

## 第6回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

## ラットの顕微授精について

平林 真澄

岡崎国立共同研究機構 生理学研究所

ラットにおいて、一連の生殖工学関連技術（過剰排卵誘起，胚採取，胚移植，胚の凍結保存，体外受精，外来遺伝子導入など）の完成度はマウスと同じぐらい高いレベルにある。しかしラットでは最近まで顕微授精の成功例がなく，これはラットの未受精卵子は体外に取り出すと自発的に活性化を始めるという特異性に加え，ラットの精子が大きく，かつ頭部の形状が極端に曲がった釣り針状を呈していることに関係していた。ここでは，卵細胞質内精子注入法（ICSI; intracytoplasmic sperm injection），伸張精子細胞注入法（ELSI; elongating spermatid injection），円形精子細胞注入法（ROSI; round spermatid injection）について，技術の実際と応用の事例を紹介する。

## 顕微授精技術の実際

ICSIでは，準備する注入用ピペットは先端の外径が2～4  $\mu\text{m}$ のもので，精子頭部のハンドリングを容易にするためにややテーパをつけておく必要がある。精子の尾部は超音波処理，またはPiezoパルスによって切断しておく。精子頭部をピペットの先端に引っかけるように吸引し，一旦ピペット外部へ吐き出してから透明帯に穴を開ける。そして再び精子頭部をピペット先端に引っかけて卵細胞膜に押し当て，Piezoパルスで細胞膜を破ると同時に精子頭部を吐き出し，素早くピペットを引き抜く。この方法で82%の注入卵子生存率と19%の産仔率が得られている。

ELSIでは，注入用ピペットの外径は5～7  $\mu\text{m}$ とICSIで用いるものよりもやや太く，精子形成9～11ステージにある伸張精子細胞を2～3回，吸ったり吐いたりすることで細胞膜を破っておく。細胞核を注入ピペットの先端からやや離れた部位に置き，Piezo

パルスをかけて透明帯に穴を開ける。卵細胞膜にピペットを押し当てながらPiezoパルスを与え，膜を貫通させる。そして静かに細胞核を卵細胞質内に注入し，慎重にピペットを引き抜く。この方法で83%の注入卵子生存率と13%の産仔率が得られている。

ROSIの手法は基本的には上述のELSIのそれと同じだが，齧歯類の円形精子細胞は卵子活性化因子をまったく，あるいはわずかしかなかったため，顕微注入操作に先立って卵子に直流パルスおよび6-ジメチルアミノプリンによる活性化処理を施しておく必要がある。この方法で78%の注入卵子生存率と15%の産仔率が得られている。

## 顕微授精技術の応用

不妊ラット系統の救済：実験動物学領域では，ヒトの遺伝疾患に酷似している自然発症のモデル動物は原因遺伝子の組み合わせによって繁殖力に問題が生じたり，実験的に作出したトランスジェニック動物が外来遺伝子の精巢上での発現によって不妊になる，という例が少なくない。外来遺伝子（A）の場合，老化によって不妊になったトランスジェニック系統をICSIによって継代することが可能であった。しかし外来遺伝子（B）の場合，トランスジェニックラット精子は運動性をもたず，精子頭部の先体領域も欠落していた重篤な不妊症例であった。そのためICSI手法を適用できなかったが，ROSIによって産仔獲得に成功した（表1）。

外来遺伝子の導入：外来遺伝子を導入したトランスジェニック動物を作製するには，前核期卵の雄性前核に遺伝子溶液を顕微注入する方法がもっとも一般的で，かつ再現性の高い方法である。これに代わ

るものとして精子を外来遺伝子のベクターとして利用する方法が考え出され、マウスではICSIを介した方法によって外来遺伝子をうまくゲノム上に導入できると証明された。そこでEGFP遺伝子をモデル遺伝子としてラット精子頭部あるいは伸張精子細胞に付着させ、顕微授精によって作製した産仔ラットにおける外来遺伝子の導入効率を調べた。その結果、顕微授精 (ICSI, ELSI) を介したトランスジェニックラットの作製効率は常法の前核への顕微注入法と比較しても遜色ないか、あるいはそれ以上であることがわかった (表2)。

#### まとめ

ラットの顕微授精において、注入する雄性生殖細胞として精子・伸張精子細胞・円形精子細胞のい

れを用いるとしても、そのそれぞれに長所・短所がある (表3)。円形精子細胞は耐凍性が低く、その核タンパクがプロタミンではなくヒストンであることから安定性も乏しいことに加え、注入する卵子には活性化処理を施す必要がある。伸張精子細胞になると卵子活性化能を持つようになるが、調製可能な細胞の絶対数が少ない。一方、サイズが大きく釣り針状の精子 (頭部) の顕微注入にはかなり高度なテクニックが要求される。マウスではICSIする際に太めのピペットを用いて注入しても卵子の生存性に問題はなく、この点がラットとは大きく異なっている。マウスと同様にラットにおいても、顕微授精技術は不妊系統を救済する手段として利用できるばかりでなく、外来遺伝子を導入したトランスジェニック動物を作製することにも適用できる。

表1 顕微授精による不妊トランスジェニックラット系統の継代

外来遺伝子	顕微授精法	注入	生存	移植	Tg	
		卵数	卵数	胚数	産仔数	産仔数
A	ICSI	398	333 (84%)	328	102 (31%)	39 (12%)
B	ICSI	353	271 (77%)	218	0 (0%)	---
	ROSI	263	244 (93%)	219	3 (1%)	2 (1%)

表2 顕微授精技術を利用したEGFPトランスジェニックラットの作製

顕微授精法	注入卵数	生存卵数	移植胚数	産仔数	Tg産仔数
ICSI	612	469 (77%)	426	71 (17%)	9 (2%)
ELSI	615	541 (88%)	511	45 (9%)	6 (1%)
前核注入	466	416 (89%)	350	104 (30%)	3 (1%)

表3 顕微授精に用いるラット半数体雄性生殖細胞の特性

	精子	伸張精子細胞	円形精子細胞
精巢内生殖細胞の相対的比率	29%	15%	30%
卵子活性化因子的存在	++	+	-/±
核タンパク質の安定性	高い	高い	低い
凍結融解後の細胞膜正常性	94%	93%	44%
注入ピペットの至適サイズ	2-4 μm	5-7 μm	5-7 μm
要求される顕微注入技術	高度	中程度	中程度

## 文献

- Dozortsev, D., Wakayama, T., Ermilov, A. and Yanagimachi, R. (1998): Intracytoplasmic sperm injection in the rat. *Zygote*, 6, 143-147.
- Hirabayashi, M., Kato, M., Aoto, T., Sekimoto, A., Ueda, M., Miyoshi, I., Kasai, N. and Hochi, S. (2002): Offspring derived from intracytoplasmic injection of transgenic rat sperm. *Transgenic Res.*, 11, 221-228.
- Hirabayashi, M., Kato, M., Aoto, T., Ueda, M. and Hochi, S. (2002): Rescue of infertile transgenic rat lines by intracytoplasmic injection of cryopreserved round spermatids. *Mol. Reprod. Dev.*, 62, 295-299.
- Kato, M., Ishikawa, A., Hochi, S. and Hirabayashi, M. (2004): Effect of activation regimens for rat oocytes on full-term development following round spermatid injection. *Contem. Top. Lab. Anim. Sci.*, 54, In press.
- Kato, M., Ishikawa, A., Kaneko, R., Yagi, T., Hochi, S. and Hirabayashi, M. (2004): Production of transgenic rats by ooplasmic injection of spermatogenic cells exposed to exogenous DNA: A preliminary study. *Mol. Reprod. Dev.*, 67, In press.
- Kimura, Y. and Yanagimachi, R. (1995): Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development*, 121, 2397-2405.
- Ogonuki, N., Mochida, K., Inoue, K., Matsuda, J., Yamamoto, Y., Takano, K. and Ogura, A. (2003): Fertilization of oocytes and birth of normal pups following intracytoplasmic injection with spermatids in *Mastomys (Praomys coucha)*. *Biol. Reprod.*, 68, 1821-1827.
- Ogura, A., Matsuda, J. and Yanagimachi, R. (1994): Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 7460-7462.
- Perry, A.C.F., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y. and Yanagimachi, R. (1999): Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, 284, 1180-1183.
- Uehara, T. and Yanagimachi, R. (1976): Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol. Reprod.*, 15, 467-470.