

学位論文題名

Porcine somatic cell nuclear transfer
using follicular oocytes derived from prepubertal gilt

（性成熟前の豚の卵胞から採取した卵子を用いた体細胞核移植）

学位論文内容の要旨

豚の体細胞核移植は、人への臓器移植用豚の作出法として注目されているが、豚核移植胚の発生率は極めて低い。通常、豚の核移植には食肉用に処理された性成熟前の豚の卵胞から採取した卵子が細胞質体として使用されている。性成熟前の家畜の卵子は性成熟した家畜の卵子に比べて発生能が低く、性成熟前の豚由来卵子の使用が核移植胚の発生率の低い原因のひとつと考えられる。しかし、豚の体細胞核移植技術の実用化には性成熟前の豚由来卵子の利用が必須である。そこで、本研究では豚の体細胞核移植技術の開発を目指して、性成熟前の豚の卵胞内卵子の核と細胞質の成熟能および発生能について検討した。

第一章では、初めに性成熟前の豚の卵胞から採取した未成熟卵子の核成熟に要する時間を検討した。その結果、ほとんどの卵子は 32 時間の成熟培養で第二減数分裂中期（MII 期）に到達した。次いで、32～48 時間培養した卵子を活性化処理すると、単為活性化胚の胚盤胞への発生率は 42 時間培養した卵子が最も高かった。さらに、成熟培養 33 時間目（MII 期到達直後）および 44 時間目に除核した卵子と血清飢餓培養した豚胎子線維芽細胞を融合させた。作出した核移植胚は、それぞれ成熟培養 39～40 時間目（成熟完了前後）および 50～51 時間目に活性化処理して発生能を比較した。その結果、MII 期到達直後に除核して成熟完了時に活性化させた核移植胚の方が胚盤胞への発生率が高かった。以上の結果から、性成熟前の豚の卵胞内卵子は体外で完全に成熟するために MII 期到達後も約 10 時間の成熟培養が必要であり、核移植の細胞質体として使用する場合は MII 期到達時に除核して成熟完了時に活性化処理すると核移植胚の発生率の高いことが示された。

第二章では、性成熟前の豚と経産豚の卵胞から採取した未成熟卵子の核成熟能、単為発生能および核移植胚の発生能について比較した。その結果、両者の卵子の減数分裂における核成熟動態、p34^{cdc2} キナーゼ活性および単為活性化刺激に対する反応に差異は認められなかった。しかし、性成熟前の豚の卵子に由来する単為活性化胚と血清飢餓培養

した卵丘細胞を融合させて作出した核移植胚の胚盤胞への発生率は、経産豚の卵子に由来するものに比べて低かった。また、性成熟前の豚の卵胞内卵子は経産豚の卵子に比べて卵細胞質の直径が小さく、卵子の成熟培養中に卵細胞質の直径は大きくなった。したがって、性成熟前の豚の卵胞から採取した卵子は多くが発育途上にあり、核成熟能は経産豚の卵子と同等であっても細胞質が未成熟なため、核移植の細胞質体として用いた場合に核移植胚の発生率が低くなることが示唆された。

第三章では、性成熟前の豚の卵胞から採取した卵子の細胞質の発育と成熟を促すため、cdc2 キナーゼの特異的な阻害剤である butyrolactone I (BL-I) 存在下での卵子の発育培養を試みた。初めに、卵子を様々な濃度の BL-I を含む培養液中で 28~72 時間培養した結果、100 μ M BL-I 存在下で 28 時間培養するとほとんどの卵子は卵核胞期に停止していたが、48 時間以上培養すると約半数の卵子が減数分裂を再開した。また、BL-I 処理卵子を 20 時間成熟培養すると、無処理卵子と同様に MII 期に到達した。さらに、BL-I 処理 (28 時間) 後 20 時間成熟培養した卵子と無処理の卵子を除核し、それぞれ血清飢餓培養した卵丘細胞と融合させ核移植胚を作出した。BL-I 処理卵子に由来する核移植胚の胚盤胞への発生率は、無処理卵子由来の核移植胚と同等であった。これらの結果から、性成熟前の豚の卵子の減数分裂は BL-I 処理により可逆的に抑制でき、BL-I 処理卵子は発生能を損なうことなく核移植の細胞質体として利用できることが分かった。

本研究の結果、性成熟前の豚の卵胞から採取した卵子は核成熟後約 10 時間で細胞質も成熟して発生能を獲得するため、この時点で核移植に使用すると核移植胚の発生率が改善されることが分かった。また、性成熟前の豚由来卵子を用いて作出した体細胞核移植胚は経産豚卵子に由来する核移植胚に比べ発生能が低く、その原因は性成熟前の豚の卵子が発育途上で未熟な細胞質にあることが分かった。さらに、BL-I を用いた発育途上にある卵胞内卵子の体外発育培養法開発の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 芳 幸
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 伊 藤 茂 男
副 査 助 教 授 片 桐 成 二

学 位 論 文 題 名

Porcine somatic cell nuclear transfer using follicular oocytes derived from prepubertal gilt

(性成熟前の豚の卵胞から採取した卵子を用いた体細胞核移植)

豚の体細胞核移植技術の実用化には食肉用に処理された性成熟前の豚の卵胞から採取した未成熟卵子の利用が必須である。申請者は、性成熟前の豚の卵子を用いた核移植技術の開発を目指して研究を行った。

はじめに、性成熟前の豚から採取した未成熟卵子の体外培養における核成熟に要する時間を調べるとともに、成熟培養時間の異なる卵子を用いて作出した核移植胚の発生能を検討した。その結果、性成熟前の豚の卵子は、核成熟の約 10 時間後に発生能が最も高くなり、核移植の細胞質体として使用する場合もこの時期に活性化処理を施すと核移植胚の発生率が高くなることを見いだした。ついで、性成熟前の豚と経産豚の未成熟卵子の成熟能、単為発生能および核移植胚の発生能について比較した。その結果、両者の卵子の核成熟動態、p34^{cdc2} キナーゼ活性および単為活性化刺激に対する反応に差異は認められなかった。しかし、性成熟前の豚の卵子に由来する単為発生胚と核移植胚の発生率は経産豚の卵子に由来するものに比べて低く、その原因が性成熟前の豚の卵子の未成熟な卵細胞質にあることを明らかにした。そこで、性成熟前の豚の卵細胞質の発育・成熟を促す方法を開発するため、p34^{cdc2} キナーゼの特異的な阻害剤である butyrolactone I (BL-I) 存在下での卵子の発育培養を試みた。その結果、性成熟前の豚の卵子の減数分裂は BL-I 処理で可逆的に抑制でき、処理卵子を核移植の細胞質体として利用しても核移植胚の発生に悪影響のないことを示した。

以上のように、申請者は性成熟前の豚の卵胞内卵子の核および細胞質の成熟と発生能の特徴を明らかにして核移植胚の発生率を向上させるとともに、減数分裂を一時抑制して卵子の成熟を促す培養法の可能を示し、豚の核移植技術の実用化に必要な貴重な知見を提供した。よって、審査員一同は申請者が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有すると認めた。