

## 哺乳類の刷り込みメチル化に関わる DNA 配列の組織特異的ノックアウトマウスの作製

木村 美南 (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・目的】

私たちヒトを含む哺乳類は、父親と母親のそれぞれから1セットずつのゲノムを受け継ぐ。そして、ゲノム上の遺伝子は、通常、親の由来に関わらず等しく発現する。しかし、例外的に、父親から受け継いだ時のみ、あるいは母親から受け継いだ時のみ発現する遺伝子が存在し、これらは「刷り込み遺伝子」と呼ばれている。

刷り込み遺伝子の DNA 配列は、父由来と母由来のいずれのアリルにおいても等しいが、刷り込み制御領域 (Imprinting Control Region: ICR) でのメチル化修飾が親の由来に応じて異なっている (刷り込みメチル化)。この領域のメチル化状態の違いこそが、受け継いだ親の性に応じて遺伝子発現が異なる理由であると考えられている。

*Igf2/H19* 遺伝子座は代表的な刷り込み遺伝子座であり、父由来アリルでは *Igf2* (インスリン様成長因子 2) 遺伝子のみが、母由来アリルでは *H19* (ノンコーディング RNA) 遺伝子のみが発現する。また、この遺伝子座の ICR (*H19*ICR) の DNA メチル化レベルは、父由来アリルでは高く、母由来アリルでは低い。

これまで、マウス内在遺伝子座の *H19*ICR は、精子でメチル化され、この状態が、受精後に父由来アリルの *H19*ICR において維持されると考えられていた。ところが、以前、所属研究室でマウスの *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結果、導入した *H19*ICR は精子でメチル化されておらず、受精後に父由来アリルのみでメチル化されることがわかった (受精後刷り込みメチル化)。このことから、精子で *H19*ICR に 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、これが受精後に識別されることで、受精後刷り込みメチル化が可能となるのではないかと考えている。

さらに、*H19*ICR の欠損変異体を用いた実験により、受精後刷り込みメチル化を確立するために必要な *cis* 制御配列を同定した。現在、同配列と協働して刷り込みメチル化を制御する DNA 配列が存在すると予想している。

そこで、本研究は、メチル化制御の候補 DNA 配列をノックアウトし、その機能を解明することを目的とした。

## 【方法】

刷り込みメチル化制御に関与すると考えている DNA 配列 (以下、領域 X とする) は、精子でのエピジェネティック・マークの付加の際に機能することが予想される。同領域をマウスの精子特異的にノックアウトするために、Cre-loxP システムを採用することにした。そのためには、マウスゲノム中の領域 X の両側に、相同組換えによって loxP 配列を挿入する必要がある。この時、正しい位置で効率よく組換え反応が起こるように、loxP 配列挿入部位を、ゲノム編集 (CRISPR-Cas9 法) を用いて切断することとした。

CRISPR-Cas9 法では、切断したい配列を認識する guide RNA (gRNA) が必要である。そこで、まず、領域 X 周辺の DNA 配列情報から gRNA を設計し、同配列を発現する gRNA・Cas9

プラスミドを調製した。これを培養細胞に導入し、ターゲット配列の切断効率を蛍光観察により判定した。

次に、相同組換え反応の鋳型となるドナー DNA を 2 種類 (plasmid donor DNA と single strand donor DNA) 調製した。plasmid donor DNA は、gRNA・Cas9 発現ベクターとともに顕微注入法により 244 個のマウス受精卵に導入した。また、single strand donor DNA、gRNA、Cas9 タンパク質を電気穿孔法により 212 個の受精卵に導入した。さらに、領域 X の両側に片方ずつ loxP 配列を挿入できるよう、i-GONAD 法による、2 段階での loxP 配列挿入も試みた。

## 【結果・考察】

Plasmid donor DNA を用いた実験では、目的の部位に正しく loxP 配列が挿入されたマウス (F0) 個体を 3 匹得ることができた。用いた相同配列が十分に長く、組換え反応が効率よく起こったと考えられる。

一方、single strand donor DNA を導入した実験では、これまで目的の配列を持つマウスが得られていない。この実験では、loxP 配列を 2 カ所に挿入するためのドナーとして、連続した配列ではなく、2 つに分かれた single strand DNA を使用した。このため、これらが反応に使われる相同組換えよりも、2 カ所の gRNA ターゲット部位間の配列が欠損される効率が高かったと考えられる。

また、i-GONAD 法では、1 段階目の loxP 挿入反応が正しく起こったマウスを 4 匹得ることができた。しかし、i-GONAD 操作を行った複数の雌マウスで共通して、産仔数が少なかった。したがって、導入する gRNA、donor DNA、Cas9 タンパク質の濃度や、電気パルスの条件等の最適化が必要であると考えられる。

これまでに、顕微注入法による plasmid donor DNA 導入で得られた F0 個体を、同系統の野生型マウスと交配することで、全ての細胞で領域 X の両側に loxP 配列が挿入されている F1 個体が得られた。

今後は、雄の生殖細胞で特異的に発現する遺伝子のプロモーター制御下で Cre 酵素遺伝子を発現するマウスと、先の F1 個体とを交配することで、精子特異的に Cre-loxP 反応を誘導する。次に、精子特異的ノックアウトマウスの、精子での *H19*ICR のメチル化状態を、バイサルファイトシーケンシング法により解析する。これに加えて、精子で領域 X を欠損した雄親から *H19*ICR 配列が受け継がれた際に、受精後刷り込みメチル化状態が変化するかについて、受精後初期胚の解析を行う予定である。