

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24年度の成果

Development of Technology in 2012-2013

(1) 体細胞核移植クローン技術の開発

昨年までに、RNA干渉法を用いた*Xist*遺伝子の一過性抑制により雄クローンの産仔率を改善した。雌クローンにおいても同手法による産仔率改善が見られるか検討したところ、RNA-FISHにより、*Xist*遺伝子の発現低下が確認されたが、雄と異なり、産仔率は上昇しないことが明らかになった。体細胞核移植クローン技術をマウス系統保存へ応用するために、新たに抹消血由来血球細胞を用いた核移植クローンの作製を試みた。その結果、顆粒球をドナー細胞とした場合に2.1%の効率で産仔が得られた。またそれらの産仔を雄と交配したところ、正常な生殖能力を示した。本法では、一滴の血液から系統断絶の危機に瀕した貴重なマウス系統の救済に期待できる。

(1) Development of mouse somatic cell nuclear transfer techniques

We have previously found that the birth rates of males cloned from somatic cells were remarkably increased following treatment of cloned embryos with siRNA against *Xist*. We then examined whether the same could be true with females. As expected, *Xist* RNA expression was repressed, but the birth rates were not significantly improved. There may be some sex-related difference in the *Xist*-dependency in the embryonic development. We examined whether cloned mice could be made from a drop of peripheral blood. By using leukocytes derived from the blood samples, normal mice were born at 2.1% birth

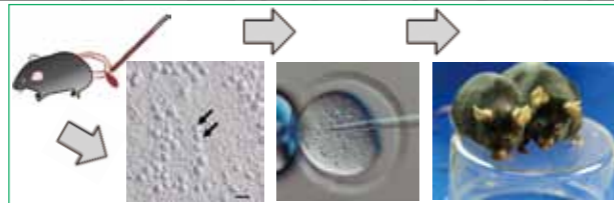


図1. 末梢血液から採取した血球を用いたクローンマウスの誕生。マウスの尾から1滴の血液を採取し、その中の白血球を用いた核移植クローンにより、正常なマウスが生まれた。今後、貴重なマウス系統の維持に利用できると期待される

Fig. 1 Mouse cloning using peripheral blood. A drop of blood was collected and isolated leukocytes were used for nuclear transfer cloning. Normal cloned offspring were born after embryo transfer. This technique is expected to be applied to preservation of invaluable genetic stocks of mouse strains.

rate. This technique may be used for propagation of invaluable strains that are facing extinction.

(2) 顕微授精技術の開発

昨年度に引き続き、生後約1ヶ月齢の幼若マウスの精細胞を用いた超スピードコンジュニク技術を、多くの免疫学研究に用いられているNOD/SCIDマウス系統へ応用した。戻し交配4-5世代を224-226日(通常の半分以下の期間)で完了させ、遺伝子改変マウス4系統のNOD/SCIDコンジュニク化に成功した。これらは、ヒト免疫能モデルマウスとしての利用が期待される。

(2) Development of microinsemination techniques

NOD/SCID mice are extensively used as hosts of Xeno-transplantation studies. Therefore, there are demands of generation of gene-modified mice with the NOD/SCID genetic background. We then applied our high-speed congenic strategy using neonates' spermatids to generation of NOD/SCID

congenic strains. So far we have generated four gene-modified NOD/SCID strains including knock-in strains. Congenics for these strains was completed within 224-226 days, which correspond to about half-term of conventional speed congenic strategy. They may be used as unique models for immunological studies.

(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)法により各発育段階におけるマウス胚を保存・回収したところ、前核期92%、2細胞期96%、8細胞期98%、桑実期98%、胚盤胞期88%、更に未受精卵子でも83%と高い生存率が得られた。また凍結胚の作出が困難とされる野生由来の*Mus musculus*に属する33系統について、抗インヒビン血清またはeCG投与を用いた過排卵、新鮮および凍結精子を用いた体外受精、ガラス化保存胚の移植による産子発生の各成績を調査した。過排卵の方法を選択することで31系統から平均10個以上の正常卵子を獲得でき、体外受精では新鮮精子で平均78%、凍結精子でも57%の受精率が得られた。更にガラス化保存・回収胚の移植により31系統から産子を獲得することに成功し、これら系統の保存に凍結胚の利用が極めて効果的であることが確認された。

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

We examined the feasibility of a high osmolality vitrification (HOV) method for cryopreservation of mouse embryos at different developmental stages. The survival rates after warming (thawing) were 83% for oocytes, 92% for 1-cells, 96% for 2-cells, 98% for morulae, and 88% for blastocysts. For practical use of wild-derived *Mus musculus* mice (33 strains), we evaluated the efficiencies of superovulation either with anti-inhibin serum or eCG treatment, IVF using fresh or frozen spermatozoa, and development of vitrified embryos. More than 10 oocytes were collected from 31 strains. Fertilization rates *in vitro* reached 78% and 57% using fresh and frozen spermatozoa, respectively. After transfer of vitrified-warmed embryos, normal pups were obtained from 31 strains, indicating that a series of ART were successfully devised for wild-derived strains.

(4) 新規幹細胞の開発

C57BL/6系統のES細胞のフィーダーフリー化を進め、雌雄の各1株について、キメラマウス作成とその生殖細胞への寄与を確認した。これらの2株を細胞材料開発室へ寄託した。マウス末梢血球細胞クローン由来のES細胞を樹立した。顆粒球由来の核移植ES細胞は、通常の培養条件下では正常なES細胞の性質を示したが、分化誘導条件下では、細胞が脱落する傾向が見られた。今後、その原因を明らかにしていく予定である。

(4) Development of new stem cell lines

We have generated C57BL/6N mouse ES cells which could be

maintained under a feeder free culture condition. We confirmed their ability to contribute to the germline through chimera mouse production. These ES cell lines (one male and one female) were deposited to BRC Cell Engineering Division (Cell Bank). We have developed ES cell lines from blastocysts derived from nuclear transfer cloning using peripheral blood cells. Those from granulocytes have a unique character. They are indistinguishable from other ES cell lines under a normal culture condition, but upon induction of differentiation, they start to fall away from colonies and degenerate. We are seeking for the underlying mechanisms.

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
- 開発研究員 [Research & Development Scientist]
平澤 竜太郎 Ryutarō HIRASAWA, 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]
水谷 美咲 Misaki MIZUTANI 塚原 文乃 Ayano TSUKAHARA
- 客員研究員 [Visiting Scientist]
本多 新 Arata HONDA, Ph.D. 斉藤 美佳子 Mikako SAITO
水谷 英二 Eiji MIZUTANI, Ph.D.
- 大学院生リサーチアソシエイト [Junior Research Associate]
上村 悟氏 Satoshi KAMIMURA 柿野 陽子 Yoko KAKINO
- 研修生 [Student Trainee]
及川 真美 Mami OIKAWA
- 国際プログラムアソシエイト [International Program Associate]
陳 俐 彬 Chen Li-Wen
- パートタイマー [Part-Timer]
富島 俊子 Toshiko TOMISHIMA 本村 香織 Kaori MOTOMURA

