

平成 23 年 5 月 30 日現在

機関番号： 8 2 4 0 1

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20500383

研究課題名（和文）

未成熟精細胞を用いたマウス超迅速近交系化技術の確立

研究課題名（英文）

A high-speed congenic strategy using first-wave male germ cells

研究代表者

越後貫 成美 (OGONUKI NARUMI)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・専任技師

研究者番号： 40373287

研究成果の概要（和文）： 新たなコンジェニックマウス系統の樹立には、性成熟マウスを用いた戻し交配を行うために1世代約3-4ヶ月かかり系統樹立に2-5年という長い時間がかかり本来の目的である遺伝子や表現型に関する研究開始になかなか到達できないという欠点があった。本研究では自然交配の代替として未成熟雄マウスの生殖細胞と多型マイクロサテライトマーカによる選抜システムを併用することで1世代交代あたりの時間短縮を図る超スピードコンジェニック法を確立した。

研究成果の概要（英文）： To establish high-speed congenic system, microinsemination with round spermatid which retrieved from immature mouse selected by marker-assisted screening system was tried. Nine congenic strains were produced by this method for 106 and 190 days of N₃ to N₅ generation. The generation turnover time in mice can be shorted to about 40 days by using the first wave round spermatids as male gametes. This method can establish congenic strain the period below about half of conventional method.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：マウス、実験動物、発生工学、顕微授精

1. 研究開始当初の背景

マウス近交系統樹立における問題点：

近交系マウスは遺伝背景の均一化を重要とする多くのマウスを用いた実験において用いられている。ある目的とする遺伝子あるいは表現型について研究を行う場合、それ以外の因子を排除するために「遺伝的背景の均一化」として近交系化する必要がある。新たな

近交系統の樹立には変異遺伝子が導入されたマウスあるいは近交系統などと近交系マウスより得られたF1から近交系統への戻し交配あるいは兄妹交配を5～20世代以上行い、近交係数が理論上98.6%以上に達して大半の遺伝子がホモ化された時点で近交系としての樹立が完了する。戻し交配・兄妹交配はマウスの性成熟を待ってからの開始となるため、1世代交代に最短3～4ヶ月はかか

り、系統樹立までに2~5年という長い時間を要する。本来の目的である遺伝子や表現型に関する研究になかなか到達できないことが従来法の問題点であった。

顕微授精技術の利点:

マウスにおける顕微授精技術は近年多くの研究が行われていて安定した技術といえる。また自然交配とは異なり、計画的出産が望める。さらに精子の運動能を必要としないため、交尾行動を行わない不妊雄マウスの精子や凍結精子、さらには未成熟精子(精細胞)からの産仔作出も可能である。そこで自然交配の代わりに顕微授精技術を利用することにより、性成熟に達していないマウスの生殖細胞を用いることで1世代交代当たりの時間短縮を図り、最終的には近交系マウス樹立までの超迅速化に繋がりたいと考えたことが本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 未成熟雄マウスの生殖細胞を顕微注入に用いるにあたり、実用的レベルとして最若何日齢の雄性生殖細胞を用いることが可能か明らかにする。

(2) 顕微授精技術を用いた近交系統の樹立法の実用化を想定して、コンジュニック系統の樹立を実際に行う。

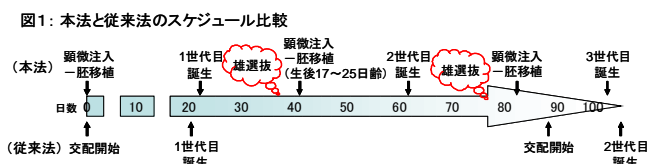
3. 研究の方法

(1) 各日齢(17~25日齢)未成熟雄マウス由来の円形精子細胞をB6未受精卵に顕微注入し、in vivo/in vitroでの発生率および産仔率を比較する。

(2) (1)の実験により得られた雄産仔より、(1)と同じ日齢で円形精子細胞を採取して再び顕微注入実験を行う。1世代目と比較してin vivo/in vitroでの発生、産仔の率や質に差がないか調べる。

(3) (1)、(2)の結果より、実用的レベルとして適当と判断した日齢の雌雄個体の配偶子(卵子と円形精子細胞)を用いて顕微授精を行う。

(4) (3)の実験により得られた雄産仔を用いて同日齢で再び顕微注入実験を行う。前世代と比較してin vivo/in vitroでの発生、産仔の率や質に差や異常がないか調べる。



4. 研究成果

(1) 未成熟雄マウスの生殖細胞を顕微授精に用いるにあたり、生後22日齢以降の円形精子細胞であれば安定して多数の産仔が得

られることが明らかになった。

さらに(2)既存の遺伝子改変マウスを用いてC57BL/6(B6)コンジュニック化を試みた。マーカー上でのコンジュニック化完了期間は106-190日で、従来法と比較して半分以下の期間に短縮できることが明らかになった。5系統7ラインのコンジュニック系統の樹立に至った。

(3) B6以外の系統への応用を目指し、既存の遺伝子改変マウスを用いてNOD/scidを受容系統としたコンジュニック化(2系統2ライン)の検討を行った。生後22-24日齢の円形精子細胞を用いた場合、B6コンジュニック化と比較して産仔獲得効率が低率であったが、同様の期間でマーカー上のコンジュニック化が完了した。産仔効率が低い系統を受容系統とする場合、生後28日齢以降の伸張精子細胞を用いたほうがより安定したコンジュニック化が進められることが示唆された。また本法はB6以外の系統でも適用できることが明らかになった。

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19件)全て査読あり。

- ① Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, & Ogawa T. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. **Nature** 471: 504-507, 2011.
- ② Ogonuki N, Inoue K, Ogura A. Birth of normal mice following round spermatid injection without artificial oocyte activation. **J Reprod Dev** (in press)
- ③ Fulka H, Hirose M, Inoue K, Ogonuki N, Wakisaka N, Matoba S, Ogura A, Mosko T, Kott T Fulka, J. Jr. Production of mouse embryonic stem cell lines from maturing oocytes by direct conversion of meiosis into mitosis. **Stem Cells** 29(3):517-27, 2011.
- ④ Matoba S, Ogura A. Generation of Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Morimoto H, Ogura A, Shinohara T. Serum- and Feeder-Free Culture of Mouse Germline Stem Cells. **Biol. Reprod.** 84:97-105, 2011.
- ⑤ Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte AP, Tian XC, Yang X, Ishino F, Abe K, Ogura A. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. **Science** 330: 496-499, 2010.
- ⑥ Ogonuki N, Mori M, Shinmen A, Inoue K, Mochida K, Ohta A, Ogura A. The effect on intracytoplasmic sperm injection outcome of genotype, male germ cell stage and

- freeze-thawing in mice. **PLoS ONE**, 5(6): e11062, 2010.
- ⑦ Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Miki H, Inoue K, Morimoto H, Ogura A, Shinohara T. Genetic influences in mouse spermatogonial stem cell self-renewal. **J Reprod. Dev**, 56: 145-153, 2009.
- ⑧ Inoue K, Ogonuki N, Mekada K, Yoshiki A, Sado T, Ogura A. Sex-reversed somatic cell cloning in the mouse. **J Reprod Dev**, 55: 566-569, 2009.
- ⑨ Miki H, Wakisaka N, Inoue K, Ogonuki N, Mori M, Kim JM, Ohta A, Ogura A. Embryonic Rather than Extraembryonic Tissues Have More Impact on the Development of Placental Hyperplasia in Cloned Mice. **Placenta**, 30:543-546, 2009.
- ⑩ Ogonuki N, Inoue K, Hirose M, Miura I, Mochida K, Sato T, Mise N, Mekada K, Yoshiki A, Abe K, Kurihara H, Wakana S, Ogura A. A high-speed congenic strategy using first-wave male germ cells. **PLoS One**, 4(3): e4943, 2009.
- ⑪ Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Miki H, Inoue K, Morimoto T, Morimoto H, Ogura A, Shinohara T. Heritable Imprinting Defect Caused by Epigenetic Abnormalities in Mouse Spermatogonial Stem Cells. **Biol Reprod**, 80: 518-527, 2009.
- ⑫ Miki H, Hirose M, Ogonuki N, Inoue K, Kezuka F, Honda A, Mekada K, Hanaki K, Iwafune H, Yoshiki A, Ishino F, Ogura A. Efficient production of androgenetic embryos by round spermatid injection. **Genesis**, 47: 155-60, 2009.
- ⑬ Honda A, Hirose M, Inoue K, Hiura H, Miki H, Ogonuki N, Sugimoto M, Abe K, Kanatsu-Shinohara M, Kono T, Shinohara T, Ogura A. Large-scale production of growing oocytes in vitro from neonatal mouse ovaries. **Int J Dev Biol**, 53:605-613, 2009.
- ⑭ Honda A, Hirose M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Shimozawa N, Hatori M, Shimizu N, Murata T, Hirose H, Katayama K, Wakisaka N, Miyoshi H, Yokoyama KK, Sankai T, Ogura A. Stable ES cell lines in rabbits - potential small animal models for human ES cell research. **Reprod Biomed Online**, 17: 706-715, 2008.
- ⑮ Tachibana M, Terada Y, Ogonuki N, Ugajin T, Ogura A, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. Functional assessment of centrosomes of spermatozoa and spermatids microinjected into rabbit oocytes. **Mol Reprod Dev**, 76:270-277, 2009.
- ⑯ Wakisaka N, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Sekita Y, Hanaki K, Akatsuka K, Kaneko-Ishino T, Ishino F, Ogura A. Ultrastructure of placental hyperplasia in mice: Comparison of placental phenotypes with three different etiologies. **Placenta**, 29:753-759, 2008.
- ⑰ Nakamura T, Inoue K, Ogawa S, Umehara H, Ogonuki N, Miki H, Kimura T, Ogura A, Nakano T. Differential effects of Akt signaling on two types of nuclear reprogramming. **Genes Cells**, 13:1269-1277, 2008.
- ⑱ Nakanishi T, Ishibashi N, Kubota H, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kashiwabara S, Baba T. Birth of normal offspring from mouse eggs activated by a phospholipase C ζ protein lacking three EF-hand domains. **J Reprod Dev**, 54:244-249, 2008.
- ⑲ Kanatsu-Shinohara M, Lee J, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Ikawa M, Nakamura T, Ogura A, Shinohara T. Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. **Biol Reprod**, 78: 681-687, 2008.
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Ogonuki N et al. Factors affecting the outcome of mouse ICSI: Factorial analysis by genotypes, stage of male germ cells, and freeze-thawing treatment. The 4th AFLAS Congress Meeting. November 9-11, 2010. Taipei, Taiwan.
- ② Ogonuki N et al. Factors affecting the outcome of mouse ICSI: Factorial analysis by genotypes, stage of male germ cells, and their freezing treatment. 11th International Symposium on Spermatology. June 24-29, 2010. Okinawa, Japan.
- ③ 越後貫成美ほか、マウス顕微授精における系統、精子成熟度、凍結保存の影響に関する統計学的解析、第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12-14 日、京都。
- ④ 越後貫成美、実験動物における顕微授精の応用、第 2 回疾患モデルシンポジウム、2009 年 11 月 17 日、東京。
- ⑤ 越後貫成美ほか、人為的卵子活性化処理なしでの凍結円形精子細胞の顕微授精によるマウス産仔の作出、第 102 回日本繁殖生物学会、2009 年 9 月 10-13 日、奈良。
- ⑥ 森真菜実、越後貫成美ほか、マウス顕微授精効率への系統、精子成熟度、および精子 (細胞) 凍結の影響に関する統計学的解析、第 102 回日本繁殖生物学会、2009 年 9 月 10-13 日、奈良。

- ⑦ 越後貫成美ほか、顕微授精技術を利用したマウス超迅速コンジェニック化技術の確立、第56回日本実験動物学会、2009年5月14-16日、大宮。
- ⑧ 越後貫成美ほか、顕微授精技術を利用した超迅速コンジェニック化技術の確立、第101回日本繁殖生物学会、2008年9月18-20日、福岡。
- ⑨ 越後貫成美ほか、顕微授精技術を利用した超迅速コンジェニック化技術の確立、第22回モロシヌス研究会、2008年9月12-13日、東京。
- ⑩ 越後貫成美、実験動物の未熟精子を用いた受精について、第4回東京受精・胚移植研究会、2008年7月27日、東京。

[その他]

ホームページ等

<http://www.brc.riken.jp/lab/kougaku/indexE.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越後貫 成美 (OGONUKI NARUMI)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・専任技師

40373287

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者