

第 60 回日本産科婦人科学会・学術講演会

シンポジウム 2 「卵の発育・成熟・老化機構の解明と臨床応用」

(4) 遺伝子発現プロファイリングによる卵の加齢機構の探索

慶應義塾大学医学部産婦人科

助教 浜谷 敏生

Global Gene Expression Change during Age-related Loss of Oocyte Quality in Mice

Toshio HAMATANI

Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Tokyo

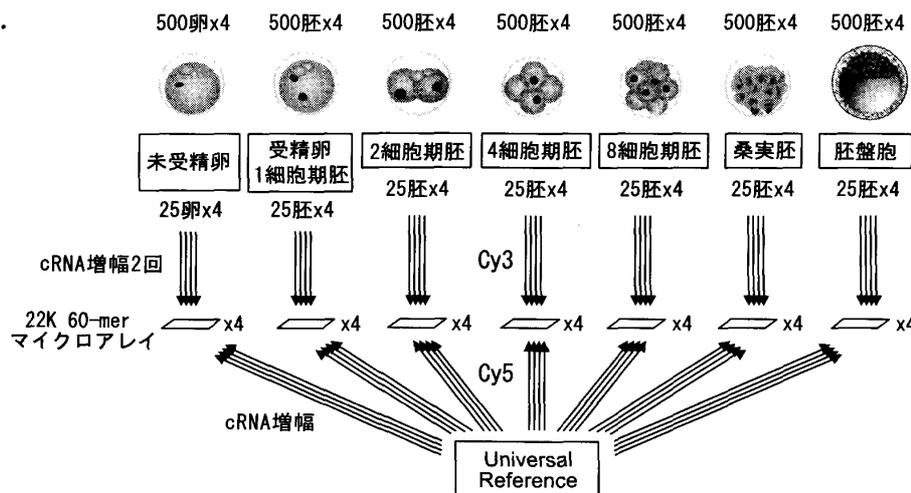
緒 言

ヒト女性の妊孕性は 30 歳代半ばで大きく下降する。これには加齢による子宮内膜着床能の減退や卵子数の減少も寄与していると考えられるが、卵の加齢変化が最も重要な原因である。なぜなら、若年健康女性から提供されたドナー卵を高齢不妊症患者に対する体外受精-胚移植 (IVF-ET) に供した場合、その妊娠率は若年不妊症患者の IVF-ET における妊娠率と変わらないからである。近年、MII 期あるいは GV 期において、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¹⁾²⁾。しかし、この治療法についてはその有効性および安全性に対する科学的論拠の不足が指摘されている。このように、卵の加齢変化に関わる分子生物学的機序の解明は、不妊症治療における最重要課題のひとつである。一方、卵は受精後に胚性ゲノムを活性化させ (zygotic genome activation [ZGA]), 全能性・不死性を備えた初期胚を生む。また、クローン胚においては、体細胞核をリプログラミングして、senescence を解き分化全能性を誘導する。このような卵はある意味「不死」の細胞と考えられるのに、本当に加齢変化が

起こるのか、起こるのであればいかなるメカニズムが関与しているのか？生殖医学や再生医学のみならず基礎生物学的な観点からも非常に興味深い。

我々は、上記の卵細胞質特性およびその加齢変化に関与する分子メカニズム解明するため、網羅的な遺伝子発現解析を目指した。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 Index³⁾ 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) が開発され⁴⁾、卵細胞および着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングが可能となった。

Key Words: Oocyte, Aging, Telomere, Microarray, Transcriptome



【図1】 実験方法：ハイブリダイゼーション・デザイン

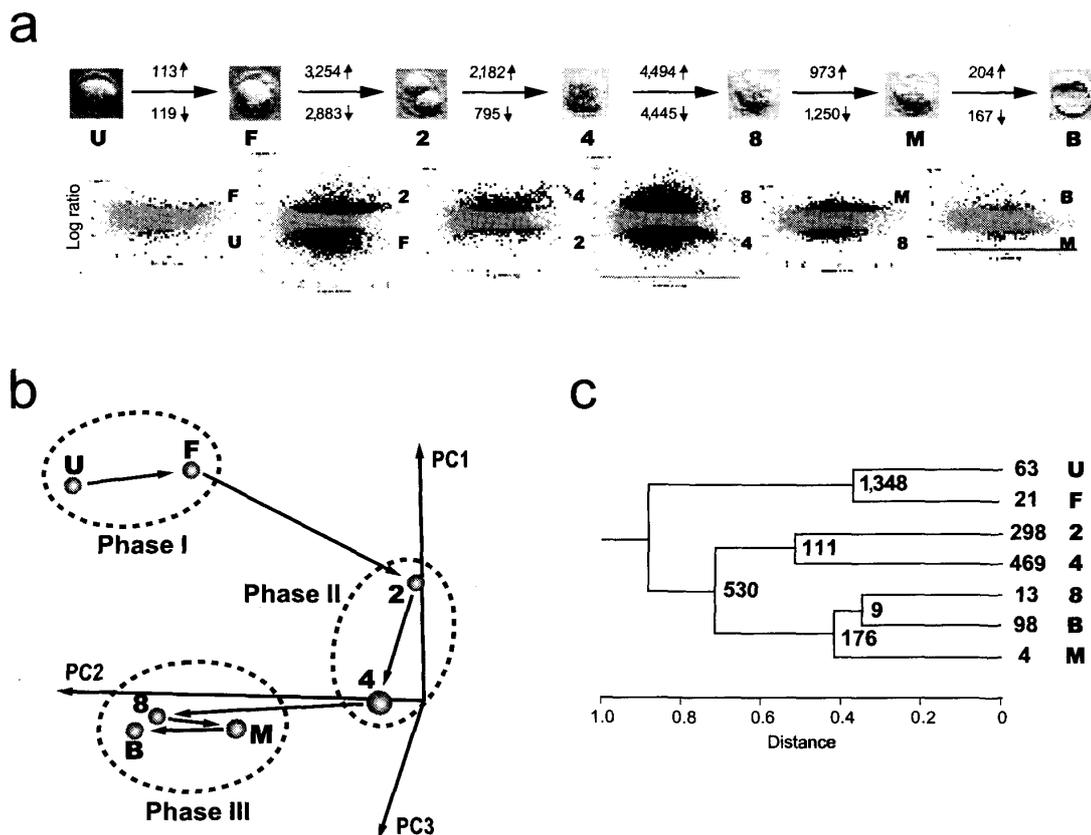
着床前期各ステージの胚を、それぞれ post-hCG 21h, 1.5 days post-coitum (dpc), 2.0 dpc, 2.5 dpc, 3.0 dpc で採取し、500 個ずつプールして1セットとしたものを、それぞれ4セットずつ集めた。各々のセットからそれぞれ mRNA を抽出、2-round の cRNA 増幅を行い、Cy3 標識した。1-round の cRNA 増幅で Cy5 標識したコントロール・サンプル、Universal reference とともに、マイクロアレイにおいてハイブリダイゼーションに供した。Hamatani, et al. *Developmental Cell* 2004 : 6 ; 117—131 より改変。

方法 1

まず最初に、正常な卵細胞質に含まれる転写産物を明らかにするため、C57BL/6J マウス各ステージ着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングを行った。未受精卵、受精卵、2細胞期胚、4細胞期胚、8細胞期胚、桑実胚、胚盤胞について、それぞれ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 反応を反復して行うことにより 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 においてハイブリダイゼーションに供した(図1)⁵⁾。以下、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/>)⁶⁾を用いた。また、データ解析には、NIA array analysis (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/>)⁷⁾、TIGR MultiExperiment Viewer (MeV) (<http://www.tm4.org/mev.html>)⁸⁾、GenMAPP (<http://www.genmapp.org/>)⁹⁾を用いた。

結果・考察 1

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、21,939 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、3,254 の遺伝子が発現上昇、2,883 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、4,494 の遺伝子が発現上昇、4,445 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12,179 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)。また、階層クラスタリングでは各ステージに特



【図2】 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

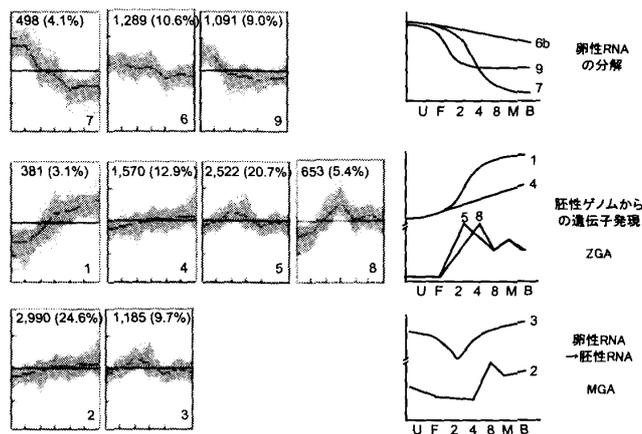
U, 未受精卵; F, 受精卵; 2, 2細胞期胚; 4, 4細胞期胚; 8, 8細胞期胚; M, 桑実胚; B, 胚盤胞. (A)隣り合う2ステージ間における対比較. 各々の scatter plotにおいて, 縦軸は Log Ratio, すなわち発現比, 横軸は Cy3・Cy5 平均信号強度を示し, 有意な発現上昇を認めた遺伝子を赤色のドットで, 有意な発現低下を認めた遺伝子を緑色のドットで示し, これらの遺伝子の数も付した. (B)主成分分析. 主成分分析において, 着床前期胚は, 未受精卵と受精卵の Phase I, 2~4細胞期の Phase II, 8細胞期以降の Phase III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: 117-131 より改変.

異的な発現を示した遺伝子が抽出された.

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, 今研究で初めて観察された現象であり, MGA (Mid-preimplantation gene activation) と称した. 形態的に最も劇的な変化を示す8細胞期以降に, 少数の遺伝子にしか発現上昇を認めていない

め, この MGA 産物が, その後に起こるコンパクト化, 胚盤胞腔の形成, 内細胞塊と栄養外胚葉への分化などに極めて重要な役割を果たしていると考えられた.

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 12,179 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



【図3】 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. 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2と3を含み, 卵性 RNA が分解を受け一方, 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. Hamatani, et al. *Developmental Cell* 2004 : 6 : 117 - 131 より改変.

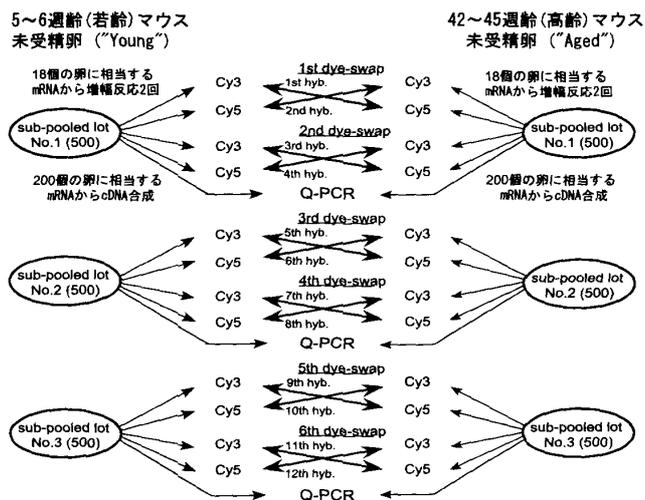
る遺伝子発現パターンの多くが, wave-like pattern, すなわち, 発現上昇の後, 速やかに抑制されるパターンであり, ステージ特異的な遺伝子発現がグローバルに存在することが明らかとなった. 今研究で観察された9つの発現パターンは, さらに大きく3つのグループに分類された. 第1のグループは, クラスタ1(381 遺伝子), クラスタ4(1,570 遺伝子), クラスタ5(2,522 遺伝子), クラスタ8(653 遺伝子)を含み, 新たに構築された胚性ゲノムからの遺伝子発現であり, ZGA に相当した. 一方, 第2のグループは, クラスタ7(498 遺伝子)とクラスタ9(1,091 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2(2,990 遺伝子)とクラスタ3(1,185 遺伝子)で, 卵性

RNA が分解を受け一方, いくらか遅れて胚性 RNA が作られるような遺伝子発現のパターンである. MGA を構成する遺伝子の多くがこのグループに含まれた. なお, クラスタ6(1,289 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.

卵形成過程に大量の RNA や蛋白質が蓄えられるが, 未受精卵(Metaphase II)においてはすべ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, ほとんどすべての卵性 RNA が2細胞期までに分解されると考えられてきた¹⁰⁾¹¹⁾. 我々のデータにおいても, 確かにクラスタ9はこれに相当するが, クラスタ6やクラスタ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¹²⁾. ここで, それぞれのクラスタにはどのような GO term(遺伝子の機能を表すキーワード)をもった遺伝子が多いのか GenMAPP を用いて統計学的検討を加えた. クラスタ7では, サークァディアン・リズム, G 蛋白, M 期有糸分裂, またクラスタ9では, 接着分子, ゴルジ装置, DNA 複製, 細胞内シグナル伝達系などの GO term が有意に高頻度に認められた. さらに, 卵細胞には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が, Zeng and Schultz et al. 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¹³⁾. このように, 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胚発生に重要な遺伝子群と考えられた.

方法 2

「方法1」では, 卵で発現する遺伝子のリストあるいは全体像を見たことになるが, それでは加齢により卵の遺伝子発現プロファイルはどのように



【図4】若齢マウス卵と高齢マウス卵について遺伝子発現プロファイルを比較検討するための実験デザイン(方法2)。C57BL/6Jの5～6週齢マウスと42～45週齢(生殖年齢末期)マウスに過排卵刺激をした後、未受精卵を500個ずつ採取し、1つの“sub-pooled lot”としたものを、3 lots 用意した。それぞれの lot から、mRNA 抽出、RNA 増幅反応後、Cy3 標識あるいは Cy5 標識で標識し、マイクロアレイに供した。Hamatani, et al. Human Molecular Genetics 2004 : 13 : 2263 — 2278 より改変。

変化するのであろうか? C57BL/6J の5～6週齢マウスと42～45週齢(生殖年齢末期)マウスに過排卵刺激を施した後、未受精卵を500個ずつ採取し、1つの“sub-pooled lot”としたものを、3 lots 用意した(図4)。それぞれの lot から、mRNA 抽出、cRNA 増幅の後、Cy3 標識あるいは Cy5 標識で標識し、マイクロアレイに供した¹⁴⁾。ここでは、universal reference は用いず、若齢マウス卵の lot と高齢マウス卵の lot を直接比較した。それぞれのマウスから生物学的に独立した(別の日に集めた)3つの lot を作製し、cRNA 増幅反応のバイアスも考慮して、同じ lot から RNA 増幅を再度別の日に行いもう1組のターゲットを作製した。さらに、2-dye システム(Cy3 で標識したターゲットと Cy5 で標識したターゲットを1つのマイクロアレイ上で同時にハイブリダイゼーションさせる)のバイアスも考慮し、dye swap(ターゲット作製時に Cy3 と Cy5 を入れ替えて標識)を行ったため、総計12回のハイブリダイゼーションを行った(図4)。

結果・考察 2

母体加齢による卵細胞の遺伝子発現プロファイルの変化

まず、定量的リアルタイム逆転写 PCR(qPCR)あるいは *In situ* hybridization を用いて、マイクロアレイの結果を検証した。50 遺伝子について qPCR を行い、高齢マウス卵と若齢マウス卵における発現比(log-ratio: Aged/Young)を求めて、マイクロアレイの結果と比較したところ、相関係数は0.80と良好な相関が得られた(図5a)。

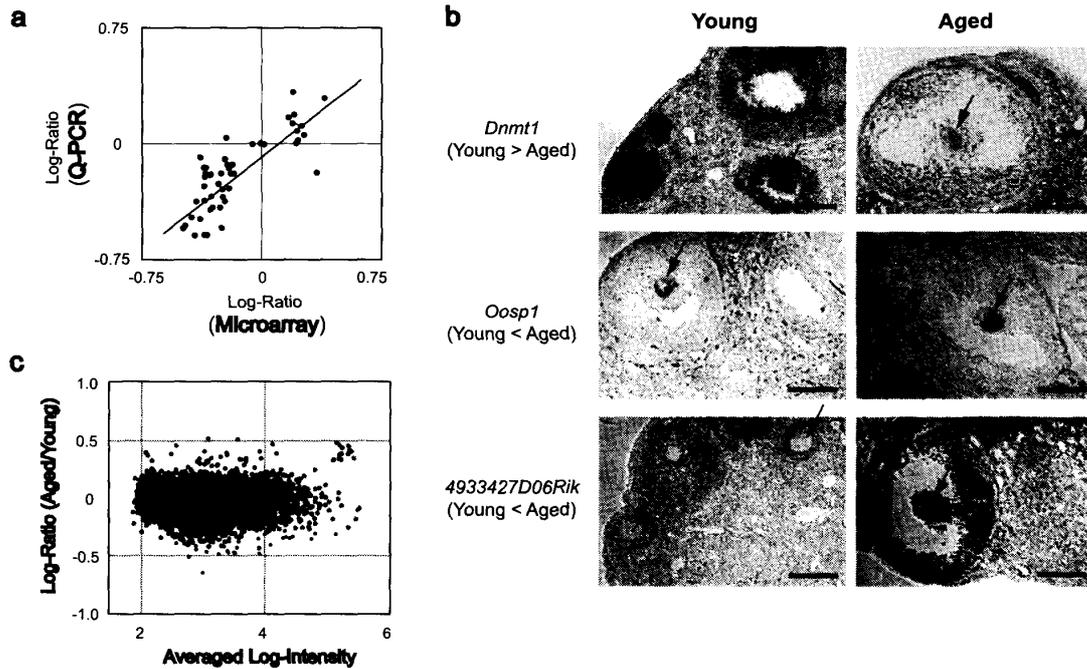
さらに、いくつかの遺伝子について *in situ* hybridization を用いて卵の加齢による卵巣切片における発現変化を検討したところ、マイクロアレイの結果と同様の発現変化が観察された(図5b)。

加齢による卵の遺伝子発現変化の全体像を見るために、まず対比較を行った。その結果、若齢マウス卵では449遺伝子が有意に高発現を示し、高齢マウス卵では81遺伝子が有意に高発現を示した。マイクロアレイに載っている21,393遺伝子のうち、合計530遺伝子しか有意な発現変化を示さなかったことから、非特異的に大部分のRNAが分解されたわけではなく、ある特異的なRNAのみが発現変化を示し、それらが加齢変化に重要な役割を果たしていると考えられた。

次に、これら530の遺伝子に関して、どのようなGO termをもった遺伝子が多いのか GenMAPP を用いて統計学的検討を加えた(表1)。

まず、高齢マウス卵ではミトコンドリア・ゲノムにコードされた遺伝子(*mt-Nd3*, *mt-Atp6*, *mt-Co1-3*など)の発現が増加し、ミトコンドリア機能やエネルギー代謝に関するGO termを持つ(核内ゲノムにコードされた)遺伝子(*Sdha* や *Atp5a1* など)の発現が低下していた(表1)。

ミトコンドリアでは、呼吸鎖と連動して、嫌氣的解糖系よりもはるかに高いエネルギーが産生される。しかし、ミトコンドリアには核にあるようなヒストンやDNA修復機構がないため、呼吸鎖から漏出する活性酸素がミトコンドリア・ゲノムを損傷し、ミトコンドリアの機能が傷害されることを反映していると考えられた。



【図5】(a) 定量的リアルタイム逆転写PCR(qPCR)によるマイクロアレイ結果の検証. 50 遺伝子を選んでqPCRを行い, 各遺伝子について, 高齢マウス卵と若齢マウス卵における発現の比, $\log\text{-ratio}(\text{Aged}/\text{Young})$ を求め(縦軸), マイクロアレイの結果(横軸)と比較した. (b) *in situ* hybridizationによるマイクロアレイ結果の検証. *Dnmt1*は, マイクロアレイの結果と同様に, 卵細胞で加齢による発現低下を認めた. 逆に, *Oosp1*や新規遺伝子4933427D06Rikでは, マイクロアレイの結果と同様, 卵細胞で加齢による発現増加を認めた. (c) 対比較 pairwise comparisonによるScatter plot. 縦軸はLog Ratio, すなわち高齢マウス卵と若齢マウス卵の2サンプル間における発現比, 横軸は緑色・赤色(Cy3・Cy5)シグナル双方の平均信号強度を示す. 若齢マウス卵あるいは高齢マウス卵で有意に高発現を示した遺伝子を, それぞれ緑色, 赤色のdotで示した. Hamatani, et al. Human Molecular Genetics 2004: 13: 2263—2278より改変.

一方, ミトコンドリアの機能が低下しATP産生能が低下すれば, 細胞骨格の制御に障害を来すことが知られているが¹⁵⁾, 高齢マウス卵では細胞骨格に関連したGO termを持つ遺伝子(*Hook1*, *Tuba2*, *Tubd1*など)の発現も低下していた(表1). したがって, 高齢マウス卵では, ミトコンドリア機能やエネルギー代謝が低下し, ATP産生が低下することにより, 微小管による染色体分離が障害されやすい状況が存在すると考えられる. すなわち, このような背景が, 高齢妊娠における児の異数体の増加に寄与している可能性がある.

また, 高齢マウス卵では*IκBα*の発現が増加していた. *IκBα*はNFκBのサプレッサーであり*IκBα*とNFκBはミトコンドリア遺伝子の発現調節に重要であることが知られている¹⁶⁾. 例えば, *IκBα*によるNFκBの抑制が電子伝達系サブユ

ニット cytochrome c oxidase subunit III や cytochrome b などの発現を増加させることが既に報告されている¹⁶⁾. *IκBα*はミトコンドリア・ゲノムにコードされた遺伝子の発現が卵の加齢とともに増加することに寄与している可能性がある.

酸化ストレス防御やアンチ・アポトーシスに関連したGO termを持つ遺伝子(*Sod1*, *Txn1*, *Apacd*, *Bcl2l10/Div1*など)も高齢マウス卵で発現が低下し, 熱ショック蛋白などのシャペロンも発現低下を示した(*Hspa4*, *Hspa8*, *Hsp70-4*, *Cct1-3*, *Cct5*など). 体細胞における加齢では, 酸化ストレスが熱ショック蛋白やライソゾーム蛋白を減少させ, ユビキチン-プロテアソーム蛋白分解システムの能力を低下させることが知られている¹⁷⁾¹⁸⁾. この場合, 本来は劣化して分解されるはずの蛋白質が代謝されないまま蓄積し, 細胞機能が障害さ

【表 1】 卵細胞の加齢における遺伝子発現変化を特徴づける GO term

GO term カテゴリー		各カテゴリーを代表する 発現変化遺伝子
▲ Oxidative damages	▲ mitochondrial electron energy pathway (genes encoded by mitochondrial genome)	<i>mt-Nd3, mt-Atp6, mt-Co(Cox)1-3</i>
	▼ energy pathway and mitochondrial function (genes encoded by nuclear genome)	<i>Sdha, Sod1, Atp5a1, Idh3a, Mrpl9, Hmgcl</i>
▼ ATP production	▼ nucleotides and ATP metabolism	<i>Atp2c1, Atp6v1d, Atp10a, Adss2</i>
	▼ ATP-binding	<i>Nek1-2, Abcb6, Camk2g, Dhx32, Ddx48</i>
▼ Protection against stress	▼ anti-apoptosis	<i>Txnl, Apacd, Rnf34</i>
	▼ chaperone	<i>Hspa4, Hspa8, Hsp70-4, Cct1-3, Cct5</i>
	▼ ubiquitin-proteasome pathway	<i>Hip1, Ubc, Ube1c, Pama6, Pamb1, Psmc2</i>
▼ Regulation of cell cycle	▼ microtubule cytoskeleton	<i>Hook1, Tuba2, Tubd1, Rnf19, Kif3b</i>
	▼ chromosome segregation	<i>Smc4l1, Nin, Pcnt2</i>
	▼ genome stability	<i>Cggbp1, Fxr2h, Msh3, Exo1, Pms1, Tert</i>
Epigenetic modification	▼ polycomb	<i>Bmi1, Ezh2, Rybp, Sfmbt1</i>
	DNA methyltransferase	(▼) <i>Dnmt1o, Dnmt1s, Dnmt3L, Dmap1</i> (▲) <i>Dnmt3b</i>
Oocyte-specific genes	reproduction/gameteogenesis/ unknown function	(▼) <i>Vasa, Kit, Zp1-3, ePAD, Zfp38, Mater</i> (▲) <i>Oosp1, Nohma, 4933427D06Rik, IkBa</i>

れる¹⁹⁾²⁰⁾。卵細胞でもこれらと同様な老化メカニズムが存在し、細胞機能が障害されると考えられる。

ゲノム安定性に関する GO term を持つ遺伝子も加齢とともに発現が変化した。Telomere reverse transcriptase (*Tert*), CGG triplet repeat binding protein 1 (*Cggbp1*), Fragile X mental retardation-related protein 2 (*Fxr2h*), あるいは Mut H/L/S mismatch repair-related proteins (*Msh3, Exo1, Pms1*) など、いずれも早期老化に関係する遺伝子が、高齢マウス卵において発現低下を示した^{21)~25)}。今研究では、卵の加齢におけるテロメラーゼ (*Tert*) の発現低下に注目し、母体加齢による卵のテロメア長の変化についても検討を加えたので、後述する。

さらに、エピジェネティックなゲノム変化に関係する遺伝子も加齢とともに発現変化を示した。ポリコム遺伝子群 (高齢マウス卵において *Bmi1, Ezh2, Sfmbt1, Rybp1* など) が有意な発現低下) や DNA メチル基転移酵素 (高齢マウス卵において *Dnmt1o, Dnmt1s, Dnmt3L, Dmap1* は有意な発現低下, *Dnmt3b* は有意な発現増加) などである。

最後に、生殖に関連した GO term をもつ遺伝子や卵特異的遺伝子の発現も、マウス卵の加齢で変化した。RNA ヘリカーゼ (*Vasa/Ddx4*) や卵透明帯蛋白 *Zp1-3*, さらに卵細胞の細胞骨格制御に関与すると考えられている *ePAD*, 卵形成過程に重要な役割を果たす *c-Kit* や *Rnf35/Trim61* などが挙げられる。

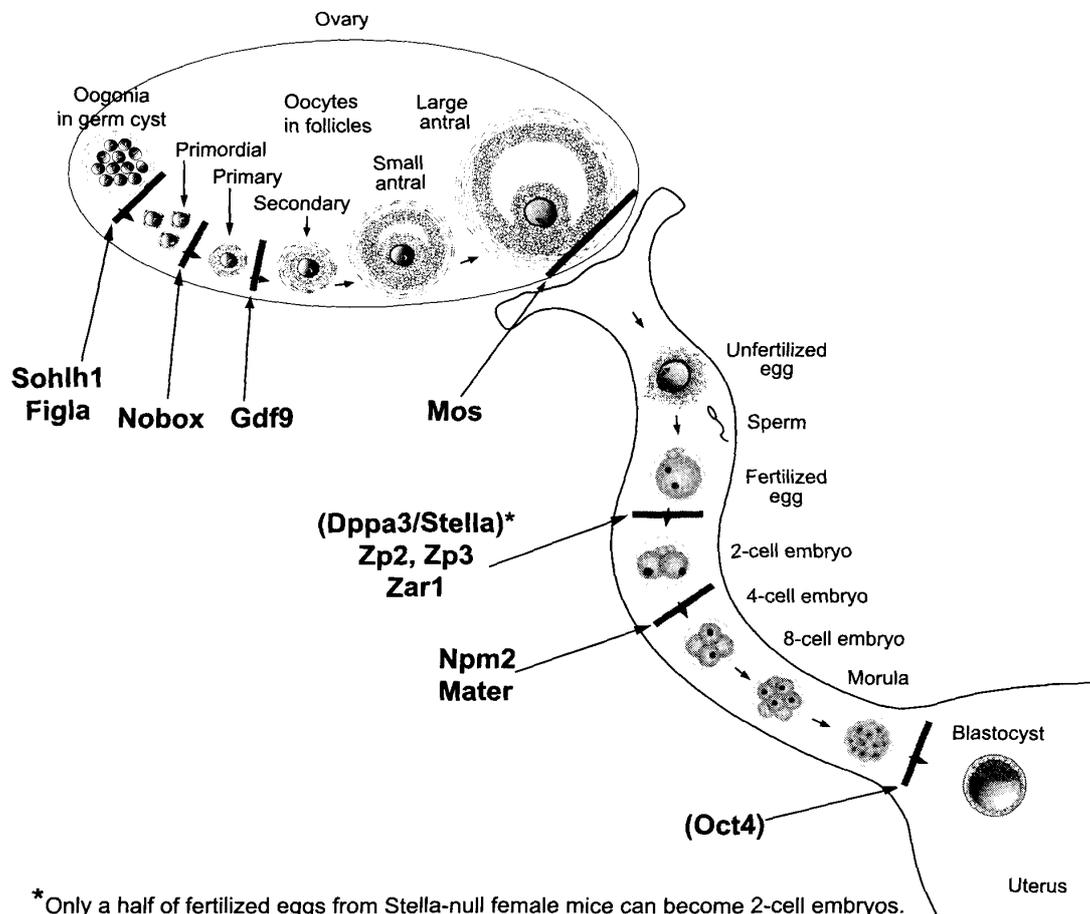
卵の加齢におけるテロメラーゼ発現・テロメア長の変化

染色体の末端にはテロメアと呼ばれる TTAGGG 配列の繰り返し構造があり、染色体末端の DNA 分解や染色体末端同士が融合する染色体組み換えから染色体末端を守っている。テロメラーゼはテロメアの延伸・維持に関与する逆転写酵素であり、*Terc* と呼ばれる鋳型 RNA と逆転写酵素活性を有する *Tert* 蛋白を内在する。体細胞ではテロメラーゼ活性は低く、加齢により、あるいは細胞分裂を繰り返すことにより、テロメア長が短縮し細胞寿命に至ることが知られている。

また、*Tert*(-/-)ノックアウトマウスは表現型に異常を認めないが、このノックアウトマウスか

【表2】 卵細胞の加齢における遺伝子発現変化と体細胞の加齢における遺伝子発現変化の比較

主な GO term カテゴリー	卵における加齢	脳や肝などの体細胞における加齢
ミトコンドリア機能, 酸化ストレス防御	↓	↓
テロメラーゼ (<i>Tert</i>)	↓	↓
DNA メチル酵素遺伝子	<i>Dnmt1o</i> ↓, <i>Dnmt1s</i> ↓, <i>Dnm3L</i> ↓, <i>Dnmt3b</i> ↑	<i>Dnmt1</i> ↓, <i>Dnmt3b</i> ↑ (in fibroblast senescence)
クロマチン・リモデリング関連遺伝子	<i>Hdac2</i> ↓, Polycombs (<i>Bmi1</i> など) ↓	→
生殖関連, 卵特異的遺伝子	RNA ヘリカーゼ (<i>Vasa</i> など) ↓, <i>Zp1-3</i> ↓, <i>Nalp</i> ↓, <i>Oosp</i> ↑	—
インスリン成長因子関連遺伝子	→	↑
炎症関連遺伝子	→	↑

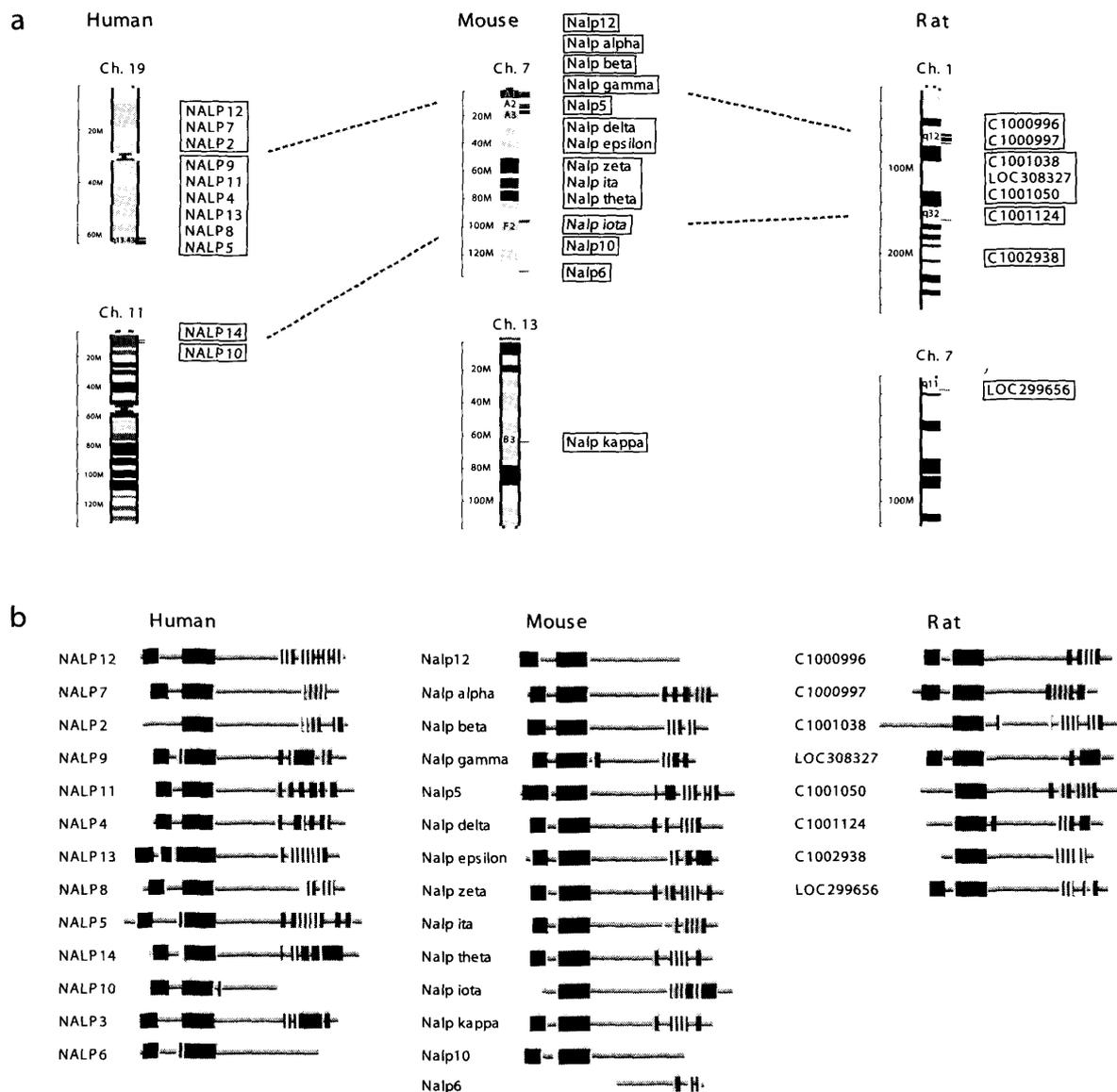


【図6】 卵特異的遺伝子に関するノックアウトマウスが示す表現型. Hamatani, et al. Reproduction 2008 : 135 : 581 — 592 より改変.

ら得られた体細胞ではテロメアが短くなっている²⁶⁾。さらに, *Tert* (+/-) 胚性幹細胞においてもテロメアの短縮が観察されたため²⁶⁾²⁷⁾, *Tert* はテロメアの維持に非常に重要であると考えられてい

る²⁸⁾。

このような *Tert* の発現を低下させた細胞における知見を踏まえ, 今研究では高齢マウス卵でテロメラーゼ (*Tert*) の発現が低下していたことに注



【図7 Nalpファミリーの種保存性。(a)卵特異的発現を示したマウス新規メンバー遺伝子およびヒトとラットにおけるホモログの染色体座位。(b)種を超えて保存されるアミノ酸ドメイン・モチーフ。Hamatani, et al. Human Molecular Genetics 2004: 13: 2263—2278より改変。

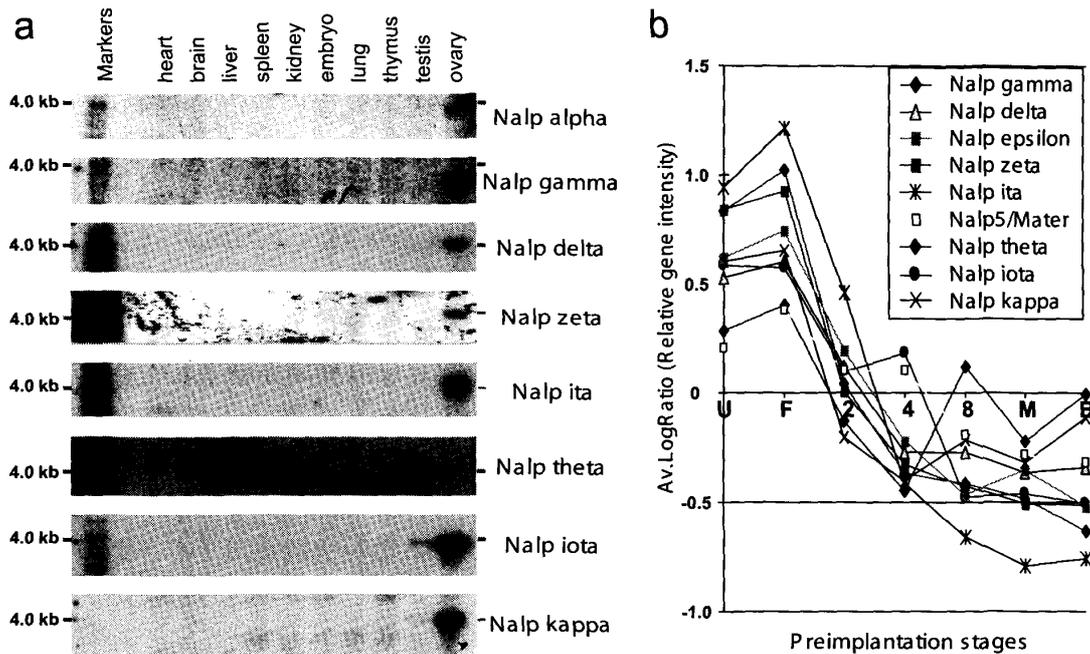
目した。すなわち、母体加齢による卵の *Tert* 蛋白の発現・活性およびテロメア長に変化について検討した。

まず、高齢マウス卵におけるテロメラーゼ (*Tert*) の RNA 発現の低下を、qPCR により確認した。高齢マウスと若齢マウス卵、それぞれのマウスから別の日に集めた3つの lot より mRNA を抽出、cDNA を合成し、qPCR を行った。qPCR の結果、高齢マウス卵における *Tert* の RNA 発現は 6.0 ± 1.4 (対 *Gapdh*) で、若齢マウス卵における RNA 発現 11.5 ± 1.6 (対 *Gapdh*) に比し、0.53 倍と有

意に減少していた。これは、マイクロアレイの結果 (0.63 倍) とほぼ同様であった。

次に、*Tert* 蛋白に対するポリクローナル抗体を用いて、若齢マウス卵と高齢マウス卵におけるタンパク発現を検討した。*Tert* 蛋白は、若齢・高齢いずれの卵でも細胞質全般に認められたが、特に若齢マウス卵では中心部に比べて細胞膜近傍にやや強い局在を認めた。一方、高齢マウス卵では、発現自体が著明に低下しており、また斑状に欠損するなどの不規則な発現パターンも認められた。

さらに、Telomerase PCR ELISA kit (ロシュ・



【図8】 マウス Nalp ファミリー新規遺伝子の卵特異的発見. (a)マウスの各種臓器から抽出された RNA パネルを用いたノザンプロット. (b)着床前期胚発生における Nalp ファミリーの RNA 発現変化(着床前期各ステージ胚における遺伝子発現プロファイリング・データより抽出). Hamatani, et al. Human Molecular Genetics 2004 : 13 : 2263—2278 より改変.

ダイアグノスティックス)を用いて, *in vitro* でテロメア伸長反応を行わせることにより, テロメラーゼ酵素活性を測定した. その結果, *Tert* の発現のみならず, テロメラーゼ逆転写酵素活性も加齢とともに 43% にまで有意に低下していることが明らかとなった(高齢マウス卵/若齢マウス卵: $0.30 \pm 0.11/0.70 \pm 0.01$).

テロメア長については qPCR を用いて検討した. 高齢マウス卵のテロメア長 (0.84 ± 0.10) は, 若齢マウス卵のテロメア長 (1.74 ± 0.20) に比べて 0.48 倍と有意に減少していた.

以上の結果から, 卵形成過程では卵母細胞はほとんど分裂をしないにもかかわらず, 実際, 加齢によりテロメア長が短くなることが明らかとなった.

テロメラーゼ欠損マウスから排卵された卵細胞のテロメア長も, wild type のそれよりも短いことが報告されているため²⁹⁾, 加齢によるテロメラーゼの発現および活性の低下がテロメア長の短縮に寄与していると考えられる. 高齢マウスでは, 排卵に至るまでの interval が長くなり, 加齢によって卵におけるテロメラーゼ活性が落ち, 酸化スト

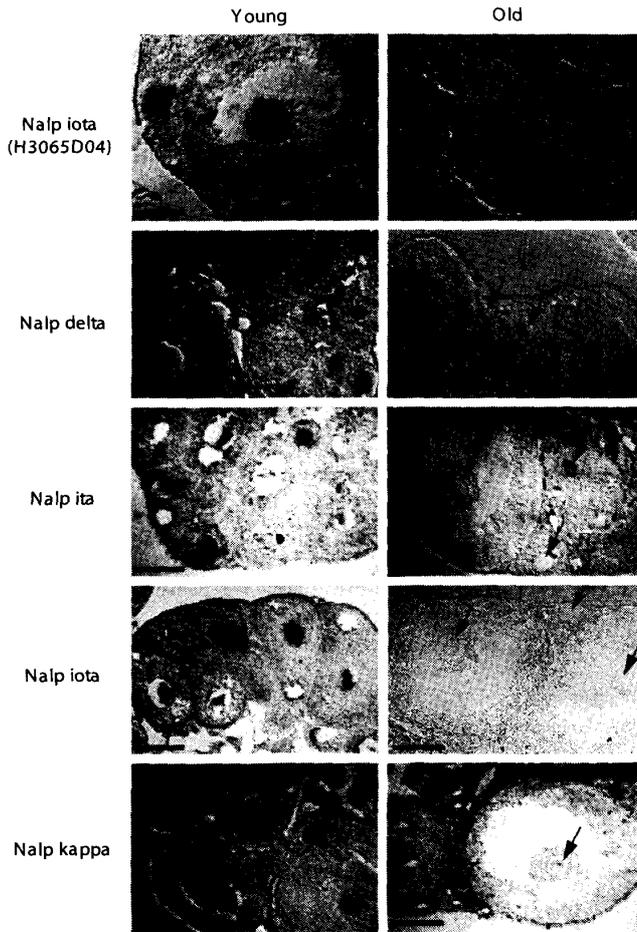
レスの蓄積も加わり, テロメア長が維持できずに短縮してしまうと考えられた.

さらに最近では, 着床前期胚発生におけるテロメア長の短縮がフラグメンテーションの増加と相関すると報告されており³⁰⁾, 加齢によるテロメラーゼの発現および活性の低下が着床前期胚発生を障害する可能性が示唆されるものの, 今後のさらなる検討が必要である.

卵細胞質移植の有効性と安全性

今研究では, 卵細胞の老化には, ミトコンドリアの機能低下によるエネルギー産生障害をはじめとした細胞質の劣化が寄与していると考えられたため, 卵細胞質移植の有効性が示唆された.

しかし一方では, DNA メチル転移酵素やポリコーム遺伝子などのゲノム修飾やクロマチン高次構造に関わる遺伝子, あるいは *Tert* や Mut H/L/S ホモログなどゲノム安定性に関わる遺伝子についても発現変化が観察されたため, 既に核が異常な状態に変化してしまっている可能性も考えられる. 実際に今研究でも, 高齢マウス卵におけるテロメラーゼの発現低下は, テロメア長の短縮に寄与していることが示唆された. そのため, 卵細胞



【図9】 卵細胞におけるマウス Nalp ファミリー新規遺伝子の加齢による発現変化(卵巣切片における *in situ* hybridization). Hamatani, et al. Human Molecular Genetics 2004 : 13 : 2263—2278 より改変.

質移植は、クローニングと同様、兎にエピジェネティックな異常を起こす可能性が危惧された。

体細胞における加齢との比較

さらに、脳や肝など体細胞の加齢変化について遺伝子発現変化を網羅的に観察したマイクロアレイ・データを用いて、卵細胞における加齢と体細胞における加齢を比較検討した。

加齢マウスから得た卵では、加齢による酸化ストレスおよびミトコンドリアの機能障害などを示唆する遺伝子の発現変化が観察され(表2)、また、加齢によるテロメラーゼの発現低下やDNAメチル基転移酵素の発現変化(加齢により *Dnmt1* が発現低下、*Dnmt3b* が発現増加)³¹⁾なども体細胞の加齢と同様に認められたため、生殖細胞でも体細胞と同様の加齢メカニズムを有することが示唆された。

しかし一方で、卵細胞の加齢においては、炎症やインスリン成長因子に関連した遺伝子に発現変化が認められなかったことが特徴的であった。さらに、“Stemness”に関わる遺伝子(ストレス耐性やクロマチン・リモデリングに関わる遺伝子、DNA修復酵素やRNAヘリカーゼなど)³²⁾や一部の卵特異的遺伝子も加齢により発現低下していたことは、卵の加齢に特異的であった。

加齢により発現が低下した卵特異的新規遺伝子ファミリー

そもそも、卵細胞に備わるユニークな能力を考えると、卵で発現する遺伝子の中でも、卵でのみ発現する卵特異的遺伝子が、卵の特性に大きく貢献していると考えられる。実際、ノックアウトマウスの表現型から考えても、卵特異的遺伝子が卵形成過程および着床前期胚発生に重要な役割を果たすことが証明された例は多く存在する(図6)。

卵特異的発現の可能性に注目して、母体加齢により卵で発現が低下した遺伝子のリストを見ると、卵透明帯蛋白 *Zp1*, *Zp2*, *Zp3* あるいはノックアウトマウスが2細胞期で分裂停止に陥る *Mater* が含まれていた。さらには、*Mater* に相同性の高い3つの新規遺伝子も含まれていることが明らかとなった。そこで、これら新規遺伝子の全長cDNAをクローニングし、シーケンサーにかけて塩基配列を決定した。また、*in silico* 解析により、*Mater* に相同性の高い新規遺伝子が他にも存在しないか検討したところ、母体加齢により卵で発現が低下した3つの新規遺伝子の染色体座位の近傍に5つの新規遺伝子が発見された(図7a)。これらは遺伝子ファミリーを構成していることが明らかとなり、Nalpファミリーと呼ばれる。以上8個のNalpファミリー新規遺伝子群(Nalp α - κ)について、種保存性、発現および機能について検討したので、以下に述べる。

まず、これらマウスの新規遺伝子に、ヒトやラットでホモログが存在するか検討し、それらに共通のアミノ酸ドメイン・モチーフが存在しないか検討した。その結果、Nalpファミリーは種を超えて存在し、予想アミノ酸配列の解析から、PAAD-DAPINドメイン、NACHT NTPaseドメイン、

【表 3】 着床前期胚発生における *Nalp-iota* 発現抑制実験. 前核期に 2 種類の small interference RNA (siRNA) 発現ベクターおよびコントロール・ベクターを注入した. Hamatani, et al. Human Molecular Genetics 2004 : 13 : 2263 — 2278 より改変.

siRNA	ベクター 注入卵数	F	2	4	8	M	B	胚盤胞到達率
Control	25	0	1	1	3	0	20	80.0%
siRNA # 1	34	12	1	2	2	0	17	50.0%
siRNA # 2	22	4	5	0	7	0	6	27.3%

leusine-rich repeat が保存されていることが明らかとなった(図 7b). NACHT NTPase ドメインは, 折り畳まれた高分子の高次構造を ATP 依存的に解くことに寄与することなどが知られているが, 他の 2 つのドメインは何らかの蛋白・蛋白結合への寄与が示唆されている.

次に, 詳細な発現解析を行った. マウスの各種臓器から抽出された RNA パネルを用いてノザンブロットを行ったところ, すべてのマウス *Nalp* 新規遺伝子が卵巣でのみ特異的に発現していた(図 8a). ただし, *Nalp iota* (現在は *Nalp14* あるいは *Nlrp14* と呼ばれる)だけは精巣にも発現が認められた.

一方, 着床前期各ステージ胚における遺伝子発現プロファイリング・データを用いて⁹⁾, *Nalp* ファミリーの RNA 発現を検討したところ, *Nalp* ファミリーは卵細胞で強く発現し, 着床前期胚では胚性ゲノムから読み出されることはなく速やかに分解されていた(図 8b).

さらに, 卵巣切片において *in situ* hybridization を行うと, 若齢マウスでは卵巣内で卵細胞特異的に発現が認められたが, 高齢マウスでは発現が明らかに低下しており, マイクロアレイの結果同様, 加齢による発現低下を認めた(図 9).

最後に, *Nalp* ファミリーの機能に関して検討するため, *Nalp-iota* を例に, siRNA (small interference RNA) 発現ベクターを用いて床前期胚で発現抑制実験を行った. U6 プロモーター下に, small hairpin-loop RNA を発現する siRNA 発現ベクター (pRNAT-U6.1/Neo [GeneScript Co., Scotch Plains, NJ, USA]) を 2 種類作製して, 受精卵雄性前核に注入した. Control 群では, 高率に胚盤胞

まで発生したが, siRNA 発現ベクター注入群, 特に siRNA#2 では有意に割球分割が阻害された(表 3). さらに, 同じ実験を 2 度繰り返したが, いずれも siRNA ベクター注入群で割球分割が阻害された. したがって, *Mater* のノックアウトマウスが 2 細胞期で分割停止に陥るのと同様, *Nalp-iota* も着床前期胚発生に重要な役割を果たすことが示唆された.

このように, 卵特異的遺伝子の中には, 着床前期胚発生に重要な役割をもち, 卵の quality factor となっている遺伝子が含まれていると考えられた.

結 語

今研究では, 卵の遺伝子発現プロファイル動態を観察することで, 加齢による卵の quality の低下を説明しようと試みた. しかし, 今回紹介した結果はいずれも断片的なものに過ぎず, これらのいずれが最も重要であるのか, あるいはこれらがお互いどのように影響し合っているのかなど, 卵性 RNA の役割や加齢機構に関わる遺伝子ネットワークを解明するためには今後さらなる研究が必要である. 今後は, 加齢などによる卵の質的低下を分子生物学的に検討することにより, 卵の quality marker が見出すことができれば, 従来は形態学的指標に頼らざるを得なかった卵の質的診断を飛躍的に向上させ, さらに卵質改善に向けた治療法の開発に道を開く可能もあると考えている.

謝 辞

本シンポジウムで発表の機会を与えていただいた学術集会長の岡村州博教授, ならびに座長の労をお執りいた

いた杉野法広教授および吉村泰典教授に深謝致します。

共同研究者

慶應義塾大学産婦人科学教室

山田満稔, 久慈直昭, 丸山哲夫, 末岡 浩, 青木大輔,

吉村泰典

国立成育医療センター生殖医療研究部

阿久津英憲, 梅澤明弘

Laboratory of Genetics, National Institute on Aging

(NIA), National Institutes of Health (NIH) Minoru Ko

(洪 実)

文 献

- 1) Takeuchi T, Ergun B, Huang TH, Rosenwaks Z, Palermo GD. A reliable technique of nuclear transplantation for immature mammalian oocytes. *Hum Reprod* 1999; 14: 1312—1317
- 2) Cohen J, Scott R, Schimmel T, Levron J, Willadsen S. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet* 1997; 350: 186—187
- 3) Sharov AA, Piao Y, Matoba R, Dudekula DB, Qian Y, Vanburen V, Falco G, Martin PR, Stagg CA, Bassey UC, Wang Y, Carter MG, Hamatani T, Aiba K, Akutsu H, Sharova L, Tanaka TS, Kimber WL, Yoshikawa T, Jaradat SA, Pantano S, Nagaraja R, Boheler KR, Taub D, Hodes RJ, Longo DL, Schlessinger D, Keller J, Klotz E, Kelse G, Umezawa A, Vescovi AL, Rossant J, Kunath T, Hogan BL, Curci A, D'urso M, Kelso J, Hide W, Ko MS. Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos. *PLoS Biol* 2003; 1: E74. Epub 2003 Dec 22
- 4) 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* 2003; 13: 1011—1021
- 5) Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell* 2004; 6: 117—131
- 6) 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* 2000; 25: 25—29
- 7) Sharov AA, Dudekula DB, Ko MS. A web-based tool for principal component and significance analysis of microarray data. *Bioinformatics* 2005; 21: 2548—2549
- 8) 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* 2003; 34: 374—378
- 9) 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* 2003; 4: R7
- 10) Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ, Depamphilis ML. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J Biol Chem* 1995; 270: 22077—22080
- 11) Schultz RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 323—331
- 12) 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* 2004; 13: 1461—1470. Epub 2004 May 18
- 13) Zeng F, Baldwin DA, Schultz RM. Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev Biol* 2004; 272: 483—496
- 14) 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* 2004; 13: 2263—2278 Epub 2004 Aug 18
- 15) Bershadsky AD, Gelfand VI, Svitkina TM, Tint

- IS. Destruction of microfilament bundles in mouse embryo fibroblasts treated with inhibitors of energy metabolism. *Exp Cell Res* 1980; 127: 421—429
- 16) Cogswell PC, Kashatus DF, Keifer JA, Guttridge DC, Reuther JY, Bristow C, Roy S, Nicholson DW, Baldwin AS Jr. NF-kappa B and I kappa B alpha are found in the mitochondria. Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF-kappa B. *J Biol Chem* 2003; 278: 2963—2968
- 17) Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 1999; 285: 1390—1393
- 18) Cuervo AM, Dice JF. How do intracellular proteolytic systems change with age? *Front Biosci* 1998; 3: D25—D43
- 19) Verbeke P, Fonager J, Clark BF, Rattan SI. Heat shock response and ageing: mechanisms and applications. *Cell Biol Int* 2001; 25: 845—857
- 20) Sitte N, Huber M, Grune T, Ladhoff A, Doecke WD, Von Zglinicki T, Davies KJ. Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *Faseb J* 2000; 14: 1490—1498
- 21) Bontekoe CJ, McIlwain KL, Nieuwenhuizen IM, Yuva-Paylor LA, Nellis A, Willemsen R, Fang Z, Kirkpatrick L, Bakker CE, Mcaninch R, Cheng NC, Merriweather M, Hoogeveen AT, Nelson D, Paylor R, Oostra BA. Knockout mouse model for *Fxr2*: a model for mental retardation. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 487—498
- 22) Edelmann W, Umar A, Yang K, Heyer J, Kucherlapati M, Lia M, Kneitz B, Avdievich E, Fan K, Wong E, Crouse G, Kunkel T, Lipkin M, Kolodner RD, Kucherlapati R. The DNA mismatch repair genes *Msh3* and *Msh6* cooperate in intestinal tumor suppression. *Cancer Res* 2000; 60: 803—807
- 23) Wei K, Clark AB, Wong E, Kane MF, Mazur DJ, Parris T, Kolas NK, Russell R, Hou H Jr, Kneitz B, Yang G, Kunkel TA, Kolodner RD, Cohen PE, Edelmann W. Inactivation of Exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. *Genes Dev* 2003; 17: 603—614
- 24) Prolla TA, Baker SM, Harris AC, Tsao JL, Yao X, Bronner CE, Zheng B, Gordon M, Reneker J, Arnheim N, Shibata D, Bradley A, Liskay RM. Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in *Mlh1*, *Pms1* and *Pms2* DNA mismatch repair. *Nat Genet* 1998; 18: 276—279
- 25) Chang CL, Marra G, Chauhan DP, Ha HT, Chang DK, Ricciardiello L, Randolph A, Carethers JM, Boland CR. Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: C148—154
- 26) Liu Y, Snow BE, Hande MP, Yeung D, Erdmann NJ, Wakeham A, Itie A, Siderovski DP, Lansdorp PM, Robinson MO, Harrington L. The telomerase reverse transcriptase is limiting and necessary for telomerase function in vivo. *Curr Biol* 2000; 10: 1459—1462
- 27) Niida H, Matsumoto T, Satoh H, Shiwa M, Tokutake Y, Furuichi Y, Shinkai Y. Severe growth defect in mouse cells lacking the telomerase RNA component. *Nat Genet* 1998; 19: 203—206
- 28) Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 611—622
- 29) Liu L, Bailey SM, Okuka M, Munoz P, Li C, Zhou L, Wu C, Czerwiec E, Sandler L, Seyfang A, Blasco MA, Keefe DL. Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1436—1441 Epub 2007 Nov 4
- 30) Keefe DL, Franco S, Liu L, Trimarchi J, Cao B, Weitzen S, Agarwal S, Blasco MA. Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women—toward a telomere theory of reproductive aging in women. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 1256—1260; discussion 1260—1261
- 31) Lopatina N, Haskell JF, Andrews LG, Poole JC, Saldanha S, Tollefsbol T. Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J Cell Biochem* 2002; 84: 324—334
- 32) Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 2002; 298: 597—600

Synopsis

Mammalian ooplasm supports preimplantation development, and reprograms an introduced nucleus transferred from a somatic cell to confer pluripotency in a cloning experiment. However, underlying molecular mechanisms of the oocyte competence remain unknown. Recent advent in microarray technologies has allowed us gene expression profiling of such tiny specimens as oocytes and preimplantation embryos.

First of all, gene expression profiling of oocytes and preimplantation embryos revealed the distinctive patterns of maternal RNA degradation in addition to two major transient waves of *de novo* transcription, zygotic genome activation (ZGA) and mid-preimplantation gene activation (MGA). It has been thought that more than 90% of oocyte-stored RNAs are degraded by the 2-cell stage. Although our microarray analysis indeed confirmed the massive maternal RNA degradation pattern, we observed additional patterns of maternal RNA degradation showing significant reduction from the 4-cell to 8-cell stage.

To elucidate molecular mechanisms maintaining oocyte competence and quality, we focused on global gene expression changes in age-associated loss of oocyte quality. We compared the expression profiles of metaphase II oocytes collected from 5-6 week old mice with those collected from 42-45 week old mice using the NIA 22K 60-mer oligo microarray. Among ~11,000 genes whose transcripts were detected in oocytes, about 5% (530) showed statistically significant expression changes, excluding the possibility of global decline in transcript abundance. Consistent with the generally accepted view of aging, the differentially expressed genes included ones involved in mitochondrial function and oxidative stress. However, the expression of other genes involved in chromatin structure, DNA methylation, genome stability, and RNA helicases were also altered, suggesting the existence of additional mechanisms for aging. Among the transcripts decreased with aging, we identified and characterized a group of new oocyte-specific genes, members of the human NACHT, leucine rich repeat and PYD containing (NALP) gene family. These results have implications for aging research as well as for clinical ooplasmic donation to rejuvenate aging oocytes.
