

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500490

研究課題名(和文) マウス<->ラットキメラを用いたノックアウトラット作製法の開発

研究課題名(英文) Generation of knock out rat using mouse <-> rat chimera

研究代表者

磯谷 綾子 (Isotani, Ayako)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：20444523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ノックアウトラットの作出には、広い飼育スペースが必要でかつ、受精胚の安定的な供給が難しいといった問題点がある。そこで、マウス胚にラットES細胞を打込むと誕生する異種キメラに着目し、ノックアウトラット新規作製法の開発を目指した。全身だけでなく精子頭部もGFPで標識されるES細胞を樹立し、遺伝子ターゲティングを行った。このES細胞をマウス胚にインジェクションし、マウスラットESキメラを誕生させた。GFPを指標にES細胞由来の精子を判定して顕微授精によりES細胞由来の仔を誕生させることができた。以上の結果より、異種キメラを用いたノックアウトラットの新規作製法を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：In a previous study, we produced mouse rat chimera by injecting rat embryonic stem (ES) cells into mouse blastocysts. In this model, rat ES cells contributed to various organs, including spermatozoa, indicating potential utility for the production of a knockout rat. Hence, we established new rat ES cell lines to visualize rat spermatozoa using green fluorescent protein (GFP) from green body-green sperm (GBGS) doubly transgenic rats. Subsequently, we prepared a homologous recombined rat ES cell lines. When GBGS-rat ES cells were used to produce mouse rat chimera, rat spermatozoa were easily detected with GFP in chimeric testes. Subsequently, the germline potential of rat spermatozoa in the chimera were assessed by intracytoplasmic injections. Rat pups were generated from rat spermatozoa in chimeric testes, and normal germline potential of rat spermatozoa in the chimeric testes was demonstrated. This study provides a novel method for the production of knockout rat.

研究分野：実験動物学

キーワード：疾患モデル動物 遺伝子組換え 異種キメラ

1. 研究開始当初の背景

“ラット”は、マウスに比べ体が大きいため生体試料(尿や血液など)を経時的に採取できるので、外科手術モデルや薬物・栄養代謝の研究に利用しやすい。さらに人を識別して慣れる性質をもつことから、学習・記憶の研究に汎用されている。“ラット”にはこのような利点があるため、ノックアウトラットの作出は、実験動物学において重要な位置を担っている。しかし、ノックアウトラットの作出には、広い飼育スペースが必要でかつ、胚盤胞の安定的な供給が難しいといった問題点を抱えていた。

2. 研究の目的

ES細胞を用いたノックアウトラット作出に関する問題を解決する方法として、申請者はマウス胚にラットES細胞を打込んで誕生する異種キメラに着目した。この方法ではマウスの胚盤胞を用いるため、安定的に供給でき、また、マウスとほぼ同じ大きさになるため、このマウス+ラットESキメラを介して、ノックアウトラットの新規作製法の開発を目指した。

3. 研究の方法

- (1) **精子を GFP で追跡可能な ES 細胞の樹立**: 精子頭部に GFP シグナルが局在し、全身で GFP が発現するようなラットを作製するために、Acr3-EGFP と CAG-EGFP の両遺伝子をもつダブルトランスジェニック・ラットを作製する。作製したダブルトランスジェニック・ラットから、XY 型の ES 細胞を樹立する。
- (2) **ラット ES 細胞への遺伝子組換え**: 相同組換え法により、遺伝子ターゲティングを行いラット ES 細胞を用いて、遺伝子変異株の樹立を行う。
- (3) **マウス+ラット ES キメラの作製**: マウスの胚盤胞にラット ES 細胞をインジェクションして、マウス+ラット ES キメラ胚を作製し、偽妊娠マウスに移植して、マウス+ラット ES キメラを誕生させる。
- (4) **マウス+ラット ES キメラからの germline transmission**: 10 週齢以降の雄のマウス+ラットキメラの精巣から、GFP 蛍光を指標にラット由来の精子を選別し、採取する。過排卵によって採取したラットの未受精卵に採取したラットの精子を ICSI 法によって、卵細胞質内に打込み受精胚を作る。受精胚を偽妊娠ラットに移植して、産仔を得る。また、PCR 法により、遺伝型を調べ、germline transmission を確認する。

4. 研究成果

- (1) **精子が GFP で追跡可能な ES 細胞の樹立**: 全身だけでなく精子頭部にも GFP シグナルを持つことを期待してダブルトランスジェニック・ラット (Green Body Green

Sperm ラット: GBGS ラット) を作製した。その結果、GBGS ラットでは、全身に GFP

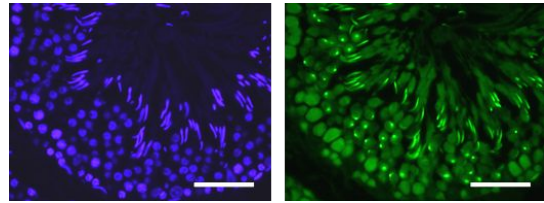


図1 GBGS-ラットの精巣切片
GFP シグナルは、細胞質のみでなく、ヘキスト染色像(左)で長細く染色される延長精子細胞の頭部にも局在していることが観察できる(右)。Bars: 50µm

蛍光が確認でき、さらには、精巣内の生殖細胞と精子頭部に GFP が確認できた(図1)。

しかしながら、精巣内の精子頭部に局在した GFP は精巣上体を通っていく過程で、蛍光が消失していくことが分かった。

また、作製した GBGS ラットから N2B27-2i 培地を用いラット ES 細胞の樹立を試み、ES 細胞特異的マーカー(ALP、Oct4、Nanog、SSEA1)を発現する細胞株を樹立した。この細胞株をマウス胚にインジェクションすると、GFP で標識されたラット由来の細胞をもつマウスラット ES キメラを誕生させることができ、ラット GBGS-ES 細胞の樹立に成功した(図2、図3)。

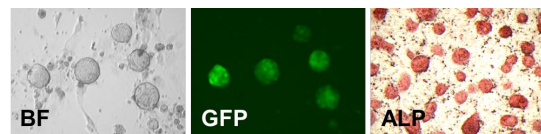


図2 GBGS ラットから樹立した ES 細胞
樹立した ES 細胞は、GFP(中図)蛍光を持ち、ES マーカーの ALP が陽性(右図、赤色)であった。



図3 GBGS-ラット由来 ES を用いたマウスラット ES キメラ
白色の毛色部分がラット ES 由来

- (2) **ES 細胞への遺伝子組換え**: フォワードジェネティクス研究から重要と考えられていたが、ノックアウトマウスの解析において、顕著な表現型をもたず重要ではないと結論付けられていた 2 つの遺伝子を組換え遺伝子に選んだ。これらの遺

伝子については、相同組換え法によって、エキソン領域に Neo 耐性遺伝子を置き換えるストラテジーで行った。エレクトロポレーションにより組換えベクターを導入後 G418 と GANC によりポジ・ネガの薬剤選択後、コロニーピッキングを行った。その結果、それぞれの遺伝子につき約 5%と、約 34%が相同組換え体であることが分かり、相同組換え効率は、マウスの ES 細胞の場合と大差は見られなかった。一方、核型解析では、解析したうち、正常と判定したクローンは、それぞれ解析したクローンの内 20%と 75%で、マウスよりも核型異常が多い傾向が見られた。

- (3) マウス×ラット ES キメラの作製：樹立した遺伝子組換え ES 細胞をマウスの胚盤胞にインジェクションしてマウス×ラット ES キメラを作製した。それぞれ、3 クローン中 2 クローンから、4 クローン中 4 クローンからマウス×ラット ES キメラを得ることができた。
- (4) マウス×ラット ES キメラからの germline transmission：得られたマウス×ラット ES キメラのそれぞれ、2 クローン中 1 クローンが、4 クローン中 2 クローンの遺伝子組換えラット ES 細胞に由来する雄キメラの精巣内にラット ES 由来の精子形成が確認できた(図 4)。

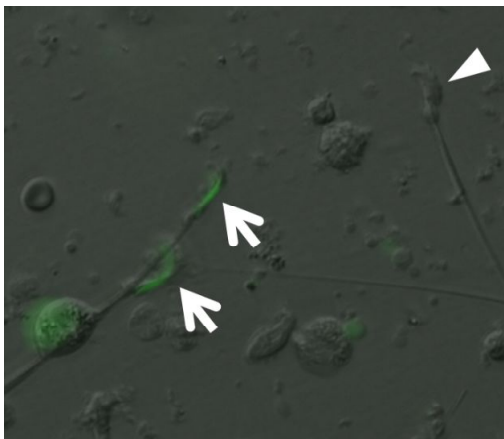


図 4 マウス×ラット ES キメラ精巣内の精子ラット由来の GFP 蛍光を持つ精子(矢印)とマウス由来の精子(矢頭)が確認できた。

さらに、マウス×ラット ES キメラの精巣内に確認できたラット由来精子をラットの未授精卵の細胞質に注入し、偽妊娠ラットに移植した。遺伝子組換えを行った ES 細胞由来の精子を 772 個の未受精卵に注入し、生存した 673 個を偽妊娠ラットに移植したところ、16 匹(約 2.3%)の産仔が得られた。得られた産仔の中に遺伝子組換えラットがいるかどうかについて、PCR 法にて遺伝子型を調べたと

ころ、うち 5 匹が遺伝子組換えラットであることが確かめられた。

さらに、誕生した遺伝子組換えラットは、野生型のラットと交配によって次世代を誕生させることを確かめた。

以上の結果より、以上の結果より、ノックアウトラットの新規作製法を確立することができた。

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 3 件)

Kimura T, Kaga Y, Ohta H, Odamoto M, Sekita Y, Li K, Yamano N, Fujikawa K, Isotani A, Sasaki N, Toyoda M, Hayashi K, Okabe M, Shinohara T, Saitou M, Nakano T. Induction of primordial germ cell-like cells from mouse embryonic stem cells by ERK signal inhibition. *Stem Cells*. 2014 Oct;32(10):2668-78. doi:10.1002/stem.1781.

Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep*. 2013 Nov 27;3:3355. doi: 10.1038/srep03355.

Fujihara Y, Satouh Y, Inoue N, Isotani A, Ikawa M, Okabe M. SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. *Development*. 2012 Oct;139(19):3583-9. doi: 10.1242/dev.081778.

[学会発表](計 3 件)

磯谷 綾子、小川 昌起、田中 高大、松村 貴史、山縣 一夫、岡部 勝、伊川 正人「マウスラット ES キメラを介した遺伝子変異ラットの作出」、『第 62 回日本実験動物学会総会』、2015 年 5 月、京都テルサ

磯谷 綾子 「マウスとラットの異種キメラの話」、『第 5 回生殖若手の会』、2012 年 07 月、東京大学三崎臨海実験所

磯谷 綾子 「A trial to form an organ from ES cells --- a rat thymus in rat-nude mouse chimera.」、『第 7 回 研

研究所ネットワーク国際シンポジウム』
2012年6月、東北大学加齢医学研究所

〔図書〕(計 3件)

磯谷 綾子、伊川 正人 南山堂 プロ
グレッシブ生命科学、140-147、2014

磯谷 綾子、伊川 正人 南山堂 生命
科学から創薬へのイノベーション、
145-155、2014

磯谷 綾子 羊土社 実験医学、
1304-1306、2014

〔その他〕

ホームページ等

感染動物実験施設 HP :

<http://www.arcid.biken.osaka-u.ac.jp/>

遺伝子機能解析分野 HP :

<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/index.html>

個人 HP :

http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/ayako_isotani.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯谷 綾子 (ISOTANI AYAKO)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：20444523

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：