

4. 核移植 PGCs を用いた生殖系列キメラ胚の作製

4-1. 目的

ニワトリの初期発生において、血管系の形成とともに、PGCs は血流中を循環するようになる。さらに発生が進むと PGCs は毛細血管の発達した生殖領域に捕捉され、能動的に血管を抜け出し生殖腺原基へ移動する (Kuwana, 1993)。PGCs がこのような移動経路をたどるのは、鳥類特有の性質である。

この性質を利用することで、生殖系列キメラ個体の作製が可能となる。PGCs が血流中を循環している時期である 2 日胚 (ドナー胚) の血液から分離した PGCs を、別の 2 日胚 (レシピエント胚) 血管中に注入すると、レシピエント胚が本来持っている PGCs とともに生殖腺へ移住する。このような個体は、生殖腺に自らの生殖細胞と移入された生殖細胞とを持つ生殖系列キメラとなり、その繁殖によって、ドナー胚由来の産子を生産することが出来る (Tajima *et al.*, 1993; Naito *et al.*, 1994)。したがって、体細胞核移植 PGCs の利用においても、核移植 PGCs をレシピエント胚に移入して生殖系列キメラを作製することにより、体細胞由来の核移植ニワトリが作製できるものと考えられる。

また、一度生殖腺に移住した PGCs も、血流中を循環している PGCs と同様に、レシピエント胚血管系への移植によって再び生殖腺へ移住し、正常な生殖細胞へ分化することが出来ることが報告されている。Tajima *et al.* (1998) は、5 日胚の生殖腺から採取した PGCs を用いて生殖系列キメラを作製し、生殖系列キメラが性成熟に達した後、後代検定によりドナー胚由来の産子を生産した。Han *et al.* (2002) も

同様に、5日胚をドナーとし、PGCsを2ヶ月間培養した後、生殖系列キメラを作製し、その産子を得ている。さらに、Tajima et al.,(2003)は、7日胚および9日胚をドナーとして、凍結融解PGCsを用いた生殖系列キメラおよびその産子の作出に成功した。生殖腺へ移住したPGCsは、分裂期に入り劇的に増殖する (Swarts and Domm, 1972)。したがって、生殖腺へ移住した後のPGCsの利用は、培養を経ずに多数のPGCsを扱うことが出来るという利点がある。

これらの報告において、生殖系列キメラを作製する際に、レシピエント胚1個体あたり、50から150個のPGCsが用いられている。前章で明らかのように、PGCsとEBCsとの融合効率が10%前後であることを考えると、核移植PGCsを用いた生殖系列キメラの作製のためには、数百から数千個のPGCsを準備する必要があることになる。これだけのPGCsを2日胚の血液から準備することは極めて困難であるため、本章ではPGCs数が数千個に達していると試算されている (Swarts and Domm, 1972)7日胚をPGCsドナーとして用いることとした。

一方、前章までは、体細胞として2日胚より採取したEBCsを用いてきたが、2日胚血液中にはPGCsが混在しており、このPGCsの存在により、結果が不鮮明になる恐れがあるため、本章では4日胚をEBCsドナーとして用いた。

すなわち本章では、体細胞核移植PGCsによる生殖系列キメラ胚を作製することを目的として、前章までで確立されたPGCsの機能的除核法およびEBCsとの電気融合法を用いて体細胞核移植PGCsを作製し、これをレシピエントとなる2日胚血液中に注入した後、このレシピエント胚の生殖腺に核移植PGCsが移住することを確認した。

4-2. 材料および方法

(1) 核移植 PGCs の作出

第 2 章の方法に準じて、4 日間孵卵した WL 胚より、血液約 10 μ l を採取した。EBCs を、Ficoll 濃度勾配遠心分離法およびフィルター法で分離回収した後、融合液で希釈、1 μ l あたり 1×10^3 の密度に調整した。

一方、PGCs は RIR7 日胚より採取した。胚を開腹し、左側生殖腺を採取、これを HTCS 上の培養液 50 μ l 中で、30G 注射針を用いて裁断し、組織片および培養液を 1.5ml 遠心チューブに回収した。そのまま、37.8 $^{\circ}$ C で 1 時間以上放置した後、十分に混合したサンプルを、20 μ m メッシュナイロンフィルター (CMN-20-D, Small Parts Inc, USA) 上へのせ、培養液 50 μ l で 3 回洗浄した。フィルターを通過したサンプルは、組織片が除かれ、また PGCs を多数含んでいる。サンプルを 1.5ml 遠心チューブに回収し、遠心分離 (200 \times g、10 分間) を行った。上澄み 150 μ l を除去し、残った培養液に沈殿を十分に混合した後、HTCS 上に滴下し、紫外線 (254nm、 $0.9 \pm 0.1 \mu$ W/cm 2) を 60 秒間照射した。このサンプルを再度遠心チューブに回収し、遠心分離 (200 \times g、10 分間) を行った。上澄みを除去し、EBCs を 1×10^3 / μ l 含む 0.25M 融合液 10 μ l で沈殿を希釈した。

PGCs および EBCs を含んだサンプル 10 μ l 中、2 μ l を用いて、PGCs 数を計測、3 μ l を対照区、3 μ l を融合区とした。融合区のサンプルは、第 3 章の方法に準じて電気融合 (AC フィールド: 350V/cm 2 , 60 秒, DC パルス: 4kV/cm 2 , 3 回) を行った。融合区の細胞融合を促進するため、両処理区のサンプルは、そのまま 37.8 $^{\circ}$ C で 30 分間放置した。

(2) PGCs の融合率の測定

PGCs を 7 日胚より回収した後、PKH-26 を用いて染色し、さらに電気融合後、Hoechst33342 により核染色を行った。このサンプルにおける PGCs の融合率を第 3 章の方法に準じて計測した。実験は 5 回繰り返した。

(3) PKH-26 染色による核移植 PGCs の生殖腺への移住の確認

EBCs を回収した後、PKH-26 にて染色し、フィルター上において融合液で十分に洗浄し、融合液に希釈した。このような EBCs を用いて電気融合を行った場合、核移植 PGCs は PKH 陽性、EBCs と融合していない PGCs は陰性となり、区別することが出来る。

対照区および融合区のサンプル 1 μ l をそれぞれ 2 個体の 2 日胚の血液中に、第 2 章の方法に準じて注入し、レシピエント胚を 5 日間孵卵した。孵卵後、レシピエント胚の両側生殖腺を採取し、第 2 章の方法に準じて、その生殖腺中に存在する PKH 陽性細胞数を計測した。実験は、5 回繰り返した。

(4) PCR 法による核移植 PGCs の生殖腺への移住の確認

PGCs ドナーより左側生殖腺を採取する際、同時に腸管を採取した。また、EBCs ドナーより血液を採取する際に、約 2 μ l の血液を別に採取した。これらのサンプル、および核移植以前にレシピエント胚より採取した血液を 1.5ml 遠心チューブ中の Proteinase K 溶液 [200 μ g/ml Proteinase K (160-14001, 和光), 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.1 % SDS (199-07121, 和光)] に希釈し、約 2 時間 37.8 $^{\circ}$ C で保温して細胞を溶解した。サンプルチューブを沸騰水に 10 分間煮沸した後、10,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離した。この上清には DNA が

抽出されており、この DNA サンプルを用いて、それぞれの胚の雌雄を判別した。

ニワトリの全 DNA を制限酵素 XhoI で切断すると、W 染色体に特異的な 0.6 および 1.1 キロ塩基対の DNA 断片が作出される (Tone *et al.*, 1982)。この塩基配列は、W 染色体上で繰り返し配列を形成しており (Tone *et al.*, 1984; Saitoh *et al.*, 1991)、この配列の一部を PCR 法を用いて増幅し電気泳動に供することにより、W 染色体を検出し、ニワトリの雌雄を判定することが出来る (Petitte and Kegelmeyer, 1995; Trefil *et al.*, 1999; Clinton *et al.*, 2001)。

雌雄判別法の手順は以下の通りである。

- ① W 染色体特異的繰り返し配列のうちの 276 塩基対を増幅するよう、プライマーは、5'-CGTGAGAAAAGTGGTAGTT-3' および 3'-CTCTGTCCACCATAAAAACC-5'とし、最終濃度 2.5 μ M に調整した。
- ② PCR には、Takara Ex Taq polymerase (宝酒造) を用い、DNA サンプル 1 μ l および両プライマーを、製品に含まれる 10 \times Taq Buffer 5 μ l、dNTP 4 μ l、および Ex Taq 0.25 μ l とともに純水に希釈して 50 μ l とした。
- ③ PCR には、PCR Thermal Cycler SP (TP400, 宝酒造) をもちい、PCR 反応は、まず 96 $^{\circ}$ C で 2 分、その後 94 $^{\circ}$ C、52 $^{\circ}$ C、72 $^{\circ}$ C それぞれ 30 秒を 1 サイクルとして 20 サイクル、最後に 72 $^{\circ}$ C を 5 分間という条件で行った。
- ④ PCR 反応後、サンプルにブルージュース [0.25% BPB, 1mM EDTA, 40 % Sucrose(30404-45, ナカライテクス, 京都)]を 5 μ l 添加し、1.5%アガロースゲルを用いて 50 V で約 50 分間泳動した。泳動槽は Mupid-2(G-2-1, コスモバイオ, 東京)、泳動バッファーには TBE

溶液、分子量マーカーとして 123bpDNA Ladder (15613-029, Gibco, USA) を用いた。

- ⑤ 泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネーター (DT-10MP, アトー、東京) を用いて、W 染色体特異的な 276bp のバンドの有無を確認した。

この結果に基づき、PGCs ドナーとしてオス、EBCs ドナーとしてメスの胚を用いた。したがって EBCs の核を移植された PGCs は W 染色体をもち、移植されていない PGCs は Z 染色体のみとなり、区別することが可能となる。また、レシピエント胚には W 染色体を持たないオスを用いた。したがって、核移植 PGCs が生殖腺に移住したときにのみ、その生殖腺から W 染色体が検出されることとなる。

対照区および融合区のサンプル 1 μ l をそれぞれ 1 個体のレシピエント胚に注入し、5 日後に両処理区の胚が生存していた場合にのみ、それぞれの胚から両側生殖腺を採取した。採取した両側生殖腺より、既述の方法で抽出した DNA サンプルを雌雄判別に供し、W 染色体の検出を行った。実験は、10 回繰り返した。

4-3. 結果

(1) PGCs の融合率

7 日胚 1 個体より採取し、紫外線を 60 秒間照射した PGCs 約 900 個を用いて、3 μ l の融合液中で $1 \times 10^3/\mu$ l の EBCs と電氣的に融合した結果、核移植 PGCs は平均 32.2 ± 5.65 個得られ、この融合効率は $3.58 \pm 0.63\%$ であった。

(2) PKH-26 染色を用いた核移植 PGCs の生殖腺への移住の確認

蛍光色素 PKH-26 にて標識された EBCs を用いて、核移植 PGCs を作製した。従って、レシピエント胚に注入された融合区のサンプルには、PKH 陽性となる核移植 PGCs のほか、PKH 陽性 EBCs、および PKH 陰性 PGCs が含まれる。同様に、対照区のサンプルには、PKH 陽性 EBCs、および PKH 陰性 PGCs のみが含まれる。

このようなサンプルを対照区、融合区それぞれ 2 個体の 2 日胚に 1 μ l ずつ注入し、5 日孵卵した後、レシピエント胚の左右生殖腺から PKH 陽性細胞を検出した。

対照区では、PKH 陽性細胞は全く検出されなかったのに対し、融合区では、その数はもっとも多い場合で 13 個と極めて少ない数ではあるものの、全繰り返しにおいて、少なくとも 2 個体中 1 個体からは PKH 陽性細胞が検出され、また 2 回目および 3 回目の繰り返しでは両レシピエント胚より PKH 陽性細胞が検出された (Table 4-1)。また、検出された PKH 陽性細胞は、PGCs に極めて類似した形態を有していた (Figure 4-1)。

(3) PCR 法による核移植 PGCs の生殖腺への移住の確認

オス胚由来 PGCs とメス胚由来 EBCs を電氣的に融合した。したがって、核移植 PGCs は W 染色体を持ち、そのほかの PGCs (ZZ) と区別することが出来る。このようなサンプルをオスのレシピエント胚に移植し、5 日後にその生殖腺から抽出した DNA を、276 塩基対の W 染色体特異的配列を増幅する PCR に供したところ、対照区では W 染色体特異的バンドは見られなかったが、融合区からは 276 塩基対のバンドが検出された (Figure 4-2)。

このような実験を 10 回繰り返した。繰り返し 5 回目の融合区、6

回目の対照区および融合区の胚は、解剖以前に死亡したものの、残り8回の対照区において目的のバンドはいずれも確認されなかった。一方、融合区では、繰り返し2回目および9回目において、W染色体特異的バンドが検出された (Table 4-2)。

4-4. 考察

本章において、1個体の7日胚から、約1,200~5,900個のPGCsを採取することができた。これを10 μ lの融合液に希釈し、そのうち3 μ lずつを対照区、融合区として用いた。さらに、それぞれの1 μ lずつをレシピエント胚に注入した。従って、融合効率が約3.6%であることを考えると、融合区では、約4~20個の核移植PGCsを注入することができたことになる。これまでの報告では、生殖系列キメラを作製するには、PGCsを50~200個用いている (Naito *et al.*, 1994; Han *et al.*, 2002; Tajima *et al.*, 2003)。従って、核移植PGCsを用いた効率的な生殖系列キメラ胚の作製には、複数のPGCsドナー胚の使用、あるいは培養PGCsの利用などによって、今回の約10倍のPGCsを準備する必要があると思われる。

本章では、核移植PGCsのレシピエント胚生殖腺への移住を確認するため、2つの方法を用いた。

まず、一つ目は蛍光色素PKH-26を利用する方法である。EBCsをPKH-26にて標識したとき、対照区のサンプルにはPKH陽性のEBCsと陰性のPGCsが存在することになるが、対照区のレシピエントの生殖腺からPKH陽性細胞が検出されなかったことから、EBCsはPGCsと融合することなしに生殖腺へ移住できないことが確認された。一

方、融合区では、これらに加え PKH 陽性の核移植 PGCs が含まれており、核移植 PGCs が生殖腺へ移住できることが明らかとなった。ただし、検出された細胞数は非常に少なく、生殖腺へ移住したのは核移植 PGCs の一部であると考えられる。また、繰り返し 5 回目において検出された PKH 陽性細胞が 13 個と他より多かったことから、紫外線照射および電気融合の際に、何らかの条件が整った場合に、移住能あるいは高い増殖能を保持した核移植 PGCs が作出される可能性が考えられる。

二つ目の方法は W 染色体上に存在する特異的繰り返し配列の利用である。オス胚から採取した PGCs (ZZ) とメス胚から採取した EBCs (ZW) を用いて作製した核移植 PGCs をオスのレシピエント胚 (ZZ) に注入し、5 日後生殖腺から DNA を抽出した。この DNA サンプルを、PCR 法による W 染色体特異的繰り返し配列の増幅に用いて、W 染色体を検出した。対照区のレシピエント胚の生殖腺には、自らが持つ染色体 (ZZ) および移入された融合していない PGCs (ZZ) が存在すると予想される。その結果、対照区から W 染色体特異的配列が検出された例はなく、PGCs と一緒に注入された EBCs (ZW) が結果に影響しないことが示された。融合区では、同時に核移植 PGCs (ZZ + ZW) が注入された。繰り返し 10 回中 2 回において、W 染色体特異的配列が検出され、EBCs がもつ DNA が核移植 PGCs によって生殖腺へ運ばれたことが明らかとなった。

PKH-26 を用いた場合には、毎回核移植 PGCs が検出されたのに対し、PCR 法で検出されたのは 10 回中 2 回のみと、結果の食い違いが生じた。しかし、PCR 法では、レシピエント胚の生殖腺由来の DNA の中に存在する微量の核移植 PGCs 由来 DNA を検出するため、10 個前後の核移植 PGCs が存在する場合にのみ検出できるのかもしれない。

い。そのようなケースは PKH 染色による実験では繰り返し 5 回中 1 回のみ出現しており、PCR 法による結果と確率的に一致している。

本研究では、生殖腺に移住した核移植 PGCs が生理的に生殖細胞として機能することを確認していない。しかし、PKH-26 を用いた実験において、レシピエント胚の生殖腺から検出された核移植 PGCs の形態は一般的な PGCs の特長と類似しており、レシピエント胚は生殖系列キメラであることを示唆している。

これらの結果をまとめると、紫外線照射および電気融合によって作出された核移植 PGCs は、注入されたレシピエント胚の血管系から生殖腺原基への移住能を保持しており、生殖系列キメラ胚を作製できると結論付けることができる。

しかし、そのような核移植 PGCs の作出効率は極めて低く、使用する PGCs や体細胞の選択、および作出技術の改良が必要である。さらに、核移植 PGCs の生殖細胞としての生理的正常性を証明するためには、生殖系列キメラ胚を孵化させ、性成熟に達した後、後代検定によって体細胞核由来産子の生産を確認する必要がある。

Table 4-1 Number of PKH-positive cells in the gonads of recipient embryos.

Replication	PGC concentration ¹ (Cells/ μ l)	Treatment ²	No of PKH-positive cells	
			Recipient 1	Recipient 2
1	260	Control	0	0
		Fusion	3	0
2	420	Control	0	0
		Fusion	1	5
3	170	Control	0	0
		Fusion	2	3
4	210	Control	0	0
		Fusion	0	1
5	440	Control	0	0
		Fusion	13	0

¹: Total PGCs were dispersed to 10 μ l of fusion fluid. Two μ l of sample was used for measuring the PGC concentration, and 3 μ l each was treatment of control and fusion. One μ l of sample of control or fusion was injected to two individual 2-day-old recipient embryos.

²: UV irradiated PGCs were mixed (control) and then electrically fused (fusion) with 1×10^3 of EBCs labeled with PKH-26 fluorescent dye. PKH-positive cells were detected from gonads of recipient embryos 5 days after injection.

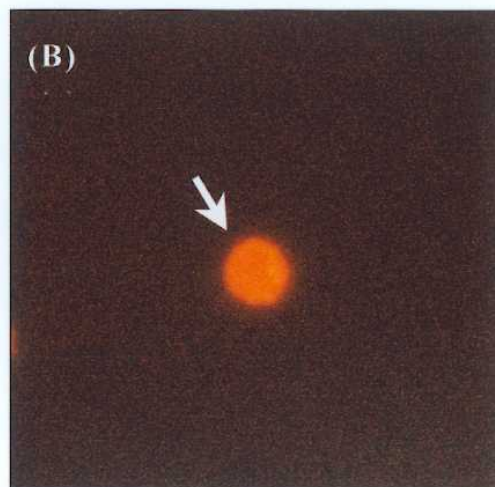
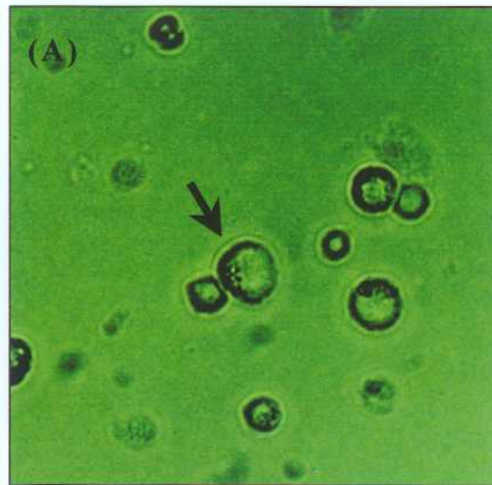


Figure 4-1 Detection of somatic nuclear transferred PGCs from gonads of recipient by PKH-fluorescent labeling.

PGCs were fused with PKH-labeled EBCs and injected to 2-day-old recipient embryos. The gonads of 7-day-old recipient embryos were digested by trypsin, and observed under the light (A) and fluorescent (B) microscope. PKH-positive cells (arrow) were recognized as migrated PGCs fused with EBCs.

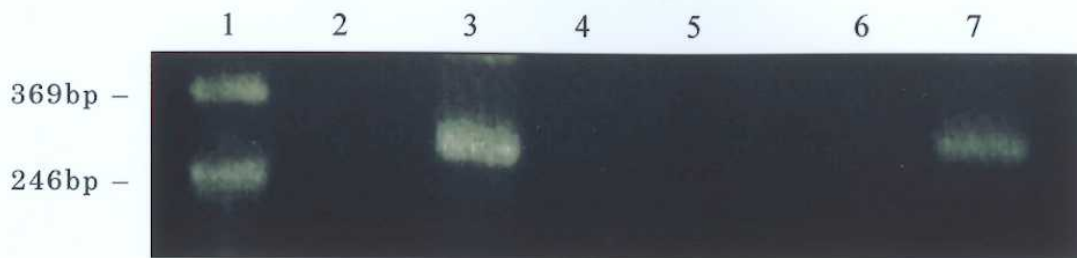


Figure 4-2 Detection of W chromosome by PCR method amplifying a part of XhoI repetitive sequence.

PGCs (ZZ) fused with EBCs (ZW) were injected 2-day-old recipient embryos (ZZ). DNA samples extracted from the gonads of 7-day-old recipient embryos were used for PCR to amplifying 276 bp DNA fragment of W chromosome specific XhoI repetitive sequence. PCR products were detected by 1.5 % agarose gel electrophoresis.

Lane 1: molecular marker (123bp), 2: PGC donor, 3: EBC donor, 4 & 5: blood of recipient embryos before injection, 6 & 7: gonads of recipients 5 days after injection, 4 & 6: recipients injected mixed sample of PGCs and EBCs (control), and 5 & 7: recipients injected electrically fused sample of PGCs with EBCs (fusion).

Table 4-2 Detection of W chromosome derived from female EBCs¹.

replication	PGC concentration ² (cells/ μ l)	Viability at 7 days old		Detection of W chromosome	
		control	fusion	control	fusion
1	120	live	live	ND	ND
2	650	live	live	ND	Detected
3	170	live	live	ND	ND
4	170	live	live	ND	ND
5	420	live	dead	-	-
6	280	dead	dead	-	-
7	240	live	live	ND	ND
8	320	live	live	ND	ND
9	460	live	live	ND	Detected
10	280	live	live	ND	ND

¹: PGCs collected from male embryos (ZZ) were mixed (control) and fused (fusion) with EBCs collected from female embryos (ZW). The samples were injected to male recipient embryos (ZZ). After 5 days incubation, W chromosome specific sequence was detected from DNA extracted from gonads of recipient by PCR and agarose gel electrophoresis.

²: Total PGCs were dispersed to 10 μ l of fusion fluid. Two μ l of sample was used for measuring the PGC concentration, and 3 μ l each was treatment of control and fusion. One μ l of sample of control or fusion was injected to 2 individual 2-day-old recipient embryos.