

氏 名(本籍)	すぎ 杉	むら 村	さと 智	し 史
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 9 3 0 号			
学位授与年月日	平 成 2 0 年 3 月 2 5 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	ブタ体細胞核移植胚におけるミトコンドリア機能の解析			
論文審査委員	(主 査)	教 授	佐 藤 英 明	
	(副 査)	教 授	山 口 高 弘	
		教 授	西 森 克 彦	

論文内容要旨

緒言

現在、体細胞核移植(Somatic Cell Nuclear Transfer; SCNT)によるクローン技術は優良家畜の増産、ヒトに有用な特定蛋白質を作り出す遺伝子改変動物の作出に利用されている。ブタにおいては臓器のサイズ、生理学および解剖学的特徴がヒトに近く、遺伝的背景が詳細にわかっていることから、ヒトに移植可能な臓器生産ブタおよびヒト疾患モデルブタの作出、さらには幹細胞の自家移植モデル系の構築が試みられている。このように、SCNT によるブタクローン技術は畜産分野のみならず医学・薬学の分野での実用化が大いに期待されている。近年、ブタ SCNT 個体作出の成功が我々の研究グループを含め徐々に報告されてきているが、作出効率はいずれも 1%以下と極めて低く、実用化に向けた最大の障害である。ブタ SCNT 胚では低い胚盤胞形成率、胚盤胞期胚での細胞数の減少およびアポトーシス陽性細胞の増加、胎盤の形成異常といった数多くの問題を抱えており、これらを解決することが実用化に向けて不可欠である。SCNT 胚が正常に発育するためには、注入されたドナー体細胞核がレシピエント卵細胞質内で体細胞型から初期胚型の遺伝子発現パターンへと再プログラミングされる初期化という過程を経なければならないと考えられている。したがって、これまで SCNT 胚における研究では、遺伝子発現やそれらを調節している DNA のメチル化やヒストンのアセチル化等のエピジェネティックな初期化に関する解析が盛んに行われてきた。これらの解析の結果、SCNT 胚における不完全もしくは不適切な初期化に起因する異常な遺伝子発現が SCNT 胚の低い発育能の原因であることが証明されてきた。しかしながら、この遺伝子発現は顕微注入操作、人為的活性化刺激および体外発生培養条件等、様々な要因によっても影響を受けることから、発育の成否の指標となる遺伝子の特定には至っていない。すなわち、発育が途中で停止する胚と個体まで発育する胚、それぞれの SCNT 胚間における発育能の違いを遺伝子発現だけで決定することは非常に困難なのが現状である。よって、今後はこれらの遺伝子や要因を絞り込むために、胚の発育・生存に必須な機能について SCNT 胚における異常性を含めた特徴をより詳細に解析することが重要であると予想される。

一方、我々は一連の SCNT 技術を成熟させるために様々な研究を行ってきた。その中の一つとして培地の改良がある。受精胚において既に効果が認められている体外発生培地(PZM)を用いて、SCNT 胚を培養し移植したところ、期待された作出効率の改善は認められなかった。この結果は、SCNT 胚が受精胚とは異なるエネルギー代謝を持っている可能性を示すものである。このエネルギー代謝の細胞内における中心的存在がミトコンドリアである。ミトコンドリアは電子伝達系を介した酸化的リン酸化(OXPHOS)による ATP 生産、アポトーシスの制御、さらには細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節といった様々な機能を持ち、細胞の増殖・分化に大きく関与している。特に、電子伝達系を介した OXPHOS といったミトコンドリア機能は、核ゲノムおよびミトコンドリアゲノム双方からなるタンパク合成系により調節されている。したがって、もし SCNT 胚において不完全もしくは不適切な初期化が生じれば、正常にミトコンドリアが機能せず SCNT 胚の発育に大きな影響を与えることが推察される。そこで本研究では、ブタ SCNT 胚の特徴およびその異常性を解析することを目的として、ブタ SCNT 胚のミトコンドリアに焦点をあて、その機能解析を行った。

1. ブタ体細胞核移植胚における酸素消費

胚の総合的なエネルギー代謝活性、およびミトコンドリア機能の指標である酸素消費を調べることで、SCNT 胚の特徴および異常性を解析した。

1-1. 体外受精(IVF)および体細胞核移植(SCNT)胚の体外発生

SCNT 胚の初期胚発生過程での特徴を把握するために 2 種類の発生培地(表 1)、NCSU-23 および PZM-3 を用いて体外発生率および胚盤胞期胚での細胞数を調べた。結果、IVF および SCNT 胚いずれにおいても PZM-3 を用いることで胚盤胞期胚への発生速度および発生率が改善された(表 2)。細胞数においては、Day5 胚盤胞期胚(D5BL)では IVF および SCNT 胚で有意な差は認められなかった。一方、Day6(D6BL)および Day7(D7BL)では SCNT 胚に比べ IVF 胚で有意に細胞数が多かった。また、IVF 胚では PZM-3 を用いることで D6BL および D7BL の細胞数が NCSU-23 を用いた場合に比べ有意に増加したのに対し、SCNT 胚では細胞数の有意な増加は認められなかった(図 1)。以上の結果、SCNT 胚では胚盤胞期胚での細胞増殖に問題があることが示された。

1-2. IVF および SCNT 胚における胚盤胞期胚の品質評価

IVF および SCNT 胚における D5BL と D7BL の品質を評価するため、PI および Hoechst33342 を用いた二重染色により、内部細胞塊(Inner Cell Mass; ICM)細胞および栄養外胚葉(Trophectoderm; TE)細胞を、さらに TUNEL 染色によりアポトーシス陽性細胞を検出した。結果、D5BL では総細胞数、ICM 細胞数、TE 細胞数および ICM/TE 比に有意な差は認められなかった。また、アポトーシス陽性細胞数および陽性率においても有意な差は認められなかった。一方、D7BL では SCNT 胚で総細胞数および TE 細胞数が有意に低く、ICM/TE 比が有意に高かった(図 2)。さらに、アポトーシス陽性細胞数は SCNT 胚で有意に多く、陽性率も有意に高かった(図 3)。以上の結果、SCNT 胚では TE 細胞の増殖およびアポトーシス陽性細胞の増加に問題があることが示された。

1-3. 異なる体外発生培地を用いた IVF および SCNT 胚の初期胚発生過程における酸素消費

2 種類の体外発生培地(NCSU-23 および PZM-3)を用いた IVF および SCNT 胚における 2 細胞期(2C)、4 細胞期(4C)、桑実期(MO)および培養 5、6、7 日目の胚盤胞期(D5BL、D6BL、D7BL)胚の酸素消費を受精卵呼吸測定装置により測定した。2C および 4C では発生培地に関わらず IVF 胚、SCNT 胚共に低い酸素消費であったが、IVF 胚においては D5BL で有意に酸素消費が増加した。さらに PZM-3 を用いることで NCSU-23 を用いた場合に比べ酸素消費は有意に増加した。一方、SCNT 胚においては D5BL での有意な酸素消費の増加は認められず、PZM-3 を用いても改善は認められなかった(図 4)。以上の結果、SCNT 胚では D5BL の低い酸素消費に問題があることが示された。

1-4. D5BL の酸素消費が胚の品質に及ぼす影響

SCNT 胚の問題が胚盤胞期胚での TE 細胞の増殖、アポトーシス細胞の増加および D5BL の低い酸素消費にあることが 1-1、1-2 および 1-3 の結果より明らかになった。そこで、D5BL の低い酸素消費が TE 細胞の増殖やアポトーシス陽性細胞の増加に関与しているか否かを明らかにするため、IVF および SCNT 胚における D5BL の酸素消費を測定後、96 穴培養皿に一個ずつ胚を入れ、48 時間の体外培養後、形態的変化の観察、二重染色による ICM 細胞および TE 細胞の検出、および TUNEL 染色によるアポトーシス陽性細胞の検出を行った。結果、D5BL で酸素消費が高かった IVF 胚では 48 時間後には透明帯から脱出したのに対し、低いものは 48 時間後の形態的変化はほとんど観察されなかった(図 5)。D5BL の酸素消費と 48 時間後の総細胞数、ICM 細胞数、TE 細胞数および ICM/TE 比の相関においては、総細胞数および TE 細胞数で D5BL での酸素消費と高い相関が認められたが、ICM に関しては酸素消費との相関は認められなかった(図 6)。D5BL の酸素消費と 48 時間後のアポトーシス陽性細胞数および陽性率の相関においては、特に SCNT 胚において D5BL の酸素消費との高い相関が認められた(図 7)。以上の結果、D5BL での酸素消費は SCNT 胚

の TE 細胞の増殖およびアポトーシス陽性細胞の増加に影響を与えることが示された。

本章の結果より、SCNT 胚における DBL の酸素消費は IVF 胚に比べ低く、このことが TE 細胞の増殖およびアポトーシス陽性細胞の増加に影響を与えていることが示された(図 8)。

2. プタ体細胞核移植胚における Day5 胚盤胞期胚の酸素消費に及ぼす要因の解析

1 章において、SCNT 胚における D5BL の酸素消費が IVF 胚に比べ低いことを明らかにした。そこで本章では、SCNT 胚における D5BL の低い酸素消費の原因を明らかにすることを目的として以下の解析を行った。

2-1. IVF、Parthenoe および SCNT 胚における D5BL の酸素消費量と総細胞数との関係

人為的活性化刺激あるいは細胞質および細胞数の減少が低い酸素消費の原因であるか否かを明らかにするため、IVF、単為発生(Parthenote)、4 細胞期で割球を 2 つ壊した 2/4IVF および SCNT 胚における D5BL の酸素消費を測定した。測定後、Hoechst33342 により細胞数をカウントした。IVF、Parthenote および SCNT 胚において細胞数に有意な差は認められなかったが、酸素消費は IVF および Parthenote 胚に比べ SCNT 胚で有意に低く、さらに細胞質および細胞数を減少させた 2/4IVF 胚よりも有意に低かった(表 3)。D5BL の酸素消費と細胞数の相関を調べた結果では、SCNT 胚は細胞数に関わらず酸素消費が IVF および Parthenote 胚に比べ低かった(図 9)。以上の結果、SCNT 胚における D5BL の低い酸素消費は人為的活性化刺激、細胞質および細胞数の減少が原因ではないことが示された。

2-2. レシピエント卵細胞質への顕微注入操作と体細胞質混入が D5BL の酸素消費に及ぼす影響

続いて、レシピエント卵細胞質への顕微注入操作および体細胞質の混入が低い酸素消費の原因であるか否かを明らかにするため、Parthenote、Buffer のみを注入し人為的活性化刺激を付加した Sham injection および脱核した体細胞質(図 10)を顕微注入し人為的活性化刺激を付加した Somatic cytoplasm injection 胚における D5BL の酸素消費を測定した。測定後、Hoechst33342 により細胞数をカウントした。細胞数においては、いずれの胚においても有意な差は認められなかった。さらに酸素消費においても有意な差は認められなかった(表 4)。以上の結果、SCNT 胚における D5BL の低い酸素消費は卵細胞質への顕微注入操作および体細胞質の混入が原因ではないことが示された。

2-3. 異なるドナー細胞種を用いた SCNT 胚における D5BL の酸素消費

低い酸素消費の原因がドナー細胞とレシピエント卵細胞質の遺伝的バックグラウンドの違い、および核の制御にあるか否かを明らかにするため、レシピエント卵子自身の卵丘細胞をドナー細胞とし、レシピエント卵細胞質とドナー細胞の遺伝的バックグラウンドを一致させた Autologous SCNT(Auto pCC)、異なる卵子由来の卵丘細胞をドナー細胞とした Allogenic SCNT(Allo pCC)および胎子線維芽細胞をドナー細胞とした SCNT(pFF)胚における D5BL の酸素消費を測定した。測定後、Hoechst33342 により細胞数をカウントした。細胞数はいずれの胚においても有意な差は認められなかった。酸素消費においては pFF 胚に比べ pCC 胚で有意に高かったが、IVF 胚に比べるとその値は有意に低かった。また、ドナー細胞とレシピエント卵細胞質の遺伝的バックグラウンドを一致させた Auto pCC 胚と遺伝的バックグラウンドが異なる Allo pCC 胚の比較では酸素消費に有意な差は認められなかった(表 5)。以上の結果、SCNT 胚における D5BL の低い酸素消費の原因はドナー核の制御にあるが、ドナー細胞とレシピエント卵細胞質の遺伝的バックグラウンドの違

いが直接的な原因ではないことが示された。

2-4. 異なる体細胞種を用いた 4 倍体胚における D5BL の酸素消費

2-3 の結果から SCNT 胚における D5BL の低い酸素消費の原因がドナー細胞核の制御にあることが示された。しかしながら、そのドナー細胞核の制御様式が不完全な制御、すなわち劣性的制御、あるいは体細胞様の核の制御、すなわち優性的制御のどちらによるものかはここまでの実験では判定できない。そこでドナー細胞核の制御様式を明らかにするため、除核をせず体細胞を注入した 4 倍体胚を作製した。体細胞には pFF および pCC を用いた。対照区には IVF および Parthenote 胚を用い、4 倍体 pFF(Tetra pFF)および 4 倍体 pCC(Tetra pCC)胚における D5BL の酸素消費と比較した。測定後、Hoechst33342 により細胞数をカウントした。結果として、もし、移植した体細胞核が優性的に酸素消費を制御しているのであれば、IVF 胚あるいは Parthenote 胚に比べ酸素消費は低下するのに対し、劣性的な制御であれば酸素消費は低下しないはずである。結果は、細胞数においてはいずれの胚においても有意な差は認められず、また、酸素消費においても Tetra pFF および Tetra pCC 胚で IVF および Parthenote 胚に比べ低下傾向にあったものの有意な差は認められなかった(表 6)。以上の結果、SCNT 胚の核の制御様式は不完全な制御、すなわち劣性的制御であることが示された。

本章の結果より、SCNT 胚における D5BL の低い酸素消費は移植したドナー細胞核の不完全な制御に原因があることが示された。

3. ブタ SCNT 胚盤胞期胚のミトコンドリア機能解析

電子伝達系を介した OXPHOS といったミトコンドリア機能の維持には核の正常な制御が必須である。したがって、ドナー細胞核の制御に問題がある SCNT 胚ではミトコンドリアが正常に機能していないことが推察される。そこで SCNT 胚における D5BL の低い酸素消費がミトコンドリア機能によるものかを明らかにするため、以下の解析を行った。

3-1. マイクロアレイによるミトコンドリア関連遺伝子群の網羅的発現解析

不完全もしくは不適切な初期化が SCNT 胚のミトコンドリア機能に影響を及ぼしているとするれば、IVF 胚とは異なったミトコンドリア関連遺伝子の発現パターンが確認されるはずである。そこで、IVF および SCNT 胚(pFF および pCC 胚)における D5BL のマイクロアレイによるミトコンドリア関連遺伝子(Mito-Genes)の網羅的発現解析を行った。IVF 胚に対して pFF あるいは pCC 胚で発現が変化した Mito-Genes は 301 個であった(図 11-A)。その遺伝子群を QT クラスタリングにより発現パターンで分類したところ、10 の発現パターンに分類された(図 11-B)。そのうち pFF と pCC 胚で減少した遺伝子群(Set1、Set4)、および増加した遺伝子群(Set2、Set3)をそれぞれ GO カテゴリーライズし、どのような遺伝子群が SCNT 胚で減少あるいは増加しているかを解析した。その結果、SCNT 胚で減少した遺伝子群の上位にはアポトーシス(促進)および OXPHOS に関わる遺伝子群が存在していた(表 7)。また、IVF 胚に対して SCNT 胚で増加した遺伝子群の上位にはアポトーシス(抑制)および解糖系に関わる遺伝子群が存在していた(表 8)。以上の結果、SCNT 胚ではミトコンドリア機能、特に OXPHOS を調節する遺伝子群の発現が減少し、一方、その上流である解糖系に関わる遺伝子群の発現が増加していることが示された。

3-2. mtDNA コピー数、ミトコンドリア依存的酸素消費、ミトコンドリア膜電位、細胞内 NAD(P)H

含量および ATP 含量の解析によるミトコンドリアの機能評価

3-1 においてミトコンドリア関連遺伝子群の発現異常が確認された。そこで、これらの遺伝子発現の異常が実際にミトコンドリア機能に影響を与えているか否かを明らかにするため、IVF および SCNT 胚(pFF および pCC 胚)の D5BL における mtDNA コピー数、ミトコンドリア依存的酸素消費、ミトコンドリア膜電位、細胞内 NAD(P)H 含量および ATP 含量を調べた。mtDNA コピー数は cytochrome B をプライマーとした real-time PCR により算出した。結果、いずれの胚においても mtDNA コピー数に有意な差は認められなかった(図 12)。ミトコンドリア依存的酸素消費は無添加 ERAM-2(測定液)での酸素消費と複合体 IV の阻害剤である NaCl(1mM)を ERAM-2 に添加した酸素消費の差により算出した。結果、IVF 胚に比べ SCNT 胚でミトコンドリア依存的酸素消費が有意に低く、細胞種の比較においては pFF 胚に比べ pCC 胚でその値が有意に高かった(図 13)。ミトコンドリア膜電位はミトコンドリア膜電位依存的プローブである JC-1 を用いて解析した。結果、IVF および pCC 胚に比べ pFF 胚で有意にミトコンドリア膜電位が高かった。一方、pCC 胚は IVF 胚に比べ低下傾向にあるものの有意な差は認められなかった(図 14)。細胞内 NAD(P)H 含量は自家蛍光(励起:360/40nm)の蛍光強度により算出した。結果、IVF 胚に比べ SCNT 胚で有意に NAD(P)H 含量が高かった(図 15)。ATP 含量は ATP 含量測定試薬 BacTiter Glo™ を用いて、Luminometer により算出した。結果、IVF 胚に比べ SCNT 胚で有意に ATP 含量が低かった(図 16)。以上の結果、IVF 胚と SCNT 胚ではミトコンドリア機能が異なり、さらにドナー細胞種の違いでも、その機能が異なる可能性が示された。

3-3. SCNT 胚における D5BL の電子伝達系を介した OXPHOS システムの機能評価

3-2 において IVF 胚と SCNT 胚ではミトコンドリア機能が異なる可能性が示され、また、3-1 において OXPHOS 関連遺伝子群の発現が IVF 胚に比べ減少していることを明らかにした。そこで、このミトコンドリア機能の違いが電子伝達系を介した OXPHOS システムの機能的変化に起因するものかを明らかにするため、IVF および SCNT 胚(pFF および pCC 胚)の D5BL における最大酸素消費、cytochrome c oxidase(COX)活性および OXPHOS 依存的酸素消費と OXPHOS 効率を調べることで電子伝達系を介した OXPHOS システムの機能評価を行った。最大酸素消費は脱共役剤である CCCP(1 μ M)を ERAM-2 に添加し、酸素消費を測定することで算出した。結果、IVF 胚に比べ SCNT 胚で有意に最大酸素消費が低かった(図 17)。COX 活性は複合体 III の阻害剤である antimycin(5nM)、電子供給のための TMPD(10mM)/アスコルビン酸(5mM)および CCCP(1 μ M)を ERAM-2 に添加し酸素消費を測定することで算出した。結果、IVF 胚に比べ SCNT 胚で有意に COX 活性が低かった(図 18)。OXPHOS 依存的酸素消費および OXPHOS 効率は ATP 合成酵素の阻害剤である oligomycin(2 μ g/ml)を ERAM-2 に添加し酸素消費を測定することで算出した。結果、OXPHOS 依存的酸素消費は IVF 胚に比べ SCNT 胚で有意に低く、また細胞種の比較では pFF 胚に比べ pCC 胚で有意に高かった。一方、OXPHOS 効率は IVF および pCC 胚に比べ pFF 胚で有意に低かった(図 19)。以上の結果、SCNT 胚は IVF 胚に比べ電子伝達系を介した OXPHOS システムの機能が低下していることが示された。また、その機能はドナー細胞種によっても異なることが示された。

3-4. 2-NBDG を用いた SCNT 胚における D5BL のグルコースの取り込み

3-1 のマイクロアレイの結果で、SCNT 胚で発現が増加していたカテゴリーの上位に解糖系関連遺伝子群が存在していた。そこで、実際に解糖系の機能的変化が起きているか否かを明らかにす

るため、解糖系の機能評価の一パラメータであるグルコースの取り込みを蛍光グルコースである 2-NBDG を用いて解析した。IVF、pFF および pFF 胚を 2-NBDG(1mM)添加 PZM-3 で 30 分間培養し、培養後、蛍光強度を調べることでグルコースの取り込みを評価した。また、IVF 胚に関しては NaCN(1mM)あるいは oligomycin(2µg/ml)を PZM-3 に添加した場合での 2-NBDG の取り込みも調べた。結果、IVF 胚に比べ SCNT 胚でグルコースの取り込みが有意に増加していた。また、oligomycin あるいは NaCN を添加し、複合体 IV あるいは ATP 合成酵素を阻害した IVF 胚においても無処理 IVF 胚に比べグルコースの取り込みが有意に増加した(図 20)。以上の結果、SCNT 胚ではミトコンドリア機能の低下に伴い、グルコースの取り込みが増加していることが示唆された。

本章の結果より、SCNT 胚はミトコンドリア機能が IVF 胚とは異なり、特に OXPHOS 関連遺伝子群の発現低下により OXPHOS システムの機能が低下していることが示された。さらに、その機能はドナー細胞種の違いによっても変化することが示された。一方、ミトコンドリア機能の低下に伴い、その上流である解糖系の機能が変化していることが示唆された。

総括

ブタ SCNT 胚の特徴および異常性の解析を目的とし、ミトコンドリア機能に焦点をあてた本研究の結果、

1. SCNT 胚における D5BL の酸素消費は IVF 胚に比べ低く、このことが細胞増殖、特に TE 細胞の増殖およびアポトーシス陽性細胞の増加に影響を与えていること
2. SCNT 胚における D5BL の低い酸素消費は移植したドナー細胞核の不完全な制御に原因があること
3. SCNT 胚はミトコンドリア機能が IVF 胚とは異なり、特に OXPHOS 関連遺伝子群の発現低下により OXPHOS システムの機能が低下していること、さらにその機能はドナー細胞種の違いによっても変化すること、一方、ミトコンドリア機能の低下に伴い、その上流である解糖系の機能が変化していること

が明らかになった。

以上のことから、ブタ SCNT 胚ではドナー細胞核の不完全な初期化により、特に OXPHOS に関わるミトコンドリア関連遺伝子群の発現が低下し、これに伴いミトコンドリア機能、特に OXPHOS システムの機能が低下することで、TE 細胞の増殖低下、アポトーシス陽性細胞の増加さらにはグルコースの取り込み増加といった異常が引き起こされ、結果として発育が停止している可能性が示された。

本研究は、これまでの単に分子生物学的側面から異常性を解析するといったアプローチとは一線を画すものである。遺伝子発現が異常であっても実際に胚の発育・生存に必須な機能が変化しない限り、異常性の証明にはならず、また発育停止の原因を解明したことにはならない。一方、ブタ SCNT 胚におけるミトコンドリア機能の低下といった発育・生存に必須な機能の異常性の証明は、発育停止の原因を詳細にするうえで極めて大きな知見である。したがって本研究で得られた知見は、ブタ SCNT 胚の発育停止の原因解明だけではなく、今後のブタ SCNT 技術の改善と安定化に大きく貢献するものであると強く確信している。

表1. 体外発生培地(NCSU-23およびPZM-3)の組成

components	NCSU-23	PZM-3
NaCl(mM)	108.73	108.00
KCl(mM)	4.78	10.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O(mM)	1.70	-
KH ₂ PO ₄ (mM)	1.19	0.35
MgSO ₄ ·7H ₂ O(mM)	1.19	0.40
NaHCO ₃ (mM)	25.07	25.07
Glucose(mM)	5.55	-
Na-pyruvate(mM)	-	0.20
Ca-(lactate) ₂ ·5H ₂ O(mM)	-	2.00
L-Glutamine(mM)	1.00	1.00
Taurin(mM)	7.00	-
Hypotaurin(mM)	5.00	5.00
BME(ml/l)	-	20.00
MEM(ml/l)	-	10.00
BSA(mg/ml)	4.00	3.00

表2. 異なる体外発生培地(NCSU-23およびPZM-3)を用いた IVFおよび SCNT胚の体外発生

Embryos	Medium	No. of Embryos cultured	No. (%) of embryos cleaved	No. (%) of embryos development		
				D5BL	D6BL	D7BL
IVF	NCSU-23	58	38(65.5) ^a	10(17.2) ^{a,d}	16(27.6) ^{a,c}	18(31.0) ^{a,c}
	PZM-3	114	84(73.7) ^b	37(35.2) ^c	47(41.2) ^c	47(41.2) ^c
SCNT	NCSU-23	158	87(55.0) ^b	0(0) ^b	7(4.4) ^b	12(7.6) ^b
	PZM-3	116	76(65.5) ^a	19(16.4) ^d	28(24.1) ^a	30(25.8) ^a

値は平均値±S.D. ^{a-c}P<0.05.

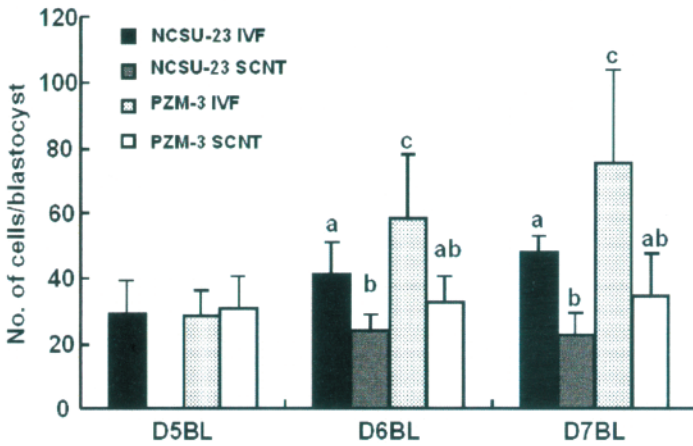


図1. 異なる発生培地(NCSU-23およびPZM-3)を用いたIVFおよびSCNT胚における胚盤胞期胚の細胞数. ^{a-c}P<0.05. 値は平均値±S.D.

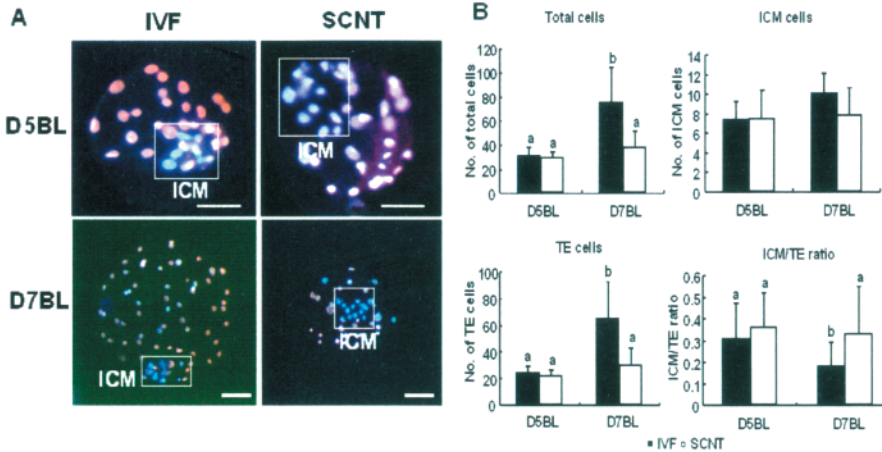


図2. D5BLおよびD7BLにおける総細胞数, 内部細胞塊(ICM)細胞数, 栄養外胚葉(TE)細胞数とICM/TE比. A: 二重染色によるICMおよびTE細胞の検出. Bar=60 μm. B: 総細胞, ICM細胞およびTE細胞数とICM/TE比. 値は平均値±S.D. ^{a-b}P<0.05.

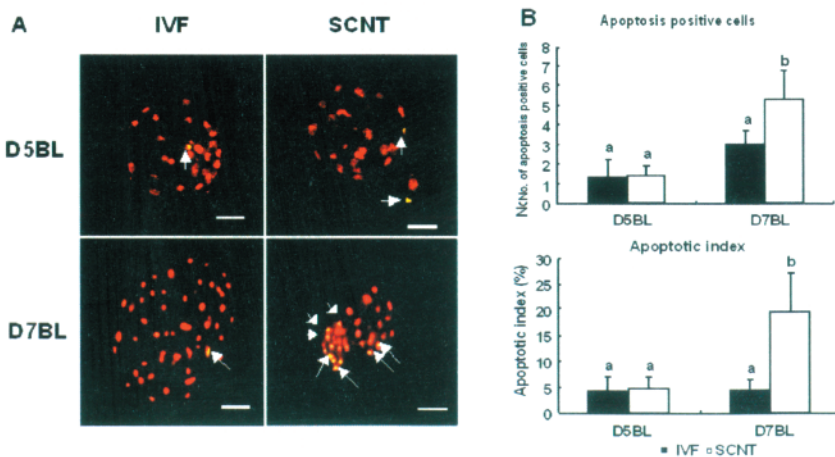


図3. D5BLおよびD7BLにおけるアポトーシス陽性細胞数と陽性率. A: TUNEL染色によるアポトーシス陽性細胞の検出. 矢印はアポトーシス陽性細胞を示す. Bar=60 μm. B: アポトーシス陽性細胞数および陽性率. 値は平均値±S.D. ^{a-b}P<0.05.

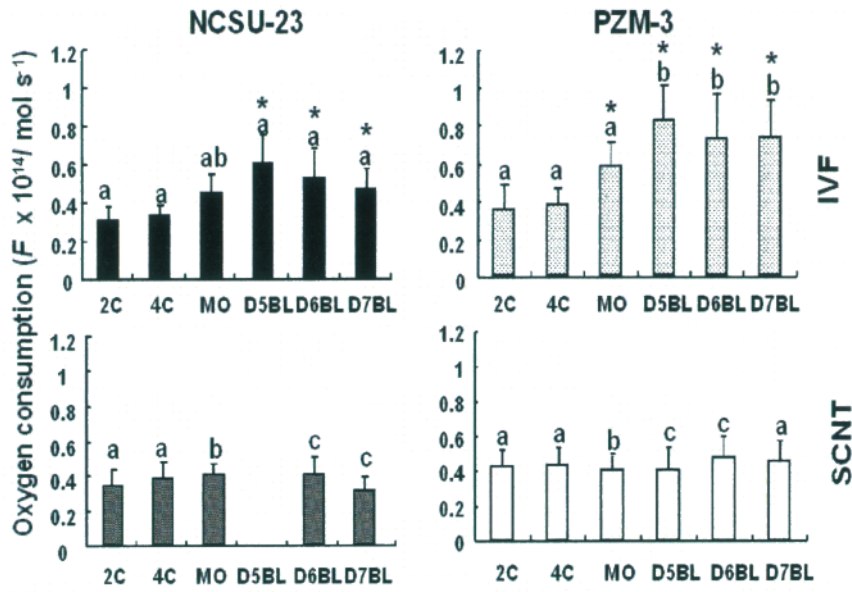


図4. 異なる発生培地 (NCSU-23および PZM-3)を用いたIVF およびSCNT胚の初期胚発生過程における酸素消費値は平均値±S.D. * $P < 0.05$ (同ステージ間). * $P < 0.05$ vs. 2C.

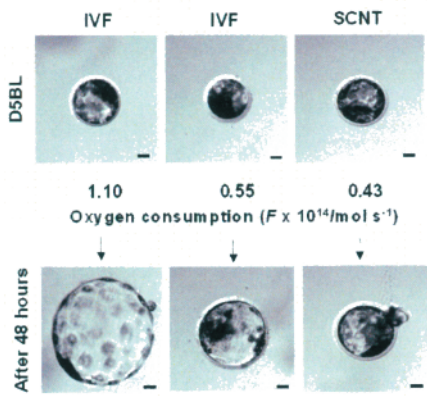


図5. 体外発生培養後5日目および酸素消費測定後48時間目の胚盤胞期胚. Bar=30.

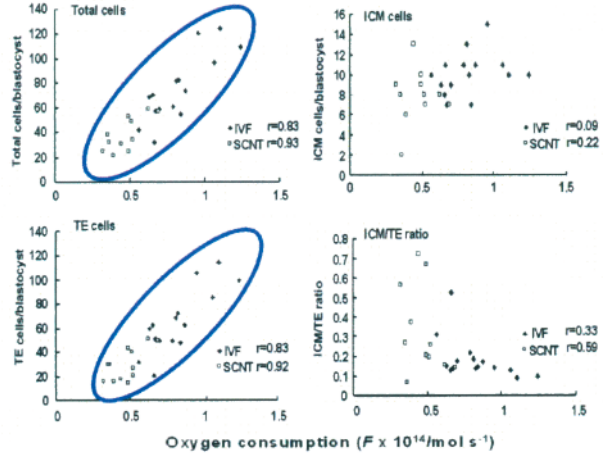


図6. IVFおよびSCNT胚におけるD5BLの酸素消費量と酸素消費測定後48時間目の総細胞数, ICM細胞数, TE細胞数およびICM/TE比との相関.

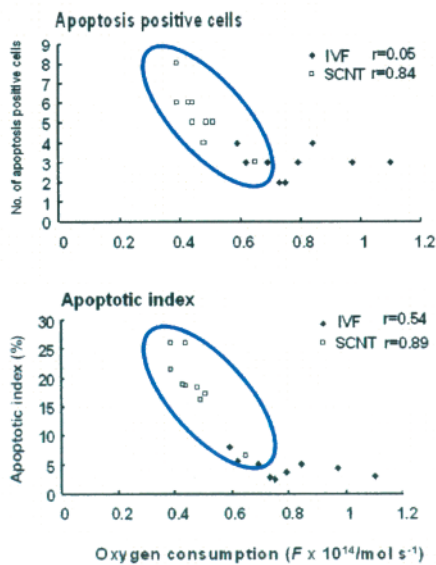


図7. IVFおよびSCNT胚におけるD5BLの酸素消費量と酸素消費測定後48時間目のアポトーシス陽性細胞数および陽性率との相関.

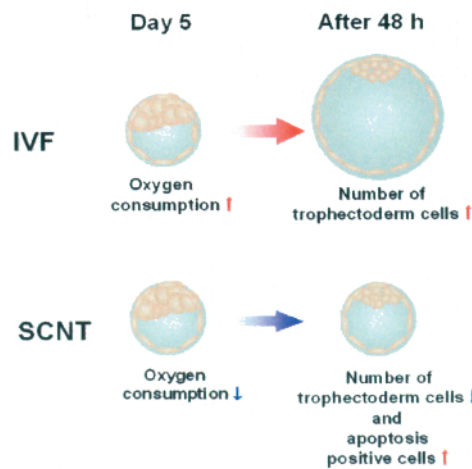


図8. SCNT胚におけるD5BLの低い酸素消費がその後のTE細胞の増殖およびアポトーシス陽性細胞の増加に及ぼす影響.

表3. IVF, parthenoteおよびSCNT胚におけるD5BLの酸素消費と総細胞数

Embryos	No. of evaluated D5BL	Oxygen consumption ($F \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$)	No. of total cells/blastocyst
IVF	19	$0.80 \pm 0.24^{\text{ab}}$	$28.4 \pm 6.8^{\text{a}}$
2/4 IVF	10	$0.67 \pm 0.09^{\text{b}}$	$14.6 \pm 3.5^{\text{b}}$
Parthenote	10	$0.82 \pm 0.16^{\text{a}}$	$30.8 \pm 3.0^{\text{a}}$
SCNT	17	$0.41 \pm 0.12^{\text{c}}$	$31.0 \pm 9.8^{\text{a}}$

^{a-c} $P < 0.05$. 値は平均値 \pm S.D.

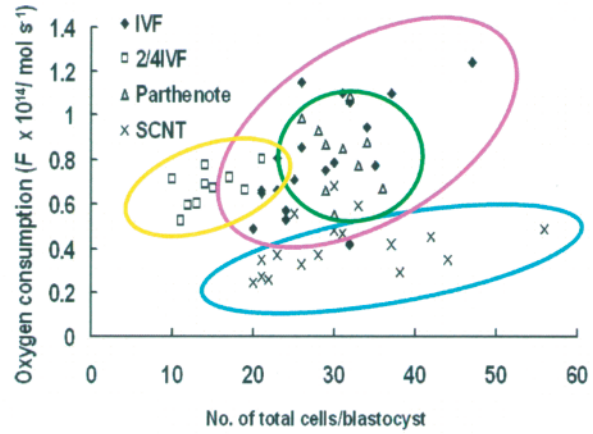


図9. IVF, parthenoteおよびSCNT胚におけるD5BLの酸素消費と総細胞数の相関.

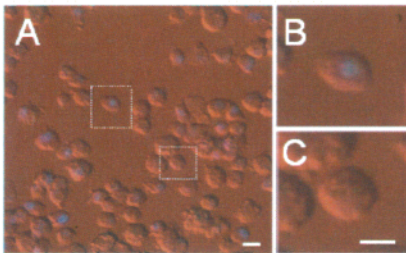


図10. 脱核処理した胎児線維芽細胞(pFF)由来体細胞質. A: 脱核処理を施したpFF. 脱核成功率は約70%. B: 脱核されなかったpFF. C: 脱核されたpFF.

表4. 顕微注入操作および体細胞質の混入がD5BLの酸素消費に及ぼす影響

Embryos	No. of evaluated D5BL	Oxygen consumption ($F \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$)	No. of total cells/blastocyst
Control (Parthenote)	8	0.75 ± 0.07	33.4 ± 6.1
Control (Sham injection)	9	0.76 ± 0.10	31.7 ± 5.2
Somatic cytoplasm injection	9	0.73 ± 0.10	31.0 ± 4.5

値は平均値 \pm S.D.

表5. 異なるドナー細胞種を用いたSCNT胚におけるD5BLの酸素消費

Embryos	No. of evaluated D5BL	Oxygen consumption ($F \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$)	No. of total cells/blastocyst
IVF	10	$0.77 \pm 0.13^{\text{a}}$	34.1 ± 12.1
pFF	13	$0.48 \pm 0.04^{\text{c}}$	28.9 ± 10.2
Allo pCC	13	$0.57 \pm 0.05^{\text{b}}$	33.2 ± 7.4
Auto pCC	9	$0.62 \pm 0.08^{\text{b}}$	32.8 ± 3.1

値は平均値 \pm S.D. ^{a-c} $P < 0.05$.

表6. 異なる細胞種を用いた4倍体胚におけるD5BLの酸素消費

Embryos	No. of evaluated D5BL	Oxygen consumption ($F \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$)	No. of total cells/blastocyst
IVF	9	0.73 ± 0.12	33.9 ± 5.8
Parthenote	9	0.73 ± 0.10	30.3 ± 5.9
Tetra(pFF)	9	0.67 ± 0.06	28.6 ± 5.0
Tetra(pCC)	10	0.68 ± 0.10	30.5 ± 7.0

値は平均値 \pm S.D.

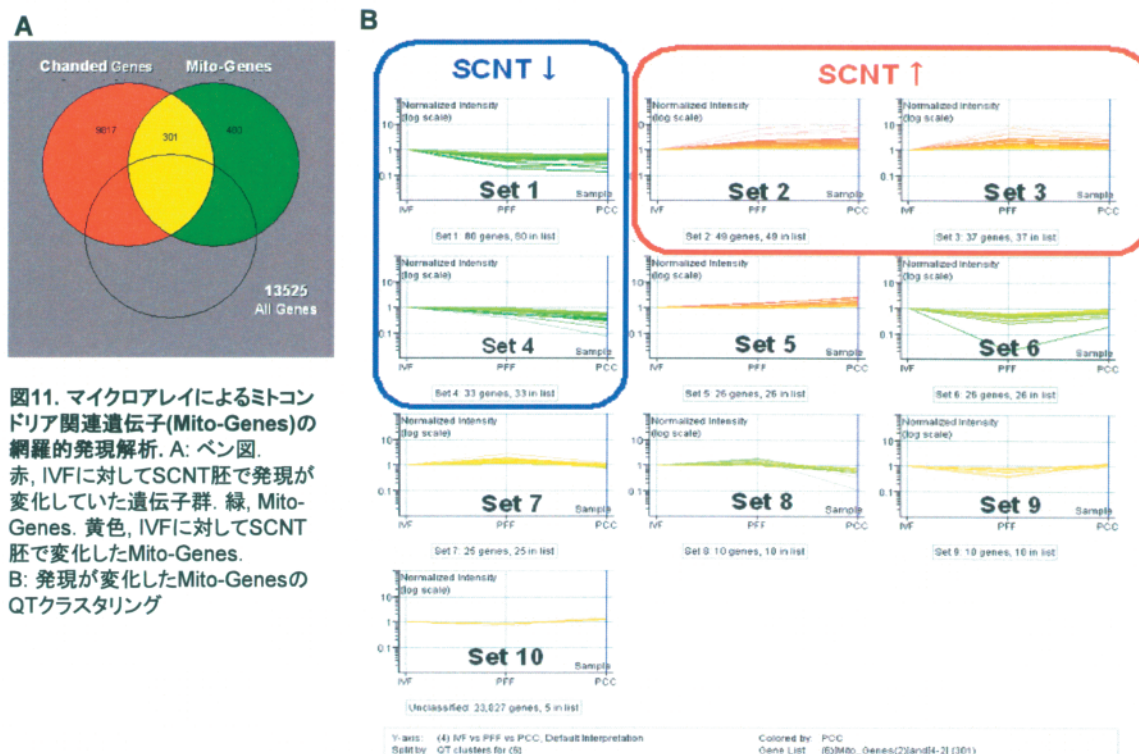


図11. マイクロアレイによるミトコンドリア関連遺伝子(Mito-Genes)の網羅的発現解析. A: ベン図. 赤, IVFに対してSCNT胚で発現が変化していた遺伝子群. 緑, Mito-Genes. 黄色, IVFに対してSCNT胚で変化したMito-Genes. B: 発現が変化したMito-GenesのQTクラスタリング

表7. SCNT胚で発現が減少していた遺伝子群(Set1+Set4)のGOカテゴライズ

Category	Genes in Category	% of Genes in Category	Genes in List in Category	% of Genes in List in Category	p-Value
GO:12501: programmed cell death	74	2.801	6	21.43	9.08E-05
GO:6815: apoptosis	74	2.801	6	21.43	9.08E-05
GO:8219: cell death	81	3.066	6	21.43	0.000151
GO:18285: death	81	3.066	6	21.43	0.000151
GO:48468: cell development	85	3.217	6	21.43	0.000198
GO:42981: regulation of apoptosis	56	2.12	5	17.86	0.000242
GO:43067: regulation of programmed cell death	56	2.12	5	17.86	0.000242
GO:48889: cellular developmental process	143	5.413	6	21.43	0.00317
GO:30154: cell differentiation	143	5.413	6	21.43	0.00317
GO:32502: developmental process	206	7.797	7	25	0.00485
GO:1806: cell killing	12	0.454	2	7.143	0.0067
GO:31840: killing of cells of another organism	12	0.454	2	7.143	0.0067
GO:51715: cytolysis of cells of another organism	12	0.454	2	7.143	0.0067
GO:51801: cytolysis of cells in other organism during symbiotic interaction	12	0.454	2	7.143	0.0067
GO:1897: cytolysis by symbiont of host cells	12	0.454	2	7.143	0.0067
GO:19538: hemolysis by symbiont of host red blood cells	12	0.454	2	7.143	0.0067
GO:52331: hemolysis by organism of red blood cells in other organism during symbiotic interaction	12	0.454	2	7.143	0.0067
GO:51883: killing of cells in other organism during symbiotic interaction	12	0.454	2	7.143	0.0067
GO:1807: killing by symbiont of host cells	12	0.454	2	7.143	0.0067
GO:51646: mitochondrion localization	12	0.454	2	7.143	0.0067
GO:51658: maintenance of mitochondrion localization	12	0.454	2	7.143	0.0067

Category	Genes in Category	% of Genes in Category	Genes in List in Category	% of Genes in List in Category	p-Value
GO:15986: ATP synthesis coupled proton transport	26	0.984	4	23.53	1.81E-05
GO:15985: energy coupled proton transport, down electrochemical gradient	26	0.984	4	23.53	1.81E-05
GO:6119: oxidative phosphorylation	27	1.022	4	23.53	1.88E-05
GO:6754: ATP biosynthetic process	27	1.022	4	23.53	1.88E-05
GO:6753: nucleoside phosphate metabolic process	27	1.022	4	23.53	1.88E-05
GO:48034: ATP metabolic process	28	1.06	4	23.53	2.19E-05

表8. SCNT胚で発現が増加していた遺伝子群(Set2+Set3)のGOカテゴライズ

Category	Genes in Category	% of Genes in Category	Genes in List in Category	% of Genes in List in Category	p-Value
GO:12501: programmed cell death	74	2.801	11	31.43	9.52E-10
GO:6815: apoptosis	74	2.801	11	31.43	9.52E-10
GO:8219: cell death	81	3.066	11	31.43	2.60E-08
GO:18285: death	81	3.066	11	31.43	2.60E-08
GO:48468: cell development	85	3.217	11	31.43	4.42E-08
GO:42981: regulation of apoptosis	56	2.12	9	25.71	2.06E-08
GO:43067: regulation of programmed cell death	56	2.12	9	25.71	2.06E-08
GO:48889: cellular developmental process	143	5.413	11	31.43	1.08E-06
GO:30154: cell differentiation	143	5.413	11	31.43	1.08E-06

Category	Genes in Category	% of Genes in Category	Genes in List in Category	% of Genes in List in Category	p-Value
GO:6086: glycolysis	30	1.136	5	17.24	1.31E-05
GO:6007: glucose catabolic process	33	1.249	5	17.24	2.13E-05
GO:46365: monosaccharide catabolic process	34	1.287	5	17.24	2.48E-05
GO:19320: hexose catabolic process	34	1.287	5	17.24	2.48E-05
GO:46164: alcohol catabolic process	34	1.287	5	17.24	2.48E-05
GO:44275: cellular carbohydrate catabolic process	36	1.363	5	17.24	3.31E-05
GO:16052: carbohydrate catabolic process	39	1.476	5	17.24	4.94E-05
GO:6006: glucose metabolic process	39	1.476	5	17.24	4.94E-05

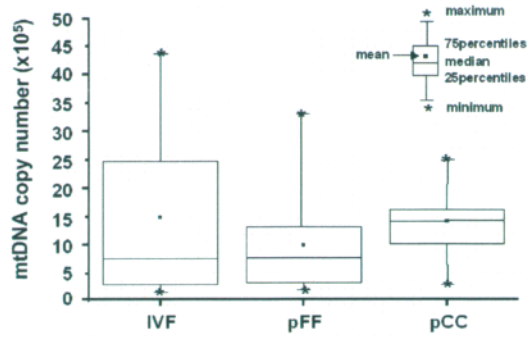


図12. IVFおよびSCNT胚におけるD5BLのミトコンドリアDNAコピー数.

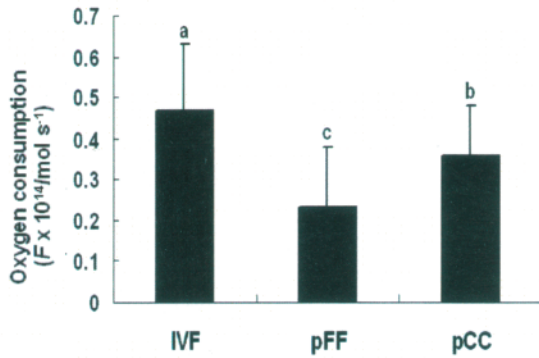


図13. IVFおよびSCNT胚におけるD5BLのミトコンドリア依存的酸素消費.値は平均値±S.D. ^a_b*P*<0.05

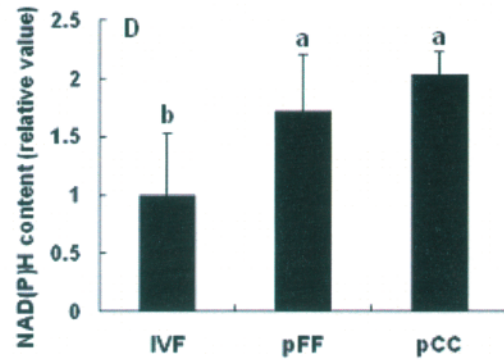
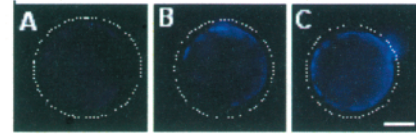


図15. IVFおよびSCNT胚におけるD5BLの細胞内NAD(P)H含量. A-C: IVF(A), pFF(B)およびpCC胚(C)におけるD5BLのNAD(P)H自家蛍光像. Bar=60 μm. D: 自家蛍光による細胞内NAD(P)H含量の測定.IVFの平均値を1とした相対値.値は平均値±S.D. ^a_b*P*<0.05

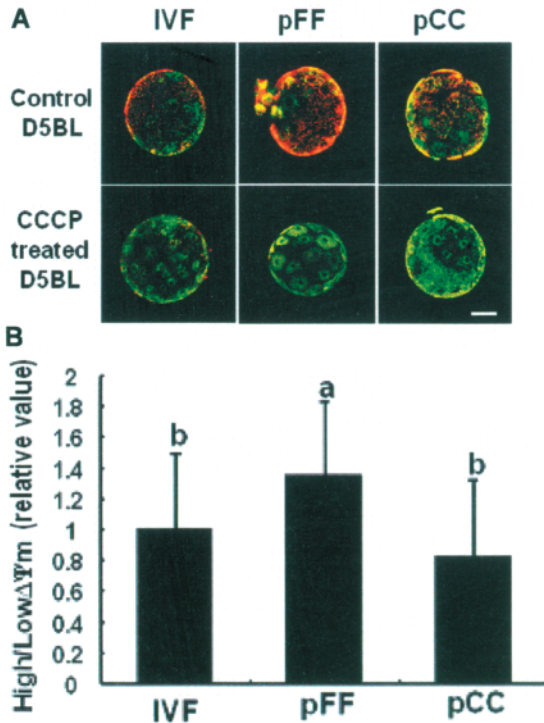


図14. IVFおよびSCNT胚におけるD5BLのミトコンドリア膜電位. A:JC-1染色像. CCCP添加により膜電位低下. Bar=60 μm. B: ミトコンドリア膜電位(High/Low ΔΨ_m). IVFの平均値を1とした相対値. 値は平均値±S.D. ^a_b*P*<0.05

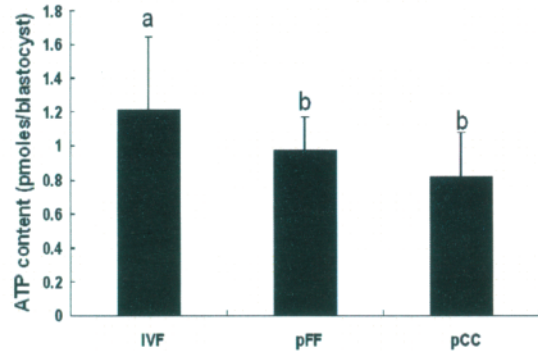


図16. IVFおよびSCNT胚におけるD5BLのATP含量. 値は平均値±S.D. ^a_b*P*<0.05

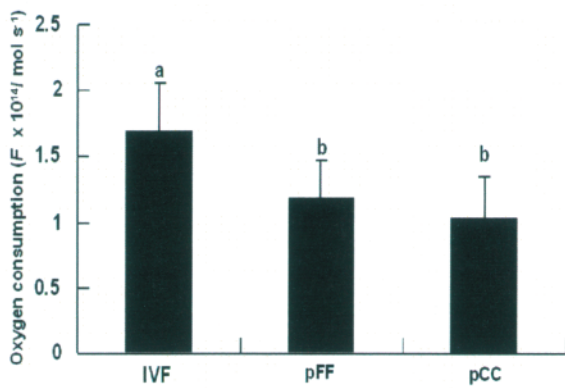


図17. IVFおよびSCNT胚におけるD5BLの最大酸素消費。値は平均値±S.D. $^{a-b}P < 0.05$.

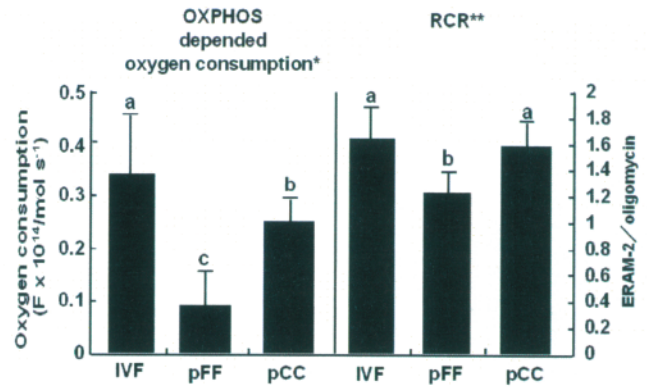


図19. IVFおよびSCNT胚におけるD5BLのOXPPOS依存的酸素消費とOXPPOS効率。*無添加(ERAM-2)での酸素消費とoligomycin添加酸素消費の差。**ERAM-2での酸素消費:oligomycin添加での酸素消費の比率。値は平均値±S.D. $^{a-c}P < 0.05$.

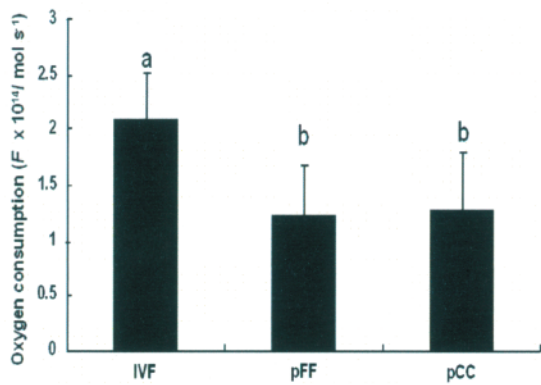


図18. IVFおよびSCNT胚におけるD5BLのcytochrome c oxidase (COX) 活性。値は平均値±S.D. $^{a-b}P < 0.05$.

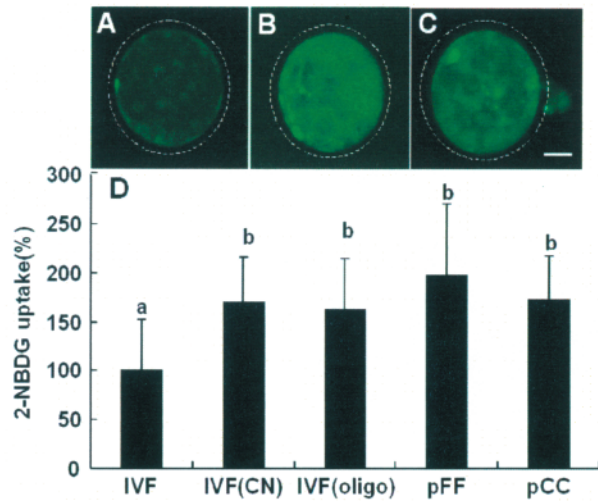


図20. IVFおよびSCNT胚におけるD5BLの2-NBDGの取り込み。A-C: IVF(A), pFF(B)およびpCC胚におけるD5BLの2-NBDG取り込み像。Bar=40 μm 。D: 2-NBDGの取り込み。IVFの平均値を100%とした。値は平均値±S.D. $^{a-b}P < 0.05$.

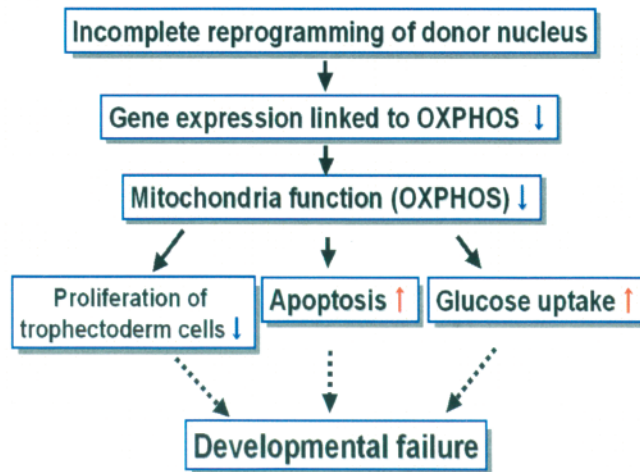


図21. プタ体細胞核移植胚の发育停止原因の可能性

論文審査結果要旨

ブタ体細胞核移植(SCNT)技術は、畜産分野のみならず医学・薬学の分野への応用が期待されている。近年、東北大学動物生殖科学の研究グループを含め徐々にブタ SCNT クローン個体の作出成功が報告されてきているが、その作出効率は1%以下と極めて低い。しかしながら、その原因は詳細になっておらず、その原因の解明が急務になっている。本研究では、ブタ SCNT 胚の特徴および異常性の解析を目的とし、ミトコンドリア機能に焦点をあて、ブタ SCNT クローン個体の発育停止の一因を明らかにしようとしたものである。得られた知見は下記の通りである。

1) SCNT 胚における培養5日目胚盤胞(D5BL)の酸素消費は体外受精(IVF)胚に比べ低く、このことが栄養膜(TE)細胞の増殖性低下およびアポトーシス陽性細胞の増加に影響を与えている。2) SCNT 胚におけるD5BLの低い酸素消費は、人為的活性化刺激、顕微注入操作、体細胞質の混入、ドナー細胞とレシピエント卵子の遺伝的バックグラウンドの相違によるものではなく、移植したドナー細胞核の不完全な制御といったSCNT胚特異的な原因によるものである。3) SCNT胚はミトコンドリアの代謝状態がIVF胚とは異なり、特にOXPHOS関連遺伝子群の発現低下によりOXPHOSシステムの機能が低下していること、さらにその機能はドナー細胞種の違いによっても変化すること、一方、ミトコンドリア機能の低下に伴い、解糖系が亢進し、グルコースの取り込みが増加している。

以上のことから、ブタ SCNT 胚ではドナー細胞核の不完全もしくは不適切な初期化によるOXPHOS関連遺伝子群の発現低下に伴い、ミトコンドリア機能、特にOXPHOSシステムの機能が低下することで、TE細胞の増殖性低下、アポトーシス陽性細胞の増加さらには解糖系の亢進に伴うグルコースの取り込み増加といった異常が引き起こされ、結果として発育が停止している可能性が示された。ブタ SCNT 胚におけるミトコンドリア機能の低下といった発育・生存に必須な機能の異常性の証明は発育停止の原因を詳細にするうえで極めて大きな知見であるとともに、ミトコンドリア機能がブタ SCNT 胚の発育・生存の成否の指標になりうることを示すものである。したがって、本研究で得られた知見は、ブタ SCNT 胚の発育停止の原因解明と共に、今後のブタ SCNT 技術の改善と安定化に大きく貢献するものである。よって博士(農学)の学位を授与できるものと判定した。