

平成 21年 5月 20日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19710162

研究課題名（和文） 転写因子遺伝子群に限定した網羅的ヒトインプリント遺伝子の探索

研究課題名（英文） A comprehensive identification of human imprinted genes, limited to transcription factor genes

研究代表者 山田 洋一 (YAMADA YOICHI)

金沢大学・電子情報学系・講師

研究者番号：30377402

研究成果の概要：

哺乳類の DNA 塩基にメチル基が付加される化学的塩基修飾(メチル化)は、個々の遺伝子の発現段階・各組織特異的な機能発現制御、ゲノム刷り込み現象、雌における X 染色体不活化、そしてゲノムに侵入したウイルスの不活性化による生体防御など、哺乳類の生命維持に不可欠である。このため、約 3 万個からなるヒト各遺伝子の転写制御領域(プロモータ領域)のメチル化状態を各組織別に調べることは、ヒトゲノム配列決定後の一大研究となっている。このような背景を基に、これまで研究代表者は、独自に考案した HM-PCR 法により、ヒト転写因子遺伝子約 2,000 個のプロモータのメチル化状態を 5 つの正常組織において調べる「ヒトメチル化ボディマップ」の作成に取り組んできた。現在までに、ヒト末梢血細胞由来ゲノムにおいて、約 1,000 個のヒト転写因子遺伝子プロモータのメチル化状態を同定済みである。このうちインプリント遺伝子近隣に頻繁に見られ、かつアレル特異的なメチル化を受けている領域(DMR)の候補である混合型メチル化を受けているプロモータは 129 個存在した。

そこで本研究では、既に同定済みの混合型メチル化を受けている 129 個のヒト転写因子遺伝子プロモータから、新規の DMR およびそれらの周辺に存在すると予想される新規ヒトインプリント遺伝子を同定することを目的とした。混合型メチル化を受けているプロモータのうち約 40 個について、そのメチル化状態を Bisulfite sequencing 法により確認した。結果としてこのうち約 50%のプロモータが実際に混合型メチル化を受けている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,800,000	0	2,800,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,300,000	150,000	3,450,000

研究分野：分子生物学
科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学
キーワード：ゲノム機能、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

哺乳類ゲノム中には、由来する親の性に依存して一方のアレルのみが発現するインプリント遺伝子が少数存在している。インプリント遺伝子は、細胞の増殖分化、個体発生、さらに高次行動の制御などに重要な役割を果たしているものが多く知られている。またヒトにおいては、インプリント遺伝子は、特殊な遺伝病のみならず糖尿病、アトピー、躁鬱病などの発症頻度の高い疾患や種々の悪性腫瘍の発症に関与しており、広い分野からの注目を集めている。

一般に、インプリント遺伝子周辺には、配偶子形成過程においてDNA塩基へのメチル基付加(メチル化)がアレル特異的に行われる領域(DMR)が生じ、これがインプリント遺伝子のアレル特異的な発現に必要であると考えられている。現在のところ、各DMR間では、その配列の上での共通性は見いだされていないが、CG配列に富んだCpG island様の構造をとっていることと、タンデムリピート配列を含んでいることが多いという特徴がある。

また哺乳類のメチル化は、個々の遺伝子の発生段階・各組織特異的な機能発現制御、ゲノム刷り込み現象、雌におけるX染色体不活性化、そしてゲノムに侵入したウイルスの不活性化による生体防御など、哺乳類の生命維持に不可欠である。メチル化の細胞レベルでの破綻は癌を引き起こし、個体レベルでの消失は哺乳類の胚性致死を生じることが知られ

ている。このため、約3万個からなるヒト各遺伝子の転写制御領域(プロモータ)のメチル化状態を各組織別に調べることは、ヒトゲノム配列決定後の一大研究となっている。しかしながら、これまでの網羅的と称されるメチル化研究は、いずれも選択的濃縮実験手法を利用していたため、一定の見落としが避けがたく真に網羅的な解析とは言えなかった。

このような背景を基に著者は、ゲノム配列情報に基づく見落としのない真に網羅的なメチル化解析技術であるHpaII-McrBC PCR(HM-PCR)法を独自に考案した。そして、ヒト21番および11番染色体上のそれぞれ149個および656個のプロモータを計算機により推定し、HM-PCR法を用いて、これらのメチル化状態をヒト末梢血由来ゲノムにおいて網羅的に調べ、その有効性を証明した。また同時にHM-PCR法はDMRの有効な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合型メチル化も検出可能なことが証明されたため、新規DMRの単離とその近傍に存在することが予想される新規インプリント遺伝子の網羅的単離への期待も国内外で高まっている。

以上の実績に基づき申請者は、独自に開発したHM-PCR法により、ヒト転写因子遺伝子約2,000個およびヒト21番染色体上遺伝子群のプロモータのメチル化状態を5つの正常組織において調べる「ヒトメチル化ボディマップ」の作成に取り組んできた。現在までに、ヒト末梢血細胞由来ゲノムにおいて、ヒト転写因子遺伝子約1,000個のプロモータ領域のメチル化状態を末梢血細胞由来ゲノムを調

べ、DMR の強力な候補と考えられる混合型メチル化を受けるプロモータを 129 個同定している。

2 . 研究の目的

本研究申請では、上記の混合型メチル化を受けるプロモータ 129 個から、新規の DMR およびそれらの周辺に存在すると予想される新規ヒトインプリント遺伝子を同定することを目的とした。

3 . 研究の方法

既に混合型メチル化として同定済みの 129 個のヒト転写因子遺伝子プロモータについて、Bisulfite sequencing 法によりそのメチル化状態を確認する。ゲノムを Sodium Bisulfite(亜硫酸水素ナトリウム)で処理すると、非メチル化シトシンはウラシルに変換されるが、メチル化シトシンはそのままである。これを鋳型とし、特定のプロモータに特異的なプライマー対により PCR 増幅を行うとウラシルはチミンへと変換される。PCR 産物は、ベクターにクローニング後、個々のクローンをシークエンスする。ここでクローン挿入配列全体に渡ってシトシンが全く出現しないクローンと、同様に全体に渡って CG 配列のシトシンが残存するものに分かれた場合、このプロモータが混合型メチル化を受けていると判定する。

4 . 研究成果

既に同定済みの混合型メチル化を受けているプロモータのうち約 40 個について、そのメチル化状態を Bisulfite sequencing 法により確認した。結果として、このうち約 50%

のプロモータが実際にクローン挿入配列全体に渡ってシトシンが全く出現しないクローンと、同様に全体に渡って CG 配列のシトシンが残存するものからなる混合型メチル化を受けている可能性が示唆された。以下にその一例を示す。

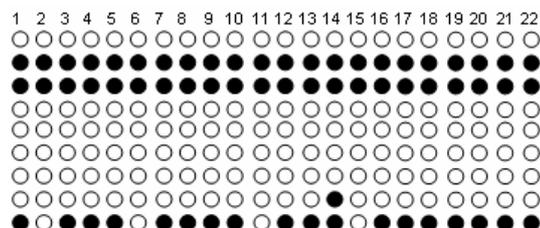


図 1 : アレル特異的なメチル化を受けたプロモータの例

および は、各クローン中の非メチル化およびメチル化部位をそれぞれ示す。

今後は、これら混合型メチル化を受けたプロモータを有する遺伝子のアレル別発現状態を調べ、由来する親の性依存的なアレル特異的発現を行っているかどうかを調べる必要がある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. Yoichi Yamada, Ken-ichi Hirotsu, Kenji Satou, Ken-ichiro Muramoto, An identification method of data-specific GO terms from a microarray data set, IEICE TRANSACTIONS on Information and Systems, 査読有, Vol.E92-D No.5, pp.1093-1102, 2009.
2. Yoichi Yamada, Kenji Satou, Prediction of Genomic Methylation Status on CpG Islands Using DNA

Sequence Features, WSEAS Transactions
on Biology and Biomedicine, 査読有,
Vol.5, pp.153-162, 2008.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 洋一 (YAMADA YOICHI)

金沢大学・電子情報学系・講師

研究者番号 : 30377402