

実験動物開発室

Experimental Animal Division

室長 小幡 裕一
OBATA, Yuichi

当室の運営は、マウスの収集・保存・提供事業と開発事業を2つの柱とする。バイオリソースによる研究基盤の整備は、最終的にはヒトを理解することとヒトへの貢献を視野に入れて進めなければならない。ヒトとの遺伝的な相同性、哺乳類遺伝学研究の長い歴史、モデルを用いる実験医学研究の大きな蓄積、さらには近年の遺伝子操作動物としての発展やクローン動物の開発等から考えて、当対象とするリソースとしてマウスを取り上げる。昨年度からは文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトにおいて当開発室は実験動物（マウス）の中核機関として選定され、マウスリソースの本格的な収集・保存・提供を開始した。

1. マウス系統の収集・保存・提供事業

(1) マウス系統の収集・保存・提供（吉木、池、目加田、平岩、野呂、中田、小幡、小木曾^{*1}、門田^{*1}、小林（め）^{*1}、小島^{*1}、山崎^{*1}、北坂^{*1}、新井^{*1}、小林（亜）^{*1}、宮崎^{*1}、大沼^{*1}、藤本^{*1}、飯村^{*1}、杉山^{*1}、伊藤^{*1}、猪狩^{*1}、高島^{*1}、滝本^{*1}、田中^{*1}、長栄（敦）^{*1}、小高^{*1}、松本^{*1}、野口^{*1}、糸賀^{*1}、藤田^{*1}、長栄（世）^{*1}、柴原^{*1}、山田^{*1}、白坂^{*1}、小貫^{*1}、沼尻^{*1}、大高^{*1}、鈴木^{*1}、富山^{*1}、大久保^{*1}、横田^{*1}、野島^{*1}、濱^{*1}、飯田^{*1}、越山^{*1}、櫻井、阿部^{*1}、村上、宇都野）

マウス系統の収集・提供を行うための和文・英文の生物遺伝資源移転同意書を整備した。昨年度までに国内外の研究機関より収集したマウス系統および実験動物開発室にて開発したマウス系統を既収集系統として維持し、さらに、新規収集系統を内外研究機関より導入し、寄託内約系統も含め多種類の系統収集を行った。これらの系統は近交系、野生由来系統、突然変異系統、遺伝子操作系統を含み、がん、免疫・アレルギー、内分泌疾患、脳・神経疾患、発生・分化異常、感覚器異常のモデルマウスとして有用である。提供に関しては昨年度から継続して増加している。これまでの提供先は国内および海外ともすべて学術機関であった。非学術機関についても提供に関する問い合わせは既に受けており今後ホームページ、学会および学会誌上での広報活動により提供依頼が増加すると見込まれる。系統内訳については全体の約52%を遺伝子操作マウスが占めており、約11%を野生マウス由来系統が占めていた。

(2) マウス系統の清浄化操作（平岩、池、小幡、田中^{*1}、山崎^{*1}、小島^{*1}、高島^{*1}、杉山^{*1}、小木曾^{*1}、宮崎^{*1}、小林（亜）^{*1}、村上；持田（BRC 遺伝工学基盤技術室））

生体で導入した寄託マウス系統についてはすべて清浄化の対象として、体外受精と胚移植、または、帝王切開による清浄化操作を施してバリア内 SPF 飼育室への導入を行った。寄託系統を、受入れ時微生物検査結果に基づいて陰圧または陽圧バイオバブル飼育装置に導入して清浄化に備え

た繁殖を行い、十分な個体数の確保された系統より順次清浄化操作を実施した。

(3) マウス胚および精子の凍結保存（平岩、小幡、小木曾^{*1}、宮崎^{*1}、小林（亜）^{*1}；持田（BRC 遺伝工学基盤技術室））

凍結胚による寄託分と合わせて生体維持系統から作成した胚についても凍結胚として保存した。精子についてはストローにて凍結保存を行い、寄託系統の半数以上を凍結胚・精子として保存した。凍結胚のうち65系統について融解後の形態的正常率は72%（平均）であった。B6 由来系統（14系統）の凍結精子を用いた体外受精では平均54%（26～75%）の受精率が得られた。

(4) マウス系統の品質検査

(i) 微生物検査（池、小幡、小島^{*1}、村上）

本年度は、寄託マウスの微生物検査として、重要感染症8項目の血清検査を行った。汚染状況に応じて清浄化用一時飼育施設に分別収容した。清浄化後、主要18項目あるいは21項目を対象に微生物検査を実施し、清浄化を確認してバリア内 SPF 飼育室に導入した。系統維持を行っている飼育室の各ラックにおとり動物を準備し、上記の項目の定期的な微生物検査を実施した。さらに、施設環境検査として、落下菌、付着菌検査を定期的に実施した。

(ii) 遺伝的検査（野呂、小幡、北坂^{*1}、宇都野、新井^{*1}、大沼^{*1}）

生化学的標識遺伝子を対象に、標準15項目の遺伝的検査を実施した。遺伝子改変マウスはPCR法により遺伝子検査を実施した。マイクロサテライト96マーカーによる系統バックグラウンド検査システムを構築し、28系統について標準サイズ表を作製した。また、コンジェニック系統作製検査などのために、2系統ずつ15種類の組み合わせについて、80～96マーカーによる検査システムを構築した。

(iii) 染色体検査（目加田、小幡）

マウス系統の染色体核型検査を行うために染色体解析技術を導入した。解析方法は染色体分染法およびFISH法を用いた。染色体変異マウス系統の変異核型検査および遺伝子導入系統の導入遺伝子の染色体マッピングを行った。

(5) 系統情報の収集と提供（中田、目加田、吉木、平岩、小幡、越山^{*1}、櫻井）

発表された論文や報告書、各機関の公開データをもとに収集・保存系統に関する系統特性情報を整備した。提供マウスへのデータ添付およびホームページによるデータ公開を行った。寄託および提供に必要な書式についてはホームページよりダウンロード可能とした。カルタヘナ議定書の締約により、平成16年2月19日から「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」が施行となり、リソース収集・提供時の組換え体に関する

正確な情報添付について特に注意が必要となった。この点に関する情報を利用者に周知するためにホームページおよびカタログの改定を行った。

2. 開発事業

当室では、収集・保存・分譲事業に密接に関連し、その事業に役立つ技術の開発を行う。本年度は以下の技術開発を行った。

(1) 新規マウスリソースとその技術開発 (吉木, 池, 目加田, 平岩, 野呂, 中田, 小幡, 小木曾^{*1}, 門田^{*1}, 小林(め)^{*1}, 小島^{*1}, 山崎^{*1}, 北坂^{*1}, 新井^{*1}, 小林(亜)^{*1}, 宮崎^{*1}, 大沼^{*1}, 藤本^{*1}, 飯村^{*1})

(i) 遺伝的に均一なマウス系統の開発

変異形質を示すマウスの近交系化ならびに変異遺伝子の遺伝的背景の異なる系統への導入 (コンジェニック化) を行った。

(2) 品質管理技術および系統特性データベースの開発

(i) 病理学的・生理学的特性データベースの開発 (吉木, 目加田, 小幡, 村上, 新井^{*1}, 山崎^{*1})

本年度は、マウス系統個体のマクロ写真の整備を行った。さらに、病理組織学的解析として近交系および突然変異系統の病理組織標本の作成を行った。

(ii) 微量検体を用いての迅速微生物検査方法の開発 (池, 小幡, 小島^{*1}, 村上)

微生物検査の微量化・迅速化を目的に、実験動物中央研究所・動物衛生研究所などとの情報交換を進め、各種検査条件を調査・収集し、対照コントロールを用意し、また検体の各種処理についての条件をまとめるなど開発準備を進めた。

(iii) 分子プロファイリングデータベースの開発 (野呂, 小幡, 北坂^{*1}, 宇都野, 後藤^{*2})

RAPD 法というゲノム増幅法を用い、系統差を調べるシステムを開発した。

^{*1} 業務委託, ^{*2} 研修生

Experimental Animal Division has two missions; one is to collect, maintain and distribute high quality animal resources, and the other is to develop novel technologies and animal models useful for biomedical research. Our ultimate goal is to facilitate scientific research on human being and contribute to the human welfare, and basic biological sciences. Based on the needs from scientific community, our division focuses on the mouse as the most important resource among the experimental animals. Since 2002 fiscal year, Experimental Animal Division of RIKEN BRC has been selected as a core center for experimental animal (mouse) by National BioResource Project operated by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT).

1. Bioresource program

(1) Collection, maintenance, and distribution of the mouse strains

The Materials Transfer Agreement was prepared both in Japanese and English for collection and distribution of the mouse strains. Over 400 new strains were added or promised to be deposited in this fiscal year from universi-

ties and research institutes in Japan and overseas. In addition to the mouse strains that had been maintained in our center, various kinds of strains have been now collected and maintained. These mice include inbred, wild mouse-derived, mutant, and genetically engineered strains that are useful model mouse for the study on cancer, immunity and allergy, endocrine disease, brain and neurological disorder, development and differentiation abnormality, and sensory organ abnormality. Mouse strains have been distributed to users. The distributions have been only to academic institutions both for domestic and abroad so far. We also had some queries from non-academic institutions. Hopefully, advertisement through web site, scientific meetings or journals will enhance distribution. Of these distributions, 52% were genetically engineered strains and 11% were wild mouse-derived strains.

(2) Clean up of mouse strains

All strains were tested for infection of 8 dangerous microorganisms. Based on the results of microbiological testing, mice were transferred into the Bio-bubble housing facilities either in negative or positive pressure, and bred until appropriate number of mice were accumulated to produce specific pathogen free animals by *in vitro* fertilization and embryo transfer or Cesarean section.

(3) Cryopreservation of mouse embryos and spermatozoa

Cryopreservation of mouse embryos was carried out for strains collected from 2002 to 2003 including the strains which were collected as frozen embryos. The spermatozoa of the strains were also cryopreserved in straws. After thawing, 72% of cryopreserved embryos in 65 strains were morphologically normal. And the mean fertilization rate *in vitro* with cryopreserved sperm was 54% (26-75%) in 14 strains of C57BL/6 background.

(4) Quality control of the mouse resources

(i) Microbiological monitoring

After cleaning up, the periodic microorganism tests for major 18 or 21 items were carried out for the individual racks in the housing facilities by using sentinel mice. Pathogen-free mice were transferred into the SPF breeding room in the barrier. Microbiological environment of our facility was also monitored periodically for bacteria and fungi.

(ii) Genetic monitoring

In order to make a genetic profiling of strains in this center, we performed biochemical tests for 15 standard markers. For the genetically engineered strains, PCR genotyping tests were performed. We have developed a new system for strain characterization by using microsatellite marker PCR. We have developed a microsatellite marker panel for 28 inbred strains. For congenic and recombinant strains, we made 15 combinations of 80-96 marker set for 6 inbred strains.

(iii) Karyotyping and chromosomal mapping

For the surveillance of the variation of mice strains with chromosomal aberrations in RIKEN BRC, we analyzed the karyotype by several banding methods. Chromosome preparations were made from spleen cell cultures. The survey of the transgene integration sites in the transgenic mice strains in RIKEN BRC were also examined by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

(5) Collection and distribution of associated information

Information on the mouse strains and relevant literatures were collected from the public databases of other institutes and facilities. These data were attached to the mice at the time of distribution and were made available

to the public through web page. Document for deposition and distribution including the Materials Transfer Agreement can be downloaded from web page.

2. Development program

The technology necessary for the promotion of especially collection, preservation, and distribution of the mouse strains, was developed as follows in this fiscal year:

(1) Development of novel mouse resources and relevant technologies

The development of the genetically uniform mouse strain: Establishment of inbred mutant strains by extensive inbreeding, and introduction of mutant gene into the inbred strains by back crossing (congenic strain).

(2) Development of strain characteristics database

In order to achieve high quality genetic control, the following databases were developed:

(i) Development of patho-physiology database

We collected photographic images of coat colors of mouse strains in our facility. Histopathological sections were also prepared from various inbred and mutant strains for microscopic images.

(ii) Development of fast screening methods using small amount of test samples

In order to develop the fast screening methods for survey of the specific infectious microorganisms in mice, we started information exchange with the Central Institute of Experimental Animal (Kawasaki, Japan). We tested several methods for various materials and positive controls, and determined appropriate treatment conditions for clinical samples.

(iii) Development of molecular profiling database

We developed the system for strain characterization by using RAPD analysis of genome.

Research and Development Subjects and Members of Experimental Animal Division

1. Collection, maintenance, and distribution of mouse resources
2. Development of new mouse models and technologies
3. Construction of strain characteristics database for genetic quality control

Head

Dr. Yuichi OBATA

Members

Dr. Fumio IKE
Dr. Atsushi YOSHIKI
Ms. Noriko HIRAIWA
Dr. Chikako YOSHIDA-NORO
Dr. Hatsumi NAKATA
Dr. Kazuyuki MEKADA
Ms. Ayumi MURAKAMI^{*1}
Ms. Maria Manami UTSUNO^{*1}
Ms. Norie SAKURAI^{*2}

^{*1} BioResource Technical Staff

^{*2} Assistant

in collaboration with

Mr. Keiji MOCHIDA (Bioresource Engineering Div., BRC)

Visiting Members

Ms. Hitomi ABE (Science Service, Inc.)
Ms. Fujimi ARAI (Science Service, Inc.)
Mr. Atsushi CHOEI (Science Service, Inc.)
Ms. Sei CHOEI (Tokyo Business Service)
Ms. Yuko FUJIMOTO (Science Service, Inc.)
Mr. Tadashi FUJITA (Tokyo Business Service)
Mr. Daiki HAMA (Tokyo Business Service)
Mr. Hitoshi IGARI (Science Service, Inc.)
Mr. Tomoyasu IIDA (Science Service, Inc.)
Ms. Kumiko IIMURA (Science Service, Inc.)
Ms. Yuko ITO (Science Service, Inc.)
Mr. Hideo ITOGA (Tokyo Business Service)
Ms. Masayo KADOTA (Science Service, Inc.)
Ms. Yukiko KITASAKA (Science Service, Inc.)
Ms. Akiko KOBAYASHI (Science Service, Inc.)
Ms. Megumi KOBAYASHI (Science Service, Inc.)
Mr. Ryuji KODAKA (Science Service, Inc.)
Ms. Aya KOGISO (Science Service, Inc.)
Ms. Reiko KOJIMA (Science Service, Inc.)
Ms. Akemi KOSHIYAMA (Science Service, Inc.)
Mr. Ichiro MATSUMOTO (Tokyo Business Service)
Ms. Fumie MIYAZAKI (Science Service, Inc.)
Ms. Noriko NOGUCHI (Tokyo Business Service)
Mr. Yuji NOJIMA (Tokyo Business Service)
Mr. Hiroyuki NUMAJIRI (Tokyo Business Service)
Mr. Tomohiro OKUBO (Tokyo Business Service)
Mr. Katsuya ONUKI (Tokyo Business Service)
Mr. Masaru ONUMA (Science Service, Inc.)
Mr. Naoki OTAKA (Tokyo Business Service)
Dr. Shinji SASAKI (Saitama Med. Sch.)
Ms. Masako SHIBAHARA (Tokyo Business Service)
Ms. Noriko SHIRASAKA (Tokyo Business Service)
Mr. Masashi SUGIYAMA (Science Service, Inc.)
Ms. Mieko SUZUKI (Tokyo Business Service)
Ms. Rika TAKASHIMA (Science Service, Inc.)
Mr. Hideto TAKIMOTO (Science Service, Inc.)
Ms. Chihiro TANAKA (Science Service, Inc.)
Ms. Keiko TOMIYAMA (Tokyo Business Service)
Ms. Chieko YAMADA (Tokyo Business Service)
Ms. Kyoko YAMAZAKI (Science Service, Inc.)
Mr. Yasuhiro YOKOTA (Tokyo Business Service)
Dr. Noriyuki YOSHIDA (Saitama Med. Sch.)

Trainees

Ms. Naoko GOTO (Gene Exper. Cen., Univ. Tsukuba)
Ms. Chihiro AKIMOTO (Grad. Sch. Agric. Life. Sci., Univ. Tokyo)
Dr. Shuji TAKABAYASHI (Inst. Exper. Anim., Hamamatsu Univ. Sch. Med.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文

- Carninci P., Waki K., Shiraki T., Konno H., Shibata K., Ito M., Aizawa K., Arakawa T., Ishii Y., Sasaki D., Bono H., Kondo S., Sugahara Y., Saito R., Osato N., Fukuda S., Sato K., Watahiki A., Kishikawa T., Nakamura M., Shibata Y., Yasunishi A., Kikuchi N., Yoshiki A., Kusakabe M., Gustincich S., Beisel K., Pavan W., Aidinis V., Nakagawa A., Held W. A., Iwata H., Kono T., Nakauchi H., Lyons P., Wells C., Hume D. A., Fagioli M., Hensch T. K., Brinkmeier M., Camper S., Hirota J., Mombaerts P., Muramatsu M., Okazaki Y., Kawai J., and Hayashizaki Y.: "Targeting a complex transcriptome: The construction of the mouse full-length cDNA encyclopedia", *Genome Res.* **13**, 1273–1289 (2003). *
- Song J., Ugai H., Nakata-Tsutsui H., Kishikawa S., Suzuki E., Murata T., and Yokoyama K.: "Transcriptional regulation by zinc-finger proteins Sp1 and MAZ involves interactions with the same *cis*-elements (Review)", *Int. J. Mol. Med.* **31**, 547–553 (2003). *
- Adachi H., Katsuno M., Minamiyama M., Sang C., Pagoulatos G., Angelidis C., Kusakabe M., Yoshiki A., Kobayashi Y., Doyu M., and Sobue G.: "Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein", *J. Neurosci.* **23**, 2203–2211 (2003). *

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国内会議)

- 後藤菜穂子, 鈴木實, 野呂 (吉田) 知加子, 森脇和郎, 小幡裕一, 宮崎均, 鈴木明身: "マウス系統差糖脂質プロファイリング", 第 75 回日本生化学会大会, 京都, 10 月 (2002).
- 伊藤恵実, 田中耕一, 富永晃生, 御石浩三, 飯田順子, 後藤菜穂子, 伊藤幸成, 鈴木實, 鈴木明身: "MALDI-QIT-TOF 質量分析による糖脂質及び糖ペプチドの構造解析", 第 51 回日本質量分析総合討論会, 筑波, 5 月 (2003).
- 小木曾彩, 持田慶司, 平岩典子, 宮崎史恵, 小林亜希子, 山崎京子, 新井富士美, 吉木淳, 小倉淳郎, 小幡裕一: "マウス精子の運動性と体外受精成績との関連性の検討", 第 50 回日本実験動物学会総会, さいたま, 5 月 (2003).
- 越後貴成美, 持田慶司, 井上貴美子, 三木洋美, 吉木淳, 小幡裕一, 森脇和郎, 小倉淳郎: "繁殖困難な遺伝子改変マウス維持への顕微授精技術の利用", 第 50 回日本実験動物学会総会, さいたま, 5 月 (2003).
- 小林亜希子, 持田慶司, 平岩典子, 小木曾彩, 宮崎史恵, 友清雅世, 小林めぐみ, 吉木淳, 小倉淳郎, 小幡裕一: "理研バイオリソースセンターにおけるマウスの体外受精成績について", 第 50 回日本実験動物学会総会, さいたま, 5 月 (2003).

- 宮崎史恵, 持田慶司, 平岩典子, 小木曾彩, 小林亜希子, 山崎京子, 吉木淳, 小倉淳郎, 小幡裕一: "理研バイオリソースセンターにおけるマウス胚の凍結保存成績について", 第 50 回日本実験動物学会総会, さいたま, 5 月 (2003).
- 北坂幸子, 野呂 (吉田) 知加子, 宇都野マリア 真奈美, 小幡裕一, 森脇和郎: "理研バイオリソースセンターにおける遺伝的品質管理技術開発: RAPD 法によるマウス近交系統間および系統内のゲノム変異解析", 第 50 回日本実験動物学会総会, さいたま, 5 月 (2003).
- 平岩典子, 持田慶司, 池郁生, 吉木淳, 小木曾彩, 小林亜希子, 宮崎史恵, 田中ちひろ, 中田 - 筒井初美, 野呂 (吉田) 知加子, 小倉淳郎, 小幡裕一: "理研バイオリソースセンターにおける寄託マウスの受け入れと SPF 化について", 第 50 回日本実験動物学会総会, さいたま, 5 月 (2003).
- 吉木淳, 中田 - 筒井初美, 門田雅世, 小林めぐみ, 大塚隆博, 池郁生, 平岩典子, 野呂 (吉田) 知加子, 目加田和之, 持田慶司, 小幡裕一, 森脇和郎: "理研バイオリソースセンターにおける実験動物 (マウス) の収集保存提供体制について", 第 50 回日本実験動物学会総会, さいたま, 5 月 (2003).
- 野呂 (吉田) 知加子, 後藤菜穂子, 大場美奈子, 渥美忠男: "ES 細胞・幹細胞の全能性・多能性を決めるマウス遺伝子群の網羅的探索 2", 日本発生生物学会第 36 回大会, 札幌, 6 月 (2003).
- 渥美忠男, 大場美奈子, 野呂 (吉田) 知加子, 井川洋二, 天沼宏: "マウス EC 細胞より得られた体細胞型万能細胞", 日本発生生物学会第 36 回大会, 札幌, 6 月 (2003).
- 大場美奈子, 野呂 (吉田) 知加子, 友岡康弘, 渥美忠男: "神経幹細胞の自己複製と分化の制御", 日本発生生物学会第 36 回大会, 札幌, 6 月 (2003).
- 横田秀夫, 中村佐紀子, 吉木淳, 牧野内昭武, 姫野龍太郎: "マウス体内における標的遺伝子の三次元発現パターン解析手法の開発", 第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会, 横浜, 10 月 (2003).
- 鈴木康弘, 小見悠介, 芦野洋美, 吉木淳, 山下潤, Eichmann A., 小嶋聡一: "レチノイドによる Angiopoietin-2 遺伝子の発現促進を介する血管形成抑制", 第 26 回日本血栓止血学会学術集会, 東京, 11 月 (2003).
- 渥美忠男, 今道慎也, 後藤菜穂子, 大場美奈子, 安西弘子, 天沼宏, 井川洋二, 野呂 (吉田) 知加子: "ES 細胞由来の造血幹細胞株 A-6 の遺伝子発現パターンの解析", 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).
- 野呂 (吉田) 知加子, 後藤菜穂子, 大場美奈子, 渥美忠男: "ES 細胞・幹細胞の全能性・多能性と細胞間相互作用", 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).
- 鈴木康弘, 小見悠介, 吉木淳, 山下潤, 小嶋聡一: "アンジオポエチン-2 による血管リモデリング阻害はレチノイドにより誘導される", 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).
- 後藤菜穂子, 北坂幸子, 宇都野マリア 真奈美, 宮崎均, 森脇和郎, 小幡裕一, 野呂 (吉田) 知加子: "バイオリソース遺伝的品質管理のためのマウス系統分子プロファイリングデータベース開発 2: 遺伝子発現の系統差解析", 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).