

【研究紹介】

ウイルス挿入変異による新しいがん関連遺伝子の同定

Identification of novel cancer genes by retroviral insertional mutagenesis

金沢大学がん研究所
分子標的がん医療研究開発センター
機能ゲノミクス研究分野
鈴木 健之

はじめに

がんの発症・悪性化の分子メカニズムを理解し、がんを克服するためには、その原因となる遺伝子を同定し、機能を明らかにすることが重要である。原因遺伝子の同定に有用なモデル動物として、古くからレトロウイルス感染マウスが利用されてきた。レトロウイルスは、細胞に感染すると、逆転写酵素によって合成されたプロウイルスを細胞ゲノムのほぼランダムな位置に挿入する。ウイルスの挿入による遺伝子の変異や挿入部位周辺の遺伝子の発現異常が原因となり、マウスにがんが発症する。したがって、がん細胞のプロウイルス挿入部位を解析することで、発がん過程に関与する遺伝子が同定できる。これまでに同定された遺伝子の多くは、ヒトの発がんにおいても重要な役割を果たすことが示されてきた。私たちは、このモデルマウスを用いて、ウイルス挿入変異の標的となるがん関連遺伝子を網羅的に単離し、その機能や相互作用の解析を通して、発がんの分子メカニズムの解明と新しいがん分子標的の開発を目指している。

1. レトロウイルス挿入変異

挿入変異に用いられるレトロウイルスは、ウイルス自体に細胞由来のがん遺伝子を持たない非欠損型(慢性型)ウイルスであり、マウスでは、白血病・リンパ腫を起こす白血病ウイルス(MLV)がよく知られている。ウイルスの感染は、ウイルスのenvタンパク質と細胞表面の受容体との結合に依存し、一旦感染が成立すると、envタンパク質が受容体を占有するため再感染は阻害される。しかしMLVの場合、env配列とマウスゲノム上のレトロウイルス由来の配列との組換えが頻繁に起こって変異envタンパク質が産生されるため、再感染の阻害が解除される。こうして、ひとつの細胞が重複感染を受け、ゲノムに複数の挿入変異を導入されることが、効率的ながんの発症につながっている。

ウイルス感染マウスに発症したがんでは、ウイルスの挿入によるがん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活性化が予想される。その主なメカニズムを図1に示した。エンハンサー挿入やプロモーター挿入による野生型の遺伝子産物の大量発現は、がん遺伝子の活性化の場合によく観察される。また、遺伝子の3'非翻訳領域に挿入した場合、ウイルスのLTRのpolyA付加シグナルの影響で転写が途中で終了し、本来のmRNAの中の不安定化シグナルが除去されて、遺伝子発現が増強されることがある。一方、ウイルスが遺伝子の翻訳領域の内部に挿入すると、

polyA付加シグナルやスプライシング異常などで、完全長でない転写産物ができ、転写産物が不安定化されたり、変異タンパク質が産生されたりする。

2. ウイルスタギングによるがん関連遺伝子の同定

発症したがんでは、ウイルスをタグと見なして、ウイルス挿入部位を含むゲノムDNAを単離(ウイルススタギング)すれば、がん関連遺伝子を同定できる。PCRを応用したウイルススタギング法の開発とマウスゲノム塩基配列の解読によって、ウイルス挿入部位を網羅的に単離し、そのゲノム上の位置を特定できるようになった²⁾。このうち、共通挿入部位(コモンサイト: 別々の腫瘍に由来する複数のウイルス挿入が見つかる遺伝子座)が、発がんにとって重要と考えられる。一般に、同じ遺伝子座へのウイルス挿入は偶然には起こりにくく、その遺伝子座に挿入をもつ細胞が選択的に増殖した結果と捉えられるからである。

私たちは、MLV感染でリンパ腫を発症する発がんモデルマウスを用いて、がん関連遺伝子の網羅的スクリーニングを行い、コモンサイトを新たに約150箇所以上発見した²⁾。さらに、こうした研究成果(ウイルス挿入部位や標的遺伝子)を有効に活用してがんの研究に生かすために、他のグループの結果も含めて、がん関連遺伝子データベース(RTCGD: Retroviral Tagged Cancer Gene Database (<http://rtcgd.abcc.ncifcrf.gov>))を作成した³⁾。このデータベースには、既知のヒトがん関連遺伝子の約65%が含まれており、モデルマウスから得られた知見が、ヒトのがん研究に役立つことが確認されている。

3. ゲノム不安定性を示すマウスを利用したがん抑制遺伝子の同定

ヒトのがんにおいて、がん抑制遺伝子の関与は大変大きい。そのため、新しいがん抑制遺伝子の探索とその機能解析は、重要な課題である。しかし、従来のウイルス挿入変異法では、発現や機能が活性化されることで発がんに関わるがん遺伝子が主に単離され、がん抑制遺伝子がほとんど単離されなかった。がん抑制遺伝子の不活性化には、両方の対立遺伝子に変異が起こる必要があるが、ウイルス挿入変異だけでは極めて確率が低いと、と考えられる。そこで私たちは、分裂組み換えやヘテロ接合性の消失(LOH)を頻発するゲノム不安定性をもつ変異マウスを用いて、ウイルス挿入変異を行うことで、両アレルへの変異導入効率を高めて、がん抑制遺伝子を効率的に単離する系を開発した。変異マウスとしては、ブルーム症候群モデルマウスを利用した。ブルーム症候群はヒトの劣性遺伝病で、原因遺伝

子Blmの変異によりゲノムの不安定性が生じ、様々ながんの早期発症をともなう⁹⁾。Blm遺伝子変異マウスは、分裂組み換えやLOHの頻度の上昇が見られ、ヒトのブルーム症候群のモデルとなることが報告されている⁹⁾。

まず、MLV感染Blm遺伝子変異マウスを作製すると、通常のMLV感染マウスより早期にリンパ腫を発症することが確認された⁹⁾。次に、腫瘍からウイルス挿入部位を網羅的に単離し、新たに100個以上のコモンサイト遺伝子を同定した。特に、翻訳領域の内部にウイルス挿入が見られるコモンサイト遺伝子(がん抑制遺伝子の候補)を十数種類発見することに成功した。そのうち、由来した腫瘍で両アレルでの変異が認められたもの

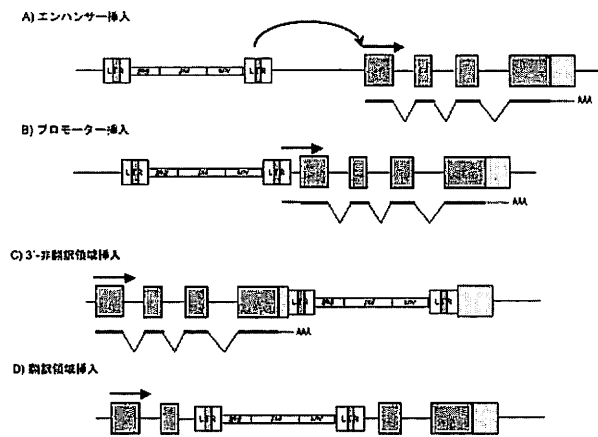


図1. レトロウイルス挿入による遺伝子の変異
A)エンハンサー挿入。ウイルスLTRエンハンサーの作用で、周辺遺伝子の発現上昇を引き起こす。B)プロモーター挿入。ウイルスLTRからの転写により、野生型の遺伝子産物が大量発現する。C)3'非翻訳領域挿入。mRNAの中の不安定化シグナルが除去されて、遺伝子発現が顕著に増強される。D)翻訳領域挿入。転写産物が不安定化されたり、変異タンパク質が産生されたりする。

には、pRb関連遺伝子 (p107, p130)、ファンconi貧血原因遺伝子 (Fancg) など既知の有力な候補遺伝子が含まれており、目的の実験系が確立されたことがわかった。

新しい候補遺伝子のうち、Fbxl10とJmjd5は、JmJCドメインという共通の構造をもっていた。shRNA発現ウイルスを用いて、それぞれの遺伝子の発現を抑制すると、DNA修復の異常が起こり、突然変異率が顕著に上昇したことから、これら遺伝子産物が、ゲノムの恒常性を維持する役割をもつことがわかった⁹⁾。さらに、JmJCドメインがヒストンの脱メチル化酵素の重要なモチーフであることが報告され⁷⁾、ヒストンのメチル化制御とがんとの関連性が浮かび上がってきた。これまでに私たちは、ヒストンのメチル化制御に関わる酵素の多く(メチル化酵素17種と脱メチル化酵素11種)を、ウイルス挿入の標的となるがん遺伝子またはがん抑制遺伝子の候補として同定している(図2)。

4. 発がんにおける non-coding RNAの役割

さらに私たちは、挿入変異の解析過程で、ウイルス挿入により non-coding RNAの発現異常が誘導されることを見いだした。実際、数百種類あるマウス microRNA 遺伝子のうち、約20%の遺伝子が挿入変異の標的となることがわかった。ウイルス挿入変異では、ひとつの腫瘍が、重複感染による複数のウイルス挿入を持つという特徴がある。microRNA 遺伝子を標的とする腫瘍の多くでは、同時にタンパク質をコードする別の遺伝子も標的となっている。このような協調的に作用しうるタンパク質因子に注目しつつ、新しい切り口から、microRNA遺伝子の発がんへの関与を解析している。またmicroRNA以外の non-coding RNAも標的として相当数同定している。これらの non-coding RNAは、ゲノム上に多数存在するが、まだほとんど生物学的機能が報告されておらず、その機能発見のためのツールとして、ウイルス挿入変異が利用できると期待される。

おわりに

ヒストンの翻訳後修飾は、転写制御、DNA複製・修復、X染色体不活性化など様々な生物学的現象に関与している。特に、ヒストンのアセチル化と発がんの関係は、既にその重要性が報告されている。アセチル化酵素は、ヒトのがんで欠失や変異が報告されており、がん抑制遺伝子と考えられている。脱アセチル化酵素は、遺伝子の大量発現が頻繁に観察され、がん遺伝子とされている。また注目すべきことに、脱アセチル化酵素の阻害剤が抗がん剤として開発されている。これに対し、ヒストンのメチル化と発がんの関係は、脱メチル化酵素の発見が最近ということもあり、研究がまだまだ進んでいない。私たちは、ヒストンのメチル化を制御する酵素群が、新しいがんの分子標的になりうる有力な候補と考え、その発がんにおける役割を詳細に解析している。

文 献

- 1) Mikkers H, et al: Adv Cancer Res 88: 53-99, 2003.
- 2) Suzuki T, et al: Nat Genet 32: 166-174, 2002.
- 3) Akagi K, et al: Nucl Acids Res 32: D523-527, 2004.
- 4) German J: Medicine 72: 393-406, 1993.
- 5) Luo G, et al: Nat Genet 26: 424-429, 2000.
- 6) Suzuki T, et al: EMBO J 25: 3411-3421, 2006.
- 7) Tsukada Y, et al: Nature 439: 811-816, 2006.

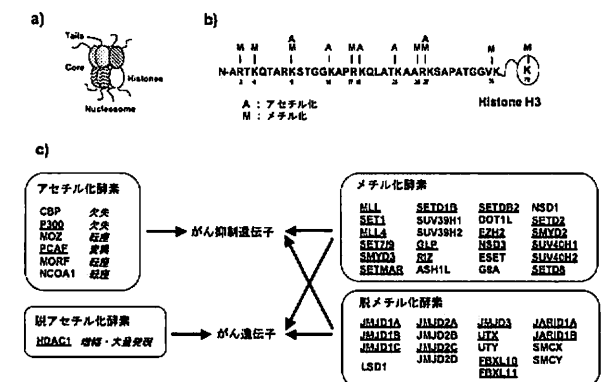


図2. がんの新しい分子標的としてのヒストンのメチル化制御酵素
a) ヒストンは、ヌクレオソームの構成分子であり、クロマチンを構築する。b) ヒストンH3のテール部分(N末端)の翻訳後修飾(アセチル化およびメチル化)。c) ヒストンの翻訳後修飾に関わる酵素とがんとの関係。ヒストンのメチル化を制御する酵素の多くは、ウイルス挿入変異の標的(下線で示す)となっている。