

ニワトリにおける遺伝子移植

京都大学農学部研修員 中西 章

緒言

動物に対する遺伝子移植 (Gene transfer) は、外来遺伝子を動物のゲムに組込むことにより今までには無い有用な形質を恒久的に発現させることを主眼としている。従って外来遺伝子の導入は発生の早い時期 (可能であれば受精直後) に行ない、必ず生殖細胞に外来遺伝子を導入できる事が望ましい。更に外来遺伝子DNAの組込み自体がゲムであるため、できるだけ多くの形質転換動物を得ることができる効率的な実験系が必要である。現在までに報告された形質転換動物の多くが受精直後の卵子に外来遺伝子DNAを注入することにより作製されたのは、以上の条件に最も合致している理由からである。しかしニワトリにおいては、卵子が大きくさらに細胞質部分が極端に少ない為に前核を確認するのは困難であり、またニワトリの自然排卵数は1個であるため、実験の際に数多く必要な前核期卵子が十分な数で得ることができない。従ってニワトリではこれまでとは異なった方法での遺伝子導入を検討する必要がある。本講演ではニワトリに対する遺伝子移植の研究に関して特に遺伝子移植の方法論に関して、ウイルスによる遺伝子導入と精子経路による遺伝子導入の二つに焦点をあわせて、その遺伝子移植に対する有効性を論ずる予定である。

ウイルスによる遺伝子導入

ニワトリに於ける遺伝子移植で有効と考えられる方法の一つにウイルスを用いるものがある。ウイルスは遺伝子本体がRNAであり逆転写酵素により自らの遺伝情報を宿主細胞のゲムに組込んでしまう。ウイルスによる遺伝子移植は、外来遺伝子を組込んだ組換えウイルスを、目的の細胞に感染させることによって行なわれる。ウイルスを遺伝子導入に用いる際に有利な点としては、1) DNAに組込む機構としては最も効果的であること、2) ウイルス自身のゲムは小さく、扱いが簡単なこと等が上げられる。これらの考察からニワトリに対する最初の遺伝子導入の試みはウイルスを用いて行なわれた。最も成功した例として上げられるのはBosselmanら (1989) が発表した、ウイルスの感染機能だけを残し、組込まれる中身の構造遺伝子を導入すべき遺伝子にすり替えてしまうことにより、このウイルスを孵卵前の卵子に感染させて遺伝子導入を行なったものである。しかしこれまでのウイルスに関する研究の過程で以下の問題点が明らかになった。1) ウイルスに組込む外来遺伝子の大きさに制限があること、2) 場合によっては組込まれた外来遺伝子の発

現不活化が見られること、3) 外来遺伝子の発現はウイルスのプロモーターに影響されてしまうこと、4) ウイルスを孵卵前の胚に感染させる場合、この胚から発生したニトリの生殖細胞の全てが外来遺伝子を取り込んでいるわけではないため、外来遺伝子が生殖細胞に組込まれているかどうかは次世代での検定を待たなければならないこと、5) ウイルスは単体で自己増殖できない為、組替えウイルスの作製の為にはウイルス産生細胞株の樹立の手間が掛かること、6) そして何よりもウイルスの性質についての厳密な研究無しには行なえないこと等である。これらの問題点はウイルスを遺伝子導入の手段として用い得る限界を示しており、より汎用性の高い方法が必要だと考えられる。

精子経路による遺伝子導入

ウイルスを用いる以外に外来遺伝子を導入する方法としては、DNAを組込む対象となる細胞（受精卵など）のDNA複製の場に、多量の外来遺伝子DNAを共存させることにより、偶然に細胞ゲムに組込まれる事を期待する方法がある。この方法はウイルスを用いる際に比べて簡便で、外来遺伝子の発現も安定であって、培養細胞や受精卵の前核に対するDNA注入による形質転換動物作出もこの方法により行なわれている。しかし上記のように受精卵を用いる場合は様々な理由で困難であるため、ニトリにおいては遺伝子導入の新しい経路として精子経路による遺伝子移植を検討する必要がある。この方法で有利な点として、ニトリは多精子受精の為、取込んだ精子による卵子細胞質への外来DNA導入率は比較的高い事が予想できることである。過去に行なわれた研究では、精子がDNA分子を吸着する性質を利用し、DNAを吸着させた精子を人工受精して胚ゲムへの遺伝子導入を期待するものであったが、結果は思わしいものではなかった。もう一つのアプローチとしては精子に予めDNAを細胞内に導入しておき、受精の際に胚ゲムへの取込みを期待する方法がある。この導入法として有効なものにエレクトロポレーション（電気穿孔法）が考えられる。エレクトロポレーションとは瞬間的な高電圧を細胞に掛けることにより一時的な穴をあけ、その穴を通して外部の物質を導入する方法である。通常精子のような細胞はエレクトロポレーション処理に弱い為、ニトリの精子はエレクトロポレーション処理の後も生存し、人工授精にも用いることが判明した。この方法を用いる遺伝子導入については最新の結果を交えて、より包括的な検討を行なう予定である。