

ウシ生体由来の卵丘細胞-卵子複合体を用いた体細胞核移植

長谷川清寿 安田康明¹⁾ 山田彰司 佐々木恵美 安部茂樹

要約 特定の生体由来の核移植材料を継続的に回収できる経膈採卵 (ovum pick up : OPU) に着目し、採取した卵丘細胞-卵子複合体 (cumulus-oocyte complexes : COC) を用いたウシ体細胞核移植について検討した。核移植には、成熟培養後の複合体から分離した卵丘細胞および卵子細胞質を用いた。融合処理数は133個であり、融合率は70.7% (94/133)、卵割率は86.2% (81/94)、核移植後7日目での移植可能胚 (後期桑実期~胚盤胞期) への発生率は42.6% (40/94) であった。また、胎齢40日目での受胎率は28.6% (2/7)、生存胎子率は15.4% (3/13) であり、1頭の受胎雌ウシから双子を娩出した。双子産子からDNAを採取してマイクロサテライトDNA多型領域を解析した結果、ドナー細胞由来雌ウシのクローン産子であることを確認した。また、双子のミトコンドリアDNA型は、D-loop領域の塩基配列を直接シーケンスした結果、双方の毛根組織サンプルでは異なったアリルが検出され、由来レシピエント卵子のDNA型と一致した。双子の生時体重は29.6および40.8kg、生時体高は67.0および70.8cmであったが、2から18週齢時までの体重および体高発育値は概ね相似して推移した。以上のことから、OPUで採取したCOCは、卵丘細胞を成熟培養後にドナー細胞として、卵子をレシピエント細胞質としてそれぞれ利用した場合、発生した体細胞核移植胚が個体発生能を有し、産子生産が可能であることが明らかとなった。さらに、表現型のうち生後の発育値に関してはドナー核の影響が大きく、少なくとも2から18週齢時までの発育に関しては、レシピエント細胞質の影響は認められないことが推察された。

キーワード : ウシ 体細胞核移植 卵丘細胞-卵子複合体 経膈採卵 ミトコンドリアDNA

世界初の体細胞クローン動物“ドリー”の誕生³¹⁾と、それに続く国内での生体体細胞由来クローンウシの誕生¹⁴⁾によって、畜産分野では、それまで研究開発が進められてきた胚 (受精卵) クローン技術に加えて、優良家畜の大量複製の可能性も現実味を帯びた。しかし、現状では、特に体細胞クローン技術について子ウシ生産効率が低いことなどが指摘されており^{13, 28)}、実用化を危惧する向きもある。このような情勢を踏まえ、本技術が生産技術として認知されるためには、個体発生の過程あるいは産子の正常性および斉一性などの多角的調査の必要性が指摘されている⁹⁾。そのためには核移植に用いる素材、すなわちドナー細胞およびレシピエント細胞質は、その由来が既知の材料であることが重要であり、可能な限り継続的に確保できればさらに望ましい。また、ドナー細胞として卵丘細胞が成熟培養後に利用できれば体細胞の分離・継代培養が不要であり、ドナー細胞およびレシピエント細胞質が同時に確保できればさらに効率的である。このような理由で、特定の生体由来の材料を継続的に回収できるOPUに着目した。

我々は、すでに摘出卵巣⁷⁾および生体卵巣⁶⁾から採取したCOCを用いた体細胞核移植について検討を行い、成熟培養後の卵丘細胞 (ドナー核) から移植可能胚の作出が可能であることを示した。今回は、体細胞核移植胚を受胎雌に移植して、その受胎性を確認するとともに、個体生産が可能かどうかを検討した。さらに、娩出子は、DNA型および表現型について調査した。

材料および方法

1) 生体由来COCの採取および核移植

OPUは、既報⁸⁾に基づき、経産成雌ウシ (黒毛和種3頭およびホルスタイン種2頭) を用いて行った。採取した生体由来COCは、卵丘細胞あるいは卵子細胞質が変性したCOCを除いた後、5%子牛血清添加TCM-199 (Gibco BRL) で19~20時間成熟培養し、0.1%Hyaluronidase (Sigma) 加M2液中のピペティングで卵丘細胞と卵子に分離した。卵丘細胞は直ちに0.5%牛胎子血清添加PBS (-) 中に浮遊させ、ドナー細胞とした。卵子は、第1極体およびその周辺細胞質を透明体外に押し出し、レシピエ

ント細胞質とした。核移植卵は、Zimmerman's Cell Fusion Medium³¹⁾ 中で直流パルス (30V/150 μm、10 μsec × 1回) を通電後、2.5 μg/ml Cytochalasin D (Sigma) および10 μg/ml Cycloheximide (Sigma) で1時間、さらにCycloheximideで4時間の処理を行い、融合・活性化²⁵⁾した。融合を確認した核移植卵は、5%O₂、5%CO₂、90%N₂の気相条件下の改変TCM-199 (IVD-101; Institute of Functional Peptide)²⁾で発生培養した。

2) 受胎雌ウシへの移植

発生培養Day 7から8 (核移植日: Day 0) 時点での実体顕微鏡下の形態検査で移植可能と判定した胚盤胞は、Day 6~7 (発情日: Day 0) の機能黄体を有する交雑種受胎雌ウシ^{1, 21)}に、1または2胚を新鮮移植した。胎子の生存性は、胎齢30および40日目に超音波画像診断装置 (Aloka SSD-900) を用い、胎子およびその付属物の確認ならびに胎子心拍の有無によって判定した。

3) 娩出子のDNA型および表現型の調査

DNA型は、末梢血および皮膚毛根組織から調製したDNAを用いて、核内DNAおよび核外DNAについて調査した。核内DNA型はマイクロサテライトDNA (MS-DNA) 多型領域³²⁾、核外DNA型はミトコンドリアDNA (mtDNA) のD-loop領域^{4, 26)}の塩基配列を直接シーケンスして解析した。

表現型は、外貌検査に加え、生時から2週ごとに発育値 (体重および体高) を測定して、それらの経時的推移を比較した。交雑種受胎雌ウシおよび娩出子の飼養管理は、既報⁵⁾に基づいて行った。

融合率 (融合数/処理数) は70.7% (94/133)、卵割率 (卵割数/融合数) は86.2% (81/94)、Day 7での移植可能胚 (後期桑実期~胚盤胞期) への発生率 (発生数/融合数) は42.6% (40/94) であった。また、黒毛和種COC由来胚を受胎雌ウシへ新鮮移植した結果、Day40での受胎率 (受胎頭数/受胎雌頭数) は28.6% (2/7)、生存胎子率 (生存胎子数/移植胚数) は15.4% (3/13) であり、1頭の受胎雌ウシが双子を娩出した (表1および図1)。

双子のMS-DNA型は、ドナー細胞由来雌ウシと同一であった。また、双子のmtDNA型は、双方の毛根組織由来のDNAサンプルでは異なったアリルが検出され、由来レシピエント卵子のDNA型と一致した。しかし、末梢血由来のDNAサンプルではmtDNA型の混在が検出され、双子は個体識別できなかった (表2および図2)。



図1 成熟培養後の卵丘細胞-卵子複合体を用いた体細胞核移植で生産した同腹双子ウシ

成 績

体細胞核移植における融合処理数は133個であり、

表1 体細胞核移植および受胎牛への移植成績

核移植材料 の由来品種 による区分 ¹⁾	体細胞核移植				受胎牛への移植						
	核移植数	融合数 (%)	卵割数 (%)	発生数 ²⁾ (%)	移植頭数	受胎頭数 (%)	移植胚数 ³⁾	生存胎子数			産子数
								Day30	Day40	Day60(%)	
黒毛和種	110	90 (81.8)	79 (87.8)	40 (44.4)	7	2 (28.6)	13	3 (23.1)	3 (23.1)	2 (15.4)	2
ホルスタイン種	23	4 (17.4)	2 (50.0)	0 (0)	-	-	-	-	-	-	-
計	133	94 (70.7)	81 (86.2)	40 (42.6)	7	2 (28.6)	13	3 (23.1)	3 (23.1)	2 (15.4)	2

1) COCを採取した供試牛の品種による区分。

2) 核移植後7日目までに発生した移植可能胚(後期桑実期~胚盤胞期)。

3) 受胎牛1頭当たり新鮮1または2胚移植。

双子（No.1およびNo.2：図3）の生時体重差は約10kg（29.6および40.8kg）、体高差は約4cm（67.0および70.8cm）であった。生時の体重および体高差は2週齢時にはみられなくなり、哺育方法が異なっていたものの、以後18週齢までは、体重が黒毛和種

牛の発育標準値（標準値）³⁴⁾の上限に沿い、また体高が標準値の下限に沿って、概ね相似して推移した。このほか、双子の舌色は相違していたが、鼻紋は酷似していた。双子のうちNo.2は慢性肺炎の悪化で20週齢時にへい死した。

表2 体細胞核移植産子(同腹双子)の生産経過および調査の概要

項目	体細胞核移植産子		備考
	No.1	No.2	
ドナー細胞由来牛	D1	D1	
レシピエント卵子由来牛	D2	D1	
核移植胚の移植実施日	2000.6.22	No.1と同じ	
娩出日	2001.3.25	No.1と同じ	分娩誘起による
哺育形態	自然哺乳	人工哺乳	
表現型性別	♀	♀	
生時体重	29.6kg	40.8kg	生後から2週間間隔で測定
生時体高	67.0cm	70.8cm	生後から2週間間隔で測定
舌の色	白	黒	
鼻紋	Aタイプ	Aタイプ	D1に酷似、産子互いに酷似
DNA型			
核DNA型	D1	D1	毛根細胞および血液細胞
mtDNA型(毛根細胞)	D2	D1	
“(血液細胞)”	D1およびD2	D1およびD2	

考察

体細胞核移植によってクローン産子が得られることは、既に様々な動物種で報告されている。これらの知見は、ヒツジ³⁰⁾、マウス²⁹⁾、ウシ¹⁴⁾、ヤギ³⁾およびブタ²²⁾の種々の組織細胞をドナーとした核移植で、ドナー核の初期化¹⁰⁾が惹起され、個体発生にまで辿り着くことの証明である。ウシの体細胞核移植におけるドナー細胞としては、卵丘細胞、卵管上皮細胞、皮膚繊維芽細胞、胎子細胞などが利用されてきており、それぞれの細胞種での胚生産効率ならびに産子生産効率¹⁵⁾が徐々に示されてきている。Katoら¹⁵⁾によれば、成牛由来の継代卵丘細胞を核移植ドナーとしたときの発生率は20%程度であると報告しており、我々が用いた成熟培養直後つまり“未継代”の卵丘細胞の発生率（約40%）は比較的高い成績であったと考えられる。

今回我々は、特定個体から採取した細胞および卵子を核移植の素材として用いるため、材料採取法としてOPUを選択した。OPU技術は、発情周期の任意の時期に卵子を採取可能で、過排卵処理での反応不良牛からの卵子採取も可能であることから、最近

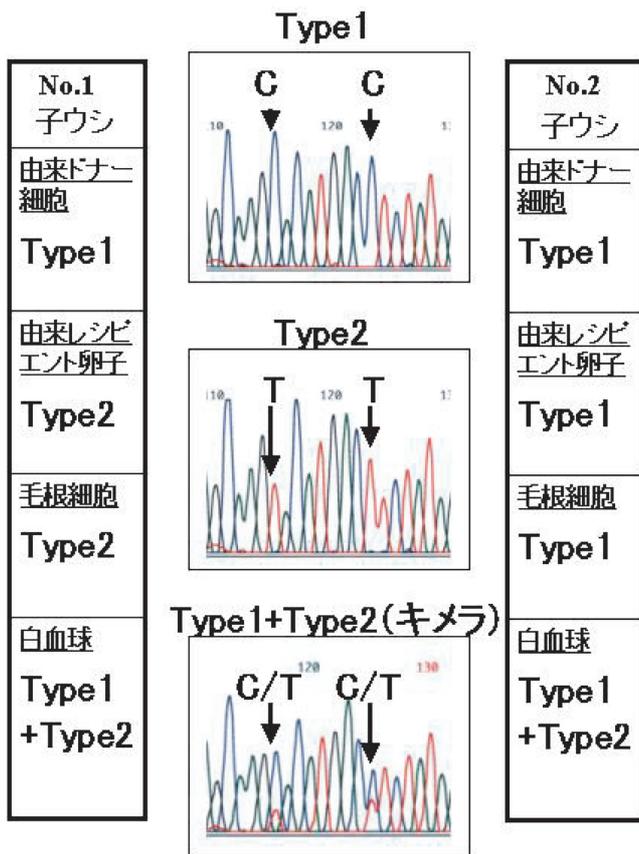


図2 mtDNAのD-loop領域の塩基配列解析

ダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定。No.1子ウシのドナー細胞はType1,レシピエント卵子はType2. No.2子ウシのドナー細胞およびレシピエント卵子はともにType1. 子ウシのmtDNA型は、毛根組織ではそれぞれの由来レシピエント卵子のmtDNA型と同一. 子ウシ (No.1およびNo.2) は、ともに同一受胎雌から娩出された同腹双子.

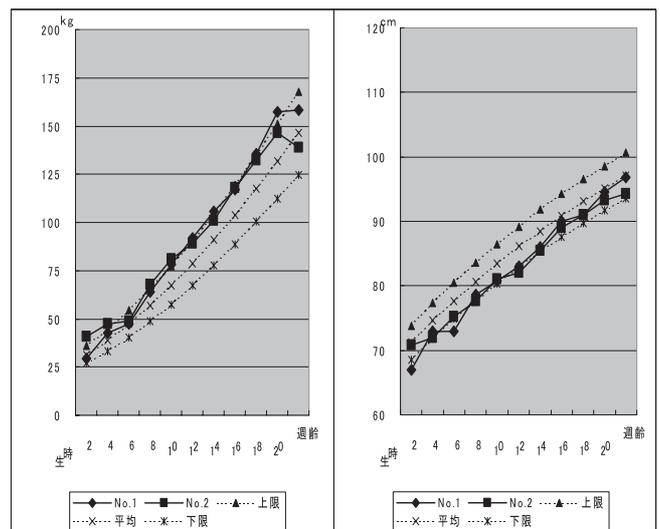


図3 体細胞クローン双子の発育値の推移

同一牛房内で飼養管理を行い、生後から2週間間隔で体重(左図)および体高(右図)を測定。ただし、基本的な哺育方法は、No.1が自然哺乳、No.2が人工哺乳。図中、点線は黒毛和種正常発育曲線(全国和牛登録協会,1989)。

では牛においてもルーチン化された技術として位置づけられている¹²⁾。このOPU技術を核移植材料の採取に利用できれば、既知の個体由来のレシピエント細胞質は継続的に確保される。ただし、摘出卵巣あるいは生体卵巣から採取したCOCを成熟培養後、卵子はレシピエント細胞質として、周囲の膨潤化卵丘細胞はドナー細胞として核移植に利用し、移植可能胚を作出できることはすでに報告した^{6, 7)}が、その核移植胚が個体へ発生するかどうかは未確認であった。そして我々は、特定個体の生体卵巣からOPUで採取したCOCを用いて体細胞核移植を行い、作出胚の受胎牛への移植でその受胎性を確認するとともに、ドナー細胞由来のクローン個体の生産に成功した。このことにより、(1)特定個体を用いた1回のOPUでドナー細胞およびレシピエント細胞質が同時に確保でき、翌日(成熟培養後)に核移植が可能であること、さらに、(2)OPUは継続的に実施できることから、由来の判明したレシピエント細胞質に種々のドナー細胞を融合させて、個体発生能を有する体細胞核移植胚が得られることが明らかとなった。

一般に、核移植手法を用いたクローン産子の生産は、ドナー核の複製を前提として行われている。従って、レシピエント細胞質の影響については、調査の必要性は指摘されているが、あまり調べられていない²⁷⁾。最近、体細胞クローン産子について、相似性、繁殖性などの家畜としての生産性をターゲットとした飼養試験が国内の研究機関で行われており、注目されている^{20, 24)}。さらに昨今、クローン動物および由来生産物の食品としての安全性に関する調査が精力的に行われている¹⁶⁾。しかしながら、このような様々な調査の対象となる産子は、核移植の材料であるドナー細胞は特定されているがレシピエント細胞質の由来はほとんどケースで特定されていないと思われる。この場合、仮に、レシピエント細胞質が表現型に何らかの影響を及ぼしていると想定した場合、その追跡調査は不可能である。

統計的手法によって報告されている卵子細胞質内のmtDNAが表現型に及ぼす影響^{17, 23)}を、核移植等の直接的な手法によって証明することは、核移植が生産技術として実用化されるための第1歩と考えられる。今回我々が生産した同腹双子はドナー核が同じであるが、レシピエント細胞質が相違しており、それは毛根組織由来のDNA材料を用いたmtDNA型検査で確認できた。ただし、末梢血から採取したDNA材料には2タイプのmtDNAが混在しており、末梢血のmtDNA型による個体識別は不可能であった。

父母の異なる2胚移植、追い移植等によって生産された双子ウシでみられる血液キメラは、胎子期の血管吻合によって生じ、末梢血サンプルを用いたMS-DNA型による個体識別では核DNAの混在として検出される³³⁾。体細胞核移植胚の2胚移植で生産された今回の同腹双子例のように、核DNAが相同でレシピエント細胞質のmtDNA型が相違した場合では、末梢血から調製したDNAサンプルはmtDNAが混在する、いわゆるmtDNA型のヘテロプラズミー²⁷⁾として検出されることが明らかとなった。従って、今回のような同腹双子例の個体識別は、毛根組織から採取したDNAサンプルを用いれば可能であった。

クローン双子の表現型について、体測値を調べた結果、生時の体重および体高差は2週齢時にはみられなくなり、哺育方法が異なっていたものの以後は概ね相似して推移した。2子牛が死亡したため、20週齢以後の発育比較ができなかったが、同腹クローン双子の初期発育はレシピエント細胞質のmtDNA型が異なっても相似していた。このことから、表現型のうち生後の発育値に関してはドナー核の影響が大きく、少なくとも2から18週齢時までの発育に関しては、レシピエント細胞質の影響は認められないことが推察された。その一方で、生時にみられた体測値の差異が、胎子期の発育差で生じた可能性が高いが、それがレシピエント細胞質のmtDNA型の違いであるかどうかについては結論付けることはできなかった。mtDNAが表現型に及ぼす影響は、マウスで種々報告されている^{18, 19)}。表現型の差異に及ぼすmtDNAの影響は、核の遺伝情報に大きなバリエーションのあるウシ等の家畜で解析することは極めて困難なこと¹⁰⁾かも知れない。しかしながら、mtDNAが細胞のエネルギー生産に関して重要な役割を担っていることはよく知られており、mtDNA型をタイピングして表現型との関連性を解析することは、今後重要なテーマになると思われる。

本試験によって、OPUで採取したCOCは、卵丘細胞を成熟培養後にドナー細胞として、卵子をレシピエント細胞質としてそれぞれ利用した場合、発生した体細胞核移植胚が個体発生能を有し、産子生産が可能であることが明らかとなった。今後は、OPUと核移植技術を組み合わせた方法によるクローン産子の生産モデルを実証、提示して、実用化への一助にしたい。

謝 辞

本試験の実施にあたり、終始ご助言、ご指導いた

だいた独立行政法人農業技術研究機構畜産草地研究所生殖細胞研究室の高橋清也、赤木悟史、同研究所育種素材研究室の武田久美子の各氏に感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 安部茂樹ら．島根県立畜産試験場研究報告, 27: 10-14. 1992.
- 2) Aoyagi K., et al. Journal of Reproduction and Development, 45:129-134.1999.
- 3) Baguishi A., et al. Nature Biotechnology, 17: 456-461.1999.
- 4) 春海 隆ら．日本畜産学会報, 65:149-151.1994.
- 5) 長谷川清寿ら．島根県立畜産試験場研究報告, 28:6-10.1993.
- 6) Hasegawa K., et al. Journal of Reproduction and Development, 45:a15.1999.
- 7) 長谷川清寿ら．日本胚移植学雑誌, 23:61-66. 2001.
- 8) 長谷川清寿ら．島根県立畜産試験場研究報告, 35:1-4.2002.
- 9) 広岡博之．日本畜産学会報, 71:19-25.2000.
- 10) 今井 裕・山内一也．クローン技術を利用した動物性食品の安全性について (中間報告書). 39-49. 厚生省. 東京. 2000.
- 11) 今井 裕．遺伝, 56:31-35.2002.
- 12) 今井 敬．高度畜産新技術実用化促進事業報告書. 1-9. 家畜受精卵移植技術研究組合. 東京. 1998.
- 13) 入谷 明．遺伝, 56:27-30.2002.
- 14) Kato Y., et al. Science, 282:2095-2098.1998.
- 15) Kato Y., et al. Journal of Reproduction and Fertility, 120:231-237, 2000.
- 16) 熊谷 進．クローン技術を利用した動物性食品の安全性について (中間報告書). 51-54. 厚生省. 東京. 2000.
- 17) Mannen H., et al. Journal of Animal Science, 76 :36-41.1998.
- 18) Nagao Y., et al. Journal of Reproduction and Development, 44:129-134.1998.
- 19) Nagao Y., et al. Genes and Genetic Systems, 73:21-27, 1998.
- 20) 野崎 聡ら．鹿児島肉用牛改良研究所研究報告, 6:1-4.2001.
- 21) 岡崎尚之ら．島根県立畜産試験場研究報告, 29: 5-10.1994.
- 22) Ohnishi A. et al. Science, 289:1188-1190.2000.
- 23) Schutz M.M., et al. Livestock Production Science, 37:283-295.1994.
- 24) 志賀一穂ら．大分県畜産試験場試験成績報告書, 30:55-61.2001.
- 25) Takahashi S., et al. Cloned Animal and Placentation. 30-35. Yokendo. Tokyo. 2000.
- 26) 武田久美子．日本畜産学会報, 68:1161-1165. 1997.
- 27) 武田久美子．畜産技術, 545:2-5.2000.
- 28) 角田幸雄, 実験医学, 19:2102-2106.2001.
- 29) Wakayama T., et al. Nature, 394:369-374.1998.
- 30) Wilmut I., et al. Nature, 385:810-813.1997.
- 31) Wolfe BA, Kraemer DC. Theriogenology, 31:5-15.1992.
- 32) Yazawa S., et al. Animal Science and Technology, 68:1166-1169.1997.
- 33) 安田康明ら．島根県立畜産試験場研究報告, 34: 11-14.2001.
- 34) 全国和牛登録協会．黒毛和種正常発育曲線. 1-12. 全国和牛登録協会. 京都. 1989.