

### 33. 種特異的なゲノム刷り込み遺伝子座に寄与するレトロトランスポゾン

奈良県立医科大学 医学部医学科発生・再生医学講座 准教授 小林 久人

#### 概要

親の由来に応じて片方の対立遺伝子（アレル）のみが発現するインプリント（刷り込み）遺伝子は、哺乳動物の胚・胎盤形成に関わる機能を持つものが多く含まれる一方、同定された遺伝子の半数以上が生物種特異的な刷り込みを受けており、ゲノムインプリンティング機構の多様性の機序解明が期待されている。以前代表者（小林）らは哺乳動物卵子のマルチオミクス解析により、卵子で再活性化する長鎖末端反復配列（LTR）レトロトランスポゾンが種特異的なエピゲノム修飾を形成し、ヒトなどの霊長類あるいはマウスなどの齧歯類特異的な刷り込み遺伝子を成立させることを明らかにした。本研究では、以前同定した刷り込み遺伝子"*ZDBF2*"の制御に関わるノンコーディング RNA "*GPR1-AS*"の第1エクソンもまたLTRと重複することに着目し、進化の過程におけるLTR挿入と*ZDBF2*刷り込みの成立が関連するかを明らかにするため、様々な哺乳動物の胚体外組織（胎盤系列）のトランスクリプトーム解析を行った結果、*GPR1-AS*は真主齧上目（霊長目・齧歯目・ウサギ目を含む）のみに出現し、ヒトと同様に*GPR1-AS*第1エクソンがLTRと重複することを明らかにした。また*ZDBF2*のアレル特異的解析の結果、*ZDBF2*のインプリント型発現は真主齧上目のみで成立することが明らかとなった。今回の発見は“受精後に再活性化するLTR由来配列”も種特異的あるいは系統特異的な刷り込み遺伝子の成立に寄与している可能性を示唆している。

#### 背景および目的

刷り込み遺伝子である*ZDBF2*（Zinc Finger DBF-Type Containing 2）は、卵子由来のDNAメチル化によって制御されているが、そのエピジェネティックな調節は、生殖細胞由来のDNAメチル化に長期的に依存する多くの典型的な刷り込み遺伝子とは大きく異なる。*ZDBF2*遺伝子座では、母親由来のDNAメチル化による一次的なインプリント型DMR（Differentially Methylated Region）が着床後に継続されず、そのDMRの非メチル化父方対立遺伝子（アレル）側から一時的に転写される*GPR1-AS*（G Protein-coupled Receptor 1, Antisense RNA、ヒト）あるいは*Liz*（Long isoform of *ZDBF2*、マウス）が胚体における二次的DMRの確立に寄与し、*ZDBF2*の父方アレル特異的発現を維持していると考えられている。*ZDBF2*遺伝子座におけるインプリンティング状態はヒトとマウスにおいて確認されているが、他の哺乳動物でもこのユニークな制御機構が保存されているかどうかは不明であった。

#### 方法

各哺乳動物における*ZDBF2*インプリンティング成立の可否について検証するには、*GPR1-AS*の同定が鍵となると考えた。*GPR1-AS/Liz*は胎盤でも発現が継続していることに注目し、ヒト、チンパンジー、アカゲザル、ウサギ、マウス、ブタ、ウシ、オポッサムの胎盤・胚体外組織に関する公開RNA-seqデータおよび独自に入手したRNA-seqデータを用いて*GPR1*、*ZDBF2*遺伝子間の転写物予測解析を行った。また、ヒト*GPR1-AS*の第1エクソ

ンが MER21C サブファミリーに属する LTR レトロトランスポゾンと重複することに着目し、各動物種のゲノム比較により、同定された *GPRI-AS* と LTR 位置との関連性について検証した。また、アカゲザル、ウサギ、ウシ、ワラビーにおける *ZDBF2* のアレル別発現解析を行い、*ZDBF2* インプリンティング成立の進化上の分岐点を探索した。また、マウスゲノム上の *Liz* 第 1 エクソンは LTR としてアノテーションされていないため、LTR と重複するヒト *GPRI-AS* の第 1 エクソンとの機能的保存性について検証するため、Dual reporter assay によるプロモーター活性測定を行った。

## 結果とまとめ

胎盤 RNA-seq 解析の結果、マウス、ヒト以外にもウサギおよび複数の霊長動物において *GPRI-AS* オーソログが同定されたが、ウシ、ブタ、オポッサムでは同定できなかった。興味深いことに、同定された *GPRI-AS* の第 1 エクソンは、LTR レトロトランスポゾン的一种である **MER21C** の位置と重複していた。この LTR ファミリーは、**真主髻上目**（霊長目・髻歯目・ウサギ目を含む）とローラシア獣上目を含む北方真獣類において出現したと考えられるが、哺乳動物のゲノム配列上の LTR 位置情報を比較すると、*GPRI-AS* の相同領域への MER21C の挿入は、真主髻上目の共通祖先で生じていると推測される。また、ウサギ、アカゲザル血液サンプルにおいて、ヒト、マウスと同様に父方アレル特異的発現が認められた一方、真主髻上目ではないウシおよびワラビーでは解析したすべての組織において *ZDBF2* は両アレル発現をしており、インプリンティングが成立していないことが示された。さらに、Dual reporter assay の結果、マウス *Liz* の第 1 エクソンはヒト *GPRI-AS* の第 1 エクソンと同様のプロモーター活性を有することが示された。この機能的保存性は、LTR としてアノテーションされているヒト *GPRI-AS* 第 1 エクソンとアノテーションされていないマウス *Liz* 第 1 エクソンが共通祖先から由来する配列であることを示し、マウス（おそらくネズミ科）における高頻度の突然変異により MER21 コンセンサス配列との保存性が低下していることが推測される。

これらの結果より、霊長目・髻歯目・ウサギ目を含む真主髻上目の共通祖先において *GPRI-AS* 相同領域への MER21C 挿入が起こっており、*GPRI-AS* 出現および *ZDBF2* インプリンティングが成立する引き金になったと推測される。これまでの研究により、卵子で再活性化する LTR が種特異的なインプリンティングを誘導することが明らかにされている。今回の発見は“受精後に再活性化する LTR 由来配列”も種特異的あるいは系統特異的な刷り込み遺伝子の成立に寄与している可能性を示唆している。

(完)

## 発表論文

- 1) Kobayashi H., et al., bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2023.10.30.564869>

## 引用文献

- 1) Kobayashi H., et al., Epigenetics 8 (6), 635-645
- 2) Bogutz AB., Nature communications 10 (1), 5674