

機関番号：32658

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780252

研究課題名（和文） 卵細胞質の機能を制御する遺伝子の探査

研究課題名（英文） Exploration of candidate genes associated with ooplasmic function

研究代表者

尾畑 やよい (YAYOI OBATA)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：70312907

研究成果の概要（和文）： 機能不全の XY 卵母細胞と正常な XX 卵母細胞の遺伝子発現プロファイルと比較し、卵細胞質の機能に関与すると推察される遺伝子の抽出を行った。その結果、5 倍以上の発現差を示す遺伝子として、BMP15 等、既知の卵子形成に必須な遺伝子が抽出された他、これまで卵母細胞での機能が明らかにされていない遺伝子も抽出され、総遺伝子数は 92 あった。

研究成果の概要（英文）： To explore candidate genes associated with ooplasmic function, we compared gene expression profile of GV oocytes derived from XX female with those derived from XY sex-reversed female. Transcripts of 92 genes showed >5-fold differences, including with BMP15, as known as essential gene for normal oocyte development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・応用動物科学

キーワード：発生工学

1. 研究開始当初の背景

B6.Y^{TIR}雌マウスは XY の性染色体を有しているにも関わらず、およそ 6 割が雌へと性転換する系統である。雄へと分化した 4 割の個体については妊性が認められるものの、性転換した雌は正常な XX 雌マウスは必ず不妊となる。B6.Y^{TIR}雌マウスに正常な XX 雌マウスの卵巣を移植すると、交尾後、産仔が得られること、しかし産仔はいずれも XX 雌マウス由来の子であることから、B6.Y^{TIR}雌マウスの不妊の原因は、内分泌環境や生殖腺の構造によるものではなく、卵母細胞の異常によることが示唆された。そこで、卵母細胞の詳細な解析を行ったところ、B6.Y^{TIR}雌マウスの卵母

細胞は第一減数分裂を正常に進行させ半数体となること、第二減数分裂中期で分裂装置の形態異常が認められ、以降、この異常が顕著となること、その結果、受精後 4 細胞期までに発生を停止することが明らかにされてきた。さらに、B6.Y^{TIR}雌マウス由来卵母細胞の核を正常な XX 雌マウス由来卵母細胞に移植すると、この核移植卵は、正常な第二減数分裂中期像を呈し、受精後、産仔へと発生することが示された。これらのことから、B6.Y^{TIR}雌マウス由来卵母細胞の異常は、卵細胞質の異常によることが明らかとなった。

2. 研究の目的

正常な卵細胞質は減数分裂や受精後の胚発生を支持するために不可欠であり、近年では、高齢不妊の原因や高齢出産におけるダウン症児の増加に卵細胞質の異常が一因する可能性が示唆されている。卵細胞質の正常・異常にかかわる分子は明らかにされつつあるものの、全容は依然として不明である。そこで、我々は、卵細胞質の異常の原因を分子生物学的に明らかにし、卵細胞質の機能を制御する遺伝子を探査することを目的に、B6.Y^{TIR} 雌マウスの卵細胞質異常に着目した。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析

卵細胞質異常をもたらす原因遺伝子を網羅的に探査するために、マイクロアレイ解析を行った。

B6.Y^{TIR} および B6 雌マウスに PMSG を投与し 48 時間後に GV 期卵母細胞を採取した。卵母細胞 10 個をプールし、独立した各 3 サンプルより cRNA 合成と標識を行った。得られた cRNA を Affymetrix 社の GeneChip Micro Array 2.0 上でハイブリダイズした。

得られたデータは「6 サンプル中 1 サンプルでもフラグが 'P' のプローブ」という条件でフィルターをかけ、抽出されたプローブについて、さらに解析を行った。

(2) Ingenuity Pathways Analysis

B6.Y^{TIR} および B6 雌マウス由来の各卵母細胞（以下、XY 卵母細胞および XX 卵母細胞とする）3 サンプルの平均 raw 値を比較し、3 倍以上発現差が認められたプローブを抽出し、異常な発現を示したこれらの遺伝子群がどのような pathway を構築するのか解析した。

(3) 細胞質移植実験と免疫染色

XY 卵母細胞の細胞質異常が、ある因子の不足によるものなのか、あるいはある有害な因子が存在するためなのかを考察するために、卵核胞期で 1 つの XX 卵母細胞に XY 卵細胞質の 10-15% を移植し、また、1 つの XY 卵母細胞に XX 卵細胞質の 10-15% を移植した。それぞれの操作卵を体外成熟培養に供試し、免疫染色により第二減数分裂中期像がどのような形態になるのかを解析した。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析

XX 卵母細胞あるいは XY 卵母細胞における遺伝子の発現量を各サンプル間で比較した結果、同じ核型を有するマウスより採取した卵母細胞間に誤差は少なかった ($R > 0.99$)。階層的クラスタリングをみると、同じ核型を有するサンプル間で、遺伝子発現プロファイルは似ており、XX 卵母細胞と XY 卵母細胞は異なる遺伝子発現プロファイルであることが示された (図 1)。

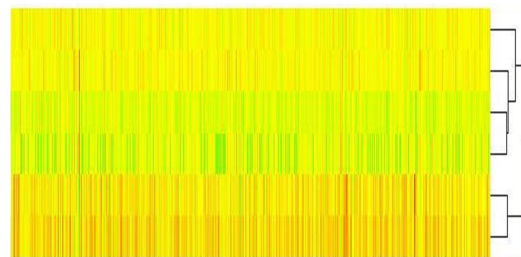
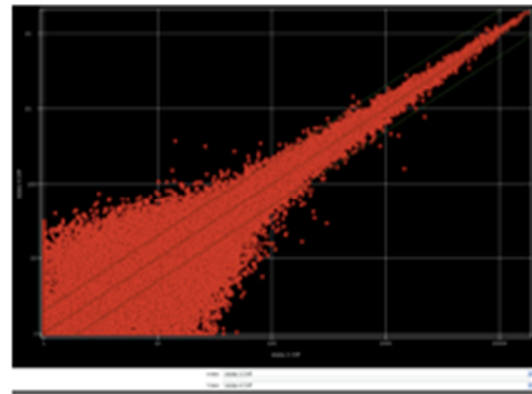


図 1 各サンプル間の相関 (上段) および各サンプル間の階層的クラスタリング (下段) 横軸は XY 卵母細胞のサンプル 2、縦軸は XY 卵母細胞のサンプル 3 ($R=0.996$)。赤いドットは 1 遺伝子のサンプル 2 およびサンプル 3 における遺伝子発現強度がプロットされており、対角線 ($R=1$) 上にプロットされた遺伝子はサンプル間で発現のばらつきが少ないことを意味する。また、発現強度 (raw 値) が低いとサンプル間誤差は大きく、同じ核型のサンプル間における発現強度の差が二倍未満になるような発現強度 (raw 値) はおよそ 100 と判断された。

階層的クラスタリング解析において XX 卵母細胞と XY 卵母細胞は遺伝子発現プロファイルが異なるものと判断された。

XX 卵母細胞の遺伝子発現量の 3 サンプルの平均値と XY 卵母細胞の各サンプルの遺伝子発現量で 5 倍以上発現が変化しているプローブは 518 存在し、全ての XY サンプルに共通しているプローブは 197 存在した (図 2)。1 遺伝子に対して複数のプローブが存在するため、197 プローブから重複を除き、発現強度を表す raw 値を 100 以上という条件でフィルターしたところ、92 遺伝子が抽出された。92 遺伝子の染色体上の座位を調べたところ、17 遺伝子が X 染色体上に 3 遺伝子が Y 染色体上に存在し、性染色体上の遺伝子が有意に多かった。また、BMP15 等、既知の卵子形成に

必須な遺伝子が抽出された他、転写因子や染色体構造に関与する遺伝子が 20、生殖に関連する遺伝子が 9、細胞周期や細胞骨格に関連する遺伝子が 10、ミトコンドリア関連遺伝子が 4、およびアポトーシス関連遺伝子が 9 抽出されたほか、機能が明らかにされていない遺伝子も抽出された。

一方、X 染色体と Y 染色体に存在する相同遺伝子に着目した。例えば、X 染色体上に存在する Eif2s3x は Y 染色体上の Eif2s3y と同じ機能を有することが示唆されている。本研究において、XY 卵母細胞において、Eif2s3y は過剰に発現していたが、Eif2s3x の発現は 1 本しか X 染色体が存在していないにもかかわらず、XX 卵母細胞と比較して同程度であった。このことから、XY 卵母細胞では、Eif2s3 が過剰に発現しているものと考えられた。同様に、性染色体上の 5 種の相同遺伝子の発現に差があることが明らかとなった。

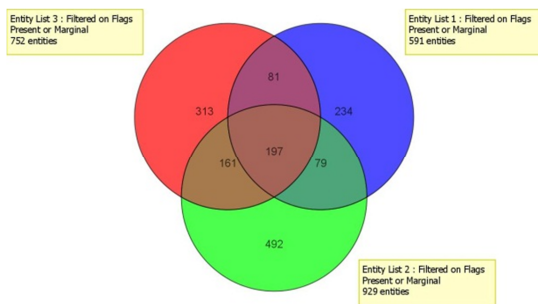


図 2 XY 卵母細胞において差時的発現をする候補遺伝子の総数

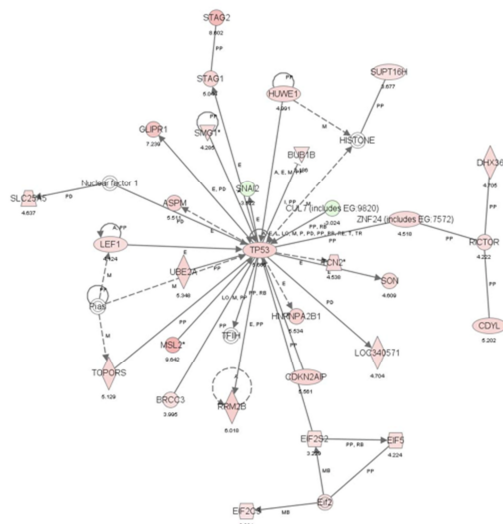


図 3 XY 卵母細胞において発現異常を呈する遺伝子群で形成されるネットワーク
赤は XY 卵母細胞で発現低下を示し、緑は XY 卵母細胞で高発現している遺伝子を示す。

(2) Ingenuity Pathways Analysis

次に、XY の各サンプルで 5 倍以上発現が変化している 518 プローブ、492 遺伝子について、IPA にて解析した。その結果、これらの遺伝子群は (スコアの高い順に) Reproductive System Development and Function, Cell Death, Cellular Development, Cellular Movement, Cellular Assembly and Organization に関するネットワークで機能することが明らかとなった (図 3)。

(3) 細胞質移植実験と免疫染色

XY 卵母細胞の細胞質不全の原因が X 染色体上の遺伝子の転写産物の不足によるものか Y 染色体上の遺伝子の転写産物が卵細胞質機能に悪影響を及ぼしているのか解析するために、細胞質移植を行うことにした。その結果、XX 卵母細胞に XY 卵細胞質を移植し、成熟培養を行った場合、XX 卵細胞質を移植した場合と比較して異常な第二減数分裂中期像が増えることが明らかとなった。一方、XY 卵母細胞に XX 卵細胞質を移植し成熟培養を行った場合、異常な第二減数分裂中期像を示す率に差が認められなかった。以上より、XY 卵細胞質中には、減数分裂に悪影響を及ぼす因子が存在する可能性が考えられ、加えて、Y 染色体上の遺伝子の転写産物が卵細胞質機能に悪影響を及ぼしている可能性が高いことが示唆された。

以上の結果から、XY 卵母細胞で発現異常を呈する遺伝子は多数存在することが明らかとなり、細胞質の機能を制御する遺伝子の同定までには至らなかった。しかし、細胞周期や細胞骨格に関与する遺伝子が含まれていたことや、XY 卵母細胞の細胞質中には細胞骨格に異常を来す因子が含まれることから、今後は、XX 卵母細胞に XY 卵母細胞で過剰発現する遺伝子の mRNA を導入することで、操作卵が XY 卵母細胞と同様の表現型を呈するかどうか、詳細な解析を進めていきたい。

5. 主な発表文等

(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 3 件)

1) Epigenetically Immature Oocytes Lead to Loss of Imprinting During Embryogenesis. Obata Y, Hiura H, Fukuda A, Komiyama J, Hatada I, Kono T. *J Reprod Dev.* 57 in press (2011)

2) Study on the mechanism of maternal imprinting during oocyte growth. Obata Y. *J Reprod Dev.* 57, 1-8. (2011)

3) Deletion of *Gt12*, imprinted non-coding RNA, with its differentially methylated region induces lethal parent-origin-dependent defects in mice. Takahashi N, Okamoto A, Kobayashi R, Shirai M, Obata Y, Ogawa H, Sotomaru Y, Kono T. *Hum Mol Genet.* 8, 1879-1888 (2009).

〔学会発表〕(計4件)

- 1) 原聡史、高野喬、尾畑やよい、河野友宏. マウス非成長期卵母細胞におけるDNAメチル基転移酵素の発現誘導. 日本繁殖生物学会 2010年9月
- 2) 尾畑やよい. 卵母細胞におけるゲノム刷込み機構に関する研究. 日本繁殖生物学会 2010年9月
- 3) XX型雌マウスとXY型性転換雌マウス由来卵母細胞における網羅的遺伝子発現解析. 尾畑やよい、曹峰、Teruko Taketo、Bao-Zeng Xu、河野友宏. 日本哺乳動物卵子学会 2010年5月
- 4) 胚形成過程におけるゲノムインプリンティングの維持と消失. 尾畑やよい、河野友宏. 日本繁殖生物学会 2009年9月
- 5) 配偶子におけるepigenetics. 尾畑やよい. 日本哺乳動物卵子学会 2009年5月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾畑 やよい (YAYOI OBATA)
東京農業大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：70312907

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無