



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27年度の成果

Development of Technology in 2015-2016

(1) 体細胞核移植クローン技術の開発

本年度は、初期胚におけるエピゲノム情報を得るために、以下の研究を行った。着床前初期胚のヒストンH3.1の機能を明らかにするために、ヒストンシャペロンCAF-1のノックダウンを行ったところ、CAF-1はレトロトランスポゾン(RT)領域のH3.1の蓄積に必須であり、抑制性ヒストン修飾のH3K9me3とH4K20me3を蓄積させることでRTの転写を抑制することが明らかになった。また、マウス129/Sv系統(129)の高いゲノム可塑性を司るゲノム領域を同定する目的で、候補染色体が129に置換されたコンソミック系統を用いて体細胞クローン産仔の作出を行った結果、1系統で129の特徴を示すクローン産仔が得られた。今後は、候補となる遺伝子の絞り込みを行う予定である。

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

To identify the function of histone H3.1 in preimplantation embryos, we investigated the effect of knockdown of histone chaperone CAF-1 that mediates the replacement of H3.3 with H3.1/H3.2. The results showed that H3.1 was essential for retrotransposon (RT) silencing by accumulation of repressive histone mark H4K20me3 and H3K9me3 on RT in preimplantation embryos. To identify genomic regions that can lead high genomic plasticity in a mouse inbred strain, 129, we produced cloned mice using somatic cells from consomic strains in which candidate chromosomes were substituted with those of 129. As a result, cloned mice from one of these strains showed characters specific for 129. We will narrow down candidate

genes on this chromosome in near future.

(2) 顕微授精技術の開発

マーモセット幼若雄個体を用いた顕微授精技術を確立するために、各発生段階の精子細胞の出現時期の特定および各発生段階の精子細胞の卵子活性化能の検定を行った。精巣の組織学的および細胞学的観察より生後8ヶ月齢で精母細胞、10-11ヶ月齢で初期精子細胞が出現することが明らかになった。マーモセット各精子細胞をマウス卵子へ注入し、その卵子の活性化を観察した結果、初期円形精子細胞は卵子活性化能を持たないが、後期円形精子細胞は卵子活性化能を持つことが明らかになった。後期円形精子細胞以降の精子細胞を顕微授精に用いることで超スピードコンジュニク法による遺伝子改変マーモセット系統の作出に期待できる。

(2) Development of microinsemination techniques

To establish a marmoset microinsemination system using first-wave male germ cells, we examined whether marmoset male germ cells at different stages could be retrieved from immature testes, together with their oocyte-activating capacity. Testicular tissues from 8 and 10-11 month-old marmosets developed up to the secondary spermatocytes and early spermatids. We found that late spermatids, but not early spermatids, had the oocyte-activating capacity.

(3) 効率的な胚・配偶子の凍結保存法の開発

新規開発した性周期の同期化と抗インヒビン血清による過排卵誘起法は、C57BL/6、BALB/c、ICR、B6D2F1系統の

成熟マウス(10-20週齢)において従来法(PMSG-hCG)よりも正常卵子数が3-4倍であり、15ヶ月齢でも2倍と、幅広い系統と週齢に効果的であった。AやB10背景系統でも約3倍の正常卵子数が得られ、体外受精が困難なB10背景系統では凍結精子用の培養液により受精率が6-8%から85-92%に急上昇した。胚移植が困難なA背景系統では前核期で一度胚移植し、2細胞期胚をガラス化保存-回収後に胚移植して約30%が産子へ発育した。各生殖工学技術が困難な系統でも大幅に成績が改善された。

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

We developed high-yield superovulation protocol by anti-inhibin serum treatment combined with estrous cycle synchronization. The numbers of normal oocytes increased about 3-4 times in C57BL/6, BALB/c, ICR and B6D2F1 strains of mice, and 2 times in aged mice (15 M) compared with standard protocol. In ART-resistant strains such as A and B10 background strains, the numbers of normal oocytes increased about 3 times, and fertilization rates were dramatically improved from 6-8% to 85-92% with the medium for sperm freezing.

(4)新規幹細胞およびマウス系統の開発

ヘテロな細胞集団である trophoblast stem cell が幹細胞として維持されるメカニズムを明らかにするために、コロニータイプ別の遺伝子発現とキメラ形成能の解析を行った。B6またはICR由来の株を用いた。その結果、偽足を持つ小型不定形の細胞からなるドーム型のコロニーが未分化状態を維持すること(図1)、Cdx2よりもElf5がより鋭敏な未分化マーカーであることを明らかにした。

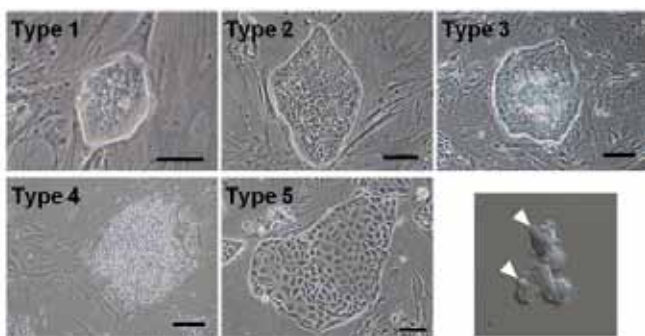


図1 マウス trophoblast stem cell に現れるコロニー。コロニータイプの変遷や遺伝子解析により、type 1 が最も未分化なコロニーであることがわかった。右下は、type 1 コロニーを構成する細胞。不定形で、偽足(矢頭)をもつ。

Fig.1 Colony types that appear in trophoblast stem cells. We identified that type 1 is the most undifferentiated type, based on the observations of colony type transitions and gene expression profiles. The photo right bottom show typical cells composing type 1 colonies. They have an irregular shape and small pseudopods (arrowheads).

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

To understand the mechanisms underlying the maintenance of the stemness of trophoblast stem cells, we analyzed the gene expression profiles and the chimera-contribution ability of different colony types. Cell lines with the B6 and ICR strain backgrounds were used. We found that dome-shape colonies containing small amorphous cells with pseudopods are responsible for the maintenance of cell lines (Figure) and that *Elf5* rather than *Cdx2* can be used as an undifferentiation marker.

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
- 研究員 [Research Scientist]
的場 章悟 Shogo MATOBA, D.V.M., Ph. D.
- 特別研究員 [Postdoctoral Researcher]
畑中 勇輝 Yuki HATANAKA, Ph.D. 上村 悟氏 Satoshi KAMIMURA, 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.
- 国際プログラムアソシエイト [International Program Associate]
刘 金沙 Jinsha LIU
- 大学院生リサーチアソシエイト [Junior Research Associate]
本村 香織 Kaori MOTOMURA 井上 弘貴 Hiroki INOUE
- 訪問研究員 [Visiting Researcher]
Domenico IUSO, Ph.D.
- パートタイマー [Part-Timer]
富島 俊子 Toshiko TOMISHIMA 百々 由希子 Yukiko DODO

