

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658244

研究課題名(和文) 母性 mRNA による哺乳類初期胚の分化調節機構について

研究課題名(英文) Involvement of maternal mRNA in the regulation of differentiation during preimplantation development.

研究代表者

青木 不学 (Aoki, Fugaku)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20175160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円、(間接経費) 930,000 円

研究成果の概要(和文)：初期発生期における細胞分化に関与する母性 mRNA を探索するために、RNA シーケンスを行った。その結果、大部分の母性 mRNA は受精後急激に分解されるが、約 30% は急激な分解から逃れており、さらに全体の 7.6% に相当する 691 遺伝子由来のものは 1 細胞期間にほとんど分解されないことが明らかとなった。また、これら急速な分解を受けないものに機能的特徴があるかどうかを調べるために、gene ontology 解析を行ったところ、転写に関わる遺伝子が顕著に多いことが分かった。

研究成果の概要(英文)：To identify the maternal mRNA that are involved in the differentiation during preimplantation development, I conducted RNA sequencing analysis using the oocytes and embryos. The results showed that although 70% of maternal mRNAs were degraded soon after fertilization, the rest of them survived this wave of a rapid degradation. Especially, those from 691 genes were hardly degraded during the 1-cell stage. Gene Ontology (GO) enrichment analysis revealed that these genes were enriched in the GO terms categorized into transcription.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：初期発生 細胞分化 母性 mRNA 2細胞期胚 4細胞期胚

1. 研究開始当初の背景

受精直後の初期胚は全能性を有しているが、発生に伴い細胞分化が進行していく。哺乳類では、8~16細胞期までは各割球は均等な性質を有しているが、桑実胚期頃より内側と外側の割球でその後の細胞運命が異なってくる事が知られている。すなわち、外側に位置する細胞は、胚盤胞期において栄養外胚葉となる細胞に分化するが、内側に位置する細胞は内細胞塊となるものが存在するというものである。しかし近年、2~4細胞期ですでに割球間で異なる性質を持つということが報告された。2あるいは4細胞期でそれぞれの割球の性質が異なり、将来胚盤胞期で栄養外胚葉あるいは内細胞塊となる割合が異なるというものである。さらにヒストンH3のアルギニンのメチル化が4細胞期の割球ごとに異なるということが明らかにされた。したがって、受精後の細胞分化はこれまでに考えられていた時期よりもはるかに早い2~4細胞期で始まっているものと考えられる。しかし、その分化を調節する機構についてはこれまでにまったく明らかにされていない。

一方、線虫やショウジョウバエでは初期発生期で細胞運命を決定する因子として受精前の卵から由来した mRNA (母性 mRNA) が知られている。これらの胚では、分割の際に母性由来 mRNA が各割球に均等に分配されず、その違いにより各割球の性質が異なったものになるという機構である。哺乳類の初期胚でも、受精前には翻訳されず受精後に始めて翻訳されてその機能を発揮する母性 mRNA が存在することが知られている。また、多くの母性 mRNA は受精後に速やかに分解されるが、一部にはすぐに分解されず4細胞期においてもかなりの量が残存するものもある。申請者は実際に様々な母性 mRNA の分解速度が異なっていることを明らかにしている。

2. 研究の目的

近年、受精後の初期胚は2~4細胞期ですでに割球間で異なる性質を持ち、この時期に細胞分化がスタートしている可能性が示されている。本研究においては、この時期の細胞分化の調節機構に受精前の卵から由来した母性 mRNA が関わっていると仮定して、その母性 mRNA の同定と分化調節のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

本研究により、これまでにまったく明らかにされていない着床前初期発生期における細胞分化のメカニズムが明らかにされ、受精直後の発生調節機構を解明するための基盤となる知見をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、「2~4細胞期の胚で割球間に均等に分配されない母性 mRNA が存在し、それが割球間の性質の違いを生み、その後の細

胞分化に影響を及ぼす」という仮説のもとに、以下の解析を行う。

(1) 2、4細胞期において、割球間で量の異なる母性 mRNA の同定

受精後の胚から mRNA を回収した場合、その中には卵で転写されて持ち越された母性 mRNA と受精後に転写された mRNA とが混在している。そこで、母性 mRNA のみを抽出するために、母性 mRNA をプロモ標識するという手法を用いる。以下にその手順を示す。

まず、生後12日目のマウスから卵胞を回収し、成長期卵に BrUTP を顕微注入する。この時期の卵は転写を活発に行っており、新たに合成された mRNA は BrU を取り込む。

BrUTP を顕微注入した卵を *in vitro* で培養し卵成長を促す。10日間の培養後、hCG を培養液に加えることで卵成熟を引き起こす。その後、精巣上体から得られた精子を用いて体外受精を行い、2細胞あるいは4細胞期までの培養を行う。尚、核酸の代謝は早いため、BrUTP は10日間の培養中に完全に卵から消失するものと考えられる。したがって、受精後に転写された mRNA は BrU を取り込むことはない。

2細胞あるいは4細胞期胚の透明帯を pronase で取り除いて各割球をバラバラにし、割球ごとに全 RNA の抽出を行う。対照として受精直後の1細胞期胚を用いる。

抗 BrU 抗体を用いた免疫沈降法により、全 RNA のサンプルから BrU を取り込んだ母性 mRNA を抽出する。

得られた母性 mRNA についてマイクロアレイを行い、各割球間で発現量(残存量)に差のある遺伝子を細胞分化調節因子の候補とする。尚、1個の細胞を用いてマイクロアレイを行う手法が報告されており、各種の細胞を用いて成果が得られていることからこの手法を用いることにする。

発現量に差があった遺伝子について、その抗体で免疫染色を行い、2細胞あるいは4細胞期胚において割球間にタンパク質の発現量に差があるかどうかを確認する。そして差のあったものを母性 mRNA による細胞分化調節因子の最終的な候補とする。

(2) 母性 mRNA が細胞分化に及ぼす影響について

上記(1)で得られた細胞分化調節因子の最終候補遺伝子について、siRNA により母性 mRNA を壊し、その後の分化に及ぼす影響を調べることでその機能を明らかにする。以下にその手順を記す。

各候補遺伝子について、その siRNA を受精直後の1細胞期胚に顕微注入する。この操作により、2細胞あるいは4細胞期においてターゲットとした母性 mRNA が壊されて消失していることを RT-PCR で確認する。尚、マウスの卵および着床前初期胚で siRNA が有効に作用することは申請者の研究室でこれまで

に確認している。

siRNA を顕微注入した初期胚について、その後の発生状況を発生率および形態変化に着目して解析する。また、胚盤胞期の細胞分化に重要な働きをしていることが知られている Cdx2 および Oct3/4 などの発現を mRNA およびタンパク質レベルで、それぞれ RT-PCR および免疫染色法によって調べる。特に、免疫染色法では、CDX2 および OCT3/4 タンパク質の栄養外胚葉と内部細胞塊における局在変化に注目して調べる。

上記で分化調節因子としての機能が確認された遺伝子について、その全長の cDNA をクローニングし、in vitro で RNA を作成する。これを 2 細胞あるいは 4 細胞期のすべての割球に顕微注入する。尚、この操作によって各割球間でのタンパク質の発現量が均等になる程度の量の RNA を注入する。RNA を注入した胚のその後の発生および分化状態を上記で記したように形態および遺伝子発現の面から解析する。この実験により、母性 mRNA の割球間での分布の違いがその後の分化に影響を及ぼすかどうか明らかとなるものと考えられる。

4. 研究成果

本研究では、「2~4 細胞期の胚で割球間に均等に分配されない母性 mRNA が存在し、それが割球間の性質の違いを生み、その後の細胞分化に影響を及ぼす」という仮説のもとに、このような母性 mRNA を同定するための実験を以下のように計画した。

生後 12 日目のマウスから卵胞を回収し、成長期卵に BrUTP を顕微注入し、新たに合成された mRNA に BrU を取り込ませる。BrUTP を顕微注入した卵を in vitro で培養し卵成長を促す。その後卵成熟を誘導し、体外受精を行い、2 細胞あるいは 4 細胞期までの培養を行う。2 細胞あるいは 4 細胞期胚の各割球をバラバラにし、割球ごとに全 RNA の抽出を行う。抗 BrU 抗体を用いた免疫沈降法により、全 RNA のサンプルから BrU を取り込んだ母性 mRNA を抽出する。得られた母性 mRNA についてマイクロアレイを行い、各割球間で発現量(残存量)に差のある遺伝子を細胞分化調節因子の候補とする。

以上のような計画のもとに、まず生後 12 日目のマウスから得られた成長期卵に BrUTP を顕微注入し、その後の in vitro での成長、卵成熟そして受精後の初期発生の進行を調べたところ、BrUTP の顕微注入は卵成長及び卵成熟にやや悪影響を及ぼすことが明らかとなった。また、この傾向は顕微注入を行う時期を生後 15 日に変更しても改善されることはなかった。さらに、受精後の 2 細胞、4 細胞そして桑実期における BrU の残存量を抗 BrU 抗体で調べたところ、いずれの時期においても顕微注入を行っていないコントロール胚と有意な差が認められなかった。

一方、初期胚の遺伝子発現を RNA シーケン

スによって網羅的に解析するプロジェクトを現在行っており、その予備的実験で各遺伝子の mRNA 量の変化を正確に知ることができたことがわかった。そこで、この実験系を用いて目的の母性 mRNA の同定が可能であると考えた。

そこで、RNA シーケンスのデータを用いて、着床前初期胚の発生およびその分化に関わる母性 mRNA の同定を試みた。

これまでの報告で、母性 mRNA の中で受精後に急速に分解されるものとそうでないものが存在することが知られていることから、まず受精後に急激な分解を受ける母性 mRNA を除く作業が有効であることが考えられた。そこで、受精前の成長卵において発現量の低い遺伝子を除いた 9,128 遺伝子由来の母性 mRNA の受精後における分解パターンについてクラスター解析を行った。その結果、全体の約 2/3 に相当する 6,025 遺伝子由来の母性 mRNA が急速に分解されることが明らかとなった。しかし、残りの母性 mRNA は急激な分解から逃れており、さらに全体の 7.6% に相当する 691 遺伝子由来のものは 1 細胞期の間にほとんど分解されないことが明らかとなった。現在、急速な分解を受けないものの中で、卵特異的に発現するものを抽出することで目的の母性 mRNA の候補をさらに絞り込む作業を行っている。また、これらの急速な分解を受けるものと受けないものとの間でその機能的特徴に差異があるかどうかを調べるために、gene ontology 解析を行ったところ、急速な分解を受けないものにおいて転写に関わる遺伝子が顕著に多いことが分かった。

以上の結果より、着床前初期胚の発生およびその分化に関与する母性 mRNA の同定は未だ達成されていないものの、その候補となる遺伝子を網羅的に得ることができ、これらが転写調節に関わっている可能性が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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

金綾奈、鈴木元、阿部健一郎、青木不学：
マウス受精前後における母性 mRNA 分解
に関する網羅的な動態解析．第 116 回日
本畜産学会、広島、2013 年 3 月 28 日
阿部健一郎、山本龍馬、曹旻君、鈴木穰、
青木不学：RNA シーケンスによるマウス
一細胞期胚の遺伝子発現解析．第 116 回
日本畜産学会、広島、2013 年 3 月 28 日

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 不学 (AOKI FUGAKU)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
教授
研究者番号：20175160

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：