

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：72611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18406

研究課題名(和文) 発生工学技術を用いたトランスクロモソミック(人工染色体導入)マウスの作製法の開発

研究課題名(英文) The generation of trans-chromosomic mouse using developmental engineering.

研究代表者

吉村 祐貴 (Yoshimura, Yuki)

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・研究員

研究者番号：50771242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、人工染色体を保持するマウス(Tcマウス)を効率よく作製するために、発生工学技術を応用した新規Tcマウス作製方法の開発を試みた。マウス人工染色体ベクターを保持する細胞を用いて、(1)顕微受精技術を応用した微小核移植による作製法と、(2)体細胞核移植による作製法とについて検討を行った。方法(1)については未だ成功していないものの、方法(2)によりマウス人工染色体を保持するクローンTcマウスを得ることに成功し、その割合は7.1%であった。今後、体細胞核移植の成功率、クローンTcマウスでのマウス人工染色体の安定性については今後の検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Mouse artificial chromosomes (MACs) are powerful episomal vectors for carrying Mb-size transgenes, and trans-chromosomic (Tc) animals carrying MAC vectors show promise for use in disease models. The generation of Tc mice takes several years, and involves maintenance and establishment of the MAC vector in Chinese hamster ovary (CHO) cells where the gene of interest is inserted. Chimeric mice are produced by the transfer of MAC vectors from CHO cells into mouse ES cells using microcell-mediated chromosome transfer. This has a very low efficiency. We attempted two novel methods to generate Tc mice that did not include chimeric mouse production. The first used intracytoplasmic sperm injection with the co-injection of a microcell carrying a MAC vector derived from CHO cells. This has not yet succeeded. The second technique used somatic cell nuclear transfer of mouse ES cells carrying MAC vectors as donors. This method has generated a MAC clone Tc mouse with an efficiency of 7.1%.

研究分野：実験動物学

キーワード：実験動物学 人工染色体 Transchromosomic mouse 体細胞核移植

### 1. 研究開始当初の背景

マウス人工染色体ベクターは、マウスの染色体の遺伝子領域を取り除き、LoxP 配列を挿入することでベクター化したものであり、数 Mb に及ぶ巨大な外来遺伝子を導入できるユニークな特徴を持っている。通常、マウス人工染色体は Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に保持されており、Cre/loxP システムを用いて目的遺伝子をマウス人工染色体上へ挿入することが可能である。近年では、複数の部位特異的組換え酵素を用いることで、マウス人工染色体へ複数の目的遺伝子を導入することも可能になった。さらに、微小核細胞融合法を用いることで、目的のマウス人工染色体をマウス ES 細胞へ移入することができ、キメラマウスを経て、人工染色体を保持するマウス(トランスクロモソミック (Tc) マウス) を作製することが可能である。しかしながら、Tc マウスの作製には 2~3 年の時間と労力を必要としており、かつ、この方法に変わる Tc マウス作製方法はなく、発生工学的知見に乏しい。

本研究では、体細胞核移植や顕微受精技術など発生工学技術を用いて、キメラマウス作製を必要としない新たな Tc マウスを作製する技術を開発することとした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、発生工学技術を基盤とした新規 Tc マウス作製方法の開発である。

### 3. 研究の方法

マウス人工染色体を保持する細胞をドナー核とした (1) 顕微受精を応用した微小核移植による作製法、及び (2) 体細胞核移植による作製方法について検討する。

### 4. 研究成果

本研究では、マウス人工染色体の有無を確認するために緑色蛍光タンパク質 (GFP) をレポーターとして用いた。当初は Multi-integrase マウス人工染色体 (MI-MAC) ベクターに GFP 遺伝子を搭載する予定としていたが、MI-MAC ベクターと同様に、複数遺伝子の導入が可能であり、かつ、すでに GFP 遺伝子が導入された人工染色体ベクターである MAC4 ベクターを使用した。

方法(1)については、マウス人工染色体を含む微小核を精子頭部と注入することにした。MAC4 を保持する CHO 細胞を長期間コルセミド含む培地で培養すると、微小核を形成する。これら微小核はそれぞれ染色体が含まれており、特に小さな微小核には小さい染色体や MAC4 が含まれていると考えられているため、これら微小核を精製し、BDF1 精子と共に BDF1 未受精卵へ注入した (図 1)。

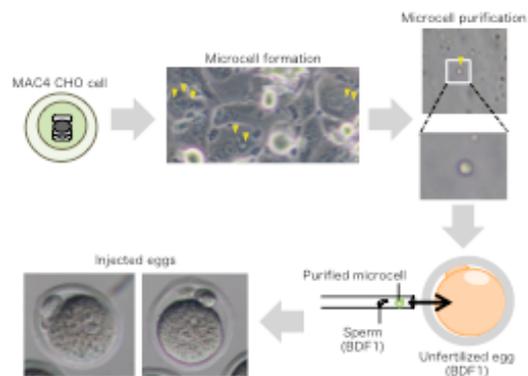


図1. 方法(2)顕微受精を応用した微小核移植による作製法概略

しかしながら今の段階では、GFP の発現を示す胚は得られていない。また、未受精卵ではなく受精卵へ微小核のみを注入する方法も行ったが、胚盤胞期胚に発生するものの、GFP 陽性胚を得ることはできなかった。受精卵と微小核の電気刺激による融合など、今後、検討の余地があると考えている。

方法(2)については、まず体細胞核移植のドナー細胞の作製から行った。MAC4 を CHO 細胞からマウス ES 細胞へ移入し、MAC4 を保持

するマウス ES 細胞 MT20 を作製した (図 2)。

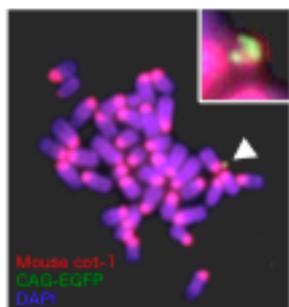


図2. MAC4を保持しているマウスES細胞MT20の染色体 (矢印はMAC4を示す、拡大はMAC4を示す)

MT20 を用いて従来法により Tc マウスが作製できたことから、MT20 細胞を体細胞核移植のドナー細胞として用いることにした。MT20 細胞をドナーとして、BDF1 未受精卵に体細胞核移植を行った胚のうち、22.6%の胚が 2 細胞期胚に発生し、さらに発生させたところ GFP 陽性を呈する胚も確認できた (図 3)。

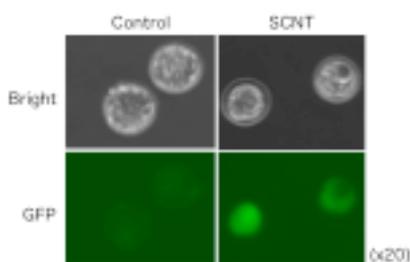


図3. MT20をドナー核とした体細胞核移植

次に、体細胞核移植を行った 2 細胞期胚を仮親に移植したところ、1 匹の MT20 由来クローン Tc マウスが得られ、その効率 は 7.1% であった (表 1)。

Donor cell	Embryo strain	SCNT			Activation			In vitro culture		Embryo Transfer	
		# of SCNT embryos	# of survived embryos	%	# of Activated embryos	# of survived embryos	%	# of 2-cell	%	Pup	%
1	MT20 BDF1	33	28	84.8%	9	9	100.0%	3	33.3%	0	0
2	MT20 BDF1	51	43	84.3%	23	19	82.6%	4	21.1%	0	0
3	MT20 BDF1	60	52	86.7%	28	19	67.9%	2	10.5%	0	0
4	MT20 BDF1	35	33	94.3%	20	15	75.0%	5	33.3%	1	20.0%
Total		179	156	87.2%	80	62	77.5%	14	22.6%	1	7.1%

表1. MT20をドナー核とした体細胞核移植成績

さらに、この MT20 由来クローン Tc マウスに MAC4 ベクターが保持されているか染色体解析を行った。その結果、この MT20 由来クローン Tc マウスに MAC4 ベクターが保持されていることがわかった (図 4)。

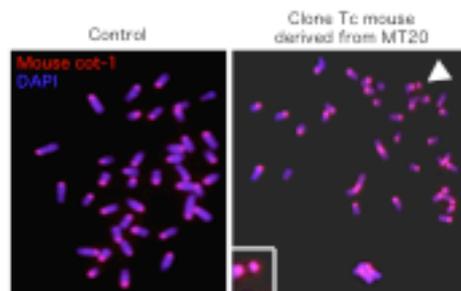


図4. MT20由来クローンマウスの染色体 (矢印はMAC4を示す)

また、遺伝的背景検査からもこのマウスが MT20 由来であることも確認できた。よって、方法(2)による Tc マウスの作製に成功したことがわかった。

この MT20 由来クローン Tc マウスにおける MAC4 の安定性を解析した。GFP の発現を確認するため、各主要臓器 (肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、小腸、脳、卵巣) について抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行った。従来法によって作製された MAC4 Tc マウスでは、各臓器で GFP の発現が確認できたが、この MT20 由来クローン Tc マウスでは、いずれの臓器においても GFP の発現が確認できなかった。次に、このクローン Tc マウスの線維芽細胞を用いて染色体解析を行ったところ、MAC4 を保持している細胞の割合は 13.3%であることがわかった。

本研究結果から、マウス人工染色体を保持するマウス ES 細胞を用いた体細胞核移植による Tc マウスの作製に成功し、従来法とは異なる方法で Tc マウスを作製することができた。しかしながら、体細胞核移植によって得られたクローン Tc マウスのマウス人工染色体の安定性については今後詳細な検討が必要である。体細胞核移植の成功率や、クローン Tc マウスにおけるマウス人工染色体の安定性を改善することで、Tc マウス作製の効率化が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Yuki Yoshimura、Yasuhiro Kazuki、Mitsuo Oshimura、Takeshi Takahashi

The generation of trans-chromosomal mouse using intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer

Joint Annual Meeting of JSDB 51<sup>st</sup> and JSCB 70<sup>th</sup>, 2018. 6. 5-8, Tower Hall Funabori, Tokyo

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 祐貴(Yoshimura Yuki)

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物

研究部・研究員

研究者番号 : 50771242

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

( )