

氏名(本籍)	ぬま た まさ し 沼田和志(福島県)			
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	博 甲 第 5844 号			
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	RAG による染色体転座形成機構			
主査	筑波大学教授	薬学博士	金 保 安 則	
副査	筑波大学教授	医学博士	千 葉 滋	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	洪 谷 和 子	
副査	筑波大学助教	博士(医学)	福 田 綾	

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

白血病で頻繁に観察されるゲノム異常として染色体転座が挙げられる。急性リンパ性白血病に見られる一部の染色体転座では、その転座領域に V(D)J 組換えの実行因子である RAG (recombination activating gene) 組換え酵素の標的配列 RSS (recombination signal sequence) に類似した配列が存在することから、異常な V(D)J 組換え反応と染色体転座の関連性が長年にわたって示唆されてきた。これまでに、プラスミド DNA を基質に用いた細胞内での V(D)J 組換えアッセイおよび *in vitro* での RAG 組換えタンパク質を用いた切断アッセイにより、融合遺伝子の片方の遺伝子座に *Ig/TCR* 遺伝子座を含むいくつかの融合遺伝子については RAG の関与が証明されてきた。しかしながら、*Ig/TCR* 遺伝子座を含む染色体転座はこれまでに同定されている染色体転座のほんの一部であり、その他の染色体転座への RAG の関与については全く不明である。本研究では、*Ig/TCR* 遺伝子座を含まない染色体転座における RAG 依存的組換えの可能性および RAG 依存的染色体転座の分子機構を明らかにすることを目的とした。さらに、正常な V(D)J 組換え反応の促進因子として示唆されている HMGB1 タンパク質と RAG 依存的染色体転座の関連性について明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

白血病およびリンパ腫の患者から同定されている 100 種類以上の染色体転座の中から、*Ig/TCR* 遺伝子座を保持せずかつ比較的発症頻度が高い染色体転座を解析対象として選択した。急性リンパ性白血病で観察される *TEL-AML1* および *E2A-PBX1*、急性骨髄性白血病で観察される *DEK-CAN*、*SET-CAN*、*MLL-AF9* の合計 5 つの転座型遺伝子を選択した。次にそれらの転座領域 DNA を基質プラスミド DNA にクローニングし、V(D)J 組換えアッセイを用いて RAG 依存的組換えの有無を検討した。また、RAG 依存的組換えが観察された染色体転座について、その転座領域における RAG の DNA 結合活性および DNA 切断活性をそれぞれ、ChIP アッセイおよび Ligation-Mediated(LM)-PCR アッセイにより解析した。先行研究より HMGB1 タンパク質は *in vitro* において RAG 依存的 DNA 結合および切断活性を促進することが報告されているので、RAG および HMGB1 の組換えタンパク質を精製し、*in vitro* での EMSA および切断アッセイを行なうことにより、

RAG の転座領域 DNA に対する直接的な結合活性および切断活性について解析した。さらに *in vitro* の詳細な解析により、HMGB1 による RAG の DNA 切断制御機構について詳細な解析を行なった。Circular permutation assay により転座領域 DNA 上における DNA bending center の同定を試みた。また、Ligation-mediated DNA circularization assay によって RAG および HMGB1 の DNA bending 活性について定量的な解析を遂行した。

(結果)

V(D)J 組換えアッセイの結果、小児の急性リンパ性白血病で最も高頻度に観察される *TEL-AML1* 配列間において、RAG 発現依存的な組換えが観察された。また、得られた組換え部位は患者由来の転座部位と同様に分散しており、患者でみられる転座箇所から数塩基近傍に位置していた。それら組換え部位の近傍には RAG の標的コンセンサス配列に類似した配列が多数存在していた。さらに、ChIP アッセイおよび LM-PCR アッセイの結果より、RAG タンパク質は *TEL* 転座密集領域に特異的に結合し DSBs (double-strand breaks) を導入することが明らかとなった。次に、RAG 依存的に組換えが生じた *TEL* および *AML1* の DNA 配列を対象に、RAG および HMGB1 組換えタンパク質を用いた EMSA と切断アッセイを行なった結果、RAG 依存的組換え部位近傍での RAG の DNA 結合および DNA 切断が検出された。また、*TEL* 転座領域中の一部では RAG が誤って RSS に類似した配列を RSS として認識して結合することにより、DNA を切断することが明らかとなった。さらに、*TEL* 配列中の複数の RAG による切断箇所の中かから、HMGB1 による促進が最も顕著に観察された切断箇所に着目してそのメカニズムの解析を進めた。HMGB1 の主な機能として DNA bending 活性が挙げられることから、circular permutation assay により *TEL* 転座領域中の bending center を同定した。さらにその bending center に点変異を導入した DNA 断片では DNA の bending は抑制され、HMGB1 依存的な RAG の DNA 切断活性も同時に抑制されることが明らかとなった。以上の結果より、RAG および HMGB1 による協調的な DNA bending の促進が *TEL* 転座領域における DNA 切断の促進に重要であることが示された。

(考察)

In vivo および *in vitro* の両方の解析結果より、急性リンパ性白血病に属する *TEL-AML1*t(12;21)(p13;q22) 染色体転座形成に V(D)J 組換えの実行因子である RAG 組換え酵素が関与している可能性が示唆された。*TEL-AML1* 染色体転座を有する白血病細胞株 Reh 細胞は RAG タンパク質を発現していることから、*TEL-AML1* 染色体転座が RAG 依存的に生じた可能性は十分に考えられる。RAG タンパク質はリンパ球細胞の免疫受容体の多様性を生み出すために正常な V(D)J 組換え反応を担う一方で、RAG タンパク質の DNA 配列認識の不正確さが異常な DNA 切断を誘発し、染色体転座を引き起こす可能性が示唆された。また、HMGB1 はその DNA bending 活性を介して RAG の異常な DNA 切断活性を促進している可能性が示唆された。これより、HMGB1 は RAG 依存的 *TEL-AML1* 染色体転座発症を促進している可能性が考えられる。HMGB1 タンパク質は様々な組織で恒常的に発現している。しかしながら、Reh 細胞株ではその発現量が他の細胞株と比較して高いことから、HMGB1 の高発現が RAG 依存的 *TEL-AML1* 染色体転座発症の引き金になっている可能性も考えられる。

(結論)

本研究により、小児急性リンパ性白血病において最も高頻度に観察される *TEL-AML1* 領域の転座が RAG 依存的に起こることを世界に先駆けて明らかにした。さらに cell-free 系での解析より、DNA bending タンパク質として知られる HMGB1 依存的な RAG の新奇 DNA 切断促進機構が明らかとなった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、プラスミド DNA を基質に用いた染色体転座モデル系によって急性リンパ性白血病で観察され

る *TEL-AML1* 染色体転座が RAG 発現依存的に生じることを明らかにした点で興味深い研究成果であり、すでに国際専門誌に公表され評価を受けている。さらに、cell-free 系を用いた詳細な解析結果から、HMGB1 依存的な RAG の新奇 DNA 切断促進機構を明らかにしており、その研究成果は国際専門誌に現在投稿中である。しかしながら、実際の生体内において *TEL-AML1* 染色体転座が RAG 依存的に発症し、かつ HMGB1 依存的に促進されるという証明は未だなされておらず、この点に関しては今後の検証が必要と思われる。

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。