

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640051

研究課題名(和文)細胞周期特異的局在性を利用した卵子特異的リプログラミング因子の網羅的探索

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of egg-specific reprogramming factors based on cell cycle-specific localization

研究代表者

外丸 祐介(SOTOMARU, YUSUKE)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授

研究者番号：90309352

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):クローン動物の作製効率の改善に向け、マウスを用いて卵子特異的なリプログラミング因子の探索を行った。標的は「核を除去した前核期卵の細胞質と比較して、未受精卵に多く存在するタンパク質」であり、卵子由来サンプルを質量分析装置で解析することで、この条件に合致したタンパク質の中で最大比であったヌクレオプラスミンをリプログラミング因子の第一候補として研究を進めた。本研究期間中に、ヌクレオプラスミンのmRNAを核移植の際に同時注入することでクローン胚を作製し、体外培養および移植試験により発生への効果を確認するに至っている。

研究成果の概要(英文):To improve the efficiency of animal cloning, we used mice to detect egg-specific reprogramming factors, by setting proteins that are abundant in the cytoplasm of unfertilized eggs, compared with enucleated pronuclear-stage eggs, as target proteins. Quantitative mass spectroscopy of proteins that were isolated from eggs and that fulfilled the conditions of target proteins found that nucleoplasm had the highest localization rate and was therefore the top candidate reprogramming factor. In this study, we were able to produce cloned embryos by concurrently injecting nucleoplasm mRNA during nuclear transplantation and to verify the efficiency of embryo development, fertilization, gene expression by performing in vitro culture and transplantation.

研究分野：生殖工学

キーワード：発生工学 リプログラミング因子 クローン動物

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳動物における体細胞・ES細胞クローン作製の報告から10年以上が経過したが、実際のクローン技術は成功率の低さや奇形等の発生異常の問題点を抱えている。この問題を解決するため、発生異常の原因究明に関する研究が国内外問わず進められており、我々も含めた近年の取り組みにより、クローン胚の発生異常は核の不十分なリプログラムのために起こる遺伝子発現調節機構の異常に起因していることが明らかになって来た (Fukuda A et al., PLoS One, 2010、Jincho Y et al., Biol Reprod, 2008、Wee G et al., Reproduction, 2007)。このことから、このリプログラミング因子の正体を突き止めることが、今後のクローン研究進展の鍵を握っていると言える。

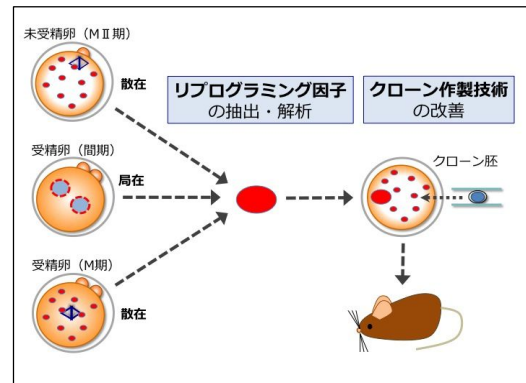
(2) 分化の進んだ細胞に未分化マーカー発現と多分化能を誘導する現象を、一般的にリプログラムと呼ぶ。これに対し我々は、細胞核を卵細胞質へ導入することで通常の受精直後の状態へ引き戻す、所謂“初期化”の誘導を必要とするクローン技術におけるリプログラムは、未分化細胞の場合とは部分的に異なる現象であると考えている。これは、種々の未分化マーカーを発現して多能性を有するES細胞をドナーとした場合でも、体細胞をドナーとした場合との比較において、個体発生能には明確な差が存在しないことからわかる (Ogonuki et al., Nat Genet, 2002)。すなわち、未分化細胞の場合は多能性を誘導した段階にすぎず、分化した核を受精卵の段階までリプログラムするには卵子特異的な因子が働いていると言える。

(3) これまでの卵子特異的なリプログラミング因子の探査研究では、卵核胞期卵や成熟未受精卵からの抽出物を感作させることで体細胞に未分化マーカーの発現を誘導できることが確認されている (Miyamoto et al., Mol Reprod Dev, 2007)。しかし、これらは現状ではクローン技術の改善に直接的に結びつくものではなく、未受精卵には分化した細胞核をリプログラムすることのできる因子が含まれることは疑いようが無いものの、ターゲットとなる因子の分離・同定には至っていない

(4) クローン胚作製の一般的なプロトコルでは、ゲノム(核/染色体)を除去した未受精卵の細胞質へ細胞核が移植される。また、受精卵の細胞質に移植しても発生能は獲得されないことから、「リプログラミング因子は受精(活性化)後間もなく消失してしまう、未受精卵特異的な因子」と考えられていた。しかし、最近、2細胞期へ分裂前のM期に限っては受精卵の細胞質を用いてもクローンが作製できることが報告され、リプログラミング因子は受精前に限らず受精後の卵子に

も存在することが明らかとなった (Egli Det al., Nature, 2007)。我々はこの事から示唆されるリプログラミング因子の細胞周期による局在性に着目し、受精前後の卵子を材料としてタンパク質を網羅的に解析することで、リプログラミング因子に辿り着けるという着想に至った(図1)。

図1. リプログラミング因子抽出のイメージ



2. 研究の目的

(1) 体細胞やES細胞から個体を作製する所謂クローン技術は様々な哺乳動物に応用され、実験動物学、基礎医学、畜産学等の様々な領域での応用が進んでいる。しかし、現実にはその成功率は低く、未だ不安定な技術のままである。また、クローン胚の発生には、未分化細胞における多能性獲得の程度とは異なり、移植されたドナー核が通常の受精直後の状況にリプログラムされる必要があるが、そのメカニズムやその誘導因子(リプログラミング因子)についても明らかになっていない。そこで我々は、このメカニズムの解明に向けて、「標的因子は卵子内で局在性を示す」という仮説を手がかりに、卵子内に存在する卵子特異的なリプログラミング因子の探査をはかる。

(2) 卵子におけるリプログラミング因子の探査研究は多くの研究者が取り組んでいるが、漠然とした物の中からターゲットとなる因子を分離・同定することは非常に困難である。これに対し、本研究では細胞周期による局在性に注目することで、雑多な候補の中からの絞り込みが可能となることから既存の取組みに比べて優位であると言える。そして、この研究の目標である卵子特異的なリプログラミング因子の特定が達成できれば、リプログラム機構の解明ならびに安定的で確実性の高いクローン技術の構築に貢献することができる。

(3) クローン技術は、基礎医学や再生医療研究等の前臨床的応用研究のツールとして極めて有用であるものの、実際のクローン技術は成功率の低さや奇形等の発生異常の問題点を抱えており、現状では十分に確立された

技術とはなっていない。この問題を解決するため、国内外問わず、発生に有利な手法や条件の検討や、発生異常の原因究明に関する遺伝子発現レベルでの研究がなされているが、未だ革新的な改善はなされていない。この根本となる理由は、「レシピエントである卵細胞質へ導入されたドナー核が、どのような機構により受精直後の状態へとリプログラムされるか？」が未だ十分に解明されていないことにある。この研究の目標である卵子特異的なリプログラミング因子の特定が達成できれば、前述の疑問の回答の手がかりとなることで安定的で確実性の高いクローン技術の構築に向けて大きく前進し、また、生命科学分野の研究全般の進展にも貢献できることになる。

3. 研究の方法

本研究では、マウスの卵子を材料として、先ず「核を除去した細胞周期間期の卵子細胞質には殆ど存在せず、その除去した核を含む細胞質に存在し、且つ未受精卵細胞質中に存在するタンパク質」を分離する。次に、このタンパク質を解析・同定した後、クローン胚におけるリプログラミング能力を検証することで、卵子特異的なリプログラミング因子としての検証を行う。

(1) 材料の作製

標的タンパク質を分離する為の材料として、BDF1 マウスを用いて以下のように卵子を収集・作製した。収集目標数は、二次元電気泳動による展開に必要なタンパク質量を150 μ g として、マウス卵子あたり 30ng 程度と見込んで概算した。

雌マウスに PMSG と hCG を投与することで過剰排卵処置し、排卵卵子（未受精卵）を採取・収集する。（目標数 = 5,000 個）

上記 同様に過剰排卵処置し、雄マウスと自然交配もしくは排卵卵子へ体外受精を施すことで受精後 10-12 時間目の細胞周期間期の受精卵（前核期卵）を採取・収集する。（目標数 = 5,000 個）

上記 により得た前核期卵から、顕微操作により核及びその周辺細胞質を除去した前核期受精卵細胞質を採取・収集する。（目標数 = 10,000 個）

(2) タンパク質の発現・相対定量解析

上記(1)で作製した材料からタンパク質を抽出し、BCA 法によりタンパク質量を行う。次に、これらを iTRAQ 試薬でラベルした後に LC-MS/MS 分析に供してタンパク質発現・相対定量解析（株式会社アプロサイエンスに依頼）を実施し、この結果をもとに発現量差の大きいタンパク質群の中からリプログラミング因子の候補を選抜する。

(3) 候補タンパク質の核への局在の確認

未受精卵に塩化ストロンチウムを用いて

活性化処置を施すことで単偽発生卵を作製し、処置後 12 時間目の前核期単偽発生卵について候補タンパク質の抗体を用いて免疫染色を行い、核への局在（候補選抜の趣旨への合致）を確認する。

(4) 発現ベクターの作製

候補タンパク質の遺伝子（cDNA）にタグ遺伝子 FLAG を融合させた発現ベクター作製、ならびにこのベクターより mRNA を調整する。これらを未受精卵細胞質中にインジェクションした後に活性化処置を施すことで単偽発生卵を作製し、6、12 および 21 時間目に FLAG 抗体を用いて免疫染色を行うことで、タンパク質発現と核への局在を確認する。

上記 に準じて、発現ベクターより調整した mRNA を異なる濃度でインジェクションした単偽発生卵を作製し、これらを体外培養することで注入量に伴う発生能への影響を検討する。

(5) リプログラミング能力の検証

上記(4)により作製した候補タンパク質の mRNA を核移植の際に同時注入することで体細胞クローン胚を作製し、体外培養および移植試験により発生への効果を確認する。

PMSG と hCG を投与することで過剰排卵処置した BDF1 雌マウスより未受精卵を採取し、顕微操作により染色体を除去することでレシピエントとする。

未受精卵の採取時にあわせて得られる卵丘細胞をドナーとし、この細胞核をピエゾマイクロナニピュレーターを用いてレシピエントに注入（核移植）する。この核移植操作の際に候補タンパク質の mRNA を同時注入する。

核移植から 1-2 時間後に塩化ストロンチウムにより活性化処置を施し、前核形成に至ったものをクローン胚として KSOM 液にて体外培養する。

個体作製試験に供する場合は、偽妊娠 1 日目の ICR 系雌マウスの卵管に移植する。

4. 研究成果

(1) 材料の収集とタンパク質解析

当初計画では、排卵卵子（未受精卵）は 5,000 個、細胞周期間期受精卵（前核期卵）は 5,000 個、核及びその周辺細胞質を除去した前核期受精卵細胞質（前核期卵細胞質）は 10,000 個を収集目標数とした。しかし、その後得た新規情報により、従来のタンパク質分離・解析手段の 2 倍程度の分解能を持つ新規手段（「上記「3. 研究の方法 (2) タンパク質の発現・相対定量解析」参照）を利用できることがわかり、収集目標数を半分程度に変更した。

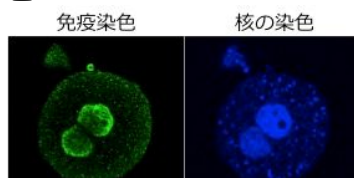
未受精卵は 3,239 個、前核期卵は 2,800 個、前核期卵細胞質は 5,042 個を収集した。当分の比較解析の対象を未受精卵と前核期卵細胞質として、抽出したタンパク質を定量した

結果、それぞれ約 35.0 μg と約 24.0 μg であった。次に、これらを iTRAQ 試薬でラベルした後に LC-MS/MS 分析に供してタンパク質発現・相対定量解析を実施した。その結果、825 種類のタンパク質を検出することができ、818 種類について定量的比較が可能であった。本研究で標的とするタンパク質は「核を除去した前核期卵の細胞質と比較して、未受精卵に多く存在する」ものであるが、818 種類中 93 種類がこれに該当した。特に 1.5 倍以上のものは 2 種類あり、最大比 (2.812 倍) を示したヌクレオプラスミンをリプログラミング因子の第一候補として、以降の試験を実施した。

(2) 候補タンパク質の核への局在の確認

活性化処置後 12 時間目の前核期単偽発生卵について、ヌクレオプラスミンの抗体を用いて免疫染色を行った。この結果、細胞周期間期における核への局在が観察され (図 2)、候補選抜の趣旨へ合致することが確認できた。

図 2 . ヌクレオプラスミン抗体による免疫染色



(3) 発現ベクターの作製と確認

タグ遺伝子 FLAG を融合させたヌクレオプラスミン発現ベクター、ならびにこの mRNA を未受精卵細胞質中にインジェクションした後に活性化処置を施すことで単偽発生卵を作製し、FLAG 抗体を用いて免疫染色を行った。活性化処置後 12 時間目の前核期で観察を行った結果、発現ベクターの場合はタンパク質発現を確認できず、mRNA の場合ではその発現と核への局在を確認できた (図 3) ことから、以降の試験は mRNA を使用することとした。また、mRNA の場合は、活性化処置後 6 時間目の前核期でもタンパク質発現が確認できたが、21 時間目の分裂直後の 2 細胞期では確認することができなかった (図 4)。

図 3 . FLAG 抗体による免疫染色 (活性化処置後 12 時間目)

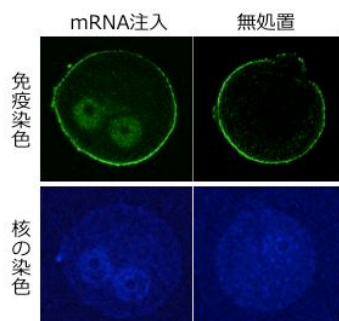
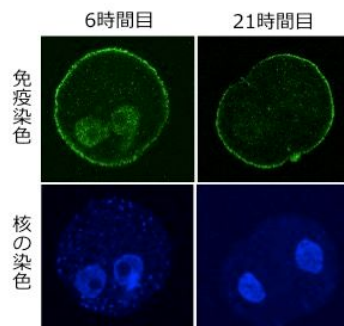


図 4 . FLAG 抗体による免疫染色 (活性化処置後 6、21 時間目)



約 100ng/ μL x 0.5pL、約 500ng/ μL x 0.5pL、ならびに約 1,000ng/ μL x 0.5pL のヌクレオプラスミン mRNA をインジェクションした単偽発生卵を作製し、これらを体外培養することで注入量依存的な発生能への影響を検討した。その結果、胚盤胞への発生率はそれぞれ 86%、90%、93%で、また無処置の場合の 94%との比較でも差は無く、注入量の影響は認められなかった。ことから、以降の当面の試験は約 1,000ng/ μL x 0.5pL の注入量で実施することとした。

(4) リプログラミング能力の検証

核移植の際に約 1,000ng/ μL x 0.5pL のヌクレオプラスミン mRNA を同時注入することで体細胞クローン胚を作製し、体外培養および移植試験により発生への効果を確認中である。これまでに 80 個のクローン胚について移植試験を実施したが、効果は確認できなかった (継続実施中)。

(5) 本研究の位置づけとインパクト、および今後の展望

現時点においても、国内外を問わず、クローン胚の発生能改善につながる卵子特異的なリプログラミング因子は特定されていない。ヌクレオプラスミンは、これまでも論文等においてリプログラミング因子の候補としての試験報告があるが、明確な証拠は得られていない。しかし、この状況には、本研究の現状も含めて、未だ十分な検証試験がなされていないという側面も含まれていると考えられる。今後は、本研究において得られた知見を一層発展させ、核移植操作におけるヌクレオプラスミン mRNA の注入量・注入時期の至適化やドナー細胞への導入の検討、また、関連タンパク質・遺伝子群の生物学的機能の情報を利用した相乗・複合的効果を加味しながら進めることで、より詳細な検証に取り組む予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sakashita A1, Kobayashi H, Wakai T, Sotomaru Y, Hata K, Kono T. Dynamics of

genomic 5-hydroxymethylcytosine during mouse oocyte growth. Genes Cells. 査読有. 2014. 19(8): 629-36. DOI: 10.1111/gtc.12164.

〔学会発表〕(計1件)

野村圭代、藤原真、高橋望、雉岡めぐみ、隈本宗一郎、外丸祐介、河野友宏 . Dlk1-Dio3ドメイン BAC-TG マウスに認められる発生異常 .第37回日本分子生物学会年会(2014.11.26、横浜、ポスター)

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/nbard/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

外丸 祐介 (SOTOMARU, Yusuke)
広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授
研究者番号：90309352

(2)研究分担者

河野 友宏 (KONO, Tomohiro)
東京農業大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：80153485

(3)連携研究者

神田 暁史 (KANDA, Akifumi)
広島大学・自然科学研究支援開発センター・研究員
研究者番号：80512649

畠山 照彦 (HATAKEYAMA, Teruhiko)
広島大学・技術センター・技術員
研究者番号：50452595

(4)研究協力者

吉岡 みゆき (YOSHIOKA, Miyuki)
広島大学・自然科学研究支援開発センター・教育研究補助職員