

最先端・次世代研究開発支援プログラム  
事後評価書

研究課題名	哺乳類らしさを形作るメカニズム
研究機関・部局・職名	東海大学・健康科学部・教授
氏名	金児-石野 知子

【研究目的】

本研究では、哺乳類になって獲得された哺乳類特異的遺伝子群および哺乳類特異的エピジェネティック機構であるゲノムインプリンティングが、胎生機構全般ー胎盤の発生から妊娠の成立や維持、哺乳や子育て行動ーにどのように関わり、哺乳類らしさを生み出しているのか？という問題を主題とし、ゲノムインプリンティングの起源・リプログラミングに関わる DNA 脱メチル化の分子機構の実態などの重要問題を含めて解明することを目指した。

ゲノムインプリンティングの研究から胎盤形成に必須なインプリント遺伝子として同定した *PEG10* と *PEG11/RTL1* は sushi-ichi レトロトランスポゾンに由来する遺伝子であり (Ono *et al.* Genomics 2001、Charlier *et al.* Genome Res 2001)、報告した 2001 年当時、それらの生物学的意義に注目した研究者はほとんどいなかった。申請者は 1990 年の研究開始当初より、レトロトランスポゾンなどの外来 DNA を精子または卵子の中で不活性化することがゲノムインプリンティングの起源であると考え (図の A-C-2 の過程)、外来 DNA 由来のインプリント遺伝子の存在を想定していた。*Peg10* が胎盤の初期形成に必須な機能をはたし (Ono *et al.* Nat Genet 2006)、*Peg11/Rt11* が胎生中期以降の胎盤の胎児毛細血管の維持に必須な機能をもつこと (Sekita *et al.* Nat Genet 2008) は、それを実証する良い例であった。さらに有袋類および単孔類の *PEG10* 領域のゲノム解析から、*PEG10* が胎生の哺乳類である真獣類と有袋類のみに共通して存在することを明らかにし、胎生の起源における LTR レトロトランスポゾン由来の遺伝子の重要性を世界で初めて実証した (図の A-B-2 の過程)。さらに *PEG10* 領域のインプリント制御に関わる DNA 配列自体が、予想どおり *PEG10* と同様に外来の挿入配列に由来することも世界で初めて報告した (図の A-C-2 の過程) (Suzuki *et al.* PLoS Genet 2007)。申請者は、また、インプリント制御領域にゲノムインプリントとして記憶されている DNA メチル化が次世代に伝わる際、生殖細胞で DNA 脱メチル化され完全に消去されることも世界で初めて明らかにした (Lee *et al.* Development 2002)。

本研究では、以上の研究成果を (1)新規 LTR レトロトランスポゾン由来の遺伝子群の探索と *Sirh* family 遺伝子の機能解析、(2)染色体の十数カ所に存在するゲノムインプリント領域における制御配列の由来の解明、(3)生殖細胞におけるゲノムインプリント記憶の消去のメカニズムという、哺乳類の特徴解明に重要性の高い 3 つの方向へさらに展開させた。具体的には、

(1) 新規 LTR レトロトランスポゾン由来の哺乳類特異的遺伝子の探索と機能解析：真獣

## 類と有袋類における分布解析と *Sirh* 遺伝子の機能解析 (妊娠の成立・維持等の母子関係成立および活動性・行動に関わる脳機能の検証) (A-B-2 の過程)

LTR レトロトランスポゾン由来の哺乳類特異的遺伝子群には Sushi-ichi レトロトランスポゾン由来の *Sirh* (sushi-ichi retrotransposon homologues) と Gypsy12 レトロトランスポゾン由来の *Pnma* (paraneoplastic Ma antigen) の 2 つがある。有袋類・真獣類各種のゲノム解析から、それらの獲得時期と進化との関係性を明らかにする。また、*Sirh* 遺伝子群においてノックアウトマウス解析による生物学的機能の解明 (図の A-B-2) を進め、胎生機構に関連するヒト疾患との関係も視野に入れる。対象とするのは最も胎盤形成の初期に発現する *Sirh7*、最も種間保存性が高く、脳、生殖巣で発現する *Sirh3*、胎盤では発現せず脳、生殖巣のみで発現する *Sirh11* の 3 遺伝子である。

## (2) インプリント領域形成に必須の制御配列の起源の解明 (A-C-2 の過程)

染色体の十数カ所に存在するインプリント領域は、通常、それぞれが複数の父親性・母親性発現インプリント遺伝子 (*Peg* と *Meg*) を含んでいる。それらの発現の ON-OFF を逆向きに制御し片親性発現を成立させるためには、雌雄の生殖細胞の一方で特異的な DNA メチル化を受ける制御配列の存在が必須である。これらの制御配列間には DNA 配列上の共通性はなく、哺乳類でどのようにゲノムインプリント制御がはじまったか? という問題は未解決のままである。この問題に対して、本研究ではこれらの制御配列が哺乳類ゲノム中にどのようにして生じたか? という制御配列自体の由来からアプローチする。(図の A-C-2)。

## (3) 生殖細胞におけるゲノムインプリント記憶の消去のメカニズム (生殖細胞における脱メチル化機構の解明) (1-C、A-B の過程)

哺乳類における DNA 脱メチル化機構の解明は、体細胞クローニングや iPS 細胞の樹立などのような体細胞記憶のリプログラミングのメカニズムに応用可能であり、個体発生機構としてだけでなく再生医療の面からも重要なものである。次世代に遺伝情報を伝える際に、生殖細胞においてゲノムインプリント記憶が一度消去されるが、この反応に関わる DNA 脱メチル化が能動的機構によるものか、受動的機構によるものか決着がつかない。近年、DNA 脱メチル化プロセスにヒドロキシメチルシトシンを中間体とする経路があることが明らかとなっている。この情報を取り込んだ形で、生殖細胞における脱メチル化を詳細に解析できる実験系を樹立し、DNA 複製阻害剤存在下で反応が進むかどうかを明らかにする。

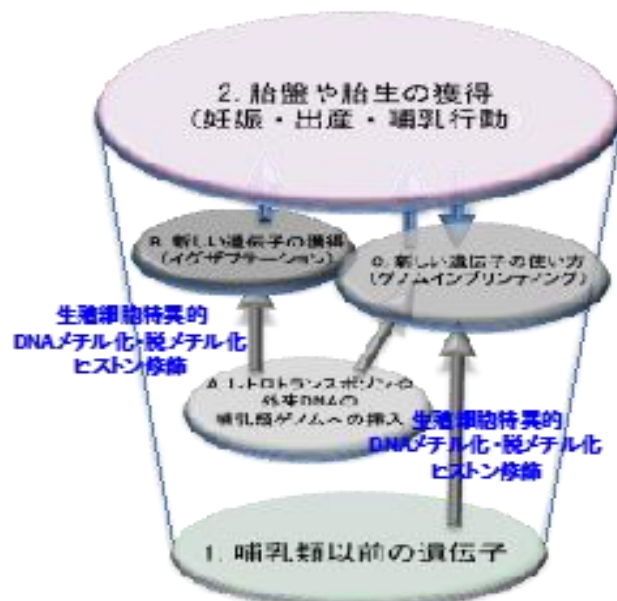


図 哺乳類の進化のメカニズム

【総合評価】	
	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
○	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】
① 総合所見
<p>本研究課題では、哺乳類らしさを、動物群が胎盤をもつことと片親由来遺伝子のみを発現するゲノムインプリンティング機構があることと捉えて、前者については Sushi-ichi レトロトランスポゾン由来の3つの遺伝子の機能を明らかにすること、後者については生殖細胞における DNA メチル化・脱メチル化機構を解明すること、の二つを目的としている。前者については、sushi-ichi レトロトランスポゾン由来の別の遺伝子が、行動、胎盤形成を介した妊娠・分娩の制御、哺育行動を含めた生殖機能に関連した働きをする可能性を示し、今後の成果が期待される。これらの知見は、申請者らの発見に基づいて計画されており、しかも広い意味での哺乳類らしさの成立維持を考える上で大変重要な知見となることから、高く評価できる。一方、後者については、一定の成果が上がっているが、必ずしも順調とは言えなかった。その後、近年のエピゲノム解析の進展により、生殖細胞におけるインプリント領域特異的な DNA メチル化機構という問題設定自体が成り立たなくなっただけで中止となっている。</p> <p>東日本大震災の影響でマウス繁殖に問題が生じ、このための研究当初（平成 22～23 年度）の研究の遅れが、現在までに至っている。平成 25 年になってようやく当初の目的に近づいたことから、今後の成果を期待したい。</p>

② 目的の達成状況
<p>・所期の目的が  <input type="checkbox"/> 全て達成された ・ <input checked="" type="checkbox"/> 一部達成された ・ <input type="checkbox"/> 達成されなかった</p>
<p>研究代表者は、哺乳類らしさを、この動物群が胎盤をもつことと片親由来遺伝子のみを発現するゲノムインプリンティング機構があることと捉えて、前者については Sushi-ichi レトロトランスポゾン由来の3つの遺伝子 Sirh7, Sirh3, Sirh11 の機能を明らかにすること、後者については生殖細胞における DNA メチル化・脱メチル化機構を解明すること、の二つを研究の目的と定めて研究を行ってきた。</p> <p>Sirh7, Sirh3, Sirh11 の機能の解析はノックアウトマウスの作製を通して行い、胎盤形成にとどまらず、保育や分娩といった哺乳類特異的行動などの関係にまで研究を進める予定であった。東日本大震災によるマウスの繁殖状況の悪化により研究の大幅な遅れが生じたが、その後繁殖が回復したマウスにおける各遺伝子の機能解析結果（Sirh3 は夜間行動量の減少、Sirh7 は胎盤形成異常、Sirh11 は繁殖異常など）は興味深い結果である</p>

が、成果として主張するためにはより明確な結果が必要と思われる。今回のように一つのノックアウトで表現形が明確でないような場合にはダブルノックアウトに進むことを考えて当然とも思われるが、それに向けた努力を行っているものの、全体として研究の進展が遅いという感は否めない。

受精直後精子由来 DNA の脱メチル化は passive な脱メチル化が重要で、始原生殖細胞におけるゲノムインプリント記憶の消去に関しては、active 脱メチル化が関与する可能性を示したが、active 脱メチル化の制御機構については進行中であり、この問題の本質の解明はまだ先のように思える。実際、近年のエピゲノム解析の進展により、生殖細胞におけるインプリント領域特異的な DNA メチル化機構という問題設定自体が成り立たなくなったため中止となっている。

このようにインプリント機構も DNA メチル化制御機構そのものについても大きな進展は伺えないが、哺乳類の特性の解明に近づくという、初期目標に向けた今後の努力に期待したい。

### ③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が  
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が  
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

当該研究代表者らは本研究計画以前にレトロトランスポゾン由来遺伝子が、胎生の成立に重要な役割を果たすことを実証し、それがきっかけとなって本研究課題を開始している。本研究課題以前の研究成果は、哺乳動物の特性を考える上でも極めて重要な研究成果であり優位性があった。それを上回るブレークスルーと呼べる研究成果はこれまでのところ出ていないが、既出の遺伝子以外のレトロトランスポゾン由来遺伝子が妊娠や子育て行動に関係する可能性を示したことも、哺乳類の特性を語る上では特筆すべき研究成果と言える。また、始原生殖細胞で起きる DNA 脱メチル化が、受動的な脱メチル化ばかりでなく、DNA 複製を阻害した状況下でも能動的脱メチル化も起きることを示した点も大きい。さらに所期の目標外のテーマとして半数体 ES 細胞株の安定培養法と EpiSC への分化条件を確立した。

### ④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が  
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が  
(見込まれる ・ 見込まれない)

レトロトランスポゾン由来の遺伝子群が、生殖や行動に影響を与えているならば、哺乳動物の進化を考える上で重要な概念であり、生殖ばかりでなく、進化研究分野の進展に寄与が見込まれる。加えて、遺伝子変異に伴う病気を考えた場合、特に表面化しにくい生育医療関連研究分野の進展に寄与することが想定される。

一般的な知的向上ばかりでなく、少子高齢化がますます進む社会において、生殖にまつわる疾患の解明と治療という点で貢献できる可能性があるが、これまでの成果との関連性は薄く、社会的、経済的課題に対して具体的にどのように貢献するか不明である。

#### ⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

研究目的の達成に向けての研究計画は、ノックアウトマウスの作製や解析は常套手段ということもあり、適切と思われる。一方、DNAメチル化制御やインプリント配列については、より具体的な研究計画でないと、哺乳類らしさの解明にはつながらないという印象が強い。指摘事項への対応状況のうち、後半2計画のDNAメチル化制御とインプリンティング制御に関しては、問題設定の基礎にしていたデータ自体が変化したことが明確となったためテーマを打ち切っている。結果、研究代表者の優位性がある研究計画1に集中できたことになる。また半数体ES細胞株の安定培養法とEpiSCへの分化条件の確立については予定外の成果をあげた。

マネジメントについては各担当者との連絡を頻繁に行っており、適切であると評価される。助成金で購入した物品は計画どおり使用されており、購入機器は当初の計画には無かったものも含め有効に活用されている。

各ノックアウトマウスの解析結果に関する報告は学会発表の形で行われている。また、雑誌論文7件とあるが、責任著者のものが少ないように見える。独立した研究者としての今後の発信に期待したい。

アウトリーチ活動については、研究一般に関する話題や、女性研究者ならではの立場で対話を実施されたことは評価できる。