

氏 名(本籍)	やま 山	なか 中	けん 賢	いち 一
学位の種類	博 士 ( 農 学 )			
学位記番号	農 博 第 9 0 6 号			
学位授与年月日	平 成 19 年 3 月 27 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	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	生育性の高いミニブタ体細胞クローン胚作出系の確立			
論文審査委員	(主 査)	教 授	佐 藤 英 明	
	(副 査)	教 授	内 田 隆 史	
		助教授	尾 定 誠	
		助教授	佐々田 比呂志	

# 論文内容要旨

## 緒言

1997年、ヒツジの乳腺細胞由来の産子が得られたことが報告されて以来、体細胞をドナー核としたクローン技術が急速に進展し、様々な哺乳動物において体細胞クローン個体が作出された。この体細胞クローン技術の利点は、体細胞の核をドナー核として利用できるため遺伝的構成が同じ個体を多数作ることができるという点である。遺伝的な伝達率が高い乳量や肉質の能力の高い家畜を増産し、畜産物の生産性を高めることに大きく貢献できるものと考えられる。さらに、遺伝子操作を行った細胞で核移植を行えば、疾患モデル動物やヒトに有用な蛋白質を乳汁、尿または血液中に作り出す遺伝子改変動物の作出が可能である。実際、ウシでカゼイン蛋白質を乳中に作り出す遺伝子改変クローン個体が作出され、ごく最近では、遺伝子改変クローンヤギが生産した抗血液凝固作用を示すアンチトロンビンⅢがEUにおいて商業的に認可され、遺伝子改変動物の動物工場としての利用が現実のものになりつつある。ブタは、ヒトと生理および解剖学的に近似しているという性質を持っており、遺伝子改変により拒絶反応を軽減させた遺伝子改変クローンブタの臓器移植医療への利用に加え、実験動物としての利用が注目されている。このように、体細胞クローン技術は畜産分野のみならず医学・薬学分野においても大きく貢献できるものと考えられる。しかしながら、体細胞クローン個体の作出効率は動物種に関わらず極めて低く、ブタでは仮親へ移植したクローン胚のうち産子が得られる確率は1~5%程度である。この低い生産性は実用化における大きな障害であり、効率的な体細胞クローン個体の作出技術の確立が求められている。

体細胞クローン技術は核移植操作単独の技術ではなく、卵母細胞の成熟培養、ドナー細胞の調整、核移植、活性化処理、胚の発生培養、仮親の発情同期化、胚移植および妊娠母体の管理から分娩までの一連の過程からなる総合的な技術である。したがって、クローン個体作出に関わる技術の一つ一つを確立することが、効率的なクローン産子獲得、さらには遺伝子改変動物を用いた構想の実現に必要なものである。ブタの場合、産子を得るための基盤となる体外生殖技術の確立がマウスやウシなど他の動物種と比べ遅れている。加えて、ブタは多胎であり、母体の妊娠認識に受胎産物側からのエストロジェンの分泌が重要であり、妊娠12日目までに4頭以上の受胎産物が存在していなければ流産するという特徴を持っている。このため、ブタでは通常受精卵移植によって産子を得る場合、他の産業動物よりも多数の良質な胚を用意する必要がある。発生能力の低いクローン胚から産子を得るためには、より多数のクローン胚を用意する必要がある(図1)が、一度に作製できるクローン胚の数には限界がある。したがって、受精卵に近く生育性の高いクローン胚を作出することが効率的なブタクローン個体作出には不可欠である。

そこで、本研究ではブタよりも臓器サイズがヒトに近く、省スペースでの飼育が可能であることから、実験動物として注目されているミニブタの体細胞を用いて、ミニブタクローン個体作出効率の改善を目的とし、高い発生能を持つクローン胚の作出系の確立を行った。

## 1. アクチンフィラメントを指標としたミニブタクローン胚の活性化法の最適化

クローン胚の発生開始のためには受精により引き起こされる活性化刺激に似た人為的な刺激を与えることが不可欠である。クローン胚に付加される人為的な活性化刺激としては主に電気刺激が用いられているが、細胞膜直下に存在するアクチンフィラメント分布の異常を引き起こすことが報告されている。電気刺激以外の活性化法としては、卵子内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させるイオノマイシンの培地中への添加処理およびMPFのサブユニットであるサイクリンBの合成を阻害することでMPF活性を低下させる蛋白質合成阻害剤、シクロヘキシミドの培地中への添加処理が報告されている。そこで本実験では、異常卵割を抑制するために、アクチンフィラメントを指標として活性化法の最適化を検索し、発生能の高いミニブタクローン胚の作出することを目的とした。

### 1. 1. 活性化法がブタ成熟卵子の活性化および体外発生に及ぼす影響

単一処理区としてイオノマイシン区(I;15  $\mu\text{M}$ , 20分間)、電気刺激区(E;1.2 kV/cm, 60  $\mu$ 秒間, 5秒間間隔, 2回)、シクロヘキシミド区(C;5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )および複合処理区としてI+E、I+C、E+CおよびI+E+C区を設け、ブタ成熟卵子を活性化した。活性化後8時間で卵子を固定染色し、前核の形成を指標として卵子の活性化率を調べた。その結果、複合処理区において単一処理区と比較して有意に高い活性化率であった(表1)。複合処理区間においては活性化率に有意な差は認められなかった。

次に体外発生能に及ぼす影響を調べるため、同様の処理区で活性化後、単為発生胚を体外培養した。発生培養後2日に分割率、7日に胚盤胞期への発生率を算出した。さらに、得られた胚盤胞期胚を固定染色し、細胞数を測定した。その結果、2細胞期および胚盤胞期への発生率は単一処理区と比較して複合処理区で有意に高かった。さらに、活性化率では有意な差が見られなかった複合処理区間においても胚盤胞期への発生率は、I+C区が36%(88/244)で他の処理区と比較し有意に高かった(表2)。

### 1. 2. 活性化法がクローン胚の体外発生に及ぼす影響

前節の結果で最も発生率の高かったI+C区および活性化率が最も高かったI+E+C区およびクローン胚の活性化法として一般的に用いられているE区の3つの区を設け、活性化後のクローン胚の体外発生率を調べた。その結果、I+C区において胚盤胞期への発生率が14%(11/98)で他の区と比較して有意に高かった(表3)。

### 1. 3. 活性化法がクローン胚のアクチンフィラメントの分布に及ぼす影響

活性化法の違いが卵子表層のアクチンフィラメント分布にどのように影響するのか調べるために、体外受精胚およびE、I+CあるいはI+E+Cで活性化したクローン胚をローダミン/ファロイジン染色し、アクチンフィラメント分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。アクチンフィラメントの分布は連続、不連続および散在型の3つに分類され(図2)、連続型を正常な分布としてその割合を調べた。その結果、EおよびI+E+C区において正常なアクチンフィラメント分布を示す割合が他の区と比較し有意に低かった。一方、I+C区では、正常な

アクチンフィラメントの分布を示した割合が体外受精胚と同等であった(図3)。

#### 1. 4. 活性化法が異常分割クローン胚の出現率に及ぼす影響

活性化法と異常卵割との関係を調べるために、I+CおよびI+E+C区のクローン胚を培養後2日でHoechst染色し異常卵割の割合を調べた(図4)。その結果、I+E+C区において有意に高い結果であった(表4)。

以上の結果、ミニブタクローン胚では、電気刺激は卵子表層のアクチンフィラメント分布の異常、さらには培養過程での胚の異常分割を引き起こす一要因であり、その後の発生率を低下させることが示唆された。したがって、ミニブタクローン胚の活性化法として化学的な活性化処理のみで行うことが有効であり、本研究で決定したイオノマイシンとシクロヘキシミドの複合処理を用いることで発生能の高いクローン胚を作出できることが明らかとなった。

#### 2. 胚移植によるミニブタクローン個体の作出

前章で決定した活性化法を用いて作製したクローン胚を胚移植することにより、クローン個体の作出を試みた。ブタでは、初期胚の損耗および妊娠中の胎子の損失が特徴的であり、妊娠50日目までに約40%の胚が死亡する。そこで、最適化した活性化法に加え、ミニブタへの胚移植のために当研究室において独自に確立された方法を用いることにより胚移植を行った。すなわち、前章で確立したクローン胚の活性化法、仮親であるミニブタのために独自に確立した発情同期化法および妊娠初期での流産を防ぐため単為発生胚をクローン胚とともに仮親へ共移植する方法を組み合わせることで行った。妊娠の有無は発情周期の回帰を指標とするノンリターン法と超音波診断により判定した。その結果、計1,558個のクローン胚を10頭の仮親に移植した結果、7頭が妊娠し、1頭の正常な産子を得た(表5および図5)。マイクロサテライト解析の結果、得られた産子がクローン個体であることが証明された。

本章の結果から、1章で確立した活性化法により作製されたクローン胚が個体まで発生する能力を有していることが示された。

#### 3. 高い発生能を持つクローン胚作出系の確立

前章までの実験で最適化した活性化法により作製したクローン胚から体細胞でクローンミニブタ個体の作出に成功したが、その作出効率は0.1%と低く、これまでの報告でもクローンブタの作出効率は他のクローン個体が得られている動物種と比較して低い。品質の高いクローン胚を生産できる体外培養系の確立はクローン産子を効率的に得るためにも重要な要因の一つである。そこで本章では、体外発生培養条件の検索を行ったうえで、ヒストンのアセチル化レベルに焦点をあて、クローン胚のクロマチン構造の修飾を人為的に誘起

することによりクローン胚の発生能を向上させることを目的とした。

### 3.1. 体外発生培地の比較

ブタでは、これまで体外培養系の確立が不完全なため、体外受精後外科的に仮親の卵管へ移植することが一般である。最近、ブタ体外発生培地として卵管液の組成を基にPZM(Porcine Zygote Medium)が開発された。PZM5で体外培養されて得られた胚盤胞期胚を非外科的に子宮へ移植することで効率的に産子が得られることが示され、品質の高い胚を生産することができる発生培地であることが証明された。そこで、本節ではより品質の高いクローン胚を生産することを目的とし、体外発生培地がクローン胚の体外発生および胚盤胞期胚の品質に及ぼす影響を調べた。さらに、胚の代謝様式が発生ステージによって異なることから、二段階でクローン胚を培養し、胚の発生率および品質を向上させる可能性を追求した。さらに、最も効果的であった培養区で得られた胚盤胞期のクローン胚の品質についてTUNEL法でアポトーシス陽性細胞の割合を算出し、体外受精胚と比較した。

#### 3.1.1. 培養培地が単為発生およびクローン胚の体外発生に及ぼす影響

NCSU23(N)、アミノ酸添加NCSU23(Naa)およびPZM5(P)で6日間培養した結果、単為発生胚では発生率で有意な差がみられなかったが、胚盤胞期胚の細胞数はNaaおよびP区がN区と比較し有意に高かった。一方、クローン胚では、発生率および胚盤胞期胚の細胞数とともにP区で他の区と比較し有意に高かった(表6)。

#### 3.1.2. 二段階培養が単為発生およびクローン胚の体外発生に及ぼす影響

前節の結果、クローン胚と単為発生胚とともにP区で発生率および細胞数が最も良かったことから、培養後4日までPで培養し、その後2日間N(P→N)、Naa(P→Naa)およびP(P→P)で培養し、計6日間の二段階培養を行った。その結果、単為発生胚では発生率で有意な差がみられなかったが、胚盤胞期胚の細胞数はP→Naa区がP→NおよびP→P区と比較し有意に高かった。一方、クローン胚では、各処理区間での発生率および胚盤胞期胚の細胞数に有意な差はみられなかった(表7)。

#### 3.1.3. 培養培地が胚盤胞期クローン胚の品質に及ぼす影響

前節までの結果から、クローン胚の体外培養にはPZM5が最も有効であることが示された。そこで、本節ではPZM5で体外培養を行い、胚盤胞期クローン胚のアポトーシス陽性細胞率をTUNEL法により測定した。その結果、体外受精胚およびクローン胚ともに培養培地によるアポトーシス陽性細胞率に変化は見られなかった(図6および表8)。

以上の結果、PZM5培地は体外受精胚同様に単為発生およびクローン胚の発生培養に有効であることが明らかになった。さらに、二段階培養によって単為発生胚では胚盤胞期胚の細胞数の有意な増加が見られたものの、クローン胚では胚盤胞期胚の品質の改善はみられず、体外受精や単為発生胚とは異なった性質を持っていることが示唆された。

### 3. 2. ドナー細胞およびクローン胚のヒストン H3 のアセチル化レベルがクローン胚の体外発生に及ぼす影響

体細胞クローン個体が作出されるには、ドナー細胞核の遺伝子発現パターンが体細胞型から初期胚型へ変換されるためのリプログラミングというエピジェネティックなゲノムの修飾が必要であるが、クローン胚では、初期胚型のパターンを獲得できずゲノム修飾の不完全性がみられることが報告されている。初期化についての詳細な機構はいまだ明らかにされていないが、リプログラミングに関わる主な調節機構として、DNA メチル化とヒストンの化学修飾が知られている。最近、マウスの TS 細胞をメチル化酵素阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (TSA) で処理することにより、未分化マーカーのひとつである Oct-4 の発現が誘起されることや ES 細胞を TSA で処理することにより ES 細胞の分化をブロックすることが報告されている。そこで、本研究ではドナー細胞核およびクローン胚のヒストン H3 アセチル化レベルに注目し、それらを人為的に制御することで高い発生能を持ったクローン胚の作出系を確立することを目的とした。

#### 3. 2. 1. ドナー細胞のヒストンアセチル化レベルがクローン胚の体外発生に及ぼす影響

ドナー細胞のヒストン H3 のアセチル化レベルをフローサイトメトリーで測定し、ドナー細胞核のヒストン H3 アセチル化レベルとクローン胚の発生能との関連を調べた。異なる継代数の細胞 (5、10、15、20、25 および 30 代) を蛍光免疫染色し、フローサイトメーターによりヒストン H3 アセチル化レベルを測定した (図 7)。さらに、各継代数の細胞をドナー細胞として核移植を行い、クローン胚の体外発生能を比較した。その結果、継代 15 代目の細胞をドナー細胞として用いた場合、胚盤胞期への発生率が他の区と比較して有意に高かった (図 8)。一方、ヒストン H3 アセチル化レベルは継代を重ねるにつれて高くなり、30 代目の細胞で最も高かった。

#### 3. 2. 2. TSA 処理がクローン胚の体外発生能に及ぼす影響

TSA 処理がクローン胚の体外発生に及ぼす影響を調べるために、活性化開始から 0、5、10、15 または 20 時間 5 nM TSA を含む培地で培養した。その結果、TSA 処理によるクローン胚の胚盤胞形成率は、処理 15 時間区および 20 時間区で 0 時間区と比較し有意に高かった (表 9)。次に、TSA 処理濃度がクローン胚の体外発生に及ぼす影響を調べるために活性化開始から 0、5、50 および 500nM の濃度を含む PZM5 で 20 時間クローン胚を処理した。その結果、TSA 処理によるクローン胚の胚盤胞形成率は、5nM 区で 0nM 区と比較し有意に高かった (表 10)。さらに、TSA 処理時間におけるクローン胚の核の動態を調べるために、活性化後 0、5、10、15 および 20 時間でクローン胚の動態を観察した。その結果、クローン胚の核の動態は、活性化開始後 10 時間で前核形成率がプラトーに達し、その後 20 時間で分割卵へ移行しているものが多く観察された (図 9)。

#### 3. 2. 3. TSA 処理がクローン胚のヒストン H3 のアセチル化レベルに及ぼす影響

TSA 処理がクローン胚のヒストンアセチル化レベルに及ぼす影響を調べるため、発生培養

後 8 時間、2 細胞期および胚盤胞期の受精卵、クローン胚および TSA 処理クローン胚を固定・透過処理し、アセチル化ヒストン H3 を免疫蛍光染色した (図 10)。染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、蛍光強度によりヒストンのアセチル化レベルを解析した (図 11)。その結果、培養後 8 時間および 2 細胞期のヒストンのアセチル化レベルは無処理のクローン胚では受精卵と比較し低いレベルであったのに対し、TSA 処理クローン胚では受精卵と同等のレベルであった。一方、各区間における胚盤胞期でのヒストンのアセチル化レベルは 3 区間で有意な差はみられなかった (図 11)。

#### 3. 2. 4. TSA 処理が胚盤胞期胚の品質に及ぼす影響

TSA 処理クローン胚から得られた胚盤胞期胚の品質を総細胞数およびアポトーシス陽性細胞の割合を指標として体外受精胚と比較した結果、総細胞数は有意に低く、また、アポトーシス陽性細胞の割合は有意に高い結果であった (表 11)。

本章の結果より、前核形成率がプラトーに達した時期に TSA 処理した区でクローン胚の発生率が向上されたことから、前核期にクローン胚を TSA 処理することが有効であることが示唆された。また、TSA でクローン胚を処理することにより、分裂初期にあるクローン胚のヒストン H3 のアセチル化レベルが受精卵と同等のレベルになることが明らかになった。これらのことから、ヒストン H3 のアセチル化レベルを人為的に高めることが体細胞クローン胚におけるエピジェネティック修飾に有利に働くことが示された。

#### 総括

以上、本研究は効率的にミニブタ体細胞クローン胚を作出し、同時にエピジェネティックな修飾を改良し生育能の高いクローン胚を作出するための諸条件を明らかにすることを目的とし、

1. ミニブタ体細胞クローン胚の発生に必要である人為的活性化処理について、従来行われてきた電気刺激法に代わる新たな方法として、イオノマイシンとシクロヘキシミドを複合処理する最適な活性化法を確立した。
2. 最適化した活性化法によりクローン胚を作出し、胚移植することにより産子を獲得し、確立した活性化法が生育能のあるクローン胚を作出するものであることを証明した。
3. 体外発生培地を改良することにより、クローン胚の発育能を向上することが可能であり、エピジェネティックな修飾としてヒストンのアセチル化レベルを高めることが高い発育能を持つクローン胚を作出できる知見を示した。

これらの知見は核移植技術を利用したブタにおける遺伝子改変動物作出や優良個体のクローン個体作出に貢献するものと確信する。

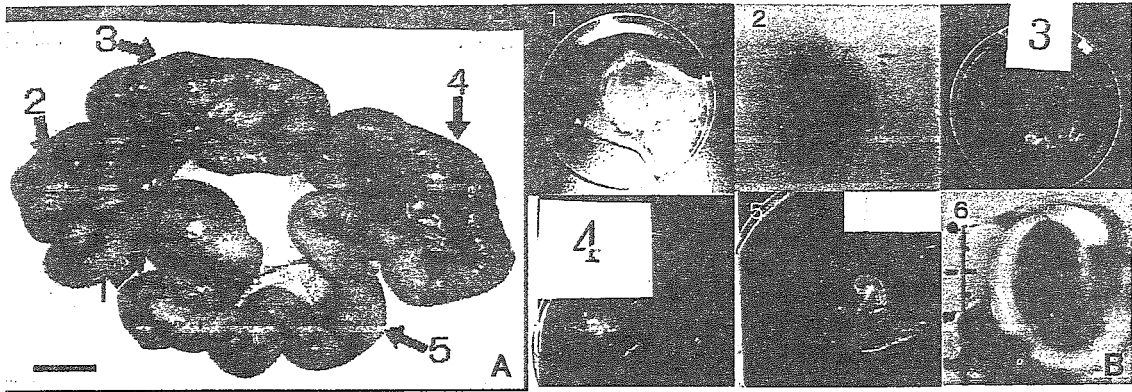


図1. 妊娠30日での仮親の子宮, クローン胎子および人工授精胎子.

A. 摘出した子宮, 矢印: 着床部位, Bar: 5cm. B. 1~5の着床部位から得られたクローン胎子. 1, 3-5: 残留物が見られたが, 胎子は退行していた. 2: クローン胎子 (体長約1cm) は人工授精から得られた胎子 (体長約3cm) と比較して未熟であった. 6: 人工授精により得られた胎子.

表 1. 活性化法がブタ卵子の活性化に及ぼす影響

活性化処理*	供試数	活性化数 (%)
I	35	15 (42.9) <sup>a</sup>
E	39	20 (51.3) <sup>a</sup>
C	32	0 (0) <sup>b</sup>
I+C	28	23 (82.1) <sup>c</sup>
I+E	31	25 (80.6) <sup>c</sup>
E+C	32	25 (78.1) <sup>c</sup>
I+E+C	28	22 (78.6) <sup>c</sup>

3回の実験結果の成績を示した.

\*I, イオノマイシン; E, 電気刺激; C, シクロヘキシミド.

<sup>a-c</sup> 異符号間に有意差あり (P<0.05).

表 2. 活性化法がブタ単為発生胚の体外発生に及ぼす影響

活性化処理*	培養数	各ステージへの発生数 (%)		胚盤胞期の細胞数**
		≥2 細胞期	胚盤胞期	
I	198	66 (33.3) <sup>a</sup>	11 (5.6) <sup>a</sup>	35.3 ± 5.9
E	117	41 (35.0) <sup>a</sup>	13 (11.1) <sup>a</sup>	43.7 ± 7.6
C	103	10 (9.7) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>b</sup>	—
I+C	244	157 (64.3) <sup>cd</sup>	88 (36.1) <sup>c</sup>	38.2 ± 1.8
I+E	184	104 (56.5) <sup>c</sup>	38 (20.7) <sup>de</sup>	37.3 ± 2.7
E+C	144	97 (67.4) <sup>d</sup>	21 (14.6) <sup>ad</sup>	36.4 ± 5.2
I+E+C	150	103 (68.7) <sup>d</sup>	37 (24.7) <sup>e</sup>	35.1 ± 0.4

5回の実験結果の成績を示した.

\*I, イオノマイシン; E, 電気刺激; C, シクロヘキシミド.

\*\* 平均値 ± S. E. <sup>a-e</sup> 異符号間に有意差あり (P<0.05).



表 3. 活性化法がミニブタクローン胚の体外発生に及ぼす影響

活性化処理*	培養数	各ステージへの発生数(%)		胚盤胞期胚の細胞数**
		≥2 細胞期	胚盤胞期	
E	74	39 (52.7)	3 (4.1) <sup>a</sup>	40.0±6.5
I+C	98	60 (61.2)	14 (14.3) <sup>b</sup>	39.0±5.5
I+E+C	109	52 (47.7)	5 (4.6) <sup>a</sup>	35.7±5.8

4回の実験結果の成績を示した。

\*I, イオノマイシン; E, 電気刺激; C, シクロヘキシミド。

\*\*平均値±S. E. <sup>a, b</sup>異符号間に有意差あり (P<0.05)。

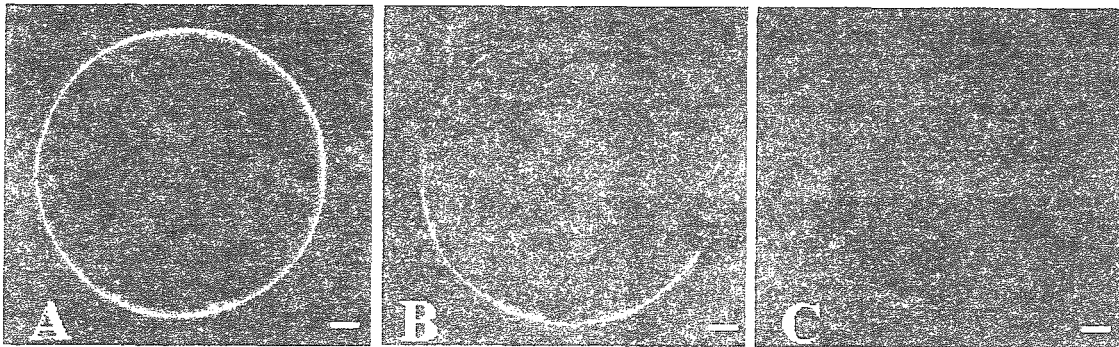


図2. 活性化後のミニブタクローン胚におけるアクチンフィラメントの分布. 活性化後8時間で固定染色を行い, 共焦点レーザー顕微鏡により観察した像. A, 連続型(正常); B, 不連続型(異常); C, 散在型(異常). Bar=10 μm.

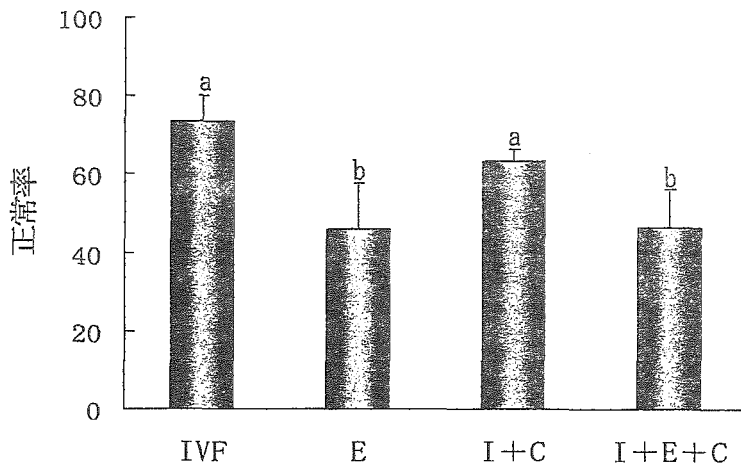


図3. 活性化法がアクチンフィラメントの分布に及ぼす影響. アクチンフィラメントの分布が連続型(図2. A)であったものの割合を示した. IVF, 体外受精卵; I, イオノマイシン; E, 電気刺激; C, シクロヘキシミド. <sup>a, b</sup>異符号間に有意差あり (P<0.05)。

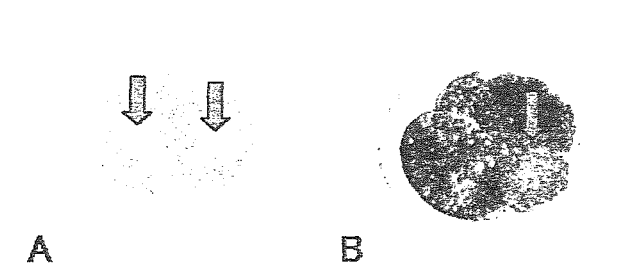


図4. Hoechst 染色による異常分割胚の観察像. A, 正常分割; B, 異常分割. ↓: 細胞核

表 4. 活性化法が異常分割クローン胚の出現率に及ぼす影響

活性化処理*	供試胚数	異常分割胚数
I+C	86	21 (24.4) <sup>a</sup>
I+E+C	84	31 (36.9) <sup>b</sup>

3 回の実験結果の成績を示した.

\*I, イオノマイシン; E, 電気刺激; C, シクロヘキシミド.

<sup>a, b</sup> 異符号間に有意差あり (P<0.05).

表 5. ミニブタクローン胚の体内発生成績

移植数	移植頭数	妊娠頭数	産子数
1558	10	7	1

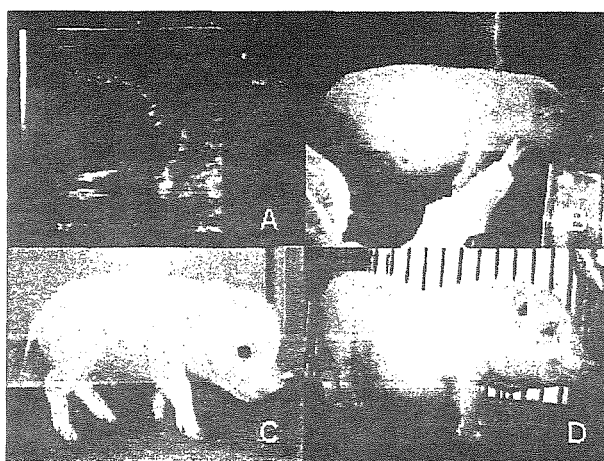


図5. 胚移植により得られたミニブタクローン産子.

A, 仮親の超音波ソナー画像 (胚移植後91日目); B, 妊娠仮親ブタ (胚移植後105日目); C, 生後3日のクローン産子 (体重356g); D, 5ヶ月齢のクローン個体 (体重約20kg).

表 6. 培養培地が単為発生およびクローン胚の体外発生に及ぼす影響

実験区	培養培地*	培養数	各発生ステージへの発生数 (%)		胚盤胞期胚の細胞数**
			≥2 細胞期	胚盤胞期	
単為発生胚	N	76	53 (69.7)	16 (21.1)	33.7±3.2 <sup>a</sup>
	Naa	89	61 (68.5)	19 (21.3)	49.5±4.6 <sup>b</sup>
	P	97	62 (63.9)	30 (30.9)	49.7±4.4 <sup>b</sup>
クローン胚	N	110	58 (52.7)	8 (7.3) <sup>a</sup>	22.0±1.1 <sup>a</sup>
	Naa	70	40 (57.1)	5 (7.1) <sup>a</sup>	26.0±3.1 <sup>a</sup>
	P	64	37 (57.8)	13 (20.3) <sup>b</sup>	43.0±4.2 <sup>b</sup>

4 回の実験結果の成績を示した.

\*N, NCSU23; Naa, アミノ酸添加 NCSU23; P, PZM5.

\*\* 平均値±S. E.

<sup>a, b</sup> 同一実験区内の異符号間に有意差あり (P<0.05).

表 7. 二段階培養が単為発生およびクローン胚の体外発生に及ぼす影響

実験区	培養培地*	培養数	各発生ステージへの発生数(%)		胚盤胞期胚の細胞数***
			≥2 細胞期	胚盤胞期	
単為発生胚	P→P**	80	61 (60.0)	23 (28.8)	43.2±2.9 <sup>a</sup>
	P→N	100	59 (59.0)	36 (36.8)	36.8±1.8 <sup>a</sup>
	P→Naa	80	49 (61.3)	30 (37.5)	60.7±3.8 <sup>b</sup>
クローン胚	P→P	68	45 (66.2)	13 (19.9)	30.5±2.5
	P→N	57	35 (61.4)	9 (15.8)	28.3±3.0
	P→Naa	81	52 (64.2)	17 (21.0)	39.1±3.9

4 回の実験結果の成績を示した.

\*N, NCSU23; Naa, アミノ酸添加 NCSU23; P, PZM5.

\*\*培養後 4 日で PZM5 から各培地へと交換して継続培養した.

\*\*\*平均値±S. E.

<sup>a, b</sup> 同一実験区内の異符号間に有意差あり (P<0.05).

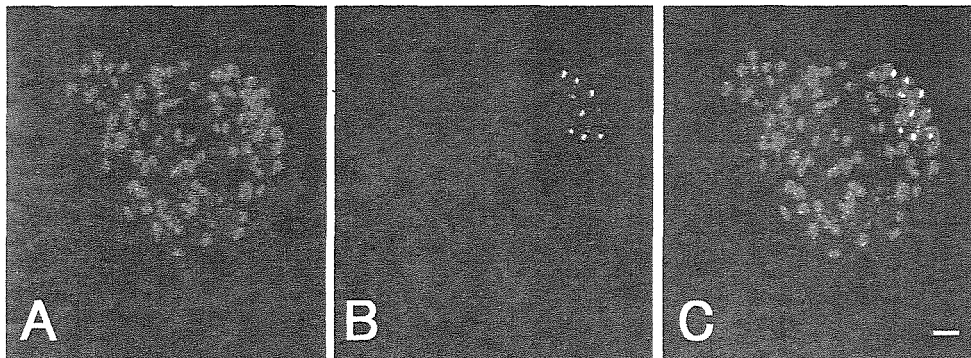


図6. TUNEL法による胚盤胞期胚のアポトーシス陽性細胞の検出.

A, DNA (赤); B, TUNEL陽性細胞 (緑); C, 重ね合わせ像. Bar=20 μm.

表 8. 培養培地が胚盤胞期クローン胚の品質に及ぼす影響

実験区	培養培地	培養数	胚盤胞期胚の	
			平均細胞数*	アポトーシス陽性細胞率*
体外受精胚	NCSU23	14	47.6±4.3 <sup>a</sup>	3.0±0.5 <sup>a</sup>
	PZM5	10	75.6±5.7 <sup>b</sup>	4.3±0.9 <sup>a</sup>
クローン胚	NCSU23	5	26.0±1.1 <sup>c</sup>	12.6±1.9 <sup>b</sup>
	PZM5	10	48.8±6.3 <sup>a</sup>	9.3±0.4 <sup>b</sup>

3 回の実験結果の成績を示した.

\*平均値±S. E.

<sup>a, b, c</sup> 異符号間に有意差あり (P<0.05).

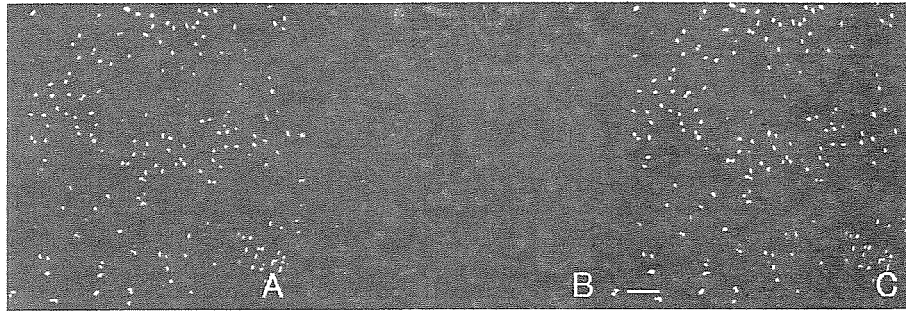


図7. ミニブタ胎子線維芽細胞核のアセチル化ヒストンH3 lysine18 の蛍光免疫像.  
A, アセチル化ヒストンH3 lysine18(緑); B, DNA(赤); C, 重ね合わせ像. Bar=20 μm.

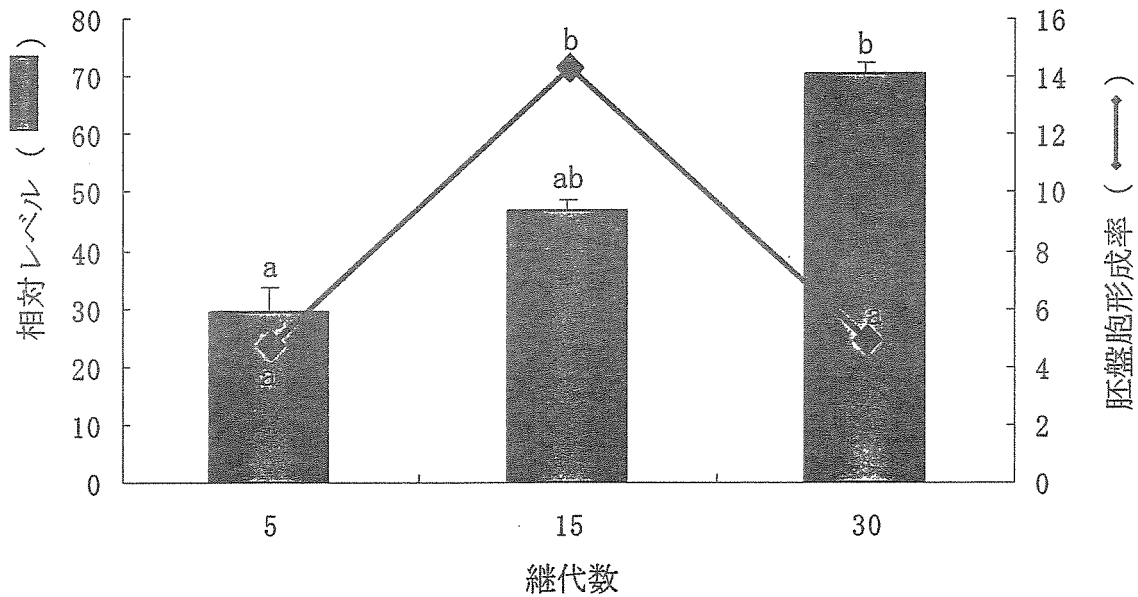


図8. ドナー細胞のヒストンH3のアセチル化レベルがクローン胚の体外発生に及ぼす影響.  
3回の実験結果をまとめて示した. <sup>a-b</sup> 異符号間に有意差あり (P<0.05).

表9. トリコスタチンA 処理時間がクローン胚の体外発生に及ぼす影響

TSA 処理時間 (h)	培養数	各発生ステージへの発生数(%)		胚盤胞期胚の細胞数*
		≥2 細胞期	胚盤胞期	
0	97	64(66.0) <sup>a</sup>	17(17.5) <sup>a</sup>	43.2±3.0 <sup>a</sup>
5	105	76(72.4) <sup>ab</sup>	18(17.1) <sup>a</sup>	42.0±3.8 <sup>a</sup>
10	76	54(71.1) <sup>ab</sup>	16(21.1) <sup>ab</sup>	47.1±5.6 <sup>ab</sup>
15	81	65(80.2) <sup>b</sup>	27(33.3) <sup>b</sup>	53.6±3.8 <sup>bc</sup>
20	80	61(76.3) <sup>ab</sup>	25(31.3) <sup>b</sup>	63.0±3.5 <sup>c</sup>
50	58	45(77.6) <sup>ab</sup>	15(27.6) <sup>ab</sup>	46.9±4.0 <sup>ab</sup>

6回の実験結果の成績を示した.

\*平均値±S.E.

<sup>a-c</sup> 異符号間に有意差あり (P<0.05).

表 10. トリコスタチン A による処理濃度がクローン胚の体外発生に及ぼす影響

TSA 処理濃度 (nM)	培養数	各発生ステージへの発生数 (%)		胚盤胞期胚の細胞数*
		≥2 細胞期	胚盤胞期	
0	68	48 (70.6)	13 (19.1) <sup>a</sup>	40.3 ± 5.4 <sup>a</sup>
5	81	65 (80.2)	27 (33.3) <sup>b</sup>	53.6 ± 3.8 <sup>b</sup>
50	25	19 (76.0)	6 (24.0) <sup>ab</sup>	43.5 ± 6.5 <sup>ab</sup>
500	83	52 (62.7)	13 (21.7) <sup>a</sup>	44.6 ± 5.5 <sup>ab</sup>

4 回の実験結果の成績を示した。

\* 平均値 ± S. E.

<sup>a,c</sup> 異符号間に有意差あり (P < 0.05).

表 11. トリコスタチン A 処理が胚盤胞期クローン胚の品質に及ぼす影響

実験区	供試胚数	胚盤胞期胚の 平均細胞数*	アポトーシス陽性細胞率*
体外受精卵	14	71.2 ± 4.8 <sup>a</sup>	5.1 ± 1.0 <sup>a</sup>
TSA 処理クローン胚	5	48.0 ± 4.1 <sup>b</sup>	9.7 ± 0.9 <sup>b</sup>

3 回の実験結果の成績を示した。

\* 平均値 ± S. E.

<sup>a,b</sup> 異符号間に有意差あり (P < 0.05).

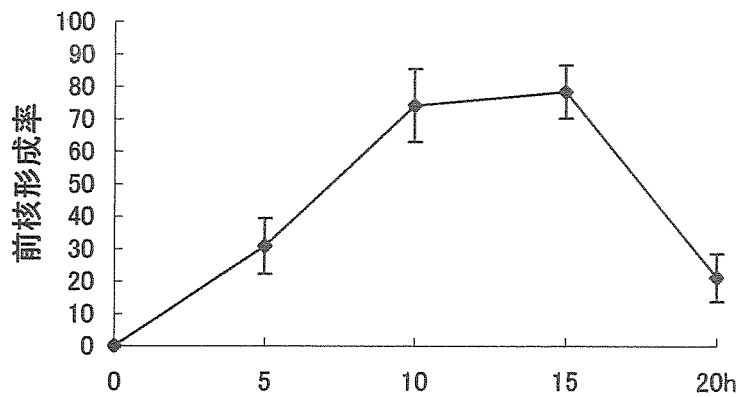


図 9. 培養経過に伴うクローン胚の前核形成率。

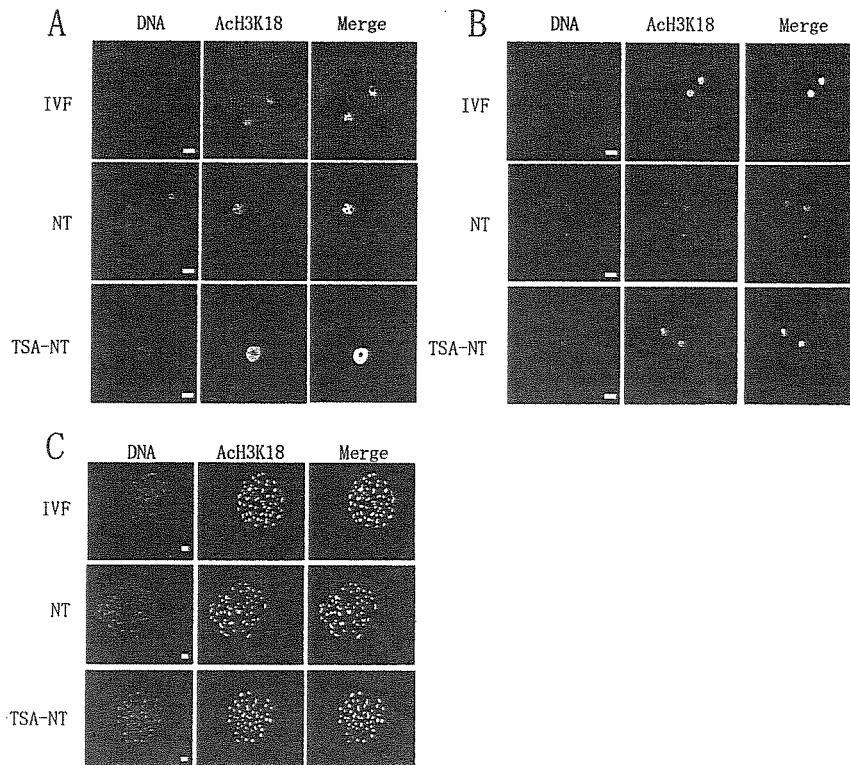


図10. 各ステージにおけるアセチル化ヒストンH3の免疫蛍光染色像。  
 A: 前核期, B: 2細胞期, C: 胚盤胞期. IVF, 体外受精卵; NT, クローン胚;  
 TSA-NT, TSA処理クローン胚; ACh3K18, アセチル化ヒストンH3 lysine 18.  
 Bar=30  $\mu$ m.

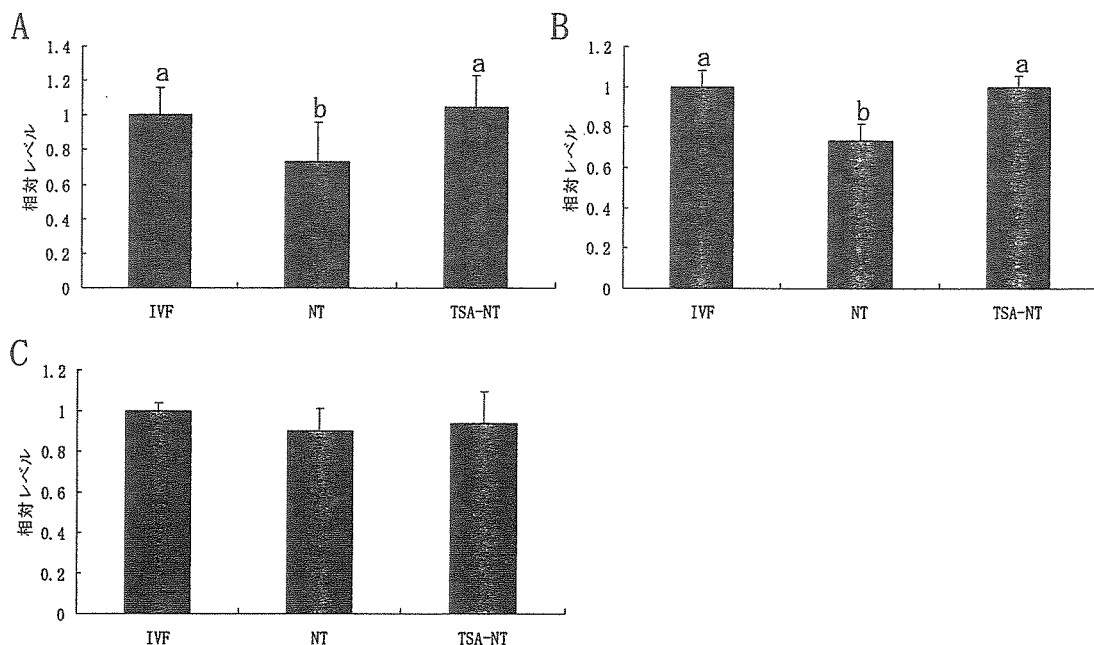


図11. TSA処理が各発生ステージにおけるヒストンH3アセチル化レベルに及ぼす影響。  
 A: 前核期, B: 2細胞期, C: 胚盤胞期. IVF, 体外受精卵; NT, クローン胚; TSA-NT, TSA処理  
 クローン胚. <sup>a,b</sup>異符号間に有意差あり (P<0.05).

## 論文審査結果要旨

本研究は効率的にミニブタ体細胞クローン胚を作出し、同時にエピジェネティックな修飾を改良し生育能の高いクローン胚を作出するため諸条件を明らかにすることを目的とした。

第1章では、ミニブタクローン胚への活性化としては、イオノマイシンおよび電気刺激により  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を引き起こし、さらに、シクロヘキシミドにより MPF の蓄積を抑える複合処理が有効であることを明らかにした。また、電気刺激の付加はブタ卵子表層のアクチンフィラメント分布の異常、さらには培養過程での胚の異常分割を引き起こす一要因であり、その後の発生率を低下させることが示唆され、イオノマイシンとシクロヘキシミドの複合処理を用いることで発生能の高いクローン胚を作出できることが明らかとなった。すなわち、ミニブタ体細胞クローン胚の発生に必要な人為的活性化処理について、従来行われてきた電気刺激法に代わる新たな方法を確立した。

第2章では、前章において最適化した活性化法によりクローン胚を作出し、胚移植することにより産子を獲得し、確立した活性化法が生育能のあるクローン胚を作出するものであることを証明した。すなわち、ミニブタ体細胞クローン個体作出系の確立に成功し、研究室レベルでの遺伝子改変ミニブタの作出の可能性を示した。

第3章では、体外発生培地を改良することにより、クローン胚の発育能を向上することが可能であることを明らかにした。同時に、クローン胚は培地に対する感受性は体外受精および単為発生胚とは異なり、クローン胚に特異的に適した培地の開発の必要性を示した。さらに、エピジェネティックな修飾としてヒストンのアセチル化レベルに注目し、それらを人為的に修飾することにより、高い発生能を持ったクローン胚の作出系を開発した。また、これらの初期のステージでのクローン胚のクロマチン構造の修飾がクローン個体作出効率の改善の糸口になる可能性を示した。

これらの知見は核移植技術を利用した遺伝子改変動物作出や優良個体のクローン個体作出に貢献するものと確信する。よって博士（農学）の学位を授与できるものと判定した。