

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5078074号
(P5078074)

(45) 発行日 平成24年11月21日 (2012.11.21)

(24) 登録日 平成24年9月7日 (2012.9.7)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A O 1 K 67/027 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

A O 1 K 67/027

C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 5 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2007-171707 (P2007-171707)
(22) 出願日 平成19年6月29日 (2007.6.29)
(65) 公開番号 特開2009-5649 (P2009-5649A)
(43) 公開日 平成21年1月15日 (2009.1.15)
審査請求日 平成22年4月30日 (2010.4.30)

(73) 特許権者 598096991
学校法人東京農業大学
東京都世田谷区桜丘 1 丁目 1 番 1 号
(74) 代理人 100080609
弁理士 大島 正孝
(74) 代理人 100109287
弁理士 白石 泰三
(72) 発明者 河野 友宏
東京都世田谷区桜丘 1 丁目 1 番 1 号 東京
農業大学内
(72) 発明者 川原 学
東京都世田谷区桜丘 1 丁目 1 番 1 号 東京
農業大学内
審査官 太田 雄三

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核移植卵、単為発生胚および単為発生非ヒト哺乳動物の作出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非ヒト哺乳動物の核移植卵を作出する方法であって、

(1) 除核した卵核胞期卵 (G V 期卵) に、非成長期卵 (n g 卵子) を導入した後、体外成熟培養し M I I 期 (第 2 減数分裂中期) まで移行させ第 1 核移植卵とする工程、

(2) 該第 1 核移植卵から M I I 期染色体を取り出し、別の M I I 期卵 (f g 卵子) に導入し第 2 核移植卵とする工程、

からなる、 n g 卵子由来の半数体ゲノムセットおよび f g 卵子由来の半数体ゲノムセットを有する核移植卵を作出する方法において、 n g 卵子または f g 卵子として、 (A) H 1 9 遺伝子および I g f 2 遺伝子の発現を制御する D N A メチル化インプリント領域 (領域 A) 並びに (B) G t 1 2 遺伝子および D 1 k 1 遺伝子の発現を制御する D N A メチル化インプリント領域 (領域 B) の双方を欠損する卵子であって、領域 A を欠損した非ヒト哺乳動物と領域 B を欠損した非ヒト哺乳動物とを交配して得られた卵子から、領域 A および領域 B の双方を欠損した卵子を選択することにより得られた卵子を用いることを特徴とする、前記核移植卵の作出方法。

【請求項 2】

非成長期卵 (n g 卵子) は、新生仔の卵母細胞である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

別の M I I 期卵 (f g 卵子) は、排卵卵子である請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法で得られた第 2 核移植卵を活性化処理した後、体外発生培養することからなる単為発生胚の作出方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法で得られた単為発生胚を非ヒト哺乳動物の子宮に移植し成長させることからなる単為発生非ヒト哺乳動物の作出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、核移植卵の作出方法に関する。さらに詳しくは、雌ゲノムのみから構成される核移植卵の作出方法に関する。また本発明は、核移植卵から単為発生胚を作出する方法に関する。さらに本発明は、該単為発生胚から単為発生非ヒト哺乳動物を作出する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

哺乳動物では、精子と卵子の受精により個体発生が行われ、決して卵子のみでは個体発生を完了することはない。これは、精子と卵子のゲノムの機能が決定的に異なっていることを意味する。この機能差は生殖細胞が形成される過程で後天的に刷り込まれる化学的な DNA 修飾の結果、同一遺伝子の発現が精子に由来するものと、卵子に由来するものとで全く異なる遺伝子群（インプリント遺伝子）が存在するためであると考えられている。事実、新生仔の卵母細胞はこの遺伝子修飾を受けておらず、あたかも精子由来の遺伝子発現パターンを示す遺伝子が多数存在する。

20

このようなインプリント遺伝子の発現パターンを解析するため、本発明者は、マウスの新生仔卵母細胞由来のゲノムと成熟雌由来の卵子ゲノムから核移植卵を作出する方法を提案した（非特許文献 1 参照）。かかる方法は、（1）除核した卵核胞期（GV 期）卵に、新生仔卵母細胞（ng 卵子）を導入した後、体外成熟培養し MII 期（第 2 減数分裂中期）まで移行させ第 1 核移植卵とする工程、（2）該第 1 核移植卵から MII 期染色体を取り出し、別の MII 期卵（fg 卵子）に導入し第 2 核移植卵とする工程からなる。この方法で得られる第 2 核移植卵は、ng 卵子由来の半数体ゲノムセットおよび fg 卵子由来の半数体ゲノムセットを有する。

本来、新生仔卵母細胞（ng 卵子）は、卵子成長過程の後期（マウスでは卵子の直径がおよそ 60 μm ）になるまでは減数分裂を再開することがなく、第 1 減数分裂前期のディプロテン期で細胞周期を停止している。本発明者は、この細胞周期を停止している新生仔卵母細胞（ng 卵子）を、十分に成長した卵母細胞の細胞質へ導入すると、減数分裂を再開することを見出し、上記方法を提案した。

30

【0003】

導入された ng 卵子由来の遺伝子は、卵子成長期に後天的に刷り込まれる化学的な DNA 修飾を受けておらず、第 2 核移植卵はインプリント遺伝子の発現制御を解析する上で、有用な材料となることが期待される。かかる第 2 核移植卵からの単為発生胚は、形態的には受精卵由来の胎仔と比べ遜色のない妊娠 13 . 5 日目の胎仔まで発生することを確認したが、それ以上の成長は確認できなかった。

40

その後の研究により、本発明者は、上記方法において ng 卵子または fg 卵子として精子形成過程で後天的遺伝子修飾をうけるインプリント遺伝子、特に H19 遺伝子を欠損する卵子を用いると、成体までの発育能を有する核移植卵が得られることを見出し、特許出願し（特許文献 1）、文献に発表した（非特許文献 2）。この方法は、成体までの発育能を有する核移植卵が得られる点において優れた方法であるが、成体は単為発生胚に対して 1 . 5 % 程度しか作出せず、成体の作出効率の向上が望まれていた。

【非特許文献 1】河野友宏著、「卵子形成過程におけるゲノム刷込みと胚発生」、蛋白質核酸 酵素 Vol. 43 No. 4 (1998), p 267 - 274

【非特許文献 2】Tomohiro Kono et al, Nature Vol.428, No.6985, pp.860-864, 22 April 2004

50

【特許文献1】国際公開W O 2 0 0 5 / 0 1 1 3 7 1号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

そこで本発明の目的は、非ヒト哺乳動物の卵子由来の半数ゲノムを2セット有する核移植卵であって、成体の作出効率に優れた核移植卵を提供することにある。また本発明は、該核移植卵からの単為発生胚の作出方法、該単為発生胚からの単為発生非ヒト哺乳動物の作出方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

特許文献1に記載の方法に使用するf g 卵子またはn g 卵子は、インプリント遺伝子、特にH 1 9 遺伝子が欠損されている点で、精子由来の遺伝子に近いものであるが、精子由来の遺伝子とは相違し、得られた核移植卵からの成体の作出効率は低い。

そこで、本発明者は、卵子由来の半数ゲノム2セットを有する第2核移植卵のゲノム遺伝子を、より精子と卵子の生殖におけるゲノム遺伝子に近づけるべく、遺伝子の父方発現と母方発現に着目して検討した。

その結果、特許文献1記載の方法において、n g 卵子またはf g 卵子として、(A) H 1 9 遺伝子およびI g f 2 遺伝子の発現を制御するDNAメチル化インプリント領域(領域A)並びに(B) G t 1 2 遺伝子およびD 1 k 1 遺伝子の発現を制御するDNAメチル化インプリント領域(領域B)の双方を欠損する卵子を用いると、成体の作出効率を格段に向上させることができることを見出し、本発明を完成した。

【0006】

即ち、本発明は、非ヒト哺乳動物の核移植卵を作出する方法であって、

(1) 除核した卵核胞期卵(GV期卵)に、非成長期卵(n g 卵子)を導入した後、体外成熟培養しM I I 期(第2減数分裂中期)まで移行させ第1核移植卵とする工程、

(2) 該第1核移植卵からM I I 期染色体を取り出し、別のM I I 期卵(f g 卵子)に導入し第2核移植卵とする工程、

からなる、n g 卵子由来の半数体ゲノムセットおよびf g 卵子由来の半数体ゲノムセットを有する核移植卵を作出する方法において、n g 卵子またはf g 卵子として、(A) H 1 9 遺伝子およびI g f 2 遺伝子の発現を制御するDNAメチル化インプリント領域(領域A)並びに(B) G t 1 2 遺伝子およびD 1 k 1 遺伝子の発現を制御するDNAメチル化インプリント領域(領域B)の双方を欠損する卵子であって、領域Aを欠損した非ヒト哺乳動物と領域Bを欠損した非ヒト哺乳動物とを交配して得られた卵子から、領域Aおよび領域Bの双方を欠損した卵子を選択することにより得られた卵子を用いることを特徴とする、前記核移植卵の作出方法である。

【0007】

また本発明は、該第2核移植卵を活性化処理した後、体外発生培養することからなる単為発生胚の作出方法を包含する。

【0008】

さらに本発明は、該単為発生胚を雌非ヒト哺乳動物の子宮に移植し成長させることからなる単為発生非ヒト哺乳動物の作出方法を包含する。

【0009】

本発明において成体の作出効率を向上させることができる理由は以下のように推定できる。即ち、哺乳動物では、父方および母方から由来している相同染色体上に、同じ遺伝子あるいはその対立遺伝子が同一順列で配列されており、両親のアレルから同等に遺伝子発現が行われ個体の形質発現に携わっている。

しかし、一部の遺伝子には父方発現するものと母方発現するものがある。例えば、胚成長因子I g f 2 (Insulin like growth factor II)遺伝子は、父方遺伝子座(精子由来)で発現するが、母方遺伝子座(卵子由来)では発現しない。逆に、I g f 2 遺伝子の下流に位置するH 1 9 遺伝子は、母方遺伝子座からのみ発現する。このような遺伝子をインプ

10

20

30

40

50

リント遺伝子と呼ぶ。これは I g f 2 遺伝子と H 1 9 遺伝子が、H 1 9 遺伝子の下流に存在するエンハンサー（遺伝子発現増強配列）を共有しているためである。このエンハンサーは、通常 H 1 9 遺伝子に対して優位に機能するが、H 1 9 遺伝子上流の発現調節領域（領域 A）が精子形成過程で後天的遺伝子修飾（DNAメチル化）を受けると H 1 9 遺伝子に対して機能することができなくなり、I g f 2 遺伝子に対して機能するようになる。その結果、H 1 9 遺伝子は父方での発現が抑制され、I g f 2 遺伝子は父方で発現するといった相互関係が成り立つ。

【 0 0 1 0 】

同様に D 1 k 1 遺伝子と G t 1 2 遺伝子は、それぞれ父方および母方遺伝子座から発現するインプリント遺伝子である。G t 1 2 遺伝子の上流にある発現調節領域（領域 B）は精子形成過程でメチル化を受け、発現調節が成立する。

10

即ち、通常の精子と卵子による生殖においては、母方で H 1 9 および G t 1 2 遺伝子が発現し、父方で I g f 2 および D 1 k 1 遺伝子が発現することにより、正常な胚成形が行われている（表 1 参照）。卵子同士の単為生殖では、双方の遺伝子が母方に由来するため、母方で発現する H 1 9 および G t 1 2 遺伝子が過剰発現され、父方で発現する I g f 2 および D 1 k 1 遺伝子の発現が生じないことが予想される（表 2 参照）。そこで、本発明のように、n g 卵子または f g 卵子として、領域 A および領域 B の双方を欠損する卵子を用いると、通常の精子と卵子による生殖に近い発現調節が行なわれ、成体発生率を格段に向上させることができるものと推定される（表 3 参照）。

【 0 0 1 1 】

20

【表 1】

表 1

遺伝子	I g f 2	H 1 9	D 1 k 1	G t 1 2
精子	○	×	○	×
卵子	×	○	×	○

○：発現が促進 ×：発現が抑制

30

【 0 0 1 2 】

【表 2】

表 2

遺伝子	I g f 2	H 1 9	D 1 k 1	G t 1 2
卵子	×	○	×	○
卵子	×	○	×	○

○：発現が促進 ×：発現が抑制

40

【 0 0 1 3 】

【表 3】

表 3

遺伝子	I g f 2	H 1 9	D 1 k 1	G t 1 2
領域 A および B 領域 の欠損卵子	○	×	○	×
卵子	×	○	×	○

○：発現が促進 ×：発現が抑制

10

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、非ヒト哺乳動物の卵子由来の半数ゲノムを2セット有する核移植卵であって、成体の作出効率に優れた核移植卵の作出方法が提供される。また本発明によれば、該核移植卵からの単為発生胚の作出方法、該単為発生胚からの単為発生非ヒト哺乳動物の作出方法が提供される。本発明により得られる非ヒト哺乳動物は、正常な繁殖能力を有する。

特に本発明によれば、単為発生胚に対する成体の作出効率が7%程度となり、作出効率が1.5%程度の従来法（特許文献1）に比べその技術的意義は大きい。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

（第1核移植工程）

除核した卵核胞期卵（GV期卵）に、非成長期卵（ng卵子）を導入した後、体外成熟培養し、MII期（第2減数分裂中期）まで移行させる工程である。

GV期卵は、成熟した非ヒト哺乳動物に妊馬絨毛性性腺刺激ホルモンなどを投与し、過排卵処理により得られる体内成長卵子や、成熟した非ヒト哺乳動物の卵巢から無処理で得られる体内成長卵子を用いることができる。かかる体内成長卵子は、過排卵処理、あるいは無処理により得られる雌非ヒト哺乳動物の卵巢からPBS溶液等を用いて注射針等で卵胞を切り裂いたり、注射針等で卵胞から吸引することにより採取することができる。卵丘細胞が付着しているGV期卵はガラスピペットなどによるピペッティングや、トリプシン・EDTA等の酵素処理によって卵丘細胞を除去することが好ましい。

30

GV期卵は、透明帯の切断および除核を行いレシピエント卵とする。透明帯は、顕微鏡で観察しながらガラスナイフなどで切断することができる。除核は、除核ピペットを透明帯の切断部から挿入し、少量の細胞質とともに除去して行うことができる。

【0016】

ng卵子は、胎生期の卵母細胞または新生仔の卵母細胞であることが好ましいが、成熟した非ヒト哺乳動物の卵巢から採取することもできる。

導入は、細胞融合により行うことが好ましい。レシピエント卵の囲卵腔内にng卵子をセンダイウイルス（HVJ）とともに注入し融合させることが好ましい。

40

その後、体外成熟培養し、MII期（第2減数分裂中期）まで移行させる。体外成熟培養は、ウシ胎仔血清（FBS）を5%添加したαMEM培地等により、炭酸ガス培養器中で培養することができる。またウシ胎仔血清（FBS）を5%添加したM16培地を用いることができる。体外成熟培養により、卵は核膜の崩壊、分裂装置の形成、減数分裂、第1極体の放出を行いMII期に達した第1核移植卵を得ることができる。

非ヒト哺乳動物としては、マウス、豚、牛、ヒツジ、ヤギ、ラット、ウサギ等が好ましい。

【0017】

（第2核移植工程）

第1核移植卵からMII期染色体を取り出し、別のMII期卵（fg卵子）に導入し第

50

2 核移植卵とする工程である。

f g 卵子は、雌成熟非ヒト哺乳動物からの排卵卵子であることが好ましい。かかる排卵卵子は、成熟した非ヒト哺乳動物に妊馬絨毛性性腺刺激ホルモンやヒト絨毛性性腺刺激ホルモンなどを投与し、過排卵処理により排卵卵子を得ることが出来る。一方、成熟した非ヒト哺乳動物の卵巣から無処理で得られる体内成長卵子を卵丘細胞に覆われた状態で体外成熟培養し M I I 期に達した卵を f g 卵子として用いることも出来る。f g 卵子は透明帯の一部を切断しておくことが好ましい。

【 0 0 1 8 】

導入は以下の方法で行うことができる。第 1 核移植卵の透明帯切断部から除核用ピペットで M I I 期染色体（分裂装置）を吸引する。ついで、ピペット先端にセンダイウイルスを吸引し、f g 卵子の透明帯切断部から挿入して M I I 染色体を注入することができる。これらの操作は M 2 培地等の核移植用培地中で行うことが好ましい。その後、M 2 培地中で所定の時間、培養して融合させ第 2 核移植卵を得ることができる。第 2 核移植卵は、n g 卵子由来の半数ゲノムセットと f g 卵子由来の半数ゲノムセットを有する。

【 0 0 1 9 】

（領域 A、領域 B）

本発明においては、n g 卵子または f g 卵子は、領域 A および領域 B の双方を欠損する卵子である。

領域 A は、H 1 9 遺伝子および I g f 2 遺伝子の発現を制御する DNA メチル化インプリント領域である。領域 A は、マウスでは、I g f 2 遺伝子と H 1 9 遺伝子との間にある、長さ 1 0 k b の領域である。H 1 9 遺伝子の 5 ' 側の直近の E c o R I 制限酵素切断部位から約 1 0 k b 上流の E c o R I 制限酵素切断部位までの領域である。

H 1 9 遺伝子は、Leighton P.A.et al,Nature 375,34-39,1995 に記載されている。H 1 9 遺伝子の長さは 3 k b である。I g f 2 遺伝子は、Leighton et al,Nature 375,34-39,1995 に記載されている。

【 0 0 2 0 】

領域 B は、G t 1 2 遺伝子および D 1 k 1 遺伝子を発現制御する DNA メチル化インプリント領域である。領域 B は、マウスでは、D 1 k 1 遺伝子と G t 1 2 遺伝子との間にある、長さ 4 . 2 k b の領域である。G t 1 2 遺伝子の 5 ' 側の直近の S c a 1 制限酵素切断部位から約 4 . 2 k b 上流の S a c 1 制限酵素切断部位までの領域である。

G t 1 2 遺伝子は、maternally expressed gene 3/gene-trap locus 2,Schmidt,J.V.et al,Genes Dev.14,1997-2002,2000 に記載されている。D 1 k 1 遺伝子は、Schmidt,J.V.et al,Genes Dev.14,1997-2002,2000) に記載されている。

領域 A および B の双方を欠損する卵子は、それぞれの遺伝子欠損哺乳動物の交配により誕生した産子から得ることができる。

遺伝子欠損哺乳動物は、公知の標的遺伝子組換え法(ジーン・ターゲティング:例えば、Methods in Enzymology 225:803-890,1993)を用いることにより、例えばマウスの場合、以下のとおりに作成することができる。

【 0 0 2 1 】

まず、単離した領域 A および B の標的配列をネオマイシン耐性遺伝子 (N e o r 遺伝子) と置換し、また領域 A および B の端部にヘルペスウイルスのサイミジンカイネース遺伝子 (H S V - t k 遺伝子) を付加してターゲティング・ベクターを作成する。このターゲティング・ベクターをマウスの胚性幹細胞 (E S 細胞) に導入し、細胞ゲノム DNA の領域 A および B がターゲティング・ベクター中の変異配列に相同組換えされた細胞を選択する。

このような遺伝子組換え細胞の選択は、G 4 1 8 を細胞培地に添加して N e o r 遺伝子を持たない非組換え細胞を除去し、さらにガンシクロビルを添加して H S V - t k 遺伝子が残存するランダムな組換え細胞を除去することによって行うことができる。選択された遺伝子組換え細胞の領域 A および B は、そのコード配列中に N e o r 遺伝子が挿入された変異配列であり、発現することはできない。

【 0 0 2 2 】

次いで、この遺伝子組換えされた E S 細胞をマウスの初期胚（胚盤胞）に注入し、この初期胚を雌マウスの体内で個体へと発生させ、キメラマウスを産出させる。そして、このキメラマウスと野生型マウスとを交配して子孫マウスを産出させ、これらの子孫マウスの中から、領域 A および B の双方に変異配列を有するマウス個体を選別することによって、遺伝子欠損マウスを得ることができる。

本発明においては、発現制御領域である領域 A および B の双方を欠損する卵子を用いればよいが、領域 A および B に加えて H 1 9 遺伝子自体を欠損する卵子を用いてもよい。

【 0 0 2 3 】

（単為発生胚の作出）

本発明は、上記第 2 核移植卵を活性化処理した後、体外発生培養することからなる単為発生胚の作出方法を包含する。卵子の活性化は、ストロンチウムで行うことが好ましい。具体的には、10 mM の SrCl_2 を含む M 1 6 培地で培養して活性化させることができる。また、電気パルスやエタノール等によっても卵子を活性化することが出来る。体外発生培養は、5 % CO_2 、5 % O_2 、90 % N_2 の気相、37 ~ 39 の条件で行うことができる。

【 0 0 2 4 】

（単為発生非ヒト哺乳動物の作出）

本発明は、上記単為発生胚を非ヒト哺乳動物の子宮に移植し成長させることからなる単為発生非ヒト哺乳動物の作出方法を包含する。移植する非ヒト哺乳動物としては、特に制限されるものではないが、人工授精させた後の妊娠初期にプロスタグランジン $\text{F} 2 \alpha$ 等を用いて人工流産させ、同期化を行った非ヒト哺乳動物を用いることが好ましい。非ヒト哺乳動物としては、マウス、豚、牛ヒツジ、ヤギ、ラット、ウサギ等が好ましい。

【実施例】

【 0 0 2 5 】

以下、実施例により本発明を説明する。実施例では、哺乳動物としてマウスを用いた。

【 0 0 2 6 】

実施例 1

（n g 卵子の採取）

標的遺伝子組換え法(Methods in Enzymology 225:803-890,1993)により H 1 9 遺伝子 (3 kb) およびその上流 (10 kb) を合わせて 13 Kb (H 1 9 遺伝子および領域 A) を欠損したマウス(Leighton et al.,Nature375:34-39,1995)および D 1 k 1 - G t 1 2 発現調節領域(領域 B、長さ 4 . 15 Kb、G t 1 2 遺伝子上流)を欠損したマウス(Schmidt, J.V. et al, Genes Dev.14,1997-2002,2000)を交配して得られた雌の生後 1 日の新生仔の卵巣を採取した。採取した卵巣を 0 . 02 % EDTA 溶液中に移し 37 で 10 分間培養した。ついで、注射針にて卵巣を切り裂き解離してきた非成長期卵子を採取した。得られた卵子の内、領域 A および領域 B の双方が欠損した卵子を選択しドナー用 n g 卵子とした。

【 0 0 2 7 】

（GV 期卵の採取）

成熟したマウス (8 ~ 12 週齢、B 6 D 2 F 1、チャールズブリバーノクレア) に妊馬絨毛性性腺刺激ホルモンを 5 ~ 7 . 5 IU 投与した後、卵巣中の発育した卵胞を 27 ゲージ注射針にて裂き卵丘細胞に包まれた GV 期卵を採取した。卵丘細胞をピペッティングにより除去した後、GV 期卵を M 2 培地 (240 μM dbcAMP および 5 % FBS を添加) で 37 にて 2 時間培養した。

【 0 0 2 8 】

（除核）

倒立顕微鏡にマイクロマニピュレーター (成茂社製) を取り付け実施した。まず、GV 期卵の透明帯をガラスナイフを用いて 15 ~ 20 % 切断した。ついで、GV 期卵を核移植用 M 2 培地 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サイトカラシン B、100 ng/ml コルセミド、24

10

20

30

40

50

0 μ M dbcAMPおよび5% FBSを添加)に移し、15分間37℃で培養した。顕微操作により除核ピペット(直径が25 μ m)を透明帯の切断部から挿入し、GV期卵の核を少量の細胞質とともに除去しレシピエント卵とした。

【0029】

(第1核移植工程)

次いで、ng卵子を移植用ピペット(直径が15 μ m)に吸引したのち、センダイウイルス(HVJ:コスモバイオ)をピペットの先端に吸引した。ピペットをレシピエント卵の透明帯の切断部から挿入しレシピエント卵に押し付けながら注入した。得られた核移植卵を5% FCS添加 α MEM培地に移し、炭酸ガス培養器中で37℃にて14時間、培養した。核移植卵は、核膜の崩壊、分裂装置の形成、減数分裂、第1極体の放出の各工程を経て、第2減数分裂中期(MII期)に達し、第1核移植卵を得た。

【0030】

(第2核移植工程)

雌成熟マウス(8~12週齢、B6D2F1、チャールズリバー/クレア)に妊馬絨毛性性腺刺激ホルモンおよびヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを48時間間隔でそれぞれ5~7.5 IU投与し、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン投与14時間後に卵管を採取した。卵管より卵丘細胞に包まれた排卵卵子の塊を採取した後、300 μ g/mlヒアルロニダーゼを含むM2培地中で卵丘細胞をピペッティングにより除去した後、排卵卵子(fg卵子)を採取した。顕微操作により透明帯の一部を切断した。排卵卵子および第1核移植卵を核移植用M2培地(5 μ g/mlサイトカラシンBを添加)に移した。上述の第1核移植卵の透明帯切断部から除核用ピペット(直径25 μ m)を挿入し、MII期染色体(分裂装置)を吸引した。ついで、ピペット先端にセンダイウイルスを吸引し、fg卵子の透明帯切断部にピペットを挿入して、MII期染色体を注入した。M2培地中に移し、37℃で30分間培養して両者を融合させ第2核移植卵を得た。

下記表4に核移植卵の生産効率を示す。

【0031】

【表4】

表4

	第1核移植卵	第2核移植卵
融合卵数/操作卵数(率)	322/383 (84.1%)	238/274 (86.9%)
成熟卵数(率)	274(85.1%)	—

【0032】

実施例2

(単為発生胚の作出)

得られた238個の第2核移植卵を、10M塩化ストロンチウムを含むM16培地にて37℃で3時間培養し、人為的に卵子の活性化を誘起させた。その結果221個の卵子が活性化され、それらをM16培地にて37℃で3日間体外培養した。その結果、206個の胚盤胞が作出された。

【0033】

実施例3

(単為発生マウスの作出)

得られた206個の胚盤胞を偽妊娠2.5日目の雌マウス(定法に従い、精管結紮雄交配させ膈栓を確認した日を偽妊娠0.5日目とした雌マウス)の子宮に移植したところ、14匹の正常雌産子が誕生し、すべて成体にまで発育した。したがって、作出効率は7%と高率である。これらの遺伝子を解析した結果、H19-Igf2遺伝子およびGTL-

D L K 1 遺伝子の発現調節メチル化領域（領域 A および B ）の欠損をそれぞれヘテロに持つことが確認できたことから、第 2 核移植卵由来の産子であることが確認された。

これら 14 匹の単為発生マウスうち 5 匹に関して繁殖能力を調べた結果、試験した全ての単為発生マウスは正常に交配、妊娠および出産することが判明し、正常な繁殖能力を持つことが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0034】

本発明によれば、卵子由来の半数ゲノムを 2 セット有する成体の単為発生非ヒト哺乳動物が作出できる。かかる非ヒト哺乳動物は遺伝子の働きを解析する実験用動物として有用である。本発明によれば、作出される非ヒト哺乳動物は全て雌なので、例えば、優秀な遺伝子を有し遺伝的に均一な乳牛を効率よく生産することが可能となる。また、優れた肉牛を作出する雌牛を効率よく生産することが可能となる。このように本発明は畜産業において利用が期待される。本発明により単為発生哺乳動物を作出する場合は非ヒト哺乳動物を主たる対象とするが、本発明は医療分野における移植用の臓器の生産にも応用することが期待できる。

10

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図 1】発明の核移植卵を作出する方法の概略を示した図である。

20

【0036】

【図 2】本発明より得られた単為発生マウスとその産子の写真である。

【符号の説明】

【0037】

a：新生児由来 n g 卵子

b：成熟雌由来 f g 卵子

c：核移植

d：体外成熟培養

e：成熟した核置換卵子

f：排卵卵子

30

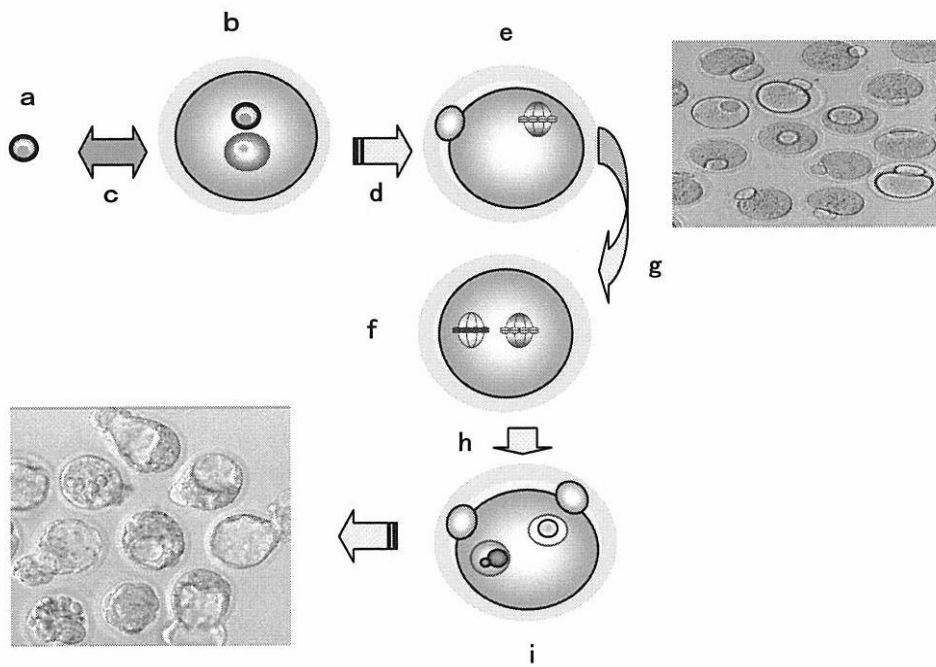
g：M I I 期分裂装置の移植

h：卵子の人為的活性化

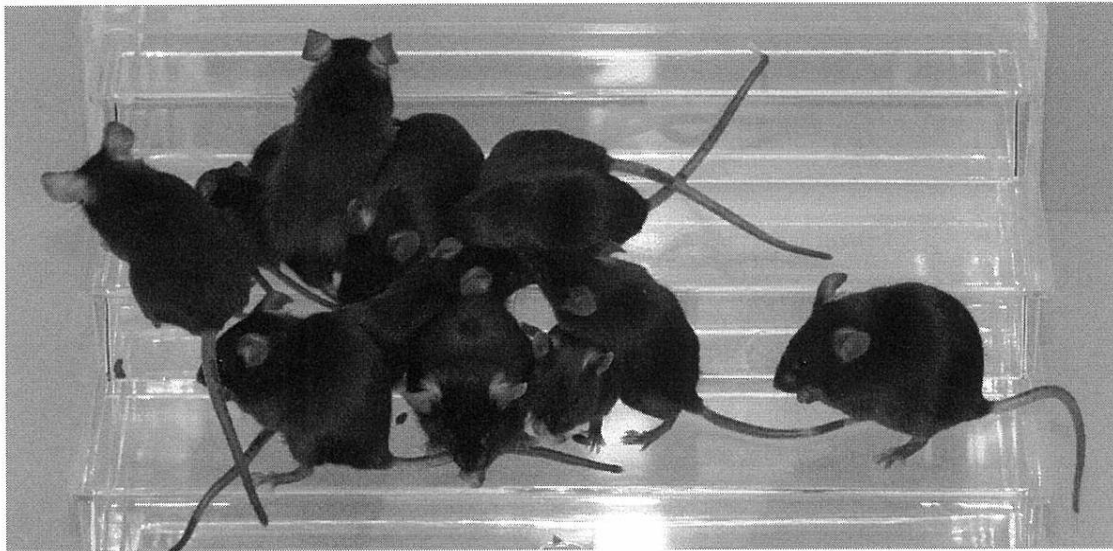
i：再構築された n g / f g 単為発生胚

a ~ e は、本発明の第 1 核移植工程に対応する。f ~ i は、本発明の第 2 核移植工程に対応する。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2005/011371(WO, A1)

産婦人科の世界, 2005年 8月 1日, 第57巻第8号, 第607-615頁

Reproduction, 2006年, Vol. 131, pp. 481-488

Stem Cells in Reproduction and in the Brain, 2006年, Vol. 60, pp. 23-33

NATURE, 2004年 4月, Vol. 428, pp. 860-864

NATURE BIOTECHNOLOGY, 2007年 8月19日, Vol. 25, No. 9, pp. 1045-1050

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/10

A01K 67/027

C12N 15/09

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

Cinii