

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 陳 迎章

本研究は 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。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、その領域に存在する候補癌抑制遺伝子を同定し、下記の結果を得ている。

1. 大腸菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) の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 であった。BAC コンティグの順番は fluorescence in situ hybridization (FISH) 法で確認した。本領域は、多数の癌でのヘテロ接合体欠失 (LOH) が報告されており、複数の癌の発生と進展に關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。
2. 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 から D1S244 のが、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

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。このホモ欠失はサザンプロット解析でも確認された。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。

3. 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 個の既知遺伝子と 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。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。

以上、本論文は 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、作成した高密度 STS 含有地図を用いて、神経芽腫の細胞株で約 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。本研究はこれまで不明であった神経芽腫の原因解明に重要な貢献をすろと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。