

正常な体細胞クローン胚の作出・選別と妊娠増強に関する研究

角田幸雄・加藤容子

近畿大学農学部

要 約

体細胞クローン羊ドリーが作出されて以来 (Wilmut ら 1997), 有用動物の育種・改良・増殖, 希少動物種の保護, 異種臓器移植用動物の作出, 医薬品の生産, ヒトクローン ES 細胞の樹立, 基礎生物学や基礎医学などの多様な分野での応用を念頭に, 体細胞クローン個体が作出されてきた (角田 2009)。体細胞を除核未受精卵に導入すると, 核は初期化されて受精卵と同様に卵割を続けて, 10 ~ 50% の胚は胚盤胞に達する。胚盤胞を受胎雌に移植すると, 50% 以上の胚が着床するが, 妊娠途中で高率に流産し, 分娩に至るのは例外を除くと数% にすぎない。発生率が比較的高い牛の場合でも, 得られた個体の半数以上に死産, 産後直死や形態形成異常等が見られる (Kato ら 1998; Kato ら 2000)。このような異常は, 体細胞クローン個体作出技術を応用するにあたって深刻な障害となっている。本稿では, 3つの観点から, 正常な体細胞クローン個体の作出を目指して実施している我々の研究内容について紹介した。

キーワード: 初期化因子, TCTP, 遺伝子発現, hCG

1. 正常な個体への発生能の高いクローン胚の作出に関する研究

1.1 初期化誘導因子

異なる細胞周期の牛体細胞核を核移植すると胚盤胞へ発生し, 受胎雌に移植すると個体へ発生するM期未受精卵と, 核移植卵は8細胞期で発育を停止し, 胚盤胞へ発生しない活性化未受精卵を用いて解析を行った (Tani ら 2001)。その結果, MPF と MAP キナーゼは体細胞核を初期化する直接の因子ではないこと (Tani ら 2003), 発生を支持するM期未受精卵細胞質中にはその消長が体細胞核の初期化誘導能の有無と一致する 23kD のリン酸化タンパク質が存在することが判明した。約2万個の牛未受精卵を用いて, このタンパク質のアミノ酸配列を同定し, 遺伝子を特定したところ, phosphorylated transcriptionally controlled tumor protein (pTCTP) (Tani ら 2007) で有ることが明らかになった。リン酸化 TCTP ペプチド導入牛体細胞を用いて核移植を行うと, 胚盤胞への発生率は向上しなかったが, 受胎雌へ移植後に正常な個体が得られる割合が向上した。このことから, pTCTP は体細胞核の初期化に関わる因子である可能性が高いと考えられた (角田ら 2005)。

1.2 TSA 処置

体細胞核移植卵を遺伝子の発現を促進させる薬剤トリコスタチン A (TSA) 添加培地で培養すると, 胚盤胞への発生率や受胎雌へ移植後のマウス個体への発生率が向上する (Kishigami ら 2006; Rybouchkin ら 2006)。TSA 処置核移植卵では, ヒストンのアセチル化や DNA

のメチル化に関わる酵素の遺伝子や多能性に関わる Sox2 や c-Myc などの遺伝子の発現量が増加していることから, これらが発生能の向上に結びついている可能性が考えられる (Li ら 2008)。

2. 正常な個体への発生能の高いクローン胚の選別に関する研究

これまで, 個体への発生能と得られる個体の正常性が異なる核移植胚を用いて遺伝子発現解析を行い, 正常な個体への発生能の指標となる遺伝子を求めて検討してきた。マウスでは, 生体回収胚 (個体への発生率 75%), 体外培養胚 (同 40%), 前核置換胚 (同 33%), 単為発生胚 (同 0%), 桑実胚核移植胚 (同 10%), ES 細胞核移植胚 (同 3%) と卵丘細胞核移植胚 (同 1%) ならびに TSA 処置卵丘細胞核移植胚 (同 2.2%) と無処置卵丘細胞核移植胚 (同 0.7%) を用いて, 発生に重要な働きをする遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で解析した。その結果, Sox2 と Oct4 の発現量が, 個体への発生能と関連することを認めた (Li ら 2005, 2006)。

牛では, 核移植卵由来胚盤胞を受胎雌へ移植後の受胎率 (32% vs 42%) と子牛への発生率 (31% vs 24%) には大差がないが, 子牛の正常率が相違する (67% vs 0%) 2種の核移植胚を用いて検討した。まず, 8日齢核移植胚を受胎雌へ移植して15日目に回収した受胎産物 (2種の核移植胚と体外受精胚) を用いて, cDNA マイクロアレイ解析を行った。3種間での正常個体への発生率を勘案しながら, 同定された 1722 遺伝子のうち 38 遺伝子に焦点を合わせた。さらに, 機能の判明している 10 遺

伝子を選び、8細胞期と胚盤胞期胚を用いて発現量を比較した。その結果、胚盤胞栄養外胚葉で発現する妊娠維持に関わる $\text{INF-}\tau$ 遺伝子に違いが有ることが判明した。すなわち、胚盤胞期での発現量は体外受精胚と正常個体が得られる核移植胚で高いこと、8細胞期胚での発現は体外受精胚や正常個体が得られる核移植胚ではほとんど見られないのに対して、異常個体の出現頻度が高い核移植胚では見られることが明らかになり、 $\text{INF-}\tau$ 遺伝子の発現量と有無を指標にすれば、正常な核移植胚を選別できる可能性が示唆された（加藤 2009）。

3. 体細胞クローン胚の妊娠維持増強に関する研究

体細胞核移植卵の体外での発生率や受胎雌に移植後の着床率は、比較的高い。マウスの場合、核移植卵の 60～80%が胚盤胞に発生し、移植した胚盤胞の 50%以上が着床する。しかしながら、着床後高頻度で流産し、分娩に至るのは移植した胚盤胞の数%にすぎない。核移植胚では、前述のように多くの遺伝子で発現異常が見られており、これが流産の一因と考えられている。哺乳類胚の着床や着床後の胚発生には、胚-母体間相互作用が重要であり、胚から分泌されるシグナル伝達によって黄体が維持され、妊娠が継続していくと考えられる。牛凍結保存胚で示されるように、人為操作胚ではこのシグナル伝達が不十分な場合があり、hCG 投与を行うと妊娠状態が増強され、受胎率が向上することが知られている（Nishigai ら 2002）。

そこで、我々は体細胞核移植由来胚盤胞を移植した受胎雌マウスに、hCG あるいはプロゲステロンを投与することによって、個体への発生能が向上するか否か調べた（Tsuiji ら 2010）。その結果、妊娠 10.5 日目における胎子への発生率は、hCG 投与区で 21%であり、対照区の 10%に比べて有意に向上した。しかしながら、満期産子への発生率は、hCG 投与によっても向上しなかった。また、プロゲステロン投与によっても、満期産子への発生率は向上しなかった。個体への発生能の高い核移植胚を選別した上で受胎雌へ移植し、本稿で示したような内分泌学的方法をはじめとする妊娠維持増強処置を施せば、妊娠中期の胎子への発生だけでなく、満期産子への発生率も向上するものと期待される。

4. おわりに

マウスを用いて、1985 年に我が国で初めて哺乳類の核移植に成功（角田ら 1985）してから 25 年、また 1998 年に世界で最初の成体体細胞由来クローン牛の作出に成功（Kato ら 1998）してからでもすでに 12 年が経過した。我々は、これまで核移植技術を人工授精、受精卵移植につぐ、家畜の育種・改良・増殖技術として実用化するこ

とを念頭に研究を積み重ねてきた。ようやく昨年 6 月に、総理府食品安全委員会から「体細胞クローン技術を用いて生み出され、食用にされる牛・豚の健全性は、従来の繁殖技術による牛・豚と比べて違いは認められない」との判断が出されたことは、長年研究に従事してきた者として感無量である。

我が国の動物生産の将来を考えると、コピー家畜を生産できる体細胞クローン個体作出技術は、牛の育種・改良・増殖を目的に、世界に先駆けて昭和 39 年に開発された非外科的牛受精卵移植技術（Sugie 1965）をより効率化する為にも是非とも実用化したい技術である。既存の優れた要素技術を組み合わせて核移植法を組み立て、これまで我が国の畜産技術研究をリードしてきた旧農林水産省畜産試験場を中心に、核移植胚の移植試験を中規模で実施して正常個体作出率を確定することによって、消費者に安心感を与え、核移植技術が広く我が国の畜産現場で使用されるようになることを願っている。また、我々はさらに良い要素技術を開発するために、なお一層、戦略的基礎研究を推進していきたい。

謝 辞

本総説で引用した著者らの研究は、生研機構基礎研究推進事業、生研センター新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業、文部科学省科学研究補助金、三菱財団研究助成金を受けて実施された。

文 献

- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. 1998. Eight clones cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282, 2095-2098.
- Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. 2000. Cloning of calves cloned from various somatic cell types of male and female adults, newborn and fetal cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 120, 231-237.
- Kato Y, Li XP, Amarnath D, Ushizawa K, Hashizume K, Tokunaga T, Taniguchi M, Tsunoda Y. 2007. Comparative gene expression analysis of bovine nuclear-transferred embryos with different developmental potential by cDNA microarray and real-time PCR to determine genes that might reflect calf normality. *Cloning and Stem Cells* 9, 495-511.
- 加藤容子 2009. クローン個体の作出から見た「核移植と核のリプログラミング」. *MedicalBio* 2009.9, 14-21.
- Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T. 2006. Significant improvement of mouse cloning

- technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340, 183-189.
- Li XP, Kato Y, Tsunoda Y. 2005. Comparative analysis of development-related gene expression in mouse embryos with different developmental potential. *Molecular Reproduction and Development* 72, 152-160.
- Li XP, Kato Y, Tsunoda Y. 2006. Comparative studies on the mRNA expression of development-related genes in individual mouse blastocysts with different developmental potential. *Cloning and Stem Cells* 3, 204-214.
- Li XP, Kato Y, Tsuji Y, Tsunoda Y. 2008. The effect of trichostatin A on mRNA expression of chromatin structure-, DNA methylation-, and development-related genes in cloned blastocysts. *Cloning and Stem Cells* 10, 133-142.
- Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. 2002. Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 58, 1597-1606.
- Rybouchkin A, Kato Y, Tsunoda Y. 2006. Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biology of Reproduction* 74, 1083-1089.
- Sugie T 1965. Successful transfer of a fertilized bovine eggs by non-surgical techniques. *Journal of Reproduction and Fertility* 10, 197-201.
- Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. 2001. The direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biology of Reproduction* 64, 324-330.
- Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. 2003. Reprogramming of bovine somatic cell nuclei is not directly regulated by maturation promoting factor or mitogen-activated protein kinase activity. *Biology of Reproduction* 69, 1890-1894.
- Tani T, Shimada H, Kato Y, Tsunoda Y. 2007. Bovine oocytes with the potential to reprogram somatic cell nuclei have a unique 23-kDa protein, phosphorylated transcriptionally controlled tumor protein. *Cloning and Stem Cells* 9, 267-280.
- Tsuji Y, Kato Y, Tsunoda Y. 2010. Effect of human chorionic gonadotropin and progesterone administration on the developmental potential of mouse somatic cell nuclear-transferred oocytes. *Cellular Reprogramming* 12, 183-189.
- 角田幸雄, 加藤容子, 谷哲弥. 2005. 特許登録番号 3736517.
- 角田幸雄. 2009. 総論 核のリプログラミングー動物生産から再生医療までー. *MedicalBio* 2009.9, 11-13.
- 角田幸生, 安井司, 徳永智之, 内田駿, 杉江侑. 1985. マウス前核の置換と置換卵の移植による産子の生産. *家畜繁殖研究会誌* 31, 130-134.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.

Studies on the production and selection of somatic cell cloned embryos which develop into normal young, and the enhancement of pregnancy

Yukio Tsunoda and Yoko Kato

College of Agriculture, Kinki University

Summary

Somatic cell nuclear-transferred (SCNT) oocytes have a relatively high potential to develop into blastocysts in vitro, but a large proportion embryos die at various pre- and postimplantation stages after transfer to recipients. Although the reason for the high mortality of SCNT embryos at peri- and postimplantation stages is not clear, epigenetic abnormalities of SCNT embryos are considered to be the main reason. To establish reliable SCNT technology, methods to produce and select SCNT embryos which develop into normal young, and to enhance fetal development of SCNT embryos are required. In this review, we introduce our recent trails on the production and selection of somatic cell cloned embryos, and the enhancement of pregnancy.

Key words: reprogramming factor, TCTP, gene expression, hCG