

令和元年6月5日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18403

研究課題名(和文) ヒト配列ノックインマウスを用いたIG-DMRによるインプリント制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of human IG-DMR in knock-in mice

研究代表者

原 聡史 (Hara, Satoshi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・研究員

研究者番号：80739582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトにおける小児遺伝疾患の原因となるIG-DMR領域が周辺の遺伝子をどのように制御しているかを明らかにするために、当研究部が報告したIG-DMR内部の特徴的な配列をヒトにおける類似配列に置き換えたマウスを作出した。ヒトの配列を父由来で遺伝した場合、その配列上のDNAメチル化状態が個体によって大きくばらつくことが明らかになった。メチル化が正常レベルに回復した個体では、IG-DMRのDNAメチル化を維持するために重要な因子TRIM28の結合が確認された。このことから、ヒト配列に正しくTRIM28がリクルートされるとメチル化を維持できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IG-DMRの欠失は、重篤な小児遺伝疾患であるKagami-Ogata症候群およびTemple症候群の原因となることから、IG-DMRによって周辺の遺伝子が制御されることが重要と考えられている。この領域はマウスを用いてその分子メカニズムが研究されてきたが、一方でヒトIG-DMRが生体内で周辺の遺伝子を制御する機構はいまだに不明な点が多い。本研究で得られた結果から、IG-DMRによる遺伝子発現制御機構のヒト-マウス間での違いを理解することでKagami-Ogata症候群およびTemple症候群の病態解明に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We generated knock-in mice, in which a tandem repeat array sequence in IG-DMR was replaced with its corresponding sequence in human. The mice with paternally inherited replaced allele showed variable methylation levels at the paternal IG-DMR. Chromatin immunoprecipitation showed that the transcription co-factor TRIM28, which is essential for the maintenance of DNA methylation at the locus, was enriched around paternal IG-DMR. These results suggest that successful recruitment of TRIM28 is associated with maintenance of the methylation status of paternal IG-DMR.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：ゲノムインプリント DIK1-Dio3ドメイン IG-DMR ゲノム編集 ヒト-マウス配列置換

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類には父母いずれかのアレルからのみ発現するインプリント遺伝子とよばれる遺伝子群が存在し、それらの多くは父母のアレルで DNA メチル化状態の異なる領域 (differentially methylated region; DMR) により片アレル性の発現が制御される。ヒト 14 番染色体上に存在する *DLK1-DIO3* 領域は、Kagami-Ogata 症候群および Temple 症候群とよばれるインプリンティング疾患の責任領域であり、IG-DMR とよばれる父方メチル化 DMR により制御されることがわかっている。当研究室では、塩基配列の特徴からマウス IG-DMR 内部に存在する 216 bp の繰り返し配列 (tandem repeat; TR) に着目している。TR 配列を欠損したマウスは父方アレルにおけるメチル化インプリントが破綻し胎生致死となったことから、TR 配列はマウス IG-DMR のメチル化インプリントに重要であることを明らかにした。一方で、ヒト IG-DMR 内部にも類似した繰り返し構造を持つ配列が存在しているものの、マウスとは全く異なる配列であることから、インプリント制御における機能は不明である。そこでヒト IG-DMR のインプリント制御機構を明らかにするために、TR 配列をヒトにおける類似配列 (hTR) へ置換したマウス (hTR マウス) を作出した。表現型を観察したところ、hTR 配列を父由来で遺伝した個体は正常に出生し、hTR 配列のメチル化が維持されているという予備的データが得られたことから、繰り返し配列のメチル化はヒト-マウス間で共通の機構によって制御されていることが示唆された。また、hTR 雌マウスの多くに分娩遅延が認められたことから、何らかの異常が母体に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト IG-DMR が *DLK1-DIO3* ドメインを制御する分子機構の全容を解明することを最終目的として、(1) TR 配列依存的に IG-DMR のメチル化状態を維持するヒト-マウス共通の機構 (2) hTR 雌マウスの仔が致死となる原因 以上の二点について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TR 配列において IG-DMR のメチル化状態を維持できるヒト-マウス共通の機構の解明

① hTR マウス胚における IG-DMR のエピゲノム状態およびインプリント遺伝子発現解析
まず、hTR 配列を父方より遺伝した個体 (父方 hTR) における予備実験の結果を精査するため、父方 hTR マウスの解析数を増やし、正確な出生率および表現型を明らかにする。また、父方 hTR 胚における IG-DMR のメチル化状態およびインプリント遺伝子の発現解析を行う。また、TR 配列のメチル化維持に重要であることが知られる ZFP57 および TRIM28 に着目し、父方 hTR マウスにおける ZFP57-TRIM28 の結合をクロマチン免疫沈降 (ChIP) により解析する。

② TR 配列の DNA メチル化維持に寄与する未知のタンパク質のスクリーニング

hTR 配列に結合し、メチル化を維持する因子を同定するため、ZFP57 あるいは TRIM28 をベイトとし、マウス胚の cDNA ライブラリーから酵母ツーハイブリットを用いてこれらと相互作用するタンパク質をスクリーニングする。候補のタンパク質と hTR 配列の結合をゲルシフトあるいは ChIP を用いて明らかにする。

(2) hTR 雌マウスの仔が致死となる原因の解明

① hTR 雌マウスにおける表現型の精査

予備実験で認められた表現型の精査を行う。特に、世代を経ても同様の表現型が認められるか否か、hTR 雌マウスの遺伝子型との関連性に着目する。

② 胚移植を用いた hTR 雌マウスの仔の致死原因の解析

hTR 雌マウスの仔が致死となる原因は母体にあるか仔にあるのかを明らかにするために、hTR 雌マウスと野生型の雄との受精卵を採取し、仮親へ胚移植を行う。また、野生型同士の交配によって得られた受精卵を、hTR 雌マウスへ移植する。これらの操作によって、分娩遅延および仔の致死が観察されるか否かを評価する。

③ hTR 雌マウスにおけるインプリント遺伝子発現と表現型との関連性の探索

これらの表現型が *Dlk1-Dio3* ドメインのインプリント遺伝子の発現と関連しているのかを明らかにするために、妊娠 hTR 雌マウスより胎仔、胎盤および子宮を採取し、インプリント遺伝子の発現解析を実施する。また、どのような異常が起こっているのかをマイクロアレイにより網羅的に明らかにする。

4. 研究成果

(1) TR 配列において IG-DMR のメチル化状態を維持できるヒト-マウス共通の機構の解明

① hTR マウス胚における IG-DMR のエピゲノム状態およびインプリント遺伝子発現解析
最初に、予備実験で認められた父方 hTR マウスの表現型を精査した。その結果、父方 hTR マウスのうち出生するのは一部であり、多くは胎生致死となっていた。父方 hTR 胚における IG-DMR の DNA メチル化解析を行ったところ、hTR 配列のメチル化状態は個体によって大きく異なり、メチル化レベルが完全に回復した個体のみが生存可能であると考えられた。また、

メチル化レベルに相関して、IG-DMRにより制御を受けるインプリント遺伝子の発現異常あるいはその回復が認められた。こうしたメチル化のばらつきがいつから起こるのか時期を追って解析したところ、胚盤胞の時点で既にばらつきが生じていたことが明らかになった。さらに、マウス IG-DMR のメチル化維持に重要な転写因子 ZFP57 および TRIM28、また転写抑制のマーカであるトリメチル化 H3 リジン 9 (H3K9me3) の父方アレル上の hTR 配列における蓄積を解析したところ、メチル化が完全に回復した個体においては父方 hTR 配列周辺に TRIM28 および H3K9me3 の蓄積が認められた。しかし ZFP57 は全ての個体で低レベルであったことから、ZFP57 以外の何らかの因子が TRIM28 を hTR 配列にリクルートしていることが示唆された。

② TR 配列の DNA メチル化維持に寄与する未知のタンパク質のスクリーニング

前項で明らかになったことから、TRIM28 と相互作用し、胎生期に発現する新たなタンパク質を同定するため、酵母ツーハイブリッドによるスクリーニング系を導入し、準備を進めていた。しかし最近になって、ヒト IG-DMR に結合する TRIM28 と相互作用する因子として ZNF445 が報告されたことから、hTR 配列は ZNF445 の足場となり、メチル化維持を行うという可能性が示唆された。今後は、ZNF445 と hTR 配列との関係性を明らかにすることが重要と考えられた。

(2) hTR 雌マウスの仔が致死となる原因の解明

① hTR 雌マウスにおける表現型の精査

雌マウスにおける表現型の精査を行った。その結果、C57BL/6 系統へ戻し交配を始めた当初の世代では分娩遅延などが認められていたものの、戻し交配を重ねるにつれて表現型が弱まり、N5 世代で完全に表現型が認められなくなった。このことから、雌マウスにおけるこれらの表現型は遺伝的背景の影響である可能性が示唆されたため、以降の解析は実施しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

① Takeshi Saito, Satoshi Hara, Tomoko Kato, Moe Tamano, Akari Muramatsu, Hiroshi Asahara, Shuji Takada. A tandem repeat array in IG-DMR is essential for imprinting of paternal allele at the Dlk1-Dio3 domain during embryonic development. *Human Molecular Genetics*, 査読有、Vol. 27, 2018, pp. 3283-3292, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy235>

〔学会発表〕 (計 4 件)

①原 聡史、齋藤剛史、高田修治、配列置換マウスを用いた Dlk1-Dio3 領域のインプリント制御配列の機能解析、2017. 5. 22-23、第 11 回日本エピジェネティクス研究会

②原 聡史、高田修治、ヒト配列置換マウスにおける IG-DMR インプリント制御配列のエピゲノム状態、2018. 5. 24-25、第 12 回日本エピジェネティクス研究会

③原 聡史、村松あかり、高田修治、欠失および配列置換マウスを用いた IG-DMR による発現制御機構の解析、2018. 9.13-15、第 111 回日本繁殖生物学会

④原 聡史、高田修治、ヒト-マウス間における IG-DMR によるインプリント制御機構の違い、2018. 11.28-30、第 41 回日本分子生物学会

〔図書〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。