

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 The construction of BAC-based STS-content map extending 35Mb region in human chromosome 1p35-36 and the search for tumor suppressor genes in neuroblastoma  
(ヒト1番染色体短腕 1p35-36 領域の BAC の整列化地図作成と神経芽腫の癌抑制遺伝子の探索)

氏名 陳 迎章

### I はじめに

近年、*RB*、*p53*、*WT1*、*NF1*、*p16<sup>INK4a</sup>* および *p19<sup>ARF</sup>* 遺伝子等の癌抑制遺伝子が次々と単離され、種々の腫瘍の発生や進展に関与していることが明らかとなった。これらの遺伝子産物は細胞周期の制御に関与することから、細胞における癌抑制遺伝子の不活化が癌発生の原因と考えられている。そのメカニズムとしては、染色体の両方のアレルのホモ接合体欠失や、片方のアレルのヘテロ接合体欠失(LOH)と他のアレルの遺伝子変異、あるいはメチル化などがある。

神経芽腫は小児の悪性腫瘍の中では白血病、脳腫瘍について頻度が高く、腹部の固形腫瘍では最も頻度が高い。*MYCN* 遺伝子の増幅は神経芽腫の進展例の約半数にみられることから、予後不良の指標とされている。また、神経芽腫では1番染色体短腕(1p)の 1p36 領域の LOH が高頻度に見られることから、この領域に原因遺伝子が存在することが示唆されている。

他方、1p35-36 領域には神経芽腫以外でも、大腸癌、胃癌、乳癌、肝癌、膀胱癌、悪性黒色腫など多数の癌で LOH がみられ、複数の腫瘍の発生や進展に重要な役割を果たす癌抑制遺伝子が存在すると推測されている。1番染色体に存在する神経芽腫の候補癌抑制遺伝子を同定する目的で、1p35-36 の約 35Mb の領域の高精度物理地図作成を行なった。すなわち、染色体マーカーの sequence tagged site (STS)を正確にマップするために2段階-polymerase chain reaction (PCR)

スクリーニング法を開発し、大腸菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) の整列化をおこない、最長 20Mb、計 11 個のコンテイングを作製した。この結果、染色体 40kb 毎に発現遺伝子、および STS を配置した。更に、この高精度物理地図を用いて、神経芽腫の細胞株におけるホモ接合体欠失領域を探索し、ショットガン法でシーケンスを決定し、その領域に存在する候補癌抑制遺伝子を同定した。

## II 材料と方法

### (材料)

- (1) BAC: ヒト全ゲノム RPCI-11 BAC library  
(<http://www.chori.org/bacpac/home.htm>)  
末端シーケンス (TIGR 社)  
(<http://www.tigr.org/tdb>)  
ランダムフィンガープリント (FPC データベース: WU)  
([http://genome.wustl.edu/gsc/cgi-bin/humanFPC\\_single.pl](http://genome.wustl.edu/gsc/cgi-bin/humanFPC_single.pl))  
ドラフトシーケンス (NCBI)  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- (2) 染色体マーカー: PCR プライマー (STS) の設計と合成  
radiation hybrid map (1p35-36) (NCBI)  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99/>).  
1p36 コスミドの末端シーケンス
- (2) 神経芽腫細胞株 25 株

### (方法)

#### 1. BAC の整列化による高密度 STS 含有地図の作成

- 1) 基本概念: 2 種類以上の PCR シグナルをもつ BAC をスクリーニングし、Maximum matching alignment 法で BAC を整列化する。この結果、同時に radiation hybrid map 上の染色体マーカー (STS) を正しい位置に配列できる。
- 2) 限定した BAC (147000 株、7 倍量) を使用した 2 段階スクリーニング法を用いる。1 段階目はキットで MTP プレートを選択し、STS の整列化とコンテイングの枠組みをつくり、2 段階目では溝プレートによる BAC クローンを単離し確認する。

- 3) コンティグの伸長、確認するために BAC 末端シーケンスによる染色体歩行を行う。
  - 4) BAC コンティグの順番は fluorescence in situ hybridization (FISH) 法で確認する。
2. 染色体マーカー(STS)によるホモ欠失領域の検索と BAC ドラフトシーケンスによる癌抑制遺伝子の同定
- 1) 高密度 STS 含有地図を用いて神経芽腫細胞株 25 株の欠失領域を検索する。
  - 2) Southern blotting でホモ接合体欠失領域を確認する。
  - 3) ホモ欠失領域の BAC の shotgun 法による シーケンス解析とデータベースによる検索を行い、その領域に存在する遺伝子を同定する。

### III 結果と考案

BAC 整列化はヒトゲノム解析計画の最大の障害となっていた。このため、私は、従来の制限酵素を用いる方法をやめて、限定した数の BAC に radiation hybrid パネル上に配置してある STS マーカーが存在するかどうかをスクリーニングで検索し、確定した約 1300 個の STS マーカーを目印に BAC を整列化する方法を用いた。この結果、1p35-36 領域の 35Mb の高密度 STS 含有地図が作成できた。この 35Mb の領域内は 11 個の BAC コンティグを含み、このうち最も長いコンティグは約 20Mb である。本領域は、多数の癌での LOH が報告されており、複数の癌の発生と進展に関与する癌抑制遺伝子が存在することが示唆されている。このため、今回作成した 35Mb の BAC コンティグはこれらの癌抑制遺伝子を単離、同定するうえで有用と考えられる。

神経芽腫では従来の LOH 解析より、1p 上に少なくとも 2 箇所の共通欠失領域が存在すると推定されており、特に 1p36 上の D1S214 と D1S244 の間、進展例における共通欠失領域と推定されている。このため神経芽腫の候補癌抑制遺伝子を同定する目的で、BAC コンティグを用いて神経芽腫細胞株 25 株における 1p36 領域のホモ欠失の検索を行った。はじめに共通欠失領域 (D1S214 と D1S244) をカバーする約 20Mb の領域内の 150 個の STS マーカーを用いて、PCR 法でスクリーニングを行った。その結果、神経芽腫細胞株 1 株(NB-1)で、連続した 27 個の STS マーカーがホモ欠失していることが判明した。次に、このホ

モ欠失をサザンブロット解析でも確認した。作成した高密度 STS 含有地図より推定したところ、この欠失は約 480kb であった。このホモ欠失領域に神経芽腫の候補癌抑制遺伝子の存在が示唆されたので、更にショットガン法によるシーケンスとデータベースを用いてこの領域のゲノムシーケンスを決定した。その結果、この約 480kb の領域には 7 つの既知遺伝子と 9 個の EST マーカー、更に 2 個のマイクロサテライトマーカーが存在することが判明した。これら既知の 7 個の遺伝子はユビキチン経路の遺伝子 (E4B)、キネシン family 遺伝子 (KIF1B)、アポトーシス関連遺伝子 (DFF45)、ペルオキシゾーム膜蛋白質遺伝子 (PEX14)、解糖系の酵素遺伝子 (PGD) および T 細胞特異的分子 (SCYA5) である。KIF1B 蛋白は特に神経細胞の軸索に多量に分布し、シナプス間の物質の運搬に重要な役割を果たしている。このためこの遺伝子は神経細胞の分化や増殖にも重要な役割を果たしている可能性がある。また *DFF45* 遺伝子は caspase カスケードの下流で機能し、アポトーシス実行に重要な役割を果たしている。更に、最近、ユビキチン経路の遺伝子が MYCC 蛋白の分解に関与していることが明らかとなった。このため、これらの遺伝子が神経芽腫の発生や進展に関与しているか否かを詳細に解析していく必要がある。

#### IV まとめ

Radiation hybrid パネルを用いて、1p35-36 領域の約 35Mb の BAC の整列化地図を作成した。1p35-36 領域には神経芽腫をはじめ成人のいくつかの癌に関与する癌抑制遺伝子が存在することが示唆されているので、この領域の広範囲な BAC の整列化地図を作成することは、これらの癌抑制遺伝子の単離、同定に有用と考えられた。作成した高密度 STS 含有地図を用いて、神経芽腫の細胞株を用いて、ホモ欠失のスクリーニングを行ったところ、一つの細胞株で約 480kb のホモ欠失を検出した。この領域をショットガン法とデータベースを用いて解析したところ、少なくとも 7 個の遺伝子が存在することが判明した。これらの遺伝子が神経芽腫の発生や進展に関与しているか否か、更に詳細な解析が必要である。