

トランスジェニックブタ作出のための 発生工学技術の開発と課題

長 嶋 比呂志

明治大学農学部生命科学科

Transgenic pig の作出が研究段階から実用段階に移行するに伴い、より効率的なブタの発生工学技術の開発への要求が高まっている。DNA 前核注入法は多年に渡り、最も信頼できる transgenic pig の作出法であったが、その効率の低さは transgenic pig の実用的応用を進める上で大きな障害であった。Sperm mediated gene transfer や核移植のような新規技術によって、transgenic pig 生産は一層効率化されるものと期待される。しかし、これらの先端技術は、まだ完成の域に達しているとは言えないし、また、過排卵処理、卵の体外成熟、胚の体外培養、凍結保存、胚移植などの基盤技術が確立・整備されて始めて、その能力を十分に発揮することができる。本稿では、transgenic pig の効率的生産に必要な、種々の発生工学技術の現状と課題さらに展望を概説する。

1. DNA 前核注入法の限界

前核注入法は、トランスジェニックマウスの作出にルーチンに用いられる方法である。過排卵処理した雌からの受精卵（前核期胚）の採取、胚の前核へのDNAのマイクロインジェクション、DNA注入胚のレシピエント雌への移植という過程は、transgenic pig 作出においても同じである。

この方法の問題点は、実験材料として多数の前核期胚を要することである。1頭のtransgenic pigを得るために、どれだけの胚にDNA injectionを行えば良いのかということは、一概には言えない。導入する遺伝子の種類やサイズ、DNAの精製度などが、効率に大きな影響を及ぼすからである。また、導入遺伝子の産

物が胚や胎仔の発生に及ぼす影響によって、transgenic pig 生産の効率は大きく左右される。このことを前提として認識しながらも、成長ホルモン遺伝子および成長に関連する遺伝子の導入によって、どのような効率でtransgenic pigが得られたかを見れば、この技術の効率を概ね把握することができよう。DNA注入卵に対する産仔の生産効率は、約10%あるいはそれ以下である。Transgenic産仔は、産仔中の約10%あるいはそれ以下なので、DNA注入卵総数に対する生産効率は1%あるいはそれ以下となる。これが、DNA前核注入法による、transgenic pig 生産の効率である。

2. Sperm vector による transgenic pig 生産は実用的方法となり得るか

Perry *et al.* (1999)¹⁾ は、DNA と co-incubation した精子を卵細胞質内に顕微注入することで、効率よく transgenic mouse を作出できることを報じた (sperm-vector 法)。この sperm vector 法を体外成熟卵と組み合わせれば、transgenic pig の作出は飛躍的に容易になると考えられる。

ブタ卵の顕微授精による産仔の生産の成功例は既に報告されている。Martin (2000)²⁾ は *in vivo* matured oocytes に unfrozen sperm の顕微注入を行った結果、約30%が胚盤胞に発達することを認めた。さらに顕微授精卵の69個を3頭のrecipient pig に移植し、3頭の正常産仔を得た。Kolbe & Holtz (2000)³⁾ もまた、*in vivo* matured oocytes に対して unfrozen sperm の顕微授精を行い、顕微授精卵322個の移植によって1頭の

Table 1. The cloned pigs produced by out group

Donor cell		Sex	The date at birth	Body weight at birth (kg)	Recent status	Progeny (litter size)
Breed	Origin					
Meishan	Fetus	Female	July 2 2000	1.2	Alive	Yes (14)
Meishan	Oviduct	Female	Oct. 19 2000	0.6	Alive	Yes (17)
Meishan	Oviduct	Female	Feb. 10 2001	1.0	Alive	Yes (12)
Meishan	Oviduct	Female	March 11 2001	1.1	Dead (Crushed by mother)	—
Landrace	Ear	Male	Jan. 3 2002	0.6	Dead (Bitten by mother)	—
Meishan	Oviduct	Female	Apr. 8 2002	0.1	Alive	?

産仔を得ている。さらに、凍結融解精子のIVM oocytesへの顕微授精によっても産仔が得られている (Lai *et al.* 2001)⁴⁾。また、Nakai *et al.* (2003)⁵⁾ は、体外成熟卵への顕微授精で、正常産仔を得た。

一方、sperm vector によるブタ卵への外来遺伝子の持ち込みも報じられている。Triton X-100, NaOH, 凍結融解等で処理した精子を vector に用いて、ブタ卵への GFP 遺伝子の導入と、導入遺伝子の発現が確認されている。

以上の報告から、ブタにおいても ICSI で正常産仔が得られること、および sperm vector 法によるブタ卵への Foreign gene の持ち込みは可能なことが明らかである。

3. Sperm vector によるブタ体外成熟卵への GFP 遺伝子の導入

我々の研究では、凍結精子の頭部のみでの注入で最も高い発生率が得られたので、この方法をベースとして sperm vector による GFP 遺伝子の導入を行った。BF5 を用いたペレット法で凍結保存された精子を用いて、顕微授精後の胚発生と GFP 遺伝子導入効率を調べた。その結果、20%を越える胚盤胞形成率が得られた。GFPの発現は、得られた胚盤胞のうちの約半数に認められた。また、DNA carrying sperm の ICSI によって得られた胚盤胞形成率は、DNA の付着していない精子を注入した際のそれに匹敵するものであった。

以上のことから、凍結精子を用いた sperm vector 法によって、ブタ IVM 卵への外来遺伝子の導入と導入遺伝子の発現が可能なことが示された。また DNA

carrying sperm による ICSI によって胚の発生率が低下するという現象が見られなかったことは、sperm vector 法による transgenic pig 作出に期待を持たせる。

4. 核移植による transgenic pig の生産：ユニークな donor cell の探索

これまでに clone pig の作出に使われて来た核ドナー細胞の種類は、胎仔繊維芽細胞とその他の数種に限られる。genetic modification を効率よく行うことが可能で、かつ、初期化を受けやすいドナー細胞の種類を特定すること、あるいは、そのような細胞を樹立することは、非常に重要な課題である。我々は胎仔繊維芽細胞やその他の組織由来の体細胞に加えて、成体幹細胞や putative embryonic stem cell に興味を持ち、それらを核移植に用いている。

我々は前駆脂肪細胞を成体ブタの皮下脂肪組織より分離し、核移植に用いている。前駆脂肪細胞は、他の生体組織由来の細胞と同様に、通常の培養条件で増殖可能である。この細胞を血清飢餓、接触阻害、化学的処理、および分化誘導によって細胞周期を同調し、各同調処理の効率を比較すると共に、それぞれの処理が細胞にどのような影響を及ぼすかを調べた。前駆脂肪細胞は、他の体細胞と異なり、分化誘導による細胞周期の同調が可能な点が特徴的である。また、分化を誘導された細胞はすみやかにGO期に入り、同調の効率も他の方法に比べて高い。血清飢餓は、細胞のアポトーシスを誘起しやすいと言われているが、分化誘導によって細胞周期同調された細胞では、アポトーシスの出現頻度は低かった。近年、種々の成体幹細胞が発見されているが、それらの核移植における

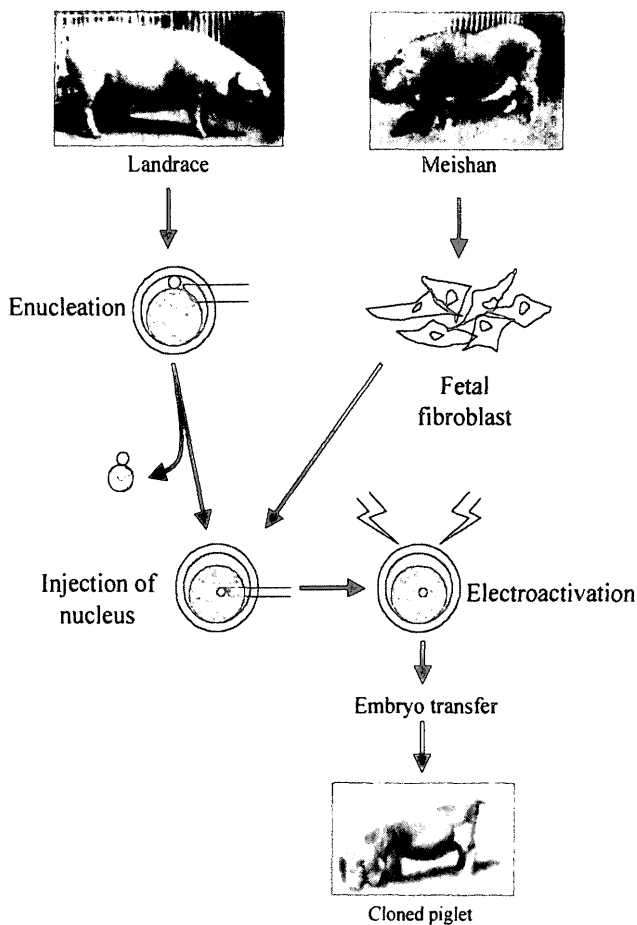


Fig. 1 Procedure for pig cloning

応用性は注目に値するであろう。

我々はまた、putative porcine ES の核移植も進めている。この putative porcine ES cell と非常に特徴が類似した bovine ES は、神経細胞を始めとする種々の細胞への *in vitro* での分化能を持つ。さらに、その細胞の核移植によって正常な子ウシが得られることが証明されている。Putative porcine ES cell は非常に増殖性に優れているので、genetic modification を行うためにも有利であろう。

5. Clone pig 作出の労力的コストを下げる試み

これまでの殆どの報告では、非常に多数の核移植胚を1頭のレシピエントに移植して、1頭ないし数頭の clone pig が得られる程度の効率である。体外成熟

卵を用いて再構築した核移植卵 200 個以上を、1頭のレシピエントに移植したケースも珍しくない。

核移植胚を移植の前に、*in vivo* あるいは *in vitro* である程度発生させておくというステップを置くことは、大きな副次的効果を生み出す可能性がある。つまり、核移植胚を初期分割期以後にまで発達させることによって、それらを凍結保存することが現実的になってくる。ブタ胚の凍結保存は、既に実用的レベルに近い技術であるが、胚の凍結後の生存性は、桑実期以降の方が圧倒的に高い。核移植胚を凍結保存することが出来れば、1頭のレシピエントの移植に多数の胚を要するとしても、その必要数を徐々に集めることもできよう。また、良好に達した桑実胚あるいは胚盤胞であれば、わずか10個程度の移植で1頭の clone pig を得られる可能性さえ示唆される (Onishi *et al.* 2002)⁶⁾。そのような発達能の高い、凍結 clone 胚の生産が実現すれば、その価値は非常に大きいであろう。加えて、clone 胚の生産には IVM 卵を用いるのが主流になりつつある最近の状況がある。

以上のことから、我々は体外生産 (IVP) ブタ胚の凍結保存を可能にする研究に取り組んでいる。IVP 胚のモデルとして、IVM 卵由来の単為発生胚を用いてガラス化保存を行い、非常に有望な成績を得ている。活性化後6日目の単為発生胚盤胞を minimum volume cooling method によってガラス化した結果、約40%の生存率が得られた。IVP 胚の凍結保存において、拡張胚盤胞は耐凍性の高い stage であることが知られている。その知見に基づき、耐凍性の高い stage を選択的に用いれば、IVP 胚の凍結保存も可能であることが示された。さらに、ブタ胚の耐凍性は細胞質内脂肪顆粒の除去 (delipation) によって飛躍的に向上することが知られているが、これを IVP 胚に応用し、加えて MVC 法でガラス化することによって、一層高い生存性が得られる。活性化4日後の IVP 単為発生桑実胚を delipate し、その後胚盤胞期にまで発達させた後にガラス化することで、高い生存性が得られた。Delipation による胚自体の耐凍性の向上、胚盤胞期の胚の耐凍性の高さ、そして MVC 法の効果が相乗的に働き、IVP 胚の効率的な凍結保存が実現したと解釈される。この成果をもとに、核移植胚の凍結保存にも取り組んでいる。

文 献

- 1) Perry ACF, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 284: 1180-1183.
- 2) Martin MJ. 2000. Development of in vivo-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 63: 109-112.
- 3) Kolbe T, Holtz W. 2000. Birth of a piglets derived from an oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Anim Reprod Sci* 64: 97-101.
- 4) Lai L, Sun Q-Y, Wu G, Murphy CN, Kuhholzer B, Park K-W, Bonk AJ, Day BN, Prather RS. 2001. Development of porcine embryos and offspring after intracytoplasmic sperm injection with liposome transfected or non-transfected sperm into in vitro matured oocytes. *Zygote* 8: 339-346, .
- 5) Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Hayashi Y, Nakatsukasa E, Fuchimoto D, Noguchi J, Kaneko H, Shino M, Kikuchi K. 2003. Viable piglets generated from porcine oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm head injection. *Biol Reprod* 68: 1003-1008.
- 6) Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AFC. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289: 1188-1190.