

平成22年 4月 1日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20710145

研究課題名（和文） 有袋類特異的ゲノムインプリンティング領域の探索

研究課題名（英文） Identification of Marsupial-Specific Genomic Imprinting Loci

研究代表者

鈴木 俊介（SUZUKI SHUNSUKE）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任教員

研究者番号：30431951

研究成果の概要（和文）：ゲノム刷り込みは両親に由来する2対の遺伝子の内、片方のみの働きを抑制するユニークな遺伝子発現調節機構であり、高等脊椎動物では哺乳類のみに存在する。しかし遺伝子の片親性発現は、本来もう一方の正常な遺伝子により異常がカバーされるはずの劣勢変異であっても、即座に異常が出てしまうという明らかなデメリットを生じる。本研究では、何故、どのようにゲノム刷り込みが哺乳類の進化上現れたのかを解析するための一つのステップとして、有袋類のゲノムDNAからゲノム刷り込みを受ける候補領域を濃縮する方法を新たに開発した。

研究成果の概要（英文）：Genomic imprinting is a unique regulatory mechanism of gene expression, causes monoallelic gene expression by silencing of one of two genes derived from both parents. In higher vertebrates, only mammals have genomic imprinting and it is essential for normal embryonic development. However, monoallelic gene expression has a critical demerit in that only one hit of recessive mutations could lead abnormal phenotypes immediately. In this research, we have developed the novel approach identifying imprinted loci from marsupial genomic DNA as the first step to investigate why and how genomic imprinting arose in mammalian evolution.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：エピジェネティクス

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：インプリンティング、ゲノム刷り込み、有袋類

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム刷り込み（インプリント）は一部の遺伝子に親由来により異なるエピジェネテ

ック修飾を与え、片親性発現を引き起こす。本来、雄由来と雌由来の染色体からなる2倍体の細胞をもつことは劣勢変異の表現型を

抑える大きなメリットがあるが、片親性発現であるインプリント遺伝子は2倍体でありながらその機能が1倍体と同じ状態になっている。このユニークな遺伝子発現制御機構は、高等脊椎動物において哺乳類には広く保存されているが、鳥類以下では見つかっていない。ゲノム刷り込みが哺乳類の進化上なぜ現れ、どのように進化して現在まで保存されてきたかは、非常に興味深い側面であるがまだ結論は出ていない。哺乳類には、卵生で胎盤をもたない単孔類、胎生だが真獣類と比べ非効率的な胎盤をもち早期に出産する有袋類、効率のよい胎盤をもち長期間胎内で子を育てる真獣類という、それぞれ異なった生殖様式をとる3つのサブグループが存在する。当該分野においてほとんどの研究が対象にしていたマウスやヒトの属する真獣類とは別のグループである、有袋類や単孔類において、ゲノム刷り込みを受ける遺伝子や領域、メカニズムを解析し比較することは、その起源や生物学的意義、進化を論じる上で必須である。またゲノム刷り込みは、哺乳類のみにもみられること、インプリント遺伝子群に胎児の成長や母子間の栄養輸送、母性行動などに関わる遺伝子が複数含まれること、ほとんどのインプリント遺伝子が胎盤組織で高い発現レベルを示すことなどから、哺乳類の胎生の進化と関連があると考えられている。したがって、前述のように生殖様式の異なったグループにおいてゲノム刷り込みがどのように異なるかは非常に注目されている。

2000年にKillianら、O' Neillらが、真獣類においてインプリント遺伝子として知られる *IGF2*, *IGF2R*が、南米に生息する有袋類であるオポッサムにおいても刷り込みを受けることを初めて報告した。続いて2005年に、私はオーストラリアに生息する有袋類であるワラビーにおいて、*IGF2*, *PEG1/MEST*が刷り込みを受けることを報告した。興味深い点は、真獣類においてインプリント遺伝子の片親性発現の制御に重要である、親由来によりDNAメチル化状態が異なる領域 (DMR; differentially methylated region) が、有袋類の *IGF2R*, *PEG1/MEST*では共通して見つからないことであった。このことから、有袋類のゲノム刷り込みは真獣類とは異なり、DNAメチル化非依存的なメカニズムによるのではないかと考えられた。しかし私は2007年に、レトロトランスポゾンに由来する遺伝子 *PEG10*にはDMRが存在することを明らかにし、有袋類にもDNAメチル化を伴う刷り込み機構が存在すること、レトロトランスポゾンの挿入がゲノム刷り込み領域の起源となり得ることを初めて報告した。2008年には、Smitsらにより *H19*遺伝子においてもDMRが存在することが明らかになった。*H19*遺伝子は鳥類

以下には存在せず、*PEG10*と同様に哺乳類の進化の過程で現れたという共通性は興味深い。この他に、有袋類ではゲノム刷り込みを受けない遺伝子が複数報告されており、単孔類では今のところゲノム刷り込みは見られていない。これらの研究により、(i)ゲノム刷り込みは哺乳類が卵生から胎生へ変化したのと同時期に現れたこと、(ii)有袋類では真獣類のインプリント遺伝子の一部が刷り込みを受けるが、DNAメチル化を伴うメカニズムによるものとそうでないものがあること、(iii)真獣類で一般的なDNAメチル化を伴うメカニズムの獲得は、外来配列の挿入が引き金となり得ることが解ってきた。

しかし、これまでに有袋類で解析されたのは、全て真獣類のインプリント遺伝子のオルソログである。その中で、有袋類では刷り込みを受けない遺伝子は、有袋類との分岐後に真獣類の系譜のみで刷り込みが起きたと考えられる。このような遺伝子が複数存在することは、逆に有袋類のみで刷り込みを受ける遺伝子が存在する可能性を示唆している。有袋類ではどのような機能をもった遺伝子が刷り込みを受けようになったのか、刷り込みを受けない真獣類とはゲノム領域にどのような違いがあるのか、有袋類特異的な刷り込み領域の解析からは、ゲノム刷り込みの起源、進化、生物学的意義に関する重要な知見が得られると考えられる。通常、全く新規のインプリント遺伝子を同定する場合、雄性発生胚や雌性発生胚を用いて過剰発現または発現がなくなる遺伝子をスクリーニングする。しかし、現時点では有袋類においてそのような特別な材料は得られない。

## 2. 研究の目的

前述のように、インプリント遺伝子の片親性発現という特徴を指標に用いてスクリーニングすることが現時点では困難である。そこで私は、DMRという特徴を指標に用いてゲノム領域をスクリーニングすることで、新規の刷り込み領域を発見できないかと考え、高度にDNAメチル化されているものほとんどされていないものが混在するCpGアイランドを選択的に濃縮する方法を新たに考案した。本研究では、有袋類特異的なゲノム刷り込み領域を同定するため、DMRをスクリーニングする方法を作り上げる。

## 3. 研究の方法

DMRのスクリーニング法については実験ステップごとの具体的な解説は割愛するが、DNAメチル化があると切断できないメチル化感受性制限酵素およびDNAメチル化を認識して切断するメチル化依存性制限酵素を用いた反応、ゲノムDNAの熱変性と再アニーリン

グ等を組み合わせた一連の処理を終えた産物を、リンカーによるPCRで増幅することでDMR候補配列を濃縮する。

最終的なリンカーによるPCRには、GCリッチ配列の配列単純性によるキメラ産物や長さによる増幅の偏りを抑える工夫として、エマルジョンPCRを用いる。エマルジョンPCRは、PCR溶液、油、界面活性剤を混合して乳化させ、1個につき1テンプレートを含むPCR溶液の水泡中でPCRを行うことで、先の問題を抑えることができる。

クローニング時には長さによる効率の影響を考慮して、大きさごとにゲルを切り出してクローニングする。それぞれのクローンにおける挿入配列を決定し、Bisulfiteシーケンシング（Bisulfite処理；非メチル化シトシンはウラシルに変化するがメチル化シトシンは無反応）によってDNAメチル化状態を調べる。DMRであれば、メチル化アレルと非メチル化アレルがほぼ半分ずつ得られるはずである。

#### 4. 研究成果

本研究により開発された手法において、ポジティブコントロールである *PEG10*-DMR の3つの断片は最終的なリンカー-PCRによりすべて増幅され、ネガティブコントロールであるDMRではないCpGアイランドは増幅されないことが確認された（図1）。さらに、メチル化と非メチル化アレルが混在するDMR様のDNAメチル化状態を示す候補領域および *PEG10*-DMR自身がこの系を用いて独立に同定された（図2）。これらのことから、高度にDNAメチル化されているものとほとんどされていないものが混在するCpGアイランドを選択的に濃縮する新たな方法が完成したと考えられる。

前述のように、これまでは真獣類のインプリント遺伝子のオルソログの解析に限られていたが、今回開発した方法により、有袋類で *PEG10*, *H19* の他にどのようなゲノム領域にDMRが存在するのか、有袋類特異的なインプリント遺伝子（領域）は存在するのか、あるとすればどのような機能をもった遺伝子であるのかという問題に足を踏み入れる準備が整った。今後、これらからゲノム刷り込みの起源や生物学的意義、進化にわたる幅広い重要な情報が得られることが期待される。

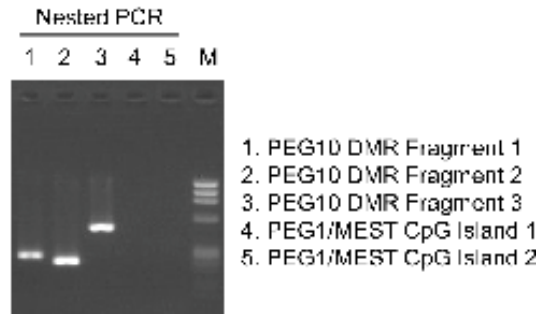


図1 リンカーによる最終PCR産物をテンプレートに用いたNested PCRの結果

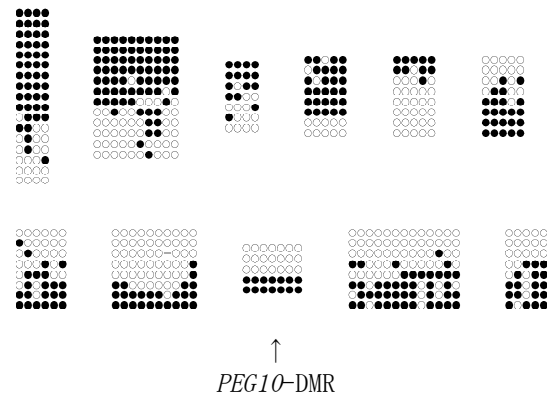


図2 スクリーニングにより得られたDMR候補領域（*PEG10*-DMRを含む）のDNAメチル化状態

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 俊介 (SUZUKI SHUNSUKE)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任教員

研究者番号：30431951

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし