

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21810010

研究課題名（和文） 哺乳類のゲノム刷り込み獲得に必要な因子の同定

研究課題名（英文） Identification of the essential factor(s) to establish the genome imprinting in mammals.

研究代表者

宮野 勝 (MIYANO MASARU)

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・博士研究員

研究者番号：50547198

研究成果の概要（和文）：

哺乳類のゲノム刷り込み発現に必要な因子の同定、エピジェネティックな修飾と高次クロマチン構造を明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、ヒト H19 遺伝子において、鳥類細胞では DNA 修飾等のエピジェネティックな変化は見られないが、哺乳類細胞でみられた高次クロマチン構造が形成されていないことが明らかになった。これにより、正常なゲノム刷り込み発現には、進化の過程で獲得した鳥類細胞には存在しない因子により、ゲノム刷り込み遺伝子近傍に適切な高次クロマチン構造が形成されることが重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In order to understand the mechanism of the genome imprinting, we tried to identify the factor(s), epigenetic modifications of chromatin, and higher order chromatin structures requiring for the establishment of the imprinting. We demonstrated that higher order chromatin loop structures at human H19 gene locus in the avian cell hybrids are different from those in mammalian cells, although DNA methylation status and histone modifications at the locus in the hybrids are maintained to those in the mammalian cells. This result suggested a possibility that it may be important to being formed the proper higher order chromatin structures mediated by an unknown factor that is not in the avian cells, but is in the mammalian cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物学・基礎ゲノム科学

キーワード：遺伝子、ゲノム刷り込み、発現制御、クロマチン構造

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム刷り込み現象は哺乳類に特有の遺伝子発現調節機能であり、正常な個体発生には必須である。しかしながら、相同遺伝子の一方をあらかじめ不活性化しておくという一見不利に思える機構を、どのようにして進化の過程で獲得、確立してきたのか。これはゲノム刷り込み現象が発見された当初からの疑問として残されていた。2005年に鳥類ではゲノム刷り込み現象が存在しない、また、有袋類においてはゲノム刷り込み現象がみられるが、卵生の単孔類には存在しないという事象が相次いで報告されたことから、ゲノム刷り込みの獲得と胎盤形成との関わりが示唆されていた。その後の解析により、Dnmt3L (DNA メチルトランスフェラーゼ) がゲノム刷り込みの確立に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。また、この遺伝子は鳥類等では存在していないことから、Dnmt3L の獲得とゲノム刷り込みの獲得の関連性が示唆されていた。しかしながら、実際何が引き金となって、ゲノム刷り込みが確立したのかは分かっていないのが現状である。

そこで、ヒトのゲノム刷り込み遺伝子をゲノム刷り込みが存在しない鳥類細胞に移入し、その遺伝子発現調節機構を解析することで、ゲノム刷り込みの確立に必要なメカニズムを明らかにできるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

我々は、ゲノム刷り込み遺伝子を持つヒトの染色体をゲノム刷り込みのない鳥類の細胞に移入した結果、鳥類細胞中において、正常な刷り込み発現を安定的に保持していた遺伝子とそうでない遺伝子が存在することを見いだした。このことから、鳥類細胞ではヒト染色体上の刷り込み情報を認識する因子が存在しない、もしくは、ヒト刷り込み遺伝子近傍の DNA のメチル化を含めたエピジェネティック修飾が鳥類細胞中で変化し、本来の刷り込み遺伝子発現を呈さなかった可能性が示唆された。

そこで、鳥類細胞においてゲノム刷り込み発現異常が認められた遺伝子において、ヒト染色体上のエピジェネティック修飾を含めた何が変化したのか、また、何を鳥類細胞に導入することで、正常な刷り込み発現を回復させることができるのかを見つけ出すことで、哺乳類細胞が進化の過程で獲得したゲノム刷り込み発現に必要な因子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

鳥類細胞において刷り込み発現異常が認められた遺伝子に関して、何が発現異常を引き起こしたのかを解析するために、エピジェネティックな修飾の変化を解析した。このエピジェネティック修飾は遺伝子発現に重要な役割を果たしていると考えられている。解析方法は DNA のメチル化の状態を調べるために Bisulfite 法を用いた。さらに、ヒストンの修飾状態を調べるために、ヒストン修飾を特異的に認識する抗体を用いて、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) により解析を行った。また、H19/IGF2 遺伝子領域において、H19 および IGF2 の刷り込み遺伝子の発現は親アレルト異的な高次クロマチン構造に起因することがすでに報告されている。そこで、発現異常が認められた H19 遺伝子近傍の高次クロマチン構造を 3C (Chromosome Conformation Capture) 法を用いて解析を行った。3C 法は細胞内において空間的に近接したクロマチン領域を解析する方法で、従来の DNA-FISH 法よりも、より高解像度で解析できる利点がある。これにより、発現異常が認められた H19 遺伝子近傍の高次クロマチン構造の詳細な解析が可能であると考えた。

## 4. 研究成果

ゲノム刷り込み遺伝子が存在するヒトの染色体をゲノム刷り込みがないとされている鳥類細胞 (DT40 細胞) に移入した結果、哺乳類細胞内と同様に刷り込み発現を示した遺伝子がある一方、刷り込み発現異常を示した遺伝子も存在することが明らかになった。後者に属する遺伝子として、H19 遺伝子について、詳細に解析を行うことにした。本来であれば、父親アレルからの転写が抑制されているはずの H19 遺伝子において、その発現抑制解除が見られた。しかしながら、この発現抑制解除の見られた H19 遺伝子を持つヒト染色体を鳥類細胞から単離し、マウスの A9 細胞に再移入したところ、正常な刷り込み発現を再び示した。このことから、発現抑制解除は細胞移入により人工的に引き起こされた事象ではなく、ゲノム刷り込みが存在しないとされている鳥類細胞に移入したことが原因であるという結論に至った。次に、この発現抑制解除の原因を明らかにするために、H19 遺伝子の上流にある発現調節領域 (DMR) におけるメチル化状態を解析した (図 1)。

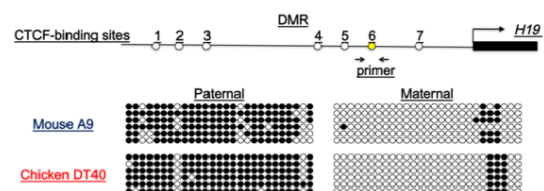


図1 H19 遺伝子上流 DMR のメチル化解析。  
白丸は非メチル化, 黒丸はメチル化 CpG をそれぞれ示す。

大変興味深いことに、発現異常が認められた鳥類細胞において、父方アレル由来の H19 遺伝子上流に存在する ICR(DMR) のメチル化状態は、哺乳類細胞におけるそれと同様に高メチル化状態を維持していた。つまり、発現抑制解除が認められたにも関わらず、DNA のメチル化状態は発現抑制型を示していた。この結果から、以下の二つの可能性が予想された。

(1) ヒト染色体を鳥類細胞に移入した結果、DNA メチル化以外のエピジェネティック修飾が変化し、刷り込み発現が変化した。

(2) ヒト染色体上のエピジェネティック修飾は維持されているが、それを認識し、発現制御する因子が鳥類細胞中に存在しないため、刷り込み発現に以上が生じた。

まず、前者の可能性を検討するため、DNA のメチル化同様、遺伝子の発現調節に重要な役割を果たすと考えられているヒストン修飾の解析を行った (図2)。

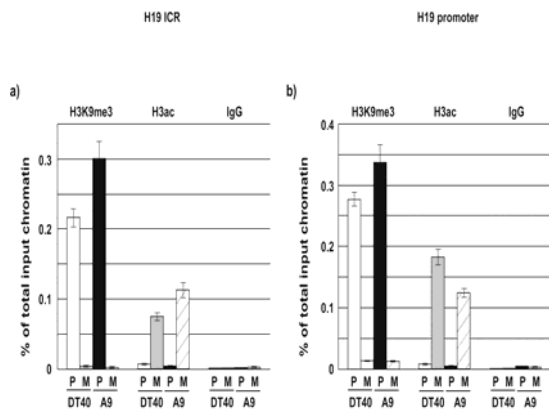


図2 ヒト H19 遺伝子におけるヒストン修飾の解析。  
縦軸は免疫沈降されたクロマチン量を示す。  
P; 父方アレル, M; 母方アレル, IgG; ネガティブコントロール

ヒト H19 遺伝子のプロモーター領域、および、その上流の ICR に対して、発現抑制型 (H3K9me3) および、発現活性化型 (H3ac) のヒストン修飾を認識する抗体を用い、ChIP 法により DNA を回収した後、リアルタイム PCR 法を用いて、その修飾状態を定量的に解析した。その結果、ICR および、プロモーター領域において、鳥類細胞での父方アレル上のヒストンの修飾状態は DNA メチル化解析結果と同様、遺伝子発現抑制型、すなわち、哺乳類細胞同様の修飾状態を維持したままであった。以上から、上述した (1) のようなエピジェネティック修飾の変化が原因ではないと結論づけた。

次に、(2) の可能性に関して、検討を行った。これまでにマウスの *Igf2/H19* 領域において、親アレル特異的なクロマチン構造が形成されており、*H19* および *Igf2* の発現制御に関わっていることが報告されている。鳥類細胞において、エピジェネティック修飾に変化が見られないことから、おそらく H19 遺伝子の発現抑制解除は H19 遺伝子近傍の局所的な変化ではなく、その 100 Kbp 以上上流に存在する *IGF2* 遺伝子を含めた領域全体のクロマチン構造に変化が生じたためと推察された。そこで、3C 法を用いて H19/*IGF2* 領域の高次クロマチン構造の解析を行った (図3)。

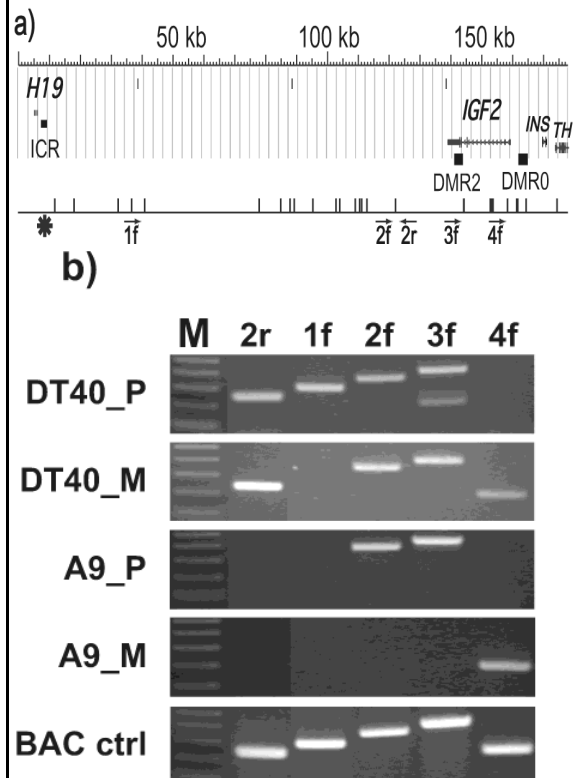


図3 高次クロマチン構造の解析。  
a) ヒト *H19/IGF2* 領域の物理地図。最下段に用いたプライマーの位置と向きを示した。アスタリスクは起点となるプライマーの位置を示す。b) アガロースによる解析結果。データ上部の記号は a) 中のプライマーに対応。P; 父方アレル, M; 母方アレル, BAC ctrl; ポジティブコントロール。

H19 の ICR を起点として、どの領域と空間的に近接しているかを解析した結果、マウス A9 細胞において、父方アレルは *IGF2* の 3' 末端側に存在する DMR2 と、また、母方アレルは *IGF2* の 5' 末端側とそれぞれ得意的に相互作用していることが明らかになった。これは、これまでに報告されている結果とも一致する。しかしながら、鳥類細胞 DT40 内において、同様の解析を行ったところ、父方アレル、母方アレルともに哺乳類細胞内のそれとは

大きく異なる相互作用を示した。図3の結果から、*H19/IGF2*領域の高次クロマチン構造はそれぞれの雑種細胞において以下のようになっていると考えられる（図4 a-d）。

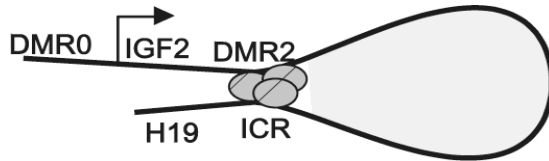


図4-a 父方11番染色体移入マウス雑種細胞

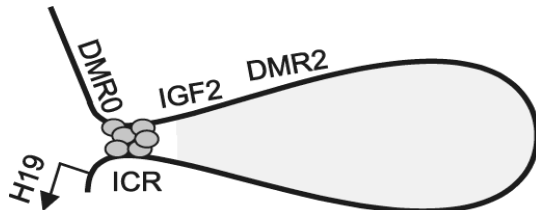


図4-b 母方11番染色体移入マウス雑種細胞

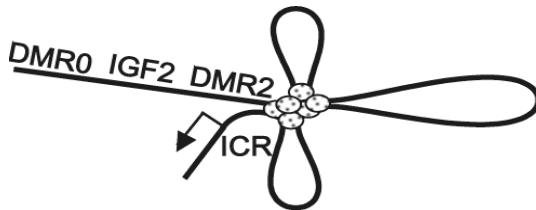


図4-c 父方11番染色体移入鳥類雑種細胞

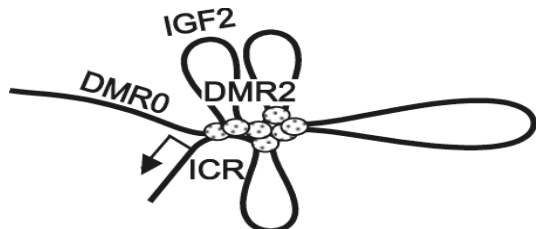


図4-d 母方11番染色体移入鳥類雑種細胞

マウス、鳥類雑種細胞において、*H19*のICRと*IGF2*の5'末端側に母方アレル特異的な相互作用が認められるものの、それ以外の領域ではアレル特異的な相互作用は見られなかった。また、鳥類細胞内では哺乳類細胞内で見られたアレル特異的な大きなクロマチンループ構造ではなく、小さなクロマチンループ構造が*H19/IGF2*領域に多数形成されていることが明らかになった。この高次クロマチン構造の違いが*H19*の発現抑制解除に関与していると推察された。しかしながら、鳥類細胞における*H19*の発現抑制解除は、父方アレル特異的なエピジェネティック修飾を認識する因子が存在しないことによって母方アレル様のクロマチン構造を形成したためではないと考えられる。母方アレルにおいても小さなクロマチンループ構造が多数形成さ

れていることから、むしろ、アレル特異性を認識する因子の欠損により、*H19/IGF2*領域で適切な高次クロマチン構造が形成されないことで、両アレルからエクトピックな発現が生じたものと推察された。

今回の結果は、哺乳類細胞が進化の過程で獲得した因子が局所的な遺伝子発現の制御だけに関わっているのではなく、*H19/IGF2*領域全体を通して、適切な高次クロマチン構造の形成に寄与していることを示唆している。また、さらに、適切な高次クロマチン構造形成がアレル特異的な発現に必須であることを示した点を含めて、非常に興味深い知見を得ることが出来たと考えている。

今後は進化の過程で獲得した因子を同定することで、ゲノム刷り込みの発現調節機構をより詳細に明らかにしていきたい。これらの研究により、生物学分野の一つの大きな疑問であるゲノム刷り込み現象の生物学的意義に対する答えに近づけることができると期待している。

## 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）

〔学会発表〕（計 1件）

1. 宮野勝、堀家牧子、押村光雄、堀家慎一、  
What is the essential component in the evolution of genomic imprinting in mammals.  
第32回日本分子生物学会年会、  
2009年12月10日、パシフィコ横浜（神奈川県）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮野 勝 (MIYANO MASARU)  
金沢大学・フロンティアサイエンス機構・  
博士研究員  
研究者番号：50547198

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

堀家 慎一 (HORIKE SHIN-ICHI)  
金沢大学・フロンティアサイエンス機構・

特任助教  
研究者番号 40448311

堀家 牧子 (HORIKE MAKIKO)  
金沢大学・学際科学実験センター・  
博士研究員  
研究者番号 50448312