

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：30-28

課題名：ヒト IG-DMR におけるインプリント制御の分子機構の解析

主任研究者名 (所属施設) 国立成育医療研究センター研究所
(所属・職名) システム発生・再生医学研究部 研究員

(研究成果の要約) 本研究では、ヒト IG-DMR のインプリント制御機構の全容解明を目指して、hRep 配列の分子生物学的な機能を解明することを目的とした。はじめに、ヒト培養細胞における hRep 配列のメチル化状態を解析したところ、精巣腫瘍由来の NT2D1 細胞でのみ、IG-DMR の高メチル化が認められた。そこで NT2D1 の IG-DMR における hTRIM28 の結合を ChIP 解析した結果、hRep 配列への濃縮が認められたことから、メチル化された hRep 配列へ hTRIM28 がリクルートされていることが確かめられた。近年の研究で、hTRIM28 と相互作用する KRAB-ZNF ファミリーが数多く同定されている。そこで公開されているデータベースをもとに KRAB-ZNF ファミリーを検索し、ヒットした 4 つのタンパク質を NT2D1 に過剰発現させた。しかし、発現させた 4 つすべてにおいて、有意な蓄積は認められなかった。今後は未知の因子を同定するため、イーストツーハイブリッド法によるスクリーニングを試みる。

1. 研究目的

当研究部ではマウス IG-DMR に存在する特徴的な繰り返し構造を持つ配列 (IG-DMR-Rep) が *Dlk1-Dio3* ドメインのインプリント制御に重要であることを、欠損マウスを用いて明らかにしてきた (Saito, Hara et al., *Human Molecular Genetics* 2018)。一方で、ヒトにも類似した配列 (ヒト IG-DMR-Rep; hRep) が存在するが、その配列はマウスのそれとは大きく異なることから、hRep 配列のインプリント制御における機能は未だに不明である (Paulsen et al., *Genome Res.* 2002)。本研究では、ヒト IG-DMR のインプリント制御機構の全容解明を目指して、hRep 配列の分子生物学的な機能を解明することを目的とした。

2. 研究組織

原 聡史 国立成育医療研究センター研究所
システム発生・再生医学研究部研究員

3. 研究成果

1) 既知のメチル化インプリントに関与する因子の hRep への結合
はじめに、ヒト培養細胞における hRep 配列のメチル化解析を行った。その結果、多くの株化細胞では hRep 配列が低メチル化されているのに対し、精巣腫瘍由来の NT2D1 細

胞でのみ、hRep が高メチル化されていることが明らかになった。そこで NT2D1 をモデルとし、ヒト TRIM28 の結合を ChIP 解析により解析したところ、hRep 配列への濃縮が認められた。このことから、メチル化された hRep 配列へ hTRIM28 がリクルートされることが確かめられた。

最近、ヒト ES 細胞を用いて、hTRIM28 と相互作用するタンパク質のスクリーニングが、IP-MS/MS 解析によって行われた (Jang et al., *Nucleic Acids Res.* 2018)。TRIM28 と相互作用し、DNA に直接結合するのは KRAB-ZFP とよばれるファミリーであることから、この報告から有意に hTRIM28 と相互作用すると考えられる KRAB-ZFP ファミリーあるいは KRAB ドメインを持つ DNA 結合タンパク質を検索したところ、4 つ (ZNF143、ZNF724P、ZNF195、POGK) がヒットした。これらを HA タグ付きでクローニングし、NT2D1 細胞に発現させた後、抗 HA 抗体で ChIP を行った。しかしながら、発現させたすべてのタンパク質で hRep 配列への蓄積は認められなかったことから、既知の TRIM28 と相互作用する DNA 結合タンパク質因子で hRep に結合するものは存在しないことが示唆された。

2) hRep に結合する未知の因子のスクリーニング

hRep 配列に結合する未知因子のスクリーニングを行うために、ヒト TRIM28 の全長を pGBKT7 ベクターにクローニングした。また、TRIM28 と相互作用し、DNA に直接結合するのは KRAB-ZFP とよばれるファミリーであることから、KRAB-ZFP と相互作用する RBCC ドメインを単独でクローニングした。現在、ヒト iPS 細胞 mRNA より cDNA ライブラリーを作製しており、これらを用いて Y2H スクリーニングを実施する予定である。

4. 研究内容の倫理面への配慮

研究では、ヒト遺伝子解析研究および人を対象とする医学研究に関する倫理指針が含まれる。

ヒト遺伝子解析研究：ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 26 年 11 月 25 日一部改正）を遵守して実施する。同意は全て書面で取得され、同意書および患者と匿名化番号の対応表は、個人情報管理者により厳重に保管されている。国立成育医療研究センターの倫理委員会において、

先天奇形症候群における遺伝的原因の探索（国立成育医療研究センター-受付番号 518）、成長障害における遺伝的要因の探索（国立成育医療研究センター-受付番号 519）の研究課題が承認されている。

人を対象とする医学研究に関する倫理指針：人を対象とする医学研究に関する倫理指針（平成 27 年 3 月 31 日改定）を遵守して実施する。倫理指針で指摘されているインフォームド・コンセント、個人情報の管理などについてはすべて倫理委員会申請書に記載されており、倫理委員会で承認されている。本研究にあたっての利益相反は認めない。

マウスを用いた実験は、当センター内の実験動物委員会の承認の下に実施する。実施に当たっては 3R を遵守し、実験動物に苦痛を与えないよう最大限の配慮をする。

タイトル：Genomic imprinting の分子機構の解明（承認番号：2011-008）