

平成21年 4月11日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780211
 研究課題名（和文） 体細胞クローン胚の発生にともなう遺伝子発現変化とその制御機構の解明
 研究課題名（英文） Changes in the gene expression in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer
 研究代表者
 澤井 健 (SAWAI KEN)
 岩手大学・農学部・助教
 研究者番号：90390864

研究成果の概要：ウシ体細胞クローン胚に特異的な発現動態を示す遺伝子の特定と、その制御因子の DNA メチル化状態が胚発生にともないどのように変化するかを検討した結果、胚の分化や胎盤機能に関連する遺伝子においてクローン胚に発現異常がみとめられ、これら異常を示す遺伝子の発現量は胚発育にともない発現が正常化する遺伝子と、発現異常が継続する遺伝子が存在することが明らかとなった。また、クローン胚の DNA メチル化割合は、胚盤胞期において高いものの、その後の胚発生にともなって正常化することが明らかとなった。本研究によりウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現動態とその制御機構の一端が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

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 遺伝子発現 体細胞クローン 胚 ウシ

1. 研究開始当初の背景

多くの動物種において体細胞クローン個体が作出されているが、いずれの種においてもクローン個体の生産率は極めて低い。特にウシにおいてはクローン胚の受胎能力の低

さ、高頻度での流産の発生、胎子の過大化がクローン個体の生産を制限する要因となっている。体細胞クローンにみられるこれらの異常は、胚、胎子および胎盤における遺伝子発現の異常が原因であると考えられている。

現在までにマウスやウシにおける体細胞クローン胚の遺伝子発現解析に関する報告はなされているものの、その多くが胚盤胞期までの初期胚を用いた解析である。そのため、体細胞クローン胚の子宮内での発生にともなう遺伝子発現の変化や、遺伝子発現が胚の組織分化や機能におよぼす影響は未だ十分に理解されていない。また近年、DNA メチル化やヒストンのアセチル化を介した遺伝子の発現調節機構(エピジェネティクス機構)が明らかにされつつあるが、胚の発生にともなう遺伝子発現の変化と DNA メチル化、ヒストン修飾の関係など、体細胞クローン胚の遺伝子発現制御機構は明らかではない。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、ウシの体細胞クローン胚では胚盤胞期から伸長期にかけて IGF 関連遺伝子の発現量および DNA メチル化レベルの変化がみとめられ、それらの推移は受精過程を経た通常の胚と異なることを明らかにしてきた。本研究ではさらに伸長期胚の胚盤(胎子組織)と栄養膜細胞(胎盤組織)および流産の発生が多発する胎齢 90 日までの胎子・胎盤に着目し、胚の組織分化にともなう遺伝子発現の変化、特に各組織への分化・機能維持に重要な役割をもつ遺伝子群の発現動態を明らかにするとともに、体細胞クローン胚の発生・分化能力、胎子および胎盤組織の機能評価を行う。また、それら遺伝子発現解析を行った同一組織における DNA メチル化およびヒストン修飾の解析およびこれらエピジェネティクス因子の人為的制御により、ウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現調節機構の解明を目指す。

(1) 体細胞クローン胚の発生および組織分化

にともなう遺伝子発現動態の解明

ウシ体細胞クローン胚の子宮内伸長、着床、胎子・胎盤形成など発生における重要な事象に關与する様々な遺伝子の時期・組織特異的な発現を解析し、体細胞クローンに特徴的な遺伝子発現動態を明らかにする。

(2) 体細胞クローン胚の遺伝子発現制御機構の解明

遺伝子発現の制御に關与する DNA メチル化(脱メチル化)に關して、体細胞クローン胚の発生時期、組織ごとに解析を行い、体細胞クローン胚の遺伝子発現を制御する因子・機構を明らかにする。

(3) エピジェネティクスの人為操作による遺伝子発現の制御

ヒストンのアセチル化に作用する薬剤の処理などにより、体細胞クローン胚のエピジェネティクス機構を人為的に操作し、胚発生や着床など体細胞クローン胚の機能性の向上を目指す。

3. 研究の方法

(1) 体細胞クローン胚の発生および組織分化にともなう遺伝子発現動態の解明

ウシ体細胞クローン胚の胚盤胞期および着床前の伸長期における上記遺伝子群の発現動態をリアルタイム PCR 法を用いた mRNA の発現量解析を行い、胚発生、着床および組織分化において鍵となる遺伝子(OCT-4, IFN- τ , FGF 関連)の発生にともなう発現動態を検討した。ウシ線維芽細胞をドナー細胞に用いた体細胞核移植胚を胚盤胞期まで体外培養し、レシピエント牛に移植した。Day16 日に回収した伸長期胚および胚盤胞期胚から RNA を抽出し、RT-リアルタイム PCR 法により

遺伝子発現解析を行った。各遺伝子の mRNA 発現量は同一サンプルの GAPDH 発現量で補正した。

(2) 体細胞クローン胚の遺伝子発現制御機構の解明

胚盤胞期および伸長期の体細胞クローン胚から抽出した DNA をバイサルファイト処理し、Satellite I 領域を PCR により増幅した。PCR 産物を制限酵素処理し、電気泳動像を解析することにより DNA メチル化レベル(発生過程を通じたゲノム全体の DNA メチル化レベルの変化)の解析を行った。

(3) エピジェネティクスの人為操作による遺伝子発現の制御

ウシ体細胞クローン胚作出時にヒストン脱アセチル化阻害剤であるトリコスタチン A を処理し、体細胞クローン胚の発生能力および産子作出能力を検討した。

4. 研究成果

(1) 体細胞クローン胚の発生および組織分化にともなう遺伝子発現動態の解明

細胞の未分化性維持に重要な役割を持つ OCT-4 遺伝子では胚盤胞期胚において体細胞クローン胚の発現量が体内発生・体内受精胚と比較して有意に高い値を示したが、その後の胚発生にともない両区の遺伝子発現に差はみとめられなくなった。組織分化に関与する FGF-2R 遺伝子および FGF-2 遺伝子においては体細胞クローン胚と体内受精・体内発生胚に差はみとめられなかったものの、FGF-4 遺伝子においては体細胞クローン胚の胚盤胞期での発現量が有意に低い値を示した。

(2) 体細胞クローン胚の遺伝子発現制御機構の解明

体細胞クローン胚の胚盤胞期における DNA メチル化割合は、ドナー細胞と比較して有意に低下しているものの、体内受精・体内発生胚、体外受精胚、受精卵クローン胚および単為発生胚よりも有意に高い値を示した。また、体細胞クローン胚においては胚盤胞期において有意に高い DNA メチル化レベルを示すもののその後の胚発生(伸長)によって胚の栄養膜組織においては DNA の脱メチル化が起こることが明らかとなった。一方、胚の内部細胞塊に由来する胚盤胞組織のメチル化レベルは変化せず、その結果、胚盤胞期以降の胚発育にともない DNA のメチル化が起こった体内受精・体内発生胚とクローン胚の間には DNA メチル化レベルに有意な差がみとめられなくなることが明らかとなった。

(3) エピジェネティクスの人為操作による遺伝子発現の制御

50nM トリコスタチン A 処理により、クローン胚の胚盤胞形成率(42%)は無処理区(22%)のものと比較して有意に高くなること、またその効果はトリコスタチン A 処理濃度に比例して高くなることが明らかになった。しかしながら、それらトリコスタチン A 処理を行った体細胞核移植胚の受胎率および産子形成率は無処理区のものと同様であり、ウシにおいてはトリコスタチン A 処理が体細胞クローン胚の受胎および産子作出能に影響をおよぼさないことが明らかとなった。

以上の本研究により、ウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現動態とその制御機構の一端が明らかとなり、得られた知見は体細胞クローン技術を利用した個体生産の効率化などに寄与するものと考えられる。

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1件)

- ① Ken Sawai, Studies on gene expression in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. Journal of Reproduction and Development. 55, 11-16 (2009) 査読無

[学会発表] (計2件)

- ① Sawai K, Hirayama H, Minamihashi A, Hashizume T, Moriyasu S. Effect of trichostatin A treatment after bovine somatic cell nuclear transfer on productions of blastocyst and offspring. World Congress on Reproduction Biology, 2008年5月24日 アメリカ合衆国ハワイコナリゾート

- ② 永井裕記、平山博樹、森安悟、南橋昭、尾上貞雄、手塚雅文、澤井健 ウシ単為発生胚における胎盤機能関連遺伝子の発現動態 第100回日本繁殖生物学会 2007年10月21日 東京大学

[図書] (計0件)

[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

澤井 健 (SAWAI KEN)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：90390864