

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780273

研究課題名(和文)体細胞クローン牛の生殖細胞形成過程におけるリプログラミング機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of epigenetic reprogramming during germ cell development in cloned cattle

研究代表者

金田 正弘(Kaneda, Masahiro)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80469840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、体細胞クローン動物には多くの発生異常が生じる事が報告されているが、通常の受精で生まれたその子孫には異常が起きない事が知られている。その原因は、クローン動物のエピジェネティックな異常が生殖系列を通過する際にリセットされるためであろうと考えられてきた。今回、体細胞クローン牛の精子・卵子を材料に、そのDNAメチル化状態を非クローン牛と比較したところ、解析した遺伝子・領域について両者で差異は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：There are lots of reports showing developmental defects in somatic cell nuclear transferred animals (cloned animals). However, these abnormalities are not inherited to the next generation via normal fertilization process. It is assumed that epigenetic errors occurred in cloned animals were reset during germ cell development. In this project, we analyzed DNA methylation levels in sperm and oocytes derived from cloned cattle and non-cloned control ones. All genes and regions analyzed were not different between cloned and non-clones.

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：クローン エピジェネティクス DNAメチル化 精子 卵子 生殖細胞 インプリント遺伝子

1. 研究開始当初の背景

世界初の体細胞クローン牛が日本で誕生してから 10 年以上になる。その間、500 頭以上のクローン牛が誕生したが、5-10%以下という低い作出率は未だ解決されていない。その理由として、ドナー細胞となる体細胞核において、DNA メチル化などのエピジェネティックな情報が正しく初期化(リプログラミング)されないために、遺伝子発現に乱れが生じ、胎子の発生異常や胎盤の過形成、出生異常や生後直死の頻発に繋がると考えられている。一方で、正常に生まれたクローン動物の繁殖能力に異常はなく、またその産子(後代)には種々の発生異常が観察されないことが知られている。

このことは、クローン動物の生殖細胞形成過程において、いったんエピジェネティックな異常がリセットされることにより、後代には正常な配偶子が伝達されるためであると考えられる。しかし、これはあくまで後代の表現型から推察した仮説であり、実験的に実証されてはいない。そこで、その実証を行い、分子生物学のレベルで体細胞クローン牛の生殖細胞形成過程におけるエピジェネティックな変化を解析する必要がある。

2. 研究の目的

体細胞クローン動物の低い作出効率は、ドナー核の不完全なリプログラミングによってエピジェネティックな異常が生じることが原因であると考えられている。一方で、通常の受精によって生まれたクローン動物の子孫には異常が無く、その理由は生殖系列を通過することでエピジェネティックな異常がリセットされるためであると考えられている。

そこで本研究では、体細胞クローン牛の体細胞、生殖細胞(精子・卵子)および受精卵におけるエピジェネティックな状態を直接比較・解析し、クローン牛の生殖系列におけるリプログラミング機構の正常性を分子レベルで解明する。

3. 研究の方法

(1)体細胞クローン牛の生殖系列におけるリプログラミング機構の検証

成牛まで发育した体細胞クローン牛(およびコントロールの非クローン牛)より体細胞(末梢白血球)および精子・卵子、さらにこれらの精子・卵子に由来する初期胚(胚盤胞期胚)を回収し、DNA メチル化レベルをバイサルファイト法を用いて解析する。より多数の領域を解析するために、時間・費用のかかるシーケンス法ではなく、COBRA (COmbined Bisulfite Restriction Analysis) 法および DNA フラグメント自動解析装置を用いることで、簡便かつ定量的なメチル化解析を行う。

(2)斃死したクローン牛の体細胞・生殖細胞における DNA メチル化レベルの解析

性成熟以前に斃死した体細胞クローン牛より体細胞(各臓器)および生殖細胞(精原細胞、未成熟卵子)を回収し、DNA メチル化レベルを解析することで、体細胞におけるエピジェネティックな異常が生殖系列においてリセットされるかを調べる。精原細胞の回収方法として、我々が開発したレーザーマイクロダイセクション装置を用いて精巣組織切片から精原細胞のみを回収する方法を用いる。DNA メチル化の解析方法はと同様である。

4. 研究成果

(1)体細胞クローン雄牛(9 頭)、および非クローン雄牛(8 頭)から末梢血および精子 DNA を回収し、それぞれの遺伝子について DNA メチル化の状態を解析した。その結果、反復配列である Satellite I 領域は末梢血でクローン牛・非クローン牛とも 90%程度のメチル化状態であったものが、精子では 20-30%程度に脱メチル化されており、Satellite II 領域も同様に末梢血で 70%程度のメチル化が精子では 20%程度になっていることが分かった。一方、散在性に分布するレトロエレメントである art2 のメチル化は、末梢血でも変化はなかった。これらの反復配列領域の DNA メチル化の状態にクローン牛・非クローン牛間での違いは無かった。父由来インプリント遺伝子である H19 は末梢血で 30-40%のメチル化であったが精子ではクローン牛・非クローン牛ともにほぼ 100%メチル化されていた。一方、母由来インプリント遺伝子である PEG3 は末梢血で 60-70%程度のメチル化であったが精子ではクローン牛・非クローン牛ともほとんどメチル化されていないことが分かった。

また、メスで X 染色体不活性化に關与する XIST 遺伝子の DNA メチル化状態を同様に解析した。その結果、末梢血ではほぼ 100%メチル化されていたものが、精子ではほぼ完全に脱メチル化されている事を見いだした。これは、オスでは X 染色体が不活性化されないように XIST 遺伝子がメチル化されて発現が抑制されていることを示唆している。また、精子ではほぼ完全に脱メチル化されているということは、受精後すぐ XIST 遺伝子が発現するようなリプログラミングを受けていると推察される。すなわち、X 染色体を持つ精子由来の受精卵は全てメスになることから、初期胚における X 染色体不活性化のメカニズムに關与している可能性が考えられる。ウシの X 染色体不活性化のメカニズムについては、マウスのような詳細な解析はされていないものの、これまでの研究からは動物種による差が大きい事が知られているため、今後、ウシの受精卵を用いることで、哺乳類の X 染色体不活性化に共通するメカニズムを探る研究を行う事ができるかもしれない。

体細胞クローン動物は、初期胚、着床後、発生途中、生後直後など、様々な段階で死亡する事が分かっている。特に、初期胚では体

外受精胚や体内受精胚に比べると、その発生効率は明らかに低い。その要因の一つとして、初期胚の発生に必須な全能性に関与する遺伝子の発現異常が考えられている。そこで、全能性遺伝子である OCT4 および NANOG の DNA メチル化レベルを体細胞クローン牛・非クローン牛の末梢血および精子 DNA を用いて解析した。両遺伝子とも、体細胞ではメチル化されて発現が抑制されている事がマウスなどの実験から知られている。予想通り、両遺伝子とも末梢血では高度にメチル化されていたが、精子では低メチル化状態にあった。これは、XIST 遺伝子同様、受精後すぐに発現する必要があるので、精子形成過程で脱メチル化を受けていると考えられる。このメチル化の違いに、クローン牛・非クローン牛間で違いはなかった。

同様の解析を体細胞クローン雌牛の卵子を用いて行った。卵子の場合は、回収できるサンプル量が精子に比べて極めて少ないため(1頭あたり約 20 卵子を OPU により回収)、反復配列のメチル化のみを解析した。Satellite I 領域は雄牛同様末梢血で 90%程度のメチル化が、卵子では 60-70%に低下していた。Satellite II 領域は末梢血で 70-80%程度のメチル化が卵子では 40%程度に低下していた。卵子でのメチル化状態にクローン牛・非クローン牛間での違いは無かった。これらの結果から、体細胞クローン牛の精子・卵子における DNA メチル化状態は、非クローン牛と同様のレベルにあることが明らかとなった。

これらの成果は、これまでマウス等で報告されていた、通常の受精過程を経て誕生したクローン動物の子孫にはクローン動物自体に見られるような発生異常が見られない、という実験結果に対して、分子レベルでの実証証拠を与えるものであり、将来的に体細胞クローン家畜を畜産物として産業応用する場合に、非常に重要な知見となる。

(2)すでに入手していた幼若牛の精巣を用いて、レーザーマイクロダイセクション装置による幼若精原細胞の単離を試みたが、様々な条件を検討したものの、サンプル自体の問題か手法の問題か切り分ける事が困難であり、安定した結果を得る事はできなかった。また、非クローン牛の精巣は入手できたものの、クローン牛の精巣を入手する事はできなかった。これは、全国的にクローン牛の生産がほとんど行われず、本研究課題が実施された 2 年間にわずか 1 頭しかクローン牛が誕生していない、という現実によるものである。

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 10 件)

1) Production of Fertile Offspring from

Oocytes Grown In Vitro by Nuclear Transfer in Cattle. Hirao Y, Naruse K, Kaneda M, Somfai T, Iga K, Shimizu M, Akagi S, Cao F, Kono T, Nagai T, Takenouchi N. *Biol Reprod.* 2013;89(3):57-67. 査読あり doi: 10.1095/biolreprod.113.109439

- 2) Naloxone increases maturation rate and ratio of inner cell mass to total cells in blastocysts in pigs. Dang-Nguyen TQ, Viet Linh N, Minoia R, Kaneda M, Somfai T, Haraguchi S, Akagi S, Kikuchi K, Nakai M, Tajima A, Nagai T. *Anim Sci J.* 2013;84(12):765-773. 査読あり doi: 10.1111/asj.12071.
- 3) Downregulation of histone methyltransferase genes SUV39H1 and SUV39H2 increases telomere length in embryonic stem-like cells and embryonic fibroblasts in pigs. Dang-Nguyen TQ, Haraguchi S, Furusawa T, Somfai T, Kaneda M, Watanabe S, Akagi S, Kikuchi K, Tajima A, Nagai T. *J Reprod Dev.* 2013;59(1):27-32. 査読あり
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/59/1/59_2012-118/_article
- 4) Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. Takahashi T, Inaba Y, Somfai T, Kaneda M, Geshi M, Nagai T, Manabe N. *Reprod Fertil Dev.* 2013;25(4):589-99. 査読あり doi: 10.1071/RD11262.
- 5) Age-related changes in gene expression of the growth hormone secretagogue and growth hormone-releasing hormone receptors in Holstein-Friesian cattle. Komatsu M1, Kojima M, Okamura H, Nishio M, Kaneda M, Kojima T, Takeda H, Malau-Aduli AE, Takahashi H. *Domest Anim Endocrinol.* 2012;42(2):83-93. 査読あり doi: 10.1016/j.domaniend.2011.09.006
- 6) Telomere elongation during morula-to-blastocyst transition in cloned porcine embryos. Dang-Nguyen TQ, Haraguchi S, Akagi S, Somfai T, Kaneda M, Watanabe S, Kikuchi K, Tajima A, Nagai T. *Cell Reprogram.* 2012;14(6):514-519. 査読あり doi: 10.1089/cell.2012.0045.

- 7) Influence of Intergeneric/interspecies Mitochondrial Injection; Parthenogenetic Development of Bovine Oocytes after Injection of Mitochondria Derived from Somatic Cells. Takeda K, Srirattana K, Matsukawa K, Akagi S, Kaneda M, Tasai M, Nirasawa K, Pinkert CA, Parnpai R, Nagai T. *J Reprod Dev.* 2012;58;323-329. 査読あり https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/58/3/58_2011-013/_article
- 8) Follicular Growth-Stimulated Cows Provide Favorable Oocytes for Producing Cloned Embryos. Sugimura S, Kobayashi S, Hashiyada Y, Ohtake M, Kaneda M, Yamanouchi T, Matsuda H, Aikawa Y, Watanabe S, Nagai T, Kobayashi E, Konishi K, Imai K. *Cell Reprogram.* 2012;14;29-37. 査読あり doi: 10.1089/cell.2011.0060.
- 9) Effects of the timing of cumulus cell removal from bovine oocytes on enucleation rate and subsequent development after somatic cell nuclear transfer. Akagi S, Shiraishi T, Somfai T, Kaneda M, Haraguchi S, Watanabe S. *J Reprod Dev.* 2012;58(5):615-9. 査読あり https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/58/5/58_2012-042/_article
- 10) The Effect of Ovary Storage and In Vitro Maturation on mRNA Levels in Bovine Oocytes; A Possible Impact of Maternal ATP1A1 on Blastocyst Development in Slaughterhouse-derived Oocytes. Somfai T, Imai K, Kaneda M, Akagi S, Watanabe S, Haraguchi S, Mizutani E, Dang-Nguyen TQ, Inaba Y, Geshi M, Nagai T. *J Reprod Dev.* 2012;57;723-730. 査読あり https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/57/6/57_11-020H/_article

〔学会発表〕(計 6件)

- 1) 金田正弘、伊藤強、渡辺伸也、赤木悟史、平子誠、下司雅也、永井卓 タイトル「同ドナー細胞由来の体細胞クローン牛を用いたエピジェネティクス解析」学会名：第156回日本獣医学会学術集会 2013年9月20日(岐阜大学)
- 2) Masahiro Kaneda タイトル「EPIGENETICS OF CLONED CATTLE, THEIR GERM CELLS AND OFFSPRING」国際会議

名：2013Bimodulation Symposium "From Germplasm to Cloning" 2013年6月5日(韓国・ソウル国立大校)

- 3) 金田正弘、伊藤強、渡辺伸也、赤木悟、平子誠、武田久美子、下司雅也、永井卓 タイトル「同ドナー細胞由来の体細胞クローン牛におけるミトコンドリア DNA コピー数・関連遺伝子のメチル化解析」学会名：第7回エピジェネティクス研究会 2013年5月30日(奈良県新公会堂)
- 4) Masahiro KANEDA, Kumiko TAKEDA, Takashi NAGAI, Kanokwan SRIRATTANA and Rangsun PARNPAI タイトル「Epigenetic modifications of cloned buffalo embryos」国際会議名：第10回国際バッファロー会議プレワークショップ 2013年5月5日(タイ国プーケット市)
- 5) 金田正弘、渡辺伸也、平尾雄二、赤木悟史、原口清輝、ソムファイタマス、武田久美子、内山京子 タイトル「ウシ精子核 DNA のメチル化およびミトコンドリア DNA コピー数と受胎性との関連」学会名：第105回日本繁殖生物学会大会 2012年9月6日(筑波大学)
- 6) 金田正弘、渡辺伸也、赤木悟史、原口清輝、ソムファイタマス、武田久美子、内山京子 タイトル「ウシ精子における DNA メチル化レベルおよびミトコンドリアコピー数と受胎性との関連性の解析」学会名：第6回エピジェネティクス研究会 2012年5月14日(学術総合センター)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

6．研究組織

(1)研究代表者

金田 正弘 (KANEDA MASAHIRO)

国立大学法人東京農工大学大学院農学研
究院動物生命科学部門・助教

研究者番号：80469840