

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06533

研究課題名(和文)Weaver症候群の遺伝学的要因と発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Genetic analysis of mutations associated with polycomb repressive complex 2 in Weaver Syndrome

研究代表者

今川 英里 (IMAGAWA, Eri)

横浜市立大学・医学研究科・博士研究員

研究者番号：60579895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Weaver症候群の発症メカニズムがポリコム蛋白質複合体2 (polycomb repressive complex 2: PRC2) 蛋白質異常に由来することの証明を目的とし、既に全エクソーム解析により単離されたPRC2関連遺伝子 (EED、SUZ12) の新生突然変異に対して、ヒストンメチル化酵素活性の評価に基づいたPRC2蛋白質機能解析を施行した。結果、変異型蛋白質(EED、SUZ12)ではH3K27me3レベルが回復されないことが確認された。我々はこれら解析結果をまとめた論文を投稿し、2017年2月、Human Mutationにオンラインで掲載された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to investigate a pathogenicity of a p.Arg236Thr in EED and a p.Glu610Val in SUZ12, which was detected in a proband with clinically suspected Weaver Syndrome. The EED and SUZ12 proteins are components of polycomb repressive complex 2 (PRC2) that has histone methyltransferase activity and catalyzes the trimethylation of histone 3 at lysine 27 (H3K27me3). To investigate the functional effects of the mutations, we performed rescue experiments using the Tet-on system for 293 T-Rex cells. The results showed that increased H3K27me3 signals were observed after wild-type EED or SUZ12 transfection, whereas the mutants failed to rescue and produced similar levels of H3K27me3 as the mock transfections. These results of reduced H3K27me3 levels indicate that the identified mutations might lead to PRC2 loss-of function. Finally, we summarized these results in the article on Human Mutation (Hum Mutat. 2017. Jun;38(6):637-648.) .

研究分野：遺伝学

キーワード：Weaver症候群 ポリコム蛋白質複合体2 全エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) Weaver 症候群 (WS) は、1974 年に Weaver らにより初めて報告された常染色体優性遺伝形式の稀な過成長症候群であり、現在までに世界で約 50 症例の報告がある。WS の原因遺伝子は 2011 年に *EZH2* が同定されたが、発症機序・病態の理解が依然難しい疾患とされている。研究開始当初、我々は全エクソーム解析により Weaver 症候群 2 家系において、それぞれ新規原因遺伝子 (*EED*, *SUZ12*) が疑われる新生突然変異を見出していた。*EED*, *SUZ12* がコードする蛋白質はいずれも、*EZH2* 蛋白質と共にポリコム蛋白質複合体 2 (polycomb repressive complex 2: PRC2) と呼ばれるヒストンメチル基転移酵素の構成因子である。そのため、我々は WS の発症要因が PRC2 の構造・機能異常に関連していることを考え、変異を有する PRC2 蛋白質機能・構造の評価を試みることにした。さらに、PRC2 機能に関連している遺伝子は、今回同定した遺伝子以外にも多数存在することが知られている。そのため我々は、未だ同定されていない PRC2 関連遺伝子変異が WS 発症に関わっている可能性を考え、WS およびその他類縁の過成長症候群が疑われた多症例の全エクソーム解析を行い、更なる新規原因遺伝子の同定を試みた。

2. 研究の目的

(1) *EED*, *SUZ12* が PRC2 複合体構成蛋白質であることを利用し、免疫沈降法を用いて PRC2 複合体と機能的に関連した *EZH2* 蛋白質と、変異型蛋白質 (*EED*, *SUZ12*) との結合能の異常を検索する。

(2) 変異型蛋白質 (*EED*, *SUZ12*) の PRC2 機能への影響を評価するため、PRC2 の主な機能の一つであるヒストンメチル基転移酵素の活性をレスキュー実験にて評価する。(解析はヒストンメチル基転移酵素の触媒により生成される H3K27me3 レベルの測定を行った。)

(3) 更なる PRC2 関連遺伝子の変異同定のため、WS を含めた類似の過成長症候群 (Sotos 症候群・Beckwith-Wiedemann 症候群) 計 81 症例の全エクソーム解析を施行する。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降法: まず N 末端に V5 タグを付加した野生型あるいは変異型 *EED*・*SUZ12* と、C 末端に GFP タグを付加した野生型 *EZH2* を、各々 co-transfection により COS1 細胞で発現させた (組み合わせ: 野生型 *EED*・野生型 *EZH2*、変異型 *EED*・野生型 *EZH2*、野生型 *SUZ12*・野生型 *EZH2*、変異型 *SUZ12*・野生型 *EZH2*)。

その後 GFP 抗体で *EZH2* を pull-down した蛋白質溶液を作成し、その溶液に対し V5 抗体を一次抗体として用いて Western Blot 解析を施行した。

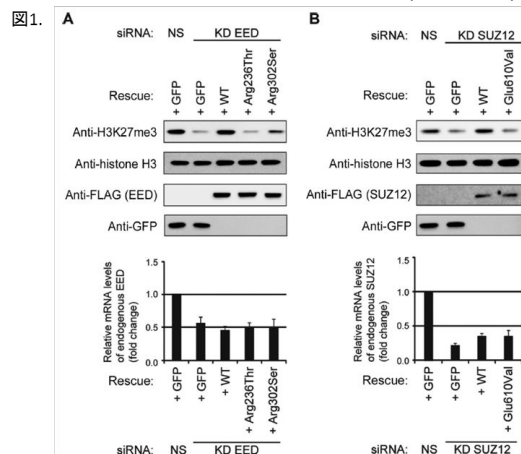
(2) レスキュー実験 (H3K27me3 測定): 解析には Tet 発現誘導システムを使用し、まずドキシサイクリン存在下で発現する野生型、または変異型 *EED*・*SUZ12* を 293T T-Rex 細胞に安定発現させた株を作製した。次に、siRNA により内在性 *EED*・*SUZ12* を抑制すると同時に、ドキシサイクリン刺激により野生型あるいは変異型 *EED*・*SUZ12* を各々発現させ、H3K27me3 レベルが回復するかどうかのレスキュー実験を施行した。H3K27me3 レベルは、抗 H3K27me3 抗体を使用した Western Blot 解析にて評価した。

(3) 過成長症候群 81 症例の全エクソーム解析: 解析には既に確立された解析フローに従い、病的変異を同定した。変異が検出されなかった家系に対しては、遺伝子のコピー数異常の可能性を考え、eXome-Hidden Markov Model (XHMM, Fromer et al., Am J Hum Genet. 2012) 解析、およびエクソン単位の詳細な解析が可能な Nord 解析 (Nord et al., BMC Genomics. 2011) を施行した。

4. 研究成果

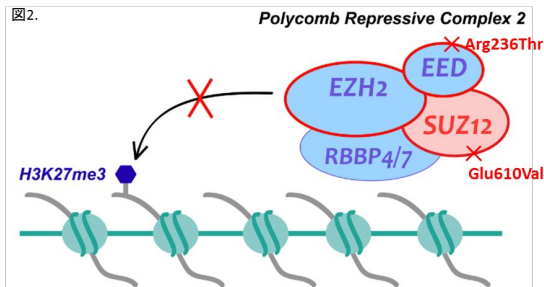
(1) 免疫沈降法: H27 年度に予定していた *EED*・*SUZ12* 変異を導入した組換え発現ベクターの作成、および変異蛋白質の発現を Western Blot 解析により確認する工程を終了した。さらに発現させた組換え *EED*・*SUZ12* 蛋白質 (野生型/変異型) と *EZH2* 蛋白質の結合能を免疫沈降法の実験に進み、結果、野生型と変異型蛋白質間に結合能の差はみられないことが明らかになった。この結果により、同定された両変異は *EZH2* との結合能に影響を及ぼさないことが証明された。

(2) レスキュー実験 (H3K27me3 測定): H28 年度に、*EED*・*SUZ12* 変異を用いた PRC2 機能のレスキュー実験の工程を全て終了した。結果、野生型蛋白質 (*EED*・*SUZ12*) は、その発現に伴い H3K27me3 量の回復がみられたのに対して、変異型蛋白質 (*EED*・*SUZ12*) では H3K27me3 量が回復されることが確認された (図 1A, B)。



(今回同定した変異: Arg236Thr, Glu610Val)
(Cohen らにより報告された変異: Arg302Ser)

本結果と H27 年度の免疫沈降実験の結果より、同定された EED・SUZ12 変異は、EZH2 との結合能に関しては正常であるが、PRC2 複合体の機能であるヒストンメチル基転移酵素の活性を低下させ、結果、H3K27me3 の発現レベルを低下させていることが強く示唆された(図 2)。



(3) 過成長症候群 81 症例の全エクソーム解析: H27-H28 年度内に予定していた全エクソーム解析は、サンプル調整、シーケンス、*in silico* による変異情報解析を終了した。各症例は過成長症候群の 13 既知遺伝子 (*NSD1*, *NFIX*, *EZH2*, *CDKN1C*, *KCNQ1*, *NLRP2*, *PHLDA2*, *GPC3*, *GPC4*, *OFD1*, *DIS3L2*, *PTEN*, *BMPR1A*) の変異検索を行い、結果、81 症例中 14 症例でこれらいずれかの遺伝子変異が検出された。しかし、新たな PRC2 関連遺伝子の同定には至らなかった。また既知遺伝子が同定された 14 症例中 1 症例に、WS の既知遺伝子 *EZH2* の最終エクソンを含んだ 25.42kb の欠失を XHMM 解析により検出した。我々はさらに、この *EZH2* 欠失を有する患者由来のリンパ芽球細胞を用いて、H3K27me3 の発現レベルを Western Blot 解析により確認した所、顕著な H3K27me3 量の減少をみとめた。これら結果は、(2) EED・SUZ12 変異のレスキュー実験と同様、ヒストンメチル基転移酵素の活性低下が引き起こされていることと一致する。

我々は上記の結果より、WS の発症メカニズムが PRC2 の機能低下に由来する可能性が強く示唆されたことをまとめ、Human Mutation に論文投稿を行った。(研究開始当初、*EED* の生殖細胞系列変異はまだ報告がされておらず、新規原因遺伝子として研究を進めていたが、2015 年 Cohen らにより Weaver-like overgrowth syndrome の原因遺伝子として *EED* が報告された [Cohen et al., J Hum Genet. 2015]。そのため我々の論文では、*SUZ12* のみを新規原因遺伝子として報告した。)

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 1 件)

IMAGAWA Eri, HIGASHIMOTO Ken, SAKAI

Yasunari, NUMAKURA Chikahiko, OKAMOTO Nobuhiko, MATSUNAGA Satoko, RYO Akihide, SATO Yoshinori, SANEFUJI Masafumi, IHARA Kenji, TAKADA Yui, NISHIMURA Gen, SAITSU Hiroto, MIZUGUCHI Takeshi, MIYATAKE Satoko, NAKASHIMA Mitsuko, MIYAKE Noriko, SOEJIMA Hidenobu, MATSUMOTO Naomichi, Mutations in genes encoding polycomb repressive complex 2 subunits cause Weaver syndrome, Human Mutation, 査読有, 2017 Jun;38(6):637-648.

DOI: 10.1002/humu.23200

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 1 件)

今川英里, 三宅紀子, 松本直通. Weaver 症候群. 新領域別症候群シリーズ No. 29. 神経症候群 IV (第二版). 2014. 709-712. (巻号なし)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今川 英里 (IMAGAWA Eri)

横浜市立大学・医学研究科・博士研究員
研究者番号: 60579895

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()