

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 前立腺特異的に発現する新規遺伝子 *hJAL* に関する研究

指導教官 北村唯一教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 藤田喜一郎

1 目的

染色体領域 1q21 はさまざまな腫瘍において変異が認められている。また、この領域には EDC (epidermal differentiation complex) として知られている、表皮の最終分化に関与する遺伝子群がクラスターを形成し、遺伝子の密度が高くなっている領域が存在している。このように特徴的な染色体領域に局在する遺伝子として、*hJTB* (jumping translocation breakpoint) が単離された。*hJTB* は急性骨髄単球性白血病症例において認められた、希な染色体転座である jumping translocation (JT) の転座点に局在する遺伝子として同定された、膜貫通ドメインを有する膜蛋白である。JT によって変異を受けた *hJTB* はこの膜貫通ドメインを欠失しており、この変異が白血病の発生機構と関連があることが示唆されている。

この特徴的な染色体領域についての知見を得ることは、染色体転座の発生機構、および、腫瘍の発生や悪性度の進展の機構を解明する有用な手がかりになり得ると考え、本研究では、染色体 1q21 の構造について、詳細に検討することを目的とする。

2 結果と考察

2.1 hJAL の単離

まず、hJTB 遺伝子座の周辺領域のゲノム DNA の塩基配列を決定し、解析した。得られた塩基配列をもとに、データベース検索を行ったところ、hJTB 近傍の塩基配列と相同性を持つ EST クローンが得られた。この EST クローンを用いて、cDNA の全長を単離することに成功した。得られた cDNA をプローブとしたノーザンブロット解析の結果、想定される遺伝子は約 1.8 kb の転写産物として、前立腺に特異的に発現していることが明らかとなった。卵巣、胃、甲状腺、気管においても発現を認めたが発現量はごくわずかであった。以上から、この cDNA が実際に遺伝子をコードしていることが確認された。得られた cDNA の塩基配列をもとに、データベース検索を行ったところ、有意な相同性を示すクロンは得られなかった。そこで、この遺伝子を新規なものと判断し、hJAL (human jumping-translocation-associated gene, large) と名付けた。hJAL cDNA は全長 1747 塩基対からなり、予想される ORF は 395 アミノ酸からなる分子量 43.4 kDa の蛋白質をコードしていると考えられた。予想されるアミノ酸配列から、bZIP (basic domain-leucine zipper) モチーフを分子の中央付近に有することが明らかとなり、bZIP 転写因子スーパーファミリーに属することが予想された。また、アミノ末端とカルボキシル (C) 末端に 1 つずつ、セリン残基に富んだ領域が認められた。さらに、hJAL cDNA が実際に蛋白質をコードしていることを確認するために、C 末端を FLAG で標識した組み換え蛋白質 (hJAL-FLAG) を 293T 細胞に発現させ、ウエスタンブロットで解析した。その結果、hJAL-FLAG は 54.0 kDa および 58.1 kDa の 2 本のバンドとして検出された。この結果から hJAL が実際に蛋白質をコードしており、また hJAL が何らかの修飾を受けていることが予想された。

hJAL 遺伝子座周辺のゲノム DNA の塩基配列を詳細に解析し、cDNA の塩基配列と比較したところ、hJAL は 10 個のエキソンおよび 9 個のイントロンからなり、全体としては約 6.5 kb におよぶ構造を持つことが明らかとなった。また *Alu* 繰り返し配列を多く含んでいること、および、hJAL と hJTB は tail-to-tail の形で隣接し、hJAL のポリ A シグナルの 3' 末端と hJTB のポリ A シグナルの 3' 末端の間にはわずか 180 塩基対しか存在していないことが明らかとなった。これらの結果は、この領域の遺伝子の密度が高いということを反映していると考えられた。

2.2 hJAL の構造

hJAL cDNA から予測されるアミノ酸配列を用いて、データベース検索を行ったところ、bZIP 転写因子スーパーファミリーに属する hLZIP と有意な相同性を持つことが分かった。hLZIP の生物学的機能は不明であるが、HCF (host cell factor) -1 と結合することにより、細胞周期に依存した転写制御に関与していると考えられている。hJAL と hLZIP の間には bZIP ドメインを中心として、約 120 アミノ酸にわたってよく保存されている領域が認められた。この領域内に、hLZIP では膜貫通ドメインが存在しており、hJAL にも同様のドメインの存在が示唆された。両蛋白質間でよく保存されている領域は、hJAL のエキソンの構造とほぼ一致していると考えられ、hJAL と hLZIP が進化上近い関係にあることが示唆された。

hJAL cDNA の塩基配列を用いたデータベース検索によって得られた EST クローンを用いて、マウスのホモログ (mJAL) を単離することに成功した。mJAL は 370 アミノ酸からなる分子量 41.0 kDa の蛋白質で、hJAL の全長と比較して 66.4% の同一性を有していることが明らかとなった。また、ラット、ウシ、ブタ、ゼブラフィッシュにも、高い相同性を有する EST クローンが検索され、JAL が広く脊椎動物の間で保存されていることが明らかとなった。

ウサギ網状赤血球抽出液を用いて組み換え hJAL 蛋白質を発現させた。この組み換え蛋白質を用いたゲルシフトアッセイの結果、hJAL が CRE に結合することが明らかとなった。また、hJAL の C/EBP 結合配列、AP-1 配列への結合は認められなかった。以上の結果からアミノ酸配列からだけでなく、機能的にも CREB/ATF ファミリーと関連が強いことが示された。

2.3 hJAL 遺伝子座の変異

hJAL をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果、前立腺癌症例の一部において、染色体の変異と考えられる付加的な DNA 断片が検出された。同一症例の正常精巣由来では、同様の変異は認められなかった。さらに解析を進めた結果、hJAL 遺伝子座に転座点を有する染色体転座で、hJAL のセントロメア寄りの一部の増幅を伴っているものであると推測された。上記と同様の変異が前立腺癌細胞株においても認められるかを検討した結果、本研究で用いた 3 種類の細胞株全てにおいて変異が認められないことが明らかとなった。

2.4 hJAL の発現

前立腺癌細胞株における、hJAL の発現をノーザンブロットで検討した。その

結果、アンドロゲン依存性を有する細胞株 LNCaP においては hJAL の発現を認めた。これに対して、アンドロゲン非依存性株 PC-3, DU145 では、発現が認められないことが明らかとなった。さらに、前立腺癌組織における hJAL の発現をノーザンブロットを用いて解析したところ、正常前立腺、前立腺肥大症組織では発現を認めたが、前立腺癌組織では hJAL の発現を認めなかった。さらに RT-PCR にて hJAL の発現を検討したところ、正常前立腺、前立腺肥大症組織では発現を認めた。一方、前立腺癌組織では hJAL の発現が減少している傾向が認められたものの、発現が検出される症例も認められた。以上の結果から、hJAL は正常前立腺におけるアンドロゲン依存性の発生、分化、増殖に関連した機能を有しており、hJAL の発現の低下により、正常の分化、増殖の制御機構が破綻し、前立腺の癌化を引き起こす可能性があるかと推測された。

これまでに得られた結果から、hJAL の発現量の低下が、前立腺の腫瘍化の原因と関連があることが推測された。そこで、hJAL のプロモーター領域を解析することによって、hJAL の発現機構の解明を試みた。その結果、すでに報告されている、いくつかの前立腺特異的に発現する転写因子の結合配列が存在していることが明らかとなった。興味深い点は、検索された転写因子結合配列のうち、出現頻度が最も高く、かつコンセンサス配列と高度に一致を認めた配列として、性決定因子とされる SRY とその関連蛋白質 SOX5 の結合配列が認められたことである。SRY と前立腺の発生や前立腺癌の形成との関わりについては、ほとんど知られていないが、個体の発生に関与する転写因子の結合配列が hJAL のプロモーター領域に多数見いだされたことは、hJAL が前立腺の発生、分化に関与している可能性を示唆するものと考えられた。

3 まとめ

本研究によって得られた結果から、hJAL は正常前立腺におけるアンドロゲン依存性の発生、分化、増殖に関連した機能を有していると推測されたが、今後、hJAL の生物学的機能を明らかにすることによって、解明の進んでいない、前立腺の腫瘍化、悪性度の進展の分子生物学的機構を説き明かす手がかりが得られることが期待される。