

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22700453

研究課題名（和文）

核移植直後の第一卵割における中心体の役割の解明

研究課題名（英文）

Function of centrosome at the first cleavage after nuclear transplantation

研究代表者

足立 朋子（Tomoko Adachi）

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・研究員

研究者番号：70456599

研究成果の概要（和文）：

体細胞核移植における個体形成のメカニズムには未だに解明されていない点が多い。我々がメダカで成功した体細胞核移植ではマウスと異なる独自の方法をとるため、個体形成につながる初期卵割、特に第一卵割の成立メカニズムには注目すべき現象が含まれていると考えられる。すなわち、魚類の体細胞核移植胚は、雌性発生胚と同様に、第一卵割の紡錘体形成を担う中心体は体細胞あるいは、不活化精子などにより外部から供給されるため、中心体と雌性前核が正しく配置されることが第一卵割の成立に重要な要素になる可能性がある。本研究の目的は、いまだ謎の多く残る核移植クローンの個体形成のメカニズム解明に向けて、雌性発生胚および核移植胚が初期卵割する仕組みを明らかにする事である。

我々は、まず初めに核移植個体の遺伝子型を詳細に調べた。メダカの24本の染色体それぞれにつき4つの多型マーカーで、成体にまで発生した3個体の核移植個体を解析したところ、すべての個体のゲノムはドナー細胞由来であることが判明した。

我々は、メダカ特有の核移植法がなぜ正常な二倍体クローンを生み出すのかを解明するために、核移植個体の初期卵割におけるレシピエント核、ドナー核、および中心体の動態を観察した。しかし、そもそもの移植胚の発生率が極端に悪く、クローンを形成する正常発生胚をコンスタントに得ることが難しかった。核移植個体を用いたクローン形成メカニズムを解明するためには、体細胞核移植胚の初期卵割の成立頻度を大幅に改善する必要があった。そこで、核移植に適した未分化細胞を簡単に判別、分取出来るトランスジェニックメダカ Tg(oct3/4:egfp)を作製した。

研究成果の概要（英文）：

Nuclear transfer is a key technique to create a cloned animal from a somatic cell. We reported the first success in the fish cloning field in medaka, using a novel method of nuclear transfer with donor nuclei of primary culture cells from adult tail fin tissues. In this method, the donor nuclei were transferred into non-enucleated and diploidized recipient eggs. Subsequent development of reconstructed embryo gave rise to offspring phenotypically identical to the donor, and not chimeric in the composition of somatic or germ line cells. However, it is still unknown where the recipient nucleus has gone, and why the donor nucleus has chosen to be retained in the reconstructed embryos. In order to answer these questions, we decided to investigate further, especially the differential contribution of centrosomes from the recipient and donor sources.

At the beginning of this project, we tested if the nuclear transplants were authentic clones of donor-nucleus origin. For this purpose, we conducted the nuclear transfer using a combination of genetically-diverse medaka strain (d-rR) and donor (HNI-I), and successfully obtained three adult nuclear transplants. The DNA polymorphisms of these two strains enabled us to identify the origin of DNA. We checked the genotype of the nuclear transplants by PCR polymorphic markers. A total of 96 markers were examined at all chromosomal locations, four on each of the 24 chromosomes. All the genomic DNA samples from the fin of the three transplants and from the internal organs of one

transplant showed an identical genotype to HNI-I strain. These results indicated that the nuclei of the three transplants originated from the donor.

Next, we tried to investigate the differential contribution of centrosomes from the recipient and donor sources. However, cloning efficiency of medaka is extremely low. We designed a different approach to improve the efficiency of nuclear transfer by using pluripotent cells as donor. The fugu oct3/4 promoter-driven transgenic medaka Tg(oct3/4:egfp) was generated. Oct3/4 (Pou5f1) is expressed specifically in pluripotent stem cells, and is indispensable for their self-renewal and maintenance in mammals. GFP expression mimicked the endogenous oct3 expression, and thus the 2kb fragment of Fugu oct3 regulatory sequence is sufficient for reproducing the endogenous expression pattern of medaka oct3. The offspring of the transgenic parents were GFP-positive in all blastomeres and blastoderms during early embryogenesis, and most parts of the embryonic body were fluorescent until late somite-stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：若手研究 (B)

キーワード：核移植、初期卵割、中心体、メダカ、鰭再生、蛍光、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は、メダカを材料として独自に開発した新しい方法によって、世界で初めて魚類の体細胞核移植個体の作製に成功した。この方法では、有核卵をレシピエント卵として用いるにも関わらず、ドナー体細胞核に由来するクローンが得られる。電気パルスによって付活化した卵に第二極体放出阻止を施し、そこに体細胞核を顕微注入する。レシピエント卵に中心体は存在しないので、中心体の供給はドナー細胞からの移植に依存することになる。

これまでの結果から、G2/M 期のドナー細胞を用いた核移植は効率に個体形成につながる事が分かっている。このとき、二倍体化処理したレシピエント卵の細胞周期も G2/M 記にあることから、ドナー核とレシピエント卵細胞質の細胞周期が一致していることが核移植の個体形成に重要であると思われる。また、G2/M 期のドナー体細胞においては、核と中心体がより強く相互作用しており、これらがそろって卵に導入されることは、ドナー核がレシピエント核よりも第一卵割に寄与するのに有利に働く事を想像させる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、いまだ謎の多く残る核移植クローンの個体形成のメカニズム解明に向けて、雌性発生胚および核移植胚が初期卵割する仕組みを明らかにする事である。

我々は、メダカにおける核移植個体形成のメカニズムを解明するために、第一卵割における中心体の動向に注目した。その根拠は、魚類は前述したように第二極体放出によって二倍体雌性発生クローンを作製することが可能であり、その際に紫外線照射した精子（異種精子でも可能）を必要とするという点である。これは、精子の持つ中心体が卵割に必要な不可欠であることを物語っている。しかし、雌性発生における中心体の果たす役割については全く報告がない。また、フナをはじめとした種々の魚類では自然界に天然クローン（雌性発生個体）が存在することも科学的に証明されているとは言い難い。現段階で雌性発生や核移植による個体形成率が必ずしも高くないのは、第一卵割に至るまでの中心体の動態や機能に不明な点が多いことに原因があると考えられる。

そこで本研究では、メダカを材料とし、雌性発生胚および核移植胚が初期卵割する仕組み、特に中心体の挙動と細胞周期およびその相互関係に注目し、第一卵割に至るまでの間に中心体が果たす役割を解明することを

目的とした。

3. 研究の方法

1) 異系統間核移植個体を用いたクローン性の検証

日本のメダカは大きく分けて北日本集団と南日本集団を持ち、両集団間には、非常に大きな遺伝多型を持つことが知られている。我々は、核移植で得られた個体がドナー各由来のクローンであることを証明するために、この多型を利用した。北日本集団由来のHNI-Iをドナーに、南日本由来のd-rRをレシピエントとして核移植を行い、核移植個体を得た。

遺伝子マーカーはメダカのもつ 24 本の染色体上に各 4 個、計 96 個の多型マーカーを設定した。

2) トランスジェニックメダカ

Tg(oct3/4:egfp)の作製

フグ oct3/4 のプロモーター領域に EGFP cDNA を連結した発現ベクターを構築し、マイクロインジェクション法によってメダカ受精卵に導入した。異なる F0 個体によって由来する安定導入家系が 3 系統得られ、どの系統においても初期胚に蛍光が観察された。3 系統のうち最も蛍光の強い系統を詳細に観察した。

4. 研究成果

1) 異系統間核移植個体を用いたクローン性の検証

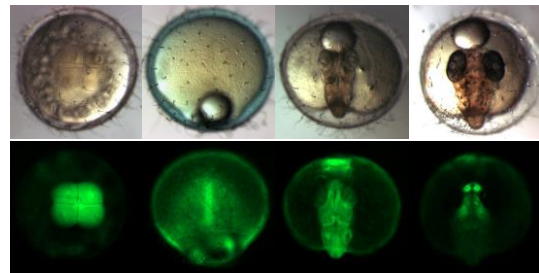
メダカ核移植は哺乳類の核移植とは異なり、有核未受精卵をレシピエントとして用いるため、レシピエント由来の核の混入が疑われる。これまで、同系統のドナー細胞とレシピエント卵を用いた方が核移植の成功率が高いことから、同系統間で核移植を行い、外来遺伝子(GFP)と性決定遺伝子をドナーマーカーとして核の由来を調べてきた。しかし、これら二つの遺伝子だけではクローンであることの証明には不十分であると考えられ、詳細な解析が必要であった。そこで、多型マーカーが知られている異系統間、HNI-I と d-rR を用いて核移植を行い、得られた個体のゲノムを詳細に解析した。メダカが持つ 24 本の染色体上に各 4 個、計 96 個の多型マーカーを設定した。異系統間核移植で得られた 3 個体について、各器官(脳、眼、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、ヒレ)からゲノムを抽出し、遺伝型を解析したところ、すべてのマーカーにおいてドナー由来の遺伝型を示した。この結果から、メダカ体細胞核移植によって得られる個体は、ドナー由来のクローン個体であることが証明された。

2) トランスジェニックメダカの作製

これまでの結果から、胞胚器までの胚葉細胞をドナーとした核移植では個体形成率が高

いことが分かっている。そこで、初期胚の多能性幹細胞に特異的に発現することが知られる oct3/4 をマーカーとしてドナー細胞を可視化する方法を開発した。

Tg(oct3/4:egfp)胚のEGFP蛍光は胞胚器までのすべての胚細胞、原腸胚期および体節期の胚体全体に観察された。中期体節期においては中脳後脳境界、後期体節期においては終脳、尾部および生殖原基に強い蛍光が見られた(下図)。内在性 oct3/4 mRNA の発現を in situ hybridization によって調べたところ、これらの蛍光発現部位と一致した。このことは、フグ oct3/4 プロモーターがメダカにおいても oct3/4 mRNA の発現を再現できることを示している。

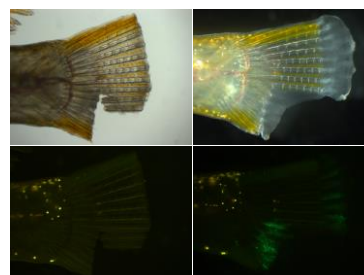


[胚発生における蛍光発現のパターン]

一般に魚類のヒレは再生することが知られている。メダカで尾ビレを切断すると、再生芽が形成され、やがて元通りにヒレが再生する。本研究で、Tg(oct3/4:egfp)成体のヒレ切断面に、切断2日後から蛍光陽性細胞が現れることを見出した(下図)。切断したヒレ断片を培養した初代培養系によっても同様の現象が観察された。これらのことは、ヒレ再生過程で脱分化した幹細胞において oct3/4 が再発現し、未分化性の維持など、何らかの役割を果たしている可能性を示唆している。

ヒレの初代培養細胞からの核移植によって個体が形成される理由の一つに、魚類のヒレが再生することが考えられる。ヒレ初代培養細胞にはおそらく再生過程で産まれる再生芽細胞が含まれている可能性が高く、この再生芽細胞は全能性こそ持たないものの、組織幹細胞の性質を備えていると予想される。したがって、この再生芽細胞を選択して核移植した胚は比較的高い確率で正常発生する

のではないかと期待できる。



[左図] 尾ビレ切断直後(左写真)、切断3日後(右写真)。

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 2 件)

1) Etsuko Sawatari, Ryoko Seki, Tomoko Adachi, Hisashi Hashimoto, Susumu Uji, Yuko Wakamatsu, Takahiro Nakata and Masato Kinoshita: Overexpression of the dominant-negative form of myostatin results in doubling of muscle-fiber number in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 55, 183-189(2010)
(査読あり)

2) Ekaterina Bubenshchikova, Elena Kaftanovskaya, Tomoko Adachi, Hisashi Hashimoto, Masato Kinoshita, Yuko Wakamatsu: A protocol for adult somatic cell nuclear transfer in medaka fish (*Oryzias latipes*) with a high rate of viable clone formation. *Cellular Reprogramming*, (under review)

〔学会発表〕(計 3 件)

1) Tomoko Adachi, Ryoko Seki, Etsuko Sawatari, Masahiko Hibi, Tohru Suzuki, Hisashi Hashimoto: Visualization of oct3-expressing cells in medaka 第44回日本発生生物学会・宜野湾市・沖縄 2011年5月

2) Tomoko Adachi, Yusuke Nagao, Vecky Chao, Masahiko Hibi, Robert Kelsh, Hisashi Hashimoto: Sox5 controls pigment cell development from the neural crest
Joint Meeting of the British Societies for Cell Biology and Developmental Biology
Spring Conference, Warwick University, UK
2012年4月

3) Tomoko Adachi, Yusuke Nagao, Vecky Chao, Masahiko Hibi, Robert Kelsh, Hisashi Hashimoto: Sox5 regulates the development of neural crest-derived pigment cells in medaka and zebrafish

17th European Society for Pigment Research Meeting, Geneva, Switzerland
2012年9月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 朋子 (Tomoko Adachi)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・研究員

研究者番号：70456599