

平成12年度日米科学技術協力事業「脳研究」分野長期派遣共同研究者実施報告書

所属機関・職名・氏名：生理学研究所 技術課・文部科学技官・三宝 誠

研究課題：神経細胞核を用いたクローンマウス作製技術の開発

米国側研究機関・共同研究者：The Institute for Biogenesis Reserch

Department of Anatomy and Reproductive Biology

University of Hawaii School of Medicine

山崎 由希子

派遣期間：平成13年3月29日～平成13年5月28日

研究の概要： 神経細胞核を用いたクローンマウス作製技術の開発を目的として研究を行った。まず最初に、クローンマウス作製技術を習得するために、クローンマウスを作製するための操作を部分的に行った。特に除核はこれまでに経験したことがない技術であるため、一週間にわたり集中して行った。除核とは、卵子の核を抜き取ることで、マイクロマニピュレーター、およびピエゾドライブシステムを用いてサイトカラシンBによって細胞骨格を崩した卵子の核を外径10 μ mのガラスピペットで卵子を死なさずに抜き取らなければならない。また、ピエゾドライブシステムを使いこなす必要もあった。それらの基本的操作ができるようになった上で、次に、卵丘細胞の核を用いてクローンマウス作製を行った。卵丘細胞を選んだ理由は、卵丘細胞は宿主となる卵子を採取する際にヒアルロニダーゼ処理によって簡易にかつ大量に解離した状態で得られること、ほとんどの卵丘細胞はクローンマウス作製に必要な条件である細胞周期がG1およびG0期であることを満たしており、細胞周期を整える必要がないこと、細胞の大きさが10 μ m程度であり、初心者がクローンマウス作製を行うのにちょうど良い大きさであることである。核導入後の卵の発生効率は、核導入で生き残った卵のうち、3日後にmorula/blastocystまでに発生が進むものが約5割であることが現在のこのシステムでの最高レベルであり、実際に行った結果、約3割まで発生効率を上げることができた。また、それらを仮親に移植してnew bornとして生まれる効率は約5%で、1匹の仮親に20個の卵を移植して1匹生まれる確率である。私が行った結果は、移植後、妊娠10日目で約15%の効率で生きた胎仔を確認することができた。しか

し、もともと妊娠10日目から14日目の間にクローンの胎仔が致死および吸収される確率が非常に高く、なかなかnew bornとして得ることができなかったが、11回目にnew bornとして得ることができた。その胎仔は帝王切開で取り出した直後に死亡したが、その後に行ったものからnew bornとして得ることができ、そのクローンマウスは現在ハワイ大学において飼育中である。脳神経細胞核を用いたクローンマウス作製は、クローンマウス作製技術の習得中に行ったが、技術が未熟であるため、結果としてはnew bornとして得ることができなかった。ただし、移植後10日目に胎仔としていることは確認しており、技術をさらに向上させることによって作製可能と考えられる。これまでに習得したクローンマウス作製技術を用いて、生理学研究所においてクローンマウス作製システムを確立したのちに、脳神経細胞核を用いたクローンマウス作製を行う予定である。