

氏 名 新田 洋久

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1686 号

学位授与の日付 平成26年3月20日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Genetic and functional analysis of ZBTB24, which is mutated in
type 2 ICF syndrome

論文審査委員 主 査 教授 大久保 公策
教授 角谷 徹仁
教授 相賀 裕美子
准教授 小出 剛
特別主管研究員 岡野 正樹 理化学研究所

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Centromeric and pericentromeric regions of the genome are important for stable chromosome structure, sister chromatid separation, and proper chromosome segregation. These regions are composed of highly condensed repetitive DNA sequences and form constitutive heterochromatin during interphase. Centromeric and pericentromeric regions contain different repetitive sequences: human centromeric and pericentromeric regions contain α -satellite repeat and satellite-2 and -3 repeats, respectively, and corresponding mouse regions contain minor satellite repeat and major satellite repeat, respectively. Transcription of these repeats is epigenetically repressed, and disruption of this repression causes transcription of the repeats and aberrant chromosome segregation. DNA methylation is important for the epigenetic repression and stabilization of the constitutive heterochromatin formed at these repeats. However, the mechanisms of establishment and maintenance of DNA methylation at the satellite repeats remain unclear. In mammals, there are three DNA methyltransferases, DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B. DNMT1 is a maintenance methyltransferase, which copies the pre-existing methylation patterns from the parental DNA strands to newly synthesized DNA strands during DNA replication. DNMT3A and DNMT3B are de novo methyltransferases, which methylate unmethylated DNA at CpG dinucleotides and create new methylation patterns.

Immunodeficiency, centromeric instability, and facial anomalies (ICF) syndrome is a rare autosomal recessive disorder that shows DNA hypomethylation at pericentromeric satellite-2 and -3 repeats in chromosomes 1, 9, and 16. ICF syndrome is classified into two groups: type 1 (ICF1) patients have mutations in the DNMT3B gene, and about half of type 2 (ICF2) patients have mutations in the ZBTB24 gene. Besides satellite-2 and -3 repeats, α -satellite repeats are also hypomethylated in ICF2. Importantly, all ICF1 patients have at least one hypomorphic DNMT3B allele perhaps because null mutants are lethal. In contrast, some ICF2 patients are null mutants for ZBTB24. ZBTB24 protein belongs to the BTB-zinc finger domain family, which contains a BTB domain, an AT-hook domain, and eight C2H2-type zinc finger domains, but its biological function is totally unknown. Although *Dnmt3b* null knockout mice show embryonic lethality at around E14.5-16.5 with multiple tissue defects, mice homozygous for ICF1 hypomorphic mutations develop to term and show phenotypes that are reminiscent of ICF1 patients. Therefore, DNMT3B has been experimentally proved to be the causative gene for ICF1. However, the role of ZBTB24 in satellite repeat methylation is unknown and there is no functional evidence that ZBTB24 is a causative gene for ICF2.

In this study, I determined the sequences of ZBTB24 in two Japanese and one Cape Verdean ICF2 patient, and found three novel ZBTB24 mutations. A Japanese patient was homozygous for a novel missense mutation (C383Y), and a Cape Verdean patient was a compound heterozygote for a novel nonsense mutation (K263X) and a novel frameshift mutation (C327W fsX54). The second Japanese patient was homozygous for a previously reported nonsense mutation (R320X). The

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

C383Y mutation abolished a C2H2 motif in one of the eight zinc finger domains, and the other three mutations caused a complete or large loss of the zinc finger domains.

To examine the importance of the zinc finger domains, I performed immunofluorescent analysis with EGFP fusion proteins, and found that wildtype mouse *Zbtb24* localizes at constitutive heterochromatin in NIH3T3 cells. In contrast, *Zbtb24* mutant proteins possessing either of the mutations corresponding to C383Y and R320X are mislocalized from pericentromeric heterochromatin, suggesting that the zinc finger domains are required for proper intranuclear localization of this protein. Next, I sought a factor(s) that is required for the proper intranuclear localization of this protein. Wildtype *Zbtb24* properly localized at pericentromeric heterochromatin independent of DNA methylation and repeat sequences, indicating that ZBTB24 might recognize some structural components of the chromatin or RNAs contained in the chromatin.

Finally, I generated *Zbtb24* knockout mice to examine whether a lack of ZBTB24 causes the phenotypes of ICF2 patients. Although ICF2 patients homozygous for ZBTB24 null mutations are born alive, *Zbtb24* null mice were embryonic lethal at around E10.5. However, yolk sac cells of *Zbtb24* null embryos clearly showed hypomethylation in major and minor satellite repeats although the phenotype was less clear in embryonic tissues.. Therefore, I obtained the first experimental evidence that ZBTB24 is functionally involved in satellite repeat methylation. Furthermore, the results strongly suggested that ZBTB24 is a bona fide causative gene of ICF2. Altogether, this study will provide a basis for understanding the pathogenesis of ICF2 and the mechanisms involved in the formation of heterochromatin at the centromeric and pericentromeric satellite repeats.

Immunodeficiency, centromeric instability and facial anomalies (ICF) syndrome は免疫不全や顔貌異常を伴う常染色体劣性の遺伝性疾患であるが、その半分の症例(ICF-type1)はメチル化酵素の変異に起因することが知られていた。新田氏は残りの症例(ICF-type2)においてもヒトにおけるゲノムメチル化調節にかかわる遺伝子の関与を期待し、その原因同定を目指し研究を行った。研究開始当時は原因不明の遺伝病であったこと およびメチル化機構に関する知見を与えると期待できることの2点から、この研究課題設定は十分に理解できる。研究実施中に競合研究グループにより ICF-type2 の遺伝子同定が行われたことから、同グループが同定した原因遺伝子 *ZBTB24* を対象にして、独自の患者検体を用いた解析を行った。その結果、5例中3例の症例において当該遺伝子エクソンに新規変異を含む変異を検出し、我が国で確認された ICF-type2 の症例においても *ZBTB24* 遺伝子変異が原因となっている可能性が高いことを明らかにした。

さらに、ICF-type2 患者の *ZBTB24* 遺伝子で発見した変異は、機能不明の DNA 結合領域に集中していることに注目し、蛍光 EGFP キメラタンパク質を利用して細胞内局在を解析することで機能推定を行った。その結果、正常型のマウス *Zbtb24* 遺伝子がコードするタンパク質は核内で中心体周辺に分布したが、ICF-type2 患者と同型の変異を導入された *Zbtb24* 由来のタンパク質は核内で分散する局在異常を示した。

最後に当該遺伝子の機能消失変異（ジンクフィンガー欠損変異）をホモに導入したノックアウトマウスを作製して解析したところ、当該遺伝子の機能欠損型変異は胎生致死をひき起こした。さらなる解析により、この胚体細胞にはメチル化異常はないものの卵黄嚢組織ではセントロメア領域のメチル化が低下していることを示した。この結果は、当該遺伝子の機能欠損がサテライト領域のメチル化異常をもたらし、染色体機能異常の原因となっている可能性を示唆した。

この一連の研究は、ICF-type2 疾患の原因遺伝子が *Zbtb24* 遺伝子であることを強く示すとともに、その変異によって生じる *ZBTB24* 局在異常によって染色体の動原体およびその周辺のヘテロクロマチン領域の低メチル化が生じ、それにより引き起こされる染色体機能異常が ICF-type2 疾患の発症機序となっている可能性を示唆する成果である。今後、ICF-type2 疾患の発症機序をさらに理解し、また染色体セントロメア領域のサテライト配列のヘテロクロマチン化の機構を理解する上で重要な知見であると考えられる。以上のことから審査員全員で審査した結果、新田氏の本論文は本大学院における学位授与の水準を十分に満たす内容であると判断した。