

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年2月14日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580311

研究課題名（和文）遺伝子改変ミニブタ作出技術の超高度化

研究課題名（英文）Improvement of the developmental capacity of nuclear transfer embryos derived from gene-modified clawn miniature pig cells using a histone deacetylase inhibitor and latrunculin A.

研究代表者

吉田 光敏（YOSHIDA MITSUTOSHI）

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：00174954

研究成果の概要（和文）：遺伝子導入クラウン系ミニブタ体細胞クローン胚の体外発生・体内発生に及ぼす脱アセチル化酵素阻害剤処理（HADCi）および細胞骨格阻害剤処理の影響について検討した。その結果、体細胞クローン胚の胚盤胞への体外発生能の超高度化にはHADCi処理（トリコスタチンA、スクリパタイトまたはスベロイルビスヒドロキサム酸）および細胞骨格阻害剤（ラトランキュリンA）処理が有効であり、得られた体細胞クローン胚の胎仔および産仔への体内発生能が示された。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to examine the effects of postactivation treatment of histone deacetylase inhibitors (HADCi) and an actin polymerisation inhibitor, latrunculin A (LatA) on *in vitro* and *in vivo* development of somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos derived from gene-modified Clawn miniature pig cells. After electric activation, SCNT embryos were treated with or without LatA, and cultured *in vitro*. The rate of blastocyst formation was significantly higher ($p < 0.05$) in SCNT embryos treated with HADCi and $0.5 \mu\text{M}$ LatA than that in control. In addition, fetuses and piglets were obtained from recipient uteri after transfer of embryos treated with HADCi and LatA. The results of this study showed for the first time that postactivation treatment with HADCi and LatA was effective to improve *in vitro* and *in vivo* developmental capacity of gene-modified cloned miniature pig embryos.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：体細胞クローン、遺伝子改変、脱アセチル化、トリコスタチンA、スベロイルビスヒドロキサム酸、スクリパタイト、ラトランキュリンA、クラウン系ミニブタ

1. 研究開始当初の背景

(1) 体細胞核移植によるクローン動物作出技術は、同一の遺伝形質を持つ個体を多数作出することができ、医工学分野で求められている遺伝子改変ミニブタを創成するために大変重要である。我々はクラウン系ミニブタの体細胞クローンの作出に独自の手法を開発したが、遺伝子改変ミニブタ胚の作出効率は低い。

(2) 体細胞クローン動物の低い作出効率および生存クローン動物の異常は体細胞核のリプログラミングの不適切性に起因することが指摘されるとともに、リプログラミング効率とヒストンアセチル化の関連が示されてきた。

2. 研究の目的

本研究ではクラウン系ミニブタと体細胞クローン作出技術を基礎に、発光遺伝子などを導入した遺伝子改変ミニブタの作出効率を超高度化し、新たな高付加価値ミニブタ系統の創成に繋げる目的で、遺伝子導入したミニブタ体細胞を用いた核移植に由来するクローン胚の体外発生・体内発生に及ぼす脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)処理および活性化における新規細胞骨格阻害剤処理の影響について検討した。

3. 研究の方法

食肉センター由来の産業ブタ卵巣から卵丘・卵母複合体を採取し、成熟培地で42時間培養後、卵丘細胞を完全に剥離した。そして、第1極体を放出した形態的に正常な体外成熟卵を選抜し、実験に供した。卵は、吸引除去法により除核後、囲卵腔にクラウン系ミニブタ体細胞を導入し、融合液中で微細電極により電氣的に融合処理を行った。融合胚は超音波活性化または電気活性化処理した。活性化処理後、クローン胚は細胞骨格阻害剤およびHDACi添加発生培地にて2時間培養した。次いで、クローン胚はHDACiのみを添加した発生培地へ移し、さらに4~26時間培養した。HDACi処理後、クローン胚はHDACi無添加発生培地へ移し、培養を継続した。なお、体外発生状況は活性化後2日で卵割状況を、6日で胚盤胞形成状況を対照区と比較した。

実験1ではEndo- β -ガラクトースC遺伝子発現ベクターを導入したミニブタ体細胞を用いて作出したクローン胚の体外発生に及ぼすHDACi:トリコスタチンA(TSA)の影響を調べた。クローン胚は

活性化後28時間、50nMまたは100nMのTSAを添加した発生培地で培養し、その後の体外発生状況を比較した。

実験2では活性化後の新規細胞骨格阻害剤:ラトランキュリンA(LatA)処理濃度が α 1,3-ガラクトース転移酵素ノックアウト(GTKO)遺伝子導入ミニブタ体細胞由来のクローン胚の体外発生に及ぼす影響を調べた。クローン胚は活性化処理直後から、0.5、1 μ M LatA、10.4 μ M サイトカラシンB(CB)、または細胞骨格阻害剤無添加の4区にてそれぞれ2時間培養した。その後の体外発生状況を比較した。

実験3では活性化後の細胞骨格阻害剤: LatA処理がGTKO遺伝子導入ミニブタ体細胞由来のクローン胚の体内発生に及ぼす影響を調べた。クローン胚は活性化処理直後から、0.5 μ M LatAまたは10.4 μ M CBにて、それぞれ2時間培養した。その後、50nM TSA添加発生培地にて22時間培養後、発情を同期化した受胎雌ミニブタの卵管に外科的移植し、子宮における胚の着床状況や胎仔の有無を観察した。

実験4では細胞毒性が低いHDACiであるスクリパタイト(SPD)およびスベロイルビスヒドロキサム酸(SBHA)処理濃度がミニブタ体細胞クローン胚の体外発生に及ぼす影響を検討した。クローン胚は活性化後16時間、種々の濃度のSPD(0、5、50、500、1000nM)またはSBHA(0、50、250、500 μ M)を添加した発生培地で培養し、その後の体外発生状況を比較した。

実験5では活性化処理後のSPD処理が緑色発光を発するEGFP遺伝子、赤色発光を発するtdTomato遺伝子または動脈硬化の危険因子として知られているヒトアポリポプロテイン(a)[hApoL(a)]を発現する遺伝子を導入したミニブタ体細胞由来クローン胚の体外発生に及ぼす影響を検討した。活性化後、0および500nM SPDを添加した培地でクローン胚を16時間培養し、その後の体外発生状況および導入遺伝子発現状況を比較した。

実験6ではSBHA処理がtdTomato遺伝子またはGTKO遺伝子導入ミニブタ体細胞由来クローン胚の体外発生および導入遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。活性化後、0および50 μ M SBHA

を添加した培地でクローン胚を16時間培養し、その後の体外発生状況および導入遺伝子発現状況を比較した。

実験7ではSPD処理がhApoL (a)遺伝子を導入したミニブタ体細胞由来クローン胚の体内発生に及ぼす影響を検討した。すなわち、実験5と同様にhApoL (a)遺伝子を導入したミニブタ細胞を用いて作製したクローン胚を活性化後、0および500nM SPDを添加した培地で16時間培養した。その後、クローン胚はホルモン処理にて発情周期を同期化した受胎雌ブタの卵管内に外科的に移植し、受胎状況を超音波画像診断装置によって比較した。

4. 研究成果

実験1：クローン胚の胚盤胞形成率は50nM TSA添加区(23.8%)で無添加区(12.0%)と比べて有意に増加した($P < 0.05$)。一方、胚盤胞における導入遺伝子発現状況にはTSA添加の有無で差はなかった。従って、TSA処理が導入遺伝子発現状況に影響せず、ミニブタ体細胞クローン胚の体外発生能の改善に有効であることが示された。

実験2：クローン胚の胚盤胞形成率は0.5 μ M LatA処理区(32.8%)で無処理区(10.8%)および10.5 μ M CB処理区(17.5%)に比べ有意に高い値を示した($P < 0.05$)。一方、胚盤胞における導入遺伝子発現状況にはTSA添加の有無で差はなかった。従って、0.5 μ M LatA処理が導入遺伝子発現状況に影響せず、遺伝子導入ミニブタ体細胞クローン胚の体外発生能の改善に有効であることが初めて示された。

実験3：246個のクローン胚を移植した結果、胚移植21日後の子宮内24ヶ所の着床箇所(9.8%)が見られ、そのうち5頭の胎仔(2.0%)が得られた。24ヶ所の着床箇所から得られた組織片や5頭の胎仔にはすべて導入遺伝子発現が認められた。従って、0.5 μ M LatA処理が導入遺伝子発現状況に影響せず、ミニブタ体細胞クローン胚の体内発生能の改善に有効であることが初めて示された。

実験4：SPD処理濃度がクローン胚の体外発生に及ぼす影響を検討した結果、胚盤胞形成率は500nM SPD処理区(26.2%)が0、5、50、および1000nM区(10.0~12.9%)と比べて有意に高い

値を示した($P < 0.05$)。SBHA処理濃度がクローン胚の体外発生に及ぼす影響を検討した結果、胚盤胞形成率は50 μ M SBHA処理区(18.5%)が0、250、および500 μ M区(6.6~8.3%)と比べて有意に高い値を示した($P < 0.05$)。従って、500nM SPDまたは50 μ M SBHA処理が導入ミニブタ体細胞クローン胚の体外発生能の改善に有効であることが初めて示された。

実験5：胚盤胞形成率はすべての遺伝子改変ミニブタ体細胞クローン胚でSPD処理区(16.7~38.2%)が無処理区(6.9~21.1%)と比べて有意に高い値を示した($P < 0.05$)。胚盤胞における導入遺伝子の発現状況(100%)にSPD処理の有無で差はなかった。従って、500nM SPD処理が導入遺伝子発現状況に影響せず、遺伝子導入ミニブタ体細胞クローン胚の体外発生能の改善に有効であることが初めて示された。

実験6：胚盤胞形成率はすべての遺伝子改変ミニブタ体細胞クローン胚でSBHA処理区(24.9~34.8%)が無処理区(7.1~8.4%)と比べて有意に高い値を示した($P < 0.05$)。胚盤胞における導入遺伝子の発現状況(100%)にSBHA処理の有無で差はなかった。従って、50 μ M SBHA処理が導入遺伝子発現状況に影響せず、遺伝子導入ミニブタ体細胞クローン胚の体外発生能の改善に有効であることが初めて示された。

実験7：胚移植後24~34日において、SPD処理区ではクローン胚を移植した受胎雌ブタ3頭とも受胎していることが確認できた(100%)。一方、SPD無処理区では胚移植した受胎雌ブタ3頭のうち1頭が受胎していることが確認できた(33.3%)。胚移植45~53日以降においてはSPD処理区受胎雌ブタ2頭で受胎していることが確認できた(66.6%)。一方、SPD無処理区では受胎していることが確認できなかった。また、SPD処理区(術後27日目)およびSPD無処理区(術後35日目)の受胎雌ブタが流産した。得られた胎児からは導入遺伝子が検出された。

HDACiであるTSA、SPD、SBHAや新規細胞骨格阻害剤であるLatA処理により遺伝子改変クラウン系ミニブタ体細胞クローン胚の発生能の改善に成功し、遺伝子改変クローン個体作出の可能性およびその作出効率の改善が示された。本研究で得られた

新知見は、効率的な高付加価値ミニブタ作出戦略を確立するうえで大きく貢献することが期待された。

5. 主な論文発表等

[雑誌論文](計7件)

- ① Miyoshi K, Mori H, Mizobe Y, Akasaka E, Ozawa A, Yoshida M, Sato M. Valproic acid enhances in vitro development and Oct-3/4 expression of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. Cell Reprogram, 査読有, Vol.12, 2010, pp.67-74.
- ② Himaki T, Mori H, Mizobe Y, Miyoshi K, Sato M, Takao S, Yoshida M. Latrunculin A dramatically improves the developmental capacity of nuclear transfer embryos derived from gene-modified clawn miniature pig cells. Cell Reprogram, 査読有, Vol.12, 2010, pp.127-131.
- ③ Himaki T, Yokomine TA, Sato M, Takao S, Miyoshi K, Yoshida M. Effects of trichostatin A on in vitro development and transgene function in somatic cell nuclear transfer embryos derived from transgenic Clawn miniature pig cells. Anim Sci J, 査読有, Vol.81, 2010, pp.558-563.
- ④ Himaki T, Watanabe S, Chi H, Yoshida M, Miyoshi K, Sato M. Production of genetically modified porcine blastocysts by somatic cell nuclear transfer: preliminary results toward production of xenograft-competent miniature pigs. J Reprod Dev, 査読有, Vol.56, 2010, pp.630-638.
- ⑤ Miyoshi K, Mori H, Mizobe Y, Akasaka E, Ozawa A, Yoshida M, Sato M. Development of a noninvasive monitoring system for evaluation of Oct-3/4 promoter status in miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. J Reprod Dev, 査読有, Vol.55, 2009,

pp.661-669.

- ⑥ 日巻武裕, 梅野知子, 三好和睦, 吉田光敏. プロスタグランジンF2 α 類縁物質と性腺刺激ホルモン投与によるクラウン系雌ミニブタの発情同期化に関する研究, 鹿児島県獣医師会会報, 査読有, Vol.23, 2009, pp.5-7.

[学会発表](計7件)

- ① 小川純輝、小澤政之、三好和睦、吉田光敏、活性化後のスクリプタイドまたはスベロイルビスヒドロキサム酸処理がミニブタ体細胞クローン胚の体外発生に及ぼす影響, 第104回日本繁殖生物学会, 2011年9月17日(岩手).
- ② 脇詩織、三好和睦、吉田光敏、マイクロアレイを用いたブタ体外成熟卵子の網羅的遺伝子発現解析, 第112回日本畜産学会, 2010年3月28日(東京).
- ③ 日巻武裕、溝部大和、津田健一郎、末友雅士、三好和睦、吉田光敏、活性化後のラトランキュリンA処理がミニブタ成体腎細胞に由来するクローン胚の発生能に及ぼす影響, 第112回日本畜産学会, 2010年3月28日(東京).
- ④ Himaki T, Mori H, Mizobe Y, Miyoshi K, Sato M, Takao S, Yoshida M. Latrunculin A dramatically improves the developmental capacity of nuclear transfer embryos derived from gene-modified Clawn miniature pig cells, 42nd Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 2009年7月19日(アメリカ合衆国).
- ⑤ 王建輝、池海英、三好和睦、吉田光敏、Effect of latrunculin A on developmental potentials of electrically activated porcine oocytes, 第110回日本畜産学会, 2009年3月29日(神奈川).
- ⑥ 日巻武裕、森寛倫、溝部大和、三好和睦、佐藤正宏、高尾尊身、吉田光敏、 α -1,3-galactosyl-transferase 遺伝子ノックアウトベクターを挿入したクラウン系ミニブタ体細胞に由来するクローン胚の体内発生能の検討, 第12回日本異種移植研究会, 2009年3月7日(鹿児島).
- ⑦ 森寛倫、溝部大和、赤坂恵理、小澤明央、吉田光敏、佐藤正宏、三好和睦、バルプロ酸がミニブタ体細胞クローン胚の体外発生に及ぼす影響, 第12回日

本異種移植研究会， 2009年 3月7日
(鹿児島).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 光敏 (YOSHIDA MITSUTOSHI)
鹿児島大学・農学部・教授
研究者番号：00174954

(2) 研究分担者

三好 和睦 (MIYOSHI KAZUCHIKA)
鹿児島大学・農学部・准教授
研究者番号：70363611

佐藤 正宏 (SATO MASAHIRO)
鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進
センター・教授
研究者番号：30287099

(3) 研究協力者

日巻 武裕 (HIMAKI TAKEHIRO)
鹿児島大学大学院・連合農学研究科学生

森 寛倫 (MORI HIRONORI)
鹿児島大学大学院・農学研究科学生

津田 健一郎 (TSUDA KENNICHIROU)
鹿児島大学大学院・農学研究科学生

溝部 大和 (MIZOBE YAMATO)
鹿児島大学大学院・農学研究科学生

末友 雅士 (SUETOMO MASASHI)
鹿児島大学大学院・農学研究科学生

小川 純輝 (OGAWA JYUNKI)
鹿児島大学大学院・農学研究科学生

赤星 薫 (AKAHOSHI KAORU)
鹿児島大学・農学部学生