

体細胞からの個体形成 —細胞のリプログラミングの現状と課題—

今井 裕（京都大学大学院 農学研究科 生殖生物学研究室）

はじめに

生物の体を構成している体細胞は、細胞としての役割分担が決められている。例えば、心臓のリズミカルな心拍を生み出している心筋細胞は、神経組織で情報の伝達に携わっている神経細胞とは、それぞれの性質は明らかに異なっている。細胞の役割分担が決定してゆく過程を細胞分化とよぶが、この細胞分化の過程が逆戻りすることも、まして、この細胞から個体ができることは自然界ではありえないことである。

20世紀前半、ドイツの発生生物学者シューペーマンは、細胞の分化について次のような疑問を抱いている。細胞分化の過程は非可逆的なものであり、分化にともない核内の遺伝情報が書き換えられてゆくのか、あるいは、分化した細胞の性質は見かけ上異なるが、核は個体を形成しうるすべての遺伝情報を保持しつづけていくのか、いずれが正しいのであろうかという点である。これを科学的に確かめる手段として、発生初期の胚細胞に分化した細胞を移植する核移植法（クローン技術）を1938年に提唱している¹⁾。この考え方は、後の研究者達に継承され、1952年には、受精後間もない未分化なカエルの細胞を未受精卵内に移植することによって、クローンのカエルを創り出すことに成功し²⁾、1962年には、オタマジャクシの小腸由来の上皮細胞から、成体のカエルを再構成できることが証明されている³⁾。これらのことから、細胞分化の過程は可逆的であり、分化した細胞でも、個体を構成するすべての組織や臓器に再構成しうる能力（全能性）を維持しつづけていることが示された。

哺乳動物では、1970年代の後半になって、マウスを使ってクローンの研究がすすめられてきた。しかし、クローンマウスを創ることは難しく、1996年の権と河野の報告⁴⁾が初めての成功例となる。家畜におけるクローン技術の開発は、応用的側面からみれば、マウスとは全く異なった意味をもつ。1986年ウィラードセン⁵⁾による、受精後8個の割球に分裂した細胞からのクローンヒツジの生産は、クローン技術を家畜生産に応用する上で一つの重要なマイルストーンとなった。また、ここで用いられた手法が、現在の体細胞クローン技術のベースとなっている。

これに対して、1996年キャンベルら⁶⁾によって報告されたヒツジにおける核移植の方法は、従来の概念をまったく変えるものであった。彼らは、妊娠9日目のヒツジ胎子胚盤に由来し、細胞の形態や細胞分化マーカーによって上皮細胞であることが確認された体細胞から、3頭のクローンヒツジを誕生させた。これが哺乳動物における、分化細胞からの初めてのクローン動物の誕生となった。1997年に同じ研究グループから報告された体細胞クローンヒツジ“ドリー”は⁷⁾、手法上も概念上も上記の報告の延長線上にあるにすぎない。

どのような手法を用いれば、体細胞からクローン動物ができるのかは明らかとなった。しかし、どのような仕組みによって、体細胞からクローン動物ができるのだろうか。ここでは、体細胞クローン技術を概説しながら、体細胞から個体が再構成されてゆく不思議について考えてみる。また、実際の講義に際しては、クローン技術の現状とその活用法についても紹介する。

クローン技術の実際

まず、クローン技術を特徴づけている核移植について、その流れを図1に示している。ここでは、受精後間もない細胞を核移植する受精卵クローンと分化した体細胞を用いた体細胞クローンを区別して示している。この図で見る限り、核移植する細胞の種類が異なることと、体細胞の場合は血清飢餓処理をしていること以外に、両者の手順の流れは基本的に同じである。

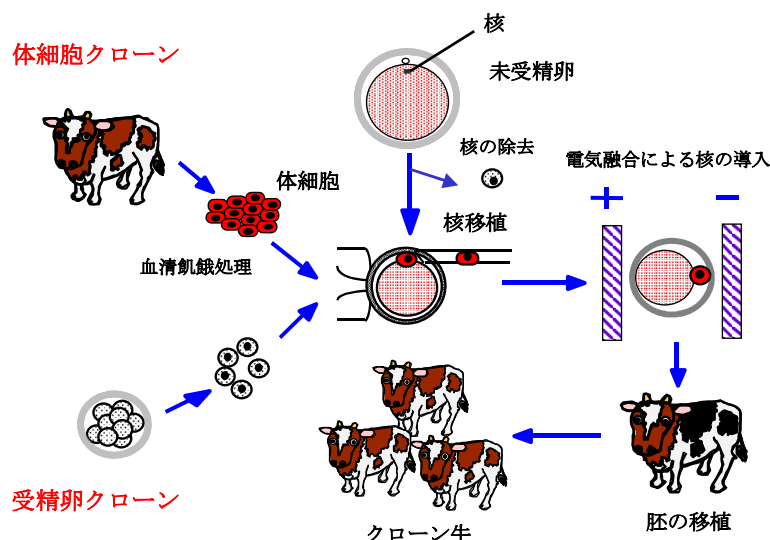


図1 体細胞クローンに用いられる核移植技術

核移植において一つ重要な要因は、対象となる細胞が大変小さいことである。体細胞で $10\mu\text{m}$ 、受精後に分裂した細胞で約 $30\mu\text{m}$ 、受精卵で $100\mu\text{m}$ である。これらの細胞を体外で取り扱うためには、特殊な装置を必要とする。まず、核移植の操作は、倒立顕微鏡という特殊な顕微鏡を用い、マイクロマニピュレーターとよばれる装置を駆使しながら行う (図2)。

核移植には、移植の対象となるドナー細胞とその器となるレシピエント細胞が必要である。ドナー細胞は、レシピエント細胞である未受精卵の中で、個体を構成するすべての組織や臓器を形成する能力 (全能) を獲得すると考えられている。この過程をリプログラミングとよんでいる。

レシピエント細胞は卵細胞としての核をもっているが、核移植によってドナー細胞の核が移植されるので、レシピエントの核は除去 (除核) される (図1)。つ

いで、ドナー細胞をレシピエント細胞に接するようにガラスピペットで導入する。この時点では、ドナー細胞の核はレシピエント細胞内に入っていない。核の移植は、両者の細胞の接触面に対して直流電流を流し、接触面に生じた細胞膜の融合現象を利用する（図 1、電氣的細胞融合）。両者の融合は 15 分程度で終了し、ドナー細胞の核がレシピエントの細胞質内に移植される。

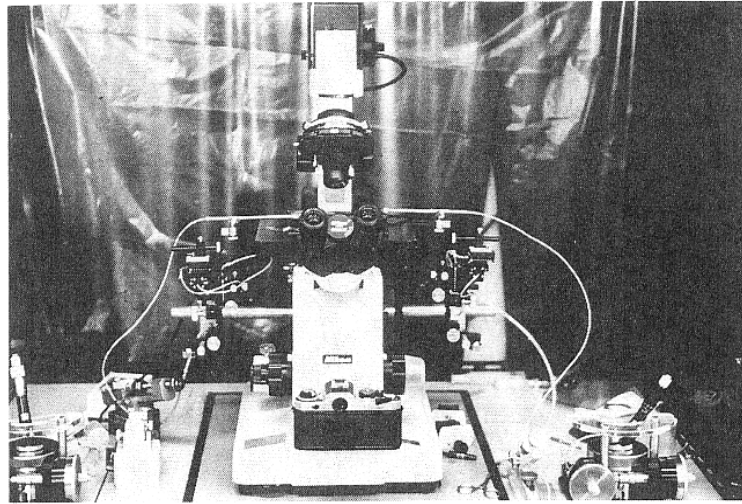


図 2 核移植に用いる倒立顕微鏡とマイクロマニピュレーター

通常の受精とは異なり、核移植には精子は関与しない。受精の場合には、精子が卵子に侵入する刺激がシグナルとなって、個体形成のプログラムが始動する。核移植の場合には、このシグナルがないため、前述した電気による細胞融合がこのシグナルを代用している。このシグナルは、個体形成の開始に重要な要因であるので、電気以外にも、エタノール、カルシウム・イオノフォア、ストロンチウムなど各種の薬剤を併用して、確実に発生開始の指令を与えるようにする。ここでは受精と区別するために、このシグナルのことを活性化刺激とよぶことにする。

核移植の基本的な概念は、未受精卵の中にドナー細胞を導入するという単純なことである。しかし、細かな手法上の違いは、動物種によって、また研究者によって異なっている。クローン技術がそれだけ改善の余地があることを示している。

核移植後の胚は（核移植胚あるいはクローン胚）、体外の条件下でその後発生させることはできない。哺乳動物では、妊娠という複雑で、重要な過程があり、クローン胚は母体にもどさないと成長できない。このため、仮親の卵管あるいは子宮に移し、分娩するまで仮親の子宮の中で育つことになる（図 1）。

表 1 に、これまでに成功している受精卵クローンおよび体細胞クローンの動物種をあげている。クローンが成功している動物種は両者で必ずしも一致しておらず、現在では体細胞クローンの成功例が多くなった。その理由は、体細胞クローンのほうがドナー細胞の調整が容易であることが大きな原因と考えられる。

表 1 クローン動物の成功例

受精卵クローン	体細胞クローン
マウス(1983年)	ヒツジ(1996年)
フェレット(2006年)	マウス(1998年)
ウシ(1987年)	ウシ(1998年)
ラット(1988年)	ヤギ(1999年)
ウサギ(1988年)	ブタ(2000年)
ブタ(1989年)	ムフロン(2001)
ヤギ(1991年)	ミニブタ(2002)
サル(1997年)	ウサギ(2002年)
	ネコ(2002年)
	ラット(2003年)
	ロバ(2003年)
	ウマ(2003年)
	イヌ(2005年)

体細胞のリプログラミング

これまでに述べてきたように、クローン動物を作製するキーポイントは、様々な分化過程にある細胞（ドナー細胞）を個体形成の出発点である未受精卵（レシピエント細胞）に核移植することにある。ドナー細胞から直接個体を創ることはできないので、ドナー細胞の全能性の再獲得は未受精卵に依存し、未受精卵はリプログラミングを誘導する何らかの因子を有していると考えられる。

体細胞クローン技術を開発したイギリスのキース・キャンベルは、体細胞に全能性を与えうる条件として、全能性細胞である未受精卵と体細胞の同調性を重視して考えた。そのための手段として、一つは体細胞を血清飢餓の条件に置くこと（図1）、二つ目はドナー細胞をレシピエント細胞に核移植するタイミングの問題である。この二つの条件は非常に重要であるので、ここで簡単な解説が必要であろう。

前者の血清飢餓処理とは、体細胞を培養する際、通常培養液中に添加している10%の血清を、その二十分の一にあたる0.5%にまで低下させて細胞を培養することである。このことによって、細胞内の遺伝子発現やタンパク質合成能は低下し、細胞はG0期とよばれる細胞周期に誘導される。この状態は、細胞としては休止状態にある未受精卵の状態と似ており、このことがリプログラミングに有効であると考えたのである。体細胞クローン技術は、応用的にも極めて価値があるため、すでに特許が成立しているが、彼のこの考え方は、特許のバックボーンの一つを形成している。このため世界各国の企業を中心として、この考え方がリプログラ

ミングに本質的であるのかがまず検討された。しかし、結果的には血清飢餓処理を行わなくても、クローン動物は生まれることがその後明らかとなり、この処理がリプログラミングに絶対的なものではないことがわかった。

後者の核移植のタイミングについては、具体的には次のような例が挙げられる。活性化刺激とドナー細胞の核を移植するタイミングを変えたものである（図3）。キャンベル自身は G0 期の細胞を核移植し、しばらく未受精卵内で保持した後に受精に類似した活性化をかけることが重要であると予想していた。事実、ドリーはこのような方法で生まれてきたし、マウスのクローンも同様な方法で生まれている。しかし、この方法でなければ成功しないかという、そうではない。この矛盾をどのように考えたらよいのであろうか。

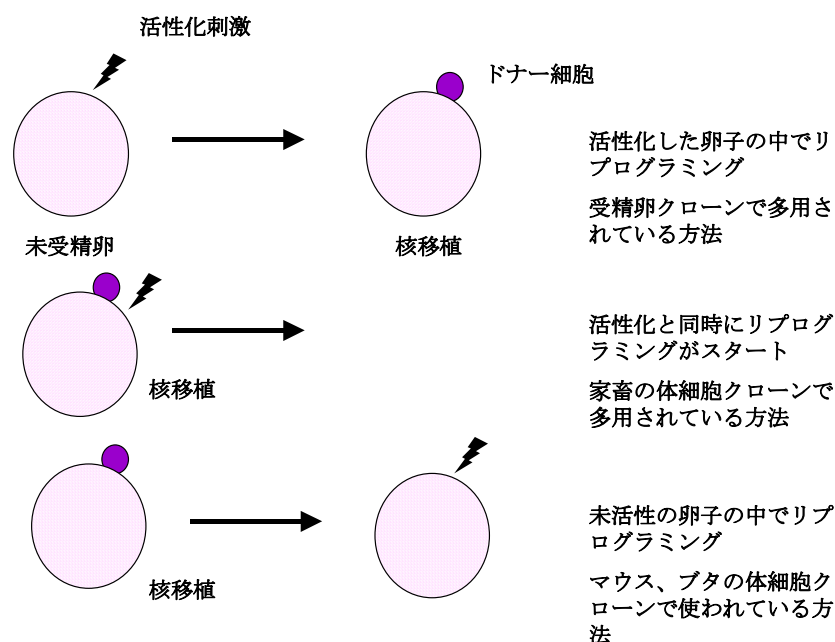


図3 体細胞のリプログラミングにおける核移植と活性化刺激のタイミング

リプログラミングと細胞周期

体細胞クローンが可能になる以前、受精卵に由来するドナー細胞を用いた受精卵クローンがまず成功していた⁵⁾。今でこそ、受精卵クローンの成功率は牛で約30%程度と安定したものとなってきたが、この技術の開発当初は、体細胞クローンの成功率に匹敵するほど低かった。受精卵クローン技術が安定した最大の理由は、レシピエント細胞とドナー細胞の細胞周期を一致させることであった。

活発に増殖する細胞は、細胞内の遺伝子発現や染色体の構造などによって4つのステージに大きく分けられる（図4）。染色体が複製されるDNA複製期（S期）

と複製した染色体を二つの娘細胞に分配する分裂期（M 期）が2つの間期（G1 と G2 期）によって分けられている。分裂を終えた細胞は、増殖活動を停止して静止期（G0 期）に入る場合もある。先に述べた血清飢餓処理によって、細胞を静止期に誘導することもできる。静止期の細胞は、組織の再生など、細胞増殖を促すシグナルによって、再び細胞増殖周期の中に入ってくる。

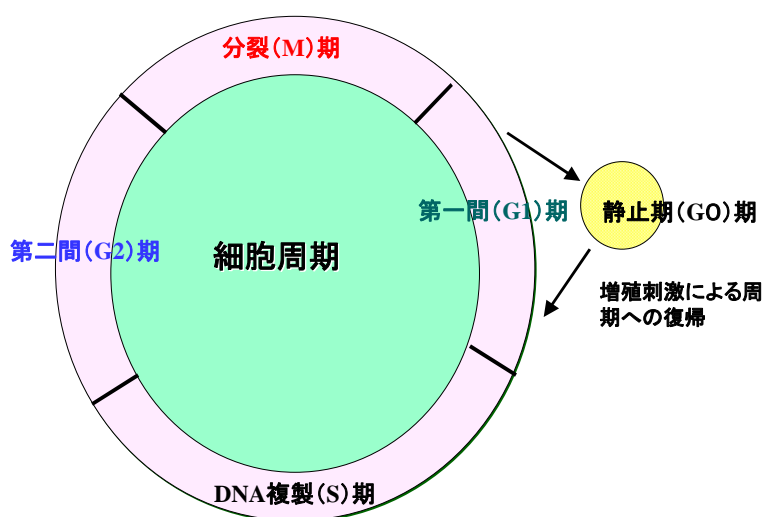


図4 細胞増殖のライフサイクル—細胞周期—

レシピエント細胞である未受精卵は、細胞周期を M 期の途中で停止している、極めて特殊な細胞である。精子による刺激を受けて、受精直後に M 期の分裂を再開し、細胞周期が回り始めると同時に、活発に細胞分裂を繰り返す。この時期の細胞の細胞周期を調べてみると、驚くことにその 90% が S 期にある。受精直後の細胞は、M 期と S 期を交互に繰り返し、G1 や G2 期はないか、あってもきわめて短いと推察される。

受精卵クローンにおける核移植を細胞周期の観点から考えると、レシピエント細胞は M 期であり、S 期のドナー細胞を核移植することになる。つまり、ドナー細胞とレシピエント細胞の細胞周期は一致していないことになる。M 期では、細胞核は分裂に備えて凝集し、染色体を形成している。この染色体の凝集を誘導するのが MPF（M-phase promoting factor、M 期促進因子あるいは Maturation promoting factor、卵成熟促進因子）とよばれる物質であり、未受精卵の細胞質内に豊富に存在する。このため、未受精卵内に導入された核は、凝集して染色体形成に向かう。一方、S 期は DNA を複製する時期であり、染色体構造は G1 期にすでに解かれて、DNA 鎖は複製しやすいように開かれた状態になっている。M 期のレシピエント細胞に S 期のドナー細胞を核移植するとどうなるのだろうか（図3の中央と下段の方法）。S 期の核は、DNA 複製の途上で染色体を構成するように凝集を受け、DNA 鎖はその物理的な力によって分断されると想像される。確かに、

このようにして核移植した胚はほとんど発生しなかったのである。

その後、ドナーとレシピエント細胞の細胞周期の重要性が認識されるようになり、受精卵クローンの場合には、レシピエント細胞にあらかじめ人工的な活性化刺激を与え、その細胞周期をS期にまで移行させた後

に細胞核を移植することによってクローンの生産効率は格段に改善されたのである（図3の上段の方法）。

ドナー細胞としての体細胞は、成体から採取して体外で一定期間培養した細胞を用いる。これらの細胞の細胞周期は、活発に増殖している細胞であっても、その70%程度は静止期（G0期）あるいは間期（G1期）にある。血清飢餓処理により、体細胞をG0期に誘導しても、80%程度の細胞群がG0/G1期に同期化されるにすぎない。つまり、体外で培養した体細胞の細胞周期は、ほとんどがG0あるいはG1期にあるとあってよい。前述の受精卵クローンにおける細胞周期の重要性を考慮すると、体細胞クローンの場合には、レシピエント卵子に核移植し、その直後に活性化刺激をかければ、細胞周期はほぼ一致することになる。受精卵クローンで成功した方法をそのまま体細胞クローンの手法として使うと、胚は全く発生しない（表2）⁸⁾。皮肉なことに、現在の体細胞クローンで用いられている方法は、受精卵クローンの技術開発初期に失敗していた方法なのである。

表2 核移植のタイミングの差と体細胞クローン胚の発生

核移植の方法	核移植胚数	正常分裂胚数 (%)	発生したクローン胚数 (%)
受精卵クローン	181	32 (18)	0
体細胞クローン	101	82 (81)	47 (47)

高橋ら (1998)⁸⁾

リプログラミングの実態

先に述べたように、レシピエント卵子の細胞質はMPF活性による強い染色体凝集作用を持ち、体細胞核は核移植直後にその影響下に置かれる。筆者らは、未受精卵のMPF活性と体細胞核の移植のタイミングをより詳細に検討した(図5)⁹⁾。まず、染色体凝集活性の本体であり、MPFの主要構成成分としてMPF活性と直接関係するcyclin Bの消長を検討した。cyclin Bは活性化刺激直後から消失し始め、2時間後には完全に消失することが分かった。つまり、活性化刺激の2時間後には、未受精卵の染色体凝集活性は低下する。しかし、このまま放置すると、1時間後に再びcyclin Bが出現し、MPF活性が復活する。いったん低下したMPF活性が再度復活することは、通常の受精には見られないので、人工的に与えてい

る活性化刺激が十分でないことは予想される。ここでは、cyclin B の再発現をタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドで処理することにより抑制した。このときの未受精卵の細胞周期は、すでに M 期から G1 期に移行していると考えられるので、DNA 合成阻害剤であるアフィディコリンにより G1/S 期に同期化した体細胞を核移植したところ、これまでの体細胞クローンの方法に比べて、核移植後の分裂胚、発生胚の割合が高まった⁹⁾。このことは、細胞周期をより正確に同調することにより、核の遺伝情報に対する損傷を回避しながら、核をリプログラミングできる可能性を示している。しかし、この方法がクローン個体の生産においても有効であるのかについては検討の余地が残されている。

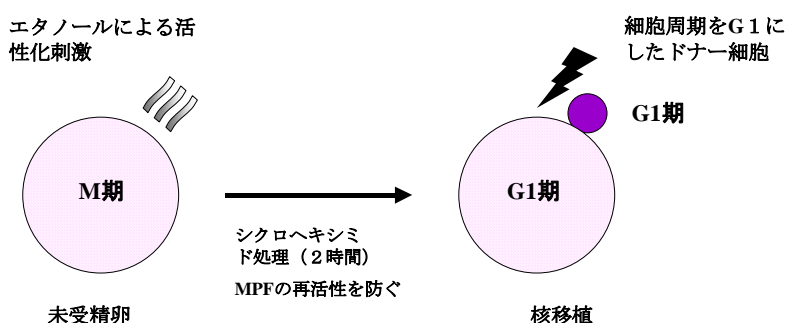


図5 レシピエント細胞とドナー細胞の細胞周期を同調化した核移植

体細胞からの個体形成を考えると、自然界で起こる受精を対比して考えないわけにはいかない。何よりも、体細胞クローンと受精による個体形成の決定的な違いは、前者は無性生殖であり、後者は有性生殖であることだ。しかし、核移植の過程と受精の過程は極めて類似している。受精の過程は、高度に分化した体細胞である精子と卵子が融合する現象であると考えれば、それはむしろ当然かもしれない。

受精にともなう初期発生の過程では、卵子の細胞質は精子染色体をコンパクトに凝集していたプロタミンを解離して核を形成させる。染色体構成タンパク質であるリンカーヒストンは、受精卵のゲノムが転写活性を持つようになる時期（胚ゲノムの活性化；動物種によって異なるが、2細胞期～8細胞期のいずれかの時期に起こる）に胚型のヒストン（ヒストン B4）から体細胞型のヒストン（ヒストン H1、H1⁰）に変換される。これと同様な現象はウシの体細胞核移植胚においても見られる。受精の過程と同様に、体細胞型のヒストン H1 は核移植後にいったん消失し、胚ゲノムの活性化後にヒストン H1 活性が再出現する。さらに、核移植後にはドナー細胞の転写活性は低下するとともに、胚ゲノムの活性化時期に再

び転写活性が高まることが知られている。このように、受精後の精子核には染色体再構成や遺伝子発現のダイナミックなリプログラミングが起こっており、少なくともそのいくつかの現象は、核移植後にも正常に起こっているように思われる。しかし、ヒストンの置換は核移植の方法によっては、様相が異なってくることが報告されている。つまり、これまでの体細胞クローンの手法ではヒストンの置換はゆっくり起こる¹⁰⁾。著者らも、核移植後のクローン胚の DNA 合成のタイミングについて検討したところ、上記の手法を用いて、G1 期の細胞を核移植した時の DNA 合成は、6 時間後にはほとんどの胚で開始されていたのに対し、血清飢餓処理後の G0/G1 期の体細胞の DNA 合成時期はさらに遅れて起こっていた⁹⁾。このことは、ヒストンの変換や DNA 合成のタイミングは核移植の手法の差によって生じることを示している。しかし、これらのことが体細胞のリプログラミングにどのような意味を持つのかについては、未だに不明である。

受精後の初期胚において無視できない変化の一つに、精子ミトコンドリアの分解がある。受精に関与した精子のミトコンドリアは核形成期に分解され、その結果卵子のミトコンドリアだけが子孫に伝わると考えられている。ミトコンドリアの母系遺伝はこのことによって説明されている。クローン胚においても、ドナー細胞由来のミトコンドリアは核移植直後から急速に消失し始め、クローン個体の大部分はレシピエント卵子のミトコンドリアに置き換わる¹¹⁾。しかし、例外的に、しかし無視できない確率で、ドナー細胞のミトコンドリアがクローン個体で残る例（ミトコンドリアヘテロプラスミー）を確認している¹²⁾。少なくとも PCR で検出した限り、初期胚にはドナー由来のミトコンドリアは見つからないので、その後の胚発生のいずれかのステージでドナー細胞のミトコンドリアが複製することになる。筆者らは、マウスにおいて異種系統間でミトコンドリアを置換したミトコンドリアコンジュニクマウスを用いた研究から、これらのマウスでは胚発生や個体における運動性や体成長などの表現型に差が生じることを見出し、その原因の一つとして核とミトコンドリアのミスマッチの可能性を指摘している¹³⁾。

クローン動物は遺伝的に同一の情報をもつ個体と言われている。しかし、ミトコンドリアに由来する遺伝情報を加味すれば、個々のクローン個体は全く異なった個体に由来する遺伝情報をもつことになる。この意味で、クローンはそれぞれ別のもものといえる。しかし、このことがリプログラミングやその後の胚発生、個体形成後の表現型にどのように影響を及ぼすのかについては、現時点では不明である。

体細胞クローン技術の問題点

体細胞クローン動物の生産を可能にした大きな理由がレシピエント細胞とドナー細胞の細胞周期の同調化にあるとしても、現時点での生産効率あまりにも低い(表 1)。体細胞クローン技術も今後改善されてゆくと思われるが、そのためには解決すべき問題も多い。前述したように、体細胞クローン動物がどのようなメカニズムで誕生するのかという謎に答える必要がある。いったん分化した体細胞

が個体形成に関与するためには、移植された未受精卵の中で全能性が再獲得されていると考えるのが妥当であるが、現在の低い効率から考えると、その過程が必ずしもうまくいっているとは言えない。表3に平成17年11月に農林水産省技術安全課でまとめられたわが国における体細胞クローン牛の生産状況を示している。体細胞クローンの出産率は、受精卵移植や受精卵クローンのそれと比べると、明らかに低い。その原因の詳細については不明であるが、遺伝子のメチル化によって制御されている(ゲノミック・インプリンティング)遺伝子発現機構が機能していないいくつかの実例が報告されている。インプリンティングによる遺伝子発現調節機構は、哺乳動物の受胎と胎児の発育に必須のものであり、この機構に異常が見られるのはむしろ当然のことかもしれない。

表3 クローン家畜生産の現状

クローン種		
受精卵クローン	出生頭数	700 頭
	死産	73 頭 (10%)
	生後直死・病死・事故死	151 頭 (21%)
体細胞クローン	生産頭数	474 頭
	死産	72 頭 (15%)
	生後直死・病死・事故死	190 頭 (40%)

平成17年11月28日現在、農林水産省技術安全課資料より改変

クローン胚に見られる発生異常

上記のように、核移植後に仮親に胚を移植し、正常な産子として生まれてくるのは極めて限られている。動物種によって多少の違いはあるが、一般的に、着床期以降に生存胎子の数は急速に減少してゆく。クローンの作製効率としては、およそ数%、もっとも安定しているウシの生産効率で、5%程度である。発生異常の特徴は、胎子の過成長、胎盤の形成異常、胸腺欠失、臍帯動脈の異常増殖などである。重要なことは、これらの異常が臨床上既知のものであって、全く新しい病変がこの技術によって生じた例はないことである。動物種によって、異常の種類や頻度は多少異なる。マウスやブタでは、妊娠初期に流産が多いが、ウシでは多くは妊娠初期で流産しても、妊娠中期や周産期にも流産が見られ、分娩直後に約半数が死亡する。ブタの場合は、生まれた後の生存率は高く、異常もほとんど見られない。発生初期に、異常胚が強く淘汰されるのかもしれない。

体細胞クローンが不可能視されていた大きな理由は、哺乳動物に特徴的なゲノミックインプリンティング機構の存在である。哺乳動物では、精子と卵子の形成過程でインプリンティング遺伝子への刷り込みがあり、ある遺伝子の精子側と卵子側のゲノムの遺伝子発現が胎子形成、妊娠過程で巧妙にコントロールされてい

る。精子あるいは卵子のいずれかのゲノムから構成される胚、それぞれ雄性発生胚あるいは雌性発生胚では、マウスでは妊娠 9.5 日目までに死亡する。従って、ゲノミックインプリンティングを全く経験していない体細胞が、たとえリプログラミングをうまく誘導されたとしても、その後の胚発生の過程で発生異常が起ってもなんら不思議はない、事実この 10 年間の多くの研究から、体細胞クローン胚ではインプリンティング遺伝子の発現異常が起こっていることが知られている⁴⁾。クローンの異常にインプリンティング遺伝子が関与していると想定されるもうひとつの理由は、クローンの雄と雌を交配した実験からも明らかである¹⁴⁾。クローン動物間から生まれる動物には、発生異常は認められず、全く正常に子供を生産する。このことから、ゲノミックインプリンティングを受けていない体細胞では、胚発生異常が起こるが、生存したクローンは体内で正常な生殖細胞を生産し、インプリント遺伝子に正常なマークをつけるので、クローンの次世代では正常な子供が生まれると推察できる。

我々は、クローンに見られる発生異常は、インプリンティング遺伝子の発現異常の結果を見ているばかりでなく、もっと多様な、かつ核移植後のもっと初期にすでに異常が起こっているのではないかと考え、遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析する手法である、ディファレンシャルディスプレイ法やマイクロアレイ法を用いて、クローン胚と体外受精、あるいは体内受精胚の胚盤胞期にいたるまでの遺伝子発現をマウスとウシで検討した。すると、ウシでは、クローン胚と体外受精胚とで、8 細胞期、桑実胚期および胚盤胞期ですでに遺伝子発現のパターンは異なっており、クローン胚は子宮に着床する以前にすでに問題を抱えていることになる。さらに、胚発生において、胚に由来する遺伝子発現の重要なターニングポイントであり、胚性ゲノムの活性化期における遺伝子発現について、マウスクローン胚で検討した。マウスでは、ゲノムの活性化は 2 細胞期後期にメジャーな活性化が起こるといわれているが、このときに活性化され、発現が上昇する遺伝子がクローン胚では発現が低下したままであった。限られたデータではあるが、これらのことからクローン胚に見られる発生異常は、すでに胚性ゲノムの活性化以前、おそらくリプログラミングの過程で起こっているものと推測されるのである¹⁵⁾。

リプログラミングの人為的誘導

すでに述べたように、体細胞クローンに関わる多くの問題は、結局のところ、卵細胞内で起こるリプログラミングの機構をもっとよく理解することにあると思われる。核移植は単一の細胞を単一の卵子内に導入する手法であり、個々の核移植胚で起こっているリプログラミングの現象を生化学的に解析することは質的にも量的にも大変難しい。ここでいう質的とは、ドナー細胞のリプログラミングが個々の細胞で異なる可能性についてであり、量的とは、1 個の胚を解析するための生化学的手法は限られていることによる。

最近になって、アフリカツメガエルの卵細胞質から調整した抽出液をもちいて、体細胞のリプログラミングを解析する系が作られている。アフリカツメガエルの体細胞を卵抽出液で処理すると、体細胞核から TBP (TATA binding protein)、ヌクレオリンあるいはヒストン H1 などの物質が核外へと放出され、ATP 依存的なクロマチンリモデリングファクターである ISWI、ヌクレオプラスミンあるいはヒストン B4 などは核内へと取り込まれていくことがわかった¹⁶⁾。ここで ISWI を卵抽出液から取り除くと、TBP の核からの放出が阻害された。TBP は、本来卵抽出液中には存在しないので、体細胞は卵抽出液によってリプログラムされ、少なくともリプログラミングの一部には ISWI が関与している可能性を示唆した。我々も、哺乳動物、特に家畜において、体細胞のリプログラミング機構を理解するとともに、試験管内でリプログラムされた細胞を用いて、効率的にクローン家畜を生産するための実験系を模索している (図 6)。その中で、ブタの体細胞をアフリカツメガエルの卵抽出液で処理すると、卵抽出液中のヒストン B4 がブタ細胞の核内に入っていることがわかった。さらに、胚型のラミンであるラミン LIII の取り込みも認められた¹⁷⁾。ヒストン B4 やラミン LIII は卵抽出液に存在するものであり、染色体の構造や遺伝子発現に影響をあたえるこれらの核構成成分が、種を越えて細胞核内に取り込まれることは興味深い。

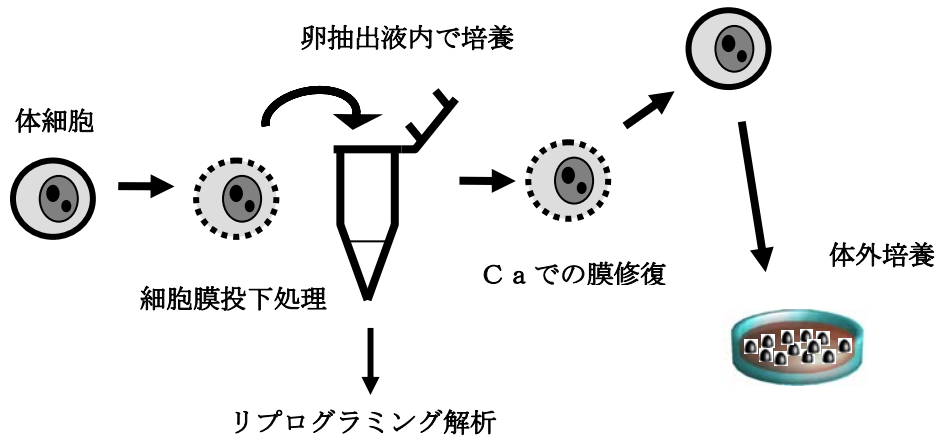


図 6 アフリカツメガエル卵抽出液中での哺乳動物体細胞のリプログラミング誘導

さらに、我々は、アフリカツメガエル卵抽出液中で処理した細胞を体外で培養した (図 6)。すると、培養 3 日目から、未分化細胞のマーカである OCT4 の発現が見られるようになった。細胞の形態も、OCT4 の発現と呼応するように、ES 細胞様のコロニーを形成した。同様の作用は、ウシの体細胞にも認められ¹⁸⁾、ウシの Oct4 プロモーターに接続した GFP 遺伝子をウシ繊維芽細胞に導入し、卵抽出液で処理後に培養した細胞は、ES 細胞様のコロニーを形成すると同時に、GFP タンパク質の強い緑色蛍光を発した。Oct4 以外の未分化細胞の性質を維持する作用を持つ Sox2 や Nanog の発現について検討したところ、Sox2 の発現は認められたものの、Nanog の発現は見られなかったことから、体細胞は卵抽出液

中でリプログラミングが誘導されていると考えられるが、多能性細胞への脱分化誘導としては、その作用は不十分であるのかもしれない。

体細胞クローンにおいては、異種の未受精卵内では個体再構成が可能なリプログラミングは誘導できないといわれている。従って、進化的にも遠く離れたアフリカツメガエルの卵抽出液中での誘導されるリプログラミングは、哺乳動物における核移植時に誘導されるそれとは異なる可能性がある。そこで、ブタの未受精卵（GV期とMII期卵母細胞）から細胞抽出液を作製した。これらの細胞抽出液内でブタの体細胞を処理したところ、アフリカツメガエルと同様のリプログラミングが誘導されるとともに、それぞれの抽出液では誘導されるリプログラミングの様式が異なることが明らかとなった¹⁹⁾。つまり、GV期卵ではNANOGやSOX2などの多能性遺伝子の発現が誘導されるのに対して、MII期卵では体細胞で発現している遺伝子の抑制が起こっていた。MII期細胞抽出液が体細胞のどのような因子に対して影響を及ぼしているのかについて検討するために、抽出液処理後の核タンパク質の変化を無処理の体細胞核とプロテオーム解析によって検討した。その結果、25種類の核タンパク質に大きな変化がみられた。このうちで、多様な細胞で普遍的に存在し、未受精卵内にも多量に存在するDJ-1について詳細に検討したところ、DJ-1はリプログラミング時に核移植胚内のがん抑制因子P53の活性を抑制し、細胞周期の刺激と細胞死の抑制に作用していることを明らかにした²⁰⁾。恐らく、他のリプログラミング因子と協調して、核移植胚の生存性と細胞増殖に重要な作用をしていると考えられる。

哺乳動物の体細胞がこのような体外でのリプログラミング誘導系によって、分化—脱分化—再分化の道筋をコントロールできれば、基礎・応用の両面で多様な研究分野が開かれ、今後の研究の進展が期待される。

クローン技術の産業応用と将来展望

畜産領域での体細胞クローン技術は、とくに牛において、種雄牛のクローン化、乳量・肉質など特定の優良経済形質を示す家畜の増産への利用、育種改良技術への応用に期待がかかる。つまり、コマーシャルストックとブリーディングストックの両面から応用を考えてゆくことになる。後者では、その方法や規模にもよるが家畜の遺伝的多様性を確保する必要があることはいうまでもない。

体細胞クローン技術がすでに応用技術として利用されつつある例もある。遺伝子組換え家畜生産への応用である。これまでの遺伝子組換え家畜の作出は、受精卵の核への遺伝子のマイクロインジェクションによっているが、その生産効率は1%以下であり、さらに目的とする優良な家畜が得られる効率はその10分の1にも満たない。この方法によれば、1頭の遺伝子組換えウシを作出するために最低限500頭のウシを必要とするが、クローン技術と組み合わせることによって生産効率を現在の数倍程度には高めることができる。能力の高い遺伝子組換え家畜が現存していれば、その体細胞を用いたクローン化も可能となる。しかし、マイクロインジェクション法と核移植のいずれの方法で遺伝子組換え家畜を作出しても、これらの家畜内で導入した遺伝子の発現を正確に制御することはできない。

それは、導入遺伝子の染色体内への挿入がランダムに起こるため、遺伝子導入部位に影響を受けない導入遺伝子の構築あるいは染色体内の目的とした位置に正確に遺伝子導入する技術の開発が今後の重要な研究課題となろう。また、食用動物を遺伝子組換えに利用した場合、これらの動物をどのような扱いあるいは規制をするのか、社会的なコンセンサスの形成が必要となる。

世界的にはすでに多くの遺伝子組換え家畜が生産されている。なかでも、乳汁中に医療用ヒトタンパク質を分泌する手法は、すでに医薬品として用いるための臨床試験が終了し、臨床医薬としての販売が間近いといわれている。異種臓器移植用の遺伝子組換えブタや遺伝子組換えクローンウシ胎仔の神経細胞を神経疾患患者に投与する遺伝子治療に関する研究も、臨床応用にはまだ問題点が残されてはいるものの、研究は進められている。ヒト疾患モデル動物としての遺伝子組換え家畜の利用も進展する可能性がある。これまで、家畜は、食用としての利用に限定した見方が根強い。しかし、上述のように、医学領域も含めた幅広い領域で家畜の利用は有用であり、このための技術開発の余地も大きい。

おわりに

クローン研究の現状と今後の研究の方向性について家畜に限定して述べてきた。これまで示してきたように、体細胞がどのようにリプログラムされて個体を形成するようになるのか、ほとんど明らかにされていない。リプログラミングの成否は、クローン動物の正常な発生に大きな要因となっていると思われる。ここでは、クローン動物に見られる発生異常の原因については言及しなかったが、未受精卵内に移植されるのが精子と体細胞では根本的に異なることは明らかである。精子は、個体形成のために特殊化された細胞であるからである。しかし、そうであるからこそ、確率は低いながらも体細胞から個体ができることは、今更ながら驚かされる。

体細胞クローンというと、短命、異常出産、食肉に適さないなど、マイナス面だけが強調される傾向にある。しかし、正常な個体発生が進むためには、数え切れないほどのチェック機構をパスする必要がある。自然の生殖によって生まれようとする動物ですら、この過程で何らかの問題が生じ流産する例は稀なことではない。このような多くの難関を乗り越え、現在も元気に生きているクローン動物を一度間近で御覧にあることをお奨めする。各県の畜産研究所では、クローン動物を公開している。

一方で、正常性・安全性の評価が未決定で、流通もされていないクローン動物に関する研究をすることに意味はないとする極論もある。しかし、クローン生産物は動物に限らない。クローン農産物は、野菜や花卉など、すでに多くの農業生産物の中で確固たる地位を占めているのは周知の事実である。技術的には未熟ではあるものの、動物におけるクローン技術の 21 世紀の畜産業、医学領域まで含

めた幅広い産業応用技術としての価値は高い。不可能といわれた技術のブレークスルーには、技術開発上参考になる多くのコンセプトが隠れている。そのようなコンセプトを学ぶことは、新たな技術開発に有用な情報を提供するだろう。農業生産技術が目先の応用技術ばかりに追われるようになってしまったら、時代に即した新技術を開発する芽は摘まれてしまいかねない。

クローン技術に関してもっと詳しく知りたい諸氏は、以下の書籍を参考にしていただきたい^{21, 22, 23, 24}。

参 考 文 献

- 1) Spemann H. In: "Embryonic Development and Induction", 1938; pp. 371-372, New Haven, Yale University Press.
- 2) Briggs R. and King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1952; 38: 455-463.
- 3) Gurdon JB. Developmental capability of nuclei taken from interstitial epithelium cells of feeding tadpoles. J. Embryol. Exp. Morphol., 1962; 10: 622-640.
- 4) Kwon OY and Kono T. Production of identical sextuplet mice by transferring metaphase nuclei from four-cell embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1996; 93: 13010-13013.
- 5) Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature, 1986; 320: 63-65.
- 6) Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA and Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature, 1996; 380: 64-66.
- 7) Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 1997; 385: 810-813.
- 8) Takahashi S, Kubota C, Nakahara H, Shimizu M, Tokunaga T, Yamaguchi M and Imai H. Importance of cytoplasmic factor after oocyte activation on development of somatic cell-nuclear transferred bovine embryos. In: "Gametes Development and Function" Lauria A, Gandolfi F, Enne G, Gianaroli L (eds.), 1998; pp. 607, Milan, Serono Symposia.
- 9) Kurosaka S, Nagao Y, Minami N, Yamada M, Imai H. Dependence of DNA synthesis and in vitro development of bovine nuclear transfer embryos on the stage of the cell cycle of donor cells and recipient cytoplasts. Biol. Reprod., 2002; 67: 643-647.
- 10) Bordignon V, Clarke HJ and Smith LC. Factors controlling the loss of immunoreactive somatic histone H1 from blastomere nuclei in oocyte cytoplasm: a potential marker of nuclear reprogramming. Dev. Biol., 2001; 233: 192-203.
- 11) Takeda K, Takahashi S, Onishi A, Goto Y, Miyazawa A and Imai H. Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. J. Reprod. Fertil., 1999; 116: 253-259.
- 12) Takeda K, Akagi S, Kaneyama K, Kojima T, Takahashi S, Imai H, Yamanaka M, Onishi A and Hanada H. Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves (*Bos taurus*) derived from cumulus cells. Mol. Reprod. Dev., 2003; 64: 429-437.
- 13) Nagao Y, Totsuka Y, Atomi Y, Kaneda H, Lindahl KF, Imai H and Yonekawa H. Decreased physical performance of congenic mice with mismatch between the nuclear and the mitochondrial genome. Genes Genet. Syst., 1998; 73: 21-27.
- 14) Shimozawa N, Ono Y, Kimoto S, Hioki S, Araki Y, Shinkai Y, Kono T. and Ito M. Abnormalities in cloned mice are not transmitted to the progeny. Genesis. 2002; 34: 203-207.
- 15) Suzuki T, Minami N, Kono T. and Imai H. Zygotically activated genes are suppressed in mouse nuclear transferred embryos. Cloning Stem Cells. 2006; 8: 295-304.
- 16) Tamada H and Kikyo N. Nuclear reprogramming in mammalian somatic cell nuclear cloning. Cytogenet Genome Res., 2004;105: 285-291.
- 17) Miyamoto K, Furusawa T, Ohnuki M, Goel S, Tokunaga T, Minami N, Yamada M, Ohsumi K. and Imai H. Reprogramming events of mammalian somatic cells induced by *Xenopus laevis*

- egg extracts. *Mol. Reprod. Dev.*, 2007; 74: 1268-1277.
- 18) Miyamoto K, Yamashita T, Tsukiyama T, Kitamura N, Minami N, Yamada M. and Imai H. Reversible membrane permeabilization of mammalian cells treated with digitonin and its use for inducing nuclear reprogramming by *Xenopus* egg extracts. *Cloning Stem Cells*, 2008; 10: 535-542.
 - 19) Miyamoto K, Tsukiyama T, Yang Y, Li N, Minami N, Yamada M. and Imai H. Cell-free from mammalian oocytes partially induce nuclear reprogramming in somatic cells. *Biol. Reprod.*, 2009; 80: 935-943.
 - 20) Miyamoto K, Nagai K, Kitamura N, Nishikawa T, Ikegami H, Binh NT, Tsukamoto S, Matsumoto M, Tsukiyama T, Minami N, Yamada M, Ariga H, Miyake M, Kawarasaki T, Matsumoto K and Imai H. Identification and characterization of an oocyte factor required for development of porcine nuclear transfer embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 7040-7045.
 - 21) ジーナ・コラータ: “クローン羊ドリー”、1998; アスキー出版、東京
 - 22) 今井 裕、「クローン動物はいかにして創られるのか」、1998、岩波科学ライブラリー、岩波書店、東京
 - 23) ウィルマット、キャンベル、タッジ: 「第二の創造」 牧野俊一訳、2002、岩波書店、東京
 - 24) 大澤勝次・今井 裕、「食の未来を考える」、2003、岩波書店、東京