

# 先天異常症候群におけるメチル化・ヒドロキシメチル化

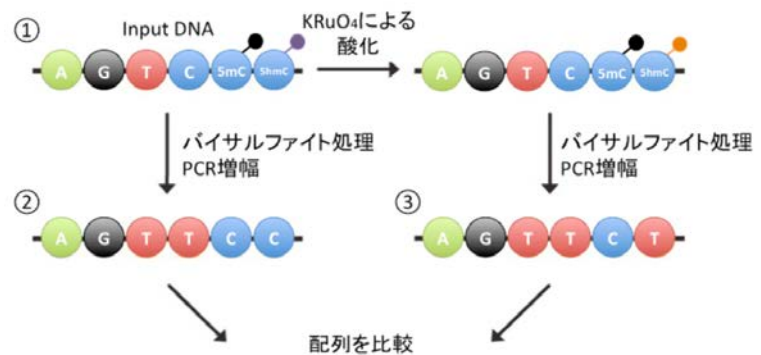
慶應義塾大学 医学部 小児科学教室  
山澤 一樹

## 1. 背景と目的

シトシン塩基 (C) のメチル化は最も詳細に解析されているゲノムのエピジェネティック修飾である。インプリンティング遺伝子の発現調節を司るメチル化可変領域 (DMR) におけるメチル化異常 (エピ変異) は、ヒトインプリンティング異常症の発症原因となる。近年、ゲノム DNA 中に存在が確認されたヒドロキシメチル化シトシン (5hmC) は、メチル化シトシン (5mC) の酸化産物である。5mC→5hmC→C という脱メチル化カスケードの存在が証明されたことから、5hmC は DNA 脱メチル化機構の中間代謝産物であると考えられ、「第 6 の DNA 塩基」として注目されている。しかしながら従来のバイサルファイト法 (BS) による解析では 5mC と 5hmC を区別することができず、インプリンティング異常症において 5hmC の果たす役割は不明である。本研究の目的は、DMR における 5hmC の分布を解明し、5hmC がヒトインプリンティング異常症の発症にどのように関与しているかを明らかにすることである。

## 2. 対象と方法

エピ変異により発症したヒトインプリンティング異常症例を対象とする。5hmC の解析には酸化バイサルファイト法 (oxBS) を用いた。通常の BS 法を行うと、C が T に変換される一方で、5mC および 5hmC は変換されず C と判定される。oxBS 法では、まず過ルテニウム酸カリウム (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) を用いた酸化反応によって 5hmC のみがホルミルシトシン (5fC) に変換



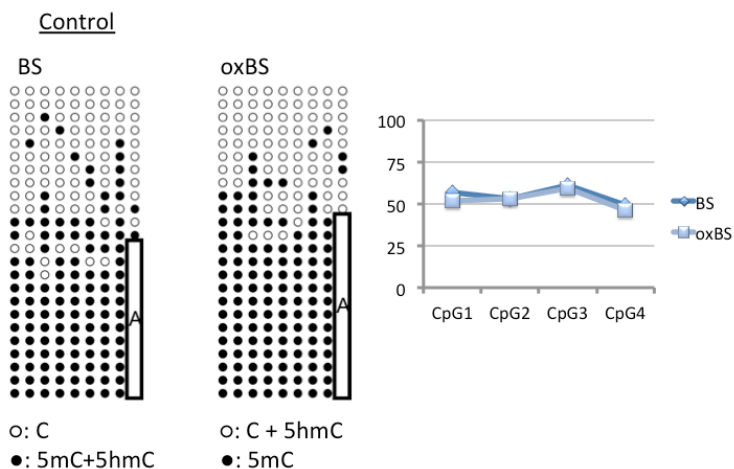
	① 未処理	② バイサルファイト処理	③ K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 酸化+バイサルファイト処理
C	C	T	T
5mC	C	C	C
5hmC	C	C	T

される。引き続いてのバイサルファイト処理により、C と 5fC が T に変換される一方で、5mC は変換されず C と判定される。従って、①元の配列、②バイサルファイト処理、③K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>酸化+バイサルファイト処理、の三者の配列を比較することにより、一塩基の解像度で C、5mC、5hmC の同定が可能である。Pilot study として、IG-DMR の高メチル化のエピ変異により発症した 14 番染色体父親性ダイソミー (upd(14)pat) 症候群患者の末梢血 DNA を用い、oxBS 処理サンプルと BS 処理サンプルをサブクローニングおよびパイロシーケンスにより解析し、IG-DMR における 5mC および 5hmC の分布を正常コントロールと比較検討した。

### 3. 結果

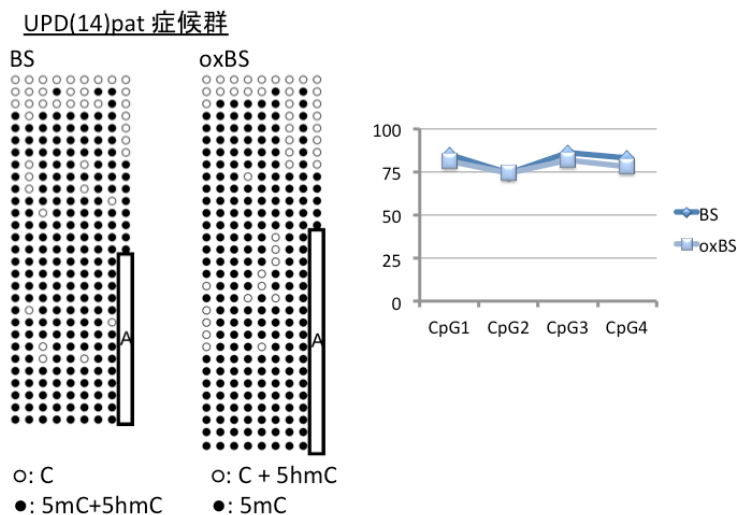
#### 正常コントロール

サブクローニングの結果、正常コントロールの IG-DMR において、父親由来アレルに 5mC が、母親由来アレルに C が存在したが、5hmC はほとんど検出されなかった。パイロシーケンスの結果、BS 法と oxBS 法のメチル化指数に有意な差は認められず、5hmC はほとんど存在しないことが判明した。



#### upd(14)pat 症候群患者

サブクローニングの結果、患者 IG-DMR においては、母親由来アレルに 5mC の増加を確認したが、5hmC はやはりほとんど検出されなかった。パイロシーケンスの結果、BS 法と oxBS 法のメチル化指数に有意な差はやはり認められず、5hmC はほとんど存在しないことが判明した。



### 4. 考察

正常コントロールおよび高メチル化エピ変異患者末梢血検体において 5hmC はほとんど存在していない可能性が示された。現在、解析箇所および症例数を増やし解析を進めている。解析上の問題として、oxBS 処理を行う試薬が非常に高価であるうえ、 $\text{KRuO}_4$  による酸化反応が DNA に与えるダメージが想像以上に大きく、oxBS 処理後のプロセスが困難である点が挙げられる。より低コストで DNA ダメージの少ない解析方法を開発すべく、試行錯誤している。

また、末梢血にはそもそも 5hmC 含有量が少ないと思われる。マウスでは、神経組織に 5hmC が多く含まれることが報告されている。患者脳組織を取得することは困難であるため、現在インプリンティング異常症患者の線維芽細胞由来 iPS 細胞を樹立し、それを神経細胞に分化させて 5hmC の解析を行う研究も並行して進行中である。

## 5. 発表論文、参考文献

Radford EJ, Ito M, Shi H, Corish JA, Yamazawa K, Isganaitis E, Seisenberger S, Hore TA, Reik W, Erkek S, Peters AH, Patti ME, Ferguson-Smith AC. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. **Science** 2014;345(6198):1255903.

Yamada M, Yamazawa K (corresponding author), Sekiguchi S, Shinjoh M, Tomita K, Takenouchi T, Takahashi T. A pediatric case of antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by *Klebsiella oxytoca*. **Glob Pediatr Health** 2014 (in press).

Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, Kagami M, Yamazawa K, Ogata T. Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome. **Plos One** 2013;8(3):e60105.