

# アカハライモリのクローン作成

秋山 繁治

Cloning of *Cynops pyrrhogaster* (Japanese fire bellied newts) through nuclear transplantation

Shigeharu AKIYAMA

In this study, we attempted to artificially reproduce newts using cloning technology, which is a bioengineering method made capable by obtaining fertilized eggs, thus precluding the need to kill the parent individual. Frogs that Gardon has successfully cloned are parthenogenetic and activate only through needle stimulation. Newts are multi-fertilized and do not activate only via nuclear transplant stimulation. This presents several hurdles to cloning which require special measures to overcome.

An attempt was made to clone the blastomere (donor nucleus) into an unfertilized egg (recipient) through nuclear transplantation. A calcium ionophore solution was used to activate the nuclear-transplanted eggs. As a result, a total of 397 eggs were transplanted 22 times. Overall, 21% were activated (cell division), 3.3% developed to at least the morula stage and above, and 0.3% developed to the blastula stage of development.

## はじめに

2012年、iPS細胞の開発で、山中伸弥博士がノーベル生理学賞を受賞したというニュースが日本中を駆け巡った。東日本大震災の影響で、暗い未来しか描けなくなっていた日本の人々にとって、希望の光となる大きなニュースだった。多くの雑誌にiPS細胞の記事が掲載され、共に受賞したジョン・ガードン博士の両生類でのクローンの研究<sup>1)</sup>についても紹介されていた。

クローン技術については、1960年にガードンが両生類で成功した後、1997年に哺乳類では羊の乳腺由来の細胞を卵母細胞と融合させることによってクローン羊のドリーが誕生した。人間と同じ哺乳類で成功したということで、クローン技術が大きな話題となり、その技術の応用が期待された。しかしながら、その成功率の低さから具体的な利用は進まなかった。そしてクローンガエル誕生から50年以上が経過した今、クローン技術の延長線上で、遺伝子導入の技術で開発されたiPS細胞が医療に貢献する新技術として注目されている<sup>2)</sup>。

## 目的

本研究では、クローン技術を有尾類の繁殖に応用する技術の開発を目指した。なお、有尾目に注目したのは、生物学の研究に歴史的に使われてきた経緯はあるが、近年の自然環境の人為的な改変によって激減し、多くの種がレッドデータに記載されており、研究目的であっても近い将来、使用できなくなることが危惧されるからである。今や動物保護、生物学研究の両面で、親個体を殺さずに受精卵を手に入れる方法を確立する必要がある時代になっているといえる。クローン技術は、その成功率の低さが原因でなかなか実用化されなかったが、その技術を動物たちの保護に役立てたいと考えた。

研究対象は日本固有種のアカハライモリ*Cynops pyrrhogaster*とした。技術的な面では、有尾目イモリ科は受精様式が無尾目(カエル目)のように単性受精(卵に精子が一個しか入らない)ではなく、多精受精(多くの精子が細胞膜を通過)なので、針を刺した刺激だけでは賦活(細胞分裂)が起こらない。逆に言えば無尾目とは異なった新たな方法が必要となるので、研究としての意義が大きいと考えた。初期胚(胞胚)の割球を使った核移植でクローン動物の作成を目指した。

## 研究方法

材料にしたアカハライモリは、下北半島から鹿児島まで日本の広範囲に生息している種で、その名の通り腹面が赤く、黒い斑点があるのが特徴である。産卵期は4月から6月で、雄がフェロモンを出して雌を誘引し、雄が落とした精胞（精子の塊）を雌が貯精嚢に取り込み、産卵時に卵が総排出腔を通過するときに体内で受精させる仕組みになっている。ホルモンによる排卵誘発で得た受精卵を胞胚まで発生させた卵の核（ドナー核）を、別に採取した未受精卵（レシピエント）に移植する方法でクローン作成を試みた。産卵期の5月に採取した雌を使用するまで5℃で保持して、8月まで使用した。

### 1. マイクロピペットの作製

- (1) 実験に使用するマイクロピペットは、ガラス管に熱を加えて、電磁石の力で引き延ばす機械（※プラー・ナリシゲPN-30）で作成する。注）ガラス管を引き延ばすときは、加熱後、始めは弱い力（SUB）で少しずつ、その後強い力（MAIN）を加える。
- (2) マイクロピペットの先を細胞にさしやすくするために、針の先端を加熱して溶かして引き延ばした（ナリシゲMF-900使用）。

※予備実験Ⅰ：細胞に刺しやすい形の針を作成できる設定をさがす。

#### （実験A）

- ① MAINの力を50に設定し、加熱温度とSUBの力を変えて針を作成する。
- ② 針（ガラス管）の直径30μmから直径40μmになるときの長さを測定する。
- ③ 細胞に刺しやすい長さ（7.5~9.0mm）になる条件を最適とした。

#### （実験B）

- ① MAINの力を40に設定し、加熱温度とSUBの力を変えて針を作成する。
- ② （実験1）と同様に、長さを測定する。
- ③ （実験1）と同様にして適切な設定値を見つける。

### 2. レシピエントの準備

#### (1) 未受精卵の採取

- ① 1個体につき80単位のHCG（※胎盤性性腺刺激ホルモン・ゴナトロピン※）を1日おきに雌の顎皮下に注射し、20℃で飼育することによって排卵を誘発した。

- ② 1回目の注射から5日後、雌の腹を軽く押して採卵した。

#### (2) ゼリー層の除去

- ① 採取した未受精卵のゼリー層を1.5%チオグリコール酸ナトリウム溶液に浸して除去した。
- ② 卵を生理水で10回洗浄した。

#### (3) 未受精卵の卵核の不活性化

- ① ゼリー層を除去した未受精卵をステンレス製ネットの穴に動物極側を上にして置き、余分な水分を除いた。
- ② マイクロピペット（先端直径30μmのガラス製の針）を動物極の卵表直下にある卵核の付近に差し込み、一定量の細胞質（核を含む）をインジェクターで吸い取る方法で不活性化させた。傷口から細胞質が流出するのを防ぐために、4%フィコール溶液を用いた。

※予備実験Ⅱ：HGC注射での排卵誘発の効果を調べる雌に80単位のHGCを1日目と3日目の2回注射し、1日3回採卵して、産卵数を記録した。

### 3. ドナー核の準備

#### (1) 受精

- ① 雄の下腹部を絞って精液を採取し、少量の生理水で薄めて精子懸濁液をつくった。雌から採取した未受精卵にパスツールピペットを用いて精子懸濁液をかけて受精させた。その後15分間静置した後、10%生理水に卵を浸した。
- ② ゼリー層の除去  
受精45分後、受精卵のゼリー層を1.5%チオグリコール酸ナトリウム溶液に浸して除去し、生理水で10回洗浄した。
- ③ 卵をCa<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>を含まない生理水中に入れて20℃（注）で保存した。

※予備実験Ⅲ：Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>を含まない生理水中で、受精卵を20℃で24時間後まで観察した。

### 4. ドナー（胞胚）核の移植

- ① 寒天を敷いたシャーレの4%フィコール溶液中で、受精約24時間後の胞胚の受精膜を先端の細かいピンセットで破り、解離した割球を得た。
- ② マイクロピペットの針の先端（直径30μm）より少し大きい割球を選び、インジェクターで吸い取った。

③卵核を除去して不活性化させた未受精卵（レシピエント）に、②で吸い取った割球を注入して核移植を行った。外液を4%フィコール溶液にして細胞質の流出を防いだ。

### 5. 核移植卵の賦活

①核移植した卵を1~2 μM(※)のCaイオノフォアA23187(※)を含んだ生理水に10分浸して賦活させた。

※予備実験Ⅳ：賦活のためのCaイオノフォアの最適濃度を決定する。

- ①卵の動物極側のホワイトスポットの中心部分にあるピット(受精卵では存在しない)を確認して、未受精卵であると判断した。
- ③Caイオノフォアの濃度設定を変えた各溶液に卵を10分間浸した。
- ④18時間後、卵の状態を3段階(正常卵割・異常卵割・賦活しない)に分けて記録した。
- ⑤正常卵割の割合が高い濃度を最適と判断した。

②卵を生理水で洗浄した後、滅菌した生理水中で発生させた。

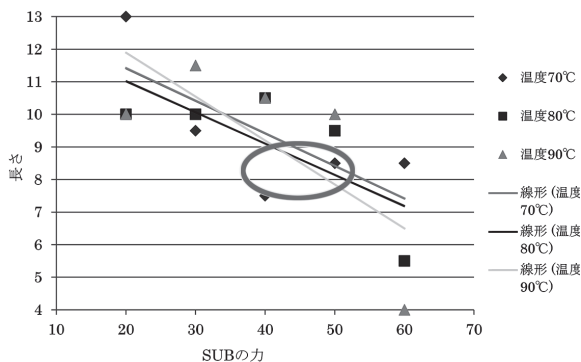
※予備実験Ⅴ：異常卵の正常発生卵への影響を調べる

- ①異常卵(発生せず白くなった卵)と、正常な受精卵を一緒に、各溶液中で保存する。
- ②保存開始から6日間、卵の状態を観察する。

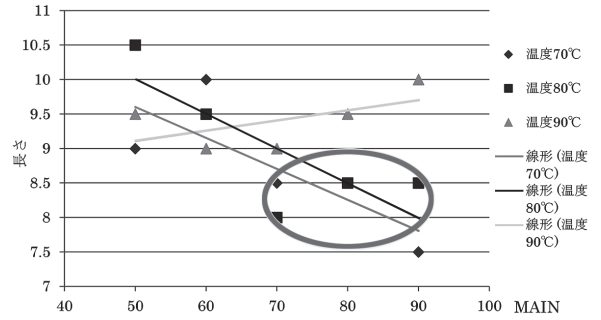
## 結果

### 1. 予備実験Ⅰ(マイクロピペットの作製)

(実験A)

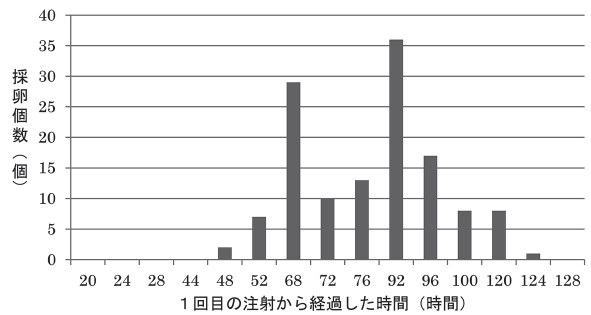


(実験B)



割球(ドナー核)を吸い込む際に圧力がかかりすぎない最適な設定は、温度70~80°C, SUBの力が40~50, MAINの力が70~90であった。

### 2. 予備実験Ⅱ(採卵)

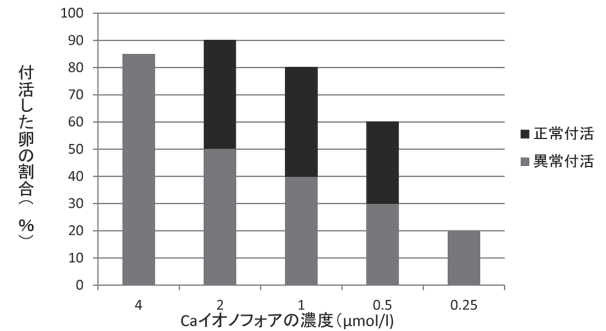


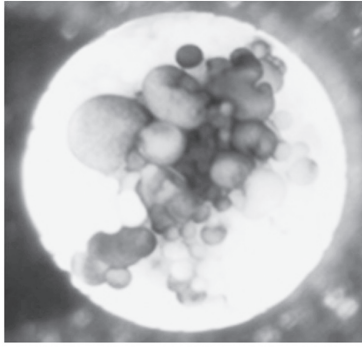
最初のHGC注射から4日後が、採卵に最も適していることが分かった。一回の注射だけでは、産卵を誘発できないが、2回注射することで、実験に使える十分な数の卵を採取できた。

### 3. 予備実験Ⅲ(ドナー核の準備)

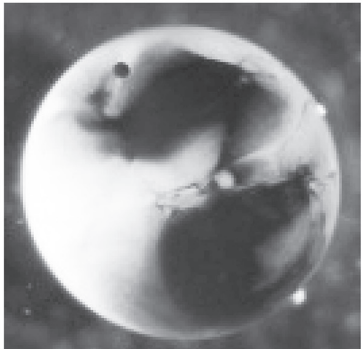
Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>を含まない生理水中で、割球同志の接着力が弱くなり、割球が解離することと、24時間後胞胚(インジェクターで核を吸いとるのに適した発生段階)になることが確認できた。

### 4. 予備実験Ⅳ(賦活処理)

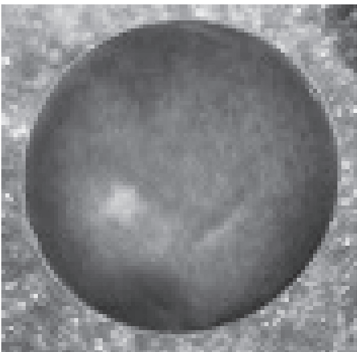




正常賦活した卵，処理18時間後



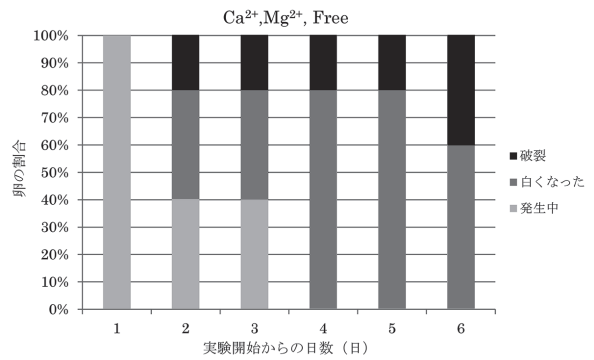
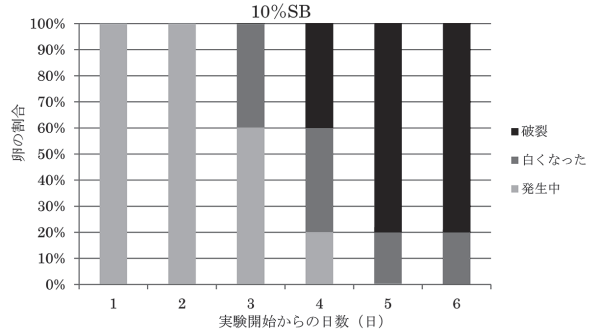
異常賦活した卵，処理18時間後



賦活しなかった卵，処理30時間後

イモリでは針を刺しただけの刺激では賦活しないが，Caイオノフォアを用いれば賦活できることがわかった。その条件は，1~2 $\mu$ mol/l溶液で10分間浸すことが最も適切であることが分かった。1~2 $\mu$ mol/lより高い濃度でも賦活させることはできるが，異常卵割をしてしまうことが多く，卵を正常に発生させるための賦活処理には適さないことがわかった。

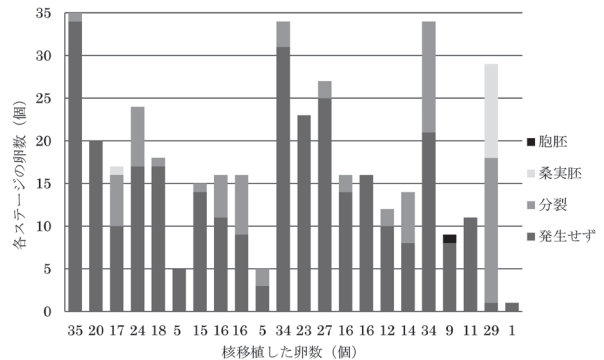
5. 予備実験V (異常卵の影響)

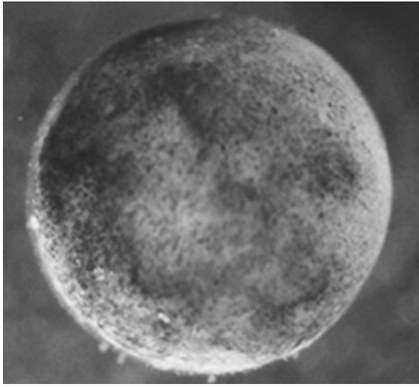


異常卵を正常発生卵と同じシャーレに保持した場合，異常卵の影響を受けて，正常発生卵が2日後には白くなったり，破裂してしまうものが多くなる。そして，6日後には，すべて発生が止まってしまった。このことから，核移植実験後の卵を発生させるとき，異常卵（発生せず死んでしまった卵）は見つけ次第排除した方がいいと判った。

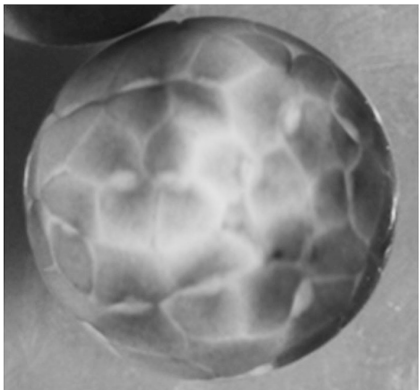
6. 核移植実験の成果

6月9日から8月3日にかけて22回の実験を行い，合計で397個の卵に核移植を行った。移植後については，賦活（細胞分裂）したのが21%，桑実胚以上まで発生したのが3.3%，胞胚まで発生したのが0.3%であった。

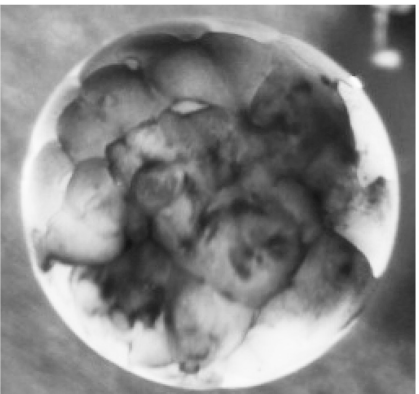




胚, 実験 39 時間後



桑実胚, 実験 20 時間後



分裂, 実験 23 時間後

マイクロピペットの改善及び移植後の処置の改善を繰り返して、21回目の実験では、賦活した卵が96.6%、桑実胚まで発生したのが38.3%とレベルまで到達できた。19回目の実験では、最高で胚まで発生させることに成功した。

## 考察

イモリを低温で保持することによって、繁殖期の5月に採取した個体を使って繁殖期を過ぎた8月まで移植実験をおこなうことができた。核移植の技術は、核移植の際に使用するマイクロピペットの針先が重要

で、卵（レシピエント）に負担をかけない程度に細く、一方で割球の核を傷つけないように吸い込める太さが必要である。本実験では太さが直径30 $\mu$ mのものを作成した。また、マイクロピペットの形状では、急激に細い形状の針では、吸引したり、排出したりするときに核や細胞が傷つく危険があるので、緩やかに細い形状の針を使うように改善した。また、マイクロピペットの先端が核に挿入された部分から細胞質が流出することがあったので、外液を粘り気のある4%フィコール溶液に変えてから、細胞質の流出を減らすことができた。そして、移植後も4%フィコール溶液に浸けて細胞質が流出するのを防いでから、賦活処理をおこなったことも効果があったと考えている。これらの工夫の結果、桑実胚以上まで発生させることに成功できたと考えている。

## 結論

イモリは骨をもつ脊椎動物の中で最も再生力の高い生き物である。尾や手足、眼の再生はよく知られているが、心臓・脳などの臓器の一部まで再生できる生き物である。iPS細胞が開発する前は、一般の動物では分化した細胞を脱分化するには核移植しか方法がなかったが、その時代にあってもイモリは、分化した細胞を脱分化して幹細胞を作りだせる能力を有していることが発見されており、再生力の強さを考慮して、核移植実験がうまくいくのではないかと予想した。

一方で、イモリの卵は多精受精なので、核移植時のマイクロピペットによる刺激だけでは賦活（細胞分裂の開始）しないので、核移植と同時に賦活を誘発する操作が必要だと考えていた。

後者の賦活の技術については、今回はCaイオノフォア溶液で処理することで解決できた。そして、最終的には、桑実胚まで到達したのが38.3%とレベルまで到達することができた。

現段階では、イモリの再生力の強さを生かした結果をまだ得られていないが、さらに、成熟卵の見分け方、マイクロピペットの針先、挿入技術、賦活試薬（精子破砕液）を改善すれば、成功率をさらに上げて、クローン技術を両生類の繁殖技術として役立てることができると考えている。

この実験で、一番大切なのは、実は日常の動物の世話であると感じている。きちんと管理しないと良好な卵を採取することはできないし、少しの気のゆるみが動物たちの命を奪ってしまうことになる。飼育動物を

適切に維持しながら, 科学研究に取り組んでいきたい。

## 謝辞

生物教室のアカハライモリは, 卒業された先輩方から引き継いで育てているものである。多くの生徒たちのこれまでの努力の証が本研究だと考えている。また, 本研究の指導をいただいた山口大学の岩尾康宏教授に感謝する。

## 参考文献

- 1) J. B. Gurdon 『発生における遺伝子調節』 共立出版 (1976)
- 2) Paul J. Verma, Alan O. Trounson. Nuclear Transfer Protocols (2010).