

ウサギ半数体 ES 細胞樹立に向けた雌性半数体胚の解析

堂本 勇磨¹、八尾 竜馬^{1,3}、山縣 一夫¹、細井 美彦^{1,2}

要 旨

半数体胚性幹 (Embryonic stem : ES) 細胞は、染色体を一組しか持たないという特徴を有している。そのため、遺伝子導入や破壊が容易であり、遺伝子型と表現型との関係を直接的に知ることができる。

そこで本研究では、ウサギ半数体 ES 細胞の樹立を最終的な目的として、まず、ウサギ雌性半数体胚の作製とその詳細な観察を行った。マニピュレーション操作によって 2 前核 (Pronuclear : PN) 胚である受精卵から雄性前核の除核を行い、1 つの前核を有する胚 (1PN 胚) を得た。この胚の発生過程をライブセルイメージング技術を用いて 3 次元的に観察し、卵割時における 1PN 胚の染色体及び紡錘体の動態の多次元画像情報を得た。これを元に、分裂期の M 期染色体の体積を比較すると、1PN 胚における核の体積が 2PN 胚と比較して有意に減少していることが確認できた。次に、1PN 胚の卵割過程を解析したところ、8 細胞期以降で発生が停止することが明らかとなった。さらに、2 細胞期及び 4 細胞期に要する時間を計測し、比較した結果、1PN 胚の 4 細胞期に要する時間が有意に増加していることが確認された。また、4 細胞期までの卵割における染色体分配異常 (Abnormal chromosome segregation : ACS) の観察を行ったが、1PN 胚及び 2PN 胚において、差は無かった。以上の結果から、作製された 1PN 胚の各細胞期における発生遅延の蓄積が 8 細胞期以降の発生に影響していると考えられる。また、ウサギ胚においてもマウス胚と同様、4 細胞期までの染色体分配の安定性が保たれていることが示唆された。

キーワード：半数体胚、半数体 ES 細胞、ウサギ、ライブセルイメージング、染色体分配異常

1. 緒 論

2011 年に、マウスの雌性半数体単為発生胚から半数体 ES 細胞の樹立の報告がなされた⁽¹⁾。興味深いことに、この半数体 ES 細胞は通常の 2 倍体 ES 細胞と同様に、自己複製能及び分化多能性やキメラ形性能を持つことが示された⁽¹⁾。半数体 ES 細胞は、染色体を一組しか持たないという特徴を有している。そのため、遺伝子導入や破壊も容易であり、染色体の遺伝子型がそのまま表現型に現れることから、逆遺伝学研究への応用がなされており⁽²⁾、これまでにマウスに加えてラット⁽³⁾ やカニクイザル⁽⁴⁾ などにおいてもその樹立が報告されている。また、雌性だけでなく、マウス雄性半数体単為発生胚からの半数体 ES 細胞の樹立が報告され、この雄性半数体 ES 細胞は、雄性由来のゲノムインプリンティングのメチル化パターンを示すことが確認された⁽⁵⁾。雄性半数体 ES 細胞の精子様細胞としての特徴を利用し、雄性半数体 ES 細胞を卵細胞質へ直接顕微注入することで、胚発生が進み、正常な産仔の獲得が報告された⁽⁵⁾。このことから雄性半数体 ES 細胞は、遺伝子改変可能な半数体生殖細胞としての利点を有していることが示された⁽⁵⁾。マウス ES 細胞と異なり、キメラ形成能が著しく低い、ウサギ⁽⁶⁾ やカニクイザル⁽⁷⁾ の ES 細胞にこのような技術を応用することで、キメラ個体を介することなく遺伝子改変個体の作製が可能になると考えられ

原稿受付 2017 年 2 月 28 日

1. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 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

3. 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター 〒536-8523 大阪府大阪市城東区森之宮 2-2-30

る。

ウサギは発生工学分野の研究に多く利用されており、卵母細胞の採取法、顕微授精や体細胞核移植といった技術も確立された^{(8), (9)}。また、マウスよりも代謝系がヒトに類似していることから、医薬品の薬効・安全性試験、ヒト代謝疾患モデル⁽¹⁰⁾として広く利用されている実験動物である。さらに、マウスとは異なり、ウサギ ES 細胞は、ヒトやサルなどの ES 細胞とコロニーの形態や未分化維持機構等の性質が類似しているため⁽¹¹⁾、ヒトへの外挿において重要な知見を有している可能性が高い。もしウサギにおいて半数体 ES 細胞の樹立が為されれば、より効率的な遺伝子欠損・導入による疾患モデル ES 細胞や動物個体の作製が可能になると考えられる。そこで本研究では、ウサギ半数体 ES 細胞の樹立を最終的な目的として、まず、ウサギ雌性半数体胚の作製とその詳細な観察を行った。

2. 材料と方法

(1) 供試動物

実験に使用したニュージーランドホワイト (NZW) 種のウサギは、日本エスエルシー株式会社及び北山ラバス株式会社から購入した。入荷後、概日調整を行い順化した後 (明期 8:00-20:00)、8 ~ 12 ヶ月齢の個体を実験に供試した。飼育条件は、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 50% の飼育環境下において、飼料 (RC4 : オリエンタル酵母工業 (株)) を約 120 g/日となるように給餌を行った。また 1 日 2 回の給水ボトル交換により給水を行った。なお、本実験に際して動物実験の立案および実験動物の飼養と管理については、近畿大学動物実験規定に準じて実施した。

(2) ウサギ受精卵の採取

ニュージーランドホワイト (NZW) 種の成熟雌ウサギに妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG、ノバルティスアニマルヘルス、ピーメックス 1000) を 50 IU、大腿部に筋肉注射した。PMSG 投与後 72 時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG、ノバルティスアニマルヘルス、プベローゲン 1500) を 100 IU、耳の静脈から投与した。hCG 投与後、NZW 種の成熟雄と同ケージ内に入れ、交配を行った。hCG 投与から 14 時間後に、ソムノペンチル (共立製薬株式会社) を約 3 mL 耳の静脈に注射することで安楽死を行い、雌ウサギより卵巣、卵管及び子宮を摘出した。20% (v/v) fetal bovine serum (FBS、Hyclone、SV30014.03) 添加 Medium 199 Earle's Salts (Gibco、11150059) により卵管を灌流し、受精卵を採取した。得られた受精卵は、パスツールピペットを用いてピペッティングすることで卵丘細胞を除去した。得られた受精卵は、流動パラフィン (nacalai tesque、26117-45) で覆った胚培養液中で、実験に供するまで 38°C 、5% CO_2 、飽和湿度下で培養した。胚培養液は、0.55 mg/mL sodium pyruvate (Sigma、P2256)、0.146 mg/mL L-Glutamine GlutaMAX™ Supplement (Gibco、35050061)、1.861 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Sodium DL-lactate solution (Sigma、L7900)、0.063 mg/mL penicillin G potassium salt (nacalai tesque、26239-84)、5.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ gentamicin solution (Sigma、G1272)、以上を添加した CMRL-1066 (Gibco、11530037) に 20% (v/v) FBS を添加したもの (以下、mCMRL) を用いた。

(3) 1PN 胚の作製

1PN 胚の作製に使用するマイクロマニピュレーターは、Piezo Micro Manipulator (PRIME TECH、PMM-150) を用いた。インジェクションピペットは、ガラス管 (SUTTER INSTRUMENT、B100-75-10) を内径 10-15 μm で、ホールディングピペットは外径 100-120 μm でそれぞれ作製し、使用した。顕微操作を行うディッシュは 100×15 mm ペトリディッシュ (FALCON、35-1029) のふたを用いた。10% (w/

v) poly vinyl pyrrolidone (PVP, Sigma, P5288) (針洗浄用)、7.5 µg/mL cytochalasin B (CB, Sigma, C-6762) 添加 M2 培地 (アーク・リソース㈱) (除核用) のそれぞれ 20 µL のドロップを作製し、流動パラフィンで覆った。ジョイスティック油圧マイクロマニピュレーター (NARISHIGE、MO-202) を装着した倒立顕微鏡 (OLYMPUS、IX-71) のステージ上に操作ディッシュを置いた。Piezo Micro Manipulator (PRIME TECH、PMM-150) には予め水銀 (nacalaitesque、215-32) をピペット内に約 5 mm 程度になるように注入したインジェクションピペットを、マイクロインジェクター (NARISHIGE、IM-9B) にはホールディングピペットをそれぞれ取り付け付けた。さらに、操作ディッシュとインジェクションピペットおよびホールディングピペットが平行になるように、マイクロマニピュレーターを調節した。受精卵を除核用培地である 7.5 µg/mL CB 添加 M2 培地で 10 分間処理した。操作ディッシュ内の除核用培地ドロップに卵子を導入し、ホールディングピペットで固定した。除核用ピペットを透明帯にあてピエゾで透明帯を貫通し、雄性前核をピペット内に吸引し除核を行った。除核を行った受精卵は M2 培地で洗浄し、mCMRL 中で、38°C、5% CO₂、飽和湿度下で 1 時間回復培養した。

(4) Live Cell Imaging

回復培養後、1mg/mL Bovine Serum Albumin (BSA) の代わりに 1mg/mL Poly (vinyl alcohol) (PVA、Sigma、P1763) を添加した KSOMaa (Mol Reprod Dev 1995 41 232-238、以下 mKSOMaa) 培地にて受精卵を洗浄し、mRNA 注入まで 38°C、6% CO₂、5% O₂、飽和湿度下で培養した。次に、あらかじめ試験管内にて合成しておいた、染色体 (赤色) と紡錘体 (緑色) をそれぞれ標識する Histone H2B-mCherry (25 ng/µL) と EGFP-EB1 (25 ng/µL) の mRNA を HEPES CZB 培地内へ移しておいた受精卵へ、ピエゾマイクロマニピュレーターを用いて注入した。mRNA の作製については既報⁽¹²⁾ に従い作製した。mRNA の受精卵への注入後、胚をガラスボトムディッシュ (MatTek) 又はフィルムボトムディッシュ (松浪硝子株式会社) 内の mKSOMaa ドロップに配置した。観察前には、光パワーメータ (HIOKI、3664) を用いてレンズ直上のレーザーパワーを測定し、CSU-W1 (488 nm : 0.1 mW、561 nm : 0.1 mW) と CV1000 (488 nm : 0.05 mW、561 nm : 0.1 mW) において励起光の出力を微調整した。その後、顕微鏡ステージ上のインキュベーターで培養 (38°C、6% CO₂、5% O₂、飽和湿度下) しながら連続観察を行った。観察には、超高感度 EM - CCD カメラ (Andor、iXON DV887-BV) を倒立蛍光顕微鏡 (オリンパス、IX-71) に搭載したスピニングディスク式共焦点レーザー顕微鏡 (横河電機、CSU-W1) 及びライブセルイメージング装置 (横河電機、CV1000) を用いた。CSU-W1 では、1 つの胚を高解像度で観察するために、60 倍のシリコン浸対物レンズ (UPlanApo ×60 oil) を用いて観察を行った。CV1000 では、一つの視野内で複数の胚を観察するために、20 倍のシリコン浸対物レンズ (UPlanApo ×20 oil) を用いた。また、観察の詳細については既報⁽¹³⁾ を参考に実験を進めた。観察画像は、3 µm 間隔に 41 枚のスライス画像 (Z 軸 : 120 µm) を 5 分間隔 (CSU-W1) と 10 分間隔 (CV1000) で 5 日間観察することによって得られた。得られた画像は、MetaMorph version 7.7 (Molecular Devices)、CV1000 Software 1.06 (横河電機) 及び Volocity Version 6.3 (PerkinElmer) を用いて解析を行った。また、MetaMorph を用いて染色体の蛍光画像の各スライスを積層した画像ファイルを得た。この画像ファイルを Volocity で処理することで核を認識させ、その体積情報を得た。

(5) 統計学的解析

本実験操作における全ての統計処理については、表計算ソフトウェア (Microsoft Excel 2013) を使用し、*t* 検定により評価した。なお、統計学的有意差は、5% 水準未満とした。

3. 結 果

雄性前核除核による 1PN 胚の作製過程を図 1 に示した。ホールディングピペットで固定した受精卵に雄性前核（黒円）と雌性前核（赤円）が確認できた。除核用ピペットで透明帯を貫通し、雄性前核をピペット内に吸引し除核を行った（黒楕円）。前核の観察を行った結果、除核後の胚では 1つの前核が確認できた（1PN 胚）のに対して、未除核胚では 2つの前核が見られた（2PN 胚）（図 2）。

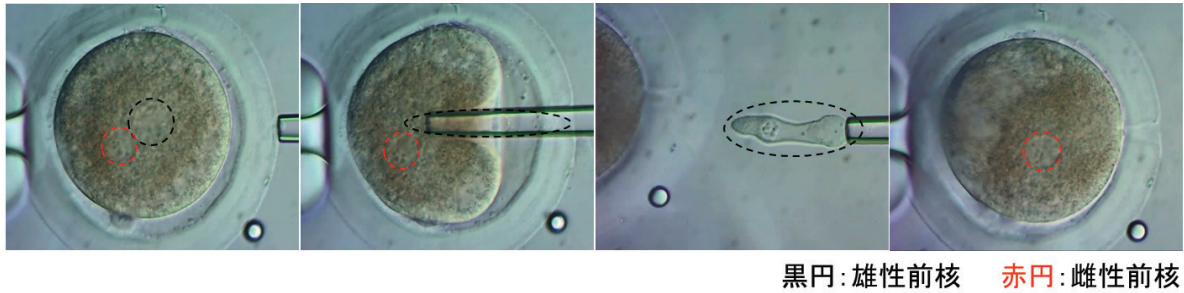


図 1 雄性前核除核の過程

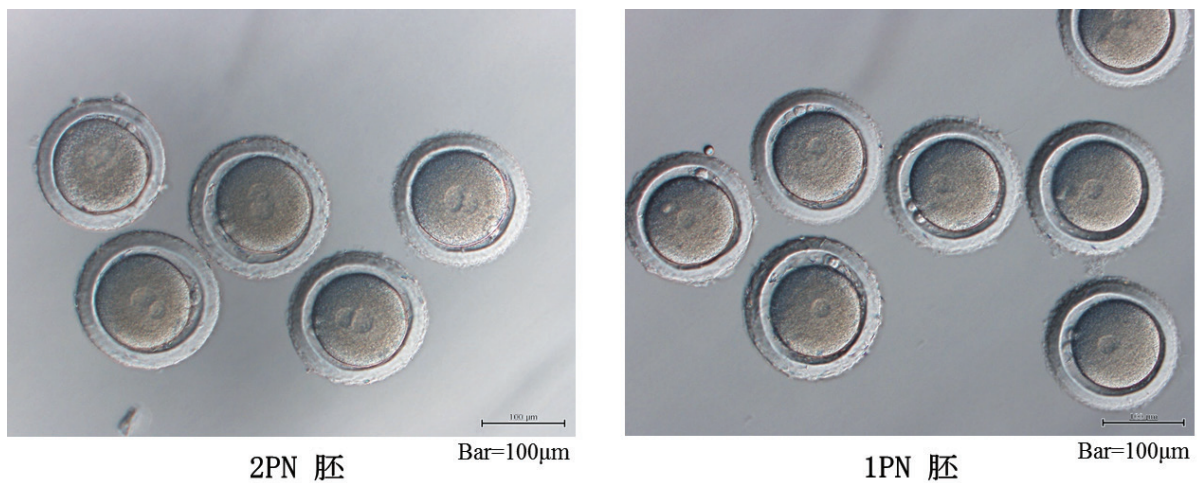


図 2 前核の確認

表 1 には、受精卵からの雄性前核除核成績を示した。受精卵を雄性前核の除核に供試した結果、91% (66/72) の生存を確認し、生存していた胚の 92% (61/66) で 1つの前核が見られた。これらのことから、おおむね高率に雄性前核の除核が行われていることが認められた。

表 1 受精卵からの雄性前核除核成績

供試卵子数	生存卵子数 (%) *	1前核胚数 (%) **
72	66 (91)	61 (92)

* 供試卵子数を分母とする。 ** 生存卵子数を分母とする。

実験回数=7

図3には、3次元的に観察した1PN胚の染色体及び紡錘体の蛍光画像を示した。2PN胚と1PN胚それぞれの2細胞期から4細胞期への卵割における分裂前期(Prophase)、中期(Metaphase)、後期(Anaphase)、間期(Interphase)の染色体(H2B:赤色)と紡錘体(EB1:緑色)が観察できた。2細胞期(分裂中期)における染色体(H2B:赤色)の拡大画像から、1PN胚の染色体の数が2PN胚と比較して明らかに減少していることが観察された。このことを定量的に解析するために、この細胞分裂中期における染色体の蛍光画像を3次元画像解析ソフトウェアで処理することで、染色体の体積の測定を行った(図4)。その結果、1PN胚における核の体積が2PN胚と比較して有意に減少していることが認められた(図5)。これらのことから、1PN胚の作製において、雄性前核の除核が適切に行われていることが確認できた。

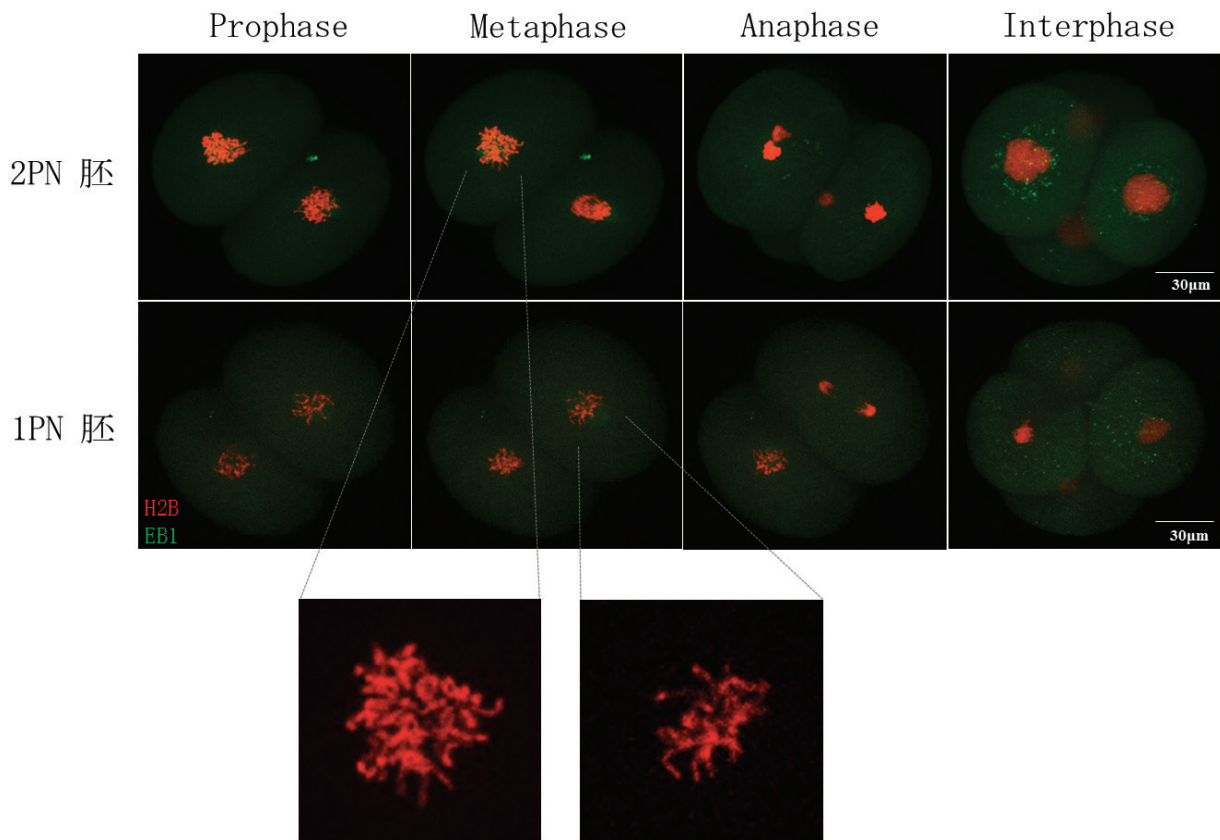


図3 1PN胚における染色体の可視化

画像は、レーザーパワーを488 nm (0.1 mW)、561 nm (0.1 mW)として、60倍のシリコン浸対物レンズ(UPlanApo ×60 oil)を用いて、3 µm間隔で41枚のスライス画像(Z軸:120 µm)を撮影し、得られた画像を1枚に積層した。5分間隔で撮影し、分裂各期の画像を示した。拡大画像は、2PN胚と1PN胚の2細胞期(分裂中期)における染色体(H2B:赤色)を示した。

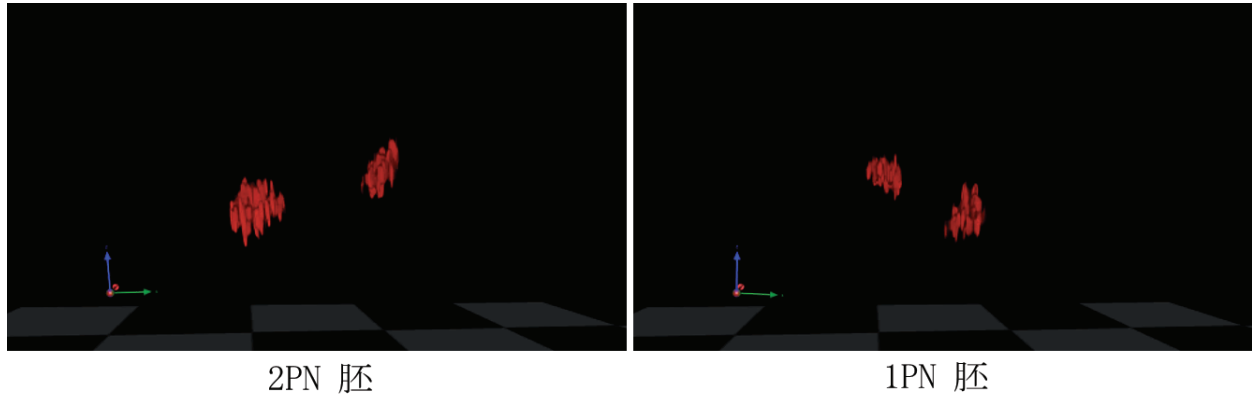


図4 染色体の3次元観察像

図3で示された2細胞期の分裂中期における染色体（H2B：赤色）の画像を、3次元画像解析ソフトウェア「Volocity」を用いて処理することで得られた染色体の3次元観察像。

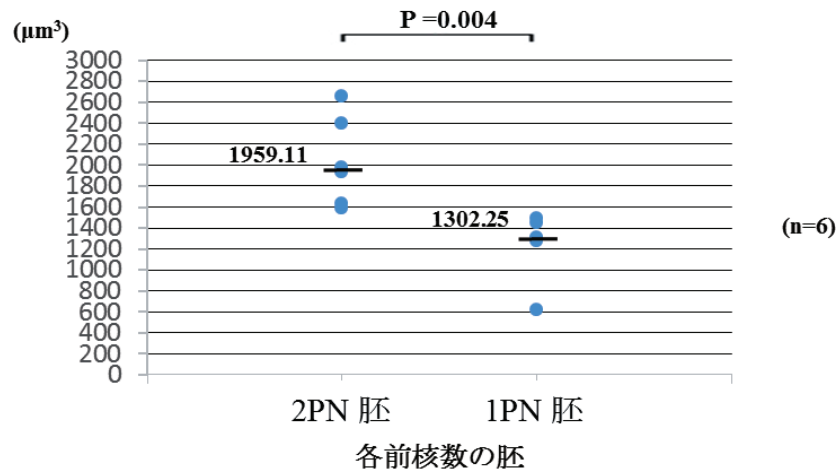


図5 染色体の体積の比較

2細胞期の分裂中期における、2PN 胚と 1PN 胚それぞれの割球ごとの核の体積を計測し、比較したグラフ。グラフ中の数値と棒線は中央値を示し、n は割球数を示す。2PN 胚をコントロールとして用いた。

1PN 胚の発生過程をイメージングシステム（CV1000）によって5日間観察し、その発生成績を表2に示した。また、その蛍光画像を図6に示した。1PN 胚の発生が2PN 胚と比較して、8細胞期以降の発生が停止することが確認された（表2）。次に、得られた画像を用いて1PN 胚と2PN 胚の2細胞期及び4細胞期に要する時間を計測し、比較した。その結果、1PN 胚の2細胞期に要する時間（ 6.33 ± 0.28 h）については、2PN 胚（ 5.42 ± 0.19 h）と比較して、有意差が認められなかった（図7）。一方、1PN 胚の4細胞期に要する時間（ 8.16 ± 0.30 h）については、2PN 胚（ 6.5 ± 0.39 h）と比較して有意に増加していることが認められた（図7）。

表2 1PN 胚の発生成績

	供試胚数	前核胚数 (%)	2細胞期胚数 (%)	4細胞期胚数 (%)	8細胞期胚数 (%)	桑実胚数 (%)	胚盤胞期胚数 (%)
1PN 胚	6	6 (100)	6 (100)	6 (100)	3 (50)	0 (0)	0 (0)
2PN 胚	5	5 (100)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	1 (20)

* 供試胚数を分母とする。 ** 前核形成数を分母とする。

実験回数=2

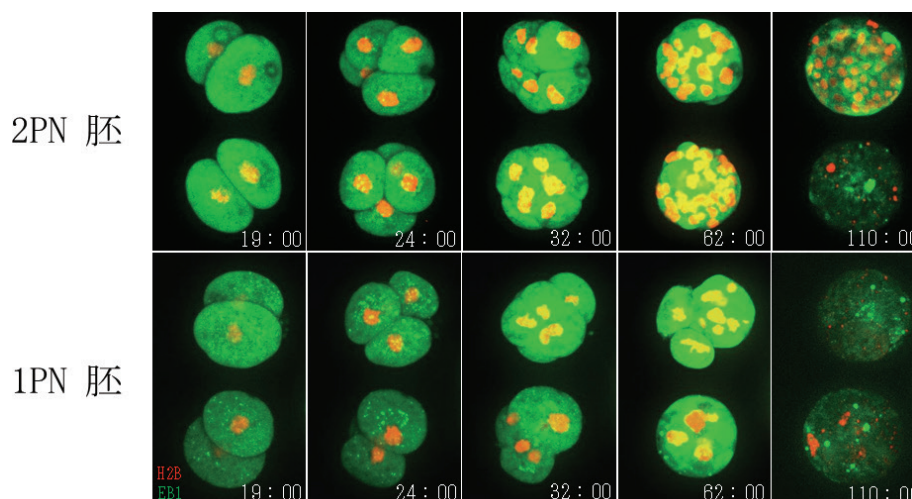


図6 半数体胚の卵割過程

画像は、レーザーパワーを 488 nm (0.05 mW)、561 nm (0.1 mW) として、20 倍のシリコン浸対物レンズ (UPlanApo ×20 oil) を用いて、3 μm 間隔で 41 枚のスライス画像 (Z 軸: 120 μm) を撮影し、得られた画像を 1 枚に積層した。10 分間隔で 5 日間撮影し、それぞれの経過時間ごとの画像を示した。交配から 12 時間後受精が生じる時間とし、その後の経過時間を画像の右下部に示した。

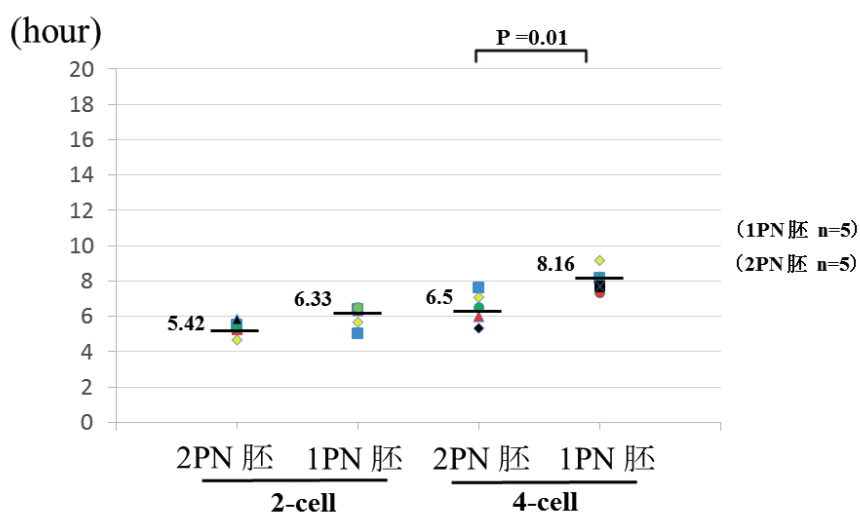


図7 各細胞期に要する時間の比較

得られた画像を用いて 1PN 胚と 2PN 胚の 2 細胞期及び 4 細胞期に要する時間を計測し、比較したグラフ。グラフ中の数値と棒線は中央値を示し、n は胚の数を示す。1PN 胚の内 1 つは、観察当初から 2 細胞期胚であったため、解析対象から除外した。2PN 胚をコントロールとして用いた。

ウサギ胚の染色体分配におけるゲノムの安定性を知るために、細胞分裂の過程で染色体が正常に分配されない染色体分配異常 (Abnormal chromosome segregation: ACS) の観察を行った。その結果、1PN 胚及び 2PN 胚において、4 細胞期までは ACS は確認されなかったが、4 細胞期から 8 細胞期への移行時に ACS が確認された (図 8、表 3)。

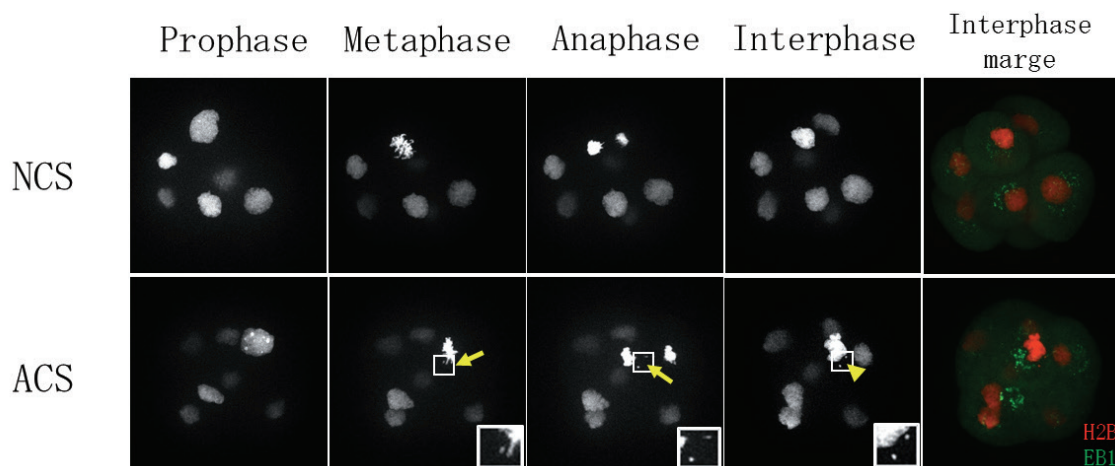


図8 ACSの観察画像

NCS (Normal chromosome segregation) は正常な染色体分配、ACS は染色体分配異常を示す。矢印は分配異常染色体、矢頭は微小核を示す。ACS の図において、Metaphase では正常に配列していない染色体が、Anaphase では分裂の際に取り残された染色体が観察された。Interphase では、ACS で生じた染色体から形成された微小核が認められる。

表3 卵割時における ACS の発生頻度

	No. of embryos examined	No. of ACS/division		
		1 to 2cell	2 to 4cell	4 to 8cell
2PN 胚	5	0/5	0/10	2/20
1PN 胚	5	0/5	0/10	1/18*

* 6細胞期で発生停止した胚を含む

4. 考 察

受精卵からの雄性前核除核により作製された胚において一つの前核が認められたこと、また、染色体の体積が 2PN 胚と比較して有意に減少していたことから、この胚は半数体胚であると考えられる。この 1PN 胚の発生を長時間イメージングした結果、8 細胞期以降で発生が停止することが明らかとなった。さらに、各細胞期に要する時間を測定したところ、4 細胞期において有意に発生の遅延が見られた。これらのことから、卵割初期からの発生遅延の蓄積が 8 細胞期以降の発生に影響していると考えられる。

マウスを用いた研究では、雌性半数体胚の発生能が 2 倍体胚と比較して有意に低下していることが報告されている⁽¹⁴⁾。この雌性半数体胚において、母性インプリント遺伝子である *Igf2r* と *Abs4* の発現を 2 倍体胚と比較した結果、*Igf2r* の発現が有意に上昇すること、*Abs4* については発現が見られないことが明らかになっている⁽¹⁴⁾。また、雌性半数体胚と 2 倍体の雌性発生胚において、特定の常染色体および X 染色体連鎖遺伝子の発現レベルの関係を調べた研究では、雌性半数体胚においてほとんどの mRNA の発現は僅かな変化を示すのみであるが、X 染色体連鎖遺伝子である *Bex1* の mRNA 発現が一貫して上昇していることが報告されている⁽¹⁵⁾。これらのことから、半数体胚における遺伝子発現調節機構の異常が、本研究で確認された卵割初期からの発生遅延の一因である可能性が考えられる。今後、これら遺伝子の発現につい

てウサギ胚でも解析を行いたいと考えている。

また、哺乳動物においては、着床前の初期胚の発生過程で胚発生に重要な現象である胚性ゲノムの活性化 (Zygotic gene activation : ZGA) が起きる。この ZGA の開始には、母性の mRNA やタンパク質の分解が必要であり、これらが阻害されると ZGA が開始されず発生が停止することが明らかとなっている⁽¹⁶⁾。加えて、ウサギ初期胚の胚発生に関するこれまでの研究から、ウサギ胚の ZGA が 8 から 16 細胞期に生じることが報告されている⁽¹⁷⁾。これらのことから、本研究において初期胚の発生に必要な遺伝子機能の異常により、ZGA が正常に行われなかったことから、8 細胞期以降の胚発生停止がもたらされた可能性が考えられた。

マウスでは、細胞分裂の過程で染色体が正常に分配されない染色体分配異常 (Abnormal chromosome segregation : ACS) が初期胚において観察され、早期に ACS を起こした胚は仮親に移植しても、すべて流産に終わることが報告されている^{(18), (19)}。マウスの IVF 胚では、4 細胞期までの間に 7% が ACS を起こしており、4 細胞期から 8 細胞期への分裂において 20.5% の胚が ACS を起こすと報告されている⁽¹⁹⁾。一方、本研究では自然交配胚であり、かつ合計 10 個と解析対象が少ないが、ウサギ胚においてもマウス胚と同様、4 細胞期までの染色体分配の安定性が保たれていると考えられる。

近年、カイニクイザルの 2 倍体単為発生胚から発生した 4 から 8 細胞期胚の単一割球を ES 細胞用培地へ播種することで、ES 細胞の樹立に成功している⁽²⁰⁾。本研究では、1PN 胚の 8 細胞期以降の発生が停止することが確認されているが、4 細胞期胚までの卵割時には、各割球において染色体が正常に分配されることが確認されている。今後、既報のような 4 細胞期胚の単一割球からの ES 細胞の樹立を試みることで、ウサギ半数体 ES 細胞の樹立が成される可能性が考えられる。

今回、残念ながら胚盤胞期胚への発生が見られなかったため、ES 細胞の樹立を試みることができなかった。今後は、2 または 4 細胞期胚の単一割球からの ES 細胞樹立⁽²⁰⁾を試みたいと考えている。

5. 参考文献

1. Leeb M., Wutz A. (2011) Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature* 479, 131-134.
2. Elling U., Taubenschmid J., Wirnsberger G., O'Malley R., Demers S-P., Vanhaelen Q., Shukalyuk A.I., Schmauss G., Schramek D., Schnuetgen F., von Melchner H., Ecker J.R., Stanford W.L., Zuber J., Stark A., Penninger J.M. (2011) Forward and Reverse Genetics through Derivation of Haploid Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 9, 563-574.
3. Li W., Li X., Li T., Jiang M-G., Wan H., Luo G-Z., Feng C., Cui X., Teng F., Yuan Y., Zhou Q., Gu Q., Shuai L., Sha J., Xiao Y., Wang L., Liu Z, Wang X-J., Zhao X-Y., Zhou Q. (2014) Genetic Modification and Screening in Rat Using Haploid Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 14, 404-414.
4. Yang H., Liu Z., Ma Y., Zhong C., Yin Q., Zhou C., Shi L., Cai Y., Zhao H., Wang H., Tang F., Wang Y., Zhang C., Liu X-Y., Lai D., Jin Y., Sun Q., Li J. (2013) Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes. *Cell Res*. 23, 1187-1200.
5. Yang H., Shi L., Wang B-A., Liang D., Zhong C., Liu W., Nie Y., Liu J., Zhao J., Gao X., Li D., Xu G-L., Li J. (2012) Generation of Genetically Modified Mice by Oocyte Injection of Androgenetic Haploid Embryonic Stem Cells. *Cell*, 149, 605-617.
6. Zakhartchenko V., Flisikowska T., Li S., Richter T., Wieland H., Durkovic M., Rottmann O., Kessler B., Gungor T., Brem G., Kind A., Wolf E., Schnieke A. (2011) Cell-Mediated Transgenesis in Rabbits:

- Chimeric and Nuclear Transfer Animals. *Biol. Reprod.* 84, 229-237.
7. Tachibana M., Sparman M., Ramsey C., Ma H., Lee H-S., Penedo M-C., Mitalipov S. (2012) Generation of Chimeric Rhesus Monkeys. *Cell* 148, 285-295.
 8. Hosoi Y., Miyake M., Utsumi K., Iritani A. (1988) Development of rabbit oocyte after microinjection of spermatozoa. *Proceeding of the 11th international congress on animal reproduction.* abstract 331.
 9. Chesné P., Adenot P.G., Viglietta C., Baratte M., Boulanger L., Renard J-P. (2002) Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 366-369.
 10. Watanabe Y. (1980) Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis.* 36, 261-268.
 11. Honda A., Hirose M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Shimozawa N., Hatori M., Shimizu N, Murata T., Hirose M., Katayama K., Wakisaka N., Miyoshi H., Yokoyama K.K., Sankai T., Ogura A. (2008) Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. *Reprod Biomed Online.* 17, 706-715.
 12. Yamagata K. Suetsugu R., Wakayama T. (2009) Longterm six-dimensional live-cell imaging for the mouse preimplantation embryo that does not affect full-term development. *J. Reprod. Dev.* 55, 343-350.
 13. Yamagata K., Ueda J. (2013). Long-term live-cell imaging of mammalian preimplantation development and derivation process of pluripotent stem cells from the embryos. *Develop. Growth Differ.* 55, 378-389.
 14. Hu M., Zhao Z., TuanMu L-C., Wei H., Gao F., Li L., Ying J., Zhang S. (2014) Analysis of imprinted gene expression and implantation in haploid androgenetic mouse embryos. *Andrologia* 47, 1-7.
 15. Latham K.E., Akutsu H., Patel B., Yanagimachi R. (2002) Comparison of Gene Expression During Preimplantation Development Between Diploid and Haploid Mouse Embryos. *Biol. Reprod.* 67, 386-392.
 16. Li L., Zheng P., Dean J. (2010) Maternal control of early mouse development. *Development* 137, 859-870.
 17. Henderson G.R., Brahmasani S.R., Yelisetti U.M., Konijeti S., Katari V.C., Sisinthy S. (2014) Candidate gene expression patterns in rabbit preimplantation embryos developed in vivo and in vitro. *J Assist Reprod Genet.* 31, 899-911.
 18. Yamagata K., Suetsugu R., Wakayama T. (2009). Assessment of chromosomal integrity using a novel live-cell imaging technique in mouse embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 24, 2490-2499.
 19. Mizutani E., Yamagata K., Ono T., Akagi S., Geshi M., Wakayama T. (2012). Abnormal chromosome segregation at early cleavage is a major cause of the full-term developmental failure of mouse clones. *Dev. Biol.* 364, 56-65.
 20. Okahara-Narita J., Yamasaki J., Iwatani C., Tsuchiya H., Wakimoto K., Kondo Y., Wakayama T., Torii R. (2007). Establishment of cynomolgus monkey embryonic stem cell line from a single blastomere. *The Fourth Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology. Society.* Singapore.

英文要旨

Analysis of rabbit haploid embryos toward to derivation of haploid embryonic stem cells

Yuma Domoto¹, Tatsuma Yao^{1,3}, Kazuo Yamagata¹, Yoshihiko Hosoi^{1,2}

Haploid embryonic stem (ES) cells have a unique feature that single set of chromosomes exist and function in them. Therefore, from the viewpoint of gene manipulation and developmental engineering, it is feasible to transfer and knockout the genes, and then, it can be linked between genotypes and phenotypes directly without making the homozygous cell lines and animals. Although the haploid ES cells were known to be derived from haploid blastocyst embryos, the procedures and developmental characters of haploid embryos have been unclear. In this study, we produced and analyzed female haploid embryos of rabbit, towards to establish the haploid rabbit ES cells in future. Male pronucleus was removed from fertilized rabbit oocytes by piezo-driven micromanipulator and embryo with one pronucleus (1PN) was obtained. By means of long-term three-dimensional live-cell imaging technology we previously developed, time-dependent changes in chromosome and spindle structure during cleavage were monitored in the rabbit 1PN embryos. When comparing volume of metaphase chromosomes during first mitosis, it was apparent that the volume in 1PN embryos was significantly smaller than that of fertilized eggs with two pronuclei (2PN), suggesting the validity of procedures to make the haploid embryo. Expectedly, the cleavage of the 1PN embryos was retarded and arrested at the 8-cell stage or later. Furthermore, the time durations at 2- and 4-cell stages of 1PN embryos were measured. As a result, the time required for 4-cell stage of 1PN embryos was significantly increased when compared with that of 2PN embryos. In addition, when the chromosomal integrity during the each cleavage was assessed, the occurrence of abnormal chromosomal segregation, such as lagging chromosome and misaligned chromosome, was comparable among these two groups of embryos and also that of mouse in vitro fertilized embryo, previously reported by us. These results demonstrated that the accumulation of slight delays in each stage may result in lower rate of development in 1PN rabbit embryos, and that the chromosome integrity during the segregation seem to be sustained also in rabbit embryo likely to mouse regardless of its karyotype.

Key words: Haploid embryos, haploid ES cells, rabbit, live cell imaging, abnormal chromosomal segregation

1. Department of Genetic Engineering, B.O.S.T, Kindai University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

2. Institute of Advanced Technology, Kindai University, Kainan, Wakayama, 649-0017, Japan

3. Research and Development Center, Fuso Pharmaceutical Industries, LTD. Morinomiya, Joto-ku, Osaka, 536-8523, Japan