

氏 名(本籍)	いの 井	うえ 上	ふか 玄	し 志
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 7 9 2 号			
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 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	農学研究科資源生物科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	ウサギにおける体細胞核移植技術開発に関する基礎研究			
論文審査委員	(主 査)	教 授	佐 藤	英 明
	(副 査)	教 授	秋 葉	征 夫
		助教授	佐々田	比呂志
		助教授	麻 生	久

論文内容要旨

緒言

遺伝子組換え技術は遺伝子の持つ生物学的・生理学的機能の研究，疾患モデル動物の作出，家畜の品種改良，有用物質の生産，さらに再生医療への応用などに貢献している。しかしながら，受精卵の前核注入法では遺伝子相同組換えなどの遺伝子操作が行えない。この点で，マウスでは胚性幹（ES）細胞が樹立されたことから，この細胞を用いることで遺伝子相同組換えマウスの作出が可能となった。現在までにES細胞はマウスでしか樹立されていないため，この技術を利用した遺伝子改変動物を作出するのはマウスに限られている。最近，体細胞核移植（SCNT）技術を用いてヒツジが誕生したことが報告され，核移植により分化した細胞である体細胞核であっても個体に発生する能力を維持していることが証明された。これ以降，他の動物種でも同様な研究が行われ，ウシ，ブタを含めた多く動物種で体細胞クローン個体が作出されている。SCNT技術では，胎子や成体の体細胞・培養細胞を用いて直接的に個体を作出できる。したがって，注入核として培養細胞を用いることで，あらかじめ，体外培養条件で遺伝子を導入することが可能であり，実際，SCNT技術を利用したウシ，ヒツジ，ブタ等の遺伝子相同組換え動物が作出されている。このように，SCNT技術は農学分野において育種改良面に与える恩恵は極めて高く，この技術の実用化へ向けて研究が発展している。また，SCNT技術は優秀な家畜の育種・改良ばかりでなく，生命現象を理解する上で有用であると考えられる。しかしながら，いずれの種においてもSCNT技術による個体作出効率は低く，さらに生まれてきた個体に様々な異常が見られ，残された問題点が多い。

ウサギは，世界で初めて胚移植に成功した動物であり，生殖関係の研究で重用されており，飼育しやすく周年繁殖で交尾排卵動物・多排卵動物である。さらに，ウサギは中型動物であることからSPF化が容易である。そのため，多種類の組換え蛋白質を生産させる動物として期待されており，医学分野における実験モデル動物として広く利用されている。しかしながら，ウサギにおいてははまだES細胞は樹立されておらず，SCNT技術による個体作出は2例の報告があるに過ぎず，その後，世界でこれらの研究成果を再現できていない。したがって，SCNT技術を利用した遺伝子相同組換えウサギ作出の報告はなく，この動物におけるSCNT技術開発に期待がもたれている。

以上の背景下，本研究はウサギにおける体細胞クローン個体作出を目的として，ウサギ体細胞核移植技術開発に必要な諸要因について解析した。

第1章 体細胞核移植胚の作出条件

1997年のヒツジでの体細胞クローン個体が誕生して以来，様々な哺乳動物において体細胞クローン個体が誕生している。しかしながら，ウサギにおいて

は胚盤胞期胚を作出した報告は多数あるが、個体作出に至った報告は同一グループによる2報のみである。本章では、SCNT技術により核移植胚を作出するための諸条件の確立を目的とした。

常法により日本白色種雌ウサギに過剰排卵を誘起し、ホルモン投与後16時間で未受精卵子を採取した。除核操作のために卵子をサイトカラシD 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で10分間処理後、UV照射下あるいはPol-Scopeを用いて観察しながら除核を行った(Fig.1)。その結果、Pol-Scopeを用いることでヘキスト染色後にUV照射することなく紡錘体を確認することが可能であり、除核率、融合率および胚盤胞期胚への発生率がいずれも他の処理区より高い値であった(Table 1)。

次に、ドナー細胞と除核細胞質との細胞融合を電気刺激で行った。電気刺激用として0.5 mm幅の平行ワイヤー電極チャンバーを用い、チャンバーを100 μM Ca^{2+} および Mg^{2+} を含む0.32 Osm/kgのマニトール(M0.32)液で満たし、電極間の中央に核移植胚を静置し、電気刺激した。ドナー細胞には新鮮な卵丘細胞を用いた。電圧(Table 2)、電圧幅(Table 3)および回数(Table 4)の条件を調べた結果、400 V/mm、100 μsec の電気パルスを1回付加する条件で最も融合率が高く、活性化が誘起されない条件であることがわかった。

続いて、核移植胚における活性化条件を調べた。その結果、採卵後活性処理を施す時期が過剰排卵処置後22時間で最適であることがわかった(Table 5)。また、電気刺激を付加した後2 mM 6-ジメチルアミノプリン(6-DMAP)とシクロヘキシミド(CHX) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で1時間処理する条件で、高い発生率がえられた(Fig.2)。電気的な活性化処理の条件として、M0.32液内で150 V/mm、100 μsec の電気パルスを8分間隔で4回連続付加することで、核移植胚発生率が高い傾向であった(Table 6)。さらに、電気的な活性化処理に用いる溶液として、低浸透圧(0.17 Osm/kg)のグルコース液を用いることで高い発生率が得られた(Table 7)。

次に、ドナー核の細胞由来による核移植胚の発生率を比較した。培養胎子繊維芽細胞培養していない顆粒層細胞、培養条件の異なる2種類の培養顆粒層細胞、培養していない卵丘細胞および培養卵丘細胞の核をドナーとして核移植し、胚盤胞期までの体外発生能を比較した(Table 8)。その結果、融合率に差が見られたものの、胚盤胞期までの発生率にドナー細胞の種類による影響は認められなかった。また、核移植胚の発生は、生体内由来受精卵の体外発生と比較するとほぼ同様の発生パターンを示し、核移植由来胚盤胞期胚は形態的に受精卵由来ものと同等

であった (Fig.3)。

よって、採卵時に得られ、取り扱いが容易であり、培養による異常を考慮しなくて良い卵丘細胞・顆粒層細胞の核をドナーとして実験に用いることとした。

第2章 胚移植時期の同期化

体外操作した胚を仮親へ移植する場合、仮親の母体組織の発達時期に胚自身の発生時期を同期化することが重要である。一般に、体外操作した胚は生体内での胚に比べ、胚自身の発生速度が遅れることが知られている。このような場合、胚の体外操作時期を制御することで、仮親の組織発達時期と胚の発生時期を同期化することが可能であると考えられる。ウサギの妊娠では、妊娠 6 日目の早い時期に子宮に着床部位が形成され、妊娠 7.5 日目で着床が開始される。そこで本章では、体外培養した核移植胚に適した胚移植時期の決定を行った。

まず、最初に体外培養により胚発生がどの程度遅延するのかを調べる目的で、核移植胚と交配後 16 時間目に採卵した受精胚を 96 時間体外培養した。培養後、胚の直径および細胞数を計測し、両者間および交配後 4 日目に採取した受精胚と比較した (Table 9)。その結果、交配後 4 日目に採取した胚に比べ、体外培養した胚では直径および細胞数共に約 4 倍の差が生じることがわかり、体外培養により胚の発生が著しく遅延することが明らかになった。

そこで、胚移植後、体外操作した核移植胚が受精胚と同等の細胞数になる時期について解析した。核移植胚と体外培養した受精胚を体外培養 1 日目に胚移植した。その後、胚移植後 4 日目および 6 日目に胚を回収し、移植した胚の細胞数を計測した。その結果、胚移植後 4 日目において、核移植胚と体外培養した受精胚の細胞数は、交配後 4 日目に採取した胚の細胞数に達していなかった (Fig.4)。一方、胚移植後 6 日目では、核移植胚および体外培養した受精胚いずれも交配後 4 日目に採取した胚より細胞数が増加し、体内培養 5 日目で同等の細胞数になることが示された。また、移植した胚の形態も交配後 4 日目に採取した胚と同様であった (Fig 5)。

以上ことから、核移植胚の体外操作開始時期を仮親の準備開始時期より 1 日速めることで、胚移植時期を同期化することができることが示された。

第3章 体細胞クローン胎子の作出

前章までの結果で、ウサギ体細胞核移植法について、核移植胚の作出条件を調べ、電気融合条件、活性化法および仮親への胚移植スケジュールの同期化法を確立した。そこで本章では、作出した核移植胚を仮親に胚移植し、体細胞クローン個体の作出を行った。

核移植胚を体外培養 18 時間目で 2 細胞期の胚と 4 細胞期の胚、および 24 時間目で 4 細胞期胚の 3 種類を、偽妊娠誘起した仮親に胚移植した。偽妊娠の誘起を第 2 章の結果に基づき、仮親の妊娠時期と移植胚の発生時期を同期化するため、体外操作開始時期より 1 日後に行った。胚移植は、両側卵管にそれぞれ約 5~20 個ずつの胚を注入することで行った。胚移植後 11 日目に、子宮より受胎産物を摘出した。それらを正常胎子、発生遅延胎子、異常胎子等に分類した (Fig.6)。その結果、体外培養 18 時間目の 4 細胞期胚の胚移植を行うことで着床率に高い傾向が認められ (Table11)、2 例ではあるが、妊娠 11 日目に核移植胚由来の胎子が得られた (Fig 7)。以上、確立した SCNT 技術で作製した核移植胚から生存胎子を作成することに成功した。

第4章 核移植胚の発生能・遺伝子発現の解析

前章までの結果で、作出した核移植胚を胚移植することにより胎子を得ることに成功した。しかしながら、作出効率は極めて低いものであった。マウスでは、ドナー細胞の種類が着床期以降の胚発生に影響を与え、さらに核移植胚に遺伝子発現異常があることが報告されている。これらのことは、核移植胚作出方法や核移植胚の体外培養条件によってその後の遺伝子発現に影響を受けることを示唆している。そこで本章では、同一細胞を異なる培養系で誘導し 2 種類の細胞を作製し、それぞれをドナー細胞核として核移植を行い、得られた核移植胚の体外発生と発現遺伝子の相違を調べ、ドナー細胞の培養系がどのように核移植胚の発生に影響を及ぼすかを解析した。

胞状卵胞より採取した顆粒層細胞を hCG (10 IU/mL) 添加した区 [培養顆粒層細胞(+)] あるいは非添加区 [培養顆粒層細胞(-)] の 2 区を設け、84 時間体外培養した。得られた 3 区の細胞をドナー細胞核として核移植した。体外培養後 96 時間目に得られた胚盤胞期胚の遺伝子発現解析を定量的 RT-PCR で行った。

培養顆粒層細胞 (+) では、培養経過と共に *p450scc* 発現量とプロジェステロン分泌量が増加したが、培養顆粒層細胞 (-) では減少した (Fig 8)。これらの細胞

を用いて核移植を行った結果、胚盤胞期への発生率とその細胞数に差は認められなかった (Table 11)。得られた胚盤胞期胚において、初期発生に関わる遺伝子発現を解析した (Fig.9)。 *oct3/4* の発現が全ての胚において検出された。*bmp4* は受精胚で発現していたが、培養顆粒層細胞(-)と培養顆粒層細胞(+)由来核移植胚では発現していなかった。また、*gata4* は培養顆粒層細胞(-)由来核移植胚で発現していたが、培養顆粒層細胞(+)由来のものでは発現していなかった。これに対し、*fgfr2* は培養顆粒層細胞(+)由来核移植胚で発現していたが、培養顆粒層細胞(-)由来のものでは発現していなかった。これらの結果、両者の培養細胞由来核移植胚における遺伝子発現に明らかな相違が認められた。

以上の結果、同一細胞由来であっても、異なる条件の体外培養系を経た細胞をドナー細胞核として核移植を行うと、得られた核移植胚における遺伝子発現パターンが変化することが示された。したがって、核移植胚作出にともなうドナー細胞の培養・維持が、体細胞クローン個体作出効率を低下させる原因の一つである可能性が推察された。

総 括

本研究では、体細胞核移植由来ウサギを作出することを目的として、体細胞核移植胚の作出条件を確立し、胚移植を行った。その結果、以下の成果が得られた。

1. ウサギ体細胞核移植胚作出のための以下の条件を確立した。
 - ・ 除核の確認法：Pol-Scope
 - ・ 細胞融合条件：400 V/mm, 100 μ sec, 1 回
 - ・ 活性化条件：過剰排卵誘起後 22 時間で付加
150 V/mm, 100 μ sec, 4 回, 8 分間隔
低浸透圧グルコース液
電気刺激後, 6-DMAP/CHX 処理 1 時間
2. 胚移植の同期化として、体外操作時期を 1 日早める。
3. 体外培養 18 時間で 4 細胞期核移植胚を胚移植した結果、妊娠 11 日目で、体細胞クローン個体が得られた。
4. 同じ由来の細胞でも、異なる条件で体外培養することで、作出した胚盤胞期胚における遺伝子発現パターンが影響を受ける。

本研究の成果は、核移植胚の発生速度と着床能に相関があること、体細胞核移植におけるドナー細胞培養系がその後の遺伝子発現に影響を与えることをはじめて明らかにしたものと評価できる。本研究で得られた知見は、ウサギ体細胞核移植技術ならびに遺伝子相同組換えウサギ作出のための今後の研究に大きく貢献するものであると確信する。

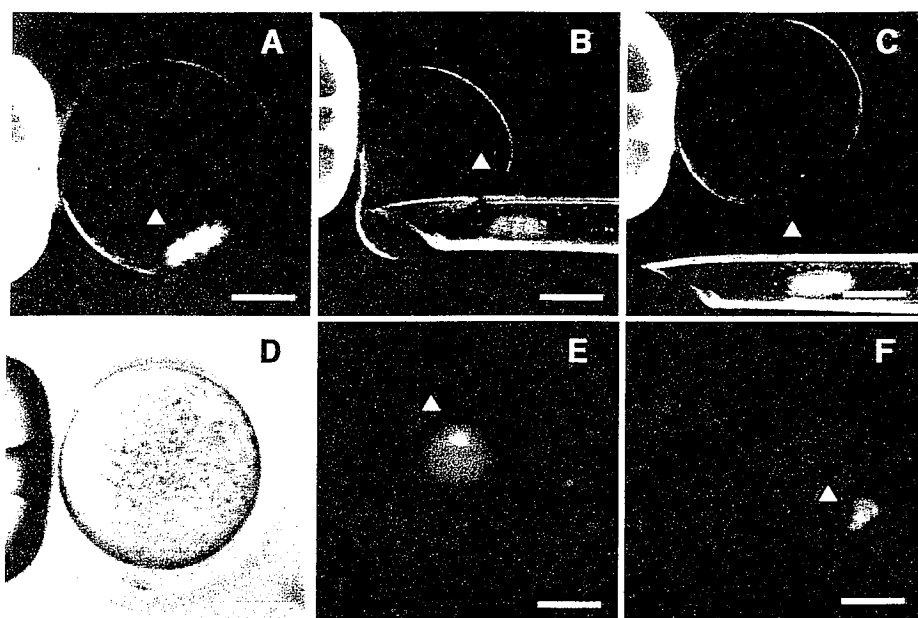


Fig. 1. Spindles (arrowhead) in rabbit metaphase II oocytes at enucleation. (A-C) Spindle imaging using Pol-Scope, (D) Oocyte under HMC, (E) Spindle imaging of a karyoplast labeled with Hoechst 33342 and (F) Spindle imaging of a cytoplasm labeled with Hoechst 33342. Bar = 25 μ m.

Table 1. Effect of spindle imaging of rabbit MII oocytes on subsequent development of SCNT embryos

Method	No. of eggs examined	No. (%) of eggs enucleated	No. (%) of eggs fused	No. (%) of eggs cleaved	No. (%) of blastocysts
Pol-Scope	30	30 (100)	23 (76.6)	18 (78.3) ^a	5 (21.8) ^a
Karyoplast-UV	19	15 (78.9)	12 (80.0)	9 (75.0) ^a	1 (8.3) ^b
Cytoplasm-UV	20	20 (100)	10 (50.0)	2 (20.0) ^b	0 (0.0) ^b

Pol-Scope: Spindle imaging in oocytes using Pol-Scope, Karyoplast-UV: Spindle imaging in karyoplasts labeled with Hoechst 33342, Cytoplasm-UV: Spindle imaging in cytoplasts labeled with Hoechst 33342. *Percentage of the enucleated oocytes. **Percentage of the fused oocytes. ^{a, b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2. Effect of voltage amplitude of pulse on fusion of enucleated oocytes with cumulus cells

Voltage amplitude (V/mm)	No. of eggs examined	No. (%) of eggs fused
200	20	6 (30.0) ^a
300	30	18 (60.0) ^b
400	30	21 (70.0) ^b
500	30	3 (10.0) ^{a, c}
600	30	0 (0.0) ^c

^{a, b, c} Values with different superscripts in the column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 3. Effect of pulse duration on the fusion of enucleated oocytes with cumulus cells

Pulse duration (μ sec)	No. of eggs examined	No. (%) of eggs fused
25	16	1 (6.3) ^a
50	24	9 (37.5) ^b
100	23	15 (65.2) ^b
200	18	2 (11.1) ^a

^{a, b} Values with different superscripts in the column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 4. Effect of number of pulses on the fusion of enucleated oocytes with cumulus cells

Number of pulses	No. of eggs examined	No. (%) of eggs fused
1	24	19 (79.2) ^a
2	23	9 (39.1) ^b
3	23	0 (0.0)

^{a, b} Values with different superscripts in the column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 5. Effect of post-superovulation duration on parthenogenetic activation

Time of activation (h post SOV)	No. of eggs examined	No. (%) of eggs cleaved	No. (%) of blastocysts
20	19	15 (75)	6 (30) ^b
22	25	21 (84)	17 (68) ^a
24	23	18 (78)	12 (52) ^{ab}

^{a, b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

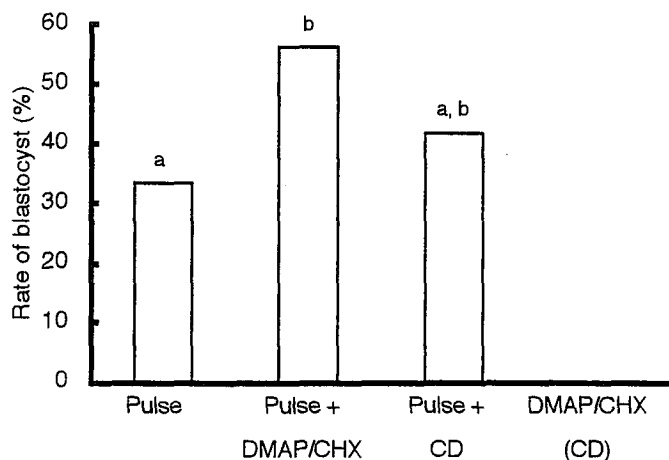


Fig. 2. Effect of treatment after electric activation on subsequent development of SCNT embryos. DMAP; 6-dimethylaminopurine, CHX; cycloheximide, CD; cytochalasin D. ^{a, b} Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Table 6. Effect of electric activation treatment on subsequent development of SCNT embryos

Treatment	No. of eggs examined	No. (%) of eggs fused	No. (%) of eggs cleaved	No. (%) of blastocysts
100V/40sec/3	24	23 (95.8)	13 (56.5)	6 (23.1)
150V/8min/4	23	21 (91.3)	16 (76.2)	8 (38.1)

*Percentage of the fused oocytes.

Table 7. Effect of activation solution on subsequent development of SCNT embryos

Solution	Osmolarity (Osm/kg)	No. of eggs examined	No. (%) of eggs fused	No. (%) of eggs cleaved	No. (%) of blastocysts
Mannitol	0.32	12	9 (75.0)	6 (66.7)	2 (22.2)
Mannitol	0.17	21	18 (85.7)	11 (61.1)	7 (38.8)
Glucose	0.32	14	12 (85.7)	7 (58.3)	2 (16.7)
Glucose	0.17	15	13 (97.4)	10 (76.9)	6 (46.2)

*Percentage of the fused oocytes.

Table 8. Effect of type of donor cells on subsequent development of SCNT embryos

Type of donor cells	No. of eggs examined	No. (%) of eggs fused	No. (%) of eggs cleaved
Cultured Fetal fibroblast cell	20	18 (90.0) ^a	15 (83.3)
Fresh granulosa cell	24	21 (87.5) ^a	12 (57.1)
Cultured granulosa cell (-)	23	20 (87.0) ^a	13 (65.0)
Cultured granulosa cell (+)	32	15 (46.9) ^b	10 (66.6)
Fresh cumulus cell	20	16 (80.0) ^a	12 (75.0)
Cultured cumulus cell	30	26 (86.7) ^a	16 (61.5)

*Percentage of the fused oocytes.

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05).

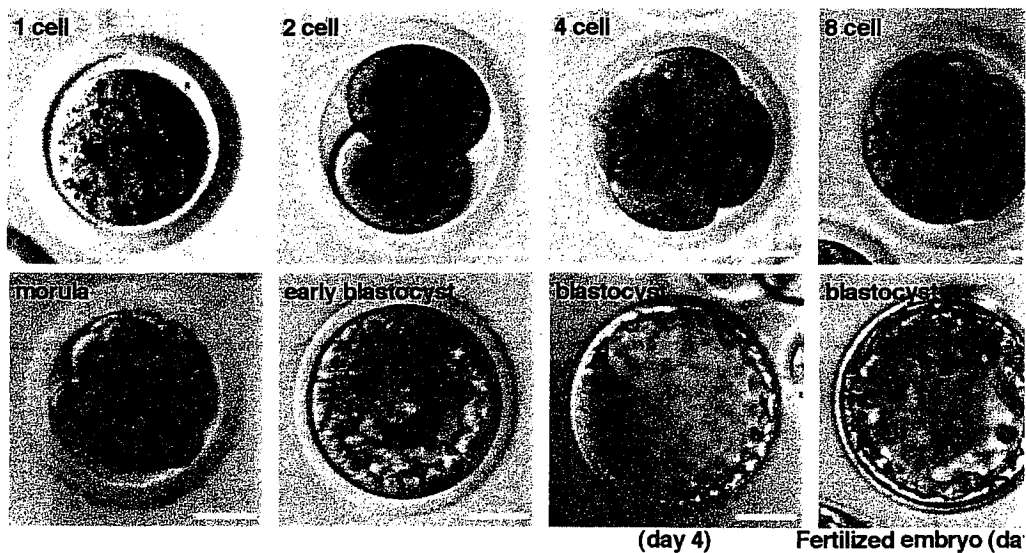


Fig. 3. *In vitro* development of rabbit SCNT embryos. Bar = 25 μ m.

Table 9. Diameter and number of cells in three kinds of embryos 4 day after *in vitro* culture

Origin	No. of eggs examined	Diameter Mean \pm SEM.	No. of cells Mean \pm SEM.(n=6)
SCNT	10	141 \pm 10 ^a	150 \pm 83 ^b
FE-vitro	22	173 \pm 8 ^a	215 \pm 47 ^b
FE-vivo	18	678 \pm 134 ^a	821 \pm 326 ^b

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05).

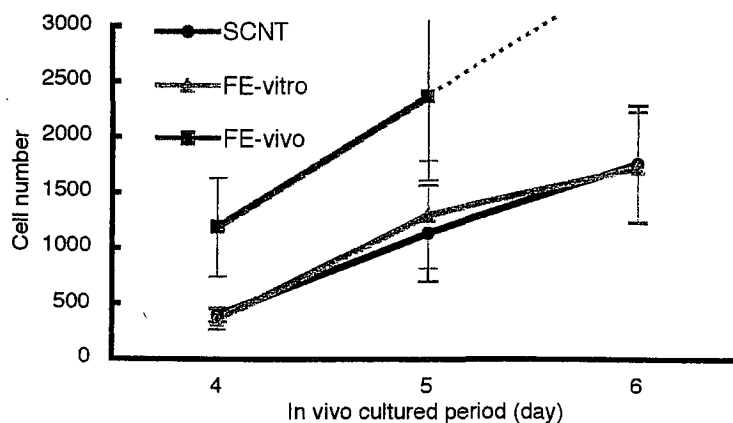


Fig. 4. Number of cells in three kinds of embryos transferred to foster mothers.

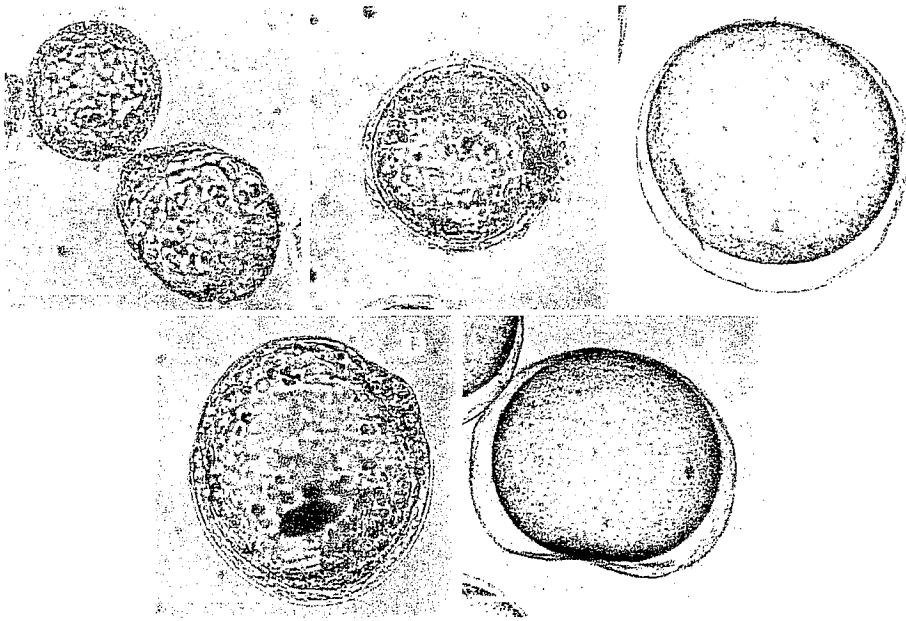


Fig. 5. Photomicrographs of rabbit embryos. (A) SCNT embryos 4 day after *in vitro* culture, (B) Fertilized embryos 4 day after *in vitro* culture, (C) Fertilized embryos 4 day after *in vivo* culture, (D) SCNT embryos 4 day after transfer to oviducts, and (E) SCNT embryos 6 day after transfer to oviducts. Bar = 100 μ m.

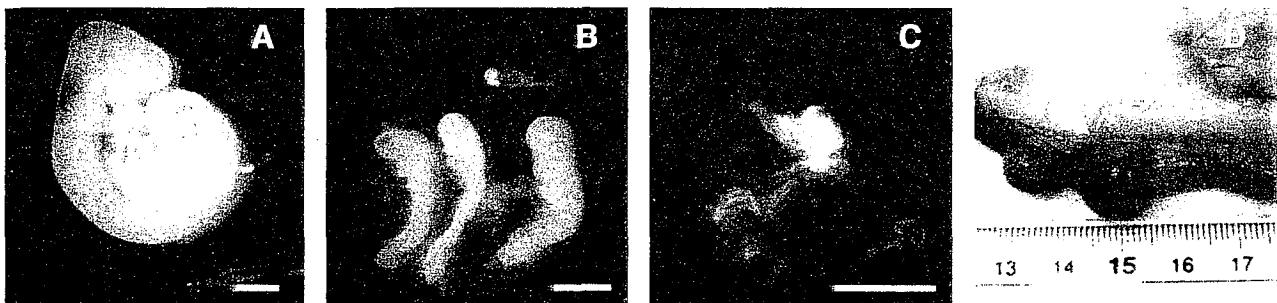


Fig. 6. Types of rabbit conceptuses at day 11 of pregnancy. (A) Class A: the conceptuses are smaller than those derived from fertilized eggs, (B) Class B: the conceptuses display obvious alterations, such as abnormal cephalocaudal, (C) Class C: only placenta, and (D) Class D: degenerated implanting sites. The arrowhead is the distinctive implanting site at day 11 of pregnancy. Bar = 0.5 mm.

Table 10. Results of embryos transfer at day 11 of pregnancy in SCNT embryos

Stage at embryo transfer	No. of eggs transferred	No. of recipient used	No. (%) of implantation sites	Class of conceptuses*			
				A	B	C	D
2cell at 18h	86	7	0 (0.0)	0	0	0	8 ^{ab}
4cell at 18h	93	7	4 (4.3)	0	2	2	15 ^a
4cell at 24h	98	6	1 (1.0)	0	0	1	6 ^b

* The classification is referred to Fig. 6.

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

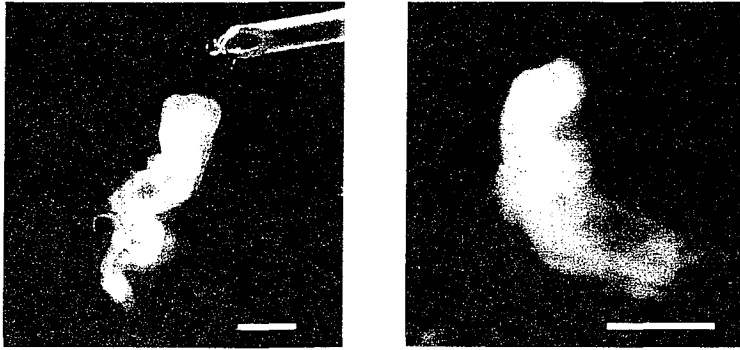


Fig. 7. Fetuses obtained on day 11 of pregnancy after nuclear transfer of SCNT embryos with cumulus cells. These fetuses were classified as class B. Bar = 0.5 mm.

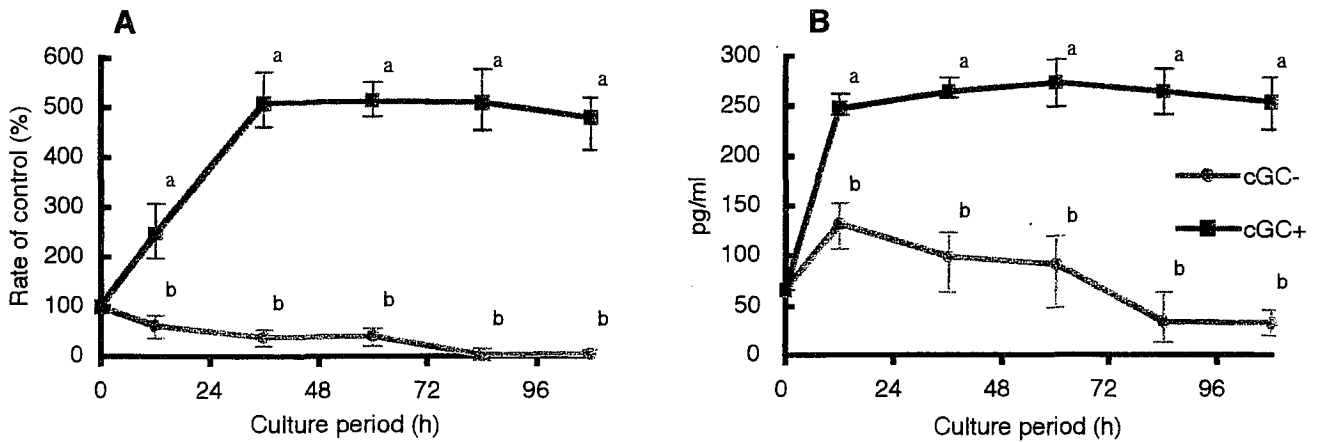


Fig. 8. Change of p450scc expression and progesterone secretion levels in cultured granulose cells (-) [cGC-] and cultured granulose cells (+) [cGC+]. (A) P450scc mRNA expression levels in cGC- and cGC+. Data are normalized relative to the values of gene expressions in fresh granulose cells. (B) The progesterone levels in the culture medium of cGC- and cGC+. Values without common characters are significantly different from each other at the same time ($p < 0.05$).

Table 11. Effect of *in vitro* culture condition of donor cells on subsequent development of SCNT embryos

Culture condition	No. of eggs examined	No. (%) of eggs fused	No. (%)*of eggs cleaved	No. (%)*of blastocysts	No. of cells Mean \pm SEM (n)
Fresh granulosa cells	54	51 (94.4) ^a	35 (68.6)	14 (27.5)	161 \pm 62 (4)
Cultured granulosa cells (-)	60	56 (93.3) ^a	40 (71.4)	17 (30.4)	178 \pm 53 (5)
Cultured granulosa cells (+)	76	38 (50.0) ^b	28 (73.7)	14 (36.8)	164 \pm 41 (4)
Fertilized embryos	-	-	-	-	182 \pm 39 (6)

^{a, b}Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

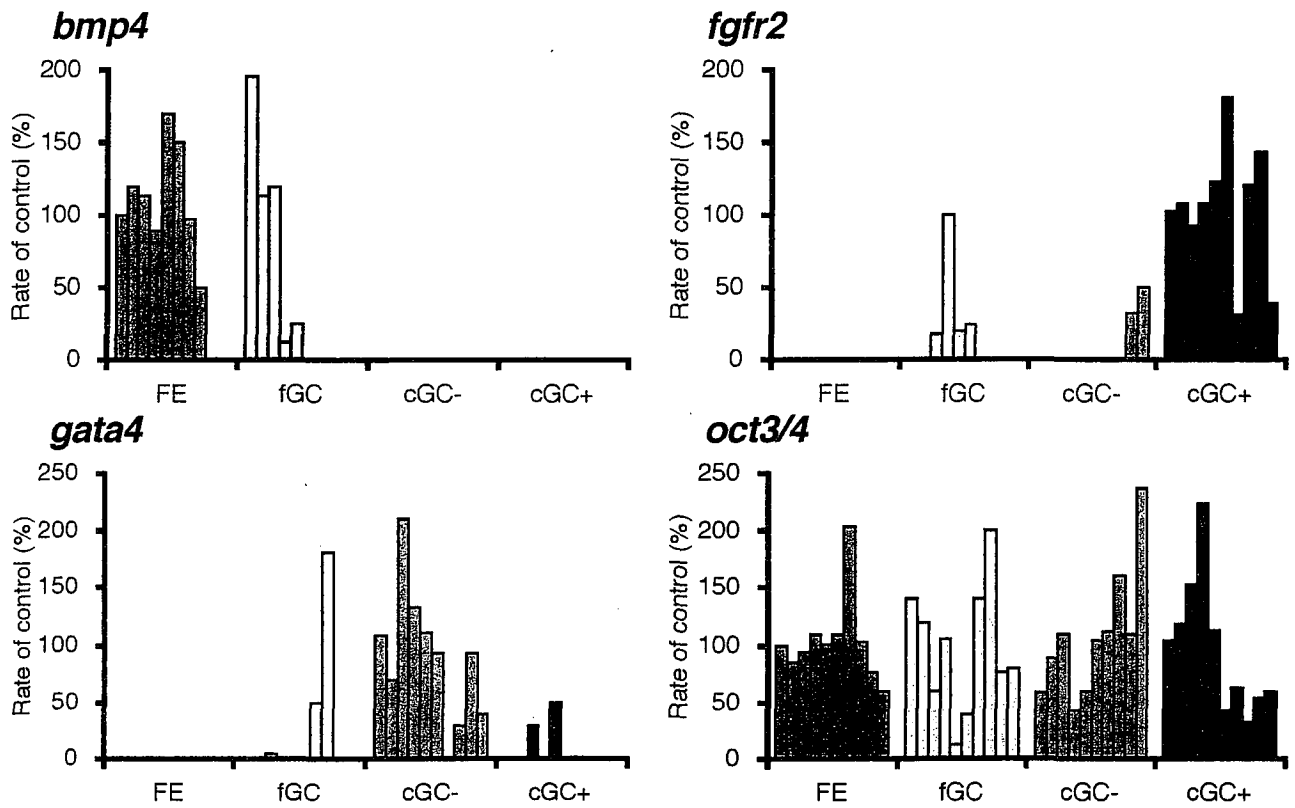


Fig. 9. Gene expressions in different kinds of blastocysts. FE: *in vivo* fertilized embryos (n=10), fGC: SCNT embryos derived from fresh granulose cells (n=10), cGC-: SCNT embryos derived from cultured granulose cells (-), cGC+: SCNT embryos derived from cultured granulose cells (+). Data are normalized relative to the corresponding value of each gene expression in FE.

原著論文

1. Fukashi Inoue, Junichi Matsuda, Katsuhiko Ohkoshi, Tadashi Furusawa, Seiya Takahashi, Hiroshi Sasada, Eimei Sato and Tomoyuki Tokunaga. Differences in gene expression patterns in somatic cell nuclear transfer embryos derived from rabbit granulosa cells treated in vitro with hCG. *Cloning and Stem cells*, 2004 (投稿中).
2. Fukashi Inoue, Junichi Matsuda, Katsuhiko Ohkoshi, Tadashi Furusawa, Seiya Takahashi, Hiroshi Sasada, Eimei Sato and Tomoyuki Tokunaga. Timing of the cleavage affects the implantation potency of rabbit embryos. *Cloning and Stem Cells*. 2004 (投稿準備中).

参考論文

1. 徳永智之、大越勝広、本田紅里穂、井上玄志、古澤軌。マウス ES 細胞の扱い方と分化機構解明の新しいアプローチ、*Organ Biology* 10: 181-187, 2003
2. Misa Hosoe, Tadashi Furusawa, Fukashi Inoue, Miki Sakatani, Tomoyuki Tokunaga, Richard. M. Schultz and Masashi Takahashi. Specific inhibition of transient and stable EGFP gene expression by double stranded RNA interference in mouse preimplantation embryos. *J. Mamm. Ova Res. Vol. 20*, 99-105, 2003
3. H. Miyazaki, M. Imai, T. Hirayama, S. Saburi, M. Tanaka, M. Maruyama, C. Matsuo, H. Meguro, K. Nishibashi, F. Inoue, J. Djiane, A. Gertler, S. Tachi, K. Imakawa and C. Tachi. Establishment of feeder-independent cloned caprine trophoblast cell line which expresses placental lactogen and interferon tau. *Placenta Vol. 23*, 613-630, 2002
4. Fukashi Inoue, Kurato Takanashi, Tae Noguchi, Mayu Hayashi, Eimei Sato and Chikashi Tachi. Analysis of the telomere shortening in the cloned caprine cultured cell line, CPF-1, derived from placenta of Shiba goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Dev. Vol. 48*, 469-476, 2002

論文審査結果要旨

ウサギは、世界で初めて胚移植に成功した動物であり、実験モデルとしての歴史が古く、情報量が豊富にある。さらに中型動物であることから SPF 化が容易である。そのため多種類の組換え蛋白質を生産させる動物として期待されている。しかしながら、ウサギにおいて胚性幹細胞は樹立されておらず、体細胞核移植 (SCNT) 技術による個体作出は同一グループによる 2 例の報告があるに過ぎない。したがって、SCNT 技術を利用した遺伝子相同組換えウサギ作出の報告はない。以上の背景の下、本研究はウサギにおける体細胞クローン個体作出を目的として、ウサギ SCNT 技術開発に必要な諸要因について解析し、次の成果を得た。

(1) SCNT 技術により核移植胚を作出するための諸条件を確立した。(2) 体外培養した核移植胚に適した胚移植時期の決定を行い、仮親の準備開始時期を核移植胚の体外操作開始時期から 1 日遅らせることで、胚移植時期を同期化することができることを明らかにした。(3) 作出した核移植胚を仮親に胚移植し、体細胞クローン個体の作出を行い、2 例ではあるが、妊娠 11 日目に核移植由来の胎子が得られた。(4) 同一細胞を異なる培養系で誘導し 2 種類の細胞を作製し、それぞれをドナー細胞核として核移植を行い、得られた核移植胚の体外発生と発現遺伝子の相違を調べ、ドナー細胞の培養系がどのように核移植胚の発生に影響を及ぼすかを解析し、同一細胞由来であっても、異なる条件の体外培養系を経た細胞をドナー細胞核として核移植を行うと、得られた核移植胚における遺伝子発現パターンが変化することを明らかにした。

本研究の成果は、核移植胚の発生速度と着床能に相関があること、SCNT におけるドナー細胞培養系がその後の遺伝子発現に影響を与えることをはじめ明らかにしたものであり、応用動物科学において高く評価できる。よって博士 (農学) の学位を授与できるものと判定した。