

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659156

研究課題名(和文) 相同染色体上の遺伝子領域間三次元核内配置と遺伝子発現に関する研究

研究課題名(英文) The three-dimensional distances between the genes on each homologous chromosome in each cell as nuclear organization and genomic expression of the imprinted gene.

研究代表者

涌井 敬子 (WAKUI, Keiko)

信州大学・医学部・講師

研究者番号：50324249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、相同染色体上の遺伝子領域間三次元核内配置が、エピジェネティックメカニズムとして遺伝子発現に影響する、という仮説の検証をめざした。

片親性発現を示す15q11.2-q12領域に座位する発現パターンの異なるSNRPNとUBE3Aの遺伝子間距離を、正常同一個人由来の3細胞種を対象に3D-FISH法にて計測し、いずれの細胞も相同染色体間で差があるという結果を得た(Kawamura et al., 2012)。

さらに距離の違いと発現の関係について直接検証するため、父性由来発現のSNRPN遺伝子についてRNA-FISH法による単一細胞の発現解析後、連続して三次元距離を計測する方法の確立を試みている。

研究成果の概要(英文)：This study is motivated to verify that gene-to-gene spatial positioning affect genomic function as epigenetic mechanism.

We focused on 15q11.2-q12, one of the known imprinted region, and measured 3D inter-gene distances between SNRPN and UBE3A genes on each homologous chromosome in each cell of the three different cell types from the same individual. And we have demonstrated that the distances were significantly different between alleles in all cell types (Kawamura et al., 2012).

Since then we have been trying to establish the sequential RNA and DNA FISH method as a single-cell gene expression analysis; which proceed sequentially from detection RNA signals of paternally expressed SNRPN gene to measurement of 3D distances of SNRPN-UBE3A genes in the same nucleus, in order to confirm the direct relationship between the differences of 3D distances of the genes and gene expression of SNRPN.

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：三次元核内配置 遺伝子発現 エピジェネティクス インプリンティング 相同染色体 3D-FISH RNA-FISH 単一細胞解析

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患は、染色体や遺伝子といったゲノムの量的あるいは構造の変化に伴い、責任遺伝子の発現や機能が影響をうけることによる、メンデル遺伝形式による発症がメカニズムとして知られている。そして、細胞を培養し、分裂中期の染色体を得て顕微鏡下に観察する細胞遺伝学的解析法や、DNA を抽出して責任遺伝子の塩基置換等を確認する分子遺伝学的解析法などを用いた遺伝学的検査が診断に応用されている。しかしながら、責任遺伝子が同定されていない疾患もまだまだあり、また臨床的に診断可能で責任遺伝子も同定されている遺伝性疾患でも、症例によっては必ずしもゲノムの変異を特定できない場合もある。

そのような症例の一部は、マイクロアレイや次世代シーケンサーといった全ゲノムを対象とすることが可能な遺伝学的解析手法の技術革新により、従来の分裂像を用いた核型分析では検出困難であった数 Mb 以下のゲノムのコピー数変化を伴う染色体異常症の診断や、特に遺伝的異質性の高い疾患における遺伝子変異の検出率を大幅に向上させることが可能となってきた。

また、インプリンティングなど、ゲノムの一次構造の変化を伴わない発現への影響、いわゆるエピジェネティックなメカニズムによる疾患発症も明らかにされてきて、こちらも網羅的遺伝学的解析が実施可能となってきた。

研究代表者は、先天異常の染色体異常症例の解析に携わっており、ゲノムの一次構造の変化が特定できない遺伝性疾患のなかに、染色体の核内配置の変化により遺伝子発現が影響され発症に結びつくといった、エピジェネティックな新たな発症メカニズムを証明したいと考えた。遺伝子の担体である染色体は、構造遺伝子が主に発現する G0 期には高度に区画化され互いに混ざりあわない「染色体テリトリー」と称される規則性のある核内配置をとっているが、核内での染色体はそれぞれある程度位置が決まっており、おおまかには遺伝子密度の高い染色体は核の中心に、遺伝子密度の低い染色体は核膜近くに位置している傾向があること、核膜の近くに位置する遺伝子は不活性であることが多いこと、がん細胞などにおいて、遺伝子の発現状態によって当該遺伝子の空間配置が変化している可能性があること、などの知見が明らかにされてきていたことによる (Cremer T & Cremer C, 2001)。

そのような背景もあり、数年前より遺伝子の核内三次元配置を相同染色体ごとに計測する 3D-FISH 法を用いた解析に取り組んできた。そして、先行研究として遺伝子の片親性発現が Prader-Willi 症候群 (PWS) と Angelman 症候群 (AS) の発症に影響していることが知られている、15 番染色体のインプリンティング領域 q11.2-q12 上の *SNRPN* 遺伝子と *UBE3A* 遺伝子をターゲットとして、正常 B リンパ芽球様細胞株 (LCLs) における核内三次元相対距離を 2 色 3D-FISH 解析で計測し、相同染色体間の遺伝子間距離に差がありそうだという実験結果を得ていた (2008

～2010 年 基盤研究(C), 代表: 涌井敬子, 課題番号: 20590328)。その差が、染色体の親由来と関連している可能性があると考えられたが、2 点間の距離計測では確認できるとは言い難く、さらにどちらの親由来染色体を計測しているかについても識別できていなかった。三次元距離の差と染色体の親由来について直接検証したいと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

遺伝性疾患において、疾患関連遺伝子の三次元核内配置の変化と遺伝子発現すなわち疾患発症が関連している場合がある、という仮説の検証を目的とした。

親由来により発現の異なることが知られている遺伝子をターゲットに、相同染色体それぞれについて特定領域の三次元核内配置として相対距離を計測し、その距離が確かに相同染色体間で差があるかどうかを評価する。差があることが確認できたなら、さらにその差が遺伝子発現と関係しているかを直接確認する解析手法の確立と実施をめざす。

3. 研究の方法

(1) 正常細胞における *SNRPN*, *UBE3A*, *GABRB3* 遺伝子の 3 色 3D-FISH 法による核内遺伝子間相対距離計測

対象の正常細胞を三次元構造を維持して固定した標本に、先行研究で用いていた父性発現の *SNRPN*、組織特異的母性発現の *UBE3A* に加え、両親性発現の *GABRB3* 遺伝子の計 3 遺伝子領域を対象プローブとし、それぞれ色の異なる蛍光色素で標識した 3 色 3D-FISH 法を実施した。共焦点レーザースキャン顕微鏡 (Zeiss) で画像をスキャンし、画像解析 software “IMARIS” (Zeiss) を用いて、各プローブの三次元座標から遺伝子間距離を算出した。IMARIS に新たにオプションとして加わった “MeasurementPro” と “Cell” の機能により、それまで同時計測は 2 点間の距離が限界であった三次元距離が、3 色で区別した 3 座標をそれぞれ特定し同時に 3 座標間のそれぞれの距離を算出することが可能となったことで、本法を実施することができた。

解析対象試料は、当初 1 個人の正常 LCLs のみであったが、細胞の種類による差の有無を確認するため、同一個人由来の皮膚線維芽細胞株 (FBs) を加え、さらに細胞周期の影響のない同一個人由来の末梢血から分離した単核球細胞 (PBs) も追加解析した。さらに個人差の有無を確認するため、異なる同一個人由来の LCLs と PBs の解析も追加し、細胞種間の差についても検討した。既報告の核内配置解析は 20 細胞程度のものが多かったが、本法では 50 細胞ずつ解析した。

(2) RNA-DNA 連続 3D-FISH 解析法確立の試み

正常、および母性ダイソミーによる発症が確認されている Prader-Willi 症候群 (PWS-UPD) 患者、父性ダイソミーによる発症が確認されている Angelman 症候群 (AS-UPD) 患者の LCLs を用

いて, *SNRPN* と *UBE3A* 遺伝子の 2 色 RNA-FISH 法による相同染色体の発現パターンを可視化した。

その後, 同標本に連続して 2 色 DNA-FISH 法による相同染色体を区別した *SNRPN-UBE3A* 三次元距離計測を実施した。

4. 研究成果

(1) 正常細胞における *SNRPN*, *UBE3A*, *GABRB3* 遺伝子の 3 色 3D-FISH 法による核内遺伝子間相対距離計測

一次構造上, *SNRPN*, *UBE3A*, *GABRB3* という順に座位している 3 つの遺伝子は, 核内では非直線状に配置していることが, 算出した距離情報からのみならず, 可視化した画像上でも確認された (図 1b, c)。

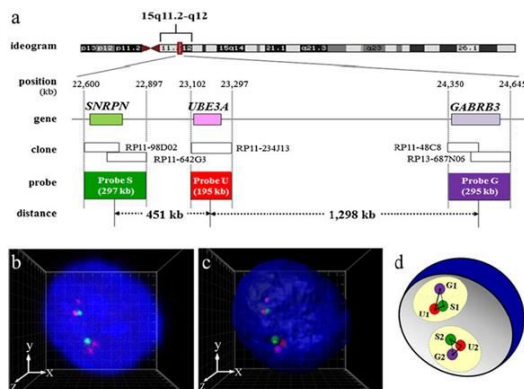


図 1. *SNRPN*, *UBE3A*, *GABRB3* 遺伝子をターゲットとした 3 色 3D-FISH 解析のプロブデザイン (a) と, 正常 LCLs にハイブリダイズした取得画像の一例 (b, c) およびその概要図 (d)。(Kawamura et al., 2012) より引用。

また, 各遺伝子間距離は同一細胞内の相同染色体間で差があり, 一次構造上, *SNRPN-UBE3A* 遺伝子間距離に比べて 3 倍弱距離が離れているため計測誤差が大きいと考えられる *UBE3A-GABRB3* 遺伝子間距離のほうが, *SNRPN-UBE3A* 遺伝子間距離より相同染色体間の差が小さいという結果を得た (図 2a)。また核内において *GABRB3* は *UBE3A* よりも *SNRPN* までの距離が近いという結果も得た。

SNRPN は材料として用いた LCLs でも父由来発現が保存されていると言われており, *UBE3A* は母由来発現を有するが LCLs では両親性発現と言われている。*GABRB3* はもともと両親性発現の遺伝子である。3 点間距離を同時計測したことにより, 染色体の親由来により発現が異なる *SNRPN* を含む遺伝子間距離が, 親由来による発現に差が無い遺伝子間距離に比べて相同染色体間距離の差が大きかったということを明らかにでき, その差が *SNRPN* の発現パターンに影響されている可能性を一定の根拠をもって示せたと考えた。

さらに, 同一染色体上の一次構造上の距離と三次元配置としての遺伝子間距離を比較すると, *SNRPN-UBE3A* 遺伝子間距離の差は, 片方のアレルが緩んでいる状態と考えられた (図 2b)。

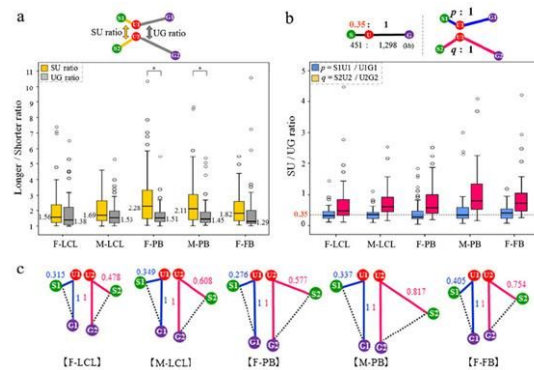


図 2. 同一個人由来の 3 細胞種 (LCLs, PBs, FBs), 別の同一個人由来の 2 細胞種 (LCLs, PBs) の, *SNRPN*, *UBE3A*, *GABRB3* 遺伝子の三次元遺伝子間距離の相同染色体間の比較 (a), 相同染色体内の領域間の比較 (b), およびそれらの中央値から算出した立体配置の模式図 (c)。(Kawamura et al., 2012) より引用。

今回, 解析に用いた異なる 3 つの細胞種 (LCLs, PBs, FBs) すべてにおいて, *SNRPN*, *UBE3A*, *GABRB3* の遺伝子の空間配置は, 同様の規則性を有することが認められた。異なる同一個人由来の LCLs と PBs についても同様の傾向であった (図 2c)。ただし, 実遺伝子間距離は細胞種によりやや異なる傾向を認めたため, 個人間の差を確認する際は同種細胞を用いることが必要と考えられた。

以上の結果は, ゲノムの一次構造は同じであるにも関わらず, 少なくとも染色体の親由来により発現の異なる遺伝子のクラスターを形成している 15q のインプリンティング領域においては, 核内三次元遺伝子間距離が親由来 (遺伝子発現) により異なるという現象が顕れている可能性を示唆するものと考えられた。また, 遺伝子間距離はクロマチン凝縮とも関係しているため, クロマチン凝縮と遺伝子発現にも何らかの関連がある可能性が推測された。

以上の結果を, 学会 (European Human Genetics Conference 2012) および論文 (Kawamura et al., 2012) にて発表した。研究協力者である河村を発表者として登録した European Human Genetics Conference の演題は, 同学会の Young Investigator Awards の候補として選出され口演発表の機会を得た。

(2) RNA-DNA 連続 3D-FISH 解析法確立の試み

正常 LCLs を用い, *SNRPN* と *UBE3A* 遺伝子領域をそれぞれプロブとした RNA-FISH 法を習得し, *SNRPN* 遺伝子の RNA シグナルが相同染色体の 1 本のみ, *UBE3A* は両相同染色体にシグナルが観察されるという想定されたパターンが多いことを確認した。しかしながら, 他パターンも観察されたため, 細胞周期による影響を考え, 細胞周期が影響しない G0 期に相当する正常末梢血単核球細胞を用いた RNA-FISH 解析も試みたが, 同様の結果であった。

さらに, 母性ダイソミーの PWS-UPD 患者, 父性ダイソミーによる AS-UPD 患者についても同

法を実施し, *SNRPN* 遺伝子の RNA シグナル数は, PWS-UPD 患者が 0, AS-UPD 患者が 2, という想定していたパターンが主であることを確認し, 基本的には LCLs および末梢血単核球細胞において, *SNRPN* は片親発現を, *UBE3A* は両親発現を示すことを確認した. しかしながら他パターンもそれぞれ一定の割合観察されたことは, RNA-FISH 解析により検出するシグナルが通常の DNA-FISH 法で得られるシグナルと異なり大きさが様々ということからも, 発現の度合いと相関している可能性, すなわち最近注目されている“発現の揺らぎ”の顕れとも考えられた. 以上の結果を, 学会(日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012)にて発表した.

次に, *SNRPN* と *UBE3A* の三次元距離が相同染色体間で差があるという現象が, *SNRPN* の父性発現と関係しているかどうかを直接検証するため, RNA-FISH 法により *SNRPN* が発現している相同染色体を確認後, 連続して DNA-FISH 法による *SNRPN-UBE3A* 遺伝子間三次元距離を計測し, 距離の長い染色体あるいは短い染色体のいずれかが, 発現している相同染色体と一致するかどうかの直接検証を試みた. しかしながら, RNA-FISH で必ずしも典型的なシグナルパターンが得られない細胞も確認されること, 一旦カバーガラスで封入した標本のカバーガラスを剥がして同じ標本に DNA-FISH する手法のため, RNA シグナルパターンを確認した細胞が剥がれてしまったり, 該当細胞を確認しても核の形態が歪んだりして核内配置の計測に適さない細胞となってしまうといった様々な理由により, 本研究期間内に RNA-DNA 連続 3D-FISH 解析法を確立することはできなかった.

近年, 単一細胞解析も注目され, 解析法の開発も進展しているが, 相同染色体を区別して核内配置と遺伝子発現の関係を確認するには, 本研究で計画した RNA-DNA 連続 3D-FISH 解析法等による分子細胞遺伝学的解析が必要である. 条件設定を変更した検討や, 他領域への RNA-FISH 法の応用などを実施しながら, 新たに開発された解析法が応用できないか等についても情報収集し, 引き続き目的としていた相同染色体上の遺伝子領域間三次元相対距離と遺伝子発現を直接検証するための解析法を確立すること, その方法により結果を得ることをめざして研究を継続している.

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)

Kawamura, R., Tanabe, H., Wada, T., Saitoh, S., Fukushima, Y., Wakui, K. (2012)
Visualization of the spatial positioning of the *SNRPN*, *UBE3A*, and *GABRB3* genes in the normal human nucleus by three-color 3D fluorescence *in situ* hybridization.

Chromosome Res., 20, 659-672. 査読有

(学会発表)(計 3 件)

Iha, W., Kawamura, R., Yamaguchi, T., Fukushima, Y., Wakui, K.(代表).
Visualization of *XIST* expression in a female with structural X chromosome abnormality: Single-cell analysis by three-color interphase RNA-FISH. European Human Genetics Conference 2014, 2014, June, 1, Milano, Italy

河村理恵(代表), 齋藤伸治, 田辺秀之, 和田敬仁, 福嶋義光, 涌井敬子. RNA-FISH 法を用いた *SNRPN-UBE3A* 遺伝子の発現パターン解析. 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012.10.27, 東京

Kawamura, R.(代表), Tanabe, H., Wada, T., Saitoh, S., Fukushima, Y., Wakui, K.
Nonlinear and nonrandom genome organization of *SNRPN*, *UBE3A*, and *GABRB3* in the normal human nucleus by three-color 3D-fluorescence *in situ* hybridization. European Human Genetics Conference 2012, 2012, June, 24, Nürnberg, Germany

(図書)(計 1 件)

涌井敬子. メディカル ドゥ, 臨床細胞遺伝学, 遺伝子医学 MOOK 別冊 いまさら聞けない『遺伝医学』, 2014, 25-41

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

田辺 秀之(TANABE, Hideyuki)
総合研究大学院大学・先端科学研究科・准教授
研究者番号:50261178

(3)連携研究者

福嶋 義光(FUKUSHIMA, Yoshimitsu)
信州大学・医学部・教授
研究者番号:70273084

齋藤 伸治(SAITOH, Shinji)
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号:00281824

(4)研究協力者

河村 理恵(KAWAMURA, Rie)
信州大学医学部・アソシエイト研究員(2012年度), リサーチレジデント(2013年度)
研究者番号:なし