

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18370090
 研究課題名(和文) X染色体上の哺乳類特異的レトロトランスポゾン由来の遺伝子 *Sirh7* の機能解析
 研究課題名(英文) Analysis of a retrotransposon-derived, mammalian-specific *Sirh7* gene on X chromosome
 研究代表者 石野(金児) 知子(KANEKO-ISHINO TOMOKO)
 東海大学・健康科学部・教授
 研究者番号：20221757

研究成果の概要：Sushi-ichi レトロトランスポゾンに由来する *Sirh7* は X 染色体上に存在する哺乳類特異的遺伝子である。ノックアウトマウスの解析から、この遺伝子が正常なマウス胎盤における 3 層構造の形成に必須の機能をもつことを明らかにした。この研究により、申請者が既に報告した *Peg10*、*Peg11* 同様、レトロトランスポゾンに由来していることを証明した。「哺乳類特異的臓器である胎盤の構造形成・機能獲得に、哺乳類ゲノムに新たに挿入されたレトロトランスポゾンが関わっていた」という新しい概念の構築に大きく貢献するものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	9,600,000	2,880,000	12,480,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：(D)器官形成、(G)遺伝子発現調節、(J)進化発生

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者はレトロトランスポゾン由来で哺乳類特異的に存在する父親性発現インプリント遺伝子 *Peg10* のノックアウトマウスが胎盤形成不全のために初期胚致死になることを明らかにした。これは哺乳類ゲノムに新

規に獲得されたレトロトランスポゾンが進化の過程で内在性遺伝子となり哺乳類特異的臓器である胎盤の形成に関係したことを初めて証明した。

(2) *Peg10* と同じレトロトランスポゾンに由来するインプリント遺伝子 *Peg11* のノックア

ウトマウスの解析も同時に進め、これが胎盤機能不全のために胎児期後期／新生児致死となることを明らかにした。

(3) 哺乳類ゲノムには *Peg10* と *Peg11* を含め sushi-ichi レトロトランスポゾンに由来する 11 個の哺乳類特異的遺伝子 (sushi-ichi retrotransposon homologues, *Sirh*) が存在することを明らかにした。

(4) X 染色体上に存在する *Sirh7* は、膵臓ガンなどで発現亢進が報告されている *Ldoc1* と同一の遺伝子であることがわかっていた。

2. 研究の目的

Sirh7/Ldoc1 は *Peg10* と *Peg11* と同様に sushi-ichi レトロトランスポゾンに由来する哺乳類特異的遺伝子であり、これが哺乳類の個体発生にどのような機能をもつかを明らかにすることを目的とする。この研究を通じて、「哺乳類の進化においてレトロトランスポゾン由来の哺乳類特異的遺伝子群がどのように寄与したのか」という、生物学上の大問題に挑戦したいと考えた。

3. 研究の方法

Sirh7/Ldoc1 は膵臓ガンにおいて発現亢進がみられることから、ガン抑制遺伝子である可能性が示唆されている。

各発生段階と各臓器での *Sirh7* 遺伝子の発現解析を行い、*Sirh7* ノックアウトマウスでは、発現量の高い臓器における表現型を解析することとした。また、発現している臓器のワイルドタイプとノックアウトマウスでの構造解析の比較や in situ hybridization による発現パターンの解析を進めた。

4. 研究成果

研究の主な成果：

(1) *Sirh7* 遺伝子は、着床直後の初期の胎盤形成期において、胎盤のもとになるエクトプラセンタルコーンに発現することから、胎盤のすべての細胞系列に影響を与える可能性が考えられた。*Sirh7* 遺伝子の発現量は胎盤形成初期に高くみられるが、しだいに減少し、胎児期 15 日目以降ではほとんど消失する。一方で、胎児、新生児、成体での発現は脳で弱い発現が観察されるが、一般的に弱く、胎児期の発生において、胎盤で機能することが予想された。

(2) *Sirh7* ノックアウトマウスは、正常に生まれ成長した。しかし、胎盤の構造に大きな変化が見られた。最も特徴的なことはラビリンス層とスポンジオトロホブラスト層の境界が大きく乱れていたことで、場所によってはラビリンス層が母親側の胎盤である脱落膜に接している像が観察された。また、スポンジオトロホブラスト層では、グリコーゲン細胞の増加が確認された。ノックアウトマウ

ス作製には 129 由来の ES 細胞を使用し、生まれたキメラマウスと B6 の交配で F1 を作成した。以後、常に B6 と交配してマウスを維持しているが、F4 世代まで作成したところで、この胎盤の構造異常による胎児の致死性は確認されていない。

(3) *Sirh7* 遺伝子は X 染色体上に存在することから、胎盤では父親由来の X 染色体が選択的に不活性化されることが予想された。胎盤における表現型も予想通り、母親からノックアウト変異が伝達された場合は、父親から正常なアリルが伝わっても (-/+ のヘテロの場合でも)、ホモと同じ表現型を示すことが確認された。同様に、その逆で、父親からノックアウト変異が伝達された場合は、母親から正常なアリルが伝わっても (+/- のヘテロの場合)、正常な胎盤形成が起きた。

(4) *Sirh7* ノックアウトマウスの胎盤で観察された、ラビリンス層とスポンジオトロホブラスト層の境界が大きく乱れやすスポンジオトロホブラスト層では、グリコーゲン細胞の増加といった表現型は、これまで体細胞クローンマウスの胎盤や亜種間交配マウスの胎盤などでもみられている。*Sirh7* 遺伝子がこれらの原因である可能性について解析を進めている。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト：申請者は、胎児期致死性に関係するインプリント領域における原因候補遺伝子として *Peg10* および *Peg11* の解析を進め、実際に、これらの遺伝子が初期胚致死、胎児期後期／新生児期致死の原因であることをノックアウトマウスの解析により証明してきた。これらは、面白いことに、どちらも胎盤機能に関係していた。今回は、これらの遺伝子と相同性を有する哺乳類特異的に存在するレトロトランスポゾン由来の遺伝子という観点のみで選択した *Sirh7* 遺伝子についての機能解析を行った。その結果、*Sirh7* 遺伝子も実際に胎盤構造形成に関わり、哺乳類の個体発生に必須な機能を果たしていることを明らかにした。

これら一連の研究により、哺乳類特異的臓器である胎盤の構造形成・機能獲得に、哺乳類ゲノムに新たに挿入されたレトロトランスポゾンが関わっていた」という新しい概念の構築に大きく貢献するものと考えられる。

今後の展望

哺乳類特異的に存在する sushi-ichi レトロトランスポゾン由来の遺伝子は全部で 11 個存在し、これまで解析した 3 つの遺伝子はすべて胎盤形成の異なる段階で機能する必須遺伝子であった。残る遺伝子は、胎盤形成以外にも哺乳類特異的な機能もつ可能性が

高く、レトロトランスポゾンによる哺乳類進化の多様な例を示すことができることが期待される。

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 8 件)

1. Shiura, H, Nakamura, K, Hikichi, T, Hino, T, Oda, K, Suzuki-Migishima, R, Kohda, T, Kaneko-Ishino, T and Ishino, F. Paternal deletion of *Meg1/Grb10* DMR causes maternalization of the *Meg1/Grb10* cluster in mouse proximal Chromosome 11 leading to severe pre- and postnatal growth retardation. *Hum. Mol. Genet.* **18**(8), 1424-1438 (2009).
2. Yamamoto, Y, Ishino, F., Kaneko-Ishino, T., Shiura, H, Uchio-Yamada, K, Matsuda, J, Suzuki, O and Sato, K. Type 2 diabetes mellitus in a non-obese mouse model induced by *Meg1/Grb10* overexpression. *Exp. Animals* **57**(4), 385-395 (2008).
3. Sekita, Y, Wagatsuma, H, Nakamura, K, Ono, R, Kagami, M, Wakisaka-Saito, N, Hino, T, Suzuki-Migishima, R, Kohda, T, Ogura, A, Ogata, T, Yokoyama, M, Kaneko-Ishino, T and Ishino, F. Role of retrotransposon-derived imprinted gene, *Rtl1*, in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nat. Genet.* **40**(2), 243-248 (2008).
4. Suzuki, S, Ono, R, Narita, T, Pask, A J, Shaw, G, Wang, C, Kohda, T, Alsop, A E, Graves, J A M, Kohara, Y, Ishino, F., Renfree, M B, and Kaneko-Ishino, T. Retrotransposon Silencing by DNA Methylation Can Drive Mammalian Genomic Imprinting. *PLoS Genetics* **3**, e55 (2007).
5. Wakisaka-Saito, N., Kohda, T, Inoue, K, Ogonuki, N, Miki, H, Hichiki, T, Mizutani, E, Wakayama T, Kaneko-Ishino, T. Ogura, A and Ishino, F. Chorioallantoic placenta defects in cloned mice. *Biochem. Biophys. Res. Commn.* **349** (1), 106-114 (2006).
6. Kaneko-Ishino, T., Kohda, T, Ono, R and Ishino, F. Complementation hypothesis: the necessity of a monoallelic gene expression mechanism in mammalian development. *Cytogenet. Genome Res.* **113**(1-4), 24-30 (2006).
7. Sekita, Y, Wagatsuma, H, Irie, M, Kobayashi, S, Kohda, T, Matsuda, J, Yokoyama M, Ogura, A, Schuster-Gossler, K. Gossler, A, Ishino, F and Kaneko-Ishino, K. Aberrant regulation of imprinted gene expression in *Gtl2^{lacZ}* mice. *Cytogenet. Genome Res.* **113**(1-4), 223-229 (2006).

8. Ono, R, Nakamura, K, Inoue, K, Naruse, M, Usami, T, Wakisaka-Saito, N, Hino, T, Suzuki-Migishima, R, Ogonuki, N, Miki, H., Kohda, T, Ogura, A, Yokoyama, M, Kaneko-Ishino, T and Ishino, F. Deletion of *Peg10*, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat. Genet.* **38**(1), 101-106 (2006).

[学会発表] (計 53 件)

1. Ishino, F., Ono, R, Sekita, Y, Suzuki, S, Naruse, M, Kohda T, Ogura, A, Nakamura, K, Yokoyama, M, Renfree, M and Kaneko-Ishino, T. Mammalian-specific genes derived from retrotransposons functioning placenta formation. The 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Workshop: Integrative approaches towards evolutionary studies. Dec 9-12, 2009 (Pacifico Yokohama, Yokohama).
2. 石野史敏、金児-石野知子 ゲノムインプリンティングの起源 -そのとき哺乳類ゲノムに何が起きたのか?- 第 82 回日本生化学会年会 シンポジウム トランスポゾンとの共生が織りなすゲノムシステムのダイナミクス 平成 21 年 10 月 14 日 (神戸国際会議場、神戸)。
3. Ishino, F, Ono, R, Suzuki, S, Sekita, Y, Naruse, M, Kohda T and Kaneko-Ishino, T. Contribution of Retrotransposons to the Evolution of Genomic Imprinting and Placentation in Mammals. The 24th NAITO Conference on Nuclear Dynamics and RNA (II), Jun 23-26, 2009 (Chateraise Gateaux Kingdom, Sapporo, Hokkaido).
4. Ishino, F., Ono, R, Suzuki, R, Sekita, Y, Naruse, M, Kohda, T and Kaneko-Ishino, T. Retrotransposons and Evolution of Genomic Imprinting and Placentation in Mammals. Symposium: Epigenetic impacts for differentiation and patterning. The 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. May 28-31, 2009 (Toki Messe, Niigata).
5. 石野史敏、金児-石野知子 レトロトランスポゾンはどうのように哺乳類の進化に関わったか? -その Genetic な役割と Epigenetic な役割について- 第 56 回日本実験動物学会シンポジウム 哺乳動物の発生と進化におけるエピジェネティクスの役割 平成 21 年 5 月 14 日 (大宮ソニックシティ、大宮)。
6. 金児-石野知子 Epigenetics 研究の topics -哺乳類特異的ゲノム機構とレトロトランスポゾン- 第 50 回 日本哺乳動物卵子学会 シンポジウム 生殖に関わる epigenetics の基礎と臨床 平成 21 年 5 月 9 日 (都市

- センターホテル、東京)。
7. 石野史敏、小野竜一、関田洋一、鈴木俊介、金児-石野知子 哺乳類に特異的に存在するレトロトランスポゾン由来の遺伝子と胎盤形成 第147回日本獣医学会学術集会ワークショップ レトロエレメントのダイナミズム 平成21年4月2日(栃木県総合文化センター、宇都宮)。
 8. Ishino, F., Ono, R, Suzuki, S, Sekita, Y, Naruse, M, Kohda, T and Kaneko-Ishino, T. Contribution of retrotransposons to the evolution of genomic imprinting and placentation in mammals. International Symposium on Decoding Epigenetic Code. Dec 15-16, 2008 (Tokyo University, Tokyo).
 9. 金児-石野知子、関田洋一、遠藤大輔、鏡雅代、小野竜一、幸田尚、緒方勤、石野史敏 個体発生に必須な機能をはたすアンチセンスRNA: RNAi 機構を介したアンチセンスRNAによる *Peg11/Rtl1* 遺伝子の発現制御 BMB2008 平成20年12月9日-12日(神戸国際会議場)。
 10. 石野史敏、小野竜一、関田洋一、鈴木俊介、成瀬美衣、入江将仁、幸田尚、横山峯介、中村健司、金児-石野知子 哺乳類特異的なレトロトランスポゾンによる哺乳類の胎生進化 シンポジウム“哺乳類成立の為の分子基盤” BMB2008 平成20年12月9日-12日(神戸国際会議場)。
 11. Ishino, F. Ono, R, Suzuki, S, Sekita, Y, Naruse, M, Kohda, T and Kaneko-Ishino, T. Evolution of placentation in eutherian mammals contributed by exaptation of *PEG10* and *PEG11/RTL1* from retrotransposons. The 8th NIBB-EMBL Joint Meeting “Evolution: Genomes, Cell Types and Shapes”, Nov 21-23, 2008 (Okazaki Conference Center, Okazaki).
 12. Kaneko-Ishino, T. Suzuki, S, Pask, A, Shaw, G, Kohda, T, Graves, J, Renfree, M and Ishino, F. Origins of retrotransposon-derived *PEG10* and imprinted regulation by DNA methylation. EMBO Workshop on Genomic Imprinting, Sep 21-24, 2008 (TEMASEK LifeScience Laboratory, Singapore).
 13. Ono, R, Naruse, M, Nakamura, K, Hino, T, Suzuki-Migisima, R, Usami, T, Cross, J C, Kaneko-Ishino T and Ishino, F. Phenotypic analysis of *Peg10* KO mouse placenta. European Placenta Group Meeting 14th IFPA Conference, International Federation of Placenta Association, Sep 10-13, 2008 (Seggau Castle, Austria).
 14. Ishino, F. Ono, R, Suzuki, S, Kohda, T and Kaneko-Ishino, T. Evolution of genomic imprinting and placentation in mammals by retrotransposons. The 6th NIBB-EMBL Joint Meeting “Evolution of Epigenetic Regulation” Mar 17-19, 2008 (EMBL Heidelberg, Germany).
 15. 金児-石野知子、鈴木俊介、小野竜一、幸田尚、小原雄治、Marilyn Renfree、石野史敏 レトロトランスポゾンによるゲノムインプリンティング領域の成立 シンポジウム 哺乳類の発生システムとエピゲノム BMN2007 平成19年12月12日(パシフィコ横浜、横浜)。
 16. 石野史敏、鈴木俊介、小野竜一、幸田尚、小原雄治、Jeniffer Graves、Marilyn Renfree、金児-石野知子 レトロトランスポゾン挿入による新規インプリント領域の成立 平成19年度文部科学省科学研究費補助金・特定領域「生殖細胞の発生プロセス・再プログラム化とエピジェネティクス」公開シンポジウム 平成19年11月21日-22日(コクヨホール、品川)。
 17. Ishino, F. Ono, R, Sekita, Y, Suzuki, S and Kaneko-Ishino, T. Essential roles of retrotransposon-derived imprinted genes, *Peg10* and *Peg11/Rtl1*, in mammalian placenta development and evolution. The 14th World Congress on Gestational Trophoblastic Disease. Nov 12, 2007 (Fukuoka) .
 18. Ishino, F. Ono, R, Suzuki, S and Kaneko-Ishino, T. Role of *PEG10* in mammalian placenta development and evolution, The 34th Fetal and Neonatal Physiological Society Annual Meeting Aug 29, 2007 (Sendai).
 19. 金児-石野知子、鈴木俊介、小野竜一、幸田尚、小原雄治、Marilyn Renfree、石野史敏 ゲノムインプリンティング領域の成立とレトロトランスポゾン トピック講演 日本エピジェネティクス研究会 平成19年6月15日-16日(大阪大学、大阪)。
 20. 石野史敏、小野竜一、関田洋一、鈴木俊介、成瀬美衣、幸田尚、金児-石野知子 哺乳類の生殖機構に必須の機能をもつレトロトランスポゾン由来の哺乳類特異的遺伝子群について 平成18年度文部科学省科学研究費補助金・特定領域公開シンポジウム 平成18年12月15-16日(東京大学)。
 21. 石野史敏、小野竜一、鈴木俊介、関田洋一、成瀬美衣、幸田尚、成田貴則、Anderw Pask, 小原雄治、Marilyn Renfree、金児-石野知子 個体発生に必須のレトロトランスポゾン由来の遺伝子群 日本分子生物学会 2006 フォーラム シンポジウム“動く遺伝子: ゲノム多様化と新規機能獲得へのインパクト” 平成18年12月6日(名古屋国際会議場、名古屋)。
 22. Sekita, Y, Wagatsuma, H, Nakaura, K, Ono, R, Hino, T, Suzuki-Migishima, R, Kohda, T, Ogura, A, Yokoyama, M, Kaneko-Ishino, T and Ishino, F. Role of Retrotransposon-derived

- imprinted gene, *Peg11/Rtl1*, in mouse placenta. International Genomic Imprinting Workshop 2006, Nov 30-Dec 1, 2006 (Tokyo Medical and Dental University, Tokyo).
23. Ono, R, Naruse, M, Sekita, Y, Usami, T, Kohda, T, Kaneko-Ishino, T and Ishino, F. Retrotransposons and the evolution of mammalian viviparity. International Genomic Imprinting Workshop 2006, Nov 30-Dec 1, 2006 (Tokyo Medical and Dental University, Tokyo).
 24. Ishino, F, Ono, R, Sekita, Y, Suzuki, S, Naruse, M, Kohda, T and Kaneko-Ishino, T. Retrotransposon-derived genes essential for development. The 5th Surugadai Symposium "Genomics and Epigenetics of Human Diseases and Mammalian Development" Nov 29, 2006 (Tokyo Medical and Dental University, Tokyo).
 25. Sekita, Y, Wagatsuma, H, Ono, R, Kohda, T, Hino, T, Migishima, R, Nakamura, K, Yokoyama, M, Ogura, A, Kaneko-Ishino T, and Ishino F. Analysis of the retrotransposon-derived imprinted gene *Peg11/Rtl1* Joint Cold Spring Harbor Laboratory/Wellcome Trust 2006 Conference GENOME INFORMATICS, Sep 13-17, 2006 (Hinxton, UK).
 26. Suzuki, S, Ono, R, Narita, T, Pask, A J, Shaw, G, Wang, C, Kohda, T, Alsop, A E, Graves, J A M, Kohara, Y, Ishino, F, Renfree, M B and Kaneko-Ishino, T. Characterization of retrotransposon-derived *PEG10* in a marsupial, the tamer wallaby. Mouse Molecular Genetics, Aug 30-Sep 3, 2006 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York).
- 他 27 件

[図書] (計 18 件)

1. 金児-石野知子, 石野史敏 哺乳類における胎生の進化とレトロトランスポゾン 特集 genetics/epigenetics から見えてきたゲノム機能の進化 実験医学 27(19) 3080-3086 (2009).
2. 金児-石野知子, 石野史敏 哺乳類の原点? カモノハシ 哺乳類のゲノム機能の進化を探る 蛋白質・核酸・酵素 54(1), 58-64 (2009).
3. 金児-石野知子, 石野史敏 ゲノムインプリンティングと進化 蛋白質・核酸・酵素 53(7), 836-843 (2008).
4. 関田洋一, 金児-石野知子, 石野史敏 レトロトランスポゾン由来の印譜リンティング遺伝子 *Peg11/Rtl1* は胎盤の母子間相互作用部位で必須機能を果たしている細胞工学 27(3), 256-257 (2008).
5. 金児-石野知子, 鈴木俊介, 小野竜一, 石野史敏 哺乳類の胎生機構とゲノムイン

プリンティング機構の起源: レトロトランスポゾン由来の遺伝子 *PEG10* の解析から見えてきたもの 特集生殖細胞の発生・エピジェネティクスと再プログラム化 蛋白質・核酸・酵素 52(16), 2149-2156 (2007).

6. 鈴木俊介, 小野竜一, 石野史敏, 金児-石野知子 レトロトランスポゾンの挿入と哺乳類ゲノムインプリンティングの成立 特集ゲノム上を“動く遺伝子”トランスポゾン 実験医学 25(16), 2478-2484 (2007).
 7. 金児-石野知子, 小野竜一, 石野史敏 レトロトランスポゾンと哺乳類進化 科学 77(1), 87-92 (2007).
 8. 幸田尚, 金児-石野知子, 石野史敏 体細胞クローンとエピジェネティクス ゲノムワイドに展開するエピジェネティクス医学 実験医学増刊 24(8), 152-157 (2006).
 9. 石野史敏, 金児-石野知子 ゲノムインプリンティング 新編 精子学 (毛利秀雄・星元紀監修) 1 1 章 東京大学出版会 pp.231-248 (2006).
 10. 石野史敏, 金児-石野知子 ゲノムインプリンティング 再生医療のための分子生物学 再生医療の基礎シリーズ3 (仲野徹編) コロナ社 pp.52-65 (2006).
- 他 8 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石野 (金児) 知子 (Tomoko Kaneko-Ishino)
東海大学・健康科学部・教授
研究者番号: 20221757

(2) 研究分担者

石野 史敏 (Fumitoshi Ishino)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号: 60159754

(3) 連携研究者

なし