

## 体細胞由来クローンマウスの成育および生殖能力の検討と マイクロサテライトマーカーによる遺伝的背景の解析

森田 真裕<sup>1</sup>、西脇 恵<sup>2</sup>、安齋 政幸<sup>3</sup>、加藤 博己<sup>3</sup>、  
細井 美彦<sup>2</sup>、入谷 明<sup>3</sup>、三谷 匡<sup>3</sup>

### 要 約

本研究では、マウス体細胞核移植 (Somatic Cell Nuclear Transfer : SCNT) 胚の産子への発生能の検討と作出されたクローンマウスの生育ならびに繁殖能力について検討した。ドナー細胞として卵丘細胞を用いて核移植を行い、得られた2細胞期の再構築胚を卵管へ移植した。その結果、1匹のクローン産子を作成することに成功した (生存産子1匹 / 移植胚数24個 : 4.2%)。クローンマウスの生殖能力について検討した結果、2度の自然分娩で計20匹の産子を獲得し、正常に子孫を得ることが確認された。また、クローンマウスとその産子それぞれについて経時的に体重測定を行った結果、クローンマウスで従来報告されているような極度の肥満はみられず、またその産子では肥満はみられなかった。さらに、各近交系間のマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的背景の解析を行った結果、クローンマウスの遺伝的背景はドナー細胞のB6D2F1と一致した。これらの結果から、B6D2F1卵丘細胞由来の体細胞クローンマウスでは、正常な繁殖能力を有し肥満もみられないこと、マイクロサテライトマーカーでの解析においては、遺伝的背景はドナー細胞により決定されることが示された。

### 緒 言

体細胞核移植 (Somatic Cell Nuclear Transfer : SCNT) を用いて作出された最初のクローン哺乳類であるヒツジのドリーの誕生が1997年にWilmutらにより報告され<sup>1)</sup>、その翌年に、Wakayamaらが細胞注入法 (Honolulu method) を用い、成体の卵丘細胞で核移植を行い、クローンマウスの作出に成功した<sup>2)</sup>。それから10年経ち、現在までに、様々な体細胞や幹細胞をドナー細胞として用いられているが<sup>2-11)</sup>、個体への発生率はいずれも低いままである。また、作出された体細胞クローン個体では様々な異常を伴い<sup>12, 13)</sup>、特に顕著な特徴として、胎盤肥大、肥満などの異常がみられる<sup>14, 15)</sup>。しかし、そのような個体でも通常の交配によって産子を獲得できることができ、次世代にそれらの異常が認められないことから、異常の原因はジェネティックな要因によるものではなく、エピジェネティックな修飾が原因であると考えられる。これらの原因は動物種やドナー細胞などで様々であり、現在完全に解明されていないことから、エピジェネティックな異常を様々な遺伝子の発現や個体の表現型で解析する必要がある。

そこで本研究では、Wakayamaらが報告した細胞注入法によるクローンマウス作出技術と同様の方法を用い、ドナー細胞として卵丘細胞に由来する体細胞クローンマウスを作成した。作出したクローンマウスの生育ならびに生殖能力の検討およびマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝背景の検討を行い、さらにクローンマウスからのF1産子の生育について検討した。

1. 近畿大学 生物理工学部 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930  
2. 近畿大学大学院 生物理工学研究科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930  
3. 近畿大学 先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

## 材料および方法

### 動物

核移植に用いるレシピエント卵子及びドナー細胞は、成熟週齢の B6D2F1 (C57BL/6Cr×DBA/2Cr) 雌マウス (日本エスエルシー (株)) より回収した。胚移植に供するレシピエント雌マウスには、精管結紮した同系統の雄マウスと交配を行った MCH (ICR) (日本クレア (株)) を用いた。里親には、同系統の雄マウスと交配を行い、分娩した MCH (ICR) を用いた。さらに、クローン個体およびその産子の体重を比較するために、C57BL/6Cr 雌マウス (日本エスエルシー (株)) と DBA/2Cr 雄マウス (日本エスエルシー (株)) との交配を行い、分娩された B6D2F1 (C57BL/6Cr×DBA/2Cr) マウスを用いた。クローン個体と交配を行うために B6D2F1 (C57BL/6Cr×DBA/2Cr) 雄マウス (日本エスエルシー (株)) を用いた。

なお、実験の立案および動物の飼育については、近畿大学先端技術総合研究所における動物実験の指針に準じておこなった。

### 核移植操作

体細胞核移植操作は、Wakayama らの方法<sup>2)</sup>に従って行った。すなわち、過剰排卵処理を行った B6D2F1 雌マウスの卵管膨大部より卵子-卵丘細胞複合体を回収し、0.1% ヒアルロニダーゼ中に静置することで卵丘細胞の除去を行った。卵子の徐核には、微分干渉倒立顕微鏡にピエゾインパクションユニットを取り付けた、圧電的に駆動されたマイクロピペットで吸引して行った。ドナー細胞には、レシピエント卵子を回収した際に遊離した卵丘細胞を回収し、細胞注入操作に用いた。ドナー細胞注入後、D-Glucose を添加した mCZB にて約 1 時間培養した卵子を倒立顕微鏡下で観察し、早期染色体凝集を起こしていることを確認後、Ca<sup>2+</sup> 不含 mCZB 培地に 10mM ストロンチウム、5 μg / ml サイトカラシン B を添加した培地で 3 時間培養を行った。次に、5 μg / ml サイトカラシン B 含む mCZB 培地にて 3 時間培養を行なった。活性処理後の卵子は倒立顕微鏡下で、雌雄両前核の形成を確認後、mCZB 培地の小滴に移し、2 細胞期胚 (細胞注入後 24 時間後) まで 37°C・5%CO<sub>2</sub> の炭酸ガスインキュベーター内で培養した。

### 胚移植

精管結紮した同系統の雄マウスとの交配により偽妊娠した MCH (ICR) をレシピエントに用いた。2 細胞期まで培養した再構築胚を偽妊娠 0.5 日のレシピエントマウスの卵管へ移植した。レシピエントは交配後 19.5 日に帝王切開して着床および産子の確認を行った。

### 生殖能力の検討およびクローン個体とその産子の体重測定

性成熟に達したクローン個体と B6D2F1 雄マウスの交配を 2 度行い、クローンマウスの生殖能力について検討した。また、クローン個体と分娩された産子 (1 産目のものに限る) の体重測定を継続して行った。またこの時、対照区として C57BL/6Cr 雌マウスと DBA/2Cr 雄マウスとの交配を行い、分娩された B6D2F1 マウスについても同様に体重測定を行った。

### 各近交系間で認められるマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝背景検査

遺伝背景検査は、(財) 実験動物中央研究所へ委託し、各マウス系統由来の遺伝的モニタリングを検討した。詳細な方法は、Goto らの方法<sup>16)</sup>に従って行った。クローン個体の尾部を約 1cm 回収し、マウス尾からの DNA 抽出は EXTRACTOR TA-100 (TaKaRa, TA-100) を用いて行った。PCR は、94°C 1 分、55°C 1 分および 72°C 1 分を 32 サイクル行った。判定は、MGI and MMDBJ のデータベースとの比較に

より行った。今回用いたサテライトマーカーには、D1Mit24・D2Mit42・D3Mit51・D4Mit37・D5Mit218・D6Mit39・D7Mit84・D8Mit88・D9Mit27・D10Mit180・D11Mit51・D12Mit5・D13Mit35・D14Mit7・D15Mit29・D16Mit4・D17Mit34・D18Mit7・D19Mit41・DXMit89を用いた。

## 結 果

### SCNT 胚の発生能および産子への発生能の検討

SCNT 胚における 2 細胞期まで発生能を検討した (表 1)。卵丘細胞注入後の生存卵子のうち 72.4% が早期染色体凝集をおこし、86.2% の細胞注入卵子が前核様構造を形成した。それらの再構築卵子を mCZB 培地で培養した結果、その多くが 2 細胞期胚まで発生することが確認された (82.7%)。このとき、2 細胞期まで発生した胚をすべてレシピエント雌マウスの卵管に移植し、その後の産子への発生能を検討した (表 2)。その結果、24 個の 2 細胞期胚のうち、8 個の着床 (33.3%) を確認し、さらに、1 匹のクローン産子 (4.2%) を獲得した。この時、胎盤の肥大が確認された (図 1)。

表 1. 体細胞核移植における 2 細胞期までの発生能

細胞注入 生存卵子数 <sup>a</sup>	早期染色体 凝集 <sup>b</sup> (%) <sup>e</sup>	前核様構造形成 卵子数 <sup>c</sup> (%) <sup>f</sup>	2細胞期胚 <sup>d</sup> (%) <sup>g</sup>
29	21(72.4)	25(86.2)	24(82.7)

早期染色体凝集:細胞注入後1時間

前核様構造形成卵子:活性化処理後6時間

2細胞期胚:細胞注入後24時間

$e=b/a$ ,  $f=c/a$ ,  $g=d/a$

表 2. SCNT 胚移植後の産子への発生能

移植胚数 <sup>a</sup>	着床数 <sup>b</sup> (%) <sup>d</sup>	産子数 <sup>c</sup> (%) <sup>e</sup>
24	8(33.3)	1(4.2)

$d=b/a$ ,  $e=c/a$

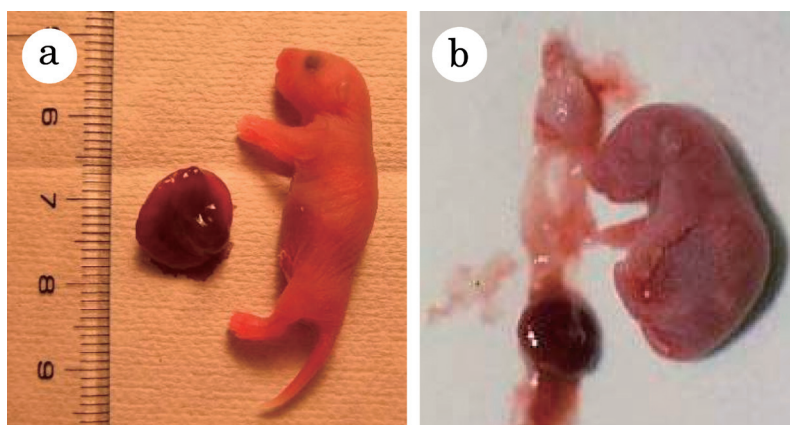


図 1. 卵丘細胞由来クローンマウス

(a) クローンマウス (左:胎盤, 右:クローン産子)

(b) ICR 系マウス (左:胎盤, 右:産子)

### クローンマウスの生殖能力の検討

性成熟に達したクローンマウスと B6 D2F1 雄マウスとの交配を 2 回行った結果、クローンマウスは 2 回とも妊娠・分娩した。1 産目には、雌 3 匹、雄 7 匹、計 10 匹の生存産子が、2 産目も、雌 4 匹、雄 6 匹の計 10 匹の生存産子が得られた。1 産目において得られた結果を表 3 に示した。

表 3. クローンマウスの生殖能力の検討

個体識別	性別	毛色
クローン1	♀	黒
クローン2	♀	グレー
クローン3	♀	グレー
クローン4	♂	黒
クローン5	♂	黒
クローン6	♂	黒
クローン7	♂	グレー
クローン8	♂	グレー
クローン9	♂	茶
クローン10	♂	シナモン

### クローンマウスおよびその産子の体重測定

分娩されてから 26 週齢までクローンマウスの体重測定を行った (図 2)。12 週齢と 19 週齢で分娩しているため、その後の数週間は体重が急激に増加しているが、分娩した産子の離乳後は、体重が減少し、ある一定の体重で維持された。また対照区である C57BL/6Cr 雌マウスより分娩された B6D2F1 雌マウス (n=8) と比較しても、大きな体重の差はみられず、さらに、現在 (生後 41 週) までに目立った異常は確認されなかった。また、クローンマウスの次世代産子においても同様の体重測定を行った (図 3)。クローンマウスと同様に、雌雄、ともに、B6D2F1 マウスと大きな差はみられなかった。また、産子でも現在 (生後 24 週) までに目立った異常は確認されなかった。

### 各近交系間で認められるマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝背景検査

クローンマウスより回収したゲノミック DNA を用いて、各近交系間で認められるマイクロサテライトマーカーである D1Mit24・D2Mit42・D3Mit51・D4Mit37・D5Mit218・D6Mit39・D7Mit84・D8Mit88・D9Mit27・D10Mit180・D11Mit51・D12Mit5・D13Mit35・D14Mit7・D15Mit29・D16Mit4・D17Mit34・D18Mit7・D19Mit41・DXMit89 について PCR を行った結果、1 マーカーにつき、2 つのバンドが得られた。得られた各 PCR 産物のサイズは、MGI and MMDBJ のデータベース上の数値と比較した結果、C57BL/6 と DBA/2 と同様のサイズであることが確認できた (表 4)。これより B6D2F1 (C57BL/6×DBA/2) と同一の遺伝背景であることが示された。

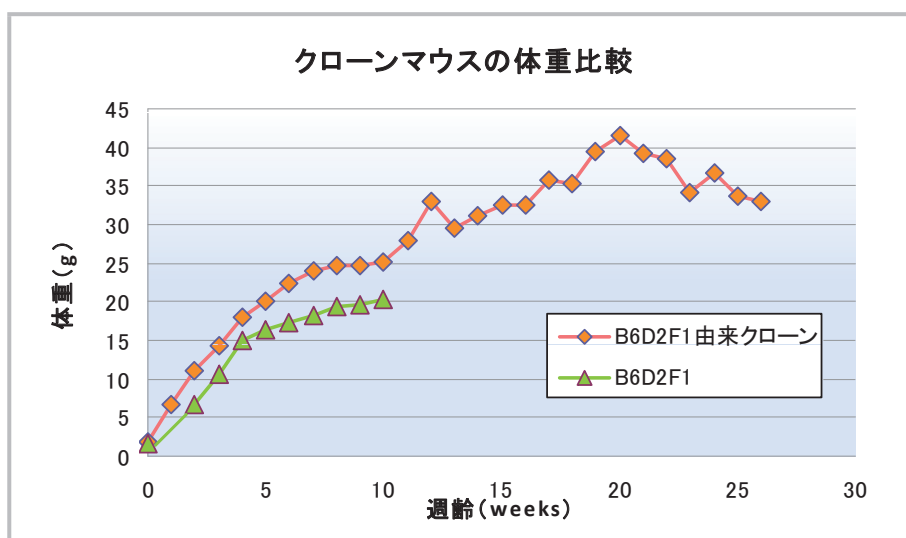


図2. クローンマウスの体重測定の比較結果  
12週目と19週目にクローンマウスは産子を分娩。

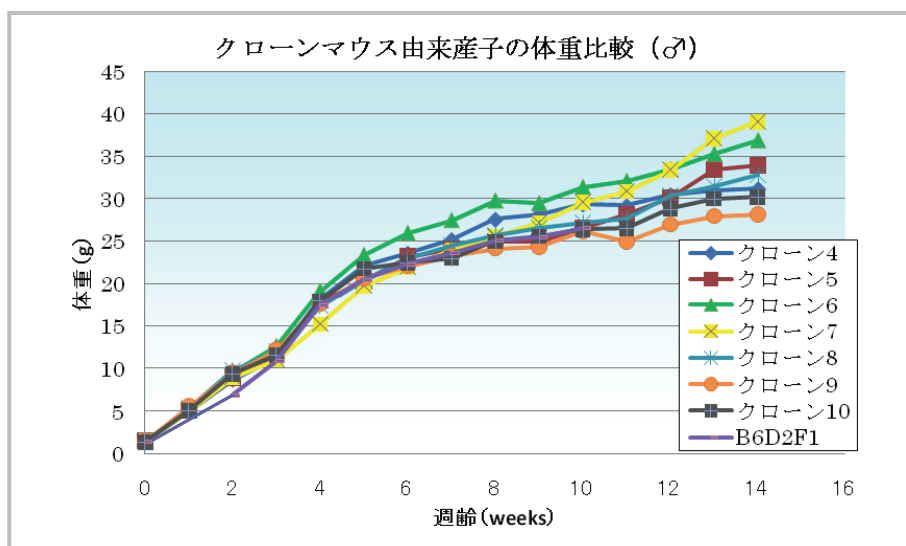
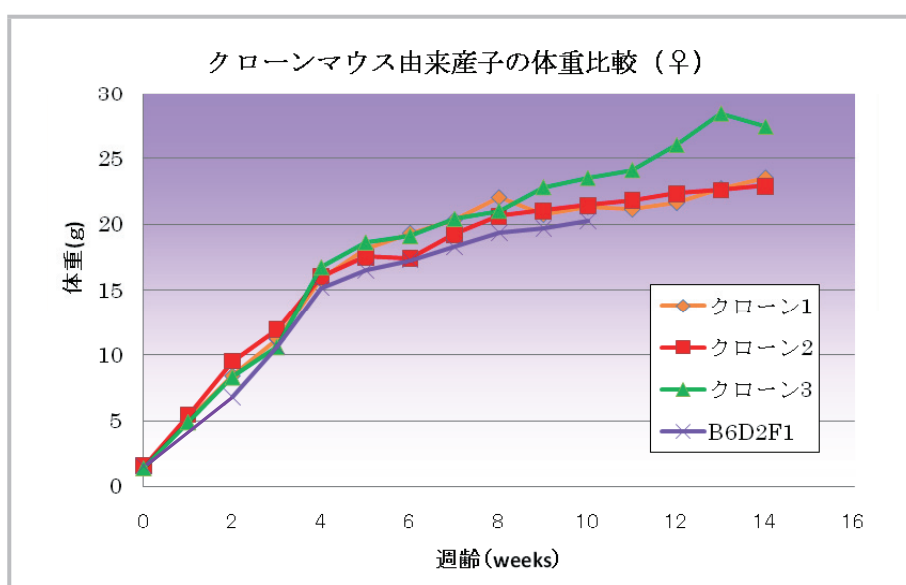


図3. クローンマウス分娩産子の体重測定の比較結果

表4. マイクロサテライトマーカーを用いたクローンマウスの遺伝背景解析結果

DNAマーカー	MGI (cM)	C57BL/6	C3H/He	DBA2/2	クローン個体
D1Mit24	41	202 (bp)	202 (bp)	218 (bp)	B6 / D2
D2Mit42	47.5	136	142	150	B6 / D2
D3Mit14	64.1	170	198	198	B6 / D2
D4Mit37	56.5	238	232	220	B6 / D2
D5Mit18	45	238	220	220	B6 / D2
D6Mit39	46.3	146	118	118	B6 / D2
D7Mit84	28.4	170	176	184	B6 / D2
D8Mit88	58	116	128	128	B6 / D2
D9Mit27	29	174	188	188	B6 / D2
D10Mit180	64	134	206	156	B6 / D2
D11Mit51	18	140	132	132	B6 / D2
D12Mit5	37	176	160	160	B6 / D2
D13Mit35	75	190	182	182	B6 / D2
D14Mit7	44.5	107	95	95	B6 / D2
D15Mit29	42.8	152	152	186	B6 / D2
D16Mit4	27.3	132	123	123	B6 / D2
D17Mit34	18.8	148	126	156	B6 / D2
D18Mit7	50	93	123	123	B6 / D2
D19Mit41	16	160	174	150	B6 / D2
DXMit89	3	149	157	157	B6 / D2

MGI and MMDBJデータベース参照

## 考 察

本研究において、卵丘細胞をドナー細胞とした SCNT によりクローン胚の作出とクローンマウスの生存産子が得られることが示された。Wakayama らは、卵丘細胞をドナー細胞として核移植を行うと、再構築胚が胚盤胞期胚へは発生するものの、移植後の着床率は低く致死に至る胚が多くあると報告している<sup>2)</sup>。本実験においても、クローン産子の作出効率は、4.2% と Wakayama らの報告と同様に低率であった。また、今回得られたクローンマウスの胎盤でも肥大が確認された (図 1)。SCNT 胚の分化後、胎盤になる栄養外胚葉系譜特異的発現様式を示す遺伝子の発現の遅延や欠損<sup>17)</sup>、またクローンマウスの胎盤で共通して遺伝子の発現量の異常が認められる<sup>18)</sup>。したがって、低い作出効率や胎盤の形成異常は、マウスのみならずウシでも報告されていることから<sup>19)</sup>、初期発生の段階で核移植にともなう直接的な影響によりもたらされる異常であると考えられる。今回作出されたクローンマウスでは、生殖能力が正常であることが示され、さ

らにクローンマウスでは、従来報告されているような極度の肥満<sup>15)</sup>はみられず、またその産子においても肥満などの異常が見られなかった。このことは、これまで報告されていた肥満の原因は、必ずしも従来考えられているような核移植操作が直接もたらすものではなく、ドナー細胞の遺伝的背景（系統差）が大きく影響しているという報告<sup>15)</sup>を支持している。また、各近交系間で認められるマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的背景に関する検査の結果、クローンマウスの遺伝的背景がドナー細胞である B6D2F1 (C57BL/6×DBA/2) と同一であることから、注入された核が遺伝的背景を決定していることが証明された。

これらの結果より、クローンマウス作出技術の再現性の確立がされ、クローンマウスの経時的な観察ができた。その作出後の異常は見られなかったものの、低い作出効率や胎盤形成の異常などの問題が今回も同様に確認されたことから、今後、胎盤に寄与する栄養外胚葉系譜の遺伝子の発現量に注目し、研究を進める必要があると思われる。

## 謝 辞

各近交系間で認められるマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的背景に関する検査に御協力いただいた、(財) 実験動物中央研究所 後藤一雄博士、日本クレア (株) 福田千晶氏に感謝いたします。

## 参 考 文 献

1. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and mammalian cells. *Nature* 385; 810-3, 1997.
2. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394; 369-74, 1998.
3. Wakayama T, Yanagimachi R. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nat. Genet.* 22; 127-128, 1999.
4. Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, Noguchi A, Takano K, Nagano R, Suzuki O, Lee J, Ishino F, Matsuda J. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 62; 1579-1584, 2000.
5. Wakayama, T. Yanagimachi, R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol. Reprod. Dev.* 58; 376-383, 2001.
6. Ono Y, Shimozawa N, Ito M, Kono T. Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 64; 44-50, 2001.
7. Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, Yanagimachi R, Mombaerts P. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96; 14984-14989, 1999.
8. Inoue K, Wakao H, Ogonuki N, Miki H, Seino K, Nambu-Wakao R, Noda S, Miyoshi H, Koseki H, Taniguchi M, Ogura A. Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells. *Curr. Biol.* 15; 1114-1118, 2005.
9. Miki H, Inoue K, Kohda T, Honda A, Ogonuki N, Yuzuriha M, Mise N, Matsui Y, Baba T, Abe K, Ishino F, Ogura A. Birth of mice produced by germ cell nuclear transfer. *Genesis* 41; 81-86, 2005.
10. Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Hirose M, Noda S, Kim JM, Aoki F, Miyoshi H, Ogura A. Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer. *J. Cell Sci.* 119; 1985-1991, 2006.

11. Yamazaki Y, Makino H, Hamaguchi-Hamad K, Hamada S, Sugino H, Kawase E, Miyata T, Ogawa M, Yanagimachi R, Yagi T. Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98; 14022-14026, 2001.
12. Boiani M, Eckardt S, Schöler HR, McLaughlin KJ. Oct4 distribution and level in mouse clones : consequence for pluripotency. *Genes Dev.* 16; 1163-1166, 2002.
13. Ogonuki N, Inoue K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Tanemura K, Suzuki O, Nakayama H, Doi K, Ohtomo Y, Satoh M, Nishida A, Ogura A. Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat. Genet.* 30; 253-254, 2002.
14. Tanaka S, Oda M, Toyoshima Y, Wakayama T, Tanaka M, Yoshida N, Hattori N, Ohgane J, Yanagimachi R, Shiota K. Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biol. Reprod.* 65; 1813-1821, 2001.
15. Tamashiro KL, Wakayama T, Akutsu H, Yamazaki Y, Lachey JL, Wortman MD, Seeley RJ, D'Alessio DA, Woods SC, Yanagimachi R, Sakai RR. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Adv. Exp. Med. Biol.* 59; 72-83, 2002.
16. Goto K, Muguruma K, Kuramochi T, Shimozawa N, Hioki K, Itoh T, Ebukuro M. Effects of Cryopreservation of mouse embryos and in vitro fertilization on genotypic frequencies in colonies. *Mol. Reprod. Dev.* 62; 307-311, 2002.
17. Daniels R, Hall V, Trounson AO. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol. Reprod.* 63; 1034-1040, 2000.
18. Inoue K, Kohda T, Lee J, Ogonuki N, Mochida K, Noguchi Y, Tanemura K, Kaneko-Ishino T, Ishino F, Ogura A. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science* 295; 297, 2002.
19. Wells DN, Misica PM, Tervit HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod.* 60; 996-1005, 1999.



---

**英文要旨****Growth and fertility of cloned mouse by somatic cell nuclear transfer and  
microsatellite analysis of its genetic background**

Masahiro Morita<sup>1</sup>, Megumi Nishiwaki<sup>2</sup>, Masayuki Anzai<sup>3</sup>, Hiromi Kato<sup>3</sup>,  
Yoshihiko Hosoi<sup>2</sup>, Akira Iritani<sup>3</sup>, Tasuku Mitani<sup>3</sup>

**Abstract**

In this study, we produced a cloned mouse by somatic nuclear transfer (SCNT) and examined its growth, fertility and its genetic background. SCNT embryos derived from cumulus cells developed to the 2-cell stage (96%) and were transferred into oviducts of recipient mice. Of twenty four SCNT embryos transferred, one offspring was delivered (4.2%) and the relatively large placenta was recovered. This cloned mouse gave birth to 20 offspring from 2 deliveries. Cloned mouse and its offspring showed growing healthy without remarkable obese. We also examined microsatellite marker analysis. It was shown that its genetic background coincided with that of donor cells from B6D2F1 strain. These results demonstrated that cloned mice from cumulus cells of B6D2F1 strain have normal fertility and grow healthy without obese and that its genetic background is defined completely by donor cells.

---

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

2. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

3. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama, 642-0017, Japan