

# 細胞機能を司るゲノムDNAメチル化によるインプリンティング制御と疾患発病機構

●向井 常博 ◆副島 英伸

佐賀大学 医学部 分子生命科学講座 (旧佐賀医科大学 生化学講座)

## ＜研究の目的と進め方＞

Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) はインプリンティングがかかわる疾患であり、しかも胎児性腫瘍を高頻度に伴う。その候補遺伝子として IGF2 ならびに P57Kip2 が知られているが、これらの遺伝子がどのような過程を通じて発現異常を引き起こすのかその調節機構はまだ十分解明されていない。我々は現在までに当該領域に対応するマウスゲノム領域 7F4/F5 の 530 kb に及ぶ一つのドメイン全体のシーケンスを行った。ここではこのドメイン全体にわたり、ヒトおよびマウスを用いてDNAメチル化の生理的動態を解析する。さらに疾患発症のメカニズムの解明のために、メチル化解析の結果を基盤にしたドメインレベルでの制御機構を明らかにしたい。

インプリンティング領域では配偶子インプリントが生殖細胞に起き、それが体細胞での親由来アリル特異的発現を決定しており、その本体はDNAメチル化と考えられている。従って進め方として生理的なDNAメチル化状態の解析を体細胞、生殖細胞で行う。ついでドメインレベルの制御中枢としてのインプリンティングセンターを想定し、その同定を行う。この領域の異常により発症する BWS や Wilms 腫瘍を解析し、モデルとの整合性を明らかにする。

## ＜研究開始時の研究計画＞

マウスゲノム領域 7F4/F5、Nap114-TapaI 間のシーケンス結果のコンピューター解析により、CpG island のマッピングを行い、CpG island のDNAメチル化状態を解析する。先ず、体細胞でのDNAメチル化をそれぞれの CpG island について調べる。メチル化感受性制限酵素HpaIIを用い、さらに Bisulfite sequencing 法により詳細に解析を行う。試料として、F1マウスを用意し、あらかじめポリモルフィズムをみつめておき、アリルの由来がわかるようにしておく。成体腎、10.5 dpc 胎児、8.5 dpc 胎盤について解析を行う。ついで体細胞で片親性のDNAメチル化がみられた CpG island について、生殖細胞 (精子, 卵子) での DNAメチル化状態を調べる。生殖細胞でメチル化されている領域を制御中枢としてのインプリンティングセンターと想定し、DNaseI 感受性部位を調べる。Lit1 領域のDNAメチル化と p57Kip2 の発現の関係の解明する。ヒト11p15.5 当該領域のDNAメチル化解析ならびに疾患解析を行う。

## ＜研究期間の成果＞

1) マウスゲノム領域 7F4/F5 の Nap114-TapaI 間 530 kb のシーケンス結果 (0202181940) のコンピューター解析により、未知遺伝子の同定、ヒト-マウス間の高ホモロジー領域の同定、CpG island のマッピングを行った。その結果、新しいヒトインプリンティング遺伝子 KCNQ1DN (0202181935) や C11orf21 (0202181949) を同定し、報告した。また、マウスになく、ヒトにのみ存在する遺伝子 ORCTL2S の SNP (0202181943)、このサブドメインをコントロールしていると考えられるヒト LIT1 の RFLP

(0202181945) を報告し、今後の解析に役立てる。

2) マウス Nap114-TapaI 間に存在する10ヶ所の CpG island (CGI) の体細胞のDNAメチル化状態を調べた。Bisulfite sequencing 法により全メチル化の実体をアリルを区別して解析した。体細胞 (成体腎、10.5 dpc 胎児) では、p57Kip2 プロモーターとその上流領域 (CGI4, 5) の父親アリル特異的メチル化、Lit CpG island (CGI8; DMR-Lit1) の母性アリル特異的メチル化が観察された。

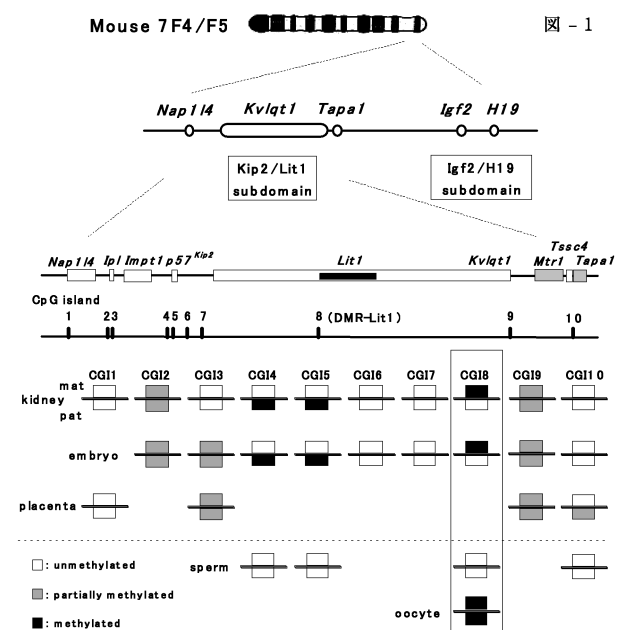
3) 生殖細胞のDNAメチル化解析を行った。体細胞で観察された CGI4, 5 の父親アリル特異的メチル化は精子では観察されなかった。ところが、CGI8 (DMR-Lit1) は体細胞のみならず卵子でもDNAメチル化が観察された。

4) インプリンティングセンターの近傍に存在するといわれている DNaseI 感受性部位を解析したところ、p57Kip2 プロモーター付近 (HSS-2, 3) の母性アリル、Lit1 プロモーター付近 (HSS-1) の父性アリルに DNaseI 感受性部位がみられた。

5) この領域に存在する遺伝子の発現状態を調べたところ、組織、時期を問わずにアリル特異的DNAメチル化と発現が常に一定なのは p57Kip2 と Lit1 だけであった。

6) BWS 患者サンプルの発現ならびにメチル化解析を一部行った。

以上の結果から、解析した Kip2/Lit1 サブドメイン内では DMR-Lit1 のみに生殖細胞のDNAメチル化と発現アリル (父親アリル) 特異的 DNaseI 感受性部位が存在した。Kip2/Lit1 サブドメインのインプリンティング遺伝子群は DMR-Lit1 を中心に調節されている可能性が強く示唆された (0301061136)。



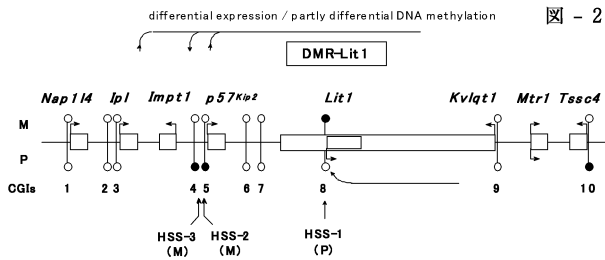


図 - 1 : 10ヶ所のCpG islandのDNAメチル化状態を模式的に示した。成体腎、胎児、胎盤、精子、卵子の両アレルのメチル化状態を調べた。CGI8がDMR-Lit1に対応する。

図 - 2 : Kip2/Lit1 サブドメインに存在する遺伝子のDNAメチル化と発現の状態ならびにDNaseI感受性部位を示した。DMR-Lit1がKip2/Lit1サブドメインにおける仮想のインプリンティングセンターであることを示す。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

国外では類似の研究はドイツ、イギリス連合であるが、このようにドメイン全体を解析してインプリンティングセンターを示唆した研究はこれまで無い。国内でも他に1グループがあるだけである。

インプリンティング遺伝子がクラスターをなして存在していて、体細胞ではDMR (Differentially methylated region) がみられるのに、生殖細胞ではこの中の一つだけであったことから、インプリンティングにおける生殖細胞でのDNAメチル化は発生が進行するにつれて、周辺の遺伝子にDMRが広がっていくことが推測され、ドメインレベルでの解析でしかわからないことが評価された。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

計画内容が多すぎて物理的に予定どおり消化できなかった。マウスのインプリンティングセンターの可能性は指摘できたが、同定まではいたらなかった。ヒトのメチル化解析、疾患解析は予定どおり進行しなかった。

#### 〈今後の課題〉

仮想インプリンティングセンターの機能解析  
DMR-Lit1のDNaseI感受性部位に結合する因子の同定。  
ヒト11p15.5当該領域のDNAメチル化解析ならびに疾患解析。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0202181935  
Xin Z, Soejima H, Higashimoto K, Yatsuki H, Zhu X, Satoh Y, Masaki Z, Kaneko Y, Jinnno Y, Fukuzawa R, Hata J and Mukai T., A novel imprinted gene KCNQ1DN, within the WT2 critical region of human chromosome 11p15.5 and its reduced expression in Wilms' tumors, J Biochem., 128, 847-853 (2000).
2. 0202181940  
Yatsuki H, Watanabe H, Hattori M, Joh K, Soejima H, Komoda H, Xin Z, Zhu X, Higashimoto K, Nishimura M, Kuratomi S, Sakaki H, Sakaki Y and Mukai T., Sequence-based structural features between Kvlqt1 and Tapal on mouse chromosome 7F4/F5 corresponding to the Beckwith-Wiedemann syndrome region on human 11p15.5: long-stretches of unusually well conserved intronic sequences of Kvlqt1 between mouse and human,

DNA Research, 7, 195-206 (2000).

3. 0202181943  
Higashimoto K, Soejima H, Katsuki T and Mukai T., Identification of a novel single nucleotide polymorphism (SNP) in the human organic cation transporter-like 2-antisense (ORCTL2S) gene, J Hum. Genet., 45, 58-59 (2000).

4. 0202181945  
Higashimoto K, Soejima H, Yatsuki H, Katsuki T and Mukai T., An Nsi RFLP in the human long QT intronic transcript 1 (LIT1), J. Hum. Genet., 45, 96-97 (2000).

5. 0202181949  
Zhu X, Higashimoto K, Soejima H, Yatsuki H, Sugihara H, Mukai T, Joh K., C11orf21, a novel gene within the Beckwith-Wiedemann syndrome region in human chromosome 11p15.5, Gene, 256, 311-317 (2000).

6.  
Hatada I, Mukai T., Genomic imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome, Histol Histopathol., 15, 309-312 (2000).

7. 0202181957  
Soejima H, Kawamoto S, Akai J, Miyoshi O, Arai Y, Morohka T, Matsuo S, Niikawa N, Kimura A, Okubo K, Mukai T., Isolation of novel heart-specific genes using the BodyMap database, Genomics, 74, 115-120 (2001).

8. 020281605  
Hatada I, Mukai T., Methylation-sensitive genome scanning, Methods Mol Biol., 181, 83-100 (2001).

9. 0301061136  
Yatsuki H, Joh K, Higashimoto K, Soejima H, Arai Y, Wang Y, Hatada I, Obata Y, Morisaki H, Zhang Z, Nakagawachi T, Satoh Y, Mukai T., Domain regulation of imprinting cluster in Kip2/Lit1 subdomain on mouse chromosome 7F4/F5: large-scale DNA methylation analysis reveals that DMR-Lit1 is a putative imprinting control region, Genome Res., 12, 1860-1870 (2002).

10.  
Higashimoto K, Soejima H, Yatsuki H, Joh K, Uchiyama M, Obata Y, Ono R, Wang Y, Xin Z, Zhu X, Masuko S, Ishino F, Hatada I, Jinno Y, Iwasaka T, Katsuki T, Mukai T., Characterization and imprinting status of OBPH1/Obph1 gene: implications for an extended imprinting domain in human and mouse, Genomics, 80, 575-584 (2002).

11.  
Mukai T, Yatsuki H, Joh K, Soejima H., Imprinting cluster and domain regulation, In Excerpta Medica., 161-167 (2002).