

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、わ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、従来のマウス遺伝子解析に汎用されてきた標準的近交系統とは別亜種の関係にあり、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、突然変異表現型の連鎖解析やさまざまな生物機能の遺伝子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、マウスの高次生命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。

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に全力を尽くした。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が確立し、その一部についてはデータベースを一般に公開した。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ェニック系統については、戻し交配が順調に伸展し、一部の系統については導入染色体（遺伝子）のホモ化も完了した。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を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、本格的 BAC ライブラリー作製のための準備が完了した。

第 II 期の 2 年間では、第 I 期で得られた研究成果をもとに多型情報の整備を終了し多型情報データベースを完成する。さらに多型情報を基盤とする遺伝子機能解析システムの完成を目指す。コンソミック系統については、全系統を樹立し、それらを用いた高次生命機能を制御する遺伝子の同定と解析を行う。また、BAC のラージスケールライブラリーを完成する。その利用の一端として、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。以上の研究で得られた多くの成果については、多型情報データベースを一般に公開する。さらに、新しく開発したマウス系統や BAC ライブラリーを希望者に配布し、この分野の研究者が利用できるような体制をつくる。

2. 研究内容及び目標

1. 遺伝子多型情報の整備に関する研究

(1) 多型マーカー情報の整備と亜種間単一交配に基づいたそれらの遺伝的地図作製に関する研究（（財）東京都臨床医学総合研究所）

これまで、目標である 2,000 種類のマイクロサテライトマーカー（MS マーカーと略）の多型情報を整備し、それを国立遺伝学研究所、山崎由紀子博士との共同研究によって、インターネットを通じて情報を公開した。通常の遺伝子マッピングであればこの情報で十分対応が可能なので、この目標については完了したと考え、より汎用性を持った遺伝子マッピングシステムに移行可能な gSNP の開発とそのマッピングを残り 2 年間の新たな研究目標に設定し直した。gSNP (genomic single nucleotide polymorphism: ジェノミック単塩基置換多型) は MS マーカーに比べ、TaqmanPCR 等によるタイピングの自動化に極めて適しており、大量の試料のマッピングには有効と期待できる。また、gSNP によるマッピングシステムは MS マーカーによるシステムと原理的に異なるため、両者を組み合わせることにより、マウスゲノム上で遺伝子マッピングのためのマーカーをより均一化して分布させることができる。それ故、これら gSNP マーカーの多型情報とマッピングによる位置情報を MSM, JF1 について整備することは、これまで行ってきた MS マーカーの応用範囲をさらに拡大し、わが国の哺乳類遺伝学の発展に大きく寄与すると考えられる。目標としては、今後 2 年間に MS マーカー数と同程度、すなわち、約 2,000 種類の gSNP マーカーを整備し、MS マーカー同様その情報をインターネットを通じて情報公開する。

(2) 完全長 cDNA クローンの SNP 情報の開発とそれらの遺伝的地図作製に関する研究（（理化学研究所ゲノム科学総合研究センター））

理化学研究所ゲノム科学総合センター遺伝子構造・機能研究グループでは、マウスの cDNA プロジェクトを推進してきた。これらの中には、発生の初期段階に関わる特異的な遺伝子も多く含まれている。今回は、これらの発生の初期に特異的に発現する遺伝子群の中から、C57BL/6J と MSM のあいだの cSNP 情報を検出し、これらを zygotic expression や、imprinting 遺伝子の解析を行なうためのリソースとする。最終的には、病気に関連する imprint 遺伝子の同定や、発生における zygotic expression の変化について解析していくことを目標とする。

(3) 遺伝子多型情報のデータベース構築と公開（国立遺伝

学研究所)

マイクロサテライト多型マーカーおよびスニップ (SNP) データを統合したマウス遺伝子多型情報データベースを完成させることを目標とする。また、ゲノム情報など本多型情報データベースと関連する情報については、最大限の連携を行ない、統合型の遺伝子多型データベースを目指す。このための情報交換手段としては、定着してきたXMLフォーマットを採用する。最後に、本データベースを有効利用するための解析支援ソフトを開発し、一般に提供する計画である。

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) マウス亜種間コンソミック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 (国立遺伝学研究所)

標準的マウス近交系である C57BL/6J を染色体受容系統に日本産亜種由来の MSM 系統を染色体供与系統にしてコンソミック全 21 系統の戻し交配を継続する。N10 世代に到達した系統および遺伝的背景が C57BL/6J の遺伝的多型マーカーで置換された系統について、該当する染色体が MSM 由来の供与染色体についてホモ接合となった系統を作製する。ホモ接合個体の雌雄を交配してコンソミック系統を完成させる。完成したコンソミック系統については、凍結精子と受精卵凍結による系統維持を行う。コンソミック系統マウスを大量に同一時期に生産するための試験管内受精 (IVF) 法によるマウス生産システムを確立する。また、X-染色体をはじめ通常交配による系統維持が困難である系統も想定される。それらの系統については透明体部分切開法、顕微受精法などを応用したマウス生産を検討する。

コンソミック系統を用いた遺伝子機能解析システムの開発のため、染色体受容系統と供与系統である C57BL/6J と MSM 系統についての表現型解析を押し進める。特に、行動遺伝学的特性と形態学的特性、さらに染色体構造等に関しての細胞遺伝学的特性について体系的に解析してデータベース化する。また、完成したコンソミック系統についての基礎遺伝的特性として、外部形態、体重、成長曲線、

細胞遺伝学的特性等について解析してデータベース化する。

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) 日本産亜種マウス由来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 (熊本大学発生医学研究センター)

遺伝子多型性に富む日本産亜種マウス由来の MSM 系統 JF1 系統からゲノム DNA を単離し、これを材料に BAC ライブラリーを構築する。各ゲノム DNA クローンは、個別にプレート中に保存する。クローンを効率良くスクリーニングするための高密度コロニーフィルターを作製し、内外の研究者に配付可能な形とするためのシステムを開発する。

このライブラリーをスクリーニングし、17 番染色体の約 30Mb にわたるゲノム領域である t-コンプレックス領域から BAC クローンを単離する。特に未分化幹細胞の増殖制御に異常を呈し、胚性致死となる tw5 突然変異責任遺伝子を含むゲノム領域を BAC クローンコンティグによってカバーし、各 BAC クローン導入マウスを作製する。これを変異マウスと交配する機能的レスキュー実験により責任遺伝子の同定を行う。

3. 年次計画

本研究プロジェクトは、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命機能について研究するための総合的な遺伝解析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、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。

研究項目	10年度	11年度	12年度	13年度	14年度
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					
1. 遺伝子多型情報の整備に関する研究					
(1) 多型マーカー情報の整備と亜種間単一交配に基づいたそれらの遺伝的地図作製に関する研究		マイクロサテライト多型情報の整備 (2000 遺伝子座)		gSNP 情報の開発とマーカー遺伝子座のマッピング	
(2) 完全長 cDNA クローンの SNP 情報の開発とそれらの遺伝的地図作製に関する研究	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		CDNA3'-UTR の SNP 開発	cSNP 情報の開発とマッピング	
(3) 遺伝子多型情報のデータベース構築と公開に関する研究	データ登録システムと検索システムの開発およびデータベース構築			刷り込み遺伝子 SNP 情報の確認	
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				関連情報の連携と解析ツールの開発	統合データベースの構築と公開
(1) マウス亜種間コンソミック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		戻し交配による MSM 系統由来染色体の C57BL/6J 系統への導入		コンソミック系統の遺伝特性の解析とデータベース化	
		コンソミック親系統 (C57BL/6J, MSM) の表現型解析		コンソミック系統の維持および生産システムの開発	
3. 日本固有の実験用マウス系統の BAC ライブラリーの構築とその応用に関する研究					
(1) 日本産亜種マウス由来系統の BAC ゲノムライブラリーの構築とその応用に関する研究		BAC ゲノムライブラリー構築の諸条件の検討と設定		MSM, JF1 BAC ライブラリーの構築と評価およびスクリーニング系の開発	
		効率的な BAC-DNA トランスジェニックマウス作製技術の開発		突然変異遺伝子の BAC-DNA 導入によるレスキュー実験系の開発	
所要経費 (合計)	140 百万円	226 百万円	207 百万円	209 百万円	

4. 平成 13 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) 多型マーカー情報の整備と亜種間単一交配に基づいたそれらの遺伝的地図作製に関する研究 (駒東京都臨床医学総合研究所)

① これまで整備したマイクロサテライトマーカー (2,000 種類以上) のマウス各染色体上の位置を平成 12 年度から作成中の約 200 頭のパネル (B6×(B6×MSM) F1 96 頭 + (B6×MSM) F1×B6 96 頭) を用い、GeneScan のシステムで行う。

② gSNP のシステムを立ち上げ、今年度は約 1,000 種類についての情報整備を行う。gSNP のプライマー情報は <http://www-genome.wi.mit.edu/SNP/mouse/> で提供されるものを MSM, JF1, そして C57BL/6J に応用する。また、画像データとして PCR-SSCP のものを、これまでの MS マーカーと類似の方法で作成し、インターネットで

公開する。

③ 上記の他、MSM の BAC クローンができ次第、そのバック末端を STS 化し、マッピングを行う (熊本大学発生医学研究センターとの共同研究)。

(2) 完全長 cDNA クローンの SNP 情報の開発とそれらの遺伝的地図作製に関する研究 (理化学研究所ゲノム科学総合研究センター)

① RIKEN 完全長マウス cDNA ライブラリーより得られた塩基配列情報より、適切なプライマーを作成し、3'UTR 領域より PCR 法を用いて C57BL/6J と MSM 系統より増幅した産物をダイレクトシーケンスすることにより、多型情報を収集する。これらの cDNA clone 自体を RH マッピング法によりマッピングを行ない、マーカーとして使用可能にして cSNP のデータベースを充実させる。現予算内で全遺伝子の cSNP 検出は無理なので、preliminary study として、cSNP の検出が生物学的な意味を持つものに焦点

をしぼる。1つは、imprinting 関連遺伝子の cSNP 検出及び mapping, もう1つは、発生の初期段階での zygotic expression に関係する遺伝子群に焦点を絞る。

(3) 遺伝子多型情報のデータベース構築と公開 (国立遺伝学研究所)

① SNP 情報の追加登録作業およびマイクロサテライトマーカー多型情報と SNP を統合したマウス多型情報データベースを完成させる。

② 多型情報データベースの XML 化作業を開始する。特に海外の同類データベースとの情報交換を視野に入れ、XML における細部の仕様に関してはむしろ先導して提案していく。

③ ゲノムの配列情報, マップ情報など関連情報との関連づけ作業を開始する。

④ 多型情報解析ソフトの開発を開始する。

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) マウス亜種間コンソミック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 (国立遺伝学研究所)

① C57BL/6J を染色体受容系統, MSM 系統を供与系統としたコンソミック系統を戻し交配を継続して作製する。N10 世代若しくは遺伝的背景が C57BL/6J 系統で置換した系統については MSM 由来染色体をホモ接合に持つ個体を作製し, それらの雌雄を交配してホモ個体マウスの系統を完成する。ホモ化したコンソミック系統については, 再度, 全染色体について多型マーカーを解析して受容系統への置換を確認する。

② 完成したコンソミック系統について, 凍結精子および凍結受精卵による系統維持を進める。通常の交配による系統維持の困難な系統については, 試験管内受精, 透明体部分切開法等による試験管内受精, あるいは顕微受精法等を応用したマウス生産を検討する。

③ コンソミック系統を用いた遺伝子機能解析システムを

開発する目的で, まず親系統である C57BL/6J 系統と MSM 系統の遺伝的特性を体系的に解析してデータベース化する。特に, 行動学的特性, 形態学的特性, 細胞遺伝学的特性について表現型を解析する。また, 完成したコンソミック系統については, 外部形態, 体重, 成長曲線, 細胞遺伝学的特性等について順次解析してデータベース化する。

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) 日本産亜種マウス由来の実験用マウス系統の BAC ゲノムライブラリーの構築 (熊本大学発生医学研究センター)

① MSM 系統由来の BAC ゲノムライブラリー作製とスクリーニング系の開発。

前年度までに BAC ライブラリー作製法の開発を行ってきた。これを踏まえて 13 年度は, 実用のための 5 ゲノム相当の BAC ライブラリー作製を行う。このため, 13 年度中に 10 万クローンの単離を目標とし, これをプレート中に個別に保存する。これらのクローンを 22×22cm のナイロンフィルターにスポットした高密度コロニーフィルターを作製し, これを用いて実際に t-コンプレックス領域からの BAC クローン単離を行う。ライブラリー評価の意味合いも含めこれらのゲノムクローンの構造解析を行う。PCR スクリーニングのための BAC クローン DNA プールの作製を行う。

② BAC クローン導入マウスの作製。

t-コンプレックス領域, 特に胚性致死遺伝子 tw5 をカバーするゲノム領域から BAC クローンを単離し, コンティグを作製する。これらを導入したトランスジェニックマウス系統を複数作製する。tw5 変異ホモ個体は, 胎生 6.5 日において, 未分化幹細胞である原始外胚葉の増殖・分化が特異的に阻害され, 胚性致死となる。この変異責任遺伝子を同定するため, tw5 ゲノム領域からの BAC 導入マウスを変異マウスと交配し, 機能的な相補が起きるかを調べることにより責任遺伝子の同定を行う。13 年度は, そのための BAC 導入マウスの作製, 系統樹立を行う。

II 平成13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) 多型マーカー情報の整備と亜種間単一交配に基づいたそれらの遺伝的地図作製に関する研究	(財)東京都医学研究機構臨床医学総合研究所実験動物研究部門	米川博通
(2) 完全長cDNAクローンのSNP情報の開発とそれらの遺伝的地図作製に関する研究	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター	岡崎康司
(3) 遺伝子多型情報のデータベース構築と公開に関する研究	国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報総合センター	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) マウス亜種間コンソミック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	国立遺伝学研究所系統生物研究センター	城石俊彦
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) 日本産亜種マウス由来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	熊本大学発生医学研究センター	阿部訓也

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	国立遺伝学研究所 系統生物研究センター哺乳動物遺伝研究室教授
阿部訓也	熊本大学 発生医学研究センター助教授
岡崎康司	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター遺伝子構造機能研究グループチームリーダー
山崎由紀子	国立遺伝学研究所 生物遺伝資源情報総合センター系統情報研究室助教授
米川博通	(財)東京都医学研究機構 臨床医学総合研究所副所長
[プロジェクト外委員]	
勝木元也	東京大学 医科学研究所教授
木南凌	新潟大学 医学部生化学教室教授
古関明彦	千葉大学 大学院医学研究科教授
森脇和郎	理化学研究所 筑波研究所バイオリソースセンターセンター長

(注：○は研究推進委員長)

IV 研究連絡会議

委 員	所 属
阿 部 訓 也	熊本大学 発生医学研究センター助教授
岡 崎 康 司	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター遺伝子構造機能研究グループチームリーダー
小 出 剛	国立遺伝学研究所 助手
城 石 俊 彦	国立遺伝学研究所 系統生物研究センター哺乳動物遺伝研究室教授
山 崎 由 紀 子	国立遺伝学研究所 生物遺伝資源情報総合センター系統情報研究室助教授
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 道	助 働 東京大学医学研究機構 臨床医学総合研究所副所長