

第17回 動物生殖工学研究会  
プログラム・抄録集

平成17年12月3日(土)

北里本館 大会議室

# プログラム

開会挨拶

会長 横山崇介

## 特別講演

「核移植技術および ICSI-Transgenesis を用いて明らかになった精子核および  
体細胞核の特性」

長田 智治先生（三菱化学生命科学研究所）

## 一般講演

- 1 マウス精子に対する各種糖類の凍害保護効果について  
日野敏昭（三菱化学生命科学研究所）
- 2 ES細胞の核移植による変異マウスの作製  
宮地 均・清成 寛・相澤慎一・中尾和貴（理化学研究所 発生・再生  
科学総合研究センター）
- 3 コモンマーマネットを用いた再生医療の前臨床研究モデル動物システム構  
築への取り組み  
佐々木えりか（（財）実験動物中央研究所 バイオメディカル部霊長類研  
究室）
- 4 ブタにおける単為発生胚と体細胞核移植胚の集合胚の発生能  
平原尚人・滝沢明子・鈴鴨知佳・中嶋紀憲・紫野正雄・柏崎直巳  
（麻布大学）
- 5 ミニブタ体細胞クローン技術の開発  
井上須美子（鹿児島大学農学部）
- 6 ウシ体外受精技術の展開  
浜野 晴三（（社）家畜改良事業団家畜バイオテクセンター）

総 会

懇 親 会

# 核移植技術および ICSI-Transgenesis を用いて明らかになった精子核 および体細胞核の特性

長田 智治

(三菱化学生命科学研究所、組織再生グループ)

2000年から2002年までの2年間、ハワイ大学柳町隆造教授の許で先鋭的な発生工学 (ICSI-Transgenesis, Honolulu method) を学んだ。そしてそれらの技術を基盤として、2002年から2005年まで、神経細胞核由来のクローン個体の作成を行った。まだまだ、改善および工夫の余地は残っているが、それらの技術を用いて明らかにしたことを述べたい。

## 1) ICSI-Transgenesis の改良。

柳町研では、核移植を学ぶ前に必ず、ICSI を習熟しなければならなかった。ICSI を学ぶ事は、すなわち Piezo-drive を使いこなすこと、に尽きた。ICSI の1応用例として、Transgenesis がある。我々は、EGTA 溶液 (Kusakabe et al., PNAS 2001) において不動化した精子の精子膜を Freeze and thawing で部分的に破壊した後、DDT 溶液に 4℃ で 30 分浸し、その後 DNA と会合させた結果、導入産子作出効率の向上が観察された。この方法を用いて、200Kb 平均の BAC DNA を導入した所、DNA の切断が殆どない導入マウスが得られた (Osada et al., MRD, 2005)。

## 2) Honolulu method を用いた非増殖細胞 (神経細胞) の中期染色体の可視化。

これについては、クローン技術の新しい応用例が得られないか、ということ で考えた。成体では増殖能が休止している分化体細胞の細胞周期を核移植により再開させた結果、分化した細胞核由来の中期染色体を観察することが出来た。特に神経細胞では染色体の異数性が頻発していた (Osada et al., Cytogenet Genome Res. 2002)。これは予想外な結果であった。我々が用いた受精卵の第一卵割期における染色体標本の調製法は熟練を必要としたことから、得た結果については artifactable な要因が含まれると考えられる。しかしながら、他研究グループから異数性の神経細胞に関して多くのデータが出ている (Rehen, et al., PNAS 2002, Kaushal et al., J. Neurosci., 2003, Yang et al., J. Neurosci., 2003, McConnell et al., 2004, Kingsbury et al., PNAS 2005) ことから、我々の得た結果は、成体の神経細胞核の一側面を反映しているとも考えられた。

## 3) 神経細胞核由来のクローン個体の作成。

Honolulu method により得られた核移植を用いて神経細胞核由来のクローン個体が得られるかを検討した。大脳皮質神経細胞において細胞分化を境にクローン作成効率が低下する報告 (Yamazaki et al., PNAS, 2001) や、分化直後の神経細胞核を用いたクローン胚は神経管を含めた異常が多発するという報告

(Makino et al., Stem Cell Cloning 2005)があったため、神経細胞分化に伴う核ゲノムの一次構造変化を含めた何かしらの質的変化が示唆された。しかしながら、DNAの一次構造変化を伴う免疫細胞核からクローン個体の作成 (Hochedlinger and Jaenisch, Nature, 2003) や、同じくDNA再構成が示唆されている嗅覚神経細胞核由来のクローン個体の作成 (Eggan et al., Nature, 2004, Li et al., Nature 2004) が報告されたことから、ゲノムの一次構造の変化は必ずしもクローン個体が出来ない理由にはならないことが示されてもいた。本研究では、免疫細胞や嗅覚神経細胞核由来のクローン個体作成の際に用いられた、クローン胚からES細胞を樹立する方法を用いた。用いた大脳皮質神経細胞は生後14-21日の幼若マウスから採取し、神経細胞特異的DNA組み換えにより選択的に蛍光標識 (EGFP発現) されているものを用いた。合計2026個の神経細胞核を除核未受精卵に注入した結果、403個が2細胞期に発生した。大部分が2細胞期で停止する傾向が観察されたが、4細胞期に移行したものの大部分は胚盤胞へ発生した。発生した76個の胚盤胞を *in vitro* で培養した結果、6株のES様細胞株が樹立できた。これらのES細胞核由来の個体を野生型4倍体胚とのキメラ個体作成および核移植から作製した。992個の4倍体胚盤胞への注入により、3細胞株から合計19匹の産子が得られ、10匹が生存した。2179個のES細胞核を注入した結果272個の2細胞期胚が得られそれを偽妊娠雌マウスへ移植した結果、3細胞株から合計4匹の産子が得られ、内2匹が生存した。これらの結果から、大脳皮質神経細胞は可塑的分化能力を保持することが示された (Oasada et al., J. Neurosci., 2005)。しかしながら、その効率は他の体細胞同様低いことや、多様な神経細胞集団から得られた結果であることから、全ての神経細胞核が発生的可塑性を保持しているかは、今後の研究課題として残されている。単一神経細胞核の分化の可塑性とその制限を司るメカニズムを知る事は、神経細胞核のエピジェネティクスを知る上でも重要だと考える。

## マウス精子に対する各糖類の凍害保護効果について

日野敏昭

(三菱化学生命化学研究所)

### 【目的】

マウスにおいて、凍結保存精子を用いた体外受精による産仔の作出例が 1990 年に最初に報告されてから(1,2,3)、精子の凍結保存は現在、系統保存法の一つとして広く利用されている(4)。しかし、遺伝子改変マウスの作成に頻繁に用いられる C57BL/6 マウスの凍結精子の体外受精率は非常に低いことが知られている(5,6)。本実験では、従来から凍結保存液に用いられている 18% raffinose 以外での糖類における凍害保護効果を検討したので報告する。

### 【材料および方法】

凍結保存液：ラフィノースの他に、同じ三糖類であるメレジトース、二糖類であるシュークロース、トレハロース、マルトース、ラクトース、単糖類であるガラクトース、キシロース、グルコース、フルクトース、ラムノース、糖アルコールであるソルビトール、マルチトール、ラクチトール、人工甘味料であるスクラロースを保護剤として使用した。各糖類は 4~33%濃度の幅で溶解し、skim milk を 3%濃度で溶解した。

実験 1：C57BL/6 マウスの成熟雄を用い、各保存液における凍結精子の生存性と運動性を検討した。凍結操作は中潟の報告(6)にしたがい、100 $\mu$ l の各保存液中に摘出した 2 個の精巣上体尾部を入れ、ハサミで細切してから振動させて精子浮遊液を作成した。この精子液を 10 $\mu$ l ずつ 0.25ml プラスチックストローに封入した。ついで、液体窒素タンク内の気層部に 10 分間保持して冷却した後、液体窒素中に浸漬して 1~数日間保存した。融解は、37 $^{\circ}$ C の温湯中に保管タンクから取り出したストローを投入して行った。さらに、融解した精子液の 1 $\mu$ l を 200 $\mu$ l の体外受精用 TYH 培地(7)のドロップに静かに添加し、37 $^{\circ}$ C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで約 1 時間培養した後、生存性ならびに運動性を調べた。

実験 2：次に、いくつかの糖類で生存性ならびに運動性の最も高かった濃度の保存液を用いて精子の凍結保存を行い、体外受精に供した。精子採取雄マウスとしては BALB/c、C3H/He、C57BL/6、DBA/2、B6C3F1、B6D2F1、MCH(ICR) を使用した。融解した精子液は 1ml の TYH 培地を加えたチューブに静かに移し、37 $^{\circ}$ C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1 時間培養した後、チューブ底から約 1cm の層から 150 $\mu$ l 採取し、あらかじめ 150 $\mu$ l の培地を除いた 200 $\mu$ l 培地のドロップに静かに加えた。次に PMSG と hCG の処理で過排卵誘起した B6C3F1 成熟雌マウスの卵管膨大部から未受精卵を採取し、TYH 培地のドロップ中に静かに導入し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。6 時間後に雌雄前核の形成をもとに受精を判定し、さらに受精卵は mWM で培養を継続してその後の発生を観察した。

### 【結果および考察】

凍結融解後の精子の生存性と運動性は、単糖類においては、7.5%濃度のグルコースにおいて最も生存性・運動性が高かったが、18%ラフィノースと比較すると低かった。その他の単糖類では生存性が非常に低いか、もしくは生存精子が確認できなかった。一方、二糖類ではすべてが12%濃度において、また三糖類であるメレジトースでは18%濃度において、18%ラフィノースの場合と同等の結果となった。糖アルコールではマルチトールが10.5%濃度において、ラクチトールが12%濃度において、18%ラフィノースの成績と比較すると若干低いものの、最も生存性・運動性が高かった。シュクロースの3つの水酸基を選択的に塩素原子で置換して生成される人工甘味料であるスクラロースにおいては、生存精子は確認できなかった。次に、グルコース、シュクロース、トレハロース、マルトース、ラクトース、メレジトース、ラフィノースにおいて、生存性が最も良好な濃度の保存液で精子を凍結し、体外受精を行った場合、C57BL/6においては全ての糖類において受精率が2~18%と、未凍結精子の受精率である92%と比較して非常に低くなった。その他の系統であるBALB/c、C3H/He、DBA/2、B6C3F1、B6D2F1、MCH(ICR)においては、B6C3F1では若干劣るものの、マルトース、メレジトース、ラフィノースで、未凍結精子の受精率と比較し、ほぼ同等の受精率となった。またシュクロースではBALB/c、DBA/2、MCH(ICR)において、トレハロースではBALB/c、C3H/He、DBA/2、B6D2F1において、ラクトースではBALB/c、B6D2F1において、未凍結精子の受精率と比較し、ほぼ同等の受精率となった。以上の結果から、18%ラフィノースと3%スキムミルク溶液が、マウスの精子の凍結保存に有効であることが再確認された。またいくつかの糖類において、ラフィノースと同等の生存性や運動性、受精率を示す事も確認された。しかし、C57BL/6においてはすべての糖類において、未凍結精子の受精率である92%と比較して著しく低く、C57BL/6精子の凍結保存に効果的な糖類は確認できなかった。

### 【参考文献】

- 1) M.Yokoyama, et al (1990) *Exp Anim*, 39:125-128
- 2) N.Tada, et al (1990) *J Reprod Fertil*, 89:511-516
- 3) M.Okuyama, et al (1990) *J Fertil Implant*, 7:116-119
- 4) Claire E, et al (1999) *Mamm Genome*, 10: 987-992
- 5) Jorge M. Sztejn, et al (2000) *Biol Reprod*, 63:1774-1780
- 6) N.Nakagata (2000) *Mamm Genome*, 11: 572-576
- 7) Y.Toyoda, et al (1971) *Jap J Animal Reprod*, 16:147-151

## ES細胞の核移植による変異マウスの作製

○宮地 均・清成 寛・相澤慎一・中尾和貴

(理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 変異マウス開発チーム)

KOマウスを得るためにはキメラマウスを作製し、そのキメラマウスからES細胞由来の子孫を得なければならない。もし、体細胞から直接個体を得ることができる核移植技術を利用する事が出来れば、一世代繁殖させる必要がなくなり、より短期間でKOマウスが得られる可能性がある。しかしながら、核移植は個体への発生率が非常に低く、実用性に乏しいのが現状である。そこで個体への発生率を改善するため、使用するES細胞を選別して使用し、核移植により遺伝子を操作したES細胞から直接KOマウスを得る事を検討した。

ES細胞はコルセミド(1  $\mu$ g/ml)を添加したES培地で1時間処理をすることで、細胞周期をM期とした。M期のES細胞を倒立顕微鏡下で観察し、形態的に正常だと考えられる細胞を選別して、脱核未受精卵へのインジェクションに使用した。注入3時間後にストロンチウムで活性化させ、翌日、正常な2細胞へ発生した核移植卵を偽妊娠マウスの卵管へ移植し産仔へと発生させた。

今回使用した10遺伝子のうち3つの遺伝子については産仔が得られなかった。産仔が得られなかった3つの遺伝子のうち2つは、通常のESインジェクションでもキメラマウスが得られておらず、今回の結果と同様な傾向を示した。

産仔が得られた7つの遺伝子のうち通常のESインジェクションでもキメラマウスが得られたのは3つであった。残りの4つの遺伝子のうち2つは通常のESインジェクションではキメラマウスが得られず、残り2つは通常のESインジェクションは実施されておらず比較が出来なかった。

これらの結果から、核移植により、遺伝子を操作したES細胞から直接KOマウスを得る事が可能であった。しかしながら、産仔への発生率は依然として1.0-3.6%と低く、より安定した技術とするためには更なる検討が必要である。

コモンマーモセットを用いた  
再生医療の前臨床研究モデル動物システム構築への取り組み

佐々木 えりか

((財) 実験動物中央研究所 バイオメディカル部霊長類研究室)

1998年にヒトの胚性幹(ES)細胞株が樹立され、その後ヒトES細胞を *in vitro* において様々な細胞系列への分化誘導が可能であることが示されつつある。これらの事からES細胞を用いた再生医療への期待が高まっているが、その有効性および安全性には未知の部分が多い。ES細胞およびES細胞由来の細胞を臨床に用いるためには、ヒトに近い実験モデル系を用いた前臨床研究の必要性が高まっている。

我々がサル類の実験動物として注目しているコモンマーモセットは、真猿類であり解剖学的、生理学的にもヒトに近く、成体で300~400gと小型の霊長類である。コモンマーモセットは取り扱いが比較的容易であること、国内に実験動物用のクローズドコロニーが存在すること、一頭当たりの年間産仔数が2~4匹と繁殖効率が良いこと、などの実験動物としてのメリットが多い。

我々はコモンマーモセットを用いた再生医療前臨床研究モデル動物システムの確立を目指し、コモンマーモセットの生殖工学技術の開発研究を行っている。その手始めとして、我々はES細胞を用いた再生医療の前臨床研究に用いるためにコモンマーモセット(CM)ES細胞株を樹立し、これらの細胞特性の検討を行ったので紹介する。



## ブタにおける単為発生胚と体細胞核移植胚の集合胚の発生能

○平原 尚人・滝沢 明子・鈴鴨 知佳・中嶋 紀憲・紫野 正雄・柏崎 直巳  
(麻布大学)

ブタ体細胞核移植胚の発生能は低く、産子作出効率は極めて低い。しかし、体細胞核移植を介したトランスジェニックブタの作製法は、DNA 顕微注入法よりも有利な点が多い。本研究はブタ体細胞核移植胚の発生能の改善を目的とし、単為発生胚と体細胞核移植胚を集合させ、その集合胚の発生能を検討した。

実験 1: ブタ初期胚の集合胚作製条件を検討するために、発生ステージが異なる単為発生胚同士の集合胚の集合率および胚盤胞への発生率を調べた。単為発生胚は、48 h 体外成熟培養後の卵母細胞に 1 kV/cm、64  $\mu$  sec、0.5 sec 間隔で三回印可による活性化誘起処理を施し、サイトカラシン B で倍数体処理をおこなって作出した。活性化処理後 48 あるいは 72 h に 0.5% pronase により透明帯を除去し、発生ステージの異なる単為発生胚を 3 通りの組み合わせ (48 h + 48 h 区、48 h + 72 h 区、72 h + 72 h 区) で集合させ、その集合率、胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数を調べた。活性化処理 48 h 後に透明帯除去し、集合させずに培養したものを対照区とした。透明帯除去単為発生胚の集合率および胚盤胞への発生率は、48 h + 48 h 区で 58.3% (60/103) および 50.5% (52/103)、48 h + 72 h 区で 28.5% (43/151) および 22.5% (34/151)、72 h + 72 h 区で 38.6% (71/184) および 28.8% (53/184) となり、48 h + 48 h 区が他の区に比べ有意に ( $P < 0.05$ ) 高い値を示した。また、対照区は胚盤胞への発生率が 36.7% (18/49) で、48 h + 48 h 区より有意に ( $P < 0.05$ ) 低い値を示した。集合胚由来の胚盤胞における細胞数は、各区が対照区に比べ有意に ( $P < 0.05$ ) 高い値を示した。実験 2: 実験 1 の結果から、活性化処理後 48 h に透明帯除去させた単為発生胚と卵丘細胞をドナーとした核移植胚とを集合させ (集合区)、その集合率、胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数を調べた。活性化処理 48 h 後に透明帯除去し、集合させなかった核移植胚を対照区とした。集合区の集合率、胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数は、42.9% (39/91)、38.2% (39/102) および  $55.3 \pm 4.3$  であった。また、対照区の胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数は、20.9% (9/43) および  $25.3 \pm 2.5$  であり、集合区が対照区に比べ有意に ( $P < 0.05$ ) 高い胚盤胞への発生率を示した。

以上の結果から、ブタの体細胞核移植胚と活性化処理後 48 h の単為発生胚を集合させることで、体細胞核移植胚の胚盤胞への発生能が改善することが示唆された。

## ミニブタ体細胞クローン技術の開発

井上須美子

(鹿児島大学農学部家畜繁殖学研究室)

体細胞核移植によるクローニング技術は、優良家畜の増産や遺伝子資源の保存に利用できる。さらに遺伝子を改変した体細胞を用いることにより、遺伝子改変動物を作出することも可能である。特にミニブタにおいては、臓器移植用のドナーとして用いるために、免疫反応を制御した遺伝子改変細胞に由来するクローンブタの作出が期待されている。しかしその作出効率は依然低く、改善すべき点も多い。体細胞核移植によるクローン産仔の作出率に影響を及ぼす要因の一つとして、活性化処理方法があげられる。これまでブタにおいては電気パルスを印加する方法が主流であったが、最近ミニブタ体細胞クローン胚の活性化における超音波照射の有効性が明らかになった。

そこで今回は、従来一般的だった電気パルスを印加するかわりに、超音波を用いて活性化したクローン胚の作出手順とクローンミニブタの将来性について紹介する。

## ウシ体外受精技術の展開

浜野 晴三

((社) 家畜改良事業団家畜バイオテクセンター)

実験動物を中心に開発されてきた体外受精技術は、1978年にヒトの「試験管ベビー」が誕生したことにより、技術レベルが実用域に達したと考えられた。しかし、ウシでは人工授精の広範な普及から実用的価値に乏しい技術と考えられ、牛卵巣から採取した卵子を材料とした最初の体外受精卵産子が産まれたのは1986年である。その後、不可食物として廃棄されていた卵巣は個体を生産し得る資源と認識され、牛卵子の体外受精技術は新たな子牛生産技術として研究開発が進み、今日の実用技術へと発展した。

(社) 家畜改良事業団では1987年から黒毛和種体外受精卵の移植試験と生産子牛の展示共励会を以て技術の有用性を示し、1991年から黒毛和種体外受精卵を利用した子牛生産事業に着手した。これは、国の生産振興策であると共に同年から始まった牛肉の輸入自由化に対応して国内農家の国際競争力を高める意向も込められていた。

現在、体外受精卵の移植は酪農家が飼養するホルスタイン種を受卵牛に利用するケースが全体の約95%を占めている。その利用は、肥育素牛生産を目的としており、生まれた子牛は主に家畜市場で肥育農家へ販売される。

黒毛和種の受精卵を大量に安価で生産することから始まり十数年を経て、ウシの体外受精技術は育種改良への応用的な利用、さらに性判別技術の導入により経営に有利な性の子牛を生産する技術まで展開を遂げてきている現状を紹介したい。