

# 岡山大学において遺伝子組換え動物を 使用するための初心者向けガイド※

動物実験委員会副委員長  
岡山大学自然生命科学研究支援センター  
動物資源部門 教授 樺木 勝巳

2018.6.1暫定第一版

※なるべく簡便な表記にしていますので、この資料に記載の遺伝子組み換え生物等に関するルールは正式のものではないとご理解ください。特に、遺伝子組み換え生物等に関する詳細は、ゲノムプロテオーム情報解析部門または岡山大学組換えDNA安全管理委員会にお問い合わせください。

## はじめに

現在の本学の動物実験計画の審査では、動物実験に関わる各種法令の遵守状況の最終確認を実施していますが、特に、遺伝子組換えDNA計画書の内容との照合に関して不都合がきたしています。具体的には申請者が用いている実験動物の名称に統一性がなく、○○○KOマウスと記載されている○○○の部分タンパク質名の時があります。また、○○○KOマウスと記述されている動物が単なるKOマウスなのか？コンディショナルKOマウスのかを示しているのかでさえ、一見で判定できません。そのために非常に読み難い本学の組換えDNA実験安全計画書を読み返さなければならぬ事態に陥っています。特に、コンディショナルKOマウスの作出の**交配計画**やコンジェニック動物の作出の**交配計画**においては、コメントを返すために必要以上に内容把握に時間がかかっている状況にあります。そこで本学では動物実験計画書の動物種等の欄の一般名に国際命名規約に準じた名称（実験動物供給業者や国際データベースで採用）を追記していただくことをお願いすることにいたしました。これにより動物実験委員会が各種データベースを使って使用する実験動物の特性把握が容易になり審査スピード向上の一助となります。よろしく、ご協力のほどお願いいたします。

## 遺伝子組換え動物実験で用いられる用語の意義

核酸	一般的にヌクレオチド単体（デオキシリボ核酸）も示すが、ここでは <b>ポリヌクレオチド</b> のこと。
供与核酸	遺伝子の塩基配列を有する核酸で、生物に移入しようとしているもの。
同定済核酸	遺伝子の塩基配列に基づき、当該核酸からの生成物（RNAや蛋白質のこと）の機能が既知のもの。
核酸供与体	ベクター以外の供与核酸の由来生物のこと 例) GFPならばオワンクラゲのこと
宿主	供与核酸が移入される動物のこと 例) Tgマウスの作出実験ならば、マウスのこと
ベクター	移入された宿主内で当該組換え核酸の全部又は一部を複製させるもの。特にウイルスベクター使用時は、実験実施箇所が感染実験専用の区域に限定される <sup>※1</sup> 。 <sup>※1</sup> 岡山大学研究用病原体等安全管理規則による。

※わかりやすく説明するために省略しているので、最終的には二種省令で確認してください。

## カルタヘナ法による規制の対象

### 核酸を移転し又は複製する能力のある生物（LMO）が対象

LMOとなりうる対象は、主務省令で定めるもの及びウイルス、ウイロイドのことである。

主務省令による生物の定義

第一条 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（以下「法」という。）第二条第一項の主務省令で定める一の細胞（細胞群を構成しているものを除く。）又は細胞群（以下「細胞等」という。）は、次に掲げるもの**以外**のものとする。

一 ヒトの細胞等

二 分化する能力を有する、又は分化した細胞等（個体及び配偶子を除く。）であって、自然条件において個体に**成育しないもの**

**げっ、二重否定だ！わかりにくい！**

ようするに以下の区分

規制されない対象

ヒト及びヒトの細胞、配偶子、胚  
哺乳動物の培養細胞、組織（配偶子と胚は除く）

規制の対象

ウイルスやウイロイド  
酵母、細菌や原虫といった細胞  
複数の細胞（哺乳動物等）からなる個体動物等の配偶子や胚

## Living Modified Organisms (LMO) とは

LMOとは、細胞外において**核酸を加工する技術**あるいは異なる科に属する生物の**細胞を融合する技術**により得られた核酸またはその複製物を有する**生物**のこと

### 【規制の対象外となる実験】

動物個体の体細胞（**法的に生物ではない**）に複製しないDNAを直接注入して、DNA機能を一過性に発現させる実験

遺伝子組換え動物から取り出した体細胞（**法的に生物ではない**）を用いた実験

※ES細胞（**法的に生物ではない**）は規制の対象外だが、配偶子及び胚仔は規制対象である。

ただし、このようにして作製した**細胞を動物に移植した場合は動物作成実験**に該当するので規制の対象となる。当然、遺伝子組換え動物（**法的に生物と定義**）から細胞を取り出す行為やウイルスベクター（**法的に生物と定義**）を用いてES細胞で遺伝子を破壊する実験は規制の対象である。

### 動物実験委員会が

#### 把握したいのは、ベクターの種類と核酸供与体※1

カルタヘナ法では、**宿主、ベクター及び核酸供与体の特性**から執るべき拡散防止措置を定められており、拡散防止措置のグレードは以下の目安に従う。委員会としてはできるだけ組換えDNA実験安全計画書を読み返さなくても把握できるようにしたい。

病原性が**ない**もの※1 → **クラス1 (P1A)**

病原性が**低い**もの → **クラス2 (P2A)**

病原性が**高く、かつ、伝播性が低い**もの → **クラス3 (P3A)**

病原性が**高く、かつ、伝播性が高い**もの → **クラス4**

（※クラス4については国内で稼働している設備は平成30年4月1日現在存在しません。）

すなわち、**※1病原性の有無や伝播性の高低に関わらず**、組換え生物等の拡散は常に防止しなければならない。

文部科学大臣が定め**ない**もの→『大臣確認実験』。クラス1相当と推測されても定め**ない**ものすべてが対象

※1動物作成実験では、宿主＝実験動物なので通常は病原性のないクラス1になる。

※上記の分類には、例外が存在するので二種省令を確認すること。

## ミュータント系における命名のルール

### 命名法の原則（全てに通じる原則的な様式）

【遺伝子受容動物（宿主）の系統名】－（ハイフン）遺伝子表現型（イタリック）  
または、－（ハイフン）遺伝子記号（イタリック）

プラスで遺伝子表現型（or 遺伝子の修飾内容）を上付きイタリックで追加。

例えば、遺伝子組換え技術が一般化する前の突然変異型のミュータント系では、

(1) B細胞・T細胞機能欠如マウスC.B-17-*scid/scid*（いわゆるscidマウスのこと）は、変異遺伝子が*Prkdc*と判明しているのでCB17-*Prkdc<sup>scid</sup>*と表記される場合がある。いずれも【遺伝子受容動物（宿主）の系統名】に引き続きハイフンを用いて導入した遺伝子の表現型または遺伝子記号で示されている。前者は遺伝子型（ホモ接合体／ヘテロ接合体）も示し、後者は遺伝子の変異内容を示す。仮に、後者の表記をあえて遺伝子型も示す場合、これを表示するルールはないが、表記するならばCB17-*Prkdc<sup>scid</sup>*-*scid/scid*として欲しい。

(2) 本学農学部の国枝哲夫教授が理研バイオリソースセンターに寄託しているreproシリーズ変異マウスの一つであるrepro22マウスは、C3B6-*Mad21<sup>repro22</sup>*とデータベース上で登録されており、表記だけでC57BL/6とC3Hの混合背景マウスでMAD2 mitotic arrest deficient-like 2遺伝子のミュータント系であることがわかる。さらに当該データベース検索でどのように作られたかといった詳細情報にアクセスすることが可能になっている。

## トランスジェニックマウスの命名法

遺伝子組換え技術が一般化されはじめたころに開発されたトランスジーンが発現を強要する古典的なトランスジェニックマウス命名は、ミュータント系の命名の法則は原則に従うが、遺伝子（供与核酸）の略号の前に“Tg”という記号を追加し、導入しようとする遺伝子がランダムに挿入されているということを明示します。

【遺伝子受容動物（宿主）の系統名】－（ハイフン）Tg（遺伝子記号（イタリック））

(3) B6-Tg(*hCD8*)

ヒト*CD8*遺伝子を含むトランスジーンをもったC57BL/6Jマウスの意で、ヒトの*CD8*遺伝子のoverexpressionが見られる。

(4) B6-Tg(*Wnt1-LacZ*)

*Wnt1*プロモーター（エンハンサー）を付けた*LacZ*トランスジーンを持つC57BL/6Jマウスのこと。すなわち、遺伝子略号間のハイフンは遺伝子カセットの並び順を示す。

(5) B6.Cg-Tg(*Tyr-cre/ERT2*)<sup>13Bos/J</sup>

遺伝子略号間のスラッシュは遺伝子カセットが連続して繋がった融合タンパク質Cre ERT<sup>2</sup>に翻訳されることを意味する。*Tyr*はハイフンで*cre/ERT2*連結されているので、この融合タンパク質遺伝子の発現はチロシナーゼのプロモーター／エンハンサーでコントロールされるということを示す。上付きの数字は作成ラボで付けられた番号＋作成ラボの略号です。

## トランスジェニックマウスのバリエーション区分例

(6) Vaspin (Serpina12) 遺伝子のトランスジェニックマウス

医歯薬学総合研究科の和田 淳教授らのグループは

C57BL/6-Tg(*Fabp4-Serpina12*)1, C57BL/6-Tg(*Fabp4-Serpina12*)10, C57BL/6-Tg(*Fabp4-Serpina12*)58  
の三つのトランスジェニックマウスを理研バイオリソースセンターに寄託しています。

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・和田 淳、東京大学医科学研究所・岩倉洋一郎 (2005)

付番は作成順だと想像でき、導入遺伝子のコピー数等が異なったラインである可能性がある。名称からはそれらの情報は読み取れないが、異なったラインということだけは名称だけでわかります。ラインの種類等を問題にしない動物実験計画において動物実験委員会はこの情報を無視して審査を行うので、付番のようなラインを区分する記述を省いてもかまいません。

当該のトランスジェニックマウスは、C57BL/6J背景でfatty acid binding protein 4のAP2プロモーター制御下でVaspin(Serpina12)を発現するということが名称から読み取れます。さらに、データベースからはその他の供与核酸としては、rabbit beta-globin intron とhuman Growth hormone polyAが導入されていることが示されています。しかし、これら供与核酸はこのTg動物を用いた動物実験の結果に影響を与えないのでわざわざ表記しません。もちろんこれらの情報は本学の組換えDNA実験安全計画書からも読み取ることは可能です。

できれば最終確認以外では二つの計画書の内容を突き合わせる作業の手間を省きたいと思っています(組換えDNA実験安全計画書の閲覧が動物実験計画の審査の手間を増やしているのです)。

## ノックアウトマウスの命名法

【遺伝子受容動物(宿主)の系統名】 - (ハイフン) ノックアウトした遺伝子略号 (イタリック) **tm**  
(N) (導入した遺伝子の略号) 作成ラボの略号 (上付きイタリック)

※tm=target mutationの略号をノックアウトした遺伝子略号に上付きイタリックで表示する。

(7) 129-*Col4a6*<sup>tm1</sup>

医歯薬学総合研究科の大橋 俊孝教授らのグループが熊本大学に寄託している*Col4a6*のノックアウトマウス。通常、ネオマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子を供与核酸として、遺伝子の配列中にインサートされています。このノックアウトマウスを用いた動物実験においてこれら薬剤耐性遺伝子はその機能が実験に影響を示しませんので、導入した遺伝子としての略号を明示しません。

(8) B6;129SvJ-*Hapln4*<sup>tm1</sup>

大橋 俊孝教授らのグループが熊本大学に寄託している*Hapln4* (=Bra2) のノックアウトマウスです。先頭のB6はC57BL/6の略号で、129sv1由来のES細胞を使って標的破壊し、C57BL/6をホストとしているが、セミコロんで区分されているので二つの近交系の混合状態のストックということになります。

(9) B6.129P2-*Lgr5*<sup>tm1(cre/ERT2)Cle/J</sup>

ジャクソン研究所のデータベースから。標的破壊に用いた遺伝子がこの動物を用いる動物実験に意味が出てくる場合、インサート(ノックイン)した遺伝子配列を括弧で囲んで表示させます。例はCre-ER<sup>T2</sup>融合タンパク質が作られる。同時にGFPも同じ細胞で作られるがマーカーとして使われるものなのでその表示を省く。なお、ドットで二つの系統が区分表示されていますが、この場合、C57BL/6Jにコンジェニック化されているということを示します(遺伝的背景は、C57BL/6Jである)。

## Floxedマウスの命名方法

遺伝子配列中にloxPを挿入した標的破壊なので、通常のノックアウトマウスと同様に記述する。ただし、通称名も使ってfloxとなっていることを伝える必要がある。

### (10) B6.129(Cg)-*Il1r1*<sup>tm1.1Rbl/J</sup>

ジャクソン研究所のデータベースから。このマウスはinterleukin 1 receptor, type I 遺伝子のfloxedマウスです。国際命名規約ではloxPの遺伝子改変については標的破壊法で作製されたノックアウトマウスと区別する表示方法がルール化されていませんので、tmを使った名称となります。よって、**規約上の名称とも通称名も忘れず表記するようにしてください**。当該動物の通称名としてジャクソン研究所のデータベースでは、*IL1R*<sup>loxP/loxP</sup> floxedマウス (*IL1R*<sup>loxP/loxP</sup> floxed mice) が示めされています。

また、国際命名規約ではホモ型、ヘテロ型といった遺伝子型を表記するルールがありませんので、これを示す必要がある場合には、以下のように通称名に遺伝子型 (flox/floxやflox/w) を追記するようにしてください。

例) *IL1R* floxedマウス—flox/flox、*IL1R* floxedマウス—flox/w

もちろんくどい表記になりますが、*IL1R*<sup>loxP/loxP</sup> floxedマウス—flox/floxとしても可。

なお、例の遺伝子受容動物の系統名は、129由来ES細胞で遺伝子改変を実施。その後混合系統か遺伝的背景が不明の系統に移された後、戻し交配が行われてC57BL6/Jの遺伝的背景をもったストックとなっているという意味です。

## 複数の導入遺伝子をもったマウスの命名方法

複数の導入遺伝子をもったマウスでは、導入する遺伝子表示をスペースを挟んで連続して列挙します。

### (10) B6.129(Cg)-*Ptprc<sup>a</sup>* *Cx3cr1*<sup>tm1Litt/Litt</sup>J

ジャクソン研究所のデータベースから。このマウスはCX3CR1-GFP (CX3CR1 locusにEGFP遺伝子を挿入したCX3CR1 locusノックアウトマウス/GFPノックインマウス) マウスです。遺伝的背景をC57BL/6としていますが、C57BL/6はCD45のアイソフォームのうちCD45.2 (*Ptprc<sup>b</sup>*) アレルのみ保有し、CD45.1 (*Ptprc<sup>a</sup>*) アレルを保有しません。よって、C57BL/6の遺伝的背景下で、CD45.1 (*Ptprc<sup>a</sup>*) を利用するために交雑系にして*Ptprc<sup>a</sup>*を他の近交系マウスから導入、C57BL/6に戻し交配しています。このような場合、導入する遺伝子 (改変した遺伝子を含む) を連続して列挙します。

### (11) B6.Cg-*Braf*<sup>tm1Mcm</sup> *Pten*<sup>tm1Hwu</sup> Tg(*Tyr-cre/ERT2*)13Bos/BosJ

ジャクソン研究所のデータベースから。このマウスは*Braf*、*Pten*の二つの遺伝子をそれぞれにfloxed化した上で、*Tyr-cre/ERT2*トランスジーンを導入した (ダブル) コンディショナルKOマウスです。やはりこの場合も導入された遺伝子表示をスペースを挟みつないで表示されています。

## ゲノム編集された遺伝子をもったマウスの命名方法

ジャクソン研究所のデータベースでは、ゲノム編集されたマウスを表示するために、エンドヌクレアーゼを介してゲノム編集したことを意味するemをtmに代えて用いられていますので、これを参考に命名してください。

### (12) B6(Cg)-Fxn<sup>em2.1Lutzy/J</sup>

ジャクソン研究所のデータベースから。このマウスはFxn遺伝子でコードされたフラタキシンのノックアウトマウスですが、CRISPR/cas9エンドヌクレアーゼを用いたゲノム編集法によって作製されたものです。このような場合、ゲノム編集したことを意味するemをtmに変わって用いて表記してください。また、この場合、特に同一遺伝子であっても複数の箇所に変異が導入される可能性が高いので、emのあとに作製番号を付番して区分することを忘れずにお願いいたします。

## 最後になりますが、 動物実験委員会が提供する動物実験に関するガイドについて

実験動物及び動物実験に関してのテキストの多くは、あまりにも正確性を重視するあまり冗長的と思えるような表現を使っている場合が多々あります。このことは実験動物分野に深く寄り添う必要がないと考える動物実験実施者にとって、その内容を理解する上で妨げとなっているのは否めません。

例えば、実験動物に対する麻酔や鎮痛薬の選択について私が参考にしているテキストでは、様々な薬剤やバランス薬の特徴、及びその作用機構を含め出版編集時点における知見に基づき出来る限り詳しく説明されていますが、ほとんどの研究者にとってこれらの情報よりはむしろ「第一選択薬はいずれか？」という思いの方が強いのではないのでしょうか？

そこで、岡山大学動物実験委員会では、これから動物実験を行う研究者向けに本学ではほとんど使われないような項目について割愛したガイドを作成しました。したがって、より正確性を求める場合にはこれらのガイドに頼るのではなく、やはり関連する成書を参照していただきたいと思えます。