

令和 5 年 5 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03134

研究課題名(和文)新規メカニズムによるゲノム刷り込み遺伝様式の共通性と特異性の解明

研究課題名(英文)Elucidation of commonalities and specificities in genomic imprinting inheritance by novel mechanisms

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、胎盤性哺乳動物に特有のエピジェネティックな遺伝現象であるゲノム刷り込みにおける、我々が見いだした「受精後刷り込みメチル化現象」の分子機序の解明である。計画期間中、同現象に必須のH19-ICR内118-bp配列に結合するタンパク質性因子をゲルシフトアッセイにより同定し、そのcis結合配列に変異をもつ遺伝子改変マウスを作製して機能検証をおこなった(学会発表3件；学術論文投稿中)。また、ヒトやラットのH19-ICRや、他のDMR(IG-DMR)における受精後刷り込みメチル化現象の保存性について、遺伝子改変マウスを作製することで検討にした(学会発表4件；学術論文公表2件)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：DNA塩基配列に依存しない遺伝様式であるエピジェネティクスにおいて、その情報の担い手はDNAメチル化やヒストン修飾であり、これらは細胞分裂や世代を超えて継承される。ゲノム刷り込みでは、生殖細胞でのDNAメチル化が、受精後に両アレルを区別するためのマークと考えられているが、我々の成果は、新規マークの存在を示唆する。

社会的意義：ゲノム刷り込み異常が関わるエピジェネティクス疾患の原因として、生殖細胞での確立、あるいは、着床後の維持過程における刷り込みメチル化の破綻がある。我々の成果は、受精直後の維持過程でも破綻が生じつつあることを示唆し、関与する分子の同定により、治療や診断が可能となる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to understand the molecular mechanism of "genomic imprinting", an epigenetic phenomenon unique to placental mammals, through elucidation of the "postfertilization imprinted methylation activity", which we originally discovered. During the project period, we identified several proteins (binding activities) bound to the 118bp sequence of the H19 ICR by gel shift assay, which is essential for the phenomenon, and generated transgenic mice carrying mutations in the cis-binding motifs to verify their functions (3 conference presentations and one manuscript in preparation). In addition, by generating transgenic mice, the conservation of post-fertilization imprinted methylation phenomena in human and rat H19 ICR and other DMRs (IG-DMR) was demonstrated (5 conference presentations, one paper published).

研究分野：動物生命科学

キーワード：ゲノム刷り込み 遺伝子改変マウス 制御分子

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスの代表的な研究対象である「ゲノム刷り込み」は、胎盤性哺乳動物の一部の遺伝子で見られる片アレル性発現(刷り込み発現)メカニズムである。刷り込み発現の分子基盤は精子、あるいは卵の形成時にゲノムに付加される DNA のメチル化であり、受精後の体細胞で両親由来のアレルを区別するために必要である。このようなアレル間でメチル化状態が異なる領域は Differentially Methylated Region (DMR) と呼ばれ、父方アレルが高メチル化の場合(paternal DMR; 3箇所のみ)と、母方アレルが高メチル化の場合(maternal DMR; 20箇所以上)とがある。刷り込み遺伝子のうち、成長因子をコードする *Igf2* (*Insulin-like growth factor 2*) 遺伝子は父親から、その近傍の *H19* 遺伝子は母親から受け継がれたときのみ発現する。この刷り込み発現は、*Igf2/H19* 遺伝子座の中央に位置し、精子でメチル化される DMR (*H19-ICR*; Imprinting Control Region = paternal DMR) により制御される。*H19-ICR* の刷り込みメチル化状態は受精後も維持され、その破綻は、*Igf2* や *H19* 遺伝子の刷り込み発現異常、ひいては、ヒト新生児の巨軀、がんの高発生リスクなどを特徴とする Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)や、重度の子宮内発育遅延や出生後の低成長などを特徴とする Silver-Russell 症候群(SRS)などのエピジェネティクス疾患の原因となる。

我々は、*H19-ICR* 配列が精子特異的にメチル化され、受精後、父方アレルでのみ高メチル化状態が維持されるメカニズムを理解するために、2.9-kb の *H19-ICR* 配列を用いて、トランスジェニック(Tg)マウスを作製した。体細胞における Tg *H19-ICR* のメチル化解析の結果、父親由来では高メチル化、母親由来では低メチル化状態を示した。つまり 2.9-kb の DNA 断片内には、*H19-ICR* が paternal DMR であることを特徴付ける、何らかのエピジェネティックな印が付加されており、当然これは DNA メチル化であると考えられた。ところが驚いたことに、Tg *H19-ICR* 配列は精子生殖細胞で全くメチル化されていなかった。つまり、体細胞で観察された父方アレル特異的な DNA メチル化は、受精後、アレル特異的に付加されたと考えられ、両親由来アレルを区別するプライマリーな印であるという、これまでの概念は崩れたのである。申請者は、「*H19-ICR* には、生殖細胞において DNA メチル化以外の未知のエピジェネティック・マークも付加されており、これを目印とすれば、受精後であっても父親アレル特異的なメチル化反応(受精後刷り込みメチル化)が可能である」と考えている。

その後、我々は多数の遺伝子改変マウス系統を作製・解析することで、受精後刷り込みメチル化に必須の *H19-ICR* 内 *cis* 配列を 118-bp にまで絞り込んだ。同配列を含む領域をマウス内在の *Igf2/H19* 遺伝子座から欠失した結果、*H19-ICR* 配列(の残存部分)は、精子でメチル化されるものの、受精後にメチル化状態が失われることが分かった。したがって、受精後刷り込みメチル化活性は内在遺伝子座において、初期胚におけるゲノムワイドな脱メチル化活性から、*H19-ICR* の刷り込みメチル化状態を(動的平衡反応により)保護する役割を果たすと考えられた。

2. 研究の目的

Igf2/H19 遺伝子座における受精後刷り込みメチル化現象は、*H19-ICR* 配列に対する、精子における DNA メチル化以外のエピゲノム修飾の付加と、受精後、このマークを目印とした、アレル特異的な *de novo* メチル化、とから構成されると考えられる。これらの過程におい

て、118-bp 配列は、未知のエピゲノム修飾が不可される場所 (PODS = parent of origin deposition site と命名)、あるいは、*de novo* DNA メチル化酵素が触媒反応をおこなう際の足場、として機能する可能性を考えた。どちらの場合であっても、同配列に結合するタンパク質性因子を同定し、その *in vivo* での機能検証をおこなうことが重要である。また、我々が新規に見いだした受精後刷り込みメチル化活性が、ヒトやラットの *H19*-ICR 配列、あるいは (精子でメチル化される) 他の DMR においても保存されているのかを明らかにすることが重要である。そこで、本研究の目的を「118-bp 配列に結合する因子の同定、及び、種間や他の DMR との間のメチル化制御機構の保存性の検証を通して、新規ゲノム刷り込み制御の基盤メカニズムを理解すること」と設定した。

3. 研究の方法

(1) ゲルシフト・アッセイによる 118-bp 配列結合活性の検討：受精後刷り込みメチル化制御因子は精子 (上記 のケース)、あるいは初期胚 (のケース) (、あるいは両方) に存在することが予想される。そこで、野生型 *H19*-ICR の一部配列を放射性標識プローブとして用い、マウス精巣、ES 細胞や P19 胚性腫瘍 (多能性幹) 細胞からの核抽出液と混合することで、ゲルシフトアッセイをおこなった。見いだした複数の結合活性について、変異型配列をコンペティターとして用いることで、その認識コンセンサス配列を決定した。

(2) 118-bp 配列結合活性の同定-1： *H19*-ICR の一部配列を蛍光(TAMRA)標識プローブとして用い、マウス精巣や ES 細胞核抽出液を用いてゲルシフトアッセイをおこなった。因子を含むと考えられるバンドを切り出し後、質量分析による分子同定を試みた。

(3) 118-bp 配列結合活性の同定-3：ゲル濾過、イオン交換、疎水性、ハイドロキシアパタイト、ダイカラムや、DNA 配列親和性ビーズを用い、大量培養した P19 細胞の核抽出液から、生化学的な精製を試みた。また、転写因子データベースを用いた探索もおこなった。

(4) (1) で決定したコンセンサス配列を破壊する 5 塩基の変異 ($\Delta 5$) を *H19*-ICR 配列に導入し、Tg マウスを作製した。生殖細胞や体細胞におけるメチル化状態に対する、同変異の影響を調べた。

(5) マウス以外の *H19*-ICR として、ヒトやラットの *H19*-ICR 配列を用い、Tg マウスの作製とメチル化解析をおこなった。

(6) 父方アレルがメチル化される他の DMR として *Dlk1-Dio3* 遺伝子座の IG-DMR を用い、Tg マウスの作製とメチル化解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) ゲルシフト・アッセイによる 118-bp 配列結合活性の検討により、精巣、マウス ES 細胞、P19 胚性腫瘍 (多能性幹) に共通して存在するタンパク質性因子が 118-bp 配列に結合する可能性を見いだした。この結果は、同因子が精子で親の性に関するエピゲノム情報の *H19*-ICR 配列への付加と、初期胚を含む体細胞でアレルを区別して *H19*-ICR 配列に結合し、*de novo* メチル化の足場としての役割、の両方に関与しうる可能性を示唆した (投稿中)。

(2) 野生型と変異型の *H19*-ICR 配列を蛍光(TAMRA)標識プローブとして用い、ES/精巣核抽出液でゲルシフトアッセイをおこなった。野生型配列でのみ検出されるバンドを切り出し、タンパク質を抽出後、質量分析による分子同定を試みた。しかし、サンプルの精製度が低かったためか、非常に多くのシグナルが検出されてしまい、分子同定には至らなかった。

(3) DNA アフィニティー・カラムを含む複数カラムにより、生化学的手法により候補分子を精製した。精製サンプルを質量分析に供することで、分子同定を試みた結果、複数の候補因子を見いだした。さらに、精子や初期胚に存在し、118-bp 配列に結合すると考えられる因子を *in silico* でも探索し、いくつかの候補を同定した。これら候補因子について、発現様式や機能ドメイン等をデータベースで調査し、その機能妥当性を検討した。これら分子のうち、いくつかについては胚性致死となることが報告されていた(ゲノム刷り込みに関する記述はない)ため、生殖細胞特異的 Cre 遺伝子発現マウスを用いることで、条件付きノックアウトマウスを作製し、他の分子については、ゲノム編集法によりノックアウトマウスを作製中である。(未発表)

(4) (1) で決定したコンセンサス配列を破壊する 5 塩基の変異 ($\Delta 5$) を *H19*-ICR 配列に導入し、Tg マウスを作製した。野生型 *H19*-ICR Tg マウスと同様、変異型 Tg 配列も生殖細胞でメチル化されなかった。受精後、野生型 *H19*-ICR 配列は *de novo* メチル化されたが、変異型 ($\Delta 5$) *H19*-ICR 配列はされなかった。したがって、変異を導入した 5 塩基のいずれか(あるいは全て)とその結合因子が、受精後刷り込みメチル化に必須であることが示された(投稿中)。

(5) ヒト *H19*-ICR 断片を用いて Tg マウスを作製した結果、着床前胚ではアリル特異的なメチル化が観察されたが、この受精後刷り込みメチル化は着床後に失われることが分かった [Hum. Mol. Genet. (2020) 29:3646-61]。そこで、マウス *H19*-ICR 配列の結果との違いの原因を探るため、ラット *H19*-ICR 配列を用いて Tg マウスを作製した。その結果、マウス配列との高い相同性にもかかわらず、ラット配列は受精後刷り込みメチル化を受けなかった。種間で配列が異なる部分に着目することで、受精後刷り込みメチル化に必須の配列の同定に役立つと考えられる。

(6) *Dlk1-Dio3* 遺伝子座の IG-DMR 配列 (2.7-kb) を用い、Tg マウスを作製した。同配列は精子でメチル化されず、受精後、父方アレルにおいてのみメチル化された。つまり、IG-DMR 配列にも受精後刷り込みメチル化活性が存在することになる。しかしながら、母方アレルの同配列は、着床後、ゲノムワイドな *de novo* メチル化活性によりメチル化された結果、最終的に DMR 状態が失われた。したがって、使用した 2.7-kb 配列中には、母方アレルを着床後のメチル化から保護する活性が欠けていることが示唆された [Epigenetics & Chromatin (2023) 16:7]。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuzaki Hitomi, Miyajima Yu, Fukamizu Akiyoshi, Tanimoto Keiji	4. 巻 4
2. 論文標題 Orientation of mouse H19 ICR affects imprinted H19 gene expression through promoter methylation-dependent and -independent mechanisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02939-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirakawa Katsuhiko, Matsuzaki Hitomi, Tanimoto Keiji	4. 巻 29
2. 論文標題 Transient establishment of imprinted DNA methylation of transgenic human IC1 sequence in mouse during the preimplantation period	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 3646 ~ 3661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddaa253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuzaki Hitomi, Kuramochi Daichi, Okamura Eiichi, Hirakawa Katsuhiko, Ushiki Aki, Tanimoto Keiji	4. 巻 13
2. 論文標題 Recapitulation of gametic DNA methylation and its post-fertilization maintenance with reassembled DNA elements at the mouse Igf2/H19 locus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13072-019-0326-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsuzaki Hitomi, Sugihara Shokichi, Tanimoto Keiji	4. 巻 16
2. 論文標題 The transgenic IG-DMR sequence of the mouse DIK1-Dio3 domain acquired imprinted DNA methylation during the post-fertilization period	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13072-023-00482-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 杉原 翔吉、松崎 仁美、谷本 啓司
2. 発表標題 トランスジェニックマウスにおけるラットH19-ICRのDMR形成能の検討
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎 仁美、宮嶋 優、谷本 啓司
2. 発表標題 マウスH19-ICR配列のin vivo反転によるインプリント遺伝子発現機構の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松崎 仁美、平川勝彦、谷本 啓司
2. 発表標題 ヒトH19-ICR YACトランスジェニック・マウスを用いた受精後刷り込みメチル化活性の検証
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirakawa, K., Hitomi, M., Tanimoto, K.
2. 発表標題 Test for DNA methylation activity of the human H19-ICR in YAC transgenic mice by adopting a transgene co-placement strategy
3. 学会等名 The 15th Transgenic Technology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Matsuzaki, Daichi Kuramochi, Katsuhiko Hirakawa, and Keiji Tanimoto
2. 発表標題 Reconstituted H19 ICR sequence with identified cis elements is capable of maintaining genomic imprinting in knock-in mouse
3. 学会等名 33rd International Mammalian Genome Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平川 勝彦、松崎 仁美、谷本 啓司
2. 発表標題 YACトランスジェニック・マウスを用いたヒトH19-ICR刷り込みメチル化メカニズムの検証
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮嶋 優、谷本 啓司、松崎 仁美
2. 発表標題 マウスのゲノム刷り込み制御におけるH19-ICR配列反転の効果
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学生命環境系 谷本研究室 https://sites.google.com/view/tanimoto-lab/ 谷本研究室 (ゲノム情報生物学) https://sites.google.com/view/tanimoto-lab 筑波大学生命環境科学研究科谷本研究室 http://kt-b1-mac1.tara.tsukuba.ac.jp/~tanimotokeiji/Keijis/Welcome.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------