

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 26 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：20062015

研究課題名（和文）卵子による核の初期化機構の解明およびその促進方法の開発

研究課題名（英文） Study of nuclear reprogramming using mammalian oocyte

研究代表者

若山 照彦 (WAKAYAMA TERUHIKO)

独立行政法人理化学研究所・ゲノム・リプログラミング研究チーム・チームリーダー

研究者番号：40360672

研究分野：生殖系列

科研費の分科・細目：

キーワード： 初期化、リプログラミング、核移植、クローン動物、卵子、

1. 研究計画の概要

体細胞クローン動物の成功率は現在でも数%しかなく、エピゲノムによる異常がほぼすべてのクローン動物に生じてしまう。その原因は卵子による初期化が不完全であるためだと考えられているが、初期化機構そのものがまったくわかっていない。そこで本研究では、核移植技術を様々な条件で行い、DNA 及びヒストンの修飾変化、卵子細胞質の効果、インプリント遺伝子の発現変化、およびマウスの遺伝的バックグラウンドの影響などについて検討する。最終的に卵子による核の初期化機構の解明を目指すと同時に初期化の促進方法を開発し、体細胞核の完全初期化および異常が生じない健全なクローン個体を高率に作出することを目指している。

2. 研究の進捗状況

(1). 我々はクローンマウスの成功率をヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤 (HDACi) によって改善することに成功したが、それがどの様にクローン動物特異的なエピゲノム異常を修復しているのかわかっていなかった。そこで HDACi 処理後のクローン胚を調べたところ、ヒストンのアセチル化レベルおよび新生 RNA 合成量が受精卵と同レベルに改善されていることが明らかとなった (Bui et al., 2010)。また様々な HDACi で成功率改善の有無を調べた結果、初期化の促進には HDAC クラス IIb を抑えることが重要だということが明らかとなった (Thuan et al., 2009, Ono et al., 2010)。一方、卵子内に存在する初期化因子は、卵子の成熟に伴って変化することが分かってきた。未成熟卵子はドナー核のヒストンを脱メチル化出来るが、成熟するとその能力は失われる。そこで未成熟卵子の細胞質で体細

胞に前処理を行うことで、クローン動物の成功率を改善することに成功した (Bui et al., 2008)。

(2). 従来不可能だった死滅動物からの核移植技術を開発し、最長 16 年間凍結保存されていたマウスの死体や凍結乾燥保存した細胞からクローン個体作出に成功した (Wakayama et al., 2008, Ono et al., 2008)。

(3). 単為発生胚由来の細胞を核移植することでインプリント遺伝子に対する初期化の影響を調べた。その結果、特定の PEG 遺伝子は核移植後に脱メチル化され、受精卵と同じ発現量を示した。さらに核移植を繰り返すことで単為発生胎児は 14.5dpc まで生存可能になった。ところが胎盤は完全発生したことから、単為発生致死は胎盤の形成不全で生じるという従来説を否定し、その原因が胎盤より胎児自身にあることが明らかとなった (Hikichi et al. 2008, 2010)。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。
予定していた実験の多くは計画以上の成果を出すことができたが、中には予備実験でつまづき解決策が見つかっていないものもある。

4. 今後の研究の推進方策

(1). これまでの研究により HDACi による初期化促進には限界があることが分かってきた。そこで HDACi とは異なる作用のエピゲノム改変試薬 (ヒストン脱アセチル化剤など) や、エピゲノムとは直接関係ない試薬 (細胞骨格などに作用する試薬) で核移植を行い、改善可能な試薬を見つけ出す。効果が確認できた試薬については、HDACi との違いを明ら

かにし、初期化を理解する助けとする。
(2). 我々は単為発生由来胎児の死亡時期を最長14.5dpcまで伸ばすことに成功したが、すべての胎児は腸ヘルニアなどの異常が生じていた。そこで様々な初期化促進剤を用いて単為発生胚をより強力に初期化し、エピゲノムの改変および胎児の延命を試みる。
(3). ライブセルイメージングによって個々のクローン胚の中から産仔へ発育可能な胚を選び出す技術を開発する。そして胚の段階でクローン個体へ発育出来る胚と致死の胚を選び出し、エピゲノム修飾の違いを明らかにし、その違いを薬品により特異的に修復してさらなる成功率の改善を試みる
(4). 卵子細胞質に含まれる初期化因子の濃度および量について検討する。卵子細胞質の量を増減した卵子、あるいは遠心処理および細胞質置換により密度に差のある卵子を作出し、初期化因子の存在部位ならびにその発生能を明らかにする。

5. 代表的な研究成果

(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 20 件)

- ① Hikichi T., Ohta H., Wakayama S., and Wakayama T. Functional full-term placentas formed from parthenogenetic embryos using serial nuclear transfer. *Development* 137: 2841-2847, 2010, 査読有り
- ② Ono T., Li C., Mizutani E., Terashita Y., Yamagata K., and Wakayama T. Inhibition of Class IIb Histone Deacetylase Significantly Improves Cloning Efficiency in Mice. *Biol Reprod.* 83:929-937, 2010, 査読有り
- ③ Bui HT., Wakayama S., Kishigami S., Thuan NV, Wakayama T. The cytoplasm of mouse germinal vesicle (GV) stage oocytes can enhance somatic cell nuclear reprogramming. *Development* 135:3935-3945, 2008, 査読有り
- ④ Wakayama S, Ohta H, Hikichi T, Mizutani E, Iwaki T, Kanagawa O, Wakayama T Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20°C for 16 years, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 17318-17322, 2008, 査読有り

[学会発表] (計 24 件)

- ① Wakayama T. Nuclear transfer as a new tool for preserving mouse strain. 9th Transgenic Technology meeting, March 22-24, 2010. Berlin Germany.
- ② Wakayama T. Nuclear transfer as a new tool for study of reproduction and genome preservation. Epigenetics, chromatin & Transcription. Cold Spring Harbor Conferences Asia. May 17-21, 2010. Suzhou, China.

- ③ Wakayama T. Nuclear transfer ES cells as a new tool for basic biology. The sixth Annual Meeting of Asian Reproductive Biotechnology Society. November 16-18. 2009. Siem Reap City, Cambodia.
- ④ Wakayama T. Improvement of efficiency of mouse cloning and ES cell establishment. 12th ADNAT convention. The Biology of Embryonic and Adult Stem Cells, Centre for Cellular and Molecular Biology, February 23-24. 2008. Hyderabad, INDIA

[図書] (計 7 件)

- ① Wakayama S, Mizutani E. and Wakayama T. (ed. Krishnarao Appasani Raghu K. Appasani) Humana Press, USA. Stem Cells & Regenerative Medicine: From Molecular Embryology to Tissue Engineering. 2010, pp351-369.
- ② Wakayama S, Kishigami S, Wakayama T. (ed. Ralf Kuehn, Wolfgang Wurst) Humana Press, USA. Gene Knockout Protocols: *Methods in Molecular Biology* 2009, 530:251-265.
- ③ 若山照彦 アドスリー社 東京. クローンマンモスへの道—クローン技術最前線の技術における発生・再生医療技術を探る 2009年。80ページ
- ④ Wakayama S, and Wakayama T. (ed. Mikkel L. Sorensen). Nova Science Publishers, Inc. New York USA, Stem Cell Applications in Diseases 2008 pp.189-214.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 動物組織からクローン動物ならびにntES細胞を作成するための新規方法

発明者: 若山清香、若山照彦

権利者: 若山清香、若山照彦

種類: 特許

番号: 特願 2008-123133

出願年月日: 2009年11月19日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.cdb.riken.go.jp/grp/>

報道関連情報

2008年11月4日「死体細胞から生命復活凍結16年クローンマウス作成 理研世界初」毎日新聞掲載。同様な見出しで読売新聞や朝日新聞などすべての全国紙で掲載。NHKや民放のテレビでも放映された。またCNN, BBC, National Geographicなど海外でも大きく紹介された。