2.0km以内で被曝はしているが、LSS集団には入っておらず、DS86線量推定が不可能な群である。表1には各群の白血病症例数をFAB分類⁴⁾別に示す。0.01～0.99 Gy群と被曝線量非賦与群の染色体所見が類似性を示すため以後の統計処理は両群を合わせて行った。1 Gray以上の被爆者白血病では5症例にM6症例がみられており、やや多い傾向を示した。

表2には染色体モード別頻度と、各群の染色体異常症例頻度を示す。1 Gray以上被爆者白血病では46本の染色体数を持ち、異常を示す症例が9例と最も多く、3例がhyperdiploidy、4例がhypodiploidyを示した。表3には2 Gray以上の骨髄線量を被爆者に発生した急性骨髄性白血病6症例の核型を示す。症例2は12才時に被曝し、41年後に白血病になった症例であるが、これ以外の症例は全て当時30才以上の成人であった人たちである。複雑な異常が各症例にみられている。トリソミー、モノソミー、欠失を1 hit異常とみなし、相互転座、腕内欠失、逆位などを2 hit異常とみなして各症例のstem lineの染色体異常を数として計算し表示したのが表4である。1 Gray以上の被爆者白血病では、白血病細胞の核型が非常に複雑であることが統計的にも($p < 0.005$)明らかとなった。5番や7番染色体に異常を示す症例につ

Table 1. Numbers of Leukemia Patients and FAB Classification¹⁾²⁾

DS86 marrow dose group in Grays	M1	M2	M3	M4	M5	M6	MDS	Total
1.0 ~	2	4	0	1	1	5	3	16
0.01~0.99	3	5	0	1	1	1	0	11
0	11	6	0	1	3	3	1	25
exposed ³⁾	5	2	3	1	1	2	9	23
non-exposed	62	72	25	24	13	30	35	261

¹⁾ Study period from September 1962 to March 1989.

²⁾ All blood smears from patients who developed leukemia before 1980 were reclassified and subgrouped according to the FAB classification.

³⁾ Exposed at a distance of between 1.0 and 2.0 kilometers from the hypocenter but doses were not estimated by DS86 dosimetry.

Table 2. Modal Chromosome Number and Percentage of Patients with Chromosome Aberrations

DS86 marrow dose (in Grays)	Modal chromosome number									Total cases analysed	Percentage of patients with chromosome aberrations
	42	43	44	45	46(n)	46(ab)	47	48	≥49		
1.0 ~	2			2		9		2	1	16	100*
0.01~0.99				4	16	10	4			34	52.9
0 and "exposed"			2	3	11	6	2		1	25	56.0
Non-exposed	2	4	8	34	102	71	26	6	8	261	60.9

* p<0.001

Table 3. Chromosome Aberrations in Heavily Exposed Leukemia Patients (2 Grays or more)

Case	Age/Sex	Marrow dose (Grays)	Date of onset	Type of leukemia	Karyotype
1	81/F	2,085	Dec/1985	M6	46,XX,del(7)(q11q22),del(20)(p12)
2	53/M	2,187	Dec/1986	M2	42,X,-Y,-1,-2,-5,-13,-13,-14,-15,-17,-19,-21,-22,+dic(1;?)(p32;?),+dic(2;?)(p13;?),+dic(2)t(2;?)(q37;?),del(7)(q32),i(8q),del(9)(q22q31),+der(14)t(14;?)(q32;?),+der(19)t(11;19)(q24;q13),+der(22)t(22;?)(p11;?),+mar1,+mar2,+mar3
3	66/M	2,474	Feb/1980	MDS	48,XY,+17,+20,del(5)(q12q31)
4	80/M	2,537	Sept/1978	M2	42,XY,-4,-4,-5,-8,i(8q)/46,XY,-8,i(8q),+22
5	61/M	4,094	Dec/1976	M6	45,XY,-8,13q+,17p+
6	72/F	4,528	April/1986	MDS	46,XX,-10,-14,-20,i(1q),del(5)(q15),+der(14)t(3;14)(q22;q22),+mar,+ring

いてみると、1 Gray 以上の群で分染法を施行した 8 例中 6 例にみられ、他の群と比べ明らかに高率を示した (表 5)。本年になり、Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法でモノソミー 7 の有無を検討したところ、染色体核型では 2 つの正常な染色体をもつ異常核型を示しておりながら、静止核でのモノソミー 7 の頻度を観察してみると、数十%にモノソミー 7 がみられる近距離被爆者を 2 例経験しており、-5 や -7 は確実に高頻度であると思われる。FAB 病型に特異的な染色体異常として 8;21 転座 (M2) や 15;17 転座 (M3) が一般に見出されるが、本研究でも M2 89 例中 29 例、M3 28 例中 15 例にそれぞれ 8;21 転座や

Table 4. Number of Chromosome Aberrations per Stem Line

DS86 marrow dose group in Grays	Number of chromosome aberrations per stem line							% of patients with more than 3 abnormalities
	0	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-	
1.0 ~	0	4	8	2	0	1	1	75*
0.01~0.99 and "exposed"	16	14	3	1	0	0	0	11.7
0	11	8	2	0	0	2	2	24.0
Non-exposed	102	90	38	8	6	6	11	26.4

* p<0.05

Table 5. Abnormalities in Chromosome 5 and/or 7 in Banded Patients

	Abnormalities in chromosomes			% of patients with abnormalities in 5 or 7
	5 and 7	5 or 7	None	
1.0 ~	1	5	2	75
0.01~0.99 and "exposed"	0	3	18	14.3
0	1	1	7	22
Nonexposed	9	28	134	27.6

15;17転座が見出された。しかし、1 Gray 以上の症例にはこのような特異的染色体異常は見出されなかった。

以上のように、高線量被爆者白血病では染色体異常を示す頻度が高く、5番、7番染色体異常を含む複雑な染色体異常を示すことが明らかとなった。ではなぜ高線量被爆者に発生した白血病の細胞に複雑な核型異常がみられるのであろうか、この疑問に対する答は健常な被爆者の染色体研究の中にある。われわれのこれまでの研究では500m 以内被爆者で健常な31名（平均被曝線量 2.5Grays T65D）の染色体異常は96.8%の人に見られ、骨髄細胞の22.6%（平均値）が安定型染色体を持っていることがわかった。また、500~1,000m 被爆者では平均17.6%の骨髄細胞に染色体異常が観察された。このことは、1,000m 以内原爆被爆者あるいは1~4 Gray の被曝を受けた人には平均20%前後の骨髄細胞染色体異常がみられることを意味している。また、健常人被爆者の骨髄細胞染色体を経時的に観察すると、異常クローンの出現や消失がみられ、不安定な染色体異常クローンの動きのあることがわかり、このような骨髄内状況では機能的により悪性な細胞が出現してくる可能性が容易にうなづける。このように、1 Gray 以上の被爆者白血病にみられた複雑な染色体異常を示す白血病細胞は恐らくは被曝当時直接放射線被曝をし、核型異常をもつようになっていた造血幹細胞に由来するものと考えられる。

2. 慢性骨髄性白血病

1963年9月より1985年3月までの22年間に染色体分析を行った慢性骨髄性白血病の症例数を線量別に表6に示す。慢性期、急性転化期を含め計67名中、述べ55名が被曝していたが、0.01Gray 以上の被曝を

Table 6. Numbers of CML Cases Examined¹⁾

Estimated dose (in Grays) ²⁾	Chronic phase	Blastic phase	Total
>2.0	4	3	7
0.01-2.0	18	10	28
0.01>	14	6	20
Non-exposed	111	56	167

1) Study period: from Sept. 1963 to March 1985.

2) T65D air dose

した36例と非被曝群111例（慢性期）、19例と56例との間に染色体異常には差はみられず、全例、Philadelphia 染色体を示した。Ph¹ 染色体以外のいわゆる付加的染色体異常の率も両群とも慢性期約20%、急性転化80%であり、差はみられなかった。

II. 被曝者白血病における分子生物学的研究

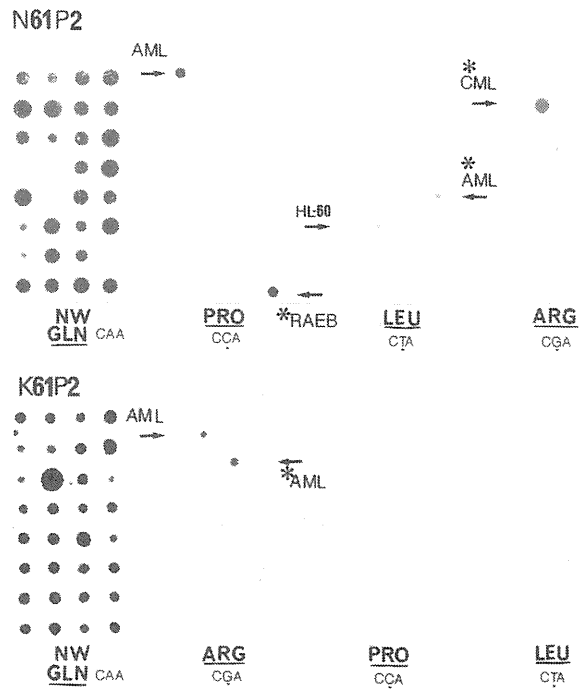
1. RAS 遺伝子の点突然変異

放射線被曝に基づく白血病化機構を検討すべく25例の被曝者白血病と47例の非被曝者白血病について、RAS 遺伝子の点突然変異に関して PCR 法および in vivo selection assay⁹⁾ を用いて観察を行った。表7にその結果を示す。25例の被曝者白血病のうち、5例（3例が急性白血病、2例が慢性骨髄性白血病）に、N- または K-RAS の点突然変異が証明された。44例の非被曝者群では12例（6例が急性骨髄性白血病、2例が急性リンパ性白血病、4例が慢性骨髄性白血病）が点突然変異を示した。変異コドンの部位や塩基置換に関しても両群とも類似した変化を示し、差はみられなかった。図1は N-RAS および K-RAS のコドン 61P2 における点突然変異を1つの例として示したものである。文献上、RAS 遺伝子の点突然変異は慢性骨髄性白血病で約10%、急性白血病で30~40%といわれている⁶⁾⁻⁸⁾。われわれの結果は両群ともこの数値に近い値を示した。塩基置換の部位も Bos⁹⁾ らによる de novo 白血病の部位と類似性を示した。RAS 遺伝子の活性化は放射線照射による白血病・リンパ腫発生マウスにおいても見出されてい

Table 7. Point Mutation of Ras Oncogenes in Leukemia Patients with and without a History of Atomic Bomb Exposure (PCR Method)

	No. of cases examined	ras gene mutation		Number of mutated codons				
		N-	K-	N12	N13	N61	K12	K61
CML Exposed	8	1	1	1				1
Non-exposed	25	2	2	1*	1	1*		2
AML Exposed	13	2	1	1		1		1
Non-exposed	14	5	1	2		3		1
ALL Exposed	4	0	0					
Non-exposed	5	2	0			2		

* the same patient



* 原爆被爆者白血病

図1. オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによるRAS遺伝子塩基置換の決定
 フィルター上では in vivo selection assay 法による腫瘍 DNA も分析してある。正常プロンプを用いた時、スポットが小さいのはN-RAS、K-RAS陰性のサンプルである。
 * 原爆被爆者

る¹⁰⁾¹¹⁾。すなわち、 γ 線照射誘発マウスにおけるK-RAS遺伝子の変化¹²⁾、中性子照射マウスで誘発された急性非リンパ性白血病¹³⁾などが報告されている。放射線誘発ヒト白血病にはこのような特異的RAS遺伝子変化は現在までのところ見出されていない。

2. BCR 遺伝子の再構成

Ph1染色体をもつ慢性骨髄性白血病のうち原爆被曝歴をもつ7例と、もたない22例のBCR遺伝子の再構成の有無ならびに再構成部位について検討した。表8は被爆者7例の染色体異常およびBCR遺伝子の再構成を示す。被爆者7例は全例BamHIまたはBglII酵素処理により再構成バンドが証明された。図2はそのサザンプロットを示す。RFLP (restriction fragment length polymorphism) の可能性を除外するため4つの酵素と2つのprobeを用い、得られた結果よりBCR遺伝子内切断点の同定を行った(図3)。BCR遺伝子内の切断点は両群に差はみられなかった。原爆被曝歴のある慢性骨髄性白血病症例の染色体やBCR遺伝子に非被曝群のそれと差のないことの原因は明らかではない。最も重要な要因は放射線誘発と考えられる慢性骨髄性白血病の大部分が1965年以前に発生しており、われわれの検討した症例が被曝後20~40年を経て発生してきた症例である点である。近年ではホルマリン-パラフィンブロックからのRNAの抽出も可能となっており、被曝後、慢性骨髄性白血病の頻度が高かった頃(7~15年)の病理用ブロックを用いての研究はこの問題に解答を与えてくれるかもしれない。

Table 8. Ph⁺ Chromosome and bcr Rearrangement in 7 Atomic Bomb Related CML Patients

Case No.	Sex	Age (yr)	Distance from hypocenter (km)	Estimated T65D dose (rad)	Phase of CML	Chromosome aberration	bcr rearrangement													Region in bcr						
							3' bcr probe						5' bcr probe ①					5' bcr probe ②								
							Bg ²	Bm	H	E	S	X	Bg	Bm	H	E	S	X	Bg		Bm	H	E	X		
1	M	72	0.7	400 ¹	CH ³	46,XY,Ph ⁺ (t(3;8))	+ ⁴	+	+							-								D		
2	M	44	1.5	-	Ch & Ac	46,XY,Ph ⁺	+	+	+	+	-	- ⁶					-	+	- ⁶			-	-	+	+	D
3	F	68	1.7	-	Ch & Ac	46,XX,Ph ⁺	+	+	+	+	+	+ ⁵								+	+					D
4	F	51	2.0	-	Ch & Ac	46,XX,Ph ⁺	+	+	+			+			- ⁶					+			-	- ⁶		D
5	M	51	2.0	-	Ch & Ac	46,XY,Ph ⁺	+	+	-			+								+						C
6	F	63	2.5	0	Ch	46,XX,Ph ⁺	+	+	+			+								+						D
7	M	60	3.0	-	Ch & Ac	46,XY,Ph ⁺	+	-	-			+			+					+			-	-		B

¹ Estimated from chromosome aberration frequency in lymphocytes
² Restriction enzyme, Bg: Bgl II, Bm: BamH I, H: Hind III, E: Ecor I, S: Sst I, X: Xba I
³ Ch: Chronic phase, Ac: Acute phase
⁴ Rearrangement band
⁵ Rearrangement band different from that detected by 3' bcr probe
⁶ Probably two bands of same size overlapping

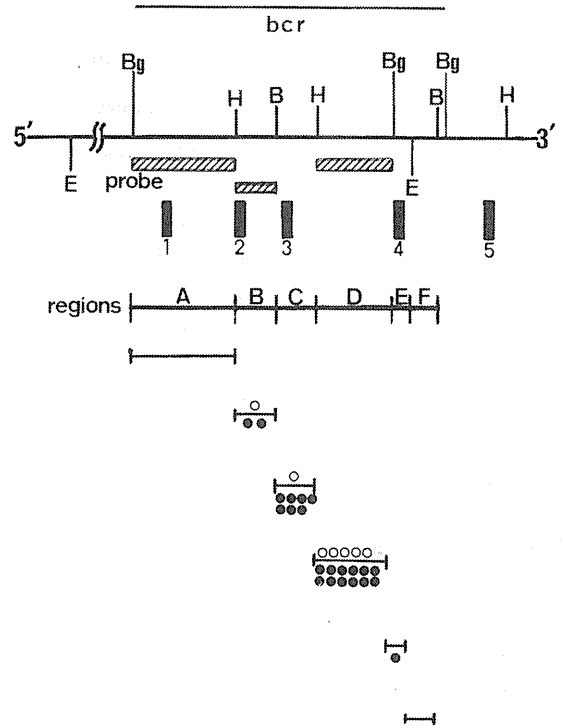
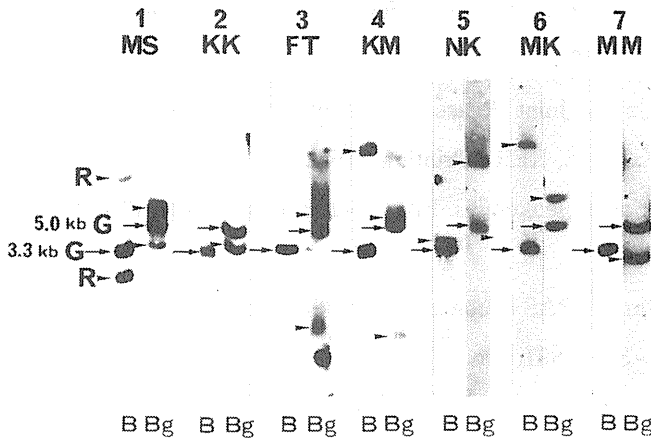


図2. 原爆被爆者慢性骨髄性白血病症例における

BCR 遺伝子再構成
 R : 再構成バンド
 G : germ バンド
 B : BamH I
 Bg : Bgl II

図3. BCR 遺伝子内切断部位

○ : 被爆者白血病
 ● : 非被爆者白血病

3. MLL 遺伝子の再構成

二次性白血病に11q23異常を伴うことが多いことより、二次性白血病の性格をもつ原爆被爆者に11q23の異常ならびに MLL/ALL-1 遺伝子の再構成について検討を行った。1986年より1993年の6年間に急性白血病ないし骨髄異形成症候群で染色体検査を行い、原爆被爆者同様1946年5月以前に出生している白血病患者は計333例であった。このうち、37例は原爆に被曝しており、295例は非被爆者であった。また、11q23異常は被爆者に3例、非被爆者に7例みられており、この頻度は原爆被爆者に多い傾向

($p=0.06$) を示した。11q23異常症例について MLL プローブ X を用いて、MLL 遺伝子の再構成の有無は検討したところ、被爆者 3 例、全例に再構成はみられなかった。一方、非被爆者では 7 例中 4 例に再構成がみられた。この結果より、放射線誘発白血病の 11q23 異常は通常 11q23 異常症例でみられる 8.5kb 領域での再構成とは異なることが考えられた。

おわりに

各種の分子生物学的手法の進展にはすばらしいものがあるものの、原爆被曝 50 年になろうとする現今では、真に放射線誘発白血病と考えられる症例は非常に少なくなっている。残されたヒト材料について可能な分子生物学的手法をもとに有意義に検討することが今後の大切な課題と思われる。

参考文献

- 1) Kamada, N. and Tanaka, K. : Cytogenetic studies of hematological disorders in atomic bomb survivors. Ishihara, T. and Sasaki, M. S. ed., "Radiation-Induced Chromosome Damage in Man. Alan R. Liss, New York, 1983, pp.455-474.
- 2) Milton, R. C. and Shohoji, t. : Tentative 1965 radiation dose estimation for atomic bomb survivors. Atomic Bomb Casualty Commition Technical Report 1-68, 1968.
- 3) Radiation Effects Research Foundation : US-Japan Joint Reassessment of Atomic Bomb Radiation Dosimetry in Hiroshima and Nagasaki, Roesch, W. C. ed., RERF Printing Office Hiroshima, Japan, 1987.
- 4) Bennett, J. M. et al. : Proposal for classification of acute leukemias. French-American-British(FAB) Co-operative group, *Br. J. Hamatol.*, **33**, 451-458, 1976.
- 5) Tanaka, K., Takechi, M. and Kamada, N. : Mutation of RAS oncogenes in leukemia patients with a history of atomic bomb exposure. *J. Radiat. Res.*, **32**, 378-388, 1991.
- 6) Liu, E., Hjelle, B. and Bishop, M. : Transforming genes in chronic myelogenous leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1952-1956, 1988.
- 7) Jonssen, J. W. G., et al. : RAS gene mutations in acute and chronic myelocytic leukemias, chronic myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 9228-9232, 1987.
- 8) Bos, J. L., Verlaan-de Vries, M., et al. : Mutation in N-ras predominate in acute myeloid leukemia. *Blood*, **69**, 1237-1241, 1987.
- 9) Bos, J. L. : RAS oncogenes in human cancer : a review. *Cancer Res.*, **49**, 4682-4689, 1989.
- 10) Diamond, L. E., Guerrero, I. and Pellicer, A. : Concomitant K- and N-ras gene point mutations in clonal murine lymphomas, *Mol. Cell Biol.*, **8**, 2233-2236, 1988.
- 11) Sloan, S. R., Newcomb, E. W. and Pellicer, A. : Neutron radiation can activate K-ras via a point mutations in codon 146 and induced a different spectrum of ras mutations than does gamma radiation. *Mol. Cell Biol.*, **10**, 405-408, 1990.
- 12) Guerrero, I., Villasante, A., et al. : Activation of a c-K-ras oncogene by somatic mutation in mouse lymphomas induced by gamma radiation. *Science*, **225**, 1159-1162, 1984.
- 13) Gumerlock, P. H., Meyers, F. J., er al. : Activated c-N-ras in radiation-induced acute nonlymphocytic leukemia ; Twelfth codon aspartic and acid. *Rad. Res.*, **117**, 198-206, 1989.

VIII. 特別講演

1. Analysis of Human and Murine Chromosomes using Fluorescence in situ Hybridization

D. C. Ward

2. The Genetic Changes in Treatment – Related Leukemia are Related to the Type of Prior Therapy

Janet D. Rawley

3. ゲノム解析によって期待される21世紀の医療
— 治療する医療から予知・予防する医療へ

中村 祐輔

1 . Analysis of Human and Murine Chromosomes using Fluorescence in situ Hybridization

D. C. Ward, J. Menninger, J. Lieman, T. Desal,
P. Bray – Ward, D. Rounds, A. G. Matera, and T. Haaf

Departments of Genetics and Molecular Biochemistry & Biophysics,
Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a powerful technique for visualizing DNA sequences in metaphase chromosomes, interphase nuclei or extended chromatin fibers. As chromatin condensation decreases, sequence elements can be analyzed with increasing spatial resolution; ranging from 1–2 Mbp (metaphase chromosomes) to 1–5 Kbp (extended fibers). We have used FISH to assist in the construction of physical maps of individual chromosomes and to decipher the genetic organization at specific chromosomal loci, including centromeres and telomeres.

YAC contigs, constructed by the CHPH and Genethon consortium in France, are being FISH mapped on human metaphase spreads to validate contig integrity, confirm chromosomal localization, and to define chimeric clone status. Several hundred YAC clones identified by hybridization with probes for polymorphic STS markers have been FISH mapped in order to begin integrating the cytogenetic, physical and genetic linkage maps. These experiments also have identified regions in the human genome, notably near telomeres, which exhibit a higher than anticipated frequency of genetic recombination.

A biotinylated telomere repeat probe has been used to capture terminal Not1 fragments of mouse genomic DNA on immobilized avidin. Probes were made using primers from B1 or B2 repetitive sequence elements to PCR amplify the interrepeat sequences from the affinity captured DNA. Over 200 cosmid clones were isolated from a mouse genomic DNA library and multiple clones were identified by FISH and PFGE studies that hybridize to the ends of individual mouse chromosomes or to a small subset of the chromosome complement. The chromosome-specific are being incorporated into the genetic linkage map.

Alpha-satellite DNA found in divergent forms at the centromeres of all human chromosomes, pro-

vides the primary sequence information for at least some aspects of centromere function. Since the total length of each alpha satellite array in extended chromatin fibers is well over 100 μ m, sequence motifs can be visualized within individual arrays. The CENP-B box sequences were found to be relatively evenly distributed within arrays of alpha-satellite sequences on most human chromosomes. By resolving two independent subsets of alpha-satellite DNA on chromosome 7, it was possible to show, combining multicolor FISH and immunofluorescence, that only one subset (p7tet1) binds detectable amounts of the centromeric proteins specifically recognized by CREST autoantibodies. These results demonstrate that extended chromatin fibers may provide important insights into chromatin structure and organization.

* Analysis of the CEPH YACs is a collaborative enterprise with Daniel Conen, Ilya Chumakov, Christine Bellanne-Chantelot, Denis le Paslier, Jean Weissenbach and their colleagues.

2 . The Genetic Changes in Treatment – Related Leukemia are Related to the Type of Prior Therapy

Janet D. Rowley, M. D.*

University of Chicago Medical Center

Section of Hematology/Oncology 5841 S. Maryland Ave., MC 2115 Chicago,

IL 60637–1470 Telephone : 312–702–6117 Fax : 312–702–3163

This work was supported by the Department of Energy

grant DE–FG02–86ER60408 and the National Institutes of Health, CA42557

I . Abstract

Two general types of clonal chromosome abnormalities are observed in de–novo acute myeloid leukemia (AML). They are unbalanced aberrations with visible gains or losses of chromosome material and balanced aberrations without such obvious gain or loss. AML can be induced by therapy with cytostatic drugs and radiation. The alkylating agents reacting directly with DNA induce AML which often presents as myelodysplasia (MDS) with unbalanced aberrations, primarily loss of chromosome material. Cytostatic agents targeting DNA–topoisomerase II, frequently administered together with alkylating agents or cisplatin may induce the same type of leukemia. In addition they often induce another type with a more rapid onset with the recurring balanced chromosome aberrations which are rarely observed after therapy with alkylating agents alone. All of the most important chromosome aberrations found in de–novo AML are now also found in therapy–related AML (t–AML). Thus t–AML may serve as a model in the search for mechanisms leading to the development of AML in general.

II . Text

A. Introduction

Clonal chromosome aberrations are observed by current techniques in approximately 80% of patients with de–novo AML. There are two general types : balanced aberrations, primarily reciprocal translocations or inversions, with rearrangement but without visible gain or loss of chromosome material, and un-

*Blum–Riese Distinguished Service Professor of Medicine and of Molecular Genetics and Cell Biology

balanced aberrations with gain or of whole chromosomes or of parts of chromosomes. (Table 1) The characteristic chromosome aberrations in AML are the subject of increased interest for two main reasons. They are an important prognostic factor for the response to intensive antileukemic chemotherapy and long term survival. (1–3) Furthermore, all of the balanced translocations or inversions in AML that have been shown to result in formation of abnormal chimeric genes of importance for the development of the disease. (4–10) (Table 2) Little is known at present about the mechanisms leading to development of chromosome aberrations in cancer in general. For example, do the characteristic aberrations arise more specifically in certain chromosome or certain chromosome bands or do they arise completely at random with a selection of those aberrations providing the cell with a proliferative advantage. Gain and loss of whole chromosome may occur as the result of nondisjunction at

Table 1. Balanced and Unbalanced Chromosome Aberrations Observed in both denovo Acute Myeloid Leukemia and in Leukemia Secondary to Therapy with Cytostatic Agents

Unbalanced aberrations observed in de-novo AML and in t-AML following alkylating agents and/or radiation	Balanced aberrations observed in de-novo AML and in t-AML following drugs targeting DNA-topoisomerase II
-7	t(4;11)(q21;q23)***
del(7q)	t(6;11)(q27;q23)
-5	t(9;11)(p22;q23)
del(5q)	t(11;19)(q23;p13)
del(12p) or t(12p)	t(15;17)(q22;q12)
del(17p)	t(3;21)(q26;q22)
del(20q)	t(8;21)(q22;q22)
-18	t(6;9)(p23;q34)
+8*	t(8;16)(p11;p13)
dup(1q)**	inv(16)(p13q22)

* In t-AML most often observed in only a subclone of cells

** Gain of the long arm of chromosome 1 in t-AML may occur due to an unbalanced translocation der(7)t(1;7)(q11;q11); this rearrangement also results in loss of the long arm of chromosome no. 7

*** Most often observed in de-novo and therapy-related acute lymphoid leukemia, but also seen in biphenotypic acute leukemia and in single cases of AML

Table 2. Genes Rearranged in Balanced Chromosome Aberrations in Therapy Related Acute Lymphoid and Myeloid Leukemia

Aberrations	Genes
t(4;11) t(6;11) t(9;11) t(11;19)	<i>MLL</i> , <i>HRX</i> or <i>ALL1</i> : 11q23 <i>AF4</i> *: 4q21 <i>AF9</i> *: 9p22 <i>ENL</i> *: 10p13
t(3;21)	<i>AML1</i> : 21q22 <i>EAP</i> or <i>MDS1</i> : 3q26
t(8;21)	<i>AML1</i> : 21q22 <i>ETO</i> : 8q22
t(15;17)	<i>RARA</i> : 17q12 <i>PML</i> : 15q22
inv(16), t(16;16)	<i>CBFB/PEBP2B</i> : 16q22 <i>MYH11</i> : 16p13
t(6;9)	<i>DEK</i> : 6p23 <i>CAN</i> : 9q34

*Share sequence homology and/or common motifs

mitosis, whereby one daughter cell loses a chromosome that may be gained by the other daughter cell.

Chromosome loss may be the result of chromosome lagging during anaphase and gain of chromosomes the result of reduplication. Structural chromosome aberrations have been related to the existence of fragile sites within the genome, either hereditary or constitutional. (11) X irradiation and some alkylating agents may cause random chromosome breaks whereas other drugs such as melphalan and etoposide may induce non-random chromosome breaks in cultured human lymphocytes. (12, 13)

In AML most cases arise de-novo with unknown causative factors. However, 10~20% of cases of AML observed in many institutions are now secondary or therapy related. (14, 15) In these cases the leukemogenic agent, most often a cytostatic drug, is chemically well-defined, administered in a known dose and at a known time, and with a mechanism of action, particularly in cell killing, which has been studied in detail. In small percentage of patients, radiation has been the only treatment. The fact most chromosome abnormalities observed in de-novo AML have now been observed in t-AML suggests that a review of the development of the chromosome aberrations and their role in the evolution of AML is appropriate.

B. Risk of Leukemia Following Different Types of Cytostatic Drugs

We have known for more than two decades that there is an increased risk of MDS and AML following therapy with alkylating agents. Almost all alkylating agents in clinical use today have been demonstrated to be leukemogenic. (14, 15) (Table 3) Increasing age has been shown to predispose to development of t-MDS and t-AML in patients with Hodgkin's disease treated with alkylating agents, and the risk has been shown to increase with dose. (16) In many series of patients treated with different alkylating agents, the cumulative risks have been shown to increase by 1/2% - 1% per year from two years after start of chemotherapy to at least six to eight years after cessation of therapy. (16) In the same studies the relative risk (the ratio between the observed number of t-AML and the expected number of de-novo AML) has often been above 100.

An increased risk of AML following therapy with a cytostatic drug not belonging to the alkylating

Table 3. Cytostatic Agents Known to be Leukemogenic in Man

Alkylating Agents	Drugs Poisoning DNA-topoisomerase II
Mechlorethamine	Etoposide
Cyclophosphamide	Teniposide
Melphalan	Doxorubicin
Chlorambucil	4-epi-doxorubicin
Busulphan	Mitoxanthrone
Dihydroxybusulphan	Razoxane
Prednimustine	Bimolane*
Carmustine	
Lomustine	
Semustine	

* Has not yet been shown to target DNA-topoisomerase II but belongs to the group of dioxopiperazine derivatives with such action

agents was first reported for Razoxane, (17) a dioxopiperazine derivative targeting DNA – topoisomerase and previously used mainly in the treatment of psoriasis. (Table 3) Quite recently another drug, Bimolane, belonging to the same chemical class of cytostatic agents and also used for psoriasis, has been demonstrated as leukemogenic in Chinese studies. (18) Other cytostatic agents targeting DNA – topoisomerase II such as the epipodophyllotoxins, etoposide and teniposide, have been shown to induce AML, most often in combination with cisplatin or alkylating agents. (19, 20) The results of two larger case – control studies suggest that the anthracycline, doxorubicin, may be leukemogenic. (21)

C. Cytogenetic Characteristics of Therapy – Related Leukemia

The fact that most cases of t – MDS and t – AML have unbalanced chromosome aberrations with loss of whole chromosome nos. 5 and 7 or of part of their long arm was first demonstrated in 1977. (22) This finding has subsequently been confirmed, and loss or deletion involving these chromosomes has been closely associated with previous therapy with alkylating agents. (14 – 16, 2) (Table 1, 4) The breakpoints for the deletions are variable, but a common chromosome region, the so called critical region, is almost always deleted. For chromosome no. 5, the critical region is 5q31. (24) For chromosome no. 7 there may be two critical regions, 7q22 to 7q31 and 7q32 to 7q34. Deletions of the short arm of chromosome no. 12 and no. 17 and of the long arm of chromosome no. 20, and loss of whole chromosome no. 18 as well as gain of a whole chromosome no. 8 or of the long arm of chromosome no. 1 have also been observed as recurring abnormalities in t – MDS and t – AML related to therapy with alkylating agents. (14 – 16, 23) (Tables 1, 4)

In the initial studies demonstrating an increased risk of t – AML following therapy with etoposide and teniposide the predominant finding was rearrangement of the long arm of chromosome no. 11 rather than deletions of chromosome no. 5 and no. 7. (15, 26) Subsequently, specific balanced translocation involving chromosome bands 11q23 and 21q22 in t – AML (Tables 1, 4) were found to be significantly associated with previous therapy with various drugs targeting DNA – topoisomerase II, primarily the

Table 4. Clinical and Cytologic Characteristics of Different Cytogenetic Subtypes of Acute Myeloid Leukemia

<p><i>-7, del(7q), -5, del(5q), in AML de-novo:</i> older patients, often have mutagen exposure, often have preceding MDS, all FAB sub-types most often M1, M2 or M6 but not M3, poor response to intensive antileukemic therapy. <i>In t-AML:</i> significantly related to treatment with the alkylating agents and/or radiation, preceding MDS, long latent period (3-7 years).</p>	<p><i>Balanced translocations to 11q23 in AML de-novo:</i> younger patients, t(9;11) or t(11;19) in infants, FAB-subtypes M4 or M5. <i>In t-AML:</i> related to treatment with the epipodophyllotoxins. <i>t(8;21) and inv(16) in AML de-novo:</i> younger patients, FAB-subtypes M2 and M4E0, respectively. <i>In t-AML:</i> related to treatment with the anthracyclines. <i>t(15;17) in AML de-novo:</i> younger patients, FAB-subtype M3. <i>In t-AML:</i> related to treatment with the dioxopiperazine derivatives and perhaps radiation. <i>For all balanced translocations:</i> MDS rare, favorable response to intensive antileukemic chemotherapy, short latent period.</p>
---	---

epipodophyllotoxins and the anthracyclines. (20) On the other hand, both studies showed that unbalanced rearrangements of the same two bands occurred to the same extent following therapy with alkylating agents alone and after radiotherapy. Also other balanced chromosome aberrations such as inv (16), t(15;17), t(8;16) and t(6;9) have been observed in t-AML following therapy with drugs targeting DNA-topoisomerase II. (27-28) (Table 1) These drugs targeting topo II were often administered with either cisplatin or an alkylating agent. The leukemias with a more rapid onset and with balanced translocations may represent cases induced by the drugs targeting topo II, whereas the later occurring leukemias, with deletions of chromosome no. 5 or 7 may represent leukemias induced by the alkylating agents or cisplatin used in the combined treatment. (15)

D. Clinical Characteristics of the Leukemias Associated with Presenting Unbalanced and Balanced Chromosome Aberrations

Major clinical differences are observed between leukemias with unbalanced chromosome aberrations and those with balanced aberrations, whether they arise de-novo or therapy-related. This emphasizes that a distinction between these two types of chromosome abnormality in AML is of biological importance. AML patients with unbalanced aberrations, in particular deletions of chromosome no. 5 and 7, are often older, in many cases they have a history of past exposure to mutagenic chemicals, and they often present as MDS. They may be of an FAB subtype except for M3, and they generally respond poorly to intensive antileukemic chemotherapy. It is of interest that many patients with erythroleukemia (FAB subtype M6) show the same clinical and cytogenetic features. (29) With regard to leukemias with balanced translocations, translocations to chromosome band 11q23 predominate in neonatal leukemia. (30) In these cases the *MLL* gene characteristically rearranged and the leukemias are most often of FAB-subtype M4 or M5. The t(8;21), t(15,17) and inv (16) are characteristically observed in children and younger adults with AML and they are closely related to the FAB-subtypes M2, M3 and M4EO, respectively. MDS is rarely observed in such patients and the leukemias generally respond favorably to intensive antileukemic chemotherapy. (3)

E. Mechanisms Involved in the Development of Chromosome in AML and the Role of these Aberrations in Leukemic Transformation

It has been an open question whether the chromosome aberrations observed in t-AML arise as a primary direct result of an exposure of hematopoietic cells to cytostatic drugs or whether they develop secondarily by alternative mechanisms and merely reflect other more important cellular changes. In two in-vitro studies, phytohemagglutinin-stimulated normal human lymphocytes were exposed to an alkylating agent, melphalan (12) and to the topo II targeting epipodophyllotoxin, etoposide. (13) in short-term culture, and cytogenetic studies were performed. Deletions predominated in cells exposed to melphalan, whereas an excess of reciprocal translocations was observed following etoposide. A slight excess of deletions of chromosome no. 7 was observed following melphalan, and chromosome band 11q22 was one of several bands showing some excess rearrangements following etoposide. The experience in

t-AML demonstrating a strong association between exposure to alkylating agents and development of unbalanced chromosome aberrations, and exposure to drugs targeting BNA-topo II and the development of balanced chromosome aberrations, thus seems reflected in the short-term culture of normal human lymphocytes exposed to the two classes of drug.

The cytogenetic results from t-AML and from in vitro culture of normal human lymphocytes exposed to melphalan and etoposide suggest that interference with topo II is involved in the development of balanced chromosome aberrations. The enzyme induces transient, enzyme-bridged double-strand breaks of DNA, and re-ligation of these breaks is inhibited by the epipodophyllotoxins and by many aberrations. (31) Inhibition of re-ligation of DNA double-strand breaks could facilitate illegitimate cross-over recombination between two different chromosomes.

Numerous experimental data related to carcinogenesis and the elegant studies of genetic alterations during development of colorectal cancer by Vogelstein and his colleagues (32) all indicate that malignant transformation is a multi-step process. In AML the abnormal chimeric genes derived from the balanced chromosome translocations. (Table 2) and the deleted, presently unidentified, tumor suppressor genes on the long arms of chromosome nos. 5 and 7, probably represent different and alternative steps in leukemogenesis.

The difference in many of the clinical features between the two general types of leukemia supports the hypothesis that they have a different genetic origin. Presumably those cases of AML, both de novo and therapy-related, with an apparently normal karyotype, have sustained comparable genetic changes that are undetected with our present cytogenetic techniques. A number of such examples have now been identified, e. g. chronic myelocytic leukemia, in which some patients have a BCR-ABL rearrangement in the absence of a detectable Philadelphia chromosome and an AML-ETO fusion gene has been detected in some cases of AML FAB-subtypes M2 who lack a t(8;21). (33-35) The use of the appropriate molecular probes has allowed detection of these rearrangements.

F. Conclusion

With the increasing availability of more sophisticated tools and a better understanding of drug-chromatin interactions, it should be possible to analyze the mechanisms leading to balanced translocations in t-AML. These insights should allow a more comprehensive understanding of the events leading to these translocations in patients with no prior exposure to noxious agents.

III. References

1. Berger R, Bernheim A, Ochoa-Noguera ME, Daniel M-T, Valensi F, Sigaux F, Flandrin G, Boiron M, Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia: A study of 343 patients. *Cancer Genet Cytogenet*, 28: 293-9, 1987.
2. Keating MJ, Smith TL, Kantarjian H, Cork A, Walters R, Trujillo JM, McCredie KB, Gehan EA, Freireich EJ. Cytogenetic pattern in acute myelogenous leukemia: a major reproducible determinant of outcome. *Leukemia*, 2: 403-12, 1988.

3. Arthur DC, Berger R, Golomb HM, Swansbury GJ, Reeces BR, Alimena G, vanden Berghe H, Bloomfield CD, de la Chapelle A, Dewald GW, Garson OM, Hagemeyer A, Kaneko Y, Mitelman f, Pierre KV, Ruutu T, Sakurai M, Lawler SD, Rowley JD. The clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 40: 203-16, 1989.
4. Ziemin-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa III R, Patel Y, Harden A, Rubinelli P, Smith SD, LeBeau MM, Rowley JD, Diaz MO. Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 10735-9, 1991.
5. Cimino G, Moir DT, Canaani O, Williams K, Crist WM, Katsav S, Cannizzaro L, Lange B, Nowell PC, Croce CM, Canaani E. Cloning of ALL-1, the locus involved in leukemias with the t(4;11) (q21;23), t(9;11) (q22;23), and t(11;19) (q23;q13) chromosome translocations. *Cancer Res*, 51: 6712-4, 1991.
6. Nakamura T, Alder H, Gu Y, Prasad R, Canaani O, Kamada N, Gale RP, Lange B, Crist WM, Nowell PC, Croce CM, Canaani E. Genes on chromosome 4, 9 and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology and/or common motifs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 4631-5, 1993.
7. Miyosi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 1043-4, 1991.
8. Nucifora G, Birn DJ, Espinosa III R, Erickson P, LeBeau MM, Roulston D, Mckeithan TW, Drabkin H, Rowley JD. Involvement of the AML1 gene in the t(3;21) in therapy-related leukemia and in chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood*, 81: 2728-34, 1993.
9. Borrow J, Goddard AD, Sheer D, Salomon E. Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science*, 249: 1577-80, 1990.
10. Liu P, Tarle SA, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Siciliano MJ, Collins FS. Fusion between transcription factor CBF β /PEBP2 β and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science*, 261-1041-4, 1993.
11. Yunis JJ, Soreng AL. Constitutive fragile sites and cancer. *Science*, 226: 1199-1204, 1984.
12. Mamuris Z, Prieur M, Dutrillaux B, Aurias A. The chemotherapeutic drug melphalan induces breakage of chromosome regions rearranged in secondary leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 37: 65-77, 1989.
13. Maraschin J, Dutrillaux B, Auris A. Chromosome aberrations induced by etoposide (VP-16) are not random. *Int J Cancer*, 46: 808-12, 1990.
14. Levine EG, Bloomfield CD. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Seminars in Oncology*, 19: 47-84, 1992.
15. Pedersen-Bjergaard J. Radiotherapy and chemotherapy-induced myelodysplasia and acute myeloid leukemia. A review. *Leukemia Res*, 16: 61-5, 1992.
16. Pedersen-Biergaard J, Specht L, Larsen SO, Ersboll J, Struck J, Hansen MM, Hansen HH, Nissen NI. Risk of therapy-related leukemia and preleukemia after Hodgkin's disease. *Lancet*, 11:83-8, 1987.
17. Bhavnani M, Wolstnholme RJ. Razoxane and acute promyelocytic leukemia. *Lancet*, 11:1085, 1987.
18. Xue Y, Lu D, Guo Y, Lin B. Specific chromosomal translocations and therapy-related leukemia induced by bimolane therapy for psoriasis. *Leukemia Res*, 16: 1113-23, 1992.

19. Ratain MJ, Kaminer LS, Bitran JD, Larson RA, LeBeau MM, Skosey C, Purl S, Hoffman PC, Wade J, Vardiman JW, Daly K, Rowley JD, Golomb HM. Acute nonlymphocytic leukemia following etoposide and cisplatin combination chemotherapy for advanced non-small-cell carcinoma of the lung. *Blood*, 70: 1412-17, 1987.
20. Ratain, M. J., Rowley, J. D. Therapy-related acute myeloid leukemia secondary to inhibitors of topoisomerase II: From the bedside to the target genes. *Annals Oncol*, 3: 107-111, 1992.
21. Pedersen-Bjergaard J, Sigsgaard YC, Nielsen D, Gjedde SB, Philip P, Hansen M, Larsen SO, Rorth M, Mouridsen H, Dombernowsky P. Acute monocytic or myelomonocytic leukemia with balanced chromosome translocations to band 11q23 after therapy with 4-epi-doxorubicin and cisplatin or cyclophosphamide for breast cancer. *J Clin Oncol*, 10: 1444-51, 1992.
22. Rowley JD, Golomb HM, Vardiman J. Nonrandom chromosomal abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia in patients treated for Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphomas. *Blood*, 50: 759-70, 1977.
23. LeBeau MM, Albain KS, Larson RA, Vardiman JW, Davis EM, Blough RR, Golomb HM, Rowley JD. Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes of chromosomes no. 5 and 7. *J Clin Oncol*, 4: 325-45, 1986.
24. LeBeau MM, Espinosa III R, Neuman WL, Stock W, Roulston D, Larson RA, Keinanen, M, Westbrook CA. Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 5484-8, 1993.
25. Pedersen-Bjergaard J, Philip P. Balanced translocations involving chromosome bands 11q23 and 21q22 are highly characteristic of myelodysplasia and leukemia following therapy with cytostatic agents targeting at DNA-topoisomerase II. *Blood*, 78: 1147-8, 1991.
26. Larson RA, LeBeau MM, Ratain MJ, Rowley JD. Balanced translocations involving chromosome bands 11q23 and 21q22 in therapy-related leukemia. *Blood*, 79: 1892-3, 1992.
27. Quensel B, Kantarjian H, Pedersen-Bjergaard J, Brault P, Estey E, Lat JL, Tilly H, Stoppa AM, Archimbaud E, Harousseau JL, Bauters F, Fenaux P. Therapy related acute myeloid leukemia with t(8;21), inv(16) and t(8;16). A report on 25 cases and review of the literature. *J Clin Oncol*, in press.
28. Detournignies L, Castaigne S, Stoppa AM, Harousseau JL, Sadoun A, Janvier M, Demory JL, Sanz M, Berger R, Bauters F, Chomienne C, Fenaux P. Therapy-related promyelocytic leukemia: A report on 16 cases. *J Clin Oncol*, 10: 1430-5, 1992.
29. Olopade OI, Thangavelu M, Larson RA, Mick R, Kowal-Vern A, Schumacher HR, LeBeau MM, Vardiman JW, Rowley JD. Clinical morphologic, and cytogenetic characteristics of 26 patients with acute erythroblastic leukemia. *Blood*, 80: 2873-82, 1992.
30. Cimino G, Lo Coco F, Biondi A, Flia I, Luciano A, Croce CM, Masera G, Mandelli F, Canaani E. ALL-1 gene at chromosome 11q23 is consistently altered in acute leukemia of early infancy. *Blood*, 82: 544-6, 1993.
31. Lui LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Ann Rev Biochem*, 58: 351-75, 1989.
32. Fearon E, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-767, 1990.
33. Bartram CR, Carbonell F. *bcr* rearrangement in PH-negative CML. *Cancer Genet Cytogenet*, 21: 183-

184, 1986.

34. Maruyama F, Yang P, Stass SA, Cork A, Freireich EJ, Lee M-S, Chang K-S. Detection of the AML1/ETO fusion transcript in the t(8:21) masked translocation in acute myelogenous leukemia. *Canc Res*, 53: 4449-4451, 1993.
35. Nucifora G, Dickstein JJ, Torbenson V, Rowley JD, Vardiman JW. Correlation between cell morphology and expression of the AML1/ETO chimeric transcript in patients with acute myeloid leukemia without the t(8;21). *Blood*, submitted.

3. ゲノム解析によって期待される21世紀の医療 — 治療する医療から予知・予防する医療へ

中 村 祐 輔*

Medicine in the 21th Century Expected from Human Genome Analysis

Division of Biochemistry, Cancer Institute

1-37-1 Kamiikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 170

国際協力のもとにゲノム解析計画は急速に進展しつつある。ゲノム解析によってわれわれ人類にもたらされる波及効果は膨大なものであることは明かである。生物学・情報分野は言うに及ばずその医学分野での貢献も計り知れないものと期待される。では、ゲノム情報によって将来の医学・医療がどう変わって行くのであろうか。

増加する一方の医療費・社会の高齢化など21世紀を間近にひかえて医療のかかえる問題は深刻である。がん・糖尿病・心臓病などの成人病は増え続けているがはたしてこれらの病気は予防することができないのであろうか？医療費や患者のQOL (quality of life) を考えたとき、火事が大きくなってから消すよりも、まだボヤのときに消したり、火元に注意を払って火事を起こさないほうが良いのと同様に、病気を早期にみつけて治療したり、病気にならないように生活習慣に気をつけるほうが望ましいに決まっている。確かに、病気にならないように注意すべき一般的なことはこれまでに色々な機会に取り上げられてきたが、あまりにも一般的過ぎて個人個人の切実な問題としては取り上げられてこなかった。しかし、最近のサイエンスの発達によってがん・糖尿病などにどの程度かかり易いか、などの診断を個々について行うことが可能になりつつある。もし、この様な診断を受けて、「あなたは、肥満になると99%糖尿病になりますよ」といわれれば、その人は自分の問題と深刻に受けとめて太らないように心がけることによって糖尿病を防ぐことができる。あるいは、「あなたは乳癌になりやすいですよ」と診断されれば、定期的に検診を受けることによって、非常に早期にがんを見つけて完治することができる。これらの病気に対する危険度—なり易さ・なりにくさ—を決めているのが「遺伝子」であることが次第に明らかになってきている。「遺伝子」に異常があるかどうかによって個々の人の病気の危険度が決まるため、その傷の有無を調べることができれば、危険度を判断することもできる。もし、がんになりやすいことがあらかじめ予知できており、これ

* (財)癌研究会癌研究所・生化学部 (東京都豊島区上池袋1-37-1)

を防ぐあるいは、非常に早期に発見して治療することができれば、本人の生活だけでなく、家族にとっても大きな影響があることは間違いない。このことはがんに限らずすべての病気にとっていえることであり、いろいろな病気に対する個人レベルでの危険度—病気にかかりやすい、かかりにくいかを遺伝子を調べることによって予知することが可能になってきた。したがって、21世紀の医療は「治療」する医療から「予防」する、あるいは「予知」することによって早期に病を根絶やしにする医療へと変貌するものと推測される。

このような変化をもたらさうる鍵を握っているのが「ヒトゲノム解析計画」である。われわれのゲノムは30億個の塩基からなり、この中に約10万個の遺伝子が存在している。この約10万種類の遺伝子が、必要に応じてスイッチを「ON」にしたり「OFF」にしたりして体のコントロールがはかられる。われわれの身体は約6兆個の細胞からできているが、それぞれの細胞は、脳、肺、心臓、消化器、筋肉、血液、といったさまざまな器官にあって機能を分担している。ものを食べ、消化し、栄養物を全身に送り、呼吸をし、知覚し、考え、喜び、悲しむ、こういったすべての行為も、個々の細胞が働くべき遺伝子がおのおのの務めを果たすことによって成立しているのである。

しかしながら、10万種類の遺伝子のうち、その機能やどのような蛋白をコードしているかが明らかになったものはわずかに5%前後に過ぎないのである。このわずかの情報だけでもインスリン・血液凝固因子・エリスロポイエチンなどの非常に有用な医薬品が作られるようになったし、多くの遺伝病が出生前・発症前に診断が可能となってきた。当然のことながら、ゲノム解析が進み、遺伝情報の50~60%が明らかになれば、現在の数倍・数十倍の成果が医学の領域にもたらされることは間違いない。

ゲノム解析の進展によってもたらされる将来の医学の可能性について紹介したい。

Ⅸ．動物突然変異

1．脆弱X症候群に関連する動的突然変異

山内 正剛

2．筋緊張性ジストロフィー症の発症機構

三木 哲郎 他

1. 脆弱X症候群に関連する動的突然変異

山内正剛*

Dynamic mutation involved in fragile X syndrome.

Masatake Yamauchi

Division of Genetics, National Institute of Radiological Sciences

4-9-1 Anagawa, Inage, Chiba 263 Japan

The fragile X syndrome is the most common familial form of mental retardation, and is associated with fragile site at Xq27.3 (FRAXA). Recently, the nature of the fragile X syndrome has been uncovered at the molecular level. Evidence has accumulated for the possible involvement of abnormal amplification of a characteristic (CCG) n repeat and DNA methylation (imprinting) in a CpG island at the FRAXA locus in the progression toward the fragile X syndrome. This new class of mutation caused by a genetically unstable tandem repeat is termed a dynamic mutation. A two-step dynamic mutation is required for clinical and cytogenetic manifestations of the fragile X syndrome.

We established a procedure to prepare diagnostic DNA probe for the fragile X syndrome by direct enzymatic amplification of the chromosomal region adjacent to the (CCG) n repeat from human DNA. The diagnostic DNA probe, pPCRfx1, can detect dynamic mutations associated with the fragile X syndrome.

The probe was used to examine the transmission of the fragile X dynamic mutations in Japanese families, including the progeny of an affected male patient. Extensive dynamic mutations were commonly detected among mentally retarded individuals (termed full mutation). Among phenotypically normal carriers, relatively small dynamic mutations were detected (termed premutation). At the molecular level, we identified that; (1) a premutation can be transmitted as a full mutation only when transmitted through female meiosis, and (2) when a fragile X mutation, a premutation or a full mutation, was transmitted through male meiosis, it can be

*科学技術庁 放射線医学総合研究所 遺伝研究部 (〒263 千葉県稲毛区穴川4-9-1)

transmitted only as a premutation, never as a full mutation.

The DNA methylation pattern was also examined by double digestion with *EcoRI* and *EagI*. The analysis detects the methylation status in a CpG island adjacent to the trinucleotide repeat, and hypermethylation in the CpG island is suggested to affect the transcription of the *FMR* gene. The degree of methylation in the CpG island had positive correlation with the degree of fragile X dynamic mutation.

The pPCR_{x1} was also applied to the prenatal diagnosis of fetuses which were at risk of having the fragile X mutation. In the case of a male fetus, both full fragile X mutation and abnormal hypermethylation were detected from the chorionic villus DNA, therefore diagnosed to have a high probability of being a fragile X patient with mental retardation. Another case was a female fetus, and both full mutation and hypermethylation were also detected. However, it could not be determined whether the fetus would be mentally retarded, since about 50% of female carriers of the fragile X full mutation were reported not to exhibit mental retardation.

緒言

脆弱X症候群とは家族性（遺伝性）精神遅滞症候群であり、ヒト集団中に非常に高頻度にみいだされる（1/1500–2000）。この名称はX染色体長腕 q27.3領域において葉酸感受性脆弱部位が特異的に発現されることに由来する（図1）。染色体脆弱部位 fragile site とは、ヒト細胞を特定の培養条件下で培養したときにその中期染色体像の特定領域において非染色性のギャップあるいは切断として観察されるものである。脆弱部位は大きく2種類に分類でき、集団中のほとんどの人において観察されるものは common fragile site と呼ばれ、ある特定の家系においてのみ観察されるものは rare fragile site と呼ばれる。rare fragile site はメンデル性相互優性形質として遺伝することが知られている¹⁾。

脆弱X症候群と fra (X) q27.3との特異的な相関関係が判明してから、様々な細胞学的な解析が行われてきた。葉酸感受性脆弱部位とは、メソトレキセートなどの葉酸代謝拮抗剤を用いて細胞内葉酸プールを低下させた条件下でのみ特異的に発現する脆弱部位である。葉酸はアミノ酸合成や核酸前駆体合成などの様々な細胞内代謝経路に関与するビタミン作用を持つ化合物であり、その還元型が補酵素として働く。そして、これらの代謝経路中でも特に脆弱部位の発現との関係が深いのは、核酸前駆体合成系におけるチミジル酸合成経路である。チミジル酸合成酵素活性の発現には補酵素としてのテトラヒドロ葉酸の存在が不可欠である。メソトレキセートはジヒドロ葉酸還元酵素活性を阻害することによってテトラヒドロ葉酸プールを枯渇させ、その結果としてチミジル酸合成酵素活性が阻害されることが知られている。チミジル酸合成酵素の関与は、チミジル酸合成酵素活性を欠損したマウス変異株細胞内にヒト脆弱X染色体だけを保持させた雑種細胞を用いた実験において、細胞内チミジン飢餓状態を人為的に誘導した条件下でも fra(X-q27.3) が効率良く発現されることから明らかである²⁾。染色体は、DNA とそれに結合した様々な蛋白質との非常に複雑な高分子複合体であり、その構築にはまだ不明な点も多い。しかし、fra (X) q27.3がDNA合成を阻害する条件下で発現され、さらに染色体を構築する蛋白質成分のほとんどをマウス細胞側から供給されている条件下でも脆弱部位が発現されることから、当該領域のDNAの塩基配列そのものに fra (X) q27.3発現の原因があることが強く示唆されていた。

また、脆弱X症候群はその変異がX染色体上にある伴性遺伝性疾患であるはずであるのに、遺伝学的に

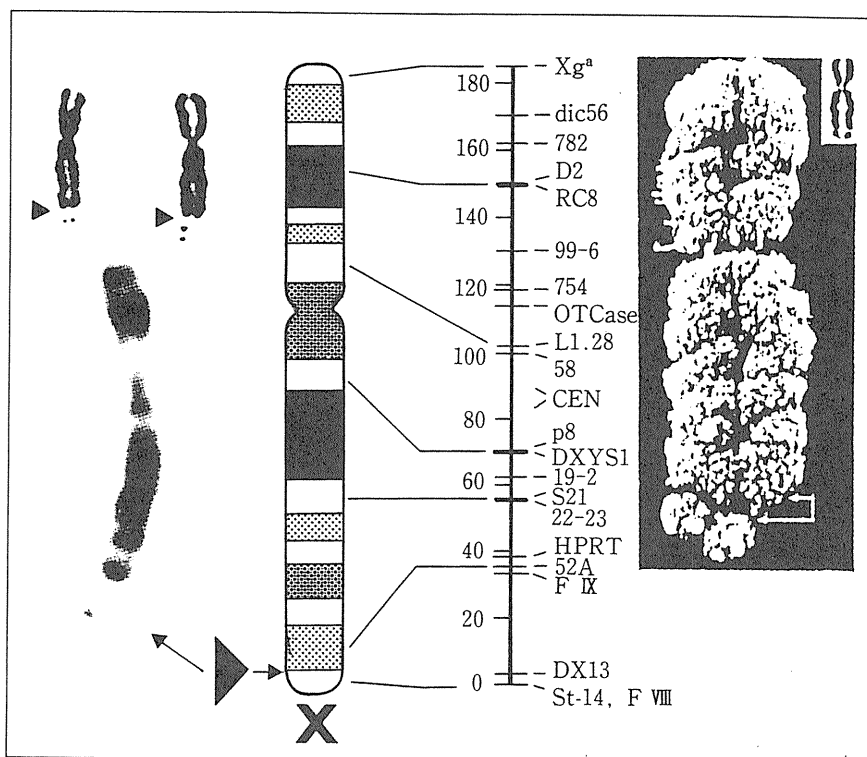


Figure 1 (図1)
 G-band pattern of human X chromosome and fragile X site (arrows) are shown in the centre. The electron microscopic photograph (right) and the light microscopic ones of the fragile X chromosome (left) are also given.

はそれと矛盾する不可解な遺伝様式が家系内で観察される。その一つは、30~35%の女性キャリアにおいても精神遅滞の発症がみられることである。そしてもう一つの大きな矛盾は男性キャリアの存在である。すなわち、脆弱X染色体を受け継いだ男性のうち20~25%は精神遅滞を発症せず、見かけ上は正常となる。男性キャリアは遺伝病を子孫に伝える能力を持つことから normal transmitting male と呼ばれている。

現在では、Xq27.3を指標としたポジショナルクローニングにより、脆弱X症候群の原因遺伝子領域が酵母人工染色体 Yeast Artificial Chromosome を用いてクローン化され、その原因を分子レベルで解析することが可能になった^{3,4)}。ここでは、当研究室において行なった脆弱X症候群遺伝子診断用 DNA プローブの作製⁵⁾と、それを用いた家系分析⁶⁾や出生前診断^{7,8)}について説明する。また、脆弱X症候群に続いて同様の動的変異が同定された他のヒト遺伝病についても概説を加えたい。

遺伝子診断用 DNA プローブの調整⁵⁾

図2は疾患の原因であると考えられている領域を模式的に示したものである。酵母人工染色体にクローン化されたゲノム領域の解析の結果、(CCG) n の単位よりなる遺伝的に不安定な反復配列が見いだされた。CCG反復配列数は正常人においても一定ではなく、その反復数は6-54の範囲にある。しかし、キャリアではその表現型は正常であるものの、(CCG) n の反復数が200回程度にまで増幅している。このような発症には至らない比較的程度の小さい変異は premutation と呼ばれる。精神遅滞を発症した患者においては (CCG) n の反復数が数千回にも増幅していることがあり、このような発症の原因となる変異は full mutation と呼ばれている^{3,4)}。従来の点突然変異や欠失変異が一度発生するとそのまま子孫へと受け継がれて

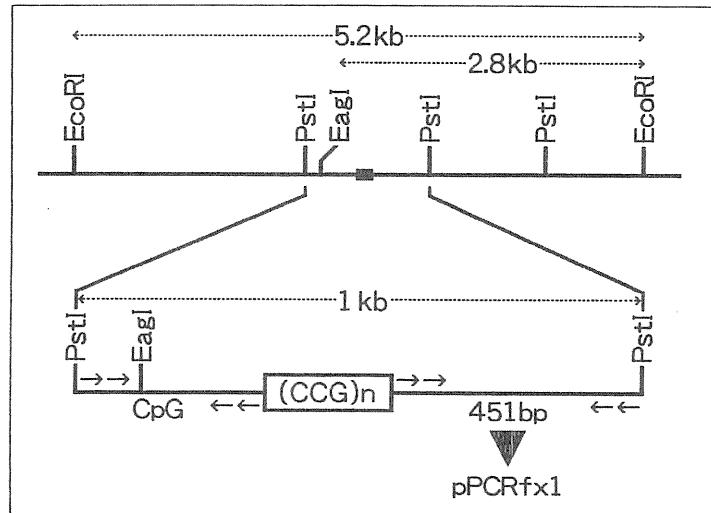


Figure 2 (図2)

Alignment of oligonucleotide primers for PCR amplification and restriction sites around the (CCG)_n repeat. Resultant PCR product was subcloned into pUC plasmid vector and was termed pPCRfx1. The diagnostic DNA probe detects 1kb *Pst*I fragment, 5.2kb *Eco*RI fragment, and 2.8kb *Eco*RI-*Eag*I fragment.

行く静的変異 static mutation であるのに対して、このような遺伝的に不安定な反復配列の異常な増幅をもたらす新しいタイプの突然変異は、動的変異 dynamic mutation と呼ばれている。反復配列近傍に認識配列をもつ制限酵素でゲノム DNA を消化して、これをサザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて解析することにより、動的変異は切断断片のサイズの増大として比較的容易に検出することができる。しかし、この方法を用いて解析を行なうには反復配列を含む切断断片を検出できる DNA プローブが必要である。我々は、まずこの目的に使用できる遺伝子診断用 DNA プローブを PCR 法により作製することを試みた。

PCR とは、polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応と訳される) の略であり、耐熱性細菌 *Thermus aquaticus* より精製された耐熱性の DNA 合成酵素 Taq DNA polymerase と合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、DNA 断片の目的とする領域だけを試験管内で特異的に増幅する手法である⁹⁾。脆弱 X 症候群の遺伝子診断用プローブを調整する目的には、PCR に用いる合成プライマーを図 2 に示すように設定した。簡便かつ再現性良くゲノム DNA から目的の領域を十分量増幅するため、まず外側に設定したプライマーを用いてゲノム DNA を増幅してから、さらにその増幅産物を 1 回目の PCR で用いたプライマーのすぐ内側に設定したプライマーを用いて増幅するという、2 段階 PCR 法を用いて行なった。図 2 に示した 1kb の *Pst*I 断片中の DNA 領域は GC 含有量が高いため非特異的なプライマーの結合が避けられず、PCR を一回しか行なわない場合には目的とする PCR 産物以外に多量の非特異的 PCR 産物が増幅され混入してくることが予想された。しかし、たとえ 1 回目の PCR で非特異的な産物が混入してきても、これら非特異的な PCR 産物の両端にあるプライマー結合部位のすぐ内側に 2 回目の PCR で用いるプライマーに相補的な塩基配列が偶然に存在する可能性は極めて低いので、1 回目の PCR で非特異的に増幅されてきた産物は 2 回目の PCR では増幅されず、目的とする産物だけを特異的にかつ十分量増幅できると考えられた。事実、2 段階 PCR 法を用いることにより、極めて特異的に十分量の PCR 産物を増幅することができた。我々は、他の実験においても得られた PCR 産物が目的とする産物であることを確認

したい場合に2段階PCR法を利用している。この方法はサザンハイブリダイゼーションや塩基配列の決定と比較するとはるかに迅速かつ容易である。次いで、PCR産物をプラスミドベクターにクローン化し、その塩基配列を決定したところ、得られた増幅産物は間違いなく目的の領域に由来するものであることが確認された。図2においてCCG反復配列の右側に位置する451bpのPCR増幅産物をプローブとして用いた場合にもっともサザンプロットハイブリダイゼーションにおけるバックグラウンドが低かったので、そのクローンをpPCRfx1とし、遺伝子診断用DNAプローブとして以後の解析に用いた。プローブ調整法の詳細については、原報を参照されたい。

脆弱X症候群の遺伝子診断⁹⁾

脆弱X症候群の診断においては身体的外見的特徴はあまり顕著であるとはいえず、従来は主に精神遅滯症状と染色体分析によって診断されていた。しかし、この疾患について診断を下せる臨床医の存在は決して一般的ではなく、また染色体分析も高度な熟練技術を要する等のその診断における大きな問題点がいくつかあった。その従来法における大きな問題点の一つに、表現型が正常で脆弱X部位を発現しないキャリアの推定は可能ではあったものの断定はできなかったことが挙げられる。我々が開発した遺伝子診断用DNAプローブを用いた脆弱X症候群の診断法は、これら従来法では避けられなかった問題点を解消するものである。

図3に具体的な家系分析例を示す。家系分析は、家族構成員の血液試料からDNAを抽出し、そのPstI消化物をサザンプロット解析して行なった。男性キャリア(lane 1)ではX染色体を1本しか持たないため約1.3 kb断片だけが、また男性キャリアの直接の子供である3人の女性キャリア(lane 3, 7, 8)からは正常な1 kbの断片に加えて、約1.5 kbの断片が検出され、dynamic mutationがpremutationとして保有されていることがわかる。しかし、精神遅滯を発症しているlane 5の男子では、母親から伝えられたpremutationはfull mutationへと変化しており、CCG反復配列を含む脆弱X領域は様々な大きさの制限酵素切断断片の集積またはスメアとして検出された。これは、患者個人を構成する体細胞において脆弱X領域のCCG反復配列数がモザイクになっていることを示唆するものである。CCG反復配列の脆弱X領域における遺伝的不安定性を如実に示すものであるといえよう。また、この結果は脆弱X症候群は母親から遺伝した場合にのみ発症し、父親から遺伝した場合にはその直接の子供においては発症しないという従来の観察データを分子レベルで支持するものである。図3aの家系ではlane 1の祖父から3人の女子へと脆弱X染色体が遺伝しているが、そのいずれの場合においてもpremutationはpremutationとしてしか遺伝していなかった。これら3人の女性キャリアの表現型は正常である。

また、図3bの家系は精神遅滯を発症した男性患者(lane 1)が正常な女性(lane 2)と結婚して子供(lane 3, 6, 10)をもうけた大変まれな例である。この男性患者からは異常にサイズが増大した断片が検出されたが、これは男性精神遅滯患者に典型的なサザンプロットの結果であるといえる。しかし、驚くべきことに、この男性患者から脆弱X染色体を遺伝した3人の女子からはpremutationしか検出されなかった。この結果は、たとえ精神遅滯を発症している患者からであっても男性から遺伝した場合にはその直接の子供においては精神遅滯が発症しないという観察事実^{10, 11)}を分子レベルで具体的に裏付けるものである。この結果は男性患者の場合には体細胞と生殖細胞では脆弱X領域におけるdynamic mutationの程度が大きく異なっている可能性を示唆するものであるが、この男性患者から生殖細胞の提供をうけてこれを解析することはできなかった。

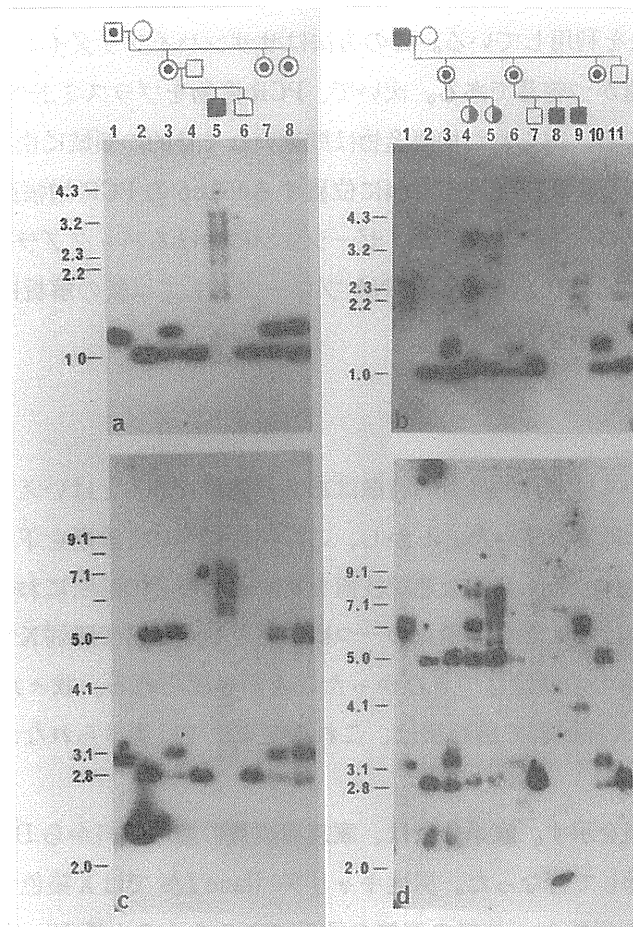


Figure 3 (図3)

Transmission of the fragile X mutation analyzed by Southern blot hybridization technique. The diagnostic DNA probe, pPCRfx1, was used to detect the dynamic mutations in *Pst* I-digested DNA samples (above). The methylation status was also analyzed by using *Eco* RI-*Eag* I-digested samples (below). Pedigree symbols are as follows: open circle, normal female; open square, normal male; dot in circle, female carrier who did not express the fragile site; dot in square, normal transmitting male who did not express the fragile site; half shaded circle, female carrier who expressed the fragile site; shaded square, mentally retarded fragile X syndrome male who expressed the fragile site.

男性患者の生殖細胞における dynamic mutation の程度に関しては、脆弱X患者と正常人のそれぞれの血液細胞と精子とを試料に用いた PCR 法による解析が最近になって報告されている。その報告によれば、体細胞において full mutation が検出された患者でもその精子または精巣からは premutation しか検出されなかった¹²⁾。この結果は我々の仮説が正しかったことを全面的に支持するものである。

また、図 3b の家系の lane 4 と 5 の女子においては精神遅滞が見られ、染色体脆弱部位の発現も観察されていたが、このような女子からは共通して full mutation が検出された。premutation と full mutation との境界は CCG 反復配列数にして 200 回程度、DNA の長さにして 600 bp 程度であるといわれているが³⁾、これら精神遅滞を発症している女子の例では dynamic mutation の程度が premutation の範囲を大きく逸脱していることがみてとれる。

このように脆弱X症候群においては、その性別にかかわらず脆弱X染色体が遺伝した場合にキャリアになる者と患者になる者とが存在する。この現象をよりよく理解するため正常人や患者における CCG 反復配列近傍のメチル化についても調べた。これは、*FMR-1* と命名された (CCG) n 反復配列を含む転写

産物が脆弱X領域において同定されていることと、一般的に遺伝子の転写活性の抑制にその領域のメチル化が関与する事実^{13, 14)} に基づいて行なったものである。この領域におけるメチル化の有無の検出は、図2に示した模式図中の制限酵素 *Eag* I 認識切断部位がメチル化を受けている場合、*Eag* I がその認識配列を切断できなくなることを利用して行なった。DNA を *Eag* I と *Eco*RI で消化した場合、*Eag* I 部位がメチル化を受けていなければ5.2 kbの *Eco*RI 断片は切断され、診断用 DNA プローブで検出される断片の長さは2.8 kb となるが、メチル化を受けている場合には5.2 kb の *Eco*RI 断片が検出される。この方法を用いた解析結果を図 3c、3d に示す。まず、正常な男性のX染色体はメチル化されていないので2.8 kb の断片だけが検出され (図 3c、lane 4, 6; 図 3d、lane 7, 11)、正常な女性では2本のX染色体のうち1本だけがメチル化を受けているので2.8 kb と5.2 kb の2本の断片を生じる (図 3c、lane 2、図 3d、lane 2) その表現型が正常な男性キャリアにおいては約3 kb の断片だけが検出され、脆弱X領域がメチル化を免れていることがわかる (図 3c、lane 1)。それに対して、男性患者においては5.2 kb よりも大きな断片のみが検出され、脆弱X領域がメチルを受けているのがわかる (図 3c、lane 5; 図 3d、lane 1, 8, 9)。脆弱X領域にコードされる *FMR*-1遺伝子の転写産物が正常な知能の発育に必須であるならば、メチル化によるその発現抑制が男性患者において精神遅滞をもたらす原因であると考えられそうであるが、この考え方では女性の場合には適用できない。女性においても男性の場合に観察されたメチル化のパターンと本質的には差はなく、キャリアにおいては *premutation* を起こしている脆弱X領域がメチル化を免れており、(図 3c、lane 3, 7, 8, 図 3d、lane 3, 6, 10)、精神遅滞患者においては *full mutation* を起こしている脆弱X領域がメチル化を受けている (図 3d、lane 4, 5)。すなわち、女性患者では脆弱X染色体だけがメチル化を受け、正常X染色体はメチル化を免れている。メチル化による *FMR*-1遺伝子の転写抑制が精神遅滞の原因であるなら、女性患者ではメチル化を受けていない正常な染色体の脆弱X領域から正常な *FMR*-1遺伝子が転写されているはずなので、この場合は正常に知能が発育し、精神遅滞を発症しないはずである。女性患者の正常X染色体上にある *FMR*-1遺伝子またはその転写産物は、他の機構により不活性化されているのかもしれない。

脆弱X症候群の出生前診断^{7, 8)}

我々が作製した遺伝子診断用 DNA プローブは出生前診断にも有用である。ここで紹介する2例においてはあらかじめ家系調査により胎児が脆弱X症候群を遺伝する危険性が予知されていた。それぞれ妊娠10週日前後に絨毛を採取し、短期間培養後、DNA を抽出してサザンプロット解析を行なった。絨毛は将来的に胎盤へと分化する組織であり、胎児由来である。その解析結果を以下に示す。2例のうち1例は女子 (図4) であり、もう1例は男子 (図5) であったが、いずれの場合においても反復配列の異常な増幅によると考えられる *Pst* I 切断断片のサイズの増大が検出された (図4, lane 6, 7; 図5, lane 7)。しかし、女子胎児の絨毛試料におけるメチル化パターンについては、これまでに血液試料を用いた解析で検出されたものとは異なっており、この女子胎児の絨毛 DNA からは明らかな *full mutation* 検出されたにもかかわらず (図4, lane 6, 7)、脆弱X染色体の *Eag* I 部位におけるメチル化は検出されなかった (図4, lane 13, 14)。しかし、他の研究グループからも同様の解析結果が報告されており¹⁵⁾、我々の結果はこれらと矛盾するものではない。

男子胎児からも *full mutation* が検出されたが (図5, lane 7)、その *Eag* I 部位におけるメチル化のパターン (lane 11) は男性患者の血液試料から得られたもの (図4, lane 12) と同様のものではなかった。

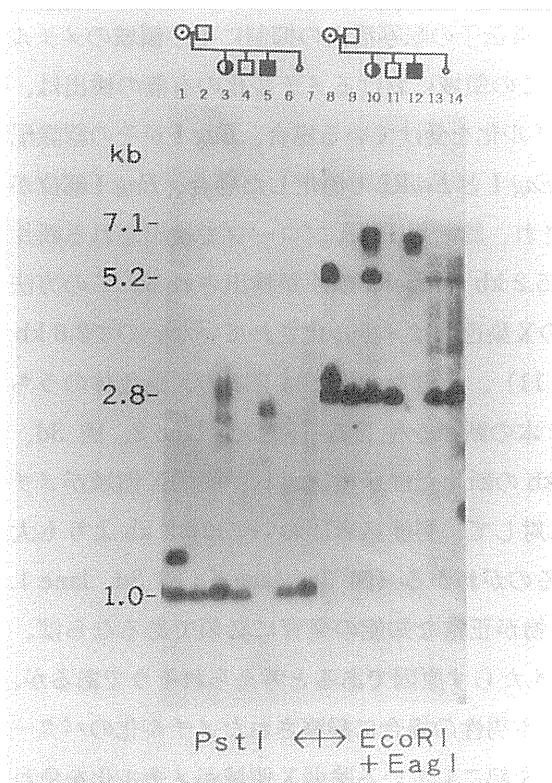


Figure 4 (図4)

Prenatal diagnosis of the female fetus. The fragile X genotype (*Pst* I digests) and the methylation status (*Eco* RI-*Eag* I digests) were analyzed by Southern blot hybridization using leukocyte DNA of the family members (lanes 1-5, and 8-12) and chorionic villus DNA of the fetus (lanes 6,7,13, and 14). Although extensive somatic mosaicism was detected from the CVS of the at-risk fetus, it could not be determined whether the fetus would be mentally retarded, since about 50% of female carriers with fragile X full mutation were reported not to exhibit mental retardation. Pedigree symbols are as follows: open square, normal male; dot in circle, female carrier who did not express the fragile site; shaded square, mentally retarded fragile X syndrome male who expressed the fragile site; small shaded square, male fetus with fragile X full mutation.

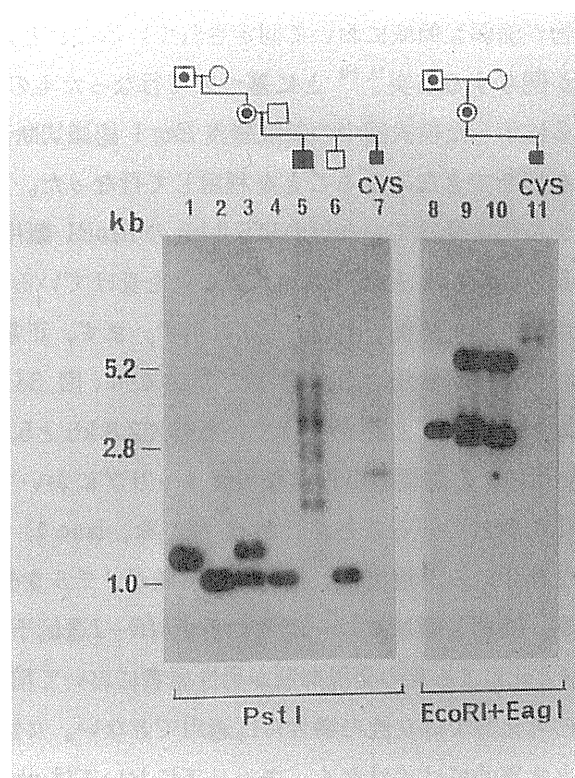


Figure 5 (図5)

Prenatal diagnosis of the male fetus. The fragile X genotype (*Pst* I digests) and the methylation status (*Eco* RI-*Eag* I digests) were analyzed by Southern blot hybridization technique using leukocyte DNA of the family members (lanes 1-6 and 8-10) and chorionic villus DNA of the fetus (lanes 7, and 11). The fetus at-risk was diagnosed as a fragile X patient, since extensive somatic mosaicism was detected from the CVS. Pedigree symbols are as follows: open circle, normal female; open square, normal male; dot in circle, female carrier who did not express the fragile site; dot in square, normal transmitting male who did not express the fragile site; shaded square, mentally retarded fragile X syndrome male who expressed the fragile site; small shaded square, male fetus with fragile X full mutation.

子胎児については full mutation が検出されたことから将来において精神遅滞を発症する危険性が極めて高いと結論された。しかし、女性ではたとえ full mutation が検出されても、その50%において精神遅滞が発症しないことを示す統計的観察事実¹⁶⁾ が報告されていることから、女子胎児については将来的に精神遅滞を発症するかどうか結論は下せなかった。

動的変異によるヒト遺伝病

脆弱X症候群に続いて、同様の3ヌクレオチド反復配列の異常な増幅による動的変異が筋緊張性ジストロフィー Myotonic Dystrophy^{17, 18)} やケネディ症候群 Kennedy's Syndrome (脳脊髄性筋萎縮症、Spinal

and Bulbar Muscular Atrophy ともいう)^{19, 20)}、ハンチントン病 Huntington's Disease²¹⁾、脳脊髄性運動失調症 Spinocerebellar ataxia type 1²²⁾、および FRAXE 精神遅滞²³⁾ においても同定されている。現時点において動的変異が同定されたこれら 6 種類の遺伝病に関する主な知見を表 1 にまとめた。これらのヒト遺伝病において同定された遺伝的に不安定な反復配列は FRAXE 精神遅滞を除いて全て転写領域内に含まれており、mRNA となることが知られている。特に、筋緊張性ジストロフィーにおいては 3' 非翻訳領域中に存在する反復配列の増加が変異 mRNA の安定性を向上させ、これが筋緊張性ジストロフィーの優性遺伝様式を説明するものではないかといわれている²⁴⁾。また、同様に筋緊張性ジストロフィーにおいて突然変異の由来である親よりも反復配列数が減少した子供が最近になって複数例報告されている^{25, 26)}。そのような子供においては症状の軽減や発症の遅延がみられることから、少なくとも筋緊張性ジストロフィーにおいては反復配列数が病状と直接的に関係していることが明らかとなってきた。また、ハンチントン病において一般集団よりも (CAG) n 反復配列数が増幅しているが、患者と比較するとその反復数が少ない人たちが同定された²⁷⁾。このような人たちは脆弱X症候群における premutation carrier に相当するものであり、ハンチントン病の症状は呈さない。ハンチントン病キャリアの反復配列は脆弱X症候群キャリアの反復配列と同様に遺伝的不安定性を示すが、脆弱X症候群と異なる点は男性キャリアから遺伝した場合のみ発症につながる full mutation への増幅が起こることである。今後も同様の遺伝的に不安定な反復配列の異常な増幅が原因となって起こるヒト遺伝病が新たに同定されてくることは想像に難くない。

Table 1 (表 1)

Dynamic mutations involved in human genetic diseases. The human genetic diseases identified to be caused by dynamic mutation of the trinucleotide repeat are listed with frequency, gene product if known, genetically unstable triplet and its location in the transcript if known, repeat number of the triplet in normal, carrier, and patient, and chromosomal location.

動的変異によるヒト遺伝病

遺伝病	出現頻度	遺伝子産物	反復配列 転写領域中の位置	反復配列数			遺伝子座
				正常	キャリア	患者	
脆弱X症候群 Fragile X syndrome	1/2,000	機能不明 広範囲に発現	p(CCG)n/p(CG)n 5'非翻訳領域	6-54	52-200	200-2,000	Xq27.3
ケネディ病 または 脳脊髄性筋萎縮症 Kennedy's disease or Spinobulbar muscular atrophy (SBMA)	1/50,000	アンドロゲン 受容体	p(CTG)n/p(CAG)n 翻訳領域	11-31		40-52	Xq11-12
筋緊張性ジストロフィー Myotonic dystrophy (DM)	1/8,000	プロテイン キナーゼ?	p(CAG)n/p(CTG)n 3'非翻訳領域	5-35	50-100 (軽症)	100-2,000 (重症)	19q13.2-13.3
ハンチントン病 Huntington's disease	1/10,000	機能不明 広範囲に発現	p(CTG)n/p(CAG)n 翻訳領域?	11-30	30-38	42-100	4p16.3-16.4
脳脊髄性運動失調症 Spinocerebellar ataxia type 1	?	機能不明 広範囲に発現	p(CTG)n/p(CAG)n 翻訳領域?	25-36		41-81	6p22-23
FRAXE精神遅滞 FRAXE mental retardation	?	機能不明	p(GCC)n/p(GGC)n 転写領域?	6-25	116-133	>200	Xq28

おわりに

脆弱X症候群は集団中における出現頻度が非常に高いにもかかわらず、遺伝様式の不確かさや診断の困難さから、多くの研究者や臨床医の注目を集めてきたとはいええない遺伝病であった。しかし、遺伝子診断用 DNA プローブの実用化により、従来と比較してはるかに簡便かつ確実に分子レベルで診断が下せるようになった。ただし、前述のように、女子胎児の出生前診断においては dynamic mutation の検出だけでは将来の知能程度を予測することはできない等の問題点はまだ解決されていない。また、ここではその詳細は省略するが、長年経験を積んできた臨床医の目から見て脆弱X症候群患者である可能性が高いにもかかわらず、遺伝子診断用 DNA プローブを用いた解析ではこの領域における dynamic mutation が全く検出されなかった例を我々は経験している。同様の例がハンチントン病においても報告されており、この場合も反復配列数は正常の範囲にあった²⁷⁾。遺伝子転写産物を含めた遺伝的不安定性領域がヒト遺伝病の発生においてどのような役割を担っているかを分子レベルで解明していくことが、脆弱X症候群を含むヒト遺伝的疾患のより確実な理解と診断へとつながっていくことはいうまでもない。また、分子細胞遺伝学的見地からも、脆弱X症候群は特定ゲノム領域における遺伝的不安定性、すなわち動的変異 dynamic mutation による遺伝子活性の抑制という新しい概念をもたらした点で非常に興味深いものである。さらに、これらヒト遺伝病において発見されたゲノムの遺伝的不安定性、すなわち動的変異が放射線や化学物質によっても誘発されるかどうかは今後検討を重ねていくべき重要な課題である。動的変異の発生機構を解明することは、脆弱X症候群を含めたヒト遺伝病の成因を理解する目的だけにとどまらず、染色体の分子構築やゲノムのダイナミズムを分子レベルで理解して行く上で避けることの出来ない過程の一つであるといえよう。

謝 辞

脆弱X症候群に関する一連の本研究は、放射線医学総合研究所遺伝研究部において堀 雅明・同研究部長、山内正剛・同研究部研究員、辻さつき・同研究部研究員、片倉令子・同研究部研究補助員、関 直彦・かずさDNA研究所研究員が中心となった共同研究により行なわれたものである。同症候群の家系調査については、近藤郁子・愛媛大学医学部衛生学教室教授および梶井 正・山口大学医学部小児科教授との共同研究によるものである。また、同症候群の出生前診断については、近藤・梶井両教授に加え、永田 新・国立福岡中央病院婦人科医師、外山芳郎・千葉大学医学部解剖学教室講師、原田直樹・九州メディカルサイエンス細胞遺伝学研究室研究員、新川詔夫・長崎大学原爆後遺障害医療研究施設先天異常（遺伝子）部門教授、益野一郎・山口大学医学部小児科医師、鈴森 薫・名古屋市立大学医学部産婦人科医師との共同研究によるものである。この紙面をお借りして、諸先生方の本研究における多大なるご尽力に対し謝意を表させていただくものである。

参考文献

- 1) Sutherland GR and Hecht F.: "Fragile Site of Human Chromosomes." Oxford University Press, New York, 1985.
- 2) Hori T, Takahashi E, Tsuji H, et al.: Fragile X expression in thymidine prototrophic and auxotrophic human-mouse somatic cell hybrids under low and high thymidylate stress condition. *Cytogenet. Cell Genet.*

- 47, 177-180, 1988.
- 3) Richards RL and Sutherland GR.: Fragile X syndrome: The molecular picture comes into focus. *Trends in Genetics* 8, 249-255, 1992.
 - 4) Mandel J-L and Heitz D.: Molecular genetics of the fragile X syndrome: a novel type of unstable mutation. *Current Opinion in Genetics and Development* 2, 422-430, 1992.
 - 5) Yamauchi M, Seki N, and Hori T.: Rapid preparation of diagnostic probes for the fragile X syndrome by direct PCR amplification of human chromosomal DNA. *Jpn. J. Hum. Genet.*, 37, 195-203, 1992.
 - 6) Hori T, Yamauchi M, Seki N, et al.: Heritable unstable DNA sequences and Hypermethylation associated with fragile X syndrome in Japanese families. *Clin. Genet.*, 43, 34-38, 1993.
 - 7) Yamauchi M, Seki N, Hori T, et al.: Prenatal diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of the dynamic mutation due to an unstable DNA sequence. *Clin. Genet.*, 44, 169-172, 1993.
 - 8) Suzumori K, Yamauchi M, Hori T, et al.: Prenatal diagnosis of a hypermethylated full fragile X mutation in chorionic villi of a male fetus. *J. Med. Genet.*, 30, 785-787, 1993.
 - 9) PCR とその応用 - 基礎研究から臨床まで 編集/榎 佳之、村松正実、高久史磨 *実験医学増刊* 羊土社 8 (9), 1990.
 - 10) Moric-Petrovic D and Laca Z.: A father and daughter with fragile X chromosome. *J. Med. Genet.* 20, 476-478, 1983.
 - 11) Van Roy BC, De Smedt MC, Raes RA, et al.: Fragile X trait in a large kindred: transmission also through normal males. *J. Med. Genet.*, 20, 286-289, 1983.
 - 12) Reyniers E, Vits L, De Boule K, et al.: The full mutation in the *FMR-1* gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nature Genetics*, 4, 143-146, 1993.
 - 13) Toniolo D, Martini G, Migeon BR, and Dono R.: Expression of the G6PD locus on the human X chromosome is associated with demethylation of three CpG islands with 100kb of DNA. *EMBO J.*, 7, 401-406, 1988.
 - 14) Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, et al.: DNA methylation represses *FMR-1* transcription in fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 1, 397-400, 1992.
 - 15) Sutherland GR, Gedeon A, Kornman L, et al.: Prenatal diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of the unstable DNA sequence. *N. Engl. J. Med.*, 325, 1720-1722, 1991.
 - 16) Tejada I, Mornet E, Biancalana V, et al.: Direct DNA analysis of fragile X syndrome in Spanish pedigrees. *Am. J. Med. Genet.*, 43, 282-290, 1992.
 - 17) Fu YH, Pizzuti A, Fenwick BG, et al.: An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*, 255, 1256-1259, 1992.
 - 18) Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, et al.: Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, 68, 799-808, 1992.
 - 19) La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, et al.: Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 352, 77-79, 1991.
 - 20) Biancalana V, Serville F, Pommier J, et al.: Moderate instability of the trinucleotide repeat in spino-

- bulbar muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, 1, 255–258, 1992.
- 21) The Huntington's Disease Collaborative Research Group.: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72, 971–983, 1993.
 - 22) Orr HT, Chung MY, Banfi S, et al.: Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genetics*, 4, 221–226, 1993.
 - 23) Knight SJL, Flannery AV, Hirst MC, et al.: Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell*, 74, 127–134, 1993.
 - 24) Sabouri LA, Mahadevan MS, Narang M, et al.: Effect of the myotonic dystrophy (DM) mutation on mRNA levels of the gene. *Nature Genetics*, 4, 233–238, 1993.
 - 25) O'Hoy KL, Tsilfidis C, Mahadevan MS, et al.: Reduction in size of the myotonic dystrophy trinucleotide repeat mutation during transmission. *Science*, 259, 809–812, 1993.
 - 26) Abeliovich D, Lerer I, Lavon IP, et al.: Negative expansion of the myotonic dystrophy unstable sequence. *Am. J. Hum. Genet.*, 52, 1175–1181, 1993.
 - 27) Goldberg YP, Kremer B, Andrew SE, et al.: Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. *Nature Genetics*, 5, 174–179, 1993.

2. 筋緊張性ジストロフィー症の発症機構

三木哲郎*・山縣英久*・荻原俊男*

Mechanism of CTG repeat expansion in myotonic dystrophy

Tetsuro Miki, Hidehisa Yamagata and Toshio Ogihara

Department of Geriatric Medicine, Osaka University Medical School,

2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Abstract

Recently the gene for myotonic dystrophy (DM) was found to be an expansion of an unstable CTG repeat in the 3'-UTR of the putative protein kinase gene. The absolute linkage disequilibrium observed in both Caucasian and Japanese patients, between the DM mutation and an insertion/deletion polymorphism located 5kb upstream from the CTG repeat, suggests a single common origin of the mutation.

To trace this ancestral event, we have analyzed the copy number of the repeat in 93 Japanese DM families using PCR. The associations of CTG repeat alleles on the normal chromosomes and the closely markers D19S63, p37.1 and an insertion/deletion polymorphism were investigated. The results strongly suggest that (CTG)₁₁₋₁₃ alleles are independent and (CTG)₁₇₋₃₅ may act as a predisposing allele.

I. 緒言

筋緊張性ジストロフィー症（以下 DM）は常染色体優性の形式で遺伝する浸透率の高い難病である。筋肉症状以外に、白内障、前頭部禿頭、知能低下、性腺機能低下、耐糖能障害、心筋伝導障害などの全身症状を合併する。症状の一部が生理的老化と類似し、遺伝性早老症の一つに分類されているため、原因遺伝子の単離同定は、老化機序の解明に役立つものと期待されている。有病率は10万人に約5人であり、成人型筋ジストロフィー症の中では最も頻度が高い。患者の臨床症状により、次の3種の臨床型に分類できる。①出生時から筋肉症状と発育・知能障害を伴う先天型、②顔面筋と母指球筋の萎縮、筋力低下を伴う

*大阪大学医学部老年病医学講座（〒565 大阪府吹田市山田丘2-2）

成人型、③晩年になっても筋肉症状がほとんどなく白内障や筋電図の異常所見だけが出現する軽微型である。同一家系の罹患した同胞間でも臨床症状の重症度が異なること、ほとんどの先天型 DM は成人型の罹患した母親から出産すること、さらに親から子へと世代を経るにつれて発症年齢が早まること（表現促進）など臨床遺伝学的な特徴があるが、これらの病態は全く不明であった。

約10年前に、家系を使った連鎖分析により原因遺伝子座位は第19染色体長腕に決定されたが、原因遺伝子そのもののポジショナルクローニングには欧米のグループが成功した¹⁻³⁾。この遺伝子は、19q13.3に座位し、プロテインキナーゼの一種（DMK）で、cDNA 遺伝子の 3' 非翻訳部に（CTG）反復配列が存在する（図1）。正常人では、（CTG）反復配列が5回から36回であるのに対し、DM 患者では50回以上2000回までと拡大する。不安定領域の長さが長い程、臨床症状は重症で発症年齢も早い傾向にあることが証明された。DM の発症には、（CTG）反復配列よりなる不安定 DNA 配列が関与していることが判明した。この領域の cDNA をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行うと患者では遺伝子挿入として診断できる。（CTG）反復の数はPCRを用いて決定できるため、補助診断として利用できる。日本人においても DM 家系を解析することにより、これまでの臨床診断や連鎖分析を利用した間接的な遺伝子診断法と比べ、直接的で正確な遺伝子診断が可能となった^{4,5)}。

今回、日本人 DM 家系（93家系、構成員約 300名、患者約 190名）の DNA を解析し、発症前診断、出生前診断、確定診断などの遺伝子診断を行うと共に、（CTG）反復配列の拡大機構のモデルを作成した。

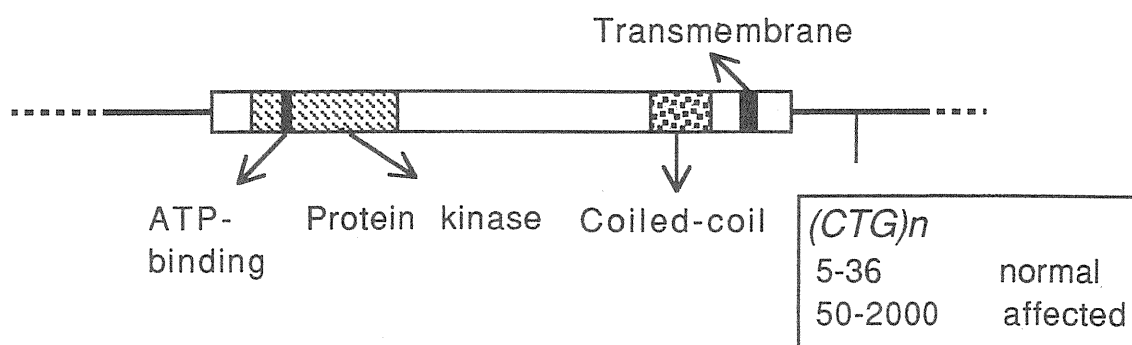


図1 DMK 遺伝子の構造。（CTG）反復配列は、3' 非翻訳部に存在する。ATP 結合部位とプロテインキナーゼの部位を示した。

II. 方法

1. サザンハイブリダイゼーション：DM 家系の構成員の末梢血白血球由来の高分子量 DNA を EcoRI, BglII, PstI などの制限酵素で消化後、DNA である cDNA25 とサザンハイブリダイゼーションした。得られたバンドの長さから、（CTG）反復配列の拡大した長さを算出し、先天型 DM、成人型 DM、軽微型 DM の 3 群で長さを比較した。

2. PCR 法：（CTG）反復配列の長さ回数を PCR を利用して決定するために、反復配列の前後の領域で適当な長さの PCR プライマーを合成した。5' 側プライマーは、DM101 (5'-CTTCCCAGGC-CTGCAGTTTGCCCATC-3')、3' 側プライマーは、DM102 (5'-GAACGGGGCTCGAAGGGTCCT-TGTAGC-3') とした。反応条件は、94℃ 1.5分、62℃ 1分、72℃ 2分を 35 サイクル行った。PCR での解析は、非標識のプライマーを利用し、PCR 産物の長さをアガロースゲル電気泳動で直接的に決定する方法と、³²P で標識したプライマーで PCR を行った産物を塩基配列決定用のゲルにて泳動し反復配列の

回数を決定する方法で行った。また、正常人で (CTG) 反復配列の数と、DMK 遺伝子のイントロン多型性遺伝子マーカーとの間で連鎖不平衡が存在するか否かを検討した。統計学的検討は、 χ^2 検定で行った。正常人の (CTG) 反復配列は、日本人123名、白人は論文発表例^{6,7)} を加えて210名とした。

III. 結果

1. (CTG) 反復配列の長さとの臨床症状

cDNA25を用いたサザンハイブリダイゼーションの結果、正常人では EcoRI 消化において、9.8kb と 8.6kb の 2 本の多型性バンドが出現した。その遺伝子頻度は、それぞれ0.45、0.55であった。患者では、9.8kb か8.6kb の正常バンドと10kb 以上の拡大したバンドが検出された。症状の軽い患者では、9.8kb のバンドと重なったバンドが出現するため、EcoRI 消化ではバンドの長さを正確に検出するのは困難であった。このような場合は、BglI か PstI のサザンハイブリダイゼーションで、それぞれ3.4kb か1.3kb の正常バンドより長いバンドとして検出できた。(CTG) 反復配列の長さとの臨床型の関係を、図2に示した。先天型 DM は 2 kb 以上、軽微型は 1 kb 以下の拡大があり、成人型は二つの中間であった。日本人においても DM の重症度や発症年齢が、(CTG) 反復配列の拡大の程度と相関関係が認められた。これは、これまで白人で報告されているのと同じ傾向であった。

80例の親子間（父子間43例、母子間37例）で (CTG) 反復配列の長さを比較すると、世代を経るにつれて拡大する傾向にあった。例外的に2例の父子間で、長さの短縮が認められた。したがって同一家系において、罹患した親よりも罹患した子の方が (CTG) 反復配列が拡大している傾向が認められた。

また、家族歴がなく、46の (CTG) 反復配列をもった健常な父から、反復配列が拡大し病気が発症した子供が生まれた。この父の反復配列は46であるが、次の世代で患者の範囲まで拡大していることより、父の46 (CTG) 反復配列をもつ不安定領域は、premutation の状態にあると考えられた。

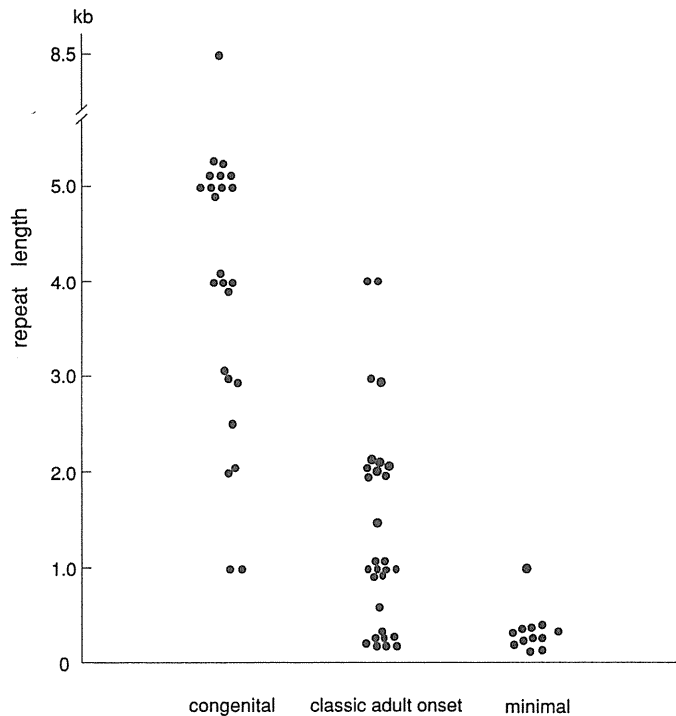


図2. DM の臨床分類で、先天型、成人型、軽微型の3型に分け、それぞれの型での (CTG) 反復配列の長さを比較した。

2. (CTG) 反復配列と創始者効果 (founder effect)

PCR 法により得られた健常人の (CTG) 反復配列の分布を図 3 に示した。日本人、白人とも 5~36 回の (CTG) 反復配列が、正常範囲であった。反復配列の遺伝子頻度は、5 回、11~17 回と 20~30 回の 3 相からなっていた。対立遺伝子の遺伝子頻度は、日本人の場合は 12 回で最大値を、白人の場合は 5 回で最大値をとり、いずれも有意差 ($p < 0.01$) があつた。また、表 1 に示すように、(CTG) 反復配列の数と 1 kb 上流の存在するイントロン 10 の遺伝子挿入 (I) / 欠失 (D) 多型についてハプロタイプを作成すると、日本人の結果は既報告のフランス人のデータと同じような傾向にあつた。つまり、5 回と 17 回以上の反

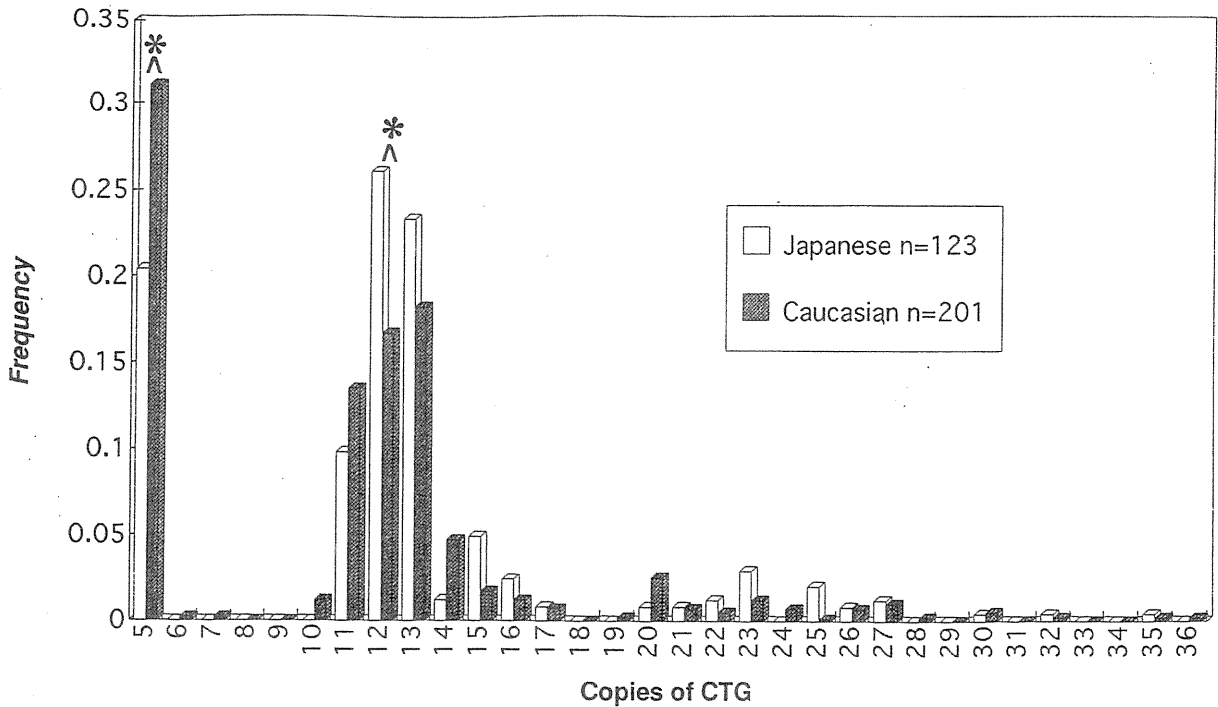


図 3. (CTG) 反復配列と対立遺伝子の頻度。白人の頻度は文献^{6,7)}によつた。
* $p < 0.01$

表 1. 日本人とフランス人での (CTG) 反復配列と遺伝子挿入 (I) / 欠失 (D) 多型の関連。
Ins=遺伝子挿入多型、Del=遺伝子欠失多型、フランス人のデータは文献による⁷⁾。

	Japanese		(CTG)n	French	
	Ins	Del		Ins	Del
normal	50	0	5	104	0
	0	0	6-10	5	1
	0	24	11	0	45
	0	64	12	0	42
	3	54	13	1	43
	0	3	14	11	7
	2	10	15	0	2
	5	1	16	1	0
	29	0	17-36	33	0
total	89	156		155	140
affected	90	0		100%	0%

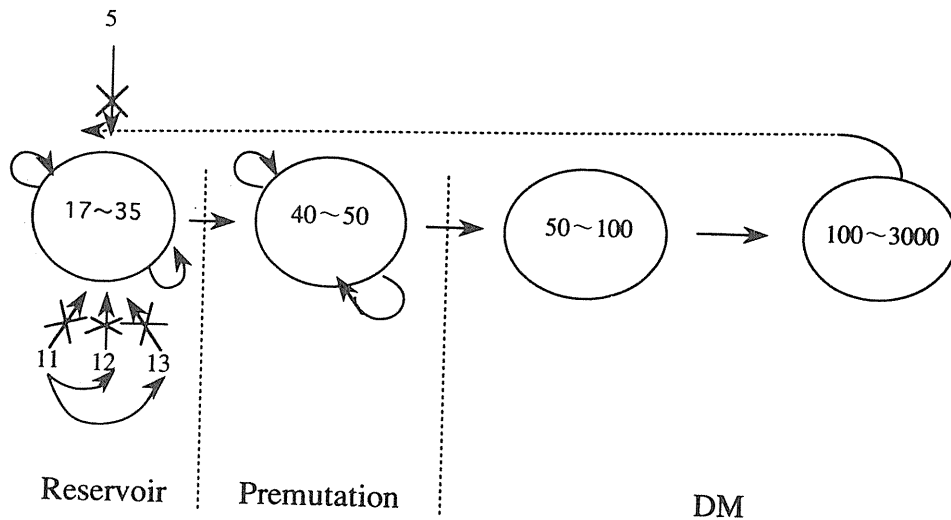


図4. (CTG) 反復配列の拡大するモデル。ある一定のハプロタイプと連鎖した (CTG) 反復配列をもつ不安定 DNA 領域が拡大するとする仮説。

復は全例が遺伝子挿入型であり、11、12、13回の反復のほとんどの例が遺伝子欠失型であった。この結果と (CTG) 反復配列の100kb 下流にある p37.1や D19S63の結果を合わせると、図4に示すような拡大機構のモデルが作成できた。

IV. 考察

1992年の2月に発表された DM の原因遺伝子である DMK は、アミノ酸組成の相同性から、コードする蛋白はプロテインキナーゼの一種であること、3'側の非翻訳部に (CTG) のくり返しを含む不安定 DNA 領域があり、正常では5~36回であるのに対し、患者において50回以上に増大している事が判明した¹⁻⁵⁾。このため塩基反復配列が拡大する疾患は、報告されていた脆弱X症候群、球脊髄性筋萎縮症とあわせて3番目となった⁸⁾。現在は、ハンチントン病、脊髄小脳失調症などが付け加えられている。これらの成功例は、ポジショナルクローニング（主に連鎖分析を使って遺伝子座位を狭めて、目的遺伝子その所在位置より単離する方法）の所産である。

これまでの遺伝子診断は、多型性 DNA マーカーを使って家系を連鎖分析により診断する間接的なものであったが、今や原因遺伝子そのものを標的とした直接診断が可能となった。サザンハイブリダイゼーションが現在、DNA 診断法としては一般的である。被験者の DNA を EcoRI で消化した後、電気泳動し、ナイロンフィルターにトランスファーする。原因遺伝子の cDNA で標識しハイブリすると、正常者では 8.6/8.6kb、9.8/9.8kb のホモ接合体か、9.8/8.6kb のヘテロ接合体のバンドがみられる。しかし患者では多くの場合、8.6/10kb 以上の拡大したバンドが出現する。その長さが長いほど重症で、発症年齢も早い傾向がみられ、家系についてみると世代を経る毎に患者の持つ不安定領域が長くなり、表現促進が遺伝子レベルで確かめられた。DM の遺伝子異常は、同じ筋ジストロフィー症である Duchenne 型筋ジストロフィー症の遺伝子欠失型と比べ遺伝子挿入型であるため簡便にまた正確に検出できる。PCR 法は、GC に富み、(CTG) くり返し部分が異常に長い患者では増幅困難なため、現段階では補助診断である。DM の確定診断、発症前診断、出生前診断として、この DNA 診断が有用になりつつあり、診断基準の1つに加える必要があると考える。

DMK 遺伝子の発現状態やその蛋白質として機能も全くわかっていない。これまでの生理、生化学的デー

タや先天性ミオトニアと Cl⁻ チャンネル異常、先天性パラミオトニアと Na⁺ チャンネル異常の関連から、このプロテインキナーゼは、膜のイオンチャンネル (Na⁺, K⁺, Cl⁻) 活性に影響していると考えられ、その異常が1つ以上のイオンチャンネルの機能障害を引きお越し、いくつかの過程を経て DM が発症するという説がある。優性遺伝病の場合、一般的に遺伝子変異により異常な物質が蓄積して発病すると考えられている。その例が、プレアルブミンという蛋白の異常でアミロイドが組織に蓄積して発病する、家族性アミロイドポリニューロパチーである。DN の場合は、単純な蓄積病ではなく、今後の研究が大いに待たれている。また、DM は、遺伝性早老症に含まれるから、発症機序を明らかにする事は、老化解明に大いに役立つものと期待される。

(CTG) 反復配列に隣接する DNA 多型の解析から、新しい突然変異はほとんど無く、日本人と白人は共通の創始者 (founder) を持つ可能性のあることが示唆された。今後、人種間での (CTG) 反復配列の解析を行うと、日本人に DM 遺伝子が移入された時期が判明するであろう。

参考文献

- 1) Buxton, J., Shelbourne, P., Davies, J., Jones, C., Van Tongeren, T., Aslanidis, C., de Jong, P., Jansen, G., Anvret, M., Riley, B., Williamson, R. & Johnson, K.: Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* 355, 547-548, 1992.
- 2) Harley, H. G., Brook, J. D., Rundle, S.A., Crow, S., Reardon, W., Buckler, A. J., Harper, P. S., Housman, D. E., & Shaw, D. J. : Expansion of unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* 355, 545-546, 1992.
- 3) Aslanidis, C., Jansen, G., Amemiya, C., Shutler, C., Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Chen, C., Alleman, J., Wormskamp, N. G. M., Vooijs, M., Buxton, J., Johnson, K., Smeets, H. J. M., Lennon, G. G., Carrano, A. V., Korneluk, R. G., Wieringa, B. & de Jong, P. J., Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping the putative defect. *Nature* 355, 548-551, 1992.
- 4) Yamagata, H., Miki, T., Ogihara, T., Nakagawa, M., Higuchi, I., Osame, M., Shelbourne, P., Davies, J. & Johnson, K.: Expansion of unstable DNA region in Japanese myotonic dystrophy. *Lancet* 339, 692, 1992.
- 5) 山縣英久、三木哲郎、Johnson, K., 萩原俊男：筋緊張性ジストロフィー症の DNA 診断、*医学のあゆみ* 161, 947-948, 1992.
- 6) Davies, J., Yamagata, H., Shelbourne, P., Buxton, J., Ogihara, T., Nokelainen, P., Nakagawa, M., Williamson, R., Johnson, K. & Miki, T.: Comparison of the myotonic dystrophy associated CTG repeat in European and Japanese populations. *J. Med. Genet.*, 1992.
- 7) Imbert, G., Kretz, C., Johnson, K. and Mandel, J-L.: Origin of the expansion mutation in myotonic dystrophy. *Nature Genet.* 4: 72-76, 1993.
- 8) Richards, R. I. and Sutherland, G. R.: Dynamic mutations: A new class of mutations causing human disease. *Cell.* 70, 709-712, 1992.

X. 突然変異検出法

1. PCR-SSCP 法とそのヒトゲノム研究への応用

林 健志

2. 放射線被曝による体細胞突然変異の誘導とその 検出

秋山 實利

3. 原爆被爆者の子供の反復配列突然変異

佐藤千代子

4. 体細胞分裂組換えと欠失突然変異の解析

異 紘一

1. PCR-SSCP法とそのヒトゲノム 研究への応用

林 健 志*

PCR-SSCP Analysis and Its Application to Human Genome Study

Kenshi Hayashi

Division of Genome Analysis, Institute of Genetic Information, Kyushu University

Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka-shi, 812 Japan

Abstract

A large amount of DNA sequence data are now available owing to the development of the human genome project. These data are deposited in public databases, e.g. DDBJ, GenBank and EMBL, and freely accessible to scientific community. One of the major advantages of having these databases is that we can now detect sequence differences between individuals in a large scale. Using the sequence informations, we can design primer sequences, amplify various target regions of the sample DNA's by PCR and detect abnormal sequence changes from reference, or normal sequences. Detecting sequence changes, or mutations, are essential part of searching genes responsible for hereditary diseases and also DNA diagnosis of hereditary diseases or cancer. We can also measure mutation frequency of the human genome by knowing its variability. Our group has developed and been improving a method, PCR-SSCP analysis, as an extremely rapid and easy technique for detection of sequence differences between sample DNA's. Knowing the sensitivity (percentage detection of mutations) of this technique is important in evaluating usefulness of it for the purposes stated above. Considerable number of experiences on PCR-SSCP analysis of fragments shorter than 300 b.p. are accumulating. We summarize here the sensitivity of PCR-SSCP analysis for various sequence context of this size range examined in various electrophoretic conditions conducted in many laboratories. Data on mutation detection by this technique for longer fragments are limited. We also present our effort for defining electrophoretic conditions of PCR-SSCP analysis when ex-

*九州大学遺伝情報実験施設・ゲノム解析分野（福岡市東区馬出3-1-1）

aminating longer (350 to 600 b.p.) fragments.

要 約

ゲノム計画の進展の結果、大量のヒトゲノム DNA 配列が決定され、GenBank、EMBL 等のデータベースに蓄積されつつある。この情報をわれわれは何に使うか。その重要な利用法の一つは個体間、あるいは試料間の DNA 配列の差異の検出である。DNA 配列情報をもとにプライマー対を合成し、試料 DNA 中の種々の標的ゲノム領域を PCR によって増幅し、その産物中の DNA 配列の異常を検出することは、遺伝病要因遺伝子の検索、遺伝病の診断、癌の DNA 診断等に役立つ。またヒトゲノム配列の多様性を解明することが可能である。われわれは突然変異を極めて迅速かつ容易に検出する実験法として、PCR-SSCP 法を開発、確立してきた。上記の種々の目的に PCR-SSCP 法がどの程度有効であるかを判断するには、まずその検出効率を明らかにしなければならない。また、現在まで、PCR-SSCP 法はほとんどの場合、300bp 以下の DNA 断片に対してのみ用いられてきたが、長大なゲノム領域を能率よくスキャンするためにはより長い DNA 断片を分析したほうが能率がよいことは明らかである。したがって長い DNA 断片での検出感度を推定し、あるいはそれに適した実験条件を知る必要がある。

緒 言

今日、DNA 診断は臨床検査の場で、急速にその重要性を増しつつある。遺伝病診断における要因遺伝子中の突然変異の検出、癌における癌遺伝子や癌抑制遺伝子の突然変異を含む構造変化の検出、感染性疾患における病原体の同定、等である。DNA 診断の有用性は従来から明白な事であったが、これには、組み換え DNA 技術を含むかなり高度な生物学的実験技術が必要であり、例えば臨床検査の場でこれを行うのは事実上不可解であった。1980年後半に出現した PCR は、この状況を一変させた。通常の生化学的試薬の他に、プライマーとして使うオリゴヌクレオチドと、耐熱菌由来 DNA ポリメラーゼ、それに比較的簡単な装置があれば、極めて簡単に、極く微量のゲノム DNA から特定領域の配列を選択的に増幅し、取り出す事が可能となった。さらに、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を利用して、PCR 産物中の突然変異の有無を、極めて簡単に検出する実験法が PCR-SSCP 法である。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は、極めて分解能の高い分離技術である。従来、蛋白質分子の荷電状態、分子量、あるいは高次構造の差から来る移動度の変化をもとにした分離分析法として発展し、利用されて来た。核酸研究分野では、主に分子の大きさ（核酸は表面荷電密度が均一な直鎖状分子なのでその長さ）の検出手段として、用いられてきた。その技術の頂点とも言うべきものが、DNA ヌクレオチド配列決定法である。この電気泳動法では、たとえば、ヌクレオチド残基数1000と1001を識別することが可能である。ここで述べるSSCP法では、一本鎖核酸、特に DNA の高次構造の差を利用して、DNA ヌクレオチド配列の違い、即ち突然変異や DNA 多型を検出する^(1,2)。

PCR-SSCP 法の原理

本法では、まず最初にゲノム DNA あるいは cDNA 中の対象とする配列を PCR によって増幅する³⁾。この時放射性標識されたプライマーまたはヌクレオチドを用いることによって増幅と同時にその産物を放射性標識する⁴⁾。増幅産物をホルムアミド溶液で適当に希釈し、加熱によって DNA 鎖を解離させた後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離する。泳動後、ゲルを濾紙上に乾燥させ、オートラジオグ

ラフィーによってDNAのバンドを検出する。配列の異なる単鎖DNAは移動度が異なるので、突然変異を持つDNAは、正常DNAとは異なる位置のバンドとして検出される。

非変性条件下では、単鎖DNAは分子内相互作用のために、折り畳まれた構造をとっている。この相互作用は塩基配列によって異なる。従って異なる配列を持つDNA断片（例えば正常配列と突然変異を持つ配列）は、別の高次構造をとるがゆえに、移動度が違う。

分子内相互作用とは、分子内塩基対形成、塩基間スタッキング等を含み、現在のところ、これらの相互作用が単鎖DNAの3次元構造をどのように決定しているかを正確に予言することはできない。従って折り畳まれた単鎖DNAのゲル電気泳動における移動度を理論的に予測することは不可能であり、配列変化がもたらす移動度の変化もまた、予想出来ない。

短いDNA断片での検出感度

PCR-SSCP法では突然変異をどの程度検出することが出来るかを、理論的に推定することは、上記の理由から困難である。一方、既知の突然変異を移動度の差として検出する率として、本法の感度を経験的に推定することは可能である。この推定にも問題がある。既述のように、PCR-SSCP法では、変異ヌクレオチドが、分子内の他のヌクレオチドといかなる相互作用をするかが重要である。従って本法の感度は、調べようとするDNAの配列によって異なることが予想され、未知の配列にたいして妥当な検出感度を推定するには、多くの配列での検出感度を集計しなければならない。表1に複数の研究室が、種々の配列中のいくつかの既知突然変異に対してPCR-SSCP分析を行った結果の検出感度の集計を示す。ある程度のばらつきはあるものの、おおむね高頻度で突然変異を検出していることが読み取れる。結論として、例

表1. PCR-SSCP分析の検出感度（短いDNA断片の場合）

著者 (遺伝子)	長さ (b. p.)	温度 (°C)	%C ^a	%T ^b	gly	検出/検索	感度 (%)
Gaidano et al. ^c (p53)	101-200	r.t.	5.0	6	+	19/19	100
Michaud et al. ^d (OAT)	101-200	4	3.0	5	-	4/4	100
		4	3.3	5	+	4/4	100
	201-300	r.t.	3.3	5	+	4/4	100
		4	3.3	5	-	2/4	50
	4	3.3	5	+	4/4	100	
		r.t.	3.3	5	+	4/4	100
	201-300	4	5.0	6	-	6/6	100
		4	5.0	6	+	5/6	83
		r.t.	5.0	6	+	6/6	100
		4	5.0	6	-	5/6	83
301-350	4	5.0	6	+	4/6	67	
	4	5.0	6	+	5/6	83	
	r.t.	5.0	6	+	5/6	83	
Suzuki et al. ^e (ras)	101-200	4	2.0	5	-	10/10	100
		r.t.	2.0	5	+	9/10	90

^aN,N'-メチレンビスアクリルアミドが全アクリルアミド中に占めるパーセント。^b全アクリルアミドの濃度。^cGaidano, G. et al., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 88, 5413, 1991.

^dMichaud, J. et al., Genomics 13, 389, 1992. ^eSuzuki, Y. et al., Oncogene 5, 1037, 1990.

例えば300塩基以内の配列であれば、本法の感度はほぼ90%とするのが妥当であろう⁵⁾。PCR-SSCP法の感度は、長いDNA断片では低下する。従って長いDNA断片中の突然変異を検索するには、これをいくつかの小断片に分けると良い。具体的には、オーバーラップするいくつかの領域に分けて個々に増幅する。又は長い断片として増幅した後、制限酵素切断によって短いDNA断片とする、等の後、SSCP分析を行う。しかしながら、哺乳動物のエクソンは一般的に300ヌクレオチド以下であるから、イントロン内のエクソンに隣接する領域の配列をプライマーとして（イントロンプライマー）、PCR-SSCP分析を直接行うことにより、ほとんどの遺伝子の蛋白質コード領域の突然変異をゲノムDNAを用いて検索することが可能である。

長いDNA断片での感度

我々は以上の諸観点から、特に400-700bpのDNA断片での検出感度と実験条件、について検討した。材料として、Factor IX（X染色体上）に突然変異をもつDNAを用い（Mayo ClinicのS. Sommer博士より得た）、同遺伝子の種々の領域の配列変化の検出の可否を、種々のSSCP条件下で検討した。これらの配列変化と増幅断片の長さ、および実験結果を表2に示す。

表2. PCR-SSCP法の検出感度（長いDNA断片の場合）

EXON	SIZE	No.	Mutation	PAA			MDE	
				5%	5%	7%	0%G	5%G
				0%G	5%G	5%G	0%G	5%G
A	425 bp	1	g → a	-	-	-	-	+
		2	a → g	+	+	+	+	+
		3	G → A	+	-	-	+	-
		4	T → C	+	+	+	+	+
		5	t → g	+	+	+	+	+
B-C	629 bp	1	C → T	-	+	+	-	nd
		2	G → A	-	-	-	-	nd
		3	T → C	-	-	-	-	nd
		4	G → A	-	-	-	-	nd
		5	C → T	-	+	+	-	nd
E	339 bp	1	G → A	+	+	+	+	+
		2	G → C	+	+	+	+	+
		3	G → A	-	+	+	+	+
		4	G → C	+	+	+	-	+
		5	t → a	+	+	+	+	+
F	388 bp	1	a → g	+	+	+	+	+
		2	del of T	+	+	+	+	+
		3	G → A	-	+	+	-	-
		4	C → T	-	+	+	+	-
		5	G → A	+	+	+	+	+
G	525 bp	1	T → C	-	+	+	-	-
		2	G → A	-	+	+	-	-
		3	T → G	+	+	+	+	+
		4	T → C	+	+	+	-	-
		5	del of AC	-	+	+	+	+
H	797bp	1	C → T	-	+	-	+	nd
		2	C → A	-	+	-	-	nd
		3	C → A	-	+	-	-	nd
		4	G → A	-	-	+	+	nd
		5	G → T	-	+	+	-	nd
		6	C → T	-	+	-	+	nd
% detection				42	81	71	55	70

PCR-SSCP法の改良

PCR-SSCP法の原法ではアジオアイソトープを用いており、これを行えるのは、それなりの施設に限

られていた。そこで、より多くの分野での PCR-SSCP 法の応用、たとえば臨床検査等への応用、を目指して、いくつかの非放射性 PCR-SSCP 法が開発された。その一つは蛍光標識したプライマーで PCR を行い、電気泳動とバンドの検出に自動 DNA シークエンサーを用いるものである。この方法は、実験結果が直接コンピュータに入力される、泳動温度を一定に保てる、人手を介する実験ステップが少ないので、多数試料を扱う場合の人為的ミスが少なくなる、等の利点があるが、自動 DNA シークエンサーが非常に高価であるのが欠点である。今一つの非放射性 PCR-SSCP 法として、バンドを銀染色する方法がある。この方法では、染色脱染色の操作の便宜上、小さいゲルを用いるので、検出感度がどの程度であるのか、改めて検討する必要があると思われる。すでにいくつかの遺伝病要因遺伝子の突然変異の検出に有効であることが報告されており、臨床検査等の場で有用であることは確かであるが、未知の突然変異を見つけるのには限界があるであろう。

考 察

PCR-SSCP 法は、種々の遺伝子の突然変異の検出に使われて来ており、それらの経験を総合すると、本法の検出感度は極めて高いと思われる。しかしながら、種々の泳動条件を試みても検出出来ない変異が存在することも事実である。さらに、突然変異を検出しにくい配列と言うものもあるかも知れない。従って PCR-SSCP 法を突然変異が存在しないことの証明に使うことはできない。今後本法はさらに基礎生物学から臨床医学、法医学等幅広い応用がきたいされるが、上記の限界を十分考慮することが望まれる。

参考文献

1. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. et al. (1989), "A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction", *Genomics* 5, 874-879.
2. Hayashi, K. (1991), "PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA", *PCR Methods Applic.* 1, 34-38.
3. Saiki, R., Gelfand, D. H., Stoffel, S. et al., (1988), "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", *Science* 239, 487-491.
4. Hayashi, K., Orita, M., Suzuki, Y. et al. (1989), "Use of labeled primers in polymerase chain reaction (LP-PCR) for a rapid detection of the product" *Nucl. Acids Res.* 17, 3605.
5. Hayashi, K. (1992), "PCR-SSCP: A method for detection of mutations", *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9, 73-70.
6. Makino, R., Sekiya, T. and Hayashi, K., (1992), "Fluorescence-based Single Strand Conformation Polymorphism Analysis", *PCR Methods Applic.* 2, 10-13.
7. Ainsworth, P. J., Surh, L. C. and Coulter-Mackie, M. B. (1991), "Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP): A simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant", *Nucl. Acids Res.* 19, 405-406.
8. Sugano, K., Kyogoku, A., Fukayama, et al., (1993), "Methods in Laboratory Investigations: Rapid and simple detection of c-Ki-ras 2 gene codon 12 mutations by non-radioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis", *Laboratory Investigations* 68, 361-366.

2. 放射線被曝による体細胞突然変異の誘導とその検出

秋山 實利*

Detection of somatic cell mutation induced by radiation exposure in man

Mitoshi Akiyama

Dept. of Radiobiology, Radiation Effects Research Foundation
5-2 Hijiyama-Park, Minami-Ku, Hiroshima, 732, Japan

Abstract

Methods to measure the frequency of somatic mutations using flow cytometry and peripheral blood cells have been developed. Here, we introduce methods by measuring the frequency of somatic mutations in peripheral blood lymphocytes and erythrocytes among atomic-bomb survivors and report their application to radiation-exposed people. The frequency of mutations of erythrocyte glycophorin A (GPA) gene was measured for a total of approximately 700 A-bomb survivors in Hiroshima, and for approximately 350 A-bomb survivors in Nagasaki. The results of measurements revealed a significant dose-response relationship between the frequency of mutants and radiation dose in the two cities. Comparison between the two cities showed that the slope of dose-response relationship for function-loss type (MO or NO) mutants in Nagasaki was approximately 60% of that in Hiroshima.

No significant dose-response relationship in the frequency of lymphocyte T-cell antigen receptor (TCR) gene mutants among A-bomb survivors. However, a significant dose-response relationship was found among recently exposed people. On the other hand, examination of patients who had received radiotherapy revealed that the frequency of these mutants had a good correlation with dicentric aberration. This measurement method was therefore considered to be useful for mass screening.

In both methods, the data obtained from A-bomb survivors or other exposed people will be used as basic data in studies at the time of radiation exposure accident.

*放射線影響研究所 放射線生物学部 (〒732 広島市南区比治山公園5-2)

Furthermore, we will report that 100 Gy X-irradiation of human cultured cells in vitro produced BCR-ABL fusion genes characteristic of human chronic myelogenous leukemia. This seems to be useful as a model to explain the increased risk of leukemia by radiation exposure at the molecular level.

要 旨

フローサイトメトリーと末梢血液細胞を利用した体細胞突然変異頻度 (Mf) の測定が開発されている。ここでは、末梢血液リンパ球および白血球における体細胞突然変異頻度測定法の紹介と放射線被曝者における応用例を示した。2つの方法とも原爆被曝者の調査を行い、放射線被曝者事故時の基礎データとするものである。広島原爆被曝者合計約700名について赤血球 GPA 突然変異頻度の測定をした。また、長崎被曝者については約350名の調査を行った。それらの結果、両市の突然変異体頻度と被曝線量の間には有意な線量効果関係が認められた。両市の比較では、機能喪失型 (MO 又は NO) の線量効果関係の勾配は長崎は広島の約60%であった。

リンパ球 TCR 変異体頻度は、原爆被曝者では有意な線量効果関係は認められなかった。しかし、最近の被曝者で有意な dose response が認められた。一方、この突然変異体頻度は放射線治療を受けた患者についての調査より、2動原体型異常とよい相関を示すことが明らかとなり、この測定法はマスキングには有用な方法と考えられた。

またヒト培養細胞の in vitro 100Gy の X線照射により、ヒト慢性骨髄性白血病 (CML) に特有の BCR-ABL 融合遺伝子が生じることを確認した。これは、放射線被曝による白血病リスクの上昇を分子レベルで説明するモデルとして役立つと思われる。

I. 緒言

放射線は、目に見えないし、体に当たっても痛くもかゆくもなく、放射線もれ事故などの場合、どの位の放射線を被曝したのか分りにくい所がある。また、事故が起こると、少なからぬ不安を社会全体に与えることにもなる。このような場合に、たとえば少量の血液から、その人が受けた放射線の量が推定できれば、今後発症が予想される病気のリスクの推定や必要の解消に役立つ。また逆に、自覚症状はないのに、受けた放射線の量は多いという人も分るので、そのような人については特別に入念な健康調査が可能となる。体細胞遺伝子の突然変異頻度調査はこのような目的には大変良い方法と考えられている。

ところで、放射線被曝事故が発生した場合、それが発電所あるいは研究所の内部にとどまっている場合には、被曝者はそう多くないであろう。従って、たとえば少々手間のかかるリンパ球の染色体調査のような方法でも十分に対処できる。他方、旧ソ連チェルノビル原発事故や、ブラジル ゴイアニアの ^{137}Cs 線原事故の如く、事故が一般人をも巻き込んだ場合、被曝者数は容易に拡大し、とても迅速な対処はできなくなる恐れが出てくる。生物学的線量評価には血液細胞を用いた突然変異測定が現在の時点では最も迅速であることは疑いの余地はない。ところで、この体細胞突然変異測定法は、たとえば放射線被曝により遺伝子に変異が生じてその細胞がただちに突然変異細胞としてあらわれないので、被曝直後の利用には限界がある。しかしながら、実際、事故の全容の把握にはある程度の期間がかかるので多数の検体についての調査方法を確立しておくことは重要なことであろう。

我々はフローサイトメトリーを利用した末梢血リンパ球および赤血球における体細胞突然変異頻度測定

法を確立し、それを用いて、原爆被爆者をはじめ種々の放射線被曝者についての調査を行っている¹⁾。

ここではそのうち赤血球の Glycophorin A (GPA) 遺伝子とリンパ球の T 細胞抗原受容体 (TCR) 遺伝子における突然変異頻度を調査する方法を紹介してその応用例を示す。

赤血球 GPA 遺伝子やリンパ球 TCR 遺伝子における突然変異検出法は、自動化という点では大変すぐれたもので、蛍光標識したモノクローナル抗体により細胞を標識して、フローサイトメーターにより毎秒 1000 個以上の細胞を調査できるという点で大変魅力的である。

染色体異常の解析は、これまで自動化の試みが幾度か試みられたが、いまだ完全なものには至っていない。それは、画像処理の自動化が難しいためであると聞いている。

またヒト培養細胞の *in vitro* 100Gy の X 線照射により、ヒト慢性骨髄性白血病に特有の BCR-ABL 融合遺伝子²⁾ が生ずることを確認した。これは、放射線被曝による白血病の発生リスクの上昇を分子レベルで説明するモデルとして役立つと思われる。

II. 【方法】：

(1) 赤血球 GPA 遺伝子突然変異：MN 式血液型がヘテロであるドナーから末梢血 1 ml を得て測定を行った。方法の詳細は文献³⁾ を参照されたい。概要は GPA の M あるいは N の遺伝子産物に特異的なモノクローナル抗体を異なる蛍光色素で標識し、どちらか一方の蛍光抗体の結合しなくなった赤血球の頻度を求めるものである。

(2) リンパ球 TCR 遺伝子突然変異検出法：方法の主旨は、赤血球 GPA 法と同じである。即ち、正常の成熟 T リンパ球の膜表面にはあまねく存在しているはずの TCR 遺伝子産物が突然変異により発現しなくなった細胞を蛍光標識モノクローナル抗体によって検出する。赤血球 GPA 法と異なるのは TCR 遺伝子産物は膜に発現するためには CD3 分子と複合体をつくる必要があるので、この点に着目し、CD3 に対する抗体を用いて間接的に TCR 遺伝子産物の発現喪失を測定する点である。具体的には、PE で標識した抗 CD3 抗体と FITC で標識した抗 CD4 抗体で 2 重染色し、CD4⁺ であって CD3⁻ の細胞の頻度を測定する⁴⁾。

(3) BCR-ABL 転座の誘発：ヒト白血病由来 HL60 細胞に 100Gy の X 線を照射し、48 時間培養後、RNA を抽出した。この RNA に逆転写酵素をはたらかせて cDNA とし、BCR および ABL 特異的なプライマーを用いて PCR 増幅を行った。CML 由来細胞 (K562) の RNA を陽性対照群として、系の動くことを確認した。すなわち、10⁶ 個の正常細胞中に 1 個の K562 細胞が存在していても、BCR-ABL 融合 mRNA の存在を検出し得る²⁾。

【結果】：

(1) 赤血球 GPA 突然変異：広島原爆被爆者約 700 名の結果は、MO 型に関しては $Mf(x10^{-6}) = 26.5 + 21.5D$ 、NO 型 $Mf = 24.6 + 27.2D$ 、MM 型 $Mf = 20.5 + 7.4D$ (D は Gy 単位) となった (図 1、2)。長崎については約 300 名についての調査を行ったが (図 3)、その欠失型の勾配は、広島の約 60% であった。

(2) リンパ球における TCR 突然変異：健常人における調査では突然変異頻度は 10⁻⁴ のオーダーであることが分かっている⁵⁾。TCR 遺伝子は常染色体におりながらそのような高い頻度を示す理由は、常染色体上に 1 対存在する TCR 遺伝子のうちの一方は不活性化しており、細胞当たり一つの TCR 遺伝子しか発現していないためである。したがって、X 染色体上の遺伝子と同様、機能している TCR 遺伝子に生じた一つの突然変異によって細胞の表現型が変化する。他方、CD3 遺伝子は常染色体上にあり細胞当たり二つ

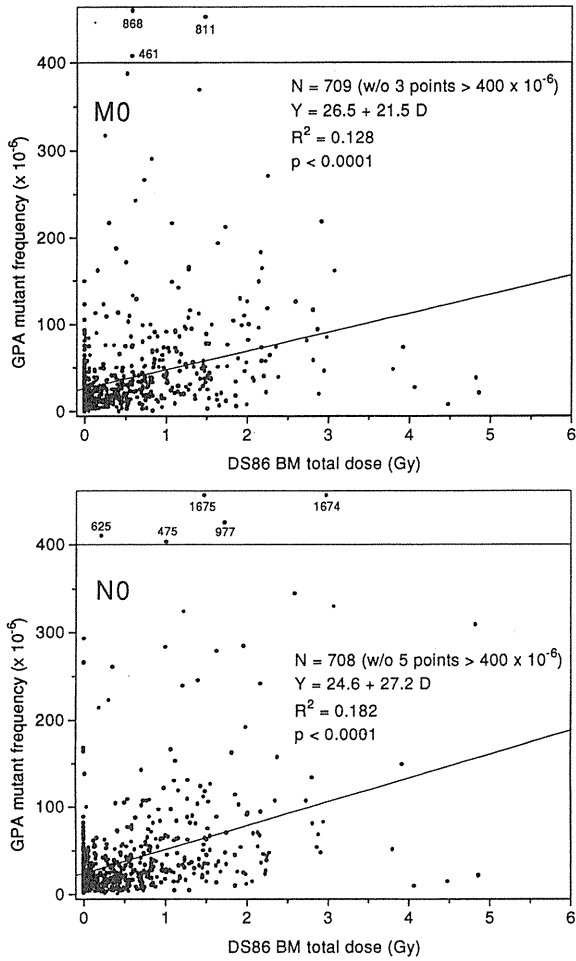


Figure 1: Relationship between the frequency of erythrocyte GPA mutants and bone marrow dose among A-bomb survivors in Hiroshima. The results for the NO-type are shown on the upper panel and results for the MO-type on the lower panel.

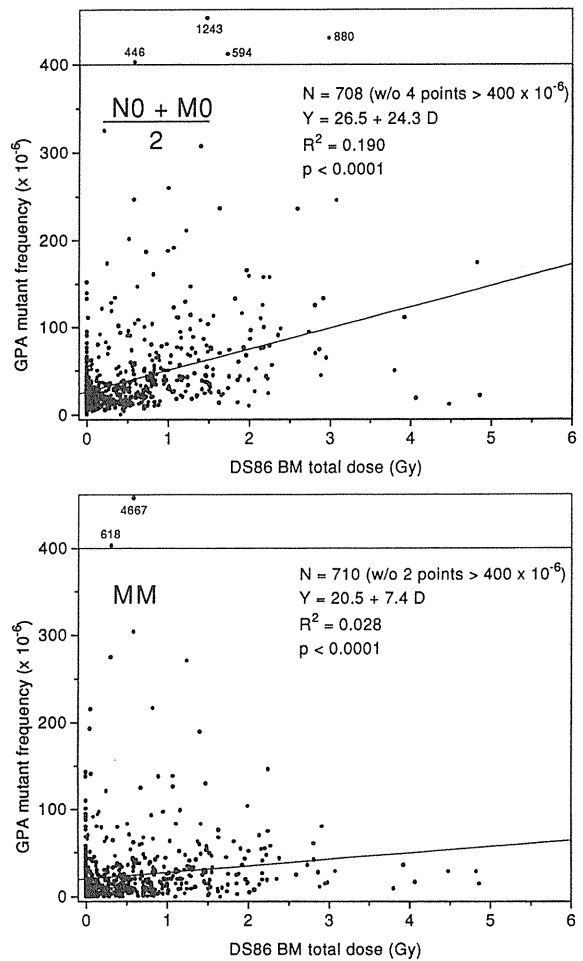


Figure 2: Summary of erythrocyte GPA frequency among A-bomb survivors in Hiroshima. The mean value for the gene-function loss type is shown on the upper panel and for the somatic recombination type mutants on the lower panel.

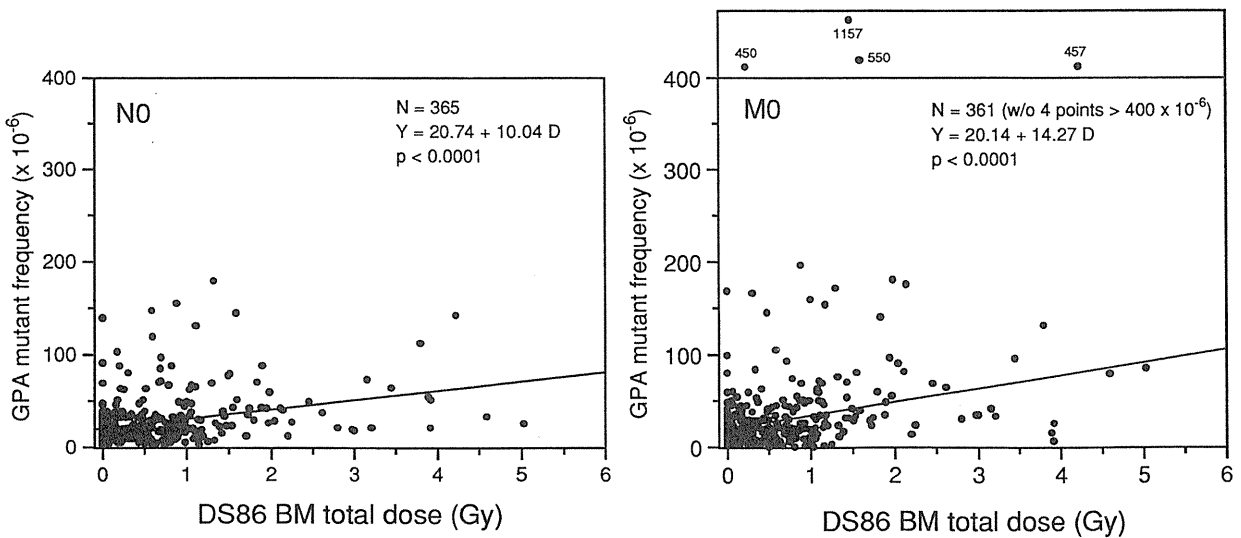


Figure 3: Relationship between the frequency of erythrocyte GPA mutants and bone marrow dose among A-bomb survivors in Nagasaki.

の遺伝子が発現している。したがって、CD3 遺伝子に生じた異常が原因で細胞が CD3⁻ になるためには両方の遺伝子に変異を生じることが必要で、その確率は大変低い。原爆被爆者約500名における TCR 変異体頻度調査 (1988~1992) では有意な dose response は得られなかったが (図 4)、最近の被爆者である ¹³¹I 治療甲状腺癌患者 (図 5) や約50年前にトトロラスト造影剤を注入され、今日でも持続的にアルファ線線の被曝を受けているトトロラスト症患者 (図 6) では放射線被曝量の増加に比例して TCR 変異体頻度は有意に増加していた。そこで、子宮癌のため ⁶⁰Co の放射線治療 (約50~60Gy の局所照射) を受けた患者について TCR 突然変異あるいは染色体異常頻度が治療後の年数と共に、どう変化するかを調べた。治療年数は同じでも TCR 変異体頻度、染色体異常頻度には大きな個人間の差異が認められた (図 7 a、b)。しかしながら、両者の関係には大変よい相関が認められた (図 7 c)。

(3) in vitro BCR - ABL 融合遺伝子の誘発 : 100Gy の X線 を照射した合計 10⁸ 個の生存 HL60細胞 (dye

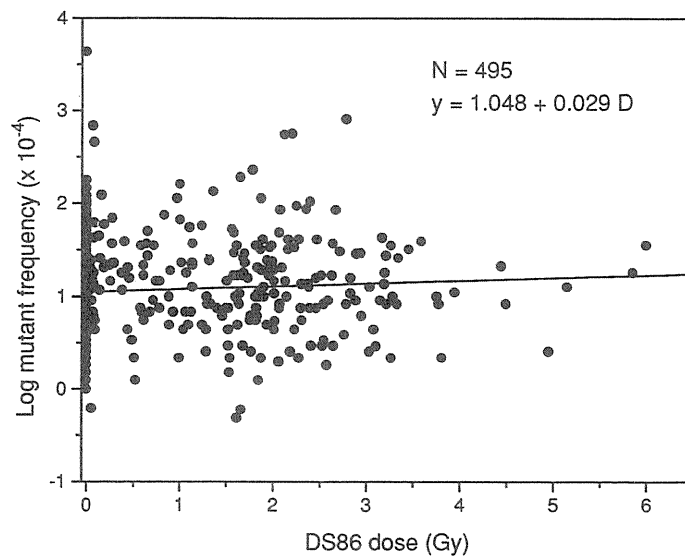


Figure 4: Relationship between the frequency of lymphocyte TCR mutants and DS86 kerma dose among A-bomb survivors in Hiroshima.

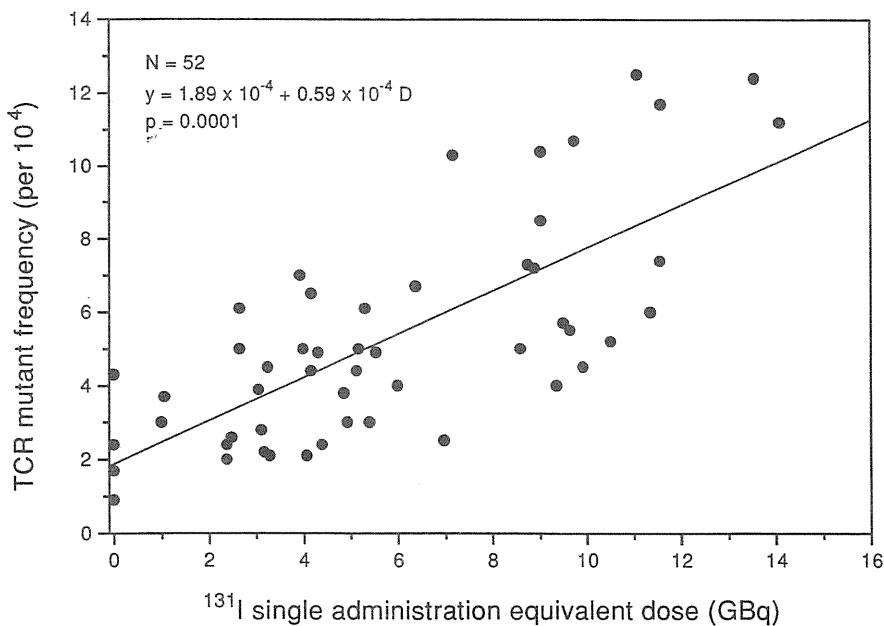


Figure 5: Frequency of TCR mutants among ¹³¹I-treated thyroid cancer patients.

exclusion 法による) から RNA を抽出し、逆転写 PCR 法による検索を行った。その結果、5 例の BCR-ABL 融合 mRNA を検出した。塩基配列を調べた結果、これらは 5 種類の互いに異なる融合産物であることが明らかになった (図 8)。用いた X 線の線量が 100Gy という超致死線量であるとはいえ、この結果は放射線の照射によって少なくとも CML に固有の遺伝子変化が生じることをはじめて示したものである²⁾。

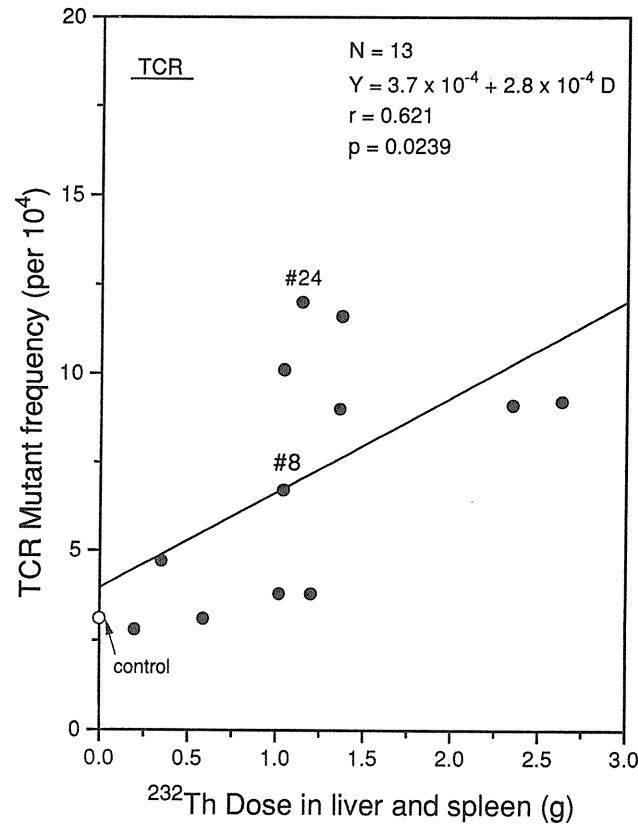


Figure 6: Frequency of lymphocyte TCR mutants among Thorotrast-affected patients.

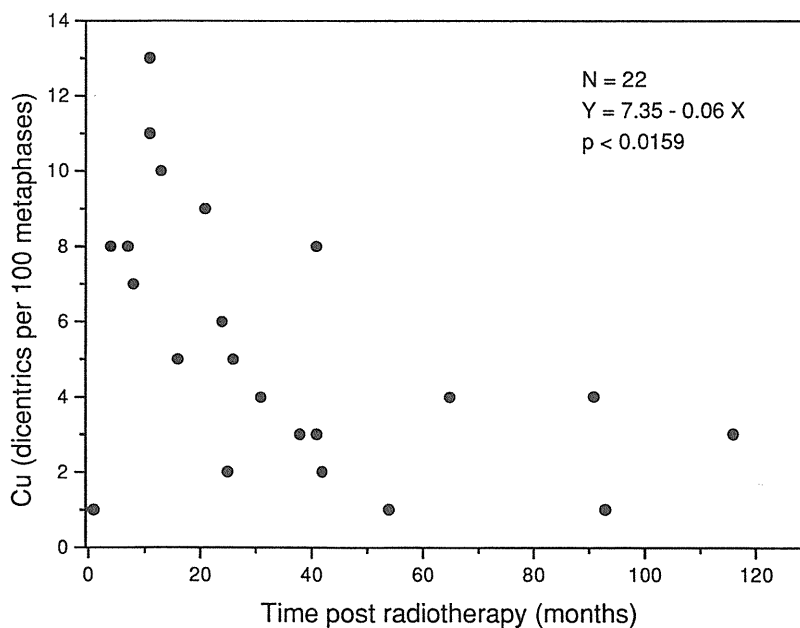


図 7 a

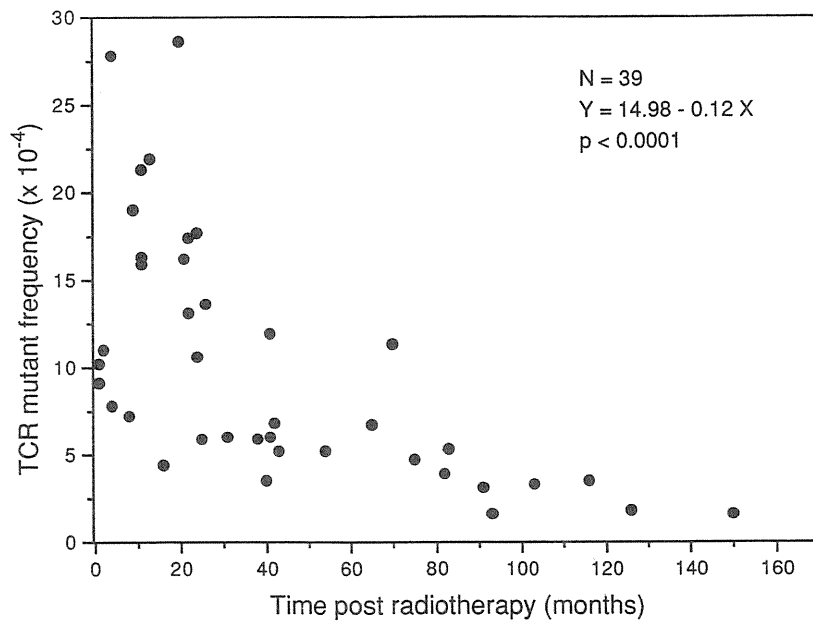


図 7 b

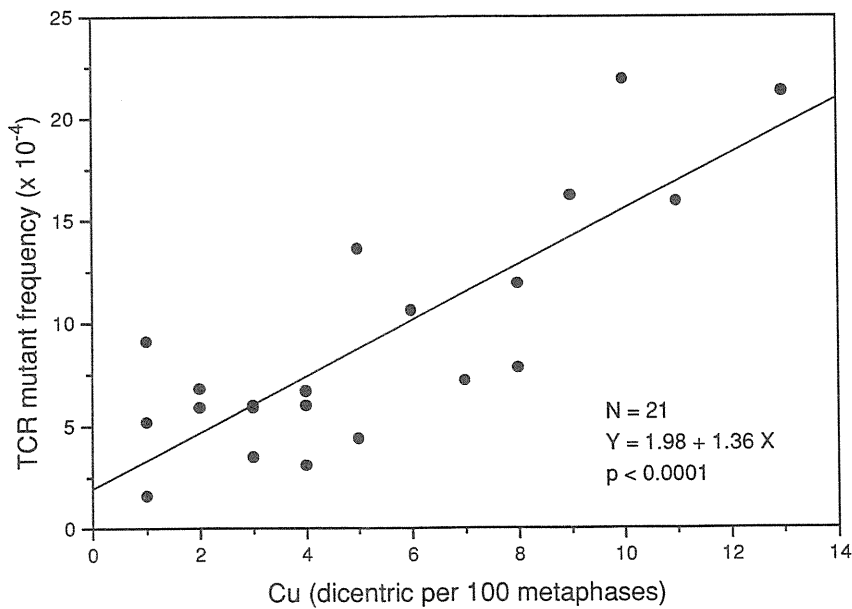


図 7 c

Figure 7: Relationship between somatic mutation in lymphocytes derived from uterus cancer patients who had received radiotherapy and lapse of years after treatment. (a) Frequency of dicentric aberrations, (b) frequency of TCR mutants, and (c) relationship between the frequency of dicentric aberrations and the frequency of TCR mutants.

III. [考察]

フローサイトメトリーとヒト末梢血リンパ球及び赤血球を使用した生物学的な線量推定方法はこれまでいくつか報告してきた¹⁾。これらのうち赤血球 GPA および Tリンパ球 TCR 突然変異頻度測定法について紹介した。

赤血球 GPA 法による Mf は安定型の染色体異常頻度と有意の相関を示し、原爆放射線線量とも有意の

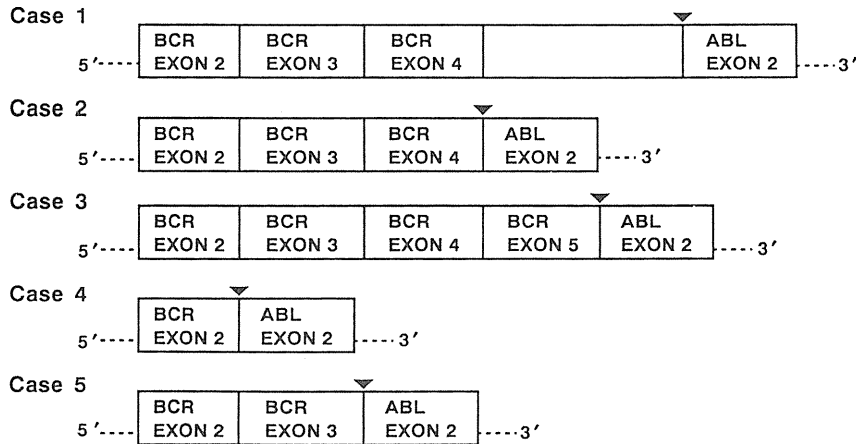


Figure 8: BCR-ABL fusion genes detected after 100 Gy X-irradiation. Construction of the induced BCR-ABL fusion genes was shown. The blank indicates an unknown sequence. The arrowheads indicate junction sites. These five BCR-ABL fusion genes were different from each other and contained not only CML-specific fusion genes, as in cases 4 and 5, but also other types of fusion genes, as in 1, 2, and 3.

相関が示された。これらのことは生涯に亘る被曝線量のモニタリングにこの方法が適していることを示すものである。ところで、広島と長崎の両市において、Mfの dose response curve の slope に差が認められる。ひとつは両市の被曝線量推定に関する何らかの根本的問題で、染色体異常についても広島被爆者の回帰線が長崎のそれよりも上にくることと軌を同じくしている。もう一つの可能性は周知の如く広島型原爆はウラン爆弾で長崎型プルトニウム爆弾よりも中性子線の寄与が大きかったことである。確かにT65D と比べれば、DS86による線量評価は、広島の中性子線の寄与の割合は大変すくなくなりはした。しかし、その妥当性については現在も議論が続いていることであり、可能性は完全に否定されてはいない。

リンパ球 TCR 法による Mf は半減期は約 2 年と考えられている⁶⁾。このため原爆被爆者における Mf は約 50 年前の影響を検査しているため有意の dose response を示さなかったと考えられる。しかしながら最近の被爆者における Mf は有意な dose response 関係を示し、更に子宮癌の放射線治療を受けた患者の TCR 突然変異あるいは染色体異常頻度は治療後年数は同じでも大きな個人間の差異が認められたが、両者の間には大変よい相関が認められた。従って、これらの個人差は、測定の誤差に起因するものではなくて、恐らく生物学的な原因にもとづくものと思われる。その理由は現在の所は明らかではない。

X線による治療を受けた強直性脊髄炎患者に関する染色体異常のデータによると、治療後の年数と共に、不安定型異常頻度は減少するが、それらの異常にはほとんどの場合、無動原体断片が共存している⁷⁾。従って、リンパ球の大半は分裂をしないまま、ある速度で新しいリンパ球によって置き換えられていることを示している。T細胞受容体 (TCR) はTリンパ球の増殖に関して重要な働きをされると考えられているが、もしも大半のTリンパ球が in vivo では分裂しないとすれば、TCR 突然変異細胞といえども、必ずしも負の淘汰は受けないだろう。従って、これらは不安定型染色体異常を持つ細胞と同じ速度で、末梢のリンパ球プールから排除されていくと考えることは、理にかなっていると思われる。このことは、Tリンパ球の TCR 突然変異は、不安定型染色体異常と同等の価値を持つと考えてよいことを示している。実際の頻度の測定に必要な時間から言えば、フローサイトメーターを用いた TCR 変異体頻度測定には、採血後わずか数時間しかかからないという優れた特徴がある。従って、これは不安定型染色体異常では困難が予想さ

れる大集団の迅速なスクリーニングに適したものと言えるだろう。他方、この TCR 変異体は、放射線被曝後、数カ月間を経てはじめて突然変異頻度がピークに達するので、その期間の間は推定線量の過小評価が生じるという短所がある。状況によって、染色体異常と TCR 変異体を使い分けられることが望ましいだろう。

次に *in vitro* BCR-ABL 融合遺伝子の誘発について。

使用した X 線の線量が 100Gy という super lethal dose であるとはいえ、この結果は放射線の照射によって少なくとも CML 患者リンパ球に特徴的な遺伝子変化が生じることをはじめて示したものである。大変興味深いことには、実際に CML 患者において検出されるもの（図 8、例 4 と 5）だけでなく、BCR exon 4 又は 5 と ABL exon 2 が融合したもの（例 2 と 3）および BCR exon 4 のあとに由来不明の DNA 断片が挿入されたもの（例 1）が同定された。これら、CML 患者ではみられないタイプのものは、たとえ体内で生じたとしても読み枠が正しく保たれないか、あるいは、ABL 遺伝子産物の活性化に結びつかないのではないかと考えられる。

今回の結果は、100Gy という大変高い線量を急照射した細胞についてのものであるので、これを低線量域に外挿するためには、少なくとも線量効果関係を明らかにする必要がある。DNA 2 重鎖切断の数は、放射線量に単純比例するという報告と、線量の 2 乗に比例するという報告の両方が存在する。しかし、Chadwick と Leenhouts⁸⁾ は、Dugle ら⁹⁾ の研究が最も確かではないかと述べ、後者の仮説を示唆している。もしそうだとすると、1 Gy 当たりの BCR-ABL 転座誘発率は 100Gy 照射の場合のおおむね 1 万分の 1 ($1/100 \times 1/100$) ということになる。この点に関しては今後更に検討を重ねる必要がある。

参考文献

1. Akiyama, M. Kusunoki, Y. Umeki, S. Hirai, Y. Nakamura, N. and Kyoizumi, S.: Evaluation of four somatic mutation assays as biological dosimeter in humans. W. C. Dewey, M. Edington, R. J. M. Fry, E. J. Hall and G. F. Whitmore ed., Radiation Research: A Twentieth-Century Perspective Vol. II. Academic Press. New York, 1992, pp177-182.
2. Ito, T. Seyama, T. Mizuno, T. Hayashi, T. Iwamoto, S. K. Dohi, K. Nakamura, N. and Akiyama, M.: Induction of BCR-ABL fusion genes by *in vitro* X-irradiation. Jpn. J. Cancer Res., 84: 105-109, 1993.
3. Kyoizumi, S. Nakamura, N. Hakoda, M. Awa, A. A. Jensen, R. H. and Akiyama, M.: Detection of somatic mutations at the glycophorin A in erythrocytes of atomic bomb survivors using a single beam flow sorter. Cancer Res., 49: 581-598, 1989.
4. Kyoizumi, S. Akiyama, M. Hirai, Y. Kusunoki, Y. Tanabe, Y. and Umeki, S.: Spontaneous loss and alteration of antigen receptor expression in mature CD4⁺ T cells. J. Exp. Med., 171: 1982-1999, 1990.
5. Kyoizumi, S. Umeki, S. Akiyama, M. Hirai, Y. Kusunoki, Y. Nakamura, N. Endoh, K. Konishi, J. Sasaki, M. S. Mori, T. Fujita, S. and Cologne, J. B.: Frequency of mutant T lymphocytes defective in the expression of the T cell antigen receptor gene among radiation exposed people. Mutation Res., 265: 173-180, 1992.
6. Umeki, S. Kyoizumi, S. Kusunoki, Y. Nakamura, N. Sasaki, M. S. Mori, T. Ishikawa, Y. Cologne, J. B. and Akiyama, M.: Flow cytometric measurement of somatic mutation in Thorotrast patients. Jpn. J. Cancer Res., 82: 1349-1353, 1991.

7. Buckton, K. E. Smith, P. G. and Brown, W. M. C.: The estimation of lymphocyte lifespan from studies on males treated with X-rays for ankylosing spondylities. In "Hman radiation cytogenetics Eds by HJ Evans, WMC Brown and AS Mclean. North Holland Publishing Co. 1967, pp106-114.
8. Chadwick, K. H. and Leenhouts, H. P.: The molecular theory of radiation biology. Springer Verlag, 1981.
9. Dugle, D. Gillespie, C. J. Chapman, J. D.: DNA strand breaks, repair and survival in X-irradiation mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. UAS., 73: 809-812, 1976.

3. 原爆被爆者の子供の反復配列突然変異

佐藤千代子*、小平美江子*

Mutations detected in the repetitive sequences in the children of the atomic bomb survivors

Chiyoko Satoh, Mieko Kodaira

Department of Genetics, Radiation Effects Research Foundation

5-2 Hijiyama Park, Minami-ku, Hiroshima, 732 Japan

Abstract

We have been examining the genetic effects of radiation in the children of the atomic bomb survivors. In a pilot study to compare various types of DNA as potential targets for the detection of germinal mutations, 50 exposed families including 64 children and 50 control families with 60 children were examined for trinucleotide repeat expansion mutations at 3 loci and mutations at 6 minisatellite loci. In the exposed families, both parents were exposed in a single family and one parent was exposed in 49 families. Average dose of the 51 exposed parents was 1.8 Sv. By examining a total of 124 children from the 100 families, 65 germ cells derived from the exposed parents and 183 germ cells from the non-exposed parents were examined. These families are subsamples of 1,000 families for which cell lines are being established for the future study.

The trinucleotide repeat expansions in genes of certain human genetic diseases show remarkable variation both within the cells of a single individual and among affected members of a single family which have been interpreted as mitotic and meiotic instability, respectively. We examined the regions with triplet repeats in the *FMR-1*, *AR* and *DM* genes causative for fragile X syndrome, spinobulbar muscular atrophy and myotonic dystrophy, respectively. No mutations were detected in a total of 177 regions derived from 65 germ cells from the exposed parents and 443 regions from 183 germ cells from the non-exposed parents. No effects on the instability of the triplet repeats in the germ cells derived from exposed or unexposed in-

*放射線影響研究所・遺伝学部（広島市南区比治山公園5-2）

dividuals were observed.

In the examinations of the 6 minisatellite loci of *Pc-1*, *λTM-18*, *ChdTC-15*, *pλg3*, *λMS-1*, and *CEB-1*, we detected single mutations at each of the *pλg3* and *λMS-1*, and 4 mutations at the *CEB-1* locus which had occurred in the 65 gametes in the exposed parents. Thus, mutation rates per gamete at the *pλg3*, *λMS-1* and *CEB-1* were 1.5%, 1.5% and 6.2%, respectively. On the other hand, mutations in these 3 loci in the 183 gametes from non-exposed parents were 0, 11 and 11, respectively, that is, the mutation rates per gamete were 0%, 6.0% and 6.0%, respectively. No significant difference was observed in the mutation rate at each of the 3 loci between the 2 groups of parents. These preliminary results suggest that A-bomb exposure seems not to affect the germline instability at these 3 loci.

1. 緒言

原爆放射線の遺伝的影響については、当研究所において40年以上にわたり広範な研究が行われてきた。異常妊娠終結頻度（流産、奇形の頻度）^{1,2)}、被爆者の子供の死亡率³⁾、悪性腫瘍頻度⁴⁾等に関する疫学的調査、および染色体調査⁵⁾、蛋白質レベルで突然変異を検出する遺伝生化学調査⁶⁾等が行なわれたが、何れの指標を用いた場合にも、被爆群と対照群に検出された異常の頻度に統計的有意差は認められなかった。核エネルギーが利用され、医療用放射線の使用も多い現代においては、放射線の遺伝的影響の解明は益々重要である。この重要性にかんがみ、被爆者の子供に対するDNAレベルの遺伝生化学調査が開始された。調査に必要なDNA試料を確保するために、父-母-子から成る1,000家族から、B-リンパ球の永久細胞株を作製するプロジェクトが開始された。500家族は被爆群であり、両親または片親の被曝線量が0.01Gy以上の家族が選ばれた。500家族は対照群で、両親は非被曝または線量が0.01Gy未満である。現在、合計約850家族については細胞株が樹立されている。

高い効率で突然変異を検出するために最適の技法を選び、放射線誘発突然変異の検出に適したターゲットは何であるかを検討する目的で、“ヒト生殖細胞突然変異に関するワークショップ”⁷⁾が、1991年11月、当研究所において開催された。日米英の研究者の活発な討論の後、「放射線誘発突然変異に対し、感受性の高い遺伝子は未だ発見されていないことを考慮し、種々のタイプのDNAを検査して、生殖細胞突然変異検出に適した標的配列を選定するための試行調査を開始すべきである」という勧告がなされた。この試行調査には、細胞株を作製中の1,000家族の中から被爆群50家族と、対照群50家族を選んで用いるべきことも、同時に勧告された。この勧告に従って、1992年より試行調査が開始され、機能を持つ単一コピーのDNA配列ばかりでなく、機能は持たないが、領域によっては高い自然突然変異率の検出されている、数種の反復配列の検査も行われている。

最近明らかにされたトリヌクレオチド反復数の増幅という突然変異は、ヒトのみに検出された全く新しいタイプの遺伝子変異であり、脆弱X症候群⁸⁻¹⁰⁾、筋緊張性ジストロフィー症^{11,12)}、ハンチントン病¹³⁾等の遺伝病の原因となっている。これら遺伝病においては、原因遺伝子のエクソン中に存在するトリヌクレオチド（CGG, CTG, CAG または GCC¹⁴⁾）の反復数が異常に増大しており、その反復数は同一個人の細胞間、患者家族の成員間においても異なるほどの多様性を示す^{15,16)}。この多様性は、体細胞分裂および減数分裂における不安定性によるものと説明されているが、増幅のメカニズムは解明されていない。従って、原爆放射線が生殖細胞において、これらトリヌクレオチド反復配列の不安定性に影響を与えたか否かを知

ることは重要である。

ミニサテライト¹⁷⁾はVNTR^{18, 19)}とも呼ばれ、一定の塩基配列が十数個から数十個繰り返して並ぶ領域であり、ヒトやマウスのゲノム中に多数分散して存在する。数種のミニサテライトでは、個体間の反復数の変化が非常に多く、多数の対立遺伝子が検出されており、家系調査を行ったところ、生殖細胞突然変異が非常に高かったことが報告されている²⁰⁾。また、マウスミニサテライトで、Pc-1と呼ぶプローブ^{21, 22)}で検出される領域 (Ms6-hm と呼ぶプローブ²³⁾で検出されるものと同一の領域) では、生殖細胞突然変異率が約10%を示すほど高いこと、ヒトゲノム中にも Pc-1で検出されるミニサテライトの存在することが報告されている。これらのミニサテライトの不安定性は、生殖細胞における放射線の影響を明らかにする上で、有用なマーカーとなる可能性がある。

これらを考慮し、本稿では、脆弱X症候群、球脊髄筋萎縮症²⁴⁾、筋緊張性ジストロフィー症の原因遺伝子の *FMR-1*、*AR*、*DM* (*FMR-1*、*AR*はX染色体上に、*DM*は19番染色体上にある) 中に存在するトリヌクレオチド反復配列と、Pc-1で検出される領域を含む6種のミニサテライトに関して行われた突然変異検出スクリーニングの結果を述べる。

2. 試料と方法

1) 対象家族とDNA試料

検査した100家族は、先に述べた1,000家族の一部であり、各々の家族のメンバーについて、末梢Bリンパ球から、Epstein-Barr virus によるトランスフォーメーションを用いて、永久細胞株が作製されている。また、無処理のリンパ球および顆粒球も液体窒素中に保存されている。被曝50家族のうち、1家族では両親ともに被曝しており、子供は1人である。残る49家族では、片親のみの被曝で、子供は63人いる。合計51人の被曝した親の平均線量は、1.8Sv (RBE=20) である。対照50家族には子供が60人いる。この試行調査では、合計100家族の子供124人を検査することにより、被曝した親に由来する65個の生殖細胞と、非被曝の親に由来する183個の生殖細胞を検査することになる。

DNA サンプルは、細胞株または末梢リンパ球、顆粒球の細胞核から抽出した²⁵⁾。スクリーニングには細胞株から抽出したDNAを用いたが、突然変異と考えられる変異が検出された場合は、その家族全員について、無処理のリンパ球または顆粒球から得たDNAを用いて検査を行い、生殖細胞中に生じた突然変異か否かを確認した。

2) トリヌクレオチド反復配列数の検査

*FMR-1*のトリプレット反復数の検出には、Kremerら²⁶⁾のプライマーを一部改変したものをを用いた。上流プライマーは5'-GCGCTCAGCTCCGTTTCG-3'、下流側プライマーは、5'-TCCTCCATC-TTCTCTTCAGCC-3'であった。このプライマーセットをもちいると、CGGの反復数が16の時、PCRで増幅される領域は248bpとなる。12.5 μ lのPCR反応液は、50-150ngのゲノムDNAと、0.3unitのAmpliQ DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus) を含む10mMトリス (pH8.3) 緩衝液で、ジメチルスルフォキシド (DMSO) 10%を含み、50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, プライマー濃度は各々 0.5 μ M, dNTP (dATP, dCTP, TTP, 7-deaza-2'-dGTP) 濃度は各々200 μ M, α -³²P-dCTP 2 μ Ci (1 Ci=37 GBq) とゼラチンを100 μ g/mlの割合に含むものであった。ゲノムDNAを、95 $^{\circ}$ C 10分間の加熱で変性させた後、PCRは27サイクル (変性は95 $^{\circ}$ C 30秒、ハイブリダイゼーションは55 $^{\circ}$ C 90秒、DNA鎖延長は

72°C 60秒) を行い、最終サイクルにおいては72°Cの加熱を、7分間延長した。等量の変性剤を加え、5分間沸騰水浴中で加熱後、氷水中で急冷し、直ちに、シークエンス用ポリアクリルアミドゲル (T=6%) で18時間電気泳動を行った。オートラジオグラフィーを行い、同時に泳動した M13シークエンスラダーのバンドの位置と、PCR産物のバンドの位置を比較して、CGGトリプレット反復数を推定した。

ARのCAG反復数の検出に用いた上流側プライマーは、Spadaら²⁴⁾のものと同一で、5'-TC-CAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3'、下流側プライマーは、5'-CAGGACCAGGTAGCCTGTGG-3'であった。このプライマーセットをもちいると反復数が16の時、増幅される領域は245bpとなる。この領域の増幅に用いたPCR反応液とFMR-1のCGG反復領域に用いたPCR反応液との差は、プライマーセット以外ではDMSOを含まず、7-deaza-2'-dGTPでなくdGTPを用いたことである。PCRは25サイクル(95°C 30秒、63°C 90秒、72°C 60秒)行った。

DMのCTG反復数の検出には、Fuら¹¹⁾と同一のプライマーセットを用いた。このセットを用いると反復数5の時、78bpのPCR産物が生じる。PCR反応液の組成は、プライマーセット以外はARのCAG反復領域増幅に用いたものと同じで、反応条件も同一であった。PCR産物の長さは、M13シークエンス用ラダーとの比較によって推定したが、78bpのPCR産物(反復数5)、99bpのPCR産物(反復数12)については、サイクルシークエンス法によって実際に反復数を確認した。

3) ミニサテライトプローブ

5種類の人由来ミニサテライトプローブのλTM-18²⁷⁾、ChdTC-15²⁸⁾、λg3²⁹⁾ λMS-1²⁰⁾、CEB-1³⁰⁾と、マウス由来のPc-1プローブ²¹⁾を生殖細胞突然変異検出の目的で用いた。各々のプローブで、単一ミニサテライト領域中の長さの異なる対立遺伝子が検出される。Pc-1、λTM-18、ChdTC-15は木南博士から、λMS-1はJeffrey博士から、CEB-1はVergnaud博士から供与された。pλg3はJeffreyら²⁹⁾の方法でPCR法で増幅して作った。DNAフィンガープリント用プローブ33.6と33.15¹⁷⁾の核を成す領域を含む多座位検出用プローブ6.3と15.1.11.4は、Jeffrey博士から供与された。子供に突然変異が検出された家族において、その両親が子供にとって真に生物学的な親であることを確認するための検査に使用した。

4) サザンブロット分析

DNA 10μgをHinfI (New England Biolabs)で消化後、25cmの長さの1%アガロースゲル上で泳動した後、ニトロセルロースフィルターにトランスファーした。プローブはマルチプライムラベルシステム(Amersham)を用い、α-³²P-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml; 1 Ci=37 GBq)でラベルした。フィルター上のバンドとハイブリダイズさせた後、65°Cで0.5×SSCを用いて3度フィルターを洗った後、Dupon Gronex HI-Plut増感スクリーンとフジX-線フィルムを用いてオートラジオグラフィーを行った。フィルターは、次々と6種のプローブを用いてハイブリダイズした。突然変異と思われるバンドが検出された時には、家族全員のDNAを、AluIまたはMboI (CEB-1プローブで検出される領域の場合)で消化し、反復数の変異を確認した。

3. 結果

1) トリヌクレオチド反復配列数

X-染色体上の遺伝子FMR-1のCGGトリヌクレオチド反復配列、AR遺伝子のCAGトリヌクレオ

チド反復配列および常染色体上の *DM* 遺伝子の CTG トリヌクレオチド反復配列に関し、被曝50家族の両親50組と子供64人、対照50家族の両親50組と子供60人を検査した。被曝した親の65個の生殖細胞に由来する遺伝子のうち、トリヌクレオチド反復配列を含む177領域を検査したことになるが、突然変異は検出されなかった。一方、非被曝親の183個の生殖細胞に由来する、443遺伝子領域にもトリヌクレオチド反復配列数を変化させる突然変異は検出されなかった。

表1. 100人の母親中の *FMR-1*、*AR* 遺伝子、200人の両親中の *DM* 遺伝子に検出された対立遺伝子数、トリヌクレオチド反復数、ヘテロザイゴシティ

	対立遺伝子数	トリヌクレオチド 反復数	ヘテロザイゴシティ
<i>FMR-1</i>	22	9-46	0.73
<i>AR</i>	15	15-38	0.90
<i>DM</i>	21	5-31	0.86

FMR-1、*AR* に関して母親100人、*DM* に関しては両親200人中における対立遺伝子数、対立遺伝子中のトリヌクレオチド反復数、ヘテロザイゴシティを計測し、表1にまとめた。*FMR-1*、*AR* に関し、100人の母親に検出された対立遺伝子数は各々22と15であった。反復数は各々9-46、15-38の範囲内であった。父親にのみ検出された対立遺伝子と、トリプレット反復数を加えると、検査した両親200人中の *FMR-1* の対立遺伝子数は24となるが、反復数の最大最小値には変化無く、*AR* の対立遺伝子数は18、反復数の最大値は40となった。*DM* で検出された対立遺伝子数は21、反復数は5-31の範囲内であった。*FMR-1*、*AR*、*DM* 領域において、ヘテロザイゴシティは0.73、0.90、0.86であったので、全例において、子供の対立遺伝子が母親由来か父親由来かを知ることが可能であった。

2) ミニサテライト

反復配列内を切断しない制限酵素 *HinfI* により DNA を消化後、サザンプロット法による分析を行い、家族成員に検出されたバンドの長さを比較した。表2に示されたように、6種のミニサテライト領域におけるヘテロザイゴシティは、何れも高く、子供の示したバンドが両親のどのバンドに由来するかを明らかにすることができた。子供に、突然変異による新しい対立遺伝子のバンドと思われるものを検出した場合は、*AluI* または *MboI* を用いて、再度サザンプロット分析を行った。

図1には、 λ MS-1 プローブを使って行われた、2家族の検査結果を示した。0693という家族の娘には、母親と同一長のバンドは検出されたが、被曝した父親と同じ長さのバンドは観察されなかった。矢印で示したバンドは、父親の約9 kbのバンドよりも僅かに長く、父親の一方の対立遺伝子に生じた反復数を増加させる突然変異の結果と考えられる。0883家族の息子の2本のバンドは、非被曝の両親の示した4本のバンドとは長さが異なり、両親の配偶子の各々に突然変異が生じたものと考えられる。

図2には、CEB-1 プローブを用いた突然変異検出例を示した。0716という家族の息子の、矢印で示したバンドは、非被曝の父親の2個の対立遺伝子の何れかの一方に生じた、反復数の減少する突然変異に由来するものと考えられる。0546家族の2番目の息子には、被曝した父親に生じた反復数の増加する突然

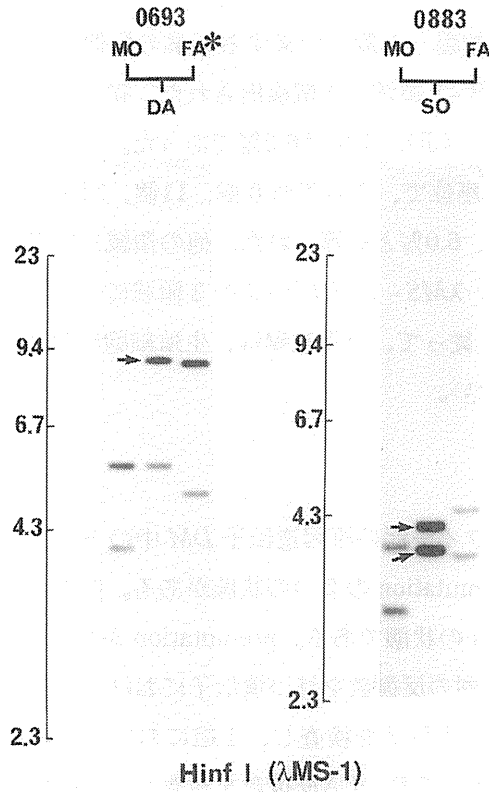


図1: λ MS-1プローブで検出された、対立遺伝子の長さを変化させる突然変異

0693、0883は家族の認識番号を示す。矢印を付したバンドは、突然変異によって生じたものである。バンドの左側の数字は、使用したマーカーの位置と長さ (kb) を表す。

*は、被曝親を示す。

DNAは *Hinf*I で消化後、サザンプロット分析を行った。MO、DA、SO、FAは、各々母、娘、息子、父を表す。

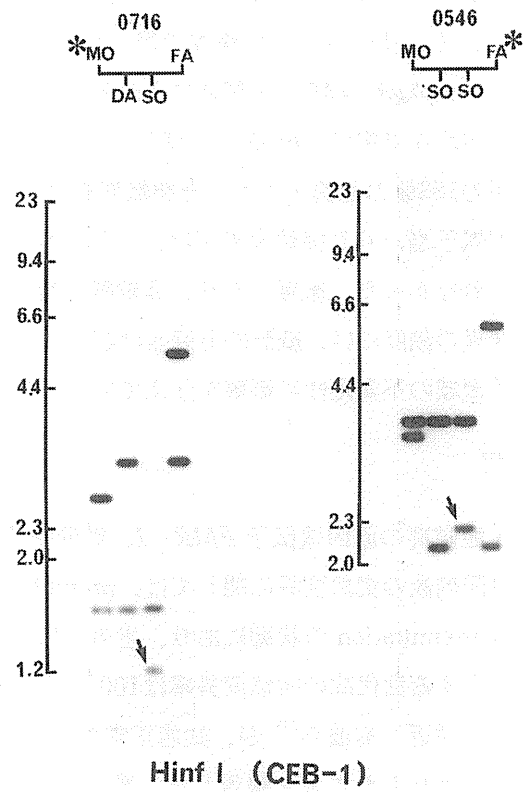


図2: CEB-1プローブで検出された突然変異

0716、0546は家族の認識番号である。他の説明は全て図1と同じである。

表2. 6種のミニサテライト領域のヘテロザイゴシティ及び被曝した親、非被曝の親に検出された突然変異の頻度

ミニサテライト	ヘテロザイゴシティ	被曝した親 突然変異/配偶子	非被曝の親 突然変異/配偶子	両群の親 突然変異/配偶子
<i>Pc-1</i>	70	-	-	0/248
λ TM-18	77	-	-	0/248
<i>ChdTC-15</i>	95	-	-	0/248
<i>p</i> λ g3	92	1/65 (1.5%)	0/183 (0%)	1/248 (0.4%)
λ MS-1	97	1/65 (1.5%)	11/183 (6.0%)	12/248 (4.8%)
<i>CEB-1</i>	97	4/65 (6.2%)	11/183 (6.0%)	15*/248 (6.0%)

*突然変異は、全て父親の生殖細胞に由来

変異に由来すると考えられるバンドが検出された。

表2に、ミニサテライトの検査で得た結果をまとめた。被曝した親に由来する65個の配偶子に生じた突然変異が、 $p\lambda g3$ 、 $\lambda MS-1$ 領域にそれぞれ1個ずつ、 $CEB-1$ 領域に4個検出された。従って、配偶子当たりの突然変異率は、 $p\lambda g3$ と $\lambda MS-1$ ではそれぞれ1.5%、 $CEB-1$ では6.2%であった。一方、非被曝の親由来の183個の配偶子に生じた突然変異は、これらの3座位で、それぞれ0個、11個、11個であったので、配偶子当たり突然変異率は、それぞれ0%、6.0%、6.0%と計算された。他の領域には突然変異は検出されなかった。被曝した親、非被曝の親の間で $p\lambda g3$ 、 $\lambda MS-1$ 、 $CEB-1$ の3領域における生殖細胞突然変異の頻度には、統計的有意差は認められなかった。従って、原爆被曝は、生殖細胞におけるこれら遺伝子領域の不安定性に影響を与えているとは考えられない。

4. 考察

脆弱X症候群の原因遺伝子 $FMR-1$ 、筋緊張性ジストロフィー症の原因遺伝子 DM 中のトリヌクレオチド反復配列数の突然変異に関しては、premutation と full mutation の2つの状態がある。保因者の遺伝子中では premutation の状態にあり、患者では full mutation の状態である。premutation から full mutation に変化する世代間の突然変異率は100%である。正常範囲の反復数を持つ遺伝子における突然変異に関しては、最近、有波ら³¹⁾が、知能正常の303組の親子の $FMR-1$ を検査し、1組において反復数が29から21へと変化したことを報告した。彼らは、 $FMR-1$ 遺伝子近傍のCA反復数を検査して、脆弱X染色体ではCA反復数のハプロタイプの分布は、一般集団と異なっていること、親子間で反復数を減少させる突然変異が検出された例においては、X染色体のCA反復数のハプロタイプは、脆弱X染色体で見られるものの一つであることを報告した。脆弱X症候群、筋緊張性ジストロフィー症の患者家族系の $FMR-1$ 、 DM 遺伝子のハプロタイプ分析から、創始者染色体 (founder chromosome) の存在が報告されている^{32, 33)}。従って、特別のハプロタイプを持つ染色体のみが突然変異を起こし易いが、正常範囲のCGG反復配列の大多数は安定であると考えられている。ハプロタイプに反映される塩基配列の差が反復配列の、放射線に対する感受性に影響するか否かは、興味のある問題である。

マウスの生殖細胞におけるミニサテライトの放射線感受性について、Sadamotoら³⁴⁾は、雄マウスに⁶⁰Co γ -線を3Gy照射後、無処理の雌と交配させてF1マウスを作り、 $Pc-1$ ミニサテライト領域における突然変異を調べた。減数分裂時に照射された場合には、非照射マウスのF1にくらべ、突然変異率が有意に上昇した。しかし、これは放射線の直接の影響だけではなく、2次的な何らかの影響もあると示唆している。減数分裂前の精原細胞に照射された雄マウスの場合には、F1マウスの突然変異率に有意差は無かった。Dubrovaら³⁵⁾は、雄マウスに0.5または1.0Gyの γ 線を照射後、無処理の雌マウスと交配させてF1を作り、DNAフィンガープリント用プローブ33.6と33.15で検出されるバンドに見られる突然変異を調べた。精原細胞に照射された雄マウスから生まれたF1マウスにおいて、バンドの長さを変化させる突然変異率は有意に上昇し、倍加線量は0.5Gyであると報告している。

我々の集団では、 $Pc-1$ 領域に、自然突然変異も放射線誘発突然変異も検出されなかった。検査した子供たちは、父親、母親の生殖細胞が減数分裂を行う以前に被曝していることがSadamotoらの場合とは異なる。また、マウスでは生殖細胞における $Pc-1$ 領域の自然突然変異率は約10%であり、体細胞突然変異も高率に検出されている³⁴⁾。我々の集団では、体細胞突然変異は検出されなかった。また、ヒトの細胞株を用いた検査でも体細胞突然変異は認められなかった。ヒト、マウスとも、 $Pc-1$ 領域は、GGGCAと

いう核となる配列の反復によって成立しているが、反復配列の周辺配列はヒトとマウスでは異なっており、*Pc-1* 領域の不安定性に影響を与えている可能性がある。

Dubrova ら³⁵⁾ は、多座位検出用プローブを用い、マウスのミニサテライト領域が放射線感受性であることを報告した。観察された倍加線量は、マウスについて、他の方法で得られた値に近い。我々の集団（100家族）中の被曝した親の平均線量は、1.8Sv であるが、これは今までにわれわれが被爆者の子供に関する調査全体から推定した倍加線量1.7–2.3 Sv に相当する³⁶⁾。33.6と33.15プローブで検出される領域が、マウスとヒトにおいて同じように放射線感受性であるならば、ヒトの生殖細胞に対する放射線の影響をモニターする上で、この領域は非常に有用となるであろう。

我々は、原爆被爆者の子供に対する DNA レベルの遺伝生化学調査で、どれだけの数の塩基配列を検査すれば、被曝した親の子供とその対照となる子供の間で突然変異率に有意差を検出できるものかを試算した⁷⁾。この計算においては、ヒトゲノムにおける欠失、挿入、リアレンジメントタイプの突然変異と、ヌクレオチド置換突然変異を含む総自然突然変異率を 2×10^{-8} /ヌクレオチド/世代、ヒトにおける倍加線量を2.0 Sv、被曝した親の平均線量を0.5 Sv（細胞株を作製している被爆500家族の親の平均線量に相当）と仮定している。95%信頼限界で有意差を得るためには、両群でそれぞれ 1.2×10^{10} ヌクレオチドを検査する必要がある。これは巨大な数であり、現在知られている如何なる方法を用いても簡単にスクリーニングできる数ではない。しかし、放射線に対して感受性の高い DNA 配列を検査するならば、この数値を小さくすることが可能である。我々は、この試行調査において、効率の良い DNA の変異検索法と共に、放射線に感受性の高い DNA 領域を求めて努力する必要がある。

参考文献

1. Neel JV, Schull WJ (1956) The effect of exposure to the atomic bombs on pregnancy termination in Hiroshima and Nagasaki. Pub 461. National Academy of Sciences–National Research Council, Washington, DC
2. Otake M, Schull WJ, Neel JV (1990) The effects of parental exposure to the atomic bombings of Hiroshima and Nagasaki on congenital malformations, stillbirths and early mortality among their children: a reanalysis. *Radiat Res* 122:1–11
3. Kato H, Schull WJ, Neel JV (1966) A cohort-type study of survival in the children of parents exposed to atomic bombings. *Am J Hum Genet* 16:214–230
4. Yoshimoto Y, Neel JV, Schull WJ, Kato H, Soda M, Eto R, Mabuchi K (1990) Malignant tumors during the first 2 decades of life in the offspring of atomic bomb survivors. *Am J Hum Genet* 46:1041–1052
5. Awa AA, Honda T, Neriishi S, Sofuni T, Shimba H, Ohtaki K, Nakano M, et al (1987) Cytogenetic studies of the offspring of atomic bomb survivors. In: Obe G, Basler A (eds) *Cytogenetics: basic and applied aspects*. Springer, Berlin, pp166–183
6. Neel JV, Satoh C, Goriki K, Asakawa J, Fujita M, Takahashi N, Kageoka T, et al (1988) Search for mutations altering protein charge and/or function in children of atomic bomb survivors: final report. *Am J Hum Genet* 42: 663–676
7. Neel JV, Satoh C, Myers R (1993) Report of a workshop on the application of molecular genetics to the study of mutation in children of atomic bomb survivors. *Mutat Res* 291:1–20

8. Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boué I, et al (1991) Instability of a 550–base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252:1087–1102
9. Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A, Reiner O, et al (1991) Identification of a gene (FMR–1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65: 905–914
10. Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, et al (1991) Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 252: 1179–1181
11. Fu Y-H, Pizzuti A, Fenwick RG Jr, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, et al (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255: 1256–1258
12. Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shutler G, Amemiya C, Jansen G, Neville C, et al (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3′-untranslated region of the gene. *Science* 255: 1253–1255
13. The Huntington’s disease collaborative research group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington’s disease chromosomes. *Cell* 72: 971–983
14. Knight SJL, Flannery AV, Hirst MC, Campbell L, Christodoulou Z, Phelps SR, Pointon J, et al (1993) Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell* 74: 127–134
15. Yu S, Mulley J, Loesch D, Turner G, Donnelly A, Gedeon A, Hillen D, et al (1992) Fragile–X syndrome: unique genetics of the heritable unstable element. *Am J Hum Genet* 50: 968–980
16. Fu Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJMH, et al (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the sherman paradox. *Cell* 67: 1047–1058
17. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Nature* 314: 67–73.
18. Nakamura Y, Leppert M, O’Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, et al (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235: 1616–1622
19. Wong Z, Wilson V, Patel P, Povey S, Jeffreys AJ (1987) Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann Hum Genet* 51: 269–288
20. Jeffreys AJ, Royle NJ, Wilson V, Wong Z (1988) Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem–repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature* 332: 278–281
21. Mitani K, Takahashi Y, Kominami R (1990) A GGCAGG motif in minisatellites affecting their germline instability. *J Biol Chem* 265: 15203–15210
22. Suzuki S, Mitani K, Kuwabara K, Takahashi Y, Niwa O, Kominami R (1993) Two mouse hypervariable minisatellites: chromosomal location and simultaneous mutation. *J Biochem* 114: 292–296
23. Kelly R, Bulfield G, Collick A, Gibbs M, Jeffreys AJ (1989) Characterization of a highly unstable mouse minisatellite locus: evidence for somatic mutation during early development. *Genomics* 5: 844–856
24. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH (1991) Androgen receptor gene mutations in X–linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352: 77–79

25. Asakawa J, Satoh C, Yamasaki Y, Chen S-H (1992) Accurate and rapid detection of heterozygous carriers of a deletion by combined polymerase chain reaction and high-performance liquid chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9126-9130
26. Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, et al (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science* 252: 1711-1714
27. Honma M, Mitani K, Mizusawa H, Sofuni T, Muramatsu M, Kominami R (1992a) A new VNTR-type RFLP probe (λ TM-18) on chromosome 1 (D1S157). *Hum Mol Genet* 1: 554
28. Honma M, Mitani K, Mizusawa H, Sofuni T, Muramatsu M, Kominami R (1992b) A new VNTR-type RFLP probe (ChdTC-15) on chromosome 12 (D12S65). *Hum Mol Genet* 1: 555
29. Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J (1988) Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res* 16: 10953-10971
30. Vergnaud G, Mariat D, Apiou F, Aurias A, Lathrop M, Lauthier V (1991) The use of synthetic tandem repeats to isolate new VNTR loci: cloning of a human hypermutable sequence. *Genomics* 11: 135-144
31. 有波忠雄、浅野美登里、浜口秀夫 (1993) 脆弱X症候群遺伝子のCGG反復数と隣接するCA反復数との連鎖不平衡。日本人類遺伝学会第38回大会要旨集、272頁
32. Harley HG, Brook JD, Floyd J, Rundle SA, Crow S, Walsh KV, Thibault M-C, et al (1991) Detection of linkage disequilibrium between the myotonic dystrophy locus and a new polymorphic DNA marker. *Am J Hum Genet* 49: 68-75
33. Richards RI, Holman K, Friend K, Kremer E, Hillen D, Staples A, Brown WT, et al (1992) Evidence of founder chromosomes in fragile X syndrome. *Nature Genetics* 1: 257-260
34. Sadamoto S, Suzuki S, Kamiya K, Kominami R, Dohi K, Niwa O (1993) Radiation induction of germline mutation at a hypervariable mouse minisatellite locus. *Mutat Res*, in press
35. Dubrova YE, Jeffreys AA, Malashenko AM (1993) Mouse minisatellite mutations induced by ionizing radiation. *Nature Genetics* 5: 92-94
36. Neel JV, Schull WJ, Awa AA, Satoh C, Kato H, Otake M, Yoshimoto Y (1990) The children of parents exposed to atomic bombs: estimates of the genetic doubling dose of radiation for human. *Am J Hum Genet* 46: 1053-1072

4. 体細胞分裂組換えと欠失突然変異の解析

巽 紘一*、立花 章**、藤森 亮***、加藤武司****

Analysis of Mitotic Recombination and Deletion in Human Cells

Kouichi Tatsumi*, Akira Tachibana**, Akira Fujimori*** and Takeshi Kato****

*Division of Biology, National Institute of Radiological Sciences, 4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba-shi, 263 Japan

**Radiation Biology Center, Kyoto University, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, 606 Japan

***Department of Molecular Oncology, Faculty of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, 606, Japan

****Department of Radiation Biology, Faculty of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamada-Oka, Suita-shi, Osaka 565, Japan

Abstract

The resolution and the ease of the structural analysis on the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene in 6-thioguanine resistant (TG^r) mutants have recently been very much improved by the introduction of the multiplex PCR in which all of the 9 exons in the gene are simultaneously amplified with appropriate primers. By the use of this technique, approximately 30% (4/13) of the spontaneous TG^r mutants and 38% (18/48) of γ -ray-induced TG^r mutants from the control TK6 cells were shown to bear deletions in the HPRT gene, while 80% (12/15) of γ -ray-induced TG^r mutants from an ataxia telangiectasia cell line, GM2783, were demonstrated to have lost some exons. Moreover, 8 of these 12 deletion mutants lacked the entire set of exons. A human lymphoblastoid cell line derived from a heterozygous carrier of 2, 8-dihydroxyadenine urolithiasis, WR10, was employed for mutation analysis at the autosomal APRT locus on the chromosome 16. Molecular characterization of 2, 6-diaminopurine resistant (DAP^r) mutants, exploiting a restriction fragment length polymorphism associated with the APRT locus of WR10 cells, revealed that 85% (22/26) of the spontaneous mutants and 93% (64/69) of the γ -ray-induced mutants resulted from the loss of the intact one of the two APRT alleles. Determination of the dosage of APRT genes in those mutants with allelic losses indicated that approximately half of them were attributed to either recombination or non-disjunction with duplication. Thus, in vitro mutagenesis assays using human lymphoblastoid cells can register types of genomic rearrangements that have been im-

*放射線医学総合研究所生物研究部、**京都大学放射線生物研究センター、***京都大学医学部分子腫瘍、****大阪大学医学部放射線基礎医学

plicated in the development of malignancies including retinoblastoma. Further structural characterization including the extent of deletion in TG^+ mutants and DAP^+ mutants and the distribution of breaking points for mitotic recombination in DAP^+ mutants will delineate a possible distinction in the spectrum of DNA rearrangements between mutations arising spontaneously and those induced by ionizing radiation.

I. はじめに

放射線によってヒト体細胞に誘発される突然変異の生成機構をより詳細に理解するには、変異体の遺伝子構造解析が必須であり、したがって分子生物学的技術の進歩に大きく依存する。一方では、変異検出系そのものが回収される突然変異の型や量を規定してしまう場合の多いことが知られるようになり、したがって一つの検出系で得られた特徴を一般化するには十分の注意が必要である。また DNA 解析技術の適用にあたっては、標的遺伝子の大きさをはじめ、その構造の特徴が情報の質を規定してしまうことも考えられ、できるだけ多種類の突然変異検出系を利用したい。しかしながら現在のところ、ヒト体細胞における定量的変異検出が可能である遺伝子座位はそれほど多くない (Table 1)。

Table 1. Loci for selectable markers and their mapped site on human chromosome.

Locus	Enzyme	Human chromosome	Exon	Size (kb)
<i>hprt</i>	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	Xq26	9	44
<i>tk</i>	thymidine kinase	17q23-25	7	13
<i>aprt</i>	adenine phosphoribosyl transferase	16q24	5	2.5

私達は X 染色体上の HPRT 遺伝子および 16 番染色体上の APRT 遺伝子における定量的突然変異検出系と解析技術を利用して、放射線が誘発する突然変異の内、欠失突然変異と体細胞分裂組換えに関して、自発突然変異と放射線誘発変異とが異なっているか否か、放射線感受性高発がん性遺伝病患者由来細胞が正常人由来細胞と異なっているか否か、の二点を明らかにするため検討をはじめている。

II. 半接合遺伝子における欠失突然変異

HPRT 遺伝子の失活変異を検出する 6 チオグアニン抵抗性 (TG^+) 指標がヒトを含む哺乳動物細胞で多用されてきた理由は、この遺伝子が X 染色体長腕に位置して半数性であるために、失活には一回の変異で十分であり、従って自然にも 10^{-6} 程度の頻度で起こるので検出が比較的容易であることによる。もう一つには雄細胞では相同染色体が存在しないので変異遺伝子の構造解析が邪魔されないことである。ヒト HPRT 遺伝子は 9 個のエキソンからなる約 43kb の大きな遺伝子で、染色体 3、5 番に一つずつ、11 番に

二つ、合計四つ偽遺伝子が存在する。HPRT 遺伝子がクローニングされてから、cDNA をプローブとしてサザンプロット解析を行って大まかに遺伝子構造の変化の大小を区別できるようになった。ヒトリンパ芽球様細胞株 TK 6 に得られた自発TG変異ではバンド変化が約30%に見られ、 γ 線誘発変異ではほぼ50%に変化が見られた (Table 2)。これに対し、紫外線誘発変異ではバンド変化を伴うものはなかった¹⁾。

Table 2. Frequency of mutations with deletions and rearrangements at *hprt* locus in TK6 cells

Treatment	Number of deletion mutants / Number of clones
spontaneous	5 / 17
UV-light	0 / 14
γ -rays	7 / 16

偽遺伝子の存在や、制限酵素断片とプローブ相同部分の長さの違いからサザンプロット解析ではもともと分解能に限界があったが、HPRT 遺伝子の全塩基配列決定に続いて多重 PCR 法が開発されて、遺伝子解析はより少ない DNA 量で、より多くの試料を短時間に処理出来るようになった²⁾。この多重 PCR 法を用いた検索からアタキシア・テランジェクタシア (AT) 患者由来リンパ芽球では γ 線誘発 TG^r 変異体内、欠失を伴うものの比率が正常細胞の場合 (50%) より高く (80%)、かつ HPRT 遺伝子の全領域を欠失しているものが大多数であることが明らかになった (立花他、未発表; Table 3, Fig. 1)。AT 患者由来細胞は電離放射線の細胞致死作用に高感受性だが、X (γ) 線の線量当たり誘発 TG^r 変異は正常人由来細胞と差がない³⁾。従って少なくとも致死ヒット当りの比較では TG^r 指標に関する限り AT 細胞は変異誘発低感受性の様に見える。恐らく半接合 X 染色体上の HPRT 遺伝子を標的とする、AT 細胞で多くの広範な欠失が近傍の他の遺伝子に及んで細胞致死につながるために変異体の収率が低いのではない

Table 3. Oligonucleotide primers for the multiplex PCR of *hprt* exons.

The Primer Mixture I				
ex3	459 bp	ex3pF ex3pR	(125 nM) (125 nM)	GTGGAAGTTTAATGACTAAGAG GTATATATCCTCCAAGGTGACTAG
ex4	332 bp	ex4pF ex4pR'	(150 nM) (150 nM)	GCTATGGATATTAGCTAGCTAAC GCTTCCAAGGGTTAAATAACCCA
ex5	236 bp	ex5pF' ex5pR	(40 nM) (40 nM)	AGCATCTAAAAACAAGAGTTTGG AACTGATGCAGAGGAATTTCTCTC
ex9	794 bp	ex9pF ex9pR	(125 nM) (125 nM)	ACTAATGTGATAGACTACTGC GAACTGCTGACAAAGATTCACTG
The Primer Mixture II				
ex2	387 bp	ex2pF ex2pR'	(125 nM) (125 nM)	CACCTAAATTTCTCTGATAGACTAAGG GATACTAAGTAAATTAGTAAGGCC
ex6	258 bp	ex6pF ex6pR'	(150 nM) (150 nM)	GATTTTGGTGAGAATTACTGTGCTG CACTTAATCCCCCTTCAAATGAG
ex7/8	900 bp	ex78pF ex78pR'	(40 nM) (40 nM)	ACCAAGTGCCTTGTCTGTAGTGTC TCCTAAATCTTCTCAACCATGTTC

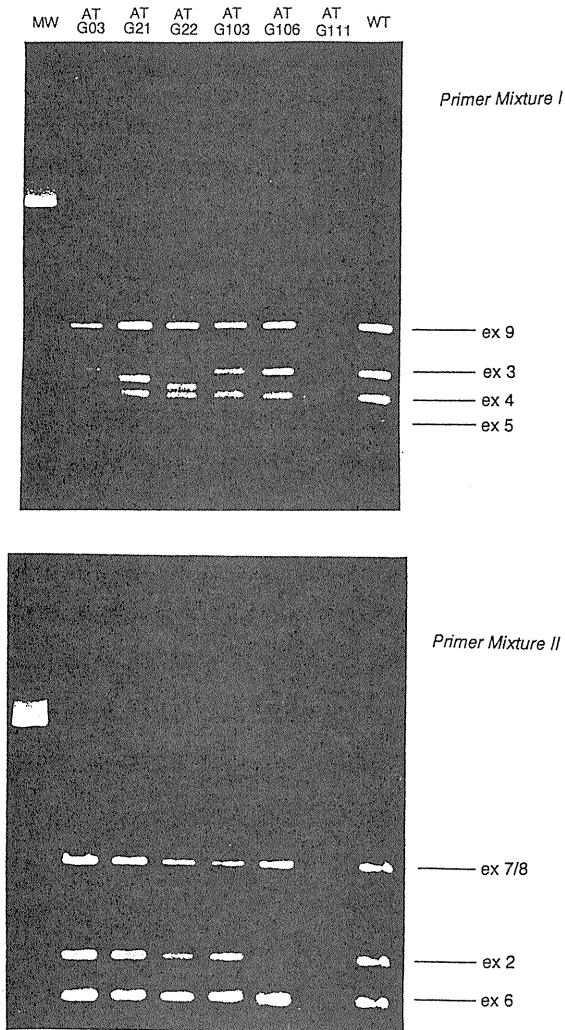


Fig. 1 Multiplex amplification of the *hprt* gene in $6tg^f$ mutant clones from GM2783. (Tachibana et al. unpublished)
 ATG111 total deletion
 ATG106 shortened exon 2
 ATG103 no change
 ATG22 shortening of exon 3
 ATG21 as above
 ATG03 loss of exon 5

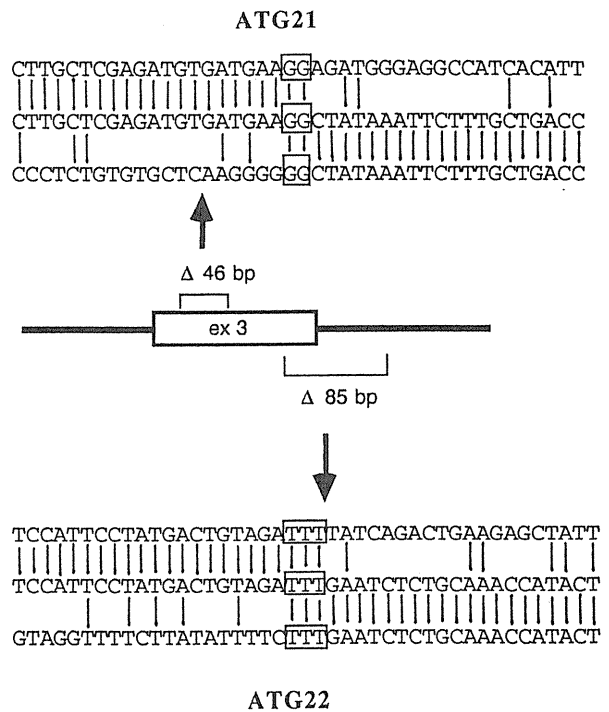


Fig. 2 Junction sequences of two *hprt* mutants from γ -irradiated GM2783 cells, together with corresponding wild type upstream and downstream sequences. (Tachibana et al., unpublished)

かと考えられる。またサザンプロットでは解析できない百 bp 以下の極めて短い欠失を検出できる (Clones 21 and 22 in Fig. 1) のも多重 PCR 法の利点で、PCR 産物の塩基配列決定により 3 個の AT リンパ芽球 TG^f 変異体で欠失断端に数ヌクレオチドの反復配列を見いだした (Fig. 2)。

III. 異型接合常染色体遺伝子の対立遺伝子喪失

プリン代謝経路を司るもう一つの酵素 APRT を欠損する劣性遺伝病では、リン酸化されずに血液中にたまったアデニンが酸化されて難溶性の 2, 8 ジハイドロキシ・アデニンになり、尿路結石症を引き起こす。この遺伝病の保因者から樹立されたリンパ芽球様細胞 (第 1 ヒットはナンセンス変異) を培養して、新たに起こる第 2 ヒットの頻度を 2, 6 ジアミノプリン抵抗性 (DAP^r) を指標にして調べる

と、自発突然変異率は 1.8×10^{-6} /細胞/世代を示し、TG^rの場合よりも約10倍高率であった。またγ線は大変効率よく DAP^r 変異を誘発し、自発突然変異頻度を差し引いた正味の誘発頻度上昇は DAP^r では TG^r のやはり約10倍であった。しかし紫外線は DAP^r 変異を強く誘発せず、TG^r 変異と同程度であった (Fig. 3)。ヒト ART 遺伝子は5つのエキソンからなるが、全長は2.5kb とむしろ標的として HPRT 遺伝子よりはるかに小さい。したがって、接合性の相違により自発突然変異と電離放射線による誘発変異の頻度が大きく異なるものと考えられた。さらに検定細胞株が APRT 遺伝子近傍の SphI RFLP についても異型接合であることを利用し (Fig. 4)、自発およびγ線誘発の DAP^r 変異体クローンについて異型接合性消失 (loss of heterozygosity; LOH) を調べたところ (Fig. 5)、自発突然変異体の85%、γ線誘発変異体の93%が LOH を伴っていた (Table 4)⁴⁾。染色体17番上の TK 遺伝子の量を内部標準としてフジックス・バイオイメージアナライザー (BAS2000) による APRT 遺伝子量プロット解析 (Fig. 5) を行うと、LOH を伴う DAP^r 変異体の内、自発変異では約半数が、放射線誘発変異でも60%が2コピーを示した。これらは第1ヒットとしての経世代失活対立遺伝子の同型接合を示唆する。一方、約半数が1コピーの半接合であって野生型対立遺伝子の欠失によって生じた変異体であることが判る。APRT 遺伝子はゲノム DNA 断片をプローブとして行う FISH 解析でも確認でき、また後述のごとく16番染色体上の他の多型部位における LOH 解析からその範囲が十分大きい場合には通常の染色体解析で欠失の鑑別が可能である (Fig. 6)。以上の結果は自発および放射線誘発変異では細胞分裂組換えか染色体不分離の関与が大きいことを示唆しており、網膜芽細胞 (retinoblastoma) の場合に観察される癌抑制遺伝子 Rb に認め

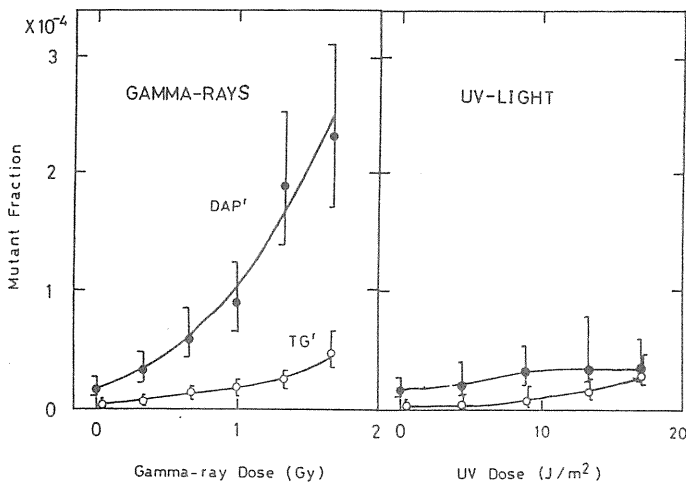


Fig. 3 Differential mutability of *aprt* and *hprt* loci in WR10 cells. (A) γ-rays (B) UV-light

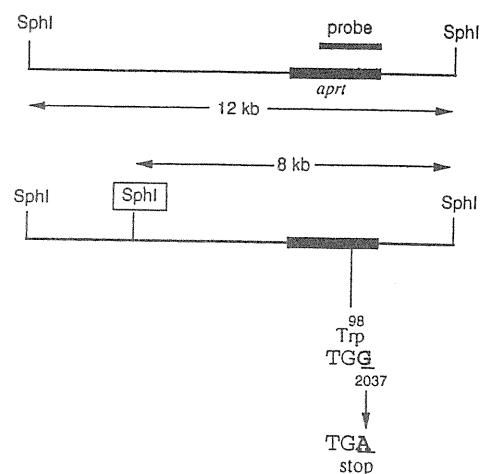


Fig. 4 Structure of the two *aprt* alleles WR10 cells. SphI in box denotes a polymorphic restriction site.

Table 4. Structural change of *aprt* gene in DAP^r mutants.

Treatment	Number of mutants clones analysed	Number of clones with allelic loss
None (spontaneous)	26	22 (85%)
γ-rays (2Gy)	69	64 (93%)
UV-light	31	17 (55%)

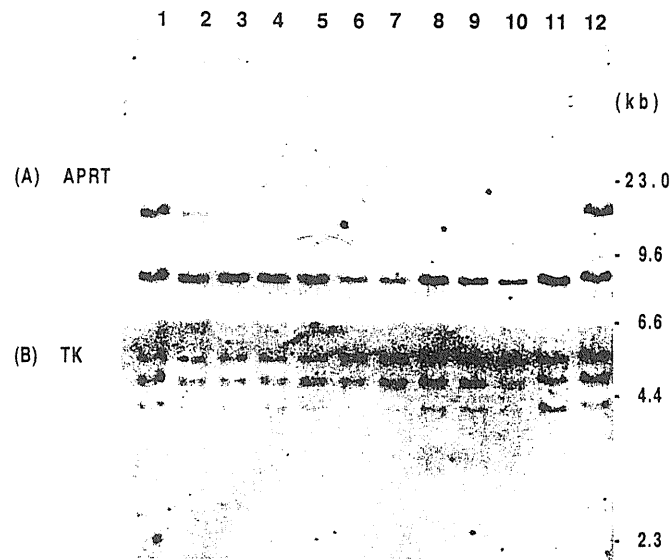


Fig. 5 Determination of the number of *aprt* copies in wild-type cells and γ -ray-induced mutant clones. Lanes 1 & 12, parental WR10; Lanes 2-10, DAP⁺ mutants; Lane 11, TK6 as a reference.

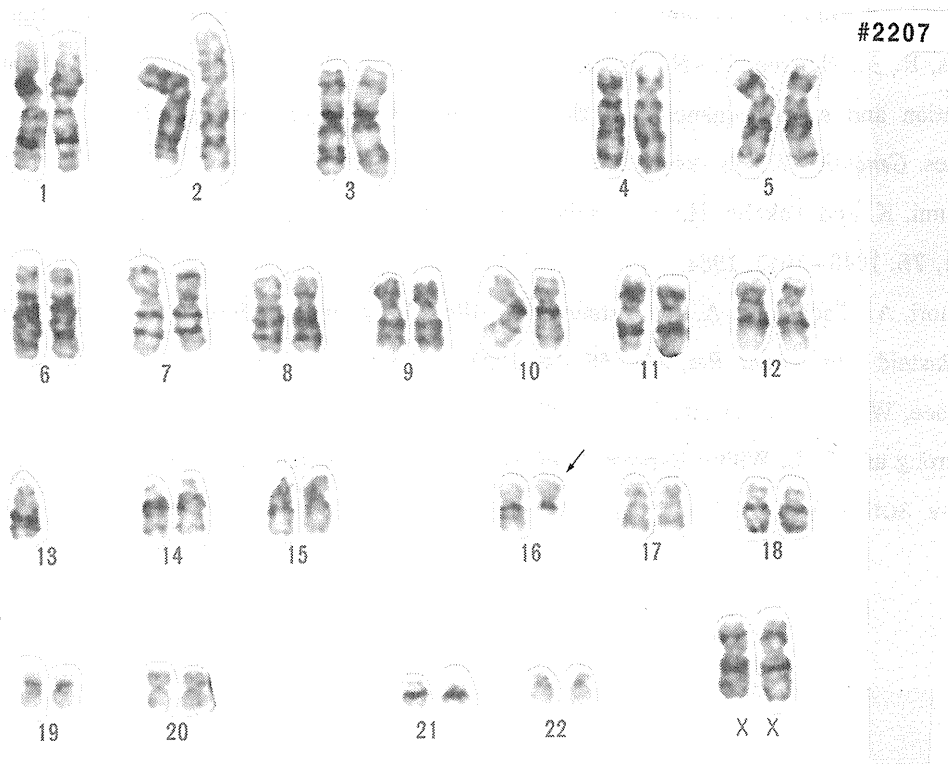


Fig. 6 Karyogram of a spontaneously arising DAP⁺ mutant clone with a large deletion in the long arm of the chromosome 16 (the arrow).

られる失活変化⁵⁾と酷似していた。したがって正常対立遺伝子の消失はがん化に関与しない常染色体遺伝子においてもごく普遍的に生じている機構であることが明らかとなった。

このように半接合染色体では起こり得ない組換え、不分離の寄与が極めて大きいこと、相同染色体の存在によってかなり大きな欠失も細胞致死や増殖遅滞につながらないらしいこと (Fig. 6)、などがDAP⁺変異頻度とTG⁺変異頻度の約10倍の差異の原因と推察できよう。

常染色体上の遺伝子に電離放射線によって誘発される突然変異で認められる遺伝子変化は自発突然変異

のそれと類似しており、放射線はある種の自発突然変異生成機構を促進させているという観方も可能である。最近 RFLP のみならず、(CA)_n リピートをはじめミニサテライト DNA の VNTR が多型マーカーとして16番染色体上でも多数利用できるようになってきており、これを使って染色体不分離と体細胞分裂組換えを判別することや、欠失の大きさまたは体細胞分裂組換えの切断点の位置を大まかに知ることができる。これらの細かい点では自発変異と放射線誘発変異が異なっている可能性が残っており、今後検討を進めていく予定である。

IV. おわりに

このように現在利用できる数少ないヒト体細胞突然変異検出指標の利点を生かしてヒト体細胞における自発および電離放射線誘発変異の構造解析をさらに進めて行くことが発がん性遺伝子変化と電離放射線作用の関連性をより深く理解できるように必要である。

参考文献

- 1) Tachibana, A., Ohbayashi, T., Takebe, H. and Tatsumi, K.: Molecular changes in UV-induced and γ -ray-induced mutations in human lymphoblastoid cells. *Mutation Research*, **230**, 159-166, 1990.
- 2) Gibbs, R. A., Nguyen, P.-N., Edwards, A., Civitello, A. B. and Caskey, C. T.: Multiplex DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene in Lesch-Nyhan families. *Genomics*, **7**, 235-244, 1990
- 3) Tatsumi, K. and Takebe, H.: γ -Irradiation induces mutation in ataxia telangiectasia lymphoblastoid cells. *Gann*, **75**, 1040-1043, 1984.
- 4) Fujimori, A., Tachibana, A. and Tatsumi, K.: Allelic losses in mutations at the APRT locus of human lymphoblastoid cells. *Mutat. Res*, **269**, 55-62, 1992.
- 5) Cavenee, W. K., T. P. Dryja, R. A. Phillips, W. F. Benedict, R. Godbout, B. L. Gallie, A. L. Murphree L. C. Strong and R. L. White: Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, **305**, 779-784, 1983.

編集後記

第25回放医研シンポジウムは「ヒト・マウス・ゲノム解析研究と放射線生物学」と題して、平成5年11月18、19日の両日にわたって放医研において開催される。このシンポジウムシリーズ No. 25はその発表論文を収録したものである。

本テーマは現在、国際的に進展している「ヒト・ゲノム・プロジェクト」の現状を把握して、放射線生物学の新たな展望を見いだそうと企画されたもので、放射線生物学研究者とゲノム関連研究者の交流の場を意図したものであった。本シンポジウムでヒトとマウスの両ゲノムをとり上げたのは、これからの放射線生物影響研究においても、マウスを用いた実証的研究（メカニズム研究と線量効果関係）とヒト集団での疫学的研究（分子実験疫学も含めた）の両輪が必要であり、ゲノム解析的研究アプローチによって両種のゲノム構造とその遺伝的変異性を理解することがヒトへの放射線のリスク評価の精度向上必須であると考えたからである。UNSCEAR（原子放射線の影響に関する国連科学委員会）の1993年報告書にも「遺伝的影響」の章の中でゲノム解析研究の重要性が特記されている。

今回のシンポジウムでヒトとマウス解析研究が国際的プロジェクトとして予測をはるかに超えて急速な勢いで進んでいることを実感した。また、放射線の生物影響研究についても分子レベルの解析が着実に進展しつつあり、解析技術の向上もみられた。放射線生物学とヒト・ゲノム解析研究の接点を探る今回の企画が放射線生物影響研究の今後の展開に新たな局面を与え、本書が若手研究者のこの challenging な研究領域への積極的な参画の一助となれば幸甚である。

最後に、今回の企画にご賛同いただきご講演、ご討論くださった諸先生方に厚く御礼を申し上げるとともに、本シンポジウムにご後援をいただいた放射線影響協会と運営にご協力くださった放医研企画課と関連研究部の諸氏に感謝いたします。

堀 雅 明

第25回放医研シンポジウムプログラム

「ヒト・マウス・ゲノム解析研究と放射線生物学」

主 催：放射線医学総合研究所

開 催 日：平成5年11月18日(木)・19日(金)

開催場所：放射線医学総合研究所 講堂

時 間	セッション・講演タイトル	演 者	座 長
第1日目 9:45~10:00	-11月18日(木)- 開会の辞	松平 寛通(放 医 研)	
10:00~10:20	I. マウス・ゲノム解析研究の現状 ゲノム・スキマニング	林崎 良英(理 研)	木南 凌(新 潟 大)
10:20~10:40	染色体マッピング	松田 洋一(放 医 研)	
10:40~11:00	メチル化インプリンティング	木南 凌(新 潟 大)	
11:00~11:20	II. 放射線感受性遺伝子 recA/rad51 遺伝子	小川 智子(大 阪 大)	佐々木正夫(放 生 研)
11:20~11:40	ERCC-5/XPGC 遺伝子	塩見 忠博(放 医 研)	
11:40~12:00	DNA 損傷誘導遺伝子	根井 充(放 医 研)	
12:00~12:20	放射線応答のシグナル伝達路	佐々木正夫(放 生 研)	
12:20~13:20	昼食		
13:20~14:10	III. 特別講演 一般概説 (マウス・ゲノム解析研究)	V. Chapman (R P M I)	松村 正実(埼玉医科大)
14:10~15:00	XP モデル・マウス	田中亀代次(大 阪 大)	
15:00~15:20	コーヒーブレイク		
15:20~15:40	IV. 放射線発がんのゲノム変異 マウス皮膚腫瘍/p53・遺伝子	大津山 彰(国立がんセ)	丹羽 太貫(広 島 大)
15:40~16:00	マウス骨髄性白血病	石原 弘(放 医 研)	
16:00~16:20	マウス胸腺リンパ腫	武藤 正弘(放 医 研)	
16:20~16:40	V. モデル・マウスと放射線生物学 Scid マウスの放射線感受性	小松 賢志(長 崎 大)	山村 研一(熊 本 大)
16:40~17:00	トランスジェニック・マウス/突然変異検出法	勝木 元也(九 州 大)	
17:00~17:20	遺伝子トラップ法	山村 研一(熊 本 大)	
17:30~19:00	懇親会		
第2日目 9:30~ 9:50	-11月19日(金)- VI. ヒト・ゲノム解析研究の現状 染色体地図/FISH	高橋 永一(放 医 研)	大木 操(国立がんセ)
9:50~10:10	遺伝的連鎖地図/RFLP	山川 和弘(癌 研)	
10:10~10:30	物理的地図/YAC	今井 高志(癌 研)	
10:30~10:50	コンテイング地図/P1	細田 文恵(国立がんセ)	
10:50~11:10	VII. がんの原因遺伝子 消化器系腫瘍と APC 遺伝子	堀井 明(癌 研)	鎌田 七男(広 島 大)
11:10~11:30	急性骨髄性白血病/染色体転座解析	清水喜美子(国立がんセ)	
11:30~11:50	原爆被爆者白血病/遺伝子解析	鎌田 七男(広 島 大)	
11:50~13:00	昼食		
13:00~13:40	VIII. 特別講演 一般概説 (ヒト・ゲノム解析研究)	D. Ward (エール大)	堀 雅明(放 医 研)
13:40~14:20	ゲノム再配列と白血病	J. D. Rowley (シカゴ大)	
14:20~15:00	ヒト・ゲノム解析と医学	中村 祐輔(癌 研)	
15:00~15:20	コーヒーブレイク		
15:20~15:40	IX. 動的突然変異 脆弱X症候群	山内 正剛(放 医 研)	堀 雅明(放 医 研)
15:40~16:00	筋緊張性ジストロフィー症	三木 哲郎(大 阪 大)	
16:00~16:20	X. 突然変異検出法 PCR・SSCR 法	林 健志(九 州 大)	巽 紘一(放 医 研)
16:20~16:40	放射線被曝と体細胞突然変異	秋山 實利(放 影 研)	
16:40~17:00	原爆被爆者の子供/反復配列突然変異	佐藤千代子(放 影 研)	
17:00~17:20	体細胞分裂組換え/欠失突然変異	巽 紘一(放 医 研)	
17:30~17:45	閉会の辞	川島 勝弘(放 医 研)	

第25回放医研シンポジウム実行委員会委員一覧

委員長	堀	雅	明	(遺伝研究部)
委員	石	原	弘	(薬理化学研究部)
〃	三	田	和英	(生物研究部)
〃	塩	見	忠博	(遺伝研究部)
〃	松	田	洋一	(遺伝研究部)
〃	武	藤	正弘	(生理病理研究部)
〃	早	田	勇	(障害基礎研究部)
〃	小	木曾	洋一	(内部被ばく研究部)
〃	根	井	充	(養成訓練部)
〃	向	井	稔	(重粒子治療センター治療・診断部)
〃	鈴	木	元	(重粒子治療センター障害・臨床研究部)
〃	小	池	幸子	(重粒子治療センター障害・臨床研究部)
〃	神	田	玲子	(総括安全解析研究官付)
〃	村	上	正一	(管理部企画課)
事務局	管理部企画課			

放医研シンポジウムシリーズ No. 25

ヒト・マウス・ゲノム解析研究と放射線生物学

1994年3月 発行

編 集 堀 雅明

編集協力 高橋 淳・佐藤博信

放射線医学総合研究所

〒263 千葉市稲毛区穴川4-9-1

電 話 043-251-2111