

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

Bio-COBRA 法による Beckwith-Wiedemann 症候群のエピゲノム解析

研究分担者：秦 健一郎  
国立成育医療センター研究所  
周産期病態研究部 部長

研究要旨

BWS 患者において、ヒトゲノム中の 23 ヶ所の「メチル化可変領域」(DMR: Differentially Methylated Region) についてメチル化状態を Bio-COBRA 法で解析した。Bio-COBRA 法は、従来法と遜色のないメチル化解析法であること、他の刷り込み異常疾患を除外するためにも有用であることがわかった。メチル化解析を含む遺伝子解析が BWS の正確な診断のために必要である。また、特徴的なメチル化異常を示す症例を解析することにより、ヒト発生異常にかかわる重要な知見が得られると期待される。

A. 研究目的

BWS の発症に密接に関与するゲノムインプリンティング（ゲノム刷り込み）現象は、二つのアレル間で親由来に従って DNA メチル化状態が異なる「メチル化可変領域」（DMR: Differentially Methylated Region）のメチル化状態で制御されている。DMR は、BWS 責任座位である 11 番染色体短腕 15.5 領域（11p15.5）の刷り込み領域以外にもヒトゲノム中に多数散在する。そこで、既知のヒト DMR

に加えマウスとの配列比較により DMR と推定される領域合計 23 ヶ所について BWS 患者におけるメチル化状態を解析した。

B. 研究方法

試料は、研究代表者副島らの収集した BWS 症例 58 検体のゲノム DNA を用いた。内訳は、末梢血由来が 28 例、株化細胞（EBV 形質転換リンパ芽球細胞）由来が 25 例、その他の組織由来が 5 例であった。対照群として健常人

の末梢血由来ゲノム DNA 15 検体を併せて解析した。

方法は、我々が開発した Bio-COBRA 法を用いた。バイサルファイト処理を行ったゲノム DNA をテンプレートにして、各 DMR を PCR で増幅し、PCR 産物を適切な制限酵素で消化した。消化後、Agilent 2100 バイオアナライザで解析することにより、DMR のメチル化状態を定量的に解析した。

### C. 研究結果

末梢血ゲノム DNA を解析した 28 例は、副島らにより既知の異常について、メチル化感受性サザンプロット、多型タイピング、変異解析が行われている（父性片親性ダイソミー (pUPD11) 症例が 5 例、KvDMR1 低メチル化症例が 11 例、H19-DMR 高メチル化症例が 2 例、*CDKN1C* 変異症例が 3 例、既知の異常なしが 7 例）。今回実施した Bio-COBRA 解析の結果は副島らの分子診断結果とほぼ一致した。pUPD11 症例の 5 例中 3 例において、H19-DMR 高メチル化と KvDMR1 低メチル化が検出され、他の DMR におけるメチル化異常はなかった。KvDMR1 低メチル化症例 (11 例) については、KvDMR1 低メチル化に加えて、1 例で MCTS2-DMR 低メチル化、1 例で MEG3-DMR 高メチル化傾向が検出された。また、顕微授精 (ICSI) による出生例では、KvDMR1 低メチル化に

加え NESPAS-GNASXL の低メチル化を認めた。H19-DMR 高メチル化症例 (2 例) については、H19-DMR 高メチル化に加えて H19-DMR の制御下にあることが知られている IGF2 遺伝子座の DMR (DMR0, DMR2) における高メチル化傾向も検出されたが、それら以外の DMR ではメチル化異常は無かった。既知の異常を認めない 7 症例のうちの 1 症例で、14 番染色体の IG-DMR および MEG3-DMR における顕著な高メチル化傾向 (メチル化レベル >90%) が見られた。これらの DMR の高メチル化は、父性 14 番染色体ダイソミー (pUPD14) 症候群で認められることが報告されていることため、この症例の臨床所見を再度詳細に検討したところ、BWS の臨床症状とおよび pUPD14 症候群の臨床症状の両方を満たしていることが判明した。

株化細胞ゲノム DNA を解析した 25 例のうち 12 例は分子診断が確定していない原因不明の BWS 症例であったが、その約半数の 7 例で IG-DMR における高メチル化傾向 (メチル化レベル 65-90%程度) が検出された。IG-DMR の高メチル化により MEG3-DMR も高メチル化となることが pUPD14 症候群では知られているが、これら 7 例の MEG3-DMR メチル化レベルは正常域の値を示した。

末梢血・株化細胞以外の組織 (具体的には、舌、肺、臍臓、胎盤) 由来の

ゲノム DNA を解析した 6 例中 1 例は、調べた DMR のほぼ全てで顕著なメチル化異常を示した。副島らと吉浦らによる全ゲノム SNP 解析の結果、この症例は全ゲノム父性片親性ダイソミー症例であることが明らかになった。

#### D. 考察

我々の結果と副島らによる BWS 分子診断結果はよく一致しており、Bio-COBRA 法が既知のメチル化異常を効率よく検出できることが確認できた。ゲノム中の 23 ヶ所の DMR をスクリーニングする方法として有用と考えられる。

H19-DMR 高メチル化症例では IGF2 遺伝子座の DMR (DMR0, DMR2) も高メチル化傾向を示すことから、BWS においては IGF2/H19 刷り込みドメイン全体が高メチル化されることが示唆された。

BWS と診断されていた症例の 1 例について IG-DMR・MEG3-DMR 高メチル化を同定したことが契機となり、当該症例は pUPD14 症候群の臨床症状も併せ持っていること確認された。この例は、既知 DMR を対象とした網羅的メチル化解析が分子診断として有効であること、正確な診断にはゲノム全体の DMR を解析する必要があることを示していると考えられる。

株化細胞ゲノム DNA の Bio-COBRA 解析から IG-DMR の部分的な高メチル化が

BWS 表現型の原因となっている可能性を示唆する興味深い結果を得た。一方で、現時点では細胞株化によるメチル化レベルの攪乱である可能性も否定できない。今後、対照群（健常人由来の株化細胞検体群）を解析することでこの結果を評価する予定である。

解析した 57 症例中 1 症例において、解析したほぼすべての DMR でメチル化異常が検出された。当該症例に対する副島、吉浦らのメチル化解析・SNP 解析結果と COBRA 解析結果を総合すると、この症例は父ゲノム二倍体モザイク症例であると考えられた。同様の症例を過去に報告した論文が一報あるのみで、非常に希少な症例である。今後の詳細な解析により、BWS をはじめとするヒト発生異常にかかわる重要な知見が得られると期待される。一方、今後同様の発生異常が散見されるようであれば、新たな疾患概念による分類が必要と考えられる。

#### E. 結論

Bio-COBRA 法が従来の方法と遜色のないメチル化解析法であることがわかった。また、pUPD14 症候群など他の刷り込み異常疾患を除外するためにも有用であった。これらのことから、メチル化解析を含む遺伝子解析が正確な診断のために必要であることがわかった。

H19-DMR 高メチル化は、H19-DMR だけでなく IGF2 遺伝子座を含む IGF2/H19 刷り込みドメイン全体が高メチル化の標的となることが示唆された。

株化細胞でのメチル化解析については、今後の解析を待たねばならないが、株化による影響を考慮する必要があると思われた。

患者解析から父ゲノム二倍体モザイク症例を見出した。ヒト発生異常にかかわる重要な知見が得られると期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 中林一彦、吉田亘、山澤一樹、緒方勤、秦健一郎. 「DNA メチル化プロファイリングによるゲノムインプリンティング領域の網羅的解析」日本人類遺伝学会第 54 回大会、東京、2009 年 9 月 25 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

SNP アレイによる Beckwith-Wiedemann 症候群のゲノム構造異常の解析

研究分担者：吉浦 孝一郎

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

原爆後障害医療研究施設分子医療部門人類遺伝学分野 教授

### 研究要旨

Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）では、既知の異常を認めない症例が 3 割を占める。そこで BWS の原因となりうる新規の構造異常をスクリーニングする目的で BWS 症例を Affymetrix 社の SNP Array を用いて解析した。既知の異常がない BWS 症例解析の結果、BWS の原因となるような共通する構造異常は認められなかったが、KvDMR1 脱メチル化患者に KvDMR1 近傍に母由来欠失を認め、KvDMR1 の母性メチル化を制御するエレメントが含まれる可能性が示唆された。また、SNP Array 6.0 を用いてゲノム解析により UPD 領域を同定することが可能であると判明し、多検体の解析により UPD 領域の同定と臨床症状との関連を解析できると考えられた。

#### A. 研究目的

Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）の原因として、KvDMR1 脱メチル化、H19-DMR 高メチル化、11 番染色体短腕の父性片親性ダイソミー（*upd(11)pat*）、*CDKN1C* 変異、11 番染色体短腕構造異常が知られているが、約 30% の症例ではこれらの異常が検出できない。このことは、他の原因が存在する可能性を示唆する。また、最

近、H19-DMR 高メチル化症例において H19-DMR の微小欠失・点変異が報告され、高メチル化の原因と考えられている。しかし、もっとも頻度が高い KvDMR1 脱メチル化症例では、KvDMR1 全体を含む数百 kb の欠失例が 2 例報告されているのみである。以上より、BWS の原因となりうる新規の構造異常をスクリーニングする目的で BWS 症例を Affymetrix 社の SNP Array を用い

て解析した。

## B. 研究方法

### 1) コピー数解析 (欠失・重複探索)

研究代表者副島らの患者解析により既知の異常がないと判明している BWS 症例 15 名を対象として、Affymetrix 社の Human Mapping 250K SNP Array にてゲノム中の特定の領域の欠失がないかを検討した。また、KvDMR1 領域の脱メチル化がある BWS 症例 20 例を Affymetrix 社の Genome-Wide Human SNP Array 6.0 を用いて同様に欠失解析をおこなった。GeneChip システムによるデータ取得後コピー数は Partek Genomics Suite により解析した。2 コピー標準化試料として、長崎大学で所有している SNP Array 6.0 のデータを用いた。

### 2) 欠失領域部分の塩基配列決定

コピー数解析により、KvDMR1 脱メチル化患者 1 名に約 130kb の欠失が見られたので、その領域のゲノムシーケンスを行っている。対象患者は、欠失をもった 1 名を除く 26 名の KvDMR1 脱メチル化のうち、DNA が比較的多く解析に使用できる患者 22 名とした。目的の 130kb を約 3kb 毎・27 PCR amplicon に分割して増幅し、Illumina 社の次世代シーケンサー Genome Analyzer II によりターゲット領域シ

ーケンス解析・depth 30 を予定し、塩基配列決定を進めている。方法は、PCR 増幅後に 27 amplicon を個人毎に 130kb 領域としてまとめて Illumina 社のインデックスリードを含めたリンカー連結後に library 作成し、マルチプレックスシーケンス法を行っている。

### 3) upd(11)pat 症例の UPD 領域の決定

BWS でみられる UPD は 11 番染色体全体ではなく短腕に局限していることが多い。しかし、11 番染色体短腕のどこからどこまでが UPD になっているのかについて、くわしく解析されていない。そこで、upd(11)pat を示す 3 例について Affymetrix 社の Genome-Wide Human SNP Array 6.0 を用いて欠失解析をおこなった。このうち 1 例は、研究分担者秦らの Bio-COBRA 解析によりそのメチル化パターンから父ゲノム二倍体モザイクを疑われた症例であった。

## C. 研究結果

### 1) コピー数解析 (欠失・重複探索)

Human Mapping 250K SNP Array による既知の異常がない BWS 症例 15 名の解析の結果、BWS の原因となるような共通する構造異常は認められなかった。

Genome-Wide Human SNP Array 6.0

よる解析の結果、1名の KvDMR1 脱メチル化患者に KvDMR1 近傍に約 130 kb の欠失を認めた。また、本欠失が母由来であることを同様に SNP Array で確認した。他の KvDMR1 脱メチル化症例について、SNP Array 6.0 の検出限界以下の微細な欠失を次世代シーケンサーにて解析中である。

## 2) upd(11)pat 症例の UPD 領域の決定

11 番染色体短腕の UPD 領域の同定については、モザイク率 36%の症例とモザイク率 47-60%の症例を Genome-Wide Human SNP Array 6.0 で解析した。UPD 領域では、Allele Difference のスコアが-0.5 および +0.5 付近にシフトし、スコア 0 のデータが得られないことが判明した。また、2つの症例で UPD 領域はかなり異なることがわかった。このことから、SNP Array 6.0 を用いて UPD 領域を同定することが可能であると判明した。一方、メチル化パターンから父ゲノム二倍体モザイクを疑われた症例は、SNP Array 6.0 のデータからは完全な父ゲノム二倍体とのデータを得た。

## D. 考察

### 1) コピー数解析 (欠失・重複探索)

既知の異常がない BWS 症例において BWS の原因となるような共通する構造異常は認められなかったことから、

BWS の原因となりうる新規のゲノム構造異常の存在については可能性が低いと考えられる。ゲノム構造異常以外のファクター、つまり未知の原因遺伝子の変異や未知のメチル化異常等の可能性が考えられる。

一方、KvDMR1 脱メチル化患者に KvDMR1 近傍に約 130 kb の欠失を認めたことは重要な発見と考えられる。本欠失内にメチル化を制御するエレメントが存在する可能性があるからである。これまでに報告されている欠失は 250 kb と 900 kb であり、本症例の欠失がもっとも小さい。さらに、母由来の欠失であることから、本欠失領域内に CDKN1C/LIT1 刷り込みドメインの刷り込み調節領域 KvDMR1 の母性メチル化を制御するエレメントが含まれる可能性が高い。つまり、本来卵形成時に KvDMR1 はメチル化されるが、本症例では、卵ゲノムにおいてメチル化制御エレメントが欠失しているため正常なメチル化が起こらず、受精後も脱メチル化まま発生が進んだと考えられる。この新たなインプリンティング制御部の存在の可能性を探るために、22名の KvDMR1 脱メチル化 BWS 患者のゲノムシーケンスが進行中である。新たなインプリンティング制御部が存在しているなら、塩基配列決定により、KvDMR1 脱メチル化患者で塩基変異が見つかるであろうし、今後の診断

ツールとして有益である。また、インプリンティング制御、DNA メチル化の制御という生物学的な新発見につながる。

2) upd(11)pat 症例の UPD 領域の決定  
SNP Array 6.0 を用いて UPD 領域を同定することが可能であると判明した。また、UPD 領域は症例により異なることもわかった。研究代表者副島は UPD 症例をすでに 14 例収集しているため、これらをすべて解析することにより UPD の範囲と臨床症状との関連性が明らかになると推測される。

一方、メチル化パターンから父ゲノム二倍体モザイクを疑われた症例は、SNP Array 6.0 のデータからすべての染色体において完全な父ゲノム二倍体とのデータを得た。しかし、父ゲノム二倍体は雄性発生であり全胞状奇胎となるはずである。BWS の個体として生存していることから、本性例は、正常 2 倍体細胞の割合が極めて低く、父ゲノム二倍体細胞の割合が高いモザイクであると推測される。実際、11p15.5 のメチル化解析では父性 UPD 細胞のモザイク率が高いデータを得ている。極端に高いモザイク率のため、SNP Array で完全な父ゲノム二倍体と判断されたと考える。

## E. 結論

既知の異常がない BWS 症例の解析の結果、BWS の原因となるような共通する構造異常は認められなかった

KvDMR1 脱メチル化患者に KvDMR1 近傍に母由来欠失を認め、KvDMR1 の母性メチル化を制御するエレメントが含まれる可能性が示唆された。

SNP Array 6.0 を用いてゲノム解析により UPD 領域を同定することが可能であると判明した。

メチル化パターンから父ゲノム二倍体モザイクを疑われた症例は、SNP Array 6.0 解析により全染色体の父ゲノム二倍体であった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Miyazaki K, Mapendano CK, Fuchigami T, Kondo S, Ohta T, Kinoshita A, Tsukamoto K, Yoshiura KI, Niikawa N, Kishino T. Developmentally dynamic changes of DNA methylation in the mouse Snurf/Snrpn gene. *Gene* 432(1-2): 97-101. 2009

### 2) 学会発表

#### 国内学会

1. アレイ染色体検査のための健常



- 人 CNV データベース構築の試み.  
松井 健, 霜川 修, 吉浦孝一  
郎, 新川詔夫, 松本直通, 原田  
直樹. 第 16 回日本遺伝子診療学  
会 2009 年 7 月 30 日 (水) ~8  
月 1 日 (土), ホテル札幌ガーデ  
ンパレス, 札幌
2. 6 番染色体部分片親性ダイソミ  
ーを認めた 3M 症候群の 1 例.  
佐々木健作, 岡本伸彦, 小崎健  
次郎, 川良洋城, 吉浦孝一郎,  
松本直通, 原田直樹. 第 54 回日  
本人類遺伝学会 2009 年 9 月 23  
日 (水) ~26 日 (土), グラン  
ドプリンスホテル高輪, 東京
3. アレイ染色体検査のための健常  
人 CNV データベース構築の試み.  
松井健, 霜川修, 齋藤和正, 吉  
浦孝一郎, 新川詔夫, 松本直通,  
原田直樹. 第 54 回日本人類遺伝  
学会 2009 年 9 月 23 日 (水) ~  
26 日 (土), グランドプリンス  
ホテル高輪, 東京
4. 嚢胞内乳ガンは嚢胞内乳頭腫に  
比べ顕著なゲノム変化を有す  
る: 高密度 SNP マイクロアレイ  
によるゲノムワイド copy  
number/LOH 解析. 及川将弘, 永  
安武, 矢野洋, 安倍邦子, 林徳  
真吉, 新川詔夫, 吉浦孝一郎.  
第 54 回日本人類遺伝学会 2009  
年 9 月 23 日 (水) ~26 日 (土),  
グランドプリンスホテル高輪,  
東京
- 国際学会
1. Intracystic papillary  
carcinoma of breast harbors  
significant genomic alteration  
compared with intracystic  
papilloma: Genome-wide copy  
number and LOH analysis using  
high-density single-nucleotide  
polymorphism arrays. Oikawa M,  
Nagayasu T, Yano H, Hayashi T,  
Abe N, Yoshiura K, Niikawa N.  
The American Society of Human  
Genetics, 59<sup>th</sup> Annual Meeting,  
Honolulu, Hawaii, October 20-27,  
2009
2. DNA array-based copy number  
analysis in chorionic villus  
samples (CVS) of spontaneous  
abortions with normal  
karyotypes. Yamada T, Ohra T,  
Hosoki K, Shimada S, Morikawa M,  
Yamada T, Yoshiura K, Minakami  
H, Niikawa N. The American  
Society of Human Genetics, 59<sup>th</sup>  
Annual Meeting, Honolulu,  
Hawaii, October 20-27, 2009
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

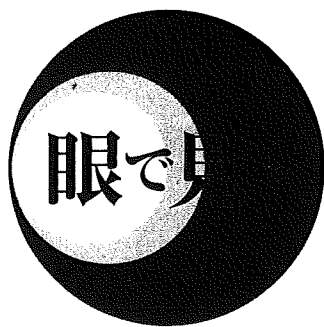
#### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
副島英伸	Wiedemann-Beckwith症候群	新川詔夫, 緒方勤監修	ビジュアル疾患解説 目で見える遺伝病とターナー症候群	株式会社メディアート	大阪	2009	No.5: 6-7

#### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Joh K <sup>†</sup> , Yatsuki H <sup>†</sup> , Higashimoto K, Mukai T, Soejima H. († equal contribution)	Antisense transcription occurs at the promoter of a mouse imprinted gene, <i>Commd1</i> , on the repressed paternal allele.	J Biochem	146(6)	771-774	2009
副島英伸	エピジェネティクス関連疾患と解析方法	臨床病理	57(8)	769-778	2009
東元 健、副島英伸	特集小児疾患における臨床遺伝学の進歩. Beckwith-Wiedemann症候群	小児科	50(7)	1046-1052	2009
Miyazaki K, M apendano CK, Fuchigami T, Kondo S, Ohta T, Kinoshita A, Tsukamoto K, Yoshiura K I, Niikawa N, Kishino T.	Developmentally dynamic changes of DNA methylation in the mouse Snurf/Snrpn gene.	Gene	432(1-2)	97-101	2009

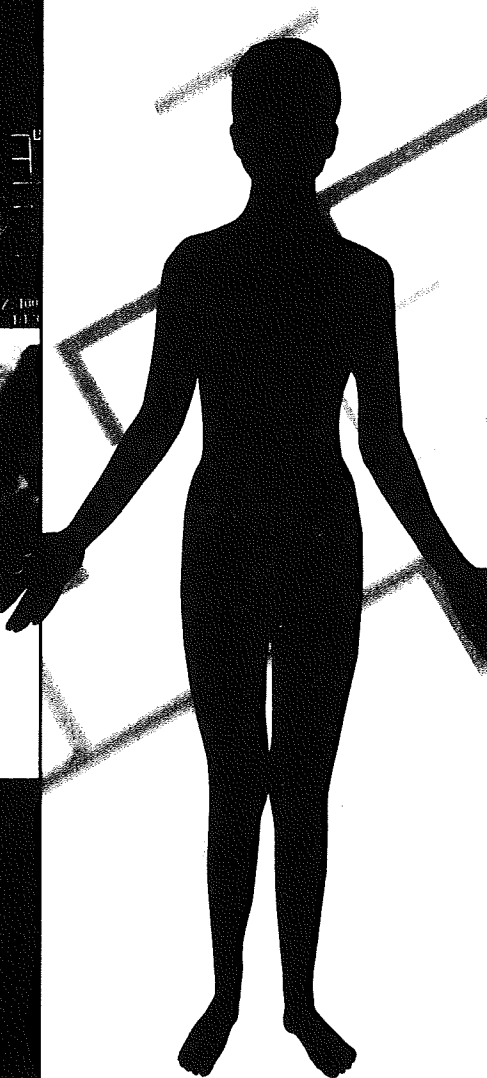
## IV. 研究成果の刊行物・別冊



# 遺伝病と ターナー症候群

監修(遺伝病): 北海道医療大学 個体差健康科学研究所 教授・所長 新川 昭夫

監修(ターナー症候群): 国立成育医療センター研究所 小児思春期発育研究部 部長 緒方 勤



# Wiedemann-Beckwith症候群

Wiedemann-Beckwith syndrome

副島英伸

京都大学医学部分子生命科学講座分子遺伝学・エピジェネティクス分野 教授

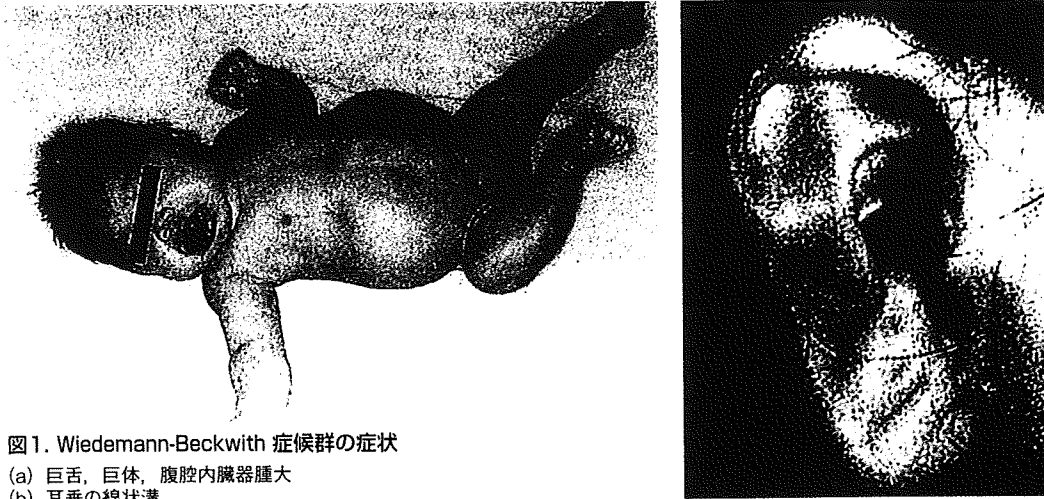


図1. Wiedemann-Beckwith 症候群の症状

- (a) 巨舌, 巨体, 腹腔内臓器腫大  
(b) 耳垂の線状溝

「新川詔夫: Wiedemann-Beckwith 症候群, 新先天奇形症候群アトラス (梶井正ほか編), p.251, 1998, 南江堂」より許諾を得て転載.

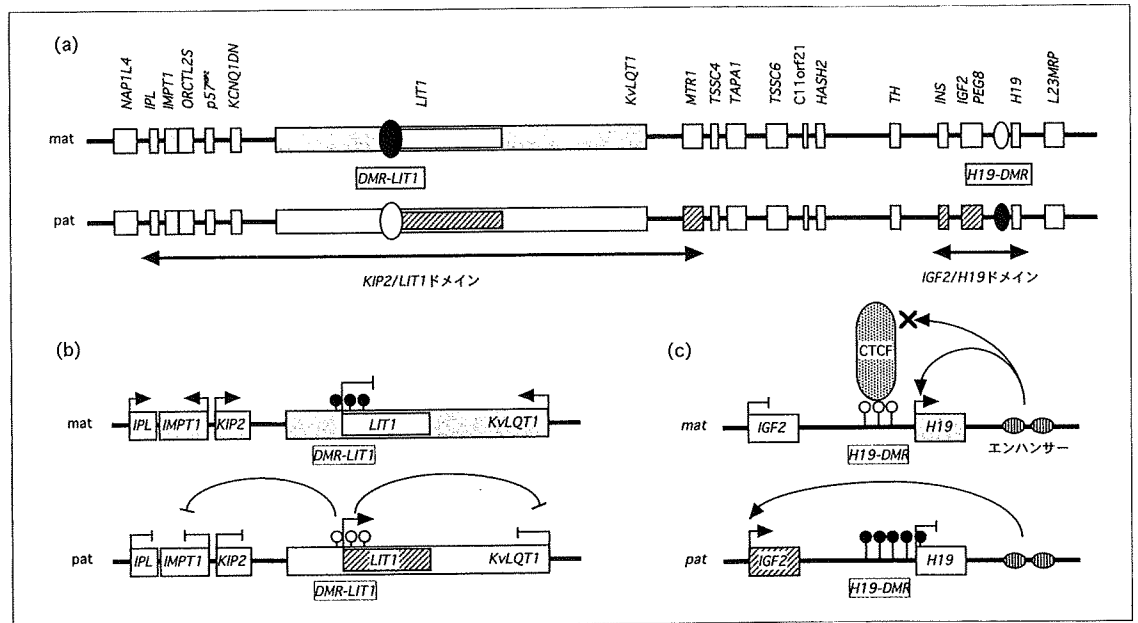


図2. 11p15.5刷り込み領域と制御機構

- (a) 11p15.5の刷り込みドメイン。楕円はICRを示し、黒はDNAメチル化、白はDNA非メチル化を表す。  
mat: 母性アレル, pat: 父性アレル, ◻: 母性発現, ◻: 父性発現, □: 非刷り込み遺伝子  
(b, c) KIP2/LIT1ドメインとIGF2/H19ドメインの刷り込み調節機構。詳細は本文参照。○: 非メチル化DNA, ●: メチル化DNA

分子遺伝学的異常	頻度 (%)	症状との関連性	Elliott 5 <sup>9)</sup>	DeBaun 5 <sup>9)</sup>	Weksberg 5 <sup>9)</sup>
DMR-LIT1の脱メチル化	44	腹壁欠損, 内臓腫大	<b>メジャー症状</b> 1. 巨舌 2. 胎生期または出生時体重 > 90パーセントイル 3. 前腹壁欠損	1. 巨舌 2. 出生時体重 > 90パーセントイル 3. 前腹壁欠損 (臍帯ヘルニア, 臍ヘルニア, 腹直筋解離) 4. 生後1カ月の低血糖 5. 耳垂の線状溝, 耳輪後縁の小窩	1. 巨舌 2. 巨大児 3. 片側肥大 4. 前腹壁欠損 (臍帯ヘルニア, 臍ヘルニア, 腹直筋解離) 5. 耳垂の線状溝, 耳輪後縁の小窩 6. 胎児性腫瘍
11番染色体父性片親性ダイソミー (patUPD)	16	高発がんリスク, 片側肥大, 低血糖	<b>マイナー症状</b> 1. 耳垂の線状溝, 耳輪後縁の小窩 2. 顔面の火焰状母斑 3. 低血糖 4. 腎腫大 5. 片側肥大	なし	1. 新生児期低血糖 2. 腹腔内臓器腫大 3. 腎奇形
H19-DMRの高メチル化	9	高発がんリスク (特にWilms腫瘍)	<b>診断基準</b> メジャー症状3つまたはメジャー症状2つとマイナー症状3つ以上	上記症状2つ以上	メジャー症状3つ以上またはメジャー症状2つとマイナー症状1つ以上
p57 <sup>KIP2</sup> の遺伝子変異	5	腹壁欠損, 巨舌, 耳の小奇形			
11番染色体構造異常 (転座・重複)	2	不明			
異常なし	25	不明			

表1. 分子遺伝学的異常の頻度と症状 (欧米症例<sup>5,10-12)</sup>

表2. Wiedemann-Beckwith 症候群の診断基準

## 疾患解説

### ■ 臨床症状

過成長症候群の一つで、巨大児、巨舌、臍ヘルニアや臍帯ヘルニアなどの腹壁欠損を三主徴とする先天奇形症候群である(図1)。ほかに新生児期の低血糖、耳垂の線状溝、耳輪後縁の小窩、顔面の火焰状母斑、腹腔内臓器腫大、片側肥大などを伴う。また、5~10%の患児に胎児性腫瘍(Wilms腫瘍、肝芽腫、横紋筋肉腫など)を合併する。

### ■ 頻度

1/13,700と言われるが、本邦では不明。過成長症候群でも高頻度である。性比は1。85%は弧発例、15%は家族例で常染色体優性遺伝を呈する。

### ■ 遺伝学的発生機序

本症の責任遺伝子座11番染色体短腕15.5領域(11p15.5)は、ゲノム刷り込み(genomic imprinting)領域である。ゲノム刷り込みは、両親から受け継いだ一对の対立遺伝子のうち、その親の性に従って、一方の親由来の遺伝子が優勢に発現する現象である。11p15.5には、*IGF2/H19*と*KIP2/LIT1*の2つの刷り込みドメインが隣接して存在する。各ドメインは複数の刷り込み遺伝子から構成されており、それぞれの刷り込み調節領域(Imprinting Control Region: ICR)により独立して刷り込みが制御されている(図2a)。本症の主要な原因は、ドメインレベルでの刷り込み破綻である<sup>1)</sup>。

#### 1) 刷り込み制御機構と発症機序

##### i) *IGF2/H19*ドメイン

*IGF2/H19*ドメイン内の重要なインプリント遺伝子は、父性発現する*IGF2*と母性発現する*H19*である。*IGF2*は細胞増殖因子で、発現増加は過成長と胎児性腫瘍発生に関連する。本ドメインのICRは、*H19*の上流2-5kbにある*H19-DMR*(母性非メチル化、父性メチル化)である<sup>1)</sup>。母性アレルの非メチル化*H19-DMR*にCTCFが結合して、*H19*下流のエンハンサーをブロックし、*IGF2*への作用を阻害し*H19*に作用させる。一方、父性*H19-DMR*はメチル化によりCTCF結合が阻害され、エンハンサーは*IGF2*に作用する(図2)。結果的に、*H19*は母性発現、*IGF2*は父性発現を示す。本症では、母性アレルの*H19-DMR*が高メチル化されるために両アレルでCTCFの結合が阻害される結果、*IGF2*が両アレル発現(loss of imprinting: LOI)する症例が認められる。

##### ii) *KIP2/LIT1*ドメイン

*KIP2/LIT1*ドメイン内の主要なインプリント遺伝子は、母性発現する*p57<sup>KIP2</sup>*(*KIP2*)と父性発現する*LIT1*である(図2)。*KIP2*はサイクリン依存性キナーゼ(CDK)インヒビターで、負の細胞増殖因子であり、その発現減少は本症の発症原因の一つである<sup>2)</sup>。本ドメインのICRは、*LIT1*上流にある*DMR-LIT1*(*KvDMR1*)である(母性メチル化、父性非メチル化)<sup>3)</sup>。父性アレルではnon-coding RNAである*LIT1*が発現し周辺の刷り込み遺伝子を抑制すると考えられ

ている。約半数では母性アレル*DMR-LIT1*が脱メチル化している。そのため、両アレルとも父型の発現パターンとなり*KIP2*の発現が減少する<sup>3,4)</sup>。また、*KIP2*の点変異も認められ、弧発例で5%程度、家族例で40%程度にみられる<sup>5)</sup>。

#### 2) 発症原因と臨床症状との関連

弧発例の発症原因の頻度と臨床症状との関連を表1に示す。父性片親性ダイソミー(paternal uniparental disomy: patUPD)では、2つの刷り込みドメインがともに父型エピジェノタイプとなり、*IGF2* LOI、*H19*発現消失、*KIP2*発現消失が起こると考えられる。*H19-DMR*高メチル化やpatUPDの場合は、Wilms腫瘍リスクが高くなる。一方、*DMR-LIT1*脱メチル化の腫瘍リスクそのものは低いが、Wilms腫瘍以外の腫瘍が発生しやすい<sup>5,6)</sup>。

### ■ 診断

臨床診断基準を表2に示す。

### ■ 治療、予後

生後3日間は6時間ごとに血糖値モニタリング。膵細胞過形成による持続性低血糖に対してジアゾキサイド治療。臍帯ヘルニアは新生児期に手術が必要。8才くらいまでは3~6カ月おきに腹部超音波により腫瘍のスクリーニングを行う。生命予後は良。

本研究室では、Wiedemann-Beckwith症候群の遺伝子解析を無償で行っているため、ご希望される際はご連絡いただきたい。

### 【参考文献】

- 1) Weksberg R, et al.: Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005; 137: 12-23
- 2) Higashimoto K, et al.: Imprinting disruption of the *KIP2/LIT1* domain: the molecular mechanism causing Beckwith-Wiedemann syndrome and cancer. *Cytogenet Genome Res* 2006;113(1-4): 306-312
- 3) Diaz-Meyer N, et al.: Silencing of *CDKN1C* (*p57<sup>KIP2</sup>*) is associated with hypomethylation at *KvDMR1* in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 2003; 40: 797-801
- 4) Soejima H, et al.: Silencing of imprinted *CDKN1C* gene expression is associated with loss of CpG and histone H3 lysine 9 methylation at *DMR-LIT1* in esophageal cancer. *Oncogene* 2004; 23(25): 4380-4388
- 5) Weksberg R, et al.: Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of *KCNQ1OT1*. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2989-3000
- 6) Rump P, et al.: Tumor risk in Beckwith-Wiedemann syndrome: A review and meta-analysis. *Am J Med Genet A* 2005; 136: 95-104
- 7) 梶井正, 他編: Wiedemann-Beckwith症候群. 新先天奇形症候群アトラス. 1998: 250-251; 南江堂
- 8) Elliott M, et al.: Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. *Clin Genet* 1994; 46(2):168-74
- 9) DeBaun MR, et al.: Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry. *J Pediatr* 1998; 132: 398-400
- 10) Gaston V, et al.: Analysis of the methylation status of the *KCNQ1OT* and *H19* genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 409-418
- 11) DeBaun MR, et al.: Epigenetic alterations of *H19* and *LIT1* distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 604-611
- 12) Bliet J, et al.: Epigenotyping as a tool for the prediction of tumor risk and tumor type in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS). *J Pediatr* 2004; 145: 796-799

## Antisense Transcription Occurs at the Promoter of a Mouse Imprinted Gene, *Commd1*, on the Repressed Paternal Allele

Keiichiro Joh<sup>1,\*†</sup>, Hitomi Yatsuki<sup>1,†</sup>, Ken Higashimoto<sup>1</sup>, Tsunehiro Mukai<sup>2</sup> and Hidenobu Soejima<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Molecular Genetics and Epigenetics, Department of Biomolecular Sciences, Faculty of Medicine, Saga University, 5-1-1 Nabeshima, Saga 849-8501; and <sup>2</sup>Saga University, The Administration Office, 1 Honjo-machi, Saga 840-8502, Japan

Received July 16, 2009; accepted September 1, 2009; published online September 17, 2009

The *Commd1* gene is imprinted in the adult mouse brain and is predominantly expressed from the maternal allele. A paternally expressing imprinted gene, *U2af1-rs1*, resides in the first intron of *Commd1* in an antisense orientation. We found that RNA polymerase II phosphorylated at serine 2 of the carboxyl-terminal domain repeats, a marker of transcription elongation, is enriched on the paternal allele than on the maternal allele in the *Commd1* promoter. The *Commd1* promoter harbours no allelic differences in DNA methylation and histone modifications. These results strongly suggested that imprinting of *Commd1* is generated by interference with paternal *Commd1* transcription by the oppositely directed *U2af1-rs1* transcription.

**Key words:** genomic imprinting, epigenetics, DNA methylation, histone modification.

Abbreviations: DMR, differentially methylated region; CTD, carboxyl-terminal domain; ICR, imprinting control region; ChIP, chromatin immunoprecipitation; Pol II, RNA polymerase II; H3-K4me3, histone H3 trimethylated at K4; H3-K9me2, histone H3 dimethylated at K9; H3-K27me3, histone H3 trimethylated at K27; H3-Ac, acetylated histone H3; pS2-Pol II, RNA polymerase II phosphorylated at S2; pS5-Pol II, RNA polymerase II phosphorylated at S5.

Imprinted genes are expressed from one of the two parental alleles, in a parent specific manner. Imprinted genes are generally linked to differentially methylated regions (DMR) that harbour allele-specific methylation (1). This differential methylation occurs in a CpG island, a genomic region highly enriched in CpG dinucleotides. Among the DMRs linked to imprinted genes, DMRs whose methylation is established during gametogenesis and is maintained throughout development have been described. Such DMRs coordinately regulate imprinting of imprinted genes linked to them and are termed imprinting control regions (ICR).

The murine imprinted gene *Commd1* (also known as *Murr1*) is predominantly expressed from the maternal allele in adult brain (2). This gene contains another imprinted gene, *U2af1-rs1*, in its intron 1. *U2af1-rs1*, an intron-less gene, is expressed exclusively from the paternal allele and is transcribed in the direction opposite to the *Commd1* gene (Fig. 1A). The genes surrounding *Commd1* are not imprinted and thus, *Commd1* and *U2af1-rs1* form a small imprinted domain on chromosome 11 (3). The *U2af1-rs1* promoter locates in a maternally methylated DMR. The maternal methylation is established during female gametogenesis, and is maintained throughout the development (3, 4). To date,

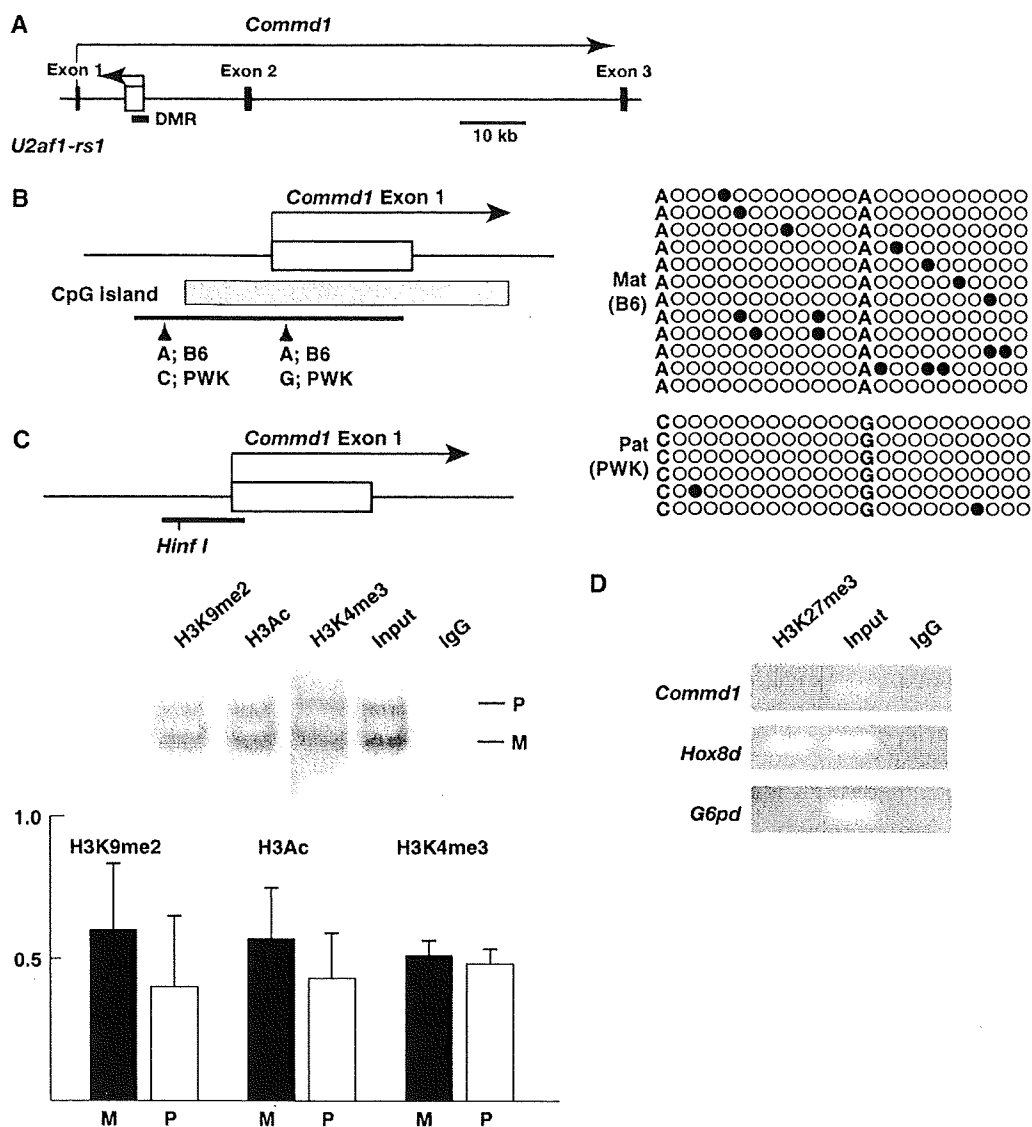
no other DMR has been identified in the genomic region of the *Commd1/U2af1-rs1* locus (3). Taken together, it is hypothesized that the DMR of *U2af1-rs1* is the ICR for this small imprinted domain. It is plausible that the paternal expression of *U2af1-rs1* is caused by the methylation of the maternal promoter in the DMR. However, the mechanism underlying *Commd1* imprinting is yet to be elucidated.

The *Commd1* promoter region has a CpG island, and thus allele-specific methylation was the most likely mechanism underlying *Commd1* imprinting. Bisulfite sequencing was undertaken on the promoter in adult brain to determine the methylation status in detail. In order to distinguish parental alleles with SNPs, we used adult brain tissue from an F1 mice resulting from the cross between C57BL/6 female and PWK male. The experiment on mice was approved by the Saga University Animal Care and Use Committee and was carried out according to the Regulation on animal experimentation at Saga University. On both parental alleles, all of the analyzed CpG sites within the region remained essentially unmethylated (Fig. 1B). This result suggests that allelic differences in *Commd1* expression do not depend on the differential methylation of the promoters.

Histone modifications are also important epigenetic determinants that influence the transcriptional activity of genes (5). Methylation of histone H3 at lysine 9 (K9) is associated with repression of gene expression. In contrast, methylation of histone H3 at K4 and acetylation of histone H3 are associated with active gene expression. A similar phenomenon is also observed for

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81-952-34-2262, Fax: +81-952-34-2067, E-mail: joh@cc.saga-u.ac.jp and Tel: +81-952-34-2260, Fax: +81-952-34-2067, E-mail: soejima@cc.saga-u.ac.jp

†These authors contributed equally to this work.



**Fig. 1. Epigenetic analyses of the *Commd1* promoter.** (A) A schematic diagram of the *Commd1* and *U2af1-rs1* genes. The thin lines with an arrow head indicate the direction of transcription. The bar underlining the *U2af1-rs1* gene outlines the DMR of the gene. The gene diagrams are to scale. (B) Bisulfite sequencing of the *Commd1* promoter. The *Commd1* exon 1 (205 bp) and the CpG island (480 bp) are shown schematically to scale. The horizontal bar underlining the CpG island indicates the region PCR-amplified for sequencing. The SNPs used for the discrimination of the alleles are indicated underneath. Genomic DNA was isolated from mouse brain using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, USA) and was modified with sodium bisulfite using the EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Germany). PCR was carried out with the modified DNA and the primers, BS-MurrA: 5'-GGAGTGAAGAAGGAAATAAT-3' and BS-MurrB; 5'-AACTCCTCCGATAACACTTCPCR-3'. Amplification was performed under the condition of initial denaturation at 95°C for 12 min; followed by 45 cycles of 95°C for 30 s, 62°C for 30 s, 72°C for 1 min. PCR products were cloned and were sequenced. A total of 22 CpG sites are identified in the region. Each CpG site is represented by an open circle (unmethylated) or filled circle (methylated). Each row of circles illustrates the result of one PCR product clone. SNPs are also outlined. (C) The histone modifications at the *Commd1* promoter. ChIP analyses were performed with antibodies directed against H3-K9me2 (ab7312, Abcam, USA), H3-Ac (06-599, Upstate, USA), or H3-K4me3 (ab8580, Abcam, USA). Control experiments included the input chromatin used for ChIP (Input) and the chromatin precipitated

with nonimmune-antisera (IgG). The analyzed region is highlighted with a horizontal bar under the promoter. The *Hinf I* site is located on the maternal allele and was used to discriminate from the paternal alleles. Brain tissue was treated with EpiQuik Tissue ChIP kit (Epigentec, Inc., USA) and the extract was immunoprecipitated with antibodies directed against each of the modified histones. PCR was performed under the condition of initial denaturation at 95°C for 12 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min. PCR primers are Murr9, 5'-TGCACATCGGAGTGAAGAAG-3' and Murr10, 5'-TGTCCGTGAAAGGCGTTCG-3'. End-labelled PCR products were obtained by the addition of one primer end-labeled with  $^{32}\text{P}$  to the final amplification cycle (Hot-stop PCR) (9, 10). PCR products were digested with *Hinf I* and electrophoresed. Representative electrophoregram of ChIP analyses on H3-K9me2, H3-Ac and H3-K4me3 was shown.  $^{32}\text{P}$ -labeled DNAs in the electrophoregram were quantitated with a BAS-2000 (Fujifilm Co., Japan) and normalized with input values. The experiments were repeated six times on H3-Ac and four times on H3-K9me2 and H3-K4me3. Quantification results are summarized in the graph and are presented as mean with SD. M, maternal allele; P, paternal allele. (D) ChIP analyses on H3-K27me3 at the *Commd1* promoter. The ChIP experiments were performed same as in (C) with the antibody against H3-K27me3 (07-449, Upstate, USA). PCRs were done with unlabeled primers and PCR products were electrophoresed without *Hinf I* digestion. *Hox8d* and *G6pd* served as the positive and negative controls, respectively. The analyses were performed four times and produced consistent results.



imprinted genes (6–8). Thus, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) on adult brain of the F1 mice to see allelic differences in dimethylated histone H3 at K9 (H3-K9me2), trimethylated histone H3 at K4 (H3-K4me3) or acetylated histone H3 (H3-Ac) at the *Commd1* promoter. We found that there were no significant differences in the histone modifications at the promoter for the two parental alleles (Fig. 1C). On the *U2af1-rs1* promoter, we have obtained the results consistent with the previous report by Fournier *et al.* (8), which indicated the enrichment of H3-K4me3 and H3-Ac on the active paternal allele and the enrichment of H3-K9me2 on the repressed maternal allele (data not shown).

Imprinted genes that lack allele-specific DNA methylation also exist in mice. Some of these genes show allelic differences in H3-K27me3 (11). As DNA methylation does not occur at the *Commd1* promoter, we next analyzed H3-K27me3 levels. As shown in Fig. 1D, H3-K27me3 is not detected in the promoter. These epigenetic analyses indicate that the imprinting of *Commd1* is not the result of allelic differences in DNA methylation and histone modification at the promoter.

In the previous study, we have found that the relative expression level of *U2af1-rs1* against *Commd1* increased about 10-fold during brain development from the embryo to the adult. We also detected antisense transcripts in the *Commd1* promoter only on the paternal allele in the adult brain (2). The paternal allele-specific antisense transcript was also detected further upstream of the *Commd1* gene (Supplementary Figure). The presence of the paternal allele-specific antisense transcripts indicates that transcription elongation, presumably originated from *U2af1-rs1*, occurs via the paternal *Commd1* promoter in the adult brain.

In order to determine whether RNA Polymerase II (Pol II) elongation complexes exist in the *Commd1*

promoter on the paternal allele, we analyzed the binding of phosphorylated Pol II to the promoter region. The largest subunit of Pol II harbours a characteristic seven amino acid repeat (YSPTSPS) in the carboxy-terminal domain. Phosphorylation at Ser 5 (S5) in the repeat occurs upon the formation of an active pre-initiation complex at the promoter and thus, phosphorylated Pol II at S5 (pS5-Pol II) is mainly detected in promoter regions. In contrast, Pol II at a promoter is not phosphorylated at Ser 2 (S2) in the repeat, as the modification only occurs and then increases, when the enzyme proceeds to transcription elongation stages. In fact, pS2-Pol II is predominantly detected in the body of a gene (12, 13).

We performed ChIP analyses of pS2-Pol II and pS5-Pol II at the *Commd1* promoter with antibodies directed against pS2-Pol II or pS5-Pol II. As shown in Fig. 2A, pS2-Pol II, which is the enzyme generally absent from promoter regions, was detected in the *Commd1* promoter enriched on the paternal allele. This result indicates that transcription elongation occurs in the *Commd1* promoter on the paternal allele and supports the notion that paternal allele-specific transcription originating from *U2af1-rs1* passes through the *Commd1* promoter. pS2-pol II was also detected in the maternal promoter. Given that the ChIP method detects protein-binding just outside of the PCR-amplified region in addition to that within the region, the pS2-Pol II in the maternal promoter may represent the enzyme bound to exon 1 of *Commd1* and involved in transcription of *Commd1* (Fig. 2B).

Although one can expect that pS5-Pol II exists at the *Commd1* promoter with enrichment on the active maternal allele, pS5-Pol II was detected equally on both alleles (Fig. 2A). Part of the pS5-Pol II on the paternal allele may be Pol II doubly phosphorylated at S2 and S5 (pS2/pS5-Pol II) involved in the elongation, originating from

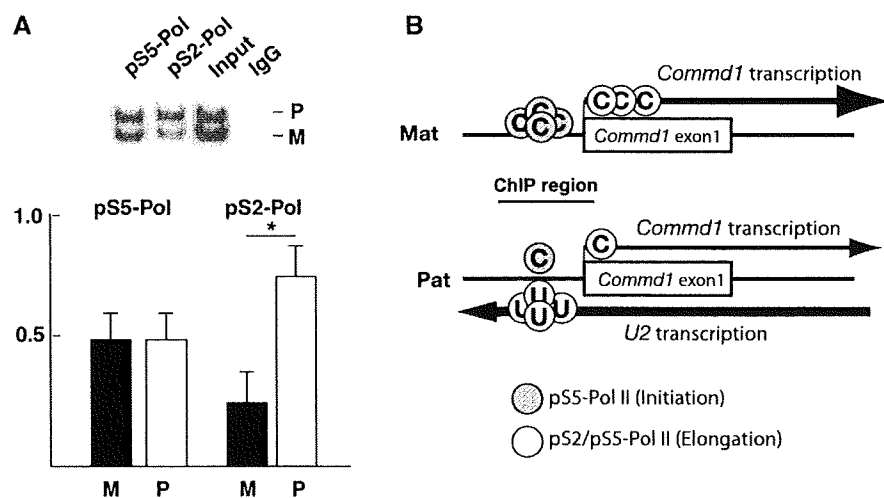


Fig. 2. The phosphorylated RNA polymerase II at the *Commd1* promoter. (A) ChIP analyses were performed in the same region as Fig. 1C and D with an antibody directed against pS5-Pol II (ab5131, Abcam, USA) or pS2-Pol II (ab5095, Abcam, USA). ChIP analysis with each antibody was repeated ten times. The asterisks indicate a significant difference ( $P < 0.001$  by

paired *t*-test). (B) A model of the distribution of phosphorylated Pol II at the promoter. Pol IIs labelled with C are for *Commd1* transcription and those labelled with U are for the transcription of the *U2af1-rs1* gene. The Pol IIs shown in the *Commd1* exon 1 are conjectured to explain the ChIP results in (A) (see text).

*U2af1-rs1* (Fig. 2B). The phosphate molecule located at S5 is not dephosphorylated during transcription elongation and thus pS2-Pol II undergoing elongation retains phosphorylated S5 in mammals (12). pS5-Pol II and pS2-Pol II are also enriched on the paternal allele in the region ~1,000 bp upstream of the *Commd1* gene (data not shown), where a paternal antisense transcript was detected (Supplementary Figure).

In the current study, we report the detection of Pol II involving in transcription elongation at the *Commd1* promoter on the paternal allele. As allelic differences were not detected in DNA methylation and histone modification in the *Commd1* promoter, transcriptional interference is hypothesized to be the cause of *Commd1* imprinting as follows. In this case, maternal allele-specific methylation at the *U2af1-rs1* promoter resulted in the paternal allele-specific expression of the gene. The transcription of the gene extends to the *Commd1* promoter on the paternal allele only. This antisense transcription interferes with *Commd1* transcription and reduces the expression level of the paternal *Commd1* gene in the adult brain where the relative expression level of *U2af1-rs1* against *Commd1* has increased.

Many previous studies have reported that a gene can be repressed in *cis* by active neighbouring genes through transcriptional interference in yeast (14, 15), *Drosophila* (16) and mammals (17). In some cases, transcriptional interference plays an important role in the regulation of gene expression (15, 16). *Commd1* is the first imprinted gene described whose imprinted expression is suggested to be regulated by transcriptional interference.

#### SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at *JB* online.

#### FUNDING

Grant-in-Aid for Scientific Research (C) from the Japan Society for the Promotion of Science (No. 20590330; to H.S., in part); a Grant for Child Health and Development from the National Center for Child Health and Development (to H.S.); grants provided by the Takeda Science Foundation (to H.S.); the Ichiro Kanehara Foundation (to H.S.); The Uehara Memorial Foundation (to K.H.).

#### CONFLICT OF INTEREST

None declared.

#### REFERENCES

1. Reik, W. and Walter, J. (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 21–32
2. Wang, Y., Joh, K., Masuko, S., Yatsuki, H., Soejima, H., Nabetani, A., Beechey, C.V., Okinami, S., and Mukai, T. (2004) The mouse *Murr1* gene is imprinted in the adult brain, presumably due to transcriptional interference by the antisense-oriented *U2af1-rs1* gene. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 270–279
3. Zhang, Z., Joh, K., Yatsuki, H., Wang, Y., Arai, Y., Soejima, H., Higashimoto, K., Iwasaka, T., and Mukai, T. (2006) Comparative analyses of genomic imprinting and CpG island-methylation in mouse *Murr1* and human *MURR1* loci revealed a putative imprinting control region in mice. *Gene* **366**, 77–86
4. Hatada, I., Nabetani, A., Arai, Y., Ohishi, S., Suzuki, M., Miyabara, S., Nishimune, Y., and Mukai, T. (1997) Aberrant methylation of an imprinted gene *U2af1-rs1*(SP2) caused by its own transgene. *J. Biol. Chem.* **272**, 9120–9122
5. Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science* **293**, 1074–1080
6. Fournier, C., Goto, Y., Ballestar, E., Delaval, K., Hever, A.M., Esteller, M., and Feil, R. (2002) Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *EMBO J.* **21**, 6560–6570
7. Higashimoto, K., Urano, T., Sugiura, K., Yatsuki, H., Joh, K., Zhao, W., Iwakawa, M., Ohashi, H., Oshimura, M., Niihara, N., Mukai, T., and Soejima, H. (2003) Loss of CpG methylation is strongly correlated with loss of histone H3 lysine 9 methylation at *DMR-LIT1* in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 948–956
8. Soejima, H., Nakagawachi, T., Zhao, W., Higashimoto, K., Urano, T., Matsukura, S., Kitajima, Y., Takeuchi, M., Nakayama, M., Oshimura, M., Miyazaki, K., Joh, K., and Mukai, T. (2004) Silencing of imprinted *CDKN1C* gene expression is associated with loss of CpG and histone H3 lysine 9 methylation at *DMR-LIT1* in esophageal cancer. *Oncogene* **23**, 4380–4388
9. Uejima, H., Lee, M.P., Cui, H., and Feinberg, A.P. (2000) Hot-stop PCR: a simple and general assay for linear quantitation of allele ratios. *Nat. Genet.* **25**, 375–376
10. Uejima, H., Lee, M.P., Cui, H., and Feinberg, A.P. (2001) Correction: hot-stop PCR: a simple and general assay for linear quantitation of allele ratios. *Nat. Genet.* **28**, 97
11. Lewis, A., Mitsuya, K., Umlauf, D., Smith, P., Dean, W., Walter, J., Higgins, M., Feil, R., and Reik, W. (2004) Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. *Nat. Genet.* **36**, 1291–1295
12. Morris, D.P., Michelotti, G.A., and Schwinn, D.A. (2005) Evidence that phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeats is similar in yeast and humans. *J. Biol. Chem.* **280**, 31368–31377
13. Hirose, Y. and Ohkuma, Y. (2007) Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *J. Biochem.* **141**, 601–608
14. Prescott, E.M. and Proudfoot, N.J. (2002) Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 8796–8801
15. Martens, J.A., Laprade, L., and Winston, F. (2004) Intergenic transcription is required to repress the *Saccharomyces cerevisiae* *SER3* gene. *Nature* **429**, 571–574
16. Petruk, S., Sedkov, Y., Riley, K.M., Hodgson, J., Schweisguth, F., Hirose, S., Jaynes, J.B., Brock, H.W., and Mazo, A. (2006) Transcription of bxd noncoding RNAs promoted by trithorax represses *Ubx* in *cis* by transcriptional interference. *Cell* **127**, 1209–1221
17. Martianov, I., Ramadass, A., Serra Barros, A., Chow, N., and Akoulitchev, A. (2007) Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* **445**, 666–670

---

第 53 回九州地方会

---

期 日：平成 21 年 2 月 14 日  
場 所：エルガーラホール  
総会長：山根 誠久(琉球大学医学部臨床検査医学講座)

---

特別講演 1

---

エピジェネティクス関連疾患と解析方法

副 島 英 伸\*

---

Epigenetics-Related Diseases and Analytic Methods

*Hidenobu SOEJIMA, MD, PhD\**

Epigenetics is defined as the study of changes in gene function that are mitotically and/or meiotically heritable and that do not entail a change in DNA sequence. Epigenetic regulation of gene expression plays a critical role in development and differentiation, X inactivation, genomic imprinting and several human diseases, including cancer. DNA methylation and histone modifications play an essential role in epigenetic gene expression. In this article, an outline of epigenetics and representative analytic methods are explained. Then, epigenetic alterations and clinical implications of diseases, such as cancer, genomic imprinting-related diseases, and others, are described. The great advance in epigenetic research, from basic to clinical, will bring significant benefits to human health and a broad range of life sciences.

[Rinsho Byori 57 : 769~778, 2009]

Corresponding author: *Hidenobu SOEJIMA*, MD, PhD, Division of Molecular Genetics & Epigenetics, Department of Biomolecular Sciences, Faculty of Medicine, Saga University, Saga 849-8501, Japan. E-mail: soejimah@med.saga-u.ac.jp

**【Key Words】** epigenetics(エピジェネティクス), DNA methylation(DNA メチル化), histone modification(ヒストン修飾), cancer epigenetics(癌のエピジェネティクス), genomic imprinting(ゲノム刷り込み)

---

エピジェネティクスは、「DNA の配列変化を伴わずに子孫や娘細胞に伝達される遺伝子機能の変化と、この現象を探求する学問」と定義されている。本稿では、エピジェネティクスの概略、代表的な解

析方法について述べ、ついで癌およびゲノム刷り込み疾患を中心にエピジェネティクスと疾患との関わりを解説する。

---

\*佐賀大学医学部分子生命科学講座分子遺伝学・エピジェネティクス分野(〒849-8501 佐賀市鍋島 5-1-1)

I. エピジェネティクスの概略

A. ジェネティクスとエピジェネティクス

遺伝学(ジェネティクス)は生物の遺伝現象を研究する学問で、遺伝とは世代を超えて形質が伝わることである。この形質を決定しているのは遺伝子、つまり DNA の配列である。例えば、ヒトの耳垢は湿型と乾型の二つに分けられ、遺伝することが知られているが、この型は *ABCC11* 遺伝子の一塩基多型(SNP)が決定している<sup>1)</sup>。また、多くの遺伝性疾患の原因遺伝子に変異を認めること、癌関連遺伝子の変異により癌が発生することは周知の事実である。ごく簡単に言うと、ジェネティクスは「DNA 配列の変化による遺伝子機能の変化と、これを研究する学問」ということもできる。

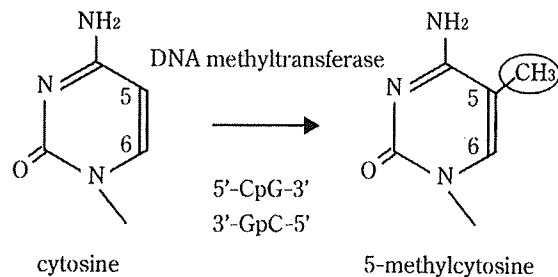
これに対してエピジェネティクスは、「DNA の配列変化を伴わずに子孫や娘細胞に伝達される遺伝子機能の変化と、この現象を探求する学問」と定義されている<sup>2)</sup>。エピ-(epi-)とは、「上」「間」「外側」「追加」「付帯」「後」の意味を持つ接頭辞なので、エピ-ジェネティクスは DNA 配列(ジェネティクス)の「上」「間」「外側」に何かを「追加」「付帯」したようなイメージとしてとらえられる。

実際、エピジェネティクスの重要なファクターには DNA のメチル化とヒストン修飾があり、これらが変化すると遺伝子機能が変わる。DNA メチル化は、DNA 配列の「上」や「間」にメチル基が「追加」「付帯」することであり、ヒストン修飾は、DNA 配列の「外側」にあるヒストン蛋白(DNA はヒストンに巻き付いている)にメチル基やアセチル基などが「追加」「付帯」することを示す。

B. DNA メチル化

DNA のメチル化は、A, C, G, T の 4 つの塩基のうちシトシンにのみ生じる。DNA メチル化酵素が C と G がならんだ配列(CpG 配列)を認識し、CpG 配列のシトシンの 5 位の炭素にメチル基(CH<sub>3</sub>)を付加する(Fig. 1A)。したがって、CpA, CpC, CpT 配列はメチル化されない。マウスゲノムでは、約 80% の CpG 配列がメチル化している。また、ゲノム中の G+C 含量が高い領域を CpG アイランドと呼ぶが、その多くは遺伝子のプロモーター領域に存在する。一般に、遺伝子が転写されているときはプロモーター CpG アイランドは低メチル化状態だが、抑制されているときは高メチル化を示す。DNA メチル化酵素には、非メチル化 CpG 配列に新しくメチル基を付加する *de novo* メチル化酵素 Dnmt3a,

A.



B.

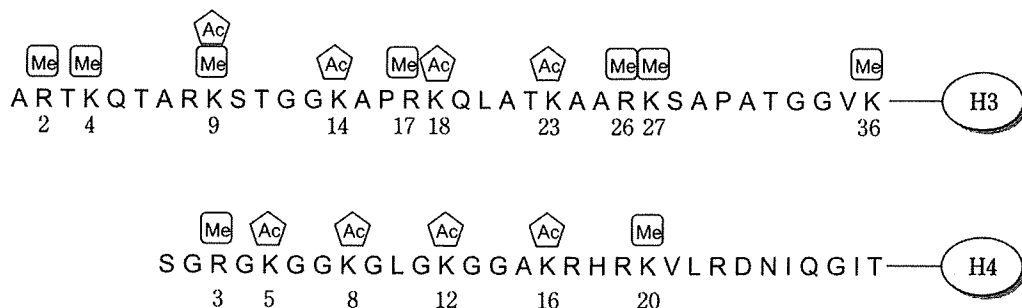


Figure 1 DNA methylation and histone modifications.

(A) 5-methylcytosine. A methyl group is added to the number 5 carbon of the cytosine pyrimidine ring by DNA methyltransferase. (B) Representative histone modifications. The amino-terminal tails of histones are covalently modified, such as methylation (Me) and acetylation (Ac). See text for details.