

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 and mouse strains

Mission

平成26年度の成果

Development of Technology in 2014-2015

(1) 体細胞核移植クローン技術の開発

異なる発生ステージのマウス前精原細胞をドナーとした核移植を実施し、得られたクローン胎仔の3つの父性DMRのメチル化と、対応するインプリント遺伝子発現を解析した。その結果、父性インプリントは胎齢16.5-17.5日の前精原細胞で確立するが、その時期および支配遺伝子発現制御にはDMRで差があることを明らかにした。また、トリコスタチンA (TSA) 処理により核移植胚の発生能が上昇する理由を明らかにするために、2細胞期核移植胚の遺伝子発現解析を行ったところ、TSA処理によって特定の転写因子の発現量が改善することが明らかとなった。核移植胚はTSA処理によって転写因子の発現が改善し、胚性遺伝子の発現が正常

化していると予測される。

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

Cloned fetuses derived from E15.5-P0.5 prospermatogonia were analyzed for patterns of the DNA methylation in three DMRs and the expression of imprinted genes. We found DMR-specific timing for the paternal imprint establishment (during E16.5-17.5) and imprinted gene expression regulation.

To clarify the reason why trichostatin A (TSA) treatment can improve developmental efficiency of cloned embryos, we analyzed gene expression pattern of TSA-treated cloned embryos at the 2-cell stage. The results showed that TSA normalized zygotic gene activation by increasing expressions of

specific transcription factors in cloned embryos.

(2) 顕微授精技術の開発

高度な免疫不全を呈するNOD/Scidは、様々なヒト疾患のメカニズム解明に利用されているが、発生工学的な手法についての報告は少ない。今回、顕微注入刺激に弱い同卵子を予め活



図1 CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術により作出した nonagouti (a)遺伝子ノックアウト日本産野生由来 MSMマウス。ヘテロノックアウト(左)は野生色、ホモノックアウト(右)は黒色の被毛を持つ。

Fig. 1 CRISPR/Cas9 Knockout mice derived from Japanese wild-derived MSM strain. The nonagouti (a) gene was disrupted by the CRISPR/Cas9 system. A heterozygous KO mouse with wild-type agouti coat color (left) and a homozygous KO mouse with black coat color (right).

性化処理することで生存率を改善した。それを生後36-38日齢オスの伸張精子細胞を顕微授精に用いた超スピードコンジェニック法による遺伝子改変NOD/Scid系統の作出に応用し、通常の自然交配では系統樹立に約3年掛かるところ、175-226日間で7系統の樹立が完了した。また、eCGの代わりに抗インヒビン血清を用いることにより、正常卵回収率が50から100%へと改善された。

(2) Development of microinsemination techniques

NOD/Scid mice strain provides human disease models, but its basic embryo engineering techniques remain to be devised. We found that oocyte activation prior to injection improve the survival of NOD/Scid oocytes. This technique was successfully applied to generation of seven NOD/Scid congenic knock-out/knock-in strains by injection with immature spermatogenic cells from 24-38 days of age. Congenics were completed by 175 - 226 days. We also devised the superovulation regimen by using anti-inhibin serum instead of eCG; the normality of oocyte was improved from 50% to 100%.

(3) 効率的な胚・配偶子の凍結保存法の開発

未成熟な雄マウスでは35日齢以降に精子が精巣上体尾部へ到達し、37日齢の精子から体外受精由来の受精卵が得られた。更に40日齢以降で受精率が50%以上に安定した。通常の交配よりも3-4週間早く受精卵が獲得でき、繁殖の困難な疾患モデル系統の次世代獲得や、コンジェニック系統作出の高速化に効果が期待される。また、過排卵誘起法の改善として、プロゲステロンの2日間連続投与による性周期の同期化後、野生由来系統で効果的だった抗インヒビン血清とhCGの投与により、C57BL/6系統で平均59個（従来法では23個）と多くの排卵卵子を得ることに成功した。

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

We examined whether first wave spermatozoa from immature males could be used for IVF. Spermatozoa first appeared in the cauda epididymides at around 35 days after birth, and IVF became successful with high fertilization rates ($\geq 50\%$) at 40 days. We also succeeded in obtaining large numbers of mature oocytes (59 oocytes per female) when females were treated with anti-inhibin serum and hCG after synchronization of estrus cycle by injections of progesterone. This method is expected to be applied to the strains which are poor responders to eCG.

(4) 新規幹細胞およびマウス系統の開発

CRISPR/Casシステムを利用して、6遺伝子/領域のKOマウスを作成した。日本野生由来のMSMマウスを用いたKOにも成功し、*nonagouti* (a) KO系統を3ライン確立した。それぞれ被毛が黒色であるが、配列改変のパターンにより、腹部の被毛に差異が生じている。現在、マウス表現型解析開発チームと連携して行動解析および馴化テストを行っている。

(4) Development of new stem cell lines and mouse strains

The CRISPR/Cas9 system was applied to generate gene-targeted mouse strains. Until now, KO strains for six genes/regions have been generated. They included *nonagouti* (a) KO mice derived from MSM, a Japanese wild-derived strain. They showed black coat color with different belly colors according to the modified genomic sequences. They are now under detailed examination for the behavior and tameness in collaboration with Japan Mouse Clinic at BRC.

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 Ryutaro HIRASAWA, Ph.D.
- 特別研究員 [Postdoctoral Researcher]
畑中 勇輝 Yuki HATANAKA, Ph.D. 及川 真実 Mami OIKAWA, 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]
塚原 文乃 Ayano TSUKAHARA 柴田 裕美 Hiromi SHIBATA
- 客員研究員 [Visiting Scientist]
本多 新 Arata HONDA, Ph.D. 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
本村 香織 Kaori MOTOMURA
- 研究生 [Research Fellow]
ツェルニク マルタ テレサ Marta Teresa CZERNIK, Ph.D.
- パートタイマー [Part-Timer]
富島 俊子 Toshiko TOMISHIMA 井上 弘貴 Hiroki INOUE
百々 由希子 Yukiko DODO 刘 金莎 Jinsha LIU

