

転写コアクチベーターCBPとp300の白血病への関与とRubinstein-Taybi症候群
(分担研究：効果的な小児慢性特定疾患治療研究事業の推進に関する研究)

研究協力者：林 泰秀

共同研究者：滝 智彦、辰巳 憲、村田 敬

要旨：小児のt(11;16)-白血病とt(11;22)-白血病の11q23に座位するMLL遺伝子を用いて相手遺伝子を同定・単離したところ、CBPとp300遺伝子であることが判明した。これらの遺伝子はアデノウイルスE1Aに結合する蛋白で、転写因子CREBと結合する転写コアクチベーターであった。また様々な転写因子・核内レセプターなどの結合領域をもち、転写制御に関する重要な遺伝子である。CBP遺伝子は、Rubinstein-Taybi症候群の原因遺伝子でもあり、この疾患においてCBP遺伝子の解析を進めている。

見出し語：白血病、転写コアクチベーター、CBP遺伝子、p300遺伝子、MLL遺伝子、
Rubinstein-Taybi症候群

研究目的

11q23転座型白血病は乳児白血病の約70%にみられ、この異常のある白血病は予後不良である。またエトポシド等のトポイソメラーゼII阻害剤による治療関連の二次性白血病でも高頻度に11q23の異常がみられることが判明し、小児白血病の病態の解明のためには、この転座型の解析は重要である。11q23転座型白血病のt(4;11), t(9;11), t(11;19)より、11q23領域からMLL遺伝子が単離され、ショウジョウバエのtrithoraxと高い相同性があることが判明した。またMLL遺伝子の転座相手遺伝子は10個以上単離されており、相手遺伝子の機能も最近少しずつ明らかにされはじめた。我々はt(11;16)(q23;p13)をもつ

myelodysplastic syndrome(MDS)2例およびt(11;22)

(q23;q13)をもつ二次性白血病の1例より新しいMLLの転座相手遺伝子の同定・単離を行った。

研究方法

t(11;16)-とt(11;22)-白血病の凍結細胞よりDNA、RNAと蛋白質を抽出し、DNAを複数の制限酵素で消化し、MLLとCBP, p300遺伝子をプローブにしてサザンブロッティングを行った。またRNAをゲル泳動し、MLL, CBP, p300をプローブにしてノーザンブロッティングを行った。またCBPとp300の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

RNAから逆転写酵素を用いてcDNAを作成した。MLLとCBP, p300のcDNA上にプライマーを作成

し、reverse transcriptase(RT)-polymerase chain reaction(PCR)法でcDNAを増幅し、MLL-CBP、CBP-MLL、MLL-p300、p300-MLLのキメラcDNAの同定を試みた。増幅されたPCR産物を非RIシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。

BALM14白血病細胞株よりcDNAライブラリーを作成し、とれたCBPとp300の断片をプローブにして、CBPとp300のfull cDNAの単離を行った。

CBPのcDNA上に約400bpの大きさではさむプライマーを8組設定し、Rubinstein-Taybi症候群10例の患者より樹立したEB-virusのBリンパ球細胞株より得たcDNAをPCRで増幅して泳動し、single strand conformation polymorphism(SSCP)法でスクリーニングを行った。

結果

①サザンブロッティング：MLLのcDNAをプローブにしたサザンブロッティングではt(11;16)-とt(11;22)-白血病のいずれも再構成バンドが認められた。またt(11;22)については同じプロットをp300のcDNAをプローブにしたサザンブロッティングでも再構成バンドが認められ、両方の再構成バンドのサイズは同じであった。t(11;16)ではCBPのcDNAをプローブにしたサザンブロッティングでは再構成バンドは認めなかった。

②ノーザンブロッティング：CBPとp300のcDNAをプローブにしたところ、いずれも異常バンドが認められ、CBPとp300遺伝子がこれらの転座に関与していることが示唆された。

③ウエスタンブロッティング：t(11;22)-白血病についてp300のmonoclonal抗体を入手し、ウエスタンブロッティングを行ったところ、サイズの異なるバンドが認められた。

④FISH法：MLL、CBP、p300のゲノムをとりFISH用のプローブにして検索を行ったところ、いずれのプローブもスプリットして、座位する遺伝子と相手遺伝子の両方でシグナルが認められた。

⑤RT-PCR法：MLL、CBPとp300のcDNA上の、切断点と予想される部分をはさむプライマーを作成し、RT-PCR法によりそれぞれのcDNAを増幅したところ、t(11;16)-AML 2例のうちMLL-CBPキメラcDNAが2例に、CBP-MLLキメラcDNAが1例に認められた。またt(11;22)-AML症例はMLL-p300とp300-MLLキメラcDNAが検出された。

⑥塩基配列の決定：RT-PCR法で増幅したPCR産物を非RIシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。予想される蛋白質の模式図を図1と2に示す。t(11;16)では大きなサイズの産物(521bp)はMLLのexon8とCBPのexonが、小さい産物(407bp)はMLLのexon7とCBPのexonがin-frameでつながっていた。

⑦CBPとp300遺伝子の単離：CBPとp300遺伝子の小さな断片をプローブにして、cDNAライブラリーよりスクリーニングを行い、それぞれの塩基配列を決定した。CBPcDNAの一部は他施設から供与していただいた。

⑧CBPcDNA上に設定したプライマー8組でRubinstein-Taybi症候群10例のcDNAを用いてPCR-SSCP法を行ったところ、1組で泳動度の異なるバンドがみられ、切り出して塩基配列を決定したところ10bpのdeletionがみられ、frame shiftが生じていた。

まとめと考案

MLL遺伝子は染色体11q23の転座切断点からクローニングされた。MLL遺伝子のcDNAは15kbにも及び、36個のexonより構成され、3969個のアミノ

酸をコードする。このMLL蛋白は431kDと予想され、N末端にATの豊富な配列と結合すると思われるAT-hooksがあり、DNAメチルトランスフェラーゼの一部のドメインと相同性のある47アミノ酸からなるMT領域、そして中央部にDNA結合領域であるZnフィンガー領域があり、これらのことからMLL蛋白は転写因子であると考えられている。MLL蛋白とショウジョウバエのtrithoraxはZnフィンガー領域が高い相同性がみられることと、両者のC末端がzesteのエンハンサーの116アミノ酸と高い相同性がみられることより、MLL蛋白はDNAとの結合、もしくはDNA結合蛋白との相互作用により分化の制御に関与するものと思われる。

11q23転座の転座相手は20以上の染色体領域に及ぶ。その中で最も多くみられるものはt(4;11)で、t(9;11)、t(11;19)が続き、その他の転座はまれである。これらの中で通常t(4;11)はALL、t(9;11)はAMLにみられるが、t(11;19)はALLとAMLの両方にみられ、最近19p13の切断点は3箇所あることがわかり、切断点の違いにより、病型が異なることがわかってきた。現在までにMLLの相互転座における転座相手遺伝子は15個単離されている。これらの構造には全てに共通したものはなく、その機能についてもあまりわかっていなかった。最近このうちのAF-6がRasと結合しそのシグナル伝達に関与することがわかり、またELL/MENはRNAポリメラーゼの転写伸長因子であることがわかり、転写における重要な働きを持つことが明らかになった。

今回はまずt(8;16)-AMLの16p13の遺伝子がCBPであることが報告されたことより、ノーザンブロット解析によりt(11;16)にCBPが関与していることを確認し、さらにRT-PCRによりMLL-CBPキメラ転写産物を同定した。CBPにはp300という構

造、機能が非常によく似た同じファミリーに属する遺伝子が存在し、p300が22q13に座位することからt(11;22)に同様にp300が関与しているのではないかと考え解析を行ったところ、同じようにMLL-p300キメラ転写産物を同定できた。CBPとp300は当初はそれぞれ転写因子CREBと結合する転写コアクチベータ、アデノウイルスE1A結合蛋白として別々に単離された。様々な転写因子、核内レセプターなどとの結合領域を持ち、さらに最近ヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を持つことが判明し、転写制御に関与する重要な遺伝子であることが明らかになった。t(11;16)の1例では5'-CBP-MLL-3転写産物が見られなかったことから、従来

の報告どおり共通してみられたMLL-CBP、MLL-p300が白血病化に重要であると考えられた。t(11;16)、t(11;22)ともMLL側の切断点は従来報告されていた切断点と同じ領域にあったが、CBPとp300の切断点は異なる領域に存在した。即ち、CBPはCREB結合領域を含むほぼ全ての機能ドメインを含む形でMLLと結合していたが、MLL-p300ではp300のCREB結合領域は消失していた。このことからCREB結合領域は白血病化に重要ではないのか、またはこの部分の有無により細胞の性質に相違が見られるのか現在検討中である。t(11;16)、t(11;22)ともほとんどがトポイソメラーゼII阻害剤による治療関連二次性白血病でみられ、現在転座相手遺伝子とキメラ遺伝子の二次性白血病を含めた11q23転座型白血病発症への関与について検討中である。CBP遺伝子はRubinstein-Taybi症候群の責任遺伝子であることが報告されたので、同疾患10例におけるPCR-SSCP法によるCBP遺伝子の解析を行ったところ、1例に10bpの欠失がみられた。現在更に解析を続けているところである。

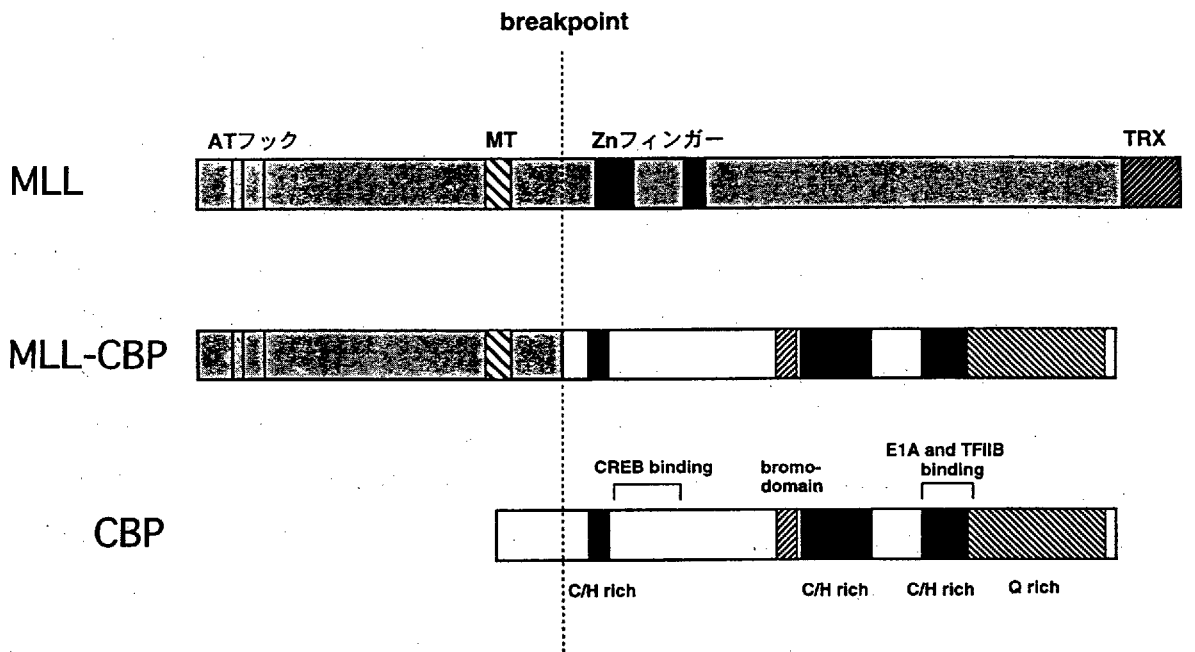


図1. MLLとCBPおよびキメラ蛋白の模式図

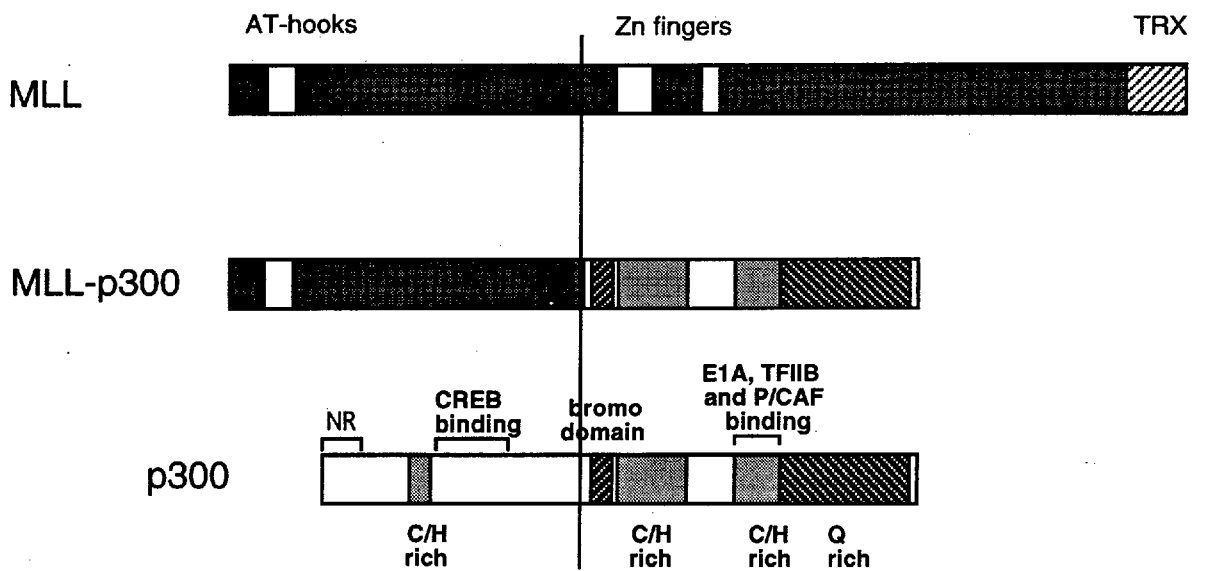


図2. MLLとp300およびキメラ蛋白の模式図



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要旨:小児の t(11 ; 16)-白血病と t(11 ; 22)-白血病の 11q23 に座位する MLL 遺伝子を用いて相手遺伝子を同定・単離したところ、CBP と p300 遺伝子であることが判明した。これらの遺伝子はアデノウイルス E1A に結合する蛋白で、転写因子 CREB と結合する転写コアクチベーターであった。また様々な転写因子・核内レセプターなどの結合領域をもち、転写制御に関する重要な遺伝子である。CBP 遺伝子は、Rubinstein-Taybi 症候群の原因遺伝子でもあり、この疾患において CBP 遺伝子の解析を進めている。