

報告番号	乙第	5231 号
------	----	--------

乳腺発現系トランスジェニックラット
に関する研究

名古屋大学図書	
和	1253619

平林 真澄

目 次

第 1 章 緒 論	1
第 2 章 ラット個体への乳腺発現系プロモーターに連結した ヒトタンパク質遺伝子の導入	
第 1 節 緒 言	11
第 2 節 ヒト成長ホルモン遺伝子のラット個体への導入率に 及ぼす乳腺発現系プロモーターの影響	12
第 3 節 トランスジェニックラットの作出効率に影響を 及ぼす要因の検索	29
第 4 節 小 括	37
第 3 章 ヒト成長ホルモンを乳中に分泌するトランスジェニック ラットの発現解析	
第 1 節 緒 言	39
第 2 節 乳腺発現系プロモーターの種類と外来遺伝子発現率 ならびに乳中分泌量との関係	41
第 3 節 奇乳へ分泌されたヒト成長ホルモンの定量による 外来遺伝子発現の早期検定	56
第 4 節 小 括	67
第 4 章 ヒト成長ホルモンを乳中に分泌するトランスジェニック ラット系統の凍結保存	
第 1 節 緒 言	69
第 2 節 ラット 2 細胞期胚の蘇生にとって有効な二段階凍結 またはガラス化保存条件の検討	70

第3節	凍結融解に由来するトランスジェニックラット胚の 発生能ならびに遺伝子伝達性	78
第4節	小 括	85
第5章	総 括	87
謝 辞		93
引用文献		94

略語一覽表

A	AGPC	acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform
B	β -actin	beta actin
	b α LA	bovine alpha lactalbumin
	b α S1CN	bovine alpha S1 casein
	b β CN	bovine beta casein
	BCA	bicinchoninia acid
	b κ CN	bovine kappa casein
	β LG	beta lactoglobulin
	BSA	bovine serum albumin
D	DAF	decay accelng factor
	dATP	deoxyribose adenosine 5'-triphosphate
	dCTP	deoxyribose cytidine 5'-triphosphate
	dGTP	deoxyribose guanosine 5'-triphosphate
	DMSO	dimethyl sulfoxide
	DNA	deoxyribonucleic acid
	DNTPs	deoxynucleoside triphosphate
E	EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
	ES	embryonic stem cell
F	FCS	fetal calf serum
G	GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
H	hCG	human cholonic gonadotrophin
	hGH	human growth hormone
	HRF20	homologous restriction factor 20
M	m-KRB	modified krebs-ringer bicarbonate buffer

	MCP	membrane cofactor protein
	mRNA	messenger ribonucleic acid
	mWAP	mouse whey acidic protein
P	PBS	phosphate-buffered saline
	PCR	polymerase chain reaction
	PEG	polyethylene glycol
	PLSD	protected least significant difference
	PMSG	pregnant mare's serum gonadotrophin
R	r α CN	rat alpha casein
	RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
	rWAP	rat whey acidic protein
S	s β LG	sheep beta lactoglobulin
	SDS	sodium dodecyl sulfate
	SSC	standard saline citrate
	SV-40	simian virus 40
T	t-PA	tissue-plasminogen activator
	TE	tris-EDTA
	TTP	thiamin triphosphate

第 1 章 緒 論

トランスジェニック（形質転換）動物とは、外来遺伝子を導入することにより新しい遺伝形質を獲得した動物個体や、既存のゲノム上に何らかの改変を加えることで元の遺伝形質に変更を生じた動物個体のことを意味する。マウスでは主としてクローニングされた遺伝子の動物個体レベルでの機能解析のためにこのトランスジェニック動物が利用されている。従来はクローニングされた遺伝子は培養細胞に導入され、細胞の分化に対応した遺伝子発現の調節機構や遺伝子産物の細胞に与える影響について調べられてきた。しかし、トランスジェニック技術の進歩により、これらの外来遺伝子の特性や機能を単一系の細胞ではなく動物個体の正常な発生過程のなかで周囲の異種細胞と相互作用を保ちながら正常 2 倍体細胞で調べるのが可能になった。たとえば、ヒトのガン遺伝子を導入したオンコマウス [1] は病因の解明や治療法の探索のための疾患モデルとして世界で最初のトランスジェニック動物特許となり、話題を呼んだ。また、補体抑制因子の decay-accelerating factor (DAF)、membrane cofactor protein (MCP)、homologous restriction factor (HRF20、CD59) 等の遺伝子を導入したマウス [2] やブタ [3] では超急性拒絶反応が効果的に抑制されたことから、自然抗体および補体系の活性化による超急性拒絶反応の抑制が成功の鍵とされている異種動物間臓器移植に道を開いた。

一方、家畜では成長ホルモン遺伝子の導入による成育促進効果 [4]、チーズの生産効率改善を目的に乳タンパク遺伝子の導入による乳成分の改変 [5]、アクチンやミオシン遺伝子の導入による肉質改善 [6、7]、ケラチン遺伝子の導入による羊毛質の改良 [8]、などにトランスジェニック技術が利用されている。さらに、有用生理活性物質などのバイオ医薬品の原料となる遺伝子を動物に組み込んで、大量にしかも安価に外来遺伝子産物を分泌させる、いわゆるアニマルバイオリアクター（動物生産工場）としてのトランスジェニック動物

の研究も実験小動物だけでなく家畜でも盛んに行われている [9-14]。トランスジェニック動物を作出する方法として今日もっとも一般的に用いられているのは、1細胞期受精卵の雄性前核に外来遺伝子溶液を直接導入する顕微注入法で、1980年にマウスで最初に報告された [15]。この方法は特殊な装置とある程度の技術者の熟練を要するものの、外来遺伝子の構造や特性にあまり影響されずに導入でき、導入遺伝子の発現効率も比較的高い。現在までにラット [16] やウサギ [17] などの小実験動物からヒツジ [17]、ヤギ [11]、ブタ [17] およびウシ [14] といった産業家畜に至る様々な動物種においてこの顕微注入法によるトランスジェニック動物が作出されている。この顕微注入法は外来遺伝子を付加するには有効な方法だが、既存のゲノム上の遺伝子に変更を加えることは不可能である。

自己増殖能および多分化全能性を持つ胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell) を培養し、リボソームや静電パルスまたはリン酸カルシウムを使って外来遺伝子を組み込む ES 細胞法 [18] は、胚盤胞に注入してキメラ動物を作出することにより外来遺伝子を動物個体へと導入できる。この方法は外来遺伝子の付加だけでなく、ジーンターゲティングによって既存のゲノムを改変することも可能となる。しかし、この方法は ES 細胞の樹立がマウス以外の動物では非常に難しく、その維持も大変である。さらに、そのキメラの生殖系列に導入遺伝子が組み込まれている割合も低いことから、ES 細胞法によるトランスジェニック動物の作出はいまだに実験段階を出ていないのが現状である。また、外来遺伝子をウィルスのベクターにつなぎ、4～8細胞期の初期分割卵に感染させることによって遺伝子を導入するウィルスベクター法 [19] も、ウィルスが多細胞期の受精卵のみ感染することから作出されたトランスジェニック動物はモザイクとなり、導入した形質を固定するまでに多大の時間と労力を要するという欠点がある。

これに対し、精子を外来遺伝子を含んだ培養液中に浮遊させることによって外来遺伝子を精子に取り込ませ、その精子を用いて体外受精することによりトランスジェニック動物を作出するという精子ベクター法 [20] が、特殊

な装置や熟練した技術者を必要としない簡単な方法として注目を浴びた。この方法が報告された直後に、トランスジェニック研究の第1人者である Brinster が複数の研究機関の追試結果を集計し、この方法で約 2,000 匹のマウスを作出しても 1 例のトランスジェニックマウスも得られなかったという報告をした [21]。その後、精子ベクター法によりマウス [20]、ブタ [22] およびウシ [23] においてトランスジェニック動物作出の成功例が報告されるようになったが、導入遺伝子の一部欠失や再配列などの問題が提起された [24]。また、日本の研究者により開発された精巢介在性遺伝子導入法 (Testis Mediated Gene Transfer) [25] は、高濃度の外来遺伝子溶液とリポフェクチンの混合液を直接精巢に注入することで精原細胞に遺伝子を導入し、雌と交配することによりトランスジェニック動物を得るというものだが、再現性に問題がある。

このように、最初のトランスジェニック動物であるスーパーマウスの写真が Nature 誌の表紙を飾ってから 17 年以上経過した今なお、もっとも信頼できるトランスジェニック動物の作出法は雄性前核への顕微注入法なのである。実験動物としてもっとも汎用性が高いマウスではトランスジェニックマウスを効率的に作出するための検討が細部にわたってなされてきた。顕微注入法において外来遺伝子の導入効率に影響を及ぼす要因としては、外来遺伝子溶液の濃度、緩衝液の組成、マウスの系統、受精卵への注入部位などが挙げられた [26]。さらに、外来遺伝子の構造に関しては鎖長に関係なく組み込まれること、環状よりも直鎖状のもののほうが組み込まれやすいこと、および突出末端（粘着または非粘着）をもつ外来遺伝子は平滑末端のものよりも組み込まれやすいこと、が報告された。このように、トランスジェニックマウス作出条件の最適化が進んだ結果として、適度な経験を積んだ技術者がいる研究機関であれば、顕微注入したマウス胚の約 10% がトランスジェニックマウスとして得られるようになった。

一方、トランスジェニックラットはヒトの疾患モデル動物として高血圧 [27-29]、炎症 [30]、内分泌 [31、32]、代謝 [33]、臓器移植 [34] に関連

した分野で利用されている。しかし、ラットの前核期卵は脆弱な細胞質と弾性に富んだ前核をもつこと [35] に関係して、トランスジェニックラットをうまく作出できる研究機関の数は限られている [28-39]。それゆえ、トランスジェニックラットの作出に関する至適条件について十分に検討されてきたとは言えず、顕微注入ラット胚由来の産子に対するトランスジェニックラットの割合にはかなり大きな変動がある。一部の研究機関から報告されている高値のトランスジェニックラット作出効率 [27、28、33] が技術的な差の範囲を越えて存在するならば、トランスジェニックラットの作出効率に影響を及ぼす未知の要因が存在するかもしれない。

従来、遺伝子組換え技術による生理活性物質の生産には大腸菌が宿主細胞として利用されてきた。しかし、ヒトにとって有用な物質を量産しようとした場合、大腸菌のような単細胞生物ではいくつかの不都合な点があった。それは、大腸菌は生産したタンパク質がヒトで正常に機能するためにときとして必要な糖鎖の付加やリン酸化などの機能に欠けることや、ヒトタンパク質を異物として認識して消化分解したり顆粒体として排除する傾向があること、および大量の異種タンパク質の存在下では大腸菌の生育そのものが阻害されやすいこと、などである [40]。一方、哺乳動物の培養細胞を有用物質生産のための宿主にする場合はその生産効率が問題で、生産量は大腸菌や酵母を宿主とする場合と比べて 100 分の 1 にも満たない [40]。このような背景のもと、大腸菌や培養細胞の欠点を克服できるトランスジェニック動物が有用物質を生産するための宿主として注目されるようになったのである。

トランスジェニック動物において導入遺伝子による新規タンパク質は、その遺伝子のプロモーターによって、どの細胞で、どの発生段階で、どの程度の量を合成するかが支配される。乳腺を標的としたアニマルバイオリアクターの作出において、目的とするヒト生理活性物質を動物の乳中に分泌させるには乳腺で機能するプロモーターにその外来遺伝子を連結すればよい。このプロモーターは泌乳期に特異的に乳腺で働き、合成されたタンパク質を乳腺

細胞外に輸送することを命令する塩基配列が必要であり、この種の制御領域としては乳タンパク質遺伝子のプロモーターが候補に挙げられた。Simons ら [41] はヒツジの β ラクトグロブリン遺伝子をマウス受精卵に顕微注入し、ヒツジの乳中と同等もしくはそれ以上の濃度でヒツジ β ラクトグロブリンを分泌するトランスジェニックマウスを作出した。この結果は導入したヒツジ β ラクトグロブリン遺伝子はその遺伝子産物を乳汁中に分泌させるプロモーターを含み、また、この領域がマウスのゲノム上でも機能できるということを示している。その後トランスジェニックマウスの乳中に分泌されることが示された乳タンパク質には、ウシの α ラクトアルブミン [42]、ラットの β カゼイン [43]、そしてマウスのホエー酸性タンパク質 (mWAP) [44]、がある (Table 1)。

乳タンパク質遺伝子のプロモーターは構造遺伝子が別の種類に変わってもその発現を制御できる。Gordon ら [45] はヒト組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) の構造遺伝子と mWAP 遺伝子上流のプロモーターとの融合遺伝子をマウスに導入し、生物活性のある t-PA をトランスジェニックマウスの乳中に分泌されることに成功したが、その発現レベルは非常に低いものであった ($<0.4 \mu\text{g/ml}$)。また、細胞表面マーカーの CD4 も mWAP のプロモーターによってトランスジェニックマウスの乳中に分泌させることができる [46] が、その分泌も低濃度であった ($0.2 \mu\text{g/ml}$)。しかし、Pittius ら [47] は同じプロモーターを用いて $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度で t-PA を乳中に分泌する別のトランスジェニックマウス系統を報告している。この頃から外来遺伝子産物を高濃度でトランスジェニックマウスの乳中に分泌させる報告が相次ぎ、Meade ら [48] はウシ αS1 カゼイン遺伝子のプロモーターを用いてヒトのウロキナーゼを $1,000\sim 2,000 \mu\text{g/ml}$ の濃度で、Archibald ら [49] はヒツジ β ラクトグロブリン遺伝子のプロモーターを用いてヒトの α -アンチトリプシンを $7,000 \mu\text{g/ml}$ の濃度で産生させることに成功した。その他にも、ヒツジトロフォブラストインターフェロン [50]、ウシ卵胞刺激ホルモン [51]、嚢胞性線維症の膜透過性因子 [52]、ヒト成長ホルモン [53、54]、ヒ

Table 1. Research history of transgenic animal for bioreactors.

DNA	Promoter	Origin	Host	References
β lactoglobulin	-	sheep	mouse	Simons et al, 1987 [41]
α lactalbumin	-	cattle	mouse	Villote et al, 1989 [42]
β casein	-	rat	mouse	Lee et al, 1988 [43]
whey acidic protein	-	mouse	mouse	Bayna & Rosen, 1989 [44]
<hr/>				
tissue plasminogen activator	mouse WAP	human	mouse	Gordon et al, 1987 [45]
CD4	mouse WAP	human	mouse	Yu et al, 1989 [46]
anti-hemophilic factor IX	ovine β LG	human	sheep	Clark et al, 1989 [12]
α 1 -antitrypsin	ovine β LG	human	mouse	Archibald et al, 1990 [49]
urokinase	bovine α S1CN	human	mouse	Meade et al, 1990 [48]
interleukin-2	rabbit β CN	human	rabbit	Bühler et al, 1990 [59]
trophoblast interferon	bovine α LA	sheep	mouse	Stinnakre et al, 1991 [50]
lactoferrin	bovine α S1CN	human	cattle	Krimpenfort et al, 1991 [60]
follicle-stimulating hormone	rat β CN	cattle	mouse	Greenberg et al, 1991 [51]
growth hormone	mouse WAP	human	mouse	Reddy et al, 1991 [54]
cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	goat β CN	human	mouse	Ditullio et al, 1992 [52]
β interferon	mouse WAP	human	mouse	Schellander & Péli, 1992 [55]
protein C	mouse WAP	human	pig	Velander et al, 1992 [56]

ト β インターフェロン [55]、ヒト C タンパク質 [56]、ヒト $\alpha 1$ -アンチトリプシン [57]、などが様々な動物種に由来する乳タンパク質遺伝子のプロモーターを用いて生産されている (Table 1)。 外来遺伝子産物をトランスジェニック動物の乳中で大量生産させるにはマウスよりも大きな動物種への適用が重要である。ウシ α ラクトアルブミン遺伝子を発現するトランスジェニックラット [58] や mWAP 遺伝子を発現するトランスジェニックブタ [9] に加えて、組換え遺伝子の導入によってもウサギ β カゼイン遺伝子プロモーターの制御下でヒトインターロイキン-2 遺伝子を発現するトランスジェニックウサギ [59]、mWAP 遺伝子プロモーターの制御下でヒト C タンパク質遺伝子を発現するトランスジェニックブタ [10]、ヒツジ β ラクトグロブリン遺伝子プロモーターの制御下でヒト抗血友病因子 IX 遺伝子を発現するトランスジェニックヒツジ [12] およびウシ $\alpha S1$ カゼイン遺伝子プロモーターの制御下でヒトのラクトフェリン遺伝子を発現するトランスジェニックウシ [60] が報告されている (Table 1)。これらの報告は乳タンパク質遺伝子のプロモーターがマウス以外の多くの哺乳動物種にわたって機能できることを示しているが、構造遺伝子の乳中発現量はプロモーターと構造遺伝子、さらに、宿主となる動物の組み合わせによってあまりにも差が大きく、アニマルバイオリアクターのための乳タンパク質遺伝子のプロモーターの評価を困難にしている。

一方、乳腺における外来遺伝子の発現を解析するにはそのトランスジェニック動物が泌乳可能な時期までに成長しなければならない。例えばラットの場合、目的とする搾乳が可能になるには第1世代のトランスジェニックラットが雌であったとしてもおよそ4ヶ月、雄であったときは第2世代の雌を得るための時間を含めておよそ6ヶ月の時間がかかる。また、これがウシやブタなどの家畜が対象になった場合、これらの時間は最低でも数年、という単位になってくる。導入が確認された外来遺伝子の発現を早期に検定しようという試みには2つの異なったアプローチが取られてきた。一つは外来遺伝子から mRNA への転写を乳腺細胞で検出しようというもので、トランスジェニ

ックマウスにおいてヒト血清アルブミン遺伝子の発現検定を目的に行われた [61]。他の一つはエストロジェンおよびプロジェステロンの投与によって時期よりかなり早くに泌乳を誘起しようというもので、ヤギにおいて試験された [62]。しかしながら、現在の時点では、実験動物と家畜のいずれにおいても、外来遺伝子の発現を予測するための技術開発はまだうまくいっていない。

トランスジェニック技術を適用可能な動物種は実験小動物のマウスやラットから大型家畜のウシにまで至っており、これらのトランスジェニック動物の系統維持には多大な労力と莫大な経費がかかるため、初期胚や精子のレベルでこれらを凍結保存しておこうという可能性が模索されている [63、64]。しかし、外来遺伝子を付加したトランスジェニック動物由来の凍結保存胚の生存性や凍結融解胚から発生した産子における外来遺伝子の安定性についての情報は少なく、凍結融解胚由来のトランスジェニックマウスにおいて伝達率が 33～46%であったという報告があるに過ぎない [64]。

胚の凍結保存は、マウスやラットなどの実験小動物では系統や特異形質の保存を目的として、また、ウシなどの家畜では人工妊娠技術の実用化における基幹技術として、その重要性の大きさから過去 25 年以上にわたって多くの努力が費やされてきた研究分野である。胚は水分含量が 80%以上を占める複数の細胞からなる生物体であり、その水分のうち 90%は脱水可能な細胞内自由水である。一般には、細胞外の氷晶形成により細胞内外に浸透圧的不均衡ができると浸透圧平衡を保とうとする作用により結果として細胞から自由水が脱水される。しかし、胚細胞は球形を呈しているため体積に対する表面積の比率が小さく、脱水率が低い。それゆえ、胚の凍結傷害は、細胞内自由水の細胞内凍結によって引き起こされるタンパク質の高次構造を形づくる SH 架橋の物理的崩壊、が原因であると考えられてきた [65]。

細胞の脱水程度は冷却速度によって支配され、冷却を緩慢に行えば細胞は十分に脱水される。そして、急激な水の流入による浸透圧ショックを和らげるために緩慢に融解を行えば、生存細胞を効率よく回収できる [66]。哺乳動

物胚の低温保存の可能性を最初に示唆したのは1958年のFerdowsら [67] で、ウサギの2細胞期胚においてグリセリンを凍害保護物質として -79°C まで冷却し、融解した胚を宿主へ移植して産子を得ることに成功した。そして、再現性が得られないままに時が流れたが、1972年のWhittinghamら [68] の報告によって一気に活性化した。彼らはジメチルスルホキシド (DMSO) の存在下で -196°C まで凍結・融解したマウス胚を移植して発育産子を得た。その後、この緩慢凍結法はラット [69]、ウサギ [70]、ヒツジ [71]、ヤギ [72]、ウシ [73] といった様々な動物種にも適用された。

これに対し、ある程度まで細胞を脱水させた後に急速に超低温まで冷却したときには、細胞内氷晶の移動再結晶を回避するために急速な融解をすれば生存細胞が回収できる。1980年、WoodとFarrant [74] はこの原理をマウス胚に適用し、液体窒素中に浸漬させる温度を $-20\sim-25^{\circ}\text{C}$ という比較的高い零下温度とした二段階凍結法を報告した。これにより従来の緩慢凍結法に比べて冷却行程が大幅に短縮された。二段階凍結法による哺乳動物胚の保存成功例は、ラット [75]、ウサギ [76]、ウマ [77]、ウシ [78]、ヒト [79] といった動物種で報告されている。

さらに1985年、マウス胚の脱水を液体環境下 (0°C 以上) で誘起しておいてから超急速凍結する方法がRallとFahyによって開発され [80]、形成される氷晶が超微細なために凍結した溶液がガラス状に透き通って見えることからガラス化保存法と呼ばれた。この方法は、非常に高濃度の凍害保護物質溶液に胚をさらして脱水させることを特徴としている。この方法はプログラムフリーザーなどの装置を必要とせず、緩慢凍結法や二段階凍結法よりも時間がかからない、という利点をもつ。現在までに、ラット [81]、ウサギ [82]、ヒツジ [83]、ウマ [84]、ウシ [85]、ヒト [86] といった動物種に適用されてきた。

本研究の目的は、乳腺を外来遺伝子の発現器官としたトランスジェニックラットを作出し、その外来遺伝子産物の泌乳について解析することである。

まず、5 種類の乳タンパク質遺伝子のプロモーターの下流にヒトの成長ホルモン遺伝子をつないだ融合遺伝子を構築し、ラット前核期卵に顕微注入してトランスジェニックラットを作出した。そして、これらのトランスジェニックラットについて、乳タンパク質遺伝子のプロモーターの違いによるヒト成長ホルモン遺伝子の発現を調べた。また、新生児ラットの乳腺から細胞をバイオペシーし、mRNA の検出により導入遺伝子の発現を早期に検定しようとした。最後に、トランスジェニックラット由来 2 細胞期胚を凍結融解し、個体への発生能、導入遺伝子の伝達性と発現について調べた。

第2章 ラット個体への乳腺発現系プロモーターに 連結したヒトタンパク質遺伝子の導入

第1節 緒言

トランスジェニック動物を作出するには1細胞期受精卵の雄性前核に直接、外来遺伝子溶液を注入する顕微注入法が最も一般的に用いられている。この方法により1980年にGordonら[15]が初めてトランスジェニックマウスを作出するのに成功している。その後、1985年にHammerら[17]がウサギ、ヒツジおよびブタにおいて、1988年にはBieryら[14]がウシにおいて顕微注入法によるトランスジェニック動物を誕生させた。

現在ではある程度の訓練を受けた技術者が行うかぎりトランスジェニックマウスの作出はそれほど困難なことではなく、マウス個体への外来遺伝子の導入に影響を及ぼす要因も検討されている[26]。例えば、顕微注入される外来遺伝子溶液の濃度は1~2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲が適当で、外来遺伝子を溶解する緩衝液(10 mM Tris-HCl)に添加する物質は MgCl_2 に比べるとEDTA(0.1~0.3 mM)のほうがよい。また、外来遺伝子の鎖長は導入効率に影響しないが、直鎖状の遺伝子は環状のものよりも導入効率が高く、さらに突出末端(粘着または非粘着)の遺伝子は平滑末端のものよりも導入効率が高い。前核期胚を提供するマウスの系統については近交系よりも交雑系のほうが導入効率が高く、受精卵の注入部位は細胞質に注入するよりも前核に注入したときのほうが導入効率はよい。しかしながら、適切な作業環境下におけるトランスジェニックマウスの作出効率は、今なお外来遺伝子を注入した胚に対して10%前後の割合でしかない[88-92]。

一方、トランスジェニックラットの作出は、大家畜のそれよりもさらに遅れて1990年にHammerら[30]、Mullinsら[27]、Hochiら[16]が相次いで成功を報告している。しかし、ラット受精卵の細胞膜は脆弱で前核は弾

性に富み、物理的な刺激に対して抵抗性が低いこと [35] に起因してか、トランスジェニックラットの報告例はこれらを含めても数例 [28-39] と少ない。マウスの場合とは異なって、トランスジェニックラットの作出に関する至適条件の検討は十分にはなされていない。このことが、マウスと同等の医学的有用性を備えているにもかかわらずトランスジェニックラットを使った研究が少ない原因のひとつかもしれない。

本章においてはまず、乳中に有用生理活性物質を生産するトランスジェニック動物の作出技術を確立するため、トランスジェニック動物の作出方法として最も一般的に用いられている顕微注入法を用いて、乳腺発現系プロモーターのラット個体への外来遺伝子導入に及ぼす影響を検討した。次に、42 種類に及ぶ直鎖状の外来（融合）遺伝子をラット個体へと導入し、その遺伝子のプロモーター、構造遺伝子、鎖長、両端の構造ならびに注入濃度がトランスジェニックラットの作出効率に及ぼす影響について調べ、また、注入術者やラットの系統差についても検討した。

第 2 節 ヒト成長ホルモン遺伝子のラット個体への導入率に及ぼす 乳腺発現系プロモーターの影響

材料と方法

(1) 顕微注入に用いる外来遺伝子の調製

まずウシゲノム DNA を鋳型にして、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法 [93] によって α ラクトアルブミン ($b\alpha LA$)、 β カゼイン ($b\beta CN$)、 $\alpha S1$ カゼイン ($b\alpha S1 CN$) および κ カゼイン ($b\kappa CN$) の 5' 上流域を調製した。ゲノム DNA の抽出は Hogan ら [94] の方法に従って行った。すなわち、ウシの乳房組織 (和光純薬工業) 3~5 g を 10.5 ml の溶解液 (50 mM Tris-HCl;

pH 8.0、100 mM EDTA、100 mM NaCl、1% SDS) 中で切り刻み、プロテナーゼ K (10 mg/ml、SIGMA) を 525 μ l 加えゆっくり攪拌した後、55°C で一晩消化した。次に、RNase A (2 mg/ml、SIGMA) を 300 μ l 加えて 37°C で 1~2 時間反応させた後、フェノール、フェノール:クロロホルム (1:1)、クロロホルムの順で DNA を抽出した。得られた上清液に同量の 2-プロパノールを加えて攪拌し、糸状になった DNA をガラスキャピラリーで巻き取った。この DNA を 70% エタノール、100% エタノールで順次洗浄した後、200 μ l の TE バッファー (10 mM Tris-HCl: pH 8.0、1 mM EDTA) で一晩溶出し、これをウシゲノム DNA 溶液とした。また、マウスのホエー酸性タンパク質 (mWAP) 遺伝子の 5'上流域は、mWAP 遺伝子をふくむプラスミド (NIH の Dr. L. Hennighausen より贈与) を鋳型 DNA として調製した。

それぞれの乳タンパク質遺伝子の 5'上流域の調製に用いたオリゴヌクレオチドプライマーは増幅断片の 5' 側および 3' 側の両側に適切な制限酵素認識部位を加えるように設計した (Table 2-1)。プライマーの合成には Model 394 DNA/RNA シンセサイザー (Applied Biosystems) を用い、オリゴヌクレオチドピュリフィケーションカラム (OPC カラム、ABI) で精製した。PCR 反応液には、鋳型 DNA 200 ng、10 mM dNTPs (dATP、dGTP、dCTP、TTP) 2 μ l、50 mM プライマー溶液: 2 μ l、10 \times PCR buffer (500 mM KCl、25 mM MgCl₂、100 mM Tris-HCl: pH 8.4、2 mg/ml ゼラチン) 10 μ l、H₂O: 86 μ l の混合液を用いた。PCR 反応液をまず 95°C で 10 分間加熱して DNA を変性させた後、1.7 単位の Taq ポリメラーゼ (パーキンエルマーシートス) を加えて、数滴のミネラルオイルで反応液を覆った。95°C 1 分間の加熱変性、55°C 2 分間のアニーリング、72°C 2 分間の DNA 合成を 1 サイクルとし、DNA サーマルサイクラー (パーキンエルマーシートス) を用いて反応を 30 サイクル繰り返した。そして反応液をクロロホルムで処理することによりミネラルオイルを除去し、60 倍量の PEG 溶液 (2.5 mM NaCl / 20% ポリエチレングリコール 6000) を加えて混合した後、4°C で 1 時間静置した。そして 15,000 rpm で 10 分間遠心した後、沈殿を 70% の冷エタノールで 2

Table2-1. Primers for preparation of 5' regulatory regions of milk protein genes.

Gene	Primers	Sequences ¹	Corresponding region		Reference
			on the gene		
b α S1CN	BAC01H:	ctcaagcttGTCACAAAGAACTGGACACGACTTA	− 671 to +51:	722 bp	Yu-Lee et al, 1986 [95]
	BAC11B:	ctcgatccTGAACCCCAAGACTGGGAAGAA			
	b β CN	BBC01H:	ctcaagcttTCGAATCCATCTCTATCAATTA	− 1723 to +37:	
b α LA	BBC12B:	ctcgatccCCAAAGTAGAGGACAAGAAAGT			Vilotte et al, 1991 [97]
	BLA21X:	ctctctagaAAGCTTATATATTTATGAACA	− 738 to +27:	765 bp	
	BLA31B:	ctcgatccTTTGGTGACCCCCCAAGATTTC			
b κ CN	BKC01N:	ctccatatgGATCCCTACTTTTATATTGATTA	− 552 to +64:	616 bp	Alexander et al, 1988 [98]
	BKC12B:	ctcgatccTTTCCTTGTGACCGTCAGCTCTTGC	(+61: 613 bp) ²		
	mWAP	MWP11B:	ctcgatccGGTACCGGGTCAGGCAAGTGACTGAT	− 2600 to +33:	
MWP12B:		ctcgatccCAGGCAAGTGACTGATGGCTGGCTGA			

¹ Nucleotide sequences written in small letters contain recognition sites of restriction enzymes and link to 5' ends of the genomic sequences for amplification written in capital letters.

² A plasmid, pBKCNHG-1, used in this study was found deleted of 3 bp corresponding to 5' untranslated region from +62 to +64 of bovine κ -casein gene.

回洗浄し、TEバッファーに溶解した。この溶液 15 μ l を 3% NuSieve+1% SeaKem アガロース (FMC バイオプロダクト) の混合ゲルで 100 V 1.5 時間電気泳動した後、臭化エチジウム染色して 280 nm 下で PCR 増幅産物を確認した。そして、5' および 3' 末端に付加した制限酵素切断部位を各々の制限酵素を用いて切断した後に 1.2 %アガロースゲルで電気泳動し、Gene Clean II (BIO 101) を用いて精製した。このようにしてそれぞれの乳タンパク質遺伝子 5'上流断片 (プロモーター) を得た。

構造遺伝子については、Nicholas Institute Diagnostics 社より購入したヒト成長ホルモン (hGH) 遺伝子のエクソン、イントロンおよびポリ A シグナルを含むプラスミド p0GH を用いた。 $b\alpha$ LA、 $b\alpha$ S1CN、 $b\beta$ CN および mWAP のプロモーターを Hind III と BamH I で消化し、その断片を p0GH の Hind III および BamH I サイトに挿入して、それぞれ、pBLAGH-1 (5.6 kb)、pBAS1CNGH-1 (5.5 kb)、pBBCNGH-1 (6.6 kb) および pMWAPGH-1 (7.4 kb) を構築した。また、 $b\kappa$ CN のプロモーターの BamH I 断片を p0GH の BamH I サイトに挿入し、pBKCNH-1 (5.4 kb) を構築した。pBLAGH-1 と pBKCNH-1 は Hind III と EcoR I で、また、pMWAPGH-1 は EcoR I で消化することによりベクター領域を除去した。pBAS1CNGH-1 と pBBCNGH-1 はそれぞれに 3 ヶ所あるいは 4 ヶ所の EcoR I サイトを保有しているため、Hind III での完全消化と EcoR I での部分消化によって調製した。このように調製した融合遺伝子はそれぞれ、 $b\alpha$ LA/hGH、 $b\alpha$ S1CN/hGH、 $b\beta$ CN/hGH、 $b\kappa$ CN/hGH および mWAP/hGH と命名した。これらの鎖長はそれぞれ、2.9、2.8、3.9、2.6 および 4.7 kb である。そして顕微注入用には 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) / 0.1 mM EDTA で 5 μ g/ml の濃度になるように溶解し、使用するまで -20°C で凍結保存した。

(2) トランスジェニックラットの作出

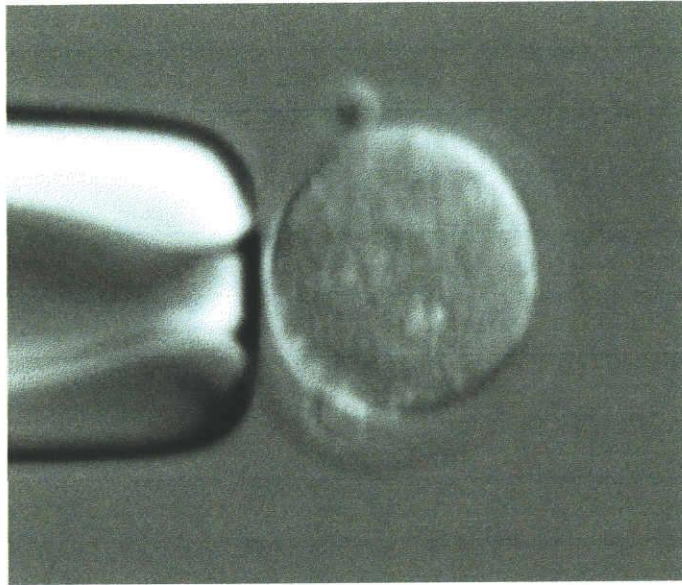
8~25 週齢 Wistar 系の雌ラット (日本チャールス・リバー) の性周期を膣スメア像の観察によって把握し、発情後期に妊馬血清性性腺刺激ホルモン

(PMSG、日本全薬工業) 150 IU/kg、48 時間後の発情前期にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG、三共) 75 IU/kg をそれぞれ腹腔内に投与して過剰排卵を誘起した [100]。そして hCG を投与した日の夕方から同系統の成熟雄と同居させ、翌日に膣栓の有無により交配の成立を確認した。hCG の投与から 32 時間後に 0.1% ヒアルロニダーゼ (SIGMA) を含む m-KRB 液 [101] で卵管を灌流し、卵丘卵子複合体を採取した。そして同培地中に 5 分間静置して卵丘細胞を完全に取り除いた後、卵子を m-KRB 液で 3 回洗浄した。そしてあらかじめミネラルオイル (SIGMA) で覆って 37°C、5% CO₂、95% 空気の気相下で平衡させた 100 μ l の m-KRB 液中に卵子を移し、静置しておいた。

顕微注入装置は、ノマルスキー微分干渉装置を装着した倒立型位相差顕微鏡 (TMD-300、Nikon) とマイクロマニピレーター 1 組 (HMO-102、HMO-103、成茂科学器械) から構成されており、右側に注入用ピペット、左側に保定用ピペットを配置した。注入用ピペットはガラス毛细管 (G-1、成茂科学器械) をメカニカルプラー (PN-3、成茂科学器械) で引き切り、フッ化水素 (和光純薬) で先端に穴を開け、シグマコート (SIGMA) で表面をコーティングした。また、保定用ピペットは、メカニカルプラーで引き切ったガラス管をマイクロフォージ (MF-79、成茂科学器械) で細工した。いずれのピペットもマイクロフォージで約 30° の角度に曲げて使用した。注入操作はアクリル板 (60×50×3 mm) に直径 25 mm の穴を開け、カバーガラス (30×30 mm、マツナミ) を蜜蝋で張り付けたチャンバー内で行った。20% ウシ胎児血清 (FCS、Hy Clone Laboratories) を添加したダルベッコのリン酸緩衝液 (PBS、日水製薬) の 40 μ l に対して 50～100 個の卵子を入れ、ミネラルオイルで覆った。そして 1 個ずつ、前核の膨潤が最大となるまで外来遺伝子溶液の注入操作を行った (Fig. 2-1)。

外来遺伝子溶液を注入した前核期胚は 100 μ l の m-KRB 液中で 12～15 時間培養し、形態的に正常な 1 細胞期および 2 細胞期の胚のみを FCS+PBS で 3 回洗浄した。そして精管結紮雄と交配して偽妊娠にした Wistar 系雌ラ

(a)



(b)

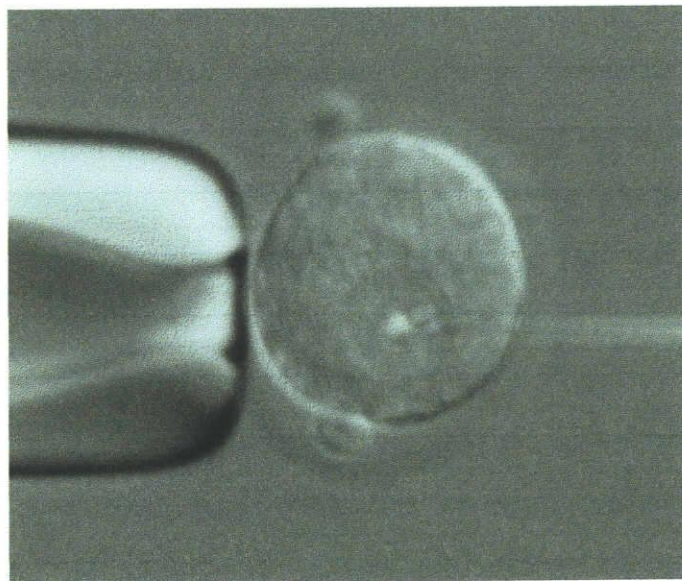


Fig. 2-1. Appearance of pronuclei before (a) and after (b) microinjection of DNA.

ットの卵管内に同培地を用いて移植した。受胎雌には偽妊娠 1 日目 (膣栓確認日) のものを用い、1 匹あたり 10~30 個の胚を移植した。

(3) 外来遺伝子の検定

胚移植により得られた産子ラットに外来遺伝子が導入されていたか否かについては、迅速かつ簡便な PCR 法により検定した。ゲノム DNA は Hogan ら [94] の方法に従って 3 週齢以降で離乳した産子の尻尾から抽出した。すなわち、1~1.5 cm 程度切断した産子の尻尾を 700 μ l の溶解液中で切り刻み、35 μ l のプロテナーゼ K を加えてゆっくり攪拌した後、55°C で 12~14 時間消化した。次に 20 μ l の RNaseA を加えて 37°C で 1~2 時間反応させた後、フェノール、フェノール：クロロホルム (1 : 1)、クロロホルムの順で DNA を抽出した。得られた上清液に同量の 2-プロパノールを加えて攪拌し、糸状になった DNA をマイクロキャピラリーで巻き取った。この DNA を 70% エタノール、100% エタノールで順次洗浄した後、200 μ l の TE バッファーで一晩溶出し、DNA 溶液とした。抽出 DNA 20 ng、dNTPs (10 mM) 2 μ l、プライマー溶液 (50 mM) 2 μ l、10 \times PCR buffer 10 μ l および H₂O 86 μ l を混合して PCR 反応液を調製した。プライマーは HGH003 (^{5'}OH ACACCTAC CAGGAGTTTGTAAGCTC^{3'}OH) / HGH103 (^{5'}OH CTGGAGACCAGCTCCCAT TGTTACT^{3'}OH)、あるいは HGH004 (^{5'}OH TCTCAGAGTCTATTCCGACACCC TC^{3'}OH) / HGH104 (^{5'}OH AAGACACTCCTGAGAACTGCACGG^{3'}OH) [102] を用いた。この反応液を 95°C で 10 分間加熱して DNA を変性させ、2.5 単位の Taq ポリメラーゼを加えて数滴のミネラルオイルで反応液を覆った。95°C 1 分間の加熱変性、55°C 2 分間のアニーリング、72°C 2 分間の DNA 合成を 1 サイクルとし、DNA サーマルサイクラーを用いて 24 サイクル繰り返した。反応終了後さらに 72°C で 8 分間おき、最後の合成反応が完全に行われるようにした。そして反応液 15 μ l を 3% NuSieve+1% SeaKem アガロースの混合ゲルで 100 V 1.5 時間電気泳動した後、臭化エチジウム染色して 280 nm 下で観察した。増幅されたバンドの有無の判定の際、対照としてゲノムあた

り 0、0.02、0.2 および 1 コピーの外来遺伝子を野生型ラットの DNA と混ぜて PCR を行った反応液を同時に電気泳動した。また、内部標準として α -フェトプロテイン遺伝子 (RAFP002; 5'OH GAACTTCAGCGCTACTGCTCAC AGT^{3'OH} / RAFP102; 5'OH CTTGGGTCTCATGACGTGTGTTTAC^{3'OH}) [103] の増幅を同時に行った。そして 0.2 コピー以上の検出感度で内部標準 DNA が増幅されている条件下において、該当する大きさのバンドの有無を判定した。

(4) ドットプロットハイブリダイゼーション

トランスジェニックラットの倍数体ゲノムあたりの hGH 遺伝子のコピー数を調べるため、Ninomiya ら [104] によって報告された方法に従ってドットプロットハイブリダイゼーションを行った。各トランスジェニックラットのゲノム DNA 12 μ g を 480 μ l の TAE バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 0.5 mM Sodium Acetate / 0.5 mM EDTA) に溶解し、沸騰水中で 15 分間加熱した後、氷水中ですばやく冷却して DNA を変性させた。変性 DNA 溶液 400 μ l (10 μ g に相当) および 80 μ l (2 μ g に相当) を、Bio-Dot (バイオラッド) を用いてナイロンメンブレン Z-probe (バイオラッド) 上にスポットした。正常ラットの DNA に各導入遺伝子を倍数体ゲノムあたり 0、1、5、25、125 コピー相当の量を添加したものを同様にスポットし、陽性対照とした。DNA をスポットしたフィルターを風乾し、真空中 80°C で 2 時間加熱してフィルター上の DNA を固定した。そして、フィルターを 0.5% SDS を含む 0.1 \times SSC (1 \times SSC: 150 mM NaCl / 15 mM Sodium Citrate) において 65°C で 1 時間洗浄した。フィルター 1 cm² あたり 0.1 ml のプレハイブリダイゼーション溶液 (50% 脱イオン化ホルムアミド、5 \times SSC、50 mM Sodium Phosphate: pH 6.5)、10 \times Denhardt's 溶液*、0.5 mg/ml 加熱変性ウシ胸腺 DNA、1% SDS: *Denhardt's 溶液 (100 \times); 2% Polyvinylpyrrolidone (SIGMA)、2% ウシ血清アルブミン (BSA)、2% Ficoll 400 (Pharmacia)) を加え、加熱したビニール袋中で 42°C で一晩プレハイブリダイゼーションを行った。フィルターを新しいビニール袋に移し、ハイブリダイゼーション溶

液 (50% 脱イオン化ホルムアミド、5×SSC、20 mM Sodium Phosphate (pH 6.5)、2×Denhardt's 溶液*, 0.1 mg/ml 加熱変性ウシ胸腺 DNA、1% SDS、 $1\sim2\times10^6$ cpm/ml プローブ) を 1 ml/8 cm² の割合で加えて加熱シールした後、42°Cで 16 時間以上ハイブリダイゼーションを行った。プローブとして hGH 遺伝子を含む p0GH の Hind III-EcoR I 断片 2.1 kb をニッケトランスレーション法 [105] により [α -³²P]dCTP (アマシャム) で標識したものを用いた。通常、 $1\sim2\times10^9$ cpm/ μ g DNA の比活性を持つプローブが得られた。ハイブリダイゼーション終了後、3×SSC / 1% SDS 溶液中で室温にて 10 分間振とうすることによって洗浄した。この洗浄操作を繰り返した後、フィルターを 0.1×SSC / 1% SDS 溶液中へ移し、65°Cで 1 時間振とうしてハイブリダイズしていないプローブを除去した。フィルターを風乾後、X線フィルム RXO-H (富士フィルム) を用いて-80°Cで 10 日間、オートラジオグラフィを行った。導入された DNA のコピー数は X線フィルムに感光されたシグナルの強さ、すなわちハイブリダイズしたアイソトープの量をデンストメーター (UltroScan Laser Densitometer 2202, LKB) を用いて数値化し、同時にスポットした対照のそれと比較することにより求めた。

(5) 統計処理

5 種類の外来遺伝子について、個々の反復実験における注入胚の生存率 (12~14 時間培養後に形態的に正常と判定された胚の割合)、移植後の個体発生率およびトランスジェニックラットの作出効率 (トランスジェニックラット数 / 注入胚数×100) をアークサイン変換した後一元分散分析した。有意差の有無は Fisher's protected least significant difference (PLSD) test により検定した ($P<0.05$)。

結 果

外来遺伝子を顕微注入した前核期胚を移植することによって発生したラットについて、PCR 法によって判定したトランスジェニックラット作出の結果を Table 2-2 に示した。 $b\alpha LA/hGH$ 、 $b\beta CN/hGH$ 、 $b\alpha S1CN/hGH$ 、 $b\kappa CN/hGH$ および $mWAP/hGH$ をそれぞれ、694、892、757、564 および 743 個の前核期胚に顕微注入したところ、48.0、32.7、38.0、38.3 および 53.8%の注入胚が培養 12~14 時間後でも正常な形態を有しており、胚移植の結果、18.7~34.7%が産子ラットへ発生した。顕微注入胚の生存率および個体発生率に外来遺伝子による差は認められなかった。これらの産子のうち 8.6~25.0%がトランスジェニックラットであった。顕微注入胚を母数とするトランスジェニックラットの作出効率は、 $b\alpha LA/hGH$ 、 $b\beta CN/hGH$ 、 $b\alpha S1CN/hGH$ 、 $b\kappa CN/hGH$ および $mWAP/hGH$ 遺伝子でそれぞれ、1.15、1.68、1.05、2.12 および 2.56%であり、外来遺伝子間で有意な差は認められなかった。

ラットの尻尾から抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR 法による外来遺伝子 ($b\alpha LA/hGH$) 導入の判定例を Fig. 2-2 に示した。レーン 1~44 のサンプル DNA のうち、レーン 2、12、14、16、23、29 および 34 のラットの DNA に $b\alpha LA/hGH$ のプライマー間の増幅されたバンドが検出された。

PCR 陽性と判定した $b\alpha LA/hGH$ 、 $b\beta CN/hGH$ 、 $b\alpha S1CN/hGH$ 、 $b\kappa CN/hGH$ および $mWAP/hGH$ をもつトランスジェニックラット、それぞれ、8、14、8、12 および 19 匹についてドットプロットハイブリダイゼーションを行った。そのオートラジオグラフィーの結果の一部を Fig. 2-3 に示した。また、これらのシグナルの強さに基づいて算出したトランスジェニックラットの倍数体ゲノムあたりの導入コピー数を Fig. 2-4 に示した。個々のトランスジェニックラットにおける導入コピー数には大きな変動が認められたが (範囲は 1 以下から 239 コピー)、外来遺伝子間で顕著な差は認められなかった。

$b\alpha LA/hGH$ 、 $b\beta CN/hGH$ 、 $b\alpha S1CN/hGH$ 、 $b\kappa CN/hGH$ および $mWAP/hGH$ をもつトランスジェニックラットのファウンダー (G0)、それぞれ、8、14、

Table 2-2. Production of transgenic rats carrying hGH gene.

Injected DNA	No. (%) of eggs				No. (%) of pups			Overall efficiency ¹
	Injected	Survived	Transferred	Born	Analyzed	Integrated		
bαLA/hGH	694 (100)	333 (48.0)	294 (100)	55 (18.7)	54 (100)	8 (14.8)	1.15	
bβCN/hGH	892 (100)	292 (32.7)	246 (100)	62 (25.2)	60 (100)	15 (25.0)	1.68	
bαS1CN/hGH	757 (100)	288 (38.0)	277 (100)	96 (34.7)	93 (100)	8 (8.6)	1.05	
bκCN/hGH	564 (100)	216 (38.3)	214 (100)	59 (27.6)	58 (100)	12 (20.7)	2.12	
mWAP/hGH	743 (100)	400 (53.8)	372 (100)	81 (21.8)	81 (100)	19 (23.5)	2.56	

¹ Pups integrated/Eggs injected $\times 100$

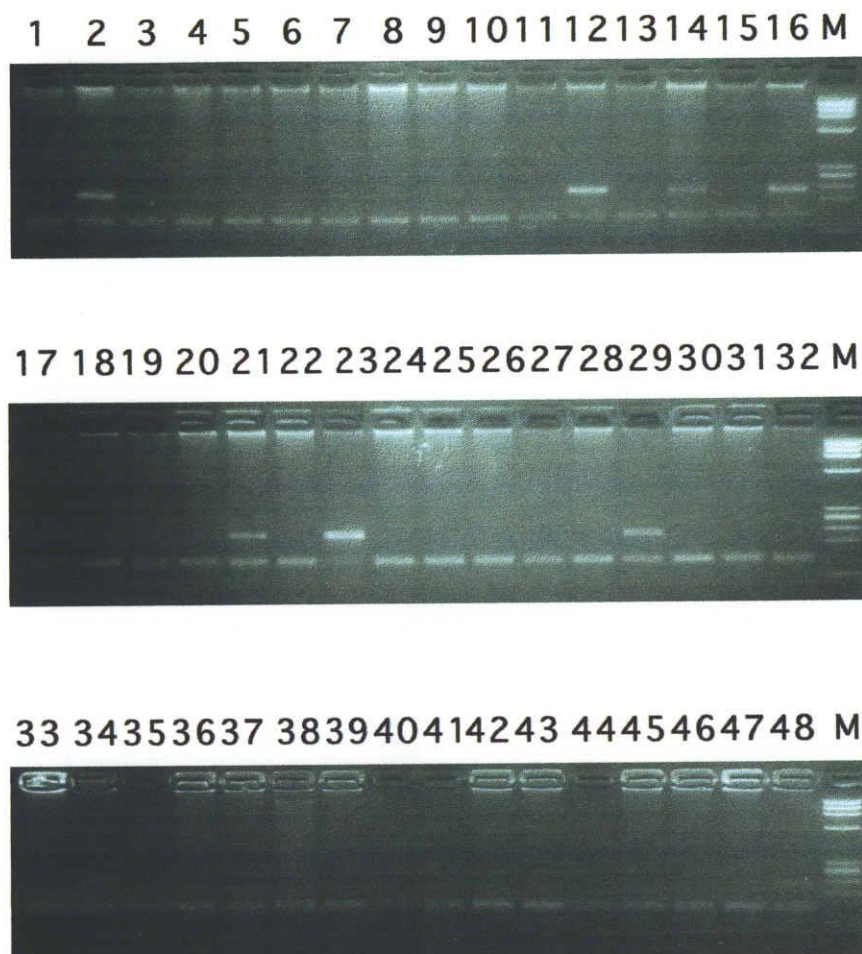


Fig. 2-2. PCR analysis of pups tail DNA in the case of b α LA/hGH microinjection.

Lanes 1-44; Sample DNA, Lanes 45-48; Control DNA: normal rat DNA + introduced DNA (0, 0.02, 0.2 and 1 copies equivalent/genom, respectively).

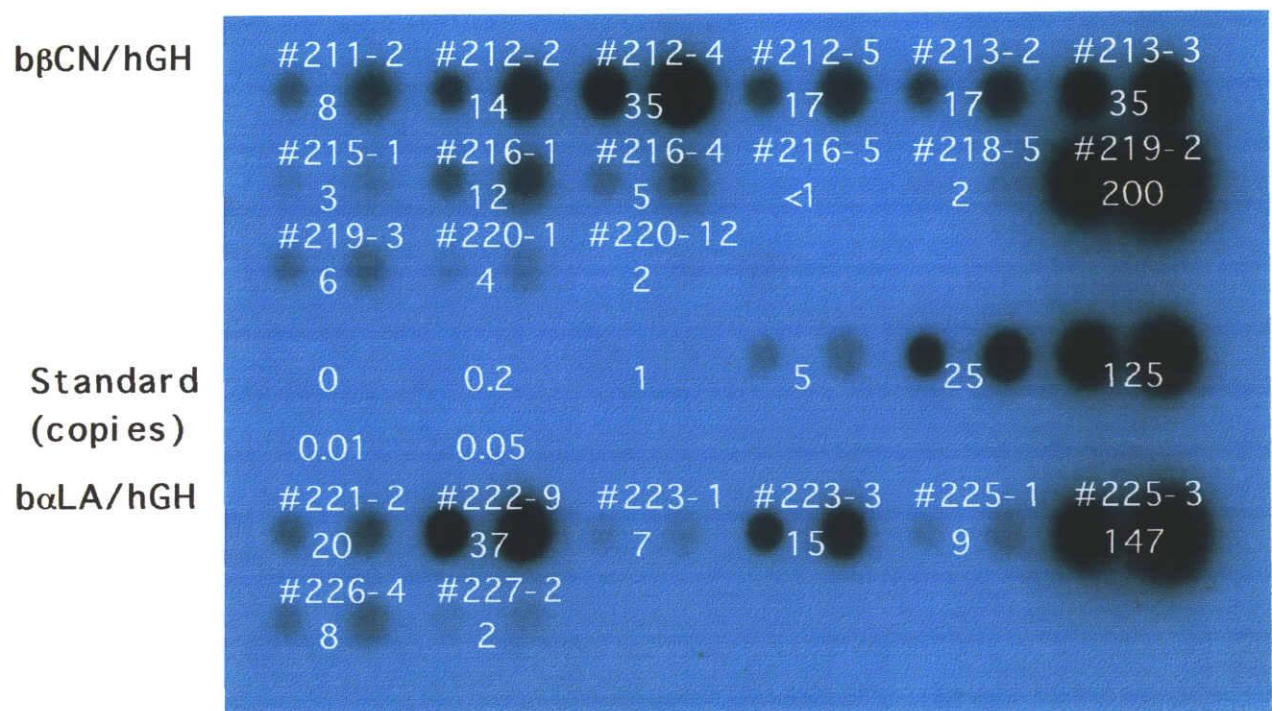


Fig. 2-3. Estimation of copy number in PCR-positive rats by dot blot hybridization.

Two (left) and 10 μ g (right) of DNA for each rat were spotted.
The number of each rat was indicated above the corresponding spots.

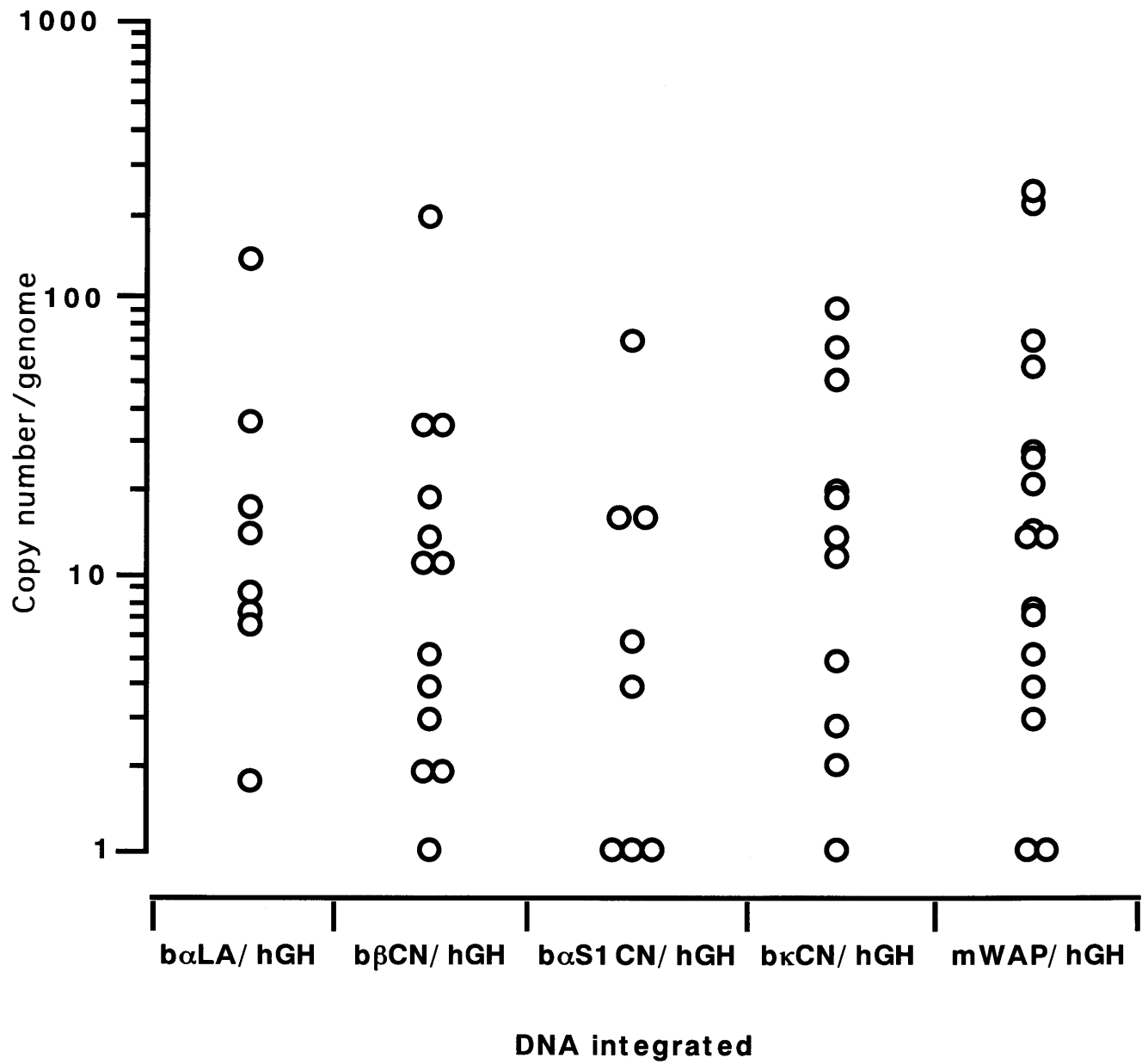


Fig. 2-4. Distribution of copy numbers in transgenic rats carrying hGH controlled under different promoter regions.

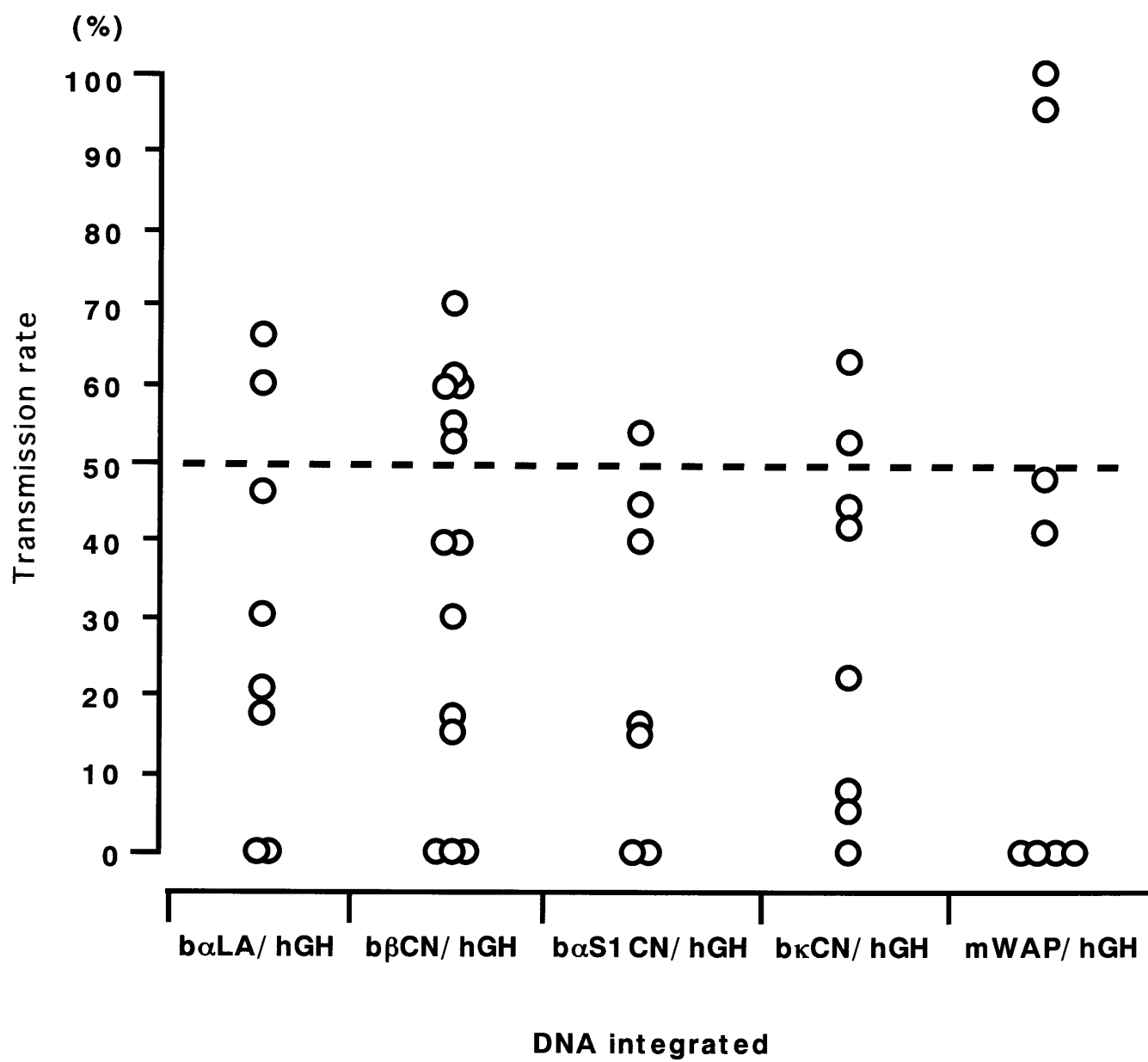


Fig. 2-5. Transmission rate of transgenes from founder to next generation.

7、12 および 19 匹について Wistar 系雄ラットと交配し、次世代への外来遺伝子の伝達性を調べた (Fig. 2-5)。個々のトランスジェニックラット系統における次世代への外来遺伝子の伝達率には変動が認められるものの、外来遺伝子の種類による顕著な差は見られなかった。しかし、b β CN/hGH、b κ CN/hGH および mWAP/hGH をもつトランスジェニックラットのうちそれぞれ、1 匹 (雄: 7%)、4 匹 (雄 2 匹、雌 2 匹: 33%) および 11 匹 (雄 6 匹、雌 5 匹: 58%) は妊娠が成立せず、不妊と思われた。また、b α LA/hGH、b β CN/hGH、b α S1CN/hGH、b κ CN/hGH および mWAP/hGH をもつトランスジェニックラット系統のうち、それぞれ、2 (25%)、3 (21%)、2 (29%)、1 (8%) および 4 匹 (21%) についてはそれらの 1~22 匹の産子のいずれにも外来遺伝子は伝達していなかった。

考 察

ウシおよびマウスの乳タンパク質遺伝子のプロモーターにヒト成長ホルモン遺伝子を連結した 5 種類の融合遺伝子 (b α LA/hGH、b β CN/hGH、b α S1CN/hGH、b κ CN/hGH、mWAP/hGH) を Wistar 系ラットの前核期胚に顕微注入してから 12~14 時間後の生存率は 30~50% という値で、マウスでの生存率 [35] に比べると約半分しか生き残らなかったことになる。ラットの受精卵は細胞膜が脆弱で前核は弾性に富み、物理的な刺激に対して抵抗性が低いことがすでに報告されており [35]、本結果もこれを支持するものとなった。一方、顕微注入後の生存胚のうち 18.7~34.7% が移植後に産子ラットへと発生し、このうち 8.6~25.0% がトランスジェニックラットであることが確認できた。顕微注入胚を母数にするとトランスジェニックラットの作出効率は 1.05~2.56% となり、これらはトランスジェニックマウスで報告されているもの [88-92] と比べても遜色のない値であった。

トランスジェニックラットへ組み込まれた外来遺伝子のコピー数は倍数体ゲノムあたり 1 コピー以下から 239 コピーと大きな変動幅があった。このよ

うな現象は顕微注入法で作出されたトランスジェニックマウス [106、107] のみならず、トランスジェニックヒツジ [108] やトランスジェニックブタ [109] といったトランスジェニック動物においても認められている。一般的に顕微注入法によってトランスジェニックマウスに導入された外来遺伝子は Head-to-Tail の型でタンデムに繋がって染色体に組み込まれる [110-114] が、稀には Head-to-Head や Tail-to-Tail の配列で組み込まれることがある [115]。このような現象はサザンブロットハイブリダイゼーションによって解析可能であるが、本実験では行わなかった。トランスジェニックラットにおいても、Head-to-Tail の型でタンデムに繋がって染色体に組み込まれるのが中心であるが、Head-to-Head や Tail-to-Tail の配列で染色体に組み込まれた例も報告されている [116]。

外来遺伝子の次世代への伝達率には顕微注入した遺伝子の間で顕著な差は認められなかった。理論的にはヘテロ (+/-) に外来遺伝子をもつ動物と野生型 (-/-) の動物の交配からはその産子の 50%に外来遺伝子を伝達することができる。しかし、この理論的伝達率 (50%) よりもかなり低い伝達率が何例かに認められた。これらのトランスジェニックラットには外来遺伝子がモザイク状に導入されていた可能性が示唆される。顕微注入法によって作出したトランスジェニックマウスにおいてモザイクの発生頻度は 10~20% 程度であり [26]、最も多い報告では 30% であった [117] というものがある。5 種類すべての外来遺伝子について平均するとモザイクであることが疑われる (伝達率が 10%以下であったものとした場合) トランスジェニックラットの割合は作出したすべてのトランスジェニックラットの 33%で、この割合はマウスの場合と大差ないようにも思えた。しかし、検定個体の半数 (4/8) がモザイクと疑われる外来遺伝子 (mWAP/hGH) もあり、モザイク発生と外来遺伝子の伝達については、さらなる検討が必要と思われる。

第3節 トランスジェニックラットの作出効率に影響を及ぼす要因 の検索

材料と方法

(1) 外来遺伝子溶液の調製

本章第2節に述べた方法に準じて直鎖状にした42種類の顕微注入用の外来遺伝子を調製した。プロモーターには本章第2節で用いた乳タンパク質遺伝子由来の5種類を含む計9種類 (SV40、ニワトリ β -actin など) を用い、構造遺伝子にはヒト成長ホルモン遺伝子を含む計14種類 (ヒトエリスロポエチン、ヒトインターロイキン2遺伝子など) を用いた。外来遺伝子は10 mM Tris-HCl (pH 7.6)/0.1 mM EDTA で通常は5 μ g/ml の濃度になるように溶解し、顕微注入するまで -20°C で保存した。また、外来遺伝子溶液の至適濃度の検討にはウシ α S1 カゼインのプロモーターとヒトの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 遺伝子の融合遺伝子 (b α S1CN/CSF) を0.5、1、5、25 および50 μ g/ml の濃度になるように調製した。

(2) トランスジェニックラットの作出

本章第2節に述べた方法に従ってトランスジェニックラットを作出した。前核期胚はWistar系雌ラットから採取し、3人の技術者が雄性前核に外来遺伝子を顕微注入した。さらに、前核期胚ドナーのラット系統がトランスジェニックラットの作出に及ぼす影響について検討するため、Wistar系に加えてLEW (日本チャールス・リバー) およびDA (日本SLC) の計3系統のラットから採取した前核期胚にウシの α S1カゼインプロモーターとヒト成長ホルモン遺伝子の融合遺伝子 (b α S1CN/hGH) を顕微注入した。顕微注入胚の受胎雌にはすべてWistar系ラットを用いた。胚移植により得られた産子ラットは離乳後に尻尾からゲノムDNAを抽出し、本章第2節に述べたPCR法により外来遺伝子の有無を検定した。

(3) 統計処理

個々の外来遺伝子について、顕微注入胚の生存率、移植後の個体発生率およびトランスジェニックラットの作出効率をアークサイン変換した後に一元分散分析した。それぞれの平均値間の有意差の有無は PLSD-test により検定した ($P<0.05$)。

結 果

42 種類の外来遺伝子をラット前核期胚に顕微注入し、得られたトランスジェニックラットは総計 359 匹に達した。個々の外来遺伝子について注入胚数を母数とするトランスジェニックラットの作出効率は $1.68 \pm 0.61\%$ (平均値 \pm 標準偏差) であった。

外来遺伝子をプロモーター (組織特異的発現系か非組織特異的発現系)、構造遺伝子 (Genomic か cDNA)、鎖長 (2.0 kb 以下、2.1~4.0 kb、4.1~6.0 kb か 6.1 kb 以上) および両端の構造 (直鎖化するための制限酵素が相同か非相同) に分類してトランスジェニックラットの作出効率を比較したが、いずれの要因によっても分類した群の間で有意な差は認められなかった (Table 2-3)。

また、トランスジェニックラットの作出効率に 3 人の技術者間で有意な差は認められなかった (Table 2-4)。しかし、注入後の胚の生存率は技術者 A、B および C の間で有意な差が認められ ($P<0.05$)、とくに B と C の技術者間ではおよそ 2 倍の差があった。また、C の術者の移植後の個体発生率は A および B の術者に比べて有意に低かった。

b α S1CN/CSF 遺伝子を 0.5、1、5、25 および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のいずれかの濃度でラット前核期胚に顕微注入したところ、外来遺伝子溶液の濃度は胚の生存性に何ら影響を与えなかった (Fig. 2-6)。しかし、移植後の個体発生率は外来遺伝子濃度が増加するにつれて有意に低くなり ($P<0.05$)、とくに 25 および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度における個体発生率は 2 および 8% と他の濃度群より

Table 2-3. Factors affecting the producing efficiency of transgenic rats.

Factors	Group	DNA	Overall efficiency : % (Transgenic rats/eggs injected)
Promoter	Tissue-specific	34	1.69 (300/17,726)
	Non tissue-specific	8	1.45 (59/4,080)
Structural gene	Genomic	14	1.59 (148/9,323)
	cDNA	16	1.81 (116/6,407)
Chain length (kb)	>2.0	3	1.55 (19/1,224)
	2.1~4.0	19	1.71 (192/11,201)
	4.1~6.0	13	1.55 (104/6,707)
	6.1<	7	1.65 (44/2,674)
Strand ends	Similar	25	1.76 (233/13,208)
	Dissimilar	16	1.49 (106/7,106)

Table 2-4. Effect of technicians on the producing efficiency of transgenic rats.

Technician	DNA	No. (%) of eggs				No. (%) of pups		Overall efficiency ¹	Range
		Injected	Survived	Transferred	Born	Analyzed	Integrated		
A	11	3,989	2,641	2,447	636	627	74	1.91 ± 0.78	0.99-3.16
		(100)-----	(66.2) ^a	(100)-----	(26.0) ^d	(100)-----	(11.8)		
B	12	10,040	4,192	3,837	912	898	159	1.59 ± 0.50	0.73-2.56
		(100)-----	(41.8) ^b	(100)-----	(23.5) ^d	(100)-----	(17.7)		
C	16	5,897	4,800	4,388	700	662	97	1.69 ± 0.68	0.98-3.53
		(100)-----	(81.4) ^c	(100)-----	(16.0) ^e	(100)-----	(14.7)		

¹ Pups integrated/Eggs injected × 100 ± S.D.

^{a-e} Significant difference between different superscripts (P<0.05) .

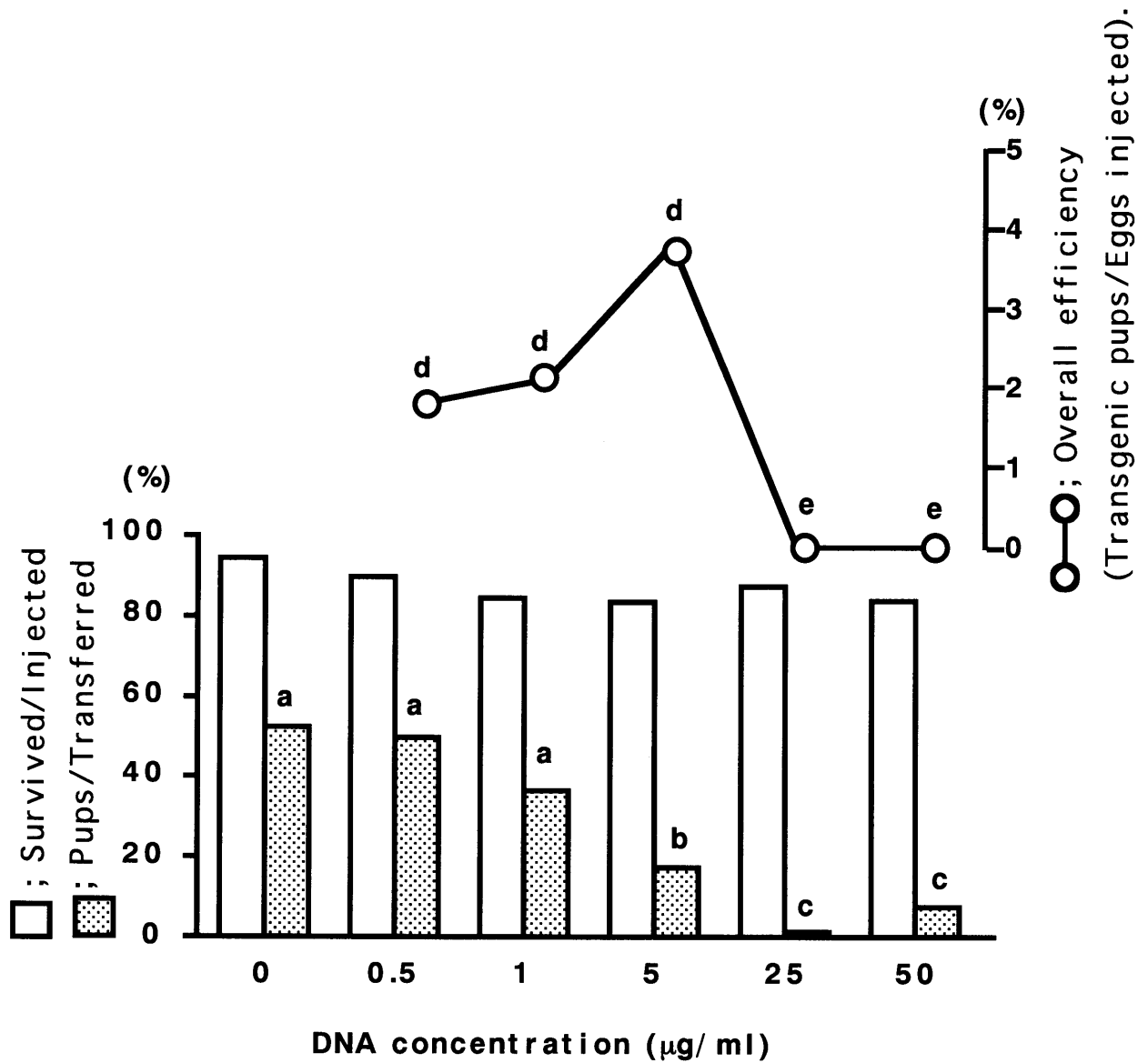


Fig. 2- 6. Effect of DNA concentration on the producing efficiency of transgenic rats.

a- c and d,e Significantly different at $P < 0.05$.

Table 2-5. Effect of strain on the producing efficiency of transgenic rats.

Strain	No. (%) of eggs			No (%) of pups		Overall efficiency ²
	Injected	Survived ¹	Transferred	Born	Integrated	
Wistar	396 (100)	322 ----- (81.3)	319 (100)	116 ----- (36.4)	19	4.80
LEW	202 (100)	173 ----- (85.6)	172 (100)	20 ----- (11.6)	2	0.99
DA	332 (100)	265 ----- (79.8)	262 (100)	82 ----- (31.3)	11	3.31

¹ Morphologically normal eggs, assessed at 12-14 hr after DNA microinjection.

² Pups integrated/Eggs injected $\times 100$

も有意に低い値を示した。一方、トランスジェニックラットの作出効率においては、5 $\mu\text{g/ml}$ 群で最も高い値が得られたが、25 および 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度群ではトランスジェニックラットは 1 匹も得られなかった。

b α S1CN/hGH を系統が異なるラットの前核期胚に顕微注入したところ、胚の生存率にラットの系統差は認められなかったが、LEW 系統の個体発生率およびトランスジェニックラットの作出効率は Wistar および DA 系統のそれに比べて低い傾向があった (Table 2-5)。

考 察

Brinster ら [26] によると「マウスでは顕微注入する外来遺伝子の両端が相同であるか非相同であるか、という問題はトランスジェニックマウスの作出効率と関係ない」という。彼らの結論は相同 (EcoR I / EcoR I)、あるいは非相同 (Sal I / EcoR I) な制限酵素で切り出された 2 種類の外来遺伝子の顕微注入に基づくものであった。本実験は相同 25 種類 (Hind III/ Hind III、BamH I/BamH I、Sal I/Sal I、EcoR I/EcoR I など)、非相同 16 種類 (Hind III/BamH I、Sal I/EcoR I など) の両端構造をもつ外来遺伝子の結果で、マウスの場合と同様に外来遺伝子の両端の構造とトランスジェニックラットの作出効率に直接的な相関はないと結論できる。これまでに発表された論文の中には、両端を BamH I で切り出した外来遺伝子をマウスの前核期胚に注入したとき、トランスジェニックマウスの作出効率は 12.9% [118] であったという報告がある。また、Hind III で両端を切り出したとき 13.0% [119] および 12.5% [120] の作出効率が報告されている。一方、EcoR I を用いて両端を切り出した場合は 3.7% [121]、4.8% [122]、4.5% [123] など、BamH I や Hind III の場合に比べると低い作出効率が報告されている。本実験では、特定の制限酵素で切り出した場合にのみトランスジェニックラットの作出効率が高かったということではなく、最も高い作出効率を示した外来遺伝子 (b α S1CN/ hGH) でも 4.80% で、マウスで報告されているような 10% を超

える作出効率を示す外来遺伝子はなかった。また、外来遺伝子の鎖長はトランスジェニックマウスの作出効率に関係しないと報告されており [26]、本研究のラットにおける結果も同じであった。加えて、外来遺伝子のプロモーターおよび構造遺伝子の由来もトランスジェニックラットの作出効率に影響を及ぼす主たる要因ではないように思われた。

外来遺伝子濃度が顕微注入胚の個体発生率およびトランスジェニック動物の作出効率に影響を及ぼすことはマウスで報告されており [26]、トランスジェニックマウスの作出効率が最も高かったのは $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度のときだった。本研究においても、外来遺伝子溶液の濃度は明らかに個体発生率やトランスジェニックラットの作出効率に影響を及ぼす要因のひとつであり、トランスジェニックラットの作出に最も適した濃度は $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ であった。一方、25 または $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ の群からは1例のトランスジェニックラットも得られず、顕微注入された高濃度の外来遺伝子溶液が、胚が個体へと発生する過程で何らかの毒性を与えたことを示唆している。

一般的にトランスジェニックマウス作出のための前核期胚は非近交系マウスあるいは近交系間の F1 マウスから採取されているが、遺伝的背景が均一な近交系マウスを用いたほうがその後の解析が容易になると思われる。近交系マウスの C57BL/6 の胚を用いたときトランスジェニックマウスの作出効率は F1 マウスからのそれに比べて低いという報告 [26] があるが、近交系マウスの FVB/N からの胚を用いた場合はトランスジェニックマウスの作出効率は F1 マウスからのそれと同等であったことも報告されている [124]。また、ラットでは近交系由来胚の顕微注入後の個体発生率は非近交系由来胚よりも低いことが報告されている [125]。本研究では、トランスジェニックラットの作出効率は非近交系の Wistar および近交系の DA において近交系の LEW よりも高かった。これは、近交系由来のラット胚は顕微注入操作に対してとくに弱いというわけではなく、個体発生率およびトランスジェニックラットの作出効率はそれぞれの系統がもつ繁殖特性、例えば同腹産子数や胚発生速度など、と密接に関連する可能性を示唆している。

第4節 小 括

ウシおよびマウスの乳タンパク質遺伝子のプロモーターとヒト成長ホルモンの構造遺伝子を融合させ、b α LA/ hGH、b β CN/ hGH、b α S1CN/ hGH、b κ CN/ hGH および mWAP/ hGH の5種類の外来遺伝子を構築し、Wistar 系ラットの前核期胚に注入した。顕微注入後に正常形態を維持していた胚の割合は38.0～53.8%であった。それらを偽妊娠雌の卵管に移植したところ18.7～34.7%の割合で産子ラットへと発生した。産子あたりのトランスジェニックラットの割合は8.6～25.0%であり、外来遺伝子を注入した胚を母数とするトランスジェニックラットの作出効率は1.05～2.56%であった。これらの割合について、用いた5種類のプロモーターによる差は見いだせなかった。顕微注入ラット胚の個体発生率および産子あたりのトランスジェニックラットの割合は、マウスで報告された値と比べても顕著な差はなかった。しかし、外来遺伝子を顕微注入後に正常な形態を維持していたラット胚の割合はマウスの場合と比べて有意に低かった。これはラットの受精卵は細胞膜が脆弱で前核が弾性に富んでいることから、物理的な刺激に対して抵抗性が低いということで説明されるかもしれない。

トランスジェニックラットへ組み込まれた外来遺伝子のコピー数にプロモーターの違いによる偏りは認められなかった。外来遺伝子の次世代への伝達率にも外来遺伝子の種類による顕著な差は見られなかったが、理論的伝達率である50%よりもかなり低い例が多かったことは外来遺伝子がモザイクとしてラット染色体上に存在している可能性を示唆している。顕微注入法により作出されたトランスジェニックマウスではモザイクの発生頻度は10～30%程度と報告されている。5種類すべての外来遺伝子について平均するとモザイクであることが疑われるトランスジェニックラットの割合は作出したすべてのトランスジェニックラットの33%で、この割合はマウスの場合と大差ないようにも思えた。しかし、検定個体の半数がモザイクとなる外来遺伝子もあり、モザイクの発生と外来遺伝子の伝達との関係についてさらに検討する

必要がある。

次に、42 種類の直鎖状外来遺伝子を構築してラット前核期胚に顕微注入し、トランスジェニックラットの作出効率に影響を及ぼす要因について解析した。注入胚数を母数とするトランスジェニックラットの作出効率は平均 1.68% であった。融合遺伝子を構成するプロモーター（組織特異的発現系か非組織特異的発現系）、構造遺伝子（Genomic か cDNA）、鎖長（2.0 kb 以下、2.1～4.0 kb、4.1～6.0 kb か 6.1 kb 以上）および両端の構造（直鎖化するための制限酵素が相同か非相同）に基づいて分類してトランスジェニックラットの作出効率を比較したが、いずれの要因によっても分類した群の間で有意な差は認められなかった。

また、外来遺伝子溶液を 0.5、1、5、25 および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のいずれかの濃度でラット前核期胚に顕微注入したところ、この濃度は顕微注入胚の生存性に何ら影響を与えなかった。しかし、移植後の個体発生率は外来遺伝子濃度が増加するにつれて有意に低下した。一方、トランスジェニックラットの作出効率においては 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群で最も高い値が得られたが、25 および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度群ではトランスジェニックラットは 1 匹も得られず、このことは、顕微注入された高濃度の外来遺伝子溶液が、胚が個体へと発生する過程で何らかの毒性を与えたことを示唆している。さらに、系統が異なるラットの前核期胚に外来遺伝子溶液を顕微注入したところ、胚の生存率にラットの系統差は認められなかったが、LEW 系統の個体発生率およびトランスジェニックラットの作出効率は Wistar および DA 系統のそれに比べて低い傾向があった。一般的にトランスジェニック動物は、遺伝的背景が均一な近交系を用いたほうがその後の解析が容易になると思われる。近交系由来のラット胚は顕微注入操作に対してとくに弱いというわけではなく、個体発生率およびトランスジェニックラットの作出効率はそれぞれのラット系統がもつ繁殖特性と関連すると思われる。

第3章 ヒト成長ホルモンを乳中に分泌する トランスジェニックラットの発現解析

第1節 緒言

遺伝子組換え技術の進歩は、外来遺伝子を動物個体レベルで発現させることを可能にした。生物活性のある有用物質を動物の乳中に分泌させることは、外来遺伝子産物を大量に生産するための優れた方法になると期待されている。近年、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタならびにウシに至る様々な動物種において、泌乳期の乳腺でヒト由来の外来遺伝子が発現することが確認されている [126、127]。とくに家畜ではアニマルバイオリクターとしてのトランスジェニック動物の有用性は大きいが、実際にはいくつかの問題点がある。それは、顕微注入胚の生存率が低いことに加え、外来遺伝子のゲノムへの導入率がかなり低いため、トランスジェニック家畜の作出効率が低くなる [128] ということである。また、導入された外来遺伝子の発現部位や時期および発現量を制御するプロモーターの選択も極めて重要と思われる。

トランスジェニック動物の乳中に外来遺伝子の産物を分泌させるために様々な乳タンパク質遺伝子のプロモーターが利用されてきた。例えば、ウシ α ラクトアルブミン (b α LA) のプロモーターによって制御させたヒツジのトロフォブラストインターフェロン [50]、ラット β カゼイン (r β CN) のプロモーターによって制御させたウシ卵胞刺激ホルモン [51]、マウスホエー酸性タンパク質 (mWAP) のプロモーターによって制御させたヒト成長ホルモン [53、54] あるいはヒト C タンパク質 [56] などの組み合わせが報告されている。マウスより大型の動物を対象にしたものでは、ウサギ β カゼインのプロモーターによって制御させたヒトインターロイキン-2 (ホスト動物はウサギ) [59]、mWAP のプロモーターによって制御させたヒト C タンパク質 (ホスト動物はブタ) [10]、ヒツジ β ラクトグロブリン (s β LG) のプロモーターに

よって制御させたヒト抗血友病因子 IX (ホスト動物はヒツジ) [12]、ウシ α S1 カゼインのプロモーターによって制御させたヒトラクトフェリン (ホスト動物はウシ) [60]、という組み合わせが報告されている。これらの結果は、乳タンパク質遺伝子のプロモーター領域が同種・異種にかかわらず多くの哺乳動物種において正常に機能できるということを示している。しかしながら、これらのプロモーターの制御下においても外来遺伝子の発現レベルには非常に大きな差がある。

また、作出したトランスジェニック動物の乳中に外来遺伝子産物が分泌されてくるかどうかを確認することは相当な時間を要するプロセスである。ラットのような実験小動物ですらトランスジェニックラット (雌) の獲得までに 2 ヶ月、それらが分娩して泌乳するまでに 2 ヶ月の計 4 ヶ月が必要である。初代のトランスジェニックラットが雄であった場合は、さらに次世代のトランスジェニック雌ラットを確立するまでの 2 ヶ月が付加される。これがブタやウシなどの大型家畜になると、妊娠期間や性成熟までの期間が長いことから、実際にトランスジェニック家畜が泌乳するようになるまでには数年単位の時間と飼育管理のための莫大な費用が必要である。そこで、乳腺における外来遺伝子の発現を新生子期に検出し、その動物がのちに泌乳するようになったときの発現量を予測することができれば、大きな経済的効果が期待できる。

本章では、第 2 章第 2 節で作出した 5 種類の乳タンパク質遺伝子のプロモーターにヒト成長ホルモン (hGH) 遺伝子を連結した融合遺伝子をもつトランスジェニックラットを用いて乳中の hGH 量を調べ、プロモーターの違いによる発現特性の差異を検討した。また、導入した外来遺伝子の早期発現検定法を確立するため、異なったレベルで乳中に hGH を分泌する 3 ラインのトランスジェニックラットを用い、出産直後の新生子からバイオプシーによって採取した乳腺細胞における外来遺伝子由来の mRNA の同定を試みた。

第2節 乳腺発現系プロモーターの種類と外来遺伝子発現率ならびに乳中分泌量との関係

材料と方法

(1) トランスジェニックラットからの乳および血清の採取

第2章第2節の $b\alpha LA/hGH$ 、 $b\beta CN/hGH$ 、 $b\alpha S1CN/hGH$ 、 $b\kappa CN/hGH$ および $mWAP/hGH$ 遺伝子を導入して PCR で陽性と判定した初代 (G0) および次世代 (G1) のトランスジェニックラットを用いた。

トランスジェニックラット (G0) が雌の場合、10 週齢に達した時点で野生型の Wistar 系雄と交配させ、出産してから 9~11 日目の間に 2~8 ml の乳を手搾りにより採取した [58]。G0 が雄の場合には、G1 のトランスジェニック雌ラットについて同様の方法で搾乳した。ラット乳サンプルは室温において 5,000 rpm で 10 分間遠心することにより脱脂し、 -80°C で保存しておいた。

トランスジェニックラットの血液 (400~500 μl) は、交配前および泌乳期間中 (一部は妊娠中) に麻酔下でラットの眼窩静脈叢から採取した。血液は室温において 3,000 rpm で 15 分間遠心し、得られた血清サンプルは -80°C で保存しておいた。

(2) ヒト成長ホルモン (hGH) の定量

ラット乳および血清中の hGH 濃度は、アレグロ hGH RIA kit (Nichols Institute Diagnostics) を用いたラジオイムノアッセイにより測定した。すなわち、サンプルを蒸留水で適宜希釈し、サンプル溶液 100 μl に対して抗体溶液 100 μl を加えて室温で 1~2 時間反応させた後、アビジン結合ビーズを加え、室温で 90 分間振とうした。そして反応液を吸引除去し、ビーズを 2 ml のリン酸緩衝生理食塩液で 2 回洗浄した後、チューブに残ったビーズをそのままガンマーカウンター (ベックマン) にセットして放射線量を測定した。

hGH 濃度の標準曲線は、キットに付属の hGH 標準溶液 (0.5~50 ng/ml) を加えた野生型ラットの乳あるいは血清を用いて作成した。

乳中のタンパク質量は、ビュウレット反応後の検出に Bicinchoninic acid (BCA) を用いた BCA Protein Assay Reagent (Pierce) によって測定した。すなわち、脱脂乳を 100 および 500 倍に希釈し、反応液 1 ml に対して希釈した脱脂乳 1 ml を混合して 60°C で 1 時間加温した。これをマイクロプレートリーダー (3550-UV: BIO-RAD) を用いて 562 nm の吸光度を測定し、BSA 標準液により作成した標準曲線に基づいて定量した。一定量 (85 mg) のタンパク質を含む 100 倍希釈脱脂乳を分取し、滅菌蒸留水を加えて 5 ml にした後、電気泳動用緩衝液 5 ml (Tris SDS bME SEPRASOL: 第一化学) を添加して 100°C で 5 分間熱処理した。これを 16% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [129] につけ、サンプル乳におけるタンパク質組成の差異を解析した (16 cm×16 cm、厚さ 1 mm: ACl、100 A)。陽性対照にはヒト成長ホルモン (分子量 21 kDa、Growth Hormone Human Pituitary Iodination Grade: CALBIOCHEM) を使い、絶対量が 0.05、0.20、0.80 mg になるようにした。分子量マーカーには RainbowTM protein molecular weight markers (アマシャム) を用いた。ゲルは銀染色キット (和光純薬工業) で染色した。

結 果

b α LA/ hGH、b β CN/ hGH および b α S1 CN/ hGH 系統のトランスジェニックラットについては、ほとんどすべての個体から乳を採取することができた。b α LA/hGH 系統の 8 ラインのうち 2 ラインのトランスジェニックラットで乳を採取することができなかった。これは G0 雄ラットの #225-1 と #223-1 について、前者は G1 でトランスジェニックの個体が 1 例も得られず、後者は G1 で雄のトランスジェニック個体しか得られなかったことによる。また、b β CN/hGH 系統の 14 ラインではうち 1 ラインのみ乳を採取できず、この G0

雌ラット (#215-1) は不妊であった。b α S1CN/hGH 系統の G0 雄ラットの #310-4 からは G1 に雄のトランスジェニック個体しか得られず、このラインと出生直後に死んだライン (#304-2) を除く 6 ラインにおいて乳サンプルを採取できた。mWAP/hGH および b κ CN/hGH 系統に関しては、それぞれ 58% (11/19) および 33% (4/12) の G0 が不妊であった。したがって、それぞれ 5 および 8 ラインでのみ乳サンプルを採取できた。

トランスジェニックラットの乳中に分泌された hGH 量を Fig. 3-1 に示した。b α LA/hGH の系統において 6 ライン中 5 ラインで 1 μ g/ml 以上の hGH が検出できた。hGH を分泌していなかった他の 1 ライン (#225-3) については、G0 から G1 に外来遺伝子の伝達が認められなかったことからモザイクであったと思われる。b β CN/hGH 系統では 13 の乳サンプル中 11 サンプルに検出可能なレベルの hGH が認められた。b α S1CN/hGH 系統で乳採取が可能であった 6 ラインについては、2 ラインでしか hGH が分泌されていなかった。他の 4 ラインのうち 3 ラインは導入コピー数が 1 以下と算定された個体であった。それぞれの外来遺伝子をもつトランスジェニック系統のうち少なくとも 1 ラインは、それらのプロモーターによって元来ウシの乳中に分泌されている乳タンパク質と同等もしくはそれ以上の濃度で hGH を乳中に分泌していた。高発現ラインとして b α LA/hGH の #221-2、b β CN/hGH の #212-5 および b α S1CN/hGH の #311-6 ラインが特筆でき、分泌濃度はそれぞれ、4,360 μ g/ml、10,900 μ g/ml、6,480 μ g/ml であった。また、mWAP/hGH 系統の 5 ライン中 4 ラインで 6 μ g/ml 以上の hGH を含む乳が生産されており、最高は 151 μ g/ml であった。他の 1 ラインは 15 匹の G1 に外来遺伝子の伝達が認められず、モザイクであると推定された。一方、b κ CN/hGH 系統においては 8 ラインの乳サンプルのいずれから hGH は検出できなかった。

トランスジェニックラットの乳タンパク質を電気泳動した例を Fig. 3-2 に示した。移動度が精製 hGH と一致するバンドが #212-5、#219-2、#221-2 ならびに #222-9 の乳中に検出された (レーン 5、7、9 ならびに 10)。

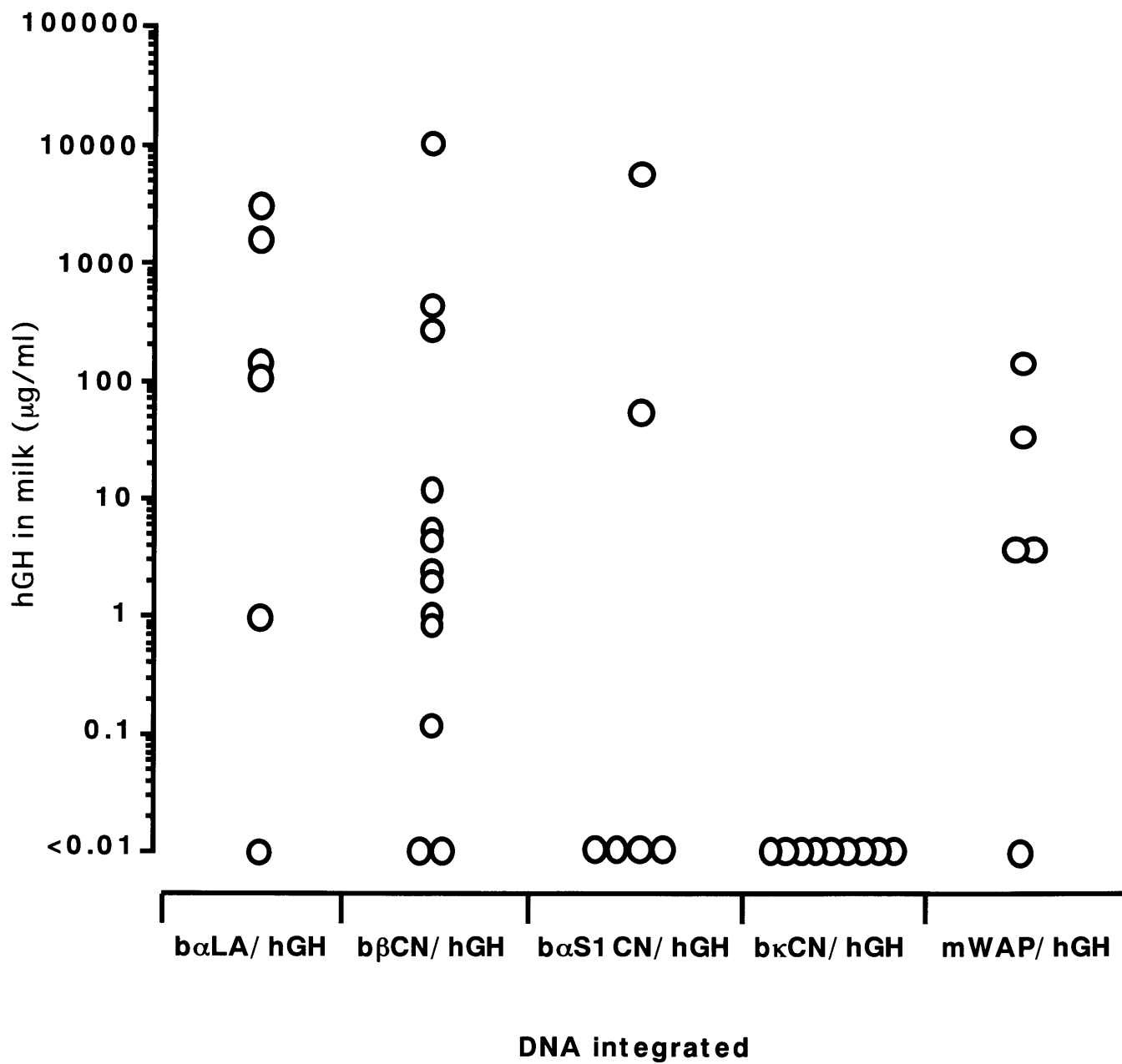


Fig. 3-1. Secretion of hGH into the lactated milk of transgenic rats.

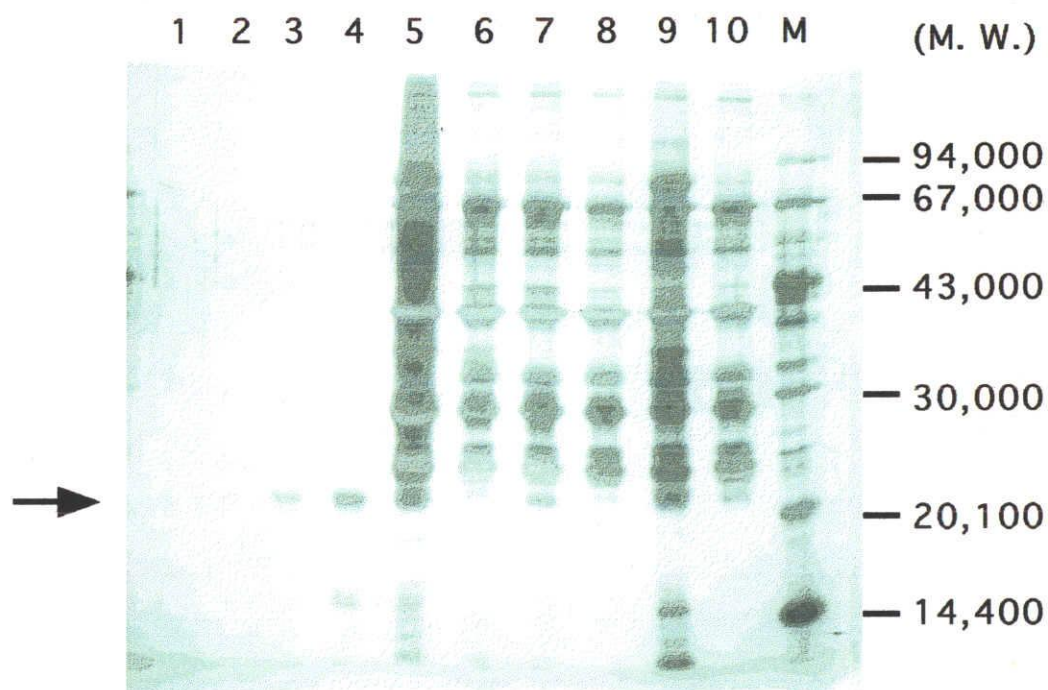


Fig. 3- 2. Gel electrophoretic pattern of α LA/hGH transgenic rat milk proteins.

Arrow indicates the distance of migration of hGH protein. Lane M, size marker; lanes 1-4, concentration standards of purified hGH for 250, 1,000, 4,000, and 16,000 μ g/ml, respectively; lanes 5- 10, 10 μ l of defatted rat milk (1/100 dilution) of #212- 5, #218- 5, #219- 2, #221- 1(Non- Transgenic litter mate) and - 2, and #222- 9, respectively.

#212-5 および#221-2 の乳中タンパク質濃度（それぞれ、226 および 133 mg/ml）は他のライン（56.5～77.6 mg/ml）に比べると 2 ～3 倍高かったが、それぞれの正常同腹子と比較しても量的に差があるとは思えなかった。

外来遺伝子の種類にかかわらず、それらのトランスジェニック系統のうち少なくとも 1 ラインにおいて血清中に hGH が検出された（Table 3-1 および Fig. 3-3）。しかしながら、血清中に hGH が検出される頻度やその濃度は導入した外来遺伝子の種類によって異なっていた。b α LA/ hGH、b β CN/ hGH ならびに b α S1CN/ hGH 系統については、乳中に 100 μ g/ ml 以上の hGH を分泌していたすべての雌ラットにおいて、泌乳期よりも以前の血清中にも検出可能な量（0.0002 μ g/ ml 以上）の hGH が認められた（Fig. 3-4）。b α LA/hGH および b β CN/hGH 系統の G0 雄のうち#223-3 と#211-2 において、血清中にはごくわずかな量の hGH（0.001 μ g/ ml 以下）が分泌されていた（Table 3-1）。そしてそれらの G1 雌は乳中に高濃度の hGH（300 μ g/ ml 以上）を分泌していた。b α S1CN/ hGH 系統の 4 匹の G0 雄ラットについては血清中に hGH を分泌しているものはいなかった。これに対して、mWAP/ hGH 系統については、モザイクと思われる 1 ライン（#359-4）を除くすべてのラインで、性別を問わず 0.001 μ g/ ml 以上の hGH が血清中に分泌されていた。b κ CN/hGH 系統についても、乳中に検出可能量の hGH を分泌しているラインはなかったにもかかわらず 11 ライン中 8 ラインで血清中に比較的高濃度の hGH が検出された。統計的には、乳中の hGH 濃度と血清中の hGH 濃度との間に相関性は認められなかった。

b α LA/ hGH、b β CN/ hGH、b α S1CN/ hGH ならびに mWAP/ hGH 系統のすべてのラインは、血清中の hGH 濃度が泌乳期になると 2 倍から 1,000 倍以上にまで増加したが、その割合は泌乳前の hGH 濃度とは無関係であった。一方、b κ CN/hGH 系統においては血清中の hGH 濃度は泌乳期には逆に 1/10 以下にまで減少した。

Table 3-1. hGH concentrations in the serum of transgenic male founders produced.

Integrated DNA	Line No.	hGH in serum (µg/ml)
bαLA/hGH	#223-1	N.D.
	#223-3	0.0009
	#225-1	N.D.
bβCN/hGH	#211-2	0.0004
	#212-2	N.D.
	#212-4	N.D.
	#213-2	N.D.
	#215-1	N.D.
	#216-1	N.D.
	#220-1	N.D.
bαS1CN/hGH	#305-1	N.D.
	#308-5	N.D.
	#309-3	N.D.
	#310-4	N.D.
bκCN/hGH	#361-1	N.D.
	#364-1	0.0137
	#365-1	0.3300
	#366-3	0.0185
	#370-4	N.D.
mWAP/hGH	#345-1	0.0053
	#346-2	0.0082
	#346-5	0.0039
	#347-2	2.8600
	#347-4	0.0686
	#355-3	0.0228
	#356-1	0.0290
	#356-3	0.0331
	#357-3	0.0081

N.D. Not detected (<0.0002µg/ml).

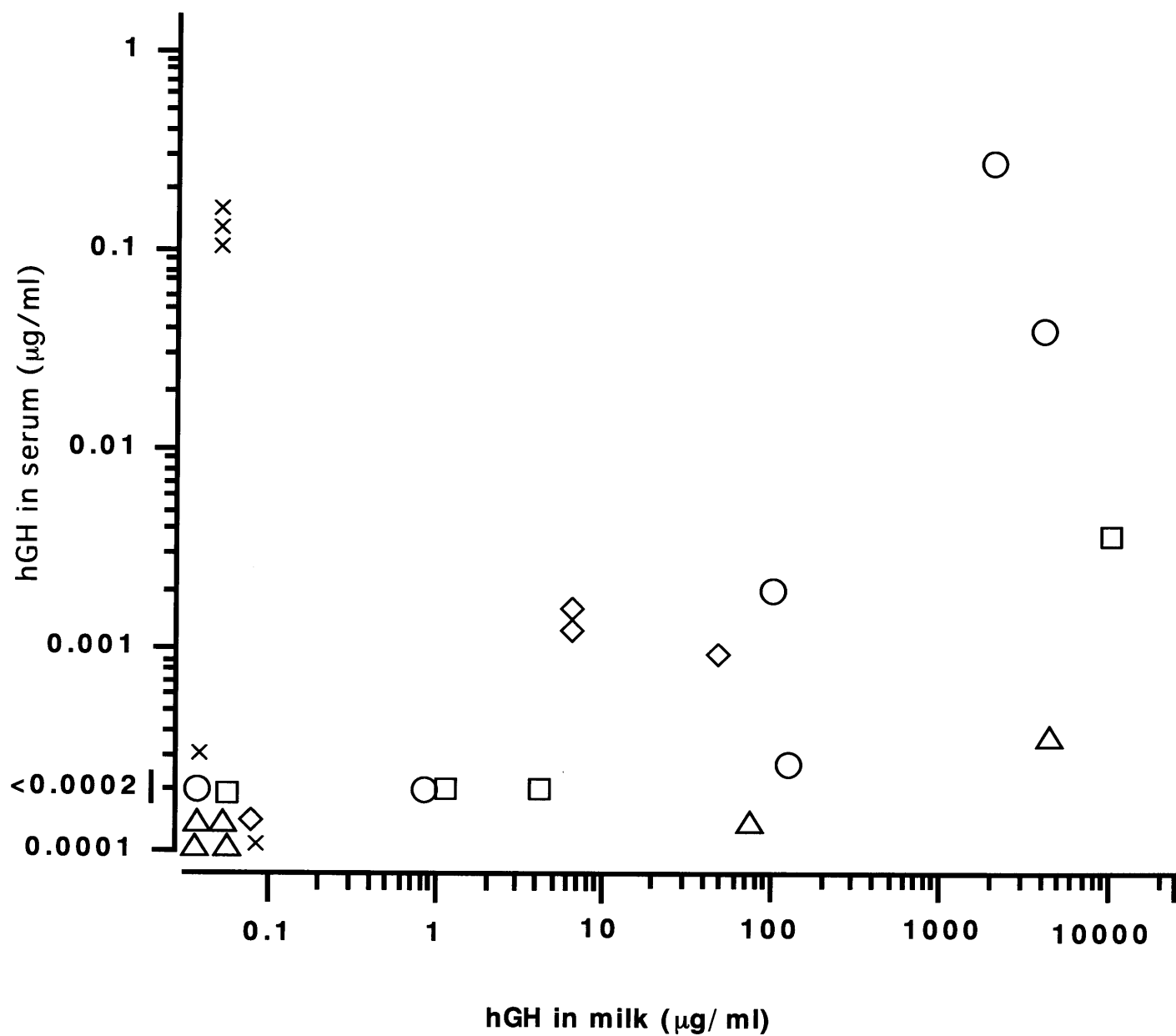


Fig. 3-3. Correlation of hGH in Milk with hGH in Serum.

○: bαLA/ hGH, □: bβCN/ hGH, △: bαS1 CN/ hGH, ×: bκCN/ hGH, ◇: mWAP/ hGH.

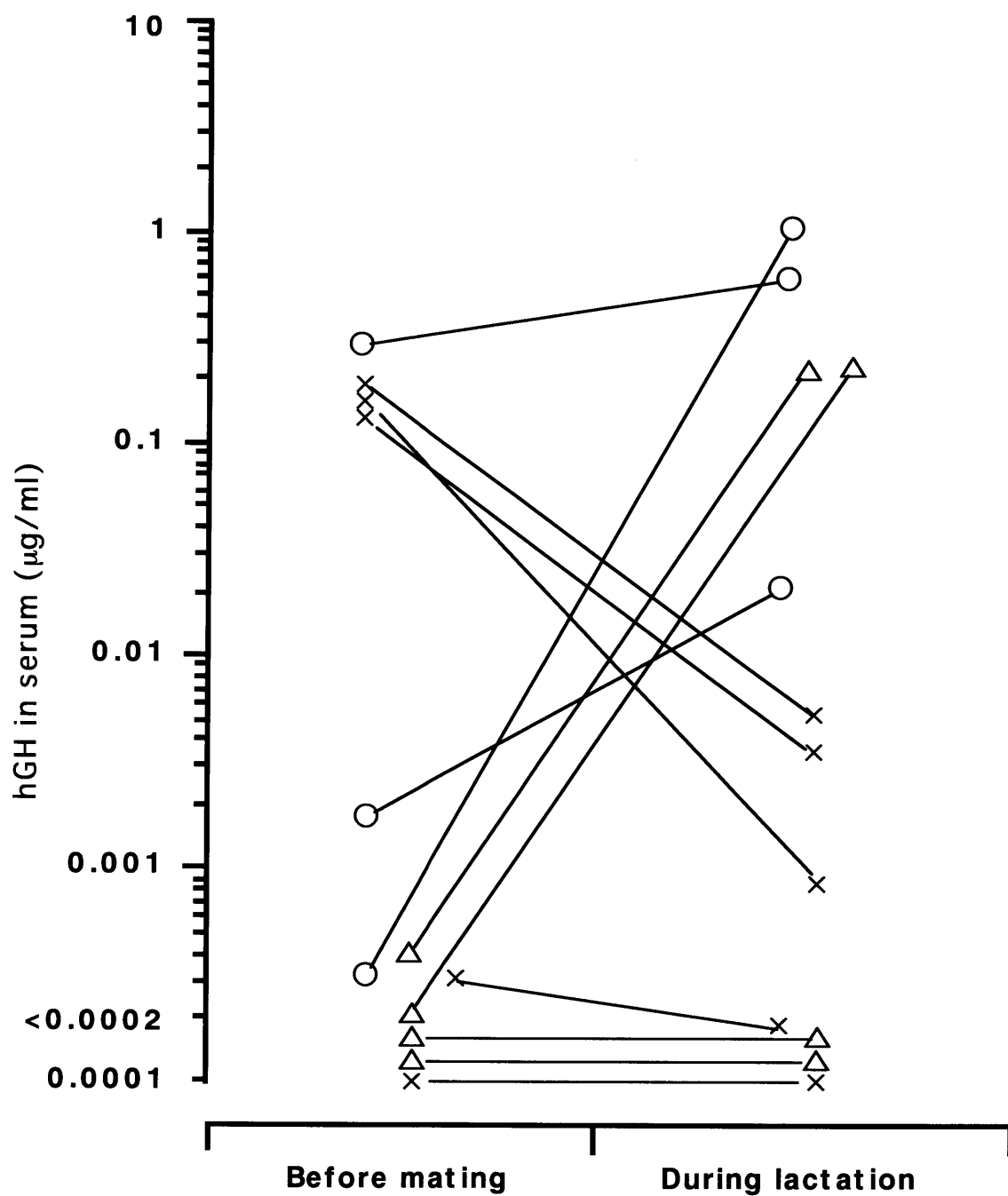


Fig. 3-4. Lactation-induced changes of serum hGH concentration in transgenic rats.

○: bαLA/ hGH, △: bαS1 CN/ hGH, ×: bκCN/ hGH.

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の hGH を乳中に産生した b α LA/ hGH および b β CN/ hGH 系統の雌では、1 例を除くすべての個体において過大化や繁殖障害あるいは腫瘍が観察された。b α LA/hGH 系統の 2 ライン (#221-2、#223-3B-2) および b β CN/hGH 系統の 1 ライン (#212-5) の計 3 ラインは 15 週齢で他の個体の 1.5~2 倍の体重に成長し、初産後に不妊となった。別の G0 雌ラット (b α LA/hGH 系統、#226-4) では乳腺に腫瘍が認められた。b α LA/hGH (#222-9) および b β CN/ hGH (#219-2) 系統 のそれぞれ 1 ラインは初産後に過大化した。b α LA/hGH (#223-3) および b β CN/hGH (#211-2) 系統の 2 匹の G0 雄ラットは外見上は正常であったが、それらの G1 のトランスジェニック雌ラットは過大化した。これらの G1 雌ラットのうち 1 匹は不妊で、1 匹は妊娠を維持できず、それ以外のラットは産子を哺育しなかった。

mWAP/ hGH 系統において過大化したラット#345-6 の体重曲線を Fig. 3-5 に示した。この例では離乳から間もない 5 週齢ですでに 200 g を超えた。この時点で正常同腹子の体重の 1.5 倍に成長し、13 週齢時には 2.5 倍の体重にまでなった。血清中に 0.016 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の hGH が検出された mWAP/ hGH 系統では成育中に腹部を中心として異常な脂肪蓄積が認められた (Fig. 3-6)。そのうち 1 ライン (#347-4) を除くすべてのラットは不妊であるか、妊娠を維持できなかった。#347-4 には妊よう性があったが、その G1 雌のトランスジェニックラットはすべて不妊であった。

血清中に 0.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の hGH が検出された b κ CN/ hGH 系統でも過大化や腹部の異常な脂肪蓄積が認められた。mWAP/ hGH との相違は、これらの異常雌のうち 1 ライン以外はすべて妊よう性があり、泌乳したことである。脂肪蓄積の起こった G0 雄ラットの#364-1 および#366-3 に由来する G1 雌ラットは外見上は正常であったが、過大化した G0 雄ラットの#364-1 ラインでは G1 雌ラットも過大化した。しかしながら、これら 3 ラインの G1 雌には妊よう性があり、泌乳も正常であった。

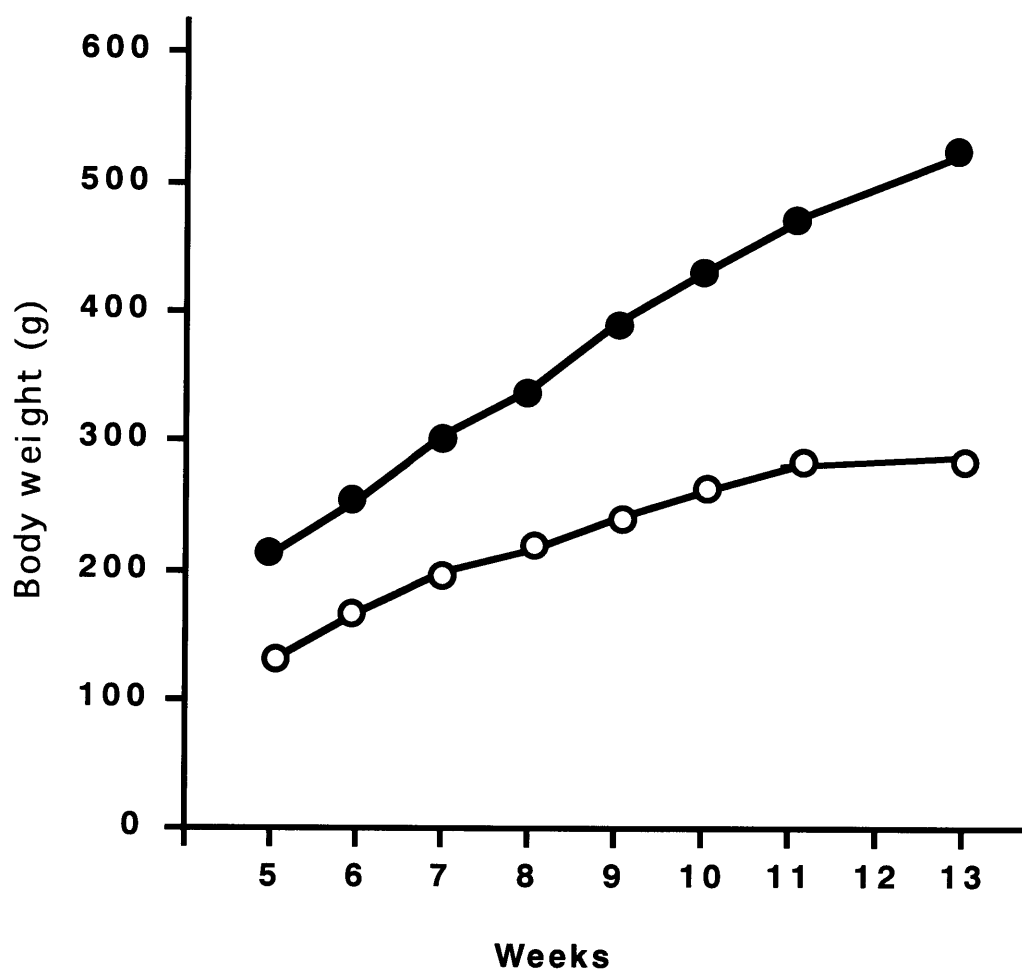


Fig. 3- 5. Five weekly gain of Body weight in a transgenic rat carrying mWAP/ hGH (●) and the litter mate (○).

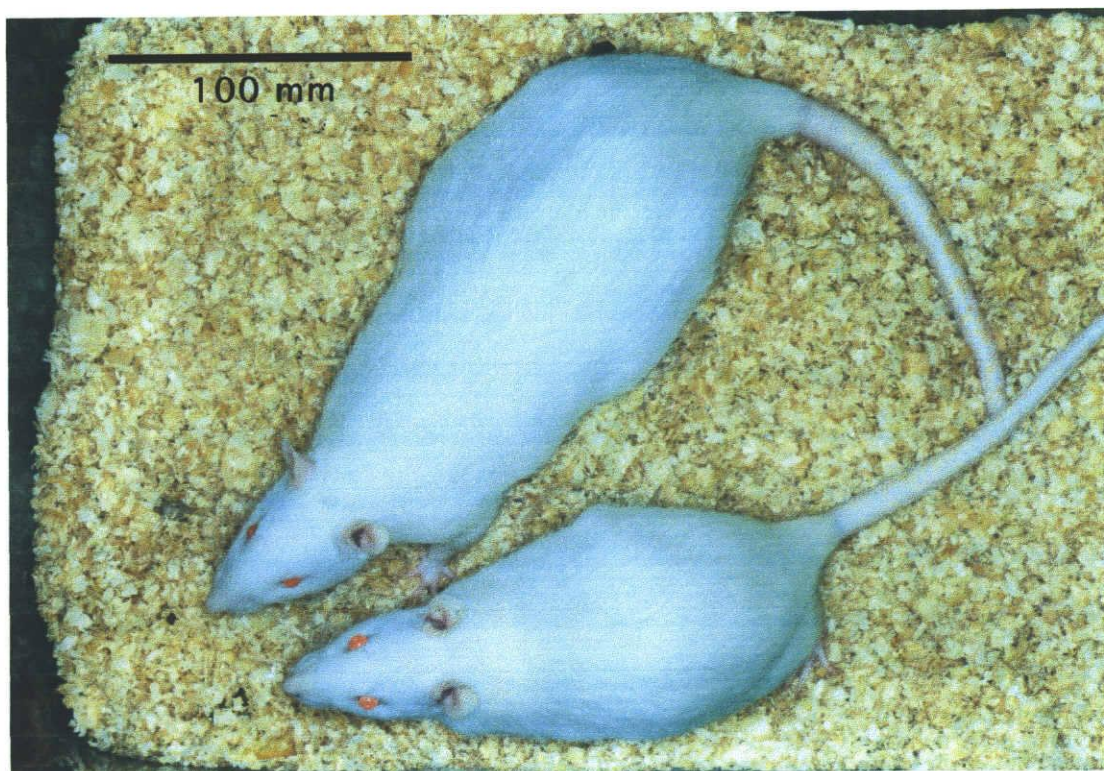


Fig. 3- 6. The super-rat overweighting by non-tissue specific expression of hGH gene.

13 weeks-old transgenic female carrying mWAP/hGH (#345- 6: upper) and the non-transgenic litter mate (#345- 5: lower).

考 察

本実験では乳タンパク質遺伝子のプロモーターが外来遺伝子産物 (hGH) の乳中への分泌を誘導する機能を比較し、b α LA、b α S1CN ならびに b β CN 遺伝子のプロモーターのほう b κ CN および mWAP 遺伝子のプロモーターよりも hGH の発現において優れていたことを示した。文献的にはヒツジ β ラクトグロブリン遺伝子のプロモーターがトランスジェニックヒツジの乳中に α 1-アンチトリプシンを 60,000 μ g/ml もの濃度での分泌を誘導できることが報告されている [130]。

Meade ら [48] は b α S1CN 遺伝子のプロモーターを用いてヒトウロキナーゼを 1,000~2,000 μ g/ml の濃度で乳中に産生するトランスジェニックマウスを報告した。彼らは転写開始部位の前には b α S1CN 遺伝子の 5' 上流配列から第 2 エクソンまでを使い、その後にはウロキナーゼの C 末端側から半分をコードするエクソン、ポリ A シグナルおよび 3' 下流配列の 8 kb を連結した計 22 kb にも及ぶ長い融合遺伝子を用いた。本実験では 671 bp の 5' 上流域および 51 bp の b α S1CN 第一エクソンだけでも乳中に高濃度 (6,480 μ g/ml) の hGH 分泌を誘導するのに十分であることが示唆された。

ラット [51] およびヤギ [52] の β CN 遺伝子のプロモーターがトランスジェニックマウスの乳腺で外来遺伝子を発現させるために用いられている。また、トランスジェニックウサギにおいてウサギの β CN 遺伝子のプロモーターも用いられている [59]。しかしながら、それらのトランスジェニック動物における発現レベルは非常に低いものであった (<1 μ g/ml)。本実験では 2.2 kb の b β CN 遺伝子のプロモーターを用いてラットの乳中に高濃度の hGH を分泌させることに成功した。Ebert ら [11] は β CN 遺伝子のプロモーター (由来不明) によって 2,000~3,000 μ g/ml の濃度でヒト t-PA をトランスジェニックヤギの乳中に産生させている。これら発現レベルの差は構造遺伝子、宿主動物、あるいは β CN 遺伝子の由来動物種の違いによって説明されるかもしれない。

Reddy ら [54] は mWAP 遺伝子のプロモーターと hGH 遺伝子との融合遺伝子で 24 ラインのトランスジェニックマウスを作出し、うち 19 ラインで血清中に 0.016~9.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の hGH が検出された。本実験で作出したトランスジェニックラットの場合とは対照的に、それらのマウスのほとんどは妊よう性をもっていた。1 匹のマウスでのみ過大化が認められたが、腹部の異常な脂肪蓄積については言及されておらず、5 匹のマウスで 0.005~410 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で乳中に hGH を産生していた。

ウサギの WAP 遺伝子上流域 (17.6 kb) がトランスジェニックマウスの乳中に 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に達する高濃度のヒト $\alpha 1$ -アンチトリプシンの発現を誘導することが報告されている [57]。しかしながら、雄のトランスジェニックマウスの血清中にもヒト $\alpha 1$ -アンチトリプシンが検出された例が多く、WAP 遺伝子のプロモーターは外来遺伝子産物を乳中に特異的に分泌させるのに十分なものではないと示唆している。本実験で作出した mWAP/hGH 系統のトランスジェニックラットの乳中における hGH の濃度が比較的低いのは、高発現のラットが不妊であったことによるのかもしれない。Dale ら [131] はラット WAP 遺伝子の 3' 非翻訳領域が遺伝子発現の制御に重要な役割を果たしていると報告している。乳腺に特異的な遺伝子発現に関する 5' 上流域以外の WAP 配列の役割については、さらなる検討が必要である。

血清中の hGH が乳腺細胞からの漏出によるものか、非特異的な組織での発現によるものかどうかは判断できない。しかし、乳中と血清中の hGH の濃度に相関がないことや、雄の血清中にも hGH が検出されていること、また、導入した外来遺伝子によって異なった異常が観察されていることから、後者の非特異的組織での発現による可能性が高いように思われる。

これまでに、 κCN 遺伝子の発現についてはトランスジェニック動物においても、また培養細胞においても報告されていない。それゆえに、外来遺伝子産物をトランスジェニック動物の乳中に分泌させるために必要な κCN 遺伝子のプロモーター領域はいまだに同定されていない。本実験でも、b κCN 遺伝子のプロモーターで乳腺特異的および泌乳期特異的に発現するトランスジェニ

ックラットの獲得には成功しなかった。用いた外来遺伝子は b κ CN/hGH 遺伝子も含めてすべてが -160 bp から -100 bp の間に "milk box" [132-134] を保有していたことから、この領域だけでは乳腺における遺伝子発現の制御を説明することはできない。本実験に用いた b κ CN 遺伝子のプロモーター領域には "milk box" に似たモチーフが 5 ヶ所、少なくとも 1 ヶ所の MPBF 結合部位 [135] を含んでいる。それにもかかわらず κ CN 遺伝子のプロモーターが乳腺特異的および泌乳期特異的な hGH の発現を支持しなかったという今回の結果は、 κ CN 遺伝子の乳腺における発現は他のカゼインとは異なったシステムで制御されており、5' 領域だけでは不十分であることを示唆している。ウシのカゼイン遺伝子は、 α S1、 β 、 α S2 そして κ CN の順で 200 kb [136] から 300 kb [137] の範囲に集中しているが、 κ CN 遺伝子だけは他の遺伝子から少なくとも 70 kb 離れている [137]。さらに、カルシウム感受性カゼイン (α S1、 β および α S2) の遺伝子は進化の過程を通して共通な構造を保存しているのに対し、 κ CN 遺伝子はその由来が異なっていると考えられている [138]。

b α LA/ hGH あるいは b β CN/ hGH 系統のラットの 80%以上が乳中に検出可能な量の hGH を分泌しており、なかには高濃度の hGH (>1,000 μ g/ml) を分泌している系統もあることから、b α LA および b β CN 遺伝子のプロモーターが乳腺における hGH の発現に最も効果的であると思われた。しかしながら、高発現の G0 ラットについてはトランスジェニック系統を確立することができなかった。したがって、hGH の大量生産には乳中に多量の hGH (6,480 μ g/ml) を分泌し、正常に成長、交配、泌乳した b α S1CN/hGH 遺伝子を保有する #311-6 というラインに実用価値がある。しかし、一般的に考えて、医薬品となる有用なタンパク質には生物活性があるため、わずかでも血清中に漏出すれば宿主にとって有害となることが予想される。それゆえに、生産するタンパク質によっては、乳腺および泌乳期に限定して発現させることが重要である。

第3節 奇乳へ分泌されたヒト成長ホルモンの定量による 外来遺伝子発現の早期検定

材料と方法

(1) トランスジェニックラット

第2章第2節で作出した b α S1CN/hGH 遺伝子を導入し、PCR で陽性と判定されたトランスジェニックラットの 3 ライン (#311-6、#308-5、#305-1) を用いた。#311-6 ラインの G1 におけるトランスジェニックラットはすべて雄で、それらを野生型の Wistar 系雌ラット (日本チャールス・リバー) と交配し、その胚を -196°C で 3 年間凍結保存した (胚の凍結保存法については第4章第2節に後述する)。凍結融解胚を偽妊娠雌に移植し、G2 世代のラットを得た。それらをさらに交配し、4 匹の G2 トランスジェニック雌ラットから G3 のトランスジェニックラット 24 匹 (雄 14、雌 10) を作出した。#308-5 および #305-1 のトランスジェニックラインでは両者とも G0 は雄で、それらを野生型雌ラットと交配して G1 を得た。#308-5 からは G1 のトランスジェニックラットとして雄 3 匹と雌 4 匹が得られた。#305-1 については 雄 2 匹と雌 5 匹のトランスジェニック G1 ラットが得られた。トランスジェニックラットの選抜には HGH003 / HGH103 (Table 3-2) のプライマーを用い、第2章第2節に述べた外来遺伝子の検定法 (PCR) に従って尻尾から抽出した DNA を解析した。それぞれのトランスジェニックラインについて、雌雄各 2 匹のトランスジェニック新生子と 1 匹の非トランスジェニック同腹子 (雄または雌) を無作為に選抜して供試した。

(2) RT-PCR による mRNA の検定

エーテル麻酔下で新生子より背部、乳腺を含む腹部皮膚および尾部の組織を採取した (Fig. 3-7)。そのサンプルを速やかに液体窒素中に浸漬して急速凍結した後、-80°C で保存した。

Table 3-2. Primers for PCR amplification of $\beta\alpha$ S1CN/hGH from tail tissue of newborn pups (HGH003/HGH103) and for RT-PCR amplification of hGH from ventral skin tissue(HGH106/HGH208, RNWAP1/RNWAP2, RNACN1/RNACN2).

Gene	Primers	Sequences ¹	Corresponding region		Size of PCR products
			on the gene		
hGH	HGH003:	5'-ACACCTACCAGGAGTTTGTAAAGCTC-3'	1,235 to	+1,430	195bp
	HGH103:	5'-CTGGAGACCAGCTCCCATTTGTTACT-3'			
	HGH106:	5'-CCGTAGTTCTTGATGATGGCGTCAT-3'	1,818 to	+2,196	384bp
	HGH208:	5'-GAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGG-3'			
r α CN	RNACN1:	5'-AGGAACAAGCAACGGCAAGT-3'	303 to	+1,036	733bp
	RNACN2:	5'-CTCTAAACAGCAGTCAAGC-3'			
rWAP	RNWAP1:	5'-TTGCTCGGAACCTACAGGAACAT-3'	55 to	+425	370bp
	RNWAP2:	5'-GCAGGCTTCTCACTGAAAGGATA-3'			

¹ Sequences are from the following references; hGH (DeNote et al., 1981) [102], r α CN (Yu-Lee et al., 1986) [95], rWAP (Hennighausen and Sippel. 1982) [140].



Fig. 3-7. Preparation of ventral skin tissues including mammary glands from newborn rats for RT-PCR.

乳腺における総 RNA は AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform) 法 [139] によって調製した。総 RNA (5 μ g) は 70°C で 5 分間加熱してから氷上で冷却した後、0.2 μ g のランダムヘキサマープライマー (Pharmacia Biotech)、20 U の逆転写酵素 (Molony's murine leukemia virus reverse transcriptase; Pharmacia Biotech)、それぞれ 200 μ M の dNTPs を含む 20 μ l の 75 mM KCl、50 mM Tris-HCl (pH 8.3)、10 mM dithiothreitol ならびに 3 mM MgCl₂ からなる緩衝液中で 37°C で 1 時間加熱した。PCR の条件は、1/20 量の first-strand cDNA を特異的プライマーとして用い、50 μ l の反応用緩衝液中で 94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 2 分を 1 サイクルとし、30~40 サイクル処理した。オリゴヌクレオチドプライマー (RNACN1/RNACN2、RNWAP1/RNWAP2 および HGH208/HGH106) の塩基配列は Table 3-2 に示した。増幅産物は 2% アガロースゲル電気泳動により分離し、臭化エチジウムで染色した。

(3) hGH の定量

乳サンプルは室温において 1,600 rpm で 10 分間の遠心分離により脱脂した。乳腺はポリトロンホモジナイザー (Kinematoca) を用いて 5 容のリン酸緩衝塩溶液中でホモジナイズした後、遠心分離 (5°C、14,000 rpm、10 分間) して抽出液を得た。乳中および乳腺抽出液中の hGH 濃度は蒸留水で適度に希釈した後、hGH ELISA キット (Gibco/BRL) を用いて測定した。

結 果

野生型の Wistar ラット同士の交配から得られた新生子ラットを用いて、出産 24 時間以内の新生子の背部および腹部の皮膚組織を採取し、内因性の α カゼイン (r α CN) およびホエー酸性タンパク質 (rWAP) の mRNA を RT-PCR で調べたの結果を Fig. 3-8 に示した。r α CN は雄 2 匹、雌 1 匹、rWAP は雄 1 匹、雌 1 匹の腹部のサンプルおよび成熟雌ラット (8 週齢) の乳腺に

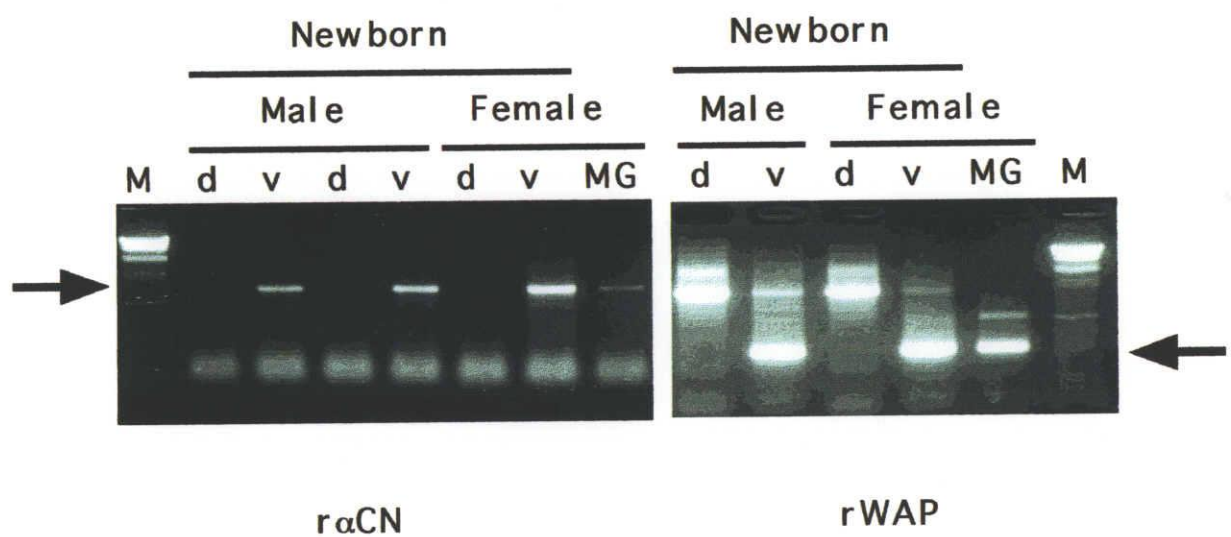


Fig. 3- 8. Detection of rat α - casein and WAP m- RNA by RT- PCR.

M, size markers (λ HindIII digest); d, dorsal skin; v, ventral skin; MG, mammary gland of virgin female; r α CN, rat α - casein; rWAP, rat whey acidic protein.

においてそれぞれの mRNA のバンドが認められた。

トランスジェニックライン#311-6 では、G0、G2 ならびに G3 世代の代表個体においてそれぞれ、6,480 $\mu\text{g/ml}$ 、1,190 $\mu\text{g/ml}$ ならびに 2,890 $\mu\text{g/ml}$ の hGH が泌乳期の乳中に分泌されていた。トランスジェニックライン#308-5 および#305-1 の乳中 hGH 濃度はそれぞれ 86.8 $\mu\text{g/ml}$ および 0.5 ng/ml (検出限界) 以下であった。トランスジェニックライン#311-6 の G3 新生子において、出生直後、生後 24 時間目ならびに生後 48 時間目に乳腺を採取し、直ちに抽出液を調製した。その抽出液における hGH の濃度を Table 3-3 に示した。hGH の濃度は出生直後の雄 1 匹と雌 2 匹において 2.0~5.7 ng/mg の範囲にあった。生後 24 時間目では雌雄各 2 匹について調べたところ、1 匹の雄で hGH を検出することができなかったが、他の雄 1 匹と雌 2 匹の計 3 匹の新生子から得られたサンプルにおいて 1.5~3.3 ng/mg の hGH が認められた。しかしながら、生後 48 時間目に採取した 6 サンプル (雄 3 匹、雌 3 匹) においては 1 例の雌を除いて hGH を検出することができなかった。さらに、トランスジェニックライン#308-5 (泌乳期の乳中に低濃度の hGH を分泌) およびトランスジェニックライン#305-1 (泌乳期の乳中の hGH 量は検出限界以下) に由来する新生子においては、検出限界が約 0.5 ng である市販の ELISA キットで検出できる量の hGH は発現していなかった。

トランスジェニックライン#311-6 の G3 新生子ラットから得られたサンプルにおいては、hGH の mRNA も検出された (Fig. 3-9)。G1 で泌乳期の乳中に 86.8 $\mu\text{g/ml}$ の hGH を産生していたトランスジェニックライン#308-5 においては hGH は検出されなかったものの、40 サイクルの RT-PCR によって hGH の mRNA が認められた (Fig. 3-10)。トランスジェニックライン#305-1 の新生子においては hGH もその mRNA もまったく検出されなかった (Fig. 3-10)。3 つのトランスジェニックラインから得られたすべてのサンプルにおいて、内因性乳タンパク質遺伝子に由来する r α CN の mRNA が同レベルで検出できた (Fig. 3-9)。この結果は、泌乳期の乳中に hGH を産生するトランスジェニックラットはそれらが新生子の時点で乳腺に hGH の mRNA

**Table 3-3. Time period allowing the detection of hGH mRNA
in newborn rat ventral skin.**

Line No.	Sex	hGH (ng/mg of tissue)		
		Time after birth		
		0hr	24hr	48hr
#311-6-4-3	Male	4.24		
#311-6-4-8	Female	2.02		
#311-6-4-10	Female	5.69		
#311-6-4-15	Male		<0.5	
#311-6-4-18	Male		2.08	
#311-6-4-22	Female		3.30	
#311-6-4-27	Female		1.50	
#311-6-4-28	Male			<0.5
#311-6-4-29	Male			<0.5
#311-6-4-30	Male			<0.5
#311-6-4-40	Female			<0.5
#311-6-4-41	Female			<0.5
#311-6-4-42	Female			0.52

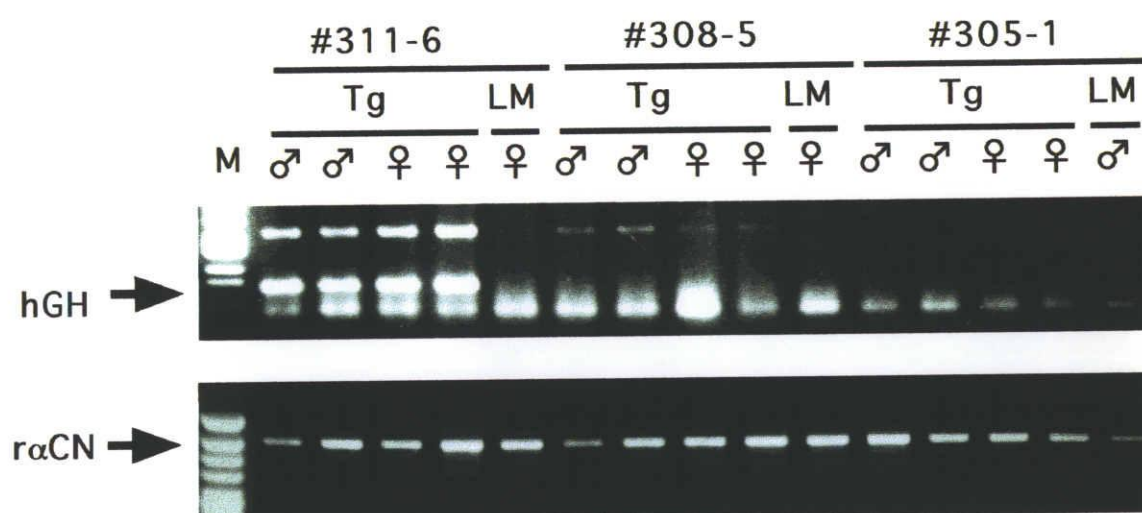


Fig. 3-9. Transcriptional analysis of hGH mRNA by 30 cycle RT-PCR .

M, size markers (Φ X174/*Hinc*II digest); Tg, transgenic rat; LM, non-transgenic litter mate; hGH, human growth hormone; rαCN, rat α-casein.

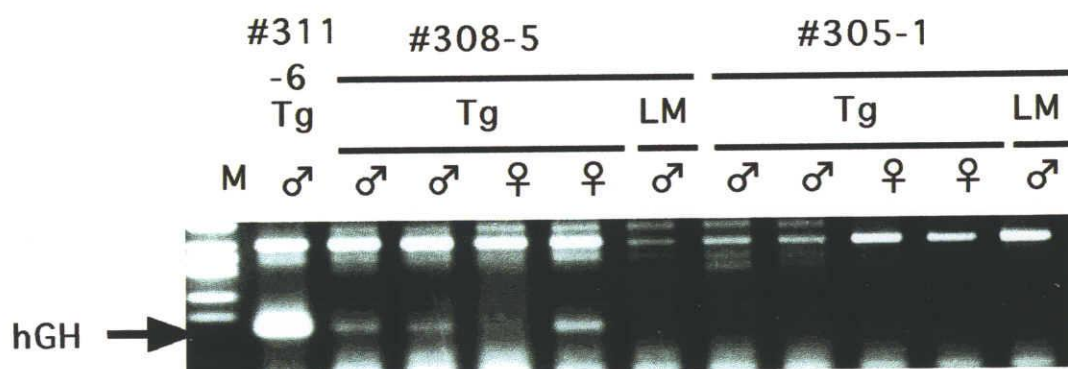


Fig. 3-10. Effect of 40 cycle RT-PCR on detection of hGH mRNA.

M, size markers (Φ X174/*Hinc* II digest); Tg, transgenic rat; LM, non-transgenic litter mate; hGH, human growth hormone.

を発現できるということを示している。

考 察

本研究では、b α S1CN プロモーターと hGH 遺伝子からなる融合遺伝子をもつトランスジェニックラットの新生子乳腺において hGH を検出した。通常の妊娠による泌乳よりも短期間で外来遺伝子の発現を評価することを目的に、多くの研究者がトランスジェニックの処女動物から得たサンプルにおいて外来遺伝子に由来するヒトタンパク質の mRNA を検出しようと試みてきた。それには二つの異なったアプローチがとられてきた。一つはトランスジェニックマウスにおけるヒト血清アルブミンの合成および分泌の検出を目的に培養乳腺組織が用いられた [61]。もう一つはヤギで報告されたもので、G1 雄の子供のトランスジェニック雌にエストロジェンおよびプロジェステロンを投与して人工的に泌乳を誘起したものである [62]。これらはトランスジェニック雄から得られた子孫で乳腺における外来遺伝子の発現を予測するには優れた方法であると思われるが、乳腺における外来遺伝子の発現を予測するための時間を短縮するには不十分である。

ヒトでは生後 3 週間ほどの期間、乳首から乳様物が分泌されることがある。この乳様物は神業であるという歴史的信仰から "Witch's Milk (奇乳)" と呼ばれている [141]。新生子ラットの乳腺で r α CN および rWAP の mRNA が本実験ではじめて検出された (Fig. 3-8)。これは、ラットにおいて奇乳の存在を示唆した最初の実験結果であると思われる。

新生子乳腺の hGH において 3 つのトランスジェニックライン、#311-6 (乳中の hGH は高発現)、#308-5 (hGH は低発現) ならびに #305-1 (hGH は検出限界以下) を比較した場合、#311-6 ラインのトランスジェニック新生子ラット (G3) において、出生直後に有意なレベルの hGH が検出された。さらに、雄および雌の新生子とも hGH を産生していたことは特に注目できる。また、#311-6 では 30 サイクルの RT-PCR によって外来遺伝子の mRNA が

明確に検出された。それに対して40サイクルのRT-PCRによっても#308-5では検出できたhGHのmRNAは比較的低レベルであり、#305-1ではhGHのmRNAを検出できなかった。また、トランスジェニックライン#308-5および#305-1のどちらにおいてもhGHは検出されなかった。これらの結果は、新生子乳腺におけるmRNAの検出は将来の乳中への外来遺伝子の発現の優れた指標になることを示している。生後48時間以内にhGHのレベルが検出限界以下になることから、将来の外来遺伝子の発現を正確に予測するためには、生後24時間以内にサンプルを採取する必要がある。この新生子乳腺においてmRNAを検出可能な時間は動物種によって異なる可能性があり、本方法を他の家畜に適用するには種ごとの予備実験が必要と思われる。

ここで示した結果は、外来遺伝子由来のタンパク質およびmRNAが新生子の乳腺において検出可能であることを示した。このことは、新生子乳腺のmRNAレベルによって将来の外来遺伝子の乳での発現量を予測できることを示しており、この方法が乳中にヒトタンパク質を産生するトランスジェニック動物の作出・確立にあたって時間および費用を節約する上で非常に有効であることを明らかにしている。この方法を乳中にヒトタンパク質を発現させる遺伝子構築の評価に使われるマウスやラットのような実験動物に応用すれば、その融合遺伝子が有用かどうかを決定するまでに要する時間を短縮することができる。また、妊娠期間が相対的に長いブタやウシのような大型家畜においては、新生子におけるmRNAの検出とそれに続くトランスジェニック動物の選抜によって、トランスジェニック動物の作出にかかる費用を劇的に削減できる可能性を含んでいる。

第4節 小 括

4 種類のウシ乳タンパク遺伝子、 α ラクトアルブミン ($b\alpha LA$)、 $\alpha S1$ カゼイン ($b\alpha S1 CN$)、 β カゼイン ($b\beta CN$)、 κ カゼイン ($b\kappa CN$) および、マウスホエー酸性タンパク質 ($mWAP$) 遺伝子のプロモーター領域 (5'上流域) とヒト成長ホルモン (hGH) 遺伝子の融合遺伝子を外来遺伝子としてもつそれぞれのトランスジェニックラットにおいて、 hGH の乳中への分泌を誘導するプロモーターの機能を比較した。 $mWAP/hGH$ 系統のトランスジェニックラットにおいては全ラインの 26%でしか乳の採取ができなかったが、他の 4 種類の外来遺伝子をもつトランスジェニックラットではそれらの 70%以上から乳を採取できた。 $b\alpha LA/hGH$ 、 $b\beta CN/hGH$ および $mWAP/hGH$ 系統のラットでは泌乳個体の 80%以上、そして $b\alpha S1 CN/hGH$ 系統のラットでは泌乳個体の 33%において検出限界よりも多い $0.05 \mu g/ml$ 以上の hGH が乳中に分泌されていた。 $b\kappa CN/hGH$ 系統のラットにおいては、乳中に hGH を分泌しているものは 1 例もなかった。いくつかのラット系統においては乳中の hGH の分泌濃度は元々そのプロモーターが制御する予定であった乳タンパク質の濃度と同等かもしくはそれ以上であった。 $b\alpha LA/hGH$ 、 $b\beta CN/hGH$ 、 $b\alpha S1 CN/hGH$ および $mWAP/hGH$ 系統のトランスジェニックラットの乳中における hGH の濃度はそれぞれ、 $1 \sim 4,360 \mu g/ml$ 、 $0.1 \sim 10,900 \mu g/ml$ 、 $87 \sim 6,480 \mu g/ml$ および $7 \sim 151 \mu g/ml$ の範囲であった。これらのトランスジェニックラットでは血清中にも hGH が検出されており、発育や繁殖に関して異常が観察された。また、ほとんどの $mWAP/hGH$ 系統の雌ラットにおいて血清中に hGH が検出され、その半数以上の個体で腹部に脂肪の異常な蓄積が認められた。乳中に検出可能量の hGH を分泌している個体のない $b\kappa CN/hGH$ 系統のラットにおいても 73%において血清中に hGH が検出された。このように、 hGH の乳中分泌量と繁殖上の異常や不都合を考えたとき、トランスジェニックラットの乳中に外来遺伝子産物を分泌させるためには $b\alpha S1 CN$ 遺伝子のプロモーターが最も適切であると判断される。

次に、外来遺伝子産物を泌乳期の乳中に生産するトランスジェニック動物の早期選抜法を確立するため、新生子ラットの乳腺における外来遺伝子の発現をその mRNA を同定する RT-PCR によって調べた。このためには、b α S1CN 遺伝子のプロモーターによる制御により hGH を乳中に分泌しているトランスジェニックラインの G3 世代のラットを用いた（高分泌ライン：1,190～6,480 μ g/ml、中分泌ライン：87 μ g/ml、非分泌ライン：0.5 ng/ml 以下）。hGH を乳中に高濃度で分泌しているラインに由来するラットでは、その性別にかかわらず、出生直後（0～24 時間目まで）に調製した乳腺の抽出物より 1.5～5.7 ng/mg の濃度で hGH が検出された。これはヒトやヤギで報告されている出生直後に分泌される初乳に似た分泌物 "Witch's Milk (奇乳)" がラットにも存在し、その中に外来遺伝子産物が分泌されていた結果と思われる。一方、中分泌ラインおよび非分泌ラインの新生子ラットの乳腺抽出物からは hGH は検出できなかった。また、高分泌ラインの新生子ラットの乳腺における外来遺伝子の発現は、hGH 遺伝子の mRNA の存在によっても確認された。これは RT-PCR を 30 サイクル行ったときの結果であるが、中分泌ラインにおいてはこれを 40 サイクルに増加したときに hGH 遺伝子の mRNA が初めて検出できた。また、内因性乳タンパク質である r α CN 遺伝子の mRNA は調べたすべてのトランスジェニックラインおよび非トランスジェニック新生子の乳腺において検出された。ここで示した結果は外来遺伝子由来のタンパク質もその mRNA も外来遺伝子を導入されている新生子の乳腺において検出可能であることを示しており、目的のトランスジェニック動物を選抜し、確立するための時間を大幅に短縮するのに有用な技術であると思われる。

第4章 ヒト成長ホルモンを乳中に分泌する トランスジェニックラット系統の凍結保存

第1節 緒言

胚の凍結保存は実験小動物では系統や特異形質の保存を目的として、また、家畜では人工妊娠技術の基幹技術として有用で、多くの研究者の努力がこの分野に投じられてきた。1972年に Whittingham ら [69] が緩慢凍結法によってマウス胚を凍結保存することに成功して以来、他の多くの動物種においても相次いで胚の凍結保存に関する成功例が報告されるようになった [70-74]。その後、冷却行程を大幅に短縮する二段階凍結法が発表されて [75]、その技術は特定の研究機関に留まらず広範な分野に普及していくことになった。さらに、コンピュータ制御しなければいけない緩慢冷却行程をまったく含まないガラス化保存法が 1985 年に Rall と Fahy [81] によって報告され、実験動物から家畜に至る多くの動物種に適用されるまでになっている [82-87]。初期の緩慢冷却法に比べるとこのガラス化保存法の操作時間は 1/10 以下にまで短縮されている。

トランスジェニック技術が適用可能な動物種は、実験小動物のマウス [82-92、118-123] やラット [28-39] から大型家畜のウシにまで至っている [14、60] が、これらトランスジェニック動物を用いた実験は非常に厳しい制約環境下で行うことを余儀なくされている。このような環境下で動物を維持、繁殖することは多くの労力と莫大な経費がかかるため、初期胚や精子のレベルでの凍結保存が試みられている [63、64]。著者らは疾患モデル動物の系統保存に二段階凍結法を用い、嚢胞腎症、免疫不全症、肥満性および痩せ型糖尿病のモデルマウスや高血圧症のモデルラットに由来する胚を凍結保存し、融解後に発生したマウスやラットが疾患形質を失っていないことを確認した [142、143]。しかしながら、遺伝子を人工的に付加したトランスジェ

ニック動物由来の凍結保存胚から発生した産子における外来遺伝子の安定性についてはあまり知られておらず、凍結融解胚由来のトランスジェニックマウスにおいて伝達率が33～46%であったという報告があるに過ぎない [64]。

本章ではまず、野生型ラットに由来する2細胞期胚を二段階凍結法およびガラス化法を用いて保存し、融解後の胚の生存性および個体発生能について調べた。次にhGHを乳中に分泌するトランスジェニックラットに由来する2細胞期胚を二段階凍結し、融解胚の個体への発生能に加えて、外来遺伝子の伝達性、ならびにhGHの発現を調べた。

第2節 ラット2細胞期胚の蘇生に有効な二段階凍結またはガラス化保存条件の検討

材料と方法

(1) ラット2細胞期胚の採取

8～25週齢のWistar系雌ラット（日本チャールス・リバー）を用い、膣スミア像の観察によりラットの性周期を把握した。発情後期にPMSG 150 IU/kg、48時間後の発情前期にhCG 75 IU/kgをそれぞれ腹腔内投与して過剰排卵を誘起した。そしてhCG投与日の夕方から成熟Wistar雄と同居させ、翌日に膣栓の有無により交配の成立を確認した。hCGの投与から42～46時間後に卵管を摘出し、HB1液 [144] あるいは18%ウシ胎児血清を含むHER液 [145] (HERs液) で灌流して2細胞期胚を採取した。形態的に正常な胚をHB1液あるいはHERs液で3回洗浄した後に実験に供した。

(2) 胚の凍結保存

二段階凍結法：2細胞期胚の二段階凍結は水野ら [143] の報告に準じて行

った。凍害保護物質には、ジメチルスルフォキシド (DMSO、SIGMA) あるいは 1, 2- プロパングリコール (和光純薬工業) を用いた。凍結媒液は 10% DMSO または 10% 1, 2- プロパングリコールを含む HERs 液とし、胚を凍結媒液に室温で 10~15 分間さらした後、0.25 ml 容量のウシ凍結精液用プラスチックストロー (富士平工業) 内に 0.2 ml の凍結媒液とともに封入した。そして、あらかじめ 0°C に冷却しておいたプログラムフリーザー (ET-U1; フジヤ矢野科学) のアルコール液槽内にストローを静置した。まず、0°C から -7°C までを 1.0°C/ 分の速度で冷却し、-7°C で液体窒素中で冷やしておいたピンセットでストローを軽く挟むことにより植氷した。その温度で 10 分間保持した後、-30°C までを 0.5°C/ 分、1.0°C/ 分、あるいは 2.0°C/ 分の速度で冷却した後、ストローを液体窒素中へ移し、1 日以上保存した。融解は 37°C の温水中にストローを投入することにより急速に行い、ストロー内の胚を含む凍結媒液とともに 0.8 ml の HERs 液中に回収し、そのまま 10 分間静置した。

ガラス化保存法：2 細胞期胚のガラス化保存は Rall と Fahy [81]、あるいは Kasai ら [146] の報告に準じて行った。すなわち、ガラス化保存液には VS1 液 [81] か、20 または 40% EFS 液 [146] を用いた。

VS1 液は 18% DMSO、14% アセトアミド (和光純薬工業)、9% プロピレングリコール (和光純薬工業) および 5.4% ポリエチレングリコール (MW 8,000、SIGMA) を含むダルベッコのリン酸緩衝生理食塩液 (日水製薬) からなる。VS1 液からは HB1 液で希釈することにより、90、50、25 および 12.5% の VS1 液を調製した。90% VS1 液への平衡を 3 段階で行う場合は、2 細胞期胚を室温で 25% VS1 液に 20 分間、4°C で 50% VS1 液に 10 分間および 90% VS1 液に 5 分間、それぞれ平衡させた後、0.25 ml 容量のプラスチックストローの中央部に 90 μ l の 90% VS1 液とともに充填した。また、90% VS1 液への平衡を 1 段階で行う場合は、4°C で 5 分間平衡させた後にストローに充填した。そしてストローの上端部を熱封入した後、液体窒素中に直接浸漬し、1 日以上保存した。加温は 2°C の冷水中にストローを投入するこ

とにより行い、脱ガラス化を生じないようにストローを撈拌した。凍害保護物質の除去を 4 段階で行う場合は、4℃で 50% VS1 液 3 ml にストロー内の胚を含む全液を回収してそのまま 10 分間、室温で 25% VS1 液に胚を移して 10 分間、そして 12.5% VS1 液に移して 10 分間、静置した。凍害保護物質の除去を 1 段階で行う場合は、室温で 3 ml の HERs 液に胚を直接回収した。

一方、20/40% EFS 液は 20/40%エチレングリコール (和光純薬工業)、18%フィコール (Pharmacia) および 0.3 M シュクロース (和光純薬工業) を含む PB1 液 [147] からなる。2 細胞期胚をいずれかの EFS 液に 30 秒間平衡させた後にプラスチックストロー内の 40 μ l の EFS 液とともに封入した。そしてストローを液体窒素ガス上で 1 分間保持し、その後液体窒素中に浸漬することによりガラス化させた。加温は 20℃の水中にストローを投入することにより急速に行った。そして、ストロー内の胚を含む全液を室温で 0.5 M シュクロースを含む PB1 液 0.8 ml 中に回収してそのまま 5 分間置き、0.25 および 0.125 M のシュクロースを含む PB1 液に 3 分間ずつ胚を移し、その後 PB1 液に静置することにより、凍害保護物質を除去した。

(3) 生存性の検定

回収胚を HERs 液で 3 回洗浄し、実体顕微鏡下での形態に基づきその正常性を判定した。そして形態的に正常と判断された 2 細胞期胚 (Fig. 4-1) をあらかじめ精管結紮雄と交配させておいた偽妊娠 1 日目の受胚雌ラットの卵管内に移植し、その後の胎子あるいは個体発生率を記録した。

(4) 統計的解析

個々の反復実験例において、凍結融解後あるいはガラス化加温後の胚の生存率および移植後の個体発生率をアークサイン変換した後に一元分散分析した。平均値間の有意差の有無は PLSD-test により検定した ($P < 0.05$)。

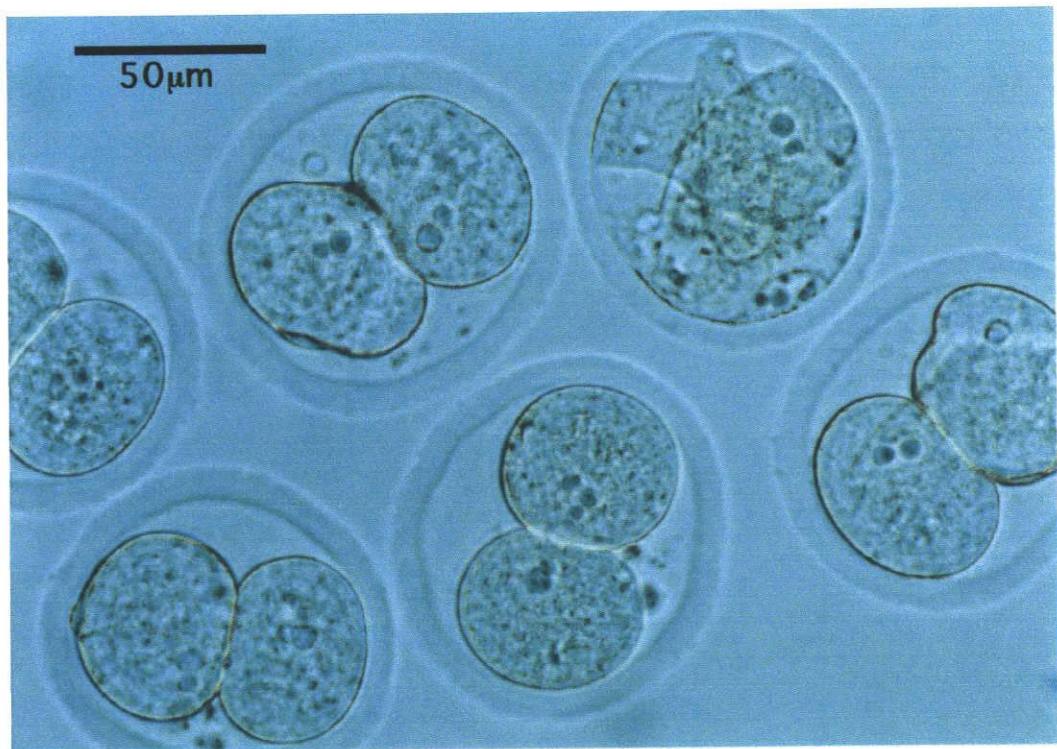


Fig. 4- 1. Two-cell rat embryos after freezing and thawing.

More than 90% of treated embryos appeared to be morphologically normal. Bar represents 50µm.

結 果

ラット 2 細胞期胚を 10% DMSO あるいは 10% 1, 2-プロパンダイオール
の存在下で -30°C まで毎分 0.5、1.0 および 2.0°C の割合で冷却した後に二段
階凍結したとき、いずれの実験群においても 90%以上の胚が正常な形態を有
していた (Table 4-1)。しかし、移植後の個体発生率を DMSO と 1, 2-プロ
パンダイオールの同一冷却速度間で比べたとき、毎分 0.5°C の群で 1, 2-プロ
パンダイオールは 24.0%と有意に低くなった。すべての実験群のなかで個体
発生率が最も高かったのは凍害保護物質に DMSO を用いて毎分 0.5°C で $-$
 30°C まで冷却したときの 66.7%であった。それぞれの凍害保護物質において
冷却速度による発生率の差は認められなかった。

また、2 細胞期胚のガラス化保存液に 90% VS1 液を用いたとき、凍害保護
物質の添加および除去の方法にかかわらず、加温後の形態に差は認められな
かった (生存率 85~92%、Table 4-2)。ガラス化保存胚の移植により受胚
雌の 91% (20/22) において妊娠が成立した。凍害保護物質を 3 段階で添加
して 4 段階で除去した場合、移植胚の 66.7%が産子として得られた。凍害保
護物質を 3 段階で添加して 1 段階で除去した場合でも 59.3%が産子へと発生
したが、添加と除去の両方を 1 段階で行った場合は加温後の胚の形態評価で
は他の群と差がなかったにもかかわらず、個体発生率は 22.4%と有意に低く
なった。後者の実験群では妊娠しなかった受胚雌が 2 匹いたので、これを差
し引いて妊娠雌あたりの個体発生率を計算し直してもなお、凍害保護物質の
添加を段階的に行った群よりも低値であった (29.5%、28/95)。いずれの実
験群からも得られた産子に外見上の異常は認められなかった。

次に 20 および 40%のエチレングリコールを含む EFS 液を用いて 2 細胞期
胚をガラス化保存したところ、それぞれ 92.1 および 76.1%の胚が形態的に
正常に見えた (Table 4-2)。しかし、移植後の個体発生率は 40% EFS 液を
用いた場合にとくに低く (3.1%)、20% EFS 液を用いた場合でもその割合は
20.0%に過ぎなかった。

Table 4-1. *In vivo* survival of 2-cell rat embryos after freezing in DMSO or 1, 2-propanediol.

Cryoprotectant	Cooling rate ¹ (°C/min)	No. (%) of embryos			Developed to fetuses
		Frozen-thawed	Morphologically surviving	Transferred	
DMSO	0.5	56	54 (96.4)	54	36 (66.7) ^a
	1	60	58 (96.7)	58	28 (48.3) ^{ab}
	2	50	45 (90.0)	45	25 (55.6) ^{ac}
1,2-propanediol	0.5	53	50 (94.3)	50	12 (24.0) ^d
	1	78	72 (92.3)	72	32 (44.4) ^{ad}
	2	92	87 (94.6)	87	34 (39.1) ^{bcd}

¹ From -7°C to -30°C.

^{a-d} Significant difference between different superscripts (P<0.05) .

Table 4-2. *In vivo* survival of 2-cell rat embryos after different procedures of vitrification.

Vitrification solution	No. (%) of embryos				
	Addition	Dilution	Vitrified-warmed	Morphologically surviving	Transferred to fetuses
90% VS1	3-step	4-step	75	67(89.3)	42
	3-step	1-step	145	123(84.8)	81
	1-step	1-step	136	125(91.9)	125
EFS (20% EG)	1-step	4-step	38	35(92.1)	35
EFS (40% EG)	1-step	4-step	42	32(76.1)	32

^{a-c} Significant difference between different superscripts (P<0.05) .

考 察

本実験ではまず、二段階凍結法でマウス、ラットおよびウサギ胚において凍害保護効果が報告されている DMSO [75-77] および 1, 2-プロパンダイオール [148、149] を用いて、ラットの 2 細胞期胚の凍結融解後の生存性に及ぼす冷却速度の影響について検討した。凍害保護物質の種類や冷却速度にかかわらず融解胚の形態は 90%以上が正常であったが、移植後の個体発生率には実験群による差が見られた。個体発生率が最も高かったのは凍害保護物質に DMSO を用いて毎分 0.5℃で冷却したときで、1, 2-プロパンダイオールで同じ冷却速度を用いたときと比べて約 3 倍の値であった。胚の耐凍性を論じる場合、発達段階の早い時期、すなわち未受精卵、前核期胚および 2 細胞期胚は 8 細胞期以降の胚に比べて弱いと言われている [150、151]。1, 2-プロパンダイオールの有効性が報告されているのはいずれも 8 細胞期以降の胚であり [148、149]、毎分 0.5℃の冷却速度との組み合わせではラットの 2 細胞期胚にとっては適当な条件ではなかった可能性が高い。しかし、毎分 1℃の冷却速度との組み合わせでは DMSO に匹敵する効果が得られた。

ラット胚をガラス化法で保存することに成功したのは Kono ら [82] が最初で、彼らは胚盤胞期の胚を用いた。本実験では、2 細胞期のラット胚にもガラス化保存法が適用できるということを明らかにした。ガラス化したラット 2 細胞期胚に由来する個体発生率は、桑実胚～胚盤胞をガラス化した場合と同等であった（データは示していない）。

Rall と Fahy の方法 [81] は凍害保護物質の添加および除去を低温（4℃）で段階的に行うという煩雑さが指摘されている。中潟 [152] は VS1 液に修正を加えることにより凍害保護物質の添加を室温で直接行える、マウス 4 細胞期胚のガラス化保存法を報告した。ラット胚を用いた本実験では凍害保護物質の除去を室温で 1 段階で行った場合の個体発生率は 4 段階で除去した場合と同等であり、90% VS1 液からの凍害保護物質の除去行程はその後の胚の生存性に影響を及ぼさなかった。しかし、凍害保護物質の添加を 1 段階で行

った場合は移植後の個体発生率が低く、胚の機能に何らかの支障をきたしていることが示唆された。

VS1 液は胚に対する毒性が非常に強く、その保護効果を失うことなく良好な蘇生率を得るには VS1 濃度と処理温度を下げる 것이重要である。Rall [144] はグリセリンとプロピレングリコールの混合液 (VS2) や 1, 2-プロパンダイオールとプロピレングリコールの混合液 (VS3) を開発し、マウス胚のより高い蘇生率を報告している。このように既知の凍害保護物質の中で低毒性のものを選択し、それらの組み合わせによる新しいガラス化保存液が模索されてきた。本実験で比較した他の一つのガラス化保存液 (EFS) はマウスの受精卵であれば 40～99%の体外生存率が得られている。ラットの桑実胚を用いた予備試験では、エチレングリコールの濃度が 20%のとき胚盤胞へと發育できた胚の割合が最も高く (88%)、Kasai ら[146] の原法である 40% EFS 液とともに 2 細胞期ラット胚への適用を試みた。しかし、加温後の形態は良好であったにもかかわらず、3～20%の個体発生率しか得られなかった。ウサギ胚ではガラス化時の發育段階はそれらの蘇生率に影響を及ぼす要因であることが報告されており [83]、ラット胚でも發育段階によってもガラス化保存液の毒性に対する感受性が違っているのかもしれない。

第 3 節 凍結融解に由来するトランスジェニックラット胚の 発生能ならびに遺伝子伝達性

材料と方法

(1) 供試胚

第 2 章第 2 節で作出したトランスジェニックラットのうち、b α LA/ hGH、b β CN/ hGH および b α S1CN/ hGH 遺伝子をもつ、それぞれ 3、4 および 3 ラインを使用した。それぞれの系統の G1 雄を 8～13 週齡の野生型 Wistar 系

雌ラットと交配した。この胚ドナーの雌ラットには、本章前節と同じ方法であらかじめ過剰排卵を誘起しておいた。翌日に膣栓の有無によって交配の成立を確認し、hCG 投与から 44～50 時間後に摘出した卵管を HERs 液で灌流して 2 細胞期胚を採取した。回収胚は HERs 液で 3 回洗浄した後に実験に供した。

(2) 胚の凍結保存と生存性評価

胚の凍結保存は本章第 2 節に記した二段階凍結法によって行った。凍結媒液は 10% DMSO を含む HERs 液とし、胚を凍結媒液に室温で 10～15 分間平衡させてから 0.25 ml 容量のプラスチックストロー内に 0.2 ml の凍結媒液とともに封入した。そして、あらかじめ 0℃に冷却しておいたプログラムフリーザー (ET-1: 富士平工業) のアルコール液槽内にストローを置き、-7℃まで 1.0℃/ 分の速度で冷却し、植氷した。その温度で 10 分間保持してから -30℃までを 0.5℃/ 分で冷却した後、ストローを液体窒素中に浸漬した。液体窒素タンクでの保存期間は 2～4 年間とした。融解は 37℃の温水中で急速に行い、胚を凍結媒液とともに 0.8 ml の HERs 液中に回収してそのまま 10 分間静置した。回収胚は HERs 液で 3 回洗浄した後、実体顕微鏡下で観察して生存率を求めた。そして精管結紮雄と交配させた偽妊娠 1 日目の受胎雌の卵管内に形態的に良好な胚のみを移植し、個体発生率を調べた。

(3) 外来遺伝子の伝達とその発現検定

凍結融解胚の移植によって得られた産子における外来遺伝子の有無は第 2 章第 2 節で述べた方法に従って検定した。すなわち、離乳後の産子の尻尾から DNA を抽出し、PCR により外来遺伝子の配列の一部を増幅させた。また、泌乳期 (分娩後 10 日目) におけるラット乳中に分泌されている hGH 量は、ELISA kit (Gibco) を用いて測定した。

(4) 統計的解析

個々の反復実験例において、凍結融解胚の生存率および移植後の個体発生率をアークサイン変換した後に一元分散分析した。平均値間の有意差の有無は PLSD-test により検定した ($P<0.05$)。

結 果

トランスジェニックラット由来 2 細胞期胚の凍結融解後の生存性を Table 4-3 に示した。回収胚のうち実体顕微鏡下で正常形態を維持していると判定された胚の割合は、 $b\alpha LA/hGH$ 、 $b\beta CN/hGH$ および $b\alpha S1CN/hGH$ の群でそれぞれ、92.2、91.8 および 88.2% といずれも高値を示した。外来遺伝子の種類やライン間で有意差は認められず、また対照群の凍結融解胚の生存率 (94.6%) との間にも有意差は認められなかった。胚移植した受胎雌のすべてにおいて妊娠が成立し、 $b\alpha LA/hGH$ 、 $b\beta CN/hGH$ および $b\alpha S1CN/hGH$ の群でそれぞれ、64.4、67.6 および 67.6% の胚が産子へと発生した。これらの割合にも対照群の凍結融解胚の発生率 (60.4%) との間に有意差は認められなかった。さらに、凍結融解していない新鮮 2 細胞期胚の移植後の産子発生率 (69.2%) とも有意差は認められなかった。

トランスジェニックラット由来の凍結融解胚を移植して得られた産子において検出された外来遺伝子の割合 (伝達率) を Table 4-4 に示した。メンデルの法則に基づく期待値 (50%) と比べると少し低い値 (11.4~46.7%、平均 32.4%) で外来遺伝子が伝達されていた。一方、凍結融解に由来しない場合の外来遺伝子の伝達率は 40.0~56.0% (平均 48.3%) であった。

$b\alpha S1CN/hGH$ を導入した #311-6 ラインにおいて、凍結融解胚由来の G2 産子の乳中には G0 と同オーダーの hGH が分泌されていた (G2 の乳中 hGH 濃度 1.2 mg/ml に対し、G0 の乳中 hGH 濃度 6.5 mg/ml)。この凍結融解胚由来の G2 産子の次世代の G3 トランスジェニックラット 2 匹においては 2.9 mg/ml および 5.6 mg/ml の hGH が乳中に分泌されていた。

Table 4-3. *In vivo* survival of transgenic rat embryos after freezing and thawing.

Transgene	Line	No. (%) of embryos		
		Frozen-thawed	Morphologically surviving	Developed to pups
b α LA/hGH	#222-9	55	51 (92.7)	30 (58.8)
	#223-3	48	47 (97.9)	35 (74.5)
	#226-4	25	20 (80.0)	11 (55.0)
	total	128	118 (92.2)	76 (64.4)
b β CN/hGH	#211-2	42	41 (97.6)	29 (70.7)
	#213-2	60	52 (86.7)	35 (67.3)
	#213-3	50	47 (94.0)	32 (68.1)
	#219-2	43	39 (90.7)	25 (64.1)
	total	195	179 (91.8)	121 (67.6)
b α S1CN/hGH	#305-1	30	26 (86.7)	18 (69.2)
	#308-5	27	26 (96.3)	15 (57.7)
	#311-6	62	53 (85.5)	38 (71.7)
	total	119	105 (88.2)	71 (67.6)
Control	Frozen-thawed	112	106 (94.6)	64 (60.4)
	Nonfrozen	—	107 (100)	74 (69.2)

Table 4-4. Transmission of the transgene to newborn pups derived from frozen-thawed transgenic rat embryos.

Transgene	Line	No. (%) of newborn pups derived from			
		Frozen embryos		Natural mating	
		Examined	With transgene	Examined	With transgene
b α LA/hGH	#222-9	30	14(46.7)	9	6(66.7)
	#223-3	35	14(40.0)	—	—
	#226-4	11	3(27.3)	16	8(50.0)
	sub total	76	31(40.8)	25	14(56.0)
b β CN/hGH	#211-2	29	11(37.9)	—	—
	#213-2	35	4(11.4)	—	—
	#213-3	32	8(25.0)	10	4(40.0)
	#219-2	25	5(20.0)	—	—
	sub total	121	28(23.1)	10	4(40.0)
b α S1CN/hGH	#305-1	18	7(38.9)	27	12(44.4)
	#308-5	15	7(46.7)	28	15(53.6)
	#311-6	38	9(23.7)	23	8(34.8)
	sub total	71	23(32.4)	78	35(44.9)
total		268	82(30.6)	113	53(46.9)

^{a, b} Different superscripts within a row denote significant differences (P<0.05).

考 察

現在、国内外を問わずトランスジェニック動物の研究者間での分与や業者による販売が開始されるようになってきた。しかしながら、トランスジェニック動物を用いた動物実験は組換え DNA 実験指針に示されている非常に厳しい制約環境下で行うことを余儀なくされている。このような環境下で動物を維持、繁殖することは莫大な費用がかかるのみならず、動物の管理者にもかなりの負担を強いている現実がある。トランスジェニック動物の系統維持に初期胚の凍結保存技術を適用すれば経費や労力の節約のみならず遺伝的変化や微生物等による感染防止も期待できるが、トランスジェニック動物に由来する胚から凍結融解後に発生させた産子における外来遺伝子の安定性についての報告は少ない。安斎ら [64] は 2 系統のトランスジェニックマウスに由来する 2 細胞期胚を超急速凍結し、融解胚から発生させたマウスに外来遺伝子の存在を確認した。

トランスジェニックラット由来の前核期胚についても融解・移植後に発生したラットに外来遺伝子の存在とその発現が確認されている [65] が、個体発生率はマウスの場合と比べてかなり低い値であった。本実験ではトランスジェニックラット由来の 2 細胞期胚を 2～4 年間にわたって長期保存しても融解後の胚の生存性および移植後の個体への発生能を失わないことを明らかにした。これは本実験で使用した二段階凍結法が疾患モデルラットのみならずトランスジェニックラットにも適用可能な汎用性が高い方法であるということを示している。

凍結融解胚由来の産子への外来遺伝子の伝達率はメンデルの法則からの期待値である 50%よりも低く、用いた 10 ラインの平均は 31.8%の伝達率であった。安斎ら [64] はラット成長ホルモンのアンチセンス遺伝子を導入したトランスジェニックマウス由来の胚を凍結融解し、移植後に発生させたマウスでの外来遺伝子の伝達率は 33.3% (5/15) であったと報告している。一方、Selden ら [153] はヒト成長ホルモン遺伝子を 1 コピー導入したトランスジ

ジェニックマウスから G1 および G2 世代への外来遺伝子の伝達率はおよそ 50%であったと報告している。本実験で用いたトランスジェニックラットのうち G0 と G1 の導入コピー数に変動がない (モザイクではない) ラインにおいて、交配実験による G0 から G1 への外来遺伝子の伝達率は期待値の 50%に近い 48.3%という平均値であったことから、凍結融解処理がトランスジェニック胚の発生に何らかの影響を与えた可能性が示唆された。

胚移植後の発生率は対照群と差がなかったことから、ひとつの可能性として凍結融解処理によってトランスジェニック胚の発生速度は遅くなり、子宮内で他のラット胚との競合に負けてしまったのかもしれない。その受胎雌から分娩可能な産子の数が運命づけられているのであれば、結果的に生まれた産子に占めるトランスジェニックラットの割合は 50%を割り込んでしまうことになる。このような現象が成長ホルモン以外の遺伝子を導入した凍結融解胚についても起こるかどうかについては、さらなる検討が必要である。また、このような問題を回避するためには、保存しようとするトランスジェニックラット系統の外来遺伝子をホモ化し、得られるすべての胚がトランスジェニック胚になるようにすればよい。一方、凍結保存胚由来のトランスジェニックラットにおける外来遺伝子は、個体間で若干の差はあるものの、世代を重ねても同一オーダーで安定して発現されていた。このことは、個体レベルで蘇生してきた外来遺伝子は凍結融解過程によって影響を受けず、もとのトランスジェニックラットに付与された機能を維持していたということを示す。したがって、本実験で用いた 10% DMSO を凍害保護物質とし、 -30°C までを冷却脱水温度域とする胚の二段階凍結技術は、トランスジェニックラット系統の維持方法のひとつとして非常に有効であると結論づける。

第4節 小 括

本章ではまず、野生型ラットに由来する 2 細胞期胚を二段階凍結法およびガラス化法を用いて保存し、融解後の胚の生存性および個体発生能について調べた。2 細胞期胚を 10% DMSO あるいは 10% 1, 2-プロパンダイオールが存在下で -30°C まで毎分 0.5 、 1.0 および 2.0°C の割合で冷却した後に二段階凍結したとき、いずれの実験群においても 90% 以上の胚が正常な形態を有していたが、移植後の個体発生率は 1, 2-プロパンダイオールを凍害保護物質にして毎分 0.5°C で冷却したときに他の群よりも有意に低くなった。すべての実験群のなかで個体発生率が最も高かったのは凍害保護物質に DMSO を用いて毎分 0.5°C で冷却したときの 66.7% であった。1, 2-プロパンダイオールの有効性が報告されているのはいずれも 8 細胞期以降の胚であり、毎分 0.5°C の冷却速度との組み合わせではラットの 2 細胞期胚にとっては適当な条件ではなかったのかもしれない。

ここではさらに、2 細胞期のラット胚にもガラス化保存法が適用できるということを明らかにした。ガラス化保存液に 90% VS1 液を用いたとき、凍害保護物質の添加および除去の方法にかかわらず、加温後の形態に差は認められなかった。凍害保護物質を 3 段階で添加して 4 段階で除去した場合、移植胚の 66.7% が産子として得られた。凍害保護物質を 3 段階で添加して 1 段階で除去した場合でも 59.3% が産子へと発生したが、添加と除去の両方を 1 段階で行った場合は加温後の胚の形態評価では他の群と差がなかったにもかかわらず、個体発生率は 22.4% と有意に低くなった。このように 90% VS1 液からの凍害保護物質の除去行程はその後の胚の生存性に影響を及ぼさなかった。また、20 および 40% のエチレングリコールを含む EFS 液を用いて 2 細胞期胚をガラス化保存したところ、それぞれ 92.1 および 76.1% の胚が形態的に正常に見えたが、移植後の個体発生率は 40% EFS 液を用いた場合にとくに低く (3.1%)、20% EFS 液を用いた場合でもその割合は 20.0% に過ぎなかった。

ウサギではガラス化時の胚の発育段階はそれらの蘇生率に影響を及ぼす要因であることから、ラット胚でも発育段階によってもガラス化保存液の毒性に対する感受性が違っているのかもしれない。

次に、hGHを乳中に分泌するトランスジェニックラットに由来する2細胞期胚を二段階凍結して2～4年間保存し、融解胚の個体発生能に加えて、外来遺伝子の伝達性、ならびにhGHの発現を調べた。b α LA/hGH、b β CN/hGHおよびb α S1CN/hGHを導入したラットを各3、4および3ライン使用し、10% DMSOを凍害保護物質として二段階凍結を行ったところ、生存率はそれぞれ、92.2、91.8 および 88.2%と高値を示した。外来遺伝子の種類やライン間で有意差は認められず、また、対照群の凍結融解胚の生存率 (94.6%) との間にも有意差は認められなかった。b α LA/hGH、b β CN/hGH および b α S1CN/hGHの群でそれぞれ、64.4、67.6 および 67.6%の胚が移植後に産子へと発生し、この割合も対照群のそれ (60.4%) と差は認められなかった。また、凍結融解していない新鮮2細胞期胚の移植後の産子発生率 (69.2%) とも差は認められなかった。このように、トランスジェニックラット由来の2細胞期胚を2～4年間にわたって長期保存しても、融解後の胚の生存性および移植後の個体への発生能を失わないことを明らかにした。

トランスジェニックラット由来の凍結融解胚を移植して得られた産子において検出された外来遺伝子の割合 (伝達率) は、メンデルの法則に基づく期待値 (50%) と比べると少し低い値 (32.4%) であった。一方、凍結融解に由来しない場合の外来遺伝子の伝達率は平均 48.3%であった ($P<0.05$)。このことから、凍結融解処理がトランスジェニック胚の発生に何らかの影響を与えた可能性が示唆された。また、b α S1CN/hGHを導入した#311-6ラインにおいて、凍結融解胚由来のG2産子の乳中にはG0と同オーダー (mg/ml レベル) のhGHが分泌されていた。以上の結果より、本実験で使用した二段階凍結法はトランスジェニックラットシステムの維持方法のひとつとして有効なものであると思われる。

第 5 章 総 括

近年の分子生物学ならびに発生工学の進歩は、遺伝子のクローニングやその組換え体の取得を容易にした。それらの遺伝子の機能を正常な個体発生の過程において調べるため、外来遺伝子の導入によって新しい遺伝形質を獲得させたトランスジェニック動物が利用されている。このトランスジェニック技術はヒトの疾患モデル動物の作出や家畜改良の手段としても使われていることに加えて、医学的に有用な外来遺伝子産物の生産工場（アニマルバイオリアクター）としても利用されうる。

本研究ではまず、乳腺を遺伝子発現の標的部位としたトランスジェニックラットを作出し、乳タンパク質遺伝子のプロモーターによってラットへの外来遺伝子の導入効率がどのように影響されるかを調べた（第 2 章第 2 節）。ウシおよびマウスの乳タンパク質（ウシ α ラクトアルブミン = $b\alpha LA$ 、ウシ β カゼイン = $b\beta CN$ 、ウシ $\alpha S1$ カゼイン = $b\alpha S1 CN$ 、ウシ κ カゼイン = $b\kappa CN$ 、マウスホエー酸性タンパク質 = $mWAP$ ）遺伝子のプロモーター領域とヒト成長ホルモン（ hGH ）の構造遺伝子を融合させた、 $b\alpha LA/hGH$ 、 $b\beta CN/hGH$ 、 $b\alpha S1 CN/hGH$ 、 $b\kappa CN/hGH$ および $mWAP/hGH$ の 5 種類の融合遺伝子を構築して Wistar 系ラットの前核期胚に顕微注入した。顕微注入後の胚の生存率、移植後の個体発生率およびトランスジェニックラットの作出効率において用いた 5 種類のプロモーターによる差は見いだせなかった。顕微注入ラット胚の個体発生率および産子あたりのトランスジェニックラットの割合は、マウスで報告されている値と比べても顕著な差はなかったが、外来遺伝子を顕微注入後に正常な形態を維持していたラット胚の割合はマウスの場合と比べて有意に低かった。これはラットの受精卵は細胞膜が脆弱であるにもかかわらず前核は弾性に富んでおり、外からの物理的な刺激に対して抵抗性が低いということで説明される。トランスジェニックラットへ組み込まれた外来

遺伝子のコピー数にプロモーターの違いによる偏りは認められなかった。外来遺伝子の次世代への伝達率にも外来遺伝子の種類による顕著な差はなかったが、理論的伝達率の 50% よりもかなり低い例が多かったことは、これらのラットには外来遺伝子がモザイクとして個体内に存在していた可能性が示唆された。

さらに、トランスジェニックラットの作出効率に影響を及ぼす要因を解析することを目的に、42 種類の直鎖状外来遺伝子を構築してラット前核期胚に顕微注入した (第 2 章第 3 節)。外来遺伝子を構成するプロモーター、構造遺伝子、鎖長および両端の構造に基づいて分類してトランスジェニックラットの作出効率を比較したが、いずれの要因によっても分類した群の間で有意な差は認められなかった。また、注入する外来遺伝子溶液 (=b α S1CN/CSF) の濃度は 0.5~50 μ g/ml の範囲では顕微注入胚の生存性に影響を与えなかったが、移植後の個体発生率は外来遺伝子溶液の濃度が増加するにつれて有意に低下した。

一方、トランスジェニックラットの作出効率は 5 μ g/ml の外来遺伝子溶液を顕微注入したときに最も高い値が得られたが、25 および 50 μ g/ml の濃度群では 1 匹のトランスジェニックラットも得られず、このことは顕微注入された高濃度の外来遺伝子溶液が、胚が個体へと発生する過程で何らかの毒性を与えたことを示唆している。さらに、系統が異なるラットの前核期胚に外来遺伝子溶液 (=b α S1CN/hGH) を顕微注入したところ、胚の生存率にラットの系統差は認められなかったが、LEW 系統の個体発生率およびトランスジェニックラットの作出効率は Wistar および DA 系統のそれに比べて低い傾向があった。一般的にトランスジェニック動物の作出にはクローズドコロニーあるいは交雑系の動物を用いているが、遺伝的背景が均一な近交系を用いたほうがその後の解析が容易になると思われる。近交系由来のラット胚は顕微注入操作に対してとくに弱いというわけではなく、個体発生率およびトランスジェニックラットの作出効率はむしろ、それぞれのラット系統の繁殖特性に関連していると思われる。

次に、第2章第2節で作出した乳中へ hGH を分泌するように設計した融合遺伝子を導入したトランスジェニックラットを用い、hGH の乳中への分泌を支配、制御するプロモーターの機能を比較した (第3章第2節)。乳の採取が可能であったラットのうち b α LA/hGH、b β CN/hGH および mWAP/hGH 系統のラットでは 80%以上、そして b α S1CN/hGH 系統のラットでは 33%において検出限界よりも多い 0.05 μ g/ml 以上の hGH を乳中に検出した。b α LA/hGH、b β CN/hGH、b α S1CN/hGH および mWAP/hGH 系統のトランスジェニックラットの乳中における hGH の濃度はそれぞれ、1~4,360 μ g/ml、0.1~10,900 μ g/ml、87~6,480 μ g/ml および 7~151 μ g/ml の範囲であった。一方、b κ CN/hGH 系統のラットにおいては乳中に hGH を分泌しているものは 1 例もなかった。いくつかのラインにおいては元々由来する動物においてそのプロモーターが制御して乳中に生産する乳タンパク質の濃度と同等かもしくはそれ以上のレベルで hGH を分泌していた。これらのトランスジェニックラットでは血清からも hGH が検出され、発育の顕著な亢進や繁殖上の異常が見られた。さらに、mWAP/hGH 系統の 95%の雌ラットの血清中からも hGH が検出され、その半数以上の個体では腹部に脂肪が異常に蓄積していた。b κ CN/hGH 系統のラットにおいても 73%においてそれらの血清から hGH が検出された。構造遺伝子産物である hGH の乳中分泌量とトランスジェニックラットに見られた繁殖上の異常や不都合を考えたとき、乳中に外来遺伝子産物を分泌させるためには b α S1CN 遺伝子のプロモーターが最も適切であると判断される。

次に、外来遺伝子産物を泌乳期に生産するトランスジェニック動物を早期に選抜する方法を確立するため、新生子ラットの乳腺における外来遺伝子の発現を調べた (第3章第3節)。このために、b α S1CN 遺伝子のプロモーターの制御により hGH を乳中に分泌しているトランスジェニックラットの G3 世代 (高分泌ライン：1,190~6,480 μ g/ml、中分泌ライン：87 μ g/ml、非分泌ライン：0.5 ng/ml 以下) を用いた。高分泌ラインのラットでは、そ

の性別にかかわらず、出生後すぐ（0～24 時間目まで）に調製した乳腺の抽出物より 1.5～5.7 ng/mg の hGH が検出された。これはヒトやヤギで報告されている出生直後に分泌される乳に似た分泌物 "Witch's Milk (奇乳)" がラットにも存在し、その中に外来遺伝子産物が分泌されていた結果と思われる。

一方、中分泌ラインおよび非分泌ラインの新生子ラットの乳腺抽出物からは hGH は検出できなかった。また、高分泌ラインの新生子ラットの乳腺における外来遺伝子の発現は hGH 遺伝子の mRNA の存在によっても確認された (RT-PCR による)。中分泌ラインにおいては RT-PCR のサイクル数を 30 から 40 に増加したときに hGH 遺伝子の mRNA が検出できた。この結果は外来遺伝子由来のタンパク質もその mRNA も外来遺伝子を導入されている新生子の乳腺において検出可能であることを示しており、目的のトランスジェニック動物を選抜するための時間（飼育期間）を大幅に短縮する方法として期待できる。

今日のようにトランスジェニック技術が適用可能な動物種が実験小動物から大型家畜にまで普及してくると、トランスジェニック動物の系統維持を初期胚や精子のレベルでの凍結保存に委ねる必要性が生じてくる。ヒトの疾患モデルラットの場合は二段階凍結法で凍結保存した胚を移植によって蘇生させても疾患形質を失わないことが確認されているが、遺伝子を人工的に付加したトランスジェニック動物由来の凍結保存胚から発生した産子における外来遺伝子の安定性については情報が少ない。そこでまず、野生型ラットに由来する 2 細胞期胚を二段階凍結法およびガラス化法を用いて保存し、融解後の胚の生存性および個体発生能について調べた (第 4 章第 2 節)。2 細胞期胚を DMSO あるいは 1, 2-プロパンダイオールが存在下で -30℃ まで毎分 0.5～2.0℃ の速度で冷却した後に液体窒素中に浸漬したとき、いずれの実験群においても 90% 以上の胚が正常な形態を有していたが、移植後の個体発生率は 1, 2-プロパンダイオールを凍害保護物質として毎分 0.5℃ で冷却したときに有意に低かった。1, 2-プロパンダイオールの有効性が報告されているの

は胚が 8 細胞期以降に発育していた場合であり、毎分 0.5℃の冷却速度との組み合わせではラットの 2 細胞期胚にとっては適当な条件ではなかった可能性が高い。一方、ガラス化保存液に VS1 液を用いたとき、凍害保護物質の添加および除去の方法にかかわらず加温後の胚の形態に差は認められなかった。凍害保護物質を 3 段階で添加して、1 あるいは 4 段階で除去した場合は移植胚の 59～67%が産子として得られたが、添加と除去の両方を 1 段階で行った場合は、加温後の胚の形態評価では他の群と差がなかったにもかかわらず、個体発生率は 22%と有意に低かった。このように、VS1 液からの凍害保護物質の除去行程はその後の胚の生存性に影響を及ぼさなかった。また、EFS 液を用いて 2 細胞期胚をガラス化保存したところ 76～92%の胚が形態的に正常に見えたが、移植後の個体発生率は 3～20%と低かった。このように 2 細胞期のラット胚にも二段階凍結法に劣らない効率でガラス化保存法 (VS1 液での段階添加群) を適用できることが明らかとなった。

次に、hGH を乳中に分泌するトランスジェニックラットに由来する 2 細胞期胚の凍結保存を試みた (第 4 章第 3 節)。b α LA/ hGH、b β CN/ hGH および b α S1 CN/ hGH 遺伝子を導入したラットを各 3、4 および 3 ライン使用し、DMSO を凍害保護物質としてそれらの胚を二段階凍結した。2～4 年間の保存後に融解したところ、約 90%の胚が形態的に生存していた。外来遺伝子の種類やライン間で有意な差は認められず、対照群の凍結融解胚の生存率とも差は認められなかった。b α LA/ hGH、b β CN/ hGH および b α S1 CN/ hGH の群でそれぞれ、64、68 および 68%の胚が移植後に産子へと発生した。この割合も対照群の 60%と差がなく、凍結融解していない新鮮 2 細胞期胚の移植後の個体発生率 (69%) にも劣らなかった。このように、トランスジェニックラット由来の 2 細胞期胚を長期間保存しても、融解後の胚の生存性および個体への発生能を失わないことが明らかになった。しかし、トランスジェニックラット由来の凍結融解胚を移植して得られた産子において検出された外来遺伝子の割合 (伝達率) は 32%で、非凍結融解胚の外来遺伝子の伝達率 (平均 48%) との間に有意な差が認められた。これは、凍結融解処理によってトラ

ンスジェニック胚の発生過程に何らかの影響を与えた可能性が示唆された。

一方、発現量に関しては凍結融解胚由来の G2 産子の乳中に G0 と同オーダー (mg/ml レベル) の hGH が分泌されていた。このように、二段階凍結法によってトランスジェニックラット系統を確実に維持 (保存) できることが示された。

結論として、(1) 乳腺発現系のトランスジェニックラットは常法の顕微注入法により作出可能で、トランスジェニックラットの作出効率には外来遺伝子の違いによる影響は見られない、(2) トランスジェニックラットにおける外来遺伝子の発現は用いたプロモーター領域によって支配されており、乳腺での発現検定は新生子の段階でも可能である、(3) トランスジェニックラット由来の 2 細胞期胚は二段階凍結法によって凍結保存でき、蘇生したラットには元来の外来遺伝子の発現レベルも保存されている。これらの結果は、トランスジェニック動物を外来遺伝子産物の大量生産に利用しようとする産業分野において非常に有用な基礎的知見を与えるものである。

謝 辞

本論文を草するにあたり終始温かい御指導と御教示を賜りました、名古屋大学 生物分子応答研究センター 北川 泰雄 教授に対し、深甚の謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり格別なご配慮を頂いた (株) ワイエスニューテクノロジー研究所 代表取締役 繁田 晴美 氏ならびに(株)ワイエスニューテクノロジー研究所 取締役研究所長 上田 正次 博士に深く感謝いたします。

研究の細部にわたり絶えず有意義な御指導と適切な助言を頂きました、信州大学 繊維学部 保地 真一 博士ならびに雪印乳業株式会社 二宮 隆博士に心から御礼申し上げます。

さらに、本研究の実施にあたり絶大なご協力とご支援を頂いた(株)ワイエスニューテクノロジー研究所 分子生物学研究室長 鈴木 高成 博士をはじめ、発生生物学研究室ならびに分子生物学研究室内の諸兄に感謝します。

参考文献

- [1] フィリップ・レダー、ティモシ・エイ・スチュアート. 特公昭 61-81743 (1986).
- [2] 林 衆治、小池 千裕、磯部 健一、横山 逸男、高木 弘. ヒト補体制御因子遺伝子を用いた異種臓器移植の研究. *日本臨床* **52**: 258-269 (1994).
- [3] Rosengard, A. M., Cary, N. R. B., Langford, G. A., Tucker, A. W., Wallwork, J., and White, D. J. D. Tissue expression of human complement inhibitor, Decay-accelerating factor, in transgenic pigs. *Transplantation* **59**: 1325-1333 (1995).
- [4] Pursel, V. G. Pinkert, C. A., Miller, K. F., Bolt, D. J., Campbell, R. G., Palmiter, R. D., Brinster, R. L., and Hammer, R. E. Genetic engineering of livestock. *Science* **244**: 1281-1288 (1989).
- [5] Martin, P., and Grosclaude, F. Improvement of milk protein quality by gene technology. *Livestock Production Science* **35**: 95-115 (1993).
- [6] Shani, M. Tissue-specific and developmentally regulated expression of a chimeric actin-globin gene in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2624-2631 (1986).
- [7] Shani, M., Dekei, I., and Yoffe, O. Expression of the rat myosin light-chain 2 gene in transgenic mice: Stage specificity, developmental regulation, and interrelation with endogenous gene. *Mol. Cell Biol.* **8**: 1006-1009 (1988).
- [8] Powell, B. C., Walker, S. K., Bawden, C. S., Sivaprasad, A. V., and Rogers, G. E. Transgenic sheep and wool growth; possibilities and current status. *Reprod. Fert. Dev.* **6**: 615-623 (1994).

- [9] Wall, R. J., Pursel, V. G., Shamay, A., McKnight, R. A., Pittius, C. W., and Hennighausen, L. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1696-1700 (1991).
- [10] Velander, W. H., Johnson, J. L., Page, R. L., Russell, C. G., Subramanian, A., Wilkins, T. D., Gwazdauskas, F. C., Pittius, C. and Drohan, W. N. High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 12003-12007 (1992).
- [11] Ebert, K. M., Selgrath, J. P., DiTullio, P., Denman, J., Smith, T. E., Memon, M. A., Schindler, J. E., Monastersky, G. M., Vitale, J. A., and Gordon, K. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goat and analysis of expression. *Bio/technology* **9**: 835-838 (1991).
- [12] Clark, A. J., Bessos, H., Bishop, J. O., Brown, P. Harris, S., Lathe, R., McClenaghan, M., Prwse, C., Simons, J. P., Whitelaw, C. B. A., and Wilmut, I. Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. *Bio/technology* **7**: 487-492 (1989).
- [13] McClenaghan, M., Archibald, A. L., Harris, S., Simons, J. P., Whitelaw, C. B. A., Wilmut, I., and Clark, A. J. Production of human α 1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep and mice: targeting expression of cDNA sequences to the mammary gland. *Anim. Biotech.* **2**: 161-176 (1991).

- [14] Biery, K. A., Bondioli, K. R., and DeMayo, F. J. Gene transfer by pronuclear injection in the bovine. *Theriogenology* **29**: 224 (1988, Abstr.).
- [15] Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., and Ruddle, F. H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7380-7384 (1980).
- [16] Hochi, S. Ninomiya T, Honma M, and Yuki A. Successful production of transgenic rats. *Anim. Biotech.* **1**: 175-184 (1990).
- [17] Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad Jr, C. E., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. Production of transgenic rabbits, sheep and pig by microinjection. *Nature* **315**: 680-683 (1985).
- [18] Zijlstra, M., Li, E., Sajjadi, F., Subramani, S., and Jaenisch, R. Germ-line transmission of a disrupted $\beta 2$ -microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* **342**: 435-438 (1989).
- [19] van der Putten, H., Bottern, F. M., Miller, A. D., Rosenfeld, M. G., Fan, H., Evans, R. M., and Verma, I. M. Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6148-6152 (1985).
- [20] Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V. M., Dolci, S., Farace, M. G., and Spadafora, C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic information of mice. *Cell* **57**: 717-723 (1989).
- [21] Brinster, R. L., Sandgren, E. P., Behringer, R. R., and Palmiter, R. D. No simple solution for making transgenic mice. *Cell* **59**:

239-241 (1989).

- [22] Sperandio, S., Lulli, V., Bacci, M. L. Forni, M., Maione, B., Spadafora, C., and Lavitrano, M. Sperm-mediated DNA transfer in bovine and swine species. *Anim. Biotech.* **7**: 59-77 (1996).
- [23] Schellander, K., Peli, J., Schmoll, F., and Brem, G. Artificial insemination in cattle with DNA-treated sperm. *Anim. Biotech.* **6**: 41-50 (1995).
- [24] Wall, R. J. Transgenic livestock: Progress and prospects for the future. *Theriogenology* **45**: 57-68 (1996).
- [25] Ogawa, S., Hayashi, K., Tada, N., Sato, M., Kurihara, T., and Iwaya, M. Gene expression in blastocysts following direct injection of DNA into testis. *J. Reprod. Dev.* **41**: 379-382 (1995).
- [26] Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Yagle, M. K., and Palmiter, R. D. Factors affecting the efficiency of introduction foreign DNA into mice by microinjection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4438-4442 (1985).
- [27] Mullins, J. J., Peters, J., and Ganten, D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse *Ren-2* gene. *Nature* **344**: 541-544 (1990).
- [28] Ganten, D., Wagner, J., Zeh, K., Bader, M., Michel, J. B., Paul, M., Zimmermann, F., Ruf, P., Hilgenfeldt, U., Ganten, U., Kaling, M., Bachmann, S., Fukamizu, A., Mullins, J. J. and Murakami, K. Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7806-7810 (1992).
- [29] Kajiwara, N., Sugiyama, F., Goto, Y., Sugiyama, Y., Fukamizu, A., Uehara, S., Sugiyama, K., Murakami, K., Hokao, R., Akahori, F.,

- and Yagami, K. Production of transgenic rats using pregnant and pseudopregnant rats prepared at a breeding farm. *Exp. Anim.* **42**: 463-466 (1993).
- [30] Hammer, R. E., Maika, S. D., Richardson, J. A., Tang, J-P., and Taurog, J. D. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human β_2m : an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* **63**: 1099-1112 (1990).
- [31] Matsumoto, K., Kakidani, H., Takahashi, A., Nakagata, N., Anzai, M., Matsuzaki, Y., Takahashi, Y., Miyata, K., Utsumi, K., and Iritani, A. Growth retardation in rats whose growth hormone gene expression was suppressed by antisense RNA transgene. *Mol. Reprod. Dev.* **36**: 53-58 (1993).
- [32] Ikeda, A., Matsuyama, S., Nishihara, M., Tojo, H., and Takahashi, M. Changes in endogenous growth hormone secretion and onset of puberty in transgenic rats expressing human growth hormone gene. *Endocrin. J.* **41**: 523-529 (1994).
- [33] Swanson, M. E., Hughes, T. E., St Denny, I., France, D. S., Paterniti Jr, J. R., Tapparelli, C., Gfeller, P., and Bürki, K. High level expression of human apolipoprotein A-I in transgenic rats raises total serum high density lipoprotein cholesterol and lowers rat apolipoprotein A-I. *Transgenic Res.* **1**: 142-147 (1992).
- [34] Charreau, B., Tesson, L., Buscail, J., Soullillou, J-P., and Anegon, I. Analysis of human CD59 tissue expression directed by the CMV-IE-1 promoter in transgenic rats. *Transgenic Res.* **5**: 443-450 (1996).

- [35] 結城 惇、保地 真一. トランスジェニック動物. 新生化学実験口座 19. 東京化学同人. 309-313 (1991).
- [36] Du, Z. T., Kallincos, N., Wallace, J. S., Owens, P., and Seamark, R. F. Expressive patterns of a metallothionein-porcine growth hormone gene in transgenic rats. *In Abstracts of the 35th Meeting of the Endocrine Society of Australia*. 47 (1992).
- [37] Smith, S. M., Lechago, J., Wines, D. R., Macdonald, R. J., and Hammer R. E. Tissue-specific expression of kallikrein family transgenes in mice and rats. *DNA Cell Biology* 11: 345-358 (1992).
- [38] Dyaico, M. J., Provost, G. S., Kretz, P. L., Ransom, S. L., Moores, J. C., and Short, J. M. The use of shuttle vectors for mutation analysis in transgenic mice and rats. *Mut ant. Res.* 307: 461-478 (1994).
- [39] Zeng, Q., Carter, D. A., and Murphy, D. Cell specific expression of a vasopressin transgene in rats. *J. Neuroendocri.* 6: 469-477 (1994).
- [40] 結城 惇. 大型トランスジェニック動物と医薬. 分子農学と医学 7: 37-40 (1992).
- [41] Simons, J. P., McClenaghan, M., and Clark, A. J. Alteration of the quality of milk by expression of sheep β -lactoglobulin in transgenic mice. *Nature* 328: 530-532 (1987).
- [42] Vilotte, J. L., Soulier, S., Printz, C., and Mercier, J. C. Sequence of the goat α -lactalbumin-encoding gene: comparison with the bovine gene and evidence of related sequences in the goat genome. *Gene* 98: 271-276 (1991).

- [43] Lee, K- F., DeMayo, F. J., Attiee, S. H., and Rosen, J. M. Tissue-specific expression of the rat β -casein gene in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* **16**: 1027-1041 (1988).
- [44] Bayna, E. M., and Rosen, J. M. Tissue-specific, high level expression of the rat whey acidic protein gene in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* **18**: 2977-2985 (1990).
- [45] Gordon, K., Lee, E., Vitale, J. A., Smith, A. E., Westphal, H., and Hennighausen, L. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/technology* **5**: 1183-1187 (1987).
- [46] Yu, S- h., Deen, K. C., Lee, E., Hennighausen, L., Sweet, R. W., Rosenberg, M., and Westphal, H. Functional human CD4 protein produced in milk of transgenic mice. *Mol. Biol. Med.* **6**: 255-261 (1989).
- [47] Pittius, C. W., Hennighausen, L., Lee, E., Westphal, H., Nicols, E., Vitale, J., and Gordon, K. A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5874-5878 (1988).
- [48] Meade, H., Gates, L., Lacy, E., and Lonberg, N. Bovine alpha S₁-casein gene sequences direct high level expression of active human urokinase in mouse milk. *Bio/technology* **8**: 443-446 (1990).
- [49] Archibald, A. L., McClenaghan, M., Hornsey, V., Simons, J. P., and Clark, A. J. High-level expression of biologically active human α 1-antitrypsin in the milk of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5178-5182 (1990).

- [50] Stinnakre, M. G , Vilotte, J. L , Soulier, S., L'Haridon, R., Charlier, M., Gaye, P., and Mercier, J. C. The bovine α -lactalbumin promoter directs expression of ovine trophoblast interferon in the mammary gland of transgenic mice. *FEBS Lett.* **284**: 19-22 (1991).
- [51] Greenberg, N. M., Anderson, J. W., Hsueh, A. J. W., Nishimori, K., Reeves, J. J., DeAvila, D. M., Ward, D. N., and Rosen, J. M. Expression of biologically active heterodimeric bovine follicle-stimulating hormone in milk of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8327-8331 (1991).
- [52] DiTullio, P., Cheng, S. H., Marshall, J., Gregory, R. J., Ebert, K. M., Meade, H. M., and Smith, A. E. Production of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the milk of transgenic mice. *Bio/technology* **10**: 74-77 (1992).
- [53] Günzburg, W. H., Salmons, B., Zimmermann, B., Müller, M., Erfle, V., and Brem, G. A mammary-specific promoter directs expression of growth hormone not only to the mammary gland, but also to Bergman Glia cells in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* **5**: 123-133 (1991).
- [54] Reddy, V. B., Vitale, J. A., Wei, C., Montoya-Zavala, M., Stice, S. L., Balise, J., and Robl, J. M. Expression of human growth hormone in the milk of transgenic mice. *Anim. Biotech.* **2**: 15-29 (1991).
- [55] Schellander, K., and Péli, J. Mammary specific secretion of human β -interferon in transgenic mice. *Theriogenology* **37**: 291(1992).
- [56] Velander, W. H., Page, R. L., Morcöl, T., Russell, C. G., Canseco, R., Young, J. M., Drohan, W. N., Gwazdauskas, F. C., Wilkins, T. D.,

- and Johnson, J. L. Production of biologically active human protein C in the milk of transgenic mice. *Annals of the New York Academy of Science* **665**: 391-403 (1992).
- [57] Bischoff, R., Degryse, E., Perraud, F., Dalemans, W., Ali-Hadji, D., Thépot, D., Devinoy, E., Houdebine, L-M., and Pavirani, A. A 17.6 kbp region located upstream of the rabbit WAP gene directs high level expression of a functional human protein variant in transgenic mouse milk. *FEBS. Lett.* **305**: 265-268 (1992).
- [58] Hochi, S., Ninomiya, T., Waga-Honma, M., and Yuki, A. Secretion of bovine α -lactalbumin into the milk of transgenic rats. *Mol. Reprod. Dev.* **33**: 160-164 (1992).
- [59] Bühler, T. A., Bruyère, T., Went, D. F., Stranzinger, G., and Bürki, K. Rabbit β -casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. *Bio/technology* **8**: 140-143 (1990).
- [60] Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., van der Schans, A., van den Broek, S., Kooiman, P., Kootwijk E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijker, R., and de Boer, H. Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. *Bio/technology* **9**: 844-847 (1991).
- [61] Barash, I., Baruch, A., Nathan, M., Shani, M., and Hurwitz, D. R. HSA production by mammary explants of virgin transgenic mice: a reliable tool for predicting levels of secretion into milk. *Anim. Biotech.* **4**:203-215 (1993).
- [62] Ebert, K. M., DiTullio, P., Barry, C. A., Schindler, J. E., Ayres, S. L., Smith, T. E., Pellerin, L. J., Meade, H. M., Denman, J., and Roberts, B. Induction of human tissue plasminogen activator

- in the mammary gland of transgenic goats. *Bio/technology* **12**: 699-702 (1994).
- [63] Pomeroy, K. O. Cryopreservation of transgenic mice. *GATA*. **8**: 95-101 (1991).
- [64] 安齋 政幸、中潟 直巳、松本 和也、高橋 明男、高橋 由美、宮田 堅司. 超急速凍結法を用いたトランスジェニックマウス由来胚の凍結保存. *実験動物*. **42**: 467-470 (1991).
- [65] 安齋 政幸、中潟 直巳、松本 和也、高橋 明男、高橋 由美、宮田 堅司. 超急速凍結法を用いたトランスジェニックラット由来前核期受精卵の凍結保存. *実験動物*. **43**: 247-250 (1994).
- [66] Mazur, P., Leibo, S. P., and Chu, E. H. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. *J. Exp. Cell Res.* **71**: 345-355 (1972).
- [67] Mazur, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* **14**: 251-272 (1977).
- [68] Ferdows, M., Moore, C. L. and Dracy, A. E. Survival of rabbit ova stored at -79°C . *J. Dairy Sci.* **41**: 739 (1958, Abstr.).
- [69] Whittingham, D. G., Leibo, S. P., and Mazur, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science* **178**: 411-414 (1972).
- [70] Whittingham, D. G. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.* **43**: 575-578 (1975).
- [71] Bank, H and Maurer, R. R. Survival of frozen rabbit embryos. *Exptl. Cell. Res.* **89**: 188-196 (1974).
- [72] Willadsen, S. M., Polge, C., Rowson, L. E. A., and Moor, R. M. Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.* **46**: 151-154 (1976).

- [73] Bilton , R. J., and Moore, N. W. *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. *Aust. J. Biol. Sci.* **29**: 125-129 (1976).
- [74] Wilmut, I., and Rowson, L. E. A. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* **92**: 686-690 (1973).
- [75] Wood, M. J., and Farrant, J. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology* **17**: 178-180 (1980).
- [76] Kasai, M., Niwa, K., and Iritani, A. Survival of rat embryos after freezing. *J. Reprod. Fertil.* **66**: 367-370 (1982).
- [77] Tsunoda, Y., Soma, T., and Sugie, T. Effect of post-ovulatory age of recipient on survival of frozen-thawed rabbit morulae. *J. Reprod. Fertil.* **65**: 483-487 (1982).
- [78] Yamamoto, Y., Oguri, N., Tsutsumi, Y., and Hachinohe, Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* **32**: 399-403 (1982).
- [79] Lehn-Jensen, H., And Greve, T. Survival of cow blastocysts utilizing short freezing curves. *Nord. Vet.-med.* **33**: 523-529 (1981).
- [80] Fehilly, C. B., Cohen, J., Simons, R. F., Fishel, S. B., and Edwards, R. G. Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in human: A comparative study. *Fertil. Steril.* **44**: 638-644 (1985).
- [81] Rall, W. F., and Fahy, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* **313**: 573-575 (1985).
- [82] Kono, T., Suzuki, O., and Tsunoda, Y. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiology* **25**: 170-173 (1988).

- [83] Smorag, Z., Gajda, B., Wieczorek, B., and Jura, J. Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology* **31**:1227-1231 (1989).
- [84] Széll, A., Zhang, J., and Hudson, R. Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at -180°C. *Reprod. Fertil. Dev.* **2**: 613-618 (1990).
- [85] Hochi, S., Fujimoto, T., Braun, J., and Oguri, N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* **42**: 483-488 (1994).
- [86] Massip, A., Van Der Zwalm, P., Scheffen, B., and Ectors, F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryoletters* **7**: 270-273 (1986).
- [87] Friedler, S., Giudice, L. C., Lamb, E. J. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril.* **49**:743-764 (1988).
- [88] Greenberg, N. M., DeMayo, F., Finegold, M. J., Medina, D., Tilley, W. D., Aspinall, J. O., Cunha, G. R., Donjacour, A. A., Matusik, R. J., and Rosen, J. M. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3439-3443 (1995).
- [89] Murphy, L. J., Molnar, P., Lu, X., and Huang, H. Expression of human insulin-like growth factor-binding protein-3 in transgenic mice. *J. Mol. Endocrin.* **15**: 293-303 (1995).
- [90] Andrew, S. E., Pownall, S., Fox, J., Hsiao, L., Hambleton, J., Penney, J. E., Kohler, S. W., and Jirik, F. R. A novel *lacI* transgenic mutation-detection system and its application to establish baseline mutation frequencies in the *scid* mouse. *Mutation Res.* **357**: 57-66 (1996).
- [91] Cheng, L., Dejbakhsh-Jones, S., Liblau, R., Zeng, D., and Strober, S. Different patterns of TCR transgene expression in single-

- positive and double-negative T cell: Evidence for separate pathways of T cell maturation. *J. Immunol.* **156**: 3591-3601 (1996).
- [92] Kitaguchi, T., Murata, M., Kuramochi, T., Kobayashi, K., Ito, M., Ueyama, Y., Nomura, T., Hikichi, K., Miyakawa, Y., Handa, M., Hiraoka, Y., Aiso, S., and Ikeda, Y. Establishment and characterization of transgenic mice expressing human platelet glycoprotein Ib α . *Biochem. Biophysical Res. Comm.* **220**: 418-424 (1996).
- [93] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491 (1988).
- [94] Hogan, B., Constantini, F., and Lacy, E. Manipulating the mouse embryo. Cold Spring Harbor, New York; *Spring Harbor Laboratory Press*: 174-176 (1986).
- [95] Yu-Lee, L.-y., Richter-Mann, L., Couch, C. H., Stewart, A. F., Mackinlay, A. G., and Rosen, J. M. Evolution of the casein multigene family: conserved sequences in the 5' flanking and exon regions. *Nucleic Acids Res.* **14**: 1883-1902 (1986).
- [96] Bonsing, J., Ring, J. M., Stewart, A. F., and Mackinlay, A. G. Complete nucleotide sequence of the bovine β -casein gene. *Aust. J. Biol. Sci.* **41**: 527-537 (1988).
- [97] Vilotte, J.-L., Soulier, S., Stinnakre, M.-G., Massoud, M., and Mercier, J.-C. Efficient tissue-specific expression of bovine α -lactalbumin in transgenic mice. *Eur. J. Biochem.* **186**: 43-48 (1989).

- [98] Alexander, L. J., Stewart, A. F., Mackinlay, A. G., Kapelinskaya, T. V., Tkach, T. M., and Gorodetsky, S. I. Isolation and characterization of the bovine κ -casein gene. *Eur. J. Biochem.* **178**:395-401 (1988).
- [99] Campbell, S. M., Rosen, J. M., Hennighausen, L. G., Strech-Jurk, U., and Sippel, A. E. Comparison of the whey acidic protein genes of the rat and mouse. *Nucleic Acids Res.* **12**:8685-8697 (1984).
- [100] Mukumoto, S., Mori, K., and Ishikawa, H. Efficient induction of superovulation in adult rats by PMSG and hCG. *Exp. Anim.* **44**:111-118 (1995).
- [101] Toyoda, Y and Chang, M. C. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fert.* **36**:9-22 (1974).
- [102] DeNoto, F. M., Moore, D. D., and Goodman, H. M. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternate splicing. *Nucleic Acids Res.* **9**:3719-3730 (1981).
- [103] Chevrette, M., Guertin, M., Turcotte, B., and Bélanger, L. The rat alpha-1-fetprotein gene: characterization of the 5'-Flanking region and tandem organization with the albumin gene. *Nucleic Acids Res.* **15**:1338-1339 (1987).
- [104] Ninomiya, T., Hoshi., M., and Yuki A. Structures of integrated DNA containing human adenovirus E1A gene in transgenic mice. *Agric. Biol. Chem.* **52**:2537-2546 (1988).
- [105] Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Berg, P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**:237-251 (1977).

- [106] Brinster, R. L., Chen, H. Y., Messing, A., van Dyke, T., Levine, A. J., and Palmiter, R. D. Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors. *Cell* **37**: 367-379 (1984).
- [107] Palmiter, R. D., Norstedt, G., Gelin, R. E., Hammer, R. E., and Brinster, R. L. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* **222**: 809-814 (1983).
- [108] Rexroad, Jr, C. E., Hammer, R. E., Bolt, D. J., Maya, K. E., Frohman, L. A., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. Production of transgenic sheep with growth-regulating genes. *Mol. Reprod. Dev.* **1**: 164-169 (1989).
- [109] Pursel, V. G., Rexroad, Jr, C. E., Bolt, D. J., Miller, K. F., Wall, R. J., Hammer, R. E., Pinkert, C. A., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. Progress on gene transfer in farm animals. *Veter. Immunol. Immunopath.* **17**: 303-312 (1987).
- [110] Brinster, R. L., Chen, H. Y., and Trumbauer, M. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* **27**: 223-231 (1981).
- [111] Rusconi, S., and Schaffner, W. Transformation of frog embryos with a rabbit β -globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 5051-5055 (1981).
- [112] Palmiter, R. D., Chen, H. Y., and Brinster, R. L. Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* **29**: 701-710 (1982).
- [113] McMahon, A. P., Flytzanis, C. N., Hough-Evans, B. R., Katula, K. S., Britten, R. J., and Davidson, E. H. Introduction of cloned DNA into sea urchin egg cytoplasm: replication and persistence during embryogenesis. *Dev. Biol.* **108**: 420-430 (1985).

- [114] Gordon, J. W., and Ruddle, F. H. DNA-mediated genetic transformation of mouse embryos and bone-marrow, a review. *Gene* **33**: 121-136 (1985).
- [115] Folger, K. R., Wong, E. A., Wahl, G., and Capecchi, M. R. Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1372-1387 (1982).
- [116] 保地 真一. “ラットへの外来遺伝子の導入に関する研究” 雪印乳業研究所報告 **96**: 95-144.
- [117] Wilkie, T. M., Brinster, R. L., and Palmiter, R. D. Germline and somatic mosaicism in transgenic mice. *Develop. Biol.* **118**: 9-18 (1986).
- [118] Stewart, T. A., Hollingshead, P. G., and Pitts, S. L. Multiple regulatory domains in the mouse mammary tumor virus long terminal repeat revealed by analysis of fusion genes in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 473-479 (1988).
- [119] Bucchini, D., Madsen, O., Desbois, P., Picret, R., and Jami, J. B islet cells of pancreas are the site of expression of the human insulin gene in transgenic mice. *Exptl. Cell Res.* **180**: 467-474 (1989).
- [120] Shi, Y., Son, H. J., Shahan, K., Rodriguez, M., Costantini, F., and Derman, E. Silent genes in the mouse major urinary protein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4584-4588 (1989).
- [121] Iwakura, Y., Asano, M., Nishimune, Y., and Kawade, Y. Male sterility of transgenic mice carrying exogenous mouse interferon- β gene under the control of metallothionein enhancer-promoter. *The EMBO J.* **7**: 3757-3762 (1988).

- [122] Cavard, C., Grimber, G., Dubois, N., Chasse, J-F., Bennoun, M., Minet-Thuriaux, M., Kamoun, P., and Briand, P. Correction of mouse ornithine transcarbamoylase deficiency by gene transfer into the germ line. *Nucleic Acids Res.* **16**: 2099-2110 (1988).
- [123] McGrane, M. M., de Vente, J., Yun, J., Bloom, J., Park, E., Wynshae-Boris, A., Wagner, T., Rottman, F. M., and Hanson, R. W. Tissue-specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase/bovine growth hormone gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **263**: 11443-11451 (1988).
- [124] Taketo, M., Schroeder, A. C., Mobraaten, L. E., Gunning, K. B., Hanten, G., Fox, R. R., Roderick, T. H., Stewart, C. L., Lilly, F., Hansen, C. T., and Overbeek, P. A. FVB/N : An inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2065-2069 (1991).
- [125] Charreau, B., Tesson, L., Soullillou, J-P., Pourcel, C., and Anegon, I. Transgenesis in rats: technical aspects and models. *Transgenic Res.* **5**: 223-234 (1996).
- [126] Hennighausen, L. The mammary gland as a bioreactor: Production of foreign proteins in milk. *Protein expression and Purification* **1**: 3-8 (1990).
- [127] Wilmut, I., Archibald, A. L., McClenaghan, M., Simons, J. P., Whitelaw, C. B. A, and Clark, A. J. Production of pharmaceutical proteins in milk. *Experientia* **47**: 905-912 (1991).
- [128] Wall, R. J., Hawk, H. W., and Nel, N. Making transgenic livestock: genetic engineering on a large scale. *J. Cell. Biochem.* **49**: 113-120 (1992).

- [129] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685 (1970).
- [130] Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P., Wilmut, I., Garner, I., and Colman, A. High level expression of active human α -1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Bio/technology* **9**: 830-834 (1991).
- [131] Dale, T. C., Krnacik, M. J., Schmidhauser, C., Yang, C. L.-Q., Bissell, M. J., and Rosen, J. M. High-level expression of the rat whey acidic protein gene is mediated by elements in the promoter and 3' untranslated region. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 905-914 (1992).
- [132] Hall, L., Emery, D. C., Davies, M. S., Parker, D., and Craig, R. K. Organization and sequence of the human α -lactalbumin gene. *Biochem. J.* **242**: 735-742 (1987).
- [133] Lubon, H., and Hennighausen, L. Conserved region of the rat α -lactalbumin promoter is a target site for protein binding *in vitro*. *Biochem. J.* **256**: 391-396 (1988).
- [134] Mercier, J.-C., Villote, J.-L., and Provot, C. Structure and Function of Milk Protein Genes. In Gelderman, H., and Ellendorff, F. (eds.): "Genome Analysis in Domestic Animals," Weinheim: VCH, 233-258 (1990).
- [135] Watson, C. J., Gordon, K. E., Robertson, M., and Clark, A. J. Interaction of DNA-binding proteins with a milk protein gene promoter *in vitro*: identification of a mammary gland-specific factor. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6603-6610 (1991).

- [136] Threadgill, D. W., and Womack, J. E. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6935-6942 (1990).
- [137] Ferretti, L., Leone, P., Sgaramella, V. Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6829-6833 (1990).
- [138] Bonsing, J., and Mackinlay, A. G. Recent studies on nucleotide sequences encoding the caseins. *J. Dairy Res.* **54**: 447-461 (1987).
- [139] Chomczynski, P., and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159 (1987).
- [140] Hennighausen, L. G., Sippel, A. E., Hobbs, A. A., and Rosen, J. M. Comparative sequence analysis of the mRNAs coding for mouse and rat whey protein. *Nucleic Acids Res.* **10**: 3733-3744 (1982).
- [141] Forbes, T. R. Witch's milk and witch's marks. *Yale. Biol. Med.* **22**: 219-225 (1950).
- [142] 平林 真澄、水野 敦子、星 雅樹. 疾患モデルマウスにおける 2 細胞期胚の凍結保存. *日本疾患モデル動物研究会記録* **4**: 21 (1988).
- [143] 水野 敦子、星 雅樹、平林 真澄. 新しい系統維持技術—SHR 胚の凍結保存—. *日本疾患モデル動物研究会記録* **3**: 42-45 (1987).
- [144] Rall, W. F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* **24**: 387-402 (1987).

- [145] Ogawa, S., Satoh, K., and Hashimoto, H. *In vitro* culture of rabbit ova from the single cell to the blastocyst stage. *Nature* **233**: 422-424 (1971).
- [146] Kasai, M., Komi, J. H., Takakamo, A., Tsudera, H., Sakurai, T., and Machida, T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.* **89**: 91-97 (1990).
- [147] Quinn, P., Barros, C., and Whittingham, D. G. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* **66**: 161-168 (1982).
- [148] Renard, J. P., and Babinet, C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant. *J. Exptl. Zool.* **230**: 443-448 (1984).
- [149] Smorag, Z., Garnier, V., Renard, J-P., and Wieczorek, B. The influence of saccharose on the survival of two-blastomeric rabbit germs being frozen in a solution of 1,2-propanediol. *Medycyna Wet.* **8**: 495-498 (1986).
- [150] Wood, M. J., and Whittingham, D. G. Low temperature storage of rat embryos; Frozen storage of laboratory animals (Zeilmaker, G. H., ed.). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. 119-128 (1981).
- [151] 宮本 元、石橋 武彦. 凍結・融解マウス胚の生存性に及ぼす胚の発生段階の影響. *哺乳卵子研* **1**: 95-98 (1984).
- [152] 中潟 直巳. 体外受精由来マウスの4細胞期胚の超急速凍結保存について. *実験動物* **38**: 279-282 (1989).

- [153] Selden, R. F., Yun, J. S., Moore, D. D., Rowe, M. E. Malia, M. A., Wagner, T. E., and Goodman, H. M. Glucocorticoid regulation of human growth hormone expression in transgenic mice and transiently transfected cells. *J. Endocrinol.* **122**:49-60 (1989).

論文目録

報 告 番 号	※ 第	号	氏 名	平 林 真 澄
主 論 文	題 目 乳腺発現系トランスジェニックラット に関する研究 主論文（要約）の印刷公表の方法および時期は別紙のとおり			
参 考 論 文	(有) ・ 無 参考論文の印刷公表の方法および時期は別紙のとおり			
備 考				

主論文（要約）の印刷公表の方法および時期

- 1) Takashi Ninomiya, Masumi Hirabayashi, Junko Sagara and Atsushi Yuki
Functions of milk protein gene 5' flanking regions on human growth hormone gene.
Mol. Reprod. Dev. 37, 276-283 (1993)
- 2) Masumi Hirabayashi, Kunihiro Kodaira, Ri-ichi Takahashi, Junko Sagara, Takashige Suzuki and Masatsugu Ueda
Transgene expression in mammary glands of newborn rats.
Mol. Reprod. Dev. 43, 145-149 (1996)
- 3) Masumi Hirabayashi, Kunihiro Kodaira, Ri-ichi Takahashi, Junko Sagara, Takashige Suzuki and Masatsugu Ueda
A method using neonatal mammary secretions to predict transgene expression: human growth hormone in mammary glands of newborn transgenic rats.
Theriogenology 45, 343 (1996)
- 4) 平林 真澄、茶谷 伸夫
ガラス化法によるラット 2 細胞期胚の超低温保存
哺乳卵研誌 7, 72-77 (1990)
- 5) Masumi Hirabayashi, Ri-ichi Takahashi, Junko Sekiguchi and Masatugu Ueda
Viability of transgenic rats embryos after freezing and thawing.
Exp. Anim. 46, (1997) in press
- 6) 平林 真澄、高橋 利一、伊藤 和美、小平 邦彦、鈴木 高成、上田 正次
トランスジェニックラットの作出効率に影響を及ぼす要因
J. Reprod. Dev. 43, (1997) in press