

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18500338

研究課題名（和文）トランスジェネシスによる高頻度組換え領域の同定

研究課題名（英文）Identification of high recombination hotspots by transgenesis

研究代表者

多屋 長治（TAYA CHOJI）

財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：90175456

研究成果の概要：C57BL/6 系統で生じた被毛突然変異の連鎖解析の過程で、第 15 染色体末端近傍で雌雄により組換え率に大きな差異のあることを明らかにした。この差異は連鎖解析のパートナーに日本産野生マウス系統を用いたときより顕著であった。この領域の物理的地図を作製した結果、雄で組換えのホットスポットの存在が明らかになった。ゲノムワイドでの検索の結果、雌では顕著なホットスポットの存在は示されなかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	690,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：減数分裂、遺伝的組換え、日本産野生マウス、MSM 系統、組換え雌雄差、ホットスポット

1. 研究開始当初の背景

(1) 減数分裂時における遺伝的組換え現象は、生物の遺伝的多様性を高める重要な機構の一つである。しかし、その機構に関しては未だ不明な点が多い。これまでの被毛の形態異常を起こす突然変異の連鎖解析の過程で、マウス第 15 染色体末端近傍で組換え率が雄で雌の数十倍高いという大きな雌雄差のあることを見いだした。この雌雄差を引き起こす原因を明らかにすることは、減数分裂時の組換え機構を探る上で重要な手がかりとなると考えられる。

(2) 本研究の実験動物学への応用として、より厳密で迅速なコンジェニックマウス系統の作製が期待される。すなわち、通常コンジェニック系統の作製に際しては 8 から 12 世代の戻し交配を行う。目的とする形質、遺伝子と連鎖していないゲノム領域は、毎世代二分の一の確率で置き換わりゲノムから除去されていくので、理論的には遺伝的背景は導入系統のものに 99.6% から 99.9% 以上置換することが期待される。しかし、連鎖領域に関しては目的形質、あるいは、遺伝子の片側 5cM までコンジェニック化を進めるのに

平均 20 世代を必要とする。かりにスピードコンジュニックの手法を用いて近傍の DNA マーカーを利用してコンジュニック化を進めても、持ち込みゲノムを片側 1cM には平均 100 個体の検索が必要となる。一方、高頻度組換えを誘導する DNA 配列が同定されれば、それを遺伝子領域の上流、下流に挿入することにより、これまでコンジュニックマウスの作製で非常に困難とされてきた、目的の遺伝子のみを置き換える操作がより確実に短期間でできるようになることが期待される。とりわけ、Tg マウスの作製に際してはあらかじめ導入遺伝子の上流下流に高頻度組換えシグナルを挿入しておくことにより、容易に遺伝的背景の入れ換えを行うことができるようになり、実験動物学の育種遺伝に大きく貢献できると考えられる。

(3) 従来ヒトでは染色体末端の組換えは雄の方が高い傾向にあるといわれている。マウスでは第 1-3 染色体末端領域で雄の方が約 2 から 5 倍高く、これは雌で組換え抑制があるためという報告もあるが、調べた個体数は 100 頭以下と少ない。いずれもその雌雄差に関する詳細な検討はなされていない。これに対して筆者の系では組換え率の雌雄差は 30 倍以上でありこれに関与する要因を検討するには有利である。さらに、ゲノムの物理構造との対応関係を詳細に解析した報告もなく、トランスジェネシスによるホットスポット領域の検索も例を見ない。

2. 研究の目的

(1) 第 15 染色体末端近傍領域の解析

高頻度組換えを起こす DNA 配列を特定するために、第 15 染色体末端近傍領域のより詳細な連鎖解析、物理地図の作製、DNA マーカーの検索を行う。また、異なるマウス系統の比較から、より高頻度に組換えを起こす DNA 配列を検索する。

(2) 全ゲノム連鎖解析によるホットスポットの検索

全染色体の連鎖解析を行うことによりさらにホットスポットを検索し、そのホットスポット領域を詳細に解析することにより、さらにホットスポットを特定し、そのゲノム構造や DNA 配列を明らかにすることで、より効率的に組換えを起こす DNA 配列を特定する。

(3) 同定された領域がゲノムの挿入位置や遺伝的背景によらず遺伝的組換えのホットスポットとして機能しうるかどうかを検証するために、ホットスポットを含む DNA 配列のトランスジェネシスによりトランスジェニックマウスを作製し DNA 挿入部位に組換えホットスポットが生じるかを検索する。

3. 研究の方法

(1) 第 15 染色体末端近傍領域の DNA マーカーによる詳細な連鎖解析を行う。

(2) 大きな組換え雌雄差の存在する、第 15 染色体末端近傍領域の詳細な物理地図を作製し、組換えのホットスポットとなっている領域をより精密に検索する。

(3) 組換え雌雄差を生ずる要因を明らかにするため、種々のマウス系統を用い、連鎖解析を行う。

(4) 全染色体領域について組換え率を調査し、第 15 染色体末端近傍以外の組換え雌雄差領域、あるいは、組換えホットスポットを検索する。

(5) 組換えホットスポットに共通するゲノム構造を解析し、高頻度組換えに必要な構造を明らかにする。

(6) トランスジェネシスによる高頻度組換え領域の同定を行う。

4. 研究成果

(1) マウス第 15 染色体末端近傍の連鎖地図

実験用近交系統 C57BL/6 と日本産野生マウス由来の MSM 系統を用いた連鎖解析の結果、第 15 染色体末端近傍で組換え率に 30 倍もしくはそれ以上の大きな雌雄差が存在した (図 1)。この結果は突然変異 Ca^{Bin} の有無に依存しなかった。

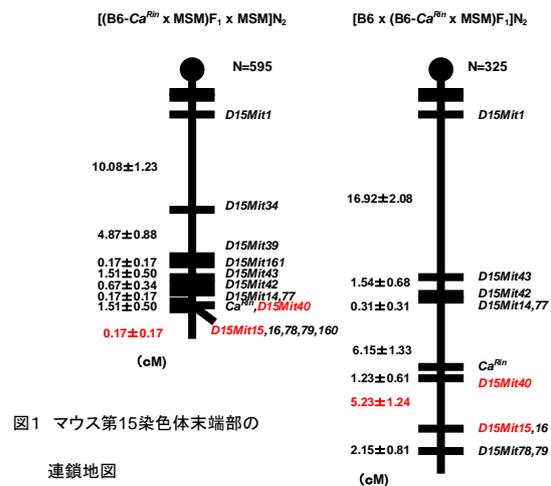


図 1 マウス第 15 染色体末端部の連鎖地図

(2) 雄における組換えホットスポットの存在

この雌雄差が雌における組換えのコールドスポットによるものか、あるいは、雄のホットスポットによるものかを明らかにするために物理地図を作製し、マーカー間の組換え率と物理的距離を比較した結果、平均的な組換え頻度と比較して 30~40 倍組換え頻度が高く、この組換え雌雄差は雄の組換えホットスポットによることを明らかにした (図 2)

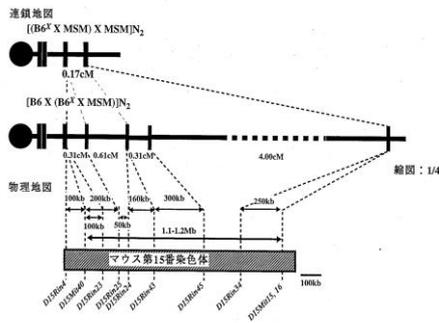


図 2 マウス第 15 染色体組換え雌雄差領域の連鎖地図

(3) 系統による差異

組換え雌雄差現象がマウス系統に依存するかどうかを検討するために種々のマウス系統を用いてこの領域の組換え率を比較した (図 3、図 4)。その結果、何れの組み合わせでも同様の雌雄差は確認されるが、日本産野生マウス由来の MSM、JF1 系統を用いた場合、より顕著な差が見られた。

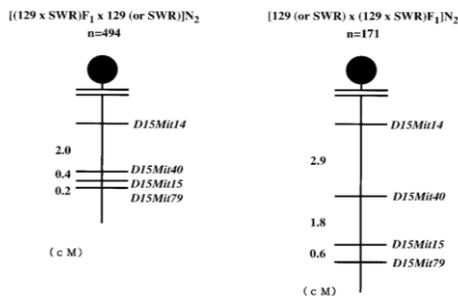


図 3 *M. musculus domesticus* 由来の近交系 129 と SWR を用いた第 15 染色体末端近傍の連鎖地図

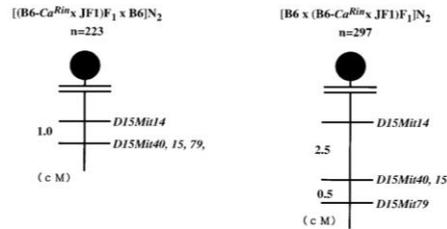


図 4 B6-Ca^{Rin} と日本産野生マウス (*M. musculus molossinus*) 由来の近交系 JF1 を用いた第 15 染色体末端近傍の連鎖地図

(4) 雌に置けるゲノムワイドの組換えホットスポットの解析

第 15 染色体末端近傍に示されたような組換え雌雄差を示す領域がマウスゲノム中に他にも存在するかどうかの検索を C57BL/6 と MSM 系統の組み合わせで行った。雌に関する連鎖解析の結果、第 2、第 11、第 19 染色体末端近傍に極めて組換え頻度が高いと示唆される領域が明らかになったが、その後、より詳細で正確なゲノム情報が明らかになりそれに基づく解析の結果、当初予想したほどのホットスポットは存在しないことが明らかになった。雄に比較して雌では比較的均一に組換えが生じている可能が示唆された。今後、雄に関する連鎖解析も含めてより詳細に検討していきたい。

(5) トランスジェネシスによる高頻度組換え領域の同定については、現在のところ明確な成果は得られておらず、今後研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多屋 長治 (TAYA CHOJI)

財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号： 90175456

(2) 研究分担者

2006~2007 年度

吉川 欣亮 (KIKKAWA YOSHIKI)

東京農業大学・生物産業学部・准教授

研究者番号： 20280787

(3)連携研究者

2008年度

吉川 欣亮 (KIKKAWA YOSHIAKI)

東京農業大学・生物産業学部・准教授

研究者番号：20280787