

マウス核移植技術の新しい実用化
および応用に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士(農学)学位論文

上 村 悟 氏

目次

第 1 章 緒言	3
第 2 章 核移植技術を用いたクローン動物の新たな作成法の開発 -微量末梢血に由来する血球細胞核移植クローンマウスの作成について-	
.....	7
2.1. 緒言	7
2.2. 材料と方法	8
2.3. 結果	12
2.4. 考察	16
図および表	21
第 3 章 核移植技術を用いた発生に関わる エピジェネティクス観察のモデル開発 -マウス前精原細胞核移植クローンによる父性インプリント確立について-	
.....	29
3.1. 緒言	29
3.2. 材料と方法	32
3.3. 結果	36
3.4. 考察	42
図および表	48
第 4 章 総論	67
第 5 章 謝辞	72
第 6 章 参考文献	73

第 1 章

緒言

核移植技術の進展は両生類を使った研究から始まった。1952 年、Briggs と King はカエル（アフリカツメガエル）を用いて、発生の各時期の細胞核を、核を除去した卵子（除核卵子）に移植する実験を行った。その結果、ある発生ステージまでの体細胞核を除核卵子に移植しても正常に発生して成体にまで達するが、発生の進んだ胚の体細胞核を移植すると、次第にその発生能力が失われてゆくことが明らかとなった[Briggs and King, 1952]。発生初期の細胞核であれば分化可逆性を有しているが、発生が進んだ細胞は不可逆性を有しているように思われた。しかし、Gurdon はオタマジャクシの小腸上皮細胞核を除核卵子に移植した結果、成体まで育てることに成功し、完全に分化した成体の細胞でも分化可逆性を有していることが明らかとなった[Gurdon, 1962]。ここで重要なことは、Briggs と King によって開発・発展させた核移植技術によって、「ゲノムリプログラム」という重要な知見を得たことである。その後長い時を経て、ヒツジに続き[Wilmut *et al.*, 1997]、マウスでも体細胞核移植クローンが報告されるに至った[Wakayama *et al.*, 1998]。

核移植技術の源流はその生物学的な興味によるものであると推察される。Briggs と King、Gurdon らの実験は前述の通り、細胞が持つ分化可逆性を証明するために核移植を用いた。核移植技術の有用な点は、生物学的特性を調べるためだけでなく、その副産物としてクローン動物が作成できることにもある。クローン動物はドナーとして用いた個体の遺伝的に均一なコピーである。その結果、核移

植の応用利用として、再生医療、生物製剤の作成、畜産、種の保存等が可能である。

近年、ゲノム DNA やヒストンなどのタンパク質から構成されるクロマチンの化学的または構造的な修飾による遺伝子発現制御機構の存在が知られるようになってきた [Reik and Walter, 2001]。このような制御をエピジェネティクス (epigenetics) と言い、発生過程で確立され、この多様なマークに沿って遺伝子発現が複雑に制御されている。哺乳類における初期胚や生殖細胞発生では、このエピジェネティクスがダイナミックに変化することが知られている [Hackett *et al.*, 2012; Sasaki and Matsui, 2008; Surani *et al.*, 2007]。特にマウスは、遺伝的に純化した近交系や遺伝子改変系統の存在、多様な解析ツール、これまでに蓄積されてきた様々な知見などの理由により、エピジェネティクス研究に広く用いられており、X 染色体不活性化機構 [Augui *et al.*, 2011]、前述のゲノムプログラミング [Buganim *et al.*, 2013; Zhou and Dean, 2014]、遺伝子疾患や癌などの発症機構 [Dawson *et al.*, 2012; Portela *et al.*, 2010]などで重要な知見をもたらしてきた。なかでも、エピジェネティクスメカニズムの一つとして知られるゲノムインプリンティングの解明において、マウスは重要な役割を果たしてきた。ゲノムインプリンティングは真獣哺乳類において、特定の親由来アレルで遺伝子発現を保証するためのメカニズムである [Kaneko-Ishino *et al.*, 2003; Reik and Walter, 2001]。インプリント遺伝子は両親アレルで非均等な片親性発現を示し、これは両親アレルのうちいずれかに付加されたエピジェネティックマークによって引き起こされることが知られている。このゲノムインプリンティング研究にマウスが用いられている重要な点の一つは、近交系と野生由来系統のアレル間の一塩基多型 (single nucleotide

polymorphism ; SNP) を解析することにより、精子由来の父性アレルと卵子由来の母性アレルを区別できるため、これによってアレル間の制御機構を詳細に観察することが出来る。さらに、マウスと核移植技術の組み合わせはエピジェネティクス研究において強い利点になると考えられる。通常、核酸を用いた解析を実施するとき、核酸量が十分量存在しないと、技術的に困難な上、正確な情報をもたらすことは難しい。ゲノム状態を解析する広く知られた既存の方法（例えば定量 RT-PCR、DNA メチル化解析、CHIP シークエンスなど）を、単一細胞に利用するには現在のところ制限がある。これを打破できるのが核移植である。単一細胞をドナーとして用いた核移植由来胚は、ドナー細胞のエピゲノム情報を（ある程度）保持したまま発生し、この胚は均一なエピゲノムを有する核酸を十分に保持していると考えられる。ゲノムインプリンティングにおいては、体細胞核移植クローン胚でインプリント遺伝子の片親性発現が適切に維持され、インプリント記憶が核移植によるリプログラミングによって乱されないことが示されている [Inoue *et al.*, 2002]。よって、ゲノムインプリンティング研究にマウスを用いた核移植技術を用いることで、単一細胞ゲノムのインプリント状態を詳細に解析することが可能となる。

以上から、核移植技術は実用目的、エピジェネティクス研究の目的のためにも強力なツールであると考えられる。そこで本研究では、これまでのマウス核移植クローン技術よりもさらに実用的に用いるための核移植システムの構築を目指し、末梢血球細胞を用いた新たな作成法の開発を目的とした。また、核移植技術を用いたエピジェネティクス研究モデルを補強するために、ゲノムインプリンティングに着目し、マウス雄性生殖細胞（前精原細胞）をドナーとしたクローン胚を解

析することで父性インプリントの確立についてより詳細なメカニズムを見出すことを目的とした。

第2章

核移植技術を用いたクローン動物の
新たな作成法の開発-微量末梢血に由来する血球細胞核移植クローンマウスの
作成について-

2.1. 緒言

核移植クローン技術は、再生医療、生物製剤の作成、畜産、種の保存など、様々な分野で応用が期待される[Meissner and Jaenisch, 2006; Niemann and Lucas-Hahn, 2012]。核移植の技術的要因および生物学的要因によりクローン胚の発生能や産仔の健康状態に様々な影響を与えることが、これまでの研究で明らかにされてきた[Inoue *et al.*, 2003; Oback and Wells, 2002; Ogura *et al.*, 2013]。これらの要因の中でも、ドナー細胞の種類は重要な要因の一つとして考えられており、また核移植技術の効率改善に向けた対象として長く研究されてきた[Inoue *et al.*, 2003; Oback and Wells, 2002; Ogura *et al.*, 2013]。生存クローン産仔をより高効率で獲得するという観点から、ドナー細胞種固有のゲノム初期化能（ゲノムリプログラミング；Genomic reprogramming）に着目し、ドナー細胞種が選択されてきた。しかし、実用面を考慮すると、マウス個体への外傷を最小限に抑えた非侵襲的な回収および準備がしやすいドナー細胞種を用いることが重要である。これは、非常に貴重な個体や、生きている個体が唯一であった場合に、特に重要である。微量の末梢血

に由来する血球細胞（白血球）は、上記の細胞条件を満たすドナー細胞として期待できる。しかし、血球細胞由来クローン胚に由来する胚性幹細胞(nuclear transfer Embryonic Stem cell ; ntES 細胞)を用いたキメラマウスを介した、クローンマウスの F₁ 産仔の作出は報告されているが[Wakayama *et al.*, 2008]、末梢血球細胞核から直接クローンマウスを作出した報告はほとんどなされていない。末梢血球細胞ではないが、リンパ節[Hochedkinger *et al.*, 2002]、骨髄[Sung *et al.*, 2006]および肝臓[Inoue *et al.*, 2005]に由来するリンパ球からクローンマウスの作出が報告されているが、リンパ球は遺伝子再構成が起こっているため、ドナー個体のゲノム情報を完全にクローニングしておらず、実用的なクローン動物の作出には適さない。

本研究では、生きているドナー個体から採取した末梢血球細胞を利用して、クローンマウスの作出を試みた。

2.2. 材料と方法

動物

B6D2F1 (C57BL/6 × DBA/2 交雑種) 雌マウス (日本エスエルシー株式会社) をドナー個体として利用し、卵丘細胞および末梢血球細胞を得た。末梢血球細胞を得るために、Oct4-GFP 遺伝子改変雄マウス (GOF18-DPE-GFP [Yoshimizu *et al.*, 1999])、Dppa3-Venus 遺伝子改変雌マウス、129XB6-P 雌マウスと 129XB6-F 雌マウスを利用した。Oct4-GFP 系統は B6D2F1 雌マウスと 10 世代以上にわたり戻し交配によって維持されており、8-45 週齢で使用した。Dppa3-Venus 系統は、B6D2F1 × B6 胚の前核に DNA を注入することにより作出され、ファウンダー雄マウス

は B6 雌マウスと交配し、F₂ および F₃ 世代の雌マウスをドナー個体として、50-80 週齢で使用した。129XB6-P および 129XB6-F 系統は 129 と B6 の交雑によって作出されたリコンビナント・インブリード(RI)系統で、約 8 週齢の雌マウスを使用した（理化学研究所バイオリソースセンター）。8-16 週齢の ICR 雌マウス（日本クレア株式会社）は胚移植レシピエントマウスとして使用した。全ての動物は照明条件下（07:00-21:00）および特定病原体不在条件下で飼育され、全ての動物実験は理化学研究所・筑波事業所の実験動物審査委員会の承認下で実施した。

ドナー細胞の回収および調整

末梢血はヘパリンコートガラス管（Drummond Scientific Company）を用いて尾静脈から採取した。採取した血液は 0.1M EDTA（10-20 μ l）を添加した 1.5 ml チューブに移し、赤血球溶解バッファー（155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 2 mM EDTA, pH 7.2）で処理し、遠心分離（1200 \times g, 5 分）によって 3 回洗浄した。遠心分離後、血球細胞のペレット（白血球と溶解された赤血球残渣を含む）は、Hepes 緩衝 KSOM 培地（Hepes-buffered potassium simplex-optimized medium [Lawitts and Biggers, 1993]）を用いて懸濁し、この懸濁液中に含まれる白血球を核移植用ドナー細胞として使用した。血球細胞懸濁液をリンパ球特異的蛍光標識レクチン（fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated, pure *Phytolacca americana*-derived lectin ; PWM）（EY Laboratories, Inc.）で処理し、蛍光顕微鏡下で観察および蛍光活性化細胞選別（fluorescence-activated cell sorting ; FACS）を用いて解析を行い、細胞サイズによって白血球細胞種の選別を試みた。この細胞サイズによる選別の精度を確認するために、倒立顕微鏡下で選別された白血球をスライドガラス上に

置き、サイトスピン (Thermo Fisher Scientific Inc.) (600rpm, 2 分) を用いて細胞の単層標本を作成した。標本をメイ・グリーンワルド・ギムザ染色することにより、白血球種を同定した。

核移植

既報の方法によって核移植を実施し [Inoue et al., 2003; Kishigami et al., 2006; Wakayama et al., 1998]、以下簡潔に記述する。B6D2F1 雌マウスの腹腔内にウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (PMSG ; エール薬品株式会社) 7.5 IU を投与し、その 46-52 時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG ; あすか製薬株式会社) 7.5 IU を投与し、14-17 時間後に卵管膨大部から未受精卵を回収した。回収した卵子-卵丘細胞複合体を 0.1% ヒアルロニダーゼ (Calbiochem) 添加 KSOM 培地で卵丘細胞を除去し、KSOM 培地で洗浄した。卵子は 7.5 $\mu\text{g/ml}$ サイトカラシン B (Calbiochem) 添加 HEPES 緩衝 KSOM 培地中で、卵子核を除去した (除核)。ドナー細胞核はピエゾアシストマイクロピペット (PMM-150FU; プライムテック株式会社) を用いて除核卵子に注入した。注入した卵子は KSOM 培地で培養した後、2.5 mM SrCl_2 、5 $\mu\text{g/ml}$ サイトカラシン B、and 50 nM トリコスタチン A (TSA ; Sigma- Aldrich) 添加 KSOM 培地で約 1 時間培養した。続いて 5 $\mu\text{g/ml}$ サイトカラシン B、50 nM TSA 添加 KSOM 培地で約 5 時間培養した後、50 nM TSA 添加 KSOM 培地で約 2 時間培養した。その後、クローン胚は 2 細胞期および 4 細胞期に発生するまで、KSOM 培地で培養した。2 細胞期および 4 細胞期のクローン胚は、精管結紮雄マウスと交配した偽妊娠 ICR 雌マウスの卵管に移植した。偽妊娠雌マウスを 19.5 日後に安楽死処置し、それらの子宮内胎仔や胎盤について調べた。Dppa3-Venus 雌マウス

の血球細胞をドナー細胞としたクローン実験において、*Xist* に対する RNA 干渉法 (siRNA 注入) を併用した[Matoba *et al.*, 2011]。クローン胚を SrCl₂ で活性化した 6-7 時間後、ピエゾアシストマイクロピペットを用いて *Xist* に対する siRNA (25 μM) を注入した。

蛍光活性化細胞選別 (FACS)

赤血球を溶解した末梢血球細胞はリンパ球特異的蛍光標識レクチン (PWM) とフィコエリスリン (phycoerythrin ; PE) 標識された抗 Mac-1、抗 Gr-1、抗 B220、抗 CD4、抗 CD8 抗体 (eBioscience) で染色した。染色した細胞は FACS Aria instrument (BD Biosciences) を用いて解析および選別した。

免疫グロブリン可変領域における再構成遺伝子の解析

細胞サイズによる白血球種の選別の精度を確かめるために、リンパ球由来クローン産仔胎盤の免疫グロブリン重鎖領域の組み換えの検出を試みた。組み換えの検出には既報の方法に従った[Rohatgi *et al.*, 2008]。マルチプレックス PCR 法 (Multiplex PCR kit ; タカラバイオ株式会社) を用い、VH プライマーと JH プライマーの混合物 (VH1-VH7 および VH8-VH16 の 2 セットのうちのいずれか) を用いて、第 1PCR 増幅を実施した。より明確な結果を得るために、第 1PCR 増幅で使用したプライマーセットより内側部分に設計したプライマーを用い、nested PCR を実施した。PCR 産物は 2%アガロースゲルを用いて解析した。

統計解析

胚の発生率はイェーツの補正を伴うカイ二乗検定を用いて解析した。白血球種のそれぞれのサイズは、一元分散分析の後、多重比較検定 (Tukey-Kramer 法) によって解析した。P < 0.05 を統計的有意とした。

2.3. 結果

はじめに、核移植を実施するために十分な末梢血量について検討した。マウス尾部に剃刀を用いて切れ込みを入れ、異なる量の末梢血を採取した (図.1A)。採取した末梢血を赤血球溶解バッファーで処理し、遠心分離で洗浄した後、血球細胞 (白血球) 懸濁液の一部を 10% ポリビニルピロリドン添加 HEPES 緩衝 KSOM 培地 (3-4 μ l) に混ぜた。注入用ピペットを用いたドナー細胞の選択において、少なくとも 5-10 個の細胞を観察するため、200 倍で観察する必要があった (10 倍接眼レンズと 20 倍対物レンズの組み合わせ)。観察の結果、最低でも約 10-15 μ l の血液量があれば核移植を実施するため十分であることが分かった。よって、健康体の成体マウスからは約 30-45 μ l、老齢もしくはサイズの小さいマウス個体からは約 15-20 μ l の血液を採取し、その後のクローン実験に使用した。

まず、B6D2F1 雌マウスから採取した末梢血球細胞懸濁液から、白血球種に依らずランダムに選択したドナー細胞を用いて、核移植を行った。ドナー細胞を注入し卵子活性化した 24 時間後の 2 細胞期胚発生率は 5 nM TSA のグループで 51%、50 nM TSA のグループで 65% だった。これらの発生率は卵丘細胞をドナー細胞とした 2 細胞期胚発生率よりも有意に低かった (表 1)。これは第一分割以前に起こる血球細胞由来胚の細胞質が高効率で断片化することに起因している。レシピ

エント雌マウスに 2 細胞期胚を移植したところ、血球細胞由来クローン産仔率は 5 nM TSA のグループで 3.6%、50 nM TSA のグループで 2.0%だった（表 1）。これらの産仔率は卵丘細胞由来クローン胚よりも有意に低かったが、末梢血球細胞が生存クローンマウスを作成するためのドナー細胞として利用可能であることを示した。出生した血球細胞由来クローン産仔のうち 2 匹を里親マウスに保育させたところ、成体まで成長した。それらは繁殖能力を有し、それぞれ 14 ヶ月と 16 ヶ月以上生存したことを確認した。

リンパ球由来クローンマウスは再構成 DNA 配列を有しているため、ドナー個体のゲノム情報を完全にクローニングしておらず[Hochedlinger *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2005]、ドナー細胞としては適さない。そこで、核移植を実施する上でリンパ球以外の白血球を選択するための方法を検討した。まず、リンパ球がリンパ球特異的蛍光標識レクチン（FITC-標識 PWM）によって同定できるか調べた。その結果、血球細胞懸濁液中に存在する白血球のうちの一部が PWM で蛍光標識されていることを確認した（図 1C）。しかし、この蛍光標識レクチンとそれぞれの白血球種に対する蛍光標識抗体を用いた FACS 解析結果から、この蛍光標識レクチン（FITC-標識 PWM）はリンパ球のうち T 細胞ではなく B 細胞のみを標識することが明らかとなった（図 2）。続いて、白血球の細胞サイズによって白血球種を識別可能か調べた。顆粒球、単球、B 細胞、ヘルパー T 細胞（CD4+）およびキラー T 細胞（CD8+）それぞれを FACS によって分取し、顕微鏡下でそれぞれの細胞サイズを計測したところ、単球および顆粒球はリンパ球よりも有意に大きいことが分かった（ $P < 0.05$ ）（図 1D）。微分干渉顕微鏡下で観察すると、マウス末梢血中の白血球は、直径 8 μm より大きいグループと 6 μm よりも小さいグループの

2 集団に大別することが出来た (図. 1C)。顕微鏡下マイクロピペットで採取した直径 8 μm 以上の血球細胞について単層標本を作成し、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色したところ、85%の効率で顆粒球・単球を採取出来ることが分かった (99 個中 84 個) (図. 1E)。また、顕微鏡下で採取した直径 6 μm 以下の血球細胞についても単層標本を作成し、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色したところ、91%の効率でリンパ球を選択できることが分かった (35 個中 32 個)。以上の結果から、ドナー細胞として、顆粒球・単球の場合は直径 8 μm 以上のサイズの大きい細胞群を、リンパ球の場合は直径 6 μm 以下のサイズの小さい細胞群を選択することとした。また、単球の数は顆粒球の数よりも少なかったため (約 1:4 の比率) (図. 1E)、顆粒球・単球をドナー細胞とした核移植クローンを以後、「顆粒球由来クローン」と記述する。

続いて、顆粒球もしくはリンパ球由来クローン胚の発生能を比較した。細胞核を注入し活性化した 24 時間後、顆粒球由来クローン胚はリンパ球由来クローン胚よりも低い 2 細胞期胚発生率を示した。これは活性化後の顆粒球由来クローン胚の細胞質がリンパ球由来クローン胚よりも高効率で断片化する現象に起因している (22.6% vs. 9.2% ; $P < 1 \times 10^{-6}$) (表 2)。一方、卵丘細胞由来クローン胚とリンパ球由来クローン胚の断片化率に有意差はなかった。これらドナー細胞種のゲノム初期化能を評価するために、4 細胞期まで発生させ、その発生率を比較した。その結果、4 細胞期胚発生率はリンパ球由来クローン胚よりも顆粒球由来クローン胚で有意に高かった (77.7% vs. 67.5% ; $P < 0.005$) (表 2)。リンパ球由来クローン胚、顆粒球由来クローン胚および卵丘細胞由来胚の 3 グループを比較したところ、卵丘細胞由来クローン胚は最も高効率で 4 細胞期へ発生することが分かつ

た (89.1%) (表 2)。4 細胞期胚を偽妊娠レシピエント雌マウスに移植したところ、顆粒球クローン胚とリンパ球クローン胚の間で産仔率に有意差はなかった(表 2)。それぞれのグループの産仔のうち 3 匹を里親マウスに保育させたところ、いずれも授乳による保育を確認したが、顆粒球由来クローン産仔のうち 2 匹は成体まで成長し繁殖能力を有することを確認した一方で、リンパ球クローン産仔はすべて離乳前 (生後 21 日以前) に死亡したことを観察した (ただし理由は不明である)。リンパ球由来クローン産仔の免疫グロブリン重鎖領域の組み換えを調べたところ、すべて B 細胞に由来することが分かった (図 3)。

以上から顆粒球由来クローンは成体まで成長し繁殖能力を有することが明らかとなったため、続いて、遺伝子改変マウス系統においても利用可能か、それらの顆粒球をドナー細胞とした核移植を実施した。まず、Oct4-GFP 系統で実施したところ、1.2%の効率でクローン産仔を作出することが出来た (表 3)。Dppa3-Venus 系統は、もともと我々の研究室で樹立された遺伝子改変系統であるが、老齢で不妊を伴う雌マウス 2 匹が生存しているのみであったため、顆粒球をドナー細胞とした核移植を実施した。核移植を 2 回実施したところ、いずれも生存産仔を作出することが出来なかったが、3 回目の核移植で *Xist*-siRNA 注入法を併用したところ、1 匹の生存産仔と 1 匹の死産仔を得ることが出来た (表 3)。さらに、リコンビナント・インブレット系統である 129XB6-P と 129XB6-F でも顆粒球をドナー細胞とした核移植を実施した。これらの核移植は、当初、別の研究プロジェクトで卵丘細胞をドナー細胞とした核移植を予定していたが、実験当日にドナー個体が排卵しておらず卵丘細胞を採取することが出来なかった。そこで急遽、卵丘細胞を採取するために安楽死処置していたドナー個体の心臓部から末梢血を採取し、

顆粒球をドナー細胞とした核移植に切り替えた。その結果、それらの系統から、それぞれ1匹ずつ顆粒球由来の生存クローン産仔を得ることに成功した(表3)。核移植を実施した遺伝子改変4系統はそれぞれ遺伝的背景が異なっていたものの、いずれの発生率において有意差はなかった(表3)。

最後に、第一分割以前に起こる細胞質の断片化が顆粒球由来クローン胚で高頻度に観察される現象について検証を行った。これが引き起こされる原因として、①核移植ドナー細胞の細胞膜が不完全に破壊されている可能性[Miki *et al.*, 2004]と、②核移植レシピエント卵子に顆粒球の分泌小胞が有害な影響を与えている可能性が予測された。そこで、除核卵子に1個もしくは2個の顆粒球を注入し活性化した後、4、8、17時間でクローン胚を顕微鏡下で形態観察することにより、それぞれの可能性の評価を行った。2個の顆粒球を注入した卵子は、1個の顆粒球を注入した場合よりも、高い偽前核形成率および低い断片化率を示した(表4)。この結果は、顆粒球由来クローン胚の高い断片化率の原因が、顆粒球の分泌小胞がレシピエント卵子に有害な影響を与えている可能性よりも、ドナー細胞膜が不完全に破壊されている可能性を支持していることを示している。

2.4. 考察

本研究では末梢血球細胞を用いて、核移植研究のためのモデルとしてマウスを使用した。マウスのクローニングと、畜産で用いられるような大型動物のクローニングはドナー細胞の調整法が異なる。大型動物で標準的に行われる核移植では、生体外で増殖させた生検材料由来の上皮細胞や繊維芽細胞のようなドナー細胞が

主に使用されている。それらの細胞の細胞周期は血清飢餓またはコンフルエント条件下で培養することで G0/G1 期に誘導され、レシピエント卵子の細胞質と同期し、胚発生が正常に進行する[Kato *et al.*, 1998]。一方マウスでは、卵丘細胞[Walayama *et al.*, 1998]や未成熟セルトリ細胞[Ogura *et al.*, 2000]がドナー細胞として標準的に使用されるが、これらは生体内において G0/G1 期の細胞が多く存在し、ドナー生体から採取され、すぐに核移植に用いられる。これは、他の種の培養細胞と比較して、マウスの培養細胞は生体外の増殖条件ではジェネティックもしくはエピジェネティックな異常を生じやすいことに起因している[Inoue *et al.*, 2007]。従って、マウスにおいては、一回の核移植で 1 匹以上のドナー個体を安楽死処置することによってドナー細胞を採取することが一般的である。以上のことを踏まえると、本研究で開発した末梢血球細胞をドナーとして利用したクローニングは、これまで報告されてきたドナー細胞種と比較しても、ドナー個体を犠牲にすることなくすぐに核移植を実施できる唯一の方法である。さらに、個体が生存している限り、繰り返しドナー細胞が採取できることも本法のメリットである。実際に、Dppa3-Venus 系統を用いた血球細胞核移植クローンでは、3 回目の核移植ではじめてクローン産仔を獲得することに成功した。

近年、遺伝子改変マウス系統数は急速に増加しているが、本法は偶発的もしくは遺伝的に不妊を呈する系統あるいは個体に対してのレスキュー法としての利用が期待できる。現在、遺伝子改変マウス系統に代表されるような遺伝資源の保存および維持方法の一つとして、顕微授精 (intracytoplasmic sperm injection ; ICSI) が広く用いられている。マウスにおける顕微授精では、成熟精子あるいは精細胞のような未成熟雄性生殖細胞[Ogura *et al.*, 2005; Ogonuki *et al.*, 2010]でさえも、受

精させることが可能であり、産仔を獲得するための信頼性の高い技術である。したがって、ファウンダーマウスや飼育している系統で唯一生き残っている個体が雄であった場合でも、顕微授精を利用することで次世代に確実に遺伝子型をつなぐことが可能である。先行研究では、36 ヶ月齢の高齢雄マウスからでも、円形精子細胞を注入することで産仔を得ることに成功している[Tanemura *et al.*, 1997]。しかし、顕微授精はドナー個体が雄である場合にのみ適用することが可能で、精巢内に半数体の生殖細胞を有していなければならない。一次もしくは二次精母細胞を利用した顕微授精も考えられるが、この方法は二倍体胚を構築させるために、通常の顕微授精よりもマイクロマニピュレーションによる工程が多くなる

[Kimura and Yanagumachi, 1997; Ogura *et al.*, 1998]。ドナー雄個体が半数体生殖細胞を保持していない場合やドナー雌個体が唯一生き残っている場合には、ドナー個体の遺伝子型を次世代に引き継ぐ方法として、顕微授精よりも核移植を利用する戦略が良い。さらに、複数領域で遺伝子変異を持つ系統や未定義の遺伝子背景を持つ変異系統などでも、顕微授精よりも核移植を利用しやすい。

末梢血球細胞のゲノム初期化能は卵丘細胞のような標準的に使用されるドナー細胞よりも低いようだったが、この問題は今後の技術改良で克服される可能性がある。先行研究で報告されているように、これまで、TSA を含むヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の使用や *Xist*-siRNA 注入によるロックダウン法を使用することにより、ゲノム初期化能が向上し産仔率が引き上げられてきた[Kishigami *et al.*, 2006; Matoba *et al.*, 2011]。 *Xist* ロックダウン法は雄個体のクローニングには非常に効果があるが、雌への効果は低いことが報告されている[Matoba *et al.*, 2011; Oikawa *et al.*, 2013]。本研究では、Dppa3-Venus 系統の雌マウスをドナーとした核

移植で、*Xist* ノックダウン法を併用した場合としなかった場合の両方を実施したが、併用した場合からのみクローン産仔を得ることに成功した。本実験では通常使用する *Xist*-siRNA 濃度 (5 μ M) よりも高濃度 (25 μ M) で使用したことに起因するかもしれないが、この可能性については今後更なる解析が必要であろう。本研究で開発した末梢血球細胞核移植クローン法で重要なポイントの一つは、ドナー細胞としてリンパ球を除外して利用する点である。これはクローン産仔に再構成された DNA 配列を引き継がせないためである [Hochedlinger *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2005]。血球細胞懸濁液からリンパ球を除外するための確実な方法は FACS による細胞選別であるが、FACS を実施するためには相当量の血液が必要で、微量血液では困難である。したがって本研究では、FACS 解析の結果得られたそれぞれの白血球種のデータから、細胞サイズから白血球種を選別することが出来るか検討を行った。顆粒球および単球はリンパ球よりも有意に大きかったことから、顕微鏡下で約 85% の効率でそれらを選別でき、リンパ球を選択する可能性を最小限に抑えられることが分かった。これは非常に単純な方法であるため、核移植を実施できる施設者であれば、何回か練習をすれば容易に再現できるだろう。本法の技術的な欠点は、顆粒球由来クローン胚の約 20% が第一分裂前に断片化を呈することである (表 2 および 3)。顆粒球由来クローン胚の断片化率は、リンパ球由来クローン胚よりも約 2 倍、卵丘細胞クローン胚よりも約 5 倍高い。クローン胚の断片化は、主に活性化卵子における微小管形成中心の崩壊によって引き起こされる。これは卵細胞質とドナー細胞質核が不完全に混和されるか、その混和が遅れることによって、卵細胞質にドナー細胞核が暴露されないことに起因する [Miki *et al.*, 2004]。除核卵子に 2 個の顆粒球を注入すると、断片化率は有意に低下

したため、顆粒球クローン胚の断片化の原因は、微小管形成中心の崩壊であると推測される。顆粒球の細胞膜は他のドナー細胞種よりも弾力性に富み、マイクロピペットを用いたピペッティングでは破壊されにくい可能性がある。断片化の他の原因は、顆粒球の分泌小胞から放出される酵素により弊害が起こる可能性もあった。顕微授精を用いて複数の精子を卵子に注入すると、精子が持つ先体酵素（アクロソーム）によって、卵細胞質が変形することが知られている[Morozumi *et al.*, 2005]。2個の顆粒球を除核卵子に注入しても断片化は増加せずむしろ減少したため、顆粒球の分泌小胞から放出される酵素が、顆粒球クローン胚の断片化の原因である可能性は低いと推測できる。

本研究では、マウス末梢血球細胞を用いてクローン産仔が獲得出来ることを初めて証明することに成功した。末梢血球細胞は採取後すぐに核移植を実施でき、ドナー個体を安楽死処置する必要がない。本法は、体外受精や顕微授精のような生殖補助技術によって保存・維持することが困難な貴重なマウス系統を複製するために使用することが期待される。

表 1. 末梢血球細胞(白血球)由来クローン胚の発生率

ドナー細胞種	TSA 処理	胚培養数	24 時間後の胚数(%)			胚移植数	胚移植 19.5 日後の胚数(%)		
			1 細胞	断片化	2 細胞期胚		着床数	産仔数	胎盤のみ
末梢血球細胞	5 nM	306	50 (16.3)	101 (33.0) ^a	155 (50.7) ^a	138	28 (20.3) ^a	5 (3.6)	0 (0)
	50 nM	164	13 (7.9)	44 (26.8) ^a	107 (65.2) ^b	98	26 (26.5) ^a	2 (2.0)	0 (0)
卵丘細胞	50 nM	181	6 (3.5)	6 (3.5) ^b	169 (93.4) ^c	169	66 (39.1) ^b	13 (7.7)	4 (2.4)

B6D2F1 雌マウスからドナー細胞を採取した

肩付きの異なる文字は値の有意差を示している (P < 0.05; イエーツの補正を伴うカイ二乗検定)

表 2. 顆粒球およびリンパ球由来クローン胚の発生率

ドナー細胞種	胚培養数	24 時間後の胚数(%)			48 時間後の 4 細胞期胚数 (% 2 細胞期胚)	胚移植数	胚移植 19.5 日後の胚数(%)		
		1 細胞	断片化	2 細胞期胚			着床数	産仔数	胎盤のみ
顆粒球	527	44 (8.3)	119 (22.6) ^a	364 (69.1) ^a	283 (77.7) ^a	283	112 (39.6)	6 (2.1)	5 (1.8)
リンパ球	327	5 (1.5)	30 (9.2) ^b	292 (89.3) ^b	197 (67.5) ^b	180	69 (38.3)	3 (1.7)	4 (2.2)
卵丘細胞	90	3 (3.3)	4 (4.4) ^b	83 (92.2) ^b	74 (89.1) ^c	74	32 (43.2)	2 (2.7)	2 (2.7)

B6D2F1 雌マウスからドナー細胞を採取した

全てのクローン胚は 50 nM TSA で処理した

肩付きの異なる文字は値の有意差を示している (P < 0.05; イエーツの補正を伴うカイ二乗検定)

表 3. 遺伝子改変系統から採取した顆粒球由来クローン胚の発生率

ドナー細胞種	胚培養数	24 時間後の胚数(%)			胚移植数	胚移植 19.5 日後の胚数(%)		
		1 細胞	断片化	2 細胞期胚		着床数	産仔数	胎盤のみ
Oct4-GFP	574	41 (7.1)	123 (21.4)	410 (71.4)	247*	78 (31.6)	3 (1.2)	3 (1.2)
Dppa3-Venus	362	43 (11.9)	70 (19.3)	249 (68.8)	249	69 (27.7)	2** (0.8)	2 (0.8)
129xB6-P	103	14 (13.6)	17 (16.5)	72 (69.9)	72	23 (31.9)	1 (1.4)	3 (4.2)
129xB6-F	235	12 (6.7)	56 (31.3)	167 (93.3)	139	41 (29.5)	1 (0.7)	4 (2.9)

全てのクローン胚は 50 nM TSA で処理した

* Oct4-GFP 系統のみ 4 細胞期で胚移植した

** これらのうち 1 匹は死産した

表 4. 顆粒球を除核卵子に注入したときの前核形成率

除核卵子に 注入した 顆粒球数	胚培養数	4 時間後の胚数(%)			8 時間後の胚数(%)			17 時間後の胚数(%)		
		偽前核 形成あり	偽前核 形成なし	断片化	偽前核 形成あり	偽前核 形成なし	断片化	1 細胞	2 細胞	断片化
0	21	0 (0)	21 (100)	0 (0)	0 (0)	4 (19.1)	17 (80.9)	0 (0)	0 (0)	21 (100)
1	29	18 (62.1)	11 (37.9)	0 (0)	18 (62.1)	7 (24.1)	4 (13.8)	3 (10.3)	16 (55.2)	10 (34.5)
2	26	26 (100)	0 (0)	0 (0)	26 (100)	0 (0)	0 (0)	8 (30.8)	17 (65.4)	1 (3.8)

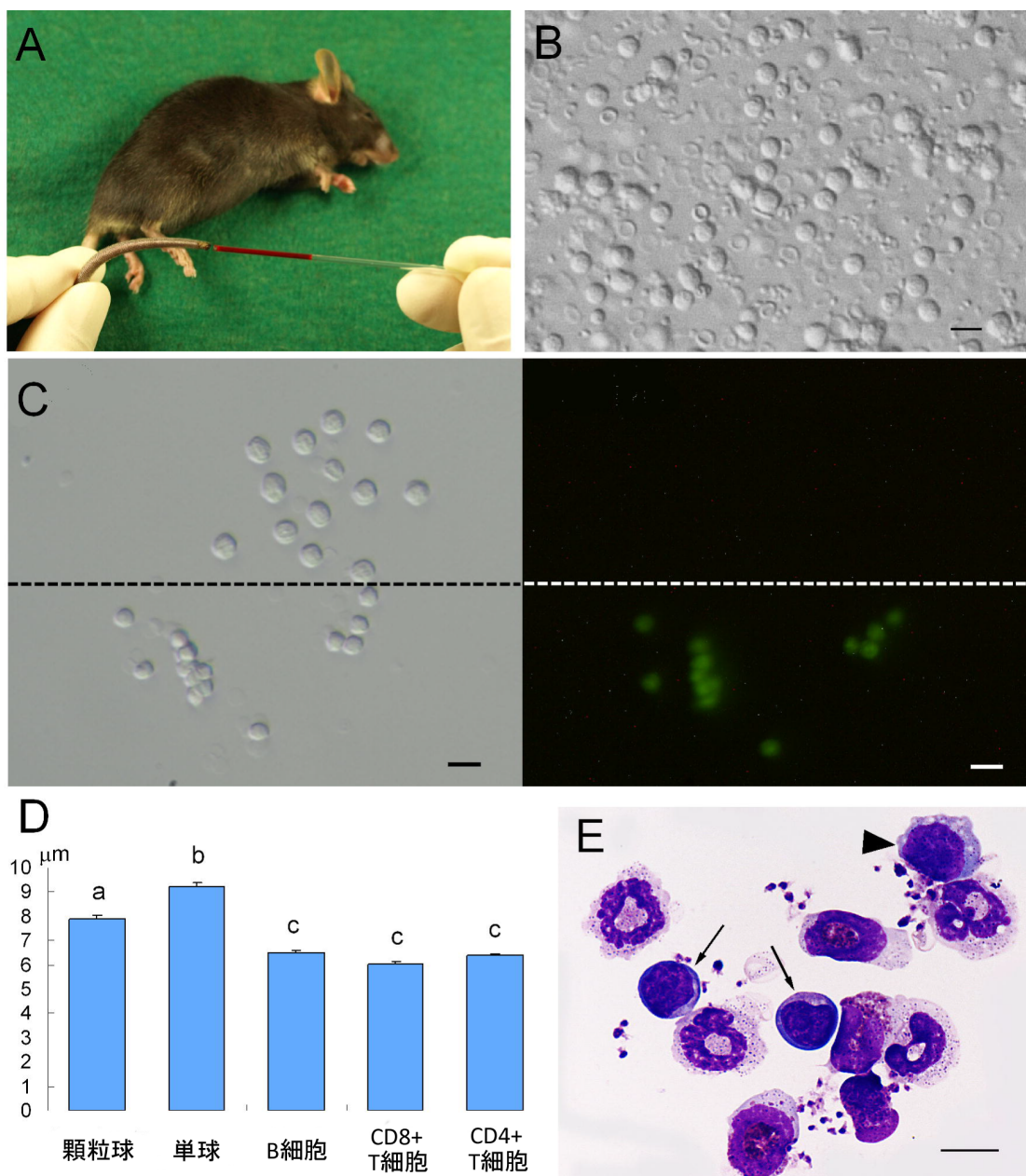


図 1. 核移植ドナー細胞に用いた末梢血球細胞の調整およびその特性

A) マウス尾部からの末梢血採取。尾部の先端を切開し、ガラス管を用いて約 15–45 μl の血液を採取した。B) 赤血球溶解バッファーで処理下後の末梢血球細胞。懸濁液中の無傷細胞はほぼ白血球であった。Bar = 10 μm 。C) FITC 標識 PWM レクチンで染色した白血球。FACS 解析の結果、陽性細胞は B 細胞ではなく T 細胞であった。蛍光を示さない細胞(上)は蛍光を示す細胞(下)より比較的大きかった。

Bar = 10 μm 。D) 各白血球種を FACS により単離した。直径は顕微鏡写真で測定した。バーの上の異なる文字は有意に異なっていることを示す。顆粒球および探求はリンパ球よりも有意に大きかった。平均値 \pm 標準誤差。E) 細胞サイズに基づいて、顆粒球と思われる細胞を倒立顕微鏡下で選択した。選択した細胞を遠心分離によってスライドガラスに貼付けた後、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色した。遠心分離に供しているために、この図中の細胞は B や C で観察・測定したサイズよりも大きい。画像中のほぼ全ての細胞は小葉核が認められるため顆粒球であるが、2 つはリンパ球で丸形核と高い核細胞質比が認められた(矢印)。大型の単球様細胞も観察された(アローヘッド)。Bar = 10 μm 。

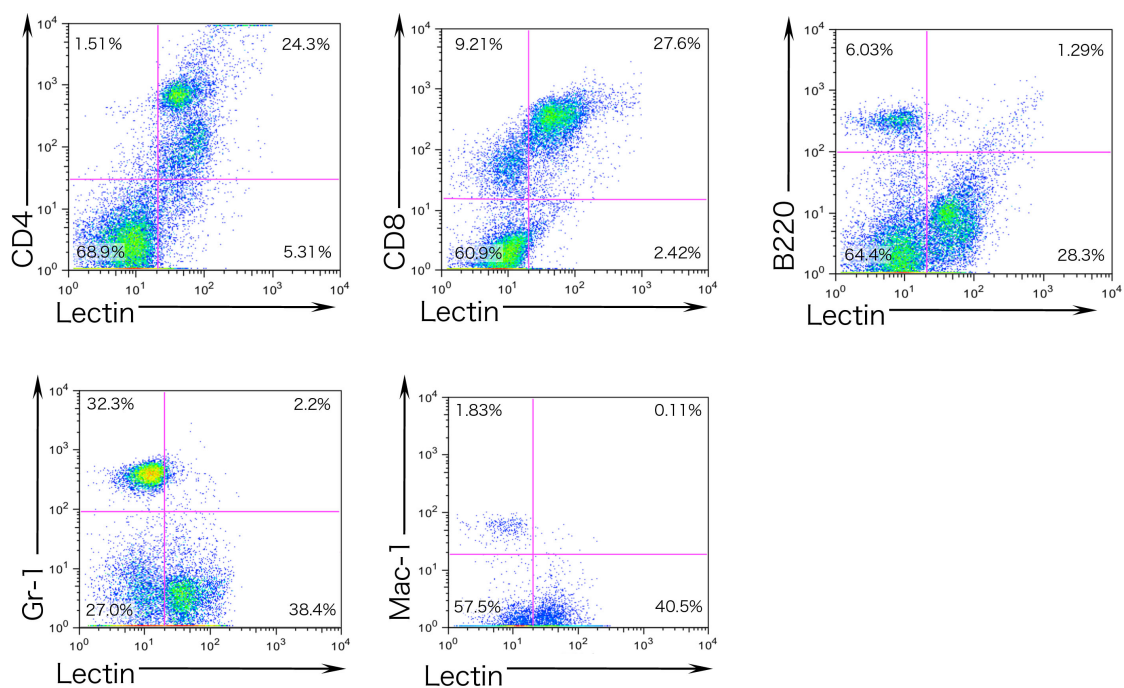
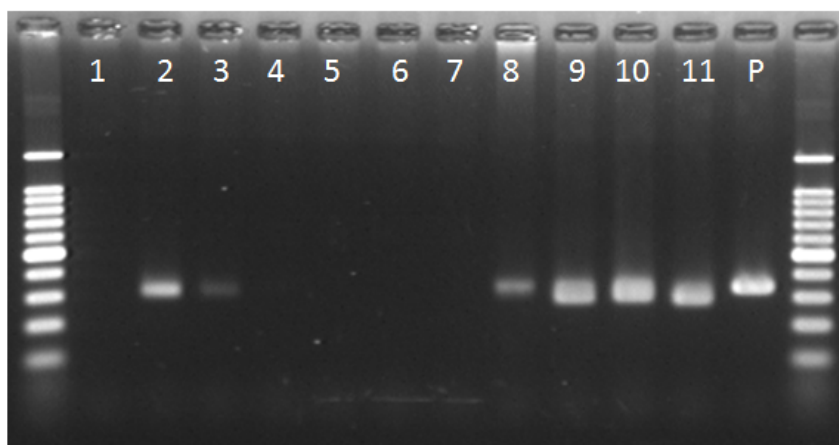


図 2. PWM に対する末梢白血球の反応性

ヘルパーT細胞(CD4+)、キラーT細胞 (CD8+)、顆粒球(Gr-1+)、単球(Mac-1+)、
B細胞(B220+)の代表的な FACS パターンが示された。B細胞ではなく T細胞が
FITC 標識 PWM レクチン陽性に染色された。

VH1-7 multiplex PCR



VH8-16 multiplex PCR

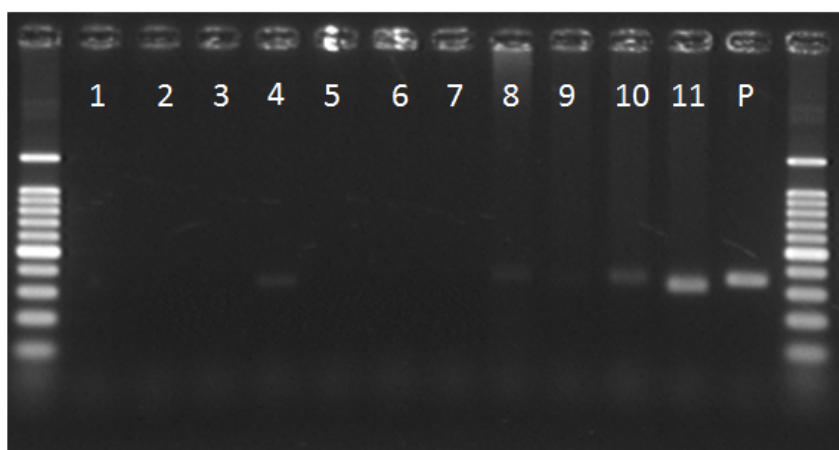


図 3. 再構成免疫グロブリン重鎖領域の PCR 増幅

細胞サイズにより選択した末梢リンパ球の核移植から作出したクローン胚に由来する ntES 細胞 (1-7 番) および胎盤(8-11 番)。全ての胎盤サンプルは再構成免疫グロブリン重鎖領域が検出され、これは B 細胞由来であることを示している。サンプル 8、9、11 番は表 2 に示した 3 匹のリンパ球由来クローン産仔の胎盤に相当する。サンプル 10 番は異なるリンパ球クローン実験に由来するものである。サンプル 2、3、4 番の ntES 細胞は B 細胞由来であることが確認された。P : ポジティブコントロールとして B 細胞由来 iPS 細胞(induced pluripotent stem cells)のゲノム DNA を使用した。

第3章

核移植技術を用いた発生に関わる

エピジェネティクス観察のモデル開発

–マウス前精原細胞核移植クローンによる父性インプリント 確立について–

3.1 緒言

ゲノムインプリンティングは、真獣哺乳類において、特定の親由来アレルで遺伝子発現（インプリント遺伝子）を保証するためのメカニズムである[Kaneko-Ishino *et al.*, 2003; Reik and Walter, 2001]。インプリント遺伝子は父性アレルと母性アレルで非均等な片親性発現を呈し、これは両親アレルのうちいずれかに付加されたエピジェネティックマークによって引き起こされる。これまで研究され、蓄積されてきた情報に基づくと、マウスにおいて、少なくとも 100 種類のインプリント遺伝子の存在が知られている[MouseBook ; <http://www.mousebook.org/>]。ノックアウトもしくはトランスジェニックマウスを用いた解析や、ヒトにおける片親性ダイソミーやインプリント遺伝子異常症の知見から明らかにされてきているように、多くのインプリント遺伝子は胎仔（胎児）もしくは胎盤の発生中に発現する[Hirasawa and Feil, 2010; Kaneko-Ishino *et al.*, 2003]。インプリント状態の主要なエピジェネティック変化は生殖系列細胞の発生中に引き起こされる。受精卵や胚の

インプリント記憶は、始原生殖細胞 (primordial germ cell ; PGC) の発生中に消去される[Hajkova *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002]。その後、雌雄それぞれの生殖細胞発生中に、インプリント記憶 (primary imprint) が特定の染色体領域に刻まれ、胚発生において精子や卵子に受け継がれていく [Kaneko-Ishino *et al.*, 2003; Reik and Walter, 2001; Sasaki and Matsui, 2008]。インプリント遺伝子はゲノム中にランダムには存在せず、特定の染色体領域内でクラスターを形成する傾向が観察される [Barlow and Bartolomei; 2014]。各クラスターは差次的メチル化領域 (differentially methylated region ; DMR) のようなインプリンティング制御領域 (imprinting control region ; ICR) によって制御されており、性特異的に配偶子が形成される過程で、その領域の DNA はメチル化を受ける。各クラスターには1つ以上の DMR が存在していることが DNA メチル化解析から明らかにされているが、生殖細胞発生中に起こる、DMR の脱メチル化やメチル化によって、ゲノムインプリンティングの消去や確立が制御されると考えられる。

これまで、マウスにおいて、DMR のメチル化状態は生殖細胞の DNA メチル化解析によって詳細に調べられてきており、インプリントの消去および確立について一致した概念が広く知られている。これまでの DNA メチル化解析によると、父性インプリントは減数分裂前の雄性生殖細胞発生中で、母性インプリントは第一減数分裂前期の卵子発生中に確立する[Sasaki and Matsui, 2008]。しかし、ゲノムインプリンティングは、DNA メチル化状態よりも、その結果生じる片親性遺伝子発現によって定義される。実際に、いくつかのインプリント遺伝子の片親性発現 (特に胎盤で発現するインプリント遺伝子) は、DNA メチル化の代わりにヒストン修飾によって制御されていることが指摘されている[Lewis *et al.*, 2004]。したが

って、生殖細胞のインプリント状態を詳細に理解するためには、DNA メチル化状態と遺伝子発現の両方を調べるのが望ましい。しかし、インプリント遺伝子の多くは胎仔体細胞や胎盤で発現するため、発生中の生殖細胞ではインプリント遺伝子が発現しておらず（あるいは発現量が少なく）、生殖細胞において遺伝子発現を解析することは難しい。これを打開するために、核移植を用い、生殖細胞核由来クローン胎仔を解析する方法が考えられる（図 4A）。レシピエント卵子細胞質によってドナー細胞核ゲノムのインプリントは変化しないことが知られているため[Inoue *et al.*, 2002]、生殖細胞核由来クローン胎仔はドナー細胞のインプリント状態を反映していることが期待できる。この核移植由来胎仔（あるいは再構築卵）を用いた方法は、PGC 発生中期に生じるインプリント消去の解明[Lee *et al.*, 2002]や、卵子における母性インプリント確立の解明[Obata and Kono, 2002]に使用されてきた。同様に、インプリント型 X 染色体不活化をもたらすインプリントの確立および消去のタイミングは、様々な発生ステージの生殖細胞をドナー細胞とした核移植由来胚を解析することにより明らかにされている[Oikawa *et al.*, 2014]。インプリントの消去については、PGC 由来クローン胎仔のインプリント遺伝子発現を詳細に解析することにより明らかにされた[Lee *et al.*, 2002]。胎齢 10.5 日から 11.5 日までに、インプリント遺伝子が正確に制御されることによって、インプリントの消去が完了する[Lee *et al.*, 2002]。母性インプリント確立については、減数分裂前期の GV (germinal vesicle) 期で、成長期卵由来および成長卵由来一倍体ゲノムの核移植により作成した単為発生胚（胎仔）を解析する戦略が用いられている [Obata and Kono, 2002]。単為発生由来胎仔のインプリント遺伝子発現パターンから、卵子のサイズが成長するに応じて、母性インプリントが獲得されることが

明らかにされた[Obata and Kono, 2002]。したがって、決定されるべき残っている課題は、マウスにおいて、出生前の前精原細胞 (prospermatogonia) 発生中に完了すると考えられている[Sasaki and Matsui, 2008]、父性インプリントの確立パターンを詳細に解析することである。これまで研究されている限りでは、父性インプリントを受ける DMR は *H19-Igf2* (*H19* DMR)、*Dlk1-Gtl2* (IG-DMR)、*Rasgrf1* (*Rasgrf1* DMR) の3領域から構成されている。本研究では、父性インプリント確立の詳細かつ遺伝子発現ベースの情報を得るために、異なる発生時期のマウス前精原細胞核由来クローン胎仔の解析を行った (図4)。

3.2. 材料と方法

動物

8-10 週齢の B6D2F1 (C57BL/6×DBA/2 交雑種) 雌マウス (日本エスエルシー株式会社) は核移植に用いるレシピエント卵子のために、8-12 週齢の ICR 雌マウス (日本クレア株式会社) は胚移植用のレシピエントとして用いた。(129×JF1)F₁ を遺伝的背景として持った雄マウスに由来する前精原細胞を核移植用ドナー細胞として用い、それは 129X1/SvJ 雌マウス (日本エスエルシー株式会社) の卵子と JF1/Msf 雄マウス (理化学研究所バイオリソースセンター) の精子を用いた体外受精 (*in vitro fertilization*; IVF) によって作出された[Mochida *et al.*, 2005]。ドナー細胞として用いた前精原細胞の一部は、(C57BL/6×JF1)F₁ を遺伝的背景として持った雄マウスから採取した (図 7-11 および 12 中のサンプル番号 (#) 12 および 13 に対応)。全ての動物は照明条件下 (07:00-21:00) および特定病原体不在条件

下で飼育され、全ての動物実験は理化学研究所・筑波事業所の実験動物審査委員会の承認下で実施した。

ドナー細胞の回収および調整

前述の通り、核移植用ドナー細胞を得るために、体外受精由来の胎齢 (embryonic day ; E) 15.5、16.5、17.5 日および出生後 (postnatal day ; P) 0.5 日の雄マウスから、核移植直前に生殖腺を採取した。10%ポリビニルピロリドン添加 HEPES 緩衝 KSOM 培地 3 μ l 中に 1-2 個の生殖腺を入れ、柄付き針でほぐすように広げることで、培地中に細胞を添加させた。未成熟セルトリ細胞は(129 \times JF1) F_1 由来 P3.5 の新生仔雄マウスから採取した[Ogura *et al.*, 2000]。以下簡潔に記述すると、0.1 mg/ml collagenase (Sigma-Aldrich) および 0.01 mg/ml DNase (Sigma-Aldrich) 添加リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline ; PBS) を用いて精細管を 30 分、37°C で処理し、その後、0.2 mg/ml トリプシン (Sigma-Aldrich) 添加 PBS を用いて 5 分、37°C で処理した。処理を終えた細胞を 4 mg/ml ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin ; BSA) (Calbiochem) 添加 PBS で 3-4 回洗浄し、核移植用ドナー細胞として使用した。

ドナーとして使用した E15.5-E17.5 の前精原細胞はバイサルファイトシーケンス法を用いて DNA メチル化状態を解析した。生殖細胞発生過程でメチル化を受ける DMR (primary DMR) の代表として IG-DMR、受精後にメチル化を受ける DMR (secondary DMR) の代表として *Gtl2*-DMR、それぞれについて、解析を行った。前精原細胞は倒立顕微鏡下で核移植に用いるマイクロピペットを用いて採取し、卵細胞質を完全に除去した空の透明帯中に注入した (1 個の透明帯あたり 50

-100 個の前精原細胞)。300-400 個の前精原細胞が E15.5-E17.5 の 1DMR のバイサルファイトシーケンス解析のために用いられた。

核移植

既報の方法によって核移植を実施した[Inoue *et al.*, 2003; Kishigami *et al.*, 2006; Wakayama *et al.*, 1998] (詳細は第 2 章第 2 節核移植の項を参照)。それぞれのステージの前精原細胞核 (もしくは未成熟セルトリ細胞核) 由来の 2 細胞期クローン胚を、精管結紮雄マウスと交配した偽妊娠 ICR 雌マウスの卵管に移植した。偽妊娠雌マウスを E9.5 で安楽死処置し、それらの子宮から胎仔を採取した。本研究における実験のスキームを模式図として、図 4B に示した。

バイサルファイトシーケンス法による DNA メチル化解析

各 DNA サンプルに 10 M 亜硫酸水素ナトリウム溶液を最終濃度が 9 M になるように混合し[Shiraishi *et al.*, 2004]、98°C で DNA を熱変成させ、70°C でインキュベートした (バイサルファイト処理)。バイサルファイト処理した DNA の脱スルホン化および精製は bisulfite DNA purification kit (Zymo Research) を用いて行った。PCR によって目的領域の増幅を行った後、増幅した DNA を pGEM T-Easy vector (Promega) でクローニングし、大腸菌 DH5 α コンピテントセルに形質転換した。個々のクローン (コロニー) は TempliPhi DNA amplification kit (GE Healthcare) を用いて DNA 増幅され、DNA シーケンスによって配列を決定した。プライマー配列を表 5 に記す。母性および父性アレルは一塩基多型 (SNP) を解析することにより識別した。

定量 RT-PCR

トータル RNA は E9.5 胎仔から Isogen (ニッポンジーン) を用いて抽出した。相補的 DNA (complementary DNA ; cDNA) は、oligo(dT)プライマーと SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) を使用して、1 μ g のトータル RNA から合成した。cDNA の定量は、QuantiTect SYBR Green PCR kits (Qiagen) と ABI Prism 7900HT sequence detection system (Life Technologies) を用いて行った。3 種類の父性発現遺伝子 (paternally expressed gene; Peg) と 2 種類の母性発現遺伝子 (maternally expressed gene ; Meg) を含む、7 種類のインプリント遺伝子を父性インプリント 2 領域および母性インプリント 2 領域から選択した。以下に発現解析に供したインプリント遺伝子を記す : *Igf2* (7 番染色体遠位部)、*H19* (7 番染色体遠位部)、*Peg3* (7 番染色体近位部)、*Igf2r* (12 番染色体近位部)、*Dlk1* (12 番染色体遠位部)、*Gtl2* (12 番染色体遠位部)、*Rian* (12 番染色体遠位部)。それぞれのインプリント遺伝子の mRNA 量は適切な検量線を用いて決定し、*Actb* (β -actin) mRNA によって補正した。全ての発現データは、前精原細胞由来クローン胎仔と同じ胎齢で採取した (E9.5)、IVF 由来胎仔の発現量の平均に対する相対値として記した。プライマー配列は表 5 に記した。

Rasgrf1 発現解析

(129 \times JF1) F_1 を遺伝的背景として持った雄マウスを IVF によって作出した [Mochida *et al.*, 2005]。トータル RNA は Isogen を使用して、E9.5 胎仔、成体個体 (生後 57 日齢) 由来の脳および肝臓から抽出した。抽出したトータル RNA は前

述の方法で cDNA の合成を行った。50 ng cDNA は、Ex Taq Hot Start version (タカラバイオ株式会社) と *Rasgrfl* もしくは *Actb* (β -*cactin*) に対するプライマーを用いて、PCR 増幅を行った。PCR 産物は 2%アガロースゲルを用いて解析した。

統計解析

バイサルファイトシーケンス法によって決定した DNA メチル化量 (%) は \arcsin 変換の後に続く一元分散分析を用いて解析を行った。その結果適切と判断された場合に、Scheffe の F 検定を用いた事後比較をグループ間の多重比較に使用した。定量 RT-PCR で決定したクローン胎仔の遺伝子発現量は、1-3 個の IVF 胎仔の発現量平均値をコントロールとし、Dunnett の多重比較によって解析した。同じ DMR 内の複数遺伝子について、父性発現遺伝子量と母性発現遺伝子量の比率を解析した。IG-DMR と *Gtl2* DMR のメチル化量の関係は、Pearson の積率相関係数によって評価した。P < 0.05 を統計的有意とした。

3.3. 結果

前精原生殖細胞由来クローン胚の発生

前精原細胞は細胞質よりも細胞核が占める比率が高く、特徴的な仮足を有するために、生殖腺体細胞と容易に見分けることが出来る[Ohbo *et al.*, 2003] (図 5A)。前精原細胞は非常に柔軟な細胞で、内径 5-7 μm のマイクロピペットで容易にピックアップすることが出来た (図 5B)。生殖腺体細胞を同じマイクロピペットでピックアップしてみると、その細胞が持つ物理的な剛性のためにピペット先端に

付着した（図 5C）。よって、前精原細胞は、特別なマーカーを用いずとも明視野の顕微鏡下ではほぼ 100%の効率で選択することができ、核移植を実施した。

前精原細胞由来クローン胚は P0.5 を除くほとんどのステージで、85%以上が 2 細胞期へ発生した（表 6）。しかし、着床後の胚発生率は、前精原細胞それぞれのステージ間で大きく変動した（0.7%–9.5%）（表 6）。E9.5 で採取した前精原細胞由来クローン胎仔はいずれも心臓の鼓動を観察したが、多くの場合 IVF 由来胎仔と比較して発生遅延を示していた（図 6）。

前精原細胞由来クローン胎仔の DMR における DNA メチル化解析

DMR のメチル化状態を解析するために、バイサルファイトシーケンス法を用いて解析を行った。近交系統マウス（129 系統もしくは C57BL/6 系統）と野生由来マウス（JF1 系統）間の SNP 解析を併用することで、アレル特異的なメチル化状態を決定した。E15.5 前精原細胞由来クローン胎仔の IG-DMR において、解析した 4 サンプルのうち 1 サンプルがメチル化を観察されたものの（図 7A, #9）、大部分のサンプルは非メチル化状態を示した（図 7A, #1–9）。E16.5 前精原細胞由来クローン胎仔の 4 サンプルでも非メチル化状態を観察した（図 3A, #11–14）。#15 は中間的メチル化状態を、#16 および 17 は（特に母性アレルでの）高メチル化状態が観察された。E17.5 前精原細胞由来クローン胎仔 2 サンプル（図 3A, #18 および 19）は、両アレルで完全なメチル化状態を示した。以上から、IG-DMR のメチル化は E16.5 で開始し、E17.5 で完了することが分かった。

H19 DMR の DNA メチル化状態は IG-DMR と非常に類似していた。全ての E15.5 前精原細胞由来クローン胎仔および E16.5 前精原細胞由来クローン胎仔の 4 サン

ブル (図 8A. #11-14) は、ほぼ非メチル化状態を示した。#15 は僅かにメチル化状態を示し、#16 では高メチル化状態を観察した (残念ながら、#17 は *H19* DMR、*Rasgrfl* DMR、*Gtl2* DMR の解析の前に失ってしまい、メチル化状態を確認することが出来なかった)。E17.5 前精原細胞由来クローン胎仔は *H19* DMR の両アレルで完全なメチル化状態を示し、以上から、*H19* DMR のメチル化は E17.5 で完了することが明らかとなった。

Rasgrfl DMR は E15.5 および E16.5 前精原細胞由来クローン胎仔で、一貫して、非メチル化状態を示した (図 9A)。IG-DMR と *H19* DMR で高メチル化状態を示した #16 は、*Rasgrfl* DMR においては完全に非メチル化状態であった。E17.5 前精原細胞由来クローン胎仔の *Rasgrfl* DMR はいずれのサンプルでも高メチル化状態を示した。以上から、これらの結果をまとめると、*Rasgrfl* DMR は、他の父性インプリント DMR (IG-DMR および *H19* DMR) よりも遅くメチル化を獲得することを示唆している。

これら 3 領域の父性インプリント DMR の DNA メチル化レベルを一元分散分析によって解析した。結果は基本的に 3 領域とも同様であり、ドナーとして使用した前精原細胞の日齢とクローン胎仔のメチル化率の間に有意差が認められた。多重比較検定 (Scheffe の F 検定) の結果、E15.5 と E17.5 間および E16.5 と E17.5 間で有意差が確認出来た (表 7)。

母性インプリントである *Peg3* DMR は、E15.5 および E16.5 前精原細胞由来クローン胎仔で、予測通り、一貫して非メチル化状態を示した (図 10A)。この結果は、クローン胚がドナー細胞のメチル化状態を保持したまま発生していること

を示しており、核移植によってインプリント状態が乱されないという本研究の前提を補強している。

さらに、*Gtl2* DMR の DNA メチル化状態の解析を行った。secondary DMR として知られる *Gtl2* DMR は、primary DMR である IG-DMR と同じ領域 (*Dlk1-Gtl2* 領域) に存在し [Nowak *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2011]、それらのメチル化状態を比較することで、メチル化獲得プロセスの関係を観察することが可能である。その結果、前精原細胞由来クローン胎仔の *Gtl2* DMR メチル化状態は、基本的に IG-DMR と類似していた (図 11A)。実際に、IG-DMR と *Gtl2* DMR の間には高い相関性が認められた ($r = 0.97$; $P < 1.82 \times 10^{-7}$, Pearson の積率相関係数) (図 11B)。体細胞 (未成熟セルトリ細胞) 由来クローン産仔の *Gtl2* DMR は母性アレルの非メチル化および父性アレルのメチル化状態を保持しており、体細胞型のメチル化パターンが確認された (図 11C)。

前精原細胞由来クローン胎仔のインプリント遺伝子発現解析

前精原細胞由来クローン胎仔におけるインプリント遺伝子発現を定量 RT-PCR によって解析した。IG-DMR には、1 種類の Peg (*Dlk1*) と 2 種類の Meg (*Gtl2* および *Rian*) が存在する。E15.5 前精原細胞由来クローン胎仔の全てのサンプルで、Peg である *Dlk1* よりも、Meg である *Gtl2* および *Rian* の優位な発現を観察した (図 7B, #1-10)。同様の発現パターンは、インプリントが消失している E12.5 もしくは E13.5 PGC 由来クローン胎仔でも観察されたことが報告されているため [Lee *et al.*, 2002]、この発現パターンは非インプリント型の (デフォルト型の) 状態を示していると考えられる。対照的に、E16.5 前精原細胞由来クローン胎仔で

は多様な発現パターンを示した。解析した7サンプルのうち、4サンプル（#11-14）は Meg の発現が優位、2サンプル（#16 および 17）は Peg の発現が優位、1サンプル（#15）はそれら中間型の発現パターンを示した（図.7B）。E17.5 および P0.5 前精原細胞由来クローン胎仔はいずれも Peg の優位な発現パターンを示した（図.7B）。Dunnett の多重比較検定によって、#15 と #16 の間で発現パターンが有意に変化することを確認した。したがって、IG-DMR に存在する 3 遺伝子の発現パターンは、前述した IG-DMR の DNA メチル化状態（非メチル化、中間型メチル化、高メチル化状態）と高度に相関していることが分かった（図 7A）。

H19 DMR によって制御されている *H19* (Meg) と *Igf2* (Peg) についても発現解析を行った。E15.5 前精原細胞由来クローン胎仔はいずれも、Meg 優位の発現パターンであった（デフォルト型発現パターン[Lee *et al.*, 2002]）（図 8B）。E16.5 前精原細胞由来クローン胎仔においては、IG-DMR に存在する遺伝子と同様に、多様な発現パターンを示した。しかし、IG-DMR 内の遺伝子とは異なり、*H19* と *Igf2* の発現パターンは、常に *H19* DMR の DNA メチル化状態と一致しないことが観察された。例えば、#13 および #16 は *Igf2* 優位な（もしくは完全な）発現パターンを示すが（図 8B）、*H19* DMR の DNA メチル化状態と一致しない（図 8A）。

（#17 の発現状態もこれまでの結果から不適當に予測されるが、前述の理由で *H19* DMR のメチル化が確認出来なかった）。E17.5 および P0.5 前精原細胞由来クローン胎仔においては、*H19* DMR の DNA メチル化状態と一致して（図 8A）、*Igf2* 優位な発現パターンが観察された（図 8B）。Dunnett の多重比較検定から、3 サンプルのみ（#18、22、23）IVF コントロール胎仔と異なる発現パターンを示した（図 8B）。

E9.5 胎仔の *Rasgrf1* について、成体雄マウスの脳をポジティブコントロールとして、肝臓をネガティブコントロールとして使用し、RT-PCR を実施した[Plass *et al.*, 1996; Sturani *et al.*, 1997] (図 9B)。その結果、E9.5 胎仔で *Rasgrf1* は発現していないことが観察されたため、定量 RT-PCR による発現解析を行わなかった。

前精原細胞由来クローン胎仔において、母性インプリントである *Peg3* (*Peg*) および *Igf2r* (*Meg*) の発現解析も実施した。予想通り、ドナー細胞として利用したどのステージの前精原細胞でも、*Peg3* は発現を示し、*Igf2r* は低発現を示した (図 6B および図 12)。Dunnett の多重比較検定では、例外的に #16 および 18 の *Peg3* の低発現を認めたが、基本的に上記の傾向を支持していた。

ドナー細胞として利用した前精原細胞の DNA メチル化解析

最後に、ドナー細胞として利用した前精原細胞自身の DNA メチル化状態 (IG-DMR および *Gtl2* DMR) をバイサルファイトシーケンス法によって決定した。IG-DMR において、E15.5 前精原細胞は低メチル化状態 (33%) で、E16.5 前精原細胞はそれよりもやや高いメチル化状態を示し (60%)、E17.5 前精原細胞は完全なメチル化状態 (98%) を示している (図 13)、これは既報の結果と一致していた[Hiura *et al.*, 2007]。対照的に、IG-DMR 領域内に存在する secondary DMR の *Gtl2* DMR は、どのステージでも低メチル化状態を示した (<12%) (図 13)。この結果を、前精原細胞由来クローン産仔の IG-DMR および *Gtl2* DMR の DNA メチル化解析の結果と共に考慮すると、*Gtl2* DMR は生殖細胞発生中ではなく、受精後にメチル化を獲得することを示した既報の結果と一致している[Nowak *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2011]。

3.4. 考察

PGCにおけるゲノムインプリント記憶は、雌雄両方で、E11.5で消去し始め、E12.5で完了する。これはマウスのPGC由来クローン胚を用いて、DMRのDNAメチル化解析およびインプリント遺伝子発現解析から明らかにされている[*Lee et al., 2002*]。その後、性特異的に異なる発生ステージの生殖細胞で、インプリントの新しいセットが再確立する。雄では、DNAメチル化解析から、発生中の前精原細胞において、父性インプリントでメチル化を受けるDMRの有意に高いメチル化が明らかにされてきた (E14.5 : H19 DMR [*Davis et al., 2000*]、E15.5 : IG-DMR および H19 DMR [*Henckel et al., 2012*]、E16.5 : IG-DMR [*Hiura et al., 2007*])。本研究の結果では、前精原細胞由来クローン産仔のDMRのメチル化状態およびインプリント遺伝子発現パターンから、E15.5前精原細胞の父性インプリントは、デフォルト型のゲノム状態 (E12.5でインプリント消去の結果生じる同様のパターン) を維持していることが観察された。全てのデータを考慮すると、全ての父性インプリント領域におけるインプリントの確立は、E16.5の短い中間期間の後、E17.5で完了すると結論付けることが出来る。本研究で得られた前精原細胞自身のDNAメチル化状態の結果 (図13) は、既報の結果と一致している [*Henckel et al., 2012; Hiura et al., 2007*]。ただし、*Davis*らによる報告では、E14.5以降にインプリントが確立すると報告している [*Davis et al., 2000*]。この違いについて明確な答えは無いが、*Davis*らは(C57BL/6×*Mus musculus castaneus*)F₁を用いて解析しているため、この野生由来マウス系統固有の差によるものかもしれない。E15.5前精原細胞由来クローン胎仔のIG-DMRのメチル化レベルは0.2-20%であったが (図7A)、

E15.5 前精原細胞自身のメチル化レベル (33%) より低かった (図 13)。これは、E15.5 の DMR はある程度、核移植によって脱メチル化されていることを示しているのかもしれない。これは DNA メチル化単独では、受精もしくは核移植におけるグローバルな脱メチル化に対して、インプリントを保護するために十分でないと仮定するのが妥当であろう。グローバルな脱メチル化に対して、インプリントは、ヒストンのメチル化などの他の抑制的エピジェネティックマークによってより安定化する可能性が高い。ヒストン H3K9 ジメチルあるいはトリメチルが精子および体細胞の父性インプリント DMR に多く存在していることが知られている [Delaval *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2012]。

本研究の結果から、前述したように、父性インプリントを受ける 3DMR は、基本的に、共通の時間経過を追っていることが分かった。これは、直径特異的に異なる時期に獲得する母性インプリントと大きく異なる。さらに、父性インプリントを受けるタイミングに DMR 固有の僅かな差が存在することが明らかとなった。これは、同一クローン胎仔内の異なる DMR のインプリント状態が比較可能であるため、核移植技術を用いてこそ見えてきた結果であろう。 *Rasgrfl* DMR は他の 2DMR に比べ、インプリントが確立するタイミングが遅いように観察された。この DMR 特異的なタイミングの差について、正確なメカニズムは分からないが、 *Rasgrfl* DMR のインプリント確立のメカニズムは、いくつかの点で IG-DMR もしくは *H19* DMR と異なることが、先行研究により知られている。 *Rasgrfl* DMR の DNA メチル化には、 *Dnmt3A* だけでなく *Dnmt3b* も必須で、さらに piRNA (Piwi-interacting RNA) 経路も必要であることが報告されている [Kato *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2011]。さらに、ヒトにおいては、IG-DMR および *H19* DMR は存

在するものの、*Rasgrfl* DMR は存在しないことが知られている[Pitamber *et al.*, 2012]。

ゲノムインプリンティングを研究するために核移植技術を用いる他の重要な利点は、生殖細胞由来クローン胎仔もしくは胎盤のインプリント遺伝子発現を観察できる点である。本研究では、IG-DMR 領域における、DNA メチル化状態と遺伝子発現パターンの中に整合した相関関係があることを見出した。IG-DMR 領域のインプリント遺伝子が強く発現したことを確認したが、これはこの領域のインプリント遺伝子は基本的に IG-DMR のメチル化が上位に制御し、primary DMR の後に secondary DMR のメチル化が非独立的に連続してメチル化を獲得することを意味している。この仮定は、IG-DMR の制御下にある可能性があった、*Gtl2* DMR での観察結果と一致する（下記参照）。対照的に、*H19* DMR 領域に存在する *H19* および *Igf2* の発現パターンは、いくつかのサンプルで *H19* DMR のメチル化パターンと整合せず、*H19* DMR のメチル化状態だけでは説明することが出来なかった。この *H19* DMR 領域における予測と一致しない結果は、E15.5 および 17.5 の前精原細胞由来クローン産仔のデータが常に他領域の結果と一貫していたため、技術的なエラーや核移植がもたらす異常によって引き起こされている可能性はかなり低いと考えられる。これまで、マウス発生における、*H19* と *Igf2* の発現制御は、インスレーターモデルとしてよく知られている。ネガティブ母性アレルでは、*H19* 上流のクロマチン境界に存在する *H19* DMR が非メチル化状態にあると、ジンクフィンガータンパク質である CTCF (CCCTC-binding factor) が結合することで、*Igf2* プロモーターにエンハンサーのアクセスが阻害され、結果として、*Igf2* の発現抑制と *H19* の発現上昇が起こる[Bell and Felsenfeld, 2000]。しかし、他の要素も

H19 と *Igf2* の発現に影響する可能性があるため、実際のメカニズムはもっと複雑であっても良いはずである。実際に、*H19* の下流には組織特異的（内胚葉および中胚葉特異的）エンハンサーが存在しており、これが差次的な CTCF 依存的に働くかもしれない。*Igf2* 領域には、組織特異的プロモーターと DMR サイレンサー（DMR1）および DMR アクティベーター（DMR2）があり、アクティブ父性アレルではこれら DMR はメチル化されている[Constancia *et al.*, 2000; Murrell *et al.*, 2001]。DMR1 を欠損させると、中胚葉組織において *H19* DMR のメチル化状態に関係なく、*Igf2* の発現が確認されている[Constancia *et al.*, 2000]。これら要素の存在のため、E16.5 前精原細胞由来クローン産仔で、*H19* DMR のメチル化状態だけでは説明できない、多様な発現パターンを引き起こした可能性がある。その後、E17.5 および P0.5 前精原細胞由来クローン産仔は予測通りの発現パターンを示している。

インプリンティング領域内の DMR には2種類存在することが知られている。primary DMR は主に生殖細胞発生中に差次的にメチル化を受ける領域で、secondary DMR は受精後にメチル化を受ける領域である。ヒトおよびマウスでは、*Gtl2* DMR (*Meg3* DMR と呼ばれる) が secondary DMR 研究のために最も広く選択されている。マウスにおいて、雄性生殖細胞発生中の *Gtl2* DMR はメチル化を受けないことが確認されており[Nowak *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2011]、本研究においても、E15.5 から E17.5 の前精原細胞自身の *Gtl2* DMR はメチル化されないことを確認した（図 13）。マウス *Gtl2* DMR の父性アレルは、E3.5 から E6.5 の体細胞でメチル化を獲得する[Nowak *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2011]。前精原細胞自身および前精原細胞由来クローン胎仔のメチル化解析結果から、*Gtl2* DMR は核移植後の

ある時点（遅くとも E9.5 以前）で、メチル化を獲得していることが示された。重要なポイントは、異なるインプリント状態を持つクローン胎仔の解析から、IG-DMR と *Gtl2* DMR のメチル化レベルは高度に相関していることである ($r = 0.97$; $P < 1.82 \times 10^{-7}$) (図 11B)。このことは、ヒトにおける疾患で、*MEG3* DMR の微小欠失がシスに IG-DMR のメチル化状態に高く依存する知見と一致している [Kagami *et al.*, 2010]。Okae らによる報告でも、体細胞由来クローン産仔の IG-DMR と *Gtl2* DMR のメチル化が高度に相関していることが示されている [Okae *et al.*, 2013]。遺伝子ターゲティングによる研究から明らかにされてきているように、*Gtl2* DMR のメチル化は少なくとも妊娠中期後に *Gtl2* のインプリント発現をもたらす [Sekita *et al.*, 2006; Steshina *et al.*, 2006]。以上をまとめると、IG-DMR によって *Gtl2* DMR は段階的に（階層的に）制御されており、これによって *Gtl2* のインプリント発現が保証されている可能性が高い。

E16.5 前精原細胞由来クローン胎仔では、IG-DMR および *H19* DMR で中間型のメチル化状態が観察された。これらクローン胎仔は、メチル化および非メチル化が混合された細胞を保持しているために、非常に興味深い。これはドナー細胞ゲノムのヘミメチル化 DNA が細胞分裂によって分配された結果として生じているのかもしれない。それぞれのクローンは G0/G1 期の単一ドナー細胞に由来しているが [Inoue *et al.*, 2003; Wakayama *et al.*, 1998]、この細胞は二本鎖 DNA が両アレルで構成された、 $2n$ の二倍体ゲノムを保持している。ゆえに、理論的には、ドナーゲノム中の DMR におけるアレルがヘミメチル化されている場合、核移植後の S 期で、*Dnmt1* 活性によって [Hirasawa *et al.*, 2008]、メチル化アレルと非メチル化アレルの両方が生じる。これらは、第一分割で姉妹割球にそれぞれ分離される。こ

れら二つの割球は発生に伴って均等に、胚および組織に分散していくため [Kurotaki *et al.*, 2007]、ヘミメチル化ドナー細胞由来クローン胎仔の DMR における DNA メチル化レベルは約 50%となる。このメチル化・非メチル化は、父性アレルと母性アレルはそれぞれ独立して生じると予測できる。例えば、IG-DMR において、#15 の両アレルと、#16 および 17 の父性アレルはドナー細胞ゲノムのヘミメチル化状態を示している可能性がある (図 7A)。この仮説を支持する報告として、卵子特異的に Dnmt1 を欠乏させた胚発生において、類似した現象が観察されている [Hirasawa *et al.*, 2008; Howell *et al.*, 2001]。これらの胚では、分割前の両アレルの DMR はそれぞれのアレルで性特異的にメチル化されていたものの、ヘミメチル化 DMR が Dnmt1 欠乏の結果生じたことを確認している。Dnmt1 活性が ZGA (zygotic gene activation) によって回復すると、これらヘミメチル化アレルは娘細胞においてメチル化アレルと非メチル化アレルそれぞれが生じた。これによって、後期胚および胎仔へのメチル化アレルおよび非メチル化アレルを有する細胞が混合している状態をもたらしたと推察される。

結論として、本研究では、全ての父性インプリント領域におけるインプリントは、E16.5 の短い中間期間を経て、E17.5 で完了することを示した。さらに、*Rasgrfl* DMR は他の 2 領域よりもインプリントの確立が僅かに遅れることを示した。また、IG-DMR は単体でその領域内に存在するインプリント遺伝子を制御するが、*H19* DMR のみではインプリント遺伝子を制御しない可能性が示唆された。受精後にメチル化を獲得する secondary DMR として知られる *Gtl2* DMR はその上流に存在する IG-DMR に従ってメチル化を獲得する可能性が示唆された。

表 5. DNA メチル化解析および遺伝子発現解析に使用したプライマーセット

遺伝子または DMR	解析法	Forward	Reverse
<i>Dlk1</i>	定量 RT-PCR	TTACCGGGGTTCTTAGAGC	TGCATTAATAGGGAGGAAGGG
<i>Gtl2</i>	定量 RT-PCR	TTGCACATTTCTGTGGGAC	AAGCACCATGAGCCACTAGG
<i>Rian</i>	定量 RT-PCR	TCGAGACACAAGAGGACTGC	ATTGGAAGTCTGAGCCATGG
<i>H19</i>	定量 RT-PCR	TTGCACTAAGTCGATTGCACT	GGAAGTCTCCAGACTAGGC
<i>Igf2</i>	定量 RT-PCR	CTAAGACTTGGATCCCAGAACC	GTTCTTCTCCTTGGGTTCTTTC
<i>Rasgrf1</i>	定量 PCR	GGCTCATGATGAATGCCTT	TACAGAAGCTTGGCGTTGTG
<i>Peg3</i>	定量 RT-PCR	TAAGCAATACGGGCAGCCT	CCAACAACTTCTGGTAACGC
<i>Igf2r</i>	定量 RT-PCR	TAGTTGCAGCTCTTGCACG	ACAGCTCAAACCTGAAGCG
<i>Actb</i> (β -actin)	定量 RT-PCR	AAGTGTGACGTTGACATCCG	GATCCACATCTGCTGGAAGG
IG-DMR	バイサルファイトシーケンス	GGTTTGGTATATATGGATGTATTGTAATATAGG	ATAAAACACCAAATCTATACCAAATATACC
<i>H19</i> DMR	バイサルファイトシーケンス	GGAATATTTGTGTTTTTGGAGGG	TTAAACCCCAACCTCTACTTTTATAAC
<i>Rasgrf1</i> DMR	バイサルファイトシーケンス	GGTGTAGAATATGGGGTTGTTTTATATTGT	CAATATAAAACAAAACAACAATAATAACT
<i>Peg3</i> DMR	バイサルファイトシーケンス	TTGATAATAGTAGTTTGATTGGTAGGGTGT	ATCTACAACCTTATCAATTACCCTTAAAAA
<i>Gtl2</i> DMR	バイサルファイトシーケンス	GGATTAGTTTTTTTGTGTTAAGTTTTAGAG	TAAAAACTATCACCCCCACATAAAATACCC

表 6. 異なる発生ステージの前精原細胞由来クローン胚の発生率

ドナー細胞の 発生ステージ	ドナー系統	胚培養数	24 時間後の 2 細胞期胚(%)	胚移植数	着床数(%)	E9.5 胎仔数(%)
E15.5	129 × JF1	208	187 (89.9)	175	54 (30.9)	11 (6.3)
E16.5	C57BL/6 × JF1	326	298 (91.4)	270	79 (29.3)	2 (0.7)
	129 × JF1	390	338 (86.7)	327	114 (34.9)	6 (1.8)
E17.5	129 × JF1	152	144 (94.7)	100	81 (81.0)	2 (2.0)
P0.5	129 × JF1	148	95 (64.2)	74	24 (32.4)	7 (9.5)

表 7. 前精原細胞の DMR における DNA メチル化レベルの発生ステージに対する影響

DMR	発生ステージの 効果(ANOVA)	多重比較検定 (Scheffe の F 検定)		
		E15.5 vs. E16.5	E15.5 vs. E17.5	E16.5 vs. E17.5
IG-DMR	< 0.005	有意差なし	< 0.005	< 0.005
<i>H19</i> DMR	< 0.05	有意差なし	< 0.05	< 0.05
<i>Rasgrf1</i> DMR	< 0.001	有意差なし	< 0.001	< 0.001

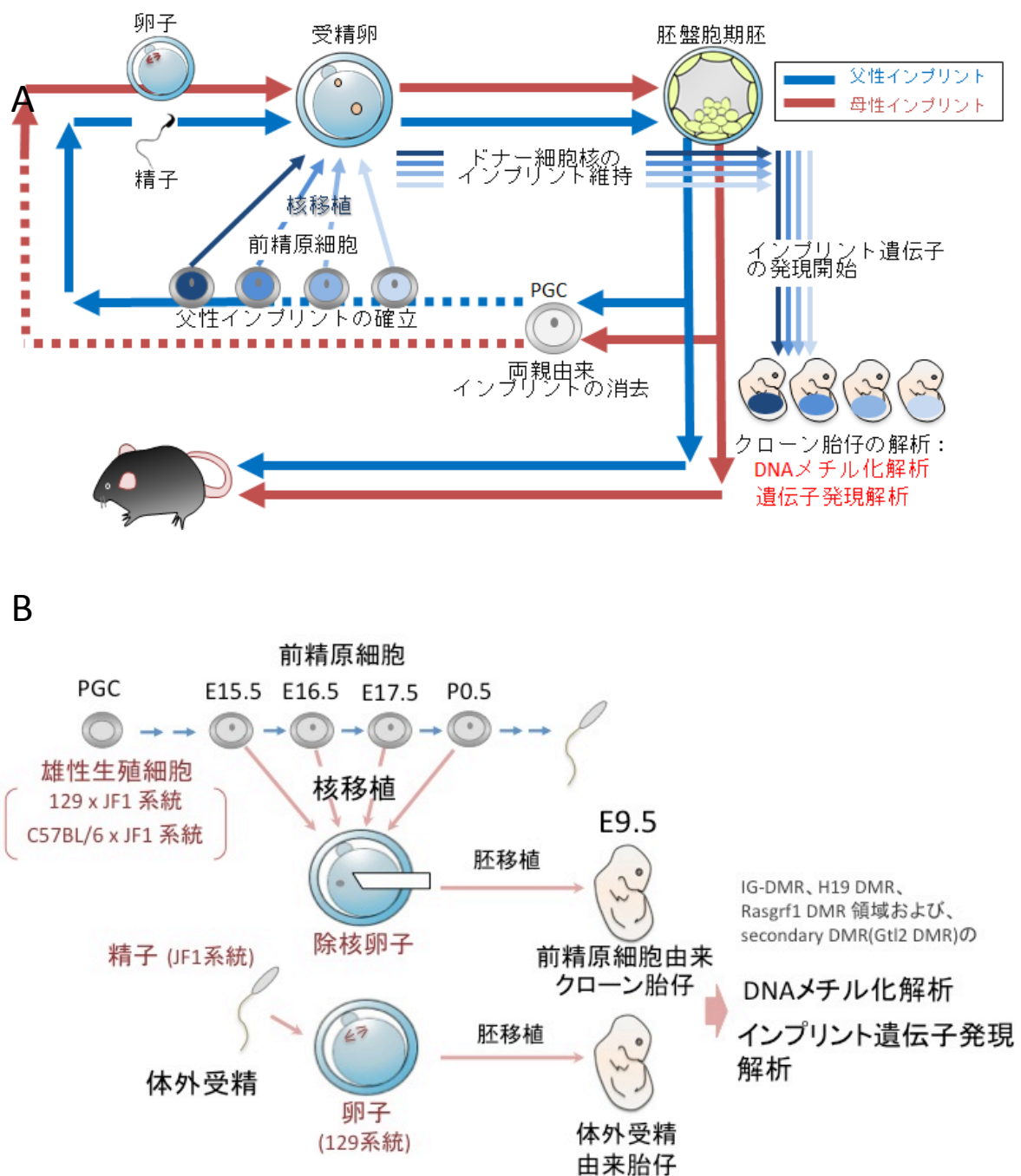


図 4. 本研究の実験スキーム

A) 異なるステージの前精原細胞から核移植を用いてクローン胎仔(E9.5)を作出し、DMRのDNAメチル化およびインプリント遺伝子発現を解析した。核移植由来クローン胚はドナー細胞ゲノムのインプリント状態を保持することが知られて

いる[Lee et al., 2002; Obata and Kono, 2002]。この戦略に沿うと、DMRのDNAメチル化パターンとインプリント遺伝子発現パターンから、父性インプリントに関する系統的情報を得ることができる。B) 本研究における実験方法および材料についての模式図。前精原細胞由来胎仔およびIVF由来胎仔(コントロール)をE9.5で解析した。いずれの場合も(129xJF1) F_1 の遺伝子型を持っていた(ただし#12および#13のみ(C57BL/6xJF1) F_1)。

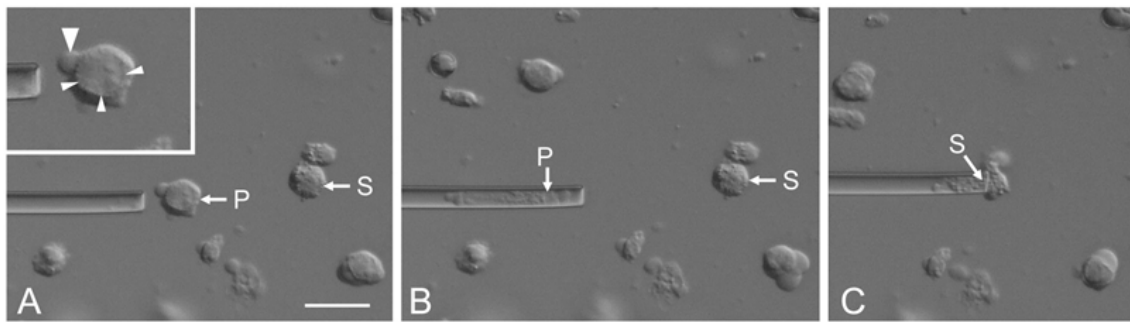


図 5. 生殖腺懸濁液からの核移植用前精原細胞の選択

A) 前精原細胞は、細胞質よりも細胞核が占める比率が高くさらに特徴的な仮足(アローヘッド大)と核膜(アローヘッド小)を有するため、生殖腺体細胞と容易に区別可能であった。B) 前精原細胞は非常に柔軟で、細胞直径(10-15 μm)よりも小さい、内径 5-7 μm のマイクロピペットで容易にピックアップできた。C) 生殖腺体細胞を同じピペットでピックアップすると、細胞が持つ物理的な剛性のためにピペット先端に付着した。P = 前精原細胞、S = 生殖腺体細胞。Bar = 20 μm 。

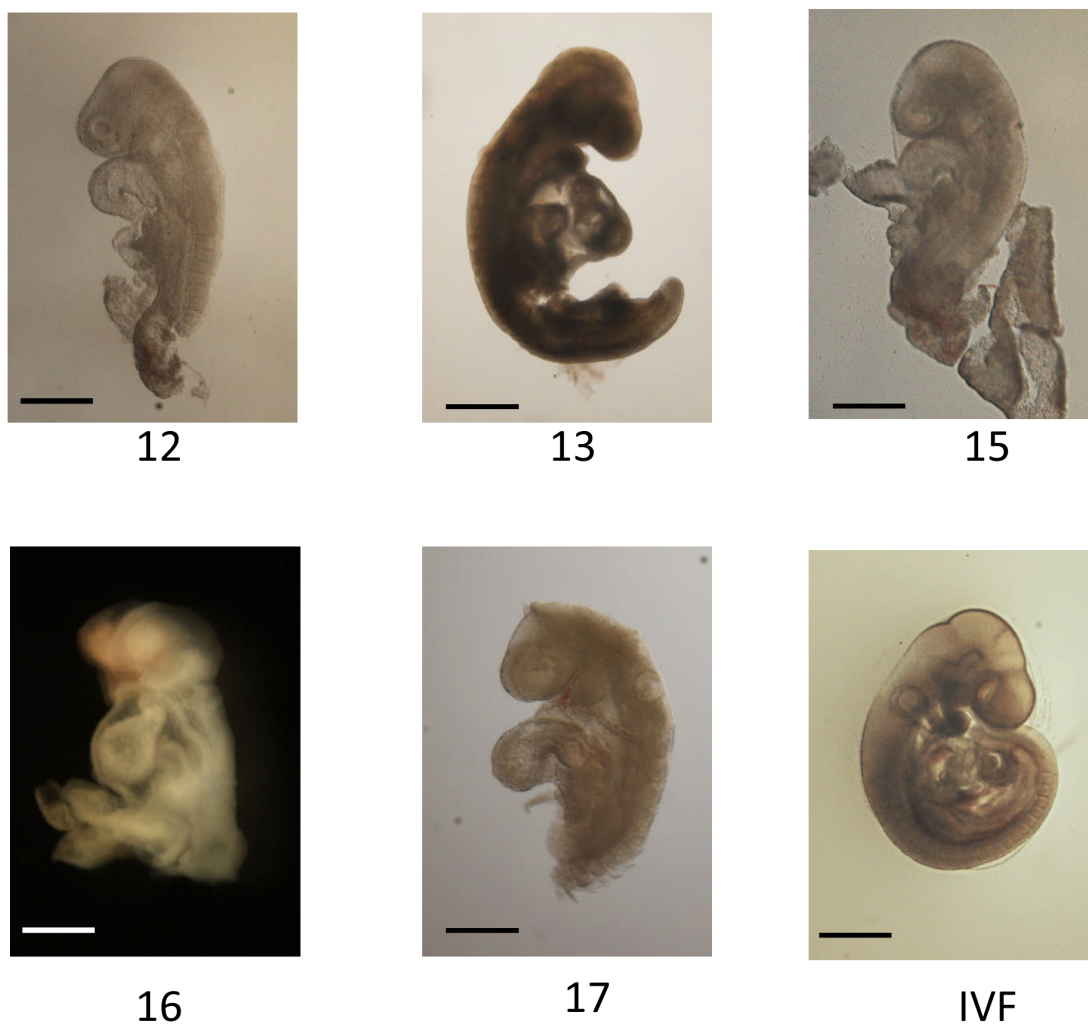


図 6. E16.5 前精原細胞由来クローン胎仔および IVF 由来胎仔

クローン胎仔は大きさと形態がそれぞれ異なっていたが、全てのサンプルで心臓の鼓動を確認した。クローン胎仔の下に記した数字は他の図中のサンプル番号に対応している。 Bar = 500 μ m。

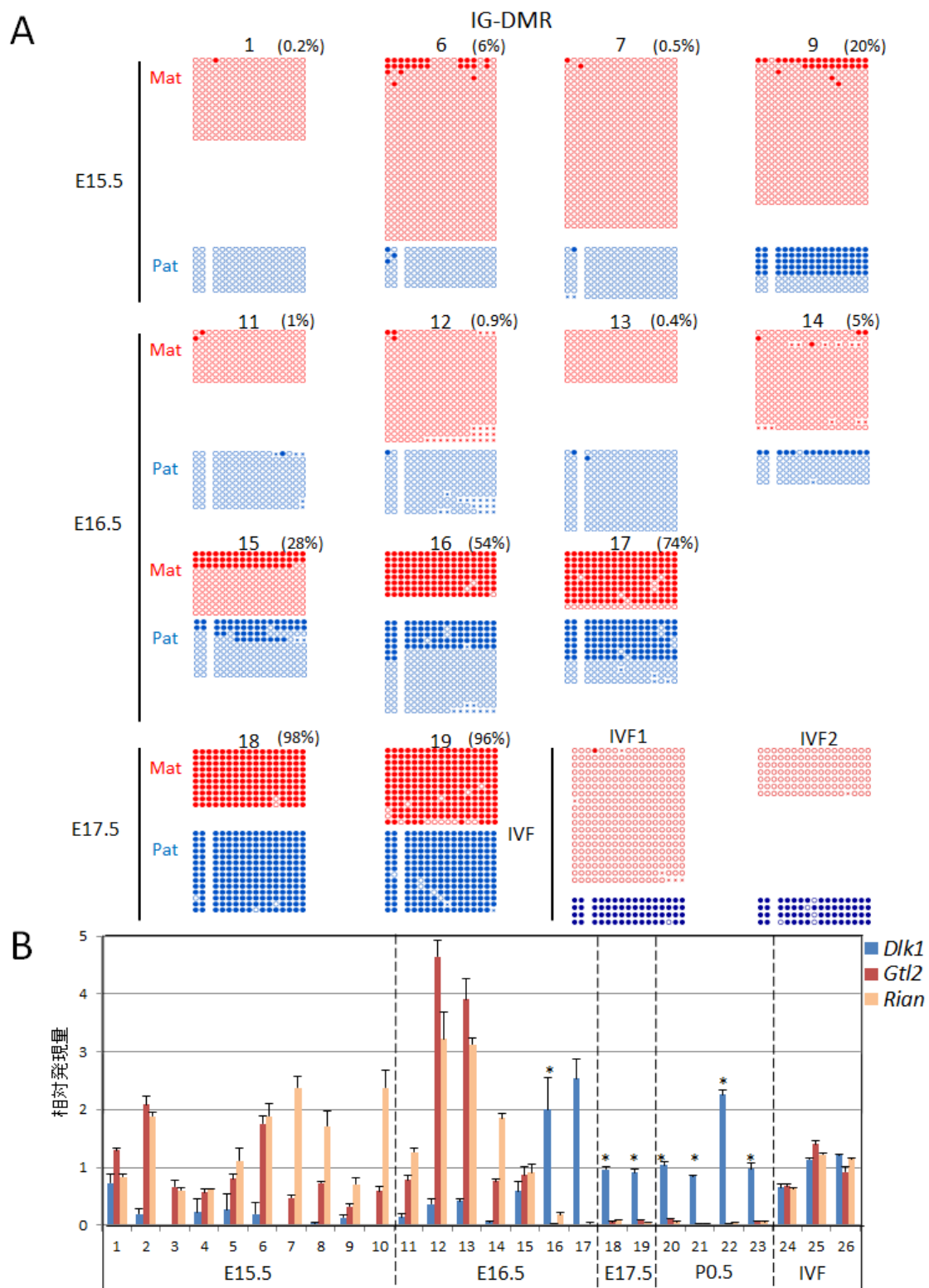


図 7. 異なる発生ステージの前精原細胞由来クローン胎仔における IG-DMR の DNA メチル化率(A)および *Dlk1*、*Gtl2* および *Rian* の発現量(B)

メチル化および発現データに表記されている数字は胎仔のサンプル番号を示す(以下の図においても同様)。A) E15.5 前精原細胞由来クローン胎仔のすべてにおいて、また E16.5 前精原細胞由来クローン胎仔の 4 サンプル(#11-14)は主に非メチル化状態を示した。#15 は中間型メチル化状態を示し、#16 および 17 は高メチル化状態を示した。全ての E15.5 前精原細胞由来クローン胎仔は完全にメチル化状態を示した。B) インプリント遺伝子の発現パターンは DMR のメチル化状態と相関していた。E15.5 では Meg(*Gtl2*, *Rian*)優位な発現を、E17.5 では Peg(*Dlk1*)優位な発現を示した。E16.5 では DMR のメチル化状態と一致して、多様な発現パターンを示した。バーの上のアスタリスクは発現量比(Peg:Meg)が IVF 胎仔と大幅に異なっていることを示す(Dunnett の多重比較)。そのとき#17 は外れ値であったため統計解析から除外した(Grubbs の外れ値検定、 $P < 0.01$)。エラーバーは標準誤差を示す。

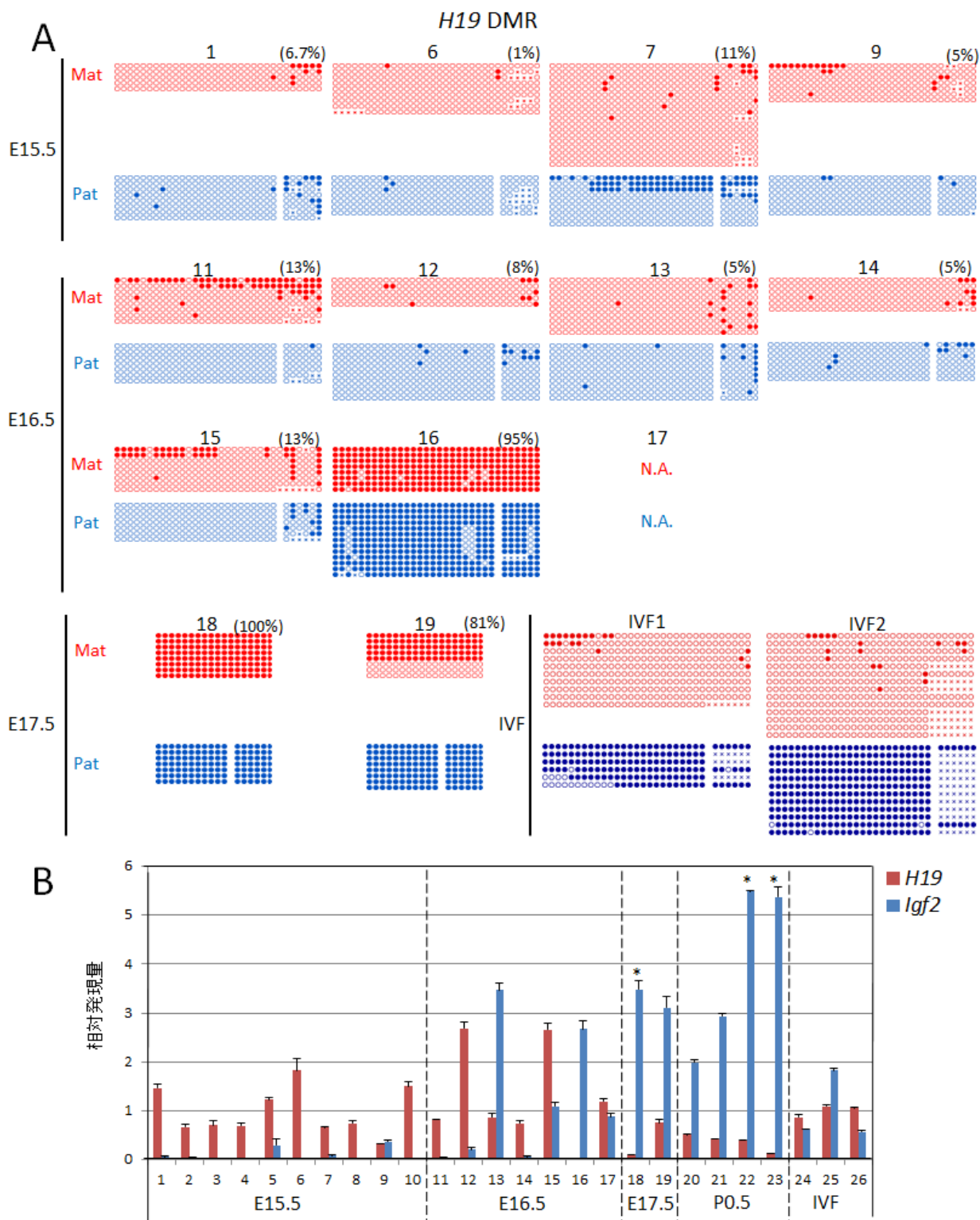


図 8. 異なる発生ステージの前精原細胞由来クローン胎仔における *H19* DMR の DNA メチル化率(A)および *H19* および *Igf2* の発現量(B)

A) *H19* DMR の DNA メチル化状態は図 7A で示した IG-DMR と非常に類似していた。E15.5 の前精原細胞由来クローン胎仔の全サンプルおよび E16.5 の 4 サンプル (#11-14) の *H19* DMR は非メチル化状態を示した。#15 は僅かにメチル化を示し、#16 は高メチル化状態を示した。E17.5 の全サンプルは完全にメチル化されていた。N.A. = not analyzed。B) *H19* DMR のメチル化パターンから予想された通り、E15.5 由来クローン胎仔の全て *H19* との *Igf2* の発現は *H19* 優位な発現パターンとなった。E16.5 由来クローン胎仔では DMR のメチル化状態と一致せず、多様な発現パターンを示した(結果および考察参照)。予想通り、E17.5 および P0.5 由来胎仔では *Igf2* 優位な発現パターンを示した。バーの上のアスタリスクは発現量比 (Peg:Meg) が IVF 胎仔と大幅に異なっていることを示す(Dunnett の多重比較)。エラーバーは標準誤差を示す。

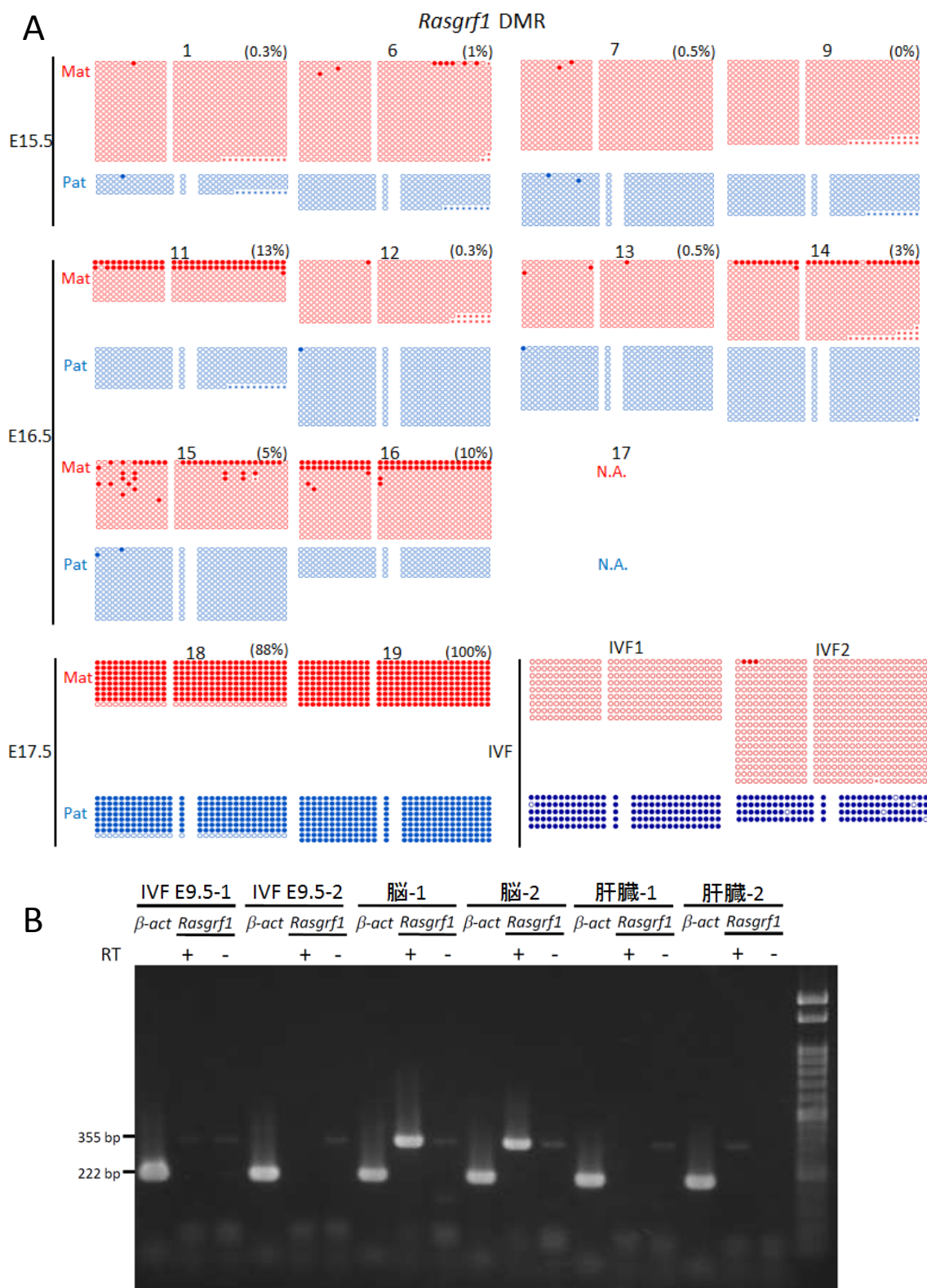


図 9. 異なる発生ステージの前精原細胞由来クローン胎仔における *Rasgrf1* DMR の DNA メチル化率(A)および *Rasgrf1* 発現解析(B)

A) E15.5 および E16.5 由来クローン胎仔(IG-DMR および *H19* DMR で高メチル化を示したサンプル(#16)を含む(図 7A および 8A))で一貫した非メチル化状態を示した。E17.5 由来クローン胎仔は完全にメチル化状態を示した。N.A. = not analyzed。

B) E9.5 胎仔や成体組織における *Rasgrfl* の発現解析。(129xJF1) F_1 由来 IVF 由来 E9.5 胎仔および成体雄の脳や肝臓の RNA について RT-PCR を実施した。*Rasgrfl* の発現は 355 bp、*Actb*(β -actin)は 222 bp を示す。+は逆転写酵素有りおよび-は無しの cDNA 合成の結果を示している。*Rasgrfl* は成体の脳では発現し、成体の肝臓もしくは E9.5 胎仔で発現が見られなかった。他の父性インプリント遺伝子とは異なり、*Rasgrfl* 発現は E9.5 胎仔で検出されなかったため、*Rasgrfl* の定量 RT-PCR は実施しなかった。

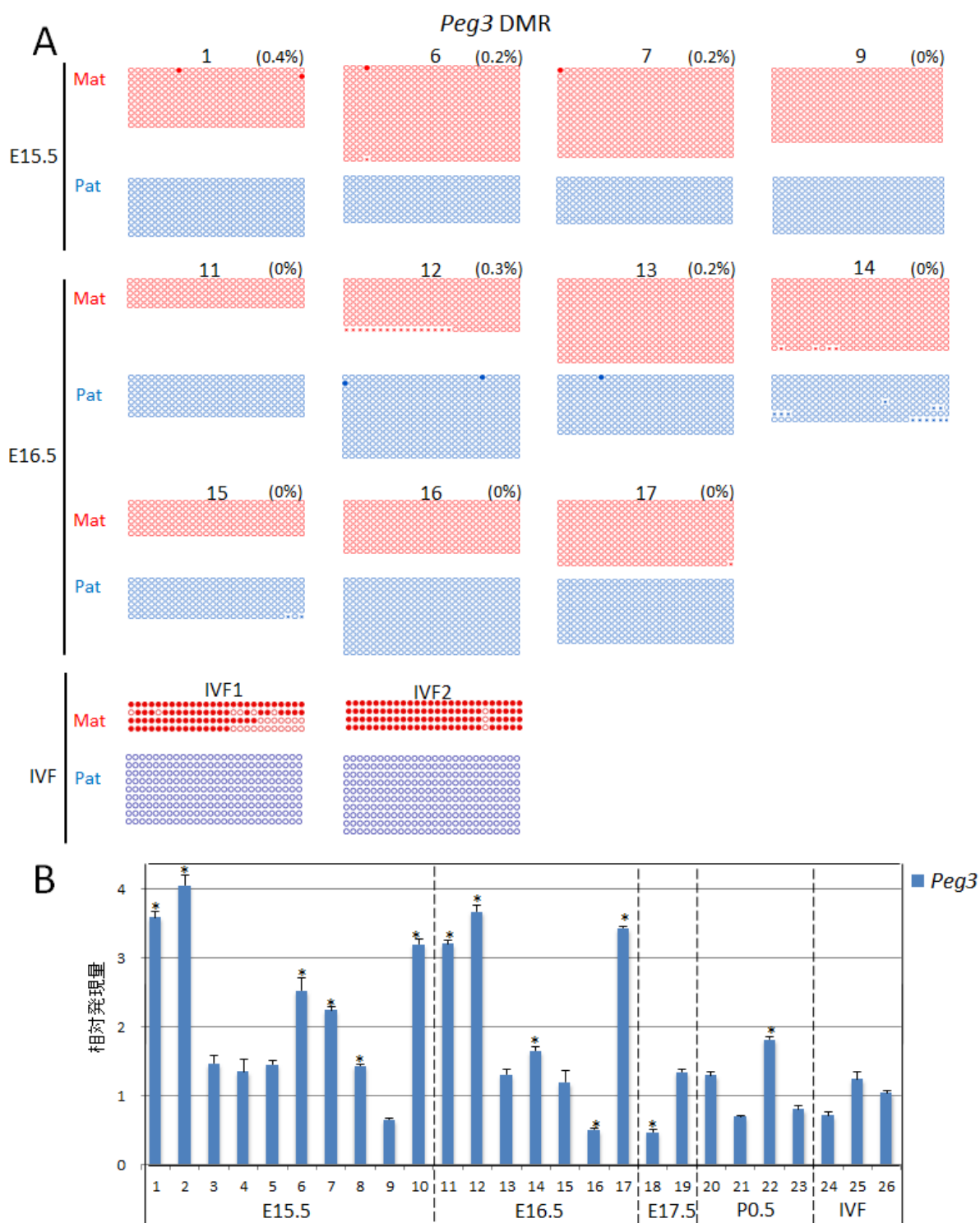


図 10. 異なる発生ステージの前精原細胞由来クローン胎仔における *Peg3* DMR の DNA メチル化率(A)および *Peg3* の発現量(B)

Peg3 は母性インプリント遺伝子であるために、全てのステージのクローン胎仔で *Peg3* DMR の非メチル化状態と *Peg3* の高発現状態が示された。(B)におけるバーの上のアスタリスクは発現量比(Peg:Meg)が IVF 胎仔と大幅に異なっていることを示す(Dunnett の多重比較)。エラーバーは標準誤差を示す。

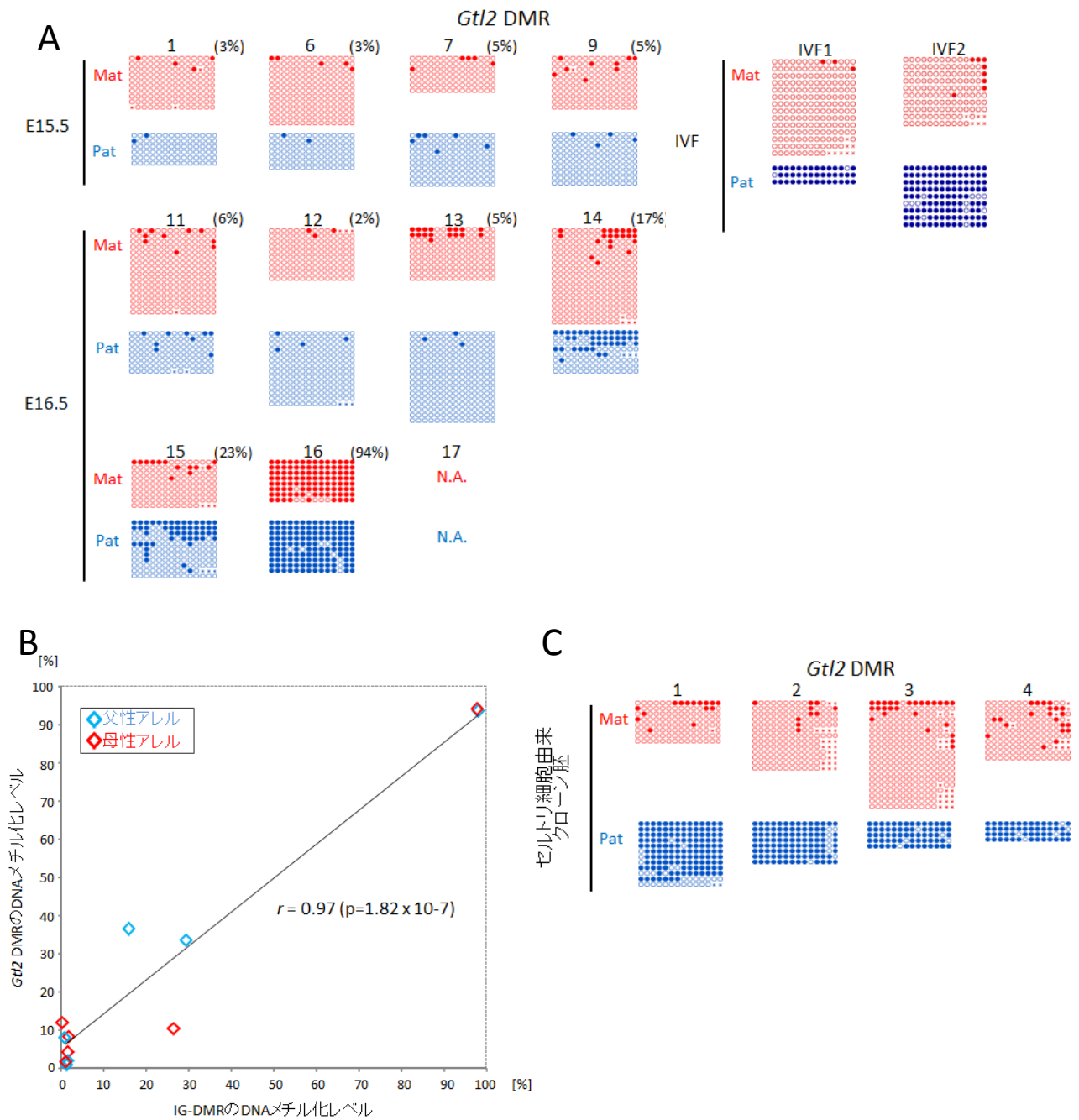


図 11. 異なる発生ステージの前精原細胞由来クローン胎仔における *Gtl2* DMR の DNA メチル化解析(A)、*Gtl2* DMR と IG-DMR 間の相関分析(B)、体細胞(セルトリ細胞)由来クローン胎仔における *Gtl2* DMR の DNA メチル化解析 (C)

A) *Gtl2* DMR のメチル化レベルは IG-DMR と高度に相関していた。N.A. = not analyzed。B) E16.5 前精原細胞由来クローン胎仔の IG-DMR と *Gtl2* DMR 間のメチル化状態に有意な相関が観察された($r = 0.97$; $P < 1.82 \times 10^{-7}$, Pearson の積率相関係数)。C) 全てのセルトリ細胞由来クローン胎仔は父性アレルで完全なメチル化、母性アレルで非メチル化状態を観察し、これは予想された体細胞型のメチル化状態を示した。

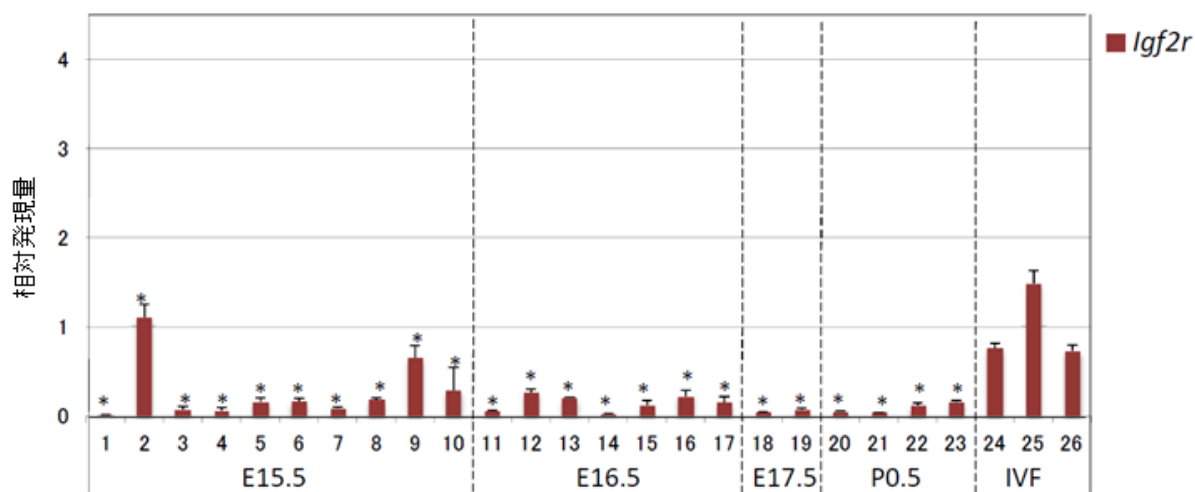


図 12. 前精原細胞由来クローン胎仔における *Igf2r* 発現量

Igf2r は母性インプリント遺伝子で、予想通り、これらの胚ではほとんど発現を示さないか僅かに発現を示した。バーの上のアスタリスクは発現量比(Peg: Meg)が IVF 胎仔と大幅に異なっていることを示す(Dunnett の多重比較)。エラーバーは標準誤差を示す。

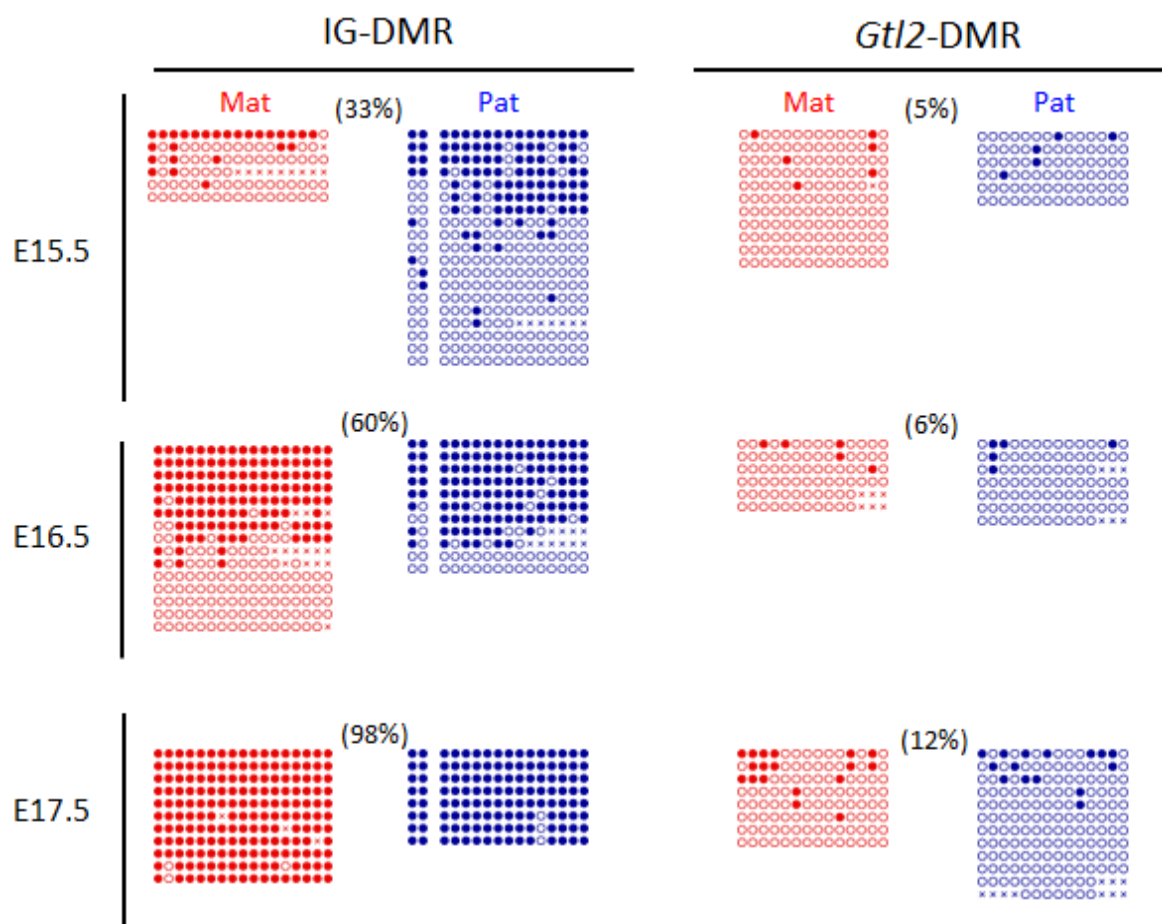


図 13. 核移植のドナー細胞として用いられた前精原細胞の DNA メチル化状態

primary DMR の代表として IG-DMR を、secondary DMR の代表として *Gtl2* DMR の解析を行った。前精原細胞における IG-DMR の DNA メチル化状態は、発生に伴って増加し、E17.5 で完全なメチル化を示した。対照的に、*Gtl2* DMR はいずれのステージでも低メチル化状態を示した。

第4章

総論

実用化としての核移植技術

本研究では、これまでのマウス体細胞核移植クローン技術よりもさらに実用的に用いるための核移植システムの構築を目指し、末梢血球細胞を用いた新たな作成法の開発を行った。その結果、微量血液（15–45 μ l）に由来するマウス末梢血球細胞を用いてクローン産仔が獲得出来ることを初めて証明することに成功した。本法は、体外受精や顕微授精のような生殖補助技術によって保存・維持することが困難な貴重なマウス系統を複製するために使用することが期待できる。

生物・医学研究において遺伝子改変マウスは、もはや欠かせないものとして、多くの実験動物施設及び研究室で飼育されているが、貴重なマウス系統が不妊・事故などの理由により、その系統が途絶えそうになることも想定される。危機回避の観点から、配偶子や胚の凍結保存技術は強力なツールであるが[Ostermeier *et al.*, 2008]、大規模な飼育施設では系統数が多い場合に、全ての系統でバックアップを取るには手間がかかり、生体による維持に頼らざるを得ないことがある。実際に系統が断絶しそうになった場合、体外受精や顕微授精は個体を維持するための有効な手段として考えられるが[Ogura *et al.*, 2005]、受精可能な精巢上体尾部精子が存在しないときには、体外受精を行うことは難しい。顕微授精は成熟精子のみならず、未成熟精子細胞を利用して産仔を獲得することが可能であるが、未成熟精子細胞すら存在しない雄や雌においては、顕微授精よりも核移植クローンを

用いた「個体の復活」が有効である。ドナーマウス個体から非侵襲的に、すぐに血液を採取できるため、レシピエント卵子を用意するための過排卵処理にかかる3日を待つのみで核移植を実施できるのも利点である。また、繰り返し血液を採取することができるため、ドナー個体が生きている限り、核移植を行うこともできる。

近年、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いた遺伝子改変マウス系統の作出が報告された[Mashiko *et al.*, 20014; Wang *et al.*, 2013]。ヒト U6 ポリメラーゼ III プロモーターから発現される guide RNA と Cas9 タンパク質の共発現をするベクターを受精卵内で発現させることによって作出する。ゲノム DNA 上のターゲット配列の 3'末端側に存在する PAM 配列 (NGG) を目印として、Cas9 タンパク質はターゲット配列に相補的な gRNA と複合体を形成してターゲット配列を認識し、PAM 配列より上流の二本差 DNA を切断する。切断されたゲノム DNA が修復または組み換えされることを利用して、ノックアウトやノックイン系統マウスの作出が可能となる[Gaj *et al.*, 2013; Hsu *et al.*, 2014]。この方法は、これまでの DNA 前核注入法や ES 細胞キメラを介した方法に比べ、遺伝子改変系統の作出効率が良く、時間もかからない。このことは遺伝子改変系統の作出が非常に手軽になったことを意味しており、今後、遺伝子改変マウス系統は爆発的に増えることが予測される。本研究で開発した、末梢血球細胞由来クローンは、遺伝子改変系統ファウンダーマウスの複製や SPF 化など等への利用も考えられ、今後の実用的な利用に期待できるであろう。

マウスのみならず、様々な動物種で CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いた遺伝子改変が報告されている[Gaj *et al.*, 2013]。特に、これまで ES 細胞の樹立が

困難な動物種や生殖系列に寄与しにくい ES 細胞であった場合に、この CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムは有用である。これまで、家畜においては核移植技術によって遺伝子改変動物を作出する戦略が用いられてきた。今後、家畜においては、この戦略は CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムに変わるかもしれない。

応用研究としての核移植技術

本研究では、核移植技術を用いたエピジェネティクス研究モデルを補強するために、ゲノムインプリンティングに着目し、マウス雄性生殖細胞（前精原細胞）をドナーとしたクローン胚を解析することで父性インプリントの確立についてより詳細なメカニズムを見出すことも目指した。その結果、全ての父性インプリント領域におけるインプリントは、E16.5 の短い中間期間を経て、E17.5 で完了することを示した。さらに、*Rasgrf1* DMR は他の 2 領域よりもインプリントの確立が僅かに遅れることを示した。また、IG-DMR は単体でその領域内に存在するインプリント遺伝子を制御するが、*H19* DMR のみではインプリント遺伝子を制御しない可能性が示唆された。受精後にメチル化を獲得する secondary DMR として知られる *Gtl2* DMR はその上流に存在する IG-DMR に従ってメチル化を獲得する可能性が示唆された。

以上の結論は、前精原細胞ドナー細胞として利用した核移植技術によってのみ観察できる結果である。これまでの解析法では前精原細胞集団による DNA メチル化解析によってのみ、個別の DMR のメチル化状態を観察するに過ぎなかった。核移植クローンを用いることで、単一細胞内のそれぞれの DMR の関係性を示す

ことが出来た。さらに、前精原細胞由来クローン胎仔のヘミメチル化 DNA が観察されたことも核移植によってもたらされた結果であろう。

マウス体細胞核移植クローンにおいて、これまで様々なエピジェネティック異常が生じることが明らかにされてきている。例えば、これまでの研究では、X染色体不活性化に関わる *Xist* の異常な発現が核移植クローン胚の低発生率を示していることがノックアウトおよびノックダウンを用いた研究により明らかにされている [Inoue *et al.*, 2010; Matoba *et al.*, 2011]。この異常な *Xist* 発現を逆にとり、様々な発生ステージの生殖細胞をドナー細胞とした核移植由来胚の *Xist* 発現を解析することで、インプリント型 X 染色体不活化をもたらすインプリントの確立および消去のタイミングが明らかにされている [Oikawa *et al.*, 2014]。

さらに、体細胞クローン胚にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) を作用させると、クローン胚の発生率が向上することが知られている [Kishigami *et al.*, 2006]。本研究においてもこの方法を併用した。これは HDACi によって、クローン胚のヒストンアセチル化レベルを高くし、結果として異常な DNA メチル化を抑制することで、初期化および正常な遺伝子発現が促進したためと推察される [Kishigami *et al.*, 2006]。つまりクローン胚では異常なヒストン脱アセチル化を生じていると考えられる。以上を考慮すると、体細胞核移植クローンで観察される異常なエピジェネティック状態とそれにより引き起こされる表現型を解析することで、様々な制御機構を明らかにすることが出来ると推測できる。これは、実用化面ではデメリットになるが、エピジェネティクス解析系としては非常に有利な点である。前述の *Xist* の異常発現を補正する方法や HDACi を用いる方法でクローンマウスの発生率は大幅に改善されつつあるが、未だ胎盤過形成や代謝異常の

表現型は解消されていない。今後、この表現型を引き起こすエピジェネティクスを解析することで、実用化面でも大きく進歩するだろう。

以上のように本研究においては、核移植技術の新しい実用的利用法の可能性を示すとともに、そのエピジェネティクス研究への応用の意義を高めることに成功した。

第 5 章

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました、指導教官である小倉淳郎先生（筑波大学生物資源科学研究科生物機能科学専攻教授・理化学研究所バイオリソースセンター 室長）に心から感謝申し上げます。時に応じて、激励を頂き、辛抱強くご指導頂いたこと、深く感謝申し上げ、今後更なる研鑽を積んで参ります。

学位論文審査において、貴重なご指導とご助言を頂いた、馬場忠先生（筑波大学筑波大学生物資源科学研究科生物機能科学専攻 教授）、柏原真一先生（筑波大学生物資源科学研究科生物機能科学専攻 准教授）、井上貴美子先生（筑波大学生物資源科学研究科生物機能科学専攻 准教授・理化学研究所バイオリソースセンター）に心より感謝申しあげます。

本研究を遂行するにあたり、共同研究者を始め、多くの方々にご助力を頂きました、皆様に謹んで感謝の意を表します。

第 6 章

参考文献

-
- Augui S, Nora EP, Heard E. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 429–442.
- Barlow DP, Bartolomei MS. Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6: pii: a018382. DOI:10.1101/ cshperspect.a018382.
- Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 2000; 405: 482–485.
- Briggs R, King TJ. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1952; 38: 455–463.
- Buganim Y, Faddah DA, Jaenisch R. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet.* 2013; 14: 427–439.
- Constancia M, Dean W, Lopes S, Moore T, Kelsey G, Reik W. Deletion of a silencer element in *Igf2* results in loss of imprinting independent of H19. *Nat Genet* 2000; 26:203–206.
- Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2885–2894.
- Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 2012; 6: 12–27.

Delaval K, Govin J, Cerqueira F, Rousseaux S, Khochbin S, Feil R. Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *EMBO J* 2007; 26:720–729.

Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013; 31: 397–405.

Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol.* 1962; 10: 622–640.

Hackett JA, Zylicz JJ, Surani MA. Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. *Trends Genet* 2012; 28: 164–174.

Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani MA. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 2002; 117:15–23.

Henckel A, Chebli K, Kota SK, Arnaud P, Feil R. Transcription and histone methylation changes correlate with imprint acquisition in male germ cells. *EMBO J* 2012; 31:606–615.

Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M, Tajima S, Li E, Jaenisch R, Sasaki H. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev* 2008; 22:1607–1616.

Hirasawa R, Feil R. Genomic imprinting and human disease. *Essays Biochem* 2010; 48:187–200.

Hiura H, Komiyama J, Shirai M, Obata Y, Ogawa H, Kono T. DNA methylation imprints on the IG-DMR of the Dlk1-Gtl2 domain in mouse male germline. *FEBS Lett* 2007; 581:1255–1260.

Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 2002; 415:1035–1038.

Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene. *Cell* 2001; 104:829–838.

Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014;157:1262–1278.

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* 2002; 295:297.

Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte AP, Tian XC, Yang X, Ishino F, Abe K, Ogura A. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science* 2010; 330: 496-499.

Inoue K, Noda S, Ogonuki N, Miki H, Inoue S, Katayama K, Mekada K, Miyoshi H, Ogura A. Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells. *Stem Cells* 2007; 25:1279–1285.

Inoue K, Ogonuki N, Mochida K, Yamamoto Y, Takano K, Kohda T, Ishino F, Ogura A. Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning. *Biol Reprod* 2003; 69: 1394–1400.

Inoue K, Wakao H, Ogonuki N, Miki H, Seino K, Nambu-Wakao R, Noda S, Miyoshi H, Koseki H, Taniguchi M, Ogura A. Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells. *Curr Biol* 2005; 15:1114–1118.

Kagami M, O’Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T. The IG-DMR and the

MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. *PLoS Genet* 2010; 6:e1000992.

Kaneko-Ishino T, Kohda T, Ishino F. The regulation and biological significance of genomic imprinting in mammals. *J Biochem* 2003; 133: 699–711.

Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, Okano M, Li E, Nozaki M, Sasaki H. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet* 2007; 16:2272–2280.

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.

Kawasaki Y, Lee J, Matsuzawa A, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Active DNA demethylation is required for complete imprint erasure in primordial germ cells. *Sci Rep* 2014; 4:3658.

Kimura Y, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol Reprod* 1995; 53: 855–862.

Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340:183–189.

Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340:183–189.

Kurotaki Y, Hatta K, Nakao K, Nabeshima Y, Fujimori T. Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. *Science* 2007; 316:719–723.

Lawitts JA, Biggers JD. Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol* 1993; 225:153–164.

Lee J, Inoue K, Ono R, Ogonuki N, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* 2002; 129: 1807–1817.

Lewis A, Mitsuya K, Umlauf D, Smith P, Dean W, Walter J, Higgins M, Feil R, Reik W. Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. *Nat Genet* 2004; 36:1291–1295.

Mashiko D, Young SA, Muto M, Kato H, Nozawa K, Ogawa M, Noda T, Kim YJ, Satouh Y, Fujihara Y, Ikawa M. Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. *Dev Growth Differ* 2014; 56:122–129.

Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, Nakamura T, Abe K, Nakano T, Ishino F, Ogura A. RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 20621–20626.

Meissner A, Jaenisch R. Mammalian nuclear transfer. *Dev Dyn* 2006; 235: 2460–2469.

Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Mochida K, Nagashima H, Baba T, Ogura A. Cytoplasmic asters are required for progression past the first cell cycle in cloned mouse embryos. *Biol Reprod* 2004; 71:2022–2028.

Mochida K, Ohkawa M, Inoue K, Valdez DM Jr, Kasai M, Ogura A. Birth of mice after in vitro fertilization using C57BL/6 sperm transported within epididymides at refrigerated temperatures. *Theriogenology* 2005; 64: 135–143.

Morozumi K, Yanagimachi R. Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(40):14209–14214.

Murrell A, Heeson S, Bowden L, Consta[^]ncia M, Dean W, Kelsey G, Reik W. An intragenic methylated region in the imprinted *Igf2* gene augments transcription. *EMBO Rep* 2001; 2:1101–1106.

Nakamura T, Liu YJ, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y, Nakano T. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature* 2012; 486:415–419.

Niemann H, Lucas-Hahn A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reprod Domest Anim* 2012; 47(suppl 5):2–10.

Nowak K, Stein G, Powell E, He LM, Naik S, Morris J, Marlow S, Davis TL. Establishment of paternal allele-specific DNA methylation at the imprinted mouse *Gtl2* locus. *Epigenetics* 2011; 6:1012–1020.

Oback B, Wells D. Donor cells for nuclear cloning: many are called, but few are chosen. *Cloning Stem Cells* 2002; 4:147–168.

Obata Y, Kono T. Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J Biol Chem* 2002; 277: 5285–5289.

Ogonuki N, Mori M, Shinmen A, Inoue K, Mochida K, Ohta A, Ogura A. The effect on intracytoplasmic sperm injection outcome of genotype, male germ cell stage and freeze-thawing in mice. *PLoS ONE* 2010; 5:e11062.

Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, Noguchi A, Takano K, Nagano R, Suzuki O, Lee J, Ishino F, Matsuda J. Production of male clone mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol. Reprod* 2000; 62: 1579–1584.

Ogura A, Inoue K, Wakayama T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013; 368:20110329.

Ogura A, Ogonuki N, Miki H, Inoue K. Microinsemination and nuclear transfer using male germ cells. *Int Rev Cytol* 2005; 246: 189–229.

Ogura A, Ogonuki N, Miki H, Inoue K. Microinsemination and nuclear transfer using male germ cells. *Int Rev Cytol* 2005; 246:189–229.

Ogura A, Suzuki O, Tanemura K, Mochida K, Kobayashi Y, Matsuda J. Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:5611–5615.

Ohbo K, Yoshida S, Ohmura M, Ohneda O, Ogawa T, Tsuchiya H, Kuwana T, Kehler J, Abe K, Schoeller HR, Suda T. Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice. *Dev Biol* 2003; 258:209–225.

Oikawa M, Inoue K, Shiura H, Matoba S, Kamimura S, Hirose M, Mekada K, Yoshiki A, Tanaka S, Abe K, Ishino F, Ogura A. Understanding the X chromosome inactivation cycle in mice: a comprehensive view provided by nuclear transfer. *Epigenetics* 2014; 9:204–211.

Oikawa M, Matoba S, Inoue K, Kamimura S, Hirose M, Ogonuki N, Shiura H, Sugimoto M, Abe K, Ishino F, Ogura A. RNAi-mediated knockdown of Xist does not rescue the impaired development of female cloned mouse embryos. *J Reprod Dev* 2013; 59: 231–237.

Okae H, Matoba S, Nagashima T, Mizutani E, Inoue K, Ogonuki N, Chiba H, Funayama R, Tanaka S, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, et al. RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. *Hum Mol Genet* 2013; 23:992–1001.

Ostermeier GC, Wiles MV, Farley JS, Taft RA. Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation. *PLoS One* 2008; 3: e2792.

Pitamber PN, Lombard Z, Ramsay M. No evidence for a parent-of-origin specific differentially methylated region linked to RASGRF1. *Front Genet* 2012; 3:41.

Plass C, Shibata H, Kalcheva I, Mullins L, Kotelevtseva N, Mullins J, Kato R, Sasaki H, Hirotsune S, Okazaki Y, Held WA, Hayashizaki Y, et al. Identification of Grf1 on mouse chromosome 9 as an imprinted gene by RLGS-M. *Nat Genet* 1996; 14:106–109.

Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 1057–1068.

Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001; 2:21–32.

Rohatgi S, Ganju P, Sehgal D. Systematic design and testing of nested (RT-)PCR primers for specific amplification of mouse rearranged/ expressed immunoglobulin variable region genes from small number of B cells. *J Immunol Methods* 2008; 339:205–219.

Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 129–140.

Sato S, Yoshida W, Soejima H, Nakabayashi K, Hata K. Methylation dynamics of IG-DMR and Gtl2-DMR during murine embryonic and placental development. *Genomics* 2011; 98:120–127.

Sekita Y, Wagatsuma H, Irie M, Kobayashi S, Kohda T, Matsuda J, Yokoyama M, Ogura A, Schuster-Gossler K, Gossler A, Ishino F, Kaneko-Ishino T. Aberrant regulation of imprinted gene expression in Gtl2lacZ mice. *Cytogenet Genome Res* 2006; 113:223–229.

- Shiraishi M, Hayatsu H. High-speed conversion of cytosine to uracil in bisulfite genomic sequencing analysis of DNA methylation. *DNA Res* 2004; 11:409–415.
- Steshina EY, Carr MS, Glick EA, Yevtodiyyenko A, Appelbe OK, Schmidt JV. Loss of imprinting at the Dlk1-Gtl2 locus caused by insertional mutagenesis in the Gtl2 50 region. *BMC Genet* 2006; 7:44.
- Sturani E, Abbondio A, Branduardi P, Ferrari C, Zippel R, Martegani E, Vanoni M, Denis-Donini S. The Ras guanine nucleotide exchange factor CDC25Mm is present at the synaptic junction. *Exp Cell Res* 1997; 235: 117–123.
- Sung LY, Gao S, Shen H, Yu H, Song Y, Smith SL, Chang CC, Inoue K, Kuo L, Lian J, Li A, Tian XC, et al. Differentiated cells are more efficient than adult stem cells for cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat Genet* 2006; 38:1323–1328.
- Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*. 2007; 128: 747–762.
- Tanemura K, Wakayama T, Kuramoto K, Hayashi Y, Sato E, Ogura A. Birth of normal young by microinsemination with frozen-thawed round spermatids collected from aged azoospermic mice. *Lab Anim Sci* 1997; 47:203–204.
- Wakayama S, Ohta H, Hikichi T, Mizutani E, Iwaki T, Kanagawa O, Wakayama T. Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -208C for 16 years. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:17318–17322.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394:369–374.

Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R..
One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by
CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 153: 910–918

Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa
S, Iida N, Hoki Y, Murphy PJ, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, et al. Role for piRNAs
and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrfl*
locus. *Science* 2011; 332: 848–852.

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

Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, Yeom YI, Ohbo K, Masuko K, Obinata M,
Abe K, Scho'ler HR, Matsui Y. Germline-specific expression of the Oct-4/green
fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Dev Growth Differ* 1999; 41:675–684.

Zhou LQ, Dean J. Reprogramming the genome to totipotency in mouse embryos.
Trends Cell Biol 2014 (in press). Published online ahead of print 21 October 2014;
DOI: 10.1016/j.tcb.2014.09.006