

Title	着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング
Sub Title	
Author	浜谷, 敏生(Hamatani, Toshio) 洪, 実(ko, Minoru) 久慈, 直昭(Kuji, Naoaki) 浅田, 弘法(Asada, Hironori) 丸山, 哲夫(Maruyama, Tetsuo) 吉村, 泰典(Yoshimura, Yasunori)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.2 (2006. 6) ,p.69- 80
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	総説
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060600-0069

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

綜 説

着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室¹⁾

Developmental Genomics and Aging Section, Laboratory of Genetics, National Institute on Aging (NIA),
National Institutes of Health, Baltimore, MD, USA²⁾

はま たに とし お こう み の る く じ なお あき あき だ ひろ のり
浜 谷 敏 生¹⁾, 洪 実²⁾, 久 慈 直 昭¹⁾, 浅 田 弘 法¹⁾,
まる やま てつ お よし むら やす のり
丸 山 哲 夫¹⁾, 吉 村 泰 典¹⁾

Key Words: Preimplantation embryo, gene expression profiling, microarray, MGA, ZGA

はじめに

近年では、未受精卵を含めた着床前期胚の潜在能力を利用することによって、発生工学が著しい進歩を遂げ、着床前期胚発生における遺伝子ネットワークの解明は、生殖医学のみならず再生医学においても極めて重要となっている。また、最近のマイクロアレイ技術の急速な進歩を背景に、着床前期胚の研究においても、生殖補助医療(ART)における卵および胚の分子生物学的質の評価法の開発、生命始動および分化全能性に係る遺伝子発現制御機構の解明、クローン胚における核のリプログラミング機構の解明などを目的として、個々の遺伝子の発現のみならず、グローバルに遺伝子発現動態を観察することが試みられている。ここでは、我々が行った遺伝子発現プロファイリングの解析結果を中心に、着床前期胚における遺伝子発現動態について述べたい。

着床前期胚における遺伝子発現動態の研究背景

着床前期胚発生においては、受精、コンパクション、胚性ゲノムの活性化、胚盤胞腔の形成、内細胞塊と栄養外胚葉の分化、着床など劇的な生物学的事象が存在する。また、少子化社会を背景に体外受精をはじめとする不妊治療の意義が増大しているため、着床前期胚発生機構の分子生物学的理解を深め、体外受精における妊娠率を向上することが重要となっている。さらに、未受精卵を含めた着床前期胚の潜在能力を利用することによって、近年、発生工学が著しい進歩を遂げている。例えば、体細胞クローン動物など人為的な遺伝的コントロールをされ

た動物の創出が多数報告されるようになった。また、ヒト染色体異常卵の治療や体外受精の成功率向上を目的として、高齢患者の卵に若年健康女性から提供されたドナー卵の細胞質を注入する、あるいは除核したドナー卵に高齢患者の卵核を注入する卵細胞質移植が検討されている。マウスでは、胚性幹細胞から外来遺伝子の導入およびマーカー遺伝子を用いた選別により、卵細胞へ特異的に分化させることが可能となった¹⁾。このようにしてできた卵細胞の核を患者の体細胞核と入れ替えて胚盤胞へと発生させ、その患者自身のゲノムを持つ胚性幹細胞を作るといったテララーメード医療も技術的には近い将来可能になるかもしれない。しかし、これらの安全性を確立するためには、置換された体細胞核の未受精卵および着床前期胚におけるリプログラミング機構の解明が必須である。このように、着床前期胚発生における分子生物学的機構の解明は生殖医学および再生医学において極めて重要である。

着床前期胚発生には、卵形成過程において蓄積された卵性遺伝子産物と受精後に胚性ゲノムから読み出される胚性遺伝子産物の両方が必要である。それでは、卵性遺伝子産物には着床前期胚においてどのような役割があるのだろうか？また、未受精卵ではあらゆる遺伝子の転写が停止しているが、いったい受精後いつからどのような胚性遺伝子群が最初に読み出され、それらはどのような生物学的役割を担っているのだろうか？さらに、着床前期胚における分化全能性とその喪失、すなわち桑実胚におけるコンパクションに続く胚盤胞期における内細胞塊と栄養外胚葉への分化などは、どのような遺伝子群によってコントロールされているのだろうか？これら

の疑問に答えるためには、従来の研究手法によりいくつかの遺伝子の発現変化を観察するのみならず、全遺伝子の発現動態を観察することにより、マスター遺伝子群を見出し、それらの有機的遺伝子ネットワークを解明することが重要である。

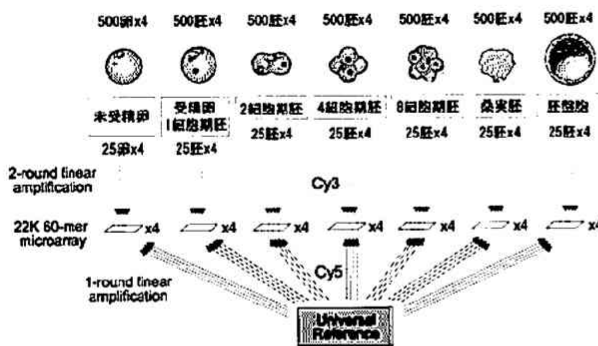
最近では、遺伝子ネットワーク解明のアプローチとして、DNA オリゴ・マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルが使用されるようになった。しかし、着床前期胚の研究においては、サンプルの希少性と、初期胚に特異的に発現される遺伝子を含むマイクロアレイ・プラットフォームの欠如が大きな障害となっていた。しかし、*in vitro* transcription による cRNA 増幅および labeling reaction の効率化 (Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit from Agilent Technologies など)、さらに、未受精卵～胚発生各段階 cDNA ライブラリーの expression sequence tags (ESTs) を含む NIA Mouse Gene Index に基づいて作製された NIA 22K 60-mer oligo microarray (Agilent Mouse Development Oligo Microarray: 現在は 44K にバージョンアップ) の登場がこれを可能にした²⁾。そこで、われわれはマウス着床前期各ステージの胚を4セット (1セット 500 個) 集め、それぞれから mRNA を抽出、*in vitro* transcription 反応により cRNA 増幅および Cy3 標識し、Cy5 標識された universal reference とともに、NIA 22K 60-mer oligo microarray において hybridization に供した (図

1)³⁾。ここでは、我々の結果を中心に、着床前期胚における遺伝子発現に関するこれまでの知見および他グループのマイクロアレイ・データ⁴⁻⁷⁾も含めて述べたいと思う。なお、遺伝子表記に関しては NCBI Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>) にある Gene symbol を用い、遺伝子機能に関するキーワードとして Gene Ontology (GO) term (<http://www.geneontology.org/>)⁸⁾を用いた。また、データ解析には、NIA array analysis (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/>)⁹⁾、TIGR MultiExperiment Viewer (MeV) (<http://www.tm4.org/mev.html>)¹⁰⁾、GenMAPP (<http://www.genmapp.org/>)¹¹⁾を用いた。

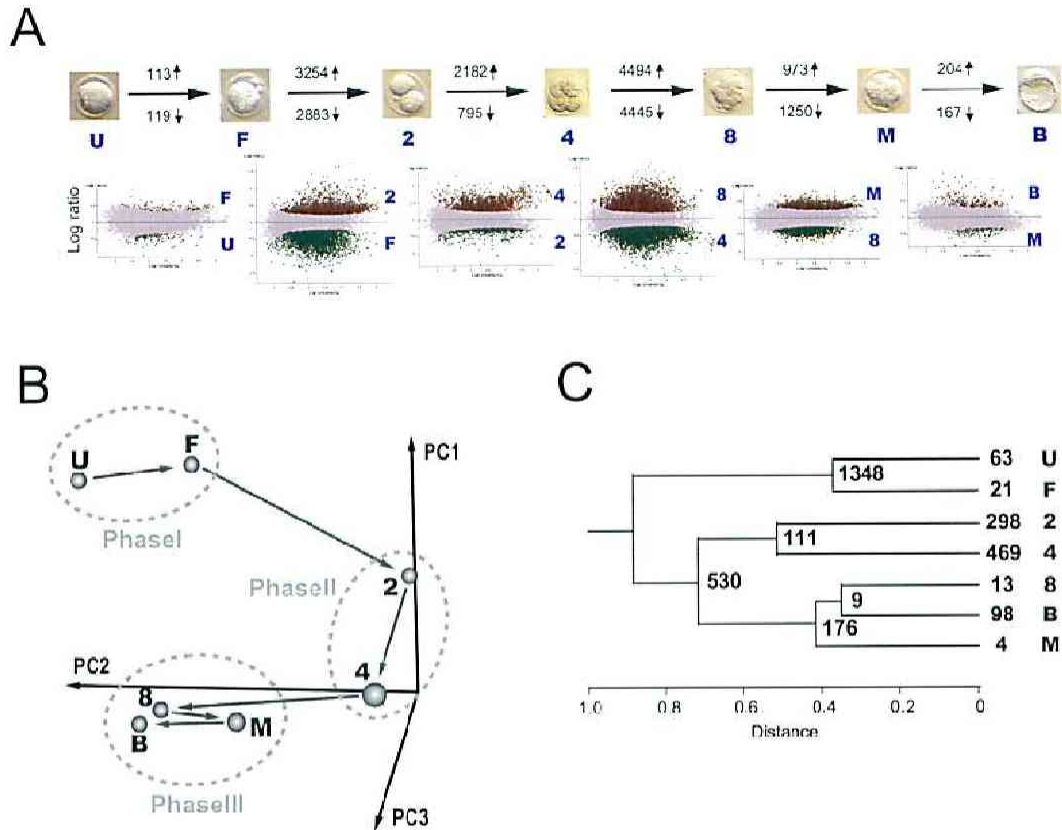
マウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング ～*in vivo*～

着床前期胚発生における遺伝子発現変化の全体像

最初に、我々のデータセットからマウス着床前期胚における遺伝子発現のおおよその傾向をつかむため、各ステージ間で対比較 pairwise comparison を行った (図 2A)。NIA 22K 60-mer oligo microarray には、21939 の遺伝子塩基配列 (60mer) がスポットされているが、そのうち、受精卵から2細胞期胚にかけて、3254 の遺伝子が発現上昇、2883 の遺伝子が発現低下を示し、さらに、4細胞期から8細胞期にかけても、4494 の遺伝子が発現上昇、4445 の遺伝子が発現低下を示した。すなわち、受精卵から2細胞期胚、また4細胞期胚から8細胞期胚の間に最も劇的な遺伝子発現の変化を認めた。また、いずれかのステージ間で有意な変化が認められた 12179 の遺伝子を用いて、階層クラスタリング hierarchical clustering あるいは主成分分析 principle component analysis (PCA) を行ったところ、同様の傾向が認められ、遺伝子発現の観点から、着床前期を未受精卵-受精卵期 (Phase I)、2-4細胞期 (Phase II)、8細胞期-胚盤胞期 (Phase III) に分けることができた (図 2B, C)。Phase I～II における多数の遺伝子の発現上昇は、女性前核と男性前核より新たに構築された核から最初に読み出された RNA によるものであり、ZGA (Zygotic gene activation) に当たると考えられる。一方、Phase II～III にかけてのグローバルな遺伝子発現上昇は、我々が初めて観察した現象であり、これを MGA (Mid-preimplantation gene activation) と称することとした。MGA については後に詳しく述べるが、Van Blerkom らは着床前期胚におけるタンパク質合成の変化を SDS-gel の泳動パターンから観察し、4細胞

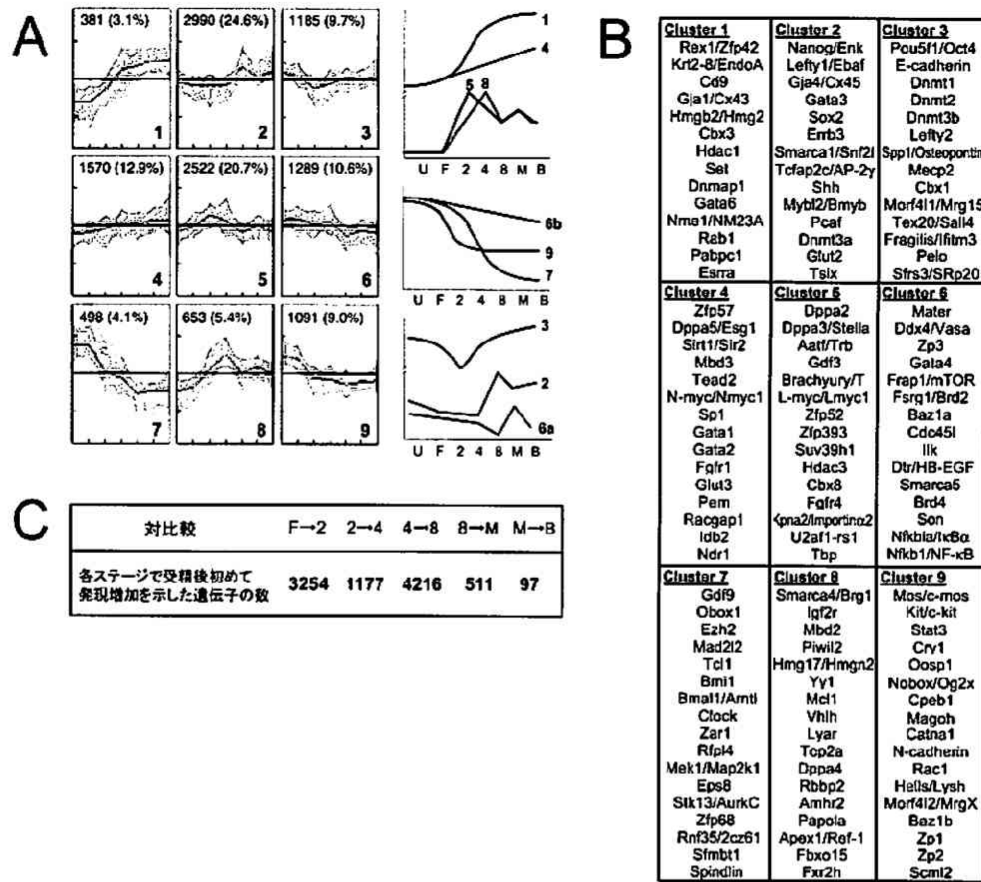


第1図 実験方法: ハイブリダイゼーション・デザイン
着床前期各ステージの胚を、500 個ずつプールして1セットとしたものを、それぞれ4セットずつ集めた。各々のセットからそれぞれ mRNA を抽出、2-round の cRNA 増幅を行い、Cy3 標識した。1-round の cRNA 増幅で Cy5 標識したコントロール・サンプル、Universal reference とともに、マイクロアレイにおいてハイブリダイゼーションに供した。(Hamatani, et al. Developmental Cell 2004: 6: 117-31 より改変。)



第2図 マイクロアレイデータの解析結果と着床前期胚における遺伝子発現の全体像

U, 未受精卵; F, 受精卵; 2, 2細胞期胚; 4, 4細胞期胚; 8, 8細胞期胚; M, 桑実胚; B, 胚盤胞。
 (A) 隣り合う2ステージ間における対比較。各々の scatter plot において、縦軸は Log Ratio, すなわち発現比, 横軸は Cy3・Cy5 平均信号強度を示し, 有意な発現上昇を認めた遺伝子を赤色のドットで, 有意な発現低下を認めた遺伝子を緑色のドットで示し, これらの遺伝子の数も付した。(B) 主成分分析。主成分分析において, 着床前期胚は, 未受精卵と受精卵の Phase I, 2~4細胞期の Phase II, 8細胞期以降の Phase III の3つのグループに分かれた。Phase I→II, すなわち受精卵から2細胞期にかけての大きな発現増加は, Zygotic gene activation, ZGA に相当する。一方, Phase II→III, すなわち4細胞期胚から8細胞期胚にかけての大きな発現増加は Mid-preimplantation Gene Activation, MGA と名付けられた。(C) 階層クラスタリング。階層クラスタリングでも同様の3つのグループに分かれた。また, 各ステージ・各グループにおいて有意に特異的な発現を示した遺伝子も抽出されたので, それらの遺伝子数も示した。(Hamatani, et al. Developmental Cell 2004; 6; 117-31 より改変。)



第3図 K-mean 法による非階層クラスタリングと胚性 RNA のさらなる解析

(A) K-mean 法による非階層クラスタリングにより、9つの発現パターンを示すクラスターが得られ、それらはさらに大きく3つのグループに分かれた。第1のグループは、クラスター1、4、5、8を含み、新たに構築された胚性ゲノムからの遺伝子発現を示した。第2のグループは、クラスター7と9を含み、卵形成過程に豊富に蓄えられた卵性 RNA で、着床前期に分解されるパターンであった。第3のグループは、クラスター2と3を含み、卵性 RNA が分解を受ける一方、少し遅れて胚性 RNA が作られるような遺伝子発現パターンであると考えられた。黒色で示した発現パターンは、これまでに報告のあるパターンであるが、赤色で示した発現パターンは、マイクロアレイ実験によって明らかとなったものである。(B) それぞれのクラスターに含まれた遺伝子の凡例を示した。(C) 胚性に読み出される遺伝子がどのステージに初めて読み出されるのかに注目し、それらの遺伝子数を示した。(Hamatani, et al. Developmental Cell 2004; 6: 117-31 より改変。)

期～8細胞期の間に最も劇的な変化があることを1975年に明らかにしている¹²⁾。

着床前期胚発生における遺伝子個々の発現パターン

次に、全体の遺伝子発現変化の傾向よりもむしろ個々の遺伝子の発現変化を追うため、いずれかのステージ間で有意な変化を認めた12179の遺伝子について、K-mean 法による非階層クラスタリングを行った。図3に

示したように、9つの発現パターンに分類された。これら着床前期胚における遺伝子発現パターンの多くが、Wave-like pattern, すなわち、発現上昇の後、速やかに抑制されるパターンであり、ステージ特異的な遺伝子発現がグローバルに存在することが明らかとなった。Wang と Zernicka-Goetz らのマイクロアレイ実験においても、同様にステージ特異的な Wave-like pattern が観察されている⁴⁾。筆者らが観察した9つの発現パター

ンは、さらに大きく3つのグループに分類された。第1のグループは、クラスター1 (381 遺伝子)、クラスター4 (1570 遺伝子)、クラスター5 (2522 遺伝子)、クラスター8 (653 遺伝子)を含み、新たに構築された胚性ゲノムからの遺伝子発現である。一方、第2のグループは、クラスター7 (498 遺伝子)とクラスター9 (1091 遺伝子)であり、卵形成過程に豊富に蓄えられ、未受精卵の成熟過程あるいは受精後に分解されるRNAと考えられた。また、第3のグループは、クラスター2 (2990 遺伝子)とクラスター3 (1185 遺伝子)で、卵性RNAが分解を受ける一方、幾らか遅れて胚性RNAが作られるような遺伝子発現のパターンである。最後に、クラスター6 (1289 遺伝子)には、第2のパターンを示す遺伝子 (Mater など)と第3のパターンを示す遺伝子 (Hb-egf など)の両方が含まれていた。

胚性 RNA

非階層クラスタリングでも明らかなように、着床前期の遺伝子発現は、卵性RNAの分解と受精後新たに構築された核から転写された遺伝子の発現上昇が、複雑に重なりあっている。そこで、我々は、胚性に読み出される遺伝子がどのステージで初めて読み出されているのかに注目した。受精卵～2細胞期、2細胞期～4細胞期、4細胞期～8細胞期、8細胞期～桑実胚期、桑実胚期～胚盤胞期に、それぞれ新たに3254, 1177, 4216, 511, 97の遺伝子の発現上昇を認めている (図3C)。対比較の結果と同様、受精卵～2細胞期、4細胞期～8細胞期で多数の遺伝子が新たに転写開始されており、それぞれがZGA, MGAに相当すると考えられた。

受精卵～2細胞期に発現上昇を認めた遺伝子のほとんどは、K-mean clusteringにおいて、クラスター1, 5, 8に分類され、ZGAパターンを呈する。これらの遺伝子は、図4に示すように、細胞分裂や核酸合成などの基礎的な細胞機能に関するGO termで特徴付けられた。すなわち、ZGAは、Phase IIIにおける高度な形態変化にではなく、新たな生命の始動に際し、Phase IIにおける細胞分裂や代謝などの基礎的な細胞機能の確立に貢献していると考えられた。

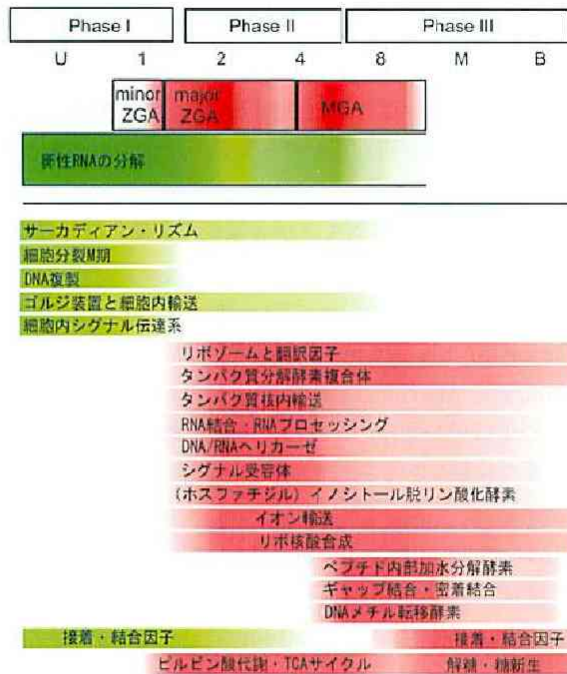
また、4～8細胞期 (Phase II～III) に発現上昇を認めた4216のMGA遺伝子のうち、2752 (82.7%)がクラスター2に、409 (12.3%)がクラスター3に分類された。形態的に最も劇的な変化をきたす8細胞期～桑実胚期および桑実胚期～胚盤胞期に、少数の遺伝子しか発現上昇を認めていないことから、このMGA産物がコンパクション、胚盤胞腔の形成、ICMとTEへの分

化などに極めて重要であることが推察された。MGA遺伝子には、Lefty-1, Oct4, Nanog, Bmyb, Melkなど、ノックアウトマウスの作製実験により初期発生に不可欠であることが明らかとなっている遺伝子が多数含まれる。また、“ペプチド内部加水分解酵素”、“ギャップ結合・密着結合”、“DNAメチル基転移酵素”などのGO termをもつ遺伝子が多く含まれた (図4)。“ペプチド内部加水分解酵素”は、Timp2, Timp3, Timp4 (Tissue inhibitor of metalloproteases)やSerpina3n, Serpinb1a (Serine/cysteine peptidase inhibitors)などの遺伝子を含み、これらの遺伝子産物が着床において重要な役割があることを示唆すると考えられる。また、“密着結合”には、Cldn6, Cldn8, Cldn10, Cldn12, Cldn15 (Claudins), Occludin (Occludin), “ギャップ結合”には、Gja3, Gja4, Gja7, Gjb1, Gjb5 (gap junction membrane channel proteins)などの遺伝子が含まれた。

8細胞期～桑実胚期あるいは桑実胚期～胚盤胞期においては、“接着因子”、“small GTPase シグナル伝達”、“グルコース代謝”などのGO termをもつ遺伝子が発現上昇を示した (図4)。“small GTPase シグナル伝達”は、Iqgap1, Rac1, Kras2, Cdc42などE-cadherinに関連した細胞接着に重要な遺伝子を含み、これらはコンパクションに重要であると考えられる。また、着床前期胚における極性に注目し、WangとZernicka-Goetzらも、この時期にWnt, Bmpのシグナル伝達系に関わる遺伝子の活性化を観察している⁴⁾。さらに、エネルギー代謝回路については、着床前期胚前期ではピルビン酸代謝・TCA cycleが主であるが、着床前期胚後期ではグルコースが利用可能となることが知られている^{13), 14)}。筆者らのマイクロアレイ・データでも、ミトコンドリア・ピルビン酸代謝に関わる遺伝子が着床前期初期から発現上昇している一方、解糖・糖新生に関わる遺伝子はむしろ徐々に発現上昇し、着床前期後期に高発現していることが確認された。さらに、glucoseの細胞内への取り込みに重要なGlut1, Glut8, Irs1, Igflrなどの遺伝子も8細胞期～桑実胚期で有意な発現上昇を示した。

卵性 RNA

卵形成過程に大量のRNAやタンパク質が蓄えられるが、未受精卵 (Metaphase II) においては全ての遺伝子の転写は停止している。これまで、マウスにおいては、一部のRNAは卵成熟過程において分解が開始され、ほとんど全ての卵性RNAが2細胞期までに分解されると考えられてきた^{15), 16)}。我々のデータにおいても、確か



第4図 着床前期胚における遺伝子発現パターンと GO term との関係

GO term と前述のクラスター分類を利用し、それぞれのステージにおいて発現上昇を示した遺伝子群に頻度の高い GO term を抽出した。(Hamatani, et al. Developmental Cell 2004: 6; 117-31 より改変。)

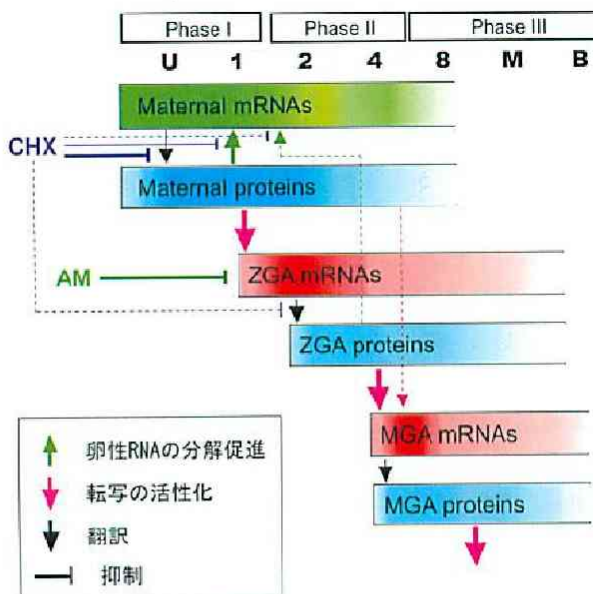
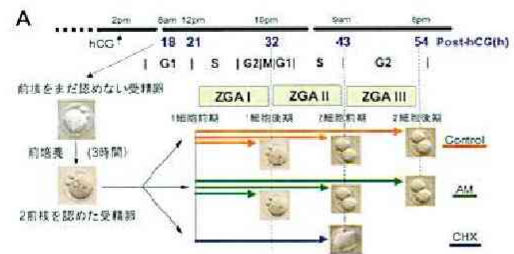


図6 着床前期胚の遺伝子発現調節機構のモデル

卵性 RNA の翻訳が ZGA に必須であり、また、一部の遺伝子の卵性 RNA 分解にも重要な役割を果たしていると考えられた。また、MGA の誘導に ZGA が必要であることが推察された。(Hamatani, et al. Developmental Cell 2004: 6; 117-31 より改変。)



B

対比較	ZGA I 21h vs. 32h	ZGA II 32h vs. 43h	ZGA I+II 21h vs. 43h	ZGA III 43h vs. 54h
阻害剤(-)で培養した場合、発現上昇を示した遺伝子	47	114	129	1733
そのうち、AMと培養した場合に発現上昇を示さなかった遺伝子	1 (2.1%)	101 (88.6%)	99 (76.7%)	1727 (99.7%)
そのうち、CHXと培養した場合に発現上昇を示さなかった遺伝子	-	-	107 (82.9%)	-

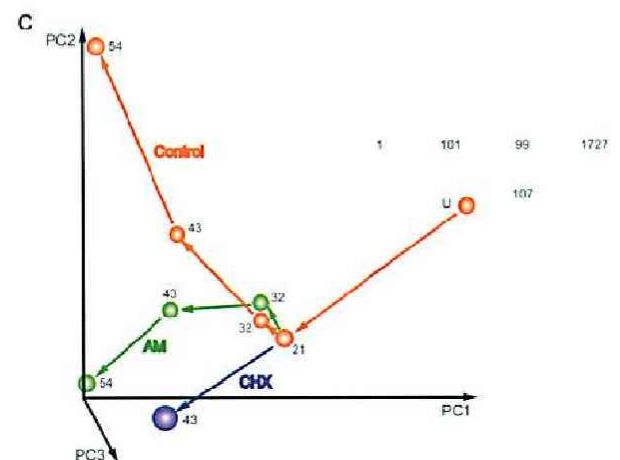


図5 体外培養胚を用いた遺伝子発現プロファイリング

(A) hCG 注射後 18 時間の採取直後に既に 2 前核を有した受精卵は棄却し、2 極体 1 前核の受精卵を 3 時間前培養し、新たに 2 前核を認めた受精卵のみを hCG 注射後 21 時間後より体外培養に供した。hCG 注射後 32, 43, 54 時間後、それぞれ 1 細胞後期、2 細胞前期、2 細胞後期の胚を採取した。それぞれ 100 個の胚をプールしたものを 3 セット集め、mRNA を抽出し、マイクロアレイに供した。また同様に、転写阻害剤 α -amanitin (AM)、翻訳阻害剤 cycloheximide (CHX)、DNA 合成阻害剤 aphidicolin (AC)、さらに AC の溶媒として用いた dimethylsulfoxide (DMSO) とともに培養した各ステージ胚も採取し、それぞれマイクロアレイに供し、各薬剤の ZGA に対する影響を観察した。Post-hCG 21h, 1 細胞前期; Post-hCG 32h, 1 細胞後期; Post-hCG 43h, 2 細胞前期; Post-hCG 54h, 2 細胞後期。(B) ステージ間対比較により、有意な発現上昇を認めた遺伝子数は、hCG 注射後 21→32 (ZGA I), 32→43 (ZGA II), 21→43 (ZGA I+II), 43→54 時間後 (ZGA III) に、それぞれ 47, 114, 129, 1733 であったが、これらの発現上昇が各種薬剤と培養した場合にどれだけ抑制されたかを検討した。(C) 体外培養胚マイクロアレイデータの主成分分析。翻訳阻害剤 (CHX) は転写阻害剤 (AM) と同等に ZGA を強く抑制した。(Hamatani, et al. Developmental Cell 2004: 6; 117-31 より改変。)

にクラスター 9 はこれに相当するが、クラスター 6 やクラスター 7 の大部分の遺伝子（それぞれ 68.7%, 70.5%）は 4 細胞期から 8 細胞期にかけて有意な発現低下を示した。また、ヒトにおいても多く卵性 RNA が 4 細胞期以降に分解されていることが観察されている⁷⁾。これら卵に転写産物が蓄えられる遺伝子は、受精および着床前期発生の準備に重要な遺伝子群と考えられるが、クローニングにおける核移植後の体細胞核リモデリングに重要な遺伝子も多く含むことが予想される。Zeng と Schultz らは、着床前期胚に比較して、未受精卵の遺伝子発現プロファイルは、クロマチン構造、ゲノム安定性などに関連する遺伝子が特徴的であったと報告している⁹⁾。さらに、最近になって、Pan と Schultz らは、原始卵胞から胞状卵胞に至る各卵胞発育段階における卵母細胞の遺伝子発現プロファイリングについても報告している¹⁷⁾。階層クラスタリングの結果、卵母細胞における遺伝子発現の変化は、原始卵胞から 1 次卵胞にかけて最大で、双方のステージで発現が認められた 16883 の遺伝子プローブのうち、5020 のプローブで 2 倍以上の変化が観察されている。これは、一層の顆粒膜細胞が立方体状に密に卵母細胞を取り囲むようになり、卵胞構造が構築され、卵胞・卵細胞が成長・分化を始めることを反映していると考えられる。また、2 次卵胞と胞状卵胞の間でも、比較的大きな遺伝子発現変化が認められ、meiotic competence の獲得（体外培養した場合に減数分裂再開）を反映しているのかもしれない。胞状卵胞で高発現を示した遺伝子には、タンパク質合成およびリボソーム、細胞分裂、DNA 修復、微小管などに関する GO term をもつものが多かった。一方、我々は、若年雌マウスから得た未受精卵と高齢雌マウスから得た未受精卵から RNA を抽出しマイクロアレイでそれらの遺伝子発現も比較したが、クロマチン構造、DNA メチル化、ゲノム安定性、細胞分裂、RNA ヘリケースなどに関わる遺伝子の発現が大きく変化していた¹⁸⁾。さらに、Van Blerkom や Tarin らが卵におけるミトコンドリアの重要性を以前から指摘しているように¹⁹⁻²¹⁾、ミトコンドリアおよびエネルギー代謝に関わる遺伝子が大きく変化していた。これらの遺伝子は卵の老化および着床前期発生および妊娠性に大きく関わっていると考えられる。

マウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング ～in vitro～

マウスにおける ZGA の遺伝子発現動態をさらに詳細に観察するため、図 5A に示したように、受精後に細胞

周期を同期させて体外培養した 1 細胞前期胚 (post-hCG 21h)、1 細胞後期胚 (post-hCG 32h)、2 細胞前期胚 (post-hCG 43h)、2 細胞後期胚 (post-hCG 54h) についても遺伝子発現プロファイリングを行った²²⁾。また同様に、 α -amanitine (AM, 転写阻害剤) あるいは cycloheximide (CHX, 翻訳阻害剤) とともに培養した各ステージ胚も、それぞれマイクロアレイに供し、これらの薬剤の ZGA における遺伝子発現に対する影響も観察した (図 6)。阻害剤 (－) で培養した場合、発現上昇を認めた遺伝子数は、1 細胞後期までに 47、1 細胞後期～2 細胞前期に 114、2 細胞前期～2 細胞後期に 1733 であった (図 5B)。1 細胞後期までの 47 遺伝子の発現上昇は、十分量の AM を使用したにもかかわらず抑制されなかったため²³⁾、poly (A) tail の長さの変化により、mRNA の安定性が変化したか、cRNA amplification labeling reaction における oligo-d (T) プライマーによる逆転写効率が変化したためであると考えられた^{23), 24)}。一方、1 細胞後期～2 細胞前期に発現上昇を示した 114 遺伝子は、AM によりその 88.6% の発現上昇が抑制され、胚性ゲノムから転写が再開されたものと考えられ、ZGA の一部 (“minor ZGA”) であると思われた。同様に、2 細胞前期～後期の 1733 遺伝子の発現上昇も AM がその 99.7% の発現上昇を抑制したため、2 細胞前期に major ZGA は 2 細胞前期に開始されと考えられた。一方、阻害剤 (－) で培養した場合、1 細胞前期～2 細胞前期には 129 遺伝子の発現上昇を認めたが、CHX と培養した場合には、そのうち 107 遺伝子 (82.9%) の発現上昇が抑制され、AM の場合 (99 遺伝子, 76.7%) と同程度まで抑制された。主成分分析 (図 5C) においても、遺伝子発現の全体像は、AM と培養した場合と同様、阻害剤 (－) で培養した場合から大きく外れることが明らかとなった。また、1 細胞後期において卵形成過程で蓄えられていた RNA は盛んに翻訳されるものの、新たに合成された RNA (ZGA RNA) は 2 細胞期になるまで翻訳されないことに照らして考えると^{16), 25)}、卵性 RNA からの翻訳こそが ZGA には必須であると考えられた²⁴⁾。さらに、阻害剤 (－) で培養した場合、1 細胞後期～2 細胞前期に 1416 遺伝子の発現が減少したが、CHX と培養した場合にはそのうち 221 遺伝子の発現が上昇に転じたため、卵性 RNA の翻訳が一部の遺伝子の卵性 RNA 分解にも重要な役割を果たしていることが示唆された。このように、着床前期胚では、卵性 RNA の翻訳と分解が能動的に行われ、その結果 ZGA が誘導されと考えられる (図 6C)。また、受精卵を AM と培養すると、RNA の翻訳は阻害されないに

もかわらず、通常次ステージまでに細胞分裂は停止することから²⁶⁾、MGAの誘導には、卵性遺伝子産物よりも、むしろZGA遺伝子産物が重要であると考えられた(図6)。

マウス胚盤胞の着床遅延現象における 遺伝子発現プロファイリング

一部の哺乳類では、気候や栄養状態が不良である場合に着床が遅延することがある。その場合、胚は着床せずに発生が停止(Dormancy, Diapause)し、環境が至適状態に戻ると胚発生が再開し、着床する。マウスにおいては、性交後3.5日に卵巣を摘除し、Progesteroneのみを毎日補充することにより、人為的に着床遅延を惹起させることができる。また、Estradiol (E₂)を単回投与することにより、Dormancyは解消され、着床が誘起され、その後の胎仔発生も正常である。マウスではこの着床遅延胚を用いるとES細胞が効率よく樹立されることから、Dormancyは細胞の分化発生能に影響を与えず、細胞分裂が抑制されていることになる。もし、このメカニズムが解明され、制御されれば、ARTにおける卵や胚の効率的な凍結保存法の開発、胎状奇胎・絨毛癌の治療法開発、ES細胞の維持培養や分化誘導の効率化などへ応用できる可能性がある。無論、胚性着床因子の研究にもこのモデルは有用である。そこで、このマウス着床遅延モデルにおいて、着床遅延にある胚盤胞(Dormant blastocyst)とE₂により着床能を回復させた胚盤胞(Activated blastocyst)の遺伝子発現プロファイルと比較検討した。それぞれ100個を1セットとしたものを3セットずつ集め、各セットからmRNAを抽出し、cRNA増幅(2本鎖DNA合成および*in vitro* transcription)を2回行い、Cy3-標識ターゲットを合成した²⁷⁾。それぞれのターゲットはCy5標識コントロール・ターゲットと共に、NIA 60mer oligo microarrayにおいてハイブリダイゼーションに供した。マイクロアレイ上にある21239遺伝子のうち、80遺伝子がDormant blastocystで、149遺伝子がActivated blastocystで有意に高発現を示した。細胞周期、シグナル伝達系、エネルギー代謝に関連した遺伝子が多く含まれていた。

一方、哺乳類の着床遅延におけるDormancyは、線虫の“Dauer larva(耐性幼虫)”，殆ど加齢せず乾燥や高温などに耐性を示し、餌の無いところで数ヶ月間(通常の寿命の数倍以上)生存可能となる現象に似ている。線虫の“Dauer larva”および加齢においては、daf-2

とdaf-16遺伝子が重要な役割を果たしている。餌が十分ある環境では、daf-2の下流で、daf-16が抑制されると耐性幼虫形成が抑制されることがわかっている。daf-2はインスリン/インスリン様成長因子の受容体であり、哺乳類の着床前期胚では、Insr, Irs1, Igf1r, Igf2rが発現しているが、そのうちIrs1とIgf2rは、Dormant blastocystで有意に高発現を示し、特にIgf2rは内細胞塊に比し、栄養外胚葉で高く発現していた。Igf2rを抑制すると、Igf2が上昇し、児の体重増加に至ることから考えると、Igf2rの高発現はリガンドの減少による2次的な反応あるいは何らかの形でDormancyの維持に貢献している可能性がある。一方、哺乳類におけるDaf-16のホモログはFork-head蛋白(Foxo1, Foxo3, Foxo4)であり、Foxo3aはDormant blastocystで有意に高発現を示し、また栄養外胚葉で高く発現していると考えられた。Foxo3aは、Smad5あるいはそれらの結合領域をプロモーターにもつp21^{cip1/waf1}とともに、Dormant blastocystで有意に高発現を示した。これらは、dormancyにおける細胞周期の停止に寄与していると考えられた(図7)。最後に、胚性着床因子としては、Activated blastocystにおけるHb-egfの高発現が注目された。そこで、リコンビナントHb-egf蛋白でコートしたビーズを子宮内腔に入れて、内膜における各種蛋白の発現を観察したところ、着床期と同様に、Cox-2やBmp2、さらにはHb-egfの発現上昇が認められたため、胚盤胞におけるHb-egfの発現上昇がバラクラインに子宮内膜に働きかけ、内膜の胚受容能引き出ししている可能性が示された。

ヒト着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング ~in vitro~

ヒト着床前期胚においても、DobsonとReijo Peraらは、未受精卵~8細胞期胚それぞれ1個からRNAを抽出して増幅し、cDNAマイクロアレイを用いてRNAプロファイリングを行っている²⁾。ヒトでは、発現変化した遺伝子数について言えば、ZGAに較べ、卵性RNAの分解の方が圧倒的に多数であったため、特異的な卵性RNAの分解が初期発生の始動にきわめて重要な働きがあると分析している。さらに、驚くことに分割停止した胚においても、ZGAが認められたことを報告しており、形態に基づく胚の質的判断は実際の胚の発生能力を過小評価している危険があることを報告している。また、4細胞期~8細胞期胚で初めて発現上昇を認めた遺伝子も認められているが、ヒトではZGAのタイミングがマウ

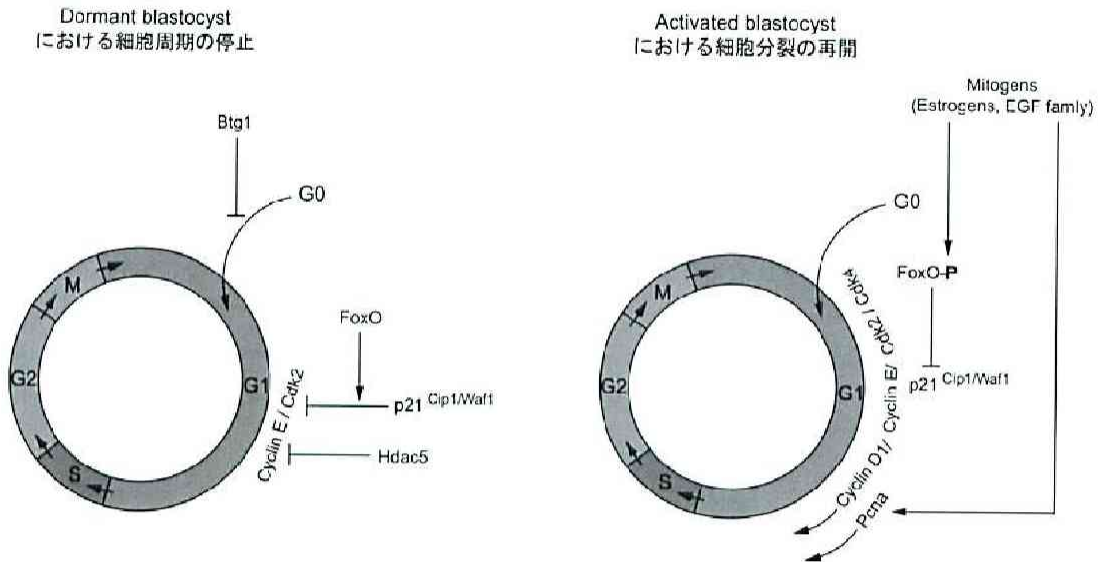


図7. Dormant blastocyst における細胞周期停止のメカニズム

p21 が G1 期の進行に不可欠な Cyclin E-cdk2 の複合体を抑制することにより、dormancy の成立・維持が行われると考えられる。また、p21 を活性化する Foxo3a などの FoxO 蛋白、クロマチン高次構造を変化させ遺伝子発現を抑制する Hdac5 や G0 期から G1 期へ進行を抑制する Btg1 など dormancy における細胞周期の停止に貢献していると考えられた、(Lopes, et al. Reproduction 2004 : 128 ; 676 より抜粋.)

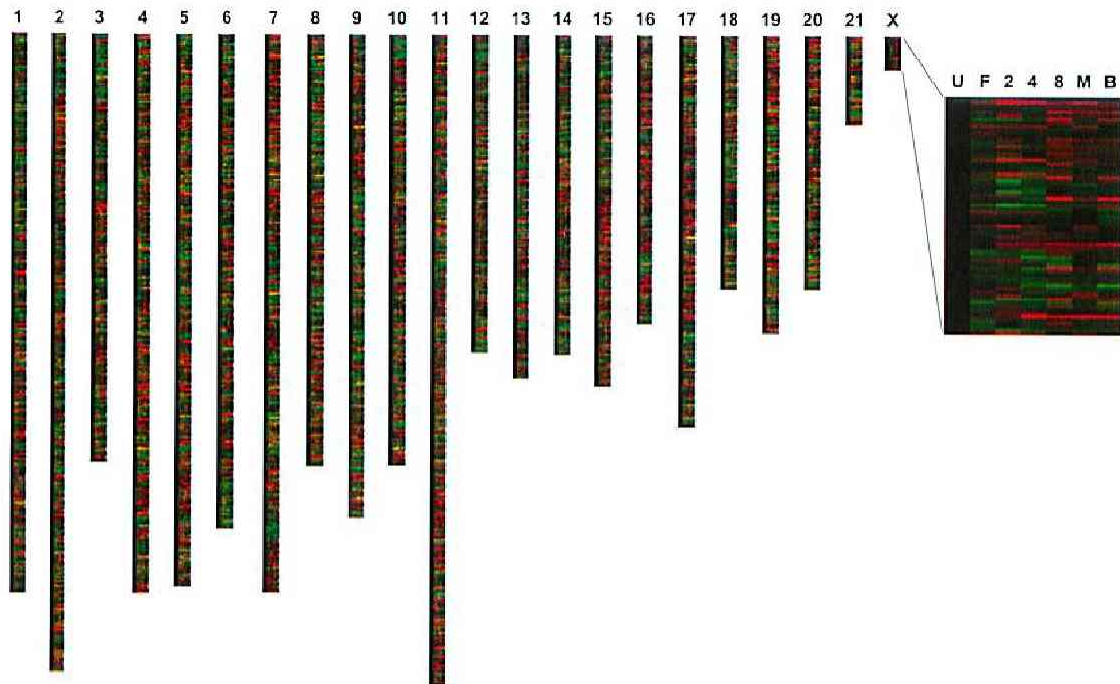


図8. 着床前期胚の遺伝子発現変化と染色体における遺伝子座との関係

各遺伝子の着床前期胚各ステージにおける発現データを、未受精卵における発現量に比して（赤色は高発現、緑色は低発現）横方向に示し、縦方向には各染色体上の遺伝子座の順に並べた。

スよりも遅いため、これがマウスにおける ZGA の一部に相当するのか MGA に相当するのか今後の検討が期待される。

おわりに

このように、マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングは、着床前期胚の研究にも非常に有用である。また一方では、以下の点から、発生学や分子生物学のみならず、情報工学や発生工学の研究リソースとして今後の活用が期待される。第2減数分裂中期で停止して

いた未受精卵が、受精により細胞周期が再開するため、着床前期胚では細胞周期が極めて同調している。また、未受精卵ではすべての遺伝子の転写が停止しているが、受精後まもなく1細胞期後期には胚性ゲノムよりの転写が開始される。さらに、卵丘細胞の混入に細心の注意を払えば、他組織の混入がほとんどない、均一なサンプルが入手可能である。つまり、着床前期胚発生における遺伝子発現プロファイリングは、Bioinformatics における遺伝子発現ネットワークの解明やシミュレーションに格好のサンプル・データを供給できる。例えば、着床前期胚の遺伝子発現データを、それぞれの染色体上におけ

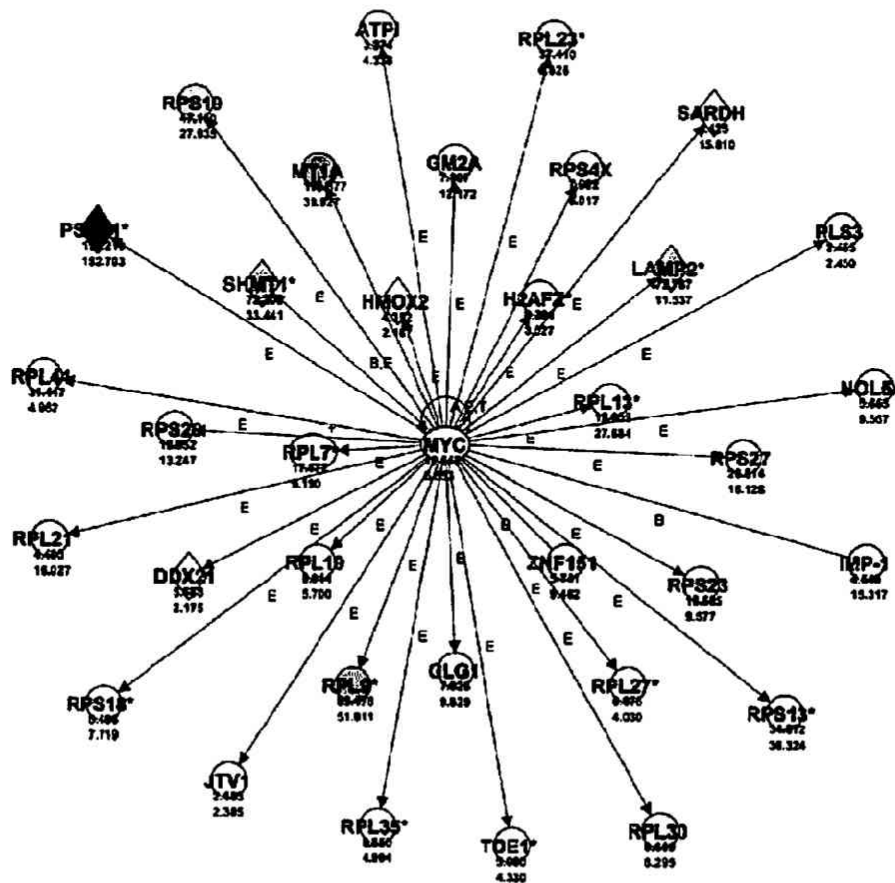


図9. ZGA における遺伝子ネットワーク解析

1細胞期胚から2細胞期胚にかけて発現上昇を示し、かつその上昇がα-amanitinにより抑制された遺伝子の中から、Ingenuity Pathways Analysisソフトウェアにより抽出されたMyc遺伝子ネットワーク⁹⁾。遺伝子間の距離は関連の強さを示し、“E”は発現の相関に基づいており、“B”は物理的な結合が報告されているものである。各遺伝子の下に記された数字は、上段が1細胞期胚の発現強度に対する2細胞期胚の発現強度の比、下段がα-amanitinと培養した2細胞期胚の発現強度に対するコントロール2細胞期体外培養胚の発現強度の比である。比が高いほど濃い赤色で示してある。各遺伝子の図形(円形、菱形など)は、遺伝子産物の機能(酵素、転写因子など)に基づいて表記されている。(Zeng, et al. Developmental Biology 2005: 283; 40-57より抜粋。)

る遺伝子座に載せてみると、図8が描ける。この図から、同調して発現上昇あるいは発現低下を示す遺伝子がクラスターを形成しているように見える染色体部分がある。これらは染色体高次構造の変化により、転写因子がDNAにアクセスしやすくなり、ゲノム上近い場所にある遺伝子群の転写をいっせいに活性化するのもかもしれない。さらに、これらの遺伝子がネットワークを形成し、ある一つの細胞機能を果たしているかもしれない。Paillissonらは、マウス卵のcDNA libraryにおけるESTの出現頻度を解析し、*in silico*で卵特異的発現を示す遺伝子を抽出し、それらがマウス染色体上でクラスターをなしていることを報告している。さらに、そのlociはいずれもテロメアに近いと、他臓器での可逆的な発現抑制がいわゆる“Telomere position effect²⁹⁾”による可能性があることを指摘している。一方、ZengとSchultzらは、1細胞期胚から2細胞期胚にかけて発現上昇を示し、かつその上昇が α -amanitinにより抑制された遺伝子を抽出した上で、Ingenuity Pathways Analysisというソフトにより、これまでの知見を統合して、ZGAのマスター遺伝子の描出を試みている(図9)⁹⁾。今後は、このような情報工学的解析と更なる生物学的データの蓄積により、着床前期胚におけるZGAおよびMGAの誘起システムが解明され、さらには遺伝子ネットワークの全貌が明らかとなることを期待したい。最後に、ここで紹介した遺伝子発現プロファイリング・データは全て、NCBI-GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) あるいはEBI-ArrayExpress database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) よりダウンロードが可能であることも記しておきたい。

文 献

- Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, 3rd, Boiani M, Scholer HR : Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells, *Science*, 300(5623) : 1251-6, 2003.
- Carter MG, Hamatani T, Sharov AA, Carmack CE, Qian Y, Aiba K, Ko NT, Dudekula DB, Brzoska PM, Hwang SS, Ko MS : In situ-synthesized novel microarray optimized for mouse stem cell and early developmental expression profiling, *Genome Res*, 13(5) : 1011-21, 2003.
- Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS : Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development, *Dev Cell*, 6(1) : 117-31, 2004.
- Wang QT, Piotrowska K, Ciemerych MA, Milenkovic L, Scott MP, Davis RW, Zernicka-Goetz M : A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo, *Dev Cell*, 6(1) : 133-44, 2004.
- Zeng F, Baldwin DA, Schultz RM : Transcript profiling during preimplantation mouse development, *Dev Biol*, 272(2) : 483-96, 2004.
- Zeng F, Schultz RM : RNA transcript profiling during zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo, *Dev Biol*, 283(1) : 40-57, 2005.
- Dobson AT, Raja R, Abeyta MJ, Taylor T, Shen S, Haqq C, Pera RA : The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development, *Hum Mol Genet*, 13(14) : 1461-70, 2004.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G : Gene ontology : tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium, *Nat Genet*, 25(1) : 25-9, 2000.
- Sharov AA, Dudekula DB, Ko MS : A web-based tool for principal component and significance analysis of microarray data, *Bioinformatics*, 21(10) : 2548-9, 2005.
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J : TM4 : a free, open-source system for microarray data management and analysis, *Biotechniques*, 34(2) : 374-8, 2003.
- Doniger SW, Salomonis N, Dahlquist KD, Vranizan K, Lawlor SC, Conklin BR : MAPPFinder : using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data, *Genome Biol*, 4(1) : R7, 2003.
- van Blerkom J, Brockway GO : Qualitative patterns of protein synthesis in the preimplantation mouse embryo. I. Normal pregnancy, *Dev Biol*, 44(1) : 148-57, 1975.
- Carayannopoulos MO, Chi MM, Cui Y, Pingsterhaus JM, McKnight RA, Mueckler M, Devaskar SU, Moley KH : GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(13) : 7313-8, 2000.
- Martin KL, Leese HJ : Role of developmental factors in the switch from pyruvate to glucose as the major exogenous energy substrate in the preimplantation mouse embryo, *Reprod Fertil Dev*, 11(7-8) : 425-33, 1999.
- Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ, DePamphilis ML : Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development, *J Biol Chem*, 270(38) : 22077-80, 1995.

- 16) Schultz RM : The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo, *Hum Reprod Update*, 8(4) : 323-31, 2002.
- 17) Pan H, O'Brien M J, Wigglesworth K, Eppig JJ, Schultz RM : Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development *in vitro*, *Dev Biol*, 286(2) : 493-506, 2005.
- 18) Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MS : Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes, *Hum Mol Genet*, 13(19) : 2263-78, 2004.
- 19) Tarin JJ : Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos, *Mol Hum Reprod*, 2(10) : 717-24, 1996.
- 20) Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A : Consequences on offspring of abnormal function in ageing gametes, *Hum Reprod Update*, 6(6) : 532-49, 2000.
- 21) Van Blerkom J, Sinclair J, Davis P : Mitochondrial transfer between oocytes : potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasm, *Hum Reprod*, 13(10) : 2857-68, 1998.
- 22) Kidder GM, Green AF, McLachlin JR : On the use of alpha-amanitin as a transcriptional blocking agent in mouse embryos : a cautionary note, *J Exp Zool*, 233 (1) : 155-9, 1985.
- 23) Rambhatla L, Patel B, Dhanasekaran N, Latham KE : Analysis of G protein alpha subunit mRNA abundance in preimplantation mouse embryos using a rapid, quantitative RT-PCR approach, *Mol Reprod Dev*, 41(3) : 314-24, 1995.
- 24) Wang Q, Latham KE : Requirement for protein synthesis during embryonic genome activation in mice, *Mol Reprod Dev*, 47(3) : 265-70, 1997.
- 25) Nothias JY, Miranda M, DePamphilis ML : Uncoupling of transcription and translation during zygotic gene activation in the mouse, *Embo J*, 15(20) : 5715-25, 1996.
- 26) Schultz RM, Davis W, Jr., Stein P, Svoboda P : Repr ogramming of gene expression during preimplantation development, *J Exp Zool*, 285(3) : 276-82, 1999.
- 27) Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MS, Dey SK : Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(28) : 10326-31, 2004.
- 28) Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA : Position effect at *S. cerevisiae* telomeres : reversible repression of Pol II transcription, *Cell*, 63 (4) : 751-62, 1990.