

酵母遺伝学を用いたゲノム刷り込み制御因子の探索

平川 勝彦 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 谷本 啓司 (筑波大学 生命環境系)

[背景]

ヒトを含めた哺乳類は、精子と卵が受精してできる2倍体生物であり、父親と母親に由来する1対のゲノムを持つ。また、両者の塩基配列は基本的には同一であり、多くの遺伝子は父親と母親に由来する両方のアリル (対立遺伝子座) から同等に発現する。しかし、一部の遺伝子は一方の親から由来した時のみ発現し、この哺乳類特有の遺伝子発現様式を「ゲノム刷り込み (genomic imprinting)」という。自然界では、卵が精子と受精することなく、卵単独で新しい個体を発生する現象 (単為発生) が知られているが、哺乳類ではその例がみられない。これは、哺乳類にゲノム刷り込みがあるためであると考えられている。

ゲノム刷り込みを受ける遺伝子 (刷り込み遺伝子) は、マウスやヒトでこれまでに100個以上知られている。*Igf2/H19* 遺伝子座は、ごく初期に発見された刷り込み遺伝子座である (図1)。*Igf2* 遺伝子は父親由来アリルで、*H19* 遺伝子は母親由来アリルでそれぞれ発現する。このような「刷り込み発現」の原因は、アリル間でのDNAメチル化状態 (刷り込みメチル化) の違いにある。*H19* 遺伝子上流には、「刷り込み制御領域 (imprinting control region; ICR)」と呼ばれる配列が存在する。この*H19* ICRは、父親由来ではDNAメチル化レベルが高く、母親由来ではメチル化されていない。その結果、アリル間で転写調節因子の結合状態に差を生じ、それが遺伝子発現の差に繋がる。同配列の特徴的なDNAメチル化状態は、始原生殖細胞において「消去」される。その後、生殖細胞形成過程で、その個体自身の性別に対応したメチル化状態が「確立」する。つまり、精子では*H19* ICRがDNAメチル化されるが、卵ではメチル化されない。この刷り込みメチル化状態は、受精後の体細胞において、細胞分裂を経た後でも「維持」される。

[目的]

H19 ICR配列は精子でのみDNAメチル化されるが、この反応に関わるDNAメチル化酵素は、精子と卵の両方に存在する。つまり、*H19* ICR配列のアリル特異的なメチル化は、DNAメチル化酵素だけでは説明できないため、未だ明らかになっていないメカニズムが存在すると予想される。当研究室では以前、2.9-kbの*H19* ICR断片を用いて、トランスジェニックマウスを作製した。マウスゲノムに挿入された*H19* ICR断片は、父親由来の時にだけDNAメチル化されたことから、同断片は刷り込みメチル化に十分な情報をもつことが示された。次に、*H19* ICR配列の5'側を欠損する一連の断片を用いてトランスジェニックマウスを作製し、DNAメチル化状態を調べた。その結果、118-bpの配列を欠損すると、刷り込みメチル化が失われることが分かった。つまり、同配列が父親由来*H19* ICRを高メチル化状態にするために重要であると考えられる。また、同配列に結合するタンパク質が、P19細胞、ES細胞や精巣の核抽出液中に存在することがゲルシフトアッセイにより確認された。同タンパク質は*H19* ICRの刷り込みメチル化を制御する可能性が示唆される。

そこで、本研究では、酵母遺伝学的手法を用いることで、118-bp配列に結合するタンパク質の同定を試みた。

[方法]

Yeast one hybrid system (Y1H) は、特定DNA配列に結合するタンパク質を、酵母内でスクリーニングする方法である (図2)。酵母由来の転写活性化因子 GAL4 タンパク質の分子内には、DNAへ結合するためのDNA結合ドメイン (DBD) と、プロモーターの活性化に関わる活性化ドメイン (AD) が存在する。これら2つのドメインは機能的に独立しているため、DBDを他のタンパク質のDBDと交換した場合でも、その機能は維持される。本研究では、まず、P19、ES、精巣細胞から抽出したmRNAを逆転写反応によりcDNAへと変換し、酵母用発現ベクターに組み込むことで、GAL4-ADとの融合タンパク質を発現するcDNAライブラリーを作製した (図2左)。次に、父親由来*H19* ICRのメチル化に重要な118-bp配列を、抗生物質耐性遺伝子上流に挿入した酵母クローンを作製し (図2中)、同クローンにcDNAライブラリーを導入した。酵母内で発現した融合タンパク質のDNA結合ドメインが118-bp配列に結合した場合には、GAL4-ADを介して下流の抗生物質耐性遺伝子が発現する。その結果、酵母は抗生物質添加培地上で生育できるようになり、同酵母からcDNAクローンを回収することで、目的タンパク質をスクリーニングすることができる。

[結果と考察]

Y1Hによるスクリーニングの結果、計24個の候補cDNAクローンが得られ、シーケンス解析により各クローンがコードする遺伝子を決定した。現在、これら候補クローンにコードされるタンパク質を動物細胞で発現させ、そのDNA結合能を解析中である。今後、刷り込みメチル化に関与する可能性が高い遺伝子を特定できた場合には、ゲノム編集法によりノックアウトマウスを作製し、刷り込みメチル化に対する影響を調べる予定である。

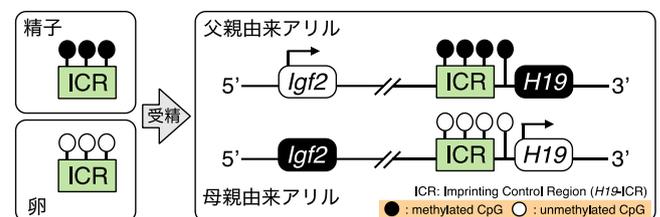


図1: *Igf2/H19* 遺伝子座におけるゲノム刷り込み

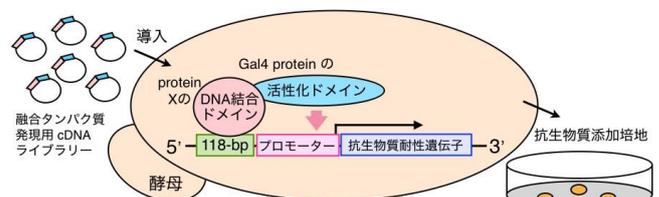


図2: Y1H システムによるスクリーニング