

遺伝工学基盤技術室

Bioresource Engineering Division

室 長 小 倉 淳 郎

OGURA, Atsuo

当室は、理研バイオリソースセンターが各リソース、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ことを目的としている。現在の具体的な技術開発課題は、安定かつ実用的技術確立が望まれている基盤的技術である体細胞核移植クローン法、顕微授精法、胚・配偶子の各種保存法（凍結その他）ならびに各種幹細胞の樹立法の開発である。本年度は主にマウス、一部ウサギの胚・配偶子・細胞を材料としてこれらの技術を開発した。マウスクローンでは、実験条件の改善による安定化に成功し、一方でその低効率の原因の一端を解明した。ウサギクローンでは、核移植後の卵子活性化の方法を改良することにより、初めてクローン胎仔を得ることに成功した。また、さまざまな条件下の顕微授精によりマウスおよびウサギ産子を得た。そして、精子および胚の凍結保存技術および輸送技術の改良を行い、マウスバンク業務の効率化が期待される成果が得られた。

1. 体細胞核移植クローン技術の開発

(1) 着床後の胚の脱落原因の解明（小倉，井上，越後貫）

マウス核移植クローン胚は、胚移植後、約半数が着床するが、実際に産子まで発生するのは数%に過ぎない。そこで Day 9.5 のレシピエント子宮を組織学的に観察したところ、(i) 約 60% の着床部位に栄養膜細胞浸潤が見られず、実質的な着床をしていない（脱落膜反応のみ）、(ii) 残りの多くは卵黄嚢胎盤および尿膜絨毛膜胎盤を形成するが、未分化の二倍体栄養膜細胞の数が著しく少ないため、胎盤基底部分が発達していないことが判明した。よって着床直後の栄養膜層の増生低下がクローン胚の着床直後の致死発生低下の大きな原因であると考えられた。この栄養膜層の増生低下を補償する目的で、通常受精卵四倍体胚とクローン胚のキメラを作製し、胚移植を行って正常なクローン胎仔を得た。

(2) DNA マイクロアレイ解析によるクローンマウスの異常発現遺伝子の同定（井上，越後貫，小倉）

上に述べたようにクローン胚の発生能低下の表現型に一定のパターンが存在することから、その上流に何らかの特定の異常（正常胚との相違）が介在することが示唆される。その異常を検索するためにクローン胎仔および胎盤を用いて DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。（東工大 石野研究室との共同研究）その結果、一群の遺伝子に過剰発現が観察され、これらの遺伝子の特性からその周囲の遺伝子発現に干渉が生じ、これがクローン特有の異常に至っていることが示唆された。

(3) ドナー細胞由来ミトコンドリア DNA (mtDNA) の消長解析（井上，越後貫，小倉）

ドナー細胞を除核卵子に導入する際には、ドナー細胞由来の mtDNA も共に卵子内に導入されていると考えられる。しかし、卵細胞質中の mtDNA（約 10^5 コピー）に対して、体細胞質中の mtDNA（約 10^3 コピー）は極少数であるため、クローンマウス成体内にドナー細胞由来の mtDNA が残存しているかどうかは明らかではない。そこで、mtDNA 多型を有するマウス由来の体細胞を利用してクローンマウスを作製し、脳、肝臓、腎臓、尾におけるドナー細胞由来

mtDNA の有無を PCR 法を用いて解析したところ、解析に使用したクローンマウス 26 個体中 25 個体にドナー細胞由来の mtDNA が確認された。この結果から多くのクローンマウス個体においてドナー細胞由来の mtDNA が残存していると考えられた。

(4) ウサギ核移植クローン技術の開発（井上，越後貫，三木^{*}，小倉）

ウサギのクローン胚は、胚移植後にほとんど着床しないことが知られている。そこで卵子活性化方法として、受精卵と同じカルシウムオシレーションを生じる IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) の電気穿孔法を試みた。その結果、クローン胚の着床が認められ、妊娠中期以降の臓器クローン胎仔を初めて得ることができた。

2. 顕微授精技術の開発・応用

(1) 繁殖障害系統の継代への応用（越後貫，持田，井上，小倉）

自然突然変異あるいは遺伝子改変により繁殖障害を生じたマウス系統あるいは責任遺伝子の解析のために、精子あるいは未成熟精子（精子細胞）を用いた顕微授精を行った。用いた 4 系統すべて体外受精は不可能であったが、顕微授精により産子を得られ、マウス系統が維持されたとともに、一部責任変異遺伝子を特定することができた。

(2) ウサギの顕微授精技術の開発（越後貫，井上，三木^{*}，小倉）

遺伝子導入動物の作出などへの応用を可能にするために、ウサギの顕微授精技術の開発も行っている。通常の精子を用いた顕微授精では効率よく産子を得ることができた。（国立感染症研究所 山海研究室との共同研究）また卵子活性化能の低い円形精子細胞を用いた場合でも、適切な卵子活性化法（ストロンチウム法）を選択することにより精子に匹敵する胚発生成績が得られることが明らかになった。

(3) 精原幹細胞移植由来精細胞からの産子の作出（越後貫，井上，三木^{*}，小倉）

さまざまな条件下で実施した精原幹細胞移植由来精細胞

を用い、顕微授精を併用することにより正常産子を得る試みを行った。(京大 篠原研究室との共同研究)未成熟精巢精細管へ移植した、体外培養 40 日後の精原幹細胞、凍結保存精原幹細胞、そして遺伝子導入精原幹細胞に由来する精子あるいは精細胞を用いて顕微授精を行うことにより、すべての実験において正常産子を得ることに成功した。

3. マウス初期胚および精子の凍結保存と体外受精に関する研究

(1) マウス各系統の体外受精成績の調査(持田;平岩,小林,小木曽,宮崎(実験動物開発室))

177 系統において体外受精を行ったところ、全体で 71%の受精率であった。由来および系統の種類で分類すると野生由来系統(14 系統)が 49%,BALB/c 系が 53%と低い値を示した他は、68~75%と安定した成績であった。

(2) マウス各系統の初期胚凍結保存の成績(持田;平岩,宮崎,小木曽,小林(実験動物開発室))

エチレングリコールをベースとする EFS 溶液を耐凍剤として用いたガラス化法により凍結保存した、15 系統のマウスの胚を融解したところ、回収率は 97%であり、80%(722/906)が形態的に正常であった。これらを移植した 29 匹のレシピエント全例が妊娠し、着床率は 63%,新生仔への発育率は 38%であり、簡便で優れた凍結方法であることが確認された。

(3) マウス凍結精子の運動性と受精率との関連性の検討(持田;平岩,小木曽,宮崎,小林(実験動物開発室))

18%ラフィノース + 3%スキムミルク水溶液を用いて凍結した精子の融解後の運動性を調べたところ、前培養中に、活発な精子は培養液の縁に同在することが認められた。これらの運動性の高い精子を採取して媒精に用いることで、新鮮精子を用いた場合とほぼ同様の受精率が得られた。(BDF1: 89%(凍結) vs 92%(新鮮),ICR: 67% vs 75%)

(4) 低温輸送した精巢上体尾部から採取した精子の受精能の検討(持田,小倉)

BDF1 マウスの精巢上体尾部を高知大学から理研筑波研究所まで低温輸送した場合、冷蔵 2 日目の受精率は 93%,その後凍結保存した精子の受精率は 83%であった。これらからマウス精子は精巢上体尾部ごと簡便な宅配便で冷蔵輸送し、更に凍結保存もできることが明らかになった。(高知大 葛西研究室との共同研究)今後は他の系統についても検討していく予定である。

4. 各種幹細胞の樹立法の開発(井上,越後貫,三木*,小倉)

ウサギ胚性幹(ES)細胞を樹立する目的で、受精卵あるいは卵丘細胞核移植胚由来のウサギ胚盤胞より内細胞塊を分離して培養した。その結果、いずれの実験群においても約 20%の胚より継代可能、アルカリフォスファターゼ陽性の ES 様細胞を得ることができた(国立感染症研究所 山海研究室との共同研究)。今後はこの細胞のキメラ形成能を調べる予定である。

* 研修生

The objective of our research is to develop new techniques for practical genetics, which are essential for the high-quality maintenance of bioresources at RIKEN BRC.

Such techniques include nuclear transfer, microinsemination, gamete/embryo cryopreservation, and stem cell line establishment.

1. Nuclear transfer

We have established a protocol for maintaining cloning efficiency at a practical level in nuclear transfer experiments using mice and rabbits. In mice, irrespective of the nucleus-donor cell type, about 90% of cloned embryos showed arrested development between 5 and 8, shortly after implantation. Some implantation sites contained a normal chorioallantoic placenta, but not normal ectoplacental cone. These conceptuses could be rescued by tetraploid embryo complementation. In rabbits, cloned embryos are characterized by their extremely poor postimplantation development, despite their high survivability until the blastocyst stage *in vitro*. By employing inositol 1,4,5-trisphosphate as an oocyte activating agent, viable cloned fetuses with normal organogenesis were obtained.

2. Microinsemination

Microinsemination techniques for mouse and rabbit have been significantly improved. By using the Piezo-driven micromanipulator, microinsemination with spermatozoa, elongated spermatids, and round spermatids was highly efficient in producing mouse and rabbit offspring. These haploid male germ cells could be used for infertility treatment in individual mice, or for the propagation of strains with breeding problems. The mouse microinsemination technique was also applied to fertilization with male germ cells derived from spermatogonial stem cell transplantation. Spermatogonial stem cells that had been cultured *in vitro* for 40 days or those transfected with exogenous genes developed into male gametes and supported full term development after microinsemination.

3. Cryopreservation of mouse embryos/gametes

Cryopreservation techniques for mouse embryos/gametes have been optimized for each mouse strain to increase banking efficiency. Ethylene glycol-based EFS solutions, in particular, well maintained the viability of cryopreserved embryos from some inbred strains of mice. The efficiency of *in vitro* fertilization with frozen-thawed spermatozoa was significantly improved when nonmotile sperm and cell debris were removed from thawed suspensions of sperm. Mouse spermatozoa in the epididymis were found to be fertilization-competent even after stored in a refrigerator for 2 days. This system would allow us conventional transportation of spermatozoa between laboratories.

4. Establishment of rabbit embryonic stem (ES) cell lines

ES cell-like cell lines were established from rabbit blastocysts derived from *in vivo* fertilization or somatic cell nuclear transfer. They showed positive staining for alkaline phosphatase even after 2 months in culture, and formed embryoid bodies after induction of differentiation.

Research Subjects and Members of Bioresource Engineering Division

1. Development of somatic nuclear transfer techniques

2. Development of microinsemination techniques
3. Development of techniques for cryopreservation of embryos/gametes
4. Development of techniques for establishment of stem cell lines

Head

Dr. Atsuo OGURA

Members

Mr. Keiji MOCHIDA

Dr. Kimiko INOUE

Ms. Narumi OGONUKI

Ms. Kanako NAKAMURA *

* BioResource Technical Staff

in collaboration with

Mrs. Noriko HIRAIWA (Experimental Animal Div.)

Ms. Akiko KOBAYASHI (Experimental Animal Div.)

Ms. Aya KOGISO (Experimental Animal Div.)

Ms. Fumie MIYAZAKI (Experimental Animal Div.)

Trainees

Ms. Hiromi MIKI (Meiji Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文

Kim J., Ogura A., Nagata M., and Aoki F.: "Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer", *Biol. Reprod.* **67**, 760–766 (2002). *

Inoue K., Ogonuki N., Yamamoto Y., Noguchi Y., Takeiri S., Nakata K., Miki H., Kurome M., Nagashima H., and Ogura A.: "Improved postimplantation development of rabbit nuclear transfer embryos by activation with inositol 1,4,5-trisphosphate", *Cloning Stem Cells* **4**, 311–317 (2002). *

Shinohara T., Inoue K., Ogonuki N., Kanatsu-Shinohara M., Miki H., Nakata K., Kurome M., Nagashima H., Toyokuni S., Kogishii K., Honjo T., and Ogura A.: "Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular piece and in vitro microinsemination", *Hum. Reprod.* **17**, 3039–3045 (2002). *

Suzuki O., Mochida K., Yamamoto Y., Noguchi Y., Takano K., Matsuda J., and Ogura A.: "Comparison of glycoprotein hormone α -subunits of laboratory animals", *Mol. Reprod. Dev.* **62**, 335–342 (2002). *

Ikawa M., Tergaonkar V., Ogura A., Ogonuki N., Inoue K., and Verma I. M.: "Restoration of spermatogenesis by lentiviral gene transfer: Offspring from infertile mice", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7524–7529 (2002). *

Kashiwabara S., Noguchi J., Zhuang T., Ohmura K.,

Honda A., Sugiura S., Miyamoto K., Takahashi S., Inoue K., Ogura A., and Baba T.: "Regulation of spermatogenesis by testis-specific, cytoplasmic poly(A) polymerase TPAP", *Science* **298**, 1999–2002 (2002). *

Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Inoue K., Ogura A., Toyokuni S., Honjo T., and Shinohara T.: "Allogeneic offspring produced by male germ line stem cell transplantation into infertile mouse testis", *Biol. Reprod.* **68**, 167–173 (2003). *

(総 説)

Ogura A., Inoue K., Ogonuki N., Lee J., Kohda T., and Ishino F.: "Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse", *Cloning Stem Cells* **4**, 397–405 (2002).

Kohda T., Lee J., Inoue K., Ogonuki N., Wakisashi-Saito N., Kaneko-Ishino T., Ogura A., and Ishino F.: "Epigenetic regulation in mammalian development and dysfunction: the effects of somatic cloning and genomic imprinting", *Int. Congr. Ser.* **1246**, 151–159 (2002).

Inoue K., Ogura A., and Hayashi J.: "Production of mitochondrial DNA transgenic mice using zygotes", *Methods* **26**, 358–363 (2002).

Ogura A., Ogonuki N., Inoue K., and Mochida K.: "New microinsemination techniques for laboratory animals", *Theriogenology* **59**, 87–94 (2003).

小倉淳郎: "クローンは正常か?", *遺伝* **56**, No. 4, pp. 24–26 (2002).

小倉淳郎: "疾患モデルとしてのクローンマウス", *医学のあゆみ* **203**, 499–502 (2002).

井上貴美子, 越後貴成美, 持田慶司, 小倉淳郎: "体細胞クローンの異常", *蛋白質 核酸 酵素* **47**, 1789–1796 (2002).

[単行本・Proc.]

(総 説)

Ogura A., Ogonuki N., and Inoue K.: "Microinsemination and nuclear transfer with male germ cells", *Principles of Cloning*, edited by Cibelli J., Lanza R. P., Campbell K. H., and West M. D., Academic Press, San Diego, pp. 175–186 (2002).

小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貴成美: "クローン動物: 哺乳類 (齧歯類)", *生命工学—新しい生命へのアプローチ*, 浅島誠, 山村研一 (編), 共立出版, 東京, pp. 236–243 (2002).

小倉淳郎: "3. 生殖細胞の操作 3.4 胚の操作 3.4.1 顕微授精", *動物発生工学*, 岩倉洋一郎他 (編), 朝倉書店, 東京, pp. 112–115 (2002).

井上貴美子: "3.7 胚の移植 3.7.4 実験動物の胚移植", *動物発生工学*, 岩倉洋一郎他 (編), 朝倉書店, 東京, pp. 167–169 (2002).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Ogura A.: "Cloned mice", 2003 Pre-Conf. Symp. on Mechanisms Regulating Developmental Plasticity, (Roslin Institute), Auckland, New Zealand, Jan. (2003).

Ogura A.: "New microinsemination techniques for laboratory animals", 29th Ann. Conf. of Int. Embryo Transfer Soc., Auckland, New Zealand, Jan. (2003).

(国内会議)

越後貫成美, 中平美穂, 持田慶司, 井上貴美子, 野口章, 三木洋美, 松田潤一郎, 古矢恵子, 杉山文博, 八神健一, 小倉淳郎: “マウス凍結精子を用いた卵細胞質精子注入法 (ICSI) による産仔の獲得”, 第 49 回日本実験動物学会総会, 名古屋, 5 月 (2002).

持田慶司, 越後貫成美, 井上貴美子, 小倉淳郎: “近交系マウス初期胚の最適な凍結保存法の検討: 緩慢法とガラス化法の比較”, 第 49 回日本実験動物学会総会, 名古屋, 5 月 (2002).

井上貴美子, 越後貫成美, 山本美江, 野口洋子, 竹入修二, 三木洋美, 中田久美子, 黒目麻由子, 長嶋比呂志, 小倉淳郎: “卵丘細胞由来ウサギ核移植クローン胚の発生能について”, 第 49 回日本実験動物学会総会, 名古屋, 5 月 (2002).

持田慶司, 越後貫成美, 井上貴美子, 小倉淳郎: “老齢マウス由来凍結精子を用いた体外受精と卵細胞質内精子注入法の成績”, 第 36 回日本実験動物技術者協会総会, 札幌, 6 月 (2002).

越後貫成美, 小倉淳郎, 広瀬良宏, 岡田浩典, 山海直: “カニクイザル円形精子細胞が有する卵子活性化能の個体差の解析”, 第 18 回日本霊長類学会, 東京, 7 月 (2002).

小倉淳郎: “クローンマウスの遺伝子発現と表現型”, 第 28 回遺伝医学研究会, (東京女子医科大学遺伝医学研究会), 東京, 7 月 (2002).

小倉淳郎: “核移植クローンマウスの遺伝子発現と表現型”, 第 14 回高遠・分子細胞生物学シンポジウム: 生物学と医学の接点, (医学生物学研究所), 高遠, 8 月 (2002).

小倉淳郎: “雄性生殖細胞を用いた顕微授精と核移植”, 第 7 回精子形成・精巣毒性研究会, 東京, 9 月 (2002).

小倉淳郎: “クローンマウスは短命か”, 第 75 回日本生化学会大会, 京都, 10 月 (2002).

小倉淳郎: “マウス核移植クローン技術の開発とその利用”, 第 13 回東北動物実験研究会, 盛岡, 10 月 (2002).

伊川正人, Tergaonkar V., 小倉淳郎, 越後貫成美, 井上

貴美子, Verma I.: “各種ウイルスベクターを用いた精巣細胞への遺伝子導入と SI/Sld 雄性不妊マウスの遺伝子治療への応用”, 第 17 回日本生殖免疫学会, 東京, 11 月 (2002).

伊川正人, Tergaonkar V., 小倉淳郎, 越後貫成美, 井上貴美子, Verma I.: “レンチウイルスベクターを用いた SI/Sld 雄性不妊マウスの遺伝子治療”, 第 19 回疾患モデル動物学会, 伊香保, 11 月 (2002).

小倉淳郎: “実験動物の核移植クローンの現状について”, 京都大学再生医科学研究所学術講演会, 京都, 2 月 (2003).

小倉淳郎: “クローンマウス作出の現状と今後”, 実験動物懇話会, (日本実験動物技術者協会), 東京, 2 月 (2003).

小倉淳郎: “実験動物の体細胞核移植クローンの現状”, 動物への遺伝子導入とその応用の開発研究会, 東京, 2 月 (2003).

小倉淳郎: “体細胞クローンマウスの正常と異常”, 文科省科研費補助金特定領域研究「生殖細胞系列の制御機構と発生工学」公開シンポジウム「生殖細胞の発生プロセス・再プログラム化とエピジェネティクス」, 京都, 2 月 (2003).

広瀬良宏, 岡田浩典, 井上貴美子, 越後貫成美, 三木洋美, 竹入修二, 長嶋比呂志, 小倉淳郎, 山海直: “ウサギの受精卵および体細胞の核移植由来胚からの ES 細胞樹立の試み”, 第一回フォーラム「医療に貢献する実験用ウサギの新しい展開」, (佐賀医科大学医学部), 佐賀, 3 月 (2003).

山口-山田美鈴, 内尾-山田こずえ, 後藤康文, 森俊治, 坂田千夏, 永尾雅哉, 小倉淳郎, 山本美江, 宮本元, 眞鍋昇: “遺伝性腎疾患 (ICGN) マウスにおける腎性貧血発症機序の解明”, 第 135 回日本獣医学会学術集会, 東京, 3-4 月 (2003).

後藤康文, 内尾-山田こずえ, 山口-山田美鈴, 小倉淳郎, 山本美江, 宮本元, 眞鍋昇: “腎尿細管間質線維芽細胞培養系を用いた遺伝性腎疾患 (ICGN) マウス腎線維症発症の分子メカニズムの解析”, 第 135 回日本獣医学会学術集会, 東京, 3-4 月 (2003).