

IX. 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の作製支援
2. 胚凍結保存支援
3. 遺伝子改変マウス供給

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・発生工学分野および分子病態分野が支援します。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。なお、システム疾患モデル研究センターの発足に伴い、所内の依頼者に対しては無料で年間 20 系統程度の作製支援を行います。20 系統を超えた分については、作製経費を一部負担していただきます。また、所外の研究者も利用可能ですが、同様に作製経費の一部を負担していただきます。

2. ノックアウトマウスの作製手順

- (1) 作製依頼書類を作成し、発生工学研究分野長（吉田）、または分子病態研究分野長（岩倉）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
岩倉洋一郎 内線：75536 Mail：iwakura@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する情報、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。
(別紙様式 2 に記載の項目事項についてあらかじめご検討ください。)
- (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 細胞は通常 E14-1 を使用し、細胞はセンターで用意します。E14-1 以外の B6 系 ES 細胞の使用を希望さ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、予めスクリーニング法（サザン法、場合によっては PCR も可）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には以下の 2 通りが選択できます。

1) 発生工学研究分野：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、センター側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。

2) 分子病態研究分野：ES細胞の培養、遺伝子導入からクローン単離まで、センター側が行います。

- ・ いずれの場合も、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細胞クローンをお渡ししますので、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。
- ・ 同定されたクローンを再増殖した後依頼者にお渡ししますので、サザン法により、標的遺伝子の5'、及び3'側で正確に相同遺伝子組み換えが起こっていることを確認して下さい。これらの解析で問題がなければ、キメラ作製の計画を立てます。DNAの解析は、ESクローンを依頼者にお渡ししてから1月以内に終える様をお願いしております。

(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2〜3ヶ月を要しますが、センター側が行いますので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. 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、予め遺伝子組み換え生物等安全委員会の承認を得て下さい。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、予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。

・ 必要書類

- (1) 第二種使用等拡散防止措置確認申請書
- (2) 動物実験計画書

作製依頼申込書にこれらの書類を添付して下さい。

4. 作製経費

所内からの依頼研究のうち、システム疾患モデル研究センターの目的に合致する研究課題については、20件程度の作製経費を無料とします(平成22年度枠:*)。それを超えた分の所内依頼者に対する作製経費は当面の間以下のように設定致します。所外からの依頼の場合は追加経費が必要になりますので、別途ご相談ください。

- ・依頼者がセンター指導でES相同組換えクローンを樹立する場合：単純なK0で一遺伝子あたり15万円。Cre-loxPを用いてES細胞のスクリーニングを2回行う場合は10万円を追加します。
- ・センターがES相同組み換えクローンを樹立する場合：単純なK0で25万円。Cre-loxPを用いてES細胞のスクリーニングを2回行う場合は15万円を追加します。
- ・目的のクローンが得られず、再スクリーニングを行う場合は1回につき15万円(依頼者がセンターで行う場合、10万円)を追加し、ベクターを再構築した場合は新規スクリーニングと見なします。
- ・ES細胞からのキメラ作製：25万円。追加キメラ作製を行った場合には、1回につき15万円。また、条件K0マウス作製のため、lox-P配列などの有無で2系統のキメラ作製を行う場合は、別々の料金とします。なお、キメラ作製時の受容胚としてBALB/cなどの特殊系統が必要となるC57BL/6のES細胞からのキメラ作製については40万円、追加インジェクションは30万円とします。
- ・研究経費は実験を開始してから3ヶ月以内にお支払い下さい。また、たとえ目的のESクローンが得られなかった場合や、生殖系列キメラが得られなかった場合でも、上記経費を支払うものとします。

*：平成22年度募集の詳細については、資料を別途請求ください。

5. 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。

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

3. 遺伝子改変マウス供給

システム疾患モデル研究センターで作製または繁殖・維持している遺伝子改変マウスには、研究用に供給可能なものもありますのでご相談下さい。

遺伝子改変マウスホームページ

医科研ホームページ>研究支援>研究資源>疾患モデルマウス

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/cem_dcb/Pages/support.html

問い合わせ

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

岩倉洋一郎 内線 : 75536 Mail : iwakura@ims.u-tokyo.ac.jp

甲斐知恵子 内線 : 75497 Mail : 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

希望依頼先 1. 発生工学研究分野（吉田） 2. 分子病態研究分野（岩倉）
3. どちらでもよい

研究責任者（所属分野長）

所属

氏名

印

実験担当者

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

記

実験課題名：

実験目的：丸を付けてください

ノックアウトマウスの作製、ノックインマウスの作製、トランスジェニックマウスの作製、キメラマウスの作製

改変遺伝子名：

実験の概要：

改変遺伝子の構造略図を添付して下さい。

また、別に第二種使用等拡散防止措置確認申請書（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。

予定マウス飼育室（ ）

その他希望等があればご記入下さい。

遺伝子導入、あるいはキメラマウス作製開始予定日は追って連絡させていただきますが、物理的許容量がありますのでそれぞれの分野長にご一任ください。

受付番号

担当

