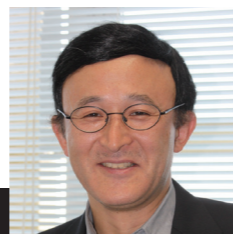


遺伝工学基盤技術室

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.

Activities:

- I. Development of mouse somatic nuclear transfer techniques
- II. Development of microinsemination techniques
- III. Development of reliable cryopreservation techniques for mouse embryos or gametes
- IV. Development of new stem cell lines



平成23年度の成果

Development of Technology in 2011-2012

(1) 体細胞核移植クローン技術の開発

前年度までに、我々は、ヒストンメチル化修飾(H3K9me2)は核移植によるリプログラミングの阻害因子である可能性を見出した。一方、脳組織中にH3K9me2の蓄積が少ない細胞を発見した。これをドナー核とする核移植実験を開始し、成体マウス脳細胞からのクローンマウス作出に成功した。また、昨年までに、*Xist* 遺伝子の異所性発現が、クローン胚の発生効率を低下させていることを明らかにした。これを受けて、遺伝子改変を伴わない実用的なクローン効率改善法として、RNA干渉法によって*Xist*を一過性に抑制する手法を開発した。その結果、クローン出生率は劇的に改善し、通常の約10倍にあたる20%にまで上げることに成功した。こうして生まれたクローン産仔の組織では、通常のクローン産仔でみられる遺伝子発現の乱れも大幅に改善していた。

(1) Development of mouse somatic cell nuclear transfer techniques

Until recently, we have found that the histone modification, H3K9me2, was one of the epigenetic marks that are resistant to genomic reprogramming by somatic cell nuclear transfer (SCNT). We identified certain brain cells to be nearly devoid of H3K9me2 and used them for SCNT. As a result, we successfully generated first cloned mice from adult mouse brain cells. We have revealed that the ectopic expression of *Xist* is a major cause of the poor development of SCNT embryos. To improve the cloning efficiency without genetic manipulation, we devised an RNAi-mediated method to transiently repress

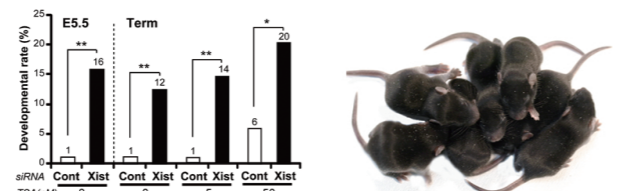


図1. *Xist* 遺伝子ノックダウンによるマウス体細胞クローン技術の改善。*Xist* 遺伝子に特異的な siRNA を再構築胚へ注入することにより、生存胚および産子数が10倍以上増加する(左図、黒バー)。胚移植当たり、10-30%程度の効率でクローン産子が生まれる(右図)。Fig. 1 Remarkable improvement of mouse somatic cell cloning by *Xist* gene knock-down. Injection of reconstructed embryos with *Xist*-specific siRNA resulted in more than 10-fold increase in the rates of live embryos and term offspring after embryo transfer (left). About 10-30% of embryos transferred reached term (right).

Xist expression, which resulted in a remarkable increase in the birth rate of cloned mice up to 20%, 10 times higher than that of control clones. Moreover, this transient *Xist* suppression at an early embryonic stage significantly ameliorated the aberrant gene expression patterns in the tissues of cloned pups at birth.

(2) 顕微授精技術の開発

多くの免疫学研究に使われるNOD/SCIDマウスの卵子は、注入刺激に弱く、顕微授精に不向きであったが、予め活性化処理を行うことで、顕微授精が可能になった。そこで同卵子を用いてスピードコンジュニクを開始し、2系統のNOD/SCIDコンジュニクKOマウス系統作出に成功した。また、産仔作出効率が極めて低率である一次精母細胞を用いた顕微授精技術に、ヒストンアセチル化酵素阻害剤を利用し、再構成胚のアセチル化を低下させたところ産仔が得られた。さらに、これらの胚の顕微授精後のライブセルイメージング観察により、雌雄両染色体の分裂スピードが一致していないことも明らかにした。

(2) Development of microinsemination techniques

Oocytes from NOD/SCID mice are very fragile and not suitable for microinjection. We found that this difficulty could be overcome by pre-activation of oocytes. This technique was successfully applied to generation of two NOD/SCID congenic knockout strains by injection with immature spermatogenic cells. The poor outcome after microinsemination using primary spermatocytes may be due to premature segregation of sister chromatids, which is associated with abnormal global histone acetylation. Normal mice were obtained when the reconstructed oocytes were treated with a histone acetyltransferase inhibitor. A live-cell imaging system revealed asynchronous behaviour of paternal and maternal chromosomes, which might be responsible for the poor developmental ability of resultant embryos.

(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HOV(高浸透圧ガラス化)法により、主要な近交系マウス6系統の2細胞期胚を保存した。いずれの系統でも回収後は93%以上が形態的に正常であり、移植胚の32~82%が産子へと発生したことから、様々な系統の保存に効果的であることが確認された。また、野生由来マウス各系統の雌へのeCGまたは抗インヒビン血清の投与で36系統中32系統から10個/匹以上の正常卵子を得た。更に体外受精により33系統中27系統で60%以上の受精率が得られ、HOV法で保存した25系統中21系統から産子を得る事に成功した。

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

When 2-cell embryos from 6 inbred mouse strains were cryopreserved by a high osmolality vitrification (HOV) method we developed, at least 93% of the embryos showed normal morphology after recovery and after embryo transfer 30-82% developed to term offspring. More than 10 oocytes were collected from 32 out of 36 wild-derived mouse strains after superovulation by the injection with eCG or anti-inhibin serum. These oocytes were successfully fertilized in vitro at a rate more than 60%. We succeeded in obtaining live offspring from 2-cell embryos cryopreserved by HOV method in 21 out of 25 wild-derived mouse strains. Thus, we confirmed that HOV is eminently applicable for embryo cryopreservation in many mouse strains.

(4) 新規幹細胞の開発

C57BL/6系統のES細胞について、その性質を保持させながらフィーダーフリーの培養環境下で維持できる細胞を開発した。フィーダー細胞の混入の無い、ES細胞の厳密な生化学的・遺伝学的解析が可能になる。現在、生殖系列への寄与を確認している。また、ウサギES/iPS細胞においては、神経系への分化誘導においてES細胞に劣っていたiPS細胞に未分化度を高める処理を施し、ES細胞を越える分化能を獲得させることに成功した。今後はこれら多能性幹細胞の質を高め、バイオリソースとしての価値を高めていきたい。

(4) Development of new stem cell lines

We have generated mouse C57BL/6N ES cells which could be maintained by a feeder free culture condition. They are expected to be used for stringent biochemical and genetic analysis of ES cells without contamination of feeder cells. Their germline contribution ability is now being evaluated using chimeric mice. After some technical modifications, we have successfully converted rabbit iPS cells to a more undifferentiated status, which significantly improved their differentiation ability to the neural lineage cells. They would be the next-generation bioresources that may extensively contribute to advancements of biomedical researches.

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 越後貴 成美 Narumi OGONUKI
- 協力研究員[Contract Researcher]
水谷 英二 Eiji MIZUTANI, Ph.D.
- 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. 齊藤 美佳子 Mikako SAITO
- 研修生 [Student Trainee]
上村 悟氏 Satoshi KAMIMURA 柿野 陽子 Yoko KAKINO
及川 真美 Mami OIKAWA
- パートタイマー [Part-Timer]
羽鳥 真功 Masanori HATORI 富島 俊子 Toshiko TOMISHIMA

