

令和元年5月30日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02478

研究課題名(和文) 哺乳類のゲノムインプリンティング機構とインプリント遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Analyses of genomic imprinting mechanism and imprinted gene functions

研究代表者

石野 史敏 (ISHINO, Fumitoshi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：60159754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,500,000円

研究成果の概要(和文)：父親性発現インプリント遺伝子Peg10、Peg11/Rtl1はLTRレトロトランスポゾン由来の獲得遺伝子かつ哺乳類特異的遺伝子でもある。前者は胎盤特異的トロホプラスト細胞の分化に、後者は胎盤の胎児毛細血管維持および新生児の骨格筋分化に必須であることを明らかにした。また、同じ獲得遺伝子群に属するSirh3、Sirh8が脳における機能を持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを含む哺乳類のゲノムに存在する外来のレトロトランスポゾン/レトロウイルス由来の獲得遺伝子が、哺乳類の特徴である胎生にとって重要な胎盤や、高度に発達した脳の機能に関係していることが明らかになった。哺乳類が「獲得遺伝子により大きな進化を遂げた」という新しい知見を生み出した。これはヒトの生物としての歴史の一部を明らかにしたものである。

研究成果の概要(英文)：Two paternally expressed imprinted genes, Peg10 and Peg11/Rtl1, are mammalian-specific domesticated genes from an LTR retrotransposon. We demonstrated that Peg10 is essential for induction of placenta-specific trophoblast cells and that Peg11/Rtl1 is essential for skeletal muscle development as well as maintenance of placental fetal capillary. We also demonstrated that Sirh3 and Sirh8, the domesticated genes from the same retrotransposon, play important roles in brain.

研究分野：分子発生学、分子生物学、ゲノム機能進化学

キーワード：ゲノミックインプリンティング Peg10 胎盤 Peg11.Rtl1 筋肉 ヒト染色体14番父親性2倍体症候群  
獲得遺伝子 LTRレトロトランスポゾン

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは2006年に *Peg10* KO マウスが胎盤形成に異常をきたし初期胚致死になること、2008年に *Peg11/Rtl1* KO マウスが胎盤機能を維持できずに胎児期後期／新生児致死となることを報告した。*Peg10* が生化学的にどのような機能を持つのか、*Peg11/Rtl1* が胎盤以外にどのような機能を持つのかは明らかになっていなかった。また、*Peg10*、*Peg11/Rtl1* と同じレトロトランスポゾン由来の9個の遺伝子が本当に機能を持つのかどうかについては、2014年に *Sirh7* が胎盤の内分泌制御に、2015年に *Sirh11* が脳の認知行動に影響があることを示したが、その他の遺伝子の機能は不明であった。

## 2. 研究の目的

哺乳類特異的のエピジェネティック機構であるゲノムインプリンティングの研究から発見した胎盤形成に必須の2つのインプリント遺伝子 *PEG10* および *PEG11/RTL1* の生化学的機能解明やヒト疾患（染色体14番父親性および母親性2倍体症候群）における胎盤以外の異常への寄与を明らかにすること。および他の獲得遺伝子である *Sirh* 遺伝子群の機能解析を行い、哺乳類特異的な獲得遺伝子群が哺乳類の進化にどのように貢献したのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) *Peg10* の胎盤の初期形成に必須な機能がどのような生化学機能によるのかを明らかにするために、胎盤形成に関与する幹細胞であるTS細胞の分化系で *Peg10* KO の効果を調べる。また、*Peg10* タンパク質の機能ドメインに変異を入れたマウスの異常を解析することで、それぞれの部位の役割を明らかにする。
- (2) ヒト *PEG11/RTL1* はヒト染色体14番父親性および母親性2倍体症候群のモデルである *Peg11/Rtl1* の過剰発現／欠失マウスを用いて、筋肉組織の網羅的解析を行い *Peg11/Rtl1* タンパク質の発現を確認するとともに、疾患との関連病態を解析する。
- (3) *Sirh3*、*Sirh8* KO マウスの行動観察から、これらの生物学的機能を明らかにし、哺乳類の個体発生、行動における重要性を明らかにする。

## 4. 研究成果

- (1) TS細胞を用いた *in vitro* 分化系で *Peg10* が、胎盤特異的細胞であるトロホブラスト細の分化に関わり、それが特定のシグナル伝達系に関係することを明らかにした（論文準備中）。また、*Peg10* タンパク質の機能ドメインの一つであるDSGプロテアーゼモチーフに変異を入れASGに変換した *Peg10* ASG マウスは、初期胚致死性ではなく周産期致死性を示した。この胎盤では胎児毛細血管系が壊滅的にダメージを受けており、DSGプロテアーゼモチーフは胎盤機能維持に必須機能を持つことが明らかになった（論文準備中）。
- (2) *Peg11/Rtl1* mRNA の発現は多くの臓器で確認されたが、*Peg11/Rtl1* タンパク質として確認されたのは胎盤だけであった。今回、発生段階を詳細に解析したところ、胎児期・新生児期にのみ特異的に *Peg11/Rtl1* が骨格筋で発現することを確認し、さらに新生児期でこれらの骨格筋の異常を検出できた（図1右）。異常は肋間筋、横隔膜、腹筋などで特に著しいことから、これらが新生児における呼吸不全や腹直筋断裂の原因となる強い証拠を得ることができた（論文投稿中）。一方、*Peg11/Rtl1* 欠質モデルでも筋肉に異なる異常が見られたことから（図1左）、*Peg11/Rtl1* は胎児期・新生児期の骨格筋の

発生に必須の機能を果たし、過剰発現も骨格筋に悪影響を与えることが明らかになった（論文投稿中）。哺乳類の骨格筋に胎児期・新生児期にだけ LTR レトロトランスポゾン由来の獲得遺伝子である *Peg11/Rtl1* が重要な機能を果たすことは、胎児が母親の体内で生育する哺乳類の胎生機構への適応と考えられる。

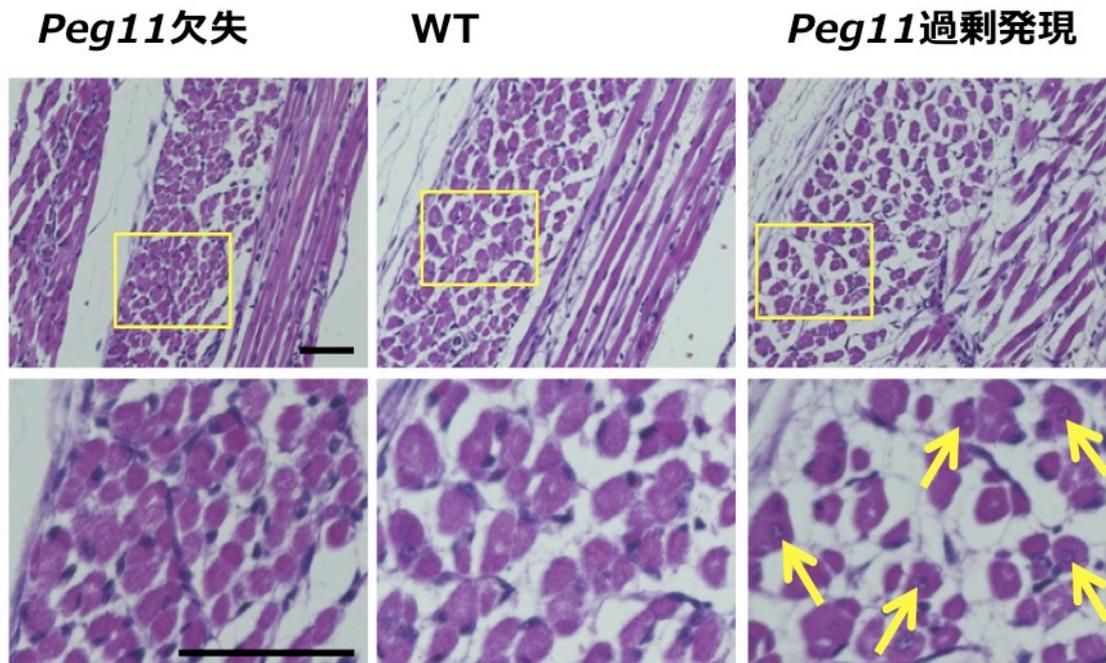


図1 *Peg11/Rtl1* 欠失と過剰発現による新生児骨格筋における異常

欠失では筋繊維束径の減少（左）、過剰発現では著しい減少（右）が見られる。矢印は中央核で筋肉が未成熟であることを示している。

- (4) マウスは夜行性動物であるが、*Sirh3* KO マウスの行動観察の結果、夜間における行動減少が著しく減少すること、その分睡眠量が増加することが明らかになった。しかし、*Sirh3* タンパク質の発現量が極めて少ないことから、それを検出するために *Sirh3-Venus* を内在遺伝子部位にもつ KI マウスを作製し、蛍光シグナルが脳特異的に検出されることを確認した（図2）。これにより、*Sirh3* は脳で機能する遺伝子であり、行動量に大きく影響する重要な遺伝子であることを証明できた（論文投中）。

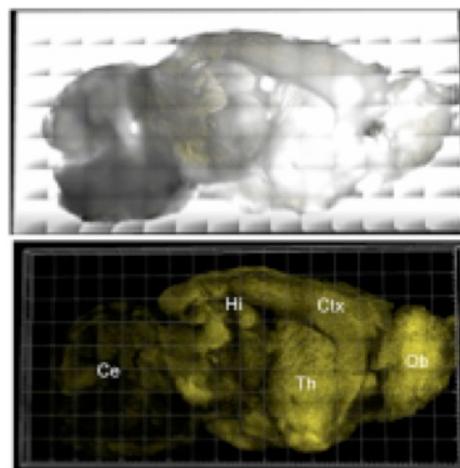


図2 *Sirh3* タンパク質の脳での発現

Ob:嗅球、Ctx:大脳皮質、Th: 視床  
Hi:海馬、Ce:小脳

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 10 件）全て査読あり

- ① Kaneko-Ishino T and Ishino F. Evolution of viviparity in mammals: what genomic imprinting tells us about mammalian placental evolution. *Reprod Fert Dev* (2019). doi:10.1071/RD18127
- ② Hosoi Y, Soma M, Shiura H, Sado T, Hasuwa H, Abe K, Kohda T, Ishino F, Kobayashi S. Female mice lacking Ftx lncRNA exhibit impaired X-chromosome inactivation and a microphthalmia-like phenotype. *Nat Commun* **9**(1):3829 (2018). doi:10.1038/s41467-018-06327-6.
- ③ Kawai K, Harada T, Ishikawa T, Sugiyama R, Kawamura T, Yoshida A, Tsutsumi O, Ishino F, Kubota T and Kohda T. Parental age and gene expression profiles in individual human blastocysts. *Sci Rep* **8**(1):2380 (2018). doi:10.1038/s41598-018-20614-8.
- ④ Lee J, Matsuzawa A, Shiura H, Sutani A and Ishino F. Preferable in vitro condition for maintaining faithful DNA methylation imprinting in mouse embryonic stem cells. *Genes Cells* **23**(3), 146-160 (2018). doi: 10.1111/gtc.12560.
- ⑤ Kaneko-Ishino T, Irie M and Ishino F. Mammalian-specific traits generated by LTR retrotransposon-derived *SIRH* genes. *In Evolutionary Biology: Self/NonSelf Evolution, Species and Complex Traits Evolution, Methods and Concepts* (ed. Pontarotti P), Springer International Publishing, pp.129-145 (2017). doi:10.1007/978-3-19-61569-1\_7
- ⑥ Kitazawa M, Tamura M, Kaneko-Ishino T\* and Ishino F\*. Severe damage to the placental fetal capillary network causes mid to late fetal lethality and reduction of placental size in *Peg11/Rtl1* KO mice. *Genes Cells* **22**(2), 174-188 (2017). doi:10.1111/gtc.12465
- ⑦ Wakayama S, Kamada Y, Yamanaka K, Kohda T, Suzuki H, Shimazu T, Motoki, N. Tada M N, Osada I, Nagamatsu A, **Kamimura S**, Nagatomo H, Mizutani E, Ishino F, Yano S, Wakayama T. Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**(23):5988-5993 (2017). doi:10.1073/pnas.1701425114
- ⑧ Kawasaki Y, Kuroda Y, Suetake I, Tajima S, Ishino F and Kohda T\*. A novel method for the simultaneous identification of methylcytosine and hydroxymethylcytosine at a single base resolution. *Nucl Acids Res* **45**(4):e24 (2017). doi:10.1093/nar/gkw994
- ⑨ Kobayashi S\*, Hosoi Y, Shiura H, Yamagata K, Takahashi S, Fujihara Y, Kohda T, Okabe M and Ishino F. Live imaging of X chromosome reactivation dynamics in early mouse development can discriminate naïve from primed pluripotent stem cells. *Development* **143**(16), 2958-2964 (2016). doi:10.1242/dev.136739.
- ⑩ Irie M, Koga A, Kaneko-Ishino T\* and Ishino F\*. An LTR retrotransposon-derived gene displays lineage-specific structural and putative species-specific functional variations in eutherians. *Front Chem* **4**:26 (2016). doi: 0.3389/fchem.2016.00026.

〔学会発表〕（計 38 件）

- ① 石野史敏 エピジェネティックな制御と哺乳類の個体発生-microRNAを中心に-第8回ベリックサイエンスセミナー 東京（フクラシア東京ステーション）2019年3月9日
- ② Futmitoshi Ishino and Tomoko Kaneko-Ishino. Gene domestication from retrotransposons contributed to Mammalian evolution. Symposium: Non-coding DNA tells the past, the present and the future. The 41<sup>st</sup> Annual Meeting of Molecular Biology Society of Japan (Pacifico Yokohama, Yokohama), November 28-30, 2018.

- ③ Futmitoshi Ishino, Moe Kitazawa and Tomoko Kaneko-Ishino. Evolution of skeletal muscle in mammals by domestication of an LTR retrotransposon. 22<sup>nd</sup> Evolutionary Biology Meeting at Marseilles (CRDP, Marseilles, France) September 25-28, 2018.
- ④ Fumitoshi Ishino. Roles of LTR retrotransposon-derived genes in mammalian development and evolution. International Symposium on Mammalian Reproduction & Evolutionary Genetics (Shinshu University, Ina) February 28, 2018.
- ⑤ Fumitoshi Ishino. Acquired traits in mammals: genomic imprinting and LTR retrotransposon-derived genes. Keynote Address, JSPS Alumni Association in Australia (Shine Dome, Canberra, Australia) October 9-10, 2017.
- ⑥ 石野史敏、金児-石野知子 哺乳類特異的ゲノム機能と成長と発達 第41回 日本産婦人科栄養・代謝研究会 教育講演 (奈良春日野国際フォーラム、奈良) 2017年8月18日-19日。
- ⑦ Fumitoshi Ishino and Tomoko Kaneko-Ishino. Acquired traits in mammals: genomic imprinting and roles of LTR retrotransposon-derived genes. Reproduction Down Under 2017 (Mantra on Salt Beach, Australia) August 12-14, 2017.
- ⑧ 石野史敏 レトロトランスポゾン由来の哺乳類特異的遺伝子の個体発生における機能 第35回日本受精着床学会総会・学術講演 シンポジウム「レトロトランスポゾンと生殖・発生」(米子コンベンションセンターBiG SHiP,鳥取) 2017年7月20日-21日
- ⑨ 石野史敏 ゲノムインプリンティングと内分泌疾患 第90回日本内分泌学会学術集会(ロームシアター京都/みやこメッセ、京都) 2017年4月20日-22日。
- ⑩ Fumitoshi Ishino and Tomoko Kaneko-Ishino. Mammalian evolution by gene acquisition from retrotransposons. Symposium: Unidentified functions of the genome, The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of MBSJ (Pacifico Yokohama, Yokohama), December 1, 2016.
- ⑪ Fumitoshi Ishino. Regulation of placental function by mammalian-specific genes from retrotransposons. The 2nd IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism: International Frontiers in Homeostatic Regulation Research (Tojo Hall, Gunma University, Gunma), November 10-11, 2016.
- ⑫ Fumitoshi Ishino and Tomoko Kaneko-Ishino. Mammalian evolution by gene acquisition from Retrotransposons. The 20<sup>th</sup> Evolutionary Biology Meeting at Marseilles (CRDP, Marseilles, France), September 20-23, 2016
- ⑬ 石野史敏 哺乳類の胎生進化とレトロトランスポゾン由来の遺伝子群 第253回 長崎産科婦人科学会学術集会 (長崎県医師会館、長崎) 2016年6月5日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：心臓オルガノイド及びその製造方法

発明者：石野史敏、李知英

権利者：東京医科歯科大学

種類：特許

番号：特願 2017-190950

出願年：平成 29 年

国内外の別：国内

名称：臓器オルガノイド及びその製造方法

発明者：石野史敏、李知英

権利者：東京医科歯科大学

種類：特許

番号：PTC/JP2018/036538

出願年：平成 30 年

国内外の別：国外

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

石野研究室ホームページ：<http://www.tmd.ac.jp/mri/epgn/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：金児-石野知子

ローマ字氏名：Tomoko Kaneko-Ishino

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：20221757

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：幸田 尚

ローマ字氏名：Takashi Kohda

研究協力者氏名：李 知英

ローマ字氏名：jiyoung Lee

研究協力者氏名：志浦 寛相

ローマ字氏名：Hirosuke shiura

研究協力者氏名：入江 将仁

ローマ字氏名：Masahito Irie

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。