

課題番号	LS112
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

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

1. 当該年度の研究目的

<p>本申請研究は、哺乳類になって獲得された遺伝子群が、胎生機構全般－胎盤の発生だけでなく排卵、妊娠の成立や維持、哺乳や子育て行動－に、またゲノムインプリンティングを構成するリプログラミングなどのエピジェネティックな分子機構が、どのように関わって哺乳類らしさを生み出しているかを明らかにしようとするものである。具体的には、</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Sushi-ichi レトロトランスポゾンに由来する3つの哺乳類特異的遺伝子 <i>Sirh7</i>、<i>Sirh3</i>、<i>Sirh11</i> のノックアウトマウスの解析</li> <li>2) 哺乳類における DNA 脱メチル化機構の解析</li> <li>3) 生殖細胞特異的な DNA メチル化の解析</li> <li>4) 有袋類の培養細胞を用いたゲノムインプリンティング機構の起源の解析</li> </ol>
--

2. 研究の実施状況

<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Sushi-ichi レトロトランスポゾンに由来する3つの哺乳類特異的遺伝子 <i>Sirh7</i>、<i>Sirh3</i>、<i>Sirh11</i> のノックアウトマウスの解析  <p><i>Sirh3,11</i> 遺伝子のノックアウトマウスの解析については DNA マイクロアレイによる各組織の解析、<i>Sirh7</i> 発現の見られる組織での正確な発現を <i>in situ</i> hybridization や免疫染色法で解析を行った。発現解析が進んでいる <i>Sirh3,7</i> 遺伝子のノックアウトマウスは行動解析を行い、<i>Sirh3</i> ノックアウトマウスは行動異常が見つかった。<i>Sirh7</i> 遺伝子のノックアウトマウスは分娩異常が見られており、妊娠期のホルモン値の測定により分娩が延期するメカニズムが明らかになってきた。<i>Sirh11</i> 遺伝子の IVF による定常的な繁殖を行い、各臓器の発現解析を行った。また、子育てに異常がみられるため、妊娠期・出産後の発現解析を集中して行った。<i>Sirh11</i> 遺伝子ノックアウトマウスの行動解析は理化学研究所のマウスクリニックに依頼した。</p> </li> <li>2) 哺乳類における DNA 脱メチル化機構の解析  <p>受精直後の精子由来の雄性前核における DNA 脱メチル化は active な脱メチル化の代表であると言われてきた。しかし、受精から雌雄前核の融合が起きるまでの過程を再度、生物学的、生化学的に見直したところ、脱メチル化が起きるタイミングと言われた受精後 6-7 時間後には、雌雄両者の前核において DNA 複製が進んでおり、この過程が passive な脱メチル化であることが示唆された。これまでの報告のメチル化解析の結果も、半保存的なメチル化模様であることから、この時期におきているメチルシトシン(5mC)の減少は、Tet 酵素による全面的なヒドロキシメチルシトシン (5hmC) への変換を見たものであり、その後、5hmC が passive に希釈されて行くと考えられるべきであると考えられる。最近の他の研究者の報告も、この見方を支持するものが</p> </li> </ol>
--

様式19 別紙1

増えており、受精直後の精子由来の雄性前核における DNA 脱メチル化に関しては active ではなく passive な脱メチル化と考えるべきと考えている。現在までのところ、in vivo でも in vitro でも active な脱メチル化の確固たる証拠は無くなった。しかし、われわれが 2002 年に報告した始原生殖細胞(PGC)におけるゲノムインプリント記憶の消去に関しては、これに active 脱メチル化が実際に関与することを示す証拠を得ることに初めて成功した (論文投稿中)。この結果と哺乳類における生殖細胞分化システムを考えあわせると、生殖細胞における active な脱メチル化は必須なものである可能性が高いと考えている。

3) 生殖細胞特異的な DNA メチル化の解析

2)で述べたように、哺乳類では生殖細胞においてインプリント記憶が消去される際に、active な脱メチル化の関与が示されている。これを個々のインプリント領域で詳細に解析すると、脱メチル化の進行は、領域ごとに異なっており、特にレトロトランスポゾンの反復からなる制御領域の DNA メチル化は、他の制御領域と比べて早く完了していることがわかった。ゲノム中におけるレトロトランスポゾンの脱メチル化はインプリント制御領域よりも早く起きることがわかっており、これが反映された結果と考えている。一方で、種類によってはレトロトランスポゾンのメチル化は完全には消去されず、次世代まで残るエピジェネティック記憶となることも知られている。このようにレトロトランスポゾンの種類による DNA メチル化、脱メチル化の違いについて解析を続けている。

4) 有袋類の培養細胞を用いたゲノムインプリンティング機構の起源の解析

有袋類には DNA メチル化によらないインプリント遺伝子の発現制御がされると考えられる領域が複数存在する。これらがヒストン修飾の制御を受けているのかどうかをヒストンメチル化酵素、脱アセチル化酵素の遺伝子の RNAi 実験で確認するための実験系を検討している。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 2 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 2 件                  ①Kaneko-Ishino, T.<sup>1</sup> and Ishino, F<sup>2</sup> (<sup>1</sup> Faculty Health Sci., Tokai Univ., <sup>2</sup>Dep. Epigenetics, MRI, TMDU.) The role of genes domesticated from LTR retrotransposons and retroviruses in mammals. <i>Frontiers In Microbiol.</i> (2012) Vol.3, Article 262                  ②Renfree, M., B.,<sup>1</sup> Suzuki, S. and Kaneko-Ishino, T. (<sup>1</sup>The University of Melbourne, <sup>2</sup>Sinsyu Univ. <sup>3</sup> Faculty Health Sci., Tokai Univ.,) The origin and evolution of genomic imprinting in mammals. <i>In Mammalian Epigenetics in Biology and Medicine. Phillos Trans R Soc Lond B Biol Sci.</i> (2013) Vol. 368, No.1609                  (掲載済み一査読無し) 計 0 件                  (未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 8 件</p>	<p>専門家向け 計 8 件                  ①Fumitoshi Ishino<sup>1</sup>and Tomoko Kaneko-Ishino<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dep. Epigenetics, MRI, TMDU, <sup>2</sup> Faculty Health Sci., Tokai Univ.) Contribution of LTR retrotransposons to evolution of mammals: a novel view from comparative genomics. Tokyo, Japan 2012 Jul. 11<sup>th</sup> Surugadai Symposium                  ②Mie Naruse<sup>1,3</sup>, Ryuichi Ono<sup>1</sup>, Toshiaki Hino<sup>2</sup>, Akira Akatsuka<sup>3</sup>, Kenji Nakamura<sup>3</sup>, Minesuke Yokoyama<sup>4</sup>, Tomoko Kaneko-Ishino<sup>3</sup>, and Fumitoshi Ishino<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dep. Epigenetics, MRI, TMDU, <sup>2</sup>Asahikawa Med. Univ., <sup>3</sup> Faculty Health Sci., Tokai Univ., <sup>4</sup>Niigata Univ.)</p>

様式19 別紙1

	<p>Phenotypic analysis of placenta in Sirh7, a retrotransposon-derived gene, deficient mice. Cambridge, U.K. 2012 Jul. CTR Annual Trophoblast Meeting</p> <p>③Fumitoshi Ishino<sup>1</sup>, Ryuichi Ono<sup>1</sup>, Shunsuke Suzuki<sup>2</sup>, Yoichi Sekita<sup>3</sup>, Mie Naruse<sup>1,4</sup> Masahito Irie<sup>4</sup>, Masayuki Ishii<sup>1</sup>, Sawa Iwasaki<sup>4</sup>, Moe Kitazawa<sup>1</sup>, Takashi Kohda<sup>1</sup> and Tomoko Kaneko-Ishino<sup>4</sup> (<sup>1</sup>Dep. Epigenetics, MRI, TMDU, <sup>2</sup>Sinsyu Univ., <sup>3</sup>Osaka Univ., <sup>4</sup> Faculty Health Sci., Tokai Univ.) Role of mammalian-specific retrotransposon-derived genes in mammalian reproductive system. Beijing, China 2012 Oct. The 2<sup>nd</sup> SKLRB Symposia in Reproductive Biology</p> <p>④小野 竜一,<sup>1</sup> 成瀬 美衣,<sup>1, 2</sup> 北澤 萌恵,<sup>1</sup> 金児-石野 知子,<sup>2</sup> 石野 史敏<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京医科歯科・難研・エピジェネティクス、<sup>2</sup>東海大学) 哺乳類特異的レトロトランスポゾン獲得による胎生進化 博多、2012年12月 第35回日本分子生物学会年会</p> <p>⑤成瀬 美衣,<sup>1, 2</sup> 小野 竜一,<sup>1</sup> 日野 敏昭,<sup>3</sup> 赤塚 明,<sup>4</sup> 中村 健司,<sup>3</sup> 横山 峯介,<sup>5</sup> 石野 史敏,<sup>1</sup> 金児-石野 知子<sup>2</sup> (<sup>1</sup>東京医科歯科大・難研・エピジェネティクス、<sup>2</sup>東海大学・健康科学、<sup>3</sup>三菱化学生命科学研究所 <sup>4</sup>東海大学・教育研究支援センター、<sup>5</sup>新潟大学・脳研) 博多、2012年12月 第35回日本分子生物学会年会</p> <p>⑥入江 将仁,<sup>1</sup> 成瀬 美衣,<sup>1, 2</sup> 幸田 尚,<sup>2</sup> 小野 竜一,<sup>2</sup> 若菜 茂晴,<sup>3</sup> 石野 史敏,<sup>2</sup> 金児-石野 知子<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東海大・健康科学、<sup>2</sup>東京医歯大・難研・エピジェネティクス、<sup>3</sup>理研 BRC・マウス表現型解析開発チーム) Sushi-ichi レトロトランスポゾン由来の遺伝子 Sirh3 の機能解析 博多、2012年12月 第35回日本分子生物学会年会</p> <p>⑦山口 佑季,<sup>1, 2</sup> 李 知英,<sup>2, 3</sup> 幸田 尚,<sup>1</sup> 金児-石野 知子,<sup>4</sup> 石野 史敏<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京医歯大・難治研・エピジェネティクス、<sup>2</sup>東京医歯大・GCOE、<sup>3</sup>PRESTO、<sup>4</sup>東海大・健康科学) <i>Ex vivo</i>, <i>In vitro</i> 培養法による始原生殖細胞の DMR 脱メチル化の解析 博多、2012年12月 第35回日本分子生物学会年会</p> <p>⑧岩崎 佐和,<sup>1, 2</sup> 幸田 尚,<sup>2</sup> 鈴木 俊介,<sup>3</sup> 小野 竜一,<sup>2</sup> Clark Helen,<sup>4</sup> Shaw Geoff,<sup>4</sup> Renfree Marilyn B.,<sup>4</sup> 金児-石野 知子,<sup>1</sup> 石野 史敏<sup>2</sup> (<sup>1</sup>東海大・健康科学部、<sup>2</sup>東京医歯大・難研 <sup>3</sup>信州大・農学部・エピゲノミクス部門、<sup>4</sup>メルボルン大・動物学部) 真獣類および有袋類特異的なレトロトランスポゾン由来の遺伝子群 PNMA ファミリーとインプリンティングの解析 博多、2012年12月 第35回日本分子生物学会年会</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計1件</p>	<p>①Kaneko-Ishino, T.<sup>1</sup> and Ishino, F<sup>2</sup> (<sup>1</sup> Faculty Health Sci., Tokai Univ., <sup>2</sup>Dep. Epigenetics, MRI, TMDU.) Evolution of viviparity and genomic imprinting in mammals by retrotransposons. <i>In Evolutionary Biology: Mechanisms and Trends</i> (ed. Pontarotti, P.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2012) Apr. pp265-282</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件  (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>現在作成中ですので、作成できましたらご連絡いたします。</p>

様式19 別紙1

<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>東海大学・伊勢原市提携事業総合型地域スポーツクラブ／大学開放講座（2012年9月8日）                  伊勢原市民対象 大学開放講座 参加者数 30名 「遺伝子でみる健康について」講演                  伊勢原市民対象 健康クラブ 参加者数 70名 「遺伝子でみる健康について」講演</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載計0件</p>	<p>なし</p>
<p>その他</p>	<p></p>

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	135,000,000	48,050,000	46,140,000	40,810,000	
間接経費	40,500,000	14,415,000	13,842,000	12,243,000	
合計	175,500,000	62,465,000	59,982,000	53,053,000	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	21,984,460	46,140,000		68,124,460	48,045,529	20,078,931	
間接経費	6,605,622	13,842,000		20,447,622	20,447,622	0	
合計	28,590,082	59,982,000	0	88,572,082	68,493,151	20,078,931	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	20,755,790	実験用マウス、器材、試薬、DNAマイクロアレイ 他
旅費	266,240	学会(日本分子生物学会)参加による旅費 他
謝金・人件費等	13,508,469	特任助教員1名、ホストクター1名、臨時職員1名
その他	13,515,030	東海大学実験動物センター利用料他
直接経費計	48,045,529	
間接経費計	20,447,622	
合計	68,493,151	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
パイオクリンベンチ	パナソニックヘルスケア (株)	1	850,000	850,000	2012.8.14	東海大学
倒立型電子リサーチ 顕微鏡システム	オリンパス(株)	1	12,200,000	12,200,000	2012.10.11	東海大学
キメラマウス	発生工学研究会	1	693,000	693,000	2013.3.5	東海大学