

### 審査の結果の要旨

氏名 山田 洋一

本研究は、ヒトにおけるインプリント遺伝子やその発現制御領域である allelic differentially methylated region (DMR)の網羅的同定法を独自に開発し、これを用いて実際にヒト 21 番染色体上に二つの新規 DMR を初めて同定したものであり、以下の結果を得ている。

- 1、 ヒト 21 番染色体ゲノム配列から、長さ 400bp 以上、GC 含有量 50% 以上、CpG 配列の出現頻度 0.6 以上の基準を満たす 149 個の CpG island (CGI)をプログラムを用いて情報学的に抽出した。
- 2、 DMR の候補と考えられるメチル化アレルと非メチル化アレルの混在型アイランド(compositely methylated island: CMI )を他のメチル化状態の CGI から簡便に区別するために、Hpa II-McrBC PCR 法を独自に開発した。そして既知の DMR を用いて、この方法が確かに CMI を他のメチル化状態のアイランドから区別可能なことを確認した。
- 3、 上記 1 において抽出した 149 個の CGI のメチル化状態を上記 2 において開発した Hpa II-McrBC PCR 法により検討するために、個々の CGI を個別に PCR 増幅するための特異的 primer 配列をプログラムと手設計により抽出した。この primer 対を用いて、149 個の CGI 中 147 個について実際に、ヒトゲノムから PCR 増幅を確認できた。
- 4、 増幅可能であることが確認できた 147 個の primer 対を用いて、Hpa II-McrBC PCR 法により、147 の CGI のメチル化状態を検討した。その結果、CGI は通常メチル化を受けないという通説どおり、大半 (110 個) の CGI はメチル化を受けていなかったが、21 個は両アレルとも完全にメチル化を受けており、DMR の候補と考えられる CMI も 16 個存在した。
- 5、 以前より DMR には、しばしばタンデムリピート配列が存在することが

指摘されてきたが、DMR 以外の CGI についても同様なことが言えるかはこれまで全く検討されていなかった。そこで Harr plot 解析とタンDEMリピート配列検出プログラムを用いて、メチル化とタンDEMリピート配列の相関性を検討した。この結果、完全にメチル化されている CGI とタンDEMリピート配列の相関の有意性を統計的に示すことができた。

- 6、 Hpa II-McrBC PCR 法により CMI と判定した 16 個の CGI のうち 12 個について、実際にこれらが CMI であるか否かを bisulfite sequencing 法をもちいて検討した。この結果、12 個中、6 個が実際に CMI であることが示された。
- 7、 最終的に DMR であるか否かを検討するために、6 個の CMI のうち 2 個について一塩基多型 (SNP) 部位を同定した。これらの CGI について、メチル化感受性酵素でゲノムを切断した後、SNP を挟んだ primer による PCR 増幅産物を直接シーケンスする方法で、これらが DMR であるか否かを検討した。この結果、SNP を同定した 2 個の CGI が、いずれも新規の DMR であることが証明された。

以上、本論文は、これまでに適切な方法論が存在しなかったヒトにおける新規インプリント遺伝子や DMR の網羅的単離を可能にしたものである。これによりインプリント遺伝子や DMR の同定が進み、インプリント遺伝子の生物学的存在意義や発現制御メカニズム、ひいてはインプリンティングが関与する種々の疾患の病因解明にも重要な貢献をなすものと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。