

マウスを用いたゲノム高度可塑性因子の同定とその応用

Identification of factors endowing the genome with a high plasticity in the mouse and their applications to biomedical researches

小倉 淳郎 (OGURA ATSUO)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・室長



研究の概要

129 系統マウスゲノムに存在するゲノム高度可塑性因子のゲノム上の位置を順遺伝学的手法により絞り込み、転写産物解析から候補因子を同定すると共に、細胞生化学的手法を用いてその機能を解明する。さらにこの機能を応用して極めて正常に近い体細胞由来多能性幹 (iPS) 細胞や体細胞クローン動物を作出する技術を実用化する。

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：発生工学

1. 研究開始当初の背景

体細胞核移植クローンの成功や体細胞由来多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立は、発生に伴うエピジェネティックな変化が不可逆ではなく、人為的に巻き戻すことが可能であることを示している。しかしながら、この逆方向エピジェネティック変化 (再プログラム化) は、その不自然さ故にしばしばエラーあるいは不完全な再プログラム化が生じてしまう。

我々は、多くのマウス体細胞クローン実験を進めるうちに、一部のマウス系統 (系統名: 129 系) のゲノムは、非常に正確に再プログラム化され、その体細胞に由来する胚の品質 (網羅的遺伝子発現など) はほとんど受精卵と変わらないことに気付いた。この 129 系マウスは、約 30 年前に最初に胚性幹細胞 (ES 細胞) が樹立された系統でもある。核移植に用いるレシピエント卵子は共通 (F1 交雑系の卵子) であるので、これらの正確なゲノム再プログラム化のメカニズムは 129 系ゲノムそのものの中に隠されているはずである。すなわち、129 ゲノムが自らに高度な可塑性を付与していることになる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、その 129 系統マウスのゲノムに隠されているゲノム高度可塑性因子のゲノム上の位置を順遺伝学的手法により絞り込み、転写産物解析から候補因子を同定すると共に、細胞生化学的手法を用いてそ

の機能を解明する。最終的には、この機能を応用して極めて正常に近い誘導多能性幹細胞や体細胞クローン動物を作出する技術を実用化することにより、産業および医学領域への貢献をめざす。

3. 研究の方法

形質から遺伝子を探索する順遺伝学手法 (forward genetics) を応用する。標準系統である C57BL/6 系統と本研究のターゲットである 129 系統間のリコンビナント近交系あるいはコンソミック近交系を用いて核移植等のゲノム再プログラム化実験を実施し、その再プログラム化パターンをもとに 129 型の特性を有する系統を分別する。そしてリコンビナント近交系間のゲノム上多型パターンから領域を絞り込み、責任遺伝子を特定する。この結果から 129 系に高度ゲノム可塑性をもたらす因子とその機構を推定し、さらには本因子のウサギ、サル、家畜等への移植を試みる。

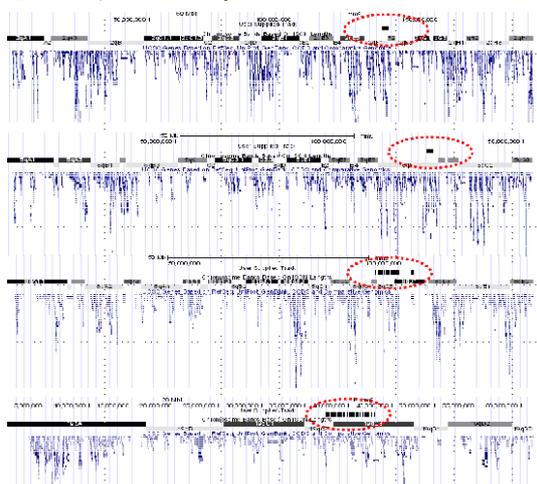
4. これまでの成果

129 系統の体細胞クローン産仔出生率が高いことと、クローン胎盤重量が小さい (正常) という特異な表現型を利用して、各リコンビナント近交系のクローン産仔作出を行い、出生率と胎盤重量の解析を行った。仮親への移植胚数は何らかのアクシデントによる発生不良の可能性などを除去するために、各系統 500 個程度を目標とした。その結果、近交系にも関わらずクローン産仔が得られた 6 系統

と得られなかった3系統が確認された。さらに、これら6系統より得られた産仔の胎盤重量を確認したところ、出産が確認された6系統のうち、重量の小さいものが4系統、大きいものが2系統確認された。すなわち、129型として確実に分類され得る4系統が同定された。

そこで、これらの結果の裏付けを行うため、リコンビナント近交系と129を掛け合わせたF1系統についても体細胞クローン産仔の作製を行った。F1遺伝子型のクローンはもともと胎盤が大きくなる傾向があるために、胎盤重量は同一系統内においても分散が大きく統計解析に適しなかったが(9項参照)、出生率については胎盤重量の低い3系統および出生率の低い別の3系統は、上記の結果と一致しており、そのデータが裏付けられた。

ここまでの結果から、特定された4系統を129型、3系統をB6型とした場合の、リコンビナント近交系のゲノム多型データベースと一致する領域の絞り込みを行ったところ、全ゲノム上の4ヶ所の領域に限定されることが明らかとなった(図)。染色体上における各領域は1.8-5.2Mbpとごく限られた大きさで、各領域に含まれる遺伝子数は各40-70個程度であるため、候補遺伝子数は200個程に絞り込まれた。さらに、胎盤重量の大きい2系統をB6型とした場合、さらに2ヶ所の領域に絞り込まれた。従って、129系統のゲノム高度可塑性因子を含み得る領域は、全ゲノム中の4ヶ所で、その内2ヶ所が有力な候補として挙げられる。



5. 今後の計画

現在、候補染色体が置換されたB6 x 129コンソミック系統を米国より生体または凍結精巢の形で入手し、ゲノム情報の確認とホモ個体化を行っている。このコンソミック系統を用いたクローン結果により、主要な領域1か所が決定する予定である。領域が決定し、その領域内にある遺伝子の既知の機能から、数個から20個程度の候補遺伝子まで絞り込

む。それぞれB6と129系統間の多型を確認し、産物としてのタンパク質が変化するかどうかを考慮しながら、129型の遺伝子構成を持つBACトランスジェニックマウスを作出する。これらのマウスの体細胞クローンを行い、129型を示すトランスジェニックマウスの遺伝子を確定する。その129型の多型情報を元に、その機能の変化を予想し、他の動物への応用を試みる(細胞および個体)。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

Oikawa M, (8人略), Abe K, Ishino F, Ogura A. Understanding the X chromosome inactivation cycle in mice: A comprehensive view provided by nuclear transfer. *Epigenetics* 9: 204-211, 2014.

Hirasawa R, Matoba S, Inoue K, Ogura A. Somatic donor cell type correlates with embryonic, but not extra-embryonic, gene expression in postimplantation cloned embryos. *PLoS One* 8: e76422, 2013.

Honda A, (9人略), Ogura A. Naive-like conversion overcomes the limited differentiation capacity of induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem* 288: 26157-26166, 2013.

Kamimura S, Inoue K, Ogonuki N, Hirose M, Oikawa M, Yo M, Ohara O, Miyoshi H, Ogura A. Mouse cloning using a drop of peripheral blood. *Biol Reprod* 89: 24, 1-6, 2013.

Ogura A, Inoue K, Wakayama T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0329>

Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, Nakamura T, Abe K, Nakano T, Ishino F, and Ogura A. RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 20621-20626, 2011.

的場章悟, 井上貴美子, 小倉淳郎. 「核移植技術: Xistの機能抑制による体細胞クローン作出効率の改善法」細胞工学 Vol. 31, No. 3 学研メディカル 秀潤社 2012年2月22日発行

ホームページ等

<http://www.riken.go.jp/r-world/research/lab/brc/engineering/index.html>

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