

哺乳類の胚操作と畜産への利用と将来(72)

誌名	畜産の研究 = Animal-husbandry
ISSN	00093874
著者	菅原, 七郎
巻/号	61巻6号
掲載ページ	p. 709-715
発行年月	2007年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



哺乳類の胚操作と畜産への利用と将来 (72)

—XXIII 手動方式によるクローン個体の作出法—

菅原七郎*

ix) 発生の状況

トリプレットの発生能は他の動物種の場合と同様、24時間毎に検査し、記録する。培養7日までの胚盤胞形成率を調べる。

x) ブタ HMC の成果

ブタ卵子は活性化処理をすると単為発生する割合が高いことが知られている⁵¹⁾。

HMC の成果を胚盤胞形成率でみる場合、単為発生胚と比較してみることは胚クローン胚の移植との関係で極めて重要なことである。

イ) 単為発生のための活性化法

IVM 卵子はHMC用サイトプラストの調整と全く同様に卵細胞から裸化する。透明帯はプロネース処理を長くして完全に融解して除去する。透明帯除去卵子 (ZF 卵子) は活性化溶液に10秒間浸してから、融合液を満たした融合室に入れる。次いで、DC 0.85kV/cm, 80 μ sec のパルスで通電する。

一方、正常卵子 (透明帯をもつもの: ZI 卵子) は ZF 卵子の場合と同様にして、DC 1.25kV/cm, 80 μ sec のパルスを通電して活性化させる。

単為発生刺激卵子はHMCトリプレットと同様の発生培養を行ない胚盤胞までの発生能を比較する。

ロ) トリプレット卵子の発生能

HMC トリプレット卵子の発生能を透明帯除去単為発生刺激卵子と体外受精卵子のそれらを胚盤胞形成率で比較している。

結果は表 23-20 に示した如く、ZFPA 卵子の発生率が最も高く、ついで IVF 卵子で 30 \pm 6% であり、HMC トリプレットは 17 \pm 4 と有意に低かった。

しかし、この結果はこれまでのブタでの HMC の報告と比べ発生率が倍以上も良い⁵²⁾。トリプレットの発生率が高くなったことは ET 後の発生能にも関係する。現在、ET 試験を行なっているとのことで正常産子の作出が待たれる^{53,54)}。

なお、発生胚盤胞の細胞数についても表示した如く、IVF 由来、胚盤胞は 74.6 \pm 6 個に対して透明帯

除去単為発生胚は 53 \pm 6 個と有意に少ない。さらに、トリプレットの細胞数は 46 \pm 5 であり、前2者と比べ有意に少ないが、産子までの発生能については ET の成果を確認する以外にはない。

表 23-20 ブタトリプレット卵子の発生率
(Duら'05改写)

	培養 卵子数	胚盤 胞数	胚盤 胞形成率 (M \pm SEM)	胚盤胞の 細胞数 (M \pm SEM)
トリプレット (HMC)	243	41	17 \pm 4	46 \pm 5
透明帯除去単為 発生 (ZFPA)	97	46	47 \pm 4	53 \pm 6
体外受精卵子 (IVF)	170	52	30 \pm 6	74 \pm 6

ハ) トリプレットの由来と発生能

これまでの IVP (IVMFC 胚) や SCNT (体細胞核移植卵子) の発生能についての報告^{55,56)}にみられるように HMC のトリプレットの発生能は、これまでの成果と同じく、経産豚由来の卵胞内卵子の方が未経産豚由来のものとは有意に高いことが明らかになった。すなわち、SCNT の胚盤胞形成率は 1~11% であり⁵⁷⁾、これと比べ明らかに HMC トリプレットの発生率が高いことが判る。

xi) ブタ HMC の課題

ブタ HMC トリプレットの胚盤胞形成率は明らかに IVMFC, ZFPA 卵子と比べ低く、細胞数も少ない。このことは卵細胞質量の少ないことと除核操作と融合までの時間および発生培養に起因すると考えられる。

イ) 透明帯除去の問題

プロネース処理に対する感受性から完全な透明帯融解までの培養ができない。酸性溶液での完全融解との比較が必要である。

ロ) 培養系の改善

HMC トリプレットの発生培養の改善工夫が必要である。集団培養との比較も必要である。

*Ecos 研究所 (Shichiro Sugawara)

ハ) ET 試験

HMC 由来胚の ET による正常産子を得ることである。

g) マウスの HMC 法

マウスでの HMC 法は表 23-21 に示したタイムスケジュールで行なわれる。

マウスのクローン作出のためのレシピエント卵

表 23-21 マウスの HMC タイムスケジュール (原著)

日 程	処理操作手順	処 理 方 法
-3日	採卵処理	過排卵処理: 8~10週齢B6D2F1に5IU cCG 48時間後5IU hCG
	↓	
1日目	採卵	hCG処理後13~13.5時間後(卵管膨大部)
	↓	
(13~13.5時間)	卵丘細胞除去	300IU/ml ヒアルロシダーゼへベス CZB液で数分間処理
	↓	
	選別	極体と均一な細胞質のもの
	↓	
	透明帯除去	a) 酸タイロド液 (pH=2.5±0.3) 3~5分間処理
	↓	b) 5mg/ml プロネエース hCZB液+0.1mg/ml PVAで3~5分間処理
	↓	hCZB液※で洗浄
	6時間後確認 (活性化の有無)	透明帯除去処理で活性化が起こらないことを確認
	↓	
	除核	
	↓ 吸引除核	1) 5µg/ml サイトカラシン B-hCZB中で行う
	↓	2) 染色せず、MIIの位置は容易に見分けられる
3.0~4.0時間	↓	3) 吸引除去(内径0.78、外径1.0mm、長さ×150mmピペット)
	↓ 確認	1) 吸引した断片を染色してUVで確認
	↓	
	融合	
	↓ PHA液	1) 10µg/ml PHA-hCZB液滴にドナー細胞を入れる
	↓	2) サイトプラストをドナー細胞のPHA液滴に入れ、接着させる
	↓ 電氣的	1) ペアを5~10個融合液に滴した融合室に入れる 30℃
	↓	2) AC 2.0KV/cm、一列に並べる
	↓	3) DC 2.0KV/cm、2×16 µ sec通電 30℃
	確認	1) Ca-free hCZB液で洗浄、30~60分後に確認
	↓	2) CZB液で、37℃、5%CO ₂ で1~2時間培養
(17~18時間目)	活性化	1) 10mM塩化ストロレチウム+5µg/ml サイトカラシンB 添加 CZB
	↓	
	↓	2) またCa free CZB 5~6時間培養
23~24時間	発生培養	培養液で洗浄
	↓	5µl液滴培養液 (CZB) 5%CO ₂ 空気37℃、4日間
2日	発生検査 (24時間毎)	
~	↓	
4日	胚移植	桑実胚胚盤胞
	↓	2.5日齢偽妊娠レシピエント (C57BL/65×CBA/2J) 子宮に移植
19.5日	帝王切開	胎子取り出し、保育箱に入れ育てる
	↓	
	里親哺乳	泌乳中里親 (Balb/c) につける

※CZB液: Chatot, C. L *et al* (1989) *J. Reprod. Fert.*, 86: 679~688

hCZB液: Hepes CZB液: Gas, S *et al* (2003) *Cloning Stem Cells* 5: 287~294

子(サイトプラスト)は成雌での過排卵処理卵子を用いている。マウス独自の処理法などが工夫されている⁵⁸⁾。

i) サイトプラストの採取

イ) 過排卵処理

8~10週齢のB6D2F1(C57BL/6J×DBA/2)成雌に5IUのeCGを皮下または腹腔に投与し、その48時間後に5IUのhCGを同様に注射し過排卵を誘起する。

ロ) 採卵

hCG投与後、13.0~13.5時間目に放血屠殺マウスから卵管を切り取り、卵管膨大部を切開してCOCsを取り出す。

ハ) 卵丘細胞の除去

COCsは300IU/mlヒアルロニダーゼhCZB液で処理して裸化する。

ii) 透明帯除去

透明帯の除去は以下の二つの方法があり、実施されているが、プロネース処理がより効率が良い。

イ) 酸性タイロード液処理

裸化卵子を塩酸タイロード液(pH: 2.5±0.3)に入れ、1~2分間放置すると透明帯が融解する。ただちに、取り出し、hCZB液に移し、洗浄する。

次の操作に移るまでの間hCZB液で保持する。

ロ) プロネース液処理

透明帯除去には酸性タイロードの代わりに、プロネース処理が行なわれる。

①透明帯除去

裸化卵子を5mg/mlプロネース+0.1mgPVA(MW: 10,000~30,000)添加のhCZB液で3~5分処理して透明帯を融解させる。透明帯が融解し始めたものから順次取り上げ、hCZB液に移し換えて、数回洗浄して透明帯を完全に除去する。

②活性化の防止

マウス卵子は薬物処理で単為発生を起こし易い性質をもっていることからプロネース処理のみでは活性化が誘起されない処理条件を吟味してから透明帯除去を行なう。

iii) 除核操作

次の手順で透明帯除去卵子から除核する。

イ) サイトカラシンB液での平衡

まず透明帯除去卵子を5μg/mlサイトカラシンB-hCZB液に移し、数分間保持し、平衡させる。

ロ) 除核操作はサイトカラシン液中で図23-7に示した如く、まず、吸引ピペットと支持ピペットの間に透明帯除去卵子をMIIのある部位を吸引ピペット側にして平行にしてハサミ込む(a)。次いで、吸引ピペットを押し込みながら吸引する。吸引部位を切り落とすために支持ピペットに対して幾分上方に押し上げながら吸引してMII部分を切り取る。

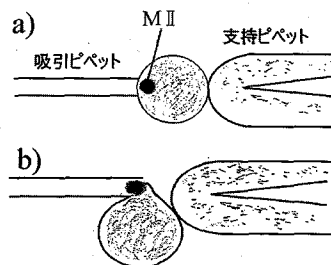


図23-7 マウス透明帯除去卵子からの除核操作の模式図(原著)

- a. 卵子を支持棒に対し、MIIの位置を吸引ピペット側にして吸引ピペットで平行に押さえる。
b. 吸引ピペットをMIIに向けて押しつつ、吸引しながら上方にずらしていき除核する。

この操作は約2分で終了することが可能で、反復操作して効率よく除核できる便利さがある。熟達すると除核は数秒間で終了するといわれている。

ハ) 除核は染色せずに実施する。これはマウスでは干渉顕微鏡を用いることでウシ、ブタ、ヒツジ卵子と比べMIIの位置が判り易いためである。

二) 除核の確認

吸引した断片を染色して確認する。

iv) ドナー細胞の融合操作

以下の手順で行なう。

イ) PHA液滴へのドナー細胞の導入

10μg/ml PHA-hCZB液滴(20μl)に5~10個のドナー細胞を分散させて入れる。

次いで、サイトプラストをそれぞれのドナー細胞の上におき、ピペットで接着させる。

ロ) サイトプラストとドナー細胞を接着させた、いわゆるペアを5~10個、融合液(表23-22)を満たした融合室に移して電氣的に融合させる。

表 23-22 マウス融合液組成

組成	濃度
マニトール	0.2M
MgSO ₂	0.1mM
Hepes	0.5mM
BSA	0.05%
pH	7.3
mOsm	200~210

ハ) 通電

①AC 2.0kV/cmを通電し、ペアを一行に並べる。

②DC 2.0kV/cm, 16 μ sec で2回通電してドナー核とサイトプラストを融合させる。

ニ) 融合の確認

通電後、Ca-free hCZB で洗浄して、CZB 液に移し、37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 下で1~2時間培養する。その間30~60分のところで融合したことを確認する。

v) 活性化処理

融合したことを確認したペアは 10mM 塩化ストロンチウム+5 μ g/ml サイトカラシン B の CZB 液または Ca-free hCZB 液に移し、5~6時間培養して活性化する。

vi) 発生培養

活性化処理が終了したら培養液でペアを洗浄して、5 μ lCZB 培地に入れ、5%CO₂, 空気下 37 $^{\circ}$ C で4日間培養し発生させる。

vii) 発生状況

24時間毎に観察し、卵割状況を記録する。

viii) 胚移植試験

偽妊娠2.5日齢のレシピエントの子宮に胚盤胞を

移植し、妊娠19.5日齢で帝王切開により娩出させ、哺育する。

ix) マウス HMC の成果

マウス卵子はヒアルロニダーゼ、プロネース処理によって活性化され単為発生する確率が高いことから単為発生と *In vivo* 受精透明帯除去卵子および活性化卵子の発生能と比較して再構築卵子の発生を確認する。

イ) 単為発生活性化

hCG 投与後 13~13.5時間目で採取した COCs を透明帯除去除核サイトプラストが活性化処理される時間帯 (hCG 投与から 17~18時間目) まで培養しておき、活性化溶液 (10mM 塩化ストロンチウム+5 μ g/ml サイトカラシン BCZB 液) で5~6時間培養して活性化させる。

ロ) *In vivo* 受精透明帯除去卵子とその発生能

サイトプラスト採取と同様、過排卵処理して hCG 投与時に B6D2F1 の雄と一緒にし、交配させて、hCG 投与後 16時間目に採卵する。

採取した COCs は裸化し、透明帯を除去して4日間培養して、レシピエントに移植し、産子を哺育し、ZF ドナー細胞融合由来胚の ET 結果と比較し個体までの発生能を確認する。

ハ) NT 胚の発生能

上記各操作卵子の発生能を比較した結果は表 23-23 に示した。

NT 卵子からの胚盤胞形成率は他の操作卵子のそれと比べて有意に低かった。

ドナー核として卵胞細胞と ES 細胞を用いた場合、融合率は前者が 58.1 \pm 4.0% (573) に対し後者では

表 23-23 マウス ZF, ZI と NT 再構築卵子の活性化処理 Ca の存在と胚盤胞形成率 (Ribas ら'05 改写)

核移植 卵子	活性化 Ca	核移 植数	活性化後NI卵 子数 (%)	培養 数	卵割数 (%)	胚盤胞数 (全卵子比) (%)	胚盤胞数 (活性 化卵子との比) (%)
ZF	+	205	193 (96.1 \pm 1.6)	196	164 (80.2 \pm 41.6)	97 (47.5 \pm 5.8)	49.1 \pm 6.1
	-	217	100 (47.1 \pm 6.5)	100	96 (45.2 \pm 6.6)	55 (25.8 \pm 4.6)	56.5 \pm 7.0
ZI	+	114	114 (100 \pm 0.2)	114	74 (64.3 \pm 7.6)	38 (32.9 \pm 6.3)	32.5 \pm 6.4
	-	105	103 (98.1 \pm 1.4)	103	100 (95.3 \pm 2.4)	85 (80.8 \pm 5.0)	82.0 \pm 4.9
NT	+	397	396 (99.7 \pm 0.3)	282	118 (29.2 \pm 3.2)	33 (9.3 \pm 2.12)	13.2 \pm 3.3
	-	129	80 (65.9 \pm 14.9)	66	20 (16.5 \pm 3.9)	7 (5.8 \pm 2.4)	12.7 \pm 5.4

ZF; (透明帯除去), ZI (正常) の卵子, NIはES細胞との融合胚

42.9±2.2% (2064) と有意に低かった。卵割率も前者は後者と比べ明らかに高いが胚盤胞形成率では逆に、後者が前者より有意に高い。

二) 産子への発生率

ES 細胞融合卵子由来胚の移植で移植胚数の約 3% (1/33) が正常産子として生まれた。

最近、裸化1時間後にプロネースで1分間培養し、FCS を添加してプロネース活性を阻止して透明帯を除去し、ドナー細胞との融合を 30°C の代わりに室温 (21°C) で行ない、次いで、Ca-free で活性化する。WOW 方式で 12~15 グループ培養することで胚盤胞形成率がこれまでより 2.4 倍も高く 30% に達することが報告された⁵⁹⁾。

ホ) マウス HMC の課題

現状でドナー細胞として卵胞細胞を用いた場合、HMC では 2 細胞期で発生を中止し、桑実期、胚盤胞までも達していない。それゆえ、少なくとも胚盤胞期までの発生が得られる操作法の改善が必要である。

なお、マウス卵子は透明帯除去によって著しくこわれ易いので操作するうえでより注意して対処する必要がある。

一方、マウス卵子の MII 核は干渉顕微鏡下ですぐに見分けられるのでヘキスト染色をしなくて除核できる利点がある。

現在、マウスの HMC で産子が得られており近い将来、核移植技術の一つとして利用されることは疑いない。

h) その他動物種での HMC 法

ウマの体細胞クローン作出で透明帯除去卵母細胞を用いた例⁶⁰⁾があるが、従来法との比較で実施されていないのでウマではどちらの手法がより良いのかについては、今後の成果を待つ以外にない。

なお、いろいろな動物種での HMC が試みられることが望まれる。とくに野生種と家畜間での HMC は将来的に有効な手法であり研究が待たれる。

E. HMC の課題と応用

これまで述べてきた HMC 法について現在実施されている手順を動物毎に比べ一覧表にした (表 23-24)

この表でこれまでの各動物の手法が比較でき、それぞれの特性も理解できる。

a) 手動式クローニングの技術的課題

HMC 法は従来法でマイクロマニプレーターで操作されてきたものを、全く手動式にした点で技術的に非常に難しいと考えられがちであるが、これまでの報告でみる限り技術的に決して特殊で名人芸的なものでないことが理解できる。すなわち、練習によって容易に会得できる技術であり、まず、試みることから始めるものであるといえる。

しかし、より一層の効率を高めるための個々の操作段階での改善と工夫が必要であることはいうまでもない。

b) マイクロ技術との関係

HMC の開発と工夫は哺乳動物卵子研究手法のよりマイクロ技術化の発展によることが大きい。既述のように、操作液量、培養系、代謝系などがよりマイクロ化されたいろいろな分野の発展によって支えられていることは明らかである。

したがって、将来的に HMC の確立と利用にはよりナノマイクロ技術との関わりでの発展が非常に重要であるといえる。

c) HMC の利用

HMC 法の割断による除核の際、とくに三つの割断片にした場合、ドナー核との融合には最少 2 個のサイトプラスト片を必要とする。

i) 遺伝子の相乗効果

いわゆるトリプレットでの再構築卵子にすることであり、主要核遺伝子はドナー細胞由来であるがミトコンドリア遺伝子 (MtDNA) は 2 個のサイトプラスト由来の三つから構成されており、これらの相乗効果が期待できる。

ii) 遺伝子発現の解析

ドナー核のリプログラミングが完了し、卵割を開始し、正常発生していく過程での遺伝子のエピジェネティックな発現との関係を *in vivo*, *in vitro* 受精発生卵子や 1 個のサイトプラスト核移植卵子からの発生胚との比較で解析することによって核移植胚、胎子や産子での異常性の要因遺伝子を解明できる。

iii) 遺伝的疾患の回避

とくに、MtDNA に起因する遺伝的疾患を正常な MtDNA のサイトプラストをレシピエントサイトプラストとして用いることにより正常個体として作出することも可能である。

iv) 発生機構の解析手法としての利用

表 23-24 各種動物における HMC の操作手順と実施法の比較

	ウシ	ヒツジ	ブタ	マウス
由来 (生産供給)	IVM(屠場、生体) 重炭酸塩TCM199+15%CS PMSG+hCG	IVM (生体) 重炭酸塩 TCM199+グルタミンFSH+ H1E2	IVM 重炭酸 TCM199+10% CS+10% PFF+10IU PMSG+5IU hCG	多排卵処理(卵管) 5IU PMSG+5IU hCG
サイト プラ ス ト の 調 整	21~22hr 1) 0.5mg/ml ヒアルロナーゼ (500 μ l の T0) 2) 1.5mg/ml プネエース (60% T10) で 10~15分処理 3) 3ml の T20 に移し、洗浄	19~23hr 1) ヒアルロナーゼ SOF 液数分処理 2) 5 μ g/ml プロネエース 3~5分 3) 20mg/ml BSA SOF	42~43hr 1) 1mg/ml ヒアルロナーゼ処理とビペッティング 2) 3.3mg/ml プロネエース T33 (33% CS) で5秒 3) 洗浄 T2 と T20 (変型前に)	13.0~13.5hr (hCG後) 1) 300IU/ml ヒアルロナーゼ CZB (ヘビス) 2) 酸タイロド液 3~5分 2-2) 5mg/ml プロネエース 3~5分 hCZB+ 0.1mg PVA 3) 透明帯処理活性化を6時間後でおき確認
除核 操作 法	前処理1) 5.0 μ g/ml サイトカラシン液 (T0液) 数分処理 2) 割断(3ml の T20) 3) 10 μ g/ml ヘキスト染色5分 4) 除核確認	前処理1) 5 μ g/ml サイトカラシン B (SOF) 2) 5 μ g/ml ヘキスト染色 数分 3) 割断 or 吸引 4) 除核確認	1) 3mg/ml PVA+2.5 μ g/ml サイトカラシン B 39°C で操作 2) 割断(三つに割断) 3) 5 μ g/ml ヘキスト液 (TPVA) 5分 4) 1 μ l/ml の TPVA に移す 5) UV で判定、選別	1) 5 μ g/ml サイトカラシン B 処理 2) 吸引除核(微分干涉顕微鏡下)
融合 操 作	1) 除核サイトプラスト PHA で3秒処理 (500 μ g/400 μ l T2) 2) ドナー核ウエルに入れ付着させる 3) サイトプラストとドナーペア2~3ml 融合液 4) DC 65V、20 μ s、10.1sec 5) 2個のサイトプラスト融合	1) 20 μ g/ml PHA 数秒 2) ドナー核ウエルに除サイトプラストを 入れる 23~25hr IVM後 3) 電気融合(電極から0.2mmはすず) 4) 150V/cm、76 μ s、0.1s	1) 1mg/ml PHA 3秒 1段階 2) ドナー核ウエルにすばや入れる 3) 電気融合液中に移し10秒間 4) 0.6KV/cm、700kHz AC 5) DC 2.0KV/cm、9秒融合	1) 10 μ g/ml PHA ChCZB液処理でサイトプラスト をウエルに入れ 2) そのウエルに1個のドナー核をビペット押し つける 3) 低浸透化融合液 4) 電気融合 2.00KV/cm、2 \times 16 μ sec、パルス通電 5) Ca CZB液で洗浄 6) CZB液で1~2時間 37°C、5% CO ₂ で培養
体 細 胞 核 の 移 植	1) 融合4時間後(IVM28時間後) 2) 2 μ M Caイオノフォーで5分処理 3) 2mM 6DMPAPで6hr培養	1) 10 μ g/ml シクロヘキサミド液中で10~ 15分間 2) 10 μ M Caイオノホア- 5分処理 3) シクロヘキサミド 2hr培養	2段階 0) 1時間後、別のサイトプラストにAC、DCで融合 1) トリプレットをT10に移す 2) 5 μ g/ml サイトカラシン+10 μ g/ml シクロヘキサミド 4hr培養	活性化1) 融合1~2時間後(17~18hr, hCG後) 2) 5~6時間培養 10mM 塩化ストロンチウム+5 μ g/ml サイトカ ラシン B
再 構 築 胚 の 発 生 移 植	1) WOWr 発生培養 SOF+aci+5% CS	1) 寒天ウエル中	WOW 1) NCSU37+4mg BSA+0.17mM ビルビン酸+ 2.7mM 乳酸 0~2日間 2) 5.5mM グルコース 2~7日間	子宮移植 19.5日齢 帝王切開

※ヒツジのHMCはドナー細胞を融合した後に第二極体を放出した再構築卵で除核する手法が胚細胞の形成率が倍以上高い

割球の分化と個体発生におけるその役割の解析のために卵割期の割球集合によるキメラ個体が用いられてきた⁶¹⁾。

家畜卵子での研究に HMC 法によるキメラ胚の作出による割球の個体形成における役割などの解析に利用できると考えられる。

これまで実験小動物で行なわれてきた発生機構の研究が家畜においても HMC を用いることで解析が可能になったと考えられる。

d) HMC の 将 来

HMC 法は現状の体細胞核クローン作出法として小数派であり、従来法にとって代わるには手動的操作法のより簡便化と容易さが工夫される必要がある。

HMC 法はクローン個体作出法への実用と普及化に視点をいた技術として、より単純化、特技性を無くす方向への改善が求められるが、この手法は生物現象の新しい解析法として利用すべきものと考えられる。

すなわち、上述のように、哺乳類の発生過程における割球や細胞の分化とその機構の解析やキメラ、細胞の融合・集合における各種細胞の機能・役割と分担および分化と仕組みを解明するための手法としての利用すべきものとする。

文 献

- 1) Peura, TT *et al* (1998) Mol. Reprod. Dev. 50: 185~191
- 2) Vajta, G *et al* (2001) Cloning 3: 89~95
- 3) Trounson, A. O & Moore, NW (1974) J Reprod Fert. 41: 97~108
- 4) Moustafa, LA & Dixon, KL (1974) Proc Soc Exp Biol & Med 147: 285~288
- 5) Ji, W. & Bavister, BD (2000) Theriogenology 54: 827~834
- 6) Wu, G-M *et al* (2004) *ibid* 62: 1544~1556
- 7) Bronson, RA & McLaren, A (1970) J Reprod. Fert., 22: 19~36
- 8) Modlinsky, JA. (1970) J Embryol exp Morph. 23: 539~551
- 9) Xu, Kp *et al* (1990) J Reprod. Fert. 85: 57 (abst)
- 10) Geshi, M *et al* (1997) Theriogenology 47: 306 (abst)
- 11) Abeyleera, LR & Day, BN (1997) Biol. Reprod. 57: 729~734
- 12) Thadani, VM (1982) J. Exp Zool., 219: 277~283
- 13) Suzuki, H *et al* (1995) Biol. Reprod. 53: 78~83
- 14) Naito, K *et al* (1992) Hum. Reprod 7: 281~285
- 15) Tsukui, T *et al* (1996) Nat. Biotechnol. 14: 928~985
- 16) Binor, Z & Wolf, DP (1979) J Reprod. Fert., 56: 309~314

- 17) Fulka, Jr J *et al* (1982) *ibid* 64: 495~499
 18) Zhao, XM *et al* (2002) *Theriogenology* 58: 995~1006
 19) Richie, W. A *et al* (2005) *Cloning & Stem Cells* 7: 178~182
 20) Tatham, BG. *et al* (1995) *Biol. Reprod* 53: 1088~1094
 21) Peura, TT *et al* (1998) *Mol. Reprod. Dev.* 50: 185~191
 22) " (2001) *ibid* 58: 384~389
 23) Vajta, G *et al* (2001) *Cloning* 3: 89~95
 24) Booth, P. J *et al* (2001a) *Cloning Stem Cells* 3: 139~150
 25) " (2001b) *ibid* 3: 191~197
 26) Vajta, G *et al* (2003) *Biol. Reprod.* 68: 571~578
 27) " (2005) *Reprod. Fert. & Dev* 17: 97~112
 28) Oback, B *et al* (2003) *Cloning Stem Cells* 5: 3~12
 29) Booth, PJ *et al* (2001) *ibid* 3: 191~197
 30) Peura, TT & Vajta, G (2003) *ibid* 4: 257~271
 31) Kawakami, M *et al* (2003) *ibid* 5: 379~387
 32a) Ibanez, E *et al* (2003) *Biol. Reprod.* 68: 1249~1258
 32b) Elsheikh, AS *et al* (2006) *Reprod. Fert. Dev* 18: 697~701
 33) Vajta, G *et al* (2004a) *Reprod. Fert. Dev.* 16: 159
 34) Yin, XJ. *et al* (2002b) *Biol. Reprod.* 67: 442~446
 35) Peura, TT *et al* (1998) *Mol. Reprod. Dev.* 50: 185~191
 36) Wells, DN *et al* (1999) *Biol. Reprod.* 60: 996~1005
 37) Kato, Y *et al* (2000) *J. Reprod. Fert.*, 120: 231~237
 38) Tecirlioglu, R *et al* (2003) *Reprod. Fert. Dev.* 15: 361~366
 39) Tani, T *et al* (2006) *Cloning Stem Cells* 8: 61~66
 40) Peura, T. T (2003) *Clon Stem Cells* 5: 13~24
 41) Willadsen, S. M (1979) *Nature* 277: 298~300
 42) Hollingsworth, TS & Page, RD (1988) *Theriogenology* 29: 262
 43) Krentz, K *et al* (1993) *ibid* 39: 655~667
 44) Adaniya, GK *et al* (1993) *Fert. & Steril* 59: 652~656
 45) Yaniz, JL *et al* (2002) *J Vet. Med. A physiol. Patl Clim Med.* 49: 393~395
 46) Thouas, GA *et al* (2003) *Reproduction* 126: 161~169
 47) Vajta, G *et al* (2000) *Mol. Reprod. Dev.* 55: 256~264
 48) " (2004) *Theriogenology* 62: 1465~1472
 49) " (1997) *ibid* 48: 1379~1385
 50) Wells, DN *et al* (2003) *ibid* 59: 45~59
 51) Lee, JW *et al* (2004) *Mol. Reprod. Dev.* 68: 51~57
 52) Kragh, PM *et al* (2004) *Reprod. Fert. Dev.* 16: 315~318
 53) " (2005) *Theriogenology* 64: 1536~1545
 54) Du, Y *et al* (2005) *Clon. Stem Cell* 7: 198~205
 55) Sherrer, ES *et al* (2004) *J, Anim Sci.* 82: 102~108
 56) Hyun, SH *et al* (2003) *Theriogenology* 59: 1641~1650
 57) Prathen, R (2002) in *Principles of Cloning*, Ed Gibeli ら, Acad Press San Digo, USA, pp-367~374
 58) Ribas, R *et al* (2005) *Cloning Stem Cells* 7: 126~138
 59) " (2006) *ibid* 8: 10~15
 60) Galli, C *et al* (2003) *Nature* 424: 635
 61) Tarkowski, AK *et al* (2001) *J Dw, Biol.*, 45: 811~816

農業畜産情報

「胴長」遺伝子を特定 優良豚の大型化に道

農業生物資源研究所など

豚の背骨の長さを決める遺伝子が、世界で初めて特定された。背骨の長い豚の方が高級部位であるロース肉の重量が多いため、今後の品種改良に利用できる画期的な成果として注目される。「金華豚」「梅山豚」のように肉質は優れているが体長の短い豚を、大型化することも可能になる。遺伝子を判別する技術は特許出願中だ。

農業生物資源研究所と、農林水産先端技術産業振興センター農林水産先端技術研究所の研究グループが4月20日までに明らかにした。

豚の背骨を作る椎骨(ついでこつ)の数は品種で異なる。背骨の一部である胸椎と腰椎を合わせた数は、西洋品種では21~23個。東洋品種では原種のイノシシと同じ19個が標準とされる。椎骨の数が多いほど胴体が長くなり、背骨の両脇にあるロースの肉の量が増えることが分かっている。このため、豚の品種改良では体長を伸ばすことが重要課題の一つとされる。

研究グループは椎骨の多い品種と少ない品種を交配した豚を調べ、椎骨をコントロールする遺伝子が、染色体上の二つの領域にあることを突き止めた。さらに、このうち一つの遺伝子が、領域内のどこにあるかを特定した。調査では、椎骨が2、3個多い場合、胸椎・腰椎の部分にあたる背骨の長さは平均3.5センチ長かった。ロース肉とバラ肉を合わせた重量は約800グラム増加し、肉質は同等だった。

研究成果を品種改良に利用すれば、背骨の長い系統を簡単に選抜でき、品種改良のスピードが大幅にアップする。

遺伝子を利用した豚の系統選抜は、すでに遺伝病を取り除く目的で行われている。農業生物資源研究所の美川智主任研究員はロース肉の増量について「技術的には難しくない」とみている。