

博士（獣医学） マリオ アントニオ マルティネス ディアス

学位論文題名

Studies on the fusion/activation treatment for the production of porcine somatic cell nuclear transfer embryos

(豚の体細胞核移植における融合・活性化処理に関する研究)

学位論文内容の要旨

豚における体細胞核移植は遺伝子組み換え豚を作出する技術として注目されている。しかし、豚の体細胞核移植胚の発生率は極めて低く、発生能を向上させる研究が望まれている。核移植胚の発生能は各種の要因に影響されるが、本研究では、体外成熟（第二減数分裂中期；M II 期）卵子（細胞質体）と体細胞（核体）を用いて核移植胚を作出し、融合・活性化処理が核移植胚の発生に及ぼす影響について検討した。

第1章では、まず除核卵子と血清飢餓培養をした卵丘細胞（90%以上がG0/G1期）に直流電気刺激（150 v/mm, 100  $\mu$ sec）を加えて融合・活性化処理を施した結果、90%以上の融合率は得られたが、作出された核移植胚の分割率と胚盤胞への発生率は低かった。そこで、同じ電気刺激を加えたM II期卵子をタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミド（CHX）中で6時間培養し、その後の単為発生能を調べたところ、CHX処理を加えることにより単為発生胚の分割率も胚盤胞への発生率も改善されることを突きとめた。また、同じ電気刺激とCHX処理を核移植胚にも施した結果、核移植胚の分割率も胚盤胞への発生率も改善されることが分かった。

第2章では、電気刺激後のCHX処理の有効性とともに融合と活性化処理の間隔が核移植胚の発生に及ぼす影響を調べた。実験に先立ち、豚卵子の体外成熟培養における核成熟動態と融合および活性化の電気刺激条件を検討し、若い成熟卵子が得られる体外成熟培養条件と適度の融合および活性化用の電気刺激条件を決定した。血清飢餓培養した卵丘細胞を用いて、活性化電気刺激（150 v/mm, 100  $\mu$ sec）で融合・活性化処理（融合・活性化同時処理：FAS）するか、あるいは活性化電気刺激を加える1.5～4.5時間前に融合用の電気刺激（150 v/mm, 25  $\mu$ sec）を加え（活性化刺激前に融合：FBA）、核移植胚を作出した。両群の核移植胚はCHX処理の有無により、さらに2群に分けて発生能を比較検討した。その結果、CHX無処理群では融合と活性化刺激の時間間隔が長くなるほど分割率は向上したが、胚盤胞への発生率に差異は見られなかった。

一方、CHX 処理群では、いずれも高い分割率は得られたが、胚盤胞への発生率は FAS 処理をした核移植胚だけが高い値を示し、融合直後に起こる CHX 感受性の変化が核移植胚の発生を左右することが示唆された。そこで、FAS+CHX および FBA+CHX 処理した核移植胚の p34<sup>cdc2</sup> キナーゼ活性と核相の変化を調べた。その結果、両処理で作出された核移植胚の p34<sup>cdc2</sup> キナーゼ活性は融合後速やかに低下し、M 期促進因子(MPF)活性は処理により差異の無いことが示唆された。また、FAS+CHX 処理した胚の移植核は融合後速やかに染色体凝縮から前核様の形態へと変化したが、FBA+CHX 処理群の移植核は CHX 処理を受けるまで染色体が凝縮していた。このことから、FAS+CHX 処理では MPF と細胞分裂抑制因子(CSF)の活性が融合直後から低下するのに対し、FBA+CHX 処理では MPF 活性が低下しても CHX 処理を受けるまで CSF 活性は高い状態にあることが示唆された。

第 3 章では、M II 期の除核卵子と遺伝子(*enhanced green fluorescence protein: EGFP*)を導入あるいは無処理の豚胎子線維芽細胞を用いて、FAS+CHX あるいは FBA+CHX 処理により核移植胚を作出して、FAS+CHX 処理の有効性と核体への遺伝子導入の影響を調べた。その結果、核体への遺伝子導入の有無に拘わらず、FAS+CHX 処理により作出された核移植胚は FBA+CHX 処理により作出された核移植胚に比べて胚盤胞への発生率が高かった。また、融合・活性化処理の違いに拘わらず、核体への遺伝子導入が核移植胚の発生へ与える影響は認められなかった。さらに、EGFP 遺伝子を導入した線維芽細胞由来の核移植胚(桑実胚と胚盤胞)には EGFP 遺伝子の発現を示す緑色蛍光が観察され、初期化の指標となる Oct-4 遺伝子の発現も確認された。これらの結果から、胎子線維芽細胞を核体とした場合にも FAS+CHX 処理の有効性が確認された。また、核体への EGFP 遺伝子の導入は核移植胚の発生に悪影響の無いことも示唆された。

以上の研究結果から、豚の体細胞核移植胚は、直流電気刺激で融合・活性化(FAS)させた直後に CHX 処理を加えると発生率が向上することが明らかになった。また、この FAS+CHX 処理による融合・活性化は EGFP 遺伝子を導入した体細胞にも有効であることが確認された。さらに、核体と細胞質体の融合直後に起こる CHX 感受性の変化ならびに CSF と MPF の活性低下が体細胞核移植胚の初期化および発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査教授 高橋芳幸

副査教授 岩永敏彦(医学研究科)

副査教授 葉原芳昭

副査助教授 片桐成二

## 学位論文題名

Studies on the fusion/activation treatment for the production of porcine somatic cell nuclear transfer embryos

(豚の体細胞核移植における融合・活性化処理に関する研究)

申請者は、豚の体細胞核移植胚の発生能を向上させるため、体外成熟卵子と体細胞を用いて核移植胚を作出し、融合・活性化処理法について検討した。

まず、除核卵子と血清飢餓培養卵丘細胞に直流電気刺激を加えて融合・活性化した核移植胚にタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミド(CHX)処理を加えたところ、胚盤胞への発生率が改善されることを突きとめた。そこで、CHX処理の有効性ならびに電気刺激による融合と活性化の間隔の影響について調べ、CHX無処理では融合と活性化刺激の時間間隔が長くなるほど分割率は向上するが、胚盤胞への発生率は改善されないこと、CHX処理を加えた場合には融合と活性化刺激の間に拘わらず高い分割率は得られるが、胚盤胞への発生率は融合・活性化を同時に誘起(FAS処理)した時にだけ改善されることを明らかにした。また、FAS+CHX処理を施した核移植胚では融合直後からM期促進因子(MPF)と細胞分裂抑制因子(CSF)の活性が低下し、融合と活性化刺激の間隔をあけると融合直後にMPF活性が低下しても活性化刺激およびCHX処理するまでCSF活性が高いことを示した。さらに、遺伝子(*enhanced green fluorescence protein gene*)を導入した豚胎子線維芽細胞を用いて核移植胚を作出し、FAS+CHX処理の有効性、遺伝子導入が核移植胚の発生に悪影響の無いこと、ならびに核移植胚の初期化の指標となるOct-4遺伝子の発現も確認した。

以上のように申請者は、豚体細胞核移植胚の発生能を向上させる融合・活性化法を開発し、この方法が遺伝子導入核移植胚にも有効であることを明らかにした。また、融合直後に起こるCHX感受性の変化なら

びに CSF と MPF の活性低下が核移植胚の発生に重要な役割を果たしていることを示した。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。