

「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

(東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター 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、ゲノムの構造（全塩基配列）が決定している哺乳動物（ヒトおよびマウス）をもちい、個体発生、成長、細胞分化等の高次生命現象を、ゲノムの機能という立場から解明することをめざしている。また、このようなゲノム機能を遺伝子機能と遺伝子発現制御システムを総合したものであるという観点から、哺乳類の進化上の起源の問題へのゲノム科学的アプローチを試みている。

具体的な研究テーマとしては、体細胞クローン動物の個体発生と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機構の解明の2つテーマを中心に、従来のジェネティクスにエピジェネティックな方法論を加えて進めているのが特徴である。

本プロジェクトの成果として1) 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。また、これが次に述べる生殖細胞系列のリプログラミング系を欠いた発生様式による可能性を示した。2) 正常個体発生では、親由来のゲノムインプリンティング記憶は生殖細胞系列でリプログラミングされることを実証した。3) 体細胞系列でのゲノムインプリンティングの片親性発現機構は、ゲノム中の種々の機能的配列の組み合わせで決定されていることを実証した。これらにより、4) 体細胞系列、生殖細胞系列とおしたゲノムインプリンティングの制御体系を明らかにした。5) この制御体系からはゲノムインプリンティングの哺乳類の個体発生における重要性と、哺乳類の進化における必然性が説明されることを示した。

現在、ゲノムインプリンティングの分子機構の解明のための研究を進めており、このような哺乳類特異的ゲノム機能をもたらす要因となった遺伝子の生物進化上の起源を明らかにしたいと考えている。このプロジェクトにより、人類に至る進化の道すじの重要な一歩である哺乳類への進化がゲノム科学という新しいアプローチにより解明され、生物進化という歴史科学を分子生物学的に検証しうる新しい学問分野が創設されることが期待される。

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

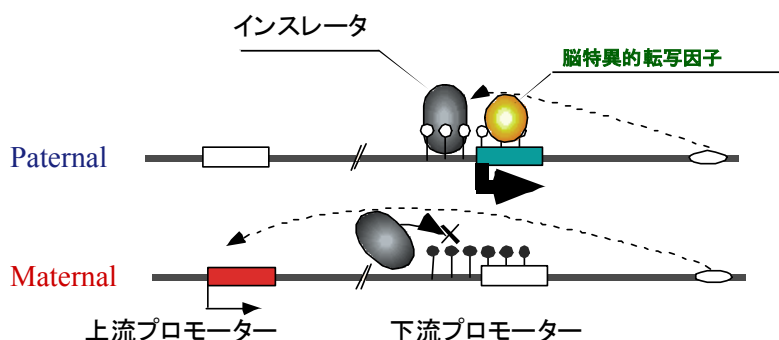
リンティングの2つをテーマとして取りあげ、これらの遺伝子発現調節機構と、その分子機構に関する研究を進めている。これまでに、ゲノムインプリティングの親由来の記憶は、生殖細胞系列で刷り込まれること、この1次インプリントはインプリティング領域全体を制御し、その領域によって父親性・母親性の支配を受けるという制御体系を明らかにした。この1次インプリントをもとに、体細胞系列で父親性発現 (*Peg*) と母親性発現 (*Meg*) が起きる機構について解析した。また、これらの解析を総合して、ゲノムインプリティングの生物学的意義を解明することに成功した。

具体的な研究実施内容は、以下のとおりです。

- (1) 体細胞における片親性遺伝子発現機構の解析
- (2) ゲノムインプリティングの制御体系と生物学的意義の解明
- (3) ゲノムインプリティングの分子機構に関する因子の分離・同定
- (4) ゲノムインプリティングの成立機構の解析
- (5) 有袋類におけるゲノムインプリティングの解析

(1) 体細胞における片親性遺伝子発現機構の解析

マウスにおいて母親性発現インプリティング遺伝子として分離した *Meg1/Grb10* 遺伝子は、ヒトにおいてはインプリティングを受けず両親性発現を示す。しかし、脳においては父親性発現を示すことが最近発見され、マウスの *Meg1/Grb10* も脳では父親性発現を示すことを報告した。このように、この遺伝子は哺乳類の種間、臓器間で異なるインプリティング制御を受ける極めて特殊な遺伝子であることが明らかになった。ヒトおよびマウスにおける遺伝子発現制御機構の解析から、臓器間のインプリティングの違いは、異なる2つのプロモーターの利用によること、ヒトとマウスにおける全身性の発現におけるインプリティングの有無は、マウスに特異的に存在するインスレーター配列の存在によることを明らかにした。すなわちマウスに見られる、全身性の発現を示す上流のプロモーターからの母親性発現は、DNAメチル化とインスレーターによるエンハンサー機能の抑制による2次的な発現調節機構の結果起こるものであり、ヒトではインスレーターが存在しないため上流のプロモーターにはインプリティングはかからない。このように、生殖細胞での1次インプリティングと体細胞における2次インプリティングの組み合わせで、*Peg* と *Meg* という片親性発現が成立することが確認された (Hikichi *et al.* Nucl. Acids Res.)。



(2) ゲノムインプリンティングの制御体系と生物学的意義の解明

生殖細胞系列と体細胞系列におけるインプリンティング遺伝子発現機構を解明することにより、半数のインプリンティング遺伝子は刷込みがなければ発現しないことが明らかとなった。すなわち、刷込みには遺伝子発現の抑制と誘導の両方の効果が有り、これは体細胞における2次的な機構によって、DNAのメチル化により逆向きの効果が同時に発揮される。このように、哺乳類ゲノムには、種々の特殊なゲノム機能単位が存在するため、総ての遺伝子を発現するためには片親性発現をする以外方法がないことがわかる。同じ理由からゲノムインプリンティングの制御をはずすことは不可能であるため、この機構は必然的に哺乳類に保存される。ゲノムインプリンティングの制御体系の解明は、このシステムの生物学的意義を明らかにすることにつながった (Kaneko-Ishino *et al.* J. Biochem. (in press))。

(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

父親性・母親性のゲノムインプリンティング領域が明らかになったため、精子形成過程と卵子成熟過程における父親性と母親性インプリンティングファクターの分離が可能となった。インプリンティング領域における重要なインプリンティング制御領域の一つであるDMR (Differentially methylated regions) 周辺のDNAに、精巣特異的、卵巣特異的に存在する結合因子が存在することをゲルシフトアッセイにより確認することに成功した。現在、DNAカラムを用いた精製により蛋白質の同定を行っている。

(4) ゲノムインプリンティングの成立機構の解析

これまでの体系的なインプリンティング遺伝子の同定により、*PEG10*と*PEG11*という2つの共通するレトロトランスポゾン由来のインプリンティング遺伝子を同定し、それらが2つの異なるインプリンティング領域に存在することを明らかにした。これらは哺乳類ゲノムに共通した領域に存在することから、哺乳類の成立前にゲノム中に挿入されたものと考えられる。また、レトロトランスポゾン由来の蛋白質のコーディング配列が高度に保存されていることから、この遺伝子自身が哺乳類の個体発生において重要な機能を果たしていることが示唆される。ゲノムインプリンティングは外来のDNAの発現を抑制するための防御機構から派生したという仮説がある。この仮説を検証するために、われわれは、これらのレトロトランスポゾン由来の遺伝子がゲノム中に挿入されることにより、その領域をインプリンティング領域に変化させたという新しい仮説を立て (レトロトランスポゾン挿入仮説)、これを実証するために、マウス*Peg10*、*Peg11*のノックアウトマウスを作製した。現在、キメラマウスまで作製が進んでおり、これらの遺伝子の機能またはインプリンティング制御における役割については最終年度に報告できると考えている。

(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の解析のため、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を行った。これまで分離した4つの相同遺伝子は、総べて真獣類 (ヒト、マウス) と同様、片親性発現が保存されていた。

このため、有袋類におけるゲノムインプリンティングの体系が真獣類にかなり近い可能性が示唆された。しかし、ワラビーのゲノム配列には明確なDNAメチル化領域が存在しないため、遺伝子発現抑制に働く分子機構は真獣類と異なっている可能性が考えられる。最終年度には、この有袋類と真獣類のゲノムインプリンティングの分子機構の違いの有無を検討する。

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。

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・センター長）

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、*Peg10*、*Peg11*のノックアウトマウス作製を行った。

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

東工大と共同で、*Meg1/Grb10*領域にある寿命決定に関係する遺伝子座のマッピングを行った。

哺乳類発生工学グループ

①小倉淳郎（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。

遺伝子機能解析研究グループ

①松田潤一郎（国立感染症研究所・室長）

②研究項目

*Meg1/Grb10*遺伝子のトランスジェニックマウスの生化学的解析を担当した。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文発表

- Hikichi, T., T. Kohda, T. Kaneko-Ishino and F. Ishino. Imprinting regulation of the murine *Meg1/Grb10* and human *GRB10* genes; roles of brain-specific promoters and mouse-specific CTCF-binding sites. *Nucl. Acids Res.* **31** (5), 1398-1406 (2003).
- T. Kohda, J. Lee, K. Inoue, N. Ogonuki, N. wakisaka-Saito, T. Kaneko-Ishino, A. Ogura and F. Ishino. Epigenetic regulation in mammalian development and dysfunction: the effect of somatic cloning and genomic imprinting. *In Genome Science-Towards a New Paradigm?* (eds. H. Yoshikawa, N. Ogasawara and N. Satoh) Elsevier, Amsterdam, pp151-159 (2002).
- Ogura, A, K. Inoue, J. Lee, T. Kohda and F. Ishino. Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse. *Cloning and Sperm Cells* **4** (4) 397-405 (2002).

（2）特許出願

なし