

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580320

研究課題名（和文）人工染色体ベクターを活用した遺伝子改変動物の開発

研究課題名（英文） Development of transgenic animals using a human artificial chromosome (HAC) vector

研究代表者

音井 威重 (OTOI TAKESHIGE)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：30311814

研究成果の概要（和文）：ネコ胎児線維芽細胞に蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を搭載した人工染色体(HAC)ベクターを移入した結果、2つの細胞系が確立できた。この細胞を核として、除核卵母細胞と融合・再構築した。融合時間(30および60 μ sec)を比較した結果、短時間(30 μ sec)での融合が有意に胚盤胞形成率を増加させた。さらに HAC ベクター細胞由来クローン胚を13頭のレシピエントに移植した結果、移植後62日目に1頭の子猫(74g)を作出する事に成功した。

研究成果の概要（英文）：We established the two cell lines of cat fibroblasts with a human artificial chromosome (HAC) vector containing the green fluorescent protein (GFP). By inserting the transgenic cell into an enucleated cat egg, the cloned embryos were produced. The ability for cloned embryos to develop to blastocysts was higher in the short-time fusion group (30 μ sec) than in the long-time fusion group (60 μ sec). The embryos were transferred to 13 recipients. Only one recipient became pregnant and delivered a live kitten (74g).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：遺伝子改変動物、人工染色体、クローン、蛍光タンパク質、ネコ

1. 研究開始当初の背景

ヒト人工染色体(HAC)はヒトやマウスの細胞株中で、細胞染色体と同調して複製・分配され、細胞あたり1コピーを保つことから新規哺乳類ベクターとして期待されている。ヒト人工染色体ベクターの利点として宿主

染色体に挿入されず独立して維持される(宿主遺伝子を破壊しない)。一定のコピー数で安定に保持され、宿主細胞の生理的発現制御を受ける(過剰発現や発現消失が起きない)。さらに、導入可能なDNAサイズに制限がない(発現調節領域を含む遺伝子や複数遺伝子/

アイソフォームの導入が可能)等の特徴を持つ。

このようにHACは、従来のベクター（ウイルス、YAC, BAC, PAC, cosmid, plasmid）には搭載できない大きな遺伝子サイズも挿入可能であり、新たな機能解析のためのベクター系として、さらに遺伝子治療用ベクターとしても有用である。

一方、ネコは脳神経科学等の分野でモデル動物として主に用いられているほか、ヒトと互いに共通性のある感染症、腫瘍があり、その効果的な治療と予防策の開発のために有効なモデルとしても利用されている。さらに、ネコはマウスよりも大きく、サルよりも安価で中間モデル動物種として扱いやすい動物である。しかし、搭載遺伝子サイズに制限のない人工染色体（HAC）をベクターとしたモデルネコは作出されていない。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子搭載サイズに制限がないヒト人工染色体（Human Artificial Chromosome: HAC）ベクターを利用して、感染症、腫瘍の治療・予防および臓器移植や細胞・組織移植研究のための体細胞クローン由来モデル動物を確立することを目標とした。まず、安定的に蛍光タンパク質（GFP）を発現する遺伝子改変ネコを作出する。その手法として、GFP-HACベクターを挿入した体細胞を作製し、体細胞クローン技術により、遺伝子改変ネコを作出する。将来的にはHAC上に目的に応じた種々の遺伝子を搭載する。

3. 研究の方法

21HACベクターを用いて蛍光タンパク質（GFP）を発現する遺伝子改変ネコを作出する。そのために必要なGFP搭載21HACベクターは研究協力者（鳥取大学、押村光雄教授）より供与され、それに係る技術移転を受ける。様々な臓器由来のネコ体細胞へのHACベクター移入効率について検討するほか、最適の受容細胞を選定する。次に、GFP搭載HAC保有細胞を核として、体細胞クローン胚の発育率を指標に、受容細胞の適正を明らかにする。さらに、発育したクローン胚をレシピエントネコの卵管および子宮に移植し、胚の発育性を観察し、効率的な遺伝子改変ネコの作製技術を確立する。

(1) GFP搭載HACベクター移入効率の高いネコ体細胞（受容細胞）を確定

ネコ胎児から採取した繊維芽細胞にGFP搭載HACを移入し、その移入効率を検討する。なお、GFP遺伝子を搭載した21HACベクターの構造を維持するために、HACベクターを受容細胞に導入する方法として微小核細胞融合

法を使用する。

(2) クローン胚の発育率を指標とした最適受容細胞の選択・解析

GFP搭載HACを導入した様々な受容細胞を核として、除核卵母細胞と融合・再構築し、その後の発育率を指標に、受容細胞を比較し、胚発育にとっての最適の受容細胞および融合条件を明らかにする。

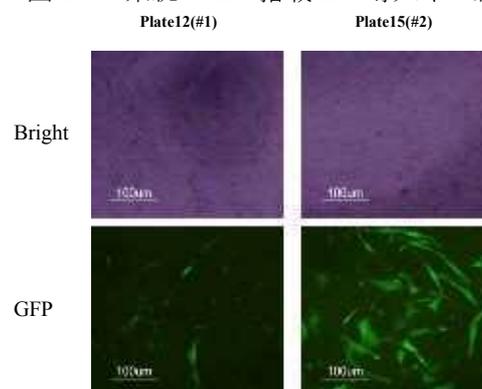
(3) クローン胚の子宮内での発育性を解明
GFP搭載HACを保有するクローン胚（GFP陽性）をレシピエントネコの卵管（1-2細胞期胚）もしくは子宮（桑実期胚～胚盤期胚）に移植し、子宮内での胚の発育性を解明する

4. 研究成果

(1) GFP搭載HACベクター移入ネコ体細胞（受容細胞）の確立

ネコ胎児の肺組織から採取した繊維芽細胞にGFP搭載HACを移入し、その移入効率を検討した。なお、GFP遺伝子を搭載した21HACベクターの構造を維持するために、HACベクターを受容細胞に導入する方法として微小核細胞融合法を使用した。その結果、移入効率は細胞の継代により生存性が低下し、その効率は数%であり、さらに、遊離した培養細胞において正常な形態を示した細胞は少なかったが、2系統の培養株由来受容細胞（GFP搭載HAC導入）が確立できた（図1）。

図1. 2系統のGFP搭載HAC導入ネコ細胞



(2) クローン胚の発育率を指標とした最適受容細胞の選択と融合時間の検討

体細胞クローン胚の発育は、移植される体細胞の種類により、その後の胚発育が異なることから、GFP搭載HACを導入した受容細胞を核として、除核卵母細胞と融合・再構築し、受容細胞由来の体細胞クローン胚の発育を比較検討した。GFP搭載HACベクター受容細胞を核として、除核卵母細胞と融合・再構築した。融合時間（30 および 60 μ sec）を比

較した結果、HAC ベクター受容細胞を核とした場合、短時間 (30 μ sec) が有意に胚盤胞形成率を増加させた。一方、対照として用いた胎児線維芽細胞を核とした場合、長時間 (60 μ sec) の融合時間がクローン胚の胚盤胞への発育率を増加させた (図 2, 3)。

図 2. 融合時間が HAC 受容細胞由来クローン胚の発育に及ぼす影響

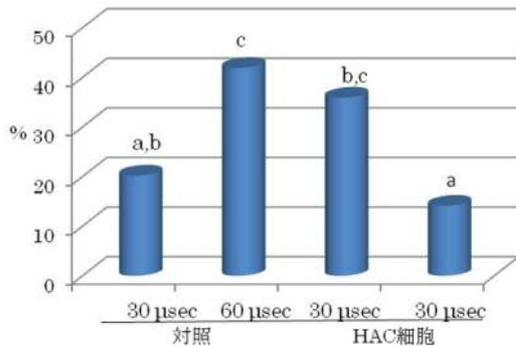
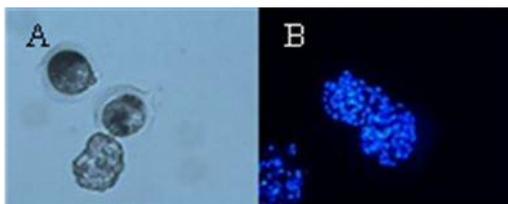


図 3. HAC 受容細胞由来クローン胚(A)と細胞数(B)



(3) クローン胚の子宮内での発育性
372 個の 2~4 細胞に分割したクローン胚 (GFP 陽性) を 13 頭のレシピエントネコの卵管 (2-4 細胞期胚) に移植した結果、移植後 62 日目に 1 頭の子猫 (74g) を作出する事に成功した (図 4)。

図 4. レシピエントネコと産子



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Wittayarat, M., Sato, Y., Do, T.K.L., Morita, Y., Chatdarong, K., Techakumphu, M., Taniguchi, M. and Otoi, T. Histone deacetylase inhibitor improves the development and acetylation levels of cat-cow interspecies cloned embryos. Cellular Reprogramming, 査読有, 2013, In press.
- ② Wittayarat, M., Fujiwara, A., Chatdarong, K., Techakumphu, M., Sato, Y., Tanihara, F., Morita, Y., Taniguchi, M. and Otoi, T. Cell cycle analysis and interspecies nuclear transfer of cat cells treated with chemical inhibitors. Acta Veterinaria Hungarica, 査読有, 2013, In press.
- ③ Luu, V.V., Hanatate, K., Tanihara, F., Sato, Y., Do, T.K.L., Taniguchi, M., and Otoi, T. The effect of relaxin supplementation of in vitro maturation medium on the development of cat oocytes obtained from ovaries stored at 4 ° C. Reproductive Biology 査読有, 2013, In press.
- ④ Tanihara, F., Kaedei, Y., Namula, Z., Luu, V.V., Sato, Y., Wittayarat, M., Taniguchi, M. and Otoi, T. Comparison of activation ability between feline and bovine oocytes. Acta Veterinaria Hungarica, 査読有, 2013, In press.
- ⑤ Wittayarat, M., Thongphakdee, A., Saikhun, K., Chatdarong, K., Otoi, T. and Techakumphu, M. Cell cycle synchronization of skin fibroblast cells in four species of family Felidae. Reproduction in Domestic Animals, 査読有, 48, 305-310, 2013
- ⑥ Murakami, M., Dong, Y.J., Suzuki, T., Taniguchi, M., Kaedei, Y., Sato, Y., Tanihara, F. and Otoi, T. Development and subsequent cryotolerance of domestic cat embryos cultured in serum-free and serum-containing media. Cryobiology, 査読有, 63, 170-174, 2011.
- ⑦ Wongsrikeao, P., Saenz, D., Rinkoski, T., Otoi, T. and Poeschla, E. Antiviral restriction factor transgenesis in the domestic cat. Nature Methods, 査読有, 8(10), 853-859, 2011.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Wittayarat, M., Namula, Z., Luu, V. V., Do, L. T. K., Sato, Y., Taniguchi, M. and Otoi, T Effect of trichostatin A on *in vitro* embryo development of interspecies nuclear transfer embryos reconstructed from cat donor nuclei and bovine cytoplasm. 39th Annual Conference of the IETS, Hannover, Germany, Jan. 20. 2013.
- ② Luu, V. V., Namula, Z., Kaedei, Y., Tanihara, F. and Otoi, T. Effects of ovary storage time on the quality and meiotic competence of cat oocytes. 38th Annual Conference of the IETS, Phoenix, AZ, USA, Jan. 8. 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

音井 威重 (OTOI TAKESHIGE)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号： 30311814

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：