

氏 名 石 原 宏

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第597号

学位授与の日付 平成14年3月22日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Identification of an evolutionarily conserved  
insulator element at the 3' boundary of  
the imprinted *Igf2/H19* domain

論文審査委員	主 査 教授	城石 俊彦
	教授	廣瀬 進
	教授	廣海 健
	助教授	赤坂 甲治 (広島大学)
	助教授	上田 均 (国立遺伝学研究所)

## 論文内容の要旨

真核生物のゲノムは、境界配列またはインスレーターと呼ばれる配列により機能ドメインごとに区切られている。これらの配列は、特定のエンハンサーが働くドメインを規定している。また、CTCF というタンパク質が脊椎動物のインスレーター配列に結合しエンハンサー遮断活性を持つことがわかっている。マウス 7 番染色体 F4/F5 領域には 14 個のインプリンティング遺伝子を含む約 1Mb のドメインが存在し、*Igf2* と *H19* の二つのインプリンティング遺伝子とそのセントロメア側に隣接する。さらにその 3' (セントロメア) 側に位置する *L23mrp* ほか複数の遺伝子は、インプリンティングを受けない。また、*H19-L23mrp* 間の内胚葉特異的エンハンサーは、*H19* と *Igf2* に作用するが、*L23mrp* には働かない。FISH 解析で、インプリンティングドメインで見られる非同調的複製から通常と同調的複製への遷移点が *H19-L23mrp* 間にあると推定されている。以上の報告から、*H19-L23mrp* 間にはドメイン境界を規定するインスレーターが存在すると想定されていた。

本学位論文では、この想定されるインスレーターを同定する目的で、既知の CTCF 結合性インスレーターと相同性を有する配列を *H19/L23mrp* 遺伝子間およそ 33kb の領域内で検索した。まず、既知の CTCF 結合配列を比較して導き出したコンセンサス配列を *H19/L23mrp* 遺伝子間で検索して合計 15 の相同配列を同定した。ゲルシフト法によりこの内 PCT4, PCT12, PCT6/14 の三つの配列が *in vitro* で CTCF と結合すること、PCT12 と PCT14 はヒト相同領域にも存在しており、ヒトの配列にも CTCF が結合することを見いだした。既知の CTCF 依存型インスレーターは、クロマチン中で DNaseI 高感受性部位と一致するが、PCT12 の位置にだけ DNaseI 高感受性部位が見られた。さらにクロマチン免疫沈降法により、PCT12 には *in vivo* で CTCF が結合しているが PCT4, PCT6/14 には結合していないことが示された。CTCF は、その標的配列中の CpG 配列がメチル化されると結合が阻害されることが知られている。CpG 配列が含まれる PCT4, PCT6, PCT14 のメチル化状態を調べた結果、これらの配列はすべて高度にメチル化されており、それが PCT4, PCT6/14 に *in vivo* で CTCF が結合できない理由であろうと推測された。

インスレーター候補として残った PCT12 について、コロニーアッセイによりインスレーター活性を調べた結果、PCT12 を含む断片は方向非依存性に働くインスレーター活性を持つことが示された。また、CTCF コンセンサス配列部に変異を入れるとその活性の大幅な低下が見られ、その活性は CTCF に依存した。したがって、この PCT12 を含む領域がドメインの境界を規定し、CTCF 結合配列がその機能に必要な可能性が示された。

以上の研究から、新たに同定した PCT12 インスレーターと既に報告されている DMR に存在するメチル化感受性の CTCF 依存型インスレーターによって挟まれる形で *H19* 遺伝子とその下流のエンハンサー群がドメイン構造を形成していると推定された。同様なドメイン構造は、ニワトリの  $\beta$ -グロビン領域にも見られ、CTCF 依存型インスレーターがドメイン境界を構成する要素として脊椎動物で共通に用いられている可能性がはじめて示された。この論文の内容は、脊椎動物ゲノムのドメイン構造に新たな知見を与えるものである。

## 論文の審査結果の要旨

脊椎動物など高等真核生物のゲノム構造は機能ドメインごとに区切られており、その境界は、インスレーターと呼ばれる配列が特定のエンハンサーが働くドメインを支配することで規定していると考えられている。また、CTCF というタンパク質が脊椎動物のインスレーター配列に結合しエンハンサー遮断活性を持つことがわかっているが、機能ドメインの詳細については不明であった。

石原君は、マウス 7 番染色体上のインプリンティング領域の *H19/L23mrp* 遺伝子間およそ 33kb の領域内に想定されるインスレーターを同定する目的で、既知 CTCF 結合性インスレーターと相同性を有する配列をこの領域内で検索した。比較ゲノム学の手法で CTCF 結合コンセンサス配列を導き出し、問題の領域に合計 15 の相同配列を同定した。ゲルシフト法、クロマチンの DNaseI 高感受性部位の検索、さらにクロマチン免疫沈降法により解析した結果、この内の PCT12 配列のみが *in vivo* で CTCF が結合している可能性が示された。その他の配列は、高度にメチル化されているため、*in vivo* で CTCF が結合できないと推測した。

PCT12 配列について、コロニーアッセイ法によりインスレーター活性を調べた結果、この配列は方向非依存性に働くインスレーター活性を持つこと、CTCF コンセンサス配列に変異を入れるとその活性が大幅に低下することがわかった。したがって、この PCT12 配列がドメイン境界を規定し、CTCF 結合配列がその機能に必要なことが示された

以上の石原君の研究は、PCT12 インスレーターと既知のメチル化感受性の CTCF 依存型インスレーターによって挟まれる形で *H19* 遺伝子とその下流のエンハンサー群がドメイン構造を形成していることを示した。同様なドメイン構造は、ニワトリの  $\beta$ -グロビン領域にも見られ、CTCF 依存性インスレーターがドメイン境界を構成する要素として脊椎動物で共通である可能性がはじめて示された。この論文の内容は、脊椎動物ゲノムのドメイン構造に新たな知見を与えるものであり、遺伝学専攻の博士論文としての水準を超えているという結論で審査員全員が一致した。また、学位論文審査に関わる公開発表会後に、論文審査員と石原君の間で質疑応答を行った。石原君は、博士論文に関わる研究分野や周辺分野について十分な学識を持ち、論理的に考察する能力を有することが明らかとなった。また、本論文は英語で書かれており、すでに筆頭著者となっている二編の論文を国際誌に発表していることから、学位にふさわしい英語能力をもつと判断した。以上、本論文の成果は、哺乳動物ゲノムの機能ドメインの理解に大きな貢献を果たしており、学位授与に相応しいと審査員一同判断した。