

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06481

研究課題名（和文）哺乳類の世代間エピジェネティックマーク変換機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of intergenerational transfer of epigenetic marks in mammals

研究代表者

松崎 仁美（MATSUZAKI, Hitomi）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：50436242

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の継世代エピジェネティック制御の代表例であるゲノム刷り込み現象では、遺伝子座の刷り込み制御領域・ICRがアレル特異的にDNAメチル化されることで、片アレル性の遺伝子発現が調節される。先行研究において、Igf2/H19遺伝子座の刷り込み状態を安定に維持するには、受精後初期胚における「H19-ICR」の父由来アレル特異的de novo DNAメチル化が重要であることを見出した。本研究では、この受精後刷り込みメチル化制御における、Znフィンガータンパク質の機能を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム刷り込みは哺乳類の正常発生に必須の制御であり、ICRのDNAメチル化異常に起因する遺伝子発現量の変化は、ヒト疾患の原因となる。ICRのメチル化を制御する因子を探索・同定することで、正常状態を安定に維持するための基盤を明らかにできると同時に、病態発症メカニズムを理解するための知見を得ることができる。

研究成果の概要（英文）：In the phenomenon of genomic imprinting, a typical example of intergenerational epigenetic regulation in mammals, mono-allelic gene expression is controlled by allele-specific DNA methylation of the imprinting control region (ICR) at the locus. In our previous study, we found that paternal allele-specific de novo DNA methylation of the 'H19-ICR' in preimplantation embryos is essential for maintaining the stable imprinted state of the Igf2/H19 locus. In this study, we investigated the function of Zn finger proteins in the regulation of this post-fertilization imprinted DNA methylation.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス ゲノム刷り込み DNAメチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では世代を越えたエピジェネティック制御が知られており、その代表例が「ゲノム刷り込み」現象である。同現象では、一部遺伝子座の転写調節配列・ICR (imprinting control region) が父・母由来いずれか一方のアレルのみで DNA メチル化されることで、遺伝子が片アレル性の発現パターンを示す。従来、ICR の DNA メチル化は、精子または卵子で獲得され、それが受精後に片アレルで維持される、と考えられてきた。一方で、研究代表者は、マウス *Igf2/H19* 遺伝子座の ICR (*H19*-ICR) を用いてトランスジェニックマウスを作製・解析する過程で、同配列が、精子での DNA メチル化非依存的に、受精直後から父由来アレル特異的に *de novo* DNA メチル化されることを見出した (受精後刷り込みメチル化)。その後、一連の欠損変異型断片のトランスジェニックマウスを解析することにより、同メチル化に必要な配列を *H19*-ICR 内 118-bp の範囲に決定した。この 118-bp をマウス内在遺伝子座から欠損すると、精子でのメチル化レベルは変化しないが、受精後父由来アレルのメチル化が低下し、また、*Igf2*、*H19* 両遺伝子の発現も異常になった。したがって、受精後刷り込みメチル化活性は、着床前胚でのゲノムワイドなエピジェネティック・リプログラミングに抗して、DNA メチル化状態を適切に維持し、その後の正常な刷り込み発現を保障するために機能すると考えられる。さらに、研究代表者らは、ヒト *H19*-ICR (IC1) 配列を導入したトランスジェニックマウスを作製し、ヒト配列においても受精後刷り込みメチル化活性が存在することを見出した。そこで、同メチル化が、哺乳類において生物種を越えて保存された必須のメカニズムであると考え、その解析に取り組むこととした。

2. 研究の目的

マウス *H19*-CR を含め、刷り込み遺伝子座の ICR のメチル化維持に、Zn フィンガータンパク質・Zfp445 が関与することが報告された。しかしながら、その作用点が、着床前胚期、すなわち、研究代表者が見出した受精後刷り込みメチル化が生じる過程なのか、それ以降の時期なのかは不明であった。そこで、これを明らかにすることで、メチル化の分子メカニズムの詳細を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 研究代表者が受精後刷り込み DNA メチル化に必要なことを明らかにしていた、*H19*-ICR 内 118-bp 配列について、Zfp445 タンパク質が結合しうるかを *in vitro* 結合実験により検証した。
- (2) 細胞の核抽出液を用いた *in vitro* 結合実験により、*H19*-ICR 内 118-bp 配列に相互作用するタンパク質の有無を解析した。また、118-bp 配列の一連の変異型断片を用いて結合実験を行うことで、タンパク質結合モチーフを探索した。
- (3) (2) で決定した結合モチーフ中に塩基置換変異を導入した、変異型 *H19*-ICR 断片を作製した。同断片を用いてトランスジェニックマウスを樹立し、受精後刷り込みメチル化の変化の有無を検証した。
- (4) (2) \ (3) で見出したモチーフに結合するタンパク質の候補について、*in vitro* および ES 細胞での結合活性を確認した。また、同候補タンパク質の遺伝子ノックアウトマウスを作製し、ゲノム刷り込み制御への関与の有無を検証した。

4. 研究成果

- (1) *Zfp445* 遺伝子 cDNA をクローニングし、発現ベクターを作製した。発現ベクターをトランスフェクションした HEK293T 細胞の核抽出液、および、大腸菌で発現・精製した GST 融合型 *Zfp445* タンパク質を調製し、これらを用いてゲルシフト・アッセイを行った。しかしながら、マウス *H19*-ICR 118-bp 配列 DNA 断片への結合は検出されなかった。したがって、*Zfp445* は、*H19*-ICR の 118-bp 以外の領域に作用して DNA メチル化維持を調節するが、118-bp を介した受精直後の刷り込みメチル化獲得には関与しないと考えられた。
- (2) (1) の結果を受け、受精後刷り込み DNA メチル化調節因子の同定に向けて、118-bp 配列

内の調節タンパク質結合モチーフの探索を開始した。P19 細胞、マウス ES 細胞、マウス精巢細胞の核抽出液と、118-bp 配列をカバーする一連の断片を用いてゲルシフト・アッセイを行った結果、結合タンパク質の存在を確認できた。そこで、各種変異型断片を用いてゲルシフト・アッセイを繰り返すことで、核抽出液内タンパク質の結合に必要なモチーフが、118-bp 内に 5 カ所存在することを同定した。

(3)(2) で同定したモチーフ内において 1 塩基ずつ、計 5 塩基を置換した変異型 *H19*-ICR 断片を構築し、これを用いてトランスジェニックマウスを作製した。その結果、変異型断片は父由来であっても受精後 DNA メチル化が起こらなくなった。したがって、この 5 塩基の全て、またはいずれかに結合するタンパク質が、*H19*-ICR における受精後刷り込みメチル化に必要であると考えられた。

(4)(3) でマウス *H19*-ICR の受精後刷り込みメチル化に必要であった 5 塩基のうちの 1 つが、ヒト初代培養細胞において *H19*-ICR (IC1) の DNA メチル化維持に必要と報告された BTB/POZ-Zn フィンガータンパク質・Kaiso の結合モチーフに含まれていることが分かった。そこで、*in vitro* (ゲルシフト) およびマウス ES 細胞 (クロマチン免疫沈降) において結合実験を行ったところ、*H19*-ICR 118-bp 領域への Kaiso の結合が検出された。この結果から、同領域への結合を介して、Kaiso が着床前胚における刷り込み DNA メチル化を誘導すると仮説を立てた。これを検証するために、iGONAD 法により *Kaiso* 遺伝子ノックアウトマウスを作製した。

ホモノックアウトマウスは成体まで発生し妊性があったため、両親ともにノックアウト個体を用いて交配を行い、全ての発生段階 (精子、卵子、受精後初期胚、発生後の体細胞) において同因子を完全に欠損して、DNA メチル化解析を行った。その結果、内在 *H19*-ICR は野生型マウスと同程度、刷り込みメチル化されていることが分かった。DNA メチル化レベルに変化がなかったことと一致して、*Igf2*、*H19* 両遺伝子の発現量にも変化がなかった。

また、交配により、*Kaiso* 遺伝子ノックアウト・アレルと *H19*-ICR トランスジーンを同一個体内に持つマウスを得た。これを用いてトランスジェニック *H19*-ICR 断片の DNA メチル化状態を調べた。その結果、精子において低メチル化、着床前胚および出生後体細胞において父由来断片が高メチル化、母由来断片が低メチル化を示した。つまり、*Kaiso* 存在時と同様に、受精後刷り込みメチル化が獲得・維持されることがわかった。

同様の方法で、ヒト IC1 トランスジーンのみメチル化状態も調べた。その結果、*Kaiso* を欠損しても、*Kaiso* 存在下のメチル化レベルと変化は認められなかった。

以上の結果から、ヒト培養細胞での報告とは異なり、マウス個体内で *Kaiso* は、*H19*-ICR の DNA メチル化制御には必要ないと考えられる。

本研究の結果より、*H19*-ICR の受精後刷り込みメチル化には、他の調節タンパク質が結合し、DNA メチル化を調節していると考えられる。現在、その因子を探索している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsuzaki Hitomi, Kimura Minami, Morihashi Mizuki, Tanimoto Keiji	4. 巻 17
2. 論文標題 Imprinted DNA methylation of the H19 ICR is established and maintained in vivo in the absence of Kaiso	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13072-024-00544-8	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 Matsuzaki Hitomi, Takahashi Takuya, Kuramochi Daichi, Hirakawa Katsuhiko, Tanimoto Keiji	4. 巻 51
2. 論文標題 Five nucleotides found in RCTG motifs are essential for post-fertilization methylation imprinting of the H19 ICR in YAC transgenic mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 7236 ~ 7253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad516	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 Matsuzaki Hitomi, Sugihara Shokichi, Tanimoto Keiji	4. 巻 16
2. 論文標題 The transgenic IG-DMR sequence of the mouse Dlk1-Dio3 domain acquired imprinted DNA methylation during the post-fertilization period	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13072-023-00482-x	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 Matsuzaki Hitomi, Miyajima Yu, Fukamizu Akiyoshi, Tanimoto Keiji	4. 巻 4
2. 論文標題 Orientation of mouse H19 ICR affects imprinted H19 gene expression through promoter methylation-dependent and -independent mechanisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02939-9	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 Hirakawa, K., Matsuzaki, H., and Tanimoto, K.	4. 巻 29
2. 論文標題 Transient establishment of imprinted DNA methylation of transgenic human IC1 sequence in mouse during the preimplantation period	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 3646-3661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddaa253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松崎仁美、木村 美南、森橋 美月、谷本 啓司
2. 発表標題 マウスH19-ICR刷り込みDNAメチル化制御におけるBTB-Znフィンガー・タンパク質の機能検証
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷本啓司、松崎仁美
2. 発表標題 マウスIgf2-H19遺伝子座の受精後刷り込みメチル化に関わるcis配列のin vivo検証とtrans因子の探索
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松崎仁美、谷本啓司
2. 発表標題 Igf2/H19遺伝子座におけるゲノム刷り込み維持機構としてのH19-ICR受精後アレル特異的DNAメチル化
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村美南、松崎仁美、谷本啓司
2. 発表標題 H19-ICR受精後刷り込みメチル化における候補トランス因子の関与の in vivo 検証
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷本啓司、松崎仁美、高橋拓也、倉持大地、平川勝彦
2. 発表標題 マウスH19-ICRの受精後刷り込みメチル化に関わるcis制御配列と候補trans因子の探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷本啓司、松崎仁美
2. 発表標題 トランスジェニックマウスにおけるDlk1-Dio3遺伝子領域IG-DMRの刷り込みメチル化の検証
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉原 翔吉、松崎 仁美、谷本 啓司
2. 発表標題 トランスジェニックマウスにおけるラットH19-ICRのDMR形成能の検討
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎 仁美、宮嶋 優、谷本 啓司
2. 発表標題 マウスH19-ICR配列のin vivo反転によるインプリント遺伝子発現機構の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松崎 仁美、平川勝彦、谷本 啓司
2. 発表標題 ヒトH19-ICR YACトランスジェニック・マウスを用いた受精後刷り込みメチル化活性の検証
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020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
---------	---------