

以上のように本研究では、日本産淡水魚の保護のうち生息域外の保存について、種苗生産技術の開発やビオトープを用いた復元研究に取り組んだ。その結果、7 魚種について種苗生産に成功し、この内の 6 魚種については大量生産技術が確立し、飼育下における遺伝子の保存が可能となった。さらにミヤコタナゴやホトケドジョウ等の 4 魚種においては、ビオトープによる復元に成功し、復元手法の提言が可能となり、対象魚種の成長や繁殖などの基礎情報も得ることができた。これらの研究は本分野においては先駆的な研究であり、今後は希少淡水魚の保全や復元に全国的に活用できる研究成果である。

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所定の手続きを経たうえ、平成 24 年 2 月 9 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。

氏 名	みづもと しげとし 水 本 茂 利
学位の種類	博 士（農学）
学位記番号	農 第 1 7 6 号
学位授与の日付	平 成 2 4 年 3 月 2 2 日
学位授与の要件	学位規程第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	ラット体細胞核移植卵の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	加	藤	容	子
	（副主査）	教授	重	岡	成	

論文内容の要旨

1997年に世界最初の体細胞クローン個体作出成功例が報告されて以来、これまでに20種類の動物種において体細胞クローン個体が得られている。しかしながら、ラットは有用な実験動物であるにも関わらず、体細胞クローン個体作出例成功は2003年の1報にとどまっている。そこで、本研究は再現性のあるラット体細胞核移植実験系の確立を最終目標として行なわれた。

体細胞核移植を行う際のレシピエント卵として、第二減数分裂中期卵(MII期卵)を用いることが一般的である。ラットにおけるMII期卵は、自然発生的に活性化を起こすという特徴を持っており、このことが体細胞核移植を行う上での障壁と考えられている。そこで、まず第2章では、プロテアソーム阻害剤であるMG132および微小管の重合阻害剤であるDemecolcineを用いることで、ラットの可逆的な活性化の阻止が可能か検討した。その結果、MII期卵は採卵後1時間経過すると単為発生誘起後の発生率が低下したのに対し、MG132を添加した培地を用いて培養することで採卵後4時間目まで単為発生卵の発生能を高く維持できることが明らかとなった。ついで、多くの動物種において体細胞核移植卵の発生能向上が報告されているヒストン脱アセチル化阻害剤Trichostatin A(TSA)処理の影響を検討したが、体細胞核移植卵の発生能は著しく低く、発生能を改善することはできなかった。

次いで第3章において、ラット体細胞核移植卵の発生能が低い要因として、核移植後の紡錘体形成に着目した。その結果、ドナー細胞核注入後活性化刺激を与えるまでの培養時間が長くなるに従って紡錘体は異常に伸長し、染色体は離散することが明らかとなった。また、同時に、培養時間を経ることで体細胞核移植卵の発生能は低下した。この傾向はMG132を添加した場合に見られたことから、DemecolcineあるいはNocodazoleに代替して検討したところ、形態的な異常は改善されたが、長時間培養後の後の発生能は同様に低下した。

活性化阻止剤処理が体細胞核移植卵の発生能に悪影響を及ぼす可能性が示唆されたことから、第4章では、まず核移植操作から活性化前培養までMG132に感作用させない実験系の影響を検討した。その結果、活性化阻止剤を添加しない培地中で体細胞核移植卵を長時間培養した場合、自然活性化が再発し、ドナー細胞核の一部が極体として放出されることが確認された。このことから、活性化阻止剤の有無にかかわらず、適切なタイミングで活性化刺激を激付与する必要があることが判明した。次いで、阻害剤を用いない自然活性化阻止法として、低温処理の影響を検討した。その結果、低温処理により、MII期卵の紡錘体は消失し、なお染色体は中期状態を長時間維持できることが明らかとなった。また、長時間低温下で培養したMII期卵は、単為発生誘起後の発生能は維持されていたが、体細胞核移植卵の発生能の改善には至らなかった。

第2章～第4章において、MII期卵の自然活性化阻止法について検討を行ったが、ラット体細胞核移植卵の発生能の改善には至らなかった。そこで、以降の実験では他の要因に着目して研究を行った。

第5章では、卵の活性化条件および培養条件に着目して、核移植卵の発生能に及ぼす影響を検討した。まず単為発生卵を用いて活性化処理条件を比較した結果、Butyrolactone I、6-dimethylaminopurine、およびCycloheximideを用いると、ストロンチウムを用いた場合と同等の発生能を示すことが明らかとなった。しかしながら、いずれの試薬を用いた場合であっても、体細胞核移植卵の発生に有効に働くことはなかった。また、KSOMを用いた培養系は、単為発生卵の発生能を向上させたが、体細胞核移植卵の発生能を向上させるには至らないことが判明した。

ついで、第6章では、ドナー細胞の種類が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。ドナー細胞として、卵丘細胞、培養卵丘細胞、卵胞上皮細胞、培養卵胞上皮細胞、尾由来繊維芽細胞、ならびに腎臓由来細胞を用いた結果、卵丘細胞を用いた場合よりも培養卵丘細胞が、また卵胞上皮細胞よりも培養卵胞上皮細胞を用いた場合の方が、体細胞核移植卵の発生能が高いことが明らかとなった。また、尾由来繊維芽細胞を用いることによって、胚盤胞を得ることが出来た。本章の結果から、細胞の採取法や細胞株によって核移植卵の発生能が異なることが明らかとなり、ドナー細胞の選択は実験系の中で特に重要な位置にあることが示唆された。

第7章においては、ラットの系統およびレシピエント卵の状態が体細胞核移植卵の発生能に及ぼす影響を検討した。マウス体細胞核移植で有効なF1雌を用いた実験では、偽前核の形成が不十分であり、桑実胚への発生が高い傾向にあったが、胚盤胞への発生は見られなかった。次いで、様々な状態にあるレシピエント卵を用いることが核移植卵の発生能に及ぼす影響について検討した結果、予め活性化付与した卵や、受精卵を用いた場合は、体細胞核移植卵の発生能は極めて低かった。それに対して、除核しないMII期卵をレシピエント卵として用いた場合は、極体の有無に関わらず胚盤胞まで発生した。しかし、その発生率は単為発生卵よりも低いことから、体細胞を導入することの悪影響が改めて確認された。

第8章では、体細胞核移植卵の受胎雌への移植試験を行い、体内発生能の検討を行った。まず、卵丘細胞をドナー細胞として用いた体細胞核移植卵の胚移植を行ったところ、核移植卵の卵割のタイミングによって選別した場合であっても着床すら確認できなかった。それに対して、培養卵丘細胞をドナー細胞として用いたところ、低率ではあるが着床を確認することが出来た。このことから培養細胞をドナー細胞として用いることは、核移植卵の体内発生にも有効であることが示唆された。

他の動物種と比較して、ラットの体細胞核移植に関する知見は乏しいのが現状である。そのため本研究は、ラット卵子の特徴を考慮しながら、基本的な核移植実験系を改良することにより、体細胞核移植卵の発生能が改善するか否かを指標に実施した。本研究における検討内容において、それら基本的な実験系の中で、特に用いるドナー細胞の種類がラット体細胞核移植卵の発生能に影響を及ぼす要因であることを明らかにした。

しかしながら、本研究において、培養細胞を用いることによってラット体細胞核移植卵の発生能が向上した要因は明らかではない。今後、その要因を分子生物学的に明らかにすることができれば、体細胞核移植卵の発生能が劇的に改善する可能性があると考えられる。また、ラットのよ様な体細胞核移植が困難である動物種において発生能向上に関わる因子が特定された場合、その知見は他の動物種における体細胞クローン個体の作出や核の初期化機構の解明に大きく貢献するものと考えられる。

1997年に成体の体細胞を用いた核移植卵よりクローンヒツジのドリーが誕生し、翌年に学位申請者の所属する研究室においてウシで、また米国ハワイ大学においてマウスで、それぞれ成体体細胞由来のクローン個体の作出に成功している。以降、さまざまな20種類の動物種において作出例が報告され、体細胞核移植を用いたクローン個体の作出は確かな技術であることが証明された。しかし、その成功率は低いことから、作出効率を向上するため、多岐に渡る研究が行われている。

最初の成功例が報告されてから10年以上経つ現在においても、マウスやウシのように数多くの研究が実施されている動物種でも作出成功率は5%程度と低率であるが、長い研究過程において膨大な数の体細胞クローン個体が得られている。

その中において、ラットは2003年にZhouらが最初に体細胞クローン個体の作出に成功して以降、作出例が全く報告がされていない。Zhouらは、プロテアソーム阻害剤であるMG132を用いて、ラットの第二減数分裂中期卵(MII期卵)の特徴である自然発生的な活性化を阻害することで産子を得ている。体細胞核移植の際の適切な操作条件は未だ明らかとなっていないが、他の動物種においては確実に産子の得られる実験系があるに関わらず、ラットにおいては、MG132を用いた場合でも再現性は確認されていない。そこで、学位申請者はラット体細胞核移植実験系の確立を最終目標として、発生能に及ぼす諸条件の検討を行った。

核移植卵が発生するためには、核移植に用いた細胞核が初期化されることが必要である。特に、体細胞核の場合は、核の初期化は第二減数分裂中期卵(MII期卵)の細胞質中で生じるが、細胞周期がM期ではない活性化した卵細胞質中では通常生じないとされている。しかしながら、排卵されたラットMII期卵は、体外での操作中に自然発生的に活性化を起こすという特徴を持っており、このことが体細胞核移植を行う上での障壁と考えられている。そこで、第2章～4章では、ラット卵子の自然活性化の阻止に注目した検討を行った。

まず第2章では、プロテアソーム阻害剤であるMG132および微小管の重合阻害剤であるDemecolcineを用いることで、ラット卵の可逆的な活性化の阻止が可能か検討した。その結果、単為発生卵の発生能を指標とする限り、MG132の方がM期維持能が高いことが判明した。

しかし一方、第3章では、体細胞核移植卵における紡錘体は、MG132添加培地で培養すると、時間を経るごとに異常に伸長し、染色体は紡錘体上に散らばり、発生能が逆に阻害されることが明らかとなった。

そこで、第4章では、MG132を用いない自然活性化阻止法として、低温処理の影響を検討した。MII期卵を低温下で培養することにより、紡錘体が消失し、染色体は中期状を保ち、単為発生誘起後の発生能を採卵後長時間維持できることが明らかとなった。しかしながら、上述の実験系と同様に、体細胞核移植卵を低温条件下で作出しても、発生能を改善することは出来なかった。

以上の検討から、卵の自然活性化阻止を行うのみでは、ラット体細胞核移植卵の発生を向上するには不十分であると考えられた。そこで第5章では、実験系における他の条件として、特に活性化および培養条件に着目した。まず、核移植卵を発生させるための単為発生刺激法の影響を検討したが、従来から用いてきたストロンチウム処理との間で発生率に大差は見られなかった。また、体細胞核移植卵を発生させるための培養液の影響を検討したが、従来から用いてきた培養液の場合と大差が見られなかった。

第6章では、核移植に用いるドナー細胞の影響を検討した。まず、卵丘細胞に加えて、培養卵丘細胞、卵胞上皮細胞、培養卵胞上皮細胞、尾由来繊維芽細胞、ならびに腎臓由来細胞をドナー細胞として用いた体細胞核移植卵の発生能を比較した。その結果、卵丘細胞と培養卵丘細胞、卵胞上皮細胞と培養卵胞上皮細胞のように同由来の細胞を核移植に用いた場合、培養した細胞の方が核移植卵は高率に4-8細胞期へ発生することが明らかとなった。また、尾由来繊維芽細胞を用いた場合にも発生能は向上した。核移植卵がコンパクション以降に発生する割合に差は見られなかったが、培養卵胞上皮および尾由来繊維芽細胞を用いた場合に胚盤胞への発生が確認できた。

第7章では、核移植に用いるラットの系統ならびにレシピエント卵の状態が、体細胞核移植卵の発生能に及ぼす影響を検討したが、いずれの実験区においても発生率に大差はみられなかった。

第8章では、これまで検討してきた実験の内、最もラット体細胞核移植卵の体外発生能に有効な条件であった培養細胞をドナー細胞として用い、核移植卵を行った後、受胎雌へ移植することで体内発生能を検討した。その結果、培養卵丘細胞をドナー細胞として用いた核移植卵は、低率ではあるが着床することを確認することができた。このことから、核移植のドナー細胞として培養細胞を用いることによって、体外発生能と同様に体内発生能も向上する可能性が示された。

これらの研究成果は、日本哺乳動物卵子学会、日本繁殖生物学会、日本畜産学会などで計10回口頭発表を行うとともに、オリジナリティの高い国際学術誌に2編(いずれも筆頭者)を公表している。また、学位申請者は日本学術振興会特別研究員に採択されており、研究業績は高く評価されている。

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所定の手続きを経たうえ、平成24年2月9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。

氏名	福 間 康 文			
学位の種類	博 士 (農学)			
学位記番号	農 第 1 7 7 号			
学位授与の日付	平 成 2 4 年 3 月 2 2 日			
学位授与の要件	学位規程第5条第1項該当			
学位論文題目	零度以下の低温環境による魚肉の未凍結貯蔵に関する研究			
論文審査委員 (主 査)	教授	安 藤	正 史	
(副主査)	教授	塚 正	泰 之	
(副主査)	教授	山 根	猛	