

研究種目：基盤研究（A）	
研究期間：2006～2008	
課題番号：18208024	
研究課題名（和文）	単為発生マウスをモデルとしたインプリント遺伝子による個体発生制御機構の解明
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・応用生物学部・教授	
研究者番号：80153485	

## 研究成果の概要：

父性メチル化インプリント制御に焦点を当て研究を進め新規知見を得た。二母性マウスの胎仔および胎盤におけるマイクロアレイ解析を行い、6番および12番染色体の父性メチル化領域のインプリント遺伝子により個体発生が制御されていることを明らかにした。12番染色体の父性メチル化領域の母方発現*Gtl2*転写産物から生じるmiRNAが個体発生に重要な役割をもつことを初めて明らかにした。マウス1番染色体およびヒト2番染色体で父性発現するインプリント遺伝子*Zdbf2*を初めて発見した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	15,300,000	4,590,000	19,890,000
2007年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2008年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
年度			
年度			
総計	36,700,000	11,010,000	47,710,000

研究分野：生殖工学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

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. 研究開始当初の背景

受精卵が細胞の分化、組織・器官形成を介して高次生命構造をもつ個体に発生する過程は、遺伝子発現調節のネットワークが不可欠である。最近の研究からエピジェネティクス機構が個体発生に決定的な役割を持つことが明らかとなり、ゲノムインプリンティングに代表されるエピジェネティクスの視点からの戦略が、個体発生の仕組みを理解する上で益々重要となることは疑う余地がない。ゲノムイ

ンプリンティングが雌雄生殖細胞ゲノムの決定的な機能差を生じさせ、ほ乳類における単為発生を阻止している。そこで、単為発生はゲノムインプリントの個体発生における作用の全容を明らかにするための素晴らしいモデルとなり得る。すでに我々は、1) 新生仔卵母細胞ゲノムはゲノムインプリンティングを欠いているために精子型インプリント状態にあり、インプリント改変ゲノムをもつ単為発生胚が発生延長を示すこと (Nature

Genetics, 1996)、さらに、2) 父性インプリント遺伝子である H19 遺伝子欠損マウスを活用して雄型インプリントに近づけることにより、満期に達する個体発生を遂げることを世界で初めて報告した (Nature 2004)。

単為発生マウスをモデルとして用いることによりゲノムインプリント遺伝子の機能を網羅的かつ遺伝子ネットワークとして捉え解明する新しい研究の展開を図ることが望まれている。しかも、これまで注目されなかったタンパクをコードしていない RNA が個体発生に重要な作用を示している可能性を示す重要な研究テーマを包含している。

## 2. 研究の目的

実際に、卵母細胞の核移植による卵子再構築および4タイプの遺伝子欠損マウス由来の卵母細胞ゲノムを利用して、7遺伝子型の単為発生モデルマウス胎仔および産仔の作出を可能としている。それらはいずれもインプリント遺伝子の発現タイプごとに特異的な発生特性を示す。これまでの研究成果は、それらの遺伝子型をもつ単為発生マウス胚の個体への発生特性を明らかにしつつある。しかしながら、なぜ発生延長が可能であったのかを、遺伝子レベルで理解するにはあまりにも情報が少ない。本研究は、上記のモデルマウスを用いて、ゲノムインプリント遺伝子の個体発生、器官形成および細胞分化に対する役割をより明らかにすることを目的として実施する。

## 3. 研究の方法

目的を達成するために、以下の課題を遂行した。1) 可能なマウス二母性胚・個体 (核移植により作成された2セットの卵子ゲノムを持つ: 卵子から発生する単為発生胚とは区別される) を作出して、それらの発生特性 (発生限界および形態形成) をすべて明らかにしようとした。2) 12.5日胚を対象として、40,000の遺伝子を対象としたオリゴマイクロアレイ解析を徹底的に実施した。3) データベースを使用した網羅的遺伝子発現プロファイルの作成およびパスウェイ解析を実施して、各遺伝子型をもつ二母性胚の遺伝子発現プロファイルと発生特性の関係を明らかにしようとした。4) 総合的な発生を病理組織学および *in situ* hybridization による遺伝子発現解析、免疫組織染色等による細

胞・組織の機能解析を実施した。5) 1) ~ 4) より7タイプの単為発生胚における組織特異的な発生・分化・機能発達を反映する遺伝子群の特定を図るとともに、遺伝子相互間の発現調節について追求した。これにより、人為的に制御された特定のインプリント遺伝子、特に父性制御を受ける *Igf2*, *H19*, *Dlk1* および *Gt12* 等が個体発生において果たす機能を発生生物学的かつ分子生物学的に明らかにすることができる。6) 細胞培養系を用いた遺伝子欠損、過剰発現、発現抑制 (siRNA) などの実験系を導入し、遺伝子相互間の調節機能をさらに検証する。また、non-coding RNA である *H19* および *Gt12* の作用についても焦点を当て、その作用を解明する。以上、5年の研究実施期間中に、単為発生胚をモデルとした総合的かつ詳細な研究を介して、生殖細胞におけるゲノムインプリンティングが個体発生に果たす役割を、特に父性インプリント遺伝子の作用に焦点をあて、研究を展開した。

## 4. 研究成果

卵子 (雌) ゲノムから構成されるマウス二母性胚の個体発生能を、インプリントとの関連から追及した。卵母細胞の核移植ではインプリント型を改変できない2セットの父性インプリント遺伝子に注目した。一つは、マウス7番染色体遠位部に存在する *Igf2-H19* 遺伝子、他の1セットは12番染色体遠位部にある *Dlk1-Gt12* 遺伝子である。*Igf2-H19* 遺伝子については、母方発現する *H19* 遺伝子の転写領域と転写調節領域の計 13kb を欠損したマウス (*H19* Δ 13) を従来通り使用した。一方、*Dlk1-Gt12* 遺伝子の発現改変には、あらたに *Gt12* の上流にある転写調節領域 (IG-DMR, intergenic differentially methylated region) を欠損させたマウスを導入した。この IG-DMR 欠損マウスでは、雌アレルからの *Gt12* の発現が抑制され、一方発現が抑制されていた *Dlk1* の発現が活性化され、雄アレル型の遺伝子発現パターンを示す。これら2種の遺伝子欠損マウスを交配し、両遺伝子アレルを欠損した雌マウス新生仔を生産した。この新生仔より非正長期卵母細胞を採取し、二母性胚を核移植により作出して、30%以上の効率で個体発生させることに成功した。

また、マイクロアレイにより、二母性胚の遺伝子発現プロファイルを作成し、受精胚と比較検討した。その結果、両領域を欠損した非成長期卵子を用いて再構築した二母性胚由来の胎仔および胎盤では、受精卵由来の正常胎盤と何ら差異は認められず、完全な機能

的胎盤が形成されたことが証明された。ところが、*Igf2-H19* 遺伝子領域が、正常なインプリント状況に改変されている胎盤では、サイズには可成りの改善が見られたものの、胎盤の組織構造には、依然明らかな異常が認められた。一方、*Dlk1-Gtl2* 遺伝子の発現が正常になるよう改変された胎盤では、サイズの改善は限定されていたものの、胎盤の組織構造は顕著に改善されていることが、明らかとなった。マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果からも、両インプリント領域の胎盤形成における作用が、裏付けられた。これらの結果から、2つの父性メチル化インプリント領域は、胎盤形成に対して補完的に機能していることを実証した。GeneChip マイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイルを作成して発現調節ネットワークの観点から検討した。その結果、6番および12番染色体の父性メチル化インプリント遺伝子、特に *Igf2* および *Dlk1* 遺伝子の発現が正常化に集約されることが判明した。

また、7番および12番染色体の父性メチル化インプリント領域を2重欠損した成熟マウスの卵子ゲノムと母性メチル化インプリントを欠いたマウス新生仔の卵母細胞ゲノムから作成した二母性胚も正常な産子に発生することを明らかにした。この成果から、完全な父性型ゲノムの存在は個体発生に不可欠ではなく、むしろインプリント遺伝子の発現が発現アレルに依存することなく2倍体ゲノムセットとして正常に修正されれば、胚は正常な個体発生を遂げることが可能であることが証明された。また、3種の遺伝子型 (*Igf2* 発現、*Dlk1* 発現、*Igf2* および *Dlk1* 発現) の二母性マウス胎盤の GeneChip マイクロアレイ解析および遺伝子発現ネットワーク解析から、正常な胎盤形成が *Igf2* および *Dlk1* 遺伝子の発現が正常化に依存していることが明らかにされた。

*Gtl2* 遺伝子マスを作成し、その表現型解析および遺伝子発現解析した。その結果この遺伝子欠損マウスは致死性を示すことが明らかとなり、さらに miRNA の発現変動が致死性と密接に連動していることを示した。

##### 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 17 件)

- ① Wu, Q., Kono, T. 他 6 名 Regulated expressions of two sets of paternally imprinted genes is necessary for mouse parthenogenetic development to term. *Reproduction* 131, 481-488 (2006) 査読有
- ② Hiura, H., Kono, T. 他 3 名 Oocyte

growth-dependent progression of maternal imprinting in mice. *Genes to Cells* 11, 353-361 (2006) 査読有

- ③ Kono, T. Genomic imprinting is a barrier to parthenogenesis in mammals. *Cytogenet. Genome Research* 113, 31-35 (2006) 査読有
- ④ Ogawa, H., Kono, T. 他 3 名 Disruption of parental-specific expression of imprinted genes in uniparental fetuses. *FEBS Letters* 580, 5377-5384 (2006) 査読有
- ⑤ Arima, T., Kono, T. 他 6 名 The human HYMAI/PLAGL1 differentially methylated region acts as an imprint control region in mice. *Genomics* 88, 650-658 (2006) 査読有
- ⑥ Kawahara, M., Kono, T. 他 3 名 Complementary roles of genes regulated by two paternally methylated imprinted regions on chromosomes 7 and 12 in mouse placentation. *Human Molecular Genetics* 15, 2869-2879 (2006) 査読有
- ⑦ Hiura, H., Kono, T. 他 4 名 DNA methylation imprints on the IG-DMR of the *Dlk1-Gtl2* domain in mouse male germline. *FEBS Letters* 581, 1255-1260 (2007) 査読有
- ⑧ Honda, A., Kono, T. 他 10 名 Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. *PNAS* 104, 12389-12394 (2007) 査読有
- ⑨ Kawahara, M., Kono, T. 他 6 名 High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos. *Nature biotechnology* 25, 1045-1050 (2007) 査読有
- ⑩ Obata, Y., Kono, T. 他 2 名 Long-term effects of In vitro growth of mouse oocytes on their maturation and development. *Journal of reproduction and development* 53, 1183-1190 (2007) 査読有
- ⑪ Kawahara, M., Kono, T. 他 2 名 Appropriate expression of imprinted genes on mouse chromosome 12 extends development of bi-maternal embryos to term. *FEBS Letters* 581, 5178-5184 (2007) 査読有
- ⑫ Kawahara, M., Sotomaru, Y., Kono, T. 他 5 名 Protocol for the production of viable bimaternal mouse embryos. *Nature protocols* 3, 197-209 (2008) 査読有
- ⑬ Kono, T. Genetic modification for

- bimaternal embryo development. *Reproduction, Fertility and Development* 21, 31-36 (2009) 査読有
- ⑭ Kobayashi, H., Sotomaru, Y., Kono, T. 他 7 名 Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene *Zdbf2* on chromosome 1 and its imprinted human homolog *ZDBF2* on chromosome 2. *Genomics* 93, 461-472 (2009) 査読有
- ⑮ Ogawa, H., Sotomaru, Y., Kono, T. 他 9 名 Developmental ability of trophoblast stem cells in uniparental mouse embryos. *Placenta* 30, 448-456 (2009) 査読有
- ⑯ Takahashi, N., Sotomaru, Y., Kono, T. 他 5 名 Deletion of *Gtl2*, imprinted non-coding RNA, with its differentially methylated region induces lethal parent-origin-dependent defects in mice. *Human Molecular Genetics* 18, 1879-1888 (2009) 査読有
- ⑰ Kawahara, M., Kono, T. 他 2 名 Defining contributions of paternally methylated imprinted genes at the *IGF2-H19* and *DLK1-GT12* domains to mouse placentation by transcriptomic analysis. *Journal of Biological Chemistry* (published online on April 20) (2009) 査読有

[学会発表] (計 29 件)

- ① 川原学、河野友宏 “Genes controlled by two paternally imprinted regions differentially contribute to mouse placentation” Society for Reproduction and Fertility Conference 2006年7月3日 (英国)
- ② 松崎隆、河野友宏 “Maturation of prcine oocytes reconstructed with a nucleus from the growing stage oocytes.” Society for the Study of Reproduction 2006年7月29日 (米国)
- ③ 小川英彦、河野友宏 「雄核発生胚および雌核発生胚由来栄養膜幹細胞における *Cdx2* 遺伝子の発現」日本繁殖生物学会 2006年9月7日 (名古屋)
- ④ 尾畑やよい、河野友宏 「B6-Y 性転換マウス由来卵母細胞の発生特性」日本繁殖生物学会 2006年9月7日 (名古屋)
- ⑤ 呉瓊、河野友宏 ”Effect of *Igf2* and *Dlk1* genes on hematopoiesis in mouse” 日本繁殖生物学会 2006年9月7日 (名古屋)
- ⑥ 川原学、河野友宏 「マウス胎盤形成にお

- ける 7 番染色体および 12 番染色体上の父性インプリント遺伝子の役割」日本繁殖生物学会 2006年9月7日 (名古屋)
- ⑦ 神長祐子、河野友宏 「マウス ES クローン胚盤胞期における特異的発現遺伝子の網羅的探査」日本繁殖生物学会 2006年9月7日 (名古屋)
- ⑧ 白井求、河野友宏 「マウス父性インプリント遺伝子の精子形成過程における DNA メチル化修飾獲得時期の特定」日本繁殖生物学会 2006年9月7日 (名古屋)
- ⑨ 山田かおり、河野友宏 「マイクロアレイ解析を用いたマウス新規インプリント遺伝子の探査」日本繁殖生物学会 2006年9月7日 (名古屋)
- ⑩ 高橋望、河野友宏 「非コードインプリント遺伝子 *Gt12* 欠損マウスの発生解析」日本繁殖生物学会 2006年9月7日 (名古屋)
- ⑪ 河野友宏 ”Complementary roles of *Igf2* and *Dlk1* for descendants” International Genomic Imprinting Workshop 2006年11月29日
- ⑫ 樋浦仁、河野友宏 「マウス卵母細胞におけるインプリント遺伝子のヒストン修飾解析」日本分子生物学会 2006年12月 (名古屋)
- ⑬ 小川英彦、河野友宏 ”Establishment of trophoblastic stem like cell from mouse parthenogenetic embryos” International Embryo Transfer Society 2007年1月6日 (京都)
- ⑭ 尾畑やよい、河野友宏 ”Developmental competence of mouse oocytes after in vitro growth nuclear transfer, and in vitro fertilization” International Embryo Transfer Society 2007年1月6日 (京都)
- ⑮ 河野友宏 「父母メチル化インプリントの責務」日本哺乳動物卵子学会 2007年5月17日 (山梨)
- ⑯ 山田かおり、外丸祐介、河野友宏 「マイクロアレイ解析を用いたマウス新規インプリント遺伝子の探査」日本哺乳動物卵子学会 2007年5月17日 (山梨)
- ⑰ 河野友宏 ”Regulation of mammalian development by genomic imprinting” International Young Scientist Forum on Mammalian Reproductive Biotechnology 2007年8月28日 (中国)
- ⑱ 川原学、河野友宏 「雄の遺伝的関与を欠いたマウスの効率的な生産」日本繁殖生物学会 2007年10月20日 (東京)
- ⑲ 河野友宏 「二母性マウス表現型の特徴」日本繁殖生物学会 2007年10月20日 (東京)

- ⑳ 岡本晶、河野友宏「Glt2 遺伝子欠損マウスにおける器官形成異常」日本哺乳動物卵子学会 2008年5月17日(名古屋)
- 21 河野友宏 ”Generation of viable bimaternal mice lacking a paternal genome” World Congress on Reproductive Biology 2008年5月24日(米国)
- 22 高橋望、河野友宏 ”Deletion of the maternally expressed imprinted gene, Glt2, resulted in parental-specific lethality in mice” World Congress on Reproductive Biology 2008年5月24日(米国)
- 23 小林久人、外丸祐介、河野友宏 「単為発生胚を用いた新規インプリント遺伝子の探索:マウス1番染色体の Zdbf2 遺伝子は父由来アレル特異的に発現するインプリント遺伝子である」日本繁殖生物学会 2008年9月18日(福岡)
- 24 曹峰、外丸祐介、河野友宏 「マイクロアレイ方を用いた単一マウスクローン胚盤胞の網羅的遺伝子発現解析」日本繁殖生物学会 2008年9月18日(福岡)
- 25 小林亮太、河野友宏 「Non-coding RNA インプリント遺伝子 Glt2 欠損マウスにおける Rt11 遺伝子の発現解析」日本繁殖生物学会 2008年9月18日(福岡)
- 26 高橋望、河野友宏 「非コードインプリント遺伝子 Glt2 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年12月11日(神戸)
- 27 岡本晶、河野友宏 「非翻訳インプリント遺伝子 Glt2 欠損マウスにおける致死性および器官形成異常」日本分子生物学会 2008年12月11日(神戸)
- 28 小林久人、外丸祐介、河野友宏 「単為発生胚を用いた新規インプリント遺伝子の探索:マウス1番染色体の Zdbf2 遺伝子は父由来アレル特異的に発現するインプリント遺伝子である」日本分子生物学会 2008年12月12日(神戸)
- 29 河野友宏 “Genetic modification for bi-maternal embryo development” the International Embryo Transfer Society 2009年1月5日(米国)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 2 件)

名称: 核移植卵、単為発生胚および単為発生

哺乳動物の作出法

発明者: 河野友宏、尾畑やよい

権利者: 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: Method of Constructing Nuclear-Transplanted Egg, Parthenogenetic Embryo and Parthenogenetic Mammal

発明者: 発明者: 河野友宏、尾畑やよい

権利者: 東京農業大学

種類: European patent

番号: No 1661456

取得年月日: 2009年2月25日

国内外の別: 国外

[その他]

#### 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

外丸 祐介 (SOTOMARU YUSUKE)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・准教授

研究者番号: 90309352

##### (3) 連携研究者