

氏名（本籍）	上村 悟氏		
学位の種類	博 士（ 農学 ）		
学位記番号	博 甲 第	7353	号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	マウス核移植技術の新しい実用化および応用に関する研究		
主査	筑波大学教授（連携大学院）	農学博士	小倉 淳郎
副査	筑波大学教授	農学博士	馬場 忠
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	柏原 真一
副査	筑波大学准教授（連携大学院）	博士（理学）	井上 貴美子

論 文 の 要 旨

本論文では、マウス核移植技術の発展的利用を目指し、実用化および応用研究に関する以下の二点に着目して研究を行った。

第一に、これまでのマウス核移植技術をさらに実用的に用いるための核移植システムの構築を目指し、微量末梢血球細胞を用いた新たなマウスクローン作成法を開発した。非選択的に採取した末梢血（15- 45 μ l）由来の血球細胞（白血球）を核ドナーとして用いて、マウスクローン産仔を獲得することに成功した。しかし、白血球のうちリンパ球は再構成 DNA 配列を有しているため、ドナー個体のゲノム情報の正確なクローニングとはならず、ドナー細胞としては適さない。そこで、核移植を実施する上でリンパ球以外の白血球（顆粒球および単球）を選択するための方法を、FACS 解析および顕微鏡観察を用いて検討したところ、細胞サイズを指標に顕微鏡下で高効率に選別できることが分かった。この選別法を用いて、顆粒球・単球クローン産仔とリンパ球クローン産仔をそれぞれ獲得することが出来た。また、不妊の遺伝子改変系統マウスを用いて顆粒球核移植クローンを実施し、産仔を得ることに成功した。

第二に、核移植技術を応用したエピジェネティクス研究モデルを発展させるために、ゲノムインプリンティングに着目し、異なる発生ステージのマウス雄性生殖細胞（前精原細胞）をドナーとしたクローン胚を解析することで父性インプリントの詳細な確立時期について明らかにした。ゲノムインプリンティングは、父性アレルと母性アレルいずれかの片親性発現を示すエピジェネティックメカニズムの1つであり、生殖細胞形成過程で確立することが知られている。父性インプリントが確立されるタイミングである、胎齢 15.5 日から 17.5 日の前精原細胞をドナーとした核移植クローン胎仔（胎齢 9.5 日）の differentially methylated region (DMR) の DNA メチル化と、それによって制御されるインプリント遺伝子発現解析を実施したところ、全ての父性インプリント領域（IG-DMR、*H19*DMR、*Rasgrf1* DMR）におけるインプリントは、胎齢 16.5 日の短い変換期を経て、胎齢 17.5 日で完了することを示した。さらに、*Rasgrf1* DMR は他の 2 領域（IG-DMR および *H19*DMR）よりもインプリントの確立がわずかに遅れることを示した。また、IG-DMR は単体でその領域内に存在するインプリント遺伝子発現を制御するが、*H19* 領域では *H19* DMR のメチル化状態に加えて何らかの因子がインプリント遺伝子の発現パターンを制御している可能性が示された。受精後にメチル化を獲得する secondary DMR として知られる *Gt12* DMR はその上流に存在する IG-DMR に従ってメチル化を獲得する可能性が示唆された。

以上のように本研究においては、核移植技術の新しい実用的利用法の可能性を示すとともに、そのエピジ

エネティクス研究への応用の意義を高めることに成功した。今後、いっそうの技術改良が進むことにより、核移植技術の実用および研究目的の利用が促進されることが期待される。

審 査 の 要 旨

マウス核移植技術を実用的に用いる場合の技術的な欠点として、(1)多くの手法ではドナー細胞を侵襲的に回収しなければならない、(2)非侵襲的に採取可能な繊維芽細胞を用いる場合でも長期培養が必須で、直ちに核移植を実施することが出来ない、などの問題点が挙げられる。本研究で開発された微量の末梢血に由来する血球細胞をドナー細胞として用いるクローニング法は上記の欠点を回避できるため、体外受精や顕微授精のような生殖補助技術によって保存・維持することが困難な貴重なマウス系統を複製するために使用することが期待される。

また、マウス雄性生殖細胞の父性インプリント確立は妊娠中期から始まることが知られているが、従来の方法では生殖細胞集団を解析しているために、DNAメチル化解析しか実施できず、同一ゲノム内 DMR を比較検討することは困難であった。しかし、核移植技術を用いることによって、インプリント遺伝子発現解析が実施できるという利点に加え、同一ゲノム内 DMR の比較も可能となる。本研究によって明らかにされた、(1) *H19* DMR 以外の因子がインプリント遺伝子を制御している可能性、(2) *Rasgrf1* DMR は他 2 領域よりもインプリント確立が遅れる、(3) *Gtl2* DMR は非自律的にメチル化を獲得する、という現象は、核移植を用いた解析だからこそ実証された結果で、新規性が認められる。これまでに、核移植技術を用いて生殖細胞形成過程におけるインプリント消去過程、および母性インプリント確立過程が明らかにされてきたが、本研究においては父性インプリント確立過程の詳細なメカニズムを明らかにすることによって、インプリント形成の全体像を明らかにすることに成功した。

以上の点から、本論文は高度発生工学技術である核移植の実用化・応用化に貢献し得る重要なアプローチを示しており、当該研究分野にとっても価値の高い知見を提供していると言える。

平成 27 年 1 月 19 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査および最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。