

# ゲノム機能解析に資する遺伝子操作マウスの 胚・配偶子バンク確立のための基盤的研究開発

## I 試験研究の全体計画

### 1. 研究の趣旨

ヒトゲノム塩基配列構造解析が21世紀初頭に完成することが明らかになり、次なるテーマとしてゲノムの機能解析が始まりつつある。この目的を達成するには、哺乳類に10万近く存在すると推定される遺伝子に突然変異を持つ個体を解析していくことが最も良い方法と考えられている。実際には遺伝学的な研究に好適なマウスを利用するが、突然変異を飽和させるまでどのようにして作り、集めるか、またこの莫大な数の個体をどのように解析するかが問題となる。

ゲノムの機能単位に変異を起こしたマウスを保存し、必要な時に必要な場所で利用できるようにすることは、ゲノム情報の基礎研究を行っている研究者だけにとどまらず、この情報を医療や産業に応用する技術を開拓する研究現場からのニーズも高い。しかし、機能単位を効率的に探索する方法と、利用しやすい形で保存する方法が確立されておらず、新しい遺伝子改変技術の開発とともに、作出された遺伝子改変マウスの保存システムの樹立が期待されている。

平成9年度、知的基盤整備推進制度によりこの試験研究が開始されて以来、諸外国における、この分野の問題意識は益々活性化し、本年の mouse molecular genetics meeting においては、アメリカの国家的研究計画の全容が提示された。国際協調に応じるために、我国におけるこの分野の国家的支援は急務と言える状況に達している。

莫大な数の突然変異を必要に応じて計画的にマウス個体として生産し、有効利用できる胚バンクの確立を目指した本実験計画は、開始以来、順調に進行しており、本年度は、中心課題である研究項目1.(1)において、バンクの運用を想定した情報公開の手法開発と、技術の標準化に関する方法を具体的に検討し始める。この試験研究で行われている胚・配偶子の凍結保存技術を、国際的基準技術として標準化することは、次世代のゲノム科学において要求されている国際的な協調に対応するための知的基盤整備として最も基本となる課題である。一方、もう一つの中心課題である研究項目2.(1)、遺伝子トラップ法による突然変異マウスの作成については、ベクターの開発が順調に進んでおり、本年度は、そのスクリーニング法の開発を具体化していくことを検討する段階に入る。これらを支え、また、その応用を念頭に置いた周辺領域の研究項目における基盤的研究開発も平行して進め、新たな遺伝子資源の保存と有効な利用、さらに胚・配偶子バンクの運営の具体化を目指す。

### 2. 研究概要

本課題は第一に、多面的利用が可能な胚・配偶子バンクの確立に資するため、遺伝子操作を行った胚・配偶子またES細胞を凍結保存することを中心とした生殖工学的技術の開発と標準化および普及に関する研究を行う。第二に、バンクに保存される新しい遺伝子資源の作成に必要な遺伝子操作技術の開発に関する研究を行う。これら2つの柱を相互に有機的に機能させることにより効率的な胚・配偶子バンク（ワーキングバンク）の設立に向けての基盤を作る。

#### 1. 遺伝子資源保存のための生殖工学技術に関する研究

遺伝子機能解析に必要とされる改変遺伝子資源の効率的な保存に資するため、生殖工学技術に関する研究を行う。

##### (1) 胚・配偶子およびES細胞凍結保存技術に関する研究

###### ① 胚・配偶子の凍結保存技術に関する研究

(㈱三菱化学生命科学研究所以生殖工学開発室 横山峯介)

###### ② ES細胞による遺伝子資源保存技術に関する研究

(東京大学医科学研究所獣医学研究部 中村健司)

胚・配偶子およびES細胞の凍結保存や輸送法の標準化と普及に資するため、凍結保存技術の開発・改良に関する研究と、その技術を紹介するビデオの作製を行う。また、遺伝子資源として重要な遺伝子操作マウスの胚及び配偶子のワーキングバンク確立のための具体的な検討として運用の実際を想定し、インターネットによるホームページの構築を進める。これらは、実施内容の性格上、上記2機関が連携して行う。

##### (2) 配偶子形成の遺伝子操作技術に関する研究

(㈱三菱化学生命科学研究所以先端研究部門 野瀬俊明)

精子形成細胞とその前駆体である生殖幹細胞を対象にして、その培養条件下における発生分化制御の解析および精子形成過程への遺伝子導入法の検討を通して、精子形成を介した新たな遺伝子改変変動物作出技術の開発のための基盤研究を行う。

#### 2. 遺伝子機能の選択的改変のための基盤技術に関する研究

胚・配偶子バンクに保存され、多方面の研究領域で有効利用されるべき新しい遺伝子資源の作成に資するため、ゲノム遺伝子の供給と新規遺伝子操作マウス作成技術の開発に関する研究を行う。

##### (1) 飽和突然変異マウス作成法の開発に関する研究

多種多様な細胞種における発現特異性を指標とする遺伝子操作マウスのライブラリー化に資するため、新たに開発した遺伝子トラップやエンハンサートラップベクターのゲノム遺伝子への挿入により、ES細胞に網羅的に遺伝子操作を施す技術の開発に関する研究を行う。この課題は、下

記の2機関が独立の手法により目的の達成に当たる。

① 特異的発現を示す遺伝子群に対する飽和突然変異導入の開発に関する研究

(助癌研究会癌研究所細胞生物部 八尾良司)

効率的な飽和突然変異マウス作成技術の開発に資するため、トラップカセットを用いてトラッピングベクターを複製する。一方、特異的遺伝子発現を示す遺伝子群のトラップ法の開発に資するため、ES細胞分化誘導系の確立を試みる。これらのシステムにより、実際にES細胞に遺伝子トラップベクターの導入を行い、効率よく多種の分化誘導が可能で、かつ短時間に大量の検体を処理できる方法を確立することを目指す。

② ES細胞の分化に関連する遺伝子群に対する飽和突然変異導入の開発に関する研究

(熊本大学医学部遺伝発生医学研究施設 荒木喜美)

ES細胞を用いた効率の良いトラップ技術を開発することにより、飽和突然変異マウス作成を目指す。トラップベクターには、得られた突然変異マウスを広く応用できるように、Cre-loxシステムを用いると同時に、レポーター遺伝子としてGFP遺伝子の使用も試みる。

(2) 特異的発現制御による遺伝子機能の標識化技術の開発に関する研究

(㈱三菱化学生命科学研究所プロジェクトセンター 井ノ口馨)

2.(1)の研究において技術開発されて、1.の研究において凍結保存されて確立される試作胚バンクの有用性を確認するための探索的研究として、能海馬の慢性LTPにともない発現制御される遺伝子の網羅的探索を行い、遺伝子のカタログ化を試みる。また、海馬の発生に伴い発現が調節される遺伝子を探索して、その遺伝子構造を解析する。

(3) 実験動物による遺伝子機能解析のためのDNA材料の作出と供給

(厚生省国立感染症研究所遺伝子資源室 橋本雄之)

2.(2)との連携研究に資するため、マウスDNAライブラリーから完全長cDNAを分離して、変異を起こした遺伝子の特定と機能解析のためのDNA材料を提供する。また、これまで分離されているヒト遺伝子で、機能の未確定のものを選定し、そのマウス相同遺伝子を分離し、ノックアウトなどによる機能解析に必要なDNA材料を供給可能とする。さらに、ゲノムデータベースとリンクした新規突然変異遺伝子のマッピングによるデータベースを構築する。

3. 年次計画

研究項目	9年度	10年度	11年度	12年度	13年度
1. 遺伝子資源の保存のための生殖工学技術に関する研究					
(1) 胚・配偶子およびES細胞の凍結保存技術に関する研究	凍結保存技術の開発・改良と標準化				
(2) 配偶子形成の遺伝子操作技術に関する研究	胚・配偶子バンクの試作・運用				
	造精細胞培養系の開発		生殖細胞の移植操作		
	精子形成細胞細胞への遺伝子導入				
	造精幹細胞株化のための基礎研究				
	組換え体作成技術の開発				
2. 遺伝子機能の選択的改変のための基盤技術に関する研究					
(1) 飽和突然変異マウス作成法の開発に関する研究	遺伝子トラップに資するベクターの開発				
	遺伝子トラップによるES細胞の突然変異株作出と保存				
	遺伝子の単離とマッピング				
	特異的発現を示す突然変異体の選別				
(2) 特異的発現制御による遺伝子機能の標識化技術の開発に関する研究	特異的発現を示す遺伝子の選別				
	胚バンクの応用				
(3) 実験動物による遺伝子機能解析のためのDNA材料の作出と供給	ゲノムバンクから特定遺伝子の分離				
	データベース構築の検討				
所要経費(合計)	218百万円	220百万円	222百万円		

## II 平成11年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
1. 遺伝子資源保存のための生殖工学技術に関する研究		
(1) 胚・配偶子およびES細胞の凍結保存技術に関する研究		
① 胚・配偶子の凍結保存技術に関する研究	㈱三菱化学生命科学研究所	横山 峯 介
② ES細胞による遺伝子資源保存技術に関する研究	東京大学医科学研究所	中 村 健 司
(2) 配偶子形成の遺伝子操作技術に関する研究	㈱三菱化学生命科学研究所	野 瀬 俊 明
2. 遺伝子機能の選択的改変のための基盤技術に関する研究		
(1) 飽和突然変異マウス作成法の開発に関する研究		
① 特異的発現を示す遺伝子群に対する飽和突然変異導入の開発に関する研究	助癌研究会癌研究所	八 尾 良 司
② ES細胞の分化に関連する遺伝子群に対する飽和突然変異導入の開発に関する研究	熊本大学医学部	荒 木 喜 美
(2) 特異的発現制御による遺伝子機能に標識化技術の開発に関する研究	㈱三菱化学生命科学研究所	井ノ口 馨
(3) 実験動物による遺伝子機能解析のためのDNA材料の作出と供給	厚生省国立感染症研究所	橋 本 雄 之
3. 研究運営	㈱三菱化学生命科学研究所	藤 本 弘 一

## III 運営委員会

委員	所 属
○藤 本 弘 一	㈱三菱化学生命科学研究所 先端研究部門部門長
相 沢 慎 一	熊本大学 医学部遺伝発生医学研究施設形態発生部門教授
勝 木 元 也	東京大学 医科学研究所獣医学部門教授
小 林 利 克	㈱三菱化学生命科学研究所 副所長
野 田 哲 生	東北大学 医学部教授
橋 本 雄 之	厚生省 国立感染症研究所遺伝子資源室長
山 村 研 一	熊本大学 医学部遺伝発生医学研究施設発生遺伝部門教授
横 山 峯 介	㈱三菱化学生命科学研究所 生殖工学開発室長

(注：○は運営委員長)