

脊椎動物におけるエピジェネティクス機構の比較ゲノム解析

●佐々木 裕之^{1),2)} ◆佐渡 敬^{1),3)} ◆秦 健一郎¹⁾

1) 国立遺伝学研究所総合遺伝研究系 2) 総合研究大学院大学生命科学研究科 3) 総合研究大学院大学先端科学研究科

〈研究の目的と進め方〉

エピジェネティクスはゲノム機能を調節する重要な機構である。脊椎動物の中でも哺乳類には性染色体の遺伝子量補償やゲノムインプリンティングなどのエピジェネティックな現象があるが、これらは鳥類には存在しないなど、エピジェネティクスの役割や働き方に違いがある。本研究では、脊椎動物のエピジェネティクスで中心的な役割を果たすDNAメチル化酵素 (DNMT) ファミリーに注目し、哺乳類と鳥類の間での比較ゲノム学アプローチと標的遺伝子破壊を用いて、その機能と進化を総合的に理解する。そのため、ニワトリのDNMT遺伝子ファミリーを網羅的に単離し、哺乳類遺伝子との対応、酵素活性、時間的空間的局在の違いを知る。またDNMTファミリーを系統的にニワトリDT40細胞中でノックアウトし、それらの細胞内機能をマウスのノックアウトの結果と比較検討する。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) ニワトリのDNMT遺伝子ファミリーメンバーを網羅的に単離する。
- 2) 哺乳類のインプリンティングに特異的に関与するDNMT1 α 、DNMT3A2、DNMT3Lのホモログがニワトリに存在するか検討する。
- 3) 酵素活性や時間的空間的局在を哺乳類と比較し、それらの結果をもとに、哺乳類でインプリンティングが進化した機構上の違いを検索する。
- 4) ニワトリDNMTを系統的にDT40細胞中でノックアウトする作業を進める。

〈研究期間の成果〉

- 1) ニワトリのDNAメチル化酵素DNMT2、DNMT3A、DNMT3BのcDNAを全て単離し、それらの構造を解析した (DNMT1は既に他研究室で単離済み)。その結果、ニワトリDNMT3Bは他の脊椎動物では見られない興味深い構造 (触媒ドメインの一部の欠失) をもつことが分かった (1)。一方、DNMT3Aの構造は高度に保存されていた (1)。
- 2) 哺乳類のインプリンティングに特異的に関与するDNMT1 α (DNMT1のアイソフォーム)、DNMT3A2 (DNMT3Aのアイソフォーム)、DNMT3Lのホモログがニワトリに存在するか、RT-PCR、サザン法、ゲノムシークエンスの結果をもとに検討を行った。その結果、ニワトリにはDNMT3Lのホモログは存在しないことが分かった (1)。また、DNMT1 α 、DNMT3A2に特異的なエクソンのホモログは見つからなかったが、これら生殖細胞特異的なアイソフォームを生み出す他のエクソンの有無については今後の課題である。
- 3) 酵素活性や時間的空間的局在を解析するための発現ベクター作りを行った。
- 4) ニワトリDNMTをDT40細胞中でノックアウトするためのターゲティングベクター作りを行った。
- 5) 当初計画にはなかったが、有袋類や魚類のゲノム配列

データが公共データベースに蓄積してきたため、オボッサムやフグにDNMTのホモログが存在するかどうか調べた。その結果、真獣類と同じ哺乳類である有袋類はDNMT3と1:1に対応するホモログを持っていたが、魚類は鳥類と同じくDNMT3Lを有していなかった (1)。また、魚類はDNMT3Aホモログを2個持つことが明らかになった (1)。

以上の結果を総合すると、脊椎動物においてDNMTファミリーは一般的に高度に保存されていること、一方、DNMT3Lの有無がゲノムインプリンティングの有無と相関していること、が明らかになった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ニワトリDNMT遺伝子ファミリーの系統的な単離と解析は我々が世界で最初である。また、脊椎動物のDNMT3について哺乳類、鳥類、魚類を含めて系統関係を明らかにしたのも我々が最初である。この成果は国内外の学会で発表され、DNMT3ファミリーの進化とゲノムインプリンティングの起源を結びつける発見として注目されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

発現ベクター構築過程でミスがあり、予想以上に時間がかかったため、ターゲティングベクター構築に大幅な遅れが出た。しかし、一方でニワトリゲノム6倍カバーに相当するシークエンスデータ (2004年3月) や有袋類、魚類のゲノムシークエンスデータが公開されるなど、構造に関する解析は一気に加速することができた。

〈今後の課題〉

ニワトリDNMTファミリーの個々の酵素の活性を測定し、また、時間的空間的局在を調べる必要がある。また、ニワトリDNMTを系統的にDT40細胞中でノックアウトし、染色体の安定性や細胞機能に異常がないか検討する予定である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Yokomine, T., Hata, K., Tsudzuki, M. & Sasaki, H. Evolution of the vertebrate DNMT3 gene family: a possible link between existence of DNMT3L and genomic imprinting. *Cytogenet. Genome Res.* (Special Issue on Genomic Imprinting), (in press).