

CRISPR/Cas 系による *cis* 配列反転マウスを用いたゲノム刷り込み制御機構の解析

宮嶋 優 (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】

哺乳類は二倍体生物であり、遺伝子の大部分は、父親由来と母親由来の両方のアレルから同等に発現する。しかし、一部の遺伝子は、両親のいずれか一方に由来するアレルのみしか発現しない。同現象は「ゲノム刷り込み」と呼ばれ、父親・母親由来のそれぞれのアレルに特異的な DNA メチル化、すなわち「刷り込みメチル化」のパターンによって制御される。

ゲノム刷り込み制御を受ける遺伝子座のひとつに、*Igf2/H19* 遺伝子座がある (図 1)。同遺伝子座の 5' 上流側には、インスリン様成長因子をコードし、胚の成長を促進する機能を持つ *Igf2* 遺伝子があり、一方、3' 下流側には、非コード RNA が発現し、胚の成長抑制や転写の調節に働く *H19* 遺伝子がある。両遺伝子はそれぞれ、父親由来アレルと母親由来アレルのみで発現し、他方のアレルでは抑制されている。同刷り込み発現は、*H19* 遺伝子上流に位置する発現制御領域、*H19*ICR (Imprinting control region) が、父親由来アレルのみで高メチル化されることに起因する。

父親由来アレルでは、*H19*ICR に加えて、下流の *H19* 遺伝子プロモーター領域もメチル化されている。したがって、同メチル化が、*H19* 遺伝子発現を抑制すると考えられてきた。一方で最近、刷り込み制御を受けない別の遺伝子座 (α -fetoprotein 遺伝子座) に *H19*ICR を挿入した変異マウスの報告によって、遺伝子プロモーターのメチル化に非依存的な、*H19*ICR による発現抑制メカニズムの存在が示唆された。ただし、 α -fetoprotein 遺伝子プロモーター中の CpG モチーフの数や、*H19*ICR と遺伝子との距離などが、本来の *H19* 遺伝子座とは異なるため、同じメカニズムが再現できているのかについては疑問である。したがって、*H19* 遺伝子の発現制御機構は完全には明らかになっていない。

【目的】

H19 遺伝子は多くの機能を持つことが明らかになってきており、その発現制御機構を理解することは重要である。本研究では、このメカニズムの解明のために、父親由来アレルでの *H19* 遺伝子の転写抑制に本当にプロモーター領域のメチル化は必要なのか、を解決することを目的とした。

当研究室の先行研究において、*H19*ICR 配列を、通常はゲノム刷り込み制御を受けないヒト β グロビン遺伝子座に酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome; YAC) 上で挿入し、YAC トランスジェニックマウスを作製した。同マウスの解析の結果、導入した *H19*ICR は父親由来のみでメチル化されており、*H19*ICR 配列中に刷り込みメチル化の確立に十分な情報が含まれることが示された。さらに、*H19*ICR 配列中の 5' 側部分に存在する責任配列から 3' 側へ向かってメチル化が開始される、と考えられる結果が得られた。

そこで本研究では、「父親由来 *H19* 遺伝子の発現抑制は、*H19*ICR 上流から始まったメチル化が、さらに下流の *H19* 遺伝

子プロモーター領域まで広がることで起こる」という仮説を立て、マウス内在遺伝子座において *H19*ICR の方向を反転させることで、*H19* プロモーターのメチル化状態が変化すれば、これを検証できると考えた (図 2)。

【方法】

*H19*ICR の反転は、CRISPR/Cas 系によって *H19*ICR の両端を切断することで誘導することにした。このために、*H19*ICR の両端を認識する 2 種類のガイド RNA と Cas9 タンパク質を発現するベクターを作製した。さらに、ICR の反転した連結が起こりやすくなることを期待して、反転後の ICR の両連結部分に相同な配列を持つ一本鎖ドナー DNA を準備した。これらをマウス受精卵の前核に顕微注入し、ファウンダー (F0) マウスを作製した。同マウスの尾からゲノム DNA を抽出し、PCR 解析とシーケンシング解析を行い、*H19*ICR が正しく反転した個体を選抜した。その後、野生型マウスとの交配によって変異マウス系統を確立した。

*H19*ICR 反転アレルを父親、または母親から受け継ぐ個体を交配により得た後、現在、ICR 配列内部および周辺の DNA メチル化状態をサザンブロッティング法、および、bisulfite sequencing 法を用いて解析している。今後、*H19* 遺伝子の発現量を qRT-PCR 法によって解析する予定である。

【結果】

CRISPR/Cas 系を用いたゲノム編集を行った結果、27 匹の F0 マウスのうち 3 匹で、*H19*ICR 配列全域が正しく反転していた。これらのマウスをそれぞれ野生型マウスと交配させ、最終的に 2 系統の *H19*ICR 反転マウス系統を確立することができた。

卒業研究発表会にて、DNA メチル化解析の結果の一部を発表する。

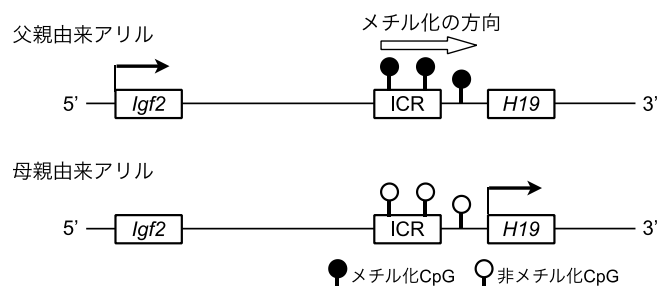


図 1: *Igf2/H19* 遺伝子座におけるゲノム刷り込み

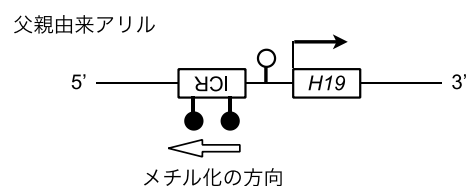


図 2: *H19*ICR 反転マウスの作製と期待される表現型