

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：平成 23 年度～平成 24 年度

課題番号：23650234

研究課題名（和文）内在変異蓄積法による新たな量的デザインマウスの開発

研究課題名（英文）Production of new design mice by accumulation of mutations

研究代表者

八木 健 (YAGI TAKESHI)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：10241241

研究成果の概要（和文）：

内在的な突然変異率を高めた mutator マウスの長期継代により、致死的でない多数の変異を蓄積させ、量的形質の多様化したマウスの開発に取り組んだ。その結果、継代系統間で量的形質(体重、体長、尾長、繁殖能力)に差異が認められ、同一の継代系統内の個体ごとの量的形質のバラツキの増大も観察された。生化学検査の結果、肝臓や腎臓の機能障害や動脈硬化が疑われるマウスも見つかった。新型シーケンサーを用いた解析により、各継代系統には1万を超える新規変異の存在が示唆された。量的形質を支配する多因子変異の新しい解析手法として有効だと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

To create new model to investigate mutational network controlling quantitative traits in vivo, we established several mutation accumulation (MA) lines with long term breeding of mutator mice. We observed differences in quantitative traits (weight, body length, tail length) between and within each of MA line. Biochemical analysis revealed MA lines include mice having dysfunctions of liver or kidney or arteriosclerosis. NGS analysis showed abundant de novo mutation in MA lines. Our approach using the MA lines would provide a new way to understand quantitative genetics in mammalian model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

これまでのマウス遺伝学での解析は、単一遺伝子の機能欠損や有害突然変異を対象とした解析であり、遺伝的多型により生じる量的形質を捉える系ではない。本研究では、私たちがこれまでに作製した内在的に遺伝子変異を高発するマウス系統を利用し、このマウス系統を継代することにより、生きたマウス個体に遺伝的多型を蓄積させ、エピスタシ

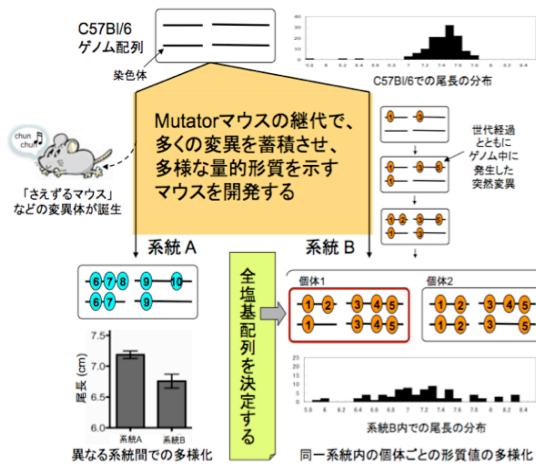
ス（多重な遺伝的変異の相互作用）や量的形質をもたらす遺伝的多型の解析を解析する実験系、新たな量的デザインモデル作製系の確立を試みる。本研究期間において、遺伝的多型が蓄積したマウス個体を作製し量的形質を含む表現型の解析を行う。本研究は、これまで難しかった量的形質に注目し、新たな遺伝的多型をもつマウス系統を確立し、あたらなヒト疾患モデルを確立する意義の高い

ものである。

2. 研究の目的

ノックアウトマウスや変異マウスの作製により、生命現象をもたらす分子メカニズムが明らかとなり、ヒト病的疾患モデルの開発も進んできている。しかし、これまでのノックアウトマウスや変異マウスを利用した解析系は、主に単一遺伝子の有害突然変異を対象とした生命現象の解析やモデルの開発であり、遺伝的多型により生じる量的形質を捉える系にはなっていない。野生生物では、生存に有利でも不利でもない遺伝的多型が蓄積し（木村資生、1986）、ヒトにおける遺伝的多型をもたらす、量的形質や種々の疾患における影響を与えている。このようなエピスタシス（多重な遺伝的変異の相互作用）や量的形質をもたらす遺伝的多型の解析をする実験系は少なく、哺乳類のマウス個体レベルでのアプローチについては皆無であった。そこで本研究では、これまでに作製した内在的に遺伝子変異を高発するマウス系統を利用し、このマウス系統を継代することにより、生きたマウス個体に遺伝的多型を蓄積させ、量的形質の変化を解析する実験系、新たな量的デザインモデル作製系の確立を試みた。

3. 研究の方法



研究方法の概要: Mutatorマウスの長期継代により、変異蓄積系統を作製し、量的形質変異を持つマウスの作出を試みる。本研究では、変異蓄積系統の作製を進めるとともに、個々の個体の量的形質の測定を行う。同時に、NGSを利用した全ゲノム解析にも取り組む。

本研究では、私たちがこれまでに作製した染色体 DNA 複製時の忠実度を低下させた C57BL/6 マウス系統（遺伝子変異率増加マウス、Mutator マウス、Uchimura et al. 2009）を用いて兄妹交配し、継代することにより遺伝子変異を蓄積させたマウス系統を確立する。その過程で、各個体の尻尾のマウス DNA を保存するとともに、生きたマウス個体における量的形質を含む新たな表現形質の解析を進めてきた。また、新しい表現形質をもつ

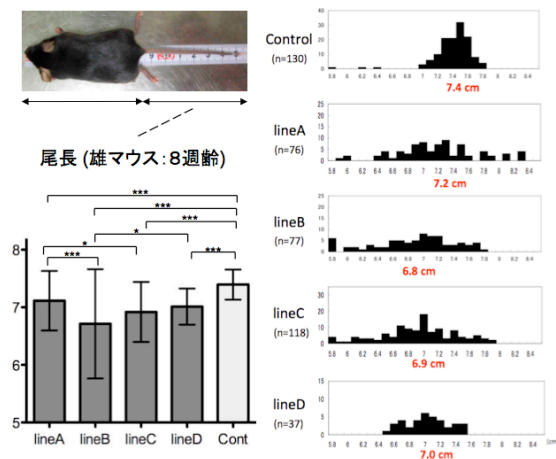
マウス系統の量的形質及び表現形質については、形質ごとに、形態、行動、組織、生化学などの解析も行った。さらに、遺伝子変異の同定を進めるため、「ゲノム支援」との連携により、次世代シーケンサーを利用した全ゲノム配列の解読に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 作製した Mutator マウス系統を複数の系統（合計 15 系統）に分け、兄妹交配による継代を進めてきた。本研究期間も含め、これまでの 7 年間で、最大で 20 世代の継代が遂行された。

(2) これらの継代実験からは、これまでに「小鳥のように鳴く変異体」、「四肢が短い変異体」、「指の数が減少した変異体」など、40 種以上の新規表現型をもつ変異マウスを得ることに成功した。

(3) 本研究では、単一の遺伝子座を対象とした解析では取り扱いが難しい量的形質に特に注目して解析を進めた。独立に継代を重ねた Mutator 系統間では、計測した量的形質（体重、体長、尾長）において統計的に有意な差が認められた。また、世代経過とともに、繁殖能力が低下する傾向が認められ、いくつかの系統では兄妹交配の継続が不可能になり、継代実験の断絶が生じた（断絶した系統についても精子凍結等を実施して、遺伝的資源としての確実に保存を行った）。



10世代以上の継代がなされた変異蓄積系統で生じた量的形質（尾長）の分布の例。系統間での有意差（図B左）に加えて、遺伝的背景が近いと考えられる同一系統内でも、分布の広がり（ばらつき）の拡大（図B右）が観察された。

(4) これらの系統全体で認められる量的形質の変化に加えて、今回の解析では、遺伝的背景が近いと考えられる同一の継代系統内の個体間の量的形質（体重、体長、尾長）の値にもばらつきが増大することが観察された。このばらつきの増大は、継代数が多い系統で

特に顕著に認められた。このことは、長期継代での変異蓄積により生じた、個体発生を支える遺伝的バッファリングの緩和の結果であると考えられ、これらの表現型変異を生み出す原因として、複数の遺伝子変異間ネットワークの関与が疑われる。

(5) 本実験で認められた同一系統内での量的形質の変化について、ヒトの疾患モデルとの関連を明らかにするため、血清を用いた生化学試験を行った。その結果、見た目の表現型は正常であるにも関わらず、Mutator 系統のマウスには、肝臓や腎臓の機能障害、動脈硬化などが疑われるマウスが存在することが明らかになった。実際に、TG(トリグリセリド)、AST、ALT、T-BIL、Na、Cl などの測定値では、Mutator 系統では、野生型マウスを用いた同等の長期継代系統に比べて、統計的に有意に分散が増大していた。このことから、本方法で作製された変異蓄積系統は、生活習慣病のモデルマウスの作製法として有効であることが示唆される。

(6) これらの表現型変異を生み出すに至った遺伝的基盤を明らかにするため、新型シーケンサを利用して、全ゲノム配列の解読を行った。17 世代が経過した mutator 系統のマウスと継代開始時(継代数:0 世代)での雌雄ペアのマウスについて解析を行った。現時点では、解析途中であるため、予備的な結果となるが、Mutator マウスを用いた変異蓄積系統の各系統には、ENU 等の mutagenesis で誘発される変異(3000 程度)より多い、少なくとも1万程度の新規の変異が含まれることが示唆されている。

(7) 本研究によって、Mutator マウス系統を用いて作製した変異蓄積系統は、質的な形質変異に加えて、ヒト疾患にも関連するような量的形質を多様化させるマウスを作出することが可能であることが示され、実際に多数の de novo 変異が確認された。これにより、従来までは解析が難しいと考えられた、多数の変異と量的形質の関係の直接的な解析が可能になると考えられ、新たな量的デザインモデル作製系を確立することができた。

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)

[雑誌論文] (計4件)

(1) Yokota S, Hirayama T, Hirano K, Kaneko R, Toyoda S, Kawamura Y, Hirabayashi M, Hirabayashi T, and Yagi T. Identification of the cluster control region for the Protocadherin-b genes located

beyond the Protocadherin-g cluster. *J Biol Chem* 286, 31885-31895 (2011)
doi:10.1074/jbc.M111.245605

(2) Yagi, T. Molecular codes for neuronal individuality and cell assembly in the brain. *Front Mol Neurosci* 5, 45 (2012)
doi: 10.3389/fnmol.2012.00045

(3) Hirayama T, Tarusawa E, Yoshimura Y, Galjart N, and Yagi T. CTCF is required for neural development and stochastic expression of clustered Pcdh genes in neurons. *Cell Reports* 2, 345-357 (2012)
doi.org/10.1016/j.celrep.2012.06.014

[学会発表] (計20件)

(1) 内村有邦、日高裕子、増村健一、能美健彦、三浦郁夫、若菜茂晴、八木 健。マウスをモデルとした、高頻度に発生する生殖系列突然変異が次世代以降の個体に与える影響の解析。日本環境変異原学会 第40回大会。2011年11月22日 東京

(2) Arikuni Uchimura, Mouse evolution project: Understanding genetic buffering system in mammalian. Indo-Japan meeting National Center for Biological Sciences 2012年1月10日 Bangalore (India)

(3) 内村有邦。mutator マウスの内村有邦長期継代が個体の表現型に及ぼす影響の解析。日本遺伝学会第84回大会(招待講演)2012年9月24日 九州大学

(4) 内村有邦。ヒト可聴音域で発声行動を示す新規変異マウスの解析。日本遺伝学会第84回大会(招待講演)2012年09月26日 九州大学

(5) 内村有邦。哺乳類の生殖系列突然変異が後世代の個体に及ぼす影響の解析。第25回変異機構研究会 夏の学校(招待講演)2012年06月30日~2012年07月01日 小牧勤労センター

(6) 内村有邦。Experimental mouse evolution model can produce variable novel phenotypes: the birth of singing mice。新学術領域研究「ゲノム支援」国際シンポジウム2013年1月9日~2013年1月10日 東京大学:伊藤国際学術研究センター

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学 生命機能研究科 心生物学研究室

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/yagi/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 健 (YAGI TAKESHI)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：10241241

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

内村 有邦 (UCHIMURA ARIKUNI)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教

研究者番号：20513063