

## ウシ卵子成熟用培地への不飽和脂肪酸の添加が 体細胞核移植における細胞融合に及ぼす影響

佐伯和弘<sup>1,2</sup>、松葉純子<sup>2</sup>、谷口俊仁<sup>1,3</sup>、  
細井美彦<sup>1,2</sup>、松本和也<sup>1,2</sup>、入谷明<sup>1,2</sup>

### 要 約

ウシ体細胞クローン胚作製における体細胞と卵子細胞質の融合率を向上させることを目的に、ウシ卵子の成熟用培地への不飽和脂肪酸の添加が、その後の体細胞との融合に及ぼす影響を調べた。卵子成熟用培地にウシ新生子ウシ血清 (NBCS)、ウシ血清アルブミン (BSA)、オレイン酸アルブミン (OAA) あるいはリノール酸アルブミン (LAA) を添加した培地および無添加の培地で、屠体由来ウシ卵子卵丘細胞複合体を21時間成熟したところ、成熟率に差は見られなかった (69-72%,  $P>0.05$ )。さらに、これら卵子を除核処理したところ、いずれの区においても形態的に正常な除核卵子 (92-97%,  $P>0.05$ ) が得られた。これら除核卵子とウシ耳介由来線維芽細胞を電気融合し融合率を調べたところ、LAA 添加により融合率が上昇することが示された (無添加;43% vs. LAA;62%,  $P<0.05$ )。これらより、ウシ卵子成熟用培地へのリノール酸の添加は、ウシ卵子の成熟率や除核率を低下させることなく、体細胞との融合率を上昇させることが示された。

### 緒 言

1997年に Wilmut らが、哺乳類では初めてクローンヒツジの誕生を報告して以来、マウス (Wakayama et al., 1998) およびウシ (Kato et al., 1998, Wells et al., 1998, 1999, Shiga et al., 1999) においても成功例が報告されている。この体細胞クローン技術により、同じ遺伝形質を有する個体が多数作出できることから、優良家畜の複製・増殖による牛群改良や種雄牛選抜にかかる検定期間短縮・精度向上などへの応用が期待されている。また、遺伝子導入した培養細胞による核移植でトランスジェニック動物の作出効率が高まり (Cibelli et al., 1998)、得られたトランスジェニック動物由来生産物からの医薬品や移植用臓器の生産など、畜産分野のみならず医薬分野への応用も考えられている。しかしながら、胚盤胞期までの発生率は一部の報告 (49% : Kato et al., 1998) を除いて未だ低く (12% : Cibelli et al., 1998; 11.7% : Wilmut et al., 1997)、核移植方法の改善が望まれている。

核移植において種々の体細胞を除核した成熟卵子に融合させるが、細胞の由来や培養方法により、安定して高い融合率が得られていない。アルブミン結合型不飽和脂肪酸は細胞膜の流動性を向上させることから、一価および二価不飽和脂肪酸であるオレイン酸およびリノール酸結合型アルブミンの卵子成熟培地への添加が核移植胚作製における体細胞と卵子細胞質との融合率に及ぼす影響を検討した。

### 材 料 と 方 法

#### 卵子の体外成熟

屠場から回収したウシ卵巢から卵巢表面の直径2~10mmの卵胞から卵子を吸引法により採取した。実体顕微鏡下で2~4重に卵丘細胞が付着した卵子卵丘細胞複合体 (COCs) のみを選別して採集した。1mg/ml ポリビニルアルコール (M.W. 40,000, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA)、0.02AU/ml FSH (Antrin,

Denka Seiyaku, Tokyo, Japan)、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  エストラジオール-17 $\beta$  (Cat. No. E8875, Sigma)、0.5 mM ピルビン酸ナトリウム (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)、1% (v/v) 抗菌抗カビ溶液 (Gentamicin solution, Cat. No. G1272, Sigma) を添加した 25mM HEPES 緩衝 TCM-199 (Earle's salt, Cat. No. 12340, Gibco) を基礎培地とし、無添加、5% 新生子ウシ血清 (newborn calf serum, NBCS, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)、3% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA, Sigma)、3% オレイン酸アルブミン (oleic acid albumin, OAA, Sigma) および 3% リノール酸アルブミン (linoleic acid albumin, LAA, Sigma) をそれぞれ添加し、ミネラルオイル下の 50  $\mu\text{l}$  の液滴とした。採取した COCs を 10 個ずつ、これらの成熟培養液滴に導入し、39 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、95% 空気、飽和湿度下で 20 時間成熟培養した (Saeki et al., 1990)。

### 成熟卵子の除核

成熟培養後、COCs を 5mg/ml ヒアルロニダーゼ (Cat. No. H3506, Sigma) を添加した 3% PVA 添加 TCM-199 に 2 分間曝露し、ボルテックスおよびピペッティングにより卵丘細胞を除去した。第 1 極体を放出した卵子のみを選別し、極体付近の透明帯をガラス針でスリットを開け、その後同一のガラス針で卵子の中央付近を上部から押しつけることで第 1 極体とその付近の卵子細胞質をスリットから透明帯外に押し出した。押しだされた細胞質はピペッティングにより除去することで、卵子細胞質のみを透明帯内に残させた。これら卵子細胞質をレシピエント卵子とした。

### ドナー細胞の調整

1 頭の黒毛和種雌子ウシの耳介から採取した繊維芽細胞を増殖、継代し、5～10 代の継代培養後、コンフルエントまで増殖した培養細胞を、0.5%FCS を添加した D-MEM で 7～10 日間血清飢餓培養後 Trypsin-EDTA で単離し、ドナー細胞として用いた。

### 体細胞と卵子細胞質との融合

レシピエント卵子細胞質の囲卵腔にドナー細胞を 1 細胞ずつ注入後、Zimmerman cell fusion medium (Robl et al., 1987) に導入した後、融合用電極により細胞融合装置 (ECM200, BTX, San Diego, CA, USA) によりドナー細胞と卵子細胞質を融合した (DC 26 V / 150  $\mu\text{m}$ , 10 $\mu\text{sec}$  x 2)。

### 実験デザイン

#### 実験 I.

体細胞構築胚の作製には、成熟卵子が必須であることから、不飽和脂肪酸結合型アルブミンの成熟培地への添加が卵子成熟に及ぼす影響を調べた。無添加、5% NBCS、3% BSA、3% OAA および 3% LAA を添加した成熟培地中で成熟培養した卵子を酢酸-エタノール (1:3) で固定した後、1%アセトオルセインで染色し、卵子の核の成熟を調べた。第 2 減数分裂中期の核相を有する卵子を成熟卵子と判定した。

#### 実験 II.

不飽和脂肪酸結合型アルブミンの成熟培地への添加が成熟卵子の除核操作後の卵子細胞質の形態変化を調べた。無添加、5% NBCS、3% BSA、3% OAA および 3% LAA を添加した成熟培地中で成熟培養した卵子を除核操作し、除核 1 時間後に細胞膜の崩壊がなく球体を示すものを除核に成功した卵子と見なした。

#### 実験 III.

不飽和脂肪酸結合型アルブミンの成熟培地への添加が除核成熟卵子細胞質と体細胞との融合率に及ぼす

影響を調べた。無添加、5% NBCS、3% BSA、3% OAA および 3% LAA を添加した成熟培地中で成熟培養した卵子を除核した後、卵子細胞質と単離した体細胞を電気刺激により融合処理をした。融合処理 30 分後実体顕微鏡下で融合確認を行った。融合確認では導入した細胞が卵卵腔内に残存しているものを非融合、していないものを融合と判別した。さらに融合処理した再構築胚は、酢酸-エタノール (1:3) で固定した後、1% アセトオルセインで染色し、細胞の融合の状況を調べた。導入した体細胞の細胞膜が確認できたものは非融合とし、卵子内に核が認められ細胞膜が確認できなかったものを融合と判定した。

## 結果および考察

表-1 は、成熟培養時に添加した不飽和脂肪酸結合型アルブミンが卵子の成熟に及ぼす影響について示した。OAA および LAA の成熟用培地への添加は、ウシ卵子の成熟率に影響しなかった。このことより、不飽和脂肪酸結合型アルブミンを添加した培地で成熟させたウシ卵子が、体細胞核移植における受容細胞質

表 1. 成熟用培地への不飽和脂肪酸結合型アルブミンの添加がウシ卵子の成熟に及ぼす影響<sup>a</sup>

成熟用培地に添加した物質	検査した卵子数	成熟卵子の割合 (%) <sup>b</sup>
無添加	354	69.2 ± 4.0
NBCS <sup>c</sup>	324	71.5 ± 1.6
BSA <sup>d</sup>	270	69.5 ± 1.8
OAA <sup>e</sup>	290	71.9 ± 6.6
LAA <sup>f</sup>	375	70.4 ± 2.1

a, 6 回反復実験を行った。

b, 平均 ± S.E.M.

c, 5% 新生子ウシ血清

d, 3% ウシ血清アルブミン

e, 3% オレイン酸アルブミン

f, 3% リノール酸アルブミン

表 3. 成熟用培地に添加した不飽和脂肪酸結合型アルブミンが卵子の除核操作に及ぼす影響<sup>a</sup>

成熟用培地に添加した物質	除核操作処理した卵子数 <sup>b</sup>	形態的に正常な卵子数 (%) <sup>c</sup>	変性卵数 (%)
PVA <sup>d</sup>	180	167 (93 ± 3)	13 (7 ± 3)
BSA <sup>e</sup>	200	191 (95 ± 1)	10 (5 ± 1)
NBCS <sup>f</sup>	149	142 (92 ± 3)	11 (9 ± 4)
OAA <sup>g</sup>	168	156 (93 ± 6)	12 (7 ± 6)
LAA <sup>h</sup>	211	205 (97 ± 3)	6 (3 ± 3)

a, 6 回反復実験を行った。

b, 第一極体を放出した卵子。

c, 平均 ± S.E.M.

d, 5% 新生子ウシ血清。

e, 3% ウシ血清アルブミン。

f, 3% オレイン酸アルブミン。

g, 3% リノール酸アルブミン。

に利用できることが示された。また、これら卵子を物理的にガラスピペットを用いて除核処理を行っても、OAA および LAA の成熟用培地への添加が卵子細胞膜の崩壊を引き起こすことなく、除核が可能なが示された (表 2)。

図-2 より体細胞との電気融合時において不飽和脂肪酸を添加した培養液で成熟させた卵子の融合率は、他の区よりも高かった。LAA 添加区で最も高い融合率が得られた (63%,  $P < 0.05$ )。融合直後の変性率は、全ての区で同等だった ( $P > 0.05$ )。

LAA は耐凍性が低いとされている体外受精由来胚、分割胚、性判別胚、クローン胚等の凍結保存液に添加されることで、耐凍性を高めて凍結融解後の生存性を向上させることが知られている。LAA が各種の胚の耐凍性を高めるメカニズムとして、融点が  $-4^{\circ}\text{C}$  と低いリノール酸が細胞膜の脂質二重層に挿入されることで耐凍性が向上すると考えられている (Hochi et al., 1999)。また膜に挿入されたりノール酸が細胞膜

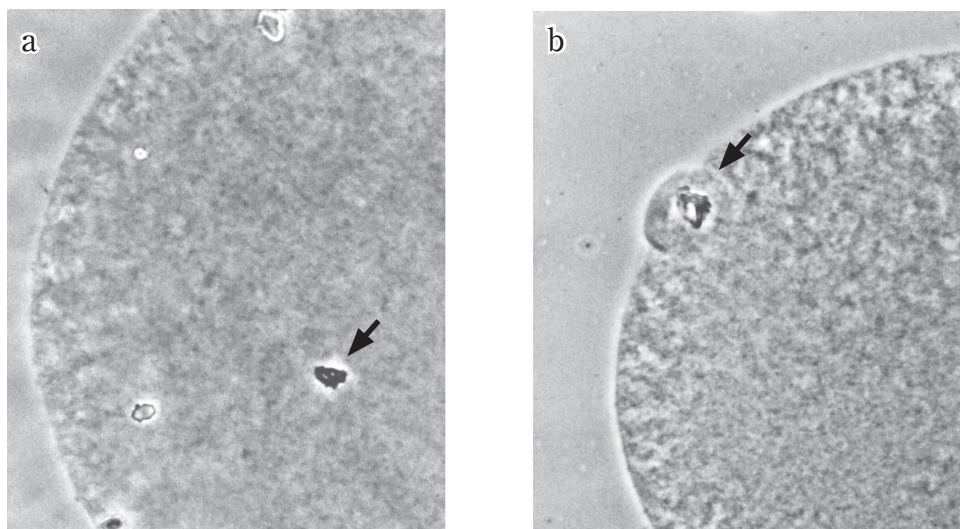


図 1 除核卵子細胞質と電気融合したウシ体細胞。

- a, 融合胚：卵子細胞質内に体細胞由来の核質 (矢印) が観察できる。  
 b, 非融合胚：卵子細胞質表面に細胞膜を保持した体細胞 (矢印) が観察される。

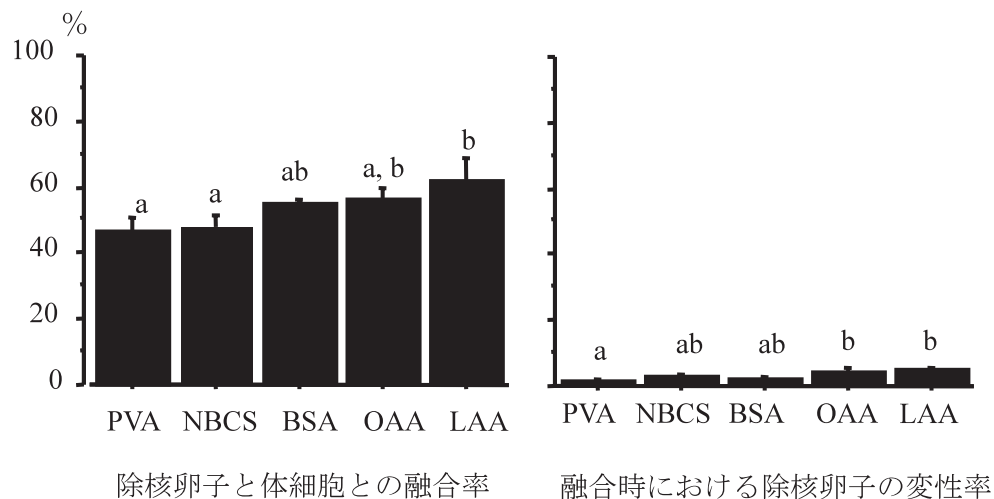


図 2 成熟用培地への不飽和脂肪酸結合型アルブミンが除核卵子細胞質と体細胞との融合へ及ぼす影響。Error bar は SEM を示す。a,b; 有意差あり ( $P < 0.05$ )。

の総脂肪酸の不飽和度を高め、その結果、膜の流動性もしくは透過性を高めていると考えられる。一方アルブミンのコレステロール抽出作用も膜の流動性を高める一因と考えられている (Yanagimachi, 1981)。以上のことより、成熟培養時に卵子細胞膜の脂質二重層に挿入された不飽和脂肪酸とアルブミンのコレステロール抽出作用が膜の流動性を高めた結果、膜がある程度不安定となり融合率が向上したものではないかと考えられる。また、オレイン酸とリノール酸では、リノール酸が分子構造上、流動性が高いことより、電気融合処理により膜の崩壊が起こりやすいこと、および体細胞膜との接触面積が増大したことにより、体細胞との融合率が向上したものと考えられる。

## 謝 辞

本研究の一部は、科学技術振興事業団・和歌山県地域結集型共同研究事業「アグリバイオインフォマティクスの高度活用技術の開発」の研究助成により行われた。

## 参 考 文 献

- Campbell, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A., Wilmut, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380, 64-69 (1996).
- Daniels, R., Hall, V. and Trounson A.O. Analysis of gene transcription in nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol. Reprod.*, 63, 1034-1040 (2000).
- Fulka, Jr., J., First, N. L., Loi, P., Moor R. M. Cloning by somatic cell nuclear transfer. *BioEssays*, 20, 847-851 (1998).
- Hochi S., Kimura K. and Hanada A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. *Theriogenology*, 52, 497-504 (1999).
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282, 2095-2096 (1998).
- Kono, T. Nuclear transfer and reprogramming: *Reviews of Reproduction*, 2, 74-80 (1997).
- Prather, R. S., Branes, F. L., Sims, M. M., Robl, J., Eyestone, W. H. and First, N. L. Nuclear transcription in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37, 859-866 (1998).
- Robl, J. M., Prather, R. , Barnes, F., Eyestone, W. , Northey, D., Gilligan, B. and First, N. L. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci*, 64, 642-647 (1987).
- Rosenkranz, J.R., C.F., Zeng, G.Q., Mcnamara, G.T., Schoff, P.K. and First, N.L. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.*, 49, 459-462 (1993).
- Saeki, K., Hoshi, M., Leibfreid-Rutledge, M. L. and First, N. L. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol. Reprod.*, 44, 256-260 (1991).
- Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccoti, M., Johnson, K.R. and Yanagimachi R. Full-term developed of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394, 369-389 (1998).
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H.S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810-813 (1997).
- Yanagimachi R. Mechanisms of fertilization in mammals. in *Fertilization and embryonic development* (L. Mastroianni, Jr. and J. D. Biggers eds.). 12-182. Plenum Press, NY, (1981).

## 英文要旨

The Effect of addition of unsaturated fatty acid into a maturation medium for bovine oocytes on the efficiency of electrical fusion of bovine somatic cells and the enucleated oocytes

Kazuhiro Saeki<sup>1,2</sup>, Junko Matsuba<sup>2</sup>, Shunji Taniguchi<sup>1,3</sup>,  
Yoshihiko Hosoi<sup>1,2</sup>, Kazuya Matsumoto<sup>1,2</sup> and Akira Iritani<sup>1,2</sup>

**Abstract**

To improve the efficiency of electrical fusion of bovine somatic cells and the enucleated oocytes, we examined the effect of addition of unsaturated fatty acid into a maturation medium for bovine oocytes on their subsequent fusion with bovine somatic cells. Maturation rates of oocytes with none, new-born calf serum (NBCS), bovine serum albumin (BSA), oleic acid albumin (OAA) and linoleic acid albumin (LAA) did not differ among groups (69-72%,  $P>0.05$ ). Rates of morphological normality of oocytes after enucleation were also the same among groups (92-97%,  $P>0.05$ ). Fusion rates of somatic cells and the enucleated oocytes matured with LAA were higher than other groups (62% vs. 43%,  $P<0.05$ ). These results indicated that addition of unsaturated fatty acid into a maturation medium did not affect maturation and enucleation rates, but improved the fusion efficiency with somatic cells.

---

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

2. Department of Genetic engineering, Kinki University, Uchita, Wakayama, 649-6493, Japan.

3. Livestock Experiment Station, Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries, Susami, Wakayama, 649-3141, Japan.