

# 15q11-q13刷り込みドメインの ヒストンアセチル化解析に関する研究

## 学位論文内容の要旨

ゲノム刷り込み現象は遺伝子の発現が親由来特異的に異なる遺伝現象である。ヒト 15 番染色体長腕 11-13 (15q11-q13) は同現象が認められる領域である。この領域には、Prader-Willi 症候群 (PWS) と Angelman 症候群 (AS) の原因遺伝子が存在する。PWS は新生時期の筋緊張低下、特徴的な顔貌、精神遅滞、食欲亢進と肥満などを特徴とし、AS は重度精神遅滞、てんかん、容易に引き起こされる笑いなどを特徴とする。父性発現する遺伝子は PWS の候補遺伝子で、母性発現を示す遺伝子 UBE3A が AS の原因遺伝子である。父性発現遺伝子の発現が失われると PWS が、母性発現を示す UBE3A の発現が失われると AS が発症する。疾患の原因は、PWS、AS ともに大多数は同領域を含む染色体腕内欠失である。マウス 7 番染色体 7C 領域はヒト 15q11-q13 の相同領域であり、刷り込み状態も共通している。最近、同領域を欠失するモデルマウスが開発され、PWS もしくは AS のモデル動物と考えられている。本研究においては 15q11-q13 およびマウス相同領域における、刷り込み遺伝子のヒストンアセチル化状態の評価検討を行った。

【方法】15q11-q13 領域に欠失を有する PWS、AS 患者および正常対照から末梢血を採取し、樹立した不死化リンパ芽球、及びマウス細胞としては、7C に欠失を父由来に有する PWS、および母由来欠失を有する AS モデルマウス、および正常対照マウスより樹立された線維芽細胞を用いた。これらより、cDNA を合成し、RT-PCR を行った。ヒトでは父性発現を示す、SNURF-SNRPN、NDN、MKRN3、IPW および脳において母性発現を示す UBE3A を対象とし、非刷り込み遺伝子である GAPDH を対照とした。マウスでは刷り込み遺伝子として *Snurf-Snrpn*、*Ndn*、*Mkrn3*、UBE3A を対照とし、非刷り込み遺伝子である *Gapdh* を対照とした。また、同様の細胞を用いてウサギポリクローナル抗アセチル化ヒストン H3 抗体、H4 抗体でクロマチン免疫沈降法によるヒストンアセチル化の解析を行った。抗体と反応させる前の分画から抽出した DNA は対照 (Input) として用いた。残りの分画を用いて免疫沈降反応を行い、得られた沈降分画から DNA を抽出し、引き続き PCR 反応を行った。プライマーとして、ヒトでは SNURF-SNRPN、NDN、MKRN3、GAPDH、マウスでは *Snurf-Snrpn*、*Ndn*、*Mkrn3*、対象の非刷り込み遺伝子として *Dmnt* を対象とした。刷り込み遺伝子については CpG アイランドに相当する 5' 側の領域とそれ以外の遺伝子領域の部分から、非刷り込み対象遺伝子と SNURF-SNRPN/*Snurf-Snrpn* については CpG アイランドに相当する領域にプライマーを設定した。

【結果】RT-PCR では、正常、PWS 患者由来リンパ芽球いずれにおいても、NDN と MKRN3 は RT-PCR ではバンドが検出されなかった。SNURF-SNRPN と IPW では PWS 患者由来リンパ芽球においてはバンドは検出されなかった。AS 患者由来リンパ芽球における発現はすべて、正常と同様

であった。UBE3A と GAPDH はいずれの細胞でも同様に発現していた。UBE3A は脳においてのみ母性発現を示すが、その他の臓器では両親性発現を示す。マウスでは、父性発現遺伝子 *Snurf-Snrpn*、*Mkrn3*、*Ndn* はすべて正常対照細胞における発現が検出された。*Snurf-Snrpn* と *Mkrn3* は PWS マウスではバンドが検出されなかった。*Ndn* は PWS マウスにおいて発現を認めたが、バンドは薄かった。*Ube3a* と *Gapdh* はすべての細胞で同様に発現していた。ヒストンアセチル化についての検討では、SNURF-SNRPN の CpG アイランドは抗アセチル化 H3 および H4 抗体いずれを用いた検討でも PWS 細胞ではバンドが検出されないが、正常対照と AS 細胞ではバンドが検出された。MKRN3 では CpG アイランド領域、3'側領域ともに PWS 細胞ではバンドが薄かった。さらに、正常及び AS 細胞においても SNURF-SNRPN に比較してバンドは薄かった。NDN ではいずれの細胞においてもほとんどバンドが検出されなかった。UBE3A ではヒストン H4 では PWS 細胞における CpG アイランド部位でのバンドが正常に比し薄かったが、遺伝子中央部分では違いを認めなかった。ヒストン H3 では細胞間での違いはいずれの領域でもはっきりしなかった。マウス 7C におけるヒストンアセチル化については、父性発現を示す *Snurf-Snrpn*、*Mkrn3*、*Ndn* では H3、H4 ともに、PWS モデルマウスにおいてバンドの出現がないか、あっても明らか低かった。また、5'側の CpG アイランド領域と 3'側とにおいて違いを認めなかった。また、*Ube3a* は細胞間でのバンドの強さに明らかな違いを認めなかった。

【考察】本研究の先行研究において行われた SNURF-SNRPN のヒストンアセチル化の解析の結果では、活性な父由来対立遺伝子の 5'側の CpG アイランド領域では H3、H4 ヒストンともアセチル化されていたが、不活性な母由来対立遺伝子ではヒストンアセチル化が著明に低下していた。Fulmer らは同様の結果に加えて、SNURF-SNRPN 遺伝子以外のヒト 15q11-q13 での刷り込み遺伝子のヒストンアセチル化のレベルは低く、親由来ごとの違いははっきりしないと報告し、本研究の結果と概ね一致している。ヒトにおける結果では、SNURF-SNRPN と比べるとその他の父性発現遺伝子のヒストンアセチル化の程度は低かった。しかし、本研究では MKRN3 にはわずかではあるが、親由来特異的なヒストンアセチル化の違いが観察され、親由来ごとのわずかな違いは存在するのかもしれない。RT-PCR の結果では、MKRN3、NDN ともに発現が認められなかった。MKRN3 と NDN のヒストンアセチル化レベルの低さはリンパ芽球ではこれらの遺伝子が発現していないことを反映している可能性が考えやすい。UBE3A 遺伝子は今回用いた細胞では刷り込みを受けていない。今回のヒトにおける解析では一定の傾向を示すことはできず、ヒストンアセチル化の役割ははっきりしなかった。マウスでは Fournier らはマウス *Snurf-Snrpn* において、活性な父由来対立遺伝子が不活性な母由来対立遺伝子よりもヒストンアセチル化の程度が強く、さらにこの違いは CpG アイランドのみではなく、さらに 3'側の遺伝子本体部分にも認めたとし、本研究の結果はこの報告と良く一致する。*Snurf-Snrpn* 以外の父性発現遺伝子 *Mkrn3* と *Ndn* では父由来対立遺伝子と母由来対立遺伝子のヒストンアセチル化の違いが明らかであり、また、この違いは CpG アイランドに限局していなかった。一方、両親由来発現を示す *Ube3a* ではヒトと同様に両親由来対立遺伝子間での違いを認めなかった。マウス 7C では父性発現遺伝子が存在する領域は全体的なクロマチン構造の親由来ごとの違いが存在し、活性な遺伝子が存在する父由来染色体では開いた染色体構造となっている可能性が示唆される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦  
副 査 教 授 佐々木 秀 直  
副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

## 15q11-q13刷り込みドメインの ヒストンアセチル化解析に関する研究

ゲノム刷り込み現象は遺伝子の発現が親由来特異的に異なる遺伝現象である。ヒト 15 番染色体長腕 11-13(15q11-q13)は同現象が認められる領域である。この領域には、Prader-Willi 症候群(PWS)と Angelman 症候群(AS)の原因遺伝子が存在する。PWS は新生時期の筋緊張低下、特徴的な顔貌、精神遅滞、食欲亢進と肥満などを特徴とし、AS は重度精神遅滞、てんかん、容易に引き起こされる笑いなどを特徴とする。父性発現する遺伝子は PWS の候補遺伝子で、母性発現を示す遺伝子 UBE3A が AS の原因遺伝子である。父性発現遺伝子の発現が失われると PWS が、母性発現を示す UBE3A の発現が失われると AS が発症する。疾患の原因は、PWS、AS ともに大多数は同領域を含む染色体腕内欠失である。マウス 7 番染色体 7C 領域はヒト 15q11-q13 の相同領域であり、刷り込み状態も共通している。本研究においては 15q11-q13 およびマウス相同領域における刷り込み遺伝子のヒストンアセチル化状態の評価検討を行った。【方法】15q11-q13 領域に欠失を有する PWS、AS 患者および正常対照から末梢血を採取し、樹立した不死化リンパ芽球、及びマウス細胞としては、7C に欠失を父由来に有する PWS、および母由来欠失を有する AS モデルマウス、および正常対照マウスより樹立された線維芽細胞を用いた。これらの細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR で目的遺伝子の発現を見た。ヒトでは父性発現を示す SNURF-SNRPN、NDN、MKRN3、IPW および脳において母性発現を示す UBE3A を対象とし、非刷り込み遺伝子である GAPDH を対照とした。マウスもヒトと対応する刷り込み遺伝子について同様に解析した。ヒストンアセチル化の解析はウサギ抗アセチル化ヒストン H3 抗体、H4抗体によるクロマチン免疫沈降の後、沈降分画から DNA を抽出し、PCR 反応で沈降物に存在する目的遺伝子を同定した。【結果】RT-PCR では、父性発現遺伝子 SNURF-SNRPN と IPW は PWS 患者由来リンパ芽球においてバンドが検出されなかった。即ち、母親由来対立遺伝子が存在しても不活性化していることを示す。一方これらの遺伝子は AS 患者由来リンパ芽球での発現は全て正常と同様であった(活性な父親由来対立遺伝子が存在することを示す)。UBE3A と GAPDH はいずれの細胞でも同様に発現していた(UBE3A は脳においてのみ母性発現を示し、脳以外の臓器では両親性発現を示す)。マウスの父性発現遺伝子の解析結果はヒトのそれと概ね対応していた。ヒストンアセチル化についての検討では、SNURF-SNRPN の CpG アイランドは抗アセチル化 H3 および H4 抗体いずれを用いた検討でも PWS 細胞ではバンドが検出されないが、正常対照と AS 細胞で

はバンドが検出された。この事は、PWS では母親由来対立遺伝子が存在してもそのヒストンは脱アセチル化していることを意味する。一方、MKRN3 では CpG アイランド領域、3'側領域ともに PWS 細胞ではバンドは薄いと同定された。即ち、母親由来 MKRN3 のヒストンアセチル化は低いと認められることを意味する。NDN ではいずれの細胞においてもほとんどバンドが検出されず、親由来遺伝子に関わらずアセチル化が低いことが伺われた。UBE3A ではヒストン H4 では PWS 細胞における CpG アイランド部位でのバンドが正常に比し薄かったが、遺伝子中央部分では正常と同様であった。マウス 7C におけるヒストンアセチル化については、Snurf-Snrpn、Mkrn3 はヒトとほぼ同様であったが、Ndn アセチル化はヒトと異なり明らかに親由来遺伝子に差をみとめた。

【考察】本研究の先行研究において行われた SNURF-SNRPN のヒストンアセチル化の解析の結果では、活性な父由来対立遺伝子の 5'側の CpG アイランド領域では H3、H4 ヒストンともアセチル化されていたが、不活性な母由来対立遺伝子ではヒストンアセチル化が著明に低下していた。Fulmer らは同様の結果に加えて、SNURF-SNRPN 遺伝子以外のヒト 15q11-q13 での刷り込み遺伝子のヒストンアセチル化のレベルは低く、親由来ごとの違いははっきりしないと報告し、本研究の結果と概ね一致している。ヒトにおける結果では、SNURF-SNRPN と比べるとその他の父性発現遺伝子のヒストンアセチル化の程度は低かった。しかし、本研究では MKRN3 にはわずかではあるが、親由来特異的なヒストンアセチル化の違いが観察され、親由来ごとのわずかな違いは存在するのかもしれない。RT-PCR の結果では、MKRN3、NDN ともに発現が認められず、またヒストンアセチル化レベルも低かったことからリンパ芽球ではこれらの遺伝子が発現していないことを反映している可能性が考えやすい。UBE3A 遺伝子は今回用いた細胞では刷り込みを受けていない。今回のヒトにおける解析では一定の傾向を示すことはできず、ヒストンアセチル化の役割ははっきりしなかった。マウスでは Fournier らはマウス Snurf-Snrpn において、活性な父由来対立遺伝子が不活性な母由来対立遺伝子よりもヒストンアセチル化の程度が強く、さらにこの違いは CpG アイランドのみではなく、さらに 3'側の遺伝子本体部分にも認めたとし、本研究の結果はこの報告と良く一致する。Snurf-Snrpn 以外の父性発現遺伝子 Mkrn3 と Ndn では父由来対立遺伝子と母由来対立遺伝子のヒストンアセチル化の違いが明らかであり、ヒトと異なっていた。マウス 7C では父性発現遺伝子が存在する領域は全体的なクロマチン構造の親由来ごとの違いが存在し、活性な遺伝子が存在する父由来染色体では開いた染色体構造となっている可能性が示唆される。

公開發表に際し、副査の佐々木秀直教授より刷り込み遺伝子のヒストンアセチル化の程度の差と用いた細胞種との関係など、また副査の清水教授から刷り込み遺伝子の変化と臨床症状に関する事など、主査の小林教授からヒストンアセチル化と DNA メチル化の機序などの質問があり、いずれの質問に対しても申請者は過去の文献報告や自身の研究結果をもとに概ね妥当に回答した。

本研究は、ヒト 15q11-q13 及びマウス7番染色体 7C の刷り込み遺伝子領域のヒストンアセチル化のマッピングを行った点で評価され、今後のこの分野の研究に寄与するものと期待される。

審査一同は、これら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。