

# 学位論文要約

Oct motif variants in Beckwith-Wiedemann syndrome patients disrupt maintenance of the hypomethylated state of the *H19/IGF2* imprinting control region

(ベックウィズ-ウィーデマン症候群患者のOctモチーフバリエーションは、*H19/IGF2* インプリント制御領域の低メチル化状態維持機能を妨げる)

(著者：久保修一、村田千洋、岡村華世、酒瀬川琢、櫻井千恵、初沢清隆、堀直裕)

令和2年 FEBS Letters 594巻 1517頁～1531頁

*H19/Igf2*インプリント遺伝子座では、*H19*遺伝子上流に存在するインプリント制御領域(ICR)で異なるDNAメチル化状態が形成されており、*Igf2*はICRが高メチル化状態である父方アレルから転写され、*H19*はICRが低メチル化状態である母方アレルから転写されている。ヒトやマウスの発生過程において、父母由来アレルで異なるICRメチル化状態形成に不備が生じると、*H19*と*IGF2*遺伝子の転写バランスが乱れる。ヒトでは、母方アレルICRに生じた異常メチル化は、先天性過成長症であるBeckwith-Wiedemann症候群(BWS)発症の原因との関連が報告されている。

先行研究で、マウスのICR内に存在する転写因子Sox2、Oct3/4結合配列(S0 motif)が、未分化細胞においてICRの広域に生じるDNA脱メチル化に必要な配列であり、またマウス個体において母方ICR低メチル化状態の維持に必要な配列であることが明らかにされている。S0 motif様の配列は種間で保存されており、ヒトのICR内には2つのSOX2結合motif様配列(S1、S2)と3つのOCT3/4結合配列(r0、01、02)で構成されたS0 motif様配列が存在する(hD1)。

近年、母方ICRの高メチル化異常を伴うBWS患者において、r0、01内に複数の一塩基バリエーションが生じている例が報告された。hD1がマウスのS0 motifと同様にICRの脱メチル化に必要な配列であれば、ICRの高メチル化異常は、バリエーションがDNA低メチル化状態維持機構を阻害したために生じた可能性があるが、これらの関連性については未解明であった。

## 方法

DNA脱メチル化誘導活性の解析は、hD1内の01、02、S1、S2に各々OCT3/4、SOX2の結合を抑制する変異(コンセンサス変異)を加えたDNA断片と、r0、01をBWS患者から見出されたバリエーションに置換したDNA断片(約250bp)を用いて行った。250bpの断片をプラスミドに挿入後、*HpaII*メチル化酵素によりメチル化処理して、P19細胞に導入した。3日後に回収し

たプラスミドのメチル化状態の変化は、サザンブロットィング法を用いて解析した。ICR広域のメチル化状態の制御に対するバリエーションの影響の解析には、r0、01をBWS患者のバリエーションに置換したICR断片(約2 kb)を用いて行った。2 kbの断片をプラスミドに挿入後、*HpaII*メチル化酵素によりメチル化処理してP19細胞内の単一の染色体領域(ROSA26座)に組換え導入した。2週間後に回収したゲノム内ICRのメチル化状態の変化は、DNAメチル化感受性酵素による切断後にPCR法でICR部位を増幅させる方法(MSRE-PCR法)とバイサルファイトシーケンシング法を用いて解析した。

## 結 果

hd1を含む250bpのDNA断片は、プラスミド上で脱メチル化誘導活性を示し、その活性はBWS患者のr0、01内に存在する3種類の一塩基バリエーション置換によって強く抑制された。また、BWS患者においてバリエーションが確認されている01のコンセンサス変異も脱メチル化誘導活性の有意な抑制を示した。一方でバリエーションが確認されていないS1、S2や02のコンセンサス変異では、脱メチル化誘導活性の抑制が軽度であった。さらにr0、01内のバリエーションは、ROSA26部位に組換え導入されたICRの広範囲に生じる DNA 脱メチル化を抑制し(約1.5 kb)、DNA 脱メチル化が抑制された領域にはメチル化の蓄積が生じた。

## 考 察

母方ICRが異常な高メチル化を示すBWS患者に見出されたr0、01の一塩基バリエーションおよび01のコンセンサス変異と比較して、S1、S2、02のコンセンサス変異で脱メチル化誘導活性の抑制が軽度であったことは、脱メチル化の抑制レベルの差がICRのメチル化蓄積に影響を与える可能性を示している。またICR内には、母方ICRの低メチル化維持および*H19/IGF2*遺伝子の転写制御に必須であるCTCF結合配列(CBS)が種間で保存されており、マウスではこれらの機能がCBSのメチル化に伴うCTCFの結合不良によって抑制されることが知られている。r0、01の一塩基バリエーションにより、CBSを含む広範なICR領域においてメチル化が蓄積したことから、hd1によるCBSのメチル化の阻害がBWS発症の抑制に重要な役割を果たしていると考えられる。

## 結 論

ヒトのOCT3/4結合配列はICRの低メチル化形成・維持に機能する配列であり、BWS患者から見出されたr0、01の一塩基バリエーションは、ICRの低メチル化状態維持機構を阻害するものであることを細胞レベルで明らかにした。本研究結果は、母方ICRで高メチル化異常が

生じる分子機構の解明につながる知見となることが期待される。