

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590328

研究課題名(和文) 構成的染色体異常部位近傍の候補遺伝子の核内3次元配置の変化と位置効果に関する研究

研究課題名(英文) 3D nuclear architecture of the regions close to the candidate gene(s) related to the constitutional chromosomal abnormalities

研究代表者 涌井 敬子 (WAKUI KEIKO)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：50324249

研究成果の概要(和文)：正常成人Bリンパ芽球様細胞株を対象とした3D-FISH解析により、染色体の親由来により発現が異なることが知られている15番染色体q11.2に座位する*SNRPN*と*UBE3A*遺伝子の3次元相対核内配置を計測した。同一染色体上の2遺伝子間の距離は、平均0.3と0.6 μm と相同染色体間で差がある傾向を認めた。また、*SNRPN*遺伝子から核膜までの最短距離も、0.6 \pm 0.7と1.4 \pm 0.9 μm で、相同染色体間で差がある傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：3D-FISH analyses performed to measure the relative positioning of *SNRPN* and *UBE3A* genes at 15q11.2 region on each homologous chromosomes 15 within the interphase nucleus of normal B-lymphoblastoid cell lines. The average distances between two genes on each chromosome 15 were 0.32 and 0.60 μm . This result suggests the 3D distance between two genes on one of the chromosome 15 seems to be different from on the other chromosome 15 in each nucleus. The minimal distances from the *SNRPN* genes to the nuclear membrane were 0.6 \pm 0.7 and 1.4 \pm 0.9 μm , and also seems to be different between the homologous chromosomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：細胞遺伝学, 3D-FISH解析, 染色体構造異常, 遺伝子, ゲノム, 位置効果

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム解析研究の進展によりヒトゲノムの一次構造がほぼ明らかとなり、2007年10月現在、メンデル遺伝形式として知られている約18,000を越える表現型のうち約2/3は責

任遺伝子が塩基配列まで同定された (OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). 遺伝性疾患は数千あると考えられているが、診断のための遺伝子検査の方法が確立し、その臨床的有用性が証明されて臨床応用されているのは

そのうち 1500 疾患程度にすぎなかった (GeneTests: <http://www.genetests.org>).

さらに責任遺伝子が同定され診断法まで確立した疾患であっても、遺伝子の機能や疾患の発症機序までは解明されていないものは多く、実施されていた遺伝子解析研究は遺伝子の一次構造の違いの検索が主であった。

3D-FISH (three-dimensional-fluorescence *in situ* hybridization) 解析は、共焦点レーザースキャン顕微鏡の開発とコンピュータによる 3D 画像編集技術の進歩によって普及してきた解析技術である。医学研究への応用として注目されるようになったのは、個々の染色体が間期核において高度に区分化された“染色体テリトリー”をもっており、その核内の配置が一定の規則性をもつことが明らかにされ (Cremer T & Cremer C, 2001), さらに染色体のサイズや遺伝子密度と核の中心付近から核膜周辺部にかけての核内配置 (放射状核内配置) が密接に関連していることが報告されたことによる。また、遺伝子の塩基の変異を伴わないエピジェネティックな影響により遺伝子発現に影響を与えるという発症機序が提唱され、クロマチン構造の変化が発症に関与する先天性疾患も明らかにされてきていた。

以上の知見から、染色体異常や遺伝子変異などのゲノム構造の変化や疾患発症との関連が知られているエピジェネティックな変化により遺伝子の核内配置が変化し、そのことにより関連する遺伝子の発現に影響する場合があるのではないかと考え、そのことについて検証したいと、まず構成的染色体異常に伴う核内配置についての検証を目的に本研究を計画した。本研究により、規則性があるという染色体の核内 3 次元配置が染色体異常により変化することが証明できれば、そのことは核内 3 次元配置の変化が発症や病態に影響を及ぼすことを示唆する結果と考えられ、それはヒトにおける遺伝性疾患の新しい発症機序を提唱することにつながる可能性があると考えた。さらに、将来的には現在まで原因不明の疾患や病態について、新たな責任遺伝子あるいは疾患関連遺伝子同定のための研究戦略を提案するものとなりうる可能性もあると考えた。本研究では、染色体異常でも構造

異常に注目したいと考え、そうすると重要なことは、構造異常に関連した切断点やその近傍の遺伝子が対象となる。遺伝子などを対象とするためには、個々の染色体全体の核内配置に関する研究で用いられていたペインティングプローブではなく、100~200kb 程度の特定の塩基情報をもつ BAC プローブを用いる必要があった。しかしながらこれまでに BAC クローンを用いた 3D-FISH 解析で、ある遺伝子領域間の一次構造上の距離が 3 次元の核内ではどの程度の距離として計測されるのか、また、どの程度のレベルの一次構造上の距離の変化まで 3D-FISH 法で可視化できるのかといった検出限界を含む基礎データが不足していたため、まず基礎データの構築から実施する必要があった。

2. 研究の目的

遺伝子の担体である染色体が細胞核内で規則性をもって折りたたまれている 3 次元性を捉え、構成的染色体異常により関連遺伝子の核内 3 次元配置が変化するかどうかについて検証することを目的とした。それに先立ち、まず正常人から作製した細胞株を用いた基礎データの構築を実施した。

3. 研究の方法

さまざまな構成的染色体構造異常があるが、15 番染色体長腕 q11.2~q13 領域のほぼ同じ領域の染色体微細欠失が主たる原因として知られており、かつ片親性ダイソミーによる発症が確認された異なるふたつの疾患、Prader-Willi 症候群と Angelman 症候群の解析を視野に、15q11.2~q12 に座位し父親由来発現が確認されている *SNRPN* 遺伝子および母親由来発現が示唆されている *UBE3A* 遺伝子の 2 つの遺伝子領域を計測対象とした 3D-FISH 解析を計画した。

正常成人の B リンパ芽球様細胞株 (LCL) を対象試料として標本作製し、*SNRPN* 遺伝子領域と *UBE3A* 遺伝子領域にデザインしたプローブを用いて 3D-FISH 解析した。共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて 2 種類の蛍光シグナルと核膜を画像取得し、細胞核計測ソフトを用いて相同染色体上の 2 遺伝子領域間の 3 次元距離および各シグナルから核膜までの

最短距離を計測した。そしてそれぞれの計測値の相同染色体間での差の有無について比較検討した。

(1) FISH プローブ調整

ゲノムデータベース (UCSC Genome Browser: <http://genome.ucsc.edu/> など) を利用し, *SNRPN* 遺伝子をカバーする DNA クローンとして RP11-98D02 と RP11-642G3 のふたつを, *UBE3A* 遺伝子をカバーする DNA クローンとして RP11-234J13 の BAC クローンを選択した。 *SNRPN* 遺伝子領域用プローブは約 297kb, *UBE3A* 遺伝子領域用プローブは約 195kb の大きさであり, ふたつのプローブのデータベース上の中心間距離は約 451kb であった。染色体を形成する DNA の螺旋軸に沿った塩基対間の距離は 0.34nm と知られており, すなわち両プローブの中心間距離は一次構造上 153 μm に相当することになる (図 1)。

それぞれの BAC クローンをアルカリミニプレップ法にて培養後プローブ用 DNA を抽出・精製した。 *SNRPN* 遺伝子領域用プローブを SpectrumGreen で, *UBE3A* 遺伝子領域用プローブを SpectrumOrange でそれぞれニックトランスレーション法にて標識し, 3D-FISH 解析にて同時に検出するプローブとした。

(2) 3D-FISH 解析用試料標本作製

対象として正常人 B リンパ芽球様細胞株 (LCL) を用いた。 LCL を培養し, 二重チミジンブロック法で G1 期優位となるよう同調処理を施した。ポリ-L-リジンコートしたカバースリップ上に培養細胞浮遊液を静置, 立体構造を維持したまま固定するため 4%パラホルムアルデヒド溶液を播種, 0.5%サポニン・

0.5%Tritin X-100 溶液と液体窒素を用いて Permeabilization 処理を施した。 0.002%ペプシン・0.01N 塩化水素溶液で FISH 解析用前処理後, 50%ホルムアミド溶液中で FISH 法実施までの間保管した。

3D-FISH 解析に用いる LCL が G1 期優位となる条件について, 事前に FACS 解析により検討し, G1 期の細胞が約 75%の状態となるリリース 15 時間による処理を採用した。

(3) 3D-FISH 解析

試料標本に標識プローブを播種し, カバーグラスで密閉して denature 処理した。 37°C 湿潤状態で 3 日間ハイブリダイズし, 洗浄後, TOPRO-3 溶液にて核を後染色し抗褪色封入剤にて封入した。

共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡 (LSM510 Meta, Zeiss) で検鏡, 解析する細胞を選択し, 細胞核ごとに Z 軸を 0.2 μm 間隔でスライスした画像を取得した。得られた स्क্যান画像を LSM Image Browser にて必要な処理を施し, 細胞核計測ソフト (田辺ら, (株)KGT AVS7.1 Platform による) を用いて 3D 画像構築した。

各細胞核で, 同一の 15 番染色体上にあると想定される, 近接した *SNRPN* 遺伝子領域用プローブの緑色シグナルと *UBE3A* 遺伝子領域用プローブの赤色シグナルの距離をそれぞれ計測し, さらにそれぞれのシグナルと核膜までの最短距離を計測した (図 2)。また, 相対間距離の実測値による比較の意義の検討目的に, 各細胞核の X, Y, Z 径を計測しそれぞれの容積を算出した。距離の計測は 50 細胞について解析した。

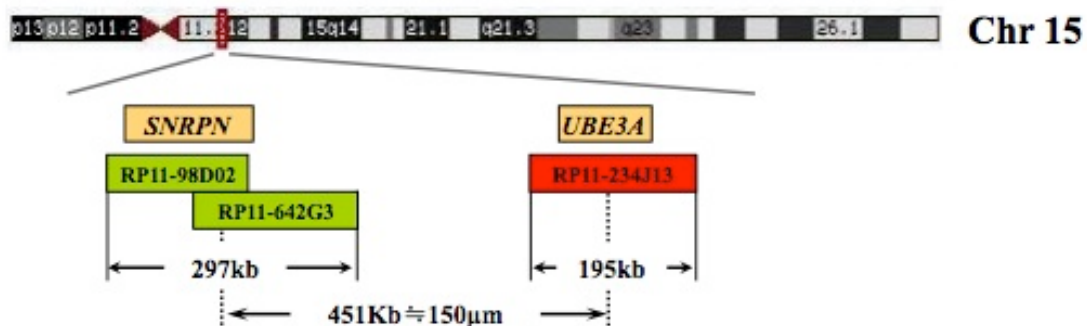


図 1. 15q11.2 に座位する *SNRPN* 遺伝子と *UBE3A* 遺伝子をそれぞれカバーする BAC クローンを選択し, それぞれを *SNRPN* 遺伝子領域と *UBE3A* 遺伝子領域の FISH 解析用プローブとして用いた。

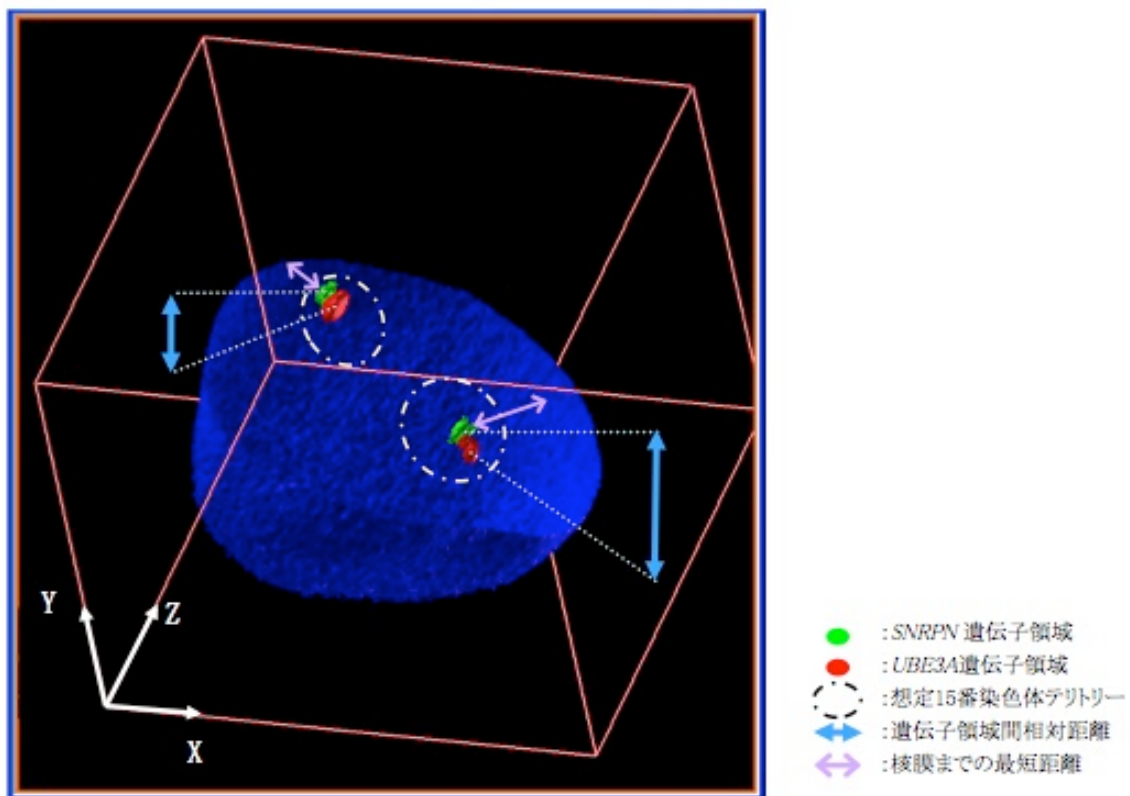


図2. 細胞核計測ソフトにより構築した細胞核内の3D-FISH解析画像例. 緑色のシグナルはSNRPN遺伝子領域, 赤色のシグナルはUBE3A遺伝子領域. 青色は細胞核膜で, Z軸の上部1/2を透明化して示した. ふたつの15番相同染色体のそれぞれのテリトリーを想定して一点鎖線で示した. 水色矢印は, SNRPN~UBE3A遺伝子間の相対距離の計測イメージ. 遺伝子領域のシグナルから核膜までの最短距離の計測イメージを紫色矢印で示した. SNRPN~UBE3A遺伝子間の相対距離は, 細胞核内の相同染色体間で差がある傾向を示した. 核膜までの最短距離も相同染色体間で差がある傾向を認め, SNRPN~UBE3A遺伝子間の相対距離が短い相同染色体の方が核膜までの距離に近い傾向が観察された.

4. 研究成果

正常人LCLを試料として, 15番染色体q11.2に座位するSNRPNとUBE3A遺伝子領域のプロープによる2色3D-FISH解析の結果, 一次構造上は約153 μm 離れている遺伝子領域は, 3次元では実測値では0.32 \pm 0.15 μm と0.60 \pm 0.23 μm の間隔があり, SNRPN~UBE3A遺伝子領域間の距離は, 相同染色体間で差がある傾向を認めた. すなわち, データベース上, プロープの中心間距離が約451kb離れている領域は3次元核内配置の可視化が可能であった.

また, 各シグナルから核膜までの最短距離の実測値は, 一方の15番染色体上のSNRPN遺伝子領域からは0.62 \pm 0.72 μm , UBE3A遺伝子領域からは0.61 \pm 0.72 μm であり, もう一方の15番染色体上のSNRPN遺伝子領域からは1.42 \pm 0.89 μm , UBE3A遺伝子領域からは1.41

\pm 0.88 μm と, 同一染色体上のふたつの遺伝子からの距離には差は認めなかったが, 相同染色体間ではやはり差があり, SNRPN~UBE3A遺伝子領域間の距離が短かった15番染色体の方が核膜までの距離も近い傾向を認めた.

3D-FISH解析技術を用いて, 15番染色体q11.2に近接して座位する, 父親由来発現として知られているSNRPN遺伝子と母親由来発現として知られているUBE3A遺伝子を含む領域間の細胞核内の3次元距離と核膜からの最短距離を計測し, 2つの相同15番染色体間で差が認められたことになる. この事実は, 何らかのエピジェネティックな要因で染色体の核内配置が変化する可能性を示唆する結果と考えられた. 今後, 同様の方法で, 他の染色体・遺伝子領域の計測や, 今回対象にした

15q11.2～q13 領域のゲノムあるいはエピゲノム異常による発症が知られている Prader-Willi 症候群および Angelman 症候群患者を対象にした同領域の 3D-FISH 解析を行い、今回の研究成果の検証を進めるとともにさらに発展させてゆきたい。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

① 河村理恵, 涌井敬子, 田辺秀之, 和田敬仁, 齊藤伸治, 福島義光. 3D-FISH 法による 15q11.2-q12 領域の細胞核内配置の解析. 日本人類遺伝学会第 55 回大会, 2010. 10. 28, さいたま

② 河村理恵, 涌井敬子, 和田敬仁, 田辺秀之, 福島義光. 3D-FISH 法による細胞核内染色体テリトリー計測における細胞周期の影響について. 日本人類遺伝学会第 54 回大会, 2009. 9. 24, 東京

③ 涌井敬子, 河村理恵, 和田敬仁, 田辺秀之, 福島義光. 3D-FISH 法における細胞核内染色体間距離の計測について. 定量生物の会 第 1 回 キャラバン遺伝研, 2009. 3. 14, 三島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

涌井 敬子 (WAKUI KEIKO)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：50324249

(2) 研究分担者

福島 義光 (FUKUSHIMA YOSHIMITSU)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：70273084

田辺 秀之 (TANABE HIDEYUKI)
総合研究大学院大学・先導科学研究科・准教授
研究者番号：50261178

和田 敬仁 (WADA TAKAHITO)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：70359727
*2008 年度のみ

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

河村 理恵 (KAWAMURA RIE)
信州大学大学院医学研究科・大学院生
研究者番号：なし