

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870766

研究課題名(和文) lincRNA型バリエーションを介した刷り込み遺伝子Zdbf2制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of epigenetic regulation via lincRNA transcription at the imprinted Zdbf2 locus

研究代表者

小林 久人 (Kobayashi, Hisato)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：70632727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類ゲノム上に存在する”刷り込み遺伝子”を制御する片アレル性DNAメチル化は、精子・卵子間でメチル化に差がある領域の一部が受精後も維持されることにより成立する。本研究において、刷り込み遺伝子Zdbf2の制御機構の解析により、この遺伝子領域には生殖細胞由来型一次刷り込みと体細胞型二次刷り込みが存在することが明らかとなった。この制御領域はヒト・マウス間でよく保存されており、非コード型RNAであるZdbf2lincあるいはGPR1ASが機能的役割を果たすことが示された。この発見はゲノム刷り込み機構成立の新たな概念を提唱するものである。

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. In this study, we focus on epigenetic regulation system of Zdbf2 imprinted gene. Here, we identified maternally methylated Gpr1 primary (germline-derived) DMR and Zdbf2 secondary (somatic) DMR at the imprinted Zdbf2 region. We also demonstrated that the epigenetic regulation mechanisms via lincRNA, i. e., lincRNA or GPR1AS, were well-conserved between human and mouse genomes. Our findings provide a new model system for dynamic shaping DNA methylation patterns in mammalian genomic imprinting.

研究分野：エピゲノム

キーワード：Genomic imprinting DNA methylation Epigenetics lincRNA Embryogenesis Placenta

1. 研究開始当初の背景

“ゲノム刷り込み機構”は胎盤を有する哺乳動物にみられるエピジェネティック修飾 (DNA 塩基配列の変化を伴わない後天的な DNA 修飾) 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” が哺乳類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 100 種類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、進化上獲得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。また近年では、不妊治療患者における刷り込み遺伝子座での DNA メチル化異常などが数多く報告されており、動物生殖学・生殖医学的観点からも注目される。

申請者らは、単為発生胚 (母親由来ゲノムだけを持つ) の遺伝子発現プロファイルにより、マウス 1 番染色体上に新規の父方発現型刷り込み遺伝子 *Zdbf2* を同定することに成功した (Kobayashi H et al. Genomics 2009)。*Zdbf2* は約 2500 のアミノ酸残基のからなる大型タンパク質をコードしており (ウエスタブロットング法では未同定)、胚時期の組織、また成体時期の脳、精巣などの一部の組織で発現している。さらに申請者らは、マウス初期胚 (胚盤胞期から原腸陥入期) において発現がみられる *Zdbf2* バリエーション: *Zdbf2linc* を同定した (Kobayashi H et al. FEBS Lett. 2012)。*Zdbf2linc* は 114-kb に及ぶ大型非コード型 (タンパク質をコードしない) RNA であり、*Zdbf2* 遺伝子と近接する *Gpr1* 遺伝子 (腎臓のみで父方発現する遺伝子。機能は不明) のイントロンより転写が開始する。また *Zdbf2*、*Zdbf2linc* の転写開始点近辺に DNA メチル化差異領域 (DMR) も同定しており、DNA メチル化を介したエピジェネティックな制御機構が存在すると考えられる (Kobayashi H et al. PLoS Genet. 2012)。現時点で *Zdbf2* 遺伝子の機能ならびに *Zdbf2linc* が刷り込み領域に果たす役割は明らかにされておらず、その制御機構ともに生物学的役割を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

大型非コード RNA (lncRNA) は、ゲノムの多くを占める機能的 RNA の新たなプレイヤーとして、注目を浴びている。申請者らが同定した *Zdbf2linc* はマウス 1 番染色体上の刷り込み遺伝子 *Zdbf2* の lncRNA 型バリエーションであり、マウス初期胚においてのみ発現がみられる。*Zdbf2linc* が刷り込み領域の制御に寄与するしくみを明らかにし、哺乳動物の胎児期発生機構において lncRNA が果たす役割を明らかにすることが、本研究の目的である。

本研究ではマウス初期胚での *Zdbf2*、*Zdbf2linc* の発現パターンをプロファイリン

グし、DMR におけるメチル化状態も同時に解析し、*Gpr1-Zdbf2* 遺伝子座のエピジェネティックな制御機構について検証する。また、*Zdbf2* 遺伝子のノックアウトマウスならびに *Zdbf2linc* 転写終了点ノックインマウスを作製し、その表現型から *Zdbf2* の制御機構解析と機能解析を同時並行で展開し、マウス 1 番染色体に刷り込み遺伝子座が登場した生物学的意義について考察する。

Zdbf2 遺伝子座の興味深い点は、2 点ある。一つ目は、近年、機能的役割を担う非コード型 RNA として注目されている lncRNA が存在することである。lncRNA は哺乳類において数千種類以上同定されており、遺伝子発現調節に重要な役割を担っているものが多く報告されている。新たにゲノム刷り込み機構における役割を明らかにすることは、分子生物学上の重要な発見となりうる。二つ目は、母由来アレル側でメチル化される DMR (*Gpr1* DMR) と父由来側でメチル化される DMR (*Zdbf2* DMR) の 2 種類が存在することである。申請者らは *Gpr1* DMR は卵子形成過程でメチル化が確立し、領域全体を支配すると考えられる “プライマリ DMR” である一方、*Zdbf2* DMR は受精後に二次的にメチル化が確立する “セカンダリ DMR” であることを明らかにした (Kobayashi H. FEBS Lett. 2012)。このように複数の DMR により制御される刷り込み領域としては *Gnas*、*Kcnq1*、*Igf2r* 遺伝子座領域がよく知られており、各プライマリ DMR から転写される非コード RNA は領域全体の刷り込み状態を制御していることも知られている (Sleutels F et al. Nature 2002, Williamson CM et al. PLoS Genet. 2011)。また、各遺伝子群マウス胚発生に重要かつ必須な役割を担うことが報告済みであり、またヒトにおいては偽性副甲状腺機能低下症タイプ 1b、Beckwith-Wiedemann 症候群などの先天性疾患の責任遺伝子座であることが知られている。このように *Zdbf2* は *Gnas*、*Kcnq1*、*Igf2r* 刷り込み領域と多くの共通点を持つ興味深い遺伝子座であり、複雑なゲノム刷り込み機構を理解する上で重要な領域であるといえる。

3. 研究の方法

マウス *Zdbf2* 遺伝子ならびに同遺伝子のバリエーションである新型 lncRNA: *Zdbf2linc* の制御機構、機能的役割について検証するため、本研究計画では以下の実験が行われた。

(1) *Zdbf2*、*Zdbf2linc* の発現プロファイリング

マウス胚盤胞期から原腸陥入期にかけて、胚体、ならびに胚胎外組織の発現パターンをリアルタイム RT-PCR、ならびに in situ hybridization により解析する。また、マウス ES 細胞の未分化・分化状態の発現も比較し、*Zdbf2*、*Zdbf2linc* 発現のプロファイリングを行う。さらに、片アレル性発現を解析するため、C57BL/6 マウスと JF1 マウスのハイ

ブリッド胚を使用する。

(2) Zdbf2 周辺のメチル化パターンの解析
遺伝子発現解析と同様に Gpr1 DMR と Zdbf2 DMR のメチル化パターンをバイサルファイトシーケンス法により解析する。

(3) Zdbf2 のノックアウトマウス作製

Zdbf2 の生物学的役割を明らかにするため、Zdbf2 ノックアウトマウスを作製する。Zdbf2 のターゲティングベクターの構築はすでに完了している。ベクターでは Zdbf2 のエキソン 5 (翻訳開始点) を含む 5-kb のゲノム領域をターゲティングしている。エレクトロポレーションによる組み換えを起こした ES 細胞をクローン化させる。

4. 研究成果

(1) (2) の解析により、Zdbf2linc は胚発生過程の原腸陥入期以降は発現が失われるものの、胎盤系列細胞では発現が維持されることが明らかとなり、Zdbf2linc 上流の片アレル性メチル化 (Gpr1-DMR) と相関することが明らかとなった。また、このような発現制御はヒト ZDBF2 遺伝子においても認められた。Zdbf2linc に良く似た発現パターンを示す lncRNA を同定し、GPR1AS と名付けた。GPR1AS は Zdbf2linc と同様にヒト胎盤で父方発現する刷り込み型転写物であり、発現パターンの類似性も高いことが示された。また DNA メチル化パターンも、ヒト・マウス間でよく保存されており、体細胞系列では Gpr1-DMR の片アレル性メチル化が消失するものの、胎盤系列では維持されることが分かった。一方で、Zdbf2 上流の領域に受精後に父由来対立遺伝子側のみが高度にメチル化される 2 次刷り込みが体細胞系列、胎盤系列とともに成立していることが分かった。Zdbf2 領域における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が本研究で明らかとなり、ゲノム刷り込み機構の lncRNA を介した新たな制御モデルを提唱するものである。

(3) の解析のため、ターゲティングベクターを用いた Zdbf2 ノックアウト ES 細胞のスクリーニングを約 250 株行ったが、ポジティブクローンは得られなかった。一方、近年登場した CRISPR/Cas9 システムの採用により、Zdbf2 および Zdbf2linc ノックアウトマウス作出を試みた。ターゲットシーケンスを挿入した px330 plasmid を受精卵雄性前核に挿入し、Cas9 による切断を行ったところ、80%以上の割合でエキソン欠損に成功した。現在、ノックアウト胚の産仔を試みている (データ未発表)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Kozakai T, Sakate M, Takizawa S, Uchide T, Kobayashi H, Oishi K, Ishida N, Saida K. Effect of feeding behavior on circadian

regulation of endothelin expression in mouse colon. Life Sciences, 査読有、Vol.118, Issue 2, 2014, pp.232-237, doi: 10.1016/j.lfs.2014.06.022

Sakashita A, Kobayashi H, Wakai T, Sotomaru Y, Hata K, Kono T. Dynamics of genomic 5-hydroxymethylcytosine during mouse oocyte growth. Genes to Cells, 査読有、Vol.19, Issue 8, 2014, pp. 629-636, doi: 10.1111/gtc.12164

Kobayashi H, Yanagisawa E, Sakashita A, Sugawara N, Kumakura S, Ogawa H, Akutsu H, Hata K, Nakabayashi K, Kono T. Epigenetic and transcriptional features of the novel human imprinted lncRNA GPR1AS suggest it is a functional ortholog to mouse Zdbf2linc. Epigenetics, 査読有、Vol.8, Issue 6, 2013, pp. 635-645, doi: 10.4161/epi.24887

Shirane K, Toh H, Kobayashi H, Miura F, Chiba H, Ito T, Kono T, Sasaki H. Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. PLoS Genetics, 査読有、Vol.9, Issue 4, 2013, e1003439, doi: 10.1371/journal.pgen.1003439

[学会発表] (計 5 件)

Hisato Kobayashi, DNA methylome analysis in mouse germ cells and early embryos, DNA methylation (Z1)-Keystone Symposia, キーストーン・コロラド州 (アメリカ), 2015 年 3 月、ポスター発表

小林 久人、坂下 陽彦、若井 拓哉、小池 佐、佐野 賢、河野 友宏、マウス生殖細胞・初期胚の DNA メチローム解析、第 37 回日本分子生物学会大会、神奈川県横浜市、2014 年 11 月、口頭・ポスター発表

Hisato Kobayashi, High-resolution DNA methylome analysis of mouse germ cells, International Symposium on "Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells", エジンバラ (イギリス), 2014 年 9 月、招待講演

小林 久人、柳澤 永吉、坂下 陽彦、菅原 直子、熊倉 紫織、小川 英彦、阿久津 英憲、秦 健一郎、中林 一彦、河野 友宏、刷り込み遺伝子クラスター領域 GPR1-ZDBF2 における lncRNA を介したエピジェネティクス制御機構とヒト・マウスゲノム間の保存性、第 36 回日本分子生物学会大会、兵庫県神戸市、2013 年 12 月、ポスター発表

小林 久人、マウス生殖細胞における全ゲノム包括的 DNA メチローム解析、第7回日本エピジェネティクス研究会、奈良県奈良市、2013年5月、研究奨励賞受賞講演

〔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〕

奨励賞受賞

2013年 日本エピジェネティクス研究会
第7回年会 奨励賞受賞

セミナー講演

小林 久人、マウス生殖細胞の全ゲノム包括的 DNA メチローム解析、2014 アジレントゲノミクスフォーラム、東京都、2014年6月

小林 久人、マウス生殖細胞の全ゲノム包括的 DNA メチローム解析、大阪大学蛋白質研究所セミナー DNA メチル化の制御機構 - メチル化模様形成、維持と消去 -、大阪府吹田市、2013年11月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 久人 (KOBAYASHI, Hisato)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：70632727