

氏名(本籍)	おかむらえいいち 岡村永一(長野県)			
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	博甲第6509号			
学位授与年月日	平成25年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	<b>Study on the Epigenetic Regulation of the <i>H19</i> Imprinting Control Region in YAC Transgenic Mice</b> (酵母人工染色体導入マウスを用いた <i>H19</i> ICR のエピジェネティック制御の研究)			
主査	筑波大学教授	博士(農学)	谷本啓司	
副査	筑波大学教授	農学博士	深水昭吉	
副査	筑波大学教授	博士(学術)	加香孝一郎	
副査	筑波大学准教授	博士(獣医学)	杉山文博	

### 論文の内容の要旨

哺乳動物は、父親と母親由来のゲノムを保持し、大多数の遺伝子は、両親由来ゲノムから対等に発現する。しかし、一部の遺伝子は、決まった片方の親由来ゲノム(アリル)からのみ発現し、この現象をゲノム刷り込みという。ゲノム刷り込みは、正常な個体の発生に必須であり、ヒトにおいても、その破綻に起因する重篤な疾患(ゲノムインプリンティング異常症)が知られている。本論文の内容は、同遺伝現象の根底にある分子メカニズムの解明を目指し、その一部を明らかにしたものである。

マウス *Igf2/H19* 遺伝子座は代表的なゲノム刷り込み遺伝子座であり、*Igf2* (*insulin-like growth factor 2*) 遺伝子は父親由来アリル、*H19* (non-coding RNA) 遺伝子は母親由来アリル特異的に発現する。*H19* 遺伝子の上流には、アリル特異的にDNAメチル化される領域(differentially methylated region; DMR)が存在する。同領域は刷り込み発現の制御に重要な役割を果たすことから、*H19* ICR (imprinting control region) とも呼ばれている。内在性遺伝子座において、*H19* ICRは精子形成過程でメチル化され、卵形成過程ではメチル化されない。このアリル特異的なメチル化(刷り込みメチル化)状態は、受精後、発生段階を通じて維持される。一方で、マウスゲノム全域は、受精後、着床期までに脱メチル化、着床期以降に新規メチル化されることが知られている。つまり *H19* ICRは、このゲノムリプログラミング活性に抗して、刷り込みメチル化状態を維持する必要があり、そのメカニズムの存在が示唆されてきた。他のグループの研究において、*H19* ICR内のCTCF結合配列が、母親由来アリルの低メチル化状態を維持するために必須であることが示されたが、刷り込みメチル化の確立と維持の詳細な分子メカニズムは依然、解明されていない。

先行研究において、刷り込みメチル化に必要なシスDNA領域を探索するため、2.9 kbの *H19* ICR断片を保持するトランスジェニックマウス(TgM)が作製された。体細胞において、同断片の父親由来アリル特異的なDNAメチル化が観察されたことから、2.9 kbの断片内に、刷り込みメチル化の制御に必要な情報が存在することが示された。ところが、同断片のメチル化が精子では観察されなかったことから、*H19* ICRには、生殖細胞形成過程でDNAメチル化以外のエピジェネティック・マークが付加され、これが受精

後にアリル特異的なメチル化状態に変換される機構が存在することが示唆された。また、この「受精後刷り込みメチル化」は、受精後のゲノム全域に渡るリプログラミング活性に抗して、*H19* ICR の刷り込みメチル化を維持する機構の一つである可能性が考えられた。

本研究では、*H19* ICR の受精後刷り込みメチル化の分子機構の解明を目指し、① *H19* ICR 断片が「父親由来アリル特異的メチル化導入活性」や、「母親由来アリル特異的メチル化からの保護活性」を有するのか、また、② 2.9 kb の *H19* ICR をさらに断片化した場合にも、これらの活性が保持されるのかについて、TgM を用いた解析を行った。

まず、*H19* ICR 断片を、上流側 (ICR21) と下流側 (ICR43) とに分割し、その間に CpG 配列に富む外来の  $\lambda$  ファージ DNA 断片を挿入した。同配列を保持する TgM の解析の結果、 $\lambda$  DNA 領域は、父親由来アリルで高メチル化、母親由来アリルで低メチル化状態を示し、*H19* ICR 領域同様に刷り込みメチル化を受けることが明らかになった。次に、生体内 Cre-*loxP* 反応により、ICR21 と ICR43 の両領域を除去し、 $\lambda$  DNA 配列を単独で保持する TgM を作製した。その結果、同配列は両アリルでともに中程度のメチル化状態を示すようになった。以上の結果より、*H19* ICR は、近傍の CpG 配列に対して、父親由来アリル特異的メチル化導入と、母親由来アリル特異的メチル化からの保護の、両方の活性を持つことが示された。

次に、これらの活性の責任領域を絞り込むため、生体内 Cre-*loxP* 反応により、ICR21 と ICR43 領域のうち、片方のみが  $\lambda$  DNA に連結した配列を保持する TgM を作製した。また、これらとは別に、ICR21 断片、あるいは ICR43 断片のみを単独で保持する TgM を作製した。これらの TgM の解析の結果、父親由来アリル特異的メチル化導入活性は ICR21 領域にのみ存在すること、また、母親由来アリル特異的メチル化からの保護活性には、ICR21 と ICR43 の両領域が必要であることが明らかになった。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

当該研究において、ゲノム刷り込み現象の根幹をなす特徴的な DNA メチル化状態の形成に、メチル基導入活性と、それからの保護活性の両者が、アリル特異的に作用することが必要であることが示された。同知見は、将来、ゲノム刷り込み現象を制御する *cis* DNA 配列や責任タンパク質を同定し、その分子機構を解明する上で、非常に有益な情報をもたらすと判断される。

以上のように、著者はゲノム刷り込み現象に関する独創的な研究を行い、基礎生態学のみならず、農学、医学など幅広い分野に貢献し得る知見を提供できたと判断される。

平成 25 年 1 月 22 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。