

第8回哺乳動物生殖工学研究会

プログラム・抄録集

会期：平成8年12月7日（土）
午後1時00分～5時30分

会場：北里大学薬学部E301教室
港区白金5-9-1 TEL 03-3444-6161

開会の辞

会長 横山峯介

特別講演

ブタ卵子成熟開始の卵胞内制御機構
内藤邦彦先生（東京大学医科学研究所）

マウス遺伝子トラップ法による新規遺伝子の同定と変異体の作成
竹内 隆先生（三菱化学生命科学研究所）

司会 岡本正則

一般講演

座長 東 貞宏

1. 精細管内遺伝子注入とエレクトロポレーションによるマウス精巣細胞への遺伝子導入の
試み
山崎由起子（三菱化学生命科学研究所 分子生殖発生）
2. 簡易ガラス化法によるマウス胚の超低温保存
○中尾和貴・中瀧直己・勝木元也（東大医科研・獣医）
3. 牛胚の核移植について
土屋秀樹（（社）家畜改良事業団家畜バイテクセンター）

座長 山田 秀一

4. PC-LANを用いたトランスジェニックマウスの系統育成管理支援システムの開発
○小林喜美男¹⁾、新名谷典朗²⁾、倉持隆司¹⁾、日置恭司¹⁾
(1) (財)実験動物中央研究所、2) (有)ヒューマンネットコーポレーション)

————— 総 会 —————

ブタ卵子成熟開始の細胞内制御機構
内藤邦彦（東京大学医科学研究所獣医学研究部）

1 はじめに

ブタを含む多くの家畜卵子では卵核胞崩壊 (GVBD) が起こるためには何らかの蛋白質合成が必要であるが、この蛋白質が何かといった疑問は未だに明らかにされていない。これまでに調べられた海洋無脊椎動物やマウスなど多くの卵は GVBD に蛋白質合成を必要としない。GVBD を起こすために合成が要求される蛋白質としては、金魚卵子において cyclin B が、また *Xenopus* 卵子において *c-mos* 遺伝子産物 (Mos) が報告されている。Cyclin B は細胞分裂期の中心的制御因子である成熟促進因子 (MPF) の制御サブユニットであり、触媒サブユニットの *cdc2* 遺伝子産物 ($p34^{cdc2}$) と結合してヒストン H1 キナーゼ (H1k) 活性を発現する。この酵素活性の上昇が卵子に GVBD を起こすための鍵となることが知られている。Mos もまた蛋白質リン酸化酵素であり Mitogen-activated protein kinase (MAPK) をリン酸化して活性化する MAPK キナーゼ (MAPKK) を直接リン酸化して活性化する MAPKK キナーゼとして働くことが知られている。MAPK の活性化と MPF の活性化が直接関連することを示した報告はないが、少なくとも *Xenopus* においては MAPK の活性化は結果的に MPF の活性化を引き起こす。ブタ卵子においても GVBD に先立ち cyclin B や Mos が合成される可能性が考えられる。この点を明らかにするためにはブタ卵子の成熟過程における MPF や MAPK の変動を明らかにすることが不可欠である。

2 ブタ卵子の成熟過程における MPF の変化

まず MPF 活性の変動を H1k 活性として測定した。培養開始 24 時間後までの GV 期卵では H1k 活性は低く、この活性は GVBD 卵では有意に上昇し、Met1 では GV 卵の約 10 倍の値となった。この活性は第一極体放出中の卵子では劇的に減少した後、Met2 では Met1 に匹敵するまでに再び上昇した。受精後は GV 期と等しい基底値にまで低下した。この変動パターンはこれまでに報告された他種のものとはよく一致しており、ブタにおいても減数分裂の制御に

MPFが重要な役割を果たすことを確認することができた。

MPFは前述した通り触媒サブユニットの p34^{cdc2}と制御サブユニットの cyclin Bよりなる。そこで次にこれらの変動について検討した。一般に p34^{cdc2}の細胞内濃度は細胞周期を通して変化せず、その活性は cyclin Bの結合とリン酸化によって制御されている。Cyclin Bは合成されると p34^{cdc2}と結合するが p34^{cdc2}はその後直ちにチロシンリン酸化され活性は抑制される。この非活性型 cyclin B 結合型 p34^{cdc2}は“pre-MPF”と呼ばれる。多くの動物種で GV 卵はこの様な状態にあると考えられており MPFの活性化は p34^{cdc2}のチロシン脱リン酸化によって起こる。この場合GVBDに cyclin Bの新たな合成は必要無い。一方、金魚のGV卵は cyclin Bの蓄積が無く p34^{cdc2}は遊離状態に停止していることが報告されている。したがって金魚ではGVBDの誘起に cyclin Bの合成が必要となる。そこでポイントはブタ卵にこの非活性型 cyclin B 結合型 p34^{cdc2}が存在するか否かということになる。

豚の p34^{cdc2}は3本のバンドとして検出することができた。このバンドの濃さはほとんど変化せず、卵細胞の p34^{cdc2}濃度が成熟期間を通して変化しないことが示唆された。そこで次に cyclin B 結合型 p34^{cdc2} (cyclin B/p34^{cdc2})のみを抗豚 cyclin B抗体による免疫沈降の後に検出した。その結果 cyclin B/p34^{cdc2}は卵胞から採取直後のGV卵でも極めて少ないが存在した。20時間培養後のGV卵でも変化は見られなかったが、Met1では有意な増加がありMet2ではさらに一段と増加した。この cyclin B/p34^{cdc2}濃度の変化は cyclin Bの合成を ³⁵Sメチオニン標識によって調べた実験によっても確認された。すなわち cyclin Bの合成はGV卵では検出されず、この期間 cyclin B/p34^{cdc2}の濃度が変化しないこととよく一致した。一方Met1とMet2卵では明らかな cyclin Bの合成が見られ、この時期の濃度上昇を支持するものであった。つまりGV卵の p34^{cdc2}は大部分は遊離型だが極少量の cyclin B/p34^{cdc2}が存在しており、その後 cyclin Bの合成に伴ってMet1、Met2では cyclin B/p34^{cdc2}が増加してくることが示唆された。

GV卵で cyclin B合成が検出できなかったこと、また極少量ではあるが cyclin B/p34^{cdc2}が存在することから、豚卵のGVBDには cyclin Bの合成は不必要であると思われる。これが事実とすればGVBDを起こすためにpre-MPF

を活性化するためのチロシン脱リン酸化が必要となるはずである。そこでチロシン脱リン酸化阻害剤のパナデイトを用いてこれを確認したところ、パナデイトをGV期から作用させると豚卵子のGVBDは完全に抑制された。この結果は豚末成熟卵のMPF活性化は金魚と異なり多くの動物種に見られるようにp34^{cdc2}のチロシン脱リン酸化が必要であることを示すものである。以上よりブタ卵子のGVBDにcyclin Bが合成される可能性は否定的であった。

3 ブタ卵子の成熟過程におけるMAPKの変化

ブタのMosに対する抗体はなく、また他の種の抗体による交差性も知られていない。そこでブタ卵成熟に対するMosの作用を考察するためにその下流に存在するMAPKの変動について調べた。MAPKはやはり蛋白リン酸化酵素でありミエリン塩基性蛋白質を良い基質とする。この活性を測定したところGV卵では低く、GVBD以後活性化されそれ以降Met2まで高い活性が維持された。イムノブロットの結果、豚には44kDaと42kDaのMAPKが存在した。このバンドの濃度は成熟期間を通して変化しないが、高活性となるGVBD以降の卵ではバンドの移動度が減少し少し上へシフトすることから、MAPKの卵細胞内濃度は変化せずに活性の変動はGVBD以後MAPKがリン酸化されることによると推察される。さらにMosの下流でMAPKの上流に位置するMAPKKをイムノブロットした結果MAPK同様に濃度変化は見られずGVBD以降リン酸化されていることが示された。

この結果はMosの合成がMAPKKを介しMAPKを活性化しそれによってGVBDが誘起されたとも考えられる。しかしMAPKの活性化がGVBDの前か後か、原因か結果かは分からない。Xenopus同様ブタでもMAPKはGVBDに先だって活性化し卵成熟の開始を誘導するのであろうか。MAPKが核膜の変化に関与するとすれば核内に存在することが予想される。そこで免疫蛍光染色を行ったところ培養0時間の卵子ではMAPKは細胞質に存在したが、24時間培養したGVBD直前のGV卵では主として核内に存在した。すなわちMAPKはGVBD以前に細胞質から核に移行する事が示された。このことはMAPKが核膜の変化に関与する可能性を示唆している。

この結果を確認するためにGV卵よりGVを単離してイムノブロットを行っ

た。その結果培養0時間のGVにはMAPKは検出されなかったが、培養24時間後のGVにはMAPKが存在し上記の結果が裏付けられた。さらにその移動度からGV内に存在するMAPKは活性型であることが示された。このことはMAPKの活性化がGVBD以前に起こることを示している。

この活性型MAPKがXenopus同様GVBDを誘起する作用を持つかどうかを調べる目的で活性型MAPKを培養0時間のGV卵に注入した。MAPKを細胞質に注入した場合はGVBDは誘起せず逆に培養48時間後までGVBDを抑制した。対照としてPBSを注入した場合は正常に24時間後にGVBDが起こったので、過量のMAPKは卵成熟に悪影響を与えるものと思われる。また細胞質に注入した場合はMAPKは極めて短時間に不活性化されることが示唆された。一方活性型MAPKをGV内に注入したところ注入卵の一部に培養5時間後にGVBDを起こしMet1に達しているものが存在した。このことはブタ卵においてもXenopus同様MAPKがGVBDを誘起できることを示している。

4 おわりに

以上の結果はブタ卵子のGVBDを誘起するためにMosが合成される必要があるとする考えと矛盾しないものである。また牛ではGVBDに先立ちMosが合成されるとする報告がある。これらは哺乳動物においてもXenopusと同様Mos/MAPKを介したMPF活性化機構の存在を示唆している。Xenopusの機構が一般に哺乳動物に受け入れられていないのは、哺乳動物で最も研究が進んでいるマウスではGVBDに蛋白質合成が必要ないのでXenopusが特殊な例と考えられるためと思われる。mos遺伝子欠損マウスでもGVBDは培養2時間後に正常に起こることから成熟の開始にMosが必要ないことが示され、この考えに拍車をかけたように思われる。しかし、むしろマウスではMos/MAPK以外の新たなMPF活性化機構が付加された結果この経路がマスクされていると考えた方が妥当ではないかと私は考えている。イソブチルメチルキサンチン(IBMX)によりGVBDを抑制したマウス卵にmosのmRNAを注入するとMAPKが活性化され培養24時間後にGVBDを誘起でき48時間後に成熟することが最近示された。この場合の時間経過はブタ卵子の成熟とみごとに一致するからである。

マウス遺伝子トラップ法による新規遺伝子の同定と変異体の作成

竹内 陸（三菱化学生命科学研究所）

ある遺伝子に変異があり異常な表現型を示す個体、すなわち変異体は、生命科学の広い分野において重要な役割を果たしてきた。変異体は生命現象と遺伝子とを結び、その生命現象の縦構を分子レベルの言葉で語る糸口を提供する。高等動物では、変異体と遺伝子との対応、すなわち、既知の変異体からその原因遺伝子の同定(forward genetics)、もしくは、既知の遺伝子からその変異体の作成(reverse genetics)は困難であった。しかし、後者については、マウスを用いた遺伝子ターゲティング法の登場によって著しく進歩し、様々の遺伝子の変異体が爆発的に作成されている。一方、forward genetics は近年、大きく進歩したものの一般に依然困難で多くの場合、多大な労力を要する。遺伝子トラップ法は、新規の興味深い発現をする遺伝子を同定できると同時にその変異体も作成できるもので、forward genetics とreverse genetics を兼ね合わせた特徴を有する優れた方法である。私達はマウスの発生に関与する新規遺伝子の同定とその機能の解明をめざし、遺伝子トラップ法を利用した。そのためこの方法の効率化を図り、そしていくつかのマウス変異体を作成し、また、そのトラップされた遺伝子（トラップ遺伝子）を同定した。さらに変異体の表現型からトラップ遺伝子の発生における機能を解析している。

これらの変異体の一つ、*jumonji (jmi)* は劣性胎生致死で神経管形成異常や肝臓、膵臓、脾臓の形成異常および造血異常を示す。肝臓では周辺部を中心に多くの細胞で増殖停止と細胞死が認められている。そのトラップ遺伝子は新規の核蛋白質をコードし、構造から転写調節因子と考えられる。また、いま一つの変異体*B8*は劣性の小人症を示し、さらに行動異常が認められている。そのトラップ遺伝子の単離に最近成功し、現在塩基配列を決定中である。

本講演では、遺伝子トラップ法の方法論、利点、問題点についてと、実際に得られた上記の変異体、遺伝子におけるこれまでの解析について紹介したい。

精細管内遺伝子注入とエレクトロポレーションによる マウス精巣細胞への遺伝子導入の試み

山崎由起子（三菱化学生命研 分子生殖発生）

哺乳類の精子発生は、幹細胞としての精原細胞の増殖、体細胞分裂から減数分裂期への移行、減数分裂、半数体の精細胞から精子への形態変化、などの複雑な過程から成り立っている。このような精子形成過程を分子レベルで解明するには、その分化制御を担う遺伝子発現制御機構を知ることが不可欠となる。しかし現状は、精子形成細胞には生体内の特異的発現を再現する培養系がないことが遺伝子解析の大きな障害となっている。

今回、精巣臓器を対象とした遺伝子発現の*in vivo* assay 系の開発を目的として、マウス精細管内へのDNA注入とエレクトロポレーション法を組み合わせた精子形成細胞への遺伝子導入を試みた。操作としては、麻酔したマウスを開腹し、精細管内腔へレポーター遺伝子（SV40-luciferase, CMV-lacZ）を注入、遺伝子導入装置（BTX社, T820）を用いて精巣全体にエレクトロポレーションを行った後、さらに一定期間飼育した。SV40-luciferase注入区は18時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、CMV-lacZ注入区ではX-gal染色後、青染している細胞を観察した。ルシフェラーゼ検定の結果からは、本法が生体臓器への遺伝子導入系として有効であることが示された。また、CMV-lacZ注入区の組織所見は、実際に精子形成細胞への遺伝子導入が起こっていることを示した。これをもとに精子細胞特異的遺伝子であるプロタミン1のプロモーターに lacZ を連結した遺伝子（Prm-lacZ）を導入した。その結果、一連の後期精子細胞群で特異的な発現が観察された。

この手法は、生体臓器を宿主とするため組織学的解析や長期に渡る遺伝子導入細胞の追跡ができることを利点とする。今回の試みから得られた知見を紹介したい。

簡易ガラス化法によるマウス胚の超低温保存

中尾和貴・中潟直己・勝木元也（東大・医科研・獣医）

〔目的〕近年、従来の緩慢凍結法に代って、ガラス化法によるマウス胚の超低温保存が進歩してきた。なかでもDAP213を用いた中潟の方法は、きわめて操作が短時間に終了し、かつ簡単で優れた方法である。しかし実施に当たっては、極短時間に、正確な操作をしなければ良好な生存性が得られず、安定した成績を得るためには熟練を要する。本実験では、1M DMSOで胚を前処理し、続いてDAP213に浸漬した後、液体窒素に投入することで、受精卵への細胞毒性を抑え、かつ各操作段階において、比較的時間に余裕のある安定した方法を開発したので報告する。

〔方法〕20～40個の胚を室温で1M DMSOに入れた後、5 μ lの溶液と共にクライオチューブに移し、直ちに0 $^{\circ}$ Cの氷水で、5分間平衡させた。つぎに0 $^{\circ}$ CのDAP213を95 μ l加えて5分間保持した後、液体窒素に投入した。加温は、液体窒素から取り出したチューブを、室温で30～60秒間放置した後37 $^{\circ}$ C 0.25Mショ糖溶液を900 μ l添加し、十分にピペティングすることで加温と保存液の希釈を行った。また回収した胚は、新鮮なPBIおよびmWM溶液で3回洗浄し、体外培養及び胚操作により、その発生能を検討した。

〔結果〕C57BL/6Jマウス由来の前核期受精卵と2細胞期胚をガラス化保存した後の回収率は98.3%(118/120)と100%(317/317)であった。またその内、形態的に正常と判定された前核期受精卵および2細胞期胚の割合は、それぞれ97.5%(115/118)および99.4%(315/317)であった。また2細胞期胚のガラス化保存後の仮親マウスへの移植による胎仔への発生率は56.5%(156/276)であった。以上、本法によるガラス化保存成績は、きわめて良好であり、またガラス化保存の一連の操作も簡単で、時間的余裕があることから、この簡易ガラス化法は、マウス胚の超低温保存法として、きわめて有効な手段に成りえるものと思われる。

演題：PC-LANを用いたトランスジェニックマウスの 系統育成管理支援システムの開発

- 小林喜美男：（財）実験動物中央研究所
- 新名谷典朗：（有）ヒューマンネットコーポレーション
- 倉持隆司：（財）実験動物中央研究所
- 日置恭司：（財）実験動物中央研究所

要旨 実験動物の系統育成および維持・生産・供給において、動物個体に関するさまざまなデータを正確かつ効率的に運用できるシステムが望まれる。そこで我々はトランスジェニック（Tg）マウスの飼育施設、DNA解析室、胚凍結保存施設をLAN（ローカルエリアネットワーク）で接続した環境を想定し、PC-LANを用いたTgマウス系統育成支援システムの開発を行なっている。このソフトウェアは系統育成管理、各種解析の管理、胚および配偶子の凍結保存管理の3つのパートから構成される。現在、系統育成管理に関する試作版が完成している。

将来的には、ここで蓄積されたデータの一部をWebページに展開し、研究所内外からブラウザで閲覧できるようにしたい。その際、アップデートされたデータの自動変更が可能なシステムを考えている。

開発環境 ソフトウェアのフロントエンド開発にはVB(Visual Basic)を用い、バックエンドのデータベース部はOracle7により構築している。PCサーバーは台湾製Acer Altos 700eをWindowsNT（サーバー）により、クライアントはCOMPAQ社ノート型パソコンをWindows95により運用している。ソフトウェアの開発は（有）ヒューマンネットが担当し、我々の作業手順を基に実際の作業との擦り合わせをしながら開発を進めている。

ソフトウェア概要 このソフトウェアは、実験動物の系統管理の実務作業を支援することを主眼としている。その際問題となる繁雑なデータ入力を可能な限り簡素化し、個体データへの容易なアクセスを可能にする。TAB形式の各種入力画面と、Explorer形式の個体選別フレームを採用し、作業環境を理解しやすく構成した。また入力の簡略化のため、選択入力方式を多用した。従来手作業で行なっていたペディグリーの出力や、各種検査項目のチェックシートによる入出力などをソフトウェア上で行なえるようにした。

試作版の作動環境は現在Windows95のみであるが、正規版はMacintosh上でも作動し、また単体での使用を可能とする。

将来的展望 実験動物資源の有効利用のために、将来的にはWebページ上で維持系統リストなどの情報提供を行ない、研究所内外からアクセスできるシステムを構築したいと考えている。また、外部の共同研究機関とインターネットやリモートアクセスで接続し、個体情報や解析結果の検索、供給依頼などが円滑に行なえるシステム展開を目指している。