

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21780269

研究課題名(和文)

生殖細胞ゲノム初期化機構の解明による人為的エピゲノム制御方法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of germ cell reprogramming and establishment of the procedure to control epigenome.

研究代表者

井上 貴美子 (INOUE KIMIKO)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・専任研究員

研究者番号： 70360500

研究成果の概要(和文)：

体細胞クローン胚盤胞期胚では、発現低下を示す39個の遺伝子の内、21個がX染色体上に位置していた。Xist遺伝子は、雌の不活化X染色体で遺伝子発現を抑制するが、体細胞クローン胚では、雌雄の活性化X染色体での異所性発現が確認された。そこでXist KOマウス由来の体細胞を核ドナーとして用いたところ、通常と比べて出生率が8～9倍上昇した。

しかしながら、発現が低下している多くの遺伝子を含む二つのX染色体領域(XqA7.2/F3)の遺伝子発現は、Xist KOマウスをドナーとしても上昇しなかった。卵丘細胞を用いて、抑制性ヒストン修飾であるH3K9me2のChIP解析を行ったところ、XqA7.2/F3にはH3K9me2が広範囲に蓄積していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

To improve understanding of the low efficiency of somatic cell nuclear transfer (SCNT), we performed global transcription analysis of mouse SCNT blastocysts. Many of the downregulated genes (21/39) identified in SCNT embryos were located on the X chromosome. When the downregulation of X-linked genes in SCNT embryos was corrected by using *Xist*-deficient donor cells, the birth rates increased 8- to 9-fold. Thus, SCNT may be significantly improved by correcting epigenetic errors specific for SCNT. In the next series of experiments, to understand the cause of consistent downregulation in the region of A7.2 and F3 on X chromosome (XqA7.2/F3) in SCNT blastocysts, we analyzed repressive modification, dimethylation of histone H3 lysine 9 (H3K9me2), with chromatin immunoprecipitation-on-chip data from cumulus cells. The results showed that H3K9me2 was broadly enriched in XqA7.2/F3 and formed tissue-specific blocks called as large organized chromatin K9 modification (LOCKs). These data suggested that downregulation of XqA7.2/F3 was caused by failure of reprogramming of LOCKs after nuclear transfer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：発生工学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：核移植クローン、エピゲノム、遺伝子発現、X染色体、H3K9me2、DNAマイクロアレイ、Xist

1. 研究開始当初の背景

体細胞による核移植クローン技術は、体細胞からの個体の作製を可能とする画期的な技術であるが、体細胞クローンの成功が発表されて10年以上が経過した現在でも実用的な技術であるとは言い難い。その理由として第一に挙げられるのが、クローン動物作製効率の低さである。クローン動物の成功率は動物種によってやや差があるものの、多くの場合は移植胚数に対し、5%以下である。この成功率の低さが障害となって、各分野における体細胞クローン技術の導入はほとんど進んでいない。

細胞のゲノム配列は基本的に生涯を通じて変化することはないために、体細胞クローン動物における低効率はゲノム配列以外の情報、すなわちDNAメチル化やヒストンメチル化、アセチル化、クロマチンの高次構造などゲノムの修飾情報（エピジェネティックな情報）によるものである。従って、体細胞クローン胚のゲノムを受精卵のエピジェネティック状態に近づけることが出来れば、核移植クローンの低効率は改善出来ると予想される。これまでも体細胞クローン効率は大きく改善されないながらも、地道な研究の積み重ねにより核移植クローン胚について非常に重要な知見を含む知見も蓄積されてきた。そのひとつがヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（HDACi）の使用である（Kishigami et al., BBRC, 2006; Rybouchkin et al., BOR, 2006）。HDACiの培養液中での添加により、初期胚におけるヒストンアセチル化が亢進し、遺伝子発現が改善することが複数報告されている。これらの報告はヒストン修飾などのエピゲノム情報を人為的に操作することによって、体細胞核移植クローンの効率が上昇させられることを示している。本研究では、自然発生的なゲノム初期化を受ける生殖細胞クローンと、体細胞核移植クローン胚を用いて、遺伝子発現やヒストン修飾などエピゲノ

ムの人為的操作方法を確立し、クローンの効率化改善に役立てるために研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、出生率が低い体細胞クローン技術の効率化を目指し、実用化へ繋げるための技術を開発することを最終目的としている。ゲノム配列は基本的に生涯を通じて変化することはないために、体細胞クローンの出生率が低いのは、核移植後にドナー細胞のゲノム修飾が初期化されないために起こる。そこで、体細胞核移植クローンと生体内での唯一のゲノム初期化プロセスを受ける細胞である生殖細胞に由来するクローンの解析を行うことによって、発生過程における体細胞クローンのゲノム初期化異常と機構を明らかにし、それを遺伝子操作やRNA注入などの方法を用いて、人為的に操作する方法を確立し、核移植クローンの効率向上に繋げることを目的としている。

3. 研究の方法

遺伝子発現解析

解析には胚盤胞期胚（核移植クローンは活性化後96時間、体外受精胚は受精後98時間）の胚を使用した。単一胚はTRIzol処理によってRNAを抽出した後、in vitro transcriptionによる増幅を2回行い（2-round aaRNA Amplification kit, Epicentre）、マイクロアレイ（mouse 44k whole genome, Agilent）による遺伝子発現解析に使用した。マイクロアレイデータはGenespring7.3により解析を行った。定量PCRはTaqMan蛍光プライマーを使用して、ABI9700HT（ABI）により解析を行った。

核移植

核移植は既報（Wakayama et al., Nature, 1998.; Inoue et al., BOR, 2003）の方法に従って行った。具体的には、過排卵処理（PMSG7.5IU, hCG7.5IU）後に採卵された（B6 x DBA/2）F1（BDF1）由来の卵子を7.5ug/ml サイトカラシンB存在下で除核した後、BDF1卵丘細胞・セルトリ細胞、（B6x129）F1（B6x129）セルトリ細胞の核をピエゾドライブマイクロマニピュレーターにより移植した。1時間培養の後、3mM塩化ストロンチウム、5ug/ml サイトカラシンB存在下で1時間活性化し、5ug/mlサイ

トカラシン B 存在下で 5 時間培養を行った。胚培養は全て 37.5°C、6%CO₂ インキュベーター下で KSOM を用いて行った。

ChIP 解析

7x10⁵ 個の卵丘細胞を 1%ホルムアミドで固定、SDS 溶液で溶解した後に、ソニケーションにより DNA を断片化した。断片化した DNA は H3K9me2 抗体と反応させ、GenomePlex Whole Genome Amplification Kit (Sigma-Aldrich) により増幅を行った。タイリングアレイ (Nimblegen MM8 Mouse ChIP 2.1M WG-T10-10 Array) へハイブリダイゼーション後、SubioPlatform (Subio) により解析を行った。

4. 研究成果

体細胞クローン産仔の作出率を上げることを目的として、体細胞を核ドナー細胞として作製したクローン胚盤胞期胚の遺伝子発現解析を行った。体外受精胚との比較の結果、BDF1 卵丘細胞・セルトリ細胞、B6x129セルトリ細胞クローン胚における遺伝子発現の共通した特徴として、発現低下を示す39個の遺伝子の内、大半の21個がX染色体上に位置することが明らかとなった。発現低下が観察されたX染色体上の遺伝子は、特に特定の二つの領域 (XqA7.2/F3) に集中しており、それぞれ、Xlr ファミリー遺伝子、Mageファミリー遺伝子がクラスターを形成している領域であった。BDF1雄より採取した14.5・16.5日胚に由来する始原生殖細胞をドナーとした生殖細胞クローン胚でも同様にX染色体特異的な遺伝子発現低下が見られ、体細胞クローン同様にX染色体上の遺伝子発現初期化が不完全であることが明らかとなった。

Xist遺伝子は、不活性化X染色体 (Xi) 上で発現することによって、X染色体における遺伝子発現を広範囲で抑制する非コード遺伝子である。通常、正常な受精卵ではXistは雌のXiのみで発現が確認されるが、体細胞クローン胚で発現を確認したところ、雌雄の活性化X染色体 (Xa) での異所性発現が確認された。そこでXa染色体上のXist遺伝子をKOしたXist KOマウス由来の体細胞を核ドナーとして用いて、クローン産仔の作出を行ったところ、通常の作出率と比べて7~8倍上昇した (BDF1雌卵丘細胞クローン: 1.7%vs12.1%、BDF1雄セルトリ細胞クローン: 1.6%vs13.0%、図1)。また、X染色体の広域にわたって観察された遺伝子発現低下は、大幅に改善して体外受精胚と同程度のレベルまで改善していることが明らかとなった (図2)。



図1 野生型の体細胞 (左) とXistKO由来の体細胞 (右) を使用した体細胞クローン産仔作出効率の比較。作出効率は平均7~8倍まで上昇する。

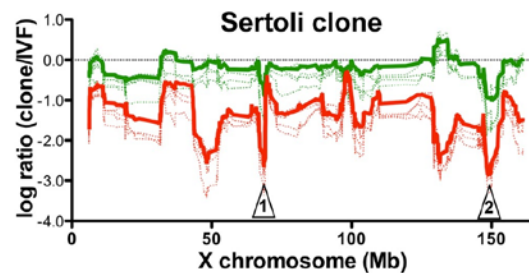


図2 野生型の体細胞 (赤) とXistKO由来の体細胞 (緑) 由来のクローン胚盤胞期胚X染色体遺伝子発現の比較。Xist遺伝子をKOすることで、遺伝子発現は大幅に改善する。

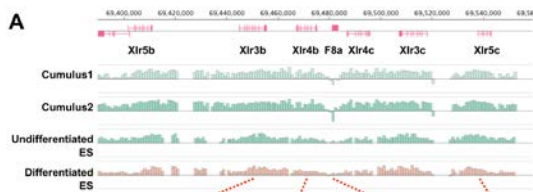
これらの結果より、クローン産仔作出の低効率は少なくともXist遺伝子の発現異常によるX染色体の遺伝子発現異常に一因があることが明らかとなった。

しかしながら、発現が低下している数多くの遺伝子が含まれる XqA7.2/F3 に位置する Xlr・Mage クラスターの遺伝子発現は、Xist KO マウスをドナーとしても上昇しなかった。一方で、始原生殖細胞を核ドナー細胞として使用した生殖細胞クローン胚ではXlr ファミリー遺伝子の発現は発現低下を示さないことが明らかとなり、この領域における体細胞と PGC 細胞のゲノム修飾の違いが示唆される結果となった。

次に、XqA7.2/F3の発現低下の原因と考えられるヒストンメチル化修飾について解析を行った。Mage遺伝子は、遺伝子発現抑制性のヒストン修飾であるヒストンH3リジン9ジメチル化 (H3K9me2) 酵素であるG9aのターゲット遺伝子であることが明らかとなっている。そこで、この二つの領域の発現低下がH3K9me2の蓄積によると予想して、核ドナー細胞としてよく使われる卵丘細胞を用いて、H3K9me2のChIP-on-chipを行った。結果として、XqA7.2/F3にはH3K9me2が広い範囲にわたって蓄積していた。また、GEOデータ (GSE13445) より分化

/未分化ES細胞のH3K9me2を解析したところ、同様にXqA7.2/F3にH3K9me2が蓄積しており(図3)、体細胞では細胞の分化度に関わらず、この領域がlarge organized chromatin K9 modifications (LOCKS)と呼ばれる転写抑制的な領域に含まれることが明らかとなった。

図3 卵丘細胞、ES細胞におけるXqA7.2領域



のH3K9me2の蓄積。広範囲にわたって、H3K9me2が蓄積しており、この領域の遺伝子発現が抑制されていることが分かる。

体細胞クローン胚ではこの体細胞のエピゲノム記憶が核移植後も初期化されないまま残っていると考えられる。次に、ヒストンH3メチル化酵素であるG9a・GlpのsiRNA、或いはH3K9me2脱メチル化酵素のmRNAを卵子内に注入後、核移植を行うことによって、Xlr・Mageクラスター遺伝子の発現が改善するか否かを検討したが、いずれの場合も発現低下は改善しなかった。従って、核移植によるLOCKSの初期化にはこれらの要素のみでは不十分であることが明らかとなった。

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4件)

- 1) Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte A. P, Tian C. X, Yang X, Ishino F, Abe K, and Ogura A. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer, *Science*. **330**, 496-499, 2010. (査読有り)
- 2) 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*, **1190**, 1-6, 2010. (査読無し)
- 3) Inoue K, Ogonuki N, Mekada K, Yoshiki A, Sado T, and Ogura A, Sex-reversed somatic cell cloning in the mouse *J. Reprod. Dev.* **55**, 566-569, 2009. (査読有

り)

- 4) Miki H, Wakisaka N, Inoue K, Ogonuki N, Mori M, Kim J, Ohta A, and Ogura A, Embryonic Rather than Extraembryonic Tissues Have More Impact on the Development of Placental Hyperplasia in Cloned Mice, *Placenta*. **30**, 543-546, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計2件)

- 1) Inoue K, Ogonuki N, Mekada K, Yoshiki A, Sado T, and Ogura A. Sex-reversed somatic cell cloning in the mouse, 6th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society 2009, Seam Reap City, Cambodia, 2009, Nov.
- 2) 井上貴美子, 越後貫成美, 幸田尚, 佐渡敬, 石野史敏, 小倉淳郎. 体細胞核移植胚盤胞期胚に観察される遺伝子発現異常の解析, 第102回日本繁殖生物学会大会, 奈良, 2009, 9月.

[図書] (計2件)

- 1) 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, 273-276, 2011.
- 2) 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* **42**, 489-493, 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: X 染色体遺伝子の発現改変技術を用いた体細胞クローン胚および産子の作出

発明者: 小倉淳郎、井上貴美子、幸田尚、石野史敏

権利者: 小倉淳郎、井上貴美子、幸田尚、石野史敏

種類:

番号: 特願 2010-197583

出願年月日: 平 22.9.3

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

発表論文は下記 URL にてプレスリリースを行った。：

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2010/100917/index.html>

また所属研究室 HP にて情報を公開している。
<http://www.brc.riken.jp/lab/kougaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 貴美子 (INOUE KIMIKO)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・専任研究員

70360500

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者