

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590330

研究課題名（和文） siRNA ライブラリーを使ってゲノム刷り込みの調節分子を同定する

研究課題名（英文） Identification of regulatory factors for genomic imprinting using siRNA library

研究代表者

副島 英伸 (SOEJIMA HIDENOBU)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：30304885

研究成果の概要（和文）：刷り込み調節の分子機構を解明することを目的として以下の研究を行った。(1) マーカー遺伝子の発現の有無で刷り込み破綻を判別できる細胞の作製のため、*Igf2r* の母性アレルに YFP を挿入した F1ES 細胞を得た。現在、父性アレルに異なる蛍光タンパクを挿入した細胞をスクリーニングしている。今後 siRNA ライブラリーによるスクリーニングを行う。(2) 刷り込み遺伝子 *KvLQT1* が父性染色体上で発現抑制されている機構に、non-coding RNA *LIT1* によるヒストン脱アセチル化酵素のリクルートとそれに伴うヘテロクロマチン形成が関与していることが示唆された。(3) *Commd1/U2af1-rs1* 刷り込みドメインでは、父性アレルにおいて *u2af1-rs1* が *Commd1* プロモーター領域まで転写伸長されることにより転写干渉が生じ、*Commd1* の発現が抑制され、結果として母性発現することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： The aim of this study is to clarify regulatory mechanisms of the imprinting. (1) To distinguish imprinting disrupted cells from normal cells by expression of marker genes, *Igf2r* was targeted with YFP cassette on the maternal allele in F1ES cell. We are trying to introduce *Igf2r-2A-E2Crimson* cassette into the paternal allele. The cells will be screened with siRNA library to identify regulatory factors for the imprinting. (2) non-coding RNA *LIT1* would recruit HDAC(s) to the promoter region of *KvLQT1* to deacetylate histone H3 and to make heterochromatin, leading to repress the *KvLQT1* gene on the paternal chromosome. (3) At mouse *Commd1/U2af1-rs1* imprinted domain, that interference with paternal *Commd1* transcription by the oppositely directed *U2af1-rs1* transcription seemed to be a mechanism for the maternal predominantly expression of *Commd1* gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究代表者の専門分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：エピジェネティクス、ゲノム刷り込み

1. 研究開始当初の背景

ゲノム刷り込みは、エピジェネティクスの中でも、特に個体発生や分化、疾患の発症に

関わる重要な遺伝システムである。複数の刷り込み遺伝子が刷り込みドメインを形成し、ドメイン内の刷り込み調節領域（ICR）に付

けられたマーク (DNA メチル化、ヒストン修飾) より、どちらの親由来の遺伝子が発現するか決定されている。刷り込みの調節機構が破綻すると様々な疾患が発症することが知られているが、破綻の分子機構は解明されていない。つまり、正常な刷り込みを調節している分子機構に関して未解明であった。このことは、物理的に離れた複数の遺伝子が、ICR のマークを基にどのような分子機構で発現調節されているかが未解明であることを意味していた。

2. 研究の目的

本研究では、刷り込み破綻をマーカー遺伝子の発現の有無で判別できる細胞を作製し、全遺伝子をカバーする siRNA ライブラリーを感染させ刷り込み破綻をスクリーニングすることにより、刷り込み機構の調節分子を同定し、その分子機構を明らかにすることを目的とした。一方、刷り込み調節には、刷り込みドメイン内に存在する non-coding RNA が一翼を担っていることが推測されているため、ncRNA の機能について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 刷り込み調節分子の同定

① *Kip2/Lit1* 刷り込みドメインの調節分子の同定: *Kip2/Lit1* 刷り込みドメインは、その刷り込み破綻が複数の先天異常や癌に関連するゲノム中で最も重要な刷り込み領域の一つである。本ドメインには 10 個程度の刷り込み遺伝子が存在するが、疾患発症に重要な遺伝子は *Kip2* である。そこで、*Kip2* の直下に IRES-GFP 遺伝子を挿入したノックインベクターを作製する。本ベクターをマウス ES 細胞に導入し、組換え体を選択する。この ES 細胞を用いて、*Kip2-GFP* ノックインマウスを作製する。ノックインマウスの雄と正常雌マウスを交配し、父由来の *Kip2-GFP* ノックインアレルを持つ胎仔の皮膚から初代線維芽細胞を樹立する。*Kip2* は母性アレルから発現し父性アレルからは発現しないので、この細胞では父性アレルの *Kip2-GFP* 遺伝子は発現しない。刷り込み調節に異常がおこり父性アレルから *Kip2-GFP* 遺伝子が発現すると、細胞は GFP 陽性となる。

② *Igf2r* 刷り込みドメインの調節分子の同定: 刷り込み遺伝子 *Igf2r* を対象とする。多型により親由来アレルを区別できる F1 マウスの ES 細胞を①と同様の方法で改変し、*Igf2r* の発現状態をマーカー遺伝子の発現で判別できる細胞を作製する。この細胞に siRNA ライブラリーを感染させる手法により、調節分子を同定し、その分子機構を解明する。

(2) *KIP2/LIT1* 刷り込みドメインにおける

non-coding RNA *LIT1* の機能解明

KIP2/LIT1 刷り込みドメイン内に存在する non-coding RNA *LIT1* に着目し、短く truncate した *LIT1* RNA を発現するような細胞を作製する。微小核融合法を用いて、ヒトの父由来 11 番染色体 1 本を保持するマウス A9 細胞から DT40 細胞へ父由来 11 番染色体を導入し、組換えにより CMV polyA signal を *LIT1* の下流に挿入する。次に改変した父由来 11 番染色体を CHO 細胞に導入する。これにより、3 種類の長さ (0.2 kb, 1.1 kb, 6.6 kb) の *LIT1* 遺伝子が転写される CHO 細胞 (ハイブリッド細胞) を作製する。これらの細胞を用いて、*LIT1* 周辺の刷り込み遺伝子の定量的発現解析、プロモーターのメチル化解析、ヒストン修飾解析、クロマチン構造解析を行う。

(3) マウス *Commd1/U2af1-rs1* ドメインの刷り込み調節機構

マウス *Commd1* 遺伝子は脳特異的に刷り込みを受ける母性発現遺伝子である。そのイントロン 1 には、更逆方向に転写される父性発現刷り込み遺伝子 *u2af1-rs1* が存在する。父性アレルにおいて、*u2af1-rs1* の 3' non-coding 領域の転写が *Commd1* のプロモーターまでおよぶことが *Commd1* の刷り込みを調節している可能性があるため、*u2af1-rs1* の 3' non-coding 領域の転写、*Commd1* プロモーターのメチル化解析、ヒストン修飾解析を行う。

4. 研究成果

(1) 刷り込みドメインの調節分子の同定

① *Kip2/Lit1* 刷り込みドメインの調節分子の同定: *Kip2-GFP* ノックインマウス作製の準備段階として ES 細胞のスクリーニングを行った。IRES につないだ *GFP* 遺伝子を刷り込み遺伝子 *Kip2* の下流に挿入した組換えベクターを構築し、マウス ES 細胞へ導入した。複数の組換えクローンを得て、*GFP* の発現を解析したところ、mRNA レベルでは発現しているものの、*GFP* に対する免疫染色では発現を認めなかった。マーカー遺伝子を Neo 耐性遺伝子に変更しても同じくその発現を認めなかった。理由として、使用した ES 細胞では、ノックイン遺伝子は IRES 配列も含めて転写されるものの IRES 配列が機能せず *GFP* の翻訳ができたかっと思えられた。一方、*Kip2* の発現は ES 細胞に比して線維芽細胞では低いレベルであることから、スクリーニングの効率に問題があると思えられた。そこで、解析対象を *Kip2/Lit1* ドメインから *Igf2r* へ変更することとした。

② *Igf2r* 刷り込みドメインの調節分子の同定: *Igf2r* は母性発現する刷り込み遺伝子で、ES 細胞を分化誘導すると両アレル発現から片アレル発現すると報告されている。このた

め、マウス作製を必要とせず ES 細胞の分化誘導で刷り込みパターン確立を再現できる系を構築できる。多型により親由来アレルを区別するため、B6 を母に JF1 を父に持つ F1 マウスの ES 細胞を用いて、発現解析をしたところ、確かに未分化状態では両アレル発現を示し分化誘導後は母性発現に変化することがわかった。そこで、*Igf2r* 下流に *Venus* (YFP) を in-frame につないだベクターを構築し導入した。得られた ES クロームはすべて母性アレルにマーカー遺伝子が組み込まれており、これは B6 と JF1 の SNP による組換え効率の違いを反映しているものと考えられた。また、*Igf2r* の発現が未分化、分化でそれぞれ刷り込み状態が維持されていることを確認した。さらに、一次インプリント領域である Air-DMR のメチル化は、分化状態にかかわらず母性メチル化を示すことも確認した。このことから、本実験系が分化誘導だけでメチル化非依存的に刷り込み状態を変化させることができる系であり、今後おこなう siRNA ライブラリーによるスクリーニングの計に適していることを示す。現在、父性アレルへ RFP を組み込むため、*Igf2r-2A-E2Crimson* ベクターを構築し組換え細胞のスクリーニングを行っている。

(2) *KIP2/LIT1* 刷り込みドメインにおける non-coding RNA *LIT1* の機能解明
短い *LIT1* RNA を発現する 3 種類の CHO 細胞 (ハイブリッド細胞) を解析したところ、周辺の刷り込み遺伝子のうち *KvLQT1* 発現が有意に上昇していた。このことは、本来父性染色体上で発現が抑制されている *KvLQT1* 遺伝子が、*LIT1* RNA を短くすることによりその発現抑制が解除されたことを意味している。*KvLQT1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化の変化は認められず、ヒストン修飾は H3 アセチル化の上昇を認めた。一方、プロモーター領域のクロマチン状態を解析したところ、*LIT1* truncation により DNase hypersensitive site が出現することを見出した。共同研究者久郷らにより ncRNA *LIT1* は *KIP2/LIT1* 刷り込みドメインのゲノム領域全体を覆うように存在していると報告されていること (Murakami et al., *J Hum Genet*, 2007)、本研究がハイブリッド細胞を用いた結果であることから、種を超えて保存されている刷り込み機構として、ncRNA *LIT1* によってヒストン脱アセチル化酵素が刷り込み遺伝子のプロモーター領域にリクルートされ脱アセチル化状態となり、ヘテロクロマチン形成により発現が抑制されていることが示唆された。

(3) マウス *Commd1/U2af1-rs1* ドメインの刷り込み調節機構

脳組織における *Commd1* プロモーター領域の DNA メチル化、ヒストン修飾を解析したところ、これらの因子についてアレル間の差異は認められなかった。一方、CTDS2 リン酸化 RNAPII が父性アレルで優位に多く結合していたことから、*u2af1-rs1* の転写伸長に関わる RNAPII が *Commd1* プロモーター領域まで達していると考えられた。以上より、父性アレルにおいて、*u2af1-rs1* が *Commd1* プロモーター領域まで転写伸長されることにより転写干渉が生じ、*Commd1* の発現が抑制され、結果として脳特異的に母性発現することが明らかとなった (Joh et al., *J Biochem*, 2009)。

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 14 件)

- ① Yamamoto S, Soejima H, Isoyama K (6 人中 5 番目) Acute megakaryocytic leukemia (AMKL, FAB:M7) with Beckwith-wiedemann syndrome. *Pediatr Blood Cancer* . 55(4):733-735, 2010, 査読有
- ② Uchihashi K, Soejima H, Toda S (10 人中 5 番目) Organotypic culture of human bone marrow adipose tissue for analyzing its biological roles. *Pathol Int*, 60(4):259-267, 2010, 査読有
- ③ Joh K, Yatsuki H, Higashimoto K, Mukai T, Soejima H. Antisense transcription occurs at the promoter of a mouse imprinted gene, *Commd1*, on the repressed paternal allele. *J Biochem* , 146(6):771-774, 2009, 査読有
- ④ 副島英伸. エピジェネティクス関連疾患と解析方法. *臨床病理*. 57(8): 769-778, 2009, 査読無
- ⑤ 東元 健、副島英伸. 小児科 特集小児疾患における臨床遺伝学の進歩. Beckwith-Wiedemann 症候群 . 50(7): 1046-1052, 2009, 査読無
- ⑥ 副島英伸. Wiedemann-Beckwith 症候群. 新川詔夫, 緒方勤監修 ビジュアル疾患解説目で見える遺伝病とターナー症候群 No. 5: 6-7, 2009 株式会社メディアート, 査読無
- ⑦ Sonoda E, Soejima H, Toda S (10 人中 4 番目) A new organotypic culture of adipose tissue fragments maintains viable mature adipocytes for a long term, together with development of immature adipocytes and mese nchymal stem cell-like cells. *Endocrinology*, 149(10):4794-4798, 2008, 査読有
- ⑧ Yakabe S, Soejima H, Higashimoto K, Joh K (10 人中 2 番目) MeCP2 knockdown reveals DNA methylation -independent

gene repression of target genes in living cells and a bias in the cellular location of target gene products. *Genes Genet Syst*, 83(2): 199-208, 2008, 査読有

- ⑨ Haruta M, Soejima H, Kaneko Y (12人中7番目) Duplication of paternal IGF2 or loss of maternal IGF2 imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural WT1 abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer*, 47(8):712-727, 2008, 査読有
- ⑩ Nomura T, Soejima H, Hatada I (7人中5番目) MeCP2-dependent repression of an imprinted miR -184 released by depolarization. *Hum Mol Genet*, 17(8):1192-1199, 2008, 査読有
- ⑪ Misago N, Joh K, Soejima H (5人中4番目) A BHD Germline Mutation Identified in an Asian Family with Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Acta Dermato-Venereologica*, 88(4): 423-425, 2008, 査読有
- ⑫ 東元 健, 副島英伸. ゲノム刷り込みと Beckwith-Wiedemann 症候群. *日本小児血液学会雑誌* 22(3): 139-143, 2008, 査読無
- ⑬ 副島英伸. ゲノムインプリンティング機構と疾患. *臨床検査* 52(6): 683-688, 2008, 査読無
- ⑭ 副島英伸. 特集エピジェネティクス-最近の動向と疾患- ゲノムインプリンティング異常と疾患. *最新医学* 63(4): 83-90, 2008, 査読無

[学会発表] (計 33 件)

- ① 副島英伸. 腫瘍細胞におけるエピジェネティックな遺伝子発現異常の分子機構. 第 49 回日本婦人科腫瘍学会学術集会. 2010. 12. 4-5. 佐賀
- ② 副島英伸. インプリンティング異常と疾患. ヒューマンサイエンス振興財団ポストゲノム医薬品開発 WG 勉強会. 2010. 10. 29 東京
- ③ Soejima H enome and epigenome analyses of an imprinting disease Beckwith-Wiedemann syndrome. The 4th Asian Chromosome Colloquium. 2010.10.11-14. Beijing, China
- ④ 副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群のインプリンティング機構と患者解析. 九州大学母子総合研究リサーチコアカンファレンス. 福岡. 2010. 3. 19
- ⑤ 副島英伸. ゲノム刷り込み疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群および Placental mesenchymal dysplasia のゲノム・エピゲノム解析. 第 18 回日本胎盤学会学術集会 2010. 9. 30-10. 1. 熊本
- ⑥ 副島英伸. インプリンティング異常と疾患.

ヒューマンサイエンス振興財団ポストゲノム医薬品開発 WG 勉強会. 2010. 10. 29 東京

- ⑦ Soejima H. Regulation of imprinted domains, mouse *Murr1/U2af1-rs1*, Human *KIP2/LIT1* and *IGF2/H19*. 18th Lake Shirakaba Conference, 2009. 6. 20-21. Vedbæk, Denmark
- ⑧ 副島英伸. エピジェネティクス関連疾患と解析方法. 第 19 回日本臨床化学会九州支部総会, 第 53 回日本臨床検査医学会九州地方会 2009. 2. 14. 福岡
- ⑨ Soejima H. Regulation of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. Northeastern Asian Symposium on "Cancer Epigenetics". 2008. 11. 5-7. Jeju, Korea
- ⑩ Soejima H Different control mechanisms of two imprinted domains, *KIP2/LIT1* and *Murr1/U2af1-rs1*. INTERNATIONAL SYMPOSIUM 「Decoding Epigenetic Code」 2008. 12. 15-16. Tokyo
- ⑪ 副島英伸. ベックウィズ・ヴィーデマン症候群のインプリンティング機序. 大阪大学蛋白研セミナー「インプリンティング疾患発症機序の解明と治療に向けて」大阪大学医学部 2008. 11. 27-28.

[図書] (計 2 件)

- ① 副島英伸, 城圭一郎, 中尾光善. 23 章エピジェネティクスとヒト疾患 エピジェネティクス. D. アリス・T. ジェニューワイン・D. ラインバーグ共編, 堀越正美監訳. 培風館. 東京. Pp505-528, 2010
- ② 副島英伸. 第 2 部ゲノミクス カラー図解 基礎から疾患までわかる遺伝学. 新川詔夫, 吉浦孝一郎監訳. メディカル・サイエンス・インターナショナル. 東京. Pp240-269, 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.biomol.med.saga-u.ac.jp/mbg/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

副島 英伸 (SOEJIMA HIDENOBU)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号: 30304885

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

城 圭一郎 (JOH KEIICHIRO)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号: 90124809

東元 健 (HIGASHIMOTO KEN)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：30346887

久郷 裕之 (KUGOH HIROYUKI)

鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40225131

古関 明彦 (KOSEKI HARUHIKO)

理化学研究所・免疫器官形成研究グルー

プ・グループディレクター

研究者番号：40225446

(3) 研究協力者

八木 ひとみ (YATSUKI HITOMI)

佐賀大学・医学部・技術専門職員