

in mammals. For a more detailed description, the reader is referred to other excellent articles and reviews.

### WHY DO ABNORMALITIES OCCUR?

The concept of “genomic reprogramming” is understood insofar as the phenomenon exists, but little is really known about the underlying mechanisms. The reprogramming mechanism in essence exists so that the genome of sperm and oocytes acting as gametes can return to the status of the genome of the fertilized oocyte. Nuclear transfer cloning technology attempts to utilize this mechanism. Thus, one would expect problems to exist in direct reprogramming of the genome of somatic cells, which of course are not germ cells. These often manifest as demethylation abnormalities in reconstructed embryos by nuclear transfer. One would further expect these abnormalities to have long-term effects on abnormal gene expression and phenotypes in cloned fetuses and individuals. Evidence is mounting that errors in genomic reprogramming occur in nuclear transfer cloning, but an understanding of this phenomenon remains a long way off. In pursuing this understanding, researchers are not relying on mammalian oocytes, in which protein analysis can be difficult. Rather, they are using frog oocytes, which have been historically used in nuclear transfer cloning studies, to provide much useful information.

### ABNORMALITIES ASSOCIATED WITH SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER CLONING

Many reports have described abnormalities in cloned individuals. Although much remains unknown, organization and classification of these abnormalities is important to further our understanding of somatic cell nuclear transfer and to set the direction for future research.

#### STAGES WHEN ABNORMALITIES DEVELOP

Stages of development when abnormalities occur can broadly be divided into the pronuclear, embryonic gene activation (EGA), implantation, placentation, fetal, perinatal, and postnatal periods. Major abnormalities at these stages generally manifest as arrested or delayed development. During pronuclear formation, abnormalities in DNA demethylation, chromatin structure, and nuclear lamina remodeling have been reported, but rarely do these lead to developmental arrest. In earlier experiments with somatic cell cloning, many embryos arrested at the EGA stage, but because of improvements in embryo manipulation technology, this is no longer a problem. Most clone-specific abnormalities occur during the placentation, fetal, perinatal, or postnatal periods. For example, abnormal placentation in mice, cattle, and sheep accounts for many deaths during the placentation–fetal period (discussed later). However, pigs generally have no placental anomalies. There are no reports (to the author’s knowledge) about cloned placentas in rats and rabbits. Postnatal abnormalities are often influenced by genetic factors and

include obesity and immune dysfunction.<sup>3,4</sup> Obesity has been reported only in mice, whereas immune dysfunction has been found in mice, cattle, pigs, and goats. This poses an interesting question on whether the immune dysfunction may be due to some common underlying factor.

### CLONE-SPECIFIC ABNORMALITIES

Somatic cell nuclear transfer cloning, like other reproductive engineering technology (e.g., *in vitro* fertilization, microinsemination) involves oocyte manipulation and embryo *in vitro* culture. These procedures themselves have been reported to cause abnormal expression of genes required for development. For example, the "large offspring syndrome" seen in cattle and sheep, associated with decreased expression of the imprinted gene *IGF2R*, is due to embryo *in vitro* culture, which is used in both *in vitro* fertilization and cloning.<sup>5</sup> Genomic imprinting memory in donor cells is basically maintained even after nuclear transfer,<sup>6</sup> so if imprinting memory in the donor cell is already abnormal, this will lead to abnormal gene expression in the cloned embryo. Therefore, to further our understanding of nuclear transfer cloning, one must carefully examine whether gene expression and phenotypic abnormalities are indeed clone-specific.

Heteroplasmy (a mixture of different mitochondrial DNA in cells), although rarely expressed phenotypically, is a clone-specific abnormality. In normal fertilization, the sperm midpiece mitochondria are degraded in the oocyte by the ubiquitin system, whereas in cloning, the donor cell mitochondria are transferred to the embryo. When somatic cell cloning was first performed, donor cell mitochondria were not thought to be transmitted to cloned individuals due to the overwhelming amount of oocyte mitochondria, but with improved DNA detection methods, it is now clear that some, albeit a small amount, of mitochondria are transmitted. Our laboratory has confirmed this phenomenon in mice. Of further interest is what appears to be organ-specific distribution, with significant accumulation of donor mitochondrial DNA in the liver.<sup>7</sup>

### TYPICAL OR VARIED ABNORMALITIES

Even though an abnormality is clone-specific, it may also be a "typical" or "varied" abnormal finding. The most well-known typical abnormalities are those related to placental morphology. In mice, there is expansion of the spongiotrophoblast layer, which is derived from diploid trophoblast cells, leading to placentomegaly.<sup>8</sup> In cattle, a reduction in size of the allantochorion leads to placental dysfunction. Obesity is also a typical finding in cloned agouti mice (especially females).<sup>3</sup> These placental anomaly and obesity phenotypes are not transmitted to offspring and thus have been shown to be epigenetic.<sup>3,9</sup> Varied abnormalities are typically associated with various gene expression levels. These can now be readily identified using DNA arrays and have been discussed in many other reports. Telomere length variations have been found among cloned individuals as well as in different organs within the same individual. Even in cloned embryos, telomere length increases during transition from a morula to blastocyst.<sup>10</sup> Variations may also occur in

subsequent stages of differentiation and development. Of interest is the normal telomere length found in germ cells (spermatozoa).<sup>11</sup>

What is the significance of these typical and varied abnormalities? Probably, when the somatic cell genome is reprogrammed in the oocyte, some areas always remain with errors, whereas other areas, at a certain rate, are accurately reprogrammed. The combination of both types of abnormalities leads to a decreased efficiency of somatic cell cloning. Interestingly, when a chimeric embryo is produced from two cloned embryos, the birth rate improves significantly.<sup>12</sup> This finding suggests that the two embryos may act to compensate for any variations in gene expression in the chimeric embryo. On the other hand, chimeras with tetraploid embryos for placental rescue do not improve the production efficiency of viable clones. Thus, developmental arrest of cloned embryos cannot be explained by placental insufficiency alone (unpublished data).

Placental abnormalities, particularly in mice, are being investigated in detail with respect to gene expression, DNA methylation, and histopathological features. As mentioned previously, these are clone-specific and typical findings. It is hoped that this will lead to a better understanding of somatic cell cloning. Most research is currently being conducted on placenta at term, but future research to elucidate underlying mechanisms is expected using placenta at earlier stages.

## EFFECTS OF DONOR CELLS

Investigation of factors causing low birth rates and a high incidence of abnormalities in cloning is not an easy task, but finding conditions leading to an improvement in these parameters can provide important clues. Using mice with uniform genetic and biological backgrounds can be effective in reaching these goals. We have conducted large-scale studies using mouse cloning technology to examine the effects of donor cell genetic background and cell type on cloning efficiency. Statistical analysis of the data shows that the combination of genetic background and cell type has a significant effect on production efficiency of viable clones.<sup>13</sup> With a combination of newborn Sertoli cells and (C57BL/6  $\times$  129/Sv-ter) F1 genetic background, a constant birth rate of about 10% per embryo transfer was demonstrated. In microinsemination using postmeiotic round spermatids (with the same genome as spermatozoa), the birth rates are 10 to 25%. This suggests that the genotype and donor combined genome may be almost normally reprogrammed by nuclear transfer. Donor cells containing the 129 strain genome usually produce favorable results, and establishment of embryonic stem (ES) cells from the 129 strain is also good, thus suggesting high genomic plasticity.

How does the degree of cell differentiation affect cloning efficiency? Currently, the donor cells with the highest cloning efficiency in mice are embryonic stem cells. The reason is probably that the Oct-3/4 gene, which is involved in maintaining high pluripotency, is expressed in donor cells before nuclear transfer.<sup>14</sup> Oct-3/4 gene expression begins during the morula stage, and in ES cell clones, *no* reprogramming is needed for gene activation. These findings in ES clones also suggest that adult tissue-specific stem cells with pluripotency might also

have high cloning efficiency. Therefore, our laboratory conducted a nuclear transfer cloning study using hematopoietic stem cells and terminally differentiated lymphocytes with the same genotype. Surprisingly, the results showed poor development of the cloned embryos from hematopoietic stem cells, whereas good results were obtained with cloned embryos from lymphocytes (unpublished data). Thus, at least in nuclear transfer cloning, genomic plasticity does not seem to correlate with the degree of cell differentiation.

### FUTURE DIRECTIONS

Eight years have passed since the birth of the first somatic cell cloned sheep from fetal fibroblasts. However, somatic cell cloning still faces continuing problems of low efficiency rates and a high incidence of abnormalities. The key to solving these problems is a better understanding of the mechanisms of germ cell development. Of particular interest is why and how the genome of germ cells at fertilization (or before and after) is normally reprogrammed. Future research, including epigenetic and biochemical studies of germ cells and embryological studies by nuclear transfer cloning, is expected to answer these questions.

### CONCLUSIONS

Almost ten years have passed since the first animal was produced by somatic cell nuclear transfer cloning. However, there have still been no decisive technological breakthroughs, as evidenced by continuing low birth rates and a high incidence of pathological abnormalities. The difficulty, of course, lies in using the genomic reprogramming mechanism of germ cells in somatic cell genomes. Phenomenological explanation of the abnormalities observed in cloned animals derived from somatic cell nuclear transfer is alone insufficient to resolve these problems. For this technology to find wider application in industry and medicine, it is essential that these abnormalities be classified and their clinical manifestations and incidence be objectively evaluated. In this regard, careful investigation of clone-specific and typical abnormalities (occurring with greater than chance probability) is particularly important. Solutions to these problems require more than simply improving the peripheral technology. Therefore, researchers in nuclear transfer cloning must examine these phenomena at the molecular, gene expression, and clinicopathological levels; select suitable models; and use objective evaluation and statistical analysis.

### REFERENCES

1. Gurdon, J.B., Byrne, J.A., and Simonsson, S., Nuclear reprogramming and stem cell creation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 11819, 2003.
2. Campbell, K.H.S., Nuclear transfer in farm animal species. *Sem. Cell. Dev. Biol.*, 10, 245, 1999.

3. Tamashiro, K.L.K. et al., Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat. Med.*, 8, 262, 2002.
4. Ogonuki, N. et al., Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat. Genet.*, 30, 253, 2002.
5. Young, L.E. et al., Epigenetic change in *IGF2R* is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat. Genet.*, 27, 153, 2001.
6. Inoue, K. et al., Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science*, 295, 297, 2002.
7. Inoue, K. et al., Tissue-specific distribution of donor mitochondrial DNA in cloned mice produced by somatic cell nuclear transfer. *Genesis*, 39, 79, 2004.
8. Tanaka S. et al., Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biol. Reprod.*, 65, 1813, 2001.
9. Shimosawa, N. et al., Abnormalities in cloned mice are not transmitted to the progeny. *Genesis*, 34, 203, 2002.
10. Schaezlein, S. et al., Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 8034, 2004.
11. Miyashita, N. et al., Normal telomere lengths of spermatozoa in somatic cell-cloned bulls. *Theriogenology*, 59, 1557, 2003.
12. Boiani, M. et al., Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: Epigenetic complementation? *EMBO J.*, 22, 5304, 2003.
13. Inoue, K. et al., Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning. *Biol. Reprod.*, 69, 1394, 2003.
14. Boiani, M. et al., Oct4 distribution and level in mouse clones: Consequences for pluripotency. *Genes Dev.*, 16, 1209, 2002.

## 核移植クローンとリプログラミング

### 5.1 核移植クローンとは

核移植クローンとは、除核した卵子あるいは胚へドナー細胞核を移植して、胚や産仔を作出する技術である（図5.1）。正確には、その用いるドナー細胞により受精卵クローンと体細胞クローンに分けられるが、一般に「核移植クローン」といえば体細胞クローンを意味することが多い。本章でもそれにならない、特に断りのない限り、クローンとは体細胞クローンとしている。

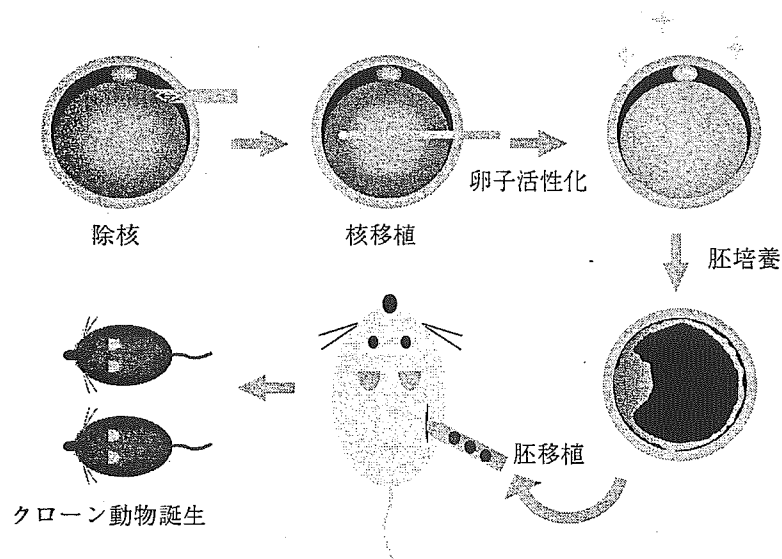


図 5.1 核移植クローン動物の作製

#### 5.1.1 核移植クローンの歴史

しかしながら、哺乳類の核移植は受精卵クローンのほうが歴史的に古い。1980年代より、発生が進行した受精卵の核に完全な個体を作り得る能力、すなわち全能性 (totipotency) があるか否かを確かめるために実験が行われた。哺乳動物最初の核移植成功例は、1983年のマウス前核期卵の核を別の卵に移植した実験であり<sup>1)</sup>、その後、ヒツジ<sup>2)</sup>、ウシ<sup>3)</sup>、ブ

タ<sup>4)</sup>、マウス<sup>5)</sup>、ウサギ<sup>6)</sup>、サル<sup>7)</sup>でも報告されている。一方、体細胞核移植クローンは、それより遅れて1996年にヒツジ由来の胎仔細胞を用いて、初めて作製に成功している<sup>8)</sup>（翌年には成体細胞由来のクローンであるドリーが誕生<sup>9)</sup>）。その後、マウス<sup>10)</sup>、ウシ<sup>11),12)</sup>、ヤギ<sup>13)</sup>、ブタ<sup>14)~16)</sup>、ネコ<sup>17)</sup>、ウサギ<sup>18)</sup>、ラバ<sup>19)</sup>、ウマ<sup>20)</sup>、ラット<sup>21)</sup>の報告が続いている。

受精卵クローンは、割球の数がクローン胚作製可能数の上限になるため、多くの産仔を得ることができないが、体細胞クローンは体内に存在、あるいは体外で増殖した数だけのクローン胚を作製することができるので、理論上は、ほぼ無限のクローンが生み出せることになる。しかしながら、その成功が初めて報告されて以降、体細胞クローンはさまざまな出生率改善に関する研究が行われてきたが、依然として低いままである。以下、おもに核移植クローンとして現在最も広く研究されている体細胞核移植クローンについて述べる。

### 5.1.2 核移植クローンの手法

体細胞核移植クローン個体は、いずれの種でも一般的に以下の手法により作製される（図5.1参照）。① 未受精卵子の染色体除去（除核）。レシピエント卵子にはほぼ必ず未受精卵が使用される（受精卵クローンは、除核胚をレシピエントにすることも可能）。② 核ドナーのレシピエント卵子への導入（核移植）。電気パルスあるいはウイルス（マウスのみ）による膜融合法または卵子細胞質内注入法が用いられる。③ 卵子活性化。レシピエント卵子は第二減数分裂中期で停止しているため、人為的に活性化して減数分裂再開による胚発生を開始させる。細胞内カルシウムイオンの上昇（電気パルス、エタノール処理など）やタンパク質合成阻害により行う。④ 胚培養。各種の胚に適した培地や温度などの条件下で数日間培養を行う。⑤ 胚移植。発生した胚を仮親の子宮または卵管内に移植する。

### 5.1.3 核移植クローンの効率

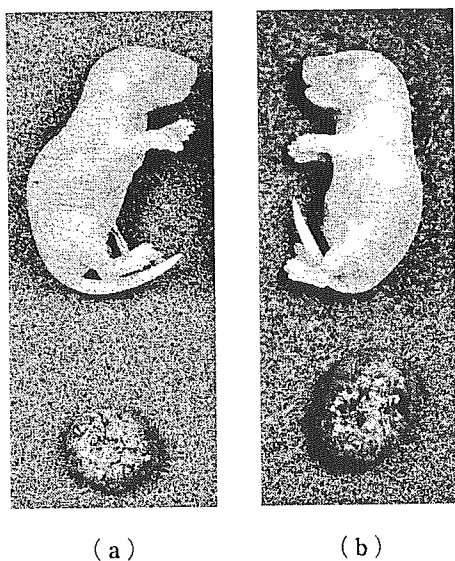
クローン個体の作出効率は、受精卵クローンの場合はレシピエント卵とドナー核の細胞周期や核移植方法、活性化の方法などを十分に考慮すれば、かなり高い効率（マウスで57%<sup>22)</sup>）でクローン産仔が得られていることが報告されている。しかしながら、体細胞クローンでは数パーセントの作出効率が一般的である（表5.1）。マウスでは、用いる核ドナーのマウス系統や細胞種を選択して改善が可能であるが、それでも10%程度である<sup>23)</sup>。

また、体細胞クローンには出生前、出生後を通して多くの異常が観察される。多くの動物種で出生時には胎盤の形態異常がみられ（図5.2）、ウシやヒツジのクローンでは周産期の死亡率が高い<sup>26),27)</sup>。さらに成長後にも、肥満<sup>28),29)</sup>、免疫力の低下<sup>30),31)</sup>、短命化<sup>31)</sup>などの異常もみられる。これらの多くは、受精卵クローン産仔にはみられない。

受精卵クローンと体細胞クローンがほぼ同じ技術を用いているにもかかわらず、このよう

表 5.1 体細胞核移植クローンの効率 [文献 59] より改変]

| ドナー核   |         |              | クローン効率 (%) |           |
|--------|---------|--------------|------------|-----------|
| 由来組織   | 細胞      | 動物種          | 生存産仔/移植胚   | 生存産仔/再構築胚 |
| 胎仔・新生仔 |         |              |            |           |
| 胎仔組織   | 線維芽細胞   | 多数           | 0.1~2      | 0.05~1.2  |
| 精巢     | 未成熟セルトリ | マウス          | 2.5        | 0.6       |
| 生殖巣    | 線維芽細胞?  | マウス          | 2.3        | 1.2       |
| 肝臓     | 線維芽細胞?  | ウシ           | 10         | 3.1       |
| 皮膚     | 線維芽細胞?  | ウシ           | 18         | 7.0       |
| 脳      | 神経細胞    | マウス          | 5~12       | 1.1~4.3   |
| 生殖巣    | 始原生殖細胞  | マウス          | 0.7        | 0.2       |
| 成体     |         |              |            |           |
| 乳腺     | 上皮?     | ウシ, ヒツジ      | 3~4        | 0.4~0.7   |
| 卵胞     | 顆粒層細胞   | ウシ, ブタ       | 1~10       | 0.3~6.9   |
| 卵胞     | 卵丘細胞    | マウス, ネコ, ウサギ | 0~5.3      | 0~4.3     |
| 精巢     | セルトリ    | マウス          | 0          | 0         |
| 卵管     | 上皮?     | ウシ           | 12         | 4.0       |
| 尾      | 線維芽細胞   | マウス          | 1          | 0.4       |
| 皮膚     | 線維芽細胞?  | ウシ           | 7          | 2.3       |
| 胸腺     | リンパ球    | マウス          | 0          | 0         |
| 腹腔     | マクロファージ | マウス          | 0          | 0         |
| 脾臓     | 白血球     | マウス          | 0          | 0         |
| 血液     | 白血球     | ウシ           | 2          | 0.4       |
| 脳      | 神経細胞?   | マウス          | 0          | 0         |
| 肝臓     | NKT細胞   | マウス          | 1.1        | 0.5       |
| 骨髄     | 造血幹細胞   | マウス          | 0.7        | 0.3       |



マウス産仔とその胎盤。図 (a) : 顕微授精産仔。  
 図 (b) : 卵丘細胞クローン産仔。クローン産仔の胎盤は顕微授精産仔のそれより 2~3 倍大きい。

図 5.2 クローンマウスにみられる胎盤過形成<sup>24),25)</sup>

にクローン個体作出効率や異常表現型の出現率に差が生じているということは、両者のゲノムが受精直後の状態に戻る過程、すなわちリプログラミング (reprogramming) の状態に差があることになる。では、そのリプログラミングとはなんだろうか。



## 5.2 ゲノムのリプログラミング

### 5.2.1 リプログラミングとは

リンパ球など特殊な一部の細胞を除き、個体を構成する体細胞の DNA 配列は受精卵とまったく同じである。したがって、体細胞は分化していく過程で DNA 配列以外のゲノム情報である DNA メチル化やヒストンのメチル化、アセチル化など、ゲノム構造上の修飾を獲得していく。これらの情報はエピジェネティック (epigenetic) な情報と呼ばれている。核移植クローンでは、これらのエピジェネティックな情報が、再び受精直後の状態に初期化される必要がある。一般に、この過程をリプログラミングと呼んでいる。

では、なぜ体細胞ゲノムは卵子へ導入されるとリプログラミングを受けるのだろうか。当然ながら、リプログラミングという機構は核移植クローンを作製するために存在しているのではない。それは本来、次世代を産出するための受精に必要不可欠なシステムである。すなわち、配偶子として分化している (特有の遺伝子発現をしている) 卵子や精子のゲノムを受精時まで完全にリセットさせ、次世代の新たな生命の発生を開始させるための機構なのである。核移植クローンはこの機構を利用しているにすぎない。体細胞核移植クローンの効率が非常に低いのは、このリプログラミングが不完全であるか、またはエラーが生じるためであると考えられる。それを裏づけるように、クローン胚やクローン個体におけるエピジェネティックな異常がさまざまな観点から解析されている。

### 5.2.2 核移植クローンにおけるエピジェネティック解析

[1] DNA メチル化 ゲノムのエピジェネティックな修飾の一つとして最も重要なものの一つが DNA のメチル化である。DNA メチル化は DNA 上の CpG 配列を認識してシトシンにメチル基を付加する機構であり、遺伝子発現の不活性化 (活性化の場合もある) やクロマチンの高次構造と大きなかかわりをもっている (6章参照)。体細胞は発生に伴い、不必要な遺伝子をメチル化することにより徐々に発現を抑制していくため、受精卵に比べてより多くのメチル化領域をもっていると考えられている。

初期胚における DNA メチル化の変化は、ゲノムワイドに高メチル化状態にある卵子と精子が受精することから始まり、受精後に脱メチル化過程をたどる。マウス、ラット、ウシ、ブタ、ヒトでは、その脱メチル化過程に雌雄前核で差が生じることが知られており、雄性前核は能動的な脱メチル化作用を受け、前核期に完全に低メチル化状態になる一方、雌性ゲノムは受動的な脱メチル化作用を受け、徐々にメチル化が低下する (6章参照)。

一方、ウサギ、ヒツジなどでは雌雄前核で差は生じず、同時に脱メチル化が進行する<sup>32)</sup>。

多くの動物では、桑実胚期に最も低メチル化状態になり、胚盤胞期胚には高メチル化状態の内部細胞塊と低メチル化状態の栄養外胚葉に分化する(6章参照)。

では、高メチル化状態にある体細胞のメチル化は、核移植後、どのように変化していくのだろうか。ウシでは、このプロセスは受精卵とは明らかに異なる過程をとる<sup>33)</sup>。移植された体細胞核は卵子の活性化後に能動的な脱メチル化作用を受け、4細胞期胚までに低メチル化状態になるものの、その後、通常の受精卵より早いサイクルでメチル化が始まり、胚盤胞期胚までに緩やかにメチル化が進行していくことが明らかになっている。一方、ブタではクローン胚の脱メチル化は体外受精胚と同様に進行し、4~8細胞期までは高メチル化状態で維持し、その後、胚盤胞期胚までに脱メチル化されていくことが示されている<sup>34)</sup>。クローン胚ではいずれの種も受精卵と違い、オス・メスゲノム間の差がない脱メチル化が起きている。

一方、クローン胎仔についても、いくつかの興味深いDNAメチル化に対する研究が行われている。HumpherysらはES細胞を用いて刷込み遺伝子のDNAメチル化と発現を調べており、同じ株でもサブクローン依存性に大きな多様性があることを報告し、さらにそれらのES細胞に由来するクローン産仔の組織でもやはりメチル化と発現に多様性があることを明らかにしている<sup>35)</sup>。またOhganeらは卵丘細胞由来のクローンマウス産仔の胎盤と皮膚を用いて自然交配由来の産仔との間にメチル化パターンの違いがあることを報告している<sup>36)</sup>。

〔2〕 ヒストンメチル化とアセチル化 クロマチンを形成しているヒストンはメチル化、アセチル化、リン酸化、ADPリボシル化、ユビキチン化などのさまざまな翻訳後修飾を受けることによってクロマチンの高次構造を変化させ、転写、DNA複製、有糸分裂などの過程にかかわり、遺伝子機能の制御に重要な役割を果たしていると考えられている。Kimらは抗体染色を用いて、減数分裂期の卵子でヒストンH3、H4のいくつかのリジン残基(H3/K9(ヒストンH3の9番目のリジン残基の意)、K14、H4/K5、K8、K12、K16)におけるアセチル化を詳細に調べており、GVBD~MII期にかけてヒストンアセチル化がヒストン脱アセチル化酵素により特異的に減少することを明らかにしている<sup>37)</sup>。さらにNIH3T3を核ドナーとした核移植胚を用いてヒストンの脱アセチル化を調べたところ、核移植後2時間で脱アセチル化が行われていることを示している。したがって核移植胚の脱アセチル化については生殖細胞のクロマチンと同等に進行していると考えられる。

さらに、Santosらはクローン胚と受精卵間のヒストンH3/K9メチル化の違いについて抗体染色を用いて調べており、受精卵の胚盤胞期胚が高メチル化の内部細胞塊と低メチル化の栄養外胚葉で明らかに異なるのに対し、クローン胚ではその差がほとんどないことを示している。筆者らは、この胚盤胞期胚におけるヒストンメチル化の異常がクローン胎仔における胎盤異常につながっているのではないかと考察している<sup>38)</sup>。

〔3〕 クローン胚におけるOct4の発現 転写因子であるOct4は、初期胚の多能性と

深く関連している胚盤胞期胚の分化に必須の遺伝子で、将来胎仔に発生する予定である胚盤胞期胚の内部細胞塊に特異的に発現している。多くのクローン胚は初期発生の際に発生を停止してしまうため、この Oct 4 の発現異常となんらかの関連性があると予測されていた。Bortvin らが RT-PCR を用いて卵丘細胞、マウス ES 細胞由来のクローン胚盤胞期胚において Oct 4 とその関連遺伝子 10 種類が発現しているか否かを調べたところ、卵丘細胞由来のクローン胚では発現している遺伝子の割合は 62% であったのに対し、ES 細胞由来のクローン胚ではすべての遺伝子が発現していることを明らかにしている<sup>39)</sup>。

また、Boiani らはマウス卵丘細胞クローン胚を作製し、Oct 4 の抗体染色と Oct 4 が発現している領域にのみ蛍光が現れる Oct 4-GFP 遺伝子導入マウスを用いて、クローン胚盤胞期胚でどのように Oct 4 が発現しているかどうかを調べている<sup>40)</sup>。その結果、時間的には正常な発現が始まるものの、発現が弱い、内部細胞塊で発現していない、胚全体にランダムに発現しているなど、空間的に異常な発現を示している胚が非常に多く、また細胞培養ディッシュ上で培養を行ったときのコロニー形成率も受精卵と比べて低いことから、Oct 4 の発現異常がクローン胚の初期発生における発生停止や着床後における胎仔の異常につながっているのだらうと推測している。さらに彼らはこの研究を進展させ、クローン胚盤胞期胚は受精卵に比べて細胞数が少なく（マウスでは胚盤胞期胚の平均細胞数は受精卵の半分以下にしかない）、細胞数が多い胚では Oct 4 を正常に発現している胚が多いことに着目し、クローン胚どうしを 2 個あるいは 3 個接着させて作製した凝集胚では Oct 4 の発現領域が正常になり、出生率も大幅に改善させることを明らかにした<sup>41)</sup>。

したがって、クローン胚の発生異常の一因として、Oct 4 の発現とそれまでの過程に関与する機構、そして Oct 4 異常に伴う関連遺伝子の発現異常がかかわっていると考えられる。しかしながら、筆者らの研究室で行った実験では、系統による差はあるものの、卵丘細胞由来のクローン胚における Oct 4 の空間的な発現異常は観察されず（未発表データ）、いずれの胚でも受精卵と変わらず正常に Oct 4 を発現していた。したがって、これらの発現異常はクローン作製の手法などに左右されていると考えることもできる。

〔4〕 卵子特異的ヒストン H1foo への置換 クロマチンの基本的なユニットは、ヌクレオソームで 146 bp の DNA がヒストン H2A, H2B, H3, H4 の 4 種類のタンパク質からなる 8 量体を包み込み、リンカーヒストンであるヒストン H1 により隣のヌクレオソームとつながっている。リンカーヒストン H1 には多くのサブタイプが存在するが、なかでもヒストン H1foo は GV 卵から 2 細胞期胚まで卵子中に特異的に発現しているヒストンタンパク質である<sup>42)</sup>。受精後は精子のヒストン H1 もまもなく H1foo に置換されることがわかっており、これらの変化は初期発生におけるクロマチンの高次構造や転写制御に深くかかわっていると考えられている。Teranishi らは、体細胞核移植胚においてこのヒストン

H1fooへの置換がどのように行われているかをマウス線維芽細胞を核ドナーとして用いて観察を行った<sup>43)</sup>。その結果、ドナー核のヒストンH1もレシピエント卵子への移植後約10分で急速にヒストンH1fooに置換されており、核移植胚におけるヒストンH1の置換プロセスには大きな支障がないことが明らかとなった。また、Gaoらも同時にマウス卵丘細胞を核ドナーとして用いて、同様の報告を出している<sup>44)</sup>。

〔5〕 用いる細胞種、系統の違いについて マウスクローンでは卵丘細胞や線維芽細胞などの体細胞を核ドナーとして用いるよりも、胚性幹(ES)細胞を用いたほうが産仔が生まれやすいことが知られている<sup>45)</sup>。これは、ES細胞が胚盤胞期胚の内部細胞塊に由来する細胞で、比較的リプログラミングされやすい状態にあること、体細胞では発現していないOct4などの多能性維持に必要な遺伝子がすでに発現していることなどが関連していると考えられる。しかし、一般にマウス細胞は長期培養によりそのエピジェネティック修飾を変化させやすい。ES細胞は長期培養が可能な多分化能を有する細胞であるが、そのクローン産仔には体細胞クローンよりはるかに多くの異常が観察される。これは、核ドナー細胞のエピジェネティックな不安定さを示していると思われる。実際、先に述べたES細胞由来クローンの刷込み遺伝子の発現の多様性に対し、卵丘細胞、セルトリ細胞由来のクローン胎仔では刷込み遺伝子発現の量、質ともに正常胎仔と大きな差がなく、出生時の形態異常も少ないことが明らかとなっている<sup>46)</sup>。

新鮮な体細胞でも細胞種によるクローン効率の差がある。筆者らは成体由来の卵丘細胞と新生仔由来のセルトリ細胞を用いて、マウスクローンの産出効率を比較したところ、明らかにセルトリ細胞の効率のほうが高いことを報告している<sup>23)</sup>(成体由来のセルトリ細胞はサイズが大きく、貪食胞をもっているため、核移植には適さない)。また、胎仔の脳神経細胞でも、採取部位により明らかなクローン効率の差が生じることが知られている<sup>47)</sup>。

ドナー細胞の遺伝子背景もクローン効率を左右する。ウシでは、一般に黒毛和種はクローンを作成しやすいことが知られている。また、マウスでは、近交系よりも交雑種で体細胞クローンを作成しやすいが、唯一例外の近交系が129系統である<sup>48)</sup>。そこで筆者らはさまざまなF1交雑型を用いてクローン作製を行ったところ、交雑系に129系統を含むとクローンの産出効率が改善することが明らかとなった<sup>23)</sup>。129はES細胞を作成しやすい細胞としても汎用されており、そのエピジェネティックな情報が変化しやすく、容易にリプログラミングを受けると推測される。今後は、129系統のゲノムを解析することで、リプログラミングの本態についてなんらかの情報が得られるかもしれない。

〔6〕 体細胞核ドナーの遺伝子発現リプログラミング 核移植胚が受精卵と同等に発生が進行していくためには、受精卵で発現している遺伝子がリプログラミングによって再び発現されなければならない。では、核ドナー細胞で発現している体細胞特異的遺伝子発現は核

移植後どうなっているのだろうか。Chungらは、卵丘細胞クローン胚が胚培養の培地よりも、体細胞の培養条件に近い高グルコース濃度のほうが発生効率が改善することを示している<sup>49)</sup>。さらにGaoらは筋芽細胞クローン胚の培養条件が胚培養の培地よりも、筋芽細胞の培養条件に近いほうが、格段に胚発生率が改善し、胚盤胞期胚の細胞数が増加することを明らかにした<sup>50)</sup>。この理由として、クローン胚はグルコースの消費量が通常の受精卵に比べて高いことを示し、筋肉で発現しているグルコース輸送タンパク GLUT 4 の発現が受精卵に比べて大幅に上昇していること、初期胚では、まだ細胞全体に分散して発現している GLUT 1 が2細胞期ですでに細胞膜上に発現していることを示した。これらの研究は、すなわち、核ドナーの体細胞の遺伝子発現がレシピエント卵子への核移植後もしばらくは完全に消去されていないことを表している。

### 5.2.3 生殖細胞におけるゲノムリプログラミング

以上のように体細胞クローンにおいてさまざまなエピジェネティックな異常が生じることは疑いなく、これらが核移植後のリプログラミングのエラーによることは容易に想像がつく。では、なぜ体細胞ゲノムはリプログラミングに障害があるのに、精子や卵子ゲノムは正常にリプログラミングされるのであろうか。ゲノムリプログラミングは、卵子ゲノムではGVBD（卵核胞崩壊期）以降に、精子ゲノムでは受精後に起こると考えられているが、いずれも卵子中である。例えば、ヌクレオソームの一部を形成するヒストン H 1 は卵子中ではGVBD 期に、精子では受精後に別のタイプに置換される。また、ヒストン修飾の一つであるアセチル化は、やはり卵子ではGVBD 期に、精子は受精後にいったん低下することが明らかとされている。すなわち、生殖細胞ゲノムも体細胞ゲノムも卵子細胞質を通ることによりリプログラミングされることには変わりはないが、体細胞を用いた場合のみに効率が低下し、異常が生じる。ということは、その根本的な原因は、核移植クローンの過程ではなく有性生殖の過程にあるゲノムの変化、すなわち発生中の生殖細胞ゲノムにおけるエピジェネティックな変化を経ているか経ていないかに起因すると考えられる。その変化は、受精前後における全能性獲得のためのリプログラミングの準備とみなすこともできる。

最近、Sekiらは、マウス始原生殖細胞（PGC）の形成から移動期にかけてヒストン H 3/K 9 の脱メチル化およびアセチル化、そしてゲノムワイドの DNA の脱メチル化が生じることを明らかにしており、生殖細胞への分化の最初のステップとして注目される<sup>51)</sup>。一方、生殖隆起に入った直後の PGC に由来するクローン胎仔（胎齢 10.5 日）はまだ体細胞クローンに類似した表現型（胎盤の過形成など）を示すことが明らかになっている<sup>52)</sup>。よって生殖細胞としてのエピジェネティックな変化（リプログラミングの準備）は、さらに後期の PGC あるいは配偶子形成過程で生じている可能性が高い。哺乳類のゲノムインプリンティングは

胎仔期 PGC (胎齢 12.5 日ころ) で DNA 脱メチル化により初期化されることが知られているが、それとほぼ時期を同じくしてゲノムワイドの DNA 脱メチル化が生じる。この時期に上記の生殖細胞としてのエピジェネティックな変化が起こっているのかもしれない。

最近、クローン動物のテロメア長の解析で興味深い結果が報告されている。体細胞クローンウシのテロメア長を調べたところ、多くの組織・臓器でテロメアの長さにはばらつきがあったが、精子のみで正常範囲であったという<sup>53)</sup>。すなわち除核卵子内でドナー細胞核のテロメア長を回復する機構はたらくものの、正確な回復には生殖系列を経る必要があることを示している。これも生殖細胞で再プログラミングの準備をしているという証拠の一つであると思われる。今後は体細胞クローンのリプログラミング異常を明らかにしていくうえで、生殖細胞の形成過程におけるリプログラミングを解明していくことが不可欠になるであろう。

#### 5.2.4 アフリカツメガエルを用いたリプログラミング因子の探索

では、卵子内にこれらのリプログラミング作用をつかさどる因子は本当に存在するのだろうか。残念ながら、これまでにリプログラミング因子と呼ぶことのできる明らかな分子は見つかっていないが、アフリカツメガエルを用いた研究から、いくつかの興味深い示唆が得られている。アフリカツメガエルは1回の採卵で数百個の卵子を得ることが可能であり、1回の過排卵処理によって多くとも数十個しか取れない哺乳動物に対し、タンパク質の解析には最適な動物である。Kikyo らは、体細胞で最も基本的な転写因子である TATA binding protein が卵細胞質中で SWI 2/SNF 2 superfamily の一員である ISWI を含むクロマチンタンパク質リモデリング複合体により、ATP などのエネルギー存在下でクロマチンから離れることを明らかにしている<sup>54)</sup>。さらに、彼らは卵細胞質中で核移植後の核小体の脱凝縮と phosphoprotein B 23 の核内での分散にかかわるタンパク質として、卵細胞質中より転写因子 FRGY 2 a と FRGY 2 b を単離することに成功している<sup>55)</sup>。

### 5.3 核移植を用いた再生医療

クローン技術において再生医療に最も期待が集まっているのが核移植胚由来の ES 細胞 (ntES 細胞) である。ES 細胞は個体のどの組織にも分化が可能な多能性をもった細胞であり、分化誘導によってさまざまな細胞を作り出すことが可能なため、この細胞を用いた臓器移植におおいに期待が集まっている。しかしながら、ここで問題になるのが移植臓器の拒否反応である。移植患者と HLA が異なる細胞は臓器移植に使用することができないため、適した型のドナーが現れなければ、移植を行うことはできない。ntES 細胞は、皮膚などから患者の体細胞を採取して、核移植を行い、クローン胚盤胞期胚を作製し、さらにこの胚盤胞

の内部細胞塊を培養して ES 細胞を得ることによって患者に移植可能な臓器を得ようとする技術である (図 5.3)。

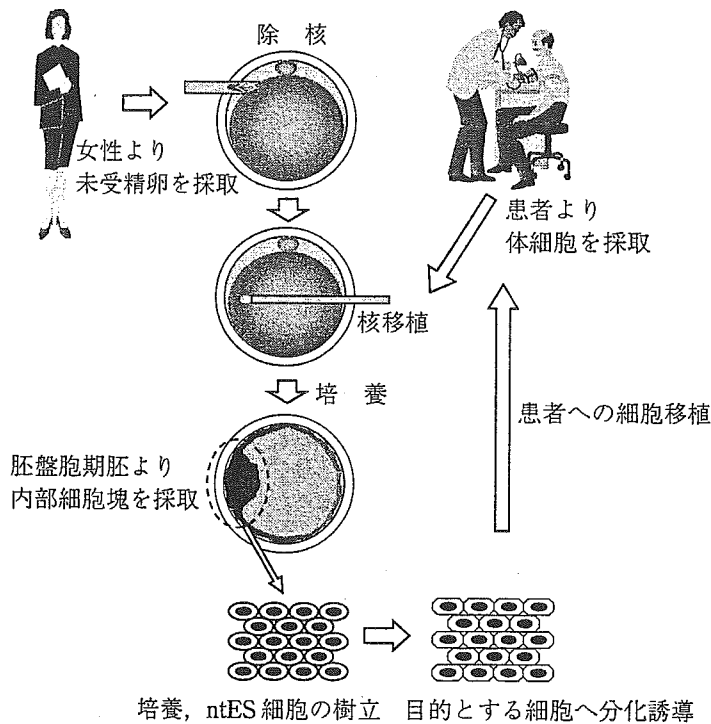


図 5.3 ntES 細胞の樹立方法とその利用

体細胞クローンの成功後、最も早くこの技術が確立されたのは、ES 細胞が汎用されているマウスであり、さまざまな細胞種への分化も可能であることが確認され<sup>56)</sup>、実際に分化誘導した血球系細胞の移植による治療実験も成功している<sup>57)</sup>。さらにヒトへの応用についてはすでに韓国でヒト ntES 細胞の樹立が報告されている<sup>58)</sup>。わが国でも、2004 年の内閣府総合科学技術会議の「ヒト胚の取扱いに関する基本的考え方」を受けて、研究用のヒトクローン胚作製の要件についての検討が開始されたものの、ヒトクローン胚の作製、取扱いや管理、また、ヒト未受精卵の入手方法など、その将来的な応用研究に関して解決されるべき倫理的問題が多く残されている。

## 引用・参考文献

- 1) McGrath, J. and Solter, D. : Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion, *Science*, **220**, 4603, pp.1300-1302 (1983)
- 2) Willadsen, S. M. : Nuclear transplantation in sheep embryos, *Nature*, **320**, 6057, pp.63-65 (1986)
- 3) Prather, R. S., Barnes, F. L., Sims, M. M., Robl, J. M., Eyestone, W. H. and First, N. L. : Nuclear transplantation in the bovine embryo : assessment of donor nuclei and recipient oocyte, *Biol. Reprod.*, **37**, 4, pp.859-866 (1987)

- 4) Prather, R. S., Sims, M. M. and First, N. L. : Nuclear transplantation in early pig embryos, *Biol. Reprod.*, **41**, 3, pp.414-418 (1989)
- 5) Kono, T., Kwon, O. Y. and Nakahara, T. : Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei, *J. Reprod. Fertil*, **93**, 1, pp.165-172 (1991)
- 6) Stice, S. L. and Robl, J. M. : Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos, *Biol. Reprod.*, **39**, 3, pp.657-664 (1988)
- 7) Meng, L., Ely, J. J., Stouffer, R. L. and Wolf, D. P. : Rhesus monkeys produced by nuclear transfer, *Biol. Reprod.*, **57**, 2, pp.454-459 (1997)
- 8) Campbell, K. H., McWhir, J., Ritchie, W. A. and Wilmut, I. : Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line, *Nature*, **380**, 6569, pp.64-66 (1996)
- 9) Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. : Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature*, **385**, 6619, pp.810-813 (1997)
- 10) Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R. and Yanagimachi, R. : Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei, *Nature*, **394**, 6691, pp.369-374 (1998)
- 11) Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A. and Robl, J. M. : Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts, *Science*, **280**, 5367, pp.1256-1258 (1998)
- 12) Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. : Eight calves cloned from somatic cells of a single adult, *Science*, **282**, 5396, pp.2095-2098 (1998)
- 13) Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D. T., Pollock, J. S., Destrempes, M. M., Cammuso, C., Williams, J. L., Nims, S. D., Porter, C. A., Midura, P., Palacios, M. J., Ayres, S. L., Denniston, R. S., Hayes, M. L., Ziomek, C. A., Meade, H. M., Godke, R. A., Gavin, W. G., Overstrom, E. W. and Echelard, Y. : Production of goats by somatic cell nuclear transfer, *Nat. Biotechnol.*, **17**, 5, pp.456-461 (1999)
- 14) Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A. C. : Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei, *Science*, **289**, 5482, pp.1188-1190 (2000)
- 15) Polejaeva, I. A., Chen, S. H., Vaught, T. D., Page, R. L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D. L., Colman, A. and Campbell, K. H. : Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells, *Nature*, **407**, 6800, pp.86-90 (2000)
- 16) Betthausen, J., Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilertsen, K., Enos, J., Forsythe, T., Golueke, P., Jurgella, G., Koppang, R., Lesmeister, T., Mallon, K., Mell, G., Misica, P., Pace, M., Pfister-Genskow, M., Strelchenko, N., Voelker, G., Watt, S., Thompson, S. and Bishop, M. : Production of cloned pigs from in vitro systems, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 10, pp.1055-1059 (2000)
- 17) Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L. and Westhusin, M. : A cat cloned by nuclear transplantation, *Nature*, **415**, 6874, pp.859 (2002)
- 18) Chesne, P., Adenot, P. G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L. and Renard, J. P. :



- Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 4, pp.366-369 (2002)
- 19) Woods, G. L., White, K. L., Vanderwall, D. K., Li, G. P., Aston, K. I., Bunch, T. D., Meerdo, L. N. and Pate, B. J. : A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer, *Science*, **301**, 5636, pp.1063 (2003)
  - 20) Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R. and Lazzari, G. : Pregnancy : a cloned horse born to its dam twin, *Nature*, **424**, 6949, pp.635 (2003)
  - 21) Zhou, Q., Renard, J. P., Le Friec, G., Brochard, V., Beaujean, N., Cherifi, Y., Fraichard, A. and Cozzi, J. : Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation, *Science*, **302**, 5648, pp.1179 (2003)
  - 22) Kwon, O. Y. and Kono, T. : Production of identical sextuplet mice by transferring metaphase nuclei from four-cell embryos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 23, pp.13010-13013 (1996)
  - 23) Inoue, K., Ogonuki, N., Mochida, K., Yamamoto, Y., Takano, K., Kohda, T., Ishino, F. and Ogura, A. : Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning, *Biol. Reprod.*, **69**, 4, pp.1394-1400 (2003)
  - 24) Wakayama, T. and Yanagimachi, R. : Cloning of male mice from adult tail-tip cells, *Nat. Genet.*, **22**, 2, pp.127-128 (1999)
  - 25) Hill, J. R., Burghardt, R. C., Jones, K., Long, C. R., Looney, C. R., Shin, T., Spencer, T. E., Thompson, J. A., Winger, Q. A. and Westhusin, M. E. : Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses, *Biol. Reprod.*, **63**, 6, pp.1787-1794 (2000)
  - 26) Wilmut, I., Beaujean, N., de Sousa, P. A., Dinnyes, A., King, T. J., Paterson, L. A., Wells, D. N. and Young, L. E. : Somatic cell nuclear transfer, *Nature*, **419**, 6907, pp.583-586 (2002)
  - 27) Tsunoda, Y. : 核移植とゲノムの初期化, *実験医学 (増刊)*, **21**, 11, pp.143-147 (2003)
  - 28) Tamashiro, K. L., Wakayama, T., Blanchard, R. J., Blanchard, D. C. and Yanagimachi, R. : Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells, *Biol. Reprod.*, **63**, 1, pp.328-334 (2000)
  - 29) Tamashiro, K. L., Wakayama, T., Akutsu, H., Yamazaki, Y., Lachey, J. L., Wortman, M. D., Seeley, R. J., D'Alessio, D. A., Woods, S. C., Yanagimachi, R. and Sakai, R. R. : Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring, *Nat. Med.*, **8**, 3, pp.262-267 (2002)
  - 30) Renard, J. P., Chastant, S., Chesne, P., Richard, C., Marchal, J., Cordonnier, N., Chavatte, P. and Vignon, X. : Lymphoid hypoplasia and somatic cloning, *Lancet*, **353**, 9163, pp.1489-1491 (1999)
  - 31) Ogonuki, N., Inoue, K., Yamamoto, Y., Noguchi, Y., Tanemura, K., Suzuki, O., Nakayama, H., Doi, K., Ohtomo, Y., Satoh, M., Nishida, A. and Ogura, A. : Early death of mice cloned from somatic cells, *Nat. Genet.*, **30**, 3, pp.253-254 (2002)
  - 32) Beaujean, N., Hartshorne, G., Cavilla, J., Taylor, J., Gardner, J., Wilmut, I., Meehan, R. and Young, L. : Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics, *Curr.*

- Biol., 14, 7, pp.R 266-267 (2004)
- 33) Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E. and Reik, W. : Conservation of methylation reprogramming in mammalian development : aberrant reprogramming in cloned embryos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 98, 24, pp.13734-13738 (2001)
  - 34) Kang, Y. K., Koo, D. B., Park, J. S., Choi, Y. H., Kim, H. N., Chang, W. K., Lee, K. K. and Han, Y. M. : Typical demethylation events in cloned pig embryos. Clues on species-specific differences in epigenetic reprogramming of a cloned donor genome, J. Biol. Chem., 276, 43, pp.39980-39984 (2001)
  - 35) Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout, W. M., 3rd, Biniszki-ewicz, D., Yanagimachi, R. and Jaenisch, R. : Epigenetic instability in ES cells and cloned mice, Science, 293, 5527, pp.95-97 (2001)
  - 36) Ohgane, J., Wakayama, T., Kogo, Y., Senda, S., Hattori, N., Tanaka, S., Yanagimachi, R. and Shiota, K. : DNA methylation variation in cloned mice, Genesis, 30, 2, pp.45-50 (2001)
  - 37) Kim, J. M., Liu, H., Tazaki, M., Nagata, M. and Aoki, F. : Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis, J. Cell. Biol., 162, 1, pp.37-46 (2003)
  - 38) Santos, F., Zakhartchenko, V., Stojkovic, M., Peters, A., Jenuwein, T., Wolf, E., Reik, W. and Dean, W. : Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos, Curr. Biol., 13, 13, pp.1116-1121 (2003)
  - 39) Bortvin, A., Eggan, K., Skaletsky, H., Akutsu, H., Berry, D. L., Yanagimachi, R., Page, D. C. and Jaenisch, R. : Incomplete reactivation of Oct 4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei, Development, 130, 8, pp.1673-1680 (2003)
  - 40) Boiani, M., Eckardt, S., Scholer, H. R. and McLaughlin, K. J. : Oct 4 distribution and level in mouse clones : consequences for pluripotency, Genes. Dev., 16, 10, pp.1209-1219 (2002)
  - 41) Boiani, M., Eckardt, S., Leu, N. A., Scholer, H. R. and McLaughlin, K. J. : Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation : epigenetic complementation?, Embo. J., 22, 19, pp.5304-5312 (2003)
  - 42) Tanaka, M., Hennebold, J. D., Macfarlane, J. and Adashi, E. Y. : A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo : homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog, Development, 128, 5, pp.655-664 (2001)
  - 43) Teranishi, T., Tanaka, M., Kimoto, S., Ono, Y., Miyakoshi, K., Kono, T. and Yoshimura, Y. : Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer, Dev. Biol., 266, 1, pp.76-86 (2004)
  - 44) Gao, S., Chung, Y. G., Parseghian, M. H., King, G. J., Adashi, E. Y. and Latham, K. E. : Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer : evidence for a uniform developmental program in mice, Dev. Biol., 266, 1, pp.62-75 (2004)
  - 45) Wakayama, T., Rodriguez, I., Perry, A. C., Yanagimachi, R. and Mombaerts, P. : Mice cloned from embryonic stem cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 26, pp.14984-14989 (1999)
  - 46) Inoue, K., Kohda, T., Lee, J., Ogonuki, N., Mochida, K., Noguchi, Y., Tanemura, K.,

- Kaneko-Ishino, T., Ishino, F. and Ogura, A. : Faithful expression of imprinted genes in cloned mice, *Science*, **295**, 5553, p.297 (2002)
- 47) Yamazaki, Y., Makino, H., Hamaguchi-Hamada, K., Hamada, S., Sugino, H., Kawase, E., Miyata, T., Ogawa, M., Yanagimachi, R. and Yagi, T. : Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer, *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 24, pp.14022-14026 (2001)
- 48) Wakayama, T. and Yanagimachi, R. : Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type, *Mol. Reprod. Dev.*, **58**, 4, pp.376-383 (2001)
- 49) Chung, Y. G., Mann, M. R., Bartolomei, M. S. and Latham, K. E. : Nuclear-cytoplasmic "tug of war" during cloning : effects of somatic cell nuclei on culture medium preferences of preimplantation cloned mouse embryos, *Biol. Reprod.*, **66**, 4, pp.1178-1184 (2002)
- 50) Gao, S., Chung, Y. G., Williams, J. W., Riley, J., Moley, K. and Latham, K. E. : Somatic cell-like features of cloned mouse embryos prepared with cultured myoblast nuclei, *Biol. Reprod.*, **69**, 1, pp.48-56 (2003)
- 51) Seki, Y. and Matsui, Y. : 生殖系列におけるエピジェネティクスのプログラム, *実験医学 (増刊)*, **21**, 11, pp.136-142 (2003)
- 52) Miki, H., Inoue, K., Kohda, T., Honda, A., Ogonuki, N., Yuzuriha, M., Mise, N., Matsui, Y., Baba, T., Abe, K., Ishino, F. and Ogura, A. : Birth of mice produced by germ cell nuclear transfer, *Genesis*, in press, pp (2005)
- 53) Miyashita, N., Shiga, K., Fujita, T., Umeki, H., Sato, W., Suzuki, T. and Nagai, T. : Normal telomere lengths of spermatozoa in somatic cell-cloned bulls, *Theriogenology*, **59**, 7, pp.1557-1565 (2003)
- 54) Kikyo, N., Wade, P. A., Guschin, D., Ge, H. and Wolffe, A. P. : Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI, *Science*, **289**, 5488, pp. 2360-2362 (2000)
- 55) Gonda, K., Fowler, J., Katoku-Kikyo, N., Haroldson, J., Wudel, J. and Kikyo, N. : Reversible disassembly of somatic nucleoli by the germ cell proteins FRGY 2 a and FRGY 2 b, *Nat. Cell. Biol.*, **5**, 3, pp.205-210 (2003)
- 56) Wakayama, T., Tabar, V., Rodriguez, I., Perry, A. C., Studer, L. and Mombaerts, P. : Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer, *Science*, **292**, 5517, pp.740-743 (2001)
- 57) Rideout, W. M., 3rd, Hochedlinger, K., Kyba, M., Daley, G. Q. and Jaenisch, R. : Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy, *Cell*, **109**, 1, pp.17-27 (2002)
- 58) Hwang, W. S., Ryu, Y. J., Park, J. H., Park, E. S., Lee, E. G., Koo, J. M., Jeon, H. Y., Lee, B. C., Kang, S. K., Kim, S. J., Ahn, C., Hwang, J. H., Park, K. Y., Cibelli, J. B. and Moon, S. Y. : Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst, *Science*, **303**, 5664, pp.1669-1674 (2004)
- 59) Oback, B. and Wells, D. : Donor cells for nuclear cloning : many are called, but few are chosen, *Cloning Stem Cells*, **4**, 2, pp.147-168 (2002)

## Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L-1 Is Essential for the Early Apoptotic Wave of Germinal Cells and for Sperm Quality Control During Spermatogenesis<sup>1</sup>

Jungkee Kwon,<sup>3,4</sup> Keiji Mochida,<sup>5</sup> Yu-Lai Wang,<sup>3</sup> Satoshi Sekiguchi,<sup>4</sup> Tadashi Sankai,<sup>6</sup> Shunsuke Aoki,<sup>3</sup> Atsuo Ogura,<sup>5</sup> Yasuhiro Yoshikawa,<sup>4</sup> and Keiji Wada<sup>2,3</sup>

Department of Degenerative Neurological Disease,<sup>3</sup> National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

Department of Biomedical Science,<sup>4</sup> Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Bioresource Engineering Division,<sup>5</sup> Bioresource Center, Riken, Tsukuba, Ibaraki 305-0074, Japan

Tsukuba Primate Center,<sup>6</sup> National Institute of Infectious Diseases, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan

### ABSTRACT

Ubiquitination is required throughout all developmental stages of mammalian spermatogenesis. Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) L1 is thought to associate with monoubiquitin to control ubiquitin levels. Previously, we found that UCHL1-deficient testes of *gad* mice have reduced ubiquitin levels and are resistant to cryptorchid stress-related injury. Here, we analyzed the function of UCHL1 during the first round of spermatogenesis and during sperm maturation, both of which are known to require ubiquitin-mediated proteolysis. Testicular germ cells in the immature testes of *gad* mice were resistant to the early apoptotic wave that occurs during the first round of spermatogenesis. TUNEL staining and cell quantitation demonstrated decreased germ cell apoptosis and increased numbers of premeiotic germ cells in *gad* mice between Postnatal Days 7 and 14. Expression of the apoptotic proteins TRP53, Bax, and caspase-3 was also significantly lower in the immature testes of *gad* mice. In adult *gad* mice, cauda epididymidis weight, sperm number in the epididymis, and sperm motility were reduced. Moreover, the number of defective spermatozoa was significantly increased; however, complete infertility was not detected. These data indicate that UCHL1 is required for normal spermatogenesis and sperm quality control and demonstrate the importance of UCHL1-dependent apoptosis in spermatogonial cell and sperm maturation.

*apoptosis, early apoptotic wave, epididymis, gad mouse, sperm, spermatogenesis, sperm quality, testis, UCHL1*

### INTRODUCTION

Ubiquitin and ubiquitin-dependent proteolysis are involved in a variety of cellular processes, such as cell cycle progression, degradation of intracellular proteins, programmed cell death, and membrane receptor endocytosis

<sup>1</sup>Supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; a grant from the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan; and a grant from Japan Science and Technology Agency.

<sup>2</sup>Correspondence: Keiji Wada, Department of Degenerative Neurological Disease, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.  
FAX: 81 42 341 1745; e-mail: wada@ncnp.go.jp

Received: 16 October 2004.

First decision: 16 December 2004.

Accepted: 21 February 2005.

© 2005 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

ISSN: 0006-3363. <http://www.biolreprod.org>

[1–5]. In spermatogenesis, the ubiquitin-proteasome system is required for the degradation of numerous proteins throughout the mitotic, meiotic, and postmeiotic developmental phases [4, 6, 7]. Ubiquitin C-terminal hydrolases (UCHs) control the cellular ubiquitin balance by releasing ubiquitin from tandemly conjugated ubiquitin monomers (*Ubb*, *Ubc*) and small adducts or unfolded polypeptides [4, 8–10]. UCHL1 is expressed at high levels in both testis and epididymis and may play an important role in the regulation of spermatogenesis [11–14]. In addition to its hydrolase activity [15], UCHL1 has a variety of functions, including dimerization-dependent ubiquitin ligase activity, and association with and stabilization of monoubiquitin in neuronal cells [16–18]. Furthermore, it has been suggested that UCHL1 also functions as a regulator of apoptosis [19]. The gracile axonal dystrophy (*gad*) mouse is an autosomal recessive spontaneous mutant carrying an intragenic deletion of the gene encoding *Uchl1* [21]. We recently found that testes of *gad* mice, which lack UCHL1 expression [18, 20, 21], have reduced ubiquitin levels and are resistant to cryptorchid injury-mediated germ cell apoptosis [22].

During prepubertal development, an early and massive wave of germinal cell apoptosis occurs in mouse testis [23, 24]. This early germ cell apoptotic wave affects mainly spermatogonia and spermatocytes and appears to be essential for functional spermatogenesis in adulthood. Decreased apoptosis has been reported in the early phase of spermatogenesis in transgenic mice overexpressing the antiapoptotic proteins *Bcl2* or *Bcl-xL* [23, 25] and in mice deficient in the apoptotic protein *Bax* [26]. This reduction in apoptosis is associated with the disruption of normal spermatogenesis and infertility. Our previous work demonstrated that *gad* mice exhibit pathological changes such as progressively decreasing spermatogonial stem cell proliferation [13] and increased expression of the antiapoptotic proteins *Bcl2* and *Bcl-xL* in response to apoptotic stress [19, 22]. Furthermore, we showed that UCHL1 functions during prepubertal development to effect normal spermatogenesis and to modulates germ cell apoptosis [22]. However, the mechanism by which UCHL1 regulates apoptosis during prepubertal development remains unclear. To further investigate the role of UCHL1 in immature testes, we evaluated the function of UCHL1 during early spermatogenesis. Here, we show that immature testes of *gad* mice accumulate premeiotic germ cells and are resistant to the massive wave of germinal cell apoptosis during the first round of spermatogenesis, eventually leading to alterations in sperm produc-