

## 論文の内容の要旨

論文題目 A genomic approach toward comprehensive identification of imprinted genes.

和訳 インプリント遺伝子の網羅的同定へのゲノム的アプローチ

指導教官 榊 佳之 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 山田 洋一

### 研究の背景及び目的

哺乳類ゲノムには、由来する親の性に依存して特定のアレルからのみ発現が見られるインプリント遺伝子が少数存在する。インプリント遺伝子には、細胞の増殖や分化、個体発生、さらには高次行動の制御などに重要な役割を果たしているものが多く、稀な遺伝病のみならず糖尿病、アトピー、躁鬱病などの頻度の高い疾患や種々の悪性腫瘍の発症に関与しており、医学生物学の広い分野から注目を集めている。またインプリント遺伝子の生物学的存在意義に関しては、これまでに様々な仮説が提示されてきたにも関わらず、いずれも証明には至っていない。これらのことからより多くのインプリント遺伝子を単離し、それらに共通な特徴を見いだすことは、その生物学的存在意義や様々なヒトの疾患の原因解明に大きく寄与するものと思われる。

インプリント遺伝子の近傍には、アレル特異的にメチル化されるゲノム領域 Differentially Methylated Region (DMR) 或いはメチル化インプリントが存在し、インプリンティングの成立維持への関与が示唆されている。これまでに同

定された DMR は、互いに配列上での相同性は示さないが、CpG アイランド様配列でしかも縦列反復構造をとるという特徴を共有している。通常の CpG アイランドは遺伝子のプロモーター近傍に存在しメチル化を免れているが、その例外が DMR と不活化 X 染色体上の CpG アイランドである。これらでは一方のアレルのみがメチル化されており、メチル化を解析するとメチル化アレルと非メチル化アレルの共存を示す「混合型メチル化パターン」を示す。

さてゲノムプロジェクトによる高精度ゲノム配列情報が得られつつある現在では、データベース検索でゲノム中の CpG アイランドを網羅することが可能である。したがってこれらの CpG アイランドに関して、混合型メチル化を識別できる方法でメチル化を簡便に検討出来れば、網羅的な DMR 検索とそれに基づくインプリント遺伝子探索の途が開けるはずである。そこで私は最も高精度の配列情報が利用可能なヒト 21 番染色体を対象に CpG アイランドの網羅的メチル化解析を行い、インプリント遺伝子探索の有効性を検証することにした。

## 結果

### 1) HpaII-McrBC PCR 法の開発

まず私は、混合型メチル化を検出する簡便な方法として HpaII-McrBC PCR 法を独自に考案した。HpaII は非メチル化 DNA を切断する制限酵素であり、McrBC はこれとは逆にメチル化 DNA を選択的に消化する酵素である。HpaII-McrBC PCR 法では、HpaII または McrBC によって消化したゲノム DNA を用いて標的配列の PCR を行う。この際にアンプリコンが HpaII および McrBC の認識部位を含むようにプライマーを設定しておく。標的配列が完全にメチル化されている場合は、McrBC で消化されるが HpaII では消化されない。したがって後者で処理した DNA からのみ増幅が見られる。逆に標的配列が完全にメチル化を免れている場合は HpaII で消化されるので、McrBC 消化 DNA からしか増幅が見られない。つまり HpaII 消化 DNA からの増幅はメチル化アレルの存在を、McrBC 消化 DNA からの増幅は非メチル化アレルの存在を示す。したがって両方のアレルが共存する場合（混合型）は、どちらの処理をした DNA からも増幅が見られるはずである。私はこの考えに基づき条件を検討し、実際に既知インプリント遺伝子中の DMR が予想通りに検出されることを確認してこの方法の有効性を確認した。

## 2) ヒト 21 番染色体 CpG アイランドの系統的メチル化解析

次に私は、配列情報が最も正確なヒト 21 番染色体から一定基準で抽出した 146 個の CpG アイランドのメチル化状態を上記の HpaII-McrBC PCR 法を用いて正常人末梢白血球 DNA を対象に検討した。定説どおり、大半の CpG アイランド (110 個) は非メチル化のパターンを示したが、完全メチル化パターンを示すものが 20 個と混合型メチル化パターンを示すものが 16 個と予想外に高率に見い出された。

正常組織中でもメチル化を受けている CpG アイランドの構造的特徴を検討したところ、Harr プロット解析で顕著な縦列反復構造が検出された CpG アイランド 21 個のうち 17 個 (80%) がメチル化を受けていることが判明した。反復構造を定量的に表現するために、反復単位長、反復回数、そして反復単位間の配列相同性を考慮したスコアを設定したところ、このスコアが高いアイランド程、メチル化される率が高いことが示された。これまでに DMR と反復構造の関連は指摘されていたが、今回の結果は DMR に限らず反復構造とメチル化の相関が示された。

## 3) 新規 DMR の同定

上記の解析で同定された混合型メチル化パターンを示す CpG アイランド 16 個に関して、メチル化がアレル特異的であるか否かを SNP を利用して検討した。その結果、これまでに 2 つの CpG アイランドについてアレル特異的メチル化が証明された。うち一方に関しては母親由来アレルがメチル化されることも判明した。この結果は、このアプローチで実際に DMR が同定できることを示すものであり、その近傍からの新規インプリント遺伝子の同定が期待される。

## 考察

これまでのインプリント遺伝子の系統的単離法は、近縁種間における多型を利用してアレル特異的発現やメチル化をディスプレイする方法や、単為発生及び雄核発生胚を用いて発現アレルやメチル化アレルを濃縮する方法が主流であった。したがって、従来の方法はマウスにしか適用が難しく、ヒトへの応用は実際上不可能であった。またこれらの方法には、全ての遺伝子や CpG アイランドを漏れなくカバーすることはできないという欠点があった。

一方で、私が提唱したアプローチは、ヒトゲノム情報を基盤に独自に考案し

た HpaII-McrBC PCR 法によって CpG アイランドのメチル化状態を漏れなく迅速に検討するというもので、上記の問題を克服するポストシーケンス時代によく適合したアプローチであるといえる。

この方法を用いて私は 21 番染色体を対象に染色体全体に渡って CpG アイランドのメチル化を検討したが、このような系統的解析はこれまでに例がない。その結果、通説と異なって CpG アイランドには正常細胞中でもメチル化を受けるものがあること、特に縦列反復構造を有する CpG アイランドが DMR 以外でもメチル化を受けやすい傾向があることが明らかになった。

この事実の生物学的意義は今後の研究の課題であるが、実用的には、例えば私が導入したスコアを利用してメチル化される可能性の高い CpG アイランドを選択し、これらに絞って HpaII-McrBC PCR 法による解析を加えることで、更に高速に新規 DMR 候補が同定出来ることを意味している。しかも急速に蓄積しつつある SNP 情報の利用でアレル特異的なメチル化の検証も日に日に容易になりつつある。したがって、私の考案したアプローチによって、ヒトインプリント遺伝子の同定が大きく進展し、ひいてはその生物学的意義や疾患との関連の理解が深まることが期待される。