

マウス遺伝子多型情報に基づいた遺伝子機能解析システムの開発

I 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

実験用マウス系統の MSM 及び JF1 は、我が国固有のモロシヌス亜種から樹立された系統である。これらは、従来のマウス遺伝解析に汎用されてきた標準的近交系統とは別亜種であり、それらと大きな遺伝的距離を有するため、標準的近交系統との間で顕著な遺伝子多型を示す。加えて標準的近交系マウスとの交配において極めて高い繁殖率を示す。これらの理由で、MSM 及び JF1 系統は、突然変異標準型の連鎖解析やさまざまな生物機能の遺伝解析に大きな威力を発揮することがすでに明らかになっている。本研究では、我が国が独自に開発した遺伝学的にユニークなこれらのマウス系統と従来の標準的近交系間に存在する遺伝子多型を基盤として、マウスの高次生体機能を制御する遺伝子機能と遺伝子発現制御機構を体系的に効率良く解明するためのゲノム解析システムを開発する。

2. 研究の概要

1. 遺伝子多型情報の整備に関する研究

(1) マイクロサテライトマーカー多型情報の整備に関する研究（財東京都臨床医学総合研究所）

日本産亜種マウス由来近交系の MSM 及び JF1 を軸に、既存の汎用近交系 C57BL/6J, DBA/2J, BALB/c, 129/Sv など 17 の近交系、計 20 系統についてマイクロサテライトマーカーの多型情報を全染色体にわたって整備する。多型解析にはアガロースゲル電気泳動と 2 塩基対の反復数を測定するための DNA シークエンサーを用いる。さらに、多型情報を基に、MSM と既存の標準的近交系の間での亜種間交配分離個体パネル（約 500 頭）を用いた詳細な連鎖解析を行い、マーカー座位の正確な位置情報を決定する。

(2) マルチキャピラリーシーケンサーを用いた遺伝子多型の高速解析技術の開発（理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター）

遺伝子多型を用いた高速マッピングシステムの樹立を目的として、マイクロサテライトマーカー多型や cDNA クローンの 3' -UTR 領域の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) あるいは Length Polymorphism をマルチキャピラリーシーケンサーを用いて高速に解析し得るシステムの開発を行う。さらに、自動的に多型を認識して連鎖解析が行えるシステムソフトウェアの開発を行い、連鎖解析を用いた cDNA クローン自身のマッピングや、ポジショナ

ル・クローニングあるいは Positional Candidate Cloning 法によるアプローチの応用を目指す。

(3) 遺伝子多型情報のデータベースの構築（文部省国立遺伝学研究所）

遺伝子多型情報のデータベース構築とその公開を目指して、一次データを集積するための遠隔地自動情報登録システムの開発、多型情報データベースの構築、柔軟な検索要求に応えられる高次検索システムの開発を行う。既設のマイクロサテライト多型に関する情報のデータベース (MMDBJ) の経験を活かし、さらにこれを発展させ、他の関連データベースとのリンクも考慮して本プロジェクトの成果としての総合的な知識情報データベースの構築を目指す。

2. 遺伝子多型情報を基盤とする新しい実験用マウス系統の樹立とそれらを用いた遺伝子機能解析システムの開発に関する研究

(1) 新しいコンソミック系統の樹立に関する研究（文部省国立遺伝学研究所）

染色体レシーピエント系統として標準的近交系である C57BL/6J と A/J 系統を、ドナー系統として日本産亜種マウス由来の MSM 系統を用いて、各々 21 系統から構成されるコンソミック系統を 2 セット合計 42 系統を樹立する。完成した系統について、特定の染色体を除いて他の全染色体領域がレシーピエント系統由来となっていることをマイクロサテライト DNA マーカーを指標として明らかにする。また、作成された各系統については、ドナー系統由来の染色体についてホモ接合として系統維持し、確立されたコンソミック系統は、全系統について凍結胚（精子）による系統保存を行い、国内外からの分与希望者に対応する。

(2) コンソミック系統を用いた高次機能遺伝子の解析システムの開発（文部省国立遺伝学研究所）

第一に、四肢形態や神経管、体節形成に関与する変異遺伝子に対して相互作用する修飾遺伝子をコンソミック系統との交配実験で明らかにし、最終的にはコンソミック系統を用いた詳細な連鎖解析で遺伝子を同定する。第二に、多数の遺伝子で制御されるマウス高次脳機能として行動パターンを取り上げコンソミック系を用いた解析システムを開発する。特に自発活動性と情動性を制御する遺伝子の解析をコンソミック系統を用いて行う。上記機能を制御する染色体が特定できたら該当するコンソミック系統を用いてさらに連鎖解析を進め遺伝子の同定を行う。

(3) 多因子で制御される生体機能解析のためのスピードコンジュニックマウス系統の開発（財実験動物中央研究所）

本研究では、スピードコンジュニックマウス作製のモデ

ルケースとして多因子性疾患モデルとして現在最も解析の進んでいる糖尿病高感受性系統である NOD マウスを染色体レシーピエント系統にして、その遺伝的背景に MSM 系統由来の糖尿病関連遺伝子を導入したコンジュニック系統をスピードコンジュニックの方法で作製する。I 型糖尿病モデルマウス NOD 系統の糖尿病感受性遺伝子はこれまで 18 種類がマップされているが、糖尿病感受性遺伝子 *Idd3*, *Idd4*, *Idd5* および *Idd9* についてこれらの遺伝子領域に SSLP マーカーを指標として MSM 系統由来の各染色体領域を導入してコンジュニックマウス系統を作製する。完成したコンジュニック系統を用いて糖尿病発症に働く *Idd* 遺伝子群の同定と遺伝子機能の解析を行う。

3. 日本固有の実験用マウス系統の BAC ゲノムライブラリーの構築とその応用に関する研究

(1) 日本固有の実験用マウス系統の BAC ゲノムライブラリーの構築に関する研究 (熊本大学医学部)

遺伝子多型性に富む日本産亜種マウス由来の MSM 系統からのゲノム DNA を材料に BAC ライブラリーを構築する。またトランスジェネシスの目的に即したベクター系の改良及び遺伝子導入技術の改良も合わせて行う。具体的には、まずゲノム全体をカバーする最小限のサイズの MSM/BAC ライブラリーを構築し、さらにライブラリーを拡大し、クローンを個別に単離、保存し、配布可能な形とするためのシステムを開発する。

(2) BAC トランスジェネシスによる BAC マウス個体ライブラリーの作製 (熊本大学医学部)

胚発生、生殖細胞機能に関連する多くの突然変異およびインプリンティング遺伝子が存在し、かつ遺伝学的解析の進んだ 17 番染色体の約 30Mb に渡るゲノム領域である t-コンプレックスを対象にして、少なくともこの領域の 10% をカバーするような BAC クローンをを用いてトランスジェニックマウス個体のライブラリーを構築する。このため、BAC クローン単離に必要なプローブ取得、BAC 導入マウス作製の効率化の基礎研究を行う。最終的には、MSM 系統 BAC クローンの単離を行い、それに応じてトランスジェニックマウス作製を行う。

4. マウス亜種間多型に基づいた遺伝子発現制御機構の解析

(1) 染色体高次機能を介した遺伝子発現制御機構に関する研究 (千葉大学大学院医学研究科)

哺乳類ポリコム群遺伝子である *mel-18* や *bmi-1* のノックアウトアルルを日本産亜種マウス由来である MSM と JF-1 系統のバックグラウンドへ導入し、様々な遺伝子座における対立遺伝子座排除の有無をマウス亜種間多型を指標に解析する。MSM または JF-1 系統と標準的実験用マウス系統の間の F1 由来の ES 細胞を作成し、ポリコム群遺伝子のドミナントネガティブ型を導入してポリコム遺伝子機能を阻害したマウス個体を作製して、ゲノム刷り

込みや X 染色体不活性化への効果を解析する。また、哺乳類ポリコム群遺伝子の機能を修飾する遺伝子 (Modifier Gene) を、マウス亜種間多型を用いた連鎖解析から同定する。

3. 年次計画

本プロジェクトは、日本産亜種マウス由来の系統の持っている遺伝子多型に立脚して、マウス個体レベルでの生物機能について遺伝解析するための総合的な研究システムを開発する。特に、マウス突然変異や特定のマウス系統が示す特徴的な遺伝形質を制御する遺伝子を迅速に効率良く同定するために遺伝子多型情報を整備することにより連鎖解析システムを開発する。また、日本産亜種マウスの示すユニークな遺伝特性を基礎にして標準的な実験用近交系マウスとの表現型の差異 (発癌感受性や行動パターン等) を決定する遺伝子群を同定するための新しい実験用マウス系統を樹立する。さらに、ポジショナルクローニングの最終段階で有効な遺伝子多型の豊富な BAC クローンを得るために、BAC ライブラリーを日本産亜種由来のマウス系統から構築し、その BAC クローンをを用いたトランスジェネシスの実験系を開発する。最後に、マウス亜種間遺伝子多型を基盤として遺伝子発現の制御機構についても研究を行う。

第 I 期の 3 年間では、以上の研究を進めるために、主に各実験系の確立のための基礎研究に全力を尽くす。特に、マイクロサテライト多型情報の整備については、体系的な方法論を開発し多型情報の量産化と多型データベースの構築と検索システムの基本設計について確立する。また、新しい実験用マウス系統であるコンソミック系統とスピードコンジュニック系統については、複数の系統の樹立を達成目標とする。BAC ライブラリーについてもラージスケールライブラリーを作製するための諸条件や BAC トランスジェニック個体ライブラリー作製するための遺伝子導入システムの諸条件の検討を行い BAC 個体ライブラリー作製のための準備を完了する。遺伝子発現制御の研究では、ポリコム遺伝子欠損マウスと亜種間交配による解析を行い、亜種間 F1 マウスからの ES 細胞株の樹立を行う。

第 II 期の 2 年間では、第 I 期で確立した実験系を基礎にして遺伝子機能解析を行うための研究システムの完成を目指す。また、多型情報の整備を終了し多型情報データベースを完成して一般に公開する。これらの多型情報を基に特定の変異遺伝子の連鎖解析に応用して研究システムの有用性を検証する。また、コンソミック系統やスピードコンジュニック系統についても全系統を樹立し、それらを用いた発がん感受性遺伝子や形態形成修飾遺伝子の同定、行動パターンを制御する遺伝子の同定、さらに糖尿病感受性遺伝子の解析等を行う。BAC のラージスケールライブラリーを完成する。また、t-コンプレックス領域に対応する BAC クローンを導入したトランスジェニックマウス個体ライブ

ラリーを構築する。さらに、遺伝子発現制御の研究では、新たな亜種間 F1 個体由来の ES 細胞を用いた解析や染色体高次構造が関与する遺伝子発現制御の修飾遺伝子の同定を行う。以上の研究で得られた多くの成果については、マ

ウス系統や BAC ライブラリーを希望者に配布し、さらに多型情報データベースを公開して、この分野の研究者が利用できるような体制をつくる。

研究項目	10 年度	11 年度	12 年度	13 年度	14 年度
1. 遺伝子多型情報の整備に関する研究					
(1) マイクロサテライトマーカー多型情報の整備に関する研究	マイクロサテライト反復数及び多型情報の整備 (1cM レベル)		2000 遺伝子座における多型情報の整備 (0.5cM レベル)		
(2) マルチキャピラリーシーケンサーを用いた遺伝子多型の高速解析技術の開発	マルチキャピラリーシーケンサーによる高速多型解析システムの開発		連鎖解析によるマーカー遺伝子座のマッピング		
(3) 遺伝子多型情報のデータベースの構築	データ項目と入力フォーマット決定	自動連鎖解析システムの開発		関連情報との連携と情報公開	
2. 遺伝子多型情報を基盤とする新しい実験用マウス系統の樹立とそれらを用いた遺伝子機能解析システムの開発に関する研究	戻し交配個体選抜用のマーカー選定				
(1) 新しいコンソミック系統の樹立		2 セット 42 系統のコンソミックマウスの作製		遺伝的背景のモニタリングによる染色体置換の評価	凍結保存
(2) コンソミック系統を用いた高次機能遺伝子の解析システムの開発	MSM, B6 系統の表現型多型網羅的検索とリストアップ	形態異常の変異の表現型修飾の解析	行動パターン解析	修飾遺伝子のマッピング	
(3) 多因子で制御される生体機能解析のためのスピードコンジェニックマウス系統の開発	MSM由来MHC, <i>Idd3, 4, 5, 9</i> 遺伝子領域の NOD 系統へのスピードコンジェニック法による導入			行動関連遺伝子のマッピング	
3. 日本固有の実験用マウス系統の BAC ゲノムライブラリーの構築とその応用に関する研究	MSM 系統からの高分子 DNA 調整	スモールスケールライブラリーの作製と解析	ラージスケールライブラリー作製の準備	コンジェニックマウスの病理学的解析	
(1) 日本固有の実験用マウス系統の BAC ゲノムライブラリーの構築に関する研究	BAC ベクター系の改良			リコンビナントコンジェニックマウスの作製による <i>Idd</i> 遺伝子のマッピング	
(2) BAC トランスジェネシスによる BAC マウス個体ライブラリーの作製	BAC トランスジェニックの効率化の研究	BAC トランスジェニックマウスの作製		ラージスケールライブラリーの構築とスクリーニング系の開発	ライブラリーの評価
4. マウス亜種間多型に基づいた遺伝子発現制御機構の解析	スクリーニング用プローブの開発	BAC ライブラリーのスクリーニング		BAC クローンの単離	
(1) 染色体高次機能を介した遺伝子発現制御機構に関する研究	既存のポリコム欠損マウスと亜種間交配を用いた解析			BAC トランスジェニックマウスの作製と解析	
	亜種間交配マウスからの ES 細胞の樹立				ES 細胞を用いた解析
		修飾遺伝子座のマッピング			
			修飾遺伝子のポジショナルクローニング		
所要経費(合計)	140 百万円				

4. 平成10年度における実施内容と達成目標

1. 遺伝子多型情報の整備に関する研究

(1) マイクロサテライトマーカー多型情報の整備に関する研究（財東京都臨床医学総合研究所）

① DNA シークエンサーによるマイクロサテライトの反復数を精確に測定するための基礎的実験を行う。また、これに先行してアガロースゲル電気泳動法による多型解析を行いDNA シークエンサーによる解析に適するマーカーを選別する。

② 技術のルーチン化を行い平成10年度内に160～200種類のマーカーの多型性と反復数を20系統のマウスに対して決定することを達成目標とする。

(2) マルチキャピラリーシーケンサーを用いた遺伝子多型の高速解析技術の開発（理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター）

マイクロサテライトマーカーに蛍光ラベルしたセットを合成して、マウスの各系統間での多型情報（約1,000マーカーについて、B6, DBA/2, SPR, MSM, 129/Svなどの系統を対象に）を集める。具体的には、マイクロサテライトマーカーの各座位に対応するプライマーセットの内、片方のプライマーに蛍光ラベルを行い、蛍光シーケンサーを用いて多型解析を行う。

(3) 遺伝子多型情報のデータベースの構築（文部省国立遺伝学研究所）

遠隔地の研究担当者が自動的に登録可能なシステムを開発する。このため、各メンバーのコンピュータ環境を調査し、入力情報及び入力方法を決定する。メンバーからの集積情報を元にデータベースを構築し、メンバー全員が情報を共有できる体制を整える。

2. 遺伝子多型情報を基盤とする新しい実験用マウス系統の樹立とそれらを用いた遺伝子機能解析システムの開発に関する研究

(1) 新しいコンソミック系統の樹立に関する研究（文部省国立遺伝学研究所）

① C57BL/6J及びA/J系統をレシーピエント、日本産垂種由来のMSM系統をドナーとして戻し交配を開始する。このため、C57BL/6J及びA/J系統とMSM系統のF1世代を作製し、N2戻し交配個体の作製を行う。また、各染色体について各戻し交配世代で個体選択の際に指標として使用するマイクロサテライトマーカーを1との共同研究によって選定する。

② 各戻し交配世代についてドナー由来の導入染色体とレシーピエント系統の染色体の置換効率をN2-N3世代について解析する。まず、迅速なゲノムDNAの抽出法とマイクロサテライトタイピングのシステムを開発する。さらに、多数のN2-N3個体を作製して置換率の分散について解析し最も効率の良いスクリーニング個体数を算出する。

(2) コンソミック系統を用いた高次機能遺伝子の解析シス

テムの開発（文部省国立遺伝学研究所）

レシーピエントとして用いるC57BL/6及びA/J系統と日本産垂種マウス由来のMSM系統について形態形成や発がん感受性、高次脳機能として行動パターンの遺伝的多型性について体系的な解析を行い、コンソミック系統を用いた遺伝解析の対象となるような表現型のリストを作製する。

(3) 多因子で制御される生体機能解析のためのスピードコンジェニックマウス系統の開発（財実験動物中央研究所）

I型糖尿病モデルマウスNOD/Shi系統における糖尿病感受性遺伝子(*Idd1*, *Idd3*, *Idd4*, *Idd5*及び*Idd9*)の機能解析を行うため、MSM系統をドナー系統として同系統由来の糖尿病感受性遺伝子領域をNOD系統（レシーピエント）系統に導入するコンジェニックマウス系統をスピードコンジェニック製法によって開始する。

3. 日本固有の実験用マウス系統のBACゲノムライブラリーの構築とその応用に関する研究

(1) 日本固有の実験用マウス系統のBACゲノムライブラリーの構築（熊本大学医学部）

① BACクローニングベクターの改良を行う。BACクロンの線状化、インサート単離のためにCpG配列を持たない18塩基認識のI-SceIをベクターに導入する。また、BACクローンをゲノムの特定部位に挿入することを目指し、そのためlox配列に変異を入れたlox66配列を導入したベクター系を開発する。

② DNAの調製、導入法を確立する。日本産垂種マウスであるMSM, JF1それぞれの組織からゲノムDNAを調製し、制限酵素による部分消化を行い、100～300kbの範囲のゲノムDNAを調製する。これをBACベクターにライゲーションし、エレクトロポレーション法によるコンピテントセルに導入する。この導入諸条件の検討を行う。これらの結果を基に小規模なパイロットライブラリーの作製を試みる。

(2) BACトランスジェネシスによるBACマウス個体ライブラリーの作製（熊本大学医学部）

① BAC導入マウス作製法を改良する。現在、BACトランスジェネシスに関しては一定の効率でBACが導入されたマウスが得られているが、さらに一連の手法、すなわち、DNA調製法、インジェクション時の濃度、環状、線状化クローンにおける効率の差異、などに検討を加えより優れた方法論を確立する。

② t-コンプレックスのゲノム解析。本研究ではMSM系統のBACライブラリーからマウスゲノムの特定領域をカバーするクローンを多数単離し、これを導入したマウス個体ライブラリーを作製する。17番染色体のt-コンプレックス領域をターゲットとし、約20Mbに渡るこの領域全体からのBAC単離を目指し、そのために必要なプローブ、PCRプライマーを開発する。

4. マウス亜種間多型に基づいた遺伝子発現制御機構の解析

(1) 染色体高次機能を介した遺伝子発現制御機構に関する研究(千葉大学大学院医学研究科)

① 対立遺伝子座排除とゲノム刷り込みに関する研究を行う。哺乳類ポリコーム群遺伝子座である *mel-18* を *bmi-1* のノックアウトアレルを日本産野生マウスである MSM と JF-1 のバックグラウンドへ導入し F2 までの交配を行う。本年度は、F2 または F3 マウスの作成までを行う。また、対立遺伝子座排除を解析するシステムの樹立を行う。日本産

野生マウスである MSM または JF-1 とラボラトリマウスの間の F1 に由来する ES 細胞を作成を試みる。作成後、キメラマウスを作成することで多能性を検定する。

② ポリコーム群遺伝子産物の Genetic Modifier の検索に関する研究を行う。哺乳類ポリコーム群遺伝子座である *mel-18* を *bmi-1* のノックアウトアレルを日本産野生マウスである MSM と JF-1 バックグラウンドへ導入し、F2 同士の交配 (F2N1 作成) を行った後、ホモ接合体における胸腺形成とホメオティック変異の程度を定量し、各染色体の由来と比較する。

II 平成10年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
(1) 遺伝子多型情報の整備に関する研究		
① マイクロサテライトマーカー多型情報の整備に関する研究	助東京都臨床医学総合研究所	米川博通
② マルチキャピラリーシーケンサーを用いた遺伝子多型の高速解析技術の開発	理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター	岡崎康司
③ 遺伝子多型情報のデータベースの構築	文部省国立遺伝学研究所	山崎由紀子
(2) 遺伝子多型情報を基盤とする新しい実験用マウスシステムの樹立とそれらを用いた遺伝子機構解析システムの開発に関する研究		
① 新しいコンソミックシステムの樹立に関する研究	文部省国立遺伝学研究所	城石俊彦
② コンソミックシステムを用いた高次機能遺伝子の解析システムの開発	文部省国立遺伝学研究所	小出剛
③ 多因子で制御される生体機能解析のためのスピードコンジェニックマウスシステムの開発	助実験動物中央研究所	若菜茂晴
(3) 日本固有の実験用マウスシステムの BAC ゲノムライブラリーの構築とその応用に関する研究		
① 日本固有の実験用マウスシステムの BAC ゲノムライブラリーの構築	熊本大学医学部	阿部訓也
② BAC トランスジェネシスによる BAC マウス個体ライブラリーの作製	熊本大学医学部	山村研一
(4) マウス亜種間多型に基づいた遺伝子発現制御機構の解析		
① 染色体高次機能を介した遺伝子発現制御機構に関する研究	千葉大学大学院医学研究科	古関明彦
(5) 研究管理	助実験動物中央研究所	

Ⅲ 研究推進委員会

委 員	所	属
[プロジェクト内委員]		
○城石俊彦	文部省 国立遺伝学研究所系統生物研究センター	助教授
阿部訓也	熊本大学 医学部遺伝発生医学研究施設	助教授
岡崎康司	理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター	研究員
古関明彦	千葉大学 大学院医学研究科	教授
山村研一	熊本大学 医学部遺伝発生医学研究施設	教授
米川博通	（助）東京都臨床医学総合研究所 実験動物部門	部長
若菜茂晴	（助）実験動物中央研究所 遺伝子解析室	室長代理
[プロジェクト外委員]		
勝木元也	東京大学 医科学研究所疾患モデル研究センター	教授
木南凌	新潟大学 医学部第一生化学教室	教授
森脇和郎	総合研究大学院大学	副学長

（注：○は研究推進委員長）

Ⅳ 研究連絡会議

委 員	所	属
城石俊彦	文部省 国立遺伝学研究所系統生物研究センター	助教授
小出剛	文部省 国立遺伝学研究所系統生物研究センター	助手
山崎由紀子	文部省 国立遺伝学研究所系統生物研究センター	助教授
若菜茂晴	（助）実験動物中央研究所 遺伝子解析室	室長代理
米川博通	（助）東京都臨床医学総合研究所 実験動物部門	部長
岡崎康司	理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター	研究員
山村研一	熊本大学 医学部遺伝発生医学研究施設	教授
阿部訓也	熊本大学 医学部遺伝発生医学研究施設	助教授
古関明彦	千葉大学 大学院医学研究科	教授