

# 保地眞一

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

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

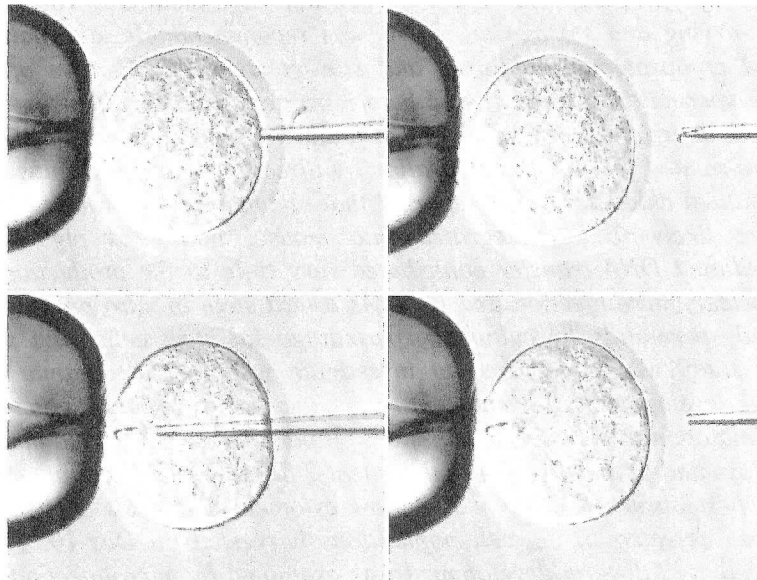
*In laboratory rats, the production of offspring by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and elongating or round spermatid injection (ELSI or ROSI) was successfully achieved. These microinsemination techniques were useful in not only rescuing infertile male individuals but also in producing EGFP-carrying transgenic rats, as an alternative method of pronuclear DNA microinjection. The first successful achievement of ICSI-mediated DNA transgenesis in the rats was expanded to several 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 analysis of next generation offspring. As a storage method of rat spermatozoa prior to the ICSI, the freeze-drying and storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  was recommendable, alternative to the conventional freezing without cryoprotective additives and storage at  $-196^{\circ}\text{C}$ . 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. Efficiency of producing rat offspring by ROSI was improved when oocytes were pre-treated for induced activation by direct current pulses plus 6-dimethylaminopurine rather than strontium chloride. It was reported that recombinase-A protein (RecA)-coated exogenous DNA was more likely to be integrated into mouse, goat and pig genomes. However, the recombinase-mediated DNA transfer contributed very little to the production of transgenic rats by means of pronuclear microinjection and ICSI. As a next step, in vitro production of developmentally competent round spermatids by culturing spermatogonial stem cells with somatic cells has been attempted. The study was undertaken to investigate whether rat spermatogonial stem cells can differentiate into developmentally competent round spermatids during a co-culture with Sertoli cells. The type-A spermatogonia and Sertoli cells were prepared from 7-days-old male rats, and co-cultured at  $37^{\circ}\text{C}$  for 3 days and at  $34^{\circ}\text{C}$  for the subsequent 7 days. Round spermatid-like cells (c.a.  $15\ \mu\text{m}$  in diameter) were first observed on Day-5. A flow cytometric analysis showed that a single peak of haploid cells was detected in the cell populations harvested on Day-10. The participation of the spermatid-like cells to full-term development was examined by microinjection into activated oocytes. The oviductal transfer of microinseminated oocytes resulted in implantations but no viable offspring. The expression of the round spermatid-specific marker gene, PRM-2, was confirmed in the Day-10 cell population by RT-PCR; however the no mRNA of two other haploid makers, TP1 or TP2, were detected. These results suggested that the rat type-A spermatogonial cells underwent meiosis during the primary co-culture with the Sertoli cells, based on morphology, flow cytometry and PRM-2 expression, but the normality of the spermatid-like cells was not supported by microinsemination and TP1/2 expression.*

## 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究極の目的としている。ここでは実験小動物としてはマウスと同等に有用でありながら（とくに脳機能解析では最高のモデル動物種であるにも関わらず）、遺伝子導入手法はあっても遺伝子改変手法が確立されていないラットを対象とした。ラットではES細胞株が樹立されていないことや信頼できるクローン作製技術がないことから、現時点でも特定遺伝子機能を封じ込めたノックアウトラットの作製ができていない。そこでラットにおける顕微授精技術の開発とそれを利用した外来遺伝子導入ならびに内在遺伝子改変の可能性を検討した。またラット顕微授精技術の高度化に関し、卵子の活性化誘起法、精子のフリーズドライ保存法、の開発も行った。

## 5年間の研究内容と成果

注入刺激に敏感なラット卵子に対してピエゾマイクロマニピュレーターを活用することにより、卵細胞質内精子注入法 (ICSI) では哺乳類で 11 番目の動物種として、伸張精子細胞注入法 (ELSI) /円形精子細胞注入法 (ROSI) では 4 番目の動物種として、生存産仔を得ることに成功した。世界で初めての成功となったラットにおける ICSI の手法を写真に示した。準備する注入用ピペットは先端の外径が  $4\ \mu\text{m}$  以下のもので、精子頭部のハンドリングを容易にするためにテーパーをつけておく必要がある。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 (左上)。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 (右上)、Piezo パルスで細胞膜を破ると同時に精子頭部を吐き出し (左下)、素早くピペットを引き抜く (右下)。重症不妊のトランスジェニックラット系統を維持するために ICSI は有効ではなかったが、ROSI によってその救済に成功した。また ROSI 前に卵母細胞に施す活性化誘起処理を塩化ストロンチウム法と直流パルス/6-DMAP 併用法とで比較したところ、産仔率は後者のほうが高くなった。さらに ICSI する前の精子頭部を尾部から単離するのに超音波処理を用いれば、産仔率が改善されることもわかった。精子頭部は ICSI に供するまで液体窒素中で保管しておくことができるが、フリーズドライ法の適用により極めて簡便に保存・輸送することが可能になった。ラット精子の凍結乾燥後の産仔獲得は哺乳類ではマウス、ウサギに次いで 3 番目の動物種となる。外来遺伝子のモデルとして EGFP を用い、これを精子と一緒に共培養後に ICSI するとトランスジェニックラットが作製できることがわかった。100kb 以上の鎖長のある外来遺伝子やあらゆるラット系統でも、遺伝子付加型の形質転換ラットを作製するのであればこの ICSI 技術が応用できることも証明した。



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ため、精原幹細胞を培養系で維持して、遺伝子組み換え後に体外で精子あるいは精子細胞へと分化させ、顕微授精によって産仔を得るというストラテジーに展開した。生後 7 日齢の雄ラット精巣から A 型精原細胞とセルトリ細胞を調製し、まず  $37^{\circ}\text{C}$  で 3 日間、その後  $34^{\circ}\text{C}$  で 7 日間、共培養したところ、培養 5 日目で円形精子細胞様の細胞が観察された。10 日目に回収した細胞の倍数性分布をフローサイトメトリーで解析すると半数体であることを示すピークが得られた。しかし顕微授精 (ROSI) では着床痕しか得られず、円形精子細胞で特異的に発現すると報告されている PRM-2、TP1、TP2 のうち RT-PCR によって mRNA が検出できたのは PRM-2 だけだった。極めて最近、ヌードマウスの精巣にラット精原細胞を移植して産仔発生に寄与できるラット精子へ分化すると報告されたので、このプロセスは体内誘導型が代替的に利用可能と思われる。トップジャーナルでは分化の進んだ細胞から樹立される生殖系列上の幹細胞が引き続き、注目を集めている。