

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790750

研究課題名（和文） 全前脳症の新規責任遺伝子の探索

研究課題名（英文） Searching for a novel gene responsible for holoprosencephaly

研究代表者

長尾 和右（NAGAO KAZUAKI）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：60392487

研究成果の概要：大脳奇形の中では最も頻度の高い全前脳症（HPE）の稀な亜型である middle interhemispheric variant (MIH) の 1 症例について解析を行った結果、6 番染色体に約 10 Mbp の欠失を認めた。現在までに報告されている責任遺伝子に変異が見られないこと、これほどの欠失は健常人では決して認められないことから、この範囲内に原因遺伝子が存在することが考えられるが、その範囲内に存在する遺伝子のひとつで、これまでに HPE の原因遺伝子としての報告のない *EYA4* 遺伝子が MIH の発症に影響を与えている可能性があることを見いだした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：EYA4・SIX3・全前脳症・MIH・マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

全前脳（胞）症（Holoprosencephaly; HPE）は大脳の奇形の中では最も頻度の高い疾患であり、自然流産の 200 例中 1 例、16,000 出生例中 1 例に認められ、妊娠 18 日から 28 日の間に生じる大脳半球の分割が様々な程度で障害された結果生じる。大部分の HPE は孤発例であり、45% に 13 トリソミー、18p 症候群のような染色体異常が合併するという報告がある。最近 5 つの HPE の責任遺伝子が相次いで報告された（*SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF*, *PTCH*）。しかしながらこれらの遺伝子に異常が見つかる確率は染色体異常を伴わない症

例の 14-20% 程度に過ぎず、残りの症例は不明であり、HPE の遺伝学的解析はまだ研究途上にあるといえる。またそれぞれの遺伝子の機能についても不明な点が多く、これらの変異がいかにして HPE の発症につながっているのか明らかでない。我々は今まで集積された症例に対し、*SHH*, *ZIC2* 等現在までに報告されている責任遺伝子の変異を通常の PCR-シーケンス法で解析したが、いずれの遺伝子にも変異を認めなかった。そこでゲノムワイドに遺伝子のコピー数を解析する目的で、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた解析を行なったところ、6 番染色体に約 10

Mbp の欠失を認めた。これほどの欠失は健常人では決して認められず、この欠失範囲内に原因遺伝子が存在することは間違いない。この範囲内には複数の遺伝子が存在するが、1) 現在までに *EYA4* 遺伝子の変異で起こる常染色体優性遺伝病が判明しており、やはり神経疾患であること、2) この患者で HPE の所見はないが、この疾患では変異タンパク質が産生されるのに対し、本症例の様に遺伝子が完全に欠損した場合には、より重症である HPE となる可能性があること、3) *EYA4* 遺伝子の産物が HPE の責任遺伝子のひとつを含む *SIX* 遺伝子ファミリー産物と結合することがわかっており、*EYA4* 遺伝子の欠損が *SIX* 遺伝子の変異と同様な機序で発症につながっている可能性があることから、*EYA4* 遺伝子に注目した。

2. 研究の目的

- (1) 本症例で見出された遺伝子欠損の切断点 (breakpoint) を決定する。
- (2) 本疾患の発症機序は上述のようにきわめて複雑であり、遺伝的要因の他に環境要因が加わっている可能性もあるが、根底に Shh シグナル伝達の障害が存在することが次第に明らかとなりつつある。従って *EYA4* 遺伝子の産物がこのシグナル伝達に及ぼす影響を、*EYA4* 遺伝子の発現ベクターを作製し *EYA4* 遺伝子の産物を培養細胞に一過性に発現させたときに Shh シグナル伝達が亢進するか検討することによって明らかにする。

3. 研究の方法

患者

20 ヶ月例の日本人男児で、主訴は精神運動発達遅滞であった。妊娠中に中毒症、薬物使用、喫煙、糖尿病、感染などの問題はなく、妊娠 38 週 1 日に帝王切開にて出生。出生体重は 2348g であった。運動発達に関しては、定額：5 ヶ月、ハイハイ：10 ヶ月、伝い歩き：14 ヶ月、自立歩行：未。小頭症と成長障害を呈し、13 ヶ月時は頭囲 38 cm (3 パーセントイル未満)、身長 72 cm (3 パーセントイル)、体重 6.7 kg (3 パーセントイル未満) であった。特徴的な顔面奇形は認められなかったが、耳介小奇形を認めた。体幹・四肢に異常所見なし。G バンド染色による染色体検査の結果、46XY で正常核型であった。MRI 検査の結果 (図 1)、矢印で示した前頭葉 - 頭頂葉付近の左右半球分離不全、矢頭で示した左右側脳室の分離不全が判明。大脳核、視床、海馬、小脳には奇形が認められなかったことから、HPE の Middle interhemispheric variant (MIH) とよばれる亜型であると診断した。全前脳症の遺伝子解析に対しては、国立成育医療センター (研究代表者の研究開始時所属機関) と千葉大学の倫理委員会より承認を受けており、そ

の決定事項を遵守した。また DNA 組換え実験に関しては当研究所遺伝子組換え実験安全委員会から承認を受けておこなった。

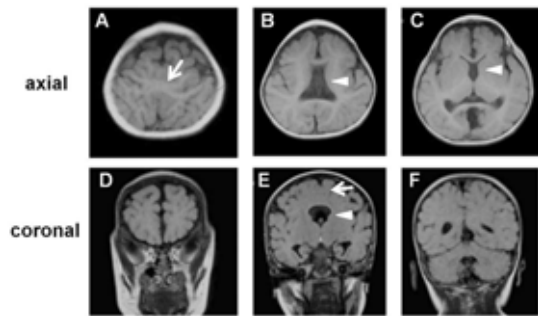


図 1. MRI T1 強調画像.

オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析

コピー数解析用オリゴヌクレオチドマイクロアレイは、ヒトゲノム (UCSC version hg17, NCBI version v35) に基づいた 1,330,354 個のプローブを搭載したカスタムアレイを使用した。プローブ間の平均値と中央値はそれぞれ 2271 bp、776 bp である。90 µg の患者由来ゲノム DNA を一晚ハイブリダイズさせ、通常の方法で洗浄、染色、解析を行った。

切断点の PCR と配列決定

10.4Mb 欠損の切断点の塩基配列を決定するために、アレイのデータに基づき切断点付近に設計した複数のプライマーを組み合わせ、TaKaRa 社 LA Taq を用いて PCR を行った。PCR 産物を 0.7% アガロース電気泳動で分離し、さらに塩基配列を決定した。

Whole-mount *in situ* hybridization (WISH)

マウスの *Eya4* cDNA を 5'-ATGGAAGACACCCAGGACCTA-3' と 5'-TTACAAATACTCTAATTCCAGTGC-3' のプライマーの組み合わせで PCR を行い増幅させた後、pGEM-T Easy ベクターにクローン化した。ベクターを直鎖化した後、Roche 社 DIG RNA labeling kit を用いて T7 RNA ポリメラーゼで DIG 標識 RNA (923bp 長) を合成させ、*Eya4* ORF の 3' 側半分ハイブリダイズするアンチセンスプローブとして、DIG 標識 RNA を WISH に用いた。

プラスミド

ヒト *EYA4* cDNAs (NM_172103.2, isoform b), *EYA1* (NM_000503.3, transcript variant 2)、およびマウス *Six3* (BC_094426) は Open Biosystems から購入した。マウス *Six3* のアミノ酸配列はヒト *SIX3* の *SIX* ドメインおよびホメオドメインと完全に同一であった。ヒト *SIX2* cDNA (NM_016932.3) は RT-PCR によってヒト前立腺由来 RNA から作製した。それぞれの cDNA を PCR で増幅し、pEGFP-C1、C2、C3、pDSRed-Monomer-N1、pJ3H (American

Type Culture Collection から購入) にサブクローニングし、発現ベクター pEGFP-EYA4、pEGFP-Six3、pEGFP-SIX2、pEGFP-EYA1、pDs-Red-SIX3、pHA-EYA4、pHA-SIX2、pHA-SIX3 を作製した。欠失変異 EYA4 の発現ベクター、pEGFP-EYA4-Ndel2 と pEGFP-EYA4-Cdel2 は pEGFP-EYA4 を鋳型としたインバース PCR 法で作製し、pEGFP-EYA4N-del1 と pEGFP-EYA4-Cdel1 は制限酵素処理後セルフライゲーションで作製した。マウス Na,K-ATPase アルファサブユニット遺伝子 (*Atp12a*) の ARE (*Atp1a1* regulatory element) 由来 Six4 結合サイトを含むレポーター遺伝子プラスミド pTKW4FLF は Kiyoshi Kawakami に分与していただいた。8x Gli-Luc は Dr. Hiroshi Sasaki に分与していただいた。マウス *Six3* プロモーター配列約 1.3kb を含む pSix3proE2-Luc は 5'-CGGGGTACCCCGTCCAGAGTCCCTAGGTTTC-3' と 5'-CGGGGTACCCCGCGGAATACCATGGACTGAC-3' をプライマーとした PCR で得られた産物から作製した。プライマー配列にはサブクローニングを容易にするために制限酵素 KpnI 認識配列を組み込んだ。この PCR で増幅されるマウス *Six3* プロモーター配列は 3 箇所の SIX3 結合モチーフ ATTA をもつ。PCR 産物は KpnI で消化し、pGV-E2 ベクターにサブクローニングした。全てのプラスミドについて塩基配列決定を行い、正しく作製されていることを確認した。

ルシフェラーゼアッセイ

12 穴プレートにまいた 293 細胞に、研究成果の各図中に示した様々な組み合わせでレポータープラスミドと発現ベクターを QIAGEN 社 Effectene Transfection Reagent を用いてトランスフェクションした (合計 DNA 量は 360 ng にそろえた)。トランスフェクション 24 時間後に細胞を回収し、promega 社 Dual-Luciferase Reporter Assay System を使用してルシフェラーゼアッセイを行った。全ての組み合わせにおいて、共トランスフェクションした pRL-SV40 から発現されたウミシイタケルシフェラーゼ活性でホタルルシフェラーゼ活性を補正した。

免疫沈降とウェスタンブロットティング

60 mm プレートにまいた 293 に、研究成果の各図中に示した様々な組み合わせで、発現ベクターをトランスフェクションし (合計 DNA 量 2 μg)、24 時間後に細胞を回収した。タンパク質 200 μg 相当の細胞ライゼートを使用し、15 μl の抗 HA 抗体結合セファロースビーズを用いた免疫沈降に続けて SDS-PAGE を行った。ウェスタンブロットティングはラビット抗 GFP 抗体と HRP 標識抗ラビット IgG

抗体をそれぞれ 1 次抗体、2 次抗体として用いた。

4. 研究成果

マイクロアレイ解析と切断点の決定

本症例において *SHH*、*ZIC2*、*SIX3*、*PTCH1* および *TGIF* を含めて、既知の HPE 遺伝子内に変異が認められなかったことから、我々は遺伝子欠損を検出する目的でマイクロアレイを用いた解析を行った。その結果、ヘミ接合性の 10.4 Mb 欠損が 6 番染色体長腕 6q22.31 ~ 23.2 (図 2 A) に検出された。

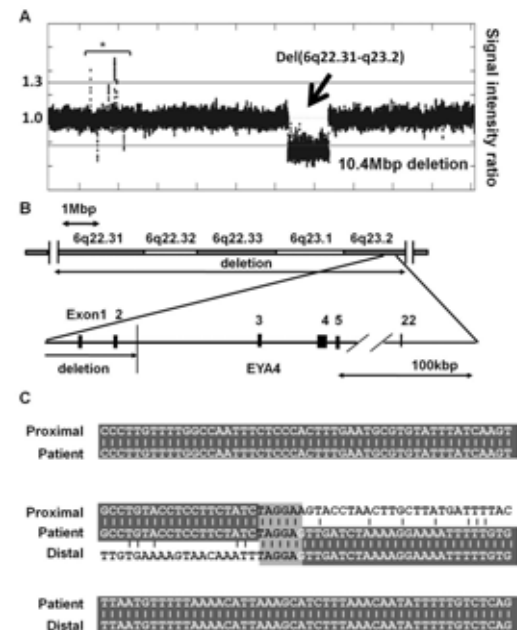


図 2. MIH 患者のマイクロアレイ解析

図 2 A のアスタリスクに示したようなコピー数多型 (CNV) を除いて、他に顕著な変化は見られなかった。この欠損範囲には 80 個の遺伝子と推定 ORF が含まれていた。遠位側の切断点が *EYA4* 遺伝子のイントロン 2 に位置していたことから、この遺伝子のプロモーター領域と第 1、第 2 エクソンが欠損していることが示唆された (図 2 B)。近位側の切断点では遺伝子の破壊は起こっていなかったため、この患者ではキメラタンパク質が発現されるような転写産物は生合成されないと考えられた。既知 HPE 遺伝子や前脳発達に重要な遺伝子のいずれもこの領域には存在していなかった。欠損の結果生じるジャンクション配列を決定するために、切断点付近に複数のオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、上流プライマーと下流プライマーを様々な組み合わせで PCR を行った結果、欠失特異的な PCR 産物がいくつかの組み合わせで得られた。それらの産物を直接塩基配列決定し、得られたジャンクション配列と近位および遠位側の切断点配列をアライメントした結果、

5 bp のオーバーラップが存在し、実際に遠位側切断点が *EYA4* のイントロン 2 内に存在することが確認された (図 2 C)。

Eya4 はマウス胚の前脳で発現している

SIX および *EYA* 遺伝子ファミリーが互いに相互作用し、*SIX3* が HPE の関連遺伝子のひとつであるという報告があることから、本症例で欠損している遺伝子のうち、我々は *EYA4* 遺伝子に焦点を当てた。*EYA4* が HPE のもう一つの責任遺伝子であるなら、HPE が生じる発生時期に大脳で発現しているはずである。それゆえ、我々はマウス胚における *Eya4* の発現を WISH で解析した。*Eya4* はこれまでに報告のあった鼻プラコード (np)、耳プラコード (op)、頭蓋間充織 (cfm) だけでなく、前脳 (fb) でも発現していた (図 3)。 *Eya4* の発現は胎性 9.5 日で最初に認められ (図 3 A)、胎性 10.5 日に広範囲で検出されるようになり (図 3 B)、胎性 11.5 日には発現が低下した (図 3 C)。これらのステージで、耳胞 (ov) での *Eya4* は認められなかった。

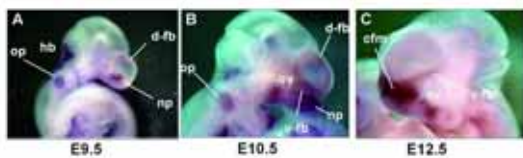


図 3. マウス胚の WISH

EYA4 は物理的に *SIX* と相互作用する

SIX3 タンパク質と *EYA4* タンパク質が物理的に相互作用するかを調べるために、我々は HA 標識 *SIX3* と EGFP 標識 *EYA4* を共トランスフェクションした 293 細胞由来ライゼートを用いて共免疫沈降法を行った。以前から相互作用することが報告されている HA-*SIX2* と EGFP-*EYA1* を共トランスフェクションし、ポジティブコントロールとして用いた。EGFP-*EYA4* が HA-*SIX3* と共免疫沈降したことから (図 4 A、レーン 1)、*SIX2* と *EYA1* と同様に (図 4 A、レーン 5)、*SIX3* と *EYA4* もまた、相互作用することが示された。EGFP タンパク質のみを共トランスフェクションすると *EYA1* もしくは *EYA4* が共免疫沈降しないことから、これらの相互作用が特異的なものであることが確認された (図 4 A、レーン 3 と 6)。

EYA ドメインが *SIX3* との相互作用に不可欠である

EYA4 タンパク質のどの領域が *SIX3* との結合に必要なかを調べるために、我々は様々な *EYA4* タンパク質の欠失変異体を EGFP 標識の形で発現するプラスミドを作製した (図 4 B)。これらの欠失変異体発現プラスミドを用いて前項と同様の実験を行ったところ、

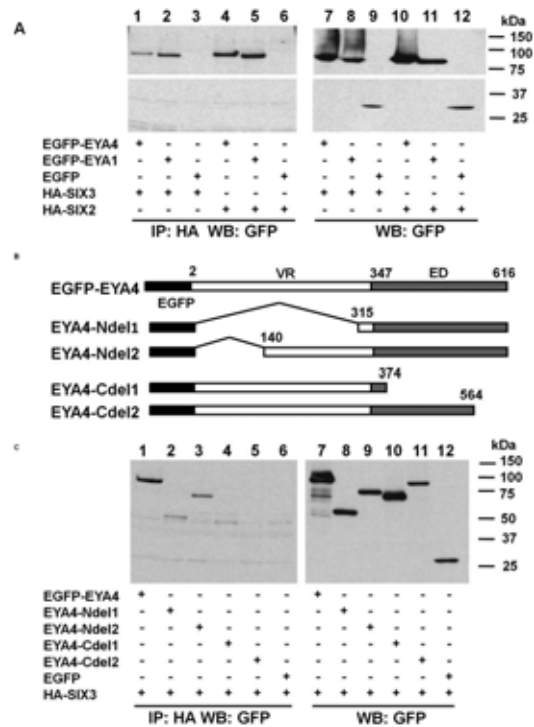


図 4. *EYA4* と *SIX3* の物理的相互作用

variable region (VR) を欠失させた *EYA4* は全長の *EYA4* と同様に *SIX3* と相互作用したが、その程度は弱かった (図 4 C、レーン 2 と 3)。対照的に、*EYA* ファミリータンパク質間で高度に保存されている *EYA* ドメイン (ED) を欠く *EYA4* は、細胞内で発現しているにもかかわらず共免疫沈降しなかった (図 4 C、レーン 4 と 5)。これらのことから、我々は *EYA* ドメインが *EYA4* と *SIX3* の相互作用に欠くことができない領域であると結論づけた。

SIX3 は機能的に *EYA4* と相互作用する

EYA4 はショウジョウバエ *eyes absent (eya)* の 4 つある哺乳類オルソログのひとつであり、*SIX3* はショウジョウバエ *sine oculis (so)* の哺乳類ホモログである。ショウジョウバエの眼の形成において、転写因子である *so* と、コアクチベーター *eya* は協調的に相互作用することが報告されている。その上、哺乳類で *Eya* と *Six* タンパク質の特定の組み合わせが相互作用していることも示されている。*SIX3* と *EYA4* がその標的遺伝子の活性化に関して、協調的に相互作用するかどうかを解析するために、*Six4* 結合部位を多数持つレポータープラスミド pTKW4FLF と共に、293 細胞に *SIX* または *EYA* を単独で、もしくは両者を組み合わせてトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行った。pEGFP-*SIX3* を単独でトランスフェクションするとレポータープラスミドのみをトランスフェクションしたコントロールに比べて、約 3 倍程度にルシフェラーゼ活性が上昇した。さらに

EYA4 を共トランスフェクションすると、活性は約 6 倍程度に上昇したが、EYA4 単独では活性の上昇が見られなかった (図 5 A)。共トランスフェクションした組み合わせの中で、SIX3 と EYA4 の組み合わせが最も高い活性化を示した。これらの結果は SIX3 と EYA4 がトランスアクティベーションにおいて協調的に働いていることを示唆している。同様の協調作用はレポータープラスミドに pSix3promE2-Luc と 8x Gli-Luc を用いた時にも確認された (図 5 B と 5 C)。

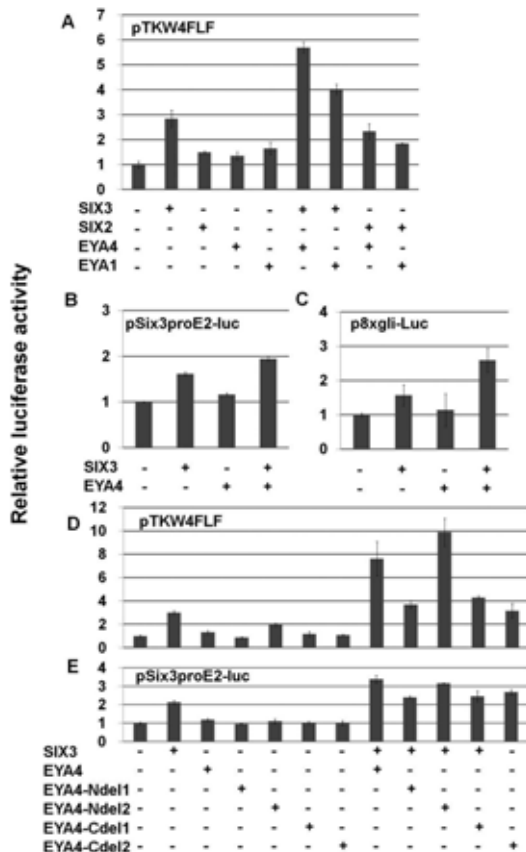


図 5. EYA4 と SIX3 の機能的な相互作用

EYA ドメインは SIX3 と EYA4 の機能的相互作用に重要だが、必須ではない

EYA4 と SIX3 の機能的相互作用に必要な領域を決定するために、我々は上述 (図 4 B) の欠失変異体 EYA4 を発現させた。共免疫沈降の結果と同様に、EYA ドメインを欠く EYA4 タンパク質、EYA-Cdel1 および EYA-Cdel2 は SIX3 と相互作用せず (図 5 D、E)、EYA ドメインが機能的な相互作用に重要であることが示唆された。予想されたように、variable region に小さな欠失を持つ EYA4 タンパク質、EYA-Ndel2 は SIX3 との協調を保持していたが、variable region を大きく欠損させた EYA-Ndel1 では SIX3 との物理的な相互作用を示したものの、機能的な相互作用を示さなかった。このことは、これらの分子の結合が必要条件ではあるものの十分条件では無い

ことを示している。

SIX3 の共発現は EYA4 の局在を細胞質から核へと変化させる

以前の研究から、SIX ファミリータンパク質が核に局在し、EYA1 と EYA3 が核と細胞質の両方に局在することが知られている。物理的・機能的に互いに相互作用する 2 つのタンパク質、SIX3 と EYA4 の細胞内局在を調べるために、HeLa 細胞に EGFP 標識 EYA4 もしくは Ds-Red-Monomer 標識 SIX3 を単独で、または組み合わせてトランスフェクションした。予想されたように、単独でトランスフェクションすると、SIX3 は核全体に局在し、EYA4 は細胞質および核に存在した (図 6 B と D)。EYA4 を SIX3 と共発現させると EYA4 は核に局在し、それは SIX3 と EYA4 の相互作用の結果であることが示唆された (図 6 G)。

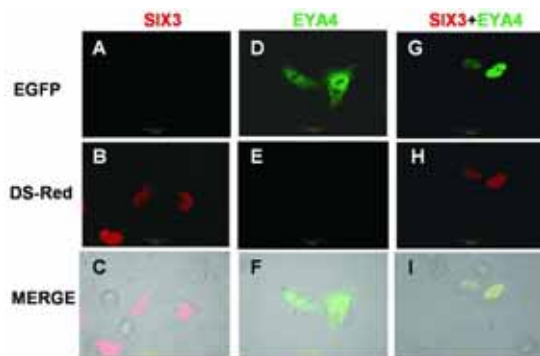


図 6. SIX3 の共発現による EYA4 の核移行

まとめ

EYA4 タンパク質は EYA ドメインを介して SIX3 と物理的・機能的に相互作用することが示唆された。また、発生初期における EYA4 発現の量的異常が SIX3 の働きに影響し、HPE を発症する可能性が考えられる。以上のことから EYA4 遺伝子は HPE 発症に関与している可能性が高いと思われるが、症例 1 例のみでは EYA4 が HPE の新規責任遺伝子であるという確証は得られず、今後さらなる症例の解析を必要とする。また、SIX3 以外の HPE 原因遺伝子と EYA4 の相互作用についても今後検討が必要である。

5. 主な発表論文等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 和右 (NAGAO KAZUAKI)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 60392487