

## 研究成果

サブテーマ名：② 有用アグリリソースの高効率生産・利用技術の開発

小テーマ名：②-4 遺伝子操作ウシの効率的作製技術開発

サブテマリーダー：(雇) 教授 佐伯和弘<sup>1,2</sup>

研究従事者：(雇) 教授 佐伯和弘<sup>1,2</sup> (小テマリーダー)

(雇) 講師 岸上哲士<sup>1,2</sup> (雇) 准教授 加藤博己<sup>1,4</sup> (雇) 准教授 岸 昌生<sup>1,5</sup>

(雇) 主査研究員 谷口俊仁<sup>1</sup> (雇) 池田俊太郎<sup>1</sup> (雇) 笠松 礼<sup>1</sup>

(共) 准教授 加藤暢宏<sup>2</sup> (共) 大家畜部長 長谷川正彦<sup>20</sup> (共) 副場長 中本和弘<sup>20</sup>

(共) 専門研究員 坂口慎一<sup>22</sup> (共) 林 登<sup>22</sup> (共) 星野洋一郎<sup>22</sup> (共) チームリーダー 若山照彦<sup>23</sup>

(共) 所長 青柳敬人<sup>34</sup> (共) 研究員 浦川真実<sup>34</sup> (共) 研究員 出田篤司<sup>34</sup>

(共) 取締役 三谷 匡<sup>35</sup> (サブテマ副リーダー) (共) 研究員 安齋政幸<sup>35</sup>

研究の概要、新規性及び目標

①研究の概要／ 中間評価を受けて研究計画を生産現場での利用可能性が高いと考えられる内容へと変更した。

〈H16. 1～H18. 3〉 実験動物で培ってきた遺伝子改変技術に関する多くの知見とノウハウをさらに発展させ、家畜への応用技術の開発を目的とする。すなわち、高効率な遺伝子改変ウシ作製の要素技術である個体への発生率が高いウシ体細胞核移植技術とウシ体細胞の遺伝子改変技術を開発し、技術あるいは遺伝子改変ウシ（凍結胚）の世界市場への販売を図る。

〈H18. 4～H20. 12〉 クローン技術を利用した新規種雄牛造成システムを開発を行う。具体的には、妊娠胎子の細胞を使ったクローンを作成し、それらを用いた肉用種雄牛クローン検定を目指す。この方法ではこれまでに研究されているクローン検定よりも約6ヶ月期間の短縮が可能である。さらにクローン胚の作製あるいは培養方法などの周辺技術の高度化を図る。

②研究の独自性・新規性

〈H16. 1～H18. 3〉 体細胞クローンウシ作製技術を利用すれば、培養細胞レベルで遺伝子改変を施し、適切な細胞を用いることで、期待する形質を獲得した遺伝子改変ウシを作製できる。我々は既にドナー細胞の細胞周期を巧みに制御することにより飛躍的に体細胞クローンウシを作成することに成功している（特許申請済）。一方、相同遺伝子組換えなど高度な遺伝子改変を施すには、初代培養細胞ではなく、例えば幹細胞のような多分化能を有し増殖活性の高い均一な細胞株の取得が有効であると考えられる。我々は既に実験動物から家畜に至る多様な動物種で、胚性幹細胞（ES 細胞）や骨髄間葉系幹細胞あるいは始原生殖細胞由来幹細胞（EG 細胞）の樹立に関する研究を進めている（ブタ EG 細胞：国際特許第 3790268 号）。

〈H18. 4～H20. 12〉 クローン検定は肉用種雄牛の選抜の効率化に極めて有効である。我々の目指す妊娠胎子の細胞を用いたクローン検定システムは、それをさらに短期化・効率化することが可能である。

③研究の目標

〈フェーズⅠ〉

- 1) ウシ始原生殖細胞の分離・同定と EG 細胞の開発
- 2) ウシ組織幹細胞の分離・同定と核移植ウシの作製
- 3) 核移植ウシの効率かつ正常な発生を誘導するためのドナー細胞の選定並びに核移植胚処理条件の検討

〈フェーズⅡ〉

- 1) クローン技術を利用した短期間・確実な新規種雄牛造成システムの開発
- 2) 実験動物の新規遺伝子改変技術によるモデル動物作製基盤技術の開発

〈フェーズⅢ〉

- 1) 短期間・確実な新規種雄牛造成システムの生産現場での利用
- 2) 新規遺伝子発現制御技術及び関連技術のライセンス、遺伝子改変胚や細胞の作製・販売

研究の進め方及び進捗状況

1) 妊娠胎子の細胞を用いたクローン検定システムについては、主要な要素技術の全てが完成した。具体的には、妊娠羊水中からの胎子由来細胞の単離技術（特願 2007-328617）、さらにそれら細胞由来の受胎性の高いクローン胚の作出技術、超低温保存技術の確立などである。それらの周辺技術として、ドナー細胞周期のコントロールにより体細胞クローンウシの作製技術を飛躍的に改善することができ、さらにプロテオーム解析によりクローン胚の個体発生効率に関連するタンパク質を特定した（特願 2008-247956）。また、ウシクローン胚のエピジェネティックな変化を制御することで胚作製効率が改善した（特願 2005-287361、PCT/JP2006/319311）。さらに、哺乳動物では困

難とされる単一胚の体外培養に適した培養装置の開発に成功した（特願 2008-210756）。

2) 新規遺伝子改変技術については、RNAi によるノックダウンマウスの作製を世界に先駆けて成功した。また、ノックダウン効率の簡易評価法を開発した（特願 2007-118962）。ウシ幹細胞の獲得に関しては、当初試行した始原生殖細胞由来 EG 細胞より精子幹細胞の獲得に修正した。マウス精子幹細胞の獲得と精子形成誘導法を確立し、並行してウシについても試行している。

主な成果

具体的な成果内容：

- 1) クローン技術を利用した短期間・確実な新規種雄牛造成システムの開発
    - ・妊娠ウシ羊水中からの効率的な胎子細胞の獲得方法の確立（特願 2007-328617）
    - ・妊娠中胎子細胞からの高受胎能を有するクローン胚の作出
    - ・プロテオーム解析によるクローン胚の受胎能力に関連するタンパク質の同定（特願 2008-247956）
    - ・ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によるウシクローン胚の生産効率改善（特願 2005-287361、PCT/JP2006/319311）
    - ・ポリジメチルシロキサンによる哺乳動物胚の培養装置の開発（特願 2008-210756）
    - ・クローン技術により、13 年間冷凍保存された精巣組織からスーパー種雄牛「安福」の復活に成功
  - 2) 実験動物の新規遺伝子改変技術によるモデル動物作製基盤技術の開発
    - ・RNAi によるノックダウンマウスの作製を世界に先駆けて成功、また、ノックダウン効率の簡易評価法を開発（特願 2007-118962）
    - ・RNA ポリメラーゼ II 型依存性 miRNA 発現ベクターを用いたノックダウンマウスを作製し、発現制御型遺伝子ノックダウン個体作製への応用可能性を実証
    - ・マウス精子幹細胞の長期培養系を確立
    - ・マウスにおいて精細管移植法並びに異所移植法による精子形成誘導法を確立
    - ・ウシ若齢精巣細胞を用いて異種異所移植法によるマウス体内でのウシ精細管様構造の再構築に成功
- 特許件数：国内 7 件 外国 1 件 論文数：42 件 口頭発表件数：108 件

研究成果に関する評価

- ①国内外における水準との対比／ 肉用種雄牛のクローン検定については、日本国内でのみ研究が行われており、過去に羊水中の胎子細胞由来クローンの成功例はなかったが、我々は独自の方法でこの技術を確立した。このことは、クローン技術の生産現場への利用面において高い評価を受けている。またこの検定方法はクローン由来の生産物の市場流通が事実上禁止されている現状でも活用できることから評価が高い。
- ②実用化に向けた波及効果／ 和牛をはじめとする肉用種雄牛の造成が低コスト・短期間となることで、国内の畜産業への波及が期待される。また、高率に発生するウシクローン胚の作製方法やプロテオーム解析との連携より解明されたタンパク質マーカーなどは、高い情報価値を有する。

残された課題と対応方針について

クローン技術を利用した新規種雄牛検定システムについては、主要な技術要素は確立したものの生産現場での実証例を示す必要があり、現在、岐阜県畜産研究所で計画中である。遺伝子改変ウシ体細胞の開発に関しては、強発現の体細胞の作製、RNA 干渉などの遺伝子改変技術の導入など、期待される形質を持つ体細胞の作製技術の確立する必要がある。そのような改変操作に有効な精子幹細胞の樹立並びに個体構築へとつながる工程を構築する。

	J S T 負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合 計
	15 年度	16 年度	17 年度	18 年度	19 年度	20 年度	小計	15 年度	16 年度	17 年度	18 年度	19 年度	20 年度	小計	
人件費	336	1,625	1,597	3,666	1,564	1,236	10,025	4,924	22,814	21,369	18,105	20,739	12,755	100,706	110,730
設備費	1,023	6,753	3,770	945	0	0	12,491	0	0	0	0	0	0	0	12,491
その他研究費	5,351	13,568	15,914	16,233	13,394	6,827	71,288	4,725	6,023	5,840	6,437	4,225	2,300	29,550	100,838
旅費	585	569	260	896	1,857	740	4,907	0	0	0	0	0	0	0	4,907
その他	17	81	284	254	199	787	1,622	0	0	0	0	0	0	0	1,622
小 計	7,312	22,597	21,825	21,994	17,014	9,590	100,332	9,649	28,837	27,209	24,542	24,964	15,055	130,256	230,587

代表的な設備名と仕様 [既存（事業開始前）の設備含む]

J S T 負担による設備：細胞融合装置、インキュベーター、画像解析システム、顕微鏡用培養装置、地域負担による設備：

※研究員氏名中の（雇）は雇用研究員、（共）は共同研究員、（技）は雇用技術員を示す。また、数字は、所属を示す。別表を参照。 ※表中、その他研究費は、消耗品費、材料費等。