

論文内容の要旨

氏名	ダサリ アマルナト Dasarei Amarnath
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農第95号
学位授与の日付	平成18年3月22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	Comparative Studies on the Developmental Potential and Characteristics of Nuclear-Transferred Bovine Oocytes with Two Kinds of Somatic Cells (異なるドナー細胞を用いたウシ体細胞核移植卵の発生能と特性に関する研究)
論文審査委員(主査)	教授 角田幸雄
(副主査)	教授 櫻谷保之
(副主査)	教授 上野紘一

成長した個体の体細胞を核移植することによって、初めてヒツジが作出されて以来、数多くの哺乳類で体細胞クローン個体が多数作出されている。しかしながら、これまで個体への発生能を高めるために体細胞核移植に関する研究が活発に実施されてきたにもかかわらず、産子への発生率は一部の例外を除くと低く、1~5%程度にすぎない。体細胞クローン個体作出技術の問題点は、個体への発生率が低いことよりも、クローン胚やクローン個体に発生異常が高頻度で見られる点にある。最近の研究では、これらの発生異常は、移植された未受精卵細胞質内における体細胞核の初期化が不十分であり、そのため発生に必要な遺伝子群の発現が異常になることによっておこると考えられている。しかしながら、これらの知見はすべて、核移植胚における遺伝子発現状況を体内あるいは体外受精胚と比較して得られたものであり、見いだされている遺伝子発現状況の違いは、必ずしも体細胞核移植胚の特性を示しているとは考えられない。我々の研究室では、これまで体細胞の由来とクローンウシへの発生能との関係を調べていたが、その過程で、得られる個体の正常性が異なる2種の体細胞株を樹立した。一つは、成体雌卵丘細胞由来の培養細胞であり、得られるクローンウシの多くが生存し、性成熟まで生育し、生殖能力を持つことが証明されている。他方は、成体雄皮膚由来の培養細胞であり、得られたクローンウシに形態形成異常が認められ、すべて分娩前後に死亡している。そこで、本研究では、これらの2種の体細胞を用いて作製したクローン胚ならびに体外受精胚における発生生物学的ならびに分子生物学的差異を解析することを目的に実施した。

まず、2種の体細胞で作製した核移植卵の体外発生率と個体への発生能の指標となる胚盤胞の細胞数を検討した。その結果、両核移植卵間で胚盤胞への発生率に差はなく、また体外受精卵と比較しても有意な差は見られなかった。胚盤胞の細胞数は、卵丘細胞核移植胚区で多い傾向が見られたが、総細胞数、個体への発生する部位である内細胞塊細胞数ならびに胎盤形成に関与する栄養外胚葉細胞数ともに、両核移植胚間で有意な差は見られなかった。しかしながら、体外受精由来胚盤胞と比較すると、両核移植卵由来胚盤胞の栄養外胚葉細胞数がともに少なかった。このことが、体細胞クローン胚を受胎雌に移植した場合、妊娠率が低く、また流産率が高い一因と考えられた。

ついで、ウシ胚の評価法として用いられている凍結融解後の生存性を比較した。まず、核移植胚の凍結保存に適した胚の発育ステージを検討した。その結

果、同じ日齢の胚盤胞でも発育が進んでいる増大胚盤胞の方が、初期の胚盤胞に比べて凍結融解後の生存性が高いことを見いだした。ついで、両核移植卵由来の増大胚盤胞を用いて、緩慢凍結・緩慢融解法による凍結保存を行い、生存性を調べた。その結果、両者間で生存性に有意差はないことが判明した。

受精卵は一定の細胞周期に基づいて卵割を繰り返して発生していくが、必ずしもすべての胚が同調して卵割をするわけではない。早く卵割する胚は、個体への発生能が高いことや、雄胚の卵割速度が早いこと等が知られている。そこで、両体細胞核移植卵ならびに体外受精卵の第一卵割時期ならびに卵割時期ごとの胚盤胞への発生率に差が見られるかを比較した。その結果、3者間で第一卵割時期に大差は見られなかった。しかしながら、卵丘細胞核移植卵と体外受精卵の場合は、これまでの研究から予想されるように、早く卵割した胚の胚盤胞への発生率が高く、卵割時期が遅くなるに従って胚盤胞への発生率が低下した。しかしながら、皮膚細胞核移植卵では、早く卵割した胚と遅く卵割した胚の胚盤胞への発生率がいずれも低く、中間区の胚の発生率が最も高かった。すなわち、正常な個体が得られる確率の高い核移植卵の第一卵割時期の特性は、体外受精卵と類似するが、異常な個体が得られる核移植卵では異なることが明らかになった。

得られる個体の正常性が異なる2種の体細胞核移植卵と体外受精卵を用いて、初期胚の段階で個体の異常性または正常性を反映する遺伝子が見られるか否かを検討した。検討した遺伝子は、初期発生に重要な役割を果たすと考えられている15遺伝子であり、8細胞期と胚盤胞期におけるmRNA量をリアルタイムPCR法を用いて比較した。解析量が微量なため、まず、複数の胚を一緒にして解析した。その結果、皮膚体細胞由来胚盤胞におけるBax, Bcl-2ならびにGlut-1 mRNA量が、卵丘細胞核移植胚ならびに体外受精由来胚と比べて有意に高いことが判明した。これらのアポトーシス関連遺伝子の発現量の差が得られるクローン個体の正常性を反映しているか否かを知るためには、選別した核移植胚を受胎雌へ移植することが必要である。次に、胚間の遺伝子発現量の変動を知るため、個々の両核移植胚ならびに体外受精胚を用いて、同様に発生関連遺伝子mRNA量を比較した。その結果、ほとんどの遺伝子において個々の胚で大きな変動が見られ、プールしたサンプルを用いて判明した両核移植胚間における遺伝子発現の差異は認められなかった。また、解析する直前に個々の胚の写真撮影を行い、形態と遺伝子発現量との関係を調べた。その結果、良好な形態の胚で

あっても、発現量に大差が見られる場合が多く、胚の形態と遺伝子発現量は必ずしも連動しないことが判明した。

以上の結果から、得られる個体の正常性が異なる体細胞を用いて作製した核移植卵の胚盤胞への発生率や得られた胚盤胞の細胞数、耐凍性には差が見られないが、胚盤胞への発生能の高い第一卵割時期には差が見られることが判明した。また、本実験で調べた発生関連遺伝子の発現量には、両核移植胚間で大きな差異は見られなかった。これは、個体の正常性を反映する遺伝子を初期胚の段階で識別することはできないのか、それともより多くの遺伝子の発現状況を調べれば、指標となる遺伝子が存在するのかについては今後の検討が必要である。

## 論文審査結果の要旨

学位申請者の所属する研究室では、1998年に世界で最初の成体体細胞の核移植によってクローンウシの作出に成功したことを報告した。成体体細胞由来のクローンウシ作出技術は、長年月かけて育種・改良してきた経済能力の高い個体のコピーを作成できることから、これまで開発されてきた人工授精技術や受精卵移植技術を凌ぐ画期的な家畜の育種・改良・増殖技術として大きな注目を集めてきた。その結果、これまでクローンウシの作出効率を高めるために、様々な検討が行われてきた。体細胞クローンウシ作出率は、体外受精卵を用いた場合の成功率と比べると低い、他の動物種と比べると格段に高い。特に、申請者の所属する研究室では、体細胞核移植卵を受胎雌に移植後の産子生産率は20%であり、比較的安定している。しかしながら、国内外ともに体細胞核移植によって得られるクローンウシには多くの異常がみられ、クローンウシの半数以上は分娩前後あるいは1ヶ月以内に死亡している。体細胞クローン個体に見られる異常は、ウシ特有の現象ではなく、他の動物種でも高頻度に観察されている。そのため、体細胞クローン家畜の生産物に特段の異常などは見られないとの調査報告がなされ、社会が家畜生産に有用な技術であると認めながらも、体細胞核移植技術はまだ実際の家畜生産技術として使用されていない。さらに最近、我国でも再生医療への応用を目的として、ヒト体細胞由来ES細胞の樹立と分化誘導に関する基礎研究を認める方針が示されたが、実際の臨床応用にあたっては体細胞クローン個体の異常性は大きな障害になると予想される。

最近、体細胞クローン個体の異常性を低下させるための核移植技術の検討が行われているが、現状では確実な方法は見られない。そこで、本研究では申請者の所属する研究室でこれまで実施してきた研究から、得られるクローン個体の正常性が異なる2種類の体細胞を用いて核移植卵を作成し、細胞数、耐凍性、卵割時期に差異があるか否か検討した。ついで、2種類の核移植胚、体外受精由来胚間で発生に重要と考えられる既知の遺伝子発現パターンの違いを調べる

とともに、個体の異常性を反映する遺伝子マーカーを見いだせないか検討した。その結果、異常な個体が得られる核移植卵では、卵割時期のパターンが体外受精卵と異なることが明らかになった。また、本実験で調べた範囲では、個体の正常性の指標となる遺伝子は存在しなかった。

申請者は、インド国 Acharya N. G. Ranga Agriculture University の講師であり、文部科学省の大使館推薦国費留学生として来日している。規則に従い、来日後半年間の日本語研修のあと研修生として入室し、ついで大学院博士後期課程大学院生として与えられた研究テーマに極めて積極的に取り組んできた。ことなる環境にもかかわらず、短期間に繊細な技能を必要とする核移植技術を新たに修得し、原著論文2編を内外の専門学術誌に公表したことは高く評価できる。

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の手続きを経たうえ、平成18年2月20日、農学研究科委員会において、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。