

# 研究報告書

## 「体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開発」

研究期間：平成20年6月～平成24年3月

研究者：岸上 哲士

### 1. 研究のねらい

体細胞クローン技術および iPS 細胞技術は、分化した体細胞をリプログラミングして全能性および多能性細胞へとそれぞれリプログラミングさせる技術である。しかしながら、その実用化に際してはリプログラミング効率が低いという共通の問題を抱えており、効率的なリプログラミング技術およびリプログラミング促進技術の開発が求められている。これまで体細胞クローンおよび iPS 細胞の作出過程において、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)を添加することで作出効率が向上することが示されている。その標的タンパク質やアセチル化の制御とリプログラミングの関係などの分子機構が解明されれば、より効率的なリプログラミング技術の開発や発生・分化におけるアセチル化の制御や役割の理解に貢献することが期待される。そこで、本研究ではこれまで研究を行ってきたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi: Histone deacetylase inhibitor)を用いた体細胞クローン技術を基盤として、その要求性の分子機構と卵子におけるアセチル化に関する解析を行った。

### 2. 研究成果

#### 2-1. 体細胞核移植が卵子の HDACi 要求性を引き起こす

卵子を除核後体細胞核移植により核置換された通常の体細胞クローン(SCNT: Somatic Cell Nuclear Transfer)胚の胚盤胞への発生は低率であり、トリコスタチン A(TSA)などの HDACi 処理により発生率が大きく改善される。一方、除核や核移植を行わない卵子由来核をもつ単為発生胚の場合、80%以上が胚盤胞へと発生する。この発生率の高い単為発生胚に体細胞核を移植した結果、これらの4倍体核をもつ体細胞核注入(SI: Somatic-cell injection)胚の胚盤胞への発生率は、大きく低下し単為発生胚と SCNT 胚の中間の発生率であった。この結果は、胚盤胞へ発生する能力のある卵子由来核があるにも関わらず体細胞核移植そのものが卵子の発生能の低下を導くことを示しており、体細胞核移植が卵子の発生に阻害的に働くことが示唆された。この SI 胚の TSA 処理を行ったところ、SCNT 胚と同様に胚盤胞への発生率が改善した。以上の結果から、体細胞核移植が卵子を HDACi 要求性へと質的に変化することが示唆された。同時に、SCNT 胚の HDACi 要求性が除核に伴う卵子由来因子の喪失によるものでないことが示唆された。

#### 2-2. 卵子初期発生におけるアセチル化リジンおよび非ヒストンタンパク質の挙動

SCNT 胚の TSA 処理に関する研究から、核移植後10時間の1細胞期胚の TSA 処理がその後の胚発生に最も重要であることが明らかになっている。この TSA の標的は HDAC であり、その阻害は様々なタンパク質の高アセチル化を誘導する。そこで本研究では、1細胞期におけるアセチル化リジンの挙動について解析を行った。これまでのヒストンのアセチル化の解析の報告から

予想された通り、アセチル化リジンの量は単為発生胚の前核と比べ、SCNT胚の前核では約70%と低かった。さらに、細胞質におけるアセチル化リジンの量も80%近くに減少することを見出した。これらの結果から、核移植胚においては核にあるヒストンだけでなく細胞質の非ヒストンタンパク質のアセチル化も影響を受けていることが示された。以上の結果から、体細胞核移植そのものが卵子の低アセチル化を誘導し、体細胞核移植胚のTSA要求性を誘導するという新しい可能性が考えられた。

### 2-3. 体細胞核移植における卵子の質的变化

SI胚の発生率低下の分子機構ならびに体細胞核移植の卵子への影響を理解するために、1細胞期の前核を調べたところ卵子由来核(雌性前核)の核小体が小さくなり増えることが観察され、体細胞核由来の偽前核に似た構造に変化することが示唆された。そこで、SI胚の前核期において、卵子由来核のアセチル化リジンの観察を行った。その結果、SI胚においても単為発生胚に比べて、核および細胞質においてアセチル化リジンの低下が観察された。興味深いことに、SI胚の同じ細胞質に存在する核のアセチル化リジンの量は、体細胞由来偽前核は雌性前核の約80%であった。これらの結果から、体細胞核注入により卵子の低アセチル化を誘導するが、体細胞由来偽前核の低アセチル化が核の内在的性質に起因していることが示唆された。

### 2-4.HDACiの標的HDACの探索

TSAの標的となるHDACは、クラスI(HDAC1-3, 8)/IIa(HDAC4,5,7,9)およびIIb(HDAC6,10)を含めて全部で10種類ある。これらのうち1細胞期の胚には、7種類(HDAC1-4,6,8,9)のHDACが発現することが示唆されている。最近Onoらにより、SCNT胚の発生率改善にはクラスIIbのHDAC阻害が重要であることが示唆された(Ono et al., 2010)。我々も、不可逆的HDAC阻害剤であるtrapoxin A(Tx)によりSCNT胚の発生率改善を試みたが、改善の効果はなかった。胚のTx処理は前核におけるアセチル化リジンを大幅に増加するにも関わらず発生率改善が見られないことから、核におけるアセチル化リジンの蓄積がSCNT胚の発生改善に直接結びつかないことが示唆された。一方、TxはHDAC6を阻害しないことが知られている。そこで、HDAC6の阻害剤であるTubastatin Aを用いたところ、SCNT胚の発生が有意に改善された。これらの結果から、SCNT胚ではHDAC6が主要な標的であり、その基質としてヒストンに加えてチューブリンなど非ヒストンタンパク質が報告されており、今回の結果からヒストンに加えて非ヒストンタンパク質のアセチル化制御がSCNT胚の発生率改善に重要であることが示唆された。

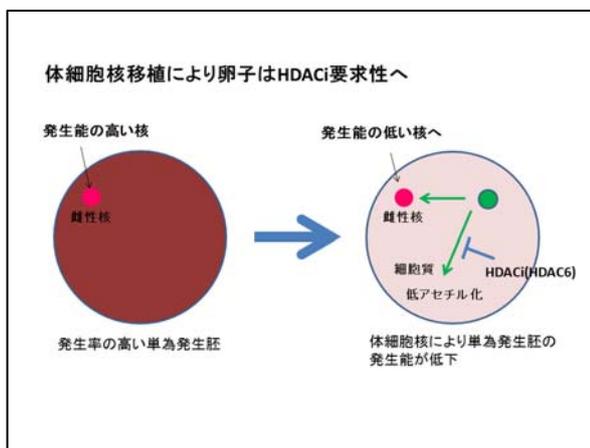
### 2-5. 卵子老化から見た発生能低下とアセチレーションの課題

排卵後の卵子は、徐々に老化していき発生能が低下する。これまで卵子の老化にともないヒストンのアセチル化が亢進することが報告されている(Chen et al., 2007)。そこで、卵子の老化にともなう発生能低下におけるアセチル化の役割を明らかにするために、老化卵子のアセチル化リジンおよび $\alpha$ チューブリンのアセチル化状態を調べたところ、老化するにつれ染色体および細胞質においてアセチル化の亢進が観察された。この結果から、卵子の老化はヒストンのアセチル化だけでなく、非ヒストンタンパク質である $\alpha$ チューブリンの増大を引き起こすことが示され、アセチル化の制御が老化とともに破綻をきたすことが示唆された。興味深いことに、老化過程の卵子をHDACi処理した場合、卵子細胞質の断片化やスピンドルの伸長を抑制し、卵子の老化を促進す

るよりむしろ抑制される結果が示された。これらの結果から、タンパク質のアセチル化が正常な卵子維持に重要な役割をしていることが示された。

## 2-6. 結語

本研究では、卵子 1 細胞期のアセチル化の挙動に着目して研究を行ってきた。その結果、従来予想されていなかった非ヒストンタンパク質アセチル化の重要性、体細胞核移植にともなう卵子アセチル化制御の異常、卵子老化にともなうアセチル化の重要性、そして HDAC6 の体細胞核移植における重要性などが明らかになってきた。これらの結果から右図のような新しいモデルを提出するにいたった。このように SCNT 胚や卵子において翻訳後修飾の一つであるアセチル化の標的は、体細胞核のリプログラミングに関わるヒストンだけでなく、非ヒストンタンパク質がその発生能に大変重要な役割を果たしていると考えられる。



## 3. 今後の展開

本研究を通じて、体細胞クローン胚の低率な発生が単なる移植された体細胞由来核のエピジェネティクス異常だけでなく、体細胞クローン胚では卵子の細胞質の質自体が変化していることが示唆された。このことは、体細胞核とそれに付随した様々な因子が核移植を通じて卵子に入ることによって様々な細胞生物学的な影響を及ぼし体細胞クローン胚の発生を低下させている可能性が考えられる。今後、HDAC6 の標的因子の探索や卵子やそれら因子の発生における役割などを明らかにすることを通じて、体細胞クローン胚の発生率の低さの原因解明や発生能および全能性の分子機構の理解に貢献していきたい。

## 4. 自己評価

本研究は、iPS 細胞技術ならびに体細胞クローン技術のそれぞれの知見を参考に新しい体細胞クローン技術の開発ならびに HDAC 阻害剤によるクローン発生率向上の機構解明を通じたリプログラミングの分子機構解明の2つの目標を掲げた。残念ながら当初の研究目標について十分な成果達成とは言えるものではなかったが、本研究期間が終わる現時点においてそれぞれの研究テーマにおいてようやく小さな研究成果の芽が出始めている。今後この芽をしっかりと育て成果につなげていくことが、このさきがけをいただいた責務と感じている。

また本さきがけ研究を通じて、失敗も多かったものの研究の組み立てや運営における経験などを積ませていただき、また多くの異なる分野の先生方との交流の機会を得てこれまで経験のない新しい共同研究の機会を与えていただいている。この場を借りて、研究総括の西川伸一先生、アドバイザーの先生方、さきがけの先生方に心より感謝したい。

## 5. 研究総括の見解

リプログラミングの研究は、もともとクローン研究を起源とする。その意味で、生粋のクローン研究者が、iPS 分野の研究者とともにリプログラミングを研究する事により相乗効果が生まれるのではと期待した。クローニングの効率を上げるという、彼本来の研究は3年間で十分な進捗があったと評価している。実際、共著ではあるがこの課題についての論文発表もしっかりできている。残念ながら、他さきがけ研究者との共同実験は後半になりようやく始まったという状況であるが、さきがけで始めた共同研究を是非実らせ、iPS とクローン研究のタッグの重要性をアピールする仕事へと発展する事を期待する。

## 6. 主要な研究成果リスト

### (1) 論文 (原著論文) 発表

1. Bui HT, Wakayama S, Kishigami S, Park KK, Kim JH, Thuan NV, Wakayama T. Effect of trichostatin A on chromatin remodeling, histone modifications, DNA replication, and transcriptional activity in cloned mouse embryos. *Biol Reprod.* 83, 454–463, 2010.
2. Van Thuan N, Bui HT, Kim JH, Hikichi T, Wakayama S, Kishigami S, Mizutani E, Wakayama T. The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice, *Reproduction* 138, 309–317, 2010.
3. Van Thuan N, Kishigami S, Wakayama T. How to improve the success rate of mouse cloning technology, *J Reprod Dev.* 56, 20-30, 2010.
4. Kishigami S, Wakayama T. Somatic cell nuclear transfer in the mouse. *Methods Mol Biol.* 518, 207–218, 2009.
5. Wakayama S. Kishigami S, Wakayama T. Cloning of ES cells and mice by nuclear transfer. *Methods Mol Biol.* 530, 251–265, 2009.
6. Van Thuan N, Bui HT, Kim JH, Hikichi T, Wakayama S, Kishigami S, Mizutani E, Wakayama T. The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction.* 2009, 138, 309-17.
7. Bui HT, Wakayama S, Kishigami S, Kim JH, Van Thuan N, Wakayama T. The cytoplasm of mouse germinal vesicle stage oocytes can enhance somatic cell nuclear reprogramming. *Development.* 2008, 35, 3935-45.

### (2) 特許出願

該当無し。

### (3) その他 (主要な学会発表、受賞、著作物等)

#### ・学会発表

1. Kishigami S, Lee A.R., Matsumoto K., Saeki K., Hosoi Y.: Dynamics of lysine acetylation during the one-cell stage mouse embryos. *The 8<sup>th</sup> Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society*, Guangxi, China, October 27,

- 2011.
2. Lee A.R., Kishigami S., Wakayama T., Matsumoto K., Saeki K., Hosoi Y.: Effect of inhibitors for class I/II and III histone deacetylases for aging oocytes. *Joint CSH Asia/ISSCR Conference-Cellular Programs and Reprogramming*, Suzhou, China, October 25, 2011.
  3. 岸上哲士 : クローンとエピジェネティクス : 第29回日本受精着床学会総会・Assisted Reproductive Technology Forum '11、東京、2011年9月10日 (招待講演)
  4. Lee A.R., Kishigami S., Wakayama T., Matsumoto K., Saeki K., Hosoi Y.: Vitamin C does not enhance reprogramming after SCNT. *The 16<sup>th</sup> International Conference of the International Society of Differentiation*, Nara, Japan, November 16, 2010.
  5. Matsubara K., Lee A.R., Kamata Y., Magotani M., Saeki K., Matsumoto K., Kishigami S., Hosoi Y.: Analysis of acetylation in oocytes and 1-cell embryos. *The 16<sup>th</sup> International Conference of the International Society of Differentiation*, Nara, Japan, November 16, 2010.
  6. Kishigami S., Lee A.R., Matsumoto K., Yamochi T., Amano T., Matsumoto K., Saeki K., Iritani A. and Hosoi Y.: What is the impact of HDACi treatment on protein acetylation and development in mice. *The 7<sup>th</sup> Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society*, Kuala Lumpur, Malaysia, November 9, 2010.
  7. Lee A.R., Matsubara K., Kishigami S., Wakayama T., Saeki K., Matsumoto K., Hosoi Y.: Aged oocyte associated with tubulin acetylation、第103回日本繁殖生物学会、青森 2010年9月2日
- ・著作物
1. 矢持隆之、岸上哲士、細井美彦 : 目で見る生殖と再生—体細胞クローナー、Hormone Frontier in Gynecology、18 : 2—5, 2011
  2. 岸上哲士、矢持隆之、松原圭吾、細井美彦 : 体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開発、再生医療、8 : 315—8, 2009
  3. 岸上哲士、辻本賀子、矢持隆之、細井美彦 : 核移植とiPS細胞技術—リプログラミングの効率化を目指して、細胞工学、28 : 223—6, 2009