

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

<研究の概要・目標>

1 何を目標しているのか
マウス遺伝子の機能解析を効率的に行うための基盤となるシステムの開発

第1期の目標

- 多型情報の基盤化とデータベース検索システムの基本設計の確立
- 動物の実験用マウス系統の創設

第2期の目標

- 2000種物の多型情報の整備と多型情報データベースの公開
- 実験用マウス全系統の創設

2 何を研究しているのか
我が国固有のマウスを用いた、遺伝子多型情報の整備、染色体・染色体の特定領域・遺伝子の各レベルで遺伝子機能解析に資する新しい実験用マウスの開発、BACゲノムライブラリーの構築等

3 何が新しいのか
国立遺伝学研究所が独占的に保有している遺伝子機能解析に非常に有利なマウス系統**を用いてシステム開発を目指す点が新しい。

*BACゲノムライブラリー：マウスの全染色体を百数十kb単位で切断した断片の集合。BACとはBacterial Artificial Chromosome(バクテリア人工染色体)の略。

**：標準系（欧米産）マウス同士を用いた遺伝子解析では、お互いの塩基配列が似ているため、表現型を制御する目的遺伝子を見つけることが難しいが、我が国固有のマウスと標準系マウスの間では塩基配列が非常に異なるため、その発見が容易となる。

<諸外国の現状>

1 現状及び我が国の水準

標準系マウスに関する遺伝子多型情報、実験用マウス系統、及びBACゲノムライブラリーが整備されており、これらを用いて研究が盛んに行われている。我が国においても、標準系マウスを用いて研究が行われているが欧米に比べ全般的に遅れている。

<研究進展によるメリット>

1 世界の水準との関係

欧米一辺倒ではなく、我が国固有のマウス系統を活用した遺伝子解析システムを他国に先駆け構築することにより、マウス遺伝子機能の解析を効率的かつ体系的に進められ、欧米との差を埋めることができるかと期待される。

2 波及効果

突然変異マウス、疾患モデルマウスの遺伝子解析が効率的に行えるようになる。この他、哺乳動物の高次の生体機能を制御する遺伝子やヒト疾患遺伝子の同定が進展する等、生物、医学、薬学分野への幅広い波及効果が期待される。

「実施体制」

第I期 (平成10年4月～平成13年3月)

研究課題

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遺伝子多型情報の整備に関する研究
(分担者：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
(分担者：理化学研究所GSC 岡崎隆司)
 - (3) 遺伝子多型情報のデータベース構築と公開
(分担者：国立遺伝学研究所 山崎由紀子)
2. 遺伝子多型を基盤とする新しい実験用マウス系統の創設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) コンソミック系統の創設に関する研究
(国立遺伝学研究所 城石俊彦)
 - (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
(分担者：国立遺伝学研究所 小比 潤)
 - (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クマウス系統の開発
(分担者：(財)実験動物中央研究所 若菜茂樹)
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
(分担者：熊本大学医学部 岡部創也)
 - (2) BACトランスジェネシスによるBAC遺伝子ライブラリーの作製
(分担者：熊本大学医学部 山村研一)
4. マウス多型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
(分担者：千葉大学医学部 古舘明彦)

第II期 (平成13年4月～平成15年3月)

研究課題

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重複間単一文配に基づいたそれらの遺伝子地図作成に関する研究
(分担者：東京都臨床医学総合研究所 米川博通)
 - (2) 完全長cDNAクローンのcSNP情報の開発
(分担者：理化学研究所GSC 岡崎隆司)
 - (3) 遺伝子多型情報のデータベース構築と公開
(分担者：国立遺伝学研究所 山崎由紀子)
2. 新しい実験用マウス系統の創設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) マウス多型コンソミック系統の創設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
(分担者：国立遺伝学研究所 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) 日本産標準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
(分担者：熊本大学医学部 → 理研BAC 岡部創也)



所要経費

(単位:千円)

研究項目	担当機関等	研究担当者	所要経費					合計
			H10 年度	H11 年度	H12 年度	H13 年度	H14 年度	
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東京都臨床医学総合研究所	米川博通	29,582	34,981	33,354	47,696	33,818	179,431
(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	埼玉医科大学ゲノム医学研究センター	岡崎康司	9,408	13,939	14,042	22,345	17,365	77,099
(3) 遺伝子多型情報のデータベース構築とその公開に関する研究	国立遺伝学研究所系統生物研究センター	山崎由紀子	4,898	10,500	10,500	14,532	14,532	54,962
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	33,786	70,066	49,278	88,349	73,299	314,778
(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	国立遺伝学研究所系統生物研究センター	小出剛	11,654	15,251	27,686	0	0	54,591
(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	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター	若菜茂晴	9,592	19,042	11,729	0	0	40,363
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に関する研究	理化学研究所バイオリソースセンター	阿部訓也	13,676	27,612	30,255	35,350	23,871	130,764
(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	熊本大学発生医学研究センター	山村研一	14,034	13,629	11,407	0	0	39,070
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	古関明彦	9,448	14,223	12,565	0	0	36,236
5 研究管理			4,293	6,313	5,888	256	240	16,990
所要経費 (合計)			140,371	225,556	206,704	208,528	163,125	944,284

研究成果の概要

総括

マウスには、進化上 50~100 万年前に分岐して遺伝的に離れた複数の亜種が存在する。この内、日本には、モロシヌスという固有亜種が分布する。現在汎用されている標準的な実験用マウス系統のゲノムの起源は、西ヨーロッパ産のドメスティカス亜種であることが、森脇（元国立遺伝学研究所、現理研バイオリソースセンター、センター長）らを中心とするグループの長年の研究でわかっていた。本研究プロジェクトは、この我が国発の研究成果を土台として、日本産マウスと標準的な実験用マウスの遺伝的多型情報を基盤にして効率的な遺伝子機能解明のための解析システムを開発することに主眼を置いて研究を進めてきた。国立遺伝学研究所で樹立してきた日本産亜種マウスから由来の近交系マウスは、遺伝的に離れた標準的な実験用マウス系統とも自由に交配することができる。したがって、両亜種間の遺伝的多型の解析には計画的な交配実験が可能である。本研究プロジェクトでの共通テーマは、この計画交配による遺伝解析をより効率化するための総合的な基盤整備を行うことであった。本研究プロジェクトの成果は、マウス亜種間の多型情報を基に遺伝子機能を解析するシステムの基盤整備を提供するものである。したがって、本研究プロジェクトは、この方向の研究の終了を意味するものではない。むしろ、この成果を基盤として、本格的な遺伝子機能解明に向けた研究を今後スタートするべき準備が整ったというべきであろう。

サブテーマ毎、個別課題毎の概要

1. 遺伝子多型情報の整備に関する研究開発

本研究では、日本産野生マウス由来の近交系統を中心に、マイクロサテライト、ゲノム SNPs および cSNPs 等のマウス多型マーカーの解析を行い当初の目標以上の成果を上げた。マイクロサテライトでは、近交系 8 系統について 2,200 遺伝子座、16 系統について 1,200 遺伝子座にわたる多型情報を整備した。さらに、ゲノム SNPs については、MSM/Ms の BAC 末端配列に対する gSNP を 3,000 マーカー、汎用近交系 50 系統については、mtDNA の全シーケンシングを完了し、それらの近交系統間での SNP 解析を終了した。cSNPs については、理研 GSC で得られた完全長 cDNA 情報を下に、新たに多型検出システムを構築し、インプリンティング関連遺伝子を中心に C57BL/6J と MSM のマウス多型を 1,758 カ所検出した。以上の多型データは、全て検索可能なデータベースとして構築し、すでに一般に公開している。

2. 遺伝子多型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

本研究では、ゲノム機能解析に有効なスピードコンジェニックマウス系統の開発と染色体置換型コンソミック系統の樹立およびコンソミック系統を利用するための解析可能な表現型リストの作成を行った。いずれも当初の目標を達成した。スピードコンジェニックマウスについては、日本産野生由来の MSM 系統の糖尿病感受性遺伝子領域をスピードコンジェニックマウス作製法にて導入し、遺伝子機能を明らかにするシステムを構築できた。コンソミック系統樹立では、MSM - C57BL/6J 系統間で当初の目標よりも多い 27 系統の樹立を達成することができた。このため、より解像度の高い表現型マッピングが可能となった。MSM と C57BL/6 系統を用いて、行動パターン等を中心に表現型多型を解析した結果、これら 2 系統は、当初予想していたよりも高次機能の差が大きく、表現型解析でのコンソミック系統の有用性が示された。

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

当初の目的は、MSM/Ms から高品質の 5 ゲノム相当のカバーレッジを持つ BAC ゲノムライブラリーを作製し、目的遺伝子を効率良く単離するためのスクリーニングシステムを構築するというものであった。II 期終了時点では、結果として平均インサート長約 130kb のクローンを約 22 万個単離し、11 ゲノム相当をカバーするライブラリーを構築することができ、当初の目標を上回る成果が得られた。また、応用研究とし

ては、BAC クローンを導入したトランスジェニックマウスの効率的な作製法を確立し、合計 43 系統のトランスジェニックマウスを作製した。当初計画した個体ライブラリーの構築には至らなかったが、変異責任遺伝子のレスキュー実験も試みるなど一定の成果があった。

波及効果、発展方向、改善点

本研究の成果は、多型マーカー・cSNPs 等のゲノム多型情報、コンソミック系統や BAC ゲノムライブラリーなどのバイオリソースなどが柱となっている。これらのリソースは、一部はすでに本研究の枠を越えて関連分野に利用されている。例えば、遺伝子多型マーカー情報については、データベースが既に公開され、国内外のマウスゲノム研究者に広く利用されている。また、一部のコンソミック系統については、生物医学分野での表現型マッピングにすでに活用されている。さらに、MSM/Ms 系統の BAC ゲノムライブラリーについては、平成 14 年度の文部科学省 NBR ゲノム解析事業(申請代表者:城石俊彦)の支援を受けて、20 万クローンの 40 万パスの BAC 端末シーケンシングが行われた。さらに、理研 GSC および理研 BRC との共同研究により、国際コンソーシアムが解読した C57BL/6J 系統のゲノムへの BAC クローンのマッピングが完了した。また、C57BL/6J 系統との比較ゲノム解析が進み、日本産野生マウスのゲノム多型のユニークさが改めて明らかになりつつある。これらは、まだまだごく一部の利用であり、今後、本研究成果の活用はさらに拡大し且つ深まっていくものと確信している。

本研究の当初から予想されていなかった成果としては、技術的なものより新発見としてのものが顕著である。例えば、多型情報については従来考えられていた以上の多型頻度(マイクロサテライト、cSNPs)が観察されたこと、コンソミック系統樹立では複数の染色体間での遺伝的相互作用が明らかとなったことなどが上げられる。これらは、将来のゲノム機能解析において斬新な研究課題を提示している。特許については、これまで申請したものはない。ただし、バイオリソースとしてのコンソミック系統は特許申請の可能性を探っている。一方、特許より有体物としての権利化を設定することの方が実利的であることもあり、専門家とも相談しているところである。

研究成果公表等の状況

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	第 期 3 件	第 期 6 件	第 期 23 件	第 期 32 件
	第 期 0 件	第 期 13 件	第 期 20 件	第 期 33 件
国際	第 期 52 件	第 期 0 件	第 期 11 件	第 期 63 件
	第 期 67 件	第 期 2 件	第 期 6 件	第 期 75 件
合計	第 期 55 件	第 期 6 件	第 期 34 件	第 期 95 件
	第 期 67 件	第 期 15 件	第 期 26 件	第 期 108 件

(2) 特許等出願件数

第 期 0 件 (うち国内 0 件、国外 0 件)

第 期 1 件 (うち国内 1 件、国外 0 件)

合計 1 件 (うち国内 1 件、国外 0 件)

(3) 受賞等

第 期 0 件 (うち国内 0 件、国外 0 件)

第 期 0 件 (うち国内 0 件、国外 0 件)

(4) 主な原著論文による発表の内訳

財団法人東京大学医学研究機構東京都臨床医学総合研究所実験動物研究部門 米川 博通

国外誌

1. Kikkawa, Y., Oyama, A., Ishii, R., Miura, I., Amano, T., Ishii, Y., Yoshikawa, Y., Masuya, H., Wakana, S., Shiroishi, T. Taya, C., Yonekawa, H.: 「A Small Deletion Hotspot in the Type II Keratin Gene mK6irs1/Krt2-6g on Mouse Chromosome 15, A Candidate for Causing the Wavy Hair of the Caracul (Ca) Mutation」, 165(2):721-733, 2003
2. Kikkawa, Y., Shitara, H., Wakana, S., Kohara, Y., Takada, T., Okamoto, M., Taya, C., Kamiya, K., Yoshikawa, Y., Tokano, H., Kitamura, K., Shimizu, K., Wakabayashi, Y., Shiroishi, T., Kominami, R. and Yonekawa, H. 「Mutations in a new scaffold protein Sans cause deafness in Jackson shaker mice」, Hum.Mol.Genet. 12,453-461, (2003)
3. Weil, D., El-Amraoui, A., Masmoudi, S., Mustapha, M., Kikkawa, Y., Lainé, S., Delmaghani, S., Adato, A., Nadifi, S., Ben Zina, Z., Hamel, C., Gal, A., Ayadi, H., Yonekawa H., and Petit, C.: 「Usher syndrome type I G (USH1G) is caused by mutations in the gene encoding SANS, a protein that associates with the USH1C protein, harmonin」, Hum. Mol. Genet. 12,463-471, (2003)

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 岡崎 康司

国外誌

1. Nikaido I., Saito C., Mizuno Y., Meguro M., Bono H., Kadomura M., Kondo S., Kono T., Morris G.A., Lyon P.A., Oshimura M., RIKEN GER Group Members, Hayashizaki Y. and Okazaki Y., Discovery of Imprinted Transcripts in the Mouse Transcriptome Using Large Scale Expression Profiling, Genome Res, in press (2003)
2. Kasukawa T., Furuno M., Nikaido I., Bono H., Hume D.A., Bult C., Hill D.P., Baldarelli R., Gough J., Kanapin A., Matsuda H., Schriml L., Hayashizaki Y., Okazaki Y. and Quackenbush J., Development and Evaluation of an Automated Annotation Pipeline and cDNA Annotation System, Genome Res, in press (2003)

3. Okazaki Y et al; RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team, Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs, Nature, 420,563-572 (2002)

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

国外誌

1. Yoshiaki Kikkawa, Ikuo Miura, Sumiyo Takahama, Shigeharu Wakana, Yukiko Yamazaki, Kazuo Moriwaki, Toshihiko Shiroishi and Hiromichi Yonekawa : 「 Microsatellite database for MSM/Ms and JF1/Ms, molossinus –derived inbred strains 」, Mammalian Genome, 12, 750-752, (2001)

国立遺伝学研究所系統生物研究センター 城石 俊彦

国外誌

1. Floyd, J., Gold, D., Concepcion, D., Poon, T., Wang, X., Keithley, E., Chen, D., Ward, E., Chinn, S.B., Friedman, R. A., Yu, H-T., Moriwaki, K., Shiroishi, T. and Hamilton, B. A. A natural allele of *Nxf1/TAP* suppresses retroviral insertion mutations. Nature Genet. in press
2. Oka A, Mita A, Sakurai N, Yamamoto H, Takagi N, Takano-Shimizu T, Toshimori K, Moriwaki K, and Shiroishi T. Hybrid Breakdown Caused by Substitution of X Chromosome between Two Mouse Subspecies. Genetics in press.
3. Isobe, T., Yoshino, M., Mizuno, K-I., Lindahl, K. F., Kiode, T., Gaudieri, S., Gojobori, T. and Shiroishi, T. Molecular characterization of the Pb recombination hotspot in the mouse major histocompatibility complex class II region. Genomics, 80, 229-235, (2002).
4. International Mouse Mutagenesis Consortium: Functional Annotation of Mouse Genome Sequences. Science, 291, 1251-1255, (2001).

国立遺伝学研究所系統生物研究センター 小出 剛

国外誌

1. Koide T., Moriwaki K., Ikeda K., Niki H., Shiroishi T. : 「 Multi-phenotype behavioral characterization of inbred strains derived from wild stocks of *Mus musculus*. 」, Mammalian Genome, 11, 664-670, (2000)

理化学研究所ゲノム科学総合研究センター 若菜 茂晴

国外誌

1. Wakana S., Sugaya E, Naramoto F, Yokote N, Maruyama C, Jin W, Ohguchi H, Tsuda T, Sugaya A, Kajiwara K. Gene mapping of SEZ group genes and determination of pentylentetrazol susceptible quantitative trait loci in the mouse chromosome. Brain Res. 857(1-2), 286-90 (2000).

理化学研究所バイオリソースセンター 阿部 訓也

国外誌

1. Santagati, F., Abe, K., Schmitt, V., Schmitt-John, T., Suzuki, M., Yamamura. K. and Imai, K. Identification of cis-regulatory elements in the mouse Pax9/Nkx2-9 genomic region : Implication for evolutionary conserved synteny. Genetics in press.
2. Kokubu, C., Wilm, B., Kokubu, T., Wahl, M., Rodrigo, I., Sakai, N., Santagati, F., Hayashizaki, Y., Suzuki, M., Yamamura, K.-I., Abe, K. and Imai, K. Undulated short-tail deletion mutation in the mouse ablates Pax1 and leads to ectopic activation of neighboring Nkx2-2 in domains that normally express Pax1. Genetics in press.
3. Abe, K., Yamamura, K. and Suzuki, M. Molecular and embryological characterization of a new transgene-induced null allele of mouse *Brachyury* locus. Mammalian Genome 11, 238-240. (2000)

熊本大学発生医学研究センター 山村 研一

国外誌

1. Saruta, T., Bernard, C.C.A., Okano, H., Miura, M. Targeted expression of baculovirus p35 caspase

inhibitor in oligodendrocytes protects mice against autoimmune-mediated demyelination. EMBO J. 19, 341-348. (2000)

2. Yamamura, K.: 「 Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: Implication of a dominant negative mechanism. 」, Human Mol. Genet. ,8, 387-396, (1999)

千葉大学大学院医学研究院 古関 明彦

国外誌

1. Suzuki. M., Mizutani-Koseki, Y., Fujimura, Y., Miyagishima, H., Kaneko, T., Takada, Y., Akasaka, T., Tanzawa, H., Takihara, Y., Nakano, M., Masumoto, H., Vidal, M., Isono K. and Koseki, H (2002) Involvement of the Polycomb-group gene Ring1B in the specification of the anterior-posterior axis in mice. Development 129:4171-4183.
2. Akasaka T, Takahashi N, Suzuki M, Koseki H, Bodmer R and Koga H. (2002) MBLR, a new RING finger protein resembling mammalian Polycomb gene products, is regulated by cell cycle-dependent phosphorylation. Genes Cells. 7:835-850.
3. Akasaka, T., van Lohuizen, M., van der Lugt, N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal, M., Alkema, M., Berns, A. and Koseki, H. (2001) Mice doubly deficient for the Polycomb-Group genes Meis1 and Bmi1 reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. Development. 128:1587-1597

(5)主要雑誌への研究成果発表

Journal	Impact Factor	サブテーマ1	サブテーマ2	サブテーマ3	サブテーマ4	合計
第 I 期						
NATURE	27.955	0	1	0	0	1
PNAS	10.896	1	0	0	0	1
GENOME RES.	9.559	1	0	0	0	1
HUM. MOL. GENET.	9.318	0	0	1	0	1
BLOOD	9.273	1	0	0	0	1
DEV. BIOL.	5.558	0	0	1	0	1
MECH. DEVELOP.	3.687	1	1	0	0	2
INT. IMMUNOL.	3.611	0	1	0	0	1
GENOMICS	3.418	0	3	2	0	5
PHYSIOL. GENOMICS	3.352	1	0	0	0	1
BBRC	2.946	1	0	0	0	1
BRAIN RES.	2.489	0	1	0	0	1
MAMM. GENOME	2.318	2	6	3	0	11
IMMUNOGENETICS	2.268	2	0	1	0	3
第 II 期						
NATURE GENET.	29.600	0	1	0	0	1
NATURE	27.955	2	0	0	0	2
SCIENCE	23.329	0	1	0	0	1
IMMUNITY	18.866	0	0	0	1	1
EMBO J	12.459	0	0	1	0	1
PNAS	10.896	1	0	0	0	1
GENOME RES.	9.559	8	0	0	0	8
HUM. MOL. GENET.	9.318	2	1	0	0	3
DEVELOPMENT	8.624	0	1	0	2	3
ONCOGENE	6.737	0	1	0	0	1
NUCLEIC ACIDS RES.	6.373	2	0	0	0	2
GENETICS	4.803	1	2	4	0	7
GENES CELLS	3.826	0	0	0	1	1
GENOMICS	3.418	0	1	0	0	1
PHYSIOL. GENOMICS	3.352	1	0	0	0	1
GENESIS	3.297	0	0	1	0	1
GENE	3.041	0	1	0	1	2
BBRC	2.946	2	0	0	0	2
MAMM. GENOME	2.318	3	3	1	1	8
IMMUNOGENETICS	2.268	2	0	0	0	2
BRAIN RES. BULL.	1.783	0	1	0	0	1
Exp. Anim.	0.579	2	0	0	0	2