

哺乳動物の受精後刷り込みメチル化は種や遺伝子座をこえて保存されているか

森橋 美月 (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】

ヒトを含む哺乳動物は、父親と母親からそれぞれ1セットずつゲノムを受け継ぎ、両アレルの遺伝子は仔で等しく発現する。しかし、一部の遺伝子は例外的に、由来する親の性に依存した片側アレル性の発現を示し、同現象は「ゲノム刷り込み」と呼ばれる。どちらの親由来の遺伝子が発現するかは、遺伝子周辺の刷り込み制御領域 (Imprinting control region; ICR) における DNA メチル化状態が両親由来で異なることで制御され、ヒトやマウスでは、母由来で高メチル化である ICR は20 個程度、父由来で高メチル化である ICR は、*H19*ICR、IG-DMR、*Rasgrf1* の3つのみが知られる。刷り込み発現は胎児の成長を促進、または抑制する遺伝子によくみられるため、哺乳動物の正常な発生や成長に必須である。

受精後の初期発生胚は、ゲノム全体が DNA 脱メチル化されることで分化多能性を獲得する。しかし ICR では、一方の配偶子のみで獲得した DNA メチル化が、ゲノム全体の脱メチル化に抵抗して維持される。所属研究室では、*H19*ICR が精子でのみメチル化を獲得し、それが受精後も維持されるメカニズムを理解するために、マウス *H19*ICR の DNA 配列をもつトランスジェニックマウス (TgM) を作製した (図 1A)。その結果、予想外に、同配列は精子ではメチル化されず、受精後の初期胚でメチル化された (図 1B)。この現象は、内在 *H19*ICR の挙動とは異なっており、新たに「受精後刷り込みメチル化」と名付けられた。

*H19*ICR 配列内で受精後刷り込みメチル化に必要な DNA 配列を同定するためには、同配列を、共通の機能をもつ他の DNA 配列と比較することが有益だと考えられた。そこで、このような候補として、マウス *H19*ICR に相溶性が高いラット *H19*ICR 配列、および、*H19*ICR と同様、父由来で高メチル化となるマウス IG-DMR について、それぞれ TgM を作製した (図 1A)。その結果、ラット *H19*ICR 配列 (2,809 bp) は、マウスで同定した受精後刷り込みメチル化に必要とされる 118 bp 配列と相同な配列 (113 bp) を含むにも関わらず、受精後刷り込みメチル化が起らなかった。一方、父由来アレルでの高メチル化維持に必要なことが報告された 216 bp のリピート配列を含むマウス IG-DMR 配列 (2,674 bp) は、受精後に父由来アレルでのみ高メチル化された。ところが、同配列は胚盤胞期以降、低メチル化であるべき母由来アレルで高メチル化されてしまった。これらの結果より、両配列には、完全な受精後刷り込みメチル化に必要な配列が含まれていないことが考えられた。

そこで私の卒業研究では、以前の DNA 断片よりも塩基配列を伸長した新しい断片を用いて TgM を作製し、受精後刷り込みメチル化に必要な制御配列を同定することを目的とした (図 1A)。まずラット *H19*ICR 配列は、その後の研究から、新たにマウス *H19*ICR の受精後刷り込みメチル化に重要と考えられた配列を含むように伸長した。一方、マウス IG-DMR については、他研究グループによって最近報告された、母由来アレルでの低メチル化の維持に必要な配列を含めた。

【方法】

新たに作製した各配列は、巨大な酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome; YAC) の内部に挿入した。YAC への挿入には Tg を位置効果から保護する目的がある。位置効果とは、Tg がゲノム上に挿入された位置の違いによって、その活性や機能が変化する現象である。本研究では、研究対象の断片と、YAC 外側のマウスゲノム配列との距離が十分に離れることで、各配列が周囲のゲノムからの影響を受けにくくなることを期待した。また、両配列は異なる2種類の loxP 配列 (loxP5171 及び loxP2272) で交互に挟まれるように連結した上で、YAC に挿入した。酵母より YAC-DNA を精製した後、顕微注入法によりマウス受精卵に導入した。得られた仔マウスのうち、Tg を1 コピーもつ個体を定量 PCR により同定した。その後、同 YAC-TgM と、卵でのみ Cre 酵素を発現する Zp3-Cre TgM との交配により、マウス生体内での Cre-loxP 組換え反応を誘導した。その結果、次世代で、ラット *H19*ICR 配列、または、マウス IG-DMR 配列どちらか一方のみをもつマウスが得られた。今後、これらの Tg を父由来、あるいは、母由来で受け継ぐマウスについて、bisulfite sequencing 法とメチル化感受性定量的 PCR 法を用いることで、そのメチル化状態を調べる計画である。

【結果・展望】

現在までに、ラット *H19*ICR、あるいは、マウス IG-DMR 配列をもつ TgM がそれぞれ3 系統ずつ得られており、今後、父、または母から受け継がれた Tg のメチル化状態を調べる。

ラット *H19*ICR Tg で受精後刷り込みメチル化が起こる場合、伸長した配列内に重要な領域が含まれる可能性がある。また、マウス IG-DMR Tg で母由来の低メチル化状態が胚盤胞期以降も維持される場合、他研究グループが報告した配列が重要である可能性がある。種間での *H19*ICR 同士の比較や、異なる遺伝子座 (*H19*ICR と IG-DMR) 間の比較をすることで、受精後刷り込みメチル化に必要な配列の探索をおこなう。

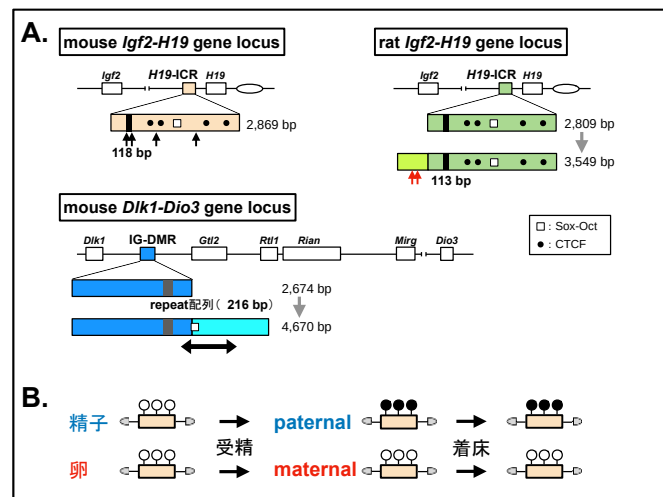


図1 A. TgM 作製に用いた DNA 断片

B. マウス Tg *H19*ICR でみられた受精後刷り込みメチル化