

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ~ 2009

課題番号：19591911

研究課題名 (和文) 卵特異的新規遺伝子と「正常な卵」を規定する遺伝子ネットワーク

研究課題名 (英文) Genes expressed specifically in oocytes may have an important role in the quality (developmental competence) of oocytes

研究代表者

浜谷 敏生 (HAMATANI TOSHIO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60265882

研究成果の概要 (和文): 本研究では、母体加齢あるいは排卵後加齢による卵の質的低下に注目し、卵の遺伝子発現プロファイリングの変化を観察した。卵の質の低下には、酸化ストレスによるミトコンドリアの機能障害、DNA 修復機能の低下など体細胞の加齢変化に共通したメカニズムの他に、DNA メチル化、クロマチン二次構造の変化、RNA 修飾などに関わる遺伝子の発現変化を認めた。さらに、遺伝子発現プロファイル・データの多元的解析および EST 発現頻度の解析により、卵細胞にのみ特異的に発現する遺伝子を *in silico* に抽出し、2 つのマウス新規遺伝子ファミリーに注目して、発現および機能の解析を試みた。

研究成果の概要 (英文):

To elucidate molecular mechanisms underlying oogenesis and oocyte quality, we first employed *in silico* analysis of global gene expression profiling data and an EST frequency database, and selected genes that are specifically expressed in oocytes and preimplantation embryos. We further studied the differences of gene expression profiles (1) between oocytes from aged mice and those from young mice, and (2) between post-ovulatory aged oocytes and fresh oocytes to extract genes that are important for oocyte quality. Finally, we focused on two oocyte-specific gene families (Nlrp [NACHT, leucine-rich repeat and PYD containing] genes and KRAB [Kruppel-associated box] zinc finger genes).

As results of quantitative RT-PCR and *in situ* hybridization assays, we confirmed oocyte-specific expression of the Nlrp and the KRAB genes at the follicle stages later than the primary-follicle stage. To analyze gene function of the Nlrp genes, we used the RNA interference approach: injection with siRNAs into mouse fertilized eggs. The knockdown of a Nlrp gene lead to cleavage arrest during preimplantation development. On the other hand, we are now in the process of generating knockout mice for an oocyte-specific KRAB zinc finger gene.

In addition, we study a preimplantation-stage-specific gene *Hmgpi* which is a putative chromosomal protein with two high-mobility-group boxes. *Hmgpi* is zygotically transcribed during zygotic genome activation, but not transcribed after implantation. The *Hmgpi*-encoded protein (HMGPI), first detected at the 4-cell stage, remains highly expressed in pre-implantation embryos. Interestingly, HMGPI is expressed in both the inner cell mass (ICM) and the trophectoderm, and translocated from cytoplasm to nuclei at the blastocyst stage, indicating differential spatial requirements before and after the blastocyst stage. siRNA (si*Hmgpi*)-induced reduction of *Hmgpi* transcript levels caused developmental loss of preimplantation embryos and implantation failures. Furthermore, reduction of *Hmgpi* prevented blastocyst outgrowth leading to generation of embryonic stem cells. The si*Hmgpi*-injected embryos also lost ICM and trophectoderm integrity, demarcated by reduced expressions of Oct4, Nanog and Cdx2. The findings implicated an important role for *Hmgpi* at the earliest stages of mammalian embryonic development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学

1. 研究開始当初の背景

ヒト女性の妊孕性は30歳代半ばで大きく下降する。これには加齢による子宮内膜着床能の減退や卵子数の減少も寄与していると考えられるが、卵の加齢変化が最も重要な原因である。なぜなら、若年健康女性から提供されたドナー卵を高年齢不妊症患者に対する体外受精-胚移植(IVF-ET)に供した場合、その妊娠率は若年健康女性のIVF-ETにおける妊娠率と変わらないからである(Navot D et al, Lancet, 1991; 337:1375-7)。一方、卵は受精後に胚性ゲノムを活性化させ(zygotic genome activation [ZGA])、全能性・不死性を備えた初期胚を生む。さらに、クローン胚においては体細胞核をリプログラミングする。果たして、どのような分子生物学的メカニズムがこのように核をリプログラミングし、不死性・分化全能性を誘導できるのか？また、このように卵に加齢変化は本当に起こるのか、起こるとするならばいかなるメカニズムが関与しているのか？生殖医学や再生医学のみならず基礎生物学的な観点からも非常に興味深い。

2. 研究の目的

本研究では、卵細胞にのみ特異的に発現する遺伝子に注目した。卵細胞は、受精能を持ち、雄性前核のリプログラミングを行い、胚性ゲノムの活性化と着床前期胚の分化全能性の賦与に関与する。また、クローニング実験においては、体細胞核のリプログラミングを行うことができる。このように、卵細胞は非常

に特異な細胞である。ここで、卵でのみ特異的に発現する遺伝子を抽出すれば、これらが上述した卵の特性に大きく寄与すると考えられる。さらに、母体加齢あるいは排卵後加齢による卵の質的低下をモデルとして、遺伝子発現プロファイリング・データの変化を多角的に解析し、またEST発現頻度の解析を行うことにより、卵の受精後発生能に重要と考えられる卵細胞特異的遺伝子を抽出した。これらの遺伝子の機能解析を通して、卵の遺伝子発現制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 母体の加齢による卵の質的低下をモデルとして、卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を検討した。卵で発現する遺伝子のうち、「卵の質」に寄与する遺伝子(quality marker)の発見を目指した。

マウス着床前期各ステージの胚を4セット(1セット500個)集め、それぞれからmRNAを抽出、*in vitro* transcription反応によりcRNA増幅およびCy3標識し、Cy5標識されたuniversal referenceとともに、NIA 22K 60-mer oligo microarrayにおいてhybridizationに供し、着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングを行った。

(2) 排卵後の加齢による卵の質的低下をモデルとして、卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を観察し、卵で発現する遺伝子のうち、「卵の質」に寄与する遺伝子(quality

marker) の発見を目指した。

以下の各々のグループについて、過排卵処理 F1 マウス(12 週齢)に hCG を注射し、3 セットの未受精卵(1 セット 1000 個)を集めた。各セットから mRNA を抽出し、*in vitro* transcription 反応により 2-round RNA 増幅した後、OpArray (70mer-oligo DNA microarray)において hybridization に供し、着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングを行った。

hCG 注射後 14 時間で採取した新鮮卵 (fresh)

hCG 注射後 23 時間で採取した加齢卵 (*in vivo* aged)

hCG 注射後 14 時間で採取し、卵丘細胞と共に *in vitro* で 9 時間培養した加齢卵 (*in vitro* aged with cumulus cells)

hCG 注射後 14 時間で採取し、卵丘細胞を除いて後 *in vitro* で 9 時間培養した加齢卵 (*in vitro* aged without cumulus cells)

(3) 卵の質的低下において発現変化を示し、卵でのみ特異的に発現している遺伝子に注目した。上記および着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング・データおよび Unigene EST database を用いて、*in silico* に卵特異的遺伝子を抽出した。その中でも、以下の新規遺伝子について、詳細な発現解析 (quantitative RT-PCR と *in situ* hybridization) に加え機能解析も進めた。一つは、Nlrp (NACHT, leucine-rich repeat and PYD containing)ファミリーで、NTPase ドメインと蛋白・蛋白結合ドメインを持ち、もう一つは Kruppel-associated box を持つ zinc finger 転写因子(KRAB Zfp)のファミリーである。

(4) *in silico* 解析により、着床前期胚に特異的であり、特徴的な転写因子 High mobility group (HMG) box ドメインを持つ新規遺伝子 Hmgpi が抽出された。Hmgpi はヒト、ウシにおいてもホモログの存在が示唆されており、種を越えて着床前期胚発生機構に重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられる。

ノザンプロット、逆転写 PCR、免疫組織染色およびウェスタンプロットにより詳細な発現解析を行った。また、RNA interference (RNAi)を用いて着床前期胚の胚盤胞までの発生率、胚移植による着床率および outgrowth を観察し、機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 母体の加齢による卵の質の低下をモデルとして、卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を検討した、卵で発現する遺伝子のうち、「卵の質」に寄与する遺伝子 (quality marker) の発見を目指した。

卵性 RNA は 2 細胞期までにそのほとんどが分解されると考えられていたが、2 細胞期以降も残存する卵性 RNA が多く存在することが明らかとなった。また、Gene Ontology Organization が遺伝子機能に関するキーワード(GO term)をそれぞれの遺伝子に割り付けているので、卵で発現する遺伝子に頻度の高い GO term を抽出した。その結果、細胞分裂に関わる GO term が多く認められ、サーカディアンリズムや接着分子といった GO term も特徴的であった。

さらに今研究では、MMLV 逆転写酵素による一括 2 本鎖 cDNA 合成と T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* transcription 反応を用いた 2-round cRNA linear amplification labeling reaction の効率化のみならず、DNA ポリメラーゼを用いた Ovation RNA 増幅システム (NuGEN Technologies 社) の有用性を検討した (久慈講師との共同研究)。これを用いて、マウス卵 1 個から RNA 増幅および Cy3 標識し、60-mer oligo microarray において hybridization に供した。

卵の質的低下 (胚発生率・妊娠率の低下) の背景を探究するため、卵の加齢変化を例に、母体加齢がマウス成熟卵の遺伝子発現プロファイリングに与える影響について検討した。卵の加齢には、酸化ストレスによるミトコンドリアの機能障害、テロメラーゼの発現・活性の低下、DNA 修復機能の低下など体細胞の加齢変化に共通したメカニズムの他に、DNA メチル化、クロマチン二次構造の変化、RNA 修飾などに関わる遺伝子の発現変化を認めた。また、それらの遺伝子の中には生殖細胞特異的に発現すると考えられる遺伝子が多く認められたため、生殖細胞に特異的な加齢機構の存在が示唆された。

(2) 排卵後の加齢による卵の質の低下をモデルとして、卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を観察し、卵で発現する遺伝子のうち、「卵の質」に寄与する遺伝子 (quality marker) の発見を目指した。

ととの対比較

in vivo aging では、Dnmt1, Dnmt3l などの DNA メチル転移酵素やクロマチン・リモデリング関連遺伝子などの発現変化が特徴的であり、卵の加齢によるクロマチン高次構造の変化が示唆された。また、ミトコンドリア機能や細胞微小骨格に関する遺伝子の発現も変

化していた(表1)。

ととの対比較

排卵後の卵細胞の *in vitro* aging における卵丘細胞の影響を検討した。卵丘細胞を保持させた卵細胞の方が卵丘細胞を除去した卵細胞よりもアポトーシス関連遺伝子の発現が大きく、より加齢が進んでいることが示唆された。

(3) 上記の遺伝子発現データから、*in silico* 解析により卵特異的新規遺伝子群 Nalp alpha-kappa (Nacht domain, Leucine-rich repeats) および KRAB-zinc finger proteins が発見された(図1)。

これらの遺伝子について、全長あるいは全翻訳領域を含む cDNA 塩基配列を TA クローニングして塩基配列を確認した。さらに、多組織パネルを用いたノザンプロット解析あるいは RT-PCR により卵巣特異的発現を確認し(図2)、卵巣薄切片を用いた *in situ* hybridization により卵巣内でも卵細胞に特異的に発現していることを示した(図3)。さらに、1つの KRAB Zfp 遺伝子についてノックアウトマウスを作成中である。

また、上記のように抽出した卵特異的遺伝子について染色体座を検討したところ、多くの卵特異的遺伝子がテロメア近傍でクラスターを形成し、それらが遺伝子ファミリーを形成していることが明らかとなった(図4)。真核生物の場合テロメア領域は主にヘテロクロマチンで構成され、ショウジョウバエや酵母ではテロメア近傍に位置する遺伝子の発現が抑制されることが知られている。したがって、マウス卵特異的遺伝子ファミリーの染色体座がテロメア近傍に存在することは、その遺伝子の発現が他臓器において抑制されていることと何らかの関連があると考えられた。

以上の結果より、我々が改良・検討を加えた RNA 増幅を用いて、おおよそ1個の卵および着床前期胚から遺伝子発現プロファイリングが可能となった。また、卵細胞で発現する遺伝子のリストおよびそれらの着床前期胚発生における発現パターン、さらには卵の(加齢による)質的变化に寄与する遺伝子群が明らかとなった。しかし、遺伝子発現プロファイリングによる卵の質的診断には、今後さらなる検討が必要である。

(4) 着床前期胚各ステージの定量的リアルタイム逆転写 PCR (Q-PCR) では2細胞期から胚盤胞期にかけて発現を認め、特に4

細胞期で最も強い発現を認めた。6-8 週齢マウスの多組織パネルを用いたノザンプロットでは発現を認めなかった。免疫組織染色では4細胞期から胚盤胞期にかけて発現を認め、桑実胚から胚盤胞において、Hmgp 蛋白の局在は細胞質から核内へ移行した。ウェスタンプロットでも同様の結果を得た。small interference RNA (siRNA) により Hmgp の発現をノックダウンした場合、69.2%しか胚盤胞に発生しなかった(コントロール注入群では95.3%)。着床への影響を検討する為、*in vitro* に outgrowth を検討したところ、良好な outgrowth を示した率は19.0%と劇的に低下し、*in vivo* においても偽妊娠マウスに移植して着床に成功した率は25.4%と有意な低下を認めた(コントロール注入群では、それぞれ91.8%、75.0%)。siRNA 注入による発現抑制を確認したところ、Q-PCR では、2細胞期において38%、4細胞期において27%、8細胞期において23%まで mRNA は抑制された。蛋白レベルにおいても抑制されていることを免疫組織染色およびウェスタンプロットにて確認した。以上より新規転写因子 Hmgp は着床前期に特異的に発現し、着床前期胚発生に寄与するのみならず、胚性着床因子として重要であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

「Tarin JJ, Hamatani T, Cano. A Acute stress may induce ovulation in women. *Reprod Biol Endocrinol* (査読あり) 2010, in press.

Toyoda M, Hamatani T, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Chip to analyze cell identity in Reproductive and Regenerative Medicine. *Current Medicinal Chemistry* (査読あり) 2010, in press

Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Human Molecular Genetics* (査読あり) 2010; 19(3): 480-493(<http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/rapidprint/19/3/480>)

Hamatani T, Yamada M, Akutsu H, Kuji

N, Mochimaru Y, Takano M, Toyoda M, Miyado M, Umezawa A, Kuji N, Yoshimura Y. What can you learn from gene expression profiling of mouse oocytes? *Reproduction* (査読あり) 2008; 135(5): 581-592(<http://www.reproduction-online.org/cgi/reprint/135/5/581>)

Kuji N, Yoshii T, Hamatani T, Hanabusa H, Yoshimura Y, Kato S. Buoyant density and sedimentation dynamics of HIV-1 in two density-gradient media for semen processing. (査読あり) *Fertility and Sterility* 2008; 90(5): 1983-1987

浜谷敏生 遺伝子発現プロファイリングによる卵の加齢機構の探索 *日本産科婦人科学会雑誌(Acta Obst Gynaec JPN)* (査読なし) 2008; 60(10): 1798-1812

Kuji N, Mizusawa Y, Naganishi M, Hamatani T, Iwata S, Yoshimura Y. Elimination of HIV-1 from semen and application of the processed semen to assisted reproductive technology. *Reproductive Medicine and Biology* (査読あり) 2007; 6(3): 151-156

Falco G, Lee SL, Stanghellini I, Basse UC, Hamatani T, Ko MSH. Zscan4: a novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells. *Developmental Biology* (査読あり) 2007; 307(2):539-550(http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6WDG-4NNWCKV-3-P&_cdi=6766&_user=1730089&_pii=S0012160607008792&_orig=search&_coverDate=07%2F15%2F2007&_sk=996929997&_view=c&_wchp=dGLzVzb-zSkWA&_md5=60407b3dd74dbd2062ff845635eae565&_ie=/sdarticle.pdf)

〔学会発表〕(計 10 件)

持丸佳之, 久慈直昭, 高野光子, 浜谷敏生, 浅田弘法, 青木大輔, 吉村泰典 交流磁場発生装置を用いたブタ卵巣の超低温保存 第 61 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2009 年 4 月 4 日 京都

山田満穂, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 持丸佳之, 高野光子, 浅田弘法, 久慈直昭, 青木大輔, 梅澤明弘, 吉村泰典 着床前期胚に特異的に発現する新規遺伝子 Hmgp の発現および機能解析 第 50 回日本哺乳動物卵子学会 2009 年 5 月 8 日 東京

持丸佳之, 久慈直昭, 山田満穂, 高野光子, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 浅田弘法, 末岡浩, 青木大輔, 吉村泰典 単一卵子の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析とその応用 第 27 回日本受精着床学会 2009 年 8 月 6 日 京都

山田満穂, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 持丸佳之, 高野光子, 浅田弘法, 久慈直昭, 吉村泰典 着床前期特異的新規遺伝子 Hmgp による着床周辺期発生の制御機構 第 54 回日本生殖医学会・学術講演会 2009 年 11 月 23 日 金沢

浜谷敏生 シンポジウム：卵の発育・成熟・老化機構の解明と臨床応用：遺伝子発現プロファイリングによる卵の加齢機構の探索 第 60 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2008 年 4 月 15 日 横浜

浜谷敏生 シンポジウム：生殖医学のトピックス：遺伝子発現プロファイリングによる卵の正常性の検討 第 26 回日本ヒト細胞学会学術集会 2008 年 8 月 30 日 東京

山田満穂, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 持丸佳之, 高野光子, 浅田弘法, 久慈直昭, 吉村泰典 マウス卵特異的新規 Krab-zinc finger 遺伝子の発現解析 第 53 回日本生殖医学会学術講演会 2008 年 10 月 24 日 神戸

山田満穂, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 浅田弘法, 久慈直昭, 吉村泰典 マウス卵特異的新規 Homeobox 遺伝子の発現解析 第 52 回日本生殖医学会総会・学術講演会 平成 19 年 10 月 25 日 秋田

Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Kuji N, Umezawa A, Yoshimura Y. Identification of a novel gene encoding a b-box zinc finger protein with its specific expression and essential role during preimplantation development. The 63th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine 平成 19 年 10 月 16 日 Washington DC

山田満穂, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 水澤友利, 庄司真弓, 羽田智則, 浅田弘法, 久慈直昭, 青木大輔, 吉村泰典 マウス新規ホメオボックス遺伝子の卵細胞・着床前期胚における発現特異性 第 59 階日本産科婦人科学会学術講演会 平成 19 年 4 月 16 日 京都

〔図書〕(計 1 件)

浜谷敏生, 山田満穂, 吉村泰典. 日本医
事新報社 よくわかる病態生理 (監修: 松尾
理) 第 12 巻婦人科疾患 (編集: 久保田俊郎)
【構造と機能】女性生殖器の発育過程. 性周
期発現と排卵の機序. (2009 年) 7-11, 24-34
頁

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜谷 敏生 (HAMATANI TOSHIO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 60265882

(2) 研究分担者

吉村 泰典 (YOSHIMURA YASUNORI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 10129736

阿久津 英憲 (AKUTSU HIDENORI)
国立成育医療センター研究所・生殖医療研
究部・室長
研究者番号: 50347225

山田 満穂 (YAMADA MITSUTOSHI)
国立成育医療センター研究所・生殖医療研
究部・研究員
研究者番号: 40383864

(3) 連携研究者

なし