

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授

石野 史敏

「哺乳類特異的ゲノム機能」

研究期間：平成10年12月1日～平成15年11月30日

1. 研究実施の概要

ヒトを含む哺乳類の動物には、父親由来または母親由来の記憶により発現調節を受けるインプリンティング遺伝子群が存在している。これらには、個体発生に必須の遺伝子、胎児期、新生児期の成長に重要な遺伝子に加え、形態形成や行動に影響する遺伝子なども含まれている。われわれの体を構成する体細胞は2倍体であり、これが重篤な遺伝病の発生防止のために有利に機能していることを考えると、なぜ、哺乳類においてこのような重要な遺伝子群が片親性発現の制御を受け、わざわざ機能的な半数体となっているのかは大きな疑問である。しかも、このゲノムインプリンティング機構は、哺乳類の各種に広く保存されている。このことは、遺伝病の発症のための安全装置をはずしてまでも、このような片親性発現機構を維持する‘何らかの必然性’が存在することを示唆している。

そこで「哺乳類特異的ゲノム機能」プロジェクトでは、ゲノムインプリンティングの発現制御機構の詳細を解明することにより、哺乳類における片親性発現機構の生物学的意義を解明することを目的として研究を進めた。そのための具体的な研究項目としては1) マウスをもちいた体系的なインプリンティング遺伝子の同定と機能解析、2) 染マウス体におけるインプリンティング領域の同定とその存在様式の特徴の解析、3) 生殖細胞系列における親由来の記憶のリプログラミング過程の解明、4) 体細胞系列における片親性発現の分子機構の解明、5) ゲノムインプリンティングと哺乳類特異的臓器である胎盤の機能との関係の解析、6) 哺乳類の別のグループである有袋類におけるゲノムインプリンティングの解析等である。これらの広範な分野に渡る解析を推進し、最終的にこれらの結果を総合することによって、本プロジェクトで掲げた目的の達成を目指した。

そのため、研究は東京工業大学遺伝子実験施設(現在は東京医科歯科大学難治疾患研究所)の研究代表の所属する哺乳類ゲノム機能研究グループを中心に、ゲノム科学、マウス発生工学、遺伝子発現解析を得意とする以下の先生方のグループとの共同で推進する体制をとった：東海大学健康科学部、金児?石野知子教授をリーダーとする遺伝子発現研究グループ、三菱化学生命科学研究所マウスゲノム工学センター長(現在は新潟大学脳研究所付属生命科学リソース研究センター教授)の横山峯介先生をリーダーとするモデルマウス解析研究グループ、理化学研究所ゲノム科学総合研究センターのチームリーダーである若菜茂晴先生のゲノム構造解析研究グループ、国立感染症研究所(現在は理化学研究所バイオリソースセンター)の小倉淳郎室長の哺乳類発生工学研究グループ、おなじく国立感染症研究所の松田潤一郎室長の遺伝子機能解析グループ。これらの各分野で最先端の業績と技術を有する研究者との共同研究により、各分野での解析において非常にユニークな研究を展開でき、最終的にゲノムインプリンティングの生物学的意味に関する新しい概念の成立に貢献出来たと信じている。また、これらの仕事により、哺乳類の進化という、生物学上の重要な問題に対して、ゲノム機能という観点から科学的に検証する新しい方向性を示すことができたと考えている。

これらの研究のなかで特筆される成果について以下に述べる。哺乳類に限らず、次代へゲノム機能を伝えるために、生殖細胞系列の役割は重要であるが、具体的にそこで何が行われているかはハッキリとはしていなかった。本プロジェクトでは、生殖細胞系列でのゲノムインプリンティングのリプログラミング過程を解析するために、体細胞クローン技術を応用して作製した生殖細胞からのクローンを体系的に解析した。これには染色体の各インプリンティング領域に同定した Peg と Meg の発現パターンの変化を、胎児の発生過程の種々の時期から分離した生殖細胞クローンで解析するという実験であったが、これにより親由来の記憶が消去される過程を世界で初めて実証することができた。これは、生殖細胞内でゲノム機能がリプログラミングを受け、エピジェネティックな情報が書き換えられることを示した最初の実験でもある。また、この技術を用いて再び性別に応じた記憶が刷り込み直される過程についても詳細な解析を行うことができた。

この解析により、ゲノムインプリンティング記憶が消去された初期化状態の詳細が明らかになり、それぞれの Peg 遺伝子と Meg 遺伝子の発現パターンの変化から、インプリンティング遺伝子を再分類することにより、ゲノムの刷り込みには卵子成熟過程で起きる Maternal imprinting と精子形成過程で起きる Paternal imprinting の両者が必要であることを明かにした。Maternal imprinting と Paternal imprinting はどちらも異なる Peg と Meg のセットを同時に制御するという一見複雑な制御をしているが、実は、これは完全に染色体上のインプリンティング領域に対応している。すなわち、片親性発現をする Peg と Meg は、遺伝子ごとに発現が制御されるのではなく、インプリンティング領域として全体的に制御を受ける体系がここに明かとなった。また、この生殖細胞での領域全体の刷り込みは、特定領域 (Differentially methylated region: DMR) の DNA メチル化によって行われていることが強く示唆された。

体細胞系列では、生殖細胞での刷り込み記憶に従って、Peg と Meg の ON-OFF が自動的に逆転する。マウス Meg1/Grb10 とヒト GRB10 の体細胞における発現制御様式を詳細に解析したところ、この Reciprocal ON-OFF スイッチ機構は、ゲノムに存在する、プロモーター、DMR、エンハンサー、インスレーターなどのゲノム機能単位とも呼べるものの組み合わせで決定されていることが明かとなった。すなわち、このようなゲノム機能単位を組み合わせると、特定領域の DNA メチル化により、その領域に含まれる Peg と Meg の発現様式を同時に逆転することができるのである。この意味で、哺乳類のゲノムは Reciprocal ON-OFF スイッチ機構という特殊装置を内在する、非常に変わったゲノム構成をとっていることがわかった。

こうして、ゲノムインプリンティングの生殖細胞系列、体細胞系列における制御体系を把握することにより、この機構のもつ片親性発現の意義が明確になった。その鍵は、哺乳類のゲノムには、種々のゲノム機能単位の組み合わせにより、何もしなければ (初期化状態では) 幾つかの遺伝子が発現できない領域が存在しているという事実である。この不活性化領域は、一部の発現制御に関わる染色体領域を DNA メチル化することにより解除できるが、この時、この領域に含まれるそれまで発現していた遺伝子群が逆に不活性化さ

れる。すなわち、領域に含まれる総ての遺伝子を活かしたいのであれば、片側ずつの染色体が異なった発現パターンをとらなければならないということである。奇妙なアイデアに聞こえるが、哺乳類のゲノム構造はそのようになっているというというのがわれわれの結論である。われわれは、この考えをゲノムインプリンティングの生物学的意味に関する Complementation 仮説として提唱した。これは、インプリンティング遺伝子の片親性発現の必然性を説明したはじめての仮説である。

この仮説は、同時に、なぜこの機構が、哺乳類に広く保存されているかも説明する。すなわち、哺乳類は父親由来と母親由来のゲノムの機能を積極的に変える制御様式を獲得したことにより、ゲノム機能の完全性を保つことを可能にした生物であり、いったん成立してしまえば、このシステムを捨てることは不可能なのである。この仮説は、「哺乳類は、いつ、どのようにして哺乳類になったのか？」という問いに対しても新しい観点を与えてくれる。

この成果と並んで哺乳類のゲノム機能の進化について重要な知見が得られた。それは、ゲノムインプリンティングと胎盤の機能の実証するべく、胎盤形成に影響をあたえると予想したインプリンティング領域の網羅的なインプリンティング遺伝子の探索から発見された2つのレトロトランスポゾン由来の遺伝子、Peg10 と Peg11 である。これらはそれぞれ初期胚致死に関係する染色体6番と胎児期後期から新生児での致死に関係する12番のインプリンティング領域に存在している。われわれは、どちらも胎盤形成に重要な領域と考えており、ゲノム配列決定やゲノムウォーキングなどのそれぞれ1 Mb に渡る領域で、網羅的にインプリンティング遺伝子探索を行ってきた。この Peg10 と Peg11 は、胎盤で特異的に高発現する遺伝子であり、遺伝子の相同性解析から、どちらもフグのレトロトランスポゾンに由来するものであることが判った。ゲノムの報告されている哺乳動物の総ての種に保存されていることから、哺乳類の成立前に祖先ゲノム内に挿入されたものであると考えられる。ORF が機能する形で保存されているのはこの2種類の遺伝子だけと少数しか存在しないことも、このレトロトランスポゾン由来の遺伝子の特徴である。これら遺伝子の Knockout による機能解析から、非常に興味深い結果が得られている。

また、途中経過であるが、おそらくこれら2つの遺伝子が、これらが存在するインプリンティング領域の表現型（初期胚致死と胎児期後期から新生児期での致死）の原因遺伝子であると考えている。実際に、Peg11KO は父親由来で伝わると新生児期までに総てが死亡するが、母親由来では問題なく子孫に伝わる。一方、Peg10KO についても父親由来で全く子供が生まれないことから、この遺伝子の欠損が致死性の原因となっていると考えられる。これは、遠い昔に哺乳類の祖先に挿入されたレトロトランスポゾン由来の遺伝子が、現在では哺乳類にとって内在性の遺伝子として機能し、個体発生に必須の機能をしていることを表わしている。すなわち、哺乳類は過去に挿入されたレトロトランスポゾンを、自分自身のゲノム機能として、しかも必須のゲノム機能として利用していることを示した世界で初めての例となる。これらの遺伝子が、なぜインプリンティング遺伝子として存在しているのか？は、今後の課題として残っている。しかし、このレトロトランスポゾンの挿入は

生物進化のどの時期に起きたのか？これらは先程も述べた哺乳類の別のグループである有袋類に加えて卵生を示す単孔類、および鳥類、爬虫類のゲノムとの比較解析によって、直ぐにでも明らかにできるであろう。

同時に解析を進めていた、有袋類のゲノムインプリンティングの解析からは、マウスおよびヒト（真獣類）に見られる4つのインプリンティング遺伝子が有袋類でもインプリンティングを受けていることが明らかになった。しかし、重要なことに真獣類では遺伝子制御に重要な過役割をするDNAメチル化を受ける部位が（少なくとも遺伝子周辺には）存在しない。わたしたちは、これはゲノムインプリンティングの原型を表わしていると考えている。すなわち、有袋類と真獣類の共通の祖先に起きたゲノムインプリンティング機構の獲得した際、この2つのグループでは基本的な制御機構は同じであったが、全く同じではなく、真獣類への進化の際にはDNAメチル化の制御が新たに加わった可能性が高いと考えている。これにより、確実にエピジェネティック記憶が真獣類では伝えられるようになったのではないかと考えている。実際に、多数の有袋類の個体を解析してみると、一部の個体に一部の遺伝子の片親性発現が外れているものが観察されている。これは Polymorphic imprinting として、ヒトでも概念的には報告されているが、われわれは、マウスおよびヒトにおけるこの種の報告は、すべて実験上のアーティファクトであることを確認している。しかし、この現象は、有袋類においては存在している可能性が高いと考えている。すなわち、DNAメチル化機構は、ゲノムインプリンティングの原型には存在しないが、それをより効率的に機能させるシステムとして真獣類が採用したシステムである可能性を、われわれの研究は示唆している。

このように、本プロジェクトは、ゲノムインプリンティングの研究が、そのエピジェネティック機構の起源と進化の問題として、また、レトロトランスポゾン由来の新しい必須遺伝子の獲得という、2つの面から、哺乳類の成立と進化に重要な機能を果たした機構であることを示すことができたと信じている。また今後、有袋類、単孔類および鳥類、爬虫類を含んだ体系的なインプリンティング領域相同領域のゲノム比較と発現調節機構の解析を推進することにより、新しいゲノム機能がどのように獲得され、それが生物進化とどのように関連したかという「哺乳類ゲノム機能進化」プロジェクトが可能となるであろう。これは、ヒトを含む哺乳動物において重要な遺伝子発現機構の起源と進化を解明する、私たち人類にとってかけがいのない知的財産を与えてくれると信じている。

2. 研究構想

平成10年度に立てた目標は、

- 1) 全インプリンティング領域からのインプリンティング遺伝子の同定と各インプリンティング遺伝子クラスターのゲノム解析(東工大と実中研)*
- 2) ゲノムインプリンティングにおける母親性刷込み・父親性刷込みの実態の解明
哺乳類初期胚操作におけるインプリンティングコントロールの検討
(東工大、東海大と感染研)*
- 3) Peg、Meg遺伝子の発現調節機構の分子機構の解明
(東工大、東海大と生命研)*
- 4) インプリンティング遺伝子が胎盤で高発現することの実験的証明
(東工大と東海大)*

であった。(*これらは申請当時の所属である。)

平成11年度からは、有袋類におけるゲノムインプリンティングの解析をプロジェクトに加えた。これも、当初から計画していた内容であるが、オーストラリアとの共同研究を含めて良いという判断をいただいてから、正式にテーマに加えたものである。

5年間のプロジェクトを総括すると、全体としては当初予想していた方向に進むことができ、予想よりも大きなものを得ることができたと考えている。ゲノムインプリンティングの生物学的意義に関して明確な説を打ち立てることができたこと、この機構が、哺乳類進化を実証するための良い系であることを示せたのは、大きな成果であった。反省点としては、Peg、Meg遺伝子の発現調節機構の分子機構の解明については、現在も進めているが完成させることはできていないことが挙げられる。これは、5年前の申請時には、ゲノムインプリンティングは母親性刷込みだけで制御されるというアイデアに基づいていたからである。それまでの卵子の核移植による実験では、父親性刷込み機構の存在が明確にできていなかったことによる。そのため、今から考えれば、インプリンティング因子を捕まえるための遺伝子と精巣、卵巣の組み合わせが正しく無かったことが判る。実際に、生殖細胞クローンの解析結果により、母親性刷込みと父親性刷込みの両者が必須であることが判明し、そこから実験をやり直している。すでに候補の因子の姿は、ゲルシフト解析のバンドとしては見えて来ているが、アミノ酸解析のために必要量を集めているところである。全貌が見えていない状態でとにかく進んで行くために、同時に複数の異なる実験を進めていくという方針が、長期戦略としては十分な意味を持ったと信じている。

ゲノムインプリンティングと体細胞クローニングの2つのエピジェネティクス系を同

時に解析するという方針も、非常に役にたった。当初は、体細胞クローンの異常をゲノムインプリンティングに求めていたが（そしてそのような報告もいくつか出されたが）、実際には、ゲノムインプリンティング記憶は体細胞クローニング技術では安定に保たれることが明らかになり、その結果として生殖細胞クローンの解析を意味あるものとして解析することが可能になった。体細胞クローンのエピジェネティックな異常については現在も研究が進行中であるが、どちらの分野にも有益な知識を還元できたと考えている。

3 . 研究成果

本研究プロジェクトにおいては、共同研究者の先生方には、それぞれの専門分野においての研究をCREST研究とは別に進めてもらいつつ、CREST研究にも協力していただいた。CREST研究に関しては、研究代表者の所属する東京工業大学遺伝子実験施設（現 東京医科歯科大学難治疾患研究所）グループのCREST研究員、大学院生が、各研究機関に出向してそれぞれ専門とするところを実際に御指導いただくか、各研究機関で作製していただいた特殊な研究材料（例えばクローンマウス等）を、東工大が解析するというという体制で行った。そのため、ここに挙げた総ての研究に研究代表者のグループが関与している。共同研究者のグループが単独で進めている研究はないため、以下のように研究項目に共同研究グループの名前を（ ）書きで加えてある

(1) 研究内容及び成果

3 - 1 インプリンティング遺伝子の体系的分離と機能解析

東工大と東海大グループで開発した極微量の生物材料からの遺伝子サブトラクション法に加えて、Affimetrix社のGeneChipによる解析（国立がんセンター研究所大木先生との共同研究）を実施し、新規のインプリンティング遺伝子としてPeg9/Dlk1、Peg12/Frat3 を分離した(Kobayashi et al. 2000, 2002)。

インプリンティング領域の中でも、特に胎盤形成に重要な機能をはたしていると考えた染色体12番遠位部では、ここにはじめて同定したMeg1/Gtl2遺伝子をプローブとしてYACクローンの分離とウォーキングを行った（実中研）。その結果、約1 Mbに渡るYACコンティグから、インプリンティング領域に相当すると考えられた約700kbのDNA配列決定を行った（日立、不二家への解析委託）。この結果に基づき、Peg遺伝子3個、Meg遺伝子4個と多数の母親性発現転写物を含む、この領域の構造を解明した（Miyoshi, et al. 2000, 論文準備中）。また、胎盤形成に重要と思われるもう一つの領域である、染色体6番近位部では、公開されているDNA配列情報を基に、ヒトおよびマウスにおいて約1M

bに存在する遺伝子についてのインプリンティング解析を行い、この領域の遺伝子構造とインプリンティングの状態を明らかにした (Ono et al. 2001, 2003)。

マウスの染色体6番近位部の相同領域であるヒトの染色体7番q21に存在するインプリンティング領域から分離しPEG10と命名した遺伝子は、フグのレトロトランスポゾンであるSushi-ichiと相同性を示すことから、レトロトランスポゾンに由来する遺伝子であると考えられた (図1、図2)。これは、現在、ゲノム配列が報告されている10種類の哺乳動物のゲノム中に存在が確認され、ORFも保存されていることから、機能的に重要な遺伝子であると考えられた。ちなみにフグのゲノムにはこの遺伝子は存在していない。

このヒトPEG10/マウスPeg10の発見につづいて、マウス染色体12番の解析から、同じSushi-ichiレトロトランスポゾンに由来するPeg11が発見された (図1、図2)。Peg10とPeg11はORFにコードされるタンパク質は異なるものの、哺乳類の間ではそれぞれ保存されていた。どちらも胎児よりも胎盤で発現が見られる遺伝子であり、それぞれのインプリンティング領域の異常で致死性が現れる初期胚期、胎児期後期の胎盤で高発現することから (東海大)、これらをこの領域の表現型の原因遺伝子の候補として、ノックアウトマウスの作製と解析を進めた (三菱生命研、東海大)。

Peg11K0マウスは、父親由来で胎児期15.5日目から出生時の間で死亡することが確認された (未発表、論文投稿中)。しかし、これが母親側から伝わる場合には生存や、表現型に全く影響はない。マウス染色体12番のインプリンティング領域にはORFを持つ遺伝子が他に2つ (Peg9/Dlk1とDio3遺伝子) 存在している。これらはどちらも父親性発現を示し、前者のK0マウスでは一部の新生児致死と成長遅滞、後者のK0マウスでは新生児期の成長遅滞と極わずかに新生児致死を伴うことが報告されている。この領域を母親性2倍体にもつ個体が新生児期以降、全く生きることが出来ないことを考えると、Peg11K0の示す表現型がこの領域の主たるものであると考えている (三菱生命研、東海大)。

Peg10K0マウスは現在、その表現型の解析途中であるが、これまでのところ、父親由来では1匹も子供が伝わらないことから、このマウスが致死性を示す可能性は高く (未発表)、予想通り初期胚期で致死になっているかどうかを現在確認中である。この遺伝子を含むマウス染色体6番領域では、これまでに2つのPeg遺伝子 (Peg10とSgce) と、胎盤でのみ片親性発現をする4つのMeg遺伝子を同定しているが、領域はもっと広がっている可能性が高い。しかし、領域全体を制御すると考えられるDifferentially methylated region (DMR)は、Peg10とこれと逆向きに読まれるSgce遺伝子の2つのプロモーター部位領域にのみ存在することから、Peg10領域がこの領域全体の発現制御に重要な部分であると考えている。ちなみに、フグのゲノム配列と比較すると、Sgce遺伝子とNeurabin遺伝子 (母親性発現を示す) の間に、レトロトランスポゾン由来のPeg10が挿入された格

好になっている。

まだ、Peg10とPeg11KOの解析は終了していないが、ここまで得られた結果から、レトロトランスポゾン由来の2つの遺伝子Peg10とPeg11が、哺乳類の個体発生に必須の機能を果たしている可能性が高い。これらの遺伝子は哺乳類では各種には保存されているが、その他の生物種では現在の所、存在している形跡はない。哺乳類の祖先のゲノムに挿入された後、内在性遺伝子として必須の機能を持つ遺伝子になった例と考えられ、哺乳類特異的ゲノム機能にレトロトランスポゾンが関わっていた証拠を示す、はじめての成果になると考えている。まだ、未発表のため後半の具体的なデータを載せていないのをお許し下さい。

3-2 体細胞クローンマウスにおける遺伝子発現の異常の解析

体細胞クローン技術により、哺乳類でも最終的に分化した体細胞から、個体発生をやり直して新たに遺伝的に同一の個体を作り出すことが可能になった。しかし、これら体細胞クローンには高い致死性、胎盤の過剰形成など多くの表現型の異常が観察されたことから、エピジェネティックな異常が起きていると考えられた。ゲノムインプリンティングの異常が、これらと同様な表現型を示すため、感染研（現在、理研バイオリソースセンター）の小倉先生のグループと共同で、ゲノムインプリンティングの異常の有無を詳細に解析した。MITのグループからはES細胞を用いたマウスクローンではゲノムインプリンティングの異常が報告されたが、われわれは体細胞をドナーに用いたクローンではゲノムインプリンティングの片親性発現機構は正確に保たれていることを明らかにした（図3?5）（Inoue et al. 2002）。しかし、クローンマウスの胎盤の解析から、非常に多くの遺伝子（インプリンティング遺伝子と非インプリンティング遺伝子の両方）で発現量が大きく変化していることを合わせて報告した（Inoue et al. 2002、未発表データ）（図6?8）。この結果は、ES細胞クローンで見られるインプリンティング遺伝子や他の幾つかの遺伝子発現の異常が、ドナーに用いたES細胞自身の性質に由来していることを示唆しており、これはその後実際に確認された。すなわち、ES細胞はロックアウトマウス作製に頻繁に利用され万能細胞として考えられてきたが、継代培養をつづけるうちに、エピジェネティックな異常が蓄積している細胞であることが明らかになった。これらの異常は、生殖細胞系列を経由する際に、正常に書き直されるため、ES細胞と正常胚のキメラから子供にKO遺伝子が伝わる時に、これらの異常はクリアされる。しかし、ES細胞自身を用いる、将来の再生医療にとっては重大な問題提起となった。ES細胞に限らず、体外での培養操作に感受性のエピジェネティック系が存在していると考えられ、私たちは、遺伝情報だけでなく、エピジェネティック情報も正しく保持したまま培養する新しい技術改良の必要性を提言している。

また、この結果は、ゲノムインプリンティング記憶は体細胞クローン技術による初期化処理に耐性であり、影響を受けないことを明らかにした。これは、体細胞クローンはドナー細胞のゲノムインプリンティング情報をそのまま受け継ぐために、低頻度ながら生まれると解釈することができる。また、この技術をもちいてドナー細胞のゲノムインプリンティングの情報をクローン胚という形で解析することができることを意味している。そこで、この技術をもちいて生殖細胞系列でのゲノムインプリンティングのリプログラミングの過程の解析を開始した。

3-3 生殖細胞系列におけるゲノムインプリンティングのリプログラミング

精子や卵子などの生殖細胞は、胎児期において生殖隆起(将来の精巣、卵巣になる器官)に始原生殖細胞(Primordial germ cells:PGC)が移住し分化することによって生じる。しかし、移住が完了する胎児期11.5日目では、PGCの数は数百のオーダーであり、十分な数を集められないことから生化学的な解析が進んでいなかった。体細胞クローン技術では一つのPGC細胞からクローン胎児を育てることができるため、このような数の問題を解決できるとともに、細胞集団として解析すると平均することにより消えてしまうPGC細胞のヘテロジェニティーの問題も、クローンであれば個体の解析数を増やすことにより解決できる利点がある。そこで胎児期11.5日目から一日おきに生殖隆起からPGCを採取し、それらから作製されたクローン胚のゲノムインプリンティングの体系的な解析を行った(図9)。

胎児期12.5日目以降のPGCをドナーにしたクローンは、すべて初期胚致死となったが、ゲノムインプリンティングの解析を行えるday10までは生育した(図10)。一方、胎児期11.5日目のPGCからのクローンは、正常胚と同様に非常に良い発生を示すものが見られた。ゲノムインプリンティング解析の結果は、12.5、13.5日目のPGCから作製したクローンでは、総ての個体において同じ発現パターンがみられた。すなわち片親性発現パターンが消失し、両親性発現を示すものと、どちらからも発現が無くなるものである(図11-12)。一方、11.5日目のPGCクローンでは、個体ごとに結果がばらつき、体細胞とほぼ同じ遺伝子発現パターンを取るものから、完全に記憶を消去されたものに近いものまで、色々な段階のもの(部分的に消去されているもの)が存在していることが示された(図11-12)。この12.5日目以降のPGCクローンの結果は、雌雄の胎児で全く同じであることも確認され、これがゲノムインプリンティングの初期化状態であることが示された。一方、11.5日目のPGCクローンにみられた個体差は、ゲノムインプリンティングの消去過程をそのまま反映したものであり、ここにゲノムインプリンティング記憶の消去過程をはじめて見ることに成功した。総てのインプリンティング遺伝子の親由来の記憶は、PGCが生殖隆起に移住が完了したその日のうちに起きるが、このデータから個々のインプリンティング遺伝子における消去の

され易さ(図13)、全体の消去具合によりPGCが生殖隆起に移住した順番も予想できることから、生殖細胞におけるエピジェネティック記憶のリプログラミング過程の詳細が、はじめて明らかになった(Lee et al. 2002)。

重要なことは、PegとMegの両者において、この両方の発現パターンが出現したことである。これにより、インプリンティング遺伝子の発現パターンは4種類に別れた。私たちはこれらを父親性インプリンティング遺伝子、母親性インプリンティング遺伝子という新たな分類を導入することにより、再整理を行った(図14-16)。前者は、初期化状態において発現を消失するPeg遺伝子と、両親性発現をしめすMeg遺伝子を含むグループ(図14)、後者は、逆に初期化状態において両親性発現をしめすPeg遺伝子と、発現を消失するMeg遺伝子のグループである(図15)。実は、この分類は染色体上におけるインプリンティング領域に対応している(図16-17)。すなわち、父親性インプリンティングに対応するインプリンティング領域(図17)と、母親性インプリンティングに対応するインプリンティング領域の両者が存在し、そこに含まれるPegとMegは、それぞれ逆の発現パターンをとっているのである。こうして、ゲノムインプリンティングは個々の遺伝子に関する制御機構ではなく、領域全体を支配する制御機構であることが示唆された。

この実験を、より後期のPGCや精原細胞に拡大することにより、父親性インプリンティングが成立する過程も示すことができた(投稿準備中)。この過程では、父親性インプリンティング領域に属するPegとMegのみの発現が変換され、母親性インプリンティング領域に属する遺伝子の発現は影響を受けないことを確認している。

3-4 体細胞系列における片親性発現パターンの成立機構

生殖細胞での父親性インプリンティング、母親性インプリンティングによる領域全体の制御を受けた後、どのようにして体細胞系列における片親性発現パターンが成立するかを、マウスMeg1/Grb10とヒトGRB10をモデル系として解析した。マウスMeg1/Grb10はわれわれが、サブトラクション法で同定したインプリンティング遺伝子で、全身で母親性発現を示す。ところがヒトの相同遺伝子であるGRB10は両親性発現を示し、ヒトではインプリンティングがかかっていないと考えていた。しかし、その後、イギリスのグループがヒトの脳においてはGRB10遺伝子は父親性発現をすることを報告した。すなわち、マウスでMegであったものがヒトではPegということになってしまった。東工大グループでは、この結果を確認すると共に、マウスにおける脳の再解析を行った。実は、マウスの脳においては、Meg1/Grb10が両親性発現を示すことをわれわれは知っていた。これを脳ではインプリンティングが外れていると解釈していたが、再解析の結果、新生児の脳では両親性発現をするが、成体の脳では父親性発現をすることが明らかになった。すなわち、この遺伝子は、種間、臓

器間、発生のステージの違いによっても、そのインプリンティングのパターンを変化させる遺伝子であることがわかったのである(図18)。幸いにして、この遺伝子は単独で存在しており、周辺の遺伝子にはインプリンティングがかかっていないことから、この遺伝子を体細胞でのインプリンティング遺伝子発現パターン成立のモデルとして最適と考え、詳細に解析を行うことにした。

まず、遺伝子の転写開始点を調べると、マウス、ヒトともに2つのプロモーターが存在しており、マウスでは上流のプロモーターからの転写産物が母親性発現、下流のプロモーターからの転写産物が父親性発現を示すことがわかった(図18)。そして、新生児の脳では、この2つの転写産物が同時に発現するため両親性発現に見え、成体の脳においては上流のプロモーターからの発現が抑制されるため、父親性発現パターンが生じることがわかった。すなわち、インプリンティング状態の変化は、2つのプロモーターの使い分けによって行われていた(図18)。一方、ヒトの場合は、上流のプロモーターからは両親性に発現し、下流のプロモーターからはマウス同様に父親性発現が起きていた(図18)。こうして、下流のプロモーターからの父親性発現はマウスとヒトで共通し、上流のプロモーターからの発現が異なることが明らかになった。2つプロモーター部位はCpGアイランドを形成しているが、下流のみがDMR(differentially methylated region)となっており、母親由来のアリールのみがDNAメチル化されている(図19)。このメチル化のパターンにより下流の遺伝子発現がPegになることは説明できるが、上流の母親性発現をするプロモーター領域にはDNAメチル化の差はなかった。このメチル化のパターンはヒトも同じであり、ヒトの場合に上流のプロモーターから両親性発現をすることと良く対応する。しかし、マウスにおける母親性発現はこの部位のDNAメチル化のパターンでは説明できない。

そこでヒトとマウスのゲノム配列を比較することによって、この発現の差の原因となる領域を探索した。その結果、2つのプロモーター領域は相同性が高いが、下流のプロモーターから上流に向けて約600bpがヒトでは欠失していることがわかった(図20)。そして、この領域にはマウスにおいて特異的な配列の繰り返しが見られた。われわれは、この配列にインスレータータンパク質であるCTCFが結合すること、またこの領域がDNAメチル化を受けることによりこの結合が起きないことを見出した(図21)。インスレーターとはエンハンサー効果をブロックする効果のあるタンパク質である。そこで、遺伝子の下流にエンハンサーが存在すると仮定すると、ヒトとマウスにおける発現を明解に説明できる(図22)。すなわち、マウスの場合、プロモーター、DMR、エンハンサーの組合わせに、インスレーター結合配列が加わると、上流に新たなインプリンティング遺伝子が発現することが説明できる。ヒトGRB10の場合は、遺伝子発現がDMRに直接制御される最も単純な発現機構モデルであり、マウスMeg1/Grb10の場合は、これに加えてエンハンサーとインスレーター

の相互作用による間接的な制御が加わっている。どちらもDMRのメチル化の有無で、発現のパターンは逆転する。すなわち、体細胞における片親性発現パターンは、これらのゲノム機能単位とも言えるものの組み合わせによって決まっていること、そしてDNAメチル化の有無は、PegとMegの発現を同時に逆転する仕組みが存在している。言葉をかえると、PegとMegのReciprocal On=OFFスイッチ機構が、ゲノム配列に内在していると言える。

ゲノムインプリンティングの体細胞における発現制御モデルとしては他にもアンチセンスRNAモデルなどが知られている。これらでは実際の制御の分子機構が異なるが、結果的には、これもPegとMegのReciprocal On=OFFスイッチ機構とみなすことができる。すまわち、インプリンティング領域とは、ゲノム機能単位とDMRの組み合わせにより、PegとMegのReciprocal On=OFFスイッチ機構が内在された領域と考えることができる。

3-5 ゲノムインプリンティングの生物学的意義

上記の実験から、生殖細胞系列で入った記憶（DMRのメチル化の有無）によって、体細胞では、自動的に片親性発現パターンが成立するというゲノムインプリンティングの発現制御体系が理解出来た（図23）。この体系をもとにして、ゲノムインプリンティングの生物学的意義を新たに考えてみる。

重要な点は2つある。一つは、親由来のゲノムインプリンティング記憶が消去された場合、インプリンティング遺伝子は両親性発現を示すものだけでなく、発現を消失するものがあることである。その数は半々であるので、ゲノムインプリンティングの刷り込みが無ければ、発現できないインプリンティング遺伝子が半数存在することになる（図24）。もう一つの点は、体細胞においては、これらの遺伝子はReciprocal On=OFFスイッチ機構によって制御され、片方が発現すると、残りの側が発現抑制される仕組みになっている点である。そこで、もしも初期化状態で発現のないインプリンティング遺伝子を誘導するために、DMRをメチル化すると、これまでに発現していたインプリンティング遺伝子の発現が消失してしまう。すなわち、すべてのPegとMegの発現をそろえるためには、インプリンティングは片親側のみ起こる必要がある（図25）。また、PegとMegには、それぞれ個体発生に必須の遺伝子が含まれているため、現在の哺乳類の個体発生システムにとって、この片親性発現機構は必須であることもわかる。

われわれは、この考えをComplementation仮説として提唱した（Kaneko-Ishino et al. 2003）（図26）が、これはゲノムインプリンティングの片親性発現機構の必然性を説明した初めてのものである。これまで、ゲノムインプリンティングの生物学的意義としてConflict仮説が非常に高い人気を保っている。これは哺乳類が誕生した後、成長促進/抑制に働く遺伝子は、それぞれ徐々に父親/母親性発現となるという説である。しかし、現在で

は例外となる遺伝子数が増えてきており、それに代わる新しい考えが求められていた。われわれの仮説からは、このシステムを獲得した生物が哺乳類になったと考えており、ゲノムインプリンティングと哺乳動物の関係を考える新しい視点が得られたと考えている。ゲノムインプリンティングの生物学的意義を明らかにできたことは、本プロジェクトの最大の成果であると考えている。

3-6 これからのゲノムインプリンティング研究

(哺乳類の進化機構へのアプローチ)

3-1および3-5で示した結果は、どちらも哺乳類特異的ゲノム機能が、哺乳類の進化においてどのように獲得されて来たのかを解析するための良い実験系を提供してくれる。すなわち、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Peg10とPeg11に関しては、高等脊椎動物の進化の過程のどの段階で、このレトロトランスポソンの挿入が起き、どの時点から内在性遺伝子として必須の機能を持つようになったのかという問題（それとなぜこの2つの遺伝子がインプリンティング遺伝子として存在しているのかという問題）であり、ゲノムインプリンティング機構の獲得に関しては、これが哺乳類の進化のどこで起き、それが哺乳動物のどのような変化と関連していたのかという問題である（図28）。

CRESTのテーマに含めていた有袋類のゲノムインプリンティングの解析からは、これまで4つのインプリンティング遺伝子の相同遺伝子を有袋類のワラビーから得ることができた。これらは、マウスやヒトを含む真獣類と同じ親由来の発現パターンを示すことから（論文準備中）、有袋類と真獣類は同じ起源のゲノムインプリンティング機構を有する可能性が高い。しかし、卵生の哺乳類である単孔類では現在までのところ、インプリンティング遺伝子は発見されていない。有袋類は一般には胎盤を持たない生物と考えられているが、実際には、卵黄嚢が変化した機能的には不完全であるが胎盤機能を有した生物である。このことは、胎盤形成とゲノムインプリンティングの密接な関係を示唆している。われわれは、先にインプリンティング遺伝子は胎盤で発現するように制御された遺伝子群であるという、新胎盤仮説を提唱している。はじめに述べたPeg10およびPeg11は、それを実験的に証明するために選んだ候補遺伝子である。これら遺伝子のノックアウトマウスによる機能解析と胎盤における機能を解明することにより、ゲノムインプリンティングと哺乳類進化との関連性を示すこれらの問題（レトロトランスポゾン挿入と胎盤機能、さらにインプリンティングの起源）が、同時に解決できるかもしれない。

また、単孔類、有袋類、真獣類のインプリンティング領域の相同領域のゲノム配列

比較と遺伝子発現解析を同時に進めて行くことも重要である。これらから、具体的なレトロトランスポゾンの挿入時期や、ゲノムインプリンティングという新しい遺伝子発現制御機構の起源が明らかにできるかも知れない。これまでの有袋類における解析から、インプリンティング遺伝子は存在しているが、真獣類において発現制御に重要な機能をしているDNAメチル化部位が見つからない。また、多数の個体を調べるとインプリンティングがかかっていない個体が幾つか発見される。これは、有袋類と真獣類ではゲノムインプリンティングは同じ起源をもつが、真獣類ではさらにDNAメチル化を制御機構に加えることにより、確実な子孫への親由来の記憶の伝達を行えるようになったとも考えられる。

この「哺乳類特異的ゲノム機能」プロジェクトを発展させた「哺乳類ゲノム機能進化」プロジェクトでは、上記の問題にアプローチをすることにより、ヒトを含む哺乳動物の進化をゲノム科学の問題として推進することが可能であると期待している。

図の説明

図1 マウスのゲノムインプリンティング地図

レトロトランスポゾン由来の2つのインプリンティング遺伝子の位置を緑の矢印で示した。Peg10は染色体6番の近位部の初期胚致死効果のあるインプリンティング領域に、Peg11は染色体12番の遠位部の胎児期後期から新生児期の致死に関するインプリンティング領域に発見した遺伝子である。

図2 Peg10とPeg11のコードするタンパク質

この2つの遺伝子はフグのsushi-ichiレトロトランスポゾンに高い相同性を示す。しかし、LTR配列は消失し、タンパク質のコーディングにもレトロトランスポジション活性に必須な部分が欠失しているため、現在はレトロトランスポゾンとしての機能は無いと考えられる。Peg10のタンパク質は、レトロトランスポゾンと同様にフレームシフトによってORF1とORF2が繋がって読まれる。これもこれがレトロトランスポゾンに由来した強力な証拠である。一方、Peg11タンパク質の場合には、一つのコーディングフレームとしてgagとpol部分が読まれている。

図3 体細胞クローンマウスにおけるインプリンティング遺伝子の発現1

Peg1/Mest は父親性発現を示すインプリンティング遺伝子である。遺伝子多型の存在するB6とJF1(日本産の野生マウス由来)を用意し、父親、母親の組み合わせを変えたF1を作製し、それぞれの雄のセルトリ細胞から体細胞クローンを作製した。解析は、胎児期10日目で行ったが、どちらのF1の場合にもドナーに用いた体細胞と同じ片親性発現を忠実に再

現していた。

図4 体細胞クローンマウスにおけるインプリンティング遺伝子の発現 2
Igf2 も、体細胞クローンマウスにおいて父親性発現は忠実に保たれていた。

図5 体細胞クローンマウスにおけるインプリンティング遺伝子の発現 3
体細胞クローンマウスにおいて2つのPegと5つのMegを複数個体調べた結果をまとめた。総てのケースでゲノムインプリンティングの片親性発現パターンは保たれている。これにより、体細胞クローンの初期化処理ではゲノムインプリンティング記憶は影響を受けないことが明らかとなった。

図6 体細胞クローンマウス胎盤における遺伝子発現の異常 1
ゲノムインプリンティングの片親性発現パターンは忠実に保たれていたが、Peg1/Mest、Meg1/Grb10では胎盤において発現量が大幅に減少している。しかし、この種の発現異常は、非インプリンティング遺伝子であるIgf2、Igf2bp2、Igf2bp6、Flk1などにも観察され、インプリンティング遺伝子に特有の現象では無いことが示される。

図7 体細胞クローンマウス胎盤での遺伝子発現異常 2
体細胞クローンでは、出生児は常に過剰形成胎盤を伴っている。胎児期 12.5 日目でもすでに、巨大胎盤を形成しているものが存在している。そこでこの時点で、正常な大きさをもつ胎盤 (clone1) と、巨大胎盤 (clone2) での遺伝子発現を正常の胎盤と比較したのがこの表である。この表には遺伝子発現が減少している遺伝子を示しているが、どちらの胎盤でも正常胎盤と比べ非常に多くの遺伝子の発現が乱れていることがわかる。緑で示したのはインプリンティング遺伝子であるが、それ以外の遺伝子の方が圧倒的に数が多いことが判る。2つの胎盤で共通した異常はオレンジで示したが、共通性とともにも多様性も大きいことが判る。

図8 体細胞クローンマウス胎盤での遺伝子発現異常 3
この表には、発現量が増加した遺伝子を示した。Clone1 は正常の大きさをもつ胎盤であったが、こちらの方が巨大胎盤 (clone2) よりも、発現量の乱れが大きいことが判る。クローンマウスは常に巨大胎盤を伴うことから考えて、clone1 のような個体は、発生途中で致死になるものであった可能性が高い。

図9 生殖細胞からのクローンマウス作製
生殖隆起に移動した始原生殖細胞 (PGC) の一つ一つの細胞から、体細胞クローン技術によってクローン胚を作製した。胎児期 11.5 から 13.5 日までの PGC 由来のクローンの解析により、ゲノムインプリンティングの記憶の消去過程が、はじめて明らかになった。また、後期の PGC と精原細胞を用いたクローンからは父親性インプリンティングの成立過程が示された。

図10 PGC クローンの発生能
胎児期 12.5 日以降の PGC をドナーに用いると、クローンは初期胚致死となり胎児期 10 日以降の発生を行わない。一方、胎児期 11.5 日の PGC 由来のクローンには、正常胚とほぼ同様の発生をするものが含まれていた。後の解析で判るように、胎児期 12.5 日以降の PGC ではゲノムインプリンティングの記憶が完全に消去されている。父親性インプリンティングと母親インプリンティングの両方を欠落した (ゲノムインプリンティングの初期状態にある) 胚は、発生できないことが判る。

図 1 1 ゲノムインプリンティング記憶の消去過程 1

2つの Meg 遺伝子のゲノムインプリンティング記憶の消去過程を示した。胎児期 11.5 日の PGC クローンでは、母親性発現が残っている個体が存在する（赤で示した）が、幾つかのものではすでに両親性発現となっていたり（H19）、発現自体を消失（Igf2r）している。どちらのケースも、父親由来と母親由来の差が消失していることから、ゲノムインプリンティングの消去と見なせる。下に書いてある数字はクローン個体の番号で、赤は雌、青は雄由来の胎児から採取した PGC を用いたことを表わす。胎児期 12.5 日以降では、雄雌由来に関わらず、まったく同一の状態になっていることから、これをゲノムインプリンティングの初期化状態であると結論した。

図 1 2 ゲノムインプリンティング記憶の消去過程 2

Peg 遺伝子にも Meg 遺伝子と同様のパターンが観察された。Peg5 は初期化状態で両親性発現を示し、Igf2 は発現が消失する。こうして Peg と Meg と合わせて 4 つの異なる発現パターン変化が観察された。

図 13 ゲノムインプリンティング記憶の消失過程 3

総てのインプリンティング遺伝子の記憶の消去は胎児期 11.5 日に起きるが、遺伝子によって消去されるタイミングにズレがあることが判る。体細胞クローン技術は 1 つの細胞に由来する個体を解析することになるため、胎児期 11.5 日における PGC 間の状態の差を反映したデータが得られる。これにより、消去過程の詳細なデータが得ることができた。

図 1 4 インプリンティング遺伝子の再分類 1

初期化状態で両親性発現を示す Peg と発現が消失する Meg を一つのグループにまとめた。これらは、この状態のまま、すでに精子の発現パターンと同じになっているため、卵子成熟過程において発現パターンが逆転される必要がある遺伝子である。この意味で、母親性インプリンティングに制御される遺伝子と言える。

図 1 5 インプリンティング遺伝子の再分類 2

ここには、父親性インプリンティングに制御される遺伝子群を並べた。このように、総てのインプリンティング遺伝子を適切に制御するためには、父親性インプリンティングと母親性インプリンティングの 2 つの機構が必要であると結論できた。

図 1 6 インプリンティング遺伝子の再分類 3

Peg と Meg は体細胞における発現をもとにした分類であり、Maternal imprinting、Paternal imprinting は生殖細胞における制御をもとにした分類である。この新しい分類では、Maternal imprinting、Paternal imprinting は異なる組み合わせの Peg と Meg を制御し、制御する方向は誘導と抑制と反対方向になっている。この分類は、次の図に見るように、染色体上のインプリンティング領域に対応している。

図 1 7 父親性インプリンティング領域

インプリンティング地図上に、父親性インプリンティングの制御に従う遺伝子をマークすると、2つの領域におさまる（点線の で囲った領域）。Igf2-H19 領域と Meg3/Dlk1-Peg9/Dkl1 領域の 2 つである（地図には示していないが Rasgrf1 領域もこれに含まれる）。それ以外の領域は母親性インプリンティングの制御に従う領域である。このことからゲノムインプリンティングの生殖細胞系列での刷り込みは、領域単位で起きていることが示唆される。

図 1 8 マウス Meg1/Grb10 とヒト GRB10 の体細胞における発現パターン

体細胞における片親性発現パターンがどのように成立するかをマウス Meg1/Grb10 とヒト GRB10 を例に解析した。この遺伝子は、マウスでは全身で母親性発現、新生児の脳では両親性発現、成体の脳では父親性発現を示す。一方、ヒト相同遺伝子である GRB10 は全身で両親性発現、脳でのみ父親性発現を示す。解析の結果、どちらの遺伝子も 2 つのプロモータを有し、プロモーターの使い分けでインプリンティングの異なるパターンが生じることがわかった。

図 1 9 2 つのプロモーター領域の DNA メチル化

2 つのプロモーター領域は、それぞれ CpG アイランドになっているが、下流の父親性発現を示すプロモータ部位だけが、雄雌由来で DNA メチル化状態の異なる DMR となっていた。この差は、卵子と精子の段階ですでに生じており、生殖細胞における刷り込みのマークとなるものである。この DNA メチル化のパターンはヒトの場合も同様である。ヒトでは上流のプロモーターは両親性発現を示すので、このパターンと整合性はあるが、マウスの母親性発現は説明できない。

図 2 0 マウス Meg1/Grb10 とヒト GRB10 のゲノム配列の比較

上流のプロモーターからの遺伝子発現の違いを説明するため、ヒトとマウスにおけるゲノム配列を比較した。2 つのプロモーター領域は高い相同性を示すが、マウスにのみ特異的に存在するリピート配列が、下流のプロモーターに繋がって存在していることがわかった。

図 2 1 マウス特異的リピート配列への CTCF の結合

マウス特異的リピート配列には、インスレーター活性をもつ CTCF が結合することがゲルシフトアッセイにより示された。この結合は、DNA メチル化により阻害される。

図 2 2 マウス Meg1/Grb10 とヒト GRB10 の発現モデル図

ヒト GRB10 は下流のプロモーターに存在する DMR による直接的な制御を受ける、最も単純なケースを表わしている。マウスの場合は、インスレーターとエンハンサー配列が組み合わせることにより、上流のプロモーターにインプリンティングが新たに生じる。このように、片親性発現の制御はゲノム中に内在する、幾つかのゲノム機能単の組み合わせにより、自動的に生じてくる。また、どちらのケースでも DNA のメチル化の有無によって、発現パターンは同時に逆転することが判る。ゲノムインプリンティングの体細胞における制御の分子機構は、他にもあるがこのような Reciprocal ON-OFF スイッチシステムとなっていることには変わりがない。

図 2 3 ゲノムインプリンティングの遺伝子発現制御体系

生殖細胞で成立した父親性インプリンティングと母親性インプリンティングの目印 (DMR のメチル化) に従って、体細胞では、インプリンティング領域の単位で自動的に Peg と Meg の発現パターン及び発現パターンの逆転が起きる。

図 2 4 初期化状態のゲノムインプリンティング

親由来の記憶が完全に消えた初期化状態のゲノムインプリンティング状態では、体細胞において約半数のインプリンティング遺伝子の発現が起こらない。

図 2 5 ゲノムインプリンティングの刷り込み

父親性インプリンティングは精子形成過程で、父親性インプリンティング領域にある Peg

と Meg の発現パターンを逆転させる。同様に母親性インプリンティングは卵子成熟過程で、母親性インプリンティング領域にある Peg と Meg の発現パターンを逆転させる。こうして体細胞でみられる発現パターンが成立する。

図 2 6 ゲノムインプリンティングの生物学的意義 1

これらの実験を総合することにより、私たちはゲノムインプリンティングの生物学的意義として Complementation 仮説を提唱した。これは、総べての Peg と Meg を発現させるためには、刷り込みは片親に入る必然性があること、インプリンティング遺伝子が片親性発現をすることは、現在の哺乳類の個体発生にとって必須であることを主張している。

図 2 7 ゲノムインプリンティングの生物学的意義 2

この仮説の立場に立つと、哺乳類においてこの機構が保存されている理由が説明できる。すなわち、片親性発現様式の採用により父親と母親由来のゲノム機能を替えることによりゲノム機能の完全性を保つ哺乳類では、いったん成立したこの機構を捨てることは不可能であるからである。

図 2 8 ゲノムインプリンティングと哺乳類の進化

この仮説は、哺乳類の成立に先立ってゲノムインプリンティング機構の獲得が起きていたことを予言する。これまで人気の高かった Conflict 仮説では、哺乳類が成立した後、徐々に片親性発現が成立したと説明していたが、われわれは発現制御体系から考えて、その順番は逆であると考えている。おそらく哺乳類の先祖ではレトロトランスポゾンの挿入に伴うインスレーター配列の出現などにより、一部の染色体領域の不活性化が生じた可能性がある。この Reciprocal ON-OFF スイッチシステムを獲得した(していた)生物のみが、そのような変化に対応できたという考えである。幸運であれば、このような証拠は、私たちのゲノムに残っているかも知れない。哺乳類の3つのグループである単孔類、有袋類、真獣類のゲノムの比較と発現解析により、このゲノムインプリンティング機構の起源と進化が明らかにできると期待している。

4. 研究実施体制

(1)体制

研究代表者

哺乳類ゲノム機能研究グループ(石野史敏)
東京医科歯科大学 難治疾患研究所
エピジェネティクス分野

「体系的な新規ゲノムインプリンティング遺伝子の分離、ゲノムインプリンティングの分子機構解析、および有袋類のゲノムインプリンティング解析」を担当

遺伝子発現研究グループ(金児-石野知子)
東海大学 健康科学部

「In situ hybridizationによる体系的な胎児期におけるインプリンティング遺伝子の発現解析、ゲノムインプリンティングの分子機構解析、および有袋類のゲノムインプリンティング解析」を担当

モデルマウス解析研究グループ(横山峯介)
三菱化学生命科学研究所
マウスゲノム工学センター

「ゲノムインプリンティングの制御領域を重複又は欠失したモデルマウスの作製」を担当

ゲノム構造解析研究グループ(若菜茂晴)
理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター

「ゲノムインプリンティング機構に変異を生じたマウスのスクリーニングの解析」を担当

遺伝子機能解析研究グループ(松田潤一郎)
国立感染症研究所 獣医科学部

「インプリンティング遺伝子の機能解析のための遺伝子改変マウスの作製と解析」を担当

哺乳類発生工学研究グループ(小倉淳郎)
理化学研究所 バイオリソースセンター

「個体発生のエピジェネティクス解析のための体細胞クローン、生殖細胞クローンの作製」を担当

(2)メンバー表

哺乳類ゲノム機能研究グループ(石野史敏)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
石野 史敏	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	教授	全般	H10,12~ H15,11	
幸田 尚	東京工業大学バイ オ研究基盤支援総 合センター	助手	インプリンティング遺伝子の 機能解析、クローンマウス の遺伝子解析	H10,12~ H15,11	
三吉 直樹	科学技術振興機構	研究補助員	新規 <i>Meg</i> 遺伝子の分離	H10,12~ H13,3	CREST 研究補助員
小林 慎	科学技術振興機構	研究員	インプリンティング領域全般 の遺伝子解析	H10,12~ H15,9	CREST 研究員
奥津 倫久	東京工業大学バイ オ研究基盤支援総 合センター	大学院博士課程	インプリンティングの分子 機構解析	H10,12~ H12,3	
我妻 広貴	東京工業大学バイ オ研究基盤支援総 合センター	大学院博士課程	インプリンティング領域全域 の遺伝子解析	H10,12~ H14,3	
引地 貴亮	東京工業大学バイ オ研究基盤支援総 合センター	大学院博士課程 (研究補助員 H15,4~H15,5)	インプリンティングの分子 機構解析	H10,12~ H15,3 H15,4~ H15,5	CREST 研究補助員
李 知英	日本学術振興会外 国人特別研究員	研究員	インプリンティングの分子 機構解析	H11,4~ H15,11	
小野 竜一	東京工業大学バイ オ研究基盤支援総 合センター	大学院博士課程	インプリンティングの分子 機構解析	H13,4~ H15,11	
甲斐 正之	東京工業大学バイ オ研究基盤支援総 合センター	大学院博士課程	インプリンティングの分子 機構解析	H13,4~ H15,11	
小西 淳夫	同上	大学院博士課程	インプリンティング遺伝子の 機能解析	H13,4~ H15,11	

鈴木 俊輔	同上	大学院博士課程	有袋類のゲノムインプリンティングの解析	H15,4~ H15,11	
関田 洋一	同上	大学院博士課程	インプリンティング分子機構解析	H15,4~ H15,11	
中嶋 美佳子	科学技術振興機構	研究事務員	研究チーム事務	H10,12~ H13,3	CREST 研究チーム 事務員
高橋 智子	同上	同上	同上	H13,4~ H16,3	CRSET 研究チーム 事務

遺伝子発現研究グループ(金児-石野知子)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
金児-石野知子	東海大学健康科学部	教授	インプリンティング遺伝子の胎児・胎盤での発現解析とインプリンティングの分子機構解析	H10,12~ H15,11	
齊藤 紀子	科学技術振興機構	技術員	インプリンティング遺伝子の体系的発現部位解析	H11,5~ H15,11	CREST 技術員

モデルマウス解析研究グループ(横山峯介)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
横山 峯介	三菱化学生命科学研究所マウスゲノム工学センター	センター長	インプリンティングの分子機構に関する組み換えマウス作製	H10,12~ H15,11	

ゲノム構造解析研究グループ(若菜茂晴)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
若菜 茂晴	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター	チームリーダー	ゲノムインプリンティングの分子機構に異常を生じた変異マウスのスクリーニング	H10,12~ H15,11	

遺伝子機能解析研究グループ（松田潤一郎）

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
松田 潤一郎	国立感染症研究所 獣医科学部実験動物開発室	室長	インプリンティング遺伝子の機能解析のための TG、KO マウス作製と解析	H10,12~ H15,11	
山本 美江	同上	研究員	TG、KO マウスの生化学検査	H14,4~ H15,11	
秦 朋子	科学技術振興機構	研究補助員	TG、KO マウス作製と飼育	H14,4~ H15,11	CREST 研究補助員

哺乳類発生工学研究グループ（小倉淳郎）

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
小倉 淳郎	理化学研究所バイオリソースセンター	室長	核移植によるクローンマウスなどの特殊な発生胚の作製と解析	H10,12~ H15,11	
井上 貴美子	同上	研究員	核移植による特殊な発生胚の作製と解析	H12,4~ H15,11	
越後貫 成美	同上	研究員	同上	H14,4~ H15,11	

5. 研究期間中の主な活動

なし

6 . 石野史敏 主な研究成果物 (1999-2003)

(1) 論文発表 (国内 1 3 件、国外 1 9 件)

- 1) Li, L-L, E. B. Keverne, S. A. Aparicio, F. Ishino, S. C. Barton and M. A. Surani. Regulation of maternal behavior and offspring growth by paternally expressed *Peg3*. *Science* **284** (5412), 330-333 (1999).
- 2) 石野史敏、金児-石野 知子 哺乳類における父親由来、母親由来のゲノム機能の差 *バイオサイエンスとインダストリー* **57** (9), 9-16 (1999).
- 3) Miyoshi, N, Wagatsuma, H, Wakana, S, Shiroishi, T, Nomura, M, Aisaka, K, Kohda, T, Surani, M A, Kaneko-Ishino, T and Ishino, F: Identification of an imprinted gene, *Meg3/Gtl2* and its human homologue *MEG3*, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genes to Cells* **5** (3), 211-220, 2000.
- 4) Okutsu, T., Y. Kuroiwa, F. Kagitani, M. Kai, K. Aisaka, O. Tsutsumi, Y. Kaneko, K. Yokomori, M. A. Surani, T. Kohda, T. Kaneko-Ishino and F. Ishino. Expression and imprinting status of human *PEG8/IGF2AS*, a paternally expressed antisense transcript from the IGF2 locus, in Wilms' tumors. *J. Biochemistry* **127** (3), 475-483, 2000.
- 5) Ogura, A, Inoue, K, Ogonuki, N, Noguchi, A, Takano, K, Nagano, R, Suzuki, O, Lee, J, Ishino F and Matsuda, J: Production of male clone mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol. Reprod.* **62** (6), 1579-1584, 2000.
- 6) Kobayasi, S, Wagatsuma, H, Ono, R, Ichikawa, H, Yamazaki, M, Tashiro, H, Aisaka, K, Miyoshi, N, Kohda, T, Ogura, A, Ohki, M, Kaneko-Ishino, T and Ishino, F: 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.
- 7) 石野史敏
育児遺伝子 *小児科診療* **63** (8), 1230-1231 (2000).
- 8) 石野史敏、金児-石野 知子
哺乳類のゲノムインプリンティング研究から見えてくるもの *蛋白質・核酸・酵素* **45** (12) 1909-1919 (2000).
- 9) 石野史敏、金児-石野 知子
ゲノムインプリンティング *BioClinica* **15** (10), 85-90 (2000).
- 10) 石野史敏、金児-石野 知子
哺乳類の行動遺伝子とゲノムインプリンティング *科学* **70** (4), 290-295 (2000).
- 11) 石野史敏、金児-石野 知子
哺乳類のゲノムインプリンティング *遺伝* **54** (1), 77-81 (2000).
- 12) Ono, R, Kobayashi, S, Wagatsuma, H, Aisaka, K, Kohda, T, Kaneko-Ishino, T and Ishino, F: A retrotransposon-derived gene, *PEG10*, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21. *Genomics* **73** (2), 232-237, 2001.

- 13) Kohda, T, Asai, A, Kuroiwa, Y, Kobayashi, S, Aisaka, K, Nagashima, G, Yoshida, M C, Kondo, Y, Kagiya, N, Kirino, T, Kaneko-Ishino, T and Ishino, F: Tumor suppressor activity of human imprinted gene *PEG3* in a glioma cell line. *Genes to Cells* **6** (3), 237-247, 2001.
- 14) Kobayashi, S, Uemura, T, Kohda, T, Nagai, T, Chinen, Y, Naritomi, K, Kinoshita, E, Ohashi, H, Imaizumi, K, Tsukahara, M, Sugio, Y, Tonoki, H, Kishino, T, Tanaka, T, Yamada, M, Tsutsumi, O, Niikawa, N, Kaneko-Ishino, T and Ishino, F: No evidence of *PEG1/MEST* gene mutations in Silver-Russell syndrome patients. *Am. J. Med. Genet.* **104** (3), 225-231, 2001.
- 15) 石野史敏、金児-石野 知子
ゲノムインプリンティング 「ポストシーケンスのゲノム科学」 4巻 ゲノムから
個体へー生命システムの理解へーpp.164-179 (2001).
- 16) 石野史敏、金児-石野 知子 インプリンティングとその分子機構 特集生殖医学のゆく
え *Hormone Frontier in Gynecol.* **8** (1), 11-16 (2001).
- 17) Ishino F, Kuroiwa Y, Miyoshi N, Kobayashi S, Kohda T, Kaneko-Ishino, T:
Subtraction-hybridization method for the identification of imprinted genes. In
Methods Mol Biol. (ed A. Ward) Vol. 181; p101-p112, 2001.
- 18) Inoue, K, Kohda, T, Lee, J, Ogonuki, N, Mochida, K, Noguchi, Y, Tanemura, K,
Kaneko-Ishino, T, Ishino F and Ogura, A: Faithful expression of imprinted genes in
cloned mice. *Science* **295** (5553): 297, 2002.
- 19) Lee, J, Inoue, K, Ono, R, Ogonuki, N, Kohda, T, Kaneko-Ishino, T, Ogura, A and
Ishino, F: Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced
from day-11.5 primordial germ cells. *Development* **129** (9), 1807- 1817, 2002.
- 20) Ogura, A, Inoue, K, Lee, J, Kohda, T and Ishino, F: Phenotypic effects of somatic cell
cloning in the mouse. *Cloning and Stem Cells* **4** (4), 397-405, 2002.
- 21) Ishino, F, Kuroiwa, Y, Miyoshi, N, Kobayashi, S, Kohda T and Kaneko- Ishino, T: A
subtraction-hybridization method. *In Methods in Molecular Biology* Vol.181:
Genomic Imprinting (ed. A. Ward) Humana press pp.101-121, 2002.
- 22) Kobayashi, S, Kohda, T, Ichikawa, H, Ogura, A, Ohki, M, Kaneko-Ishino, T and
Ishino, F: 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** (1), 403-408, 2002.
- 23) Kohda, T, Lee, J, Inoue, K, Ogonuki, N, Wakisaka-Saito, N, Kaneko-Ishino, T, Ogura,
A and Ishino F: 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.
- 24) 金児-石野 知子、幸田尚、石野史敏
クローンマウスにおけるエピジェネティクス 特集 クローン動物の頻発異常とエピ
ジェネティクス 蛋白質・核酸・酵素 **47** (13) 1816-1821 (2002).

- 25) 石野史敏、幸田尚、金児-石野 知子
ES 細胞と体細胞のエピジェネティクス 特集 細胞分化の全能性とリプログラミング
細胞工学 **21** (8) 848-852 (2002).
- 26) 石野史敏 ゲノムインプリンティングと体細胞クローニング ?哺乳動物の個体発生
のプログラミング? 特集 ゲノムインプリンティング 医学の歩み 202 (4) 1041-1045
(2002).
- 27) Hikichi, T, Kohda, T, Kaneko-Ishino, T and Ishino, F: 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.
- 28) Ishino, F, Kohda T and Kaneko-Ishino, T: The regulation and biological significance
of genomic imprinting in mammals. J. Biochem. (Review) 133 (6), 699-711 (2003).
- 29) Ono, R, Shiura, H, Abratani, Y, Kohda, T, Kaneko-Ishino, T and Ishino F:
Identification of a large novel imprinted gene cluster on mouse proximal
chromosome 6. Genome Res. 13 (7), 1696-1705, 2003.
- 30) Inoue, K, Ogonuki, N, Mochida, K, Yamamoto, Y, Takano, K, Kohda, T, Ishino, F and
Ogura, A: Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse
somatic cell cloning. Biol. Reprod. 69 (4), 1934-1400, 2003.
- 31) 金児-石野 知子、幸田尚、石野史敏
ゲノムインプリンティングと生殖医療 特集 生殖医療のすべて 医学のあゆみ 204
(13), 969-973 (2003).
- 32) 石野史敏 哺乳類の個体発生におけるエピジェネティックな記憶の再プログラム化 特集
再生医療へと動き始めた幹細胞研究の最先端 実験医学 21 (8) 1103-1107 (2003).

(2) 口頭発表

招待、口頭発表 (国内 35 件 , 海外 11 件)

招待・口頭発表

- 1) 石野史敏 哺乳類のゲノムインプリンティング研究から見えてくるもの
第 11 回哺乳動物生殖工学研究会 平成 11 年 12 月 4 日 (北里大学、東京)
- 2) 石野史敏 ゲノムインプリンティングとヒト遺伝子疾患
第 18 回小児内分泌・代謝フォーラム 平成 12 年 1 月 15 日 (住友製薬東京支店ビル、東京)
- 3) 石野史敏 マウス染色体 1 2 番のインプリンティング領域について
平成 11 年度国立遺伝学研究所研究集会 DNA メチル化に基づくゲノム機能のダイナミクス
平成 12 年 3 月 16 日 17 日 (国立遺伝学研究所、三島)
- 4) 石野史敏 哺乳類のゲノムインプリンティングと母性保育行動
第 52 回動物学会関東支部シンポジウム「動物行動学の最先端 - 解きあかされつつある行動
本能」平成 12 年 3 月 30 日 (東京都立大、東京)
- 5) 石野史敏 胎児・胎盤におけるゲノムインプリンティング
第 12 回白樺湖カンファレンス 「妊娠の生物学」平成 12 年 9 月 30 日 (三井の森)

- 6) 石野史敏、幸田尚、金児-石野知子 ゲノムインプリンティングからのガン研究へのアプローチ 第 59 回日本癌学会 シンポジウム「ポストシーケンス時代におけるがんのゲノム解析」平成 12 年 10 月 5 日 (横浜、パシフィコ横浜)
- 7) **Fumitoshi Ishino** Epigenetic regulation in cancer and development: tumor suppressor activity of human imprinted gene *PEG3*. The Thirty-first International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund "DNA methylation and Cancer" 平成 12 年 11 月 8 日 (東京、パレスホテル)
- 8) 石野史敏、三吉直樹、小林慎、幸田尚、金児-石野知子
父親由来、母親由来のゲノムの機能 ゲノムインプリンティングと母性行動
第 23 回日本分子生物学会年会シンポジウム「ゲノムからヒト・人間を見る」
平成 12 年 12 月 13 日 (神戸、神戸国際会議場)
- 9) **Fumitoshi Ishino** Genomic imprinting and cancers: Human *PEG3* as a tumor suppressor in gliomas Genomic Imprinting International Workshop in Japan "Cancer and Genetic Disorder" 平成 13 年 1 月 14 日 (大阪、千里ライフサイエンスセンター)
- 10) 幸田尚 ゲノムインプリンティングと生殖医療
第 5 回日研シンポジウム「不妊 治療の最前線」平成 13 年 2 月 10 日 (名古屋、毎日ビル国際サロン)
- 11) 石野史敏 個体および細胞におけるゲノムインプリンティングの機能
横浜市立大学木原生物学研究所セミナー「染色体構造と細胞機能」平成 13 年 3 月 14 日 (横浜、木原生物学研究所)
- 12) 幸田尚、石野史敏 クローンマウスのエピジェネティクス
平成 12 年度国立遺伝学研究所研究集会「DNA メチル化依存性のエピジェネティクス」
平成 13 年 3 月 22 日 (三島、遺伝研)
- 13) 石野史敏、石野-金児知子、小倉淳郎、若菜茂晴、横山峯介 「哺乳類特異的ゲノム機能」
CREST シンポジウム 平成 13 年 4 月 29 日 (東京：東京ガーデンパレス)
- 14) 石野史敏 体細胞系列・生殖細胞系列におけるゲノムインプリンティング?ゲノム機能とエピジェネティクス?
平成 13 年度大阪大学蛋白質研究所セミナー「遺伝子発現制御におけるエピジェネティクスの展開」平成 13 年 6 月 29 日?30 日 (大阪、阪大)
- 15) 石野史敏 ヒトゲノムの刷込み現象 (父性・母性の遺伝)
第 38 回全国保険管理研究会関東甲信越地方部会 平成 13 年 7 月 5 日 (東京、東工大)
- 16) **Fumitoshi Ishino**, Jiyoung Lee, Kimiko Inoue, Takashi Kohda, Tomoko Kaneko-Ishino and Atsuo Ogura. Erasing process of genomic imprinting memories in primordial germ cells. 14th International Congress of Developmental Biology Symposium 'Functional genomics in developmental biology. July 8-12, 2001 (Kyoto, Kyoto International Conference Hall).
- 17) 幸田尚 成長とゲノムインプリンティング
小児分子内分泌研究会 平成 13 年 7 月 20 日 (函館)
- 18) **Fumitoshi Ishino**, Naoki Miyoshi, Atsuo Konishi, Noriko Wakisaka-Saito, Rika Suzuki, Kaori Muguruma, Bruce D. Cattanach, Takashi Kohda, Sigeharu Wakana, Minesuke Yokoyama and Tomoko Kaneko-Ishino. *Meg1/Grb10* overexpression influences neonatal growth and type II diabetes development. Mouse Molecular Genetics Meeting 'Mouse Models For Human Diseases' 22-26 August (EMBL in Heidelberg, Germany).
- 19) 石野史敏 哺乳類の個体発生とインプリンティング遺伝子 *Peg* と *Meg*

第35回日本内分泌学会ランチョンセミナー 平成13年10月3日?5日(東京、東京ビックサイト)

- 20) **石野史敏** 体細胞クローンとゲノムインプリンティング
哺乳動物遺伝学研究会 平成13年10月12日?13日 (熊本、南阿蘇休暇村)
- 21) **李知英**、井上貴美子、小野竜一、越後貫成美、幸田尚、金児?石野、知子、小倉淳郎、石野史敏
PGCクローンをを用いたゲノムインプリンティング消去過程の解析
シンポジウム「エピジェネティクス：DNAメチル化とクロマチン」第74回日本生化学会
平成13年10月25日?28日(京都、京都国際会議場)
- 22) **Fumitoshi Ishino**, Jiyoung Lee, Kimiko Inoue, Takashi Kohda, Tomoko Kaneko-Ishino and Atsuo Ogura. Analysis of cloned embryos derived from primordial germ cells - Erasing process of genomic imprinting memory- International Symposium 'Development and Epigenetics of Mammalian Germ Cells and Pluripotent Stem Cells' November 19-21 (Kyoto, Miyako Hotel).
- 23) **石野史敏** 李知英、井上貴美子、小野竜一、越後貫成美、幸田尚、金児?石野 知子、小倉淳郎
クローンマウスにおけるゲノムインプリンティング
第24回日本分子生物学会 ワークショップ「ゲノム機能におけるエピジェネティクス」
平成13年12月9日?12日(横浜、パシフィコ)
- 24) **幸田尚**、井上貴美子、李知英、小西淳夫、越後貫成美、脇阪?斎藤紀子、市川仁、大木操、山崎由紀子、若山照彦、柳町隆造、金児?石野知子、小倉淳郎、石野史敏
マウス体細胞クローンにおける遺伝子発現の制御
第24回日本分子生物学会 ワークショップ「ゲノム機能におけるエピジェネティクス」
平成13年12月9日?12日(横浜、パシフィコ)
- 25) **石野史敏**、横山峯介、幸田尚、小倉淳郎、金児?石野知子
マウスにおけるジェネティクスとエピジェネティクス 第24回日本分子生物学会 シンポジウム「ポストゲノムを支えるモデル生物：マウス」平成13年12月9日?12日(横浜、パシフィコ)
- 26) **石野史敏**、幸田尚、李知英、井上貴美子、脇阪?斎藤紀子、金児?石野、知子、小倉淳郎
クローンマウスにおけるゲノムインプリンティング
第31回日本免疫学会 シンポジウム「New horizons in stem cell biology」
平成13年12月11日?13日(大阪、大阪国際会議場)
- 27) Lee, J., T. Kohda, K. Inoue, N. Ogonumki, T. Kaneko-Ishino, A. Ogura and **F. Ishino**. Epigenetic regulation of cloned mice produced from somatic and primordial germ cells. Keystone symposium 'Epigenetics in Development and Disease' 'DNA methylation and Development' 21-26 February, 2002 (Taos, New Mexico, USA).
- 28) **幸田尚** クローンマウスのエピジェネティクス
平成13年度国立遺伝学研究所研究集会「DNAメチル化が関与する生命現象」
平成14年3月14日?15日(三島、遺伝研)
- 29) **Fumitoshi Ishino**, Takashi Kohda, Jiyoung Lee, Kimiko Inoue, Narumi Ogonuki, Tomoko Kaneko-Ishino and Atsuo Ogura. Genomic imprinting memory in cloned mice produced from somatic cells and primordial germ cells. Imprinting and Growth Congress 2002 'Imprinting mechanism' 11-13 April, 2002 (London, imperial College).
- 30) **Fumitoshi Ishino** Epigenetic regulation in mammalian development and diseases -Somatic cloning and genomic imprinting- Uehara Memorial Foundation Symposium 2002 June 3-5, 2002 (Tokyo, Keio Plaza Inter-Continental).
- 31) **石野史敏** ゲノムインプリンティングの体系と分子機構

哺乳動物遺伝学研究会 平成 14 年 6 月 27 日?28 日 (北海道、支笏湖丸駒温泉)

- 32) **Fumitoshi Ishino**, Jiyoung Lee, Takashi Kohda, Kimiko Inoue, Narumi Ogonuki, Tomoko Kaneko-Ishino and Atsuo Ogura. 2002 Meeting on Mouse Molecular Genetics August 29-September 1, 2002, (New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- 33) **石野史敏**、幸田尚、金児?石野知子
ゲノムインプリンティングの生物学的意義について
日本遺伝学会第 74 回大会 ワークショップ「ゲノム内コンフリクトと超利己的な遺伝子」
平成 14 年 10 月 1 日?3 日(福岡、九州大学)
- 34) **石野史敏**、幸田尚、李 知英、金児?石野知子、井上貴美子、越後貴成美、小倉淳郎
体細胞・生殖細胞クローンマウスのエピジェネティクス 第 75 回日本生化学会大会 シンポジウム「細胞分化の全能性」平成 14 年 10 月 14 日?17 日(京都 国際会議場)
- 35) **石野史敏** 体細胞クローンマウスにおける遺伝子発現異常とゲノムインプリンティング
第 7 回開放的融合研究公開シンポジウム 平成 14 年 10 月 21 日?22 日(東京 国立ガンセンター国際研究交流)
- 36) **石野史敏** 体細胞・生殖細胞クローンマウスのエピジェネティクス
第 5 回バイオ胎盤シンポジウム 平成 14 年 10 月 28 日?29 日(東京、国立オリンピック記念青少年総合センター)
- 37) **石野史敏** 哺乳類のゲノムインプリンティング
中央畜産技術研修会講演 平成 14 年 11 月 21 日(新白河 畜産技術研究所)
- 38) **石野史敏**、幸田尚、小倉淳郎、金児?石野知子
哺乳類の体細胞・生殖細胞系列のエピジェネティクス 第 25 回日本分子生物学会
平成 15 年 12 月 11 日?14 日(横浜 パシフィコ横浜)
- 39) **石野史敏** 生殖細胞・体細胞クローンにおける遺伝子発現
特定領域研究「生殖細胞系列の制御機構と発生工学」公開シンポジウム
平成 15 年 2 月 6 日(京都、京都キャンパスプラザ)
- 40) **石野史敏** 哺乳類特異的ゲノム機能としてのゲノムインプリンティングーその発現制御機構についてー
横浜市立大学木原生物学研究所セミナー「クロマチンと遺伝子機能」
平成 15 年 3 月 20 日?21 日(横浜、横浜市大)
- 41) Fumitoshi Ishino Epigenetic systems essential for mammalian development - Somatic clones and Genomic imprinting- The 1st International Symposium on Developmental Biology and Tissue Engineering 24th March, 2003 (Yokohama, Tokyo Inst. Tech.)
- 42) **石野史敏** 哺乳類のゲノムインプリンティングの発現制御体系と生物学的意義について
理化学研究所バイオリソースセンターセミナー 平成 15 年 6 月 20 日(筑波、理研 BRC)
- 43) **石野史敏** Genomic imprinting in mammals -its regulation system and biological significance 第 76 回日本生化学会大会シンポジウム「DNA のメチル化と胚発生」
平成 14 年 10 月 15 日?18 日(横浜 横浜パシフィコ)
- 44) **石野史敏** ゲノムインプリンティングと生殖医療
東京生殖医療懇談会 平成 15 年 11 月 13 日(東京 全日空ホテル)
- 45) **石野史敏** 哺乳類のゲノムインプリンティング
中央畜産技術研修会講演 平成 15 年 11 月 18 日(新白河 畜産技術研究所)
- 46) Fumitoshi Ishino Epigenetic regulation in mammalian development and diseases
International Symposium for 30th Anniversary of Medical Research Institute, Tokyo

ポスター発表 (国内 21 件, 海外 6 件)

- 1) 我妻広貴、三吉直樹、若菜茂晴、幸田尚、石野(金児)知子、石野史敏
新規インプリンティング領域における母性発現遺伝子 Meg3 遺伝子の同定
第 22 回日本分子生物学会年会 平成 11 年 12 月 7-10 日(福岡)
- 2) 小林慎、上村拓、新川詔夫、山田正夫、山崎亮、幸田尚、石野(金児)知子、石野史敏
Silver-Russell 症候群における PEG1/MEST 遺伝子の変異解析
第 22 回日本分子生物学会年会 平成 11 年 12 月 7-10 日(福岡)
- 3) 奥津倫久、甲斐正之、横森欣司、金子安比古、横山峯介、鈴木理可、石野(金児)知子、
幸田尚、石野史敏 IGF2 のアンチセンストランスクリプト PEG8/IGF2AS の父性発現と
Wilms 腫瘍における過剰発現
第 22 回日本分子生物学会年会 平成 11 年 12 月 7-10 日(福岡)
- 4) 甲斐正之、奥津倫久、横山峯介、鈴木理可、小倉淳郎、石野(金児)知子、幸田尚、
石野史敏
精子形成異常および運動性失調症状を示すトランスジェニックマウスの解析 第 22 回日本
分子生物学会年会 平成 11 年 12 月 7-10 日(福岡)
- 5) Hirotaka Wagatsuma, Naoki Miyoshi, Takashi Kohda, Tomoko Kaneko-Ishino and Fumitoshi
Ishino. Analysis of an imprinted gene, Meg3/Gtl2 and its human homologue Meg3, first
mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. Mouse Molecular
Genetics (New York: Cold Spring Harbor Laboratory) 2000 年 9 月 1 日
- 6) 三吉直樹、小西淳夫、脇阪-斎藤紀子、鈴木理可、横山峯介、六車香里、若菜茂晴、幸田尚、
石野史敏、金児-石野知子
Meg1/Grb10 トランスジェニックマウスの解析 (II)
第 23 回日本分子生物学会年会 12 月 14 日(神戸、神戸国際会議場)
- 7) 幸田尚、李知英、種村健太郎、引地貴亮、井上貴美子、松田潤一郎、金児-石野知子、
小倉淳郎、石野史敏
マウス体細胞クローンにおける遺伝子発現の異常
第 23 回日本分子生物学会年会 12 月 15 日(神戸、神戸国際会議場)
- 8) 引地貴亮、李知英、甲斐正之、井上貴美子、幸田尚、松田潤一郎、金児-石野知子、
小倉淳郎、石野史敏
Primary Spermatocytes を用いた特殊再構成胚の解析
第 23 回日本分子生物学会年会 12 月 15 日(神戸、神戸国際会議場)
- 9) 小野竜一、小林慎、合阪幸三、幸田尚、金児-石野知子、石野史敏
新規インプリンティング遺伝子 PEG10 の解析
第 23 回日本分子生物学会年会 12 月 15 日(神戸、神戸国際会議場)
- 10) 小林慎、小野竜一、我妻広貴、市川仁、小倉淳郎、幸田尚、大木操、金児-石野知子、
石野史敏
DNA Chip を用いたインプリンティング遺伝子の体系的スクリーニング
第 23 回日本分子生物学会年会 12 月 16 日(神戸、神戸国際会議場)
- 11) 小野竜一、志浦寛相、油谷浩幸、幸田尚、金児-石野知子、石野史敏
マウス 6 番染色体近位部の新規インプリンティングクラスターの解析
第 24 回日本分子生物学会 平成 13 年 12 月 9 日?12 日(横浜、パシフィコ)

- 12) 我妻広貴、関田洋一、吉沢洋一、山崎正明、田代弘行、幸田尚、金児?石野知子、石野史敏
マウス染色体 1 2 番に存在するインプリンティング領域の解析
第 24 回日本分子生物学会 平成 13 年 12 月 9 日?12 日 (横浜、パシフィコ)
- 13) 李知英、井上貴美子、小野竜一、越後貫成美、幸田尚、金児?石野、知子、小倉淳郎、
石野史敏
PGC クローンを用いたゲノムインプリンティング消去過程の解析
第 24 回日本分子生物学会 平成 13 年 12 月 9 日?12 日 (横浜、パシフィコ)
- 14) 小林慎、幸田尚、市川仁、小倉淳郎、大木操、金児?石野知子、石野史敏
Oligonucleotide array を用いた新規インプリンティング遺伝子の同定
第 24 回日本分子生物学会 平成 13 年 12 月 9 日?12 日 (横浜、パシフィコ)
- 15) 金児?石野知子、三吉直樹、小西淳夫、脇阪?斎藤紀子、鈴木理可、六車香里、若菜茂晴、
幸田尚、横山峯介、石野史敏 Meg1/Grb10 の過剰発現による 2 型糖尿病の発症
第 24 回日本分子生物学会 平成 13 年 12 月 9 日?12 日 (横浜、パシフィコ)
- 16) 脇阪?斎藤紀子、三吉直樹、小野竜一、幸田尚、山崎正明、田代弘行、須賀孝夫、沓澤智子、
金児?石野知子、石野史敏 糖尿病における GRB10 遺伝子変異のスクリーニング
第 24 回日本分子生物学会 平成 13 年 12 月 9 日?12 日 (横浜、パシフィコ)
- 17) Fumitoshi Ishino, Naoki Miyoshi, Atsuo Konishi, Noriko Wakisaka-Saito, Rika Suzuki,
Kaori Muguruma, Bruce M. Cattanch, Takashi Kohda, Shigeharu Wakana, Minesuke Yokoyama
and Tomoko Kaneko-Ishino. Meg1/Grb10 overexpression influences postnatal growth and
type II diabetes development by affection insulin cascade. Keystone symposium
“Diabetes Mellitus: Molecular Mechanisms, Genetics and New Therapies. 10-16 January,
2002 (Colorado, USA).
- 18) Takashi Kohda, Jiyoung Lee, Kimiko Inoue, Narumi Ogonuki, Atsuo Ogura, Tomoko
Kaneko-Ishino and Fumitoshi Ishino. Genomic imprinting and epigenetic regulation in
somatic cell cloning. Imprinting and Growth Congress 2002 'Imprinting mechanism'
11-13 April, 2002 (London, imperial College).
- 19) Jiyoung Lee, Kimiko Inoue, Ryuichi Ono, Narumi Ogonuki, Takashi Kohda, Tomoko
Kaneko-Ishino, Atsuo Ogura and Fumitoshi Ishino. Erasing genomic imprinting memory
in mouse clone embryos produced from day-11.5 primordial germ cells. Imprinting and
Growth Congress 2002 'Imprinting mechanism' 11-13 April, 2002 (London, imperial
College).
- 20) Ryuichi Ono, Hirosuke Shiura, Takashi Kohda, Tomoko Kaneko-Ishino and Fumitoshi Ishino.
Analysis of a PEG10/SGCE domain, on human chromosome 7q21 and mouse proximal chromosome
6. Imprinting and Growth Congress 2002 'Imprinting mechanism' 11-13 April, 2002
(London, imperial College)
- 21) 鈴木俊介、小林慎、幸田尚、Marilyn Renfree, 金児?石野知子、石野史敏
有袋類におけるインプリンティング遺伝子のスクリーニング
第 25 回日本分子生物学会 平成 14 年 12 月 11 日?14 日 (横浜 パシフィコ横浜)
- 22) 脇阪?斎藤紀子、小野竜一、我妻広貴、関田洋一、幸田尚、金児?石野知子、石野史敏
哺乳類のゲノムインプリンティング遺伝子の胎盤における発現 第 25 回日本分子生物学会
第 25 回日本分子生物学会 平成 14 年 12 月 11 日?14 日 (横浜 パシフィコ横浜)
- 23) 幸田尚、井上貴美子、李知英、小西淳夫、越後貫成美、脇阪?斎藤紀子、市川仁、大木操、
山崎由紀子、若山照彦、柳町隆造、金児?石野知子、小倉淳郎、石野史敏
マウス体細胞クローンにおける遺伝子発現の異常

- 第 25 回日本分子生物学会 平成 14 年 12 月 11 日?14 日 (横浜 パシフィコ横浜)
- 24) 小野竜一、志浦寛相、油谷浩幸、幸田尚、金児?石野知子、石野史敏
 マウス 6 番染色体近位部 Peg10-Sgce インプリンティングクラスターの解析
 第 25 回日本分子生物学会 平成 14 年 12 月 11 日?14 日 (横浜 パシフィコ横浜)
- 25) 関田洋一、我妻広貴、幸田尚、金児?石野知子、石野史敏
 マウス 1 2 番染色体に存在するインプリンティング領域の解析? 2
 第 25 回日本分子生物学会 平成 14 年 12 月 11 日?14 日 (横浜 パシフィコ横浜)
- 26) 引地貴亮、志浦寛相、三吉直樹、幸田尚、金児?石野知子、石野史敏
 マウス Meg1/Grb10 およびヒト GRB10 発現制御機構の解析
 第 25 回日本分子生物学会 平成 14 年 12 月 11 日?14 日 (横浜 パシフィコ横浜)
- 27) Fumitoshi Ishino The regulation and biological significance of genomic imprinting
 in mammals Gordon Research Conference 10th ?15th August, 2003 (New Hampsher, USA)

プレス発表 1 件
 平成 14 年 1 月 9 日
 「体細胞クローンの異常について」

(3) 特許出願 国内 1 件 , 海外 1 件

1. ・発明の名称「糖尿病発症モデル哺乳動物」
 ・出願番号 特願平 11-298273
 ・出願日 1999 年 10 月 20 日
2. ・発明の名称「糖尿病発症モデル哺乳動物」
 ・出願番号 PCT/JP00/05546
 ・出願日 2000 年 8 月 18 日

(4) 新聞報道等

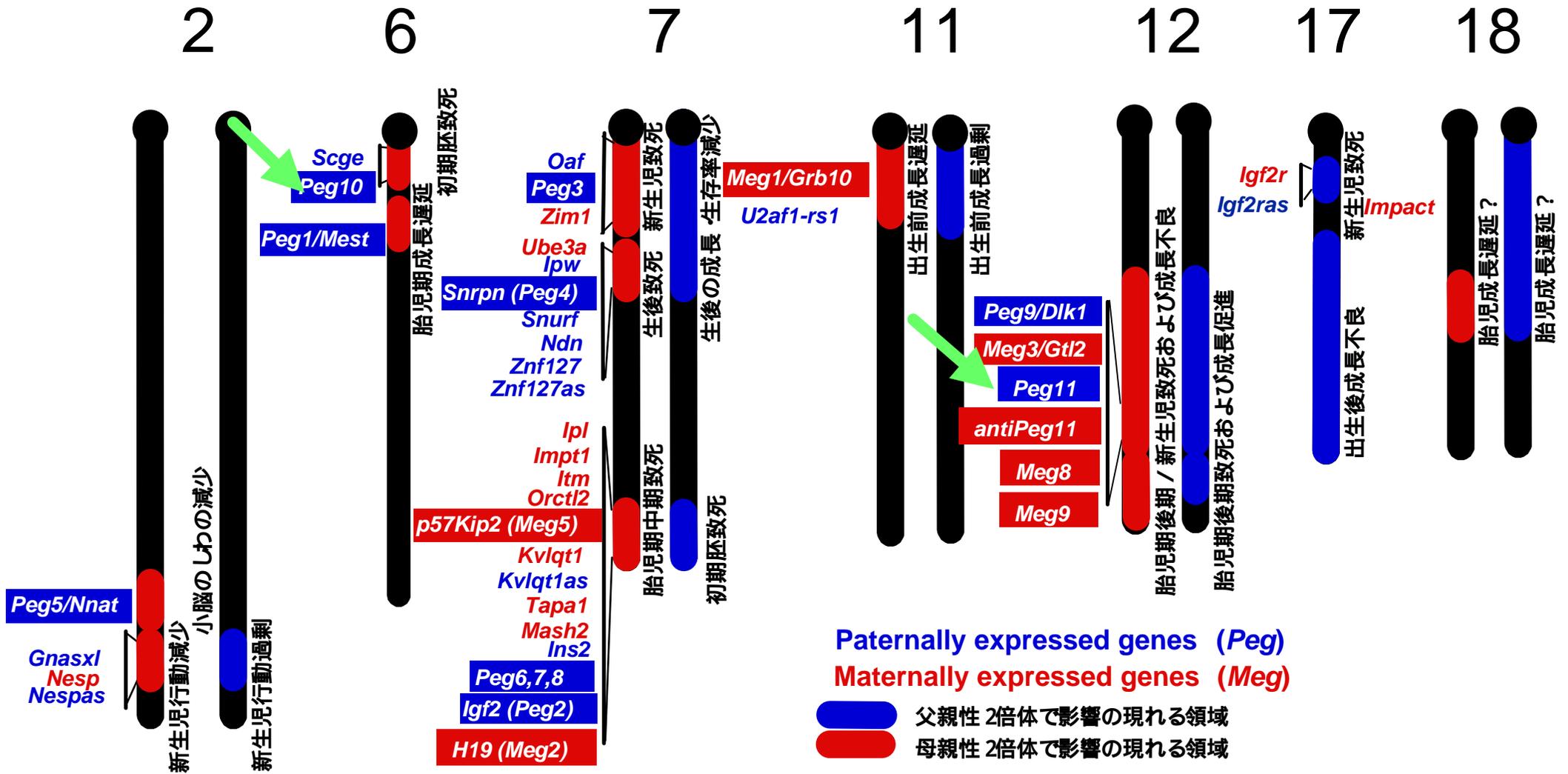
「抑制技術を確立」	平成 14 年 1 月 11 日 日刊工業新聞
「クローンマウス正常育成に成功」	平成 14 年 1 月 11 日 産経新聞
「体細胞クローン動物の出生後致死率など抑制」	平成 14 年 1 月 11 日 日本工業新聞
「体細胞クローンマウスの出産」	平成 14 年 1 月 11 日 東京新聞
「体細胞クローン生存率 9 割以上に」	平成 14 年 1 月 11 日 毎日新聞
「クローン動物遺伝子は正常」	平成 14 年 1 月 11 日 日本経済新聞
「クローンマウス出生後の以上低減」	平成 14 年 1 月 11 日 化学工業新聞

7. 結び

本研究プロジェクトにおいては、共同研究者の先生方には、それぞれの専門分野においての研究をCREST研究とは別に進めてもらいつつ、CREST研究にも協力していただいた。CREST研究に関しては、研究代表者の所属する東京工業大学遺伝子実験施設の大学院生が、各研究機関に出向してそれぞれ専門とするところを実際に御指導いただくか、各研究機関で作製していただいた特殊な研究材料（例えばクローンマウス等）を、東工大が解析するという体制で行った。そのため、全体として多岐に渡る研究内容を含むプロジェクトではあったが、最終的には、それぞれの結果を総合的にまとめあげることができ、ゲノムインプリンティングの生物学的意義の解明や、哺乳類の進化に関わる遺伝子の同定等、独創的な内容の研究として当初の予想を超える成果をあげることができたと考えています。

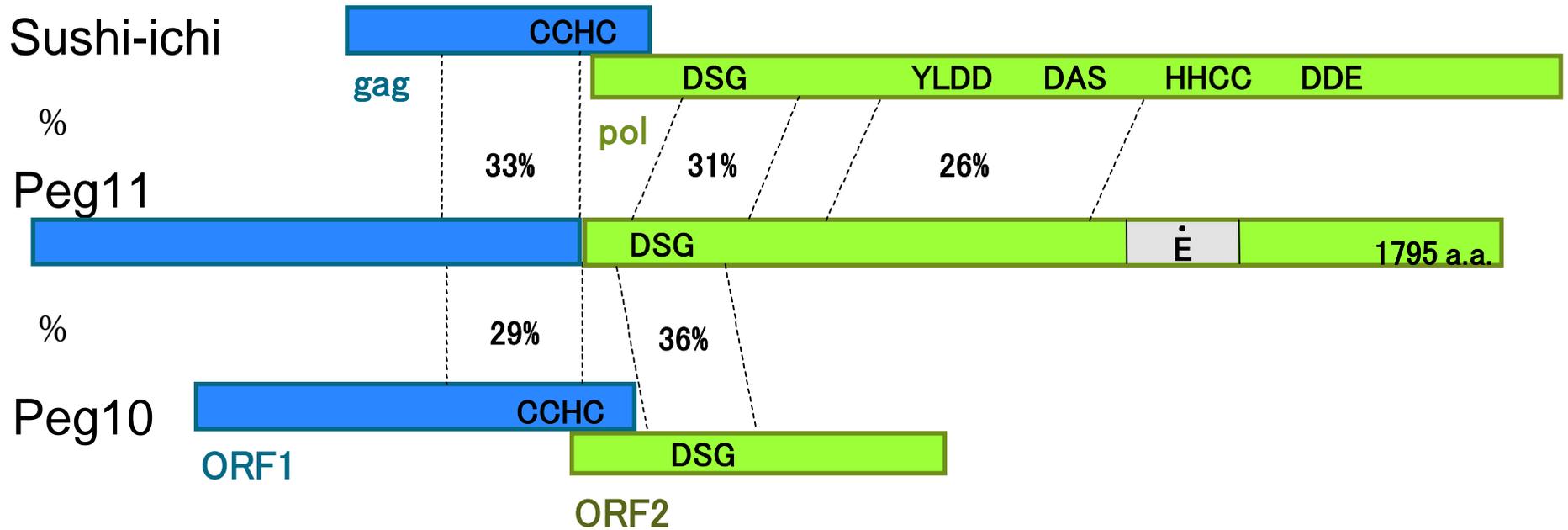
CRESTの予算をいただくことができて、ゲノム解析等の予算を多く必要とする研究を走らせることができた。結果的にマウスのゲノム配列は現在公開されているが、より早く必要な情報を得ることができたため、先手を打って多くの冒険的なアイデアを試すことができたと思います。これがPeg10やPeg11という遺伝子の発見とその後の解析に繋がった。もしも限られた予算の中であれば、胎盤の機能解析の結果と合わせて、これらが重要であるらしいというデータを持ってはいても、レトロトランスポゾン由来の遺伝子の機能を調べる実験のような、結果の予想のつかない実験を遂行しえたかは、今でも疑問である。インプリンティング領域のゲノム構造解析、機能の予測のつかない遺伝子のノックアウトマウスの解析は予算的な裏づけがなければ不可能であったかも知れないという点で、これらの研究成果はCRESTの制度のおかげとあって良い。この点を大変感謝しています。

本研究プロジェクトをスタートする前には、ゲノムインプリンティングは母親性インプリントだけで制御されると考えられるデータを持っていた。このため、インプリンティング制御因子の同定には、今から考えると間違った組み合わせの遺伝子と材料を選んでいったことになる。PGCクローンの解析から、正しいゲノムインプリンティングの体系を明らかにできたことは、このプロジェクトのもう一つの大きな成果である。これは、研究グループに理研バイオリソースセンターの小倉先生のグループ無しでは到底なし得なかったことであり、CREST研究において共同研究体制をとることができたことのもう一つの大きな効果である。体細胞クローンにおいてはゲノムインプリンティングの記憶は保存されるが、多くの遺伝子発現異常が起きているという発見は、ES細胞にエピジェネティックな異常が蓄積しているという予想外の発見にも繋がり、クローン技術とES細胞を使った再生医療研究に対しても大きな貢献ができたと信じている。



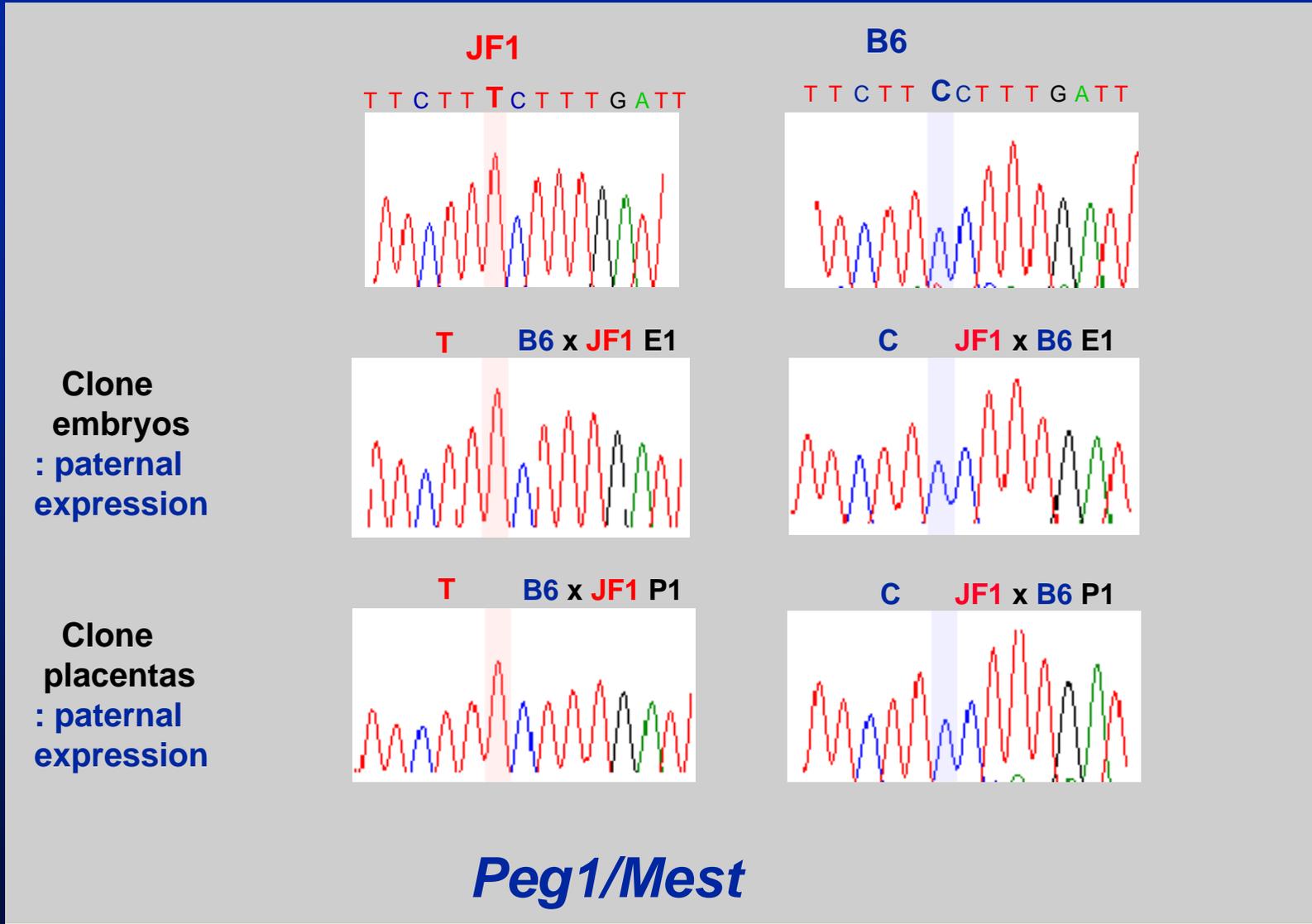
マウスのゲノムインプリンティング地図

→ 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

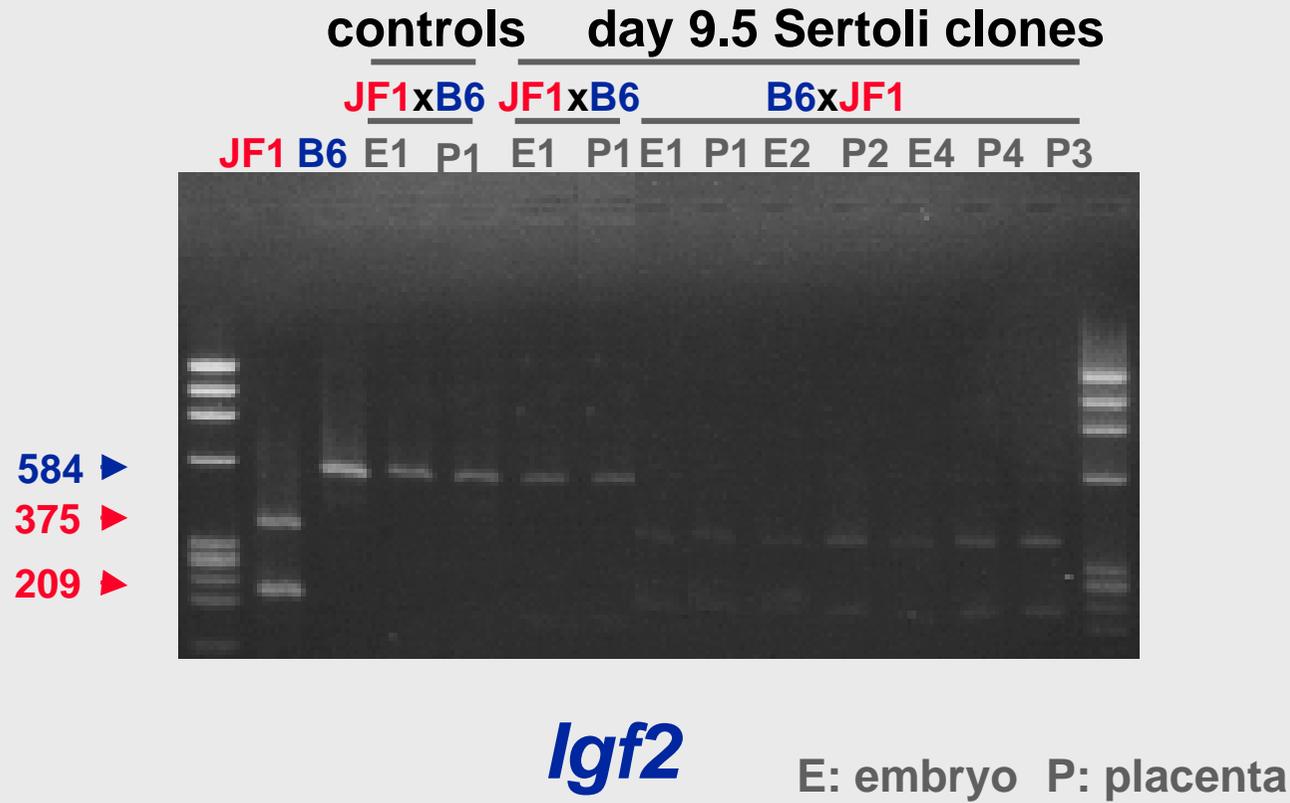


CCHC ; RNA binding motif
 DSG ; protease active site
 YLDD ; reverse transcriptase
 DAS ; RNase highly conserved motif
 HHCC ; integrase DNA binding motif
 DDE ; strongly conserved integrase
 E ; Glutamic acids repeat sequence

Peg10とPeg11のタンパク質構造比較



セルトリ細胞クローンにおけるインプリンティング遺伝子の発現(胎児期9.5日目)

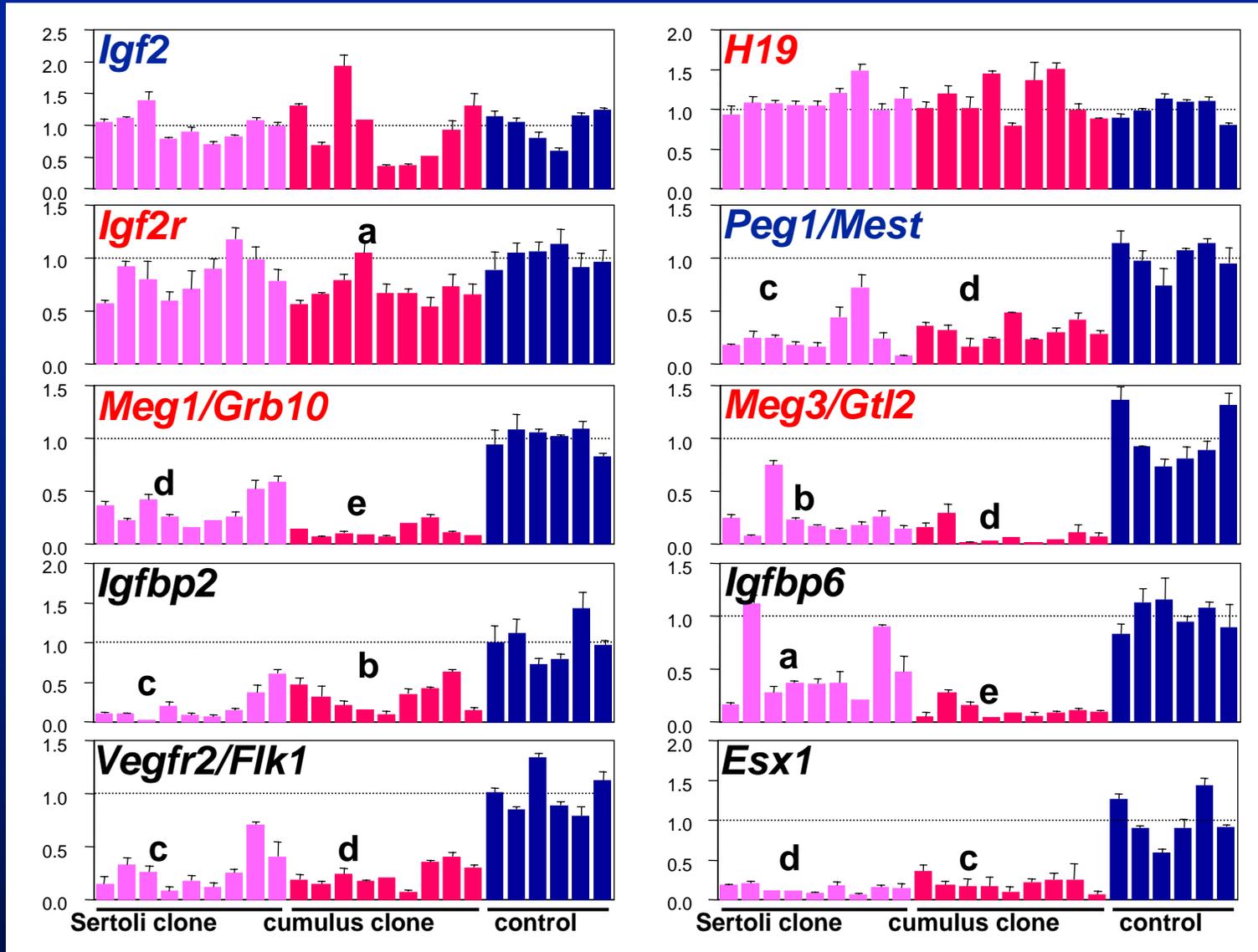


セルトリ細胞クローンにおけるインプリンティング遺伝子の発現(胎児期9.5日目)

	Expected expression allele	Embryo				Placenta				
		B6xJF1	B6xJF1	B6xJF1	JF1xB6	B6xJF1	B6xJF1	B6xJF1	B6xJF1	JF1xB6
		#1	#2	#4	#1	#1	#2	#3	#4	#1
<i>Meg1/Grb10</i>	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat*	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat
<i>H19</i>	Mat	Mat*	Mat	Mat*	Mat	Mat*	Mat*	Mat*	Mat*	Mat
<i>Meg3</i>	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat
<i>Igf2r</i>	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat
<i>Kip2</i>	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat	Mat
<i>Peg1/Mest</i>	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat
<i>Igf2</i>	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat	Pat

Mat *, predominant expression from the maternal allele with a small level of parental expression

セルトリ細胞クローンにおけるインプリンティング遺伝子の片親性発現は正常に保たれている(胎児期9.5日目)



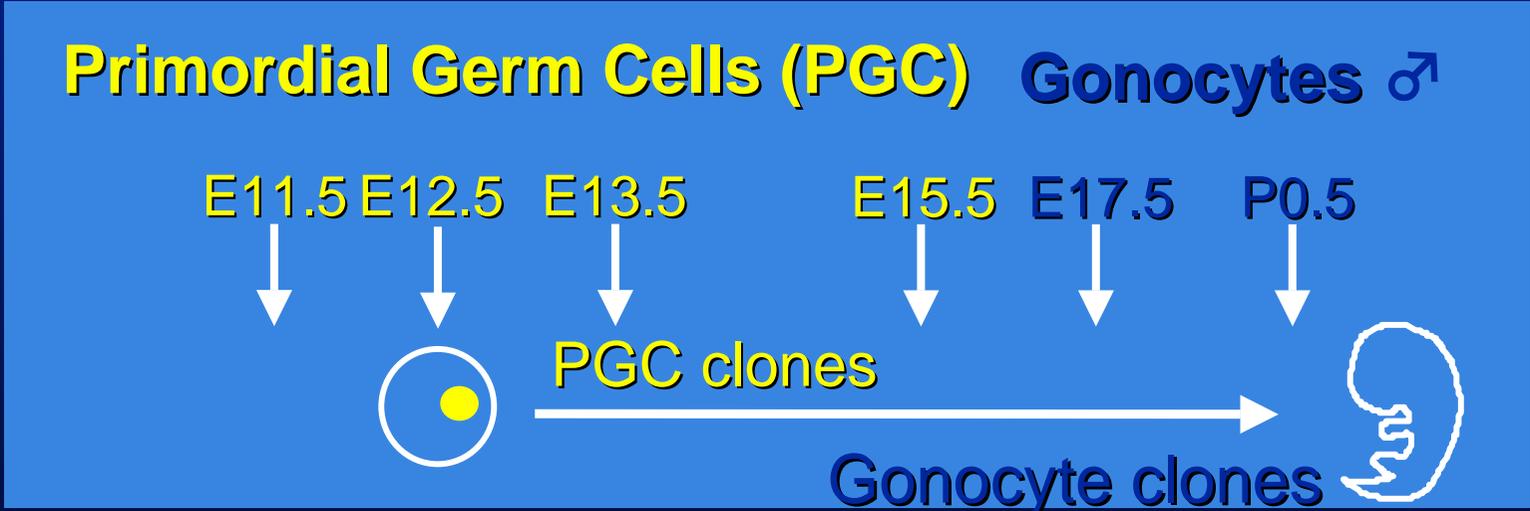
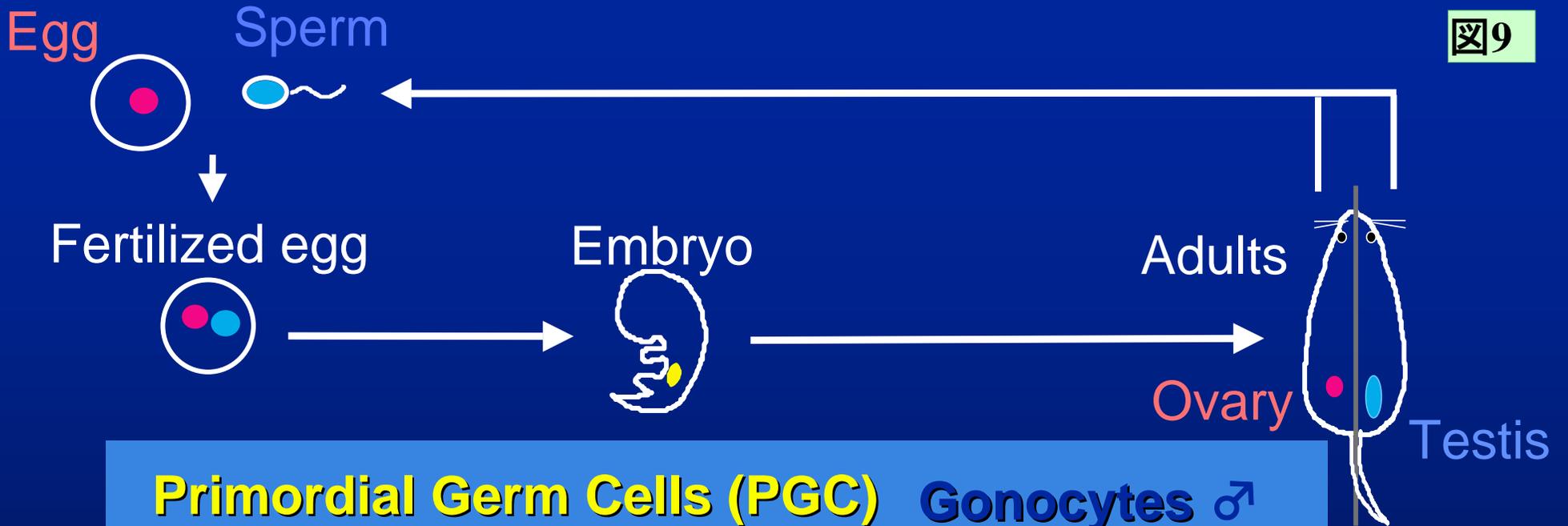
セルトリ細胞クローン胎盤における遺伝子発現レベルの変化(出生時)

Clone 1		Clone 2		Descriptions
D	0.32	D	0.12	AW121336:UI-M-BH2.2-aom-b-07-0-UI.s1 Mus musculus cDNA
NC	0.48	MD	0.13	AF016294:Mus musculus Ets transcription factor (ELF3) mRNA
NC	0.63	D	0.15	Y15443:Mus musculus mRNA for 50C15 protein
D	0.43	D	0.16	L38971:Integral membrane protein 2
NC	0.59	D	0.16	AF017994:Mus musculus Peg1/MEST protein (Peg1/MEST) gene
D	0.29	D	0.16	AF028739:Imprinted polyspecific membrane transporter-like gene 1
D	0.45	D	0.16	AI648850:uk29h07.x1 Mus musculus cDNA
NC	1.60	D	0.17	X13297:Mouse mRNA for vascular smooth muscle alpha-actin
NC	0.63	D	0.18	AW230369:uo62g07.y1 Mus musculus cDNA
NC	0.91	D	0.18	L17076:HnRNP-associated with lethal yellow
NC	1.00	D	0.18	X70842:Kinase insert domain protein receptor
D	0.48	D	0.18	X81580:Insulin-like growth factor binding protein 2
NC	0.56	D	0.19	AF081789:Mus musculus cell surface antigen AA4 (AA4) mRNA
D	0.37	D	0.19	X57349:M.musculus mRNA for transferrin receptor
D	0.19	D	0.20	D88612:Glial cells missing homolog (Drosophila), related sequence 1
NC	0.67	D	0.20	Z38110:M.musculus PMP22 mRNA for peripheral myelin protein
NC	0.34	D	0.21	AW122933:UI-M-BH2.1-apa-h-09-0-UI.s1 Mus musculus cDNA
NC	0.63	D	0.21	U58992:MAD homolog 1 (Drosophila)
NC	1.40	D	0.22	D13664:Mus musculus osf-2 mRNA for osteoblast specific factor 2
DM	0.45	D	0.22	D76440:Necdin
D	0.43	D	0.22	M95200:Vascular endothelial growth factor
NC	1.10	D	0.22	X77952:Endoglin
NC	0.77	D	0.23	X59047:M.musculus MD3 mRNA
NC	0.59	D	0.23	AI838080:UI-M-AL0-abv-e-12-0-UI.s1 Mus musculus cDNA
D	0.42	D	0.23	AI848045:UI-M-AH1-agp-g-05-0-UI.s1 Mus musculus cDNA
D	0.45	D	0.23	AJ132098:Mus musculus mRNA for Vanin-1
NC	0.59	D	0.23	AJ250490:Mus musculus mRNA for receptor activity modifying protein 2 (Ramp2 gene)
NC	0.63	D	0.24	AF093853:Mus musculus 1-Cys peroxiredoxin protein 2 gene
NC	0.48	D	0.25	AI837005:UI-M-AJ0-aaz-g-12-0-UI.s1 Mus musculus cDNA
D	0.20	NC	0.77	L22977:Mouse A12 mRNA
D	0.24	NC	0.77	AI451153:mt22h03.x1 Mus musculus cDNA
D	0.24	NC	0.91	M83348:Carcinoembryonic antigen 6
MD	0.24	NC	0.91	U90662:Ephrin A1
D	0.25	NC	0.91	M83348:Carcinoembryonic antigen 6
D	0.20	NC	1.10	AJ223966:N-acetyl galactosaminidase, alpha
D	0.22	NC	1.20	U34272:Mus musculus brain carcinoembryonic antigen (bCEA) mRNA
D	0.18	NC	1.30	AF037437:Mus musculus prosaposin gene
D	0.07	I	2.30	AF090140:Mus musculus prolactin-like protein-Calpha precursor

Sertoli クローン d12.5 胎盤で
発現低下の認められる遺伝子

Clone 1		Clone 2		Descriptions
NC	1.9	I	6.9	AA656550:vs22b01.r1 Mus musculus cDNA
NC	4.1	I	6.4	AI848825:UI-M-AJ1-ahb-b-03-0-UI.s1 Mus musculus cDNA
NC	2.2	MI	5.9	AI835989:UI-M-AJ0-abb-a-04-0-UI.s1 Mus musculus cDNA
I	4	I	5.7	M32490:Insulin-like growth factor binding protein 10
I	4.7	I	5.4	U22325:Faciogenital dysplasia homolog
I	3.7	I	5.1	L36062:Mus musculus nuclear-encoded mitochondrial steroidogenic acute regulatory protein (Star)
NC	3.2	I	4.6	AA881438:vx18h07.r1 Mus musculus cDNA
NC	1.3	I	4.5	Z23066:Microphthalmia-associated transcription factor
NC	1.1	I	4.4	U34277:Mus musculus PAF acetylhydrolase mRNA
NC	-1.3	I	4.3	AF080090:Mus musculus semaphorin IV isoform b mRNA
NC	1.4	I	4.2	AW125627:UI-M-BH2.2-aqj-h-03-0-UI.s1 Mus musculus cDNA
NC	4.2	I	4.1	AI834960:UI-M-AM1-afw-c-04-0-UI.s1 Mus musculus cDNA
I	3.3	I	4.1	M33960:Mouse plasminogen activator inhibitor (PAI-1) mRNA
NC	1.8	I	4	U63387:Chromobox homolog 4 (Drosophila Pc class)
NC	2.8	I	4	Z80941:M.musculus mRNA for semaphorin H
I	14.3	MI	3.4	V00743:Alpha fetoprotein
I	16.3	NC	3	U79573:Mus musculus apolipoprotein A-I gene
I	4	I	2.9	AF004326:Angiopoietin 2
I	5.1	I	2.8	M70642:Fibroblast inducible secreted protein
I	28.5	NC	1.8	AI850558:UI-M-BG1-ajj-e-07-0-UI.s1 Mus musculus cDNA
I	19.2	NC	2.4	U95182:Guanylate cyclase activator 2b (retina)
I	17.8	NC	2.5	AW121179:UI-M-BH2.3-aok-a-06-0-UI.s1 Mus musculus cDNA
I	16.2	NC	2.5	D50586:Tissue factor pathway inhibitor 2
I	15	NC	2.6	X13986:Mouse mRNA for minopontin
I	13.6	NC	1.6	AI844626:UI-M-AL1-ahr-a-04-0-UI.s1 Mus musculus cDNA
I	10.9	NC	1.5	K02782:Mouse complement component C3 mRNA, alpha and beta subunits
I	10.8	I	2	AF011385:Decidual/trophoblast prolactin-related protein
I	10.4	NC	-1.2	M34603:Mouse proteoglycan core protein mRNA
I	10.2	NC	1.9	AF002719:Mus musculus secretory leukoprotease inhibitor gene
I	10.1	NC	1.7	AW125478:UI-M-BH2.2-aqm-c-03-0-UI.s1 Mus musculus cDNA
I	10	NC	1.7	U63146:Mus musculus retinol binding protein (RBP) mRNA
I	9.2	NC	2.5	M58156:Mouse MHC (A.CA/J(H-2K-f) class I antigen
I	9.1	NC	1.2	X75285:Fibulin 2
I	8.9	NC	1.9	L12447:Insulin-like growth factor binding protein 5
I	8.3	NC	1.2	X04653:Mouse mRNA for Ly-6 alloantigen (Ly-6E.1)

Sertoli クローン d12.5 胎盤で
発現増加の認められる遺伝子



ゲノムインプリンティング記憶の消去と再成立 PGC clonesとgonocyte clones

Stages of donor PGCs

d12.5

d11.5

IVF controls

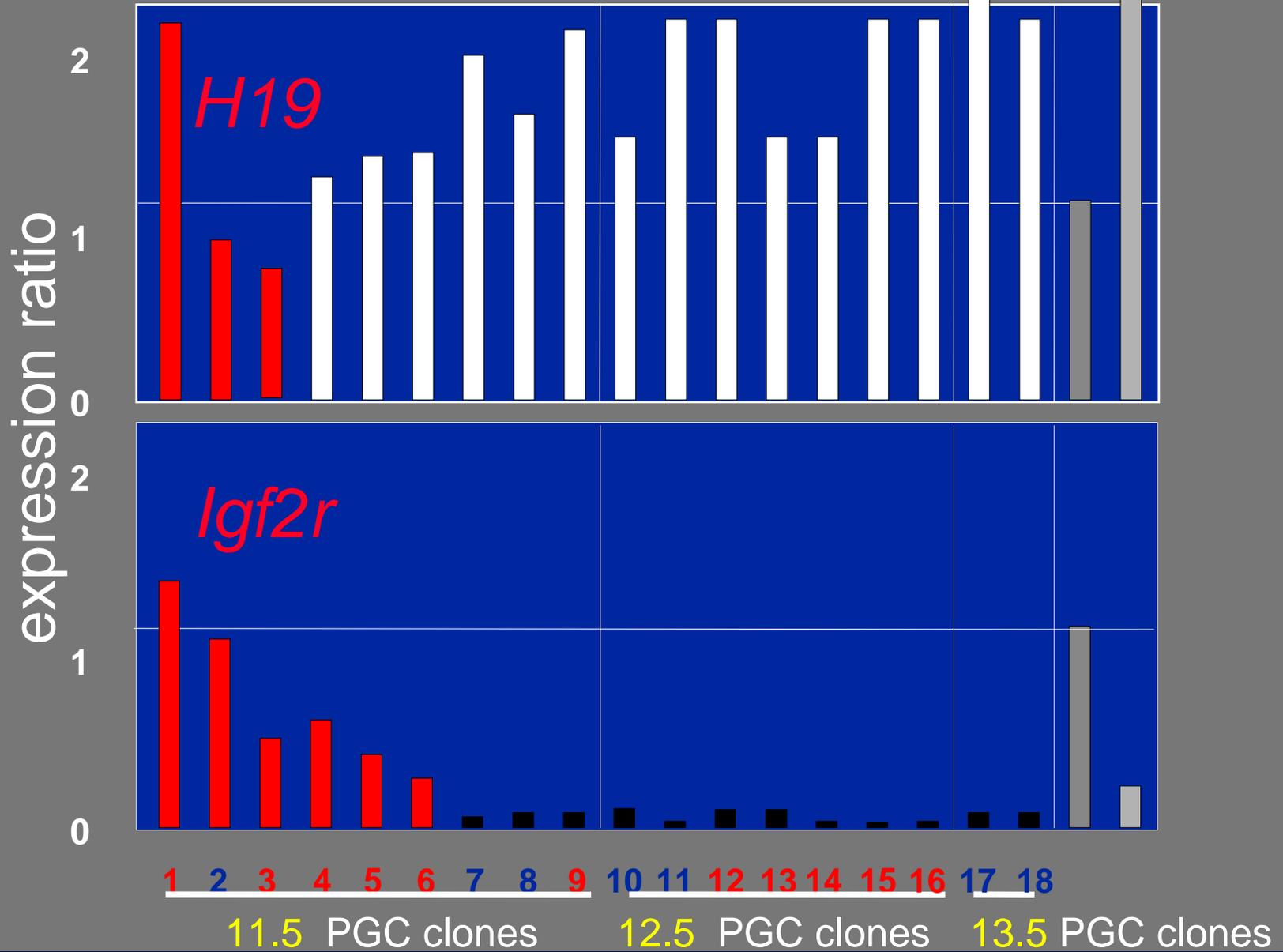
10.5 dpc



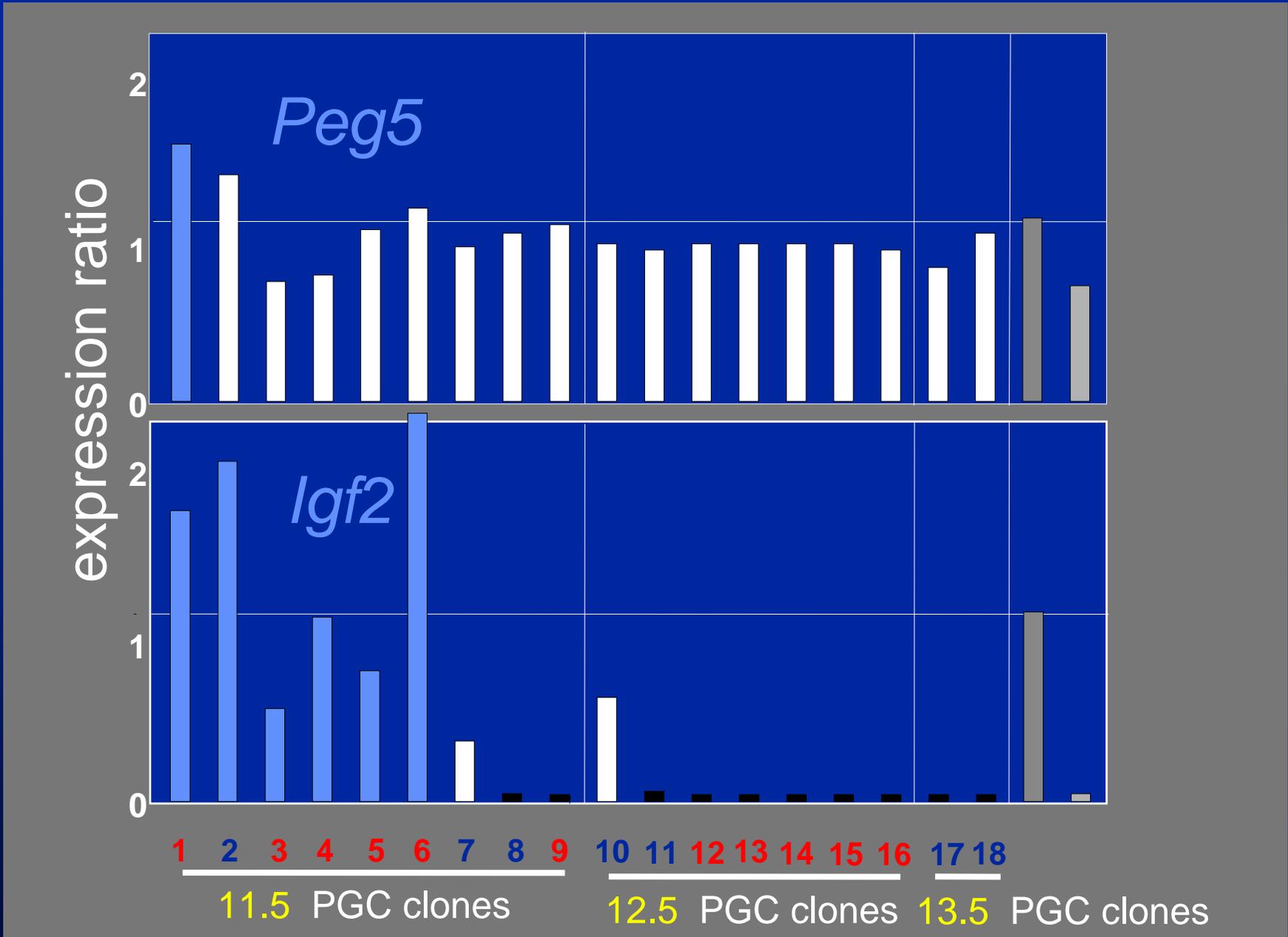
11.5 dpc



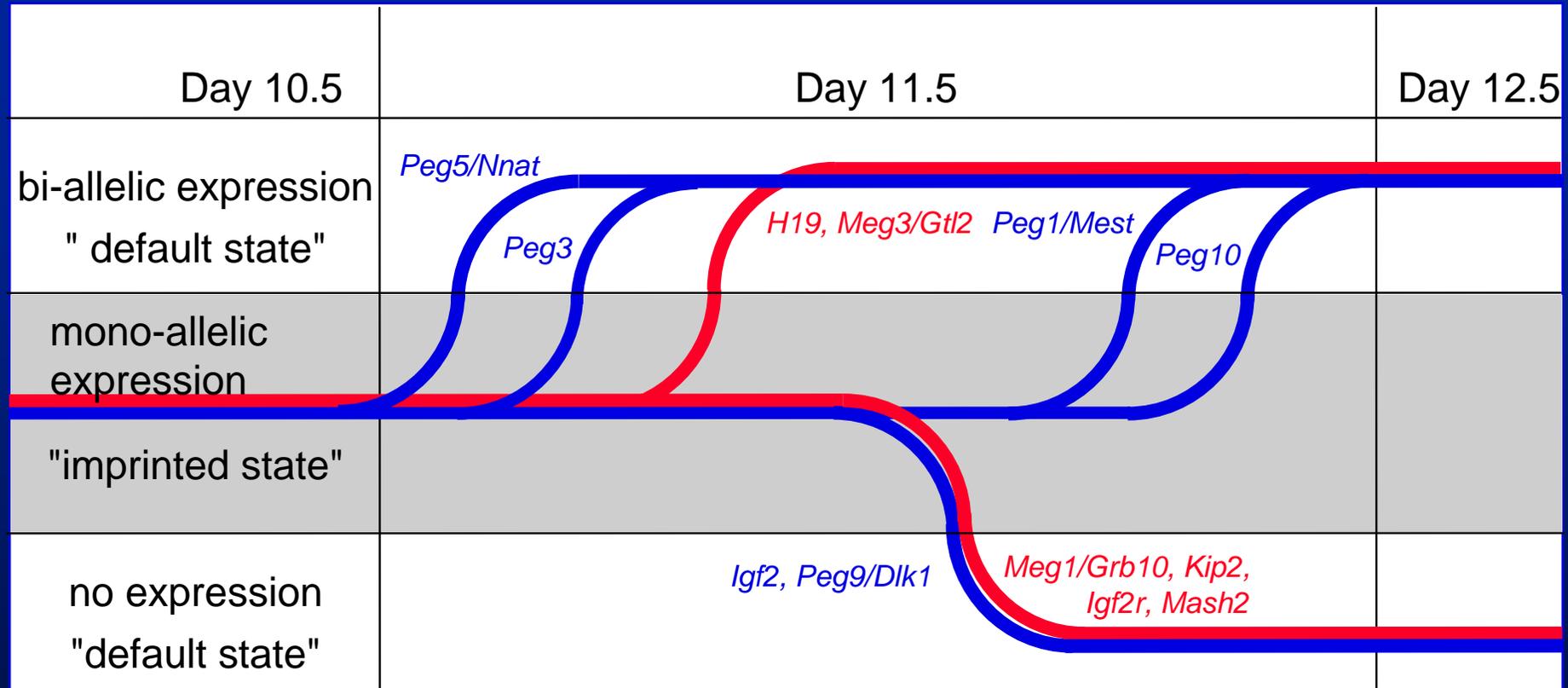
PGC クローンの個体発生能



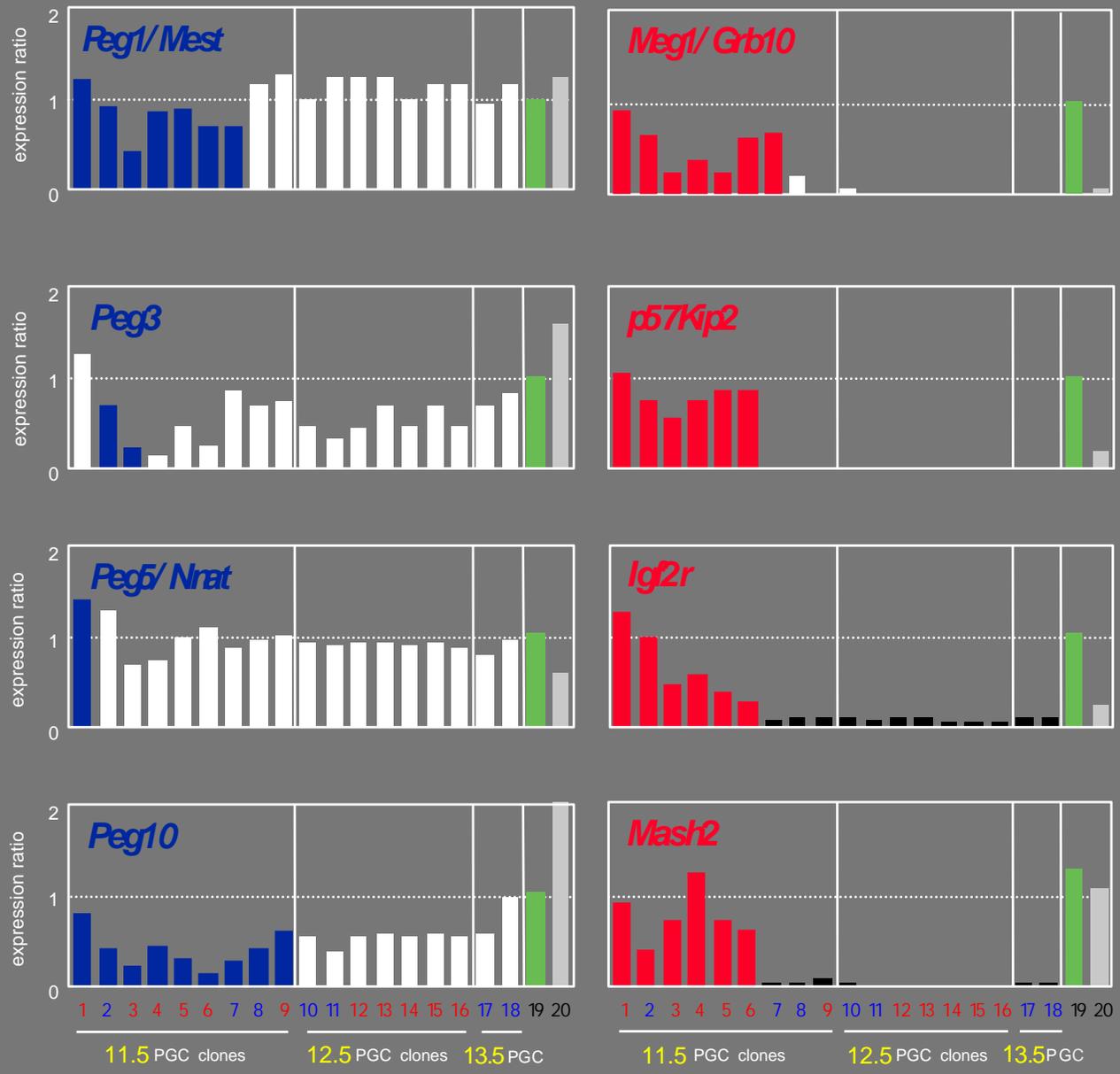
Loss of mono-allelic expressions of *Megs*



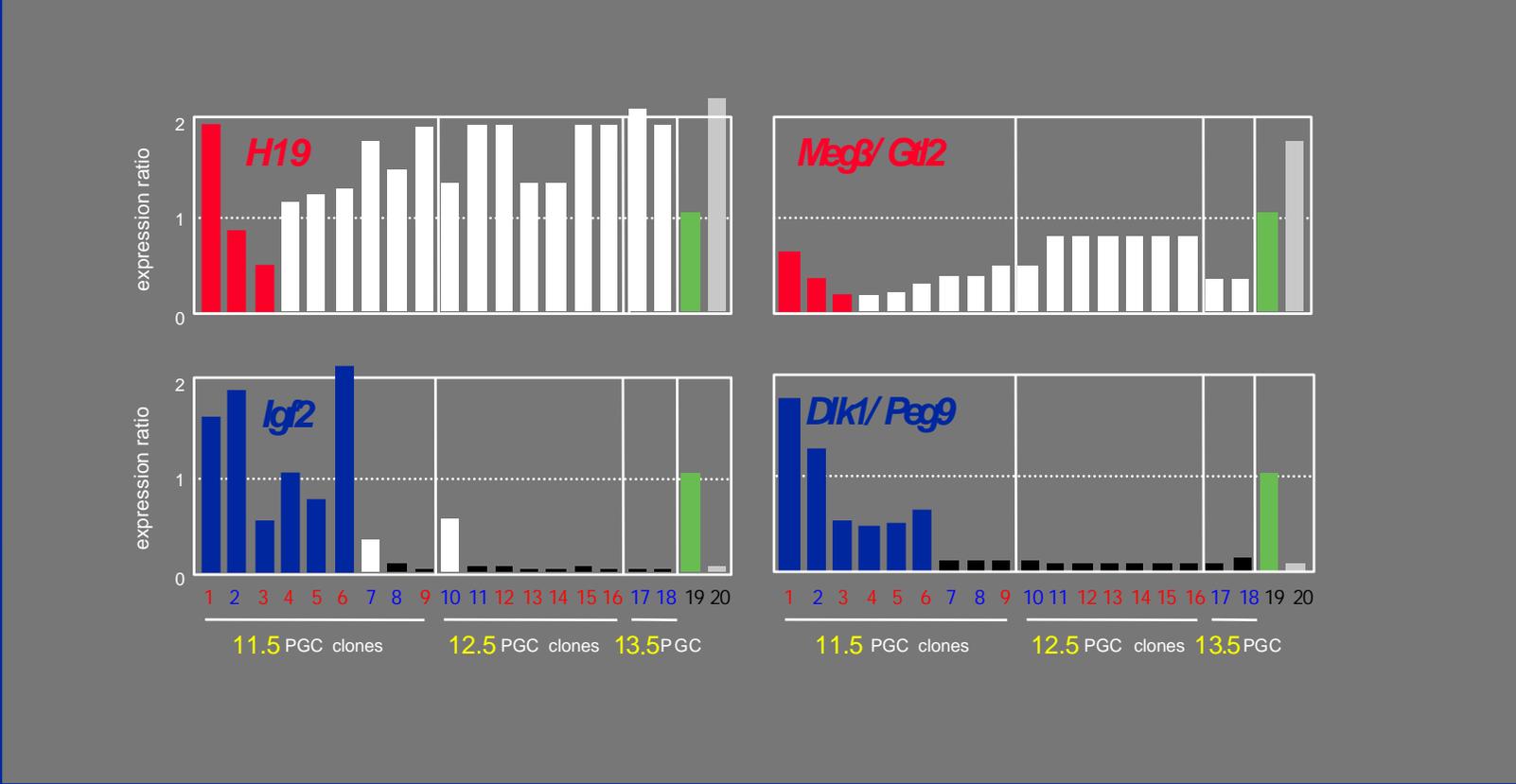
Loss of mono-allelic expressions of *Pegs*



Erasing process of genomic imprinting memory



Genes under control of **Maternal imprinting**



Genes under control of **Paternal imprinting**

Classification of imprinted genes

Peg

Meg

**Maternal
imprinting**

*Peg1/Mest, Peg3, Peg5/Nnat,
Peg10, Snrpn*, Ndn*,
Zfp127*, Impact*, Kcnq1ot1**

repression

*Meg1/Grb10, p57Kip2, Igf2r,
Mash2, Ipl*, NESP55**

induction

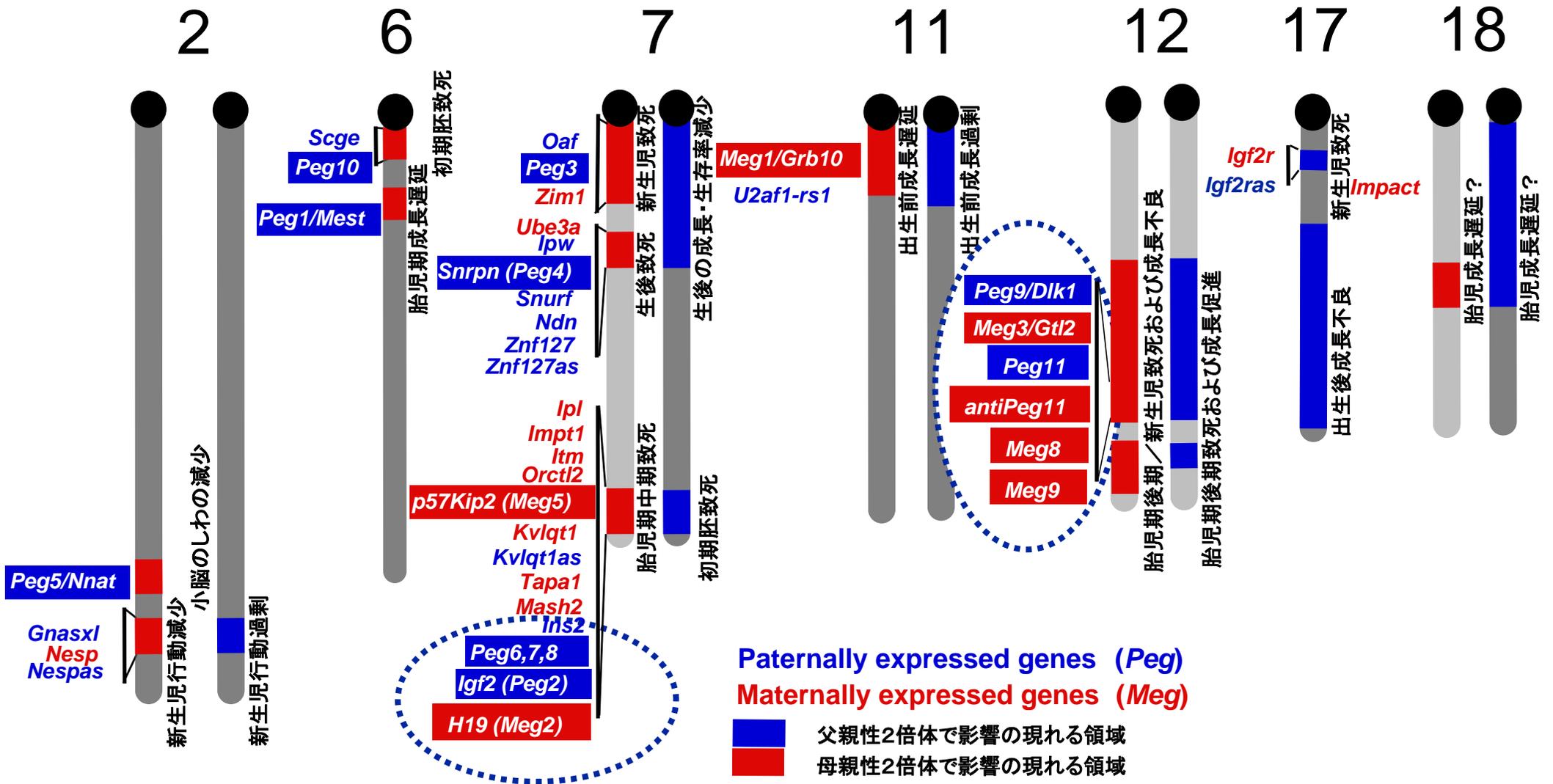
**Paternal
imprinting**

*Igf2, Peg9/Dlk1, Rasgrf1**

induction

H19, Meg3/Gtl2

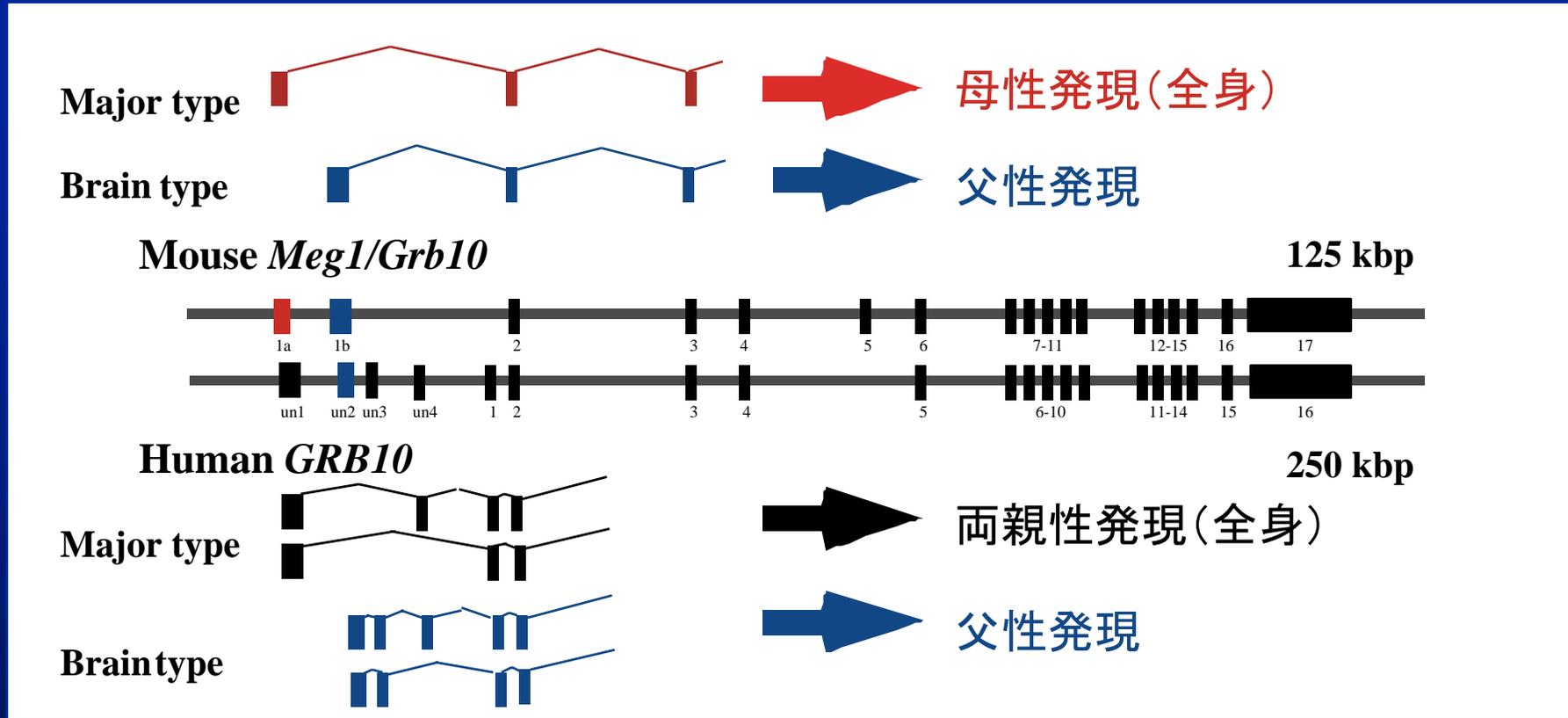
repression



Imprinted gene Map of the Mouse

父親性インプリンティング領域を点線で囲ってある

マウス *Meg1/Grb10* とヒト *GRB10* の発現制御



Brain Typeの父性発現が種間で共通



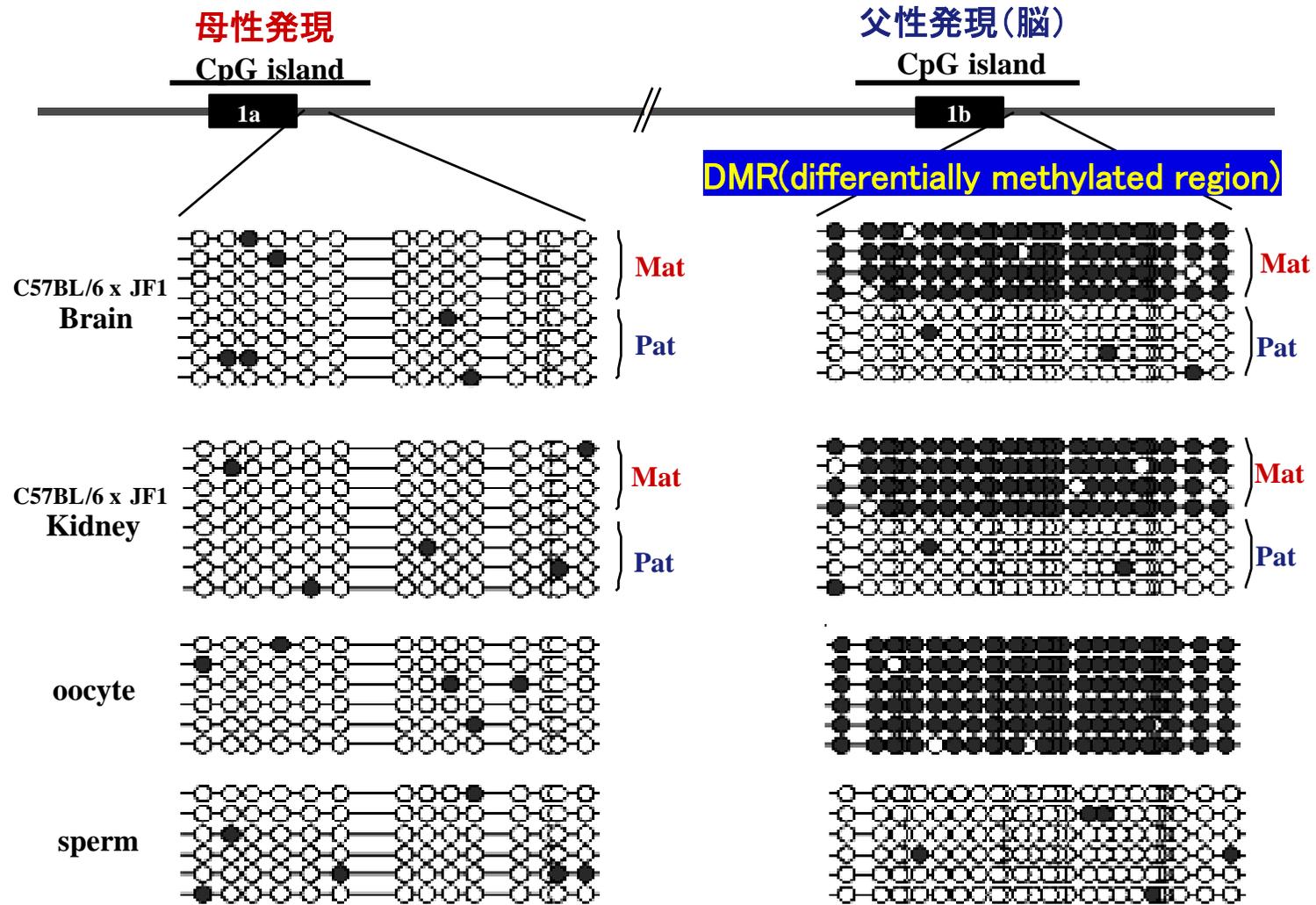
→ゲノム中に**共通した領域**が存在

Major Typeの発現パターンに種による違い

→ゲノム中に**異なる領域**が存在

マウス *Meg1/Grb10* プロモーター周辺ゲノムのDNAメチル化

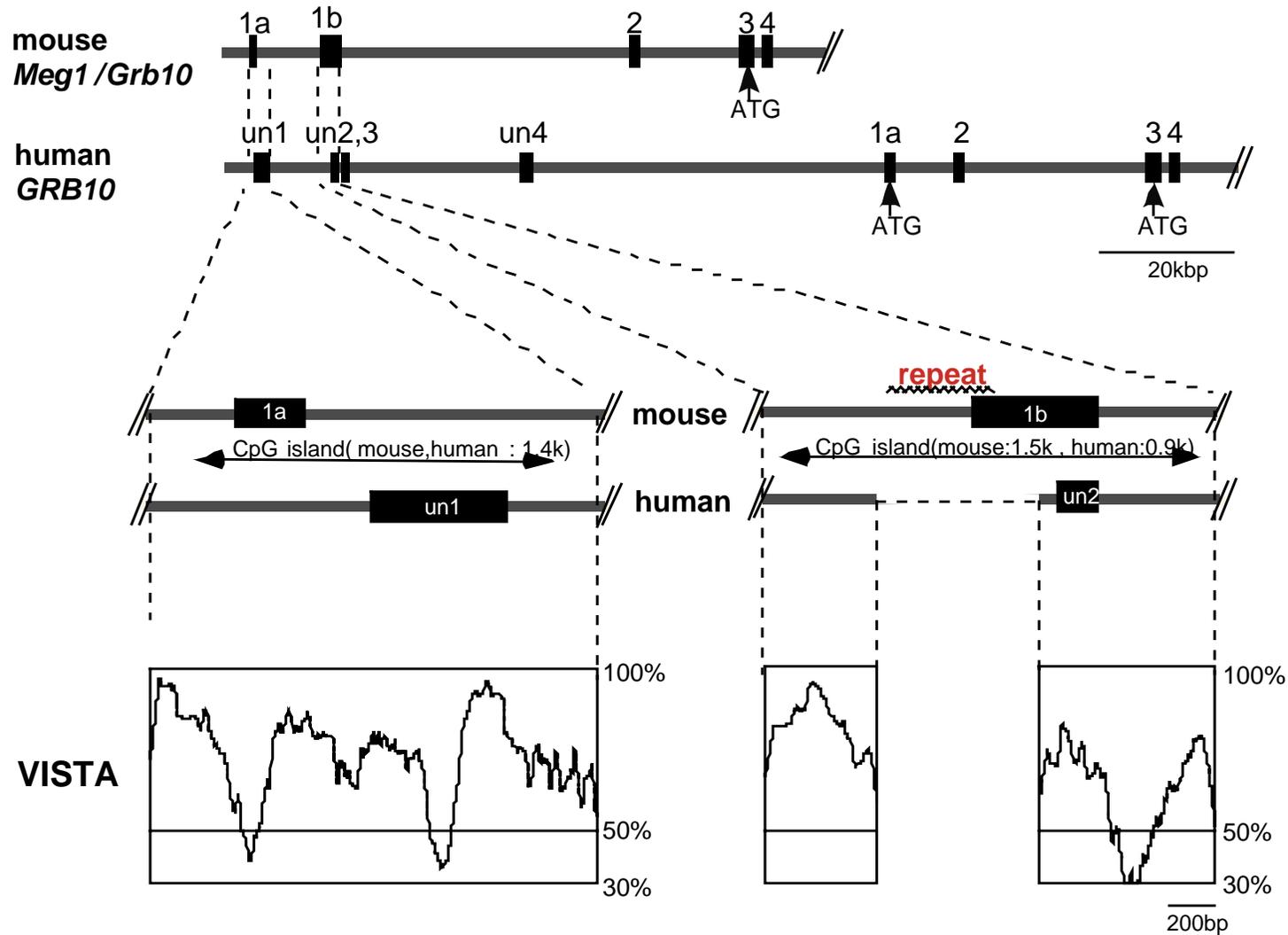
図19



DMRとして生殖細胞における刷込みに重要な領域

マウスとヒトにおけるゲノムDNAの相同性

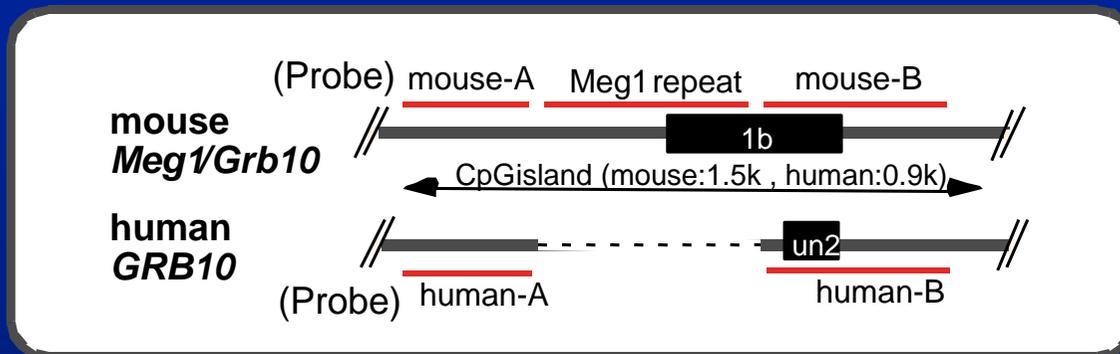
図20



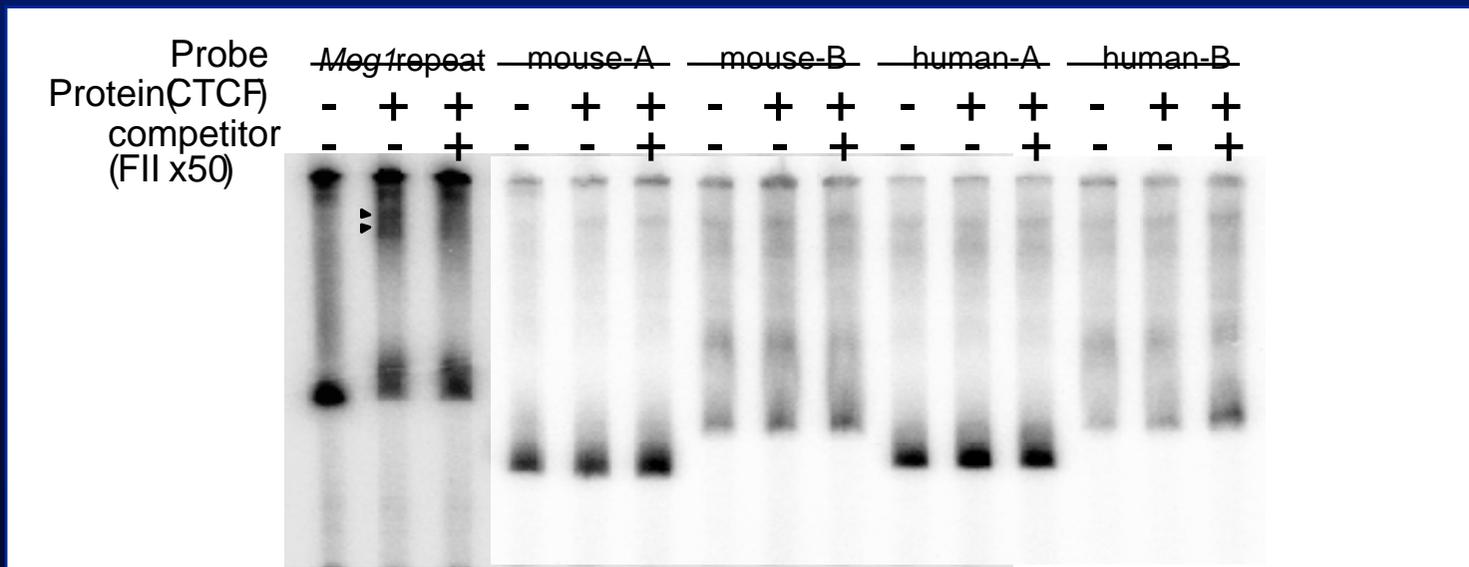
ヒトとマウスの2つのプロモーター間では高いホモロジーがみられる。
Peg プロモーター領域には **Mouse-specific repeat sequence** が存在している。

ヒトとマウスの *Peg* promoter region のゲノム比較

図21

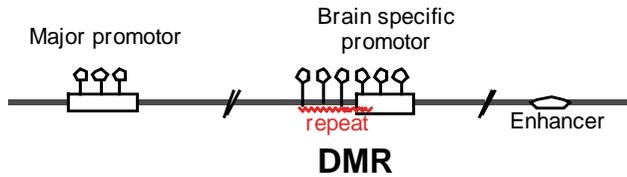


DMR配列内の *Meg1*リピート配列へCTCFが特異的結合を示す
(CCCTC-binding factor)

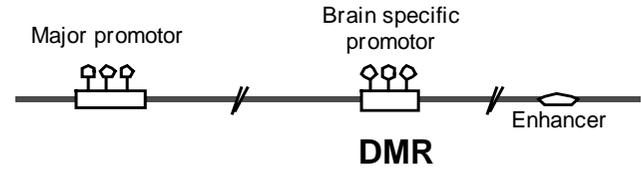


マウス *Meg1/Grb10* とヒト *GRB10* の発現制御モデル

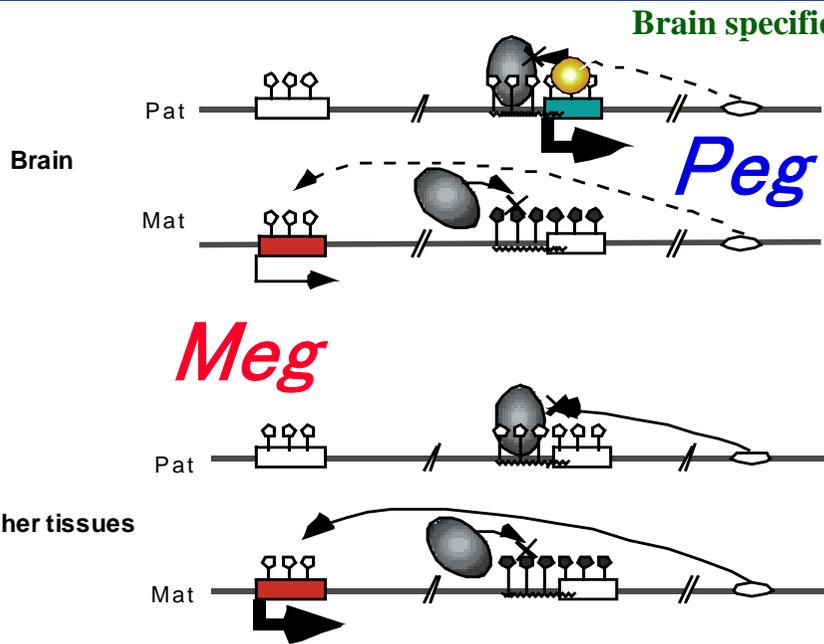
mouse *Meg1/Grb10*



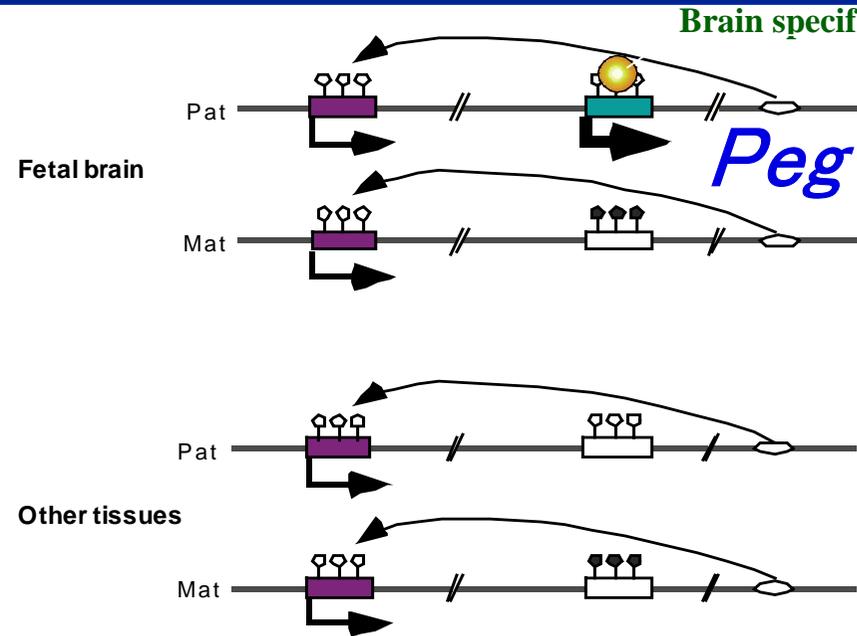
human *GRB10*



Brain specific activator



Brain specific activator



CTCFのインスレーター機能がマウスに二次的な母親性発現を誘導している。

生殖細胞

Paternal imprinting と Maternal imprinting
による領域全体の制御 (DNA メチル化)

哺乳類特異的ゲノム機能としての
ゲノムインプリンティング

体細胞

ゲノム機能単位の組合わせによる
各インプリンティング領域内での
Peg と *Meg* のレシプロカルな片親性発現パターンの成立

ゲノムインプリンティングの刷込みが存在しない場合の発現パターン

Megs

Maternally imprinted regions

Pegs

Megs silent in both alleles:
Meg1/Grb10, Igf2r, p57Kip2, Mash2

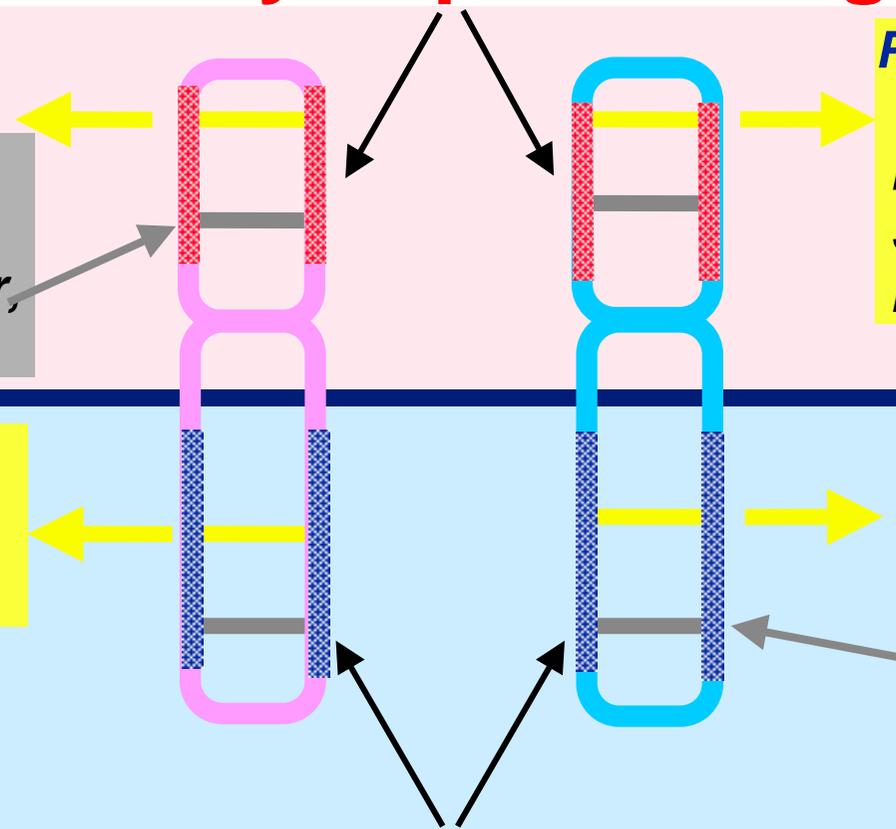
Pegs expressing biallelically:
Peg1/Mest, Peg3, Snrpn, Peg5/Nnat, Peg10, Air

Megs expressing biallelically:
H19, Meg3/Gtl2

Pegs silent in both alleles:
Igf2, Peg9/Dlk1, Rasgrf1, Peg11

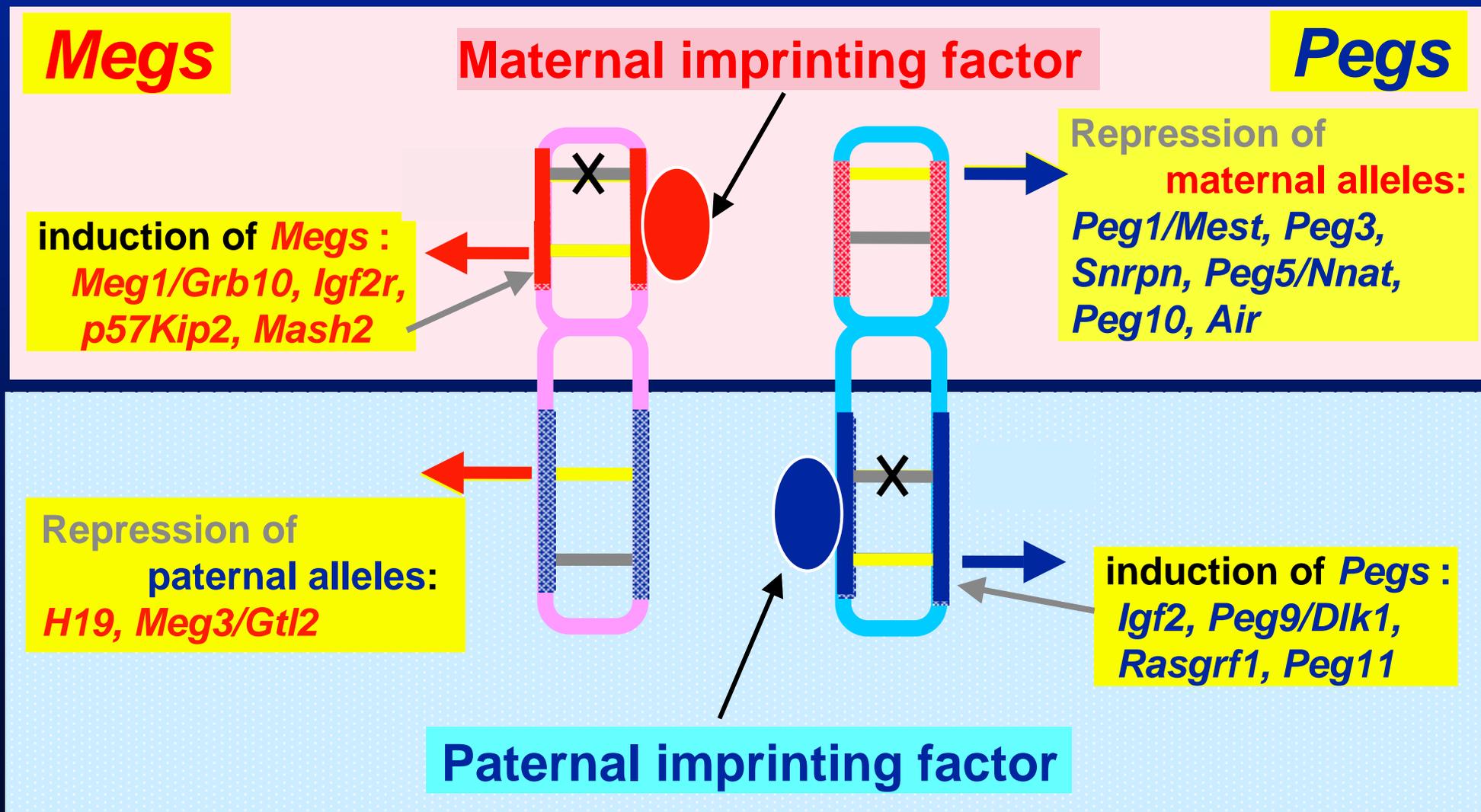
Paternally imprinted regions

Biallelic expression or non expression



生殖細胞におけるゲノム刷込みと 体細胞での発現パターン

図25



ゲノムインプリンティングの生物学的意義 としての - Complementation hypothesis -

刷込みは片側 alleleにのみ入れる**必要性**がある。

片親性発現制御は発生に必須な遺伝子を含む総てのインプリンティング遺伝子の発現を保証する機構である。

ゲノムインプリンティングの
片親性発現制御機構には**必然性**がある

Biological significance of genomic imprinting
– Complementation hypothesis –

ゲノムインプリンティングは

哺乳類の個体発生システムに必須の機構である

哺乳類の種間で広く保存される必然性がある

Origin of genomic imprinting

Mammals

Biallelic expression

(all 2 state)

Some changes might occur in pre-mammalian genomes

Conflict

between paternal and maternal alleles

Biallelic or non expression

(2 or 0 state)

Complementation by reciprocal expression of *Pegs* and *Megs*

Genomic imprinting

Monoallelic expression

Genomic imprinting

Imprinted state

(all 1 state)

Mammals



