

平成10年度 厚生科学研究費補助金
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

「ヒト難聴、がん関連遺伝子の単離のための動物ゲノム解析」
(H10-ゲノム-019)

研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 木南 凌
(新潟大学医学部教授)

目 次

総括研究報告書

「ヒト難聴、がん関連遺伝子の単離のための動物ゲノム解析」

木南 凌（新潟大学医学部生化学第一教室教授）

．．．．． 1

分担研究報告書

「聴覚平衡感覚障害マウスおよびリンパ腫感受性マウスのゲノム解析」

木南 凌（新潟大学医学部生化学第一教室教授）

．．．．． 6

分担研究報告書

「PhIP 大腸発がん感受性遺伝子群の同定」に関する研究

中釜 齊（国立がんセンター研究所生化学部長）

．．．．． 11

分担研究報告書

「ヒト聴覚障害モデルジャクソンシェーカー(*js*)マウスからの
原因遺伝子のポジショナルクローニング」

米川 博通（（財）東京都臨床医学総合研究所実験動物研究部門）

．．．．． 15

総括研究報告書

ヒト難聴、がん関連遺伝子の単離のための動物ゲノム解析

主任研究者 木南 凌 新潟大学医学部 教授

研究要旨 ①聴覚障害モデルマウスjsを対象にポジショナルクローニングを行い、有力な候補遺伝子として新しいキネシン様遺伝子を見いだした。jsは少なくとも21のエクソンをもち、6種類のアイソフォームが存在する。BACトランスジェネシスによるレスキュー実験が進行中である。②リンパ腫発症に関与する2種類のがん抑制候補遺伝子が単離された。1つは11番染色体上に存在する既知の遺伝子・Ikarosであり、もう1つは12番染色体上に存在する未知の遺伝子であった。Ikarosの変異解析の結果、アクチベーションドメインに1つのナンセンス変異と3つのフレームシフト変異を検出した。一方、未知の遺伝子については変異の検索が進行中である。③ラット大腸がん感受性遺伝子座を染色体16番のD16Rat40とD16Rat60の間約8cMの範囲に特定した(ロッド値=4.2)。一方、抵抗性座も染色体6、9、11番にマップすることができた。

木南 凌 新潟大学医学部 教授
中釜 斉 国立がんセンター研究所
発ガン研究部 部長
米川 博通 東京都臨床医学総合研究所
実験動物研究部 部長

つ可能性のある新生児を対象に重点的な発音訓練を施すことにより、言語障害を軽減化することが可能となるはずである。②発がん関連遺伝子を探索したヒトゲノム解析は多大な貢献をもたらしてきたが、解析対象家系が現在限界に近づきつつある。そこで、今後は動物モデル系の利用が重要と考えられる。本研究ではリンパ腫、大腸がんを対象にマウス、ラットのゲノム解析を行う。

A. 研究目的

疾患原因遺伝子の解析による病態の解明や診断法の開発は現在ヒトゲノム解析に負うところが大きい。しかし、モデル動物を用いた解析系も同時に重要である。本研究では単一因子性の聴覚障害を示すjs、sh-2変異、および複数因子が関与するがんを対象に、動物ゲノム解析法により原因遺伝子の探索を行う。①劣性突然変異js、sh-2マウスはヒトの非症候群性の常染色体劣性難聴(DNFB)のモデルである。現在まで、少なくとも22種類のDNFBの内単離された遺伝子は僅かに5種類である。約2,000人に1人の頻度で出現するヒト聴覚障害新生児は難聴と共に深刻な言語障害を伴う。出生後早期の遺伝子診断が可能になれば、聴覚障害を持

B. 研究方法

①js、sh-2候補遺伝子およびがん抑制遺伝子候補の検索：エクソントラッピング法、cDNA選択法、SPM法(DDGE法の1種)、およびヒト配列との保存領域の選択法を用いた。エクソン判定にはGRAILプログラム、データベースを利用した相同性検索法を採用した。②cDNAの単離にはライブラリーの選択法、PCR法によるエクソンの連結法、5'-RACE法を用いた。③放射線照射：放射線は生後4週齢から1週間間隔で2.5Gyずつ4回の分割

照射を行った。④大腸癌感受性座のタイプング：戻し交配ラットにヘテロサイクリックアミン(PhIP)を 400ppm 投与し、異常腺窩(ACF)の誘発を観察した。遺伝子連鎖解析には、解析ソフト MapManager QTL ver 2.0 を用いた。

C. 研究結果

① sh-2 難聴原因遺伝子として新しいミオシン遺伝子 (15 型) を発見した。アクチン結合ドメインに変異が存在し、この遺伝子が原因遺伝子であると判断された。一方、js 座をカバーする連結 BAC クローン群の解析から js 変異についても有力候補、キネシン様遺伝子 (DAK) が発見された。js マウスにのみ特異的な変異をもつ cDNA 断片が見つかり、その断片を含む完全長 cDNA クローンの単離を試みた。これには 5'-、および 3'-RACE 法と内耳の cDNA ライブラリーのスクリーニング法を用いた。その結果、現在までに約 3.9kb の断片を単離し、塩基配列を決定した。アミノ酸配列の相同配列検索から、その分子はキネシン様タンパク質であることが判明した。DAK 遺伝子全領域を含む BAC のショットガンシーケンスを行い、7kb のプロモーター全領域と 42kb のコーディング領域の塩基配列を明らかにした。発現パターンを 15 日胚から生後 4 週齢までの頭部から抽出した mRNA を用いて、また in situ ハイブリダイゼーション法を用いて観察した。発現は生後まもなく認められ、5 日目に最も強い発現を示した。内耳の組織分化は生後 5 日目頃より盛んになることから、この遺伝子の発現パターンはその分化と非常によい一致を示した。以上の結果から、我々はこのキネシン様タンパク質が js 突然変異に対する候補遺伝子であると結論した。DAK が原因遺伝子であることを確認するため、BAC トランスジェネシスによる形質の回復実験

を行っている。

②リンパ腫抑制遺伝子の単離：1) LOH 解析：リンパ腫発症に關与する 3 種類のがん抑制遺伝子座を見だし、それが染色体 D11Mit71 座 (セントロメア近傍)、染色体 D12Mit279 座 (約 0.45cM 領域内)、D16Mit122 座 (約 0.29cM 領域内) にあることを報告してきた。今年度行った候補遺伝子の検索から、染色体 11 番、12 番上に 2 つの候補遺伝子を見いだすことができた。2) 第 11 番染色体上の候補遺伝子・Ikaros の同定：LOH 解析から LOH のピーク領域はセントロメア近傍 4cM 領域内にあることが判明したが、その中に Ikaros 遺伝子がすでにマップされていた。本遺伝子はリンパ球の成熟をコントロールする遺伝子として単離されたが、その KO マウス (ヘテロ接合体) が T 細胞腫を発症することから、Ikaros は一つの候補遺伝子となり得る。そこで、放射線誘発リンパ腫 (71 サンプル) でホモ欠損が見られるかどうかを検討したところ、3 つのホモ欠損を示すケース、4 つのホモ欠損らしいケースを見いだすことができた。次に、2 つの Zinc finger ドメインと 1 つの活性化ドメイン領域について変異の検索を試みた。その結果、活性化ドメイン領域に集中して 1 つのナンセンス変異と 3 つのフレームシフト変異を検出された。これらの解析結果から、Ikaros 遺伝子は有力な候補遺伝子であることが判明した。3) 染色体 D12Mit279 座近傍の新規候補遺伝子：BAC クローンによる物理地図の作成を行った結果、TLR12a 領域を完全に含む BAC による連結クローンの単離が完了した。それは 20 の BAC クローンからなる。LOH 解析を詳細に行い、その結果をこの物理地図上に投影させると、LOH のピークはほぼ 35kb という極めて狭い領域に収まることが分かった。この領域を含む BAC クローンのランダム配列決定

により、1つの有力候補遺伝子 (DNA 結合ドメインをもつ) が検索された。この候補遺伝子に変異が見られるかどうかを現在アッセイ中である。

③ラット大腸がん感受性/抵抗性遺伝子座の同定：加熱肉食品中の発がん物質 PhIP をラットに投与することにより誘発される aberrant crypt foci (ACFs) の数を量的形質として、感受性遺伝子の連鎖解析を行った。BUF ラットは高感受性 (ラット一匹当たり平均 12.2 個の ACF)、ACI は抵抗性 (0.9 ACF / rat)、F344 は中等度の感受性 (3.4 ACF / rat) を示し、系統間で感受性に差が認められた。F1 ラットを用いた実験結果より、F344 ラットは優性の感受性遺伝子を有すること、また BUF と ACI の F1 ラットを用いた実験結果から、BUF ラットには劣性の感受性遺伝子、或いは ACI ラットに優性の抵抗性遺伝子が存在することが示唆された。(F344 x ACI) F1 x ACI 戻し交配ラット 170 頭を対象にした連鎖解析の結果、F344 型感受性遺伝子の候補染色体座はラット染色体 16 番 D16Rat40 と D16Rat40 の間約 8cM の範囲 (Lod 値 4.2) にマップすることができた。この領域を含むコンジェニックラットを現在精力的に作製中で、さらに詳細なマッピングを進行させている。一方、ACI ラットに存在する優性の抵抗性遺伝子座 (或いは BUF の劣性感受性遺伝子座) に関しては、(BUF x ACI) F1 x BUF の 206 頭の戻し交配 (N2) ラットを用いた ACF 誘発の感受性実験を行っている。現在までの解析結果から、抵抗性を与える遺伝子座を染色体 6、9、11 にマップすることができた。

D. 考察

① sh-2 候補遺伝子として新しいタイプのミオシン 15 型遺伝子が単離された。これでヒトの DFNB3 の遺伝子診断の基礎が

完成した。日本の遺伝性難聴の家系の組織化が待たれる。一方、js の有力な候補遺伝子も単離された。それはキネシン様蛋白を指定する遺伝子であった。キネシン様蛋白が聴覚という感覚器機能にも重要な役割を果たしているという発見は注目に値する。ヒトやマウスの遺伝性聴覚障害のゲノム解析から、非筋肉型の 6 型あるいは 7a 型ミオシンが原因遺伝子となることが報告されている。最近、英国の Steve Brown らは 7a 型ミオシンの機能構造を詳細に解析した結果、キネシンと結合可能な機能ドメインをもつと報告している。従って、js 候補遺伝子としてキネシン様遺伝子が単離されたことは、ミオシン蛋白とキネシン蛋白が相互作用をしている可能性を強く示唆している。

② 1) 第 11 染色体上の Ikaros 候補遺伝子：リンパ腫発症に関与する 2 つのがん抑制遺伝子候補が単離された。第 11 染色体上の LOH 解析、ホモ欠損領域検索、変異の同定により、Ikaros 遺伝子が候補として選ばれた。この遺伝子は細胞核で働く転写因子でリンパ系細胞の分化、成熟に関与することが知られている。ホモ欠損マウスはリンパ球が造られず、重篤な免疫不全となる。一方、ヘテロ欠損マウスは異常な T リンパ球を産出し、それらの細胞は生後 3 ヶ月頃になって悪性腫瘍へと変化する。従って、Ikaros ががん抑制遺伝子である可能性は極めて高い。今後、ヒトの T 細胞白血病で Ikaros が一つのがん抑制遺伝子として働いているかどうかを検討する。

2) 第 12 染色体上の未知の候補遺伝子：D12Mit279 座近傍の共通欠失領域 TLSR12a を約 35kb 領域にまで限定することができた。これは候補遺伝子の一部が少なくともこの領域にあるということの意味する。従って、塩基配列の決定は 35kb 領域全体とその周りを行う必要があ

る。前者はランダムシーケンスとプライマー歩行法により全配列を決定した。後者の戦略としてBACクローンのショットガンシーケンス法をとった。領域内の配列を対象に GRAIL プログラムを利用したエクソン予測を、また蛋白・核酸の配列相同性による ESTの検索などを行った。その結果、約 500 のアミノ酸から成る一つの候補遺伝子が得られた。現在変異が存在するかどうかの検討を行っている。

3)D16Mit122 近傍の共通アレル消失領域の物理地図作成を YAC、BAC クローンの単離することにより行った。両者による物理地図は完成したが、BAC 単独での連結クローンについては未だに完成に至っていない。これを現在急いでいる。

③ラット大腸がん感受性遺伝子座を特定した。それはラット染色体 16 番 D16Rat40 と D16Rat40 の間約 8cM の範囲にあるが、そのロッド値が 4.2 と高い。今後はポジショナルクローニングに向けて遺伝子の局在性を 1-2cM にまで狭めて行く必要がある。この目的達成のために本領域に存在する多型マーカーを数多く単離する。同時に、コンジェニックラットおよびその組換えラットを作製し、感受性テストを行って行く予定である。一方、ACI ラットの優性抵抗性遺伝子座の検討では、その存在が染色体 6、9、11 番にあることが分かった。今後、さらに詳細に大腸がん抵抗性遺伝子のマッピングを進めていく方針である。

E. 結論

①js 聴覚障害変異領域をカバーする BAC クローンを検索し、新しいキネシン様遺伝子を単離した。BAC トランスジェネシスにより形質の快復実験を行っている。
②リンパ腫発症に関与する 2 種類のがん抑制遺伝子候補が単離された。一つは第 11 染色体上の既知の遺伝子・Ikaros であ

り、ホモ欠損、変異が同定された。もう一つは第 12 染色体上の新規の遺伝子である。③ラット大腸がん感受性遺伝子座を染色体 16 番 D16Rat40 と D16Rat40 の間約 8cM の範囲に特定した。

F. 研究発表

1.論文発表

T. Shinbo, A. Matsuki, Y. Matsumoto, S. Kosugi, Y. Takahashi, O. Niwa and R. Kominami (1999)

Allelic loss mapping and physical delineation of a region harboring a putative thymic lymphoma suppressor gene on mouse chromosome 12. *Oncogene* (in press)

S. Kosugi, T. Miyazawa, D. Chou, Y. Saito, T. Shinbo, A. Matsuki, H. Okano, C. Miyaji, H. Watanabe, K. Hatakeyama, O. Niwa and R. Kominami (1999)

Mutations in the p53 and scid genes do not cooperate in lymphomagenesis in doubly heterozygous mice. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 255, 99-103.

N. Koide, Y. Matsumoto, S. Kosugi, D. Chou, K. Sakai, K. Hatakeyama, O. Niwa and R. Kominami (1999)

Accumulation of recombinant chromosomes and low fidelity of transmission of chromosome X DNA markers in γ -ray induced lymphomas lacking p53. *Molecular Carcinogenesis* 24,57-63.

Y. Wakabayashi, Y. Takahashi, Y. Kikkawa, H. Okano, Y. Mishima, T. Ushiki, H. Yonekawa and R. Kominami (1998)

A novel type of myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-2. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 248, 655-659.

- Y. Ishiguro, M. Ochiai, T. Sugimura, M. Nagao, H. Nakagama (1999)
Strain differences of rats in the susceptibility to aberrant crypt foci formation by 2-amino-1methyl-6-phenyl imidazo [4,5-b]pyridine: no implication of Apc and Pla2s genetic polymorphisms in different susceptibility. *Carcinogenesis*, (in press)
- R. H. Dashwood, M. Suzui, H. Nakagama, T. Sugimura and M. Nagao (1998)
High frequency of β -Catenin (*Ctnnb1*) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat. *Cancer Research*, 58, 1127-1129.
- H. Nakagama, K. Souda, M. Ochiai, I. Yukiko, T. Sugimura, M. Nagao (1999)
Genetic analysis of the susceptibility in rats to aberrant crypt foci formation 2-amino-1methyl-6-phenyl imidazo [4,5-b]pyridine, PhIP. *Cancer Letters*, (in press)
- T. Shimokawa, M. Masutani, T. Nozaki, H. Nakagama, S. Araki, Y. Aoki, and T. Sugimura (1999)
The human poly (ADP-ribose) glycohydrolase maps to chromosome 10q11.23-21.1 by fluorescence in situ hybridization. *Human Cell*, (in press)
- Y. Y. Maeda, S. Takahama and H. Yonekawa (1998)
Four dominant loci for the vascular responses by the antitumor polysaccharide, lentinan. *Immunogenet.*, 47, 159-165.
- H. Nakano, S. Mori, H. Yonekawa, H. Nariuchi, A. Matsuzawa and T. Kakiuchi (1998)
A novel mutant gene involved in T lymphocyte specific homing into peripheral lymphoid organs on mouse chromosome 4. *Blood*, 91, 2886-2895.

分担研究報告書

聴覚平衡感覚障害マウスおよびリンパ腫感受性マウスのゲノム解析

分担研究者 木南 凌 新潟大学医学部 教授

研究要旨 ①ヒト遺伝性難聴疾患 DFNB3 と類似の表現型を示す sh-2 変異マウスの原因遺伝子・15 型ミオシン遺伝子を単離した。sh-2 類似の新しい変異マウス・ns の原因遺伝子座を第 10 染色体にマップした。②リンパ腫発症に関与する 3 種類のがん抑制遺伝子座のゲノム解析から 2 つの候補遺伝子が単離された。1 つは 11 番染色体上に存在する既知の遺伝子・Ikaros であり、もう 1 つは 12 番染色体上に存在する未知の遺伝子 (DNA 結合ドメインをもつ) である。Ikaros の変異解析の結果、アクチベーションドメインに 1 つのナンセンス変異と 3 つのフレームシフト変異を検出した。一方、未知の遺伝子については変異の検索が進行中である。

A. 研究目的

①劣性突然変異 sh-2 マウスはヒトの非症候群性の常染色体劣性難聴(DFNB3)のモデルであり、類似の ns マウスは未知の DFNB のモデルであると考えられる。現在まで、22 種類の DFNB 座の内単離された遺伝子は僅かに 5 種類であり、更なる単離同定が求められている。約 2,000 人に 1 人の頻度で出現するヒト聴覚障害新生児は難聴と共に深刻な言語障害を伴う。出生後早期の遺伝子診断が可能になれば、聴覚障害を持つ可能性のある新生児を対象に重点的な発音訓練を施すことにより、言語障害を軽減化することが可能となるはずである。

②ヒトを対象とし、新しいがん抑制遺伝子を単離するには多大な労力を必要とする。また、社会的・倫理的な問題もその障害となっている。そこで、本研究は

モデル動物を利用した新しいがん抑制遺伝子の単離を目指している。具体的には、BALB/c 系統と MSM 系統の F1 マウスのリンパ腫を対象とし、その LOH 解析からポジショナルクローニングに進む。我々は昨年度までの研究からすでに染色体 11、12、16 番上に未知のリンパ腫抑制遺伝子の存在を示してきたが、これらのがん抑制候補遺伝子をゲノム解析法により単離する。得られる候補遺伝子がヒトのがん抑制遺伝子として実際に働いているかどうかを、ヒトホモログを分離することにより判別する。

B. 研究方法

① ns 突然変異の遺伝的解析。マウスの戻し交配は通常の方法を用いた。マッピングにはマイクロサテライトを用いた。
②交配と放射線照射:p53 遺伝子をノック

アウトした MSM マウス (p53+/-) と BALB/c マウスとの F1 マウスを作成し、放射線照射による発がん実験を行った。放射線は4週から1週間間隔で 2.5Gy ずつ4回の分割照射を行った。最終的には昨年までに作製した 650 のリンパ腫 (N2, F1 マウスから) に加え、さらに 183 の F1 リンパ腫を得た。

③ゲノム解析：LOH解析はマイクロサテライトを用い、物理地図の作成にはBACクローンを用いた。BACライブラリーはリサーチジェネティクス (RG) 社から販売されているものを用い、そのスクリーニングにはPCR法を用いた。BACクローンのインサート両末端部をSTS化することでBACクローン近傍の物理的地図の作成を行った。塩基配列からのエクソン判定にはGRAILプログラム、データベースを利用した相同性検索法を採用した。

④ cDNA の単離にはライブラリーの選択法、5'-RACE法を用いた。

C. 研究結果

① 1) sh-2 原因遺伝子の同定：sh-2 マウスの詳細な遺伝地図及び物理地図を元に、原因候補遺伝子を検索した。sh-1 原因遺伝子である 7 型ミオシンと一部相同性を示す全く新しいクラスのみオシン遺伝子を発見した。この遺伝子を対象に変異の検索を行った結果、アクチン結合ドメイン中のよく保存されたシステインにチロシンへの置換がみられた。この置換はミオシン蛋白機能を損なうに十分な変異であると想像され、この新しいミオシン遺伝子が sh-2 の原因遺伝子であると断定された。

2) ns 変異マウスの遺伝解析：新し

い難聴モデルマウス・ns が得られたので、その交配と遺伝解析を行った。得られた 168 頭の戻し交配マウスを対象にマッピングを行った結果、ns 座は第 10 染色体に存在することが判明した。11 年度からの本格的なゲノム解析の基盤ができあがった。

② 1) リンパ腫の作製：F1, N2 マウスに放射線照射し、650 のリンパ腫を得ていたが、今年度はさらに F1 マウスに放射線照射し、183 のリンパ腫を得た。これらの腫瘍を染色体 11 番、12 番、16 番の LOH 解析の対象とした。

2) LOH 解析：リンパ腫発症に関与する 3 種類のがん抑制遺伝子座を見だし、それが染色体 D11Mit71 座 (セントロメア近傍)、染色体 D12Mit279 座 (約 0.45cM 領域内)、D16Mit122 座 (約 0.29cM 領域内) にあることを報告してきた。今年度行った候補遺伝子の検索から、第 11 番、12 番染色体上に 2 つの候補遺伝子を見出すことができた。

3) 第 11 番染色体上の候補遺伝子・Ikaros の同定：LOH 解析から LOH のピーク領域はセントロメア近傍 4cM 領域内にあることが判明したが、その中に Ikaros 遺伝子がすでにマップされていた。本遺伝子はリンパ球の成熟をコントロールする遺伝子として単離されたが、その KO マウス (ヘテロ接合マウス) は T 細胞腫を発症することから、Ikaros は一つの候補遺伝子となり得る。そこで、放射線誘発リンパ腫でホモ欠損が見られるかどうかを検討した。71 のリンパ腫を対象に解析した結果、3 つのホモ欠損を示すケース、4 つのホモ欠損らしいケースを見出すことができた。これらのホモ欠損領域

は比較的短く、BAC長(約150kb)を超えるものはなかった。次に、2つのZinc fingerドメインと1つの活性化ドメイン領域について変異の検索を試みた。その結果、活性化ドメイン領域に集中して1つのナンセンス変異と3つのフレームシフト変異を検出した。これらの解析結果から、Ikaros遺伝子は有力な候補遺伝子であることが判明した。4)染色体D12Mit279座近傍の新規候補遺伝子：BACクローンによる物理地図の作成を行った結果、TLRS12a領域を完全に含むBACによる連結クローンの単離が完了した。それは20のBACクローンからなる。LOH解析を詳細に行い、その結果をこの物理地図上に投影させると、LOHのピークはほぼ35kbという極めて狭い領域に収まることが分かった。この領域の塩基配列の完全決定、この領域を含むBACクローンのランダム配列決定により、1つの有力候補遺伝子(DNA結合ドメインをもつ)が検索された。この候補遺伝子に変異が見られるかどうかを現在アッセイ中である。5)リンパ腫抑制遺伝子のアッセイ：得られた候補遺伝子を含むBACクローンを、新しく樹立した皮下腫瘍細胞株に導入し、そのがん細胞の増殖抑制活性を測定しつつあるが、現在その結果は得られていない。

D. 考察

①1)sh-2原因遺伝子の単離：連結BACクローンの綿密な解析により、sh-2候補遺伝子が単離された。候補遺伝子のcDNAの解析から約600アミノ酸の構造が分かり、相同配列検索から新しいタイプのミ

オシン15型遺伝子であることが判明した。ミオシン蛋白頭部にあるアクチン結合部位にシステインからチロシンへのアミノ酸の置換が見られた。本遺伝子が本当に原因遺伝子であると断定するにはレスキュー実験が必要であるが、それはアメリカのグループが行った。2)新しい難聴モデルマウス・nsを今年度から解析を始めた。マッピングの結果、nsは第10染色体D10Mit112座近傍に存在することが分かった。この染色体領域はヒト第10染色体10q22に相同領域を有するが、その領域に今のところヒト難聴遺伝子座が存在するとの報告はない。家系調査による検討が待たれる。

②1)第11染色体上のIkaros候補遺伝子：リンパ腫発症に関与する2つのがん抑制遺伝子候補が単離された。第11染色体上のLOH解析、ホモ欠損領域検索、変異の同定により、Ikaros遺伝子が候補として選ばれた。この遺伝子は細胞核で働く転写因子でリンパ系細胞の分化、成熟に関与することが知られている。ホモ欠損マウスはリンパ球が造られず、重篤な免疫不全となる。一方、ヘテロ欠損マウスは異常なTリンパ球を産出し、それらの細胞は生後3ヶ月頃になって悪性腫瘍へと変化する。従って、Ikarosががん抑制遺伝子である可能性は極めて高い。今後、ヒトのT細胞白血病でIkarosが一つのがん抑制遺伝子として働いているかどうかを検討する。

2)第12染色体上の未知の候補遺伝子：D12Mit279座近傍の共通欠失領域TLRS12aを約35kb領域にまで限定することができた。これは候補遺伝子の一部

が少なくともこの領域にあるということ
を意味し、遺伝子本体がこの領域内にあ
るというわけではない。従って、塩基配
列の決定は 35kb 領域全体とその周りを
行う必要がある。前者はランダムシーケ
ンスとプライマー歩行法により全配列を
決定した。後者の戦略として BAC クロー
ンのランダムシーケンス法をとった。領
域内の配列を対象に GRAIL プログラム
を利用したエクソン予測を、また蛋白・
核酸の配列相同性による EST の検索など
を行った。その結果、約 500 のアミノ酸
から成る一つの候補遺伝子が得られた。
現在変異が存在するかどうかの検討を行
っている。

3)D16Mit122 近傍の共通アレル消失領域
の物理地図作成を YAC、BAC クローンの
単離することにより行った。両者による
物理地図は完成したが、BAC 単独での連
結クローンについては未だに完成に至っ
ていない。これを現在急いでいる。

E. 結論

①新しい難聴モデルマウス・ns の原因
遺伝子座をマップした。ns は第 10 染色体
D10Mit112 座近傍に存在することが分か
った。この染色体領域はヒト第 10 染色体
10q22 に相同領域を有する。

②リンパ腫発症に関与する 2 種類のが
ん抑制遺伝子候補が単離された。一つは
第 11 染色体上の既知の遺伝子・Ikaros で
あり、もう一つは第 12 染色体上の未知の
遺伝子である。Ikaros についてはホモ欠
損、変異が同定され、その妥当性が示さ
れた。一方、未知の遺伝子 (DNA 結合ド
メインをもつ) については変異の検索中

である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Toshimitsu Shinbo, Atsushi Matsuki,
Yasuo Matsumoto, Shin-ichi Kosugi,
Yoshiaki Takahashi, Ohtsura Niwa and
Ryo Kominami. (1999)

Allelic loss mapping and physical
delineation of a region harboring a putative
thymic lymphoma suppressor gene on
mouse chromosome 12. *Oncogene* (in press)

Shin-ichi Kosugi, Tomonori Miyazawa,
Daizen Chou, Yoshiyuki Saito, Toshimitsu
Shinbo, Atsushi Matsuki, Hitomi Okano,
Chika Miyaji, Hisami Watanabe,
Katsuyoshi Hatakeyama, Otsura Niwa and
Ryo Kominami. (1999)

Mutations in the p53 and scid genes do not
cooperate in lymphomagenesis in doubly
heterozygous mice. *Biochem. and Biophys.
Res. Comm.* 255, 99-103.

Norihiko Koide, Yasuo Matsumoto, Shin-
ichi Kosugi, Daizen Chou, Kunio Sakai,
Katsuyoshi Hatakeyama, Ohtsura Niwa,
and Ryo Kominami. (1999)

Accumulation of recombinant chromosomes
and low fidelity of transmission of
chromosome X DNA markers in γ -ray
induced lymphomas lacking p53. *Molecular
Carcinogenesis* 24,57-63.

Futoshi Okada, Kazutomo Nakai,
Tokushige Kobayashi, Toshiyuki Shibata,

Seiichi Tagami, Yoshikazu Kawakami, Tomoji Kitazawa, Ryo Kominami, Shinichi Yoshimura, Keiichiro Suzuki, Naoyuki Taniguchi, Osamu Inanami, Mikinori Kuwawbara, Hideki Kishida, Dai Nakae, Yoichi Konishi, Tetsuya Moriuchi and Masuo Hosokawa. (1998)

Inflammatory cell-mediated tumour progression and minisatellite mutation correlate with the decrease of antioxidative enzymes in murine fibrosarcoma cells. The British Journal of Cancer 79, 377-385.

Yuichi Wakabayashi, Yoshiaki Takahashi, Yoshiaki Kikkawa, Hitomi Okano, Yukio Mishima, T. Ushiki, Hiromichi Yonekawa and Ryo Kominami. (1998)

A novel type of myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-2. Biochem. and Biophys. Res. Comm., 248, 655-659.

分担研究報告書

「PhIP大腸発がん感受性遺伝子群の同定」に関する研究

分担研究者 中釜 斉 国立がんセンター研究所 生化学部長

研究要旨

PhIPにより誘発されるラット大腸発がんモデルを用いて、大腸発がんの感受性および抵抗性を規定している遺伝的要因を連鎖解析により解明する。F344ラットが有する常染色体優性の感受性遺伝子については、170匹のバッククロスラットを用いた連鎖解析により、第16染色体のD16Rat40とD16Rat60の間、約8cMの間にマップ出来た (Lod score = 4.2)。当該領域がF344型アレルト異的なcongenic ratの作成を進め、感受性遺伝子の同定を目指す。ACIラットが有する優性の抵抗性遺伝子についても、作成したバッククロスラット202匹の内、極めて強い高感受性或いは抵抗性を示した69匹のラットを用いた予備的なQTL解析により、候補遺伝子座を染色体の6,9,11番にマップした。今後、これら感受性遺伝子群のポジショナルクローニングに向けて、当該染色体領域にマップされる数多くの遺伝多型マーカーによるタイピングをより詳細に行い、感受性遺伝子の局在領域を1-2cMの範囲まで狭めていく。

A. 研究目的

日本人のがん患者総数のうち、大腸がんの占める割合は年々増加しており、これは日本人の食生活の欧米化などの環境的な要因が深く関与していると考えられている。2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) は加熱肉食品中に含まれる変異原がん原物質であるヘテロサイクリックアミンの一つで、その含量が最も多い。PhIPをF344ラットに長期投与すると雄に大腸がん及び前立腺がんを、雌には乳がんを誘発することから、ヒトにおけるこれら臓器発癌の原因になっている可能性がある。PhIPで誘発されるラット大腸がんでは、ヒト大腸がんと同様にApc遺伝子あるいはβ-catenin遺伝子変異が高頻度に認められ、またマイクロサテライト不安定化も認められることから、ヒト大腸発がんの多段階の遺伝子変異や発がんの感受性に関わる遺伝子群を解明するためのモデル動物として有用であると考えられる。本研究では、PhIPにより誘発されるラット大腸発がんモデルを用いて、発がん感受性及び抵抗性を規定している遺伝的要因を遺伝連鎖解析により明らかにすることを目的とする。大腸発がん感受性を規定している遺伝子背景を解明することにより、遺伝的予防という全く新しいがん予防対策の開発へと発展し

うるといふ点においても極めて重要な問題である。さらに、感受性及び抵抗性遺伝子群の詳細なマップピングと遺伝子同定のために、DNAチップ等を用いた高速ゲノムタイピングが可能な遺伝多型マーカーの大量作成も平行して遂行する。

B. 研究方法

PhIPの短期投与により大腸上皮に誘発される異常陰窩aberrant crypt focus (ACF) を、大腸発がん感受性の指標として用いた。PhIPの投与方法としては、PhIP400ppm含有飼料を2週間投与し、その後4週間高脂肪食を投与する方法を用いた。実験第6週にすべてのラットを屠殺し、大腸に誘発されるACFを計測した。ACFは病理組織学的には主に過形成を呈する微少病変であり、PhIP以外の大腸発がん物質の投与によっても同様に誘発されること、ヒト大腸がんや家族性大腸腺腫症の非腫瘍部上皮にも認められること、また一部のACFではApcやK-ras遺伝子の変異が認められることから大腸前がん病変の可能性もある。ACF誘発性を指標とした遺伝解析の結果、F344は常染色体優性の高感受性遺伝子を、ACIラットは常染色体優性の抵抗性遺伝子(或いは、BUFラットに劣性の感受性遺伝子)を有することが判った。BUFラットはF344型の優

性感受性遺伝子に加え、BUF型の常染色体劣性感受性遺伝子を有すると考えた。これらのラット系統間でバッククロスラットを作成し、ACFの誘発能を解析し、各感受性或いは抵抗性遺伝子の連鎖解析を行った。連鎖解析による遺伝子マッピングには、解析ソフトMapManagerQTを用いて行った。

C. 研究結果

(1) 高感受性および抵抗性ラットの同定：

昨年度までの研究結果より、PhIPによるACF誘発性の感受性は、BUF, Wistar, F344, BN, ACIの順に高く、BUFは極めて高い感受性を、逆にACIは最も強い抵抗性を示した。さらに、各系統間のF1ラットにおけるACF誘発性を検討した結果、F344は常染色体優性の感受性遺伝子を有し、BUFはF344型の優性の感受性遺伝子に加え、常染色体劣性の感受性遺伝子を有することが判った。即ち、BUF型の劣性感受性遺伝子に対し、ACIの抵抗性遺伝子が優性に作用すると考えられる。

(2) F344型の優性感受性遺伝子のマッピング

高感受性であるF344ラットと抵抗性のACIラット間の、(F344 x ACI)F1 x ACIバッククロスラット(N2ラット)170匹を用い、個々のラットにおけるACFの誘発性を量的形質として、F344に存在する優性の感受性遺伝子のQTL解析を行ってきた。昨年までに、110個以上の多型マーカーによるゲノムワイドのタイピングを行い、感受性遺伝子をラット第16染色体にマップした。更に第16染色体上の約50個の多型マーカーを用いた、より詳細なタイピングを行うことによりD16Rat40とD16Rat60の間、約8cMのインターバルに感受性遺伝子をマップした。Interval mappingによるロッド値のピークは4.2を示した。

今年度は、さらに500匹以上のバッククロスラットを作成し、ACFの誘発性と染色体16番上の当該領域に存在する多型マーカーのゲノタイプとの関連性を検討している。上記のD16Rat40~D16Rat60間のintervalを含む、D16Rat40とD16Wox3の約15cMの間で組み換えをおこしているN2ラットで、ACFの数が6個以上を示した高感受性ラットをこれまでに11匹同定できており、感受性遺伝子はこの2つのマーカーの間に存在すると考えられる。現在、F344ラット由来の当該領域を含むコンジェニックラットの作

成を継続しており、今後、これらのコンジェニックラットを用いた発がん感受性実験を行う予定である。

(2) ACI型の優性抵抗性遺伝子のマッピング

ACIに存在する優性の抵抗性遺伝子(或いはBUF型の劣性の感受性遺伝子)についても、202匹の(BUF x ACI) x BUFのN2ラットを作成し、個々のN2ラットのPhIPに対するACF誘発性の実験を行った。各N2ラットにおけるACFの誘発数は、1匹あたりの0個という抵抗性の個体から、20個以上のACFを誘発した極めて高感受性のラットまで幅広く分布した。まず、202匹のN2ラットのうちACF誘発数が1個以下であった33匹と、7個以上のACFを誘発した36匹のN2ラットを用い、現在までに約90個の多型マーカーを用い、1500cM以上のゲノム領域をカバーする領域においてタイピングを行った。その結果、ラット第6及び第9染色体にlod score 3.0以上、第11染色体にはlod score 1.8のピークを示す複数のQTLを見出した。いずれの染色体座においても、ACI由来のアレルの存在によりACF数が有意に低く抑えられる傾向が認められ、これらの遺伝子座に発がんの抵抗性遺伝子が存在する可能性がある。今後、202匹すべてのN2ラットを用いたQTL解析により、ACI型抵抗性遺伝子をマップする。

D. 考察

F344型の大腸発がん感受性遺伝子については、lod scoreが4.2以上と高値を示したこと、また組み換えを起こしているバッククロスラットの感受性解析からも、D16Rat40とD16Rat60の間、約8cMの領域に感受性遺伝子が存在すると考えられる。今後は、ポジショナルクローニングに向けて、遺伝子の局在領域を1-2cMの範囲以内に狭めていく必要がある。この目的達成の為に本領域に存在する多型マーカー(RDA及びSNPマーカー)を数多く単離する。同時にコンジェニックラット及びそのrecombinantラットを用いた感受性実験を行い、感受性遺伝子の存在領域を絞り込んでいく事が必須である。

ACI型抵抗性遺伝子に関しては、前述した様に202匹全てのバッククロスラットを用いたQTL解析により、抵抗性遺伝子座をマッピングすることが必要である。これら抵抗性遺伝子に関しては、「遺伝子予防」という新規のがん予防法

の開発につながる可能性があり、極めて興味深いと考える。

E. 結論

ACFの誘発性を発がん性の指標としたQTL解析により、大腸発がん感受性遺伝子をラット第16染色体にマップした。また、ACI型の抵抗性遺伝子については、作成した202匹のN2ラットの内、極端に低感受性の33匹と高感受性の36匹のN2ラット、計69匹を用いた予備的なQTL解析により、候補遺伝子座を第6、第9、及び第11染色体上にマップした。今後さらに詳細に解析していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakagama H, Souda K, Ochiai M, Yukiko I, Sugimura T, Nagao M. Genetic analysis of the susceptibility in rats to aberrant crypt foci formation 2-amino-1-methyl-6-phenyl imidazo [4,5-*b*] pyridine, PhIP. *Cancer Letters* (in press)
- 2) Shimokawa T, Masutani M, Nozaki T, Nakagama H, Araki S, Aoki Y, Sugimura T. The human poly(ADP-ribose) glycohydrolase maps to chromosome 10q11.23-21.1 by fluorescence in situ hybridization. *Human Cell*, 11(4) (in press)
- 3) Ishiguro Y, Ochiai M, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H. Strain differences of rats in the susceptibility to aberrant crypt foci formation by 2-amino-1-methyl-6phenyl-imidazo[4,5-*b*]pyridine: no implication of *Apc* and *Pla2s* genetic polymorphisms in different susceptibility. *Carinogenesis* (in press)
- 4) Masutani M, Nozaki T, Nishiyama E, Shimokawa T, Tachi Y, Suzuki H, Nakagama H, Wakabayashi K, Sugimura T. Function of Poly (ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: gene-disruption study in mice. *Mol Cell Biochem* (in press)
- 5) Ochiai M, Nakagama H, Turesky RJ, Sugimura T and Nagao M. A new modification of ³²P-postlabeling method to recover IQ-DNA adducts as mononucleo- tides. *Mutagenesis* (in press)
- 6) Masutani M, Suzuki H, Kamada N, Watanabe M, Ueda O, Nozaki T, Jishage K, Watanabe T, Sugimoto T, Nakagama H, Ochiya T, Sugimura T. Poly(ADP-ribose) polymerase gene-disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2301-2304, 1999.
- 7) Masutani M, Nozaki T, Nishiyama E, Ochiya T, Nakagama H, Wakabayashi K, Suzuki H, Sugimura T. Establishment of poly(ADP-ribose)polymerase deficient mouse embryonic stem cell lines. *Proc. Japan Acad.* 74: 233-236, 1998.
- 8) Yamada S, Shima H, Toyota M, Ushijima T, Kuramoto T, Serikawa T, Okada K, Sato K, Sugimura T, Nagao M and Nakagama H. Linkage mapping of the *Bra*, *Brb* and *Brg* genes for rat protein phosphatase 2A 55 kDa B-regulatory subunit isotypes. *Jpn J Cancer Res*, 89:1014-1019, 1998
- 9) Nagao, M., Ochiai, M., Ushijima, T., Watanabe, M, Sugimura, T. and Nakagama, H. Genetic determinants and environmental carcinogens. *Mutat Res*, 402:85-91, 1998.
- 10) Dashwood, R., Suzui, M., Nakagama, H., Sugimura, T., and Nagao, M. High frequency of *b*-catenin (*Cttnb1*) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat. *Cancer Res.* 58, 1127-1129, 1998.
- 11) Suzui, H., Ushijima, T., Yoshimi, N., Nakagama, H., Hara, A., Sugimura, T., Nagao, M., and Mori H. No involvement of *Apc* gene mutations in ulcerative colitis-associated rat colon carcinogenesis induced by 1-hydroxy- anthraquinone and methylazoxymethanol acetate. *Mol. Carcinogen.* 20: 389-393, 1997.

2. 学会発表

- 1) 落合雅子、今井裕、杉村隆、長尾美奈子、中釜齊：SCIDマウスのazoxymethane (AOM) 誘発大腸発がんに対する感受性 第57回癌学会総会、1998 (横浜)
- 2) 稲森英明、落合雅子、杉村隆、長尾美奈子、中釜齊：ヒト大腸がん及び胃がんにおけるミニサテライト変異の解析 第57回癌学会総会、1998 (横浜)
- 3) 早田謙一、落合雅子、石黒由紀子、杉村隆、長尾美奈子、中釜齊：PhIPによるラット大腸発がん誘発感受性遺伝子の染色体16番へのマッピング 第57回癌学会総会、1998 (横浜)
- 4) 高塚純、祖母井庸之、佐藤雅彦、本田善子、緒方秀昭、岡本康介、畠山知昭、磯貝正博、柴

- 忠明、中釜齊：大腸腺腫症と β -catenin遺伝子変異第57回癌学会総会、1998（横浜）
- 5) 東邦大学第2外科：高塚純、佐藤雅彦、本田善子、緒方秀昭、上田一夫、岡本康介、畠山知昭、磯貝正博、柴忠明、国立がんセンター研究所・生化学：祖母井庸之、中釜齊：大腸ポリープにおける β -catenin遺伝子変異とAPC遺伝子変異第53回日本大腸肛門病学会総会、1998（東京）
- 6) Nakagama, H., Souda, K., Ochiai, M., Ishiguro, Y., Sugimura, T., and Nagao, M.: Linkage mapping of the susceptibility loci to aberrant crypt focus formation in rats induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. 89th AACR meeting 1998 (New Orleans, USA)
- 7) Nagao, M., Ushijima, T., Nakagama, H. and Sugimura, T.: Strain difference in susceptibility to digestive tract carcinogenesis in rats The 4th Joint Meeting of AACR and JCA, 1998 (Hawaii, USA)
- 8) Ochiai, M., Imai, H., Ishiguro, Y., Sugimura, T., Nagao, M., and Nakagama, H.: Cacinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in C57BL/6N and BALB/c mice. The 7th International Conference on Carcinogenic/Mutagenic N-Substituted Aryl Compounds, 1998 (Nagoya)
- 9) Nakagama, H., Soda, K., Ochiai, M., Ishiguro, Y., Ubagai, T., Sugimura, T. and Nagao, M.: Susceptibility to colon carcinogenesis induced by heterocyclic amine. The 7th International Conference on Carcinogenic/Mutagenic N-Substituted Aryl Compounds, 1998 (Nagoya)
- 10) Nakagama, H., Souda, K., Ochiai, M., Ishiguro, Y., Ubagai, T., Sugimura, T. and Nagao, M. Mapping of colon carcinogenesis susceptibility gene. 10th Japan-USA special conference Maui, 1998 (Hawaii, USA)

分担研究報告書

ヒト聴覚障害モデルジャクソンシェーカー (*js*) マウスからの原因遺伝子の ポジショナルクローニング

分担研究者 米川 博通 (財) 東京都臨床医学総合研究所
実験動物研究部門 部長

ヒト遺伝性聴覚障害の原因遺伝子の解明、および聴覚障害児に対する遺伝子診断法の開発などを目的とし、ヒト聴覚障害モデルの1つであるジャクソンシェーカー (Jackson shaker: *js*) マウスからの原因遺伝子のポジショナルクローニングを行った。これまでに構築した *js* 遺伝子座領域に対する整列BACクローン群内 (完全長約1.3メガ塩基対) において発現している遺伝子断片の突然変異解析の結果、*js* への候補遺伝子としてキネシン様蛋白DAK (Deafness associated kinesin) を単離した。そこで、今年度は、このDAKのcDNAおよび遺伝子の構造解析を重点的に行うと共に、*js* マウス、そのアليلである *seal* マウス、および正常マウスの三者間で突然変異解析を続行した。ノーザン解析によるDAKのcDNAの全長は約3.9Kbと見積もられたが、多数のアイソフォームが存在するため、3'-RACEなど通常のクローニングの手法を取ることが困難だった。そのため、DAK遺伝子全領域を含むBACを用いて、ショットガンシーケンシングを行い、遺伝子の全構造を明らかにすることにした。これまでに7Kbのプロモータ全領域と、遺伝子のコーディング領域42Kb (21個のエキソン、およびその間のイントロン) を完全にシーケンスしたが、まだ遺伝子の全長を得るには至らなかった。これまでに判明したDAKの特徴的な構造として、上述のキネシンのモータードメインの他に、ATP結合部位、ミオシンの頭部と高いホモロジーを示す領域、およびロイジンジッパーモチーフ等が存在していた。また、得られたDAKのcDNA部分配列を用い、マウス初期発生におけるDAK遺伝子の組織発現を調べた。DAKの発現は生後3日目の内耳に比較的強いことがRT-PCRとホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションで確認された。また、DAKは組織特異的なオルタネイティブスプライシングを行い、少なくとも6種類のアイソフォームの存在が確認された。さらに、このDAKが *js* 突然変異の責任遺伝子であることを直接的に証明するため、BAC-トランスジェネシスの系を開発し、研究を行った。

A. 研究目的

ヒトの聴覚障害は新生児1,500から2,000人に1人の率で生じるといわれ、またそのうちの約7割が遺伝性であると考えられている。この発症率から聴覚障害には少なくとも数十種類の遺伝子が関与していると推定されている。しかし、現在までに、聴覚障害の原因遺伝子としてはわずかが判明しているに過ぎない。また、これらの遺伝子はそれぞれ独立に発見されたもので、これらの遺伝子が内耳蝸牛を中心とする聴覚系の中でどの様な構造的・機能的関係にあるのかも全く不明のままである。

本研究は、ヒト聴覚障害モデルの1つ、ジャクソンシェーカー (Jackson shaker: *js*) マウスからその原因遺伝子を単離し、遺伝子およびそのcDNAの構造と機能を明らかに、さらにこの *js* 遺伝子に機能的・構造的

に関与する他の分子を検索することを目的とした。

B. 研究方法

- 1) *js* 候補遺伝子DAKに対するcDNAおよび遺伝子の構造解析
 1. これまで我々が構築した *js* 遺伝子座領域で発現していた遺伝子群のうち、*js* の候補遺伝子と考えられたDAKについて、そのcDNAをRT-PCR等を用いて増幅し、その構造をダイレクトシーケンシング法により決定した。
 2. DAKの遺伝子は、DAK遺伝子を完全に含む1種類のBACを用い、ショットガンシーケンシング法により構造決定を行った。
- 2) *js*、および *seal* マウスを用いた *js* 遺伝子についての突然変異部位の解析
上記の方法により、決定された塩基配列

部分について、*js*、および*seal*マウスのRNAを用い、その対応部分をRT-PCRで増幅し、これら3者についての塩基配列の比較を行い、これら3者に突然変異を起こした部位があるか否かを検討した。

3) DAK遺伝子の発現パターンの解析

1. ノーザン解析およびRT-PCRにより内耳および主要臓器での発現パターンを観察した。
2. ホールマウントin situハイブリダイゼーション法により胎生期におけるDAKの発現パターンを観察した。

4) BAC-トランスジェネシスによるレスキュー

DAK全長を含むBACクローンをマイクロインジェクションすることにより表現型のレスキューを試みた。

5) DAKのヒトホモログの単離

1. RT-PCRによりDAKのヒトホモログの単離を試みている。
2. DAKのヒトホモログを含むBACクローンの単離を行っている。

C. 研究結果

1) *js*候補遺伝子DAKに対するcDNAおよび遺伝子の構造解析

1. これまでにDAK遺伝子全領域を含むBACのショットガンシーケンシングによって、DAKプロモータの全領域7Kb(この上流には他の遺伝子が存在する)、およびコーディング領域42Kbのシーケンスが完了した。このシーケンシングにより、これまでにDAKの第21番目のエキソンまでが同定できた。

2. これまでに得られたDNAシーケンスを用い、その領域に存在する機能ドメインの検索を行った。その結果、前年度までに発見されていた、キネシンモータドメイン、ATP結合領域、コイルドコイル領域の他に、その3'側にミオシンの頭部と高い相同性を示す領域と、ロイシンジッパーモチーフを発見した。

2) *js*、および*seal*マウスを用いた*js*遺伝子についての突然変異部位の解析

1. *js*マウスと他の正常マウスの間で、昨年度PCR-SSCP解析で差が発見された、キネシンモータドメイン内に1つのミスセンス突然変異(Leu → Pro)を検出した。しかし、この変異は*js*のもう1つのアリルである*seal*では発見できなかった。

2. これまでには、上記で示した*js*に対するミスセンス突然変異以外には*js*、*seal*とも、それらに特異的な突然変異は見いだされていない。

3) DAK遺伝子の発現パターンの解析

1. ノーザン解析によるDAK遺伝子のマウス初期発生時における発現は、胎性期では発現がほとんど検出されなかった。また、成体では精巣に強く発現していたが、他の臓器では弱い発現しか見られなかった。

2. 一方、RT-PCRでは、受精後11.5日胚から、検出が可能となった。内耳では生後3日目から強い発現が見られた。

さらに、これらのRT-PCRによる増幅産物を直接シーケンスした結果、内耳においては、少なくとも4種類のDAKアイソフォームが検出された。さらに、これらを行って行ったDAK遺伝子の一次構造と比較した結果、これらのアイソフォームはオルタネイティブスプライシングによって生じていることが示唆された。

3. また、DAKが多量に発現している精巣からは、内耳とは異なるアイソフォームが存在することから、DAK遺伝子は組織特異的なオルタネイティブスプライシングにより発現が行われていることが確実にされた。

4. ホールマウントin situハイブリダイゼーション法の結果、DAKは蝸牛管の分化が起こり始まる受精後11.5日胚の耳胞で発現していることが判った。しかし、その発現は強くはなかった。また、DAKは尾部、前頭部、四肢の内側でも発現していることが明らかとなった。

4) BAC-トランスジェネシスによるレスキュー

1. 今年度中で、BAC-トランスジェネシスの系を確立することができた。

2. この系を使って、*js*のホモ接合体のマウスに対し、トランスジェネシスを数度にわたって試みたが、自然交配、およびIVF (*in vitro fertilization*) のいずれにおいても*js*のホモ接合体の胚を得ることができず、実験は失敗した。そのため、現在野生型であるC57BL/6Jの胚にBAC-トランスジェネシスを行い、BAC-トランスジェニックマウスと*js*マウスとの交配によるレスキューを試みている。

5) DAKのヒトホモログの単離

1. ヒトのジェノミックDNAに対するBACクローンをスクリーニングし、ヒトのDAKホモログを含むBACクローンの単離が完了した。
2. ヒトのcDNAライブラリーをスクリーニングし、複数個の対応するクローンを単離した。その一部をシークエンスし、ヒトとマウスとのホモロジーを解析した結果、約90%に近いホモロジーを持つことが判明した。

D. 考察

今年度は、昨年度*js*遺伝子の候補として単離されたDAKのcDNA、およびその遺伝子の構造解析を重点的に行った。

DAKのmRNAに対するノーザン、および3'-RACEによる解析の結果、DAKには少なくとも6種類以上のオルタネイティブスプライシングによるアイソフォームが存在し、しかもそれらのアイソフォームの大多数が組織内に微量にしか存在しないことが明らかとなった。そのため、3'-RACE法によるクローニングとシークエンシングを断念し、DAK遺伝子を完全に含むBACクローンを直接シークエンシングすることにより、DAKのcDNA、その遺伝子の構造を明らかにすることにした。「研究結果」の項で述べたように、これまで約7Kbのプロモータ全領域と42Kbのコーディング領域のシークエンスが完了した。これまでシークエンスされた部分とノーザン解析によるDAKのcDNAの全長約3.9Kbを比較すると、残りはcDNAにして数百塩基対と考えられた。

一方、*js*、およびそのアليلである*seal*に対応する突然変異部位の同定も、上記のシークエンシングと並行して行っているが、*js*に対するミスセンス突然変異以外はまだ発見されていない。

蛋白が機能を喪失する場合、蛋白それ自体の構造に異常を持つ場合と、そのプロモータ領域の突然変異のため、遺伝子発現に異常が生じ、結果的にその蛋白機能が発現できない場合が存在する。これまで、DAK蛋白のかなりの部分の突然変異解析を行いながら、突然変異が発見されていない*seal*マウスでは、そのDAKのプロモータ領域の突然変異体であることも考えられる。今回、DAKのプロモータの全領域がシークエンスできたことは、プロモータの機能喪失か否かを確認するための実験系ができたことを

意味し、その意義は大きい。

今年度、我々はDAK遺伝子がオルタネイティブスプライシングにより、組織特異的なアイソフォームを発現していることが判明した。これまでに同定されたすべてのアイソフォームには、キネシン機能を発現するために重要なモータドメインと、ATP結合部位を持つことから、これらのすべてのアイソフォームがキネシン様蛋白として機能していることを示唆している。さらに、ホールマウントin situハイブリダイゼーションの結果から、DAKは内耳のみならず、尾部、前頭部、四肢の内側でも発現していることが明らかとなった。これらの結果と、組織特異的なアイソフォームの存在を考えると、DAKはそれぞれの組織において、それぞれのアイソフォームが機能を使い分けている可能性が考えられる。聴覚機能におけるそれぞれのアイソフォームの役割や、本当にアイソフォーム同士が機能の使い分けを行っているのか否かについては、DAKのcDNA、遺伝子の全構造が明らかになり、すべてのDAKアイソフォームの存在が明らかになった時点で取り組むべき研究課題と考えている。

今年度、DAKのcDNA、遺伝子の構造解析以外に進展したものに、BAC-トランスジェネシスの技術が確立したことがあげられる。この技術確立によって、ポジショナルクローニングにおける責任遺伝子の最終的同定が可能になった。今回、*js*突然変異における*js*ホモ接合型胚を用いた直接的なレスキューは、残念ながら不首尾に終わってしまった。この原因としては、雌の*js*マウスの行動異常による交尾障害、および雄*js*マウスの精子の運動異常が考えられた。

しかしながら現在、この*js*ホモ接合型胚による直接的レスキューの代替法として、正常のC57BL/6JマウスによるBAC-トランスジェネシスを行い、作製されたBAC-トランスジェニックマウスと*js*マウスとの間で交配実験を行い、その過程で*js*遺伝子が導入されたBACによってレスキューされるか田舎の検討を行っているところである。

E. 結論

*js*突然変異の候補遺伝子として昨年度単離されたDAKについて、そのcDNA、および遺伝子の一次構造の大部分を明らかにした。また、DAK遺伝子の発現を調べることによって、DAK遺伝子が組織特異的なオルタネ

ティブスプライシングにより少なくとも6種類のDAKアイソフォームを持つことを見いだした。また、DAKがjs突然変異の責任遺伝子であることを直接証明するためのBAC-トランスジェネシスの系を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, Y.Y., Takahama, S. and Yonekawa, H.: Four dominant loci for the vascular responses by the antitumor polysaccharide, lentinan. *Immunogenet.*, 47: 159 - 165, 1988
- 2) Sagai, T., Koide, T., Endo, M., Tanoue, K., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Ishiguro, S., Tamai, S., Matsuda, Y., Wakana, S. and Shiroishi, T.: rim2 (recombination induced mutation 2) is a new allele of pearl and a mouse model of human Hermansky-Pudlak syndrome (HPS): genetic and physical mapping. *Mammal. Genome*, 9: 2-7, 1998.
- 3) Koide, T., Moriwaki, K., Uchida, K., Mita, A., Sagai, T., Yonekawa, H., Katoh, H., Miyashita, N., Tsuchiya, K., Nielsen, T.J. and Shiroishi, T.: A new inbred strain JF1 established from Japanese fancy mouse carrying the classical piebald allele. *Mammal. Genome*, 9: 15-19, 1998.
- 4) Nakano, H., Mori, S., Yonekawa, H., Nariuchi, H., Matsuzawa, A and Kakiuchi, T.: A novel mutant gene involved in T lymphocyte-specific homing into peripheral lymphoid organs on mouse chromosome 4. *Blood*, 91: 2886-2895, 1998
- 5) Ishii, S., Kase, R., Sakuraba, H., Taya, C., Yonekawa, H., Okumiya, T., Matsuda, Y., Mannen, K., Takeshita, M. and Suzuki, Y.: α -Galactosidase transgenic mouse: Heterogeneous gene expression and posttranscriptional glycosylation in tissues. *Glycoconjugate J.*, 15: 591 -594, 1988.
- 6) Wakita, T., Taya, C., Katsume, A., Kato, J., Yonekawa, H., Kanegae, Y., Saito, I., Hayashi, Y., Koike M. and Kohara, M.: Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *J. Biol. Chem.*, 273: 9001-9006, 1998.
- 7) Miyoshi, N., Kuroiwa, Y., Kohda, T., Shitara, H., Yonekawa, H., Kawabe, T., Hasegawa, H., Barton, S. C., Surani, M. A., Kaneko-Ishino, T. and Ishino, F.: Identification of the Meg1/Grb10 imprinted gene on mouse proximal chromosome11, a candidate for the Silver-Russell syndrome gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1102-1107, 1998.
- 8) Kase, R., Shimmoto, M., Itoh, K., Utsumi, K., Kotani, M., Taya, C., Yonekawa, H. and Sakuraba, H.: Immunohistochemical characterization of transgenic mice highly expressing human lysosomal α -galactosidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1406: 260-266, 1998.
- 9) Wakabayashi, Y., Takahashi, Y., Kikkawa, Y., Okano, H., Mishima, Y., Ushiki, T., Yonekawa, H. and Kominami, R.: A novel type of myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248: 655-659, 1998.
- 10) Mochizuki, T., Saijoh, Y., Tsuchiya, K., Shirayoshi, Y., Takai, S., Taya, C., Yonekawa, H., Yamada, K., Nihei, H., Nakatsuji, N., Overbeck, P. A., Hamada, H. and Yokoyama, T.: Cloning of inv, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* 395: 177-181, 1998.
- 11) Kuramochi, S., Matsuda, Y., Okamoto, M., Kitamura, F., Yonekawa, H. and Karasuyama, H.: Molecular cloning of the human gene STK10 encoding LOK (lymphocyte-oriented kinase) and comparative chromosomal mapping of the human, mouse and rat homologues. *Immunogenetics*, in press
- 12) Matsuoka, K., Taya, C., Kubo, S., Toyama-Sorimachi, N., Kitamura, F., Ra, C., Yonekawa, H. and Karasuyama, H.: Establishment of antigen-specific IgE transgenic mice to study pathological and immunobiological roles of IgE in vivo. *International Immunology*, in press

2. 学会発表

- 1) 吉川欣亮、若菜茂晴、小原夕紀、高田豊行、岡本美恵子、多屋長治、若林雄一、木南 凌、森脇和郎、清水邦彦、城石俊彦、米川博通：Jackson shaker (js) 突然変異の原因遺伝子の解明。第45回日本実験動物学会総会 1998. 5. 28 - 30. 松本
- 2) 吉川欣亮、若菜茂晴、城石俊彦、木南凌、米川博通：ヒト聴覚障害モデルマウスジャクソンシェーカー (js) からの原因遺伝子のポジショナルクローニング、シンポジウム「マウス遺伝子は語る」。