

細胞周期同期化処理がウサギ核移植胚の発生に及ぼす影響

歐 則 克¹、矢 持 隆 之²、木 田 雄 大¹、中 野 美 穂²、岸 上 哲 士^{1,2}、
松 本 和 也^{1,2}、佐 伯 和 弘^{1,2}、入 谷 明^{1,2}、細 井 美 彦^{1,2}

要 約

ウサギ体細胞クローンの作製において発生率の向上を目的に、核ドナーの細胞周期同期化処理を行い、ウサギ核移植後の胚発生に及ぼす影響を調べた。細胞周期同期化の影響を調べる為、対数増殖期、コンフルエント、血清飢餓培養を用いた。それぞれ胚盤胞期胚への発生率は3% (2/68)、2% (1/51) 12% (5/40) であり血清飢餓培養が最も有効であった。また発生速度を調べた結果、血清飢餓培養が他の区と比較して発生段階の速い胚が多く、脱出胚盤胞が観察された。以上の事より、血清飢餓培養により細胞周期をG0期にした細胞を核ドナーに用いることによってウサギ核移植胚の発生率の向上に有効であると示された。

諸 論

体細胞核移植は個体作出や胚性幹細胞 (embryonic stem cell:ES 細胞) の樹立などへの利用を目的として研究されており、1997 年に Wilmut らにより、哺乳類で初めて体細胞クローンの作出に成功した。その方法は血清飢餓培養により細胞周期を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により、体細胞からでも産仔が得られることがわかった。以来、マウス (Wakayama et al.1998)、ウシ (Kato et al.1998)、ウサギ (Shangang et al.2006) においても成功例が報告されている。これらの報告では核ドナー細胞の細胞周期をG0期、G1期に同期化することにより胚発生率が向上し、個体への発生率も向上することが報告されている。

本実験では、ウサギの体細胞核移植胚の発生能を改善するため、これまで報告されている、血清飢餓培養 (Shangang et al.2006) に加え、コンフルエント処理及び対数増殖期の細胞を用いてウサギ体細胞核移植胚の発生能を比較した。

材料と方法

細胞の樹立

ウサギから耳介を採取し、体毛を除去しPBS (-) で洗浄し、細切した。この組織片を細胞培養用ディッシュ上に静置し、カバーガラスをのせ10%FBS添加したDMEMを用いて、37℃、5% CO₂に設定したインキュベーター内で培養した。

ドナー細胞の準備

樹立した細胞を、対数増殖期、コンフルエント、血清飢餓培養で用いた。¹⁾ 対数増殖期は約5割コンフルエント状態で用いた。²⁾ コンフルエントはコンフルエント状態からさらに3日間培養した。³⁾ 血清飢餓培養は、培養液を0.5%FBS添加DMEMに変更し、血清飢餓状態で5日間培養した。

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

未受精卵の回収

NZW 種成熟雌ウサギに血清性性腺刺激ホルモン (PMSG) を 80IU 筋肉注射して 72 時間後にヒト胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG) を 60IU、耳の静脈に注射した。hCG の投与から 14 時間後にソムノペンチルを約 3ml 耳の静脈に注射し、屠殺後開腹し M2+0.3%BSA (以後 M2) で子宮側から卵管を灌流し、COC (cumulus-oocyte-complex; 卵子卵丘細胞複合体) を回収した。COC はヒアルロニターゼに約 1 分間暴露し、M2 の中でパストールを用いてピペッティングすることにより裸化し、洗浄オイルで覆った CMRL+20%FBS (以後 CMRL) の 50 μ l スポットに入れ、実験を供するまで 37℃、5% CO₂ に設定されたインキュベーター内で培養した。

未受精卵の除核およびドナー細胞の注入

前処理として 7.5 μ g/ml サイトカラシン B と 10 μ g/ml ヘキスト 33342 を含む 10 μ l の M2 スポットに M II 期末未受精卵子を入れた状態で 10 分間静置した。卵子を固定し、ピエゾを用いて透明帯を貫通し、中期染色体と極体を吸引した。ピペットをゆっくりと引き抜き、蛍光下で染色体の除去を確認した。細胞をトリプシン・EDTA でディッシュから浮遊させ、DMEM+10% で洗浄後、M2 スポット中でドナー細胞を除核の際に空けた透明帯の穴からレシピエント卵子の囲卵腔内に 1 個ずつ注入した。細胞融合を行うまで CMRL のスポットに入れ、37℃、5% CO₂ に設定されたインキュベーター内で培養した。

細胞融合と活性化

細胞融合には電気融合法を用いた。マンニトール緩衝液スポット中で電極を用いて卵細胞質と囲卵腔内に注入した細胞を平行になるように挟み、細胞融合装置 (LF-101: ネッパジーン) を用いて電解強度を 2.5kV/cm、直流派の間隔を 30 μ sec、直流派回数 2 回の条件下で細胞融合を行い、再構築胚を作製した。電気融合後は CMRL で 37℃、5% CO₂ に設定されたインキュベーター内で最初の活性化まで 30 分間培養した。

再構築胚の活性化には電気穿孔法を用いた。細胞融合装置、チャンバーを用いて、電解強度を 2.5kV/cm、直流派の間隔を 30 μ sec、直流派回数 2 回を 30 分間隔で計 2 回行った。電気刺激の間は CMRL 培地で培養し、電気刺激後は 6-DMAP 入れた CMRL 培地に移し、37℃、5% CO₂ に設定されたインキュベーター内で 2 時間暴露した。2 時間後 CMRL で十分に洗浄し CMRL 培地へ移し、38℃、5O₂、5% CO₂ に設定されたインキュベーター内で培養し、24 時間ごとに観察した。

結 果

表 1 は核ドナー細胞の細胞周期同期化処理が核移植胚の発生に及ぼした結果を示した。対数増殖期における卵割胚数 (%)、4 細胞期胚数 (%)、8 細胞期胚数 (%) および胚盤胞期胚数は 51% (35/68)、12% (8/68)、6% (4/68)、3% (2/68) であった。血清飢餓培養では 63% (25/40)、28% (11/40)、15% (6/40)、12% (5/40) であった。コンフルエントでは 53% (27/51)、8% (4/51)、2% (1/51)、2% (1/51) であった。卵割胚数およびその後の胚発生においても血清飢餓培養によって細胞周期同期化処理をおこなった細胞を核ドナーに用いた区が良かった。

表 1 核ドナー細胞の細胞周期同期化処理がウサギ体細胞核移植胚の発生に及ぼす影響

同期化 処理	供試 卵子数	融合胚数 (%)*	卵割胚数 (%)**	4細胞期 胚数(%)**	8細胞期 胚数(%)**	胚盤胞期 胚数(%)**
対数増殖期	79	68(86)	35(51)	8(12)	4(6)	2(3)
血清飢餓培養	52	40(77)	25(63)	11(28)	6(15)	5(12)
コンフルエント	56	51(91)	27(53)	4(8)	1(2)	1(2)

*(%)=供試卵子数








(n=5)

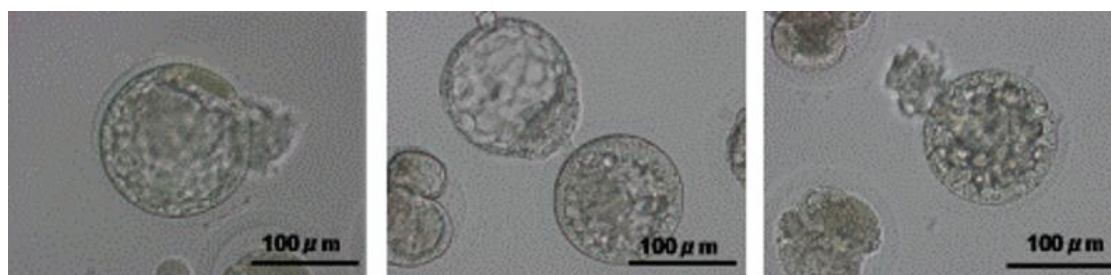
**(%)=融合胚数

表 2 は再構築胚の発生速度への影響を示した。核実験区において培養 24 時間では 2 細胞期と 4 細胞期まで発生している胚の割合、72 時間では初期桑実胚期と後期桑実胚期まで発生している胚の割合、120 時間では初期胚盤胞期、拡張胚盤胞期、脱出胚盤胞期まで発生している胚の割合を表した。

培養 24 時間、72 時間、120 時間すべてにおいて、対数増殖期区、コンフルエント区よりも血清飢餓培養区のほうが発生速度の速い胚が多く、血清飢餓培養区以外では脱出胚盤胞期胚は観察されなかった(図 1)。

表 2 核ドナー細胞の細胞周期同期化処理がウサギ体細胞核移植胚の発生速度へ及ぼす影響

培養時間	24 時間		72 時間		120 時間		
発生段階							
	2 細胞期	4 細胞期	初期桑実期	後期桑実期	初期胚盤胞	拡張胚盤胞期	脱出胚盤胞期
対数増殖期	81%	19%	100%	0%	100%	0%	0%
血清飢餓培養	32%	68%	40%	60%	40%	0%	60%
コンフルエント	70%	30%	100%	0%	0%	100%	0%



a) 対数増殖期

b) 血清飢餓培養

c) コンフルエント

図 1 培養 120 時間で観察された胚盤胞期胚

考 察

ドリー誕生後、体細胞核移植において核ドナーとなる細胞の細胞周期を G0/G1 期に同期化することが体細胞核移植胚の発生に有効であることが明らかとなった。血清飢餓培養は、細胞を不活発な G0 期に細胞を誘導する効果的な方法であり、他の方法として、コンフルエント状態で細胞を培養することにより細胞を誘導する方法がある。

しかし、同様に G0 期に同期化をしたが血清飢餓培養が他と比較して高い発生能を示した。また発生速度においても、血清飢餓が速い発生を示しており、唯一脱出胚盤胞まで観察され、これは受精卵と同等の発生速度であることよりウサギ体細胞核移植において、血清飢餓培養が有効であると考えられた。

また発生速度を観察した結果、ウサギ体細胞核移植では培養 24 時間において 4 細胞期胚まで発生していることがその後の胚発生に重要であると考えられた。

参 考 文 献

- 1 . Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ & Campbell KH 1997 Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385 810-813.
- 2 . Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR & Yanagimachi R 1998 Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394 369-374.
- 3 . Wakayama T, Yanagimachi R 1998 Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nat Genet* 22 127-8
- Li S, Chen X, Fang Z, Shi J, Sheng HZ 2006 Rabbits generated from fibroblasts through nuclear transfer. *Reproduction* 131 1085-90.
- 4 . Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol* 20 366-369.
- 5 . Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282 2095-2098.

英文要旨

Effect of cell cycle synchronization in rabbit somatic cell nuclear transfer

Noriyoshi Oh¹, Takayuki Yamochi², Yuta Kida¹, Miho Nakano², Satoshi Kishigami^{1, 2},
Kazuya Matsumoto^{1, 2}, Kazuhiro Saeki^{1, 2}, Akira Iritani^{1, 2} and Yoshihiko Hosoi^{1, 2}

Somatic cell nuclear transfer has a low success rate, due to a high incidence of fetal loss and increased perinatal morbidity/mortality. In previous reports, cell cycle synchronization of donor cells at G0/G1 phase has been demonstrated to affect successful embryonic development and the production of cloned offspring in various species. In this study, to examine the best donor cell synchronization method for rabbit SCNT, we compared exponentially growing cells, confluent cells, and serum-starved cells for nuclear donors. As a result, the developmental capacity of the embryos reconstructed with three types of cells, the embryos reconstructed with serum-starved cells showed higher rate of development than the embryos reconstructed with exponentially growing cells or confluent cells at the blastocyst development (12% vs, 3%, 2%) . Additionally, embryos reconstructed with serum starved cells developed faster than embryos reconstructed with other cells. These results demonstrate that cell cycle synchronization by serum starvation is an effective method for rabbit SCNT.

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

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