

琉球大学学術リポジトリ

良性卵巣奇形腫を利用したヒトにおける配偶子特異的メチル化機構の解析

メタデータ	言語: 出版者: 陣野吉廣 公開日: 2009-12-25 キーワード (Ja): 良性卵巣奇形腫, インプリンティング, メチレーション, 内在性レトロウィルス キーワード (En): H19, SNRPN, benign ovarian teratoma, genomic imprinting, methylation, HERV-K 作成者: 陣野, 吉廣, 石丸, 忠之, Jinno, Yoshihiro, Ishimaru, Tadayuki メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/14310

良性卵巢奇形腫を利用したヒトにおける配偶子特異的
メチル化機構の解析

(研究課題番号 10672138)

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 陣野吉廣
(琉球大学医学部教授)

はしがき

アレルの由来する親の性に依存した発現は刷り込み現象として広く知られており、この発現制御機構としてDNAのメチル化が重要な役割を果たしていることも広く認められているところである。この機構（ゲノム刷り込み）は大体においてヒトとマウスで良く保存されているが、細部には異なる点が存在することも気付かれている。

我々は本研究において女性配偶子の代替物として良性卵巣奇形腫を用いることにより、ヒトにおける配偶子特異的メチル化の分子機構解明の糸口を探ることを試みた。メチル化解析対象として、母性刷り込みを受ける刷り込み遺伝子の代表としてSNRPNを、父性刷り込みの代表としてH19を選んだ。さらに、メチル化の主要なターゲットの一つであるレトロトランスポゾンに属する内在性レトロウイルス(HERV)の個別的メチル化解析を計画した。内在性レトロウイルスはL1やAlu配列と同様、全体レベルで見たとき配偶子特異的メチル化パターンを示す一方、体細胞においては両方のアレルが高度にメチル化されている。これにより刷り込み遺伝子メチル化の他と共通した部分と特異的な部分が浮き彫りにされると期待した。

SNRPNとH19のメチル化解析から刷り込み遺伝子メチル化の分子機構への示唆が得られたほか、H19メチル化樹立の時期においてヒトとマウスで相違が存するらしいことも分かった。また、メチル化解析に先立って行った良性卵巣奇形腫の発生時期別分類から、発生時期別頻度がこれまでの欧米の報告と異なること、および、良性卵巣奇形腫が遺伝的に異質なheterogenous細胞集団から構成されることを明らかにした。

HERVメチル化解析に関しては研究期間中の研究代表者の移動もあって大幅に遅れることとなった。インプリンティングドメイン内に局在するHERV単離は不首尾に終わったが、各種組織で極めて微量ながらも、発現している活性型HERV遺伝子を複数単離・解析するなど、HERVメチル化解析に向けての基盤は整いつつある。刷り込み遺伝子のみならず、DNAのメチル化はDNA修飾を介した遺伝子制御機構の一部としても重要であり、折しもメチル化を主とするDNA修飾（機構）の異常による遺伝性疾患の報告が相次ぎ、その重要性の認識が一層高まりつつある。HERVのヒトにおける疾患への関わりが証明されたものは現在のところ無いが、1型糖尿病や多発性硬化症などの自己免疫疾患への関わりが注目を集めている。HERVはメチル化によって高度に制御されているが、その制御の乱れは種々の疾病を生じる可能性もあり、HERVのメチル化解析はインプリンティングとの関連だけでなく臨床医学の面からも興味深く、継続する価値のあるものだと判断される。

研究組織

研究代表者：陣野吉廣（琉球大学医学部教授）

研究分担者：石丸忠之（長崎大学医学部教授）

研究経費

平成10年度 1,900 千円

平成11年度 1,300 千円

計 3,200 千円

研究発表

ア 学会誌等

1. Miura K, Obama M, Yun K, Masuzaki H, Ikeda Y, Yoshimura S, Akashi T, Niikawa N, Ishimaru T, Jinno Y: Methylation imprinting of H19 and SNRPN genes in human benign ovarian teratomas. *Am J Hum Genet* 65 (5), 1359-1367, 1999
2. Hasuike S, Miura K, Miyoshi O, Miyamoto T, Niikawa N, Jinno Y, Ishikawa M: Isolation and localization of an IDDMK1,2-22-related human endogenous retroviral gene, and identification of a CA repeat marker at its locus. *J Hum Genet* 44 (5), 343-347, 1999
3. Miura K, Miyoshi O, Yun K, Inazawa J, Miyamoto T, Hayashi H, Masuzaki H, Yoshimura S, Niikawa N, Jinno Y, Ishimaru T: Repeat-directed isolation of a novel gene preferentially expressed from the maternal allele in human placenta. *J Hum Genet* 44 (1), 1-9, 1999
4. Miura K, Masuzaki H, Ishimaru T, Niikawa N, Jinno Y: A HhaI/BstUI polymorphism in a novel gene at human chromosome 11p15.5. *J Hum Genet* 43 (4), 283-284, 1998
5. Nakano M, Yoshiura K, Oikawa M, Miyoshi O, Yamada K, Kondo S, Miwa N, Soeda E, Jinno Y, Fujii T, Niikawa N: Identification, characterization and mapping of the human ZIS (zinc-finger, splicing) gene. *Gene* 25 (1-2), 59-65, 1998
6. Yun K, Jinno Y, Sohda T, Niikawa N, Ikeda T: Promoter-specific insulin-like growth factor 2 gene imprinting in human fetal liver and hepatoblastoma. *J Pathol* 185 (1), 91-98, 1998
7. Miyamoto T, Jinno Y, Miura K, Sengoku K, Soejima H, Yun K, Yaginuma Y, Niikawa N, Ishikawa M: A SacII polymorphism in the human ASCL2 (HASH2) gene region. *J Hum Genet* 43 (1), 69-70, 1998
8. Soejima H, McLay J, Hatada I, Mukai T, Jinno Y, Niikawa N, Yun K: Comparative reverse transcription-polymerase chain reaction and in situ hybridization analyses of human imprinted p57KIP2 and insulin-like growth factor 2 gene transcripts in fetal kidney and Wilms' tumors using archival tissue. *Lab Invest* 78 (1), 19-28, 1998

イ 口頭発表

1. 杉本潤、松浦信夫、陣野吉廣、多因子病への内在性レトロウィルスの関わり、日本人類遺伝学会、1999年11月
2. 三浦清徳、陣野吉廣 他、DNA多型マーカーによる成熟胞性奇形腫の発生時期分類、日本人類遺伝学会、1998年10月

研究成果

1. マイクロサテライトDNAマーカーによる良性卵巣奇形腫の発生時期分類

メチル化解析に先立ち合計45のマイクロサテライトDNAマーカーを用いて25例の奇形腫のDNAタイピングを行い、これらの奇形腫の発生時期による分類を行った。まず、16本の染色体上のセントロメア近傍の25のローカスの多型マーカーでヘテロ接合性の有無を検討し、次に3本の染色体について20のローカスから多型マーカーをとって組み換えの有無を検討した。これらの結果を患者白血球のDNAタイプと比較することによって、これら25例の奇形腫の細胞オリジンを第一減数分裂前（あるいは体細胞由来）、第一減数分裂早期、第一減数分裂後期および第二減数分裂期の4つに分類した。この結果、以下のような新知見が得られた。

- (1)これまでの報告と異なり、meiosis IIからの奇形腫発生は稀であり、25例中1例(4%)だけだった。
- (2)奇形腫は遺伝的および上位遺伝的(epigenetically)に異質な(heterogenous)細胞集団から成る。

2. 良性卵巣奇形腫におけるH19およびSNRPN遺伝子のメチル化解析

メチル化解析は父性メチル化の代表としてH19、母性メチル化の代表としてSNRPNを選んでサザンブロット法およびPCR法により行った。結果および考察を以下に要約する。

- (1)個々の奇形腫におけるH19のメチル化とSNRPNのメチル化はきれいな逆相関関係にある。そして奇形腫発生の卵形成上におけるステージが進むにつれ、両者のメチル化パターンは卵子のそれに近づく。
- (2)H19のprimary imprintは卵形成のかなり遅い時期まで完全に消去されない。またSNRPNのprimary imprintも同様に遅くまで確立されない。
- (3)以上より、配偶子特異的primary imprintの形成は漸進的構築過程であると推察される。
- (4)さらに、primary imprintの消去および確立と相反する二つの機構になんらかの共役した過程が存在することが示唆される。

これらの研究成果は American Journal of Human Genetics 65 : 1359-1367 (1999) に発表されているので、詳細は後に添付した別刷りを参照してほしい。

3. 内在性レトロウィルスの単離

メチル化の主たるターゲットの一つである寄生性DNA因子のメチル化パターンと比較することによって、刷り込み遺伝子メチル化の特異性に対応する分子機構を探る目的でそれらの単離作業を進めた。寄生性DNA因子としてヒト内在性レトロウイルス(HERV) K-familyを選び、活性型と不活性型およびインプリンティングドメイン内に局在するものとそれ以外ものに分けて解析することを計画した。

(1)HERV-K遺伝子の発現解析

活性型HERV-K遺伝子を単離するため、RT-PCRとそれに引き続くシーケンシング解析によりHERV-K遺伝子の発現解析を行った。核DNAのPCR産物がハプロイドゲノム当り30~50コピー存在するHERV-K遺伝子を反映して種々の配列を示すのに対して、RNAのPCR産物の配列は発現している少数の活性型遺伝子を反映して数種類の配列にグループ化されるという仮定のもとに作業を進めた。

RT-PCRには胎盤、胎児肺、精巣および末血リンパ球より抽出・精製したpoly(A)⁺RNAを用い、また逆転写反応に先立ってDNase処理を施すなどして混入DNAの影響を可及的小さくした。ENV領域よりプライマーをとり、589 bpの配列をnested PCRにより増幅した。RT (+)とRT (-)の反応で4サイクル以上の差が得られたものを次のステップに進めてクローニングした。各サンプルで30クローン前後をピックアップして塩基配列を解析した。

仮定した通り、RT-PCR産物の各クローンはそれぞれの組織で2~4つのグループに分類された。肺においては3つの転写産物にグループ化され、頻度の高いものから順にgroup I, II および IIIとした。胎盤ではこれらに加え第四のグループが検出された。精巣ではこれらの内の一つ (group I) とこれらとは別個の一つの二つのみの発現が検出された。末血リンパ球ではgroup II および III のほかに、1型糖尿病の一原因として急性発症で亡くなった患者膵臓の培養上清からRT-PCRによって単離されたIDDMK1,2-22の配列に100%一致する転写産物が認められた。

(2)活性型HERV-K遺伝子の単離

発現解析による589 bpの配列の各グループ間および核DNA PCR クローンとの比較から、それぞれのグループに特異的なオリゴプローブを作製してBACライブラリーをスクリーニングした。得られたBACクローンは発現解析に用いたのと同じENVプライマーでPCRを行い、シーケンシングして目的とする配列と100%一致するHERV-K遺伝子を運んでいるクローンであることを確認した。複数の組織で発現しているグループ I, II および III の3つの活性型HERV-K遺伝子を単離した。このうちグループ III は研究期間中に他研究グループからGeneBankに登録されたHERV-K102と同一のものであることがわかった。I および II の染色体局在は Radiation hybrid panel によりそれぞれ3q21-q23, 3q12 に決定された。IDDMK1,2-22に対応する核内遺伝子は既に初年度に単離しており J Hum Genet 44 (5), 343-347, 1999 に発表した (別刷り添付)。

(3)インプリンティングドメイン内に局在するHERV-K遺伝子のスクリーニング

GAGあるいはENV領域のプローブで得られた75個のコスミドクローンのうち、GAG, ENV, LTR領域のPCRで全て増幅が見られたのは33クローンだった。これらをrestriction patternよりさらに6群に分け、制限酵素マップおよび一部シーケンシングを行ったところ2種類のHERV-K遺伝子を運ぶオーバーラッピングクローンであることが判明した。そのうちの一つは22q11に局在することが分かったが、もう一つはセントロメリックリピートにHERV-K遺伝子が囲まれている形になっており局在を決めることができなかった。コンピューターによる検索では、ゲノムデータベースに登録されている11p15.5コンティグ1.5 Mbおよび15q11-q13領域の488 kbの配列の中には完全構造のHERV-Kおよび65%以上のホモロジーを持つsolo LTRも見い出されなかった。

この目的のためには他のHERVファミリーを選ぶか、あるいはL1など他の寄生性DNA因子に変更する必要があるかもしれない。