

継続し、未同定のインプリンティング領域の位置の決定と、その領域の表現型の原因遺伝子候補の分離を行うことを目的としている。

## B. 研究方法

(1) SRS に関して 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。また、発現している cDNA および一部のゲノム DNA 領域のシーケンスを行い、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した。

(2) 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。また、ヒト PEG8 遺伝子にタンパク質がコードされるかどうかを *in vitro* translation 法で確かめた。

(3) 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。またグリオーマ細胞株にヒト PEG3cDNA を導入し、発ガン活性に与える影響を調べた。また、グリオーマにおける PEG3 遺伝子の発現量の低下の原因を解析するため、プロモーター部位の DNA メチル化解析を行った。

(4) 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により新規母性発現遺伝子の分離を継続する。インプリンティングの証明を行った後、染色体上にマッピングすることにより新規インプリンティング領域の同定を目指す。

## C. 研究結果

(1) 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 SRS と酷似した表現型である。そこで、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 ケ所について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 PEG1/MEST 遺伝子のタンパク質のコーディングフレーム内の変異は発見できなかった。また、PEG1/MEST 遺伝子において上流の異なるプロモーターから転写される新規転写産物を発見した。これは、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。しかし、SRS 患者においてどちらの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) 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 倍の高発現を示した。隣接する IGF2 遺伝子も同程度の高発現をすることも確かめられ、Wilms 腫瘍における PEG 遺伝子の過剰発現が、単にインプリンティングの解除による 2 倍の発現量の増加ではないことを明らかにした。また、ヒト PEG8 は分子量 26k の塩基性に富むタンパク質をコードすることを確認した。これまで、ヒト PEG8 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製、解析したが、胎児期、新生児期および成体期いずれも発生の異常、ガンの発生は見られなかった（未発表）。ヒト腎臓細胞由来の正常細胞にヒト PEG8 遺伝子を導入実験からは不死化した細胞の出現は見られなかった。現在、マウス 3T3 細胞への導入実験を行い発ガン性の解析を行っている。

(3) 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（投稿中）。現在、オリゴデンドログリオーマの発症過程における PEG3 遺伝子の発現、および変異の有無を解析中である。

(4) 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できた。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。しかし、この遺伝子自身にはタンパク質をコードする ORF が見られないことから、成長遅延の原因の詳細は不明である。ヒトおよびマウスではこの領域の片親性 2 倍体で、骨格形態異常、精神遅滞、胎盤の機能異常などの表現型があらわれるため、この領域は広範囲に渡ってインプリンティング領域を形成していると考えられる。これら表現型の原因となる重要なインプリンティング遺伝子の分離を進めている。

#### 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。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。また、ヒトにおいてはこの遺伝子が 2 つの異なるプロモーターを用い、N 末のアミノ酸構造の異なるタンパク質を発現することが最近明らかになった。上流にあるプロモーターは両親性の発現を示す。しかし SRS 患者の血液サンプルを用いた解析では、どちらのプロモーターからの発現も正常に起きていることが確認された。ノックアウトマウスの結果からは 7 番染色体の母親性

2 倍体での SRS の発症にヒト PEG1/MEST 遺伝子の関与が大きいと考えられる。しかし遺伝学的解析から、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、他の SRS 患者において 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と結論される。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、SRS 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に異常が考えられ、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。

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。PEG3 遺伝子は最近、アポトーシスに p53 または p53 の下流遺伝子と共同して機能している可能性が示唆されている。これは、PEG3 がグリオーマにおいてガン抑制活性を持つことと矛盾しない。グリオーマ（オリゴデンドログリオーマ）の発症過程において初期から遺伝子発現が低下していることを既に見ており、相関関係は高いことが分かっている。今後、PEG3 遺伝子がグリオーマのガン抑制遺伝子であるかどうかを、臨床標本における変異解析により因果関係を証明したい。

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。このタンパク質は他のタンパク質との相同性を示さないが、核内タンパク質として遺伝子発現の制御に関与している可能性が高い。トランスジェニックマウス、正常ヒト腎臓細胞への遺伝子導入実験により PEG8 遺伝子単独での発ガンへの関与は否定的である結果を得ているが、実際の Wilms 腫瘍では PEG8 遺伝子と Igf2 遺伝子の両者が高発現していることから、これらの条件を反映したトランスジェニックマウス、および細胞株での実験が必要であると考えている。

われわれの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が今後さらに進展することが予想される。

#### E. 結論

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 SRS、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。また、精神遅滞、骨格形成異常、胎盤機能異常を引き起こすマウス染色体 12

番とその相同領域であるヒト染色体 14 番に新規 Meg3/MEG3 遺伝子の同定に成功し、これら遺伝子疾患の原因遺伝子の探索が可能となった。

#### 1. 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).

#### 2. 学会発表

- 1) 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。
- 2) 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。

3) 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。

4) 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）。

5) 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）。

## 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

ヒト内在性レトロウイルス(HERV)をターゲットとしたメチル化解析や、それらと多遺伝子病の関わりを明らかにし発症に至るゲノム基盤を解析することによってインプリンティング分子機構解明の糸口を探ることを目的として、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。胎盤、末血リンパ球、精巣および胎児肺を用いたRT-PCRに基づく発現解析から、IDDMK1,2-22のほか5つのHERV-K遺伝子が発現していることが明らかになった。オリゴプローブを用いてこれらに対応するBACクローンを単離し局在を決定した。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。

### 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の影響を受けると考えられる自己免疫疾患である。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、患者脾臓培養上清から単離されたヒト内在性レトロウイルス(HERV)に属するIDDMK1,2-22がスーパー抗原活性を持つことが示された。HERVはメチル化の主たるターゲットである寄生性DNA因子の一つであり、全体レベルで見た時、刷り込み遺伝子と同じように配偶子特異的メチル化パターンを示す一方、体細胞においては双方のアレルが高度にメチル化されている。

HERVをターゲットとして、それらのメチル化を活性別、(インプリンティングドメイン内外の)局在別に調べることにより、また、HERVのIDDMへの関わりを明確にし、発症に導くゲノム基盤を解析することに

よりインプリンティング分子機構解明の糸口を探ることを目的として、活性型HERV遺伝子の単離とIDDMK1,2-22の患者解析を行った。

### B. 研究方法

1. 発現解析: RT-PCRとそれに引き続くシーケンシングにより発現解析を行った。核DNAのPCR産物がハプロイドゲノム当り30~50コピー存在するHERV-K遺伝子を反映して種々の配列を示すのに対して、RNAのPCR産物の配列は発現している少数の活性型遺伝子を反映して数種類の配列にグルーピング化されるという仮定のもとに作業を進めた。胎盤、胎児肺、精巣および末血リンパ球よりRNAを抽出し、Poly(A)<sup>+</sup>RNAを精製してテンプレートした。さらに、逆転写反応に先立ってDNase処理を施して混入DNAの影響を可及的小さくした。ENV領域よりプライマーをとり、589 bpの配列をnested PCRにより増幅した。RT (+)とRT (-)の反応で4サイクル以上の差が得ら

れたものを次のステップに進めてクローニングした。各サンプルで30クローン前後をピックアップして塩基配列を解析した。

2. 活性型HERV-K遺伝子単離と局在：RT-PCRに基づく発現解析でグループ化したHERV-Kに対応する遺伝子を単離するため、核DNAのPCRクローンおよび各グループの配列を比較してそれぞれに特異的なオリゴプローブを作製し、BACライブラリーをスクリーニングした。得られたBACクローンは発現解析に用いたのと同じプライマーでPCRを行って、目的とする配列と100%一致することを確認した後コスミドベクターにサブクローニングした。

また、各クローンのユニーク配列部分よりプライマーを作製し、Radiation hybrid panelを用いて局在を決定した。

3. インプリンティングドメイン内に局在するHERV-K遺伝子のスクリーニング：GAGあるいはENVプローブで得られたコスミドクローンの中から、GAG、ENVおよびLTR領域のPCR全で増幅の認められたfull-lengthのHERV-K遺伝子を持つと推定されるクローンを選び、制限酵素マップでさらに分類してシーケンシングを行い、Radiation hybrid mappingでインプリンティングドメイン内に局在するHERV-K遺伝子をスクリーニングした。

4. IDDMK1,2-22遺伝子スーパー抗原領域の変異解析：IDDMK1,2-22遺伝子下流の配列を利用してnested PCRを行い、ENV N末を含む2.6 kbのDNA断片を増幅した。これをXbaIにより切断してENV N末端領域の614 bp DNA断片をクローニングした。10~20コロニーをピックアップして1つとして培養しシーケンシング解析を行った。

## C. 研究成果

HERV-K遺伝子の発現解析では肺におい

て3つの転写産物にグループ化され、頻度の高いものから順に group I, II および IIIとした。胎盤ではこれらに加え第四のグループが検出された。精巣ではこれらの内の一つ (group I) とこれらとは別個の一つの二つのみの発現が検出された。末血リンパ球では group II および III のほかにIDDMK1,2-22の発現が認められた。また、参考として、HERV-K がよく発現していることの知られている teratocarcinoma cell line (PA-1) における発現を調べたが、正常組織で検出されたものとは別個の配列が大半を占めた。さらに、これとは別の teratocarcinoma cell line (Tera2) の cDNA ライブラリーから単離された HERV-K 遺伝子とも異なっていた。

複数の正常組織で発現しているHERV-Kに重点を置いて、これらに対応する遺伝子を単離・解析した。途中、他の研究グループよりHERV-Kの系統的単離・報告がなされ、グループ III はHERV-K102と一致するものであることが分かった。グループ I および II はともに3番染色体に局在し、それらの座位はそれぞれ3q21-q23 および3q12であった。I はENV N末端に292 bpのインサクションのあるtype 2、II はこれを欠くtype 1に属するHERVであった。また、ともに両端のLTR U5領域の157 bpが欠失している構造をしており、これまで報告されているfull-lengthのHERV-Kには見られない特徴である。

GAGあるいはENVプローブで単離された75個のコスミドクローンのうち、GAG、ENVおよびLTR領域のPCRで全て増幅したクローンは33クローンであった。これらのrestriction patternよりさらに6群に分け、制限酵素マップおよび一部シーケンシングを行ったところ2種類のHERV-K遺伝子を運ぶオーバーラッピングクローンであること

が判明した。そのうちの一つはPA-1細胞で発現しているHERV-K遺伝子に対応するもので、22q11に局在する。もう一つはセントロメリックリピートにHERV-K遺伝子が囲まれている形で局在を決めることができなかった。コンピューターによる検索では、ゲノムデータベースに登録されている11p15.5コンティグ 1.5 Mbおよび15q11-q13領域の488 kbの配列の中には完全構造のHERV-K および 65% 以上のホモロジーを持つ solo LTRも見い出されなかった。

IDDMK1,2-22と1型糖尿病の関連性を伝達不平衡テストにより検証する予定だったが、両親サンプルの集積に時間がかかっている間、立て続けに2ヶ所よりHERV-Kの系統的単離を行っている研究グループが出現して危機感を抱き、患者におけるIDDMK1,2-22遺伝子の直接解析を行うことにした。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N末端(ATG)から290番目のAがGに変わったもの、もう1つは461番目のAがGに変わったものである。前者はチロシンからシステインへの、後者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。この2つの変異に関して3つのアレルが存在し、解析中の52例でA-Aアレルが75、A-Gアレルが21、G-Gアレルが8の頻度であった。G-G/G-Gのホモ接合型がIDDM患者52例中2例存在し、予測値より高くなっていた。

#### D. 考察

RT-PCRに基づく発現解析では仮定した通り少数のグループに分類することができ、これらに対応するHERV-K遺伝子は発現能を有すると推察された。しかし、その発現はpoly(A)<sup>+</sup>RNAを用いてnested PCRでやっと検出される程度で、しかもDNaseの前

処理を十分行っていないとRT(+)とRT(-)で差が出ないくらい高度に抑制されていると判断される。ノーザン解析やcDNAを単離しない限りそれらの転写産物の性状の詳細を知ることはできないが、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。

インプリンティングドメイン内に局在するHERV-K遺伝子単離は不首尾に終わった。また、コンピュータ検索でも11p15.5あるいは15q11q13領域に存在するHERV-Kを見い出すことができなかった。インプリンティングドメイン内外の局在別にメチル化を解析する目的には他のHERVファミリーを選ぶか、あるいは他の寄生性DNA因子に変更する必要があるかもしれない。

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。さらに、変異アレルのスーパー抗原活性を測定し正常型のそれと比較して意義付けを探る。また、Conradたちがスーパー抗原活性を示した実験に用いた細胞はヒト単球由来のcell lineで、IDDMK1,2-22は正常アレルであったことから、(正常より)多量に発現することが活性の条件であることが示唆され、LTR配列の変化やメチル化の変化による発現量の変化が発症に対応しているこ

とも考えられる。この点も検討していきたい。 human placenta. J Hum Genet 44 (1):1-9

## E. 結論

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種の変異を見い出した。

今後、さらに症例を増やして検索し、相関解析やスーパー抗原活性測定などを行って見い出した変異の意義を探るほか、LTR領域の変異の検索やメチル化の変化等の解析を単離した他の活性型HERV-K遺伝子についても行っていく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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

Hasuike S, Miura K, Miyoshi O, Miyamoto T, Niikawa N, Jinno Y, Ishikawa M (1999) 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

Miura K, Miyoshi O, Yun K, Inazawa J, Miyamoto T, Hayashi H, Masuzaki H, Yoshimura S, Niikawa N, Jinno Y, Ishimaru T (1999) Repeat-directed isolation of a novel gene preferentially expressed from the maternal allele in

## 2. 学会発表

杉本潤、松浦信夫、陣野吉廣：多因子病への内在性レトロウイルスの関わり。日本人類遺伝学会、1999



## 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）

Beckwith-Wiedemann 症候群の原因遺伝子としてp57KIP2を検討したところ、本邦では17%、英国では9%の変異が見つかった。変異による異常は、細胞レベルではリン酸化阻害活性、あるいは核移行の欠如という形で現れた。BWS 領域での新規遺伝子として、*ITM* (*IMPT1*, *ORCTL2*), *SMS-1*, *SMS-2*などが明らかになった。一方、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クローンのシークエンスを行った。疾患関連遺伝子や制御配列の検索を開始し、新規エンハンサーとDNA結合蛋白質の結合配列を同定した。ヒトにおける4つのゲノムインプリンティング受ける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* 遺伝子や*SMS4*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がわかった。1型糖尿病のスーパー抗原としてヒトレトロウイルスHERV-K遺伝子の関与が考えられている。胎盤、肺、精巣および末血リンパ球におけるHERV-K遺伝子の発現解析で末血リンパ球にIDDMK1,2-22の発現を確認し、5種のHERV-K遺伝子の発現が検出された。そして、遺伝子を単離し解析した。さらに、IDDMK1,2-22と1型糖尿病の関わりについて、患者のIDDMK1,2-22スーパー抗原コード領域の変異検索を行い、変異を見出した。

神経病、糖尿病のほか、種々の腫瘍、また、未同

### 【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）

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、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

### 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、

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. *p57KIP2*の患者解析は従来準備していたプライマーを用いて、直接シーケンスで決定した。*p57KIP2* 変異体を作成し細胞に感染させ、その機能を調べた。

2. 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、対応するマウスクローンを分離した。

3. 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クローンをを用い、ショットガン法で行った。

4. 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、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、ゲルシフト法により結合因子の有無を検討した。

5. 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。

6. ヒトインプリンティング遺伝子を得るために、体系的スクリーニング法を開発しそれによりマウスのインプリンティング遺伝子を得、それをもとにヒト遺伝子を分離した。そして染色体マップの結果から、次のような疾患との関連を調べた。Silver-Russell 症候群に関して*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*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*PEG3*遺伝子の発現量の定量を行った。

7. 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) Beckwith-Wiedemann 症候群の解析  
Beckwith-Wiedemann 症候群の原因遺伝子として *p57KIP2* を検討した。その結果、本邦では24名中4名、英国では67名中6名の変異が見つかった。変異の結果をまとめると、患者ではC末付近に位置するグルタミン、スレオニンリッチなQTドメインが常に欠失していることがわかった。原因遺伝子として確認するために細胞にその変異体を導入しその影響を調べたところ、導入した変異体によりリン酸化阻害活性、あるいは核移行の欠如などが観察された。一方、この症候群に伴って発症する小児腫瘍についても検討したところ、変異は見いだされなかったが、発現が抑制を受けていることがわかった。

さらに、ヒト*TAPA1*から*NAP2*遺伝子に至る領域において新規遺伝子の探索を行った結果、*ITM (IMPT1, ORCTL2)*, *SMS-1*, *SMS-2*, *SMS-3*, *SMS-4*などの遺伝子が明らかになった。*SMS-4*はさらに詳しく解析したところ、インプリンティングを受けており、母親由来遺伝子が発現していた。Wilms腫瘍でその発現を調べたところ、47% (19例中9例) に発現の消失が観察された。さらに、*SMS-4*の発現が消失している例はすべての例に*IGF2*のインプリンティングの消失(loss of imprinting)が観察された。

2) インプリンティング領域の大規模シーケンスとその解析  
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た。次いで、既にシーケンスの間のハープロット解析を行ったところ、*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。

マウス*Kvlqt1*に対するアンチセンスRNAの*Lit1* 遺伝子について調べた。*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。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り、発生・分化における発現状況は変わらなかった。

*Tpa1*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ところ、インプリンティングを受けていないことがわかった。

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。発現は胎児組織で検出されたが、インプリンティングを証明することはできなかった。

### 3) 新規エンハンサーの同定

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。

### 4) メチル化感受性因子の結合配列の同定

ヒト-マウス間の塩基配列比較により、*H19*遺伝子の上流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。

5) 新規DNAメチルトランスフェラーゼの解析  
新たなDNAメチルトランスフェラーゼを分離した。それに対する抗体を作成し、マウスの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。さらに、mRNAの存在についても検討した結果、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

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法を用いて*Peg1/Mest*, *Peg8*, *Peg3* 遺伝子を得た。それをもとにヒト遺伝子を得、疾患との対応を明らかにした。

### 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、コーディングフレーム内の変異、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倍の高発現を示した。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* の遺伝子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、マップした。*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。

## 3. インシュリン依存性糖尿病と内在性レトロウイルス

インシュリン依存性糖尿病 (IDDM) の発症に関与すると考えられる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

今までのサイクリンキナーゼインヒビター *p57KIP2* 遺伝子変異の結果をまとめると、日本人

の例は 17% であり、英国の例は 9% である。この頻度は、これが原因遺伝子だとするにはあまり高くない。変異がなく発現が抑制されている例が多くあるのだろうか。そのような可能性は後で述べる仮説によると多いに考えられることではある。

ここで見られた変異に共通してみられたのは C 末付近に位置するグルタミン、スレオニンリッチな QT ドメインが常に欠失しており、蛋白質としてこの領域が重要であることが示唆された。一方、QT ドメインには核移行シグナルが存在すると言われており、また最近ではこの蛋白の C 末には PCNA (proliferating cell nuclear antigen) の結合部位があるといわれている。我々の実験では、患者 6 のみならず患者 8 でも核移行ができないという形で正常に機能しないことが細胞レベルで証明された。

Wilms 腫瘍に関していくつかの遺伝子の変異検索を進めた。その遺伝子は、*IPL*, *ITM(IMPT1)*, *ORCTL2S*, *p57KIP2* などである。数十例解析したが、残念ながら変異は見つからなかった。その理由として、*p57KIP2* が *BWS* の原因遺伝子なので、仮に腫瘍でこの遺伝子に変異が入ったとしても多分第二の変異が必要であり、それが欠失という形で来ると変異が全然見つからないという結果が出ることも多いに予想されることではある。

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、*HI9*遺伝子領域40kbの配列をヒト-マウス間で比較したところ、エンハンサーと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。われわれの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. Beckwith-Wiedemann 症候群の原因遺伝子として *p57KIP2* を検討した。その結果、本邦では17%、英国では9%の変異が見つかった。細胞レベルでのその変異による異常は、リン酸化阻害活性、あるいは核移行の欠如という形で現れた。また、随伴する小児腫瘍についても検討したところ、変異は見いだされなかったが、発現が抑制を受けていることがわかった。BWS 領域での新規遺伝子として、*ITM (IMPT1, ORCTL2)*, *SMS-1*, *SMS-2* などが明らかになった。
2. 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、新規エンハンサーと DNA 結合蛋白質の結合配列を同定した。
3. 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。

4. 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

平成 9 年度

- Hatada, I., Nabetani, A., Arai, Y., Ohishi, S., Suzuki, M., Miyabara, S., Nishimune, Y and Mukai, T. Abberent methylation of an imprinted gene *U2af1-rs1 (SP2)* caused by its own transgene. *J. Biol. Chem.*, 272, 9120-9122, 1997.
- Hatada, I., Nabetani, A., Morisaki, H., Xin, Z., ohishi, S., Tonoki, H., Niikawa, N., Inoue, M., Komoto, Y., Okada, A., Steichen, E., Ohashi, H., Fukumiti, Y., Nakayama, M. & Mukai, T. New imprinted gene in Beckwith-Wiedemann syndrome *Hum. Genet.*, 100, 681-683, 1997.
- Nabetani, A., Hatada, I., Morisaki, H., Oshimura, M., and Mukai, T. Mouse *U2af1-rs1* is a neomorphic imprinted gene. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 789-798, 1997.
- Soejima, H., Mclay, J., Hatada, I., Mukai, T., Jinno, Y., Niikawa, N. & Yun, K. 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.
- Schwienbacher, C., Sabbioni, S., Campi, M., Veronese, A., Bernardi, G., Menegatti, A., Hatada, I., Mukai, T., Ohashi, H., Barbanti-Brodano, G., Croce, C. M. & Negrini, M. Transcriptional map of 170kb region at the 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.
- Sermsuvitayawong, K., Wang, X., Nagabukuro, A., Matsuda, Y., Morisaki, H., Toyama, K. & Mukai, T. Genomic organization of *Ampd3*, heart-type AMPD gene, located mouse chromosome 7 *Mammal. Genom.*, 8, 767-769, 1997.
- Zubair, M., Hilton, K., Saam, J.R., Surani, M.A., Tilghman, S.M. & Sasaki, H. Structure and expression of the mouse *L23mrp* gene downstream of the imprinted *H19* gene: biallelic expression and lack of interaction with the *H19* enhancers. *Genomics* 45, 290-296, 1997.
- Hayashida, T., Eversole-Cire, P., Jones, P.A. & Sasaki, H. Imprinted genes are up-regulated by growth arrest in embryonic fibroblasts. *J. Biochem.* 122, 901-903 1997.
- Moore, T., Constancia, M., Zubair, M., Bailleul, B., Feil, R., Sasaki, H. & Reik, W. Multiple imprinted sense and antisense transcripts, differential methylation and tandem repeats in a putative imprinting control region upstream of mouse *Igf2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12509-12514 1997.
- H. Soejima., Jinnno, Y. et al. : Three novel PAX3 mutations observed in patients with Waardenburg syndrome type 1. *Hum. Mutat.* 9, 177-80, 1997.
- T. Otsuka., Jinnno, Y. et al. : The growth hormone receptor gene mutation of a Japanese patient with Laron syndrome. *Jpn. J. Hum. Genet.* 42, 323-329, 1997.
- K. Mitsuya., Jinnno, Y. et al. : Paternal expression of WT1 in human fibroblasts and lymphocytes. *Hum. Mol. Genet.* 6, 2243-2246, 1997.

13. T. Miyamoto., Jinnno, Y. et al. : A SacII polymorphism in the human *ASCL2* (HASH2) gene region. *J. Hum. Genet.* 42, 69-70, 1998
14. H. Soejima., Jinnno, Y. 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.
15. K. Yun., Jinnno, Y. et al.: Promoter-specific insulin-like growth factor 2 gene imprinting in human fetal liver and hepatoblastoma. *J. Pathol.* 185, 91-98, 1998.

平成10年度

1. Maeda, K., Matsushashi, S., Hori, K., Xin, Z., Mukai, T., Tabuchi, K., Egashira, M. and Niikawa, N: Cloning and characterization of a novel human gene, TM4SF6, encoding a protein belonging to the transmembrane 4 superfamily, and mapped to Xq22. *Genomics* 52:240-242, 1998.
2. Morisaki, H., Hatada, I., Morisaki, T. and Mukai, T.: A novel gene, *ITM*, located between *p57KIP2* and *IPL*, is imprinted in mice. *DNA Res.* 5:235-240, 1998.
3. Soejima, H., McLay, J., Hatada, I., Mukai, T., Jinnno, Y., Niikawa, N. and Yun, K: Comparative RT-PCR and in situ hybridization analyses of human imprinted *p57KIP2* and *IGF2* gene transcripts in fetal kidney and Wilms tumors using archival tissue. *Lab. Invest.* 78:19-28, 1998.
4. 畑田出穂, 向井常博: ゲノムインプリンティングと発癌. *Molecular Medicine* 35:778-787, 1998.
5. 向井常博: ゲノムインプリンティング発生と遺伝性疾患の新しい鍵. *Molecular Medicine* 35:814-823, 1998.
6. 向井常博, 畑田出穂, 副島英伸: Beckwith-Wiedemann症候群とその発症機構. *Molecular Medicine* 35:836-845, 1998.
7. 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.
8. 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 *Grf1/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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Lefebvre, L., S. Viville, 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.
13. Nakano, M. Jinnno, Y. et al.: Identification, characterization and mapping of the human ZIS (zinc-finger, splicing) gene, *Gene*, 225, 59-65, 1999.
14. Miura, K., Jinnno, Y. 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.
15. Miura, K., Jinnno, Y. et al.: A *HhaI*/*BstUI* polymorphism in a novel gene at human chromosome 11p15.5, *J Hum Genet* 43, 283-284, 1998.

16. Yun, K., Jinno, Y. et al.: Promoter-specific insulin-like growth factor 2 gene imprinting in human fetal liver and hepatoblastoma, *J Pathol*, 18,: 91-98, 1998.
17. Miyamoto, Y., Jinno, Y. et al.: A SacII polymorphism in the human ASCL2 (HASH2) gene region, *J Hum Genet*, 43, 69-70, 1998.
18. Soejima, H., Jinno, Y. 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*, 7, 19-28, 1998.
7. Soejima H, Miyoshi O, Yoshinaga H, Masaki Z, Ozaki I, Kajiwara S, Niikawa N, Matsuhashi 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).

平成 11 年度

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 beta 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)
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  
平成9年度
1. Mukai, T., Nabetani, A., Hatada, I. Genomic feature of mouse imprinted gene *U2af1-rs1* as a neomorph. FASEB summer Research Conference 'DNA methylation' Vermont USA June 16-19, 1997.
  2. Mukai, T. Abberent methylation of an imprinted gene *U2af1-rs1* by own transgene 'Epigenetics' Ciba Foundation Symposium London June 24-26, 1997.
  3. Mukai, T. & Hatada, I. Genomic imprinting in human disease. 'Taejeon Molecular & Cytogenetic symposium' Chungnam National University Hospital. Taejeon, Korea. Aug. 16, 1997.
  4. Mukai, T., Hatada, I., Morisaki, H. & Bhuiyan, A. Human cyclin-dependent kinase inhibitor, *p57kip2*, and Beckwith-Wiedemann syndrome. BSDB Autumn Developmental Biology Meeting. Symposium 'Mammalian genetic imprinting: its role in development and disease' Cambridge UK. Sep. 4-7, 1997.
  5. Hatada, I., Nabetani, A., Arai, Y., Ohishi, S., Suzuki, M., Miyabara, S., Nishimune, Y. & Mukai, T. Transgene causes abnormal imprinting of the endogenous imprinting gene. BSDB Autumn Developmental Biology Meeting. poster 'Mammalian genetic imprinting: its role in development and disease' Cambridge UK. Sep. 4-7, 1997.
  6. Mukai, T. DNA methylation and genomic imprinting. 'Korean NIH symposium on thrifty phenotype and mitochondrial biogenesis' National Institute of Health, Korea. Dec. 5, 1997.
  7. Morisaki, T., Iida, K., xHidaka, K., Yutani, C., Nakayama, M. & Mukai, T. Alternative splicing of MEF2 genes during embryonic development of human and mouse heart Keystone Symposia Colorado April 1-6, 1997.
  8. Arai, Y., Sugama, K., Hashido, K., Ohishi, S. & Mukai, T. Regulatory region for restoring chromatin structure of the rat aldolase C gene in transgenic mice 9th International Congress on Genes, Gene Families, and Isozymes Texas April 14-19, 1997.
  9. Morisaki, T., Sermsuwitayawong, K., Wang, X., Nagabukuro, A., Masuda, Y., Ogasawara, N., Mineo, I., Morisaki, H. & Mukai, T. Molecular analysis of mouse *Ampd3* gene encoding heart-type isoform of AMP deaminase 9th international/6th European joint symposium on purine & pyrimidine metabolism in man Austria June 1-7, 1997.
  10. Iida, K., Morisaki, T., Yutani, C., Takeuchi, M. & Mukai, T. Expression of MEF2 genes and sarcomere-related genes during cardiac development in human International Society for Heart Research, The 14th annual meeting of the Japanese Section Asahikawa, July 18-19, 1997.
  11. 向井常博、畑田出穂. ゲノムインプリンティングとBeckwith-Wiedemann症候群 シンポジウム「分子・タンパクからみた個体発生異常」第37回日本先天異常学会 平成9

- 年7月15日、京都会館
12. 向井常博 遺伝子病の総説 シンポジウム「遺伝子検査・診療の現状と将来」第52回国立病院療養所総合医学会. 平成9年11月14日 香川.
  13. 畑田出穂、鍋谷彰、荒井勇二、大石祥子、鈴木操、宮原晋一、西宗義武士、向井常博. トランスジーンによる内在性遺伝子のインプリンティングの異常 ワークショップ「ゲノムインプリンティング研究の最近の進歩」第20回日本分子生物学会 平成9年12月18日、京都
  14. 森崎裕子、畑田出穂、鍋谷彰、向井常博 マウス及びヒト p57kip2 遺伝子における CpG のメチル化の解析 第20回日本分子生物学会 平成9年12月18日、京都
  15. 畑田出穂、Z A Bhuiyan, 大石祥子、鍋谷彰、森崎裕子、外木秀文、新川詔勅夫、井上正宏、河本陽介、岡田正、E. Steichen, 大橋博文、福嶋義光、中山雅弘、向井常博 Beckwith-Wiedemann 症候群における p57KIP2 の変異とその役割 第20回日本分子生物学会 平成9年12月18日、京都
  16. Ueda, T., Zubair M., Niwa, K., Noguchi, M., Kawase, Y., Kono, T., Matsuda, Y., Fujimoto, H., Shibata, H., Hayashizaki, Y. & Sasaki, H.: A paternal-specific methylation imprint of the mouse *H19* gene is established prior to meiosis. BSDB Autumn Symposium on Genomic Imprinting-Its Role in Development and Disease, Cambridge, September, 1997.
  17. baier, M., Hilton, K., Saam, J.R., Surani, M.A., Tilghman, S.M. & Sasaki, H. Structure and expression of the mouse *L23mrp* gene downstream of the imprinted *H19* gene: biallelic expression and lack of interaction with the *H19* enhancers. BSDB Autumn Symposium on Genomic Imprinting-Its Role in Development and Disease, Cambridge, September, 1997.
  18. Hatano, N., Eversole-Cire, P., Saam, J.R., Ferguson-Smith, A.C., Jones, P.A., Tilghman, S.M., Surani, M.A. & Sasaki, H. Enhancer-dependent, locus-wide play a major role in the regulation of the mouse insulin-like growth factor II gene. BSDB Autumn Symposium on Genomic Imprinting-Its Role in Development and Disease, Cambridge, September, 1997.
  19. Moore, T., Constancla, M., Zubair, M., Bailleul, B., Feil, R., Sasaki, H. & Reik, W. A tissue-specific imprinting control region upstream of mouse *Igf2*. BSDB Autumn Symposium on Genomic Imprinting-Its Role in Development and Disease, Cambridge, September, 1997.
  20. 佐々木裕之: ゲノムインプリンティング機構に関する分子遺伝学的研究. 日本人類遺伝学会第42回大会(奨励賞受賞講演), 神戸, 10月
  21. 佐々木裕之: ゲノムインプリンティングの機構と胚発生. 第15回絨毛疾患研究会(特別講演), 熊本, 11月
  13. 加藤玲子, Mohamad Zubair, 水野晋一, 石原宏, 小出剛, 筒井研, 佐々木裕之: マウス第7染色体F4/F5領域のインプリンティングドメインのゲノム構造. 第20回日本分子生物学会年会, 京都, 12月
  22. 波多野直哉, Pamela Eversole-Cire, Jennifer R. Saam, Anne C. Ferguson-Smith, Peter A. Jones, Shirley M. Tilghman, M. Azim Surani, 佐々木裕之: マウスインスリン様成長因子II遺伝子座全体に働くエンハンサー依存的な発現制御機構. 第20回日本分子生物学会年会, 京都, 12月
  23. 石原宏, 加藤玲子, 古海弘康, Mohamad Zubair, 陣野吉広, 佐々木裕之: インプリンティングを受けるマウス*H19*遺伝子領域約40kbの構造と新しい転写単位の同定. 第20回日本分子生物学会年会, 京都, 12月
  24. 芝田英雄, 植田孝之, 神谷守, 依田賀香, 吉木淳, 日下部守昭, 加藤玲子, 佐々木裕之, 砂原昭一, 勝木元也, C. Plass, W. A. Held, 村松正実, 林崎良英: マウスインプリント遺伝子 *U2afbp-rs/U2af1-rs1* の遺伝的に制御されたメチル化変化. 第20回日本分子生物学会年会, 京都, 12月
  25. 大野みずき, 天前豊明, 山形哲司, 佐々木裕之, 池村淑道: ヒト間期核内での染色体DNAの配置を決める分子機構; 三重鎖を含む特殊DNA構造の関与について. 第20回日本分子生物学会年会, 京都, 12月
  26. 植田孝之, Mohamad Zubair, 丹羽勝利, 野口基子, 川瀬洋介, 河野友宏, 松田洋一, 藤本弘一, 高木信夫, 芝田英生, 林崎良英, 佐々木裕之: マウス*H19*遺伝子の父親特異的メチル化インプリンティングは減数分裂以前に確立する. 第20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研究の最近の進歩), 京都, 12月

27. 三浦清徳、陣野吉広 他: 反復配列をターゲットとしたインプリンティング遺伝子単離の試み. 日本人類遺伝学会、1997

平成10年度

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. (シンポジウム)
2. 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.
3. 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.
4. 向井常博, 朱喜科, 八木ひとみ, 陳国云, 副島英伸, 城主一郎, 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.
5. 八木ひとみ, 朱喜科, 辛正翰, 陳国云, 城主一郎, 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.
6. 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.
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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  $\alpha$ B-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
17. 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

18. 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
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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
23. 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
24. 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。
25. 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。
26. 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。
27. 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。
28. 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
29. 石野史敏. 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。
30. 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。
31. 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。
32. 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。
33. 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。
34. 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。
35. 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。
36. 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。
37. 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。
38. 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。

平成11年度

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