

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830066

研究課題名(和文)細胞周期をリアルタイムで可視化する蛍光プローブFucciを組み込んだブタの開発

研究課題名(英文)Generation of transgenic pigs expressing Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator, Fucci.

研究代表者

渡辺 将人(Watanabe, Masahito)

明治大学・研究・知財戦略機構・講師

研究者番号：00321688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞周期を可視化できる蛍光プローブ(Fucci)を導入した遺伝子改変ブタを体細胞核移植により作出することを目的とした。Fucciとしての機能を有するブタ胎仔線維芽細胞を体細胞核移植の核ドナーとして樹立した。この細胞を核ドナー細胞としてクローン産仔を作出し、さらにその後代産仔を得た。産仔の各組織・臓器の蛍光観察では、皮膚、心臓、骨格筋の一部で蛍光が確認されたが、他の組織では観察されなかった。これら結果は、体細胞核移植に伴う導入遺伝子のサイレンシングによるものと考えられ、DNAメチル化解析によりFucci遺伝子のプロモーター領域が高度にメチル化されていることが確認された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to create genetically modified pigs expressing Fucci, a fluorescent probe that allows the real-time visualization of the cell cycle in living cells, by using somatic cell nuclear transfer (SCNT). Porcine fetal fibroblasts introducing Fucci vector were successfully established as nuclear donor cell for SCNT. Cloned pigs were subsequently generated using the cell established through SCNT and their progeny were created by sexual reproduction. Fluorescence observation of the tissues and organs of the cloned pigs and their progenies did not confirm the systemic expression of Fucci, but confirmed Fucci expression in some of the skin, the heart and the skeletal muscles. These results demonstrated that transgene silencing occurred following SCNT. DNA methylation analysis revealed that the promoter sequences in Fucci transgene was highly methylated.

研究分野：実験動物学

キーワード：Fucci 細胞周期 蛍光プローブ ブタ 体細胞核移植

1. 研究開始当初の背景

細胞周期は個体を形成する全ての細胞に共通するプロセスであり、細胞周期の可視化は多くの生命現象や疾患の解明さらには治療法の開発に重要な知見をもたらす。細胞周期を2つの蛍光タンパク質で可視化するプローブである Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator, フーチ) の開発により、G1 期は赤色 (mCherry) に、S/G2/M 期は緑色 (Venus) に生細胞でリアルタイムに観察することが可能となった。これにより細胞が組織・器官・個体を形成する際、個々の細胞及び細胞周期が分化、形態形成、そして細胞死へどのように関わっているか、またどのように協調しているかを動的かつ時空間的に観察することが可能となった。実際、Fucci を導入したマウスの作出により、発生・分化・再生による形態形成、ガンの浸潤・転移をリアルタイムで観察することが可能であることが示され、さらには抗ガン剤への細胞の反応性評価といった創薬研究への利用など、Fucci 技術の利用は非常に多岐に渡っている。近年、解剖学的、生理学的にヒトに類似した特徴をもつブタは、移植・再生医学領域のトランスレーショナルリサーチにおいて外挿性の高い知見が得られる大型実験動物と認識され、前臨床的な治療法の開発・評価においても重要な実験モデルとなる。Fucci ブタの開発は、マウスモデルで得られる知見に加え、よりヒトへの応用を視野に入れた外挿性の高い知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

これまでに哺乳動物では、Fucci を発現するマウスが作出されているが、Fucci を発現する大型実験動物の報告はない。本研究では、細胞周期を可視化できる蛍光プローブ Fucci を導入したブタ胎仔線維芽細胞の樹立を行い、これを体細胞核移植の核ドナー細胞として、体細胞クローン技術を用いて細胞周期をリアルタイムで可視化できるブタの作出を目的とした。

3. 研究の方法

Fucci を導入したブタ胎仔線維芽細胞の樹立では、全身発現を可能とする CAG プロモーター下で mCherry-hCdt1 (30/120) と mVenus-hGem (1/110) を発現する2つの Fucci 遺伝子をブタ胎仔線維芽細胞にエレクトロポレーションにより導入後、抗生物質による薬剤選択を行い、限界希釈法によりシングルセルクローニングを行った。樹立した Fucci 遺伝子導入のブタ胎仔線維芽細胞は、フローサイトメーターによる蛍光と細胞周期の同定を行うことにより、Fucci としての機能解析を実施した。体細胞核移植は、

Matsunari et al. (2008) の方法を一部改変して行った。NCSU23 を基本とする培地を用いてブタ卵丘卵子複合体から体外成熟卵を得て、除核後、体細胞核移植のレシピエント卵子とした。本研究で樹立した Fucci を発現する線維芽細胞を核ドナー細胞として、これをレシピエント卵子の卵胞腔内へ挿入し、融合法により再構築胚を作製した。得られた核移植胚は電気的活性化により卵割を誘導し、胚盤胞への発生能、ならびに初期胚における Fucci の発現を解析した。Fucci を導入したクローンブタは、上記の通り構築した核移植胚を発情同期化したレシピエントブタの卵管内へ外科的に移植して作出した。得られたクローン胎仔ならびに産仔について、各組織・各臓器における Fucci の発現を蛍光顕微鏡により観察・解析した。

4. 研究成果

G1 期に mCherry、S/G2/M 期に mVenus の蛍光を発するブタ胎仔線維芽細胞を樹立し (図1)、タイムラプス観察及びフローサイトメーターを用いた解析により、ブタ細胞において Fucci が機能することを初めて明らかにした (図2)。

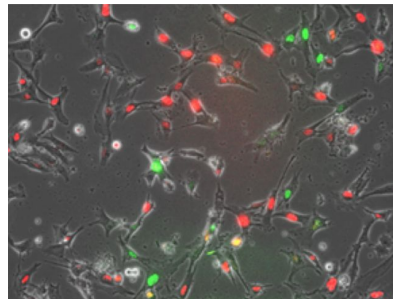
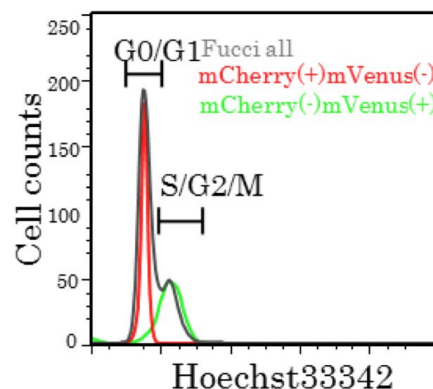


図1: 樹立した Fucci を発現するブタ胎仔線維芽細胞



図

2: 細胞周期と Fucci 蛍光

樹立した Fucci を発現する細胞を核ドナーとした体細胞核移植胚の体外発生能試験では、遺伝子を導入していない野生型 (Control) の細胞を用いて構築した核移植胚と同等の体

外発生能であったことから、Fucci の導入による胚発生への影響はないことが明らかになった (表 1)。

表 1. Fucci 遺伝子を導入した核移植胚の体外発生能

核ドナー細胞	正常分割率 (%)	胚盤胞形成率 (%)
Fucci-01	76.0 (38/50)	82.0 (41/50)
野生型 (Control)	92.5 (37/40)	75.0 (30/40)

構築した核移植胚の経時的な蛍光発現解析では、Fucci の蛍光は桑実胚から確認され、胚盤胞において mCherry 及び mVenus の蛍光が確認されたが、蛍光の確認できない細胞も存在した (図 3)。

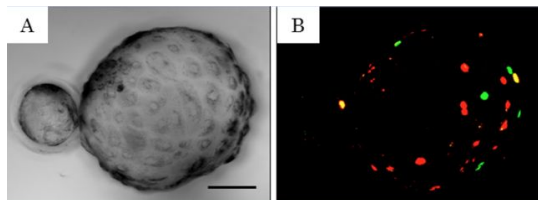


図 3 : Fucci を発現する体細胞核移植胚

樹立した Fucci 細胞は体細胞核移植のための核ドナー細胞として、良好な増殖性と形態を維持していたことから、当初計画より Fucci を導入したクローンブタの作出を早く進めることが可能であった。構築した核移植胚をレシピエントブタに胚移植したところ、4 頭のクローン産仔を得ることに成功し (図 4) また、有性生殖による後代産仔の作出も行うことができた。



図 4 : Fucci を発現する体細胞核移植胚から作出したクローン産仔

得られたクローンおよび有性生殖産仔の各組織・臓器の蛍光観察では、全身性の Fucci 遺伝子の発現は観察されず、皮膚 (図 5A'、A'')、心臓 (図 5B'、B'')、骨格筋 (図 5C'、C'') でのみ蛍光が観察され、さらにその蛍光

は部分的であったことから、遺伝子サイレンシングの可能性が示唆された。

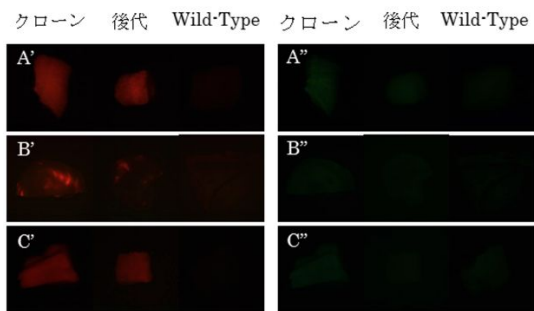
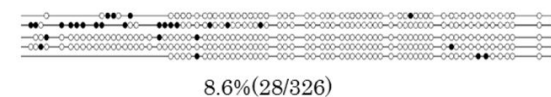


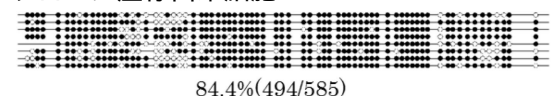
図 5 : クローン、後代産仔の臓器における Fucci の蛍光発現

このため、得られた個体由来の線維芽細胞について、導入された Fucci ベクターのプロモーター領域について DNA メチル化解析を行ったところ、Fucci としての機能が確認された核ドナー細胞に比べ、クローン産仔及び後代産仔由来の細胞ではプロモーター領域の DNA が高度にメチル化されていることが明らかになった。本研究では Fucci としての機能を有したブタ細胞の作出に成功し、Fucci 遺伝子を導入した個体の作出できた。しかしながら、体細胞核移植後の遺伝子サイレンシングにより全身に Fucci を発現する個体は得られず、この導入遺伝子のサイレンシングは有性生殖を介しても解消されないことが示唆された (図 6)。

核ドナー細胞 :



クローン産仔由来細胞 :



後代産仔由来細胞 :

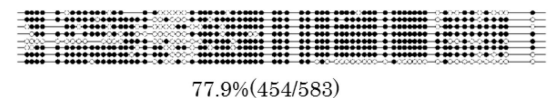


図 6 : 作出した個体由来細胞の DNA メチル化解析

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

林田豪太, 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 金井貴博, 小林美里奈, 松村幸奈, 倉本桃子, 坂井理恵子, 浅野吉則, 内倉鮎子, 前原美樹, 新井良和, 梅山一大, 長屋昌樹, 沢野朝子, 宮脇敦史, 長嶋比呂志: 細胞周期可視化蛍光プローブ Fucci を発現

するブタ体細胞核移植胚の作出. 第 106 回日本繁殖生物学会大会、2013 年 9 月 11～14 日、東京農工大学 (東京).

渡邊將人, 林田豪太, 松成ひとみ, 中野和明, 小林美里奈, 松村幸奈, 倉本桃子, 坂井理恵子, 浅野吉則, 内倉鮎子, 新井良和, 梅山一大, 長屋昌樹, 阪上 沢野朝子, 宮脇敦史, 長嶋比呂志: 細胞周期可視化蛍光プローブ Fucci 導入トランスジェニック・クローンブタの作出. 第 107 回日本繁殖生物学会大会:、2014 年 8 月 21～24 日、帯広畜産大学 (北海道).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 将人 (WATANABE Masahito)

明治大学・研究 知財戦略機構・特任講師

研究者番号: 00321688