

マウスの雄性前核への顕微注入に関する研究

後藤和文・小池 学・中西喜彦・小川清彦

(家畜繁殖学研究室)

昭和63年7月22日受理

A study on Microinjection into Male Pronucleus of Mouse Egg

Kazufumi GOTO, Manabu KOIKE, Yoshihiko NAKANISHI, Kiyohiko OGAWA,
(Laboratory of Animal Reproduction)

緒 言

家畜の生産においてその経済性を高めるためには、家畜のもつ発育能力、繁殖能力、飼料効率および抗病性を遺伝的に向上させることが必須である。

遺伝子工学の急速な発展により今日では多くの遺伝子が単離されてきている。これらの外来性遺伝子を直接動物の前核期卵の雄性前核に導入することにより、形質転換動物の作出が行われている。

初めて形質転換動物を作出したのは Gordon²⁾らによるもので、マウス受精卵の前核に直接外来性のDNAを注入したものである。

Palmiter^{3,4)}は、マウスMT遺伝子のプロモーターをヒトやラットの成長ホルモンの構造遺伝子に連結して導入した形質転換マウスを作出した。このようにして得られたマウスは通常マウスの2倍程大きく、スーパーマウスとして世界に広く知られた。

家畜における外来性遺伝子の導入の成功例は Hammer⁵⁾らによって初めて報告された。Hammerらは、ウサギ、ヒツジ、ブタにMT-hGH合成遺伝子を導入した。その結果、遺伝子挿入率(挿入頭数/生まれた頭数)は、ウサギで12.8%、ブタで10.4%、ヒツジで1.3%であった。しかし、いずれもスーパーマウスにみられたような成長促進効果は認められなかった。

発生工学的手法によって受精卵を体外に取り出し、顕微操作をほどこし、再び偽妊娠動物の卵管又は子宮に戻すことによって形質転換動物を作出することができる。しかし、これらの手法を牛などの大動物に応用するためには、遺伝子を導入した前核期卵を外科的手術により卵管に移植することより非外科的に子宮に移植することが望まれる。そのためには遺伝子導入卵を子宮に移植可能な桑実胚～胚盤胞期ま

で体外で発育させる必要がある。

そこで本研究は、将来牛の前核期卵に遺伝子を導入して、それを本研究室で開発した体外培養系^{3,6)}により胚盤胞まで発育させて牛の子宮に非外科的に移植して形質転換牛を作出するための予備実験である。実験はマウスの前核期卵に顕微注入をほどこし、体外培養により胚盤胞まで発育させる可能性について追究した。

材料と方法

供試動物はすべてICR-JCL系成熟マウス(2～5ヵ月齢)で、マウス用固型飼料および水を不断給与して飼育したものである。培養液はTYH-280⁷⁾から牛血清アルブミン(BSA)を除去して、EDTA(100 μ M)を添加した蛋白質無添加培地⁸⁾を用いた。

前核期卵の採取：成熟雌マウスに5IUのPMSG(セロトロピン、帝国臓器)およびhCG(ゴナトロピン、帝国臓器)を48時間間隔で腹腔内注射し、hCG注射後一晩雄マウスと同居させ、翌朝陰栓がみられた雌マウスは、hCG注射後18時間目に屠殺し、卵管膨大部から卵子を採取した。屠殺後直ちに取出した卵管は滅菌した濾紙上で附着している血液および脂肪組織を除いた後、ヒアルロニダーゼ(0.1%、和光純薬、Lot. 115F-8165)を含む培養液内に移し、卵管膨大部より卵丘細胞塊に包まれた卵子を針でつついて取り出した。ヒアルロニダーゼ的作用により、卵丘細胞が除去された卵子は直ちに洗浄後、ポリスチレン製の培養皿(コーニング社製、60 \times 15mm)の中央に作った流動パラフィン下の培養液のスポット(400 μ l)に移し、さらに6時間培養することにより前核が大きくなるのを確認したのち、マイクロインジェクションに使った。

マイクロインジェクション：マイクロインジェク

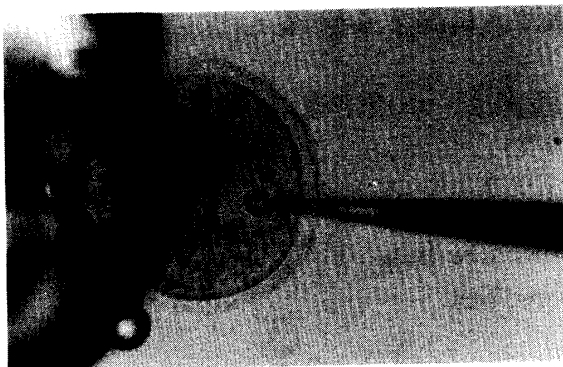


Fig. 1. Microinjection of buffer into male pronucleus.

シオンおよび卵子の保定用のピペットはすべて自作製した。本実験では、遺伝子を含まない培養液を注入ピペットに吸引して、雄性前核内に微量（2 pl 前後）注入した（Fig. 1）。注入がうまくいったときは、雄性前核が少しふくらむことで容易に判定できた。

卵子の発生：マイクロインジェクションされた前核期卵，また対照区として無処置区の前核期卵は，炭酸ガス培養器（39°C，5% CO₂，95% 空気）で継続培養を行い，一日一回発育の様子を観察した。

結果と考察

Table 1. Development of one-cell mouse ova microinjected with buffer

Group	No. of one-cell ova cultured	% of embryos developed into :			
		2-cell (24h) ¹⁾	4-8cell (48h)	Morula (72h)	Blastocyst (96h)
Microinjection	53	88.7*	60.4***	39.6***	5.7***
Control	208	96.2	88.0	82.2	68.0

1) Hours in culture.

* : P<0.05 ; *** : P<0.001

Table 1 に本実験の結果を示した。マイクロインジェクションした前核期卵（実験区）の88.7%（47/53）が24時間の培養後2細胞へ発育した。対照の無処置の前核期卵では96.2%（200/208）が2細胞へ発育し，実験区より有意に高い発育率であった。48時間の培養後4～8細胞へ発育した卵率は実験区60.4%，対照区88.0%で対照区において有意に高い発育

率であった。72時間の培養後桑実胚に発育した卵率は実験区39.6%，対照区82.2%で対照区で有為に高い発育率であった。96時間の培養後胚盤胞に発育した卵率は実験区5.7%，対照区68.0%で対照区において有為に高い発育率であった。

Brinster ら⁹⁾は，マイクロインジェクションの操作はマウス前核期卵の生存性を低下させると報告している。また Rexroad ら¹⁰⁾は羊前核期卵においてマイクロインジェクション操作はその生存性を低下させると報告している。本研究においても同様に前核期卵へのマイクロインジェクション操作はマウス卵の発育率を低下させることが示された。とくに子宮に移植可能なステージの桑実胚への発育率は39.6%，胚盤胞への発育率は5.7%と大きく低下した。今後はこれらの原因の解明が急務であるが，とくに卵子の破壊を最小限にするインジェクション用ピペットの作製，注入技術の向上が必要である。また今の技術水準では桑実胚から胚盤胞の段階で急激に発育卵率が低下するので子宮への移植を桑実胚期で実施する方が好ましいように思われる。

要 約

マウス前核期卵の雄性前核内に，緩衝液を微量顕微注入しその後の体外での発育を観察した。

体外培養により2細胞，4～8細胞，桑実胚，胚盤胞期へ88.7，60.4，39.6，および5.7%が発育した。顕微注入をしなかった対照区では，2細胞，4～8細胞，桑実胚，胚盤胞期へ96.2，88.0，82.2，および68%が発育した。

以上の結果より，現在の技術水準では前核への顕微注入操作は前核期卵の発育率を低下させるが，桑実胚，胚盤胞まで発育する卵も見られたことより，将来牛卵への応用の可能性が示唆された。

文 献

- 1) Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Yager, M. K. and Palmiter, R. O. : Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **82**, 4438-4442 (1985)
- 2) Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A. and Ruddle, F. H. : Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 7380-7385, (1980)
- 3) Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. and Ogawa, K. : Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in vitro matured follicular

- oocytes. *J. Reprod. Fert.*, **83**, 753-758 (1988)
- 4) Goto, K., Takagi, Y., Nakanishi, Y., and Ogawa, K. : *In vitro* fertilization and development of mouse ova in protein-free medium. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, **32**, 48-53 (1987)
- 5) Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E. Jr., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. : Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, **315**, 680-683 (1985)
- 6) 梶原豊・後藤和文・小坂昭三・中西喜彦・小川清彦 : 牛卵胞卵子の体外受精および体外培養によるふ化. 家畜繁殖学雑誌. **24**, 19-22 (1987)
- 7) Kasai, K., Minato, Y. and Toyoda, Y. : Fertilization and development *in vitro* of mouse eggs from inbred strains and F₁ hybrids. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, **24**, 19-22 (1978)
- 8) Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Birnberg, N. C. and Evans, R. M. : Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, **300**, 611-615 (1982)
- 9) Palmiter, R. D., Norstedt, G., Gelin, R. E., Hammer, R. E. and Brinster, R. L. : Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, **222**, 809-814 (1983)
- 10) Rexroad, C. E. Jr. and Wall, R. L. : Development of one-cell fertilized sheep ova following microinjection into pronuclei. *Theriogenology*, **27**, 611-619 (1987)

Summary

The effects of the microinjection of buffer into male pronucleus on the *in vitro* development of the mouse ova were studied.

The percentages of the ova developed into 2-cell, 4~8-cell, morula and blastocysts were 96.2, 88.0, 82.2, and 68.0 % for control (not injected) group, and 88.7, 60.4, 39.6 and 5.7 % for microinjected group, respectively.

The result of this study indicated that a high rate in the loss of injected ova might be an unavoidable cost of inserting foreign genes into pronucleus, at this crucial moment.