

「ゲノムの構造と機能」
平成10年度採択研究代表者

石野 史敏

(東京工業大学遺伝子実験施設 助教授)

「哺乳類特異的ゲノム機能」

1. 研究実施の概要

生物のゲノムにはその生物種の持つ個々の遺伝子の情報と、それら遺伝子全体の発現を制御する個体発生に関係する情報が含まれている。このように生物の個体発生はその生物ゲノムの持つ全体的な機能発現といえる。さらにゲノムにはその生物種の生物進化の歴史である系統発生の情報が含まれている。個体発生と系統発生では扱われる時間軸が大きく異なるが、これらをつなぐ鍵は特定の生物群にのみ見られるゲノム機能であろう。体制の大きく異なる生物群の出現(大進化)には、突然変異だけでなく大幅なゲノム構造の再編までも含めた、新しいゲノム機能の獲得が必要であったと考えられる。現在見ている個体発生は、そのような生物群に特異的ゲノム機能と生物共通に存在する普遍的ゲノム機能の集積の結果の現れであろう。

ゲノムインプリンティングは高等脊椎動物では哺乳類にのみ見られる遺伝子発現制御機構である。われわれはこれまでのインプリンティング遺伝子群の体系的分離と解析から、この遺伝子発現機構が哺乳類の個体発生のみならず、哺乳類の進化に重要であったことを示唆するデータを得ている。そこで本プロジェクトでは、このゲノムインプリンティングを哺乳類特異的ゲノム機能と考え、個体発生、系統発生の問題から哺乳類の発生工学の問題まで、基礎科学、応用科学の枠を超えた新しいゲノム科学の展開をめざしている。

2. 研究実施内容

「哺乳類特異的ゲノム機能」プロジェクトの大きな柱は、

- (1) 哺乳類の個体発生やヒト遺伝病に関わる個々のインプリンティング遺伝子の分離と機能の解明
- (2) ゲノムインプリンティングの分子機構の解明および分子機構と個体発生、系統発生との関係の解析
- (3) 哺乳類の初期胚操作実験におけるゲノムインプリンティングの制御

からなる。平成12年度の研究実施内容としては、

- 1) 新規インプリンティング遺伝子の分離・同定
 - ・ これまでのサブトラクション・ハイブリダイゼーション法による新規イン

プリンティング遺伝子分離に加え、アフィメトリクス社のGeneChipを用いた約30Kの遺伝子の発現パターンを解析する手法を取り入れた。用いた材料はサブトラクション法に用いたのと同じ、母親由来のゲノムのみをもつ雌性単為発生胚、父親由来のゲノムのみを持つ雄性発生胚およびコントロールとしての正常受精胚である。解析の結果、われわれがこれまで分離したインプリンティング遺伝子群はこれらの胚における発現量の違いから明確に同定できることが示され、同時に複数の新規遺伝子候補が分離できた。そのうちの1つを詳細に解析し、胎児期後期から新生児期の致死を引き起こすマウス染色体12番遠位部に新規インプリンティング遺伝子*Peg9/Dlk1*を同定した。また、ヒト染色体14番に存在する相同遺伝子*PEG9/DLK1*も父性発現を示すことを証明した(論文発表)。この遺伝子は昨年、われわれが報告したマウス*Meg3/Gtl2*、ヒト*MEG3*の80-100kb上流に同定され、精神行動、胎盤機能、骨格形態形成に重要な機能をもつインプリンティング領域に、インプリンティング遺伝子の新しいクラスターの同定につながった。BACのDNA塩基配列決定による、この領域の詳細な遺伝子地図の作製も同時に行っている。

- ・ 初期胚致死を引き起こすインプリンティング領域であるマウス染色体6番近位部に対応するヒト7q21領域遺伝子の探索の結果、新規インプリンティング遺伝子*PEG10*を同定した。遺伝子構造解析の結果、この遺伝子はレトロウィルスのgag, pol タンパク質をコードしており、レトロトランスポゾン由来のDNAが哺乳類のゲノムに挿入されたものであることが分かった。レトロトランスポゾン由来の遺伝子にインプリンティングが証明されたのは初めての例である。マウスにおいては、このタンパク質が神経細胞のミエリン結合タンパク質の誘導に重要な機能を果たすことが示唆されている。外来性のDNAが本当に哺乳類の発生、分化に重要な機能を獲得したのかどうか、哺乳類の進化を考える上で重要な遺伝子であると考えられる。また、ゲノムインプリンティングは外来のウィルスDNAの発現を抑制するためのDNAメチル化機構から派生して成立したという仮説が提唱されている。この遺伝子の発現制御機構の解析から哺乳類におけるゲノムインプリンティングの成立のメカニズムが解明できる可能性が示唆された(論文発表)。

2) ヒトのインプリンティング遺伝子の機能解析とヒト遺伝疾患の原因遺伝子の同定

- ・ ヒト*PEG3*は成体の脳で特異的に発現しているが、ヒト脳腫瘍であるグリオーマで発現が著しく減少している。この遺伝子をグリオーマ細胞株に導入することにより癌抑制活性を示すことを明らかにした。これが生体内でのグリオーマ発症の原因となっているかどうかを明らかにするために、悪性度の

低い段階の腫瘍を解析したところ、オリゴデンドログリオーマでは初期の段階からPEG3の発現が激減していることがあきらかになった。また腫瘍部分のPEG3遺伝子のメチル化は高メチル化となっているものが存在した。これからガンの発生においてはこれまで言われていた変異とLOH (loss of heterozygosity) 以外に、DNAメチル化による発現抑制等のエピジェネティックな機構が重要であることが示された。また、片親性発現を示すインプリンティング遺伝子がガン抑制遺伝子として機能する場合、発現しているアレルに変異、LOH、DNAメチル化異常等の変化が起きた場合、one-hitで発症に結びつく可能性があることを意味している。

- ・ ヒト染色体11p15.5に存在するPEG8がウィルムス腫瘍で特異的に高発現していることを昨年、報告した。ウィルムス腫瘍の場合、この領域のインプリンティング遺伝子が発症に関係していることが示唆されていることから、原因遺伝子としての可能性を検討するために、ヒトPEG8のトランスジェニックマウスの作製、ウィルムス腫瘍におけるPEG8遺伝子の変異の探索の両面から解析を進めている。
- ・ Meg1TGマウスに高インスリン血漿、糖尿病の発症が見られた。このため、新しい糖尿病モデルマウスとして、このマウスで糖尿病の発症過程の詳細を解析した(論文投稿中)。また、ヒト糖尿病におけるこの遺伝子の変異解析を行い、数%以下の頻度でアミノ酸置換を伴う変異を検出した。糖尿病は多因子病であり、複数の遺伝子の変異の集積と生活習慣が合わさって発症にいたる。この遺伝子の糖尿病における役割を解析している。

3) インプリンティングの分子機構の解明

- ・ 始原生殖細胞(PCG)から体細胞クローン技術と同じ方法でPGCクローンマウスを作製した。これらは初期の胎児期9-10日目で致死となり、生まれることはなかった。このPGCクローン胚では、インプリンティング遺伝子の片親性発現が消失しており、これが致死の原因であると考えられた。また、PGCクローンの解析により、生殖細胞系列でゲノムインプリンティングの情報が消去される過程をはじめて検出することに成功した。ゲノムインプリンティングの初期状態を解明できたことにより、生殖細胞系列におけるゲノムインプリンティングの消去から成立までの実態を解析することが可能になり、DNAメチル化との関連性等についての詳細な解析を行っている(論文投稿中)。
- ・ 生殖細胞系列においてゲノムインプリンティングの成立過程の制御に関するゲノム上のインプリンティングボックス配列の決定とそれと相互作用する卵巣および精巣内のインプリンティングファクターの分離を継続中であ

る。

5) クローン動物におけるゲノムインプリンティング

- ・ クローン動物が生まれることは、哺乳類の生物学にとって画期的な出来事であるが、出生までの致死率が非常に高いことが知られている。この原因を探るため、クローン初期胚、出生児および胎盤に関してゲノムインプリンティング遺伝子発現の異常の有無を調べた。この結果、胎盤において多くの遺伝子に発現の異常が起きているが、ゲノムインプリンティングによる片親性発現機構は維持されていることが確認された(投稿準備中)。また、胎児側における遺伝子発現異常についても解析を続けている(投稿準備中)。

6) 有袋類におけるゲノムインプリンティング

- ・ オーストラリア、メルボルン大学と共同研究で有袋類(ワラビー)におけるゲノムインプリンティングを解析している。ワラビー胎児からcDNAライブラリーの作製を行い、マウスの*Peg*、*Meg* 遺伝子群の相同遺伝子の体系的スクリーニングにより、これまで4つの相同遺伝子の分離に成功した。これらの遺伝子の完全長配列の決定を行うとともに、さらに多くの遺伝子の分離を継続している。これら遺伝子のインプリンティングの解析により、哺乳類の進化のどの段階でゲノムインプリンティングが生じたかという問題と有胎盤類と有袋類のゲノム機能の違いを解明する。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

Kohda, T., A. Asai, Y. Kuroiwa, S. Kobayashi, K. Aisaka, G. Nagashima, M. C. Yoshida, Y. Kondo, N. Kagiya, T. Kirino, T. Kaneko-Ishino and F. Ishino. Tumor suppressor activity of human imprinted gene *PEG3* in a glioma cell line. *Genes to Cells* 6,(3) 237-247(2001)

Ono, R., S. Kobayashi, H. Wagatsuma, K. Aisaka, T. Kohda, T. Kaneko-Ishino and F. Ishino. A retrotransposon-derived gene, *PEG10*, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7 q21. *Genomics* 73, 232-237(2001)

Kobayashi, S., H. Wagatsuma, R. Ono, H. Ichikawa, M. Yamazaki, H. Tashiro, K. Aisaka, N. Miyoshi, T. Kohda, A. Ogura, M. Ohki, T. Kaneko-Ishino and F. Ishino. Mouse *Peg9/Dlk1* and human *PEG9/DLK1* are paternally expressed imprinted genes closely located to the maternally expressed imprinted genes: mouse *Meg3/Gtl2* and human *MEG3*. *Genes to Cells* 5, (12) 1029-1037(2000)

Ogura, A., K. Inoue, N. Ogonuki, A. Noguchi, K. Takano, R. Nagano, O. Suzuki, J. Lee, F. Ishino and J. Matsuda. Production of male clone mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 62, 1579-1584(2000)