

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31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 genome 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

研究成果の概要（和文）： マウス7番染色体の *Igf2-H19* 領域および12番染色体の *Dlk1-Dio3* 領域における非コードRNA遺伝子を含むインプリント遺伝子群の胚発生および胎盤形成に対する作用機構について新たな知見を提供した。また、雌雄生殖細胞における包括的DNAメチロームデータを作成した。その外、雌雄ゲノムの個体発生への特異的な関与についてクローン胚およびTS細胞において発生工学および分子生物学の手法を用いて示した。

研究成果の概要（英文）： We showed novel findings that imprint gene clusters, including the non-coding RNAs, in the *Igf2-H19* domain of the chromosome 7 and the *Dlk1-Dio3* domain of the chromosome 12, play a decisive role for embryogenesis and placentation. In addition, we provided comprehensive and single resolution DNA methylome data of germ cells, and also we showed particular functions of maternal genome on embryogenesis in cloned embryos and trophoblastic stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	21,700,000	0	21,700,000
2009年度	21,700,000	0	21,700,000
2010年度	21,700,000	0	21,700,000
2011年度	21,700,000	0	21,700,000
2012年度	21,700,000	0	21,700,000
総計	108,500,000	0	108,500,000

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：ゲノムインプリント、二母性胚、遺伝子発現、個体発生、非翻訳RNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 特定領域研究B（1999-2002）、および（独）農業・食品産業技術総合研究機構（2002-2006）の研究助成を受け、雌雄生殖細胞系列で行われるメチル化刷込み（メチル化インプリント）が、生殖細胞の個体発生支持機能の根幹を形成するゲノム修飾であることを、インプリント修飾の改変により雌ゲノムのみを持つ胚から産子（二母性マウス）の作出システムを構築し実証したが、イン

プリント遺伝子による制御機構の全貌は不明であった。

(2) 二母性マウスの研究から父性メチル化インプリントによる支配を受けているマウス12番染色体のインプリント領域が重要な役割を演じていることは明らかだが、*Gtl2* 遺伝子および周辺の miRNA および SnoRNA を含む母性発現する非コードRNAが個体発生における役割は不明であった。

(3) 雌雄ゲノムの機能差の根幹をなす生殖細胞におけるDNAメチル化修飾の全貌を示す

包括的 DNA メチローム情報は提供されておらず、早急な研究推進が期待された。

2. 研究の目的

(1) マウス二母性胚の発生特性、遺伝子発現特性および生理学的特性について詳細に検証し、ゲノムインプリントによる二母性マウスの発生制御機構を明らかにすると共に、生殖系列におけるメチル化インプリントの成立機構を明らかにする。

(2) マウス 7 番染色体の *Igf2-H19* 領域および 12 番染色体の *Dlk1-Dio3* 領域における非コード RNA 遺伝子を含むインプリント遺伝子群の胚発生および胎盤形成に対する作用機構について解明する。

(3) 個体発生および胎盤形成における雌雄ゲノムの役割とリプログラミング機構を追究する。

3. 研究の方法

(1) *H19* 遺伝子欠損マウス、*Gt12* 発現調節領域欠損マウスならびに両遺伝子欠損マウスに由来する新生仔非成長期卵を成長 GV 期卵へ核移植することにより二母性卵子を構築する。マイクロアレイによる網羅的遺伝子プロファイルの作成およびバイオインフォマティクス解析を実施する。さらに、二母性マウスの生理学的正常性を詳細に評価する。

(2) 非コード遺伝子 *Gt12* が RNA レベルで *cis/trans* の遺伝子発現調節および個体発生そのものに関与する可能性を検証するため、*Gt12* 遺伝子欠損マウスにおける microRNA および snoRNA を含む遺伝子発現および交配試験による個体発生特性を詳細に調べ、その制御機構を解析する。さらに、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。

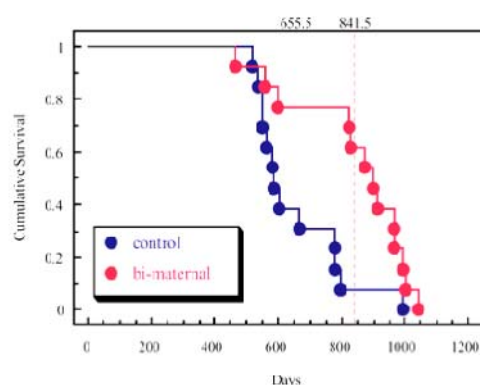
(3) 生殖細胞形成過程で確立するメチル化インプリント領域の解析を、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムバイサルファイトシーケンス解析を実施して、雌雄生殖細胞に特異的なメチル化領域を全決定する。

(4) 体細胞クローンマウス胚の単一胚を対象としたマイクロアレイ解析を確立し、初期発生過程における包括的なトランスクリプトーム解析を実施して、遺伝子発現特性の全貌を明らかにする。また、雌核発生胚および雄核発生胚由来の TS 細胞を作出し、胎盤を形成する細胞への分化特性を検討する。

4. 研究成果

(1) 主要インプリント遺伝子である *Igf2*、*H19*、*Dlk1* および *Gt12* 遺伝子等が二母性マウスの誕生に実際どのような役割を演じたの

か遺伝子発現プロファイルから明らかにした。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および胎盤形成にかかわるネットワークを形成していた。父性メチル化インプリント領域としてはこの2カ所が必要十分条件である結論を得た (*J Biol Chem*, 2009)。さらに、二母性マウスの特性を詳細に調べた結果、生理学的には正常であること、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 (*Hum Reprod*, 2010)。これらの成果は、哺乳類の個体発生における雌雄ゲノムの必要性を、独創的な方法によりゲノムインプリントの機構で全て説明できることを実証したものである。

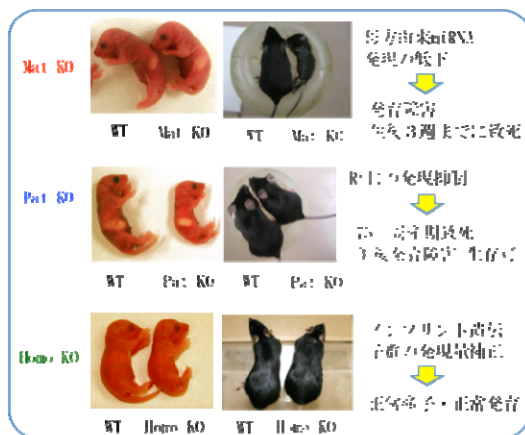


二母性マウスの長命性

(2) この他、父方発現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 (*Genomics*, 2009)。また、網羅的に雌雄メチル化領域の特定を進め、同領域に新規メチル化インプリント領域を見いだしている (*Nuc Acid Res*, 2010, *PLoS Genetics*, 2012)。

(3) *Dlk1-Gt12* ドメインの母性アレル発現の非コード RNA (*Gt12*, *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。しかし、本研究で作成された *Gt12* 欠損マウスによると、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った。一方、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った。病理組織解析から、肺と肝臓への異常が確認されたが、両アレルから欠損を受け継いだ Homo では矮小化を示すものの、全てのマウスが繁殖能力を有する成体になることを明らかにした (*Hum Mol Gen*, 2009)。さらに、それらの発生障害の分子生物学的背景を明らかにする為に、*IG-DMR-KO* マウスとの交配試験により *IG-DMR/Gt12-KO* マウス (二

重欠損) を作出し、*Dlk1* 遺伝子の発現補正を行った。その結果、この *IG-DMR /Gt12-KO* マウスには出生前の致死性は認められなかったが、生後の高い致死性が明らかとなった。遺伝子発現解析の結果から母方発現非コードRNAの発現が明らかに低下していることが判明し、致死性の原因であることが強く示唆された(*J Biol Chem*, 2010)。これらの成果は、母性インプリント発現をする非コードRNAの重要性を初めて実証したものである。



Gt12-KOマウスの表現型

(4) さらに、*Dlk1-Gt12* 領域のインプリント遺伝子群の発現が iPS 細胞の分化能に大きな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(*Nature*, 2010)。

(5) 次世代シーケンサーを用いた卵子および精子における全ゲノムバイサルファイトシーケンス解析を実施し、DNAメチル化マップの作成に成功した。雌雄ゲノム間でメチル化状態の異なる領域を多数検出した(*PLoS Genetics*, 2012)。また、雌性生殖細胞形成過程でメチル基転移酵素遺伝子 *Dnmt3L* および *Dnmt3a* を非成長期卵母細胞から特異的に発現する TG マウス由来の産子の発生解析から、妊娠初期から中期にかけて顕著な分化・発生異常を発症し、致死になることが明らかとなった(投稿準備中)。

(6) 体細胞クローンマウス胚の初期発生過程における包括的なトランスクリプトームデータを作成し、クローン胚で特異的な発現挙動を示す遺伝子群を同定した(*PLoS One*, 2010; *Reproduction*, 2013)。また、雄核発生胚からは TS 細胞を樹立することが出来たが、雌核発生胚から樹立された培養細胞系譜は内部細胞塊に由来することが判明した。胎盤の幹細胞形成には雄ゲノムの関与が必須であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(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 24 件)

- ① Shirane K, Toh H, Kobayashi H, Miura F, Chiba H, Ito T, Kono T, Sasaki H. Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. *PLoS Genet*, 9(4):e1003439 (2013). 査読有, doi: 10.1371/journal.pgen.1003439.
- ② Cao F, Fukuda A, Watanabe H, Kono T. The transcriptomic architecture of mouse Sertoli cell clone embryos reveals temporal-spatial-specific reprogramming. *Reproduction*, 145(3):277-288 (2013). 査読有
- ③ Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Yayoi O, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. *PLoS Genet*, 8(1):e1002440 (2012). 査読有, doi: 10.1371/journal.pgen.1002440.
- ④ Ogawa H, Matsuzaki T, Yamamoto A, Kashiwazaki N, Kono T. Porcine nuclei in early growing stage do not possess meiotic competence in matured oocytes. *Theriogenology*, 78(3):560-566 (2012). 査読有, doi:10.1016/j.theriogenology.2012.03.001.
- ⑤ Kobayashi H, Sakurai T, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Kono T. Imprinted DNA methylation reprogramming during early mouse embryogenesis at the *Gpr1-Zdbf2* locus is linked to long cis-intergenic transcription. *FEBS Lett*, 23:586(6): 827-833 (2012). 査読有, doi: 10.1016/j.febslet.2012.01.059.
- ⑥ Obata Y, Hiura H, Fukuda A, Komiyama J, Hatada I, Kono T. Epigenetically immature oocytes lead to loss of imprinting during embryogenesis. *J Reprod Dev*, 57(3):327-334 (2011). 査読有
- ⑦ Kawahara M, Kono T. Longevity in mice without a father. *Hum Reprod*, 25(2):457-461 (2010). 査読有, doi:10.1093/humrep/dep400.
- ⑧ Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature*, 13:465(7295):175-181 (2010). 査読有, doi: 10.1038/nature09017.
- ⑨ Takahashi N, Kobayashi R, Kono T. Restoration of *Dlk1* and *Rtl1* is necessary

but insufficient to rescue lethality in intergenic differentially methylated region (IG-DMR)- deficient mice. *J Biol Chem*, 285(34): 26121-26125 (2010). 査読有, doi: 10.1074/jbc.M109.075325.

⑩ Fukuda A, Cao F, Morita S, Yamada K, Jincho Y, Tane S, Sotomaru Y, Kono T. Identification of inappropriately reprogrammed genes by large-scale transcriptome analysis of individual cloned mouse blastocysts. *PLoS One*, 30;5(6):e11274. (2010). 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0011274.

⑪ Kobayashi H, Yamada K, Morita S, Hiura H, Fukuda A, Kagami M, Ogata T, Hata K, Sotomaru Y, Kono T. Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene *Zdbf2* on chromosome 1 and its imprinted human homolog *ZBDF2* on chromosome 2. *Genomics*, 93(5): 461-472 (2009). 査読有, doi: 10.1016/j.ygeno.2008.12.012.

⑫ Takahashi N, Okamoto A, Kobayashi R, Shirai M, Obata Y, Ogawa H, Sotomaru Y, Kono T. Deletion of *Gtl2*, imprinted non-coding RNA, with its differentially methylated region induces lethal parent-origin-dependent defects in mice. *Hum Mol Genet*, 15;18(10):1879-1888 (2009). 査読有, doi: 10.1093/hmg/ddp108.

⑬ Kawahara M, Morita S, Takahashi N, Kono T. 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(26): 17751-17765 (2009). 査読有, doi: 10.1074/jbc.M109.000299.

⑭ Ogawa H, Shindo N, Kumagai T, Usami Y, Shikanai M, Jonwn K, Fukuda A, Kawahara M, Sotomaru Y, Tanaka S, Arima T, Kono T. Developmental ability of trophoblast stem cells in uniparental mouse embryos. *Placenta*, 30(5):448-456 (2009). 査読有, doi: 10.1016/j.placenta.2009.02.006.

⑮ Kawahara M, Obata Y, Sotomaru Y, Shimozawa N, Bao S, Tsukadaira T, Fukuda A, Kono T. Protocol for the production of viable bimaternal mouse embryos. *Nat Protoc*, 3(2): 197-209 (2008). 査読有, doi: 10.1038/nprot.2007.531.

[学会発表] (計 4 3 件)

① 曹峰, 福田篤, 渡辺大士, 河野友宏, 着床前クローン胚発生において異常発現遺伝子の染色体マップ, 第 35 回日本分子生物学会, 2012. 12. 11, 福岡国際会議場

② 河野友宏, DNA メチローム解析による生殖系列のリプログラミング評価, 第 56 回日本生殖医学会学術講演会・総会, 2011. 12. 8, パシフィコ横浜

③ 小林久人, 河野友宏, マウス配偶子における全ゲノム包括的 DNA メチローム解析, 日本分子生物学会, 2011. 12. 16, パシフィコ横浜

④ 小川英彦, 後藤詩織, 岸靖典, 曹峰, 河野友宏, マウス雌核発生胚の胚盤胞期胚における内部細胞塊および栄養外胚葉における網羅的遺伝子発現解析, 第 104 回日本繁殖生物学会大会, 2011. 9. 16, いわて県民情報交流センター

⑤ Tomohiro Kono, Methylomes and transcriptomes in mouse germ cells, Fertility 2011, 2011. 1. 7, Dublin, Ireland

⑥ 曹峰, 福田篤, 岸靖典, 河野友宏, 着床前マウスクローン胚におけるトランスクリプトーム解析, 第 33 回分子生物学会 (MB2010), 2010. 12. 7, 神戸ポートアイランド

⑦ 小林久人, 桜井隆順, 福田篤, 高橋望, 尾畑やよい, 中林一彦, 秦健一郎, 外丸佑介, 鈴木穰, 河野友宏, Bisulphite Shotgun Sequencing 法によるマウス生殖細胞の包括的 DNA メチル化解析, 第 33 回分子生物学会 (BMB2010), 2010. 12. 8, 神戸ポートアイランド

⑧ Tomohiro Kono, The regulation of imprinted gene, From imprinting to the Epigenome in 25 years, 2009. 9. 6, University of Cambridge, England

⑨ 高橋望, 小林亮太, 岡本品, 山口瑛人, 河野友宏, 非コードインプリント遺伝子 *Gtl2* 欠損マウスの親特異的な致死性と分子制御機構, 第 102 回日本繁殖生物学会, 2009. 9. 10, 近畿大学農学部

⑩ 川原学, 森田慎之助, 高橋望, 河野友宏, 二母性マウス胚由来胎盤における網羅的遺伝子発現解析, 第 102 回日本繁殖生物学会, 2009. 9. 12, 近畿大学農学部

⑪ Tomohiro Kono, Genetic modification for bi-maternal embryo development, 35th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 2009. 1. 5, SanDiego, USA

⑫ 高橋望, 岡本品, 小林亮太, 白井求, 小川英彦, 尾畑やよい, 河野友宏, 非コードインプリント遺伝子 *Gtl2* 欠損マウスにおける親の特異的な致死性および遺伝子発現異常, 日本分子生物学会, 2008. 12. 11, 神戸ポートアイランド

⑬ Tomohiro Kono, Generation of viable bimaternal mice lacking a paternal genome, World Congress on Reproductive Biology, 2008. 5. 24, Hawaii, USA

⑭ Nozomi Takahashi, Akira Okamoto, Motomu Shirai, Ryota Kobayashi, Tomohiro Kono, Deletion of the maternally expressed imprinted gene, Gtl2, resulted in parental-specific lethality in mice, World Congress on Reproductive Biology, 2008. 5. 24, Hawaii, USA

[図書] (計2件)

- ① 河野友宏, 他, 京都大学学術出版会, 卵子発育とゲノムインプリンティング, 「卵子学」, 2011, 110-121.
② 河野友宏, 他, 近大出版, 生殖系列細胞のプログラム, 「生命の誕生にむけて」2010, 20-26.

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

名称: METHOD OF CONSTRUCTING NUCLEUS-IMPLANTED EGG, PARTHENOGENETIC EMBRYO AND PARTHENOGENETIC MAMMAL
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: 特許権
番号: 12/213, 385
出願年月日: 2008年6月18日
国内外の別: 国外

名称: METHOD OF CONSTRUCTING NUCLEAR-TRANSPLANTED EGG, PARTHENOGENETIC EMBRYO AND PARTHENOGENETIC MAMMAL
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: 特許権
番号: 04771478. 7
出願年月日: 2004年8月4日
国内外の別: 国外

名称: 核移植卵、単為発生胚および単為発生非ヒト哺乳動物の作出方法
発明者: 河野友宏、川原学
権利者: 学校法人東京農業大学
種類: 特許権
番号: 特願2007-171707
出願年月日: 平成19年6月29日
国内外の別: 国内

名称: 核移植卵、単為発生胚および単為発生哺乳動物の作出方法
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: 特許権
番号: 特願2005-512613
出願年月日: 平成16年8月4日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計4件)

名称: METHOD OF CONSTRUCTING NUCLEUS-IMPLANTED EGG, PARTHENOGENETIC EMBRYO AND PARTHENOGENETIC MAMMAL
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: 特許権
番号: 7659443
取得年月日: 2010年2月9日
国内外の別: 国外

名称: METHOD OF CONSTRUCTING NUCLEAR-TRANSPLANTED EGG, PARTHENOGENETIC EMBRYO AND PARTHENOGENETIC MAMMAL
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: 特許権
番号: 1661456
取得年月日: 2009年2月25日
国内外の別: 国外

名称: 核移植卵、単為発生胚および単為発生非ヒト哺乳動物の作出方法
発明者: 河野友宏、川原学
権利者: 学校法人東京農業大学
種類: 特許権
番号: 特許第5078074号
取得年月日: 平成24年9月7日
国内外の別: 国内

名称: 核移植卵、単為発生胚および単為発生哺乳動物の作出方法
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: 特許権
番号: 特許第4275137号
取得年月日: 平成21年3月13日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

尾畑 やよい (OBATA YAYOI)
東京農業大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 70312907

小川 英彦 (OGAWA HIDEHIKO)
東京農業大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 20339089

[その他]

<http://nodai-konolab.net/>