マウス体細胞核移植由来再構築卵子における核内構造制御タンパク質の発現の解析

西山有依[1]、森田真裕[2]、安齋政幸[3]、加藤博己[3]、
細井美彦[2]、三谷匡[3]、入谷明[3]

要　約

体細胞核移植（Somatic cell nuclear transfer : SCNT）技術は、1997 年の Wilmut らによる報告後、様々な動物種においてクローン個体の作出を実現してきたが、10 余年を経た現在においてもその作出効率は未だに低率である。その原因を解明し作出効率を上げるための研究は活発に行われているが、その根本的な原因は不明なままである。近年、生細胞における分子の動態や、クロマチンの配置などの解析から、核内構造構築が転写活性などの遺伝子発現制御の基盤となることがわかってきた。そして最近、核内のアクチン関連タンパク質（Arp）がクロマチン構造を　する複合体に広く含まれており、Arp ファミリータンパク質が細胞核、クロマチンの機能構造やダイナミクスに関与していることが示唆されている。本研究では、受精卵および核移植由来卵子において、クロマチンリモデリング因子 SWR 1 複合体の構成因子である Arp4、Arp6、SWR1 の局在を免疫組織化学的染色によって解析した。その結果、受精卵および核移植由来卵子で、クロマチン構造に違いが見られた領域での Arp4 および SWR1 の発現パターンが異なっていた。このことから、クロマチン配置の相違、あるいは核内構造制御タンパク質の局在パターンが核移植由来卵子での核の不適切なリプログラミングを反映している可能性が示唆された。

緒　言

1997 年のクローンヒツジ“ドリー”の報告後 10 余年を経た現在まで、様々な動物種において体細胞や幹細胞を用いたクローン動物が作出されてきたが、どの動物種においても体細胞核移植（SCNT）個体への発生率は 2-10% と低率である[1－10]。 マウスにおいては 1998 年に Wakayama らにより報告され[11]、その作出率を改善するために、Dimethylsulfoxide（DMSO）の添加[12]、クローン胚同士のアグリゲーションキメラ[13]、Trichostatin A（TSA）[14] など、様々な方法が試みられてきた。しかし、いずれの方法においても、新生仔の奇形や胎盤の肥大など、体細胞クローンマウスの発生で特徴的な異常を修復することはできていない。

近年、核内構造タンパク質、染色体タンパク質、核内因子などが、染色体テリトリーや染色体間領域における様々な構造体、遺伝子の配置などを動的に制御することにより、遺伝子発現制御の基盤を形成していることがわかってきた 。そして、アクチンが、細胞質の骨格形成に関わることから、核に存在するアクチンファミリーが、核構造の構築に関わる可能性が以前から考えられていた。核内のアクチン関連タンパク質（Arp）が、クロマチン構造を変換する複合体に広く含まれており、Arp ファミリータンパク質が細胞核､クロマチンの機能構造やダイナミクスに関与していることが示唆されている[15]。出芽酵母において、Arp ファミリーは 10 種類存在し、そのうち Arp4, Arp6 は、クロマチンリモデリングに関わる SWR1 複合体に含まれる。SWR1 複合体は、ヌクレオソーム中のヒストン H2A を H2A のバリアントである H2A.Z に

1. 近畿大学生物理工学部遺伝子工学科　〒649-6493　和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学大学院生物理工学研究科　〒649-6493　和歌山県紀の川市西三谷 930
3. 近畿大学先端技術総合研究所　〒642-0017　和歌山県海南市南赤坂 14-1

置換する。ヒストン H2A.Z が導入されるとヒストンのメチル化が抑制され、転写活性化が促進されることが報告されている[16, 17]。また、ショウジョウバエにおいて、Arp6 はヘテロクロマチン形成に関与し、さらに多能性幹細胞と分化細胞の核内配置の違いにも関与していることが示唆されている[18]。

核内構造が、細胞（核）内因子に対する反応性に関与するとすれば、その制御因子の動態を理解することによって、核のリプログラミングを制御する手がかりが得られるのではないかと考えられる。そこで本研究では、受精卵、核移植由来卵子の核において、Arp6、Arp4、SWR1 の局在について、免疫組織化学的解析を行った。

材料および方法

動　物

核移植に供するレシピエント卵子は、成熟週齢の B6D2F1（C57BL/6N × DBA/2）の雌マウス（日本エスエルシー（株））より回収した。ドナー細胞には卵丘細胞を用い、成熟齢の B6C3F1（C57BL/6 × C3H/He）雌マウス（日本チャールスリバー（株））より回収した。

体外受精（IVF）には、成熟週年齢の B6C3F1（C57BL/6 × C3H/He）雌マウス（日本チャールスリバー（株））より回収した卵子と、同系統の雄マウスより回収した精子を用いた。

なお、実験の立案および、動物の飼養については、近畿大学動物実験規定に準じて行った。

核移植ならびに体外受精

体細胞核移植（SCNT）は常法に従い行った[11]。すなわち、過排卵処理を行った B6D2F1 雌マウス卵管膨大部より卵子を回収し、0.1% ヒアルロニダーゼ中に静置することにより卵丘細胞の除去を行った。卵子の除核には、微分干渉倒立顕微鏡にピエゾインパクトユニットを取り付けた、圧電的に駆動されたマイクロピペットで吸引して行った。ドナー細胞には、同じく過剰排卵処理を行った Crj:B6C31 雌マウスから卵丘細胞を回収し、細胞注入操作に用いた。ドナー細胞注入後、約 1 時間培養した卵子を倒立顕微鏡下で検鏡し、早期染色体凝集を起こした核移植由来卵子を、Ca^{2+} 不含有 mCZB 培地に 10mM Sr^{2+}、5 μl/ml サイトカラシン B を添加した培地で 3 時間培養を行い、続いて、mCZB 培地に 5 μl/ml サイトカラシン B を添加した培地で 3 時間培養を行った。活性化処理後の卵子は、mkSOM 培地で、37℃、5%CO_2 の気相下で、9 時間まで培養した。

体外受精（IVF）は Toyoda らの方法に従い行った[19]。すなわち、B6C31/Crj 雄マウスの精巣上体尾部より採取した精子を mTYH 培地にて 1.5 時間培養し、受精能を獲得させ、同系統の Crj:B6C31 雌マウスより回収した卵子へ媒精させた。媒精後 5 時間に雌性前核形成を確認し、mkSOM 培地で洗浄を行い、さらに 9 時間まで 37℃、5%CO_2 の気相下で培養した。

卵子の免疫組織化学染色

体外受精卵は媒精後、核移植卵子は細胞注入後それぞれ 5 時間、7 時間、9 時間で回収した。卵子の固定は、10% ホルムアルデヒド、透過処理には 0.1%Triton X－100（SIGMA, T-8787）を用いて行った。一次抗体反応には、それぞれ anti-Arp6 rabbit polyclonal IgG（東北大学、原田昌彦博士より分与）、anti-Arp4 rabbit polyclonal IgG（abcam, ab3882）、anti-SWR1 rabbit polyclonal IgG（東北大学、原田昌彦博士より分与）、二次抗体反応には、donkey anti-rabbit IgG-Rhodamine（Santa Cruz Biotechnology, sc-2095）を用いて染色を行った。

結　果

体細胞核移植由来再構築卵子の前核様構造の形成

体細胞核移植由来再構築卵子における前核様構造の形成を表 1 に示した。卵丘細胞注入後 5 時間で、多くの卵子は 2 前核様構造を形成し（70.5%)、一部が 1 あるいは、3 前核様構造を形成した（1 前核様：9.5%、3 前核様：0.4%)。

表 1．体細胞核移植由来再構築卵子における前核様構造の形成

細胞注入供試卵子数[a]	生存卵子数[b] (%)	前核様構造形成卵子数[c] (%)		
		1前核	2前核	3前核
517	221 (42.7)	21 (9.5)	156 (70.5)	1 (0.04)

c：前核様構造の形成は、活性化処理後5時間で観察.
生存率 (%) ＝ b/a × 100
前核様構造形成率 (%) ＝ c/b × 100

体外受精卵および核移植由来卵子における Arp6 の経時的免疫組織化学的解析

核移植由来卵子および体外受精卵子における Arp6 の発現と局在について、免疫組織化学的解析を行った（図 1)。体外受精卵（A ～ R）は媒精後、核移植由来卵子（a ～ r）は細胞注入後、それぞれ 5 時間、7 時間、9 時間で回収した。Arp6 は核全体にドット状に局在しており、5 時間の卵子の核での発現は受精卵、核移植由来卵子ともに少量であった（A ～ F, a ～ f)。その後、7 時間（G ～ L, g ～ l)、9 時間（M ～ R, m ～ r）と時間の経過と共に Arp6 の発現は増加の傾向にあった。

また、受精卵の雄性前核と雌性前核で Arp6 の発現を比較すると、雄性前核の方が Arp6 の発現している部位が多いことが示されたが、核移植由来卵子においては、2 つの前核様構造の間に差はみられなかった。

体外受精卵および核移植由来卵子における Arp6、Arp4、SWR1 の免疫組織化学的解析

核移植由来卵子および体外受精卵における、Arp6、Arp4、SWR1 の発現と局在について、免疫組織化学的解析を行った（図 2)。核移植由来卵子は細胞注入後、体外受精卵は媒精後、9 時間で固定し観察した。Arp6 は、受精卵、核移植由来卵子ともに核全体でドット状の局在が見られた（A ～ F, a ～ f)。Arp4 については、受精卵と核移植由来卵子の核全体での均一な発現がみられた。また、受精卵では核小体辺縁部で均一なリング状の発現が確認できたが、核移植由来卵子では核小体辺縁部での発現が不均一だった（G ～ L, g ～ l)。Arp4 と同様に受精卵の SWR1 は、特に雄性前核の核小体辺縁部で強く均一な発現が見られたが、核移植由来卵子では核小体辺縁部での局在が少なく、また不均一だった。核内全体でのドット状の発現は受精卵と核移植由来卵子での差は見られなかった（M ～ R , m ～ r)。

また、DAPI の染色パターンに着目したところ、受精卵に比べ、核移植由来卵子の核小体辺縁部でのヘテロクロマチン構造の形成が不均一であることが示された。

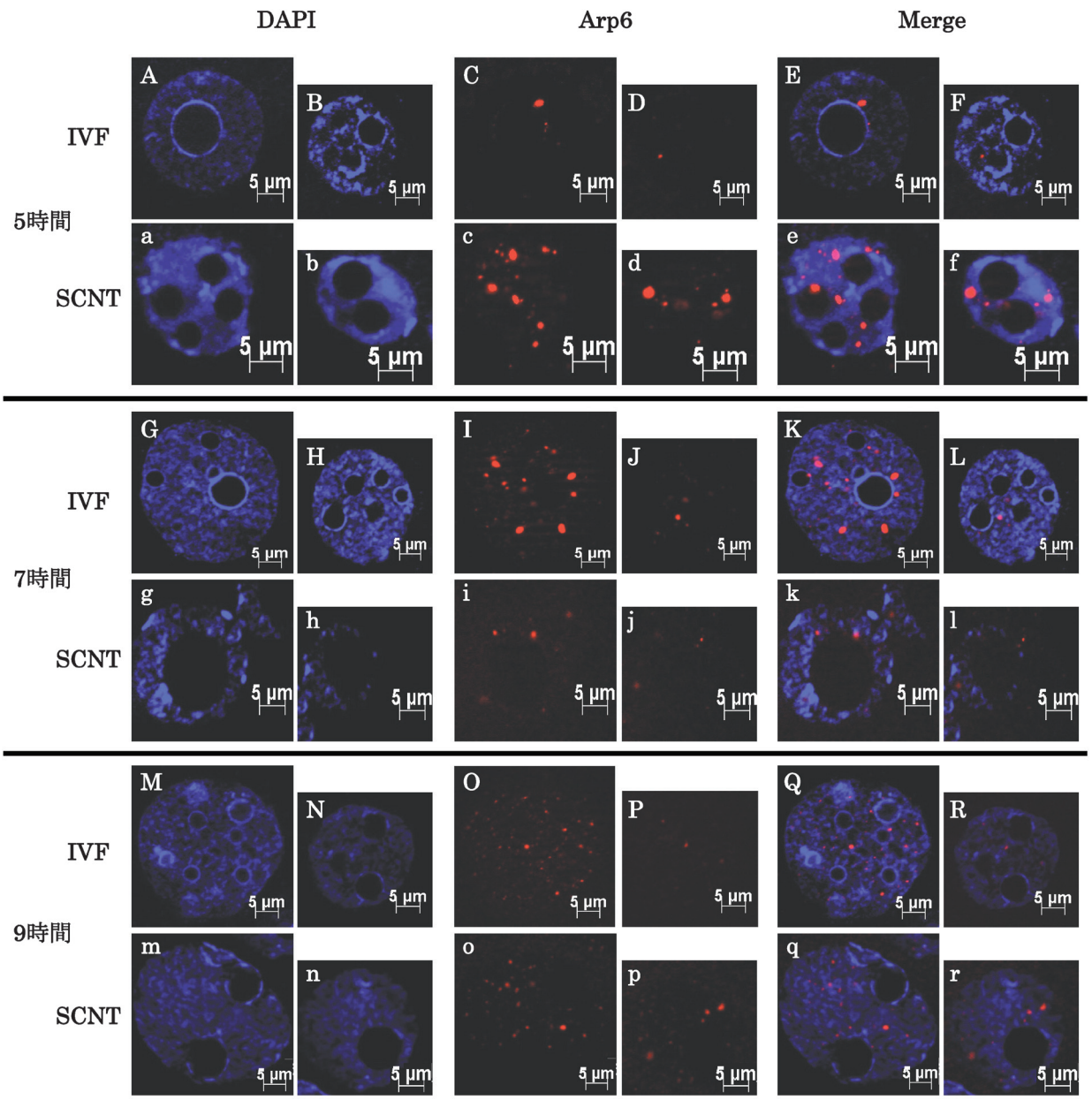


図 1．体外受精卵および核移植由来卵子における Arp6 の免疫組織化学的解析．（A ～ R）体外受精（IVF）卵前核．（A, C, E, G, I, K, M, O, Q）雄性前核．（B, D, F, H, J, L, N, P, R）雌性前核．（a ～ r）体細胞核移植（SCNT）卵子．SCNT 卵子の核は、2 前核様構造が形成されたものを示している．Arp6 は、体外受精媒精後 5 時間ならびに細胞注入後 5 時間で核内、特にユークロマチン領域でドット状に局在した。Arp6 の発現は、IVF 卵では雌性前核（D, J, P）よりも雄性前核（C, I, O）での発現が強かった。SCNT 卵子については、2 前核様構造の間で Arp6 の局在に顕著な差はみられなかった。

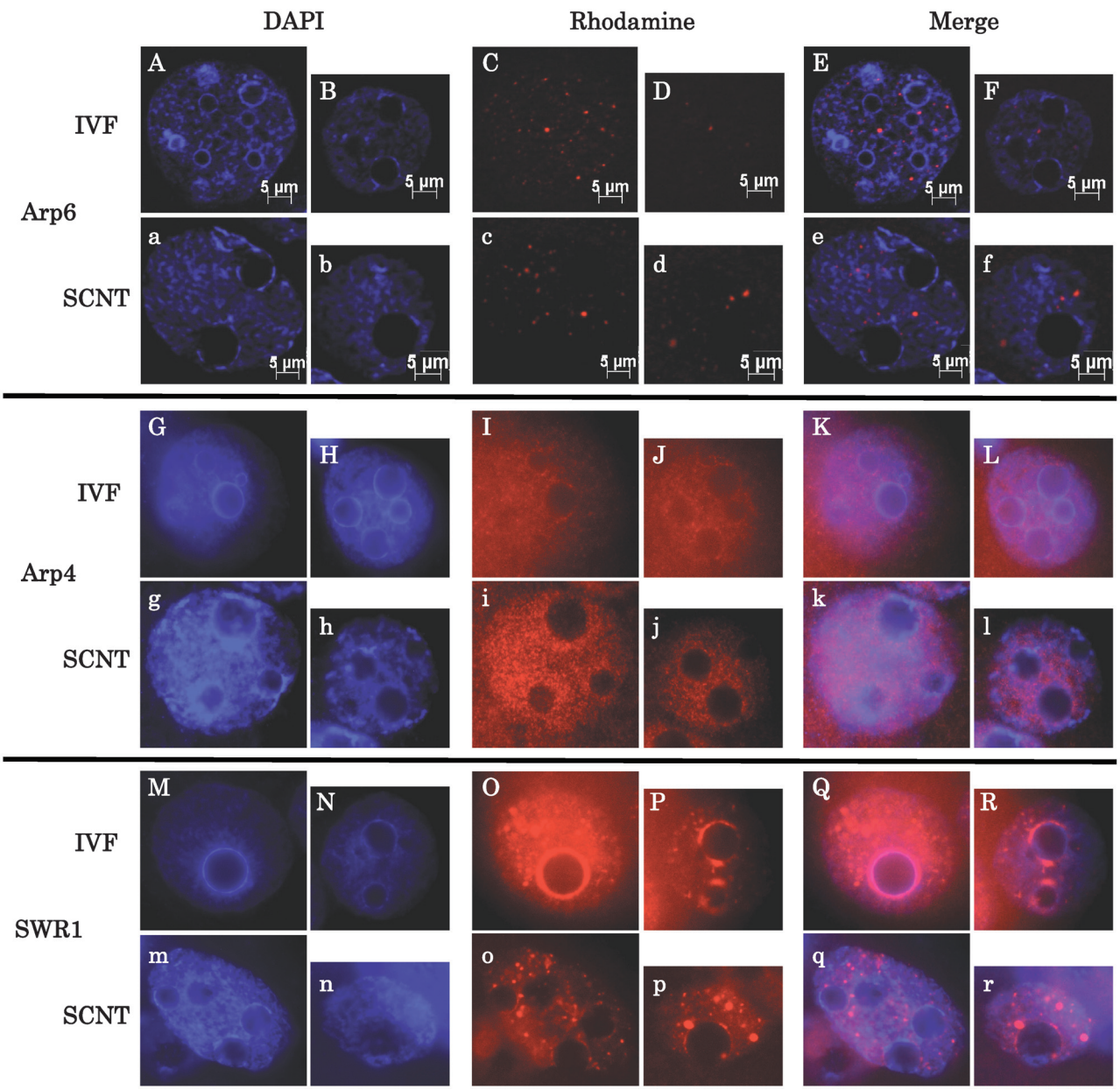


図２．体外受精卵および核移植由来卵子における Arp6、Arp4、SWTR1 の免疫組織化学的解析.

（A ～ R）体外受精（IVF）卵前核（媒精後 9 時間）.（A, C, E, G, I, K, M, O, Q）雄性前核.（B, D, F, H, J, L, N, P, R）雌性前核.（a ～ r）体細胞核移植（SCNT）卵子（細胞注入後 9 時間）. SCNT 卵子の核は、2 前核様構造が形成されたものを示している. Arp6（A ～ F, a ～ f）については、図 1（M ～ R, m ～ r）を参照。Arp4（G ～ L, g ～ l）は、IVF 卵、SCNT 卵子ともに核内に存在し、ヘテロクロマチン領域への局在がやや多くみられた。SWR1 は、IVF 卵、SCNT 卵子ともに核内にドット状に存在した。IVF 卵では特に核小体辺縁部のリング状のヘテロクロマチン領域への強い局在がみられた。一方、SCNT 卵子では核小体辺縁部のヘテロクロマチン領域の形成が不均一であり、SWR1 の局在も不均一であった。

考　察

受精卵において、雌性前核に比べ雄性前核での Arp6 の発現が高かったことは（図 1, M ～ R）、核内構造制御タンパク質が、受精後の雌雄前核での脱メチル化などの過程を制御している可能性を示唆していると考えられる。

核移植由来卵子において DAPI 染色でリング状に濃染される核小体辺縁部のヘテロクロマチン領域が、受精卵と比較して不均一であった。また、Arp4（I, J, i, j）、SWR1（O, P, o, p）において、核移植由来卵子の核小体辺縁部での局在が不均一であった。このことから、受精卵と核移植由来卵子でのクロマチン領域形成の違いにより、Arp4 や SWR1 の局在が変化し、このような違いが核移植由来卵子での不完全な核のリプログラミングに反映されている可能性が考えられた。

Arp6 と SWR1 は核内全体でドット状の発現が見られたが、Arp4 は核内で均一に発現していた(I, J, i, j)。Arp4 は、INO80 や BRM といった様々な複合体の構成因子として機能しているため [20]、Arp4 を構成因子として存在するその他のクロマチンリモデリング因子についても解析が必要である。

また、SWR1 複合体は、ヌクレオソームのヒストンタンパク質 H2A をそのバリアントである H2A.Z に置換させる。ヒストン H2A.Z は、ヒストン H3.3 と協同してクロマチン構造の弛緩を引き起こすことから、ヒストン H2A.Z が存在する領域では活性化した遺伝子が多く存在する [21]。したがって、今後、受精卵および核移植卵子における SWR1 複合体とヒストン H2A.Z によるクロマチン構造の制御について解析する必要がある。

外見上正常に産まれてくるクローンマウスの胎盤はほとんどの場合肥大し、遺伝子の発現にも多くの異常がみられる [22]。またクローンマウス新生仔期の脳、肝臓、腎臓で、10% から 40％の遺伝子が 2 倍以上の発現量の増加あるいは減少を示し、通常の生殖による個体での 3% 程度のばらつきと比較してクローンマウスの遺伝子発現パターンは、個体によって大きな乱れが見られることが報告された [23]。このような遺伝子発現の乱れには、染色体上の近くに存在する遺伝子がそろって影響を受けているものも見られ、クローンマウスの核内構造の異常による遺伝子発現への影響が関連している可能性がある。このことから、核移植卵子におけるクロマチンリモデリング因子の解析は、核のリプログラミング機構を解明するうえできわめて重要であると考えられる。

今後、ドナー細胞における Arp6、Arp4、SWR1 の局在の解析と、受精卵および核移植由来卵子でのヒストン H2A.Z ならびにその他のクロマチンリモデリング因子に関する解析を進めることにより、核移植における体細胞核のリプログラミング機構を解明する手がかりをつかめるのではないかと考えられる。

引 用 文 献

1．Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385, 810 – 813. 1997.

2．Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science 282, 2095 － 2098. 1998.

3．Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. Nat. Biotechnol. 17,456-461, 1999.

4．Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC. Pig cloning by

microinjection of fetal fibroblast nuclei. Science 289, 1188-1190, 2000.
5． Chesné P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nat. Biotechnol. 20, 366-369, 2002.
6． Choi YH, Love CC, Chung YG, Varner DD, Westhusin ME, Burghardt RC, Hinrichs K. Production of nuclear transfer horse embryos by Piezo-driven injection of somatic cell nuclei and activation with stallion sperm cytosolic extract. Biol. Reprod. 67, 561-756, 2002.
7． Shin T, Kraemer D, Pryor J, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M. A cat cloned by nuclear transplantation. Nature 415,859, 2002.
8． Zhou Q, Renard JP, Le Friec G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. Science 302, 1179. 2003.
9． Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. Science 301, 1063, 2003.
10. Lee BC, Kim MK, Jand G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hossein MS, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. Dogs cloned from adult somatic cells. Nature 436, 641, 2005.
11. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature 394, 369-74, 1998.
12. Wakayama T, Yanagimachi R. Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. Reproduction 122, 49-60, 2001.
13. Boiani M, Eckardt S, Leu NA, Scholer HR, McLaughlin KJ. Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation? EMBO J. 22, 5304-12, 2003.
14. Kishigami S, Bui HT, Wakayama S, Tokunaga K, Van Thuan N, Hikichi T, Mizutani E, Ohta H, Suetsugu R, Sata T, Wakayama T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. Biochem. Biophys. Res. Commun. 340, 183-189. 2005
15. Zhao K, Wang W, Rando OJ, Xue Y, Swiderek K, Kuo A, Crabtree GR. Rapid and phoshoinositol-development binding of the SWI/SNF-like ZBAZF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. Cell 95, 625-636, 1998.
16. Kobor MS, Venkatasubrahmanyam S, Meneghini MD, Gin JW, Jennings JL, Link AJ, Madhani HD, Rine J. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. Science 303, 343-348, 2004
17. Wong MM, Cox LK, Chrivia JC. The Chromatin remodeling protein, SRCAP, is critical for deposition of the histone variant H2A.Z at promoters. J. Biol. Chem. 36, 26132-26139, 2007.
18. Kato M, Sasaki M, Mizuno S, Harata M. Novel actin-related proteins in vertebrates: similarities of structure and expression pattern to Arp6 localized on Drosophila heterochomatin. Gene 268, 133-140, 2001.
19. 豊田裕 マウス卵子の体外受精に関する研究Ⅰ、精巣上体精子による受精成績 . 家畜繁殖誌 . 16-147-151
20. Kawashima S, Ogiwara H, Tada S, Harata M, Wintersberger U, Enomoto T, Seki M. The INO80 complex is required for damage-induced recombination. Biochem. Biophys. Res. Commun. 355, 835–841, 2007.
21. Jin C, Felsenfeld G. Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. Genes Dev. 21, 1519-1529, 2007.

22. Kohda T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Naruse M, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F. Variation in gene expression and aberrantly regulated chromosome regions in cloned mice. Biol. Reprod. 73, 1302-1311, 2005.

23. Inoue K, Kohda T, Lee J, Ogonuki N, Mochida K, Noguchi Y, Tanemura K, Kaneko-Ishino T, Ishino F, Ogura A. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. Science 295, 297, 2005.

英 文 要 旨

Expression of the proteins involved in the formation of nuclear and chromatin structures in mouse somatic cell nuclear transfer eggs

Yui Nishiyama[1], Masahiro Morita[2], Masayuki Anzai[3], Hiromi Kato[3], Yoshihiko Hosoi[1,2,3], Tasuku Mitani[3], Akira Iritani[2,3],

Abstract

Since the first cloned sheep, "Dolly", has been created by somatic nuclear transfer (SCNT) by Wilmut and his colleagues, various kinds of mammalian species has been cloned using this technique. Although it has now been more than a decade since the birth of Dolly, cloning efficiency has still been quite low. Recently, studies on molecular kinetics in the living cells and chromatin dynamics have provided evidences that the nuclear architecture is important for genome function. It has been shown that actin-related proteins (Arps) are essential components of various chromatin remodeling and histone modification complexes and have been shown to contribute to the organization and regulation of chromatin structures. In this study, we examined the expression and localization of the components of SWR1 chromatin remodeling complex, Arp4, Arp6 and SWR1, in the in vitro fertilized eggs and SCNT eggs from cumulus cells using fluorescence immunohistochemistry. We demonstrated that Arp6 appeared sparsely in euchromatin region both in the fertilized and SCNT eggs. But the expression pattern of Arp4 and SWR1 proteins was different between the fertilized and SCNT eggs probably due to the difference of heterochromatin structures surrounding nucleoli. These results indicate the possibility that the differences of nuclear architecture or of localization of nuclear proteins which act on nuclear organization and chromatin remodeling may trigger off the aberrant nuclear reprogramming of the SCNT eggs.

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan.
2. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan.
3. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama 642-0017, Japan.