

博士論文（要約）

ブタ卵母細胞における
核外移行システムの機能解析

東京大学大学院農学生命科学研究科
応用動物科学専攻 応用遺伝学研究室
博士課程 平成 25 年 4 月入学

小沼 あすか

指導教員 内藤 邦彦

【目次】

序論	1
第一章 Cas9ヌクレアーゼの活性制御に対する 核移行システムの働き	6
緒言	7
材料と方法	9
(1) ブタ卵母細胞の採取および体外培養		
(2) gRNA合成用ベクターの構築		
(3) Cas9、Cas9-EGFP、EGFP mRNA、gRNA の in vitro 合成		
(4) 卵母細胞への RNA の顕微注入		
(5) 蛍光卵の選別		
(6) 酢酸オルセイン染色		
(7) ゲノム PCR および標的遺伝子配列解析		
(8) Cas9 卵内局在の観察		
(9) 統計学的有意差の判定		
結果	15
(1) GV 期卵への gRNA/Cas9 mRNA 注入による影響の確認		
(2) 卵成熟過程における CRISPR/Cas9 システムの変異導入活性 の検討		
(3) EGFP 付加 Cas9 発現による卵内局在解析		
(4) 核外移行阻害時の GV 期維持卵における Cas9 変異導入活性 の検討		
考察	18
図表	21

第二章	ブタ卵母細胞における		
	核外移行レセプターの機能解析	27
第三章	ブタ卵の減数分裂再開に対する		
	核外移行レセプターの機能解析	28
総合考察		29
付録		30
<p>(第二章から付録までの内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。)</p>			
参考文献		31

【序論】

雌性配偶子である卵は、減数分裂を経て母性の遺伝的形質を次代に伝達する役割を持つ極めて重要な細胞である。また卵は遺伝学、生殖学分野の研究のみならず、発生工学分野においても受精卵から発生胚に至るまで広く研究に用いられている。近年では特に、受精卵を用いたゲノム編集が注目を集め、ゲノム改変個体の作出を介した遺伝子の機能解析などの目的で盛んに研究が行われている [Gaj *et al.*, 2013]。しかし、卵の生理機能については不明の部分も多く、材料である卵側の要因が検討自体に影響を及ぼすことも少なくないことが問題となっている。

哺乳類の卵母細胞は、胎仔期の卵巣内において、第一減数分裂前期で減数分裂を停止した状態で性成熟期まで維持されている。このとき卵母細胞内には巨大な核である卵核胞 (Germinal vesicle: GV) が形成され、一般に卵核胞期 (GV 期) と呼ばれる。GV は体細胞核とは異なる卵母細胞独自の「核」であり、核内には DNA 複製を終了した 4 倍体の染色体が存在する。さらに相同染色体が特殊なタンパク質と共にシナプトネマ複合体を形成して対合し、組み換えを起こした後のキアズマを形成した状態で停止しているとされる。また、その体積は最大では通常体細胞核の 100 倍を越え、球状の核膜を持つため核膜/核質比が極めて小さい [Lénárt & Ellenberg, 2003]。GV はこの状態のまま動物種によっては数十年にわたり維持され続ける。しかし、GV の形状や核膜の状態、およびその機能の詳細や、長期間に及ぶ GV 期維持の機構には未だ不明な部分が多く存在する。

卵巣内で GV 期に維持されている卵母細胞は、出生後まもなくから一定数が卵自体の体積を増加させ、その後の成熟、受精、胚発生に必要な mRNA などを

蓄積させる [Tyler, 1967]。この過程は卵成長と呼ばれ、減数分裂再開能を獲得するために重要な過程である。性成熟期になると卵成長を完了した卵は、ブタでは直径 120 μm 程度の大きさとなり、ホルモン刺激や体外培養により減数分裂を再開する。減数分裂再開に伴い引き起こされる卵核胞崩壊 (Germinal vesicle breakdown : GVBD) により核膜は消失し、その後染色体の分離が起き、第二減数分裂中期 (MII 期) まで進行し受精能を獲得した段階で、卵母細胞は再び減数分裂を停止させる。この GVBD から MII 期に至る減数分裂の過程は卵成熟と呼ばれる。

同じ GV 期の状態であっても、卵成長の段階により卵成熟進行制御に関与する因子の発現量や活性が異なることが報告されており、成長を完了した卵 (成長卵) と未成長な卵 (成長途上卵) では GV 期維持の制御機構に相違があることが示唆されている [西村, 2013]。実際、卵成長の途中である直径 100 μm 程度のブタ卵母細胞は、卵胞外に取り出して培養を行っても減数分裂を再開できないことが確認されている [Motlik *et al.*, 1984; Hirao *et al.*, 1995; Miyano & Hirao, 2003; Nishimura *et al.*, 2012]。

現在のところ、GV 期の維持や、GVBD の誘起に対する制御機構については細胞周期の観点から多くの研究がなされてはいるものの、卵母細胞の生理機能の解明にはさらなる検証が必要とされている。これらの検証は、遺伝学、生殖学的分野の有用性はもちろん、発生工学分野の発展にとっても有益である。ゲノム改変など発生工学技術の向上のためには材料である卵母細胞の生理機能の理解が不可欠であり、卵の生理機能の解明はその基盤をなす研究と位置づけられ、ここで得られた知見を技術手法に生かすことにより、発生工学分野のさらなる発展に寄与することが期待できる。

哺乳類の卵母細胞において機能が明らかにされていない機構の一つに、核移

行システムが挙げられる。核移行システムは、核が存在する間期細胞では核膜孔に存在する核膜孔複合体（NPC）を介した物質の輸送を制御する機構である [Görlich & Kutay, 1999]。一般的に 50 kDa 以下の小分子は NPC を単独で通り抜け、拡散により核内外へ移行することができる（能動輸送）。一方、それ以上の大きさのタンパク質や核酸の核移行には核移行レセプターの関与が必要であり、一般的に核内移行のレセプターとしてインポートイン、核外移行のレセプターとしてエクスポートインが働くことが知られている。インポートインは輸送対象物質（カーゴ）に存在する核内移行シグナル（NLS）、エクスポートインは核外移行シグナル（NES）と呼ばれる一定のアミノ酸あるいは塩基配列を認識してカーゴと結合、複合体を形成する。複合体は NPC との相互作用を介して核膜孔を通過し、カーゴを核内外へ移行する。核移行レセプターは、現在酵母で 14 種類、哺乳類で 20 種類のサブタイプが報告されており、それぞれのサブタイプにより輸送するカーゴや認識する NLS、NES が異なるため、それらの多様性によって核移行システムは複雑に制御されている [Pemberton & Paschal, 2005; Kimura & Imamoto, 2014]。また、能動輸送が可能な小分子を含め多くの物質に NLS、NES は存在するため [Görlich & Kutay, 1999]、核移行レセプターの発現や認識配列との結合親和性などにより、核内への移行と細胞質への移行のバランスを調節することで物質の局在制御に機能している。

核移行システムの機能は、これまでに主に体細胞を用いた研究によって明らかにされてきた。また、電子顕微鏡による NPC の構造解析にはクシイモリやアフリカツメガエルなどの両生類卵が用いられ、核移行システムに関する研究の初期の知見として役立てられた [Goldberg & Allen, 1992; Pante & Aebi, 1996]。しかしそれ以後に卵を用いた検討は十分に行われず、特に哺乳類の卵母細胞における検討は現在でも非常に限られており、核移行システムを制御する因子自体が GV 期卵に存在し機能しているかについても明確には示されていない。

さらに、核移行システムによる因子の局在制御は、因子の活性や機能発現に大きく影響を及ぼす要因となる。人為的因子を外部から導入し作用させることを目的とする発生工学手法の効率向上のためには核移行機能の理解が重要であり、発生工学的観点からも核移行システムについての検討は有意義だといえる。

以上の背景から本研究では、哺乳類の GV 期卵において核移行システムが機能しているか、さらにその機能が核内因子の活性や GV 期維持、減数分裂再開の制御機構に対して影響を与えるか、について解明することを目的とした。本研究には哺乳類卵としてブタ卵母細胞を用いた。ブタは一定の品種、月齢の個体が定期的に食肉処理場に出荷されるため、その卵母細胞は均一な状態のものを多量に得ることが可能という実験材料として優れた特徴を持つ。さらに、安定した卵の体外培養手法が確立されており [Naito *et al.*, 1988]、顕微注入など的人為的操作に比較的強いことが知られている [Ohashi *et al.*, 2001]。また、GV 期および減数分裂過程の卵母細胞に関しては多くの分子機構が明らかとなっており、この分野においては実験動物として広く用いられている [Kuroda & Naito, 2003; Naito *et al.*, 2010]。特にマウスなどの実験動物に比べ卵成熟の進行にかかる時間が長いため [Edwards, 1965]、GV 期や成熟過程において詳細な検討を行いやすいという利点もある。

まず、第一章では核内で機能する因子の活性制御に対して核移行システムが関与するかについて発生工学的観点から確認することを目的とし、人工ヌクレアーゼ Cas9 の GV 期卵における局在と変異導入効率について、核外移行の阻害による影響を解析した。ここで用いた Cas9 は近年着目されているゲノム編集技術である CRISPR/Cas システムで用いられる人工ヌクレアーゼであり、ゲノム上の変異導入配列を認識するガイド RNA (gRNA) と共に細胞質内に導入する

ことにより、極めて効率よく簡便にゲノムに変異導入することができる [Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013]。そのため発生胚や体細胞においてゲノム改変個体の作出などに広く用いられているが [Shen *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Fujii *et al.*, 2013b; 2014a; 2014b]、特殊な状態の核を持つ GV 期の卵、および減数分裂過程の卵では十分な検討が行われておらず、CRISPR/Cas システムの効果は不明である。CRISPR/Cas システムが機能するためには Cas9 が核内へ移行することが必須であるが、Cas9 は分子量 150 kDa 以上の大分子であり [Jinek *et al.*, 2012; Fujii *et al.*, 2013b]、核内外への移行には核移行レセプターの関与が必要であるため、GV 期に核移行システムが機能しているか、その関与を調べるための良いモデルになると考えられる。第二章では卵内における核外移行レセプターの機能について検証するため、エクスポーチン-1 (XPO1) およびエクスポーチン-6 (XPO6) を GV 期卵全 RNA よりクローニングし、過剰発現によりカーゴの局在に対する影響を観察しその作用を解析することとした。卵の時期によりエクスポーチンの活性が異なるかについて検討するため、成長途上卵、成長卵、さらに単為発生処理後の 1 細胞期卵 (前核期胚) それぞれにおいてカーゴの局在変化に対する効果や内在性エクスポーチンの発現などについて解析を行い、それらの生理機能への関与について考察した。最後に、第二章での結果に基づき、核外移行レセプターの働きが GV 期維持や減数分裂再開の制御機構に与える影響について検証することを目指し、XPO1 の機能阻害や過剰発現、XPO6 の過剰発現が減数分裂の再開時期を変化させ得るかについて検討し第三章とした。以下、これらについて順を追って記述する。

第一章

Cas9ヌクレアーゼの活性制御に対する 核移行システムの働き

【緒言】

本章では、GV 期に核移行システムが機能しているか、発生工学的観点から調べるためのモデルとして、核内で働くことが知られている人工ヌクレアーゼ Cas9 の GV 期卵における局在と機能について解析した。細胞工学技術の発展に伴い、人為的に因子を細胞内に導入しその機能を解析することは一般的な手法となり、現在は様々な方法で広く研究に利用されている。導入された因子が機能するためには、因子が機能可能な活性型状態であることのみならず、その因子が“機能を発揮できる場所に存在する”こと、つまり正しい細胞内局在をしていること、が重要であり、因子の局在制御は活性を調節する重要な要因であると考えられている。

発生工学分野の研究においては、材料として用いる卵の核移行システム自体の知見が乏しく、その機能を実験技術に利用できるような段階ではない。大分子である Cas9 は単独では核膜孔を通過できないため、GV 期に Cas9 が核 DNA と接触し作用するためには核移行レセプターによる核移行が必須である [Cong *et al.*, 2013]。現在広く用いられている Cas9 には SV40 T 抗原由来 NLS (SV40 NLS) が ORF 配列の片端もしくは両端に付加されており、効率的に核内へ移行されることが想定されている [Cong *et al.*, 2013; Fujii *et al.*, 2013b]。しかし、GV 期卵において実際に Cas9 が核内移行し作用するかについては明らかにされていない。この点に関して知見を得ることは、卵内での核移行システム機能の理解と共に、今後の CRISPR/Cas システムを用いたゲノム編集技術の汎用性の向上にも役立つと考えられる。

以上の背景より本検討では、ブタ GV 期卵に Cas9 mRNA をブタ α 1,3-galactosyltransferase (GGTA1) 遺伝子配列上に設計した gRNA と共に

顕微注入した。まず RNA 注入による成熟率や、その後単為発生処理した胚の初期卵割率への影響を確認した後、GV 期で維持もしくは卵成熟を進行させた卵母細胞での変異導入効率を検討した。GV 期維持卵においては核膜が存在し続けるため、CRISPR/Cas システムが働くためには Cas9 が核内に移行する必要がある。したがって、変異導入効率には Cas9 の核内移行量が大きく影響することが予想されるため、卵あたりの変異導入効率を算出すると共に、変異の入るアレル数、さらに変異の特徴についても調べることにした。また実際に Cas9 の局在を調べるために改良緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 付加 Cas9 を GV 期卵に発現させ、蛍光強度の分布から GV 期卵での Cas9 の GV 内局在について解析を行った。さらに核外移行レセプター、XPO1 の阻害剤である leptomycin B (LMB) [Nishi *et al.*, 1994; Fornerod *et al.*, 1997; Kudo *et al.*, 1999] を用いて Cas9 の核内移行量を変化させられるか検討し、この結果に基づき、GV 期維持卵において核外移行阻害時の変異導入効率を解析した。この結果から Cas9 の活性と核移行システムの関与について検討すると共に、GV 期卵の核移行システムの存在と作用について考察した。

【材料と方法】

(1) ブタ卵母細胞の採取および体外培養

A. ブタ卵母細胞の採取

ブタ卵母細胞の採取は、既報 [Naito *et al.*, 1988] に若干の修正を加えて行った。食肉処理場にて未経産豚の卵巣を採取し、37-39°Cの 0.85% (w/v) 生理食塩水に保持し研究室に搬送した。これを 37°Cの生理食塩水で数回洗浄後、卵を採取する間 37°Cの生理食塩水内で保持した。直径 2-5 mm の胞状卵胞を 18 ゲージの注射針と 2.5 mL の注射筒を用いて、卵胞より卵母細胞 - 卵丘細胞複合体 (COC) を吸引採取した。回収した COC は、37°Cに温めた modified Tyrode's lactate-HEPES-polyvinyl alcohol (TL-HEPES-PVA) medium [Funahashi *et al.*, 1997] 内で洗浄し、卵丘細胞に十分囲まれている卵母細胞のみを選別した。

B. 体外成熟培養

体外成熟培地は、体外発生を行う実験で用いられる培地である 10% ブタ卵胞液添加 modified North Carolina State University medium 37 (mNCSU37-pFF) を用いた。ブタ卵胞液は直径 2-5 mm の胞状卵胞より吸引採取し、3000 rpm (約 1300×g) で 25 分遠心分離し、その上清を用いた。採取した卵胞液は使用するまで -80°Cで保存した。調製した培地は濾過滅菌後、37°C、5% CO₂、湿度飽和気相下で一晩静置し平衡化した。

選別した COC を mNCSU37-pFF で 4 回洗浄し、10 IU/mL 妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG; あすか製薬)、10 IU/mL ヒト絨毛性腺刺激ホルモン (あすか製薬)、1 mM dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (dbcAMP; Sigma-Aldrich) を添加した mNCSU37-pFF で 20 時間培養した。その後、ホルモンおよび dbcAMP 無添加の mNCSU37-pFF で十分に洗浄し、無添加 mNCSU37-pFF にて 24 時間培養した [Funahashi *et al.*, 1997]。GV 期の維持を行うときは、M 期/成熟促進因子 (MPF) の特異的阻害剤である 100 μM roscovitine (Ros; Cell Signaling Technology) を dbcAMP の代わりに添加した mNCSU37-pFF を用い、44 時間培養した。核外移行阻害を行うときは、200 nM leptomycin B (LMB; Merck Millipore) を培地に添加した。なお体外成熟培養には 24-well マイクロプレート (表面無処理; Iwaki) を用い、分注した培地 500 μL 中に 50-60 個の COC を入れ、37°C、5% CO₂、湿度飽和気相下の条件で行った。GV 期卵、MII 期卵サンプルは、培養 44 時間後に GV、第一極体の存在がそれぞれ確認された卵を回収した。

C. 電気刺激による単為発生処理

体外成熟培養後、培地中に 0.1% ヒアルロニダーゼ (TypeIV-S; Sigma-Aldrich) を適量添加し、卵母細胞から卵丘細胞をピペッティングによって完全に除去した(裸化)。裸化卵は 37°C に温めた TL-HEPES-PVA 内で洗浄した後、37°C のマンニトール溶液 (280 mM mannitol, 0.05 mM CaCl₂, 0.1 mM MgSO₄, 0.01% (w/v) PVA) [Matsunari *et al.*, 2012] 内に移し、溶液とともに電気刺激用シャーレ上の電極間に整列させた。細胞融合装置 (LF101; ネッパジーン) を用い、卵に電気刺激 (150 V/mm DC pulse, 100 マイクロ秒間) を 1 回かけ、単為発生活活化を行った。処理後の卵は TL-HEPES-PVA で十分に洗浄した。

D. 体外発生培養

体外発生培地は、0.4% ウシ血清アルブミン (BSA, fraction V; Sigma-Aldrich) 添加 mNCSU37 (mNCSU37-BSA) を用いた。調製した培地は濾過滅菌後、37°C、5% CO₂、湿度飽和気相下で一晩静置し平衡化した。培地はシャーレ (Iwaki) に分注し、流動パラフィン (ナカライテスク) を重層した状態で培養に用いた。

単為発生処理を行った卵は、二倍体発生を誘起させるために、2.2 µg/mL cytochalasin B (Sigma-Aldrich) を添加した mNCSU37-BSA で 3 時間処理し、第二極体の放出阻害を行った。処理後、阻害剤無添加の mNCSU37-BSA で十分に洗浄し、mNCSU37-BSA にて 2 日間体外発生培養を行った。単為発生処理から 2 日後に卵の発生段階を観察し、2 細胞期以降まで発生した卵の割合から卵割率を算出した。

(2) gRNA 合成用ベクターの構築

A. gRNA 鋳型配列の精製

変異導入を行う標的配列を α 1,3-galactosyltransferase の触媒部位をコードするブタ GGTA1 の exon 8 上に既報 [Hauschild *et al.*, 2011] を参考に設計し (図 1-1A)、gRNA 発現ベクターを既報 [Fujii *et al.*, 2013b] に従って作成した。具体的には以下の通りである。T3 プロモーター配列を 5' 末端に付加した標的塩基配列のプライマー (付録: 表 1) を、gRNA の 3' 側の塩基配列のプライマーと共に 1 µM ずつ PCR 反応液 (1×Ex Taq buffer (TaKaRa)、0.2 mM dNTP、1.5U Ex Taq (TaKaRa)) に添加し、オーバーラップ PCR を行った。PCR 条件は、[1] 熱変性: 95°C で 30 秒、[2] 熱変性: 95°C で 20 秒、アニーリング: 52°C で 30 秒、伸長反応: 72°C で 20 秒、[3] 伸長反応: 72°C で 1 分、[4] 冷却: 4°C で維持、とし [2] は 30 サイクル繰り返した。得られた PCR 産物は、FastGene™ Gel /PCR Extraction kit (日本ジェネティクス) を用いてプロトコールに従って精製を行い、全長 gRNA の配列の DNA

断片を得た。

B. DNA 断片のベクターへのライゲーション

ベクターへのライゲーションは、pGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いて行った。挿入する DNA 断片をライゲーション反応液 (1×Ligation buffer、25 ng pGEM-T Easy Vector、1.5 Weiss U T4 DNA Ligase) に加え、16°Cで3時間または4°Cで一晩静置しライゲーションを行った。その溶液をコンピテントセルに加え、トランスフォーメーション後 LB プレートに播種し、37°Cで一晩培養した。その後コロニーのスクリーニングを行い、DNA 断片が挿入されたベクターを選別し、塩基配列の確認を行った。

C. 塩基配列の解析

塩基配列の解析は、ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems; ABI) を用いて行った。使用したプライマー配列は付録：表 1 に示した。約 0.5 µg の鋳型 DNA をシーケンス反応液 (1 µL 解析用プライマー (2.5 µM)、2 µL BigDye® Terminator Ready Reaction Mix (ABI)) に加え、全量が 5 µL となるように超純水で調整し、PCR を行った。PCR 条件は、[1] 熱変性：96°Cで2分、[2] 熱変性：96°Cで30秒、アニーリング：54-56°Cで15秒、伸長反応：60°Cで4分、[3] 冷却：4°Cで維持、とし [2]は28サイクル繰り返した。この反応液 5 µL に 125 mM EDTA を 1.25 µL 加え、エタノール沈殿を行った後、15 µL Hi-Di Formamide (ABI) を加え十分に混和し、95°Cで2分間処理した。その後直ちに氷上に移し、5分以上冷却した。この反応液を MicroAmp® 96-well Reaction Plate (ABI) に移し、上記の DNA シーケンサーにセットし、1×Genetic Analyzer Buffer with EDTA (ABI) をバッファーとして用いて泳動を行い、得た塩基配列により目的の配列がベクターに挿入されていることを確認した。

(3) Cas9、Cas9-EGFP、EGFP mRNA、gRNA の in vitro 合成

Cas9、EGFP 付加 Cas9 (Cas9-EGFP) mRNA の in vitro 合成には、既報 [Fujii *et al.*, 2013b] で作製された Cas9/pCAGGS、Cas9-EGFP/pCAGGS ベクターを用いた。EGFP mRNA の合成には、当研究室で保有している EGFP-poly(A)/pCMV [永島, 2014] を用いた。大腸菌から精製したプラスミドベクターを適した制限酵素を用いて 37°Cで一晩処理することにより直鎖化し、フェノール/クロロホルム法でタンパク質を除去し、エタノール沈殿法によって DNA を精製した。DNA を風乾後 RNase-free water に溶解し、RNA 合成用の鋳型 DNA 溶液とした (-20°Cで保存)。

得られた鋳型 DNA (5-10 μg) を、RNA 合成反応液 (1 \times Buffer、全量の 4/25 量の NTP mixture、10 mM DTT、2 U/ μL RNase inhibitor (TaKaRa)、1 U/ μL RNA polymerase (Promega)) に添加し、全量を鋳型 DNA 量に応じて 30-50 μL に調製し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間反応させ RNA を合成した。mRNA の合成には、cap 構造を形成するように NTP mixture は ATP: UTP: CTP: GTP: GTP capping analog = 4:4:4:1:3 (全て 10 mM; Invitrogen) となるように混合したものを用いた。gRNA 合成時に用いた NTP mixture は GTP capping analog を除いた 4 種の NTP を等量混合し調整した。RNA polymerase は、合成する RNA に応じて T3、T7、SP6 (全て Promega) のいずれかを選択し用いた。

RNA 合成反応後、鋳型 DNA を除去するために、0.5 U/ μg (鋳型 DNA) TURBOTM DNase (Thermo Fisher Scientific) を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間処理した。フェノール/クロロホルム法でタンパク質を除去し、エタノール沈殿法によって RNA を精製した。RNA を風乾後 RNase-free water で RNA 濃度が約 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように溶解させ、使用まで -80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。濃度測定に供した RNA 溶液を 1% TAE アガロースゲルを用いて 1 \times TAE (40 mM Tris-acetate、2 mM EDTA) buffer 中で電気泳動し、目的の RNA が合成されていることを確認した。

(4) 卵母細胞への RNA の顕微注入

RNA の顕微注入に用いるピペットは、表面をシリコンコートしたものを 250 $^{\circ}\text{C}$ で 120 分間乾熱滅菌処理し、RNase-free の状態にしたものを使用した。上記で作成した RNA 溶液を以下の濃度に希釈、混合し、注入用ピペットに約 2 μL 充填し、マイクロマニピュレーター (IM-5B; Narishige) にセットした後、注入用ピペットの先端をホールディングピペットに軽く当てて鋭利に折り、RNA 溶液が適当量出るように調節した。

卵巣から採取直後の卵母細胞の細胞質中に、20 ng/ μL gRNA、50 ng/ μL Cas9 mRNA、50 ng/ μL EGFP mRNA を含む RNA 溶液を約 50 pL 注入した。その後、培養用プレートに移し一定時間培養した。

(5) 蛍光卵の選別

導入した mRNA の発現が起きたことの指標とするために EGFP mRNA を共注入した卵は、一定時間培養後、蛍光実体顕微鏡 (MZFLIII; Leica) 下で励起光を照射し GFP2 フィルターを用いて蛍光を観察した。EGFP の緑色蛍光を発した卵のみを選別し、その後の実験に用いた。

(6) 酢酸オルセイン染色

体外成熟培養後、回収した COC を 0.1% polyvinyl pyrrolidone (PVP, Av. Mol. Wt.: 10,000; Sigma-Aldrich) 添加生理食塩水の液滴中に移し、0.1% ヒアルロニダーゼを適量添加し、卵丘細胞を除去した。裸化卵をスライドガラス上に乗せ、白色ワセリンと固形パラフィンの 9:1 混合物で支持されたカバーガラスで上から圧平し、固定液 (エタノール : 酢酸 = 3:1) で一晩以上固定した。0.75% 酢酸オルセイン染色液 (酢酸 : 水 = 9:11) で約 1 時間染色した後、脱色液 (Glycerol : 酢酸 : 水 = 2:1:2) で脱色を行い、封入剤 (EUKITT; Sigma-Aldrich) を用いてカバーガラスの四辺を封入した。

作成したホールマウント標本を微分干渉顕微鏡下で観察し、核相によって卵核胞期 (GV 期)、第一減数分裂前中期 (PMI 期)、第一減数分裂中期 (MI 期)、第一減数分裂後期から終期 (ATI 期) および第二減数分裂中期 (MII 期) の各ステージに分類した。PMI 期以降の卵の割合から GVBD 率を、MII 期に到達した卵の割合から MII 期到達率を算出した。

(7) ゲノム PCR および標的遺伝子配列解析

gRNA/Cas9 を導入した卵母細胞の標的部分の塩基配列を解析するため、既報 [Fujii *et al.*, 2013a] に修正を加えた方法でゲノム PCR を行った。0.1% PVP 添加生理食塩水 0.5 μ L で卵母細胞を 1 つずつ回収し PCR チューブに入れ、5.5 μ L RNase-free water、7.5 μ L 2 \times PCR buffer for KOD FX Neo (TOYOBO)、1.5 μ L Proteinase K (\geq 600 U/mL; Roche Diagnostics) を添加し、65°C で 60 分反応させ、その後 98°C で 10 分処理することで酵素を失活させ、DNA を抽出した。これに PCR 反応液 (7.5 μ L 2 \times PCR buffer for KOD FX Neo (TOYOBO)、6 μ L dNTP (2 mM)、0.6 μ L Forward/Reverse primer (10 μ M)、0.6 μ L KOD FX Neo Taq (TOYOBO)) を添加し、変異導入部位付近の配列を PCR で増幅した。PCR 条件は、[1] 熱変性 : 95°C で 4 分、[2] 熱変性 : 98°C で 10 秒、アニーリング : 57°C で 30 秒、伸長反応 : 72°C で 1 分、[3] 伸長反応 : 72°C で 5 分、[4] 冷却 : 4°C で維持、とし [2] は 40 サイクル繰り返した。得られた PCR 産物は、1.5% TAE アガロースゲルを用いて電気泳動し、long wave UV 下で目的のバンドのみを切り出し、FastGene™ Gel /PCR Extraction kit (日本ジェネティクス) を用いてプロトコールに従って精製を行った。増幅した DNA 配列の標的変異導入部位の塩基配列を前述の (2)-C と同様に解析し、得た配列データからそれぞれの卵のゲノム配列パターンを解析した。

(8) Cas9 卵内局在の観察

採取直後の卵母細胞に、20 ng/ μ L gRNA、400 ng/ μ L Cas9-EGFP mRNA を含む RNA 溶

液を前述の (4) と同様に注入後、100 μ M Ros 添加培地にて 44 時間 GV 期で維持した。培養後、裸化した卵を 0.1% PVP 添加 PBS (137 mM NaCl、8.1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、2.68 mM KCl、1.47 mM KH_2PO_4 、pH 7.4; PVP-PBS) で洗浄した後、3.5% パラホルムアルデヒド (PFA) 添加 PVP-PBS で 1 時間固定した。PVP-PBS で洗浄、0.1% Triton X-100 添加 PVP-PBS で 20 分間膜透過処理を行い、PVP-PBS で洗浄後、10 ng/ μ L RNase (Nippon Gene) 添加 PVP-PBS で 15 分処理し、100 μ g/mL propidium iodide (PI) 添加 PVP-PBS と 30 分間反応させ DNA を染色した。PVP-PBS で洗浄した卵をスライドガラスに封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 700; Carl Zeiss) を用いて EGFP 蛍光を観察した。得られた画像から、細胞質に対する核内の蛍光強度をその程度により 3 段階にスコア化し、それぞれの局在スコアに分類し Cas9 局在について解析を行った。

(9) 統計学的有意差の判定

検討はそれぞれ独立した 3 回以上の実験により行った。MII 期到達率、卵割率の結果については χ 二乗検定、局在スコアの平均値の結果については t 検定を用いて評価した。危険率 $P < 0.05$ を統計的に有意だとみなした。

【結果】

(1) GV 期卵への gRNA/Cas9 mRNA 注入による影響の確認

本検討で用いる gRNA はブタ GGTA1 の触媒部位をコードするエクソン配列上に設計した (図 1-1A)。卵巣から吸引採取した直後の GV 期卵に gRNA/Cas9 mRNA を顕微注入し、まずは CRISPR/Cas システムの導入によりその後の卵成熟、初期胚発生が正常に進行するか確認を行った。RNA 注入した卵を体外成熟培養したところ、gRNA/Cas9 mRNA 注入区では 78.0%の卵が MII 期に到達しており、無注入区 (83.5%) との間に差はみられなかった (図 1-1B)。さらに、体外成熟培養後、電気刺激により単為発生を誘導したところ、単為発生処理 2 日後までに卵割を起こした胚は RNA 注入区で 42.2%であり、無注入区 (50.0%) と同程度であった (図 1-1C)。卵成熟率、初期卵割率のどちらにも gRNA/Cas9 mRNA 注入による影響はみられず、GV 期卵への CRISPR/Cas9 システムの導入は少なくともその後の卵成熟や初期卵割過程に大きな影響は及ぼさないことが確認された。

(2) 卵成熟過程における CRISPR/Cas9 システムの変異導入活性の検討

卵成熟過程における Cas9 ヌクレアーゼの変異導入活性を調べるため、採取直後の GV 期卵に gRNA/Cas9 mRNA を顕微注入し、44 時間培養した後に卵の 1 つずつから抽出した標的配列付近の変異導入効率を解析した。GVBD を起こし MII 期まで到達した成熟卵では 81%で塩基配列の変異導入が確認され、そのうち多くの卵で 1 本または 2 本の変異アレルが検出された (表 1)。また、導入された変異配列は最大 44 塩基長であった (表 2)。一方、M 期/成熟促進因子 (MPF) の活性阻害剤である roscovitine (Ros) を添加して GV 期のまま維持した卵においては全く変異が導入されなかった (表 1)。よって、核膜の存在によ

り GV 期卵では Cas9 が十分に機能できない可能性が示唆された。

(3) EGFP 付加 Cas9 発現による卵内局在解析

GV 期卵における Cas9 の局在を調べるため、mRNA の注入により EGFP 付加 Cas9 (Cas9-EGFP) を GV 期卵で発現させ、その蛍光を観察した。注入卵では、核内の蛍光が細胞質より明らかに低いもの、多少低いもの、同等かそれ以上であるものが観察されたため、それらを核内蛍光が低い方から 3 段階の局在スコアとして設定することとした (図 1-2A)。すると、多くの卵で局在スコアは 1 (37%) または 2 (48%) となり、Cas9 蛍光は細胞質よりも GV 内の方が低かった (図 1-2B)。GV 期卵において、導入した Cas9 は核外移行機能により GV 内存在量が低く調節されている可能性が考えられたため、XPO1 阻害剤である LMB の添加培養により核外移行を阻害することで Cas9 の核内存在量が変化するか確認した。その結果、LMB 添加区では局在スコアが 3 と判断される卵の割合が増加し (52%、図 1-2B)、無添加区と比べ局在スコアの平均値も有意に上昇した (図 1-2C)。核外移行阻害により GV 内 Cas9 存在量が増加したことから、核内移行した Cas9 は核外移行機能により再び核外へ排出されてしまい、通常状態では核内存在量が低くなっていることが示唆された。

(4) 核外移行阻害時の GV 期維持卵における Cas9 変異導入活性の検討

ここまでの結果より、GV 期卵において Cas9 の核内存在量が低い状態であることが、Cas9 による変異導入が起きない要因であることが考えられたため、核外移行阻害により核内の Cas9 量を増加させた状態であれば GV 期維持卵であっても変異導入が可能ではないかと推測した。この可能性を検証するため、核外移行を阻害した GV 期維持卵における変異導入効率を解析した。gRNA/Cas9 導入後、LMB 添加培養により核外移行を阻害した GV 期維持卵において、16.7%

で標的配列付近に変異の導入が確認された (表 3)。変異は 1 本または 2 本のアレルに導入され、最大 170 塩基長の変異が検出された (表 4)。以上の結果より、GV 期卵では核移行システムの機能により Cas9 の活性が制御されていることが示唆された。

【考察】

本章では、核内因子である Cas9 の活性制御に対する核移行システムの働きについての解析を介し、GV 期卵における核移行システムの機能について検証を行った。

結果より GV 期維持卵ではゲノムに変異が導入されないことが明らかとなり、その要因として GV 期卵では核膜の存在ならびに核移行システムの働きによって、Cas9 の核 DNA への接触が制限されている可能性が示唆された。実際 GV 期維持卵では、Cas9 は核内より細胞質に多く存在することが確認された。Cas9 は分子量 150 kDa 以上の巨大な分子であり [Jinek *et al.*, 2012; Fujii *et al.*, 2013b]、核内への移行にはインポーチンの関与が必要である。本検討に用いた Cas9 は哺乳類細胞で効率的に核移行し作用させるために SV40 NLS が ORF の両端に付加されており、過去に導入されたマウス前核期胚やヒト培養細胞では核、特に核小体への Cas9 局在が確認されている [Cong *et al.*, 2013; Fujii *et al.*, 2013b]。GV 期卵では細胞質より核内の Cas9 量が低かったため、体細胞や胚よりも核内移行活性が低い、または核外移行活性が高い状態である可能性がある。Cas9 に対する核外移行活性がブタ卵あるいは GV 期卵に特異的なことなのかについて現段階では議論できないが、GV は胎仔期に形成されたまま長期間維持される特殊な核であるため、GV 期卵ではその維持のために、核移行システムの機能が胚や他の細胞とは異なった状態で制御されていることが考えられる。

さらに、XPO1 阻害剤の LMB 添加により核内 Cas9 量は増加したことから、Cas9 には XPO1 が認識する NES が存在することが示唆された。NetNES 1.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) [la Cour *et al.*, 2004] を用いて探索したところ、Cas9 アミノ酸配列上に 2 か所の NES 予測配列、

LFGNLIALLSL (237-246aa) と LEDIVLTLTL (616-625aa) が存在した。実際にこの配列が NES として機能するかについては NES 変異型 Cas9 などを用いて解析を行う必要はあるが、Cas9 は XPO1 の標的タンパク質であり、核移行システムによる局在制御を介して活性調節を受けることが示唆された。

LMB 添加により核内に Cas9 が蓄積することが確認されたことから、GV 期卵では核外移行機能が働いていることが示された。したがって、通常の GV 期卵では発現した Cas9 はインポーチンにより核内移行されるものの、XPO1 により核外に排出され、結果としてその多くが細胞質に存在していると考えられる。この状態では CRISPR/Cas システムが作用するために十分な量の Cas9 が核内に蓄積されず、その結果変異導入は確認されなかったと考えられる。さらに、これまで未成熟卵での CRISPR/Cas システムの効果はいかなる種においても検討されていなかったが、本章において XPO1 阻害により Cas9 が核内に蓄積することで GV 期維持卵でも変異の導入が可能となることが初めて明らかにされた。今後この知見を足掛かりとして、未成熟卵での効率的な CRISPR/Cas システムの利用法の検討が進むことが期待される。また、Cas9 に限らず GV 期卵では人為的に導入しても活性を制限される因子が存在する可能性が考えられる。その場合に核移行機能の制御を同時に行うことで機能発現あるいは効率向上が可能となるという一つの例を提示できたことは、発生工学技術の発展の一助となるだろう。

本実験では、核膜の存在しない減数分裂過程における変異導入効率も調べた。その結果、核移行システムを要しない場合の効率が 80%以上という高率であり、本実験で用いた CRISPR/Cas システムの能力の高さが示された。本章の核外移行システムのための阻害による局在制御で得られた GV 期卵の変異導入効率はこ

れと比較し低かったが、今後核内移行レセプターの機能の向上も合わせて行うことができればさらに効率を高められる可能性があり、核移行システムの発生工学分野への応用が期待される。なお、変異の入るアレル数が少なく、変異の大きさは過去の報告 [Fujii *et al.*, 2013b; Hai *et al.*, 2014] と比較し小さい傾向があったが、これは核移行システムを要しない減数分裂過程でも同様であり、4倍体の染色体を持つ卵母細胞に特異的な現象である可能性が考えられる。

本章において、GV 期卵では核移行システムが機能しており、その働きにより Cas9 の変異導入活性が制御されていることが示唆された。核移行システムによる活性調節は細胞内の他の因子においても作用していることが大いに考えられるため、発生工学分野において因子の活性を検討する場合に、核移行機能について考慮することの重要性が本検討により改めて示された。

一方、GV 期において核移行システムのうち、特に核外移行側の機能の存在が示されたが、卵内で核外移行レセプターであるエクスポーチンが実際に作用しているかについては明らかにできていない。過去の報告においても、体細胞を用いたエクスポーチンの発現制御による機能確認は多く行われているが、哺乳類卵での検討は存在しない。そこで次章の検討では、エクスポーチンの発現確認や人為的な発現制御を行うことにより、卵内においてエクスポーチンが存在し核外移行レセプターとして機能しているかについて解析を行った。

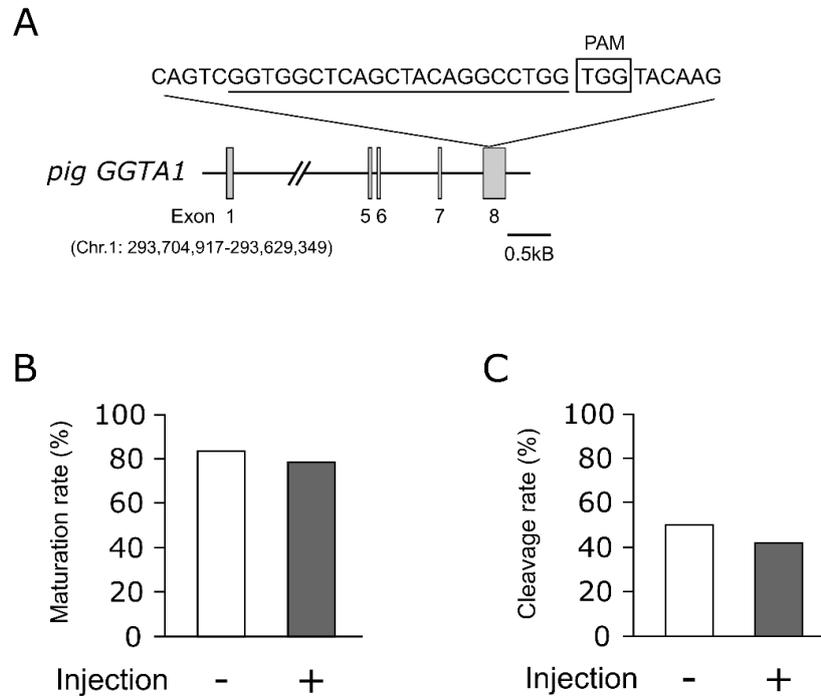


図 1-1 本検討に用いた gRNA 配列および gRNA/Cas9 導入後の卵成熟率と卵割率
 (A) gRNA はブタ GGTA1 の 8 番エクソン配列上に設計した。下線部は gRNA 結合部位、黒枠は PAM ドメイン (NGG) を示す。
 (B) 採取直後の卵に gRNA および Cas9 mRNA を顕微注入し、成熟培養 44 時間後に MII 期まで到達した卵の割合を卵成熟率として示した。
 (C) 採取直後の卵に gRNA および Cas9 mRNA を顕微注入し、成熟培養 44 時間後に電気刺激により単為発生処理を行い、その後 2 日間体外発生培養を行った。2 細胞期胚かそれ以降まで発生した卵の割合を卵割率として示した。

表 1 ブタ卵における変異導入効率と変異導入アレル数の割合

解析卵の 核相ステージ	解析卵数	変異導入卵数 (%)	各卵の変異導入アレル検出数 (%、／変異導入卵)			
			1	2	3	4
MII	42	34 (81.0)	21 (61.8)	12 (35.3)	0 (0)	1 (2.9)
GV	15	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

表 2 MII 期卵で検出された変異導入アレルの配列

標的配列付近で検出された配列*	挿入欠失 塩基数	検出 アレル数
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGCCTGGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	WT	
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGC-TGGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-1	7
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGCC-GGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-1	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGG ct TGGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-1,+1	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGG--TGGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-2	3
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGC tga TGGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-1,+3	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGC tga GGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-2,+3	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGC tga GTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-3,+3	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGC- tga TGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-4,+3	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGG-----TGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-5	6
CAGTCGGTGGCTCAGCTAC-----TGGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-5	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGC acatcc TGGTGGTACAAGGCACATCCTGA	-1,+6	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGCC accgac TGGTACAAGGCACATCCTGACG	-3,+6	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGCC accgtag TGGTGGTACAAGGCACATCCT	+7	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGCCT tactggg GTGGTACAAGGCACATCCT	+7	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGG-----TACAAGGCACATCCTGACGA	-8	1
CAGTCGGTGGCTCAGCT-----GGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-8	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTA----- tg TGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-9,+2	1
CAGTCGGTGGCTCAG----- gatg TGGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-9,+4	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTA---- togat TGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-9,+5	1
CAGT----- gg AGCTACAGGCC accgac TGGTGGTACAAGGCACATCCTG	(-9,+2),+6	1
-----GGTGGCTCAGCTACAGGC acatcctg TGGTGGTACAAGGCACATCCT	-10,(-1,+8)	1
CAGTCGGTGGCTC-----GGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-12	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGC-----ACATCCTGACGA	-15	2
CAGTCGGTGG-----TGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-17	2
CAGTCGGTGG-----TACAAGGCACATCCTGACGA	-20	6
CAG----- g CTGGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-20,+1	1
-----TGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-43	1
-----ACAAGGCACATCCTGACGA	-44	1
CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGC gaccaacaaggtacaggggta	undefined	1

* 野生型(WT)配列の下線部は PAM ドメインを示す。小文字は挿入塩基を、棒線は欠失塩基をそれぞれ示す。

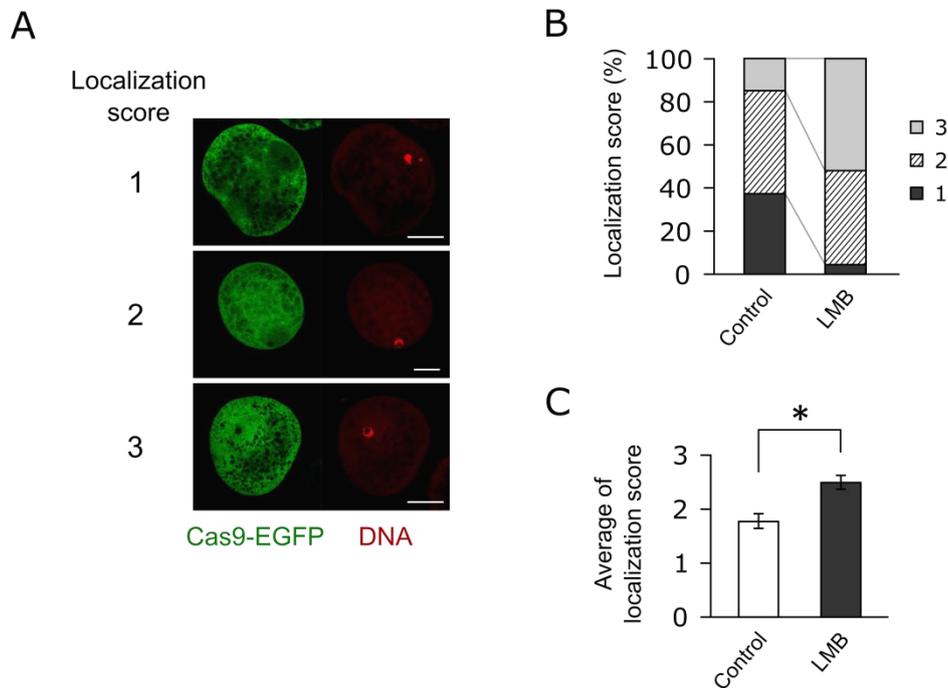


図 1-2 GV 期卵における EGFP 付加 Cas9 局在と核外移行阻害による効果

採取直後の卵に Cas9-EGFP mRNA を顕微注入し、44 時間発現させた後に PFA 固定、PI 染色を行い、共焦点顕微鏡で EGFP 蛍光を観察した。

(A) 細胞質に対する核内蛍光の強度の比較により、3 段階の局在スコアを設定した。それぞれ代表的な例を示した (スケールバー : 50 μ m)。

(B) 無添加または LMB 添加で Cas9-EGFP を発現させた卵の局在スコアの割合を示した。解析には各区 25 個以上の卵を用いた。

(C) (B) で示した局在スコアの平均値を算出した (mean \pm SEM, *: $P < 0.05$)。

表 3 LMB 処理卵における変異導入効率と変異導入アレル数の割合

解析卵の 核相ステージ	解析卵数	変異導入卵数 (%)	各卵の変異導入アレル検出数 (%、／変異導入卵)			
			1	2	3	4
MII	15	12 (80.0)	9 (75.0)	3 (25.0)	0 (0)	0 (0)
GV (+LMB)	30	5 (16.7)	4 (80.0)	1 (20.0)	0 (0)	0 (0)

表 4 MII 期卵および LMB 処理 GV 期維持卵で検出された変異導入アレルの配列

解析卵の 核相ステージ	標的配列付近で検出された配列*	挿入欠失 塩基数	検出 アレル数
	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGCCTGGT <u>GGT</u> TACAAGGCACATCCTGACGA	WT	
MII	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGC-TGGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-1	2
	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAG-CCTGGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-1	1
	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGC--GGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-2	1
	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGC tgag TGGTGGTACAAGGCACATCCTGACG	-1,+4	1
	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGG-----TGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-5	3
	CAGTCGGTGGCTCAGCTAC-----TGGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-5	1
	CAGTCGGTGGCTCAGC-----TGGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-8	2
	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAG ctcagctacag CTGGTGGTACAAGGCACATC	-2,+11	1
	CAGTCGGTGGCTCAGC----- gg AAGGCACATCCTGACGAGT	-17,+2	1
	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGC-----TGACGA	-21	1
	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGG-----	-39	1
GV (+LMB)	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGCC-GGTGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-1	1
	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGG-----TGGTACAAGGCACATCCTGACGA	-5	1
	CAGTCGGTGGCTCAGCTACAGGCC-----AAGGCACATCCTGACGA	-9	2
	----- c CACATCCTGACGA	-170,+1	2

* 野生型(WT)配列の下線部は PAM ドメインを示す。小文字は挿入塩基を、棒線は欠失塩基をそれぞれ示す。

第二章

ブタ卵母細胞における 核外移行レセプターの機能解析

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。

5年以内に出版予定。

第三章

ブタ卵の減数分裂再開に対する 核外移行レセプターの機能

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。

5年以内に出版予定。

【総合考察】

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。

5年以内に出版予定。

【付録】

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。

5年以内に出版予定。

【参考文献】

Bohnsack MT, Stüven T, Kuhn C, Cordes VC, Görlich D. (2006)

A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes.

Nat Cell Biol, **8**: 257-263.

Cabot RA, Hannink M, Prather RS. (2002)

CRM1-mediated nuclear export is present during porcine embryogenesis, but is not required for early cleavage.

Biol Reprod, **67**: 814-819.

Callanan M, Kudo N, Gout S, Brocard M, Yoshida M, Dimitrov S, Khochbin S. (2000)

Developmentally regulated activity of CRM1/XPO1 during early *Xenopus* embryogenesis.

J Cell Sci, **113**: 451-459.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. (2013)

Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.

Science, **339**: 819-823.

Dessev G, Iovcheva-Dessev C, Bischoff JR, Beach D, Goldman R. (1991)

A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro.

J Cell Biol, **112**: 523-533.

Dhanasingh I, Choi JM, Lee SH. (2015)

Karyopherins and nuclear actin transport.

Bio Design, **3**: 88-97.

Dong X, Biswas A, Suel KE, Jackson LK, Martinez R, Gu H, Chook YM. (2009)

Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1.

Nature, **458**: 1136-1141.

- Dopie J, Skarp KP, Rajakyla EK, Tanhuanpaa K, Vartiainen MK. (2012)**
Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription.
Proc Natl Acad Sci U S A, **109**: E544-552.
- Edwards RG. (1965)**
Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human oocytes.
Nature, **208**: 349-351.
- Falahzadeh K, Banaei-Esfahani A, Shahhoseini M. (2015)**
The potential roles of actin in the nucleus.
Cell J, **17**: 7-14.
- Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H, Silver PA. (1998)**
Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1.
EMBO J, **17**: 5606-5614.
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. (1997)**
CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals.
Cell, **90**: 1051-1060.
- Fujii W, Kano K, Sugiura K, Naito K. (2013a)**
Repeatable construction method for engineered zinc finger nuclease based on overlap extension PCR and TA-cloning.
Plos One, **8**: e59801.
- Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, Naito K. (2013b)**
Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease.
Nucleic Acids Res, **41**: e187.
- Fujii W, Onuma A, Sugiura K, Naito K. (2014a)**
Efficient generation of genome-modified mice via offset-nicking by CRISPR/Cas system.
Biochem Biophys Res Commun, **445**: 791-794.

Fujii W, Onuma A, Sugiura K, Naito K. (2014b)

One-step generation of phenotype-expressing triple-knockout mice with heritable mutated alleles by the CRISPR/Cas9 system.

J Reprod Dev, **60**: 324-327.

Funahashi H, Cantley TC, Day BN. (1997)

Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic AMP improves developmental competence following in vitro fertilization.

Biol Reprod, **57**: 49-53.

Fung HYJ, Fu SC, Brautigam CA, Chook YM. (2015)

Structural determinants of nuclear export signal orientation in binding to exportin CRM1.

eLife, **4**: e10034.

Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. (2013)

ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering.

Trends Biotechnol, **31**: 397-405.

Goldberg MW & Allen TD. (1992)

High resolution scanning electron microscopy of the nuclear envelope: demonstration of a new, regular, fibrous lattice attached to the baskets of the nucleoplasmic face of the nuclear pores.

J Cell Biol, **119**: 1429-1440.

Görlich D & Kutay U. (1999)

Transport between the cell nucleus and the cytoplasm.

Annu Rev Cell Dev Biol, **15**: 607-660.

Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Q. (2014)

One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system.

Cell Res, **24**: 372-375.

Han SJ, Chen R, Paronetto MP, Conti M. (2005)

Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse.

Curr Biol, **15**: 1670-1676.

Han SJ & Conti M. (2006)

New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate.

Cell Cycle, **5**: 227-231.

Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser A, Carnwath JW, Lei-Zhang AL, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R, Cost GJ, Niemann H. (2011)

Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases.

Proc Natl Acad Sci U S A, **108**: 12013-12017.

Hirao Y, Tsuji Y, Miyano T, Okano A, Miyake M, Kato S, Moor RM. (1995)

Association between p34cdc2 levels and meiotic arrest in pig oocytes during early growth.

Zygote, **3**: 325-332.

Huber J, Cronshagen U, Kadokura M, Marshallsay C, Wada T, Sekine M, Luhrmann R. (1998)

Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure.

EMBO J, **17**: 4114-4126.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. (2012)

A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.

Science, **337**: 816-821.

Kaida D, Berg MG, Younis I, Kasim M, Singh LN, Wan L, Dreyfuss G. (2010)

U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation.

Nature, **468**: 664-668.

Kimura M & Imamoto N. (2014)

Biological significance of the importin- β family-dependent nucleocytoplasmic transport pathways.

Traffic, **15**: 727-748.

Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner EP, Wolff B, Yoshida M, Horinouchi S. (1999)

Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region.

Proc Natl Acad Sci U S A, **96**: 9112-9117.

Kuroda T & Naito K. (2003)

Localization and function of cyclin B1 and cyclin B2 during porcine oocyte maturation.

J Mamm Ova Res, **20**: 93-98.

Kutay U & Güttinger S. (2005)

Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak.

Trends Cell Biol, **15**: 121-124.

Kyburz A, Friedlein A, Langen H, Keller W. (2006)

Direct interactions between subunits of CPSF and the U2 snRNP contribute to the coupling of pre-mRNA 3' end processing and splicing.

Mol Cell, **23**: 195-205.

la Cour T, Kierner L, Mølgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. (2004)

Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals.

Protein Eng Des Sel, **17**: 527-536.

Laemmli UK. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, **227**: 680-685.

Lénárt P & Ellenberg J. (2003)

Nuclear envelope dynamics in oocytes: from germinal vesicle breakdown to mitosis.

Curr Opin Cell Biol, **15**: 88-95.

Luscher B, Brizuela L, Beach D, Eisenman RN. (1991)

A role for the p34cdc2 kinase and phosphatases in the regulation of phosphorylation and disassembly of lamin B2 during the cell cycle.

EMBO J, **10**: 865-875.

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. (2013)

RNA-guided human genome engineering via Cas9.
Science, **339**: 823-826.

Marangos P & Carroll J. (2004)

The dynamics of cyclin B1 distribution during meiosis I in mouse oocytes.
Reproduction, **128**: 153-162.

Matsunari H, Maehara M, Nakano K, Ikezawa Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Ohta H, Takahashi M, Nagashima H. (2012)

Hollow fiber vitrification: a novel method for vitrifying multiple embryos in a single device.
J Reprod Dev, **58**: 599-608.

Miyano T & Hirao Y. (2003)

In vitro growth of oocytes from domestic species.
J Mammalian Ova Res, **20**: 78-85.

Motlik J, Crozet N, Fulka J. (1984)

Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles.
J Reprod Fertil, **72**: 323-328.

Mtango NR, Potireddy S, Latham KE. (2009)

Expression of microRNA processing machinery genes in rhesus monkey oocytes and embryos of different developmental potentials.
Mol Reprod Dev, **76**: 255-269.

Mühlhäusser P, Müller EC, Otto A, Kutay U. (2001)

Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones.
EMBO Rep, **2**: 690-696.

Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y. (1988)

Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro.
Gamete Res, **21**: 289-295.

- Naito K, Kagii H, Iwamori N, Sugiura K, Yamanouti K, Tojo H. (1999)**
Establishment of a small-scale western blotting system named as 'Micro-western blotting' for mammalian ova analysis.
J Mammalian Ova Res, **16**: 154-157.
- Naito K, Nishimura Y, Yamamuro T, Shimaoka T, Fujii W, Suzuki M, Nishimura T, Kano K. (2010)**
Upstream factors regulating the maturation/M-phase promoting factor activity during oocyte maturation.
J Mammalian Ova Res, **27**: 27-34.
- Nishi K, Yoshida M, Fujiwara D, Nishikawa M, Horinouchi S, Beppu T. (1994)**
Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression.
J. Biol. Chem, **269**: 6320-6324.
- Nishimura T, Shimaoka T, Kano K, Naito K. (2009)**
Insufficient amount of Cdc2 and continuous activation of Wee1 B are the cause of meiotic failure in porcine growing oocytes.
J Reprod Dev, **55**: 553-557.
- Nishimura T, Fujii W, Kano K, Sugiura K, Naito K. (2012)**
Analyses of the involvement of PKA regulation mechanism in meiotic incompetence of porcine growing oocytes.
Biol Reprod, **87**: 53, 1-8.
- Oh JS, Han SJ, Conti M. (2010)**
Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption.
J Cell Biol, **188**: 199-207.
- Ohashi S, Naito K, Liu J, Sheng Y, Yamanouchi K, Tojo H. (2011)**
Expression of exogenous proteins in porcine maturing oocytes after mRNA injection: kinetic analysis and oocyte selection using EGFP mRNA.
J Reprod Dev, **47**: 351-357.

- Palacios I, Hetzer M, Adam SA, Mattaj IW.** (1997)
Nuclear import of U snRNPs requires importin beta.
EMBO J, **16**: 6783-6792.
- Pante N & Aebi U.** (1996)
Sequential binding of import ligands to distinct nucleopore regions during their nuclear import.
Science, **273**: 1729-1732.
- Paraskeva E, Izaurrealde E, Bischoff FR, Huber J, Kutay U, Hartmann E, Luhrmann R, Görlich D.** (1999)
CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm.
J Cell Biol, **145**: 255-264.
- Pemberton LF & Paschal BM.** (2005)
Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export.
Traffic, **6**: 187-198.
- Poon IKH & Jans DA.** (2005)
Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation?
Traffic, **6**: 173-186.
- Powell MD, Manandhar G, Spate L, Sutovsky M, Zimmerman S, Sachdev SC, Hannink M, Prather RS, Sutovsky P.** (2010)
Discovery of putative oocyte quality markers by comparative ExacTag proteomics.
Proteomics Clin Appl, **4**: 337-351.
- Radford HE, Meijer HA, de Moor CH.** (2008)
Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes.
Biochim Biophys Acta, **1779**: 217-229.
- Saporita AJ, Zhang Q, Navai N, Dincer Z, Hahn J, Cai X, Wang Z.** (2003)
Identification and characterization of a ligand-regulated nuclear export signal in androgen receptor.
J Biol Chem, **278**: 41998-42005.

Shen B, Zhang J, Wu H, Wang J, Ma K, Li Z, Zhang X, Zhang P, Huang X. (2013)
Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting.
Cell Res, **23**: 720-723.

Shimaoka T, Nishimura T, Kano K, Naito K. (2009)
Critical effect of pigWEE1B on the regulation of meiotic resumption in porcine immature oocytes.
Cell Cycle, **8**: 2375-2384.

Shimaoka T, Nishimura T, Kano K, Naito K. (2011)
Analyses of the regulatory mechanism of porcine WEE1B: the phosphorylation sites of porcine WEE1B and mouse WEE1B are different.
J Reprod Dev, **57**: 223-228.

Stade K, Ford CS, Guthrie C, Weis K. (1997)
Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor.
Cell, **90**: 1041-1050.

Stüven T, Hartmann E, Görlich D. (2003)
Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes.
EMBO J, **22**: 5928-5940.

Toyoda Y, Yokoyama M, Hosi T. (1971)
Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm.
Jpn. J Anim Reprod, **16**: 147-151.

Tyler A. (1967)
Masked maternal messenger RNA. Control mechanisms in developmental processes.
Dev Biol Suppl, **96**: 170-226.

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

Zeng F, Baldwin DA, Schultz RM. (2004)

Transcript profiling during preimplantation development.

Dev Biol, **272**: 483-496.

嶋岡 琢磨 (2010)

ブタ卵母細胞の一時停止機構における Wee1B の機能解析

東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用動物科学専攻 博士論文

永島 圭介 (2014)

マウス初期胚における Zinc Finger Nuclease の特異性と親和性の検討

東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用動物科学専攻 卒業論文

西村 鷹則 (2013)

哺乳類の卵成長における減数分裂能獲得機構の解析

東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用動物科学専攻 博士論文

山室 匡史 (2010)

ブタ卵母細胞の減数分裂過程における Cyclin B 蓄積量の制御機構

東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用動物科学専攻 博士論文

【謝辞】

本研究を行うにあたり、テーマの決定、実験手法、実験結果の考察、本論文の構成など、研究のあらゆる面において時に冷静に主にとても情熱的にご指導くださいました、指導教員である東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻応用遺伝学研究室 内藤邦彦教授に深く感謝いたします。思うように実験結果が得られない私を辛抱強く見守り、温かく励ましてくださったことにも、重ねて御礼申し上げます。また、実験手法や、実験結果の考察などへの的確なご指導ご助言のみならず、様々な相談にも応じてくださった杉浦幸二准教授ならびに藤井渉助教に心より感謝いたします。

本論文を査読して頂き、かつ貴重なご助言をくださいました、応用動物科学専攻 千田和広教授、松本芳嗣教授、田中智准教授に深く感謝いたします。

本研究で用いたブタ卵巣サンプルの採取の際には、東京芝浦臓器株式会社ならびに食肉処理場のスタッフの皆様に変にお世話になりました。この場を借りて御礼申し上げます。

さらに、公私にわたり大変お世話になりました応用遺伝学研究室の先輩、同期、後輩の皆様にも感謝します。楽しい研究室生活をありがとうございました。

最後に、度重なる学生生活の延長を快く許し、すべての面において惜しみない支援を与えてくれた父と母に心からの感謝の意を表します。

平成 29 年 3 月

小沼 あすか