

## 体細胞クローン技術の高度化および遺伝子組換えブタの維持・保存に関する研究開発

相馬由和・中村 妙・吉田繁樹・大石 仁

Examination concerning improvement technique for Cloned from Somatic Nuclei and Maintenance Prognies of Transgenic Pig

Yoshikazu SOMA, Tae NAKAMURA, Sigeki YOSIDA, Hitoshi OHISHI

### 要 約

近年、ブタは医学分野への利用が進められ、体細胞クローン技術を利用し、医療用モデルブタとしての遺伝子組換えブタの作出が可能となった。しかし、ブタは極めて近交退化が生じやすく、ホモ化のためにはF2世代にわたる交配が必要で、遺伝子組換えブタの維持・保存が課題となっている。

平成20年度は、前年導入した遺伝子組換え *hDAF* (ヒト補体制御因子高発現) ブタのF2世代ブタを生産した。遺伝子解析の結果、F1の2倍の発現量の個体と1倍の個体及び遺伝子が組込まれていない個体の分離比はほぼ1:2:1で2倍の発現量を示した個体は遺伝的にホモである可能性が高かった。遺伝子量2倍の個体は他に比して生時体重が小さく、その後の発育も遅かった。また、Endo Gal C ( $\alpha$ Gal抗原を特異的に切断する能力を有する) ブタを(独)農業生物資源研究所より導入し、ホモ化のためF2世代生産を開始した。

キーワード：遺伝子組換えブタ、医療用モデルブタ、維持・保存

### 緒 言

ブタは、解剖学的、生理学的にヒトに類似していることから、疾患モデルを初めとする移植医療用のモデルブタとして有利な点を有している。

また、近年体細胞クローン技術による遺伝子組換えブタの作出が可能となったことから、医療用モデルブタとしての利用が期待されている。

しかし、ブタは近交退化が極めて生じやすく、遺伝子のホモ化のためにはF2世代へわたる交配が必要となり、作出した遺伝子組換えブタの維持・保存が課題となっている。

独立行政法人農業生物資源研究所で作出された3種類の遺伝子組換えブタを5年間維持・保存し、遺伝子のホモ化を行うとともに、遺伝子組換えブタを含むクローンブタ保管技術をマニュアル化し、将来に向けた遺伝子組換えブタ増殖技術の確立を目指す。

### 材料および方法

#### 1 供試豚

独立行政法人農業生物資源研究所で作出された遺伝子組換えブタの後代種豚を導入し、F2世代ブタを生産した。

- 1) *hDAF* (ヒト補体制御因子高発現) ブタ  
H19年度、雄1頭、雌2頭を導入した。
- 2) Endo Gal C ( $\alpha$ Gal抗原を特異的に切断する能力を有する) ブタ  
H20年度、雄1頭、雌3頭を導入した。
- 2 繁殖成績  
生時、3週齢、5週齢、8週齢の子豚体重及び子豚数を調査した。
- 3 遺伝子判定  
生産された子豚は、当該遺伝子保有の有無を判定する。検査は独立行政法人農業生物資源研究所に依頼して行った。
- 4 当該遺伝子保有ブタの育成及びホモ化確認  
当該遺伝子高発現ブタを育成し、ホモ化を確認するため、当該遺伝子が組込まれていない豚を交配して産子の遺伝子検査を実施する。

### 結果および考察

#### 1 F2世代生産

##### 1) hDAFブタ

種雄豚1頭、種雌豚2頭を用いF2世代ブタを生産した。

春の分娩結果は、1頭が妊娠110日齢で死産(♀9頭, ♂8頭), 1頭が♀3頭を分娩した。

秋の分娩結果は、1頭が♀4頭, ♂11頭を分娩(内♀1頭, ♂2頭は出生間もなく死亡), 1頭が♀6頭, ♂4頭を分娩(内♀1頭, ♂1頭は出生直後死亡)した。

##### 2) Endo Gal Cブタ

種雄豚1頭、種雌豚3頭を用いF2世代ブタ生産をめざして交配を開始した。

#### 2 子豚の発育及び遺伝子判定

春分娩された♀3頭の遺伝子判定で2頭の遺伝子導入が認められた。

秋分娩された25頭のうち出生間もなく死亡し

た5頭を除く20頭についてPCR及びFACSにより遺伝子発現量を解析の結果、F1の2倍の発現量を示した個体が6頭(♂2頭, ♀4頭), 従来の発現量の個体が10頭(♂7頭, ♀3頭), 遺伝子が組込まれていない個体が4頭(♂3頭, ♀1頭)であった。これらの遺伝子型の分離比はほぼ1:2:1となり、2倍の発現量を示した個体は遺伝的にホモである可能性が高かった。また、表のとおり、遺伝子発現量が2倍の個体の生時体重は他より小さく、その後の発育も遅かった。

#### 3 F2世代種豚の育成及びホモ化の確認

春分娩され、遺伝子導入が認められた雌豚2頭を育成し、ホモ化確認のため、当該遺伝子遺伝子組換えブタ由来でない大ヨークシャー種雄豚を交配して平成21年4月分娩予定である。

秋分娩された子豚については、表のとおり遺伝子発現量の高い豚を中心に♂3頭, ♀4頭を育成した。

表 hDAFの2世代ブタ遺伝子発現量及び子豚体重

生年月日	性別	遺伝子発現量	頭数	子豚平均体重 (kg)					備考	育成選抜
				生時	1週齢	3週齢	5週齢	8週齢		
H20	♀	2 倍	2頭	0.96	2.32	—	—	—	6日齢・20日齢死亡	1頭
		1 倍	1頭	1.10	2.64	4.72	7.14	18.6		
9/6	♂	1 倍	6頭	1.13	2.36	3.45	5.61	16.2	40日齢1頭死亡	1頭
		0	3頭	1.27	2.87	6.12	8.29	—		
H20	♀	2 倍	2頭	1.07	1.77	3.56	5.61	11.4		2頭
		1 倍	2頭	1.40	2.75	6.24	8.68	18.8		1頭
		0	1頭	1.48	2.96	6.34	10.80	19.2		
10/1	♂	2 倍	2頭	1.13	1.86	4.36	6.28	13.4		2頭
		1 倍	1頭	1.54	2.82	6.98	11.20	20.5		