

ウシ体細胞クローン胚の発生能に影響を及ぼす要因について

赤木悟史・武田久美子

農研機構畜産草地研究所

要 約

現在のクローン産子生産効率は極めて低く、この効率を改善するためには、クローン胚の作出率に影響を及ぼす要因を解明し、クローン胚作出のための様々な過程を最適化することが重要である。本研究は、クローン胚の発生能に関わる要因を明らかにする目的で、ウシ核移植におけるドナー細胞の体外培養、ドナー細胞のミトコンドリアおよびレシピエント卵子の由来が胚発生能に及ぼす影響について検討を行った。その結果、ドナー細胞を培養することで体外発生能は改善されるが、ドナー細胞の培養はクローン産子の作出には必要不可欠な処理ではないこと、ドナー体細胞ミトコンドリアの注入はウシ卵子の発生率を低下させること、レシピエント卵子として体外成熟卵に比べて経膈採卵により採取した体内成熟卵を用いるとクローン胚の体外発生能が向上することが明らかになった。

キーワード：核移植, ドナー細胞, ミトコンドリア, 体内成熟卵

1. はじめに

体細胞クローンは、遺伝的に同一な個体の複製を可能とする画期的な技術である。この技術により高能力家畜や稀少品種の増殖、家畜育種の効率化、クローン家畜を利用した医薬品等有用物質の効率的生産等が期待され、生物、農学、医学などに多くの進歩をもたらすと考えられている。しかし、現状では10%以下の低い成功率であり、実用化への障害となっている。この効率を改善するためには、クローン胚の作出率に影響を及ぼす要因を解明し、胚を作出するための様々な過程を最適化する必要がある。本研究では、ドナー細胞の体外培養、ドナー細胞のミトコンドリアおよびレシピエント卵子の由来が胚発生能に及ぼす影響について検討を行った。

2. ドナー細胞の処理

2.1 体外培養の影響

ウシ体細胞核移植のドナーとして主に培養細胞が用い

表1. 4つの異なる条件の卵丘細胞を用いたクローン胚の体外発生能

ドナー細胞	卵子数	融合数 (%)	分割数 (%)	胚盤胞数 (%)
採取直後	411	252 (61) ^a	170 (68) ^a	44 (18) ^a
成熟培養後	483	345 (71) ^b	262 (76) ^b	110 (32) ^b
血清添加培養	500	415 (83) ^c	337 (81) ^b	188 (45) ^c
血清飢餓培養	420	347 (83) ^c	276 (80) ^b	161 (46) ^c

(Akagi ら 2003)

^{a-c} 列内で異符号間に有意差あり; $P < 0.05$ (χ^2 検定)

られているが、ドナー細胞の体外培養の影響については調べられていない。我々は4種類の異なる培養条件の卵丘細胞（採取直後、成熟培養後、血清添加培養および血清飢餓培養）をドナーとして核移植後の発生能に及ぼす影響を検討した。その結果、表1に示すようにドナー細胞を培養することによって胚盤胞への発生率は有意に高くなったが、採取直後の細胞をドナーに用いたクローン胚からの1頭を含め全ての区からクローン産子の作出が可能であった（表2、図1）（Akagi ら 2003）。更に、体外培養の影響を受けない採取直後の卵丘細胞を用いたクローン胚について21頭の受胎牛に胚移植を行った。その結果、35日（核移植後）で10頭（48%）の受胎が確認された。しかし、その後6頭が流産し、4頭が分娩

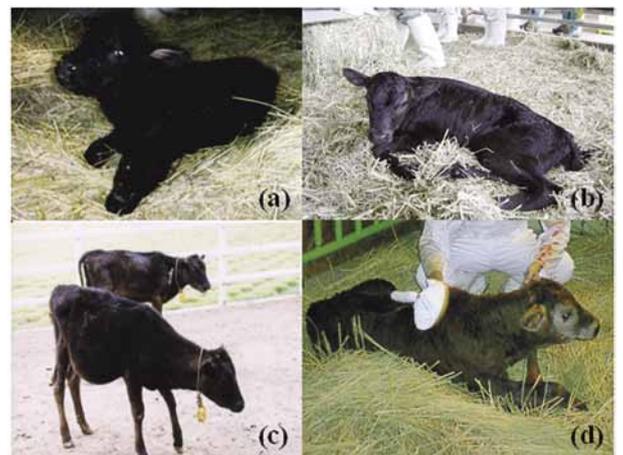


図1. ウシ卵丘細胞の核移植により作出されたクローン牛ドナーとして (a) 採取直後, (b) 成熟培養後, (c) 血清添加培養あるいは (d) 血清飢餓培養後の細胞を用いた。

表2. 4つの異なる条件の卵丘細胞を用いたクローン胚の移植後の受胎能

ドナー細胞	移植胚数	受胎頭数 (%)			産子数 (%)
		Day 30	Day 60	Day 90	
採取直後	2	2 (100)	1 (50)	1 (50)	1 (50)
成熟培養後	6	1 (17)	1 (17)	1 (17)	1 (17)
血清添加培養	7	2 (29)	2 (29)	2 (29)	2 (29)
血清飢餓培養	9	4 (44)	3 (33)	2 (22)	1 (11)

(Akagi ら 2003)

したものの、全て死産であった (Akagi ら 2008)。このことから、体外培養の影響を受けない採取直後の細胞を用いた場合でも培養細胞を用いた場合の報告と同様に胚移植後に高頻度で流死産が発生することから、流死産の原因はドナーの体外培養に起因しているのではないことが示唆された。

2.2 ドナー細胞のミトコンドリアの影響

体細胞核移植によるクローン牛生産の場合、通常はドナー細胞をレシピエント卵子に融合するため、核と共に体細胞のミトコンドリアが卵子内へ若干混入する。しかしながら、それらがクローン胚の発生や産子生産に及ぼす影響は明らかではない。我々は異なる培養条件下の細胞内ミトコンドリアの膜活性を調査したところ、コンフルエント状態のウシ線維芽細胞を7日間以上血清飢餓処理することで、ミトコンドリア膜活性が有意に高くなった (Takeda ら 2002; Takeda ら 2010)。そこで、コンフルエント状態あるいは血清飢餓処理後のウシ線維芽細胞から精製したミトコンドリアをウシ卵子内へ微量注入し、活性化刺激後の単為発生胚の体外発生能について調べた。その結果、コンフルエント状態の細胞のミトコンドリアではバッファーのみを注入した対照区と比べ有意な差は認められなかったが、血清飢餓培養のミトコンドリアを注入した時の分割率および桑実胚への発生率 (68%と38%) が対照区 (80%と53%) より有意に低かった (表3) (Takeda ら 2010)。このことから、血清飢餓培養により活性化したミトコンドリアが注入卵子の発生

表3. 血清飢餓処理・無処理した体細胞ミトコンドリア (mt) の注入がウシ単為発生卵子の発生能に与える影響

注入	卵子数 (実験回数)	活性化処理 後生存卵子 数 ^a	発生卵子数 ^b (b/a%)		
			分割	桑実期	胚盤胞期
血清飢餓なし mt	248 (10)	182	141 (78) ^{cd}	91 (50) ^{cd}	35 (19) ^{cd}
血清飢餓 mt	323 (11)	180	122 (68) ^c	69 (38) ^c	26 (14) ^c
バッファー	437 (17)	350	284 (81) ^d	200 (57) ^d	78 (22) ^{cd}
無操作	206 (13)	198	158 (80) ^d	104 (53) ^d	49 (25) ^d

(Takeda ら 2010)

c-d 列内で異符号間に有意差あり; $P < 0.05$ (χ^2 検定)

表4. 卵子の由来の違いがクローン胚の体外発生能に及ぼす影響

卵子	培養数	分割数 (%)	胚盤胞数 (%)
体外成熟	78	50 (64)	18 (23) ^a
体内成熟	24	17 (71)	11 (46) ^b

(Akagi ら 2008)

a-b 列内で異符号間に有意差あり; $P < 0.05$ (χ^2 検定)

に影響を及ぼすことが示唆された。

3. レシピエント卵子の由来

体細胞核の初期化はレシピエント卵子内で起こるため、レシピエント卵子の品質を改善することはクローン胚発生能の向上に繋がると考えられる。我々は、胚発生能の向上を目指して核移植のレシピエント卵子として経膈採卵により採取した体内成熟卵子を用いて発生率を調査した。その結果、レシピエント卵子として体外成熟卵を用いた場合 (23%) に比べ、体内成熟卵を用いることでクローン胚の胚盤胞発生率 (46%) は有意に高い値を示した (表4) (Akagi ら 2008)。以上の結果から体内成熟卵と同等の発生能が得られるように、現在の体外成熟培養法の更なる改良が必要であると考えられた。

4. おわりに

我が国で世界に先駆けて体細胞クローン牛が誕生 (Kato ら 1998) して以来、10年以上が経過した。この間にクローン胚の胚盤胞形成率が向上している報告はあるが、現在のところクローン牛の産子生産率の改善には至っていない。ウシでは妊娠期間が長い点と大規模な胚移植が困難なため、体外発生能により実験処理の有効性の評価が行われる場合が多い。しかし、クローン胚では体外発生能とその後の受胎能とは関連しない場合が多いため、胚移植前の発生率以外の新しい胚の品質評価法の開発が望まれる。

文 献

- Akagi S, Takahashi S, Adachi N, Hasegawa K, Sugawara T, Tozuka Y, Yamamoto E, Shimizu M, Izaike Y. 2003. In vitro and in vivo developmental potential of nuclear transfer embryos using bovine cumulus cells prepared in four different conditions. *Cloning and Stem Cells* 5, 101-108.
- Akagi S, Kaneyama K, Adachi N, Tsuneishi B, Matsukawa K, Watanabe S, Kubo M, Takahashi S. 2008. Bovine nuclear transfer using fresh cumulus cell nuclei and in vivo- or in vitro-matured

cytoplasts. Cloning and Stem Cells 10, 173-180.

Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science 282, 2095-2098.

Takeda K, Akagi S, Takahashi S, Onishi A, Hanada H, Pinkert CA. 2002. Mitochondrial activity in response to serum starvation in bovine (*Bos taurus*) cell culture. Cloning and Stem Cells 4,

223-230.

Takeda K, Tasai M, Akagi S, Matsukawa K, Takahashi S, Iwamoto M, Srirattana K, Onishi A, Tagami T, Nirasawa K, Hanada H, Pinkert CA. 2010. Microinjection of serum-starved mitochondria derived from somatic cells affects parthenogenetic development of bovine and murine oocytes. Mitochondrion 10, 137-142.