

審査の結果の要旨

氏名 湯地 晃一郎

TEL(*translocation-ETS-leukemia*)は *ETV6* とも称され,急性白血病及び遺伝性線維肉腫の染色体転座に関与する転写因子であり,12 番染色体短腕の染色体異常において半分以上に関与することが知られている.本研究においては,小児急性骨髄性白血病症例において認められた *t*(7;12)(p15;p13)が, *TEL* 遺伝子の関与する染色体転座かどうかを検討され, *TEL* 遺伝子に融合する相手新規遺伝子が検索された.以下に研究結果の要点を示す.

1. 症例は5歳男児, French-American-British (FAB) 分類にてAML-M1と診断された. 染色体分析にて *t*(7;12)(p15;p13)を30細胞中23細胞に認められた. 患者骨髄細胞にて Fluorescence in situ hybridization (FISH)を施行したところ, 転座の切断点は *TEL* 遺伝子 exon 2 と exon 1B 内の intron 2 (82kb)に存在することが明らかとなった.
2. *TEL* 融合遺伝子同定のために, 3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA 3'Ends)を施行し塩基配列を解析したところ, *TEL* exon 2 に続いて新規配列が得られた. 新規配列は7p11-21 のゲノム配列を含む PAC (P1-derived artificial chromosome) clone である GS1-98E2(Genbank AC007130)配列の一部に完全に一致しており,また既知の4個の EST (expression sequence tag) clone とも一致していた. *TEL*-新規融合遺伝子の存在を証明するために, プライマーを新規配列に設定して患者検体を鋳型とした nested PCR を施行し塩基配列を解析したところ, 3種類の alternative splicing form が存在することが判明した.この融合遺伝子の翻訳産物としては,いずれも新規遺伝子部分で in-frame stop が入り,*TEL* の機能領域(HLH, ETS)を持たない短い融合蛋白が形成された. この新規配列は染色体7p15に位置する新規遺伝子の一部であると考えられ, *TSL*(*testis, seven-twelve, leukemia*)と命名した. *TSL* は *TEL* 融合遺伝子として14番目の遺伝子であった.
3. *TSL* の全長決定のために, 新規配列をプローブとしてヒト正常精巣 cDNA library のスクリーニングを行い, 551bp の *TSL-A* と 424bp の *TSL-B* の, 2つのクローンが得られ, alternative splicing form だと考えられた(Genbank AB050001, AB050002

にて新規登録). ORF(open reading frame)検索では, 195bp の ORF が得られ, 64 アミノ酸をコードすると予想され, 既知の蛋白・機能領域と相同性を示さなかった.

4. 2つのクローンのヒト正常臓器における発現の差を RT-PCR 及びノーザンブロットにより確認したところ, 551bp の *TSL-A* のみが精巣にて強く発現していることが判明した. また nested PCR では, *TSL-A* 及び *TSL-B* 共各種臓器でバンドが認められ, 弱く発現していると考えられた. RNase Protection Assay を行ったところ, ヒト精巣腫瘍株 NEC8 においても *TSL-A* のみ全長の発現が認められた. また *TSL-A* の転写開始点は翻訳開始点より 295bp 上流に位置していた.
5. *TSL* 蛋白に対するポリクローナル抗体を作成し, ウェスタンブロット法で *TSL* 蛋白の確認を行ったが, 精巣腫瘍株で内在性 *TSL* 蛋白を検出することはできなかった.
6. 現在までに 4 症例, t(7;12)(p15;p13)に類似する染色体転座が報告されているが, うち 2 症例が今回症例に類似した小児男児の AML-M0 であり, t(7;12)(p15;p13)が共通の機序により小児の分化傾向の低い白血病発症に関与している可能性が示唆された.
7. *TSL* 塩基配列のデータベース検索により, *TSL* は EST clone のスプライスアウトされたイントロン内にコードされていることが判明し, 相同性検索及び 3'/5'-RACE を行い, 新規遺伝子ヒト 3'-hydroxyisobutyrate dehydrogenase (*3HIBDH*)をクローニングした. *TSL* は 86kb のヒト *3HIBDH* の第 4 イントロン内に存在し, また *3HIBDH* と逆向きに翻訳される遺伝子内遺伝子であった. *3HIBDH* は 3-ヒドロキシイソ酪酸をメチルマロン酸セミアルデヒドに変換する脱水素酵素であり, 8 つの exon から構成され, 全長 2254bp の塩基配列を持ち(Genbank AB050000 にて新規登録), 精巣を含む各種臓器で発現し, ORF 検索では 336 のアミノ酸をコードし, 生物種間で保存されていた.

以上, 本研究において, 急性骨髄性白血病(AML-M1)に認められた染色体転座である t(7;12)(p15;p13)の切断点から, *TEL* 遺伝子に融合する 14 番目の融合遺伝子として, 新規遺伝子 *TSL* が単離された. 加えて染色体 7p15 上に存在する新規遺伝子 *3HIBDH* が単離され, *TSL* は *3HIBDH* の遺伝子内遺伝子であることが明らかとなった. 本研究では新規遺伝子 2 種類が単離され, 白血病を含む発癌機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ, 学位の授与に値するものと考えられる.