

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外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. ES細胞を用いた遺伝子改変マウスの作製支援 (conditional/reporter/KI等)
2. 受精卵を用いたゲノム編集マウスの作製支援 (Indel/point mutation等)
3. 胚凍結保存支援 (実験動物研究施設)

作製を希望する研究者は、遺伝子改変マウス作製依頼書(様式1)を作成し、先進病態モデル研究分野長まで提出してください。

分野長：山田泰広

内線:75301

Mail: yasu@ims.u-tokyo.ac.jp

その後、当センターの作製担当者と遺伝子改変マウス作製プランについて打ち合わせを行いますので、その際に希望する遺伝子に関するの情報と希望する改変アレルの形状 (indel/flox/KI等) を提示してください。

<重要！>

遺伝子改変マウスを作製するに当たり必ず事前に遺伝子組み換え生物等安全委員会の承認を得てください。なお、導入用のDNAベクター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。

1. ES細胞を用いた遺伝子改変マウス等の作製支援指針

(A) 支援の概要

ベクターの構築やgRNAの設計に関する相談、CRISPR/Cas9を併用したES細胞への遺伝子導入、遺伝子改変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します。

(B) 作製手順

- i. 依頼者側でターゲティングベクターを準備(作製または購入)して頂きます。用いるES細胞は、センターが有している129マウス由来のE14.1かagouti C57BL/6Nマウス由来のJM8.A3、あるいは(129XC57BL/6)F1由来ES細胞のいずれかから選択して下さい。ただし、依頼者が用意したES/iPS細胞の使用を希望する場合はこの限りではありません。

- ii. EUCOMM、KOMP 等の International Knockout Mouse Consortium からターゲットイングベクターや相同組換え ES 細胞クローンを購入することも可能です。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/>
- iii. gRNA の評価、および遺伝子改変クローンのスクリーニング (PCR あるいはサザンブロット) は依頼者に行っていただきます。gRNA の評価方法は Mashiko et al., Sci Rep. 2013 <https://www.nature.com/articles/srep03355> または Alt-R® Genome Editing Detection Kit <https://sg.idtdna.com/pages/products/crispr-genome-editing/alt-r-genome-editing-detection-kit> の使用を推奨しています。詳しい内容についてはご相談下さい。
- iv. 遺伝子改変 ES 細胞クローンの樹立までの一連の作業は依頼者自身が動物センター4階 ES 細胞培養室あるいは各研究室で行って下さい。培養方法などは指導します。なお、センターに ES 細胞クローンの樹立を依頼する場合は、別途技術料を徴収します。
- v. 打ち合わせの際に決定した方法に従って、遺伝子改変 ES 細胞クローンを同定して下さい。遺伝子の導入からクローンの樹立までに通常約 1-2 ヶ月程度を要します。
- vi. 独立した 2 個のクローンを用いてキメラマウス作製を行います。出産後離乳まで飼育した後、依頼者にマウスをお引き渡しします (通常インジェクションから約 7 週間程度)。子孫への伝達 (germ line transmission) は依頼者側でご確認ください。具体的な指導が必要な場合はご連絡下さい。

(C) 作製経費

i. 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
gRNA の設計と評価	¥150,000	¥300,000
遺伝子改変 ES 細胞樹立 (センター指導)	¥150,000	¥300,000
遺伝子改変 ES 細胞樹立 (センター作製)	¥250,000	¥500,000
キメラマウス作製 (2 クローン)	¥250,000	¥500,000
<hr/>		
オプション	所内依頼者	所外依頼者
Cre-loxP/Flp-FRT 組換え (in vitro)	¥100,000	¥200,000
再スクリーニング	¥100,000	¥200,000
追加キメラ作製 (1 回当り)	¥150,000	¥300,000

受精卵レシピエントは C57BL6J または MCH から選択可能です。

2. 受精卵を用いたゲノム編集マウスの作製支援

(A) 支援の概要

gRNA の設計に関する相談、受精卵への gRNA の導入とゲノム編集マウス作製までの一連の過程を支援いたします。

(B) 作製手順

- i. 依頼者側で gRNA およびドナーDNA (ssODN または dsODN) の準備 (設計、評価および作製・購入) をして頂きます (trRNA をよび Cas9 protein はセンターで提供します)。詳しい内容についてはご相談下さい。受精卵は C57BL/6J マウス由来のものを使用します。
 - ii. 出産後離乳まで飼育した後、依頼者にマウスをお引き渡します (通常エレポから約 7 週間程度)。マウス個体でのゲノム編集の有無は PCR/sequencing 等により依頼者側でご確認ください。具体的な指導が必要な場合はご連絡下さい。
- i. 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
gRNA の設計と評価	¥150,000	¥300,000
受精卵へのエレクトロポレーション (2 回まで)	¥250,000	¥500,000
オプション	所内依頼者	所外依頼者
追加のエレクトロポレーション (3 回目以降 1 回当たり)	¥100,000	¥200,000

(D) 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、遺伝子改変マウス・ゲノム編集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。

支援の依頼や内容についてのお問い合わせは下記宛にお願いします。

先進病態モデル研究分野：山田泰広

内線：75301

yasu@ims.u-tokyo.ac.jp

生殖システム研究分野：小沢学

内線：72178

semil@ims.u-tokyo.ac.jp

3. 胚凍結保存支援

胚凍結存は実験動物研究施設が担当いたします。

詳細は下記宛てにお問い合わせください。

実験動物研究施設：甲斐知恵子

内線:75497

ckai@ims.u-tokyo.ac.jp

様式 1

遺伝子改変マウス作製依頼書

年 月 日

研究責任者(所属分野長)

所属

氏名

印

研究担当者

所属

氏名

印

下記の遺伝子改変マウスの作製をお願い致します。

実験課題名:

<以下当てはまるものに○を付けてください>

実験手法: ①ES細胞を用いた遺伝子改変マウスの作製

②受精卵を用いたゲノム編集マウスの作製

改変遺伝子名:

実験の概要(別紙添付可):

改変遺伝子の構造略図を別途添付して下さい。また、別に組換えDNA実験計画書、動物実験計画書の承認を受けて下さい。その他希望等があればご記入下さい。