

機関番号：12602

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) Role of mammalian-specific genes related to genomic imprinting in mammalian development and evolution

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

研究成果の概要(和文): 現在の哺乳類の個体発生システムのなかで、哺乳類としての特徴を作り出すために機能した遺伝子をどのように同定するかという研究課題に対し、レトロトランスポゾンに由来するため哺乳類にのみ存在する遺伝子群を系統的に解析した。ノックアウトマウス作成による機能解析を行ない、これらの遺伝子が、哺乳類を特徴付ける胎生機構にかかわる胎盤形成、着床、妊娠継続等に関係する機能を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文):

Sushi-ichi retrotransposon-derived genes (*Sirh* family genes) are mammalian-specific genes. Among them, we have previously reported that *Peg10* and *Peg11/Rtl1* play essential roles in placenta formation and function. In this project, we have produced knockout mice of each gene and demonstrated that *Sirh7* has mammalian-specific functions concerning implantation and pregnancy as well as placenta formation. Our systematic analysis suggests that other *Sirh* genes also have such functions.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	79,500,000	23,850,000	103,350,000
2007年度	64,700,000	19,410,000	84,110,000
2008年度	59,800,000	17,940,000	77,740,000
2009年度	57,200,000	17,160,000	74,360,000
2010年度	58,100,000	17,430,000	75,530,000
総計	319,300,000	95,790,000	415,090,000

研究分野：複合新領域

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：ゲノム機能、哺乳類、胎生、レトロトランスポゾン、発生と進化

1. 研究開始当初の背景

本申請は、申請者の「ゲノムインプリンティングの生物学的意義の解明」に関する研究の成果に基づいて提案したものである。ゲノムインプリンティングは哺乳類特異的な遺伝子発現調節機構であり、その生物学的意味を解明するために、申請者はインプリンティングで制御される遺伝子群の機能解析を進めて来た。特に、胎児期で致死性を示すインプリンティング遺伝子について重点的に解析を行った。その結果、*Peg10* および

Peg11/Rtl1 が、それぞれ初期胚致死性、胎児期後期致死性を示すインプリンティング領域の原因遺伝子であることを明らかにした。

大変おもしろいことに、この2つの遺伝子は、相同性解析の結果、Sushi-ichi レトロトランスポゾンに由来する遺伝子であり、哺乳類特異的に存在する遺伝子であった。*Peg10* および *Peg11/Rtl1* の機能解析の結果、これらは哺乳類の胎生という生殖機構の成立に重要な、胎盤という臓器の形成と機能維持に働いていることが明らかになり、「哺乳類特

異的遺伝子による哺乳類特異的ゲノム機能」という新しい概念を提出することに至った。しかも、これらがレトロトランスポゾンに由来することから、哺乳類の進化におけるレトロトランスポゾンの重要性も明らかにすることができた。

その後のゲノム解析により、哺乳類には Sushi-ichi レトロトランスポゾンに由来する遺伝子が *Peg10*, *Peg11/Rtl1* を含めて 11 個存在することが明らかとなり、これらにも、哺乳類特異的機能があるのか？どのような機能をもつのかを明らかにすることにより、哺乳類をより深く理解することができると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 哺乳類に特異的に存在する、Sushi-ichi レトロトランスポゾンに由来する 11 個の *Sirh* 遺伝子 (Sushi-ichi retrotransposon homologues) が、どのような生物学的機能を持ち、哺乳類の個体発生に重要性をもつのかを明らかにすること。

(2) 哺乳類特異的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成立機構の解明である。これは染色体の十数カ所にあるインプリンティング領域においてゲノムインプリンティング制御に重要な機能をはたす DMR (Differentially methylated regions) の由来を、進化に伴うゲノム構造の変化の立場から明らかにすることにある。

申請者らは、*Peg10*, *Peg11/Rtl1* を *Sirh1*, *Sirh2*, 残る 9 遺伝子を *Sirh3~Sirh11* と命名したが、面白いことに、*Sirh4~Sirh11* の 8 つの遺伝子は、X 染色体上に存在している。オスには 1 本メスには 2 本の X 染色体が存在するが、うち 1 本は不活性化されるため、これらの遺伝子群もインプリント遺伝子である *Peg10* および *Peg11/Rtl1* と同様、片親性発現遺伝子である。X 染色体不活性化も哺乳類特異的エピジェネティック機構であり、ゲノムインプリンティング機構と共進化した可能性が指摘されている。このプロジェクトを通して、X 染色体不活性化機構とゲノムインプリンティング機構の関連性、*Sirh* 遺伝子群の X 染色体不活性化における意味の解明につなげることでできる何らかの鍵を見いだせるか？ということも重要な問題であると考えている。

3. 研究の方法

(1) *Sirh3~Sirh11* 遺伝子に関して、それぞれノックアウトマウスを解析することにより、生物学的な機能を解明する。*Peg10* に関しては胎児と胎盤での機能をそれぞれ解析するためのコンディショナルノックアウトマウスの作成を行なう。

(2) 哺乳類には、卵生の単孔類、胎生の有袋

類および真獣類の 3 つのグループが存在している。これらと他の脊椎動物 (鳥類、魚類など) のゲノム配列を比較することにより、*Sirh* 遺伝子群が、生物進化上、いつ獲得されたのかを明らかにする。

(3) 同様の方法で、ヒトやマウスなど真獣類のゲノムインプリンティング領域に存在する制禦配列である DMR が、ゲノム構造上でいつ生じているのかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) *Sirh3*, *Sirh4*, *Sirh7*, *Sirh11* のノックアウトマウスは完成し、順次、機能解析を進めている。*Sirh5*, *Sirh6* については、KO のためのコンストラクトが完成し ES 細胞の作製中、*Sirh8*, *Sirh9*, *Sirh10* については、ゲノム構造上、ターゲティングには色々な工夫が必要であり、方法論の改善を試している。

(2) *Sirh7* は着床前の胚から胎盤系列の細胞で高発現が見られる。予想通り、これをノックアウトした場合、胎盤に見られるラビリス / スポンジオトロホプラスト / 脱落膜の 3 層構造が大きく乱れ、特にスポンジオトロホプラスト層が、ラビリス層に大きく入り込んでいた。これによって、*Sirh7* もまた、*Peg10*, *Peg11/Rtl1* と同様、胎盤形成に重要な機能をはたす、哺乳類特異的遺伝子であることを明らかにすることができた (図 1: 発表準備中)。



図 1 *Sirh7* KO の胎盤の 3 層構造の乱れ

(3) メスの *Sirh7* ホモ KO では、妊娠した場合、子宮内での着床に乱れが生じ、胚ごとに成育段階のズレが生じていた (図 2: 発表準備中)。



図 2 *Sirh7* KO メス妊娠時における着床・妊娠の異常 (胎児期 9.5 日目) 同腹の子宮内の胎児の発生 (左が正常)

これは、メスの子宮の状態の異常であると考えられ、その原因を解析中であるが、*Sirh* 遺伝子群として、はじめて胎盤以外の機能、着床、妊娠という胎生機構に重要なステップにおける機能が存在することを明らかにしたものである。同様に、*Sirh3*, *Sirh11* の解析からも、成体側における哺乳類特異的機能の存在を示唆する証拠を得ており (発表準備

中)、「レトロトランスポゾン由来の哺乳類特異的遺伝子による哺乳類特異的ゲノム機能の獲得」を示す、証拠を重ねていくことができると考えている。

(4) 哺乳類の3グループおよび他の脊椎動物の比較ゲノム解析の結果、*Peg10* は胎生の有袋類と真獣類に共通に存在し、胎盤を獲得した時期と一致することを明らかにした (Suzuki *et al.* PLoS Genet 2007)。一方で、*Peg11/Rt11* は英国とオーストラリアの研究者から、有袋類と真獣類の共通祖先にレトロトランスポソンの挿入は起きたが、内在遺伝子化は真獣類の系列だけでおき、有袋類ではレトロトランスポソンの残骸となっていることが報告された。*Peg11/Rt11* は真獣類型の胎盤での機能の重要性が明らかとなり、この遺伝子の獲得が、胎盤機能の差となり、有袋類と真獣類の胎生機構の違い(前者は、短い妊娠期間と長い授乳期間、後者は長い妊娠期間と短い授乳期間)の原因となった可能性を示唆することができた (Sekita *et al.* Nat Genet 2008)。

(5) その他の *Sirh* 遺伝子に関しては、これまで有袋類においてオーソログ遺伝子が発見されない。有袋類のオポッサムおよびワラビー(小型カンガルー)のゲノム配列には、まだ多くのギャップが残されている。ゲノム支援プロジェクトの支援をえて、*Sirh* 遺伝子と両隣の遺伝子間のギャップを埋める作業を進め、幾つかの遺伝子については、真獣類特異的遺伝子であることを確認した。おそらく、*Sirh3~Sirh11* は、有袋類と分岐した後、真獣類の系列のみで獲得された遺伝子群であると考えらる。

(6) 有袋類のゲノム解析からは、有袋類特異的な *Sirh12* 遺伝子の存在が明らかにできた。これはワラビーではタンパク質のコーディングを有しており、胎盤や内胚葉性組織で発現がみられる。しかし、オポッサムにおいては幾つもの変異により、すでに偽遺伝子となっている可能性が高い。これらの結果は、sushi-ichi レトロトランスポゾンに由来する遺伝子群は、卵生の単孔類から胎生の有袋類・真獣類が分岐するあたりの時期から、有袋類と真獣類がそれぞれ確立して行く時期において、ゲノム中に獲得された遺伝子であることが確実になった (Ono *et al.* DNA Res in press)。

(7) 真獣類におけるゲノムインプリンティング機構において DMR は、片親性発現の調節に必須の機能を果たしている。レトロトランスポゾン由来の *Peg10* は有袋類と真獣類の共通祖先において獲得され、有袋類においても真獣類同様、父親性発現をしている。この時、DMR も真獣類と保存された位置にあるが、この配列は、単孔類や鳥類には存在しないことから、DMR はこの領域がインプリンティング

制御を獲得した際に、同時に獲得された配列であることを明らかにした (Suzuki *et al.* PLoS Genet 2007)。これは、有袋類と真獣類に共通するはじめての DMR の同定であった。これに引き続き、英国とオーストラリアのグループが *Igf2-H19* 領域において *H19* DMR が、やはり有袋類と真獣類に共通に獲得された配列であり、共通したインプリント制御を行っていることを明らかにした。その他のインプリント領域でも、DMR は新たに獲得された DNA 配列に由来することが明らかになってきている。ゲノムインプリンティングの獲得は、哺乳類の進化上、ゲノム配列上の変化を伴って起きていることを示すことができた (Kaneko-Ishino and Ishino Develop Growth Differ 2010)。

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22件)

1. Ono R (15人中14番目と15番目、ダブル責任著者) Deletion of *Peg10*, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat Genet* **38**(1), 101-106 (2006).
2. Sekita Y (11人中10番目と11番目、ダブル責任著者) Aberrant regulation of imprinted gene expression in *Gtl2^{lacZ}* mice. *Cytogenet Genome Res* **113**(1-4), 223-229 (2006).
3. 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).
4. Kohda T, Ishino F, and Ogura A. Expression of imprinted genes in cloned mice. *Methods Mol Biol* **348**, 237-246 (2006).
5. Wakisaka-Saito N (11人中9番目と11番目、責任著者) Chorioallantoic placenta defects in cloned mice. *Biochem Biophys Res Commn* **349** (1), 106-114 (2006).
6. Anahara R (8人中6番目) Estrogen agonists, 17beta-estradiol, bisphenol A, and diethylstilbestrol, decrease cortactin expression in

- the mouse testis. Arch Histol Cyto **169**(2), 101-107 (2006).
7. Anahara R. (8人中6番目) Anti-estrogen ICI 182.780 and anti-androgen flutamide induce tyrosine phosphorylation of cortactin in the ectoplasmic specialization between the Sertoli cell and spermatids in the mouse testis. Biochem Biophys Res Commun **346**(1), 276-280 (2006).
 8. Anahara R (8人中6番目) Flutamide depresses expression of cortactin in the ectoplasmic specialization between the Sertoli cells and spermatids in the mouse testis. Food Chem Toxicol **44**(7), 1050-1056, 2006.
 9. Kamei Y (8人中4番目) .*Peg1/Mest* in obese adipose tissue is expressed from the paternal allele in an isoform-specific manner. FEBS Lett. **581**(1), 91-96. (2007).
 10. Suzuki S (13人中11番目と13番目、責任著者) Retrotransposon Silencing by DNA Methylation Can Drive Mammalian Genomic Imprinting. PLoS Genetics **3**, e55 (2007).
 10. Ager E (6人中5番目). Insulin is imprinted in the placenta of the marsupial, *Macropus eugenii*. Dev Biol **309**(2), 317-328 (2007).
 11. Kagami M et al. (24人中23番目. 責任著者) 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).
 12. Sekita Y, et al. (14人中13番目と14番目. 責任著者) Role of retrotransposon-derived imprinted gene, *Rtl1*, in the feto-maternal interface of mouse placenta. Nat Genet **40**(2), 243-248 (2008).
 13. Hikichi T, et al. (5人中4番目) Nuclear transfer alters the DNA methylation status of specific genes in fertilized and parthenogenetically activated mouse embryonic stem cells. Stem Cells. **26**(3), 783-788 (2008).
 14. Yamamoto Y et al., (8人中2番目と3番目) Type 2 diabetes mellitus in a non- obese mouse model induced by *Meg1/Grb10* overexpression. Exp Animals **57**(4), 385-395 (2008).
 15. Wakisaka N (9人中7番目と8番目) Ultrastructure of placental hyper- plasia in mice: Comparison of placental phenotypes with three different etiologies. Placenta **29**(8), 753-759 (2008).
 16. Miki H (12人中11番目) Efficient production of androgenetic embryos by round spermatid injection. Genesis **47**(3), 155-160 (2009).
 17. Shiura H (9人中9番目と10番目. 責任著者) 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).
 18. Sato N (22人中10番目) Spinocerebellar Ataxia Type 31 Is Associated with ‘‘Inserted’’ Penta-Nucleotide Repeats Containing (TGGAA)_n. Am J Hum Genet **85**(5), 544-557 (2009).
 19. Kobayashi S (7人中6番目). The X-linked imprinted gene family *Fthl17* shows predominantly female expression following the two-cell stage in mouse embryos. Nuc Acids Res **38**(11), 3672-3681 (2010). June
 20. Kaneko-Ishino T and Ishino F. Retrotransposon silencing by DNA methylation contributed to the evolution of placentation and genomic imprinting in

- mammals. *Develop Growth Differ* **52**(6), 533-543 (2010).
21. Inoue K, (17人中15番目) Impeding *Xist* expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell cloning. *Science* **330**(6003), 496-499 (2010).
22. Ono R, (11人中10番目と11番目.責任著者) Identification of *SIRH12*, a retrotransposon-derived gene specific to marsupial mammals. *DNA Research* (in press).

〔学会発表〕(計 93 件)

- 1) 石野史敏 レトロトランスポゾンによる哺乳類特異的ゲノム機能の進化 第18回 高遠分子細胞生物学シンポジウム 平成18年8月24日(伊那)
- 2) 金児-石野 知子 (7人中1番目と7番目) 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)
- 3) Fumitoshi Ishino, Ryuichi Ono, Sunsuke Suzuki and Tomoko Kaneko-Ishino. Role of *PEG10* in mammalian placenta development and evolution, 34th Fetal and Neonatal Physiological Society Annual Meeting 平成19年8月29日 (Sendai).
- 4) 石野史敏 ゲノムインプリンティングからみた哺乳類の進化-生物進化におけるレトロトランスポゾンの役割- 基礎生物学研究所セミナー 平成19年9月11日(基礎生物学研究所、岡崎)
- 5) 石野史敏 ゲノムインプリンティングと成長発達 ランチョンセミナー 日本小児内分泌学会年会 平成19年11月8日(パシフィコ横浜、横浜)
- 6) Fumitoshi Ishino (5人中1番目と5番目). Essential roles of retrotransposon-derived imprinted genes, *Peg10 and Peg11/Rtl1*, in mammalian placenta development and evolution. 14th World Congress on Gestational Trophoblastic Disease 平成19年11月12日 (Fukuoka).
- 7) 石野史敏 ゲノムインプリンティングからみた哺乳類の進化 異分野関連セミナー 日本免疫学会年会 平成19年11月20日(高輪プリンス、品川)
- 8) Fumitoshi Ishino (5人中1番目と5番目) 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).
- 9) Tomoko Kaneko-Ishino, (7人中1番目と7番目) Origins of retrotransposon-derived *PEG10* and imprinted regulation by DNA methylation. EMBO Workshop on Genomic Imprinting September 21-24 2008 (TEMASEK LifeScience Laboratory, Singapore).
- 10) Fumitoshi Ishino, (7人中1番目と7番目) Evolution of placentation in eutherian mammals contributed by exaptation of *PEG10* and *PEG11/RTL1* from retrotransposons. 8th NIBB-EMBL Joint Meeting “Evolution: Genomes, Cell Types and Shapes” November 21-23 2008 (Okazaki Conference Center, Okazaki).
- 11) 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)
- 12) Fumitoshi Ishino (7人中1番目と7番目) 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).

- 13) Fumitoshi Ishino (7人中1番目と7番目)
Contribution of Retrotransposons to the Evolution of Genomic Imprinting and Placentation in Mammals The 24th NAITO Conference on Nuclear Dynamics and RNA (II) June 23-26, 2009 (Sapporo, Hokkaido).
- 14) 石野史敏 哺乳類の胎生獲得におけるレトロトランスポソンの寄与 京都大学ウイルス研究所学術講演会 平成21年7月10日 (芝蘭会館、京都大学)
- 15) Fumitoshi Ishino. Retorotransposons and trophoblast biology. Trophoblast Day Meeting. July 14-15, 2009 (Univ. Cambridge, UK).
- 16) Fumitoshi Ishino. Retorotransposon-derived imprinted genes, *Peg10* and *Peg11/Rtl1* and their relation to the origin of viviparity in mammals. From Imprinting to the Epigenome in 25 years. September 4-6, 2009 (Univ. Cambridge, UK).
- 17) 石野史敏、金児-石野知子 哺乳類における胎生の進化とレトロトランスポゾン 第19回三木成夫記念シンポジウム 平成22年7月21日 (鶴見大学講堂)
- 18) 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 第18回日本胎盤学会・第28回絨毛性疾患研究会 教育講演 平成22年10月1日 (ホテル日航熊本)
- 19) Fumitoshi Ishino, (7人中1番目と7番目)
Evolution of mammalian viviparity and genomic imprinting by retrotransposons. NAIST Global COE International Symposium 2010 Plasticity in Development and Evolution November 11-12, 2010 (NAIST Millennium Hall).
- 20) 石野史敏 ゲノムインプリンティング: ほ乳類におけるその生物学的意義 第21回フォーラム・イン・ドージン エピジェネティクスによる細胞のメタモルフォーゼ 平成22

年11月26日 (ホテルキャッスル熊本)
他73件

〔図書〕(計3件)

- 1) 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).
- 2) 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) 11章 東京大学出版会 pp.231-248 (2006).
- 3) 石野史敏 エピジェネティクス ベーシックマスター発生物学 (東中川徹 ほか編) 12章 オーム社 pp.273-289 (2008).

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: クローン動物の作出方法
発明者: 小倉淳郎、幸田尚、石野史敏他
権利者: 理化学研究所、東京医科歯科大学他
種類: 特許
番号: 特願 2010-197583
出願年月日: 2010年9月3日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/mri/epgn/index.html>

6. 研究組織

- (1) 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
 - (2) 研究分担者
金児-石野知子 (KANEKO-ISHINO TOMOKO)
東海大学・健康科学部・教授
研究者番号: 20221757
 - (3) 連携研究者
幸田尚 (KOHDA TAKASHI)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号: 60211893
- 連携研究者
小野竜一 (ONO Ryuichi)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号: 10401358