

平成22年6月25日現在

研究種目： 若手研究（スタートアップ）
研究期間： 2008 ～ 2009
課題番号： 20870008
研究課題名（和文）
多種間の比較ゲノム解析による新規メチル化制御配列の同定
研究課題名（英文）
Identification of *de novo* DNA methylation signal by comparative genomics
研究代表者
岡村 浩司 （ OKAMURA KOHJI ）
お茶の水女子大学・生命情報学教育研究センター・特任講師
研究者番号： 80456194

研究成果の概要（和文）： ネズミ目およびウサギ目特異的インプリンティングを受ける遺伝子 *Impact* に着目し、卵形成で新規メチル化を受けるDNA配列を、ビーバー、リスなど約30種の動物で決定し、メチル化シグナル同定を目指してインプリンティングを受けない哺乳類ゲノムと比較解析を行った。その結果、これまで重要と考えられてきたリピート配列や、CpGおよびG+C含量ではなく、CpGサイト間の間隔がアレル別メチル化の確立に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： We performed a thorough comparative genomic analysis of a single locus, *Impact*, which is imprinted only in Glires (rodents and lagomorphs). In species from the Glires clade, *Impact* bears a differentially methylated region, where the maternal allele is hypermethylated. Analysis of this region demonstrated that imprinting was not associated with the presence of direct tandem repeats nor with CpG dinucleotide density. In contrast, a CpG periodicity of 8 bp was observed in this region in species of the Glires clade compared to those of carnivores, artiodactyls, and primates. This interval has been reported to be optimal for *de novo* methylation by the Dnmt3a-Dnmt3L complex, suggesting its importance in the establishment of imprinting in *Impact*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野： 分子遺伝学

科研費の分科・細目： 基礎生物学 ・ 遺伝・ゲノム動態

キーワード： ゲノムインプリンティング, DNAメチル化, CpGアイランド, 齧歯目, 重歯目

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の一部の遺伝子は、いずれの親に由来するかによって発現量が著しく異なるゲノムインプリンティングという独特の発現制御を受ける。これまで 100 近い遺伝子が見つかり、重要な *cis* 制御領域も同定されてきた。しかしながら、それらに共通するゲノム配列の特徴付けがなされていないため、詳細な分子機構に対する考察が進んでいなかった。

2. 研究の目的

特に、新規に DNA メチル化パターンを確立する際の標的となる配列の同定は、インプリンティングだけでなく、発生やその後の組織特異的遺伝子発現制御、さらにはがんなど疾患の発生機序を考察する上できわめて重要である。それにも関わらず明確な特徴付けがなされていないのは、最近の多くの研究が示唆しているように、インプリンティングの分子機構が個々の遺伝子によって異なっていることが一つの原因であると考えられる。また、従来の比較ゲノム解析においては、ヒトとマウスを比較し、保存されているゲノム配列から保存されている生命現象を議論するのが常であった。本研究ではヒトとマウスで異なるインプリンティングを示す遺伝子 *Impact* のみに着目するが、その代わりに多種間での比較解析を行い、新規メチル化分子機構の理解を深めることを目的とし、*cis* 制御領域配列の特徴を調べる。

3. 研究の方法

博物館の保存試料等を利用し、遺伝子 *Impact* がインプリンティングを受けるウサギ目およびネズミ目の動物種の組織を多数集め、ゲノム DNA を抽出する。アレル別に DNA メチル化状態が異なる領域は第 1 イントロンにあるため、両端エクソン内の保存された配列を利用して PCR による増幅を行い、プライマーウォーキング法でゲノム配列を決定する。これまでに報告した他の哺乳類の配列も含め、約 30 種に及ぶ多種間の比較ゲノム解析をオルソロガスな一つの領域に絞って行う。

4. 研究成果

集めたウサギ目およびネズミ目 19 種のうち、16 種のゲノムに対して *Impact* の第 1 イントロンを PCR により増幅し、配列決定を行うことができた。以前から関連が疑われていたタンデムリピートは、マウス、ラット、およびモリネズミというネズミ科の動物にの

み見られ、ウサギ目はもちろん、他の全てのネズミ目にさえ見られなかった。ウサギ目の配列はむしろ、インプリンティングを受けないサル目やウシ目など他の哺乳類とよく似ている一方で、一般に分子進化速度が速いと言われているネズミ目間の配列の保存性は観察されず、CpG アイランドが失われている種さえも存在することが明らかとなった。

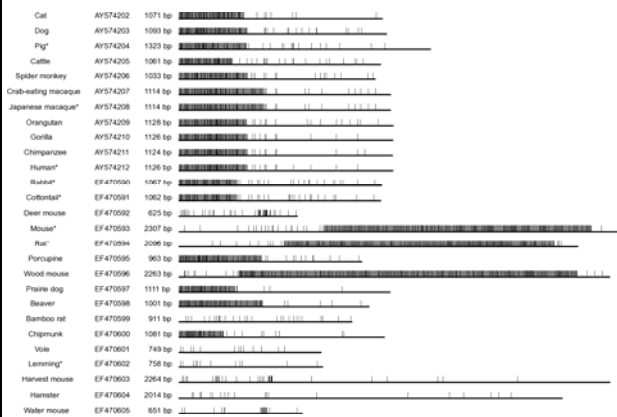


図 1. 各種 *Impact* の第 1 イントロン

そこで、そのようなレミングに加え、ワタオウサギ、ニホンザルについて DNA をバイサルファイト処理して調べたところ、インプリンティングを受けると考えられるレミングとワタオウサギにはやはり DMR が存在することが示された。PCR による増幅に失敗したのはセスジネズミ、アグーチ、パカであったが、セスジネズミに関してはネズミ科独特のリピートがより伸長しているため、アグーチとパカに関しては進化的に近いと、ともに共通した大きな変異を持つものと考えられた。興味深いことに、今回得られた *Impact* がインプリンティングを受ける種においては、8bp 離れた CpG の対が、受けない種の配列と比べ有意に多く見つかることが分かった。

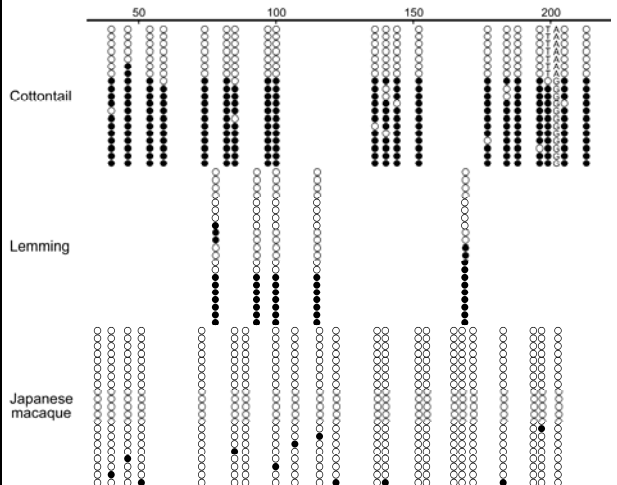


図 2. バィサルファイト処理による DNA メチル化解析

以上のことから、これまで関連が疑われていたタンデムリピートや、CpG および G+C 含量ではなく、8 bp の間隔で存在する CpG サイトがアレル別メチル化の確立に関わっていることが強く示唆された。この間隔は新規メチル化に関わる Dnmt3a-Dnmt3L 複合体に存在する 2つの活性部位の距離に相当すると考えられ、インプリンティングに限らず、時空間的な遺伝子発現制御、細胞のリプログラミング、脊椎動物ゲノムの分子進化や、DNA メチル化の異常と深く関わるがんなどの発生機序の理解に役立つものと考えられる。

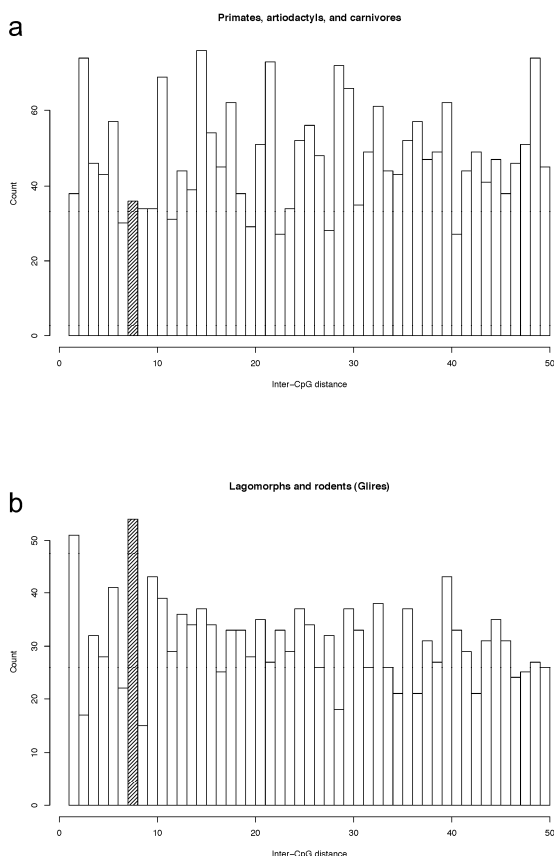


図 3. インプリンティングを受けない種(a)と受ける種(b)における CpG サイトの間隔

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 2 件)

1. Gradual transition from mosaic to global DNA methylation patterns during deuterostome evolution
Kohji Okamura, Kazuaki A. Matsumoto, and Kenta Nakai

BMC Bioinformatics in press (2010)
 (査読あり)

2. Characterization of the differentially methylated region of the *Impact* gene that exhibits Glires-specific imprinting
Kohji Okamura, Richard F. Wintle, and Stephen W. Scherer
Genome Biol. **9**, R 160 (2008)
 (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

1. 哺乳類に見られるグローバルなメチル化パターンの起源

松本 和晃, 岡村 浩司, 中井 謙太
 第 32 回日本分子生物学会年会 1P-0103
 (2009 年 12 月 09 日) パシフィコ横浜

2. 無脊椎動物ホヤの大規模転写開始点決定から探る CpG アイランドプロモータの進化
岡村 浩司, 山下 理宇, 滝本 紀子, 西辻 光希, 鈴木 穰, 日下部 岳広, 中井 謙太
 第 32 回日本分子生物学会年会 1P-0021
 (2009 年 12 月 09 日) パシフィコ横浜

3. 新規プロモータ生成源としてのレトロ転移

Retrotransposition as a source of new promoters

岡村 浩司, 中井 謙太
 日本遺伝学会第 81 回大会 MS2-5 (2009 年 09 月 17 日) 信州大学

4. 筋肉ではたらく microRNA の機能と進化
 日下部 りえ, 谷 沙織, 工樂 樹洋, 成瀬 清, 宮本 由紀, 岡村 浩司, 中井 謙太, 日下部 岳広, 井上 邦夫
 第 15 回小型魚類研究会 017 (2009 年 09 月 13 日) 名古屋大学

5. Characterization and definition of promoter-associated CpG islands in ascidian genomes

Kohji Okamura, Riu Yamashita, Noriko Takimoto, Koki Nishitsuji, Yutaka Suzuki, Takehiro G. Kusakabe, and Kenta Nakai
 The 5th International Tunicate Meeting Oral 6-4 (June 22, 2009) Okinawa Industry Support Center, Naha, Okinawa, Japan

6. Genomic organization and developmental expression of tunicate microRNAs
 Saori Tani, Rie Kusakabe, Yuki Miyamoto, Kohji Okamura, Kenta Nakai, Takehiro G. Kusakabe, and Kunio Inoue
 The 5th International Tunicate Meeting

Poster 6-7 (June 21, 2009) Okinawa
Industry Support Center, Naha, Okinawa,
Japan

7. Evolution and developmental expression
of chordate microRNAs

Rie Kusakabe, Saori Tani, Shigehiro Kuraku,
Yuki Miyamoto, Kohji Okamura, Kenta Nakai,
Takehiro G. Kusakabe, and Kunio Inoue
The 42nd Annual Meeting of the Japanese
Society of Developmental Biologists
WS1-12 (May 30, 2009) Toki Messe, Niigata,
Japan

8. レトロ転移による新規プロモータ生成
Retrotransposition as a source of new
promoters

岡村 浩司, 中井 謙太

第31回日本分子生物学会年会・第81回日本
生化学会大会 合同大会 1T17-8/1P-1321
(2008年12月09日) 神戸ポートピアホテル

[その他]

ホームページ等

ゲノム DNA のグローバルなメチル化パター
ンの程度を計算するツール MosaicGlobal を
開発して以下の URL で公開した。

<http://epigenetics.hgc.jp/mosaicglobal/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 浩司 (OKAMURA, KOHJI)

お茶の水女子大学・生命情報学教育研究セ
ンター・特任講師

研究者番号： 80456194

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし