

平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名		脳科学研究戦略推進プログラム
研究開発課題名		遺伝子改変マーマーモセットの汎用性拡大および作出技術の高度化とその脳科学への応用（遺伝子改変マーマーモセットの効率的生産に向けた生殖工学技術の整備・開発）
機関名		国立大学法人 広島大学
研究開発 担当者	所属 役職	自然科学研究支援開発センター 教授
	氏名	外丸 祐介

2. 研究開発成果の内容

①生殖工学基盤技術の整備・改良

受精卵の凍結保存技術の検討として、ガラス化法における保存液（DAP213 液、PEPeS 液、DEPS1 液）を比較した。生体由来受精卵および核移植を供試した結果では、PEPeS 液を用いた場合に比べて、DAP213 液および DEPS1 液では高い生存率が得られた。体外受精卵を DAP213 液および DEPS1 液に供試した結果では、顕著な差は見られなかった。以上より、体外培養系卵子（体外受精卵、核移植卵）の場合では生体由来受精卵に比べて生存率は低いですが、DAP213 液もしくは DEPS1 液での保存が有効であると示唆された。

また、凍結保存精子の受精率向上を目指し、体外受精培地への還元型グルタチオン（GSH）の添加について検討した。体外受精に先立って体外成熟卵を 5 mM、10 mM および 50mM GSH 添加した IVF-100 液で 30 分間培養した後、4 時間の媒精を行った結果、それぞれの受精率は 12.5%、0% および 0% であった。以上より、10mM 以上の GSH 添加は受精を阻害し、また GSH 添加の効果の確認には 5mM 以下での詳細な感作条件の検討が必要であると考えられた。

②遺伝的相同個体作製手段の構築

一卵性複数仔作製技術の改良について

一卵性多子作製の為の技術として、受精卵分離技術による個体作製試験を実施した。分割卵単独の移植試験では、4 分割卵より 1 匹の産仔が得られたが 8 分割卵からは産仔が得られなかった。この一方、4 分割卵および 8 分割卵について 4 倍体体細胞クローン胚とのキメラ胚を作製することで、それぞれより産仔を得ることに成功した。これらの結果より、4 倍体をホストとしてキメラ胚を作製することで、単独では個体発生できない細胞や受精卵割球の発生能の獲得・誘導に働くことが示唆された。

また、平成 26 年度の個体作製試験により得た受精卵クローン個体について、経過観察を継続した。生後 15 ヶ月（平成 28 年 3 月末現在）を越えて外見上異常無く生存していることから、適切な産後処置・哺育環境下では健常に発育可能であり、受精卵クローン技術は個体作製手段として実務適用が可能であると示唆された。

ES/体細胞クローン技術の開発について

クローン胚の発生率改善を目指し、卵子特異的なリプログラミング因子の候補物質と考えられるヌクレオプラスミンの効果を検討した。体細胞をドナーとして作製した核移植卵にヌクレオプラスミン発現ベクターを注入した後、活性化処置を施すことで体細胞クローン胚を作製した。体外培養により発生能を確認した結果、全てのクローン胚が 8 細胞期までに発生を停止し、本条件では効果は確認することができなかった。