

子ウシ線維芽細胞を用いた核移植によるクローンウシの受胎

保坂 卓²、谷口俊仁³、佐伯和弘^{1, 2}、金子武人²、
松本和也^{1, 2}、細井美彦^{1, 2}、西本尚武³、入谷 明^{1, 2}

要 約

哺乳動物における体細胞クローン技術は、優良な遺伝形質を有する動物の増産のみならず、効率的なトランスジェニック動物作出技術への応用が進められている。今回、子ウシより採取した線維芽細胞によるクローン胚の作製および胚移植による胎子への発生を試みた。体外成熟により得られたウシ成熟卵子から核質を除去しレシピエント卵子とした。これらの卵子に数代継代したウシ線維芽細胞を挿入して作製した513個の核移植胚を電気融合したところ、63%が融合した。これら323個の再構築胚を活性化処理し、7日間培養して胚発生を観察したところ、232個(72%)のクローン胚が卵割し、そのうち44個(19%)が移植可能な桑実期胚および胚盤胞期胚に発生した。これら発生胚のうち10個を5頭の受卵雌に2胚ずつ移植したところ、1頭(20%)で受胎が確認された。以上より、ウシ体細胞の核移植により作製したクローン胚が胎子へ発生することが確認された。

緒 論

Wilmutら(1997)は、血清飢餓培養により、細胞周期を静止期(G₀期)に誘導したヒツジの乳腺上皮細胞を除核した未受精卵に移植することで、初めて生存するクローンヒツジの産子を得た。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。これらの報告によると、細胞周期がG₀あるいはG₁期の成熟した個体あるいは胎子より得た体細胞を用い、除核した成熟卵子細胞質に移植し、その後、再構築胚の活性化処理を行うことで、個体への発生率が大きく向上することが知られている。このクローン技術により哺乳動物の培養細胞が個体にまで発生することから、あらかじめ外来遺伝子を培養細胞に導入することで、効率的にトランスジェニック動物を生産できることが示されている(Schnieke et al., 1997, Cibelli et al., 1998)。

本実験では、ウシ個体より採取した体細胞を用いた核移植によりクローン産子の受胎例を得たので報告する。

材料および方法

ウシ卵子の採取および成熟培養

ウシ卵巢は、近隣のと場にて採取し、20~25℃の生理食塩水(0.9% NaCl)に浸漬して輸送した。採取後2~3時間以内に、卵巢表面の直径2~8mmの卵胞から吸引法により卵丘卵子複合体(COCs)を回収した。卵丘細胞が緊密かつ3~4重層に付着したCOCsのみを選抜し、ミネラルオイル下の50μlの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)、1μg/ml エストラジオール-17β(Sigma)、0.5mM ピルビン酸ナトリウム(Nacalai tesque, Kyoto, Japan) and 1%(v/v) 抗菌抗カビ溶液(Cat. No. 12340, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)を添加した25mM HEPES緩衝

1. 近畿大学生物理工学研究所
2. 近畿大学生物理工学部
3. 和歌山県畜産試験場

TCM-199 (Earle 塩、Gibco) 内に10個ずつ導入し、39°C、5% CO₂、95% 空気、高湿度の条件下で20時間成熟培養した (Saeki et al., 1991)。

ドナー細胞核の作製

ドナー核となる体細胞は以下のように作製した。黒毛和種オス子牛の耳の一部をパンチングにより採取した。この組織を細切し、10% ウシ胎子血清 (FBS, Sigma) を添加した Dulbecco 修正イーグル培養液 (D-MEM, Gibco) で培養することで、ウシ線維芽細胞を得た。10% FBS 添加 D-MEM で数代継代培養した後、0.5% FBS 添加 D-MEM で約1週間飢餓培養し、細胞核ドナーとした (図1)。

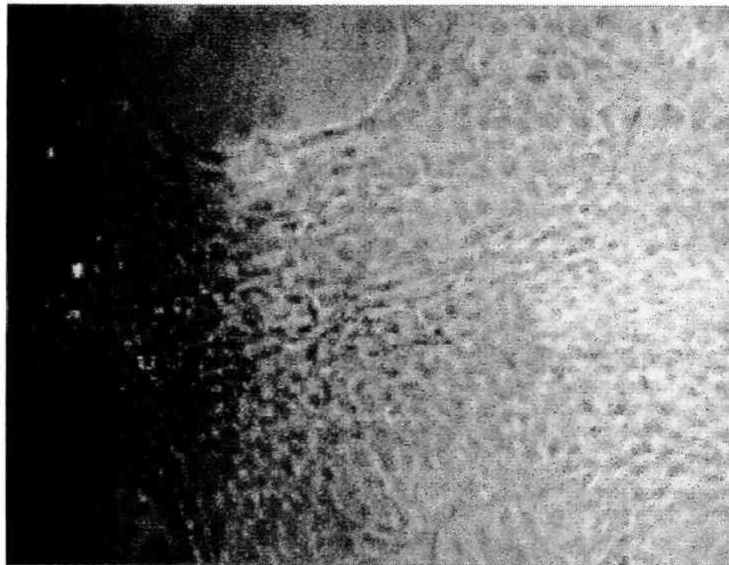


Fig 1 Bovine fibroblasts taken from a Japanese Black male calf for nuclear donor.

核移植

体外成熟後、卵丘細胞が膨潤した COCs を選別し、これらを0.1% ヒアルロニダーゼ (Sigma) を添加した5% 新生子ウシ血清 (NBCS ; Sigma) 添加 TCM-199に2分間曝露し、その後5分間 VORTEX ミキサーにより攪拌することで卵丘細胞を剥離し、卵子のみを回収した。

これら裸化した卵子から第1極体を放出したもののみを選抜し、第1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極体とその付近の細胞質を作製した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存させた。これら卵子細胞質をレシピエント卵子とした (図2)。

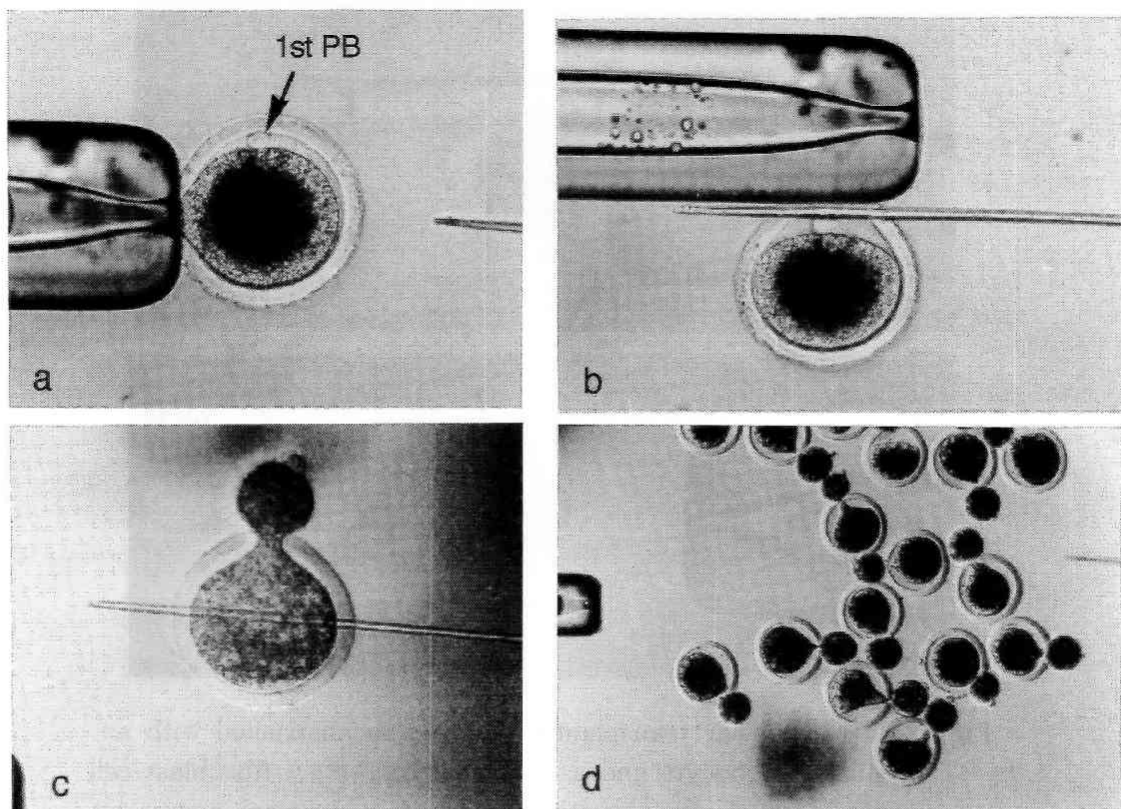


Fig 2 Enucleation of bovine oocytes matured in vitro. a ; Matured oocytes was held with a holding pipet. 1st PB ; First polar body. b ; Zona was torn open by glass needle. c ; A small portion of cytoplasm beneath the 1st PB was squeezed out by glass needle. d ; Putative enucleated oocytes.

一方、ドナー細胞は、培養細胞をトリプシン・EDTA 溶液で単離して用いた。これら細胞を、レシピエント卵子の卵胞腔内に1個ずつ注入して核移植胚を作製した(図3)。作製した胚は、Zimmerman 細胞融合液 (Robl et al., 1987) 中に導入し、微小電極で核移植胚を挟み込み、ECM 200 (BTX, San Diego, CA, USA) を用いて AC 5 V 1 秒間、ついで DC 25V/150 μ m、25 μ 秒、2 回の電気パルス刺激により融合し、再構築胚を作製した(図4)。

再構築胚は、5 μ M カルシウムイオノフォア A 23187 に 5 分間曝露した後、10 μ g/ml シクロヘキシミドに 6 時間曝露することにより活性化した。

活性化処理後、再構築胚は 5% NBCS を添加した CR 1 aa 培養液 (Rosenkrans et al., 1993) で、39°C、5% CO₂、5% O₂、90% N₂、高湿度下で 7 日間培養した。培養後、クローン胚を実体顕微鏡下 (x 60) で検査し、卵割率、桑実期および胚盤胞期胚への発育率を調べた。

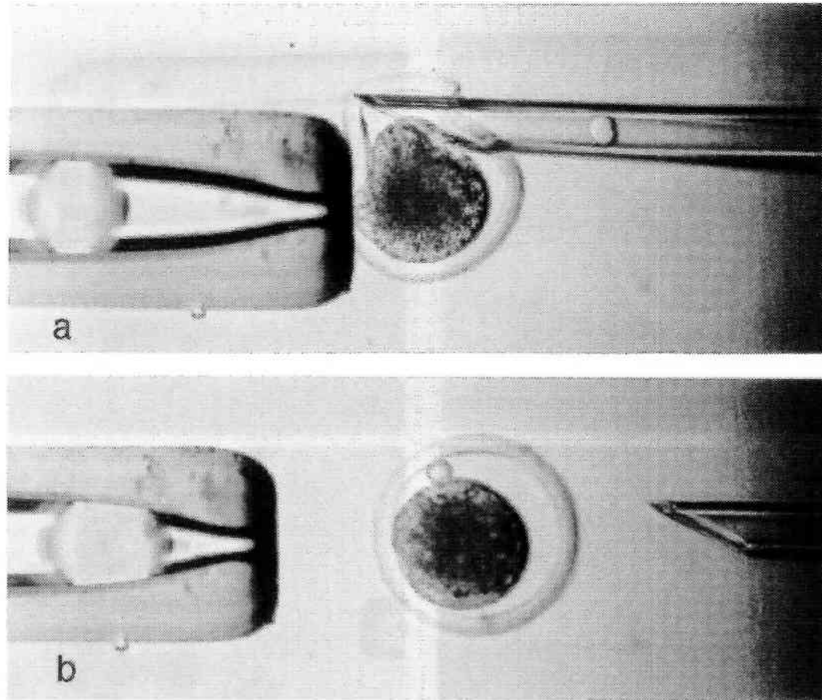


Fig 3 Bovine nuclear transplanted couplets reconstructed with an enucleated oocyte and a fibroblast cell. a ; A fibroblast cell was inserted into perivitellin space of a recipient oocyte by injection pipet. b ; A couplet reconstructed with oocyte cytoplasm and a fibroblast cell.

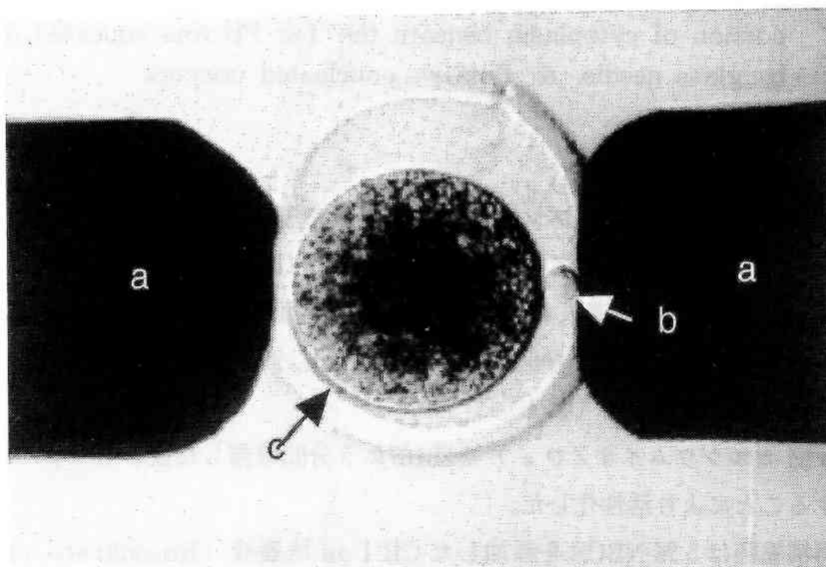


Fig 4 Electrofusion of an enucleated oocyte and a fibroblast cell using micro-electrodes. a ; a micro-electrode, b ; a bovine fibroblast cell, c ; an enucleated oocyte.

胚移植

得られた桑実期、胚盤胞期胚の一部は、性周期を同期化させた受卵雌に、1頭に2胚ずつ直腸膣法により移植した。

結果および考察

表1に示すように、合計513個の除核卵細胞質に体細胞を融合させたところ、323個（63%）が融合した。これら再構築胚を、活性化した後7日間体外培養したところ、232個（72%）が卵割胚に発生し、そのうち44個（19%）が、移植可能な桑実期あるいは胚盤胞期胚に発生した（図5）。

Table 1 Development of bovine cloned embryos with fibroblast cells taken from a Japanese Black male calf

Trial No.	No. (%) of Oocytes		No. (%) of cloned embryos		No. (%) of embryos developed to		
	Used	Fused	Cultured ¹	Cleaved	Total	M ²	Bl ³
1	88	38(43)	38	30(79)	7(23)	4	3
2	66	39(59)	39	23(59)	6(26)	3	3
3	104	79(76)	79	65(82)	11(17)	2	9
4	60	40(67)	40	30(75)	4(13)	1	3
5	149	95(64)	95	64(67)	11(17)	4	7
6	46	32(70)	32	21(66)	5(24)	1	4
Total	513	323(63)	323	232(72)	44(19)	15	29

¹Embryos were cultured for 7 days.

², ³M; morulae, Bl; blastocysts.

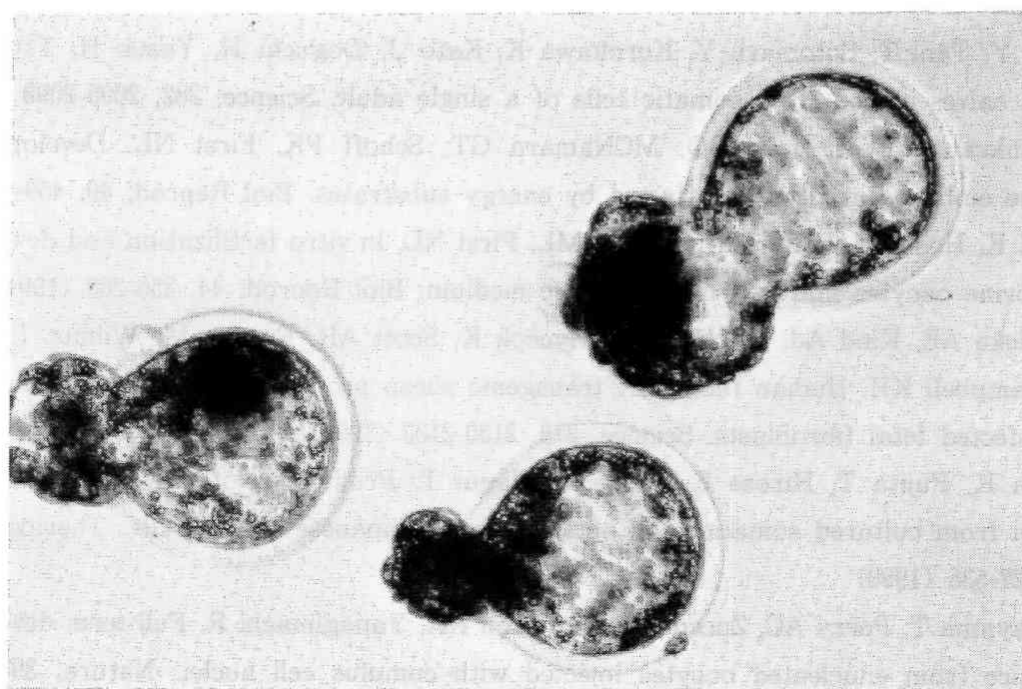


Fig 5 Blastocysts derived from bovine cloned embryos following in vitro culture for 7 days.

発育した44個の桑実期、胚盤胞期胚のうち、10個を性周期を同期化させた受卵雌に2胚ずつ5頭に移植した。その結果、移植後47日目の超音波断層診断装置による妊娠判定により、1頭の受胎を、胎子およびその心拍により確認した（1999年6月13日移植、7月25日妊娠判定、表2）。現在（1999年11月30日）も妊娠継続中である。

Table 2 Pregnancy after transfer of cloned embryos into recipient cattle

No. of cloned embryos transferred	No. of recipient animals	No. (%) of pregnant recipients
10	5	1 (20)

追試例ではあるが、本研究においても、ウシの体細胞由来のクローン胚による妊娠例が得られた。核移植技術は優秀な遺伝情報を持った個体の複製のみならず、有用な遺伝子を組み込んだ個体の作出にも用いることが可能であると考えられる。現在、今回用いた体細胞にマーカー遺伝子である EGFP 遺伝子を導入し、導入細胞のクローン化を行い、これを細胞核ドナーとした核移植の検討を行っている。

参考文献

1. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280, 1256-1258 (1998)
2. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282, 2095-2098 (1998)
3. Rosenkrans CF Jr, Zeng GQ, MCNamara GT, Schoff PK, First NL. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod*, 49, 459-62 1993
4. Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First NL. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod*, 44, 256-260 (1991).
5. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278, 2130-2133 (1997)
6. Shiga K, Fujita T, Hirose K, Sasae Y, Nagai T. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese Black bulls. *Theriogenology*, 52, 527-535 (1999)
7. 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).
8. Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod*

Fertil Dev 10, 369-78 (1998)

9. 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)
10. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810-813 (1997)
11. Robl JM, Prather R, Barnes F, Eyestone W, Northey D, Gilligan B, First NL. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J Anim Sci*, 64, 642-647 (1987).

英文要旨

Production and pregnancy of bovine cloned embryos derived from fibroblasts taken from a Japanese Black male calf

T Hosaka², S Taniguchi³, K Saeki^{1, 2}, T Kaneko², K Matsumoto^{1, 2},
Y Hosoi^{1, 2}, Y Nishimoto³ and A Iritani^{1, 2}

Production of cloned livestock from an established cultured cell line would confer various advantages in animal biotechnology, such as multiplication of valuable or endangered animals and effective production of transgenic animals. Here, we report production and in vitro development of cloned embryos with bovine fibroblasts taken from Japanese Black male calf and establishment of pregnancy with the cloned embryos following transfer into recipient animals.

In vitro matured bovine oocytes were enucleated and used for recipient cytoplasm. Bovine cultured fibroblasts derived from ear skin of a Japanese Black male calf were used for nuclear donor. Couplets were produced by insertion of each somatic cell into perivitellin space of recipient oocytes. Total of 63% out of 513 couplets was fused by electrostimulation. After activation treatment, the cloned embryos were cultured for 7 days. Frequencies of cleavage and development to the morula and blastocyst stages were 72% and 19%, respectively. Ten morulae/blastocysts were transferred into recipient cattle nonsurgically respectively. Ten morulae/blastocysts were transferred into recipient cattle nonsurgically (2 embryos/recipient). Ultrasoundsonographic diagnosis at 47 days after the transfer revealed that one (20%) pregnancy was established.

1. Research Institute of Biology-Oriented Science and Technology
2. Department of Genetic Engineering, Kinki University
3. Wakayama Prefecture Livestock Experimental Station