

## 論文の内容の要旨

論文題目 び慢性大細胞型 B細胞性リンパ腫の染色体転座点より  
同定された新規遺伝子 U50HGの解析

指導教官 森 茂郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10年 4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 田中りつ子

### [研究の背景と目的]

snoRNA (small nucleolar RNA) とは細胞の核小体に局在する安定した小さな機能性の RNA 分子である。現在、150 種以上の snoRNA が同定されており、自身のもつ構造と機能によって 2 つに大別されている。一つは box C 配列 (RUGAUGA) と D 配列 (CUGA) をもち、pre-rRNA の 2'-O-メチル化 (塩基に結合したリボースのメチル化反応) に関与し、もう一つは box H 配列 (ANANNA) と ACA 配列 をもち pre-rRNA の シュードウリジル化 (ウリジンの異性化反応) に関与するものである。box C/D 型 snoRNA は box C と D の間に 10~21 ヌクレオチドの pre-rRNA と相補的な配列をコードしており、この相補性の中にメチル化部位を含んでいる。動物細胞の snoRNA の多くはリボソーム蛋白質や翻訳関連蛋白質をコードする遺伝子のイントロンや protein non-coding 遺伝子のイントロンにコードされている。このようなイントロンに snoRNA をコードする遺伝子を snoRNA 宿主遺伝子 (snoRNA host gene, snoRNA HG) と呼ぶ。近年同定された snoRNA 宿主遺伝子には UHG、U17HG、U19HG、gas5 などがある。これら 4 つの snoRNA 宿主遺伝子はポリ (A) が付加された転写産物を産生するが、大きな Open Reading Frame (ORF) を見出すことができない。また、UHG、U17HG や gas5 についてはヒトとマウスのホモログ遺伝子のエクソンには相同性がないことが判明している。また、snoRNA 宿主遺伝子のイントロンにコードされた snoRNA は RNA polymerase II によって宿主の遺伝子と共に転写され、イントロン部分のスプライシングや末端のトリミングの過程で形成されると考えられている。

一方、これらの宿主遺伝子の転写産物の特徴としては 5' terminal oligopyrimidine (5'

TOP) のモチーフをもっていることがあげられる。5' TOP モチーフはリボソーム蛋白質の mRNA などの 5' 末端にみられ、C からはじまりピリミジンのストレッチが続く配列であり、このモチーフが snoRNA 宿主遺伝子の重要な構造上の共通性としてとらえられている。最近、インプリンティング領域として有名な Prader Willi Syndrome (PWS) の原因領域 15q11-q13 にコードされている SNURF-SNURP 遺伝子のイントロンに新規の snoRNA がコードされていることが報告された。これらの snoRNA は脳で高く発現している。複数の PWS の患者において、これらの snoRNA コーディング部位に欠失や変異があり、そこにコードされる snoRNA の発現が検出されないことが報告されている。

共同研究者である佐藤かすみは、t(3;6)(q27;q15) 転座を有する SCID マウスに継代・維持された慢性大細胞型 B 細胞性リンパ腫株 OMS19 の転座点近傍のゲノム構造の一部を明らかにした。この転座点は 3q27 に存在する BCL6 遺伝子が関わる転座であり、BCL6 遺伝子の第 1 イントロンから上流が未記載の配列に置換されていることが判明した。また、この新規の上流配列に KMS 1 プローブを設定した。

本研究では染色体 6q15 に存在する BCL6 遺伝子の新規転座相方遺伝子を単離し、その構造と発現様式を明らかにする目的でマウスホモログのクローン化及び他の悪性リンパ腫細胞株における発現と遺伝子異常の解析を試みた。その結果、この新規の配列が 6q15 にマップされる新規 snoRNA 宿主遺伝子 U50HG の一部であることを明らかにした。さらに U50HG の機能解析を行うため、本遺伝子のマウスホモログを単離し、構造及び発現を検討した。また、従来より染色体 6q15 部位を含む構造異常が血液系腫瘍において高頻度に生じることが知られ、t(3;6)(q27;q15) 転座は稀に検出される。そこで、悪性リンパ腫株 7 株について本遺伝子の構造異常を持つ例の検出を試み、1 例にこれが欠失した症例株 AMS3 を見出した。この AMS3 症例株と本遺伝子を単離するきっかけとなった OMS19 症例株は共に U50 の発現が著しく低下していることが判明した。

[方法]

#### 1) snoRNA (small nucleolar RNA) U50 の宿主遺伝子 U50HG の同定と単離

OMS19 細胞株の染色体転座点 t(3;6)(q27;q15) からみいだされた 6q15 側の新規の配列をコードする遺伝子を単離するため、KSM 1 プローブを用いて Ramos cDNA ライブラリー、健常人由来のゲノムライブラリーをスクリーニングした。また、末梢血由来の total RNA を用いて RT-PCR を行い、5' RACE 法にて転写開始点を明らかにした。cDNA とゲノム DNA の配列を決定し、これらの一次情報を照合して遺伝子の構造を明らかにした。また、BLAST 検索にて既知の遺伝子との相同性を検討した。

U50 の細胞内の局在を In Situ Hybridization を行い検討した。HaLa 細胞をスライドガラスに固定し、プローブとして U50 (75mer) 及び U50' (70mer) を特異的に認識する合成オリゴマーを用いた。

## 2) U50HG のマウスホモログ mU50HG の同定と単離

ヒト U50 (hU50) 配列をプローブにして 129SVJ マウスゲノムライブラリーをスクリーニングした。また、ここから得られたクローンの一部を用いて MEL $\gamma$ p3 cell line 由来マウス cDNA ライブラリーをスクリーニングした。cDNA ライブラリーから得られたクローンの配列をもとにプライマーを設定し、マウスゲノム DNA をテンプレートにして PCR を行い、遺伝子断片を得た。また、既知の遺伝子の検索及び単離されたクローンの類似性の検討には BLAST 検索を利用した。

mU50 (マウス U50 ホモログ) の組織特異性発現を urea 変性 6% アクリルアミドノザンブロット法にて検討した。プローブとして mU50 合成オリゴマーを用いた。

## 3) 悪性リンパ腫細胞株における U50HG の構造異常の検出と U50 の発現の検討

U50HG の転座症例株 OMS19 の他に構造異常をもつ細胞株を明らかにするために、悪性リンパ腫細胞株からゲノム DNA を抽出しサザンブロットを行った。プローブとして KSM 1 プローブを用いた。これらの細胞株における U50 及び U50' の発現を検討するために、urea 変性 6% アクリルアミドノザンブロット法にて検討した。プローブは U50 及び U50' を特異的に認識する合成オリゴマー (70-75mer) を用いた。

[結果及び考察]

### 1) snoRNA (small nucleolar RNA) U50 の宿主遺伝子 U50HG の同定

OMS19 の染色体転座点 t(3;6)(q27;q15) から 6q15 にマップされる新規の snoRNA 宿主遺伝子を単離した。この遺伝子は 5' TOP 遺伝子の family に属する全長約 2kbp であり、6 つのエクソンから構成される。少なくとも 6 種類のポリ (A) が付加された転写産物を産生するが、いずれも大きな蛋白質をコードする可能性は低いと考えられた。第 5 イントロンには U50 snoRNA (accession number: X96662) がコードされ、4 番目のイントロンには U50 と高い相同性をもつ配列 U50' がみいだされた。従って、この遺伝子を U50 host gene, U50HG と名前をつけた。U50 及び U50' は細胞の核小体に局在する分子であることが確認された。U50 は 28S rRNA の C2849 と G2864 の 2' -O- メチル化に関わる snoRNA であると考えられている。従って、U50HG は核小体で 28S rRNA の成熟に関与するイントロン由来の U50 及び U50' を産生する遺伝子であると判断された。

## 2) U50HG のマウスホモログ mU50HG の同定と単離

U50HG のマウスホモログとして mU50HG(A) と mU50HG(B) の 2 つの遺伝子が単離された。mU50HG(A) は 5' TOP 遺伝子の family に属する少なくとも 5 つのエクソン (A1, A2, A3, A4, A5) から構成される遺伝子であった。転写産物について BLAST による open reading frame (ORF) を検索したが、大きな ORF をみいだすことはできなかった。また hU50 との相同配列 mU50 は第 4 イントロンにのみ見出された。mU50HG(B) もまた 5' TOP 遺伝子の family であり、5 つのエクソン (B1, B2, B3, B3', B4) から構成される全長約 1.8kbp の遺伝子であることが判明した。今回も転写産物は大きな蛋白質をコードする可能性は低いと考えられた。mU50 配列は B3 イントロンと B3' イントロンにみいだされた。ヒト U50HG とマウス U50HG (mU50HG) の類似点はイントロンにコードされた U50 相当配列と転写開始点の CTTTT 配列に限られた。これらの知見は前述した UHG や U17HG、gas5 のヒトとマウスの間で明らかにされている知見と一致する。また、U50HG (6q15) と mU50HG(A) (9E3-F1) の染色体上の位置は相同領域にマップされた。また、mU50 は脾臓、胸腺、骨髄、リンパ節で強く発現していることが判明した。

## 3) 悪性リンパ腫細胞株における U50HG の構造異常の検出と U50 の発現の検討

AMS3 細胞株は KSM I 断片を含む遺伝子量が約 1/4 以下に減少していることが判った。この細胞株における染色体の核型は、6 番染色体の片側アリルの 6q13-q27 にかけて欠失しているものであった。しかしもう一方の染色体アリルについては染色体検索でこの部位の異常を同定することは出来なかった。結果として、片側アリルについて染色体 6q15 部位に転座が認められた OMS19 及び欠失が認められた AMS3 では、U50 及び U50' の発現が 1/4 以下に減少していることが判明した。このことから、U50HG は他の snoRNA 宿主遺伝子 (SNURF-SNURP 遺伝子) でしばしばみられるようなインプリンティングによる発現制御を受けていることが一つの可能性として考えられた。この可能性を、父方、母方由来のヒト 6 番染色体が導入されたハイブリッド細胞を用いて検証した。U50 がインプリンティングを受けていない可能性を示唆する結果を得たが、この可能性を全く否定できるものではなく、この点についてはさらなる実験が必要であると考えている。一方、OMS19、AMA3 における U50 発現の低下の説明として、U50HG のプロモーター領域は CG 配列に富むことから、U50HG がメチル化による転写制御を受けている可能性も考えられるが、この検索は現在進めているところであり今後の課題として残されている。