

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21361

研究課題名（和文）マウス-ラットを用いた異種間体細胞核移植における不和合性の解消への挑戦

研究課題名（英文）Study of nuclear-cytoplasmic incompatibility for the interspecies cloning.

研究代表者

藤井 渉（Fujii, Wataru）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：40708161

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：異種間核移植が可能となれば、卵母細胞が供給できない動物種の体細胞を利用して胚の作製が可能となると期待される。本研究では、発生工学的に近いマウス-ラット間の体細胞核移植の作製系とその解析のための諸条件を検討した。ドナー細胞として利用するiPS細胞の樹立系を検討し、マウスやラットのみならず、ウマやシマウマ、ミンクなど、幅広い動物種で利用可能な系を確立した。ラット卵をレシピエントとした核移植胚作製系を確立したものの、ラット-ラット再構築胚からの個体作出は認められなかった。一方で、マウスをレシピエントとした異種間核移植胚の作製系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、マウスおよびラットを利用した異種間核移植胚の作製系の基礎条件の確立に成功し、遺伝学的な解析が可能となった。現在解析中の知見もあわせて、将来的に異種の体細胞核を利用した核移植胚の産生へ有用な知見を提供できると期待される。また、派生技術として効率的なiPS細胞の樹立系を構築し、これまでに報告のない動物種のiPS様細胞の樹立に成功した。同様に、簡便なトランスジェニック動物の作製方法も確立できた。これらの技術は、異種間核移植胚研究のみならず、発生工学の幅広い分野へ貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Interspecies nuclear transfer is expected to be usable for the production of embryos using somatic cells of animal species that cannot supply oocytes. This study examined the conditions for the production and analysis of somatic cell nuclear transfer systems between mice and rats, which are close in developmental engineering. The establishment system of iPS cells to be used as donor cells was examined, and we could develop a method to be used in a wide range of animal species, including not only mice and rats but also horses, zebras, and minks. Although we established a nuclear transfer using rat eggs as the recipient, no individuals were produced from rat-rat reconstructed embryos. On the other hand, we found an interspecies nuclear transfer embryo creation system using a mouse as the recipient.

研究分野：発生工学

キーワード：発生工学

1. 研究開始当初の背景

体細胞核移植を介して動物を作製する、いわゆるクローン技術は、遺体などから回収した細胞核からでも個体を復元できるという利点を持つ一方で、レシピエントとなる卵母細胞を採取するために多くの同種メス個体を用意しなければならないという課題がある。もしも、どのような動物種の体細胞核でも受容可能な「ユニバーサルレシピエント卵」があれば、絶滅危惧種などの卵母細胞の供給が困難な動物種でも簡単に体細胞核移植が可能となる。このようなコンセプトに向けた挑戦の第一歩として、異なる動物種間の細胞核と卵母細胞による異種間核移植において、どのような因子が受容を拒絶する機構「不和合性」を惹起しているかを理解することで、細胞核を受容するために必要な要素を抽出できると着想した。

これまでの異種間核移植の報告は、交雑が可能な種間では成功が報告されているが、交雑不可能な種間については、胚性遺伝子活性化の時期や培養液などの着床前胚の性質が大きく異なる種間で実施されており、複雑な阻害要因が考察を困難にさせており、知見も発生能などに限られている。従って、交雑不可能でありながら着床前胚の性質が極めて近い動物種間で異種間核移植を行い、ノンバイアスかつ多角的な解析を実施することで、異種間の不和合性の根幹の因子が抽出できるのでは、と考えた。

そこで本研究では、発生工学的に近縁なマウス-ラットの異種間体細胞核移植胚について検討した。マウスとラットはともにげっ歯目に属し、着床前胚の培養系が確立されている。マウスはクローンの作製が報告されている。一方で、ラットは1例報告されているものの、その再現性が報告されておらず、クローンラットの作製は困難な状況にある。加えて、ラットの核移植実験系や、異種間核移植に向けた取り組みも極めて限られている。

2. 研究の目的

上記の背景を受け、本研究では、ラットの体細胞核移植実験系について検討するとともに、マウス-ラットの異種間核移植への応用に向けた検討を実施し、再構築胚の遺伝学的解析が可能な研究環境の構築を目的とした。

3. 研究の方法

1) iPS 細胞の樹立系の検討

ドナーとして使用する体細胞の種類によって再構築胚の発生能が異なることが知られている。本研究計画では、クローン作製に利用可能であることが報告されている多能性幹細胞をドナーとして利用することとし、そのための効率的な樹立条件を検討した。

2) ラット体細胞核移植胚および再構築胚の発生能の検討

核移植後の再構築胚において、過剰発現によって発生能が向上する遺伝子がいくつか報告されている。そこで、ラット再構築胚でその影響を解析した。また、マウス-ラット核移植胚の培養条件を検討した。

3) 再構築胚における遺伝子導入系の検討

胚における遺伝子発現実験の効率化を目指して、エレクトロポレーターを利用したトランスジェニック動物作製系について検討した。

4. 研究成果

1) **Piggybac transposase** を利用した遺伝子導入系を利用し、ラット胎生線維芽細胞からの **iPS** 細胞樹立を検討した。**Oct4, Sox2, Klf4, cMyc** を **2A** で連結し、**Tet-on** システムで発現誘導するコンストラクトを構築し、**CAG-rtTA** とともに遺伝子導入し、ドキシサイクリン存在下で培養することで、**ES** 細胞様のコロニーの出現が認められた。一方で、ドキシサイクリンを含まない培地に置換して培養継続したところ、大半のコロニーは消失し、我々の実験条件下では十分なリプログラミングが誘導できていない可能性が考えられた。そこで、上記 **4** 因子に加え、**Klf2, Nanog, Glis1, lin28, Kdm4d, p53** ドミナントネガティブ配列を発現するコンストラクトを共導入したところ、コロニーの出現率が上昇し、ドキシサイクリンを除いた後も十分なコロニー数が維持された。**Piggybac** に加え、**Episomal** ベクターによって同様の検討を行ったところ、同じく十分なコロニー形成が認められた。以上の条件の汎用性を検討するために、他の動物種由来の繊維芽細胞で **iPS** 細胞樹立を検討したところ、ミンク、インドホエジカ、シマウマ、ウマ、スルクスで高効率に **iPS** 細胞様の細胞の樹立が認められ、様々な種で汎用性の高い **iPS** 細胞樹立系として利用できる可能性が示唆された。一方で、ウシ、ブタ、キリンでは同様の検討を行ったものの **iPS** 細胞様の樹立は認められなかった。その理由としては、樹立細胞の質の問題の他に、誘導する遺伝子や培養条件が不十分でない可能性も考えられる。今後、異種間核移植のドナーとして **iPS** 細胞を用いた検討を行う場合、種を跨いでより汎用性の高い条件の検討が必要であると考えられる。

2) 受精後の胚を胚盤胞まで体外培養する場合、マウスは **KSOM** や **CZB** などの高発生率の培養

液が開発されており、体細胞核移植胚への利用も報告されている。一方で、ラットの場合、受精から2-細胞期までは **mKRB** が、それ以降は **mR1ECM** が利用されている。一方で、近年のラット胚操作では、受精卵をマウス体外受精培地で用いられる **mHTF** で操作できることも報告されている。我々は以前に **mKRB** におけるラット卵活性化条件を検討している (**Fujii and Funahashi, 2008**)。そこで、**HTF** で同様に活性化条件を検討した。カルシウム-マグネシウム不含 **HTF** および **EGTA** 添加 **HTF** に **SrCl2** を添加し、**Wistar** 由来第二減数分裂中期卵の活性化条件を検討したところ、イオン不添加 **HTF** を用いた条件で **2-3 h** 前培養することで、高効率に前核形成が誘導されることが分かった。続いて、再構築卵作製のため、除核の条件を検討した。我々の所有する顕微鏡を用いた環境では明視野での紡錘体の視認に時間がかかるため、補助として、紡錘体観測システム (ニコン) のフィルターを用いたところ、**DA** 系統では視認が困難であったものの、**Wistar** 系統では極めて簡単に紡錘体の位置が視認でき、簡単に除核ができた。また、**Wistar** 系統のうち、過排卵処理への反応が最も良好であった **Wistar Hanover** 系統を今後の実験に用いた。

続いて、ラットの体細胞核移植胚の発生能について検討した。はじめに、マウスで体細胞核移植胚の発生能の大幅な改善が報告されている **Kdm4d** の過剰発現による影響を検討した。前述の条件で除核を行い、体細胞核を導入した後に、活性化処理し、その **8** 時間後に **Kdm4d mRNA** を顕微注入した。その **5** 時間後に再構築卵を固定し、免疫染色したところ、**Kdm4d** 注入区では **H3K9me3** が消失しており、マウス体細胞卵と同様に **Kdm4d** が有効である可能性が示唆された。そこで、およそ **80** 個の再構築胚を偽妊娠ラットに移植したが、産子は認められなかった。以上の結果から、マウスでの効果的なクローン作製条件は、少なくとも我々の実験条件下ではラットクローンを作製するには至らないことが示唆された。続いて、ラット卵母細胞をレシピエントとしてマウス体細胞核を移植し、前述の条件で活性化を行ったが、前核形成そのものが認められなかった。そのため、ラット卵をレシピエントとした条件について、更なる検討が必要である。一方、**BDF1** 由来マウス卵をレシピエントとしてラット体細胞核を導入し、活性化処理したところ、前核形成が認められた。またマウス単為発生胚を用いて、ラット胚培養液での発生能を検討したところ、マウス培養液 (**KSOM**) と比較して劣るものの、およそ半数のマウス胚は **mR1ECM** で培養した場合も胚盤胞まで発生することが明らかとなった。以上の結果から、マウス卵をレシピエントとして、ラット胚培養条件下で再構築卵を作製、培養することで、解析に十分な異種間核移植胚を準備できる可能性が示唆された。

また、**A**. レシピエント卵の翻訳状態の解析、**B**. ドナー細胞特異的な遺伝子発現の解析、行うために、**A**. についてはリボソームプロファイリングを、**B**. は **de novo** 転写産物のビオチン化による解析を行うことし、卵母細胞を用いた解析条件のセットアップに取り組んだ。現在、再構築卵の解析結果を取得中である。

3) 胚における遺伝子発現実験の効率化を目指して、エレクトロポレーターを利用したトランスジェニック動物作製系について検討した。一般にトランスジェニック動物個体を作製するためには、受精卵の前核に対して直鎖化した DNA を注入することで作製する。この方法にはマイクロマニピュレーターを必要とし、技術習熟にはコストと時間を要する。さらに、同時に多くの胚を取り扱うのは困難である上、その作製効率はおよそ **1% と極めて低いことから、本研究の目的のようなスクリーニング系に注入胚を直接供することは現実的ではない。そこで、本研究では、簡便かつ効率的な Tg 胚の作製系として、マウス胚をモデルとして、マクロマニピュレーターに代わり、エレクトロポレーションを利用した方法について検討した。はじめに、マウス受精卵に対して効率的に外来核酸を導入する系を検討し、利用する **Buffer** と前培養の時間を最適化することで、効率的に外来核酸を導入できる系の確立に成功した。続いて、効率的な **DNA** の組み込みを惹起するために、**transposase** の利用を検討した。外来 **DNA** のみを導入した受精卵では、胚盤胞期で導入配列のシグナルは認められなかったのに対して、**transposase mRNA** と同時に導入した区では、シグナルが認められ、**DNA** の組み込みが示唆された。この条件で導入胚を胚移植したところ、トランスジーンを持つ個体が得られた。これらの個体では導入したコンストラクトの発現が精細管や精子で認められ、系世代によるサイレンシングを受けず、設計通り遺伝子発現することが明らかとなった。また、精巣における遺伝子発現を確認したところ、**G0** 個体では一部の精細管のみでの外来発現が認められたことから、本系によるトランスジーンはモザイクで導入されることが示唆された。以上の通り、エレクトロポレーターを利用して簡単にトランスジェニックマウスを作製可能となった。今後、レシピエント卵の特性解析や、異種間核移植に影響し得る因子の操作に対して有効に活用できると期待される。**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Holmlund Hayden, Yamauchi Yasuhiro, Durango Gerald, Fujii Wataru, Ward Monika A	4. 巻 -
2. 論文標題 Two acquired mouse Y chromosome-linked genes, <i>Prss1</i> and <i>Teyorf1</i> , are dispensable for male fertility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioac084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Wataru Fujii
2. 発表標題 Genetic Engineering Via Mammalian Zygotes.
3. 学会等名 The Rising Stars in Reproductive Biology Webinar Series, Society for the Study of Reproduction（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者:96名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

個人ホームページ
http://wtrfujii.com/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	早川 晃司 (Hayakawa Koji) (50636800)	岡山理科大学・獣医学部・講師 (35302)	
研究 分 担 者	山内 啓太郎 (Keitaro Yamanouchi) (70272440)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------