

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（S）

研究期間：2008～2012

課題番号：20678002

研究課題名（和文）受精後ゲノム刷り込みはいかにして確立するのか？

研究課題名（英文）Mechanisms for methylation imprinting establishment after fertilization

研究代表者

谷本 啓司（TANIMOTO KEIJI）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：90261776

研究成果の概要（和文）：ゲノム刷り込みは、由来する親の性を示すエピゲノム情報に従って片アレル性遺伝子発現が制御される、ほ乳類特有のエピジェネティックな現象である。本研究では、このエピゲノム情報の正体と、それがマークされるゲノム上の *cis* 配列を同定することを目的とし、遺伝子改変マウスを用いることで、以下の点を明らかにした。1) 精子生殖細胞における H19-ICR の DNA メチル化は、由来する親の性を区別するエピゲノム情報ではない。2) CTCF 転写因子のアレル特異的結合はエピゲノム情報ではない。3) 卵で見つかった H19-ICR 配列に相当する small RNA 配列は、エピゲノム情報ではない。4) H19-ICR の刷り込みメチル化は、父方アレルのメチル化と、母方アレルのメチル化からの保護の両方により形成される。5) H19-ICR 内の Oct-sox 配列は、母方アレルのメチル化からの保護に働く。6) ニワトリ HS4 インスレーターの付加は、H19-ICR の刷り込みメチル化を阻害しない。

研究成果の概要（英文）：Genomic imprinting is an epigenetic phenomenon in mammals, in which a subset of genes are mono-allelically expressed depending on their parental origin. To reveal identity of the epigenetic signature discriminating the parental origin and its deposition site within the H19-ICR sequence, transgenic mouse methodology was employed and following findings were demonstrated: 1) Paternal H19-ICR acquired methylation independently of its establishment in sperm, 2) CTCF sites were not required to establish paternal-allele-specific methylation in pre-implantation embryos, 3) Sequences in the H19-ICR corresponding to the small RNA sequences in oocytes were dispensable for methylation imprinting, 4) Differential methylation of the H19-ICR was established by its paternal-allele-specific methylation and maternal-allele-specific protection-against-methylation, 5) Oct-sox motif in the H19-ICR harbored protection-against-methylation activity *in vivo* after implantation, 6) Chicken HS4 insulator did not protect the H19-ICR from differential DNA methylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	26,600,000	7,980,000	34,580,000
2009年度	17,800,000	5,340,000	23,140,000
2010年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
2011年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2012年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
総計	80,000,000	24,000,000	104,000,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：発現制御、エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の遺伝子の一部は、片親性発現を示す（ゲノム刷り込み）。これは、親の性を示す「印」が精子や卵でゲノム（受精後のアリルに相当）に記され、受精後にその印に従って転写が制御されるからである。Igf2/H19 刷り込み遺伝子座では、Igf2 遺伝子は父方アリル、H19 遺伝子は母方アリルでのみ転写される。この刷り込み発現には、H19 遺伝子上流の、アリル特異的に DNA 配列のメチル化状態が異なる領域（Differentially Methylated Region ; DMR）が必須であり、同領域は Imprinting Control Region (H19-ICR) とも呼ばれる。DMR は他の多くの刷り込み遺伝子座にも見いだされ、始原生殖細胞において「消去」された後、あるものは精子、他は卵の形成過程で「確立」し、受精を経て体細胞で「維持」される。したがって DMR のアリル特異的なメチル化（刷り込みメチル化）こそが、親の性を示す印であると考えられていた。

## 2. 研究の目的

ゲノム刷り込み分野における最大の謎は、例えば H19-ICR は、精子ではメチル化されるが卵ではされず、逆に卵でメチル化される DMR は、精子ではされないことである。つまり、両 DMR の間には *cis* 配列上の違いがあるはずなのだが、DMR の発見以来 20 年以上が経過した現在でも、未だ見つかっていない。我々の当初の目的は、由来する親の性に応じて、DMR メチル化の有無を指令する *cis* 配列の同定にあった。この目的のために、多くの研究者がマウス内在 H19-ICR に変異を導入し、DMR 形成に対する効果を検討してきたが同定には至っていない。我々は H19-ICR 配列を、ヒト  $\beta$  グロビン YAC に挿入した後に、トランスジェニック・マウス (TgM) を作製した。YAC 上の H19-ICR は、体細胞では DMR となったが、精子ではメチル化されなかった。つまり、i) 挿入した 2.9-kb DNA 断片には、メチル化刷り込みに必要十分な活性が含まれるが、ii) 精子でのメチル化には、2.9-kb 配列の外側の活性が必要であり、したがって、iii) 親の性を示す印の本体は、2.9-kb DNA 断片内の DNA メチル化ではないこと等が明らかとなった。そこで、「メチル化刷り込みに必要十分な最小 *cis* DNA 配列を、2.9-kb の H19-ICR 内に同定することで、親の性を示すエピジェネティック・マークの正体を明らかにする」ことを研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

H19-ICR(2.9-kb)に変異を導入することで、

刷り込みメチル化に必要な配列を同定しようとしても、その外側の配列を対象に含めると、精子でメチル化されてしまうことが予想される。多くの研究者の努力にもかかわらず、内在遺伝子座への変異導入により重要配列の同定に至っていない理由は、このためであると考えられる。そこで、YAC に挿入した後に TgM を作るストラテジーを用いて、2.9-kb の DNA 断片を細分化し、その最小領域を見つけることにした。しかしながら、ゲノム刷り込みは哺乳動物でのみ見られる、世代を超えた現象であるため、マウスをモデル動物として用いたとしても、その絞り込みには膨大な時間を要する。そこで、i) 候補配列に対してピンポイントに変異を導入する、ii) 地道に欠失変異体を作製する、という 2 つの柱で実験を行うこととした。

## 4. 研究成果

(1) 2.9-kb H19-ICR 断片のみをランダムにゲノムに挿入した TgM を作製した。精子では系統ごとにメチル化状態が異なっていたが、体細胞では全系統でメチル化刷り込みが確立していたことから、精子でのメチル化は、メチル化刷り込みの確立に必須ではないことが分かった（論文④、図中 1）。

(2) CTCF は受精後体細胞で、内在母方 H19-ICR の非メチル化状態維持に関与する。同因子の受精後メチル化刷り込みの確立における役割を検証するため、H19-ICR 内 4 カ所の結合配列に変異を加え、YAC-TgM を作製した。解析の結果、メチル化刷り込みは胚盤胞期胚までに確立すること、CTCF はこの過程に関与しないことが分かった。（論文③、図中 2）

(3) Rasgrf1 刷り込み遺伝子座では、ノンコーディング RNA がメチル化刷り込みを制御することが報告された。また、H19-ICR 配列に相当する small RNA がマウスの卵子に見いだされたことから、Igf2/H19 遺伝子座の刷り込みメチル化にもノンコーディング RNA が関与する可能性が考えられた。そこで、small RNA 相当配列を H19-ICR から欠失させた後に YAC-TgM を作製した。同配列は、正常にメチル化刷り込みを受けたことから、H19-ICR においては、small RNA がエピジェネティック・マークの本体では無いことが分かった（論文②、図中 3）。

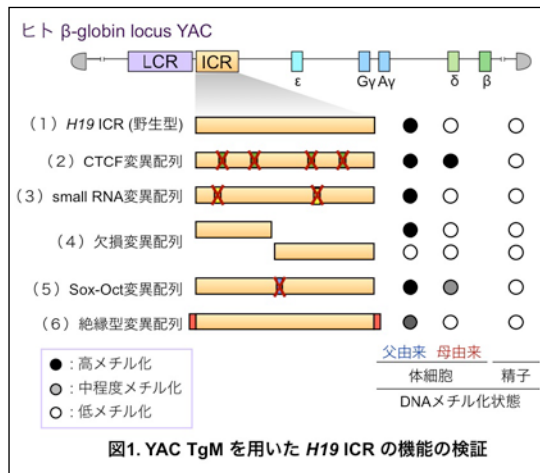
(4) H19-ICR のメチル化刷り込みは、父方アリルの選択的メチル化、母方アリルのメチル化からの選択的保護、あるいはその両方より形成されることが考えられる。その検証、及び、2.9-kb H19-ICR 断片の欠失変異体作製の第一歩として、同断片を 2 分する位置に  $\lambda$  DNA 断片を挿入し、YAC-TgM を作製した。メチル化

解析の結果、H19-ICRには両方の活性があり、選択的メチル化導入には、5'側断片のみで十分であり、保護活性には、両断片の共存が必要であることが分かった(論文①、図中4)。

(5) H19-ICRのDNAメチル化異常がその原因の一つである Beckwith-Wiedemann 症候群の患者で、多能性転写因子 Oct、及び Sox 結合配列の変異が見つかった。また、マウス培養細胞を用いた実験で、これらの結合配列が、母親由来 H19-ICR の低メチル化状態の維持に関与する可能性が見いだされた。そこで、これら cis 配列の DMR 形成における役割を *in vivo* で検証した(投稿中、図中5)。

(6) DMR 形成に必要な cis 配列が 2.9-kb の DNA 断片内にあることが確定した一方で、由来する親の印が、染色体上で H19-ICR の内側と外側のどちらに存在するのかは分からない。そこで、ニワトリ HS4 インスレーター配列を H19-ICR の両側に配することで、外側からのエピジェネティック・シグナルの伝播を妨げた YAC-TgM を作製した。同マウスの解析により、親の印が付加される場所を明らかにした(投稿中、図中6)。

(7) H19-ICR の 5' 欠変異体を持つ YAC-TgM を多系統、作製・解析することで、父親由来アレル特異的に DNA メチル化を誘導するために必要な cis 配列の同定を試みている(投稿準備中)。



## 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)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Okamura, E., Matsuzaki, H., Sakaguchi, R., Takahashi, T., Fukamizu, A. and Tanimoto, K. "The H19 ICR mediates pre-implantation imprinted methylation of nearby sequences in YAC transgenic mice" *Mol. Cell. Biol.* **334**, 858-71 (2013)(査読有) doi: 10.1128/MCB.01003-12

- ② Takahashi, T., Matsuzaki, H., Tomizawa, S.-i., Okamura, E., Ichiyanagi, T., Fukamizu, A., Sasaki, H. and Tanimoto, K.

"Sequences in the H19 ICR that are transcribed as small RNA in oocytes are dispensable for methylation imprinting in YAC transgenic mice"

*Gene* **508**, 26-34 (2012)(査読有)

doi: 10.1016/j.gene.2012.07.062

- ③ Matsuzaki, H., Okamura, E., Shimotsuma, M., 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**, 1190-8 (2010)(査読有)

doi: 10.1093/hmg/ddp589

- ④ Matsuzaki, H., Okamura, E., Shimotsuma, M., Fukamizu, A. and Tanimoto, K.

"A randomly integrated transgenic H19 imprinting control region acquires methylation imprinting independently of its establishment in germ cells"

*Mol. Cell. Biol.* **29**, 4595-603 (2009)(査読有)

doi: 10.1128/MCB.00275-09

- ⑤ Hou, C., Zhao, H., Tanimoto, K. and Dean A.

"CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation"

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**,

20398-403 (2008)(査読有)

doi: 10.1073/pnas.0808506106

[学会発表] (計 31 件)

- ① Eiichi Okamura, Hitomi Matsuzaki and Keiji Tanimoto. CDB Symposium 2013, March 4-6, 2013 (RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, Japan) "The H19 ICR mediates pre-implantation imprinted methylation of nearby sequences in YAC transgenic mice"
- ② Keiji Tanimoto. 18<sup>th</sup> Hemoglobin Switching Conference, June 7-11, 2012 (Monterey, California, USA) "The chicken LCR-HS4 insulator does not protect the H19 ICR from imprinted methylation in YAC transgenic mice"
- ③ Eiichi Okamura, Ryuuta Sakaguchi, Hitomi Matsuzaki and Keiji Tanimoto. Keystone Symposia (Epigenomics), January 17-22, 2012 (Keystone, Colorado, USA) "The H19-ICR bears activities that can introduce imprinted DNA methylation into adjacent, heterologous DNA sequences in YAC transgenic mice"
- ④ Takuya Takahashi, Hitomi Matsuzaki, Eiichi Okamura and Keiji Tanimoto. Keystone Symposia (Epigenomics), January 17-22,

2012 (Keystone, Colorado, USA) "Small RNA sequences in the H19-ICR is dispensable for its methylation imprinting in yeast artificial chromosome transgenic mice"

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 谷本啓司 (翻訳) 2012年2月25日発行  
メディカル・サイエンス・インターナショナル  
遺伝情報の発現制御 (Gene Control)  
転写機構からエピジェネティクスまで  
第9章 胚発生における遺伝子調節  
275-303頁

〔その他〕

ホームページ

<http://www1.accsnet.ne.jp/~tanimoto/Keijis/Welcome.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷本 啓司 (TANIMOTO KEIJI)  
筑波大学・生命環境系・教授  
研究者番号：90261776