

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 30 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380153

研究課題名(和文)ブタ卵の遠心・融合再構築法による生殖工学基盤・応用技術の確立

研究課題名(英文)Establishment of reproductive technology by centri-fusion method for porcine oocytes

研究代表者

菊地 和弘(Kikuchi, Kazuhiro)

独立行政法人農業生物資源研究所・動物発生分化研究ユニット・上級研究員

研究者番号：20360456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：ブタ卵を遠心し細胞質小片を融合させることにより、顕微操作技術を要しない生殖工学技術を確立することを目的とした。小片は褐色ならびに透明のものが含まれるが、褐色小片にはミトコンドリアが多数含まれていた。褐色小片から再構築した未受精卵で受精の効率が高かった。また、発生能が低下した卵に小片を融合した場合は受精・発生能を高めたが、小片のタイプで受精ならびに発生能に差がなかった。受精卵から得られた小片には卵の活性化を誘起する能力が認められた。これらの手法を基にして生殖工学応用技術の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：The objective of the study is to establish reproductive biotechnologies without micromanipulation but by fusion of ooplasmic fragments obtained after centrifugations of porcine oocytes. The fragments consisted of brownish and transparent ones; the former one contains a lot of mitochondria. The oocytes reconstructed from brownish fragments showed better fertilization ability. The oocytes showing low developmental ability were fused with the fragments, their fertilization and developmental abilities were improved, of which abilities were not different between two types of fragments. Furthermore, fusion of the fragments prepared from fertilized oocytes with the matured ones showed oocyte activation ability. These findings are now expected for further improvements of the technologies.

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：応用動物 発生・分化 発生工学 細胞操作 受精

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物において体細胞クローンや顕微授精などの発生工学研究が進展している。これらの操作には核の除去や注入などマイクロマニピュレータを用いた顕微操作が必須である。ところが、顕微操作の習熟には時間を要し、効率性は個人の技量に左右される。また、ひとつひとつの卵を操作するため、一度に大量の処理は不可能である。ここに、発生工学研究において基礎的知見の集積の遅れと、個体生産や遺伝子導入などの応用分野への非効率性が認められ、この顕微操作を回避する(マイクロマニピュレータを用いない)技術が待望されてきた。顕微操作を用いない方法として Peura and Vajta (Cloning Stem Cell, 2003)はウシでハンドメイドクローン作製法を報告した。卵を2つに切断する方法で染色体を含まない部分を選び(除核し)、体細胞と融合させるものである。この手法は簡便であるが効率化という点ではアドバンテージに乏しい。最近、私たちは、ブタにおいて従来の顕微操作法に変わる手法として、遠心・融合による体細胞クローン胚(以下、再構築クローン胚)を得る方法を開発した(Fahrudin et al., Cloning Stem Cells 2007)。遠心処理を2回行うことで、卵細胞質を小片化させる。ついで、卵細胞質の小片にHoechst-33342染色を施し、卵の核を蛍光顕微鏡下で観察することで、卵の核を有する細胞質小片と有しない細胞質小片に選別する。体細胞と核を有しない任意の数の小片と電気融合させることで再構築クローン胚が得られる。この手法には、大量の再構築胚を一度に省力的に作出できるというメリットがあり、職人芸的な顕微操作技術を必要としない。遠心・融合法は、クローン胚作製のみならず未受精卵や受精卵にも適用可能であり、その利用が期待されている。核を含む細胞質小片と任意の数の核を含まない小片を組み合わせ融合することにより小片集合卵を、操作をしていないインタクトな卵に任意の数の核を含まない小片を融合添加することにより小片添加卵の作出も可能である。小片には脂肪滴を含まないことから、家畜卵から脂肪滴を取り除き可視化させた小片集合卵を作製することも可能である。この技術によりこれまでブタ卵では不可能であった受精・発生現象を直接観察することが可能となる。また脂肪を含まないため超低温保存にも有益であり応用分野への適用が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、基礎的な知見の集積ならびに基本技術の確立として(1)を、さらに技術の

応用にむけた技術の開発として(2)を目的とした。

(1) 小片の詳細解析と可視化再構築卵作製ならびに発生の付与技術の開発

小片のタイプ分けとその評価

再構築クローン胚に関する論文(Fahrudin et al., 2007)では、再構築胚作出と胚発生能について報告したが、得られる小片の評価はなされていない。その後の予備実験において2回の遠心後の細胞質小片には細胞質が褐色のものと無色透明なものが混在することがわかった。本研究では、それぞれの小片のミトコンドリア等の細胞小器官の分布、エネルギー産生量についての検討を行った。

未固定・可視化卵の作製と解析

家畜卵、特にブタ卵やウシ卵には細胞質内に脂肪滴を大量に含むため、従来の手法では受精や初期発生の様々な諸現象を生きた状態でリアルタイムに捉えることは不可能であり、発生工学研究の遅れの大きな要因となっていた。ところが、この手法を用いると脂肪滴を偏在化させた細胞質を予め取り除くことが出来る。従って、脂肪滴を含まないクリアな細胞質を用いて小片集合卵を作製すれば、家畜卵においても、受精・発生率をそこなわずに核などを可視化出来る技術が確立され、この分野において大きなアドバンテージとなりうる。具体的には、受精時の侵入精子の形態的变化(クローン胚では導入体細胞核(クロマチン)の形態的变化)、その後の前核形成および卵割という一連の受精・発生現象を、生きた状態で詳細に解析できる。本研究項目では、小片集合卵を用いて、これまで不可能であったブタの受精卵・初期発生現象を生きたままの状態を観察できることを確認する。

発生能付与技術の開発

これまでに、発生能が劣る卵(成熟培養時の卵丘細胞が存在しない卵は受精能発生能が乏しいことが報告されている)に、遠心処理により得られる細胞質小片を融合する、いわゆる遠心・融合による卵の再構築法により、受精・発生能の改善が行えることを報告している(Linh et al., J. Reprod. Dev. 2011)。本研究では、高い発生能を有する細胞質小片を作製し、それを融合させることで高発生能を付与する卵を構築することを目的とする。具体的には、ミトコンドリア等の細胞内小器官の分布量に着目しより高い発生能を有すると想定される小片を選抜する。これを発生能の劣る卵、たとえば加齢卵や異

種移植卵巣から得られた卵に添加し、発生能を付与する手法を開発する。本研究では、卵丘細胞を成熟課程の途中で除去し人為的に発生能を低減させた卵を用いる。

(2) 卵の効率的活性化手法の確立

精子侵入による卵活性化を受けた細胞質をレシピエント卵子として使用できる、あるいはその細胞質から小片を作製しこれを核移植時に融合することによってレシピエント卵に活性化能を付与することが可能と想定される。これまでクローン胚の作製は電気刺激等の活性化刺激付与に頼っていたが効率的な活性化誘起ならびに胚発生は得られない。これらの処置によりクローン胚でも受精卵並の発生能へと改善される事が期待される。本研究では、未受精卵に受精卵由来の小片を融合し、活性化能を評価する。

そのほか、超低温保存技術への応用として、超低温による影響をうける脂肪滴を除くことで胚の保存効率の向上のための研究や、受精卵から小片を準備し精子を含む小片と含まない小片を分別し、それらを再構築することで単精子受精卵を作製する手法すなわち多精子受精回避技術の開発研究、また、これらの研究の最終段階として得られた再構築胚を雌豚に移植することによって子豚の生産にチャレンジすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小片の作製と選別

ブタ卵巣より未成熟卵を採取し定法通り成熟培養をおこなった。卵丘細胞を除去後、第一極体を放出した成熟卵を選別し、通常の体外操作液中で 13,000×g 9 分の遠心(第一遠心)処理を行った。透明帯を 0.5% pronase 処理後に除去後、上から 7.5、30、45%のパーコールの液相(いずれも 5 µg/mL の cytochalasin-B を含む)の最上層(7.5%)に静置し、引き続き 6,000×g 4 秒の遠心(第二遠心)処理をおこなった。細胞小片を採取し、約 60~70 µm のサイズの小片と、それよりも大きいサイズの小片(L 小片)に分別した。小型の小片はさらにその着色の度合いから褐色(B)小片ならびに透明(T)小片に分別した。それぞれのカテゴリーの小片の直径を計測し、回収率を求めた。本研究では、その細胞学的特徴を検索することを目的とすることから、以降は特徴的な B 小片ならびに T 小片の特性について検討した。活性型ミトコンドリアの分布量は、遠心前の卵もしくはそれぞれの小片の活性型ミトコンドリアを MitoTracker (MitoTracker Red CMXRos, Molecular Probes)により標識しレーザー共焦点顕微鏡による観察をおこなった。蛍光強度を NIH ImageJ (ver. 1.40)で解析した。透過型電子顕微鏡観察には、卵や小片を定法通

り固定、超薄切、電子染色を行い、ミトコンドリア等の細胞内小器官の分布を観察した。ATP 量の測定は、luciferin-luciferase 反応を利用したキット(FL-ASC, Sigma)を用いて、Stojkovic et al. (Biol Reprod, 2001)の方法を用いて行った。

再構築未受精卵の作製と体外受精

B ならびに T 小片を 5 µg/mL の Hoechst 33342 を含む液で処理し、落斜蛍光顕微鏡にて、それぞれにおいて核(分裂中期染色体)を含む小片と含まない小片に分別した。次に、1 個の核を含む小片と含まない 2 個の小片を、300 µg/mL の phytohemagglutinin を含む液中で接着し、1.5 kV/cm 20 µsec の DC パルスで融合刺激を付与した。1 時間後に融合したものを再構築卵(それぞれ B ならびに T 再構築卵)とし、凍結融解した精巣上体精子で定法通りに体外受精を行った。10 時間後に観察し、細胞質内の受精(前核形成)状況を確認し、あわせて固定・染色後に対比確認した。

低発生能卵への小片添加

発生能が劣る卵として、体外成熟培養 24 時間で卵周囲の卵丘細胞を除去してその後 20 時間を卵丘細胞の無い状態で培養した卵(D024 卵)を用いた。この卵は成熟するが、雄性前核形成率(=正常受精の一指標)は低く、その後の胚発生がきわめて抑制されることを既に報告している(Maedomari et al., Theriogenology 2007)。本研究では、B ならびに T 小片をそれぞれ 2 個ずつ(D024+2B ならびに D024+2T)、ならびにそれぞれの小片を 1 個ずつ(D024+BT)融合させた卵を作製した。これらの卵に前述の通り体外受精を行い、10 時間後の受精状況、さらに 6 日間の培養後に胚発生の状況を確認した。

(2) 受精卵からの細胞質小片の作製と融合

定法に従い体外成熟卵を作製し体外受精を行った。媒精後 3 時間で残存する卵丘細胞ならびに透明帯に付着する精子を除き、前述通りに 2 度の遠心処理を行って細胞質小片を回収した。さらに核(分裂中期染色体)を含む小片(SP+)と含まない小片(SP-)に分別した(この実験では、B ならびに T 小片は区別していない)。また対照区として受精させていない成熟卵から小片(cont)を作出した。別に用意した成熟卵にこれらの小片 2 個を電気刺激にて融合して、cytochalasin-B にて 2 時間処理を行い、媒精開始後 10 時間で固定し、卵の活性化状況(雌性前核形成)をしらべた。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア量の違う小片を作製した

小片を B 小片、T 小片ならびに H 小片に分

別できた(図1)。B小片、T小片ならびにH小片の平均直径は、それぞれ 61.2、72.1 ならびに 148.5 μm であった。B小片ならびにT小片の作製効率率は、核を含むあるいは含まない小片の合計として、それぞれ卵 1 個あたり 0.72、0.91 ならびに 0.18 個であった。H小片はその大きさならびに形態的な特徴から BならびにT小片の両者から構成される小片であると判断された。MitoTracker により活性型ミトコンドリアを標識しレーザー共焦点顕微鏡による観察、あるいは透過型電子顕微鏡観察によりミトコンドリア等の細胞内小器官の分布量を確認したところ、T および B小片はそれぞれ第1回目の遠処理卵の中層ならびに下層より由来し、両者の間にはミトコンドリア分布量に差があり(B小片=蛍光強度が 2.1>T小片=0.5)、ミトコンドリアを含む細胞小器官もB小片で密に存在していたがT小片ではほぼ確認されなかった。いっぽう ATP含有量は両小片の間に差がないことが明らかとなった(それぞれ、0.6 ならびに 0.7 pM)(図2)。

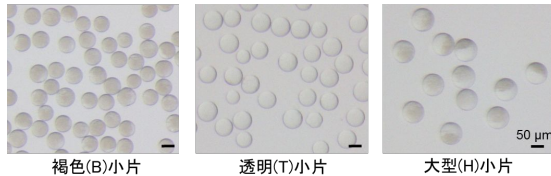


図1. 遠心処理後の小片の分類

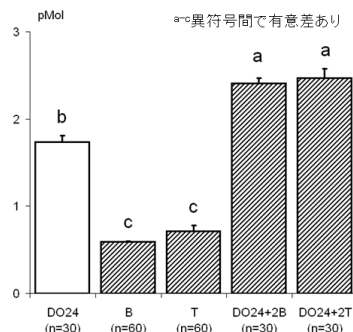


図2. ATP含量

再構築により未成熟卵が作製でき、未固定の状態でも受精現象が確認できた

BならびにT小片2個を別々に融合し、それぞれB再構築卵ならびにT再構築卵を作製することができた。両者とも脂肪滴を含まないため、当初の計画通り可視化ブタ卵として供試が可能であった。これらの卵に体外受精を行い、未固定状態での前核形成が確認できた(図3)。受精(精子侵入ならびに前核形成)に及ぼす影響を検討したところ、精子侵入率ならびに雄性前核形成率はB再構築卵(95.8%)にくらべてT再構築卵(66.7%)で有意に低下した。B再構築卵ではほとんどすべての卵で雄性前核が認められた(94.8%)。いっぽう、T再構築卵では受精しても前核が形成

されなる率が低く(50.0%)、精子頭部が膨化したままの状態のものが認められた。このデータは固定前後の観察で一致した。以上の結果から、再構築法により、ブタ卵から脂肪滴をあらかじめ取り除きクリアーな細胞質を用いて小片集合卵を作製して、前核形成までの受精・発生現象を生きた状態で詳細に解析できることが明らかになった。さらに、小片に含まれる細胞質小器官の分布の違いにより、精子侵入ならびに前核形成に影響をおよぼすことが示唆された。

発生能改善には小片の種類関与しない

融合卵(DO24+2B、DO24+2T ならびに DO24+BT)を作製し、体外受精を行ったところ、いずれも正常受精が観察され、体外胚培養により胚盤胞への発生が認められた。また、胚の品質(胚盤胞細胞数)は融合卵の中では同等であり、通常の体外生産胚に同様であった。しかし、融合を行わなかったもの(DO24 卵)では、融合区に比べ精子侵入率も低く胚発生は認められなかった(表1)。再構築実験区の間で、受精率や発生率に有意な差は認められなかった。以上の結果より、小片を発生能の劣る卵に融合・追加する場合、受精や発生は小片中のミトコンドリアの存在量に影響されないことが明らかとなった。ATP量に関しては、DO24に小片を融合することで卵あたりの量が増えるが、BならびにT小片に依存しなかった(図3)。一方で、卵細胞質内のミトコンドリアの活性が卵の受精や胚発生に影響を及ぼすことが示唆されている。実験結果より、添加されるミトコンドリアの活性あるいはその結果としてのATP量の増加というよりも、添加される細胞質に存在する因子が、もともと低発生能の卵に存在するミトコンドリアの活性に何らかの影響を及ぼし、受精率や胚発生率の向上するものと考察された。

表1. 低発生卵への細胞小片の融合による受精と胚発生の改善

実験区	供試卵数	精子侵入卵数 (%)	正常受精卵数 (%)	胚盤胞数(%)	胚盤胞細胞数
DO24	115	22 (19.1 ± 8.0) ^a	6 (27.3 ± 3.9) ^a	0 (0.0) ^a	-
DO24+2B	90	50 (55.6 ± 5.5) ^b	33 (66.0 ± 11.5) ^b	14 (9.8 ± 1.3) ^b	46.14 ± 4.6
DO24+2T	104	36 (34.6 ± 6.7) ^b	27 (75.0 ± 13.8) ^b	13 (8.1 ± 1.8) ^b	48.08 ± 9.3
DO24+BT	62	38 (61.3 ± 0.6) ^b	24 (63.2 ± 7.0) ^b	7 (10.3 ± 2.6) ^b	52.43 ± 9.2

^{ab} 異符号間で有意差あり

(2) 受精卵の小片は卵の活性化能を有する

受精卵より小片を回収し、SP+小片とSP-小片を分別できた。また対照区 cont 小片も回収できた。これらの小片と成熟卵を電気融合して10時間体外培養したところ、SP+とSP-を融合した場合は高い卵活性化率(=雌性前核形成率、それぞれ 86.6%ならびに 76.2%)が得られたが、contを融合した場合は23.2%と

低かった。受精卵の細胞質には卵を活性化させる因子が含まれることが示唆された。

なお、再構築により脂肪滴の含まれない再構築成熟卵や胚を作出する実験に関しては、予備実験を行ったが、生存卵は得られなかった。また、卵再構築技術をクローン胚作出法に応用する実験に関しては予備実験を行ったものの研究期間内の研究成果の提示は完結できなかった。今後別な機会を作り研究を継続させたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件)

金子浩之, 菊地和弘 ほか. ノードマウス体内におけるブタ原始卵胞の発育と卵の発生能. *J Reprod Engineer* 2010;13:1-6. http://sre.ac.affrc.go.jp/Contents/Vol_13/13_Kaneko.pdf 査読有.

Kikuchi K, Kashiwazaki N ほか. Xenografting of gonadal tissues into mice as a possible method for conservation and utilization of porcine genetic resources. *Anim Sci J* 2011;82:495-503. doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00919.x 査読有.

Viet Linh N, Kikuchi K ほか. Improvement of porcine oocytes with low developmental ability after fusion of cytoplasmic fragments prepared by serial centrifugation. *J Reprod Dev* 2011;57: 620-626. doi: 10.1111/j.1740-0929. 2011.00919.x 査読有.

Kaneko H, Kikuchi K ほか. Normal reproductive development of offspring derived by intracytoplasmic injection of porcine sperm grown in host mice. *Theriogenology* 2012;78:898-906. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.04.004. 査読有.

Kaneko H, Kikuchi K, Kashiwazaki N ほか. Generation of live piglets for the first time using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *PLoS ONE* 2013;8:e70989. doi: 10.1371/journal.pone.0070989. 査読有.

Tanihara F, Kikuchi K ほか. Evaluation of zona pellucida function for sperm penetration during in vitro fertilization in pigs. *J Reprod Dev* 2013;59:385-392. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/59/4/59_2013-021/_pdf 査読有.

Kaneko H, Kikuchi K ほか. Improved developmental ability of porcine oocytes grown in nude mice after fusion with cytoplasmic fragments prepared by

centrifugation: A model for utilization of primordial oocytes. *Theriogenology* 2013;80: 887-892. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.07.014. 査読有.

Egerszegi I, Kikuchi K ほか. Comparison of cytoskeletal integrity, fertilization and developmental competence of oocytes vitrified before or after in vitro maturation in a porcine model. *Cryobiology* 2013;67: 287-292. doi:10.1016/j.cryobiol. 2013.08.009. 査読有.

Viet Linh N, Kikuchi K ほか. Fertilization ability of porcine oocytes reconstructed from ooplasmic fragments produced and characterized after serial centrifugations. *J Reprod Dev* 2013; 59:549-556. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/59/6/59_2013-042/_pdf 査読有.

Tanihara F, Kikuchi K ほか. Roles of the zona pellucida and functional expression of the sperm-egg fusion factor “Izumo” during in vitro fertilization in pigs. *Anim Sci J* 2014;85: 395-404. doi: 10.1111/asj.12164. 査読有.

Kaneko H, Kikuchi K, Kashiwazaki N. ほか. Normal reproductive development of pigs produced using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *Theriogenology*. 2014;15: 82:325-331. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.04.012. 査読有.

[学会発表](計7件)

Viet Linh N, Kikuchi K ほか. Fusion with ooplasmic fragments improved in vitro fertilization and subsequent developmental ability of porcine denuded oocytes. 第103回日本繁殖生物学会大会. 2010/9/2. 十和田市.

Viet Linh N, 菊地和弘 ほか. Contribution of fusion of ooplasmic fragments to the developmental ability of porcine denuded oocytes. 第104回日本繁殖生物学会大会. 2011/9/13. 盛岡市.

Kikuchi K ほか. Fusion of cytoplasmic fragments to porcine oocytes improves the ability for embryonic development. The 17th International Congress on Animal Reproduction. 2012/7/30. カナダ国バンクーバー市.

Kaneko H, Kikuchi K ほか. Production of sperm from cryopreserved boar testicular tissue grafted into mice. 8th Association for Applied Animal Andrology Biennial Conference.

2012/7/28. カナダ国バンクーバー市.
Viet Linh N, Kikuchi K. Contribution of mitochondria in restoration of fertilization and developmental competence of oocytes with low cytoplasmic maturity. The 9th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society. 2012/10/25. フィリピン国マニラ市.

Kikuchi K, Kashiwazaki N ほか. New perspectives of in vitro gamete preservation: Xenografting of testicular tissues. Pig. 2nd Fatty Pig Conference. 2013/11/21. ハンガリー国ブダペスト市.

Kikuchi K, Kashiwazaki N ほか. Recent progress on pig genetic resources: Cryopreservation of gametes and gonadal tissues. The 2nd Symposium of Thai Society for Animal Reproduction. 2013/3/20. タイ国バンコック市.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菊地 和弘 (KAZUHIRO KIKUCHI)

独立行政法人農業生物資源研究所・動物発生分化研究ユニット・上級研究員

研究者番号：20360456

(2)研究分担者

柏崎 直巳 (NAOMI KASHIWAZAKI)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：90298232