

論文概要

論文題目：マウス胚で三胚葉を可視化する
トリプルノックインレポーターシステムの開発

指導教員：

人間総合科学研究科 生命システム医学専攻
杉山 文博 教授

所属：筑波大学大学院人間総合科学研究科
生命システム医学専攻

氏名：鈴木 颯

目 的:

哺乳類の胚発生における重要な時期として、原腸胚期がある。原腸胚期では多能性をもつエピブラストから内胚葉、外胚葉、中胚葉の三胚葉が形成される。これまでのトランスクリプトーム、エピゲノム研究により、三胚葉の形成や発達に関わる分子機構は解明されてきたが、未だ完全ではない。大規模な細胞の分化と移動が起こり複雑な細胞局在を示す原腸胚の中で三胚葉形成を把握するためには、各胚葉を同時に可視化することが有効であることから、胚葉特異的なマーカー遺伝子座に蛍光タンパク質遺伝子がノックインされたレポーターシステムをもつマウスおよびマウス ES 細胞が作製されてきた。しかし、*in vivo* のマウス原腸胚で胚発生を障害することなく三胚葉を同時に可視化できるレポーターシステムの報告はない。そこで、本研究の目的は、マウス原腸胚にて三胚葉を同時に可視化する MIERU (Multi-color Imaging of Embryonic development by Reporter Units) システムをもつマウスおよびマウス ES 細胞の作製を試みた。

対象と方法:

まず始めに、MIERU システムをもつマウスを作製するため、内胚葉可視化 *Sox17-EGFP* ノックインマウス、外胚葉可視化 *Otx2-tdTomato* ノックインマウス、中胚葉可視化 *T-TagBFP* ノックインマウス同士を交配した。MIERU マウス原腸胚におけるレポーター遺伝子の発現を確認するため、ヘテロ接合型 MIERU マウス胎齢 7.5 日胚を解剖し、蛍光顕微鏡で観察した。ホモ接合型トリプルノックインが内在性遺伝子の機能欠損を引き起こさないことを確認するため、ホモ接合型 MIERU マウス同士を交配させ産子を得た。

次に、ホモ接合型 MIERU マウスの交配で得られた胚盤胞の内部細胞塊由来の細胞を、2i/LIF 法で培養し増殖させて MIERU-ES 細胞を樹立した。樹立した MIERU-ES 細胞の多能性を確認するため、MIERU-ES 細胞と ICR マウス由来四倍体胚から四倍体補完法によりキメラ胚を作製した。

最後に、三胚葉形成に対する遺伝子機能解析において MIERU-ES 細胞が有用であることを検討するため、2 種類の CRISPR/Cas9 発現ベクターを MIERU-ES 細胞内へトランスフェクションし、*Strap* の exon2 を除去された *Strap*^{-/-}-MIERU-ES 細胞クローンを作製した。MIERU システムが遺伝子破壊による三胚葉への影響の評価に有用であるかを確認するため、*Strap*^{-/-}-MIERU-ES を用いた四倍体補完法を実施し、胎齢 9.5 日でキメラ胚を解剖して蛍光顕微鏡で観察した。

結 果:

シングルノックインマウス同士の交配を経て、トリプルノックインレポーターマウスである MIERU マウスの作出・系統化した。蛍光顕微鏡を用いて MIERU マウス胎齢 7.5 日

胚を観察すると、EGFP の蛍光は胚体部の内胚葉で観察された。tdTomato の蛍光は胚前方に位置する外胚葉で特に強い蛍光が認められた。TagBFP は胚体部後方に位置する原始線条や胚前方に伸びる脊索中胚葉で確認された。また、ホモ接合型 MIERU マウス同士の交配によって得られる平均産子数は野生型 C57BL/6J マウスと同程度であった。

ホモ接合型 MIERU マウスの交配で得られた胚盤胞から 8 株の MIERU-ES 細胞を樹立することに成功した。また、四倍体補完法で作製した胎齢 7.5 日のキメラ胚は蛍光の観察像において、キメラ胚は MIERU マウス胎齢 7.5 日胚と同様に、3 種類のレポーター遺伝子がそれぞれ胚葉特異的な部位で確認された。

MIERU-ES 細胞内ゲノム編集の結果、5 クローン of *Strap*^{-/-}-MIERU-ES 細胞を作製できた。四倍体補完法で作製した胎齢 9.5 日の *Strap*^{-/-}-MIERU-ES キメラ胚では、EGFP の蛍光は胆嚢の前駆細胞に相当する部位には認められなかった。また、tdTomato の蛍光は頭部全体で発現しており、前脳、中脳および後脳の区画化は認められなかった。脊索で確認された TagBFP の蛍光は頭部に近づくに連れて減衰しており、かつ湾曲していた。

考 察:

胎齢 7.5 日胚の蛍光顕微鏡観察の結果から、MIERU システムはマウス原腸胚にて三胚葉を同時に可視化したと言える。ホモ接合型 MIERU マウス同士の交配によって得られる平均産子数の検討から、トリプルノックインアレルは胚発生を障害しないことが示唆され、MIERU マウスおよび MIERU-ES 細胞は三胚葉形成の研究に有用であると考えられる。特に、MIERU-ES 細胞は四倍体補完法で作製されたキメラ胚において三胚葉へ分化して可視化することが証明されており、現時点で *in vivo* のマウス胚での三胚葉形成の評価に有用な唯一のトリプルノックインレポーターマウス ES 細胞であると考えられる。さらに、*Strap*^{-/-}-MIERU-ES キメラ胚において形態学的解析だけでは同定できない表現型が蛍光の観察像で確認されたことから、MIERU システムはゲノム編集技術を用いた遺伝子破壊と組み合わせることで、三胚葉の形成や発達に対する標的遺伝子の機能評価に有用であることが示唆された。

結 論:

私はマウス原腸胚において三胚葉を同時に可視化する MIERU システムをもつトリプルノックインレポーターマウスを作製した。また、MIERU マウスから高い分化能をもつ MIERU-ES 細胞を樹立した。さらに、MIERU-ES 細胞の遺伝背景下におけるゲノム編集技術を用いた遺伝子破壊と、四倍体補完法によるキメラ胚作製を組み合わせることで、三胚葉形成に対する標的遺伝子の機能評価系を確立した。