

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

17 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

The present 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 Wistar-strain male rats, and seeded at 4×10^6 cells/4-mL/35-mm dish (Day-0). They were co-cultured at 37 °C for 3 d and at 34 °C for the subsequent 7 d in 5% CO₂/air. Round spermatid-like cells (c.a. 15 μm 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 143 microinseminated oocytes resulted in only 8 implantation sites without viable offspring (6%). 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

タイプ A 精原細胞を円形精子細胞へと分化誘導し、顕微授精 (ROSI) によって個体にする。この系が出来れば、相同遺伝子組み換えによって特定遺伝子を破壊した精原細胞を選択し、分化誘導後に顕微授精することでノックアウトラットが作出できることになる。これは、ES 細胞株が樹立されておらず、体細胞クローンの作製方法も確立されていないラットにおいて、ノックアウト動物作製のための画期的なアプローチである。

一年間の研究内容と成果

7 日齢のウィスター系雄ラット精巣から A 型精原細胞とセルトリ細胞を調製し、表面処理の施された初代培養用ディッシュまたは表面未処理のディッシュに各 4 ml を播種し、まず 37°C で 3 日間、その後 34°C で 7 日間、5% CO₂、95% 空気の湿潤気相下で培養した。培養の進行につれていずれのディッシュ上でも円形精子細胞様の細胞が観察されたが、表面処理ディッシュの方がより多くの円形精子細胞様細胞が出現してきた。EGFP ヘテロのトランスジェニックラットを A 型精原細胞のドナーとして用いて培養後の遺伝子分配を解析したところ、表面処理ディッシュにおいて期待値どおり約半数 (53.5%) の円形精子細胞様細胞で蛍光発現が見られたのに対し、表面未処理ディッシュにおいてはその割合は 94.2% にも上った。また培養細胞の倍数性分布をフローサイトメトリーで解析したところ、表面未処理ディッシュで得られた円形精子細胞様細胞は培養前と同じ倍数性分布を示した一方、表面処理ディッシュで得られた円形精子細胞様細胞には半数体であることを示す大きなピークが得られた。そこで表面処理ディッシュ上での培養によって得られた円形精子細胞様細胞が正常産仔への発生寄与能を有しているかを調べるため、活性化処理を施したラット卵母細胞へ顕微授精した。143 個の顕微授精卵を卵管に移植したレシピエント雌を分娩予定日に帝王切開したが、8 個の着床痕が確認されただけで正常産仔を得ることはできなかった。円形精子細胞で特異的に発現されると報告されている 3 種の遺伝子、PRM-2、TP1、TP2 の円形精子細胞様細胞における発現を RT-PCR によって調べた結果、PRM-2 の mRNA は検出されたものの、TP1 および TP2 の mRNA は検出されなかった。

展望

ラット A 型精原細胞はセルトリ細胞の付着・成長に有効な表面処理ディッシュ上で共培養すると減数分裂を起こし、円形精子細胞様に形態的分化を遂げた。しかしこの細胞がもつ正常産仔発生に対する寄与は証明できず、核タンパク変遷に関わる遺伝子発現が不完全だったことが示唆された。