

19990351

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 11 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 12 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（佐賀医科大学学生化学講座・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。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行った。その結果、390 kbに及ぶ*Kvlqt1*遺伝子のイントロンにおいてマウス-ヒト間でホモロジーが高く保存されており、転写あるいは転写後制御による機能的制約の可能性が予想された。さらに得られた配列情報をもとに、*H19*遺伝子のインプリンティングに関与する新規のエンハンサーと、メチル化感受性因子の結合配列を同定した。父性発現インプリンティング遺伝子*PEG1/MEST*、*PEG3*、*PEG8*に関して遺伝子疾患との関連を明らかにするために解析を行った。その結果、Silver-Russell 症候群ではヒト*PEG1/MEST* 遺伝子の変異は検出されなかったが、*PEG3* がグリオーマ細胞株の発ガン性を抑制する結果を得た。Wilms 腫瘍では*PEG8* が総ての例で高発現をしていることを確認した。また、SMS-4遺伝子は母親由来遺伝子が発現しているが、Wilms 腫瘍では逆に遺伝子発現が消失していた。ヒト内在性レトロウイルス(HERV)をターゲットとした活性型のHERV単離とインシュリン依存性糖尿病患者のIDDMK1,2-22遺伝子解析を行った。IDDMK1,2-22遺伝子スーパー抗原コード領域の患者解析で2種の変異が同定された。

【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）

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、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 とそれに対応する当該領域のマウスゲノムの解析を行い、

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

Beckwith-Wiedemann 症候群の本態にせまると共に、インプリンティングのドメインレベルでの理解ならびに疾患モデル動物の作成を含む機能解析を行う。2) 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視野に入れて新規遺伝子の単離を行う。そしてその中から疾患原因遺伝子を体系的に探索する。3) インシュリン依存性糖尿病は多因子病であるが、その原因の一つとして内在性レトロウイルスの可能性について遺伝学的に検証する。

B. 研究方法

1. BAC クローンのショットガンシーケンスのため、超音波処理したDNA をショ糖密度勾配超遠心法で分離し、2 kbのDNA断片を回収した。その断片をクローニングしてPCR増幅を行い、シーケンスに用いた。

2. ヒト-マウス間の塩基配列比較により同定された*H19*遺伝子下流領域の保存配列は、*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。また*H19*遺伝子上流のDMR内にある保存配列については、二本鎖の合成オリゴヌクレオチドを作成し、これを用いたゲルシフト法により結合因子の有無を検討した。

3. Silver-Russell 症候群に関してヒト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。Wilms腫瘍に関してヒトWilms腫瘍組織と周辺正常腎組織における*PEG8*遺伝子の発現量の解析を定量的 PCR 法を用いておこなった。グリオーマに関してヒト正常脳組織とグリオーマ発症部位、正常グリア細胞とグリオーマ細胞株の間での*PEG3*遺伝子の発現量の定量を行った。

4. IDDMK1,2-22遺伝子スーパー抗原領域の変異解析としてIDDMK1,2-22遺伝子下流の配列を利用してPCRを行い、ENV N末を含むDNA断片を増幅しクローニングした。

C. 研究結果

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

1) マウス7F4/F5インプリンティング領域の大規模シーケンス

マウス第7染色体F4/F5領域から単離したYAC、BAC、コスミドクローンを物理地図に沿って整列化し、およそ1Mbの領域を完全にカバーした。さらに整列化したBACクローンをを用いて、向井研究室、佐々木研究室及び榊研究室(東大医科研・理研GSC) と共同でショットガン法で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ケンスを終え、現在ギャップを閉じる作業に入っている。向井が担当した分の550 kb は一部をのぞきほとんど終わり、構造解析及び機能解析へと入った。佐々木が担当した領域では2個のBACクローンの全塩基配列が確定した。

2) シーケンス領域のコンピューター解析

*Nap2-Tapa1*間の550 kbについて述べる。この領域の遺伝子の順序としてテロメア側から*Nap2-Ipl-Itm(Impt1)-p57kip2-Kvlt1(Kvlt1)*の転写体内に*Lit1-Mtr1-Tssc4-Tapa1*となった。次いで、既にシーケンスが報告されているヒトとマウス*KVLQTI*(エクソン9-15)間のハープロット解析を行ったところ、*KVLQTI*のイントロン約160 kbにわたってマウス、ヒト間で高いホモロジーが観察された。さらに、エクソン9付近のマウスシーケンスにホモロジーがあるダイレクトリピートシーケンスがヒトシーケンスに観察され、そのシーケンスは*Kvlt1*内で顕著に現れ約6 kbに及ぶL1 トランスポゾンのリピートで

あることがわかった。

3) *Lit1*遺伝子

マウス *Kvlqt1* に対するアンチセンスRNAの *Lit1* について調べた。*Kvlqt1* のエクソン9, 10 付近に集中するESTsシーケンスを用いて調べたところ、すべて父性発現、母性メチル化であることがわかった。次に方向について検討したところ、転写体は *Kvlqt1* のアンチセンス方向であることがわかった。さらに、このRNAは少なくとも60 kbに及ぶ父性発現の転写体であることが分かった。*Lit1* の発生分化における発現とメチレーションについて調べたところ、発現は父性発現であり、メチレーションは母性由来であることがわかった。

4) *Tssc4*遺伝子

Tapa1 近くのESTを用いてマウス胎児cDNAのスクリーニングを行いcDNAを得た。mRNAのサイズは1.7 kbで3つのエクソンよりなり、318個のアミノ酸をコードしていることが予測された。ヒト *TSSC4* はすでに報告されており *Tssc4* と命名した。腎臓と肺に最も発現していた。ついでインプリンティングの有無について検討した。胎児、新生児及び成人各種の組織の発現ではインプリンティングを受けていないことがわかった。

5) *Mtr1*遺伝子

ヒトとマウスのハープロットの結果、*Tssc4* の近くにホモロジーが高いところがあり、近くのESTを用いてマウス胎児cDNAライブラリーをスクリーニングしたところcDNAを得た。ゲノムDNAとの対応で24個のエクソンがあり、ORFは3,474 bpでアミノ酸は1,158であった。この蛋白は7回膜貫通ドメインをC端側にもつポリペプチドであった。この遺伝子はヒト遺伝子 *MTR1* が報告されていたので *Mtr1* と命名した。発現は成人組織では検出できず胎児組織で検出され、3.8-4.1 kbであった。次いで、インプリンティングの状態について検討したが、インプリンテ

ィングを証明することはできなかった。

6) 新規エンハンサーの同定

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。

7) メチル化感受性因子の結合配列の同定

H19 遺伝子の上流にあるおよそ2 kbの領域は、父由来・母由来染色体上でメチル化状態が異なるためDMR (differentially methylated region) と呼ばれている。さらにこの領域を欠失させたマウスでは、*Igf2*、*H19* のインプリンティングが乱されることが分かっている。ヒト-マウス間の塩基配列比較により、この領域内には進化的に保存されたおよそ40 bpの配列が5回繰り返して存在することが分かった。この配列に結合する蛋白質因子について検索したところ、ゲルシフト法で結合因子の存在が確認された。

8) 新規DNAメチルトランスフェラーゼの解析

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。新たなDNAメチルトランスフェラーゼに対する抗体を作成し、マウスの組織、とくに各発生段階における雌雄の生殖巣における蛋白質の局在を調べた。RT-PCR法によりmRNAの存在についても検討した結果、新規のDNAメチルトランスフェラーゼが特定の時期の生殖細胞に存在することを確認することができた。

2. ヒトインプリンティング遺伝子と疾患解析

1) *PEG1/MEST* 遺伝子

Peg1/Mest ノックアウトマウスは変異を父親から受け継いだ場合、出生前後の成長不良を引き起こす。これはヒト Silver-Russell 症候群 (SRS) と酷似した表現型である。そこで、日本人の孤発性患者について遺伝子の変異、欠損を調査したところ、患者に大きな染色体欠損のないことが確認された。また、患者の cDNA のシーケンス解析の結果からはタコーディングフレーム内の変異は発見できなかった。プロモーターからの転写にも異常がないことを確認した。

2) *PEG8* 遺伝子

Wilms 腫瘍において父性発現インプリンティング遺伝子である *PEG8* は周辺正常組織と比べ10-100倍の高発現を示す。また、ヒト *PEG8* は分子量 26kDa の塩基性に富むタンパク質をコードしていた。ヒト *PEG8* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスにはいずれも発生の異常、ガンの発生は見られなかった。

3) *PEG3* 遺伝子

グリオーマ細胞株や患者のグリオーマ組織においてこの遺伝子の発現が有意に低下していることが確認された。一方、グリオーマ細胞株にヒト *PEG3* cDNA の導入を行ったところ、軟寒天培地でのコロニー形成能、ヌードマウスでの腫瘍形成能が失われた。

4) *Meg3/MEG3* 遺伝子

マウス染色体 1 2 番と、その相同領域であるヒト染色体 1 4 番に新規インプリンティング遺伝子 *Meg3/MEG3* を同定し、このインプリンティング領域の正確な位置を決定した。*Meg3* 遺伝子は、父親由来の変異が成長遅滞を起こす *Gtl2* トランスジェニックマウスの原因領域に同定された。

5) *SMS-4* 遺伝子

Wilms腫瘍に関連する遺伝子解析を行った。新規

遺伝子 *SMS-4* を分離し、Wilms腫瘍での発現を観察したところ、47%の例で発現が消失していた。さらに、*IGF2* の発現との関連で解析したところ、すべての例で、*IGF2* のインプリンティングの消去が観察された。

3. インシュリン依存性糖尿病と内在性レトロウイルス

内在性レトロウイルス *HERV-K* 遺伝子の発現解析により、肺、胎盤、精巣で4種の発現が検出された。末血リンパ球ではその中の、グループ II および III のほかに *IDDMK1,2-22* の発現が認められた。

複数の正常組織で発現している *HERV-K* に対応する遺伝子を単離・解析した。グループ I および II はともに 3q21-q23 および 3q12 にマップされた。

患者における *IDDMK1,2-22* 遺伝子の直接解析を行ったところ、スーパー抗原コード領域の変異検索で2つの変異が見い出された。1つはチロシンからシステインへの、もう一つはストップコドンからトリプトファンへのアミノ酸置換を生じる。

D. 考察

マウス染色体 7F4/F5 領域の *Nap2-Tapa1* 間 550 kb のゲノム構成を明らかにした。そして、*Kvlqt1-Tapa1* 間の詳しい解析を行った。インプリンティングに関しては *Kvlqt1* と *Lit1* はインプリンティングを受けていたが、*Tssc4*, *Mtr1* および *Tapa1* はインプリンティングを受けていなかった。*Kvlqt1* のイントロンがマウス-ヒト間でホモロジーが高く保たれているのは予期していなかった。ホモロジーが高い理由として考えられるのは、BWSには低頻度ながら染色体転座があり、しかもその転座が *Kvlqt1* 内に局在していることと関係があると思われる。おそらく、この遺伝子内にはマウス-ヒト間で保存されてい

る遺伝子ないしはエレメントがあり、それが転座により破壊されることによりBWSの発症に影響を与える調節機構が維持されなくなるからであろうと推測される。

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つのエンハンサーと5つのDNA結合蛋白質の結合配列を同定できた。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実証している。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。

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。しかし、SRS 患者の cDNA や一部のゲノムDNA 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。*PEG3* 遺伝子に関してはグリオーマ細胞株への cDNA 導入実験により in vitro でガン抑制活性を持つことを示すことができた。*PEG3* 遺伝子のマップされる染色体19番長腕のLOHはグリオーマにおいてのみ見られるものであり、この領域に特異的なガン抑制遺伝子の存在が示唆されている部位である。これまで、Wilms 腫瘍の発症の原因として *IGF2* 遺伝子のインプリンティングの解除説が提出されているが、今回の解析から Wilms 腫瘍ではそれ以外の原因による遺伝子の高発現が起きていることを明らかに出来た。ヒト *PEG8* 遺伝子はマウス *Peg8* 遺伝子と異なり分子量26kの塩基性に富むタンパク質をコードしている。われわれが開発したサブトラクション・ハイブリダイゼーション法で母性発現インプリンティング遺伝子 マウス *Meg3*/ヒト *MEG3* を同定した。これにより、マウスの染色体上にあると予

想されるインプリンティング領域11ヶ所の7ヶ所にインプリンティング遺伝子を同定できたことになる。他の研究者の解析とあわせると10ヶ所が同定されたことになり、未同定の領域は1ヶ所となった。発見されたインプリンティング遺伝子周辺の解析により、これら領域のインプリンティング遺伝子の全貌が解明されることにより、ゲノムインプリンティングのヒト遺伝子疾患における原因遺伝子の同定が今後さらに進展することが予想される。

1型糖尿病の一原因として提示された IDDMK1,2-22が末血リンパ球で検出されたことは、そのスーパー抗原活性にはクラスII MHCの発現が必要であることを考えた時、意義あることのように思われる。単離した発現能を有する HERV-K遺伝子の一つ(グループI)はIDDM感受性遺伝子座の一つとオーバーラップする領域に局在し、他の二つは末血リンパ球で発現していて、共に興味深い。IDDMK1,2-22遺伝子解析は現在までのところ、52例の患者でスーパー抗原領域に2つの変異が見い出されている。これらがIDDMと関連するものか、さらに症例を増やし、また一般集団での出現頻度と比較することによって相関性の有無を検討していく予定である。

E. 結論

1. 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ン化し、得られたBACクローンをを用いてシーケンスを行った。その結果、*Kvlqt1*遺伝子のイントロンのホモロジーがマウス-ヒト間で高く保存されていることがわかった。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と5つのDNA結合蛋白質の結合配列を同定した。
2. マウスを用いたインプリンティング遺伝子の

体系的な分離から得られたヒトにおける3つのゲノムインプリンティング型遺伝子疾患の原因候補遺伝子を解析し、*PEG1/MEST* 遺伝子が Silver-Russell 症候群、*PEG3* 遺伝子がオリゴデンドログリオーマの発症に、*PEG8* 遺伝子が Wilms 腫瘍の発症のそれぞれ原因候補遺伝子として有望であることを明らかにした。一方、新規ヒト遺伝子 SMS-4 は母親由来が発現するインプリンティング遺伝子であり、Wilms 腫瘍で発現が消失していることがわかった。

3. 胎盤、肺、精巣および末血リンパ球における HERV-K 遺伝子の RT-PCR に基づく発現解析で末血リンパ球に IDDMK1,2-22 の発現を確認したほか、5 種の HERV-K 遺伝子の発現が検出された。このうち、複数の組織での発現が見られた 3 つに対応する HERV-K 遺伝子を単離し解析した。IDDMK1,2-22 と 1 型糖尿病の関わりについて、52 例の患者で IDDMK1,2-22 スーパー抗原コード領域の変異検索を行い、2 種の変異を見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Higashimoto K, Soejima H, Katsuki T, Mukai T.: Identification of a novel single nucleotide polymorphism (SNP) in the human organic cation transporter-like 2-antisense (ORCTLTS) gene. *J Human Genet.*, 45: 58-59 (2000)
2. Higashimoto K, Soejima H, Yatsuki H, Katsuki T, Mukai T.: An Nsi RFLP in the human long QT intronic transcript 1 (LIT1). *J. Hum. Genet.*, 45: 96-97 (2000)
3. Hatada I, Mukai T.: Genomic imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Histol Histopathol.*, 15: 309-312, 2000.
4. Bhuiyan ZA, Yatsuki H, Sasaguri T, Joh K, Soejima H, Zhu X, Hatada I, Morisaki H, Morisaki T and Mukai T.: Functional analysis of the p57KIP2 gene mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Human Genet.* 104: 205-210 (1999)
5. Iwanaga A, Ouchida M, Miyazaki K, Hori K and Mukai T.: Functional mutation of DNA polymerase β found in human gastric cancer-inability of the base excision repair in vitro. *Mutation Research DNA repair.* 435: 121-128 (1999)
6. Lam WWK, Hatada I, Oishi S, Mukai T, Joyce JA, Cole TRP, Donnal D, Reik W, Schofield PN, Maher ER.: Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation. *J. Med. Genet.* 36: 518-523 (1999)
7. Soejima H, Miyoshi O, Yoshinaga H, Masaki Z, Ozaki I, Kajiwara S, Niikawa N, Matsushashi S, Mukai T: Assignment of the programmed cell death 4 gene (PDCD4) to human chromosome band 10q24 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 87:113-114 (1999)
8. Kato, R., Shirohzu, H., Yokomine, T., Mizuno, S., Mukai, T. & Sasaki, H. Sequence-ready 1-Mb YAC, BAC and cosmid contigs covering the distal imprinted region of mouse chromosome 7. *DNA Res.* 6, 401-405 (1999).
9. Ishihara, K., Hatano, N., Furuumi, H., Kato, R., Iwaki, T., Miura, K., Jinno, Y. & Sasaki, H. Comparative genomic sequencing identifies novel tissue-specific enhancers and sequence elements for methylation-sensitive factors implicated in *Igf2/H19* imprinting. *Genome Res.* (in press).
10. Sasaki, H., Ishihara, K. & Kato, R. Mechanisms of *Igf2/H19* imprinting: DNA

methylation, chromatin and long-distance gene regulation (Review). *J. Biochem.* (in press).

11. 佐々木裕之: インプリメンティング (第9章). 岩波講座「現代医学の基礎」, 第5巻「生殖と発生 (森崇英・山村研一編)」, 183-194, 岩波書店 (1999)

12. 佐々木裕之: 単為発生とゲノムインプリメンティング (第7章). 「バイオサイエンスの新世紀」, 第14巻「生命工学: 新しい生命へのアプローチ (浅島誠・山村研一編)」, 共立出版 (印刷中)

13. Naoki Miyoshi, Hirotaka Wagatsuma, Shigeharu Wakana, Toshihiko Shiroishi, Masashi Nomura, Kohzoh Aisaka, Takashi Kohda, M. Azim Surani, Tomoko Kaneko-Ishino and Fumitoshi Ishino. Identification of an imprinted gene, Meg3/Gtl2 and its human homologue MEG3, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genes to Cells* 5, 211-220 (2000).

14. Okutsu, T., Y. Kuroiwa, F. Kagitani, M. Kai, K. Aisaka, O. Tsutsumi, Y. Kaneko, K. Yokomori, M. A. Surani, T. Kohda, T. Kaneko-Ishino and F. Ishino. Expression and imprinting status of human PEG8/IGF2AS, a paternally expressed antisense transcript from the IGF2 locus, in Wilms' tumors. *J. Biochemistry* 127, 475-483 (2000).

15. Miura K, Obama M, Yun K, Masuzaki H, Ikeda Y, Yoshimura S, Akashi T, Niikawa N, Ishimaru T, Jinno Y Methylation imprinting of H19 and SNRPN genes in human benign ovarian teratomas. *Am J Hum Genet* 65 (5): 1359-1367 (1999)

16. Hasuike S, Miura K, Miyoshi O, Miyamoto T, Niikawa N, Jinno Y, Ishikawa M Isolation and localization

of an IDDMK1,2-22-related human endogenous retroviral gene, and identification of a CA repeat marker at its locus. *J Hum Genet* 44 (5): 343-347 (1999)

17. Miura K, Miyoshi O, Yun K, Inazawa J, Miyamoto T, Hayashi H, Masuzaki H, Yoshimura S, Niikawa N, Jinno Y, Ishimaru T Repeat-directed isolation of a novel gene preferentially expressed from the maternal allele in human placenta. *J Hum Genet* 44 (1):1-9 (1999)

2. 学会発表

1. 薦田洋、城圭一郎、三宅康子、森崎裕子、向井常博: 初代培養細胞における、マウスおよびヒト *p57KIP2* のインプリメンティング. 第22回日本分子生物学会年会 1999, 12, 7-10.
2. 辛正翰, 八木ひとみ, 副島英伸, 東元健, 向井常博: 小児腫瘍を伴う Beckwith-Wiedemann 症候群 遺伝子座の新しい遺伝子. 第22回日本分子生物学会年会 1999, 12, 7-10.
3. 副島英伸, 川本祥子, 大久保公策, 木村彰方, 西村聖代, 八木ひとみ, 向井常博: Body Mapping を利用した特発性心筋症の候補遺伝子アプローチ. 第22回日本分子生物学会年会 1999, 12, 7-10. (ポスター発表)
4. 東元健, 副島英伸, 朱喜科, 辛正翰, 陣野吉廣, 香月武, 向井常博: ヒト 11p15.5 インプリメンティングドメインに存在する *ORCTL2S* のインプリメンティング状態と種間での遺伝子の保存. 第22回日本分子生物学会年会 1999, 12, 7-10.
5. 松橋幸子, 副島英伸, 吉永英俊, 向井常博, 尾崎岩太, 成澤寛: Programmed Cell Death 4 (*PDCD4:H731*) 遺伝子の発現とがん化. 第22回日本分子生物学会年会 1999, 12, 7-10.
6. 向井常博: 「エピジェネティクスと発がん」

- Beckwith-Wiedemann 症候群とそれに付随する小児腫瘍.第58回日本癌学会総会(シンポジウム), 1999, 9, 30.
7. 向井常博: ゲノムインプリンティングと疾病機序の解明. 第3回日本内分泌病理研究会(特別講演). 1999, 11, 10.
8. 八木ひとみ, 服部正平, 西村聖代, 榊佳之, 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22回日本分子生物学会年会 1999, 12, 7-10.
9. 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: DNAメチル化とゲノムインプリンティング, 大阪, 1月.
10. 佐々木裕之: ゲノムインプリンティングの機構と個体発生. 開放的融合研究公開シンポジウム: 個体発生のゲノム機能と分子機構の解明, 東京, 3月.
11. 佐渡敬, S. -S. Tan, P. P. L. Tam, E. Li: *Dnmt1*欠損マウスにおけるX染色体不活性化. 日本遺伝学会第71回大会, 広島, 10月.
12. 佐々木裕之: DNAメチル化と染色体ドメインレベルのインプリンティング制御. 日本癌学会第58回総会(シンポジウム: エピジェネティクスと発がん), 広島, 9-10月.
13. 佐々木裕之: クロマチンを介したゲノムインプリンティング制御. 第72回日本生化学会大会(シンポジウム: クロマチン機能の制御), 横浜, 10月.
14. 渡辺卓也, 吉村朗, 三嶋行雄, 遠藤禎郎, 佐々木裕之, 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72回日本生化学会大会, 横浜, 10月.
15. 佐々木裕之, 石原宏, 古海弘康, 加藤玲子: 大規模塩基配列比較に基づく *IGF2/H19* 刷り込み制御配列の同定と解析. 日本人類遺伝学会第44回大会, 仙台, 11月.
16. 佐々木裕之: インプリンティングドメインの構造とクロマチンを介した転写制御. 第22回日本分子生物学会年会(シンポジウム: クロマチン構造と転写制御), 福岡, 12月.
17. 千々岩崇仁, 阿部訓也, 酒井康弘, 河野友宏, 田嶋正二, 佐々木裕之: 哺乳類の新しいDNAメチルトランスフェラーゼ *Dnmt3* の生殖系列における発現. 第22回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月.
18. 石原宏, 佐々木裕之: *Igf2/H19* 遺伝子ドメインのインプリンティング制御領域に結合するタンパク質の同定と解析. 第22回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月.
19. 横峯孝昭, 都築政起, 松田洋一, 佐々木裕之: 鳥類におけるゲノムインプリンティングの検討. 第22回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月.
20. 大野みずき, 青木奈緒, 佐々木裕之: *Igf2* インプリンティングの初期胚における確立過程: アレル特異的RNA-FISHによる転写解析. 第22回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月.
21. 水野晋一, 千々岩崇仁, 佐々木裕之: 新規DNAメチルトランスフェラーゼ *Dnmt3a*, *Dnmt3b* の急性及び慢性骨髄性白血病における発現レベルの検討. 第22回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月.
22. 佐々木裕之: 哺乳動物におけるゲノミックインプリンティング機構. 第2回国際シンポジウム「食資源動物の生物工学」, 京都, 1月.
23. 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.
24. Shin Kobayashi, Hiraku Uemura, Masao Yamada, Norio Niikawa, Takashi Kohda, Tomoko Kaneko-Ishino and Fumitoshi Ishino. Screening of *PEG1/MEST* mutation in Silver-Russell syndrome patients. International Genomic Imprinting Meeting (Dublin) 1999年8月24-26日.

25. 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。
26. 奥津倫久、甲斐正之、横森欣司、金子安比古、横山峯介、鈴木理可、石野（金児）知子、幸田尚、石野史敏 IGF2 のアンチセンストランスクリプト PEG8/IGF2AS の父性発現と Wilms 腫瘍における過剰発現 第22回日本分子生物学会年会 平成11年12月7-10日（福岡）。
27. 小林慎、上村拓、新川詔夫、山田正夫、山崎亮、幸田尚、石野（金児）知子、石野史敏
Silver-Russell 症候群における PEG1/MEST 遺伝子の変異解析 第22回日本分子生物学会年会 平成11年12月7-10日（福岡）。
28. 杉本潤、松浦信夫、陣野吉廣：多因子病への内在性レトロウィルスの関わり。日本人類遺伝学会、1999

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

向井常博

(佐賀医科大学学生化学講座・教授)

ヒト染色体11p15.5はインプリンティング領域であり、その異常により Beckwith-Wiedemann 症候群が発症する。マウスのシンテニー領域としてマウス染色体 7F4/F5が知られている。ここでは、7F4/F5領域の *Nap2-Tapa1*間の550 kbのBAC コンテイングを作成し、シーケンスを行った。その結果、予想外のこととして、390 kbに及ぶ *Kvlqt1*遺伝子のイントロンにおいてマウス-ヒト間でホモロジーが高く保存されており、転写あるいは転写後制御による機能的制約の可能性が予想された。3つの遺伝子が新たに見いだされた。それらは、*Lit1*, *Mtr1* ならびに *Tssc4*である。*Lit1*は *Kvlqt1*遺伝子のアンチセンスRNAであり、父親由来のアリルが発現し、母親由来アリルのメチル化が観察されインプリンティング遺伝子であることが分かった。この遺伝子は少なくとも60 kbにおよぶ転写体を構成していた。*Mtr1* ならびに *Tssc4* はインプリンティングを受けていないことがわかった。

A. 研究目的

ヒト染色体 11p15.5 には 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。この疾患はインプリンティングを受けており、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。今までの研究で、その原因遺伝子として *IGF2* ならびに *p57KIP2* が明らかにされたが、マウスでの機能解析の結果では *IGF2* ならびに *p57KIP2* の異常は共に BWS の症状の一部しか示さず、両者あわせ持つ症状を示すためには *IGF2* のトランスジェニックと *p57KIP2* のターゲティングを組み合わせなければならないという複雑なことになる。これはマウスとヒト間の種の違いと言ってしまえばそれまでであるが、最近の研究結果では、今まで分からなかったドメインレベルでのインプリンティング制御をうまく説明するかも知れない成果がこの領域の研究から得られつつあ

る。なお、ヒト11p15.5にシンテニーを示すマウス染色体は7F4/F5であり、両者のゲノムDNAの構成はよく保存されている。

ここでは、BWSで転座が集中して起り、しかもウィルムス腫瘍でLOH及び腫瘍抑制活性を示す領域でもある *NAP2-TAPA1*間に着目した。そして遺伝子上の機能を浮かび上がらせることを目的に、マウス7F4/F5領域の *Nap2-Tapa1*間の直接シーケンスを試み、ほぼ終了したので構造解析を含め、その結果を報告する。

B. 研究方法

1. 両アリルが区別できるようにするためにポリモルフィズムを用いた。そのためにハイブリッド F1マウスを作成した。用いたマウスはラボラトリーマウスの C57BL/6(B6) と野生マウス PWK(P) であり、それらを掛け合わせて F1 を作成した。作成した F1 マウスは [B6 x P]F1 あるいは

その逆クロスの [P x B6]F1である。

2. BAC コンティグの作成にはDNA マーカーを用いた。プライマーを作成し、PCRの反応には 96 °C 30s, 58-60 °C 30s, 72 °C 30-45s を30-45サイクル行なった。

3. BAC クローンのショットガンシーケンスのため、超音波処理したDNA をショ糖密度勾配超遠心法で分離し、2 kbのDNA断片を回収した。その断片をクローニングしてPCR増幅を行い、シーケンスに用いた。

4. NT_000501とNT_000558の間で保存されているゲノム領域の探索には、blast 2 プログラムのblastnやtblastxを用いた。

C. 研究結果

1. BAC コンティグの作成とシーケンシング
一昨年からスターとしたマウス染色体7F4/F5領域の*Nap2-Tapa1*間のBAC コンティグ作成(約550 kb)、それに続くシーケンシングをほぼ完了した。シーケンシングにはBAC385, BAC131, BAC96P, BAC118 を用い、shot-gun法で行った。その結果、三つの新たな遺伝子を得た。そして、これらの遺伝子のインプリンティングの有無を調べた。

2. シーケンス領域のコンピューター解析
ここでは、詳しく解析した*Kvlqt1-Tapa1*間の390 kbについて述べる。この領域の構造的特徴としてまず、各遺伝子のエクソンがBAC クローン上にマップされた。その結果、遺伝子の順序としてテロメア側から*Nap2-Ipl-Itm(Impt1)-p57kip2-Kvlqt1(Kvlqt1の転写体内にLit1)-Mtr1-Tssc4-Tapa1*となった。次に、CpG islandを調べたところ、3カ所見つかった。CpG1は*Kvlqt1*の転写体内で以下に述べる*Lit1*がある場所、CpG2は*Kvlqt1*の第一エクソン、CpG3は以下に述べる*Tssc4*のプロモーター領域に存在した。CpG islandのシーケンスの特徴として、そのシーケンス内にリピートを持っている場合はその近辺に存在している遺伝子にはインプリンティングが見られた。以下に述べるよう

に、CpG1はリピートを持ち*Lit1*の父性発現、CpG2は同じくリピートを持ち*Kvlqt1*の母性発現、一方CpG3にはリピートがなく*Tssc4*にはインプリンティングが観察されなかった。さらに、EST(expressed sequence tag)探索をしたところ、*Tapa1* 付近と*Kvlqt1*のエクソン10付近に集中して多数のESTが観察された。

ヒトのこの領域のシーケンスはセントロメア側は*NAP2*からテロメア側は*ASCL2*に至るまでの約800 kbが発表されている。そこで、それとマウス*KVLQT1*(エクソン9-15)間のハープロット解析を行った。その結果、*KVLQT1*のイントロン約160 kbにわたってマウス、ヒト間で高いホモロジーが観察された。その中には後で述べる*Lit1*が含まれていた。

さらに、エクソン9付近のマウスシーケンスにホモロジーがあるダイレトリートシーケンスがヒトシーケンスに観察された。そしてそのシーケンスは*Kvlqt1*内で顕著に現れる事がわかった。そしてこのシーケンスは約6 kbに及ぶL1 トランスポソンのリピートであることがわかった。

3. *Lit1(Kvlqt1-AS)* 遺伝子

ヒト*KvLQT1*に対するアンチセンスRNAは*LIT1*あるいは*KvLQT1-AS*、マウスは*Kvlqt1-AS*として一部発表されているが、ここでは詳しく調べたので述べる。*Kvlqt1*のエクソン9, 10 付近に集中するEST(AA867058, AA671389, AA755179)について親由来発現を調べた。両親由来の区別が容易にできるようにハイブリッドマウスを作成し [[B6 x PWK]F1(BPF1) あるいは [PWK x B6]F1(PBF1)]、そのF1マウスを用いて調べたところ、すべて父性発現であることがわかった。ついでDNAのメチル化について調べたところ、AA867058は母性メチル化であることがわかった。この部位はCpG アイランドに位置している。CpG アイランドからはずれたAA671389, AA755179などでは両アリルがメチル化受けていることがわかった。

次に上記ESTの方向について検討したところ、

*Kvlqt1*に対するセンスプライマーを使用した時にのみ転写産物が得られた。この事は、転写体が*Kvlqt1*のアンチセンス方向であることを示している。近くのすべてのESTはアンチセンス方向であることがわかった。

次にこれらESTが大きい領域に散らばって存在しているため、それらがつながりの転写体かどうか明らかでない。そこで、先ずそれぞれのESTをプローブにしてcDNAをスクリーニングし、それぞれのcDNAクローンを得ることにした。cDNAは得ることはできたがそれでもつながりのRNAにならなかったため、*Kvlqt1*のセンスプライマーで作成したcDNAをテンプレートにしてお互いに重なり合ったPCRを行うことにより全RNAをつなげることができた。そのようにして少なくとも60 kbに及ぶ父性発現の転写体を得ることができた。しかしながら、この転写体がつながりであるかどうかは、やはりはっきりしない。転写開始領域にはCpGアイランド(CpG 1)が存在していた。

*Lit1*の発生分化における両親性発現とメチレーションについて調べた。その結果、発現は全体を通して父性発現であり、メチレーションはCpG 1に当たるところは母性由来であることがわかった。

4. *Tssc4* 遺伝子

*Tapa1*近くのEST AA268143を用いてマウス胎児cDNAのスクリーニングを行った。得られたcDNAは1,394 bpであり、mRNAのサイズがノーザンで1.7 kb だったのでほぼ全長に近いと考えられた。ゲノムDNAと比べることにより、この遺伝子は3つのエクソンよりなり、3番目のエクソンに318個のアミノ酸をコードしていることが予測された。ゲノムDNAのサイズは1,719 bpであり、*Tssc4*と命名された。ヒトTSSC4はすでに報告されており、両者をを比較したところアミノ酸レベルで62%のホモロジーが観察された。

ノーザンでは腎臓と肺に最も発現しており、心臓、脳、精巣でも幾分発現していた。ついでインプリンティングの有無について検討した。ハイブリッドマウスのPBF1あるいはBPF1を用い胎児、

新生児及び成人各種の組織(肝臓、腎臓、骨格筋、心臓、肺、脳、精巣、脾臓)の発現を見たところ、両アレルから発現していることがわかった。インプリンティングを受けていないことがわかった。

5. *Mtr1* 遺伝子

ヒトとマウスのハープロットの結果、*Tssc4*の近くにホモロジーが高いところがあり、近くのEST AV227734を用いてマウス胎児cDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、多くのcDNAを得た。ゲノムDNAとの対応で24個のエクソンがあることが分かった。遺伝子の最後のエクソンは2種類あることが分かった。cDNAのサイズは4,184 bp、仮定のORFは3,474 bpでアミノ酸は1,158であった。この蛋白は7回膜貫通ドメインをC端側にもつポリペプチドであった。この遺伝子はヒト遺伝子*MTR1*が報告されていたので*Mtr1*と命名した。マウスとヒト間のホモロジーはアミノ酸レベルで84%であった。発現をノーザンで調べたところ、成人組織では検出できず胎児組織で検出できた。サイズは3.8-4.1 kbであった。次いで、ハイブリッドマウスを用いてインプリンティングの状態について検討した。しかし、いろいろな時期ならびに組織(腎臓、肝臓、脳、骨格筋、肺、心臓、脾臓、および精巣)で調べてみたが、インプリンティングを証明することはできなかった。しかしながら、ヒトについてはハイブリッド細胞を用いて父性発現であると報告されている。

D. 考察

マウス染色体7F4/F5領域の*Nap2-Tapa1*間550 kbのゲノム構成を明らかにした。そして、*Kvlqt1-Tapa1*間の詳しい解析を行った。この領域には5個の遺伝子(*Kvlqt1*, *Kit1*, *Mtr1*, *Tssc4*, *Tapa1*)があり、ヒト、マウス間では遺伝子構成は保たれていた。遺伝子の大きさはそれぞれ*Kvlqt1* 350 kb, *Mtr1* 18 kb, *Tssc4* 1.7 kb, *Tapa1* 16 kbであった。遺伝子間のホモロジーは*Kvlqt1*を除きイントロンにはみられなかった。インプリンティングに関しては*Kvlqt1*と*Lit1*は

インプリンティングを受けていたが、*Tssc4*, *Mtr1* および *Tapal1* はインプリンティングを受けていなかった。

Kvlqt1 のイントロンがマウス-ヒト間でホモロジーが高く保たれているのは予期していないことであった。ホモロジーが高い理由として考えられるのは、BWSには低頻度ながら染色体転座があり、しかもその転座が *Kvlqt1* 内に局在していることと関係があると思われる。おそらく、この遺伝子内にはマウス-ヒト間で保存されている遺伝子ないしはエレメントがあり、それが転座により破壊されることによりBWSの発症に影響を与える調節機構が維持されなくなるからであろうと推測される。それが *LIT1* によるのかもしれないし、他の未知の遺伝子かエレメントかも知れない。一方、BWSのターゲット遺伝子の一つが *p57KIP2* であることを考えると、それに符号する事実がある。それは *p57KIP2* の調節に関することであるが、遺伝子の近くにはインプリンティングを活性化する領域が見つからないのである。つまり、ヒト *p57KIP2* 遺伝子の YAC トランスジェーンを導入しても活性化されないのである。*p57KIP2* と *KvLQT1* 遺伝子は 30 kb 位しか離れていない。従って、距離的に *p57KIP2* 遺伝子の調節領域が *KvLQT1* 遺伝子の中であってもおかしくない。また、*p57KIP2* 遺伝子の 50 kb 位の領域もその対象にはなる。

LIT1 は *KvLQT1* 遺伝子のアンチセンスRNAであるが、*LIT1* の CpG アイランドがインシュレーターとして働くという仮説は魅力的である。これは *IGF1/H19* 領域での仮説のアナロジーとして提出されたものである。彼等が提唱するように BWS で *LIT1* の CpG アイランドのメチル化がはずれ、その結果インシュレーターが父由来アレルのみならず両アレルとも活性化され、それに伴いターゲット遺伝子の *p57KIP2* 遺伝子の発現が抑制されるであろうという仮定であるが、結果は今後を待たねばならない。

E. 結論

マウス染色体 7F4/F5 領域の 550 kb の *Nap2-Tapal* 間の BAC コンテイング作成と、それに続く *Kvlqt1-Tapal* 間の 390 kb のシーケンスを含む解析を行った。その結果、*Kvlqt1* 遺伝子のイントロンのホモロジーがマウス-ヒト間で高く保存されていることがわかった。3つの遺伝子が新たに見いだされた。*Lit1* は *Kvlqt1* 遺伝子のアンチセンスRNAであり、インプリンティングを受けていたが、*Mtr1* ならびに *Tssc4* はインプリンティングを受けていなかった

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Higashimoto K, Soejima H, Katsuki T, Mukai T.: Identification of a novel single nucleotide polymorphism (SNP) in the human organic cation transport-like 2-antisense (ORCTLTS) gene. *J Human Genet.*, 45: 58-59, 2000.
2. Higashimoto K, Soejima H, Yatsuki H, Katsuki T, Mukai T.: An Nsi RFLP in the human long QT intronic transcript 1 (LIT1). *J. Hum. Genet.*, 45: 96-97, 2000.
3. Hatada I, Mukai T.: Genomic imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Histol Histopathol.*, 15: 309-312, 2000.
4. Bhuiyan ZA, Yatsuki H, Sasaguri T, Joh K, Soejima H, Zhu X, Hatada I, Morisaki H, Morisaki T and Mukai T.: Functional analysis of the *p57KIP2* gene mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Human Genet.* 104: 205-210, 1999.
5. Iwanaga A, Ouchida M, Miyazaki K, Hori K and Mukai T.: Functional mutation of DNA polymerase β found in human gastric cancer-inability of the base excision repair in vitro. *Mutation Research DNA repair.* 435: 121-128, 1999.
6. Kato R, Shirohzu H, Yokomine T, Mizuno S, Mukai T and Sasaki H.: Sequence-ready 1-Mb YAC, BAC and cosmid contigs covering the distal imprinted region of mouse chromosome 7. *DNA Research* 6: 401-405, 1999.

7. Lam WWK, Hatada I, Oishi S, Mukai T, Joyce JA, Cole TRP, Donnal D, Reik W, Schofield PN, Maher ER.: Analysis of germline CDKN1C(p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome(BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation. J. Med. Genet. 36: 518-523, 1999.
8. Soejima H, Miyoshi O, Yoshinaga H, Masaki Z, Ozaki I, Kajiwara S, Niikawa N, Matushashi S, Mukai T: Assignment of the programmed cell death 4 gene (PDCD4) to human chromosome band 10q24 by in situ hybridization. Cytogenet. Cell Genet., 87:113-114, 1999

2. 学会発表

1. 薦田洋、城圭一郎、三宅康子、森崎裕子、向井常博：初代培養細胞における、マウスおよびヒトp57KIP2のインプリンティング。第22回日本分子生物学会年会 1999, 12, 7-10.
2. 辛正翰, 八木ひとみ, 副島英伸, 東元健, 向井常博：小児腫瘍を伴う Beckwith-Wiedemann 症候群 遺伝子座の新しい遺伝子。第22回日本分子生物学会年会 1999, 12, 7-10.
3. 副島英伸, 川本祥子, 大久保公策, 木村彰方, 西村聖代, 八木ひとみ, 向井常博：Body Mappingを利用した特発性心筋症の候補遺伝子アプローチ。第22回日本分子生物学会年会 1999, 12, 7-10. (ポスター発表)
4. 東元健、副島英伸、朱喜科、辛正翰、陣野吉廣、香月武、向井常博：ヒト11p15.5インプリンティングドメインに存在するORCTL2Sのインプリンティング状態と種間での遺伝子の保存。第22回日本分子生物学会年会 1999, 12, 7-10.
5. 松橋幸子、副島英伸、吉永英俊、向井常博、尾崎岩太、成澤寛：Programmed Cell Death 4 (PDCD4:H731) 遺伝子の発現とがん化。第22回日本分子生物学会年会 1999, 12, 7-10.
6. 向井常博：「エピジェネティクスと発がん」 Beckwith-Wiedemann 症候群とそれに付随する

小児腫瘍.第58回日本癌学会総会(シンポジウム)、1999, 9, 30.

7. 向井常博：ゲノムインプリンティングと疾病機序の解明。第3回日本内分泌病理研究会(特別講演)。1999, 11, 10.
8. 八木ひとみ, 服部正平, 西村聖代, 榊佳之, 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22回日本分子生物学会年会 1999, 12, 7-10.

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行った。さらに得られた配列情報をもとに、*H19*遺伝子のインプリンティングに関与する新規のエンハンサー5つと、メチル化感受性因子の結合配列少なくとも3つを同定した。さらに、メチル化を触媒する新規DNAメチルトランスフェラーゼの発現時期や組織特異性を解析した。

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遺伝子を多数含んでおり、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のある11p15.5領域に相当する。この領域内には少なくとも8個のインプリンティング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。そこでヒトの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のゲノム解析を行う。さらにインプリンティングに関わる制御配列を同定し、インプリンティングの分子的な機構を探る。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新しいDNAメチルトランスフェラーゼを同定した（昨年度）ので、これらの酵素の発現時期や組織特異性についても解析を行い、インプリンティングとの関連性を調べる。

B. 研究方法

この領域の塩基配列の決定は、昨年度までに物理地図に沿って整列化したBAC（細菌人工染色体）クローンを用い、ショットガン法とND（nested deletion）法を併用して行った。配列データのとりまとめと解析はSequencherとDNASIS（ともに日立ソフト）を用いて行った。

ヒト-マウス間の塩基配列比較により同定された*H19*遺伝子下流領域の保存配列は、*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。また*H19*遺伝子上流のDMR（differentially

methyated region) 内にある保存配列については、二本鎖の合成オリゴヌクレオチドを作成し、これを用いたゲルシフト法により結合因子の有無を検討した。

また、昨年度得た新規DNAメチルトランスフェラーゼの完全長cDNAを大腸菌で発現させ、培養後酵素蛋白質を精製し、これでウサギを免役して抗血清を得た。新規メチルトランスフェラーゼの発現時期や組織特異性の解析には、この抗体を用いた免疫組織染色とRT-PCR法を用いた。

C. 研究結果

1. インプリンティング領域の大規模シーケンス

マウス第7染色体F4/F5領域から単離したYAC(酵母人工染色体)、BAC、コスミドクローンを物理地図に沿って整列化し、およそ1Mbの領域を完全にカバーした(論文発表1)。さらに整列化したBACクローン(DNAが最も安定に維持される)を用いて、向井研究室(研究代表者)および榊研究室(東大医科研・理研GSC)と共同でショットガン法ならびにND法を併用する方法で、その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ケンスを終え、現在ギャップを閉じる作業に入っている。我々が担当した4つのBACクローンのうち2個については間もなく全塩基配列が確定し、ほどなくデータベースに公開できる見通しに達した。

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(論文発表2)。

3. メチル化感受性因子の結合配列の同定

*H19*遺伝子上流にあるおよそ2kbの領域は、父由来・母由来染色体上でメチル化状態が異なるためDMR(differentially methylated region)と呼ばれている。さらにこの領域を欠失させたマウスでは、*Igf2*、*H19*のインプリンティングが乱されることが分かっている。ヒト-マウス間の塩基配列比較により、この領域内には進化的に保存されたおよそ40bpの配列が5回繰り返して存在することが分かった。この配列に結合する蛋白質因子があれば、それはインプリンティングの制御に重要な働きをすると考えられる。そこでこれらの配列を含む二本鎖の合成オリゴヌクレオチドを作成し、ゲルシフト法を行ったところ、少なくとも2種類の結合因子の存在が確認された。しかも5つのうちの3つの配列に結合する因子は、標的配列がメチル化されると結合が弱くなることが分かった(論文発表2)。この因子はメチル化状態に依存して*Igf2*、*H19*のインプリンティングを制御している可能性がある。

4. 新規DNAメチルトランスフェラーゼの解析

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。昨年度同定した新たなDNAメチルトランスフェラーゼに対する抗体を作成し、マウスの組織、とくに各発生段階における雌雄の生殖巣における蛋白質の局在を調べた。またRT-PCR法によりmRNAの存在についても検討した。その結果、新規のDNAメチルトランスフェラーゼが特定の時期の生殖細胞に存在することを確認することができた。しかし詳細はまだ検討中である。

D. 考察

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つのエンハンサーと5つのDNA結合蛋白質の結合配列を同定できた。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実証している。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ン化し、得られたBACクローンをを用いてシークエンスを行った。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と5つのDNA結合蛋白質の結合配列を同定した。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きたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato, R., Shirohzu, H., Yokomine, T., Mizuno, S., Mukai, T. & Sasaki, H. Sequence-ready 1-Mb YAC, BAC and cosmid contigs covering the distal imprinted region of mouse chromosome 7. *DNA Res.* 6, 401-405 (1999).
2. Ishihara, K., Hatano, N., Furuumi, H., Kato, R., Iwaki, T., Miura, K., Jinno, Y. & Sasaki, H. Comparative genomic sequencing identifies

novel tissue-specific enhancers and sequence elements for methylation-sensitive factors implicated in *Igf2/H19* imprinting. *Genome Res.* (in press).

3. Sasaki, H., Ishihara, K. & Kato, R. Mechanisms of *Igf2/H19* imprinting: DNA methylation, chromatin and long-distance gene regulation (Review). *J. Biochem.* (in press).

4. 佐々木裕之: インプリンティング (第9章). 岩波講座「現代医学の基礎」, 第5巻「生殖と発生(森崇英・山村研一編)」, 183-194, 岩波書店(1999)

5. 佐々木裕之: 単為発生とゲノムインプリンティング (第7章). 「バイオサイエンスの新世紀」, 第14巻「生命工学: 新しい生命へのアプローチ(浅島誠・山村研一編)」, 共立出版 (印刷中)

2. 学会発表

1. 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: DNAメチル化とゲノムインプリンティング, 大阪, 1月.

2. 佐々木裕之: ゲノムインプリンティングの機構と個体発生. 開放的融合研究公開シンポジウム: 個体発生のゲノム機能と分子機構の解明, 東京, 3月.

3. 佐渡敬, S. -S. Tan, P. P. L. Tam, E. Li: *Dnmt1* 欠損マウスにおけるX染色体不活性化. 日本遺伝学会第71回大会, 広島, 10月.

4. 佐々木裕之: DNAメチル化と染色体ドメインレベルのインプリンティング制御. 日本癌学会第58回総会 (シンポジウム: エピジェネティクスと発がん), 広島, 9-10月.

5. 佐々木裕之: クロマチンを介したゲノムインプリンティング制御. 第72回日本生化学会大会 (シンポジウム: クロマチン機能の制御), 横浜, 10月.

6. 渡辺卓也, 吉村朗, 三嶋行雄, 遠藤禎郎, 佐々木裕之, 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72回日本生化学会大会, 横浜, 10月.

7. 佐々木裕之, 石原宏, 古海弘康, 加藤玲子: 大規模塩基配列比較に基づく *IGF2/H19* 刷り込み制御配列の同定と解析. 日本人類遺伝学会第44回大会, 仙台,

11月.

8. 佐々木裕之: インプリンティングドメインの構造とクロマチンを介した転写制御. 第22回日本分子生物学会年会 (シンポジウム: クロマチン構造と転写制御), 福岡, 12月.
9. 千々岩崇仁, 阿部訓也, 酒井康弘, 河野友宏, 田嶋正二, 佐々木裕之: 哺乳類の新しいDNAメチルトランスフェラーゼ*Dnmt3*の生殖系列における発現. 第22回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月.
10. 石原宏, 佐々木裕之: *Igf2/H19*遺伝子ドメインのインプリンティング制御領域に結合するタンパク質の同定と解析. 第22回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月.
11. 横峯孝昭, 都築政起, 松田洋一, 佐々木裕之: 鳥類におけるゲノムインプリンティングの検討. 第22回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月.
12. 大野みずき, 青木奈緒, 佐々木裕之: *Igf2*インプリンティングの初期胚における確立過程: アレル特異的RNA-FISHによる転写解析. 第22回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月.
13. 水野晋一, 千々岩崇仁, 佐々木裕之: 新規DNAメチルトランスフェラーゼ*Dnmt3a*, *Dnmt3b*の急性及び慢性骨髄性白血病における発現レベルの検討. 第22回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月.
14. 佐々木裕之: 哺乳動物におけるゲノミックインプリンティング機構. 第2回国際シンポジウム「食資源動物の生物学」, 京都, 1月.

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、Peg3、Peg8 のに関してヒト相同遺伝子の遺伝子疾患との関連を明らかにするため、当該遺伝子疾患の患者ゲノムでの変異解析、遺伝子改変マウスを用いた解析、培養細胞への遺伝子導入実験を行った。対象とした遺伝子疾患は3つで 1) 出生前後の成長不良と小奇形を伴う Silver-Russell 症候群 (SRS) 2) ゲノムインプリンティング型遺伝病の代表的な例である Beckwith-Wiedmann 症候群 (BWS) およびそこで高頻度に発生する Wilms 腫瘍 3) 脳腫瘍であるグリオーマである。SRS 患者 14 人の遺伝子解析からはヒト PEG1/MEST 遺伝子の変異は検出されなかった。7 番染色体の母親性 2 倍体で SRS が発症する場合は、この遺伝子の発現が無くなることの関与が大きいと考えられるが、他の SRS の場合この遺伝子の変異による発症率は高くはないと結論された。Wilms 腫瘍ではヒト PEG8 が総ての例で 10 倍から 100 倍の高発現をしていることを確認した。これにより、単にインプリンティング機構が解除されたため、発現量が 2 倍に増え発ガンに至るというこれまでのモデルに再検討が必要になった。現在、PEG8 の発現過剰と Wilms 腫瘍発生との因果関係について検討を続けている。ヒト PEG3 がグリオーマ細胞株の発ガン性を抑制する結果を得た。また、脳腫瘍サンプルでもオリゴデンドログリオーマでは初期から発現が非常に低下することを見ている。また、マウス染色体 12 番、ヒト染色体 14 番に新規インプリンティング遺伝子 Meg3/MEG3 を同定しインプリンティング領域の正確な位置を決定できた。これにより、骨格形態異常、精神遅滞、胎盤の機能に重要なインプリンティング遺伝子の分離の道が開かれた。

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生分離したが、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。

本研究の目的は、(1)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こと。(2) ヒト染色体 11p15.5 のインプリンティング領域の変異により高発現する Wilms 腫瘍の発生と PEG8 遺伝子の発現との関連を明らかにすること。(3) ヒト染色体 19 番長腕の LOH により高発現する脳腫瘍 (グリオーマ) と PEG3 遺伝子の発現との関係を明らかにすることにある。また体系的なインプリンティング遺伝子の分離を