

## 附属発生工学実験施設

### Laboratory of Embryonic and Genetic Engineering

本実験施設の構成は細胞学部門教授勝木元也が施設長を併任し、助手中村健司、技官中尾和貴の3名のスタッフと研究補助員、室井佐和子に加え、研究生として、新技術事業団から田中三紀、研修員として、大塚製薬（株）武田 聖、大正製薬（株）大貫達也、九動（株）から香山敬志が研究に参加した。他に天津山彰（産業医大）、安澤加代子（理研）、本田浩章（自治医科大）、杉山 崇（早稲田大）、都留秋雄（奈良先端大学院大学）、佐藤俊也、小宅睦郎（新潟大）が共同研究グループから派遣され、ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスの研修を受け、技術習得後、それぞれの研究室に戻った。訪問研究員として呉銘芳（台湾）、Squire, J（カナダ）が発生工学を行う研究室で研修と講習を行った。ターゲッティングマウス、トランスジェニックマウスは今年度も次々に誕生した。動物室は、細胞学部門、感染防御学部門、生化学部門、遺伝学部門がマウスの飼育に使用しているが、年3回の微生物検査もすべて陰性の結果を得て順調に稼働している。

講師権藤洋一は4月1日から東海大学総合医学研究所助教授として転出した。米国マサチューセッツ工科大学がん研究所に留学中だった助手笹岡俊邦は11月に退職。外丸裕介、石崎宏好は日本クレア（株）に、本田正治、鶴井和孝は九動（株）に、谷口吉弘は、大塚製薬（株）に、高市康博は三共（株）にそれぞれ戻り、牟田晴美、横山俊子が結婚のため退職した。

8月8日、教授勝木元也が、東京大学医科学研究所に配置換えになることが内定し、10月1日から東京大学を併任し、平成8年1月1日に専任配置換えになることが決定した。

#### A. *H-ras* 遺伝子欠損細胞の解析（中村健司、井上琢哉、中尾和貴、伊勢和宏、饗場 篤、勝木元也）

培養細胞株を用いたこれまでの実験から、*ras* 群遺伝子産物は発がんおよび細胞の増殖、分化におけるシグナル伝達に重要な役割を担っていると考えられている。我々は*ras* 遺伝子の個体レベルでの機能を解析するために、*H-ras* 遺伝子欠損マウスの作成を行なった。

*H-ras* 遺伝子ホモ型欠損マウスは、正常に個体発生し、成熟マウスまで成長する。またホモ型欠損マウス雌雄の交配からも、野性型と同じ数の産仔が得られ正常に発育する。*H-Ras* p21タンパク質は、殆どの組織に広く認められるにもかかわらず、現在のところ *H-ras* 欠損マウスと正常マウスとの間に形態学的及び組織学的な差異を検出することができない。そこで、*H-ras* 欠損マウスより作成した胎生線維芽細胞を用いて、細胞の増殖性、形態の差異、種々の成長因子（FGF, EGF, Insulin, PDGF）に対する反対性等について検討した。その結果、形態において、*H-ras* 欠損マウスより作成した胎生線維芽細胞と正常マウス細胞との間に差が認められた。

## B. HITEC マウスを用いた体細胞突然変異の解析：Ⅱ．導入遺伝子 *rpsL* に生じる塩基変化（塩山善之，榎藤洋一，中野和貴，勝木元也）

哺乳動物に生ずる体細胞突然変異を迅速簡便に検出することは、発がんリスク評価にとって重要である。我々は、この観点から、ストレプトマイシン耐性への形質転換を利用して大腸菌系で突然変異を容易に検出できる遺伝子 *rpsL* を導入したトランスジェニックマウス（HITEC マウス）を樹立した。自然及び化学発がん剤 MNU（N-methyl-N-nitrosourea）投与による体細胞突然変異頻度については昨年度に報告した。今回は、生じた突然変異のスペクトラム及びその性質について報告する。HITEC マウス（HIT 017；約350コピー）に MNU（10 or 40mg/Kg）を投与し、14日後の脳、肝臓、脾臓での突然変異率とスペクトラムを解析した。また、妊娠 9.5日目の雌マウスに MNU（25, 50, または75mg/Kg）を投与し、胎生18日目の胎児の肝臓を同様に解析した。

- 1) MNU 40mg/Kg 投与の脾臓では明らかに突然変異率の上昇が見られ、70%が G : C から A : T の塩基置換であった。
- 2) 子宮内胎児死亡数は投与量依存性に上昇する傾向があった。胎児の肝臓における突然変異率では、75mg/Kg で上昇が見られ、そのスペクトラムも G : C から A : T への塩基置換がほとんどであった。

## C. ジーンターゲットングした ES 細胞（中村健司，室井佐和子，田中三紀，勝木元也）

本施設でノックアウトした遺伝子は、グルタミン酸受容体 5 種類〔NMDA1 (NR1), NR2A, NR2C, mGluR2, mGluR6〕, ドーパミン受容体 D2R, H-*ras*, N-*ras*, K-*ras*, セロトニン受容体 5HTR1B, cot, p53, カルボニン, Il2 $\gamma$ , ALD, および p53, H-*ras* 遺伝子への置換体（5 種類）であった。すべて 4 % 以上の確率でノックアウト ES 細胞が単離された。

また、インプリンティング遺伝子 *spot2* (U2afbp-rs)（置換体）、カルボニン（置換体）、H-*ras*（2 種類）、N-*ras*, K-*ras*（2 種類）、プリオン（置換体）、Bnp, *cnp*, p53（置換体）、セロトニン受容体 5HTR1B, *myb*（置換体）2 種類, mAhr, Cas, DRPLA もノックアウトされた。

## D. キメラマウスの作成（中尾和貴，勝木元也）

本研究施設が発足して以来多くの遺伝子がターゲットングされた（c）。この遺伝子をマウスに導入するため中尾和貴は努力を重ね、多くのキメラマウスを作成した。ほぼすべての遺伝子について生殖細胞伝達キメラであった。

## E. マウス胚の凍結保存（中尾和貴，香山敬志，勝木元也）

発生工学技術を利用して、遺伝子の働きを確認する作業には、新しいマウスの開発が不可欠であり、またそれを実験に利用するために生産も必要である。これを実験室という限られたス

ペースのなかで行うためには、マウス胚を凍結保存し、必要に応じて計画的に出産させることが得策である。従来の交配による生産よりも、同一年齢で、数の揃ったマウスを得ることができ、このことは実験の速度を速めることにもつながる。凍結技術の改良などまだまだ検討課題も多いが、研究室で活発にこの技術が利用できることを、証明できたことは、特筆すべき事と考える。

#### F. マウス胚を用いた超急速凍結保存法の改良（中尾和貴，勝木元也）

近年、遺伝子導入ならびに標的遺伝子組換え等の発生工学技術の発達により、多数のマウスが作成されている。それら多くのマウスを迅速に解析するためには効率よく生産する必要がある、その実現のために生殖工学の技術であるマウス胚の凍結保存技術が利用されている。そして最近、中潟は高濃度の凍結保存溶液（DAP213）にマウス胚をさらに、直ちに液体窒素で保存する超急速凍結保存法を開発し報告した。しかし DAP213 は極めて毒性が高いため凍結融解において迅速な操作が要求される、そのため再現性や現実の利用においては極めて困難であると思われる。そこで本研究において低温で処理することにより DAP213 の毒性を低減させる事が可能となり、同時に極めて高い生存性、ならびに再現性が得られた。過排卵処理した C57BL/6J 雌マウスより体外受精により 2 細胞期胚を得た。凍結は室温で、胚を含む 1M DMSO PBI 5  $\mu$ l をクライオチューブに入れ、次に 0℃（氷水）で 5 分間平衡させた後、前もって冷やしておいた 0℃ の DAP213 95  $\mu$ l を静かに加え、更に 5 分間平衡させた後、液体窒素に入れて凍結保存した。融解は液体窒素からチューブを取り出し室温で約 1 分間放置し、37℃ に温めておいた 0.25M sucrose PBI を 900  $\mu$ l 添加することで行なった。融解後回収した胚は PBI で 4 回洗浄し、更に m.W. 溶液で 4 回洗浄した後、形態的な観察を行なった。形態的に正常と判定した胚の一部は培養により胚盤胞期胚へ発生させ、残りは融解後直ちに偽妊娠雌マウスの卵管に移植し正常に発生するかを観察した結果は、凍結融解した後の回収率は 100% (317/317) で、回収した形態的に正常な胚の割合は 99.4% (315/317) であった。正常な胚の培養による胚盤胞への発生率は 92.3% (36/39) であった。更に移植による発生率は 56.5% (156/276) であった。以上の結果より凍結融解処理においては DAP213 の毒性は観察されず、極めて高い生存率が得られた。このことは低温で処理することと 1M DMSO PBI で前処理したためだと考えられる。融解操作において従来の超急速凍結に続く急速融解法と比べても、比較的にゆっくりと融解することが可能となったので、融解・回収等の操作が極めて簡単に行なえるようになり、このことから極めて高い再現性が得られた。以上のことから本改良は実際にマウス胚の超急速凍結保存法を実施するにおいて、従来の方法と比較しても極めて高い成績と再現性が得られることが観察された、このことから本法はマウス胚の凍結保存法として極めて有効であると考えられた。

## G. 幼若マウスを利用した遺伝的背景の転換（中尾和貴，香山敬志，勝木元也）

ジーンターゲティングによって，作られた新しい実験用マウスはその性格上，遺伝的背景が交雑種になる．そこでこれらのマウスを戻し交配していく場合 8 代の交配に従来の方法では約 2 年必要となる．実際これを行うと限られたスペースやボトルネック現象と呼ばれる交配上の問題もあってなかなか計画どおりに進まない．そこで幼若マウスに過剰排卵させることによって，体外受精を行い，計画的に数種類の戻し交配（C57BL/6J，BALB/cA，C3H/HeJ）を 1 年半で行う計画を実行した．計画は順調に進行し 8 代の交配が終了した．遺伝的背景を調べている．

## H. マウス胚凍結セミナー

12月18日三菱化学生命科学研究所・室長横山峯介博士を講師に「マウス胚の凍結保存法の実践」と題し，主に 1）体外受精法，2）凍結保存法，3）融解法，4）移植法について話してもらった．このセミナー後本施設でこの横山法の実習を計画しているため，参加者は，生医研（医学部キャンパス）と医学部・遺伝情報に限定した．参加者は約40名．

## 原著論文

### 1. Gondo,Y., Shioyama,Y., Nakao,K. and Katsuki,M.

A novel positive detection system of in vivo mutations in rpsL (strA) transgenic mice.

Mutation Res in press.

### 2. Masu,M., Iwakabe,H., Togawa,Y., Miyoshi,T., Yamashita,M., Fukuda,Y., Sasaki,H., Hiroi,K., Nakamura,Y., Shigemoto,R., Takada,M., Nakamura,K., Nakao,K., Katsuki,M. and Nakanishi,S. 1995.

Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene.

Cell 80, 757-765.

## 総 説

### 1. 勝木元也. 1995.

Gene targeting によるヒト遺伝子型マウスの開発と研究.

内分泌学の進歩, 12, 156-163.

### 2. 勝木元也. 1995.

特集 医学の最前線からⅡ 疾患モデルとしてのトランスジェニック動物（対談）.

日本医師会雑誌, 114, 814-820.

3. 勝木元也. 1995.

第1部基礎編 トランスジェニックマウスを用いた実験系.  
蛋白質 核酸 酵素, 40, 2001-2007.

4. 勝木元也. 1995.

Ⅲ-1 疾患モデル動物 遺伝子治療のための疾患モデル.  
蛋白質 核酸 酵素, 40, 2664-2667.

## 著 書

1. 権藤洋一, 勝木元也. 1995.

2.5 実験動物による検索法, 2.5.5 DNA変異を検出する方法. 「抗発がん物質とその検索法」(黒田行昭, 編) in press, 講談社サイエンティフィク, 東京.

## 学会発表

1. 勝木元也 (1995, 1/27).

新しい実験医学.  
北大シンポジウム, 札幌.

2. 権藤洋一, 勝木元也 (1995, 2/3).

体細胞相同染色体におけるアリル間遺伝子修復の解析.  
第12回染色体ワークショップ, 新潟.

3. Tanaka, H., Nakamura, K., Nakao, K., Gondo, Y. and Katsuki, M. (1995, 2/14).

Suppression of malignant lymphomas in the p53-deficient mice by the transgenes expressing normal p53 gene product.  
The Third Joint Conference of the National Cancer Institute US/Japan Meeting Maui, Hawaii.

4. 勝木元也 (1995, 3/1).

新しい実験医学.  
日本工業技術協会, 東京.

5. 勝木元也 (1995, 3/25).

早朝セミナー I 個体の遺伝子操作.  
第98回日本小児科学会, 岐阜.

6. 勝木元也 (1995, 3/26).

招待講演新しい実験医学—ヒト型薬理学実験モデル.  
第68回日本薬理学会, 名古屋.

7. 勝木元也 (1995, 5/29).  
トランスジェニックマウスを用いた新しい生体リスク評価システム.  
生体リスク評価の現状と未来—動物モデルから人へ—.  
原爆被爆50周年—日本放射線影響学会・日本環境変異源学会合同シンポジウム, 広島.
8. 勝木元也 (1995, 6/1).  
先端技術の開発 C. 遺伝子ターゲティング.  
東京大学医科学研究所シンポジウム, 東京.
9. 中尾和貴, 勝木元也 (1995, 6/7).  
凍結精子のモデルマウス生産への応用.  
第42回日本実験動物学会総会, 横浜.
10. Yamaguchi,H., Nakamura,K., Nakao,K., Aiba,A. and Katsuki,M. (1995, 8/23-27).  
Analysis of Dopamine D2 receptor mutant mice.  
Mouse Molecular Genetics, Heidelberg.
11. Ise,K., Inoue,T., Nakamura,K., Nakao,K., Aiba,A., Miyoshi,J., Toyoshima,K., Shimizu,S., Ishikawa,T. and Katsuki,M. (1995, 8/23-27).  
H-ras gene is dispensable in normal mouse development.  
Mouse Molecular Genetics, Heidelberg.
12. 時田義人, 別所康全, 榎 正幸, 中村健司, 中尾和貴, 勝木元也, 中西重忠 (1995, 9/15-18).  
受容体欠損大脳皮質神経細胞を用いたグルタミン酸細胞死の機構解析.  
第68回日本生化学大会, 仙台.
13. 塩山善之, 権藤洋一, 中尾和貴, 勝木元也 (1995, 10/3-5).  
HITEC マウスを用いた体細胞突然変異の解析: II. 導入遺伝子 rpsL に生じる塩基変化.  
第54回日本癌学会総会, 京都.
14. 田中秀欣, 中尾和貴, 中村健司, 権藤洋一, 清水誠一郎, 石川隆俊, 勝木元也 (1995, 10/3-5).  
P53遺伝子欠損マウスへの遺伝子導入による胸腺リンパ腫発生の抑制.  
第54回日本癌学会総会, 京都.
15. 古恵良桂子, 中村健司, 中尾和貴, 三好 淳, 豊島久真男, 勝木元也 (1995, 10/3-5).  
標的遺伝子組換えによる N-ras および K-ras 遺伝子欠損マウスの作成.  
第54回日本癌学会総会, 京都.
16. 伊勢和宏, 井上琢哉, 中村健司, 中尾和貴, 三好 淳, 豊島久真男, 清水誠一郎, 石川隆俊, 勝木元也 (1995, 10/3-5).  
H-ras 遺伝子欠損でもマウスは発生, 成長, 生殖する.

- 第54回日本癌学会総会，京都。
17. 谷口俊一郎，中村健司，中尾和貴，宮戸健二，高橋克仁，柴田宣彦，勝木元也  
(1995, 10/3-5).  
カルボニン遺伝子の欠失マウスの作成.  
第54回日本癌学会総会，京都。
18. 勝木元也 (1995, 10/20).  
テクニカルセミナー 2 ジーンターゲッティング法の現状.  
第48回日本細胞生物学会大会，仙台。
19. 勝木元也 (1995, 11/11).  
個体の遺伝子操作とその応用.  
日本農芸学会第20回化学と生物シンポジウム，福岡。
20. 勝木元也 (1995, 12/1).  
教育講演 ジーンターゲッティングによる生体機能の基礎的研究.  
第18回日本血栓止血学会，福岡。
21. 中村健司，井上琢哉，中尾和貴，伊勢和宏，饗場 篤，勝木元也 (1995, 12/6-9).  
H-*ras* 遺伝子欠損細胞の解析.  
第18回日本分子生物学会年会，名古屋。
22. 古恵良桂子，中村健司，中尾和貴，三好 淳，豊島久真男，饗場 篤，勝木元也  
(1995, 12/6-9).  
標的遺伝子組換えによる N-*ras* および K-*ras* 遺伝子欠損マウスの作成.  
第18回日本分子生物学会年会，名古屋。
23. 山口浩雄，中村健司，中尾和貴，饗場 篤，J-S Rhee，石橋 仁，赤池紀扶，坂上洋行，  
後藤 薫，近藤尚武，藤木元也 (1995, 12/6-9).  
D2ドーパミン受容体欠損マウスの解析.  
第18回日本分子生物学会年会，名古屋。
24. 後藤洋一，塩山善之，中尾和貴，横山俊子，藤木元也 (1995, 12/6-9).  
トランスジェニックマウスを用いた体細胞突然変異の解析：メチル化の影響.  
第18回日本分子生物学会年会，名古屋。
25. 伊藤健一，中村健司，中尾和貴，細川 哲，権藤洋一，勝木元也 (1995, 12/6-9).  
二段階相同組換え法を用いた点突然変異マウスの作成.  
第18回日本分子生物学会年会，名古屋。