

# 第13回哺乳動物生殖工学研究会

## プログラム・抄録集

会期：平成13年12月1日（土）

午後1時00分～5時30分

場所：北里本館大会議室

港区白金5-9-1

開会の辞

会長 横山 崇介

特別講演

標的遺伝子置換法の開発と Ras 欠損マウスを用いた個体レベルの機能解析

中村 健司

(三菱化学生命科学研究所 マウスゲノム工学センター)

一般講演

1. ラット精子の凍結保存

中務 胞（麻布大学獣医学部 動物応用科学科 動物繁殖学研究室）

2. 凍結 8 細胞期胚および ES 細胞を用いたキメラマウスの作製

中島竜之<sup>1)</sup>、山村研一<sup>2)</sup>（井上実験動物センター<sup>1)</sup>、熊本大学<sup>2)</sup>）

3. トランスジェニック家畜の生産とその商業的利用—PPL Therapeutics の概要—

板垣 佳明（日本農産工業株式会社 バイオ研究所）

4. 日光、北海道および長崎県対馬に棲息するニホンジカのミトコンドリア DNA  
D-loop 領域の塩基配列決定と比較解析

福井えみ子（宇都宮大学農学部）

5. ブタ卵における減数分裂再開の制御機構について

成岡春奈・大橋聰・杉浦幸二・内藤邦彦・東條英昭（東京大学大学院農学生命  
科学研究科）

6. ブタ卵の減数分裂における核の必要性について

杉浦幸二、成岡春奈、内藤邦彦、東條英昭（東京大学大学院農学生命科学研究  
科）

7. ニワトリ遺伝資源の保存に関する研究—核移植ニワトリ作製の試み—

峰松健夫<sup>1)</sup>、田島淳史<sup>2)</sup>、金井幸雄<sup>2)</sup>（<sup>1)</sup>筑波大学博士課程農学研究科、<sup>2)</sup>筑波大  
学農林学系）

Topic

TYH誕生の頃：JRD誌寄稿文から

豊田 裕

総 会

# 標的遺伝子置換法の開発と Ras 欠損マウスを用いた個体レベルの機能解析

中村 健司

(三菱化学生命科学研究所 マウスゲノム工学センター)

現在、数多く用いられている遺伝子ターゲッティング法は、生体における遺伝子の欠損を解析する方法である。また、最終的に選択遺伝子 (*neo* 遺伝子等) が残るため、その影響も考慮する必要がある。さらに、ES 細胞の段階でいくつかの遺伝子ターゲッティングを行なう場合、それぞれ別の選択遺伝子を準備する必要がある。一方、遺伝子の機能を解析するうえでは、単なる *neo* 遺伝子による遺伝子の欠損だけでなく、点突然変異、選択遺伝子の残らない遺伝子欠失、ヒト遺伝子との置換、あるいは *lacZ* や *GFP* 等のマーカー遺伝子への置換が必要となる。CRE-loxP システム等を用いた knock-in 法もあるが、最終的には loxP 配列が残ってしまう。我々は、当初よりこれらの問題を克服して、自在に遺伝子を置換する技術を考えてきた。そして、二段階の遺伝子ターゲッティングからなる gene replacement 法（標的遺伝子置換法）を考案した。この方法の原理と成果を御紹介する。

*ras* 群遺伝子は、最初に腫瘍細胞より活性化型の発がん遺伝子として発見された。ヒトやマウスでは、3種類の *ras* 遺伝子 (H-ras, N-ras, K-ras) があり、それぞれ 21kDa のグアニンヌクレオチド結合タンパク質をコードする。マウスの H-Ras, N-Ras, K-Ras は、互いに非常に高い相同性がある。また、C 末端領域は、各 Ras タンパク質に特異的なアミノ酸配列であり、脂質修飾を受ける特異的なアミノ酸配列も存在する。活性化型 Ras-GTP 複合体は、種々の下流分子にシグナルを伝え、細胞の増殖、分化、アポトーシスを制御していると考えられている。これらの推論は、すべて培養細胞株を用いた研究に由来する。しかし、がん細胞で活性型 *ras* 遺伝子が検出されていることを除けば、生体細胞での機能については不明である。我々は、これまでに H-ras, N-ras, K-ras 遺伝子欠損マウスおよび *ras* 多重遺伝子欠損マウスの解析を通して、Ras の個体レベルでの機能を明らかにしてきた。その結果、K-Ras が胎生期の発生に必須なこと、H-Ras が海馬のシナプス可塑性の制御に関わっていること等から、3種の Ras

に各種臓器での役割の違いがあることを明らかにした。一方、胎生致死である *K-ras* 遺伝子欠損マウスは、ヒト *H-ras* 遺伝子を導入することにより救われた。さらに、内在性の Ras タンパク質を全て欠失した *H-ras*、*N-ras*、*K-ras* 遺伝子同時欠損マウスもヒトの *H-ras* 遺伝子を導入することにより救われて生存した。すなわち、ヒト *H-ras* 遺伝子導入マウスは、全ての内在性 Ras タンパク質の代替が可能であることを示しており、Ras には機能的な重複も存在することが明らかとなった。そこで、新たに CRE-loxP システムを利用してコンディショナルに遺伝子発現を制御できるヒト *H-ras* 遺伝子導入マウスを作成した。このトランスジェニックマウスと胎生致死である *K-ras* 遺伝子欠損マウスとを交配した結果、生存する *K-ras* 遺伝子欠損マウスが認められた。現在さらに、胎生致死である *ras* 多重遺伝子欠損マウスが救われるかどうか交配を進めている。今後、このトランスジェニックマウスを用いて、任意の組織あるいは時期において導入遺伝子を欠失し、Ras タンパク質が全く存在しない状態を解析できると期待される。

## ラット精子の凍結保存

中務 胞

(麻布大学獣医学部 動物応用科学科 動物繁殖学研究室)

近年、トランスジェニック (Tg) ラットが精力的に作製され、有用な疾患モデル、マウスの系統保存において、胚および精子の凍結保存が用いられているが、ラット発がんモデルおよび変異原性試験のモデル動物として様々な研究分野で利用されている。Tg ラットの作製数は加速的な勢いで増え続けており、現在までに数千、数万系統が作製されているものと考えられる。ラットは実験動物として、特に医薬品や食品添加物の安全性試験に広く利用されており、また、マウスに比べて体のサイズが大きいため解析に十分な量の組織サンプルを確保できるという利点もある。さらに生理学的研究や薬理学的研究においてはラットを用いた解析方法が十分に確立していることより、様々な目的で作製されている Tg ラットが今後マウスに匹敵する有用な実験動物になるものと思われる。

マウスの系統保存において、胚および精子の凍結保存が用いられているが、ラットは精子の凍結保存方法が確立されていないため、系統保存には胚凍結保存が一般的に用いられている。Tg 動物の場合、導入された遺伝子が次世代に伝達されれば良いことから、精子の凍結保存でも十分に系統保存が可能である。精子は採取方法が容易でさらに 1 匹から得られる数においては、胚よりも多い。マウス精子凍結においては中湯らが良好な保存法を確立し、遺伝子改変マウスの保存や維持に広く応用されている。しかしながら、ラット精子の凍結保存に関する研究は現在までほとんどされていない。本研究では凍結融解後の運動精子率、精子細胞膜の正常性および受精能力について 1) 物理的傷害がラット精子に与える影響、2) ストローとペレット凍結方法の比較、3) 凍結保護物質の添加濃度、などの点に注目し検討をおこなった。その結果、我々のグループはラット凍結融解精子を用いた子宮内注入によって産子を得ることに世界に先駆けて成功したので、その研究成果をここに報告する。

E. Nakatsukasa, T. Inomata, T. Ikeda, M. Shino and N. Kashiwazaki  
Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal  
spermatozoa cryopreserved at 196°C  
Reproduction (2001) 122, 463-467

## 凍結 8 細胞期胚および ES 細胞を用いたキメラマウスの作製

○中島竜之<sup>1)</sup>, 山村研一<sup>2)</sup>

(井上実験動物センター<sup>1)</sup>, 熊本大学<sup>2)</sup>)

**【目的】**現在我々は、遺伝子トラップ法により挿入変異マウスの大量作出を行なっており、そのマウスライン樹立のためのキメラマウスを新鮮 8 細胞期胚と ES 細胞の共培養により作製している。しかしながら、共培養のたびに大量の 8 細胞期胚が必要であり、採卵用雌マウスの過排卵処理や雄マウスとの交配、交配用雄マウスの飼育に膨大なスペースが必要となった。さらに共培養に用いる ES 細胞についても共培養する 3 日前から凍結してある ES 細胞を融解し培養しなくてはならず、細胞培養の労力やコストなどの面においてさまざまな問題が生じている。そこで我々は前述の問題を解決するため、凍結 8 細胞期胚を融解直後の ES 細胞と共培養を行なうことにより、キメラマウスの作製が可能であるか、詳細な検討を行ったので報告する。

**【方法】**キメラマウス作製に用いる受容胚は、簡易ガラス化法によって凍結された 8 細胞期胚 (CD - 1 (ICR)) を日本チャールス・リバーより購入、ES 細胞 (TT2) は液体窒素内にて長期間保存したものを融解し、だたちに実験に供した (実験区)。また対照区として、新鮮胚は過排卵処理を行った CD - 1 (ICR) 雌マウスを同系統の雄マウスと交配し、2 細胞期胚を採取、24 時間培養後、8 細胞期胚まで発生した胚を用い、ES 細胞は融解して約 2.5 日間、体外培養したものを用いた。それぞれの 8 細胞期胚は、酸性タイロードで透明帯を除去し、凝集法を用いてそれぞれの ES 細胞と共培養を行い、翌日、ES 細胞を取り込み胚盤胞へ発生した胚を偽妊娠 3 日目の受容雌の子宮に移植した。

**【結果・考察】**凍結 8 細胞期胚および融解直後の ES 細胞を用いた実験区では、産子への発生率 6.8 %、総産子数 8,695 匹中 235 匹が ES 細胞由来のキメラマウスであり、その内 109 匹 (46.4 %) に毛色キメラ率 100 % のマウスが確認された。一方、対照区においては、産子への発生率 10.3 %、総産子数 540 匹中 365 匹が ES 細胞由来のキメラマウスであり、その内 134 匹 (36.7 %) に毛色キメラ率 100 % のマ

ウスが確認された。実験区では産子率がやや低値を示したが、生まれたキメラマウスに占める毛色キメラ率が 100 % のマウスの割合は対照区よりも高い値を示した。

以上のことより、凍結 8 細胞期胚および ES 細胞を用いてもキメラマウスの作製が可能であることが示された。現在これらの 100 % 毛色キメラマウスについては、生殖系列への寄与を確認中である。

## トランスジェニック家畜の生産とその商業的利用

### —PPL Therapeutics の概要—

板垣 佳明

(日本農産工業株式会社 バイオ研究所)

今年(2001年)2月に日本農産工業株式会社は、英国PPL Therapeutics(PPL)と日本における独占代理店契約を締結し、PPLが有するトランスジェニック技術を用いた医薬品の開発、生産を中心とする斡旋業務を開始した。本講演では、PPLから提供された資料をもとにPPLの概要を紹介するとともにトランスジェニック家畜を利用したヒト組換えタンパク生産の利点、医薬品としての開発状況、クローン技術などについて述べてみたい。

PPLは、スコットランドにあるAnimal Breeding Research Organization(現在のRoslin Institute)が開発したトランスジェニック技術を用いたタンパク生産を商業化するために1987年に設立され、1991年には約40g/Lのヒトタンパクを生産する商業目的として最初のトランスジェニックヒツジ(Tracey)を誕生させている。トランスジェニックタンパク生産の利点は、コストが安いこと、安全なこと(HIV、肝炎ウイルスなどの感染がない)、大量生産ができること、生産規模の拡大/縮小が容易なこと、複雑なタンパクやペプチドなど広範囲な応用が可能であることなどがあげられる。PPLでは家畜を用いて商業的に利用できるレベルの数多くのヒトタンパクを発現させており、これらには $\alpha$ -1-アンチトリプシン(AAT)、Bile Salt Stimulated Lipase(BSSL)、フィブリノーゲン、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、血液凝固第VII因子、Protein C、カルシトニンなどがある。これらのうち、AAT、BSSL、フィブリノーゲンは臨床試験段階にあり、特に囊胞性纖維症や先天性AAT欠損症の治療薬であるAATはphase IIが終了し、まもなくphase IIIが開始される。

一方、体細胞核移植技術(クローニング)の出現はトランスジェニックタンパク生産の新しい道を開き(ヒツジ:Dolly、ウシ:Mr. Jefferson、ブタ:Millie, Christa, Alexis, Carrel & Dotcom)、PPLではトランスフェクトした細胞(Polly)やジーン

ターゲッティング (Cupid & Diana) によるトランスジェニッククローンヒツジの誕生に成功している。このようにトランスジェニック家畜の生産のためにクローニングを用いることは、生産効率の向上、時間スケジュールの短縮、ノックアウトのような正確な遺伝子の改変など多くの有利性をもたらし、PPL ではトランスジェニックタンパク生産以外にも再生医療や異種移植などの医療分野への応用もめざしている。

### 参考文献

- 1) Wright, G. *et al.* Bio/Technology 9, 830-834 (1991).
- 2) Carver, A. S. *et al.* Bio/Technology 11, 1263-1270 (1993).
- 3) Wilmut, I. *et al.* Nature 385, 810-813 (1997).
- 4) Schnieke, A. E. *et al.* Science 278, 2130-2133 (1997).
- 5) McCraeth, K. J. *et al.* Nature 405, 1066-1069 (2000).
- 6) Polejaeva, I. A. *et al.* Nature 407, 86-90 (2000).

日光、北海道および長崎県対馬に棲息するニホンジカの  
ミトコンドリア DNA D-loop 領域の塩基配列決定と比較解析

福井えみ子

(宇都宮大学農学部)

日光国立公園では、冬期に3つのニホンジカの越冬集団が形成されることがモニタリング調査から明らかにされており、これら3つの越冬集団（奥日光、表日光、足尾）、北海道および対馬に棲息するニホンジカの系統発生学的な関係（母系関係）を明らかにすることを目的として実験を行った。日光15頭、北海道2頭および対馬1頭の血液よりDNAを抽出し、常法に従い、ミトコンドリアDNA D-loop領域(mtDNA D-loop)の411bpの塩基配列を決定した。得られた塩基配列から、DNA解析用ソフトGENETYX-Macを用いて系統樹を作成した。日光国立公園に棲息するニホンジカにおけるmtDNA D-loop領域(411bp)の塩基配列を調査したところ、8つのハプロタイプ（日光1～8）が検出され、これらのハプロタイプ間の相異性は82.4～99.7%であった。このうち7つのハプロタイプにおいて38～40塩基の繰り返し配列が6回、1ハプロタイプにおいて5回観察された。北海道のハプロタイプは、日光タイプと76.5～98.3%の相異性を示し、7回の繰り返し配列が観察された。対馬のハプロタイプは、日光タイプと70.9～72.4%の相異性を示し、4回の繰り返し配列が観察された。日光の3つの越冬集団（奥日光、表日光、足尾）で観察された8つのハプロタイプのうち、ハプロタイプ1と2は奥日光、ハプロタイプ3、4および5は表日光、ハプロタイプ6、7および8は足尾で採取されたニホンジカであった。このことから日光の3つの越冬集団は、各々繁殖集団であることが明らかとなり、日光のニホンジカは繁殖集団で越冬することが示唆された。さらにこれらの塩基配列をもとにUPGMA法を用いて得られた系統樹より、最も古い個体は対馬個体であり、次に日光個体、そして北海道個体であることが明らかとなった。日光の3つの越冬集団では、足尾→表日光→奥日光の順に各集団が形成されたことが明らかとなった。



## ブタ卵における減数分裂再開の制御機構について

○成岡春奈・大橋聰・杉浦幸二・内藤邦彦・東條英昭

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

未成熟卵の減数分裂再開（卵成熟開始）時には核膜崩壊の前後でタンパク質合成のパターンが変化する事が報告されている。この時卵内では、MPF に加えて MAPK もほぼ同時に活性化する。一般に核膜崩壊に対して、MPF 活性が重要である事は受け入れられているが、MAPK 活性についてはアフリカツメガエルで必須、マウスで不要という逆の報告がなされている。そしてマウス以外の哺乳動物卵においては明らかでない。さらに、タンパク質合成パターンの変化に MPF 活性と MAPK 活性がどのように関わっているかは全く報告がない。そこで我々はブタ卵を用い、核膜崩壊、タンパク質合成パターンの変化という2つの現象に対する MPF 活性と MAPK 活性の関与、及び MPF と MAPK 活性相互間の制御について調べる事にした。

まず MAPK を早期に活性化、あるいは阻害した場合に、MPF、核膜崩壊に与える影響を調べた。MAPK を活性化する上流因子の MAPKKK である Mos の mRNA をブタ未成熟卵に注入して過剰発現した卵では、MAPK 経路が早期に活性化した。しかしこの時、MPF 活性、核膜崩壊に目立った変化は見られなかった。また Mos のアンチセンス RNA の注入によりその合成を阻害した卵では、MAPK 活性の上昇が成熟期間を通して完璧に阻害されていたにもかかわらず、核膜崩壊はほぼ正常に誘起されていた。これらの結果から MAPK 経路のみによって核膜崩壊を誘起する、あるいは MPF 活性を上昇させる作用はほとんどない事が示された。しかし MAPK 活性を抑制すると MPF 活性も阻害されていた事から、MPF の十分な活性化には MAPK 活性が必要であると考えられた。

次に MPF 活性の上昇を阻害する目的で、Vanadate によって不活性型 MPF の脱リン酸化を阻害した場合に、MAPK、核膜崩壊、タンパク質合成パターンに与える影響を調べた。Vanadate 处理した卵では、MPF 活性の上昇、MAPK 活性の上昇、核膜崩壊、タンパク質合成パターンの変化は全て阻害されており、これらの変化には MPF 活性の上昇が必要である事が示唆された。また Vanadate 处理した卵でも、MPF の構成分子である

サイクリンB1のmRNAを注入し、別の経路からMPF活性を上昇させた卵では核膜崩壊が引き起こされる事から、Vanadate自体によって核膜崩壊を阻害する作用はなく、VanadateによってMPF活性の上昇が阻害された結果、核膜崩壊が阻害されている事が分かった。

上記の結果よりMPF活性の上昇がMAPK活性の上昇、核膜崩壊、タンパク質合成パターンの変化を引き起こす事が示唆されたので、今度はMPFを早期に活性化した場合に、これらの現象が実際に誘起されるかどうかを調べた。MPF活性を上昇させるために、サイクリンB1のmRNAを注入し早期に過剰発現した卵では、MPF活性がサイクリンB1の合成と同時に上昇し、それに伴い核膜崩壊も早まっていた。さらにMAPK活性の上昇、及びタンパク質合成パターンの変化も早まっていた。このようにMPF活性を早期に活性化する事によって、MAPK活性の上昇、核膜崩壊、タンパク質合成パターンの変化を引き起こす事ができる事が示された。

しかしMPF活性の上昇によってタンパク質合成パターンが変化するのは、MPF活性の上昇によりMAPK活性が上昇する事によって、タンパク質合成パターンが変化している可能性もある。そこで最後に、MPF活性を上昇させMAPK活性を低く抑制する目的で、MosアンチセンスRNAとサイクリンB1のmRNAを共注入し、核膜崩壊及びタンパク質合成パターンに与える影響を調べた。Mosの合成を阻害し、サイクリンB1を過剰発現した卵では、MPF活性は早期に上昇し、MAPK活性は阻害されていたが、核膜崩壊及びタンパク質合成パターンの変化はMPF活性の上昇に伴って起こっていた。この事から、タンパク質合成パターンの変化はMPF活性の上昇によって引き起こされ、MAPK活性は必要ない事が示された。

以上をまとめると、核膜崩壊はMPF活性のみの上昇によって起こり、MAPK活性はMPF活性の上昇を助ける意味でのみ核膜崩壊に必要であり、MAPK活性自体は必要ではない事が示された。またMPF活性が上昇する事によってタンパク質合成パターンの変化及びMAPK活性の上昇が起こる事が示された。

## ブタ卵の減数分裂における核の必要性について

○杉浦幸二、成岡春奈、内藤邦彦、東條英昭

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

卵成熟とは、卵が受精能・発生能を獲得する上で非常に重要な減数分裂の期間であり、その中心因子として卵成熟促進因子(Maturation/M-phase promoting factor: MPF)と呼ばれる酵素が存在する。MPFは卵成熟の開始時に活性化し、その後卵が第一極体を放出する時期にその活性は一旦低下する。そして、MPFは再度活性化(以下、再活性化)し、卵成熟が完了する。ヒトデやアフリカツメガエル卵を用いた基礎研究によって、MPFの制御には核内因子の関与が示唆されているがその詳細については明らかではない。また、哺乳動物ではこの点についての研究はされて来なかった。本研究ではブタ未成熟卵から核を除去して培養し、MPFの活性化に対する核の必要性を調べた。

除核した卵を培養し、MPF活性を測定すると、卵成熟開始時の活性上昇は対照卵と同様に見られた。しかし、その後、MPF活性は低下したままであり、卵成熟完了時の再活性化が見られなかった。さらに、MPF活性が低下したままの除核卵に、他の卵から核質を注入するとMPFの再活性化が見られるようになった。これらのことから、卵成熟開始時のMPF活性化に核は必要ないが、卵成熟完了時の再活性化には何らかの核内因子が必要であることが示された。

Mitogen activated protein kinase (MAPK)は、MPF同様に卵成熟の開始時に活性化する。MAPKの活性を持たないノックアウトマウスの研究によって、MAPKの活性化は、MPFの再活性化に必須であることが知られている。また、ヒトデ卵では、MAPKの活性化には核質が必要である。これらのことから、MPFの再活性化が見られなかったのは、除核卵ではMAPKの活性化が起こらなかっただためである可能性が考えられた。そこで次に、除核卵におけるMAPK活性を調べたところ、除核卵でもMAPKは正常に活性化していた。従って、MAPKの活性化に核内因子は必要ないことが示された。核を除去してしまうと、MAPK活性が高いにも関わらずMPFの再活性化が起こらなくなることから、MPFの再活性化にはMAPKと共に作用する、または、MAPKの下流で作用する核内

因子が必要であることが示唆された。

MPF は cdc2 と cyclin B と呼ばれる 2 種類のタンパク質の複合体であり、MPF の再活性化は cyclin B が合成され、蓄積することによって起こる。そこでウエスタンブロットを行い、cyclin B のタンパク質量を調べたところ、除核卵では cyclin B の蓄積が不充分であった。一方、卵内で合成されている全タンパク質の様子を調べたところ、除核卵でも対照卵と同様であった。このことから、核内因子は卵内で合成されるタンパク質全体に関与するのではなく、cyclin B の蓄積に特異的に関与することが示された。

MPF の再活性化は減数分裂に特異的な現象であり、MAPK の関与は示唆されるものの、その詳細な機構は現在のところ不明な点が多い。本研究によって MPF の再活性化は、何らかの核内因子が MAPK と共に、またはその下流で関与し、cyclin B の蓄積を促進していることが示唆された。

## ニワトリ遺伝資源の保存に関する研究

### －核移植ニワトリ作製の試み－

○峰松健夫<sup>1</sup>、田島淳史<sup>2</sup>、金井幸雄<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>筑波大学博士課程農学研究科、<sup>2</sup>筑波大学農林学系)

家禽において、非侵襲的に得られる受精卵、つまり放卵後の受精卵は、卵黄を豊富に含んでおり、さらに細胞数が約6万個まで分割した状態であることなどから、長期的な保存が極めて難しいとされている。このことから、家禽遺伝資源の保存のために、胚盤葉細胞や始原生殖細胞（PGCs）を利用する事が関心を集めている。

近年、ニワトリの胚盤葉細胞<sup>(2)</sup>あるいはPGCs<sup>(1)</sup>を移植することにより、体細胞および生殖系列キメラが作成された。これらの成果により、細胞レベルでのニワトリ遺伝資源保存が初めて可能となった。しかし、これらの細胞は受精卵から採取しなければならず、また現在のところ分離・回収方法や培養技術も十分に確立していないため、既に希少となった家禽種を保存する手段としては不十分である。

そこで、私たちの研究室では、ニワトリを用いて、PGCsをレシピエントとした体細胞核移植技術の開発を試みている。この目標を達成するために必要とされるのは 1) 除核 PGCs の作製、2) 除核 PGCs と体細胞（核体）の融合による再構成 PGCs の作製、3) 再構成 PGCs のレシピエント胚への移植の3つの技術である。

この技術を用いて生殖系列キメラを作製することが可能であるならば、これを新たなニワトリ遺伝資源保存法として提案することができる。さらに、培養が容易な纖維芽細胞などを核ドナーとして用いることにより、希少な遺伝資源の保存および増殖の効率向上にも繋がる。

一方、核ドナーとなる体細胞に新規遺伝子の導入や特定遺伝子のノックアウトなどの操作を行うことによる、トランスジェニック・ニワトリ、ノックアウト・ニワトリなどの効率的な生産への応用も考えられる。

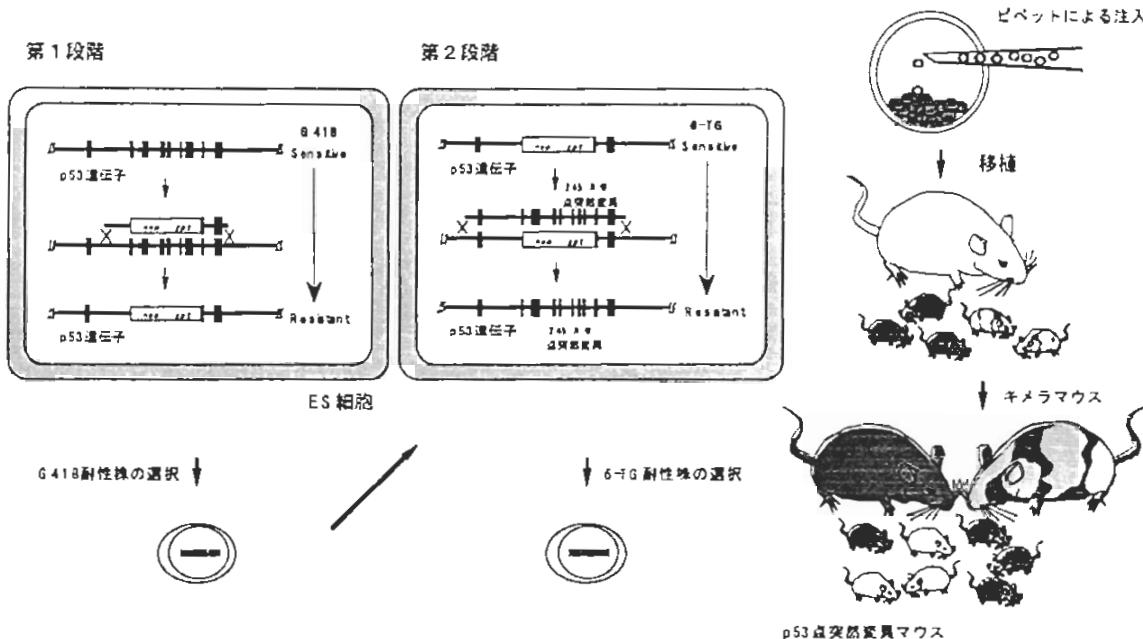
そこで現在、私たちは、除核 PGCs の作成や PGCs と体細胞の融合などの技術開発を行っている。また、今後は、再構成 PGCs の生殖腺への移住能や、卵祖細胞あるいは

精粗細胞への分化などの機能に関する研究を試みる予定である。

#### 参考文献

- (1) Tajima A., Naito M., Yasuda Y. and Kuwana T., Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). Theriogenology, 40: 509-519, 1993
- (2) Throval P., Lasserre F., Coudert F. and Dambrine G., Somatic and germline chicken chimeras obtained from Brown and White Leghorns by transfer of early blastodermal cells. Poult. Sci. 73: 1897-1905, 1994

## 相同組換えによる個体レベルの遺伝子操作



標的遺伝子組換え法(gene targeting)と標的遺伝子置換法(gene replacement)の比較

	Gene Targeting	Gene Replacement
方法の原理	<p>マウスES細胞を用い、目的とする遺伝子を、Neo耐性遺伝子やpuromycin耐性遺伝子に置き換えた、相同組み換えES細胞をクローニングする。</p> <p>統いて、キメラマウスを作成する。生殖系列を通して遺伝子欠損マウスを作成し、表現型を解析する。</p>	<p>2段階の遺伝子ターゲッティングから成る。</p> <p>第1段階のターゲッティングで、目的とする遺伝子をG418選択により、neo-gpt遺伝子へと置き換えた欠失ES細胞を作成する。</p> <p>統いて、このES細胞を用いて第2段階のターゲッティングを行なう。目的とする遺伝子を6-TG選択で自在な遺伝子(DNA配列)へと置換できる。</p> <p>第1段階のES細胞からは、遺伝子欠損マウスが作成できる。</p> <p>第2段階のES細胞からは、様々な遺伝子へ置換したマウスが作成できる。</p>
利点	<p>広く、一般的な方法である。</p> <p>技術が確立している。</p> <p>代行する企業や作成キットがある。</p>	<p>2段階目のTargeting Vectorは、neo等の選択遺伝子を必要とせず、遺伝子を自由に設定できる。その結果、点突然変異や欠失、ヒト遺伝子等への置換が自在にできる。</p> <p>置換されたES細胞にneo等の選択遺伝子が残らない。</p>
欠点	<p>遺伝子の欠失解析にとどまる。</p> <p>neo等のマーカー遺伝子が残る。</p> <p>ES細胞の段階で、複数の遺伝子ターゲッティングを行なう場合、それぞれ別の耐性遺伝子を使用する必要がある。</p>	<p>高度なES細胞培養の技術を必要とする。</p>