

多因子疾患の要因としてのインプリント遺伝子の網羅的探索：エピジェノミクス的なアプローチ

●萩原 百合子

東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター

〈研究の目的と進め方〉

ほ乳類ゲノムにおけるDNAのメチル化は、生物学的過程に深く関わる重要な機構である。ほ乳類の遺伝子の約半数はCpG islands (CGIs) を持ち、正常組織中では通常メチル化を逃れているとされていた。例外であるインプリント部位にしばしば見いだされる片アレル特異的高メチル化領域 (DMR:Differentially Methylated Region) は、ゲノムインプリンティングの成立もしくは維持において重要な役割を果たしていると考えられており、したがって、片アレル特異的に高メチル化されたCGIsを検索することで、新規DMR及びインプリント遺伝子を同定出来る可能性がある。そこで我々は制限酵素の相反するメチル化感受性を利用したHpaII - McrBC - PCR法を利用し、塩基配列情報が正確でありかつ遺伝子密度の高いヒト11番染色体長腕をターゲットに染色体ワイドな網羅的メチル化解析を行い、メチル化の全体像の把握を試みた。

〈2003年度の研究の当初計画〉

- 1) ヒト第11番染色体ゲノム情報を利用した特徴的反复配列抽出と、系統的メチル化解析によるインプリント遺伝子候補遺伝子の検索を完了する。
- 2) 候補DMRの詳細な発現解析と染色体全体メチレーション状態の把握。

〈2003年度の成果〉

- 1) CGIs予測プログラムを用いたCGIsの抽出を完了した。CGIの条件は、取り残しのないように、最も緩いパラメーターであるGardiner-Gardenのオリジナルのパラメーターを適用した。結果、11qからは889個のCGIsが抽出され、この中には、ゲノム中の反复配列が抽出パラメーターを満たして、CGIとして抽出されているものも含まれた。インプリント遺伝子の近傍には、非インプリント遺伝子に比べてSINEが低頻度に局在し、それに対し、Low complexity repeats やSimple repeatsは高頻度に局在することが報告されている (Human Genet 111; 511-520, 2002)。このため、抽出されたCGIsからRepeatMaskerにより、interspersed repeatsを含むCGIsを排除し、657個のCGIsを得た。この657個のCGIsに対して、HpaII - McrBC - PCR法を適用して、そのメチル化状態の網羅的解析に着手し、DMRを検索した。結果、従来考えられていたように、その多く83% (543個) が非メチル化CGIであった。また、メチル化CGIの割合が13%という値を示し、考えられているよりも多くのCGIがメチル化を受けていることが示された。
- 2) DMRの可能性を示したCGIは、Bisulfite Genomic sequencing法を用いた詳細なアレル別メチル化解析を行った。結果、DMR候補となる混在型メチル化CGIが6個得られた。そのうち2つのCGI (#07238933、#73839336) は、アレル非特異的なメチル化パターンを示した。これは、(1) 細胞内でランダムに片方のアレルがメチル化を受けているか、(2) 両アレルともメチル化を受けた細胞と、それとは反対に、両アレルともメチル化を免れている

細胞が共存するためであると思われる。また、母由来アレルが完全に非メチル化なのに対し、父由来アレルが一部の細胞中ではメチル化を受け、その領域がDMRとなっていると考えられるCGI (#61721374) が同定された。このCGIには、LTR elementが隣接しており、また、末梢血由来ゲノムとplacenta由来ゲノムにおいてそれぞれメチル化アレルの割合が異なることから、LTR elementの影響を受けて細胞によりそのメチル化状況が異なる可能性がある。本解析によって同定された混在型メチル化CGIのメチル化パターンは典型的メチル化インプリンティングパターンとは異なる。21qにも同様のCGIが見出されており、アレル別メチル化様式は従来考えられていた以上に多様であることが示された。更に、21qと比較すると、非メチル化CGIは両染色体でほぼ等しく分布しているが、メチル化CGIの出現頻度は有意に低く、ゲノム中におけるその分布にはかなりの偏りがあると考えられた。

〈国内外の成果の位置づけ〉

本研究により、従来考えられていたよりもはるかに多くのCGIが正常細胞中においてもメチル化状態にあり、しかも様々なアレル別メチル化パターンが存在することが示された。したがって、このようなアプローチは、正常組織におけるDNAメチル化の知見を拡げる上で強力なものであると考えられる。また、本研究は新規インプリント遺伝子の同定を目指すだけでなく、一本の染色体上のCGIのメチル化状況を網羅的に解析するものであり、メチル化に関する新たな情報が提供できると考えられる。一方、より小さな染色体である21番染色体に関する知見が既に公表され (Genome Research 14.247.2004), 11番に関してはその後追いの形となった反面、双方の比較による重要な知見が得られた。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

Low complexity repeats やSimple repeatsを含むCGIでは、PCRによる増幅が困難であり、且つBisulfite PCRも困難となるものがあつた。また、DMR候補とされたものの中には、メチル化CGIだけでなく非メチル化CGIも含まれ、まれに偽陽性を示すものがあつた。McrBCは切断箇所が未だ同定されていないため、メチル化CGIであっても切断されない場合があるようだと考えている。一方HpaIIは、解析ソフトウェアによりsiteが確認されていても、切断されない場合がある。ゲノムの領域によっては、制限酵素サイト数が少数だと、十分な切断ができないと考えている。

〈今後の課題〉

マウス相同領域に得られたDMRの有無を確認し、そのメチル化状況を解析する。インプリント遺伝子が同定された際は、疾患との関連性なども検討する。