

論文の内容の要旨

論文題目 転写調節因子 EYA4 の全前脳胞症発症への関与についての検討

指導教員 五十嵐 隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 阿部 裕一

【目的】全前脳胞症 (Holoprosencephaly: HPE) は、胎齢 18–28 日に生じる脳の左右分割不全による先天性の脳奇形である。ソニック・ヘッジホッグ (*SHH*) をはじめとして様々な原因遺伝子が知られているが、約 70% の患者ではその原因遺伝子は不明であり、他の原因遺伝子の存在や環境因子などの関与も疑われている。

今回 HPE 亜型の症例において G-バンド法による染色体異常や既知の HPE 原因遺伝子の検査における異常が認められないため、高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析をおこない、6 番染色体長腕 6q22.31 から 23.2 にかけて 10.4 Mbp の欠損を見いだした。この欠損領域には 80 の遺伝子が含まれていたが、その中に HPE 原因遺伝子の一つである転写因子 *SIX3* との相互作用の可能性のある転写調節因子 *EYA4* 遺伝子のプロモーター領域から exon 2 までが含まれているこ

とに注目した。

EYA ファミリータンパクは **SIX** ファミリータンパクとの相互作用によって転写を調節する。**EYA4** は 4 種類の **EYA** ファミリー遺伝子の 1 つで、中枢、顔面、耳、四肢末端の初期発生中に発現する転写調節因子であり、遺伝性感音難聴や拡張型心筋症の原因遺伝子として知られているが、**HPE** との関連の報告はない。そこで本研究では、6 番染色体長腕の欠損部分の詳細な解析おこなった上で、マウス初期発生における *Eya4* 発現時期と局在に関する解析、**EYA4** と既知の **HPE** 原因遺伝子であり転写調節因子として知られる **SIX3** との相互作用について分子生物学的手法を用いて解析し、**EYA4** の原因候補遺伝子としての可能性についての検討をおこなった。

【方法】症例：1 歳 8 ヶ月男児、精神運動発達の遅れで精査、頭部 MRI 画像上 大脳頭頂部での左右半球分離不全の所見であり Middle interhemispheric variant (MIH) タイプの **HPE** と診断した。

遺伝子検査を含む研究については家族による同意及び倫理委員会の承認を得た上で、症例の末梢血リンパ球ゲノムを用いて既知の **HPE** 原因遺伝子変異の有無に関する検索、高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析をおこなった。更にマイクロアレイの結果を元に染色体欠損部断端の塩基配列解析をおこなった。

Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) によるマウス胚における *Eya4* の発現

パターンの解析をおこない、発生過程における脳での発現の有無を検証した。

今回注目している *SIX3* と *EYA4*、及び *SIX* と *EYA* の相互作用が明らかになっている *SIX2*、*EYA1* を含めたタグ付きタンパクの発現ベクターを作成し以後の実験で用いた。

SIX3 と *EYA4* の複合体形成の解析目的に、タグ付き *SIX2*、*SIX3*、*EYA1*、*EYA4* 発現ベクターを動物培養細胞に遺伝子導入し、発現したタンパクを細胞ライゼートとして回収し免疫沈降を実施、共沈したタンパクを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開した後にウエスタンブロットで検出した。更に *EYA4* の N 末側の機能ドメインである variable region (VR) の欠損変異体と C 末側の Eya domain (ED) 欠損変異体を作製して同様に免疫沈降をおこない、*EYA4* 分子内における *SIX3* との結合に関与する部位の同定を試みた。欠損変異体を含めた *EYA4*、*EYA1*、*SIX2*、*SIX3* 発現ベクターをルシフェラーゼレポータープラスミドと共に培養細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイをおこなった。また細胞内局在を調べるために、EGFP タグ付きの *EYA4*、DsRed タグ付き *SIX3* の発現ベクターを培養細胞に単独もしくは同時に遺伝子導入し、細胞内局在の解析をおこなった。

【結果】 症例の末梢血リンパ球ゲノムについて主な既知の HPE 原因遺伝子である *SHH*、*ZIC2*、*SIX3*、*PTCH1* および *TGIF1* の翻訳領域について塩基配列の解析をおこなったが、各遺伝子のエクソン及びイントロン部分の塩基配列に変異は確

認できなかった。

マイクロアレイ解析では染色体 6q22.31 から 23.2 にかけてシグナルの低下を認め、6 番染色体長腕の片アレルにおける 10.4 Mbp の欠失が疑われた。染色体欠損部断端の塩基配列解析の結果、実際に 6 番染色体長腕に 10.4 Mbp の欠損があり、*EYA4* の exon 2 までを含む 80 の遺伝子が欠損範囲に含まれることが明らかとなった。断端の塩基配列の解析結果より、再結合によって生じるキメラ遺伝子の存在は否定した。

マウス胚における *Eya4* 発現解析を WISH でおこなった結果、E10.5 前後で前脳-終脳における発現を認めた。

免疫沈降では、既に結合が報告されている *EYA1* と *SIX2*、*SIX3* の組み合わせ以外に、新たに *EYA4* と *SIX3* の複合体形成が観察された。*EYA4* 欠損変異体と *SIX3* の免疫沈降においては、VR 欠損変異体と *SIX3* の結合は認められたが、ED 欠損変異体と *SIX3* の結合は見られなかった。

3 種類のレポータープラスミドを用いて *SIX3* と *EYA4* の機能的な相互作用の解析目的におこなったルシフェラーゼアッセイでは、コントロールとの比較で *SIX3* 単独でルシフェラーゼ比活性は有意に上昇、*EYA4* 単独では上昇を認めなかったが、*SIX3* と *EYA1* または *EYA4* の組み合わせにより *SIX3* 単独より有意な比活性の上昇を認めた。また *SIX2* 単独ではルシフェラーゼ比活性の有意な上昇は認めなかったが、*EYA1* または *EYA4* の存在下で有意な上昇を認めた。免疫沈

降で用いた EYA4 欠損変異体を用いたルシフェラーゼアッセイでは、SIX3 と ED 欠損変異体及び VR の大幅な欠損変異体の組み合わせにおいて、全長 EYA4 と SIX3 の組み合わせに比べて比活性の有意な低下を示した。

タグ付き EYA4 と SIX3 の培養細胞内における局在及び共存在における局在の変化についての解析では、SIX3 単独では核に、EYA4 単独では細胞質と核のどちらにも分布するが、SIX3 の存在下では EYA4 は核に局在する傾向を認めた。

【考察】今回 MIH variant タイプの HPE 症例のリンパ球ゲノムに対して原因解析目的におこなった高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析によって、G-バンド法によって検出されなかった 6 番染色体長腕に 10.4 Mbp の欠損を発見できたことから、HPE をはじめとする原因が完全には明らかとなっていない先天性疾患におけるスクリーニング検査として、ゲノムワイドなマイクロアレイは有用であると考えた。

欠損部分に含まれる 80 の遺伝子には脳で発現する遺伝子や機能不明の遺伝子も含めて HPE 発症に関与する可能性は否定できないが、HPE 原因遺伝子の一つである SIX3 との相互作用の可能性のある転写調節因子、EYA4 の転写開始コドンの存在する exon 2 までが欠損領域に含まれており、EYA4 の欠損による量的発現の減少が HPE 発症に関与すると考えた。また、EYA4 遺伝子の exon 1、2 の欠損が発症の原因であると考えた場合、残存した exon 3 以降に存在する開始コドンからの翻訳による異所性の EYA4 変異体の発現が HPE 発症へ関与した可能性

は否定できない。

マウス胚を用いた WISH による *Eya4* の発現パターンの確認では、HPE 発症の時期と考えられている脳の左右分割の時期と重なる E10.5 を中心に前脳での発現を認め、HPE 原因候補遺伝子の発現パターンとして矛盾しない結果と考えた。

免疫沈降の実験では SIX3 と EYA4 の結合が認められ、更に EYA4 の欠損変異体を用いた免疫沈降の実験結果より SIX3 との結合には EYA4 の C 末側にある ED が関与することが示唆された。

SIX3 と EYA4 の機能的相互作用の解析目的でおこなったルシフェラーゼアッセイでは、各レポーターに組み込んだプロモーター配列に対する SIX3 の転写調節作用について EYA4 が増強効果を示す一方で、EYA4 欠損変異体を用いた実験では、免疫沈降の結果で判明した、SIX3 との複合体形成が不可能な ED 欠損変異体だけでなく、大きく VR を欠損した変異体も増強効果を示さなくなることから、SIX3 の転写調節作用の増強には、EYA4 の VR が重要であると考えられた。

また培養細胞内の局在についても SIX3 存在下において EYA4 は核に局在する傾向を認めており、機能的な相互作用を示す結果であると考えられた。

これらの結果から EYA4 は分子内機能ドメインである ED を介して HPE 原因遺伝子の一つである SIX3 と複合体を形成し、VR を介して機能的に相互作用を示し、正常の脳の発生において重要な役割を果たしていると考えられるが、片アレルにおける *EYA4* の欠損によって発現の量的な低下が生じた場合には、*EYA4*

と *SIX3* の関連する転写調節障害がおり *HPE* を発症すると考えた。

【結論】 G-バンド法で正常核型を示した *MIH* タイプの *HPE1* 才男児例のリンパ球ゲノムに対しておこなった高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイ検査において、6番染色体長腕に 10.4Mbp の欠失を見いだした。この欠損領域に含まれる転写制御因子 *EYA4* はヒトでの *HPE* 発症時期にあたるマウスの胎生 E10.5 前後で一過性に脳に発現していることが判明した。*EYA4* は分子内機能ドメインである ED を介して *HPE* 原因遺伝子の一つである *SIX3* と物理的・機能的に相互作用を示しており、*EYA4* の量的発現の低下による *SIX3* の機能不全を介した *HPE* の発症が考えられた。