

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791581

研究課題名（和文） ヒト生命萌芽の分子機構の解明  
～生殖補助医療の向上及び安全性を目指して～

研究課題名（英文） Elucidation of the molecular mechanism of human life sprout

## 研究代表者

山田 満稔（YAMADA MITSUTOSHI）

独立行政法人国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部 共同研究員

研究者番号：40383864

## 研究成果の概要（和文）：

これまでに行われたマウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングの結果、未受精卵では停止していた遺伝子発現は受精後に胚性ゲノム活性化により再開され、ステージ特異的な発現がグローバルに観察されている。胚性ゲノムの活性化のステージ初期から特異的に発現している転写因子は、その後の転写増幅に重要な役割を果たしている可能性がある。しかし一方で、着床前期特異的に発現している遺伝子はわずかに *Zscan4* のみが報告されているだけである。着床前期における遺伝子発現レベルの制御機構は未だ解明されておらず、これを明らかにすることは初期胚発生メカニズムのみならず、分化全能性のメカニズムの解明に繋がると考えられる。そこでマウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングデータおよび Unigene cDNA library におけるマウス各臓器の Expressed sequence tag 発現頻度を解析することにより、着床前期特異的に発現する新規遺伝子を抽出した。その中でも二つの high-mobility-group box を持つクロマチンタンパク *Hmgpi* (an HMG-box protein, preimplantation-embryo-specific) を研究対象とし、その発現と機能を明らかにすることを目的とした。

*Hmgpi* は胚性ゲノムの活性化に伴い胚性に転写される一方、着床後には転写されなかった。HMGPI タンパクは mRNA レベルから遅れて 4 細胞期から発現し、以後の着床前期胚のすべての期間を通して高い発現を持続した。興味深いことに HMGPI タンパクは胚盤胞の内細胞塊および栄養外胚葉の両方に発現し、胚盤胞期において細胞質から核内へと局在を移行させた。このことは胚盤胞期以前と以後で *Hmgpi* が異なる機能を有していることを示唆する。siRNA (siHmgpi) を用いて *Hmgpi* の転写レベルを抑制すると、着床前期胚の胚発生の低下および着床不全を引き起こした。さらに *Hmgpi* の転写抑制は胚性幹細胞の樹立につながる胚盤胞の *in vitro* outgrowth を低下させた。siHmgpi を注入した胚から発生した胚盤胞について、内細胞塊および栄養外胚葉のマーカーである Oct4、Nanog および Cdx2 で免疫組織染色を行うといずれの発現も低下しており、内細胞塊および栄養外胚葉における BrdU の取り込みも低下していた。従って、内細胞塊および栄養外胚葉のいずれの細胞の発生にも *Hmgpi* が不可欠であると考えられた。

これらの解析結果から初期胚発生において *Hmgpi* が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今後ノックアウトマウスの作製、あるいは、*Hmgpi* が結合する cofactor や上流、下流の遺伝子ネットワークを解析することにより、*Hmgpi* の機能解明に努めたい。また、これらの研究を通じて、健全な胚盤胞、ES 細胞の樹立、未分化性の維持および分化するための培養方法を改善できると考えている。

## 研究成果の概要（英文）：

Mining gene-expression-profiling data identified a novel gene that is specifically expressed in preimplantation embryos. *Hmgpi*, a putative chromosomal protein with two high-mobility-group boxes, is zygotically transcribed during zygotic genome activation, but is not transcribed postimplantation. The Hmgpi-encoded protein (HMGPI), first detected at the 4-cell stage, remains highly expressed in pre-implantation embryos. Interestingly, HMGPI is expressed in both the inner cell mass (ICM) and the trophoblast, and translocated from cytoplasm to nuclei at the blastocyst stage, indicating differential spatial requirements before and after the blastocyst stage. siRNA (siHmgpi)-induced reduction of *Hmgpi* transcript levels caused developmental loss of preimplantation embryos and implantation failures.

Furthermore, reduction of *Hmgpi* prevented blastocyst outgrowth leading to generation of embryonic stem cells. The siHmgpi-injected embryos also lost ICM and trophectoderm integrity, demarcated by reduced expressions of Oct4, Nanog and Cdx2. The findings implicated an important role of *Hmgpi* at the earliest stages of mammalian embryonic development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学

### 1. 研究開始当初の背景

マウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイルリングの結果、未受精卵では停止していた遺伝子発現が受精後に胚性ゲノムの活性化により再開され、ステージ特異的な発現がグローバルに観察された。胚性ゲノムの活性化のステージに特異的に発現している転写因子は、その後の転写増幅に重要な役割を果たしている可能性がある。しかし一方で、着床前期特異的に発現している遺伝子はわずかに *Zscan4* のみが報告されているだけである。着床前期における遺伝子発現の制御機構は未だ解明されておらず、これを明らかにすることは初期胚発生のメカニズムのみならず、分化全能性獲得のメカニズムの解明に繋がると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、着床前期ステージ特異的に発現し、High mobility group (HMG) box をコードする新規遺伝子 *Hmgpi* (an HMG-box protein, preimplantation-embryo-specific) に着目し、その発現と機能の解明を目的とした。さらには着床前期胚の分割停止モデル、あるいは着床不全モデルの作成とその分子生物学的機構の解明を目指した。その結果、着床前期胚の長期体外培養システムの改良とそれに伴う妊娠率の向上につながると期待される。

### 3. 研究の方法

(1) *in silico* 解析によるマウス *Hmgpi* 遺伝子の抽出

マウス着床前期胚の遺伝子発現プロファ

イルングデータおよび Unigene cDNA library におけるマウス各臓器の Expressed sequence tag (EST) 発現頻度を解析することにより、着床前期胚で特異的に発現する新規遺伝子を *in silico* に抽出した。その中から、新規遺伝子のアミノ酸配列を予測し、SMART を用いたドメイン解析から High mobility group (HMG) box domain をコードする新規遺伝子 *Hmgpi* を研究対象とした。HMG family 遺伝子群における orthologue 解析には Vector NTI software (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いてアミノ酸配列の相同性に基づく系統樹を作成した。

### (2) 未受精卵および胚の採取と培養

6~8週齢の B6D2F1 雌マウスに妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) を 5IU 腹腔内投与し、48時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を 5IU 投与し、過排卵処理を施した。未受精卵および受精卵の採取は標準プロトコール(8)に従った。胚はマウス胚培養に最適化された構成成分からなる KSOM 培地(9, 10) 中で 37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。すべての操作は「国立成育医療センターにおける動物実験に関する指針」および「国立成育医療センター研究所動物実験規程」を遵守し、目的に合致した適切な実験操作を行い、麻酔等の手段によって、動物の苦痛を最低限に留めるよう配慮した。

### (3) RNA 干渉法 (RNAi) による機能解析

*Hmgpi* の発現をノックダウンする small interfering RNA (siRNA) を < 10 pl (25 ng/μl) 受精卵の細胞質中にマイクロインジェクション

ンシ (Fig.1)、胚盤胞までの発生率を観察した。コントロールには非特異的配列の siRNA を使用し、*Hmgpi* に対する siRNA は3つのターゲット塩基配列デザインを設定し、マイクロインジェクション法、定量解析および発生率の解析により至適デザインを選択した。siRNA の至適濃度を決定するため、5, 10, 25, 50 ng/ $\mu$ l の4つの濃度を試行した。siRNA を注入して胚盤胞まで発生した胚について、胚移植による着床率およびフィーダー細胞上で培養して outgrowth を観察した。

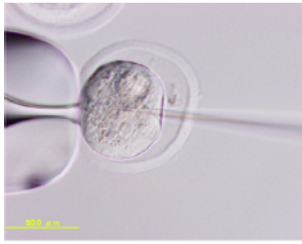


Fig.1 siRNA microinjection

#### (4) 胚性幹細胞 (ES 細胞)および outgrowth 培養

マウス ES 細胞 (B6/129sv/ter 系統)の培養は標準プロトコルに従った。マウス ES 細胞はフィーダー細胞 (MEF: mouse embryonic feeder cell)上で ES 細胞培地を用いて良好に培養維持した後、ゼラチンコート処理した培養ディッシュ上で培養し、MEF 除去操作を行った。その後、ウェスタンブロットおよび免疫組織染色に供した。

胚盤胞の outgrowth の培養は標準プロトコルに従った(Nagy et al)。胎生 3.5 日目胚の透明帯を酸性タイロド液で除去した後に、MEF をフィーダー細胞とした培養ディッシュ上に移し、ES 細胞培地の中で、37°C、5% CO<sub>2</sub>にて培養した。その後アルカリ・フォスファターゼ染色および免疫組織染色に供した。

#### (5) 免疫組織染色および共焦点レーザー顕微鏡による解析

検体を 4%パラホルムアルデヒドにて固定した。*Hmgpi* の中でも種保存性、特異性、抗原性が高いと予想される3つのペプチド

(1.CIQGHHDGAQSSRQDFTD,  
2.CMSMSGGRSSKFRTEQS,  
3.ESPRTVSSDMKFQGC)に対するポリクローナル抗体を作製し、1次抗体に使用した。蛍光色素標識した2次抗体を用い、抗原を可視化した。核は4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)および抗 Histone-H2B 抗体にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。

#### (6) 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)取り込みアッセイ

胎生 3.5 日目胚の胚盤胞及び in vitro に outgrowth させた細胞をそれぞれ 10 $\mu$ M BrdU 添加培地にて 16 時間培養し、免疫組織染色に供した。

#### (7) 遺伝子の mRNA レベルの発現解析

*Hmgpi* に対して 6-8 週齢マウスの多組織パネルを用いたノザンブロットおよび Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)により mRNA レベルでの発現解析を行った。RT-PCR 法および定量的 RT-PCR 法による解析はそれぞれ *Gapdh* および *H2afz* を内部コントロールとして対照に用いた。

#### (8) ウェスタンブロット法解析

100 個の卵子および初期胚からタンパク質を抽出後、アクリルアミドゲルを使用して SDS-PAGE を行い、 $\beta$ -ACTIN を内部コントロールとして用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス *Hmgpi* 遺伝子の in silico 解析

Unigene cDNA library における EST 発現頻度の解析では、*Hmgpi* は卵割期から桑実胚にかけての cDNA library でのみ ESTs が認められた。未受精卵や着床以降の発生段階では認められず、胎児期、新生児期および成獣期のいかなる組織でも EST は認められなかった。新規遺伝子 *Hmgpi* の全長 DNA をクローニングして塩基配列を決定し、予想されるアミノ酸配列からドメイン解析を行ったところ、*Hmgpi* は SANT ドメインおよび2つの High mobility group (HMG) box ドメインをコードすると考えられた。NCBI 遺伝子データベースでは、*Hmgpi* は Upstream binding transcription factor (*Ubtf*)とのアミノ酸配列の相同性の高さから、*Ubtf-like 1* (*Ubtfl1*)の名で登録されている。マウス、ラットおよびヒトの間で高い相同性を示すマウス *Hmgpi* のホモログ遺伝子対を解析したところ、2つのラットホモログ (*Ubtfl1* と *RGD1304745*)と3つのヒトホモログ (*UBTFL1-3*)を検出した。ラットおよびヒトのアミノ酸対比較によるアライメントスコアは、それぞれ 72.3%-72.5% および 53.8%-54.1%だった。

#### (2) *Hmgpi* 遺伝子の発現解析

RT-PCR では2細胞期から胚盤胞期にかけて、特に4細胞期で最も発現していたが、マウス成獣組織を用いた RT-PCR では発現を認めなかった。胚性幹 (ES)細胞においても発現を認めたが、胎児性癌 (EC)細胞や間葉系幹細胞では発現を認めなかった。6-8 週齢マウスの多組織パネルを用いたノザンブロット解析ではいずれの成獣組織にも発現を認めなかった。免疫組織染色の結果、HMGPI タンパクは2細胞期で発現を認めず、4細胞期か

ら桑実胚にかけて強く発現を認め、胚盤胞期でも弱く発現を認めた。ES細胞においても発現を認めた。ウェスタンブロットでも同様の結果が得られた。胚盤胞におけるウェスタンブロットはシングルバンドであり、HMGPIペプチドと前培養した抗体を用いてウェスタンブロットを行うとバンドを認めなかった。桑実胚から胚盤胞にかけて、HMGPIタンパクの局在は細胞質から核内へ移行した。ES細胞では細胞質および核の両方にタンパクは局在した (Fig.2)。

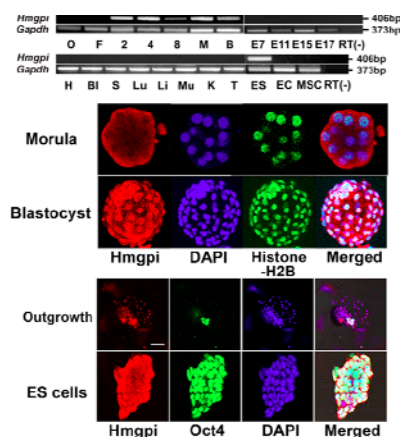


Fig.2 RT-PCR and immunohistochemistry

### (3) *Hmgpi* 遺伝子は胚性遺伝子である

RNAポリメラーゼ阻害剤の $\alpha$ -amanitinを培養液に添加し、1細胞期から2細胞期にかけて培養した。結果、コントロールと比べて $\alpha$ -amanitin添加群では*Hmgpi*の転写はほぼ完全に抑制されたため、*Hmgpi*は胚性ゲノム活性化により転写される胚性遺伝子であることが示された。

### (4) *Hmgpi* 遺伝子の機能解析

*Hmgpi*の初期胚発生における機能的役割を検討するため、RNAiを用いて*Hmgpi*の発現を低下させるノックダウン実験を行った。*Hmgpi*に対するsiRNA (siHmgpi)のデザインが有効であるか検討するため、mRNAレベルおよびタンパクレベルでの発現抑制を確認した。定量的RT-PCRの結果、2細胞期から胚盤胞期におけるすべてのステージにおいてmRNA転写は抑制されていた。タンパクレベルにおいても抑制されていることを免疫組織染色にて確認した。ウェスタンブロットでは、胚盤胞期においてsiHmgpi注入群では $33.7 \pm 12.4\%$ までタンパク翻訳は抑制された。

RNAiにより*Hmgpi*の発現をノックダウンした場合、 $68.9 \pm 1.3\%$ しか胚盤胞に発生しなかった。コントロール注入群では、 $94.1 \pm 1.3\%$ が胚盤胞に発生した (Fig.3)。

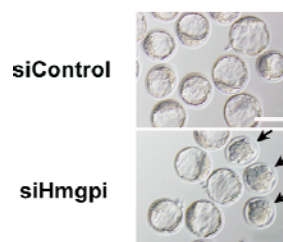


Fig.3 siRNA injected embryos

胚盤胞における免疫染色の結果、内細胞塊のマーカであるNANOG、OCT4の発現が低下する一方で、栄養外胚葉のマーカであるCDX2の発現も低下した。

胚盤胞のOutgrowth実験では、siHmgpiを注入した場合、 $19.3 \pm 3.8\%$ しか良好なoutgrowthを示さなかった。胚移植実験では、siHmgpiを注入した胚のうち、偽妊娠マウスに移植して着床に成功した率は $24.7 \pm 3.3\%$ だった。コントロール注入群では、それぞれ、 $96.2 \pm 2.7\%$ および $66.6 \pm 3.3\%$ だった。outgrowthでは内細胞塊および栄養外胚葉に由来する細胞のBrdUの取り込みがいずれも低下していたが、アポトーシスのシグナル伝達経路を構成するCaspase3の発現は胚盤胞およびoutgrowthのいずれにおいても検出されなかった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein *Hmgpi* in early embryonic development Human Molecular Genetics, 査読有, 19(3), 2010, 480-493. doi: 10.1093/hmg/ddp512

[学会発表] (計7件)

国際学会

- ① Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Kuji N, Aoki D, Yoshimura Y. Identification of a novel gene encoding a high mobility group box protein and its specific expression and essential role during preimplantation development. American Society for Reproductive Medicine 65th Annual Meeting, Atlanta, USA, (October 2009)
- ② Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Ogawa S, Okumura N, Mochimaru Y, Kuji N, Aoki D, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein *Hmgpi* in

early embryonic development. The 26th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology、Roma, Italy、(July 2010)

- ③ Yamada M Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein *Hmgpi* in early embryonic development. The 1st State Key Laboratory of Reproductive Biology (SKLRB) Symposia, Beijing, China、(May 2010)

#### 国内学会

- ① 山田満稔、浜谷敏生、阿久津英憲、持丸佳之、高野光子、浅田弘法、久慈直昭、青木大輔、吉村泰典・着床前期胚に特異的に発現する新規遺伝子 *Hmgp* の発現および機能解析・第 61 回日本産科婦人科学会総会・国立京都国際会館・2009/04/03
- ② 山田満稔、浜谷敏生、阿久津英憲、持丸佳之、高野光子、浅田弘法、久慈直昭、青木大輔、梅澤明弘、吉村泰典・着床前期胚に特異的に発現する新規遺伝子 *Hmgp* の発現および機能解析・第 50 回日本哺乳動物卵子学会・都市センターホテル・2009/05/09
- ③ 山田満稔、浜谷敏生、阿久津英憲、奥村典子、持丸佳之、浅田弘法、久慈直昭、青木大輔、吉村泰典第・着床前期特異的新規遺伝子 *Hmgp* による着床周辺期発生の制御機構・62 回日本産科婦人科学会学術講演会・東京国際フォーラム・2010/05/10
- ④ ○山田満稔、浜谷敏生、阿久津英憲、奥村典子、持丸佳之、浅田弘法、久慈直昭、青木大輔、吉村泰典・着床前期特異的新規遺伝子 *Hmgpi* による着床周辺期発生の制御機構・第 51 回日本哺乳動物卵子学会学術講演会・朱鷺メッセ・2010/05/30

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山田 満稔 (YAMADA MITSUTOSHI)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・  
生殖・細胞医療研究部・共同研究員  
研究者番号：40383864