クローン牛胚の作出における凍結卵母細胞の利用

保地 眞一・木村 建・花田 章
信州大学 繊維学部 応用生物科学科

1．緒 言

動物における発生工学領域の進歩に多大な貢献を果たすクローンは「核遺伝子が同一である個体の集まり」と定義され、乳腺細胞と融合させた卵母細胞に由来するクローンヒツジ「ドリー」の誕生（Wilmut *et al.*, 1997）がヒトへの応用に対する危惧からマスメディアを中心に大きな論議を呼んだことは記憶に新しい。産業家畜としてもっとも重要な位置づけにあり、ヒツジなどの繊維生産家畜の代替知見を与えるウシでも、最近になって卵丘細胞や卵管上皮細胞の核移植に由来する体細胞クローンの誕生が報告された（Kato *et al.*, 1998）。このクローン作出（核移植）技術は除核処理と活性化処理を施した成熟卵母細胞の調製を必要とし、このレシピエント卵母細胞とドナー細胞とを電気的に融合させた再構築胚の移植によってクローン個体を作出する。このときレシピエント卵母細胞の凍結保存が可能になれば、ドナー細胞の利用性が向上し、クローン作出技術の普及にいっそう拍車がかかるものと期待される。

本研究ではウシの核移植に用いるレシピエント卵母細胞の凍結保存技術を確立することを目的に、形態正常性に基づいて予備実験で決定した卵母細胞の凍結融解条件を用いて、凍結処理の時期を最適化するための核移植実験を行った。

2．実験方法

ウシ卵丘卵母細胞複合体を22時間成熟培養し、卵丘細胞を完全に除去した後に第１極体の放出を伴う第２減数分裂中期の卵母細胞のみを選別した。この卵母細胞を顕微外科的に除核し、イオノマイシン（45秒）とシクロヘキシミド（5時間）の併用処理によって活性化誘起した。常法（Hochi et al., 1998）に従って体外受精によって作出した桑実胚の割球をドナー細胞とし、レシピエント卵母細胞の囲卵腔に１個づつ顕微注入した後に直流パルス（20-V/mm、20μsec）を与えて融合させた。融合（クローン）胚を修正合成卵管液に移して低酸素濃度下で培養し、分割率は24時間後、胚盤胞への発生率と構成細胞数は８日後に調べた。これを非凍結対照（第Ⅰ群）とし、凍結群では1.5M エチレングリコールと0.1Mシュークロースを凍害保護物質として−35℃まで緩冷して脱水させた後に−196℃の液体窒素に浸漬する二段階凍結法（Hochi et al., 1996）を、除核直前（第Ⅱ群）、除核直後（第Ⅲ群）、除核５時間後（第Ⅳ群）、あるいは除核・活性化後（第Ⅴ群）、のいずれかの時期に挿入した。

3．結 果

非凍結対照の第Ⅰ群では体外成熟卵の91%にうまく核移植でき、うち89%が融合してクローン胚となり、このクローン胚の36%が胚盤胞期へと発育できた。

凍結融解後の生存率は除核5時間後あるいは除核・活性化後に凍結融解した第Ⅳ群および第Ⅴ群の値（69～70%）が除核直後に凍結した第Ⅲ群の値（56%）よりも有意に高かった。また凍結融解後に核移植可能であった卵母細胞の割合は第Ⅳ群の56%が他の凍結群の値（33～38%）よりも高く、融合率については第Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ群が非凍結対照の第Ⅰ群と同等のレベルであった（88～90%）。

初期分割はすべての凍結群で観察され（38～73%）、第Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ群からは発生速度と構成細胞数に関して対照群と差のない胚盤胞が得られてきた。しかしその発生率はクローン胚当たりで2～6%、対照群の値から見ると5～14%に過ぎなかった。

Fig. 1. Effects of timing of oocyte cryopreservation on cloning of bovine embryos by nuclear transfer.

Groups	Cryosurvival (Normal / Frozen)	Reconstitution (NT / M-II)	Fusion (Fused / NT)	Cleavage (2-8 cells / Fused)	Development (BC / Fused)
I	-----	91% [a] (287/316)	89% [a] (255/287)	86% [a] (219/255)	36% [a] (92/255)
II	62% [a,b] (256/414)	33% [c] (138/422)	75% [b] (104/138)	38% [c] (39/104)	0% [c] (0/104)
III	56% [b] (120/213)	35% [c] (84/243)	90% [a] (76/84)	50% [c] (38/76)	3% [b] (2/76)
IV	70% [a] (192/276)	56% [b] (165/296)	88% [a] (146/165)	45% [c] (65/146)	2% [b] (3/146)
V	69% [a] (155/224)	38% [c] (96/256)	88% [a] (84/96)	73% [b] (61/84)	6% [b] (5/84)

[a-c] Different superscripts within columns denote significant differences at $P<0.05$ (x_2-test).
NT: nuclear transferred, M-II: metaphase-II, BC: blastocysts.

4．考 察

凍結生存率における実験群間の差異より除核した卵母細胞を加齢、または活性化のために5時間培養しておくことによって除核時の膜の機械的損傷に修復の余地を与えた可能性が示唆された。一方、凍結融解後すぐにドナー細胞の顕微注入を行なわなければならない第Ⅴ群ではこの時点で多くの卵母細胞に傷害を与え、結果的に核移植卵の作出効率を低下させた。また除核前に凍結融解した第Ⅱ群の融合率が他よりも低かったのは除核時にさらされるサイトカラシンBが細胞骨格の安定剤としての役割(Dobrinsky, 1996)を凍結融解過程で果たした結果かもしれない。

凍結保存したウシ卵母細胞に核移植を施しても受胚牛に移植可能な胚盤胞期への発生率は非常に低いと報告されており(Ohkoshi et al., 1997; Booth et al., 1998)、本実験でも凍結融解の影響は胚盤胞への発生の過程でもっとも顕著に現れた。この結果は核移植卵の作出効率や融合率はレシピエント卵母細胞における原形質膜の統合性に依存している一方、クローン胚となってからの発生能力、とくに8細胞分割期以降の発生能力は父方ゲノムの活性化と関係した細胞質因子によって強く影響されることを示唆している。

結論として、除核後のウシ卵母細胞を凍結保存してから核移植することによって胚盤胞への発生例が得られること、およびその凍結保存のタイミングはクローン胚の作出効率に影響を及ぼす要因のひとつであることが明らかになった。

5．引用文献

Booth PJ, Vajta G, Holm P, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. (1998) Theriogenology 49, 384.

Dobrinsky JR. (1996) Theriogenology 45, 17-26.

Hochi S, Semple E, Leibo SP. (1996) Theriogenology 46, 837-847.

Hochi S, Ito K, Hirabayashi M, Ueda M, Kimura K, Hanada A. (1998) Theriogenology 49, 787-796.

Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. (1998) Science 282, 2095-2098.

Ohkoshi K, Hata M, Kato Y, Tsunoda Y. (1997) Anim Sci Technol (Jpn) 68, 7-12.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. (1997) Nature 385, 810-813.