

CpGアイランドのメチル化を指標としたヒトインプリント遺伝子の網羅的単離

●白石 昌彦

国立がんセンター研究所DNAメチル化とゲノム機能プロジェクト

〈研究の目的と進め方〉

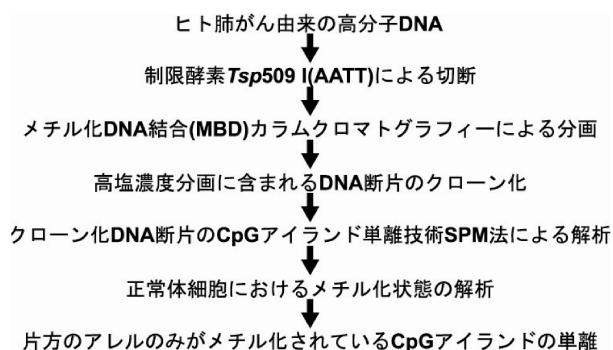
CpGアイランドは多くのヒト遺伝子の5'領域に存在するCpG配列に富む領域であり、プロモータ部位など遺伝子発現制御領域が含まれる。通常CpGアイランド内のCpG配列はメチル化されていないが、インプリント遺伝子などではCpGアイランドのメチル化により対立遺伝子の一方が不活性化される。インプリント遺伝子の発現異常はいくつかの遺伝性疾患の原因となっていることが知られている。本研究では、ヒト正常細胞において片方のアレルがメチル化されているCpGアイランドを網羅的に単離し、インプリント遺伝子のカタログ化を行なうことを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

報告者は本研究開始時までに、メチル化DNA結合(MBD)カラムクロマトグラフィーとCpGアイランド単離技術SPM法を組み合わせ、ヒト肺がんにおいてメチル化されているCpGアイランドのライブラリーを作製した。このライブラリーから数千個のプラスミドDNAを単離し、その塩基配列を決定する。

これらのうち塩基配列上CpGアイランドの特徴を有するクローンについて、正常細胞におけるメチル化の状態を解析する。報告者は既にMBDカラムクロマトグラフィーにより、メチル化されていないCpGアイランドは低塩濃度(L)分画に、メチル化されたCpGアイランドは高塩濃度(H)分画に溶出されることを明らかにしている。

塩基配列をもとにプライマーを設定し、正常細胞由来DNAのL分画、H分画それぞれを鋳型としてPCRを行なう。PCR産物が両分画に見出されれば、その塩基配列は片方のアレルがメチル化され、もう一方のアレルはメチル化されていないCpGアイランド由来である可能性が高い。このようにして、正常細胞において片方のアレルがメチル化されているCpGアイランドを網羅的に単離する。



〈研究期間の成果〉

ヒト肺がんにおいてメチル化されているCpGアイランド由来のDNA断片をメチル化DNA結合カラムを用いて濃縮し、クローン化した。このライブラリーから、正常ヒト体細胞のDNAでメチル化されているCpGアイランドを単離した。

正常体細胞由来のDNAを制限酵素Tsp509Iで切断し、メチル化DNA結合カラムクロマトグラフィーにより非メチル化CpGアイランドに由来するDNA断片を含む低塩濃度分画、メチル化CpGアイランドに由来するDNA断片を含む高塩濃度分画に分けた。それぞれの画分から回収したDNAを鋳型とし、ライブラリーから単離された標的塩基配列に由来するプライマーを用いてPCRを行い、両分画にPCR産物が検出される塩基配列を約150個得た。このうち塩基配列上CpGアイランドの特徴を有するものが約40個存在し、中には既知インプリント遺伝子であるNNAT遺伝子のCpGアイランドも含まれていた。続いて知遺伝子の5'領域に由来する配列に関し重亜硫酸修飾法を用いてさらに詳細にメチル化様式を解析した。その結果NEUROD3遺伝子などのCpGアイランドが片方のアレルがメチル化されていることが示唆された。これらの結果は、メチル化DNA結合カラムクロマトグラフィーにより、CpGアイランドのメチル化を指標としてヒトインプリント遺伝子の網羅的な単離が可能であることを示している。またこれらのCpGアイランドのうちTNFR12遺伝子を含むいくつかの遺伝子は、骨髄異形成症候群、関節リウマチなどの原因遺伝子座に位置し、これらの領域に存在する遺伝子のインプリント異常が疾患の原因となっている可能性が示唆された(1-6)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

国内外の複数の研究グループから、メチル化CpGアイランドライブラリーを分与してもらえないかとの申し出があった。これらのグループと共同で、メチル化CpGアイランドのマイクロアレイを作製し、メチル化と遺伝子発現の関連について共同研究を進めている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初メチル化CpGアイランドライブラリー中には相当数のCpGアイランド由来のクローンが含まれると予想したが、実際は全ライブラリーの1割程度がCpGアイランド由来のクローンであり、残りの多くがCpG配列に富む繰返し配列由来であった。繰返し配列の除去にかなりの労力が費やされた。

〈今後の課題〉

インプリント遺伝子であることを最終的に証明するには、その遺伝子が染色体の由来する親特異的な発現を示していることを示す必要がある。この点について現在鳥取

大学押村光雄教授の研究グループと共同で解析を進めている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Oates, A., Terry, M., Miyamoto, Y., and Sekiya, T., Heterogeneity in the methylation status of genomic DNA fragments demonstrating similar elution profiles in methyl-CpG binding domain column chromatography, *Proc. Jpn. Acad.*, 77(B)(10), 208-211 (2001).
2. Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Oates, A. J., Terry, M. J., and Miyamoto, Y., HOX gene clusters are hotspots of de novo methylation in CpG islands of human lung adenocarcinomas, *Oncogene*, 21(22), 3659-3662 (2002).
3. Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Terry, M. J., Oates, A. J., Miyamoto, Y., Chuu, Y. H., Munakata, M., and Sekiya, T., A comprehensive catalog of CpG islands methylated in human lung adenocarcinomas for the identification of tumor suppressor genes, *Oncogene*, 21(23), 3804-3813 (2002).
4. Shiraishi, M., Oates, A. J., and Sekiya, T., An overview of the analysis of DNA methylation in mammalian genomes, *Biol. Chem.*, 383(6), 893-906 (2002).
5. Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Oates, A. J., Terry, M. J., Miyamoto, Y., Tanaka, K., and Sekiya, T., Variable estimation of genomic DNA methylation: a comparison of methyl-CpG binding domain column chromatography and bisulfite genomic sequencing, *Anal. Biochem.*, 308(1), 182-185 (2002).
6. Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Oates, A. J., Terry, M. J., Miyamoto, Y., and Sekiya, T., Methyl-CpG binding domain column chromatography as a tool for the analysis of genomic DNA methylation, *Anal. Biochem.*, 329(1), 1-10 (2004).