

# 遺伝工学基盤技術室

Bioresource Engineering Division

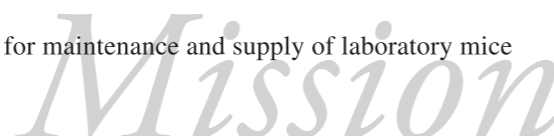


室長 小倉 淳郎 (農博)  
Atsuo OGURA, D.V.M., Ph.D.

## ミッションと事業概要

当研究室では、理研BRCが各リソース、特に実験動物および幹細胞をより高度なクオリティにて維持供給するために必要な遺伝関連技術開発を行う。また、これらの技術が広く研究コミュニティに活用されるべく、研修事業を行う。

To develop genetics-related techniques, especially those essential for maintenance and supply of laboratory mice and stem cell lines at a high quality in RIKEN Bioresource Center.



## 平成22年度の成果

### Development of Technology in 2010-2011

#### (1) 体細胞核移植クローン技術の開発

我々は、マウスクローン胚の発生低下には、*Xist* 遺伝子の異所性発現が大きく関わっており、*Xist* ノックアウト法がクローン効率を劇的に改善させることを明らかにした。そこで、その有効性を一般化するためにRNA干渉実験を開始した。一方、*Xist* 遺伝子非依存的に生じるX染色体XqA7.2/F3領域の遺伝子発現低下も認められた。そこでドナー卵丘細胞を用いたChIP-on-chip解析を行ったところ、当該領域に抑制性のヒストン修飾 (H3K9me2) が高度に蓄積していることが明らかとなり、新たな再プログラム化阻害因子を見出す事に成功した。

#### (1) Development of mouse somatic cell nuclear transfer techniques

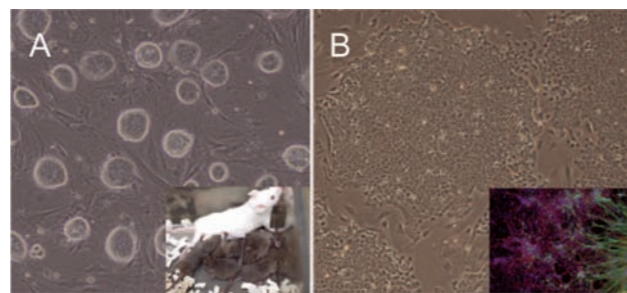
We found that normalization of the *Xist* expression by gene knockout in cloned mouse embryos remarkably increased the cloning efficiency. To seek for a more conventional strategy, we have started RNA interference experiments using cloned mouse embryos. We also found that X-linked genes at A7.2 and F3 were downregulated in cloned blastocysts in an *Xist*-independent manner. We analyzed these regions for a repressive histone modification, H3K9me2, by ChIP-on-chip using donor cumulus cells. The results showed that this regions, but not others, were highly enriched with H3K9me2, suggesting that this histone modification may be resistant to reprogramming by nuclear transfer.

#### (2) 顕微授精技術の開発

マウス雄性生殖細胞の卵子活性化能は、伸長精子細胞から精子に成熟するに連れて獲得される。このため、未成熟な円形精子細胞を用いた顕微授精では、卵子への人為的活性

#### 新規幹細胞の開発 (図1)

Development of new stem cell lines (Fig.1)



(A) 2i処理を施したマウスES細胞。コロニーの形態は改善されている。実際に質の低いES細胞でも2i処理により生殖系列寄与能を回復させることができた(右下)。(B) ウサギiPS細胞。ウサギiPS細胞のコロニーはウサギES細胞のものによく似ていた。ウサギiPS細胞の神経系への分化誘導(右下)。神経系への分化誘導試験でES細胞とiPS細胞の質を評価することができた(右下)。緑: Tuj1 (神経繊維)、赤: GFAP (アストロサイト)

(A) Mouse ES cell colonies after "2i" treatment. Colonies are closely packed and have smooth surface. Inset: The 2i-treated ES cells regained the germline transmission ability, as shown by birth of ES-derived pups from a chimeric mouse. (B) Rabbit iPS cell colonies, which resemble rabbit ES cell colonies in appearance. Inset: For assessing the quality of rabbit iPS cells, they were induced to differentiate into the neural lineage. Green: Tuj1 for neural tubes, Red: GFAP for astrocytes.

化処理が必須である。そこで、円形精子細胞の凍結処理により、卵子活性化処理なしで産仔が得られる技術を開発した。また、マウス first-wave の伸長精子細胞 (28-33日齢) および精子 (30-34日齢) を用いて顕微授精を行ったところ、着床率、産仔率ともに成熟マウス由来の精細胞と同等の成績が得られ、first-wave 精細胞が正常な受精能を持っていることを明らかにした。

#### (2) Development of microinsemination techniques

For round spermatid injection (ROSI) in mice, oocytes need to be preactivated artificially because of the lack of oocyte-activating capacity in these immature gametes. We found that by freezing and thawing testicular cells or whole testes, the oocyte-activating factor was released from spermatozoa and transferred to round spermatids. These could now activate oocytes and support full term development. Thus, we have

developed a single-step ROSI approach for mice.

To examine the fertilizing ability of the first-wave of spermatogenic cells, we injected elongated spermatids and spermatozoa from neonatal mice into oocytes. The rates of oocyte activation and normal births were similar to those produced by injection with germ cells from mature males, indicating that the first wave spermatogenic cells have normal fertility.

#### (3) 効率的な胚・配偶子の凍結保存法の開発

新規に開発した高浸透圧液で保存したマウス凍結胚を、英国MRCへドライアイス梱包し輸送したところ、回収胚の91%が正常、移植した胚の40%が産仔へと発生した。ドライシッパーを使わずに国内外へ簡易輸送することが可能となった。過排卵誘起が困難な野生由来JF1及びMSM系統へ、抗インヒビン血清を投与して内因性のFSH分泌を促進させたところ、通常のeCG投与の7-8倍の排卵数が得られた。JF1では体外受精後の胚移植で40%以上が産仔へと発生したが、MSMでは分娩直前で流産が多くみられた。

#### (3) Development of reliable cryopreservation techniques for mouse embryos or gametes

For transporting vitrified embryos without a dry shipper, we developed a novel vitrification solution with a high osmolarity. Mouse C57BL/6 strain embryos vitrified with this solution were transported in a dry ice package to MRC Harwell in UK. After recovery, 91% of the collected embryos were normal in appearance, and 40% of transferred embryos developed into live offspring, indicating that this vitrification method can be used for international embryo delivery.

In the JF1 and MSM strains of mice, widely used wild-derived strains, it is difficult to induce superovulation by conventional eCG injection. We found that the number of ovulated oocytes could be increased 7- to 8-fold by passive immunization against inhibin in both strains. More than 40% of transferred embryos derived from these oocytes developed into live offspring in the JF1 strain. However, most MSM fetuses died shortly before birth from unknown causes.

#### (4) 新規幹細胞の開発

我々はこれまでにマウスES細胞の培養条件を検討し、2i培地での培養により、もともと質の低いES細胞に生殖系列への寄与能を獲得させることができることを確認した。また、これまでに樹立したウサギES/iPS細胞の質を検査するために、体外分化誘導能を指標にした評価系を構築している。実際に、いくつかのiPS細胞株で神経系への分化能が劣るものがあることも見いだした。今後はウサギ多能性幹細胞の質をより高め、最適な再生医療モデルの構築や遺伝子改変ウサギ作製を目指して研究を展開する予定である。

#### (4) Development of new stem cell lines

Generating high quality stem cells is necessary not only for producing genetically engineered animals but also for advancing

human regenerative medicine. To these ends, we have optimized the culture conditions and have improved the potency of poor quality mouse embryonic stem (ES) cells to produce high-contribution and germline competent chimeric mice. Moreover, we are establishing systems for assessing the quality of the rabbit ES and induced pluripotent stem (iPS) cell lines using the ability to differentiate in vitro as an indicator. Actually, several rabbit iPS cell lines showed limited ability to differentiate to a neural lineage. Our next objective is to improve the quality of rabbit iPS cell lines with the goals of developing a translational research model and producing genetically engineered rabbits.

## 職員とメンバー構成 Members

- 室長 [Head of Bioresource Engineering Division]  
小倉 淳郎 Atsuo OGURA, D.V.M., Ph.D.
- 専任研究員 [Senior Research Scientist]  
井上 貴美子 Kimiko INOUE, Ph.D.
- 専任技師 [Senior Technical Scientist]  
持田 慶司 Keiji MOCHIDA 越後貫 成美 Narumi OGONUKI
- 基礎科学特別研究員 [Special Postdoctoral Researcher]  
的場 章悟 Shogo MATOBA, D.V.M., Ph.D.
- テクニカルスタッフII [Technical Staff II]  
廣瀬 美智子 Michiko HIROSE  
長谷川 歩未 Ayumi HASEGAWA
- アシスタント [Assistant]  
中村 可奈子 Kanako NAKAMURA  
水谷 美咲 Misaki MIZUTANI
- 客員研究員 [Visiting Scientist]  
本多 新 Arata HONDA, Ph.D.  
水谷 英二 Eiji MIZUTANI, Ph.D.
- 研修生 [Student Trainee]  
米澤 一弥 Kazuya YONEZAWA 上村 悟氏 Satoshi KAMIMURA
- パートタイマー [Part-Timer]  
羽鳥 真功 Masanori HATORI 富島 俊子 Toshiko TOMISHIMA

