

79. 由来する親の性依存的なアリル制御メカニズムの解明

谷本 啓司

Key words : エピジェネティクス, ゲノム刷り込み,
DNA メチル化, *Igf2-H19* 遺伝子座, 遺伝子改変マウス

筑波大学 生命環境系

緒 言

哺乳動物の一部遺伝子は、由来する親の性に依存した片アリル性発現を示し（ゲノム刷り込み）、その分子基盤は、ライフサイクルに伴ってダイナミックに変化する DNA のメチル化である。刷り込みを受けるヒトやマウスのゲノム領域には、父親と母親由来のアリル間でその DNA メチル化状態の異なる領域 (Differentially methylated region: DMR) が多数見つかり、同メチル化状態は精子や卵で特異的に確立した後、受精後の体細胞においても維持される。つまり、父親と母親由来のゲノムは自己の由来を記憶していることになる。また、同現象の破綻は、エピジェネティクス病の発症につながる事が知られており、例えば Insulin-like growth factor 2 (*Igf2*: 成長因子) 遺伝子座のメチル化異常は、Beckwith-Wiedemann 症候群や Silver-Russell 症候群などを引き起こす。本研究では、酵母人工染色体 (YAC) トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いることで、アリル特異的 DNA メチル化制御を担う未知の *cis* DNA 配列の同定を試み、その責任領域を絞り込むことに成功したので報告する¹⁾。

方法および結果

Igf2 遺伝子は父親由来アリルから、一方、近傍の *H19* 遺伝子は母親由来アリルからのみ発現する。この発現パターンは、両遺伝子間に位置する刷り込み制御配列 (Imprinting Control Region: *H19*-ICR) により制御される (図 1A)。同配列は DNA メチル化の基質である CpG に富み、父親由来アリルで高メチル化、母親由来で低メチル化状態を示す DMR である。*H19*-ICR は精子生殖細胞形成過程にメチル化され、これは受精後体細胞において維持され、次世代の生殖細胞が形成される前に (つまり、始原生殖細胞で) 脱メチル化される。始原生殖細胞はその後、再び、精子か卵子へと分化するが、全く同じ DNA 塩基配列情報を持つ *H19*-ICR が、精子ではメチル化され、卵子ではメチル化されないメカニズムは分かっていない。興味深いことに、*H19*-ICR 以外の多くの ICR は、精子ではメチル化されず、卵子でメチル化される。さらに、精子と卵子における ICR のメチル化は、共通の DNA メチル化酵素により触媒される。このため ICR 配列内には、DNA メチル化酵素の基質としての CpG 配列以外に、生殖細胞特異的にメチル化 (あるいは、非メチル化) を指令する *cis* DNA 配列が含まれると考えられており、このような仮定上の配列の同定が、ゲノム刷り込み研究の中心的課題となっている。

1. トランスジェニックマウスによる必要領域の探索

我々は以前に、マウス *H19*-ICR 配列 (2.9 kb) をヒト β -グロビン酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome: YAC) に挿入した後に、トランスジェニックマウスを作製した。*H19*-ICR 断片をいったん YAC に挿入する利点として、1) 小さな DNA 断片を用いると、多コピーの *H19*-ICR 断片を保持するマウスが得られる可能性が高いが、これは、本来の状況 (アリルあたり 1 コピー) とは大きく異なるため、解析結果の信頼性が低下する。大きな YAC DNA 断片を用いることで、1 コピーの断片を保持するマウスが得られやすくなる。2) 小さな DNA 断片は、挿入部位周囲のゲノム環境の影響を受けやすい。ヒト β -グロビン遺伝子座は、LCR 配列の存在やインスレーターによる保護のため、ヘテロクロマチン化を受けにくいことが分かっており、緩衝効果を期待できる。3) LCR エンハンサーと β -グロビン遺伝子プロモーターとの間に *H19*-ICR 断片を挿入することで、ゲノム刷り込み発現の再構築を試みることで

きる、などが挙げられる。同実験デザインにより作製したトランスジェニックマウス（無傷のトランスジーンを1コピーのみ保持する）の体細胞において、トランスジェニック *H19*-ICR は父親由来時にメチル化され、母親由来時はメチル化されなかった。つまり、用いた断片内に、DMR の形成に必要な十分な遺伝情報が存在することが確定した²⁾。

本研究では、刷り込みメチル化を制御する *cis* DNA 配列を同定するために、2.9 kb DNA 断片の欠変異体を保持する YAC トランスジェニックマウスを作製、解析することとした（図 1）。

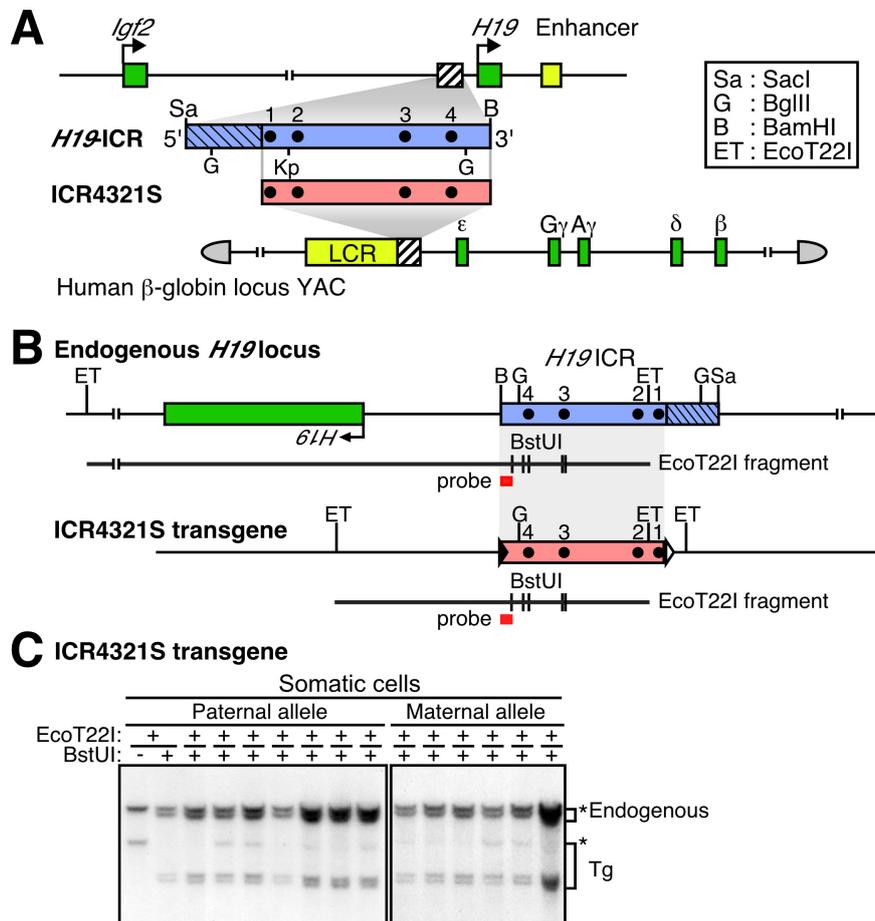


図 1. トランスジェニックマウスを用いたメチル化刷り込み必須領域の探索。

A) マウス *Igf2*-*H19* 遺伝子座の 3' 下流側には、両遺伝子の発現に必須の共通エンハンサーが存在する。両遺伝子間に存在する ICR (*H19*-ICR, 2.9 kb, *SacI*-*Bam*HI 断片) は、4 箇所の CTCF 結合部位を含む。本研究では、同断片の 5' 側配列 (766 bp) を欠損させた断片 (ICR4321S 断片) をヒト β -グロビン YAC に挿入後、トランスジェニックマウスを作製した。B) DNA メチル化状態の解析には Southern blot 法を用いた。トランスジェニックマウスの体細胞から調製したゲノム DNA を *Eco*T22I 制限酵素で切断すると、内在の *H19*-ICR 配列は大きな DNA 断片に含まれ (上段)、トランスジェニック *H19*-ICR 配列 (ICR4321S) は小さな DNA 断片に含まれる (下段)。これら断片を、さらに DNA メチル化感受性制限酵素 *Bst*UI で切断することで、そのメチル化状態を調べることができる。生成する DNA 断片の検出には、両断片に共通のプロープを用いた。C) トランスジェニック *H19*-ICR 配列 (ICR4321S) を父親 (paternal allele)、あるいは母親 (maternal allele) 由来に受け継ぐトランスジェニックマウスの尻尾 (somatic cells) から DNA を抽出し、制限酵素で切断後 (+), Southern blot 解析をおこなった。* は、*Bst*UI で切断されていない *Eco*T22I 断片の位置を示す。Endogenous は内在遺伝子座、Tg はトランスジーン由来の DNA 断片である。

まず、我々の以前の研究結果から、*cis* 制御配列は *H19*-ICR の 5' 側領域に存在することが予想されたため³⁾、同領域を 766 bp 欠失する ICR4321S 断片を調製した (図 1A)。次に、同断片をヒト β -グロビン YAC に挿入後、1 コピー、

無傷の YAC を保持するトランスジェニックマウス系統を樹立した。同欠失変異断片を父親、あるいは母親から受け継ぐマウス個体の体細胞（尻尾）DNA を調製し、DNA メチル化感受性制限酵素 (*Bst*UI) を用いた Southern blot 解析により、その DNA メチル化状態を解析した (図 1B)。その結果、母親から受け継がれた *HI9*-ICR トランスジーンはその大部分が切断されており、同断片が予想通り低メチル状態にあることが確認された (図 1C, 右)。一方、父親由来のトランスジーンは、野生型であれば高メチル化状態が期待されるが、変異型断片は低メチル化状態であった (図 1C, 左)。つまり欠失した 766 bp の配列内に、父親由来の *HI9*-ICR を高メチル化状態にするために必須の領域が含まれていることが予想された。このとき、内在遺伝子座については、父親アリル由来 (高分子) と母親アリル由来 (低分子) と考えられる 2 本の断片が、ほぼ同じ濃度で検出されたことから (図 1C)、解析方法には問題ないことが確認された。

2. ノックアウトマウスによる 765 bp 配列の必要性の検証

次に、この 765 bp 配列が内在遺伝子座においてどのような機能を持つのかを明らかにするために、同配列 (実験の都合上、実際には 765 bp) を欠損するノックアウトマウス (5'ICR-KO) を作製、解析することとした (図 2)。ジーンターゲティング法により変異型 ES 細胞を取得し、キメラマウスを介して、遺伝子欠損マウス系統を樹立した (図 2A)。次に、変異型アリルを父親から受け継ぐマウス個体の肝臓より DNA を調製し、DNA メチル化感受性制限酵素 (*Hha*I) を用いた Southern blot 法により、その DNA メチル化状態を解析した (図 2B)。その結果、父親から受け継がれた変異型 *HI9*-ICR 断片 (KO, Pat.) の一部が切断されており、同断片が部分的な低メチル状態にあることが確認された (図 2B)。この結果から、欠失した 765 bp の配列は、内在遺伝子座においても父親由来の *HI9*-ICR を高メチル化状態に維持するために必須の領域であることが明らかとなった。

次に、マウス個体 (12.5 日胚) の肝臓より RNA を抽出し、RT-PCR 法により *Igf2* 遺伝子の発現解析をおこなった (図 2C)。wt/wt 個体と wt/KO 個体で、母親由来アリルはともに野生型 *HI9*-ICR を保持するため、同アリルからの *Igf2* 遺伝子の発現はないと予想される。したがって、同解析により検出しているのは野生型、あるいは変異型 *HI9*-ICR を *cis* に持つ *Igf2* 遺伝子の発現である。ひと腹から得られた wt/wt 個体と wt/KO 個体について、RT-qPCR 法により *Igf2*、及び *GAPDH* 遺伝子 (内部標準として使用) の発現量を定量した結果、変異型 *HI9*-ICR を持つアリルからの *Igf2* 遺伝子発現は、野生型と比べて有意に低下していた ($P=0.0009$)。また、肝臓採材時の胎児体重を計測した結果、変異型マウスのそれは、野生型と比べて有意に低下しており ($P=0.0027$)、成長遅延が認められた。

考 察

Igf2-*HI9* 遺伝子座におけるゲノム刷り込み発現は、CTCF インスレータータンパク質の *HI9*-ICR DNA に対するメチル化感受性結合能を基盤として以下のように説明されている。すなわち、父親由来 *HI9*-ICR は高度にメチル化されているため、CTCF が結合できない。このため、共通エンハンサーは遠位にある *Igf2* 遺伝子を活性化する (図 2D, 上段)。一方、母親由来 *HI9*-ICR はメチル化されておらず、CTCF が結合することでインスレーターを形成する。この結果、共通エンハンサーはインスレーターよりも遠位にある *Igf2* 遺伝子を活性化することができない (図 2D, 下段)。765 bp 領域を欠損する変異型 *HI9*-ICR は、父親由来であるにもかかわらず、その DNA メチル化レベルが低下する。これは、父親由来アリルの母親化を意味する。このため、CTCF が誤って結合することで *Igf2* 遺伝子の発現レベルが低下し、増殖因子の産生が不足することで体重が減少したと考えられる。

生命現象をゲノム (DNA 塩基配列) 情報のみによって語るができないことは、今や明白である。本研究は、両親から子へと世代を超えて伝えられるエピゲノム情報を制御する *cis* DNA 配列の同定と位置づけることができる。また、ヒトにおける *HI9*-ICR の刷り込みメチル化の破綻は、胎児の成育異常につながり、同配列のメチル化レベルが両親で低下すると、*Igf2* 遺伝子の発現が低下し、重度の子宮内発育遅延や出生後の低成長、身体非対称、頭蓋に対する顔面骨の発育不全などを特徴とする Silver-Russell 症候群が引き起こされる。本研究は、このようなエピジェネティクス疾患の分子基盤を理解するための基礎になることも期待される。

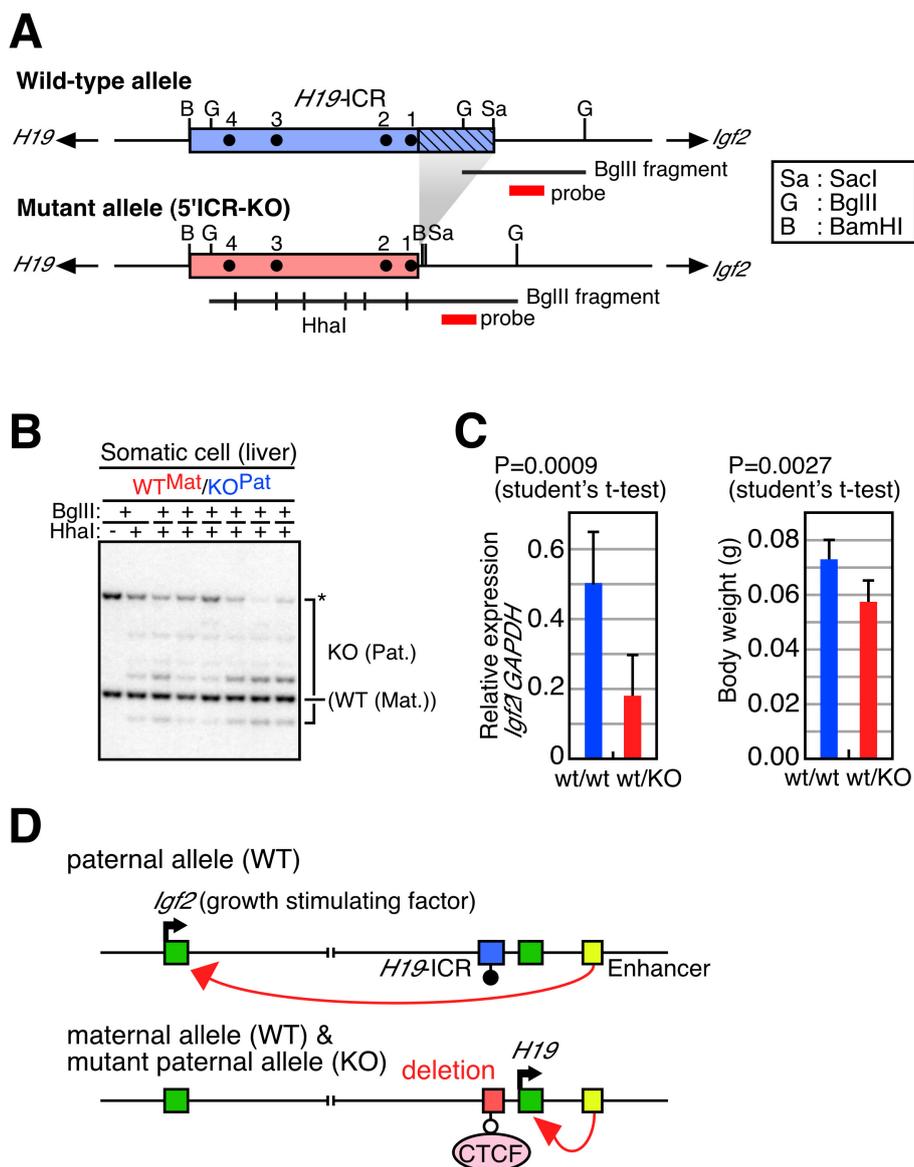


図2. ノックアウトマウスを用いたメチル化刷り込み必須領域の検証.

A) 野生型 (wild-type allele), 及び変異型 (mutant allele, 5'ICR-KO) 内在 *H19*-ICR の構造. ES 細胞を用いたジーンターゲティング法により, *H19*-ICR の 5'側領域を 765 bp 欠失させた. トランスジェニックマウスの体細胞から調製したゲノム DNA を *Bgl*II 制限酵素で切断し, 適当なプローブを用いて Southern blot 解析を行うことで, 野生型の遺伝子座からは小さい DNA 断片が (上段), 変異型遺伝子座からは大きい DNA 断片が検出される (下段). 変異型 DNA 断片は, さらに DNA メチル化感受性制限酵素 *Hha*I で切断することで, そのメチル化状態を調べることができる. B) 野生型遺伝子座 (WT) を母親から (Mat), 変異型遺伝子座 (KO) を父親から (Pat) 受け継ぐ個体の肝臓 (somatic cells) から DNA を抽出し, 制限酵素で切断後 (+), Southern blot 解析をおこなった. * は, *Hha*I で切断されていない *Bgl*II 断片の位置を示す. C) 変異遺伝子座を父親から受け継ぐ胎生 12.5 日胚の体重 (右), およびその肝臓における *Igf2* 遺伝子の発現 (左). ひと腹から得られた野生型 (wt/wt), および変異型 (wt/KO) 個体の間で比較を行った. *Igf2* 遺伝子発現解析は, *GAPDH* 遺伝子を内部標準として用いた, 定量的 RT-PCR 法により行った. 統計処理は, student's t-test により行い, P 値を示した. D) *H19*-ICR の DNA メチル化状態の違いによる *Igf2* 遺伝子発現の制御モデル.

文 献

- 1) Matsuzaki, H., Okamura, E., Takahashi, T., Ushiki, A., Nakamura, T., Nakano, T., Hata, K., Fukamizu, A. & Tanimoto, K. : *De novo* DNA methylation through the 5'-segment of the H19 ICR maintains its imprint during early embryogenesis. *Development*, **142** : 3833-3844, 2015.
- 2) Tanimoto, K., Shimotsuna, M., Matsuzaki, H., Omori, A., Bungert, J., Engel, J. D. & Fukamizu, A. : Genomic imprinting recapitulated in the human β -globin locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102** : 10250-10255, 2005.
- 3) Okamura, E., Matsuzaki, H., Sakaguchi, R., Takahashi, T., Fukamizu, A. & Tanimoto, K. : The *H19* ICR mediates pre-implantation imprinted methylation of nearby sequences in YAC transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.*, **33** : 858-871, 2013.