

トランスジェニックマウスを用いたゲノム刷り込み制御配列の遺伝子間比較

神本 悠司 (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、父親と母親それぞれから1セットずつのゲノムを受け継ぐ。両者の塩基配列は基本的に同一であり、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場合にのみ発現する。哺乳類で特徴的に観られるこの発現様式は「ゲノム刷り込み (genomic imprinting)」と呼ばれる。

Igf2/H19 遺伝子座は、ゲノム刷り込みを受ける代表的な例であり、父由来アリルで *Igf2* 遺伝子が、母由来アリルで *H19* 遺伝子がそれぞれ発現する。このような「刷り込み発現」は、*H19* 遺伝子上流の DNA 配列のメチル化レベルがアリル間で異なる(刷り込みメチル化) ことによって生じる。同配列は「刷り込み制御領域 (Imprinting Control Region; ICR)」と呼ばれ、父由来でメチル化レベルが高く、母由来では低い。この違いは、*H19*ICR が精子でのみメチル化され、卵ではされないことに起因する。このアリル間でのメチル化レベルの差は、受精後、細胞分裂を経ても安定に維持される。その結果、アリル間で転写調節因子の結合状態に差が生じ、刷り込み発現が起こる。

DNA のメチル化はゲノム刷り込み以外にも、発生・分化や、配偶子形成過程の遺伝子の転写調節などにおいて重要な役割を果たしている。配偶子で付加された DNA メチル化の多くは、受精後から着床までの期間に急激に消去される(リプログラミング)。ところが興味深いことに、ICR に付加された刷り込みメチル化は、リプログラミングの影響を受けず、一生を通して安定に維持される。

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 (TgM) を作製した。驚くべきことに、ゲノムに挿入された *H19*ICR 断片は精子ではメチル化されず、受精後、父由来アリルでのみメチル化された(受精後刷り込みメチル化)。したがって同断片は、少なくとも、子における刷り込みメチル化の形成には十分な情報を持つことが示された [1]。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た。その結果、118-bp の配列を欠損すると、受精後刷り込みメチル化が失われた。さらに、内在遺伝子座の 118-bp 配列をノックアウトしたマウスでは、精子で確立されたメチル化が、受精後のリプログラミングの時期に消失した。これらの結果から、内在遺伝子座の 118-bp 配列は、本来、受精直後の胚で父由来 *H19*ICR の高メチル化状態を維持する機能を持つことが考えられた。

【目的】

マウスの 118-bp 配列内には、既知の転写調節因子結合モチーフが複数存在する。しかし、これらのモチーフが実際に受精後刷り込みメチル化活性に関与するのかが未解明である。マウスにおける 118-bp 配列の重要性は、当研究室のこれまでの研究から明

らかであるが、他の種における 118-bp 配列の保存性やその機能については未解明である。

そこで、本研究では、マウスと同じ哺乳実験動物であるラットに注目し、ラットの *H19*ICR 断片を導入した TgM を作製・解析することで、受精後刷り込みメチル化に関与する DNA 配列の同定を目的とした。

【方法】

まず、Ensembl Genome Browser [2]を用いて、ラットの *H19*ICR 配列を入手し、GENETYCS MACにおいて、マウスの同配列との比較を行った。また、JASPAR [3]を用いて、マウス 118-bp 配列に相当するラットの配列 (113-bp) に結合する可能性のある転写調節因子を探索した。

次に同配列の機能を *In vivo* で解析するために、2.8-kb のラット *H19*ICR 配列を PCR により増幅し、酵母内相同組換え反応用ターゲットベクターに組み込んだ。同配列を挿入したヒト β -globin YAC (酵母人工染色体) をマウスの受精卵に顕微注入し、YAC-TgM を作製した (F0 TgM)。得られた F0 TgM の中から、完全長の Tg を1コピーのみ保持する個体をサザンブロッティング法、及び定量的 PCR によって選別し、系統化した。

DNA メチル化解析には、メチル化感受性制限酵素を用いたサザンブロッティング法、及びバイサルファイトシーケンシング法を用いる。その際、父由来 *H19*ICR 配列の解析には、オスの TgM とメスの野性型マウスの交配により得られたマウス個体を用い、母由来 *H19*ICR 配列の解析には、逆の組み合わせによる交配を行う。

【結果と考察】

マウスとラットの 118-bp 相当配列の相同性は 64%であった。また、両配列に共通して結合する転写調節因子の候補を複数見出した。しかし、これら因子の結合配列モチーフの数や位置には両者で違いがみられた。

また TgM の作製において、444 個の胚操作により、28 匹の F0 TgM が得られた。これらのうち、完全長の Tg を1コピーのみ保持するマウスは3個体であった。現在、この3個体について系統化を行っている段階である。今後、父由来と母由来のラット *H19*ICR 配列についてメチル化解析を行う予定である。

マウスとラットの *H19*ICR 配列全体での相同性は 78%であった。この値と比べて 118-bp 相当配列単独での保存性 (64%) が低い。したがって、ラットの同配列がマウスと同様の機能を持つのだとすると、重要な転写調節因子結合配列以外の保存性がそれほど高くないことが予想される。

【参考文献】

1. Tanimoto, K. et al. *PNAS*(2005) 102, 10250-10255
2. <https://asia.ensembl.org/index.html>
3. <http://jaspar.genereg.net>