

第四章

in vitro における休眠胚および活性化胚作製系確立の試み

緒言

着床遅延モデルを用いた前章までの研究により、卵巣から分泌される E_2 は、サイクリン D など G1 期の細胞周期を制御する因子の発現を変化させることで休眠胚を活性化状態に移行することが明らかとなった。このことから通常の胚発生でも、 E_2 は着床期胚に G1 期進行に関わる細胞周期制御因子の発現を誘導し、以降の胚発生における外因性シグナル依存的な細胞増殖の進行を促進する役割を担っていることが示唆された。また、 E_2 由来の刺激による休眠胚の活性化時には、ヒストン H3K9 のジメチル化修飾とヒストン H3.3 の置換がエピジェネティックな遺伝子発現制御機構として働いていることが示唆された。しかし、これらの機能をより明確にするためには、これらのエピジェネティックな修飾によって発現が制御されている遺伝子を明らかにすること、あるいは E_2 由来の刺激によってサイクリン D1 などの細胞周期制御因子の発現が制御されるメカニズムを明らかにすることといった、更なる解析が必要となる。しかし、着床遅延モデルを用いた手法では得られるサンプル量に限界があり、また生体内で胚に作用する様々な因子の影響を除去することが難しく、より精細な分子生物学的実験を行うことが困難である。

ところで、受精卵を体外で培養した場合にも、胚盤胞期に急に胚発生が停止する現象が見られる (Streffer et al. 1980)。この現象は、着床遅延モデルにおいて休眠状態の胚が生じる現象と同じ要因により引き起こされる可能性が高い。すなわち、休眠胚が卵巣から分泌される E_2 由来の刺激の欠如により生じるのと同様に、培養胚の発生停滞も、胚盤胞期以降の胚発生に必要な、おそらく E_2 によって子宮などから分泌される、様々な外因性因子が培養液中に欠けていることにより生ずるものと推測される。そこで本章では、着床遅延モデルの情報を

元に、胚培養系での胚発生停止現象を利用して、*in vitro* で胚の休眠化と活性化を行う培養系を構築することを試みた。*in vitro* で休眠胚や活性化胚を作製することが可能になれば、培養環境の操作が容易になり、また一度の操作で多くの胚を扱うことができるため、その後の様々な解析が可能となることが期待される。

しかし一方で、*in vitro* での胚培養には解決しなければならない問題点も多い。生体内では、胚は透明帯脱出後まもなく子宮に着床する。しかし、*in vitro* で同様の着床環境を再現することは現在まで成功しておらず、着床期以降の胚発生を *in vitro* で完全に再現することはできない。このため、透明帯脱出後の胚の発生能や着床能を測る指標として、胚の *outgrowth* 現象がこれまで様々な研究で広く用いられてきた (Enders et al. 1981; Schorpp-Kistner et al. 1999; Sutherland et al. 1993; Wang et al. 1999; Yelian et al. 1995)。細胞の接着を容易にするために適切な処理を施した培養シャーレ上では、胚発生が進行すると透明帯脱出後すぐにシャーレ底面へ接着し、TE の *outgrowth* を進行する (Armant et al. 1986)。そこで本研究でも、培養胚の活性化の指標として、まず *outgrowth* 現象を用いることにした。しかし、*outgrowth* をしたことのみで健全な発生能や着床能を有していると判断してよいのかどうかは未だ明らかになっていない。

卵巣から分泌される E_2 は、それ自体が、胚に存在する核内受容体 $ER\alpha$ や $ER\beta$ を介して直接胚に作用する可能性があるだけでなく (Hiroi et al. 1999; Wu et al. 1992)、子宮から EGF、HB-EGF、betacellulin、neuregulin などの EGF ファミリーや、IGF-1、 E_2 の代謝体であるカテコールエストロジェン ($4-OH-E_2$) など、複数のシグナル因子の産生を促す (Brown et al. 2004; Daftary and Taylor 2004; Das et al. 1997; Das et al. 1994; Lim et al. 1998; Lim et al. 1997; Paria et al. 1999; Paria et al. 2001; Paria et al. 2002; Raab et al. 1996; Reese et al. 1998)。一方、胚側でも EGF 受

容体など、様々な成長因子受容体や核内受容体の発現が見られ (Brown et al. 2004; Dardik et al. 1992; Lim et al. 1997; Nakasato et al. 2004; Paria et al. 1993; Paria et al. 1999; Tong et al. 1996; Wiley et al. 1992)、 E_2 の刺激によって子宮側から分泌されるシグナル因子が、これらの受容体を介して胚の細胞分裂や着床能獲得を誘導していると考えられる (Carson et al. 2000; Dey et al. 2004; Paria et al. 1999)。実際、 E_2 によるサイクリン D1 の発現誘導には両方の経路による作用が報告されている。ヒト乳ガン細胞では、 E_2 は核内受容体である E_2 受容体 $ER\alpha$ と結合してサイクリン D1 の制御領域に転写制御複合体を形成し、サイクリン D1 の発現を促進する (Cicatiello et al. 2004)。マウス胚盤胞にも $ER\alpha$ は発現していることから (Hou et al. 1996)、マウス胚でも卵巣由来の E_2 が胚の $ER\alpha$ に結合し、直接サイクリン D1 の発現を促進している可能性がある。また、これまでに報告されている唯一のヒストン脱メチル化酵素である LSD1 は、マウス精巣抽出液において核内受容体であるアンドロゲン受容体と複合体を形成し、ヒストン H3K9 のジメチル化修飾を脱メチル化すること、LSD1 の発現低下は LNCaP 細胞の細胞増殖を抑えることから (Metzger et al. 2005)、休眠胚の活性化時には、LSD1 が E_2 - $ER\alpha$ 複合体と結合して、ヒストン H3K9 ジメチル化修飾を脱メチル化することにより $ER\alpha$ の標的遺伝子である細胞周期制御因子の発現を促進している可能性もある。一方、EGF は様々な細胞に対して EGF 受容体を介して作用しサイクリン D1 の発現を誘導することが報告されている (Moriuchi et al. 2001; Perry et al. 1998)。

そこで本章では、 E_2 の刺激によって子宮から分泌される様々な因子が *in vitro* においても胚に作用して、胚の遺伝子発現や細胞増殖を制御することを予測し、それらの因子の有無により培養胚における胚発生の停止 (休眠化) と再活性化とを調節することを試みた。本研究では E_2 を用いると共に、 E_2 の分泌により子

宮から発現して胚に作用すると考えられている因子である、EGF、4-OH-E₂をそれぞれ単独で培養液に添加して胚への作用を調べた。また、生体内では E₂ による着床期胚の着床能獲得時に、E₂ が子宮内膜において代謝体である 4-OH-E₂ に変換されて胚に作用し、その結果として胚の EGF の結合能が高まることが報告されている (Paria et al. 1998)。そこで、*in vitro* でもこれらの因子が胚に対して協調して働く可能性を考えて、E₂ と EGF、あるいは E₂ と 4-OH-E₂ を同時に培養液に添加して、胚の活性化への作用を調べた。本研究ではさらに、*in vitro* で作出された休眠化状態や活性化状態の胚において、*in vivo* の着床遅延モデルにおける休眠胚や活性化胚と同様の細胞周期および遺伝子発現調節機構が機能しているかどうかを確認するため、これまでの結果で示された細胞周期制御因子の発現や、エピジェネティックな修飾の変化についても検討を行った。

材料と方法

(1) 未受精卵の採取、体外受精

過排卵処理により未受精卵を採取した。雌マウスに 5 IU の PMSG（セロトロピン；帝国臓器、東京、日本）を投与後、48 時間後に 5 IU の hCG（ゴナドトロピン；帝国臓器）を投与し、hCG 投与 16 時間後に卵管膨大部から卵丘卵子複合体を取り出し、HTF 受精培地（Quinn and Begley 1984）に導入した。精子は精巢上体尾部から取り出し、受精能獲得のために別の HTF 培地で 1-2 時間培養した後、媒精に供した。媒精 6 時間後に前核判定により受精卵を選別し、KSOM 培地（Lawitts and Biggers 1993）に移して 37°C の 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。以降の培養には Nunclon Delta 処理を施した、直径 35 mm シャーレを用いた（NUNC A/S, Roskilde, Denmark）。

(2) 各種因子添加条件による胚培養

媒精後、4.0 日目に胚盤胞に成長した胚を新たな KSOM 培地に移して実験に供した。媒精後 5.0 日目に KSOM 培地に E₂、4-OH-E₂、EGF、FBS を添加して、翌日、媒精後 6.0 日目胚の outgrowth を確認した。添加条件は以下の 6 種類の条件を試みた。300 pg/ml E₂、300 pg/ml 4-OH-E₂、10 ng/ml EGF、300 pg/ml E₂ + 10 ng/ml EGF、300 pg/ml 4-OH-E₂ + 10 ng/ml EGF、10% FBS。

(3) FBS 添加条件による胚培養

媒精後、4.0 日目に胚盤胞に成長した胚を新たな KSOM 培地に移して実験に供した。媒精後 5.0 日目、および 7.0 日目まで KSOM 培地に何も添加せずに培養した胚、そして、媒精後 7.0 日目に 10% FBS を添加しさらに 24 時間培養した胚、

の三種類の胚を回収し、RT-PCR または免疫染色に用いた。

(3) RT-PCR および免疫染色

RNA 抽出と RT-PCR、免疫染色は、第二章、第三章と同様に行った。

結果

(1) 胚の活性化能に影響を与える因子の探索

媒精後 4.0 日目の胚は、桑実胚から拡張胚盤胞の状態にあった。媒精後 5.0 日目になるとほとんどの胚は拡張胚盤胞となり、多くの胚が透明帯からの脱出を開始していた。媒精後 6.0 日目の胚はほとんどが透明帯を脱出し、さらに拡張した状態で維持されていた。胚は **outgrowth** を示さず、シャーレの底面にもほとんど付着していなかった。

媒精後 5.0 日目に KSOM 培地に E_2 、4-OH- E_2 、EGF、FBS を添加し、媒精後 6.0 日目胚の **outgrowth** を確認した。その結果、300 pg/ml E_2 、300 pg/ml 4-OH- E_2 、10 ng/ml EGF、300 pg/ml E_2 + 10 ng/ml EGF、300 pg/ml 4-OH- E_2 + 10 ng/ml EGF のそれぞれの添加培養条件では、いずれの条件の胚も **outgrowth** を示さず、透明帯から脱出した拡張胚の状態で維持されていた。唯一、10% FBS 条件下で培養した胚だけはシャーレの底面に付着し、**outgrowth** を起こした (図 4-1)。

(2) *in vitro* 培養で作出された休眠胚および活性化胚における細胞周期とヒストンの修飾の変化

そこで次に、媒精後 7.0 日目まで無添加の KSOM 培地で培養し拡張胚の状態に維持された胚に対し、7.0 日目に 10% FBS を添加し、その **outgrowth** を調べた。その結果、FBS 添加後 3 日目の媒精後 10.0 日目に明瞭な **outgrowth** が確認された (図 4-2)。 *in vivo* の着床遅延モデルでは、卵巣除去後 5-6 日後の胚を休眠胚として、また、休眠胚に E_2 を投与して 1 日後の胚を活性化胚として用いており、着床現象は胚の活性化のさらに後に引き起こされる。したがって、7.0 日目まで無添加の KSOM 培地で培養した胚、および FBS 添加後の 8.0 日目の胚は、それぞ

れ *in vivo* の卵巣除去で得られた休眠胚および E₂ 投与後の活性化胚に相当するものであることが期待された。これを確かめる目的で、これらの胚における細胞周期制御因子の発現と、ヒストン修飾の変化を調べた。

まず、リアルタイム PCR を用いて G3PDH、 β アクチンと、サイクリン D1、サイクリン E1、p21 の mRNA の発現量の変化を調べた。G3PDH、 β アクチンの発現は、媒精後 5.0 日目に比べ媒精後 7.0 日目の胚では低下しており、媒精後 7.0 日目に FBS を添加した 8.0 日目の胚では、G3PDH と β アクチンの発現は再び上昇していた (図 4-3)。G1 期の進行に関わる細胞周期制御因子であるサイクリン D1、サイクリン E1 の発現も同様の変化が見られた (図 4-4)。すなわち、サイクリン D1 とサイクリン E1 の発現は、どちらも媒精後 5.0 日目に比べ媒精後 7.0 日目の胚で低下し、媒精後 7.0 日目に FBS を添加した 8.0 日目の胚では、発現は再び上昇していた。CDK 阻害因子である p21 の発現は、媒精後 5.0 日目と媒精後 7.0 日目の胚では大きな変化は見られず、媒精後 7.0 日目に FBS を添加した 8.0 日目の胚では上昇していた。

次に、第三章で調べたヒストン修飾の中で、休眠胚と活性化胚の間で変化が見られたヒストン H3K9 ジメチル化修飾とヒストン H3.3 の検出を試みた。第三章において、ヒストン H3K9 ジメチル化修飾は休眠胚の ICM において高いレベルで検出され、そのシグナルは活性化胚では低下していたことから、ヒストン H3K9 ジメチル化修飾は、着床期胚の ICM における遺伝子発現の制御、特に発現を抑制する制御に関わっていると推測された。また、ヒストン H3.3 の検出量は胚の総転写活性と相関しており、総転写活性の低い休眠胚で低く、総転写活性の高い活性化胚で高く検出された。特に核小体での検出量の変化が顕著であったことから着床期胚の転写活性化とともに、翻訳活性の上昇に関与していることが示唆された。しかし培養胚におけるこれらの修飾の変化は予測された結

果とは異なっていた。すなわち媒精後 7.0 日目におけるヒストン H3K9 ジメチル化修飾のパターンは休眠胚と異なり、媒精後 5.0 日目に比べて媒精後 7.0 日目に ICM で低く検出された (図 4-5)。また FBS 添加後の媒精後 8.0 日目の胚ではヒストン H3K9 ジメチル化修飾は ICM で検出量が上昇していた。ヒストン H3.3 は、媒精後 5.0 日目も 7.0 日目も共に核内にほとんど検出されず、核小体への局在もほとんど認められなかった。FBS 添加後の媒精後 8.0 日目の胚では、ヒストン H3.3 の核内での検出量は媒精後 7.0 日目の無添加胚に比べてやや上昇した傾向が見られたが、核小体への局在は相変わらずほとんど見られなかった。

考察

卵巣から分泌される E_2 は子宮から複数のシグナル因子の発現を誘導し、これらの因子は胚へ作用して胚の着床能獲得に寄与する。これらの外因性シグナル因子が存在しない *in vitro* の胚培養系では、胚発生は胚盤胞の時期までしか進行できないことから、*in vitro* でも着床期以降の胚発生には、母体側から分泌される因子と同様のシグナル因子が必要になると考えられる。そこで本研究では、*in vitro* で胚を培養し、増殖因子等を何も添加しない条件下、および因子を添加した条件下での胚の活性化を調べ、着床遅延モデルにおける休眠胚と活性化胚の再現を試みた。

その結果、KSOM培養液中で培養し何も因子を添加しない場合、胚は胚盤胞までは正常に胚発生を進行したが、媒精後4.0日目から5.0日目頃に透明帯から脱出した後はoutgrowth現象を起こさず、以降の胚発生をほとんど停止したままの休眠胚様の状態を維持することが確認された。媒精後5.0日目にEGF、 E_2 、4-OH- E_2 を添加した場合は、単独で培養液に添加した場合も、EGFと E_2 や4-OH- E_2 を同時に添加した場合も、活性化の指標として用いた胚のoutgrowth現象は見られなかった。このことから、生体内では卵巣から分泌される E_2 や、 E_2 の刺激によって子宮内膜から産生される4-OH- E_2 やEGFは、*in vitro*では単独、あるいは今回行った二因子の組み合わせのみでは、胚の活性化を誘導できないと判断された。 E_2 によって子宮での発現が誘導されるシグナル因子は他にも数多く存在することから、着床期胚の活性化には今回は調べなかった別のシグナル因子の関与が必要である可能性もある。HB-EGFはEGFファミリーに含まれる因子で、子宮上皮細胞で産生され、胚のErbB1やErbB4に作用して胚の着床能獲得に寄与することが報告されている (Paria et al. 1999; Paria et al. 2001; Zhang et al. 1998)。膀胱癌細胞

ではHB-EGFのEGF受容体への結合はMAPキナーゼ経路の活性化をもたらし、サイクリンDの発現を伴う細胞周期のG1期の進行を促進する事が報告されている (Bulus and Barnard 1999; Ongusaha et al. 2004)。このことから、HB-EGFは胚のEGF受容体にも結合して、着床能獲得だけでなく胚におけるサイクリンD1の発現を誘導している可能性がある。EGF受容体は、JAK/STAT系やRas/MAPキナーゼ系といったシグナル伝達系を介してサイクリンDの発現を誘導し、あるいは活性化作用を持つことから、E₂によって子宮内膜で発現が誘導される betacellulinやneuregulinもまた、胚側に発現するErbB2/ErbB3やErbB4といったEGF受容体に作用して、胚におけるサイクリンD1の発現を誘導している可能性がある。

また、E₂によってマウス子宮内膜で発現が誘導される IGF-1 は、子宮上皮細胞の受容体に結合してPI3K/AKT キナーゼ系を活性化し、GSK3 β を不活化することでサイクリン D1 の発現量を上昇させる作用を持つことが報告されている (Chen et al. 2005)。IGF-1 受容体はマウス初期胚でも ICM のみに発現しており (Smith et al. 1993)、IGF-1 によって細胞増殖が促進されることが報告されていることから (Kowalik et al. 1999)、マウス胚では、ヒストン H3K9 ジメチル化修飾によって IGF-1 受容体の発現が制御を受け、胚の活性化時には子宮由来の IGF-1 が ICM 中で発現の上昇した IGF-1 受容体に作用して、PI3K/AKT 系を介してサイクリン D1 の発現を促進している可能性がある。

そこで次に、複数のシグナル因子を含有していると考えられる FBS を用いたところ、媒精後 5 日目に培養液中に FBS を添加した場合には胚の outgrowth 現象が観察された。

次に、*in vitro* で休眠胚および活性化胚と同様の状態の胚を作出するために、外因性シグナル因子の無い条件下での培養期間を延長し、その後この胚に FBS

を作用させて活性化の有無を確認した。FBS 無添加の条件下で媒精後 7.0 日目まで培養を継続した場合には、胚は透明帯脱出後も *outgrowth* を行わず、数日間同じ拡張胚の状態で維持された。この胚に FBS を投与すると、媒精後 10.0 日目には *outgrowth* が確認され、胚が活性化したことが示唆された。

そこで次に、これらの胚が着床遅延モデルから得られた *in vivo* 休眠胚や活性化胚と同様の遺伝子発現や発現制御機構を有しているか確認するために、細胞周期制御因子の発現とヒストン修飾の変化を調べた。FBS 無添加の条件下で媒精後 7.0 日目まで培養した胚では、媒精後 5 日目の胚に比べてサイクリン D やサイクリン E の発現が低下し、休眠胚と類似した遺伝子発現の変化を示すことが確認された。さらに媒精後 7.0 日目の胚に FBS を投与した胚では、1 日後の媒精後 8.0 日目にはサイクリン D やサイクリン E の発現の上昇が確認され、*in vivo* の着床遅延モデルにおける胚の活性化時と類似した状態にあることが確認された。しかし、p21 の発現パターンだけは着床遅延モデルで見られたパターンと異なっていた。これは、胚盤胞期以降の ICM の発生や維持には、LIF などを含まない KSOM の培養条件は適当ではなく、ICM の細胞増殖が停止して p21 の発現が誘導された可能性がある。あるいは、p21 が子宮間質細胞の倍数体化に関与するのと同様に (Tan et al. 2002)、栄養膜細胞の倍数体化にも p21 が関与していることを示しているのかもしれない。このように *outgrowth* を指標として作製された *in vitro* 培養胚では、細胞周期制御因子の発現が *in vivo* の胚と一部異なることが明らかとなった。

以上の結果から、胚盤胞期まで発生の進行した胚は、第二章で考察したように、その後の細胞周期を進行させるのに外因性のシグナルを必要とするようになり、外因性のシグナルを受容できない環境下では、サイクリン D やサイクリン E などの細胞周期制御因子の発現が低下して、胚はその後の発生を停滞する

こと、適切な外因性のシグナルを受容した場合には細胞周期制御因子の発現が上昇することが、培養条件下においても確認された。Outgrowth した細胞は、TE から分化し多倍数体の栄養膜巨細胞になることから (Palazon et al. 1998)、これらの細胞においては細胞周期が進行していたと考えられる。

その一方で、着床遅延モデルにおいて休眠胚の活性化に伴って変化が見られたヒストン H3K9 ジメチル化修飾やヒストン H3.3 の置換といったエピジェネティックな修飾のパターンは、*in vitro* で FBS により活性化させた胚においては、大きく異なっていた。このような結果を得た原因として、一つに、E₂ の作用のうちその一部を代償できる分の因子群だけが FBS には含まれていた可能性が考えられる。つまり FBS には媒精後 5.0 日目や 7.0 日目の胚に作用し、outgrowth の進行やサイクリン D1 などの細胞周期制御因子の発現を誘導する因子群は含まれていたものの、ヒストン H3K9 ジメチル化修飾やヒストン H3.3 の置換に影響を与え、着床遅延モデルにおける活性化胚と同じ修飾状態に培養胚を移行できる因子は含まれていなかったということである。しかし、別の可能性も考えられる。すなわち、今回胚の活性化の指標として用いた outgrowth 現象が、実際には正常な胚の遺伝子発現能や発生能を保証するものではなかったという可能性である。Outgrowth は TE がシャーレ表面へ接着し、分化して栄養膜巨細胞になる現象である。*in vivo* の発生でも着床直後から起こるこの現象は本研究でも生じたが、その一方で本来の胚発生では起こるべき現象である、胚の明確な細胞数増加や、ICM の発生・分化は今回の培養系では起こらなかった可能性がある。このことから、outgrowth 現象は、胚の一部の細胞が分化を進行したことを示しているに過ぎず、胚全体の正常な発生や、遺伝子発現の進行を保証する指標ではなかったと判断できる。胚は本来、着床直後から質量の増加を伴う急激な細胞増殖を進行する。エピジェネティックなマーカーとして用いたヒストン

H3.3 は正常な着床期胚では、核小体での rRNA の生産を促進し、活発な翻訳活性を実現することで、正常な胚での質量の増加を伴う細胞増殖に貢献すると考えられる。今回の培養条件下では細胞はヒストン H3.3 の核小体への局在が起こらない生理状態にあり、その結果、胚は質量を伴う細胞数の増加が引き起こせなかったのではないかと考えられる。ヒストン H3K9 のジメチル化修飾のパターンの違いも、今回の培養胚では多くの遺伝子発現が *in vivo* の胚とは異なることを示唆している。このように、細胞周期制御因子の発現およびエピジェネティックな変化を調べることにより、outgrowth 現象は胚の正常な胚発生を示す指標としては必ずしも適当ではないことが示唆された。

以上のことから、今回試みた *in vitro* での休眠胚および活性化胚作製系では、着床遅延モデルで作製できる休眠胚および活性化胚における細胞周期制御因子の遺伝子発現の多くを再現できることが明らかとなった。しかし一方で、エピジェネティックな修飾や一部の遺伝子発現は異なっており、outgrowth を指標として再現した今回の *in vitro* モデルは、*in vivo* の遺伝子発現制御機構や細胞周期制御機構を完全には再現していないことが明らかとなった。

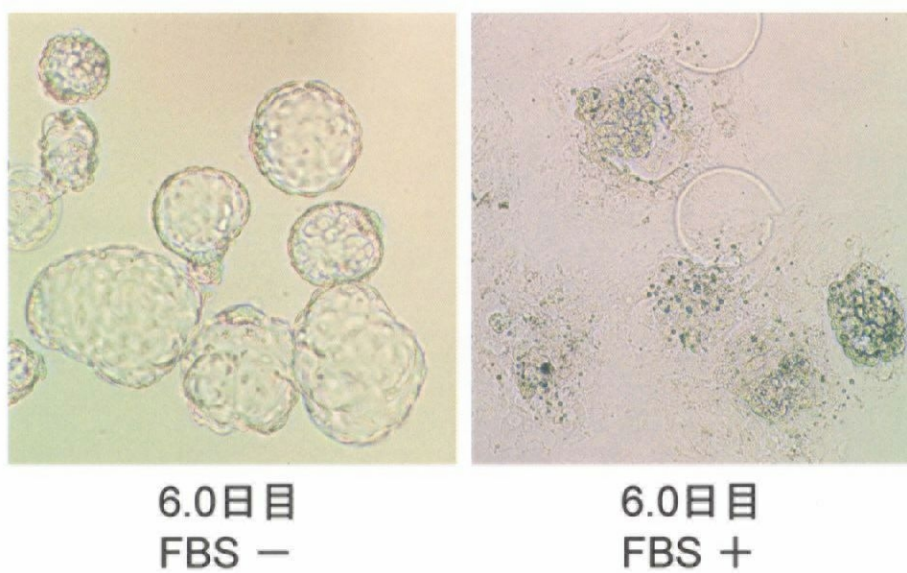
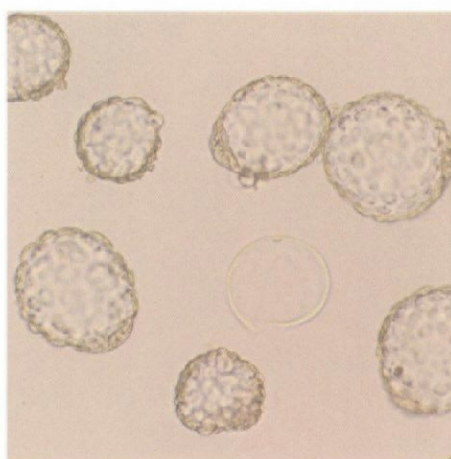
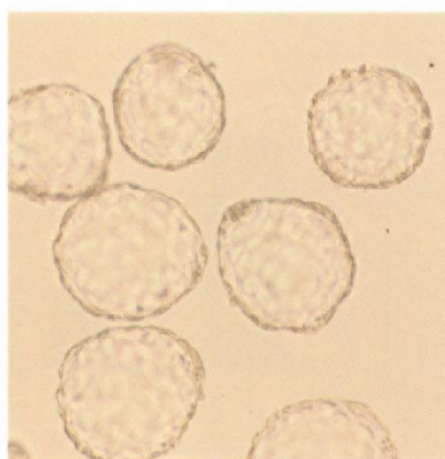


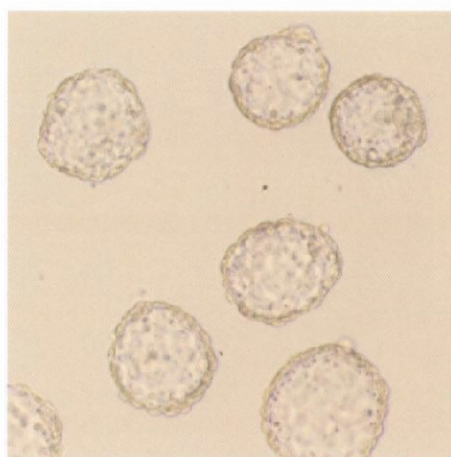
図 4-1 媒精後、KSOM 中で 6.0 日間培養した胚、及び 5.0 日目に 10% FBS を添加し、さらに 24 時間培養した 6.0 日目の胚における outgrowth の有無



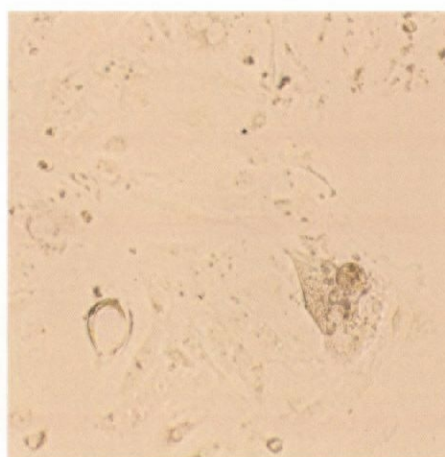
5.0日目 FBS -



7.0日目 FBS -



8.0日目 FBS +



10.0日目 FBS +

図 4-2 媒精後、KSOM 中で 5.0 日間、7.0 日間培養した胚、及び 7.0 日目に 10% FBS を添加し、さらに 24 時間、3 日間培養した 8.0 日目、10.0 日目の胚における outgrowth の有無

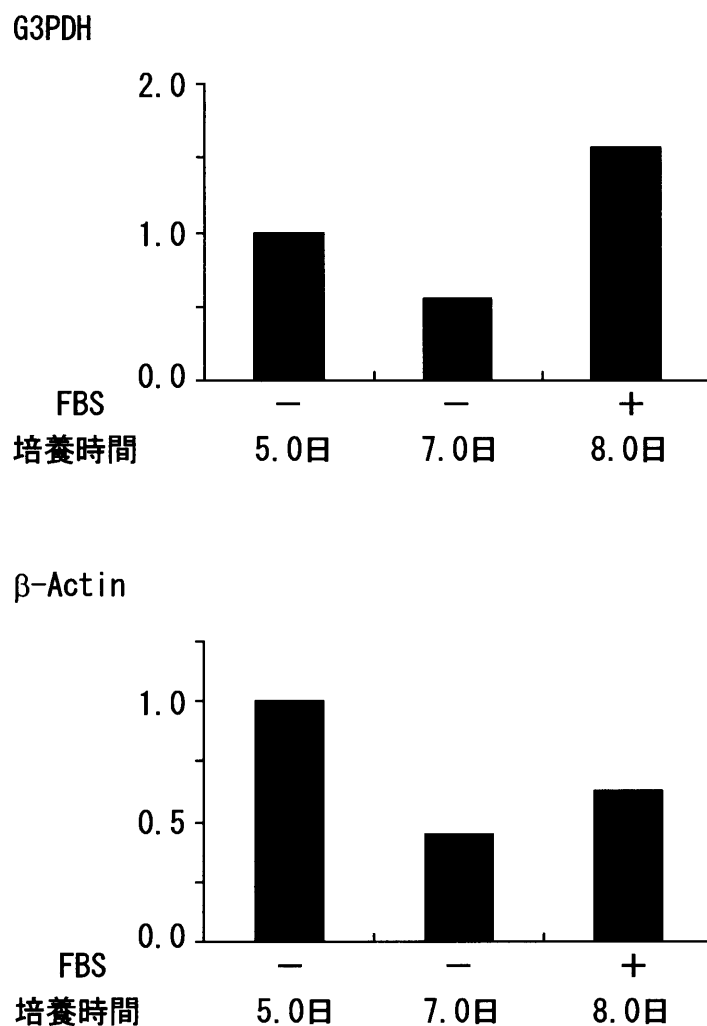


図 4-3 媒精後、KSOM 中で 5.0 日間、7.0 日間培養した胚、及び 7.0 日目に 10% FBS を添加し、さらに 24 時間培養した 8.0 日目の胚における G3PDH と β アクチンの mRNA 量の変化

RT-リアルタイム PCR を用いて各胚の mRNA 量を求め、媒精後 5.0 日目の胚の平均値を 1 とした相対値で示した。

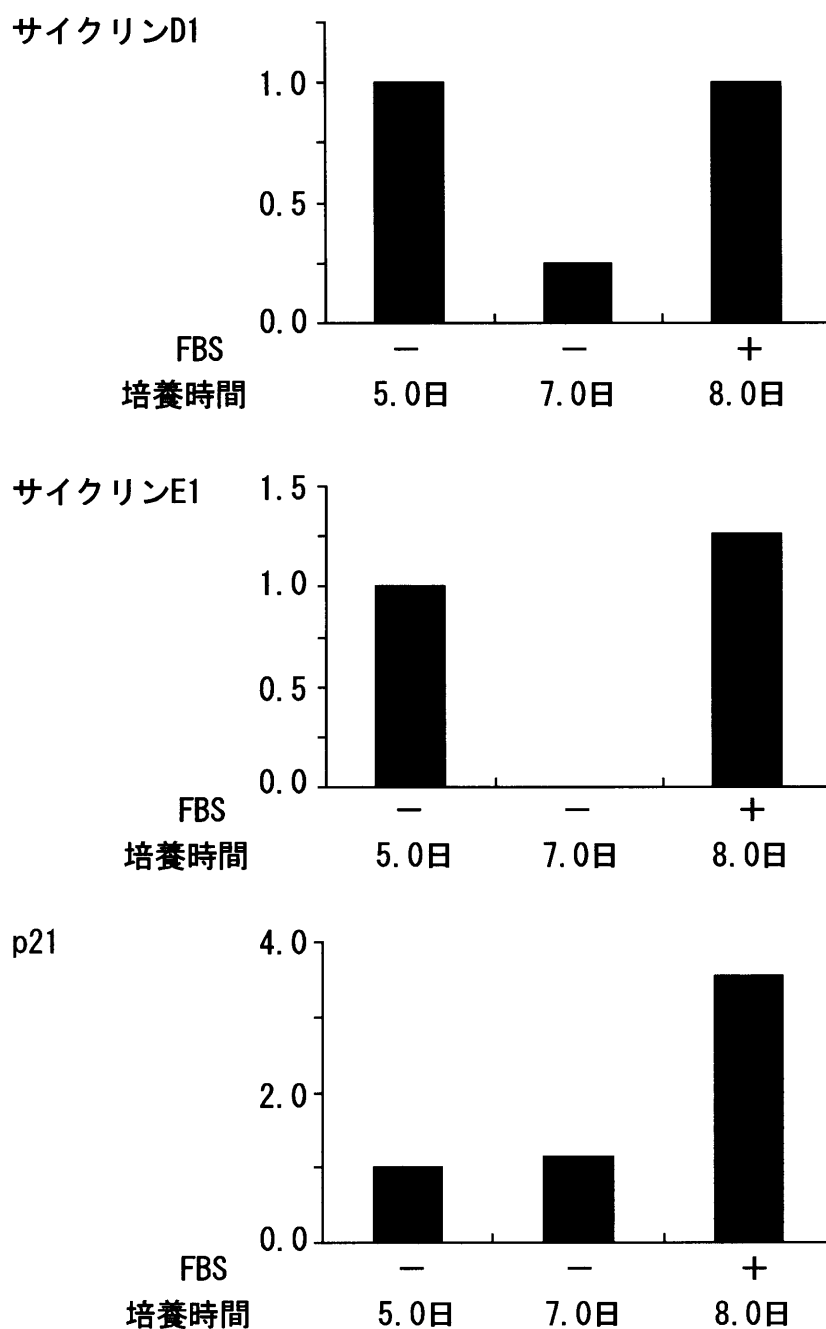


図 4-4 媒精後、KSOM 中で 5.0 日間、7.0 日間培養した胚、及び 7.0 日目に 10% FBS を添加し、さらに 24 時間培養した 8.0 日目胚におけるサイクリン D1、サイクリン E1、p21 の mRNA 量の変化

RT-リアルタイム PCR を用いて各胚の mRNA 量を求め、媒精後 5.0 日後の胚の平均値を 1 とした相対値で示した。

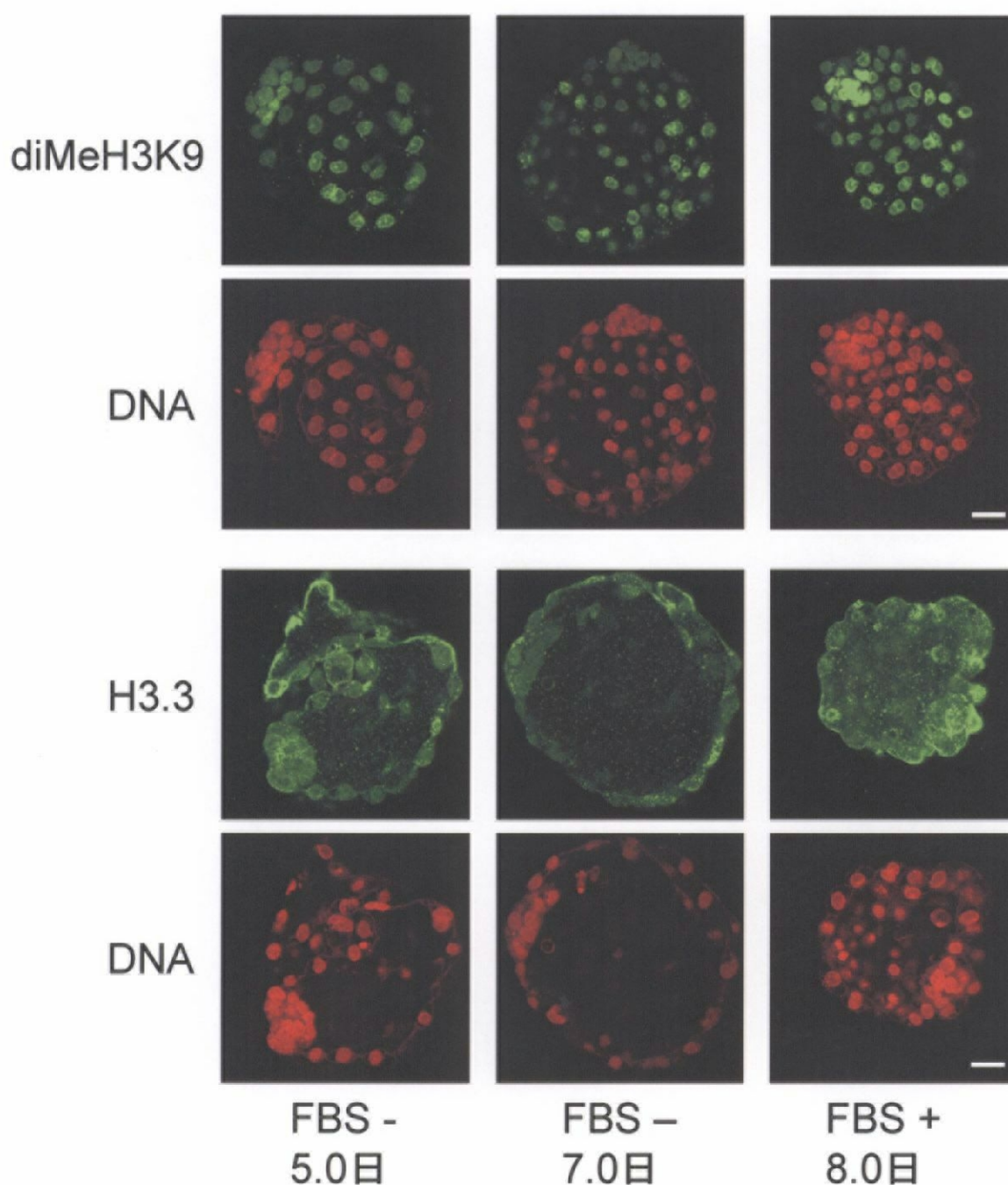


図 4-5 媒精後、KSOM 中で 5.0 日間、7.0 日間培養した胚、及び 7.0 日目に 10% FBS を添加し、さらに 24 時間培養した 8.0 日目胚におけるヒストン H3 Lysine 9 のジメチル化修飾 (diMeH3K9) およびヒストン H3.3 の検出

抗 diMeH3K9 抗体または抗 H3.3 抗体を用いて免疫染色を行い、FITC 標識の二次抗体を用いて検出した。DNA 染色には propidium iodide を用いた。白棒線は 20 μ m を示す。

総括

マウスの胚は着床期に、それまでの内在的にプログラム化された外因性シグナル非依存的な発生調節機構から、外因性シグナル依存的な調節機構へと切り替えを行うと考えられる。ちょうどこの時期に卵巣から分泌される E_2 は、着床期に胚に対して作用する主要な外因性シグナルであり、その後の胚発生において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

まず、着床期の細胞増殖調節機構転換後の細胞周期進行において E_2 が重要な役割を担っていることを示唆する結果を得た。着床期までの初期胚では、胚は G1 期進行の重要な構成因子である pRB やサイクリン D1 を発現しておらず (Iwamori et al. 2002)、G1 期をほとんど欠いた S 期と M 期の繰り返しからなる細胞周期を進行する (Chisholm 1988; Smith and Johnson 1986)。ところが着床期に近い胚盤胞期後期になると、胚では pRb の発現が開始される (Iwamori et al. 2002)。pRB は E2F に結合してその転写活性を抑制するため、pRB の抑制機能を解除し G1 期を進行させるのに、サイクリン D1 の発現が必要となる (Matsushime et al. 1992)。本研究から、この時期にちょうど胚に対して与えられる E_2 由来のシグナルは、胚に作用してサイクリン D1 の発現を上昇させ、同時に p21 の発現を低下させる事が明らかとなった。この結果、着床期に発現の上昇したサイクリン D1 は、まず CDK4/6 と結合して pRB による E2F 不活化を阻害し、解放された E2F は標的遺伝子であるサイクリン E などの S 期移行因子の転写を活性化して、細胞周期を S 期へと進行することが示唆された。一方 p21 の発現は低下することでサイクリン E-CDK2 の機能が解放され、S 期への移行が滞りなく進行されるようになると推測された。

一方、卵巣除去などにより卵巣由来の E_2 のシグナルを遮断された休眠胚の場合には、サイクリン D1 の発現が低下し、その結果 pRB が不活化されず E2F への結合を維持するため E2F の転写活性が抑制され、E2F の標的遺伝子であるサ

イクリン E などの S 期進行に関わる遺伝子の発現も低下し、細胞周期が G1 期で停滞することが示唆された。一方 p21 の発現は上昇し、サイクリン E-CDK2 の機能を抑制すると共に、DNA 複製を阻害し、細胞を G1/G0 期に安定的に維持することが推測された。休眠状態の胚に E₂ の刺激を与えた場合にはサイクリン D1 の発現が誘導され、その結果下流のサイクリン E の発現も上昇し、DNA 複製のライセンス化が可能となり、G1 期から S 期への細胞周期進行が再開されることが示唆された。一方 p21 の発現は低下し、サイクリン E は機能的な抑制からからも解除されると考えられた。サイクリン D1 は外因性のシグナルを受けて細胞周期を進行させる細胞分裂のセンサーとして働くこと (Sherr 1996)、ハムスターの線維芽細胞では、三種類の D 型サイクリンの中でも増殖因子の制御を受けて G1 期の始めに発現が確認されるのはサイクリン D1 だといわれていることから (Lavoie et al. 1996)、外因性のシグナルである E₂ 由来のシグナルが与えられることによってサイクリン D1 の発現が上昇し、マウス胚での G1 期の進行が成立するものと考えられる。

この様に本研究において、マウス胚は着床期に外因性シグナル非依存的な調節機構から外因性シグナル依存的な機構へと細胞周期調節機構を大きく転換させていること、そして転換後の細胞周期の進行開始には卵巣由来の E₂ 由来の刺激が必要であることを強く示唆することができた。

そこで次に、このような遺伝子発現の変化が E₂ によって引き起こされる制御機構を明らかにすることを試みた。交配後 4.0 日目の胚に比べて、休眠胚は総転写活性が有意に低下しており、E₂ を投与した結果活性化した胚では、その総転写活性も休眠胚に比べて有意に上昇していたが、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構であるヒストン修飾の変化を調べた結果、H3K9 のジメチル化修飾と H3.3 の置換がこの総転写活性の変化をもたらす転写制御機構の一部を担って

いることが示唆された。すなわち休眠胚の ICM では、ヒストン H3K9 のジメチル化修飾が増加して ICM における着床期胚の発生進行に関わる遺伝子の発現を抑制し、また活性化胚では、ICM でヒストン H3K9 のジメチル化修飾が低下することで抑制されていた遺伝子の発現が解除されると共に、胚全体でヒストン H3.3 の置換量が増加することで遺伝子発現が促進されることが示唆された。

このように本研究結果では、ヒストンのアセチル化修飾ではなくメチル化修飾と H3.3 の置換が E₂ 由来の刺激に伴う着床期胚の総転写活性の変化と相関した修飾量の変化を示すことが明らかとなった。ヒストンメチル化修飾と遺伝子発現の制御機構については、ヒストンの構成的ヘテロクロマチン化の様な、長期的な遺伝子抑制のメカニズムは知られているが、アセチル化修飾のように遺伝子の転写活性の変化に相関した柔軟な抑制のメカニズムはほとんど知られていない。しかし本研究では、ヒストン H3K9 のジメチル化修飾は胚の休眠化に伴って修飾レベルが上昇し胚の活性化に伴って低下するという、柔軟な変化を示すことが確認された。

HeLa 細胞において、転写因子 EGF ファミリーの一員である E2F-6 は RB 蛋白ファミリーとは無関係な様式で G0 期における遺伝子発現の抑制に関与していることが報告されている (Ogawa et al. 2002)。E2F-6 は多量体のタンパク質複合体を形成し、G0 期に E2F や Myc 結合領域をもつ遺伝子のプロモーターに結合する。これによって複合体に含まれる HMTase は結合領域のヒストン H3K9 をメチル化し、HP1 γ のメチル化 K9 への結合を更に強めることで、遺伝子の発現を抑制していると考えられている (Ogawa et al. 2002)。ヒストン H3K9 のジメチル化修飾は HP1 γ と結合して遺伝子の発現抑制に関わっていることが報告されている (Meehan et al. 2003)。またサイクリン D1 やサイクリン E はそのプロモーターに E2F と Myc の両結合領域を有すること、サイクリン D1 は胚盤胞期の ICM

に発現が見られることから (Faast et al. 2004)、E2F-6 複合体は着床期胚でも H3K9 のジメチル化修飾のレベルが高かった休眠胚の ICM においてサイクリン D1 やサイクリン E のプロモーターに結合し、プロモーター領域や転写領域のヒストン H3K9 をジメチル化してその発現を一時的に抑制し、細胞周期を G0 期に維持している可能性がある。

一方これまでの報告では、遺伝子の転写活性化においてヒストンのアセチル化修飾がよく研究されており、それぞれの残基に付加されるアセチル化と転写活性との関連が明らかにされてきている (Kristjuhan et al. 2002; Kurdistani et al. 2004; Peterson and Laniel 2004; Pokholok et al. 2005; Sterner and Berger 2000)。さらにヒストンアセチル化酵素には、増殖因子受容体からのシグナル伝達系の下流にあり、転写因子複合体の一員として働く p300/CBP のような因子や、核内受容体と複合体を形成して標的遺伝子のプロモーターに結合し、転写活性化に関与する、SRC-1 や ACTR のような因子も数多く報告されており (Sterner and Berger 2000)、外因性のシグナルによってヒストンのアセチル化レベルが変化することが示唆されている。ただ、本研究で調べた H3K9 や H3K18、H4K12 のアセチル化修飾は、胚の総転写活性との間に相関を示さなかった。しかし今回調べなかった H3K14 や H3K27 のアセチル化修飾も、酵母においては転写活性との高い相関が報告されていることから (Kurdistani et al. 2004; Pokholok et al. 2005)、これらの Lysine 残基のアセチル化レベルが E₂ からのシグナルによって変化し、着床期胚の転写活性を制御している可能性もある。

また本研究では、胚培養系での胚発生停止現象を利用して、*in vivo* の着床遅延モデルで得られる休眠胚および活性化胚と同様の胚を *in vitro* で作出する培養系の構築を試みた。その結果、胚の outgrowth を指標に作出した *in vitro* における休眠状態および活性化状態の胚では、*in vivo* の休眠胚および活性化胚で確認

された遺伝子発現制御機構や細胞周期制御機構が完全には再現されていないことが明らかとなった。これによって、*in vivo* の着床期胚発生 of 正確なモデルとなる *in vitro* の実験系の作出にはこの時期の胚発生 of 基礎となる細胞分裂および遺伝子発現調節因子に関する情報の集積が重要であることが明らかとなった。本研究で得られた、細胞周期調節因子の発現およびヒストン修飾の変化に関する結果は、このような情報の一端となるものと思われる。

引用文献

- Adenot PG, Mercier Y, Renard JP, Thompson EM. 1997. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* 124(22):4615-4625.
- Ahmad K, Henikoff S. 2002a. Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4:16477-16484.
- Ahmad K, Henikoff S. 2002b. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* 9(6):1191-1200.
- Aiken CE, Swoboda PP, Skepper JN, Johnson MH. 2004. The direct measurement of embryogenic volume and nucleo-cytoplasmic ratio during mouse pre-implantation development. *Reproduction* 128(5):527-535.
- Armant DR, Kaplan HA, Lennarz WJ. 1986. Fibronectin and laminin promote in vitro attachment and outgrowth of mouse blastocysts. *Dev Biol* 116(2):519-523.
- Arney KL, Fisher AG. 2004. Epigenetic aspects of differentiation. *J Cell Sci* 117(Pt 19):4355-4363.
- Barlow P, Owen DA, Graham C. 1972. DNA synthesis in the preimplantation mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol* 27(2):431-445.
- Basak S, Dubanchet S, Zourbas S, Chaouat G, Das C. 2002. Expression of pro-inflammatory cytokines in mouse blastocysts during implantation: modulation by steroid hormones. *Am J Reprod Immunol* 47(1):2-11.
- Bitton-Casimiri V, Brun JL, Psychoyos A. 1976. Uptake and incorporation of (3H)uridine by normal or diapausing rat blastocysts after various periods of culture. *J Reprod Fertil* 46(2):447-448.
- Brown N, Deb K, Paria BC, Das SK, Reese J. 2004. Embryo-uterine interactions via the neuregulin family of growth factors during implantation in the mouse. *Biol Reprod* 71(6):2003-2011.
- Bulus N, Barnard JA. 1999. Heparin binding epidermal growth factor-like growth factor is a transforming growth factor beta-regulated gene in intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264(3):808-812.
- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. 2000. Embryo implantation. *Dev Biol* 223(2):217-237.
- Chavez DJ, Enders AC, Schlafke S. 1984. Trophectoderm cell subpopulations in the periimplantation mouse blastocyst. *J Exp Zool* 231(2):267-271.
- Chen B, Pan H, Zhu L, Deng Y, Pollard JW. 2005. Progesterone inhibits the estrogen-induced phosphoinositide 3-kinase-->AKT-->GSK-3beta-->cyclin D1-->pRB pathway to block uterine epithelial cell proliferation. *Mol Endocrinol*

- 19(8):1978-1990.
- Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ. 1999. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J* 18(6):1571-1583.
- Chisholm JC. 1988. Analysis of the fifth cell cycle of mouse development. *J Reprod Fertil* 84(1):29-36.
- Cicatiello L, Addeo R, Sasso A, Altucci L, Petrizzi VB, Borgo R, Cancemi M, Caporali S, Caristi S, Scafoglio C, Teti D, Bresciani F, Perillo B, Weisz A. 2004. Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol Cell Biol* 24(16):7260-7274.
- Coverley D, Laman H, Laskey RA. 2002. Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nat Cell Biol* 4(7):523-528.
- Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V. 2002. Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111(2):185-196.
- Daftary GS, Taylor HS. 2004. Pleiotropic effects of Hoxa10 on the functional development of peri-implantation endometrium. *Mol Reprod Dev* 67(1):8-14.
- Dardik A, Smith RM, Schultz RM. 1992. Colocalization of transforming growth factor-alpha and a functional epidermal growth factor receptor (EGFR) to the inner cell mass and preferential localization of the EGFR on the basolateral surface of the trophectoderm in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 154(2):396-409.
- Das SK, Das N, Wang J, Lim H, Schryver B, Plowman GD, Dey SK. 1997. Expression of betacellulin and epiregulin genes in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition is coincident with the "window" of implantation. *Dev Biol* 190(2):178-190.
- Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, Andrews GK, Dey SK. 1994. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 120(5):1071-1083.
- Daujat S, Bauer UM, Shah V, Turner B, Berger S, Kouzarides T. 2002. Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr Biol* 12(24):2090-2097.

- Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. 2004. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 25(3):341-373.
- Durrin LK, Mann RK, Kayne PS, Grunstein M. 1991. Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation in vivo. *Cell* 65(6):1023-1031.
- Enders AC, Chavez DJ, Schlafke S. 1981. Comparison of implantation in utero and in vitro. In: Glasser SR, Bullock DW, editors. *Cellular and Molecular Aspects of Implantation*. New York: Plenum Press. pp 365-382.
- Faast R, White J, Cartwright P, Crocker L, Sarcevic B, Dalton S, Kohoutek J, Dvorak P, Hampl A. 2004. Cdk6-cyclin D3 activity in murine ES cells is resistant to inhibition by p16(INK4a)
- Temporal distribution of CDK4, CDK6, D-type cyclins, and p27 in developing mouse oocytes. *Oncogene* 23(2):491-502.
- Ferreira J, Carmo-Fonseca M. 1995. The biogenesis of the coiled body during early mouse development. *Development* 121(2):601-612.
- Fuchimoto D, Aoki F, Kohmoto K. 1994. Expression of Cyclins Genes during Preimplantation Development in mice. *J Mamm Ova Res* 11(2):216-224.
- Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H, Sicinski P. 2003. Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 114(4):431-443.
- Geng Y, Yu Q, Whoriskey W, Dick F, Tsai KY, Ford HL, Biswas DK, Pardee AB, Amati B, Jacks T, Richardson A, Dyson N, Sicinski P. 2001. Expression of cyclins E1 and E2 during mouse development and in neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23):13138-13143.
- Giebelhaus DH, Weitlauf HM, Schultz GA. 1985. Actin mRNA content in normal and delayed implanting mouse embryos. *Dev Biol* 107(2):407-413.
- Given RL, Weitlauf HM. 1981. Resumption of DNA synthesis during activation of delayed implanting mouse blastocysts. *J Exp Zool* 218(2):253-259.
- Graham CF. 1973. Nucleic acid metabolism during early mammalian development. In: Segal SJ, Crozier R, Corfman PA, Condliffe PG, editors. *The regulation of mammalian reproduction*. Springfield: Thomas, C. C. pp 286-298.
- Grant PA, Eberharter A, John S, Cook RG, Turner BM, Workman JL. 1999. Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem* 274(9):5895-5900.
- Gudas JM, Payton M, Thukral S, Chen E, Bass M, Robinson MO, Coats S. 1999. Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers. *Mol Cell Biol* 19(1):612-622.

- Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. 2004a. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell* 6(1):117-131.
- Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MS, Dey SK. 2004b. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28):10326-10331.
- Hiroi H, Momoeda M, Inoue S, Tsuchiya F, Matsumi H, Tsutsumi O, Muramatsu M, Taketani Y. 1999. Stage-specific expression of estrogen receptor subtypes and estrogen responsive finger protein in preimplantational mouse embryos. *Endocr J* 46(1):153-158.
- Hou Q, Paria BC, Mui C, Dey SK, Gorski J. 1996. Immunolocalization of estrogen receptor protein in the mouse blastocyst during normal and delayed implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6):2376-2381.
- Huang S, Litt M, Felsenfeld G. 2005. Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications. *Genes Dev* 19(16):1885-1893.
- Iwamori N, Naito K, Sugiura K, Tojo H. 2002. Preimplantation-embryo-specific cell cycle regulation is attributed to the low expression level of retinoblastoma protein. *FEBS Lett* 526(1-3):119-123.
- Jackson DA, Hassan AB, Errington RJ, Cook PR. 1993. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *Embo J* 12(3):1059-1065.
- Jackson PK, Chevalier S, Philippe M, Kirschner MW. 1995. Early events in DNA replication require cyclin E and are blocked by p21CIP1. *J Cell Biol* 130(4):755-769.
- Janicki SM, Tsukamoto T, Salghetti SE, Tansey WP, Sachidanandam R, Prasanth KV, Ried T, Shav-Tal Y, Bertrand E, Singer RH, Spector DL. 2004. From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell* 116(5):683-698.
- Jones DO, Cowell IG, Singh PB. 2000. Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays* 22(2):124-137.
- Kerkhoff E, Rapp UR. 1997. Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1. *Mol Cell Biol* 17(5):2576-2586.
- Kim JM, Ogura A, Nagata M, Aoki F. 2002. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer. *Biol Reprod* 67(3):760-766.
- Kimura A, Horikoshi M. 1998. Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core

- histones in vitro. *Genes Cells* 3(12):789-800.
- Kondo Y, Shen L, Yan PS, Huang TH, Issa JP. 2004. Chromatin immunoprecipitation microarrays for identification of genes silenced by histone H3 lysine 9 methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(19):7398-7403.
- Kowalik A, Liu HC, He ZY, Mele C, Barmat L, Rosenwaks Z. 1999. Expression of the insulin-like growth factor-1 gene and its receptor in preimplantation mouse embryos; is it a marker of embryo viability? *Mol Hum Reprod* 5(9):861-865.
- Kristjuhan A, Walker J, Suka N, Grunstein M, Roberts D, Cairns BR, Svejstrup JQ. 2002. Transcriptional inhibition of genes with severe histone h3 hypoacetylation in the coding region. *Mol Cell* 10(4):925-933.
- Kurdistani SK, Tavazoie S, Grunstein M. 2004. Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* 117(6):721-733.
- Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* 16(22):2893-2905.
- Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T. 2003. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* 116(Pt 11):2117-2124.
- Latham KE, Schultz RM. 2001. Embryonic genome activation. *Front Biosci* 6:D748-759.
- Lauper N, Beck AR, Cariou S, Richman L, Hofmann K, Reith W, Slingerland JM, Amati B. 1998. Cyclin E2: a novel CDK2 partner in the late G1 and S phases of the mammalian cell cycle. *Oncogene* 17(20):2637-2643.
- Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. 1996. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271(34):20608-20616.
- Lawitts JA, Biggers JD. 1993. Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol* 225:153-164.
- Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH. 2003. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* 13(14):1192-1200.
- Li E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3(9):662-673.
- Lim H, Das SK, Dey SK. 1998. erbB genes in the mouse uterus: cell-specific signaling by epidermal growth factor (EGF) family of growth factors during implantation.

- Dev Biol 204(1):97-110.
- Lim H, Dey SK, Das SK. 1997. Differential expression of the erbB2 gene in the periimplantation mouse uterus: potential mediator of signaling by epidermal growth factor-like growth factors. *Endocrinology* 138(3):1328-1337.
- Lim H, Song H, Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. 2002. Molecules in blastocyst implantation: uterine and embryonic perspectives. *Vitam Horm* 64:43-76.
- Lopes FL, Desmarais JA, Murphy BD. 2004. Embryonic diapause and its regulation. *Reproduction* 128(6):669-678.
- Lund AH, van Lohuizen M. 2004. Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 16(3):239-246.
- Makowski AM, Dutnall RN, Annunziato AT. 2001. Effects of acetylation of histone H4 at lysines 8 and 16 on activity of the Hat1 histone acetyltransferase. *J Biol Chem* 276(47):43499-43502.
- Marshall C. 1999. How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol* 11(6):732-736.
- Martin AM, Pouchnik DJ, Walker JL, Wyrick JJ. 2004. Redundant roles for histone H3 N-terminal lysine residues in subtelomeric gene repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 167(3):1123-1132.
- Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, Sherr CJ. 1992. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 71(2):323-334.
- McKittrick E, Gafken PR, Ahmad K, Henikoff S. 2004. Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(6):1525-1530.
- McLaren A. 1968. A study of blastocysts during delay and subsequent implantation in lactating mice. *J Endocrinol* 42(3):453-463.
- Mead RA. 1993. Embryonic diapause in vertebrates. *J Exp Zool* 266(6):629-641.
- Meehan RR, Kao CF, Pennings S. 2003. HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *Embo J* 22(12):3164-3174.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R, Schule R. 2005. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437(7057):436-439.
- Mito Y, Henikoff JG, Henikoff S. 2005. Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat Genet* 37(10):1090-1097.
- Moazed D. 2001. Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol Cell*

- 8(3):489-498.
- Mohamed OA, Dufort D, Clarke HJ. 2004. Expression and estradiol regulation of Wnt genes in the mouse blastocyst identify a candidate pathway for embryo-maternal signaling at implantation. *Biol Reprod* 71(2):417-424.
- Molls M, Zamboglou N, Streffer C. 1983. A comparison of the cell kinetics of pre-implantation mouse embryos from two different mouse strains. *Cell Tissue Kinet* 16(3):277-283.
- Moore GD, Ayabe T, Kopf GS, Schultz RM. 1996. Temporal patterns of gene expression of G1-S cyclins and cdks during the first and second mitotic cell cycles in mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 45(3):264-275.
- Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. 2005. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1:R47-58.
- Moriuchi A, Hirano S, Ido A, Ochiai T, Nakama T, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. 2001. Additive and inhibitory effects of simultaneous treatment with growth factors on DNA synthesis through MAPK pathway and G1 cyclins in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 280(1):368-373.
- Nakasato M, Nagata M, Aoki F. 2004. Expression of cytokine receptors in pre-implantation mouse embryos. *J Mamm Ova Res* 21(3):128-133.
- Nevins JR, Chellappan SP, Mudryj M, Hiebert S, Devoto S, Horowitz J, Hunter T, Pines J. 1991. E2F transcription factor is a target for the RB protein and the cyclin A protein. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 56:157-162.
- Nieder GL, Weitlauf HM, Suda-Hartman M. 1987. Synthesis and secretion of stage-specific proteins by peri-implantation mouse embryos. *Biol Reprod* 36(3):687-699.
- O'Neill LP, Turner BM. 1995. Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription-independent manner. *Embo J* 14(16):3946-3957.
- Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM, Nakatani Y. 2002. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296(5570):1132-1136.
- Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ. 1998. Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21^{Waf1/Cip1}. *Nature* 394(6690):295-299.
- Ongusaha PP, Kwak JC, Zwible AJ, Macip S, Higashiyama S, Taniguchi N, Fang L, Lee SW. 2004. HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res* 64(15):5283-5290.
- Palazon LS, Davies TJ, Gardner RL. 1998. Translational inhibition of cyclin B1 and

- appearance of cyclin D1 very early in the differentiation of mouse trophoblast giant cells. *Mol Hum Reprod* 4(11):1013-1020.
- Paria BC, Das SK, Andrews GK, Dey SK. 1993a. Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(1):55-59.
- Paria BC, Elenius K, Klagsbrun M, Dey SK. 1999. Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Development* 126(9):1997-2005.
- Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. 1993b. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21):10159-10162.
- Paria BC, Lim H, Wang XN, Liehr J, Das SK, Dey SK. 1998. Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholesterogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology* 139(12):5235-5246.
- Paria BC, Ma W, Tan J, Raja S, Das SK, Dey SK, Hogan BL. 2001. Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3):1047-1052.
- Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. 2002. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 296(5576):2185-2188.
- Parthun MR, Widom J, Gottschling DE. 1996. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* 87(1):85-94.
- Perry JE, Grossmann ME, Tindall DJ. 1998. Epidermal growth factor induces cyclin D1 in a human prostate cancer cell line. *Prostate* 35(2):117-124.
- Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JH, Jenuwein T. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* 12(6):1577-1589.
- Peterson CL, Laniel MA. 2004. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14(14):R546-551.
- Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolzheimer E, Zeitlinger J, Lewitter F, Gifford DK, Young RA. 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122(4):517-527.

- Psychoyos A. 1973a. CHAPTER 40:Endocrine control of egg implantation. Greep et al. eds. pp 187-215.
- Psychoyos A. 1973b. Hormonal control of ovoidimplantation. *Vitam Horm* 31:201-256.
- Quinn P, Begley AJ. 1984. Effect of human seminal plasma and mouse accessory gland extracts on mouse fertilization in vitro. *Aust J Biol Sci* 37(3):147-152.
- Raab G, Kover K, Paria BC, Dey SK, Ezzell RM, Klagsbrun M. 1996. Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development* 122(2):637-645.
- Reese J, Brown N, Das SK, Dey SK. 1998. Expression of neu differentiation factor during the periimplantation period in the mouse uterus. *Biol Reprod* 58(3):719-727.
- Ren S, Rollins BJ. 2004. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* 117(2):239-251.
- Renfree MB. 1981. Embryonic diapause in marsupials. *J Reprod Fertil Suppl* 29:67-78.
- Renfree MB, Shaw G. 2000. Diapause. *Annu Rev Physiol* 62:353-375.
- Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD. 2003. Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell* 12(6):1591-1598.
- Roh TY, Cuddapah S, Zhao K. 2005. Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. *Genes Dev* 19(5):542-552.
- Rougeulle C, Chaumeil J, Sarma K, Allis CD, Reinberg D, Avner P, Heard E. 2004. Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. *Mol Cell Biol* 24(12):5475-5484.
- Schorpp-Kistner M, Wang ZQ, Angel P, Wagner EF. 1999. JunB is essential for mammalian placentation. *Embo J* 18(4):934-948.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18(11):1251-1262.
- Schubeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, van Leeuwen F, Gottschling DE, O'Neill LP, Turner BM, Delrow J, Bell SP, Groudine M. 2004. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* 18(11):1263-1271.
- Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ, 3rd. 2002. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB

- zinc-finger proteins. *Genes Dev* 16(8):919-932.
- Schwartz BE, Ahmad K. 2005. Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev* 19(7):804-814.
- Shaulian E, Karin M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4(5):E131-136.
- Sherr CJ. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274(5293):1672-1677.
- Sherr CJ, Roberts JM. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13(12):1501-1512.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA. 2004. Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell* 119(7):941-953.
- Smith CM, Haimberger ZW, Johnson CO, Wolf AJ, Gafken PR, Zhang Z, Parthun MR, Gottschling DE. 2002. Heritable chromatin structure: mapping "memory" in histones H3 and H4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4:16454-16461.
- Smith ER, Eisen A, Gu W, Sattah M, Pannuti A, Zhou J, Cook RG, Lucchesi JC, Allis CD. 1998. ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7):3561-3565.
- Smith RK, Johnson MH. 1986. Analysis of the third and fourth cell cycles of mouse early development. *J Reprod Fertil* 76(1):393-399.
- Smith RM, Garside WT, Aghayan M, Shi CZ, Shah N, Jarett L, Heyner S. 1993. Mouse preimplantation embryos exhibit receptor-mediated binding and transcytosis of maternal insulin-like growth factor I. *Biol Reprod* 49(1):1-12.
- Smith SE, French MM, Julian J, Paria BC, Dey SK, Carson DD. 1997. Expression of heparan sulfate proteoglycan (perlecan) in the mouse blastocyst is regulated during normal and delayed implantation. *Dev Biol* 184(1):38-47.
- Snow MH. 1977. Gastrulation in the mouse: growth and regionalization of the epiblast. *J Embryol Exp Morphol* 42:293-303.
- Squires MS, Nixon PM, Cook SJ. 2002. Cell-cycle arrest by PD184352 requires inhibition of extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 but not ERK5/BMK1. *Biochem J* 366(Pt 2):673-680.
- Sterner DE, Berger SL. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(2):435-459.
- Streffer C, van Beuningen D, Molls M, Zamboglou N, Schulz S. 1980. Kinetics of cell proliferation in the pre-implanted mouse embryo in vivo and in vitro. *Cell Tissue Kinet* 13(2):135-143.
- Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH. 1993. Developmental regulation of integrin

- expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* 119(4):1175-1186.
- Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y. 2002. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev* 16(14):1779-1791.
- Tachibana M, Ueda J, Fukuda M, Takeda N, Ohta T, Iwanari H, Sakihama T, Kodama T, Hamakubo T, Shinkai Y. 2005. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev* 19(7):815-826.
- Tan J, Raja S, Davis MK, Tawfik O, Dey SK, Das SK. 2002. Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation. *Mech Dev* 111(1-2):99-113.
- Tanaka TS, Kunath T, Kimber WL, Jaradat SA, Stagg CA, Usuda M, Yokota T, Niwa H, Rossant J, Ko MS. 2002. Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res* 12(12):1921-1928.
- Thorne AW, Kmiecik D, Mitchelson K, Sautiere P, Crane-Robinson C. 1990. Patterns of histone acetylation. *Eur J Biochem* 193(3):701-713.
- Tong BJ, Das SK, Threadgill D, Magnuson T, Dey SK. 1996. Differential expression of the full-length and truncated forms of the epidermal growth factor receptor in the preimplantation mouse uterus and blastocyst. *Endocrinology* 137(4):1492-1496.
- Turner BM. 1998. Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cell Mol Life Sci* 54(1):21-31.
- Turner BM, Fellows G. 1989. Specific antibodies reveal ordered and cell-cycle-related use of histone-H4 acetylation sites in mammalian cells. *Eur J Biochem* 179(1):131-139.
- van Steensel B. 2005. Mapping of genetic and epigenetic regulatory networks using microarrays. *Nat Genet* 37 Suppl:S18-24.
- Wang H, Matsumoto H, Guo Y, Paria BC, Roberts RL, Dey SK. 2003. Differential G protein-coupled cannabinoid receptor signaling by anandamide directs blastocyst activation for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25):14914-14919.
- Wang J, Paria BC, Dey SK, Armant DR. 1999. Stage-specific excitation of cannabinoid receptor exhibits differential effects on mouse embryonic development. *Biol Reprod* 60(4):839-844.

- Wang W, Nacusi L, Sheaff RJ, Liu X. 2005. Ubiquitination of p21(Cip1/WAF1) by SCF(Skp2): Substrate Requirement and Ubiquitination Site Selection. *Biochemistry* 44(44):14553-14564.
- Weitlauf H, Kiessling A, Buschman R. 1979. Comparison of DNA polymerase activity and cell division in normal and delayed-implanting mouse embryos. *J Exp Zool* 209(3):467-472.
- Weitlauf HM. 1974. Metabolic changes in the blastocysts of mice and rats during delayed implantation. *J Reprod Fertil* 39(1):213-224.
- Weitlauf HM, Greenwald GS. 1968. Influence of estrogen and progesterone on the incorporation of 35S methionine by blastocysts in ovariectomized mice. *J Exp Zool* 169(4):463-469.
- Weitlauf HM, Kiessling AA. 1980. Comparison of overall rates of RNA synthesis in implanting and delayed implanting mouse blastocysts in vitro. *Dev Biol* 77(1):116-129.
- Whitten WK. 1955. Endocrine studies on delayed implantation in lactating mice. *J Endocrinol* 13(1):1-6.
- Whitten WK. 1971. Nutrient requirement for the culture of preimplantation embryos. *Adv Biosci* 6:129-139.
- Wianny F, Real FX, Mummery CL, Van Rooijen M, Lahti J, Samarut J, Savatier P. 1998. G1-phase regulators, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3: up-regulation at gastrulation and dynamic expression during neurulation. *Dev Dyn* 212(1):49-62.
- Wiley LM, Wu JX, Harari I, Adamson ED. 1992. Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after the four-cell preimplantation stage in murine development. *Dev Biol* 149(2):247-260.
- Worrad DM, Turner BM, Schultz RM. 1995. Temporally restricted spatial localization of acetylated isoforms of histone H4 and RNA polymerase II in the 2-cell mouse embryo. *Development* 121(9):2949-2959.
- Wu TC, Wang L, Wan YJ. 1992. Expression of estrogen receptor gene in mouse oocyte and during embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 33(4):407-412.
- Yelian FD, Yang Y, Hirata JD, Schultz JF, Armant DR. 1995. Molecular interactions between fibronectin and integrins during mouse blastocyst outgrowth. *Mol Reprod Dev* 41(4):435-448.
- Yoshinaga K, Adams CE. 1966. Delayed implantation in the spayed, progesterone treated adult mouse. *J Reprod Fertil* 12(3):593-595.
- Zariwala M, Liu J, Xiong Y. 1998. Cyclin E2, a novel human G1 cyclin and activating partner of CDK2 and CDK3, is induced by viral oncoproteins. *Oncogene*

References

- 17(21):2787-2798.
- Zhang Z, Laping J, Glasser S, Day P, Mulholland J. 1998. Mediators of estradiol-stimulated mitosis in the rat uterine luminal epithelium. *Endocrinology* 139(3):961-966.
- Zhao X, Ma W, Das SK, Dey SK, Paria BC. 2000. Blastocyst H(2) receptor is the target for uterine histamine in implantation in the mouse. *Development* 127(12):2643-2651.

謝辞

本論文を終えるにあたり、研究の機会を与えてくださり本研究を指導して頂きました、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻動物育種繁殖学教室教授・酒井仙吉先生、同助教授・今川和彦先生、同助手・永岡謙太郎先生に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、研究の場と実質的な御指導・御鞭撻を頂きました、同大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻資源生物制御学分野教授・永田昌男先生、同助教授・青木不学先生に深謝いたします。特に青木不学先生には、研究テーマの決定から実験手法や考察、論文作成等の全ての面に於いて多大なる御指導とお力添えを頂きました。心から感謝申し上げます。

また本研究において様々な御指導を頂きました、獣医学専攻や学外研究機関の諸先生方、適切な御助言を頂きました宮城大学の須田義人博士、様々な面で研究生生活を支えて頂きました動物育種繁殖学教室の立川君子さんに厚く御礼申し上げます。

動物育種繁殖学教室と資源生物制御学分野において研究生生活を共にした多くの諸先輩・諸後輩の方々には、日々の実験において様々な御助言や御協力を頂き、また日々の生活においても多くのお力添えを頂きました。深く感謝いたします。

最後に、本研究を円滑に進めるように素晴らしい環境を提供して頂いた家族ならびに、様々な苦勞および困難にも励ましの言葉を頂き研究生生活を支えて下さったすべての人に感謝の意を表します。