

## 2. 核レシピエントとしての除核 PGCs の作製

### 2-1. 目的

体細胞核移植 PGCs の作製には、まず、核レシピエントとなる除核 PGCs の作製が必要である。

これまで、細胞の除核方法として一般的に用いられている方法は、顕微操作法と超遠心分離法である。顕微操作法は、主に哺乳動物の卵子の除核に用いられている。サイトカラシンやコルセミドなどの薬品処理により細胞骨格を一時的に崩壊させ、微細ガラス針を用いて第一極体の直下に存在する染色体を少量の細胞質とともに吸引する (McGrath and Solter, 1983)。一方、超遠心分離法は、主に付着性の培養細胞の除核に用いられる。ガラスディスク上で細胞を培養し、付着させた後、サイトカラシン処理により微小管を脱重合させ、10,000G 程度の超高速にて遠心分離をすることで、核を細胞外に分離する (Prescott and Kirkpatrick, 1973)。また、付着性の弱い細胞や浮遊性の細胞は濃度勾配遠心分離法の利用により除核することができる (Bossart *et al.*, 1975; Wigler and Weinstein, 1975)。いずれの方法でも、除去された核は少量の細胞質とともに細胞膜に包まれた核体を形成する。

ところが、PGCs は直径 12~20 $\mu\text{m}$  の小さな細胞である上、細胞の大部分を核が占めている (Fig. 2-1)。このような PGCs の特徴は、上記の物理的除核法を難しくしている。そこで、本研究では紫外線を用いた機能的除核法を試みることにした。核酸の吸収極大波長は 254nm であるとされ (野津 1975)、このような短波長紫外線の照射により、核酸上のピリミジン塩基は、隣り合ったピリミジン塩基と結合し、シクロブタンピリミジンダイマー (cyclobutane pyrimidine dimers, CPDs) やピ

リミジン (6-4) ピリミドン・フォトプロダクト (pyrimidine-(6-4)-pyrimidone photoproducts, 6-4PPs) を形成する (Setlow and Carrier, 1966; Mori *et al.*, 1991; Moné *et al.*, 2001)。また、細胞の DNA 上に CPDs や 6-4PPs が存在することにより、DNA の複製 (Rupp and Howard-Flanders, 1968; Radman, 1971) や転写 (Herrlich *et al.*, 1994; Van Hoffen *et al.*, 1999; Moné *et al.*, 2001) が抑制されることも報告されている。これらの報告は、細胞への紫外線照射が機能的除核法として利用できる可能性を示唆している。

本実験では、紫外線照射が PGCs に及ぼす影響を明らかにし、紫外線照射 PGCs を核レシピエントとして利用するために適した照射条件を明らかにすることを目的として、紫外線照射による核特異的損傷の検出、および機能解析の一つとして紫外線照射 PGCs の生殖腺への移住能について検討を行った。

## 2-2. 材料および方法

### (1) 2日胚血液の採取

実験には、筑波大学農林技術センターにおいて飼育されている白色レグホーン種 (White Leghorn, WL)、およびロードアイランドレッド種 (Rhode Island Red, RIR) の受精卵を用いた。ニワトリは、雌雄ともに自由に採食・飲水できる個別ケージにて、12 時間明期 12 時間暗期の照明条件下で飼育した。

受精卵を採取するために、毎週 1 回人工授精を行った。腹部マッサージ法 (Burrows and Quinn, 1937) を用いて複数のオスから採取した精液を混合し、1ml 注射筒 (SS-01T, テルモ, 東京) を用いて、メスの卵

管腔部に約 50 $\mu$ l ずつ注入した。

放卵された受精卵は、1日1回午後1時頃に採卵し、直ちに15 $^{\circ}$ Cの貯卵庫(MIR-152, 三洋電機特機, 大阪)内に保存した。受精卵は、放卵後1週間以内の実験に使用した。

受精卵は、実験用孵卵機(P-008B, 昭和フランキ研究所, 埼玉)を用いて、37.8 $^{\circ}$ Cで約50~65時間孵卵した。孵卵後、直径10cmのプラスチックシャーレに割卵し、発生ステージ13~15に達した胚のみを実験に用いた。この時期に血液中を循環するPGCsの濃度が最も高くなると報告されている(Tajima *et al.*, 1999)。

マウスピースをつけたガラス針を用い、胚の大動脈より採血した。ガラス針は、あらかじめシリコン溶液(SIGMACOTE, SL-2, Sigma, USA)にてコーティングしたガラス毛细管(2-000-050, Drummond, USA)を、マイクロピペット製作器(PA-81-8811, ナリシゲ, 東京)を用いて針状に伸ばした後、先端をわずかに折り、さらにピペット研磨機(EG-4, ナリシゲ)を用いて鋭く研磨して使用した。採取した血液は、シリコンコーティングした1.5ml遠心チューブ(BM-15, ビーエム, 東京)内で、培養液に希釈した。培養液として、ウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum, FBS, 10082-139, Gibco, USA)を10%添加した最小培地(Minimum Essential Medium, MEM, M7278, Sigma, USA)を用いた。

## (2) 紫外線の照射

紫外線の照射には、顕微2波長分光蛍光測定装置(CAM-230, 日本分光, 東京)を光源として用いた。波長は254nm、強度 $0.9 \pm 0.1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ とした。暗所において、光源を上向きになるように固定し、サンプルを載せた15mm $\cdot$ 2穴のハードテフロンコーティングスライドガラス(HTCS, Erie Sci, USA)の底面から、紫外線を照射した。

### (3) 紫外線照射による DNA 損傷の検出

発生ステージ 13~15 の WL 胚より採取した血液約 50 $\mu$ l を培養液 100 $\mu$ l で希釈した。これを 2 つに分け、1 つを対照区、残りの 1 つを紫外線照射区とした。それぞれのサンプルは、1.5ml 遠心チューブ内で、16% (w/v) Ficoll (F-9378, Sigma, USA) を溶解した培養液 1ml 上に重層し、800 $\times$ g で 30 分間、遠心分離した (遠心分離機: LC-120, アングルローター: TMA-1, トミー精工, 東京)。その上清 300 $\mu$ l を静かに採取し、5 $\mu$ m メッシュ・ナイロンフィルター (CMN-5-D, Small Parts Inc, USA) を用いて Ficoll を除去した。さらに、フィルター上に残った細胞を、培養液 50 $\mu$ l で 3 回洗浄した後、このフィルターを 1.5ml 中で培養液 100 $\mu$ l に浸し、ボルテックス・ミキサーで約 10 秒間攪拌した。その後、フィルターがチューブ内で培養液に浸らないように固定し、遠心分離 (800 $\times$ g, 30 分間) により培養液中に細胞を回収した。

それぞれのサンプルは、HTCS 上にのせ、対照区はそのまま、紫外線照射区には 10、30、60、または 120 秒間紫外線を照射した後、37.8 $^{\circ}$ C で 4 時間培養した。

培養後、コメットアッセイ法により、DNA の損傷度を測定した。一般に、細胞内には、DNA 上の紫外線による損傷部位を切り出して修復する機構 (Nucleotide Excision Repair, NER) が備わっており (Van Hoffen *et al.*, 1995)、したがって、この際に作られた DNA 断片を定量することで、紫外線による損傷の程度を推定することが出来る。コメットアッセイ法とは、単一細胞内の DNA 断片を定量する方法であり、以下の手順で行った。

#### ① 細胞の包埋

まず、前面フロスト処理スライドグラス (S5214, 松浪硝子, 大阪)

上に、0.65%アガロース (Agarose S, 312-01193, 和光, 大阪) 溶液 250 $\mu$ l を滴下し、気泡が入らないようにカバーガラス (24 $\times$ 32 mm, Thickness No. 1, 松浪硝子) をかぶせ、4 $^{\circ}$ Cの冷蔵庫内で約 1 時間冷却し、ゲル化した。冷却後、静かにカバーガラスを除去した。

4 時間培養後のサンプルより、ガラス針を用いて約 100 個の PGCs を約 1 $\mu$ l の培養液と共に、他の細胞の混入を極力避けて収集した。収集した細胞は、プラスチックシャーレ上に小滴状におかれた 50 $\mu$ l の培養液中に移し、約 5 分間静置した。再度、同様に収集した PGCs 約 100 個を、0.5%低融点アガロース (Agarose L, 317-01182, 和光) 溶液 10 $\mu$ l と混合し、上記のアガロースゲル上に滴下、小滴の状態 で 4 $^{\circ}$ Cの冷蔵庫内で 15 分間冷却した。

冷却後、さらに 0.5%低融点アガロース溶液 100 $\mu$ l を積層し、カバーガラス (18 $\times$ 18mm, Thickness No. 1, 松浪硝子) を被せ、4 $^{\circ}$ Cで 15 分間冷却した後、カバーガラスを静かに除去した。

## ② 細胞の溶解

細胞を包埋したスライドガラスは、4 $^{\circ}$ Cに冷やした細胞溶解液 (Table 2-1) に浸し、4 $^{\circ}$ Cの冷蔵庫内に 1 時間以上静置した。この処理により、細胞の蛋白質成分が溶解され、DNA がむき出しになる。このような DNA は、環境の光線の影響を受けやすいため、以降の操作は全て暗室内において行った。

## ③ 電気泳動

スライドガラスを軽く水洗し、泳動緩衝液 (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) を満たした小型サブマリン電気泳動槽 (NB-1019, 日本エイドー, 東京) 内に 20 分間静置し、平衡化を行った後、電気泳動を行った。電源には、Power Pac 1000 (Bio-Rad, USA) を用いた。泳動条件は、定電流 300mA、5 分間とし、泳動緩衝液の液量で電圧が 25 から 27V とな

るように調節した。

#### ④ 中和および染色

電気泳動後、スライドガラスを水洗した後、0.4 M トリス緩衝液 (pH 7.5) をスライドガラス上に滴下し、室温に 15 分間放置した。この操作を 3 回繰り返して、ゲルの中和を行った。

DNA の染色には、SYBR Green I (F0513, 宝酒造, 滋賀) を用いた。TBE 緩衝液 (89 mM トリス, 89 mM ホウ酸, 2 mM EDTA) で 10,000 倍に希釈した染色液 50 $\mu$ l をスライドガラス上に滴下し、カバーガラス (18 $\times$ 18 mm) を被せ、30 分以上室温に放置した。

#### ⑤ 観察および統計処理

観察には、落射蛍光装置 (IMT2-RFC, Olympus, 東京) を装備した倒立顕微鏡 (IMT-2, Olympus) を用いた (励起波長 490nm)。それぞれのサンプルに含まれる PGCs が 50 個未満の場合は全ての泳動像の長さを、PGCs が 50 個以上の場合は無作為に選んだ 50 個の PGCs の泳動像の長さを、マイクロメーターを用いて測定し (Figure 2-2)、平均値を算出した。

コメットアッセイ法は、温度などの環境条件によって影響されやすい手法であるため、必ず対照区と紫外線照射区のサンプルを同時に処理し、それぞれの照射時間について 5 回ずつ繰り返した。

まず、対照区と紫外線照射区の泳動像の長さの平均値を、対応のある T 検定により比較し、紫外線照射による DNA 損傷の有無を検討した。つづいて、対照区と紫外線照射区の泳動像の長さの差を算出し、これをそれぞれの照射時間の紫外線による DNA 損傷の程度であるとみなし、異なる照射時間の間で、下記の式 (1) をモデルとした一元配置の分散分析、および Duncan の多重検定法を用いて比較した。このとき、 $\mu$  は全体平均、 $\alpha$  は紫外線照射時間、 $e$  は誤差を表している。

$$Y_i = \mu + \alpha_i + e_i \quad \dots \text{式 (1)}$$

#### (4) 紫外線照射 PGCs の生存性の計測

紫外線照射 PGCs の生存性の計測には、ヨウ化プロピジウム (Propidium Iodide, PI) および二酢酸フルオレセイン (Fluorescein Diacetate, FDA) による二重染色法を用いた。この方法は、細胞の生死判定に一般的に広く用いられている方法である。PI は、正常な細胞膜を透過することが出来ないため、死細胞の核のみを染色する赤色蛍光色素である。一方、FDA は、細胞内に取り込まれた後正常細胞の有する加水分解酵素によって分解されて初めて緑色蛍光を発する。したがって、必ずしも両者の判定は一致しないが、生細胞は PI 陰性および FDA 陽性、死細胞は PI 陽性および FDA 陰性となる (Jones and Senft, 1985)。

PI (343-0761, 和光) は、PBS(-)で 1 mg/ml に希釈し、4°C で保存した。FDA (348-07411, 和光) は、アセトンで 10 mg/ml に希釈し、-20°C で保存した。使用時には、それぞれ PBS(-)で希釈し、濃度を 10 $\mu$ g/ml に調整した。

DNA 損傷の検出に用いたサンプルと同様に、対照区、紫外線照射区を設け、Ficoll 濃度勾配遠心分離および Ficoll の除去後、それぞれのサンプル 100 $\mu$ l を紫外線照射後、37.8°C で 4 時間培養した。その後、PI 溶液 (10 $\mu$ g/ml) および FDA 溶液 (10 $\mu$ g/ml) それぞれ 10 $\mu$ l ずつ加え、37.8°C で 5 分間保温して染色した。

観察には、落射蛍光倒立顕微鏡を用い、まず明視野で PGCs であることを確認した後、無作為に選択した 50 個について、PI および FDA の染色性を、それぞれ 490nm および 546nm の励起波長にて観察した。

PI 陰性細胞および FDA 陽性細胞の割合を生存率とみなし、統計分析の際には、この値の平方根を逆正弦変換した後に、対応のある T 検定にて、対照区と紫外線照射区を比較した。

#### (5) 紫外線照射 PGCs の移住能

発生ステージ 13 から 15 の RIR 胚より採取した血液 5 $\mu$ l を、培養液 50 $\mu$ l に希釈し、既述の方法にて紫外線を 0、10、30、60、および 120 秒間照射した。

紫外線照射後、倒立顕微鏡下でガラス針を用いて約 30 個の PGCs を PKH-26 溶液 (Zynaxis, USA) に移し、細胞を染色した。PKH-26 は、細胞膜の脂質層に入る蛍光色素で、半減期が約 100 日と長く、細胞のトレーサーとして広く用いられている。その後、PGCs を培養液に移し、染色反応を停止させた。

標識した PGCs 15 個を、ガラス針を用いてレシピエントとなる 2 日胚 (RIR) の大動脈内に注入した。レシピエント胚は、PGCs を移植する 2 から 3 時間前に (発生ステージ 13 から 15)、卵殻に開けた直径 1 から 2cm の小さな窓から約 4 $\mu$ l 採血し、プラスチックテープを用いて窓をふさぎ、移植まで 37.8 $^{\circ}$ C の培養器内で保温した。PGCs の移植後、再度プラスチックテープを用いて同様に窓をふさぎ、37.8 $^{\circ}$ C で 5 日間孵卵を継続した。

7 日胚となったレシピエント胚は、実体顕微鏡 (SZH, Olympus) 下で開腹し、左右の生殖腺を採取した。

生殖腺は、PBS(-)で希釈した 0.1%トリプシン溶液 50 $\mu$ l 中で、精密ピンバイスに装着した 30G 注射針 (DN-3021K, テルモ) を用いて細断し、37.8 $^{\circ}$ C で 5 分間保温した。その後、ウシ血清 (Bovine Adult Serum, B2771, Sigma) 50 $\mu$ l を加え、十分に混合した懸濁液を、HTCS (15 mm, 2 穴)



上へのせ、蛍光顕微鏡（励起波長 546 nm）下で PKH 陽性生殖細胞数を計測した。

それぞれの照射時間における PKH 陽性細胞数は、式（1）を用いた一元配置の分散分析および Duncan の多重検定法にて、比較した。このとき、 $\alpha$  は紫外線照射時間である。

## 2-3. 結果

### (1) 紫外線照射による PGCs の DNA 損傷

コメットアッセイ法では、細胞を低融点アガロースゲルに包埋後、融解して電気泳動を行うため、PGCs の同定が難しい。そこで、本実験では、Ficoll 濃度勾配遠心分離法によって PGCs とそれ以外の細胞とを大まかに分離し、さらにガラス針を用いて PGCs のみを選択的に回収する操作を 2 回繰り返すことによって、きわめて PGCs の純度の高いサンプルを作製することができた (Figure 2-3)。また、PGCs は他の血球細胞に比べ、その核が著しく大きいことから、観察時に、核の大きさが他と比べて明らかに小さいものは、混入した血球の泳動像であるとみなし、測定しなかった (Figure 2-2)。

それぞれの照射時間における対照区および紫外線照射区の泳動像の長さ、およびその差を Table 2-2 および Figure 2-4 に示した。いずれの照射時間でも、泳動像は対照区に比べ紫外線照射区で有意に長かった ( $P < 0.05$ )。また、泳動像長の対照区と紫外線照射区の差は、照射時間が 60 秒のとき最も長く、次いで 120 秒、30 秒、10 秒の順に短くなり、いずれの間にも有意差が認められた ( $P < 0.05$ )。

## (2) 紫外線照射 PGCs の生存性

本実験では、PI および FDA 二重染色によって得られた、PI 陰性細胞 および FDA 陽性細胞を生細胞、PI 陽性および FDA 陰性細胞を死細胞として、紫外線照射 PGCs の生存性を測定した (Figure 2-5)。両染色性により判定された PGCs の生存性を、Table 2-3 に示した。照射時間がいずれの場合でも、対照区と紫外線照射区との間に有意な差は認められなかったが、照射時間が 120 秒のとき、紫外線照射区の PGCs の生存性が低下する傾向が、PI および FDA いずれの染色性からも認められた。

## (3) 紫外線照射 PGCs の生殖腺への移住能

紫外線を 0 から 120 秒間照射した PGCs を蛍光色素 PKH-26 で標識し、2 日胚に移植、その胚を 5 日間孵卵した後、その両側生殖腺に存在する PKH 陽性細胞数を計測した結果を Figure 2-6 に示した。

PKH 陽性細胞数は、紫外線照射時間が 0、10、30、60、および 120 秒間のとき、それぞれ  $83.6 \pm 13.66$ 、 $90.6 \pm 8.66$ 、 $41.4 \pm 3.59$ 、 $33.0 \pm 4.64$ 、および  $9.2 \pm 2.60$  個であった。照射時間が 0 秒と 10 秒の間には有意な差は認められず、30 秒および 60 秒のときに有意に減少した ( $P < 0.05$ )。また、120 秒の時には PKH 陽性細胞数が最小となり、その値は移植した PGCs 数よりも少なかった。

## 2-4. 考察

PGCs を核移植のレシピエントとして用いるには、まず PGCs の除核が必要である。

予備実験として、サイトカラシン B 処理および超高速遠心分離法による PGCs の除核を試みた。この方法は、付着性培養細胞の除核に主に用いられており、一度に大量の細胞を除核できる利点がある。サイトカラシン B は、細胞の細胞骨格を一時的に脱重合させる効果があるため、ガラスディスクに付着した細胞にサイトカラシン B 処理を施し、超遠心分離を行うことで、核が細胞から突出し、最後には核体を形成する。ガラスディスクに残された細胞断片は、除核された細胞質体となる (Prescott and Kirkpatrick, 1973)。

予備実験では、PGCs をガラスディスク上で 1 日間培養し、付着させた後、除核を試みたが、PGCs の細胞質体を得ることはできなかった。これは、PGCs の付着性が繊維芽細胞などに比べると弱いこと、PGCs の核は非常に大きいため核が突出する際に細胞をはがそうとする力が大きいことなどが理由として考えられる。特に、核が大きいという PGCs の特徴は、この方法のみならず、顕微操作など、他の物理的除核法においても不利な条件となることが予測される。

そこで、本研究では、紫外線照射による機能的除核法を用いることとした。

紫外線照射により機能的に除核した卵子を用いた核移植は、両生類において古くから試みられている。Gurdon *et al.* (1975) は、アフリカツメガエルにおいて、未受精卵の動物極側から波長 260nm の紫外線を 3,000 erg 照射することにより、その核を不活化した。このような卵子に体細胞核を注入し、正常なオタマジャクシを作製することに成功した。さらに、哺乳動物において、Yang *et al.* (1990) は、紫外線の照射によりウサギ未受精卵の単為発生をほぼ完全に抑制するものの、この紫外線照射未受精卵に 8~32 細胞期胚の割球を電氣的に融合・活性化すると、15~22% の胚が桑実胚もしくは胚盤胞期胚にまで発達すること

を報告した。また、Leal *et al.* (1999)は、ブタ未受精卵に紫外線を照射し、核の断片化や凝縮を観察して核の損傷を確認する一方で、その正常な MPF キナーゼ活性の動向や前核の形成を観察し、細胞質への影響は少ないことを明らかにした。いずれの核移植実験でも、産子の生産には至っていないが、正常な胚発生を観察しており、紫外線の照射が核移植における核レシピエントを作製する有効な手段であることを示唆している。

紫外線照射による DNA 損傷部位は NER とよばれる修復機構により除去される (Van Hoffen *et al.*, 1995)。除去された DNA 断片をコメットアッセイ法にて検出することで、DNA 損傷を定量的に測定できる。紫外線の照射時間が 10 秒以上のとき、コメットアッセイにおける泳動像の長さは、対照区に比べ有意に長くなり (Table 2-2)、明らかな DNA 損傷があることを示している。

また、対照区と紫外線照射区の泳動像の長さの差を DNA 損傷の程度であるとみなし、照射時間との関係を検討したところ (Figure 2-4)、照射時間が 10 秒から 60 秒の間では、DNA 損傷は照射時間に比例して、ほぼ直線的に増加するものの、120 秒になると 60 秒よりも減少した。これは、60 秒間の紫外線照射による DNA 損傷が、PGCs の NER による修復活性のほぼ限界であり、それ以上の損傷を被っているであろう 120 秒間照射の場合には、DNA 損傷量を正しく検出できなかったのであろうと考えられる。

照射時間が 10 秒から 60 秒間のとき、PGCs の生存性は対照区と比べ、有意な差は認められなかった (Table 2-3)。今回、生存性の指標として用いた蛍光色素 PI および FDA は、それぞれ細胞膜の透過性および細胞質の加水分解能の正常性を示している。したがって、この結果は同時に、紫外線の照射が細胞膜や細胞質へ及ぼす影響が極めて小さいこ

とも示唆している。

また、このような PGCs を蛍光色素 PKH-26 で標識し、移植実験に用いたところ、移植 5 日後のレシピエント胚の生殖腺から検出された PKH 陽性細胞数は、照射時間が 10 秒のとき対照区と差が認められず、30 秒および 60 秒のとき約半分の数となった (Figure 2-6)。紫外線によってその DNA に損傷を被った細胞は、損傷部位を修復する間、DNA の複製や転写などの活動を一時的に停止することが報告されている (Rupp and Howard-Flanders, 1968; Radman, 1971; Herrlich *et al.*, 1994; Van Hoffen *et al.*, 1999; Moné *et al.*, 2001)。また、ニワトリ PGCs は、血管内を循環する間の増殖活性は低く (Maeda, 1998)、生殖腺原基に到達した後に爆発的に増殖することが知られている (Swart and Domm, 1972)。したがって、10 秒間照射された PGCs は、その DNA 損傷を比較的短時間で修復できたために、対照区とほぼ同数の生殖細胞を検出できたのに対し、30 秒および 60 秒間照射された PGCs は、修復に時間を要したために、7 日胚から少なく検出されたのであろうと考えられる。今回、紫外線照射 PGCs の培養実験を行っていないため断言することは難しいが、30 秒および 60 秒間紫外線を照射された PGCs は、生殖腺への移住能を保ちつつ、その増殖が一時的に抑制されるのだと考えられる。

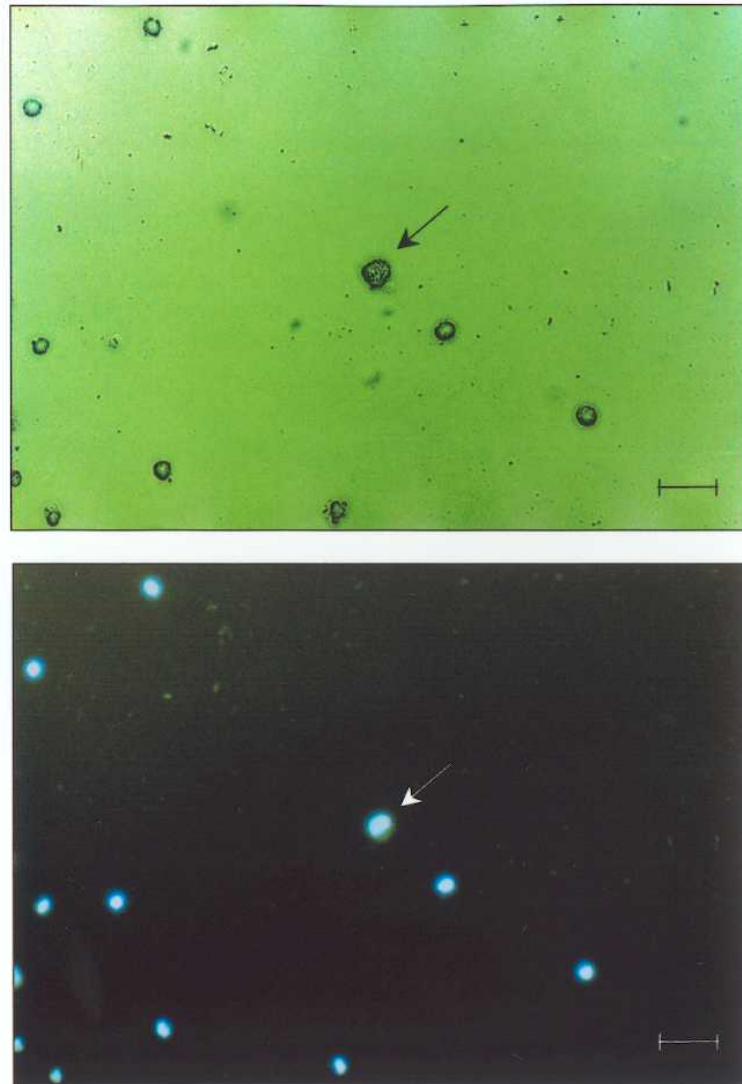
一方、120 秒間照射された PGCs の生存性は対照区に比べ減少する傾向にあり、これは修復されずに残された DNA 損傷が原因であろうと考えられる。また、そのことは同時に移植実験においてレシピエント胚の生殖腺から検出された生殖細胞数が、移植した PGCs 数よりも少ないことの原因としても考えられる。

ニワトリにおける PGCs の生殖腺原基への移住のメカニズムは、未だ十分に解明されていない。ショウジョウバエにおける生殖細胞の発

達に関する研究では、極細胞質と呼ばれる構造物が生殖細胞の細胞質に存在しており、これを形成する Nanos 蛋白質や RNA などが生殖細胞の生殖腺への移住に関係していることが指摘されている (小林, 1998)。また、ニワトリ PGCs の細胞質にも、極細胞質と類似の構造物である生殖質が存在することが知られているため (Tsunekawa *et al.*, 2000)、PGCs の生殖腺への移住に関わる何らかの因子が PGCs の細胞質に存在することが予想される。従って、紫外線照射 PGCs が移住能を保持していると言う結果は、細胞質に存在する移住に関わる因子が正常に機能していることを示唆しているものと思われる。

以上の結果より、今回用いた紫外線の照射条件 (波長: 254nm、強度:  $0.9 \pm 0.1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) において、30 秒および 60 秒間の照射は、PGCs の DNA に明らかな損傷を与えるものの、細胞への致命的ダメージはなく、また生殖腺への移住という PGCs に必須の機能をも阻害しないことが明らかとなった。したがって、このような紫外線照射 PGCs は、DNA 損傷が修復されるまでの間、機能的に除核された状態である可能性が高く、核レシピエントとして利用できる可能性が高いと言える。

しかし、今回の結果のみでは、PGCs の機能的除核が確かに達成されていることを証明することは難しく、今後、より直接的に DNA の複製や転写などの活性を測定する必要がある。また、紫外線によって機能的に除核した PGCs を核移植に用いた場合、核移植 PGCs 内に 2 つの核が存在することになり、さらに、DNA 損傷を修復される際に多数の DNA 断片が生成される。このような不活化した核や DNA 断片の存在が、その後、核移植 PGCs の増殖や分化に及ぼす影響は不明であり、今後の検討が必要である。



**Figure 2-1 Morphology of PGCs.**

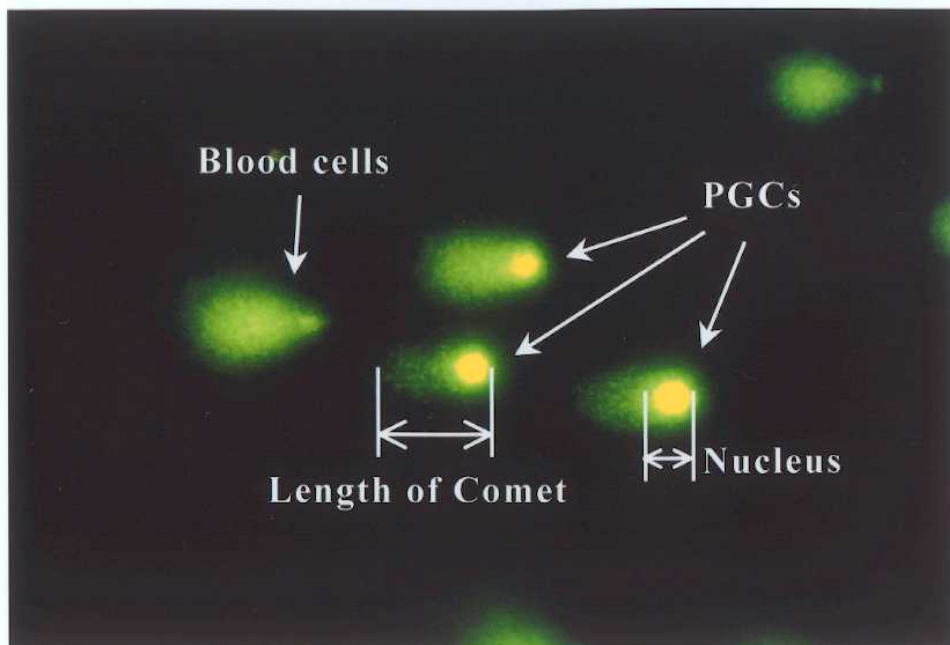
Nuclei of PGCs were visualized by staining with Hoechst 33342. PGCs were observed under a light (upper) and fluorescent microscope using 334nm excitation filter (lower). PGCs are indicated with arrows. Bar shows 50 $\mu$ m.

**Table 2-1 The constitution of lysing solution for comet assay.**

Stock Solution	
Water	890.0 ml
NaCl <sup>1</sup>	146.1 g
Na <sub>2</sub> -EDTA <sup>2</sup>	37.2 g
Tris (hydroxymethyl) aminomethane <sup>1</sup>	1.2 g
NaOH <sup>3</sup>	12.0 g
Sodium Lauroyl Sarcosine <sup>2</sup>	10.0 g
PH	10.0
Working Solution	
Triton X-100 <sup>2</sup>	1.0 %
Dimethyl Sulfoxyde <sup>3</sup>	10.0 %
Diluted with Stock Solution	

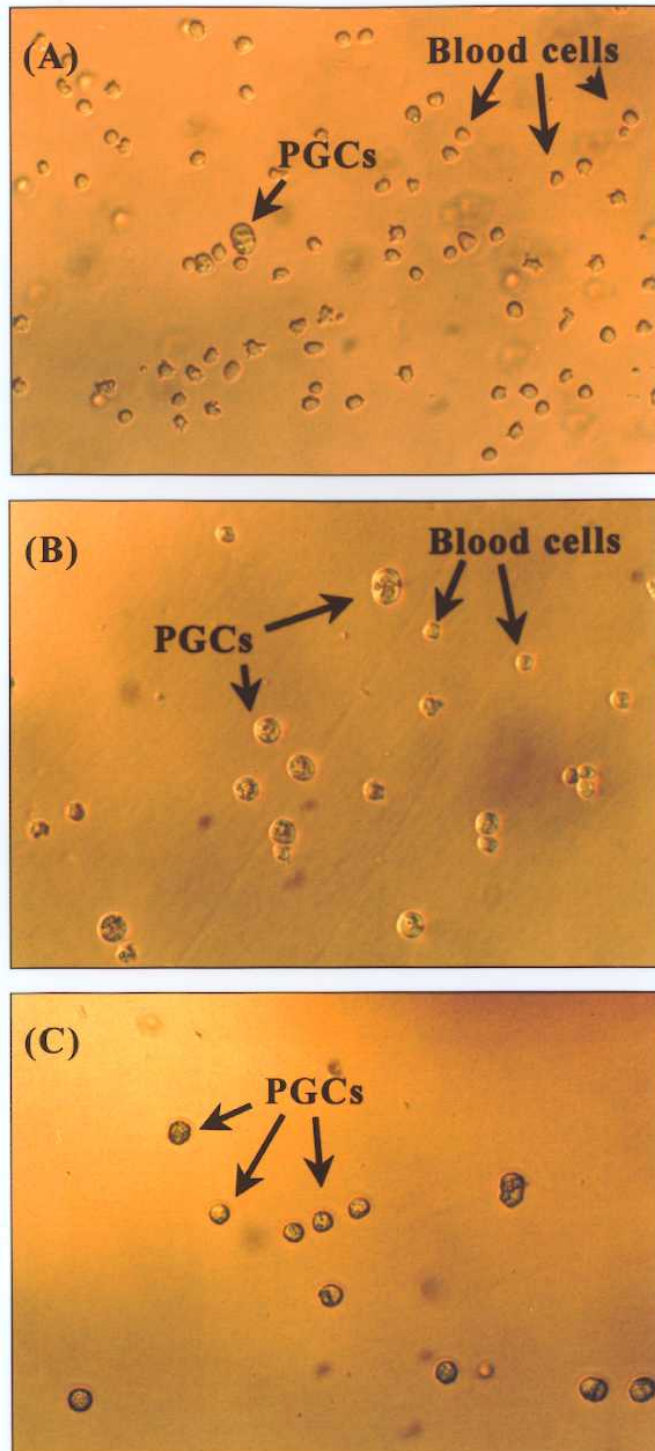
<sup>1</sup>, <sup>2</sup>, and <sup>3</sup>: Chemicals were purchased from Kishida (Osaka), Sigma (USA), and Wako (Osaka), respectively.





**Figure 2-2 DNA damage assay (Comet assay)**

UV-irradiated PGCs were embedded in a low melting point agarose gel. After lysis, the sample was electrophoresed, and stained with SYBR Green I. The effect of UV irradiation was estimated by measuring the lengths of the observed "comets."



**Figure 2-3 Isolated PGCs samples for comet assay.**

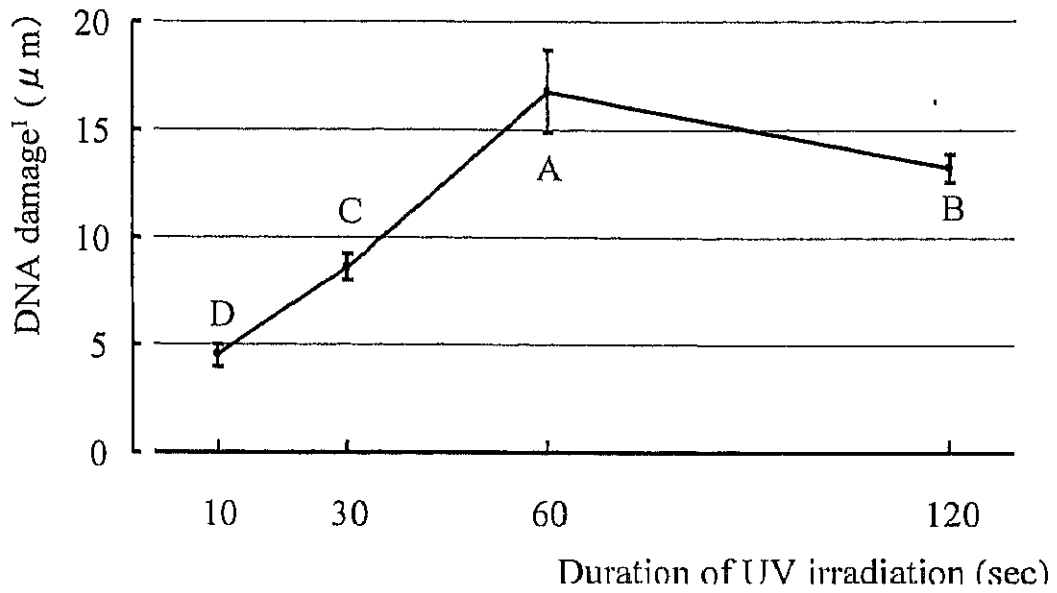
PGCs for comet assay were isolated from blood collected from 2-day-old embryos by Ficoll density gradient centrifugation and moved to fresh medium twice using fine glass needle. Photographs shows samples after centrifugation (A), 1st moving (B), and 2nd moving (C).

**Table 2-2 . DNA damage of UV irradiated PGCs.**

Duration of UV irradiation	Length of comet ( $\mu\text{m}$ , Mean $\pm$ SE)		(B - A)
	Control (A)	UV (B)	( $\mu\text{m}$ , Mean $\pm$ SE)
10 sec	40.81 $\pm$ 0.63	45.34 $\pm$ 0.73*	4.53 $\pm$ 0.52 <sup>D</sup>
30 sec	42.24 $\pm$ 0.16	50.83 $\pm$ 0.16*	8.59 $\pm$ 0.58 <sup>C</sup>
60 sec	39.13 $\pm$ 0.11	55.92 $\pm$ 0.24*	16.79 $\pm$ 1.88 <sup>A</sup>
120 sec	41.83 $\pm$ 0.10	55.03 $\pm$ 0.13*	13.20 $\pm$ 0.67 <sup>B</sup>

\*: Values are significantly different from control (P<0.05).

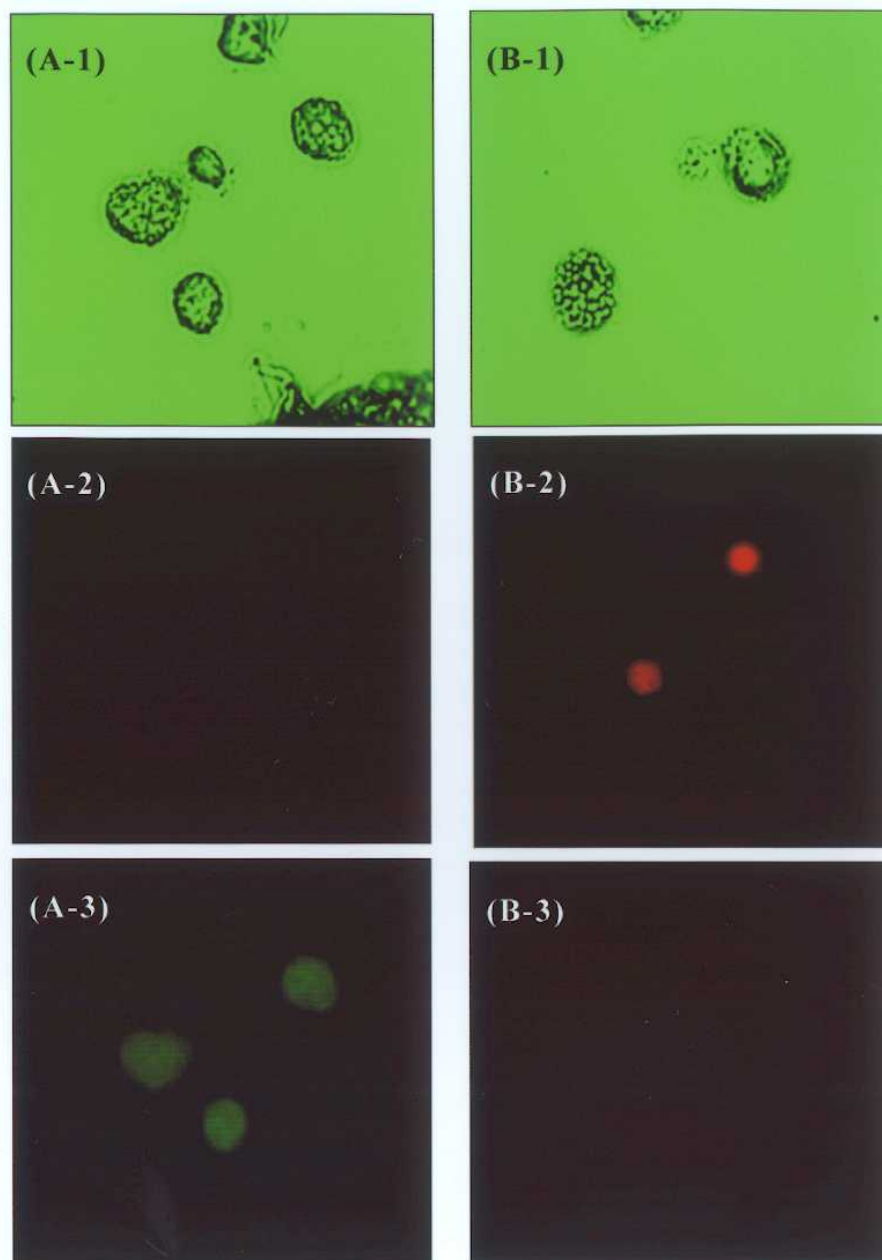
<sup>A-D</sup>: Values with different letters are significantly different (P<0.05).



**Figure 2-4 DNA damage of UV irradiated PGCs.**

<sup>1</sup>: DNA damage is the difference of the length of comet between control and UV irradiated sample.

<sup>A-D</sup>: Values with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).



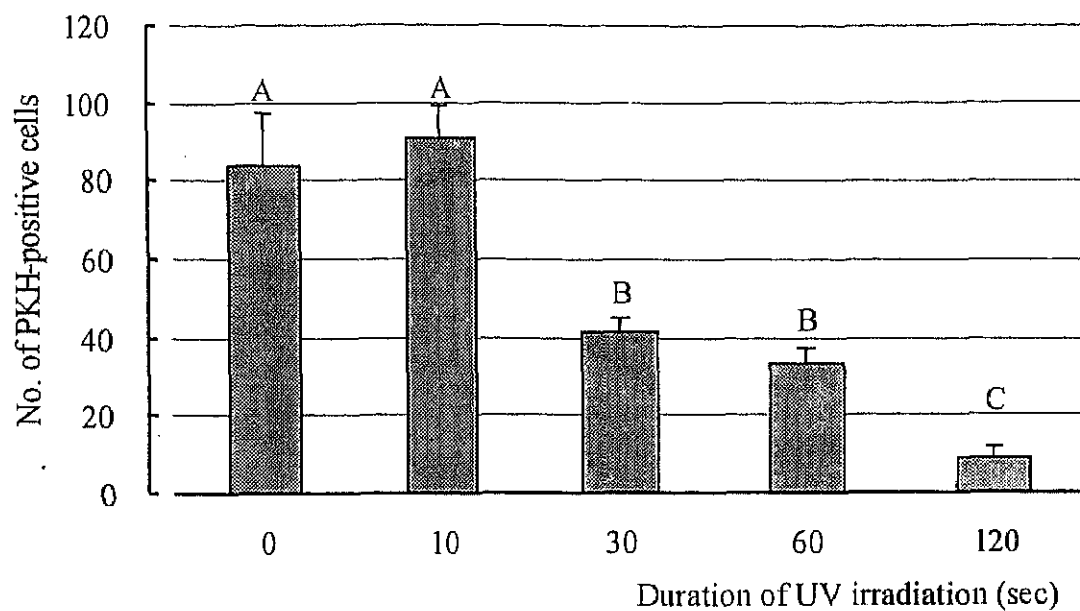
**Figure 2-5 Viability test of UV irradiated PGCs by double staining with PI and FDA.**

The morphological properties of PGCs (A-1 and B-1) were observed under the inverted microscope. Then their fluorescence of PI (A-2 and B-2) and FDA (A-3 and B-3) were observed by using excitation filter of 490 nm and 546 nm, respectively. The viable PGCs (A-1, -2, and -3) are PI-negative and FDA-positive, and the dead PGCs (B-1, -2, and -3) are PI-positive and FDA-negative.

**Table 2-3 Viability of UV irradiated PGCs indicated by PI and FDA double staining.**

Duration of UV irradiation	Viability of UV irradiated PGCs <sup>1</sup> (% , Mean $\pm$ SE)			
	PI		FDA	
	Control	UV	Control	UV
10 sec	99.2 $\pm$ 0.80	98.4 $\pm$ 0.75	96.0 $\pm$ 1.10	96.8 $\pm$ 1.50
30 sec	98.4 $\pm$ 0.75	97.7 $\pm$ 1.17	96.4 $\pm$ 1.17	93.2 $\pm$ 2.06
60 sec	97.6 $\pm$ 0.75	98.4 $\pm$ 0.75	97.2 $\pm$ 1.20	96.0 $\pm$ 0.89
120 sec	98.4 $\pm$ 0.75	94.0 $\pm$ 4.56	95.2 $\pm$ 0.80	87.6 $\pm$ 4.79

<sup>1</sup>: PI-negative and FDA-positive PGCs were defined as viable cells.



**Figure 2-6 Migration of UV irradiated PGCs.**

Fifteen UV irradiated PGCs were injected to 2-day-old recipient embryos after PKH-26 labeling. The number of PKH-positive cells in the gonads of 7-day-old recipient embryos were counted.

A-D; Values with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).