

expression, *Genomics*, **55**,
194-201 (1999)

18.岡崎康司, 林崎良英

RLGS 法を用いた高速ボ
ジショナルクローニング
システム
化学と生物, 学会出版セ
ンター, 36, 34-41, 1998

19.渡辺幸彦, 林崎良英
ヒトゲノム計画とその展
望
現代医学の基礎, 岩波書
店, 200-215, 1998

20.舘野美成子, 岡崎康司,
村松正實, 林崎良英
Cancer genome anatomy か
ら見た発癌研究
Molecular Medicine, 中山
書店, Vol. 35 No. 6, 738-
745, 1998

21.河合純, 林崎良英
ゲノムスキヤニングとラ
ンドマークの概念
ゲノム解析 1 ゲノムス
キヤニング, 医歯薬出版
(株), 1998

22.河合純, 渡辺幸彦
restriction landmark cDNA
scanning (RLCS)
ゲノム解析 1 ゲノムス
キヤニング, 医歯薬出版
(株), 1998

23.水野洋介, Piero
Carninci, 渡辺幸彦, 林崎
良英
ゲノムスキヤニングにお
ける window の設定法
ゲノム解析 1 ゲノムス
キヤニング, 医歯薬出版
(株), 1998

24.舘野美成子, 林崎良英
パルスフィールドゲル電
気泳動法と BAC ライブラ
リー作成
ゲノム解析 2 ゲノムス
キヤニング, 医歯薬出版
(株), 1998

25.秋山純一, 伊藤昌可,
林崎良英
高速多検体プラスミド調
製装置を開発 1日4万
サンプルの試料作成が可
能に
日経サイエンス, 日経サ
イエンス社, 8, 122, 1998

26.岡崎康司, 三木理雅,
林崎良英
マウス cDNA マイクロア
レイを用いた発現プロフ
ィール解析
細胞工学 DNA マイクロ
アレー, 秀潤社

27.林崎良英
ヒト (疾患) 遺伝子マッ

ブの現在 (仮題)

Molecular Medicine 連載,
中山書店

28. 三木理雅, 林崎良英
チップ

ザ・プロトコールシリーズ non-RI 分子生物実験
プロトコールー蛍光ラベ
リング・化学発光の原理
から実験まで, 羊土社

29. 林崎良英

いま化学に何がとわれて
いるのか (仮題)
科学, 岩波書店

30. 奥泉久人, 林崎良英
RLGS 法

実験医学別冊 新遺伝子
工学ハンドブック改訂第
2版, 羊土社

submission

Sei Komatsu, Yasushi Okazaki,
Minako Tateno, Jun Kawai,
Hideaki Konno, Yoichi
Matsuda, Moriaki Kusakabe,
Atsushi Yoshiki, William A
Held, Masami Muramatsu,
Yoshihide Hayashizaki

Methylation and
underexpression of mac25 is
Associated with
Tumor-suppressing In SV40T
Antigen Transgenic Mouse

2. 学会発表

1. Y. Okazaki, S. Komatsu,
J. Kawai, T. Akama, H.
Okuizumi, H. Konno, M.
Muramatsu, C. Plass, W.A.
Held and Y. Hayashizaki
Restriction Landmark
Genomic Scanning (RLGS-
M)-based genome-wide
scanning of mouse liver
tumors for alternation in
DNA methylation status.
(Japanese Organizing
Committee for the) 4th
Joint Conference of the
American Association for
Cancer Research and the
Japanese Cancer
Association
Maui, U. S. A., February
16-21, 1998

2. B. Hayward, M. Kamiya,
S. Takada, V. Moran, L.
Strain, Y. Hayashizaki
and D.T. Bonthron
XLas is a paternally
derived protein product of
the human GNAS1 gene.
The 30th ESHG meeting
Lisbon, Portugal, May 10-
13, 1998

3. N. Sasaki, M. Izawa, M.
Watahiki, E. Ohara, K.
Ozawa, T. Tanaka, Y.

Yoneda, S. Matsuura, P. Carninci, M. Muramatsu, Y. Okazaki and Y. Hayashizaki
Transcriptional
sequencing: a method
for DNA sequencing
using RNA polymerase.
Cold Spring Harbor
Meeting on Genome
Mapping, Sequencing and
Biology
New York, U. S. A., May
13-17, 1998

4.Y. Hayashizaki, Y. Okazaki, J. Kawai, P. Carninci, K. Shibata, M. Itoh, M. Tateno, N. Sasaki, H. Konno, Y. Sugahara, S. Kawahire, M. Izawa, Y. Shibata, M. Watahiki, Y. Yoneda, T. Tanaka, S. Matsuura and M. Muramatsu
Full-length mouse cDNA
analysis by automated
fluorescent 384 capillary
sequencer system (RISA:
Riken Integrated
Sequence Analysis
System)
The Institute for Genomic
Research Presents the
10th International
Genome Sequencing and
Analysis Conference

Miami, U. S. A.,
September 17-20, 1998

5.Y. Hayashizaki, Y. Okazaki, J. Kawai, P. Carninci, K. Shibata, M. Itoh, M. Tateno, N. Sasaki, H. Konno, Y. Sugahara, S. Kawahire, M. Izawa, Y. Shibata, M. Watahiki, Y. Yoneda, T. Tanaka, S. Matsuura, and M. Muramatsu
Full-length mouse cDNA
analysis by automated
fluorescent 384 capillary
sequencer system (RISA:
Riken Integrated
Sequence Analysis
System)
12th International Mouse
Genome Conference
Bavaria, Germany,
September 30-October 3,
1998

6.P. Carninci, M. Itoh, Y. Okazaki, M. Muramatsu, and Y. Hayashizaki
Highly efficient synthesis
of full-length cDNA by
trehalose thermoactivated
reverse transcriptase
12th International Mouse
Genome Conference
Bavaria, Germany,
September 30-October 3,

1998

7.N. Sasaki, M. Izawa, M. Watahiki, K.Ozawa, T. Tanaka, Y. Yoneda, S. Matsuura, P. Carninci, M. Muramatsu, Y. Okazaki and Y. Hayashizaki

Transcriptional sequencing: a new method for DNA sequencing using RNA polymerase

12th International Mouse Genome Conference

Bavaria, Germany, September 30-October 3, 1998

8.Y. Hayashizaki, Y. Okazaki, J. Kawai, P. Carninci, K. Shibata, M. Itoh, M. Tateno, N. Sasaki, H. Konno, Y. Sugahara, S. Kawahire, M. Izawa, Y. Shibata, M. Watahiki, Y. Yoneda, T. Tanaka, S. Matsuura, M. Muramatsu

Full-length mouse cDNA analysis by automated fluorescent 384 capillary sequencer system (RISA: Riken Integrated Sequence Analysis System)

Fifth International Automation in Mapping

and DNA Sequencing Conference

St. Louis, U. S. A., October 7-10, 1998

9.M. Muramatsu, N. Sasaki, M. Izawa, M. Watahiki, E. Ohara, K. Ozawa, T. Tanaka, Y. Yoneda, S. Matsuura, P. Carninci, Y. Okazaki and Y. Hayashizaki

Transcriptional sequencing: a method for DNA sequencing using RNA polymerase.

Functional Genomics Conference

Waltham, U. S. A., November 16-17, 1998

10.Y. Sugahar and Y. Hayashizaki

Application of the RLGS image analysis tool (RAT) to the construction of a genetic linkage map of recombinant inbred strain.

The ninth Workshop on Genome Informatics GIW '98 Tokyo, Japan, December 10-11, 1998

11.Y. Fukunishi, H. Konno and Y. Hayashizaki

Automatic cDNA

classification system for mouse genome project.

The ninth Workshop on Genome Informatics GIW '98 Tokyo, Japan, December 10-11, 1998

12.H. Konno, Y. Sugahara, Y. Fukunishi, K. Shibata and Y. Hayashizaki

Automated cDNA information system for large scale cDNA project

The ninth Workshop on Genome Informatics GIW '98 Tokyo, Japan, December 10-11, 1998

13.K. Morimoto, F. Tokanai, I. Tanihata and Y. Hayashizaki

Development of scientilating fiber image Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference including Sessions on Nuclear Power Systems and the Continuing Education Program

Toronto, Canada, Novemver 8, 1998

14.M. Seki, M. Narusaka, P. Carninci, Y. Hayashizaki, and K. Shinozaki

High-efficinecy cloning of arabidopsis full-length cDNA by biotinylated CAP trapper.

1998 Biotechnology Conference at Cold Spring Harbor, The *Arabidopsis* Genome: a Model for Crop Plants New York, U.S.A., December 3-6, 1998

15.Y. Hayashizaki, Y. Okazaki, J. Kawai, P. Carninci, K. Shibata, M. Itoh, M. Tateno, N. Sasaki, H. Konno, Y. Sugahara, S. Kawahire, M. Izawa, Y. Shibata, M. Watahiki, Y. Yoneda, T. Tanaka, S. Matsuura and M. Muramatsu

Full-length mouse cDNA analysis by automated fluorescent 384 capillary sepencer system (RISA: Riken Integrated Sequence Analysis System)

DOE Contractor and Grantee Workshop California, U.S.A., January 13-16, 1999

16.K. Osoegawa, B. Zhao, M. Tateno, E. Frengen, J.J. Catanese, Y. Hayashizaki

and P.J. de Jong
"RPCI" human and mouse
bacterial artificial
chromosome libraries:
construction and
characterization
DOE Contractor and
Grantee Workshop
California, U.S.A.,
January 13-16, 1999

17.K. Osoegawa, E.
Frengen, C. Zeng, M.
Tateno, C. Wu, B. Zhao, J.
Catanese, N. Nowak, Y.
Hayashizaki and P. J. de
Jong

THE HUMAN & MOUSE
GENOME PROJECTS: FROM
CLONES TO SEQUENCE-
READY REAGENTS

RGM6 (The 6th Rice
Genome Meeting, 第6回
イネゲノム meeting)

Tsukube, Japan, February
8,

18.Y. Hayashizaki
Full-length cDNA analysis
by RIKEN integrated
sequence analysis system
(RISA)

Structural and Functional
Analysis of Human cDNA

Chiba, Japan, March 22-23,
1999

19.Y. Okazaki, R. Miki, Y.
Mizuno, Y. Tomaru, P.
Carninci, K. Shibata, M. Ito,
Y. Ozawa, J. Kawai, H.
Konno, H. Goto, Y.
Hamaguchi, H. Nitanda, M.
Muramatsu, A. Yoshiki, M.
Kusakabe, J. DeRisi, V. Iyer,
M.I Eisen, P.O. Brown, and Y.
Hayashizaki

Gene expression profiling
using mouse full-length 20k
cDNA microarray

'99 Cold Spring Harbor
Laboratory Meetings ,
Genome Sequencing &
Biology

New York, U.S.A., May 19-
23, 1999

20.P. Carninci, K. Shibata, M.
Itoh, H. Konno, J. Kawai, Y.
Shibata, Y. Sugahara, Y.
Fukunishi, M. Muramatsu, Y.
Okazaki and Y. Hayashizaki
A mouse full-length cDNA
encyclopedia

'99 Cold Spring Harbor
Laboratory Meetings ,
Genome Sequencing &
Biology

New York, U.S.A., May 19-
23, 1999

21. 神田浩明, 秋吉信
吾, 野村起美恵, 岡崎康司,
岡本信明, 林崎良英, 北川

知行
RLGS 法による DEN 誘発マ
ウス肝がんの解析
日本病理学会総会，広島
1998年4月14日－1
6日

22. 芝田英生，依田賀香，神
谷守，植田孝之，日下部守
昭，村松正實，林崎良英
ゲノムインプリンティング
制御と配偶子成熟との関わり
第31回日本発生生物学会，
熊本
1998年5月28日－3
0日

23. 小松誠，岡崎康，
館野美成子，河合純，林崎
良英
RLGS-M 法を用いたマウス
肝癌のゲノム規模的解析に
よる，肝癌発症にかかわる
と考えられる遺伝子の単離
第57回日本癌学会総会，
横浜
1998年9月30日10
月－2日

24. 秋吉信吾，神田浩明，岡
崎康司，赤間智也，野村起
美恵，林崎良英，北川知行
RLGS 法による MSM/C3H の
遺伝連鎖地図の作成
第57回日本癌学会総会，
横浜

1998年9月30日10
月－2日

25. 神田浩明，秋吉信
吾，野村起美恵，岡崎康司，
赤間智也，林崎良英，北川
知行

RLGS 法による DEN 誘発マ
ウス肝がんの遺伝子解析
第57回日本癌学会総会，
横浜
1998年9月30日10
月－2日

26. 林崎良英，岡崎康司，河
合純，Piero Carninci，柴田
一浩，伊藤昌可，館野美成
子，佐々木宣哉，今野英明，
菅原雄一，川鯨滋，伊澤真
樹，柴田裕子，綿引正則，
米田祐康，田中巧，松浦修
治，村松正實

Full-length mouse cDNA
analysis by automated
fluorescent 384 capillary
sequencer system (RISA:
Riken Integrated Sequence
Analysis System)

横浜 NMR 構造生物学会
シンポジウム「ゲノム科学
と構造生物学」，横浜
1998年6月10日

27. 林崎良英
ゲノムフロンティア開拓セ
ンター
理研シンポジウム・第13回

ライフサイエンスシンポジウム／平成10年度哺乳動物遺伝学研究会，土浦，つくば

1998年6月12日－13日

28.高田修治，神谷守，有馬隆博，影林久司，芝田英生，村松正實，V.M. Chapman，和氣徳夫，林崎良英，高木信夫

RLGS-M法によるX染色体不活性化を免れるDNAメチル化部位の検出とその周辺遺伝子の単離

日本遺伝学会第70回，札幌

1998年9月23日－25日

29.林崎良英

ゲノム科学と遺伝子エンサイクロペディアが切り拓く新しい世界

第20回科学講演会（理研），横浜

1998年10月9日

30.林崎良英

創薬化学とゲノム資源の開発

朝霧シンポジウム，西八代（山梨県）

1998年10月28日－30日

31.菅原雄一，秋吉信吾，岡崎康司，谷畑勇夫，林崎良英

RLGS画像解析ツール(RAT)を用いた遺伝子連鎖地図の作成

第21回日本分子生物学会年会，横浜

1998年12月16日－19日

32.伊澤真樹，佐々木宣哉，綿引正則，大原英治，米田祐康，岩田正彰，南雲葉子，雀部博之，田中巧，小澤香織，松浦脩治，村松正實，岡崎康司，林崎良英

T7 RNAPの伸長反応機構の解析及び活性化因子の探索

第21回日本分子生物学会年会，横浜

1998年12月16日－19日

33.佐々木宣哉，伊澤真樹，綿引正則，小澤香織，田中巧，米田祐康，松浦脩治，Piero Carninci，村松正實，岡崎康司，林崎良英

新規塩基配列決定法：Transcriptional sequencing

第21回日本分子生物学会年会，横浜

1998年12月16日－

19日

34.佐々木宣哉，伊澤真樹，菅原雄一，田中巧，綿引正則，小澤香織，大原英治，船木弘子，米田祐康，松浦脩治，村松正實，岡崎康司，林崎良英
転写シーケンスにおけるcompressionの解消とその解析結果について
第21回日本分子生物学会年会，横浜
1998年12月16日－19日

35.ピエロ・カルニンチ，柴田裕子，河合純，川鱒滋，今野英明，水野洋介，小澤康裕，福西快文，菅原雄一，柴田一浩，伊藤昌可，綿引正則，村松正實，岡崎康司，林崎良英
完全長鎖 cDNA の高効率クローニング法
第21回日本分子生物学会年会，横浜
1998年12月16日－19日

36.柴田裕子，ピエロ・カルニンチ，河合純，今野英明，長岡純治，小澤康裕，菅原雄一，柴田一浩，伊藤昌可，川鱒滋，綿引正則，村松正實，岡崎康司，林崎良英

完全長 cDNA エンサイクロペディア作成のためのcDNAライブラリーのノーマライゼーションとサブトラクション

37.柴田一浩，長岡純治，佐々木宣哉，村松正實，林崎良英，中村伸，原田亨，狭間一，西根勤，池上孝，柏木克也，山本林太郎，松本博幸，坂口澄人，藤分秀司，井上光二，十川好志
384本マルチキャピラリーシーケンシングシステムの開発
第21回日本分子生物学会年会，横浜
1998年12月16日－19日

38.小松 誠，岡崎康司，館野美成子，河合 純，村松正實，林崎良英
RLGS-M法を用いたゲノム規模的解析によるマウス肝癌発症に関わると考えられる遺伝子の単離
第21回日本分子生物学会年会，横浜
1998年12月16日－19日

39.館野 美成子，柴田 一浩，河合 純，村松正實，

岡崎康司，林崎 良英
BAC library の簡便な
shotgun system の構築
第21回日本分子生物学会年
会，横浜
1998年12月16日－
19日

40.三木 理雅，岡崎 康司，
外丸 靖浩，水野 洋介，川
鱒 滋，今野 英明，河合純，
村松 正實，J. DeRisi, M.
Eisen, V. Iyer, P.O. Brown,
林崎 良英
マウスcDNA microarrayを用
いた発現プロファイルの解
析
第21回日本分子生物学会年
会，横浜
1998年12月16日－
19日

41.水野 洋介，Piero
Carninci，岡崎 康司，天沼
宏，村松 正實，林崎 良
英
cDNA 視覚化における新し
い window 作成法
第21回日本分子生物学会年
会，横浜
1998年12月16日－
19日

42.外丸 靖浩，岡崎 康司，
河合純，Ariana Wheaton，
Penny Dong，林崎 良英
蛍光標識プライマーを用い

たマウス全ゲノム染色体ス
キャンニングセットの開発
第21回日本分子生物学会年
会，横浜
1998年12月16日－
19日

43.守屋繁春，大熊盛也，
Piero Carninci，林崎良英，
工藤俊章
シロアリ腸内共生系からの
完全長 cDNA ライブラリー
の構築
第21回日本分子生物学会年
会，横浜
1998年12月16日－
19日

44.森本孝司，門叶冬樹，谷
畑勇夫，林崎良英
シンチレーションファイバ
ーを用いた位置検出型荷電
粒子検出
日本物理学会，東京
1998年3月30日－4
月2日

45.林崎良英
RISA (Riken Integrated
Sequence Analysis system)を
用いた cDNA エンサイクロ
ペディアの作成
文部省特定領域研究「ゲノ
ムサイエンス」公開シンポ
ジウム，東京
1999年1月29日

46.林崎良英

Full-length mouse cDNA
analysis by automated
fluorescent 384 capillary
sequencer system (RISA:
Riken Integrated Sequence
Analysis system)

第17回高峰カンファレンス,
東京

1999年2月6日—7日

47.林崎良英

最近のゲノム解析ビジネス
の動向について「ゲノム科
学が切り拓く新しい世界」
日本機械工業連合会講演会,
東京

1999年2月8日

48.林崎良英

ゲノムエンサイクロペディ
アとポストシーケンス Era
横浜市立大学リカレント講
座「ゲノム科学と構造生物
学」, 横浜

1999年3月1日

49.林崎良英

ゲノム科学と遺伝子エンサ
イクロペディアが切り拓く
新しい世界
富山県バイオ産業振興協会
講演, 富山

1999年5月14日

小児腫瘍におけるがん関連遺伝子の異常の把握と その情報の診断・治療への応用

分担研究者 山田正夫 国立小児病院小児医療研究センター先天異常研究部長

研究要旨

がん遺伝子がん抑制遺伝子のいくつかは同時に奇形の責任遺伝子である。ウィルムス腫瘍遺伝子 WT1 の変異を先天性腎形成不全症患者で多数見出し、転写調節能との関係で解析した。発癌過程や抗がん剤作用にアポトーシスが重要であり、関与する遺伝子と相互作用を明らかとしてアポトーシス機序を解析した。白血病・悪性リンパ腫の治療に使用されるグルココルチコイドによる白血病細胞株のアポトーシス誘導では、カスパー 3 が関与しない経路によることを見出した。高度先進医療「小児固形腫瘍の DNA 診断」の一環として、神経芽細胞腫における N-myc の増幅を診断して臨床に協力した。

A. 研究目的

ウィルムス腫瘍の責任遺伝子として同定された WT1 遺伝子は、泌尿生殖器の形成不全症の責任遺伝子であるなど、泌尿生殖器の発生分化に関与する転写調節因子である。WT1 変異を同定するとともに、WT1 産物の機能と他遺伝子の発現調節、および WT1 遺伝子自身の発現調節を解析した。アポトーシスの調節は発癌や抗がん作用に重要な役割を果たしている。アポトーシス過程に関与する遺伝子を同定し、相互作用を解析し、個々の系でのアポトーシス過程を明らかとする。

B. 研究方法

腫瘍および患者ゲノムでの変異を PCR 法などで同定した。培養哺乳動物細胞を用い、クローン化された遺伝子を導入し、レポーター遺伝子によって発現調節を解析した。培養細胞にアポトーシスを誘導し、その過程の反応を、遺伝子レベル、蛋白質レベルで解析した。

C. 研究結果

1) ウィルムス腫瘍、先天性腎不全を伴う Denys-Drash 症候群や Frasier 症候群にお

いて WT1 の変異を検出した。変異蛋白質を発現させて転写活性能を解析し、表現型との関係で調査した。

- 2) ウィルムス腫瘍、無虹彩症、泌尿生殖器形成異常、精神発達遅滞をともなう WAGR 患者は、WT1 および PAX6 遺伝子を含む複数の近接遺伝子の欠失による合併症とされてきた。しかし、WT1 はヘミ接合性を示すにもかかわらず、PAX6 はヘテロ接合性を維持しており、従来の考えが必ずしも当てはまらない 1 例を見出し、細胞株を樹立して欠失部位を精査した。一方、PAX6 遺伝子発現によって WT1 転写が促進され、また PAX6 の変異によってはその作用が消失するなど相互作用があることを見出した。
- 3) 白血病・悪性リンパ腫の治療に使用されるグルココルチコイド(GC)によるアポトーシス反応を、白血病細胞株を用いて解析した。活性化されるカスパー種を同定し、ミトコンドリアや DNA の変化にいたる過程を解析した。この反応過程では、多くのアポトーシス過程で活性化されることが報告されているカスパー 3 は限定分解を受けておらず、それに代わってカスパー 6 と 7 が活性化されていた。広範囲のカスパー阻害剤で

ある zVAD-fmk はミトコンドリアの膜電位低下、過酸化酸素の産生、細胞死そのものを効率よく抑制したが、カスパー 3 様プロテアーゼに特異的な阻害剤 Ac-DEVD-CHO は DNA の断片化は抑制したが、ミトコンドリアの変化及び細胞死そのものはほとんど阻害しなかった。以上の点から GC によるアポトーシスは少なくとも 697 細胞株においてはカスパー 3 が関与しない特殊な経路をとるアポトーシスであること、また zVAD-fmk で阻害され Ac-DEVD-CHO で阻害されないカスパーがミトコンドリアの変化より上流に存在することが示唆された。

- 4) 高度先進医療「小児固形腫瘍の DNA 診断」の一環として、神経芽細胞腫における N-myc の増幅を診断して臨床に協力した。

D. 考察

がん遺伝子がん抑制遺伝子が同定され、対応関係は確立されていても、発癌過程の詳細は不明な点が多い。個々の責任遺伝子の機能や調節作用を解析し、順次素過程を明らかにして行きたい。WAGR 症候群では、従来の近接遺伝子による合併症説以上に、近接遺伝子の相互作用が示唆された。

E. 結論

WT1 遺伝子の発現調節に関して新しい知見を得た。アポトーシス過程で新しい反応経路を見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Azuma N, Hotta Y, Tanaka H, Yamada M. Missense mutations in the PAX6 gene in aniridia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2524-2528, 1998.

Azuma N, Yamada M. Missense mutation at the C terminus of the PAX6 gene in ocular anterior segment anomalies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:828-830, 1998.

Li XK, Okuyama T, Tamura A, Enosawa S, Kaneda Y, Takahara S, Funashima N, Yamada M, Amemiya H, Suzuki S. Prolonged survival of rat liver allografts transfected with Fas ligand-expressing

plasmid. *Transplantation* 66:1416-1423, 1998.

Miyashita T, Nagao K, Krajewski S, Salvesen GS, Reed JC, Inoue T, Yamada M. Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ* 5:1034-1041, 1998.

Miyashita T, Nagao K, Ohmi K, Yanagisawa H, Okamura-Oho Y, Yamada M. Intracellular aggregate formation of dentatorubral-pallidoluyian atrophy (DRPLA) protein with the extended polyglutamine. *Biochem Biophys Res Commun* 249:96-102, 1998.

Okuyama T, Fujino M, Li XK, Funeshima N, Kosuga M, Saito I, Suzuki S, Yamada M. Efficient Fas-ligand gene expression in rodent liver after intravenous injection of a recombinant adenovirus by the use of a Cre-mediated switching system. *Gene Ther* 5:1047-1053, 1998.

Okuyama T, Kosuga M, Takahashi S, Sasaki K, Yamada M. Hepatocyte-specific gene expression by a recombinant adeno-associated virus vector carrying apolipoprotein E enhancer and α 1-antitrypsin promoter. *Gene Ther Mol Biol* 3:67-74, 1998.

Okuyama T, Li XK, Funeshima N, Fujino M, Sasaki K, Kita Y, Kosuga M, Takahashi M, Saito H, Suzuki S, Yamada M. Fas-mediated apoptosis is involved in the elimination of gene-transduced hepatocytes with E1/E3-deleted adenoviral vectors. *J Gastroenterol Hepatol* 13 Suppl:S113-118, 1998.

Sakai K, Yamada M, Horiba N, Wakui M, Demura H, Suda T. The genomic organization of the human corticotropin-releasing factor type-1 receptor. *Gene* 219:125-130, 1998.

Takayama S, Krajewski S, Krajewska M, Kitada S, Zapata JM, Kochel K, Knee D, Scudiero D, Tudor G, Miller GJ, Miyashita T, Yamada M, Reed JC. Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer*

Res 58:3116-3131, 1998.

Yuan ZR, Kohsaka T, Ikegaya T, Suzuki T, Okano S, Abe J, Kobayashi N, Yamada M. Mutational analysis of the Jagged 1 gene in Alagille syndrome families. *Hum Mol Genet* 7:1363-1369, 1998.

2. 学会発表

Miyashita T, Nagao K, Ohmi K, Okamura-Oho Y, Yamada M. Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) protein is cleaved during apoptosis. American Association for Cancer Research Special Conference, Molecular Mechanisms of Apoptosis Regulation, Palm Springs, January 9-13, 1998.

奥山虎之、李 小康、田村明彦、藤野真之、舟島直子、金田安史、山田正夫、鈴木盛一. Fas リガンド遺伝子導入による移植免疫の制御. 学際シンポジウム「臓器移植と遺伝子治療」、東京、5月28-29日、1998.

藤野真之、奥山虎之、李 小康、舟島直子、絵野沢伸、山田正夫、雨宮 浩、鈴木盛一. Cre/loxP 発現制御系アデノウイルスベクターによる Fas リガンド遺伝子の発現. 第5回日本臓器保存生物医学会総会、東京、5月28-29日、1998.

奥山虎之、李 小康、杉岡 篤、森田美和、藤野真之、舟島直子、絵野沢伸、小須賀基通、海老沼浩利、山田正夫、鈴木盛一. Fas リガンド誘発性肝炎の発症メカニズムに関する検討. 第5回肝細胞研究会、つくば、6月5-6日、1998.

小須賀基通、奥山虎之、小祝 修、李 小康、絵野沢伸、鈴木盛一、松尾宣武、Roy Chowdhury J、山田正夫. 温度感受性不死化肝細胞を用いた遺伝子治療法の開発. 第5回肝細胞研究会、つくば、6月5-6日、1998.

藤井克則、高梨潤一、長尾芳朗、山田正夫. 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) 遺伝子の構造と機能. 第150回日本小児科学会千葉地方会、第973回千葉医学会分科会、千葉、6月20日、1998.

Okuyama T, Li XK, Tamura A, Fujino M,

Funeshima N, Kosuga M, Kaneda Y, Suzuki S, Yamada M. Fas ligand expression in allograft liver by gene transfer with HVJ-liposome or adenoviral vectors allowed prolonged survival of the recipient rats. The 4th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, Tokyo, July 4-5, 1998.

Fujino M, Okuyama T, Li XK, Funeshima N, Enosawa S, Kosuga M, Suzuki S, Yamada M. Efficient Fas ligand gene expression in rodent liver after intravenous injection of a recombinant adenovirus by the use of a Cre-mediated switching system. The 4th annual meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, Tokyo, July 4-5, 1998.

山田正夫. 産物蓄積説と翻訳過程説: CAGリポート伸長病における神経細胞死をめぐる(招待講演). 神経細胞死浜名湖ワークショップ、浜名湖、7月7-8日、1998.

Li XK, Tamura A, Okuyama T, Fujino M, Funeshima N, Kita Y, Enosawa S, Kaneda Y, Yamada M, Amemiya H, Suzuki S. The preventive effect of Fas ligand expression on rat allogeneic liver transplantation. The Transplantation Society 17th World Congress, Montreal, July 12-17, 1998.

Li XK, Okuyama T, Fujino M, Funeshima N, Tamura A, Enosawa S, Kita Y, Yamada M, Amemiya H, Suzuki S. On/off switching Fas ligand gene expression in liver by Cre/loxP adenovirus vector system. The transplantation Society 17th World Congress, Montreal, July 12-17, 1998.

藤井克則、高梨潤一、宮下俊之、山田正夫. Gorlin 症候群における遺伝子解析および細胞生物学的検討. 第8回 Medical Genetics 研究会、東京、7月18-19日、1998.

小須賀基通、奥山虎之、小祝 修、田村明彦、李 小康、絵野沢伸、鈴木盛一、松尾宣武、Roy Chowdhury J、山田正夫. 温度感受性不死化肝細胞を用いた遺伝子治療法の開発. 日本人類遺伝学会第43回大会、甲府、10月14-16日、1998.

日本ウイルス腫瘍スタディグループ 岩川真由美、大川治夫、三杉和章、土田嘉

昭、横森欣司、秦 順一、山田正夫、恒松由記子、金子安比古、大橋靖雄、樋之津史郎. 日本ウイルス腫瘍グループスタディ報告-1997年登録症例-. 第14回日本小児がん学会、札幌、10月19-20日、1998.

Okuyama T, Li XK, Tamura A, Fujino M, Funeshima N, Kosuga M, Takahashi S, Kaneda Y, Suzuki S, Yamada M. Fas ligand expression in allograft liver by gene transfer with HVJ-liposome or adenoviral vectors allowed prolonged survival for the recipient rats. 49th Annual meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Chicago, November 4-10, 1998.

小須賀基通、奥山虎之、小祝 修、田村明彦、李 小康、絵野沢伸、鈴木盛一、松尾宣武、Roy Chowdhury J、山田正夫. Crigler Najjar 症候群 I 型モデルラットに対する温度感受性不死化肝細胞を用いた遺伝子治療法の開発. 第 41 回日本先天代謝異常学会、東京、11月12-13日、1998.

鈴木盛一、李 小康、奥山虎之、田村明彦、藤野真之、北 雄介、絵野沢伸、山田正夫、雨宮 浩. 臓器移植における FasL 遺伝子導入とアポトーシス(シンポジウム、アポトーシスと疾患). 第 21 回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

於保祐子、宮下俊之、山田正夫. DRPLA 蛋白はインスリン/IGF-I シグナル伝達機構に関与する. 第21回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

宮下俊之、長尾和右、山田正夫. グルココルチコイドによるアポトーシスでみられるカスパーゼの限定分解. 第21回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

大葉龍太郎、禹 麻美、井上 正、山田正夫. CAG リpeat 伸長病における神経細胞死の分子機構:連続単一アミノ酸鎖の強発現による、培養細胞および大腸菌の成育阻害. 第21回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

柳澤比呂子、宮下俊之、於保祐子、大見和宏、文東美紀、徳永勝士、山田正夫.

DRPLA 蛋白と高い相同性を持ち、また RE リpeat を持つ RERE1 蛋白の機能. 第 21 回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

藤井克則、宮下俊之、高梨潤一、河野陽一、安元慎一郎、永江祥之介、山田正夫. Gorlin 症候群における遺伝子解析および細胞生物学的検討. 第 21 回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

禹 麻美、宮下俊之、松井 淳、於保祐子、井上 正、山田正夫. 誘導可能なポリグルタミンの発現系の確立と細胞内凝集の解析. 第21回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

高橋 聡、奥山虎之、小須賀基通、佐々木恭子、李 小康、藤野真之、小祝 修、鈴木盛一、山田正夫. アデノウイルスベクターによるムコ多糖症 VII 型の遺伝子治療、特に発現蛋白の臓器組織分布についての検討. 第21回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

小須賀基通、奥山虎之、高橋 聡、佐々木恭子、小祝 修、田村明彦、鈴木盛一、松尾宣武、山田正夫. 肝クッパー細胞の排除がアデノウイルスベクターによる肝細胞遺伝子治療に与える効果. 第21回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書
DNA解析の定量化とがん遺伝子診断への応用

分担研究者 菅野康吉 国立がんセンター中央病院臨床検査部医長

研究要旨

ヒトゲノム上でヘテロ接合性の高いSNP (Single Nucleotide Polymorphism)を効率的に検索するための手法としてSHIPS(Sequencing Highly Informative Polymorphic Sites)法を開発した。本法は複数の個体に由来するゲノムDNAの混合物を鋳型として、数千ベース程度の塩基配列をLD-PCR法で増幅し、³³P標識dideoxy terminatorを用いたシーケンス反応を行うことによってヘテロ接合性の高いSNPをシーケンスラダー上で直接検出することができる。9q34.1およびp53遺伝子近傍の約16kbの領域を対象とした解析では4ヶ所のSNPを見出し、それらのヘテロ接合性は最低43%、最高53%であった。SHIPS法はゲノム上の特定の領域の遺伝子多型を効率良く見出すために有用な手法と考えられた。

A.研究目的

マイクロサテライトマーカーを利用した連鎖解析は大規模な家系資料が必要なこと、また本法の適応は比較的浸透率の高いメンデル遺伝を示す疾患に限定される等の限界が指摘されている。一方、成人病等を含む多くのcommon diseaseは、発症年齢が高い為に家系資料を集めることが困難である、浸透率が低い、多因子遺伝と考えられる場合が多い等の理由から従来の連鎖解析を用いた解析には限界がある。これらの問題点を克服する試みとしてSNP (Single Nucleotide Polymorphism)を用いてヒトゲノム全体のgenotypeを大規模に解析する試みが進められている。DNAチップ上に各SNPに対応するオリゴヌクレオチドプローブを固相化し、疾患発症の有無が明らかな個体と連鎖不均衡(LD; linkage disequilibrium)を示すSNPを見出すことによって疾患の発症に関わる特定のハプロタイプを決定することができる。LD mappingを行うために重要なことは解像力の高いSNPを見出すことであり、約10万個のSNPを使用することによって、数十キロベース程度の間隔でヒトゲノム全体を網羅することが可能と考えられる。今年度の研究ではヘテロ接合性の高いSNPを見出すための新しい方法としてSHIPS(Sequencing Highly Informative Polymorphic Sites)法を開発した。

B.研究方法

- 1) ゲノム解析により既に塩基配列が明らかにされている領域について2-5kb程度をlong distance PCR (LD-PCR) 法によって増幅する。
- 2) この際に、複数の個体に由来するヒトゲノムDNAを混合したmixtureを作成し、これをtemplateとしてLD-PCRを施行する。今回の検討には日本人13名のゲノムDNAの混合物を用いた。
- 3) 次に、LD-PCR法により増幅されたDNA断片を鋳型として³³P-dideoxy terminatorを用いたdirect sequence法によってprimer walkingを行い塩基配列を解析することにより、多型を検索した。

C. 研究結果

SHIPS法の例として、9q34.1の領域について既に発表されているコスミドクローンの塩基配列に基づき、約10Kbの領域を解析した。その結果このコスミドクローンの内部に存在するVAV2遺伝子のイントロン部分に2ヶ所のSNPを見出した。この領域のヘテロ接合性を検討したところ、それぞれ43% (6/14例中)、52% (30/58例) がヘテロ接合であり、9番染色体の欠失が高頻度に認められる膀胱癌等でblunt-end SSCP法を用いたLOH解析を行うために有用であった。さらにp53遺伝子に近接した領域についても同様の解析を行い、p53遺伝子の約10.5Kbから16Kb下流に4ヶ所のSNPを見出し、そのうちの2ヶ所について検討したところ、そのヘテロ接合性はそれぞれ42% (82/196例) および53% (42/80例)であった。これらのSNPをp53遺伝子内部の3ヶ所のSNPと組み合わせることで、この領域の日本人におけるヘテロ接合性を従来の60%から75%まで上昇させることが可能であった。

D.考察

³³P標識dideoxy nucleotideによるシーケンスはcompressionが極めて少なく、ATGCの4種類の塩基の取り込み効率も均一であることからSNPの有無をシーケンスラダー上で容易に判別でき、またPCR反応の鋳型としてヒトゲノムDNAの混合物を用いることにより、ヘテロ接合性の高いSNPのみを選択的にスクリーニングすることが可能である。実際この方法で解析した約16Kbの領域に少なくとも4ヶ所のヘテロ接合性が50%前後のSNPを見出すことが可能であった。ゲノムDNAの混合物を使用して解析することにより、日本人においてヘテロ接合性の高い遺伝子多型を選択的にスクリーニング可能である。

E. 結論

SHIPS法によってヘテロ接合性の高いSNPを選択的にスクリーニング可能であることが示された。SNPの検索は従来制限酵素断片長多型等の方法によって行われていたが、大量のゲノムの塩基配列情報が明らかにされつつある現在、塩基配列レベルで迅速にスクリーニングを行い、効率的にSNPを検索する技術としてSHIPS法は有用な手法であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Narimatsu, H., Sugano, K., et al., *Lewis and Secretor gene dosages affect CA19-9 and DU-PAN-2 serum levels in normal individuals and colorectal cancer patients.* *Cancer Res.*, 58: 512-518, 1998.

Imoto, S., Sugano, K., et al., *Determination of cytosol c-erbB-2 protein in breast cancer by sandwich enzyme immunoassay.* *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 28: 92-96, 1998.

Maekawa, M., Sugano, K., et al., *Point mutations of ornithine decarboxylase gene are an infrequent event in colorectal cancer but a missense mutation was found in a replication error positive patient with hMSH2 germline mutation.* *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 28: 383-387, 1998.

Maekawa, M., Sugano, K., et al., *Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic Polyps.* *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 28: 421-426, 1998.

Sugano, K., *A primer for genetic counseling of hereditary cancer-visits to the cancer hospitals in the United States.* *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 28: 454, 1998.

Maekawa, M., Sugano, K., *Quantification of relative expression of genes with homologous sequences using fluorescence-based single-strand conformation polymorphism analysis-application to lactate dehydrogenase and cyclooxygenase Lsozymes.* *Clin. Chem. Lab. Med.*, 36: 577-582, 1998.

Shigyo, M., Sugano, K., et al., *Allelic loss on Chromosome 9 in Bladder Cancer Tissues and Urine Samples Detected by Blunt-End Single -Strand DNA Conformation Polymorphism.* *Int. J. Cancer*, 78: 425-429, 1998.

Miyauchi, A., Sugano, K., et al., *Two germline missense mutations at codon 804 and 806 of the RET protooncogene in the same allele in a patient with multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation.* *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 1-5, 1999.

2. 学会発表

膵疾患における膵液中K-ras点突然変異検出の意義と問題点—厚生省がん研究助成金多施設共同研究による検討—：菅野康吉（平成10年4月16日）1998年日本消化器関連学会週間-DDW-Japan 1998シンポジウム（横浜）

遺伝性非ポリポーシス大腸癌の遺伝子診断と遺伝相談：菅野康吉、野村幸男、藤田伸、赤須孝之、森谷宣皓、牛尾恭輔（平成10年5月22日）日本臨床遺伝学会第22回大会（金沢）

膀胱癌におけるp53遺伝子欠失の意義と尿細胞所見について：菅野康吉、執行雅紀、日吾雅宜、島村香也子、垣添忠生、塚本泰司（平成10年6月19日）第39回日本臨床細胞学会総会シンポジウムI 膀胱癌における形態と遺伝子診断（札幌）

米国における遺伝性腫瘍の遺伝カウンセリングの現状について：菅野康吉（平成10年6月27日）第4回家族性腫瘍研究会学術集会（東京）

膀胱癌における腫瘍と尿のLOH解析と尿を用いたDNA診断への応用：執行雅紀、菅野康吉、関谷剛男、垣添忠生（平成10年9月29日）第18回腫瘍マーカー研究会（東京）

新たな高感度のHPV-DNA検出・タイピング法（nested PCR-SSCP法）の確立：中川博之、久布白兼行、塚崎克己、菅野康吉、野澤史朗（平成10年9月29日）第18回腫瘍マーカー研究会（東京）

大腸腫瘍におけるp53遺伝子不活化の機序：菅野康吉、藤田伸、深山紀子、谷口高広、関谷剛男、垣添忠生（平成10年10月2日）第57回日本癌学会総会（横浜）

大腸癌遺伝子異常と治療切除後再発との相関：藤田伸、深山紀子、菅野康吉、三宅秀夫、赤須孝之、森谷宣皓（平成10年10月2日）第57回日本癌学会総会（横浜）

良性膵疾患の膵液中K-ras突然変異の意義と問題点：中泉明彦、上原宏之、竹中明美、石川治、大東弘明、竜田正晴、菅野康吉（平成10年9月30日）第57回日本癌学会総会（横浜）

膵癌の診断における膵液中telomerase活性とK-ras変異検出の意義：上原宏之、中泉明彦、竜田正晴、飯石浩康、馬場都、竹中明美、大東弘明、石川治、岡田周市、菅野康吉（平成10年10月2日）第57回日本癌学会総会（横浜）

ヒト大腸癌組織におけるhMSH3とhMSH6のmRNA発現量比：前川真人、菅野康吉、柏原秀史、藤田伸、垣添忠生（平成10年10月1日）第57回日本癌学会総会（横浜）

ヒト神経膠腫におけるPTEN遺伝子変異、並びにマイクロサテライト不安定性の解析：昆博之、信國宇洋、園田順彦、野村幸男、菅野康吉、隈部俊宏、吉本高志、関谷剛男、村上善則（平成10年10月1日）第57回日本癌学会総会（横浜）

Lewis遺伝子、Secretor遺伝子の遺伝的多型性が、CA19-9、DU-PAN-2血清値に大きく影響する：岩崎裕子、池原謙、工藤崇、西原祥子、菅野康吉、大倉久直、藤田伸、広橋説雄、成松久（平成10年9月30日）第57回日本癌学会総会（横浜）

新たなスキルス胃癌細胞株の樹立と遺伝子増幅：柳原五吉、佐々木博己、上田哲也、根津雅彦、桑原勝孝、山田行重、菅野康吉、寺田雅昭（平成10年9月30日）第57回日本癌学会総会（横浜）

臨床検体を用いた腭腫瘍における遺伝子欠失の解析：松原央、執行雅紀、谷口高広、深山紀子、菅野康吉、小菅智男、関谷剛男、垣添忠生（平成10年10月1日）第57回日本癌学会総会（横浜）

膀胱がんにおける腫瘍と尿からの第9染色体および第17染色体短腕の欠失の解析：執行雅紀、菅野康吉、鳶巢賢一、塚本泰司、関谷剛男、垣添忠生（平成10年10月1日）第57回日本癌学会総会（横浜）

