

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	伊佐治 優希
論文題目	マウス体細胞核移植胚の発生促進技術の開発とその促進機構の解明		
(論文内容の要旨)			
<p>体細胞クローン技術(SCNT)によるクローン動物の作出は、将来的に、家畜生産をはじめ、絶滅危惧種の保全や再生医療など、様々な分野への応用が期待される有用な技術である。特に、実験動物として汎用されているマウスにおいては、SCNT技術の改善が期待されているが、その成功率の低さや技術的な困難さが、依然として克服すべき課題としてあげられている。本研究では、SCNT胚で生じる異常の回避、およびSCNT胚の作出過程で生じるダメージの軽減という2つの観点から、クローンマウス作出効率の向上に繋がる新たな方法を検討し、その作用機序を明らかにした。また、複雑なSCNT技術の簡易化を行うため、未受精卵核の化学的除去法の検討を行った。① 胚盤胞期における多能性関連遺伝子<i>Oct4</i>の発現低下の改善を目的とし、活性化後のマウスSCNT胚にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 (HDACi) であるバルプロ酸 (VPA) 処理を行った。SCNT胚を4細胞期から24時間 VPAで処理することによって、胚盤胞における<i>Oct4</i>の発現と内部細胞塊 (ICM) の細胞数、体細胞クローン胚の主要な発生異常の原因となるX染色体の不活化異常が改善されることを明らかにした。さらに、HDACiである酪酸ナトリウムおよびスクリプタイド(SCR)を用いてもVPAと同様の効果が得られたことから、この効果はクラス I/IIaのHDACを阻害することによって発揮されることを示唆した。② ドナー細胞核注入用の培養液に含まれているポリビニルピロリドン(PVP) は、SCNT胚への細胞毒性が懸念されることから、脱イオン化ウシ血清アルブミン(d-BSA)をその代替として用いた。その結果、マウスSCNT胚の胚盤胞への発生は有意に促進された。そこで、SCNT胚へのd-BSA注入の効果について詳細に検討した結果、SCNT直後にd-BSAを注入すると、前核期および2細胞期におけるヒストン修飾、胚盤胞への発生率、ICM細胞数およびクローン産仔の作出効率が改善されることが明らかとなった。このことから、卵細胞質へ注入されたd-BSAが、体細胞核のリプログラミングを促進する効果を持つことを示唆した。③ ノコダゾール処理と吸引操作を組み合わせたchemically-assisted enucleation (AE) 法による未受精卵細胞核の除核を試みた結果、90%を超える高い割合で核を含む卵細胞質隆起が形成され、簡便な除核が可能となった。さらに、AE法による除核未受精卵を用いて作出したSCNT胚は、SCR処理を併用することによって、従来の機械的な手法と比較し、胚盤胞への発生率が有意に上昇した。この結果から、AE法は、従来の機械的な除核法に比べて、体細胞核のリプログラミングにおいて優良な除核未受精卵を作製できる可能性を示唆した。</p> <p>クローンマウスの作製は世界的にも限られた研究施設でのみ可能な特殊な技術である。本研究で得られた知見をもとに、クローンマウスを簡易的な手法で、高率に作出することを可能にした。また、本研究で見いだされた方法は、SCNT胚の発生能低下の重要な原因であり、胚盤胞までの着床前発生で起こる<i>Oct4</i>の発現異常やエピジェネティック異常を著しく改善することから、ウシを含む多くの家畜のクローン作出効率の改善にも貢献できる新たな技術として期待できる。</p>			

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

哺乳動物では、体細胞を未受精卵に核移植することにより、体細胞から個体への再構築が可能になっている。特に、多種多様な系統を有するマウスにおいて、体細胞から遺伝的にクローナルな系統を即座に樹立できる体細胞クローン技術 (SCNT) の確立の意義は大きい。しかし、哺乳動物の中でも、マウスのSCNTは、技術的に非常に難易度が高いことが知られており、世界的にも限られた研究施設で行われているにすぎない。そこで、本研究では、マウスにおけるSCNT技術の改善と簡易化を目的として検討を行った。得られた成果は、以下のようにまとめることができる。

1. 核移植後のSCNT胚は、ヒストンのアセチル化修飾の不具合によって、発生に必要な遺伝子発現に異常がおこることが知られている。そこで、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) でSCNT胚を処理したところ、胚内の多能性細胞群の増加と多能性関連遺伝子の一つである *Oct4* の発現を誘導することが明らかとなった。また、この阻害剤の効果は、いくつかの脱アセチル化酵素の中でもクラスI/IIaに対して特異的に作用するものであることを示した。

2. SCNT胚の発生を支持するための培養液を構成する成分のうち、主要なタンパク質構成成分としてウシ血清アルブミン (BSA) を取り上げ、BSAを脱イオン化したd-BSAを培養液に添加して、SCNT胚の発生に及ぼす影響を検討した。その結果、SCNT胚の胚盤胞期への発生率は有意に高まるとともに、核移植直後のSCNT胚の細胞質内にd-BSAを注入することにより、ヒストンのアセチル化、胚盤胞期への発生率およびクローン産子生産効率の有意な改善が認められた。このことから、卵細胞内に注入したd-BSAが体細胞のリプログラミングの効率的な誘導に寄与している可能性を示唆した。

3. 未受精卵に存在する細胞核は、体細胞の核移植に先立って除去されるが、この操作はSCNTの中でも特に煩雑で困難な技術である。この操作を簡略化するために、微小管阻害剤であるノコダゾール処理による化学的な除核方法について検討した。その結果、90%以上と極めて高率に未受精卵からの核の除去が可能になるとともに、SCNT胚の発生率も有意に向上することを明らかにした。

以上のように、本研究は、技術的に困難であった体細胞クローンマウスの生産効率を簡易な手法により高めることに成功するとともに、クローン胚の初期発生異常の原因とその改善方法を明らかにしており、発生生物学、家畜増殖学、家畜育種学、生物資源保全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25年2月7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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。  
要旨公開可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降