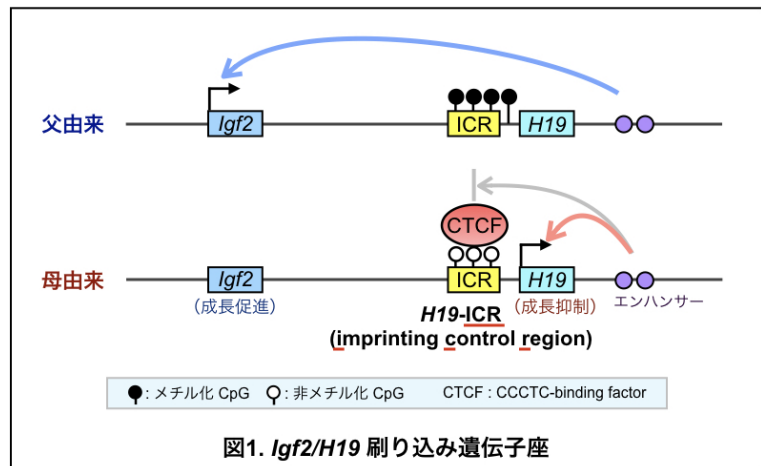


制御配列のヒト化マウスを用いたゲノム刷り込みの研究

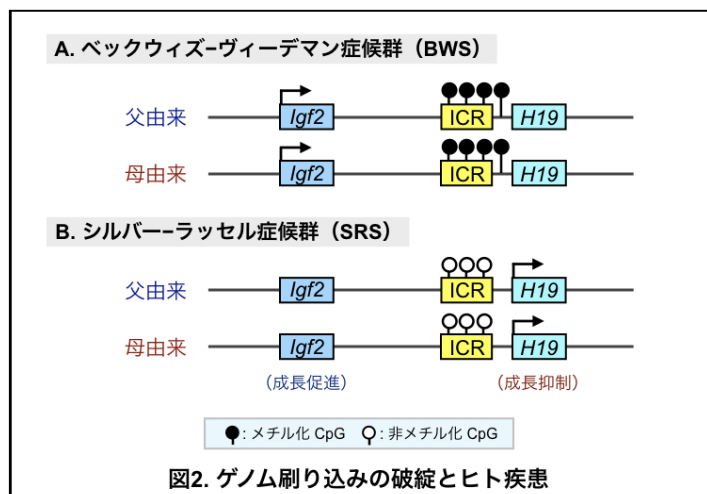
筑波大学 生命環境系
松崎 仁美

哺乳類において、親から子に遺伝する情報は、ゲノム DNA の塩基配列情報だけではない。この最たる例が、「ゲノム刷り込み (genomic imprinting)」である。哺乳類の遺伝子の一部 (マウスで約 150 個) は、父親と母親から受け継がれた一対のアリルの塩基配列が完全に同じであっても、どちらか一方のアリルからしか発現しない。つまり、親に由来する「エピ」ゲノム情報によって、子における遺伝子発現の ON-OFF が決まる。この制御は個体の正常発生に必須で、その破綻はヒト疾患の原因になる。臍帯ヘルニア・巨舌・巨体を主徴とするベックウィズ-ヴィーデマン症候群 (BWS) と、子宮内・出生後の発育遅延を呈するシルバー-ラッセル症候群 (SRS) は、おおよそ逆の症状を示すが、どちらも *Igf2/H19* 刷り込み遺伝子座のエピゲノム異常がその原因の一つとなっている。

正常時の同遺伝子座では、成長因子をコードする *Igf2* 遺伝子は父由来アリル、成長抑制作用をもつ *H19* 遺伝子は母由来アリルのみから発現する (図 1)。同刷り込み発現は、遺伝子座内の制御領域 (*H19*-ICR; imprinting control region) が父由来のときにだけ DNA メチル化されることでおこる。父由来アリルでは、ICR のメチル化が *H19* 遺伝子プロモーターを抑制する結果、*Igf2* 遺伝子のみが発現する。一方、母由来の非メチル化 ICR には CTCF インシュレータータンパク質が結合して *Igf2* 遺伝子の発現を阻害するため、*H19* 遺伝子のみが発現となる。ところが何らかの理由により、*H19*-ICR が両アリルでメチル化 (図 2A : BWS)、あるいは非メチル化 (図 2B : SRS) されると、*Igf2*、*H19* 遺伝子が両アリルで発現するように (または、発現しなく) なり、疾患発症につながる。しかしながら、正常時いかにして正しくメチル化状態が形成されるのか、BWS や SRS でなぜ異常になるのか、その分子機序は不明な点が多い。

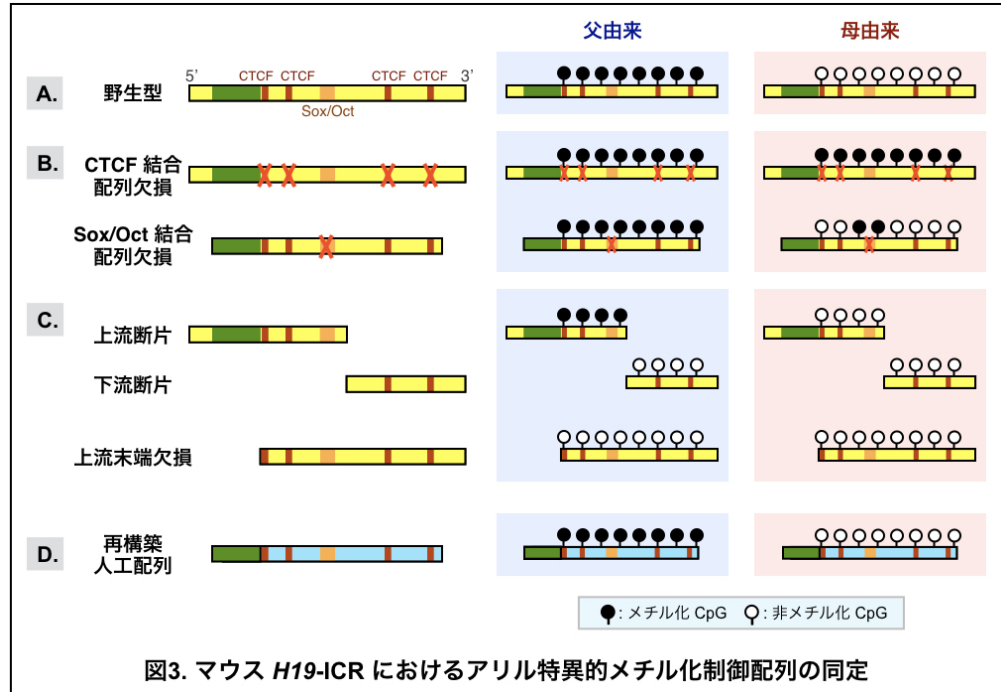


これまで我々は、マウスの *Igf2/H19* 遺伝子座を用いて、*H19*-ICR のアリル特異的メチル化に必要な・十分な *cis* 配列を同定してきた。まず、マウス *H19*-ICR 配列を導入したトランスジェニックマウスによって、同配列のみで自律的にアリル特異的メチル化が形成されることを示した (図 3A) [1, 2]。次に、ヒトの BWS 症例において *H19*-ICR 内の CTCF タンパク質結合配列を含む領域 [3]、あるいは、*Sox*、*Oct* タンパク質結合配列 [4] に変異が報告されていたことから、マウス *H19*-ICR に変異導入して検証した結果、母由来 ICR が異常にメチル化されるようになることがわかった (図



3B) [5, 6]。つまり、これらモチーフによる母由来 ICR の低メチル化維持のメカニズムは、ヒトとマウスで保存されており、その変異が BWS における異常メチル化の原因と考えられた。

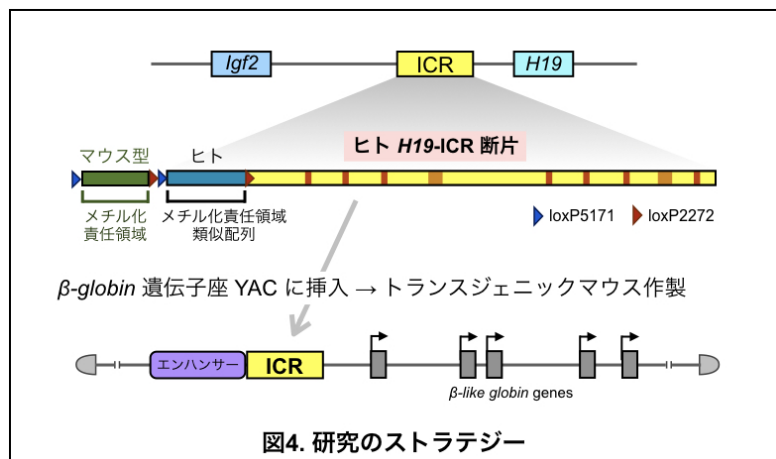
また、我々は、*H19*-ICR の分割断片や末端欠損断片を用いてトランスジェニックマウスを作製し、*H19*-ICR 配列の上流端部分に、同配列を父由来でメチル化するために必要な配列が存在することを見出した (図 3C) [7, 8]。さらに、同配列を上述の CTCF、Sox、Oct 結合配列と組み合わせて人工 DNA 断片を構築し、トランスジェニックマウスにおいて、これらのマウス *H19*-ICR 由来制御エレメントがアレル特異的メチル化の形成に十分であることを明らかにした (図 3D) [9]。



一方で、ヒト *H19*-ICR の DNA メチル化不全は、SRS 症例でもっとも多く認められる異常だが、その原因はよくわかっていない。我々は、マウスで同定したメチル化責任領域の類似配列を、ヒト配列中にも見いだしており、同配列が SRS 症例に関与する可能性が予想される。しかしながら、*H19*-ICR 配列をヒトとマウスで比較すると全体の相同性はそれほど高くないため、ヒト配列上での機能検証が必要である。また最近、海外のグループから、ヒト *H19*-ICR 配列によりマウス ICR を置換した報告がなされたが、ノックインされたヒト ICR 配列は父・母どちらに由来した際にもメチル化されなかった [10]。したがって、ヒトにおける父由来メチル化制御配列は、同報告で用いられた範囲の外側に存在すると考えられる。

本研究では、ヒト *H19*-ICR 配列上でのアレル特異的メチル化をマウス個体内で再現し、ヒトにおけるメチル化メカニズムを解明すること目的とした。メチル化制御活性の自律性を証明できるように、ヒト *H19*-ICR 配列を導入したトランスジェニックマウスを作製することにした (図 4)。その際、用いるヒト配列は、報告 [10] で使用された範囲の外側に存在する、「マウス・メチル化責任領域の類似配列」を含むようにした。同配列の活性のコントロールとして、マウス・メチル化責任領域そのものも末端に付加し、これらの配列はそれぞれ、

Cre-loxP システムによってマウス個体内で個別に欠損できるようにした (トランスジーン・コプレイスメント法)。また、トランスジーン的位置効果を回避するために、同ヒト ICR 配列は、通常はゲノム



刷り込みを受けない β -グロビン遺伝子座・酵母人工染色体 (YAC ; 150 kb) 中に挿入した上で、YAC トラン

スジェニックマウスを作製した。

同トランスジェニックマウス系統を複数樹立し、現在、トランスジーンを父親または母親から受け継ぐ個体を得て、DNAメチル化状態の解析をおこなっている。父由来特異的メチル化が再現されるのであれば、用いたヒト配列の範囲でメチル化制御に十分であることが証明される。その後、ヒト *H19*-ICR 配列におけるメチル化メカニズムの解明を目指すとともに、これまでにヒト疾患で見つかった各種変異を同トランスジェニックマウスに導入し、あるいは、エピゲノム創薬のための *in vivo* 疾患モデル動物としたい。

[参考文献]

1. Tanimoto K, Shimotsuma M, Matsuzaki H, Omori A, Bungert J, Engel JD, et al. Genomic imprinting recapitulated in the human beta-globin locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 10250-5.
2. Matsuzaki H, Okamura E, Shimotsuma M, Fukamizu A, Tanimoto K. A randomly integrated transgenic *H19* imprinting control region acquires methylation imprinting independently of its establishment in germ cells. *Mol Cell Biol*. 2009; 29: 4595-603.
3. Sparago A, Cerrato F, Vernucci M, Ferrero GB, Silengo MC, Riccio A. Microdeletions in the human *H19* DMR result in loss of *IGF2* imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature Genetics*. 2004; 36: 958-60.
4. Demars J, Shmela ME, Rossignol S, Okabe J, Netchine I, Azzi S, et al. Analysis of the *IGF2/H19* imprinting control region uncovers new genetic defects, including mutations of OCT-binding sequences, in patients with 11p15 fetal growth disorders. *Hum Mol Genet*. 2010; 19: 803-14.
5. Matsuzaki H, Okamura E, Fukamizu A, Tanimoto K. CTCF binding is not the epigenetic mark that establishes post-fertilization methylation imprinting in the transgenic *H19* ICR. *Hum Mol Genet*. 2010; 19: 1190-8.
6. Sakaguchi R, Okamura E, Matsuzaki H, Fukamizu A, Tanimoto K. Sox-Oct motifs contribute to maintenance of the unmethylated *H19* ICR in YAC transgenic mice. *Hum Mol Genet*. 2013; 22: 4627-37.
7. Okamura E, Matsuzaki H, Sakaguchi R, Takahashi T, Fukamizu A, Tanimoto K. The *H19* imprinting control region mediates preimplantation imprinted methylation of nearby sequences in yeast artificial chromosome transgenic mice. *Mol Cell Biol*. 2013; 33: 858-71.
8. Matsuzaki H, Okamura E, Takahashi T, Ushiki A, Nakamura T, Nakano T, et al. *De novo* DNA methylation through the 5'-segment of the *H19* ICR maintains its imprint during early embryogenesis. *Development*. 2015; 142: 3833-44.
9. Matsuzaki H, Okamura E, Kuramochi D, Ushiki A, Hirakawa K, Fukamizu A, et al. Synthetic DNA fragments bearing ICR *cis* elements become differentially methylated and recapitulate genomic imprinting in transgenic mice. *Epigenetics & Chromatin*. 2018; 11: 36.
10. Hur SK, Freschi A, Ideraabdullah F, Thorvaldsen JL, Luense LJ, Weller AH, et al. Humanized *H19/Igf2* locus reveals diverged imprinting mechanism between mouse and human and reflects Silver-Russell syndrome phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113: 10938-43.