

論文の内容の要旨

論文題目 Comparative Genomic Approach
Toward Species-Specific Imprinting

和訳 種特異的刷り込み遺伝子の比較ゲノム解析

指導教官 榊 佳之 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 岡村 浩司

【緒言】

哺乳類のゲノム上で一部の遺伝子は、いずれの親に由来するかによって発現量が著しく異なるゲノムインプリンティングという独特の発現制御を受け、細胞の増殖・分化や個体の発生、さらには行動の制御に重要な役割を果たしている。このインプリンティングの喪失は、新しい発癌の機構として注目されているばかりでなく、糖尿病、アトピー、躁鬱病との関連も指摘されているが、発病の詳細や治療法の確立に向けた成果は上がっておらず、分子機構の解明が求められている。さらに最近では、ヒツジ、マウスをはじめとして各種哺乳類で体細胞クローン動物が作成され、インプリンティングの重要性が再認識されつつあるが、それを司る共通の機構は依然として不明のままである。その原因として、系統的検索法がなく新規インプリント遺伝子の同定が進まず、解析が特定のインプリント遺伝子に集中したこと、また染色体ドメインとしての制御の検討に必須の広領域にわたる詳細な構造解析が行われてこなかったことの2点が挙げられる。

そこで本研究では、系統的検索法によって単離されたマウスの父性発現インプリント遺伝子 Impact および両アレル性に発現するそのヒトホモログ IMPACT 周辺領域の構造を塩基配列レベルで決定した。これを基盤にマウスおよびヒトの遺伝子構造の解明、隣接遺伝子の同定とインプリンティング領域の解明、比較解析による制御領域候補同定の3点を行い、これらを通してゲノムインプリンティングの分子機構の理解を深めることを目的とした。

【方法】

マウス Impact およびヒト IMPACT それぞれの cDNA 塩基配列からゲノムライブラリを PCR 法によりスクリーニングし、単離された BAC クローンをサブクローニングして、DNA 塩基配列を段階的欠失法により決定した。さらに、日々明らかにされつつある両種のドラフトシーケンスデータも利用して隣接遺伝子の同定を行い、Impact および IMPACT を含む広領域にわたるゲノム比較解析を行った。マウス遺伝子のアレル別発現は、B6 および JF、2 近交系の相互交雑マウスを用い、両系統間の DNA 多型を利用して RFLP 法またはダイレクトシーケンス法で調べた。ヒト遺伝子のアレル別発現は、成人末梢血から DNA と RNA を抽出して検討した。RT-PCR に用いたプライマーは、ゲノム DNA からの増幅を防ぐために全て別々のエキソンに設計した。アレル別 DNA メチル化状態は、メチル化感受性制限酵素、またはメチル化シトシンを含む DNA を消化するエンドヌクレアーゼで処理した後に PCR を行う、メチル化特異的 PCR 法で解析した。

【結果】

マウス Impact およびヒト IMPACT は、それぞれゲノム上で 25 kb および 35 kb にわたり、ともによく保存された 11 のエキソンから成ることが分かった。比較解析の結果、両遺伝子がそれぞれ 1 つずつ持つ CpG アイランドに大きな違いが見出された。Impact では第 1 イントロン内に存在するのに対し、IMPACT では第 1 エキソンを含む領域が CpG アイランドとなっていた。さらにマウスの CpG アイランドはインプリント遺伝子に特徴的であるタンデムリピートを多く含むが、ヒトにはこのような構造は見出されなかった。両 CpG アイランドに対してメチル化特異的 PCR 法で DNA メチル化状態を調べたところ、ヒト IMPACT は通常の CpG アイランドと同様、両アレルともメチル化を受けていないにもかかわらず、マウス Impact では、母性アレルが高メチル化、父性アレルが低メチル化状態にある（図 1）ことが分かった。Impact のプロモータ領域についても解析を行った結果、CpG アイランドと対応して、発現が抑制されている母性アレルが高メチル化、転写される父性アレルが低メチル化であり、それ以外の領域に関しては、この遺伝子全体にわたって高メチル化状態であることが判明した。

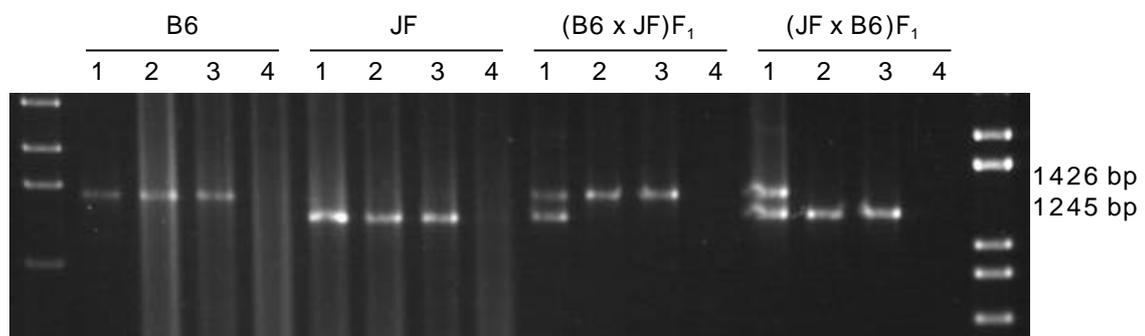


図 1. マウス Impact の CpG アイランドのメチル化特異的 PCR 法によるアレル別 DNA メチル化解析。B6、JF、およびそれらの相互交雑マウスのゲノム DNA を、1:酵素処理せずに、2:メチル化感受性酵素 Hha I で処理し、3:メチル化感受性酵素 Hpa II で処理し、4:メチル化非感受性酵素 Msp I で処理し、それらを鋳型に PCR を行い、両系統間の長さの多型を利用してアレル間で対照的なメチル化状態を明らかにした。

比較解析の領域を拡大し隣接遺伝子を同定する目的でヒトゲノムのデータを参考にし、第 18 番染色体にマップされている IMPACT の 3'側下流には、IMPACT と同転写方向に HRH4 遺伝子が、5'側上流には逆向きに OSBPL1 遺伝子が存在する（図 2）ことを確かめた。両遺伝子のアレル別発現を調べるため、何人かの日本人の DNA を採取し、転写される領域に多型を持つ個体（前者 1 例、後者 2 例）に関して成人末梢血の mRNA を調べた結果、ともに両アレル性に発現することを示すデータが得られた。OSBPL1 に関しては転写開始点の異なる 2 つの転写産物が報告されている。末梢血での発現はともに少なく、また今回見つかった多型では両者を区別することができないが、後述するメチル化解析からも、両者がともに両アレル性に発現していると推測される。OSBPL1B は OSBPL1A と共通の OSBP ドメインだけでなく、N 末端に PH ドメインを持つタンパクをコードする長い転写産物で、転写開始点が OSBPL1A よりも IMPACT のプロモータ領域に近い。

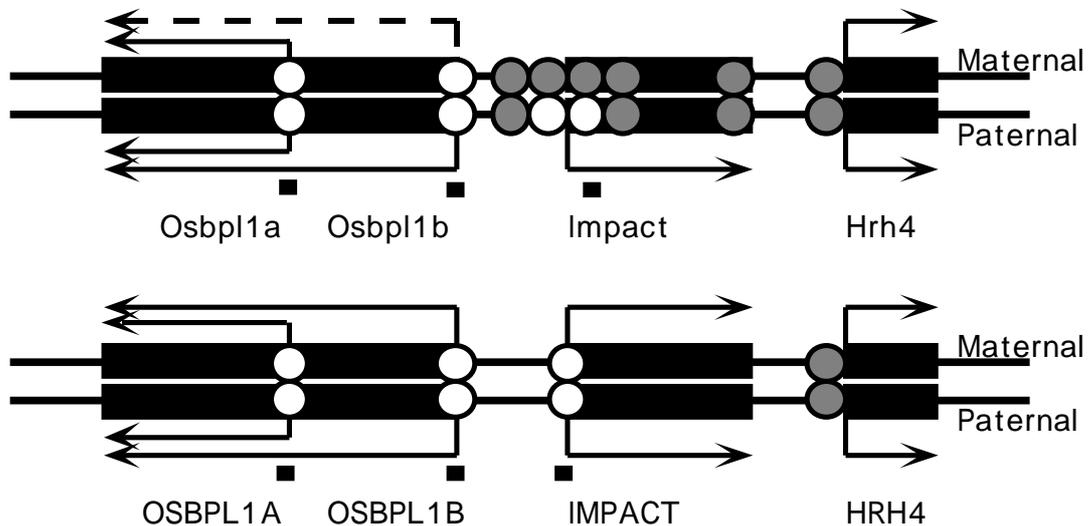


図 2. アレル別発現解析およびアレル別 DNA メチル化解析のまとめ。マウス Impact（上）およびヒト IMPACT（下）周辺のゲノム領域約 300-400 kb を模式的に示した。それぞれの上側が母性アレル、下側が父性アレルで、転写を矢印、弱い転写は波線矢印、高メチル化状態は黒丸、低メチル化状態は白丸で、また CpG アイランドの位置をそれぞれの下に太線で示した。

次にマウスゲノムのデータおよび BAC クローンの断片的な配列から、両隣接遺伝子のマウスホモログ Hrh4 遺伝子と Osbpl1 遺伝子を同定した。転写方向と遺伝子の位置関係がヒトと対応しており、またゲノム構造もよく保存されていることは、これらがオルソログである有力な証拠であると考えられる。相互交雑マウスを使い、RFLP 法でアレル別発現を調べたところ、Hrh4 および Osbpl1 とともに両アレル性に発現していることが分かった。さらに今回、これまでマウスでは報告されていなかった Osbpl1 の長い転写産物 Osbpl1b の存在も明らかにした。これらのプロモータは互いに約 100 kb 離れており、発現する組織も異なる。発現を調べた脳において、短い Osbpl1a は Osbpl1b の 20 倍の発現量があり、両アレル性発現の結果は Osbpl1a による寄与が大

きい。そこで Osbpl1b 特異的な塩基配列でアレル別発現解析を行ったところ、RFLP 法およびダイレクトシーケンス法の双方で、父性アレルがやや優勢的に発現する傾向が認められた。この傾向は B6 の代わりに ICR を用いた相互交雑マウスでも確認された。

最後に隣接遺伝子の DNA メチル化解析を行った。HRH4 および Hrh4 は CpG アイランドを持たないため、プロモータ領域を調べたところ、両アレルともに高メチル化状態であった。OSBPL1 および Osbpl1 は長短それぞれの転写産物が、転写開始点近傍に CpG アイランドを持つため、これら 4 つのメチル化状態を調べたところ、そのどれもが通常の CpG アイランドと同様に低メチル化状態でアレル間に違いは認められなかった。またこれらの領域内にタンデムリピートはなく、さらに今回解析を行った全領域にわたり、Impact を除いてそのような構造は見出されなかった。

【考察】

本研究はマウス Impact 周辺領域のゲノム構造を初めて明らかにし、ヒトの対応する領域と比較しながら解析を行って、今まで盛んに研究が進められていた他のインプリンティング領域とは異なる、極めてユニークな特徴を明らかにした。まず、親由来によって発現量が異なるマウスの遺伝子 Osbpl1b を同定した。Impact と転写方向を逆に約 20 kb 隔てて向かい合って存在する Osbpl1b は、メチル化状態の解析から基本的には両アレル性に発現する遺伝子であると思われるが、Impact プロモータ領域のアレルによるクロマチン構造の差異を反映して父性アレルの優勢発現傾向が観察されたと考えられる。これを除けば Impact はヒトホモログがインプリンティングを受けず、また周辺領域にインプリント遺伝子を持たない数少ない孤立型インプリント遺伝子である。さらに、インプリント遺伝子のイントロンに関して、数やサイズの小ささが指摘されていたが、Impact は必ずしもそうでないことの一例となった。その一方で、このような遺伝子周辺にしばしば見出される特徴的なタンデムリピートが Impact の第 1 イントロンにある CpG アイランド内に見つかり、しかも親由来によってアレルのメチル化状態が異なっていた。IMPACT のイントロンと比べると、マウス Impact のイントロンは概してサイズが小さいにもかかわらず、第 1 イントロンだけは例外で、しかもこの特徴的な CpG アイランドに対応する領域がヒトでは欠けていた。

これらの事実から、マウス Impact の CpG アイランドが、この遺伝子のインプリンティング成立維持に参与している制御領域である可能性が強く示唆された。本研究で得られた以上の成果は、ゲノムインプリンティングの分子機構を考える上で、重要かつ新たな知見であり、これまでにあまり例のない孤立型インプリント遺伝子の貴重な解析例である。