

ウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現とその人為的制御の可能性

澤井 健

岩手大学農学部

要 約

本研究はウシ体細胞クローン胚にみとめられる異常原因の一端を明らかにする目的で、ウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現動態とその制御機構に関して mRNA の発現量解析と DNA メチル化解析を用いて検討を行った。その結果、ウシ体細胞クローン胚においてはインスリン様成長因子 (IGF) 関連遺伝子の発現が体内受精・体内発生胚と異なっており、さらに satellite I 領域の DNA メチル化レベルが体細胞クローン胚では高いことが明らかとなった。しかしながら、その後の胚発生にともない体細胞クローン胚の DNA メチル化レベルは正常化し、DNA メチル期転移酵素の遺伝子発現動態から体細胞クローン胚にみられる DNA の脱メチル化は維持メチル化機能の低下による受動的なものであることが示唆された。今後、さらにウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現およびその制御機構に関する研究を継続することで、ウシ体細胞クローン産子の作出効率の改善が可能となると考えられる。

キーワード: ウシ, 体細胞クローン, 胚, 遺伝子発現

1. はじめに

哺乳動物の体細胞クローンにおいては、胚の受胎能力の低下、高頻度での流産の発生、産子の過大化、生後直死などの異常がみとめられる。これら異常の発生機序は明らかではないが、ドナー細胞核の初期化が不完全であるために、発生に関与する様々な遺伝子が正常に発現しないことがその原因の一つとして考えられる。ウシでは、胚発生に関与する遺伝子の特定やその発現動態の解明が十分になされておらず、体細胞クローン胚を含めた初期胚の遺伝子発現解析が極めて重要な課題となっている。我々は細胞分化および胚・胎子発育に関与する遺伝子のウシ体細胞クローン胚に特異的な発現動態と遺伝子発現制御因子の一つである DNA メチル化レベルの変化に関して下記のような知見を得た。

表 1. ウシ胚盤胞期胚における IGF 関連遺伝子の発現頻度

増幅産物が確認された胚数 (%)					
胚数	IGF-Ir	IGF-IIr	IGFBP-2	IGFBP-3	
NT-SC	12	12 (100)	3 (25.0) ^a	12 (100)	6 (50.0) ^a
NT-EM	12	12 (100)	9 (75.0) ^b	12 (100)	12 (100) ^b
IVF	12	12 (100)	10 (83.3) ^b	12 (100)	9 (75.0) ^{ab}
Vivo	12	12 (100)	11 (91.7) ^b	12 (100)	11 (91.7) ^{ab}
PA	12	12 (100)	6 (50.0) ^{ab}	12 (100)	11 (91.7) ^{ab}

P<0.05 at least.

2. ウシ体細胞クローン胚の mRNA 発現量

我々は、ウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現を個々の胚から抽出した RNA を用いて RT-リアルタイム PCR 法を用いて解析している。体細胞核移植 (NT-SC)、受精卵核移植 (NT-EM)、体外受精 (IVF)、体内受精体内発生 (Vivo) および単為発生 (PA) に由来するウシ胚盤胞期胚の mRNA 発現量を比較解析した結果、NT-SC 胚では、胚・胎子発育に重要な役割をもつ IGF 関連遺伝子の発現頻度 (表 1) および mRNA 発現量に異常が認められた (IGF 結合タンパク質 (IGFBP)-2, -3 の例を示す:

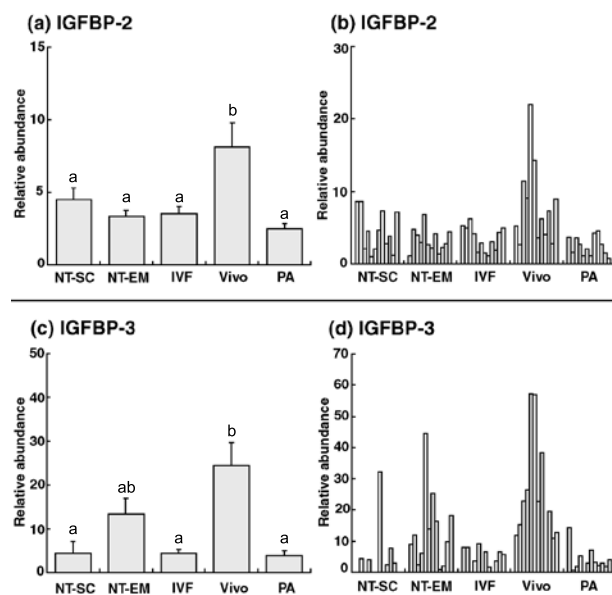


図 1. ウシ胚盤胞期胚における IGFBP 遺伝子の mRNA 発現量

表 2. 各発生段階における IGF 関連遺伝子の発現頻度

発生段階		増幅産物が確認された胚数 (%)				
		IGF-1I	IGF-1r	IGF-1lr	IGFBP-2	IGFBP-3
BC	NT-SC	0/14 (0)	14/14 (100)	3/14 (21)	14/14 (100)	7/14 (50)
BC	Vivo	0/14 (0)	14/14 (100)	12/14 (86)	14/14 (100)	13/14 (93)
EL	NT-SC	5/7 (71)	5/7 (71)	7/7 (100)	7/7 (100)	5/7 (71)
EL	Vivo	7/7 (100)	7/7 (100)	7/7 (100)	7/7 (100)	7/7 (100)

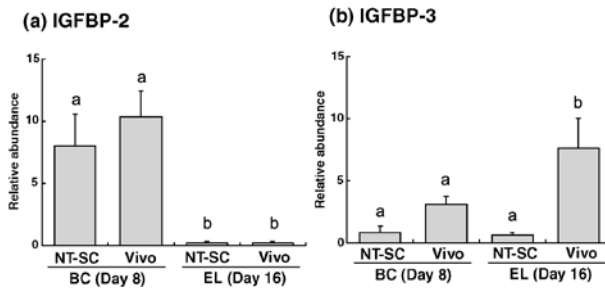


図 2. 胚発生にともなう IGFBP 遺伝子の mRNA 発現の変化

図 1, a, c)。また、ウシ体細胞クローン胚の mRNA 発現の特徴として個々の胚における mRNA 発現量のバラツキが顕著であることが明らかとなった (図 1, b, d)。さらにウシ体細胞クローン胚の mRNA 発現量の異常は IGF 関連遺伝子だけではなく組織分化に関与する FGF4 遺伝子の発現異常も確認された。

しかしながら、これら発現異常のみとめられた遺伝子群にはその後の伸長期 (EL) までの発育にともない mRNA の発現頻度 (表 2) や発現量 (図 2) が正常化する遺伝子 (IGFBP-2) と、継続的に発現異常がみとめられる遺伝子 (IGFBP-3) が混在することが明らかとなり、このことは、ウシ体細胞クローン胚の異常原因の一つとなっている可能性が示唆された。

3. ウシ体細胞クローン胚の発生にともなう DNA メチル化レベルの変化

ウシ初期胚の各発生段階における satellite I 領域の DNA メチル化レベルについて検討した結果 (図 3), Vivo 胚の DNA メチル化割合は胚発生にともない有意に増加し、なかでも伸長期胚の胚盤 (ED) は栄養膜 (TE) よりも高メチル化状態にあることが明らかとなった。一方, NT-SC 胚では胚盤胞期における DNA メチル化割合が Vivo 胚と比較して有意に高い値を示すものの、その後の胚発生によって伸長期 TE では脱メチル化されることが明らかとなった。その結果, 伸長期 NT-SC 胚の DNA メチル化レベルは Vivo 胚と比較して差はみとめられなくなった。

また, DNA メチル化酵素 (Dnmt) 遺伝子の発現量を解析した結果, NT-SC 胚では胚盤胞期における Dnmt-1 発現量が Vivo 胚よりも有意に低い値を示した (図 4)。Dnmt-1 は主に維持型メチル化を, Dnmt-3a および Dnmt-3b はともに de novo 型メチル化に重要な役割をもつことが知られており, これらのことから, ウシ NT-SC 胚では胚発生にともなう DNA メチル化状態が正常化すること, NT-SC 胚では伸長期にかけて維持メチル化機能の低下による受動的な脱メチル化が起こっている可能性が示唆された。

4. TSA 処理によるウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現変化

マウスの体細胞クローン胚では, ヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害剤のトリコスタチン A (TSA) で再構築胚を一定期間培養することにより胚盤胞期への発生率および体細胞クローン個体の作出率が向上することが知られている。我々は TSA 処理によるウシ体細胞クローン胚の発生率, mRNA 発現量およびヒストンのアセチル化におよぼす影響について検討した。その結果, ウシ体細胞クローン胚を TSA で処理することにより, TSA の濃度依存的に胚盤胞期までの発生率が向上することが明らかとなった。TSA 処理によるウシ体細胞クローン胚の mRNA 発現量の変化は, IGFBP-2 発現量においては TSA 処理の有無にかかわらず Vivo 胚および IVF 胚と比較して差は認められなかったものの, IGFBP-3 発

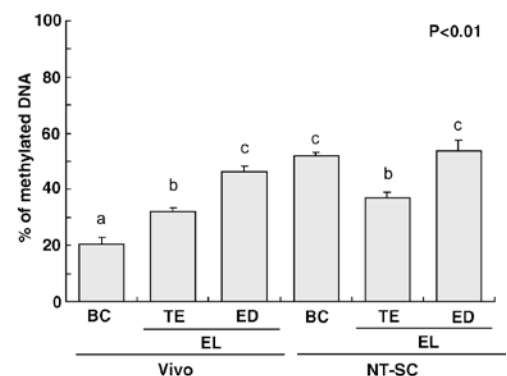


図 3. 胚発生にともなう DNA メチル化レベルの変化

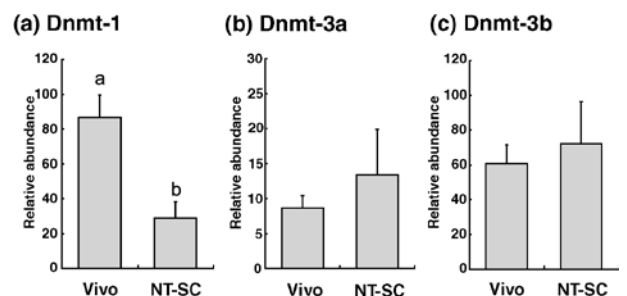


図 4. ウシ胚盤胞期胚における Dnmt 遺伝子の mRNA 発現量

現量においては TSA 無処理胚では Vivo 胚と比較して有意に低い値を示すが、TSA 処理によりその値が Vivo 胚および IVF 胚と同じレベルにまで回復することが明らかとなった。TSA 無処理の体細胞クローン胚のヒストン H3 および H4 はともに低アセチル化状態にあったが、TSA 処理により高アセチル化状態を示す胚が増加し、その割合は Vivo 胚と同程度であった。以上の結果より、ウシ体細胞クローン胚の TSA 処理は、再構築胚の mRNA 発現およびヒストン修飾を変化させ、体細胞クローン胚の遺伝子発現機構の一部を正常化する可能性が示唆された。

5. おわりに

今回、我々が得たウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現に関する研究結果の一部を紹介したが、ここに示した結果からもウシ体細胞クローン胚の様々な遺伝子の発現動態が Vivo 胚や IVF 胚などと異なることは明らかである。しかしながら、一部の体細胞クローン胚は分娩に至り、その約半数は正常に発育するため、今回示した遺伝子の発現異常が体細胞クローン胚の発生にどのような影響をおよぼしているのかを今後明らかにする必要がある。さらに、今回、我々が示したように初期胚の段階で発現異常がみとめられた遺伝子においても、胚の発生にともなって正常な発現パターンを示す遺伝子と発現異常が継続する遺伝子が存在する。このことは個々の遺伝子の発現制御が胚発生にともなって変化していることを示すものであり、発現が正常化する遺伝子と発現異常が継続する遺伝子における発現制御の違いなども明らかにする必要がある。

上記のように体細胞クローン胚の遺伝子発現を制御する機構の解明は体細胞クローン胚の異常原因の解明に必要不可欠である。遺伝子発現の制御には様々な機構が存在するが、そのなかでも DNA メチル化とヒストン修飾がよく知られている。今回、体細胞クローン胚の DNA メチル化とヒストン修飾について現在我々が行っている研究の一部を紹介したが、個々の遺伝子における DNA メチル化パターンや、ヒストン修飾状態の検討など残された課題も多く、現在、我々は様々なエピジェネティク

ス解析手法を用いてそれらの解析を進めている。今回、TSA 処理によるウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現の変化に関する研究結果を示したが、これらの結果はウシ体細胞クローン胚における遺伝子発現の人為的制御の可能性を示すものである。体細胞クローン胚の遺伝子発現制御機構を明らかにすることにより、さらに効果的かつ効率的にクローン胚の遺伝子発現の人為的制御が可能となり、現段階では胚盤胞期までの発生率の向上にとどまっているが、将来的にはウシ体細胞クローン産子の作出効率の改善につながる可能性がある。これらの課題はウシ体細胞クローン胚の発生異常原因の解明やクローン技術の改善のみならず、未だ不明な点の多い家畜胚の発生機構の理解にも大きく貢献できると考えている。

文 献

本原稿に掲載したすべての図表と結果の一部は、下記論文から転載引用したものである。

- Sawai K, Kageyama S, Moriyasu S, Hirayama H, Minamihashi A, Onoe S. 2005, Analysis of mRNA transcripts for insulin-like growth factor receptors and binding proteins in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Clonig and Stem Cells*, 7, 189-198.
- Sawai K, Kageyama S, Moriyasu S, Hirayama H, Minamihashi A, Onoe S. 2007. Changes in the mRNA transcripts of insulin-like growth factor ligand, receptors, and binding proteins in bovine blastocysts and elongated embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Journal of Reproduction and Development* 53, 77-86.
- Sawai K, Takahashi M, Moriyasu S, Hirayama H, Minamihashi A, Hashizume T, Onoe S. 2010. Changes in the DNA methylation status of bovine embryos from the blastocyst to elongated stage derived from somatic cell nuclear transfer. *Cellular Reprogramming*, 12, 15-22.