



# Secondary activation of c-abl may be related to translocation to the nucleolar organizer region in an in vitro cultured rat leukemia cell line (K3D)

高橋, 玲

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1986-03-26

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1031

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001031>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	たか はし れい 高 橋 玲 （大阪府）
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博ろ第888号
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の日付	昭和61年 3 月26日
学 位 論 文 題 目	Secondary activation of c- <i>abl</i> may be related to translocation to the nucleolar organizer region in an <i>in vitro</i> cultured rat leukemia cell line (K3 D) (ラット白血病培養株 K 3 D における c - <i>abl</i> の二次的活性化が核小体域への染色体転座に関連している可能性について)
審 査 委 員	主査 教授 杉 山 武 敏 教授 伊 東 宏 教授 藤 原 美 定

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒 言

癌細胞における重要な染色体異常の 1 つに転座がある。染色体転座の切断点近くに位置する癌遺伝子 (c-*onc*) が癌細胞の増殖に関与している例がいくつか報告されている。7,12-dimethylbenz(a)anthracene (以下DMBAと略す) で誘発されたラットの赤芽球性白血病細胞のいくつかの培養株の中の 1 つ K 3 D において, Abelson 白血病ウィルスに相同性を有する癌遺伝子 c-*abl* の転写亢進が認められた。K 3 D には 3 番染色体の長腕と 12 番染色体の短腕の転座からなるマーカー染色体が形成されていて, その染色体転座切断点付近で 3 番由来の c-*abl* と 12 番由来のリボゾーム RNA 遺伝子 (以下 rDNA) が隣接していることが *in situ* 分子雑種法で同時に明らかとなった。このマーカー染色体は, もとの K 2 D 株には見られなかったもので, その出現とともに c-*abl* の活性化が認められた。このことから染色体転座による c-*abl* と rDNA との連結が, 癌遺伝子 c-*abl* の活性化に関連していると考えられた。

### 材料と方法

細胞: 教室の前田らによって樹立された 5 つの白血病株 K 1 DB, K 2 D, K 2 DA, K 3 D 及び K 4 D を用いた。これらは DMBA を Long-Evans 系ラットに投与して得られた赤芽球性白血病で数回の移植継代後に培養株化し, 2 回のクローニングで染色体核型の異なるいくつかの細胞株として分離されたものである。正常対照としてはラット胎仔組織を用いた。

v-*abl* プローブと RI 標識: 2.3kb Bgl II 断片を含む v-*abl* 特異的プローブ (pABSub III) をニッ

クトランスレーションにより<sup>125</sup>Iまたは<sup>32</sup>Pで標識し、次のフィルター上でのRNA、DNAとの分子雑種、および染色体上の*in situ*分子雑種に使用した。

RNA抽出とノーザン・ブロッティング：各細胞の全RNAをチオシアン酸グアニジン法で遠心分離し、次いでオリゴdTカラムでPoly(A)<sup>+</sup>RNAを精製した。アガロースゲル電気泳動後ナイロン膜(バイオダインA)に移行し、<sup>32</sup>Pで標識した前述の*v-abl*プローブ(pABSubⅢ)と分子雑種させ、洗浄後にオートラジオグラフィーでX線フィルム上にバンドとして検出した。

DNA抽出とサザン・ブロッティング：フェノール法で抽出した高分子DNAを制限酵素で消化。アガロースゲル電気泳動しナイロン膜に移行した。RNAの場合と同様にして分子雑種、オートラジオグラフィーを行なった。

染色体標本の作製：72時間の培養後コルセミドを2時間作用させ分裂期細胞を得た。G-バンドで広がりやすい分裂期細胞を写真に撮り位置を記録した。

*in situ*分子雑種法：染色体標本をRNaseで処理し染色体DNAをホルムアミドの存在下で熱変性させ、前述の<sup>125</sup>Iで標識した*v-abl*プローブと染色体上で43℃、14時間分子雑種させた。洗浄後液体乳剤(サクラNRM2)によるオートラジオグラフィーで1-4週間露光させた後に現像した。あらかじめG-バンドを記録しておいた分裂期細胞を探して写真を撮り、G-バンドと対照して各染色体上の銀粒子を計数した。また<sup>125</sup>Iで標識したrRNAをプローブとした*in situ*分子雑種法を行った。

AgNOR染色：Olertらの方法に従った。pH2.6-2.7の条件で蟻酸と反応させた後、硝酸銀で染色した。

## 結 果

- (1) 各培養株の染色体核型分析の結果は、K1DBが42, XY, K2Dが43, XY, +2, K2DAが43, XY, +dup(2)(2q25-2q33), K3Dが43, XY, +2, -12, +t(3;12)(3qter-3q12:::12pter-12qter), K4Dが42, XY, -12, +t(2;12)を示した。
- (2) RNAプロットハイブリダイゼーションでは*c-abl*に関連したmRNAとして6.4及び5.0kbのバンドが認められた。K3Dにおいては対照の胎仔細胞及び他の細胞株に比べて著明な転写亢進が観察された。このことは同じフィルターにactin遺伝子でハイブリダイゼーションを追加した場合にアクチンのmRNA量にはほぼ差がなかったことにより確かめられた。
- (3) *in situ*分子雑種法による解析を*v-abl*プローブを用いてK3D染色体標本について行った結果、3q12の位置に*c-abl*の局在が証明された。また、マーカー染色体の転座部位に一致して*c-abl*がみられた。一方、rRNAをプローブとして、マーカー染色体の転座部位*c-abl*に接して#12側に銀粒子の集中がみられた。
- (4) AgNOR染色では、#3, #11, #12それぞれの二次狭搾部位に銀粒子の確認できたが、*in situ*法でrDNAの存在が示されたマーカー染色体の転座切断端には銀粒子は証明できなかった。
- (5) サザン・プロット解析では、ヒトのrDNAの28S転写部分の3'側にある介在配列の一部で

あるpDSBはv-*abl*プローブともハイブリダイズすることが示され、その意味を検討中である。

## 考 察

バーキット・リンパ腫におけるt(8;14)転座と*c-myc*, CMLにおけるt(9;22)と*c-abl*などに代表されるように、癌細胞における染色体転座と*c-onc*の活性化が関係した例が報告されている。また二次的に生じた染色体異常は癌の増殖にとって大きな利点を与えている場合が多い。一方我々のラットの系では#3, #11, #12の核小体域がしばしば癌に伴う染色体異常に巻き込まれることも多い。

今回用いた細胞の中ではK3Dのt(3;12), K4Dのt(2;12)で核小体域を含む染色体異常が観察された。特にK3Dではその親株のK2Dにみられなかったマーカー染色体t(3;12)が培養途中で出現し*c-abl*の発現がK2Dに比べて著明に亢進していたことより、K3Dでの*c-abl*の発現は増殖途上での二次的な染色体異常に伴う*c-abl*の発現と考えられた。今回、このマーカーの切断点付近での*c-abl*とrDNAの近接が染色体レベルで確認できたが、遺伝子レベルでの解析が必要であり*c-abl*とその周辺のクローニングを行なっている。ヒトのリボゾームRNA遺伝子の介在配列をプローブ(pDSB)として検索すると相同性を有する部分がラット*c-abl*の下流にも存在することが示されたが、pDSBとの相補性のみをもって直接的な*c-abl*とリボゾーム遺伝子の組換えであるとは現時点で言いきれない。pDSBに含まれている反復配列の意義も興味深い。

銀染色でマーカー染色体のrDNA部位に産生蛋白を示す銀粒子を証明出来なかった説明としては(1)蛋白遺伝子の発現に欠陥がある、(2)なんらかの原因でこの蛋白遺伝子やrDNAが転写されなくなってしまう、などが考えられた。

Nesbittらにより染色体のバンド構造からマウスの#2染色体はラットの#3染色体に一致することが報告されており、マウス#2に*c-abl*が存在するという最近の報告と考え合わせると我々の成績はよくあう。

*c-abl*の活性化の機構については、Ph<sup>1</sup>染色体を有するCMLの場合にDNAレベルの組換えが存在してそのmRNAのサイズに違いを生じているという報告がなされているが、K3DについてはmRNAには他の細胞株に比べて変化はなかった。このラットの系における*c-abl*遺伝子産物の構造や働き、とくにチロシンキナーゼ活性については今後発展させるべき重要な問題である。

## 論文審査の結果の要旨

今日、癌の発生機序の解明は急速に進みつつある。それは癌がいわゆる細胞性癌遺伝子(発癌遺伝子)の発現による細胞増殖制御異常であることが明らかになってきたからである。この癌遺伝子の発現機序の一つに、癌細胞に頻繁に見られる染色体転座現象がある。すなわち、癌遺伝子が他の染色体部位に転座することによって癌遺伝子が発現する例がいくつか報告されてきた。Burkittリンパ腫における8;14転座と*c-myc*の活性化、ヒト慢性骨髄性白血病における9;22転座と*c-abl*の関係など

に代表されるように、癌細胞における染色体転座と癌遺伝子の密接な関係が報告されている。この他にもAML (M2) の8;21転座のさいの*c-mos*, APL (M3) の15;17転座のさいの*p53*, AMoLの9;11転座のさいの*c-ets-1*, 濾胞性リンパ腫のさいの*c-bcl-2*と*c-yes-1*, マウス形質細胞種のさいの6/12;15転座と*c-myc*などが知られているが、実例としては決して数が多いとは言えない。

本研究者はラットの7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) による白血病の培養株の癌遺伝子の発現を調べているうちに、その中のK3D株でAbelson白血病ウィルスの持っている癌遺伝子*v-abl*に対応する細胞性癌遺伝子*c-abl*の転写亢進を認めた。この細胞株には3番染色体と12番染色体の転座からなるマーカー染色体があり、この細胞株の由来した親株のK2D株では*c-abl*遺伝子の発現はなく、K3D株でこの染色体マーカーの出現と共に*c-abl*の発現が起きていることから、K3Dでのこのマーカー染色体の獲得が*c-abl*の発現に関連があると推定された。*in situ*分子雑種法で調べたところ、転座部位に一致して#3染色体の*c-abl*と#12染色体のリボゾームRNA遺伝子(以下rDNA)の両染色体領域が隣接していることが明らかとなった。

このように、本研究者は染色体転座による癌遺伝子の発現例の、しかも両側の遺伝子の明らかな1例を新たに追加したものであり、相手側の遺伝子が反復遺伝子である点、癌の増殖途上での2次的な発現の例である点でもユニークな研究材料を開発したものであると言える。現在 遺伝子レベルでの解析のために、*c-abl*とその周辺のDNAのクローニングと地図作りが進められている。本研究は独自の実験材料を用いて遺伝子工学と分子細胞遺伝学の手技の結合である染色体上での*in situ*分子雑種法によって単一コピー遺伝子の染色体位置を決定し、その結果、化学物質による癌発生とその増殖機序の解明に新しい知見を加えたもので、よって、本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認めた。