

1. 研究概要

「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」(H12年～H13年、第Ⅱ期)

研究代表者：藤本弘一（三義化学生命科学研究所）他 2 機関

研究の概要・目標

1 何を目指している

ゲノム機能解析の研究に必要なミュータントマウスのバンク樹立を視野に入れた基盤技術の確立

第Ⅰ期の目標

- ・胚・配偶子の迅速かつ効率的な凍結保存技術の開発
- ・マウス飽和突然変異体作成技術の開発

第Ⅱ期の目標

- ・胚・配偶子バンク設立のために必要な生殖工学技術のシステム化
- ・ミュータントマウス作成に必要な新規生殖工学技術の開発

2 何を研究している

- (1) 胚・配偶子凍結保存技術の確立
- (2) ミュータントマウス作成のためのより効率的な生殖工学技術の開発

3 何が新しいのか

- ・迅速簡便で安定な胚・配偶子の凍結保存技術とその標準化
- ・ミュータントマウスのバンク設立による研究環境の飛躍的向上化

諸外国の現状等

1 現状

ミュータントマウスの凍結保存事業は、国際的な協調が必要であり、アメリカとヨーロッパで立ち上がり、アメリカ NIH も研究資金投入を計っている。新規生殖工学技術については、ハワイ大学で開発された核移植によるクローンマウス作成方法は画期的とも言えるが、どこの研究室でも行える標準的な技術に至っていない。

2 我が国の水準

精子の凍結保存技術については、我が国で開発されてきた技術をドイツやアメリカへ技術指導した実績があり、国際的な標準技術として進んでいく。また、本課題で標準技術として普及させていく胚凍結保存技術については、迅速簡便な点において、諸外国が踏襲している技術より胚バンク事業に適している。

研究進展・成果がもたらす利点

1 世界との水準の関係

本課題が目指している基盤技術は、生物遺伝資源を国際間で輸送可能にする国際的な標準技術として役立たせるものである。現時点では世界的に見ても高いレベルにあり、普及させていく事が重要な課題である。

2 波及効果

ヒトゲノムの構造解析が完了し、それぞれの遺伝子の機能解析を行う一つの方法として、これらの遺伝子に対するミュータントマウスの作成が進行しつつあるが、膨大な数に上ると予想される。これらのミュータントマウスを胚・配偶子の形で凍結保存して、必要なときにマウスに復元して有効に活用できるような国際的に標準化された胚バンクの確立により、基礎科学研究環境の飛躍的向上のみならず、医療への応用研究など、新産業の創生も含めた波及効果が期待される。

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

外部機関からの寄託による保存
外部研究機関からの供給依頼

技術の標準化

マウス胚バンク業務

(三菱化学生命科学研究所)

データベース化と HP 情報発信

2. (1) 精子形成の
遺伝子操作技術
(三菱化学生命科学研究所)

1. (2) 生殖工学技術によるミュータントマウス
生産技術システム
(東京大学医科学研究所／基礎生物学研究所)

2. (2) 配偶子の操作による
遺伝子改変技術
(三菱化学生命科学研究所)

2. (3) 核移植クローニング技術による
効率的ミュータントマウス作成
(国立感染症研究所)

技術の革新化

(国立感染症研究所)

マウス生産・供給

2. 所要経費一覧

第Ⅰ期

(単位:千円)

研究項目	研究担当機関	研究担当者	所要経費			
			平成9年度	平成10年度	平成11年度	合計
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 峰介	73,421	112,904	112,927	299,252
② ES細胞による遺伝子資源保存技術に関する研究	東京大学医学研究所	中村 健司	29,900	12,317	12,341	54,558
(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	42,870	25,706	25,928	94,504
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) 鮫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鮫和突然変異導入の開発に関する研究	癌研究会癌研究所	八尾 良司	8,839	13,200	13,475	35,514
② ES細胞の分化に関する遺伝子群に対する鮫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	17,387	24,692	24,892	66,971
(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	井ノ口 鑿	36,742	19,270	19,375	75,387
(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	国立感染症研究所	橋本 雄之	9,042	9,200	9,800	28,042
3. 研究運営	三菱化学生命科学研究所	藤本 弘一	33	3,017	3,225	6,275
合 計			218,234	220,306	221,963	660,503

第Ⅱ期

(単位:千円)

研究項目	研究担当機関	研究担当者	所要経費		
			平成12年度	平成13年度	合計
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)凍結保存技術の普及とバンкиング技術に関する研究	三菱化学生命科学研究所	横山 峰介	67,976	59,496	127,472
(2)生殖工学技術によるミュータントマウス生産技術システムに関する研究	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所	勝木 元也	11,092	10,693	21,785
2. 配偶子形成の新規遺伝子操作技術開発に関する研究					
(1)精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	27,437	35,005	62,442
(2)配偶子操作による遺伝子改変技術に関する研究	三菱化学生命科学研究所	東 貞宏	72,031	51,109	123,140
(3)核移植クローニング技術によるミュータントマウス作成に関する研究	厚生省 国立感染症研究所	小倉 淳郎	17,163	30,618	47,781
3. 研究運営	三菱化学生命科学研究所	藤本 弘一	2,322	6,087	8,409
合 計			198,021	193,008	391,029

3. 研究実施計画 <課題全体>

課題名:「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」
(三菱化学生命科学研究所 藤本弘一)

【研究実施計画】

本研究の課題は第一に、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ミュータントマウスの胚・配偶子を凍結保存することを中心とした生殖工学的技術の標準化と、その技術の普及に努める。また、第1期で確立された技術をもとに、外部研究機関からのミュータントマウスの寄託を受け、その胚・配偶子の凍結保存を行うバンキングを進めデータベースの公開を目指していく。第二に、マウス胚バンクに保存される新しいミュータントマウスの作成に必要な配偶子の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・配偶子バンクの確立に向けて基盤を作る。

1. 遺伝子資源保存のための生殖工学技術に関する研究

1. 1. 凍結保存技術の普及とバンキング技術に関する研究

胚・配偶子バンクの確立に資するため、胚・配偶子凍結保存技術の開発・改良とその標準化およびそれらの技術を使ってバンキングを行い、データベースの構築を目指すとともに機能的な運用に必要なノウハウに関する研究を行う。

1. 2. 生殖工学技術によるミュータントマウス生産技術システムに関する研究

ミュータントマウスの胚・配偶子バンクを設立し、その機能的な運用に資するため、遺伝子資源となるミュータントマウスを作成し、その胚および精子の凍結保存を行うために重要な技術基盤となる各種の生殖工学技術を開発し、その実用化に関する研究を行う。

2. 配偶子形成の新規遺伝子操作技術開発に関する研究

2. 1. 精子形成の遺伝子操作技術に関する研究

初期胚の操作が困難な動物への遺伝子操作技術の応用に資するため、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および遺伝子導入法の検討により、新たな遺伝子改変動物作成技術の開発のための基盤研究を行う。

2. 2. 配偶子操作による遺伝子改変技術に関する研究

遺伝子資源の新たな保存法の開発とミュータントマウスの作成の効率化に資るために、配偶子の保存条件を検討し、顕微鏡下のマニピュレーションによる授精(顕微授精)技術を用いて、精子と外来遺伝子の卵子への導入により、新たな遺伝子導入動物の作成法の開発に関する研究を行う。

2. 3. 核移植クローン技術による効率的ミュータントマウス作成に関する研究

効率的にミュータントマウスを作成する技術の確立に資するため、体細胞の細胞周期の同期化と遺伝子導入法の条件等を検討して、体細胞核移植によるクローンマウス個体の作成技術の改良に関する研究を行う。

【研究目標】

ヒトゲノムの全塩基配列構造解析が完了し、それぞれの遺伝子の機能を解析するポストシーケンス研究が急速に進んでいる。この研究を達成するためには、遺伝学的な研究に好適なマウスを利用して、哺乳類に3?4万存在すると推定される遺伝子に突然変異をもつ個体を作り解析していくことが、最も良い方法の一つと考えられている。

ゲノムの改変によるミュータントマウスの作成は、トランスジェニックマウスが1980年、ノックアウトマウスが1989年に初めて報告されて以来、現在までに、トランスジェニックマウスは数が知らないほど多く作られており、ノックアウトマウスも世界的には3,000系統を越えたとみられている。これらの数の増え方は、我が国の研究機関においても著しく、大学の動物実験施設はパンク状態を呈しており、個体で飼育するスペースが不足する状況に至っている。これらのミュータントマウスを各研究機関で飼育維持していくことは不可能であり、折角作成したミュータントマウスの系統を失いかねない。このような遺伝子資源のリスク回避、また、研究者間で遺伝子資源の共有を計って有効に活用するためには、ミュータントマウスの胚または配偶子を凍結保存し集中管理する技術を開発して、マウス胚バンクを確立することが必要である。このことは最近になって、やっとNature誌でも指摘した。

近年、ミュータントマウスをモデル動物として医療や産業に応用する展望を睨んだベンチャー企業が始まりつつあることから、ゲノム機能解析の課題は、基礎研究のみならず、応用研究さらに新産業の創生発展へと繋がりつつあると考えられる。マウス胚バンクの確立は、益々その必要性が急務となってきている。

マウス胚バンクを確立して保存管理体制を運用するためには、単に技術の開発のみならず、技術が標準化されていることと、その技術の普及を呼びかける必要性が指摘される。マウス胚の凍結保存については、すでに使われている技術がいくつがあるが、ミュータントマウス系統を遺伝子資源として共有するためには、安定で迅速簡便な技術を共有することが最も要求される。また、これらの技術に熟練した技術者が養成され、マウス胚バンクを効率的に運用できるセンターが設立されることが必要となる。本研究の主たる課題は、これらの課題の基盤となる研究開発である。

平成9年度の計画発足時点においては、国内のゲノム関連プロジェクトとして、実験動物を使ったウェットな機能解析を考慮して計画されたものがなかったので、幅広い領域を意識して計画を立てた。第Ⅰ期では、「遺伝子資源保存のための生殖工学技術の開発とその技術の標準化および普及」に関する研究と、バンクに保存される新しいミュータントマウス系統の作出に必要な「遺伝子機能の選択的改変技術の開発」に関する研究を行った。そして、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・配偶子バンクの設立に向けての基盤を作ることを目指した。

第Ⅰ期終了時点で、内外の関連状況の進歩を鑑みて見直しを行い、第Ⅱ期計画においては、前者の課題に焦点をおいて、ミュータントマウスの系統を保存し試作バンクの構築とデータベースの公開を目指した。また、マウス胚バンクとしてミュータントマウスの保存をより効率的に行うためには、これまでの技術に加えて、より画期的な新技術の開発が早急に望まれ、新規技術の開発検討にも着手した。クローンマウスの作成技術の応用によりミュータントマウスを迅速かつ効率よく作成できる期待がもたれているが、この技術の確立は、遺伝子資源リソースの保存についても凍結材料の根本的変革につながる可能性を秘めている。また、精子の卵細胞内顕微注入法により人工的に授精・発生を行わせる技術を応用すると、自然交配では子孫を維持することの出来ないミュータントマウス系統の保存や、凍結乾燥精子から個体を作成する技術への展開も期待される。この技術は再現性に乏しいが、リソースの保存と運搬が単純化されるという、現在の凍結保存技術の抱えている難題を格段に解決する可能性がある。

これらの観点を踏まえて、第Ⅱ期では、課題1「遺伝子資源保存のための生殖工学技術に関する研究」と課題2「配偶子形成の新規遺伝子操作技術開発に関する研究」を設定した。

【研究成果の概要】

・第Ⅰ期の概要

本研究の第Ⅰ期においては、迅速安定な簡易ガラス化法による凍結保存技術の確立と、この技術を用いて比類ないバンキング効率の実績を示すことができた。この分野の技術は、技術と人材が一つになって達成されるものであり、これらの技術に習熟した技術者を養成した。平成10年度以後開始されているミュータントマウス作成によるゲノム機能解析を始めとする他のプロジェクトに対しては、遺伝子資源の保存として考えられる「胚バンク構想」の基盤として必要な技術を確立するに至った。また、遺伝子機能の選択的改変技術の開発については、マウスのゲノムに突然変異を導入して、その突然変異が飽和するまでスクリーニングしていく飽和挿入突然変異体作成方法として、ベクターの挿入による遺伝子トラップ法を採用し、遺伝子トラップを大規模に行う上で完成すべき一連のシステムを立ち上げる基盤を確立した。

・課題1を中心として

第Ⅱ期では、第Ⅰ期で確立してきた胚・配偶子凍結保存技術の普及をさらに進め、国内からのリソースの寄託・収集により、バンキングをすすめて試作バンクを作成し、実際の胚バンクの運用に際して生じる問題点を効率的に解決することを中心に検討した。また、リソースの保存、新しいミュータントマウスを作成するための基本技術などを画期的に改革する新規生殖工学技術の導入と開発を図った。

課題1については、十数年来、ミュータントマウスの作成に携わってきた勝木元也教授(現・基礎生物学研究所所長)と横山峯介研究員(三菱化学生命科学研究所)とが開発してきた生殖工学技術そして胚・配偶子の凍結保存技術をもとに発展させてきた。その技術的内容は、国内のいかなる他の研究チームも持たない経験と実績に基づいて計画されたものである。特に、技術の標準化と普及を念頭に置き、マニュアルビデオの作成頒布を行い、積極的に技術講習会を開催した。また、胚の凍結保存に必要な培地類をキット化させることにも成功し、技術の標準化を行った。最終的に、「マウス胚バンク」のホームページを公開し、胚凍結保存による寄託を呼びかけて試作バンクを立ち上げミュータントマウス系統のデータベースの公開を行った。この「マウス胚バンク」の運用を通じて、「胚バンク構想」を具体化するノウハウを蓄積した。

・課題2を中心として

課題2については、第Ⅰ期の雄性生殖細胞を対象とした新規技術開発を担当した課題分担者(三菱化学生命科学研究所、野瀬俊明)の成果は、これまで確立されていない生殖工学技術であり、簡便性・応用性に富む新規技術として期待されたので、第Ⅱ期では、この技術をさらに発展させ確実な技術に展開させた。体細胞核移植をはじめとした新規生殖工学技術の開発については、国際的に技術の進んでいるハワイ大学柳町博士の研究室と交流を持って技術開発を進めている小倉淳郎博士(現・理化学研究所バイオリソースセンター)を課題分担者として加え、海外の動向をいち早く捕らえ、柔軟に対応する体制を作つて進めた。これらの技術は、国際的にも際だった質の高いものに達した成果を産み出すことが出来た。マウスの核移植クローン技術は、世界的に見て、現実にはまだ一部の研究室でしか再現されているに過ぎない。本研究の中で、高いレベルの再現性が確認されるに至ったことは、今後、この分野の技術展開としての可能性を吟味する上で、貴重な成果が得られたと考える。理研バイオリソースセンターには、リソースをより高度なクオリティにて維持供給するため必要な核移植法、顕微授精法など遺伝関連技術開発を行う遺伝工学基盤技術室が設けられ、平成14年2月、本研究において分担課題を担当した小倉教郎博士が室長に着任した。さらに技術革新され、知的基盤の整備に貢献することが期待される。卵細胞内精子注入法(ICSI)の技術改良においては、材料となる卵と精子を凍結保存する技術と併用することにより、効率的にリソースの保存を行うことが可能となった。また、精子の活性に異常のあるミュータントマウスの系統保存においても、効果的な技術として知的基盤整備に寄与できるに至った。さらに、卵子に異常のあるミュータントマウスの系統保存については、卵巣凍結保存の技術が効果的であり、この技術の確立も達成することが出来た。

・総論として

「マウス胚バンク」の構想は、総論としてゲノム科学研究の中から生まれた貴重なミュータントマウスを収集し、そのマウスの胚を凍結保存して情報をデータベース化し、必要に応じて個体に復元し研究者に供与できる「知的基盤」システムを構築するものである。このシステムにより、データベースの検索を介して研究者間でバイオリソースの有効活用を可能にし、ゲノム機能解析の発展に役立てることを目指している。本研究においては、このシステムに必要な技術と運用のノウハウを確立することに寄与してきた。

この構想が我が国の知的基盤として実を結んでいくためには、公的資金によるナショナルバンクセンターの設置が切望されていた。平成10年、熊本大学には動物資源開発センター(CARD)が発足し、平成12年から遺伝子改変マウスの保存、供給および開発を行う拠点として稼働している。この施設における胚・精子の凍結保存技術は、本研究の第Ⅰ期において分担課題に参画した中瀧直己博士が担当している。また、平成13年には、理研・筑波研究所にオールジャパンのバイオリソース支援事業の中核を目指してバイオリソースセンターが設置され、実験動物開発室において、マウス胚の凍結保存業務が進められることになった。平成14年度から、バイオリソースセンターは「ナショナルバイオリソースプロジェクト」の中核機関として機能を開始した。本研究の中核機関となった三菱化学生命科学研究所に開設した「マウス胚バンク」は、「ナショナルバイオリソースプロジェクト」におけるバイオリソースセンターのサブ研究機関として遺伝子操作マウスを中心とした胚の凍結保存・供給業務を継続することになった。本研究において唱えてきた技術の標準化は、我が国のマウスコミュニティーの中に浸透し機能しており、不測の事態によるリソースの喪失などを避けるためにも、分散型保存が確立されつつあると言える。

4. 研究成果公表等の状況<課題全体>

課題名:「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」
 (三菱化学生命科学研究所 藤本弘一)

【研究成果発表等】

		原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	前期	1件	3件	43件	47件
	後期	0件	14件	29件	43件
国外	前期	32件	0件	9件	41件
	後期	16件	2件	1件	19件
合計	前期	33件	3件	52件	88件
	後期	16件	16件	30件	62件

【特許出願等】 前期 2件(国内2件)
 後期 3件(国内3件)

【受賞等】 後期 1件(国内1件)
 ・「日本実験動物学会 安東・田嶋賞」(平成13年5月)
 三菱化学生命科学研究所 横山 峰介

【主要雑誌への研究成果発表】

	Journal	Impact Factor	サブテーマ 1	サブテーマ 2	サブテーマ 3	合計
前 期	Nature Genetics	29.600	1			1
	Genes Dev.	20.880	2			2
	EMBO J.	12.459	1			1
	Hum. Mol. Genet.	9.318	2	1		3
	Blood	9.273		1		1
	Oncogene	6.737	3			3
	Nucleic Acids Res.	6.373		1		1
	J. Neurochem.	4.834		1		1
	Genes Cells	3.826	3			3
	Biol. Reprod.	3.508	1			1
	Gene	3.041		2		2
	BBRC	2.946	3	1		4
	Mol. Reprod. Dev.	2.296		1		1
	Jpn J. Cancer Res.	2.005	1			1
	J. Biochem. Tokyo	1.990		1		1
	Cell. Mol. Biol.	1.625		1		1
	Cytogenet. Cell Genet.	1.271		3		3
	Exp. Anim. Tokyo	0.579	2			2

後 期	Nature Genetics	29.600		2		2
	Nature Science	27.955		1		1
	Immunity	23.329	1	1		2
	EMBO J.	18.866	1			1
	Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	12.459	1			1
	Development	10.896	1			1
	Oncogene	8.624		1		1
	Mech. Dev.	6.737	1			1
	Biol. Reprod.	3.687		1		1
	BBRC	3.508		2		2
	Immunology	2.946		1		1
	Mol. Reprod. Dev.	2.656	1			1
		2.296		1		1
主要雑誌小計		前期	10	10		18
		後期	6	8		13
発表論文合計		前期	19	13		32
		後期	6	10		16