

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05012

研究課題名(和文) 受精後刷り込みメチル化を誘導する生殖細胞エピゲノム情報の解明

研究課題名(英文) Search for germline epigenetic information that induces post-fertilization imprinted methylation

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類では、一部の決まった遺伝子が片アリルのみで発現することが知られており(ゲノム刷り込み)、これは正常発生に必須である。同現象は、遺伝子座の発現調節領域「ICR」がアリル特異的にDNAメチル化されることが基盤となっている。本研究では、Igf2/H19刷り込み遺伝子座のICRが、受精後、父由来特異的にDNAメチル化される過程において、アリルの識別に用いられる生殖細胞由来エピジェネティック情報を探索するとともに、制御に必要な・十分なシス配列を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトでは、刷り込み遺伝子のDNAメチル化異常による疾患が知られている。また、近年、親が曝された環境要因によりエピジェネティックな変化が配偶子で生じ、子での遺伝子発現に影響を与える可能性も指摘されている。本研究による、受精後のアリル特異的DNAメチル化制御メカニズムの解析結果は、疾患の原因究明やエピジェネティック遺伝の実体の解明に向けて、基礎となる情報を提供できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In mammals, mono-allelic expression of a subset of genes (genomic imprinting) is essential for normal development, which is governed by allele-specific DNA methylation at the imprinting control regions (ICRs) within the loci. In the present study, I searched for epigenetic information used to discriminate parental alleles in the process of post-fertilization imprinted DNA methylation of the ICR at the Igf2/H19 locus. In addition, I identified cis sequences which are necessary and sufficient for the regulation.

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

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類では、「ゲノム刷り込み (genomic imprinting)」制御により、特定の遺伝子が父・母から受け継がれた一対のアリルのうちの決まった一方しか発現しない。この特徴的な発現様式は、個体の正常発生に必須である。その制御の基盤には、刷り込み遺伝子座内の発現調節領域「Imprinting control region (ICR)」のアリル特異的な DNA メチル化がある。*Igf2/H19* 刷り込み遺伝子座では、ICR (*H19*ICR) 配列が、父由来アリルのみでメチル化される結果、*Igf2* 遺伝子は父由来、*H19* 遺伝子は母由来アリルのみで発現する。*H19* ICR は、精子のみでメチル化され (卵子ではメチル化されず)、受精後は父由来アリルのみでメチル化される。したがって、親 (生殖細胞) で確立された DNA メチル化情報が子に伝わって維持される結果、ゲノム刷り込みが起こる、つまり、DNA メチル化が世代を越えて受け継がれるエピゲノム情報の本体と考えられていた。

ところが申請者は、*H19* ICR 配列 (2.9 kb) を用いてトランスジェニック (Tg) マウスを作製した結果、導入 *H19* ICR は精子でメチル化されなかったにもかかわらず、受精直後から父由来の場合だけ新規に (*de novo*) メチル化されることを見いだした。つまり、*H19* ICR では、受精後アリルの由来を区別するための、DNA メチル化以外のエピゲノム情報も生殖細胞から受精卵に伝わっており、この印をもとに *de novo* DNA メチル化が誘導される、と考えられた。

受精直後の胚では、ゲノム全体がリプログラミングにより脱メチル化される。このような環境下でも、父由来 *H19* ICR では、正しく DNA メチル化が維持されなければならない。我々が見つけた、受精後のアリル特異的新規 DNA メチル化活性は、リプログラミングに抗した DNA メチル化維持に重要であると推測された。これは、同活性に必要な配列 (765 bp) をトランスジェニックマウスマウスで決定し、内在 *H19* ICR から欠損した結果、受精後のメチル化低下、刷り込み発現の異常と胎仔の成長遅延が観察されたことから、実証された。

## 2. 研究の目的

*H19* ICR の受精後アリル特異的 DNA メチル化のメカニズムを、制御シス配列の同定と、生殖細胞由来のエピジェネティック・マークの探索によって明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 受精後アリル特異的 DNA メチル化制御コア配列の決定

受精後のアリル特異的 DNA メチル化には、*H19* ICR 断片の上流末端約 500 bp の範囲が必要であることがわかってきた。そこで、上流末端から、さらに短い間隔で段階的に欠損させた *H19* ICR 断片を作製し、トランスジェニックマウスにおいてそのメチル化状態を解析した。これにより、メチル化制御コア配列の候補領域を決定した。さらに、同候補領域を *H19* ICR トランスジェン全長、または、マウス内在 *H19* ICR から内部欠損させ、メチル化制御における必要性を検証した。

### (2) DNA メチル化制御コア配列の活性の十分性の検証

(1) で決定したメチル化制御コア配列を、刷り込みメチル化活性のない人口断片 ( $\lambda$  ファージ由来配列) に CTCF 結合配列と Sox-Oct モチーフを挿入、親の由来にかかわらずマウス内で低メ

チル化)に追加した、再構築断片を作製した。これを用いてトランスジェニックマウスを作製し、人工断片中に挿入した制御シス配列が、刷り込みメチル化状態を形成するのに十分な活性を持つか、検証した。

#### (3) 人工 ICR 配列の機能の十分性の検証

(2) で作製した人工断片によって、内在 *H19* ICR 配列を置換したマウスを作製した。これにより、再構築した人工配列が、*H19* ICR の機能を完全に代替でき、ゲノム刷り込みを引き起こすのに十分な活性をもつか検証した。

#### (4) 生殖細胞における DNA メチル化以外のエピジェネティック・マークの探索

受精後、アレル特異的に DNA メチル化を誘導するには、*H19* ICR 配列が由来する親の性を見分ける目印が必要であり、これは生殖細胞に由来すると考えられる。このエピジェネティック・マークを明らかにするために、精子における *H19* ICR 配列(トランスジーン及び内在遺伝子座)のクロマチン状態をクロマチン免疫沈降法により解析した。

## 4. 研究成果

(1) *H19* ICR の末端を段階的に欠損した変異型断片が、トランスジェニックマウスにおいて受精後 DNA メチル化が失われるようになることを指標に、制御コア配列の候補領域を約 120 bp の範囲に絞り込んだ。同領域を *H19* ICR トランスジーン全長から内部欠損することによっても、受精後のメチル化が失われることが確認された。また、内在 *H19* ICR から欠損すると、精子でのメチル化には影響がなかったが、受精後、父由来 *H19* ICR のメチル化が失われた。したがって、同領域が、*H19* ICR の受精後アレル特異的 DNA メチル化に必要であることが同定された。

(2) (1) で同定した受精後 DNA メチル化制御コア配列(約 120 bp)を、刷り込み活性のない人工断片に付加してトランスジェニックマウスを作製した結果、人工配列は受精後父由来のみでメチル化されるようになった。したがって、同 120-bp 配列は、DNA メチル化制御に十分な活性を持つことが示された。

(3) (2) で作製した人工断片によって、内在遺伝子座 *H19* ICR を置換したノックインマウスを作製した結果、*H19* ICR と同様に、精子での DNA メチル化、受精後の父由来アレル特異的 DNA メチル化が再現され、*Igf2*、*H19* 両遺伝子の刷り込み発現、正常な個体発生が認められた。したがって、受精後アレル特異的メチル化に十分な制御配列が同定され、これを用いて人工的に ICR 配列を再構築できることが証明された。

(4) トランスジェニックマウス、及び、内在遺伝子座変異マウスの精子を用いてクロマチン状態を解析した。その際、検出精度を高めるために実験方法に改良を加え、また、上記(1)~(3)で決定できた制御コア配列を中心に解析をおこなった。これにより、受精後、*H19* ICR 配列が由来する親の性を見分けるうえで目印となる、エピジェネティック・マークを探索した。その結果、特定のヒストン修飾が多く存在する可能性が見いだされた。各種変異型 *H19* ICR を持つ精子を用いて、この結果の検証を進めている。

本研究により、*H19* ICR の受精後刷り込みメチル化制御に必要なコア配列を決定でき、その機能の十分性も証明された。また、その成果を、生殖細胞におけるエピジェネティック・マークの探索に利用した。

ヒトでは、刷り込み遺伝子の異常による疾患が多数知られており、*H19* ICR の DNA メチル化異常は Beckwith-Wiedeman 症候群や Silver-Russell 症候群の原因の一つである。また、生殖補助医療 (ART) における配偶子や胚の操作が、刷り込み遺伝子の DNA メチル化状態に影響を与える可能性や、iPS 細胞の多分化能と刷り込み遺伝子発現量との間に相関も報告されている。したがって、本研究による刷り込み DNA メカニズムの解析から、疾患の原因究明や生殖補助技術の改良 (医学分野)、高品質な幹細胞の作出 (幹細胞研究) に対して基礎となる情報を提供できると期待できる。さらに、近年、親が曝された環境要因 (栄養状態、精神的ストレス、化学物質) が、子の代謝の制御等に影響を与えうることが、疫学調査やモデル動物を用いた実験から示されている。DNA 塩基配列の変異を伴わないことから、配偶子で生じたエピジェネティックな変化が、子での遺伝子発現に影響を与えるためだと考えられる (transgenerational epigenetic inheritance)。 *H19* ICR におけるエピジェネティック遺伝のメカニズム解明は、同現象を理解する上でも有用である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuzaki, H., Kuramochi, D., Okamura, E., Hirakawa, K., Ushiki, A., and Tanimoto, K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Recapitulation of gametic DNA methylation and its post-fertilization maintenance with reassembled DNA elements at the mouse Igf2/H19 locus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13072-019-0326-1	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, H., Okamura, E., Kuramochi, D., Ushiki, A., Hirakawa, K., Fukamizu, A., and Tanimoto, K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Synthetic DNA fragments bearing ICR cis elements become differentially methylated and recapitulate genomic imprinting in transgenic mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin	6. 最初と最後の頁 36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13072-018-0207-z	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Matsuzaki, H., Kuramochi, D., Hirakawa, K., and Tanimoto, K.
2. 発表標題 Reconstituted H19 ICR sequence with identified cis elements is capable of maintaining genomic imprinting in knock-in mouse
3. 学会等名 33rd International Mammalian Genome Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirakawa, K., Matsuzaki, H., and Tanimoto, K.
2. 発表標題 Test for imprinted DNA methylation activity of the human H19-ICR in YAC transgenic mice by adopting a transgene co-placement strategy
3. 学会等名 The 15th Transgenic Technology Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮嶋優、谷本啓司、松崎仁美
2. 発表標題 マウスのゲノム刷り込み制御におけるH19-ICR配列反転の効果
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平川勝彦、松崎仁美、谷本啓司
2. 発表標題 YACトランスジェニック・マウスを用いたヒトH19-ICR刷り込みメチル化メカニズムの検証
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuzaki, H., Miyajima, Y., and Tanimoto, K
2. 発表標題 In vivo analysis of H19 gene transcriptional mechanism by inversion of the H19 imprinting control region
3. 学会等名 32nd International Mammalian Genome Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮嶋優、谷本啓司、松崎仁美
2. 発表標題 H19-ICR反転によるH19遺伝子転写制御機構のin vivo解析
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平川勝彦、松崎仁美、谷本啓司
2. 発表標題 ヒト グロビン遺伝子座におけるH19-ICR断片挿入の効果とクロマチン立体構造解析
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎仁美、宮嶋優、谷本啓司
2. 発表標題 H19-ICR 反転マウスを用いたゲノム刷り込み制御機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuzaki, H., Kuramochi, D., Hirakawa, K., and Tanimoto, K.
2. 発表標題 Imprinted gene expression can be reconstituted by synthetic DNA fragment composed of specified cis regulatory elements from the H19 ICR
3. 学会等名 Keystone Symposia (Gene Control in Development and Disease) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉持大地、松崎仁美、牛木亜季、谷本啓司
2. 発表標題 人工刷り込み制御配列によるゲノム刷り込みの再構築
3. 学会等名 第64回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----