

原著

21q11-21領域からの一過性骨髄異常増殖症の原因遺伝子単離の試み

石崎典子¹⁾ 金崎里香¹⁾ 土岐力¹⁾ 伊藤悦朗^{1,2)}

抄録 一過性骨髄異常増殖症 (TAM) は、新生児期の Down 症の約10%にみられる類白血病状態である。多くは、抗白血病治療なしに自然治癒するが、そのうち20~30%は寛解後に、急性巨核球性白血病 (AMKL) を発症する。TAM の原因遺伝子の単離は、造血細胞の癌化過程を解明する上で重要である。TAM の原因遺伝子は、21番染色体長腕のセントロメア近傍に座位することが報告されている。本報告で我々は、21q11-21から新規遺伝子の同定を試みた。Down 症の AMKL 由来の CMK11-5 の cDNA ライブラリーより、13個のクローンを単離した。クローンの解析より9個のクローンは21q11-21にコードされる同一の転写産物に由来することが示された。その中の#64クローンは、完全長であり、我々は、この新規遺伝子のエクソン-イントロン構造を決定することができた。予想される新規タンパク質のアミノ酸配列は、既知のタンパクとは相同性が認められなかった。

弘前医学 55: 83-94, 2004

キーワード: 一過性骨髄異常増殖症; Down 症候群; 21番染色体。

ORIGINAL ARTICLE

A TRIAL OF ISOLATING THE NOVEL GENES ON 21q11-21 TO ELUCIDATE THE GENE RESPONSIBLE FOR TRANSIENT ABNORMAL MYELOPOIESIS

Noriko Ishizaki¹⁾, Rika Kanazaki¹⁾, Tsutomu Toki¹⁾, and Etsuro Ito^{1,2)}

Abstract Transient abnormal myelopoiesis (TAM) is a leukemoid reaction which is found in about 10% of cases with Down's syndrome during the neonatal period. While in most of the cases, it resolves spontaneously without any antileukemic therapy, 20-30% of cases develop acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) after the remission. It is important to isolate the responsible gene for TAM, because it may lead to elucidation of the process of oncogenesis in hematopoietic cells. Possible candidate location has been reported to be in the pericentric region of 21q. In this report, we tried to identify novel genes in the region of 21q11-21 and isolated 13 independent clones by the screening of cDNA library of CMK11-5 cells, derived from AMKL in Down's syndrome. Analysis of the clones revealed that the 9 clones of them were derived from the same transcript coded in 21q11-21. The clone #64, one of the 9 clones was the full length of the gene and we could indicate the exon-intron structure of the novel gene. The predictive amino acid sequences from the gene had no homology to known proteins.

Hirosaki Med. J. 55: 83-94, 2004

Key words: TAM; Down's syndrome; Chromosome 21.

緒言

一過性骨髄異常増殖症 (transient abnormal myelopoiesis; TAM) は、Down 症候群の新生児期に約10%の割合で認められ、急性巨核球

性白血病 (AMKL) 類似の芽球が一過性に増殖する類白血病状態である¹⁾。本症の多くは、発症後3ヶ月以内に無治療で寛解に至るが、肝線維症などの致死合併症も存在し²⁾、治療の必要性や方法、および先天性白血病との鑑

¹⁾ 弘前大学医学部小児科学教室

²⁾ 別刷請求先: 伊藤悦朗
平成14年11月27日受付
平成16年1月27日受理

¹⁾ Department of Pediatrics, Hirosaki University School of Medicine

²⁾ Correspondence: E. Ito

Received for publication, November 27, 2002

Accepted for publication, January 27, 2004

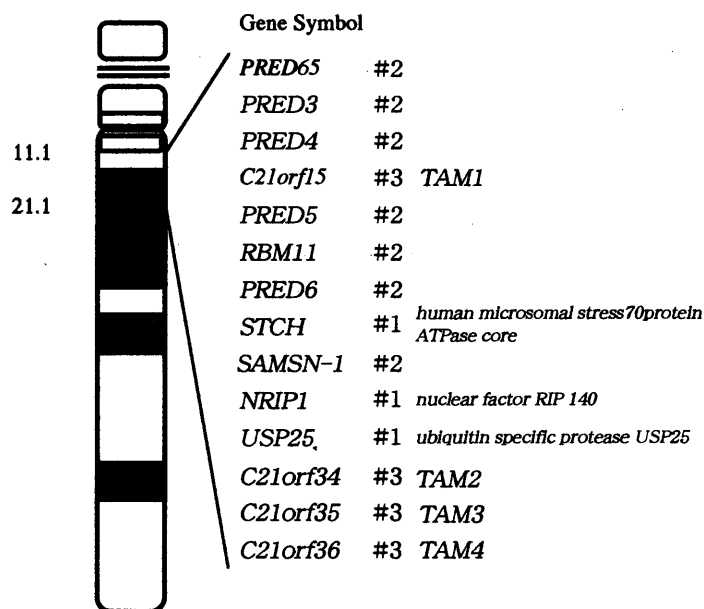


図1 21q11 近傍に存在する遺伝子.

Hattori ら¹⁴⁾ の分類による, 21q11 近傍に存在する遺伝子を模式的に示した. #1 は Known genes, #2 は Novel genes, #3 は Novel genes prediction をそれぞれ示した. Novel genes prediction に関してはセントロメア側より *TAM1*, *TAM2*, *TAM3*, *TAM4* と名称をつけた.

別^{3,4)} が問題である. 本症では寛解後数月から数年を経過して, その約20~30%において, *AMKL* を発症するという興味深い経過をとる^{5,6)}. *TAM* の既往のある患者が, *AMKL* を発症する機序に関しては解明されていないが, *AMKL* 発症時には21番染色体のトリソミー以外に付加的な染色体異常が認められることが多く^{7,8)}, 何らかの second hit が加わり, *AMKL* を発症すると考えられている^{9,10)}. これまで *TAM* の原因遺伝子は明らかになっておらず, 原因遺伝子の単離は, 芽球の増殖と自然消退の機序, および造血細胞の癌化の過程を解明する上で, 重要な情報を提供すると考えられる. さらに, 鑑別が困難である先天性白血病について, 診断の手掛かりを提供し, 臨床的にも貢献すると考えられる.

Niikawa ら¹¹⁻¹³⁾ は, 正常核型の児に *TAM* が発症した場合, 増殖している芽球では21番染色体がトリソミーであることを見出し, 発症には21番染色体の量的付加が関与すると予測し, 21番染色体の起源を調べる目的で,

heteromorphism を分析した. その結果, 染色体3本中2本でホモ接合性 (disomic homozygosity) が認められたことを報告した. さらに, 遺伝子多型解析を進め *TAM* の原因遺伝子は, 長腕のセントロメア付近の q11.1-11.2 に存在すると推定した.

2000年に21番染色体の塩基配列の全貌が明らかにされたが¹⁴⁾, この情報を基に本研究では, *TAM* の原因遺伝子が存在すると推定された領域を含む, 21q11-21.1 の領域に存在する新規の遺伝子について単離を試みた. この領域には14個の遺伝子が存在するが, Hattori¹⁴⁾ らはこれらの遺伝子を3つのカテゴリーに分類した (図1). 第1のカテゴリーは, 既知の遺伝子 (known genes). 第2のカテゴリーは, novel genes とされ, 既知のドメイン構造と相同性が認められるが, 完全な mRNA がまだ単離されていないものが含まれる. 第3のカテゴリーは novel gene prediction とされ, 発現シーケンスタグへの登録は認められるが, 既存のタンパクとは相同性をもたず, 新規の遺伝子に由来す

ると考えられる不完全な mRNA *C21orf15*, *C21orf34*, *C21orf35*, *C21orf36* が含まれている。我々はこの mRNA をコードする遺伝子を動原体側から *TAM1*, *TAM2*, *TAM3*, *TAM4* (図 1) と命名し, 本研究では, *TAM2* および *TAM3* を検索した。

材 料・方 法

用いた細胞株は, 急性前骨髄性白血病由来細胞株 HL-60¹⁵⁾, 組織球性リンパ腫由来単芽球様細胞株 U937¹⁶⁾, バーキットリンパ腫由来細胞株 Raji¹⁷⁾, 急性リンパ芽球性白血病由来細胞株 CEM¹⁸⁾, Down 症候群由来急性巨核球性白血病細胞株 MGS, Down 症候群由来急性巨核球性白血病細胞株 CMK11-5¹⁹⁾, 慢性骨髄性白血病由来細胞株 K562²⁰⁾。

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

血球系細胞株 (HL-60, U937, Raji, CEM, MGS, CMK11-5, K562) より total RNA を, acid-guanidium-phenol-chloroform 法²¹⁾ により抽出し, DNase I にて処理した後, Reverse Transcriptase M-MLV (200単位/ μ l) 存在下で 37°C, 120分反応し, 一本鎖 cDNA を合成した。これを Ex Taq Mix (TAKARA) を用いて, 下記のプライマー (最終濃度 2 ng/ μ l) 存在下に PCR を行った。

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*G3PDH*)

sense 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'
antisense 5'-CATGTGGCCATGAGGTCCACCAC-3'

1. Known genes の発現

Human microsomal stress 70 protein ATPase core (*STCH*)

sense 5'-GGGATATGAAAGCGTAGAGC-3'
antisense 5'-TCTGATTGAAGTCCTAAGCCAATG-3'

Nuclear factor RIP 140 (*NRIP*)

sense 5'-CAGACTATACCTAAGCCAATG-3'

antisense 5'-ACCAGAGAGTGTGAGAGAGA-3'
Ubiquitin specific protease USP 25 (*USP25*)
sense 5'-CAGCAGGAGACCCAGAATATC-3'
antisense 5'-ACAGATGAGGAACAGCAAGGA-3'

2. Novel genes の発現

Putative gene lipase like (*PRED5*)

sense 5'-ACAGACCAGTAGGCTCATCC-3'
antisense 5'-TCTGCTATATGGTGGTTTTCTG-3'

Putative gene, RNA binding motif protein 11 like (*RBM11*)

sense 5'-GTGACTATATGCCAAGACAGAG-3'
antisense 5'-GCTACATTCGTTGCCTCTGTT-3'

Putative gene, multidrug resistance associated protein like (*PRED6*)

sense 5'-CAGTAAAGTGACATATTCCTGG-3'
antisense 5'-CAACTGAGGCACATGAAGGAG-3'

Gene with homology to KIAA0790 protein (*SAMSN-1*)

sense 5'-CAACTGAGGCACATGAAGGAG-3'
antisense 5'-GTCTATGATGTCTCCTTTCTTG-3'

3. Novel genes prediction (*TAM2.3*) の発現

sense; TAM2VS 5'-
AATTGCAAGCATTCTATCCAAATG-3'
antisense; TAM3S1 5'-
AGTTTTCCCTTGCAGCTCAGT-3'

反応は変性 94°C 30秒, アニーリング 55°C 30秒, 伸長 72°C 30秒, 30-35 サイクルで行い, 得られた PCR 産物は, エチジウムブロミドを含む 2-3% アガロースゲルを用いて電気泳動し, 解析した。

TAM2.3 cDNA の単離

CMK11-5 細胞株より total RNA を抽出し, Oligotex-dt30 (TAKARA) を用いて mRNA を精製し, ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE) を使用して cDNA ライブラリーを作製した²²⁾ (9×10^3 pfu/ μ l). cDNA

ライブラリーを XL1-Blue MRF'へ感染させ、150 mmの NZY プレート22枚 (5 × 10⁴ pfu/プレート) へまき、ナイロン膜 Colony/Plaque Screen™ (Life Science) へリフティングした。プローブには、3'RACEの法²³⁾で、CMK11-5由来 cDNA を鋳型に、アダプタープライマー AP1 (CLONTECH) および TAM 2IVS にて増幅した産物を、さらにアダプタープライマー AP2 (CLONTECH) および TAM2IVS にて増幅することによって得られた440bp の DNA 断片を用いた。プローブを³²P-dCTP で標識し、3 × 10⁵ cpm/ml, 42°Cでハイブリダイズした。X線フィルムに露光し、陽性クローンをピックアップし、2次スクリーニングまで行い、得られた陽性クローンの塩基配列を、Bigdye terminator 法 (ABI) に従い、オートシーケンサー (ABI PRISM™ 310) を用いて決定した。

正常ヒト組織における *TAM2.3* の発現

ヒトの白血球、大腸、小腸、卵巣、精巣、前立腺、胸腺、脾臓に由来する cDNA (Multiple human tissue cDNA, CLONTECH) を鋳型にして、下記のプライマーを使用して、RT-PCR を行った。

sense; TAM2IVS 5'-
AATTGCAAGCATTCTATCCAAATG-3'

antisense; TAM3S1 5'-
AGTTTTTCCTTTGCAGCTCAGT-3'

反応は変性94°C 30秒、アニーリング55°C 30秒、伸長72°C 30秒、35サイクルで行い、得られた PCR 産物は、エチジウムブロミドを含む 3%アガロースゲルを用いて電気泳動した。また、*TAM2.3* の第1エクソンにセンスプライマーを設定し、変性94°C 30秒、アニーリング57°C 30秒、伸長72°C 30秒にて38サイクルで増幅した。使用したプライマーを以下に示す。

sense; 2&3NEW2-1 5'-
AGTGTCTTTGCCTTCTGCCAT-3'

antisense; TAM3 S1 5'-

AGTTTTTCCTTTGCAGCTCAGT-3'

増幅した産物は、3%アガロースゲルで泳動分離後、ナイロン膜 Hybond N⁺ (Amersham) 転写した。また、CMK11-5 cDNA を上記のプライマー、2&3NEW2-1 および TAM3 S1 を用いて増幅したもの (約200bp) を horseradish peroxidase (Amersham) で標識し、プローブとした。Gold hybridization buffer (Amersham) を用いて、42°C、2時間ハイブリダイズを行い、0.6 M 尿素、0.4% SDS、0.5×SSC、にて、42°C、20分、2×SSC、にて室温、5分でそれぞれ2回洗浄し、X線フィルムに5分間露光した。

RT-PCR 法による *TAM2.3* 遺伝子の転写開始点の解析

クローン#64 (図4) の5'端の上流部から下流部にかけて、センスプライマーを5個設定した。アンチセンスプライマーは TAM3S1 を使用し、CMK11-5 に由来する cDNA を鋳型に RT-PCR を行った。反応は変性94°C 30秒、アニーリング65°C 30秒、伸長反応72°C 30秒、28サイクルで行い、得られた PCR 産物は 3%アガロースゲルにて解析した。

用いたセンスプライマー (図7A) を以下に示す。

S1 5'-TGTCCTTTGCCTTCTGCCAT-3'

S2 5'-TGCCCCTGCCATGTAAGAAGTGTC-3'

S3 5'-TTCTTCCTCATTCTCTTGCCCCT-3'

S4 5'-GAGTTTGCTGCTTTTGCTTCTTCCTC-3'

S5 5'-CTGATGGGTTTATCAGAGTTTGCTGC-3'

第1エクソン上流部のプロモーター活性の検出

第1エクソンおよびその上流部を含む2.3kb をルシフェラーゼ・リポーターコンストラクトである、Pica Gene Basic Vector (東洋インキ) にサブクローニングした。CMK11-5 細胞株 4 × 10⁵ 細胞あたりコンストラクト DNA 0.9 μg を DIMRIE-C (GIBCO BRL) 2.4 μl を用いてリポフェクション法²⁵⁾にて、遺伝子導入し、ル

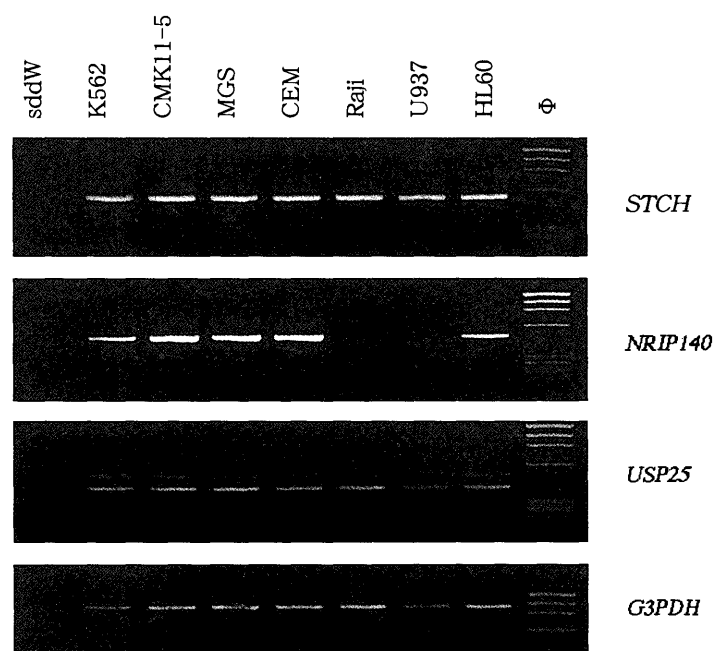


図 2A 各血球系細胞株における Known genes の発現.

アニーリングはすべて 55 °C, サイクル数は *STCH* は 32, *RIP* は 30, *USP* は 28 サイクルで行った. Down 症の AML (M7) 由来の細胞株である MGS, CMK11-5 に特異的に発現のみられる遺伝子は認められない.

ミノメーター (Lumat LB9507, Berthold GmbH) にてルシフェラーゼ活性を測定した. 尚, Pica Gene Basic Vector, および SV40 由来のプロモーターとエンハンサーを持つ Pica Gene Control Vector を同様に遺伝子導入して, 陰性および陽性コントロールとした. また, すべての遺伝子導入実験において β -ガラクトシダーゼ発現ベクター (pENL) をともに遺伝子導入し, β ガラクトシダーゼ活性を測定することで, 各サンプル間での遺伝子導入効率を補正した.

結 果

RT-PCR 法による各血球系細胞株における 21q11-21 領域に存在する遺伝子群の発現

Hattori¹⁴⁾ らの分類による known gene に分類される遺伝子, *STCH*, *NRIP*, *USP25* についての発現を比較した (図 2 A). *STCH* および *USP25* は, 検索した細胞株すべてにおいて発現がみられた. *NRIP* の発現は, *U937* およ

び *Raji* では認められなかったが, その他の細胞株では発現が認められた.

次に, novel genes に分類される遺伝子についての発現をみたが (図 2 B), *PRED5* は検索したすべての細胞株で発現が認められず, *RBM11* は, *U937* および *Raji* 以外の細胞株で発現がみられ, *K562* では強い発現が認められた. また, *PRED6* は, *CMK11-5* に弱い発現がみられたが, その他の細胞株では発現がみられなかった. *SAMSN-1* は, すべての細胞株で発現が認められたが, 特に, *CMK11-5* および *K562* で強い発現がみられた.

以上の結果より, known genes および novel genes に分類される遺伝子には, Down 症候群の AMKL 由来の細胞株である MGS および *CMK11-5* に特異的に発現がみられる遺伝子, あるいは発現がみられない遺伝子は存在しなかった.

次に我々は, 第 3 のカテゴリーである Novel Gene Prediction に分類される (図 1) *TAM2*

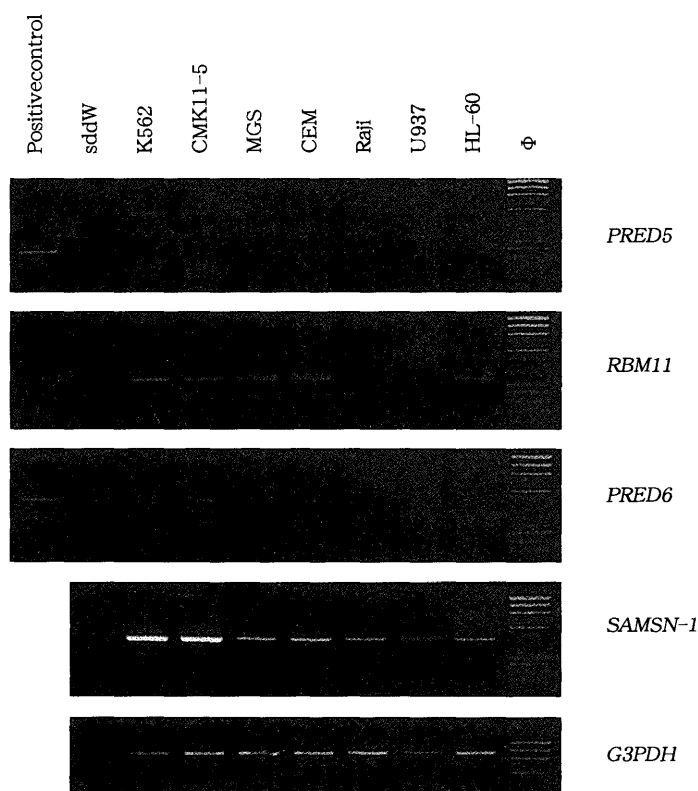


図 2B 各血球系細胞株における Novel genes の発現.

アニーリングはすべて 55℃, サイクル数は *PRED5* は 34, *RBM11* は 32, *PRED6* および *SAMSIN-1* は 30 サイクルで行った. MGS および CMK11-5 に特異的に発現している遺伝子は認められない.

および *TAM3* の検索を開始した. 両者は塩基配列を比較すると, 部分的に重複しており, ゲノム上の遺伝子構造も一部一致することが判明した. そのため, 両者は同一の転写産物に由来すると考え, 遺伝子 *TAM2.3* と仮称した. *TAM2.3* の血球系細胞株での発現を RT-PCR 法でみると, HL-60 でも軽度に発現がみられているが, MGS と CMK11-5 に, HL-60 と比較して強い発現が認められた (図 3).

TAM2.3 cDNA クローンの単離

TAM2.3 は, 発現シークエンスタグへの登録は認められているが, 遺伝子および完全長 mRNA は単離されていない. そこで, CMK11-5 の cDNA ライブラリーを作製し, 完全長 cDNA の単離を試みた.

1.1×10^6 pfu をスクリーニングし, 13個の陽

性クローンを単離した. 単離した全てのクローンが, 350bp から 400bp であったが, このうちの 10個について 3' 側に polyA 配列を確認できた. また, 単離したクローンのうち 9個は, 同様の配列であり, 同一の転写産物に由来することが判明した (図 4). 残りの 4個のクローンは, 前者 9個のクローンに含まれるエクソンを一部欠くものや, あるいは前者には含まれないエクソンを一部含むもので, 選択的スプライシングの結果生じたと考えられた (data not shown). また, 得られたクローンからアミノ酸を予想すると, 46アミノ酸および 37アミノ酸よりなる Open Reading Frame を有する可能性が示唆された (図 4). Swiss Prot データベースを利用して, これらのアミノ酸配列が既知のドメイン配列と相同性のあるものかを検索したが, 相同性のあるものは得られなかった.

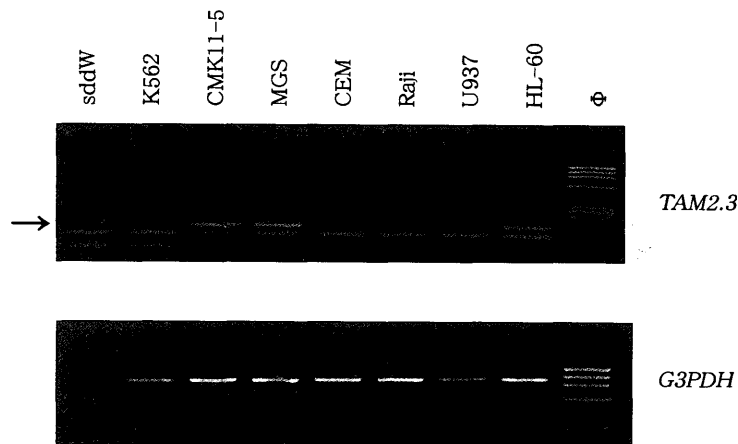


図3 各血球系細胞株における *TAM2.3* の発現.

アニーリングは 61°C, サイクル数は 34 サイクルで行った. Down 症の AML (M7) 由来の血球系細胞株である MGS と CMK11-5 および急性前骨髄性白血病由来細胞株である HL-60 に発現が認められた. 矢印は *TAM2.3* に由来する目的のバンドを示した.

```

CTGCCATGTAAGAAGTGCCTTTGCCCTTCTGCCATGATTTTGAGGCCCTCCCAGCCACGT 60
GGAAC TGAGCTCTTTCTGAGATGAAGAGAATTCTCAATGTCAAGATTTGAACAAGAAGAG 120
          M S R F E Q E E
AATGGAATACACAATATGGACATCCATAAAAAATTCATCAGAGAGCATTCTACTACTGAGC 180
N G I H N M D I H K N S S E S I L L L S
TGCAAAGGGAAAACTTAAATGGATATGAAAAGTGAAGAAAGTGATCATAGGAGAAAAAC 240
C K G K N L K W I *
          M D M K S E E S D H R R K P
CATTTCAGATGACAAGAGCACCTCAAAGGCAGCAGCCTCAAGGAGCAGCCATGGCCCCAG 300
F Q M T R A P Q R Q Q P Q G A A M A P D
ACTTGTGCGCACGGATGCAGAAAACCTAATGGAGGAGGCTGAGGTCAGAATGGGAAGAGTT 360
L S H G C R K L N G G G *
TTTAAAAAATAAAAAGGGGAGCTAATATGTGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 408

```

図4 得られたクローン (#64) の塩基配列および推定される Open Reading Frame.

スクリーニングによって得られた, クローン (#64) の塩基配列およびそれにより推定される Open Reading Frame を示した. 全長 408bp よりなり, Open Reading Frame は, 37 アミノ酸, および 46 アミノ酸の 2 種類が推定された.

スクリーニングで単離されたクローン (#64) の遺伝子構造

21番染色体はゲノム DNA 配列の全貌が明らかになっていることより¹⁴⁾, GenBank のデータベースを基にして, 得られたクローンの遺伝子構造を予想した (図5). 今回得られた遺伝子の全長は約251kbで, 5つのエクソンより構成されていたが, 各エクソンのサイズは5'側より66bp, 72bp, 50bp, 61bp, 145bpであった. 尚, この構造はエクソン・イントロンの境

界ルール (GT-AG) に適合していた. また, 5' 端の第1エクソンは, EST データベースに登録されておらず, 本研究で単離された新規のエクソンであった.

正常ヒト組織における *TAM2.3* の発現

単離した *TAM2.3* 遺伝子が新規のタンパク質をコードする可能性が高いことから, この転写産物の様々な組織での発現を検索した (図6A). その結果, *TAM2.3* は今回調べたすべての組織 (白血球, 大腸, 小腸, 卵巣, 精巣, 前

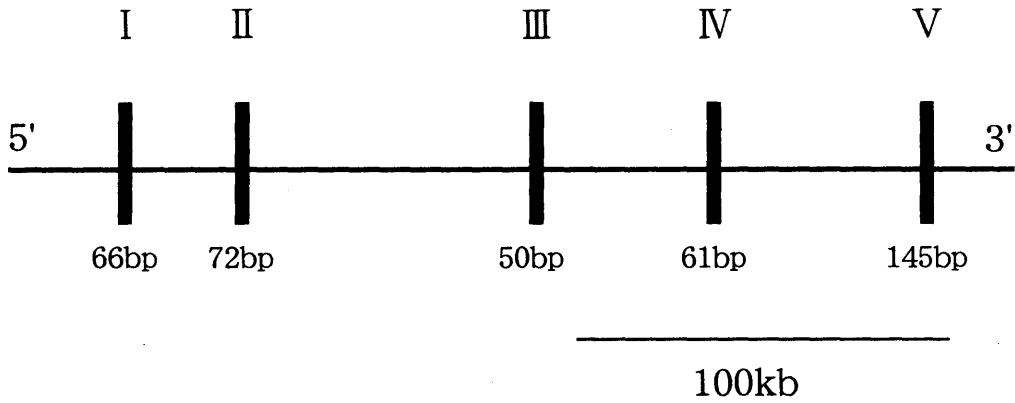


図5 TAM2.3の遺伝子構造.

全長約250kbで、5つのエクソンからなる。第1エクソンはGene BankのESTにおいて未登録のものである。各エクソンの大きさは図に示した縮尺と一致せず、模式的に示した。

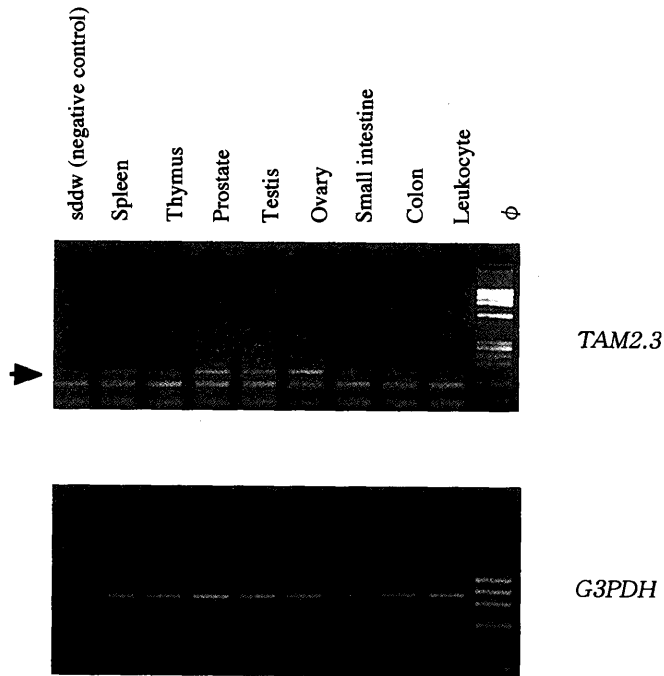


図6A ヒト組織でのTAM2.3の発現.

RT-PCRによりTAM2.3の正常組織での発現をみた。卵巣、精巣、前立腺で特に発現が認められた。矢印が目的のサイズである。増幅に用いたプライマーは、TAM2IV Sと第3.4エクソンに由来するプライマー、TAM3S1を用いた。

立腺、胸腺、脾臓)で発現がみられたが、なかでも卵巣、精巣、前立腺で強い発現が認められた。しかし、スクリーニングでは、TAM2.3に選択的スプライシングによる産物が存在する可能性が示されており、このRT-PCR法では、それらを検出している可能性がある。そこで、

第1エクソンに由来する産物が同様に検出されるか、プライマー2&3NEW2-1とTAM3S1を用いて、再度RT-PCRによる検出を試みた。その結果、同様に卵巣、精巣、前立腺でPCR産物が検出された(図6B)。

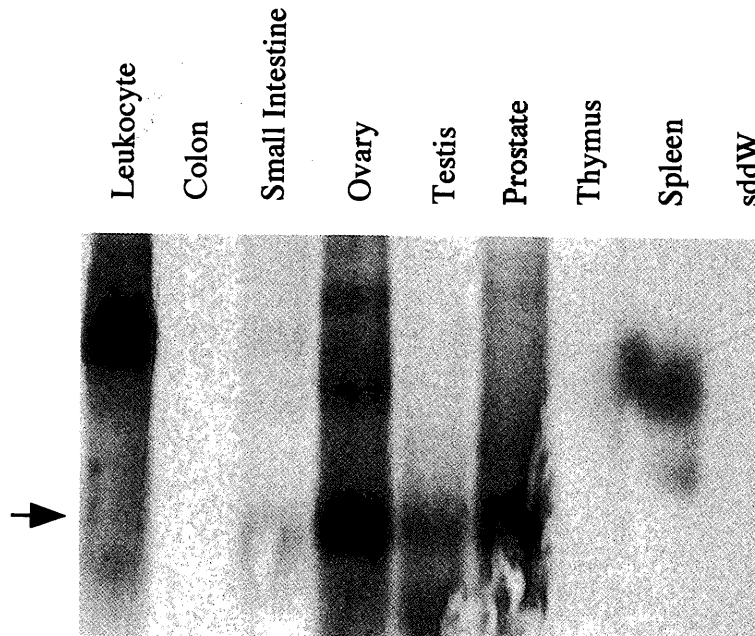


図 6B ヒト組織での *TAM2.3* の発現.

第 1 エクソンに由来する産物が同様に検出されるか、第 1 および第 3・4 エクソンに由来するプライマー (2&3NEW2-1, TAM3S1) を用いて RT-PCR による検出を試みた. 矢印は目的のサイズ. 卵巣, 精巣, 前立腺で発現が認められた.

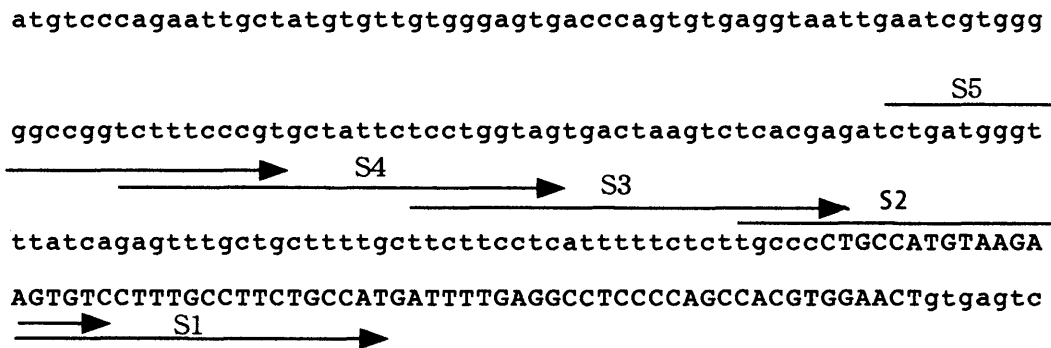


図 7A RT-PCR 法による転写開始点の解析 (プライマーの設定).

スクリーニングで得られた遺伝子の 5' 端のエクソンの配列を大文字, そのイントロンの配列を小文字で示した. センスプライマーは S1-S5 の 5 個設定し, RT-PCR を試みた.

RT-PCR 法による転写開始点の解析

TAM2.3 の転写開始点を決めるために, CMK11-5 cDNA を鋳型に第 4 エクソン 5' 端から第 3 エクソン 3' 端 (図 5) にアンチセンス・プライマー (TAM3S1) を設定し, 5 種類のセンス・プライマー (S1, S2, S3, S4, S5) を第 1 エクソンの上流とエクソン内に設

定し, RT-PCR を行った (図 7 A). センスプライマー S1, S2 では強い増幅が, S3 を用いた場合はやや弱い増幅が認められ, S5, S6 では増幅が認められなかった (図 7 B). この結果より転写開始点はクローン #64 の 5' 端とほぼ等しい位置にあることが証明された. 同様の結果は, プライマー伸長法によっても確認された

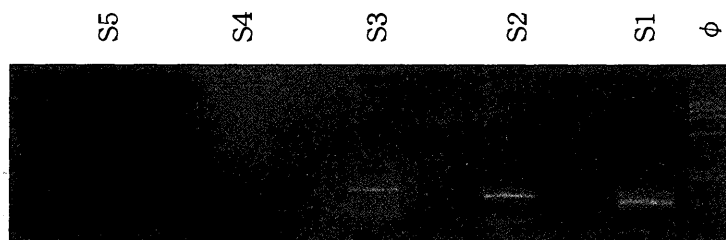


図 7B RT-PCR 法による転写開始点の解析.

S1-S5 のセンスプライマーを用いて RT-PCR を行い泳動した. S1, S2 では増幅が認められ, S3 ではわずかな増幅が認められる. S4, S5 ではバンドは認められない. 尚, 各レーンは, 鋳型を含まないネガティブコントロール (左側) と共に泳動した.

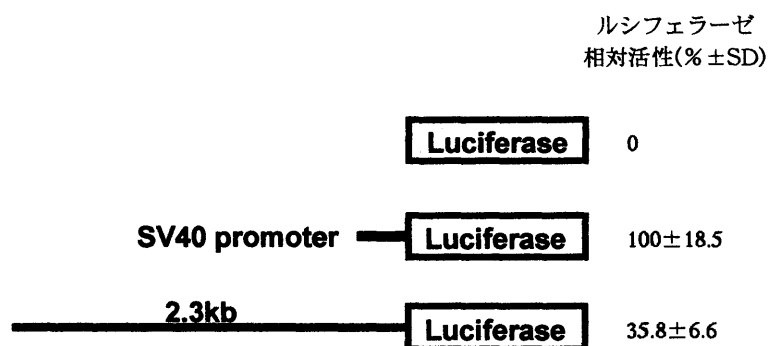


図 8 TAM2・3 の第 1 エクソン上流部のプロモーター活性.

上段はネガティブコントロール (Pica Basic), 中段はポジティブコントロールである SV40 プロモーターの活性 (Pica Control), 下段は第 1 エクソンおよびその上流部 2.3kb のプロモーターに由来するルシフェラーゼ活性を示した.

(data not shown).

第 1 エクソン上流部のプロモーター活性についての検索

転写開始点の上流近傍にプロモーターが存在することを確認する目的で, 第 1 エクソンおよびその上流部を含む 2.3kb を, ルシフェラーゼ・リポーターコンストラクトである, Pica Gene Basic Vector (東洋インキ) にサブクローニングし, 発現がみとめられた CMK11-5 細胞株に遺伝子導入した. その結果, 陽性コントロールである SV40 のプロモーター活性の測定値を 100 として相対活性をみると, 第 1 エクソン上流部は $35.8 \pm 6.6\%$ の活性が得られ (図 8), 第 1 エクソン上流部にプロモーター活性

が存在することが証明された.

考 察

本研究では, 21 番染色体の全塩基配列が解明されたことを活用し, TAM の原因遺伝子の推定領域より新規遺伝子を単離することを目的とした. 推定領域に存在する遺伝子は, 14 個と比較的数が少なく, 遺伝子の単離から機能解析を効率的に行うことが可能であると考えた. 候補とすべき遺伝子の見当をつける目的で, Down 症候群の AMKL 由来の細胞株である, MGS や CMK11-5 に特異的に発現する遺伝子, あるいはこの 2 つの細胞株に発現がみられない遺伝子が存在すれば, TAM や AMKL と関連のある遺伝子である可能性が高いと考え,

種々の血球系細胞株で、この領域に存在する遺伝子の発現を検索した。その結果、known genes や novel genes には、目的の発現パターンを示す遺伝子は存在しなかった。一方、novel gene prediction に分類された *TAM2.3* は、MGS や CMK11-5 に強い発現が認められ、また、軽度に HL-60 に発現がみられたがその他のリンパ球性および、慢性骨髄性白血病由来の細胞株では発現がみられなかった。このことより、*TAM2.3* は、AML、さらには TAM や AMKL と関連する遺伝子の可能性があると考えられる。

今回単離された TAM2,3 のクローン #64 は、上流部にプロモーター活性が存在し、完全長であると考えられた。予測される open reading frame は、37 アミノ酸、あるいは 46 アミノ酸と短く、ドメイン構造などから機能を推察できていない。今後、遺伝子産物を同定し、機能解析をすすめることが重要であると考えている。また、本遺伝子は培養株から単離したものであり、TAM あるいは AMKL 患者の検体を用いて発現を検索することが、本遺伝子が疾患に関与しているか否かを証明するために必要であると考えられる。

TAM の発症機序については、disomic homozygosity となる 21q11-21 領域に、造血を制御する遺伝子が存在し、正常核型において、染色体 2 本中 1 本で変異をおこした場合（ヘテロの片親）では、正常な造血が維持されるが、ダウン症候群において、3 本中 2 本で変異がある場合、正常造血が維持されず発症するという説がある¹⁾。また、別の説としては、この領域に癌抑制遺伝子が存在し、同一染色体上に存在する癌遺伝子に拮抗する役割を果たすが、3 本中 2 本の染色体で、機能が喪失すると、癌遺伝子に拮抗する作用が保持されなくなり発症するというものがある²⁾。本研究で単離した *TAM2.3* は、既報のタンパクと相同性がみとめられないことから、その機能を予想することができず、いずれの仮説を支持するものか、

あるいは全く異なるメカニズムで TAM 発症に関与しているか不明である。21 番染色体には *AML1*, *ETS2*, *ERG* などの白血病と関連する遺伝子が存在することが明らかになっており¹⁰⁾、TAM の原因遺伝子はそのような遺伝子にも影響をおよぼしているかもしれない。特に *AML1* については、家族性血小板減少症という AMKL に高率に移行しやすい疾患において変異があることが報告されている^{27,28)}。この疾患は、AMKL へ移行するという点において TAM に類似しており、*AML1* が TAM の原因遺伝子とともに AMKL の発症に関与する可能性があると考えられる。今後、TAM の発症機序や AMKL への移行に関して、今回我々が単離した *TAM2.3* と *AML1* 因子の相互作用や機能的関連について検査することによって、新たな知見が得られると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Zipursky A, Brown EJ, Christensen H, Doyle J. Transient myeloproliferative disorder (transient leukemia) and hematologic manifestations of Down syndrome. Clin Lab Med 1999;19:157-67.
- 2) Al-Kasim F, Doyle JJ, Massey GV, Weinstein HJ, Zipursky A. Incidence and treatment of potentially lethal disease in transient leukemia of Down syndrome: Pediatric Oncology Group Study. J Pediatr Hematol Oncol 2002;24:9-13.
- 3) Kounami S, Aoyagi N, Tsuno H, Suzuki H, Kitano N, Koike M. Additional chromosome abnormalities in transient abnormal myelopoiesis in Down's syndrome patients. Acta Haematol 1997;98:109-12.
- 4) Granzen B, Bernhard B, Reinsch I, Skopnik H, Mertens R. Transient myeloproliferative disorder with 11q23 aberration in two neonates with Down syndrome. Ann Hematol 1998;77:51-4.
- 5) 須田純子, 江口光興. 小児巨核性白血病と Down 症候群の関係. 臨床血液 1988;29:1200-6.
- 6) Duflos-Delaplace D, Lai JL, Nelken B, Genevieve F, Defachelles A, Zandecki M. Transient leukemoid disorder in a newborn with Down syndrome followed 19 months later by an acute myeloid leukemia: Demonstration of the same

- structural change in both instances with clonal evolution. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;113:166-71.
- 7) Wong KY, Jones MM, Srivastava AK, Gruppo RA. Transient myeloproliferative disorder and acute nonlymphoblastic leukemia in Down syndrome. *J Pediatr* 1988;112:18-22.
 - 8) Brissete MD, Duval-Arnould BJ, Gordon BG, Cotelingam JD. Acute megakaryoblastic leukemia following transient myeloproliferative disorder in a patient without Down syndrome. *Am J Hematol* 1994;47:316-9.
 - 9) 林 泰秀. ダウン症候群と悪性腫瘍 白血病と TMD を中心として. *小児内科* 1992;24:1675-81.
 - 10) Taub W. Relationship of chromosome 21 and acute leukemia in children with Down syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001;23:175-8.
 - 11) Niikawa N, Deng XH, Abe K, Harada N, Okada T, Tsuchiya H. Possible mapping of the gene for transient myeloproliferative syndrome at 21q11.2. *Hum Genet* 1991;87: 561-6.
 - 12) Abe K, Kajii T, Niikawa N. Disomic homozygosity in 21trisomic cells: a mechanism responsible for transient myeloproliferative syndrome. *Hum Genet* 1989;82:313-6.
 - 13) 新川詔夫. 特殊な腫瘍関連遺伝子のポジショナルクローニング: 一過性骨髄異常増殖遺伝子と多発性外骨腫遺伝子. *臨床病理* 1996;44:13-8.
 - 14) Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, Toyoda A, et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 2000; 405:311-9.
 - 15) Hozumi M. Fundamentals of chemotherapy of myeloid leukemia cell differentiation. *Adv Cancer Res* 1983;38:121-69.
 - 16) Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976;17:565-77.
 - 17) Lima TM, Kanunfre CC, Pompeia C, Verlengia R, Curi R. Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flowcytometric analysis. *Toxicol In Vitro* 2002;16:741-7.
 - 18) Takahashi T, Shimizu M, Akinaga S. Mechanism of the apoptotic activity of CI-F-araA in a human T-ALL cell line CCRF-CEM. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;50:193-201.
 - 19) Nagano T, Ohga S, Kishimoto Y, Kimura T, Yasunaga K, Adachi M, Ryo R, et al. Ultrastructural analysis of platelet like particles from a human megakaryocytic leukemia cell line (CMK11-5). *Int J Hematol* 1992;56:67-78.
 - 20) Gahmberg CG, Jokinen M, Andersson LC. Expression of the major red cell sialoglycoprotein, glycophorin A, in the human leukemic cell line K562. *J Biol Chem* 1979;254:7442-8.
 - 21) 田村隆明編. 遺伝子工学実験ノート 下. 遺伝子の解析 (シークエンスからマイクロアレイまで). 2版. 東京: 羊土社; 2001.p.133-35.
 - 22) 田村隆明編. 遺伝子工学実験ノート DNA を得る (取扱いの基本と抽出・精製・分離). 2版. 東京; 羊土社; 2001.p.125-37.
 - 23) 田村隆明編. 遺伝子工学実験ノート 下. 遺伝子の解析 (シークエンスからマイクロアレイまで). 2版. 東京: 羊土社; 2001.p.48-9.
 - 24) 村松正實, 山本 雅編. 実験医学別冊新訂 新遺伝子工学ハンドブック. 3版. 東京: 羊土社; 2000.p.97-102.
 - 25) 村松正實, 山本 雅編. 実験医学別冊新訂 新遺伝子工学ハンドブック. 3版. 東京: 羊土社; 2000.p.126-130.
 - 26) Ohta T, Nakano M, Tsujita T, Abe K, Osoegawa K, Yamagata T, Yoshiura K, et al. Isolation of a cosmid clone corresponding to an inv(21) breakpoint of a patient with transient abnormal myelopoiesis. *Am J Hum Genet* 1996;58:544-50.
 - 27) Osato M, Yanagida M, Shigesada K, Ito Y. Point mutations of the RUNX1/AML1 gene in sporadic and familial myeloid leukemias. *Int J Hematol* 2001;74:245-51.
 - 28) Okuda T, Nishimura M, Nakao M, Fujita Y. RUNX1/AML1: A central player in hematopoiesis. *Int J Hematol* 2001;74:252-7.