

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19300150  
 研究課題名 (和文) ラット顕微授精の効率化と GS 細胞由来精子細胞からの産仔獲得  
 研究課題名 (英文) The improvement of microinsemination techniques and the production of transgenic offspring with GS cell-derived spermatids in the rats  
 研究代表者  
 平林 真澄 (HIRABAYASHI MASUMI)  
 生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・准教授  
 研究者番号：20353435

研究成果の概要 (和文)：本研究の究極の目的はノックアウトラット作製の基盤技術を構築することであり、顕微授精技術の高度化を図るとともに、生殖幹細胞 (GSCs) や胚性幹細胞 (ESCs) を経由したトランスジェニック産仔の作出を目指した。その結果、ラットで GSCs と ESCs の樹立でき、それぞれにレンチウイルス法・顕微授精法およびエレクトロポレーション法・キメラ作製法を適用することによって、外来性蛍光タンパク質遺伝子を導入したラット産仔を得ることに成功した。

研究成果の概要 (英文)：The ultimate aim of this study is to establish reproductive technology for production of knock-out rats, by improving microinsemination techniques and producing rat offspring via transfected germ stem cells (GSCs) and embryonic stem cells (ESCs). As the primary result obtained, transgenic rats expressing GFP gene were successfully produced, when the established GSCs were subjected to lentiviral transfection and round spermatid injection. Transgenic rats expressing Kusabira-Orange gene were also produced via blastocyst injection of ESCs established and transfected by electroporation. It was shown for the first time that the GSCs and ESCs can contribute to the production of transgenic offspring in the rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	8,100,000	2,430,000	10,530,000

研究分野：発生工学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：ラット、蛍光タンパク質遺伝子、精子幹細胞、人為的活性化、円形精子細胞、胚性幹細胞、精細管移植、キメラ

## 1. 研究開始当初の背景

精子や精子細胞を用いた顕微授精技術は今や受精生理の研究目的にとどまらず、ヒトの男性不妊患者の子孫獲得に有効な方法と

して臨床応用されている。1988年にウサギの卵細胞質内精子顕微注入 (ICSI) により初めて産仔が得られて以来 (Hosoi et al.)、様々な動物種において ICSI の成功例が報告されて

いる。実験動物では1995年にマウスでのICSIによる産仔獲得が報告され (Kimura & Yanagimachi)、さらに精子形成過程のより早い段階である円形細胞や伸張精子細胞を用いた顕微授精 (ROSI および ELSI) による産仔の作出例も報告されている。しかし、ラットに関しては ICSI、ROSI を含む顕微授精による産仔獲得例は近年まで報告されていなかった。それは、ラット卵子が体外において自発的に活性化すること、そしてラット精子がかなり特殊な形状 (釣り針様) を持つことが要因であると考えられた。

我々は、ラット未受精卵子は体外に取り出されても40分以内であればほとんどがICSIに適した第二減数分裂中期 (Met-II) で保たれることを明らかにし (Kato et al., JRD 47, 2001)、ラット精子の形状を利用した、注入方法の改良と径の細いピペットを使用することで、ICSI由来のラット産仔を得ることに世界で初めて成功した (Hirabayashi et al., Transgenic Res 11, 2002)。

さらに、ラット卵子に適した活性化条件を検討することで、ROSIによる産仔の獲得にも成功し (Hirabayashi et al., MRD 62, 2002)、その後の検討により直流パルスとジメチルアミノプリンを併用処理した卵子を用いた方が産仔への発生率が高いことも明らかにした (Kato et al., Contemp Top Lab Anim Sci 43, 2004)。このように我々はラットの顕微授精の技術開発に成功し、マウス同様に不妊系統を救済する手段としてだけでなく外来遺伝子を導入する場合にも適用できることを証明した (Kato et al., MRD 69, 2004, Hirabayashi et al., MRD 70, 2005)。ラットの顕微授精で安定した成績を出せる研究チームは我々の他にはないが、顕微授精技術をロックアウト (KO) ラットの作製手段として用いるのならば、現状の個体発生率では十分とは言えず、さらなる向上が望まれる。

## 2. 研究の目的

マウスではES細胞を利用することや、体細胞クローン作製技術を適用することで特定遺伝子機能を破壊したKOマウスも作製されている。しかし、ラットではES細胞株の樹立は極めて困難であり、成功例はいまだ報告されていない。また、体細胞クローンラットの作出例も2003年に初めて報告された (Zhou et al.) が、その再現性は未だに確認されていない。

最近、体外で未分化なまま継代維持でき、円形精子細胞へと分化誘導できる精原細胞株の樹立がマウスで報告された (Feng et al.)。また、培養マウス生殖幹細胞 (GS細胞) に遺伝子改変を加えることで、特定遺伝子を欠損させたKOマウス作出の成功例が報告され (Shinohara et al. 2006)、これらの技術と顕微授

精技術を組み合わせることでKOラット作製への道が開けると考えられる。我々は、ラットの精原細胞をマウスの精細管内に移植することで、ラットの精細胞ならびに精子に分化させ、これらの精子細胞をラット未受精卵子に顕微授精して作製した受精卵から世界で初めてラット産仔を作出することに成功した (Shinohara et al. 2006)。現在、特定の遺伝子を狙って破壊することが可能な動物種はマウスに限られ、他の動物ではコストが高く実用的ではない。ラットはマウスよりも大きいことから手術操作も容易であり、生物・医学分野の生理学的な研究に用いられ、実験データなどの蓄積もあるためKOラットの作製が切望されている。そこで、ラットの顕微授精技術をさらに高度化し、GS細胞由来精子細胞の顕微授精による世界初のKOラットを作製の基盤技術を構築することが本研究の最大の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 円形精子細胞の顕微授精 (ROSI) による産仔作出効率の改善

我々はこれまでに凍結保存したラット円形精子細胞の顕微授精による産仔作製を報告してきた (Hirabayashi et al., MRD 62, 2002; Kato et al., Contemp Top Lab Anim Sci 43, 2004) が、精巣から調製したばかりの新鮮精子細胞を用いると産仔率は顕著に低かった。本実験では円形精子細胞 (凍結-融解 vs 新鮮)、活性化処理開始のタイミング (ROSI前 vs ROSI後)、そして活性化方法 (DCパルス vs イオノマイシン) がラットROSIに及ぼす影響を調べた。円形精子細胞はSlc:SD雄ラットの精細管から調製し、一部は7.5%グリセリンと7.5%FCSを含む保存液にて-196°Cで凍結保存した。過剰排卵誘起したSlc:SD雌ラットからhCG投与14-18時間目に未受精卵を採取し、ROSI40分前あるいはROSI10分後にDCパルス (100 V/mm, 99  $\mu$ sec, 2回) かイオノマイシン (5  $\mu$ M, 5分) により活性化誘起した。そしてROSIから23-25時間培養後、生存胚を移植して産仔率を調べた。

(2) 顕微授精に由来するラット前核期卵のDNA脱メチル化動態

エピジェネティック変化の1つであるDNAの脱メチル化現象は胚発生と密接な関係があると示唆されており、マウスやラットでは受精直後の精子由来ゲノムが急激に脱メチル化される。マウスではこの能動的脱メチル化動態は前核期卵を円形精子細胞注入法 (ROSI) で作製した場合に影響を受ける一方、体外受精 (IVF) や卵細胞質内精子注入法 (ICSI) に由来する前核期卵では体内受精卵と同様の挙動を示すと報告された。本実験では前核期卵の作製方法と脱

メチル化動態との関係が明らかにされていないラットにおいて、前核期卵を体内受精、IVF、ICSI、および ROSI によって作製し、雄性ゲノム DNA におけるメチル化量の推移を調べた。① 体内受精区：過排卵誘起・交配した 4-7 週齢の Slc:SD 雌ラットから hCG 投与 20、24、28 時間目に採取した。② 体外培養区：hCG 投与 20 時間目に採取した体内受精卵を 4 および 8 時間培養した。③ IVF 区：hCG 後 14 時間目の卵丘卵母細胞複合体を精巣上体尾部精子と 2 時間共培養し、媒精時間を含め計 6、10、14 時間培養した。④ ICSI 区：裸化卵子に精巣上体尾部精子頭部を Piezo-ICSI し、6、10、14 時間培養した。⑤ ROSI 区：精巣由来の円形精子細胞をイオノマイシン処理 (5  $\mu$ M、5 分間)した裸化卵子に注入し、シクロヘキシミド処理 (5  $\mu$ g/mL、4 時間) 後、ROSI を起点に 6、10、14 時間培養した。前核期卵サンプルには抗 5-メチル化シトシンを一次抗体とした免疫染色を施し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡下で取得した画像に基づいて同じ卵子内の雌性前核の総輝度に対する雄性前核の総輝度比 (Relative Methylation: RM) を求めた。

### (3) レンチウイルスで遺伝子導入した精子幹細胞からのトランスジェニック(Tg)ラット作製

精子幹細胞からのノックアウト動物作製には、試験管内での精子幹細胞の遺伝子改変と遺伝子改変された幹細胞からの精子細胞への分化およびそれに由来する子孫の作製が必要となる。我々はこれまでにラット精子幹細胞をマウスで発生させ、そこから得た精子で子孫作製に成功したことを報告した (PNAS 103, 13624 (2006))。そこで、遺伝子改変した精子幹細胞からの子孫作製をマウスへの異種移植法を用いて行った。今回は特に ES 細胞の遺伝子破壊によく利用されているレトロウイルス、レンチウイルスベクターを用いた検討を行った。生後 10 日から 14 日の SD ラットの精巣をトリプシン、コラゲナーゼによる酵素処理によりバラバラにした細胞とし、ここに enhanced green fluorescence protein (EGFP) を発現するレトロウイルスもしくはレンチウイルスベクターを感染させた。ウイルス感染した培養細胞はブスルファン処理により不妊になったヌードマウスの精巣内に移植した。移植後、5 ヶ月目に精巣をバラバラにし、EGFP を発現するラット生殖細胞を回収し、顕微授精に供した。

### (4) *c-myc* を過剰発現する雄生不妊トランスジェニック雄ラット精巣を利用した精子幹細胞移植

精原細胞の精子形成能を調べるためには

精細管への移植が必須で、マウスでは精原細胞欠損系統 (W/W<sup>v</sup>) やブスルファンを投与して精巣内の精原細胞を枯渇状態にしたものをレシピエントとして用いる。しかしラットには W/W<sup>v</sup> のような特徴を持つ変異系統が存在せず、ブスルファン投与によるレシピエントラットの作製も困難である。そこで *c-myc* を全身性に過剰発現させたラットが精子細胞のアポトーシスによって不妊になっていることに着目し、このトランスジェニック系統 (MT-*myc*) が精細胞移植のレシピエントとして利用可能かどうか、検討した。

ドナー精細胞は 7-15 日齢の Homozygous EGFP トランスジェニックラットより採取し、 $5 \times 10^7$  cells/ml の濃度になるよう 10%FBS を添加した DMEM 液に懸濁した。レシピエントラットには 25-28 日齢の MT-*myc* を用い、精巣あたり 20-150  $\mu$ l の精細胞懸濁液を精巣網より注入した。そして 3 ヶ月後、摘出した精巣に UV を当てて EGFP 陽性コロニーを数え、精巣の病理組織切片を作製した。また、一部のコロニーから円形精子細胞および成熟精子を調製し、顕微授精 (ROSI/ICSI) によってこれらが EGFP 産仔への正常発生に寄与できるかを検討した。

### (5) CAG/venus トランスジェニックラット胚盤胞に由来する ES 細胞株の樹立

遺伝子ターゲティングによるゲノム改変ラット個体の作製技術が切望されてきたが、マウスでの手法をラットに適用しても ES 細胞株を樹立することは困難だった。しかしごく最近、3 種類のインヒビターセットを添加した培養液を用いることによりラット ES 細胞株が樹立できたという報告がなされた (Cell 135; 2008)。本実験では、その方法論の信憑性を確かめるべく、追試を行った。CAG/venus-Tg ラット由来の 4.5 日目胚盤胞 9 個から酸性タイロド処理により透明帯を除去し、FGF レセプター阻害剤、MEK 活性化阻害剤、GSK3 阻害剤、およびラット LIF を含む N2B27 培地とともにマイトマイシン処理マウス繊維芽細胞上に播種した。7 日後に増殖した ICM を単離し、ガラスキャピラリーで数個の小塊にばらしてさらに 7 日間培養した。0.05%トリプシン処理を経て増殖コロニーを数回継代した。樹立した ES 細胞の未分化能を調べるため、アルカリフォスファターゼ活性を、市販キットを用いて調べた。また、In vivo での多分化能を調べるためヌードラットの皮下に ES 細胞  $2.5 \times 10^5$  個を移植し、テラトーマの形成を観察した。個体への寄与は、Crlj:WI および Crlj:WI と DA/Slc の F1 由来の 4.5 日目胚腔内に継代 6-8 代目の ES 細胞 10 個を顕微注入し、偽妊娠雌の子宮角に移植することによりキメラの作製を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 円形精子細胞の顕微授精 (ROSI) による産仔作出効率の改善

排卵卵子を DC パルスで活性化誘起した場合、凍結精子細胞を用いるときは ROSI 前に、新鮮精子細胞を用いるときは ROSI 後に、活性化処理を開始した方が高い産仔率が得られた (凍結-融解区 4.8 vs 3.3%、新鮮区 0 vs 4.3%)。これと同じ傾向はイオノマイシンで活性化誘起した場合にも認められた (凍結-融解区 3.6 vs 1.2%、新鮮区 2.7 vs 6.7%) (図 1)。

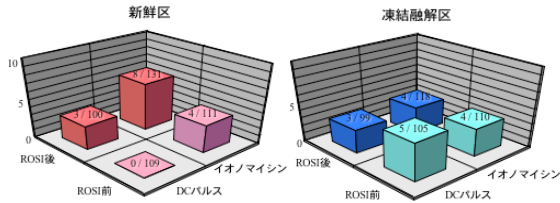


図1: 顕微授精による産仔作出効率の改善

結論として、ラット ROSI 胚の産仔発生において新鮮精子細胞を用いる場合は ROSI 後に、凍結-融解精子細胞の場合は ROSI 前に活性化することが望ましいことを明らかにした。

##### (2) 顕微授精に由来するラット前核期卵の DNA 脱メチル化動態

対照となる体内受精区の平均 RM 値は 20 時間目から 24 時間目にかけて有意に低下した。体外培養区でもこの時期に同レベルの RM 値低下が起こったが、これは既報とは異なる結果だった。IVF 区と ICSI 区でも卵齢を、hCG 投与を起点に計算すると上記時期に相当する 6 時間目から 10 時間目にかけて RM 値の有意な低下が起こったが、その程度は体内受精区ほど顕著ではなかった。

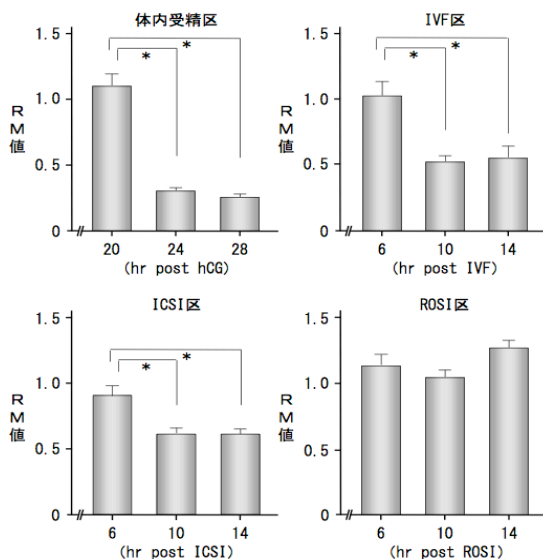


図2: ラット雄性ゲノムの能動的脱メチル化動態 (平均±SEM, \*P<0.05)

一方、ROSI 区では RM 値に有意な変動は認められず、27%の卵子にこの実験区特有の前核形態異常が観察された。最終観察時点の hCG 後 28 時間目 (体内受精区・体外培養区) あるいは IVF・ICSI・ROSI 後 14 時間目において RM 値が 0.4 未満になるまでに能動的脱メチル化が進行した前核期卵の割合は、体内受精区、体外培養区、IVF 区、ICSI 区、ROSI 区でそれぞれ、98、100、48、17、0%だった (図 2)。

結論として、① 体内受精卵を体外培養しても雄性ゲノムの能動的脱メチル化動態に影響しないこと、② IVF 由来および ICSI 由来の前核期卵では RM 値が下落する時期は体内受精卵と同じでもその程度は弱いこと、③ ROSI 由来の前核期卵には雄性ゲノムの能動的脱メチル化自体が観察されないこと、の三点をラットにおいて明らかにした。

##### (3) レンチウイルスで遺伝子導入した精子幹細胞からのトランスジェニックラット作製

回収された円形精子細胞を用いて合計 742 個の卵細胞に顕微授精を行ったところ、31 匹の産仔を得た。このうち 15 匹が EGFP を発現するトランスジェニックラットであった (図 3-D)。興味深いことにレトロウイルスを用いた場合には産仔を得ることはできたが (6 匹/312 個の卵子)、トランスジェニック動物を得ることができなかった。これはレンチウイルスの方が効率よく遺伝子改変に利用できることを示している (25 匹/430 個の卵子、15 匹のトランスジェニック産仔)。この作製効率は通常の前核への DNA 注入法を用いた場合に比較して、異種移植法を用いた場合の方が約 5-10 倍の効率でトランスジェニックラットの作製ができることを示しており (10.3% vs. 1-2%)、精子幹細胞を利用した場合の利点を明らかにした。

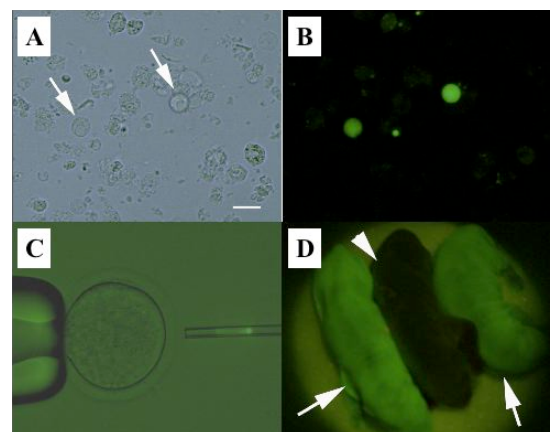


図3: ドナー細胞由来円形精子細胞を用いた Tg ラット作製  
精細管から採取した円形精子細胞 (A; 矢印)、EGFP 励起下 (B)、EGFP 陽性細胞の顕微授精 (C)、顕微授精により生まれた産仔 (D); EGFP-Tg 産仔 (矢印) およびリッターメイト (矢頭)、Bar; 20µm)



(4) *c-myc* を過剰発現する雄生不妊トランスジェニック雄ラット精巣を利用した精子幹細胞移植

ドナー細胞を移植することに成功した9個のレシピエント精巣中5個(55.6%)で1~8個のEGFP発現コロニーが観察された。ドナー細胞が生着した精細管ではEGFPを発現している精子細胞が見られ、成熟精子までの正常な精子形成像も観察できた(図4)。EGFP陽性の精細管から採取した精子細胞を注入した39個のROSI卵子、および成熟精子を注入した48個のICSI卵子をそれぞれ2匹の受

表1. ICSI/ROSIによる産仔作出

顕微注入法	移植卵数	産仔数(%)	EGFP産仔数(%)
ICSI	48	11 (23)	8 (17)
ROSI	39	10 (26)	5 (13)

胚雌に移植したところ、それぞれ5匹(12.8%)と8匹(16.7%)のEGFP産仔が得られた(表1および図5)。

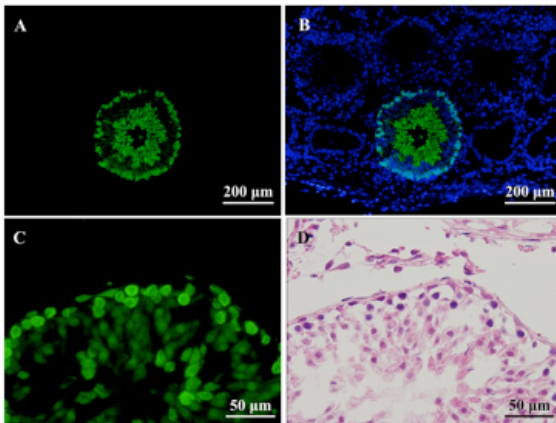


図4: ドナー細胞由来の精子形成が起こったMT-*myc* 精細管組織像 (A)ドナー細胞由来のEGFPを発現する精細管断面。基底膜上に精原細胞が配列し、内管には精子残余体が見える。(B) DAPI染色(青)とのMerge像。(C) ドナー細胞由来の精子形成が進行している。(D) C断面のHE染色像。

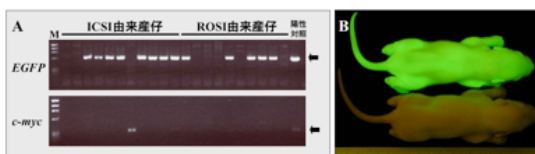


図5: 産仔ラットのPCR解析(A)と表現系(B)

結論として、①*c-myc* を過剰発現するTgラットの精細管には移植したドナー細胞が産仔発生に寄与する精子細胞および精子へ分化するための必要なニッチが残っていた、②MT-*myc* ラット系統は、完全な不妊ではなく、一部の精細管には産仔発生に寄与する精子が生産されていた、③MT-*myc* ラット系統は精子細胞移植のためのレシピエントとして利用可能なこと、の三点が明らかとなった。

(5) CAG/venus トランスジェニックラット胚盤胞に由来するES細胞株の樹立

9個の胚盤胞から2ラインのアルカリフォスファターゼ陽性のES細胞株が樹立できた(図6)。多分化能を調べるためF344/Jcl-rnu/rnuラットの皮下にES細胞 $2.5 \times 10^5$ 個を移植したところ、5週間後に肝・消化管(内胚葉)、骨・軟骨・筋肉(中胚葉)、神経組織・上皮(外胚葉)を含むテラトーマの形成が確認できた。

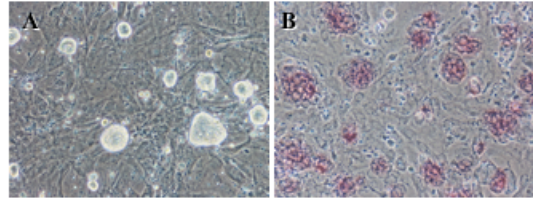


図6: 継代6代目のラットES細胞(A)とアルカリフォスファターゼ陽性像(B)

Crlj:WI および Crlj:WI と DA/Slc のF1由来の4.5日目胚腔内に継代6~8代目のES細胞10個を顕微注入し、偽妊娠雌の子宮角に移植することによりキメラの作製を試みた。その結果、すべてのE15.5胎仔でvenus遺伝子の発現が確認でき(22/22; 100%)、出産産仔におけるキメラ率も極めて高かった(9/11~17/17; 82~100%)(表2および図7)。これらのキメラ個体内、rESWiv3i-1では3匹中2匹が、rESWiv3i-5では1匹中1匹が生殖系列に寄与することを確認した。

表2. CAG/Venus由来ES細胞からのキメラ作製

ライン名	継代数	注入数	胎仔数	産仔数	解析数	キメラ数
rESWiv3i-1 (XX)	6	17	13 (77%)	-	13	13 (100%)
	6	34	-	21 (62%)	17	17 (100%)
	17	28	17 (61%)	-	17	14 (82%)
	17	28	-	14 (50%)	14	11 (79%)
rESWiv3i-5 (XX)	8	12	9 (75%)	-	9	9 (100%)
	8	13	-	11 (85%)	11	9 (82%)
	18	22	7 (32%)	-	7	7 (100%)
	18	33	-	14 (42%)	14	14 (100%)

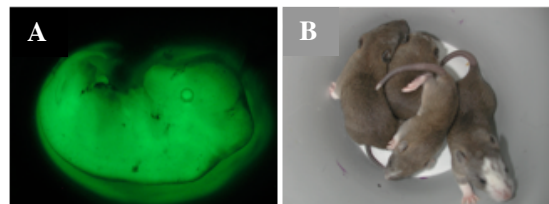


図7: 15.5日齢のキメラ胎仔(A)と生後2週齢のキメラ産仔(B)

結論として、①CAG/venus トランスジェニックラット由来の胚盤胞からES細胞2株を樹立することに成功した、②両ES細胞株の未分化能はALP活性により、多分化能はテラトーマ形成とキメラ産仔により証明できた、③本ES細胞株に由来するキメラ個体の出現率は高く、両株とも生殖系列へ寄与することを確認した、の三点が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Hirabayashi M, 他 5 名. Rat transgenesis via embryonic stem cells electroporated with Kusabira-orange gene. *Mol. Reprod. Dev.* 77: 474. (2010). 査読有
- ② Hirabayashi M, 他 6 名. Establishment of rat embryonic stem cell lines that can participate into germline chimerae at high efficiency. *Mol. Reprod. Dev.* 77: 94. (2010). 査読有
- ③ Yoshizawa Y, 他 3 名, 3 番目. Impaired active demethylation of paternal genome in pronuclear-stage rat zygotes produced by in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Reprod. Dev.* 77: 69-75. (2010). 査読有
- ④ Hirabayashi M, 他 5 名. Availability of subfertile transgenic rats expressing *c-myc* gene as recipients for spermatogonial transplantation. *Transgenic Res.* 18 (1): 135-141. (2009). 査読有
- ⑤ Kanatsu-Shinohara M, 他 5 名, Hirabayashi M, Shinohara T. Production of transgenic rats via lentiviral transduction and xenogenic transplantation of spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 79: 1121-1128. (2008). 査読有
- ⑥ Mashimo T, 他 9 名, 8 番目. An ENU-induced mutant archive for gene targeting in rats. *Nat. Genet.* 40: 514-515. (2008). 査読有
- ⑦ Hirabayashi M, 他 3 名. Direct comparison between ICSI-mediated DNA transfer and pronuclear DNA microinjection for producing transgenic rats. *Exp. Anim.* 57 (2): 145-148. (2008). 査読有
- ⑧ Hochi S, 他 3 名, 4 番目. Live rats resulting from injection of oocytes with spermatozoa freeze-dried and stored for one year. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 890-894. (2008). 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 平林 真澄, 他. CAG/venus トランスジェニックラット胚盤胞に由来する ES 細胞株の樹立. 第 102 回日本繁殖生物学会, 奈良県奈良市. 2009. 9. 10.
- ② Takada T, 他. Derivation of rat cell line which differentiate into visceral yolk sac in vivo. The 7th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, Barcelona, Spain. 2009. 7. 10.
- ③ 平林 真澄, 他. IVF、ICSI、ROSI に由来するラット前核期卵の DNA 脱メチル化動態, 第 56 回日本実験動物学会, 埼玉県さいたま市. 2009. 5. 15.
- ④ 吉沢 雄介, 他. 体内受精、体外受精、および顕微授精に由来するラット前核期卵の DNA 脱メチル化動態. 第 101 回日本繁殖生物学会, 福岡県博多市. 2008. 9. 20.

- ⑤ 平林 真澄, 他. *c-myc* を過剰発現するトランスジェニック雄ラットは精子幹細胞移植のレシピエントとして利用できるか? 日本実験動物科学技術 2008/第 55 回日本実験動物学会, 宮城県仙台市. 2008. 5. 15.
- ⑥ 保地 眞一, 他. ラット ICSI 系で作製した前核期卵における染色体異常の誘発要因について. 第 100 回日本繁殖生物学会, 東京都文京区. 2007. 10. 21.
- ⑦ 渡辺 香, 他.  $-196^{\circ}\text{C}$ 、 $+4^{\circ}\text{C}$ 、または $+25^{\circ}\text{C}$  で長期保存したフリーズドライラット精子の ICSI による個体発生成能. 第 48 回日本哺乳動物卵子学会, 山梨県甲府市. 2007. 5. 26.
- ⑧ 加藤 めぐみ, 他. ラット ROSI において新鮮精子細胞と凍結精子細胞のどちらを用いるかで卵活性化処理の適期が異なる. 第 54 回日本実験動物学会, 東京都江戸川区. 2007. 5. 24.

[図書] (計 1 件)

- ① Hirabayashi M, Hochi S. Chapter-9. Generation of transgenic rats by ooplasmic injection of sperm cells exposed to exogenous DNA. "Rat genomics: Methods and Protocols" (Eds. I Anegon) Humana Press, Totowa. 127-136. (2010).

[その他]

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/mamtg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平林 真澄 (HIRABAYASHI MASUMI)

生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・准教授

研究者番号：20353435

(2) 研究分担者

篠原 隆司 (SHINOHARA TAKASHI)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30322770

(3) 連携研究者

該当者なし