

6.

ゲノムインプリンティング制御メカニズムとその異常

押村 光雄

鳥取大学 医学部 教授

ゲノムインプリンティング（ゲノム刷り込み現象）とは、父母由来の対立遺伝子が識別され異なる発現レベルを示す現象である。親由来に偏りのある染色体異常を伴う先天性疾患において刷り込み遺伝子の発現異常が認められることから、組織特異的/時期特異的な刷り込みの正確な制御が正常な個体発生と生理機能の維持に重要であると考えられる。ヒトでは先天性疾患例における分子遺伝学的解析、実験的にはマウス遺伝学を中心に研究が進められてきた。これら

に加えin vitroでの細胞遺伝学実験が可能になれば、インプリンティング制御の分子機構解明に役立つと期待された。そこで我々は培養細胞を利用したインプリンティング解析系の開発を目標に、親起源の明らかなヒト正常染色体を1本含むマウスA9細胞ライブラリーを作製してきた。本研究ではゲノムインプリンティング制御機構を包括的に理解することを目的として、この新規の実験系を用いたアプローチにより、1) ゲノム刷り込みを受けるヒト遺伝子の単離、2) 刷り込み遺伝子のドメインレベルでの発現制御を司るインプリンティングセンターの同定を行った。また、体細胞でのエピジェネティックな変異によるゲノムインプリンティングの異常はがんの発生と深い関わりを持つことから、3) インプリンティング異常の個体差と発がんにおける役割を明らかにすることを目指した（図1）。

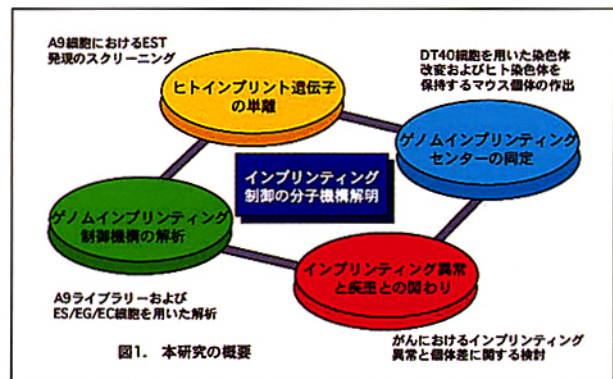


図1. 本研究の概要

1) ゲノム刷り込みを受けるヒト遺伝子の単離

i) 親由来の明らかなヒト染色体1本を保持するマウス細胞の作製

ヒト染色体を1本含むマウス細胞ライブラリーを染色体移入法により作製し、父親と母親由来の相同染色体を保持する雑種細胞の対を同定した（図2）。既知のインプリント遺伝子に関し発現パターンおよび遺伝子上流のCpG配列のメチル化状態を調べたところ、本来のヒト正常2倍体細胞での状態を維持していたことから、これらの雑種細胞パネルがインプリント解析系に適用可能であることが明らかとなった（文献1、4）。

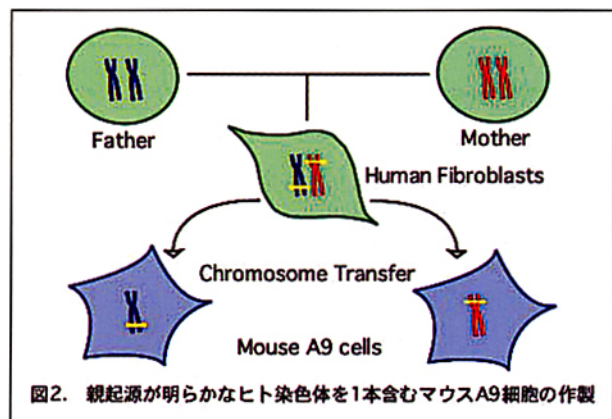


図2. 親起源が明らかなヒト染色体を1本含むマウスA9細胞の作製

ii) 新規ヒトインプリント遺伝子の体系的探索

インプリント遺伝子は染色体上の特定領域にクラスターを形成することが知られている。そこでランドマークとなる既知のインプリント遺伝子の周囲に位置するESTの発現を、先に準備した雑種細胞パネルにおいてRT-PCRにより検索した(文献14)。種々の染色体領域について検索した結果、計19種のESTがどちらか一方の親由来のヒト染色体を保持する雑種細胞でのみ発現を示した。なかでも重要なものとして、11p15.5領域におけるBeckwith-Wiedemann症候群(BWS)の原因遺伝子座に位置する父性発現のLIT1(文献5、6)、15q11-q13に位置する父性発現のGABRB3(文献1)、Prader-Willi症候群(PWS)候補領域に位置する父性発現のsnoRNA(文献12)およびAngelman症候群(AS)欠失領域に位置する母性発現のATP10C(文献15)が挙げられる。

PWSおよびASの原因遺伝子座として知られる15q11-q13領域にはこれまで数種のインプリント遺伝子が同定されているものの、原因遺伝子の特定には至っていない。今回同定したbox C/D型snoRNA遺伝子は、マウスでの実験から染色体の部分欠失により耐性致死となる領域に含まれる。同領域内の既知のインプリント遺伝子をノックアウトしたマウスでは胎生致死の表現型が現れていないため、snoRNAはPWS原因遺伝子の有力な候補である。またATP10C遺伝子はAS症例で発現低下が認められた。加えてマウスではAtp10c/Pfap遺伝子が体重増加に関与することが示唆されており、ASでも肥満を呈する症例がみられることから、ATP10CはAS原因遺伝子の有力候補の1つである。さらに自閉症患者の数%に15q1-q13領域の母方アレルの増幅が認められることから、ATP10CはASのみならず自閉症にも関与する可能性が指摘されており、現在機能解析を進めている。以上のように、親起源の明らかなヒト染色体を1本保持するマウス細胞を用い、刷り込みを受けるヒト遺伝子の体系的探索が可能になった。またこの細胞を用いることで、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関与するヒストン修飾(アセチル化)を対立アレルを識別して解析できることが示された。

2) インプリンティングセンターの同定と制御機構の解析

i) インプリンティングセンターの存在を示唆する実験的証明

ゲノムインプリンティングは世代ごとに書き換えが起きるエピジェネティックな現象である。染色体の親起源はインプリンティングセンターに刷り込まれており、体細胞でのインプリントは細胞分裂を通じて安定に引き継がれるが、生殖細胞では配偶子形成過程で刷り込みが一旦消去されたのち個体の性に応じた書き換えが起こると考えられる。マウス雑種細胞中のヒト染色体は任意の細胞に移入可能である。そこで親起源の明らかなヒト11番染色体を多分化能を有するマウス胚性腫瘍細胞株に移入し、初期分化に伴うゲノムインプリンティングの確立について検討した(文献3)。その結果未分化状態では供与細胞(A9)において不活性化していたインプリント遺伝子H19が活性化するが、分化誘導に伴い再び不活性化がみられた。このことから体細胞の染色体には親起源が刷り込まれており、インプリント遺伝子は細胞の分化段階に応じた発現様式を呈すること、および染色体に刷り込まれた親起源は生殖系列を経なければ書き換えられないことがin vitro実験系において示された。

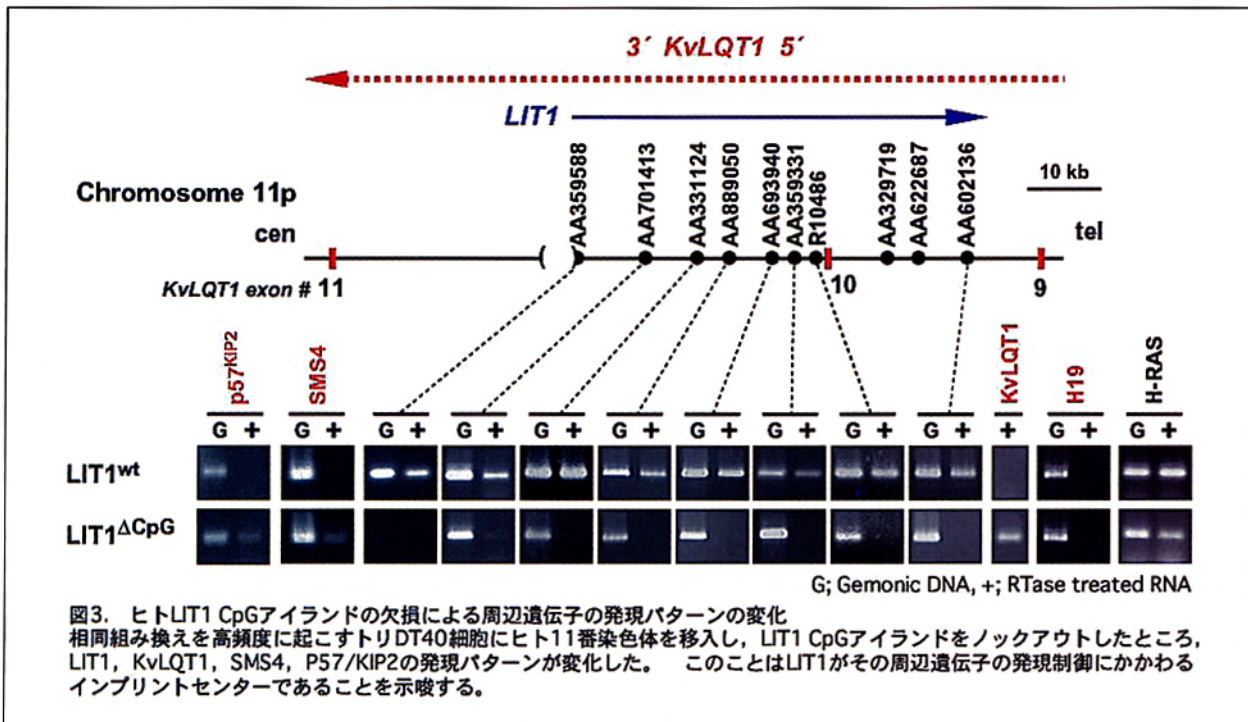
ii) ゲノムインプリンティングの進化的保存

ヒト11p15.5に位置する母性発現のインプリント遺伝子H19は、有袋類/鳥類まで保存されているが、非胎盤哺乳類での刷り込みの有無は明らかでない。そこでヒト11番染色体をA9, m5S(マウス)、BP6T(ハムスター)、FM7(インドホエジカ)、PTK1(ラットカンガルー)、DT40(ニワトリ)細胞に移入し、ヒトH19遺伝子の刷り込み状態を検討した。胎盤哺乳類由来の細胞では母方アレルのみ発現していたのに対し、非胎盤哺乳類(有袋類)と鳥類細胞では父方アレルからも発現がみられた。

さらに、ヒト11番染色体をPTK1ないしDT40細胞から再度マウスA9細胞に回収したところ、父方アレルからの発現が抑制された。一方、父方H19遺伝子上流のCpGアイランドの高メチル化状態は、いずれの細胞でもH19の発現に関わらず維持されていた。これらの知見は、ヒト染色体上に刷り込まれた親由来の情報は有胎盤類以外の細胞中でも維持されるが、発現パターンの制御機構は胎盤哺乳類と非胎盤哺乳類では異なり、少なくともヒトの刷り込みは非胎盤哺乳類においては機能しないことを示唆している。

iii) ヒトLIT1遺伝子CpGアイランド領域の機能解析

我々が11p15.5領域から新規に単離した父性発現のインプリント遺伝子LIT1は、過成長症候群(BWS)の染色体転座点に位置する。同領域に位置するKvLQT1遺伝子のイントロン10から逆方向に転写され、明確なORFを持たないことから、周囲の遺伝子発現を調節する機能を持つ可能性が示唆された(文献5、11)。LIT1上流には約1.9kbにわたるCpGアイランドが存在するが、その中にはルシフェラーゼ活性を指標としたレポーターアッセイにより228bpのプロモーター領域が同定され、さらにプライマー伸長法およびRNaseプロテクションアッセイにより転写開始点が同定された。そこでインプリンティングドメイン制御におけるLIT1の機能を明らかにする目的で、ヒト11番染色体上のLIT1 CpGアイランド領域を欠失した改変染色体を作製し、LIT1および近傍に位置するインプリント遺伝子の発現を検索した(文献10)。染色体改変は高頻度に相同組み換えを起こすニワトリDT40細胞を宿主として行った。はじめに父方あるいは母方のヒト11番染色体上のLIT1 CpGアイランド領域をターゲティングにより欠失させた。この改変染色体をCHO細胞に回収し、LIT1近傍に位置する母性発現のインプリント遺伝子KvLQT1、SMS4、p57/KIP2について刷り込み状態を検索したところ、LIT1の発現抑制に伴って本来発現のない父方のヒト染色体からこれら遺伝子の発現が検出された。よってLIT1 CpGアイランドは少なくともLIT1、KvLQT1、SMS4、p57/KIP2の4つのインプリント遺伝子の刷り込みに必須であり、インプリンティングセンター(IC)として機能することが示唆された。



このように、ニワトリDT40細胞を用いたヒト染色体改変技術は、染色体ドメインレベルにおける遺伝子発現の制御機構を解明するためにきわめて有用であることが示された（図3）。

3) インプリンティング異常の個体差と発がんにおける役割の解明

インプリント遺伝子の発現異常とがんとの関連については、はじめにIGF2遺伝子の両アレル性発現が遺伝病に併発する小児がんで見出されて以来、成人においても各種のがんで発現異常が報告されるようになった。例えば大腸がんの場合、患者のがん組織のみならず非がん部組織および末梢リンパ球においてもIGF2のインプリンティング異常が高頻度に観察され、インプリント遺伝子発現の個体差とがんの易罹患性との関わりが示唆された。そこで本研究ではインプリント遺伝子の発現異常と発がんを含めた個体差との関連を理解するため、正常人におけるインプリント遺伝子発現の個体差ならびにがん症例におけるインプリント遺伝子の発現異常を検討した。

i) 正常人末梢血液細胞でのインプリント遺伝子発現の解析

11p15.5に位置するIGF2,IMPT1ならびに15q11-q13に位置するSNRPNについて、正常人末梢血における発現を検討した（文献16）。IGF2は10%が両アレル性発現を呈したのに対しSNRPNは全例が片アレル性発現を示した。一方IMPT1は全例が両アレル性発現を示し、なおかつアレルの発現比に個体差が見出された。ポストゲノム戦略のひとつとして、がんを含む疾患に対する易罹患性の個体差と一塩基多型（SNPs）との関連が注目されている。ジェネティックな多型に加えエピジェネティックな多型が個体差を与えるという新しい概念は今後重要になると考えられる。

ii) がんにおけるインプリンティング異常

大腸がん症例においてIGF2および7q31に位置するMESTの発現を検索したところ、両アレル性発現がそれぞれ42%、35%で認められた。興味深いことに、IGF2とMESTの両アレル性発現は患者非がん部組織の38%、25%でも認められ、がんの易罹患性との関連を示唆するものであった（文献7）。また大腸がん症例においてLIT1の発現を調べたところ、60%で両アレル性発現がみられた（文献13）。染色体改変によるノックアウト実験よりLIT1はインプリンティングセンターの機能をもつと予想されることから、LIT1のインプリンティング異常が周囲のがん関連遺伝子の発現を攪乱している可能性が考えられる。

肺腺がんにおいてIGF2およびMESTの発現を調べたところ、両アレル性発現が各々42%、35%で認められたが、大腸がんにもみられるような患者非がん部での両アレル性発現は見出されなかった（文献19）。IGF2、MESTはともに細胞増殖を正に制御する因子として知られており、がん遺伝子タイプのインプリント遺伝子であるといえる。インプリンティング異常による両アレル性発現が、がん細胞の増殖を促進したと考えられた。

グリオーマ細胞株における検索では19q34に位置するPEG3の発現喪失が44%で認められ、発現制御領域内のCpGアイランドの高メチル化を伴っていた。PEG3遺伝子産物は細胞死への関与が示唆されており、がん抑制遺伝子タイプの刷り込み遺伝子といえる。インプリンティング異常による発現喪失ががん細胞の細胞死を抑制したと考えられた（文献17）。

がん関連遺伝子の検索はこれまで塩基配列の突然変異、染色体の転座/増幅/欠失を中心に行われてきた。しかし近年、塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな変化が遺伝子発現の変動につながることも明らかになりつつある。本研究で行った刷り込み遺伝子の解析は、エピジェネティクスの関与が明確なことからがん化との関連を探る有効な手段であるといえる。

主要文献

1. Meguro, M., Mitsuya, K., Sui, H., Shigenami, K., Kugoh, H., Nakao, M. and Oshimura, M.: Evidence for paternal expression of the human GABA_A receptor subunit genes, using microcell-mediated chromosome transfer. *Hum. Mol. Genet.*, 6: 2127-2133, 1997
2. Mitsuya, K., Sui, H., Meguro, M., Kugoh, H., Jinno, Y., Niikawa, N. and Oshimura, M.: Paternal expression of WT1 in human fibroblasts and lymphocytes. *Hum. Mol. Genet.*, 6: 2243-2246, 1997
3. Mitsuya, K., Meguro, M., Sui, H., Schulz, T.C., Kugoh, H., Hamada, H. and Oshimura, M.: Developmental reprogramming of the human H19 gene in mouse embryonic cells does not erase the primary parental imprint. *Genes to Cells*, 3 : 245-255, 1998
4. Kugoh, H., Mitsuya, K., Meguro, M., Shigenami, K., Schulz, T.C. and Oshimura, M.: Mouse A9 cells containing single human chromosomes for analysis of genomic imprinting. *DNA Res.*, 6: 165-172, 1999
5. Mitsuya, K., Meguro, M., Lee, M.P., Katoh, M., Schulz, T.C., Kugoh, H., Yoshida, M.A., Niikawa, N., Feinberg, A.P. and Oshimura, M.: LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. *Hum. Mol. Genet.*, 8: 1209-1217, 1999
6. Lee MP, DeBaun MR, Mitsuya K, Galonek HL, Brandenburg S, Oshimura M, and Feinberg AP: Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of IGF2 imprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96:5203-5208, 1999
7. Nishihara, S., Hayashida, T., Mitsuya, K., Schulz, T.C., Ikeguchi, M., Kaibara, N. and Oshimura, M.: Multipoint imprinting analysis in sporadic colorectal cancers with and without microsatellite instability. *Intl. J. Oncol.*, 17: 317-322, 2000
8. Arima, T., Drewell, R.A., Oshimura, M., Wake, N. and Surani, M.A.: A novel imprinted gene, *HYMAI* is located within an imprinted domain on human chromosome 6 containing *ZAC*. *Genomics*, 67: 248-255, 2000
9. Tanabe, H., Nakagawa, Y., Minegishi, D., Hashimoto, K., Tanaka, N., Oshimura, M., Sofuni, T. and Mizusawa, H.: Human monochromosome hybrid cell panel characterized by FISH in the JCRB/HSRRB. *Chromosome Res.*, 8: 319-34, 2000
10. Horike, S., Mitsuya, K., Meguro, M., Kotobuki, N., Kashiwagi, A., Notsu, T., Schulz, T.C., Shirayoshi, Y. and Oshimura, M.: Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in bekwith-wiedemann syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 9: 2075-83, 2000
11. Engel, J.R., Smallwood, A., Harper, A., Higgins, M.J., Oshimura, M., Reik, W., Schofield, P.N. and Maher, E.R.: Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J. Med. Genet.*, 37: 921-926, 2000
12. Meguro, M., Mitsuya, K., Nomura, N., Kohda, M., Kashiwagi, A., Nishigaki, R., Yoshioka, H., Nakao, M., Oishi, M. and Oshimura, M.: Large-scale evaluation of imprinting status in the Prader-Willi syndrome region: an imprinted direct repeat cluster resmblin small nucleolar RNA genes. *Hum. Mol. Genet.*, 10:383-394, 2001
13. Tanaka K, Shiota G, Meguro M, Mitsuya K, Oshimura M, Kawasaki H: Loss of imprinting of long qt intronic transcript 1 in colorectal cancer. *Oncology*, 60: 268-273, 2001
14. Inoue, J., Mitsuya, K., Maegawa, S., Kugoh, H., Kadota, M., Shinohara, T., Nishihara, S., Takehara, S., Yamauchi, K., Schulz, T.C. and Oshimura, M.: Construction of 700 human/mouse A9 monochromosomal hybrids and analysis of imprinted genes on human chromosome 6. *J. Hum. Genet.*, 46: 137-145, 2001
15. Meguro, M., Kashiwagi, A., Mitsuya, K., Nakao, M., Kondo, I., Saitoh, S. and Oshimura, M.: A novel maternally expressed gene, *ATP10C*, encoding a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. *Nat. Genet.*, 28: 19-20, 2001
16. Sakatani, T., Wei, M., Katoh, M., Okita, C., Wada, D., Mitsuya, K., Meguro, M., Ikeguchi, M., Ito, Tycko, B. and Oshimura, M.: Epigenetic heterogeneity at imprinted loci in normal popukations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283: 1124-1130, 2001
17. Maegawa, S., Yoshioka, H., Itaba, N., Kubota, N., Nishihara, S., Shirayoshi, Y., Nanba, E. and Oshimura, M.: Epigenetic silencing of *PGE3* gene expression in human glioma cell lines. *Mol. Carcinog.*, 31(1): 1-9, 2000
18. Arima, T., Drewell, R.A., Arney, K.L., Inoue, J., Makita, Y., Hata, A., Oshimura, M., Wake, N. and Surani, M.A.: A conserved imprinting control region at the *HYMAI/ZAC* domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum. Mol. Genet.*, 10(14): 1475-83, 2001
19. Kohda, M., Hoshiya, H., Katoh, M., Tanaka, I., Masuda, R., Takemura, T., Fujiwara, M. and Oshimura, M.: Frequent loss of imprinting of *IGF2* and *PEG1/MEST* in lung adenocarcinoma. *Mol. Carcinog.*, 31(4): 184-91, 2001