

学位論文題名

Developmental reprogramming of nuclear
transplant mouse embryos

（マウス核移植胚における発生の初期化）

学位論文内容の要旨

マウス核移植胚の発育におけるドナー核とレシピエント細胞質との相互作用を調べることで、核移植胚の初期化、すなわち、発生途中である胚の核を発生の初期である受精の状態まで戻す能力を増進させる可能性を検討した。

はじめに、マウス2細胞期胚の割球の電気融合を行い、融合および融合胚の体外発育に対する様々な電気刺激の影響を調べた。交流電流は割球の融合および融合胚の体外発育に影響を与えなかった。ワイヤチャンバーを用いた場合、比較的広い範囲の直流電流（パルス電圧1.0~2.5 kV/cm、パルス幅30~90 μ secならびにパルス回数1~6回）を適用しても高い融合率と胚盤胞への発育率が得られた。しかし、直角型チャンバーを用いた場合、融合胚の体外発育率に適したパルス電圧は1.0 kV/cmに限られた。

第二に、核移植胚の発育に及ぼす核と細胞質の影響を調べた。F1およびICR系マウスの前核期胚由来の核と細胞質を用いて、前核置換を行った結果、核と細胞質の融合率はマウスの系統によって影響を受けなかった。前核置換胚の胚盤胞への発育率は、F1の細胞質を用いた方（88.8~91.9%）がICRの細胞質（54.1~71.5%）より高い値を示した。さらに、F1の細胞質を用いた場合、核の由来によって胚盤胞への発育率は影響されなかったが、ICRの細胞質を用いると、核の由来によって影響された。

第三に、マウス2、4および8細胞期胚由来の核を1細胞期胚の除核細胞質と融合し、核移植胚の発育に対する細胞質の細胞周期および細胞質量の影響を調べた。後期2細胞期胚由来の核を後期1細胞期胚の除核細胞質と融合させた場合、初期1細胞期胚の除核細胞質と融合させた場合（16.9%）に比べ、高い胚盤胞への発育率（46.3%）が得られた。さらに、後期2細胞期胚由来の核を30~40%の細胞質量を減少させた後期1細胞期胚の除核細胞質に移植することによって、

高い胚盤胞への発育率（85.5%）と細胞数の増加が認められた。しかし、4および8細胞期胚由来の核の発育能は極めて低く、細胞質量を減少させた後期1細胞期胚の細胞質と融合しても胚盤胞への発育はほとんど認められなかった（3.4および0%）。後期2細胞期胚由来の核を細胞質量を減少させた後期1細胞期胚の細胞質と融合させて得られた胚盤胞を偽妊娠マウスに移植した結果、産子（12/42, 28.6%）が得られた。

次に、マウス2, 4および8細胞期胚由来の核を未受精卵の除核細胞質に移植し、核の変化（nuclear remodeling）と核移植胚の発育との関係を調べた。未受精卵は第2減数分裂中期の染色体を除去し、電気刺激によって細胞融合および活性化処置を行った。この方法によって、高い除核率（89.0%）、融合率（88.0~91.6%）および活性化率（95.8~96.9%）が得られた。除核未受精卵と融合した核は融合直後に染色体凝集（premature chromosome condensation）が観察され、さらに、細胞質の活性化により種々の前核形成に類似した核の変化が認められた。後期2細胞期胚由来の核を移植した場合、染色体の凝集の有無を問わず、胚盤胞への発育が認められたが、4および8細胞期胚由来の核を移植した胚は、胚盤胞へ発育しなかった。また、得られた胚盤胞を移植した結果、染色体が凝集し、1つの前核様構造と極体を持った核移植胚のみで産子（2/16, 12.5%）が確認された。さらに、核移植胚の染色体を調べた結果、染色体の凝集が見られた胚の62.5%と染色体の凝集が見られなかった胚の全てで染色体構成の異常が認められた。活性化後の前核様構造の形成パターンおよび染色体構成の結果から、核移植胚の発育は核の細胞周期と関係があることが示唆された。

そこで、ドナー核の細胞周期ステージが核移植胚の染色質構造および発育に及ぼす影響を調べた。2細胞期胚由来の核を除核未受精卵の細胞質に移植、融合および活性化処理したところ、初期ステージの核を移植した胚は1つの前核様構造を形成したが、中期ステージでは不規則な形態を、また、後期ステージでは極体を放出した。さらに、核移植胚のホルマウント標本を作製した結果、ドナー核の細胞周期ステージによって染色質構造に違いがあることが判明した。核移植胚の胚盤胞への発育は、初期2細胞期胚の核を移植した場合、77.8%の高い発育率が得られたが、中期および後期の核を移植した場合には有意に低い（ $P < 0.001$ ）発育率（0および20.8%）を示した。細胞周期の初期ステージにある2, 4および8細胞期胚由来の核を移植することによって、胚盤胞への高い発育率（78.2, 71.4および46.2%）が認められた。また、これらの胚盤胞を偽妊娠マウスに移植した結果、産子が得られ（29.4, 22.2および17.6%）、とくに4および8細胞期胚由来の核移植では世界で初めての成功例となった。

以上の結果から、成熟未受精卵細胞質はマウス2~8細胞期胚由来の核を初期化する能力を

持っていることが判明した。また、核と細胞質との相互作用が核移植胚の初期化に非常に重要な要因であり、核移植胚の完全な初期化のためには、細胞周期の初期ステージにある胚の核を除核成熟未受精卵の細胞質に移植することが重要であることが明らかにされた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 川 弘 司
副 査 教 授 波 岡 茂 郎
副 査 教 授 杉 村 誠
副 査 助 教 授 高 橋 芳 幸

申請者は、マウス核移植胚の初期化について研究を行い、本論文をまとめた。その内容は以下の5つに要約される。

1. ドナー核(核体)とレシピエント卵細胞質の融合に有効な電気融合法について検討を行い、その最適条件を明らかにした。
2. 核移植の一つである核の前核置換を行い、核と細胞質の影響を調べた。その結果、前核置換胚の発育は、レシピエント由来によって影響され、F1マウスの細胞質がレシピエントとして適していることを明らかにした。
3. レシピエントとして除核1細胞期胚を用いた場合、核移植胚の発育は細胞質の細胞周期ステージおよび細胞質量によって影響され、30~40%の細胞質量を減少させた後期1細胞期胚の除核細胞質に2細胞期胚由来の核を移植することによって、発育が向上するが、4細胞期以降の核の初期化は難しいことを明らかにした。
4. レシピエントとして成熟未受精卵細胞質を用いた場合、核移植胚の前核様構造の形成、染色質構造および核移植胚の発育は核の細胞周期ステージによって影響され、初期ステージの核を移植すると、1つの前核様構造を形成して、高い確率で初期化が起り、核移植胚の発育が向上することを明らかにした。
5. 細胞周期の初期ステージにある2、4および8細胞期胚の核を移植することによって、胚盤胞への高い発育率と産子を得た。とくに、4および8細胞期胚由来の核移植では、世界で初めて産子を得ることに成功した。

以上のように、申請者は細胞周期の初期ステージにある核を成熟未受精卵の除核細胞質に移植することによって、核移植胚の初期化が高率に起こることを明らかにした。これらの知見は哺乳動物のクローニング技術の進歩に大きく寄与する。よって、審査員一同は、鄭 熙泰氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。