

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780277

研究課題名(和文) 生胚内分子動態解析に基づくクローン胚発生条件の検索

研究課題名(英文) Searching for prerequisites for full term development of cloned embryos based on the live cell imaging analysis

研究代表者

水谷 英二 (MIZUTANI, Eiji)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：80443034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： 個体発生率が低いクローン胚および凍結乾燥精子顕微授精胚をライブセルイメージングに解析したところ、大部分で染色体分配異常がみられ、クローン胚ではドナー核注入後の時間経過により微小前核を形成し、これが染色体分配異常の原因であることが示唆された。さらにクローンになりやすい細胞を探したところ、海馬CA1領域に抑制的ヒストン修飾が低い細胞が存在することを見出した。この細胞を用いてクローンマウス作製を試みたところ、10%と高い効率でクローン作製が可能となったことが明らかとなり、世界で初めて成体マウス脳神経細胞からクローンマウスを作製することに成功した。

研究成果の概要(英文)： Live-cell imaging analysis revealed that most of mouse cloned embryos and ICSI embryos with freeze-dried spermatozoa occurred abnormal chromosome segregation (ACS). We found that cloned embryos formed micro pronuclei proceeding with time after donor cell injection and most of such embryos occurred ACS in subsequent development. To find cell types with high cloning efficiency, we also sought less amount of a repressive histone mark, dimethylated histone H3 lysine 9 (H3K9me2), and identified CA1 pyramidal cells in the hippocampus and Purkinje cells in the cerebellum as candidates. Using CA1 cells, cloned offspring were obtained at high rates, reaching 10%. This is for the first time demonstrated that adult neurons could be cloned by nuclear transfer. Furthermore, our data may imply that reduced H3K9me2 and increased histone acetylation would act synergistically to improve development of cloned embryos.

研究分野：発生工学

キーワード：クローン ライブセルイメージング 初期胚発生

### 1. 研究開始当初の背景

体細胞クローン技術では、配偶子を介さずに、分化した細胞である体細胞核の情報を大幅にリセットする事によって、受精過程を模倣して個体発生を促す。これまでにクローン動物の成功率改善やクローン胚の発生不全の原因探索を目的として多くの研究がされてきた。研究代表者らはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理や Xist 遺伝子発現を正常化することで成功率を 20 パーセントまで上げることに成功しているが (Matoba et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, inpress)、まだ 80%以上が発生停止胚ということになる。つまり大部分のクローン胚が正常発生に必要な過程で致命的な異常をきたし、結果的に発生不全に至っていると考えられるが、実際にクローン胚内でどのような変化・現象が起こっているのか、特にどのような胚が個体に発生出来ているのかは、未だ明らかではない。この状況を打破するためには、個々のクローン胚を対象とした、初期胚発生過程で起きている事象とその後の発生能を直接リンクさせた解析が必須である。ところが、従来の普通光下での形態観察による胚の評価で得られる情報には限界があり、特に前述したような生きた胚内で起こっている分子動態を可視化することはできない。また免疫染色法や PCR などによる遺伝子発現解析では、その後の発生を追うことはできない。雌雄選別に用いられるような割球バイオプシーと遺伝子検査の組み合わせは、手技そのものが胚にダメージを与えてしまう。そこで、生きた胚内の分子動態が視覚化でき、胚発生を阻害することなく個々の胚が解析できる手法が重要となる。このような中、研究代表者らは、新規ライブセルイメージングシステムを用い、70 時間、計 6 万枚ちかくの蛍光画像を取得したマウス受精胚を仮親に移植し、産仔を得る事に成功し、個体への発生に影響を与えることなく、初期発生過程の 6 次元 (X、Y、Z 軸、time、multi color、multi sample) イメージングに成功した (Yamagata et al., J Reprod. Dev., 2009)。この技術は、これまで不可能であった、生きた胚内における分子動態の視覚化を可能とし、胚発生過程で起こる現象がいつ、どこで起きているのかといった時間的、空間的な解析を可能とするばかりか、解析した後の胚を発生させることで、移植後の個体発生に至る遡及的・予後予測的解析を可能にしたという点で極めて優れている。研究代表者らは既に、予備実験としてマウスクローン胚をイメージングした後に仮親に移植することで個体を得ることに成功しており、本技術はクローン研究においても有用なツールとなると考えられる。また胚では報告がないが、生きた細胞内で分子の構造変化を正確に検出できる Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 解析も報告されている。これらの解析手法を用いて、生きたクローン胚の初期発生過程を解析す

ることで個体発生可能なクローン胚の条件の一端を知ることが出来、基礎生物学的にも重要な知見を得ることができる。

### 2. 研究の目的

体細胞クローン胚の多くは外観上は正常な胚盤胞まで発生できるにも関わらず、産仔まで発生できるものは非常に少ない。初期胚発生過程の細胞遺伝的・分子的解析と個体発生能の解析を同じ胚で行うことが出来れば、クローン胚発生停止のより直接的な原因が解明出来る。そこで本計画では、蛍光プローブを用いて、FRET 法とライブセルイメージングにより個々の生きたクローン初期胚内の分子動態を解析する。さらに解析後の胚を用いてマイクロアレイ解析および胚移植を行うことにより、観察された事象と遺伝子発現パターン、個体発生能との関連性を直接リンクさせて解析する。一連の実験からクローン初期胚の個体発生条件を見出すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 染色体動態を指標としたクローン胚の解析

体細胞クローンの作出効率の低さから、多くの胚で致命的なジェネティック異常がおきている可能性が高い。そこで体細胞クローン胚の初期発生過程における染色体動態の解析を詳細に行う。

##### 体細胞クローン胚の染色体動態の解析

ヒストン H2B およびチューブリンをプローブとして、体細胞クローン胚のイメージングによる解析を行う。体外受精胚での解析結果と比較、各胚の発生速度等の解析を行うことで、胚発生と染色体動態との関連性を検討する。さらにイメージングによって得られた画像データを基に、体細胞クローン胚を選別し、選別胚をグループごともしくは個別に仮親へと移植することで、それぞれの指標で分けたクローン胚の個体発生能を検討する。

#### (2) X 染色体不活化を指標としたクローン胚の解析

最近、Xist 遺伝子発現を正常化することでクローンマウス作出効率が 10 倍近く改善され、X 染色体の不活性化がクローン動物作出成功の大きな要因であることが示唆されている。そこで、不活性化 X 染色体を検出できるプローブを用いてクローン胚のイメージング解析を行い、個体発生との関連性を明らかとし、X 染色体不活化がクローン胚選別の指標となり得るか検討する。

##### macroH2A-GFP トランスジェニックマ

ウス体細胞をドナー核として、クローン胚の X 染色体の不活化状態を視覚化して解析を行う。(1)の実験と同様にイメージング画像を取得し、これを基に発現時期、シグナル数などのパラメーターと胚発生との相関を解析する。

### (3) FRET 法によるヒストンアセチル化状態変化の解析

最近、クローン胚のヒストンアセチル化状態を変化させることでクローン成功率が改善されるという報告が多くされているが、なぜ改善されるのか、どの HDAC が関与しているのかは明らかになっていない。そこで微細な分子修飾状態変化を検出できる FRET 法を用いてクローン胚のヒストン修飾状態を解析し、クローン成功率につながるメカニズムを解明する。

### (4) 初期発生過程分子動態と ntES 細胞の性質との相関性の解析

ntES 細胞の樹立成績は 20%以上と非常に高率であり、個体になれないクローン胚からも樹立できることを意味している(Wakayama S. et al. Biol. Reprod 2005)。また樹立した ntES 細胞は同じドナー細胞を用いた場合でも細胞株間で性質が異なる(Mizutani E. et al. Genesis 2008)。そこで初期発生過程での異常が ntES 細胞の樹立成績や性質にどう影響しているのかを調べる。

先の実験結果を基にクローン胚を選別し個体になる可能性があるクローン胚、なり得ないクローン胚に分けてそれぞれ ntES 細胞樹立を試みる。樹立した ntES 細胞の性質を、核型検査、マーカー発現検査、分化誘導実験およびキメラマウス作成により解析する。

### (5) エピジェネティック修飾状態の異なるドナー細胞由来クローン胚のイメージング解析

クローン個体作出において、細胞種、マウス系統などで成功率が異なっている。ドナー細胞種によるエピジェネティック修飾状態の違いが原因と予想されるが明らかではない。そこで、エピジェネティック修飾状態の異なる種々のドナー細胞由来クローン胚の発生過程を FRET およびライブセルイメージングにより解析し、その解析結果を先の実験で見出した個体発生の指標に照らし合わせて、クローン胚の発生との関連を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 染色体動態を指標としたクローン胚の解析

ヒストン H2B およびチューブリンをプローブとして、クローン胚初期発生過程をライブセルイメージング解析した結果、約 30%のクローン胚が 2 細胞期に分裂する過程で染色体分配異常(abnormal chromosome segregation, ACS)を起こしていた。ACS は 2 細胞期から 4 細胞期、4 細胞期から 8 細胞期、8 細胞期から 16 細胞期への分裂でも起きており、驚いたことに実験に供したクローン胚の 80%以上が 8 細胞期までに ACS を起こしていることが分かった。観察後のクローン胚をグループ分けして胚移植した結果、発生速度が極端に

遅くない限り発生速度の違いによるクローン成功率に差はなかった。しかし、8 細胞期までに ACS を起こした胚からは一匹も産仔は得られず、8 細胞期以降に ACS を起こした胚や ACS が見られなかったものからはクローン個体を得ることに成功した。さらに 1 匹のレシピエント雌に 1 個のクローン胚だけを移植するという単一クローン胚移植を行い 3 匹のクローンマウスを得たが、これらのもとになった胚はすべて 8 細胞期までは ACS を起こしていなかった。以上より初期胚発生過程で起きる染色体分配異常がクローン胚の発生停止の大きな原因となっていることを明らかにした。また、正常に近い発生速度を持ち 8 細胞期までに染色体異常を起こしていないことが個体発生可能なクローン胚の最低条件であることが示された。

また、クローンマウスが生まれやすいドナー細胞を用いた場合のクローン胚の染色体動態を解析するため、BDF1 × 129 マウスおよび対照として BDF1 マウス卵丘細胞をドナーとして用い、同様にヒストン H2B およびチューブリンをプローブとしてイメージング解析を行った。この場合においても第一卵割で染色体異常を起こした胚は BDF1 卵丘細胞をドナーとした場合と同様に約 30%と差はなかった。

### (2) X 染色体不活化を指標としたクローン胚の解析

X 染色体不活化を指標としたクローン胚の解析として macroH2A を指標としたクローン胚の X 染色体不活化の解析を macroH2A-GFP トランスジェニックマウス卵丘細胞をドナー核としてイメージング解析を行った。クローン胚においても、macroH2A のシグナルが解析可能となるのは通常受精卵と同様に 4 細胞期後期からであった。シグナルは検出できたものの、同一クローン胚内でも各割球でシグナルの数、強度がばらばらであり胚発生の指標として使用するのには現状では困難であると考えられた。

### (3) FRET 法によるヒストンアセチル化状態変化の解析

細胞中のエピジェネティック状態変化をリアルタイムで観察することに、Ito らが 2011 年に成功している(Ito et al. Chemistry and Biology 2011)。この研究で用いられた融合タンパク質 HISTAC を用いて初期胚中のヒストン修飾状態変化観察を試みた。まず、初期胚観察における汎用性を高めるため、HISTAC 配列から mRNA を合成した。合成 mRNA を受精卵、核移植胚に打ち込んだのち、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である TSA 処理をしてヒストン修飾状態変化を FRET 現象を指標として観察した。合成 mRNA を打ち込んだ胚では CFP および Venus 両方の蛍光が観察された。しかしながら TSA 処理をした胚の一部では FRET 現象と思われる各蛍光タンパクの蛍光強度の振れが観察されたものの、安定したものではなかった。mRNA を用いた方法は胚での観察には適していると考えられるものの、今後さらなる工夫が

必要である。

(4) 初期発生過程分子動態と ntES 細胞の性質との相関性の解析

クローン胚では染色体異常が多発し、これが発生停止の大きな要因となっていることがわかった(1)。そこでクローン胚の大部分で起きている染色体分配異常(ACS)が起きる原因を探るため、注入直後のクローン胚のライブセルイメージング解析を行ったところ、ドナー核注入から時間が経過すると、微小前核を形成することがわかった。さらに微小前核を形成したクローン胚の 80% 近くがその後の分割で ACS を起こしていることが明らかとなり、微小前核形成がクローン胚の染色体異常の一因となっていることが示唆された。これらについては論文発表の準備を進めている。現在、これらイメージング解析後のクローン胚からの ntES 細胞の樹立をすすめており、初期発生過程で起きた異常が ntES 細胞の性質に与える影響についても明らかにしていく予定である。

(5) エピジェネティック修飾状態の異なるドナー細胞由来クローン胚のイメージング解析

エピジェネティック修飾状態の異なる細胞として、H3K9me2 が低く、またこれまでにクローン作出の報告がない細胞である成体マウスの海馬 CA1 領域の細胞および小脳のブルキンエ細胞を見出した。これらの細胞と、H3K9me2 が高い細胞として海馬歯状回細胞、大脳皮質の細胞および卵丘細胞、セルトリ細胞をドナー核としてクローン胚を作出した。作出したクローン胚を胚移植実験、ライブセルイメージング解析さらにマイクロアレイ解析による遺伝子発現解析に供した。その結果、CA1 領域細胞からは 10% という高率でクローンマウスが生まれ、世界で初めて成体マウス脳神経細胞から直接クローンマウスを産ませることに成功した(下図)。



成体雄マウス  
海馬CA1領域  
細胞  
由来のクロー  
ンマウス

遺伝子発現解析の結果、H3K9me2 の低い細胞由来のクローン胚ではこれまで用いられていた卵丘細胞やセルトリ細胞に由来するクローン胚よりも遺伝子発現が改善されており、ドナー細胞の抑制的ヒストン修飾(H3K9me2)はクローン胚盤胞の遺伝子発現と相関があることが示唆された(Mizutani et al. Biol. Reprod 2015)。

クローン胚と同様に産仔率が著しく低い凍結乾燥精子の顕微授精胚の発生停止原因をライブセルイメージングによって解析した。その結果、新鮮精子を用いた顕微授精胚では第一分割における染色体分配異常が 7% であったのに対して、凍結乾燥精子の顕

微授精胚では 80% 程度と非常に多いこと、また発生速度も凍結乾燥精子では遅れていることも明らかとなった。発生速度は人為的に卵子に活性化刺激を付与することにより改善されたが、染色体分配異常の発生率は改善が見られなかった。現在、サンプル数を増やして解析を行うとともに、受精後のメチル化状態変化についても解析を行っている。

## 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 5 件)

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. *Biology of Reproduction*, 2015 年, 92 巻 3 号 81、査読有

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. *Biology of Reproduction*, 2014 年, 91 巻 5 号 120、査読有

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. *Human Molecular Genetics*, 2013 年, 992-1001、査読有

Wakayama S, Kohda T, Obokata H, Tokoro M, Li C, Terashita Y, Mizutani E, Nguyen VT, Kishigami S, Ishino F, Wakayama T. Successful serial recloning in the mouse over multiple generations. *Cell Stem Cell*, 2013 年, 12 巻 3 号, 293-297、査読有

Mizutani E, Yamagata K, Ono T, Akagi S, Geshi M, Wakayama T. Abnormal chromosome segregation at early cleavage is a major cause of the full term developmental failure of mouse clones. *Developmental Biology*, 2012 年, 364 巻 1 号, 56-65、査読有

[学会発表](計 5 件)

水谷英二、若山清香、岸田佳奈、若山照彦、凍結乾燥精子で受精したマウス初期胚のライブセルイメージング解析、第 106 回

日本繁殖生物学会、2013年9月12-14日、  
東京農工大学農学部府中キャンパス(東京都、府中市)

水谷英二、若山清香、岸田佳奈、若山照彦、  
Live-cell Imaging analysis of mouse  
oocytes injected with freeze-dried  
spermatozoa、10<sup>th</sup> Asian Reproductive  
Biotechnology Society、2013年8月20-22  
日、ムイネ シーリンクビーチリゾート、  
ファンティエット市(ベトナム)

水谷英二、山縣一夫、若山照彦、マウスク  
ローン胚のライブセルイメージングと単  
一胚移植による解析、第54回 日本卵子  
学会、2013年5月25-26日、東京都学術総  
合センター(東京都、千代田区)

水谷英二、葛西秀俊、若山照彦、餐場篤、  
小倉淳郎、Generation of cloned mice by  
direct nuclear transfer from adult  
differentiated neural cells、9<sup>th</sup> Asian Re  
productive Biotechnology Society、2012  
年10月23-28日、マニラ市(フィリピン)

水谷英二、葛西秀俊、若山照彦、餐場篤、  
小倉淳郎、成体マウス脳神経細胞からのク  
ローンマウス作出、第105回 日本繁殖生  
物学会、2012年9月5-8日、筑波大学(茨  
城県、つくば市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水谷 英二 (MIZUTANI EIJI)

山梨大学総合研究部

助教

研究者番号：80443034

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし