

機関番号：34419

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780254

研究課題名 (和文) 核リプログラミング誘導因子を利用した新規体細胞核移植技術の開発

研究課題名 (英文) Development of a new nuclear transfer technology using nuclear reprogramming inducing factors.

研究代表者

谷 哲弥 (TANI TETSUYA)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：70139763

研究成果の概要 (和文) : 体細胞核移植における核リプログラミング能力を強化するために、iPS 細胞の誘導に必要な核リプログラミング関連因子 (*Oct3/4, sox2, klf4, c-Myc, Nanog, Gadd45a*) を強発現させたブタ未受精卵を作出してレシピエント卵細胞として用いたが、核移植卵の体外発生能を向上させることはできなかった。

研究成果の概要 (英文) : For enhancement of oocyte-base nuclear reprogramming potential of unfertilized oocytes, we injected nuclear reprogramming inducing factors (*Oct3/4, sox2, klf4, c-Myc, Nanog, Gadd45a*) for iPS cells establishment into pig unfertilized oocytes before nuclear transfer. However over-expressed oocyte of reprogramming inducing factors could not enhanced developmental potential of porcine nuclear transferred oocytes in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：発生工学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：核移植・核リプログラミング・未受精卵子

## 1. 研究開始当初の背景

体細胞クローンは、完全に分化した体細胞核に全能性を誘導する唯一の技術である。しかしながら未受精卵をレシピエント卵細胞として用いてクローン胚を作製しても、核リプログラミングの効率が 1-5% と極めて低く、体細胞ゲノムの脱メチル化などの不完全なエピジェネティックな変化がその原因の一

つとして考えられている。近年 ES 細胞の未分化維持機構に必要な転写因子を体細胞に導入することにより多能性を有する iPS 細胞へ誘導させることが可能になった。そこでこれらの二つの技術を融合して効率的な体細胞核移植技術を開発できる可能性があるが未だ行われていない。

## 2. 研究の目的

未受精卵をレシピエント卵細胞として用いた通常の方法でクローン胚を作製すると、その核リプログラミングの効率が極めて低いことから、未受精卵子に含まれている核リプログラミング誘導因子の量的問題が推測されるが未だ不明な点が多い。そこで iPS 細胞の誘導に用いられる核リプログラミング誘導因子を予め未受精卵に人為的に強発現させることでその能力を増強させ体細胞クローンの成功率を向上させることを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 効率的なブタ体細胞核移植法の開発  
ブタ体細胞核移植卵の体外発生能は、マウスやウシの場合と比べて低いことから効率的な核移植法の開発を目指した。また、実験に用いる血清や卵胞液のロット差による結果の不安定を解消するために添加物を PVA と置換した完全合成培地を用いた培養系も併せて確立も目指した。近年ヒストン脱アセチル化阻害剤を用いた核移植法が最も効率的な方法として開発されているが、ブタ核移植卵の最適な処理方法は不明であるため阻害剤の種類（トリコスタチン A, バブプロ酸, Scriptide）・濃度・処理時間について検討した。

### (2) 強発現卵作製の条件設定

核リプログラミング誘導因子の強発現卵作製のための cRNA の注入時期と濃度の検討を GFP の蛍光強度を指標に行った。すなわち体外で合成した GFP の cRNA に Poly-A を付加したものを 0.1-10ng/ul の同度で GV 期及び MII 期に注入しその発現時期を蛍光顕微鏡下で確認した。

### (3) 核リプログラミング誘導因子強発現卵を用いた体細胞核移植

iPS 細胞誘導のための核リプログラミング誘導因子 (*oct3/4*, *sox2*, *klf4*, *c-myc*) や ES 細胞との融合法で効果的な *nanog*、核リプログラミングの中心因子である *Oct3/4* の脱メチル化に関与する *Gadd45a* 遺伝子をマウス ES 細胞からクローニングし、体外で cRNA を合成した後、体細胞核移植前 3-4 時間のブタ未受精卵に注入することで核リプログラミング誘導因子強発現卵を作製した。それぞれの遺伝子の発現は、ウェスタンブロッティングにより確認した。強発現卵と胎児繊維芽細胞の再構築胚を VPA で 2 日間処理した後、PZM 培地で 5 日間培養して体外発生能を調べた。また、再構築卵のメチル化状態を免疫染色により測定した。

## 4. 研究成果

### (1) ブタ体細胞核移植の安定した実験系を

確立するため、M199・PZM・NCSU37 系の基礎培地に添加する卵胞液及び牛血清を PVA に置換して体外成熟率や再構築胚の体外発生能を比較した結果、体外成熟培地には M199、発生培地には PZM を用いることにより効率的な完全合成培地によるブタ核移植実験系を構築することができた。次に、ヒストン脱アセチル化阻害剤の効率的な処理方法を検討した結果、1mM のバブプロ酸で 48 時間処理することにより胚盤胞期への発生率を無処理区の 22% から 68% に向上させることに成功した。500 nM の Scriptide を用いても 55% と効率に発生させることができたが、トリコスタチン A では 32% であった。

(2) 体外で poly-A を付加した GFP-cRNA を合成しブタ GV 期卵と MII 期卵にそれぞれ 0.1-10ng/ul の濃度で 10pl 細胞質に注入して培養した結果、MII 期卵に 1 及び 10ng/ul の濃度において注入後 2 時間目以降に GFP の蛍光が観察され 3-4 時間目でその発現量はピークに達した。注入した未受精卵に人為的に活性化を与えて単為発生を行うと、水を注入した対照区と同程度に胚盤胞へ発生したことから強発現卵の作製には、1ng/ul の cRNA を核移植 4 時間前の MII 期卵に 10pl 注入すると効果的にタンパク質に翻訳され、その影響により体外発生能を阻害しないことが明らかとなった。

(3) ブタ未受精卵の核リプログラミング因子の発現解析を Real-time PCR により行うと、iPS 細胞の誘導に必要な遺伝子 *oct3/4*, *sox2*, *klf4*, *c-myc* はすでに発現していた。それらの遺伝子及び *nanog* の強発現卵を作製して、核移植を行った結果、GFP の cRNA を注入した対照区と比較して発生を促進させることはできなかった。また、*Oct3/4* の脱メチル化に関与する *Gadd45a* を用いても同様であった。また注入する濃度を 10ng/ul にすると、注入した遺伝子の種類に関わらず全ての再構築胚の発生は 4 細胞以降停止した。これらの再構築胚のメチル化状態を調べるため trimethyl HistoneH3 lysin9 の免疫染色によりメチル化レベルを画像処理で定量化した結果、強発現による影響は見られなかった。

以上の結果よりブタ体細胞核移植の効率的な実験系を完全合成培地で確立することができた。タンパク質強発現卵は、MII 期卵の細胞質に 1ng/ul の Poly-A を付加した cRNA を 10pl 注入することにより 3-4 時間で作出することができた。核リプログラミング誘導因子を強発現した未受精卵をレシピエント卵細胞として体細胞核移植に用いても、核リプログラミングを促進させることはできずエピジェネティックな変化も起こさないこ

とが明らかとなり、新規体細胞核移植技術の開発には至らなかった。不完全な核リプログラミングは、未受精卵子に含まれている核リプログラミング誘導因子の量的な問題ではないことから体細胞核移植の効率化には異なる観点からの技術改良が必要である。

#### 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 1 件)

- ① Hiroyuki H, Tani T, Kikyo N. Structure and functions of powerful transactivators: VP16, MyoD and FoxA. Int. J. Dev. Biol., 査読無、54 巻、2010、1589-1596

[学会発表] (計 3 件)

- ① Kellner Steven, Hirai Hiroyuki, Tani Tetsuya, Katoku-Kikyo Nobuko, Firpo Meri, Kikyo Nobuaki MECHANISM OF NUCLEAR REPROGRAMMING DURING IPS CELL GENERATION. 8<sup>th</sup> International Society for Stem Cell Reserch サンフランシスコ 米国 2010 年 6 月
- ② 中野真夕・谷 哲弥・加藤容子・角田幸雄 メラトニンがブタ単為発生卵ならびに体細胞核移植卵の体外発生能に及ぼす影響 第 50 回日本哺乳動物卵子学会 東京 2009 年 5 月
- ③ 谷哲弥・加藤容子・角田幸雄 ブタ体細胞核移植卵の体外発生能に及ぼすバブプロ酸の影響 第 110 回日本畜産学会 神奈川 2009 年 3 月

[その他]

ホームページ等

<http://nara-kindai.univ.jp/02gakka/06bio/dobutsu/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 哲弥 (TANI TETSUYA)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：70139763

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし