

## ゲノム刷り込みに関わる DNA 結合タンパク質の探索

川村 風太 (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]

私たち、ヒトを含む哺乳類の体は、精子と卵子が受精し、受精卵が発生することで形作られる。つまり、二倍体生物である哺乳類の細胞内には父親と母親、それぞれに由来するゲノムが存在する。多くの遺伝子はこれら両方のゲノムから同等に発現するが、刷り込み遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子は片方の親由来ゲノムのみから発現する。この片アレル性の遺伝子発現を制御するのが DNA のメチル化であると考えられている。特に、ICR (Imprinting Control Region) と呼ばれる領域のメチル化は重要である。ICR は父親由来と母親由来とで DNA のメチル化レベルが異なり、この刷り込みメチル化により遺伝子発現の違いを生じる。従って、このメチル化レベルの違いを生み出すメカニズムの解明が極めて重要である。

*H19/Igf2* 遺伝子座は代表的な刷り込み遺伝子座である (図 1)。*Igf2* は父親由来、*H19* は母親由来アレルのみでそれぞれ発現する。同遺伝子座の ICR (*H19*-ICR) は、父親由来では高度にメチル化されており、一方、母親由来では低メチル化となっている。この結果、アレル間で転写制御因子の結合状態に差が生まれ、遺伝子発現の差に繋がると考えられる。当研究室では現在、同領域のアレル特異的なメチル化を生み出すメカニズムの解明を進めている。母親由来アレルの低メチル化維持には、CTCF や Sox-Oct 転写制御因子が関わると考えられている。しかしながら、父親由来のメチル化確立に必要な因子は分かっていない。

### [目的]

*H19*-ICR における父親由来アレルの刷り込みメチル化は、特定の DNA 領域に特定の因子が結合することで確立されると考えられる。本研究は、このゲノム刷り込みに関わる DNA 結合タンパク質の同定を目的とする。

当研究室では以前、マウスの *H19*-ICR (2.9 kb)断片を用いてトランスジェニックマウスを作製した。解析の結果、同トランスジェニックは父親由来アレルのみでメチル化されたことから、刷り込みメチル化の確立に十分な情報を含むと考えられた。さらに、*H19*-ICR の 5' 上流領域を欠損させる実験などにより、メチル化確立に必要な十分な 118-bp の配列を同定した。また、同配列に結合するタンパク質が P19 細胞や ES 細胞などの核抽出液中に存在することを、ゲルシフトアッセイにより確認した。以上の結果から、118-bp の配列に同タンパク質が結合することでゲノム刷り込みを制御していることが示唆された。そこで同領域に結合する DNA 結合タンパク質の探索を行うことにした。

### [方法]

候補タンパク質の探索は、転写因子データベースを用いておこなった。転写制御因子には、それぞれ固有の DNA 認識配列、つまり、結合コンセンサス配列が存在する。これまでに明らかとなったタンパク質のコンセンサス配列については、データベースにまとめられている。そこでまず、コンセンサス配列と高い相同性

をもつ配列が、118-bp 配列中に存在するタンパク質を検索した。次に、これらタンパク質の機能、細胞内局在、発現時期について文献調査を行うことで、目的因子としての条件を満たす 6 種類に絞り込んだ。

これら因子のクローニングをおこなうために、まず P19 細胞から抽出した RNA を逆転写して合成した cDNA を鋳型とし、PCR により目的の断片を増幅した。次に断片を動物細胞発現用ベクターと大腸菌発現用ベクターにそれぞれライゲーションした。断片が正しく挿入されたプラスミドを調製後、HEK293T 動物細胞、あるいは大腸菌 (BL21 株) に導入した。その後、タンパク質を発現させ、精製をおこなった (図 2)。

発現タンパク質の 118-bp 配列に対する DNA 結合活性は、ゲルシフトアッセイを用いて調べた。同配列を 6 つの部位に分割し、2本鎖オリゴヌクレオチドを合成した。各断片を  $\gamma$ -<sup>32</sup>P により末端標識し、DNA プローブを作製した。プローブと調製したタンパク質を混合し、電気泳動により展開した後、X 線フィルム感光をおこなった。標識 DNA 断片の移動度の変化により、候補因子の DNA 結合活性を判断した。

### [結果と考察]

候補因子のうち、1 種類については、PCR による増幅ができなかった。これは、目的のタンパク質をコードする配列が非常に GC リッチであるため、プライマーが鋳型に対して正しく結合できなかったことが原因であると考えられた。3 種類に関しては、大腸菌と動物細胞でタンパク質の調製に成功した。動物細胞サンプルについては、内因性タンパク質によるバックグラウンドが高かったため、その結合活性を判断できなかった。一方、大腸菌サンプルについては、118-bp 配列への結合活性が認められた。現在、残り 2 種類の候補タンパク質の調製を進めており、今後、その DNA 結合活性を調べる予定である。また、刷り込みメチル化に関与する可能性が高いタンパク質については、ロックアウトマウスを作製し、その因子の欠損が体内のメチル化状況にどのような影響を与えるかを解析する予定である。

