

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430183

研究課題名(和文) 父性発現インプリンティング遺伝子 Peg10 の機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of Peg10, a paternally expressed imprinted gene

研究代表者

小野 竜一 (Ono, Ryuichi)

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長

研究者番号：10401358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Peg10の詳細な機能解析の目的で CRISPR/Cas9 システムを用いて受精卵に DSB を導入し、変異マウスの作製を行った。その結果、およそ30%の個体で、レトロトランスポゾンなどの配列がDSB導入部位に挿入されることを発見した。他には、内在性の遺伝子配列のスプライス後の配列、すなわち、mRNA の逆転写産物が挿入していた。これらの結果より、申請者はマウス受精卵には豊富なレトロトランスポゾンの逆転写活性により多量の cDNA が存在する状態であり、受精卵における DSB 修復の際に microhomology を介して鋳型として働くことで DSB 部位に挿入されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have produced Peg10 mutant mice by introducing DSB using CRISPR/Cas9 system to analyze detailed function of Peg10. Then, we found that about 30 % of mutant mice had long de novo retrotransposon insertion(s) at DSB-introduced sites. In other cases, mutant mice had insertions from spliced mRNAs, indicating the involvement of reverse transcription (RT). In conclusion, RT-product, in the mouse zygote, were captured at DSB loci mediated by micro homology.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：胎盤 レトロトランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、マウス6番染色体近位部に位置する新規父性発現インプリンティング遺伝子 Peg10 を報告している。驚くべきことに、Peg10 は ORF1 および ORF1 が -1 フレームシフトをして翻訳される ORF1-2 融合タンパクを持ち、それぞれがフグの Sushi-ichi レトロトランスポソンの Gag タンパクおよび Pol タンパクに高い相同性を示すレトロトランスポソン由来の遺伝子であった。

2. 研究の目的

Peg10 の機能解析を行うために、既に研究代表者は Peg10 KO マウスを作製し、Peg10 が胎盤形成に必須な機能を持つことを明らかにしている。しかしながら、レトロトランスポソンの Gag, Pol タンパクに由来する Peg10 ORF1 および ORF1-2 融合タンパクの機能については不明である。そこで本研究課題において、ORF1 および ORF1-2 融合タンパクの詳細な機能解析を行い、ORF1 および ORF1-2 融合タンパクに機能的差異があるのか、また、それぞれ ORF に存在する機能ドメインの解析を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

Peg10 ORF1 には CCHC zinc finger domain が、ORF2 には DSG protease domain が存在している。研究代表者はゲノム編集技術「CRISPR/Cas9 システム」を用いて、Peg10-ORF1 マウス、Peg10 CCHC mutant マウスおよび Peg10 DSG mutant マウスの作製を行ない、機能解析を行う。

4. 研究成果

Peg10-ORF1 マウスに関しては、ORF1 および ORF1-2 融合タンパクを認識する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、研究代表者の予想通りに ORF1 だけが翻訳されているマウスであることが確認できた。また、Peg10-ORF1 マウスは、Peg10 KO マウス同様に胎盤形成不全による初期胚致死となった。よって、ORF1-2 融合タンパク、すなわちフレームシフトすることが哺乳類の生存に必要な機能をする事がわかった。

「CRISPR/Cas9 システム」を用いて受精卵に DNA 二重鎖切断 (DSB) を導入し、Peg10 変異マウスの作製を行なう際に、変異配列を同定するために、DSB 部位を含む領域を PCR により増幅し、シーケンスの決定を行っている。

PCR 産物の電気泳動でおよそ 30% の個体で、想定より 100bp 以上も長い PCR 産物が存在することを発見した。その多くはレトロトランスポソンなどの断片配列が挿入したものであった。マウスゲノム中に存在するレトロトランスポソンの存在比率は、L1、SINE が非常に多い。しかし、受精卵での DSB 修復

部位に挿入されたレトロトランスポソンの多くは、MuERV1 および MaLR であった。MuERV1 および MaLR は、マウス受精卵において特異的に大量に発現し、高い逆転写活性を持つことから、2細胞期で逆転写産物が多く存在すると報告されている。

レトロトランスポソンの他には、内在性の遺伝子配列の挿入も数多くあった。これらの中の一部ではスプライス後の配列が挿入されており、すなわち、スプライス後の mRNA の逆転写産物である。これらの結果より、研究代表者はマウス受精卵には豊富なレトロトランスポソンの逆転写活性により多量の cDNA が存在する状態であり、受精卵における DSB 修復の際に microhomology を介して鋳型として働くことで DSB 部位に挿入されることを明らかにした。(Ono R., et al., *Scientific Reports* 5:12281, 2015)

さらに、「CRISPR/Cas9 システム」を用いて変異を導入したマウス受精卵より作製したマウス個体、およびマウス 3T3 細胞のゲノムを抽出して、次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンスによる DSB 部位の網羅的解析を行ない、レトロトランスポソン、マウスに内在性遺伝子の mRNA および、使用したベクターDNA 配列の断片挿入の頻度を明らかにした。同時に、多くの場合は、数ベースの microhomology を介した deletion であることも明らかにした。

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 4 件)

Naruse M, Ono R, Irie M, Nakamura K, Furuse T, Hino T, Oda K, Kashimura M, Yamada I, Wakana S, Yokoyama M, Ishino M and Kaneko-Ishino T.

Sirh7/Ldoc1 KO mice exhibit placental P4 overproduction and delayed parturition., *Development* Dec ;141(24):4763-71, 2014
DOI: 10.1242/dev.114520

*Ono R., Ishii M., Fujihara Y., Kitazawa M., Usami T., Kaneko-Ishino T., Kanno J., Ikawa M., Ishino F.

Double strand break repair by capture of retrotransposon sequences and reverse-transcribed spliced mRNA sequences in mouse zygotes.

Scientific Reports Jul 28;5:12281, 2015
DOI: 10.1038/srep12281.

* corresponding author

Irie M., Yoshikawa M., Ono R., Iwafune H., Furuse T., Yamada I., Wakana S.,

Yamashita Y., Abe T., Ishino F., Kaneko-Ishino T.
Cognitive Function Related to the *Sirh11/Zcchc16* Gene Acquired from an LTR Retrotransposon in Eutherians.
PLoS Genetics, Sep 24;11(9):e1005521, 2015
DOI: 10.1371/journal.pgen.1005521

Yasuhiko Y., Hirabayashi Y., *Ono R.
LTRs of endogenous retroviruses as a source of Tbx6 binding sites
Frontiers in Chemistry (in press)
* corresponding author

[学会発表](計 15 件)

小野竜一、伊川正人、北澤萌恵、金児-石野知子、石野史敏
哺乳類特異的遺伝子 Peg10 の機能解析
第8回日本エピジェネティクス研究年会、2014年5月25-27日(伊藤国際学術センター、東大、東京)

北澤萌恵、小野竜一、金児-石野知子、石野史敏
哺乳類特異的遺伝子 Peg11/Rt11 の胎仔/胎盤における役割
第8回日本エピジェネティクス研究年会、2014年5月25-27日(伊藤国際学術センター、東大、東京)

小野竜一
レトロトランスポゾン獲得による哺乳類の胎生進化
第17回 SUMMER RETROVIRUS CONFERENCE, 熱海市, 2014年7月

小野竜一
レトロトランスポゾンによる哺乳類母子間ゲノム・遺伝子相関と雑種強勢
新学術領域ゲノム・遺伝子相関・班会議、東京、2014年6月

小野竜一
CRISPR/Cas9 システムを用いた変異マウスの作製
東京医科歯科大学・第6回実験動物センター・テクニカルセミナー、東京、2014年7月

小野竜一
レトロトランスポゾン由来の遺伝子による哺乳類の胎生機構獲得
日本遺伝学会、滋賀、2014年9月

入江将仁、幸田尚、小野竜一、古瀬民生、若菜茂晴、吉川正信、石野史敏、金児-石野知子

LTR レトロトランスポゾンに由来する真獣類特異的遺伝子 Sirh11 の機能解析
第37回日本分子生物学会年年会, 2014年11月25日(パシフィコ横浜、横浜)

北澤萌恵、小野竜一、田村勝、金児-石野知子、石野史敏
真獣類特異的遺伝子 Peg11 の胎盤と胎仔における影響
第37回日本分子生物学会年年会, 2014年11月26日(パシフィコ横浜、横浜)

小野竜一、北澤萌恵、伊川正人、金児-石野知子、石野史敏
真獣類特異的遺伝子 Peg10 の機能ドメイン解析
第37回日本分子生物学会年年会, 2014年11月26日(パシフィコ横浜、横浜)

10 石野史敏、成瀬美衣、小野竜一、入江将仁、中村健司、横山峯介、若菜茂晴、金児-石野知子
Sirh7 K0 マウスにみられる胎盤プロゲステロン産生の増加と出産遅延
第37回日本分子生物学会年年会, 2014年11月26日(パシフィコ横浜、横浜)

11 北澤 萌恵、小野竜一、岡彩子、金児-石野知子、石野史敏
真獣類特異的遺伝子 Peg11 の胎仔と胎盤における影響
第9回日本エピジェネティクス研究会年会 2015年5月25日~26日(学術総合センター 一橋講堂、東京)

12 Ono, R.
Double strand break repair by capture of retrotransposon and mRNA sequences via reverse transcription in the mouse zygote.
FASEB "Mobile DNA in Mammalian Genomes", Palm Beach, June, 2015

13 入江将仁、幸田尚、小野竜一、古瀬民生、若菜茂晴、吉川正信、石野史敏、金児-石野知子
LTR レトロトランスポゾンに由来する真獣類特異的遺伝子 Sirh11 の機能解析
BMB2015 2015年12月1日-4日(神戸国際会議場、神戸)

14 北澤萌恵、小野竜一、岡彩子、金児-石野知子、石野史敏
真獣類特異的遺伝子 Peg11 のマウス新生仔の生存に対する影響
BMB2015 2015年12月1日-4日(神戸国際会議場、神戸)

15 Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Yoko Hirabayashi, Satoshi

Kitajima, and Jun Kanno
Double strand break repair by capture of
unintentional sequences, an emerging
new risk for the leading-edge
technology
Keystone Symposia Conference /
Precision Genome Engineering 2016年1
月

【図書】(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 竜一 (ONO RYUICHI)
国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試
験研究センター・毒性部・第五室・室長
研究者番号：10401358

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()