

日本人類遺伝学会 第33回大会シンポジウム講演要旨

Abstracts of the Symposium, the 33rd Annual Meeting of
the Japan Society of Human Genetics

Symposium. Advances in Somatic Cell Genetics

シンポジウム. 体細胞遺伝学の新しい展開

**S-1. PURIFICATION AND ANALYSES OF FUNCTIONS OF DEFECTIVE
FACTORS IN AUTOSOMAL RECESSIVE DISEASES. Masaru YAMAIZUMI**
(Inst. Med. Genet., Kumamoto Univ., Kumamoto)

In some human inherited diseases of which any molecular mechanisms are unknown, abnormal phenotypes are detected only in cultured cells (mainly primary fibroblasts) derived from patients. Furthermore, based on correction of their cellular abnormalities following somatic cell hybridization, genetic complementation groups are recognized in some cases. Xeroderma pigmentosum (XP) and Cockayne syndrome (CS) are well known as this type of disease. Because in the former case patients often develop skin cancer and in the latter case patients show premature aging, these diseases have been attracting much attention as model systems for studying cancer and aging, respectively. In both diseases, the mode of inheritance is autosomal recessive, and patients show high sensitivity to ultra-violet (UV) irradiation suggesting that there are defects in the DNA-repair system. In order to purify and analyze the functions of factors which correspond to the defective ones in inherited cells, we have developed and established a general method which employs microinjection for assay of the activities of these factors in fractionated extracts prepared from normal cells.

In this symposium, I will show our recent data on the purification and analyses of the functions of putative XP-A and XP-C factors together with initial characterization of factors defective in CS cells.

**S-2. Fragile site の発現機構の解析. 堀 雅明 (放射線医学総研・遺伝) ANALYSIS
ON THE MECHANISM OF FRAGILE SITE EXPRESSION. Tada-aki HORI**
(Div. Genet., Natl. Inst. Radiol. Sci., Chiba)

Fragile site (脆弱部位, FS と略す) とは特殊な生理的条件下で染色体ギャップあるいは切断, 再配列をおこしやすい特定の hot-spots で, 各個人に共通して検出される通常型 (common) FS と集団中に稀な頻度で検出される遺伝性 (rare) FS とが知られている。遺伝性 FS はその発現条件によって葉酸

感受性群, ディスタマイシンA誘導性群, BrdU 要求性群の3群に分類されているが, いずれの FS 発現形質もメンデル性相互優性様式で子孫に伝達される。

X染色体上の fra(X)(q27.3)は脆弱X症候群と密接に関連している。Fra(X)は葉酸感受性群に属し, チミン・ストレスの条件下で FS 発現が誘発される。チミン・ストレスは一般に DNA 代謝を阻害して, 種々の遺伝的変異を誘発する生理的條件である。脆弱X症候群の男性患者由来の fra(X) 染色体を細胞融合法によりチミジル酸合成酵素(TS)欠損のマウス・ゲノムの遺伝的背景に導入し, チミン・ストレスによる fra(X) の発現機構を解析した。TS 欠損のチミジン要求性雑種細胞および fra(X) 染色体1本のみを保持したヒト・マウス雑種細胞の解析結果から, FS 発現の決定要因は Xq27.3 領域に生じた突然変異の cis 効果であり, ヒトおよびマウス遺伝子の trans 効果は関与しないことが明らかにされた。さらに, FS 領域の DNA 複製が低 dTTP と低 dCTP にも感受性であることが示された。脆弱X症候群の遺伝子組換え率における遺伝的異質性を考慮すると, 本症の突然変異は Xq27.3 の高プリン/高ピリミジン塩基配列が関与する高頻度遺伝子組換え領域に生じた染色体レベルのマクロな構造変異によると推論される。

常染色体上の遺伝性 FS については精神遅滞, 癌, 自然流産, 不妊症あるいは数的・構造的染色体異常などの種々の理由で染色体検査を受診した患者家系に多くの報告例がみられるが, 特定の疾患との対応については不明な点が多い。われわれは日本人集団の遺伝的変異を遺伝性 FS を指標に検討する目的で FS の集団検索を行った。これまでに一般健康人(1,022人)と癌患者(547人)を調査した結果, 既知の3群22種類のうち6種類と新しい3種類 [fra(8)(q24.1), fra(11)(p15.1), fra(16)(p12.1)] のディスタマイシンA誘導性の遺伝性 FS を検出した。FS 保因者の種類とその頻度に民族間差が認められた。

癌患者集団の調査により, 前白血病症例, 肺癌症例および婦人科癌(良性・悪性)症例における FS 保因者の頻度が一般健康人集団より高い傾向が認められた。また, 癌細胞にみられる特異的染色体変異の解析から, ある種の FS が造腫瘍性染色体変異の素因である可能性が示された。

S-3. 単一染色体導入による造腫瘍性の抑制. 押村光雄 (神奈川がんセンター研・細胞遺伝). SUPPRESSION OF TUMORIGENICITY BY SINGLE CHROMOSOME TRANSFER. Mitsuo OSHIMURA (Lab. Cytogenet., Kanagawa Cancer Cent. Res. Inst., Yokohama)

われわれは, a) 癌化過程における染色体突然変異の役割に関する研究, b) 癌抑制遺伝子の存在する染色体の同定のために有用な資材と考えられるヒト染色体を1本だけ含むマウス A₉ 細胞の染色体ライブラリーを作製し, 種々の癌細胞へ特定染色体を1本だけ導入する系を開発した。

1) ヒトX-常染色体転座単一染色体ライブラリーの作製: HPRT 遺伝子を含むX染色体の一部が常染色体へ転座した染色体をもつヒト線維芽細胞とマウス A₉ 細胞との雑種細胞を得た。微小核細胞をこの雑種細胞より分離し, 再び A₉ 細胞と融合した。HAT 培地で選択培養後得られたクローンの染色体解析をキナクリン・ヘキスト二重染色法により行い, ヒト転座染色体を1本だけ含む A₉ 細胞を得た。現在までに, 1番, 3番, 11番, 12番, 16番, 17番の一部を含む単一染色体ライブラリーを作製した。これらの転座染色体は微小核融合法により HPRT 欠損細胞へ導入することができる点で有用である。

2) 優性遺伝子マーカーをもつヒト単一染色体ライブラリーの作製: ヒト正常培養線維芽細胞

(MRC-5 および NTI-4) に優性遺伝子マーカーである pSV-2 neo をカルシウム沈澱法によりトランスフェクションし, G418 (800 $\mu\text{g/ml}$) を含む MEM+10% FCS 培地で選択を行った。これらの G418 耐性ヒト細胞とマウス A₉ 細胞との雑種細胞を形成し, 得られた雑種細胞より微小核融合法による染色体導入を行い, G418 耐性細胞を選択分離した。染色体解析, 酵素解析により染色体同定を行い, 現在までに, 3 番, 4 番, 14 番, 16 番, 17 番, 21 番, 22 番を除く染色体の単一ライブラリーを作製した。このライブラリーは, 優性遺伝子マーカーをもつため, どのような細胞へも染色体導入ができ, 安定に保持させることができる点で極めて有用である。

3) 種々のヒト癌細胞株への染色体導入: 癌細胞と正常細胞との雑種細胞を用いた多くの研究から, 癌細胞の造腫瘍性が正常細胞によって抑制されることが示されている。さらに, 正常細胞由来の特定染色体の消失に伴って造腫瘍性が再発現されることから, その染色体上に造腫瘍性を抑制する遺伝子(群)が存在すると予想されている。このような cell-cell 雑種法による造腫瘍性抑制に関わる染色体の同定は, 消失した染色体に抑制機能を仮定するだけで直接的証明ができない。このような cell-cell 雑種法の欠点を補うために, 上述の単一染色体ライブラリーを用い, 子宮頸癌, 横紋筋肉腫, 神経芽細胞腫, 腎癌, 子宮内膜癌への種々の染色体導入を行ってきた。現在までのところ, 子宮頸癌および横紋筋肉腫細胞株の造腫瘍性は 11 番染色体の導入によって抑制され, 神経芽細胞株では 1 番染色体, 腎癌細胞株においては 3 番染色体の導入によって造腫瘍性の抑制または低下が認められた。また, 子宮内膜癌の造腫瘍性は 1 番, 6 番, 9 番, 19 番染色体の導入によって抑制された。なお, 腎癌および子宮内膜癌の造腫瘍性は 11 番染色体の導入によって変化が認められなかった。以上の結果は, 腫瘍性に関わる遺伝子(群)は複数個の染色体に存在し, 腫瘍の型により異なることを示唆している。

S-4. X 染色体の不活性化. 高木信夫 (北大・遺伝子実験施設). X CHROMOSOME INACTIVATION: THE CONSEQUENCE OF ITS FAILURE IN FEMALE MOUSE EMBRYOS. Nobuo TAKAGI (Res. Cent. Molecular Genet., Hokkaido Univ., Sapporo)

X 染色体の不活性化という現象の存在が知られて以来, 多くの実験, 観察が積上げられ, X 染色体は単に雌体細胞での不活性化にとどまらず, 哺乳動物の生活環において厳密にその活性が制御されていることが明らかにされた。しかし, 生活環の各相における制御の意味についてはまだ全く明らかにされていない。研究が最も進んでいる体細胞における不活性化は X 連鎖遺伝子の量補正の手段と考えられている。それではその量補正が起こらない場合にはどのような不都合が生ずるのであるのか? ヒトに限らずマウスにおいても 2 本の X 染色体が活性である胚は見いだされていない。常染色体トリソミーと同じように, 単なる aneuploid 効果によって発生初期に失われるのか, 何か X 染色体に特有な異常を生ずるのかはたいへん興味ある点である。

われわれは実験用マウスに維持されている X-autosome 転座, T(X;16)16H (Searle 転座) の子孫への伝達を調べる過程で, 転座を unbalance に持つ雌胚 ($X^aX^{16}16$) では, おそらく X^{16} が inactivation center を失ったために X の不活性化が起きず, 受精後 8.5 日目までに完全に消失することを見いだした (Takagi, 1980)。この unbalance 胚は第 16 染色体の末端側約半分がトリソミーで, X は末端の約 1/4 がモノソミーとなっている。マウスではトリソミー 16 は分娩時まで生存し, モノソミー X はほとんど正常な雌である。したがって, この unbalance 胚が発生初期に成長を停止するのは X 染色体の約 3/4 に遺伝子量補正がないためと想定した。

そこで、これら unbalance 胚に現われる異常を知るために組織学的な観察を行った。受精後 6.5 日目、問題の胚では ectoplacental cone の発育が非常に悪く、胚と母体との連絡に問題があることを示唆していたが、胚自体も小さいため、単なる発生の遅れとの見方も可能であった。この 1 日後、unbalance 胚は正常の 6.5 日胚とほぼ同じ大きさにまで成長するが、やはり ectoplacental cone の発達は悪く前日の観察を裏付けた。X 染色体不活性化は細胞分化と並行して起こる。ectoplacental cone は胚で最初に分化する trophoctoderm 由来であるので、不活性化異常の影響がまず現れたと考えられる。おそらく、ectoplacental cone の発達が悪いことが、胚発生停止の一因であろう。しかし、第二の X 染色体が活性を持ちつづけることの影響が ectoplacental cone に局限されるとは考えにくい。おそらく、胚そのものにも多大の影響があるのであろう。

X 染色体の 3/4 が過剰に活性を持っただけで 8.5 日目までに胚が消失するとすれば、2 本が完全に活性となったときの影響ははるかに大きいであろう。ヒトやマウスでも X-inactivation deficient 突然変異は当然生じていると思われるが、この早期での淘汰を考慮に入れると、実際に確認することは至難であろう。したがって、この unbalance 胚を材料に多角的な検討と体細胞遺伝学的アプローチにより X 染色体の不活性化の本質を明らかにする試みを続けていきたいと考えている。