

平成21年5月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580328

研究課題名（和文）ミニブタ体細胞核移植の成否を判定するための非侵襲的評価系の開発

研究課題名（英文）Development of a noninvasive evaluation system for reprogramming status in miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos

研究代表者

三好 和睦 (MIYOSHI KAZUCHIKA)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：70363611

研究成果の概要：除核卵子に体細胞核を移植すると、その遺伝子発現が受精卵と同じ状態にリプログラミングされ、正常な個体（体細胞クローン動物）に発生する。しかし、その作出効率は極めて低いことから、ほとんどの体細胞核においてはリプログラミングが不完全であると考えられる。本研究では、初期発生過程の細胞において特異的に発現する Oct-3/4 遺伝子を指標として、体細胞核におけるリプログラミングの状態を非侵襲的に判定する系を確立した。この系を用いることにより、体細胞クローン胚の作出法を最適化し、個体への発生率を改善することが可能となる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：発生工学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：体細胞クローニング・核移植・遺伝子改変・ミニブタ・Oct-3/4 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

鹿児島大学で独自に開発・維持されているクラウン系ミニブタは、ヒトとほぼ同じサイズの臓器を持っている。そこで我々は、このミニブタのゲノムを改変し、ヒトへの臓器移植に適した遺伝子改変動物を作製しようとしている。特に、超急性拒絶反応を引き起こす糖転移酵素遺伝子の機能を破壊した遺伝子ノックアウトミニブタの作出を企図しているが、そのためには、効率的な体細胞核移植技術の確立が不可欠である。我々は、超音

波による新規の卵子活性化法を用いてクラウン系ミニブタの体細胞クローンを作成することに成功したが、その効率（仮親に移植したクローン胚のうち産子にまで発生したもの割合）はわずか1.4%であった。このような低い効率の原因として、核移植後、ドナー核が正しくリプログラミングされていないという可能性が考えられる。リプログラミングとは、移植されたドナー核の遺伝子発現が卵細胞質の影響で一旦リセットされ、本来の胚発生に沿った遺伝子発現パターンに

回帰する現象である。一般的に、核移植により得られたクローン動物においては、胎盤および胎仔の重量増加や出生後の高い死亡率および多臓器不全等の発生異常が多発することが知られており、その原因として、ドナー核の不完全なリプログラミングが指摘されている。実際に、クローン胚を分子生物学的に解析した結果、特定遺伝子において高頻度のメチル化が起きていることや、数パーセントの遺伝子群において遺伝子発現パターンが対照である体外受精胚のそれと大きく異なっていることが報告されている。

核移植の成否を如何に判定するか。最も確実な方法は、クローン胚を仮親に移植して産子への発生能力を調べることであるが、妊娠期間が約4ヶ月のブタにおいては結果が出るまでに時間がかかりすぎ、とても効率的とは言えない。上述したように、クローン胚を各ステージでサンプリングし、遺伝子発現パターンを分子生物学的に解析することによって核移植の成否を判定する試みもなされてきた。しかし、時間と労力がかかるうえに、正しくリプログラミングされていると判定されても胚自体をサンプリングしてしまうので、判定後にそれらからクローン動物を得ることはできなくなる。

そこで我々は、移植後のドナー核が正しくリプログラミングされていることを迅速、簡便かつ非侵襲的に判定できる系を考案した。その鍵となるのが、Oct-3/4 遺伝子と発光遺伝子である。Oct-3/4 蛋白は転写因子であり、マウス胚ではその発現は2-細胞期から開始され、初期胚の割球や胚盤胞の内部細胞塊 (inner cell mass: ICM) のような発生初期の幹細胞および embryonic stem (ES) 細胞や embryonal carcinoma (EC) 細胞のような未分化細胞にのみ観察される。Oct-3/4 は、遺伝子カスケードにおける下流側の幾つかの形態形成関連遺伝子群 (Sox-2, hCG, Utf-1, Rex-1, Opn, FGF-4, Esg-1 等) を支配する key master regulatory gene と呼ばれており、その欠落は胚発生の停止を引き起こす。また、Oct-3/4 遺伝子のゲノム構造は、種を超えて高度に保存されており、ブタでも胚盤胞の ICM における特異的発現が報告されている。Oct-3/4 は上述のように、下流側の種々の重要な遺伝子群を支配しているので、クローン胚での Oct-3/4 の異常な発現は、それに支配されている下流側遺伝子の機能にも影響を与え、胚発生異常を誘発する可能性が考えられる。実際に、核移植由来の胚盤胞のほとんどにおいて、Oct-3/4 のレベルが低下しているという報告もある。故に、核移植後のクローン胚における Oct-3/4 発現を調べることは、リプログラミングの程度を把握する良いアッセイ系と捉えられる。

そこで我々は、Oct-3/4 promoter に非侵襲

的な発光遺伝子である enhanced green fluorescent protein (EGFP) を結合させ、これを遺伝子導入した体細胞をドナーとして核移植に用いれば、クローン胚において Oct-3/4 promoter が機能していることを EGFP の蛍光によって確認することができるので、核移植後のドナー核におけるリプログラミングの成否を早い段階で判定することが可能となるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ミニブタ体細胞核移植の成否を迅速、簡便、かつ非侵襲的に判定し得る評価系を開発することである。この目的を達するために、まず EGFP を結合させた Oct-3/4 promoter を遺伝子導入したミニブタ体細胞の安定株を樹立した。次に、これらの遺伝子導入体細胞を除核未受精卵に移植してクローン胚を作出し、それらにおける EGFP の発現状況と体外発生能力との関連性を明らかにした。

3. 研究の方法

- (1) クラウン系ミニブタ胎子線維芽細胞 (miniature pig fetal fibroblasts: MPFFs) に pOEIN transgene [mouse Oct-3/4 promoter + EGFP cDNA + poly(A) sites + HS4 insulator + mouse phosphoglycerate kinase promoter + neomycin resistant gene + poly(A) sites] を遺伝子導入し、G418 選別によって安定株を取得した。これらの体細胞では Oct-3/4 promoter が機能しないので、EGFP 由来の緑蛍光の発現はないと予想される。
- (2) 同時に、マウス EC 細胞 (F9 細胞) に pOEIN transgene を導入し、系が動くことを確認した。pOEIN transgene 導入 EC 細胞では、Oct-3/4 promoter が機能するので、その下流側にある EGFP が発現し、緑蛍光が観察されるはずである。
- (3) 上記 (1) の項で得られた pOEIN transgene 導入 MPFFs を産業ブタの除核未受精卵に移植することにより、クローン胚を作出した。クローン胚を体外培養し、発生状況および EGFP の発現状況を観察した。
- (4) 最近、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸が、マウスおよびヒト体細胞のリプログラミングを促進することが報告された。そこで、上記 (3) の項で得られたクローン胚を種々の濃

度のバルプロ酸を添加した培地で種々の時間培養し、発生状況およびEGFPの発現状況を観察した。

- (5) 上記の実験において、クローン胚におけるEGFPの発現状況と胚盤胞への発生状況の関連性を明らかにすることにより、EGFPの発現が正常な発生能力を維持しているクローン胚を選出する指標となり得る可能性について検討した。

4. 研究成果

- (1) MPFFs に pOEIN transgene を導入後、G418 添加培地で培養することにより、12 の安定株が取得された。それぞれの株から採取したゲノムDNAをPCRで解析した結果、すべての株のゲノムに pOEIN transgene が導入されていることが確認された。いずれの株の細胞においても、EGFP の発現は観察されなかった。これらの中から、比較的増殖速度が速い株 (pOEIN-MPFF-#4) を選出し、核移植のドナーとして用いた。
- (2) pOEIN transgene および pmaxGFP transgene (cytomegalovirus promoter + GFP cDNA) を F9 細胞および NIH3T3 細胞 (マウス胎子線維芽細胞に由来する分化細胞) に導入し、EGFP および GFP の発現状況を観察した。その結果、pmaxGFP transgene を導入した場合には、F9 細胞および NIH3T3 細胞のいずれにおいても GFP の発現が観察された。対照的に、pOEIN transgene を導入した場合には、F9 細胞においてのみ EGFP の発現が観察された。これらことから、pOEIN transgene 由来の EGFP 発現は、Oct-3/4 を発現している細胞の識別において有効な指標になると考えられた。
- (3) pOEIN-MPFF-#4 細胞に由来するクローン胚を体外培養した結果、培養 1~5 日後に得られた 1-細胞期~16-細胞期胚のいずれにおいても EGFP の発現は観察されなかった。対照的に、培養 4~6 日後に得られた桑実期胚のすべてが EGFP を発現していた。同様に、5~6 日後に得られた胚盤胞の 88.9% および脱出胚盤胞の 18.2% においても EGFP の発現が観察された。しかし、培養 7 日後に得られた胚盤胞および脱出胚盤胞においては、EGFP の発現は観察されなかった。培養 7 日後に得られた胚盤胞のゲノム DNA を PCR で解析した結果、pOEIN transgene が導入されていることが確認された。これらことから、体細胞に

において一旦失われた Oct-3/4 の発現が桑実期~初期胚盤胞期のクローン胚において再活性化することが示された。しかし、その発現は後期胚盤胞期~脱出胚盤胞期において失われたことから、Oct-3/4 発現の消失がクローン胚における発生率低下の一因となっていることが示唆された。

- (4) 4mM のバルプロ酸で 24~48 時間処理することにより、クローン胚の胚盤胞形成率が改善された。無処理のクローン胚においては、培養 5 日後に得られた桑実期胚および胚盤胞の 66.7% において EGFP の発現が観察されたが、培養 7 日後の胚盤胞においてはその発現が失われた。対照的に、4 あるいは 10mM の濃度で 48 時間および 4mM の濃度で 72 時間処理した場合には、培養 5 日後に得られた桑実期胚および胚盤胞の 86.7~100% において観察された EGFP の発現が、培養 7 日後に得られた胚盤胞の 41.0~99.3% においても維持された。これらことから、バルプロ酸は、ミニプタ体細胞クローン胚の体外発生を改善し得ることが明らかとなった。また、バルプロ酸は、クローン胚における Oct-3/4 の発現を維持したことから、移植後の体細胞核におけるリプログラミングを正常化している可能性が示唆された。
- (5) 以上の結果から、ミニプタ体細胞クローン胚におけるリプログラミングの状態を非侵襲的に判定し得る系が確立された。この系は、正常な発生能力を維持しているクローン胚の選出や体細胞クローン胚作出法の最適化に有効である。よって、本研究において開発された系は、体細胞クローン動物作出効率の改善に寄与すると考えられる。

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 5 件)

- ① Mori H, Mizobe Y, Inoue S, Uenohara A, Takeda M, Yoshida M, Miyoshi K. Effects of cycloheximide on parthenogenetic development of pig oocytes activated by ultrasound treatment. *Journal of Reproduction and Development*. 査読有. 54 巻. 2008 年. 364-369 ページ
- ② Miyoshi K, Mori H, Yamamoto H, Kishimoto M, Yoshida M. Effects of

demecolcine and sucrose on the incidence of cytoplasmic protrusions containing chromosomes in pig oocytes matured in vitro. Journal of Reproduction and Development. 査読有. 54 巻. 2008 年. 117-121 ページ

- ③ Miyoshi K, Fujimoto Y, Mori H, Yoshida M. Activation and parthenogenetic development of pig oocytes exposed to ultrasound in media containing different concentrations of Ca^{2+} . Journal of Reproduction and Development. 査読有. 54 巻. 2008 年. 42-45 ページ
- ④ Nakayama A, Sato M, Shinohara M, Matsubara S, Yokomine T, Akasaka E, Yoshida M, Takao S. Efficient transfection of primarily cultured porcine embryonic fibroblasts using the Amaxa Nucleofection System™. Cloning and Stem Cells. 査読有. 9 巻. 2007 年. 523-534 ページ
- ⑤ Miyoshi K, Inoue S, Himaki T, Mikawa S, Yoshida M. Birth of cloned miniature pigs derived from somatic cell nuclear transferred embryos activated by ultrasound treatment. Molecular Reproduction and Development. 査読有. 74 巻. 2007 年. 1568-1574 ページ

[学会発表] (計 11 件)

- ① 溝部大和. 成熟培養中の振動がブタ卵子の体外成熟および単為発生に及ぼす影響. 第 110 回日本畜産学会. 2009 年 3 月 29 日. 日本大学
- ② 小澤明央. ブタ体細胞の in vitro 脱分化誘導. 第 12 回日本異種移植研究会. 2009 年 3 月 7 日. 鹿児島大学
- ③ 森寛倫. バルプロ酸がミニブタ体細胞クローン胚の体外発生に及ぼす影響. 第 12 回日本異種移植研究会. 2009 年 3 月 7 日. 鹿児島大学
- ④ 赤坂恵理. 全ゲノム増幅法を用いたブタ胚盤胞における transgene 及び targeted allele 検出の試み. 第 31 回日本分子生物学会. 2008 年 12 月 11 日. 神戸ポートアイランド
- ⑤ 小澤明央. ブタ初期化因子を非侵襲的に探索するために有効なテスター細胞株の開発. 第 31 回日本分子生物学会. 2008 年 12 月 11 日. 神戸ポートアイランド
- ⑥ 溝部大和. 培地の浸透圧が超音波照射により活性化したブタ卵子およびミニブタ体細胞クローン胚の体外発生に及ぼす影響. 第 59 回西日本畜産学会およ

び第 1 回日本暖地畜産学会. 2008 年 10 月 26 日. 佐賀大学

- ⑦ 佐藤正宏. 全ゲノム増幅法 (RCA 法) を用いたブタ胚盤胞における transgene 検出の試み. 第 101 回日本繁殖生物学会. 2008 年 9 月 20 日. 九州大学
- ⑧ 森寛倫. ミニブタ体細胞核移植胚における Oct-3/4 遺伝子発現の非侵襲的観察. 第 101 回日本繁殖生物学会. 2008 年 9 月 18 日. 九州大学
- ⑨ 森寛倫. 超音波照射後に異なる濃度のシクロヘキシミドで種々の時間処理したブタ卵子の単為発生. 第 109 回日本畜産学会. 2008 年 3 月 29 日. 常盤大学
- ⑩ 森寛倫. 異なる濃度のカルシウムを含む培地中において超音波を照射されたブタ卵子の活性化および単為発生. 第 100 回日本繁殖生物学会. 2007 年 10 月 21 日. 東京大学
- ⑪ 森寛倫. 超音波により活性化したブタ卵子の単為発生に及ぼすシクロヘキシミド処理の影響. 第 108 回日本畜産学会. 2007 年 9 月 26 日. 岡山大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 和睦 (MIYOSHI KAZUCHIKA)
鹿児島大学・農学部・准教授
研究者番号: 70363611

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

佐藤 正宏 (SATO MASAHIRO)
鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・教授
研究者番号: 30287099