

(論文内容の要旨)

分化した体細胞核を、除核した卵細胞質内に導入(核移植)することによって、核は胚性の状態へと戻り、分化全能性を獲得する。この現象を体細胞核のリプログラミングという。リプログラミングは、核移植胚を作製し、解析することによって研究されてきた。しかし、これらを司る哺乳類卵内の因子やメカニズムはほとんど解明されていない。その大きな要因の一つは、核移植の実験系にあると考えられる。核移植は高度に専門的な技術を必要とする上に、一人の術者が一度の実験で調整できる核移植胚は少ないために、多くの細胞を必要とする分子生物学的解析に用いることは困難である。卵子がもつリプログラミング機構を理解するためには、核移植時に起こるリプログラミングを効率的に誘導する実験系が必要である。その一つの候補として、卵細胞抽出系をあげることができる。卵細胞抽出系とは、卵子内成分をバッファー中に抽出した卵抽出液を使用し、抽出液中で細胞核にリプログラミングを誘導する系のことである。この卵抽出液はアフリカツメガエルにおいて広く使用されているが、哺乳類においては未だ報告がない。また、卵抽出液中で、生存性を維持しながら細胞にリプログラミングを誘導する実験系も確立されていない。本論文では、アフリカツメガエルあるいは哺乳類卵細胞抽出液中で、細胞が生存性を損なわずに哺乳類体細胞にリプログラミングを誘導する実験系の構築を目的とした。

はじめに、生存性を保った細胞に外因性の高分子を取り込ませる方法について検討した。微生物の菌体外毒素であるStreptolysin O あるいは非イオン性の界面活性剤であるDigitoninを低濃度でマウス、ブタ、ウシなどの哺乳類体細胞に作用させることによって、細胞膜上に修復可能な程度の膜孔が形成され(可逆的細胞膜透過)、その孔を介して細胞外の高分子(タンパク質等)を細胞内に流入させることができた。また、膜透過を受けた細胞は、Caイオン含有培地で培養することによって膜修復され、体外の培養液中で増殖するとともに、膜修復前に細胞内に摂取された高分子は細胞内に保持された。

次に、この可逆的細胞膜透過の系を利用して、カエル卵抽出液中で体細胞にリプログラミングを誘導することを試みた。卵抽出液中で培養後、体細胞核内で大幅なタンパク質成分の変動がみられた。特に、カエル卵特異的に存在するリンカーヒストンB4やラミンLIIIが核内に取り込まれ、体細胞核内に存在する普遍的転写因子であるTBPは核から消失した。このように、カエル卵抽出液処理によって体細胞核は胚型のクロマチン修飾へと変化した。抽出液で処理した膜透過細胞の細胞膜を修復し、再び細胞培養に用いた。細胞培養後、多能性マーカー遺伝子である*OCT4*、*SOX2*、*NANOG*の発現が認められた。また、

未分化細胞様のコロニー形成も観察された。

最後に、卵核胞期 (GV 期) あるいは第 2 減数分裂中期 (MII 期) のブタ卵母細胞を用いて卵抽出液を作製し、そのリプログラミング誘導能を調べた。ブタ卵抽出液中で、可逆的に細胞膜を透過したブタ体細胞を培養した。MII 期卵抽出液で処理後、体細胞核から TBP が消失し、ゲノム上で広域にヒストンの脱アセチル化が誘導された。これらの現象は、核移植後に体細胞核に起こる変化と同様のものであり、卵内でのリプログラミングの一部が卵細胞抽出系で再現できることが示唆された。また、GV 期卵抽出液による処理では、ヒストンのアセチル化が誘導され、抽出液処理後の細胞培養によって *NANOG* の強い発現が認められた。さらに、*NANOG* 以外の多能性マーカー遺伝子の発現とともに、体細胞マーカー遺伝子の発現抑制も観察された。これらのことから、GV 期卵抽出液は、脱分化を誘導する活性を有していることが明らかとなった。また、いずれの卵抽出液でも、*NANOG* の発現調節領域における DNA 脱メチル化が誘導されていた。

本研究で開発した卵細胞抽出系は、体外で哺乳類体細胞のリプログラミングを解析し、評価した初めての報告であり、核移植技術を用いることなく、一度に多くの細胞 (10万個以上) にリプログラミングや脱分化を誘導し、その現象を詳細に検討する実験系を提供しうると考えられる。

氏名

宮本 圭

(論文審査の結果の要旨)

哺乳類の体細胞核は、未受精卵に導入することによりリプログラミングされ、個体を再構成することが可能である。しかし、その効率は数%と低く、どのような機構でリプログラミングが起こるのか全く解明されていない。この現象は、一つの体細胞を一つの未受精卵に導入する核移植操作によって再現されているが、この技術によって作製できる胚数は限られており、リプログラミングを生化学的に解析するに十分な細胞数を調整することは難しい。そこで本研究では、アフリカツメガエルあるいはブタの卵細胞を用いて細胞質を破砕した無細胞抽出系を作製し、この抽出液中で哺乳類体細胞のリプログラミングの誘導と解析を試みている。評価できる主な点は以下の通りである。

1. アフリカツメガエル活性化卵およびブタ卵母細胞から調製した細胞抽出液は、卵細胞としての生理的条件をよく維持し、細胞周期制御タンパク質をはじめとする多くの細胞質因子を保持していた。マウス、ブタおよびウシ由来の体細胞をStreptolysin OあるいはDigitoninで処理することにより、細胞膜上に膜孔が形成され、抽出系内のタンパク質の体細胞核内への取り込みが認められた。さらに、膜透過後の細胞をCaイオン含有培地で培養することによって、体外での細胞培養が可能になった。
2. アフリカツメガエル 卵抽出液中でブタ体細胞を処理したところ、カエル卵特異的に存在するリンカーヒストンB4やラミンLIIIが体細胞核内に取り込まれ、逆に核内に存在した普遍的転写因子であるTBPは核から消失したことから、体細胞核は胚型のクロマチン修飾へと変化したことが示唆された。これらの細胞を膜修復後に細胞培養すると、多能性マーカー遺伝子である*OCT4*、*SOX2*、*NANOG*の発現が認められ、未分化細胞様のコロニー形成が観察された。
3. ブタ 卵巣由来の卵核胞期 (GV 期) あるいは第 2 減数分裂中期 (MII 期) の卵母細胞を用いて卵抽出液を作製し、それぞれのブタ体細胞に対するリプログラミング誘導能を検討している。MII 期卵抽出液では、体細胞核から TBP が消失し、ヒストンの脱アセチル化が誘導された。これらの現象は、核移植後に体細胞核に起こる変化と同様のものであり、卵内でのリプログラミングの一部が卵細胞抽出系で再現できることが示唆された。一方、GV 期卵抽出液による処理では、ヒストンのアセチル化が誘導されるとともに、抽出液処理後の細胞培養によって *NANOG* の強い発現が認められた。さらに、*NANOG* 以外の多能性マーカー遺伝子の発現とともに、体細胞マーカー遺伝子の発現抑制が観察された。これらのことから、GV 期卵抽出液は、脱分化を誘導する活性を有していることを明らかにした。また、いずれの卵抽出液も *NANOG* の発現調節領域における DNA 脱メチル化を誘導した。

以上のように本論文は、体細胞のリプログラミングを哺乳類卵子の無細胞抽出系で誘導することにはじめて成功している。この実験系は、今後、リプログラミング機構の解明に有用な研究手段を提供するものであり、発生生物学、再生医学、家畜生産学、生殖生物学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21年2月19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。