

遺伝工学基盤技術室

Bioresource Engineering Division

ミッションと事業概要 Mission

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21年度の成果

Development of Technology in 2009-2010

(1) 体細胞核移植クローン技術の開発

マウス体細胞核移植クローンの効率改善をめざして、胚盤期胚を用いてマイクロアレイによる大規模遺伝子発現解析を行った。3種のクローン胚 vs. 対照胚の差次的遺伝子群に共通する抑制遺伝子の大半はX染色体上に位置していた。これらの発現異常を補正するために、X染色体不活性化遺伝子(Xist)欠損マウスを用いてクローンを作製したところ、作製効率が8~9倍上昇した。従ってクローン動物作製の低効率にはX染色体の異常な不活性化が関わっていることが明らかにされた(図1)。

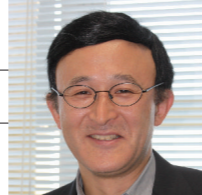
(1) Development of mouse somatic nuclear transfer techniques

To improve understanding of the low efficiency of somatic cell nuclear transfer (SCNT), we performed global transcription analysis of mouse SCNT blastocysts reconstructed from three different donor cell types. Many of the downregulated genes (24/44) identified in SCNT embryos were located on the X chromosome. When the downregulation of X-linked genes in SCNT embryos was corrected by using Xist-deficient donor cells, the birth rates increased 8- to 9-fold (Fig.1). Thus, SCNT may be significantly improved by correcting epigenetic errors specific for SCNT.

室長 Head

小倉 淳郎 (農博)

Atsuo OGURA, D.V.M., Ph.D.



体細胞核移植クローン技術の開発(図1)

Development of mouse somatic cell nuclear transfer techniques (Fig.1)



X染色体不活性化関連遺伝子のノックアウトドナー細胞を用いたクローン産子(右)。左は野生型ドナー細胞を用いたコントロール。出生率は、1.6%から15.4%へ大きく改善した。

Fetuses born following nuclear transfer using Sertoli cells with the active X chromosome. The birth rates were 1.6% and 15.4% of embryos transferred, respectively.

(2) 顕微授精技術の開発

マウス顕微授精は極めて応用範囲の広い技術である。その効率に影響する因子を明らかにするために、(5系統)×(3種の精子・精子細胞)×(その凍結の有無)の30通りの顕微授精実験を行い、三元分散分析を実施した。伸張精子細胞は精子と同等の産子作出能を有すること、凍結は胚発生に影響しないなど、多くの有意な統計学的データベースが蓄積できた。また、顕微授精の新しい応用として、体内異所性移植によって始原生殖細胞から成熟した雌雄配偶子(精細胞・卵子)を作出し、顕微授精により産仔を得る技術を確立した。これは、将来のin vitro生殖細胞由来の産子作出に応用できると期待される。

(2) Development of microinsemination techniques

Mouse ICSI has been applied to a broad range of experiments in reproductive biology using mouse models. To define the factors that affect the efficiency of mouse ICSI, we undertook experiments involving five strains and three male germ-cell types with or without freezing treatment. Developmental

parameters were analyzed by three-way ANOVA. The statistical analysis allowed us to accumulate important information on mouse ICSI. For example, sperm and elongated spermatids were indistinguishable in their developmental ability, and freeze-thawing treatment had no effect on the developmental parameters.

As an application of mouse ICSI, we developed a technique to generate functional oocytes and spermatids from fetal primordial germ cells under the adult kidney capsule. They supported full-term development when fertilized with normal counterpart gametes by ICSI. This transplantation system followed by ICSI may be used for the production of offspring using germ cells derived from pluripotent stem cells in vitro.

(3) 効率的な胚・配偶子の凍結保存法の開発

凍結胚の簡易輸送法用にドライアイス温度保存用凍結液を開発した。エチレングリコールおよびシュクロース濃度を上げた高浸透圧(34-35 moles/Kg water (PB1液は0.29))のEFSガラス化溶液を用いた場合に、7日間-79℃保存後も生存率は100%および90%と高い生存性を示した。現在は海外のマウスバンクと輸送試験を進めている。本技術を利用することで、今後はドライシッパーを使わずにガラス化保存胚を国内外へ簡易輸送することが可能になると考えられる。

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

Embryos cryopreserved by vitrification should be stored at temperatures lower than -130°C to avoid intracellular ice formation. Therefore, bulky dry-shippers should be used for their safe transportation. To develop a method for transporting vitrified embryos on dry ice, we devised a vitrification solution that does not cause devitrification of embryos at -80°C. We found that by increasing the concentration of ethylene glycol and sucrose, the vitrification status of embryos could be sustained, even at -80°C. We confirmed that C57BL/6 embryos vitrified in this solution can be transported between facilities in a dry-ice package.

(4) 新規幹細胞の開発

遺伝子改変マウスの作出に用いられるマウスES細胞は、その生殖系列への寄与能力を安定して維持することが重要である。そこで、ES細胞の未分化性を維持すると言われている2阻害剤処理(いわゆる2i)を用いることで、新たな株樹立効率のみならず、既存株のキメラ寄与能力も高まることが明らかになった。また、ヒト型のES細胞を生じるウサギから安定した誘導多能性幹(iPS)細胞の樹立に成功した。ウサギES細胞との詳細な比較を行ったところ、表現型はお互い極めて類似しているが、少数の差次的発現遺伝子が見つかった。

(4) Development of new stem cell lines

The ability to contribute to the germline is critically important for embryonic stem (ES) cells that are used for knockout mouse

generation. Recent studies have revealed that the so-called "2i (2 inhibitors)" treatment has a profound effect on the maintenance of the pluripotency of mouse ES cells. We found that 2i treatment resulted in the establishment of high-potency ES cells and the production of high-contribution chimeric mice from preexisting ES cells. We have established rabbit ES cell lines that may provide us with an invaluable experimental model for the study of cell-based regenerative medicine. More recently, we also established induced pluripotent stem (iPS) cell lines that share many important characteristics with ES cells. However, there is a subtle difference in the global gene-expression patterns between these two types of pluripotent stem cell.

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

特別研究員 Postdoctoral Researcher

的場 章悟 Shogo MATOBA

テクニカルスタッフII Technical Staff II

廣瀬 美智子 Michiko HIROSE

アシスタント Assistant

中村 可奈子 Kanako NAKAMURA

客員研究員 Visiting Scientist

本多 新 Arata HONDA, Ph.D.

訪問研究員 Visiting Researcher

金 鎮文 Kim Jin Moon

研修生 Student Trainee

米澤 一弥 Kazuya YONEZAWA

パートタイマー Part-Timer

羽鳥 真功 Masanori HATORI / 富島 俊子 Toshiko TOMISHIMA

