

氏名	ほし の よういちろう 星 野 洋 一 郎
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1480 号
学位授与の日付	平 成 17 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	ミニブタにおける体細胞クローン技術の確立

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

ブタは臓器の生理学的特性がヒトに近く、疾患モデル動物としての利用や、異種臓器移植のドナーとしての利用が考えられている。特にミニブタは、小型で扱いやすいことから実験動物としての応用が期待されている。この動物種で体細胞クローン技術を確認することにより、遺伝子改変技術の応用が可能となり、実験動物としての有用性が増加すると考えられる。しかし、現在のクローン技術には作出効率の低さ、産仔に生じる異常など、実用化のために多くの問題が残されている。また、ミニブタも含めブタなどでは、卵子や胚の体外培養技術がまだ未熟であるため核移植胚の発生能力も低く、それを補うために一頭のレシピエント雌に100個以上の核移植胚を移植するなど、クローンブタはまだまだ偶然の産物にすぎない。本研究では、ミニブタにおいて、より確実に、効率的な体細胞クローン技術の確立を目的として行った。

まず、ブタ卵子の体外成熟法を改善することによる、ミニブタ体細胞核移植胚の発生能の向上を試みた。これまで、ブタ未成熟卵子の体外成熟の進行を同期化することによって、卵子の発生能力が高められることが報告されている。本研究では、ブタ卵巣卵胞内の卵胞殻と共培養する未成熟卵子の体外成熟法を用いて、核移植胚の体外発生能力を検討した。その結果、卵胞殻共培養法で培養したブタ卵子の成熟過程は、同調化しながら急速に起こり、成熟卵子を効率的に、安定して得られることがわかった。これらの卵子をレシピエントに用いた核移植胚の胚盤胞期への発生率は、従来までの体外成熟法に比べて有意に高い値を示した。

一方、本研究で用いた卵胞殻共培養法は、卵子の成熟が従来法よりも8時間も早く完了し、核移植する以前にすでに過成熟(一種の加齢)が起こっていると考えられた。過成熟によって卵子は、単為発生が容易に起こり、発生過程で異常分割が起こる頻度も上昇するといわれている。そこで、レシピエント卵子の過成熟が核移植胚の発生能におよぼす影響について検討した。その結果、卵胞殻共培養法による卵子は、過成熟の影響を受けず、従来法に比べて高い発生能を示した。

以上の結果から、卵胞殻共培養法によるブタ体外成熟卵子を使用することによって、高い発生能を有するミニブタ体細胞核移植胚の作成が可能になった。

次に、ミニブタ体細胞核移植胚をレシピエント雌ブタに胚移植することによって、ミニブタクローン個体の作出を試みた。レシピエントとして、ゲッチングンミニブタと梅山豚を用いた。ゲッチングンミニブタに胚移植を行った場合は、移植から妊娠31日目までに全ての例で流産した。一方、梅山豚に胚移植を行った場合、4頭中2頭が妊娠した。15個の移植胚から3頭、29個の移植胚から2頭のクローン産仔が得られた。以上の結果から、従来の報告より格段に少ない移植胚数でも効率よくクローン産仔が得られることが明らかとなり、その要因の一つは体外成熟法の改善によってレシピエント卵子が質的に向上し、核移植胚の発生能力が高まったことによると考えられた。

最後に、本研究で確立されたミニブタ体細胞クローン技術を遺伝子改変に応用する可能性について検討した。本研究では、 α -1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ(α -GT)遺伝子を標的とした、RNAiによる α -ガラクトシル抗原の発現抑制を試みた。shRNAベクターによる持続的RNAiによって、ブタ線維芽細胞における α -GT mRNA量が50%程度に減少し、

ブタ細胞表面の α -ガラクトシル抗原の量も減少した。また、RNAiの効果は最低23日間持続した。shRNAベクターを導入した細胞をドナーに用いた核移植胚においても、RNAiの効果は持続し、 α -ガラクトシル抗原の量が減少していることが示された。しかし、 α -GT遺伝子の発現を完全に抑制し、発現抑制細胞からクローンミニブタを作製するためにはさらに実験条件の検討が必要であると考えられた。

以上のことから、ブタ未成熟卵子を卵胞殻と共培養して体外成熟させることによって、品質のよい卵子を安定して得ることができ、これらの卵子を用いたミニブタ体細胞核移植胚は、高い発生能力を示した。さらに、核移植胚を梅山豚に移植したところ、非常に高い効率で正常なクローン産仔が得られ、ミニブタにおける体細胞クローン技術を確立することができた。

論文審査の結果の要旨

ブタは食用家畜としての有用性はもとより、解剖学的・生理学的特性がヒトと類似するため、各種の実験モデルとして有用な動物種である。なかでも、ミニチュアブタ（通称ミニブタ）は、家畜ブタと似た特徴を有するとともに、小型で扱いやすいことから実験動物としての利用が期待されている。ミニブタを実験動物として利用してゆくには生殖工学技術の確立は非常に重要であり、特に体細胞クローン技術の確立はこの動物種の有用性を格段に高めると期待できる。本研究では、ミニブタにおける体細胞クローン技術の確立を目的として行った。得られた成果は、以下のようにまとめることができる。

1. ブタやミニブタにおいて生殖工学技術を確立する難しさは、卵子や胚の体外培養環境に対する感受性の強さにある。特に、クローン技術においては体外で成熟させた未受精卵を用いるために、その卵子の品質はクローン技術の成否を左右する。本研究では、体内環境になるべく近い培養法（卵胞殻共培養）を用いて、ブタ卵子の体外成熟を行った。その結果、従来の方法に比べて、安定して、しかも卵子全体が同調して成熟することが明らかとなった。
2. これらの体外成熟卵子を用いて、ミニブタ体細胞をドナーとした核移植を行い、体外で発生させたところ、従来の方法で成熟させた卵子よりも安定して、高率に胚盤胞期へ発生することが明らかとなった。また、ミニブタの体細胞が家畜ブタの卵子内でリプログラミングしうることを明らかにするとともに、稀少なミニブタ未受精卵の代わりにブタ卵子をレシピエントとして代用することができることを示した。
3. 未受精卵は成熟後時間を経る（加齢する）につれて、発生能が低下し、体細胞の核をリプログラミングする能力も低下すると考えられている。卵胞殻共培養法によって体外成熟させた卵子は、従来の方法で成熟させた卵子よりも加齢に対して抵抗性を示し、核移植胚は高い胚発生能を維持した。
4. 家畜ブタの未受精卵を用いて、ミニブタの体細胞を核移植した胚をゲッチングミニブタあるいは梅山豚の雌に胚移植を行った。ゲッチングミニブタからは産子を得ることはできなかったが、梅山豚からは4頭のうち2頭から、それぞれ3頭および2頭の体細胞クローンブタを得ることができた。ここで得られたクローンの生産効率は、従来の2%程度の効率に比べて7~20%と極めて高かった。また、これまで100個~200個のクローン胚を移植に用いていたのに対し、本実験では15~29個と非常に少ない移植胚数でクローンが誕生していることから、クローン胚の品質が極めて高いことが示唆された。
5. 異種臓器移植に際して、超急性拒絶反応のターゲットとなる細胞表面抗原である、 α -1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ（ α -GT）遺伝子を標的としたRNAiによる α -ガラクトシル抗原の発現抑制を試みた。ブタ線維芽細胞における抗原の発現は、50%程度まで抑制され、その効果は23日間持続させることができた。また、これらの細胞をドナーとした核移植胚においても抗原の発現は抑制されていた。本実験で選択した遺伝子の発現抑制の程度は不十分であり、今後の検討の余地はあるが、細胞の性質を変換した体細胞からのクローンブタ作製の可能性を示すことができた。

以上のように本論文は、ブタやミニブタの産業利用の範囲を格段に広げるとともに、家畜生産の効率化を目指す上で重要な知見を与えるものであり、生殖生理学、発生生物学、実験動物学、家畜繁殖学の発展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17年2月17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。