GNAS インプリンティングの制御と破綻の分子基盤解明

Elucidation of the molecular basis of *GNAS* imprinting control and dysregulation

マサチューセッツ総合病院　　岩崎　順博

研究期間　　2023 年 4 月 20 日～2024 年 4 月 20 日

滞在研究機関　　Endocrine Unit, Department of Medicine,
Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School
50 Blossom St, Boston MA 02114, United States

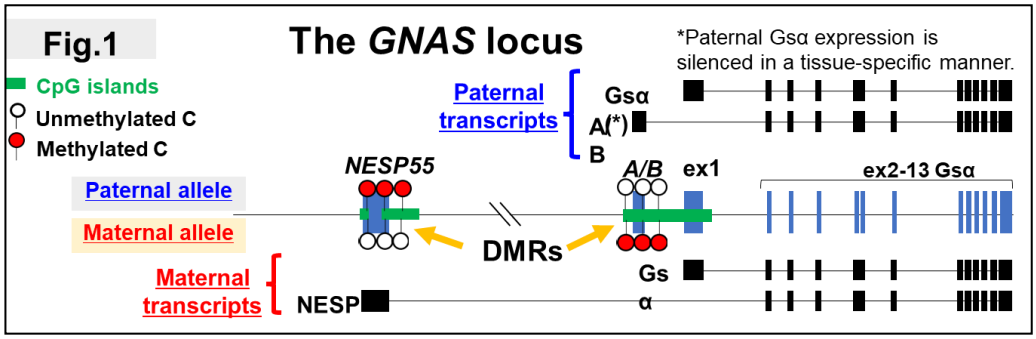
共同研究者等　　Drs. Murat Bastepe and Harald Jüppner

区分　　個人 B

GNAS is an imprinted locus encoding the stimulatory G protein α-subunit (Gsα), an essential signal transducer for G protein-coupled receptors. Several imprinted transcripts, including NESP, XL, and A/B, are expressed from *GNAS* differentially methylated regions (DMRs). Aberrant *GNAS* imprinting results in pseudohypoparathyroidism type 1B (PHP1B), a multihormone resistance disorder. Using human embryonic stem cell (hESC) models of PHP1B, we have recently identified a small region in the *STX16* locus that is pivotal for maternal A/B methylation by enhancing NESP55 transcription in the postzygotic period. In the current study, we further identified a region of diagnostic importance, *GNAS AS2*, which was hypomethylated in PHP1B patients with genetic alterations centromeric but not telomeric of this DMR. Since AS2 methylation depended on NESP transcription, its methylation levels categorized PHP1B epigenetic alterations and, thus, help identify the underlying molecular defect. Finally, we showed that *STX16* interacts with *GNAS* through allele-specific chromatin conformations in hESCs. In addition to NESP, it activates XL through the AS2 region. Upon differentiation of these cells, *STX16* lost its regulatory role, allowing the transition to a somatic cell-specific *GNAS* imprinting status. These findings revealed developmental stage- and parental allele-specific mechanisms dictating *GNAS* imprinting, which underly PHP1B pathogenesis.

研究目的

GNAS 遺伝子座は、ヘテロ三量体 G タンパク質を構成する Gsα を含む複数の転写産物をコードする。Gsα は副甲状腺ホルモン(PTH)受容体や甲状腺刺激ホルモン(TSH)受容体など多様な G タンパク質共役型受容体からのシグナル伝達を担い、その機能喪失あるいは獲得型変異が種々の内分泌疾患・腫瘍性疾患等で認められることから、医学的にも重要性である。Gsα は近位尿細管や甲状腺等、組織特異的に主に母方アレルのみが発現（父方アレル発現が抑制）するインプリント遺伝子である。このようなインプリント制御を受ける遺伝子の多くは個体の成長やホルモンシグナル等において重要であり、父・母アレル間で異なる繊細な発現量制御が必要だと考えられる。



GNAS 遺伝子座では、Gsα プロモーター自体は明らかなアレル特異的な可変メチル化領域（DMR）を持たないが、その上流に NESP, XL, A/B というエクソンが存在し、うち NESP プロモーターは父方、XL と A/B のプロモーターは母方のみがメチル化され、そのため NESP は母方、XL と A/B は原則的に父方から転写される（図 1）。これらのうち、A/B の父方発現が父方 Gsα 抑制に必要で、最も直接的に Gsα のインプリント発現を制御していると考えられる。実際に *GNAS* インプリント異常によって生じる偽性副甲状腺機能低下症 1B 型(PHP1B)では、全例で母方 A/B DMR メチル化の低下が認められる。これにより A/B は両アレル性に発現し、Gsα 発現は低下するため、PTH や TSH などのホルモンに抵抗性となるのである。つまり母方アレルの A/B DMR メチル化がどう制御され、なぜ PHP1B でメチル化が低下するのかが、*GNAS* インプリント制御及び PHP1B 発症機序を理解するための鍵となる。

A/B DMR メチル化の制御機構は長年不明であったが、A/B 低メチル化により PHP1B を家族性に発症する家系の連鎖解析により、*GNAS* から約 170 kb セントロメア側に存在する *STX16* 遺伝子の微小欠失があると、A/B メチル化が低下することが明らかにされた(Bastepe, et al. JCI 112, 1255, 2003)。しかしその後 20 年間、なぜこの領域の微小欠失により A/B メチル化が低下するのか不明であった。報告者はごく最近、*STX16* 遺伝子のイントロン 4 に *GNAS* エンハンサーが存在し、インプリント制御領域(ICR)として機能することを見出した(1)。このエンハンサーは初期胚特異的に *GNAS* 内の最もセントロメア側の NESP 転写を母方アレルで強力に誘導する。A/B はインプリント遺伝子座としては例外的に、一度配偶子形成時に確立したメチル化が受精後に低下・再メチル化され、この受精後の時期における A/B のメチル化維持に STX16-ICR のエンハンサーにドライブされた NESP 転写が必要であることが明らかになった(1)。この知見をもとに、下記の各項目に関して研究を進めた。

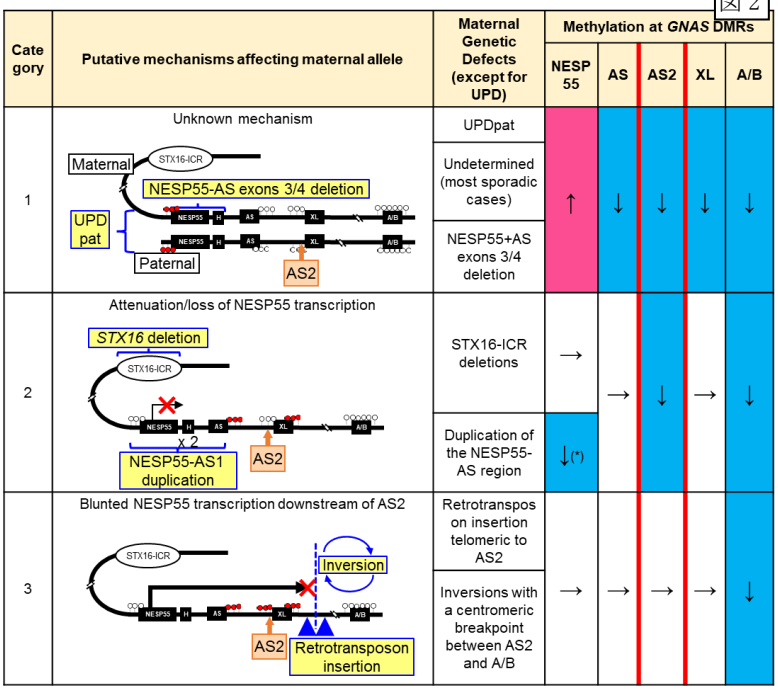
研究経過

■ 偽性副甲状腺機能低下症 1B 型の発症機序に基づく病型分類の確立

PHP1B の原因となる遺伝的異常は、*GNAS* インプリントに異常をきたすことから、それらはインプリント制御に重要なゲノム領域を含んでいると考えられる。一方、そのような異常は欠失や挿入、逆位等種々の構造異常があるうえ、20 番染色体上の *STX16-GNAS* の 200 kb 以上の広範囲に分布しており、それらの系統的分類はなかった。さらに PHP1B 症例は共通する A/B 低メチル化以外に NESP, AS, XL という他の DMRs において様々なメチル化状態を示し、これらのエピゲノム表現型が生じる病態生理学的機序も十分に理解されていなかった。そこで報告者は、まず上述の STX16-/NESP-ICR 欠損ヒト ES 細胞を用いた検討において、AS2 と呼ばれる領域が、STX16-/NESP-ICR 欠損による強い影響(脱メチル化)を受けることを見出した。従って AS2 のメチル化も、A/B と同様にこれらの ICR に依存とする領域だと考えられた。

さらに、豊富な PHP1B 症例のゲノムサンプルを解析し、遺伝的異常が AS2 領域よりセントロメア側で NESP 転写を抑制する場合のみ AS2 が低メチル化を示し、テロメア側で同転写を抑制する場合には AS2 の低メチル化が見られないことを見出した。以上の知見は受精後早期において STX16-ICR にあるエンハンサーに依存する NESP 転写が障害を受けることが PHP1B におけるインプリント異常の原因となるということを支持する所見であった。さらに、従来の A/B 低メチル化という PHP1B に共通するメチル化異常に加え、AS2 メチル化パターンによって原因

図 2

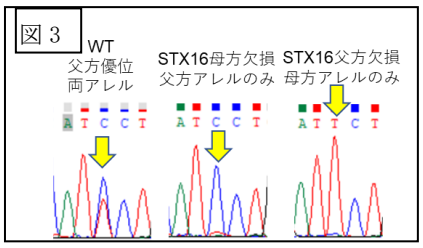


となる異常のゲノム上での位置を予想する、機序に基づく分類（カテゴリー1~3）が可能になった(図 2)（2)。

さらに、この分類において最も高頻度に認められるカテゴリー1 のメチル化異常が生じる仕組みについて検討し、卵細胞において母方 DMR メチル化に必要な転写が起こるエクソン H という領域を同定、命名した。カテゴリー1 メチル化パターンは、一段階目として卵細胞におけるエクソン H 領域の転写の消失が生じるため AS1 という領域の母方メチル化が導入されず、その結果、二段階目として受精後に本来母方アレルでは発現しない GNAS-AS1 というアンチセンス転写産物が発現し、これが NESP 領域の過剰メチル化を引き起こしていると考えられた。このモデルが、父方片親性ダイソミー（小規模なものも含む）を除くと、カテゴリー1 症例の発症機序を説明すると考えられた（3)。

■　STX16-/NESP-ICR による *GNAS* インプリント制御機構の分子機序解明

STX16-ICR の欠失は、母方アレル上でのみ *GNAS* インプリント異常を引き起こす。しかし、STX16-ICR は DMR を有しておらず、同領域の転写も両アレル性である。そこで報告者は、STX16-ICR のエンハンサー活性がアレル特異的なものかどうかを検討した。予想外にも、 STX16-ICR 父方欠損 ES 細胞では母方のみ、同母方欠損 ES 細胞では父方のみの XL 発現が認められたことから、STX16-ICR は両アレル性に活性を有しており、NESP のみならず XL の発現も制御



することが明らかになった（図 3)。一方クロマチンコンフォメーションキャプチャー法によって、STX16-ICR は母方アレルにおいて NESP と近接する一方、両アレルとも XL 領域に近接することを見いだした。すなわち STX16-ICR にあるエンハンサー自体は両アレルにおいて活性を持ちながら、*GNAS* との相互作用の構造がアレルにおいて異なること、そして NESP と相互作用するのは主に母方アレルのみであることが、STX16-ICR の母方アレル特異的なインプリント制御機能につながっていると考えられた。

また転写開始シグナルのデータベース等から推定される XL プロモーター領域をクローニングし、種々の truncated mutant を用いてコアプロモーター領域を検索した。その結果、先述の AS2 領域が XL プロモーターであり、STX16-ICR はこの領域を介して XL 転写を活性化することも明らかとなった。ES 細胞において AS2 は正常でもかなりメチル化レベルが低いことから、XL の両アレル性発現とも一致する所見であった。

さらに ES 細胞を近位尿細管細胞に分化させる系を確立し、野生型および STX16-ICR 欠損 ES 細胞を分化させた。野生型および STX16-ICR 父方/母方欠損細胞のすべてが、分化後には XL 発現が父方単アレル性発現を示した。これは STX16-ICR が分化後に XL に対する制御能を失うことを示していた。XL は出生前後の成長や哺乳力獲得等に必要であることがヒトやマウスで示唆されており、これらの表現型は父から XL を喪失した場合のみにみられることから、STX16-ICR 活性の分化に伴う消失と XL の父方単アレル性発現の獲得が、そのような表現型の遺伝形式を説明するものと考えられた。

一方 ES 細胞において CRISPR/Cas9 を用いて STX16-ICR の OCT4 結合モチーフを破壊したところエンハンサー活性が消失したことから、STX16-ICR は多能性因子によって活性化される初期胚特異的エンハンサーであると考えられた（4)。

考察

本研究により、その *GNAS* 遺伝子座におけるインプリンティングを制御するゲノム領域とその本質的機能が明らかになった。*GNAS* のインプリンティングは、Gsα のサイレンシングに最も重要な A/B 領域のメチル化がダイナミックに変化する受精後早期に、初期胚特異的エンハンサーである STX16-ICR が NESP55 転写を強力に活性化し、これが GNAS の A/B DMR の母方メチル化維持に必要である。さらに、XL プロモーターである AS2 領域のメチル化も、A/B と同様に NESP 転写に依存している。従って、エンハンサー及び NESP 転写を介する機序が染色体上のどこで破綻をきたすかによって、PHP1B 患者で認められるメチル化異常のパターンが異なる。これは、臨床的には PHP1B 患者で見られる種々のメチル化パターンから、その原因が存在する領域を概ね推定可能であることも意味している。

また *GNAS* のインプリント状態は、発生段階によ

っても変化する。STX16-ICR が支配する初期胚において NESP は母方発現、XL は両アレル性発現を示すのに対し、分化すると STX16-ICR はその制御的役割を失い、XL は父方発現へと変化する。以上により主に発生初期段階での *GNAS* インプリントの制御と破綻による病態発生基盤が解明された。今後は XL の体細胞特異的な転写制御機構や組織特異的な Gsα 発現抑制機構を解明するための研究が必要である。

研究の発表

口頭発表

1. Iwasaki, Y. et al. GNAS AS2 DMR Methylation Depends on STX16/NESP55 ICRs and Has Diagnostic Potential in AD-PHP1B. ENDO2024, abstract accepted.
2. Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism locus, STX16, comprises a biallelically active embryonic enhancer mediating the epigenetic regulation of GNAS. ENDO2024, abstract accepted.

誌上発表

1. Iwasaki, Y. et al. The long-range interaction between two GNAS imprinting control regions delineates pseudohypoparathyroidism type 1B pathogenesis. J Clin Invest 133(2023)
2. Iwasaki, Y., Reyes, M., Jüppner, H. & Bastepe, M. GNAS AS2 methylation status enables mechanism-based categorization of Pseudohypoparathyroidism Type 1B. JCI Insight (2024)
3. Iwasaki Y, Reyes M, Ryabets-Lienhard A, Gales B, Linglart A, Miller DE, et al. Bidirectional disruption of GNAS transcripts causes broad methylation defects in pseudohypoparathyroidism type 1B. Proc Natl Acad Sci U S A. 2025;122:e2423271122.
4. Iwasaki Y, Reyes M, Jüppner H, and Bastepe M. A biallelically active embryonic enhancer dictates GNAS imprinting through allele-specific conformations. Nature Communications. 2025;16(1)1377.