

顕微受精法を用いたアレルゲン除去卵創生への挑戦

静岡大学学術院農学領域・准教授 笹浪 知宏

■ 緒言

鶏卵は我々の暮らしの中で最も身近な食材のひとつであり、栄養価も高く、またマヨネーズやパン等の加工用食材としても重要である。しかし、同時に食物アレルギーの原因第1位挙げられるほど、アレルゲンとしての活性が強いことも知られている。特に乳幼児における比率が高く、0～1歳の患者では、約半数の患者が卵アレルギーであると言われている。またインフルエンザや麻疹等のワクチン生産にも鶏卵は用いられており、その接種の際にもアレルゲンのコンタミネーションが問題となっている。

鳥類の受精は哺乳類とは異なり、一個の卵子に60個もの精子が侵入するという多精受精を行う。これをインビトロで再現することが難しかったため、これまで鳥類の体外受精は成功してこなかった。本助成者は、この問題を解決し、鳥類の受精を体外で再現することに成功し、2014年に世界で初めて顕微受精法によるウズラヒナの孵化に成功した(Mizushima et al., 2014)。この技術を応用することにより、鳥類におけるジーンターゲットングに道が拓かれた。本研究では、ウズラで確立した技術をニワトリにも応用し、顕微受精方法の確立を目指すとともに、アレルゲンノックアウト鶏卵を創出するために必要な基礎的知見を得ることを目的とした。

■ 方法

ニワトリにおいて顕微受精法を確立するために、ロードアイランドレッドを用いて検討を行った。ニワトリ卵子は実験当日の産卵時刻から排卵時刻を推定し、産卵後、1-2時間に屠殺し、卵管膨大部から得た。成熟雄からマッサージ法によって射出精子を採取し、PBSで洗浄後、実験に用いた。

精子抽出物の調整は、ウズラの場合と同様の方法で行った(Mizushima et al., 2014)。すなわち、洗浄後の精子をポリトロンホモジナイザーおよび超音波ホモジナイザーにより破砕した。20,000 x g、10分間の条件で遠心した上清を精子抽出物とした。精子抽出物は、顕微受精に用いいるとともに、抗クエン酸合成酵素(anti-CS)抗体または抗アコニターゼ(anti-AH)抗体を用いたウェスタンブロット解析により解析した。また一部の精子からRNAを抽出し、RT-PCR法によるフォスホリパーゼCゼータ(PLCzeta)の発現解析を行った。

顕微受精は、ウズラの方法と同様に行った(Mizushima et al., 2014)。すなわち、精子一個と精子抽出物または各種タンパク溶液混合物を胚盤の中心部よりやや外した位置に顕微注入した。顕微注入後、濃厚卵白中で24時間、41°C培養した。培養24時間後に発生段階の観察を実体顕微鏡下でEyal-Giladi and Kochav(1976)またはHamburger&Hamilton(1951)の方法によって行った。24時間後にニワトリ卵を加工して作成した培養容器に受精卵を移し、水溶性卵白中で37°Cで培養を続けた。

ゲノム編集ニワトリを作出する前段階として、ウズラを用いて遺伝子導入およびクローン作出法の検討を行った。遺伝子導入に用いる外来遺伝子はAequorea victoria由来エンハンサーとニワトリ β -actinプロモーターを構築したpCX-EGFPベクター(Ikawa et al., 1995)を使用した。300ngのベクターをSalIで消化して直鎖状にし、凍結融解を行った精子とインキュベートすることでベクターと精子とを結合させた。これをウズラの排卵卵子に精子抽出物と共に顕微受精することで遺伝子導入を行った。胚におけるEGFPの発現の確認は、蛍光実体顕微鏡による緑色蛍光の有無およびGFP遺伝子に対するプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションにより行った。

クローン胚の作出の検討は、ドナー細胞としてstage Xの受精卵から得た胚盤葉細胞、孵卵10日目の胚から得た皮膚細胞および筋原細胞を用いた。これらの細胞を60 μ g/ml quail PLCzeta cRNA、100 μ g/ml quail CS cRNA および100 μ g/ml AH cRNAを含んだ溶液と共に顕微注入した。5 μ g/mlのサイトカラシンBを含む培養液に4時間浸し、偽極体の放出を阻害した後、体外培養を行った。顕微注入に供したレシピエント卵は、卵殻腺部(子宮部)から取り出した未受精卵にUVを10秒間することによって雌性核を不活性化して使用した。

■ 結果

1. ニワトリ精子に含まれる精子ファクターの解析

ニワトリの射出精子に含まれる精子ファクターを同定するために、精子抽出物のウェスタンブロットおよびトータル RNA の RT-PCR 解析を行った。anti-CS 抗体を用いた結果から、ニワトリ精子には分子量約 45kDa のバンドが検出され、ウズラの CS と同等の分子量を有することが判明した(図 1A)。一方、anti-AH 抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、分子量約 69kDa とウズラよりも若干小さい分子量にバンドが検出され、ウズラとは異なる構造である可能性が示唆された(図 1B)。一方、PLCZ の特異的プライマーを用いた RT-PCR の発現解析から、ウズラと同様に精子細胞に発現していることが分かった(図 1C)。

2. ニワトリを用いた顕微授精方法の確立(図 2)

ウズラで確立されている顕微授精法をニワトリにも応用可能かを調べるため、ニワトリの排卵卵にニワトリの射出精子を顕微授精した。ニワトリの精子抽出物、ウズラの精子抽出物およびウズラで効果が確認されている IP₃、CS および AH を用いて顕微授精を行った。受精率を算出したところ、ニワトリ精子抽出物を用いた場合は 33% (10/30)、ウズラの精子抽出物を用いた場合は 42% (5/12) であり、IP₃、CS および AH を用いた場合には 50% (6/12) であった。ウズラ卵子を用いた場合と比較し受精率が低く(ウズラでは 80%)、体外培養を継続しても発生が中断してしまうことから、ウズラにおける方法をそのまま適応することが難しいと考えられた。

3. 遺伝子導入ウズラの作出

凍結融解処理した精子を EGFP ベクターと共にインキュベートし、ウズラの卵に精子抽出物とともに顕微授精した。受精率は 85% (17/20) であり、発生ステージは最大で 27 まで進行した(図 3A)。蛍光実体顕微鏡下で GFP の発現を観察したところ、GFP の発現率は約 58% (7/12) であった。GFP 遺伝子のゲノムへの導入率をサザンハイブリダイゼーションで調べたところ、17.6% (3/17) であった(図 3B)。本方法によって効率よく外来遺伝子をウズラ卵に導入できることが分かった。しかし、いずれの胚も発生途中で死亡し、孵化個体を得ることはできなかった。

4. クローンウズラの作出(図 4)

UV 処理により雌性核を不活性化した卵に胚盤葉細胞核を注入し、体外培養を行った。その結果、13% (4/30) の卵が発生し、発生ステージが最大で 8 まで進行した。皮膚細胞の注入では 4% (2/45) の卵が発生し、発生ステージは最大で 6 であった。筋原細胞を注入した場合には発生率は 0% (0/12) であった。よって、クローンウズラの作出には胚盤葉細胞がもっとも適しているが、皮膚細胞も、その代替として使用可能である可能性が示唆された。

■ 考察

本研究では、これまで申請者がウズラで確立した技術である顕微授精法をニワトリにも応用可能であるかを検討するとともに、顕微授精技術を応用して、遺伝子組み換えおよびクローン鳥類を作出することに挑戦したものである。ニワトリ精子抽出物や精子トータル RNA を用いた研究から、ニワトリの精子にも、ウズラの受精に必須であることが判明した PLCzeta、CS および AH が存在することが明らかになった。しかしながら、AH の構造はウズラとニワトリで異なっていると考えられ、卵子活性化能力も異なる可能性が示唆された。また、精子抽出物をニワトリ卵に注入し顕微授精を行っても、受精はするものの、発生は途中で停止してしまうことがわかった。現時点でこの原因は不明であるが、ニワトリでは、ウズラとは異なる卵子活性化因子が必要である可能性も考えられる。近年、ウズラのゲノム配列が公開され、ニワトリとの相同性が 90% 程度であることが判明したが、精子生理においては、近縁種でありながら、大きく異なることも報告されている(Matsuzaki et al., 2017)。今後、ニワトリにおいて顕微授精方法を確立するためには、さらなる検討が必要であると考えられる。

ニワトリでの顕微授精技術の確立は現時点では難しいと判断されたため、アレルゲンノックアウト鳥類の作出の基盤となる知見を得るために、遺伝子組み換えウズラの作出を試みた。その結果、孵化個体を得るまでには至らなかったが、顕微授精法を用いて、効率良く外来遺伝子をゲノムに組み込むことに成功した。このことは、顕微授精方法さえニワトリで確立することができれば、ニワトリにおいても外来遺伝子を導入することが可能であることを示している。この観点からも、顕微授精法をニワトリで確立することが急務と考えられる。

クローンウズラの作出に関しては、体細胞核を注入することによって、未受精卵の発生を惹起可能であることが判明した。レシピエント卵の核は UV 照射によって不活性化しているため、これは

単為発生によるものではないと考えられる。本結果は、クローン鳥類を作出可能な唯一の方法であると考えられるが、すべての体細胞核注入卵は発生初期で死亡することが判明した。UV照射により、核以外の細胞内の構造がダメージを受けた可能性も考えられる為、より穏やかな方法による核の不活性化方法が有効かもしれない。しかしながら、細胞の分化程度の違いが、その後の発生に影響を与えするという知見を得ることができた。すなわち、クローン鳥類の作出には、細胞分化のあまり進んでいない胚盤葉細胞をドナー細胞として用いることが最良であり、皮膚細胞はその代替として利用可能と考えられる。

今回の研究では、同じキジ目キジ科の鳥類であるウズラとニワトリ間においても、受精メカニズムが異なる可能性が示唆された。今後は、ニワトリの卵子活性化機構を解明し、ニワトリにおける顕微授精方法の確立を目指すとともに、遺伝子組み換えニワトリの効率的な生産を目指した研究を行う予定である。また、クローン鳥類の作出に関しては、なるべくレシピエント卵子にダメージを与えない方法での核の不活性化方法を開発し、発生のさらなる向上を目指したいと考えている。

■ 要 約

これまでの研究で、ウズラを用いた顕微授精方法が確立された。本研究では、この技術をニワトリに応用可能か、可能であるなら、遺伝子組み換え鳥類およびクローン鳥類の作出に応用し、アレルゲンノックアウトニワトリの作出かを検討することを目的とした。ウズラで開発された方法を用いてニワトリの排卵卵子に顕微授精を行ったところ、受精はするものの、発生が途中で停止することがわかった。ニワトリの精子に含まれる卵子活性化因子、クエン酸合成酵素およびアコニターゼを検出したところ、ウズラのそれらとは構造が異なる可能性が示唆され、ウズラでの知見をそのままニワトリに適用できない可能性が示唆された。ウズラを用いて遺伝子組み換えウズラを作出する検討を行った。その結果、孵化には至らなかった、顕微授精法を応用して、効率良く外来遺伝子をウズラ胚のゲノムに導入する方法が確立された。クローンウズラの作出に関しては、雌性核をUV照射により不活性化した卵子に体細胞核を注入することで発生を惹起することが可能であった。しかし、これらのクローン胚は、発生のごく初期に死亡してしまうことが判明した。以上、ニワトリの顕微授精の成功には、これまで知られていないようなニワトリ独自の卵子活性化メカニズムを解明する必要がある、この問題をクリアすれば、遺伝子組み換えニワトリの作出が可能になるものと考えられた。一方、クローン鳥類の作出には、雌性核の不活性化方法の検討を含め、多くの問題を解決する必要があると考えられた。

■ 文 献

- 1) Mizushima S, Hiyama G, Shiba K, Inaba K, Dohra H, Ono T, Shimada K, Sasanami T(2014)The Birth of quail chicks after intracytoplasmic sperm injection. *Development* 141:3799-3806
- 2) Hamburger, V. and Hamilton, H.(1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49-92.
- 3) Eyal-Giladi, H. and Kochav, S.(1976). From cleavage to primitive streak formation:a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. *Dev. Biol.* 49, 321-337.
- 4) Ikawa, M., Kominami, K., Yoshimura, Y., Tanaka, K., Nishimune, Y. and Okabe, M.(1995). Rapid and non-invasive selection of transgenic embryo before implantation using green fluorescent protein(GFP). *FEBS Letters* 375, 125-128.
- 5) Matsuzaki, M., Mizushima, S., Ichikawa, Y., Shiba, K., Inaba, K. and Sasanami, T(2017)Effects of protein kinase inhibitors on sperm motility in the Japanese quail. *Journal of Poultry Science*54, 73-79.

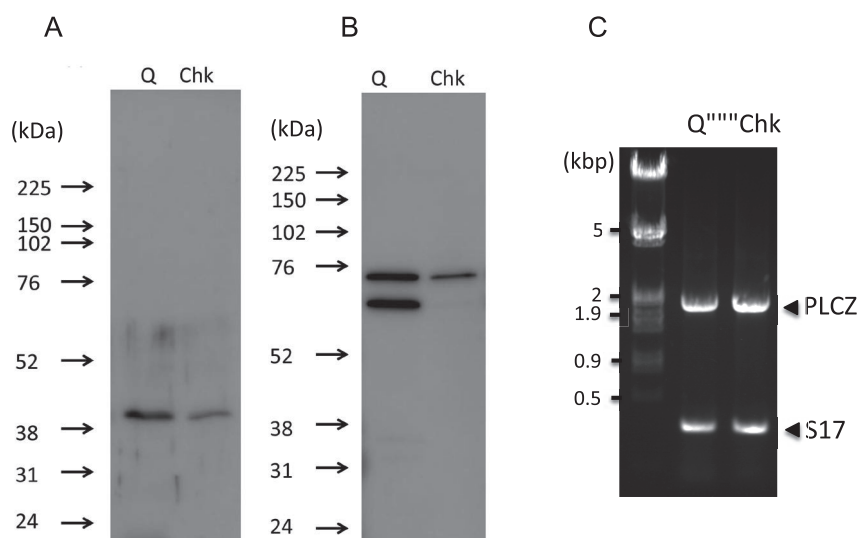


図1 ウズラ (Q) またはニワトリ (Chk) の精子ファクターの解析

A: ウズラまたはニワトリ精子の抽出物を抗 CS 抗体を用いたウェスタンブロットティングで検出した。

B: ウズラまたはニワトリ精子の抽出物を抗 AH 抗体を用いたウェスタンブロットティングで検出した。

C: ウズラまたはニワトリ精子由来のトータル RNA を PLCZ の特異的プライマーを用いた RT-PCR で検出した。

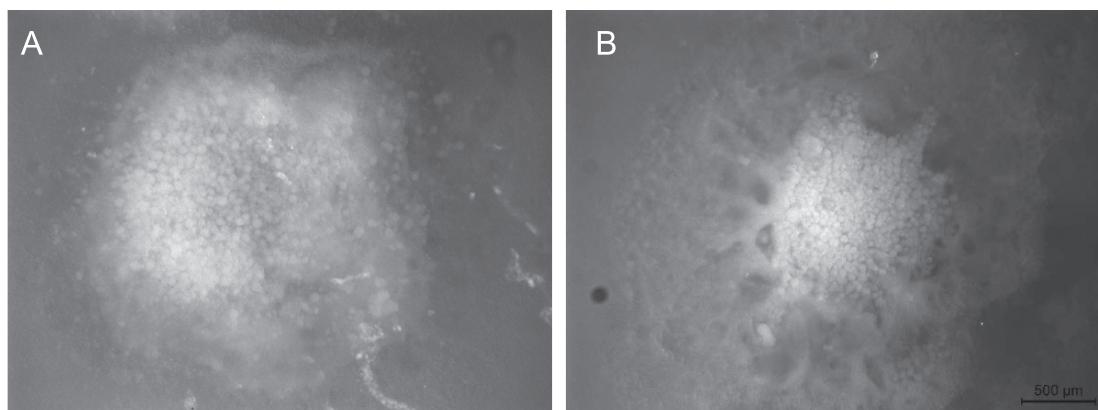


図2 顕微受精により作出したニワトリ初期胚

ニワトリの射出精子を (A) ニワトリ精子抽出物または (B) ウズラ精子抽出物と共にニワトリ排卵卵に顕微受精した。24 時間の体外培養を行い、写真撮影を行った。どちらの顕微受精卵も発生の初期に発生が停止した。

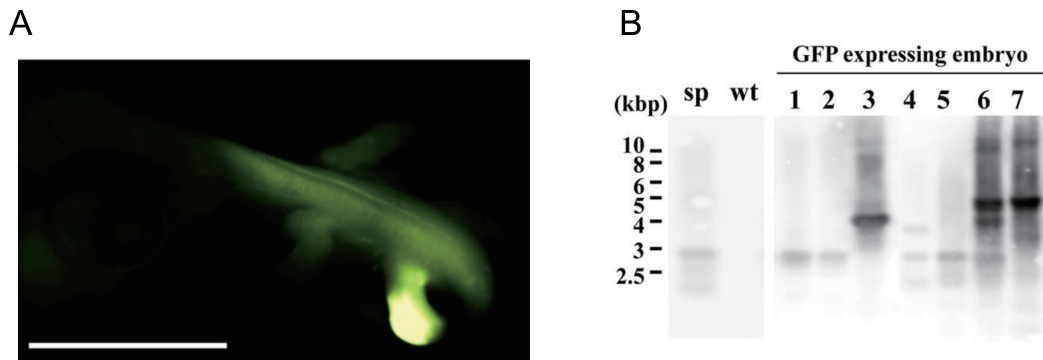


図3 遺伝子導入ウズラの作出

(A) ウズラの射出精子を凍結融解処理し、pCX-EGFP ベクターとインキュベートした。これを IP_3 、CS および AH とともにウズラ排卵卵子に顕微授精した。発生した胚を蛍光実体顕微鏡で観察した。スケールバーは 5mm (B) 遺伝子導入ウズラのサザンブロット解析。遺伝子導入処理を行った胚からゲノム DNA を抽出し、サザンブロット解析を行った。3 つの個体(レーン 3, 6 および 7)の胚ゲノムに pCX-EGFP が導入されていることが示された。sp は精子、wt は未処理のウズラ胚ゲノムの結果を示した。

注入細胞

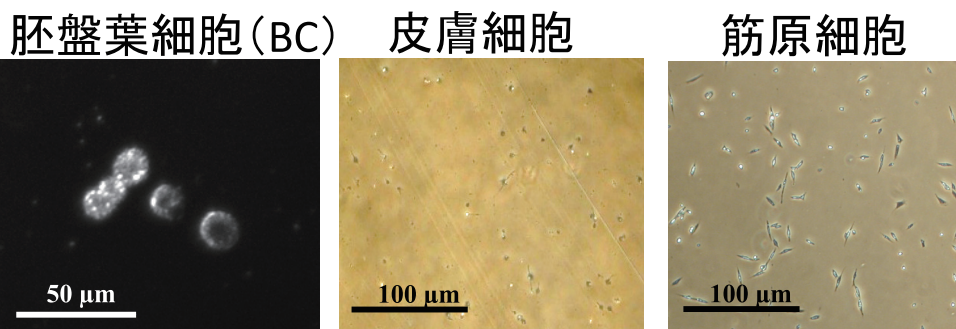


図4 クローン胚の作出に用いたドナー細胞

胚盤葉細胞は、放卵後の胚盤より採取、皮膚細胞と筋原細胞は、孵卵 10-11 日胚より採取した。