

[7] 発生工学研究支援室

システム疾患モデル研究センターでは所内の研究グループに対し、以下の研究支援を行っています。

1. ノックアウトマウス等の作製支援(発生工学研究分野)
2. 胚凍結保存支援(実験動物研究施設)

1. ノックアウト(キメラ)マウス作製支援指針

1. 支援の概要

ノックアウトマウス作製は、システム疾患モデル研究センター・発生工学研究分野が支援します。ノックアウトマウスの作製について、遺伝子の構築に関する相談からES細胞への遺伝子導入、遺伝子相同組換えESクローンの選別、確認、キメラマウスの作製までの一連の過程を支援いたします。産まれたキメラマウスは当センターで離乳するまで飼育した後、依頼者にお渡ししますので、導入遺伝子の子孫への伝達の確認は依頼者側で行って下さい。またCRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子改変マウスの作製も支援します。(詳細はお問い合わせください。)

2. ノックアウトマウスの作製手順

(1) 作製依頼書類を作製し、発生工学研究分野長に提出してください(別紙様式1)。

吉田進昭 内線:75753 Mail:nobuaki@ims.u-tokyo.ac.jp

(2) 担当者とノックアウトマウス作製について打ち合わせを行います。

あらかじめ改変を希望する遺伝子に関しての情報、内外の競合状況やベクターデザインを提示してください。ベクター構築、相同組換え体の検出方法などは基本的に依頼者に提案していただきますが、初めてノックアウトマウスを作られる場合などはお気軽にご相談下さい。

(3) 依頼者側でターゲティングベクターを作製していただきます。neo、tk、DT-Aなどベクター構築に必要な遺伝子はこちらで用意致します。ES細胞は129マウス由来のE14-1かagouti C57BL/6マウス由来のJM8. A3、あるいは(129XC57BL/6)F1由来ES細胞を使用し、細胞はセンターで用意します。他のES細胞を使われる場合は予めご相談下さい。

- ・ 相同遺伝子組換え体のスクリーニングは依頼者に行っていただきますので、あらかじめスクリーニング法（サザン法、PCR）を検討し、系が問題なく動くことを確認してください。BACの利用など、他の方法でターゲティングを行う場合には事前にご相談ください。

(4) ES 細胞相同組換えクローンの樹立の基本は以下の通りです。

ES細胞の培養は依頼者自身が動物センター4階ES細胞培養室で行い、クローン確立までは自らが中心となって行っていただくことを基本としますが、各研究室で行うことも可能です。培養の具体的な方法などは指導いたします。

- ・ 遺伝子の導入からクローンの樹立までに約1ヶ月を要します。
- ・ 樹立したES細胞クローンは事前に検討した方法に従って、相同遺伝子組換えクローンを同定してください。遺伝子解析用のgenomic DNAは各自調製していただきます。
- ・ 相同遺伝子組み換えの解析で問題がなければ、キメラマウス作製の計画を立てます。

(5) 通常、独立した2～3個のES細胞相同組換えクローンを用いてキメラマウス作製を行います。

この過程はセンター側が行いますが、日程などはその時にお知らせいたします。

キメラマウスは生後約4週で順次依頼者に引き渡します。

- ・ 子孫への伝達 (germ line transmission)は依頼者側で確認していただきますが、具体的な方法などは指導させていただきます。
- ・ 子孫への伝達を確認されてからの ES 細胞クローンの保管は各研究部でお願いいたしますが、センターにおいても一部保管します。

3. ノックインマウス、ES 細胞を用いたトランスジェニックマウス作製

単純なノックアウトマウス作製以外にも、コンディショナルターゲティングやレポーターその他 DNA のノックインマウス作製、ES 細胞を用いたトランスジェニックマウス作製など、遺伝子改変マウス作製に関するご相談を受け付けます。

4. 組換え DNA 実験、および動物実験に関する承認

キメラマウスの作製を希望する場合は、「組換えDNA実験」指針に基づいてキメラマウスを作製する必要がありますので、あらかじめ遺伝子組み換え生物等安全委員会承認を得て下さい。なお、導入用の DNA の作製にかかわる組換え DNA 実験の承認は別にとる必要があります。また、あらかじめ動物実験計画書を動物実験委員会に提出し、動物実験の許可を得ると共に、マウスの飼育室を確保してください。

5. ターゲティングベクター、相同組換え ES 細胞等の購入、使用

EUCOMM、KOMP等のInternational Knockout Mouse Consortium から

ターゲティングベクターや相同組換えES細胞クローンを購入して、キメラマウス作製を依頼することが可能です。下記サイトを参照の上、不明な点はお問い合わせください。

<http://www.knockoutmouse.org/>

5. 作製経費

(1) ES細胞を用いた遺伝子改変マウスの作製

	所内依頼者	所外依頼者
変異 ES 細胞樹立 (センター指導下)	150,000	500,000
変異 ES 細胞樹立 (センターへ依頼)	250,000	600,000
キメラマウス作製	250,000	600,000
オプション	所内依頼者	所外依頼者
Cre-lox/Flp-FRT 組換え (in vitro)	100,000	250,000
再スクリーニング	100,000	350,000
追加キメラ作製	150,000	300,000

(2) 使用受精卵がC57BL/6J以外の場合、別途料金が加算されますのでご相談ください。

(3) CRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子改変マウスの作製

	所内依頼者	所外依頼者
受精卵へのマイクロインジェクション	250,000	600,000
オプション	所内依頼者	所外依頼者
追加マイクロインジェクション	150,000	300,000

6. 共同研究について

発生工学研究支援はシステム疾患モデル研究センターの活動の一部として行われるものですので、研究成果の発表に際しましては作製に関与した研究者等を共同研究者に

加えていただきます。また、作製された遺伝子改変マウスによって得られた 研究成果 (論文別刷り、学会発表要旨など)をお知らせ下さい。そのほか、キメラマウスやトランスジェニックマウス作製に関する技術的なデータは、独自に発表することをお認め頂きますよう、お願いいたします。

- ・ 作製された遺伝子改変マウスは一部をセンターに寄託していただくことにご協力ください。
- ・ センターではこの受精卵を凍結保存致します。遺伝子改変マウスを用いた研究成果を論文発表した後、外部の研究者から分与依頼があった場合は、作製依頼者と協議した後、供与致しますが、他機関への配布は作製依頼者の意志を尊重します。

2. 胚凍結保存支援

胚凍結保存は実験動物研究施設が担当いたします。
詳細は下記宛て、お問い合わせください。

甲斐知恵子 内線:75497 Mail:ckai@ims.u-tokyo.ac.jp

