

ブタ単為発生胎子のインプリント遺伝子発現

Gene Expression of Imprinted Genes in Porcine Parthenotes

柏崎直巳, 猪股智夫

麻布大学大学院 獣医学研究科

Naomi Kashiwazaki and Tomo Inomata

Graduate School of Veterinary Sciences, Azabu University

Abstract. We examined development and expression of the insulin-like growth factor II gene (*IGF-II*) in porcine parthenotes on day-21 post artificial activation derived from *in vitro* matured (IVM) oocytes. IVM oocytes were stimulated by electric pulses, and were subsequently cultured contained cytochalasin B to obtain diploid oocytes. The oocytes were then transferred to recipients. Parthenotes were collected from the recipients at 21 days post electro-stimulation. As control, bi-parental fetuses through artificial insemination were also recovered on day-21 of gestation. Fetuses were fixed for histological preparations. From the other of the fetuses the m-RNA expressing of *IGF-II* by real-time RT-PCR. Total 16 of parthenotes and 19 of bi-parental fetuses were obtained and examined. Developmental delay was observed histologically in the parthenotes compared to bi-parental fetuses. The relative expression of *IGF-II* was detected as 6 % in the parthenotes of bi-parental fetuses. The results suggested that *IGF-II* was imprinted and paternally expressed in pigs as well as mice and sheep, and that the expression of *IGF-II* could be associated with the developmental delay of porcine parthenotes.

1. 目的

単為発生は、昆虫や爬虫類に多くみられる生殖様式であるが、哺乳類の単為発生胎子は致死である。1983年に Surani (1) はマウスの前核移植実験により、母性ゲノムのみを持つ雌核発生胚および父性ゲノムのみを持つ雄核発生胚を作出し、それらが妊娠10日に致死となることを報告した。これは、母方と父方に由来するゲノムが機能的に等価ではなく、個体発生には両性由来のゲノムの存在が不可欠であることを示している。哺乳類の初期発生においては、母性由来と父性由来とで異なる遺伝子発現をする。これらの遺伝子は、インプリント遺伝子（刷り込み遺伝子；imprinted gene）と呼ばれる。インプリント遺伝

子の発現は、DNAのメチル化、ヒストンテールのメチル化およびアセチル化などのエピジェネティック（epigenetic）な修飾により、細胞、発育段階において特異的な調節を受けている。現在までにマウスを中心に約80のインプリント遺伝子が同定されている(2)。多くのインプリント遺伝子は胎子期の始原生殖細胞で消去され、配偶子の形成過程で再び刷り込みがおこる。さらに、正常な個体発生では、受精直後から着床までの過程に再度、脱メチル化がおこり、エピヘネティックな情報が書き換えられる。

本研究は、ブタにおけるインプリント遺伝子である *IGF-II* とその発現制御に関わる *IGF-IIr* および *H19* の発現動態の検討を目的に、雌性単為発生胚の発育と各遺伝子の発現を調べた。

2. 方法

ブタ体外成熟卵に電気刺激による人為的活性化および2倍体処理を施し、その後6日間の体外培養をおこない雌性ゲノムのみを有する雌性単為発生胚盤胞を作成した。また、2倍体処理後の雌性単為発生胚を発情同期化処置した雌ブタの卵管へ外科的に移植し、21日後に帝王切開により胎子および胚胎外組織を採取した。比較対象には、雌性および雄性の両性ゲノムを持つ受精由来の体外受精由来胚盤胞、胎生21日齢人工授精由来胎子および胚胎外組織を用いた。胚盤胞については細胞数を比較し、Real Time PCRを用いて10個の胚盤胞における*IGF-II*、*IGF-IIr*および*H19*の発現量を調べた。また、胚における遺伝子の発現量の個体差を見るために、1個の胚盤胞を用いて同様の実験をおこなった。胎子や胚胎外組織については頭尾長および重量を計測し、Real Time PCRを用いて個体ごとに各遺伝子の発現量を調べた。また、それらの一部で組織標本を作製し、観察をおこなった。

3. 結果と考察

雌性単為発生胚盤胞の細胞数は、受精由来胚盤胞に比べ有意に ($P < 0.05$) 高い値となった。Real Time PCRの結果、10個の雌性単為発生胚盤胞における*IGF-II*、*IGF-IIr*および*H19*の発現量は、受精由来胚盤胞の41%、117%および253%となった。また、1個の雌性単為発生胚盤胞における各遺伝子の発現量は受精由来胚盤胞の43%、83%および230%となった。

雌性単為発生胚移植の結果、24頭の胎生21日齢雌性単為発生胎子および胚胎外組織を回収した。心臓の拍動を確認した個体を生存個体とした場合、受精由来の胎子の死亡率が7%なのに対し、雌性単為発生胎子の死亡率は33%であった。雌性単為発生胎子の重量、頭尾長および胚胎外組織の重量は、受精由来に比べそれぞれ有意に ($P < 0.05$) 小さくなった。組織標本の観察から、雌性単為発生胎子の発生の状態は受精由来に比べ遅れてはいるものの、臓器の異常は確認されなかった。胎盤においても細胞の形成に異常は確認されず、受精由来胎子における*IGF-II*、*IGF-IIr*および*H19*の発現量は、受精由来胎

子の6%、452%および243%となった。同様に胚胎外組織における各遺伝子の発現量は受精由来の3%、140%および260%となった。

哺乳類の単為発生胚(胎子)に関する研究は、主にマウスで、ヒト、ラット、ウシ、ヒツジ、ブタでおこなわれてきた。ヒトにおける研究では、着床前の胚や着床後の雌性単為発生、雄性単為発生などの奇胎についての研究も報告されている。この研究の目的は、臨床への応用、発達障害や癌などの疾病の原因の解明である。マウスは有用な実験動物であるため、着床前の胚においては雌性単為発生胚、クローン胚やES細胞とでDNAのメチル化の状態を比較した多く研究がおこなわれている。また、Konoら(3)は人為的にメチル化状態の異なる雌性核を持つ卵を作成し、核移植によって作出された雌性単為発生胚の発生能についての研究をおこなっている。ウシやブタなどの家畜においては、体外胚生産系の改良を目的に、様々な卵子活性化法の評価法として雌性単為発生胚の発生が観察されてきた。ブタにおいては、電気刺激やエタノール、 Ca^{2+} イオノフォア、ストロンチウム、6-DMAPなどを用いた人為的活性化法が検討されてきた(4)。また、Kure-bayashiら(5)によって胎生29日までブタ雌性単為発生胎子の生存が可能であることが報告された。その後、2003年にZhuら(6)によって、*in vitro*と*in vivo*に由来する成熟卵子を用いて雌性単為発生胚を作成し、移植後の発生能の検討がおこなわれている。しかし、ブタについては雌性単為発生胎子の形態学的な観察はなされているが、胚胎外組織の発育の検討、胎盤を含めた組織学的な観点からの研究、*IGF-II*などの成長因子である遺伝子の発現動態を調べた報告はない。

本研究により、ブタ胎生21日齢の胎子および胚胎外組織においてもマウスやヒトと同様に*IGF-II*が父性発現をしていることが確認された。そして、ブタ雌性単為発生胎子および胚体外組織における*IGF-II*発現レベルの極度の低下が、発育の遅滞の原因と考えられるが、この発育遅延は、組織学的な異常によるものではなかった。ブタ単為発生胎子が致死に至る原因は、*IGF-II*の発現の低下だけではなく、他のインプリント遺伝子の発現異常も関連していると考えられる。また、胚盤胞期における各遺伝子の発現動

態は胎子や胚胎外組織とは異なることから、これらの遺伝子の発現パターンは発生段階によって異なる可能性がある。

4. 要 約

哺乳類において単為発生は、致死である。ブタ体外成熟卵母細胞由来のブタ雌性単為発生胚移植により21日齢の胎子を作成し、それらの発育とインスリン様増殖因子2遺伝子 (*IGF-II*) の発現について調べた。ブタ体外成熟卵母細胞に電気刺激による人為的活性化およびサイトカラシンBを添加したNCSU-37にて培養し、2倍体のブタ雌性単為発生胚を作成した。次いでこれらを発情同期化させたレシピエントに移植した。卵子の活性化の21日後にブタ雌性単為発生胎子を採用した。比較対照として、両性由来のゲノムを有する胎生21日齢人工授精由来胎子を用いた。えられた胎子の一部を組織標本に用い、残りの胎子から個体ごとにtotal RNAを抽出し、Real Time RT-PCRを用いて*IGF-II*の発現量を調べた。*IGF-II*の発現量は、個体ごとの β -actinに対する相対値として表した。結果、16個体のブタ雌性単為発生由来および19個体の人工授精由来の心拍を確認した生存胎子を得た。組織標本から、ブタ雌性単為発生胎子は受精由来の胎子に比べ発育が遅延していることがわかった。ブタ雌性単為発生胎子における*IGF-II*の発現

量は、人工授精由来胎子における発現量の6%であった。以上から、マウスやヒツジと同様にブタ胎生21日齢においても*IGF-II*は父性発現であり、単為発生胎子の発育遅延に関連していることが示唆された。

文 献

- 1) Surani MA, Barton SC. (1983) Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science* 222: 1034-6.
- 2) Swales AK, Spears N. (2005) Genomic imprinting and reproduction, *Reproduction* 130: 389-99.
- 3) Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Park ES, Seo JS, Ogawa H. (2004) Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature* 428: 860-4.
- 4) Vajta G, Zhang Y, Machaty Z. (2007) Somatic cell nuclear transfer in pigs: recent achievements and future possibilities. *Reprod Fertil Dev* 19: 403-23.
- 5) Kure-bayashi S, Miyake M, Okada K, Kato S. (2000) Successful implantation of in vitro-matured, electro-activated oocytes in the pig. *Theriogenology* 53: 1105-19.
- 6) Zhu J, King T, Dobrinsky J, Harkness L, Ferrier T, Bosma W, Schreier LL, Guthrie HD, DeSousa P, Wilmut I. (2003) In vitro and in vivo developmental competence of ovulated and in vitro matured porcine oocytes activated by electrical activation. *Cloning Stem Cells* 5: 355-65.