

令和元年6月26日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05579

研究課題名(和文) Gpr1/Zdbf2領域から見出すゲノム刷り込み現象の新たな概念

研究課題名(英文) New paradigm of genomic imprinting at Gpr1/Zdbf2 locus

研究代表者

小林 久人 (KOBAYASHI, Hisato)

東京農業大学・その他部局等・准教授

研究者番号：70632727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,000,000円

研究成果の概要(和文)：刷り込み遺伝子における片親性DNAメチル化は、配偶子形成過程で確立し、受精後もメチル化の差は維持される。研究代表者らは以前、初期胚発生過程でエピゲノム修飾のスイッチを必要とするユニークな刷り込み遺伝子座“Zdbf2”を同定した。本研究により、このZdbf2遺伝子座は有袋類では刷り込みを受けず、メチル化をスイッチさせるZdbf2長鎖アイソフォームも存在しないことが明らかとなった。また、LTRレトロトランスポゾンが種特異的な卵子DNAメチル化領域と母方メチル化刷り込み候補領域を生み出すことを明らかにした。これらの知見は、ゲノム刷り込み機構の複雑な起源とメカニズムを解明する多くのヒントを提供する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳動物に存在するゲノム刷り込み機構は、両親由来のゲノムの機能的な補正をしながら胎児の発生を調整するしくみである。マウス・ヒト等の刷り込み機構の種間および発生比較解析により、真獣類あるいはヒト特有の刷り込み機構の成立と機序を明らかにすることができた。今後の生殖補助医療において、流産・奇形のリスクを下げるため、本研究で明らかにしたヒト特有の刷り込み情報を卵子評価に応用することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Parent-of-origin DNA methylation patterns at imprinted genes are established during gametogenesis and maintained after fertilization. However, we previously characterized the unusual regulation of the imprinted Zdbf2 locus, which requires an epigenetic switch during early embryogenesis. In this study, we revealed that this unique locus is not imprinted in marsupials without Zdbf2 long isoform switching DNA methylation mark. We also found that LTR retrotransposons transcribed in oocytes drives specie-specific oocyte DNA methylomes and maternally-methylated potentially imprinted regions. These findings provide us with many hints to elucidate the complicated origin and mechanism of genome imprinting.

研究分野：エピゲノム

キーワード：DNAメチル化 エピゲノム ゲノム刷り込み機構

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

“ゲノム刷り込み機構”は哺乳動物にみられるエピゲノム修飾(DNAメチル化、ヒストン修飾など)を介した特徴的な遺伝子制御機構であり、このしくみのもと、2本ある対立遺伝子(アレル)のうち、親の由来に応じて片方のアレルのみが発現する“刷り込み遺伝子”がゲノム上に存在する。刷り込み遺伝子は現在までヒト・マウスにおいて150遺伝子以上同定されており、胚発生・胎盤形成・癌形成・単為発生抑制などの働きを有することが報告されている。刷り込み遺伝子の機能を包括的に解明することは、進化した哺乳類特有の胎生機構を理解する上でも重要である。

多くの刷り込み遺伝子領域において、刷り込み制御領域(ICR)と呼ばれるDNAメチル化による片アレル性修飾を受ける領域が、近傍の刷り込み遺伝子の場合によっては広範囲に制御することが知られている。一般的に、ICRにおけるメチル化は、配偶子形成過程での「確立」、受精後の脱メチル化・新規メチル化のダイナミクスに抵抗する「維持」、生殖細胞運命決定後の脱メチル化にともなう「消去」のステップを経るが、我々が最近同定したGpr1/Zdbf2領域は例外的な動態を示す。この領域のICRであるGpr1-DMRでは、卵子形成過程で確立した“一次的”片アレル性メチル化が受精後の胚盤胞期までは維持されるものの、着床後の新規メチル化によりアレル間のメチル化差異はなくなり、代わりに下流のZdbf2-DMRにおいて“二次的”片アレル性メチル化が確立する。この二次的メチル化にはGpr1as/Liz/Zdbf2linc(Zdbf2遺伝子の新型バリエーション)によるジーンパディメチル化(転写による遺伝子本体のメチル化)が必須であると考えられる。つまり、刷り込みの維持は一次刷り込みが起こる領域とは異なる位置で成立することとなる。このバリエーションは胚体側では発現が消失する一方で、胚体外(胎盤系列)組織では着床後の新規メチル化が起こらず、片アレル性発現が残っている。過去のスクリーニングによるゲノム刷り込み領域の探索は、ほとんどが原腸陥入期後期以降のマウス胚もしくは組織を使用しており、Gpr1-DMRのような領域は見逃されてきた可能性が高い。現にGpr1/Zdbf2領域は、近年登場した次世代シーケンサーを利用した配偶子・初期胚の包括的DNAメチル化解析(DNAメチローム解析)によって同定できたものである。この新たなゲノム刷り込みの概念は、既知の刷り込み遺伝子における従来のICR型以外の制御機構の発見や、新たな刷り込み領域の同定につながる可能性を示す。また、従来のICRにおけるメチル化維持機構との違いも、分子レベルでのメカニズム解明の観点から注目される。

### 2. 研究の目的

配偶子および胚発生過程トランスクリプトーム・エピゲノム修飾マップの統合的解析により、真の刷り込み領域数を確定し、刷り込み機構の分子機構の全容を明らかにすることが本研究の目的である。具体的には以下の研究を進める。(1)マウス初期胚のトランスクリプトームおよびDNAメチロームのプロファイルより、刷り込み遺伝子候補を全て特定する。(2)Gpr1/Zdbf2型刷り込み領域の長鎖ncRNAを解析し、機能的役割を証明する。(3)従来型の刷り込み領域およびGpr1/Zdbf2型刷り込み領域のエピゲノム状態の比較により、“維持”機構に関わる分子機構を類推・解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 初期胚・胚体外組織におけるトランスクリプトーム・エピゲノム解析

次世代シーケンサーを用いて、マウス着床前胚、原腸陥入期胚、および胚体外組織(胎盤組織)のトランスクリプトームマップ(RNA-seq)、ヒストン修飾マップ(ChIP-seq)、DNAメチロームマップ(PBAT法)を作製する。着床前胚のような微量サンプルのエピゲノム解析を可能にするために、微量サンプルに対応できるChIP-seqプロトコル改良にも取り組む。また、(3)の解析には片アレル性発現およびエピゲノム修飾を特定する必要があるため、2系統のハイブリッドマウス(C57BL/6、JF1を予定)を解析対象とする。

#### (2) Gpr1/Zdbf2領域の機能的解析・制御機構解析

Zdbf2lincのノックアウトシステムを構築し、刷り込み領域の制御機構に与える影響、マウス表現型に与える影響を解析する。CRISPR/Cas9システムによるノックアウト(正しくはpolyAカセットのノックイン)マウスを作製し、Gpr1/Zdbf2領域の刷り込み状態への影響を調べる。

#### (3) 刷り込み維持機構の分子メカニズムの解明

(1)の包括的トランスクリプトーム・エピゲノム解析により新規の刷り込み領域および刷り込み遺伝子候補をスクリーニングし、各領域のエピゲノムレベルでの特性について調査する。既知の刷り込み遺伝子のうち4分の1近く(約20-30遺伝子)はまだICRが見つかっておらず、それらの片アレル性発現の制御機構は不明である。DNAメチロームマップからスクリーニングしたICRのうち、既知の遺伝子近傍にヒットしたものは、バイサルファイトシーケンス解析によりICRの有無を確認する。ICR候補が見つからない遺伝子については、ヒストン修飾マップから、DNAメチル化に非依存的な刷り込み制御候補の有無を調査する。従来のICR型に加え、Gpr1/Zdbf2領域型の刷り込み領域が複数見つかった場合、メチル化維持機構の分子メカニズムの違いに注目し、各ICRにおけるヒストン修飾パターンの違いを調査する。刷り込み領域のメチル化維持に重要な関連性を示すヒストン修飾を特定する。

### 4. 研究成果

### (1) 初期胚・胚体外組織におけるトランスクリプトーム・エピゲノム解析

次世代シーケンサーを用いた微量細胞からのエピゲノム解析を実現させるため、ヒストン修飾解析 (ChIP-seq)、DNA メチローム解析 (PBAT 法) 用ライブラリ調製法の改良を試みた。微量サンプル (~200 細胞) での安定的な ChIP-seq (一部のヒストン修飾) および PBAT 調製に成功し、それらはマウス・ラット・ヒト卵子のエピゲノム比較解析に応用した (3)。また、シングルセルおよび微量サンプルでの反復配列メチローム解析にも成功し、オンライン科学雑誌「Genes to Cells」にて発表した (Kobayashi H et al. Genes Cells. 2016)。

マウスの生殖細胞における全ゲノム DNA メチローム解析・トランスクリプトーム解析に続き、マウスの着床前胚、および原腸陥入期の胚体と胚体外組織 (胎盤組織) のアレル特異的なトランスクリプトームおよび DNA メチロームマップの解析に成功した。すでに雌雄由来アレル間のメチル化差異領域 (DMR) をスクリーニングしており、すべての既知の刷り込み領域を特定できていることから、極めて高精度かつ包括的な刷り込み情報 (インプリントーム) マップが作成できたと考えられる。現在生殖細胞系列のメチロームマップと合わせて俯瞰的に刷り込み型 DNA メチル化マークの変動を解析している。また、マウス特異的な反復配列が生殖細胞メチロームに及ぼす影響を調べるため、ラット生殖細胞のメチローム・トランスクリプトーム解析を実行し、マウスとのパターン比較を行っている。

### (2) Gpr1/Zdbf2 領域の機能的解析・制御領域機構解析

Gpr1/Zdbf2 領域を制御すると考えられる非コード RNA: Zdbf2linc (Gpr1as) の転写終了シグナル挿入によるノックイン・ノックアウトマウスを作製した。ノックインシステムは CRISPR/Cas9 システムを採用し、インプリンティングへの影響を解析したところ、2 次的 DMR である Zdbf2 DMR の DNA メチル化への影響が示唆された。一方で、Zdbf2linc の機能解析については、他の海外の研究チームからノックアウト解析の論文が先に発表されたため (Greenberg MV et al. Nat Genet. 2017)、以後の解析については、哺乳動物の比較発生学的解析を中心とした研究方針に変更した。

### (3) 刷り込み維持機構の分子メカニズムの解明

マウス、ラットおよびヒトの卵子エピゲノムマップ・トランスクリプトームマップの比較解析により、種特異的な DNA メチル化の確立に LTR トランスポゾンが寄与することを明らかにした。研究結果はオンライン科学雑誌「Nature Communications」にて発表した (Brind' Amour J et al. Nat. Commun. 2018)。また、種特異的な刷り込み領域の確立に LTR レトロトランスポゾンが関与すると考えられ、種横断的なインプリントーム解析を行っている。また、(1) で行った、マウス・ラットのインプリントーム解析により、マウス・ラット共通もしくはマウス・ラット特異的なインプリント領域候補を複数同定した。その中の一つはラット特異的な LTR レトロトランスポゾンにより成立した DMR が存在しており、LTR により刷り込み状態が成立した一例と考えられる。

また、Gpr1/Zdbf2 領域の刷り込みの起源を明らかにするため、有袋類であるワラビーの Gpr1 および Zdbf2 遺伝子のアレル別発現解析を行ったところ、2 遺伝子ともに両アレル性発現を示すことが明らかとなった。このことは、有袋類では Gpr1/Zdbf2 領域の刷り込みが成立しておらず、進化上少なくとも真獣類以降に成立したと推測される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

Kawabata Y, Kamio A, Jincho Y, Sakashita A, Takashima T, [Kobayashi H](#), Matsui Y, Kono T. Sex-specific histone modifications in mouse fetal and neonatal germ cells. *Epigenomics* 11(5):543-561. 2019. **査読あり**

Mochizuki K, Tando Y, Sekinaka T, Otsuka K, Hayashi Y, [Kobayashi H](#), Kamio A, Ito-Matsuoka Y, Takehara A, Kono T, Osumi N, Matsui Y. SETDB1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination by ensuring BMP signaling. *Development* 145(23):dev164160. 2018. **査読あり**

Tatsumi D, Hayashi Y, Endo M, [Kobayashi H](#), Yoshioka T, Kiso K, Kanno S, Nakai Y, Maeda I, Mochizuki K, Tachibana M, Koseki H, Okuda A, Yasui A, Kono T, Matsui Y. DNMTs and SETDB1 function as co-repressors in MAX-mediated repression of germ cell-related genes in mouse embryonic stem cells. *PLoS One* 13(11):e0205969. 2018. **査読あり**

Nagamori I, [Kobayashi H](#), Nishimura T, Yamagishi R, Katahira J, Kuramochi-Miyagawa S, Kono T, Nakano T. Relationship between PIWI4-Mediated H3K4me2 Demethylation and piRNA-Dependent DNA Methylation. *Cell Reports* 25(2):350-356. 2018. **査読あり**

Mochizuki K, Hayashi Y, Sekinaka T, Otsuka K, Ito-Matsuoka Y, [Kobayashi H](#), Oki S, Takehara A, Kono T, Osumi N, and Matsui Y. Repression of somatic genes by selective recruitment of HDAC3 by BLIMP1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination. *Cell Reports* 24(10):2682-2693. 2018. **査読あり**

Brind' Amour J, [Kobayashi H](#), Richard Albert J, Shirane K, Sakashita A, Kamio A, Bogutz A, Koike T, Karimi MM, Lefebvre L, Kono T and Lorincz MC, LTR retrotransposons

transcribed in oocytes drive species-specific, heritable changes in DNA methylation, Nature Communications 9(1):3331. doi:10.1038/s41467-018-05841-x. 2018. **査読あり**  
Ishibashi O, Sakuragi K, Fukutomi Y, Kawakami Y, Kamata Y, Sakurai M, Nakayama S, Uchiyama H, Kobayashi H, Kojima H, Inui T. Lip b 1 is a novel allergenic protein isolated from the booklouse, Liposcelis bostrychophila. Allergy 72(6):918-926. 2017.

**査読あり**

Fukushima S, Yamashita S, Kobayashi H, Takami H, Fukuoka K, Nakamura T, Yamasaki K, Matsushita Y, Nakamura H, Totoki Y, Kato M, Suzuki T, Mishima K, Yanagisawa T, Mukasa A, Saito N, Kanamori M, Kumabe T, Tominaga T, Nagane M, Iuchi T, Yoshimoto K, Mizoguchi M, Tamura K, Sakai K, Sugiyama K, Nakada M, Yokogami K, Takeshima H, Kanemura Y, Matsuda M, Matsumura A, Kurozumi K, Ueki K, Nonaka M, Asai A, Kawahara N, Hirose Y, Takayama T, Nakazato Y, Narita Y, Shibata T, Matsutani M, Ushijima T, Nishikawa R, Ichimura K; Intracranial Germ Cell Tumor Genome Analysis Consortium (The iGCT Consortium). Genome-wide methylation profiles in primary intracranial germ cell tumors indicate a primordial germ cell origin for germinomas. Acta Neuropathol. 133(3):445-462. 2017. **査読あり**

Masuta Y, Nozawa K, Takagi H, Yaegashi H, Tanaka K, Ito T, Saito H, Kobayashi H, Matsunaga W, Masuda S, Kato A, Ito H. Inducible Transposition of a Heat-Activated Retrotransposon in Tissue Culture. Plant Cell Physiol. 58(2):375-384. 2017. **査読あり**

Kobayashi H, Koike T, Sakashita A, Tanaka K, Kumamoto S, Kono T. Repetitive DNA methylome analysis by small-scale and single-cell shotgun bisulfite sequencing. Genes Cells 21(11):1209-1222. 2016. **査読あり**

Fukuda A, Mitani A, Miyashita T, Kobayashi H, Umezawa A, Akutsu H. Spatiotemporal dynamics of OCT4 protein localization during preimplantation development in mice. Reproduction. 152(5):417-30. 2016. **査読あり**

Koike T, Wakai T, Jincho Y, Sakashita A, Kobayashi H, Mizutani E, Wakayama S, Miura F, Ito T, Kono T. DNA Methylation Errors in Cloned Mouse Sperm by Germ Line Barrier Evasion. Biol Reprod. 94(6):128. 2016. **査読あり**

Sakashita A, Kawabata Y, Jincho Y, Tajima S, Kumamoto S, Kobayashi H, Matsui Y, Kono T. Sex Specification and Heterogeneity of Primordial Germ Cells in Mice. PLoS One 10(12):e0144836. 2015. **査読あり**

〔学会発表〕(計 8 件)

小林久人、Julie Brind'Amour、Julien Richard Albert、白根健次郎、坂下陽彦、神尾明日香、Mohammad Karimi、Louis Lefebvre、河野友宏、Matthew Lorincz、ヒト・ラット、マウス卵子の DNA メチローム比較解析、第 111 回日本繁殖生物学会大会、2018.

小林久人、Julie Brind'Amour、Julien Richard Albert、白根健次郎、坂下陽彦、神尾明日香、Mohammad Karimi、Louis Lefebvre、河野友宏、Matthew Lorincz、内在性レトロトランスポゾンが哺乳動物卵子 DNA メチロームの多様性を生み出す、第 12 回エビジェネティクス研究会年会、2018.

小林久人、マウスのゲノム包括的なアレレル特異的 DNA メチローム解析、第 5 回 NGS 現場の会、2017.

Hisato Kobayashi、Tasuku Koike, Akihiko Sakashita, Haruka Tsuno, Soichiro Kumamoto, Takuya Wakai, Satoshi Sano, Tomohiro Kono, DNA methylome analysis in mouse germ cells and early embryos, Genomic Imprinting, Epigenetics, and Physiological Functions, 2016.

小林久人、ゲノミックインプリンティング～全ゲノムバイサルファイトシーケンス解析から“目印”として働く DNA メチル化の本質を探る～、第 5 回生命医薬情報学連合大会、2016

小林久人、小池佐、坂下陽彦、田中啓介、河野友宏、小規模およびシングルセルショットガンバイサルファイトシーケンス解析による生殖細胞系列における反復配列特性の解明、第 38 回日本分子生物学会・BMB2015、2015.

小林久人、次世代シーケンサーを利用した新しい農学研究分野の開拓、日本動物遺伝育種学会第 16 回大会、2015.

小林久人、小池佐、坂下陽彦、田中啓介、河野友宏、小規模およびシングルセルショットガンバイサルファイトシーケンス解析による生殖細胞系列における反復配列特性の解明、第 108 回 日本繁殖生物学会大会、2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。