

論文内容の要旨

論文題目： Detection of truncating mutations in separated alleles of *ATM* gene by using a rapid screening assay in yeast

和訳： *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated) 遺伝子変異部位スクリーニングのための酵母アッセイ法の開発

指導教官 五十嵐 隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成8年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 土田里香

細胞内で放射線などの外的ストレスにより損傷を受けた DNA を感知し、細胞周期を停止させ、DNA 修復に導く監視機構の役割を果たしているのが ATM (Ataxia telangiectasia mutated) である。ATM は癌抑制遺伝子である p53 の上流でその活性化に関わり、その他の細胞周期停止に関わる p53 非依存性経路においても ATM がその上流で機能を制御している。DNA 修復にかかわる最初の分子である ATM はそれ故、癌になりやすい体質を決定する分子機構として注目されている。しかし、ATM 遺伝子はヒトの遺伝子としては最大級の 66 個のエクソン数を持つ巨大な遺伝子であるため、遺伝子変異の発見には多大な労力を伴い、ことに ATM に変異を持つ保因者のスクリーニングはほとんど行われていなかった。本研究では、この問題を解決し、安価で迅速に ATM 遺伝子変異のスクリーニングが行える手法を出芽酵母において確立した。

ATM は毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia telangiectasia; AT) の原因遺伝子であり、1995 年 Shiloh らにより遺伝子クローニングされた。ATM 遺伝子は染色体の 11q22-23 に位置し、全長 146kb で、エクソン 66 個、mRNA としては全長 10,140bp、ORF (open reading frame) の 9,168 塩基がアミノ酸に翻訳され、3,056 アミノ酸となる。ATM タンパク質は約 350kDa で主に核に局在する。

ATの発症頻度は約30万人に1人とされる。小脳変性による乳幼児期からの進行性の小脳失調症、構音障害を伴う種々の神経症状や皮膚・眼球結膜の毛細血管拡張、細胞性/液性免疫不全、胸腺低形成、性腺機能障害などの表現型の異常を伴う常染色体性劣性遺伝疾患である。さらに電離放射線に高感受性を示し、悪性リンパ腫、白血病を高頻度に合併することが知られている。リンパ系腫瘍では100~250倍も高い。リンパ系悪性腫瘍の他には、乳癌が最も多く、続いて大腸癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、子宮体癌、悪性黒色腫、卵巣癌、胃癌、口咽頭癌、甲状腺癌の頻度が高い。

ATにおけるATM遺伝子の変異はホットスポットが存在せず、全領域から変異が検出されている。ATMホモ変異体の場合、血族結婚の家系を除きほとんどの場合がATM遺伝子の両方の対立遺伝子に異なった変異を持つヘテロ変異体同士の接合体(コンパウンドヘテロ変異体)である。ATMホモ変異体の患者からはATMタンパクはほとんど検出されない。これは、遺伝子変異の80%以上がフレームシフトやナンセンス変異によるtruncating mutationであるために、mRNA、変異タンパクが不安定であるためと考えられる。

ATが発癌のハイリスク群に属することの統計学的な証明が進んでいる一方で、AT保因者(ATキャリアー)であるヘテロ患者の発癌リスクについては以前より大きな問題であった。保因者であるATMヘテロ変異体は人口の約1%と推定されている。AT保因者では乳癌発症の相対危険率が非保因者の6.8~9.0倍といわれているが、報告者によってはAT保因者であっても乳癌発症のリスクは変わらないとするものもある。しかし、AT保因者由来の細胞を用いた細胞生物学的な解析から、放射線照射後の倍数体の変化が検出され、DNAダメージに伴うM/S期における細胞周期調節機構の障害や、アポトーシス誘導能の異常が認められることが証明され、ATM遺伝子の一方のみの変異でも十分に発癌の危険性があることが示唆されている。これらのことを考慮すると、乳癌だけでなく、他の癌についても、明らかに遺伝的に発癌の危険性の高い集団が存在していることが考えられる。

AT保因者をスクリーニングする目的も含めてATM変異の検出を行うことが、研究面と発癌予防という臨床医学的見地から必要であるが、ATM遺伝子はサイズが大きく、変異のホットスポット領域もないため、その遺伝子変異を見つけるには多大な労力を要する。しかし、AT患者の解析からATM遺伝子の変異の80%以上はフレームシフトやナンセンス変異によるtruncating

mutation でありタンパク質の欠失を伴う変異であることが示されていることから、出芽酵母に *ATM* 遺伝子を導入し形質転換することでこれらの truncating mutation の有無を判定する新しい *ATM* 遺伝子変異検出法を開発した。

本方法では *ATM* cDNA を 6 分割し、得られた 6 種類の PCR 産物をギャップベクターに相同組換えして環状プラスミドとし、ロイシン不含有培地上で選択後、ウラシル・ロイシン不含有培地に移して、ウラシルの要求性の違いにより表現形を決定する。ナンセンス変異またはフレームシフト変異により truncating mutation となる AT 患者由来と AT 保因者由来の細胞株に、この酵母アッセイ法を施行し有用性を検討した。その結果、ウラシル陽性コロニー数は野生型で 90.0-100.0%、ホモ変異体で 0.0%、ヘテロ変異体で 43.3-56.7% となり、野生型、ホモおよびヘテロ変異体を明白に判別することができた。

ダイレクトシーケンスによる解析を *ATM* 遺伝子に試みる場合、cDNA を 4 領域に分けて RT-PCR を行い、350~400bp おきに、解析のためのプライマーを総計 30 個設定した。得られた結果を解析ソフトを用いコンピューター上で全長を繋ぎあわせ、野生型 *ATM* cDNA と比較検討した。ダイレクトシーケンス解析は労力もさることながら、経済的な負担が大きく、AT 保因者をスクリーニングする手段としては到底受け入れられない。また、細かくプライマーを設定するため、プライマー上に変異があった場合は変異のないアレルが相補して、最終的に全解析結果を繋ぎあわせる際、本来の変異がマスクされて、見逃される危険がある。

実際に、臨床的に間違いなく AT であると診断されていた患者の *ATM* 遺伝子ダイレクトシーケンスの結果が野生型と一致し、1 年以上も遺伝子診断ができない症例があった。しかし、酵母アッセイ法で検討した結果、1 週間で両アレルの異なった場所に truncating mutation をもつコンパウンドヘテロ変異体であることが判明した。そしてこの変異の 1 つは、これまでに報告のない 2639 del 200 (エクソン 19 欠失) の変異であることが判明した。これにより、本方法は AT 保因者のスクリーニングに有用であるばかりではなく、AT 患者の変異部位を迅速に決定できることを立証した。

高発癌性遺伝病に関わる分子のヘテロ変異体をスクリーニングすることは極めて重要であり、簡便な遺伝子変異体の検出方法の開発が必要とされていた。今後同じような方法を用いて原因遺伝子の変異を検出することが可能になり、患者や保因者の検出に役立つことが期待される。