

クローン胚盤胞におけるトランスクリプトーム解析

河野友宏

東京農業大学応用生物科学部

要 約

体細胞クローンヒツジの“ドリー”が誕生して12年になるが、体細胞クローニングにおける核のリプログラミング機構の分子メカニズムは未だに理解されておらず、クローン動物を作製する技術にも顕著な進展は認められない。我々はマウスクローン胚における遺伝子発現特性とリプログラミング機構の更なる洞察を得るために、マイクロアレイを用いて単一クローン胚盤胞から包括的な遺伝子発現プロファイリングを行った。クローン胚の作製に使用したドナー細胞は、卵丘細胞、セルトリ細胞および胚性幹細胞で、コントロール胚を含め合計87胚がマイクロアレイ解析の対象となった。解析の結果、遺伝子発現プロファイルは、用いたドナー細胞種に明らかに依存して、明確に区別される3つのクラスターを形成した。この結果は、クローン胚ではドナー細胞種特異的なリプログラミングプロセスが存在するという可能性を示唆した。さらに、コントロール胚との比較解析から、殆どのクローン胚でリプログラミングされにくい遺伝子群を抽出することが可能であった。また、これらの遺伝子のうち一部は、高発現能を獲得したと考えられる胚において正常にリプログラミングされていることを示した。これらの結果は、体細胞クローン胚におけるリプログラミング機構の解明に新たな知見となりうる。

キーワード: マイクロアレイ, 体細胞クローン胚盤胞, 遺伝子発現プロファイル

1. 緒 論

体細胞クローンは、究極のリプログラミングモデルとして、極めて興味深い研究対象である。しかしながら、体細胞クローン個体誕生の成否を制御するドナー核のリプログラミング機構に対する分子メカニズムの理解は不

十分であると言わざるをえない。一方、iPS細胞の出現により幹細胞研究は一気に生命科学の中心的位置づけになり、細胞のリプログラミングの機構解明に新たな情報が集積しつつある。他方、最近の解析技術の進歩には目を見張るものがあり、クローン研究の新たな展開に大いに貢献することが期待されている。このような背景

コントロール胚 16 C57BL/6♀とCBA♂の自然交配に由来 2.5dpcで灌流し、拡張胚盤胞まで体外培養	 拡張胚盤胞	
ESクローン胚 14 ドナー細胞: ES細胞TT2株 (B6CBF1由来) レシピエント卵: BDF1未受精卵	 ES細胞	産仔の報告なし
セルトリ細胞クローン胚 28 ドナー細胞: セルトリ細胞 (3日齢B6CBF1♂由来) レシピエント卵: BDF1未受精卵	 セルトリ細胞	 3%産仔
卵丘細胞クローン胚 29 ドナー細胞: 卵丘細胞 (BDF1由来) レシピエント卵: BDF1未受精卵	 卵丘細胞	 1.4%産仔

図 1. トランスクリプトーム解析に使用したサンプル

をうけ、体細胞クローン研究も新たな発展が期待される。

我々は、未受精卵細胞質因子による分化細胞ゲノムのリプログラミング機構の解明、発生異常の原因究明、さらにはリプログラミング誘導技術の開発、体細胞クローン技術の効率化に資することを目的に研究を展開している。リプログラミングを理解する上で、体細胞クローン胚個々の遺伝子発現プロファイルを明らかにすることは大変重要である。そこで我々は、体細胞クローン胚が着床前後に急速に生存性を失うこと、その一方で胚盤胞期胚では明瞭な形態的異常が確認できないことに注目し、トランスクリプトーム解析を進めている。

2. 材料および方法

供試した体細胞クローン胚盤胞期胚は、セルトリ細胞クローン (SR) 胚 (n=28)、ES 細胞クローン (ES) 胚 (n=14)、卵丘細胞クローン (CU) 胚 (n=29) である (図1)。なお、コントロールには自然交配で得られた胚盤胞 (n=16) を使用した。クローン胚の作出は、ピエゾシステムを用いた直接注入法で行った。

単一胚盤胞からの RNA の抽出は、RNeasy micro Kit (QIAGEN) を用い total RNA を回収した。マイクロアレイによる遺伝子発現定量解析は、2-cycle Target

Labeling and Control Reagent (Affymetrix) を用い、プロトコールの一部を改変してビオチンラベル化した cRNA を合成し、GeneChip Mouse genome 430 2.0 array (Affymetrix) を用いて実施した。得られたデータは GeneSpring v7.3 (Agilent) で解析した (図2)。マルチ Q-PCR：単一胚盤胞におけるマーカー遺伝子の定量解析を行うために、5 遺伝子の同時検定が可能な BioRAD 社 Multicolor Real Time PCR システムを用い発現量を検討した。

3. 結果

全87サンプルから得られたデータを1WAY ANOVA 解析した結果、10,520 の差次的発現遺伝子が得られた。そのうち 620 遺伝子は、ドナー細胞種に関わりなくクローン胚に共通して特異的な発現を示した。また、SR 胚では 1,710 遺伝子、ES 胚では 1,101 遺伝子ならびに CU 胚では 1,717 遺伝子がそれぞれ特異的な発現パターンを示した (図3, 図4)。さらに、Ingenuity Pathway 解析から最も有意な生物学的プロセスは、SR 胚では Gene Expression, ES 胚では Cell Cycle, ならびに CU 胚では Cell Death であった。主成分解析の結果、ドナー細胞種によって明らかに4つのグループに分けられたこ

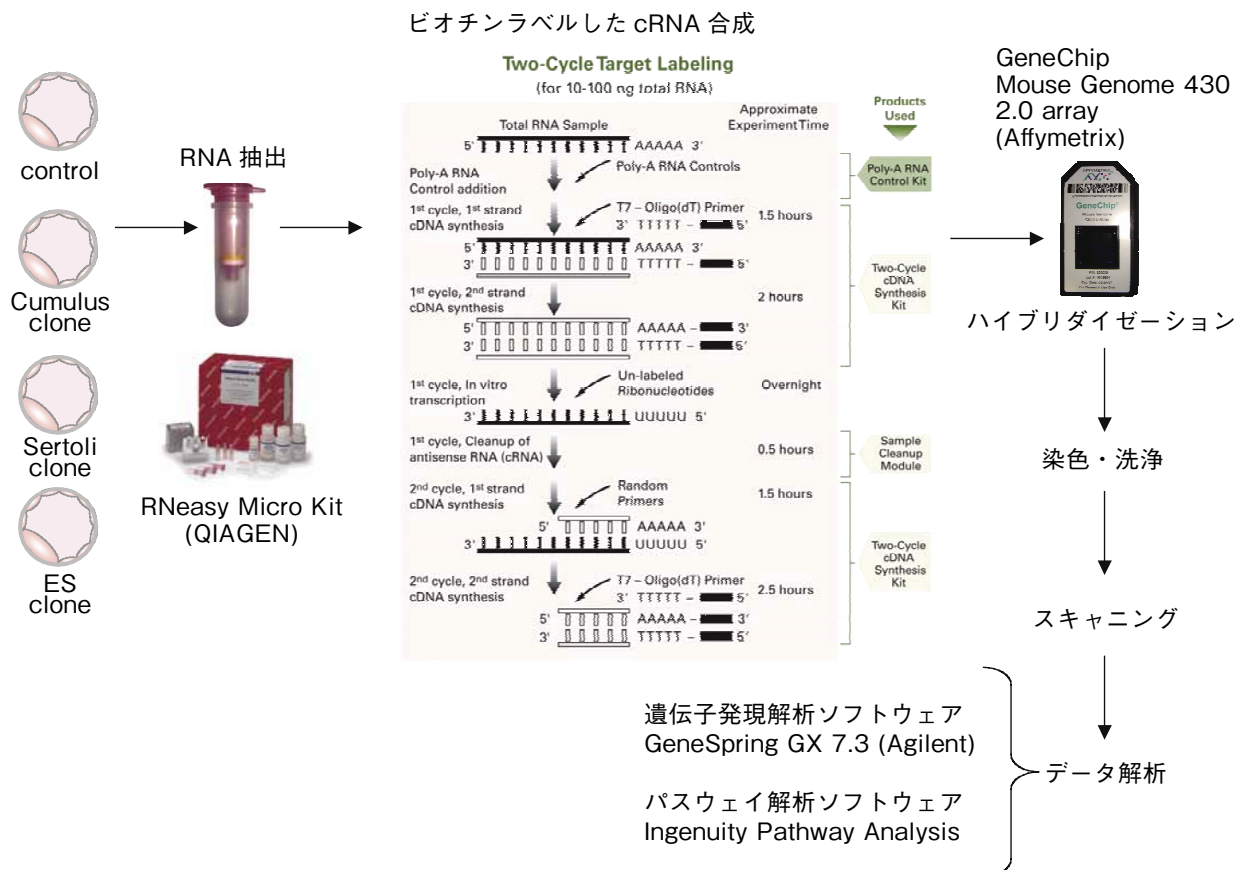


図2. マイクロアレイ解析の流れ

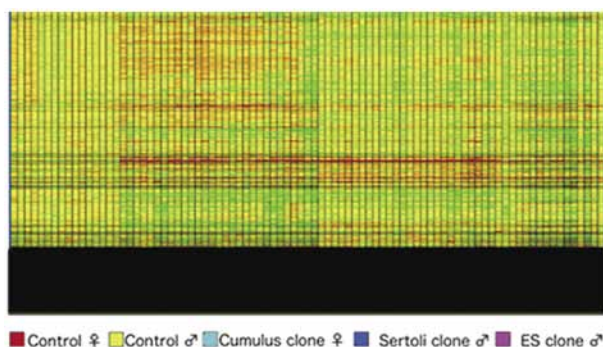


図 3. マウス体細胞クローン胚盤胞のマイクロアレイ解析データのコンディショナルツリー

コントロール：16, 卵丘細胞クローン：29,
セルトリ細胞クローン：28, ES 細胞クローン：14

とから、クローン胚におけるリプログラミングはドナー細胞種のゲノム状態を強く反映していることが裏付けられた。さらに、着床後の発生能との関連を想定した遺伝子群スクリーニングの試みでは、一群の遺伝子を抽出することができた。また、各クローン胚特異的に発現異常を示した遺伝子群の Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity) および Canonical Pathway の結果から、多数の遺伝子から構成される遺伝子ネットワークが複数構築されるとともに、細胞周期、細胞死、あるいは未分化に係わるシグナルトランスダクションに密接に関与している可能性が示唆された。一方、アレイ解析の結果を再評価するために、Multiplex PCR を用いて定量的遺伝子発現解析を実施した結果、我々が今回用いたマイクロアレイによる転写スクリプトーム解析方法は、非常に正確な定量的かつ網羅的遺伝子発現解析であり、クローン胚盤胞の特性を的確に反映していることが証明された。

4. おわりに

生殖系列細胞ではダイナミックなエピゲノム修飾のダイナミックなリプログラミングが行われ、雌雄ゲノムに特異的なゲノム機能が獲得される。この生殖細胞特異的リプログラミングに加え、胚の発生に伴い細胞の分化・組織形成に特異的なエピゲノム修飾が成立し、それらの集大成として個体発生が達成されると考えてもよいであ



図 4. マウス体細胞クローン胚盤胞のマイクロアレイ解析データの One Way Anova テスト結果

ろう。最近の幹細胞研究、特に iPS 細胞の研究と同様に、分化した体細胞の全能性を誘導することが出来るクローン技術は、ゲノムのリプログラミング機構を理解する上で優れた研究対象であることを再認識したい。新たな視点と解析手法を駆使して、体細胞クローン誕生の謎の解明に今後も努力したい。

文 献

- Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, Akutsu H, Berry DL, Yanagimachi R, Page DC, Jaenisch R. 2003. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 130, 1673-1680.
- Jincho Y, Sotomaru Y, Kawahara M, Ono Y, Ogawa H, Obata Y, Kono T. 2008. Identification of genes aberrantly expressed in mouse embryonic stem cell-cloned blastocysts. *Biology of Reproduction* 78, 568-576.
- Beyhan Z, Ross PJ, Iager AE, Kocabas AM, Cunniff K, Rosa GJ, Cibelli JB. 2007. Transcriptional reprogramming of somatic cell nuclei during preimplantation development of cloned bovine embryos. *Developmental Biology* 305, 637-649.

Transcriptome analysis in mouse cloned blastocysts

Tomohiro Kono

Department of Bioscience , Tokyo University of Agriculture

Summary

Despite extensive studies in past decade, the molecular mechanisms underlying the reprogramming of donor nuclei in somatic cell embryo cloning are still not fully understood, and a completely reliable embryo cloning technique has yet to be established. In an effort to gain further insights into reprogramming and the properties of cloned embryos, we conducted large-scale gene expression profiling of single blastocysts using GeneChip microarrays. Sertoli cells, cumulus cells and embryonic stem cells were used as donor cells. In total 87 blastocysts were subject to microarray analysis. The gene expression profiles were clearly classified into three clusters corresponding to each donor cell type. The results revealed unique gene expression profiles for each type of cloned embryo that were strictly dependent upon the type of donor cells. This suggests that a specific reprogramming process occurs in each cloned embryo. Furthermore, on the bases of comparison analysis, we selected a set of genes, which are hardly reprogrammed were selected, and then we demonstrated that some of these genes are appropriately reprogrammed only in embryos that acquire higher developmental competence. We provide a framework to further understand reprogramming in somatic cell cloned embryos.

Key words: microarray, cloned blastocysts, gene expression profile