

機関番号： 32203

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590333

研究課題名（和文） 派生染色体におけるX染色体不活化機構と遺伝子発現

研究課題名（英文） Molecular characterization of the spread of X-chromosome inactivation in an autosome of a boy with a t(X;15)(p21.1;q11.2) translocation

研究代表者：

坂爪 悟 (SAKAZUME SATORU)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：70306174

研究成果の概要（和文）：派生X染色体における常染色体領域の部分不活化を証明した。染色体の核型と臨床症状から部分的な常染色体の不活化が考えられ、分子生物学的に証明した貴重な題材である。メチル化が及ぶ領域は特定できたがそれが、単にXISTの影響なのか、それとも受精時に何らかの染色体構造異常が生じたかを区別することができていない。染色体構造異常が受精後に生じたことが示唆される。患者細胞にモザイクやキメラが証明できれば癒合染色体の存在を示唆できる物であり、染色体分析を再検討して本研究の総括としたい。

研究成果の概要（英文）：We revealed partial inactivation of autosome, using a chromosome and DNA from a patient having Prader-Willy Syndrome like phenotype. Several molecular biological techniques were used for the study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：6907 基礎医学・人類遺伝学

キーワード：(1) エピジェネティクス (2) メチル化 (3) 不活化 (4) 染色体異常 (5) X染色体転座 (6) XIST

1. 研究開始当初の背景

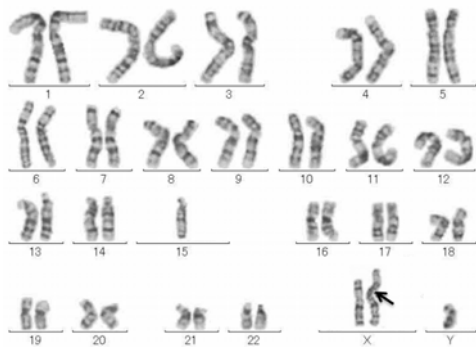
重度の成長発達障害を有する男児に、色白・毛髪色素異常（金髪）が見られた。G分染法で 47, XY, der(X), t(X; 15)(p21.1;q11.2)。この罹患者における成長発達障害は、派生（転座）染色体でXの不活化が生じ、そ

の影響が切断点を乗り越え、常染色体（この場合は15q）に影響を及ぼしているものと考えられる。

2. 研究の目的

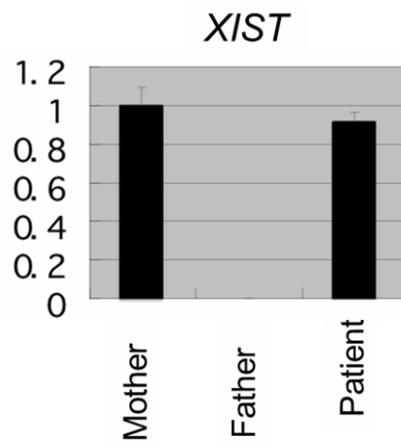
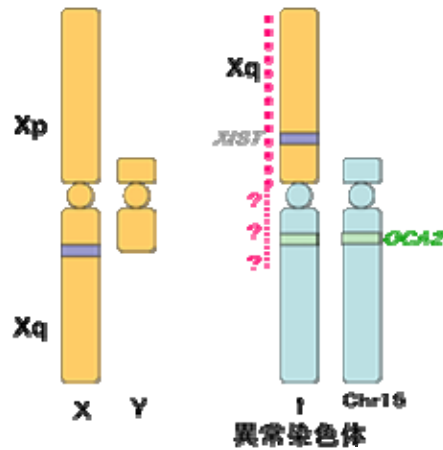
ヒトの性染色体はX染色体とY染色体で

ある。Y染色体は男性性腺発生に重要であるが、生命維持に必須な遺伝情報はないと考えられている。一方X染色体は生存に不可欠である。また、遺伝情報の多いX染色体の制御機構は重要であり、それは、男性はX染色体を1本有するが、女性はX染色体を2本有し、性別により量的な不一致が甚だしいことから推測できる。以前より、女性ではX染色体の不活化が唱えられており、不活化機構としてX染色体上に存在する遺伝子の関与が考えられている。詳細は多くの議論を残すがX染色体上の *XIST* や *TSIX* といった遺伝子転写産物がX染色体不活化に大いに寄与していることが分かってきた。一方、女性X染色体上にあっても不活化を免れる遺伝子や染色体領域が明らかになりつつある。X染色体不活化のステップとしては遺伝子プロモーター領域のメチル化の関与が確認されている。従ってメチル化状態を定量することによって発現・不活化の様子を推測することが可能と思われる。



近年、常染色体も不活化が関与することが判明しつつあるがX染色体とは異なったメカニズムで生じている。一つの理由は *XIST* や *TSIX* はX染色体上にのみに働きかける。常染色体上にもインプリンティングセンターが想定されているが、そのメカニズムがX染色

体不活化と相同であるか否かは、未だ議論の最中である。15番染色体にもインプリンティングセンターが考えられている。これらは状況に応じ近傍の遺伝子の発現を調節するメカニズムで、プロモーター領域のメチル化を介する機序も確認されている。一部のアリルは親由来によってセンターの働きが制御される。



15番染色体長腕の15p11-13領域は欠失によりプラダーウィリー症候群(PWS)やアンジェルマン症候群(AS)を引き起こすが、欠失のない患者も相当数見いだされている。非欠失型の多くは15番染色体の片親性ダイソミー(UPD)がほとんどである。PWS/AS領域はゲノムすり込み現象が生じており、親由来によって遺伝子発現パターンが異なる部位であ

る。これが、欠失及びUPDによって疾患が生じる理由、つまり欠失やUPDの由来染色体によって（欠失やUPDが父由来か、母由来かにより）疾患が異なる理由である。

今回検討する症例は、この PWS/AS 領域近傍に *XIST* を含む X 染色体が転座し派生染色体を形成している。派生染色体の X 由来部分のみが不活化されれば理論的には正常男子としてのフェノタイプになる。しかし、患者は重度の成長発達障害が見られており、第一に派生染色体の転座点近傍の常染色体領域の機能不全が疑われた。

可能性としては X 染色体の不活化が常染色体に波及し、正常なゲノム刷込みとは異なる遺伝子発現抑制を生じている可能性がある。

今回の研究では、X 染色体と常染色体の転座症例検体を用いて、X 不活化と常染色体不活化についての異同を検証したい。

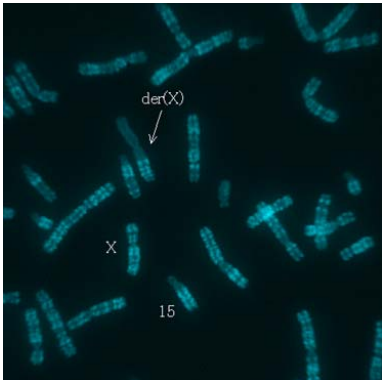
3. 研究の方法

患者と両親の検体を用いて、遺伝子発現、染色体構造異常、多型、X 及び 15 番染色体の多型を検討した。メチル化はバイサルファイト法と MeDIP 法を併用している。

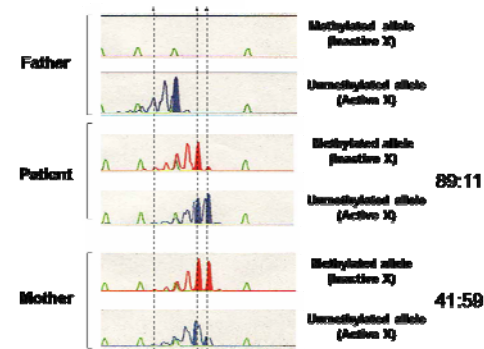
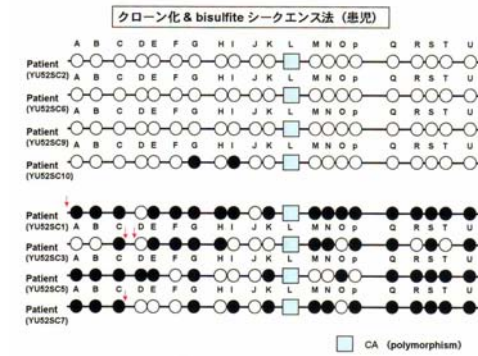
4. 研究成果

本研究に於いて解明した点は以下の通りである。

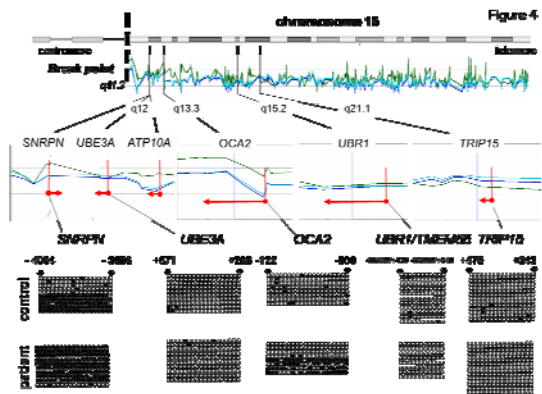
(1)、複製試験では X;15 の切断点近傍に複製遅延がみられている。



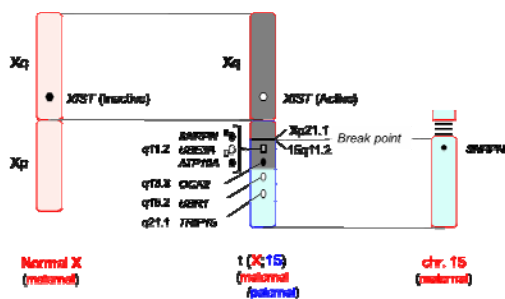
(2)、Bisulfite法を用いたPCRシーケンスで15q上のいくつかの遺伝子 (*SNRPN*, *UBE3A*, *OCA2*, *RASGRP1*, *UBR1*, *TRIP15*など) を対象にメチル化を検討した。



3)、メチル化アレイを用いた網羅的検索で、*XIST* の常染色体に及ぼすメチル化の範囲を特定した。



(4) ,以上より, X不活化が常染色体に及ぶことは判明した. 本年度の研究は研究の総括として今までの実験で得られた結果の矛盾の解消に努める. 現在では, メチル化が及ぶ領域は特定できたがそれが, 単にXISTの影響なのか, それとも受精時に何らかの染色体構造異常が生じたかを区別することができていない. SNRPNの高メチル化と, OCA2の発現低下2の半量メチルは患者の症状を理解するには十分の結果であるが, これとSNPS多型, HUMARA法によるXの親由来を検討するにあたり矛盾が出てくる. HUMARA法ではXは2アレルとも母親由来であるが, SNPS多型では15番染色体は両親由来である. この多型とメチル化を勘案すると, 染色体構造異常が受精後に生じたことが示唆される. 患者細胞にモザイクやキメラが証明できれば癒合染色体の存在を示唆できる物であり, 染色体分析を再検討して本研究の総括としたい.



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 坂爪悟, Xq, 15p派性染色体における発現遺伝子の定量的測定(査読なし): 埼玉小児医療センター医学誌(0911-4866)24 卷

1号 Page125(2009.02)

- ② 坂爪悟, 転座染色体症例を用いたX染色体不活化の常染色体へのエピジェネティック変化の検討(査読なし): Dokkyo Journal of Medical Sciences (0385-5023) 37 卷 2 号 Page163 (2010.07)

[学会発表] (計5件)

- ① 坂爪悟, ヒト(X;15)派生染色体におけるXISTの15q遺伝子群のエピジェネティックな変化第3回日本エピジェネティクス研究会年会 2009年5月22日 学術総合センター(東京都千代田区)
- ② 坂爪悟, X染色体構造異常と不活化解析, 2009年6月13日 138回染色体研究会, 東京医科大学, 新宿, 東京
- ③ 坂爪悟, X染色体不活化の常染色体への波及: 発達障害を惹起するエピジェネティックなメカニズム 2010年5月22日 第52回日本小児神経学会総会・福岡
- ④ 坂爪悟, 受精後胚細胞においてX;15転座を生じたと推察される染色体異常症の男児 第55回日本人類遺伝学会学術集会 2010年11月10日(埼玉県さいたま市)
- ⑤ 坂爪悟, Prader-Willi様のX;15転座患者: X染色体不活化の常染色体上の波及範囲とその効果 第5回日本エピジェネティクス研究会年会 2011年5月19日 KKR熊本(熊本県熊本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂爪悟 (SAKAZUME SATORU)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70306174

(2) 研究分担者

永井敏郎 (NAGAI TOSHIRO)
獨協医科大学・医学部・講師
研究者番号：90296129