

学位論文題名

MEST 周囲 7q32 領域における
インプリンティングドメインの解析

学位論文内容の要旨

緒言

ゲノムインプリンティングは、遺伝子の発現が、由来する親の性別によって異なる哺乳類特有の現象であり、これまで多くの遺伝子において報告されているが、その意義と機構は未だ不明である。インプリンティングを受ける遺伝子の機能から、本現象の中心的役割の1つは胎児の成長に関与すると考えられる。ヒト7番染色体の片親性ダイソミー(UPD7)に関して、父由来 UPD7 では胎児発育は正常であるが、母由来 UPD7 では発育不全を認めることから、7番染色体上に成長を促進する父性発現遺伝子あるいは成長を抑制する母性発現遺伝子といったインプリンティング遺伝子の存在が示唆される。今日までに、母由来 UPD7 の表現型に寄与する可能性のあるいくつかの遺伝子が報告されている。7q32 領域に局在する父性発現遺伝子 *MEST/ PEG1* 及び 7p11.2-p12 上にある母性発現遺伝子 *GRB10(MEG1)* である。最近では 7q31-qter の部分的父性 UPD7 による Silver-Russell 症候群が報告されており、7q32 に局在する *MEST* 周囲のインプリンティングドメインに注目が集まっている。インプリンティング遺伝子の多くは cluster を形成していることから、7q32 領域も同様の可能性がある。*MEST* 周囲の遺伝子に関して *MEST* の染色体末端側の *COPG2* のインプリンティング解析、及び *MEST* の動原体側 50kb に存在する新規遺伝子 *TSGA14* のインプリンティング解析を行い、これら *MEST* 両側の遺伝子から 7q32 領域のインプリンティングドメインの意義を考察した。

材料と方法

7q32 の PAC/BAC contig 内の転写地図と、最近報告された draft sequence をもとに contig 内に map された遺伝子/EST を整理し、この領域内の遺伝子を記載した。*MEST* の動原体側 50kb に隣接する新規遺伝子 *TSGA14* を遺伝子地図より同定した。*TSGA14* 及び *MEST* を含む PAC144H10 の cosmid contig を作製し制限酵素地図から *TSGA14* の構造を決定した。*TSGA14* を構成する EST を制限酵素地図に map し、その exon・intron を決定した。*TSGA14* のアイソフォームは EST のデータベースを検索し RT-PCR で確認した。十分な informed consent のもとに、ヒト胎児組織とその母親の末梢血リンパ球を得た。mRNA から cDNA への逆転写は oligo(dT)プライマーで、片鎖特異的 RT-PCR のためには特異的プライマーで行い、合成されるセンス鎖とアンチセンス鎖 cDNA を区別した。*TSGA14* I-type の発現パターンは、exon10, 11 にわたる RT-PCR 産物をブ

ローブにしてノザンプロット解析した。同様に *TSGA14* s-type のプローブは exon3A 内の PCR 産物をプローブに用いた。各プローブは [α - 32 P]-dCTP で標識し、human multiple-tissue northern blot membranes にハイブリダイズした。多型検索は 16 胎児の DNA を用い、PCR 産物のダイレクトシーケンス法により 転写産物に特異的な検索を行った。*TSGA14* l-type におけるインプリンティングは、exon 1 の SNP がヘテロ接合である胎児組織を用い RT-PCR によって解析した。PCR 産物はオートシーケンサーで塩基配列を決定した。*TSGA14* s-type におけるインプリンティングを、exon3A における GT-反復多型から解析した。成人リンパ球 DNA をメチル化感受性制限酵素により処理し、サザン解析することによって *TSGA14* の CpG island のメチル化の状態を検討した。

結果

7q32 領域に 9 個の遺伝子を同定した。*TSGA14* は *MEST* と逆方向に転写され 50-kb セントロメア側に存在した。*TSGA14* l-type は 11 の exon を持ち約 50kb に広がっていた。*TSGA14* s-type は 5'側の 2 つの exon を l-type と共有し、3 つの exon から構成されていた。最後の exon3A は l-type の intron2 に存在した。共通の exon1 は *MEST* の CpG island から 50kb 動原体側の CpG island 内に存在した。*TSGA14* l-type のノザン解析では成人の精巣と胎児組織に特異的な発現を認めた。*TSGA14* s-type でも同様であった。*TSGA14* l-type の exon 1 に A/C の変異を認めた。ヘテロ接合である Case 3 の脳、肝、肺、小腸において、また Case 10 の脳、肝、肺、精巣、腎臓において *TSGA14* l-type は両アレルから同程度発現していた。*TSGA14* s-type の GT-反復多型を 3'UTR 内に認めた。ヘテロ接合体である Case 3 の脳と肝において、両アレルはほぼ等しく発現していた。片鎖特異的 RT-PCR で、アンチセンス鎖 *TSGA14* s-type の混入を否定した。Exon 1 がある CpG island 内はメチル化されていなかった。

考察

7q32 の約 1Mb の領域は、既知の 3 遺伝子を含め 12 個の遺伝子が散在する遺伝子豊富領域であった。*TSGA14* は *MEST* の動原体側最も近傍に隣接した遺伝子であった。ノザン解析により *TSGA14* l-type, s-type は成人精巣で高度に発現していた。また、主たるアイソフォームは *TSGA14* l-type であった。*TSGA14* l-type も s-type もコードするタンパクと既知のタンパクとの相同性を認めなかった。*MEST* の動原体側に最も近傍・隣接した遺伝子を、既に Genbank 登録済みの *TSGA14* であると同定したが、本遺伝子が精巣における生殖細胞の分化と精子形成に関わる遺伝子群 *TSGA* のメンバーであるかどうかは、今回の解析では不明である。本遺伝子は成人の精巣及び胎児組織に特異的に発現していることを確認したが、今後、生殖細胞の分化と精子形成における役割を解明する必要がある。アレル発現解析により *TSGA14* l-type, s-type と胎児組織において両アレル発現であることが示された。さらに exon 1 の CpG island も両アレル間でメチル化の差異はみられなかった。山崎らは *TSGA14* とは *MEST* を挟んで反対側に存在する *COPG2* がインプリンティングを受けず、そのイントロン 転写産物である *COPG2IT1* がインプリンティングを受けることを報告している。これらの知見から *MEST* 周囲 7q32 領域はインプリンティングドメインとして強く制御されず、独立したインプリンティングシグナルによって制御されていることが示唆される。7q32 領域の他の遺伝子のインプリンティング状況が今後調べられることにより本領域のインプリンティング機構が明らかになると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

学 位 論 文 題 名

MEST 周囲 7q32 領域における インプリンティングドメインの解析

ゲノムインプリンティングは、遺伝子の発現が由来する親の性別によって異なる哺乳類特有の現象であり、その意義と機構は未だ不明である。インプリンティングを受ける遺伝子の機能から、本現象の中心的役割の1つは胎児の成長に関与すると考えられる。ヒト7番染色体の片親性ダイソミー(UPD7)に関して、父由来 UPD7 では胎児発育は正常であるが、母由来 UPD7 では発育不全を認めることから、7番染色体上に成長を促進する父性発現遺伝子あるいは成長を抑制する母性発現遺伝子といったインプリンティング遺伝子の存在が示唆される。最近では7q31-qterの部分的父性UPD7によるSilver-Russell症候群が報告されており、7q32に局在する*MEST*周囲のインプリンティングドメインに注目が集まっている。インプリンティング遺伝子の多くはclusterを形成していることから、7q32領域も同様の可能性がある。本研究においては、*MEST*周囲の遺伝子に関して*MEST*の染色体末端側の*COPG2*のインプリンティング解析、及び*MEST*の動原体側50kbに存在する新規遺伝子*TSGA14*のインプリンティング解析を行い、これら*MEST*両側の遺伝子から7q32領域のインプリンティングドメインの意義を考察した。

7q32領域に9個の遺伝子を同定した。*TSGA14*は*MEST*と逆方向に転写され50kbセントロメア側に存在した。*TSGA14*l-typeは11のexonを持ち約50kbに広がっていた。*TSGA14*s-typeは5'側の2つのexonをl-typeと共有し、3つのexonから構成されていた。最後のexon3Aはl-typeのintron2に存在した。共通のexon1は*MEST*のCpG islandから50kb動原体側のCpG island内に存在した。*TSGA14*l-typeのノザン解析では成人の精巣と胎児組織に特異的な発現を認めた。*TSGA14*s-typeでも同様であった。*TSGA14*l-typeのexon1にA/Cの変異を認めた。ヘテロ接合であるCase3の脳、肝、肺、小腸において、またCase10の脳、肝、肺、精巣、腎臓において*TSGA14*l-typeは両アレルから同程度発現していた。*TSGA14*s-typeのGT-反復多型を3'UTR内に認めた。ヘテロ接合体であるCase3の脳と肝において、両アレルはほぼ等しく発現していた。片鎖特異的RT-PCRで、アンチセンス鎖*TSGA14*s-typeの混入を否定した。Exon1があるCpG island内はメチル化されていなかった。

7q32の約1Mbの領域は、既知の3遺伝子を含め12個の遺伝子が散在する遺伝子豊富領域であった。*TSGA14*は*MEST*の動原体側最も近傍に隣接した遺伝子であった。ノザン解析

により *TSGA14* l-type, s-type は成人精巣で高度に発現していた。また、主たるアイソフォームは *TSGA14* l-type であった。*TSGA14* l-type も s-type もコードするタンパクと既知のタンパクとの相同性を認めなかった。*MEST* の動原体側に最も近傍・隣接した遺伝子を、既に Genbank 登録済みの *TSGA14* であると同定したが、本遺伝子が精巣における生殖細胞の分化と精子形成に関わる遺伝子群 *TSGA* のメンバーであるかどうかは、今回の解析では不明である。本遺伝子は成人の精巣及び胎児組織に特異的に発現していることを確認したが、今後、生殖細胞の分化と精子形成における役割を解明する必要がある。アレル発現解析により *TSGA14* l-type, s-type とともに胎児組織において両アレル発現であることが示された。さらに exon 1 の CpG island も両アレル間でメチル化の差異はみられなかった。山崎らは *TSGA14* とは *MEST* を挟んで反対側に存在する *COPG2* がインプリンティングを受けず、そのイントロン 転写産物である *COPG2IT1* がインプリンティングを受けることを報告している。これらの知見から *MEST* 周囲 7q32 領域はインプリンティングドメインとして強く制御されず、独立したインプリンティングシグナルによって制御されていることが示唆される。

公開発表に際し、副査の小林教授から、Silver-Russell 症候群の責任遺伝子が 7q32 に存在することは欠失などから判明したのか、*TSGA14* の機能あるいはタンパク構造について、インプリンティングの生物学的意義についてなどの質問があった。副査の藤本教授からは、*MEST*, *COPG2* の機能について、タンパクもコードしていない、機能が不明の *CITI* をドメインに含めて良いのか、などについての質問があった。最後に主査の長嶋教授から、*TSGA14* タンパクの機能解析の進行程度について、インプリンティングの可能性をゲノム上でスクリーニングする方法についてなどの質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、検討症例の解析結果、最新の文献情報、自身の研究経験をもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、本研究の成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。