

令和 4 年 9 月 14 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06451

研究課題名(和文) IG-DMR母方欠失マウスにおいて周産期致死を引き起こす責任配列の探索

研究課題名(英文) Exploration of the responsible sequence causing perinatal lethality in mice with maternal deletion of IG-DMR

研究代表者

原 聡史 (Hara, Satoshi)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：80739582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまでに報告されたIG-DMRの4.1 kb欠失マウスで認められた母由来で周産期致死となる表現型の責任領域を探索した。その結果、IG-DMR内部のGtl2側2.7 kb領域が母方アレルにおいて重要であることを明らかにした。この領域の内部をさらに3つの領域に分け、それぞれの領域を欠失させたマウスについて、欠失を父由来あるいは母由来で遺伝した場合の表現型を解析した結果、すべての欠失で父由来、母由来のいずれにおいても周産期致死は認められなかった。このことから、欠失アレルの母由来遺伝による周産期致死は、IG-DMRの2.7 kb領域すべてを欠失した場合に生じることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果から、IG-DMRには複数の領域に異なる分子機構が存在する可能性が示唆された。今後、これらの領域に結合する分子を同定することで、IG-DMRによる遺伝子発現制御の全容を解明することが可能になると考えられる。IG-DMRの欠失は、ヒトにおいては重篤な小児遺伝性疾患であるKagami-Ogata症候群およびTemple症候群の原因であることが知られている。本研究の成果は、IG-DMRによる遺伝子の発現制御機構を解明するだけでなく、IG-DMRの欠失を母由来に遺伝した際に発症するKagami-Ogata症候群の病態解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for the region responsible for the phenotype of perinatal lethality observed in mice with 4 kb deletion of IG-DMR. We identified a 2.7 kb region inside the IG-DMR that is essential for the maternal allele. Mice with serial deletions of the 2.7 kb region did not show any phenotypes when the deletions were inherited from either the paternal or the maternal allele. This suggests that perinatal lethality due to maternal inheritance of the deletion allele occurs when the entire 2.7 kb region of the IG-DMR is deleted.

研究分野：分子生物学、発生工学

キーワード：ゲノムインプリンティング DIk1-Dio3ドメイン CRISPR/Cas9

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一般に、哺乳類には父母いずれかのアレルからのみ発現するインプリント遺伝子とよばれる遺伝子群が存在する。インプリント遺伝子の多くは染色体上でクラスターを形成しており、近傍に存在する父母のアレルで DNA メチル化状態の異なる領域 (differentially methylated region; DMR) により片アレル性の発現が制御されている。マウス 12 番染色体上の *Dlk1-Dio3* ドメインは、代表的なインプリント遺伝子群のひとつである。このドメインのインプリント遺伝子の発現異常は胎生後期で致死をもたらすことから、*Dlk1-Dio3* ドメインの正しい発現制御は、哺乳類の正常な発生に必須であるといえる。現在までに、このドメインの発現制御には父方アレルにメチル化を受ける DMR である IG-DMR が重要であり、IG-DMR のメチル化異常は近傍のインプリント遺伝子群の発現異常を引き起こすことが知られている。

IG-DMR の *Dlk1-Dio3* ドメインにおける機能は、IG-DMR の約 9 kb のうち 4.1 kb を欠失したマウス (IG-DMR<sup>KO</sup>) により示されている (Lin et al., Nature Genet 2003、図 1)。IG-DMR<sup>KO</sup> は、欠失を父由来で遺伝した場合は表現型がなく、母由来で遺伝した場合にインプリント制御が破綻し、周産期致死となる。このことから、IG-DMR のインプリント制御には母方アレルが重要と考えられてきた。しかし、母方アレルのインプリント状態を制御する分子機構は未だ不明であり、研究課題の核心をなす学術的「問い」として残されている。この問いの解明が困難である理由のひとつは、IG-DMR<sup>KO</sup> では 4.1 kb と大きな範囲を欠失させており、原因となる因子が正確に同定できないことにある。申請者は、IG-DMR<sup>KO</sup> の表現型の原因となる配列が 4.1 kb のどこに存在するのかを明確にすることが、それを引き起こす原因分子の同定のために重要と考えている。

### 2. 研究の目的

本研究では、IG-DMR が *Dlk1-Dio3* ドメインを制御する分子機構の全容を解明することを最終目的として、(1) 母方遺伝によりインプリント異常を示す表現型の責任配列の範囲 (2) 同定した責任配列と父方アレルで重要な制御配列との関連性 以上の二点を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 母方遺伝によりインプリント異常を示す責任配列の同定

##### (1)-1. IG-DMR 部分欠失マウスの作出および表現型の解析

予備的実験の結果から、IG-DMR<sup>KO</sup> マウスの表現型の責任配列は、過去の報告で欠失した 4.1 kb 領域内部の *Gtl2* 側約 2.7 kb にまで絞り込むことができていた。そこで責任配列のさらなる絞り込みを行うために、この領域に約 900 bp おきに sgRNA を設計し、3 種類の欠失パターンを持ったマウスを作出する。それぞれの欠失を母方より遺伝した場合、仔がインプリント異常を伴う周産期致死を示すか否かを明らかにすることで、IG-DMR<sup>KO</sup> の表現型の責任配列を 1 kb 前後まで絞り込む。周産期致死が認められた欠失があれば、その領域内にさらに sgRNA を設計し、同様の実験を行う。最終的に表現型が認められなくなるまで、あるいは責任配列が 500 bp 以内になることを目標として絞り込みを行う。

##### (1)-2. IG-DMR 部分欠失マウス胚における DNA メチル化状態および遺伝子発現解析

(1)-1. で作出した IG-DMR 部分欠失マウスにおいて、インプリント遺伝子に与える影響を明らかにするために、欠失を母方より遺伝したマウス胚におけるインプリント遺伝子の発現を、定量 PCR により解析する。また、IG-DMR の欠失させていない CpG 領域および *Gtl2*-DMR の DNA メチル化状態を解析する。過去の報告および予備実験の結果から、母方アレルの IG-DMR および *Gtl2*-DMR が高メチル化状態になることで、父方発現遺伝子の発現上昇および母方発現遺伝子の発現低下が起きると想定される。また、表現型が認められない欠失であっても、インプリント遺伝子の発現量の変動する可能性があることから、それぞれの欠失アレル間における発現量を比較する (図 3)。

DNA メチル化異常が認められた場合、生殖細胞における IG-DMR のメチル化状態を評価する。部分欠失雌マウスから GV 期卵母細胞および胚盤胞を採取し、欠失アレルのみを増幅させるプライマーを用いることで、欠失アレル上の IG-DMR 残存 CpG 領域の DNA メチル化状態を解析する。これにより、インプリント異常の原因が生殖細胞もしくは受精後の胚発生過程にあるのかを明らかにする。

#### (2) 父方アレルで重要な制御配列との関連性の解明

申請者は、IG-DMR 上に存在する 216 bp の繰り返し構造をもつ配列 (タンデムリピート; TR) が父方アレルの DNA メチル化維持に重要であることを示した (Saito, Hara et al., Hum Mol Genet 2018、図 4A)。一方で、現在までの予備的実験において、前述した *Gtl2* 側 2.7 kb の領域および TR 配列を同時に欠損させたマウスは、IG-DMR<sup>KO</sup> と同様に父方から遺伝しても表現型がなく、母方から遺伝した場合に致死となった (図 4B)。よって、TR 配列の欠如による表現型をマスクするような領域がこの領域に存在すると推察されるが、これが(1)-1. で絞り込んだ IG-DMR<sup>KO</sup> の

表現型の責任配列と同一であるか否かは不明である。そこで、(1)で絞り込んだ IG-DMR<sup>KO</sup> の表現型の責任配列と TR 配列との関連性を明らかにするために、TR 配列および責任配列を両欠失させたマウスを作出する(図 4C)。両欠失アレルを父方および母方で遺伝させ、仔の表現型を(1)と同様に解析する。

父方由来で遺伝した場合の表現型が認められない(母方由来でインプリント異常を示す)場合、絞り込んだ責任配列が TR 配列の欠失による表現型をマスクする存在と同一であると考えられる。逆に TR 配列の欠如による表現型が現れた場合、IG-DMR<sup>KO</sup> の表現型の責任配列はこの現象とは独立していると考えられる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 母方遺伝によりインプリント異常を示す責任配列の同定

IG-DMR 内部の 2.7 kb 領域の欠失を母由来で遺伝したマウスは胎生 16.5 日ごろから胎生致死を示し、下流のインプリント遺伝子 Dlk1 の発現上昇および Gtl2 の発現抑制が認められた。また、胎盤の構造や重量に野生型との顕著な差は認められなかった。これらのことから、2.7 kb を欠失したマウスの表現型は過去の 4.1 kb を欠失した報告と同様であることが確かめられた。

次に、2.7 kb 領域の内部をさらに 3 つの領域に分け、それぞれの領域を欠失させたマウスについて、欠失を父由来あるいは母由来で遺伝した場合の表現型を解析した。その結果、すべての欠失で父由来、母由来のいずれにおいても周産期致死は認められず、その他にも顕著な表現型は認められなかった。このことから、欠失アレルの母由来遺伝による周産期致死は、IG-DMR の 2.7 kb 領域すべてを欠失した場合に生じることが示唆された。それぞれの部分欠失マウス胚を用いてインプリント遺伝子の発現を解析したところ、このうちのひとつで Gtl2 の発現低下が認められた。

また、生後致死を示した IG-DMR 内部の Gtl2 側 3 kb を欠失したマウスを用いて、多型を利用した DNA メチル化解析および発現アレル解析を行った。その結果、これまでの報告と同様、Dlk1 および Dio3 の両アレル発現が認められ、IG-DMR および Gtl2-DMR は母方アレルが高メチル化状態となっていることが明らかになった。

一方、欠失マウス作出の過程で、ファウンダーマウスを得られる効率が他の領域に比べ低いことがわかった。これは、IG-DMR 内部には母方アレルだけでなく父方アレルにおいても欠失すると胎生致死となる領域が存在し、いずれのアレルが欠失しても致死となるリスクを伴うことによる。そこで 2 細胞期胚の割球にインジェクションを行うことで人為的にモザイク胚を作出し、致死性のレスキューを試みた。その結果、前核期にインジェクションした場合に比べて出生率が有意に改善した。また、この方法はノックインマウス作出にも適用できた。得られたファウンダーマウスを野生型と交配させたところ、変異アレルを持つ細胞の寄与率と同程度の効率で次世代へ伝達することが可能であった。

##### (2) 父方アレルで重要な制御配列との関連性の解明

この 2.7 kb 領域とともに、父方アレルのメチル化維持に重要な役割を持ち、父方アレルでの欠失が胎生致死を引き起こすことがわかっている領域(IG-DMR-Rep)を同時に欠失したマウス(3 kb 欠失)に着目した。3 kb 欠失を父由来で遺伝させると、父方アレル上で IG-DMR-Rep を欠如しているにもかかわらず、胎生致死がレスキューされる。この現象の詳細を明らかにするため、3 kb 欠失を父由来で遺伝したマウス胚の DNA メチル化解析を行った。その結果、Gtl2-DMR の父方アレルは野生型と同様に正常にメチル化されていることが明らかになった。しかしながら残存する IG-DMR は両アレルともに低メチル化を示しており、IG-DMR の DNA メチル化状態は IG-DMR-Rep の欠失によって正常に維持できていないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hara Satoshi, Terao Miho, Muramatsu Akari, Takada Shuji	4. 巻 9
2. 論文標題 Efficient production and transmission of CRISPR/Cas9-mediated mutant alleles at the IG-DMR via generation of mosaic mice using a modified 2CC method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56676-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hara Satoshi, Terao Miho, Tsuji-Hosokawa Atsumi, Ogawa Yuya, Takada Shuji	4. 巻 30
2. 論文標題 Humanization of a tandem repeat in IG-DMR causes stochastic restoration of paternal imprinting at mouse <i>Dlk1</i> - <i>Dio3</i> domain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 564-574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddab071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原聡史、村松あかり、寺尾美穂、高田修治
2. 発表標題 マウスIG-DMRの母方アレルにおけるインプリント制御領域のスクリーニング
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原聡史、村松あかり、寺尾美穂、高田修治
2. 発表標題 マウスIG-DMRの母方アレルにおけるインプリント制御領域のスクリーニング
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原聡史、寺尾美穂、村松あかり、高田修治
2. 発表標題 2細胞期胚へのインジェクションによるインプリント制御領域IG-DMRへのゲノム編集
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関