

「生命活動のプログラム」
平成 8 年度採択研究代表者

押村 光雄

(鳥取大学医学部 教授)

「ゲノムインプリンティング制御の分子機構」

1. 研究実施の概要

ゲノムインプリンティングとは父母由来の遺伝子間において発現レベルの異なる現象であり、どのようなメカニズムでこのような現象が制御されているかを知ること、生物進化のプロセスや遺伝子発現制御のメカニズムを知る上で重要である。また、このゲノムインプリンティングの異常は発生異常やがんの発生と深く関わりを持つため、新規インプリント遺伝子の発見や制御メカニズムの解明はヒトの疾患の原因の解明や治療法の開発に極めて重要である。そのために我々は新規インプリント遺伝子の同定システムの確立や制御メカニズムの解析システムの確立を行ってきた。今後はこれらのシステムを用いてゲノムインプリンティングの生物学的意義やヒトの疾病との関わりを明らかにしていく。

2. 研究実施内容

A. ゲノム刷り込みを受けるヒト遺伝子の単離

a) ヒト刷り込み現象の解析システムの確立を目的に、微小核細胞融合法を利用して親起源の明らかなヒト 1 番、2 番、4 番、5 番、6 番、7 番、8 番、10 番、11 番、15 番、18 番、19 番、20 番、X 染色体を 1 本保持するマウス A9 細胞を作製してきた。さらに、マイクロサテライトの多型を用いて親起源を特定した。少なくとも 1 番、5 番、6 番、7 番、10 番、11 番、14 番、15 番、19 番染色体に関しては、父親と母親由来の染色体を各々有するマウス A9 細胞が得られた。さらに、既知の刷り込み遺伝子 (H19、KvLQT1、SNRPN、IPW) で、刷り込み状態がマウス細胞中でも維持されていたことから、ヒトインプリント遺伝子のアレル特異的発現パターンはマウス細胞中においても維持されていることが明らかになった。従って、これらの資材はインプリント遺伝子の同定に極めて有用と考えられる。

b) インプリント遺伝子は、特定の染色体領域にクラスターを形成して存在する。とりわけ、ヒト 11p15 および 15q11-q13 領域には、少なくとも 20 のインプリント遺伝子が存在し、それぞれ Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) や Prader-

Willi/Angelman 症候群 (PWS/AS) の発症に関与することが知られている。これらのクラスターに位置する新規のインプリント遺伝子を同定することは、疾患責任遺伝子の同定のみならず、染色体ドメイン構造の刷り込み制御機構を明らかにする上でも極めて重要であると考えられる。我々は、これら 2 つの領域に位置する計 190 の EST (expressed sequence tag) に着目し、父方と母方のヒト染色体を保持するマウス A9 細胞を用い、親由来により異なる発現を示す EST のスクリーニングを行った。その結果、父方あるいは母方のヒト染色体のみから発現が検出される 8 種の EST を同定することに成功した。さらに、転写領域に位置する DNA 多型を用いた解析から、これらの候補のうち、2 つについては実際にヒト正常体細胞で父性発現を呈する新規のインプリント遺伝子であることが明らかとなった。このように、親由来の明らかなヒト染色体を保持するマウス細胞を用いることにより、刷り込みを受けるヒト遺伝子の系統的な探索を容易に行うことが可能になった。さらに、得られた 8 つの候補のうち、11p15 領域に位置する A037 については、KvLQT1 遺伝子の antisense transcript (LIT1 と命名) であった。KvLQT1 は isoform に特異的な発現パターンをとり、Isoform 1 が母方から発現されるのに対し、LIT1 はヒト正常体細胞において父性発現を呈する。KvLQT1 遺伝子座には 2 つの CpG アイランドが存在し、KvLQT1 上流に位置する CpG アイランド (CpG1) には親由来に特異的なメチル化は認められないのに対し、LIT1 上流の CpG アイランド (CpG2) は不活性な母方特異的なメチル化を受ける。さらに、BWS 患者における CpG2 のメチル化状態を検討したところ、13 例中 4 例において母方特異的なメチル化が完全に欠如していることから、LIT1 は BWS の責任遺伝子座であることが強く示唆された。また、LIT1 は BWS の染色体転座点が集まる BWSCR1 に位置することから、11p15 領域のインプリンティングセンター (IC) として機能する可能性も考えられ、今後、ニワトリ DT40 細胞を用いた遺伝子ターゲティングにより、LIT1 によるインプリンティングドメインの制御機構を検証する。

c) ヒト 1 番染色体 p36 領域に高頻度に LOH が認められる神経芽細胞腫において母方由来のアレルの特異的欠失が認められ、この領域に本疾患に関与するインプリント遺伝子の存在が示唆されている。Monochromosomal hybrid を用いてヒト 1 番染色体 p36 領域の刷り込み遺伝子の検索を行った。約 200 個の EST を用いて検索を行った結果、1 個の候補を得た。また、最近ヒト 1 番染色体上の新規インプリント遺伝子 NOEY2 が単離されたが、この 1p31 領域にもインプリント遺伝子のクラスターが存在している可能性があることから、1p36 領域と同様にして検索を行い、2 個の候補 EST を得、現在これらの候補について解析中である。

B. インプリンティング制御機構の解析

ヒト 11 番染色体上に存在する母性発現の刷り込み遺伝子 H19 は、有袋類あるいは鳥類まで保存されているが、胎盤哺乳類と同様に刷り込み制御機構がこれらの種で保存されているか否かは不明である。そこで染色体移入法を用い、ヒト 11 番染色体を保持する A9、m5S (マウス)、BP6T (ハムスター)、PtK1 (ラットカンガルー) および DT40 (ニワトリ) 細胞を樹立し、これらの細胞におけるヒト H19 遺伝子の刷り込み状態を検討した。有胎盤哺乳類由来の細胞株の A9、m5S および BP6T 細胞においては父方 H19 遺伝子の発現が全く認められなかったのに対し、PtK1 (有袋類) 及び DT40 (鳥類) 細胞において発現が検出された。さらに、PtK1 および DT40 細胞に移入されたヒト 11 番染色体をマウス A9 細胞に回収したところ、父方 H19 遺伝子は再度可逆的に不活性化していた。一方、これら全ての細胞において、発現の有無に関わらず父方 H19 遺伝子にほぼ同様のメチル化状態が維持されていた。これらの知見からヒト染色体上の親起源の刷り込みは有胎盤類以外の細胞においても維持されるが、発現パターンの制御機構はこれらの種間で異なる可能性が考えられる。

さらに、外来 DNA とゲノム間の相同組み換えを高頻度に生ずることが知られているニワトリ pre-B 細胞株 DT40 細胞を利用し、前述の LIT1 遺伝子の CpG アイランド約 3kb を欠失させ、LIT1、KvLQT1 その他のインプリント遺伝子の刷り込み状態を検討している。現在、CpG アイランドの上流約 5kb と下流約 3kb の相同領域と、PGK _{puro} を選択マーカーに持つプラスミドベクターを構築し、ヒト 11 番染色体を保持する DT40 細胞への導入を試みているところであり、今後、得られた改変染色体を染色体移入法によりマウス A9 細胞に移入し、インプリント遺伝子の発現パターン、メチル化状態を検討し、制御機構を明らかにしていく。

C. インプリンティングセンターの同定

ヒト 11 番染色体を保持している DT40 細胞 (DT40neo11) に、ヒト H19 遺伝子 5'側上流のインプリント制御センターと考えられる領域を薬剤耐性遺伝子と置き換えたコンストラクトを導入することによって相同組み換えを起こさせ、その後別の細胞株に導入に成功し、現在改変した領域の機能の解析を行っている。また、今後改変染色体を生殖細胞を経由させることによって、インプリンティングの消去と再獲得に障害が生じるか否かを検索する系として、*in vivo* において保持させる ES 細胞を作製しつつある。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○Mitsuya, K., Meguro, M., Sui, H., Schulz, T.C., Kugoh, H., Hamada, H. and Oshimura, M. Developmental reprogramming of the human H19 gene in

mouse embryonic cells does not erase the primary parental imprint. *Genes to Cells*, 3: 245-255, 1998

○押村光雄 「遺伝子の集合体（染色体）改変」 *組織培養工学*, 24:534, 1998

○中山祐二、上島宗之、押村光雄 「染色体工学を用いた細胞老化遺伝子の探索」
組織培養工学, 24: 535-539, 1998

○野津智美、押村光雄「ニワトリ B 前駆細胞株 DT40 を用いた染色体改変」*組織培養工学*, 24: 549-552, 1998

○Uejima, H., Shinohara, T., Nakayama, Y., Kugoh, H. and Oshimura, M. Mapping a novel cellular senescence gene to human chromosome 2q37 via irradiation microcell-mediated chromosome transfer. *Mol. Carcinogen.*, 22: 34-45, 1998

○Tanaka, H., Shimizu, M., Horikawa, I., Kugoh, H., Yokota, J., Barrett, J.C. and Oshimura, M. Evidence for a putative telomerase repressor gene on the 3p14.2-p21.1 region. *Genes, Chrom. & Cancer*, 23: 123-133, 1998

○Lee, M.P., DeBaun, M.R., Mitsuya, K., Galonek, H.L., Brandenburg, S., Oshimura, M. and Feinberg, A.P. Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KvLQT1, occurs frequently in Bechwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 5203-5208, 1999