

ブタ・ラットの遺伝資源保存に関する研究

Study on conservation of germ cells for genetic resources in pigs and rats

柏崎直巳

麻布大学大学院 獣医学研究科

Naomi Kashiwazaki

Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

Abstract: The objective of the present study was to develop methods for conservation of genetic resources in pigs and rats. In pigs, a high proportion of porcine zygotes were successfully cryopreserved by solid surface vitrification at the pronuclear stage without delipitation. Full developmental competence of these zygotes to the piglet stage was preserved. We also show here for the first time successful IVF using cryopreserved rat spermatozoa. These protocols will be useful for the efficient genetic conservation in pig and rats.

ブタおよびラットは、各々家畜としてあるいは実験動物として非常に重要な動物であるにもかかわらず、その遺伝資源を効率的に保存しうるそれらの生殖系列細胞の超低温保存法の確立が不十分で、これらに関する研究は未だに限られている。

本研究では、ブタ前核期胚（受精卵）の超低温保存からの産子作出を試みた。さらにラットでは、我々の研究グループが開発したラット精子凍結保存法により超低温保存した精子から、体外受精（IVF）を介した産子作出を試みた。

ブタ前核期胚（受精卵）の超低温保存：

ブタ前核期胚（受精卵）を -196°C の液体窒素中でその代謝を完全に停止させて保存することは、ブタの遺伝資源保存や受精卵移植応用の観点から、非常に重要な技術です。そこで、体外生産系（IVP系）によって作出したブタ前核期胚を超低温保存前に遠心分離処置により、前核が2ないしは3個形成している胚を選別し、これらを固体表面ガラス化冷却（solid surface vitrification: SSV）法によってガラス化

保存した。保存後、加温胚を麻布大学で飼養する仮親へ外科的に移植した。その結果、3頭の仮親から18頭の子ブタを作出することに成功した。

この成功は、超低温保存したブタ体外成熟受精卵からの子ブタを生産させた、最初の報告例である。この成功のポイントは、1) 超低温保存法として固体表面ガラス化冷却法を採用したことと、2) 多精子受精が多い体外成熟受精卵から超低温保存前に遠心分離処置により正常な発生が見込まれる前核期胚を選別したことによるものと考えられる。これらの工夫により、超低温感作による前核期胚の損傷を軽減させ、かつ、正常に発生が見込まれる前核期胚を判別して超低温保存することにより、発生能が高い胚を多く仮親へ移植すること可能となった。

ラット凍結融解精子からIVFを介した産子作出：

ラット凍結精子からIVFによる効率的な産子作出系の開発が望まれているが、未だにその成功例はない。その一因として精子の受精能獲得が不十分であることが考えられる。受精能獲得は精子内での環状

アデノシンーリン酸 (cAMP) 濃度が上昇することでタンパク質キナーゼ A (PKA), チロシンキナーゼが活性化しタンパク質チロシンリン酸化することで起こり, マウスやウシにおいて cAMP を分解する phosphodiesterase (書略しなで記述) の阻害剤である 3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin (IBMX) で精子を処理することでタンパク質チロシンリン酸化が促進される。そこで, ラット凍結融解精子を用いた IVF 系の開発を目的に, IBMX による精子処理が受精能獲得, 体外受精率, 体外受精卵の産子への発生能に与える影響を検討した。

〈実験 I : 新鮮および凍結融解精子の体外培養による受精能獲得誘起に伴うタンパク質チロシンリン酸化の比較〉

凍結融解精子を modified Rat 1-cell Embryo Culture Medium (mR1ECM) で 5 時間前培養し, 精子の受精能獲得をウエスタンブロッティングによるタンパク質チロシンリン酸化を指標に調べ, 新鮮精子のものと比較した。その結果, 凍結融解精子は新鮮精子よりチロシンリン酸化タンパク質量が少なかった。

〈実験 II : 凍結融解精子の受精能獲得誘起時における IBMX 処理が精子内 cAMP 量, チロシンリン酸化タンパク質に与える影響〉

凍結融解精子のチロシンリン酸化タンパク質量が新鮮精子と比較し少なかったことから, 精子細胞内 cAMP 分解を抑制させる目的で 0 (無添加), 100, 200, 400 μM IBMX 添加した mR1ECM で凍結融解精子を 5 時間培養し, 凍結精子の IBMX 処理濃度を検討した。また, 200 μM IBMX 添加した mR1ECM, IBMX 無添加 mR1ECM で 5 時間培養し, 培養後の細胞内 cAMP 量を新鮮精子と比較した。その結果, 精子のチロシンリン酸化タンパク質は, IBMX 添加濃度依存的に増加し, 200 μM IBMX 添加時に最もチロシンリン酸化タンパク質が増加した。凍結融解精子を IBMX 添加 mR1ECM で培養することで, 細胞内 cAMP 量は, 新鮮精子と同等の値を示し, mR1ECM 単独で培養した時と比較し高い値を示した。

〈実験 III : 凍結融解精子への IBMX 処理が IVF における 2PN 形成, 2PN 卵の産子への発生〉

凍結融解精子を用いた IVF における至適な IBMX 添加濃度を検討するために, 100, 200, 400 μM IBMX 添加 mR1ECM で凍結融解精子を 5 時間培養した後に IVF を行い, 2PN 形成率, 胚盤胞形成率を新鮮精子および IBMX 無添培地で培養した凍結融解精子と比較した。また, 得られた 2PN 形成卵を胚移植し, 新鮮精子による IVF で得られた 2PN 卵の胚移植の成績と比較した。その結果, IBMX 添加 mR1ECM で凍結融解精子を培養し IVF を行った場合, 2PN 形成率は IBMX 無添加 mR1ECM で凍結融解精子を前培養し IVF を行った場合と比較し高い値を示した。また IBMX 添加濃度間で 2PN 形成率に差はみられなかった。胚盤胞形成率においても全ての IBMX 添加濃度で無添加と比較し高い値を示した。さらに 200 μM IBMX 添加区では新鮮精子区と比較しても胚盤胞形成率は有意差がなかった。産子率においては IBMX 添加 mR1ECM で凍結融解精子を培養し IVF により得られた 2PN 卵を移植した全てのレシピエントが妊娠出産し, 84 匹の産子が得られた。その産子率は 49 % で, 新鮮精子の IVF 卵の 58 % と比較して有意な差は認められなかった。

(まとめ)

本研究により, 1) ブタ IVP 系によって作出した前核期胚は, SSV 法による超低温保存が可能で, 産子への発生能を有することが明らかになった。2) ラット凍結融解精子の IVF を介して産子作出する場合, 凍結融解精子を IBMX 処理し, 細胞内 cAMP 量が上昇させ, タンパク質のチロシンリン酸化を促進させることで, IVF 卵の 2PN 形成率が改善し, 効率的な産子作出が可能となった。

(代表研究成果)

- 1) Somafai, T., Ozawa, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Nakai, M., Maedomari, N., Ito, J., Kashiwazaki, N., Nagai, T., Kikuchi, K. (2009) Live piglets derived from in vitro-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. *Biol. Reprod.*, 80, 42-49.
- 2) Seita, Y., Sugio, S., Ito, J., Kashiwazaki, N. Generation of live rats produced by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 80, 503-510.