

9990346.

平成11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)

「ヒト疾患関連遺伝子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12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

「ヒト疾患関連遺伝子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 斉（国立がんセンター研究所生化学部長）

..... 10

### 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）東京都医学研究機構

東京都臨床医学総合研究所副所長）

..... 14

### 総合研究報告書

「ヒト疾患関連遺伝子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）

..... 17

# 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業） 総括研究報告書

## ヒト疾患関連遺伝子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の原因遺伝子・DAKおよびヒトDAKの全cDNA配列を決定した。類似モデルns座の物理地図を作成した。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。それらは11番染色体上に存在する既知の遺伝子・Ikarosと、12番染色体上に存在する未知のRit1遺伝子である。Rit1のホモ欠損、点突然変異をリンパ腫で検出した。ヒトRit1遺伝子を利用し、ヒトがんでの変異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)。感受性をコンジェニックラットで確認した。

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  
生化学研究部 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 副所長

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、今後は動物モデルの利用系が重要と考えられる。本研究ではリンパ腫感受性を示すBALB/cマウスを用い、染色体11、12、16番上の未知のがん抑制遺伝子の単離を行う。また、大腸がん感受性・抵抗性を示すF344およびBUFラットを利用し、発がん感受性遺伝子座を連鎖解析する。すなわち、ゲノム解析法による感受性遺伝子(群)の単離を目指す。これらの研究により疾患の遺伝的予防法の開発が期待される。

### 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多い。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、ns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により原因遺伝子の探索、早期診断法の開発を行う。(1)劣性突然変異js、ns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。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、

### B. 研究方法

①聴覚障害マウスの診断：生後三週齢で異常な頭部の上下運動、金属音への反応欠如がみられ、これにより診断する。形態学的には内耳の有毛細胞に異常所見がみられる。②js候補遺伝子の解析：通常の子生

物学的手法を用いた。③がん抑制遺伝子候補の検索と同定:先ず始めに LOH 解析を行い、目的とする疾患関連遺伝子の存在する染色体領域を特定する。次に、YAC・BAC などを用い物理地図の作成を行い、その地図を用いて詳細なマッピングを行う。すなわち、100kb から 200kb の範囲に限定する。塩基配列決定により、領域内に存在する候補遺伝子を検索する。最後に、変異をもつ遺伝子の同定を行う。そのための手段として通常の分子生物学的手法を用いた。④大腸癌感受性座のタイピング: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)の誘発を観察する。遺伝子連鎖解析には、解析ソフト MapManager QTL ver 3.0b を用いる。(倫理面への配慮) 実験動物の適切な取り扱い要綱に準拠し研究する。また、動物倫理の理解を深めるため実験動物の慰霊祭への出席を義務づけている。動物遺伝子からヒト疾患原因遺伝子に到達した場合、各施設の倫理委員会に審査検討をしていただく。遺伝的予防などの新規難聴、がん予防法として臨床応用される場合には、特に慎重に審査を進める。

### C. 研究結果

①js 候補遺伝子の単離:js 座をカバーする連結 BAC クローン群の解析から js 変異の有力候補、キネシン様遺伝子 (DAK: Deafness Associated Kinesin) が発見された。この js 遺伝子については、DAK 遺伝子を含む BAC 全長のシーケンシングを行うことにより、cDNA およびその遺伝子領域の解析を完了させた。DAK 遺伝子は全長約 35kb で、18 個のエキソンから成り立ち、907 個のアミノ酸をコードする。DAK は各組織に普遍的にごく少量 (RT-PCR で検出

できる程度) 発現しているが、精巣や脳ではその発現はかなり強い。In situ ハイブリダイゼーションと DAK 特異的抗体による免疫組織化学の結果、DAK は発生初期には耳胞に、成体になっては有毛細胞に強く、しかもミオシン 7a 蛋白と共発現していることが判明した (後者は英国 MRC S. Brown 博士との共同研究)。一方、ヒト染色体 17q24-25 領域に存在するヒト DAK は 908 個のアミノ酸を含み、マウス・ヒト間のホモロジーは核酸レベルで 85.6%、アミノ酸レベルで 88.1%と非常によく保存されていた。

②ns 候補遺伝子のマッピング: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。その結果、ns の原因遺伝子座を第 10 番染色体上の D10Mit59 座と D10Mit258 座の間、約 2.67cM 領域に限定し、同時に物理地図を作製した。

③リンパ腫抑制遺伝子の単離:(1)Ikaros 遺伝子の同定:11 番染色体上の高頻度 LOH 領域近傍にマップされている候補遺伝子の検索を行い、Ikaros 遺伝子を見い出した。この遺伝子の破壊マウス 2 種類の内 1 種類はリンパ腫を発症しやすいとの報告がある。そこで、205 例の F1 リンパ腫を対象に、両者の関連性を検討した。その結果、Ikaros 遺伝子は LOH ピークの中に存在し、9 例にホモ欠失を検出することができた。一方、変異解析ではジंकフィンガードメインと活性化ドメインに塩基置換 3 例、フレームシフト変異 6 例を検出した。これらの結果から、放射線誘発マウス胸腺リンパ腫の形成において Ikaros 遺伝子はがん抑制遺伝子として機能するということが強く示唆された。(2)Rit1 遺伝子の単離:12 番染色体上の高頻度 LOH 領域 (Tlsr4) のピークは

D12Mit53 座と D12Mit279 座の間 2.9cM (約 4.5Mb) に存在する。更に Tlsr4 領域を限定するため、YAC・BAC を用いてこの間をカバーする物理地図を作成した。BAC クローンより新たに多型マーカーを複製し、詳細な LOH 解析を施行したところ、Tlsr4 は 35kb 領域内に存在することが判明した。そこで、Tlsr4 領域を中心に BAC クローン (180kb) のランダム配列決定を行い、得られた配列について逐次ホモロジーサーチ、エクソン予想を行った。得られたデータを総合した結果、一つの有力候補遺伝子の存在が示唆された。その想定エクソンは Tlsr4 領域近傍に存在し、しかもそのアミノ酸配列中には Ikaros 類似の 6 つのジンクフィンガーモチーフがコードされていた。そこで、この遺伝子の cDNA を単離配列を決定したところ、884 アミノ酸からなる新規遺伝子であることが分かった。Ikaros 遺伝子と同様に変異の検索を行うと、11 例にホモ欠失を、2 例にマイクロ欠損を、4 例に塩基置換を検出することができた。これらの結果から、本遺伝子はがん抑制遺伝子として働くと考えられ、Rit1 (radiation-induced tumor suppressor 1) と名付けた。

④ラット大腸がん感受性/抵抗性遺伝子座の同定：(1)加熱した魚肉食品中に含まれる発がん物質 PhIP をラットに投与することにより誘発される ACF 数を量的形質として、発がん感受性遺伝子の連鎖解析を行った。(F344xACI)F1xACI 戻し交配ラット (1 群 170 匹、2 群 120 匹) を用いて、それぞれ独立した連鎖解析を行った結果、いずれの群においてもラット第 16 染色体の D16Rat40~D16Rat60 間の約 8 cM に F344 系統の有する感受性遺伝子をマップできた (Lod 値は 5.2)。当該領域を有するコンジェ

ニック(N5)ラットを作製し、その ACF 誘発性の検討でも有意差を認めた ( $P<0.01$ )。以上の結果から、F344 型の感受性遺伝子が第 16 染色体上の当該領域に存在することが証明された。

さらに、最終的に作成した 700 頭の N2 ラットを用いて、第 16 染色体上の各遺伝子座におけるアレルタイプと ACF 誘発性の関連性について検討した。その結果、D16Wox7~D16Rat60 間の約 5cM の interval に 23 頭中 20 頭の N2 ラットが F344 由来のアレルをヘテロで有していることが判り、D16Rat40~D16Rat60 (8cM) 間の本領域に感受性遺伝子が存在する可能性が強く示唆された。(2)(BUFxACI)F1xBUF 戻し交配ラット 202 頭のうち、ACF 誘発数が 1 個以下と低感受性を示した 35 頭と、7 個以上の高感受性を示した 34 頭を用いた暫定的なゲノムワイドの連鎖解析の結果、第 6、第 9 および第 11 染色体の 3 カ所に抵抗性遺伝子座をマップした (ロッド値は 3.0 前後)。

#### D. 考察

①js 変異の有力な候補遺伝子として、キネシン様蛋白を指定する遺伝子が単離された。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。最近ヒト染色体 17 番の DAK 遺伝子座近傍に優性形質の non-syndromic な聴覚障害を持つ家系の存在が明らかとなった。DAK 遺伝子とこの聴覚障害原因遺伝子座との関連性を、米国研究者と共同で検討している。

劣性突然変異 ns 座領域の物理地図が完成した。この領域はヒト染色体座 10q22 に対応するが、まだヒト難聴がこの領域にあるとの報告はない。

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・同定された。第 11 染色体上の遺伝子は Ikaros であり、第 12 染色体上の遺伝子は新規蛋白をコードする Rit1 である。どちらの遺伝子もジンクフィンガーモチーフを有するという特色をもつ。Ikaros 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。一方、Rit1 蛋白もその構造特性から Ikaros 同様転写因子としての活性をもつと考えられるが、その確認実験を行う必要がある。

ヒトの Rit1 遺伝子および Ikaros 遺伝子の配列をもとに、ヒトのがんでの関与の検討を始めている（共同研究）。対象は卵巣がん、膀胱がん、神経芽腫、T 細胞白血病などである。

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。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。ポジショナルクローニングに向けて、感受性抵抗性遺伝子座を含むコンジェニックラットを完成させ、領域を 1cM 以下にまで狭める必要がある。

#### E. 結論

①js 聴覚障害関連遺伝子・DAC キネシン遺伝子が単離された。対応するヒト DAKcDNA の全塩基配列を決定した。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 染色体上の新規の遺伝子・Rit1 である。どちらの遺伝子もジンクフィンガーモチーフをもつ蛋白をコードする。③ラット大腸がん感受性遺伝子座を第 16 染色

体 D16Rat40 と D16Rat60 の間約 8cM の範囲に特定し、がん感受性遺伝子単離のための基礎が完成した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Okano, H. Mishima, Y. Miyazawa, T. Shinbo, T. Chou, D. Kosugi, S. Takahashi, Y. Odani, S. Niwa, O. and Kominami, R. (1999) Homozygous deletions and point mutations of the Ikaros gene in  $\gamma$ -ray-induced mouse thymic lymphomas. *Oncogene* 18, 6677-6683.

Chou, D. Matsuki, A. Saitou, Y. Kosugi, S. Shinbo, T. Gejyo, F. Niwa, O. and Kominami, R. (1999)

Accumulation of aberrant Y chromosomes in  $\gamma$ -ray induced thymic lymphomas lacking p53. *Molecular Carcinogenesis* 26, 157-162.

Endo, Y. Watanabe, T. Mishima, Y. Yoshimura, A. Takagi, N. and Kominami, R. (1999)

Compact chromatin packaging of inactive X chromosome involves the actively transcribed *Xist* gene. *Mammalian Genome* 10, 606-610.

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

Allelic loss mapping and physical delineation of a region harboring a putative thymic lymphoma suppressor gene on mouse chromosome 12. *Oncogene* 18, 4131-4136.

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

Kominami, R. (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.

Nakagama H. *Carcinogenicity in Animals; In Food Borne Carcinogenes.* (Edited by Nagao M. and Sugimura T.) (in press)

Burnouf D, Miturski R, Nagao M, Nakagama H, Nothisen M, Wagner J, Fuchs RP Molecular approach in cancer epidemiology: Early detection of carcinogen-induced mutations in a whole genome (Review). *Int. J. Mol. Med.*, 5(1):15-20, 2000.

Nakagama H, Souda K, Ochiai M, Yukiko I, Sugimura T, and Nagao M. Genetic analysis of the susceptibility in rats to aberrant crypt foci formation by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, PhIP. *Cancer Lett.*, 143:205-9, 1999.

Ishiguro Y, Ochiai M, Sugimura T, Nagao M, and Nakagama H. Strain differences of rats in the susceptibility to aberrant crypt foci formation by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine: no implication of Apc and Pla2g2a genetic polymorphisms in differential susceptibility. *Carinogenesis*, 20: 1063-1068, 1999

Ochiai M, Nakagama H, Turesky RJ, Sugimura T and Nagao M. A new modification of 32P-postlabeling method to recover IQ-DNA adducts as mononucleotides. *Mutagenesis*, 14:239-242, 1999.

# 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業） 分担研究報告書

## 聴覚平衡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 DFNB のモデル・ns 変異マウスを解析し、その原因遺伝子座を第 10 染色体上の D10Mit59 座近傍にマップした。また同領域の物理地図を作製した。②リンパ腫発症に関与する 2 つのがん抑制遺伝子をゲノム解析法により単離・同定した。それらは 11 番染色体上に存在する既知の遺伝子・Ikaros と 12 番染色体上に存在する新規遺伝子・Rit1 である。どちらの遺伝子もジンクフィンガーモチーフをもつ蛋白をコードする。両遺伝子のヒトがんでの関与を検討する基盤ができた。

### A. 研究目的

①劣性突然変異 ns マウスはヒトの非症候群性の常染色体劣性難聴(DFNB)のモデルである。現在まで、約 50 種類の DFNB 座の内単離された遺伝子は僅かに 15 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、すでに第 11 番染色体上にリンパ腫抑制遺伝子候補・Ikaros 遺伝子の存在を示し、また第 12 番染色体上に未知のリンパ腫抑制遺伝子の存在を示してきた。最終年度は Ikaros 遺伝子の解析と未知のがん抑制候補遺伝子の単離を目指し、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し検討するのが目的である。

### B. 研究方法

①ns 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、マッピングにはマイクロサテライトを用いた。物理地図の作成には YAC クローンを用いた。YAC ライブラリーはリサーチジェネティックス (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。YAC クローンのインサ



ート両末端部を STS 化することで YAC クローン近傍の物理的地図の作成を行った。

②ゲノム解析：塩基配列の決定により、エクソン判定、ESTs 検索を行った。そのために GRAIL プログラム、データベースを利用する相同性検索法を採用した。変異解析には SSCP 法を用いた。

③cDNA の単離にはライブラリーの選択法、5'-RACE 法を用いた。

(倫理面への配慮) 実験動物の適切な取り扱い要綱に準拠し研究する。また、動物倫理の理解を深めるため実験動物の慰霊祭への出席を義務づけている。動物遺伝子からヒト疾患原因遺伝子に到達した場合、各施設の倫理委員会に審査検討をしていただく。遺伝的予防などの新規難聴、がん予防法として臨床応用される場合には、特に慎重に審査を進める。

### C. 研究結果

①ns 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。約 1200 頭の戻し交配マウスを作製し、これらのマウスを対象にマッピングを行った結果、ns 座は第 10 染色体上の D10Mit59 座と D10Mit258 座の間、約 2.67cM 領域に存在することが判明した。YAC を用いた物理地図を作製すると、その領域を 1 つの YAC でカバーできることが分かった。

②(1) リンパ腫の解析：(1) Ikaros 遺伝子の同定：11 番染色体上の高頻度 LOH 領域近傍にマップされている候補遺伝子の検索を行い、Ikaros 遺伝子を見い出した。この遺伝子の破壊マウス 2 種類の内 1

種類はリンパ腫を発症しやすいという報告がある。そこで、205 の F1 リンパ腫を対象に、両者の関連性を検討した。その結果、Ikaros 遺伝子は LOH ピークの中に存在し、9 例にホモ欠失を検出することができた。一方、変異解析ではジंकフィンガードメインと活性化ドメインに塩基置換 3 例、フレームシフト変異 6 例を検出した。これらの結果から、放射線誘発マウス胸腺リンパ腫の形成において Ikaros 遺伝子はがん抑制遺伝子として機能するということが強く示唆された。

(2) Rit1 遺伝子の単離：12 番染色体上の高頻度 LOH 領域 (Tlsr4) のピークは D12Mit53 座と D12Mit279 座の間 2.9cM (約 4.5Mb) に存在する。更に Tlsr4 領域を限定するため、YAC・BAC を用いてこの間をカバーする物理地図を作成した。BAC クローンより新たに多型マーカーを単離し、詳細な LOH 解析を施行したところ、Tlsr4 は 35kb 領域内に存在することが判明した。そこで、Tlsr4 領域を中心に BAC クローン (180kb) のランダム配列決定を行い、得られた配列を逐次ホモロジーサーチ、エクソン予測を行った。得られたデータを総合した結果、一つの有効候補遺伝子の存在が示唆された。その想定エクソンは Tlsr4 領域近傍に存在し、しかもそのアミノ酸配列中には Ikaros 類似の 6 つのジंकフィンガーモチーフがコードされていた。そこで、この遺伝子の cDNA を単離し配列を決定したところ、884 アミノ酸からなる新規遺伝子であることが分かった。Ikaros 遺伝子と同様に変異の検索を行うと、11 例にホモ欠失を、2 例にマイクロ欠損を、4 例

に塩基置換を検出することができた。これらの結果から、本遺伝子はがん抑制遺伝子として働くと考えられ、Rit1 (radiation-Induced tumor suppressor 1)と名付けた。

マウス Rit1 遺伝子のホモログも単離した。ヒト Rit1 遺伝子がコードする蛋白は 894 のアミノ酸からなり、マウスのそれとは 93%の相同性を示した。

#### D. 考察

① 新しい難聴モデルマウス・ns を昨年度から解析を始めた。詳細なマッピングの結果、ns は第 10 染色体上の約 2.67cM 領域内に存在することが分かった。続いて行われた物理地図解析から、その領域は一つの YAC クローンの中に存在することが判明した。組換え距離ではかなり長い領域と想像されたが、物理的には塩基配列決定可能な比較的短い範囲にあるという結果となった。その違いは組換えホットスポットの存在によると考えている。この染色体領域はヒト第 10 番染色体 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。

② リンパ腫発症に関与するがん抑制遺伝子候補の単離：(1)第 11 染色体上の Ikaros 候補遺伝子：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。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の解析：D12Mit279 座近傍の共通欠失領域・約 35kb 領域に新しいリンパ腫抑制候補遺伝子・Rit1 を単離・同定することができた。Rit1 も Ikaros 同様ジンクフィンガードメインをもち、そのため転写因子と想像されるが、その詳細は明らかではない。対応するヒト Rit1 遺伝子を単離したが、その染色体座領域 (14q32) は卵巣がん、膀胱がんなどで高頻度 LOH を示すことが知られている。現在、ヒトのがんでの関与の有無を検討中である。

#### E. 結論

①新しい難聴モデルマウス・nsの原因遺伝子座の遺伝地図・物理地図を作製した。この ns 座領域はヒト染色体座 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 染色体上の新規の遺伝子・Rit1 である。どちらの遺伝子もジンクフィンガーモチーフをもつ蛋白をコードする。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Okano, H. Mishima, Y. Miyazawa, Y. Shinbo, T. Chou, D. Kosugi, S. Takahashi, Y. Odani, S. Niwa, O. and Kominami, R. (1999) Homozygous deletions and point mutations of the Ikaros gene in  $\gamma$ -ray-induced mouse thymic lymphomas. *Oncogene* 18, 6677-6683.

- Chou, D. Matsuki, A. Saitou, Y. Kosugi, S. Shinbo, T. Gejyo, F. Niwa, O. and Kominami, R. (1999) Accumulation of aberrant Y chromosomes in  $\gamma$ -ray induced thymic lymphomas lacking p53. *Molecular Carcinogenesis* 26, 157-162.
- Endo, Y. Watanabe, T. Mishima, Y. Yoshimura, A. Takagi, N. Kominami, R. (1999) Compact chromatin packaging of inactive X chromosome involves the actively transcribed *Xist* gene. *Mammalian Genome* 10, 606-610.
- Shinbo, T. Matsuki, A. Matsumoto, Y. Kosugi, S. Takahashi, Y. Niwa, O. and Kominami, R. (1999) Allelic loss mapping and physical delineation of a region harboring a putative thymic lymphoma suppressor gene on mouse chromosome 12. *Oncogene* 18, 4131-4136.
- Kosugi, S. Miyazawa, T. Chou, D. Saito, Y. Shinbo, T. Matsuki, A. Okano, H. Miyaji, C. Watanabe, H. Hatakeyama, K. Niwa, O. and Kominami, R. (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.

# 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業） 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、PhIPによる異常陰窩（ACF）の誘発性を指標として、大腸発がんの感受性および抵抗性遺伝子群を連鎖解析により明らかにすることを目的とした。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、290匹のバッククロスラットを用いた解析により第16染色体のD16Rat40とD16Rat60の約8cMの間にマップ出来た（Lod score = 5.2）。Lod値の分布から、当該領域にはさらに複数の感受性遺伝子が存在する可能性が示唆された。本領域を含むcongenicラットでは対照群に比較しPhIPによるACFの誘発数が有意に高かったことから、感受性遺伝子の存在が実証できた。ACIラットが有する常染色体優性の抵抗性遺伝子についても、ゲノムワイドの連鎖解析により候補遺伝子座を第6、9および11番染色体にマップした。発がん感受性の候補遺伝子の単離を目指し、ACIラットとコンジュニククラット間において発現量の異なる遺伝子についての網羅的な解析を開始した。

### A. 研究目的

日本人のがん患者総数の中で大腸がんの占める割合は年々増加しており、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種で、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、ヒトでのこれら臓器発がんの原因物質である可能性がある。PhIPで誘発されるラット大腸がんでは、Apc遺伝子およびβ-catenin 遺伝子変異が高頻度に認められること、マイクロサテライト変異も認められることから、ヒト大腸がんの多段階性発がんや発がん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。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、PhIP投与後、比較的早期より誘発される異常陰窩（aberrant crypt foci, ACF）の誘発数を指標として、発がん感受性及び抵抗性を規定している遺伝的要因を連鎖解析により明らかにすることを目的とした。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するという点においても極めて重要な課題である。

### B. 研究方法

加熱した魚肉食品中に多くふくまれるヘテロサイクリックアミンの1種2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)を、感受性系統であるF344ラットとBUFラット、および抵抗性ラットであるACIラット間で作成した戻し交配ラット① (F344xACI)F1xACI、② (BUFxACI)F1xBUF に投与しACFの誘発数を解析し、誘発ACF数を量的形質としたQTL解析により感受性および抵抗性遺伝子座をマップした。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、摘出した大腸をホルマリンで固定したのち、メチレンブルーによる染色を行い顕微鏡下での観察により誘発ACF数を測定した。解析ソフトとしてはMapManagerQTL ver3.0bを用いた。さらに、感受性遺伝子座の候補ゲノム領域のみを、抵抗性系統であるACIラットの遺伝的背景に導入したコンジュニククラットを作成し、PhIPによるACF誘発性を解析することにより感受性遺伝子の存在を検討した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験については、動物実験に関する規約を遵守し、また実験に供する動物も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いた。動物の苦痛に対しても十分な配慮を払い、屠殺は全身麻酔下で行った。また、実験者には動物倫理の理解を深めるため、実験動物の慰霊祭への出席を義務づけている。

#### C. 研究結果

(1) バッククロスラットを用いた感受性遺伝子座の同定：(F344xACI) F1xACIバッククロスラット(1群170匹、2群120匹)を用いて、それぞれ独立した連鎖解析を行った結果、いずれの群においてもラット第16染色体のD16Rat40~D16Rat60間の約8 cMにF344系統の有する感受性遺伝子をマップできた。両群を併せた290匹によるLod値は5.2であった。1群170匹について、D16Rat60遺伝子座におけるアレルタイプと誘発ACF数の関連性を調べた結果、F344/ACI(F/A)型のアレルタイプを示したものの85匹のACF数は平均 $2.7 \pm 0.2$ 個であったのに対し、ACI/ACI(A/A)型のアレルタイプを示したものの85匹は平均 $1.6 \pm 0.2$ 個と、その差は有意であった( $P < 0.0001$ )。さらに、誘発ACF数が6個以上と強い感受性を示したバッククロスラット9匹は全てF/A型のアレルタイプであった。

(2) さらに400匹以上のバッククロスラットを作成し、QTL解析に用いた290匹と併せた計700匹のバッククロスラットにおいて、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た。上記のD16Rat40~D16Rat60間のintervalを含む、D16Rat1とD16Rat13の約35-40cMの間で組み換えをおこなっているN2ラットで、誘発ACF数が6個以上の高感受性を示した23匹のうち、20匹のバッククロスラットは、D16Rat60~D16Wox3の約5~8cMのインターバルを共有する可能性が示唆された。この結果からも、F344型の感受性遺伝子が当該領域に存在することが強く示唆された。

(3) コンジェニックラットを用いたACF誘発性の検討：当該領域を有するコンジェニック(N5)ラットを用いたACF誘発性の検討では、N5ラット(F344/ACI型のアレルタイプ)では、1匹あたりのACF数は平均 $2.0 \pm 0.3$ 個であり、同遺伝子座でACI/ACI型のアレルタイプを示したN5ラットにおけるACF誘発数(平均 $0.6 \pm 0.3$ 個)より有意に多かった( $P < 0.01$ )。以上の結果から、F344型の感受性遺伝子が第16染色体上の当該領域に存在する

ことが証明された。

(4) ACI系統が有する抵抗性遺伝子座のマッピング：(BUFxACI) F1xBUFバッククロスラット202匹のうち、ACF誘発数が1個以下と低感受性を示した34匹と、7個以上の高感受性を示した35匹を用い、現在までに約100個の多型マーカーを用い、1500 cM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および第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。現在、202匹全ての戻し交配ラットを用いて3つの染色体における詳細なQTL解析を進めている。

#### 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5.2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、D16Rat60とD16Wox3との間、約5-8 cMの領域に少なくとも一つの感受性遺伝子が存在することが示唆された。さらにコンジェニックラットを用いた解析により、当該領域に感受性遺伝子が存在することが実証された。今後は感受性遺伝子の単離を目指し、現在作成したコンジェニックラットを起始動物として、組み換え体ラットを作成し、遺伝子の局在領域を1-2 cMの範囲内に狭めていくことが必須である。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)を数多く単離する必要がある。更にDNAチップ等の技術を導入し、抵抗性ACIラットと感受性コンジェニックラット間において、発現量の異なる遺伝子についての網羅的な解析を行い、感受性に関わる候補遺伝子を同定・単離していく。

ACI型抵抗性遺伝子に関しては、前述した様に、今後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正確にマップすることが必須である。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ている。

#### E. 結論

加熱肉食品中に含まれる変異原・がん原物質PhIPにより誘発される大腸前がん病変(ACF)の誘発性を指標とした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。本領域はヒト大腸がんで効率にLOHを呈する第8

染色体短腕 (8p12-22) 領域に相同性がある。今後、コンジェニックラットを用いて、感受性の候補遺伝子を同定・単離する。ACI型の抵抗性遺伝子については、候補遺伝子座である第6、第9、及び第11の3つの染色体について、作成した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をマップする。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nakagama H. Carcinogenicity in Animals; In Food Borne Carcinogenes. (Edited by Nagao M. and Sugimura T.) (in press)
2. Bumouf D, Miturski R, Nagao M, Nakagama H, Nothisen M, Wagner J, Fuchs RP Molecular approach in cancer epidemiology: Early detection of carcinogen-induced mutations in a whole genome (Review). *Int. J. Mol. Med.*, 5(1):15-20, 2000.
3. Nozaki T, Masutani M, Watanabe M, Ochiya T, Hasegawa F., Nakagama H, Suzuki H, and Sugimura T. Syncytiotrophoblastic giant cells in teratocarcinoma-like tumors derived from Parp-disrupted mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96: 13345-13350, 1999.
4. Katahira M, Fukuda H, Kawasumi H, Sugimura T, Nakagama H, and Nagao M. Intramolecular quadruplex formation of the mouse hypervariable minisatellite, Pc-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264:327-333, 1999
5. Nakagama H, Souda K, Ochiai M, Yukiko I, Sugimura T, and Nagao M. Genetic analysis of the susceptibility in rats to aberrant crypt foci formation by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, PhIP. *Cancer Lett.*, 143:205-9, 1999.
6. Shimokawa T, Masutani M, Ishiguro Y, Araki S, Aoki Y, Nakagama H, and Sugimura T. Linkage mapping of the rat poly(ADP-ribose)glycohydrolase (Parg) gene to Chromosome 16. *Exp. Animals.*, 48: 217-218, 1999
7. Ishiguro Y, Ochiai M, Sugimura T, Nagao M, and Nakagama H. Strain differences of rats in the susceptibility to aberrant crypt foci formation by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine: no implication of Apc and Pla2g2a genetic polymorphisms in differential susceptibility. *Carcinogenesis*, 20: 1063-1068, 1999
8. Ochiai M, Nakagama H, Turesky RJ, Sugimura T and Nagao M. A new modification of 32P-postlabeling method to recover IQ-DNA adducts as mononucleotides. *Mutagenesis*, 14:239-242, 1999.

### 2. 学会発表

1. Nakagama H, Souda K, Ochiai M, Ishiguro Y, Ubagai T, Sugimura T, and Nagao M. Mapping of colon carcinogenesis susceptibility gene: US-Japan Workshop on "New Rodent Models for the Analysis and Prevention of Carcinogenesis" (Feb. 9-10, 1999, Maui Prince Hotel, Maui, Hawaii, USA)
2. Nakagama H, Ochiai M, Kanazawa T, Ubagai T, Sugimura T and Nagao M. Genetic susceptibility of rats to the induction of ACF, putative precancerous lesions in the colon, by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine: The Thirtieth International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund: New Frontiers in Mechanistic Cancer Research in Animal Models (Nov. 16-18, 1999, Tokyo)
3. 金沢孝満、落合雅子、石黒由紀子、杉村隆、長尾美奈子、中釜齊：PhIP誘発ラット大腸発がん感受性遺伝子のD16Rat40-D16Rat60間10cM intervalへのマッピング、第58回日本癌学会(広島、9/29~10/1、1999)
4. 祖母井庸之、石黒由紀子、落合雅子、杉村隆、長尾美奈子、中釜齊：PhIPによるラット大腸発がん抵抗性遺伝子のマッピング、第58回日本癌学会(広島、9/29~10/1、1999)
5. 石黒由紀子、落合雅子、杉村隆、長尾美奈子、中釜齊：ラット第16番染色体上のPhIP大腸発がん感受性遺伝子座を含むコンジェニックラットの作成、第58回日本癌学会(広島、9/29~10/1、1999)
6. 高塚純、祖母井庸之、佐藤雅彦、本田善子、緒方秀昭、岡本康之、畠山知明、磯貝正博、中釜齊、柴忠明：大腸腺腫における遺伝子変異の検討、第58回日本癌学会(広島、9/29~10/1、1999)
7. 下川卓志、益谷美都子、野崎中成、中釜齊、杉村隆：ラットポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼのcDNAクローニングと性状解析、第72回日本生化学会大会(1999/10/6-10/9, Yokohama, Japan)
8. 下川卓志、益谷美都子、石黒由紀子、野崎中成、中釜齊、杉村隆：ラットおよびヒトポリ(ADP

-リボース)グリコヒドラーゼ遺伝子のマッピング、第22回日本分子生物学会年会（1999年、12/7-12/10, Fukuoka, Tokyo）

G. 知的所有者の所得状況

特になし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
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）東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所 副所長

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ている。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の完全長cDNAおよび遺伝子の構造解析を重点的に行った。その結果、完全長cDNA（全長約3.5kb）を単離することができ、その一次構造解析の結果DAK蛋白は907残基のアミノ酸をコードすることが明らかになった。またDAK遺伝子は7kbのプロモーター領域の7kbを含む約35kbの全長を持つ遺伝子であることが明らかになった。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（jsマウス特異的な変異の存在する部分）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、およびロイシンジッパーモチーフ等が存在していた。今年度はさらにDAKノヒトホモログの完全長cDNAの単離にも成功し、アミノ酸の一次構造上マウスより1アミノ酸残基多い908残基で構成されていた。また、今年度構築を完了したヒトの整列BACクローン群とマウスの整列BACクローン群との比較から、マウスのjs領域に相当する部分はヒト17染色体長腕の24-25（17q24-25）領域に存在することが明らかになった。また、我々はこの過程で、8種の新規遺伝子を含む19の遺伝子をこの領域にマップし、さらに約1.2Mb領域のヒト-マウス間のシンテニーが完全に保存されていることを明らかにした。しかしながら、この染色体領域にこれまでヒトで知られている聴覚障害の遺伝子座は存在しなかった。今後、このDAKの情報を基にヒトの家系解析を行い、DAKの異常で生じるヒト聴覚障害の例を探してゆくことを計画している。

#### 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もの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機能の中でどの様な構造的・機能的役割を果たすのかも全く不明のままである。

本研究は、これまで我々が単離した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）マウスの原因候補遺伝子DAKで得られたcDNAおよび遺伝子の構造・機能に関する情報をヒト聴覚障害に応用すること、およびこのDAK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DAKを始めその他js領域に存在し、発現している遺伝子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とヒトのjsシンテニック領域に対する整列BACクローンの構築

1. RT-PCRによりDAKで進化的に保存されている部分でPCRプライマーを作製し、DAKが存在していると思われるヒトBACクローンを単離した。そのBACに対しショットガンシーケンシングを行い、マウスDAKとのホモロジーサーチの結果、ヒトDAK特異的なDNA断片を得た。次にその断片の情報を基にRT-PCR、3' RACE、5' RACEを行い、ヒトDAKの完全長cDNAを単離した。

2. 上記で得られたBACクローンを基点とし、BAC end rescue法、ラディエーションハイブリッド法などを用い、ヒトのjsシンテニック領域に対する整列BACクローンの構築を行った。

## C. 研究結果

### 1) マウスDAKのcDNA遺伝子の完全長領域のシーケンシング

DAKは他のキネシンファミリー同様、オルタネイティブスプライシングを起こしやすい。内耳蝸牛管および精巣由来のcDNAライブラリーのスクリーニングの結果、6つのアイソフォームが単離された。これらのうち2種は精巣から単離されたものでモータードメイン内のエクソン4または5が発現しないものであり、残りの4種は内耳蝸牛管から単離されたものでキネシンモータードメインを共通して含み、イントロン9、11および

12が発現するタイプのスプライシングフォームであった。このような事情から、DAKの完全長cDNAの単離は非常に困難となった。そこで、Shotgun sequencingによるDAKゲノム領域の完全長シーケンシングとエクソン部位推定ソフトウェアを用いたエクソン検索およびRT-PCR、および3' RACE法を併用して完全長cDNAの単離を試みた。これらの解析の結果、DAK遺伝子のcDNAは全長約3.5kb、907残基のアミノ酸をコードすることが明らかになった。またDAK遺伝子は7kbのプロモーター領域の7kbを含む約35kbの全長を持つ遺伝子であることが明らかになった。また、DAKは20のエクソンから成り、さらに、オルタネイティブスプライシングの原因としてそれが起こったエクソンのドナーまたはアクセプター部位の突然変異により生じたものと考えられた。しかしながら、これらのアイソフォームの機能については現在のところ明らかになっていない。

また、昨年度からjs遺伝子座における対立遺伝子jssealについて、突然変異解析を行ったが、DAKを始めjs領域にあるその他の遺伝子についても、正常、js、jsseal間でそれぞれに特異的な突然変異部位を発見することはできなかった。

### 2) トランスジェネシスによるjs突然変異のレスキュー

js候補遺伝子、DAKが聴覚障害の直接の原因となることを個体レベルで証明するため、BAC-トランスジェネシスによる表現型レスキュー実験を行った。現在までに、jsマウスおよびjsマウスの遺伝背景系統(C57BL/6J: B6)の受精卵に、DAK遺伝子を完全に含むBACクローンの導入を試みた。その結果、C57BL/6J系統に2系統のTgマウスを得た。このマウスを用い、jsマウスとの交配によるレスキュー実験を行った結果、12頭のF1個体を得たが、BAC-DNA由来の配列を持つTgマウスは確認できなかった。現在、これらの実験を引き続き行っている。

### 3) ヒトDAKのクローニングと染色体マッピング

最近の研究においてマウスの聴覚障害の原因遺伝子が明らかになったことで同時にヒト聴覚障害においてもその原因が明らかになるケースが数多く報告されている。そこでヒトDAKの単離を行うと共に、ヒト染色体上の位置を明らかにするためにjs領域のヒトシンテニック領域におけるBACコンテ

ィグの作製と遺伝子の単離を行い、ヒトデータベース上の遺伝子地図の検索を行った。RT-PCR、5' RACEおよび3' RACE法によりヒトDAKホモログを単離した。その結果、1残基分マウスより多い908アミノ酸をコードしていた。また、マウス-ヒト間のホモロジーはcDNAで85.6%、アミノ酸で88.1%と高い相同性を示していた。さらに、ヒトおよびマウスのBACコンティグから単離した遺伝子をNCBIの「Human Gene Map99」において検索したところ、6種の遺伝子がヒトの染色体上にマップされていた。この結果からDAKはヒト17番染色体長腕の24-25(17q24-25)領域に存在することが明らかになった。また、我々はこの過程で、8種の新規遺伝子を含む19の遺伝子をこの領域にマップし、さらに約1.2Mb領域のヒト-マウス間のシンテニーが完全に保存されていることを明らかにした。

#### 4) DAKの発現パターンの解析

DAKの機能解析を行うための最初のステップとしてRNAプローブを用いたin situハイブリダイゼーション (ISH) およびDAKに対するペプチド抗体を用いた免疫染色を行った。各ステージの胚を用いてISHを行った結果、その発現は臓器非特異的であったが、そのうち特に耳胞、前肢および尾部に強い発現が認められた。また、内耳蝸牛管切片の免疫染色を行った結果、jsマウスにおいて異常が認められた外有毛細胞および内有毛細胞に強い発現が認められた。この発現部位はjsマウスと同様の表現型を示すshaker-1マウスの原因遺伝子として単離されたミオシンVIIa遺伝子と同位置にあり、異なる2種のモーター蛋白質が蝸牛管の神経上皮において相互作用する可能性が示唆された。現在、両者の相互作用について検討中である。

#### D. 考察

これまで我々は聴覚障害を持つマウスの突然変異であるジャクソンシェーカー (Jackson shaker: js) を材料にし、その聴覚障害の原因となる候補遺伝子DAK (Deafness-associated kinesin) を発見した。このDAKは、代表的なモーター蛋白の1つ、キネシンのモータードメイン、ATP結合部位などを持ってはいたが、ミオシンの頭部と高いホモロジーを示す領域、およびロイシンジッパーモチーフ等、他のキネシン蛋白とはかなりかけ離れた構造も兼ね備えており、これ

まで哺乳類では全くこの様な特殊な構造を持つキネシン分子は発見されていなかった。さらに、このDAKは組織特異的と思われるalternative splicingにより、少なくとも6種類のisosplice formの存在することが分かった。この蛋白DAKが、jsマウスの聴覚障害の原因の候補遺伝子であることは、このjsマウスが単離されたA/J近交系マウスと比較し、モータードメインの1カ所のアミノ酸置換を持つ突然変異のみが異なっていること、その突然変異はjs由来のDAK以外のキネシンでは全て多型が存在しない、すなわち高度に保存された部分に起こった突然変異であること、DAK特異的RNAプローブによるin situ hybridizationの結果、耳胞の発生直前に発現が始まり、その耳胞に強い発現が見られること、またDAK特異的ペプチド抗体による免疫組織学的実験によって、DAK蛋白が、内耳外有毛細胞の感覚毛に強く発現すること、またこの部位がshaker-1の原因遺伝子である7a型ミオシンと同じ部位で発現 (共発現) していることなどの証拠から、かなり強固になってきている。また、実際DAK特異的ペプチド抗体を利用して、DAKと7a型ミオシンが直接相互作用するという実験結果も得られている。

#### E. 結論

ヒト聴覚障害モデルであるジャクソンシェーカー (Jackson shaker: js) マウスの聴覚障害の原因となる候補遺伝子としてDAK (Deafness-Associated Kinesin) を同定した。このマウスDAKの情報をもとにヒトDAKのホモログを単離し、cDNAおよび遺伝子の構造を明らかにした。この結果は、DAKの異常によって引き起こされるヒト聴覚障害の発症機構を研究する上で重要な情報となり、聴覚障害を持つ新生児の遺伝子診断にも利用が期待できる。

#### F. 研究発表

##### 2. 学会発表

- 1) 吉川欣亮・米川博通：ヒト聴覚障害モデル、ジャクソンシェーカーからの原因遺伝子のポジショナルクローニング. 第46回日本実験動物学会総会疾患の遺伝子を獲る」 1999. 5. 20 - 22. 市川
- 2) 和田匡史・若林雄一・牛木辰男・米川博通・木南 凌：先天性聴覚障害モデルマウス (ns) の遺伝解析. 第22回日本分子生物学会年会 1999.12.7 - 10. 福岡

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
総合研究報告書

ヒト疾患関連遺伝子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を対象に行ったポジショナルクローニング法で、2種類の聴覚障害関連遺伝子、ミオシン 15 型と DAC キネシン様遺伝子が単離された。②マウスリンパ腫のゲノム解析により、2種類のがん抑制候補遺伝子、すなわち 11 番染色体上に存在する既知の遺伝子・Ikaros と、12 番染色体上に存在する新規遺伝子・Rit1 が単離された。どちらの遺伝子もジンクフィンガーモチーフをもつ蛋白をコードする。ヒト相同遺伝子を利用し、ヒトがんでの変異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 D16Rat40 と D16Rat60 の間約 8cM の範囲に特定し、がん感受性遺伝子単離のための基礎が完成した。

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  
生化学研究部 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 副所長

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 sh-2、js、ns 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により原因遺伝子の探索、早期診断法の開発を行う。(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 (DNFB3) のモデルであり、js、ns は対応が未確定な DNFB モデルの一つである。

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感受性を示す BALB/c マウスを用い、染色体 11、12、16 番上の未知のがん抑制遺伝子の単離を行う。また、大腸がん感受性・抵抗性を示す F344 および BUF ラットを利用し、発がん感受性遺伝子座を連鎖解析する。すなわち、ゲノム解析法による感受性遺伝子（群）の単離を目指す。こ

これらの研究により疾患の遺伝的予防法の開発が期待される。

## B. 研究方法

①聴覚障害マウスの診断：生後三週齢で異常な首の上下運動、金属音への反応欠如がみられ、これにより診断する。形態学的には内耳の有毛細胞に異常所見がみられる。②放射線照射によるマウスリンパ腫の誘発：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。③sh-2、js、ns 候補遺伝子およびがん抑制遺伝子候補の検索と同定：先ず始めに連鎖解析を行い、目的とする疾患関連遺伝子の存在する染色体領域を特定する。すなわち、遺伝学的マッピングを行う。次に、YAC・BACなどを用い物理地図の作成を行い、その地図を用いて詳細なマッピングを行う。すなわち、100kb から 200kb の範囲に限定する。塩基配列決定により、領域内に存在する候補遺伝子を検索する。最後に、変異をもつ遺伝子の同定を行う。④大腸癌感受性座のタイピング：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)の誘発を観察する。遺伝子連鎖解析には、解析ソフト MapManager QTL ver 3.0b を用いる。

(倫理面への配慮) 実験動物の適切な取り扱い要綱に準拠し研究する。また、動物倫理の理解を深めるため実験動物の慰霊祭への出席を義務づけている。動物遺伝子からヒト疾患原因遺伝子に到達した場合、各施設の倫理委員会に審査検討をしていただく。遺伝的予防などの新規難聴、がん予防法として臨床応用される場合には、特に慎重に審査を進める。

## C. 研究結果

①sh-2 および js 候補遺伝子の単離：(1) sh-2 を含む 21 の BAC クローンを元に、発現している遺伝子断片をエキソン捕獲法、cDNA 選抜法、ヒト DNA との保存領域検索法などでスクリーニングしてきた。その結果、sh-2 領域に sh-1 難聴遺伝子であるミオシン 7A と相同性をもつ DNA 配列が発見された。そこで、その相同配列を含む部分 cDNA を単離し塩基配列の決定を行った。得られた約 2,000 塩基 (600 のアミノ酸に対応する) の相同配列検索を行うと、7 型ミオシンと一部相同性を示すが、全く新しいクラスのミオシン遺伝子であることが判明した。この遺伝子を対象に変異の検索を行うと、アクチン結合ドメイン中のよく保存されたアミノ酸に置換がみられた (システインからチロシンへの置換)。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るので、単離された新しいミオシン遺伝子が sh-2 原因遺伝子の有力候補であると考えられた。

(2)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 : Deafness Associated Kinesin ) が発見された。この js 遺伝子については、DAK 遺伝子を含む BAC 全長のシーケンシングを行うことにより、cDNA およびその遺伝子領域の解析を完了させた。DAK 遺伝子は全長約 35kb で、18 個のエキソンから成り立ち、907 個のアミノ酸をコードする。DAK は各組織に普遍的にごく少量 (RT-