

## 自己評価報告書

平成 23 年 4 月 28 日現在

機関番号：32658

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062009

研究課題名（和文）ゲノム刷込みによる生殖系列の機能調節と発生制御

研究課題名（英文）Regulation of germ line function and development by genomic imprinting

研究代表者

河野 友宏（KONO TOMOHIRO）

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：80153485

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 応用動物科学

キーワード：ゲノムインプリンティング、単為発生、マイクロアレイ、遺伝子発現

## 1. 研究計画の概要

哺乳類では、ゲノム刷込みが雌雄生殖細胞ゲノムの機能差を決定づけているために、雌雄ゲノムが受精により次世代へ伝達されることが個体発生に義務づけられている。本特定領域研究では生殖細胞系列において行われるゲノム刷込み、特に DNA メチル化修飾に着目し、それによる胎盤形成を含む個体発生制御機構の全貌解明に向け実験発生学および分子生物学的なアプローチから追究する。

## 2. 研究の進捗状況

1) 二母性ゲノム胚（母性ゲノムのみを持つ 2 倍体胚）から正常な産仔を再現性高く発生させるため、精子形成過程でメチル化インプリントを受ける *Dlk1-Gtl2* 遺伝子の個体発生への関与を発生学的に追究した。これまでの研究成果により、40%程度の効率で正常に発生・発育する二母性マウス生産システムを構築した。さらに、二母性マウスの生存試験を行ったところ、受精卵由来の個体に比べ 30%以上も長命であることが判明した。2) 二母性ゲノム胚におけるマイクロアレイによる詳細な遺伝子発現解析から、2カ所の父性メチル化インプリントはそれぞれ独立的に個体発生にかかわるネットワークを形成していることを突き止めた。この2カ所の父性メチル化インプリント領域が必要十分条件である結論を得た。また、新規インプリント遺伝子をマウス 1 番およびヒト 12 番染色体で初めて同定した。3) *Dlk1-Gtl2* ドメインの母性アレレル発現の非コード RNA (*Gtl2*, *Mirg*, *Rian*) は、個体発生および生存に必須ではない可能性が高いと考えられてきたが、本研究で作成された *Gtl2* 欠損マウスの成果から、それらの非コード RNA が個体発生に必

須であることが判明した。すなわち、母性遺伝では出生時は正常であるが生後 3 日から 4 週の間成長遅延を示し、全てのマウスが致死となること、一方父性遺伝では全てのマウスが矮小化を示し、約半数が周産期で致死となることを突き止めた。さらに、*Dlk1-Gtl2* 領域のインプリント遺伝子群の発現が iPS 細胞の分化能に影響を及ぼしていることがハーバード大との共同研究で明らかとなった。4) 卵母細胞で新規 DNA メチル化酵素 *Dnmt3a2* および *Dnmt3L* を同時に発現するコンディショナル TG マウスの作成を進めており、23 年度中に作出予定である。

## 3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。二母性ゲノム胚の発生メカニズムを明らかにし、さらに父性メチル化インプリントにより支配されるインプリント遺伝子群の役割についても新たな知見を提供した。

## 4. 今後の研究の推進方策

23 年度以降は以下の課題について精力的に研究を展開する。

課題 1) Non-coding RNA インプリント遺伝子の機能の解明: マウス 12 番染色体インプリント領域における非タンパクコード RNA 群が *Gtl2* Mat-KO マウスの致死の原因であることが明らかになってきた。そこで、BAC クローンを用いて miRNAs および snoRNAs 過剰発現マウスを作成し、個体発生への影響を詳細に検討する。すなわち、*Gtl2* Mat-KO マウスの致死性が miRNAs および snoRNAs の過剰発現により回避されるか否かについて検証する。課題 2) Non-coding RNA インプリント遺伝子の腫瘍形成抑制機能の解明: マウス 12 番染色

体インプリント領域における非コード RNAs の腫瘍形成抑制機能について検証する。最近母方発現非コードインプリント遺伝子 *H19* が腫瘍形成抑制機能を有していることが報告された。そこで、*Gtl2* 欠損マウス胎仔の腎皮下移植を実施して腫瘍形成能を比較検討する。また、miRNAs の発現解析をマイクロアレイにより実施して、腫瘍形成との関連を検討する。

課題3) 雌性生殖系列におけるメチル化インプリントの人為的調節システムの構築: 作製された Dnmt3a & Dnmt3L コンディショナル TG マウスの生殖細胞の機能を、DNA メチル化解析および Chip アッセイによるヒストンのメチル化・アセチル化解析により検討し、評価する。また、TG マウスの生殖細胞を用いて再構築胚を作成し、胚の発生支持能について発生学的に検証を進め、生殖細胞の *in vitro* 生産への可能性を探る。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Fukuda, Atsushi, Kono, Tomohiro (8/8). Identification of inappropriately reprogrammed genes by large-scale transcriptome analysis of individual cloned mouse blastocysts. *PLoS One* 5, e11274, 2010 (査読有)

Takahashi, Nozomi. Kono, Tomohiro (3/3). Restoration of *Dlk1* and *Rtl1* is necessary but insufficient to rescue of the lethality in IG-DMR deficient mice. *J Biol Chem* 285, 26121-26125, 2010 (査読有)

Stadtfeld, Matthias, Kono, Tomohiro (7/9). Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 465, 175-181. 2010 (査読有)

Kawahara, Manabu, Kono, Tomohiro. Longevity in mice without a father. *Human Reprod* 25, 457-461, 2010 (査読有)

Kawahara, Manabu, Kono Tomohiro(4/4). Defining contributions of paternally methylated imprinted genes at the *Igf2-H19* and *Dlk1-Gtl2* domains to mouse placentation by transcriptomic analysis. *J Biol Chem* 284, 17751-17765, 2009 (査読有)

Takahashi, Nozomi, Obata, Yayoi(5/8), Kono, Tomohiro(8/8). *et al.* Deletion of *Gtl2*, imprinted non-coding RNA, with its differentially methylated region induces lethal parent-origin-dependent defects in mice. *Human Mol Genet* 18.

1879-1888, 2009 (査読有)

[学会発表](計6件)

Kono, Tomohiro. Methylomes and transcriptomes in mouse germ cells. Fertility 2011, 2011年1月7日, アイルランド.

Takahashi, Nozomi. The ncRNAs in the *Dlk1-Dio3* domain function as tumor suppressor. International Symposium on "Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells", 2010年11月22日, 九州大学医学部.

河野友宏, 二母性マウスの長命性について, 第102回日本繁殖生物学会, 2009年9月12日, 近畿大学農学部.

尾畑やよい, 胚形成過程におけるゲノムインプリンティングの維持と消失, 第102回日本繁殖生物学会, 2009年9月12日, 近畿大学農学部.

Kono, Tomohiro. The regulation of imprinted gene. From imprinting to the Epigenome in 25 years. 2009年9月6日, 英国ケンブリッジ大学.

Kono, Tomohiro. Generation of viable bimaternal mice lacking a paternal genome. World Congress on Reproductive Biology, 2008年5月24日, 米国ハワイ.

[図書](計1件)

河野友宏, 生命の誕生に向けて 第二版 生殖補助医療 (ART) 胚培養の理論と実際、近代出版 2011

[産業財産権]

取得状況 (計3件)

名称: 特許権

発明者: 河野友宏, 尾畑やよい, 川原 学

権利者: 学校法人東京農業大学

種類: U.S. patent

番号: No 7659443

取得年月日: 平成22年2月9日

国内外の別: 外国

名称: 特許権

発明者: 河野友宏, 尾畑やよい

権利者: 学校法人東京農業大学

種類: 特許

番号: 第4275137号

取得年月日: 平成21年3月13日

国内外の別: 国内

名称: 特許権

発明者: 河野友宏, 尾畑やよい

権利者: 学校法人東京農業大学

種類: European patent

番号: No 1661456

取得年月日: 平成21年2月25日

国内外の別: 外国