

「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

本プロジェクトでは、1)哺乳動物ゲノムのもつ個体発生全能性に関する機能およびその分子機構の解明、2)哺乳類特異的なゲノム機能であるゲノムインプリンティングと哺乳類の進化の関係性の解明、3)ヒト遺伝病の原因遺伝子、個体発生に必須の遺伝子の機能解析を目的として研究を進めている。

個体発生全能性は分子生物学的には遺伝子発現調節系のリプログラミングの問題と考えられる。哺乳動物の個体発生全能性には、1)体細胞クローン動物でみられる個体発生(細胞分化)記憶の初期化と2)ゲノムインプリンティング記憶の再成立という2つのリプログラミング系が必須の機能を果たしている。本プロジェクトでは体細胞クローン、生殖細胞クローンマウスを用いた遺伝子発現解析により、体細胞クローン動物における2つのリプログラミング系の挙動の差異、ゲノムインプリンティング記憶のリプログラミング過程の詳細を明らかにした。また、体細胞クローン動物の遺伝子発現に関する種々の問題点を明らかにした。体細胞クローンにおける特殊な個体発生機構の理解は、正常の個体発生過程を解明する上でも非常に有効であると考えている。

ゲノムインプリンティングの分子機構の解明のために、ゲノムインプリンティング領域における発現調節領域のノックアウトマウスの作製や、生殖細胞系列でのゲノムインプリンティング成立に関わる因子の検索を行っている。このような哺乳類特異的ゲノム機能の原因となった遺伝子の生物進化上の起源を明らかにすることは、進化の分子機構に新しい知見をもたらすことが期待される。

この他、2型糖尿病の発症、個体発生、形態発生に必須のインプリンティング遺伝子の分離・解析を進めている。このように個体発生、系統発生の問題から哺乳類の発生工学やヒト遺伝子疾患の問題まで、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」プロジェクトでは、体細胞クローン動物とゲノムインプリンティングの2つをテーマとして取りあげ、これらの遺伝子発現調節機構とその分子機構に関する研究を進めている。

平成13年度の研究実施内容としては、以下の研究を行った。

- (1) 体細胞クローンマウスにおける遺伝子発現調節とゲノムインプリンティングの解析

- (2) 生殖細胞クローンマウスにおける、ゲノムインプリンティング記憶のリプログラミング系の解析
- (3) ゲノムインプリンティングの分子機構に関する因子の分離・同定
- (4) 新規インプリンティング遺伝子の分離・同定と機能解析
- (5) 有袋類におけるゲノムインプリンティングの解析

(1) 体細胞クローンマウスにおける遺伝子発現調節とゲノムインプリンティングの解析

・体細胞クローンマウスにみられる、過剰成長、致死性などの種々の異常の原因を確かめるために、体外培養を行わず生体から直接分離した細胞を用いてクローンマウスの作製を行った。これらは出生率は3%とこれまでの報告と同じであったが、新生児の致死・異常はほとんど観察されなかった。また、これらの体細胞クローンマウスでは、胎児期、出生時期でゲノムインプリンティング記憶が由来した体細胞と同じ状態に保たれていることを実証した(Inoue et al. Science)。この結果、体細胞クローン技術そのものでは、ゲノムインプリンティング記憶は影響を受けないが、細胞培養の条件や細胞の種類によってゲノムインプリンティング等の記憶がゆがめられること、これらが新生児期での異常の原因となっていると考えられた。特に、ES細胞は再生医療において重要な細胞であるが、この細胞のゲノムインプリンティング等の記憶を維持には注意が必要であることが明らかになった。また、クローンマウスの胎児と胎盤では異なる遺伝子発現の異常が観察されることを明らかにした(Inoue et al. Science, Kohda et al. submitted)。低出生率の問題と合わせて、体細胞クローン技術に由来する遺伝子発現の異常が存在していることが明かとなった。

(2) ゲノムインプリンティング記憶のリプログラミング系の解析

・ゲノムインプリンティング記憶のリプログラミングが生殖細胞系列でいつ、どのように起きているかを解明するため、体細胞クローン技術で始原生殖細胞 (PGC) からPGCクローンマウスを作製した。その結果、ゲノムインプリンティング記憶の消去は、PGCが将来の生殖巣である生殖隆起に移動した直後に、DNAの脱メチル化と協調して起きていること、これらが遺伝子ごとに異なるタイミングで起きていることをはじめて明らかにした(Lee et al. Development)。これは哺乳類の個体発生の全能性に関わるリプログラミング系で、その実態が解明された初めてのものである。また、ゲノムインプリンティングの情報が完全に消去された細胞からは、クローンマウスは生まれない(初期胚致死)ことも明らかにした。また、初期化された状態の解析から卵子成熟過程でおきる母親性インプリントだけでなく、精子形成過程に父親性インプリントの存在が必要であることが示唆され、これによりゲノムインプリンティングの体系の全貌が解明できた。

(3) ゲノムインプリンティングの分子機構に関する因子の分離・同定

・ゲノムインプリンティング遺伝子発現調節には、生殖細胞系列での親由来の記憶の刷込みと、体細胞系列での片親性発現の機構の2つが重要である。このような領域の発現制御調節に関係すると考えられるDNA配列を欠損させたノックアウトマウスを作成することにより、生殖細胞系列と体細胞系列でのゲノムインプリンティング記憶の成立と維持のメカニズムを解析している。3種類のDNA配列についてES細胞のコンストラクションを行った。

・親由来で成長不良をしめす突然変異マウス解析の結果、これがゲノムインプリンティング領域全体の発現調節に関係する変異であることを明らかにした(Wagatsuma et al. 投稿準備中)。

- ・ゲノムインプリンティング生殖細胞系列においてゲノムインプリンティング領域を認識し、父親・母親由来の記憶の成立に関係する細胞内因子について分離・精製を進めている。

#### (4) 新規インプリンティング遺伝子の分離・同定

- ・サブトラクション・ハイブリダイゼーション法に GeneChip 法、既存のインプリンティング遺伝子の近傍のゲノム解析から、新規インプリンティング遺伝子分離を進めている (Kobayashi et al. BBRC)。

- ・ *Meg1TG* マウスを高インスリン血漿、糖尿病の発症モデルマウスとして特許申請を行った。
- ・ この他、幾つかのインプリンティング遺伝子のノックアウトマウスを作成・解析している。

#### (5) 有袋類におけるゲノムインプリンティングの解析

- ・ 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。これらは総べて真獣類(ヒト、マウス)でインプリンティングが保存されているものであるが、ワラビーでインプリンティングが保持されているか、多型解析を進めている。

### 3. 研究実施体制

#### 哺乳類ゲノム機能研究グループ

- ① 石野史敏(東京工業大学遺伝子実験施設・助教授)
- ② 研究項目

##### 哺乳類ゲノム機能の解析

他の研究機関と共同で研究全般を受け持つ。体細胞クローンマウス、生殖細胞クローンマウスの解析、インプリンティングの分子機構に関わる研究、新規インプリンティング遺伝子の分離、糖尿病発症マウスにおけるインスリン抵抗性など発症機構の解析を担当した。

#### 遺伝子発現研究グループ

- ① 石野(金児)知子(東海大学健康科学部、教授)
- ② 研究項目

##### インプリンティング遺伝子の発現部位の体系的解析

体系的な *in situ* ハイブリダイゼーションによる解析を行い、ゲノムインプリンティング遺伝子の発現部位の解析を担当した、共通性を解析することにより、この現象の生物学的意義に関する研究を進めている。インプリンティングの分子機構に関わる実体分子の同定とインプリンティング遺伝子を導入した糖尿病発症トランスジェニックマウスの解析、ヒト遺伝病原因遺伝子探索の部分も担当した。

#### モデルマウス解析グループ

- ① 横山峯介(三菱化学生命科学研究所・室長)

② 研究項目

ゲノムインプリンティング制御のモデルマウス作製

東工大と共同研究で、ゲノムインプリンティングの制御に関わる DNA 領域のノックアウトマウス作製を行った。また、糖尿病発症トランスジェニックマウスの系統化・保存を担当した。

ゲノム構造解析グループ

① 若菜茂晴(理化学研究所ゲノム科学総合センター・グループリーダー)

② 研究項目

インプリンティング領域のマッピングとゲノム構造解析

東工大と生命研で作製した遺伝子改変マウスのコンジェニックによる系統化のための遺伝子タイピングを担当した。遺伝子多型を用いたインプリンティング遺伝子のマッピングを担当した。

哺乳類発生工学グループ

① 小倉淳郎(国立感染症研究所・室長;現 理化学研究所バイオリソースセンター・室長)

② 研究項目

体細胞および生殖細胞からのクローンマウスの作製とゲノムインプリンティング機構解析のための特殊発生胚の作製を担当した。また、免疫染色法によるクローンマウスにおけるタンパク質の発現異常の解析を担当した。また、第一次精母細胞核の移植による発生胚の作製を行った。

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Kobayashi, S., T. Uemura, T. Kohda, T. Nagai, Y. Chinen, K. Naritomi, E. Kinoshita, H. Ohashi, K. Imaizumi, M. Tsukahara, Y. Sugio, H. Tonoki, T. Kishino, T. Tanaka, M. Yamada, O. Tsutsumi, N. Niikawa, T. Kaneko-Ishino and F. Ishino. No evidence of *PEG1/MEST* gene mutations in Silver-Russell syndrome patients. *Am. J. Med. Genet.* **104**, 225-231 (2001).
- Kobayashi, S., T. Kohda, H. Ichikawa, A. Ogura, M. Ohki, T. Kaneko-Ishino, and F. Ishino. Paternal expression of a novel imprinted gene, *Peg12/Frat3*, in the mouse 7C region homologous to the Prader-Willi syndrome region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 403-408 (2002).
- Inoue, K., T. Kohda, J. Lee, N. Ogonuki, K. Mochida, Y. Noguchi, K. Tanemura, T. Kaneko-Ishino, F. Ishino and A. Ogura. Faithful expression of imprinted genes in clones mice. *Science* **295**, 297 (2002).
- Lee, J., K. Inoue, R. Ono, N. Ogonuki, T. Kohda, T. Kaneko-Ishino, A. Ogura and F. Ishino.

Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day-11.5 primordial germ cells. *Development* **129**, 1807-1817 (2002).

- F. Ishino, Y. Kuroiwa, N. Miyoshi, S. Kobayashi, T. Kohda and T. Kaneko- Ishino. A subtraction-hybridization method In *Methods in Molecular Biology* Vol 181 : Genomic Imprinting (ed. A. Ward) Humana press pp.101-112 (2001)

(2) 特許出願

国内特許 1件

外国特許 1件