

氏名	すずきとおる 鈴木 亨
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1604号
学位授与の日付	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生物科学専攻
学位論文題目	マウス核移植胚の初期発生過程における遺伝子発現解析

論文調査委員 (主査) 教授 今井 裕 教授 久米 新一 教授 廣岡 博之

論文内容の要旨

近年、哺乳類の未受精卵には、核移植によって導入された体細胞核を再プログラム化する能力のあることが示され、現在までに多くの哺乳動物種で体細胞核移植によるクローン動物の作製例が報告されている。しかし、その生産効率は非常に低く、核移植胚はその発生過程において多くの異常を示す。これまでの研究から、このような異常は、エピジェネティックな遺伝子発現異常に起因するものとの考えが一般的になってきている。本論文は、マウス体細胞核移植胚における細胞核のリプログラミングと発生異常に関する知見を得る目的で、初期発生過程における遺伝子発現の比較解析を行った。

まず、マウス体細胞核移植胚の作製条件の検討とその効率の確認を行った。核移植胚の作製は、マイクロガラスニードルによる透明体カット、分裂染色体を含む紡錘体の吸引除去、尾部由来 G0/G1 期繊維芽細胞と除核未受精卵の電気処理による融合、ストロンチウム処理による再構築胚の発生誘起をおこなった。各操作の効率を確認したところ、核移植胚の作製に十分適用可能であると考えられた。また、これらの方法により実際にマウス体細胞核移植胚を作製したところ、一部の胚は形態上正常に胚盤胞期に発生した。しかし、核移植胚の胚盤胞期までの発生率や胚盤胞期における全細胞数は、体外受精胚や単為発生胚と比較して有意に低い値であった。以上の結果から、体細胞核移植胚はその初期発生ですでに低発生率や全細胞数減少といった発生異常を示すことが明らかになった。

ついで、核移植胚の2細胞期における遺伝子発現を体外受精胚と比較した。はじめに、核移植胚と体外受精胚との間で差次的発現を示す遺伝子を同定する目的で、ディファレンシャルディスプレイ法 (DD) をおこなったところ、核移植胚で低発現を示す遺伝子、高発現を示す遺伝子をそれぞれ2つずつ同定した。それら遺伝子のマウス初期胚における遺伝子発現パターンを RT-PCR により確認したところ、核移植胚で低発現を示した MuERV-L 遺伝子が、受精後の2細胞期胚において、一過的に発現上昇するパターンを示した。そこで、マウス初期発生において、MuERV-L と同様に2細胞期に一過的な発現上昇を示す遺伝子を、DD、デジタル DD、Gene Expression Omnibus (GEO) を用いて同定する試みを行い、同定した5つの遺伝子の発現量を核移植胚と体外受精胚で比較したところ、全ての遺伝子の発現量が核移植胚で有意に低下していた。これらの結果から、マウス体細胞核移植胚においては、2細胞期という非常に早い段階から遺伝子発現異常が見られ、特に受精後に活性化するような遺伝子においては、遺伝子発現量が低下することを明らかにした。

最後に、マウス体細胞核移植胚の胚盤胞期における遺伝子発現を体外受精胚と比較した。解析対象として、これまで核移植胚でほとんど解析されていない、RNA ポリメラーゼ I および III により転写される遺伝子と RNA ポリメラーゼ II により転写される遺伝子を用いた。その結果、それぞれのポリメラーゼにより転写される遺伝子の発現に量的な差が見られた。これらの結果は、マウス体細胞核移植胚においては、RNA ポリメラーゼ I、II および III による転写の全てにおいて、何らかの異常が生じている可能性を示唆した。

以上のことから、マウス体細胞核移植胚は初期発生過程において、すでに多くの遺伝子発現異常を示すことが明らかとなった。このことは、今後、クローン動物の効率的な生産、核移植胚の発生異常の原因究明や発生の分子メカニズムの解明に

において、重要な情報を提供することが期待される。

論文審査の結果の要旨

哺乳類の未受精卵には、体細胞核を再プログラム化し、個体まで発生させる能力があることが知られ、多くの哺乳動物種で体細胞核移植によるクローン動物の作製例が報告されている。しかし、その生産効率は非常に低く、個体形成の過程で多くの発生異常を示すことが知られている。これまでの研究から、そうしたクローンの異常は、エピジェネティックな遺伝子発現異常に起因するものと考えられているが、それがいつどのような形で起こっているのかは、全くわかっていなかった。本論文は、マウス体細胞核移植胚における細胞核のリプログラミングと発生異常に関する知見を得る目的で、核移植直後の初期発生過程における遺伝子発現を正常胚との間で比較検討している。評価できる点は、以下の通りである。

1. マウス尾部由来の繊維芽細胞を用いた体細胞核移植胚の胚盤胞期への初期発生について検討したところ、発生率の低下のみならず、細胞数の減少など、胚発生の初期にすでに発生異常を示すことを明らかにした。
2. 核移植胚の2細胞期における遺伝子発現をディファレンシャルディスプレイ法（DD）によって体外受精胚と比較したところ、核移植胚で低発現を示す遺伝子、高発現を示す遺伝子をそれぞれ同定している。これらの遺伝子のマウス初期胚における遺伝子発現パターンを RT-PCR により確認したところ、核移植胚で低発現を示した MuERV-L 遺伝子は、正常2細胞期胚では発現上昇することを明らかにした。
3. マウス初期発生において MuERV-L と同じように2細胞期に一過的な発現上昇を示す遺伝子を DD、デジタル DD、GEO を用いて同定を試みている。同定された5つの遺伝子のすべてにおいて、核移植胚での遺伝子発現量は有意に低下しており、マウス体細胞核移植胚では、2細胞期という非常に早い段階から遺伝子発現異常が見られるとともに、受精後の胚性ゲノムの活性化期に発現が増加している遺伝子において、核移植胚では発現量が低下する異常を明らかにしている。
4. 核移植および体外受精由来の胚盤胞期胚を用いて、RNA ポリメラーゼ I、II および III に依存した遺伝子の転写について検討している。その結果、それぞれのポリメラーゼにより転写される遺伝子の発現に量的な差が見られ、マウス体細胞核移植胚においては、RNA ポリメラーゼ I、II および III による転写の全てにおいて、何らかの異常が生じている可能性を示唆している。

以上のように、本論文は、体細胞核移植胚に見られる多くの異常の根本的な原因は、これまでに知られているような胎子発生期の異常ばかりでなく、より早期の初期発生時の遺伝子発現がすでに破綻していることを明らかにしたものであり、家畜繁殖学、実験動物学、動物遺伝学の分野に寄与するところが大きい。

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、平成19年2月15日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。