

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062012

研究課題名（和文） 核移植技術を用いた生殖系列の全能性獲得機構の解明

研究課題名（英文） Nuclear transfer for the analysis of the mechanisms of totipotency acquisition in the germline

## 研究代表者

小倉 淳郎 (OGURA ATSUO)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・室長

研究者番号：20194524

## 研究成果の概要（和文）：

生殖細胞ゲノムは、受精の前後に全能性（受精卵のゲノム状態）を獲得することができる。その機構を理解するために、マウスのライフサイクルのさまざまなステージの細胞をドナーとして核移植を行い、再構築された胚・胎仔組織のエピジェネティクス状態を解析した。その結果、一部の抑制性ヒストンメチル化など特定のエピジェネティクス修飾以外は、MII 卵子で再プログラム化され、全能性ゲノムが獲得されることが明らかになった。

## 研究成果の概要（英文）：

The germ cell genome can acquire totipotency, the genomic state of early fertilized embryos. To obtain clues to understanding the mechanisms of acquisition of totipotency by the germ cells, the epigenetic characteristics in the embryos reconstructed with different donor cell nuclei during the life cycle were analyzed using the mouse as the model. The results indicated that mature MII oocytes could reprogram all the epigenetic modifications with only some exceptions including a certain histone tail methylation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	20,200,000	0	20,200,000
2009年度	20,200,000	0	20,200,000
2010年度	20,200,000	0	20,200,000
2011年度	24,200,000	0	24,200,000
2012年度	24,200,000	0	24,200,000
総計	109,000,000	0	109,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：核移植、全能性、生殖系列、エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生殖細胞は、その早い性決定のために個体発生初期に始原生殖細胞 (PGC) として発生を開始し、その後は体細胞とは一生を通じて細胞系列上厳密に隔離され、配偶子として分化をしていく。しかし配偶子は受精によりそのゲノムを次世代へつなげ、新しい生命を誕生させるという大きな役割もある。

すなわち生殖細胞ゲノムは生殖細胞として分化を続けながらも、一方で全能性獲得（再プログラム化あるいは初期化）の準備を進めるといった二律背反状態で配偶子まで発生することになる。現在まで多くの研究者の衆目は前者の「分化」に集まり、実際にその過程に関与する多くの遺伝子群が明らかにされてきた。しかしながら生殖細胞の本質に関わ

るはずの後者の「初期化の準備」については全く明らかにされていない。これは通常の生殖の範疇内にはその解析手段が無いためである。そのヒントを得る数少ない実験系の一つが、核移植クローン技術である。本研究は、体細胞を用いた核移植クローンで生じる異常の背景には体細胞と生殖細胞のゲノム初期化の差があるはずであるとの前提で開始した。

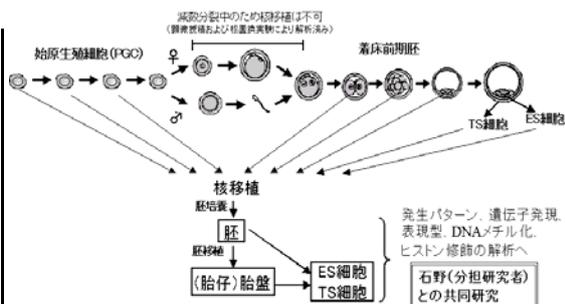
## 2. 研究の目的

本研究は、核移植クローン技術と分子生物学的解析技術を組み合わせることにより、生殖細胞特有の全能性獲得に関わるゲノム構造あるいは機能を明らかにすることを目的として行った。一般に哺乳類の生殖細胞は、配偶子（卵子および精子）すなわち分化細胞として機能しつつ、一方で受精時にはそれまでの記憶を消去して全能性ゲノムを獲得しなければならないという二律背反の運命を背負っている。本研究では、後者の全能性獲得の機構（あるいはその準備）こそが次世代にゲノムを伝える生殖細胞の本質であるとの認識をもとに、それがいつどのように生じるか、そしてその際にゲノム上にどのようなエピジェネティクス変化が起こっているかについて核移植技術を用いて、明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究の構成は大きく分けて、核移植クローン実験と、その得られた胚・胎盤のエピジェネティクス解析の2つの柱からなる。核移植クローンのドナー細胞としては、始原生殖細胞から減数分裂前までの生殖細胞、および受精後の着床前期胚の割球 (blastomere) を用いる。解析対象は、初期化の指標として核移植クローンにおける定型的な異常に絞るために、1) 着床前期胚、2) 初期胎盤、3) これらから派生する幹細胞 (ES 細胞および TS 細胞) とした。

これらの発生率、遺伝子発現パターン、DNAメチル化、ヒストン修飾パターンを解析する。そして正常初期化のマーカーが生殖系列のどの時期に現れ、どの時期に消去されるかを特定し、その時期に生じるより上位のエピジェネティック変化の解析、すなわち DNAメチル化やヒストン（脱）アセチル化関連酵素や転写因子などの関与を解析する。最終的な目標として、体細胞ゲノムの初期化の人為的制御を目指す。適宜、ノックアウト、ノックダウン、あるいは mRNA の導入などを実施する。



核移植実験のイメージ図

## 4. 研究成果

まず最も生殖細胞と異なるエピジェネティクス状態を保持すると考えられる体細胞をドナーとして核移植を行った。単一胚盤胞の遺伝子発現パターンをマイクロアレイ法を用いて解析した。マイクロアレイ解析上、3種類の体細胞核移植 (SCNT) 胚盤胞に共通した差次的遺伝子は、164 遺伝子のみであった。そのうち、131 個の発現亢進した遺伝子には特に特徴は見られなかったが、33 個の発現抑制遺伝子はそのうち 20 個が X 染色体上に位置するという特徴が見られた。また、いずれの胚においても、X 染色体遺伝子全般の発現が低下する経過が見られ、X : Autosomal の発現比率が低かった。RNA-FISH により雄 SCNT 胚の Xa 上 Xist も発現していることがわかった。そこで、Xist ノックアウトアレルが Xa 上に存在するドナー細胞を用いてクローンを行ったところ、いずれの SCNT 胚も X 染色体遺伝子の発現が正常に近づき、X : Autosomal の比率も上昇した。興味深いことに、常染色体上遺伝子の低発現遺伝子の多くも改善した。一方、Xist ノックアウトを用いても改善しない X 染色体上遺伝子群が残っていた。この領域は、Wen ら (2009) の minimal LOCKs の領域に含まれていた。この LOCKs 領域は、H3K9me2 が高密度に含まれている。体細胞、胚盤胞、着床直後の胚の ChIP 解析あるいは免疫染色により、これらの H3K9me2 は、着床直後に deposit されること、そして SCNT 胚は、着床後はこの LOCKs 領域は正常に再プログラム化されること (胎盤組織で Xlr が正常に発現を開始) が明らかになった。

また、Xist mRNA に対する RNA 干渉法を用いて、体細胞クローン胚の生存率が改善するかどうか検討を行った。特異的 siRNA を 1 細胞期クローン胚 (雄胚) に注入し、その発生および遺伝子発現パターンの解析を行った。その結果、siRNA による Xist RNA の抑制は、桑実期胚まで観察され、胚盤胞期には、異所性の Xist 発現が回復してしまっていた。しかし、これらの胚を移植したところ、着床直後の 5.5 日胚において、対照の 10 倍以上の確率で正常胚が回収できた。さらに分娩期においては、出生率も 10 倍以上まで改善した。

この結果は、着床前の Xist の異所性発現が、着床後の SCNT 胚の発生に決定的な影響を与えていることを示す。実際に、着床後の Xist 発現パターンを観察したところ、siRNA の有無にかかわらず、自然にクローン胚の異所性 Xist 発現は改善していた。これらを総合的に判断すると、SCNT 胚の遺伝子発現異常は着床前期まで継続するが、そのうち定型的な異常 (Xist 高発現、Xlr と Magea の低発現) は、着床前後の再プログラム化により発現が正常化することが示唆された。

次に、各発生段階の雌雄生殖細胞をドナーとして用いて核移植を行い、その再構築胚における Xist の発現を観察し、刷込み型 XCI 成立機序について検討を行った。その結果、fully grown GV 期卵子 (直径約 70  $\mu\text{m}$ ) 以外、すべての雌雄生殖細胞由来のクローン胚から Xist が発現することが明らかになった。すなわち、Xist は 4 細胞期ころから胚性遺伝子の一つとして発現することが本来の設定 (default) であり、卵子発育の最終段階でのみ Xist の発現を抑制するインプリントが入り、これが受精卵へ伝わると考えられる。この結果は、マウスに典型的に見られる刷込み型 XCI が父方でなく、母方のインプリントで制御されるという説を支持する。また、これにより、以前報告した体細胞クローン胚における異所性 Xist 発現も説明できる。また、さらに TS 細胞など胎盤組織細胞の核移植クローン胚は、異所性の Xist を発現したことから、母方のインプリントは、胎盤側の細胞においても消去されることが示された。生殖細胞ゲノムが完全な全能性を獲得するためには、生殖細胞の発生初期からインプリントや体細胞記憶の消去が生じ、最終的に受精の段階で大規模な変換を受ける。これらのエピゲノムレベルの変化は生殖細胞の発生段階に高い特異的があり、必ずしも成熟卵子がすべてを制御できるものではないことが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

すべて査読有り

1. Oikawa M, Matoba S, Inoue K, Kamimura S, Hirose M, Ogonuki N, Shiura H, Sugimoto M, Abe K, Ishino F, Ogura A. RNAi-mediated knockdown of Xist does not rescue the impaired development of female cloned mouse embryos. *J Reprod Dev* (in press)
2. Ogura A, Inoue K, Wakayama T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos Trans R*

*Soc Lond B Biol Sci* 368: 20110329. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0329>

3. Nakamura T, Liu Y-J, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y, Nakano T. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature* 486: 415-419, 2012.
4. Hasegawa A, Mochida K, Matoba S, Yonezawa K, Ohta A, Watanabe G, Taya K, Ogura A. Efficient production of offspring from Japanese wild-derived strains of mice (*Mus musculus molossinus*) by improved assisted reproductive technologies. *Biol Reprod* 86: 86: 167, 1-7, 2012
5. Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, Nakamura T, Abe K, Nakano T, Ishino F, and Ogura A. RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 20621-20626, 2011.
6. Hasegawa A, Yonezawa K, Ohta A, Mochida K, Ogura A. Optimization of a protocol for cryopreservation of mouse spermatozoa using cryotubes. *J Reprod Dev* 58:156-161, 2012.
7. Kohda T, Ogonuki N, Inoue K, Furuse T, Kaneda H, Suzuki T, Kaneko-Ishino T, Wakayama T, Wakana S, Ogura A, Ishino F. Intracytoplasmic sperm injection induces transcriptome perturbation without any transgenerational effect. *Biochem Biophys Res Commun.* 410: 282-288, 2011.
8. Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, & Ogawa T. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471: 504-507, 2011.
9. Ogonuki N, Inoue K, Ogura A. Birth of normal mice following round spermatid injection without artificial oocyte activation. *J Reprod Dev* 57: 534-538, 2011
10. Matoba S, Ogura A. Generation of functional oocytes and spermatids from fetal primordial germ cells after ectopic transplantation in adult animals. *Biol Reprod* 84: 631-838, 2011
11. 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.
12. Honda A, Hirose M, Hatori M, Matoba S, Miyoshi H, Inoue K, Ogura A. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *J Biol Chem* 285: 31362-31369, 2010.
  13. Ogonuki N, Moril M, Shinmen A, Inoue K, Mochida K, Ohta A, Ogura A. The effect on intracytoplasmic sperm injection outcome of genotype, male germ cell stage and freeze-thawing in mice. *PLoS ONE* 5(6): e11062. doi:10.1371/journal.pone.0011062
  14. Inoue K, Ogonuki N, Mekada K, Yoshiki A, Sado T, Ogura A. Sex-reversed somatic cell cloning in the mouse. *J Reprod Dev*, 55: 566-569, 2009.
  15. Miki H, Wakisaka N, Inoue K, Ogonuki N, Mori M, Kim JM, Ohta A, Ogura A. Embryonic rather than extraembryonic tissues have more impact on the development of placental hyperplasia in cloned mice. *Placenta*, 30: 543-546, 2009.
  16. Kim J-M, Ogura A. Changes in allele-specific association of histone modifications at the imprinting control regions during mouse preimplantation development. *Genesis*, 47: 611-616, 2009.
  17. Ogonuki N, Inoue K, Hirose M, Miura I, Mochida K, Sato T, Mise N, Mekada K, Yoshiki A, Abe K, Kurihara H, Wakana S, Ogura A. A high-speed congenic strategy using first-wave male germ cells. *PLoS One*, 4(3): e4943. doi: 10.1371/journal.pone.0004943
  18. Honda A, Hirose M, Ogura A. Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. *Exp Cell Res*, 315: 2033-2042, 2009
  19. Miki H, Hirose M, Ogonuki N, Inoue K, Kezuka F, Honda A, Mekada K, Hanaki K, Iwafune H, Yoshiki A, Ishino F, Ogura A. Efficient production of androgenetic embryos by round spermatid injection. *Genesis*, 47: 155-60, 2009
  20. Honda A, Hirose M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Shimozawa N, Hatori M, Shimizu N, Murata T, Hirose H, Katayama K, Wakisaka N, Miyoshi H, Yokoyama KK, Sankai T, Ogura A. Stable ES cell lines in rabbits - potential small animal models for human ES cell research. *Reprod Biomed Online*, 17: 706-715, 2008.
  21. Wakisaka N, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Sekita Y, Hanaki K, Akatsuka K, Kaneko-Ishino T, Ishino F, Ogura A. Ultrastructure of placental hyperplasia in mice: Comparison of placental phenotypes with three different etiologies. *Placenta*, 29:753-759, 2008
  22. Honda A, Hirose M, Inoue K, Hiura H, Miki H, Ogonuki N, Sugimoto M, Abe K, Kanatsu-Shinohara M, Kono T, Shinohara T, Ogura A. Large-scale production of growing oocytes in vitro from neonatal mouse ovaries. *Int J Dev Biol*, 53:605-613, 2009
  23. Sekita Y, Wagatsuma H, Nakamura K, Ono R, Kagami M, Wakisaka N, Hino T, Suzuki-Migishima R, Kohda T, Ogura A, Ogata T, Yokoyama M, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Role of retrotransposon-derived imprinted gene, *Rtl1*, in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nat Genet*, 40:243-248, 2008
- [学会発表] (計 7 件)
1. Ogura A, Oikawa M, Matoba S, Inoue K, "Analysis of the dynamics of imprinted X chromosome inactivation in mice by nuclear transfer" The 9th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society Manila Philippine, Oct. 24, 2012
  2. Ogura A, Oikawa M, Inoue K, "Nuclear transfer for the study of X chromosome inactivation in mice" Mouse Molecular Genetics California USA, Oct 4, 2012
  3. Ogura A, "Nuclear transfer for the study of epigenetic dynamics in mammalian development" The 84th Annual Meeting of the Genetics Society of Japan Fukuoka, Sep. 24, 2012
  4. Honda A, Hirose M, Hatori M, Ogura A, "Development of ES/iPS cell research using rabbits" SRD-NIAS the 2nd Japan-Czech Joint Symposium Tokyo, Sep. 10, 2012
  5. Ogura A, "X-chromosome inactivation status in cloned mouse embryos"

"Epigenetic Memory" The Company of Biologists Workshop Steyning UK, June 26, 2012

6. Mochida K, Ogura A, "Transportation of frozen and unfrozen materials" EMMA cryopreservation workshop Spain Madrid, May 8, 2012
7. Ogura A, "ICSI and its practical applications" EMMA Cryopreservation Workshop Madrid Spain, May 8, 2012

[図書] (計 9 件)

1. 的場章悟, 井上貴美子, 小倉淳郎 「核移植技術: Xist の機能抑制による体細胞クローン作出効率の改善法」細胞工学, 31, 282-287 (2012).
2. 小倉淳郎 「核移植クローン技術の未来は？」細胞工学, 31, 288-289 (2012).
3. 廣瀬美智子, 小倉淳郎 細胞培養プロトコール (中村幸夫 編) 羊土社 東京 pp.187-197 (2012)
4. 小倉 淳郎, 井上 貴美子, 遺伝子の導入法とノックアウト法 生命の誕生に向けて (第二版) 近代出版 東京 pp273-276 (2011)
5. 小倉 淳郎, 顕微授精と体外受精の比較論 卵子学 (総編集者 森 崇英) 京都大学学術出版会 京都 pp.757-766 (2011)
6. 井上 貴美子, 小倉 淳郎, 活性 X 染色体からの Xist 遺伝子の発現の抑制はマウス体細胞クローンの効率を改善するライフサイエンス新着論文レビュー Vol. 1190 pp1-6 (2010)
7. 本多 新, 小倉 淳郎, 新生仔マウス卵巣から分離された莖膜幹細胞と卵子の特徴について 日本生殖内分泌学会雑誌 Vol.15 pp19-24 (2010)
8. 小倉 淳郎, 井上 貴美子, 核移植によるリプログラミング 細胞 Vol.42 12 pp489-493 (2010)
9. 小倉 淳郎 体細胞クローン動物のエピジェネティクスと表現型 日本胚移植学雑誌 Vol.31 2 pp87-93 (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: クローン動物の作出方法

発明者: 小倉淳郎, 井上貴美子, 石野史敏, 幸田尚, 澤井 健

権利者: 小倉淳郎, 井上貴美子, 石野史敏, 幸田尚, 澤井 健

番号: 2010-197583

出願年月日: 平成 22 年 9 月 3 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.brc.riken.go.jp/lab/kougaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 淳郎 (OGURA ATSUO)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・室長

研究者番号: 20194524

(2) 研究分担者

幸田 尚 (KOHDA TAKASHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号: 60211893

(3) 連携研究者

石野 史敏 (ISHINO FUMITOSHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号: 60159754