

災害時に備えた遺伝子改変マウスの胚(受精卵)・精子の凍結保存

- 1匹の遺伝子改変雄マウスの凍結精子から、1,000匹以上のマウスが作出できる時代がやってきた！-

中潟直己

熊本大学生命資源研究・支援センター 動物資源開発研究施設(CARD)・資源開発分野

<http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/japanese/mousebank/index.html>

<http://nakagata-lab.weebly.com/>

はじめに

平成28年4月14日(木)および16日(土)、熊本県は震度7の強い地震に襲われた。震度7の地震が2回連続で起こった例は、日本の観測史上例がなく、当施設(熊本大学生命資源研究・支援センター 動物資源開発研究施設(CARD))でも建物や高額精密機器などに大きな被害を受けたが、関係者の必死の努力によって、飼育中の遺伝子改変マウスやこれらマウスの凍結胚・精子を無事に守ることができた。そこで、本項では、災害時に備えた遺伝子改変マウスの系統保存、すなわち、効率的なマウス胚・精子の凍結保存について解説する。

1. 遺伝資源としての遺伝子改変マウスの重要性

ヒトゲノムプロジェクト⁽¹⁾による遺伝子の構造解析がほぼ完了し、いよいよ遺伝子の機能解析の時代へと突入した。そこで、現在、遺伝子の機能解析およびそれに関連した研究開発が、国家プロジェクトとして世界中で盛んに行われている。その中で重要な役割を果たしているのが遺伝子改変(トランスジェニック(Tg)およびノックアウト(KO))マウス⁽²⁾、特にKOマウスであり、現在までに作製されたKOマウスの系統数は、5万種を超えていると言われている。また、遺伝子間の相互作用などを解析する目的で2重、3重あるいはそれ以上の遺伝子を破壊したマウスの作製が必要で、今後、その系統数は100万種以上になることが予想されている。

今後のライフサイエンスの進展にとって、バイオリソースとしての遺伝子改変マウスの重要性は、まさに知的基盤の根幹を成すものと言っても過言でなく、その収集、保存、供給、情報の管理システムが、ますます重要なものとなってきている。

2. 胚・精子の凍結保存の利点

多数の遺伝子改変マウスを生体のままで維持するには、膨大なスペースとコストおよび労力が必要であるが、凍結した胚や精子でこれらマウスの系統を維持すれば、以下のような利点がある。

- (1) 動物を飼育管理する必要がない。
- (2) 飼育スペースの大幅な削減が可能である（個体を飼育する場合に比べて、極めて少ないスペースで凍結細胞の保管が可能である）。
- (3) 個体に比べ、維持経費が凍結胚で 1/10、凍結精子の場合は 1/30 以下に押さえることが可能である。
- (4) 突然変異が起こらない。
- (5) 病原微生物に感染する恐れがない。

特に、遺伝子改変マウスの場合、導入された遺伝子あるいは遺伝子の構造の一部が破壊されたその遺伝子が次世代に伝達されれば良いことから、遺伝子改変マウスの系統保存に精子の凍結保存が急速に応用されている。胚においては、1匹から得られる数はせいぜい 10~20 個であるが、精子においては 1 個体から 1,000~3,000 万匹が得られること、さらに、胚の作製は交配あるいは体外受精などにより行わなければならないが、精子においては、成熟雄の精巣上体尾部から簡単に採取できるなどの利点がある。また、最近では、ゲノム編集技術⁽³⁾の台頭により、爆発的な Tg や KO マウス系統の作製が予想されていることから、マウス精子の凍結保存は、これらマウスの系統保存として必須の技術となっている。

生殖工学技術⁽⁴⁾の進歩と相まって、マウス精子の凍結保存技術は確立の域に達しつつある。凍結精子の融解後の運動性は、極めて良好であり、体外受精・胚移植により、C57BL/6 をバックグラウンドとする 1 匹の遺伝子改変雄から得られた凍結精子で、1,000 匹以上のマウスを作出することも可能となった。現在、世界の主な研究所で遺伝子改変マウスの精子が精力的に凍結保存されており、すでにこれら精子から極めて多くの産子が作出されている。

3. 各施設で胚/精子を凍結保存する意義

災害時に備えて、個々の施設で遺伝子改変マウスの胚や精子を凍結保存しておくことは、極めて重要である。胚や精子を事前に凍結保存しておけば、それら細胞を融解し、仮親に移植す

ることで（精子の場合は体外受精により胚を作出後）、約2ヶ月（妊娠期間：3週間、実験に使用できるまでの成長期間：5週間）でその系統を復元、実験に使用することができることから、長期間にわたって研究が中断されてしまうことが無く、比較的迅速な研究の再開が可能となる。

同じ系統でも、それら系統は各施設、個々の研究者により、独自に飼育されているものであり、バックグラウンドや世代数などが異なることから、厳密に言えば、それぞれの系統はすべて唯一のものである。従って、これらマウスが消失すれば、グローバルな活動の展開が阻害され、国家的な損失をもたらすばかりでなく世界的な損失につながることから、我が国の遺伝子の機能解析に関する研究機能の低下は、火を見るより明らかである。

将来、いかにバイオテクノロジーが進歩しようとも、大災害で甚大な被害を被ることで、これらマウスの胚や精子の遺伝資源が消失すれば、いかなる手段を講じても、その種を再び甦らせることはできない。想定外の大災害が時として起こるのは周知の事実であり、1機関のみで万全の対策を講じることは不可能である。それ故、公的マウスバンクなどの専門の施設に、バックアップとして、これら一部の凍結胚・精子を保存しておくことも必須であると思われる。

おわりに

今や、インターネットで自分の希望する遺伝子改変マウスを一瞬にして検索することが可能であり、オーダーすれば、世界中の施設から2~3週間以内にそれら系統の凍結胚・精子の入手できるようになった。しかしながら、入手先の施設で、これら凍結細胞から産子を迅速に作出できなくては、世界の研究スピードから取り残されてしまうのは必至である。

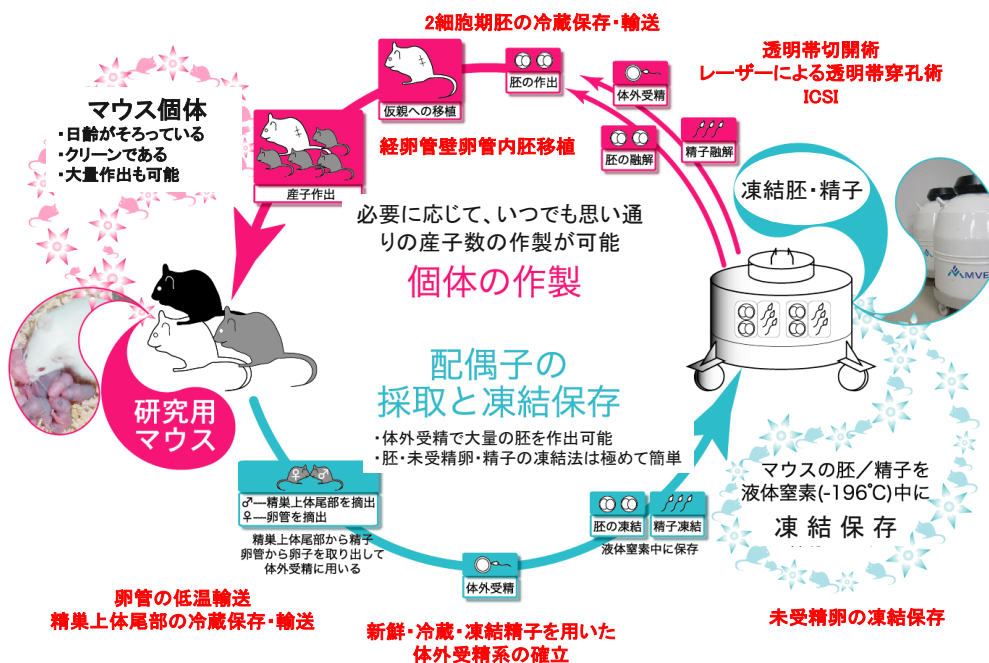
当センターが主催している生殖工学技術研修会⁽⁵⁾は、国内外ですでに50回以上開催され、世界各国の500人以上の受講生が参加している。この研修は、3~5日間で生殖工学の基本技術をマンツーマンで指導するものであり、着実にその成果を上げている。また、最近では、助教、研究員、技術員、大学院生のみならず、施設長、教授、準教授などの方々が受講されるケースが多く、「生殖工学技術」の市民権が急速に拡大している。

大災害が起こると、必ず、今後の防災対策のあり方が活発に議論されるが、それが次に生かされなくては、何の意味もなさないように思われる。

動物実験の適正な実施について、基本指針（平成 18 年文部科学省告示 71 号）が定められ、各機関における体制整備が義務づけられた。私たち動物実験施設関係者の使命は動物実験施設の充実であり、それが利用者の実験結果の信頼性に直結、各施設の研究力を高めることにつながる。

日本列島には、周辺の海底も含めて多くの活断層が刻み込まれており、現在、日本全国で約 2,000 カ所以上あることが知られている。また、最近では、活断層のない地域でも大きな地震が起きていることから、日本全国どこでも大地震が起きる可能性が指摘されている。現在、国立、公私立の主な大学や研究所には、約 250 施設の実験動物施設が設置されており、極めて多くの遺伝子改変動物が飼育されている。**物事を始めるのに遅すぎることはない！すぐやる。必ずやる。出来るまでやる。**今まさに、各大学研究機関の動物実験施設において、それぞれの施設にあった「効率的なマウスバンクシステム」（図 1）を構築することが急務であり、また、責務であろう。

図 1 生殖工学技術を用いた効率的なマウスバンクシステム



用語解説

(1) ヒトのゲノムの全塩基配列を解析するプロジェクト。1953年のDNAの二重らせん構造の発見から50周年となる2003年に完了した。

(2) 人為的に外来遺伝子を染色体に組み込んで作出されたマウス（トランスジェニック(Tg)マウス）、および人工的に特定の遺伝子に変異を導入することにより、その遺伝子機能が欠損（破壊）されたマウス（ノックアウト(KO)マウス）の総称。

(3) 部位特異的なヌクレアーゼを利用して、思い通りに標的遺伝子を改変する技術で、従来の遺伝子組み換え技術よりも、はるかに正確に遺伝子を操作できる。

(4) 生殖の過程を人為的に改変し、産子を作出する科学技術。体外受精、胚（受精卵）・精子の凍結保存、胚移植など、様々な技術がある。

(5) <http://www.mouse-ivf-training.com/join-us.html>

References

Culture time of vitrified/warmed zygotes before microinjection affects the production efficiency of CRISPR-Cas9-mediated knock-in mice. Nakagawa Y, Sakuma T, Nishimichi N, Yokosaki Y, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T. Biol Open. 2017 Apr 10. pii: bio.025122. doi: 10.1242/bio.025122.

Fertility of cold-stored mouse sperm is recovered by promoting acrosome reaction and hyperactivation after cholesterol efflux by methyl-beta-cyclodextrin. Yoshimoto H, Takeo T, Irie T, Nakagata N. Biol Reprod. 2017 Feb 1;96(2):446-455. doi: 10.1095/biolreprod.116.142901.

Ultra-superovulation for the CRISPR-Cas9-mediated production of gene-knockout, single-amino-acid-substituted, and floxed mice. Nakagawa Y, Sakuma T, Nishimichi N, Yokosaki Y, Yanaka N, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T. Biol Open. 2016 Aug 15;5(8):1142-8. doi: 10.1242/bio.019349.

Immunotherapy using inhibin antiserum enhanced the efficacy of equine chorionic gonadotropin on superovulation in major inbred and outbred mice strains. Takeo T, Nakagata N. Theriogenology. 2016 Sep 15;86(5):1341-6. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.076. Epub 2016 May 7.

N-acetyl cysteine prolonged the developmental ability of mouse two-cell embryos against oxidative stress at refrigerated temperatures. Horikoshi Y, Takeo T, Nakagata N. *Cryobiology*. 2016 Jun;72(3):198-204. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.05.002. Epub 2016 May 7.

Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. Takeo T, Nakagata N. *PLoS One*. 2015 May 29;10(5):e0128330. doi: 10.1371/journal.pone.0128330. eCollection 2015. *Cryobiology*. 2016 Jun;72(3):198-204. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.05.002. Epub 2016 May 7.

Cysteine analogs with a free thiol group promote fertilization by reducing disulfide bonds in the zona pellucida of mice. Takeo T, Horikoshi Y, Nakao S, Sakoh K, Ishizuka Y, Tsutsumi A, Fukumoto K, Kondo T, Haruguchi Y, Takeshita Y, Nakamura Y, Tsuchiyama S, Nakagata N. *Biol Reprod*. 2015 Apr;92(4):90. doi: 10.1095/biolreprod.114.125443. Epub 2015 Feb 25.

Contemporary techniques for freezing mouse spermatozoa. Guan M, Bogani D, Marschall S, Raspa M, Takeo T, Nakagata N, Taft R, Fray M. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2014 Sep 3;4(3):85-104. doi: 10.1002/9780470942390.mo140065.

In vitro fertilization in mice using the MBCD-GSH protocol. Guan M, Bogani D, Marschall S, Raspa M, Takeo T, Nakagata N, Fray M. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2014 Jun 16;4(2):67-83. doi: 10.1002/9780470942390.mo140059.

Transporting mouse embryos and germplasm as frozen or unfrozen materials. Kenyon J, Guan M, Bogani D, Marschall S, Raspa M, Pickard A, Takeo T, Nakagata N, Fray M. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2014 Jun 16;4(2):47-65. doi: 10.1002/9780470942390.mo140064.

Conservation of mouse models through embryo freezing. Guan M, Bogani D, Marschall S, Raspa M, Takeo T, Nakagata N, Fray M. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2014 Dec 11;4(4):205-27. doi: 10.1002/9780470942390.mo140082.

Prolonged exposure to hyaluronidase decreases the fertilization and development rates of fresh and cryopreserved mouse oocytes. Ishizuka Y, Takeo T, Nakao S, Yoshimoto H, Hirose Y, Sakai Y, Horikoshi Y, Takeuji S, Tsuchiyama S, Nakagata N. *J Reprod Dev*. 2014;60(6):454-9. doi: 10.1262/jrd.2014-045. Epub 2014 Sep 12.

Lipocalin 2 binds to membrane phosphatidylethanolamine to induce lipid raft movement in a PKA-dependent manner and modulates sperm maturation. Watanabe H, Takeo T, Tojo H, Sakoh K, Berger T, Nakagata N, Mak TW, Kondoh G. *Development*. 2014 May;141(10):2157-64. doi: 10.1242/dev.105148.

Rescue *In Vitro* Fertilization Method for Legacy Stock of Frozen Mouse Sperm Nakagata, N, Takeo T, Fukumoto K, Haruguchi Y, Kondo T, Takeshita Y, Nakamuta Y, Umeno T, Tsuchiyama S. *Journal of Reproduction and Development*. 2014 Apr 24;60(2):168-71

Applications of cryopreserved unfertilized mouse oocytes for in vitro fertilization. Nakagata N, Takeo T, Fukumoto K, Kondo T, Haruguchi Y, Takeshita Y, Nakamuta Y, Matsunaga H, Tsuchiyama S, Ishizuka Y, Araki K. *Cryobiology*. 2013 Oct;67(2):188-92.

Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin. Takeo T, Nakagata N. *Biol Reprod*. 2011 Nov;85(5):1066-72.

Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. Takeo T, Nakagata N. *Lab Anim*. 2010 Apr;44(2):132-7.

Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. Takeo T, Hoshii T, Kondo Y, Toyodome H, Arima H, Yamamura K, Irie T, Nakagata N. *Biol Reprod*. 2008 Mar;78(3):546-51.