

|           |                                                                                                                                                                                                        |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | 保 坂 泰 介                                                                                                                                                                                                |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                              |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2417 号                                                                                                                                                                                           |
| 学位授与の日付   | 平成 14 年 1 月 23 日                                                                                                                                                                                       |
| 学位授与の要件   | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                                                                                                |
| 研究科・専攻    | 医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻                                                                                                                                                                                    |
| 学位論文題目    | Translin binds to the sequences adjacent to the breakpoints of the TLS and CHOP genes in liposarcomas with translocation t(12; 16).<br>(t (12; 16) 転座をもつ脂肪肉腫における, TLS 及び CHOP 遺伝子の切断点近傍配列とトランスリン蛋白の結合) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 野 田 亮 教 授 日 合 弘 教 授 中 村 孝 志                                                                                                                                                               |

### 論 文 内 容 の 要 旨

従来より血液系腫瘍で高頻度に検出されていた, 染色体転座による特異的融合遺伝子の形成という現象が, 近年の細胞遺伝学及び分子生物学的解析により, 固形腫瘍でも生じていることが明らかになった。血液系腫瘍の解析から, 転座切断点周囲には, 転座の形成機構に関与すると想定されるいくつかの特徴的な塩基配列の存在が知られているが, その機構の詳細は明らかではない。成人発生軟部悪性腫瘍の代表的なものの一つである粘液型脂肪肉腫は, その約90%において, 12番染色体上の CHOP 遺伝子と, 16番染色体上の TLS 遺伝子 (FUS 遺伝子とも呼ばれる) が染色体相互転座により TLS-CHOP 融合遺伝子を形成しており, これが癌化過程で重要な役割を果たしていると考えられている。我々は以前の報告で, 粘液型脂肪肉腫における TLS 遺伝子と CHOP 遺伝子の転座切断点周囲の塩基配列を解析し, いくつかの特徴を明らかにした。その特徴の一つとして, 転座切断点周囲におけるトランスリンの認識配列と相同性の高い配列の存在があった。トランスリンは, リンパ性白血病やリンパ腫において, 転座による遺伝子融合部位の 5' 側近傍に高頻度に存在する特徴的な塩基配列に, 特異的に結合する蛋白として同定された。トランスリンの想定される作用は, 2 本鎖 DNA 切断が生じると細胞質から核内に移行し, DNA 切断部突出末端の 1 本鎖領域に結合して組換え修復を補助するというものである。本研究の目的は, 粘液型脂肪肉腫における TLS-CHOP 融合遺伝子形成過程におけるトランスリンの関与を更に解析し, 検出された候補配列が実際にトランスリンと結合するかどうかを調べることである。

TLS 及び CHOP 遺伝子の相互転座による融合遺伝子形成が確認された粘液型脂肪肉腫11例を対象とした。11例中7例で TLS-CHOP 遺伝子及び CHOP-TLS 遺伝子の両者の融合部位を, 4例で TLS-CHOP 遺伝子の融合部位を調べ, 計18カ所の融合部位を検索した。トランスリン認識候補配列検索の基準は, (1)候補配列の 3' 末端が, 遺伝子融合点から前後 5 塩基以内存在するもの, (2)候補配列と既知のトランスリン結合配列との相同性が70%以上であるもの, とした。また 2 本鎖 DNA 切断後に生じる突出末端はセンス鎖だけでなくアンチセンス鎖にも生じることから, 検索対象にアンチセンス鎖も含めた。結果として, 11例中10例にトランスリン結合候補配列が存在し, 合計13個の候補配列を検出した。これは, 検索した領域に無作為にトランスリン認識配列が出現すると仮定した場合の出現数6.98より有意に高かった ( $p < 0.025$ )。また, 検出された13個の配列から合成した 1 本鎖オリゴヌクレオチドはすべて組換えトランスリン蛋白, 及びトランスリン蛋白を含むことが証明されている Hela 細胞の細胞質抽出物と結合した。さらにこれらの DNA-蛋白複合体形成は非標識競合オリゴヌクレオチド, 及びトランスリンの DNA 結合部位を認識する抗トランスリン抗体により阻害され, トランスリン蛋白と検出した13個全ての候補配列との結合が特異的であることが確認された。ただしこれらの結合親和性の強さと, トランスリン認識配列との相同性の高さとの相関はなく, 結合親和性は別の因子で規定されていると考えられた。これらの結果より, 粘液型脂肪肉腫における TLS-CHOP 融合遺伝子形成過程において, トランスリン蛋白が積極的に関与していることを示唆する結果が得られた。

## 論文審査の結果の要旨

粘液型脂肪肉腫の約90%では、t(12; 16)により TLS 遺伝子と CHOP 遺伝子が融合遺伝子を形成し、これが発癌に関与していると推測されている。申請者等は以前の報告で、TLS 遺伝子と CHOP 遺伝子の転座切断点周囲には、転座形成に関与すると思われるいくつかの特徴的な塩基配列が存在し、うち一つがトランスリン認識配列と相同性の高い配列であることを示した。トランスリンは、元々リンパ系腫瘍における遺伝子融合部位の 5' 側に存在する特徴的な塩基配列に結合する蛋白として同定されたものである。そこで TLS-CHOP 融合遺伝子形成におけるトランスリンの関与につき、更に検討を加えた。

粘液型脂肪肉腫11例における、TLS-CHOP または CHOP-TLS 融合遺伝子の遺伝子融合部位の 5' 側近傍で、既知のトランスリン認識配列と70%以上の相同性をもつ配列を候補配列として検索した。この際センス鎖とアンチセンス鎖双方を調べた。すると、11例中10例にトランスリン結合候補配列が存在し、合計13個の候補配列を検出した。また検出された13個の配列から合成した1本鎖オリゴヌクレオチドは全てトランスリン蛋白と特異的に結合することをゲルシフトアッセイにて確認した。

以上より、粘液型脂肪肉腫の TLS-CHOP 融合遺伝子形成過程において、トランスリンが積極的に関与していることが示唆された。

以上の研究は、染色体転座の機構究明に貢献し、発癌過程の解明に寄与するものが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年10月2日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。