

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700441

研究課題名(和文) 遺伝学的モニタリングのための超迅速マウス遺伝子プロファイリングシステムの開発

研究課題名(英文) Development of high-throughput gene profiling system to monitor genetic background for mouse strains

研究代表者

三浦 郁生 (MIURA, IKUO)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・開発技師

研究者番号：70624948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子改変マウスの表現型解析を行う際に、遺伝背景の統御が重要である。本研究で開発した遺伝子プロファイリングシステムは、効率的な遺伝背景検出が可能でTaqManアッセイ法がベースとなっている。本システムは、最汎用系統であるC57BL6(B6)系統を亜系統・生産ブリーダーレベルで判別可能で、Y染色体・mtDNA由来を含む184 SNPsマーカーとドライバーマウス由来の8つの導入遺伝子検出マーカーを合わせた192マーカーを、同時に1枚の384ウエルプレート上で検出可能なデザインであり、出力されるデータを表形式へ変換するツール開発によって、効率的で詳細な遺伝背景検査をスムーズに行うことを可能とした。

研究成果の概要(英文)：It was considered that there was affection of ununiformed genetic background of the mouse on analyzing its phenotyping. We constructed the high-throughput gene profiling system for the evaluation of genetic background configured with 192 markers (consisted of 184 SNPs and 8 transgenes) using 384 well plate format based on TaqMan assay technologies. This system was possible to get information such as the ratio of replacement to backcrossing strain, the detailed difference in each B6 substrains and production breeders of B6/J and B6/N and the paternal or maternal origin from SNPs markers and the existence of transgenes as gene modification (i.e. neo, cre, and Gfp etc.) from these detection markers. We developed tool to convert the table from the raw genotyping data to the strain distribution patterns and enabled effective to detection detailed genetic background. In addition, we have improved to effective gene mapping among B6 substrains by using SNPs markers.

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：遺伝学 育種学 ゲノム SNPs

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子改変マウスの遺伝背景統御の必要性

ライフサイエンス研究で、非常に有効ツールとして遺伝子改変マウスが多数開発され、対象遺伝子の機能解明に活用されるが、正確な表現型解析を行うためには、開発したマウス系統の遺伝背景の十分な統御が必須である。遺伝背景の不均一性が要因となり、その影響を受けた結果、表現型が不明瞭となり、対象遺伝子の表現型への効果を正確に把握することを妨げる恐れがあった。実際、マウス系統の網羅的な表現型解析を提供している理化学研究所バイオリソースセンター日本マウスクリニックでは、B6 亜系統間のような近縁系統間においても表現型の差異が検出された。これは、精細な表現型解析を行う上で、解析個体群の遺伝背景が十分な統御によって均一化されることによって、遺伝背景の要因を排除・軽減すべきであることを示唆している。一方、遺伝子改変マウスは、受精卵へのマイクロインジェクション・ES 細胞からキメラ作製・Cre 等のドライバーマウスとの交配・戻し交配によるコンジュニク化等を経て開発されるが、それぞれが異なる系統に由来するケースが一般的で、複数系統の遺伝背景が遺伝子改変マウス系統の中で混在する状況を避けることは難しい。したがって、十分な戻し交配による遺伝背景の均一化が重要であるが、Y 染色体やミトコンドリア DNA (mtDNA) の置換やドライバーマウスのベクター由来の不要な導入遺伝子の残存等も一連の遺伝背景を統御する上で、大きな要因として考慮されるべきである。しかしながら、このような多方面からの遺伝背景を包括的かつ厳密にモニターすることは非常に大きな労力と費用を要するといった側面が一因となって、遺伝子改変マウス系統の遺伝背景統御は、しばしば混乱や問題が生じてしまっている状況である。研究コミュニティからのニーズとして、簡便な遺伝学的モニタリングを可能とする遺伝子プロファイリングシステム開発が背景としてあった。

(2) マウス SNPs 情報の充実と TaqMan アッセイ法の利点

昨今のバイオインフォマティクスの著しい充実の中で、実験用マウス近交系統間に存在する莫大な SNPs 情報が公共データベース (DB) 上に公開されてきた。B6/J と B6/N といった亜系統間レベルの SNPs 情報も DB 上に数多く確認可能であった。これらの情報を活用することで、詳細な亜系統レベルでの遺伝背景の検出が可能であると考えられた。一方、これら SNPs をマーカーとして検出する方法に TaqMan アッセイ法があった。TaqMan アッセイが他の検出方法と比較して優れている特長を3つ挙げると、**第1に**、実験手技が非常にシンプルなことである。対象 SNPs を検出可能な蛍光標識された TaqMan プローブを用いた PCR と、その反応後に特別な処理を必

要とせずに直接蛍光強度を機器で検出するだけでよく、労力の大きな軽減につながると考えられた。**第2に**、384 ウエルプレートフォーマットに準じていることから必要十分な高いスループットを有する点である。また、DNA アレイベースの検出方法では不可能な、任意の SNPs マーカーのみでのアッセイやマーカー構成の変更も比較的容易で高いフレキシビリティを有しており、高い運用性を持つと考えられた。**第3に**、SNPs 検出と対象とする特定遺伝子の検出という異なる性質のマーカーを同一プレート上で同時にアッセイ可能な点である。これは一連の遺伝背景統御の中で SNPs マーカーによる由来系統の検出とドライバーマウス由来の不要な導入遺伝子の残存のような、遺伝子改変マウスの品質検査を同時に可能で、非常に効率的な遺伝子プロファイリングシステムの構築が可能になると考えられた。

2. 研究の目的

効率的な遺伝子プロファイリングシステムを開発するにあたって最も重要な点は、検出するマーカーセットの構成にある。対象となる系統をある程度絞り込んだ方が、比較的少ないマーカー数でも、十分に精度の高い結果が得られると考えた。実際、遺伝子改変マウスの大多数は、実験用近交系統の中でも、とりわけ B6 系統を基準の遺伝背景としている。つまり B6 系統の検出をキーとしたマーカーセレクションを行うことが最も効果的と考えられた。したがって以下の3つのガイドラインに沿った、マーカー選抜を行うことで効率的な遺伝子プロファイリングシステムの構築という目的達成を図った。**1つ目のガイドライン**は、ゲノムワイドな均一性を検出するための常染色体と X 染色体上の SNPs マーカーで、最汎用系統である B6 系統への戻し交配を前提とし、B6 系統が特異的にその他の多くのマウス系統に対して多型を有するマーカーを選択する。亜系統間である B6/J と B6/N 間の多型マーカー、さらにはその生産ブリーダー間の多型マーカーを加え、より詳細な戻し交配系統の把握を可能とする。**2つ目は**、父系・母系の由来系統検出のための Y 染色体と mtDNA 上の SNPs マーカーで、系統ごとの SNPs パターンの違いから由来系統を判別するものである。マウスの系統維持過程において、雄雌いずれか一方のキャリアを交配毎に常に選択すると Y 染色体または mtDNA が置換されず、戻し交配回数を重ねても遺伝背景の均一化は不完全なままであり、これを検出可能とする。**3つ目は**、遺伝子改変系統作製の際に利用される *neo*, *cre*, *Gfp* 等のドライバーマウス由来導入遺伝子の検出マーカーである。対象となる遺伝子改変マウスの作製過程の評価や慮外の導入遺伝子残存をモニターするためである。これらの観点から選抜されたマーカーを1枚の384 ウエルプレート上に配置し、アッセイを行うこと

で効率的な実験系を確立する。また、得られた出力データから strain distribution patterns (SDPs) 表形式への変換ツールを開発し検査対象マウスのスムーズな遺伝背景の把握を可能にする。

3. 研究の方法

本研究を開始する以前に、理化学研究所ゲノム科学総合研究センターのマウス ENU ミュータジェネシスプロジェクト中の高速遺伝子マッピングシステムにおいて、ゲノム上の約 750 loci の SNPs を検出可能な TaqMan プローブセットを既に構築済みであった。はじめに、これらのプローブに対し、我が国において、主に供給されている B6 系統の亜系統・生産ブリーダーごとの系統、主要な実験用近交系統、野生由来系統から構成される 31 系統の SNPs アレルパターンの調査を行った(表 1)。

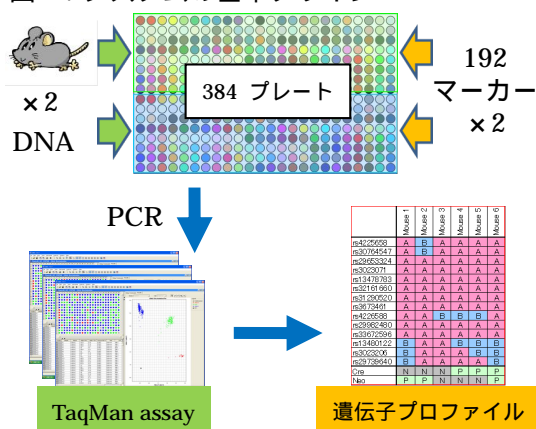
表 1: SNPs アレルを調査したマウス系統

カテゴリー	系統名	カテゴリー	系統名
B6/J 生産ブリーダー	C57BL/6Jcl	実験用近交系	SMJ
	C57BL/6J		A/J
	C57BL/6JmsSlc		FVB/N
B6/N 生産ブリーダー	C57BL/6NJcl		NZB/N
	C57BL/6NCrl		NZW/N
	C57BL/6NCrSlc		KK/Ta
実験用近交系	C57BL/6NTac		AKR/J
	129X1/SvJ		BTBR T+ tf/J
	129S1/Sv		CBA/J
	129S2/Sv		NOD/Shi
	129/Sv-ter*	野生由来	MSM/Ms
	DBA/2J		JF1/Msf
	C3H/HeJ		CAST/EiJ
	C3H/HeN		HMI/Ms
	BALB/cA		KJR/Ms
	BALB/cByJ		

マーカーが低密度なゲノム領域や Y 染色体と mtDNA 上の SNPs、および B6 系統内の SNPs を公共 DB より探索し DNA シークエンシング法によって SNPs アレルの確認を行った。結果、多型性が認められ、かつマーカー選択のガイドラインに合致した SNPs とドライバーマウス由来導入遺伝子の検出マーカーとして 10 の遺伝子 (*neo*, *puro*, *hyg*, *Cre*, *flp*, *Gfp*, *lacZ*, *HSVtk-neo*, *pgk-neo*, *IRES*) を対象に、新規に TaqMan プローブを設計し、そのバリデーションを行った。これら、TaqMan プローブの中から、最終的には計 192 マーカーが選抜され、これを 384 ウエルプレート 1 枚あたり 2 セット設置し、2 個体分の反応が行えるようにシステムを基本デザインした(図 1)。アッセイの際には、処理個体数に合わせて予めプレートの各ウエルに分注し冷凍保存された TaqMan プローブセットを凍結乾燥させ、そこに DNA と反応試薬を混合したものを分注し PCR 反応を行う。反応後、384 プレートの各ウエルの蛍光強度を専用の機器にて測定し、その値から遺伝子型判定が行われる。さらに、出力されてくるデータを機能的に処理可能にすべく Microsoft Access (ACCESS) をベースとした省力的な SDPs 表形式への変換ツールを開発した。このように確立されたシステムによって、迅速な遺伝子プロファイリング

が可能となり、個体レベルでの遺伝背景の把握が容易で非常に有効である。

図 1: システムの基本デザイン



4. 研究成果

(1) SNPs マーカーの選抜と遺伝子プロファイリングシステムの構築

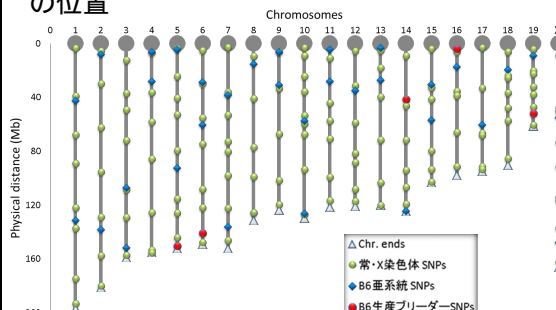
表 2a: システムのマーカー構成

Marker type	マーカー数
常・X染色体 SNPs	138
B6/J-N 間 SNPs	33
B6生産ブリーダー間 SNPs	5
Y 染色体 SNPs	4
ミトコンドリア DNA SNPs	4
ドライバーマウス由来導入遺伝子	8
計	192

表 2b: B6 亜系統と生産ブリーダー間の SNPs アレルパターン

B6/J			B6/N				数
Crj	Jcl	Slc	Crj	Jcl	Slc	Tac	
A	A	A	B	B	B	B	119
A	A	B	B	B	B	B	10
A	B	B	B	B	B	B	19
A	A	A	B	B	A	B	10
A	A	A	A	B	A	B	3
A	A	A	A	A	A	B	3

図 2: 常・X 染色体上のマーカーのゲノム上の位置



既存及び新規 SNPs のアレルパターンを調査し、TaqMan プローブを構築した結果、約 880 loci においてバリデーション済みのマーカーを開発できた。また、ドライバーマウス

由来の8つ導入遺伝子検出マーカーを開発できた。その中から本研究において選抜された192マーカーの構成を表2aに、B6亜系統間・生産ブリーダー間に認められたSNPsのアレルパターンを表2bに示した。また、これら選抜されたマーカーの常・X染色体上の位置を図2に示した。常・X染色体上から選抜された138SNPsマーカーは、B6系統をキーに他の多くの系統と多型を有しており(65-97%)、戻し交配率を多くのマウス系統で明らかにすることが可能となっている。次に、B6亜系統間の33SNPsマーカーと生産ブリーダー間の5SNPsマーカーが選抜された。表2bに示すように、我が国の主要なB6の7亜系統のSNPsアレルパターンの違いを活用することで、これらは区別可能である。図2は選抜されたSNPsマーカーのゲノム上の位置を示しているが、全体を広くカバーしていることが明らかである。さらに、Y染色体とmtDNA上より、それぞれ4SNPsマーカーが選抜され、そのアレルパターンが表3に示されている。Y染色体ではB6系統に対して多くの系統で、アレルパターンが異なっており判別が可能である。mtDNAでは、実験用近交系間にSNPsが存在せず、野生由来の系統との間に多型が認められた。またドライバーマウス由来の導入遺伝子を検出するマーカーの開発を試みた結果、8つの遺伝子(*neo*, *puro*, *hyg*, *Cre*, *Gfp*, *lacZ*, *HSVtk-neo*, *IRES*)を検出可能なマーカーの作製に成功した。このようにして遺伝子プロファイリングシステムの中で使用する192マーカーセットが構成された。

表3: Y染色体とmtDNAのSNPsアレルパターン

Y染色体	rs51567171	rs33901011	rs49163088	rs13484120
B6, BALB	A	A	A	A
129, A, NZB, NZW, KK, SM	A	A	B	A
FVB, AKR, BTBR, PGN2, NOD	B	A	B	A
C3H, CBA, DBA2, CS, JF1	A	B	B	B
MSM, KJR	A	B	B	A
CAST, HMI	B	B	B	A

mtDNA	rs33253338	rs33254239	rs33254699	rs33258767
実験用近交系	A	A	A	A
MSM, JF1	B	B	B	B
KJR	B	B	B	A
CAST, HMI	B	B	A	A

192マーカーでのTaqManアッセイが384ウェルプレートフォーマットでハイスループットに実施され、遺伝子型判定の生データが

出力されるが、検査対象の遺伝背景を検出するためには、個体ごとにマーカーの種類や染色体順に分類されたSDPs表形式に整形する必要があり、これをスムーズに変換できるツールがACCESSをベースに開発された。予めマーカーの位置情報や基準となる各マウス系統のアレルパターンを個々のローカルPCのACCESSにデータベース化しておく。そこに専用の解析のソフトウェアから出力されたテキスト形式の生データを取り込み、基準となるリファレンス系統を指定することで、自動的に個体単位に整形されたSNPsパネルを容易に出力可能になっている。比較したい任意のリファレンス系統を選択し複数同時に出力可能となっており、システムは非常に効率化された。

(2) 遺伝子プロファイリングシステムの運用結果

構築した遺伝子プロファイリングシステムの日本マウスクリニックにおける運用結果を表4に示した。遺伝子改変マウス124系統を対象にこれらの遺伝背景を事前に検査したところ、実に7割弱では、遺伝背景均一性の不備と考えられるケースが認められた。検出された問題点に対して、表現型解析への影響を排除するため、追加の戻し交配やY染色体の置換等を行い、対象マウス系統の遺伝背景の均一化を図ることが可能であった。その結果、高品質のマウスを用いた検査が可能となり、日本マウスクリニックでの高精度な表現型解析の提供につながっている。構築した遺伝子プロファイリングシステムをホームページ上に公開し、内容紹介するとともに、遺伝子改変マウスの遺伝背景統御の重要性に関して周知に努めている(http://ja.brc.riken.jp/lab/jmc/mouse_clinic/assistive/index.html)。

表4: 遺伝背景検査結果(日本マウスクリニック)

内訳	%
問題なし	31.5
不適切な戻し交配 (回数・兄妹)	33.1
B6亜系統の混在 (B6/JとN・生産ブリーダー)	33.9
Y染色体未置換	25.0
導入遺伝子未除去	4.0
遺伝的背景が不明瞭	12.1

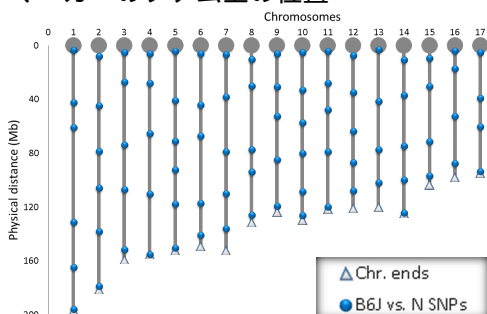
(重複あり)

(3) B6亜系統間SNPsを活用した遺伝子マッピングへの展開

一連のマーカー開発の中で、B6亜系統間のSNPsが多数見出され、そのTaqManプローブの開発に成功している(表2b)。これらのSNPsマーカーを使い、表現型解析に有利な近縁交配系統間での遺伝子マッピングへ転用することが有効と考えられた。遺伝子マッピング

では、カウンター系統との交配をおこない N2・F2 の組換え体が作製され、これらの表現型の有無と遺伝子型との相関から責任遺伝子座の染色体上の位置を特定する。しかし、交配系統間に存在する遺伝背景の違いが修飾因子となり、対象の表現型が消失または弱くなるといった影響が考えられた。これに対して、近縁系統を交配系統に用いることで、その影響を無いか非常に小さくすることができると考えられた。一方で、近縁系統間の遺伝子多型は少なくなるため、いままでは、このような近縁系統間での遺伝子マッピングは困難であったが、今回開発した B6 亜系統間の SNPs マーカーをゲノム上に約 15cM 間隔の 98 loci を選抜することで B6/J と B6/N を交配系統とする遺伝子マッピングシステムへ展開した(図 3)。構築したマッピングシステムをホームページ上に公開し、遺伝子マッピング支援を展開している。B6 亜系統間に留まらず、B6 系統をキーにした様々な交配系統を対象に、遺伝子マッピング支援を実施しており、研究コミュニティーに大きく貢献することが期待される(<http://ja.brc.riken.jp/lab/jmc/mapping.html>)。

図 3: B6 亜系統間マッピングシステムの SNPs マーカーのゲノム上の位置



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)

[学会発表](計 5 件)

三浦 郁生 他 「C57BL/6 系統を精細に判別可能な高速遺伝子プロファイリングシステムの改良」(第 61 回日本実験動物学会総会) 2014/5/17 札幌コンベンションセンター・札幌市

三浦 郁生 他 「C57BL/6 亜系統間による SNPs ベース高速遺伝子マッピングシステムの開発と有効性」(日本遺伝学会第 85 回大会) 2013/9/20 慶應義塾大学日吉キャンパス・横浜市

三浦 郁生 他 「C57BL/6 亜系統間の遺伝子マッピングシステムの構築とその有用性」(第 60 回日本実験動物学会総会) 2013/5/15 つくば国際会議場・つくば市

三浦 郁生、若菜 茂晴 「理研 BRC 日本マウスクリニック：高速遺伝子プロファ

イリングシステムによる遺伝背景検査の実際とその重要性」(第 26 回モロシヌス研究会) 2012/6/15 東京大学弥生講堂一条ホール・東京

三浦 郁生 他 「日本マウスクリニックにおける遺伝子改変マウス系統の遺伝背景の現状とプロファイリングシステムの重要性」(第 59 回日本実験動物学会総会) 2012/5/26 別府国際コンベンションセンター・別府市

[その他]

ホームページ等

http://ja.brc.riken.jp/lab/jmc/mouse_clinic/assistive/index.html

<http://ja.brc.riken.jp/lab/jmc/mapping.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 郁生 (MIURA IKUO)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・開発技師

研究者番号：70624948

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし