

ウサギ体細胞核移植における電気融合法の効果

木田雄大¹、矢持隆之²、歐則克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

本実験では、核移植胚を作成する際の核移植法として主に用いられている注入法と電気融合法の二つの方法をウサギ体細胞核移植における核の移植法として用いて、どちらがウサギ体細胞核移植において有用であるかを検討した。その結果、注入法による核移植胚の卵割率、8細胞期胚および胚盤胞期胚への発生率は、66% (19/38)、31% (9/38)、3% (10/38)、電気融合法では、96% (26/27)、89% (24/27)、63% (17/27) で、電気融合法による核移植の方が注入法よりも胚盤胞期への発生率が有意に高かった ($P < 0.05$)。また、胚の発生速度を比較したところ、電気融合法で得た胚の方が注入法で得た胚よりも発生速度が速くなることが示された。さらに、得られた胚盤胞期胚の細胞数をカウントしたが、有意な差は見られなかった。

以上の結果より、ウサギ体細胞核移植胚の着床前発生において電気融合法の方が注入法よりも有用であることが示された。

緒 言

1997年、Wilmutらによって哺乳類初のヒツジの体細胞クローン誕の報告¹がされ、分化の進んだ体細胞でもクローン産子が得られることが示された。翌年にはウシ²、マウス³においても体細胞クローン産子の誕生が報告され、その後もヤギ⁴、ウマ⁵、ブタ⁶、ネコ⁷、ラット⁸、イヌ⁹など相次いで体細胞クローンの成功が報告された。

ウサギにおいては2002年になってはじめて体細胞クローン産子作出¹⁰の報告がなされた。その後も繊維芽細胞をドナーとして用いたウサギ体細胞クローン産子作出¹¹や遺伝子改変されたウサギ繊維芽細胞からのウサギ体細胞クローン産子作出¹²などが報告された。しかしその産子作出効率は未だ低率であるため、効率よく体細胞クローン固体を得るには核移植法の改善が必要であると考えられる。

そこで本実験では、核移植胚を作成する際の核移植法として主に用いられている注入法と電気融合法の二つの方法を核の移植法として用いて、どちらがウサギ体細胞核移植において有用であるかを検討した。

材料と方法

卵子の回収

NZW種成熟雌ウサギに過剰排卵処理として、妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) 80単位を筋肉注射し、72時間後にヒト絨毛性腺刺激ホルモン (hCG) 60単位を耳の静脈に注射した。hCGの投与から

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

14 時間後に安楽死させ、卵管灌流法により卵子卵丘細胞複合体を回収、0.1% ヒアルロニターゼに約 1 分間暴露し、M2+0.3%BSA (以後 M2) 中でピペッティングすることで卵丘細胞を除去した。裸化した卵子は CMRL+20%FBS (以後 CMRL)、37°C、5% CO₂ に設定されたインキュベーター内で使用時まで保存した。

ドナー細胞の準備

卵子を裸化した際に得られた卵丘細胞をドナー細胞として用いた。顕微操作用のチャンバー上の 10%PVP ドロップに卵丘細胞を懸濁して使用した。

卵子の除核

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 M2 に卵子を入れ、10 分間静置した。マニピュレーターを用いて、染色体が 3 時の方向になるよう卵子をホールディングピペットで固定しピエゾで透明帯を破り、染色体と少量の卵子細胞質及び極体を吸引することで除核した。除核の成功はヘキスト染色された染色体の蛍光で確認した。除核した卵子は、細胞を注入するまで CMRL のスポットに入れ、37°C、5% CO₂ に設定されたインキュベーター内で保存した。

再構築胚の作成

(1) 注入法

ピエゾマイクロマニピュレーターを用いて、除核した卵子細胞質内にドナー細胞を 1 細胞ずつ注入した。再構築胚は、活性化処理するまで CMRL のスポットに入れ、37°C、5% CO₂ に設定されたインキュベーター内で保存した。

(2) 電気融合法

除核した卵子細胞質の囲卵腔内にドナー細胞を 1 細胞ずつ注入後、マンニトールに導入し、マニピュレーターにセットした融合用電極を用いて細胞融合装置〔ネッパジーン、LF-101〕により、ドナー細胞と卵子細胞質を融合した (DC 2.5kV/cm、30 μ sec \times 2)。

再構築胚は、活性化処理するまで CMRL のスポットに入れ、37°C、5% CO₂ に設定されたインキュベーター内で保存した。

再構築胚の活性化処理

細胞融合装置〔島津製作所、SSH-10〕、チャンバー〔島津製作所、FTC-22S〕を用いて、電気活性を 30 分間隔で 3 回行った (DC 2.5kV/cm、30 μ sec \times 2)。電気刺激時の融合用緩衝液にはマンニトールを用いた。電気刺激の間は、CMRL で 37°C、5% CO₂ に設定されたインキュベーター内で保存した。電気刺激後、CMRL +2mM 6-DMAP、37°C、5% CO₂ に設定されたインキュベーター内で 2 時間培養した。その後、CMRL で胚を十分に洗浄し、CMRL、38.5°C、5%O₂、5%CO₂、90%N₂ 下で培養した。胚発生の観察は電気融合を 0 時間として、24 時間毎に 120 時間まで倒立顕微鏡を用いて行った。

胚盤胞期胚の細胞数の計測

観察 120 時間の時点で胚盤胞期胚まで発生した胚をヘキスト 33342 により染色し、実体顕微鏡下でスライドガラス上に少量のメディウムと共に移動し、ベクターシールドで封入した。その後、倒立顕微鏡蛍光下で細胞数を計測した。

結 果

注入法と電気融合法によるウサギ体細胞核移植胚の発生の比較を表1に示した。注入法による核移植胚の卵割率、8細胞期胚および胚盤胞期胚への発生率は、66% (19/38)、31% (9/38)、3% (10/38)、電気融合法では、96% (26/27)、89% (24/27)、63% (17/27)であり、電気融合法による核移植の方が注入法よりも胚盤胞期胚への発生率が有意に高かった。(P<0.05)

表1 注入法と電気融合法によるウサギ体細胞核移植胚の発生の比較

核移植法	供試卵子数	前核形成胚数 (%)*	卵割胚数 (%)**	8細胞期胚数 (%)**	胚盤胞期胚数 (%)**
電気融合法	27	27(100)	26(96)	24(89)	17(63)a
注入法	38	29(76)	19(66)	9(31)	3(10)b

*(%)=供試卵子数







(n=3)






**(%)=前核形成胚数

a, b=a, b間に有意差あり(P<0.05) [Tukey Kramer 検定]

注入法と電気融合法によるウサギ体細胞核移植胚の発生の速度の比較を表2に示した。電気融合によって核移植をした方が、注入法よりも発生速度が速くなる事が示された。

表2 注入法と電気融合法によるウサギ体細胞核移植胚の発生の速度の比較

培養時間	24時間		48時間		7時間	
発生段階						
	2細胞期	4細胞期	8細胞期	初期桑実期	初期桑実期	後期桑実期
電気融合法	4%	96%	11%	89%	12%	88%
注入法	42%	58%	100%	0%	100%	0%

培養時間	96時間		120時間		
発生段階					
	後期桑実期	初期胚盤胞期胚	初期胚盤胞期胚	拡張胚盤胞期胚	脱出胚盤胞期胚
電気融合法	59%	41%	6%	6%	88%
注入法	100%	0%	0%	100%	0%

活性化開始時間を0時間とする

注入法と電気融合法によるウサギ体細胞核移植胚の胚盤胞期における細胞数の比較を表3に示した。注入法による胚盤胞期胚の細胞数は 149 ± 43 、電気融合法による胚盤胞期胚の細胞数は 374 ± 229 であり、有意差は見られなかった。

表3 注入法と電気融合法によるウサギ体細胞核移植胚の胚盤胞期における細胞数の比較

核移植法	供試胚盤胞期胚数	細胞数 ±S.D
電気融合法	15	374 ± 229
注入法	3	149 ± 43

考 察

ウサギ体細胞核移植における核の移植法として、注入法と電気融合法の二つの方法を行い、その後の発生にどのように影響するかを観察し比較した結果、ウサギにおいて電気融合法の方が注入法よりも胚盤胞期胚への発生率が向上することが示された。また、二つの方法で得られた胚の発生速度を比較したところ、電気融合法の方が注入法よりも発生速度が速くなる傾向が示された。さらに、得られた胚盤胞期胚の細胞数を計測した結果、有意な差は見られなかったが平均細胞数に2倍以上の差が観察された。

これらのことから、ウサギ体細胞核移植胚の作出において、電気融合法による核注入は注入法よりも有用であると考えられた。また、胚の発生速度が電気融合法のほうが受精卵のものに近い場合、胚移植した場合に注入法よりも着床率が高くなる可能性が考えられる。さらに、注入法は高度な技術が要求されるため、比較的操作が容易である電気融合法の方が核移植の技術が安定しやすいと考えられる。

参 考 文 献

1. I. Wilmut, N. Beaujean, P.A. de Sousa, A. Dinnyes, T.J. King, L.A. Paterson, D.N. Wells, L.E. Young, Somatic cell nuclear transfer, *Nature* 419 (2002) 583-586.
2. Y. Kato, T. Tani, Y. Sotomaru, K. Kurokawa, J.Y. Kato, H. Doguchi, H. Yasue, Y. Tsunoda, Eight calves cloned from somatic cells of a single adult, *Science* 282 (1998) 2095-2098.
3. T. Wakayama, A.C.F. Perry, M. Zuccotti, K.R. Johnson, R. Yanagimachi, Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei, *Nature* 394 (1998) 369-374.
4. A. Baguisi, E. Behboodi, D.T. Melican, J.S. Pollock, M.M. Destrempe, C. Cammuso, J.L. Williams, S.D. Nims, C.A. Porter, P. Midura, M.J. Palacios, S.L. Ayres, R.S. Denniston, M.L. Hayes, C.A. Ziomek, H.M. Meade, R.A. Godke, W.G. Gavin, E.W. Overstrom, Y. Echelard, Production of goats by somatic cell nuclear transfer, *Nature Biotechnology* 17 (1999) 456-461.
5. C. Galli, I. Lagutina, G. Crotti, S. Colleoni, P. Turini, N. Ponderato, R. Duchi, G. Lazzari, A cloned horse born to its dam twin (vol 424, pg 635, 2003), *Nature* 425 (2003) 680-680.

-
- 6 . I.A. Polejaeva, S.H. Chen, T.D. Vaught, R.L. Page, J. Mullins, S. Ball, Y.F. Dai, J. Boone, S. Walker, D.L. Ayares, A. Colman, K.H.S. Campbell, Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells, *Nature* 407 (2000) 86-90.
 - 7 . T. Shin, D. Kraemer, J. Pryor, L. Liu, J. Rugila, L. Howe, S. Buck, K. Murphy, L. Lyons, M. Westhusin, A cat cloned by nuclear transplantation, *Nature* 415 (2002) 859-859.
 - 8 . Q. Zhou, J.P. Renard, G. Le Friec, V. Brochard, N. Beaujean, Y. Cherifi, A. Fraichard, J. Cozzi, Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation, *Science* 302 (2003) 1179-1179.
 - 9 . S.G. Hong, G. Jang, M.K. Kim, H.J. Oh, J.E. Park, J.T. Kang, O.J. Koo, D.Y. Kim, B.C. Lee, Dogs cloned from fetal fibroblasts by nuclear transfer, *Animal Reproduction Science* 115 (2009) 334-339.
 10. P. Chesne, P.G. Adenot, C. Viglietta, M. Baratte, L. Boulanger, J.P. Renard, Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells, *Nature Biotechnology* 20 (2002) 366-369.
 11. S.G. Li, X.J. Chen, J.J. Shi, Y. Guo, C.G. Yin, L.X. Du, H.Z. Sheng, Cloning rabbits from fetal fibroblasts, *Livestock Science* 122 (2009) 77-80.
 12. S.G. Li, Y. Guo, J.J. Shi, C.G. Yin, F.Y. Xing, L.Y. Xu, C.S. Zhang, T. Liu, Y. Li, H.B. Li, L.X. Du, X.J. Chen, Transgene expression of enhanced green fluorescent protein in cloned rabbits generated from in vitro-transfected adult fibroblasts, *Transgenic Research* 18 (2009) 227-235.

英文要旨

The effect of electrical fusion method in rabbit somatic cell nuclear transfer

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

We examined which method is more useful for rabbit somatic cell nuclear transfer; electrical cell fusion method or injection method. As a result, the development rate of cleavage, 8cell and blastocyst by injection method was 66% (19/38), 31% (9/38), and 3% (10/38) respectively. The development rate of cleavage, 8cell and blastocyst by fusion method was 96% (26/27), 89% (24/27) and 63% (17/27) respectively. These data suggest that the developmental rate reaching the blastocyst stage of the electrically fused embryos was significantly higher than that of injected embryos ($P < 0.05$). Also, cleavage timing of the electrically fused embryos was earlier than that of injected embryos. Furthermore, we counted the number of cells of the injected and fused blastocysts. However, a significant difference was not shown. These results indicate that electrical cell fusion method is more useful for rabbit somatic cell nuclear transfer than injection method.

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 Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan