

平成30年6月15日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26840113

研究課題名(和文) マウスゲノム刷り込み遺伝子座におけるエピジェネティック修飾制御の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of epigenetic regulation at the mouse imprinted locus

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類のゲノム刷り込み現象では、アリル特異的なDNAメチル化(刷り込みメチル化)が制御の中心的役割を果たし、その破綻は個体発生の異常やヒト疾患の原因となる。しかし、同メチル化を確立・維持する分子メカニズムは、まだよくわかっていない。我々は、先行研究において、Igf2/H19遺伝子座の転写制御配列「H19 ICR」が、受精後、父由来アリル特異的メチル化を自律的に獲得できることを見出していた。本研究では、複数のH19 ICR配列トランスジェニックマウス、および、ノックアウトマウスを作製・解析し、そのメチル化制御の責任配列を、百数十bpの範囲に同定した。

研究成果の概要(英文)：Parent-of-origin-specific DNA methylation (imprinted methylation) plays a central role in controlling imprinted genes expression in mammals, malfunction of which frequently leads to developmental defects and diseases. However, molecular mechanisms by which the methylation status is established and maintained are not fully understood. We previously demonstrated that the H19 imprinting control region (ICR) sequence of the Igf2/H19 locus possesses intrinsic activity to acquire paternal-allele-specific methylation after fertilization in the ectopic genomic loci. In this study, I generated multiple transgenic mouse lines bearing a series of 5'-truncated H19 ICR fragments, and knockout, as well as transgenic mouse lines, in which candidate regulatory sequences were internally deleted from the H19 ICR. Analyses of these animals revealed that one hundred-ish base-pairs of sequences in the H19 ICR are responsible for methylation acquisition on the paternal allele after fertilization.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ゲノム刷り込み DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳類の遺伝子の一部では、アレルが父または母のどちらに由来するかで、子における発現の有無が決定される(ゲノム刷り込み: genomic imprinting)。同現象は個体の正常な発生・成長に必須で、その破綻は疾患の原因となるため、制御メカニズムの解明は重要である。ゲノム刷り込みは、遺伝子 DNA の塩基配列の変化は伴わず、エピジェネティックな修飾により制御される。その中心は、アレル特異的な DNA メチル化で、*Igf2/H19* 遺伝子座では、制御領域「*H19* ICR (imprinting control region)」の父由来アレル特異的な DNA メチル化が、刷り込み遺伝子発現を引き起こす。同領域は精子でメチル化されるが卵ではメチル化されず、この差が受精後もアレル間でそのまま維持されると広く考えられてきたが、その分子機構はよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

以前我々は、*H19* ICR 断片を導入したトランスジェニックマウスの解析によって、導入 *H19* ICR 配列は精子でメチル化されないにもかかわらず、受精後に、父由来特異的に DNA メチル化されることを見出した。つまり、生殖細胞で DNA メチル化されなくても、子でアレル特異的な DNA メチル化パターンが形成されうるといえる。刷り込み遺伝子発現の制御に直結するのは、子における *H19* ICR 配列の DNA メチル化状態であり、同メチル化は、発生の各段階で生じる他のゲノム領域のエピジェネティックな変化に影響されずに保たれる必要がある。これを実現するのが、先のトランスジェニックマウスの結果から示唆された、受精後に父由来 *H19* ICR を積極的にメチル化する制御メカニズムである可能性が高いと考えた。そこで、本研究は、*H19* ICR において、受精後、アレルが父・母どちらに由来するかが識別され、一方のアレルのみが DNA メチル化される分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

H19 ICR 配列内の活性を個体レベルで検証するために、同断片を酵母人工染色体(YAC)上のヒトβ-グロビン遺伝子座に挿入した後、YAC トランスジェニックマウスを作製する方法を用いた。同手法の利点として、トランスジェニック上の野生型 *H19* ICR 配列(2.9 kb)が、生殖細胞ではメチル化されないが、子では父由来特異的にメチル化されるため、受精後のメチル化制御メカニズムに特化して解析することができること、また、巨大な DNA 断片(YAC; 150 kb)を用いるため、ゲノムに挿入されたトランスジェニックが位置効果を受けにくく、安定した結果を得られること、が挙げられる。

二分割した *H19* ICR 断片の活性を同手法によって解析した先行研究の結果から、5'側半

分に父由来メチル化に必要な配列が含まれると予想した(引用文献)。そこで、メチル化制御責任領域を絞り込むために以下の解析をおこなった。

(1) 5'末端から二段階に配列を欠損した断片を作製した。それぞれをβ-グロビン遺伝子座 YAC に挿入後、YAC トランスジェニックマウスを作製し、メチル化解析をおこなった。

(2) (1) の結果をもとに、さらに細かく段階的に上流から配列を欠損した一連の *H19* ICR 断片を作製した。これらのメチル化状態を、同様に、β-グロビン遺伝子座 YAC トランスジェニックマウスを作製して解析した。

(3) 上記の結果から推定されたメチル化制御責任領域の必要性を証明するために、同配列を、β-グロビン YAC トランスジェニック上の全長 *H19* ICR 配列、あるいは、マウス内在遺伝子座 *H19* ICR 配列内から CRISPR/Cas9 システムによって内部欠損させたマウスを作製し、メチル化状態を解析した。

4. 研究成果

(1) もとになる 2.9 kb の *H19* ICR 断片の 5' 末端から、0.8 kb、あるいは 1.0 kb 短くした断片を作製し、メチル化状態を YAC トランスジェニックマウスにおいて解析した。その結果、0.8 kb 欠損しただけで、父由来であっても全くメチル化されなくなり、1.0 kb 欠損した断片も同様にメチル化されなかった。したがって、父由来アレルで受精後メチル化を誘導するための配列は、*H19* ICR 断片 5' 末端から 0.8 kb の範囲の中に存在すると考えられた(引用文献)。

(2) *H19* ICR 断片の 5' 末端から 0.8 kb の範囲で、細かく段階的に短くした一連の欠損型断片を作製し、それぞれを導入した YAC トランスジェニックマウス系統を樹立した。同トランスジェニックマウスにおいてメチル化状態を解析した結果、父由来であってもメチル化されなくなる断片が見つかった。その断片の末端の位置から、父由来で受精後メチル化を誘導するために必要な配列の存在が予想される領域を、百数十 bp の範囲に絞り込んだ。

(3) 父由来メチル化誘導責任配列の候補範囲の両端をターゲットとするガイド RNA と、Cas9 タンパク質とを発現するベクターを受精卵に顕微注入することで、*H19* ICR (YAC トランスジェニック上、あるいは、内在遺伝子座内)から内部欠損させた。その結果、*H19* ICR トランスジェニックの受精後メチル化は全く見られなくなり、また、内在父由来 *H19* ICR のメチル化も受精後低下した。したがって、同定した範囲を、現時点での受精後の父由来メチル化責任配列と決定した。

以上の結果から、*H19* ICR の父由来メチル化は、特定の塩基配列を介して制御されることがわかった。我々はすでに、母由来アリルを異常なメチル化から保護して非メチル化状態を保つために必要な配列を報告していた(引用文献、)が、父由来でメチル化を誘導する配列を百数十 bp という短い範囲で同定したのは、他の研究グループも含めてこれが初めてである。この結果から、*H19* ICR のアリル特異的メチル化は、「父由来でメチル化する」ための配列と、「母由来でメチル化を防ぐ」ための配列の組み合わせによって実行されることがわかった。それぞれのアリルのメチル化状態が異常になると、遺伝子の刷り込み発現が異常になり、ベックウィズ-ヴィーデマン症候群やシルバー-ラッセル症候群の原因となることが知られている。本研究の成果は、これらゲノム刷り込み病の発症のメカニズムを理解する上で、重要な知見となる。

<引用文献>

Okamura, E., **Matsuzaki, H.**, Sakaguchi, R., Takahashi, T., Fukamizu, A., and Tanimoto, K. “The *H19* imprinting control region mediates preimplantation imprinted methylation of nearby sequences in yeast artificial chromosome transgenic mice” *Mol. Cell. Biol.* 33, 858-871 (2013)

Matsuzaki, H., Okamura, E., Takahashi, T., Ushiki, A., Nakamura, T., Nakano, T., Hata, K., Fukamizu, A., and Tanimoto, K. “*De novo* DNA methylation through the 5'-segment of the *H19* ICR maintains its imprint during early embryogenesis” *Development* 142, 3833-3844 (2015)

Matsuzaki, H., Okamura, E., Fukamizu, A., and Tanimoto, K. “CTCF binding is not the epigenetic mark that establishes post-fertilization methylation imprinting in the transgenic *H19* ICR” *Hum. Mol. Genet.* 19, 1190-1198 (2010)

Sakaguchi, R., Okamura, E., **Matsuzaki, H.**, Fukamizu, A., and Tanimoto, K. “Sox-Oct motifs contribute to maintenance of the unmethylated *H19* ICR in YAC transgenic mice” *Hum. Mol. Genet.* 22, 4627-4637 (2013)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Matsuzaki, H., Okamura, E., Takahashi, T., Ushiki, A., Nakamura, T., Nakano, T., Hata, K., Fukamizu, A., and Tanimoto, K. “*De novo* DNA methylation through the 5'-segment of the *H19* ICR maintains its

imprint during early embryogenesis” *Development* 142, 3833-3844 (2015)
DOI: 10.1242/dev.126003 査読有

[学会発表](計 16 件)

Matsuzaki, H., Kuramochi, D., Hirakawa, K., and Tanimoto, K. “Imprinted gene expression can be reconstituted by synthetic DNA fragment composed of specified *cis* regulatory elements from the *H19* ICR” Keystone Symposia (Gene Control in Development and Disease), 2018

倉持大地、**松崎仁美**、牛木亜季、谷本啓司「人工刷り込み制御配列によるゲノム刷り込みの再構築」第 64 回日本実験動物学会総会、2017 年

松崎仁美、倉持大地、牛木亜季、谷本啓司「マウス *H19* ICR におけるアリル特異的 DNA メチル化制御配列の同定」第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年

谷本啓司、**松崎仁美**、牛木亜季、倉持大地「アリル特異的 DNA メチル化(刷り込みメチル化)配列の *in vivo* 再構築」第 89 回日本生化学会大会、2016 年

Matsuzaki, H. and Tanimoto, K. “Imprinted DNA methylation status can be reconstituted by combining activity of distinct *H19* ICR elements in mice” Mouse Genetics 2016 at The Allied Genetics Conference 2016, 2016

松崎仁美「受精後アリル特異的 *de novo* DNA メチル化によるゲノム刷り込み制御」第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会、2016 年

松崎仁美、倉持大地、谷本啓司「マウス *H19* ICR 上流配列を介したアリル特異的 DNA メチル化の検証」第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会 2016 年

Matsuzaki, H. and Tanimoto, K. “5'-segment of the *H19* ICR confers ability to acquire post-fertilization allele-specific DNA methylation to artificial DNA sequences” International Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells, 2016

松崎仁美、倉持大地、谷本啓司「マウスにおける再構築刷り込みメチル化配列の活性の検証」BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会) 2015 年

Tanimoto, K., **Matsuzaki, H.**, Okamura, E., Ushiki, A., and Takahashi, T. “*De novo* DNA

methylation mediated by 5' portion of the *H19* ICR is essential for maintaining its methylation imprint during early embryogenesis in mice” Mouse Molecular Genetics 2015. 2015

松崎仁美、谷本啓司「刷り込みメチル化配列の再構築」第9回日本エピジェネティクス研究会年会、2015年

Matsuzaki, H., Okamura, E., Ushiki, A., Takahashi, T., and Tanimoto, K. “A role for postfertilization, allele-specific DNA methylation activity in maintaining the imprinted *H19* ICR methylation” Keystone Symposia (DNA methylation), 2015

松崎仁美、岡村永一、牛木亜季、高橋拓也、谷本啓司「*Igf2/H19* 刷り込み遺伝子座における受精後アリル特異的 DNA メチル化活性の解析」MBSJ2014 (第37回日本分子生物学会年会)、2014年

松崎仁美、岡村永一、牛木亜季、高橋拓也、谷本啓司「マウス *H19* ICR における受精後アリル特異的 DNA メチル化活性の解析」第8回日本エピジェネティクス研究会年会、2014年

Matsuzaki, H., Okamura, E., Ushiki, A., Takahashi, T., and Tanimoto, K. “Allele-specific, post-fertilization DNA methylation activity is essential for patching up imprinted *H19*-ICR methylation status” Keystone Symposia (Epigenetic Programming and inheritance), 2014

Matsuzaki, H., Sakaguchi, R., Okamura, E., and Tanimoto, K. “Sox-Oct motifs maintain the unmethylated state of the *H19* ICR in YAC transgenic mice” Keystone Symposia (Epigenetic Programming and inheritance), 2014

6. 研究組織

(1) 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：5 0 4 3 6 2 4 2