

氏名(本籍)	かな 金	ざわ 澤	のぶ 伸	お 郎	(東京都)
学位の種類	博士(医学)				
学位記番号	博甲第1,426号				
学位授与年月日	平成7年3月23日				
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当				
審査研究科	医学研究科				
学位論文題目	Alternative splicingによるWT1産物の構造と機能の多様性				
主査	筑波大学教授	医学博士	三輪	正直	
副査	筑波大学教授	医学博士	大川	治夫	
副査	筑波大学教授	医学博士	小磯	謙吉	
副査	萬有製菓株式会社筑波研究所長 (筑波大学客員教授)理学博士		西村	暹	
副査	筑波大学助教授	理学博士	石井	哲郎	

論文の要旨

〈目的〉

近年、系統的且つ精力的に癌抑制遺伝子の探索が行われるように、次々に新しい癌抑制遺伝子が単離されている。ウィルムス腫瘍の癌抑制遺伝子である WT1 遺伝子については、alternative splicing (選択的スプライシング) によって生ずる WT1 遺伝子産物の存在が知られている。ウィルムス腫瘍細胞においては、two hit 説に合致する構造異常の外に、dominant negative な機能が予想される遺伝子産物の発現するものが知られており、それが腫瘍の発症に重要であるとの考えも報告されている。従って、癌抑制遺伝子の異常による発癌の機構を理解するためには遺伝子の構造異常のみならず、遺伝子産物の細胞内における生理的機能を理解することが不可欠であると考えられる。

ウィルムス腫瘍細胞では WT1 遺伝子の機能ドメインであるジンクフィンガーに選択的スプライシングが認められており、これらのアイソ型蛋白質の DNA 結合能、発現量や機能が各々異なっていることが予想される。そこで本研究では正常胎児由来の cDNA を用いてスプライシングパターンを異にする WT1 遺伝子産物の構造、発現、機能について解析を行う。

〈方法〉

WT1 遺伝子産物の構造の解析は、ジンクフィンガードメインを含む cDNA をプローブとしてヒト胎児腎臓 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。さらに、ヒト胎児腎臓 (20 週齢) の mRNA 中に存在する WT1 産物を、ジンクフィンガードメインをはさむプライマーを用いた RT-PCR 法により解析した。

WT1遺伝子産物の発現の解析は、ヒト悪性腫瘍、およびヒト急性前骨髄球性白血病由来の細胞株 HL60を用いて、RT-PCR法、ノーザンブロット法により解析した。各アイソ型蛋白質の発現の比率は、サブクローニングしたクローン数から算出した。

WT1遺伝子産物の機能の解析としては、各アイソ型蛋白質が特異的に認識する塩基配列の決定と、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ活性測定（CATアッセイ）を用いたプロモーター活性測定を行った。

〈結果・考察〉

正常ヒト胎児腎臓における WT1遺伝子産物の構造の解析から、それぞれ第2ジンクフィンガーまたは第3ジンクフィンガーがスプライシングにより除かれた産物（WT1- Δ F2産物および WT1- Δ F3産物）が存在することを見出した。これは WT1遺伝子産物の多様性を示唆している。このうち WT1- Δ F2産物は本研究により発見されたものであり、さらに第3ジンクフィンガーのC末端側の3アミノ酸（KTS）があるものとないものそれぞれ2種類が検出された。一方、WT1- Δ F3産物はこれまで1例のウィルムス腫瘍でのみ発現が報告されており、異常なスプライシングによる異常な産物と考えられていた。この症例では残りのアミノ酸には変異は認められないので、この異常な産物が dominant-negative な作用により腫瘍発症に関与していると考えられてきた。しかし今回、この WT1- Δ F3産物が正常組織にも発現することを見出した。

WT1遺伝子産物の発現の解析から、WT1が発現する組織ではいずれもこれらの新たなアイソ型産物（WT1- Δ F2産物および WT1- Δ F3産物）が検出された。特に白血病や悪性リンパ腫ではこれらの産物が過剰に発現している症例もあり、しかも症例によって WT1- Δ F2産物と WT1- Δ F3産物の発現の比率が変わることが認められた。さらに HL60細胞に分化を誘導させると、その過程で WT1の発現が変化し、同時に WT1- Δ F2産物と WT1- Δ F3産物の発現の比率も変化することが認められた。このことから WT1遺伝子産物の量的、質的な変化が血球細胞の増殖、癌化、分化と関連することが考えられた。

WT1遺伝子産物の結合する塩基0列の解析から WT1- Δ F3産物は GTGTGGAGT と、一方、WT1- Δ F2KTS（-）産物は CACTACGCA と特異的に結合することを見出した。これらの認識配列は、報告されている他のアイソ型産物のいずれのものとも異なる新しい配列であった。さらに WT1- Δ F3産物の *in vivo* における転写活性を CAT アッセイを用いて解析し、血小板由来増殖因子の A 鎖遺伝子のプロモーターの近傍に上記の結合配列を挿入することにより同プロモーター活性を抑制的に制御していることを見出した。

以上のことから、選択的スプライシングにより生ずる WT1産物の各々のアイソ型蛋白質は DNA 結合ドメインの3次元構造の変化を伴うものと考えられる。従って個々のアイソ型蛋白質各々が異なる遺伝子の特異的な結合配列を認識した上で、転写を制御し、細胞の増殖、分化、それらの異常としての癌化の機構に関与している可能性が示唆された。

審 査 の 要 旨

ウィルムス腫瘍の癌抑制遺伝子である WT1 遺伝子の役割は、染色体の両方のアレルにおける遺伝子の失活によって、または、片側の染色体アレルから生ずる異常蛋白質が正常蛋白質の働きを阻害するという dominant-negative 作用によって、腫瘍増殖が起きるとされている。本論文は後者の場合について選択的スプライシングの面から検討したところ、従来、ウィルムス腫瘍細胞でのみ報告されていた WT1- Δ F3 産物は、実は正常な胎児腎臓でも選択的スプライシングにより生ずることを見出し、ここがユニークな点である。また、同時に WT1- Δ F3 産物の外にスプライシングにより生ずる新しい WT1- Δ F2 産物を見出している。著者らは、これらの産物を組み替え蛋白質として合成し、それらが各々異なる特異的塩基配列と結合することを明らかにした。さらに WT1- Δ F3 産物については *in vivo* においても、或る種の遺伝子の転写を低下させることを明らかにしている。

以上の研究は癌抑制遺伝子の 1 つである WT1 遺伝子の腫瘍抑制効果を直接的に解明したものではないが、選択的スプライシングにより生ずる WT1 遺伝子のアイソ型産物の役割の重要性を示した点で重要であり、癌抑制遺伝子の作用を解明する上で価値のあるものである。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。