

「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。これまでに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を同定し、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。今年度はヒト15番染色体上に2つの新規インプリント遺伝子を同定し、それらの機能と疾病との関わりについて解析した。また、インプリント遺伝子の発現異常とがん化との関係について検索したところ、肺癌においてIGF2とMEST遺伝子のLOIが、グリオーマにおいてPEG3遺伝子のGOIが高頻度に認められた。

### 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

##### 1) ヒト15番染色体Prader-Willi症候群候補領域に位置する父性発現遺伝子の同定

父方あるいは母方のヒト15番染色体1本を保持するマウス細胞を用い、15q11-q13領域に位置する計131のESTについて、親由来により異なる発現を示す遺伝子のスクリーニングを行った結果、父方染色体からのみ発現が検出される9クローンを同定した。それらの1つについては多型解析により、実際にヒト正常体細胞において父性発現を呈することを確認した。これらのクローンいずれにおいても明確なORFは認められず、多くはRNAとして機能すると考えられ、父方染色体をde novoメチル化から保護するなどの役割を担っている可能性がある。

次に、15q11-q13領域をカバーするYACあるいはコスミドクローンをを用い、

刷り込み候補ESTの詳細なマッピングを行った。その結果、SNRPN-IPW間に位置するEST H88273は、それぞれ20kbを超える2つの大きな反復配列クラスター内に位置していることが明らかとなった。この反復配列クラスターは、哺乳類において広く保存されており、また、父方染色体がヌクレアーゼ高感受性を示すオープンなクロマチン構造をとっていることを見いだした。さらに詳細な解析の結果、これら2つの反復配列クラスターに共通な98bpのコンセンサス配列を見いだした。このコンセンサス配列は反復配列クラスター内に24個存在しているが、その全てに、ボックスC/D型 snoRNAと呼ばれる低分子核小体RNA (small nucleolar RNA) に特徴的なC, D, D' エLEMENTが認められることから、この反復配列クラスターは、少なくとも24のsnoRNA遺伝子群により構成されていることが示唆された。これらのsnoRNAはPWSの発症に関与している可能性が考えられる。

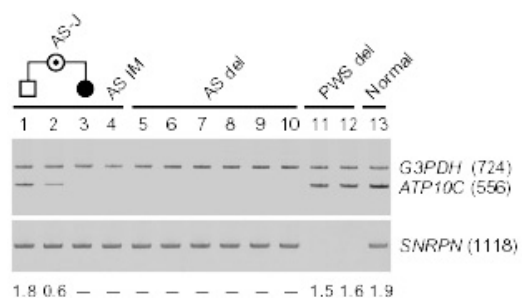
## 2) Angelman症候群欠失領域に位置する新規の母性発現遺伝子ATP10Cの同定

ORFが見いだされた15q11-q13領域に位置するESTについて、YACを用いたマッピングを行った結果、AS欠失領域に位置する新規の遺伝子をもつ同定した。データベースサーチにより、その遺伝子は、P-type ATPaseの一つであるATP10Cであることが明らかとなった。また最近、肥満マウスの原因候補遺伝子として単離されたpfatpが、ATP10Cのマウスホモログであることも明らかとなった。

ASは主に神経症状を呈する疾患であり、さらに、これまで原因遺伝子であると考えられているUBE3A遺伝子は、脳でのみ刷り込み発現を呈することから、我々はまず、3'非翻訳領域に位置するSNPを用い、脳組織におけるアレル特異的発現を検討した。その結果、アレル間の発現量に著しい偏りが見いだされ、刷り込みを受けている可能性が示唆された。そして、多型解析の可能なリンパ芽球細胞を用い、発現しているアレルの親由来を解析した結果、ATP10Cは母性発現を呈することが明らかとなった。

さらに、刷り込み変異例2例を含む計8例のAS患者におけるATP10Cの発現量をRT-PCR法により解析した。PWS患者においてはATP10Cの発現量に変化が認められなかったのに対し、欠失例および刷り込み変異例いずれのAS患者においても、健常人に比較しATP10Cの著しい発現低下が認められた(図1)。以上より、ATP10Cは母性発現の刷り込み遺伝子であり、AS発

図 1



症に關与する可能性が強く示唆された。

(B) ゲノムインプリンティング制御機構の解析

1) 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

ヒトH19遺伝子5'側上流にある反復配列はマウス、ラット及びヒトで相同性のあるCTCF結合領域を含み、母親由来に特異的なDNaseI高感受性領域であることが知られている。これらの事からこの反復配列はICであると考えられている。この領域をpuromycin耐性遺伝子で置き換えたコンストラクトを構築し、ヒト11番染色体を保持するDT40細胞に導入した。DT40細胞内での相同組み換えにより得られた、反復配列を欠失したヒト染色体をCHO細胞及びP19細胞に導入した。このP19細胞を分化させ、H19遺伝子の発現を調べ、未分化状態と比較することで、ヒトH19遺伝子のインプリンティングに必要な領域を探る。また、改変染色体を導入されたES細胞を用いてキメラマウスを作成し、生殖細胞を経由させることによってこの反復配列のインプリンティングの消去と獲得に対する役割を検討する。

(C) インプリンティングセンター (IC) の同定

1) ヒトLIT1遺伝子CpGアイランドの機能解析

ヒトLIT1遺伝子に存在するCpGアイランドはLIT1、KvLQT1、SMS4の刷り込みに必須である事が相同組み換えによる欠失実験によって示されたが、その刷り込み機構における役割は明らかではない。しかしこのCpGアイランドは親由来特異的にメチル化状態が違ふことから、このメチル化の違いを認識し遺伝子刷り込みに対して何らかの關与をしている因子の存在が期待される。またヒトLIT1遺伝子の転写開始点の決定は為されていないが、刷り込み遺伝子に限らず多くの遺伝子でCpGアイランドがプロモーター領域である事を考えると、このCpGアイランドがLIT1遺伝子のプロモーターとして働いているのではないかと考えられた。そこでCpG islandを含む数種類のDNA断片をPCRで増幅し、ルシフェラーゼ遺伝子を持つレポータープラスミドにサブクローンした。培養細胞に導入してルシフェラーゼ活性を測定したところ、CpG island内の228bpの領域に強いプロモーター活性があった。他にも様々なコンストラクトを作製し解析したところ、このCpG island内にはエンハンサー活性を持つ領域はないと思われた。また、塩基配列よりCTCF結合領域と相同性のある部位を用いてinsulator活性を測定したが明確な活性は確認できなかった。

2) ヒト11p15.5領域のゲノム刷り込み制御機構の解明

H19遺伝子上流のICを、LIT1 CpGアイランドをノックアウトした領域に組み込むために図に示したH19 ICR Insertion constructを構築し、LIT1 CpGアイラ

ンドをロックアウトした11番染色体を保持するDT40細胞にトランスフェクションした。Insertion constructの構築においては、インスレーターとして機能することが示されたCTCFと呼ばれるzinc finger タンパクの結合サイトを含む約2.2kbのマウスH19 IC領域と優勢選択マーカーとしてPGKneoを含むようにデザインした。相同組み換え体の確認には、サザンブロット解析およびPCR解析を行った。その結果、60クローンの薬剤耐性クローン中3クローンが相同組み換え体であることを確認した。さらに今後、この改変染色体をチャイニーズハムスター細胞(CHO)に微小核細胞融合法を用いて導入し、H19 ICRがLIT1 CpGアイランド領域で周囲の刷り込み遺伝子にどのように影響を与えるかRT-PCR法により検討する。本研究は、LIT1 CpGアイランド周辺遺伝子の制御機構の解明のみならず、様々な染色体座で同定されている各々のICの類似性や保存性を確かめる上で重要であると考えられる。

#### (D) 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

##### 1) ヒトグリオーマ細胞株におけるPEG3のエピジェネティックな発現抑制

マウス7番染色体近位部はインプリント遺伝子群のクラスターが存在するインプリントドメインである。その相同領域であるヒト染色体19q13.4はグリオーマにおいてヘテロ接合性の消失が多数報告されている興味深い領域であるが、ゲノム刷り込み状態については明らかにされていない。この領域のゲノム刷り込み状態の体系的解析を目的として、親由来の明らかなヒト19番染色体を保持するマウス雑種細胞を資材に、アレル特異的発現、およびDNAメチル化領域について検討した。その結果、マウスにおいて刷り込みを受けることが知られている遺伝子Peg3 (paternally expressed gene 3)のヒト相同遺伝子が雑種細胞内で父方特異的に発現し、エクソン1を含むCpGアイランドが母方特異的なメチル化を受けることを明らかにした。後述するように、PEG3がヒト正常脳組織において片アレル性発現を示すことも確認しており、マウス同様刷り込みを受ける可能性を示唆した。さらに、グリオーマにおいてPEG3の発現が減少、消失しているという知見から、PEG3のアレル特異的発現及びメチル化状態を正常脳組織とグリオーマ細胞株で比較、検討した。正常脳組織(2例)と調べた9例中5例のグリオーマ細胞株については片アレル性発現を示し、アレル間でメチル化に差異が認められたが、残りの4例では異常なメチル化による発現の消失が認められた。

##### 2) 肺腺がんにおける刷り込み遺伝子IGF2およびMESTの発現異常

刷り込み遺伝子IGF2の発現異常、特に刷り込み喪失による両アレル性の遺伝子発現が多量の腫瘍組織において報告されている。しかしその他の刷り込み遺伝子について腫瘍との関連を検討した例は少ない。そこで本研究では35例の肺



腺がん症例を対象とし、がん部および非がん部において6種の刷り込み遺伝子に関して対立アレルの発現状態を検索した。IGF2およびMESTについては、多型を示した症例の非がん部組織で片アレル性発現が維持されていたのに対し、がん部ではそれぞれ47%（15例中7例）および85%（13例中11例）において両アレル性発現が認められた。IGF2の両アレル性発現は低分化型および中分化型腺がんで高頻度に認められる傾向があった。これに対し残る4種の刷り込み遺伝子H19、SNRPN、NDN、LIT1では、がん部においても片アレル性発現が維持されていた。これらの結果から、肺腺がんでは特定の刷り込み遺伝子についてのみ発現異常が起きていること、IGF2およびMESTの刷り込み喪失が発がんに関与することが示唆された。

### 3) 健常人末梢血液細胞での刷り込み遺伝子発現に関する研究

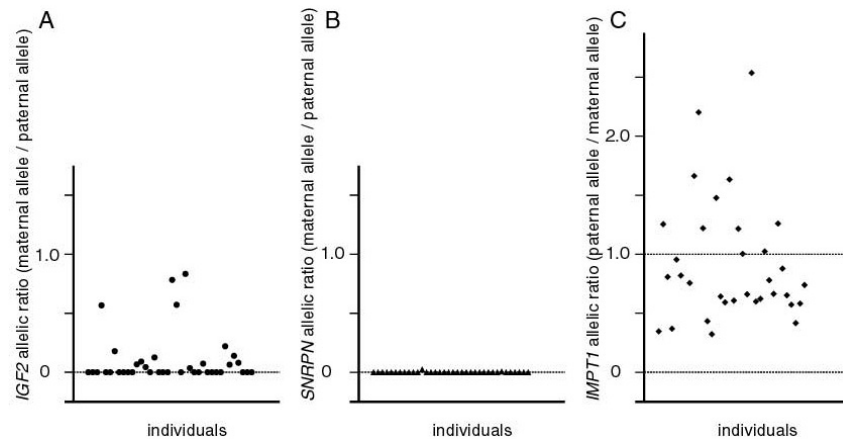
健常人における刷り込み遺伝子の発現状態のコントロールサーベイを目的として、末梢血液細胞における3種の刷り込み遺伝子のアレル発現を検索した。genomic DNAの解析の結果、IGF2, SNRPN, IMPT1のそれぞれに対して、38例、36例、34例の親由来の明らかなアレルを有する子供が選ばれた。これらを用いてアレル特異的な遺伝子発現の解析を行った。

IGF2に関する解析では、38例中4例（10.5%）で本来不活性であるはずの母親由来アレルが強く発現していた。解析できる子供が同一家系に2人いた一家系では、一方の子供が両アレル発現を示したのに対し、もう一方の子供では父親由来のアレルのみの発現であった。他の3例については、同一家系内に親由来の明らかなアレルを有する子供はいなかった。また両アレル発現を示す子供の親についても同様の検討を行ったが、両アレル発現を示すものはなかった。以上より、今回解析を行った限りでは、IGF2のアレル発現の多型にgenetic traitはなかった。

SNRPNに関する解析では、ほぼ全例において父親由来アレルのみの発現であり、厳密に刷り込みが保たれていることが明らかとなった。

IMPT1に関する解析では、本来不活性であるはずの父親由来のアレル発現が全例でみられ、約25%では父親由来アレルの発現が母親由来アレルの発現よりも強かった。（図2）のように刷り込み状態にかなりのばらつきがみられた。人種による違いの有無を検討するために米国人でも同様のことを行った。ここでもやはり、個体による刷り込み状態の差がみられた。その個体差が経時的に維持されているかどうかを検討するため、初めの採血から6ヶ月後に再び採血を行い、同様の解析を行ったが、allelic ratioは、個人にほぼ固有のものであった。日本人においても経時的变化の有無を調べたが、allelic ratioはほぼ個人特有のものであった。

図 2



以上より、刷り込み遺伝子の刷り込み状態には、健常人においても個体差がみられること、また刷り込み遺伝子によっては、刷り込み状態が厳密に保たれているものや、ばらつきのみられるものがあることが明らかとなった。IGF2は腫瘍発生に関与することや、IMPT1はコードする蛋白がbacteriaで過剰発現した時にキニジンやクロロキンに抵抗性を示すとの報告もあることから、今回の検討では生物学的背景にまでは言及できなかったが、刷り込み状態の個体差に何らかの意味があるのではないかと考えられた。

### 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Sato, K., Oshimura, M. and Ishida, I. : Double trans-chromosomic 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

Kuroiwa, Y., Tomizuka, K., Shinohara, T., Kazuki, Y., Yoshida, H., Ohguma, A., Yamamoto, T., Tanaka, S., Oshimura, M. and Ishida, I.: Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts. Nat. Biotechnol., 18 : 1086-1090, 2000

Nishihara, S., Hayashida, T., Mitsuya, K., Schulz, T.C., Ikeguchi, M., Kaibara, N. and Oshimura, M. : Multipoint imprinting analysis in sporadic colorectal cancers with and without micorsatellite instability. International Journal of Oncology, 17: 317-322, 2000

Horike, S., Mitsuya, K., Meguro, M., Kotobuki, N., Kashiwagi, A., Notsu, T., Schulz, T.C., Shirayoshi, Y. and Oshimura, M. : Targeted disruption of the human LIT 1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential

role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Human Molecular Genetics*, 9 : 2075-7083, 2000

Engel, J.R., Smallwood, A., Harper, A., Higgins, M.J., Oshimura, M., Reik, W., Schofield, P.N. and Maher, E.R. : Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J. Med. Genet.*, 37: 921-926, 2000

Arima, T., Drewell, R.A., Oshimura, M., Wake, N. and Surani, A.: A novel imprinted gene, HYMAI, is located within an imprinted domain of human chromosome 6 containing ZAC. *Genomics*, 67 : 248-255, 2000

Inoue, J., Mitsuya, K., Maegawa, S., Kugoh, H., Kadota, M., Shinohara, T., Nishihara, S., Takehara, S., Yamauchi, K., Schulz, T.C. and Oshimura, M. : Construction of 700 human/mouse A9 monochromosomal hybrids and analysis of imprinted genes on human chromosome 6. *J. Hum. Genet.*, 46: 137-145, 2001

Tanaka K, Shiota G, Meguro M, Mitsuya K, Oshimura M, Kawasaki H. : Loss of imprinting of long qt intronic transcript 1 in colorectal cancer. *Oncology*, 60: 268-273, 2001

Meguro M, Kashiwagi A, Mitsuya K, Nakao M, Kondo I, Saitoh S, Oshimura M.: A novel maternally expressed gene, ATP10C, encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. *Nat Genet.*, 28 : 19-20, 2001