

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850183

研究課題名(和文)ウシ胎盤特有の形態形成に関与するレトロウイルスの解析

研究課題名(英文) Analysis of bovine-specific endogenous retrovirus sequences responsible for the placentation

研究代表者

櫻井 敏博 (Sakurai, Toshihiro)

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：70568253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類のゲノムの約10%を占めるとされる内在性レトロウイルス(ERV)が、哺乳類の胎盤の進化に関与している可能性について、ERVの解析がほとんど進んでいないウシに着目し解析を行った。その結果、ウシ着床周辺期胚に発現するERVを10種同定し、その内5種について発現動態および発現局在解析、発現制御解析を行った。また、これらの解析に必要なin vitro implantation系の改善とERVの発現に関与する発現調節因子の解析を行った。これらの検証からウシ特有の胎盤形態に必要なERVが存在することが確認できたが、その詳細な機能については今後の検討課題となった。

研究成果の概要(英文)：Endogenous retrovirus (ERV) is thought to exist about 8-10% on the genome of placental mammals. Placentas in all mammals are known to provide similar functions, but the genes responsible for placental development differ among species, and remain largely unidentified. To identify ERV sequences unique to placentation of the bovine species, we characterized the expression profiles of bovine conceptus transcripts during the peri-attachment period using RNA-seq analysis. We isolated 10 bovine-specific ERV structures. We, further, evaluated the localization and the modification of gene expressions about 5 within the 10 ERV sequences. Besides, we improved the method for the evaluation of implantation in in vitro, and we analyzed the transcription factor responsible for the ERV expression. These observations support the argument that during the evolutionary process, mammalian species captured not only ERV sequences with similar structures but also sequences unique to individual species.

研究分野：繁殖学

キーワード：内在性レトロウイルス ウシ 着床周辺期胚

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物における胎盤の機能は、胎児を育むことにあるが、その形態は動物種間で著しく異なる。『胎生』自体は哺乳類の専売特許というわけではなく、脊椎生物の比較的初期段階でその原基となる機能を獲得していた。哺乳類は、その原基となる胎生機能を基盤に胎盤を発達させ、胎内保育へと可能性収束していった。つまり原基となる胎生機能を基盤に新たな遺伝子を獲得し、既存の遺伝子の機能を補完もしくは置換させながら、種特異的な胎盤形態へとなっていったと考えられる。しかしながら、胎盤の形態が動物種間でこれまでも複雑化し、多種多様化したのはなぜか？生命誕生からヒトに至る系統で、何回かの大規模なゲノムサイズの拡大があり、動物種が多様化するとともに繁殖形態（胎盤形態）も複雑化したと考えられている。このゲノムサイズの拡大による生物の多様化に大きく関わるのがゲノム上のレトロウイルスに由来する配列・レトロトランスポゾンであると考えられている。近年、レトロトランスポゾンの1つである内在性レトロウイルス(ERV)が、胎盤形成において重要な役割を担うことが報告されているが、その全貌は明らかになっていない。種差はあるものの、ERVは、哺乳類のゲノムの約10%を占めることが明らかとなっている。これらの多くは、変異や欠失によってオープンリーディングフレーム(ORF)が失われているが、一部は生理学的な機能を有することが知られている。その代表的な因子が血液-漿膜胎盤型(ヒトやマウスなど)や内皮柔毛胎盤型(イヌやネコなど)の動物で確認されたSyncytinである。Syncytinは、着床後の胎盤形成時における栄養膜細胞の融合に関与するERVである。さらに、新たにマウスにおいてPeg10およびPeg11/Rtl1が、ヒツジにおいてはJSRVなどの種特異的なERVが見つかり、ERVが哺乳類の胎盤の進化・形態の多様性に深く関与していると示唆される。しかしながら、上皮絨毛胎盤型の動物であるウシにおいて、その胎盤形成へのERVの関与についての知見はない。

### 2. 研究の目的

本申請は、ERVの解析がほとんど進んでいないウシに着目し、ウシ特有の胎盤形成メカニズムを明らかにするため、内在化したレトロウイルス由来遺伝子(レトロエレメント)を特定し、着床期における発現動態・発現調節機構および胎盤形成時の機能解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

胚の伸長期から初期胎盤形成期(妊娠17、20および22日の胚)にかけて発現するERVを同定し、レトロエレメントの発現動態と局在を解明し、全長cDNAクローニングを行った。発現調節機構とアミノ酸配列から胎盤形成

における機能を明らかにしていった。

#### (1) ウシ胎盤発現性レトロエレメントの探索

次世代シーケンサー-SOLiD3を用いて、着床周辺期胚(妊娠17、20および22日の胚)に発現するtotal RNAを網羅的に解析した。次いで、Ensemblのウシ遺伝子データベース(Btau4.0)を用い、レトロエレメントを検出するソフトウェア「Retrotector」を用いて、LTR型のERVを抽出した。次世代シーケンサーのデータとRetrotectorの情報から、妊娠17、20および22日の少なくとも2日において発現していること、予想されるORFから少なくとも100アミノ酸をコーディングしていることを条件にウシERVを絞り込んだ。

#### (2) レトロエレメントの胚における発現動態と各組織における発現

絞り込んだレトロエレメントの胚における発現動態をリアルタイムPCRにて確認した。また、そのレトロエレメントが胚特異的に発現しているか否かを全身の組織においてリアルタイムPCRを用いて確認した。

#### (3) レトロエレメントの全長クローニング

3'および5'-RACEにより、レトロエレメントの全長を同定した。また、バリエーションの有無をノーザンブロットにより確認した。

#### (4) in situ hybridizationによる局在

着床周辺期子宮およびリアルタイムPCRにて発現が確認された組織における局在をin situ hybridization法により確認した。

#### (5) レトロエレメントの発現調節機構解析

どのようにレトロエレメントの発現が調節されているかそのプロモーター解析や関与する転写因子の同定を行った。その評価の際に必要なin vitro implantation法の改良にも着手した。

#### (6) レトロエレメントの機能解析予測

全長クローニングにより得られたアミノ酸配列情報からモチーフ・ドメイン解析を行い、おおよその機能を予測した。

### 4. 研究成果

ウシの着床周辺期胚において発現するレトロエレメントの網羅的探索の結果、10種のレトロエレメントを見出した。これらのレトロエレメントはいずれもウシ特異的であった。これら候補レトロエレメントに対して、発現解析を行い、その発現量と発現動態から3種のレトロエレメントに着目した。また、その解析に用いるin vitro implantation法の改良を行い、ウシ子宮上皮細胞の不死化細胞を樹立した。

(1) Chr.6 に存在するレトロエレメントについて

このレトロエレメントは gag タンパク質由来であり、3つのスプライシングバリエントが存在した。いずれのバリエントも着床前(妊娠17日)に発現が高く、着床時(妊娠20日)に低下し、着床後(妊娠22日)に発現が消失した。また、その局在は、栄養膜細胞と子宮上皮細胞のみであった。しかしながら、核外移行シグナルや核局在シグナルおよびペルオキシソーム局在化シグナルなどのドメインは有していなかった。このレトロエレメントのパラログは18種存在し、このレトロエレメント以外胚で発現していないことが分かった。In vitro implantation 法より、着床の刺激によってこのレトロエレメントの発現が低下することが分かった。このレトロエレメントの詳細な機能は今後の検討課題である。

(2) Chr.7 に存在するレトロエレメントについて

このレトロエレメントは gag タンパク質由来であり、2つのスプライシングバリエントが存在した。どちらのバリエントも着床前(妊娠17日)に発現が弱く、着床時(妊娠20日)に増加し、着床後(妊娠22日)に発現がさらに増加した。しかし150日の胎児胎盤では、1つのバリエントは発現し続けていたが、もう片方のバリエントの発現は消失していた。また、その局在は、子宮上皮(管腔・腺)、胚栄養膜細胞、腎皮質集合管、グリソン鞘と接する肝細胞、腸陰窩とリンパ球であった。しかしながら、核外移行シグナルや核局在シグナルおよびペルオキシソーム局在化シグナルなどのドメインは有していなかった。In vitro implantation 法より、液性因子では発現に変化なく、着床の刺激によってこのレトロエレメントの発現が増加することが分かった。このレトロエレメントは胎盤機能獲得や胎盤の維持に必須の役割を演じていると考えられるが、詳細な機能は今後の検討課題である。

(3) Chr.X に存在するレトロエレメントについて

このレトロエレメントは env タンパク質由来であり、スプライシングバリエントは存在していなかった。着床前(妊娠17日)に発現が高く、着床時(妊娠20日)に低下し、着床後(妊娠22日)に発現が消失した。このレトロエレメントはトランスメンブランダインを有していた。In vitro implantation 法より、液性因子では発現に変化なく、着床の刺激によってこのレトロエレメントの発現が消失することが分かった。このレトロエレメントは胚の融合に関与している可能性が考えられるが、詳細な機能は今後の検討課題である。

## 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10件)

Tachibana Y, Sakurai T, Bai H, Shiota K, Nambo Y, Nagaoka K, Imakawa K.

RNA-seq analysis of equine conceptus transcripts during embryo fixation and capsule disappearance.

PLoS One. (2014) 16: e114414. 査読あり  
doi: 10.1371/journal.pone.0114414.

Bai H, Sakurai T, Bai R, Godkin JD, Imakawa K.

The localization of GATA2 in the nuclear and cytoplasmic regions of ovine conceptuses.

Anim Sci J. (2014) 85(12):981-985.

doi: 10.1111/asj.12267. 査読あり

Bai R, Bai H, Kuse M, Ideta A, Aoyagi Y, Fujiwara H, Okuda K, Imakawa K, Sakurai T.

Involvement of VCAM1 in the bovine conceptus adhesion to the uterine endometrium.

Reproduction. (2014) 148:119-127.

doi: 10.1530/REP-13-0655. 査読あり

Bai H, Sakurai T, Bai R, Yamakoshi S, Aoki E, Kuse M, Okuda K, Imakawa K.

Establishment and characterization of immortalized bovine endometrial epithelial cells.

Anim Sci J. (2014) 85:799-804.

doi: 10.1111/asj.12202. 査読あり

Bai H, Sakurai T, Godkin JD, Imakawa K.

Expression and in situ localization of GATA4, 5 and 6 mRNAs in ovine conceptuses and uterine endometria during the peri-implantation period.

Anim Sci J. (2014) 85:388-394.

doi: 10.1111/asj.12156. 査読あり

Sakurai T, Nakagawa S, Kim MS, Bai H, Bai R, Li J, Min KS, Ideta A, Aoyagi Y, Imakawa K.

Transcriptional Regulation of Two Conceptus Interferon Tau Genes Expressed in Japanese Black Cattle during Peri-Implantation Period.

PLoS One. (2013) 8:e80427.

doi: 10.1371/journal.pone.0080427. 査読あり

Sakurai T, Bai H, Bai R, Sato D, Arai M, Okuda K, Ideta A, Aoyagi Y, Godkin JD, Imakawa K.

Down-regulation of Interferon Tau Gene Transcription With a Transcription Factor, EOMES.

Mol Reprod Dev. (2013) 80:371-383.

doi: 10.1002/mrd.22171. 査読あり

Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Kodaka Y, Hirata A, Sakurai T, Bai H, Imakawa K, Nishi H, Isaka K, Nagai T, Nagao T, Tachikawa E.

Regulation of decidualization in human endometrial stromal cells through exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac).

Placenta. (2013) 34:212-221.

doi: 10.1016/j.placenta.2012.12.017. 査読あり

Nakagawa S, Bai H, Sakurai T, Nakaya Y, Konno T, Miyazawa T, Gojobori G, Imakawa K.

Dynamic Evolution of Endogenous Retrovirus-Derived Genes Expressed in Bovine Conceptuses during the Period of Placentation.

Genome Biol Evol. (2013) 5:296-306.

doi: 10.1093/gbe/evt007. 査読あり

Kim MS, Sakurai T, Bai H, Bai R, Sato D, Nagaoka K, Chang KT, Godkin JD, Min KS, Imakawa K.

Presence of Transcription Factor OCT4 limits Interferon-tau Expression during the Pre-attachment Period in Sheep.

Asian-Australas. J. Anim. Sci. (2013) 26:638-645.

doi: 10.5713/ajas.2012.12462. 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

関野貴洋, 中嶋雄紀, 山口美奈, 箱田健匡, 船谷桂子, 小林芳子, 加藤真介, 櫻井敏博  
ウシ不死化子宮上皮細胞の樹立  
日本薬学会第134年会(熊本市総合体育館・熊本市中央区)2014年3月27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:  
出願年月日:  
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

櫻井 敏博 (SAKURAI, Toshihiro)

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号: 70568253

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: