

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23680048

研究課題名(和文) 効率的な体細胞クローンの作出へ向けたクローン特異的 X 染色体発現抑制に関する研究

研究課題名(英文) Production of somatic cell nuclear transferred mice by regulations of X-linked gene expression

研究代表者

井上 貴美子 (INOUE, KIMIKO)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・専任研究員

研究者番号：70360500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞核移植クローン(SCNT)技術は、体細胞から個体を作出できる唯一の生殖工学技術であるが、その産仔作出率は移植した胚数に対して5%以下と非常に低い。本研究ではSCNT技術を実用化することを目標として、遺伝子改変によらない遺伝子発現制御方法を開発し、SCNTの低い作出効率を改善することを試みた。その結果、(1)受精後に活性化される転写因子のmRNAをSCNT胚細胞質に導入すると、発生効率が改善する。(2) X染色体の不活性化を司るXist遺伝子の発現をRNAノックダウンによって抑制すると産仔作出効率が10倍まで向上する、などの成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Although somatic cell nuclear transfer (SCNT) is sole reproductive engineering technique to allow us to produce individuals from somatic cells, their developmental efficiency is usually less than 5%. In this study, we aimed at practical applications of this technique and attempted to develop procedures of gene regulations by non-genetic modification to improve low developmental efficiency of SCNT. As a results, we obtained following conclusions. (1) mRNA introduction of a transcription factor activated in fertilized embryos could improve developmental efficiency of SCNT embryos in vitro. (2) RNA knock down of Xist gene that triggered X chromosome inactivation in female somatic cells could remarkably ameliorate impaired developmental efficiency into term offsprings of SCNT embryos.

研究分野：発生工学

キーワード：体細胞核移植クローン エピジェネティクス 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

体細胞核移植クローン (Somatic Cell Nuclear Transfer: SCNT) 技術は、体細胞から個体を再生できる唯一の生殖工学技術であり、その応用範囲は医療、畜産、基礎生物学と幅広い。しかしながら、SCNTによる産仔の作出効率は移植胚に対して通常 5%以下と非常に低く、その改善が強く求められている。SCNT 作出効率の改善には、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) の利用が効果的であることがマウスを用いて明らかとなっているが、その効果は限定的で、動物種によっても効果に違いがあることが示されている (1)。我々は、これまでにマウス SCNT 初期胚を用いた大規模遺伝子発現解析から、マウス SCNT 胚では X 染色体特異的な遺伝子発現低下が観察され、これが雌の体細胞で X 染色体不活性化を司る Xist 遺伝子の異所的発現により引き起こされることを明らかにした。さらにこの知見を利用して、遺伝子組換え技術により片側アレルの Xist 遺伝子を欠損させたマウスの体細胞を核ドナーとして用いると、X 染色体関連遺伝子の発現低下が改善し、SCNT 産仔作出効率が 10 倍程度向上出来ることを明らかにした (2)。しかしながら、遺伝子組換え技術は、家畜などマウス以外の生物種には適用が困難であること、医療応用を目的とした場合には不向きであることなどから、遺伝子組換えを伴わない SCNT 技術の改良が不可欠と考えられている。

2. 研究の目的

これらの状況を踏まえた上で、遺伝子組換えを伴わない汎用性の高い SCNT 技術の開発を行うことを目的として本研究課題を遂行した。

3. 研究の方法

SCNT 胚作出は、若山らの方法を改変し用いた (3, 4)。遺伝子組換えを伴わない遺伝子操作方法として、初期胚への mRNA の導入や RNAi の利用による遺伝子発現制御方法を用いた。またそれらの導入時期や導入量の検討を行い、目的とする発現変化が最も効果的に現れる条件の検討を行った。

4. 研究成果

(1) HDACi は SCNT 胚の zygotic gene activation (ZGA) を正常化する

SCNT 胚の産仔作出効率は通常 5%以下であるが、核ドナー細胞を卵子細胞質に導入した再構築胚を活性化した後に HDACi 処理を行うことで、産仔作出効率を上昇させることが可能である (4, 5)。そこで、HDACi 処理により産仔作出効率が上昇する理由を明らかにするために、マウス胚において主要な ZGA が起こる 2 細胞期胚を用いて、アジレント社 44k マイクロアレイによる大規模遺伝子発現解析を行った。材料としては、最も効

果的な HDACi のひとつであるトリコスタチン A (TSA) を処理した SCNT 胚を用いた。未受精卵子 (OC)、正常受精卵 (IVF)、TSA 処理 SCNT 胚 (TSA+)、TSA 無処理 SCNT 胚 (TSA-)、核ドナー卵丘細胞 (Cumulus) を用いて多変量解析を行ったところ、SCNT 胚は TSA 処理の有無に関わらず遺伝子発現パターンはほぼ同一で、IVF 胚とは大きく異なっていた。(図 1)

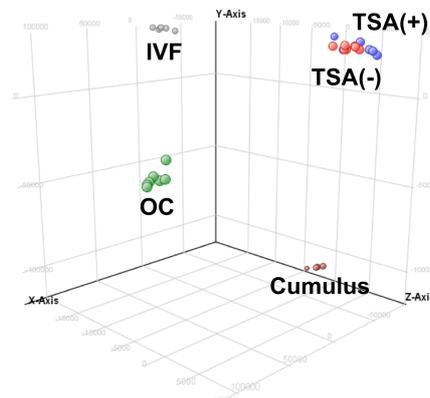


図 1 各サンプルの Principal Component Analysis : SCNT 胚 (TSA+, TSA-) は IVF 胚とは大きく離れた位置にプロットされており、両者の発現パターンが大きく異なっていることを示している。TSA 処理の有無による影響はほとんど見られない。

加えて TSA+ と TSA- 間で差次的遺伝子数は 495 個と非常に少ない数であり、多変量解析では両者の明確な差は観察されなかった。次に IVF と TSA+ 間、または IVF と TSA- 間で抽出した差次的遺伝子より共通な遺伝子を除いた遺伝子リストについて Gene Ontology (GO) 解析を行ったところ、TSA+ では、“Regulation of transcription”、“transcription”などの GO term が上位に来ており、転写に関する因子の遺伝子発現が改善していることが示唆された。そこで、外来の mRNA 注入による SCNT 胚発生改善を目指して、TSA 処理により発現が亢進した遺伝子の内、2 細胞期で発現している転写因子である Spi-C の mRNA を SCNT 胚に導入することを試みた。注入時期としてレシピエント卵子と再構築胚活性化後の前核期胚、濃度として 0.1~100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の条件で導入したところ、0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で前核期に導入をした際に着床前 SCNT 胚の発生率が有意に改善されることが明らかになった。

次に 2 細胞期で ZGA を受ける遺伝子の機能解析を行ったところ、正常受精卵である IVF では、“Expression of RNA”、“Transcription”など転写に関わる機能が高く、逆に SCNT 胚では、これらの機能が大幅に低下している事、TSA を処理することによってこれらの機能が IVF レベルまで大きく改善すること、Spi-C mRNA の導入によって

不完全ながらこれら一部の機能が改善していること、などが明らかとなった (図2)。本研究より、SCNT 胚に対して TSA 処理を行うことで、転写に関する遺伝子の発現が正常胚のレベルまで改善し、その後の胚発生に必要な遺伝子発現が正常化されていることが示された。

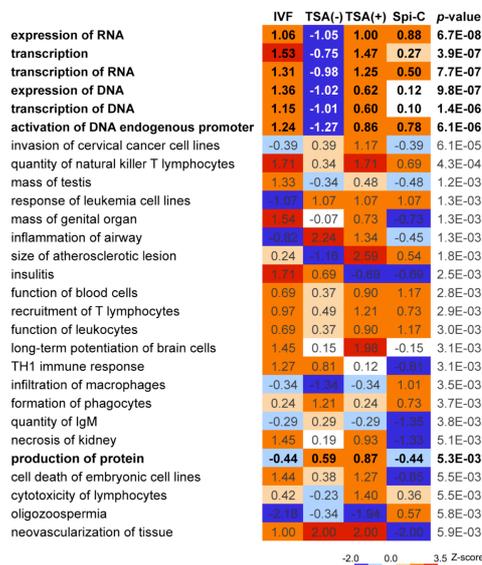


図2 各胚における機能解析：2細胞期胚でZGAを受ける遺伝子の機能をP値の順に羅列している。表内の数値はZ-scoreを示している。IVF胚では転写に関わる機能が低いに対し、TSA-ではこれらほとんどの機能が低下している。Spi-C mRNAの導入では一部の機能が改善するのみであるが、TSA処理によりこれらの機能はほぼIVFレベルまで改善していることが分かる。太字は胚の初期発生に重要であることが予想される機能。

(2) Xist 遺伝子ノックダウンにより SCNT 胚の発生効率は改善する

我々は以前の研究により、遺伝子操作により Xist 遺伝子を欠損させた核ドナー細胞を用いると、産仔作出効率が大幅に改善することを明らかにした (2)。本研究では、遺伝子変化によらない産仔作出効率の改善を目指した。Xist 遺伝子発現の抑制には、細胞質への Xist small interfering RNA (siRNA) 注入による RNA ノックダウンを利用した。siRNA は核 DNA に挿入されることはないため、遺伝子組換えを引き起こすことはない。siRNA 注入後の SCNT 胚における Xist 遺伝子発現量を測定したところ、活性化後 72 時間までは Xist siRNA 注入胚で Xist 遺伝子の有意な発現低下が見られたが、96 時間では対象区と差は見られなかった。さらに、大規模遺伝子解析で SCNT 胚における X 染色体上の遺伝子発現パターンを確認したところ、Xist 遺伝子の発現量に従って、72 時間までは Xist siRNA 注入胚で X 染色体上の遺伝子発現が改善していたが、96 時間では対象区との差が見られなかった。従って、siRNA の効

果が持続する時間は 72 時間程度と考えられる。

次に、Xist siRNA 注入 SCNT 胚と対象区における着床後の発生率を比較したところ、着床直後の 5.5 日胚、妊娠満期共に 10 倍以上の効率で発生率/産仔率が改善したことが明らかとなった。本研究により、SCNT 胚発生改善に対する Xist 遺伝子の発現抑制は 72 時間までが重要であること、遺伝子変化を利用しない RNA ノックダウンによる発現抑制を用いて、10 倍程度の産仔作出効率の改善が見られることが明らかとなった。

一方で、本手法は X 染色体が細胞内に 1 本のみ存在している雄由来の SCNT 胚のみで有効な手法であり、雌由来の SCNT 胚には効果がないことも明らかにした。

(3) ヒストン H3 リジン 9 (K9) メチル化酵素の発現抑制・脱メチル化酵素の亢進では、SCNT 胚の発生効率は改善しない

我々はこれまでの研究で、X 染色体上の XqA7.2-7.3/F3 領域にヒストン H3K9 ジメチル (me2) 修飾が蓄積し、この領域における遺伝子発現の低下を引き起こしていることを明らかにした (2)。これらの修飾は、核ドナー細胞のエピゲノム記憶が引き継がれていると考えられる。そこで、H3K9me2 の脱メチル化を目指して、H3K9 メチル化酵素である G9a/Glp の siRNA の細胞質内導入による発現制御の効果を観察した。

G9a/Glp 遺伝子の発現量解析から、siRNA 注入により両遺伝子の発現量が低下している事は明らかとなったが、XqA7.2-7.3/F3 領域における遺伝子発現は抑制されたままで改善せず、妊娠満期産仔への発生効率も改善が見られなかった。

また、ヒストン H3K9 脱メチル化酵素 Jhdm2 mRNA の細胞質導入による SCNT 胚発生効率への影響も観察したが、着床前、着床後共に改善が見られなかった。従って、抑制性ヒストン修飾である H3K9me2 関連因子の発現量を操作しても該当する領域の遺伝子発現、あるいは発生効率に影響を与えないことが明らかとなった。

引用文献

- Ogura A, Inoue K, Wakayama T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368: 20110329, 2013.
- Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte AP, Tian XC, Yang X, Ishino F, Abe K, Ogura A. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science* 330: 496-469, 2010.

- 3 Wakayama T, Perry A, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-374, 1998.
- 4 Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan N Van, Wakayama S, Bui H-T, Wakayama T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340: 183-189, 2006.
- 5 Rybouchkin A, Kato Y, Tsunoda Y. Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 74: 1083-1089, 2006.
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 28 件)
- 1 Inoue K, Oikawa M, Kamimura S, Ogonuki N, Nakamura T, Nakano T, Abe K, Ogura A. Trichostatin A specifically improves the aberrant expression of transcription factor genes in embryos produced by somatic cell nuclear transfer. *Sci Rep (in press)*
- 2 Kurotaki YK, Hatanaka Y, Kamimura S, Oikawa M, Inoue H, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A. Impaired active DNA demethylation in zygotes generated by round spermatid injection. *Hum Reprod* 30: 1178-1187, 2015. doi: 10.1093/humrep/dev039
- 3 Mizutani E, Oikawa M, Kassai H, Inoue K, Shiura H, Hirasawa R, Kamimura S, Matoba S, Ogonuki N, Nagatomo H, Abe K, Wakayama T, Aiba A, Ogura A. Generation of cloned mice from adult neurons by direct nuclear transfer. *Biol Reprod* 92: 1-11, 2015. doi: 10.1095/biolreprod.114.123455.
- 4 Kamimura S, Hatanaka Y, Hirasawa R, Matsumoto K, Oikawa M, Lee J, Matoba S, Mizutani E, Ogonuki N, Inoue K, Kohda T, Ishino F, Ogura A. Establishment of paternal genomic imprinting in mouse prospermatogonia analyzed by nuclear transfer. *Biol Reprod* 91: 1-12, 2014. doi: 10.1095/biolreprod.114.120451.
- 5 Hasegawa A, Mochida K, Tomishima T, Inoue K, Ogura A. Microdroplet in vitro retilization can reduce the number of spermatozoa necessary for fertilizing oocytes. *J Reprod Dev* 60: 187-193, 2014. URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/60/3/60_2013-136/_article
- 6 Shinagawa T, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Huynh LM, Sivaraman P, Kumarevel T, Inoue K, Nakato R, Katou Y, Sado T, Takahashi S, Ogura A, Shirahige K, Ishii, S. Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 14: 217-227, 2014. doi: 10.1016/j.stem.2013.12.015.
- 7 Oikawa M, Inoue K, Shiura H, Matoba S, Kamimura S, Hirose M, Mekada K, Yoshiki A, Tanaka A, Abe K, Ishino F, Ogura A. Understanding the X chromosome inactivation cycle in mice: A comprehensive view provided by nuclear transfer. *Epigenetics* 9: 204-211, 2014. doi: 10.4161/epi.26939.
- 8 Okae H, Matoba S, Nagashima T, Mizutani E, Inoue K, Ogonuki N, Chiba H, Funayama R, Tanaka S, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Ogura A, Arima T. RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. *Hum Mol Genet* 23: 992-1001, 2014. doi: 10.1093/hmg/ddt495.
- 9 Hirasawa R, Matoba S, Inoue K, Ogura A. Somatic donor cell type correlates with embryonic, but not extra-embryonic, gene expression in postimplantation cloned embryos. *PLoS One* 8: e76422, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0076422.
- 10 Morimoto H, Iwata K, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Kanatsu-Shinohara M, Morimoto T, Yabe-Nishimura C, Shinohara T. ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 12: 774-786, 2013. doi: 10.1016/j.stem.2013.04.001.
- 11 Kamimura S, Inoue K, Ogonuki N, Hirose M, Oikawa M, Yo M, Ohara O, Miyoshi H, Ogura A. Mouse cloning using a drop of peripheral

- blood. *Biol Reprod* 89: 1-6, 2013. doi: 10.1095/biolreprod.113.110098.
- 12 Oikawa M, Matoba S, Inoue K, Kamimura S, Hirose M, Ogonuki N, Shiura H, Sugimoto M, Abe K, Ishino F, Ogura A. RNAi-mediated knockdown of Xist does not rescue the impaired development of female cloned mouse embryos. *J Reprod Dev* 59: 231-237, 2013. URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/59/3/59_2012-195/_article
- 13 Ogura A, Inoue K, Wakayama T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368: 20110329. doi: 10.1098/rstb.2011.0329.
- 14 Nakamura T, Liu Y-J, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y, Nakano T. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature* 486: 415-419, 2012. doi: 10.1038/nature11093.
- 15 Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, Nakamura T, Abe K, Nakano T, Ishino F, and Ogura A. RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 20621-20626, 2011. doi: 10.1073/pnas.1112664108.
- 16 Kohda T, Ogonuki N, Inoue K, Furuse T, Kaneda H, Suzuki T, Kaneko-Ishino T, Wakayama T, Wakana S, Ogura A, Ishino F. Intracytoplasmic sperm injection induces transcriptome perturbation without any transgenerational effect. *Biochem Biophys Res Commun*. 410: 282-288, 2011. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.133.
- 17 Ogonuki N, Inoue K, Ogura A. Birth of normal mice following round spermatid injection without artificial oocyte activation. *J Reprod Dev* 57: 534-538, 2011. URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/57/4/57_11-008M/_article
- 18 Fulka H, Hirose M, Inoue K, Ogonuki N, Wakisaka N, Matoba S, Ogura A, Mosko T, Kott T Fulka, J. Jr. Production of mouse embryonic stem cell lines from maturing

oocytes by direct conversion of meiosis into mitosis. *Stem Cells* 29: 517-527, 2011. doi: 10.1002/stem.585.

[学会発表] (計 4 件)

1. 井上貴美子, 小倉淳郎 胚遺伝子発現解析に基づくマウスクローン技術の改善とその応用 第 58 回日本実験動物学会、船堀タワー (東京都江戸川区)、2011.5 (招待講演)
2. 井上貴美子, 上村悟氏, 水谷英二, 池田理恵子, 沼田興治, 的場章悟, 越後貫成美, 阿部訓也, 小倉淳郎 129 マウス系統の高度ゲノム可塑性に関する研究、第 60 回日本実験動物学会、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)、2013.5
3. 井上貴美子, 小倉淳郎 体細胞核移植クローンの効率を決定する因子の探索、第 85 回日本遺伝学会、慶応義塾大学日吉キャンパス (神奈川県横浜市)、2013.9 (招待講演)
4. 井上貴美子, 及川真実, 上村悟氏, 越後貫成美, 中村肇伸, 仲野徹, 小倉淳郎 トリコスタチン A 処理による体細胞核移植クローン胚の転写因子関連遺伝子発現の改善について、第 107 回日本繁殖生物学会、帯広畜産大学 (北海道帯広市)、2014.8

[図書] (計 1 件)

Inoue K and Ogura A Clone-specific X-linked gene repression caused by ectopic *Xist* transcripts from the active X chromosome, Principle of Cloning, 2nd edition, Academic Press, 2014.

[その他]

ホームページ等
 遺伝工学基盤技術室ホームページ
<http://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/>

理化学研究所プレスリリース
 遺伝子改変なしにクローンマウスの出生率を10倍高める技術を開発
 -畜産、医療、製薬分野への本格導入に期待-
 2011年11月8日

日刊工業新聞
 1細胞から新たな生命を誕生させる「クローン技術」の実用化 2011年5月17日

科研費 NEWS
 体細胞クローン動物が生まれにくい原因は X 染色体の異常にあった
 2011 vol.2

6. 研究組織
 (1)研究代表者
井上 貴美子 (INOUE, Kimiko)
 独立行政法人 理化学研究所

バイオリソースセンター 専任研究員
研究者番号：70360500