



Mutation analysis of transcriptional co-activators, CREB binding protein and p300, in hematological malignancies

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 重野, 一幸 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1193

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 340号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏名	重野 一幸		
論文題目	Mutation analysis of transcriptional co-activators, CREB-binding protein and p300, in hematological malignancies. (造血器悪性腫瘍における転写共役因子, CBP 及び p300 の遺伝子変異解析)		

博士(医学) 重野 一幸

論文題目

Mutation analysis of transcriptional co-activators, CREB-binding protein and p300, in hematological malignancies

(造血器悪性腫瘍における転写共役因子、CBP及びp300の遺伝子変異解析)

論文の内容の要旨

[目的]

CREB-binding protein (CBP)およびp300は多くの転写因子を含む核内タンパクの共役因子でありヒストンアセチル化酵素活性によるクロマチン構造の制御、および一部転写因子の直接アセチル化を通じて、さまざまな遺伝子発現の制御を行っている。CBPの遺伝子変異が原因となるRubinstein-taybi症候群には高頻度に腫瘍が認められ、CBP^{+/-}-transgenic mouseにおいて腫瘍の発生増加がありtumor suppressor geneとの位置付けが可能である。これまでに胃癌、大腸癌、乳癌などでp300の遺伝子変異が報告されている。

造血器悪性腫瘍においては急性骨髄性白血病のt(8; 16)転座ではMOZ-CBP、骨髄異形成症候群のt(11; 16)転座でのMLL-CBP、急性骨髄性白血病のt(11; 22)のMLL-p300などが報告されており、CBP/p300の融合遺伝子が白血病発症の原因の一つであると推測される。

今回、造血器悪性腫瘍においてCBP/p300における遺伝子変異をPT-PCR-single-strand conformation polymorphism (SSCP)法にて検討した。

[材料ならびに方法]

細胞株：白血病細胞株(K562, NKM1, HL60, U937, NOMO-1, NB4, Meg01, KG1, CEM/C1)。臨床検体：造血器悪性腫瘍患者の骨髄単核球26例(AML, ALL, CML, MDS, MM)。正常人の末梢血単核球：30例(正常コントロール)。

RT-PCR-SSCP：細胞株およびFicoll分離にて得られた単核球よりTRIzolにてtotal RNAおよびgenome DNAを抽出した。AMV-reverse transcriptaseを用いてcDNAを作成した。PCRはGenbankにてCBP(gb: U85962)、p300(gb: U01877)cDNAをもとに5つの機能領域に対してnested-PCR法を用いて約200bpのDNAとなるように増幅しアガロースゲルにて確認した。次に10%ポリアクリルアミドゲルにて5%グリセロール添加、非添加および4℃、25℃の条件にてSSCPを行い、異常バンドの検出を行った。3回繰り返し同様のバンドが検出されたものを陽性とした。

Sequence：ポリアクリルアミドゲルより異常バンドを切り出しDNAを抽出した後に、同じprimerを用いてPCRで再増幅したものをpCR2.1ベクターに導入してABI310シーケンサーにて遺伝子変異を検討した。

genome PCR：細胞よりRNAと同様にTRIzolにてgenome DNAを抽出。遺伝子変異を認めた領域に対して、intronにプライマーを設定しPCRをおこない同様にpCR2.1ベクターに導入した後にシーケンスにてその遺伝子変異を検討した。

[結果と考察]

- 1) CBP、p300ともRT-PCRにてbandが検出され対象としたすべての細胞にてそれらのmRNAの発現があることが確認された。

- 2) 細胞株9種類のうちCEM/C1では電気泳動にて正常サイズに加えてshort formが認められた。シーケンスによりp300(gb:U01877)のbromodomainの4461bpから4481bpまでの21bpのcDNAの欠失であり、exon18の開始部位に相当することが明らかになった。genome PCRの解析にてintron 17のacceptor siteにtag GATからtgg GATへの変異が認められ、この部位のaberrant splicingによる欠失であることが確認された。この変異はP/CAFのbromodomainの相同性解析によりアセチル化リジンを認識するのに重要であるp300のTyr1089を含む前後7アミノ酸の欠失である事が認められ、その構造と機能上の変化を生じることによりp300のヒストンアセチル化活性に影響を与えることが推測された。bromodomainではヒストンのアセチル化リジンを認識し安定化することにより局所におけるヒストンのアセチル化を促進したり、アセチル化された他の転写因子を認識しDNA結合能やその転写活性を増強するという機能が推測されており、この部位の変異は重要であると考えられた。他の検体および細胞株、正常コントロールにおいてこのような欠失は認めなかった。
- 3) 臨床検体26例および健常人ではSSCPの解析でCBP/p300の異常バンドを検出できなかった。

[結論]

造血器悪性腫瘍において白血病細胞株9種、臨床検体26例にてCBP/p300の遺伝子変異をRT-PCR-SSCP法にて解析した。細胞株CEM/C1においてp300のbromodomainの保存領域に21bpの欠失変異を認め、bromodomainのアセチル化リジンを認識するTyr1089を含む7アミノ酸の欠失となりp300のヒストンアセチル化活性に影響を与えることが推測された。細胞株においてはCBP/p300の遺伝子変異が造血器悪性腫瘍においてその腫瘍形成に寄与する可能性があるかと推測された。

今のところ限られた数の臨床検体においてはCBP/p300とも変異は認められず、恐らくその頻度は稀であると考えられるが、一部の造血器悪性腫瘍においてはCBP/p300がその腫瘍の発生に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

p300および、CBP(CRE=Cyclic AMP Responsive Element, Binding Protein)は別々の遺伝子座にあるものの、構造に相同性が高く、機能上もDNA転写因子を含む核内蛋白の共役因子で、実際に両者とも染色体転座をとまう一部のヒト造血器腫瘍でMLLやMOZといった遺伝子と融合蛋白をつくり腫瘍化に寄与していることが知られている。一方p300はごく一部の固形腫瘍で点突然変異も知られている。申請者は、ヒト白血病細胞株および臨床検体においてp300とCBP(p300/CBPと記載されることが多い)のメッセージの変化をしらべるために以下の実験を行った。

[材料ならびに方法]

細胞株：白血病細胞株(K562, NKM1, HL60, U937, NOMO-1, NB4, Meg01, KG1, CEM/C1)。臨床検体：造血器悪性腫瘍患者26例の骨髓単核球(AML, ALL, CML, MDS, MM)。正常人30例の末梢血単核球(正常コントロール)。RT-PCR-SSCP：細胞株およびFicoll分離にて得られた単核球よりTRIzolにてtotal RNAおよびgenome DNAを抽出した。AMV-reverse transcriptaseを用いてcDNAを作成した。PCRはGenbankにてCBP(gb:U85962)、p300(gb:U01877)cDNAをもとに5つの機能領域に対してnested-PCR法を用いて約200bpのDNAとなるように増幅シアガロースゲルにて確認した。次に10%ポリアクリルアミドゲルにて5

%グリセロール添加、非添加および4℃、25℃の条件にてSSCPを行い、異常バンドの検出を行った。3回繰り返し同様のバンドが検出されたものを陽性とした。Sequence：ポリアクリルアミドゲルより異常バンドを切り出しDNAを抽出した後に、同じprimerを用いてPCRで再増幅したものをpCR2.1ベクターに導入してABI310シーケンサーにて遺伝子変異を検討した。genome PCR：細胞よりRNAと同様にTRIzolにてgenome DNAを抽出。遺伝子変異を認めた領域に対して、intronにプライマーを設定しPCRをおこない同様にpCR2.1ベクターに導入した後にシーケンスにてその遺伝子変異を検討した。

〔結果〕

申請者は以下の知見を得た。

- 1) CBP、p300ともRT-PCRにてbandが検出され対象としたすべての細胞にてそれらのmRNAの発現があることが確認された。
- 2) 細胞株9種類のうちCEM/C1では電気泳動にて正常サイズに加えてshort formが認められた。シーケンスによりp300(gb：U01877)のbromodomainの4461bpから4481bpまでの21bpのcDNAの欠失であり、exon18の開始部位に相当することが明らかになった。genome PCRの解析にてintron17のacceptor siteにtagGATからtggGATへの変異が認められ、この部位のaberrant splicingによる欠失であることが確認された。この変異はP/CAFのbromodomainの相同性解析によりアセチル化リジンを認識するのに重要であるp300のTyr1089を含む前後7アミノ酸の欠失であることが認められ、その構造と機能上の変化を生じることによりp300のヒストンアセチル化活性に影響を与えることが推測された。bromodomainではヒストンのアセチル化リジンを認識し安定化することにより局所におけるヒストンのアセチル化を促進したり、アセチル化された他の転写因子を認識しDNA結合能やその転写活性を増強するという機能が推測されており、この部位の変異は重要であると考えられた。他の検体および細胞株、正常コントロールにおいてこのような欠失は認めなかった。
- 3) 臨床検体26例および健常人ではSSCPの解析でCBP/p300の異常バンドを検出できなかった。

〔結論と考察〕

造血器悪性腫瘍において白血病細胞株9種、臨床検体26例にてCBP/p300の遺伝子変異をRT-PCR-SSCP法にて解析した。細胞株CEM/C1においてp300のbromodomainの保存領域に21bpの欠失変異を認め、bromodomainのアセチル化リジンを認識するTyr1089を含む7アミノ酸の欠失となり、p300のヒストンアセチル化活性に影響を与えることが推測された。細胞株においてはCBP/p300の遺伝子変異が造血器悪性腫瘍においてその腫瘍形成に寄与している可能性が推測された。

今のところ限られた数の臨床検体においてはCBP/p300とも変異は認められず、恐らくその頻度は稀であると考えられるが、一部の造血器悪性腫瘍においてはCBP/p300がその腫瘍の発生に重要な役割を果たしていると結論づけた。

以上、申請者はCBP/p300を白血病においてはじめて広範に検索し、興味深い新知見を得た点で、審査員全員がその科学的価値を認めた。

以上の申請者の研究内容について審査委員会では以下のような質問および議論があった。

- 1) p300, CBPファミリーに他のメンバーはあるか

- 2) 腫瘍細胞におけるp300のtruncated proteinの構造、とくにbromodomainについて
- 3) p300, CBPを含む融合遺伝子の切断点はどこか
- 4) 腫瘍化あるいは先天異常のためには、CBPとp300の両方の異常が必須なのか
- 5) p300遺伝子の固形腫瘍における変異の頻度はどのくらいか
- 6) Retinoic acidによる白血病の分化誘導のとき、p300/CBPはかかわっているのか
- 7) RT-PCRのときにrandom primerを用いることにした理由
- 8) SSCPはnon-RIでおこなったのか
- 9) プライマーのデザインによって増幅の効率にちがいはあったか
- 10) CEM/C1細胞株にはsubcloneがあるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梶 村 春 彦
副査 難 波 宏 樹 副査 戸 倉 新 樹