

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。

②リンパ腫抑制遺伝子の単離：(1)LOH 解析：BALB/c と MSM の F1 マウスおよび戻し交配マウスを約 1000 頭作製し、それぞれに放射線を照射し約 600 頭から胸腺リンパ腫を得た。この胸腺リンパ腫に対し多型マーカーを用いた全染色体に及ぶ LOH 解析を行なった。その結果、11 番、12 番、16 番染色体上にそれぞれ 40%、65%、45% という高頻度 LOH を示す領域を見出すことができた。

(2)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 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。

(3)Rit1 遺伝子の単離：12 番染色体上の高頻度 LOH 領域 (Tlstr4) のピークは D12Mit53 座と D12Mit279 座の間 2.9cM (約 4.5Mb) に存在する。更に Tlstr4 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、Tlstr4 は 35kb 領域内に存在することが判明した。そこで、Tlstr4 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、エクソンを予想を行った。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 Tlstr4 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、本遺伝子の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。

③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 匹の 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 の範囲に 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

①難聴原因遺伝子探索の結果、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。また、js 変異の有力な候補遺伝子が単離された。それはキネシン様蛋白を指定する遺伝子であった。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、まだヒト難聴原因遺伝子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。どちらの遺伝子もジंक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 1 cM 以下にまで狭める必要がある。

E. 結論

①2 種類の聴覚障害関連遺伝子、ミオシン 15 型と DAC キネシン遺伝子が単離された。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ラット大腸発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 γ -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 γ -ray induced

thymic lymphomas lacking p53. *Molecular Carcinogenesis* 26, 157-162.

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.

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

Wakabayashi, Y. Takahashi, Y. Kikkawa, Y. Okano, H. Mishima, Y. Ushiki, T. Yonekawa, H. and Kominami, R. (1998) A novel type of myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-2. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 248, 655-659.

Ishiguro, Y. Ochiai, M. Sugimura, T. Nagao, M. Nakagama, H. (1999) Strain differences of rats in the susceptibility to aberrant crypt foci formation by 2-amino-1-methyl-6-phenyl imidazo [4,5-b]pyridine: no implication of Apc and Pla2s genetic polymorphisms in different susceptibility. Carcinogenesis, (in press)

Dashwood, R. H. Suzui, M. Nakagama, H. Sugimura, T. and Nagao M. (1998) High frequency of β -Catenin (*Cttnb1*) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat. Cancer Research, 58, 1127-1129.

Nakagama, H. Souda, K. Ochiai, M. Yukiko, I. Sugimura, T. Nagao, M. (1999) Genetic analysis of the susceptobolity in rats to aberrant crypt foci formation 2-amino-1-methyl-6-phenyl imidazo [4,5-b]pyridine, PhIP. Cancer Letters, (in press)

Shimokawa, T. Masutani, M. Nozaki, T. Nakagama, H. Araki, S. Aoki, Y. and Sugimura, T. (1999) The human poly (ADP-ribose) glycohydrolase maps to chromosome 10q11.23-21.1 by fluorescence in situ hybridaization. Human Cell, (in press)

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

Nakagama H. Souda K, Ochiai M, Yukiko I,

Sugimura T, and Nagao M. (1999) 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,

Ishiguro, Y. Ochiai, M. Sugimura, T. Nagao, M. and Nakagama, H. (1999) 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.

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

Maeda, Y. Takahama S. and Yonekawa, H. (1998) Four dominant loci for the vascular responses by the antitumor polysaccharide, lentinan. Immunogenet., 47, 159-165.