

保地 眞一・木村 建

目的別テーマ：バイオテクノロジーを活用した新規繊維生物の作出

16年度研究テーマ

15-2-10 : 顕微授精システムを利用した形質転換動物の作出

ABSTRACT

(1) *The first successful achievement of intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-mediated transgenesis in the rats was expanded to the another exogenous DNAs with larger chain length (>100 kb) and the different rat strains. The stable integration of the exogenous DNA in the founder transgenic rats was also confirmed from the PCR analyses of next generation offspring.*

(2) *As a storage method of rat spermatozoa prior to the ICSI, the freeze-drying and storage at -20°C was recommendable, alternative to the conventional freezing without cryoprotective agents and storage at -196°C . Live offspring were produced effectively if the spermatozoa were treated before freeze-drying by ultra-sonication to dissociate the sperm heads from their long tails.*

(3) *Efficiency of producing rat offspring by round spermatid injection (ROSI) was improved when oocytes were pre-treated for induced activation by direct current pulses plus 6-dimethylaminopurine rather than strontium chloride. In vitro production of developmentally competent round spermatids by culturing spermatogonial stem cells with somatic Sertoli cells is being attempted.*

研究目的

外来遺伝子の付加、あるいは改変による形質転換動物の作出方法の開発を通して、高付加価値をもつ繊維成分を生産する動物を人工的に作製することを目的としている。

一年間の研究内容と成果

昨年度、外来遺伝子 (EGFP : 3 kb) 溶液で処理したラット精子を顕微授精することで緑色蛍光を発する産仔ラットを得たことから、この ICSI 技術が不妊系統の救済だけでなく、外来遺伝子付加型の形質転換動物の作製方法としても有効なことを見出した [Mol. Reprod. Dev. 69 (2), 153-158, 2004]。本年度はこの成果を鎖長の長い他の外来遺伝子 (>200 kb) や他の複数のラット系統にも適用可能なことを証明するとともに、導入された外来遺伝子がゲノム上に安定して組み込まれていることを確認した [Mol. Reprod. Dev. 70 (4), 422-428, 2005]。また、凍結乾燥したラット精子が顕微授精後に産仔発生に寄与する能力を保有していること、その際とくに精子尾部を頭部から切断するために前もって超音波処理を施してことが有効であることがわかった [Zygote 13 (1), in press, 2005]。さらに円形精子細胞注入法での産仔率の改善を試み、従来より使ってきた塩化ストロンチウムで卵子を活性化する方法と比較して、直流パルスと 6-ジメチルアミノプリン併用によって活性化誘起する方法がより有効なことを見出した [Comtemp. Top. Lab. Anim. Sci. 43 (2), 13-15, 2004]。

展望

ES 細胞株の樹立や体細胞クローン作製技術が確立されていないラットではとくに特定遺伝子機能を破壊したノックアウトラット作製に対する要望が強い。ラットにおいて顕微授精技術、とくに円形精子細胞注入法で安定して産仔を作製する技術を確認したので、今後、生殖幹細胞株を樹立し、それを体外で分化誘導して半数体の円形精子細胞を作製する技術の開発を進めたい。