

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580333

研究課題名(和文) ウシインターフェロンタウの性に依存した分泌動態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of sexual dimorphism of IFN τ secretion in bovine blastocyst

研究代表者

木村 康二 (KIMURA KOJI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜育種増殖研究チーム・主任研究員

研究者番号：50355070

研究成果の概要(和文)：ウシ妊娠認識物質であるインターフェロンタウ (IFN τ) の胚における発現はその性に依存していることが知られている。この特徴的な分泌動態は IFN τ 遺伝子の発現を制御している転写因子自体の遺伝子発現の性による違いによって引き起こされているものではなかった。しかしながら、DNA メチル化酵素の一つである、Dnmt3a の遺伝子発現は雌胚に比べ雄胚で有意に高く、また、DNA メチル化酵素阻害剤である 5-azadeoxycytidine の培養液への添加により、ウシ胚からのインターフェロンタウ生産の雌雄差が消滅した。以上の結果から、ウシ胚ゲノム DNA のメチル化がこの現象に大きく関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sexual dimorphic expression of IFN τ of bovine embryo was not caused via the sexual difference of expression of transcription factors, which affect IFN τ gene expression. However, the expression of Dnmt3a, one of DNA methyltransferases, of bovine male blastocysts was significantly higher than that of female embryos. Moreover, addition of 5-azadeoxycytidine, an inhibitor of DNA methyltransferase, to the culture medium of bovine embryo abolished the sexual dimorphic secretion of IFN τ from bovine embryos. These results suggest that the DNA methylation of bovine embryo genome might be involved in the occurrence of sexual dimorphic expression of IFN τ in bovine embryos.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：家畜繁殖学

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：ウシ・胚・インターフェロン・性・転写因子

1. 研究開始当初の背景

ウシにおいて、胚は子宮内腔で浮遊しながら伸長を続け、受精後約 1 ヶ月で着床する。ウシではこの間に発情が回帰してしまうため(性周期 21 日)、妊娠を維持するために胚は何らかのシグナル物質を分泌し、その存在を母体に知らせるメカニズムが働いている

と考えられ、Imakawa ら (1987) は、ウシ栄養膜細胞 (trophoblast) から分泌されるこのシグナル物質の同定に成功し、インターフェロンとホモロジーが高いため、インターフェロンタウ (IFN τ) と命名された。この IFN τ は子宮内膜上皮細胞上のレセプターに結合し、子宮からの PGF_{2 α} 分泌を変化させて黄

体退行を防ぎ、妊娠を維持することが明らかとなっている。この IFN τ は胚盤胞期胚から着床に至る短い期間でのみ分泌される時期特異的発現形式を示し、その遺伝子の転写には様々な転写因子が関与することが示唆されている。例えば、Ezashi ら (1998) は、IFN τ 遺伝子のプロモータ領域に転写因子 Ets-2 が結合して転写を活性化させ、また、この Ets-2 に Oct-4 が結合することによって転写が抑制されることを示した。一方、ウシ胚盤胞期胚からの IFN τ 分泌に関して興味深い知見が得られている。Larson ら (2001) は、個々に培養した体外由来ウシ胚盤胞期胚の培養液中に分泌された IFN τ 量を測定し、雌胚が雄胚より多くの IFN τ を分泌していることを示した。さらに、申請者らは、この胚盤胞期胚の IFN τ 分泌における雌雄差が受精後 14 日齢の体内生産胚では見られないことを明らかにした。この雌雄による IFN τ 分泌差の消長時期は、ウシ胚における X 染色体不活性化の時期と一致している。一般に体細胞では雌の 2 本ある X 染色体のどちらかが不活性化し、雌雄の X 染色体上遺伝子の発現量を等しくするメカニズムが存在するが、初期胚においてはこのシステムが不完全であり、ウシの場合、受精後約 14 日で完了すると言われている。申請者らは、この現象に注目し、X 染色体上の遺伝子が間接的にこの現象の発現に関与する可能性を示唆しているものの、その全貌は已然としてブラックボックスの中である。

2. 研究の目的

G6PD は、グルコースがペントースリン酸経路 (PPP) に流入する最初の段階に位置する“門番”であり、その反応の中で NADP を還元し、細胞内の酸化・還元状態の維持に大きな役割を持つことが知られている NADPH を生成する。近年、ES 細胞の分化や Oct-4 の発現および DNA との結合が細胞の酸化還元状態に影響を受けることが明らかとなっており (Ezashi et al, 2005, Guo et al., 2004)、雌雄胚での G6PD 量の差が、雌雄胚細胞内の酸化還元状態の差を生み出し、Oct-4 等の転写因子の遺伝子発現またはその DNA・タンパク質との相互結合に影響を与えることにより、IFN τ 分泌の雌雄差の発現に関与している可能性が考えられる。本研究ではこの点に着目し、ウシ胚盤胞期胚における IFN τ 分泌の性に依存した分泌動態メカニズムの解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 食肉センター由来ウシ卵巣から卵子を吸引し、FSH およびピルビン酸添加 TCM199+10%FBS で 22-24 時間成熟培養した。その後卵丘細胞卵子複合体 (COC) を受精培地

(へパリン添加 IVF-TL+0.6% BSA) に移し、凍結融解精液により受精した。受精後 18 時間に卵を回収し、卵丘細胞を除去した後、グルコースを含まない 0.4% BSA 添加合成卵管培地 (m-SOF) で、低酸素 (5%) 気相下で培養した。培養開始後 48 時間後、8 細胞期胚を回収し、次に 1.5mM グルコースを含む m-SOF+0.4% BSA、低酸素気相下でさらに培養を続けた。120 時間後、拡張胚盤胞期に発育した胚を回収し、BRL 細胞を事前に培養して作製した BRL-conditioned TCM199+10% FBS で個別培養した。こうして得られた脱出胚盤胞期胚は内細胞塊を顕微鏡下で切除し、内細胞塊は PCR による性判別に用い、残った栄養膜細胞は RNA 抽出バッファーに個別に入れ、-80°C で保存した。PCR による性判別の情報を元に、雌雄胚それぞれ 5 個をまとめ、RNA 抽出を行い、逆転写酵素により cDNA を作成した (雌雄それぞれ 20 サンプル作製)。この cDNA を鋳型にして、IFN- τ 発現に影響を及ぼすと報告されている各種転写因子 (Ets2, Oct4, Dlx3, Cdx2) および IFN- τ 遺伝子発現量を表 1 に示したプライマーおよびプローブによるリアルタイム PCR により定量した。なお、GAPDH の発現量を内部標準としてもちい、各遺伝子断片を挿入したベクターをスタンダードとして検量線を作成して定量を行った。

表 1 リアルタイム PCR に用いた各種遺伝子のプライマー、プローブ配列および反応温度

	Forward	Reverse	Probe	Annealing Temp.
IFN- τ	TGCTAGGTGCCAGGGAG AAC	TCCACCATCTCTGAGG AAGAC	TCAGGCTCTCG GCCCCGAATGA AC	65
GAPDH	GGGCGTGAACCACGAA GTATAA	CCCTCCACGATGCCAA AGT	ATACCTCAAG ATTGTCAGCAA TGCCTCTCT	60
Oct4	GATCGAGAACCAGTGA GAGG	CTGGCGACGGTTGCAA AAC	ACCACGTCTTC TCCAGCCCCGAG C	60
Ets2	GGAATCAAGAACATGGA CCAGGT	GGGACCCATCAAAGGT GTCAA	CGCTTGAGTGT CCCTCTGTAAAC TGCTGGC	60
Cdx2	AACCTGTGCGAGTGGAT GC	CGCTGGTGGTCCGTGT AC	TCGTCCTGGTT TTCACTTGGCT GCC	62
Dlx3	TACCGGCAATATGGAGC CTACC	GGCTTCCCCTTCCACCAT GC	CGTGCCCCGCT CAGGACCCAG TG	60

(2) (1) と同様に脱出胚盤胞期胚を作出し、個別培養の後、内細胞塊を切除した。切除内細胞塊は PCR による性判別に供し、残った栄養膜細胞はホルマリンで固定後、洗浄し、酪酸ナトリウムを含む PBS に移し、個々に -80°C で保存した。雌雄胚それぞれ 100 個をまとめ、界面活性剤を添加して細胞を溶解し、超音波処理を行って、クロマチンを断片化した。断片長を電気泳動で確認した後、この断

片化クロマチンを抗 Oct4 抗体をコーティングしたマイクロ磁気ビーズと反応させ、洗浄後、抗体と結合した断片化クロマチンを遊離精製した（クロマチン免疫沈降法：ChIP アッセイ）。このクロマチンを鋳型としてリアルタイム PCR を行い IFN- τ プロモーター領域遺伝子量の定量を行い、雌雄胚の Oct4 結合 IFN- τ 遺伝子量を比較した。

(3) (1) と同様に脱出胚盤胞期胚を作出し、個別培養の後、内細胞塊を切除した。切除内細胞塊は PCR による性判別に供し、残った栄養膜細胞は RNA 抽出バッファーに個別に入れ、-80°C で保存した。PCR による性判別の情報を元に、雌雄胚それぞれ 5 個をまとめ、RNA 抽出を行い、逆転写酵素により cDNA を作成した（雌雄それぞれ 20 サンプル作製）。この cDNA を鋳型にして、DNA メチル化酵素 Dnmt3a の遺伝子発現量を Taqman Probe を用いたリアルタイム PCR 法により定量し、雌雄胚での発現量を比較した。なお、スタンダードおよび内部標準は (1) と同様に設定した。

(4) (1) と同様に食肉センター由来ウシ卵巣を用いて体外成熟、授精および培養によって 8 細胞期胚を得た。そのうち、DNA メチル化酵素阻害剤 5-azadeoxycytidine を 0, 1 および 10 μ M 添加した 1.5mM グルコースを含む m-SOF+0.4% BSA を用いて培養し、120 時間後に胚盤胞期胚を得た。得られた拡張胚盤胞期胚をさらに同じ濃度の 5-azadeoxycytidine を含む BRL-conditioned TCM199+10% FBS で個別培養を 48 時間行い、その培養上清を回収し、-80°C で保存した後、MDBK 細胞およびウシ水泡性口内炎ウイルスを用いた抗ウイルスアッセイ法により分泌された IFN- τ 量を測定した。胚は個々に回収し PCR による性判別に供し、DNA メチル化酵素抑制剤がウシ胚の性に依存した分泌動態に及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

(1) ウシ雌雄胚盤胞期胚における IFN- τ 遺伝子発現量はこれまでの報告と同じく雄胚に比較して有意に雌胚で高い値となっていた（図 1）。しかしながら、その発現を制御していると報告されている転写因子（Oct4、Ets2、Cdx2、Dlx3）の遺伝子発現量は雌雄胚で有意な差が認められなかった。この結果から、仮説に反して、転写因子の発現を介してウシ胚盤胞期胚で見られる IFN- τ の性に依存した分泌動態が生じているのではないことが示された。

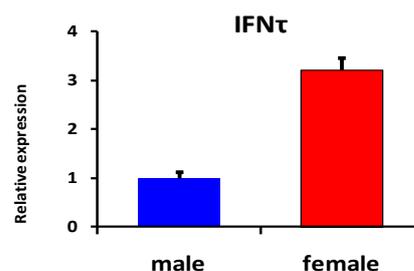


図 1. ウシ雌雄胚における IFN- τ 遺伝子発現量 雄胚の発現量を 1 としてその比率で表示。雌雄間に有意差有 ($P < 0.05$)

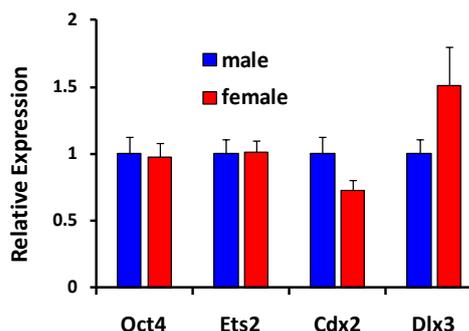


図 2. ウシ雌雄胚の IFN- τ 発現を制御している各種転写因子の遺伝子発現量。雄胚の発現量を 1 としてその比率で表示。

(2) それぞれ 100 個の雌雄胚を転写因子 Oct4 抗体を用いて ChIP アッセイを行い、Oct4 に結合する IFN- τ 遺伝子量を測定した。しかしながら、この数の胚を用いてもその遺伝子を検出することが出来なかった。

(3) DNA メチル化酵素の一種である Dnmt3a のウシ雌雄脱出胚盤胞期胚での発現は性に依存しており、雄胚で有意に雌胚より高い値を示していた（図 3）。

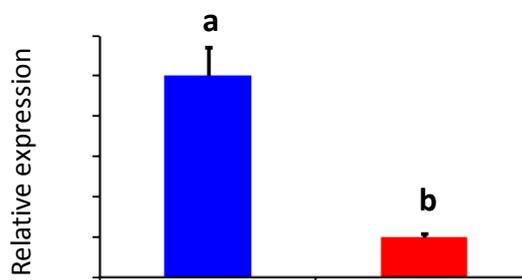


図 3 ウシ雌雄脱出胚盤胞期胚における Dnmt3a 遺伝子発現量 雄胚の発現量を 1 としてその比率で表示。異符号間に有意差有 ($P < 0.05$)

(4) 8 細胞期胚からの DNA メチル化酵素阻

害剤 5-azadeoxycytidine の 10 μ M 添加により胚盤胞期胚への発生は有意に低下した (表 2、 $P < 0.05$)。

表 2. DNA メチル化阻害剤 5-azadeoxycytidine (5-AZdC) のウシ胚発生に及ぼす影響

5-AZdC 濃度(μ M)	処理胚数	拡張胚盤胞数 (%)
0	375	206(55) ^a
1	375	205(55) ^a
10	375	161(43) ^b

a, b: 異符号間に有意差有 ($P < 0.05$)

また、5-azadeoxycytidine 添加状態で発生したウシ脱出胚盤胞期胚の IFN- τ の分泌量を測定したところ、0 および 1 μ M の濃度では雄胚に比べて雌胚で有意に高い分泌量を示したが、10 μ M の濃度では性に依存した分泌は消失していた。

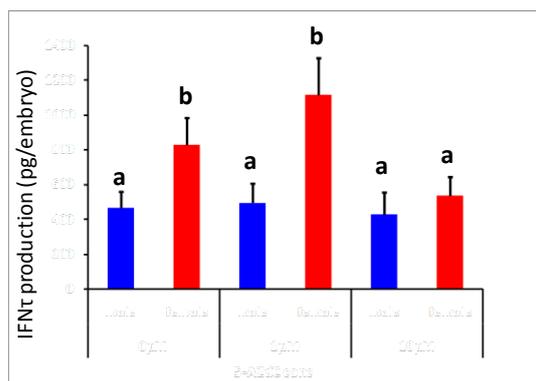


図 4. DNA メチル化酵素阻害剤 5-AZdC の添加がウシ胚 IFN- τ 分泌に及ぼす影響

a, b: 異符号間に有意差有 ($P < 0.05$)

以上の結果から、ウシ胚における妊娠認識物質インターフェロントウの発現の性に依存した分泌動態はその発現を制御している転写因子の遺伝子発現によって決定されているのではないことが示唆された。ウシ胚ゲノム DNA のメチル化がこの現象に大きく関与していることが示唆され、Dnmt3a のウシ雌雄胚での発現は IFN- τ の発現とは逆のパターンを示している。よって雄胚では雌胚に比べてゲノムの DNA メチル化レベルが高い状態にあり、その結果インターフェロントウやその発現に関与するその他の遺伝子群の発現が低下していることがインターフェロントウの性に依存した分泌動態に関与しているという

仮説も考えられる。このように、ウシ胚での分泌が性に依存している現象にも DNA のメチル化などのエピジェネティック機構による制御が関与していることは新しい知見である。本課題ではインターフェロントウ遺伝子またはその発現制御領域のメチル化の程度が雌雄胚で異なっているかどうかの検討は加えられておらず今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Walker AM, Kimura K, Roberts RM. Expression of bovine interferon-tau variants according to sex and age of conceptuses. Theriogenology. 査読有、72 巻、2009、44-53
- ② Green MP, Spate LD, Parks TE, Kimura K, Murphy CN, Williams JE, Kerley MS, Green JA, Keisler DH, Roberts RM. Nutritional skewing of conceptus sex in sheep: effects of a maternal diet enriched in rumen-protected polyunsaturated fatty acids (PUFA). Reproductive Biology and Endocrinology. 査読有、6 巻、2009、21-31
- ③ Iwata H, Shiono H, Kon Y, Matsubara K, Kimura K, Kuwayama T, Monji Y. Effects of modification of in vitro fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos. Animal Reproduction Science. 査読有、105 巻、2009、234-244

[学会発表] (計 1 件)

木村康二・松山秀一、ウシ胚盤胞期胚における IFN- τ 発現に関わる転写因子の遺伝子発現について、日本胚移植研究会、2010. 9. 29、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 康二 (KIMURA KOJI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜育種増殖研究チーム・主任研究員

研究者番号：50355070