

## 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

藤木美佐子・吉田繁樹・相馬由和・大石 仁

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

Misako FUJIKI, Shigeki YOSHIDA, Yoshikazu SOMA and 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。

2009年度は、2007年度に導入した遺伝子組換え *hDAF* (ヒト補体制御因子高発現) ブタおよび *Endo Gal C* ( $\alpha$ Gal 抗原を特異的に切断する能力を有する) ブタのF2世代ブタを生産した。またF2世代ブタについては遺伝子検査の結果よりF1の2倍の遺伝子発現量の個体をホモ、1倍の個体をヘテロと推察し、これらのF2世代ブタについて育成後、ワイルドタイプ(当該遺伝子を組込まれていないブタ)と交配して産子の遺伝子発現状況を調査することによりF2世代ブタの遺伝子検査結果を確認した。さらにホモ化および繁殖能力の確認されたF2世代ブタについて維持している。

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

### 材料および方法

### 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<sup>1,2,3)</sup>。

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2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。

### 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。生産されたF2世代ブタより当該遺伝子保有豚を選抜育成し、ワイルドタイプとの交配に供した。

- 1) *hDAF* (ヒト補体制御因子高発現) ブタ  
2007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  
2008年度、雄1頭、雌3頭を導入した。
- 3) *hDAF* のF2ブタ  
2007年度から2008年度にかけて生産したF2世代ブタの中でホモまたはヘテロと推察された雄4頭、雌6頭を育成し、ワイルドタイプと交配した。
- 4) ワイルドタイプブタ  
当所飼養の大ヨークシャー種雄豚および

Endo Gal C導入種雄豚 (hDAF を保有していないブタ)

結果および考察

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。当該遺伝子を保有している検体についてはさらに遺伝子発現量を測定し、F1 の 2 倍発現量の個体をホモ, 1 倍発現量をヘテロと判定した。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, ホモまたはヘテロ判定を確認するため, 当該遺伝子が組込まれていないブタ (ワイルドタイプ) を交配して産子の遺伝子保有状況を検査する。

1 F2 世代生産

1) hDAF ブタ

導入種雌豚1頭が分娩し, ホモ判定1頭, ヘテロ判定6頭, 遺伝子を発現していないブタ10頭を生産したが, ホモ判定の子豚は生後間もなく死亡した。

2) Endo Gal Cブタ

種雄豚1頭, 種雌豚3頭を用い F2 世代ブタを生産した。母豚No19-533 が3回分娩、母豚No18-44 が2回分娩したが別の1頭は繁殖豚として不適格であったため淘汰した。No19-533 の産子数はそれぞれ7頭, 2頭, 8頭でそのうちホモ判定の子豚は4頭, 1頭, 1頭であった。またNo18-44 の産子数はそれぞれ4頭, 13頭でそのうちホモ判定の子豚は0頭, 2頭であった(表1)。

2 子豚の発育と遺伝子発現量

Endo Gal Cブタにおいてはホモ、ヘテロ判定および遺伝子発現していない産子の間で発育成績に差は見られなかった。hDAF ブタではヘテロ判定および遺伝子発現していない産子を3週齢まで育成したが発育成績に差は認められなかった。

表1 Endo Gal C の F2 生産状況

母豚No	分娩日	生産数(頭)	検体数(頭)	遺伝子発現		
				ホモ(頭)	ヘテロ(頭)	- (頭)
19-533	2009.4.12	7	7	4	2	1
18-44	2009.6.7	4	5	0	3	2
19-533	2009.9.7	2	2	1	1	0
18-44	2010.3.12	13	15	2	5	8
19-533	2010.3.14	8	8	1	6	1

種雄豚はすべて Endo Gal C の導入雄

3 F2 世代種豚の育成及びホモ化の確認

1) hDAF ブタ

2008 年度に生産し育成豚として選抜したホモまたはヘテロ判定の雄4頭, 雌6頭<sup>4)</sup>のうち繁殖豚として不適格であった雄2頭, 雌1頭については淘汰した。雌5頭のうち4頭はワイル

ドタイプと交配し2009年4月, 8月, 9月, 12月にそれぞれ分娩した。産子の遺伝子検査を実施したところホモ判定 F2 ブタの産子は全てヘテロで遺伝子を保有していたが、ヘテロ判定 F2 の1頭の雌において2009年9月分娩の産子が全てヘテロで遺伝子を保有していたことか

らホモである可能性が残ったため、再度ワイルドタイプと交配し 2010 年 2 月に分娩した。2 産目の産子および別のヘテロ判定 F2 雌の産子はヘテロまたは遺伝子を保有していなかった。この結果より遺伝子発現量によるホモ、ヘテロ判定が正確であることが確認された(表 2)。育成中であった雄および残りの雌 1 頭についてもワイルドタイプと交配し、2010 年 4 月

および 2010 年 6 月に分娩予定である。  
2) Endo Gal Cブタ

2009 年 4 月に生産されたホモ判定の雌 1 頭について 2009 年 12 月にワイルドタイプの種雄豚と交配し、2010 年 4 月に分娩予定である。2009 年 4 月に生産された雄 1 頭、2009 年 9 月に生産された雌 1 頭は育成中である。

表 2 hDAF の F3 生産状況 (F2 遺伝子保有状況確認試験)

母豚No	分娩日	生産数 (頭)	検体数 (頭)	遺伝子発現		
				ホモ (頭)	ヘテロ (頭)	- (頭)
20-010 (F2 ホモ)	2009.4.10	5	5	0	5	0
20-009 (F2 ヘテロ)	2009.8.7	6	6	0	2	4
20-011 (F2 ヘテロ)	2009.9.4	9	9	0	9	0
20-028 (F2 ホモ)	2009.12.20	5	5	0	5	0
20-011 (F2 ヘテロ)	2010.2.10	9	9	0	2	7

種雄豚はすべてワイルドタイプ (当所飼養の大ヨークシャー種および Endo Gal C の導入雄)

#### 参考文献

- 1)河原崎達雄, ブタ体細胞クローン作製技術, 日本養豚学会誌, 41, 49-58,
- 2)Liu D, Kobayashi T, Onishi A, Furukawa T, Iwamoto M, et al, 2007, Relation between human decay-accelerating factor(hDAF) expression in pig cells and inhibition of human serum anti-pig cytotoxicity:value of highly expressed hDAF for xenotransplantation, 14, 67-73
- 3)Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry ACF, 2000, Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei, Science,289,1188-1190
- 4)相馬由和, 中村妙, 吉田繁樹, 大石仁, 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, 茨城畜セ研報,42, 50-51