Chimaeras Obtained by the Nuclear Transplantation Technique in the Mouse

Kosho NAKAMURA* and Yukio TSUNODA

National Institute of Animal Industry, Tsukuba Norindanchi P.O. Box 5,
Ibaraki 305, and *on leave of absence from Safety Evaluation Lab,
of Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., 14 Shinomiya, Minami Kawara-cho,
Yamashina-ku, Kyoto 607

(Accepted for publication May 6, 1987)

Summary. The present study was undertaken to produce chimaeras by using nuclear transplantation technique in the mouse. The nuclear transplantation was performed between BALB/c×BALB/c embryo (GPI-1, a/a and albino) and F1 (C57BL/6J×CBA)×CBA embryo (GPI-1, b/b and non-albino) at 2-cell stage.

The results obtained are as follows.

1. The proportion of F1 embryos which received BALB nucleus and developed to blastocyst stage was significantly higher than that of BALB embryos receiving F1 nucleus (62% vs 42%).
2. Chimaeras were obtained after transfer of F1 embryos receiving BALB nucleus to the uterus of recipient CD-1 females (38%). On the other hand, BALB embryos receiving F1 nucleus did not produce chimaeric mice.
3. The results of the analysis of chimaeric state showed that BALB/F1 ratio of coat color patterns almost coincided with GPI-1 a/b ratio in the red blood cells but not in the germ cell line. **KEY WORDS:** CHIMAERA, NUCLEAR TRANSPLANTATION, MOUSE EMBRYO.

Jpn J Anim Reprod 33, 82-87, 1987

核移植技術を用いたキメラマウスの作出

中村 公章*・角田 幸生

農林水産省畜産試験場, *科研製薬(株)安全性研究所

キメラ動物とは複合動物という意味であり、2個以上の遺伝的に異なる細胞集団から構成された動物を示すのに使われている (McLaren, 1976)。キメラマウスは、これまで2つの異なった方法によって作出されている。すなわち、Tarkowski (1961) および Mintz (1962a) によって開発された胚の集合による方法と Gardner (1968) によって考察された顕微注入による方法である。前者の集合法は、透明帯を除去した2個以上の胚を集合させて1つの巨大な胚とする方法であり、必要とする装置が少ないこと、操作が容易であること等の利点がある。しかしながら、用いる胚のステージが限定される欠点があ

り、2細胞 (Mintz, 1962b; Mulnard, 1971) および4細胞期 (Hillman *et al.*, 1972) あるいは初期胚盤胞 (Stern and Wilson, 1972) 同士の集合も試みられているがキメラ作出率が低いことから、粘着力の強い8細胞前後のステージの胚を用いる必要がある。後者の注入法は、胚盤胞の腔内に他の細胞を顕微注入する方法であり、特殊な装置および高度な技術を必要とする欠点があるが、発生過程の異なる胚やテラトーマ細胞 (Dewey *et al.*, 1977) 由来のキメラを作出できる利点がある。また、透明帯を除去した胚の移植によって産仔が得られないウサギのような動物種にも適用できる (Moustafa,

1974) 利点がある。

1983年に McGrath and Solter が、異なった2つの系統のマウス前核期受精卵間で前核の置換を行うことによって産仔の作出に成功して以来、核移植技術は哺乳動物の初期発生過程における核と細胞質の相互作用や遺伝子発現機構の解明の手段として有効に利用され始めている。本実験は、マウス2細胞期胚の片側割球の核を置換することによって、キメラマウスが作出できるか否かを検討することを目的に実施した。

材料と方法

供試動物 アルビノである BALB/c 系および有色の F1 (C57BL/6J×CBA) 成熟雌を用いた。Glucose-phosphate isomerase-1(GPI-1)のサブタイプは、BALB/c 系で a/a, F1 では b/b である。それぞれ PMSG と hCG を投与して過剰排卵誘起後、BALB/c あるいは CBA (GPI-1 b/b) 系の雄と交配し、hCG 注射後45~47時間目に卵管を灌流して採取した2細胞期胚を用いた。胚の回収は M2 液 (Fulton and Whittingham, 1978) を用い、採取した胚は流動パラフィン (英国 BDH 社製, No. 29436) 下の M16 液 (Whittingham, 1971) 内に移して、核移植を行うまで 5% CO₂, 95% 空気の炭酸ガス培養器内に静置した。

核移植 既報 (角田ら, 1985; Tsunoda *et al.*, 1986) の方法を用いて、2つの系統の2細胞期胚片側割球核の交換移植を行った。まず、核移植に先立ってマイクロビペットの挿入を容易にするため供試するすべての胚の透明帯の1部 (10~20%) をガラス針で切断し、小孔をあけた。ついで、BALB×BALB (以下 BALB 系と称する) 2細胞期胚の片側割球より、マイクロビペットを用いて少量の細胞質を含む核 (カリオプラスト) を吸引除去し、ビペットの外にはき出した。次に、F1×CBA (以下 F1 と称する) より採取した2細胞期胚の片側割球から同様にカリオプラストをビペット内に吸引した。F1 由来のカリオプラストを同量の不活化センダイウィルス (HVJ, 2700 HAU/ml) とともに、あらかじめ片側割球より核を除去してある BALB 系2細胞期胚の細胞質に注入し、注入後2時間目に注入核と細胞質の融合を観察した。また、この逆の組み合わせで核移植を実施した。すなわちこのような2細胞期胚の片側割球核の交換移植によって、一方の割球で BALB 系の細胞質+BALB 系の核、他方の割球で BALB 系の細胞質+F1 の核の組み合わせの2細胞期胚と、一方の割球が F1 の細胞質+F1 の核、他方の割球が F1 の細胞質+BALB 系の核の

2種類の2細胞期胚が新しく作出できたことになる。融合が確認できた胚は M16 液内で3日間体外培養して胚盤胞期への発生率を調べ、胚盤胞期に发育した胚は偽妊娠3日目 (陰栓のみられた日を1日目とする) のマウスの子宮内に移植した。受卵マウス (CD-1系) は、2度にわたって不妊であることを確認した精管結紮雄 (CD-1系) と交配したものをを用いた。なお、対照実験として無処置の BALB 系および F1 2細胞期胚を48~72時間培養して桑実胚および胚盤胞への発生率を調べ、ついで得られた胚盤胞を受卵マウスに移植して妊娠率ならびに産仔生産率を調べた。

キメラの判定 得られた産仔がキメラであるか否かは、産仔の眼色、毛色ならびに血中 GPI-1 型により判定した。GPI-1 の測定は、尾静脈より採取した血液から血球を分離後、蒸留水で溶血させたのち Eicher and Washburn (1978) および Mikami and Onishi (1985) の方法により、Titan III Iso-vis セルロースアセテート膜 (ヘレナ研) を用いて電気泳動法により行い、クリニスキャンデンストメーター (ヘレナ研) を用いて GPI-1^a と GPI-1^b の比率を測定した (Mikami and Onishi, 1985)。得られたキメラマウスの1部については、生殖能力ならびに生殖細胞におけるキメラ状態を調べる目的で、雄では2匹の雌と、雌では1回それぞれ CD-1 系アルビノマウスと交配して産仔の毛色を調べた。

結 果

Table 1 に、無処置の BALB 系および F1×CBA 2細胞期胚の体外培養ならびに发育胚を移植後の産仔生産成績を示した。表に示すように、本実験で用いた実験条件下では、BALB 系胚の桑実胚 (63%) および胚盤胞 (47%) への発生率は、F1×CBA 胚 (98% および 97%) に比べて有意 ($P < 0.001$) に低いことが明らかとなった。また、体外培養によって得られた胚盤胞の移植結果でも、BALB 系における産仔生産率 (41%) は、F1×CBA (71%) に比べて有意 ($P < 0.05$) に低いことが知られた。

Table 2 に核移植胚の培養成績を示した。BALB 系の核を注入した F1 胚では、操作胚 188 個中 116 個 (62%) が胚盤胞に、58 個 (31%) が片側割球のみ胚盤胞に発生した。逆に F1 の核を注入した BALB 系では、操作胚 153 個中 65 個 (42%) が胚盤胞に、58 個 (38%) が片側割球のみ胚盤胞に発生し、残りの 30 個 (20%) は桑実胚期以前で発生を停止した。胚盤胞への発生率は両者間で有意差 ($P < 0.001$) がみられた。なお、片側割球のみが

Table 1. In vitro and in vivo development of 2-cell mouse embryos from BALB/c strain and F1

Strain	No. of embryos cultured	No. of embryos developed to		No. pregnant/ No. of recipients (%)	No. of young/ No. of blastocysts transferred (%)
		morulae ¹⁾ (%)	blastocysts ²⁾ (%)		
BALB×BALB	175	110 (63) *	82 (47) *	13/13 (100)	21/51 (41) **
F1×CBA	106	104 (98)	103 (97)	11/11 (100)	36/51 (71)

1) examined 48 hrs after culture

2) examined 72 hrs after culture

* P<0.001 ** P<0.05

Table 2. In vitro development of micromanipulated 2-cell embryos following allogeneic exchange of single nucleus

Donor nucleus	Recipient embryo	No. of embryos cultured	No. of embryos developed to (%):		
			Blastocyst	Incomplete Blastocyst	Others
BALB×BALB	F1×CBA	188	116 (62)	58 (31)	14 (7)
F1×CBA	BALB×BALB	153	65** (42)	58 (38)	30** (20)

** P<0.001

Table 3. In vivo development of blastocysts developed from reconstituted 2-cell embryos after transfer to the uterus of the recipient females

Donor nucleus	Recipient embryo	No. pregnant/ No. of recipients (%)	No. of young/ No. of blastocysts transferred (%)	No. of young at weaning			
				Sex	No. of young	Coat color (%)	
						Colored	Albino Chimaera
BALB×BALB	F1×CBA	12/14 (86)	42/110 (38)	Male	18	7	0
				Female	21	14	3
				Total	39	21 (54)	3 (8)
F1×CBA	BALB×BALB	3/ 9 (33)	10/ 51 (20) *	Male	5	5	0
				Female	5	5	0
				Total	10	10 (100)	0

* P<0.05

胚盤胞へ発生した胚についてはどちらの核由来のものであるか判別できなかった。

Table 3 に培養により発生した胚盤胞の移植成績および得られた産仔のキメラ状態を示した。BALB 系の核を注入した F1 胚より発生した 110 個の胚盤胞を 14 匹の受卵雌に移植したところ、12 匹 (86%) が妊娠し 42 匹 (38%) の産仔が得られた。F1 の核を注入した BALB 系胚由来の胚盤胞 51 個の移植成績では、妊娠率 (33%, 3/9) が低く、また産仔生産率 (20%, 10/51) も逆の組

み合わせに比べて有意 ($P<0.05$) に低かった。キメラ個体は、BALB 系の核を注入した F1 胚の移植によってのみ得られた。すなわち、離乳時まで生存した 39 匹の産仔の毛色による判定の結果、キメラは雄 18 匹中 11 匹 (Fig. 1)、雌 21 匹中 4 匹 (Fig. 2) の計 15 匹 (38%) でみられ、F1 由来の毛色のみを示す個体は雄 7 匹、雌 14 匹の計 21 匹 (54%)、BALB 系由来の毛色のみを示す個体は雌にのみ 3 匹 (8%) みられた。これに対して、F1 核を注入した BALB 系胚の移植で得られた 10 匹の産仔

Fig. 1

Fig. 2

Male (Fig. 1) and female (Fig. 2) chimaeras obtained by nuclear transplantation. Each figure in plates, except No. 15 in Fig. 1 and No. 21 in Fig. 2 denotes the mouse number in Table 3.

はすべて F1 由来の毛色を示し、アルビノおよびキメラ個体は得られなかった。

Table 4 に、得られたキメラ個体雄 8 匹、雌 3 匹の血中 GPI-1 型の比率および生殖能力の検定結果を示した。GPI-1 型の分析では、b 型のみを示す個体から、a 型の比率が高い個体までのばらつきがみられたが、全体として b 型の比率、すなわち F1×CBA 由来の遺伝子の発現割合が高かった。これらキメラ個体の GPI-1 型の比率は、それぞれの個体における毛色の比率 (Figs. 1 and 2) とほぼ一致した傾向を示した。

生殖能力の検定試験では、雄 8 匹のうち 1 匹 (No. 6) が 2 匹の雌と 2 週間同居させたが交尾せずに不妊におわり、また雌 3 匹のうち 1 匹 (No. 6) が交尾後妊娠が成立しなかった。妊娠した 9 匹のキメラのうち、有色とアルビノの産仔が同時に得られた個体は 4 匹であり、これらの個体では生殖細胞がキメラ状態になっていることが判明した。残り、5 匹のキメラ個体のうち 3 匹では産仔の毛色が有色であり、逆に 2 匹の個体の産仔はすべてアルビノであった。これらのキメラ個体の生殖細胞は、いずれか一方の系統の遺伝子から構成されていることが明らかとなった。GPI-1^a 型の比率が低いキメラ個体 (雄 No. 2 の 13.2%, No. 3 の 21.2% および雌 No. 2 の 35%) でも、a 型である BALB 系由来の毛色 (アルビノ) を示す産仔の比率が高く (19/22, 31/31, 5/6), GPI-1 の比率と生殖細胞におけるキメラ状態は一致しなかった。

考 察

胚の集合法あるいは胚盤胞への顕微注入法を用いて作出された個体は、いずれも細胞間キメラであり、集合あるいは注入された細胞の核と細胞質は同一起源のものである。すなわち、同一起源の核-細胞質系が、相手側の胚細胞の影響を受けつつ、互いに整合性をもちながら分裂を繰り返してキメラ個体となる。これに対して、核移植技術を用いて作出したキメラ胚では、本来の細胞質と他系統由来の核とをもつ核-細胞質間雑種としての性格を合わせもっている。この結果、核の組み合わせという点では、F1×CBA の核と BALB 系の核を、同じようにもつ 2 種類のキメラ 2 細胞期胚を作出したにもかかわらず、BALB 系の核を注入した F1 胚でのみキメラ個体得られる (Table 3) という異なった結果が得られた。また、この組み合わせで、一方の遺伝子のみを発現した 24 匹の産仔のうち 21 匹 (88%) が F1 核由来の産仔であり、さらに F1 核を注入した BALB 系胚の移植で得られた産仔はすべて F1 核由来の毛色遺伝子のみを示す有色個体であった。これは、キメラ胚の発生過程で BALB 系由来の核が脱落しやすいためか、あるいは両系統の胚の発生速度が異なるため F1 胚由来の核が内部細胞塊に主としてとり込まれ、BALB 系胚の核が栄養膜細胞に分布した結果と考えられる。BALB 系胚に比べて F1×CBA 胚の発生速度は早く (角田, 未発表), また早く分割した割球は内部細胞塊に分布する確率が高いことが知られている (Kelly *et al.*, 1978; Rossant and Vijn,

Table 4. Individual data of chimaeric mouse on GPI-1 type in red blood cells and reproductive ability

Sex	Animal No.	R. B. C. GPI-1 ratio (%)		Fertility					
		b	a	No. pregnant/ No. of mated	No. of young	Sex of young		Coat color	
						Male	Female	Colored	Albino
Male	1	74.0	26.0	1/2	15	8	7	15	0
	2	86.8	13.2	2/2	22	13	9	3	19
	3	78.8	21.2	2/2	31	19	12	0	31
	6	45.5	54.5	0/2	—	—	—	—	—
	8	100	0	2/2	30	11	19	27	3
	9	41.0	59.0	2/2	24	8	16	0	24
	12	100	0	2/2	26	12	14	26	0
	13	74.8	25.2	2/2	27	11	16	23	4
Female	2	65.0	35.0	Pregnant	6	3	3	1	5
	3	100	0	Pregnant	10	7	3	10	0
	6	57.5	42.5	No. pregnant	—	—	—	—	—

1980)。

本実験で用いた培養条件下では、無処置の F1×CBA 2細胞期胚の胚盤胞への発生率および胚盤胞を移植後の産仔生産率は、無処置の BALB 系 2細胞期胚に比べて高い (Table 1)。核移植技術を用いて作出したキメラ胚では、細胞質が BALB 系由来である場合、F1×CBA 由来である場合に比べて胚盤胞への発生率が低く (Table 2)、また移植後の産仔生産率も低い (Table 3) ことから、人為操作に対する BALB 系胚の感受性の強さは核よりもむしろ細胞質に依存していると考えられる。

核と細胞質の組み合わせの違いによってキメラ胚の発生率およびキメラ個体の作出率が異なるという点を除けば、核移植によって得られたキメラマウスの所見は集合法あるいは注入法によって得られた個体と大差がみられない。すなわち、得られたキメラマウス15匹のうち11匹が雄(73%)であり、キメラマウスの性は雄に偏ること、キメラ個体の毛色分布と GPI 型の比率は相関すること、GPI 型の比率と生殖細胞のキメラ状態とは一致しないこと (McLaren, 1976) などが明らかとなった。

謝 辞

センダイウィルスを供与いただいた大阪大学細胞工芸学センター内田驍教授に深謝する。また、赤血球 GPI-1 型の分析にあたり御指導いただいた当場育種部三上仁志博士ならびに大西彰研究員、実験をお手伝いいただいた小野寺政一氏 (現、バイオ科学研究所)、御校閲いただいた花田繁繁殖部長ならびに家畜改良事業団家畜改良技術センター杉江佑博士に深謝する。

References

- Dewey MJ, Matrin DW, Martin GR, Jr., Mintz B (1977) Mosaic mice with teratocarcinoma-derived mutant cells deficient in hypoxanthine phosphoribosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5564-5568.
- Eicher EM, Wachburn LL (1978) Assignment of genes to regions of mouse chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 946-950.
- Fulton BP, Whittingham DG (1978) Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature (Lond)* 273: 149-151.
- Gardner RL (1968) Mouse chimaeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature (Lond)* 220: 596-597.
- Hillman N, Sherman MI, Graham C (1972) The effect of spatial arrangements on cell determination during mouse development. *J Embryol exp Morph* 28: 263-278.
- Kelly SJ, Mulnard JG, Graham CF (1978) Cell division and cell allocation in early mouse development. *J Embryol exp Morph* 48: 37-51.
- McGrath J, Solter D (1983) Nuclear transplantation in the mouse embryo by micromanipulation and cell fusion. *Science* 220: 1300-1302.
- McLaren A (1976) *Mammalian Chimaeras*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Mikami H, Onishi A (1985) 'Heterosis' in litter size of chimaeric mice. *Genet Res Cam* 46: 85-94.
- Mintz B (1962 a) Formation of genotypically mosaic mouse embryos. *Amer Zool* 2: 432.
- Mintz B (1962 b) Experimental recombination of cells in the developing mouse egg: normal and lethal mutant genotypes. *Amer Zool* 2: 541-542.

- Moustafa LA (1974) Chimaeric rabbits from embryonic cell transplantation. *Proc Soc exp Biol Med* 147: 485-488.
- Mulnard JG (1971) Manipulation of cleaving mammalian embryos with special reference to a time-lapse cinematographic analysis of centrifuged and fused mouse eggs. *Adv Biosci* 6: 255-274.
- Rossant K, Vijn KM (1980) Ability of outside cells from preimplantation mouse embryos to form inner cell mass derivatives. *Dev Biol* 76: 475-482.
- Stern MS, Wilson IB (1972) Experimental studies on the organization of the preimplantation mouse embryo. I. Fusion of asynchronously cleaving eggs. *J Embryol exp Morph* 28: 247-254.
- Tarkowski AK (1961) Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature (Lond)* 190: 857-860.
- Tsunoda Y, Yasui T, Tokunaga T, Uchida T, Sugie T (1985) Pronuclear transplantation in the mouse. *Jpn J Anim Reprod* 31: 130-134 (in Japanese).
- Tsunoda Y, Yasui T, Nakamura K, Uchida T, Sugie T (1986) Effect of cutting the zona pellucida on the pronuclear transplantation in the mouse. *J Exp Zool* 240: 119-125.
- Whittingham DG (1971) Culture of mouse ova. *J Reprod Fert Suppl* 14: 7-21.

要 約

核移植技術を用いて、BALB×BALB および F1×CBA の2細胞胚期間で片側割球核の交換移植を行いキメラマウスの作出を試みた。得られた結果の概要は次の通りである。

1. BALB 系の核を注入した F1 胚の胚盤胞への発生率 (62%) は、F1 の核を注入した BALB 系胚の発生率 (42%) に比べて有意に高かった。
2. 培養胚の移植により、BALB 系の核を注入した F1 胚で、産仔の 33% (15/39) に体毛キメラが得られた。しかしながら、逆の組み合わせではキメラ個体は得られなかった。
3. GPI-1 型の比率と体毛のキメラ状態は一致したが、生殖細胞では異なっていた。