

受精後ゲノム刷り込みはいかにして確立するのか？

Mechanisms for methylation imprinting establishment after fertilization

谷本 啓司 (TANIMOTO KEIJI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授



研究の概要

我々は、通常、生殖細胞において確立する DNA のメチル化刷り込みが、受精後の体細胞においても確立し得ることを、トランスジェニック・マウスの系を用いて明らかにしました。そこで、由来する親の性を見分けて、ゲノム刷り込み遺伝子座をメチル化、あるいは非メチル化することを指令する cis DNA 配列の同定を通して、ゲノム刷り込みメカニズムの解明を目指します。

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

哺乳動物の一部の遺伝子は父親・母親由来の一方のアリルのみが発現する（ゲノム刷り込み）。これは、由来する親の起源を示す「印」がゲノムに記憶され、子においてその「印」に従って転写が制御されるからである。Igf2/H19遺伝子座はごく初期に見つかった刷り込み遺伝子座であり、Igf2遺伝子は父方アリルで、H19遺伝子は母方アリルで転写される。この刷り込み発現には、H19遺伝子の上流に存在する、アリル特異的にDNA-CpG配列のメチル化が異なる領域（Differentially Methylated Region；DMR）が必須であり、同領域はImprinting Control Region（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、同領域の特徴的なメチル化（刷り込みメチル化）は始原生殖細胞において「消去」され、その後、生殖細胞（精子や卵）の形成過程において「確立」され、受精を経て体細胞で「維持」される。したがって、このDNAのメチル化こそが、親から子の伝わるエピジェネティックな記憶の本体であるというのが一般的な理解である。

2. 研究の目的

Igf2/H19遺伝子座のDMRを含むいくつかのDMRは、父方アリルでメチル化される。一方、他の多くのDMRは母方アリルでメチル化される。これはすなわち、DNAメチル化酵素が精

子（あるいは卵）にのみ存在するためにDMRが形成される、という単純なメカニズムではないことを意味する。つまり、CpG配列の他に、精子（あるいは卵）の中での特異的なメチル化を指令するcis配列情報が存在するはずであり、我々の研究の目的は、この「由来する親の性を見分けて、DMRをメチル化、あるいは非メチル化することを指令するcis DNA配列の同定を通して、ゲノム刷り込みのメカニズムを解明する」ことにある。

3. 研究の方法

我々と同様の目的のために、多くの研究者がマウス内在H19-ICRに変異を導入し、その精子におけるDMR形成に対する効果を検討してきたが、「必要な」cis配列の同定には至っていない。我々はH19-ICR配列を、位置効果からの保護を目的としてヒトβグロビンYACに導入した後に、トランスジェニック・マウス（TgM）を作製した。同マウスの体細胞において導入ICRはDMRとなっていたが、精子においては非メチル化状態であった。つまり、導入したDNA断片（2.9-kb）がメチル化刷り込みに「必要十分な」活性を持つことと、精子におけるメチル化には、2.9-kb配列の外側の活性を必要とすることが明らかとなり、生殖細胞と体細胞の現象を区別することができた。そこで、今後もTgMの実験系を用いてのみ観察可能な、受精後メチル化刷り込みに必要十分なcis配列の同定を目指したい。

4. これまでの成果

精子におけるメチル化刷り込みに必要な活性が 2.9-kb の範囲の外側に存在することを確認するために、2.9-kb 断片のみをランダムにゲノムに挿入した TgM を複数系統作製した。同マウスの精子においては系統ごとにメチル化の状態が異なっていたが、体細胞においては全ての系統でメチル化刷り込みが確立していたことから、精子においてメチル化されることは、メチル化刷り込みの確立には必須ではないことが分かった。(論文 4)

インシュレーター・タンパク質 CTCF は、内在 H19-ICR において、体細胞雌性アリの非メチル化状態を「維持」することにより DMR 形成に寄与しているが、精子におけるメチル化や卵における非メチル化状態の「確立」には必須ではない。同タンパク質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に、CTCF 結合配列に変異を加えた H19-ICR を用いて YAC-TgM を作製した。同マウスの解析の結果、受精後メチル化刷り込みは 1-2 細胞期胚で確立すること、CTCFはこの過程に関与しないことが分かった。(論文 2)

H19-ICR における DMR は、父方アリにおける積極的なメチル化と、母方アリにおけるメチル化からの保護の両者、あるいはどちらかにより形成されると考えられる。その検証、および 2.9-kb H19-ICR 断片のどの部分にこれらの活性が存在するのかを明らかにするために、同断片を 2 分する位置に DNA 断片を挿入し、YAC TgM を作製した。解析の結果、H19-ICR には両方の活性があり、それぞれがアリ特異的に働くことが示唆された。(投稿準備中)

5. 今後の計画

YAC-TgM の精子クロマチンを用いて ChIP アッセイを行うことにより、ヒストン修飾が親の性を示すエピジェネティック・マークとなっている可能性について検討する。

DNA メチル化酵素や修飾酵素のノックアウト・マウスとの交配により、受精後メチル化刷り込みに関与する酵素を同定し、またその生物学的意義を検討する。

候補トランス因子の結合配列に変異を導入した H19-ICR を用いて YAC-TgM を作製し、その受精後メチル化刷り込みへの関与を検討する。

2.9-kb の H19-ICR の部分欠失変異体を作製し、YAC-TgM を作製することにより、受精後メチル化刷り込みに必須の cis DNA 配列を同定する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

[発表論文 (8 件中 5 件)]

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

DNase I hypersensitivity and epsilon-globin transcriptional enhancement are separable in LCR HS1 mutant human beta-globin YAC transgenic mice
J. Biol. Chem. 285, 14495-503 (2010)

2. 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, 1190-1198 (2010)

3. Okamura, E., Matsuzaki, H., Campbell, A.D., Engel, J.D., Fukamizu, A., and Tanimoto, K.

All of the human beta-type globin genes compete for LCR enhancer activity in embryonic erythroid cells of yeast artificial chromosome transgenic mice
FASEB J. 23, 4335-43 (2009)

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, 4595-4603 (2009)

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

CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105, 20398-20403 (2008)

[学会発表 (17 件)]

[ホームページ]

<http://web.me.com/tanik3/Keijis/Welcome.html>