

ゲノムインプリンティングがかかわる疾患
ならびにゲノム解析

課題番号 H10-ゲノム-024

平成10年度厚生科学研究費
ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業報告書

平成11年4月
研究代表者 向井常博
(佐賀医科大学医学部教授)

ゲノムインプリンティングがかかわる疾患 ならびにゲノム解析

向井常博 (佐賀医科大学生化学講座・教授)

Beckwith-Wiedemann 症候群の原因遺伝子をさらに探るために新規遺伝子の探索を行った結果、いくつかの遺伝子を同定し、インプリンティングの有無を明らかにした。さらに、この疾患ならびにインプリンティングの機構を塩基配列レベルで理解するために、ヒト 11p15.5 に対応するマウス 7F4/F5 領域のインプリンティング領域を完全にクローン化し、得られた BAC クロームを用いてシーケンスを開始した。父性発現インプリンティング遺伝子 *Peg1/Mest* は、マウスを用いた分子生物学的解析からヒト Silver-Russell 症候群 (SRS) の原因遺伝子の最有力候補であることが示された。ヒトの SRS の原因遺伝子の証明のために変異検索を行った。また、インスリン依存性糖尿病 (IDDM) 患者脾臓培養上清より RT-PCR で単離された IDDMK1,2-22 に対応すると考えられる核内遺伝子を単離した。

【研究組織】

- 向井 常博 (佐賀医科大学医学部生化学講座・教授)
- 佐々木裕之 (国立遺伝学研究所人類遺伝部門・教授)
- 陣野 吉広 (琉球大学医学部沖縄・アジア医学研究センター・教授)
- 石野 史敏 (東京工業大学遺伝子実験施設・助教授)

A. 研究目的

ゲノムインプリンティングは非メンデル遺伝を示す現象として新しく発見された遺伝現象である。その破綻により、発育障害や過成長を来す疾患、神経病、糖尿病のほか、種々の腫瘍、また、未同定の疾患が発症する。これらの疾患は一部その責任遺伝子も特定されつつあるが、メカニズムを始めまだ未解明の部分がほとんどである。ここではゲノムインプリンティングが関与するヒト疾患に関する研究を行う。そのために 1) ゲノム解析法を利用してインプリンティング領域のヒト

11P15.5 とそれに対応するマウスゲノムの解析を行い、Beckwith-Wiedemann 症候群の本態にせまると共に疾患モデル動物の作成を含む機能解析を行う。2) 多因子病のインシュリン依存性糖尿病はインプリンティングを受けた遺伝子の関与が示唆されているが、その本態を明らかにする。3) インプリンティングにかかわる遺伝子は未同定のものが多いので班員により開発された体系的スクリーニング法を利用して全染色体領域を含めた新規遺伝子の単離を行い、それから疾患原因遺伝子との対応をつける。

B. 研究方法

新規遺伝子の探索のために、ヒト EST の探索を行った。領域は、11p15.5 である。それをプローブに用いて cDNA ライブラリーからクローンをスクリーニングした。対応するマウスクローンの分離も行った。胎児性腫瘍を解析するために、Wilms 腫瘍、横紋筋肉腫、肝芽腫、副腎腫瘍について、*MPT1*, *IPL*, *ORCTL2S* 遺伝子の直接シーケンスにより変異を同定した。

STSマーカーの配列をもとにマウスのYAC、BACライブラリーをスクリーニングし、クローンを分離して整列化した。塩基配列の決定にはBACクローンを用い、ショットガン法で行った。種間の塩基配列比較により同定された非コード領域の保存配列は、*Igf2-LacZ*レポーター遺伝子と接続してトランスジェニックマウスに導入し、エンハンサー活性をもつかどうか調べた。新規DNAメチルトランスフェラーゼの同定は、既知の酵素の触媒ドメインの配列をもとにESTデータベースを検索することで行った。

RT-PCRにより単離されたIDDMK1,2-22に対応する核内遺伝子を単離し、該当遺伝子領域近傍の多型マーカーを同定した。IDDMK1,2-22はHERV-Kファミリーの一つで類似ないしは近似の配列がヒトゲノム中に50以上存在すると見積もられているところから、その単離には幾つものチェックを入れて慎重に作業を進めた。

マウスの *Peg1/Mest* 遺伝子のゲノム DNA 構造を決定し、a/b hydrolase fold family に属するこの遺伝子の標的組換えを行うべく組換えDNAを作製し、ES細胞に導入した。ヒトSRS患者の血液サンプルからゲノム DNA、mRNAを分離し、血液における *PEG1/MEST* 遺伝子自身の欠損、または変異検索を検討した。

C. 研究結果

1. Beckwith-Bledemann 症候群に関連する領域の構造と機能解析

1) 新規遺伝子の単離と解析

ヒト *TAPA1* から *NAP2* 遺伝子に至る領域において *ITM*、*SMS-1*、*SMS-2* 遺伝子などを明らかにした。一方、マウス遺伝子では *Itm*、*Sms-1* 遺伝子などを明らかにした。*ITM* 遺伝子は特に腎臓と肝臓で顕著に発現していた。マウスで調べた限り、遺伝子は胎児、新生児など多くの組織において機能的にインプリンティングを

受けているが、最も発現している腎、肝では両アリルとも発現していた。*SMS-1* 遺伝子は精巢、骨格筋や肝で多く発現しており、イントロン-エクソン構造を有している。マウス新生児、成人組織で調べた限りでは、インプリンティングを受けていない。一方、*SMS-2* 遺伝子は *KVLQT1* 遺伝子内部にあり、*KVLQT1* と転写方向が逆向きである。この遺伝子にはイントロンがなく、しかも ORF はない。多くの組織で発現しており、mRNA の大きさは 1.7 kb である。インプリンティングを受けており、父親由来遺伝子が発現している。

2) 胎児性腫瘍の解析

この領域に互いに隣接して存在する *IMPT1*、*IPL*、*ORCTL2S* について、胎児性腫瘍 (Wilms 腫瘍、横紋筋肉腫、肝芽腫、副腎腫瘍) における変異解析を施行した。*IMPT1* および *IPL* の変異は認められなかったが、41 症例の解析で *ORCTL2S* では Wilms 腫瘍 1 例でミスセンス変異、副腎腫瘍 1 例と肝芽腫 1 例において loss of heterozygosity (LOH) を認めた。

2. マウス 7F4/F5 インプリンティング領域の機能解析と疾患遺伝子の探索

1) 整列化クローンの作製とシーケンス

マウス第7染色体F4/F5領域およそ1MbをカバーするYAC、BAC、コスミドを単離・整列化し、その物理地図を完成した。得られたBACクローンを用いて、向井研究室 (研究代表者) 佐々木研究室 (研究分担者) や榊研究室 (東大医科研) と共同でショットガン法による全塩基配列の決定を開始した。

2) 新規エンハンサーの同定

マウス *H1* 9領域約40 kbの塩基配列を決定してヒトの配列と比較したところ、遺伝子外に合計10箇所の進化的に保存された領域が見つかった。そこで他の断片をトランスジェニックマウスに導入して検討したところ、5つがエンハンサー競合に

かかわる可能性のある新しい組織特異的エンハンサーであることが分かった。

3) 新規DNAメチルトランスフェラーゼの同定
ゲノムインプリンティングでは、両親の配偶子形成過程で生じるDNAメチル化の違いが、対立遺伝子を区別するマークであると考えられている。哺乳類で知られていた唯一のDNAメチルトランスフェラーゼ*Dnmt1*の触媒部位のアミノ酸配列をもとに、BLASTを用いてESTデータベースを検索し、新たなDNAメチルトランスフェラーゼと思われるヒト、マウスのcDNAを同定した。これまでにマウスの完全長cDNAのクローニングを終え、そのタンパク質産物がDNAメチル化活性を有することを確認した。

3. 多遺伝子病へのゲノムインプリンティングの関わりとそのゲノム基盤の研究

オリゴプローブOPDVはゲノムDNAのサザンプロット解析でIDDMK1,2-22の配列から予想されるサイズに一致するバンドの他に1本の薄いバンドを検出した。このプローブによるコスミドクローンのスクリーニングから、ただ1つの完全HERV遺伝子が単離された。GenBankに登録されたIDDMK1,2-22の塩基配列との比較で99.7%のホモロジーが得られた。しかし、env領域の塩基配列から翻訳されるスーパー抗原のアミノ酸配列は100%一致した。コンピューター検索でHERV-K18が検出された。HERV-K18の比較可能な配列は3'LTR (M12852)のみであるが、99.5%のホモロジーが得られた。塩基配列解析の結果、このHERV遺伝子はCD48遺伝子の第一イントロン中にこれと逆向きに存在することが判明した。FISHによる染色体局在は1番染色体長腕1q21.3-q22に決定した。Radiation hybrid mappingでSHGC-30228 locusに一致した。このHERV遺伝子の5'端より約20 kb上流にCAリピートが同定された。30人の日本人集団で4つのアレルが検出され、0.73のheterozygosity

が得られた。

4. 新規インプリンティング遺伝子の同定とヒト相同遺伝子の分離

父親から*Peg1/Mest*遺伝子の欠損が伝わる場合、出生前後の成長遅延がすべてのマウスにおいて確認された。また、これらの中には新生児致死性を示すものもかなりの頻度で存在した。しかし、同じ変異が母親から伝わる場合には全くこれらの異常は観察されなかった。このことから、ここに見られた異常は、父性インプリンティング遺伝子*Peg1/Mest*の欠損の影響であることが結論された。これは、ヒト*PEG1/MEST*遺伝子がゲノムインプリンティング型遺伝病であるSilver-Russell症候群(SRS)の最有力原因遺伝子であること、この*Peg1/Mest*ノックアウトマウスがSRSのモデルマウスとなりうることを示唆している。一方、日本人の14家系の孤発性SRS患者における*PEG1/MEST*遺伝子の変異、欠損を調査した。*PEG1/MEST*遺伝子の周辺のSTSマーカー9ヶ所の解析を患者および父、母について行った結果、すべてがメンデルの法則に矛盾しない伝達様式を示していた。これから、この遺伝子周辺を含めて患者に大きな染色体欠損のないことが推定された。次に*PEG1/MEST*遺伝子のタンパク質のコーディングフレームを前半と後半の2つの部分にわけ、患者のcDNAをダイレクトシーケンスを行ったが、これらの家系から*PEG1/MEST*遺伝子の変異を示す証拠はまだ得られていない。

D. 考察

*p57^{KIP2}*遺伝子はBeckwith-Wiedemann症候群の原因遺伝子であり、かつ腫瘍抑制遺伝子の可能性がある遺伝子である。それは、この遺伝子がCDKインヒビターであるからである。*p57^{KIP2}*遺伝子は*p21^{CIP1}*ファミリーに属し、*p21^{CIP1}*はすでに腫瘍抑制遺伝子として働くことが証明さ

れている。仮に $p57^{KIP2}$ が腫瘍抑制遺伝子として、もしこれだけで癌化すればすべてのBWS患者は癌になることになる。しかし、実際はその7-8%の患者に癌が発生する。このことは癌化にこの遺伝子が必要だとしても、さらに他の遺伝子の変化が必要なことを示している。そこで、ここでは第二の腫瘍関連遺伝子として IPL , ITM , $ORCTL2S$ を想定し、胎児性腫瘍におけるこれら遺伝子の変異を探索した。その結果、低頻度ながら $ORCTL2S$ に変異が見つかった。

当該マウス領域の完全なクローン化と物理地図作成を終え、全塩基配列の決定が最終段階に入ったことで、疾患関連新規遺伝子や制御配列の探索を行う土台がほぼ完成した。また配列情報をもとに遺伝子や制御配列を同定する試みとして、 $H19$ 遺伝子領域40kbの配列をヒト-マウス間で比較したところ、新たに5つのエンハンサーを同定できた。この結果は、種間の塩基配列比較が制御領域を同定するのに非常に有効であることを示唆している。今後は得られた大量の配列情報にこのような解析手法を応用して、新たな疾患関連遺伝子や制御配列を同定する。またマウスのゲノム情報を得ている利点を生かして、モデル動物の作成をめざす。また今回新たに同定した新規DNAメチルトランスフェラーゼは、発生初期や生殖系列での発現が高く、インプリンティングで重要な働きをしている可能性がある。

RT-PCRによって単離されたIDDMK 1,2-22に対応する核内遺伝子を目指して単離されたHERV遺伝子はIDDMK1,2-22と99.7%の高いホモロジーを示した。このことは新しく単離した遺伝子がHERV-K18と同一のもので、配列の不一致は多型やシーケンシングエラーによる可能性を示唆する。従って、三者は同一の遺伝子を表している可能性が高い。新しく単離したHERV遺伝子はヒト1番染色体長腕1q21.3-q22にマップされた。この領域はイギリスの最新のIDDMの遺伝解析で、

感受性遺伝子の存在する可能性のある領域として新たに同定された領域1q12-q24に含まれる。このHERV遺伝子の近傍に同定されたCAリピート多型マーカーは当該領域のIDDM感受性遺伝子の同定に有用なマーカーとなるであろう。

$Peg1/Mest$ ノックアウトマウスの示す表現型から、ヒト $PEG1/MEST$ 遺伝子がSRSの原因遺伝子の最有力候補であることが示された。しかし、SRS患者のゲノム解析からはこれまでのところ、遺伝子欠損、変異は発見されていない。この原因としては、遺伝学的解析から、SRSの原因遺伝子は複数(少なくとも5つ位)あることが考えられるため、 $PEG1/MEST$ 遺伝子の異常により発症するケースは必ずしも多くないことが考えられる。遺伝子欠損、変異の検出には解析数を増やす必要があるのかも知れない。

E. 結論

Beckwith-Wiedemann 症候群の原因遺伝子をさらに探すために新規遺伝子の探索を行った結果、 ITM ($IMPT1$, $ORCTL2$), $SMS-1$, $SMS-2$ などの遺伝子が明らかになった。さらに、この疾患ならびにインプリンティングの機構を塩基配列レベルで理解するために、ヒト11p15.5に対応するマウス7F4/F5領域のインプリンティング領域を完全にクローン化し、得られたBACクローンをを用いてシーケンシングを行った。マウスを用いた分子生物学的解析から、父性発現インプリンティング遺伝子 $Peg1/Mest$ は胎児期、新生児期の成長に重要な機能を果たす遺伝子であることが証明された。また、ノックアウトマウスの示す表現型から、ヒトSRSの原因遺伝子の最有力候補であることが示された。インシュリン依存性糖尿病(IDDM)患者臓器培養上清よりRT-PCRで単離されたIDDMK1,2-22に対応すると考えられる核内遺伝子を単離した。この遺伝子はヒト染色体1q21.3-q22にマップされた。本研究は

HERVとIDDMの関連のみならず、CD遺伝子とIDDMの関連やHERVと免疫系の関わりなどの究明に向けての第一歩になると思われる。

Beckwith-Wiedemann 症候群に関連する領域の 構造と機能解析

向井常博

(佐賀医科大学生化学講座・教授)

Beckwith-Wiedemann 症候群の原因遺伝子をさらに探すべく、11p15.5 の *TAPA1* と *NAP2* の間の 600 kb で新規遺伝子の探索を始めた。*ITM* (*IMPT1*, *ORCTL2*), *SMS-1*, *SMS-2* などの遺伝子を明らかにした。*ITM* と *SMS-2* はインプリンティングを受けていることがわかった。一方、胎児性腫瘍の解析も行った。ウィルムス腫瘍を初めとする 41 例で、*ITM*, *IPL*, *ORCTL2S* 遺伝子の変異を探索した。その結果、*ORCTL2S* 遺伝子に変異を見いだすことができた。さらに、この疾患ならびにインプリンティングの機構を塩基配列レベルで理解するために、ヒト 11p15.5 に対応するマウス 7F4/F5 領域の 1 Mb におよぶ DNA シークエンスを共同でスタートした。そのために、マウス *Tapal* と *Nap 2* の間 600 kb の領域の BAC コンティグを作成し、シークエンシングを開始した。

A. 研究目的

ヒト染色体 11p15.5 には先天性遺伝病の Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) の原因遺伝子が存在することが知られている。この症候群は臍帯ヘルニア、巨舌症、巨人症、低血糖およびウィルムス腫瘍等の小児癌に罹りやすいことで特徴づけられた常染色体性の優性遺伝病である。母親由来の染色体の転座、切断あるいは父親染色体のダイソミーにより発症することより、ゲノムのインプリンティングがその原因と考えられている。近年、この領域に存在するインプリンティング遺伝子の *IGF2* および *H19* が原因として説明されてきたが、これらの遺伝子だけで必ずしも十分説明できているわけではなく他に主遺伝子の存在が考えられてきた。最近、我々はこの領域にマップされたサイクリン依存性キナーゼインヒビター、*p57^{KIP2}* の父親由来の遺伝子がインプリンティングを受けていることをマウス及びヒトで見いだした。さらに、Beckwith-Wiedemann 症候群ではこの遺伝子に変異があることを見だしその原因遺伝子として発表した。

ここでは、この疾患の原因遺伝子解析の拡大と、それに併発する小児腫瘍の解析を行う。そのために、ヒト *TAPA1* から *NAP2* 遺伝子に至る領域から新規遺伝子の単離を行い、インプリンティングの有無、遺伝子の特徴などを明らかにする。ついで、胎児性腫瘍の発症と遺伝子とのかかわりを明らかにするために、いくつかの遺伝子で変異解析を行う。さらに、ヒトに対応するマウス当該領域のゲノム解析も行う。

B. 研究方法

新規遺伝子の探索のために、ヒト EST の探索を行った。領域は、11p15.5 である。それをプローブに用いて cDNA ライブラリーからクローンをスクリーニングした。対応するマウスクローンも分離した。インプリンティングの有無、ノーザン等を行った。

胎児性腫瘍を解析するために、Wilms 腫瘍 23 例、横紋筋肉腫 7 例、肝芽腫 6 例、副腎腫瘍 5 例について、*MPT1*, *IPL*, *ORCTL2S* 遺伝子の直接シークエンスにより変異を同定した。

マウスゲノム DNA の塩基配列決定に関して、20 kb の配列決定は exonuclease III による欠失変異体作成法によった。600 kb のシークエンシングは、先ず BAC クローンのコンティグを作成してその中から適当な オーバーラップクローンを選択し、ショットガンシークエンスを行った。東大医科研の榊佳之博士研究室との共同研究である。

C. 研究結果

1) 新規遺伝子の単離と解析

ヒト *TAPA1* から *NAP2* 遺伝子に至る領域において *ITM*, *SMS-1*, *SMS-2* 遺伝子などを明らかにした。一方、マウス遺伝子では *Itm*, *Sms-1* 遺伝子などを明らかにした。*ITM* 遺伝子は *p57^{KIP2}* よりも 17 kb セントロメアに位置し、*IPL* より 3 kb テロメア側にある。マウスにもホモログがあり、染色体 7 番の 7F4/F5 領域に位置し、やはりマウス *Ipl* と *p57^{KIP2}* 遺伝子の間にある。遺伝子の大きさは、ヒトで 22 kb、マウスで 24 kb で、11 個のエクソンよりなっていた。この遺伝子は特に腎臓と肝臓で顕著に発現し、心、肺、精巣で中等度に発現していた。マウスで調べた限り、遺伝子は胎児、新生児など多くの組織において機能的にインプリンティングを受けているが、最も発現している腎、肝では両アリルとも発現していた。マウス *Itm* は中等度の GC 含量、リピート遺伝子の欠如、大きなイントロンを含むなど、インプリント遺伝子としては一般的ではない特徴を有していた。この遺伝子は別名 *IMPT1*, *ORCTL2* とも呼ばれている。

SMS-1 遺伝子は *TAPA1* 遺伝子のセントロメア側 4.8 kb に位置しており、そのマウスホモログ *Sms-1* も染色体 7 番の当該領域に位置している。この遺伝子は精巣、骨格筋や肝で多く発現しており、イントロン-エクソン構造を

有している。マウス新生児、成人組織で調べた限りでは、インプリンティングを受けていないが、さらに詳細に調べている。

SMS-2 遺伝子は *KVLQTI* 遺伝子内部のエクソン 10 よりセントロメア側にあり、*KVLQTI* と転写方向が逆向きである。この遺伝子にはイントロンがなく、しかも ORF はない。多くの組織で発現しており、mRNA の大きさは 1.7 kb である。インプリンティングを受けており、父親由来遺伝子が発現していることがわかった。

一方、インプリンティングの状態について、*IMPT1* と *IPL* は母由来発現であることが判明しているが、*ORCTL2S* については未確認である。我々は、エクソン 3 内に存在する比較的高頻度の多型を同定したので、この多型を利用してこの遺伝子のインプリントの状態を検索した。ヒト胎盤においては両アリル発現であることが判明したが、インプリンティングは組織特異性があるため現在他の組織についての検索を行っている。

2) 胎児性腫瘍の解析

この領域に互いに隣接して存在する *IMPT1*, *IPL*, *ORCTL2S* について、胎児性腫瘍 41 例 (Wilms 腫瘍 23 例、横紋筋肉腫 7 例、肝芽腫 6 例、副腎腫瘍 5 例) における変異解析を施行したが、*IMPT1* および *IPL* の変異は認められなかったが、*ORCTL2S* では Wilms 腫瘍 1 例でミスセンス変異、副腎腫瘍 1 例と肝芽腫 1 例において loss of heterozygosity (LOH) を認めた。

3) マウス当該領域の全塩基配列決定の準備
BWS において転座が起こる領域は、一方の端は *KVLQTI* 遺伝子転写体の内部に存在することが知られている。このことは、この遺伝子の内部に BWS の発症にかかわる調節領域が存在することを示唆する。また、染色体移入による腫瘍抑制活性を示す染色体領域もこの *KVLQTI* を含む領域にある。そこで、ここでは *KVLQTI* を含むヒト *TAPA1* から *NAP2* に至

る約 600 kb の領域で重要な DNA 情報 (エレメントないしは遺伝子) を塩基配列レベルで得るために、ヒトとマウスゲノムを比較することにした。そのために、マウスゲノム DNA の全塩基配列の決定を計画した。まず、マウスゲノム BAC クローンのコンティグを作成した。ついで、いくつかのクローンを選びショットガンシークエンスを開始している。

それより以前に、我々は *p57^{KIP2}* を含む 20 kb の配列を決定した。その領域は *p57^{KIP2}* の上流 16 kb と下流 2 kb を含む 20195bp である。この領域に対応するヒトゲノムシークエンスとハー・プロット解析を行ったところ、ホモロジーが観察されるのは *p57^{KIP2}* とその周辺領域のみであった。それより上流 15kb には高いホモロジーを示す領域は見いだせず、意外な結果であった。というのはヒトの 11p15.5 はマウス 7F4/F5 とシンテニーであり、両者間は保存されていることが他の多くの遺伝子を通して証明されているからである。少なくとも両ゲノムのこの領域に存在する遺伝子の順序は保たれていたのである。ヒトの当該領域には *p57^{KIP2}* 遺伝子と *ORCTL2* 遺伝子の間に 15.6kb に及ぶ *ORCTL2S* 遺伝子が見つけられているが、マウスのホモログは見つかっていない。そこでハー・プロットの結果も含め同領域にはヒト・マウス間でホモロジーが見いだせないこと、cDNA が得られないことなどよりマウスゲノムには *Orctl2s* は存在しないと結論した。

D. 考察

p57^{KIP2} 遺伝子は Beckwith-Wiedemann 症候群の原因遺伝子であり、かつ腫瘍抑制遺伝子の可能性がある遺伝子である。それは、この遺伝子が CDK インヒビターであるからである。*p57^{KIP2}* 遺伝子は *p21^{CIP1}* ファミリーに属し、*p21^{CIP1}* はすでに腫瘍抑制遺伝子とし

て働くことが証明されている。仮に *p57^{KIP2}* が腫瘍抑制遺伝子として、もしこれだけで癌化すればすべての BWS 患者は癌になることになる。しかし、実際はその 7-8% の患者に癌が発生する。このことは癌化にこの遺伝子が必要だとしても、さらに他の遺伝子の変化が必要なことを示している。そこで、ここでは第二の腫瘍関連遺伝子として *IPL*, *ITM*, *ORCTL2S* を想定し、胎児性腫瘍におけるこれら遺伝子の変異を探索した。その結果、低頻度ながら *ORCTL2S* に変異が見つかった。ただ、この遺伝子変異の意味について慎重に検討している。

マウスゲノム DNA 600 kb の解析をスタートした。この領域のヒトゲノム DNA シークエンスはすでに報告されているので、マウス DNA のシークエンスが決定されるとマウスとヒトで保存されている重要なシークエンスがわかることになる。新しい遺伝子の存在、重要な DNA エlement あるいはインプリンティングに特有な DNA 構造とか色々期待している。

E. 結論

Beckwith-Wiedemann 症候群の原因遺伝子をさらに探るために、11p15.5 の *TAPA1* と *NAP2* の間の 600 kb で新規遺伝子の探索を行った。その結果、*ITM* (*IMPT1*, *ORCTL2*), *SMS-1*, *SMS-2* などの遺伝子が明らかになった。一方、Wilms 腫瘍を初めとする 41 例で、*ITM*, *IPL*, *ORCTL2S* 遺伝子の変異検索を行い、*ORCTL2S* 遺伝子に変異を見いだした。さらに、この疾患ならびにインプリンティングの機構を塩基配列レベルで理解するために、ヒト 11p15.5 に対応するマウス 7F4/F5 領域のマウス *Tapa1* と *Nap 2* の間の 600 kb におよぶ DNA シークエンスを計画した。その為に、BAC コンティグを作成し、シークエンシングを

開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Bhuiyan, Z A., Yatsuki, H., Sasaguri, T., Joh, K., Soejima, H., Zhu, X., Hatada, I., Morisaki, H., Morisaki, T. and Mukai, T: Functional analysis of the *p57^{KIP2}* gene mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome Human Genet. in press.

2. Lam, W WK., Hatada, I., Ohishi, S., Mukai, T., Joyce, J A., Cole, T R P., Donnai, D., Reik, W., Schofield P N. and Maher E R: Analysis of germline CDKN1C(*p57^{KIP2}*) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation J. Med. Genet. in press.

3. Morisaki, H., Hatada, I., Morisaki, T. and Mukai, T: A novel gene, *ITM*, located between *p57^{KIP2}* and *IPL*, is imprinted in mice. DNA Res. 5:235-240, 1998.

4. Schwienbacher, C., Sabbioni, S., Campi, M., Veronese, A., Bernardi, G., Menegatti, A., Hatada, I., Mukai, T., Ohashi, H., Barbanti-Brodano, G., Croce, CC. and Negrini, M: Transcriptional map of 170-kb region at chromosome 11p15.5: Identification and mutational analysis of the *BWR1A* gene reveals the presence of mutations in tumor samples. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:3873-3877, 1998.

5. Soejima, H., McLay, J., Hatada, I., Mukai, T., Jinno, Y., Niikawa, N. and Yun, K: Comparative RT-PCR and in situ hybridization analyses of human imprinted *p57^{KIP2}* and *IGF2* gene transcripts in fetal kidney and Wilms tumors using archival tissue. Lab. Invest. 78:19-28, 1998.

2. 学会発表

1. Hatada, I., Nabetani, A., Morisaki, H., Xin, Z., Oishi, S., Tonoki, H., Niikawa, N., Inoue, M.,

Komoto, Y., Okada, A., Steichen, E., Ohashi, H., Fukushima, Y., Nakayama, M and Mukai, T: Imprinted genes on 11p15.5 and their involvement in Beckwith-Wiedemann syndrome and cancer. Genomic Imprinting and Environmental Disease Susceptibility sponsored by National Institute of Environmental Health Sciences and Duke University Medical Center. 1998. 10. 8-10.

2. 加藤玲子, 横峰孝昭, 水野晋一, 白水久男, 石原宏, 小出剛, 向井常博, 佐々木裕之: 第21回日本分子生物学会年会. 1998. 12. 19.

3. 向井常博: *U2af1-rs1* 遺伝子とそのインプリンティング. ゲノムインプリンティングの分子メカニズムと生殖細胞の分化. (シンポジウム) 1998. 5. 23.

4. 向井常博, ゲノムインプリンティングと疾患—Beckwith-Wiedemann症候群とその発症機序. 第4回動物遺伝育種シンポジウム 動物ゲノム解析と新たな家畜育種戦略. 1998. 11. 9.

5. 向井常博, 朱喜科, 八木ひとみ, 陳国云, 副島英伸, 城圭一郎, 辛正翰, 畑田出穂: Beckwith-Wiedemann症候群とその発症機序. (ワークショップ) 第21回日本分子生物学会年会. 1998. 12. 18.

6. 副島英伸, 松橋幸子, 向井常博, 吉永英俊, 真崎善二郎, 尾崎岩太, 梶原進, 三好修, 新川詔夫: 細胞周期関連遺伝子ヒト*H731*遺伝子の発現に関する検討. 第21回日本分子生物学会年会. 1998. 12. 18.

7. 八木ひとみ, 朱喜科, 辛正翰, 陳国云, 城圭一郎, 副島英伸, 西村聖代, 森崎裕子, 森崎隆幸, 畑田出穂, 向井常博: Beckwith-Wiedemann症候群遺伝子座に対応するマウスゲノム領域の解析. 第21回日本分子生物学会年会. 1998. 12. 19.

8. 向井常博 Beckwith-Wiedemann 症候群 蛋白研セミナー(阪大) DNAメチレーションとゲノムインプリンティング 1999. 1. 28-29.

マウス7F4/F5インプリンティング領域の機能解析と 疾患遺伝子の探索

佐々木裕之 国立遺伝学研究所・人類遺伝研究部門・教授

マウス7F4/F5領域はインプリンティングを受ける領域で、Beckwith-Wiedemann症候群やWilms腫瘍などの小児固形腫瘍の責任座位を含むヒト11p15.5領域に相当する。新たなインプリンティング関連の疾患遺伝子を探索し、染色体ドメインレベルの制御機構を明らかにするため、このマウス領域のゲノム解析を行った。そのため、当該領域約1MbをカバーするYAC、BAC、コスミドクローンを整列化し、ショットガン法による大規模シーケンスを開始した。また、得られた配列情報をもとに、インプリンティングに関与する可能性が高い新規のエンハンサーを5つ同定した。さらに、インプリンティングの機構として重要なDNAメチル化を触媒する新規のDNAメチルトランスフェラーゼを同定した。

A. 研究目的

ゲノムインプリンティングは哺乳類の父・母由来の対立遺伝子に発現差をもたらす現象であり、個体発生に重要で、種々の先天異常やがんの原因と関連している。マウス第7染色体の遠位部にあるF4/F5バンド領域はインプリンティングを受ける領域であり、ヒトではBeckwith-Wiedemann症候群やWilms腫瘍などの小児固形腫瘍の責任座位を含む11p15.5領域に相当する。この領域内には複数のインプリンティングを受ける遺伝子が報告されているが、未だ未同定の疾患関連遺伝子が多数あると思われる。そこで疾患遺伝子の探索を支援し、また将来モデル動物を作成してインプリンティングや疾患のメカニズムを調べることを視野に入れ、このマウス7F4/F5領域およそ1Mbのゲノム解析を行った。またインプリンティングの根本的な機構であるDNAメチル化を明らかにする目的で、この反応を触媒するDNAメチルトランスフェラーゼについても解析した。

B. 研究方法

STS (sequence tagged site) マーカー (遺伝子を含む) の配列をもとにPCR法でマウスのYAC (酵母人工染色体)、BAC (細菌人工染色体) ライブラリー

をスクリーニングし、クローンを分離して整列化した。またYACクローンをコスミドにサブクローン化し、物理地図に沿って整列化した。塩基配列の決定にはBACクローンをを用い、ショットガン法で行った。

種間の塩基配列比較により同定された非コード領域の保存配列は、*Igf2-LacZ*レポーター遺伝子と接続してトランスジェニックマウスに導入し、エンハンサー活性をもつかどうか調べた。

新規DNAメチルトランスフェラーゼの同定は、既知の酵素の触媒ドメインの配列をもとにEST (expressed sequence tag) データベースを検索することで行った。完全長cDNAは、既存のヒト、マウスcDNAライブラリーをプライクハイブリダイゼーション法でスクリーニングして得た。

C. 研究結果

1. 整列化クローンの作製とシーケンス

マウス第7染色体F4/F5領域およそ1MbをカバーするYAC、BAC、コスミドを単離・整列化し、その物理地図を完成した。得られたBACクローンをを用いて、向井研究室 (研究代表者) や榊研究室 (東大医科研) と共同でショットガン法による全塩基配列の決定を行った。すでに全BACクローンのショットガンシー

クエンスを終え、現在ギャップを閉じる作業に入っている。さらにインプリンティング遺伝子がCpGアイランドをもつ点に着目し、CpGアイランドを同定する簡便な方法を開発した。

2. 新規エンハンサーの同定

本研究で解析しているインプリンティング領域のセントロメア端には、*Igf2*、*H19*の2つのインプリンティング遺伝子があり、これら2つの遺伝子の対立遺伝子特異的な発現はエンハンサー競合により起こることが知られている。マウス*H19*領域約40kbの塩基配列を決定してヒトの配列と比較したところ、遺伝子外に合計10箇所の進化的に保存された領域が見つかった。そのうちの2つは既知のエンハンサーと正確に一致していた。そこで他の断片をトランスジェニックマウスに導入して検討したところ、5つがエンハンサー競合にかかわる可能性のある新しい組織特異的エンハンサーであることが分かった。

3. 新規DNAメチルトランスフェラーゼの同定

ゲノムインプリンティングでは、両親の配偶子形成過程で生じるDNAメチル化の違いが、対立遺伝子を区別するマークであると考えられている。哺乳類で知られていた唯一のDNAメチルトランスフェラーゼ*Dnmt1*の触媒部位のアミノ酸配列をもとに、BLASTを用いてESTデータベースを検索し、新たなDNAメチルトランスフェラーゼと思われるヒト、マウスのcDNAを同定した。これまでにマウスの完全長cDNAのクローニングを終え、そのタンパク質産物がDNAメチル化活性を有することを確認した。

D. 考察

当該マウス領域の完全なクローニングと物理地図作成を終え、全塩基配列の決定が最終段階に入ったことで、疾患関連新規遺伝子や制御配列の探索を行う土台がほぼ完成した。また配列情報をもとに遺伝子や制御配列を同定する試みとして、*H19*遺伝子領域40kbの配列をヒト-マウス間で比較したところ、新たに5つのエンハンサーを同定できた。この結果は、種間の塩基配列比較が制御領域を同定するのに非常

に有効であることを示唆している。今後は得られた大量の配列情報にこのような解析手法を応用して、新たな疾患関連遺伝子や制御配列を同定する。またマウスのゲノム情報を得ている利点を生かして、モデル動物の作成をめざす。また今回新たに同定した新規DNAメチルトランスフェラーゼは、発生初期や生殖系列での発現が高く、インプリンティングで重要な働きをしている可能性がある。したがって今後さらに詳しく解析する必要があると思われる。

E. 結論

マウス第7染色体バンドF4/F5領域のインプリンティング領域を完全にクローニングし、得られたBACクローニングを用いてシークエンズを行った。また得られた情報を用いて疾患関連遺伝子や制御配列の検索を開始し、5つの新規エンハンサーを同定した。今後、DNAメチル化機構についての解析結果とあわせて、この領域のインプリンティング疾患の発生機序を明らかにしていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hatano, N., Eversole-Cire, P., Ferguson-Smith, A.C., Jones, P.A., Surani, M.A. & Sasaki, H. Enhancer-dependent, locus-wide regulation of the imprinted mouse insulin-like growth factor II gene. *J. Biochem.* 123, 984-991 (1998).

Shibata, H., Yoda, Y., Kato, R., Ueda, T., Kamiya, M., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Plass, C., Pearsall, R.S., Held, W.A., Muramatsu, M., Sasaki, H., Kusakabe, M. & Hayashizaki, Y. A methylation imprint mark in the imprinted gene *Grfl/Cdc25Mm* locus shares a common feature with the *U2afbp-rs* gene: an association with a short tandem repeat and a hypermethylated region. *Genomics* 49, 30-37 (1998).

Ishihara, K., Kato, R., Furuumi, H., Zubair, M. & Sasaki, H. Sequence of a 42-kb mouse region containing the imprinted *H19* locus: identification of a novel muscle-specific transcription unit showing biallelic expression. *Mamm. Genome* 9, 775-777 (1998).

Kato, R. & Sasaki, H. Quick identification and localization of CpG islands in large genomic fragments by partial digestion with *HpaII* and *HhaI*. *DNA Res.* 5, 287-295 (1998).

佐々木裕之: 新しい遺伝概念「ゲノム刷り込み」と疾患. 内科学進歩のトピックス (仁保喜之・石橋大海編), 6-8, 九州大学出版会 (1998)

2. 学会発表

佐々木裕之: ゲノムインプリンティングと染色体ドメインレベルの制御. シンポジウム: ゲノムインプリンティングの分子メカニズムと生殖細胞の分化, 大阪, 1998年5月

石原宏, 波多野直哉, 古海弘康, モハマドズバイル, 佐々木裕之, 岩城徹: マウス*Igf2/H19*領域のインプリンティングを調節すると考えられるエンハンサー群. 大規模塩基配列比較による遠位制御配列の検索. 日本発生生物学会第31回大会, 熊本, 1998年5月

武田裕彦, 巖佐庸, 佐々木裕之: ゲノムインプリンティングの数理モデル: 対立遺伝子多型の実現. 日本発生生物学会第31回大会, 熊本, 1998年5月

佐々木裕之: ゲノムインプリンティングと先天異常・小児癌. 第7回成長と成長障害に関する講演会, 福岡, 1998年7月

佐々木裕之: ゲノムインプリンティングと染色体ドメインレベルの制御. 日本遺伝学会第70回大会 (シンポジウム: ゲノムインプリンティングの分子機構), 札幌, 1998年9月

Kato, R., Ishihara, K., Yokomine, T., Mizuno, S., Furuumi, H., Shirozu, H., Hatano, N., Iwaki, T., Jinno, Y. & Sasaki, H: Genome analysis of the distal imprinted region of mouse chromosome 7: comparative sequencing between human and mouse identifies multiple tissue-specific enhancers in the downstream region of *H19*. 12th International Mouse Genome Conference, Garmisch-Partenkirchen, 1998年9-10月

佐々木裕之: DNAメチル化とインプリンティング・胚発生. 第71回日本生化学会大会 (シンポジウム: クローン動物の可能性), 名古屋, 1998年10月

渡辺卓也, 遠藤禎郎, 三嶋行雄, 佐々木裕之, 高木信夫, 木南凌: ゲノムインプリントを受けた染色体領域のクロマチン凝縮状態. 第71回日本生化学会大会, 名古屋, 1998年10月

佐々木裕之, 加藤玲子, 石原宏, 水野晋一, 横峯孝昭, 白水久男, 古海弘康, 大野みずき, Wahyu Purbowasito, 千々岩崇仁: ドメインレベルのインプリンティング制御機構. 第21回日本分子生物学会年会 (ワークショップ: ゲノムインプリンティングの機構と疾患), 横浜, 1998年12月

辻本直美, 鈴木諭, 岩城徹, 佐々木裕之, 服巻保幸, 岩城明子: Head-to-headで近接して存在する*HSPB2*遺伝子とaB-クリスタリン遺伝子の筋組織における発現調節機構. 第21回日本分子生物学会年会, 横浜, 1998年12月

渡辺卓也, 遠藤禎郎, 三嶋行雄, 佐々木裕之, 高木信夫, 木南凌: ゲノムインプリントを受けた染色体領域のクロマチン凝縮状態. 第21回日本分子生物学会年会, 横浜, 1998年12月

加藤玲子, 横峯孝昭, 水野晋一, 白水久男, 石原宏, 小出剛, 向井常博, 佐々木裕之: マウス7F4/F5領域のインプリンティングドメインのゲノム構造. 第21回日本分子生物学会年会, 横浜, 1998年12月

石原宏, 波多野直哉, 加藤玲子, 古海弘康, 陣野吉広, 岩城徹, 佐々木裕之: 広範囲塩基配列比較による*Igf2/H19*インプリンティングドメインの制御配列の同定. 第21回日本分子生物学会年会, 横浜, 1998年12月

大野みずき, 青木奈緒, 佐々木裕之: RNA-FISHによるマウス初期胚におけるインプリンティング遺伝子*Igf2*の転写の解析. 第21回日本分子生物学会年会, 横浜, 1998年12月

千々岩崇仁, 古海弘康, Wahyu Purbowasito, 水野晋一, 藤本弘一, 河野友宏, 田嶋正二, 佐々木裕之: 哺乳類の新規DNAメチルトランスフェラーゼ*Dnmt3*のクローニングと解析. 第21回日本分子生物学会年会, 横浜, 1998年12月

佐々木裕之: DNAメチル化とドメインレベルのインプリンティング制御. 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 大阪, 1999年1月

佐々木裕之: ゲノムインプリンティングと哺乳類の胚発生. 開放的融合研究シンポジウム, 東京, 1999年3月

多遺伝子病へのゲノムインプリンティングの関わりと そのゲノム基盤の解明

陣野吉広 琉球大学医学部・沖縄アジア医学研究センター
分子生物研究分野・教授

インシュリン依存性糖尿病(IDDM)の一原因としてRT-PCRにより単離された内在性レトロウイルス(HERV) IDDMK1,2-22のIDDMとの関係を遺伝学的に検証するため、これに対応する核内遺伝子を単離した。さらに、この遺伝子近傍にCAリピート多型マーカーを同定した。このHERV遺伝子はヒト1番染色体長腕1q21.3-q22に局在し、CD48遺伝子の第一イントロン中にこれとは逆向きに存在していた。この染色体領域は新たに検出されたIDDM感受性領域に含まれ、CAリピートマーカーはHERVとIDDMの関連解明や当該領域のIDDM感受性遺伝子の同定に向けて有用と思われる。

A. 研究目的

多因子病の代表的な一つであるインシュリン依存性糖尿病(IDDM)は複数の遺伝子が関与し、遺伝因子とともに環境因子に影響されると考えられる自己免疫疾患である。遺伝性は認められるが遺伝様式は複雑で、疾患伝達の性差が見られるなどインプリンティングの関わりが示唆される局面を有する。

IDDM発症へのスーパー抗原の関わりが推察されており、このようなスーパー抗原としてヒト内在性レトロウイルス(HERV)のメンバーの一つであるIDDMK1,2-22が患者脾臓培養上清から単離された。HERVは寄生性DNA因子の一つであるが、親由来に依存したアレルト異的発現調節に重要な役割を果たすことが認められているDNAのメチル化は本来寄生性DNA因子に向けられた防御機構として発達してきたと考えられている。

IDDMの複雑な遺伝性はHERVの制御機構と関連している可能性があり、HERVの制御機構はインプリンティングの分子機構とも関連性を有するかもしれない。そこで、多因子病へのインプリンティングの関わりとそのゲノム基盤の解明を目的として、疾患対象にIDDMを選びターゲットをHERVに絞って、HERVとIDDMの関係を遺伝学的に検証することにした。

B. 研究方法

RT-PCRにより単離されたIDDMK1,2-22に対応する核内遺伝子を単離し、該当遺伝子領域近傍の多型マーカーを同定する。このマーカーを利用してIDDMとIDDMK1,2-22の連鎖の有無を確かめる。IDDMK1,2-22はHERV-Kファミリーの一つで類似ないしは近似の配列がヒトゲノム中に50以上存在すると見積もられているところから、その単離には幾つものチェックを入れて慎重に作業を進めた。

1. オリゴプローブの作製：GenBank登録のHERV-K10とIDDMK1,2-22 (env領域および3'LTR)およびPCR産物のクローン化DNAとの塩基配列の比較から20-mer(OPDV)および19-mer(SSDM)のオリゴプローブを作製。コスミドライブラリースクリーニングおよびゲノム解析に使用。
2. コスミドライブラリースクリーニング： 6.5×10^5 のヒト胎盤DNAコスミドライブラリーをスクリーニング。
6xSSC/5xDenhardt's solution/10 mM sodium phosphate/1 mM EDTA/0.5% SDS, 55度Cで1晩ハイブリした後、6xSSC/0.1% SDSで55度C, 15分洗浄した。
3. 塩基配列解析：pUC19にサブクローニングしてALF DNA sequencerで塩基配列を決

定した。IDDMK1,2-22と比較した領域

(env領域および3'LTR)は両方向で数回反応および泳動を行って特に念入りに解析した。

4. 染色体局在決定：FISHにより染色体局在を決定した。プローブには3'下流のウォーキングクローンをを用いた。さらに、スタンフォードハイブリッドパネルを用いて確認した。

5. CAリピート単離および多型解析：

Poly(dA-dC)・Poly(dG-dT)をプローブとしてCAリピートを単離した。シーケンシングを行って確認した後30人の日本人非近縁者で多型解析を行った。

C. 研究結果

オリゴプローブOPDVはゲノムDNAのサザンブロット解析でIDDMK1,2-22の配列から予想されるサイズに一致するバンドの他に1本の薄いバンドを検出した。このプローブによる 6.5×10^5 のコスミドクローンのスクリーニングから4個が単離された。1つはHERV全構造を含んでおり、2個はこのクローンにオーバーラップするクローンだった。残りの1個は5'LTRとgag領域を欠失したHERVを持つクローンだった。従って、 6.5×10^5 のコスミドからただ1つの完全HERV遺伝子が単離されたことになる。GenBankに登録されたIDDMK1,2-22の塩基配列 (accession no. AF012337, AF012336 and AF012335) との比較で2547 nt 中 7 nt に不一致が見られ99.7%のホモロジーに留まった。しかし、env領域の塩基配列から翻訳されるスーパー抗原のアミノ酸配列は100%一致した。コンピューター検索でこのHERV配列に高いホモロジーを示すものとして、他にHERV-K18が検出された。HERV-K18の比較可能な配列は3'LTR (M12852) のみであるが、99.5%のホモロジーが得られた。HERV-K18ファ

ージクローンの制限酵素マップとの比較でユニーク配列領域でもよく一致した。

塩基配列解析の結果、このHERV遺伝子はCD48遺伝子の第一イントロン中にこれと逆向きに存在することが判明した。

FISHによる染色体局在はオリジナルクローンで単一ローカスを検出できなかったの、下流に延びるクローンを単離して1番染色体長腕 1q21.3-q22 に局在を決定した。Radiation hybrid mappingでSHGC-30228 locusに一致した (LOD=1000; 0.00 cR10000)。

このHERV遺伝子の5'端より約20 kb 上流にCAリピートが同定された。30人の日本人集団で4つのアレルが検出され、0.73のheterozygosityが得られた。

D. 考察

RT-PCRによって単離されたIDDMK1,2-22に対応する核内遺伝子を目指して単離されたHERV遺伝子はIDDMK1,2-22と99.7%の高いホモロジーを示したが、100%一致するものではなかった。また、HERV-K18と同様の高いホモロジーを示した。さらに、制限酵素マップの比較でHERV-K18遺伝子内のみならず、ユニーク配列領域でもよく似ていた。このことは新しく単離した遺伝子がHERV-K18と同一のもので、配列の不一致は多型やシーケンシングエラーによる可能性を示唆する。従って、三者は同一の遺伝子を表している可能性が高い。

新しく単離したHERV遺伝子はヒト1番染色体長腕 1q21.3-q22にマップされた。この領域はイギリスの最新のIDDMの遺伝子解析で、感受性遺伝子の存在する可能性のある領域として新たに同定された領域 1q12-q24 に含まれる。このHERV遺伝子の近傍に同定されたCAリピート多型マーカーは当該領域のIDDM感受性遺伝子の同定

に有用なマーカーとなるであろう。

CD48はCD2のリガンドの一つである。生理的機能の詳細は不明だが、CD48欠損マウスではCD4⁺T cellの活性化が著しく阻害されることが最近報告されている。因に、マウスCd2遺伝子は3番染色体に局在しその領域にはマウスIDDMの感受性遺伝子の一つ Idd10がマップされている。そしてこの領域に対応するヒトの染色体領域が1p13で、これも新しく同定された感受性領域1p21-p12に含まれる。スーパー抗原としてIDDM発症に関わると提示されたHERVがこれらのCD遺伝子の発現を介して疾患の発症に関わっている可能性も考えられる。

E. 結論

IDDM患者脾臓培養上清よりRT-PCRで単離されたIDDMK1,2-22に対応すると考えられる核内遺伝子を単離した。これはHERV-K18とも高いホモロジーを示した。三者の塩基配列に0.3~0.5%の不一致が見られたが、これらは同一の遺伝子を表している可能性が高い。この遺伝子はヒト染色体1q21.3-q22にマップされた。さらに、この遺伝子近傍に同定されたCAリピートマーカーはこの領域のIDDM感受性遺伝子同定に向けて有用なマーカーになると思われる。本研究はHERVとIDDMの関連のみならず、CD遺伝子とIDDMの関連やHERVと免疫系の関わりなどの究明に向けての第一歩になると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① M. Nakano, Y. Jinno et al.: Identification, characterization and mapping of the human ZIS (zinc-finger, splicing) gene, *Gene*, 225: 59-65, 1999.
- ② K. Miura, Y. Jinno et al.: Repeat-directed isolation of a novel gene

preferentially expressed from the maternal allele in human placenta, *J Hum Genet*, 44: 1-9, 1999.

- ③ K. Miura, Y. Jinno et al.: A HhaI/BstUI polymorphism in a novel gene at human chromosome 11p15.5, *J Hum Genet* 43: 283-284, 1998.

- ④ K. Yun, Y. Jinno et al.: Promoter-specific insulin-like growth factor 2 gene imprinting in human fetal liver and hepatoblastoma, *J Pathol*, 185: 91-98, 1998.

- ⑤ T. Miyamoto, Y. Jinno et al.: A SacII polymorphism in the human ASCL2 (HASH2) gene region, *J Hum Genet*, 43: 69-70, 1998.

- ⑥ H. Soejima, Y. Jinno et al.: Comparative reverse transcription-polymerase chain reaction and in situ hybridization analyses of human imprinted p57KIP2 and insulin-like growth factor 2 gene transcripts in fetal kidney and Wilms' tumors using archival tissue, *Lab Invest*, 78: 19-28, 1998.

2. 学会発表

蓮池史画、陣野吉広 他、インスリン依存性糖尿病の原因としてのIDDMK1,2-22の遺伝学的検証、日本人類遺伝学会、1998。

新規ゲノミック・インプリンティング遺伝子の同定と ヒト相同遺伝子の分離

石野史敏

(東京工業大学遺伝子実験施設・助教授)

われわれが subtraction-hybridization 法を用いて分離した新規父性発現インプリンティング遺伝子 *Peg1/Mest* のノックアウトマウスの解析から、この欠損変異が父親から伝わる場合にのみ胎児、新生児期の成長遅延が起こることを明らかにした。ヒト染色体7番の母親性2倍体により発症するSilver-Russell 症候群 (SRS) は出生前後の成長遅延と小奇形を伴うゲノム・インプリンティング型遺伝子疾患であるが、ヒト相同遺伝子 *PEG1/MEST* は染色体7番に唯一発見されている父性発現インプリンティング遺伝子であり、SRS の最有力原因遺伝子であることが明らかになった。しかし、現在までのところヒトSRS患者における *PEG1/MEST* 遺伝子の欠損、変異は検出されていない。

A. 研究目的

近年、ゲノム・インプリンティングが種々のヒト遺伝病に関係することが明らかになってきた。われわれはこれまで、マウスを用いた体系的なインプリンティング遺伝子のスクリーニングにより、新規遺伝子9個を含む13のインプリンティング遺伝子を分離したが、その遺伝子の染色体上の位置からヒトゲノムインプリンティング型遺伝病の原因遺伝子の候補と考えられるものが複数分離されている。その一例として、ヒト染色体7番の母親性2倍体により発症するSilver-Russell症候群 (SRS) における *PEG1/MEST* 遺伝子の関与を明らかにする目的で研究を行っている。SRS は出生前後の成長遅延と小奇形を伴う疾患で多くの場合は孤発例であり、染色体解析から原因遺伝子は複数存在すると考えられているが詳細は不明である。しかし、ゲノムインプリンティングが関与することはヒト染色体7番の母親性2倍体によりこの疾病が発症することから明らかであり、原因遺伝子は父性発現インプリンティング遺伝子であることが予想される。*PEG1/MEST* 遺伝子はわれわれが分離した父性発現インプリンティング遺伝子であり、現在まで染色体7番長腕上にマップされる唯一のインプリンティング遺伝子である。英国との共同研究でこの遺伝子のノックアウトマウスの作製・解析を行うとともに、*PEG1/MEST* 遺伝子が SRS の原因遺伝子であることを証明するた

めにSRS患者における *PEG1/MEST* 遺伝子の欠損・変異の探索を行った。

B. 研究方法

マウスの *Peg1/Mest* 遺伝子のゲノム DNA 構造を決定し、a/b hydrolase fold family に属する加水分解酵素をコードする ORFを含むエクソン3-8を IRES-bgeo で置換した DNA を作製し、ES細胞に導入した。相同組換えを起こした ES 細胞を用いて作製した雄のキメラマウスと129 系統のメスマウスを交配し、父親由来で *Peg1/Mest* 遺伝子の欠損が伝わる F1 マウスを解析した。また、生まれた雌の F1 マウスの交配から、母親由来で遺伝子欠損が伝わる場合に同様の異常が起きるかどうかを確認した。

ヒトSRS患者の血液サンプルからゲノム DNA、mRNA を分離し、血液における *PEG1/MEST* 遺伝子の発現量とインプリンティング状態を調べた。小児、成人とも血液での発現は極微量であり、しかもこの遺伝子が両親から発現していることが確認された。マウスを用いた実験から、成体で父性発現を示す臓器は脳だけであることが予想されており、ヒトを用いた解析では、インプリンティングのかかっている臓器を直接対象にできない制約があることが明らかになった。このため、実際にこの遺伝子の発現がSRS患者で欠損しているかどうかではなく、多数の SRS 患者のなかにこの遺伝子自身の欠損、ま

たは変異が見つかるかどうかを検討することにした。

C. 研究結果

父親から *Peg1/Mest* 遺伝子の欠損が伝わる場合、出生前後の成長遅延がすべてのマウスにおいて確認された。また、これらの中には新生児致死性を示すものもかなりの頻度で存在することが明らかとなった。しかし、同じ変異が母親から伝わる場合には全くこれらの異常は観察されなかった。このことから、ここに見られた異常は、父性インプリンティング遺伝子 *Peg1/Mest* の欠損の影響であることが結論された。これは、ヒト *PEG1/MEST* 遺伝子がゲノムインプリンティング型遺伝病である Silver-Russell 症候群 (SRS) の最有力原因遺伝子であること、この *Peg1/Mest* ノックアウトマウスが SRS のモデルマウスとなりうることを示唆している。また、予想外のこと、この父親から欠損を受け継いだ雌マウスにおいては成熟後、出産に伴う母性行動の異常が起きることが明らかとなった。この *Peg1/Mest* 遺伝子の機能解析は胎児期、新生児期の成長に関する SRS のみならず、成熟した雌の脳における行動に関わる重要な知見をもたらすことが期待される。

一方、日本人の 14 家系の孤発性 SRS 患者における *PEG1/MEST* 遺伝子の変異、欠損を調査した。*PEG1/MEST* 遺伝子の周辺の STS マーカー 9ヶ所の解析を患者および父、母について行った結果、すべてがメンデルの法則に矛盾しない伝達様式を示していた。これから、この遺伝子周辺を含めて患者に大きな染色体欠損のないことが推定された。次に *PEG1/MEST* 遺伝子のタンパク質のコーディングフレームを前半と後半の 2つの部分にわけ、患者の cDNA をダイレクトシーケンスを行ったが、これらの家系から *PEG1/MEST* 遺伝子の変異を示す証拠は得られていない。しかし、この解析の過程で *PEG1/MEST* 遺伝子の新規転写産物を発見した。これは異なるプロモーターから転写され、N末端のアミノ酸配列の異なるタンパク質をコードするスプライシング多型である可能性が高い。この転写産物の

発現と SRS 患者の発症の関係を解析中である。

D. 考察

Peg1/Mest ノックアウトマウスの示す表現型から、ヒト *PEG1/MEST* 遺伝子が SRS の原因遺伝子の最有力候補であることが示された。しかし、SRS 患者のゲノム解析からはこれまでのところ、遺伝子欠損、変異は発見されていない。この原因としては、遺伝学的解析から、SRS の原因遺伝子は複数 (少なくとも 5 つ位) あることが考えられるため、*PEG1/MEST* 遺伝子の異常により発症するケースは必ずしも多くないことが考えられる。遺伝子欠損、変異の検出には解析数を増やす必要があるのかも知れない。*PEG1/MEST* 遺伝子はある種の加水分解酵素をコードしていることから、発病のメカニズムとしてはこの遺伝子の基質となる物質の代謝系の異常が考えられ、これに関係すると考えられるタンパク質をコードする遺伝子は同様に SRS の発症を引き起こすことが考えられる。SRS の発症機構を考える場合、今後はこのような生化学的アプローチも重要になると考えられる。ヒトにおいては *PEG1/MEST* 遺伝子のほとんど唯一の発現部位であると考えられる脳組織の解析はほぼ不可能であり、遺伝子発現解析による SRS の原因遺伝子であることの直接証拠を得ることが難しい。しかし、今回発見した新規スプライシング多型をしめす転写産物の発現に関わるプロモーター部位の解析など、ゲノム DNA 解析から間接的に証明するアプローチ、ゲノムインプリンティングの機構からのアプローチにより因果関係をつきとめたいと考えている。

E. 結論

マウスを用いた分子生物学的解析から、父性発現インプリンティング遺伝子 *Peg1/Mest* は胎児期、新生児期の成長に重要な機能を果たす遺伝子であることが証明された。また、ノックアウトマウスの示す表現型から、ヒト SRS の原因遺伝子の最有力候補であることが示された。ヒトの SRS の原因遺伝子の証

明のために、変異検出のみではなく、この遺伝子の発現制御機構を解明する必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Lefebvre, L., S. Vville, S. C. Barton, F. Ishino, E. B. Keverne and M. A. Surani.

Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene *Mest*. *Nat. Genet.* 20 (2), 163-169 (1998).

2. 学会発表

1) 石野史敏 インプリンティングとその分子機構および機能 第16回日本受精着床学会(大阪:ホテルニューオータニ大阪)平成10年7月9日。

2) Takashi Kohda, Akio Asai, Yoshimi Kuroiwa, Shin Kobayashi, Tomoko Kaneko-Ishino and Fumitoshi Ishino. Tumor suppressor activity of human imprinted gene *Peg3* in gliomas. *Cancer Genetics & Tumor Suppressor Genes* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory) 1998年8月20日。

3) Fumitoshi Ishino, Yasushi Takai, Takafusa Hikichi, Tomohisa Okutsu, Takashi Kohda, Tomoko Kaneko-Ishino. Maternal Imprinting Model, a novel model on molecular mechanism of genomic imprinting. *Mouse Molecular Genetics* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory) 1998年9月3日。

4) 石野史敏、金児-石野知子 ゲノム・インプリンティングの生物学的意義 日本遺伝学会(札幌:北海道大学)平成10年9月23日。

5) ゲノムインプリンティングと発ガン 幸田尚、

奥津倫久、金児-石野知子、石野史敏 第57回日本癌学会(横浜:パシフィコ横浜)平成10年9月30日

6) ゲノミック・インプリンティングと哺乳類の単為発生 第71回日本生化学会(名古屋:国際会議場)平成10年10月14日。

7) 金児(石野)知子、幸田尚、石野史敏 インプリンティングの分子機構モデルを考える 第21回日本分子生物学会(横浜:パシフィコ横浜)平成10年12月18日。

8) 幸田尚、浅井昭夫、黒岩義巳、小林慎、桐野高明、合阪幸三、石野(金児)知子、石野史敏 *PEG3* 遺伝子の glioma におけるがん抑制遺伝子としての働き 第21回日本分子生物学会(横浜:パシフィコ横浜)平成10年12月18日。

9) 三吉直樹、鈴木理可、幸田尚、石野(金児)知子、横山峯介、石野史敏 インプリンティング遺伝子 *Meg1/Grb10* トランスジェニックマウスの解析 第21回日本分子生物学会(横浜:パシフィコ横浜)平成10年12月19日。

10) 野村将志、小林慎、合阪幸三、幸田尚、石野(金児)知子、石野史敏 ヒト *IGF2* と *WT1* の Polymorphic Imprinting について 第21回日本分子生物学会(横浜:パシフィコ横浜)平成10年12月19日。

11) 石野史敏 父親、母親に由来するゲノムの機能的差異 PRESTO Symposia '98 「さきがけ研究21」研究報告会 「遺伝と変化」領域(東京:東京ガーデンパレス)平成10年12月14日。

12) 石野史敏、幸田尚、金児-石野知子 ゲノムインプリンティングの分子機構と生物学的意義について 蛋白質研究所セミナー(大阪:大阪大学)平

成11年1月29日。

13) 石野史敏 遺伝子から見た父と母 「遺伝子研究の新地平」シンポジウム（東京：国際連合大学）
平成11年2月19日。

14) 石野史敏 哺乳類の個体発生におけるゲノムイ
ンプリンティングの役割について1998年度関東甲
信越地区小児がん登録研究会（東京：東京大学）平
成11年2月20日。