

初期 G1 期細胞によるウシ核移植胚における DNA のメチル化レベルの検討

岩本 太作¹、中本 善之²、笠松 礼¹、立溝 篤宏¹、
谷口 俊仁^{1,3}、細井 美彦^{1,2,4}、松本 和也^{1,2,4}、出田 篤司⁵、
浦川 真実⁵、青柳 敬人⁵、入谷 明^{1,2,4}、佐伯 和弘^{1,2,4}

要 約

体細胞核移植技術による核移植 (NT) 胚の産子作出効率はいまだ低い。この原因の 1 つとして NT 胚の不十分な DNA の脱メチル化が関係していると考えられている。最近、ドナー細胞として分裂直後の初期 G1 期細胞を用いることで、血清飢餓培養により得た G0 期細胞による NT 胚 (G0-NT 胚) よりも産子作出効率が向上することが報告された。そこで本研究では、eG1 期細胞による NT 胚 (eG1-NT 胚) では、ゲノム全体の DNA メチル化の状態を免疫染色法により調べた。ウシ胚では、8 細胞期に DNA のメチル化レベルが低下することが知られている。このため、本研究では、8 細胞期の G0-NT 胚および eG1-NT 胚の DNA のメチル化の状態を抗 5-メチルシトシン抗体により体外受精胚 (IVF 胚) と比較した。その結果、G0 期あるいは eG1 期のドナー細胞の違いに関わらず、NT 胚の DNA のメチル化レベルは、IVF 胚よりも高かった ($P < 0.05$)。さらに、eG1-NT 胚の DNA のメチル化レベルは G0-NT 胚よりも低かった ($P < 0.05$)。以上より、eG1-NT 胚の 8 細胞期での DNA のメチル化レベルが G0-NT 胚よりも低いことが産子作出効率に関係していると思われる。

緒 論

哺乳動物で初めて報告された分化した体細胞に由来するクローンヒツジは、血清飢餓培養により細胞周期を G0 期に誘導した体細胞を除核未受精卵子に核移植することで作出された [1]。G0 期の細胞は、転写や翻訳が抑制されていることから様々なシグナルにตอบสนองしやすいので [2]、体細胞核移植 (NT) のドナー細胞として G0 期細胞が広く用いられてきた [3, 4]。

ウシ胚は、その発生初期の 8 細胞期にゲノム DNA が低メチル化の状態となっている。しかし、ウシ NT 胚は 8 細胞期において不完全な脱メチル化によりウシ胚と比べて十分に低メチル化されていないことが報告されている [5]。この NT 胚での不十分な脱メチル化が NT 胚の産子作出効率が極めて低い原因の一つになっているのではないかと考えられている [5]。一方で、最近、核ドナー細胞として培養細胞が分裂した直後の初期 G1 期細胞を用いると NT 胚 (eG1-NT 胚) の産子への発生率が向上したことが報告されている [6, 7]。しかしながら、eG1-NT 胚での DNA のメチル化などのエピジェネティックな修飾については十分検討されていない。

本研究では、血清飢餓培養により得た G0 期細胞による NT 胚 (G0-NT 胚) および eG1-NT 胚を、抗 5-メチルシトシン (5MeC) 抗体を用いた免疫染色法により調べ、ゲノム全体の DNA のメチル化状態を体外受精胚 (IVF 胚) と比較検討した。

材料と方法

除核卵子の調整

食肉処理場にて採取したウシ卵巣の直径 2 ~ 8mm の卵胞から卵丘細胞卵子複合体 (COCs) を採取した。COCs を 10 個ずつ、パラフィンオイル下の 50 μ l の 5% 胎子ウシ血清 (FBS, Bio west, Paris, France)、0.5 mM ピルビン酸ナトリウム (ナカライテスク)、0.02 AU/ml 卵胞刺激ホルモン (FSH, アントリン, 川崎三鷹製薬) および 1 μ g/ml エストラジオール 17- β (Sigma, St. Louis, MI, USA) を添加した TCM-199 (Earle's salts, Gibco, Grand Island, NY, USA) に導入し、炭酸ガスインキュベーター (39 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 95% 空気、飽和湿度) 内で 21 時間成熟培養を行った。成熟培養後、COCs を 0.25% (w/v) ヒアルロニダーゼ (Sigma) を含む 5% FBS 添加 TCM-199 (Hank's salts, 199H-FBS) に移し、ピペッティングにより卵丘細胞を除去した。裸化された卵子から倒立顕微鏡下で第一極体を放出した成熟卵子のみを選別し、マイクロマニピュレーターを用いて第一極体付近の透明帯を切開した。これら卵子を 5 μ g/ml サイトカラシン B (Sigma) を添加した 199H-FBS に移し卵細胞質の一部を透明帯切開部位から押し出すことで除核した [8]。押し出された卵細胞質を 20 μ g/ml hoechst 33342 (Sigma) で染色し、蛍光顕微鏡下で核体の有無を調べることによって卵子の除核を確認した。

ドナー細胞の調整

黒毛和種のオス子ウシ耳介より採取した組織を 10% FBS を添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM、日水製薬) 中で 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95% 空気、飽和湿度下で培養し、コンフルエントな単層の繊維芽細胞を得た。これら細胞を 4 代以上継代培養し、コンフルエントな細胞を 0.4% FBS 添加 DMEM で 7 日間培養 (血清飢餓培養) することで、G0 期細胞とした。

eG1 期への同期化は、Urakawa らの方法 [7] に従い、Shake-off 法により分裂期 (M 期) の細胞を回収、培養することで得た。すなわち、増殖期の細胞を分裂阻害剤である 1 μ M 2-Methoxyestradiol (Sigma) を含む 10%FBS 添加 Minimam Essential Medium α (α -MEM; Gibco) で 30-40 分間培養し、培養皿をボルテックスで振盪した。上澄みを捨て、再度培養液を加え同様の処理を行った。この作業を 3 回繰り返し、3 回目の振盪後の培養上清に浮遊した細胞を遠心沈殿させ、M 期細胞を含む懸濁液を得た。この懸濁液から直径 20 μ m の細胞のみを回収した。回収した細胞は、10% FBS- α -MEM で 2 時間培養し、分裂した細胞を eG1 期細胞として得た。

得られた G0 期および eG1 期細胞は、塩化マグネシウムおよび塩化カルシウムを含まない Dalbecco's リン酸緩衝液 (D-PBS (-), Gibco) で洗浄した後、0.04% EDTA (ナカライテスク) および 0.25% トリプシン (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を含む D-PBS (-) に移し、39 $^{\circ}$ C で 2 分間インキュベートすることで細胞を単離した。これら単離された G0 期および eG1 期細胞細胞をドナー細胞として用いた。

体細胞核移植胚の作製

単離された G0 期および eG1 期細胞をそれぞれパラフィンオイル下の 2 μ l の 10% ポリビニルピロリドン (PVP, M.W. 360.0, ナカライテスク) を添加した D-PBS (-) に導入した。除核した卵子は別の 2 μ l の 199H-FBS に移し、マイクロマニピュレーターを用いて体細胞を 1 個ずつ除核卵子の卵胞腔内に導入した。これら胚を Zimmerman 細胞融合液 [9] に導入し、微小電極で挟み、細胞融合装置 (ECM200, BTX, San Diego, CA, USA) を用いて、直流 2.7 kV/cm、11 μ sec を 2 回印加することで除核卵子和導入した体細胞とを電氣的に融合して NT 胚を作製した。

活性化処理および体外培養

作製したNT胚を100 μ lの5 μ M Ca^{2+} イオノマイシン (Sigma) および0.1%ポリビニルアルコール(PVA, Sigma) を添加した Dalbecco's リン酸緩衝液 (D-PBS (+), Gibco) 内に移し、暗所で5分間暴露した。その後、10 μ g/ml シクロヘキシミド (Sigma) を添加した修正合成卵管液 (修正 SOF, [10]) 内に移し、39°C、5% CO_2 、5% O_2 、90% N_2 、飽和湿度のインキュベーター内で6時間インキュベートすることで、活性化処理を行った。活性化処理したNT胚を修正 SOF に移し、2回洗浄した後、胚をパラフィンオイル下の50 μ lの修正 SOF に20~30個ずつ移し、39°C、5% CO_2 、5% O_2 、90% N_2 、飽和湿度のインキュベーター内で融合後60時間まで体外培養した。

体外受精

体外受精は、Nagao ら [11] に従った。受精用培養液は、defined medium (DM, [12]) からグルコースを除去し、ペニシリンに変えて1% (v/v) 抗生物質-抗真菌剤溶液を添加した修正受精用培養液 (修正 DM) を用いた [11]。精子は、黒毛和種の凍結精液を用いた。凍結精液を融解し、パーコール溶液による不連続密度勾配法 [13] により精子の洗浄を行った。一方、COCs をパラフィンオイル下のヘパリン (Sigma) を含む修正 DM に10個ずつ導入した。そこに精子懸濁液を精子の最終濃度が 1×10^6 sperm/ml、ヘパリンの最終濃度が10 μ g/ml となるように導入し、39°C、5% CO_2 、95% 空気、飽和湿度下で18時間培養した。授精後、卵子に付着した精子および卵丘細胞を5分間のボルテックスおよびピペッティングで除去し、NT胚と同様の条件下で培養した。

抗5-メチルシトシン (5-MeC) 抗体を用いたメチル化シトシンの免疫染色

8細胞期に発生したG0-NT胚、eG1-NT胚およびIVF胚を、0.1%PVAを含むD-PBS (-) (PBS-PVA) で洗浄した後、3分間0.05% Trironx-100 (Sigma) を含むPBS-PVAで前透過処理を行った。その後、4% パラホルムルデヒド (ナカライテスク) を含むPBS-PVAに胚を移し4°Cで固定した。固定された胚は4°Cの1% Triton X-100 を含むPBS-PVAで一晩透過処理を行った後、室温で1時間2 N HClに移し、胚のDNAを変性させた。さらに、中和のために100 mM Tris · HCl buffer (pH 8.5) に10分間浸した [5]。ついで0.1% Tween-20 (Sigma) および2% BSAを添加したD-PBS (-) に室温で1時間静置してブロッキング処理を行った。

一次抗体は、0.05% Tween-20を含むD-PBS (-) (Tw-PBS) を用い10,000倍希釈して使用した。胚をTw-PBSで数回洗浄した後、一次抗体溶液に侵漬し、4°Cで一晩反応させた。一次抗体の洗浄後、二次抗体反応はTw-PBSで1,000倍希釈した溶液で1時間遮光下にて反応させた。その後、二次抗体をTw-PBSで洗浄した。核の染色は、100 μ g/ml ribonuclease A (RNase A; Roche) で37°Cで30分間、RNAを分解した後、Propidium iodide (PI; Sigma) を用いて30分間室温で染色した。胚は、Tw-PBSにて数回洗浄した後、蛍光顕微鏡用スライドガラス上にベクタシールド (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) で封入した。本実験では、一次抗体には、抗5-メチルシトシン抗体 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) を、二次抗体には Alexa fluor 488 標識された抗マウス IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた。

共焦点レーザー顕微鏡による観察およびDNAメチル化レベルの解析

免疫染色後の胚の観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS NT, Leica) を用いて Alexa fluor 488 による5-MeC およびPIによるシグナルを検出し、それぞれの画像として取得した。各画像の Alexa fluor 488 およびPIのシグナル量を画像解析ソフト Aqua Cosmos (浜松ホトニクス) を用いて定量し、PIのシグナル量を1とした Alexa fluor 488 の相対的シグナル量を算出することで、各胚の割球でのDNAのメチル化レベ

ルを数値化した。

統計学的検定

得られたデータは分散分析 (ANOVA) した後、Bonferroni and Dunn による多重比較を行った (Stat View Ver. 5.0 SAS Institute)。

結 果

IVF 胚、G0-NT 胚及び eG1-NT 胚のゲノム全体の DNA のメチル化状態を抗 5MeC 抗体を用いた免疫染色の結果、IVF 胚の 5MeC のシグナルは、G0-NT 胚及び eG1-NT 胚の NT 胚に比べ弱かった (図 1)。

さらに、画像解析ソフトにより相対的な DNA のメチル化レベルを算出した。その結果、G0-NT 胚及び eG1-NT 胚のゲノム全体の DNA のメチル化レベルは、IVF 胚よりも高かった。また、eG1-NT 胚の DNA のメチル化レベルは、G0-NT 胚よりも低かった (図 2)。

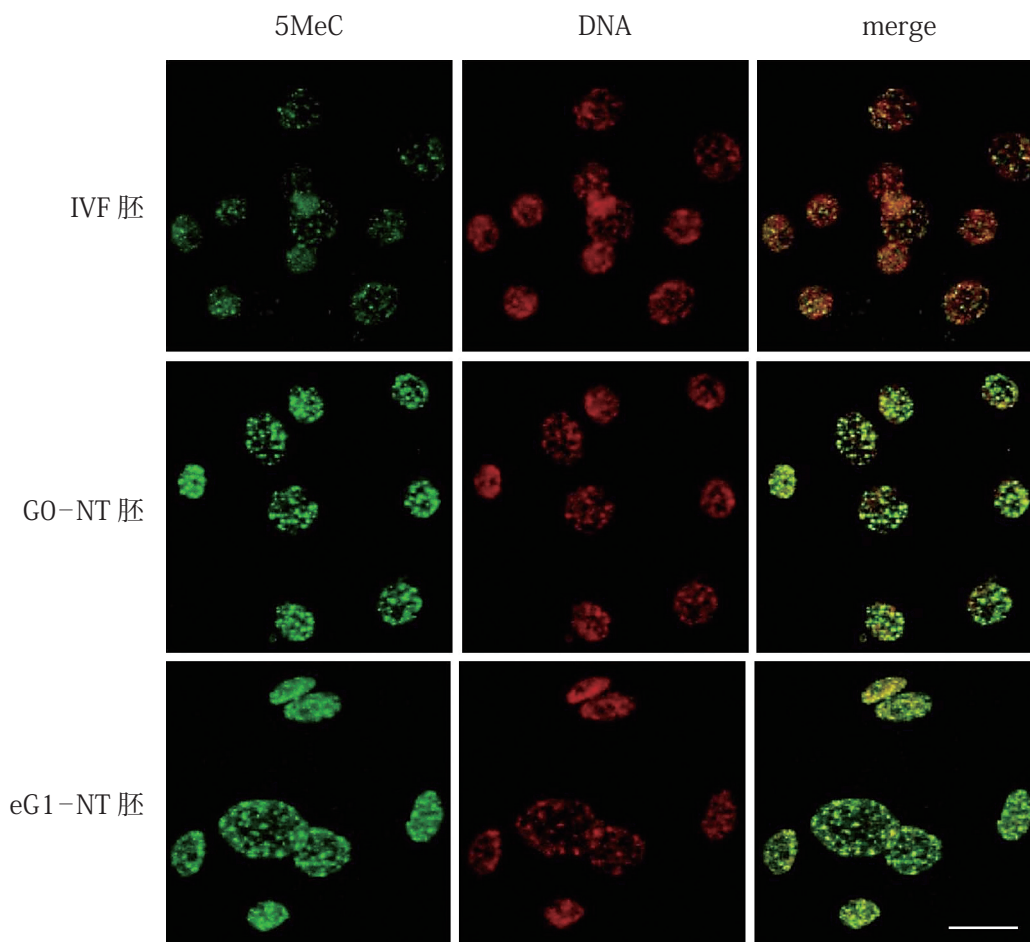


図 1. 抗-5MeC 抗体を用いた IVF 胚、G0-NT 胚および eG1-NT 胚の免疫蛍光染色像

8 細胞期に発生した IVF 胚、G0-NT 胚及び eG1-NT 胚を用いた。

IVF 胚；体外受精胚、G0-NT 胚；G0 期細胞による核移植胚、eG1-NT 胚；初期 G1 期細胞による核移植胚。

5MeC；抗-5MeC 抗体を用いて免疫染色し、Alexa Fluor 488 標識二次抗体を用いて可視化した (緑色)。DNA；PI を用いて DNA を染色した (赤色)。スケールバーは 40 μm で示した。

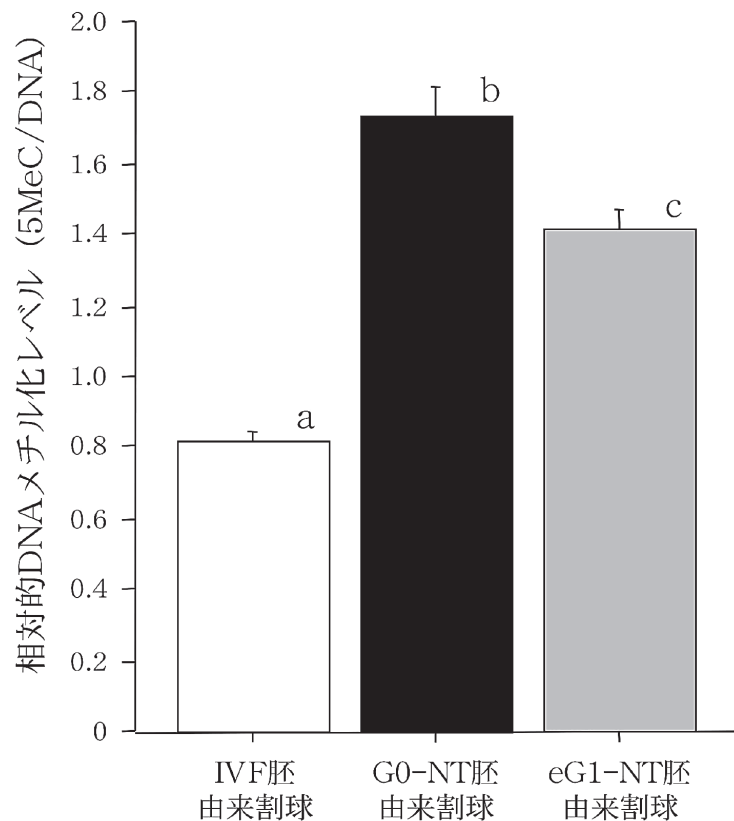


図2. IVF 胚、G0-NT 胚および eG1-NT 胚の相対的な DNA メチル化レベル
DNA のメチル化および DNA の染色像を画像解析ソフトにより Alexa Flour 488 および PI の蛍光シグナルを計測し、Alexa Flour 488 のシグナル量を PI のシグナル量で除じた値を相対的メチル化レベルとして表した。IVF 胚は白色、G0-NT 胚は黒色、eG1-NT 胚は灰色で示した。a, b, c ; 有意差あり (P<0.05)。

考 察

哺乳動物の胚の初期発生におけるゲノム全体の DNA のメチル化は、発生に伴い大きく変化することが報告されている [5, 14]。精子および卵子のゲノムは元来固有のメチル化状態を有するが、精子ゲノムは受精直後に急激な能動的脱メチル化を受ける [15, 16]。一方で、卵子ゲノムでは、8 細胞期胚まで受動的な脱メチル化を受ける。このことで 8 細胞期胚のゲノム全体が低メチル化状態となることが明らかにされている [5, 14]。それに対して、ウシ NT 胚のゲノムでは、十分に脱メチル化されず、4 細胞期から再メチル化が起こることが示されている [5, 14]。本研究において、G0 および eG1 期のいずれの細胞でも 8 細胞期のウシ NT 胚でのゲノム全体の DNA のメチル化レベルは受精により得た胚よりも高いことが示された。この結果は、これまでの報告 [5, 14] と同様であった。eG1-NT 胚の DNA メチル化レベルを G0-NT 胚と比較したところ、eG1-NT 胚で低いことが示された。このことから、eG1-NT 胚の産子作出効率が低い原因の 1 つとして 8 細胞期胚での DNA のメチル化レベルが G0-NT 胚よりも低いことが考えられた。今回の研究では、eG1-NT 胚が G0-NT 胚よりも能動的に脱メチル化されやすかったのか、あるいはドナー細胞である eG1 期細胞のメチル化レベルが G0 期細胞よりも低かったことによるものなのかは明らかではない。従って、今後、ドナー細胞のメチル化レベル、さらに初期発生過程での NT 胚のメチル化レベルの推移についても検討する必要があると思われる。

参考文献

- 1 . Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385: 810–813.
- 2 . Campbell KH. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning*. 1999; 1: 3–15.
- 3 . Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev*. 1998; 10: 369 – 378.
- 4 . 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*. 1998; 282: 2095–2098.
- 5 . Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 13734–13738.
- 6 . Kasinathan P, Knott JG, Wang Z, Jerry DJ, Robl JM. Production of calves from G1 fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2001; 19: 1176–1178.
- 7 . Urakawa M, Ideta A, Sawada T, Aoyagi Y. Examination of a modified cell cycle synchronization method and bovine nuclear transfer using synchronized early G1 phase fibroblast cells. *Theriogenology*. 2004 ;62: 714–728.
- 8 . Kasamatsu A, Saeki K, Tamari T, Iwamoto D, Tatemizo A, Matsumoto K, Hosoi Y, Iritani A. Timing and uniformity of embryonic gene activation affect subsequent pre-implantation development of cloned bovine embryos. *J Reprod Dev*. 2007; in press.
- 9 . Robl JM, Prather R, Barnes F, Eyestone W, Northey D, Gilligan B, First NL. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J Anim Sci*. 1987; 64: 642–647.
10. Saeki K, Nagao Y, Kishi M, Nagai M, Iritani A. Timing of completion of the first meiotic division in bovine oocytes after maintenance of meiotic arrest with cycloheximide and their subsequent development. *J Vet Med Sci*. 1998; 60: 523–526.
11. Nagao Y, Saeki K, Hoshi M, Kainuma H. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. *Theriogenology*. 1994; 41: 681–687.
12. Brackett BG, and Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod*. 1975; 12: 260–274.
13. Saeki K, Hoshi M, Leibfried–Rutledge ML, First NL. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod*. 1991; 44: 256–260.
14. Santos F, Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction*. 2004; 127: 643–651.
15. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*. 2000; 403: 501–502.
16. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*. 2002; 241: 172–182.

英文要旨

DNA methylation levels in cloned bovine embryos with early G1 cells

Daisaku Iwamoto¹, Yoshiyuki Nakamoto², Aya Kasamatsu¹, Atsuhiko Tatemizo¹,
Shunji Taniguchi^{1,3}, Yoshihiko Hosoi^{1,2,4}, Kazuya Matsumoto^{1,2,4}, Atsushi Ideta⁵,
Manami Urakawa⁵, Yoshito Aoyagi⁵, Akira Iritani^{1,2,4}, and Kazuhiro Saeki^{1,2,4}

Although cloning by somatic cell nuclear transfer (NT) has achieved in various mammalian species, its efficiency has been extremely low. Recently, enhanced development to full-term was obtained with NT embryos with bovine early G1 cells rather than NT embryos with serum starved (G0) cells. In this study, we examined genome-wide DNA methylation of cloned bovine embryos with early G1 cells by immunostaining technique with an antibody to 5-methyl cytosine. Somatic cell nuclear transfer embryos were produced by bovine enucleated matured oocytes electrofusing with bovine G0- or eG1-phase fibroblasts. Levels of DNA methylation of the NT embryos both with G0 or eG1 cells were compared to those of in-vitro fertilized embryos at 8-cell stage. Our results indicated that regardless of the donor cell type, greater relative levels of DNA methylation were observed in NT embryos than those of IVF embryos. However, the relative levels of DNA methylation of eG1-NT embryos were lower than those of G0-NT embryos. Thus, eG1-NT embryos were genome-widely hypomethylated compared with G0-NT embryos. These results suggest that a possible reason of the high success rate of eG1-NT embryos may be due to their lower methylation levels than those of G0-NT embryos at 8-cell stage.

1. Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

2. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

3. Wakayama Industry Promotion Foundation, Wakayama, 640-8227, Japan

4. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama, 649-0017, Japan

5. ZEN-NOH Embryo Transfer Center, Kamishihiro, Hokkaido, 080-1407, Japan