

## 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、講師 榎藤洋一、助手 中村健司、技官 中尾和貴の4名のスタッフに加え、日本クレア(株)から外丸祐介、石崎宏好、九動(株)から本田正治、鶴井和孝、大塚製薬(株)から高野雅明、谷口吉弘、三共から高市康博が研修員として参加しているもので総勢11名である。助手 笹岡俊邦は、米国に留学中。また研究補助員として、室井佐和子、横山俊子に加え4月から牟田晴美が協力し、ターゲッティングマウス、トランスジェニックマウスが次々誕生している。昨年クリーニングした動物室は、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。

#### a. HSV-tk 遺伝子を標的導入したマウス p53アリルにみられる分離の歪み (榎藤洋一、中村健司、中尾和貴、勝木元也)

二段階相同組換え法を用いて自在に標的遺伝子を置換する方法の開発に成功した。この方法では、1段階目のジーンターゲッティングにおいて、neo 遺伝子と HSV-tk 遺伝子をカセットにして導入し、二段階目は、任意の置換用ターゲッティングベクターとこの neo-tk カセットの置換体を GANC 耐性として選択する。各段階から得られた ES 細胞株の個体への発生能を検討したところ、p53 遺伝子座に、neo-tk カセットを導入した独立な細胞株 3 系統(1 段階目)と lacZ に置換した独立な ES 細胞株 2 系統(二段階目)から、キメラマウスの生殖細胞を通してマウス個体が多数得られた。この集団では、メンデルの法則に従って、野生型と標的型(neo-tk もしくは lacZ)のアリルが半数ずつに分離するはずである。実際、lacZ 置換体 ES 細胞 2 系統から得られたマウスのうち約半数が標的型アリルを持っていた。ところが、neo-tk をもつ ES 細胞由来のマウスを 100 個体以上検討したところ、標的型の neo-tk アリルをもつものは、1 個体も得られなかった。これは、全く予想されなかったヘテロ接合アリルの完全な分離の歪み(meiotic drive)である。neo 遺伝子導入アリルは個体に伝わるのが既に知られているので、原因は HSV-tk 遺伝子にあると思われる。

#### b. 発癌リスク評価系マウスによる体細胞突然変異の測定(榎藤洋一、塩山善之、中尾和貴、勝木元也)

我々は、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。HITECマウスは、全細胞に正常の rpsL 遺伝子をもっている。そこで、これを回収し、ストレプトマ

イシシ耐性 (Sm<sup>R</sup>) の大腸菌にトランスフェクションし、カナマイシン (Km<sup>R</sup>) を選択マーカーとして、プラスミド遺伝子導入大腸菌を選択し、そのうちに存在する Sm<sup>R</sup> 数を数える。正常 rpsL 遺伝子は Sm<sup>R</sup> の性質を優性に運ぶことから、通常の遺伝子導入大腸菌は、Km<sup>R</sup>Sm<sup>R</sup> であるが、rpsL に体細胞突然変異によって変異が導入されていれば、rpsL の Sm<sup>R</sup> の性質は消え、Sm<sup>R</sup> として表われる。

現在、遺伝子を多コピーもつ HIT017 (約350コピー) 系統を中心に、個体に生じる体細胞突然変異のデータを蓄積している。HIT017の脳、脾臓、肝臓について、自然及び化学発がん剤 MNU (N-methyl-N-nitrosourea) の投与による体細胞突然変異率を検討した。また、形質変換された136個の大腸菌コロニーよりプラスミドを回収後、rpsL 遺伝子の塩基配列を決定した。これらの配列と野生型 rpsL 配列とを比較し、その中に生じている塩基配列を検出した。その結果、自然突然変異では、1塩基欠失を主とするフレームシフト変異が41個、塩基変換4個、比較的大きな欠失1個、計46個であるのに対し、MNUを投与したマウスでは、フレームシフト変異59個、塩基置換30個、3塩基欠失1個、計90個であり、とくに塩基置換の中ではG-CからA-T、G-CからT-Aへの変化がほとんどであった。また臓器間での比較を行った結果、他の2臓器に比べ、脳では塩基置換よりもフレームシフト変異が多い傾向にあった。

#### c. ES細胞を用いた新しい遺伝子置換法の開発 (中村健司, 伊藤健一, 中尾和貴, 権藤洋一, 三好 淳, 勝木元也)

我々は、特定の遺伝子を種々の遺伝子に自由に置き換える方法として、2段階のジーンターゲットングからなる遺伝子置換法の開発を行ってきた。この方法は neo および HSV-tk 遺伝子を持つベクターを作成し、第1段階には G418、第2段階には GANC による選択を行い、標的遺伝子を自在に置換するものである。ところが、第1段階で得られるはずのノックアウト型個体が得られなかった。その理由は、HSV-tk 遺伝子をもつ細胞が、子孫に伝達されないためである。しかし、第2段階では目的の子孫が得られた。第1段階で K/O 型の個体が得られればこの方法はより有効になる。そこで、この問題を解決するため、HSV-tk 遺伝子の代わりに Eco-gpt 遺伝子を用いた遺伝子置換を p53 遺伝子および H-ras 遺伝子について行った。Eco-gpt は、第1段階で HPRT<sup>-</sup>の細胞に導入した後、第2段階で目的の遺伝子に置換されると 6-チオグアニン耐性となる。それぞれの遺伝子について第1段階目の K/O 型の個体が得られたので、neo および HSV-tk 遺伝子を用いた従来の遺伝子置換法と比較している。

#### d. 個体形成過程における p53 遺伝子の発現 (中村健司, 権藤洋一, 中尾和貴, 勝木元也)

p53 遺伝子は、がん抑制遺伝子として腫瘍の発生や悪性化に広く関与していると考えられている。一方、正常細胞での機能も注目されはじめた。我々は、p53 遺伝子の正常個体細胞での

機能を解析する目的で、相同組換えを用いた遺伝子置換法により、マウス ES 細胞の p53 遺伝子を第 2 から第 10 エクソンまでの領域で、大腸菌の lacZ 遺伝子に置き換えた突然変異マウスの作成を行った。置換した lacZ 遺伝子の酵素活性を利用して、p53 遺伝子の発現を調べた結果、すべての ES 細胞において強く発現していることが確認された。

さらに、胎児期における p53 遺伝子の発現を解析したところ 7.5 日、9.5 日、11.5 日、13.5 日の各発生段階によって発現に組織及び細胞特異性が認められ、個体形成過程での p53 遺伝子発現の様相が明らかになった。一方、p53 遺伝子をホモ型に欠損したマウスは、正常に生まれてくることから、個体発生において必須ではないと考えられる。しかし、p53 欠損マウスからは、高頻度に個体発がんが認められたので、これらの腫瘍での p53 遺伝子の発現についても lacZ の発現を指標に確認した。

**e. ジーンターゲティングした ES 細胞（中村健司、室井佐和子、高野雅明、牟田晴美、高市康博、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 [NMDA 1 (NR 1), NR 2 A, NR 2 C, mGluR 2, mGluR 6], ドーパミン受容体 D 2 R, H-ras, N-ras, K-ras, セロトニン受容体 5 HTR 1 B, cot, p53, カルボニン,  $\text{IL}2\gamma$ , 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。

**f. キメラマウスの作出（中尾和貴、外丸祐介、石崎宏好、谷口吉弘、鶴井和孝、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ティングされた（e）。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、約 8945 個の胚に注入した。この中から 1984 匹のマウスが誕生し、1061 匹離乳することが出来た。このうちキメラマウスは 446 匹（♀155 ♂291）であった。雄 291 匹中 186 匹が生殖細胞キメラであった。1 産目で生殖細胞キメラと識別できたもの 51.5%，2 産目で生殖細胞キメラと識別できたもの 57.7%，3 産目で生殖細胞キメラと識別できたもの 63.9%，であった。ターゲットされていない細胞ではそれぞれが 50.6%，57.3%，78.7% を示した。

**g. マウス胚の凍結保存（中尾和貴、外丸祐介、石崎宏好、谷口吉弘、鶴井和孝、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。

#### h. 凍結精子のモデルマウス生産への応用（中尾和貴，勝木元也）

遺伝子の機能解析ならびにモデルマウス作出のためにジーンターゲット法が利用されている。その結果、キメラマウスやヘテロ接合体マウスから、大量のホモ接合体マウスを迅速に効率よくかつ計画的に生産することが望まれている。そのため精子凍結保存法や幼若雌マウスの過排卵処理による未受精卵の大量採取などの生殖技術を駆使し、ホモ接合体マウスの効率的な生産方法およびその有用性を検討した。

ジーンターゲット法により得られたヘテロ接合体雄マウスの精巢上体尾部より取り出した精子を中濁の保存液（3% skim milk; 18% raffinose）で液体窒素中に2本に分注して凍結保存し、その後の体外受精に用いた。凍結精子の1本を融解し、過排卵処理したBDF1雌マウスの未受精卵で体外受精し、得られた受精卵を2細胞期胚まで培養した後、一部を移植により産仔まで発生させた。産仔は3週齢で尾の一部をDNA解析用として、サザンブロッティング法によりヘテロ接合体を同定した。これらの雌を幼若時に過排卵処理することで得た多数の未受精卵に、残った凍結精子を融解し、体外受精によって受精させ、2細胞期胚で移植し、ホモ接合体マウスを生産した。またそれぞれの体外受精で得られた2細胞期のうち移植に用いなかったものは、緩慢凍結法により凍結保存し、計画的な生産に用いた。

凍結精子による第一回目の体外受精率は90.7%であり、受精卵の産仔への発生率は54.0%であった。幼若ヘテロ接合体雌マウス18匹を過排卵処理したところ615個（34.2個/匹）の未受精卵が得られた。これを用いた第二回目の体外受精率は76.7%であり、受精卵の産仔への発生率は54.3%であった。また離乳した産仔の遺伝子型は、ホモ接合体17匹・ヘテロ接合体44匹・野生型15匹となりほぼ期待値どおりのホモ接合体マウスを生産できた。以上の結果から成熟した1匹の雄マウスの凍結精子から、多数のホモ接合体術を併用することで、短期間で大量の受精卵を得ることができ、それらを凍結保存することで目的の遺伝子型をもつマウスを計画的に生産することができる。このことからマウス精子の凍結保存技術は、効率的なモデルマウスの生産に留まらず系統保存としてもきわめて有効な技術であることが示された。

#### i. 幼若マウスを利用した遺伝的背景の転換（中尾和貴，外丸祐介，石崎宏好，鶴井和孝，谷口吉弘，勝木元也）

ジーンターゲット法によって、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中である。計画は順調に進行している。

#### j. 実験用マウス胚の供給 (中尾和貴, 外丸祐介, 石崎宏好, 勝木元也)

各研究室で行う実験のために希望の系統, 種類では胚を提供した。

感染防御部門には16回1217個の2 cell胚を提供した。

#### 原著論文

1. Gondo, Y., Nakamura, K., Nakao, K., Sasaoka, T., Ito, K., Kimura, M. and Katsuki, M. 1994.

Gene replacement of the p53 gene with the lacZ gene in mouse embryonic stem cells and mice by using two steps of homologous recombination.

Biochem Biophys Res Commun, 202, 830-837.

#### 総説

1. 勝木元也. 1994.

新春特集 バイオテクノロジーの新潮流: 発生工学—その新しい展開—  
バイオインダストリー, 11, 33-38.

2. 権藤洋一, 池田由美子, 茂手木淑子, 高橋美千江, 竹下 綾, 中尾和貴, 勝木元也. 1994.

トランスジェニックマウスを用いた変異原の高感度解析法の開発.

環境変異原研究, 16, 53-65.

#### 著書

1. 山村研一, 勝木元也, 相沢慎一編. 1994.

マニュアル疾患モデルマウス.

Molecular Medicine (臨時増刊) pp397, 中山書店, 東京.

2. 権藤洋一, 中村健司, 中尾和貴, 勝木元也. 1994.

I. トランスジェニックマウスの基礎と方法論 5-c. 標的遺伝子組換えの新しい戦略—  
自在な標的遺伝子置換法.

山村研一, 勝木元也, 相沢慎一編 Molecular Medicine (臨時増刊) マニュアル疾患モデルマウス pp54-59, 中山書店, 東京.

3. 権藤洋一, 勝木元也. 1994.

Ⅱ. 疾患モデルマウスの実例 18 HITEC マウス: トランスジェニックマウスを用いた体細胞突然変異解析系.

山村研一, 勝木元也, 相沢慎一編 Molecular Medicine (臨時増刊) マニュアル疾患モデルマウス pp343-347, 中山書店, 東京.

## 学会発表

1. Gondo, Y. and Katsuki, M. (1994, 1/25-28)

Hypersensitive *in vivo* test of carcinogenicity: Detection of somatic mutations by using transgenic mice.

The 24th Joint Scientific Conference on Novel Methods to Assess Environmental Mutagens and Carcinogens, US/Japan Cooperative Medical Science Program, Joint Panel of Environmental Mutagenesis and Carcinogenesis, Harriman, New York, U.S.A.

2. 権藤洋一. (1994, 2/3)

発がん性検定のための HITEC マウスの開発.

平成5年度がん特別研究 公開・合同シンポジウム, 東京.

3. 権藤洋一, 中村健司, 中尾和貴, 勝木元也. (1994, 2/15)

二段階相同組換えを用いた標的遺伝子置換と組換え修復.

第11回染色体ワークショップ, 姫恋.

4. 勝木元也. (1994, 5/11-12)

教育講演-遺伝子治療に用いる実験動物の開発.

遺伝子治療シンポジウム, 東京.

5. Gondo, Y. and Katsuki, M. (1994, 5/25-26)

Universal gene replacement by using two-step homologous recombination.

National Cancer Institute US/Japan Meeting, Gene Manipulation in Malignant Cells. Maui Price Hotel, Maui, Hawaii.

6. Katsuki, M. and Gondo, Y. (1994, 6/6-7)

Universal Gene Replacement in Mouse Genome.

Joint Japan-Canada Symposium on Molecular Medicine and Science, Japan Research and Development Corporation and Canadian Genetic Diseases Network, Toronto, Canada.

7. 勝木元也. (1994, 6/7)

新しい実験医学の展開.

宮崎医科大学創立20周年記念学術講演, 宮崎.

8. 塩山善之, 権藤洋一, 勝木元也. (1994, 6/8)  
招待講演—トランスジェニックマウスを用いた遺伝毒性の検定と解析.  
第3回日本毒科学会サテライトシンポジウム, 札幌.
9. 権藤洋一. (1994, 7/15)  
トランスジェニックマウスによる体細胞突然変異の検出と解析.  
第4回原医研学術講演会, 広島.
10. Katsuki, M. (1994, 7/24-29)  
Transgenic animal models for human disease.  
XIIth Int. Congress of Pharmacology, Montreal, Canada.
11. 権藤洋一. (1994, 8/30)  
二段階相同組換え法と遺伝子治療の可能性.  
厚生省特定疾患難病の宿主要因調査研究班公開シンポジウム, 福岡.
12. Gondo, Y., Nakamura, K., Nakao, K., Sasaoka, T., Ito, K., Kimura, M., and Katsuki, M.  
(1994, 8/31-9/4)  
Gene Replacement of the p53 gene with *IacZ* by using two steps of homologous recombination: The expression of the p53 gene during the mouse development.  
Mouse Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., U.S.A.
13. 権藤洋一, 塩山善之, 勝木元也. (1994, 10/8)  
トランスジェニックマウス (HITECマウス) を用いた体細胞突然変異の解析: MNU投与と臓器別体細胞突然変異.  
日本遺伝学会第66回大会, 大阪.
14. 権藤洋一, 勝木元也. (1994, 10/19-21)  
ワークショップ招待講演—トランスジェニックマウスを用いた生体内における体細胞突然変異の検出と解析.  
第53回日本癌学会総会, 名古屋.
15. 塩山善之, 権藤洋一, 中尾和貴, 勝木元也. (1994, 10/19-21)  
HITECマウスを用いた体細胞突然変異の解析: I. 導入遺伝子 *rpsL* に生じる塩基変化.  
第53回日本癌学会総会, 名古屋.
16. 三好 淳, 伊勢和宏, 中村健司, 中尾和貴, 豊島久真男, 勝木元也. (1994, 10/19-21)  
標的遺伝子組換えによる H-ras 遺伝子欠損マウスの作成.  
第53回日本癌学会総会, 名古屋.
17. 中村健司, 権藤洋一, 中尾和貴, 勝木元也. (1994, 10/19-21)  
個体形成過程における p53遺伝子の発現.  
第53回日本癌学会総会, 名古屋.

18. 伊藤健一, 中村健司, 中尾和貴, 権藤洋一, 三好 淳, 勝木元也. (1994, 10/19-21)  
gpt 遺伝子を用いた遺伝子置換法の開発.  
第53回日本癌学会総会, 名古屋.
19. 田中秀欣, 権藤洋一, 中尾和貴, 中村健司, 谷口俊一郎, 勝木元也. (1994, 10/19-21)  
p53遺伝子欠損マウスの悪性リンパ腫発生抑制の試み.  
第53回日本癌学会総会, 名古屋.
20. 細川 哲, 権藤洋一, 中村健司, 中尾和貴, 伊藤健一, 田中秀欣, 勝木元也.  
(1994, 10/19-21)  
マウスp53遺伝子コドン248のヒト型への標的置換.  
第53回日本癌学会総会, 名古屋.
21. 法村俊之, 野本 論, 権藤洋一, 勝木元也. (1994, 10/27-29)  
自爆遺伝子p53欠損マウスの放射線催奇感受性.  
日本放射線影響学会第37回大会, 福岡.
22. 勝木元也. (1994, 11/2)  
哺乳動物での体細胞突然変異系の開発—新しい発癌リスク評価系—  
(財)食品農医薬品安全評価センター第2回学術講演会, 静岡.
23. 権藤洋一, 中村健司, 中尾和貴, 勝木元也. (1994, 12/13-16)  
HSV-tk 遺伝子を標的導入したマウスp53アリルにみられる分離の歪み.  
第17回日本分子生物学会年会, 神戸.
24. 伊勢和宏, 三好 淳, 中村健司, 中尾和貴, 豊島久真男, 勝木元也. (1994, 12/13-16)  
H-ras 遺伝子欠損マウスの作成.  
第17回日本分子生物学会年会, 神戸.
25. 中村健司, 伊藤健一, 中尾和貴, 権藤洋一, 三好 淳, 勝木元也. (1994, 12/13-16)  
ES細胞を用いた新しい遺伝子置換法の開発Ⅳ.  
第17回日本分子生物学会年会, 神戸.
26. 山口浩雄, 中村健司, 中尾和貴, 勝木元也. (1994, 12/13-16)  
D2 ドーパミン受容体欠損マウスの作成.  
第17回日本分子生物学会年会, 神戸.
27. 広常真治, 廣瀬健二, 高原得栄, 日下部守昭, 吉木 淳, 勝木元也, 中尾和貴, 松村正寶,  
VM.Chapman, 林崎良英. (1994, 12/13-16)  
マウス染色体5番におけるリーラー locus 周辺の物理的地図の作成.  
第17回日本分子生物学会年会, 神戸.