

染色体の起源の同定のみならず転座切断点まで含めて精確に決定することが可能であった。また、従来のSKY法のみでは、染色体ペインティングプローブを用いている性質上、同一の染色体上でおこる欠失、逆位、重複といった異常の切断点は同定できなかつたが、dual karyotypeは、この欠点をも克服することが可能であった。これにより、高精度の染色体解析システムが確立した。

3. 潜在型染色体転座.

4例においてG染色法で正常と判定された染色体において、その潜在型転座(cryptic translocation)を見出した。2例は均衡型転座, $t(11;19)(q23;p13.1)$, $t(3;15)(q26;q24)$, 他の2例は不均衡型転座, $der(20)t(7;20)(?;q13.3)$, $der(4)t(3;4)(q26;q32)$ であった。 $t(11;19)(q23;p13.1)$ が見い出された症例では、MLL遺伝子をプローブとしたFISH解析で11q23切断点でMLL遺伝子がinvolveしていることを明らかにした。

4. 不均衡型転座を生じていた欠失型異常.

複雑型異常を有する16症例においては、G染色法で64個の染色体欠失が認められたが、その約半数(29個)が単純な欠失ではなく、実際にはその欠失領域と考えられる部分がG染色法では同定困難であった染色体(add or mar)や一見正常と思われた染色体に転座していた。あるいは、欠失を受けた染色体側においても欠失端部でG染色法では同定できなかった短いsegmentの染色体が転座していたことを明らかにした。

5. CGH法によるゲノム増幅の同定

われわれはCGH法を標準化し、食道癌、胃癌、胃平滑筋肉腫、大腸癌、転移性肝癌、肝細胞癌など各種消化器癌の染色体遺伝子異常の解析を行ない、8p23.1をはじめ現在のところ標的候補遺伝子が明らかでない高頻度の変化を示すいくつかの新規ゲノム異常を同定した。このうち8p23.1の新規増幅領域にかんしては、ハ

イブリッドセレクションを行い、新規増幅遺伝子を単離した。また、これまでにCGH法で明らかとなった乳癌の新規増幅領域(20q13)からAIB1やBTAKが候補遺伝子として報告されているが、われわれもCGH法で胃癌や大腸癌でも同じ20q13の増幅を認め、この領域の候補遺伝子の一つであるAIB1遺伝子が胃癌で増幅、高発現し、肝転移、リンパ節転移と関連するのを確認した。

D. 考察

SKY法により、Gバンドでは解析困難であった染色体異常がすべて同定できた。このことより、SKY法は、複雑型異常が比較的多いMDSの染色体解析に特に適していることが示された。複雑型異常における染色体欠失では、その約半数において欠失を受けた側の染色体および欠失した側の染色体のいずれかで不均衡型転座を生じていたことがSKY法で明らかになった。このことは、Gバンドのみで欠失範囲ならびに欠失の切断点を精確に同定することは困難であることを示唆している。逆に、SKY法はこうした欠失型異常の解析でもGバンド解析を補完する意味で有用であると考えられた。染色体欠失に比べて、HSRのような特定の癌遺伝子の増幅を示す染色体異常はMDSではきわめて稀であるが、この染色体起源の同定にもSKY法は有効であった。HSRを認めた3例ともovert leukemiaであり、HSR内での特定の遺伝子の増幅がMDSの白血病化に関与している可能性があったが、1例では、FISH法を用いてHSR内でのMLL遺伝子を含む11q23領域の増幅を確認した。MDSでは、複雑型異常のほかに正常核型を示す症例も多く(primary MDSで30~50%)、何らかの隠れた異常が

存在する可能性が以前から指摘されていた。今回、正常核型であったMDS 2例のうち1例でt(11;19)(q23;13.1)を見い出した。11q23-qterおよび19p13.1-pterは、pale bandのパターンでサイズもほぼ同じくらいであったために両者の間の相互転座は見落とされていた。これと同様な例は他にも存在すると考えられ、今後正常核型の症例においてもSKY法を行うことは意義があると考えられた。

CGH法による胃癌の検索でわれわれは8p23, 20q13に新規増幅領域を確認し、ことに後者の領域の存在するAIB1遺伝子が胃癌で増幅、高発現し、転移や予後にも関連することを明らかにした。また、最近この領域からcentrosomeの倍加に関係する遺伝子(aurora/STK15)の増幅が報告された。多極分裂は異数性をきたす機序の一つであり、染色体不安定性の原因となって、癌の増悪に関与するものとして、非常に注目される。

E. 結論

SKY法でMDSの複雑型染色体異常を解析し、欠失型異常の約半数が単純な欠失ではなく、種々の染色体との不均衡型転座であること、またAML1, MLL遺伝子が増幅している白血病化症例があることを明らかにした。このことから、SKY法は複雑型異常の多いMDSの染色体異常の解析に特に有用であることが示された。消化器癌についてのCGH法による検討の結果、8p23, 20q13に新規増幅領域を確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kishi K, Toda K, Azegami T, Tsukada N,

Uesugi Y, Masuko M, Niwano H, Hashimoto S, Sakaue M, Furukawa T, Koike T, Takahashi H, Maekawa T, Abe T, Aisawa Y: Hematopoietic cytokine-dependent differentiation to eosinophils and neutrophils in a newly established acute promyelocytic leukemia cell line with t(15;17). *Experimental Hematology* 26: 135-142(1998)

2) Sakakura C, Koide K, Ichikawa D, Wakasa T, Shirasu M, Kimura A, Taniguchi H, Hagiwara A, Yamaguchi T, Inazawa J, Abe T, Takahashi T, Otsuji E: Analysis of histological therapeutic effect, apoptosis rate and p53 status after combined treatment with radiation, hyperthermia and 5-fluorouracil suppositories for advanced rectal cancers. *Brit J Cancer* 77:159-166(1998)

3) Ishino S, Hashimoto N, Fushiki S, Date K, Mori T, Fujimoto M, Nakagawa Y, Ueda S, Abe T, Inazawa J: Loss of material from chromosome arm 1p during malignant progression of meningioma revealed by fluorescent in situ hybridization. *Cancer* 83:360-366(1998)

4) Chikayama S, Kimura S, Kobayashi Y, Abe T, Maekawa T, Kondo M: Effects of daunorubicin on cell growth, cell cycle and induction of apoptosis in HL-60 cells. *Haematologia* 29:115-121(1998)

5) Ariyama Y, Fukuda Y, Okuno Y, Seto M, Date K, Abe T, Nakamura Y, Inazawa J: Amplification on double-minute chromosomes and partial-tandem duplication of the MLL gene in leukemic cells of a patient with acute myelogenous leukemia. *Genes, chromosomes & Cancer* 23 : 267-272

(1998)

6) Yashige H, Horiike S, Taniwaki M, Misawa S, Abe T: Micronuclei and nuclear abnormalities observed in erythroblasts in myelodysplastic syndromes and in de novo acute leukemia after treatment. *Acta Haematologica (Basel)* 101:32-40, 1999

7) Abe T: Infantile leukemia and soybeans -a hypothesis-. *Leukemia* 13:317-320, 1999

8) 嘉数直樹, 阿部達生: SKY法による癌の染色体異常解析 - 骨髓異形成症候群(MDS)を中心とした解析 -. *実験医学*. 16:1638-1641 (1998)

9) Sakakura C, Mori T, Sakabe T, Ariyama Y, Shinomiya T, Date K, Hagiwara A, Yamaguchi T, Takahashi T, Nakamura Y, Abe T, Inazawa J: Gains, losses, and amplifications of genomic materials in primary cancers analyzed by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes & Cancer* 24:299-305, 1999.

10) Sakakura C, Hagiwara H, Taniguchi T, Yamagishi T, Koyama K, Abe T, Inazawa J: Chromosomal aberrations in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C infection detected by comparative genomic hybridization. *Brit J Cancer*. (in press)

8) Kakazu N, Taniwaki M, Horiike S, Nishida K, Hirakawa K, Goto S, Takahashi T, Uoshima N, Akaogi T, Inazawa J, Ohki M, Abe T: Spectral karyotyping (SKY) analysis of chromosome abnormalities in myelodysplastic syndromes (MDS) and

overt leukemias developed from MDS. *Genes Chromosomes Cancer* (in press)

2. 学会発表

1) 嘉数直樹, 谷脇雅史, 稲澤譲治, 阿部達生. Spectral karyotyping (SKY)法を用いたMDSにおける染色体異常の解析. 第60回日本血液学会総会. 1998年3月26日; 大阪

2) 嘉数直樹, 谷脇雅史, 堀池重夫, 阿部達生. SKY/DAPI解析およびG分染後SKY解析を用いたMDSにおける染色体異常解析. 第57回日本癌学会総会. 1998年10月1日; 横浜

3) 嘉数直樹, 堀池重夫, 西田一弘, 谷脇雅史, 阿部達生. Spectral karyotyping (SKY)法による骨髓異形成症候群(MDS)における染色体異常の同定. 第43回日本人類遺伝学会. 1998年10月16日; 山梨.

4) 嘉数直樹, 阿部達生, 堀池重夫, 西田一弘, 谷脇雅史, 赤荻照章, 平川浩一. SKY法を用いたdual karyotypeによる骨髓異形成症候群(MDS)における染色体異常の同定. 第40回日本臨床血液学会総会. 1998年11月11日; 金沢.

5) 小出一真, 阪倉長平, 中西正芳, 安岡利恵, 荒金英樹, 大辻英吾, 山口俊晴, 高橋俊雄, 阿部達生, 稲澤譲治. 免疫染色併用迅速FISH法による胃癌・大腸癌の微小腹膜播種診断の試み. 第57回日本癌学会総会. 1998年9月30日; 横浜

6) 阪倉長平, 中西正芳, 安岡利恵, 荒金英樹, 小出一真, 高橋俊雄, 山口俊晴, 荻原明於, 大辻英吾, 谷口弘毅, 中村祐輔, 稲澤譲治, 阿部達生. 胃癌におけるAIB1遺伝子の増幅, 高発現と悪性度との関連. 第57回日本癌学会総会. 1998年9月30日; 横浜

厚生省科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

急性骨髄性白血病の発症機構の解明に関する研究

分担研究者 大木 操 国立がんセンター研究所・放射線研究部長

研究要旨 急性骨髄性白血病で多く見られるt(8;21)転座において発現するAML1-MTG8融合タンパク質は、新規MTGファミリーであるMTGR1又はMTG16タンパク質を介してヒストン脱アセチル化酵素と複合体を形成して作用し、AML1と拮抗的に作用することによりマウス骨髄性細胞L-Gの好中球への分化を阻害することが明らかになった。また、正常なAML1はp300/CBPヒストンアセチル化酵素複合体と相互作用し、両者は協調的にAML1依存性の転写及び好中球への分化を促進することが示された。

A. 研究目的

急性骨髄性白血病で見られ染色体転座により生じるAML1-MTG8融合融合遺伝子産物の作用機構を解析することにより、白血病の発症機構を明らかにする。また、それらの知見をもとに診療への応用をはかる。

B. 研究方法

試験管内で好中球への分化誘導が可能なL-G細胞を用いてAML1-MTG8の強制発現の効果を検討した。L-G細胞はIL-3依存性のマウス骨髄性細胞株で、G-CSF存在下で培養することにより増殖を停止し7-10日で成熟好中球へと分化する。この細胞にレトロウイルスベクターを用いてAML1-MTG8および正常AML1a、AML1bを強制発現させて、細胞分化・増殖への影響を検討した。さらに、一連の欠失変異体を用いてAML1及びAML1-MTG8に結合する因子を免疫沈降法などにより解析することにより、それらの作用機序について解析した。

C. 研究結果

L-G細胞に、AML1-MTG8を発現させた場合、G-CSF存在下でも停止せずに対数的に増殖し、成熟好中球への分化は完全に阻害された。このようなG-CSF存在下での増殖や分化阻害は、ベクターコントロールやAML1bを発現させた細胞では見られなかった。C末端を欠くAML1aを発現させた場合、G-CSF存在下での増殖はわずかに促進されたが、AML1-MTG8の場合の効果に比べ非常に弱く分化阻害はみられなかった。また、AML1-MTG8を強制発現したL-G細胞にさらにAML1bを大量に発現させたところ、G-CSF存在下での増殖は抑制され、成熟好中球への分化が見られるようになった。これらの結果およびAML1-MTG8はAML1bによる転写活性化を抑制することから、AML1-MTG8はAML1の機能を抑制することによりG-CSFに依存した好中球分化を阻害し、白血病発症へと導くと考えられた。

AML1-MTG8による分化阻害に関与する機能ドメインを同定するため、AML1-MTG8の一連の欠失変

異体を作製してL-G細胞に導入し、G-CSFに対する反応性を検討した。C末端のアミノ酸538まで欠失した場合には完全長のものと同様に好中球への分化を阻害しG-CSF依存的に細胞は増殖したが、さらにアミノ酸487まで欠失すると分化は阻害されずG-CSFに依存した増殖も見られなかった。このことから、487-538の領域がAML1-MTG8の作用に必要であることが示された。免疫沈降による解析からこの領域には分子量85 kDのリン酸化タンパク質が結合することが示され、このタンパク質との相互作用がAML1-MTG8の作用に重要であると考えられた。そこで、このタンパク質をコードするcDNAを単離して構造解析を行ったところ、このタンパク質の予想されるアミノ酸配列はMTG8のそれと高い相同性があることが示され、このタンパク質をMTGR1(MTG8-related protein 1)と名付けた。それらを発現させたL-G細胞の抽出物を用いた免疫沈降により両者は共沈殿することから、MTGR1とAML1-MTG8は安定な複合体を形成することが示された。また、急性白血病でみられるt(16;21)転座によって生じるAML1の新しい融合パートナーとして3番目のMTG8ファミリーであるMTG16を最近我々は同定したが、AML1-MTG8はこのMTG16ともMTGR1と同様に安定な複合体を形成することが示された。これらの結果から、AML1-MTG8はMTGR1またはMTG16と複合体を形成して作用することが強く示唆された。MTGR1遺伝子はヒト染色体20q11.2にマップされた。この領域はMDSでの欠失やいくつかの転座が報告されており、それらとの関連性について検討中である。

AML1-MTG8を強制発現したL-G細胞にさらにAML1bを大量発現させたところ、G-CSF存在下での増殖は抑制され、成熟好中球への分化誘導が見られた。AML1-MTG8はAML1bによる転写活性化を抑制することから、AML1-MTG8はAML1の機能を抑制することによりG-CSFに依存した好中球分

化を阻害し、白血病発症へと導くと考えられた。AML1の欠失変異体を用いた解析から、AML1-MTG8により分化抑制されたL-G細胞の分化誘導には、そのC末端領域が重要であることを見出した。一方、免疫沈降およびFar-Westernによる解析からAML1はヒストンアセチル化酵素活性を持つ転写コアクチベーターp300/CBPと複合体を形成が示された。この結合にはAML1のC末端領域が必要で、これは分化誘導に関与する領域とよく一致した。さらに、myeloperoxidaseプロモーターにおいてp300はAML1による転写活性化を促進することから、p300はAML1の転写コアクチベーターとして機能することが示された。また、p300遺伝子はAMLにおいてt(11;22)染色体転座によりMLL遺伝子と融合していることを見出した。これらのことから、AML1/p300/PEBP2βヘテロ三量体複合体は骨髓性細胞の分化に重要で、この複合体の全ての構成要素の転座による構造・機能異常は急性骨髓性白血病の原因となることが示唆された。最近、AML1と共同して作用することが知られる転写因子C/EBP及びc-Mybもp300/CBPと結合することが報告されており、骨髓性細胞におけるこれら転写因子の共同作用にはp300/CBPとの相互作用が重要であると考えられる。

ヒストン脱アセチル化阻害剤であるトリコスタチンAのAML1-MTG8の作用に対する効果を検討したところ、AML1-MTG8によるL-G細胞の分化阻害はトリコスタチンAにより解除されることが示された。さらに、特異的抗体を用いた免疫沈降実験からMTGR1複合体及びMTG16複合体には強いヒストン脱アセチル化活性があることを見出した。

D. 考察

これまでの結果から、正常な転写因子AML1はp300/CBPヒストン脱アセチル化酵素複合体として作用することが明らかになった。急性骨髓性白血病で生じるAML1-MTG8融合遺伝子産物は

AML1 と拮抗的に作用することから、AML1-MTG8の作用にはAML1とは逆の作用、すなわちヒストン脱アセチル化が関与している可能性が考えられた。実際、AML1-MTG8によるL-G細胞の分化阻害はヒストン脱アセチル化阻害剤であるトリコスタチンAにより解除されることが示された。さらに、AML1-MTG8と強く結合するMTGR1複合体及びMTG16複合体には強いヒストン脱アセチル化活性があることが示された。今後AML1-MTG8複合体を精製してその構成要素を明らかにすることにより作用機構を明らかにする。また、白血病発症にはヒストン脱アセチル化酵素が関与することが明らかとなったことから、その阻害剤は白血病治療に有効である可能性が考えられ、これについても検討する。

E. 結論

急性骨髄性白血病で多く見られるt(8;21)転座において発現するAML1-MTG8融合タンパク質は、新規MTGファミリーであるMTGR1又はMTG16タンパク質を介してヒストン脱アセチル化酵素と複合体を形成して作用し、AML1と拮抗的に作用することによりマウス骨髄性細胞L-Gの好中球への分化を阻害する。正常なAML1はp300/CBPヒストン脱アセチル化酵素複合体と相互作用し、両者は協調的にAML1依存性の転写及び好中球への分化を促進する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kitabayashi I, Ida K, Morohoshi F, Yokoyama A, Mitsushashi N, Shimizu K, Nomura N, Hayashi Y, Ohki M. The AML1-MTG8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG8(ETO/CDR) family, MTGR1. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 846-858, 1998

Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K, Ohki M.

Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J.*, 17: 2994-3004, 1998

2. 学会発表

第57回日本癌学会総会

・AML1およびAML1-MTG8によるヒストンアセチル化を介した細胞分化の制御と白血病：北林一生・横山明彦・清水喜美子・諸星文子・大木操

・AML1-MTG8により発現の変化する遺伝子の differential displayによる解析：嶋田博之・中村左和子・勝利恵子・岩佐光輝・北林一生・市川仁・大木操

第20回日本分子生物学会総会

・AML1およびAML1-MTG8によるヒストンアセチル化を介した細胞分化の制御と白血病：北林一生・相川祐規子・横山明彦・鈴木光浩・諸星文子・大木操

厚生省がん克服戦略研究事業
分担研究報告書

分野 1 蓄積遺伝子異常の網羅的把握によるがんの特徴の解明と診療への応用
(主任研究者 関谷 剛男)

分担研究課題 細胞死に関わるがん関連遺伝子の網羅的把握とその機能解
析からえられる情報の制がん研究への応用

分担研究者 口野 嘉幸 国立がんセンター研究所生物物理部長

研究要旨： s-mycやmycL2などのイントロンレスmyc遺伝子を含むmyc関連遺伝子の発現によるアポトーシス誘導の分子機構の解明を行った。その結果イントロンレスmyc遺伝子もc-mycの場合と同様にカスパーゼ3様プロテアーゼの活性化を介してアポトーシスを誘導することを突き止めた。またこれら一連の研究成果をもとにc-mycと協調して細胞のがん化に関与していることが知られているがん遺伝子rasがc-myc依存性のアポトーシス誘導に対して抑制的に働き、このことががん細胞のアポトーシスに対する耐性能獲得と密接な関係にあることを明らかにした。さらに今回このras遺伝子が悪性脳腫瘍や胃癌などのヒトがん細胞にアポトーシスとは異なったタイプのプログラム細胞死を誘導することを世界に先駆けて明らかにすることに成功した。

A. 研究目的

アポトーシスはプログラム細胞死の一型で、生体（細胞）の恒常性維持に重要な役割を果たしている。したがってアポトーシスの異常はがんを含めた様々な疾患の発生原因となる。一方細胞のがん化やがん細胞の転移のプロセスがアポトーシス耐性と密接な関係にあることがわかってきた。このようなことからアポトーシスに関する研究はがんの発生や進展・転移の分子機構を理解していく上で非常に重要であるといえる。そこで本研究では悪性リンパ腫や肺がん、神経芽細胞腫など、多くのがんの発生や進展に関与していることが知られているmyc関連遺伝子に的を絞り、Mycが関与するアポトーシスの機構を解明するとともに、そこからえられる情報をもとにMycによる細胞のトランスフォーメーションとアポトーシスとの相関性を明らかにしていくことを目的とした。またこれら一連の研究からえられる情報をもとに、グリオーマのような難治がんに対する治療法の開発を行っていくことを研究目標とした。

B. 研究方法

1、遺伝子導入細胞の樹立：c-myc, s-myc, mycL2遺伝子をそれぞれCMVプロモーターをもつpCEPプラスミドに組み込み、リポフェクション法を用いてRat-1細胞に導入し、個々の遺伝子が導入された細胞株を樹立する。

2、カスパーゼ活性の測定：血清除去によってアポトーシスを誘導し、死にゆく細胞から細胞液を調製する。えられた液中のカスパーゼの活性をAc-DEVD-MCAやAc-YVAD-MCAを基質として測定する。

3、細胞のがん化とアポトーシス耐性：c-mycとの協調発現によって細胞のがん化に関与することが知られている遺伝子を（1）でえられた細胞株に導入し、アポトーシス誘導に及ぼす影響を調べる。

C. 研究結果

1、細胞培養液から血清を除去することによってmyc関連遺伝子を発現した細胞はアポトーシスに陥る。この時c-mycだけではなくs-mycやmycL2遺伝子を発現する細胞において、Ac-DEVD-MCAを分解するカスパーゼ3様プロテアーゼの活性化が共通して認められた。

2、s-mycやmycL2遺伝子の発現によって誘導されるアポトーシスはc-mycの場合と比較してBcl-2によるアポトーシス抑制に抵抗性を示した。

3、fibroblastsのトランスフォーメーションにc-mycと協調して機能するras遺伝子の発現によってMyc依存性アポトーシスが抑制された。

4、c-mycと協調してリンパ腫の発生に関与するがん遺伝子pim-1は予想に反してMyc依存性のアポトーシスを増強した。

5、Myc依存性アポトーシスに対して抑制的に機能するがん遺伝子rasは驚いたことにヒトの悪

性脳腫瘍細胞や胃癌細胞にカスパーゼ非依存的細胞死を誘導した。

D、考察

myc関連遺伝子を用いた一連のアポトーシス誘導実験から、Myc依存性アポトーシスの場合も放射線や抗がん剤によるアポトーシスと同様にカスパーゼ3様プロテアーゼの活性化を介して誘導されることがわかり、カスパーゼ3様プロテアーゼがアポトーシス実行の中心的役割を果たしていることが明らかになった。しかし今回がん遺伝子rasの発現によって誘導される細胞死にはこのカスパーゼが関与していないことから、この細胞死はアポトーシスとは異なった機構で誘導されているものと考えられる。また最近の研究からがん遺伝子rasの発現によって誘導される細胞死がp53非依存的に誘導され、Bcl-2によって抑制されないことなどの点が明らかとなってきた。このようなことからアポトーシス耐性を獲得している多くのがんに対する新たな治療法としてこのカスパーゼ非依存的に誘導できる細胞死のシステムを利用できる可能性がでてきた。今後このRasの発現によって誘導される細胞死の分子機構を明らかにし、プログラム細胞死の全容を解明していきたい。またプログラム細胞死に関与する遺伝子を網羅的に検索し、がんの発生や進展との相関性を明らかにしながら、がんのもつ弱点を探し出し、そこからえられる情報をもとにより有効ながんの治療法の開発を目指したい。

E、結論

- 1、s-mycやmycL2などのイントロンレス遺伝子もc-myc遺伝子と同様な機構でアポトーシスを誘導する。
- 2、がん遺伝子rasはbcl-2と同様にmyc関連遺伝子によるアポトーシスに対して抑制的に働く。これらの事実はc-mycと協調して細胞のがん化に関与している多くの遺伝子は細胞のアポトーシス耐性獲得に重要な役割を果たしていることを示している。
- 3、今回がん遺伝子rasの発現によってカスパーゼ非依存的細胞死が誘導されたことは、プログラム細胞死にはアポトーシス以外のものが存在していることを示唆している。

F、研究発表

1. 論文発表

1. K. Hanaki, T. Odawara, N. Nakajima, Y.K. Shimizu, C. Nozaki, K. Mizuno, T. Muramatsu, Y. Kuchino, and H. Yoshikura: Two different reactions involved in the primer/template-independent polymerization of dATP and dTTP by Taq DNA polymerase. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 244, 210-219,

1998.

2. K. Mishima, S. Higashiyama, A. Asai, K. Yamaoka, Y. Nagashima, N. Taniguchi, C. Kitanaka, T. Kirino, and Y. Kuchino: Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor stimulates mitogenic signaling and is highly expressed in human malignant gliomas. *Acta Neuropathologica*, 96, 322-328, 1998.
3. S. Chi, C. Kitanaka, K. Noguchi, T. Mochizuki, Y. Nagashima, M. Shirouzu, H. Fujita, M. Yoshida, W. Chen, A. Asai, M. Himeno, S. Yokoyama, and Y. Kuchino: Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cell. *Oncogene*, in press, 1999.
4. A. Sugiyama, K. Noguchi, C. Kitanaka, N. Katou, F. Tashiro, M.C. Yoshida, and Y. Kuchino: Molecular cloning and chromosomal mapping of mouse intronless myc gene acting as a potent apoptosis inducer. *Gene*, 226, 273-283, 1999.
5. C. Kitanaka, and Y. Kuchino :caspase-independent cell death with necrotic morphology. *Cell Death & Differentiation*, in press, 1999.
6. 口野嘉幸：プログラム細胞死を見直す。アポトーシスに関する研究方面動向について（アポトーシス技術研究委員会編），（社）日本工業技術振興協会，pp.91-99，1998
7. 口野嘉幸：アポトーシスの概念と疾患における意義一序にかえて。Biotherapy 特集 がん化学療法の新しいターゲット—アポトーシスを中心に—（日本BRM学会編），癌と化学療法社，pp.933-937,1998
8. 口野嘉幸：転写因子とアポトーシス。血液・腫瘍科，科学評論社，37(1):21-28,1998
9. 口野嘉幸：Myc依存性アポトーシスのシグナル伝達。医学のあゆみ，医歯薬出版，187(5):354-358，1998
10. 口野嘉幸：皮膚とアポトーシス。皮膚，大阪大学医学部皮膚科学教室，40(5):444-448，1998
11. 口野嘉幸：細胞周期とアポトーシス。消化器病とアポトーシス—消化器病セミナー7 4—（石井裕正編），へるす出版，74:47-57，1999

学会発表

1. アポトーシス誘導におけるイントロンレスmycの特性：口野嘉幸 山形大学医学部 1998年5月7日
2. Mycとアポトーシス：口野嘉幸 第12回箱根G IBCO-BRL生物学フォーラム—アポトーシスの分子生物学的基礎—（箱根）1998年7月30—8月1日
3. Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells: C Kitanaka, K Noguchi and Y Kuchino, 第3回「先端がん」若手カンファレンス 細胞増殖の制御（茅野）1998年8月31日-9月3日
4. Function of c-Jun N-terminal kinase in Myc-mediated apoptosis: K Noguchi, H Yamana, C

Kitanaka, T Mochizuki and Y Kuchino, 第3回「先端がん」若手カンファレンス 細胞増殖の制御 (茅野) 1998年8月31日-9月3日

5. 癌遺伝子産物Pim-1キナーゼによるMyc依存性アポトーシス増強に関わる分子機序: 望月俊宏, 北中千史, 野口耕司, 口野嘉幸 第57回日本癌学会総会 (横浜) 1998年9月30-10月2日

6. ヒト型イントロンレス遺伝子産物MycL2のもつ細胞死増強ドメイン (DEAD) に会合する因子の検索: 北中千史, 野口耕司, 望月俊宏, 口野嘉幸 第57回日本癌学会総会 (横浜) 1998年9月30-10月2日

7. Myc依存性アポトーシスにおけるJNKとp38MAPKの関与: 野口耕司, 北中千史, 望月俊宏, 加々谷重英, 口野嘉幸 第57回日本癌学会総会 (横浜) 1998年9月30-10月2日

8. がん細胞におけるATP依存性プロテアーゼLonの発現異常: 村松知成, 北中千史, 杉山晶規, 野口耕司, 口野嘉幸 第57回日本癌学会総会 (横浜) 1998年9月30-10月2日

9. Oncogenic Rasによる細胞死: 北中千史, 口野嘉幸 第57回日本癌学会総会シンポジウム (横浜) 1998年10月1日

10. マウスATP依存性プロテアーゼLonの遺伝子の単離とその機能解析: 村松知成, 飯田雅人, 青裕子, 北中千史, 野口耕司, 田之倉優, 口野嘉幸 第71回日本生化学会大会 (名古屋) 1998年10月14-17日

11. 高度好熱菌ATP依存性プロテアーゼlon遺伝子のクローニング: 渡部暁, 村松知成, 青裕子, 田之倉優, 口野嘉幸 第71回日本生化学会大会 (名古屋) 1998年10月14-17日

12. Programmed cell death induced in neuroepithelial cells by oncogene expression: Y Kuchino, and C Kitanaka, Workshop on Cell Death, Paris, France, October 29 and 30, 1998

13. Myc-mediated death signaling: Y Kuchino, The U.S.-Japan Cooperative Cancer Research Program, Boston, USA, November 17 and 18, 1998

14. ヒト脳腫瘍細胞での遺伝子変化と細胞死誘導: 口野嘉幸 日本癌学会シンポジウム: 脳神経系腫瘍研究の最前線 (熊本) 1998年11月21日

15. 活性型Rasにより誘導される非アポトーシス性プログラム細胞死: 北中千史, 池順姫, 野口耕司, 口野嘉幸 第21回日本分子生物学会 (横浜) 1998年12月16-19日

16. Myc依存性アポトーシスにおけるc-Jun N-terminal kinaseの関与: 野口耕司, 山名広修, 北中千史, 望月俊宏, 口野嘉幸 第21回日本分子生物学会 (横浜) 1998年12月16-19日

17. 消化器官に特異的に発現する糖鎖合成酵素とそのスプライシング異常: 村松知成, 北中千史, 杉山晶規, 口野嘉幸 第21回日本分子生物学会 (横浜) 1998年12月16-19日

18. 高度好熱菌ATP依存性プロテアーゼlon遺伝子

のクローニングと結晶化: 渡部暁, 村松知成, 青裕子, 田之倉優, 口野嘉幸 第21回日本分子生物学会 (横浜) 1998年12月16-19日

19. Role of Ras-mediated signaling through induction of caspase-independent programmed cell death in the treatment of human cancer: Y. Kuchino and C. Kitanaka, AACR Special Conference, Whistler, Canada, March 4-8, 1999

20. Myc/Rasによる細胞死制御: 口野嘉幸 平成10年度がん重点公開合同シンポジウム (東京) 1998年2月2-3日

G、知的所有権の取得状況

特許取得

ヒト型イントロンレスmyc遺伝子に関する特許

厚生科学研究費補助金 (平成10年度がん克服戦略研究事業)
分担研究報告書

細胞周期の制御に関与するがん関連遺伝子の異常の把握とその機能の解析

分担研究者 田矢 洋一 国立がんセンター研究所生物学部 室長

研究要旨

ヒトのがんの50%で失活の見られる最も重要ながん抑制蛋白質であるp53の生理機能の制御機構を明らかにするために、p53上の推定されるリン酸化部位(約13カ所)を特異的に認識する抗体をほぼすべて作製した。こうした抗体を用いて、昨年度すでに、p53のN末端側のリン酸化が、DNA傷害時などにおけるp53量の増加と活性化に重要であることを明らかにしたが、今年度はその研究をさらに発展させて、がんにもなり易い遺伝病Ataxia telangiectasiaの原因遺伝子であるATM蛋白質がプロテインキナーゼの活性をもち、しかも、p53のSer15を直接にリン酸化することを証明した。また、新たに、Ser20のリン酸化も重要らしいことを見出した。

A. 研究目的

p53は、細胞がDNAにダメージなどを受けると増加して活性な状態になるが、活性化されたp53は、G1停止あるいはアポトーシスを引き起こす。その際のp53の活性の制御がp53上のリン酸化部位の違いでなされると推定するので、作製したp53の多数のリン酸化部位特異的抗体を用いて、どの部位のリン酸化がp53のどのような活性の制御を行うのかを明らかにする。

一方、RB蛋白質のリン酸化には数種類のサイクリン-Cdkが関与するといわれながら、それらのキナーゼの使い分けのメカニズムはわかっていないのでこれを明らかにしたい。RBは細胞分化を積極的に推進することも行っているのではないとも言われているので、分化の際、RBの各リン酸化部位がどのように変化するかということも解析する。

B. 研究方法

1. ATM蛋白質に対するモノクローナル抗体を用いて、細胞の抽出物を免疫沈降させ、それを酵素原としてリン酸化反応を行い、p53がリン酸化されるか否かを調べた。

2. ATRのキナーゼドメインを変異させたものを

発現誘導できるようにした細胞系を用い、ATRを阻害すると、DNAダメージ後のSer15のリン酸化が阻害されるか否かを解析した。

3. p53のいろんな断片を含んだプラスミッドをトランスフェクトして発現させ、さまざまなリン酸化部位特異的抗体を用いてリン酸化された部位を調べた。

4. 大腸菌で発現させて精製したRB蛋白質を、精製したサイクリンD1-Cdk4、サイクリンE-Cdk2、サイクリンA-Cdk2あるいはサイクリンB-Cdk2でリン酸化した後、これらのリン酸化部位特異的抗体によるウエスタンブロットングにかけて解析した。

C. 研究結果

1. ATM蛋白質がプロテインキナーゼ活性を有し、p53を直接にリン酸化することを見出した。これはAT細胞からの免疫沈降物では起きなかった。さらに、p53のさまざまな欠失変異体などを基質にして解析すると、Ser15がリン酸化されているらしいことがわかった。このことは、われわれが作製したさまざまなリン酸化部位特異的抗体を用いることによって確認できた。

一方では、ガンマ線や抗癌剤によるDNAダメージ後、正常細胞ではSer15のリン酸化が起きるが、AT細胞では起きないことも見出した。

2. ATRを阻害すると、DNAダメージ後のSer15のリン酸化が阻害されることを見出した。しかし、紫外線照射でDNAにダメージを与えた場合にはほぼ完全にSer15のリン酸化が阻害されるのに対して、ガンマ線や抗癌剤によるDNAダメージの場合には、後期のSer15のリン酸化のみが阻害された。

3. p53のN末端側の断片だけではin vivoでリン酸化されないことがわかった。さらに解析すると、DNA結合ドメインは必要無いけれどもテトラマー形成ドメインが必要であることがわかった。

4. RBについては、すでに明らかにしたSer780のほかに、Ser795とSer608とは、サイクリンD1-Cdk4でよくリン酸化されるが他のCdk類ではほとんどリン酸化されない部位であることがわかった。これとは逆に、Thr356、Ser612、Thr821やThr826はCdk2ではよくリン酸化されるが、サイクリンD1-Cdk4ではほとんどされない部位であることがわかった。

推定リン酸化部位を含む非リン酸化ペプチドをこれらのCdk類でリン酸化する実験によっても同様の特異性が得られた。

そして、同調化した細胞の抽出物をこれらのリン酸化部位特異的抗体によるウエスタンブロッティングにかけて解析した結果、in vivoでも同様な特異性があることが確認できた。

D. 考察

p53のリン酸化部位特異的な抗体も、DNAダメージとp53活性化の関係を解明するための強力な武器となることがわかった。活性化されたp53は、ある場合にはp21などを誘導して細胞をG1期に停止させるが、別の場合には、未知の遺伝子を誘導して細胞をアポトーシスで自殺させる。この選択のメカニズムの解明は新しいがん治療法の開発のためにも大変に重要であると思われるが、私はこの選択がp53のリン酸化部位の違いでなされると予想している。我々が作製したリン酸化部位特異的抗体を用いてこの仮説を試す実験を進めている。

今回われわれがサイクリンD1-Cdk4特異的であることを明らかにしたSer780、Ser795とSer608とは、E2F1などとの結合に主に使われる領域に含ま

れ、逆に、Cdk2ではよくリン酸化されるが、サイクリンD1-Cdk4ではほとんどされない部位であることがわかったThr821やThr356はLXCXEモチーフをもつRB結合蛋白質（ヒストンデアセチラーゼなど）との結合につかわれる領域に含まれるのではないかと推測される。この可能性を試す実験を進めていたが、その予想に合致したデータが出つつある。

また、RB蛋白質上の13ヶ所のリン酸化サイトを区別する抗体は、それぞれのリン酸化サイトがどのキナーゼでリン酸化されるのかということ解析するための強力な道具となることがわかった。特に、ラジオアイソトープを使わずに、フォスフォペプチドマッピングも必要なく、簡単な実験でより明瞭な結果が得られることは大きなメリットである。

E. 結論

Ataxia telangiectasiaの原因遺伝子であるATM蛋白質がプロテインキナーゼの活性をもつことを初めて明らかにし、しかも、p53のSer15を直接にリン酸化することを証明した。活性化されたp53は、ある場合には細胞をG1期に停止させるが、別の場合には、細胞をアポトーシスで自殺させる。この選択のメカニズムの解明は新しいがん治療法の開発のためにも大変に重要であると思われるが、私はこの選択がp53のリン酸化部位の違いでなされると予想している。そこで、我々が作製したリン酸化部位特異的抗体を用いて今後、この仮説を試す実験を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Banin, S., Moyal, L., Shieh, S-Y., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Snorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. and Ziv, Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281: 1674-1677 (1998).
2. Canman, C.E., Lim, D-S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., Siliciano, J.D. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 281: 1677-1679 (1998).
3. Khanna, K.K., Keating, K.E., Kozlov, S., Scott, S., Gatei, M., Hobson, K., Taya, Y., Gabrielli, B.,

- Chan, D., Lees-Miller, S.P. and Lavin, M. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nature Genet.*, 20: 398-400 (1998).
4. Lu, H., Taya, Y., Ikeda, M., Levine, A.J. Ultraviolet radiation, but not gamma radiation or etoposide-induced DNA damage, results in the phosphorylation of the murine p53 protein at serine-389. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6399-6402 (1998).
 5. Tibbetts, R.S., Williams, J.M., Taya, Y., Shieh, S.-Y., Prives, C. and Abraham, R.T. ATR is a DNA damage-responsive protein kinase that phosphorylates the p53 tumor suppressor protein. *Genes & Dev.*, 13: 152-157 (1999)
 6. Cuddihy, A.R., Li, S., Tam, N.W.N., Wong, A.H.T., Taya, Y., Abraham, N., Bell, J.C. and Koromilas, A.E. The interferon-inducible protein kinase PKR mediates the transcriptional activation of the tumor suppressor p53. *Mol. Cell. Biol.*: 19, 2475-2484 (1999)
 7. Adams, P.D., Li, X., Sellers, W.R., Baker, K.B., Leng, X., Harper, J.W., Taya, Y. and Kaelin, W.G. The retinoblastoma protein contains a C-terminal motif that targets it for phosphorylation by cyclin/cdk2 complexes. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1068-1080 (1999)
 8. Nakagawa, K., Taya, Y., Tamai, K. and Yamaizumi, M. Requirement of ATM in the phosphorylation of the human p53 protein at serine 15. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 2828-2834 (1999)
 9. Brugarolas, J., Moberg, K., Boyd, S.D., Taya, Y., Jacks, T. and Lees, J.A.: Inhibition of CDK2 by p21 is necessary for pRB-mediated G1 arrest following g-irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1002-1007 (1999)
 10. Shieh, S.-Y., Taya, Y. and Prives, C.: DNA damage-inducible phosphorylation at N-terminal sites including a novel site, serine 20, requires oligomerization of p53. *EMBO J.*, in press (1999, April 1 issue)
 11. Nagata, Y., Anan, T., Yoshida, T., Mizukami, T., Taya, Y., Fujiwara, T., Kato, H., Saya, H. and Nakao, M. The stabilization mechanism of mutant-type p53 by impaired ubiquitination: the loss of wild-type p53 function and the hsp90 association. *Oncogene*, in press.
- ## 2. 学会発表
1. Taya, Y. : Functional analysis of the RB protein and p53 using phosphorylation site-specific antibodies. 4th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer association (Maui, Hawaii, February 1998)
 2. Mihara, K., Ikeda, M., Tamai, K., Shieh, S.-Y., Prives, C. and Taya, Y. : Generation and application of antibodies to recognize specific phosphorylation and acetylation sites of p53. 9th International p53 Workshop (Crete, Greece, May 1998)
 3. Prives, C., Baptisete, N., Chen, X., DiComo, C., Friedlander, P., Gaiddon, C., Jayaraman, L., Moorthy, N.C., Taya, Y. and Shieh, S.-Y. : Signaling to p53 by covalent and non-covalent modifiers. 9th International p53 Workshop (Crete, Greece, May 1998)
 4. Shieh, S.-Y., Taya, Y. and Prives, C. : Characterization of sites and domains required for DNA damage-induced signaling to p53. 9th International p53 Workshop (Crete, Greece, May 1998)
 5. Hitomi, K., Ono, T., Kitagawa, M., Hogashi, H., Ikeda, M., Tamai, K. and Taya, Y. : Distinction of Cdk4- and Cdk2-specific phosphorylation sites of the RB protein by antibodies. Cold Spring Harbor Meeting "Cancer Genetics & Tumor Suppressor Genes" (Cold Spring Harbor, USA, August 1998)
 6. Shieh, S.-Y., Taya, Y. and Prives, C. : Characterization of sites and domains in p53 required for DNA damage-induced signaling . Cold Spring Harbor Meeting "Cancer Genetics & Tumor Suppressor Genes" (Cold Spring Harbor, USA, August 1998)
 7. Taya, Y. : Generation and application of antibodies

to recognize specific phosphorylation and acetylation sites of p53 and the RB protein. The 1998 Japanese-German Workshop (Kumamoto, Japan, November 1998)

8. Taya, Y. : Generation and application of antibodies to recognize specific phosphorylation and acetylation sites of p53 and the RB protein. The 3rd Japan-Korea Cancer Research Workshop. (Seoul, Korea, December 1998)
9. Obata, T., Ikeda, M., Tamai, K., Shieh, S.-Y., Prives, C. and Taya, Y. : Generation and application of antibodies to recognize specific phosphorylation and acetylation sites of p53. ISREC Symposium "Cancer and the Cell Cycle" (Lausanne, Switzerland, January 1999)
10. Obata, T., Ikeda, M., Tamai, K., Shieh, S.-Y., Prives, C. and Taya, Y. : Generation and application of antibodies to recognize specific phosphorylation and acetylation sites of p53. Lorne Cancer conference (Lorne, Australia, February 1999)
11. 田矢洋一 : リン酸化による R B 蛋白質と p53 の生理機能の制御. 日本癌学会総会 (横浜、1998 年9月)
12. 北川雅敏、人見奏恵、東 秀明、古川雄祐、平井愛山、中山敬一、田矢洋一 : サイクリン依存性キナーゼによる R B 蛋白質の部位特異的リン酸化と細胞分化における意義. 日本癌学会総会 (横浜、1998 年9月)
13. 田矢洋一 : R B 蛋白質の活性制御機構. 日本生化学会大会シンポジウム (名古屋、1998 年10月)
14. 人見奏恵、小野達也、北川雅敏、東 秀明、池田雅子、玉井克之、田矢洋一 : R B 蛋白質上の Cdk4 と Cdk2 特異的リン酸化部位. 日本分子生物学会大会 (横浜、1998 年12月)

新しいゲノムスキャンニング法の開発とがん関連 遺伝子へのアプローチに関する研究

研究者

所属；理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター
ゲノム科学研究室

氏名；岡崎康司、林崎良英

研究要旨

RLGS-M法を用いてがんにおいてメチル化が変化する領域をスクリーニングした結果、メチル化により発現が抑制されていると考えられる候補遺伝子を捕らえることができた。

A.研究目的

がんの発症、転移及び増殖のメカニズムの一つとして、近年DNAのメチル化の重要性が報告されている。がんとメチル化との関係を詳細に解析するためには、全ゲノムにわたるメチル化の変化を統括的に解析する必要がある。本研究ではゲノム全体を一枚の画像上でスキャンニングできるRLGS法を用いて、全ゲノムにおけるメチル化の変化を解析し、発がんに関与する遺

伝子を探索する。

B.研究方法

RLGS-M法を、発がんモデルマウスに生じた肝がんに応用し、全ゲノムをスクリーニングし、がん組織で特異的にメチル化の起こる14個のスポットを検出した。これらの領域からBACクローンを用いて転写単位を同定する。

C.研究成果

我々の開発した、RLGS (Restriction Landmark Genome Scanning)法は、全染色体上の約3,000点を、一枚の画像上で screening 可能である。この方法は、まずゲノム DNA を稀な頻度で切断する酵素を用いて切断し、その切断端に ^{32}P -dCTP, ^{32}P -dGTP でラベリングを行う (restriction landmark)。テストチューブ内でもう一度制限酵素で切断後、一次元アガロースゲル電気泳動を行い、更にゲル中で制限酵素切断を行った後、二次元アクリルアミドゲル電気泳動を行う。この際、restriction landmark として用いる酵素を *NotI* などのメチル感受性酵素を使うことによって、ゲノム上のメチル化の変化を検出できる (RLGS-M 法、M は methylation の頭文字)。本方法は、全染色体上のメチル化の程度を一度にスクリーニングできるという点では、他に類

をみない独創的な方法である。また制限酵素の種類を変えることにより、色々な制限酵素サイトのスクリーニングが実質的には可能である。本法を、高頻度にがんを発症するトランスジェニックマウスに生じた肝臓がんに応用した。トランスジェニックマウス MT-D2 は、SV40 T 抗原の上流に C57BL/6 (B6) の MUP (major urinary protein) の発現制御領域をつないだ外来遺伝子を B6 マウス受精卵に導入し、作製した^{10,11}。MT-D2 系統は肝臓に高頻度に癌を多発し、他の野生マウスと交配することにより、癌の発症頻度がさらに高められることが確認されている。交配により得られた F_1 雑種では LOH の検索が容易であること、B6 と野生マウスである *Mus spretus* (Spr) の系統間でみられる RLGS の polymorphic スポットは既に染色体上にマップされていること¹²等の利点か

ら、本研究には MT-D2 系統と Spr マウスとの交配により得られた F₁ 雑種 (BSF₁) を用いた。交配は MT-D2 系統のメスと Spr のオスの間で行い、10~18 ヶ月後肝癌組織の摘出を行った。

メチル感受性酵素をランドマーク酵素として使うと、メチル化のおこった制限酵素部位にはラベルが入らないため、スポットが消失する。この原理に基づいて、がん組織と正常組織の RLGS-M 画像を比較し、がん組織で特異的にメチル化の起こる領域を検索した。すでに染色体上の位置がわかっている 575 個の spot の変化を 30 個のがんサンプルに適用することにより、がんにおいて共通して (75% 以上) 高頻度にメチル化がおこるスポットを 14 個同定した。これら 14 個のスポットをクローニング後、シーケンスをしてホモロジー検索を行ったところ、2 つはがん抑制遺伝子 *p16* と、

がんの転移に関与しているといわれている *α4-integrin* であった。今年度はさらに 4 座位について解析した。1 座位については、northern hybridization により正常肝臓を含む幾つかの臓器での発現が確認されたので、当研究室で作成したマウス完全長 cDNA library をスクリーニングして、その完全長 cDNA クローンを得た。シーケンスの結果、ヒト乳癌での発現抑制が報告されている *mac25* 遺伝子であることがわかった。メチル化を受ける部位は第一エクソン内に存在しており、癌組織では高頻度にメチル化されていることが確認された。Taqman probe を用いた定量的 PCR 法で発現量を詳細に調べたところ、肝癌組織では正常組織に比べて発現量が有意に低下していた。よって、*mac25* 遺伝子は、RLGS-M 法で同定された領域のメチル化によって、癌化とともに発現が抑制されるこ

とが示唆された。

残り3座位については、大規模シーケンスと database を活用した転写単位の探索を行った。マウス BAC library をスクリーニングし、各座位をカバーする BAC クローン（インサート長約 200kb）を同定した。それぞれの BAC クローンより shotgun library を作成し、当研究室で開発した高速多検体シーケンサー（RISA シーケンサー）を用いて 5 fold 分のシーケンスを行った。得られた配列に対し、NCBI nt/EST database を用いて BLAST search を行い、高いスコアでヒットするクローンをリストアップしたところ、各 BAC clone について 1-2 種類の cDNA と 20-30 種の EST が得られた。このうちいくつかの cDNA/EST について、正常・癌組織における発現量を RT-PCR 法で調べたところ、肝癌組織において有為に発現量が低下して

いる EST が 1 つ確認された。残りのものについては現在検討中である。

D. 考察

RLGS-M 法を、発がんモデルマウスに適用することにより、高頻度にメチル化を受けるスポットを 14 個同定した。これらのうち 1 つは、がん抑制遺伝子の *p16* であり、もう一つはがん転移に関与しているとされている *$\alpha 4$ -integrin* であることがわかった。残りの 12 個のスポットに対応する転写単位のスクリーニングを現在行っている。RLGS-M 法は、がんにおけるメチル化の変化をゲノム規模的にスクリーニングするのに非常によい方法である。今回は前年度までの、*p16* や、*infertility-related sperm protein* に *homology* のある遺伝子のほかに、新たに *mac25* がみつかった。この遺伝子は臨床的にもヒト乳がんにおいて抑制されることが

報告されており、今回メチル下の程度と発現が相関を示すことが証明された。他の3座位については BAC クローンの shotgun sequence により候補遺伝子を同定し、そのうちの1つは発現が低下していることを証明した。

E. 結論

RLGS-M法を用いてがんにおいてメチル化が変化する領域をスクリーニングした結果、メチル化により発現が抑制されていると考えられる候補遺伝子を捕らえることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato M.V., Ikawa Y., Hayashizaki Y. and Shibata H. Paternal imprinting of mouse serotonin receptor 2A gene *Htr2* in embryonic eye; A conserved imprinting regulation on the *RB/Rb* locus, *Genomics*, **47**, 146-148 (1998)

2. Naas, T.P., DeBerardinis R.J., Moran J.V., Ostertag E.M., Kingsmore S.F., Seldin M.F., Hayashizaki Y., Martin S.L. and Kazazian, Jr. H.H., An actively retrotransposing, novel subfamily of mouse L1 elements, *EMBO*, **17**, 590-597 (1998)

3. Sasaki N., Izawa M., Watahiki M., Ozawa K., Tanaka T., Yoneda Y., Matsuura S., Carninci P., Muramatsu M., Okazaki Y. and Hayashizaki Y., Transcriptional sequencing: A method for DNA sequencing using RNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 3455-3460 (1998)

4. Sasaki N., Nagaoka S., Itoh M., Izawa M., Konno H., Carninci P., Yoshiki A., Kusakabe M., Moriuchi T., Muramatsu M., Okazaki Y. and Hayashizaki Y., Characterization of gene expression in mouse blastocyst using single-pass sequencing of 3995 clones, *Genomics*, **49**, 167-179 (1998)

5. Carninci P., Nishiyama Y.,

Westover A., Itoh M., Nagaoka S., Sasaki N., Okazaki Y., Muramatsu M. and Hayashizaki Y., Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 520-524 (1998)

6. Shibata H., Yoda Y., Kato R., Ueda T., Kamiya M., Haraiwa N., Yoshiki A., Plass C., Pearsall R. S., Held W.A., Muramatsu M., Sasaki H., Kusakabe M. and Hayashizaki Y., A methylation imprint mark in the mouse imprinted gene *Grf1/Cdc25 Mm* locus shares a common feature with the *U2afbp-rs* gene; An association with a short tandem repeat and a hypermethylated region, *Genomics*, **49**, 30-37 (1998)

7. Pearsall R.S., Imai K., Shibata H., Hayashizaki Y., Chapman V.M., Held W.A. and Plass C., The *Rasgrf1*-repeat sequence (*D9Ncvs53*) maps between *Mod1* and *Rbp1* on mouse chromosome 9 and may define a putative

imprinted region, *Mammal. Genome*, **9**, 261-262 (1998)

8. Izawa M., Sasaki N., Watahiki M., Ohara E., Yoneda Y., Muramatsu M., Okazaki Y. and Hayashizaki Y., Recognition sites of 3'-OH group by T7 RNA polymerase and its application to transcriptional sequencing, *J. Biol. Chem.* **273**, 14242-14246 (1998)

9. Sugahara Y., Akiyoshi S., Okazaki Y., Hayashizaki Y. and Tanihata I., An automatic image analysis system for RLGS films, *Mammal. Genome*, **9**, 643-651 (1998)

10. Hayward B.E., Kamiya M., Strain L., Moran V., Campbell R., Hayashizaki Y. and Bonthron D.T., The human *GNAS1* gene is imprinted, and encodes distinct paternally and biallelically expressed G proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 10038-10043 (1998)

11. Sasaki N., Izawa M., Sugahara Y., Tanaka T., Watahiki M., Ozawa K., Ohara E., Funaki H., Yoneda

- Y., Matsuura S., Muramatsu M., Okazaki Y. and Hayashizaki Y., Identification of stable RNA hairpins causing band compression in transcriptional sequencing and their elimination by use of inosine triphosphate, *GENE*, **222**, 17-24 (1998)
12. Seki M., Carninci P., Nishiyama Y., Hayashizaki Y. and Shinozaki K., High-efficiency cloning of *Arabidopsis* full-length cDNA by biotinylated CAP trapper, *Plant Journal*, **15**, 707-720 (1998)
13. Mori M., Akiyoshi S., Mizuno Y., Okuizumi H., Okazaki Y., Hayashizaki Y. and Nishimura M., Genetic profile of the SMXA recombinant inbred mouse strains revealed with restriction landmark genomic scanning, *Mammalian Genome*, **9**, 695-709 (1998)
14. Mizuno Y., Carninci P., Okazaki Y., Tateno M., Kawai J., Amanuma H., Muramatsu M. and Hayashizaki Y., Increased specificity of reverse transcription priming by trehalose and oligo-blockers allows high-efficiency window separation of mRNA display, *Nucleic Acides Res.*, **27**, 1345-1349 (1999)
15. Sugahara Y., Akiyoshi S., Okazaki Y., Tanihata I. and Hayashizaki Y., Application of RLGS image analysis tool (RAT) to the construction of a genetic linkage map of recombinant inbred strain SMXA, *Mammal. Genome* (1998) in press
16. Itoh M., Kitsunai T., Akiyama J., Shibata K., Izawa M., Kawai J., Tomaru Y., Carninci P., Shibata Y., Ozawa Y., Muramatsu M., Okazaki Y. and Hayashizaki Y., Automated high-throughput plasmid preparation system with microtiter glass-filter plates by filtration method, in press
17. Pearsall R.S., Plass C., Romano M.A., Garrick M.D., Shibata H., Hayashizaki Y. and Held W.A., A direct repeat sequence at the *Rasgrfl* locus and imprinted