

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名	かわの 河野 康二郎		
学位の種類	博 士 (農学)		
学位記番号	農 第 1 2 7 号		
学位授与の日付	平 成 2 0 年 9 月 1 5 日		
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	直接注入法ならびに細胞融合法で作出したブタ 体細胞核移植卵の体外発生能に関する研究		
論文審査委員 (主 査)	教授	角 田 幸 雄	
	(副主査)	教授 重 岡 成	
	(副主査)	教授 櫻 谷 保 之	

2000年に、体細胞を核移植する事によってクローンブタの作出成功例が報告されて以来多数の研究が実施されてきたが、ウシにおける成功率と比べると個体への発生率は低い。そこで本研究では、胚盤胞への発生率ならびに得られた胚盤胞の細胞数を指標として、効率的なブタ体細胞核移植技術を確立することを目的に実施した。

1. 活性化刺激法の違いがブタ単為発生卵の体外発生能に及ぼす影響

本章の実験では、まず活性化に用いる電解液中のカルシウム濃度の違いがブタ単為発生卵の発生能に及ぼす影響について検討した。その結果、カルシウム濃度を 10 倍にした区では、対照区に比べて分割率、8 細胞ならびに胚盤胞への発生率がむしろ有意に低下した。また、マウス体細胞の核移植では、ストロンチウム添加培地で培養することによって、クローンマウスが作出されている。そこで、ストロンチウムの処理によってブタ未受精卵の単為発生誘起が可能か否か検討した。その結果、マウスで効果の見られた EGTA 添加の有無にかかわらず、ブタ卵子ではストロンチウム処理によって単為発生を誘起する事は出来なかった。本実験結果から、電気刺激によってブタ未受精卵に単為発生刺激を与えると、20～30%の卵子が胚盤胞へ発生することが明らかとなった。

2. ブタ体細胞核移植卵の体外発生能に及ぼす核移植方法の影響

哺乳動物の核移植は、主として2つの手法を用いて実施されている。一つは、マウスの前核置換によって初めて哺乳動物で核移植に成功した細胞融合による方法であり、マウス初期胚、ウシ初期胚や体細胞の核移植で広く用いられている。もう一つの方法は、精子の顕微注入に用いられている直接注入による方法であり、マウス体細胞の核移植に広く用いられている。ブタでは、細胞融合法と直接注入法の両方が体細胞の核移植に用いられているが、その効率を比較した報告は見られない。

そこで本章の実験では、核移植方法の違いが、ブタ体細胞核移植卵の発生能に及ぼす影響について検討した。その結果、いずれの方法で核移植を行っても、核移植卵の胚盤胞への発生率ならびに得られた胚盤胞の細胞数に差は見られなかった。しかし、細胞融合法では技術的な困難さのため再構築卵の作出成功率が有意に低かった。また、直接注入法では再構築率は高かったが、ドナー細胞の核およびレシピエント卵細胞質へのダメージによって、8細胞期以降への発生

率が低下する現象がみられた。このように、いずれの核移植方法にも利点と欠点があり、そのため、胚盤胞への発生率では細胞融合法で18%、直接注入法で13%と両法間で差が見られない結果となった。用いるドナー細胞の種類によっても両法間で発生率に差が現れることも考えられ、さらに検討が必要であると言える。

3. トリコスタチン A 処置がブタ体細胞核移植卵の体外発生能に及ぼす影響

学位申請者の所属する研究室では、マウス体細胞核移植卵を核移植直後にヒストン脱アセチル化阻害剤である TSA で短時間処置すると胚盤胞への発生率が向上し、受胎雌へ移植後個体への発生率が向上することを報告した。

そこで本章の実験では、トリコスタチン A (TSA) によるブタ体細胞核移植卵ならびにドナー細胞の処置が、核移植卵の体外発生能に及ぼす影響について検討した。直接注入法による核移植を行い、電気刺激ならびにイオノマイシンと 6-DMAP による活性化刺激後、0.1 あるいは 1.25 μ M TSA 処置を 6 時間実施したが、胚盤胞への発生率は 3~14% であり、TSA 無処理区の 3~9% と大差が見られなかった。また、核移植前に TSA 処置を行った体細胞を核移植に用いても、胚盤胞への発生率は向上しなかった。今後、TSA の処置濃度、処置時間、処置のタイミングをさらに検討する必要があると考えられる。

4. TCTP による初期化の増強がブタ体細胞核移植卵の体外発生能に及ぼす影響

学位申請者の所属する研究室では、最近ウシ M II 期未受精卵細胞質内に体細胞核の初期化誘導能の有無と消長が一致する 23 kD のリン酸化蛋白質が存在すること、その蛋白質はリン酸化に伴って活性化されること、またリン酸化 TCTP ペプチドをあらかじめ導入した体細胞を核移植に用いると、受胎率が向上し、流産率が低下するのみでなく、得られた個体のすべてが正常なクローンウシとして分娩されたことを報告した。TCTP 遺伝子は、哺乳動物種で広く保存されていることから、ブタ体細胞でも核の初期化を促進する可能性が考えられた。

そこで本章の実験では、ブタ体細胞に 2 種類の異なるリン酸化 TCTP ペプチドを取り込ませた後、核移植を行い、その後の体外発生能及び得られた胚盤胞の細胞数について検討した。用いたペプチドは、既報のリン酸化ペプチド、新規に合成を依頼したリン酸化ペプチドならびに非リン酸化ペプチドであり、細

胞融合法と直接注入法を用いて実施した。核移植卵の胚盤胞への発生率は、6~15% であり、ペプチド導入の有無あるいは核移植方法の違いによって大差は見られなかった。ウシ体細胞核移植卵の場合も、胚盤胞への発生率はペプチド導入の有無によって大差は見られなかったが、ブタ体細胞核移植卵の場合も傾向は一致していた。受胎雌へ移植後の発生能の指標として、得られた胚盤胞の細胞数を用いたが、リン酸化ペプチド導入によって得られた胚盤胞では細胞数が多い傾向が見られた。

本研究では、体外成熟卵子を用いたブタ体細胞核移植卵の発生能の向上を目的として、核移植方法の違い、ヒストン脱アセチル化阻害剤ならびに新たに見いだした核の初期化誘導因子リン酸化 TCTP 処置が、核移植卵の体外発生能に及ぼす影響を検討した。本研究では、ブタ核移植卵の発生能を劇的に向上させる結果は得られなかったが、核移植卵の 10~20% が確実に胚盤胞に発生する技術を確立できた。今後、主要なエピジェネティクス制御機構である DNA のメチル化の人為的操作やリン酸化 TCTP の導入方法の工夫等を通じて、より発生能の高いブタ体細胞核移植卵作出技術を確認する必要があると考えられる。

論文審査結果の要旨

ブタは、生理学的特性がヒトと類似していることから、不足する臓器移植用臓器を補うための異種臓器提供用動物として考えられてきた。そのため、核移植技術を用いて、臓器をヒトに移植した場合に生じる超急性拒絶反応がおこらないブタの作出が試みられてきた。2000年に、体細胞を核移植する事によってクローンブタの作出成功例が報告されて以来多数の研究が実施されてきたが、ウシにおける成功率と比べると個体への発生率は低いのが現状であった。そこで学位申請者に、胚盤胞への発生率ならびに得られた胚盤胞の細胞数を指標として、効率的なブタ体細胞核移植技術を確立することを目的とする研究テーマを与えた。

核移植卵の発生能を左右する要因として、核移植卵に付与する単為発生刺激の影響が大きい。そこで申請者は、まず高率に発生する単為発生誘起技術の確立を行った。その結果、電気刺激を与えたブタ単為発生卵は20～30%が確実に胚盤胞へ発生することを確認した。

哺乳動物における体細胞の核移植は、2つの異なる手法を用いて実施されている。すなわち、ヒツジやウシで実施されている細胞融合法を用いる方法と、マウスで実施されている顕微注入による方法である。ブタでは、両手法を用いて体細胞クローン個体が作出されていたが、いずれの場合も発生率は低かった。そこで申請者は、どちらの核移植方法が、体細胞クローンブタ胚の作成に適しているかを検討した。その結果、細胞融合法では再構築卵の作出成功率が有意に低い胚盤胞への発生率が高いこと、直接注入法では再構築率は高いが発生率が低いことが明らかとなった。そのため、胚盤胞への発生率では細胞融合法と直接注入法間で差が見られない結果となった。

マウスの体細胞核移植実験系では、体細胞を除核未受精卵に核移植すると直後にヒストンが脱アセチル化されるが、それを防ぐことで、体細胞核のreprogrammingが促進されると報告されている。そこで、ブタ体細胞核移植卵ならびにドナー細胞の脱アセチル化処置が、体外発生能に及ぼす影響について検討した。その結果、マウスの場合と異なって核移植前にTSA処置を行った体細胞を核移植に用いても、あるいは、核移植卵をTSA処置しても、胚盤胞への発生率は変化しない事が判明した。

筆者の所属する研究室では、最近ウシMⅡ期末未受精卵細胞質内に体細胞核の

初期化誘導能の有無と消長が一致する23kDのリン酸化蛋白質TCTPが存在すること、リン酸化TCTPペプチドをあらかじめ導入したウシ体細胞を核移植に用いると、受胎率が向上し、流産率が低下するのみでなく、得られた個体のすべてが正常なクローンウシとして分娩されたことを報告した。そこで、ブタ体細胞に2種類の異なるリン酸化TCTPペプチドを取り込ませた後、核移植を行い、その後の体外発生能及び得られた胚盤胞の細胞数について検討した。核移植卵の胚盤胞への発生率は、ウシの場合と同様に、ペプチド導入によって大差は見られなかったが、胚盤胞の細胞数が増加した。本実験では、核移植卵の受胎雌への移植実験を実施していないが、ウシの場合と同様に、リン酸化TCTPペプチドの導入によって個体への発生能が向上する可能性が期待できた。

本研究では、ブタ体細胞核移植卵の発生能を劇的に向上させる結果は得られなかったが、核移植卵の10～20%が確実に胚盤胞に発生する技術を確認できた。本研究で得られた成果は、これまで筆頭著者として1編の論文として国外の国際学術専門誌に公表した。また、得られた成果は世界の体細胞クローンブタ作出研究の進展に大きな貢献をしてきた。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成20年7月15日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。