

## ウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現制御機構

澤井 健\*  
(岩手大学農学部)

原稿受理：2011年1月20日

### Regulatory mechanism of gene expression in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer.

Ken Sawai  
(Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan)

世界初の体細胞クローン動物である羊のドリーが1996年に誕生して以来<sup>1)</sup>、多くの哺乳動物種において体細胞クローン個体が作出されている。ウシやブタなど家畜においては種畜造成時の検定用個体を体細胞クローン技術で作出することにより、従来よりも精度の高い検定を効率的かつ低コストで行える可能性があり、体細胞クローンを用いた検定法の確立に複数の研究機関が取り組んでいる。しかしながら、家畜の体細胞クローンにおいては、胚の受胎能力の低下、高頻度での流産の発生、産子の過大化、生後直死などの異常がみとめられる<sup>2)</sup><sup>6)</sup>。そのため体細胞クローン個体の作出効率は低い状態に留まっており、体細胞クローン個体の産業利用には上記したような体細胞クローンにみとめられる様々な問題を解決する必要がある。体細胞クローンにおけるこれら異常の発生機序は明らかではないが、ドナー細胞核の初期化が不完全であるために、胚発生に関与する様々な遺伝子が正常に発現しないことがその原因の一つとして考えられる。しかしながらウシでは、胚発生に関与する遺伝子の特定やその発現動態の解明が十分になされておらず、体細胞クローン胚を含めた初期胚の遺伝子発現解析が極めて重要な課題となっている。

本総説では、これまでに筆者がウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現制御機構に関して取り組んできた研究の中から、ウシ体細胞クローン胚における胚発生および組織分化に関与する遺伝子群の発現動態と遺伝子発現制御因

子の一つであるDNAメチル化レベルの変化に関する知見<sup>7)</sup><sup>10)</sup>を概説するとともにウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現制御に関する知見をいくつか紹介したい。

#### 1. ウシ体細胞クローン胚の初期発生過程における mRNA 発現動態

前述したように、各種哺乳動物の体細胞クローンにみとめられる様々な異常は、体細胞核の初期化不全による遺伝子発現異常に起因する可能性が早くから指摘されていた。そこで、ウシ体細胞クローン作出の成功直後から体細胞クローン胚の遺伝子発現解析が行われてきた<sup>11)</sup><sup>13)</sup>。それらの概要はNimannらの総説<sup>14)</sup><sup>15)</sup>に詳しいが、当初の予測通り、ウシ体細胞クローン胚では胎盤形成に関与する遺伝子や妊娠認識機構に関与する遺伝子発現に異常がみられることが明らかとなった。さらに、Wrenzyckiらは、ウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現がクローン胚の活性化法や体外培養環境によって変化することを示している<sup>13)</sup>。しかしながら、ウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現解析に関しては、解析サンプルとして複数の胚をまとめて処理したものが多く、個々の体細胞クローン胚の遺伝子発現を比較解析した報告は少なかった。体細胞クローン胚は同時期に作出した胚のなかでも着床や個体発生能力に差があり、遺伝子発現にバラツキが存在する可能性が高い。そのため個々の胚を個別にサンプリングし、その遺伝子発現を解析する必要がある。さらに遺伝子発現の比較対象として体外受精胚を用いる場合が多いが、体外受精胚は体細胞クローン胚と

\* 連絡者：澤井 健 (さわい けん)  
(岩手大学農学部)  
〒020-8550 岩手県盛岡市上田3丁目18-8  
TEL/FAX 019-621-6259

同様にいくつかの遺伝子における発現動態の異常が報告されており<sup>15)</sup>、初期胚の遺伝子発現を比較解析するためには、様々な手法で作出された胚を用いることが望ましい。そこで我々は、ウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現を個々の胚から抽出した RNA を用いて RT-リアルタイム PCR を行い、体細胞核移植 (NT-SC)、受精卵核移植 (NT-EM)、体外受精 (IVF)、体内受精体内発生 (Vivo) および単為発生 (PA) に由来するウシ胚盤胞期 (BC) 胚の様々な遺伝子における mRNA 発現量を比較解析した<sup>8)</sup>。その結果、NT-SC 胚では、胚発生や胎子発育に重要な役割をもつ IGF 関連遺伝子の発現頻度 (表-1) および mRNA 発現量に異常が認められた (IGF 結合タンパク質 (IGFBP) -2, -3 の例を示す: 図-1, a, c)。また、

表-1 ウシ胚盤胞期胚における IGF 関連遺伝子の発現頻度

胚数	増幅産物が確認された胚数 (%)			
	IGF-Ir	IGF-IIr	IGFBP-2	IGFBP-3
NT-SC	12 (100)	3 (25.0) <sup>a</sup>	12 (100)	6 (50.0) <sup>a</sup>
NT-EM	12 (100)	9 (75.0) <sup>b</sup>	12 (100)	12 (100) <sup>b</sup>
IVF	12 (100)	10 (83.3) <sup>b</sup>	12 (100)	9 (75.0) <sup>ab</sup>
Vivo	12 (100)	11 (91.7) <sup>b</sup>	12 (100)	11 (91.7) <sup>ab</sup>
PA	12 (100)	6 (50.0) <sup>ab</sup>	12 (100)	11 (91.7) <sup>ab</sup>

P<0.05 at least.

表-2 各発生段階における IGF 関連遺伝子の発現頻度

発生段階	増幅産物が確認された胚数 (%)				
	IGF-II	IGF-Ir	IGF-IIr	IGFBP-2	IGFBP-3
BC NT-SC	0/14 (0)	14/14 (100)	3/14 (21)	14/14 (100)	7/14 (50)
BC Vivo	0/14 (0)	14/14 (100)	12/14 (86)	14/14 (100)	13/14 (93)
EL NT-SC	5/7 (71)	5/7 (71)	7/7 (100)	7/7 (100)	5/7 (71)
EL Vivo	7/7 (100)	7/7 (100)	7/7 (100)	7/7 (100)	7/7 (100)

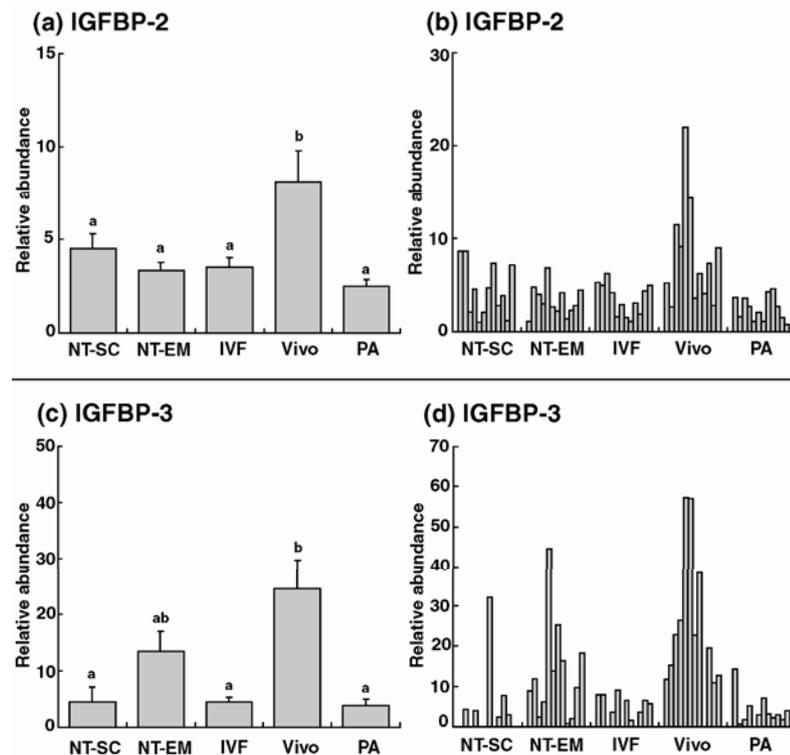


図-1 ウシ胚盤胞期胚における IGFBP 遺伝子の mRNA 発現量

ウシ体細胞クローン胚の mRNA 発現の特徴として個々の胚における mRNA 発現量のバラツキが顕著であることが明らかとなった (図-1, b, d)。

しかしながら、これら発現異常のみとめられた遺伝子群にはその後の伸長期 (EL) までの発育にとまない mRNA の発現頻度 (表-2) や発現量 (図-2) が正常化する遺伝子 (IGFBP-2) と、継続的に発現異常がみとめられる遺伝子 (IGFBP-3) が混在することが明らかとなった<sup>9)</sup>。Bertolini ら<sup>16)</sup> は、ウシ BC 胚では IGF 関連遺伝子および Glut 関連遺伝子の発現動態が体外培養を行った IVF 胚と Vivo 胚とは異なるものの EL 期においては両者に差がみとめられなくなることを報告しており、今回の我々が明らかにしたウシ体細胞クローン胚の EL 期胚における遺伝子発現異常は、BC 期までの体外培養による影響ではなく NT-SC 胚の遺伝子発現の特徴を示すものと考えられる。

## 2. ウシ体細胞クローン胚の組織分化関連遺伝子の発現動態

ウシ NT-SC 胚では BC 期におこる内部細胞塊 (ICM) および栄養膜細胞 (TE) への分化異常が報告されているが<sup>17)-18)</sup>、その原因は不明である。さらに、ウシ NT-SC 胚の受胎率低下や高頻度での流産の発生は、NT-SC 胚の胎盤形成異常が原因の一つと考えられている

が、ウシなど家畜における胎盤形成、すなわち胚の組織分化を制御する遺伝子やその発現動態は明らかではない。そこで我々は、マウス初期胚で研究が進む ICM と TE の分化制御に関する分子機構<sup>19)-22)</sup> を参考に、ウシ初期胚の ICM および TE 組織における OCT-4, CDX2, TEAD4, GATA3, NANOG, FGF4 各遺伝子の発現解析を行った<sup>7)</sup>。ウシ初期胚においては、OCT-4 が ICM および TE 両方に発現することが知られているが<sup>23)-24)</sup>、その他の遺伝子の ICM および TE における発現量に関しては詳細な解析が行われていなかった。今回我々は、ウシ初期胚では OCT-4, NANOG および FGF4 遺伝子が TE と比較して ICM において高い発現を示すこと、逆に CDX2 においては TE 組織で高発現であることを明らかにし、さらにウシ初期胚でも TEAD4 遺伝子が発現することを初めて見出した<sup>7)</sup>。これらの結果は、マウス胚同様にウシ初期胚においても

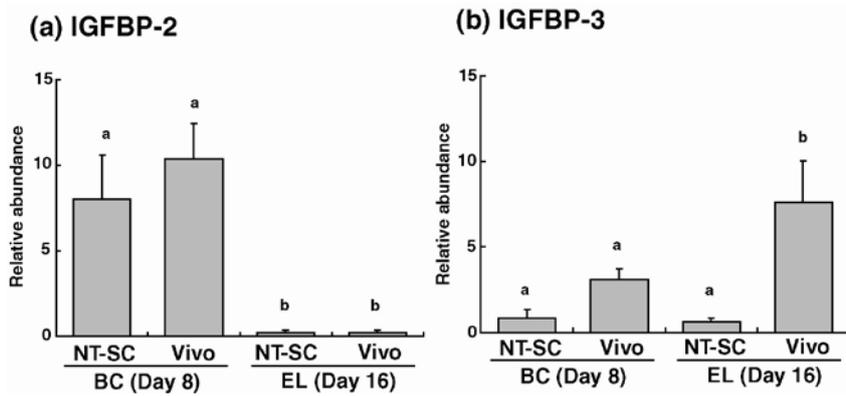


図-2 胚発生にともなう IGFBP 遺伝子の mRNA 発現の変化

ICM および TE への組織分化制御に、OCT4、CDX2、TEAD4、GATA3、NANOG、FGF4 遺伝子が関与することを示唆するものである<sup>7)</sup>。さらに、ウシ NT-SC 胚の BC 期および EL 期におけるこれら組織分化制御遺伝子の発現動態を解析することにより、ウシ NT-SC 胚の組織分化制御機能を評価した結果、ウシ NT-SC 胚における OCT4、NANOG、FGF4 遺伝子発現量は ICM および TE とともに低いことが明らかとなった<sup>7)</sup>。一方 EL 期では、全ての遺伝子発現量において Vivo 胚と NTSC 胚間に有意な差は認められなかった。これらの結果より、

### 3. ウシ体細胞クローン胚の発生にともなう DNA メチル化レベルの変化

これまで述べてきたような NT-SC 胚の遺伝子発現異常の発生原因は明らかではないが、NT-SC 胚では遺伝子発現を制御する DNA メチル化などエピゲノムの特異性が初期胚の遺伝子発現異常を引き起こしていることが考えられる。実際に Kang ら<sup>25) -27)</sup> は、ウシ NT-SC 胚における BC 期での satellite I 領域の DNA メチル化異常を明らかにしており、さらにウシ NT-SC 胚においてはゲノム全体の DNA メチル化レベルの異常も明らかになっている<sup>28)</sup>。上記したようにウシ初期胚では胚の発生にともなう遺伝子発現の変化がみとめられることから、それら遺伝子の発現制御を担う DNA メチル化レベルが胚発生にともなうどのように変化するかを明らかにすることはウシ NT-SC 胚の遺伝子発現制御機構の解明にとって重要となる。そこで我々は、ウシ初期胚の各発生段階における satellite I 領域の DNA メチル化レベルについて解析した<sup>10)</sup>。その結果 (図-3)、Vivo 胚の DNA メチル化割合は胚発生にともない有意に増加し、なかでも EL 期胚の胚盤 (ED) は TE よりも高メチル化状態にあることが明らかとなった。一方、NT-SC 胚では BC 期における DNA メチル化割合が Vivo 胚と比較して有意に高い値を示すが、その後の胚発生によって EL 期 TE では脱メチル化されることが明らかとなった。最終的に、EL 期 NT-SC 胚の DNA メチル化レベルは Vivo 胚と比較して差はみとめられなくなった。

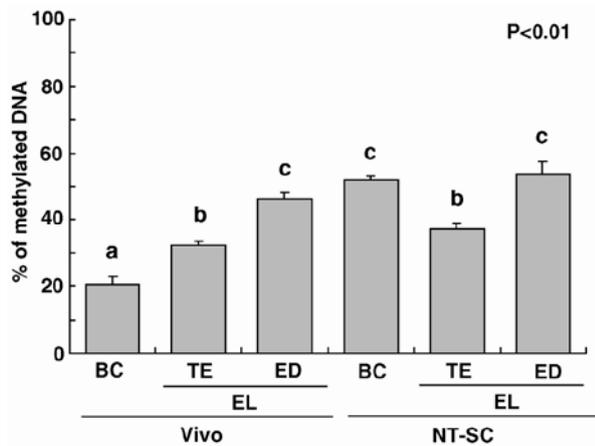


図-3 胚発生にともなう DNA メチル化レベルの変化

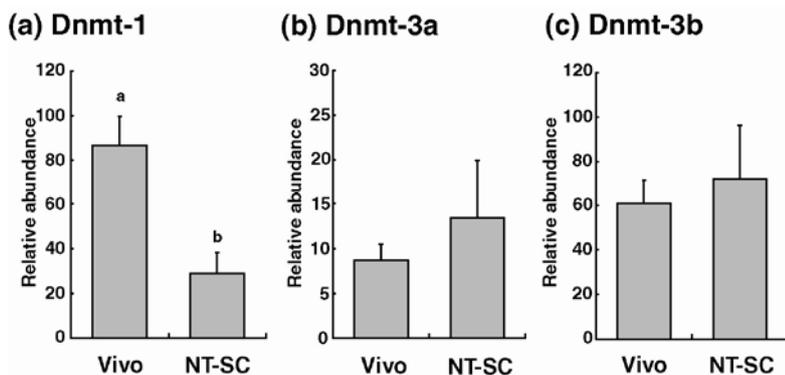


図-4 ウシ胚盤胞期胚における Dnmt 遺伝子の mRNA 発現量

また、DNA メチル化酵素 (Dnmt) 遺伝子の発現量を解析した結果、NT-SC 胚では BC 期における Dnmt-1 発現量が Vivo 胚よりも有意に低い値を示した (図-4)。Dnmt-1 は主に維持型メチル化を、Dnmt-

3a および Dnmt-3b はともに de novo 型メチル化に重要な役割をもつことが知られており、ウシ NT-SC 胚では EL 期にかけて維持メチル化機能の低下による受動的な脱メチル化が起こり DNA メチル化状態が正常化する可能性が示唆された<sup>10)</sup>。このことから、ウシ NT-SC 胚における BC 期での遺伝子発現異常は、胚の高い DNA メチル化レベルに起因し、その後、胚発生にともなって DNA が脱メチル化することにより一部の遺伝子発現が正常化することが示された<sup>10)</sup>。

#### 4. 今後の展開について

これまで多くの研究者によって体細胞クローン胚のエピジェネティクス異常が報告されており<sup>11) -13)</sup>、今回示した我々の結果とあわせてウシ体細胞クローン胚の様々な遺伝子の発現動態が Vivo 胚や IVF 胚などと異なることは明らかである。しかしながら、子宮内に移植された体細胞クローン胚の全てが死滅するわけではなく、一部の体細胞クローン胚は着床し、分娩にまで至る。さらに今回、我々が示したように初期胚の段階で発現異常がみとめられた遺伝子においても、胚の発生にともなって正常な発現パターンを示す遺伝子が存在する。このことは個々の遺伝子の発現制御が胚発生にともなって変化していることを示すものであり、体細胞クローン胚の異常原因の解明には発現が正常化する遺伝子と発現異常が継続する遺伝子における発現制御の違いなどを明らかにする必要がある。

遺伝子発現の制御には様々な機構が存在するが、そのなかでも DNA メチル化とヒストン修飾などがよく知られている。今回、体細胞クローン胚の DNA メチル化について我々の研究結果の一部を紹介したが、個々の遺伝子における DNA メチル化パターンや、ヒストン修飾状態の検討など残された課題も多い。そこで現在、我々は様々なエピジェネティクス解析手法を用いてそれらの解析を進めている。また、我々はヒストン脱アセチル化阻害剤の一種であるトリコスタチン A (TSA) 処理によるウシ体細胞クローン胚の遺伝子発現の人為的制御を目指している。TSA 処理による NT-SC 胚の初期発生および体細胞クローン作出効率の向上は、マウスにおいて報告<sup>29) -30)</sup> されているが、他の動物種においても同様の効果が期待されている。我々の研究においても TSA 処理によってウシ NT-SC 胚の胚盤胞期までの発生率の向上が確認されており (未発表)、これらエピジェネティクス制御薬剤により将来的にはウシ体細胞クローン産子の作出効率の改善が可能となるであろう。さらに最近、我々は、マウス NT-SC 胚においては、X 染色体不活化に関

与する Xist 遺伝子が過剰に発現することを明らかにし、さらに Xist 遺伝子発現の正常化させると体細胞クローン個体の作出効率が向上することを報告した<sup>31)</sup>。我々は同時に、ウシ NT-SC 胚における Xist 遺伝子の過剰発現を明らかにしており<sup>31)</sup>、ウシにおいても Xist 遺伝子の発現制御によって体細胞クローン個体の作出効率向上が期待できる。これらの課題はウシ体細胞クローン胚の発生異常原因の解明やクローン技術の改善のみならず、未だ不明な点の多い家畜胚の発生機構の理解にも大きく貢献できると考えている。

本稿に掲載したすべての図表は、文献 8) -10) から改訂引用したものである。

#### 引用文献

1. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813, 1997.
2. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256-1258, 1998.
3. Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 66: 6-13, 2002.
4. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282: 2095-2098, 1998.
5. Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev* 10: 369-378, 1998.
6. Zakhartchenko V, Alberio R, Stojkovic M, Prella K, Scherthaner W, Stojkovic P, Wenigerkind H, Wanke R, Duchler M, Steinborn R, Mueller M, Brem G, Wolf E. Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. *Mol Reprod Dev* 54: 264-272, 1999.
7. Fujii T, Moriyasu S, Hirayama H, Hashizume T, Sawai K. Aberrant expression patterns of genes involved in segregation of inner cell mass and trophectoderm lineages in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Cell Reprogram* 12: 617-625, 2010.

8. Sawai K, Kageyama S, Moriyasu S, Hirayama H, Minamihashi A, Onoe S. Analysis of mRNA transcripts for insulin-like growth factor receptors and binding proteins in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 7: 189-198, 2005.
9. Sawai K, Kageyama S, Moriyasu S, Hirayama H, Minamihashi A, Onoe S. Changes in the mRNA transcripts of insulin-like growth factor ligand, receptors and binding proteins in bovine blastocysts and elongated embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *J Reprod Dev* 53: 77-86, 2007.
10. Sawai K, Takahashi M, Moriyasu S, Hirayama H, Minamihashi A, Hashizume T, Onoe S. Changes in the DNA methylation status of bovine embryos from the blastocyst to elongated stage derived from somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 12: 15-22, 2010.
11. Daniels R, Hall V, Trounson AO. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol Reprod* 63: 1034-1040, 2000.
12. Daniels R, Hall VJ, French AJ, Korfiatis NA, Trounson AO. Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques. *Mol Reprod Dev* 60: 281-288, 2001.
13. Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, Niemann H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod* 65: 309-317, 2001.
14. Niemann H, Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Brambrink T, Kues WA, Carnwath JW. Gene expression patterns in bovine in vitro-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. *Cloning Stem Cells* 4: 29-38, 2002.
15. Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev* 17: 23-35, 2005.
16. Bertolini M, Beam SW, Shim H, Bertolini LR, Moyer AL, Famula TR, Anderson GB. Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 63: 318-328, 2002.
17. Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim HN, Oh KB, Son DS, Park H, Lee KK, Han YM. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol Reprod* 67: 487-492, 2002.
18. Li X, Kato Y, Tsunoda Y. Comparative studies on the mRNA expression of development-related genes in an individual mouse blastocyst with different developmental potential. *Cloning Stem Cells* 8: 214-224, 2006.
19. Home P, Ray S, Dutta D, Bronshteyn I, Larson M, Paul S. GATA3 is selectively expressed in the trophectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression. *J Biol Chem* 284: 28729-28737, 2009.
20. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95: 379-391, 1998.
21. Nishioka N, Yamamoto S, Kiyonari H, Sato H, Sawada A, Ota M, Nakao K, Sasaki H. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev* 125: 270-283, 2008.
22. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 2005; 123: 917-929.
23. Degrelle SA, Campion E, Cabau C, Piumi F, Reinaud P, Richard C, Renard JP, Hue I. Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Dev Biol* 288: 448-460, 2005.
24. Kuijk EW, Du Puy L, Van Tol HT, Oei CH, Haagsman HP, Colenbrander B, Roelen BA. Differences in early lineage segregation between mammals. *Dev Dyn* 237: 918-927, 2008.
25. Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet* 28: 173-177, 2001.
26. Kang YK, Lee HJ, Shim JJ, Yeo S, Kim SH, Koo DB, Lee KK, Beyhan Z, First NL, Han YM. Varied patterns of DNA methylation change between different satellite regions in bovine preimplantation development. *Mol Reprod Dev* 71: 29-35, 2005.
27. Kang YK, Park JS, Koo DB, Choi YH, Kim SU, Lee KK, Han YM. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *Embo J* 21: 1092-1100, 2002.
28. Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant

- reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13734-13738, 2001.
29. Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 340: 183-189, 2006.
30. Rybouchkin A, Kato Y, Tsunoda Y. Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol Reprod* 74: 1083-1089, 2006.
31. Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte AP, Tian XC, Yang X, Ishino F, Abe K, Ogura A. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science* 330: 496-499, 2010.