

5. 総合考察

5-1. 核移植効率の改善

PGCs と EBCs との電気融合において、第 3 章では 10% 前後の高い融合効率を示したが、第 4 章では約 3.6% と半分以下の成績であった。

細胞間の電気融合では、細胞膜上の蛋白質の存在が融合効率に影響することが推測されている (Zimmermann *et al.*, 1984)。一方、PGCs はその発達に伴って、膜表面蛋白質が変化することが知られている (Nagano *et al.*, 1995; Halfter *et al.*, 1996; D'Costa and Petite, 1999)。実験 2 と実験 3 における融合効率の違いは、2 日胚の血液中を循環する PGCs と生殖腺に定着した後の PGCs の膜表面蛋白質の違いに起因するものと考えられる。したがって、核移植 PGCs 作製効率の改善には、PGCs を採取するドナー胚の発生ステージについて検討する必要がある。

また、今回の実験における試算では、核移植 PGCs を用いた生殖系列キメラニワトリの作製には 10^4 以上の PGCs を用いる必要があることが示された。このような多数の PGCs を複数の胚から準備するには、多大な時間と労力を要する。従って、培養 PGCs の利用も検討する必要がある。PGCs の培養は、多くの場合、支持細胞を用いた共培養で行われる。Chang *et al.* (1995a) は、5 日胚生殖腺の間質細胞を支持細胞として用いた 5 日間の共培養で、PGCs が約 3~7 倍に増殖したことを報告した。Yang and Fujihara (1999) は、培養期間を 17 日まで延長し、約 29 倍の増殖率を得た。さらに、Fukushima and Fujihara (2001) は、支持細胞として 5~7 日胚の左右それぞれの生殖腺の間質細胞を用いて PGCs の増殖率を比較し、5 日胚の左側生殖腺を用いた場合に

最も高い増殖率を示すことを明らかにするとともに、30日間の培養によって約100倍の増殖率を達成した。一方、Kawashima et al. (2002)は、PGCsの単独培養を試みた。培養液として、発生ステージ27の胚より採取した繊維芽細胞を飽和状態で24時間培養した培養液を用いた。その結果、多くのPGCsが5日間の培養期間の間に、1~3回細胞分裂することを確認し、単独培養も可能であることを示した。このように培養したPGCsを用いた生殖系列キメラの作製が可能であることも確認されているため (Chang et al., 1995b)、核レシピエントとして、培養PGCsも選択肢の一つとして検討を要する。

今回、体細胞としてEBCsを用いた。鳥類のEBCsは、有核であり、また比較的同質な集団を容易に採取できるため、非常に利用価値の高い細胞である。しかし、核移植技術を遺伝資源の保存に応用することを考えた場合、繊維芽細胞など増殖性の高い細胞を培養して用いることは、保存効率を高めるために必要である。また、トランスジェニック動物の作製への応用では、多数の体細胞に対して遺伝子導入操作が行われる。そのなかで目的の遺伝子改変を達成できた細胞のみを選択し、増殖させた上で核移植に用いることによって、トランスジェニック動物の作製効率を飛躍的に向上させることができるものと期待される。従って、今後は、培養細胞を核ドナーとして利用することも試みる必要がある。

哺乳動物の核移植では、核ドナー細胞およびレシピエントとなる卵子や1細胞期胚の細胞周期のステージの組み合わせが、核移植後のDNA合成や胚発生に影響することが知られている (Cambell et al., 1996; Kurosaka et al., 2002)。このことは、PGCsをレシピエントとした核移植でも細胞周期の組み合わせに配慮する必要があることを示唆しており、それぞれの細胞の細胞周期の同期化、およびその組み

合わせが PGCs の増殖や分化に及ぼす影響を明らかにする必要がある。

5-2. 核移植 PGCs の発達と分化

本研究では、紫外線照射による機能的除核および電気融合によって作製された核移植 PGCs が生殖腺へ移住できることが示され、また移住した核移植 PGCs が PGCs に特徴的な形態をしていることから、核移植 PGCs を用いた生殖系列キメラ胚の作製が可能であることが示唆された。しかし、今後、核移植 PGCs 内で体細胞核がリプログラミングされ、生殖細胞の核として機能し、核移植 PGCs が正常に精子や卵子に分化することを確認する必要がある。

卵子をレシピエントとした体細胞核移植において、リプログラミングは「初期化」と和訳され、分化した体細胞の核が再び分化全能性を獲得する過程を指す。最近の研究において、体細胞核の初期化には、DNA のメチル化やゲノムインプリンティング、X 染色体の不活化、染色質の立体構造、テロメアなどの変化が必要であり、それにはレシピエントの細胞質に存在する様々な因子が関わっているとされている (Shi et al., 2003)。

これまで、本研究のように、PGCs をレシピエントとして用いた例はない。PGCs へ移植した体細胞核も、リプログラミングされることが必要であると考えられるが、この場合のリプログラミングとは、初期化とは異なり、生殖細胞決定因子の関与が必要であると考えられる。

生殖細胞の発生、分化、およびそれに関わる細胞内因子の解析は、

ショウジョウバエにおいて研究が進んでいる。ショウジョウバエの生殖細胞は、発生初期に形成される極細胞に由来する。また、極細胞の形成には、受精卵の後極に局在する極細胞質が必要である (岡田・長濱, 1996)。Page *et al.* (2000)は、極細胞質の形成に *mei-P26* 遺伝子が、関与していることを明らかにした。また、極細胞質は、極顆粒と呼ばれる電子密度の高い構造物が主となって構成しており、極顆粒とそれに由来する構造物は、生殖系列の分化過程のほぼ全ステージで観察されることから、極顆粒に生殖細胞の分化に必要な因子が局在されると考えられる (岡田・長濱, 1996)。さらに極顆粒の分子解析により、Oskar、Vasa、Tudor、Nanos などの蛋白質などが同定され、それらが、生殖細胞の形成や分化、移動などに関与していることが明らかとされた (小林, 1998)。

また、極細胞質と極めて類似した Nuage material と呼ばれる構造物が線虫 (飯野, 1998)やゼブラフィッシュ (柴田ら, 1998)、アフリカツメガエル (池西, 1998)、マウス (阿部, 1998)などの生殖細胞に発見され、これは生殖質と呼ばれる。さらに、生殖質から Vasa 蛋白質や Nanos 蛋白質のホモログも分離され、生殖細胞形成への関与が指摘されている。Tsunekawa *et al.* (2000)は、ニワトリの生殖細胞から Vasa ホモログ (CVH) 蛋白質を同定し、さまざまなステージの生殖細胞における CVH の発現および生殖質と類似した構造物の存在を確認した。未だ CVH 蛋白質の機能は明らかにされていないが、生殖細胞にのみ局在していることから、やはり生殖細胞形成への関与が予想されている。

その他にも、これまで生殖系列特異的な因子が多数同定されている。無精子症の男性において欠損していることが発見された DAZ 遺伝子もその一つである (Reijo *et al.*, 1995)。DAZ 遺伝子はヒト Y 染

染色体上に位置しているが、このホモログが常染色体からも同定されており (DAZL 遺伝子)、いずれも精粗細胞から円形精子細胞に特異的に発現していることが示されている (Reijo *et al.*, 2000)。これらの遺伝子のホモログは、ショウジョウバエ (Cheng *et al.*, 1998)、線虫 (Karashima *et al.*, 2000)、アフリカツメガエル (Houston *et al.*, 1998)、マウス (Cooke *et al.*, 1996) など広い動物種で発見されている。

そのほか、マウスの生殖細胞で発現している因子として、Meg1、TRA369、Calmegin (Watanabe *et al.*, 1994)、熱ショック蛋白質である Hsp70-2 (Dix *et al.*, 1996) や Apg-1 (Kaneko *et al.*, 1997)、Tex261 (López-Fernández *et al.*, 1998)、サイクリン A1 および A2 (Ravnik and Wolgemuth, 1999)、*mil-1* および *mil-2* (Tanaka and Matsui, 2002) などが知られている。

リプログラミングは、このような生殖細胞に特異的な因子を含んだ細胞質に、体細胞核が影響されることによって起きるものと予想される。

また、PGCs の DNA は、脱メチル化された状態であること (Maatouk and Resnick, 2003)、体細胞は分化に伴ってメチル化される領域が増えていくこと (Dean *et al.*, 2003) から、初期化と同様に、体細胞核の脱メチル化もリプログラミングに関わりがあるかもしれない。

一方、PGCs の移植による生殖系列キメラの作成において、PGCs の遺伝的性に関わらず、レシピエントの性に従って PGCs は発達し、オス PGCs 由来卵子や、メス PGCs 由来精子が生産されるものの、キメラ作出効率は低くなることが報告されている (Naito *et al.*, 1999)。このことは、核移植 PGCs の作成において、体細胞、PGCs およびレシピエント胚それぞれの性の組み合わせについても、検討が必要であることを示唆している。

5-3. まとめ

本研究では、はじめて PGCs をレシピエントとした核移植について検討した。

物理的に除核することが難しい PGCs を、紫外線照射によって機能的に除核し、電気融合によって体細胞核を導入することで、体細胞核移植 PGCs が作製できることが明らかとなった。また、体細胞核移植 PGCs を 2 日胚血管中に注入すると、核移植 PGCs は生殖腺へ移住できることも明らかとなり、核移植 PGCs を用いた生殖系列キメラ胚の作製が可能であることが示唆された。これらの結果は、体細胞核移植ニワトリ作製を実現するための、大きな第一歩であると考えられる。

しかし、核移植 PGCs がレシピエント胚において正常に発達、分化できるのか、今後確認する必要がある。通常、生殖腺原基へと移住した PGCs は、その後急激に増殖し、精粗細胞あるいは卵祖細胞へと分化する。精粗細胞は減数分裂や形態的变化を経て精子へ分化し、卵祖細胞は減数分裂のほか、卵黄の蓄積や卵胞の形成などを経て卵子へと分化する。従って、今後、レシピエント胚の生殖腺へ移住した核移植 PGCs を追跡し、このような正常な分化の過程を辿ることができるのか、生体内での研究が必要である。一方、核移植 PGCs 内の体細胞核のリプログラミング、および生殖細胞として必要な因子の発現の確認など、生体外での核移植 PGCs の機能的解析も望まれる。更に、核移植 PGCs 由来配偶子の受精による産子の作出によって、体細胞核移植ニワトリ作製技術の完成が強く望まれる。