

Christophe K. Mapendano 論文内容の要旨

主 論 文

Expression of the *Snurf-Snrpn* IC transcript in the oocyte
and putative role in the imprinting establishment of the mouse 7C imprinting domain

卵母細胞における *Snurf-Snrpn* 刷り込み調節中枢転写産物の発現と
マウス 7C 刷り込みドメインの刷り込み機構における役割

Christophe K. Mapendano, Tatsuya Kishino, Kazumi Miyazaki, Shinji Kondo,
Koh-ichiro Yoshiura, Yoshitaka Hishikawa, Takehiko Koji, Norio Niikawa, Tohru Ohta

Journal of Human Genetics, 2006 年 (in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻
主任指導教員：新川詔夫 教授

緒 言

ゲノム刷り込みは親起源依存性の遺伝子の発現差やクロマチン構造の違いを表す現象である。ヒト染色体 15q11-q13 における Prader-Willi 症候群 (PWS) と Angelman 症候群 (AS) 領域 (マウスにおける相補領域である 7C 領域) のゲノム刷り込み制御は、刷り込みドメインに存在する 2 つの刷り込み調節中枢 (PWS-IC と AS-IC) の共同支配化にあることが知られている。PWS-IC (PWS-SRO と同義) はヒト *SNURF-SNRPN* およびマウス *Snurf-Snrpn* 遺伝子のエクソン 1 を含む領域であり、体細胞では刷り込みドメインの父性エピジェノタイプの維持に働き、一方 AS-IC (AS-SRO) はシス作動性因子として、雌性生殖細胞系または初期発生胚細胞の PWS-SRO における 1 次母性マークの成立に関与している。マウス *Snurf-Snrpn* 遺伝子プロモータ上流のこれらの刷り込み調節中枢付近から発現している IC 転写産物は、脳では父性発現している。ヒトとマウスでの発現パターンやゲノム構造はよく保存されていることから、これらの転写産物は刷り込みドメインにおける 1 次母性マークの成立に重要な役割を果たすと推定されている。1 次母性マークは雌性生殖細胞系において確立する。従って 1 次母性マークが IC 転写産物によって確立または関与するならば、IC 転写物は雌性生殖細胞系で発現することが必須である。しかし、雌性生殖細胞系における IC 転写産物の動態は不明である。

本研究は、マウス IC 転写産物の雌性生殖細胞系における発現を調べ、マウス 7C 領域の刷り込み機能に対する役割を明らかにする目的で行った。

対象と方法

(1) RT-PCR：3 週齢マウスの脳・心・肝・骨格筋・精巣・腎・卵巣組織から RNA を抽出し、cDNA を合成した後、マウス *Snurf-Snrpn* および IC 転写産物のエクソン U1, 1, 3 プライマーを用いて RT-PCR を行った。PCR 産物をプラスミドでクローン化し、塩基配列を決定した。IC 転写産物の量的解析はリアルタイム PCR で検討した。

(2) 卵母細胞と卵丘細胞の収集：10 週齢の雌マウスをホルモン処理で過剰排卵させ、卵丘細胞のない中期 II 卵母細胞と、卵母細胞のない卵丘細胞を収集し、RT-PCR 解析を

行った。

(3) *In situ* hybridization (ISH)：上記マウスの卵巣をパラフィン固定し、組織切片をジゴキシゲニン標識した *Snurf-Snrpn* エクソン U2 に相補的アンチセンスプローブを用いた ISH 解析を行った。

結 果

(1) 卵巣組織における IC 転写産物の発現：マウス IC 転写産物の発現が脳に局限しているとの報告があるが、本研究では脳および卵巣に原局発現していることが明らかとなった。脳における発現量は卵巣の 7 倍であった。一方、*Snurf-Snrpn* 遺伝子は調べた組織全てで発現していたが、脳で最も高値で、次いで心・卵巣であった。塩基配列決定の結果、RT-PCR 産物の *Snurf-Snrpn* エクソン U1 はエクソン 1 をスキップしエクソン 2 に連結していた。つまり、*Snurf-Snrpn* 遺伝子の選択的エクソンからの IC 転写産物の発現が確認された。

(2) IC 転写産物の細胞特異的発現：培養ニューロン、グリア細胞、線維芽細胞、卵母細胞、顆粒膜細胞を随伴した卵母細胞における IC 転写産物の発現量を解析した結果、IC 転写産物はニューロン（卵母細胞の 7 倍）、卵母細胞（顆粒膜細胞を随伴した卵母細胞の 1 / 3 量）、顆粒膜細胞で発現していた。

(3) マウス卵巣における IC 転写産物の発現局在：強い ISH シグナルがグラフ濾胞の卵母細胞と顆粒膜細胞に局在して観察された。非標識プローブを用いた競合 ISH で、シグナルの特異性が確認された。

結 語

以上の結果によって、雌性生殖細胞系における IC 転写産物の発現を確認し、転写産物は、*Snurf-Snrpn* プロモータ上流の別のプロモータを用いていることが再確認された。すなわち雌性生殖細胞系において選択的にスプライスされる *Snurf-Snrpn* 転写産物が考えられる。しかし KO マウス実験から、*Snurf-Snrpn* 蛋白はマウスの正常発生には必須ではないことが知られているので、IC 転写物は雌性生殖細胞系に必要な *Snurf-Snrpn* 蛋白を発現するための選択的転写産物とは考えにくい。さらにこの IC 転写物の上流は、ヒトとマウスでは塩基配列は異なっている。しかし、重複したプロモーターや遺伝子構造、発現パターンはヒトとマウスで保存されている。すなわち、この IC 転写物は何らかの重要な役割を担っていると思われる。

雌性生殖細胞系における母性マークの成立に対して、AS-SRO に結合するトランス作用性因子の存在がこのドメイン全体のエピジェネティクスパターンを変える考えは否定できないが、本研究の結果は、IC 転写物が母性染色体上の PWS-IC のメチル化に関するシスに作用する何らかの因子であるという仮説を支持するものである。