

「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（ゲノム刷り込み現象）とは、父親と母親由来の遺伝子が異なる発現レベルを示す現象であり、どのようなメカニズムでこの現象が制御されているのかを知ることは、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、インプリンティングの異常は発生異常やがんの発生に深く関わりをもつため、新規の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疾患の原因解明や治療法の開発にきわめて重要である。我々は、新しく確立したインプリンティング解析システムにより、過成長症候群の原因遺伝子であるLIT1を単離し、さらにLIT1が近傍の刷り込み状態を規定するインプリンティングセンターとして機能することを明らかにしてきた。今後は、これらの解析システムを用いゲノムインプリンティングの生物学的意義やその制御機構を明らかにしていきたい。

2. 研究実施内容

(1) ゲノム刷り込みを受けるヒト遺伝子の単離

A) 親由来の明らかなヒト染色体1本を保持するマウス細胞の作製

ヒト刷り込み現象の解析システムを確立することを目的とし、染色体移入法を用い親由来の明らかなヒト染色体1本を保持するマウス細胞の作製を進めてきた。現在まで、1番、2番、4番、5番、6番、7番、8番、10番、11番、14番、15番、18番、19番、20番、21番、X染色体の16種のヒト染色体を保持するマウス細胞を作製した。さらに多型解析の結果、1番、5番、6番、7番、10番、11番、14番、15番、18番、19番の10種の染色体については、父親と母親由来の染色体を各々保持するマウス細胞が得られた（表1）。将来的には、Y染色体を除く22の染色体すべてについて、父親と母親のヒト染色体を保持するマウス細胞のパネルを完成させる。

B) 新規のヒトインプリント遺伝子の体系的探索

新規の刷り込みを受ける遺伝子（インプリント遺伝子）の単離は、ヒト疾患の原因遺伝子の解明だけでなく、ゲノムインプリンティングの制御機構を明ら

かにする上でも、きわめて重要であると考えられる。現在まで、得られた雑種細胞を用い6q24, 7q32, 11p15, 14q32, 15q11-q13領域などの刷り込み候補領域に存在する計2,000以上のEST (expressed sequence tag) について、インプリント遺伝子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からのみ発現が検出される計18種のESTを同定することに成功した(図1)。これらの領域はすべて遺伝性疾患の発症に深く関与することが知られており、現在、その発症機序との関連を検討している。後述するように、これらのうちヒト11p15に位置する新規の刷り込み遺伝子LIT1は過成長症候群であるBeckwith-Wiedemann症候群(BWS)の原因遺伝子座であり、周囲の遺伝子群の刷り込み状態を規定するインプリンティングセンター(IC)としての機能を有することを明らかにした。このように、親由来の明らかなヒト染色体1本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体系的探索を容易に行うことが可能となった。

C) Beckwith-Wiedemann症候群(BWS)の原因遺伝子座LIT1の同定

得られた候補のうち、11p15領域に位置するLIT1については、Beckwith-Wiedemann症候群(BWS)の染色体転座点に位置する新規のインプリント遺伝子であり、BWSの主要な原因遺伝子座であることを明らかにした。LIT1は400 kbを越える巨大なKvLQT1遺伝子の10番目のイントロンから転写される antisense transcriptであり、KvLQT1が不整脈を主徴とする特発性QT延長症候群(long QT syndrome)の原因遺伝子であることから、我々はこの遺伝子座をLIT1 (long QT intronic transcript 1) と命名した(図2)。KvLQT1は主に母方から発現されるのに対し、LIT1は逆の父性発現を呈する。さらに、LIT1の5'領域に位置するCpGアイランドは不活性な母方特異的なメチル化を受けることを明らかにした。また、BWS患者におけるLIT1 CpGアイランドのメチル化状態を検討したところ、49例中25例(51%)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の主要な責任遺伝子座であると考えられた。また、LIT1はBWSの染色体転座点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示唆され、後述するように、ニワトリDT40細胞を用いたヒト遺伝子のターゲティングを行ったところ、LIT1が近傍に存在するインプリント遺伝子群の刷り込みに必須であることが明らかとなった。これらの結果は、刷り込み遺伝子群が染色体ドメインレベルで発現制御を受けることを示すきわめて興味深い知見であると考えられる。

(2) ゲノム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ことが示唆されているが、胎盤哺乳類と同様の刷

り込み制御機構が非胎盤哺乳類で保存されているか否かについては明らかにされていない。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), FM7 (インドホエジカ), PTK1 (ラットカンガルー), 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について検討を行った。胎盤哺乳類に由来する細胞株A9, m5S, BP6T, FM7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、非胎盤哺乳類であるPTK1 (有袋類), DT40 (鳥類) 細胞においては母方と同様の発現が検出された。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、父方のH19遺伝子は再度可逆的に不活性化していた。一方、これらすべての細胞において、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。これらの知見は、「ヒト染色体上の親由来の情報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胎盤哺乳類と非胎盤哺乳類では異なり、少なくともヒトの刷り込みは非胎盤哺乳類においては機能しない」ことを示唆している。

(3) インプリンティングセンター (IC) の同定

A) ニワトリDT40細胞を用いたヒトLIT1 CpGアイランド領域のターゲティング

インプリンティングドメイン制御におけるLIT1の機能を明らかにすることを目的として、ヒト11番染色体上のLIT1 CpGアイランド領域を欠失した改変染色体を作製し、LIT1および近傍に位置するインプリント遺伝子の発現パターンについて検討を行った。まず、高頻度にターゲットインテグレーションが誘導されるニワトリDT40細胞に父方あるいは母方のヒト11番染色体を移入し、CpGアイランド領域を選択マーカー puroで置換したターゲティングベクターを構築し、父方のヒト11番染色体を保持するDT40細胞へ導入した。約20%の頻度で相同組換えによりCpGアイランドが欠失したクローンを得ることに成功した (図3)。さらに、この改変染色体をCHO (チャイニーズハムスター) 細胞に回収し、LIT1近傍に位置し母性発現を呈するインプリント遺伝子KvLQT1, SMS4, p57KIP2について刷り込み状態を検討した結果、父方の改変ヒト染色体上からの発現が検出され、転写抑制が解除されることが明らかとなった。これらの結果から、LIT1 CpGアイランドは少なくともLIT1, KvLQT1, SMS4, p57KIP2の4つのインプリント遺伝子の刷り込みに必須であり、インプリンティングセンター (IC) として機能することが明らかとなった。このように、ニワトリDT40細胞を用いたヒト染色体改変技術は、染色体ドメインレベルにおける遺伝子発現の制御機構を解明するためにきわめて有用であると考えられ、現在、このCpGアイランド領域に結合する機能分子の同定を進めており、その生物学的意義を

明らかにしたい。

B) H19遺伝子上流に位置し父方特異的にメチル化を受ける反復配列の機能解析

現在まで、多くの刷り込み遺伝子にユニークな反復配列が存在し、親由来に特異的なメチル化を受けることが明らかにされてきたが、反復配列の生物学的意義は明らかにされていない。そこで、DT40細胞を用いヒトH19遺伝子5'側上流のインプリンティングセンターとして機能すると考えられる反復配列を除去した改変ヒト染色体を作製した(図4)。現在、Cre/loxPシステムによりヒト染色体断片がマウス染色体上に転座したキメラマウスの作製を進めており、このようなヒト染色体改変技術による反復配列の機能解析を試みている。

(4) インプリンティング異常の発がんにおける役割と個体差に関する研究

A) 大腸がんにおけるインプリンティング異常とゲノム不安定性

とりわけ大腸がんにおいて、ゲノム不安定性(microsatellite instability)が腫瘍の発生にきわめて重要な要因となっていることが明らかとなってきた。我々は、インプリンティング異常がゲノム不安定性に起因する可能性を検証することを目的として、ゲノム不安定性を示す症例と示さない症例のそれぞれについて、複数のインプリント遺伝子のインプリンティング異常の頻度についての検討を行った。その結果、インプリンティング異常はある特定の遺伝子に限られること、さらに、ゲノム不安定性の認められる症例により高頻度にインプリンティング異常が検出されることが明らかとなり、ゲノム不安定性とインプリンティング異常に密接な関連があることが示唆された。また、IGF2遺伝子についてはがんにおいてインプリンティング異常が認められる例では、その正常組織においてもインプリンティング異常が認められ、発がんの素因を考える上で興味深い知見であると考えられた。

B) インプリンティング異常と個体差

大腸がんとその正常組織におけるインプリンティング異常の解析結果は、IGF2のインプリンティング異常ががんに対する感受性を遺伝的に規定している可能性を示唆している。そこで、我々はIGF2の発現パターンに個体差が認められるかどうかを検証することを目的として、計50家系200個体以上の正常集団について、IGF2を含めた複数のインプリント遺伝子の発現パターンの解析を進めている。現在まで大規模な正常集団におけるインプリント遺伝子の発現パターンの個人差についての検討例はなく、がん発生の感受性の解明に貢献するものと期待される。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

- Lee, M.P., DeBaun, M.R., Mitsuya, K., Galonek, H.L., Brandenburg, S., Oshimura, M., Feinberg, A.P. Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense

- orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 5203-5208, 1999
- Mitsuya, K., Meguro, M., Lee, M.P., Katoh, M., Schulz, T.C., Kugoh, H., Yoshida, M.A., Niikawa, N., Feinberg, A.P., Oshimura, M. LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 1209-1217, 1999
- Kugoh, H., Mitsuya, K., Meguro, M., Shigenami, K., Schulz, T.C., Oshimura, M. Mouse A9 cells containing single human chromosomes for analysis of genomic imprinting. *DNA Res.*, 6, 165-172, 1999
- Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Sato, K., Oshimura, M., Ishida, I. Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 722-727, 2000
- Sasaki, M., Dahiya, R., Fujimoto, S., Ishikawa, M., Oshimura, M. The expansion of the CAG repeat in exon 1 of the human androgen receptor gene is associated with uterine endometrial carcinoma. *Mol. Carcinog.*, 27, 237-244, 2000

表 1. 親由来の明らかなヒト染色体 1 本を保持するマウス細胞

ヒト染色体	ハイブリッド細胞	親由来	標識部位
#1	A9(neo1P)-1	Paternal	ND
	A9(bsr1M)-1	Maternal	1p36.3
#2	A9(bsr2M)-1	Maternal	2p22
	A9(bsr2M)-2	Maternal	2q35
#4	A9(bsr4P)-1	Paternal	4p13
	A9(bsr4P)-2	Paternal	4q23-q24
#5	A9(bsr5P)-1	Paternal	5q34
	A9(bsr5M)-1	Maternal	5q14
#6	A9(neo6P)-1	Paternal	ND
	A9(neo6P)-2	Paternal	ND
	A9(neo6M)-1	Maternal	ND
	A9(neo6M)-2	Maternal	ND
#7	A9(bsr7P)-1	Paternal	7q22
	A9(bsr7P)-2	Paternal	7q21.2-q21.3
	A9(bsr7P)-3	Paternal	7q32
	A9(bsr7M)-1	Maternal	ND
#8	A9(bsr8M)-1	Maternal	8p22
	A9(bsr8M)-2	Maternal	8q24.3
	A9(bsr8M)-3	Maternal	8q23.3
#10	A9(bsr10P)-1	Paternal	10q22
	A9(bsr10P)-2	Paternal	10q21.2-q21.3
	A9(bsr10M)-1	Maternal	10q15.3
#11	A9(bsr11P)-1	Paternal	11q25
	A9(bsr11P)-2	Paternal	11q22.3-q23.2
	A9(bsr11M)-1	Maternal	11q14.3-q22.2
#14	A9(neo14P)-1	Paternal	ND
	A9(neo14M)-1	Maternal	ND
#15	A9(bsr15P)-1	Paternal	15q21.3-q22.2
	A9(bsr15M)-1	Maternal	ND
#18	A9(neo18P)-1	Paternal	ND
	A9(bsr18M)-1	Maternal	ND
#19	A9(neo19P)-1	Paternal	ND
	A9(neo19M)-1	Maternal	ND
#20	A9(bsr20P)-1	Paternal	20q11.23-q12
#21	A9(neo21M)-1	Maternal	21q22.2
#X	A9(bsrXM)-1	Maternal	Xp11.2

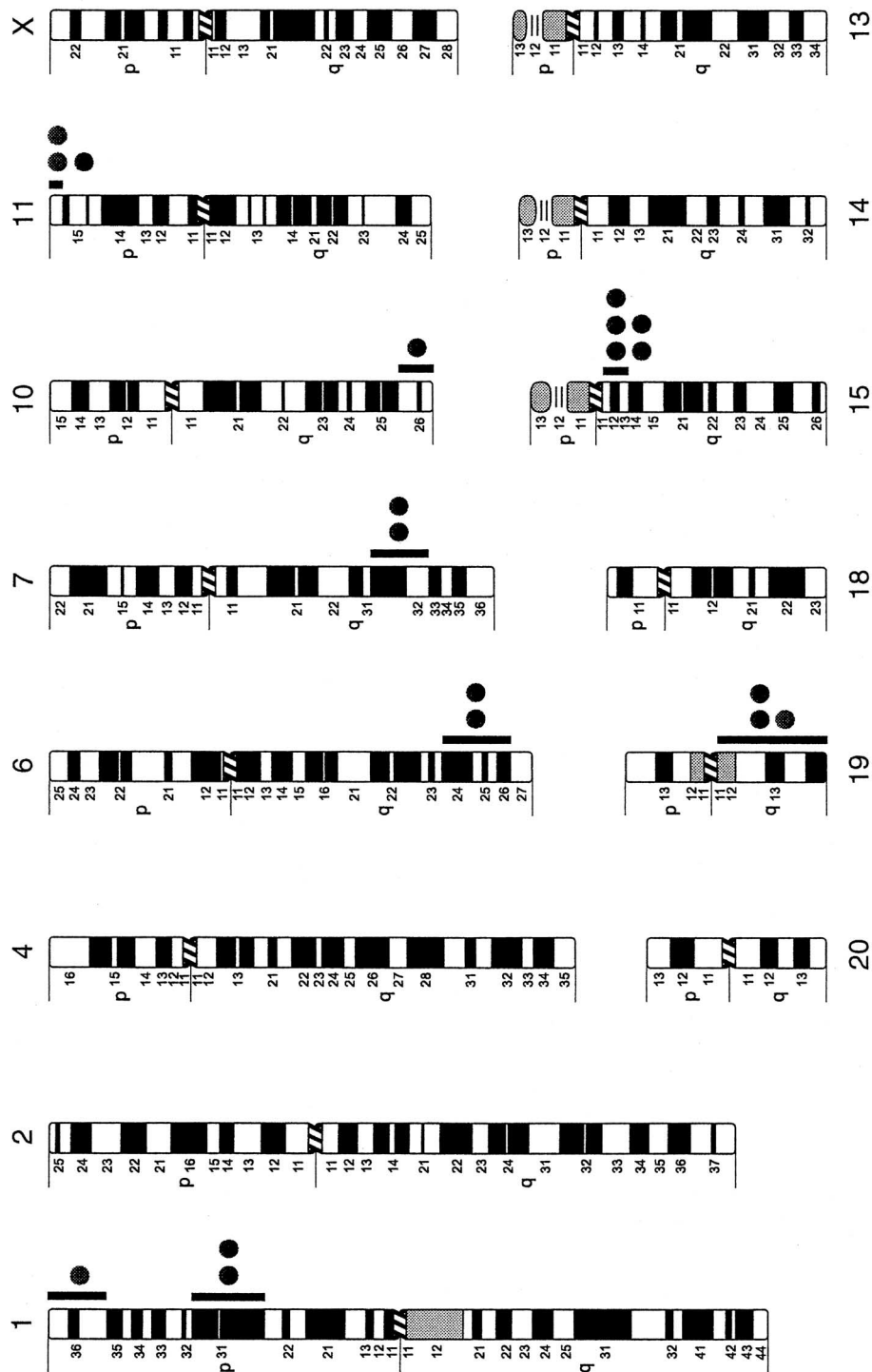


図1. 刷り込みを受けるヒト染色体領域。
 親由来の明らかなヒト染色体1本を保持するマウス細胞を用いたスクリーニングにより、得られた刷り込み候補遺伝子 (新規のインプリント遺伝子も含む) を●で示す。

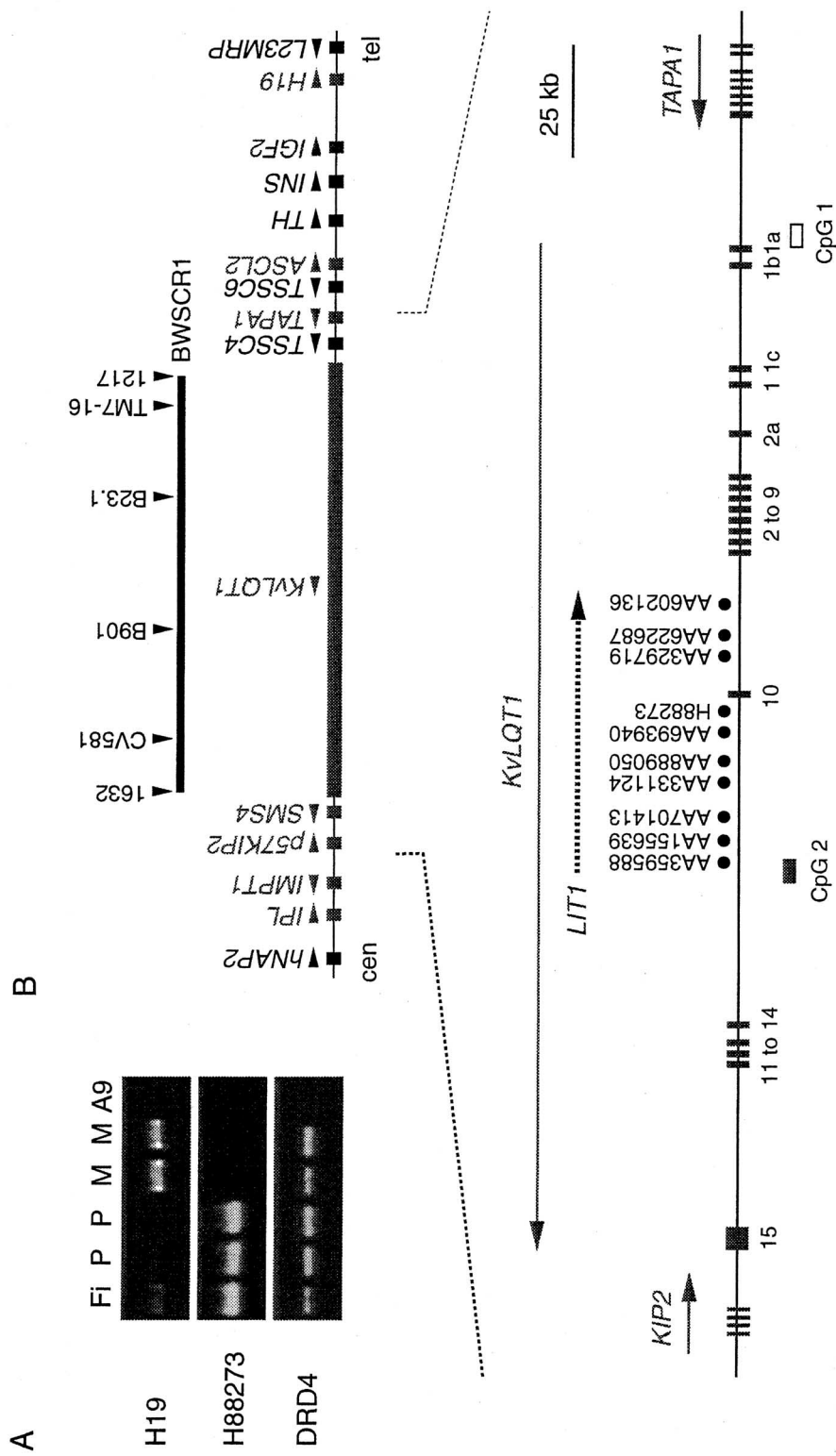


図2. BWSの責任遺伝子座LIT1の同定。
 (A) 父方あるいは母方のヒト染色体からのみ発現が検出されるESTの同定. LIT1に対応するH88273が父方のヒト染色体からのみ転写されることが分かる。
 (B) ヒト11番染色体上のインプリンティングドメイン. LIT1はKvLQT1遺伝子座から転写されるantisense transcriptであり, KvLQT1とは逆の父性発現を呈する。

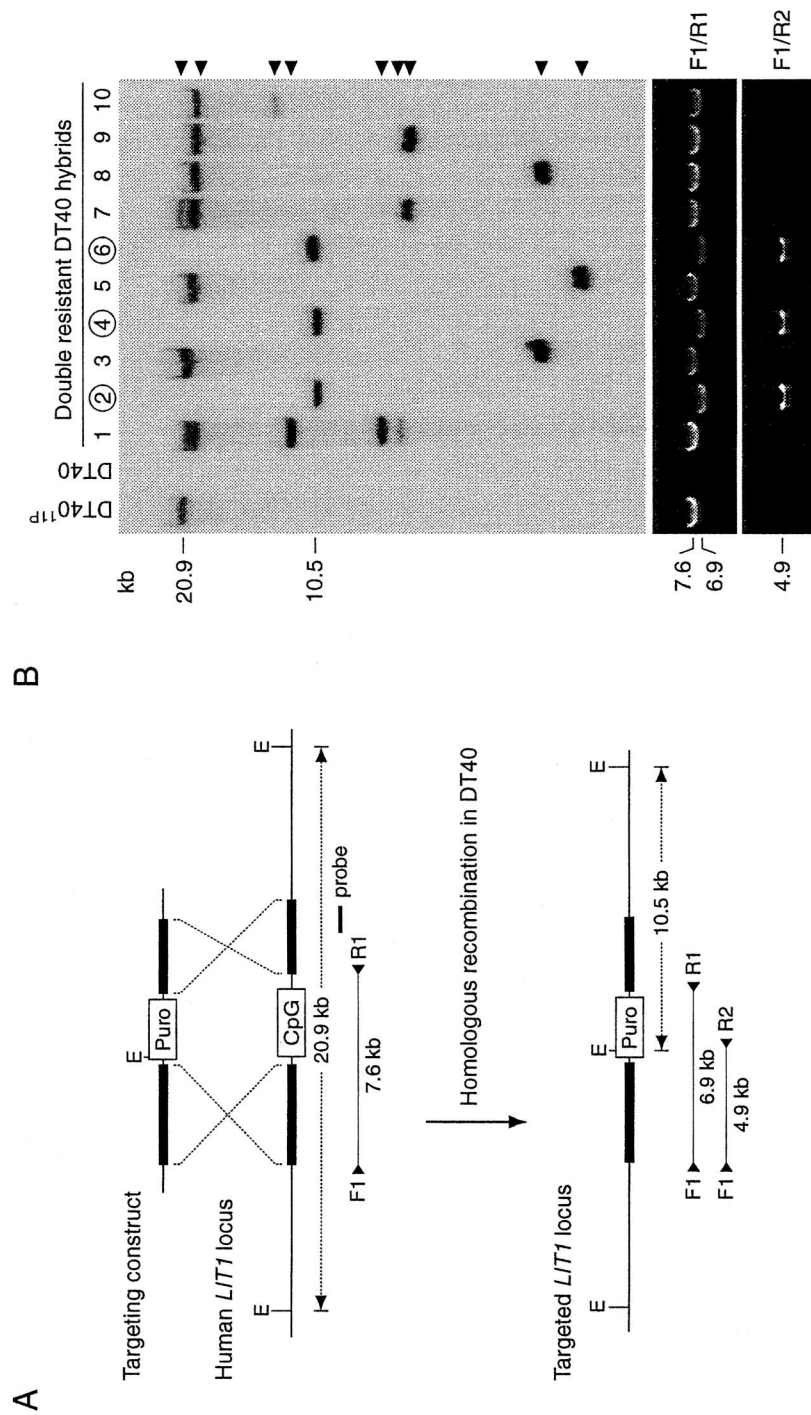


図3. ニワトリDT40細胞を用いたヒト遺伝子領域のターゲティング。
 (A) ポジティブセレクションによるヒトLIT1 CpGアイランド領域のターゲティング. CpGアイランド領域を欠失した改変ヒト染色体を得るために, CpGアイランド領域を薬剤耐性遺伝子に置き換えたコンストラクトを, ヒト11番染色体を保持するDT40細胞に導入した.
 (B) 薬剤耐性クローニングのサザンブロットおよびPCR解析. 約21%の頻度で目的領域を欠失した改変ヒト染色体(○)を得た.

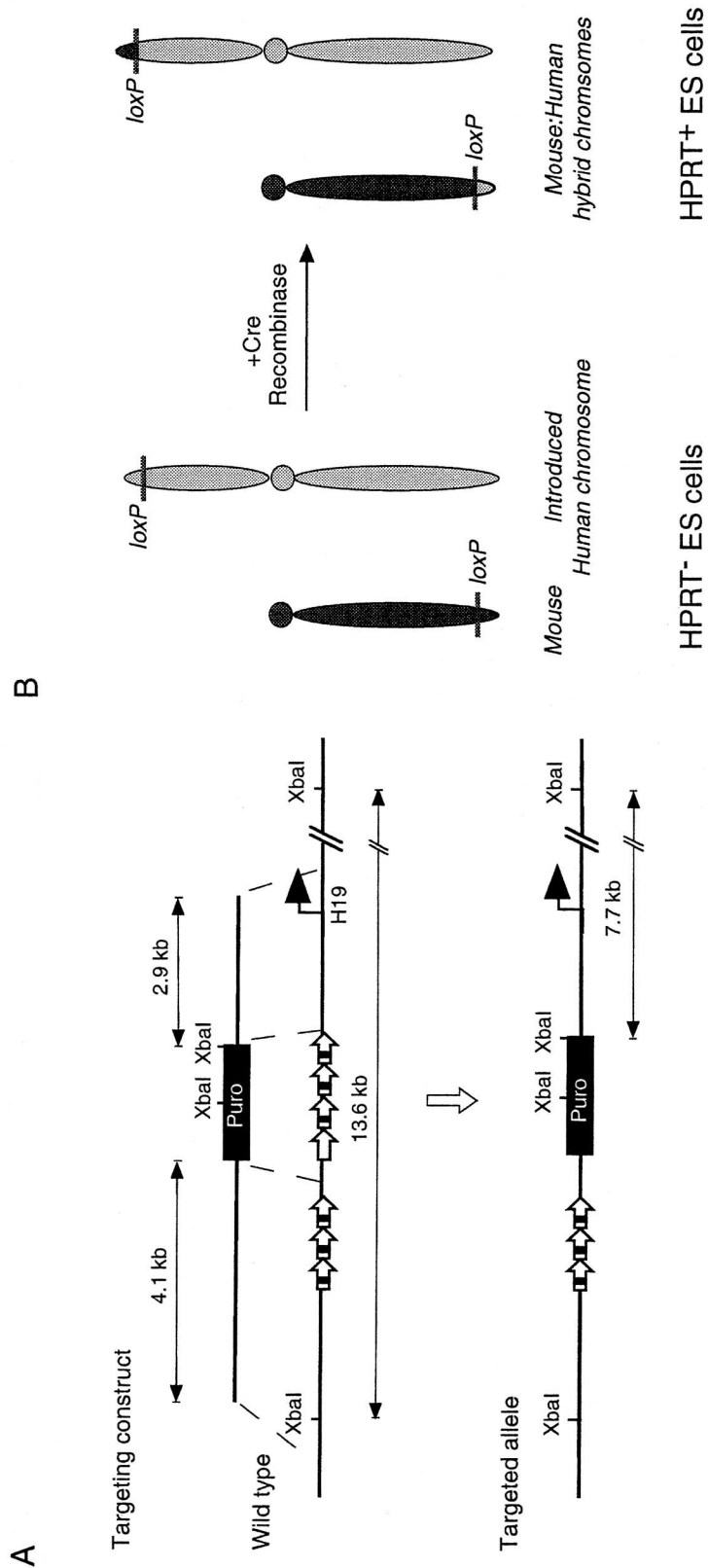


図4. ニワトリDT40細胞を用いた転座型のヒト染色体断片を保持するマウスES細胞の作製。
 (A) DT40細胞を用いたヒトH19遺伝子の上流に存在する反復配列のターゲティング。反復配列のクラスター領域を薬剤耐性遺伝子に置換したターゲティングコンストラクトをヒト染色体を保持するDT40細胞に導入し、改変ヒト染色体を得た。
 (B) Cre/loxPシステムを用いた転座型のヒト染色体断片を保持するマウスES細胞の作製。
 ヒトとマウスのそれぞれの染色体領域にloxP配列を挿入後、Creを導入することにより安定に保持される転座型のヒト染色体断片を保持するマウスES細胞を得ることができる。