

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04605

研究課題名(和文) 生胚内個別染色体動態解析および染色体操作による次世代胚操作技術の確立

研究課題名(英文) Analysis of individual chromosome dynamics in living embryo and establishment of next generation embryo manipulation technique by chromosome transfer

研究代表者

水谷 英二 (MIZUTANI, EIJI)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：80443034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：核移植技術では核そのものを操作するが、それよりも小さな単位、すなわち染色体を操作するための技術開発を試みた。特定の染色体をラベルするため suntag system を使用し、ES細胞中のY染色体をラベルすることに成功し任意の染色体をラベルできる可能性を示した。また胚の染色体を分散させることで、生きた胚間での染色体移植が可能であることを示した。しかしながら、胚において特定染色体をラベルして操作するには至らなかった。加えて、染色体操作の使用が想定される絶滅危惧種において、個体を傷つけずに採取可能な尿に含まれる極わずかな細胞から、クローン個体およびntES細胞株が樹立可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Nuclear transfer technique manipulates the nucleus itself, but attempts to develop technologies to manipulate smaller units, ie chromosomes. We used the suntag-system to label specific chromosomes and succeeded in labeling the Y chromosome in ES cells and showed the possibility of labeling any chromosome. It also showed that chromosomal transfer between live embryos is possible by dispersing the chromosome in embryos. However, we failed to label and manipulate specific chromosomes in embryos at present. In addition, cloned mouse and ntES cell lines can be established from very few cells contained in the urine that can be harvested without harming individuals in the threatened species expected to use chromosomal manipulation.

研究分野：発生工学

キーワード：染色体操作 核移植 イメージング

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報は高度に制御された機構により、生殖細胞形成過程における減数分裂および受精後の体細胞分裂時を通して、染色体としてコンパクトに収納され次世代へと受け継がれていく。この際に何らかの異常をきたした胚は、正常な遺伝情報場としての機能を失い、結果として発生停止もしくは発生異常をきたすこととなる。ダウン症を引き起こす21番染色体のトリソミーや加齢による染色体異常がそのよい例である。すなわち、染色体の制御機構、分配時の動態を明らかにすることは哺乳類胚発生の仕組みを理解するうえで不可欠であるといえる。最近減数分裂時に働くタンパク質や細胞分裂時に働くモータータンパク質などは同定されてきており、ライブセルイメージング技術の発達により、減数分裂時の染色体動態解析がなされている (Kitajima et al. Cell 2011)。しかし、生殖細胞形成や受精後の胚発生過程における**個々の染色体配置、動態などについては未だに明らかにされていない**うえ、**染色体単位での操作技術は確立されていない**。近年、遺伝情報の人為的操作技術として体細胞クローン技術が発展してきており、畜産や絶滅危惧種などの希少動物保全への利用が期待されている。体細胞クローン技術では、核移植という操作により、ある細胞の持つ遺伝情報を丸ごと除核した卵細胞に移植することで個体を作製する。言い換えれば、細胞の持つ染色体セットを丸ごと人為的に操作する技術であるため、生まれてくる個体の性別もドナー細胞の性別に原則として依存するため、希少動物や絶滅動物に利用した場合はその後の繁殖が難しい。またクローン技術には大きな問題があり、成功率が低い。申請者らは以前、染色体を構成するヒストン H2B タンパク質を蛍光ラベルしてクローン胚の初期発生過程をライブセルイメージング解析することに成功した (Mizutani et al. Dev. Biol. 2012)。その結果、大部分のクローン胚では初期発生過程で染色体の異常分配が起こり、それが発生停止を引き起こしていることが明らかとなった。さらに注入されたドナー核の染色体配置が異常なため、その後の染色体分配異常を引き起こしている可能性についても取得画像の解析により示唆されている (未発表データ)。一方で Inoue らは全くの偶然ではあるが核移植により性転換が起こることを報告している (Inoue et al. JRD 2009)。同様の現象は申請者らの実験によっても確認されており、性転換を起こしたクローンマウスは正常に生殖能力を持つことも確認している (未発表データ)。これらの現象はすなわち、**初期胚で染色体を任意に操作できれば、異常発生の原因となる染色体異常の改善や生まれてくる個体の性別を初期胚段階で人為的に操作できる**ことを意味している。問題点としては先にも述べたように染色体単位での置換、操作技術が確立されてい

ない点、また個々の染色体を胚を生かしたまま識別できる手法が確立されていない点があげられる。

2. 研究の目的

胚発生に伴う染色体の配置、分配は哺乳類の発生にとって非常に重要なプロセスであるが生きた胚で実際に解析した例はほとんどなく、減数分裂においては Kitajima らの報告 (Kitajima et al. Cell 2011) 初期胚発生では申請者らが顕微授精胚やクローン胚で行ったものが唯一といえる。この場合においても、個々の染色体を識別して解析できてはいない。そこで本研究では、**哺乳類卵細胞や初期胚中の各染色体を可視化する技術を確立し、胚発生に伴う染色体配置や分裂時の動態を明らかにする**。また染色体自体を可視化することで可能となる、**生きた初期胚における単一染色体操作技術を確立**する。これらの技術開発と解析により、**哺乳類胚発生における染色体配置、動態の意義を明らかにし、初期胚での染色体置換による性別操作、トリソミーなどの染色体異常が原因となっている疾患の治療法の確立など次世代の胚操作技術の基盤構築**を目指していく。

3. 研究の方法

(1) 卵細胞または胚の個々の染色体の可視化

メスの場合、2本のX染色体のうち1本は不活化されており、特異的なヒストン修飾 (H3K27 トリメチル化) がされていることが知られている。この場合、抗体を用いてこれを標識することが可能であることが予測される。一方、オスの場合はY染色体を識別する必要があるが、X染色体と比べて小さく蛍光シグナルが弱いと操作が困難であることから、後述するTALENとCRISPR/Cas9のシステムを利用してマーカーを挿入することでできるだけ検出しやすい標識が必要であると考えられる。

常染色体については新規のゲノム編集ツールである、CRISPR/Cas9システムを応用して、染色体の可視化を試みる (Chen et al., Cell, 2013)。Cas9ヌクレアーゼのDNA切断活性部位を破壊したdead Cas9に蛍光タンパクを連結したベクターもしくはmRNAを用い、染色体特異的な反復配列もしくは人工的に挿入したリピート配列を標的とし、蛍光シグナルを観察する。また、TALENとして話題になっている人工DNA結合タンパク質TAL effectorを用いて、シグナルの強度、蛍光タンパク発現までの時間を検証し、より鮮明に可視化できる手法を採用する (Miyanari et al., nature structural & molecular biology, 2013)。

(2) 卵成熟や胚発生に伴う染色体配置、動態の時間的、空間的な解析

卵成熟過程の減数分裂、初期胚発生での

卵割過程においても各染色体はシステムチックに複製、整列、分配を繰り返している。殊にクローン胚では申請者らの研究により、染色体の整列、分配がうまくいかずその後の個体発生を停止してしまう事例が多く観察されている。しかしながら哺乳類の胚発生過程における染色体の配置、動態がどのような規則性、意義を持っているのかを個々の染色体を識別して解析した例はない。この解析を行うためには、卵子や胚を固定するのではなく、生きたまま解析することが不可欠である。申請者らは観察後のクローン胚からクローンマウスを得るなど高度な胚のライブセルイメージング技術を持っている。そこで、染色体を可視化した卵子もしくは胚をライブセルイメージング解析に供し、取得画像を基に各染色体の動態を時間的、空間的な要素をもって詳細に解析する。解析後の卵子については受精能を、胚については取得画像を基に観察された事象ごとに選別し、グループごともしくは個別に偽妊娠メスマウスに胚移植して個体発生能まで解析する。

(3) 単一染色体操作技術の確立

Y染色体操作による初期胚性転換マウスの作出

前年度に引き続き単一染色体操作技術の確立を行う。すでに予備実験としてオス細胞の核移植で偶然得られたメスクローンマウス尻尾細胞から申請者が作製して保有している核型XOのES細胞をドナーとして同様の手法でクローン胚を作成する。同時にオス胚を準備し標識されたY染色体単体を胚から抽出して、XO胚に移植する。染色体操作が終わった胚はと同様に培養、胚移植、核型解析を行い、目的の核型の個体が作出できることを確認する。

常染色体操作胚からのマウス作出

性染色体の操作技術に続いて、常染色体をターゲットとした染色体操作を試みる。具体的な手法としてはと同様に行っていく。

(4) 絶滅危惧動物種のための核移植方法の構築

本研究計画で染色体を操作する目的の一つに、絶滅危惧種等を核移植でレスキューした場合に初期胚段階で性別をコントロールすることがある。それに先んじて絶滅危惧種動物を用いることを想定した核移植技術の開発を行う。具体的には、動物個体を傷つけずに採取可能なドナー細胞の選定、それを用いた核移植技術の開発を行う。

4. 研究成果

(1) 卵細胞または胚の個々の染色体の可視化

初期胚中の染色体を可視化するため、ドナ

ー細胞となるマウスES細胞の染色体可視化方法を検討した。細胞中の染色体を可視化するためにsuntag systemを採用した。Suntag systemは短いペプチドの繰り返し(24xGCN4)で標識し、Tagを細胞内で発現させた蛍光色素で検出する方法であり、通常は蛍光が弱くラベルしても標識が困難な染色体においても、比較的明確な蛍光ラベルが可能であることが予測された。まずES細胞に対してdCAS9-24xGCN4を発現するベクターおよびGCN4の蛍光標識抗体(scFV-eGFP)を発現するベクターとテロメア特異的配列を用いたgRNAをエレクトロポレーションにより導入し、細胞中に蛍光シグナルが検出できるかを検討したところ、多数の蛍光シグナルが細胞中にドットとして確認できた。次に同システムで特定の染色体がラベル可能かを検討した。具体的には雄であることを確認した129B6系統のES細胞にY染色体上の特異的配列より設計したgRNA、dCAS9-24xGCN4発現ベクターおよびscFV-eGFP発現ベクターの3種類をエレクトロポレーションにより導入した。その結果、細胞内に一つの蛍光シグナルを確認できた(図1)。このことは本システムを用いることにより、各染色体上の配列をもとに設計したgRNAを使用することで任意の染色体を哺乳類細胞でもラベル可能であることを示している。さらに、初期胚中においても本システムにより任意の染色体がラベル可能かを検討した。初期胚で染色体をラベルし操作するためにはプラスミドベクターを導入する手法は発現までに時間がかかりすぎるため使えない。このため、dCAS9-24xGCN4およびscFV-eGFPのmRNA作成用のベクターを新たに構築した。これらベクターを用いて各mRNAをin vitro transcriptionにより合成し、実験に供した。dCAS9-24xGCN4、scFV-eGFPおよびY染色体上の特異的配列のgRNA、さらにすべての染色体をラベルするためのH2B-mRFP1融合タンパク質をコードするmRNAを卵子にマイクロインジェクションにより注入した。各染色体は速やかにH2B-mRFP1により赤色蛍光でラベルされたが、卵細胞質全体に薄くGFP蛍光が観察されたものの、ドット上のGFP蛍光シグナルは蛍光顕微鏡下では確認できなかった。卵細胞質中で任意の染色体をラベルするためには、各mRNAの濃度検討、同一染色体配列を認識するgRNAの種類をさらに増やすなどのさらなる検討が必要である。

(2) 卵成熟や胚発生に伴う染色体配置、動態の時間的、空間的な解析

上述したように卵細胞または胚の個々の染色体の可視化が現状困難であったことと、研究代表者の異動によりライブセルイメージング装置が自由に使用できなくなったことから、大規模なイメージング解析を行うことができなかった。今後、胚もしくは卵子での任意の染色体可視化が達成できた時点で、

イメージング解析を行っていく予定である。

(3) 単一染色体操作技術の確立

通常、胚発生において染色体はM期に出現し各染色体はチューブリンと動原体で接続し紡錘体を形成している。胚の単一染色体を操作するためには、この構造を破壊し細胞質内で各染色体を分散させる必要がある。そこで、紡錘体構造を破壊するためコルセミド（ノコダゾール）および早期染色体凝集を起こすオカダ酸を用いて胚内で染色体を分散させることを試みた。具体的には、常法に従って核移植胚を作製し、その後染色体を可視化するためにH2B-mRFP1のmRNAをマイクロインジェクションにより注入した。mRNAを注入した胚をノコダゾールおよびオカダ酸を含む胚培養培地に移して、翌日まで培養した。蛍光顕微鏡下で観察したところ、mRFPの赤色蛍光でラベルされた染色体が細胞質中に分散している様子が観察された。次に、マイクロマニピュレーターでこれらの分散した染色体を実際に操作可能か調べた。染色体を分散させた胚を細胞骨格を破壊するサイトカラシンBで処理し、ピエゾドライブを装着したガラスピペットで蛍光ラベルを指標として、染色体を操作した。その結果、卵細胞質内に分散した染色体を、少量の卵細胞質とともにガラスピペットを用いて分離することに成功した。さらにこれらの分離した染色体を、マウス受精卵に注入することも可能であった（図1）。これらの結果は、染色体の蛍光ラベルおよびコルセミド処理を組み合わせることにより、生きた胚において単一染色体のマイクロマニピュレーション操作が可能であることを示している。

次に本操作が、異種動物の染色体についても有効であるかを検討した。tdTomatoを発現するサルES細胞をドナーとして、マウス胚を用いて異種核移植胚を作製した。マウスの場合と同様にして、H2B-mRFP1のmRNAを注入後、ノコダゾールおよびオカダ酸で処理した。翌日蛍光顕微鏡下で観察したところ、マウスと同様に赤色蛍光でラベルされた染色体が分散している様子が観察された。これらの染色体をマイクロマニピュレーターを用いて取り出し、マウス受精卵に注入して培養を継続した。桑実胚期に発生した胚を蛍光観察したところ、いくつかの胚で赤色蛍光が観察された。このことは、注入されたサルの染色体がマウス胚内で機能しうることを示している。本手法により、異種間ハイブリッド胚の作製も可能であることが示唆された。

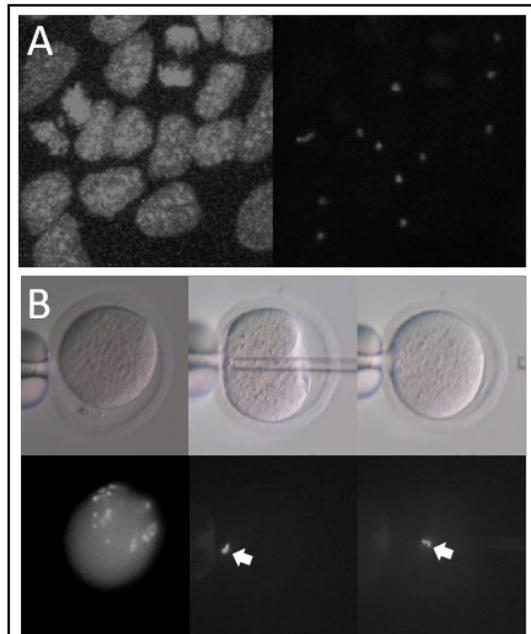


図1. 染色体ラベルと操作。

A. Y染色体がラベルされたマウスES細胞（左:DAPI, 右:GFP）。

B. H2Bを蛍光ラベルしたマウス胚の染色体移植操作。左:卵子内で分散した染色体。中央:注入操作。右:注入後。

矢印:移植された単一染色体。

(4) 絶滅危惧動物種のための核移植方法の構築

絶滅危惧種を核移植技術でレスキューする場合、個体を傷つけずに体細胞を採取する手段が重要となる。動物尿中には極わずかではあるものの体細胞が含まれている。そこでこの尿中の体細胞に着目し、これを核移植のためのドナー細胞として使用できないかを検討した。まず、129B6GFPtgマウス5匹を用いて、これらマウスから尿を採取してそこに含まれる細胞を観察した。細胞数はまちまちであったものの、すべてのマウスからGFP蛍光を持つ細胞が得られ、生細胞が含まれていることが確認できた。次に129B6F1メス、BDF1メス、129オスおよびメス、C57BL/6オス、メスそれぞれの系統から尿中の細胞を採取し、BDF1系統卵子を用いて核移植を行った。すべての系統の核移植胚が胚盤胞期まで発生し、免疫蛍光染色の結果、ICMおよびTEへの正常な分化が観察された。さらにこれらの胚盤胞からntES細胞株を樹立することに成功した。樹立されたntES細胞株はすべてアルカリフォスファターゼ染色陽性、未分化マーカー陽性であり、胚盤胞注入法によりキメラ個体の体細胞に寄与することも確認できた。次に、尿中の細胞から直接クローン個体作成が可能であるかを検討した。129B6F1系統メス、BDF1系統オスおよびメスの尿から細胞を採取し、核移植胚を作成後2細胞期で偽妊娠メスマウス卵管に胚移植した。その結果、すべての系統のマウスからクローン個体作

出に成功した。成功率はそれぞれ 1.7%、1.3%および3.1%であった。さらに得られたクローンマウスどうしを交配したところ、正常な繁殖能力を持つことも確認できた。以上より、尿中の細胞を用いることで、個体を傷つけずにドナー細胞を採取可能であること、さらにこれらの細胞からクローン個体が作出可能であることが示された。

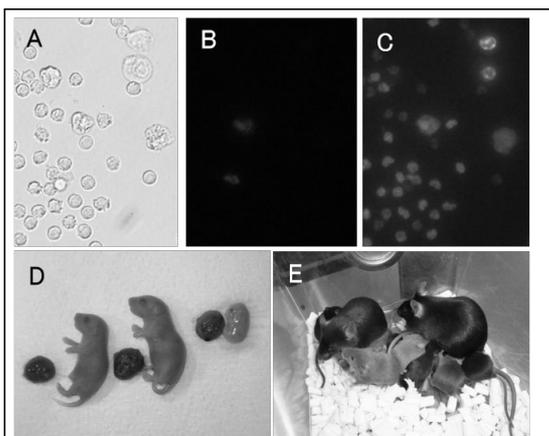


図2. 尿中細胞からのクローンマウス作出
A. 尿中の細胞、B. 尿中の死細胞、C. 核染色。得られたクローンマウス(D)は正常に成長し繁殖能力も持つ(E)。

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6件)

Nagatomo H, Yao T, Araki Y, Mizutani E, Wakayama T. Agarose capsules as new tool for protecting denuded mouse oocytes/embryos during handling and freezing-thawing and supporting embryonic development in vivo. *Sci. Rep.* 2017 Dec 20;7(1):17960 査読有
Yagi M, Kishigami S, Tanaka A, Semi K, Mizutani E, Wakayama S, Wakayama T, Yamamoto T, Yamada Y. Derivation of ground-state female ES cells maintaining gamete-derived DNA methylation. *Nature.* 2017 Aug 10;548(7666):224-227. 査読有
Wakayama S, Kamada Y, Yamanaka K, Kohda T, Suzuki T, Tada MN, Osada I, Nagamatsu A, Kamimura S, Nagatomo H, Mizutani E, Ishino F, Yano S,

Wakayama T. Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jun 6;114(23):5988-5933 査読有

Araki R, Mizutani E, Hoki Y, Sunayama M, Wakayama S, Nagatomo H, Kasama Y, Nakamura M, Wakayama T, Abe M. The number of Point Mutations in Induced pluripotent Stem Cells and Nuclear Transfer Embryonic Stem Cells Depends on the Method and Somatic Cell Type Used for Their Generation. *Stem Cells.* 2017 May;35(5):1189-1196 査読有

Wakayama S, Tanabe Y, Nagatomo H, Mizutani E, Kishigami S, Wakayama T. Effect of Long-Term Exposure of Donor Nuclei to the oocyte Cytoplasm on Production of Cloned Mice Using Serial Nuclear Transfer. *Cell Reprogram.* 2016 Nov;18(6):382-389 査読有

Mizutani E, Torikai K, Wakayama S, Nagatomo H, Ohinata Y, Kishigami S, Wakayama T. Generation of cloned mice and nuclear transfer embryonic stem cell lines from urine-derived cells. *Sci Rep.* 2016 Apr 1;6:23808 査読有

〔学会発表〕(計3件)

尿中の体細胞からのクローンマウス作出および核移植胚由来 ES 細胞株の樹立
水谷英二、鳥飼昂平、若山清香、長友啓明、大日向康秀、岸上哲士、若山照彦
第 109 回 日本繁殖生物学会大会 2016 年 9 月 12 日 15 日 麻布大学
マウス 2 細胞期胚において分配異常を起こした染色体の回収と同定の試み
柴崎郁江、鎌田裕子、鳥飼昂平、長友啓明、水谷英二、若山照彦
第 109 回 日本繁殖生物学会大会 2016 年 9 月 12 日 15 日 麻布大学
ラット卵細胞質内精子注入法の簡便化の試み
水谷英二、加藤めぐみ、笠井真理子、中内啓光
第 40 回 日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 6 日 9 日 神戸ポートアイランド

〔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

水谷 英二 (MIZUTANI, Eiji)
東京大学・医科学研究所・特任研究員
研究者番号：80443034

(2) 研究分担者

長友 啓明 (NAGATOMO, Hiroaki)
山梨大学・総合研究部・特任助教
研究者番号：30746813

若山 照彦 (WAKAYAMA, Teruhiko)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：40360672