

|  |                |
|--|----------------|
| 研究テーマ：凍結乾燥精子の顕微授精を介した遺伝子導入技術の開発<br>～抗体酵素を生産する新動物の開発に向けて～ |                |
| 研究代表者（職氏名）：教授 堀内 俊孝                                      | 所属：生命環境学部生命科学科 |
| 共同研究者（職氏名）：教授 宇田 泰三，教授 山田 學，准教授 矢間 太，准教授 一二三 恵美          |                |

宇田教授は、酵素機能を持つ抗体が存在することを発見し、スーパー抗体酵素と命名した。このスーパー抗体酵素は、特異部位に結合後、酵素作用によってタンパク質を分解することから、抗体医薬として着目されている。抗体をヒトに直接投与するためには、抗体のアミノ酸配列がヒト型になっていなければならない。ヒト型抗体遺伝子を導入したマウスを作出することで多様なヒト型の抗体酵素を作出することができる。ヒト抗体遺伝子は遺伝子サイズが大きく、関連遺伝子は複数の染色体に位置するため、メガベースの遺伝子をマウスに導入する技術を確立する必要がある。

本研究では、凍結乾燥精子の顕微授精を介した遺伝子導入法を検討し、受精卵の前核に遺伝子ベクターを注入する従来法による遺伝子導入効率と比較した。さらに、凍結乾燥精子の顕微授精を介した遺伝子導入法は各種マウス系統に応用できることを明らかにした。

- (1) B6D2F1 マウスの精巣上体尾部精子を 50mM NaCl と 50mM EGTA を含む Tris-HCl 緩衝液で懸濁し、ガラスアンプルに 100  $\mu$ l 入れ、凍結乾燥機 (FD-100) によって 6 時間凍結乾燥した。アンプルは真空に保ち密閉し、冷蔵庫冷凍室 (-20°C) に保存した。アンプル開封後、100  $\mu$ l の滅菌水を加え再水和した。凍結乾燥精子は常法に従って顕微授精を行い、染色体異常率を調べた。凍結乾燥精子および新鮮精子の染色体異常率は各 19% と 7% となり、同様であった。
- (2) C57BL/6, BALB/c, C3H, CBA マウスの精巣上体尾部精子を上記方法で凍結乾燥し、顕微授精を行った結果、染色体異常率は各 13%, 16%, 21%, 19% であり、有意な差はなかった
- (3) B6D2F1 マウスの凍結乾燥精子および新鮮精子の顕微授精による 2 細胞期率は各 98% と 84%, 桑実期率は各 91% と 79%, 胚盤胞率は各 89% と 78% となり、同様であった。
- (4) C57BL/6, BALB/c, C3H, CBA における凍結乾燥精子の顕微授精による 2 細胞期率は、各 100%, 98%, 98%, 100%, 桑実期率は各 87%, 88%, 91%, 96%, 胚盤胞率は各 87%, 76%, 83%, 96% となり、系統間で有意な差はなく、B6D2F1 の凍結乾燥精子や新鮮精子と同様であった。
- (5) 凍結乾燥精子の顕微授精に由来する 2 細胞期胚の胚移植による産仔率は 41% で、新鮮精子の顕微授精に由来する 2 細胞期胚の胚移植による産仔率 46% と同様であり、昨年度実施した凍結融解精子のトリトン X-100 処理区によって得られた産仔率 25% を大きく改善した。
- (6) pCX-EGFP の遺伝子断片 3179bp を凍結乾燥精子と混合し顕微注入したときの B6D2F1, C57BL/6, BALB/c, C3H, CBA の桑実期胚&胚盤胞への発生率は、各 78%, 68%, 82%, 76%, 97% であり、このうち緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現胚率は各 60%, 52%, 66%, 57%, 59% であった。一般的に汎用される前核注入法の桑実期胚&胚盤胞への発生率は 70%, このうち GFP 発現胚率は 10% となり、凍結乾燥精子の顕微授精と比べ有意に低かった。
- (7) B6D2F1, C57BL/6, BALB/c, C3H, CBA の桑実期胚&胚盤胞の胚移植による GFP 発現マウス (グリーンマウス) 率は各 20%, 20%, 21%, 20%, 13% となり、凍結融解トリトン X-100 処理精子の顕微授精の 4%, 前核注入法の 8% よりも高いグリーンマウス率であった。