



(0) 研究分野

分科会:生物

キーワード:受精、ゲノム再プログラム化、生殖細胞、エピジェネティクス

(1) 研究背景と研究目標

哺乳類のライフサイクルの中で、大規模なエピジェネティクス改変が生じるイベントの分子メカニズムの解明を目指す。すなわち、受精によってどのように新しい命が始まるか、生殖細胞ゲノムはいかにして確立するか、そして最初の細胞系列の分岐である胎仔側と胎盤側のエピジェネティクスはどのように決まってくるのかを明らかにする。この目的のために、正常な発生胚のみならず、さまざまな人為的操作（発生工学操作）によって特殊胚（核移植胚や顕微授精胚など）や幹細胞を作出し、解析する。さらにこれらの解析に必須な技術も開発する。解析対象の動物には、関連技術やゲノム情報をもっとも豊富にそろっているマウス (*Mus musculus*) を主に用いているが、マウスモデルが適切でない場合（ノックアウトで表現型が出ないなど）は、ゴールデン（シリアン）ハムスター (*Mesocricetus auratus*) を用いている。本研究室の強みは、自ら開発した発生工学技術や幹細胞作出技術を最先端のゲノム・エピゲノム解析技術を組み合わせることによって、独自のデータを蓄積できるところにある。この結果、上記の困難な目標に挑むことができる。

(2) 2021年度成果と今後の研究計画

(A) 核移植技術を用いた野生由来マウス系統のES細胞の樹立

広く生物学研究に用いられている実験用マウス（ラボマウス）は遺伝的多様性が小さいという欠点を持つため、これを補うマウスとして野生由来マウス（野生マウス）の利用が進んでいる。理研BRCでは世界的な野生マウスのコレクションを保有しているが、従来の生殖工学技術の適応が難しいことが大きな欠点であり、ES細胞もほとんど樹立をされていない。野生マウス系統の安定的な供給と維持、およびその遺伝的特性が最大限に利用できるように、核移植クローン技術を用いたnuclear transfer embryonic stem cells (核移植ES細胞)の樹立を試みた。レシピエント卵子には、代表的なラボマウスのF1交雑系であるB6D2F1 (*M. m. domesticus*) の成熟卵子を使用し、核ドナーには亜種野生系統 CASP/1Nga、CAST/Ei (いずれも*M. m. castaneus*) マウスの末梢血から回収した単球および顆粒球を用いた。胚盤胞期胚まで発生したクローン胚をLIFおよび2つの分化阻害剤を加えた、いわゆる2i法で核移植ES細胞を樹立した。樹立した核移植ES株はマイクロサテライト解析、およびミトコンドリア (mt) DNAの確認により、核と細胞質のゲノム情報を調べ、未分化マーカーの確認、染色体数の確認、テラトーマ形成試験を行った。CASP/1Ngaから樹立した13ライン（雄5、雌8）、CAST/Eiから樹立した11ライン（雄8、雌3）を用いて、マイクロサテライト解析による由来系統の同定を行なったところ、全ラインの核ゲノムがドナーの野生マウス由来であることが確認できた。一方、mtDNAについては、予想通り、レシピエント卵子として使用した*M. m. domesticus*に由来していた。未分化マーカーと染色体数の結果から選抜した高品質な雌雄1ラインを用いて8細胞期、あるいは胚盤胞期胚に注入したところ、両系統においてキメラマウスを作出することに成功した。さらにCAST/Eiの雄のキメラマウスでは、交配試験により、germline transmissionが確認できた。よって、本法により、完全な多能性を有する野性マウスのES細胞の樹立に成功した。

今後の計画 1) ラボマウスでもしばしば観察されることであるが、雌ES細胞は、雄ES細胞に比べて樹立しにくく、かつその品質も低い。その原因を明らかにするとともに、高品質の雌ES細胞の樹立を目指す。2) 今回ES細胞を樹立した野生マウスは、ラボマウスの亜種にあたる。これにより、ラボマウスの卵子を用いてもクローン胚盤胞を得ることができ、ES細胞を樹立できたと考えられる。今後は、ラボマウスの異種にあたる野生マウスを用いて実験を行う予定である。

(B) 精母細胞の発生停止に起因する無精子症マウスからの産子の作出

マウスにおいて、顕微授精技術を用いた一次精母細胞からの産子作出が報告されている

(Ogura et al. 1998)。しかしその成功率は4%と非常に低い。原因として、一次精母細胞注入後の卵子において染色体分離エラーが高頻度に生じることが挙げられているが、改善報告はない。近年、京極らは卵母細胞における染色体分配異常は、その大きな細胞質サイズに依存していることを報告した(Kyogoku and Kitajima, 2017)。そこで、一次精母細胞注入に用いる卵子の細胞質サイズを小さくすることで染色体分配異常の改善と産子率の向上を試み、さらに減数分裂異常を生じる不妊雄系統マウスへの応用を試みた。【方法】顕微操作にて細胞質サイズを1/3~1/2に減少させたマウスMI卵子に、一次精母細胞の顕微注入を行った。体外成熟後のMII染色体(雌雄染色体を含む)を別の新鮮除核MII卵へ移植し活性化処理を行った。翌日2細胞期に発生した再構築胚をレシピエント卵管に移植した。コントロールの産子率は1% (1/96移植胚数)に対し、細胞質サイズ減少群では19% (17/90)と大きな改善が確認された。また、染色体分離の正常性について、MII期胚の染色体標本およびライブセルイメージングを行ったところ、細胞質減少胚ではコントロール卵由来胚に比較して分配異常の減少が確認された。一次精母細胞で精子発生が停止する遺伝子改変マウスへ応用したところ、2系統では産子が得られ、これらの産子の繁殖能も確認された。一次精母細胞は多くの無精子症男性にもその存在が認められているので、本法が新たな不妊治療法の一つとなる可能性が示された。

今後の計画 1) 雄とも雌の減数分裂はさまざまな相違があるため、一次精母細胞の染色体が卵子中で減数分裂を進めて20%近くもの出生率に至ることは予想外であった。世の中には、数多くの精母細胞で発生停止する変異マウスが存在する。今後、どのような変異が本法で救済ができるのかを検討していく予定である。

(3) 研究室メンバー

(2021年度)

(主任研究員)

小倉淳郎

(アシスタント)

塚原文乃

(4) 発表論文等

1. “Highly rigid H3.1/H3.2–H3K9me3 domains set a barrier for cell fate reprogramming in trophoblast stem cells”, Hada M, Miura H, Tanigawa A, Matoba S, Inoue K, Ogonuki N, Hirose M, Watanabe N, Nakato R, Fujiki K, Hasegawa A, Sakashita A, Okae H, Miura K, Shikata D, Arima T, Shirahige K, Hiratani I, Ogura A., **Genes Dev** 36, 84-102 (2022).
2. “Formation of spermatogonia and fertile oocytes in hamsters requires piRNAs.” Loubalova Z, Fulka H, Horvat F, Pasulka J, Malik R, Hirose M, *Ogura A, *Svoboda P., **Nat Cell Biol** 23, 992-1001 (2021).
3. “Easy and quick (EQ) sperm freezing method for urgent preservation of mouse strains.” Mochida K, Hasegawa A, Shikata D, Itami N, Hada M, Watanabe N, Tomishima T, Ogura A., **Sci Rep** 11, 14149 (2021).
4. “Improved development of mouse SCNT embryos by chlamydocin analogues, class I and IIa histone deacetylase inhibitors.” Kamimura S, Inoue K, Mizutani E, Kim J-M, Inoue H, Ogonuki N, Miyamoto K, Ihashi S, Itami N, Wakayama T, Ito A, Nishino N, Yoshida M, Ogura A., **Biol Reprod** 105, 543-553 (2021).
5. “Tsga8 is required for spermatid morphogenesis and male fertility in mice.” Kobayashi Y, Tomizawa SI, Ono M, Kuroha K, Minamizawa K, Natsume K, Dizdarević S, Dočkal I, Tanaka H, Kawagoe T, Seki M, Suzuki Y, Ogonuki N, Inoue K, Matoba S, Anastassiadis K, Mizuki N, Ogura A, Ohbo K., **Development** 148, dev196212 (2021).

Laboratory Homepage

https://www.riken.jp/research/labs/brc/bioresour_eng/index.html

<https://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/index.html>