

氏 名	くろ 黒 さん 坂 さん 哲
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1297 号
学位授与の日付	平 成 14 年 9 月 24 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	ウシ体細胞核移植胚における細胞周期と初期発生に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 今 井 裕 教 授 佐 々 木 義 之 教 授 宮 本 元

論 文 内 容 の 要 旨

体細胞クローン技術の生産効率向上のためには、ドナー細胞としての体細胞、レシピエント細胞としての体外成熟卵子などの細胞生物学的性質、核移植操作の技術的な問題、さらに体細胞核のリプログラミング機構など様々な問題を解決する必要がある。本論文では、ドナー細胞、レシピエント卵細胞質およびこれらから再構成された核移植胚の細胞周期について詳細に検討し、新たな核移植法を模索するとともに、リプログラミング機構の解明へのアプローチを試みた。

まず、ウシ体細胞クローン技術において一般的に用いられているタンパク質合成阻害剤（シクロヘキシミド）処理が核移植胚の発生に及ぼす影響を調べた。核移植後2時間目から4時間目までシクロヘキシミド処理を行なわなかった核移植胚では、MPF 活性の再上昇により核移植胚の染色体が凝縮し、前核形成以降の発生が阻害された。また、核移植胚の分割率は、核移植直後からシクロヘキシミド処理を行なった胚と核移植後1時間目からシクロヘキシミド処理を開始した胚で差がないにもかかわらず、分割胚が胚盤胞期へ発生する割合は、核移植直後からシクロヘキシミド処理を施した胚の方が高かった。この結果から、核移植直後のタンパク質合成に関連する現象がドナー核のリプログラミングおよび核移植胚の発生能に大きな影響を及ぼすことが推察された。

ついで、細胞周期の制御に関わる MPF（成熟促進因子）および MAPK（MAP キナーゼ）について、その活性パターンを様々な変えたレシピエント卵細胞質を用いて核移植を行い、レシピエント卵細胞質への受精に類似の活性化刺激のタイミング、MPF 活性および MAPK 活性が核移植胚の発生に及ぼす影響を調べた。MPF 活性が低いレシピエント卵細胞質は、MPF 活性の高いレシピエント卵細胞質と同様に体細胞核移植胚の胚盤胞期への発生を支持できた。活性化後6時間経過したレシピエント卵細胞質は、MAPK 活性の高低にかかわらず体細胞核移植胚の胚盤胞期への発生をほとんど支持できなかった。これらのことから、活性化卵細胞質も未活性化卵細胞質と同様に体細胞核移植胚を胚盤胞期まで発生させることができるが、その能力は卵細胞質の活性化後に徐々に減少した後、活性化後6時間目には消失することが示唆された。

さらに、細胞周期の G0 期あるいは G1/S 期に同期化したドナー細胞と、未活性化レシピエント卵細胞質（F24 卵細胞質）あるいは活性化後2時間目のレシピエント卵細胞質（A22F24 卵細胞質）を組み合わせる核移植を行った。G0 期の核では核移植後に S 期への進行が早められるか、あるいはレシピエント卵細胞質の細胞周期の進行に従って細胞周期が進行した。一方、G1/S 期の核を用いた核移植胚では、G0 期の核を用いたものよりも早期に DNA 合成を開始した。核移植胚の胚盤胞期への発生率は、G0 期および G1/S 期のドナー細胞をそれぞれ F24 および A22F24 卵細胞質に核移植した場合により高率であった。これらのことから、核移植胚の DNA 合成のタイミングおよび発生能は、ドナー細胞の細胞周期とレシピエント卵細胞質の活性化状態の組み合わせによる影響を受けると考えられた。

本論文によって、ドナー細胞とレシピエント卵細胞質の細胞周期が体細胞核移植胚の発生能に及ぼす影響は大きく、かつ多様であることが明らかになった。細胞周期の視点からさらに核移植にともなう現象を詳細に解析することによって、今後のクローン動物の生産効率の向上、あるいはリプログラミング機構の解明に貢献することが期待される。

論文審査の結果の要旨

体細胞核を未受精卵に核移植すると卵細胞質内でリプログラムされ、個体形成能を再獲得することが知られている。しかし、得られたクローン個体の多くが発生異常を示し、その生産効率は極めて低い。その主たる原因は、核移植後のリプログラミングが不完全であるためと考えられている。

核移植は二種類の全く性質の異なった細胞を融合する操作であり、これによって再構成される核移植胚は細胞生物学的、発生学的に正常な受精卵とは異なった性質を持つと予想される。本論文では、核移植に関与するドナー細胞およびレシピエント細胞の細胞周期とその制御因子に着目し、それらが体細胞のリプログラミングや核移植胚の発生能とどの様にかかわってくるのかについて検討を行なっている。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. 核移植後の核移植胚に対するタンパク質合成阻害剤（シクロヘキシミド）による処理は、その処理時間に依存して核移植胚の発生、すなわち体細胞核のリプログラミングに影響を及ぼした。
2. シクロヘキシミドは、レシピエント卵細胞質内にあって染色体凝集活性を有する MPF の再活性化を抑制することによって作用し、この処理を行わない場合には細胞分裂が停止した。また、その処理時間との関係から核移植後 1 時間が体細胞のリプログラミングに重要な時間であることを明らかにしている。
3. 細胞周期の制御に関わるレシピエント卵細胞質内の MPF と MAPK 活性と核移植胚の発生能との関係を検討した結果、両者の活性の有無に関わらず、活性化後の時間的な経過がリプログラミングに影響を及ぼし、活性化後 6 時間を経過したレシピエントでは胚発生が顕著に低下し、リプログラミング能を消失していることを明らかにしている。
4. 種々の細胞周期上にあるドナー細胞とレシピエント細胞間で核移植を行ない、核移植後の細胞周期の進行および核移植胚の胚発生能について検討した。核移植胚の DNA 合成時期は、ドナー細胞の細胞周期によって異なったパターンを示し、G1/S 期のドナー細胞を用いた場合に DNA 合成が早まることを明らかにしている。また、胚発生率もドナー細胞の細胞周期とレシピエント細胞の活性化条件によって左右され、核移植胚が効率的に発生したのは G1/S 期のドナー細胞を活性化レシピエント卵に核移植した場合であった。

以上のように本論文は、体細胞核移植において核移植直後の胚内で起こる細胞周期に関連する因子と核移植胚の発生能に関して詳細に検討し、体細胞核をより効果的にリプログラムする全く新しい手法について提唱しており、細胞生物学、発生学、生殖生物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14年7月18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。