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 gamates
IV. Development of new stem cell lines

Mission

平成25年度の成果
Development of Technology in 2013-2014

(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（SCNT）初期胚においては、X染色体上のXist遺伝子に異所性発現が生じる。本年度は、様々な発生段階の生殖細胞や体細胞の核移植胚を解析したところ、成長完了卵の核移植胚でのみ異所性発現が抑制されたことから、*Xist*の発現抑制には卵成長の最終期に確立される発現制御機構が必要であることが示された。また、着床直後のマウスSCNT胚遺伝子発現を解析し、着床前の発現異常が胚組織で維持される一方、胚体外組織では改善されている事を明らかにした。胚体外組織において大規模な遺伝子発現の変化が起きていることを示唆している。

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

To understand the mechanism that causes ectopic Xist expression in SCNT embryos, we analyzed embryos cloned with different donor cells throughout the life cycle. As a result, only the genome from fully-grown oocytes could repress the expression of *Xist*, suggesting establishment of repressing marks at the last stage of oogenesis. We analyzed global gene expression in early postimplantation SCNT embryos and found that the donor cell-derived impaired gene expression remained in embryonic tissues, but not in extraembryonic tissues. This finding may suggest genome-wide epigenetic alterations occurring in extraembryonic tissues during implantation.

(2) 顕微授精技術の開発

マウスでは顕微授精技術により円形精子細胞からも産仔が得られるが、その産仔率は精子を用いた場合と比較して低率である。マウス前核期胚におけるDNAメチル化レベルを免疫染色により観察したところ、既報通り精子注入（ICSI）

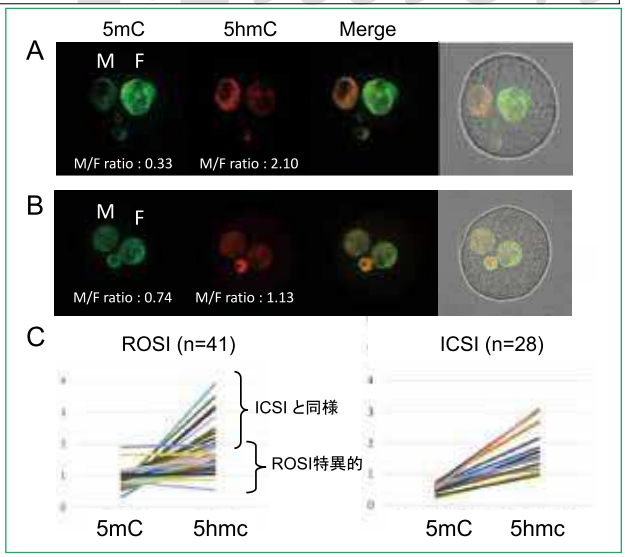

図 1　ROSI後の雌雄両前核の5mCおよび5hmC　レベルの比較（注入後10時間）。(A)雄性前核(M)で5mCの低下と5hmCの上昇が見られるパターン。(B) 雄性前核(M)の5mCの低下は見られず、5hmCの上昇が見られるパターン。(C) 全てのICSI胚（右）が同一胚における5mCと5hmCの関係において正常なパターンを示したのに対しROSI(左)ではICSI胚と同様のパターンとROSI胚特異的なパターンの2つが認められた。

Fig. 1 The 5mC and 5hmC levels of the pronuclei in mouse ROSI embryos (10 hours after injection). The numbers represent the ratios of the immunofluorescence intensities of the male to female pronuclei. (A) A ROSI embryo with the male pronucleus (M) showing decreased 5mC and increased 5hmC levels. (B) A ROSI embryo with the male pronucleus (M) showing equivalent 5mC and 5hmC levels. (C) ROSI embryos show two combinational patterns of 5mC and 5hmC; a normal pattern with higher 5hmC levels (as shown in A [above] and ICSI embryos [right]), and a ROSI-specific pattern with equivalent 5mC and 5hmC levels (as shown in B [above]).

胚では雄性前核で5-methylcytosine (5mC) が消失し、5-hydroxymethylcytosine (5hmC) が増加していた（能動的DNA脱メチル化）。一方、円形精子細胞注入（ROSI）胚ではICSI胚と同じパターンを示す胚(図A)と、5mCレベルが高いまま5hmCレベルが上昇している胚(図B)の2パターンが観察された(図C)。今後、このエピジェネティック異常が発生低下に繋がるのか解析する。

(2)Development of microinsemination techniques

Although offspring can be obtained by round spermatid injection (ROSI) in mice, its efficiency is low. To see whether any epigenetic abnormalities were involved in this inefficient development, we examined the 5-methylcytosine (5mC) and 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) levels of the male pronucleus of ROSI embryos. Some embryos showed a normal pattern of decreased 5mC and increased 5hmC (A in figure). However, the remaining embryos showed equivalent levels of 5mC and 5hmC in their male pronucleus (B in figure). Whether the latter pattern leads to ROSI-specific developmental deficiency would be a future subject.

(3)効率的な胚・配偶子の凍結保存法の開発

精子形成異常や凍結精子など、十分な精子数を確保できない場合に有効な体外受精法として、卵子3または5個を入れた1 µlの微小滴にキャピラリを用いて前進運動性を示す5-50精子を導入する方法を新規開発し、通常の体外受精に必要な1/1000以下の精子量で受精卵の獲得が可能となった。また、2011年度より進めてきた野生由来系統マウスのガラス化保存胚からの産子獲得は*Mus musculus*、*Mus spretus*、*Mus spicilegus*の合計41系統で成功した。これらは系統ごとに効率的な過排卵誘起および受精卵作出、胚移植の各方法を選択して利用することで実現できた。

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

We developed a new IVF protocol using microdroplets. Only 5-50 sperm were introduced with glass capillary into an 1 µl droplet containing 3-5 oocytes. Fertilization rates reached 60% even using frozen B6J sperm. This method may be particularly advantageous when only a limited number of motile sperm are available. Also we succeeded in obtaining offspring from vitrified embryos in 41 wild-derived strains belonging to *Mus musculus, M spretus*, and *M spicilegus*. This could be achieved by optimizations of assisted reproductive techniques including super ovulation, IVF, and embryo transfer.

(4)新規幹細胞の開発

trophoblast stem cells(TS細胞)は、胚盤胞の栄養外胚葉から樹立され扁平形のコロニーを形成するが、詳細にコロニーを観察すると、主に5種類のタイプに分類できることが明示された。各タイプにおけるTS細胞未分化マーカーであるCdx2の発現を解析したところ、コロニー形態に応じてほぼ予想通りの発現レベルが確認されたが、一部、形態が崩れたコロニーでも高発現が観察された。今後、各タイプの網羅的な遺伝子発現と形態の遷移について解析し、最も未分化と考えられる形態を同定する予定である。

(4)Development of new stem cell lines

Trophoblast stem (TS) cells are derived from trophectoderm of blastocyst. Although it is generally accepted that they form flattened colonies, our detailed morphological observations revealed the coexistence of five types of colonies. Cdx2, a stem cell marker of extraembryonic tissues, was differentially expressed in different types of colonies and, unexpectedly, those with irregular shapes also showed a high Cdx2 expression. We will perform time-lapse observations for the transformation of each type of colonies.

職員とメンバー構成
Members

●室長[Head of Bioresouse 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

●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.

●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

●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
及川 真実 Mami OIKAWA　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]
冨島 俊子 Toshiko TOMISHIMA