

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

研究代表者：城石 俊彦（国立遺伝学研究所）

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の間が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。

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（助東京都臨床医学総合研究所）

第Ⅱ期の目標であった2,000遺伝子座のマイクロサテライトマーカーの多型情報をこれまでに整備し、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 (genomic single nucleotide polymorphism: ゲノミック単塩基置換) の開発とそのマッピングを第Ⅱ期の残りの1年間の新たな研究目標に設定し直した。gSNP は、マイクロサテライトマーカーに比べ、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マイクロサテライト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。さらに、近年ミトコンドリアゲノムの多型が、糖尿病、難聴などいくつかの多因子性疾患について関与していると思われるデータが蓄積している。そのため、既存の代表的近交系30種類以上（できれば40種類）についても多型情報の整備を行うことにした。この整備により、これまで行ってきたマイクロサテライトマーカーの応用範囲をさらに拡大し、我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、マイクロサテライト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、その情報をインターネットによって情報公開する。また、マイクロサテライトマーカーと gSNP とを連鎖解析によってそれらの染色体上の位置関係を明らかにして、両マーカーの統合を試みる。

(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。

具体的には、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 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絞る。一つは、imprinting 関連遺伝子の cSNP 検出及び mapping、もう一つは、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）

マウス遺伝子多型情報の統合データベースを完成することを目標とする。これまでに構築したプロジェクト内のデータを中心とするデータベースを拡張し、外部組織が公開し

ているゲノム情報、マップ情報、SNP 情報その他の関連情報を加えていく。さらに公開情報から多型情報を自動抽出するシステムを開発し、これらを一元管理できるような統合データベースの構築を目指す。また集積しつつある BAC ライブラリーの配列解析および統合データベースへの格納を計画している。

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)

二つのマウス亜種 (*M.m.domesticus* と *M.m.molossinus*) 由来のマウス系統間で染色体を交換したマウス亜種間コンソミック系統を確立し、それらを用いた遺伝子機能解析システムを開発する。このため、以下の研究目標を達成する。

遺伝的背景が C57BL/6 の遺伝的マーカーで置換したコンソミック系統について、当該染色体が MSM 由来のホモ接合となった系統を作成し、それらの雌雄を交配してコンソミック全系統を確立する。更にそれらの凍結精子と凍結卵による系統保存を行う。また、試験管内受精法 (IVF) 法によるマウス生産技術を確立する。通常交配が困難である系統に関しては顕微受精法などを応用したマウス生産を試みる。また、コンソミック系統を用いた遺伝子機能解析システム開発のため、親系統である C57BL/6 系統と MSM 系統についての表現型解析を押し進め、形態学的、行動学的、生化学的、さらに染色体構造など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的遺伝特性として外部形態、体重、成長曲線、生化学的、細胞遺伝学的特性について解析し、同様にデータベース化する。

3. 日本固有のマウス系統の 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とその応用に関する研究 (理化学研究所バイオリソースセンター)

遺伝子多型性に富む日本産亜種マウス由来の MSM 系統および JF1 系統からゲノム DNA を調整し、これを材料に BAC ライブラリーを構築する。クローンは個別にプレート中に保存する。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

第 II 期最後の 1 年間で当初の研究目標の全てを達成する。さらに、広くマウス遺伝学およびゲノム科学の研究分野に利用されるよう本研究の成果を公開する。

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 (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 (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 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					
	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	
	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	
				刷り込み遺伝子 SNP 情報の確認	
	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			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
			コンソミック系統の遺伝特性の解析とデータベース化		

研究項目	10年度	11年度	12年度	13年度	14年度
(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	
	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	
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					
所要経費 (合計)	140 百万円	226 百万円	207 百万円	209 百万円	163 百万円

4. 平成 14 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 (勸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 13 年度に完成した約 200 頭のパネル { (B6×(B6×MSM) F1) 96 頭 + ((B6×MSM) F1×B6) 96 頭 } を用い、Gene Scan のシステムで行う。

② 平成 13 年度に立ち上げた gSNP については、最終目標の約 2,000 種類についての整備を行う。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。

③ 昨年度構築された MSM の BAC クローン、約 1,500 種類を用い、その BAC 末端の STS 化、シーケンスを順次行いつつある。今年度は最終目標の 2,000 種類の gSNP について多型情報を整備し、それらについてマッピングを行う (理研バイオリソース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)

平成 14 年度は、発見された cSNP の遺伝子型や周辺配列、シーケンスクオリティなどの情報を Web 上から閲覧できるインターフェイスを用意し、cSNP の発見された配列と本研究室が公開している機能注釈データベースやマイクロアレイデータベース、*in silico* mapping データベースを統合し、より高次の生物情報を付加した。cSNP を見

出すことができたクローンについては、*in silico* mapping を行ったが、今後は、Radiation Hybrid Mapping 法でのマッピングも行っていく。なお、cDNA マイクロアレイを用いて、parthenogenote, androgenote に特異的に発現する遺伝子群に焦点をあてて、cSNP を同定し新規のインプリント遺伝子のマススクリーニング系も構築する。

平成 13 年度の研究活動の継続とともに、より生物学的意義のあるクローンに焦点を絞り、バイオリソースとしての付加価値を高める。実際には、cDNA マイクロアレイを用いてインプリント様発現を示す遺伝子に着目し、それらの cSNP をスクリーニングする。cSNP が見つかった遺伝子については、reciprocal cross マウスを用いて imprint 関連遺伝子の確認証明を行う。初期発生に関わっている遺伝子群についても網羅的に cSNP を確認し、zygotic expression を示す遺伝子群の発生時期における影響などの解明に貢献できる遺伝子セットを同定する

(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)

① 公開情報から多型情報を自動抽出するためのシステムを開発し、それを用いて多型情報を統合化し既設のデータベースに格納する。

② 本研究で得られた多型情報と他のゲノム情報との連携を図る。

③ 統合データベースの更新を効率よく行うシステムを開発する。

④ BAC 配列の解析を行い、配列および解析結果をデータベースに加える。

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) 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 コンソミック系統の完成

目標とするコンソミック系統 21 系統の内、5 系統は当該染色体のホモ化がすでに完了し系統として確立している。現在ホモ化を進行中の 14 系統は本年度中にホモ化を終了し系統として確立する。更に、戻し交配進行中の 2 系統についても、戻し交配を終了し、ホモ化を行う。これにより、一連のコンソミック系統はほぼ全ての染色体について系統として樹立されることになる。

② コンソミック系統の維持生産システムの確立

樹立されたコンソミック系統は、精子と受精卵を凍結することにより安定的に系統保存する。不妊性などによる繁殖の困難な系統に関して、IVF や顕微受精などの発生工学的手法を用いて、安定した生産システムを確立する。通常の繁殖可能な系統は、凍結による系統保存と同時に繁殖による維持を行い、各コンソミック系統の遺伝的特性の詳細な解析に供与する。

③ コンソミック系統についての遺伝的特性の体系的解析とデータベース化

それぞれのコンソミック系統について、形態学的、行動学的、細胞学的、生化学的な表現型に関して、その特性を明らかにし、親系統である C57BL/6J と MSM の遺伝子多型に起因する遺伝機能解析系を完成する。

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

リーの構築とその応用に関する研究（理化学研究所バイオリソースセンター）

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い、5 ゲノム相当の BAC クローン（約 10 万クローン）の単離を行った。これらのクローンを 384 穴タイタープレート中に個別に保存し、複数のレプリカを作製した。14 年度は MSM ライブラリーをさらに拡充するとともに、JF1 系統からのライブラリー作製を行う。14 年度中に JF14 系統においても 10 万クローンの単離を目指す。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、ハイブリダイゼーションによるスクリーニングを可能とし、これを用いて実際に 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。

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で責任遺伝子の同定を行う。前年度まで、2 種の BAC クローンからのファウンダートランスジェニックマウスを作製した。14 年度はさらに 3-4 種の BAC クローンをを用いて BAC 導入マウスの作製、系統樹立を行う。

II 平成 14 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	(助)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

研究項目	担当機関	研究担当者
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) 日本産垂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	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター	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	理化学研究所 バイオリソースセンター動物変異動態解析技術チーム チームリーダー
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	岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所 所長
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	理化学研究所 バイオリソースセンター動物変異動態解析技術チーム チームリーダー
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
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
米川博道	(財)東京都医学研究機構 臨床医学総合研究所 副所長