

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062012

研究課題名（和文）核移植技術を用いた生殖系列の全能性獲得機構の解明

研究課題名（英文）Nuclear transfer study for the mechanisms of acquisition of totipotency by the germ cell genome

研究代表者

小倉 淳郎（OGURA ATSUGO）

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・室長

研究者番号：20194524

研究分野：生殖系列

科研費の分科・細目：

キーワード：核移植、生殖細胞、胚盤胞、遺伝子発現、マウス、再プログラム化

1. 研究計画の概要

本計画研究は、核移植クローン技術と分子生物学的解析技術を組み合わせることにより、生殖細胞特有の全能性獲得に関わるゲノム構造あるいは機能を明らかにすることを目的とする。本研究では、全能性獲得の機構（あるいはその準備）こそが次世代にゲノムを伝える生殖細胞の本質であるとの認識をもとに、それがいつどのように生じるか、そしてその際にゲノム上にどのようなエピジェネティクス変化が起こっているかを明らかにする。生殖細胞ゲノムが正常にリプログラミングされるためのいくつかの条件が明らかにされ、さらにそれを体細胞クローンの改善により証明できた。最終的には、体細胞ゲノムの初期化の人為的制御を目指したい。

2. 研究の進捗状況

これまでに体細胞および生殖細胞をドナーとして核移植クローン実験を行い、再構築胚の発生能、そして胚、胎仔、および個体の遺伝子発現および表現型の解析結果から、生殖細胞特有のゲノム構造あるいは機能を獲得するのは、始原生殖細胞の発生中期であるという傍証を得た。そして具体的なエピジェネティクス変化としては、centric/pericentric 領域の脱メチル化、体細胞特異的 H3K9 ジメチル領域の活性化、そして Xist 発現制御の変化（おそらくプロモーター非依存性）が示唆された。これらの多くのデータは、単一胚盤胞の網羅的遺伝子発現解析技術を元に、マイクロアレイ解析を実施したものである。特に Xist 遺伝子の発現制御に関しては、体細胞をドナーに用いた核移植クローン胚において活性化 X 染色体からの Xist の異所性発現が

観察された。一方、4 細胞期胚の核をドナーに用いた核移植胚の遺伝子発現パターンはほぼ正常であったことから、これらの異常は体細胞クローン特異的であることが示された。そしてこの発現を抑制することにより、マウス体細胞クローン胚の発現がゲノムワイドに改善し、クローン産子作出効率を 10 倍程度も向上させることに成功した。一方、Xist 非依存性の発現低下を示していたヒストン H3K9 ジメチル領域（Magea および Xlr 遺伝子群を含む）の正常化のために、ヒストンメチル化酵素の阻害や脱メチル化酵素の mRNA 注入を行った。しかしながら、クローン胚盤胞におけるこれらの遺伝子の発現上昇には至らず、これらのヒストン修飾には強固な維持制御が働いていることが示唆された。一方、Xist ノックアウトでも体細胞クローン特異的な胎盤形成異常（後期の過形成など）が残っていることから、新たな原因解明を開始した。まずは着床直後の胚のマイクロアレイ解析を実施し、胚体外組織における胎盤関連遺伝子が成熟型の発現パターンを示していることを明らかにした。これは、未分化型胎盤細胞が極めて少ないクローン初期胎盤組織像所見と一致している。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。
(理由) 生殖細胞ゲノムが正常にリプログラミングされるためのいくつかの条件が明らかにされ、さらにそれを体細胞クローンの改善により証明できたことは予想以上の成果となった。一部の成果は、Science 誌に掲載された。

4. 今後の研究の推進方策

本研究の構成は大きく分けて、核移植クローン実験と、その得られた胚・胎盤のエピジェネティクス解析の2つの柱からなる。核移植クローンのドナー細胞としては、始原生殖細胞、着床前期胚の割球 (blastomere)、体細胞を用いる。1) 着床前期胚、2) 初期胎盤、3) これらから派生する幹細胞 (ES 細胞および TS 細胞) について、遺伝子発現パターン、DNA メチル化、ヒストン修飾パターンを解析する。2 2 年度までに、胚側の発生に影響を与える生殖細胞ゲノムの特性、特に X 染色体遺伝子に関わる解析が進んだものの、一方では正常胎盤形成に関わる生殖細胞のエピジェネティクスが未解明である。すなわち、体細胞クローンの成功率の改善には成功したものの、クローン胎盤の異常はまだ残されている。この胎盤異常も改善することにより、最終的には、体細胞ゲノムの初期化の人為的制御を目指す。

5. 代表的な研究成果

(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 14 件)

- ① Inoue, K., Kohda, T., (14 名省略), 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 Ogonuki N., (6 名省略), Ogura, A.. The effect on intracytoplasmic sperm injection outcome of genotype, male germ cell stage and freeze-thawing in mice. *PLoS ONE* 5, e11062 (2010). (査読有り)
- ③ Honda, A., (5 名省略), Ogura, A.. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *J. Biol. Chem.* (in press). (査読有り)
- ④ Honda, A., (10 名省略), Ogura, A.. Large-scale production of growing oocytes in vitro from neonatal mouse ovaries. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 605-613 (2009). (査読有り)
- ⑤ Inoue, K., Ogonuki, N., Mekada, K., Yoshiki, A., Sado, T., Ogura, A.. Sex-reversed somatic cell cloning in the mouse. *J. Reprod. Dev.* 55, 566-569 (2009). (査読有り)

[学会発表] (計 18 件)

- ① Ogura A. Recent technical advancements of nuclear transfer in the mouse. 4th AFLAS Congress Meeting/5th AMMRA Annual Meeting/11th CSLAS Annual Meeting, 2010

年 11 月, Taipei, Taiwan

② Ogura A., Inoue K. Improvement of somatic cell nuclear transfer in mice: Genetic and epigenetic approaches. Czeck-Japan Joint Symposium for Animal Reproduction, "From Gametes to Stem Cells" 2010 年 9 月 21 日 Liblice Castle, Czech Republic

③ 小倉淳郎. 雄性生殖細胞の受精能とゲノム刷り込み. 農業生物資源研究所 生殖機構研究シンポジウム, 2009 年 12 月, 東京

④ Ogura A. Micro-insemination and nuclear transfer using male germ cells. World Congress on Reproductive Biology 2008 年 5 月 24 日, Hawaii, U. S. A.

[図書] (計 1 件)

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」, 近代出版, 2011 年, pp 273-276

[その他]

・研究所の広報担当を通じて、2009 年に 1 回、2010 年に 2 回のプレス発表を行い、社会への成果の発信を行った。それぞれ、新聞等に掲載された。

例: 「クローンマウス 出生率 10 倍に」(日経産業新聞 2010 年 9 月 17 日)

・研究室のホームページを開設・更新した <http://www.brc.riken.go.jp/lab/kougaku/>。