

除核卵母細胞の耐凍性に及ぼすリノール酸アルブミンの影響

○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

クローンは「核遺伝子が同一である個体の集まり」と定義することができ、現在までにヒツジ (Wilmot *et al.*, 1997)の他にもマウス (Wakayama *et al.*, 1998)とウシ (Kato *et al.*, 1998)で体細胞の核移植によるクローン個体の作出が成功している。クローンの作出には除核処理と活性化処理を施した卵母細胞を調製し、ここでドナー核をリプログラミングする必要がある。この宿主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て核移植技術がますます盛んになるものと期待されるが、凍結融解した除核ウシ卵母細胞を用いて作出したクローン受精卵の発生率はあまり高くない (Ito *et al.*, 1999)。

これまでに我々は、体外受精由来のウシ桑実胚の耐凍性を改善する効果を持つリノール酸アルブミン (LAA; Hochi *et al.*, 1999b) が1細胞期 (前核期) 卵の凍結保存にも有効に作用することを報告してきた (Hochi *et al.*, 1999a)。そこで本研究では、体外成熟・除核・活性化という除核ウシ卵母細胞の調製過程のすべての培養液にLAAを添加し、凍結融解後に核移植を施して作出したクローン受精卵の体外発生能を調べた。

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。この除核卵母細胞の調製過程において、イオノマイシン処理時を除く各種培養液に0.1%の濃度になるようにLAAを添加しておいた。除核卵母細胞の凍結保存には、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°C まで緩冷して脱水させた後に -196°C の液体窒素に浸漬する二段階凍結法 (Hochi *et al.*, 1996) を採用した。ドナー細胞には体外受精によって作出したウシ桑実胚の割球を用い、融解後に正常に見えた除核卵母細胞の囲卵腔に顕微注入し、直流パルス (20V/mm, 20 μsec) を与えて融合させた。そして融合したクローン受精卵を修正合成卵管液に移して低酸素濃度下で体外培養し、分割率を24時間後、胚盤胞への発生率とその構成細胞数を7日後に調べた。

3. 結果

体外成熟培地におけるLAAの有無は除核操作の成功率に影響を及ぼさなかった (LAA + : 96%, 289/302 vs LAA - : 94%, 305/323)。凍結融解した除核未受精卵の形態正常率は、LAA添加区 (80%, 190/238) が非添加区の値 (65%, 159/243) よりも高かったが、統計的な有意差は認められなかった。また形態的に正常に見えた除核未受精卵の囲卵腔にドナー細胞を顕微注入したとき、LAA添加区の方がLAA非添加区に比べて機械的損傷を受けにくい傾向があった (96 vs 80%, $P=0.13$)。

核移植胚の体外発生能はTable 1に示した。融合率には3実験区のみで差は認められなかったが、分割率にはLAA非添加 (凍結) 区と新鮮対照区とのあいだで有意な差が認められた。胚盤胞発生率については、LAA添加区の

Table 1. Effect of LAA on in vitro development to blastocysts of nuclear-transferred zygotes using frozen-thawed bovine cytoplasts

LAA	n	NT zygotes		
		Fused	Cleaved	Developed
+	159	87%	70% ^{ab}	13% ^b
-	116	90%	59% ^b	3% ^c
Nonfrozen	115	82%	71% ^a	32% ^a

^{a-c} Significantly different within columns ($p < .05$)

値(13%)が非添加区(3%)よりも有意に高くなった。新鮮対照の除核未受精卵に施した核移植では、32%という高い胚盤胞発生率が得られた。得られた胚盤胞の質を発生速度と構成細胞数に基づいて比較したが、3実験区間でそれらの平均値に差は認められなかった(発生速度: 6.35~6.50日、構成細胞数: 96.6~112.3個)。

4. 考察

これまでの凍結保存したウシ卵母細胞を核移植のレシピエントに用いた研究ではクローン胚盤胞への発生率は0~7%に過ぎなかった(Booth et al., 1999; Ito et al., 1999)が、本実験では凍結前処理にLAAを用いることによってその割合を13%にまで改善することができた。LAAによって体外受精由来のウシ桑実胚の耐凍性を改善するには48~120時間、前核期卵の耐凍性を改善するには44時間の処理時間が必要であった(Hochi et al., 1999a, b)。本実験では0.1% LAAで卵子を処理できる時間は29~30時間が上限になってしまうが、添加濃度の増加によりLAAのさらなる効果を引き出すことが可能になるかもしれない。

LAAのような不飽和脂肪酸と結合したアルブミンによる耐凍性増強効果の本質はよくわかっていない。ドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)といったリノール酸と同じ高級不飽和脂肪酸は、細胞膜のコ

レステロール代謝に影響することが報告されている(Murthy et al., 1988)。また血清アルブミンは精子の受精能獲得の過程で細胞膜からコレステロールを引き抜く働きがあることが知られている(Davis et al., 1979)。このような細胞膜組成の変化は"膜流動性の増加"に繋がるものであり、LAAの作用機序を考えたとき緩慢冷却の過程で細胞脱水の効率を良くすることを通して胚の初期発生に係わる細胞質因子の保護に携わったものと推測できる。

結論として、ウシ卵母細胞の体外成熟・除核・活性化過程におけるLAA処理は調製した除核未受精卵の耐凍性を向上させ、核移植後の胚盤胞発生率を改善した。

5. 引用文献

- Booth PJ, Vajta G, Hoj A, Holm P, Jacobsen H, Greve T, and Callesen H. (1999) *Theriogenology* 51, 999-1006.
- Davis BK, Byrun R, and Hungund B. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 558, 257-266.
- Hochi S, Semple E, and Leibo SP. (1996) *Theriogenology* 46, 837-847.
- Hochi S, Kanamori A, Sugisawa K, Kimura K, and Hanada A. (1999a) *J. Mamm. Ova Res.* 16, 19-22.
- Hochi S, Kimura K, and Hanada A. (1999b) *Theriogenology* 52, 497-504.
- Ito K, Hirabayashi M, Ueda M, Nagao Y, Kimura K, Hanada A, and Hochi S. (1999) *Mol. Reprod. Dev.* 54, 81-85.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, and Tsunoda Y. (1998) *Science* 282, 2095-2098.
- Murthy S, Albright E, Mathur SN, and Field FJ. (1988) *J. Lipid Res.* 29, 773-780.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, and Yanagimachi R. (1998) *Nature* 394, 369-374.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, and Campbell KHS. (1997) *Nature* 385, 810-813.