

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850211

研究課題名(和文)体細胞クローンウズラの胚発生に及ぼす核の初期化と卵子活性化のタイミング

研究課題名(英文)Effect of the timing of nuclear reprogramming and egg activation on the developmental potential of somatic cell-nuclear transferred-quail eggs

研究代表者

水島 秀成(MIZUSHIMA, Shusei)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・特命助教

研究者番号：20515382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、鳥類に得意な多精受精成立に関わる分子機構の詳細を解明し、それより得られた情報をもとに確立した卵子活性化法と体外培養法を駆使して、顕微授精法によるウズラ雛の孵化育成に世界で初めて成功した。さらにウズラ卵へ卵子活性化処理と同時にニワトリ由来の胚盤葉細胞または皮膚細胞核移植することによって、ドナー細胞由来の体細胞クローン胚の作出にも成功を収めた。本技術は、ゲノム改変家禽の作出や近縁種を介した絶滅危惧鳥種の救済に有効な手段になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Somatic cell-nuclear transfer (SCNT) becomes a powerful tool to make copies of individuals in many mammalian species, but in birds no SCNT has been reported because physiological polyspermic egg-activation leading to meiotic resumption and subsequent embryo development is difficult to mimic in vitro. In the present study, I show (1) sperm extracts contain three factors- phospholipase C ζ (PLCZ), aconitate hydratase (AH) and citrate synthase (CS)- essential to complete activation of quail egg, and (2) the first case of live quail chick production by intracytoplasmic sperm injection using cRNAs mixture of PLCZ, AH and CS. Furthermore, I show the embryo development of quail egg microinjected with a nucleus of chicken blastodermal or skin cells together with cRNAs mixture of PLCZ, AH and CS. These results create new opportunities to assist in the production of genetically modified and cloned birds.

研究分野：応用動物科学(生殖工学)

キーワード：体細胞クローン家禽 雌性核 胚盤葉細胞 皮膚細胞 筋原細胞 近縁種 顕微授精法 卵子活性化

1. 研究開始当初の背景

(1) ロスリン研究所の研究グループが、生体の乳腺細胞の核移植によるクローン羊 "ドリー" の作出に成功して以来 (1997 年)、その後も哺乳類では、初期胚細胞核、体細胞核を元にしたクローン個体作出法が相次いで報告された。現在では、哺乳類のみならず両生類や魚類においてもクローン動物の作出技術が開発されており、これらの技術は、基礎生物学やエピジェネティック遺伝学の発展に必要不可欠なツールとして、生命科学の発展に大きく貢献している。しかしながら、クローン鳥類の作出はこれまで全く手掛けられていない。その最大の原因は、鳥類の卵子に多量の卵黄が蓄積し、細胞質が不透明なために顕微鏡下での染色体の除去が困難であることや、核注入および卵を活性化する技術も開発されていなかった為である。

(2) 一方、本研究代表者は、鳥類の受精様式が、複数の精子が卵内に連続的に侵入するという多精受精を示すことに着目し、この多精子侵入が卵子活性化に伴う減数分裂の再開と、その後の体細胞分裂の進行に必須であることを明らかにしてきた。具体的に、鳥類の卵子活性化時には、卵細胞質内で一過性とスパイラル様の Ca^{2+} 上昇反応 (スパイラル様オシレーション) が起こり、この 2 つの異なった Ca^{2+} 上昇反応の惹起には、100 個分量に相当する精子由来のタンパク質が必要であることが分かった。さらに本研究代表者は、単一精子を卵細胞質に直接注入する顕微授精 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI) 法を駆使し、精子抽出物 (sperm extracts: SE) による 2 つ Ca^{2+} 上昇反応を人為的に組み合わせることで、ICSI ウズラ胚の孵化育成に世界で始めて成功している。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、鳥類卵子活性化の効率を上げる為に、卵細胞質内 Ca^{2+} 上昇反応を惹起する SE に含まれる精子由来卵子活性化因子 (sperm-borne oocyte-activating factor: SOAF) を同定するとともに、その候補遺伝子のみを利用した ICSI 法の確立・得られたウズラ胚の孵化育成を目指すこととした。

(2) さらに鳥類卵内の核は除核できないため、雌性核の不活化条件や、胚盤葉細胞核移植後における卵子活性化のタイミングを検討し、それより得られた最適な条件をもとに、クローンウズラ胚を作出することを目的とした。

(3) また本研究では、最終的に皮膚細胞や筋原細胞核を利用したクローンウズラ胚の作出を目指すだけでなく、ウズラの近縁種で

あるニワトリの体細胞核をウズラ卵に移植することで、近縁種鳥類への汎用性および種得異性等についても検討することとした。

3. 研究の方法

(1) カラムクロマトグラフィーにより分離した SE の画分を排卵直後のウズラ卵に投与し、 Ca^{2+} 指示薬である Fluo-8H, AM を用いて卵細胞質内 Ca^{2+} 濃度上昇を観察した。 Ca^{2+} オシレーションを誘起した画分から、レクチン処理、polyacrylamide gel electrophoresis および LC-MS/MS 解析によって SOAF タンパク質を同定した。また受容体の阻害剤を適宜選択使用し、一過性 Ca^{2+} 上昇に関与する SOAF についての同定も行った。さらに新規 SOAF の cDNA クローニングを行ない、その cRNA を射出精子 1 個とともに排卵直後のウズラ卵に顕微注入し、常法に従って ICSI 卵の体外培養を行った。

(2) 核移植用ウズラ卵の雌性核の除核処理に代わる新たな核不活化手段を確立する為に、2 つの条件検討を行った。

①カエル配偶子核の不活化に有効とされている紫外線 (UV) 照射法を適用し、排卵直後のウズラ卵に 1, 5, 10 秒間の暴露を行った。その後、SOAF cRNA 溶液とともに ICSI 処理を行い、受精卵が得られるか評価した。

②家禽の卵は受精せずに放卵された場合に、そのほとんどの雌性核は、卵内に発現する核分解酵素の作用によりフラグメント化、あるいは完全に消失する事が報告されており<引用文献 1>、この事象は、卵管を通過する際のどこかで卵核が不活化作用を受けていることを示唆するものである。この特性を生かし、排卵後 4, 10, 12, 14, 18 時間に卵管より回収した卵に ICSI 処理を行う事で、卵エイジングに伴う核の消失時期を、受精の有無から査定することとした。

(3) 孵卵 10-12 日のウズラおよびニワトリ胚から、細片化、遠心、フィルター濾過によって採取した皮膚細胞や筋原細胞、孵卵 0 日の胚盤葉をトリプシンによって解離した胚盤葉細胞からマイクロマニピュレーターを用いて核を取り出し、その核を SOAF cRNA 溶液とともにウズラ卵へ顕微注入した。注入卵はサイトカラシン B を添加した培地中で 4 時間の処理を行い、その後サイトカラシン B 無添加培地中で発生胚が死亡するまで体外培養を行った。死亡胚からゲノム DNA を抽出した後、PKCI 遺伝子より設計したウズラとニワトリのそれぞれの配列のみを増幅させることができるプライマーを用いた PCR 解析を行った<引用文献 2>。

4. 研究成果

(1) 精子得意的に発現する phospholipase Czeta (PLCZ) の cRNA、あるいはその代謝産物である inositol-trisphosphate (IP_3) を

投与することによって、SEの投与時と同等の一過性の卵細胞質内 Ca^{2+} 上昇反応が観察され、またそれらの上昇も IP_3 受容体の阻害剤で処理することで消失したことから、一過性の Ca^{2+} 上昇を惹起するウズラ SOAF は PLCZ であることが分かった。一方、カラムクロマトグラフィ分析により分子量 30-90 kDa 付近にスパイラル様 Ca^{2+} オシレーションを誘起する成分が含まれていることが分かった。またその画分における Ca^{2+} オシレーションの誘起能力は、LCA レクチンに吸着されることが分かった。LCA 処理と未処理画分に含まれるタンパクのディフレンシャル解析および LC-MS/MS 解析から、スパイラル様 Ca^{2+} オシレーションを惹起する SOAF として aconitate hydratase (AH) と citrate synthase (CS) を同定した (図 1A)。さらに PLCZ、AH、CS の cRNA 混合液と単一精子用いた ICSI をウズラ排卵直後の卵に行ったところ、孵化個体を得る事に成功した (図 1B)。以上の結果から、体細胞核移植卵への PLCZ、AH、CS cRNA の導入は、疑似受精の完了及びその後の胚発生への移行に有効な手段になると考えられる。

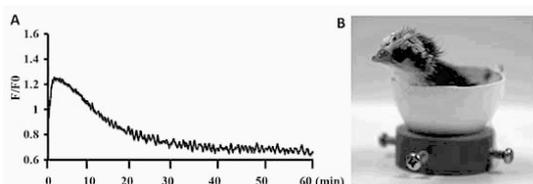


図 1. A: PLCZ、AH、CS タンパク質を含んだ SE の投与によるウズラ卵細胞質内 Ca^{2+} 上昇の変化、B: PLCZ、AH、CS cRNA の投与によって孵化した ICSI ウズラ雛

(2) UV 照射を行った排卵直後のウズラ卵に SE あるいは PLCZ、AH、CS cRNA とともに ICSI 処理を行ったところ、5 秒以上の照射で胚発生を示した卵は無かった。しかしながら、卵細胞質内における Ca^{2+} 上昇反応を観察したところ、5 秒以上に照射は細胞質にもダメージが生じ、3 つの SOAF の投与にも関わらず、双方のカルシウム波ともに誘起されることが分かった (図 2A)。一方、排卵直後、排卵後 4、10、12、14、18 時間経過した卵に ICSI 処理を行ったところ、排卵直後、排卵後 4 時間では、7 割以上の胚発生率を示したが、10 時間経過した卵では、そのほとんどが受精できないことが分かった。さらに排卵後 10 時間以降の卵に、発生関連タンパク質が保持されているか調査したところ、排卵後 14 時間以内であれば、PLCZ、AH、CS の cRNA 混合液の投与による一過性とスパイラル様の双方の卵細胞質内 Ca^{2+} 上昇反応が誘起されることが分かり、さらにその後の細胞質分裂も惹起される事が分かった。従って、以上の 2 つの実験結果から、排卵後 10-14 時間の卵が除核操作も必要とせず、発生能も保持した体細胞核移植卵として最適であると推察された。

(3) さらに排卵後 10-14 時間に卵管から回収したウズラ卵に胚盤葉細胞核と 3 つの SOAF を同時に投与し、卵培養を行ったところ、一部の胚で胚ステージの 8 までの発生進行が観察された (図 2B)。一方で、卵賦活化処理後、あるいは処理前の核移植によって発生したウズラ胚は無かった。

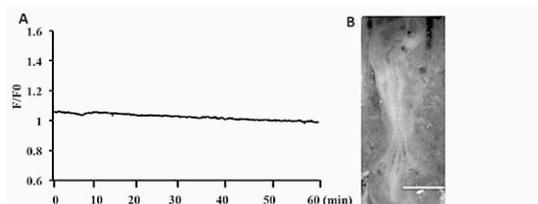


図 2. A: PLCZ、AH、CS タンパク質を含んだ SE の投与による UV 照射したウズラ卵細胞質内 Ca^{2+} 上昇の変化、B: PLCZ、AH、CS cRNA と胚盤葉細胞核を移植して得られた体細胞クローンウズラ胚。バー: 1mm

(4) 孵卵 10-12 日ウズラ胚由来の皮膚または筋原細胞核を PLCZ、AH および CS cRNA の混合溶液とともに排卵後 10-14 時間のウズラ卵に顕微注入したところ、皮膚細胞核移植群において、胚発生が確認された。対照的に、筋原細胞核移植群において、発生したウズラ胚は無かった。またニワトリ体細胞核をウズラ卵へ移植したところ、ウズラ体細胞核移植群と同様に、胚盤葉細胞および皮膚細胞核移植群においてのみ、ドナー核由来の胚発生が確認された。

(5) 以上のことから、排卵後しばらく卵管を通過した鳥類卵は、除核操作を必要としない核移植用卵としての利用が可能であり、またそれらの卵は、近縁種を介した体細胞クローン鳥種の作出にも応用可能であることが示唆された。

<引用文献>

① Mizushima S, Takagi S, Ono T, Atsumi Y, Tsukada A, Saito N, Shimada K. 2007. Possible role of calcium on oocyte development after intracytoplasmic sperm injection in quail (*Coturnix japonica*). *Journal of Experimental Zoology*, 307A (11):647-653.

② Takagi S, Ono T, Tsukada A, Atsumi Y, Mizushima S, Saito N, Shimada K. 2007. Z-chromosome specific primers for chicken-quail hybrid blastoderm. *The Journal of Poultry Science*, 44(2): 209-212.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

① Kato A, Mizushima S, Shimada K, Kagami H, Ono T. 2014. Simple culture system for bobwhite quail and Japanese quail embryos

from the blastoderm stage to hatching using a single surrogate eggshell. *The Journal of Poultry Science*, 51 (2): 203-206. (査読有)
doi: 10.2141/jpsa.0130118

② Mizushima S, Hiyama G, Shiba K, Inaba K, Dohra H, Ono T, Shimada K, Sasanami T. 2014. The Birth of quail chicks after intracytoplasmic sperm injection. *Development*, 141(19):3799-3806. (査読有)
doi: 10.1242/dev.111765

③ Sasanami T, Izumi S, Sakurai N, Hirata T, Mizushima S, Matsuzaki M, Hiyama G, Yorinaga E, Yoshimura T, Tsutsui K. 2014. A unique mechanism of successful fertilization in a domestic bird. *Scientific Reports*, 5:7700. (査読有)
doi: 10.1038/srep07700

④ Kang KS, Park TS, Rengaraj D, Lee HC, Lee HJ, Choi HJ, Mizushima S, Ono T, Han JY. 2015. Fertilization of cryopreserved sperm and unfertilized quail ovum by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction, Fertility and Development*, in press. (査読有)
doi: 10.1071/RD15126

⑤ Matsuzaki M, Mizushima S, Hiyama G, Hirohashi N, Shiba K, Inaba K, Suzuki T, Dohra H, Ohnishi T, Sato Y, Kohsaka T, Ichikawa Y, Atsumi Y, Yoshimura T, Sasanami T. 2015. Lactic acid is a sperm motility inactivation factor in the sperm storage tubules of the domestic bird. *Scientific Reports*, 5:17643. (査読有)
doi: 10.1038/srep17643

⑥ Hiyama G, Mizushima S, Matsuzaki M, Ichikawa Y, Kansaku N, Sasanami T. 2016. Expression of prolactin receptor on the surface of quail spermatozoa. *The Journal of Poultry Science*, 53 (2): 157-164. (査読有)
doi: 10.2141/jpsa.0150132

[学会発表] (計 4 件)

① 水島秀成. ウズラの受精時に卵を活性化する新規精子ファクターの探索. 日本家禽学会秋季大会, 2014年9月27日, 鹿児島大学 (鹿児島県, 鹿児島市).

② Mizushima S. Full-term development of quail egg by intracytoplasmic sperm

injection (ICSI) and use of ICSI for avian transgenesis. *10th Asia Pacific Poultry Conference*, October 19-23, 2014, Jeju (Korea).

③ Mizushima S. Establishment of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique in quail and its possible application for transgenic and cloned birds. *The 2nd tenure track system international symposium*. March 5, 2015, 富山大学 (富山県, 富山市).

④ Mizushima S, Ono T, Sasanami T. Attempt on the establishment of somatic cell nuclear transfer method in Japanese quail. 17th AAAP Animal Science Congress, August 22-25, 2016, 九州産業大学 (福岡県福岡市).

[図書] (計 1 件)

① Matsuzaki M, Hiyama G, Mizushima S, Shiba K, Inaba K and Sasanami T. 2014. Specific mechanism of sperm storage in avian oviducts. pp. 23-29. "Sexual Reproduction in Animals and Plants" (Sawada H, Inoue N and Iwano M Eds). Springer.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 鳥類の体外受精方法及びクローン細胞又はクローン個体の作製方法、並びにキット、
発明者: 笹浪知宏, 水島秀成

権利者: 静岡大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-191576.

出願年月日: 2014年9月19日

国内外の別: 国内

[その他]

Mizushima S. 2014. Full-term development of quail chick by ICSI. *Development, The Node-Community Site for Developmental Biologists-*
<http://thenode.biologists.com/full-term-development-of-quail-chick-by-icsi/research/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水島 秀成 (MIZUSHIMA, Shusei)

富山大学・大学院理工学研究部 (工学) ・
特命助教

研究者番号: 20515382

(2) 連携研究者

笹浪 知宏 (SASANAMI, Tomohiro)

静岡大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：80322139