

石崎庸子論文内容の要旨

主論文

Role of DNA Methylation and Histone H3 Lysine 27 Methylation in Tissue-Specific
Imprinting of Mouse *Grb10*

マウス *Grb10* 遺伝子の組織特異的な刷り込みにおける
DNA メチル化とヒストン H3-K27 メチル化修飾の役割

石崎(山崎)庸子, 茅島智彦, Mapendano C. Kamungu, 副島英伸, 太田亨, 増崎英明,
木下晃, 浦野健, 吉浦孝一郎, 松本直通, 石丸忠之, 向井常博, 新川詔夫, 木住野達也

Molecular and Cellular Biology. 2007 Jan;27(2):732-42

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員: 増崎英明教授)

緒言

ゲノム刷り込み現象とは、本来等価であるはずの両親由来のゲノム領域からの遺伝子発現がその由来する親の性別により、差異を生じる現象である。マウス *Grb10* 遺伝子は刷り込みを受ける遺伝子であり、組織特異的な発現をすることが知られている。マウス *Grb10* は脳以外の組織では母性アレルからのみ発現しているが、脳においては父性アレルからの優位な発現を示し、その組織特異的な刷り込みパターンは、脳では脳特異的プロモーターから、その他の組織では主要プロモーターから発現すると推定されている。その制御にはDNAメチル化やポリコーム蛋白など塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな因子が関連していることが示唆されているが、詳細な分子基盤は不明である。近年、組織特異的な刷り込み遺伝子の解析には細胞レベルでの解析が重要視されている。本研究は、組織特異的な発現を示すマウス *Grb10* を DNA メチル化、ヒストン修飾、ポリコーム蛋白などのエピジェネティック因子を細胞レベルで解析することで、細胞分化に伴う組織特異的な刷り込み遺伝子の制御機構を明らかにしたものである。

対象と方法

(1) 遺伝子発現解析と刷り込み解析: F1 ヘテロマウス (BL6 × PWK) の脳・肝臓・腎臓組織、および初代培養神経細胞・グリア細胞・線維芽細胞から RNA を抽出し cDNA を合成した後、*Grb10* の各プロモーター領域のエクソプライマーを用いて RT-PCR を行った。*Grb10* のエクソン内に存在する一塩基多型 (SNP) を利用し、各転写産物がいずれの親由来のアレルから発現しているかを検討した。量的解析はリアルタイム PCR で検討した。

(2) DNA メチル化解析: 組織および培養細胞より得た DNA を用いて bisulfite 処理を行った。DNA を *Grb10* の各プロモーター領域に存在する CpG アイランドに特異的なプライマーを使用して PCR を行い、TA クローニング法でクローニングした各クローンの塩基配列決定によりメチル化解析を行った。

(3) ヒストン修飾解析: プロモーター領域のヒストン修飾状態を調べるために、アセチル H3、アセチル H4、ジメチル K4、ジメチル K9、トリメチル K9、トリメチル K27 の各抗体を用いた免疫沈降抗体法 (ChIP) で、

培養細胞におけるクロマチンの沈降物を得た。各サンプルを RI でラベルしたプライマーを用いて SSCP または Hot-stop PCR 法を行った。量的解析にはリアルタイム PCR を用いた。

結果および考察

(1) 遺伝子発現および刷り込み解析: 主要プロモーター領域の転写産物の発現は、神経細胞、グリア細胞、線維芽細胞のすべてに認め、それは母性アレル由来だった。一方、脳特異的プロモーター領域の転写産物の発現は神経細胞のみに認め、それは父性アレル由来だった。従って脳特異的プロモーター領域の転写産物の発現は、実際には神経細胞特異的な発現であることが認められた。

(2) DNA メチル化解析: 主要プロモーター領域の CpG アイランド (CGI1) は全組織でアレル間にメチル化の違いが認められないのに対して、脳特異的プロモーター領域の CpG アイランド (CGI2) では脳を含めた全組織で母性アレルのみメチル化されており、これらのメチル化パターンは配偶子時期から維持されていることが知られている。培養細胞における DNA メチル化解析においても同様に CGI1 においては両アレルの低メチル化を、CGI2 においては母性アレルの DNA メチル化を神経細胞・グリア細胞・線維芽細胞で認めた。CGI2 の DNA メチル化パターンは、その領域における転写産物の発現を認めた神経細胞だけでなく、他の培養細胞においても同様であったことから、DNA メチル化以外の因子もその転写制御に関わっている可能性が示唆された。

(3) ヒストン修飾解析: ヒストンのアセチル化は両プロモーター領域における転写産物の発現に一致していた。ヒストンのジメチル K4、ジメチル K9、トリメチル K9 は発現パターンには一致していなかったが、脳特異的プロモーター領域の DNA メチル化と相関していた。一方トリメチル K27 については、主要プロモーター領域において線維芽細胞の父性アレルの転写産物の発現抑制に一致していたが、神経細胞においてはアレル差を認めなかった。ポリコーム蛋白複合体の Eed/Ezh2 はヒストン H3K27 のメチルトランスフェラーゼ活性を有することから、DNA メチル化が存在しない主要プロモーターにおけるそのアレル特異的な転写産物の発現抑制には、ポリコーム蛋白群の関与が示唆された。

結 語

本研究結果は、配偶子形成時期からの修飾である DNA メチル化とそれに続くポリコーム蛋白群によって起こるクロマチンのリモデリングが、細胞分化の過程で組織特異的な刷り込みの獲得に関与していることを示唆するものである。