

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2006～2010

課題番号：18GS0315

研究課題名（和文） ゲノム刷込みに関連する哺乳類特異的遺伝子群の個体発生・系統発生における役割

研究課題名（英文）

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

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：哺乳類進化、ゲノム機能、ゲノムインプリンティング、レトロトランスポゾン、個体発生、系統発生、胎盤形成、胎生

1. 研究計画の概要

現在の哺乳類のもつ胎生という生殖様式やゲノムインプリンティングというエピジェネティック機構などに代表される哺乳類に特徴的な個体発生システムは、生物進化上どのように形成されたのであろうか？本研究プロジェクトは、この系統発生学上の謎を、主として哺乳類ゲノムに保存される 11 個の *sushi-ichi* レトロトランスポゾン由来の遺伝子群の機能と起源の解析というゲノム科学的アプローチから解明することを目的としている。

具体的な研究目標としては、1) レトロトランスポゾン由来の 11 個の遺伝子それぞれのノックアウトマウス解析による機能の解明、2) 哺乳類を構成する 3 つのグループ（単孔類、有袋類、真獣類）における比較ゲノム解析、DNA メチル化解析およびゲノムインプリンティング解析による、これら遺伝子の起源およびゲノムインプリンティング機構の起源の解明 3) レトロトランスポゾンから内在性遺伝子への遺伝子・タンパク質レベルでの進化の解明を考えている。

これらのレトロトランスポゾン由来の遺伝子群の機能については、例えば、すでに明らかにしたように *Peg10* や *Peg11/Rt11* の胎盤形成・胎盤機能維持に関わる機能のように、何らかの哺乳類特異的な機能を想定している。胎盤の形成・維持に関しては、これに関係した遺伝子の獲得と胎生の起源の関係を明らかにしたい。また、この解析をとおして、胎盤以外の哺乳類特異的な機能にも迫りたい。

ゲノムインプリンティングや X 染色体不活

性化などの哺乳類特異的なエピジェネティック機構の起源は、「哺乳類が DNA メチル化をどのように利用してきたか」に大きく関係していると考えている。哺乳類のゲノムの半分がレトロトランスポゾン由来の配列の残骸で埋め尽くされているという事実とあわせて、このような観点からレトロトランスポゾン挿入とエピジェネティック機構の成立について考えてみたい。

レトロトランスポゾン由来の遺伝子の産物が新しい機能をもつに至った、その経緯と現状を明らかにするため、遺伝子機能の解明に加えて、これらタンパク質の結晶化による構造解析からのアプローチも進めたいと考えている。

2. 研究の進捗状況

Peg10 と *Peg11/Rt11* に加えて、新規遺伝子 3 つに関してはノックアウトマウスが完成し、表現型の解析を進めている。これにより、新たに胎盤構造の形成に重要な遺伝子を同定できた（発表準備中）。これは哺乳類の胎盤形成に *sushi-ichi* レトロトランスポゾン由来の遺伝子が大きく関与したという新たな証拠であると考えている。また、5 つの遺伝子については、現在ノックアウトマウスが製作中であり、これらも完成し次第、解析に入る予定である。胎盤での発現が少ない遺伝子についても解析を進めており、これらがどのような機能をもつか期待をもって研究を進めている。

Peg11/Rt11 に関しては、欠失だけでなく過剰発現が新生児致死を引き起こすことを新

たに発見した (Nat Genet 2008a)。すなわち、マウス 12 番染色体遠位部およびヒトの相同部位である染色体 14 番の母親性・父親性二倍体による重篤な表現型は、それぞれ *Peg11/Rtl1* の欠失と過剰発現によることが証明できた (Nat Genet 2008a and 2008b)。これはレトロトランスポゾン由来の遺伝子が、個体発生に関する重要な機能を通じて、ヒト疾患にも関係していることを明らかにしたものである。

ゲノムインプリンティングの起源とレトロトランスポゾンの関係については、*PEG10* についての単孔類、有袋類、真獣類の比較ゲノム解析と DNA メチル化解析、インプリンティング解析を進めた。その結果、この遺伝子の元となったレトロトランスポゾンが有袋類と真獣類の共通祖先に挿入されたこと、および、このレトロトランスポゾンの挿入が、この領域のゲノムインプリンティング制御のきっかけになったことを示す強い証拠を得ることができた (PLoS Genet 2007)。これは、インプリント領域の成立の機構を考える上で画期的な発見であり、世界で初めての明確な証拠であると考えている。この私たちの論文以降、他の研究者からのインプリント遺伝子の比較ゲノム解析研究も報告され、われわれが *PEG10* で示したように、ゲノムインプリンティング領域には、何らかの新規 DNA 配列の挿入が関係していたことが明らかになってきている。

3. 現在までの達成度

[2]: おおむね順調に進展している。

ノックアウトマウスの作製は、上記のようにほぼ順調に進んでおり、胎盤形成以外にも新たな機能がないかどうか期待をもって解析を進めている。しかし、現在、作成中のものの中には、予想外のことに、ES 細胞の段階で成長が非常に悪くなるものがある。これについては、新たにコンディショナル KO としてコンストラクトを作り直している。

胎盤形成に必須の *PEG10* 遺伝子の比較ゲノム解析により、レトロトランスポゾンとゲノムインプリンティングの起源、レトロトランスポゾンと哺乳類の胎生の起源に関する大きな知見が得られた。これについては期待以上の成果であると考えている。

タンパク質結晶化によるタンパク質構造進化のアプローチとして、*Peg10* タンパク質の結晶化を進めてきた。しかし、これも予想に反して、高濃度にタンパク質を精製すると、もともとのレトロトランスポゾン Gag タンパク質の性質が強くあらわれ、大きな会合体を形成してしまうことがわかった。対象としているすべての遺伝子は Gag に由来するタンパク質をコードするため、タンパク質結晶化というアプローチには不向きなタンパク質群

である可能性が高くなった。

4. 今後の研究の推進方策

1) 現在、まだノックアウトマウスの作製が進んでいない遺伝子のほとんどは、遺伝子が 1 つの大きなエクソンからなるため、両側に loxP を挿入したコンディショナル KO のコンストラクトを作製するにはサイズが大きすぎるものである。そのため、一部の遺伝子では完全欠失させたコンストラクトを試したが、組換え ES 細胞の分離の段階で増殖不良という表現型が出てしまった。これ自体、非常に興味深いことであるが、KO マウス作製には障害となっている。コンディショナル KO によりタンパク質コーディングフレームを完全に欠失させるためには、前後二カ所の遺伝子ターゲティングが必要となり、KO マウスの完成までに最低 3 年はかかることが予想される。これらの遺伝子については、一つ一つにコンストラクトに工夫をこらすことで、ノックアウトマウスとしての解析を可能にすることを考えている。

2) レトロトランスポゾンとゲノムインプリンティングの起源に関する非常に大きい手がかりが得られた。これをもとにしてインプリント領域成立の必要十分条件を見つけるための実験 (人工インプリント領域作製実験) へとつなげたいと考えている。また、X 染色体不活性化との関連性についての手がかりを得られるよう努力する。

3) タンパク質結晶化によるタンパク質構造進化のアプローチは、レトロトランスポゾン Gag タンパク質の性質に大きく影響され難しい (Gag 自体も完全な結晶化はできていない) と考えられる。結晶化のアプローチ自体に新たな工夫が必要であるため、これは本計画からは切り離し、生化学的アプローチや細胞生物学的アプローチへの方向転換を行なう。

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 23 件)

- 1) Shiura, H., Nakamura, K., Hikichi, T., Hino, T., Oda, K., Suzuki-Migishima, R., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., 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.** in press. 査読有
- 2) Wakisaka, N., Ogonuki, N., Miki, Y., Sekita, Y., Hanaki, K., Aikatsuka, A., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F., and Ogura, A. Ultrastructure of placental hyperplasia in mice: Comparison of

- placental phenotypes with three different etiologies. **Placenta** 29(8), 753-759 (2008). 査読有
- 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). 査読有
- 4) Kagami, M., Sekita, Y., Nishimura, G., Irie, M., Kato, F., Okada, M., Yamamori, S., Kishimoto, H., Nakayama, M., Tanaka, Y., Matsuoka, K., Takahashi, T., Noguchi, M., Tanaka, Y., Masumoto, K., Utsunomiya, T., Kouzan, H., Komatsu, Y., Ohashi, H., Kurosawa, K., Kosak, K., Ferguson-Smith, A. C., Ishino F. and Ogata, T. Deletions and epimutations affecting the human chromosome 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. **Nat. Genet.** 40(2), 237-242 (2008). 査読有
- 5) 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., Kaneko-Ishino, T. Retrotransposon Silencing by DNA Methylation Can Drive Mammalian Genomic Imprinting. **PLoS Genetics** 3, e55 (2007). 査読有

〔学会発表〕(計 63 件)

- 1) 石野史敏、小野童二、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(神戸ポートアイランド、神戸)。
- 2) Fumitoshi Ishino, Ryuichi Ono, Sunsuke Suzuki, Yoichi Sekita, Mie Naruse, Takashi Kohda and Tomoko Kaneko-Ishino. Evolution of placenta-tion in eutherian mammals contributed by exaptation of *PEG10* and *PEG11/RTL1* from retro-transposons. 8th NIBB-EMBL Joint Meeting “Evolution:Genomes, Cell Types and Shapes” November 21-23 2008 (Okazaki Conference Center,

Okazaki).

- 3) Yochi Sekita, Masayo Kagami, Daisuke Endo, Ryuichi Ono, Takashi Kohda, Tsutomu Ogata, Tomoko Kaneko-Ishino and Fumitoshi Ishino. Roles of *Peg11/Rtl1* in neo- and postnatal growth. EMBO Workshop on Genomic Imprinting September 21-24 2008 (TEMASEK LifeScience Laboratory, Singapore).
- 4) Fumitoshi Ishino, Ryuichi Ono, Sunsuke Suzuki, Takashi Kohda and Tomoko Kaneko-Ishino. Evolution of genomic imprinting and placentation in mammals by retrotransposons. 6th NIBB-EMBL Joint Meeting “Evolution of Epigenetic Regulation” March 17-19 2008 (EMBL Heidelberg, Germany).
- 5) 金児-石野 知子、鈴木 俊介、小野 童二、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(横浜、パシフィコ横浜)。

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 石野史敏 エピジェネティクス ベーシックマスター発生生物学 (東中川徹・八杉貞雄・西駕秀俊 共編) 12章 オーム社 pp.273-289 (2008).

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

- 朝日新聞：2007年7月6日「「刷り込み」の起源 DNA断片が関係？」、2008年1月7日「「スシイチ」胎盤成長に大事」
- 読売新聞：2008年1月7日「胎盤働かず遺伝子発見」
- 毎日新聞：2008年1月13日「胎児毛細血管維持に必要な遺伝子発見」
- 共同通信配信で2008年1月13日に京都新聞、神戸新聞、山形新聞、茨城新聞、東奥日報、河北新報で「胎盤遺伝子はウイルス由来」「胎盤はウイルス由来」等
- NHK：2009年1月18日「女と男-最新科学が読み解く性-」第3回 男が消える？人類も消える？の番組制作協力者
- ホームページ：http://www.tmd.ac.jp/mri/epgn/index.htm