

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640047

研究課題名(和文) 内在変異蓄積法による新たな生命デザインマウスの開発

研究課題名(英文) Novel animal model by using high germline mutation rate

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生殖系列での突然変異率は遺伝的多様性獲得や進化において重要な指標である。本研究では、C57BL/6マウス系統とDNA複製エラーを増大させたミューテータマウス系統における生殖系統での突然変異率を明らかにし、20世代以上の長期兄妹交配による表現型への影響を解析した。その結果、ミューテータマウス系統は、C57BL/6マウス系統に比べ17倍、生殖系列での突然変異率が高く、異常な表現型の出現率は4倍高く、体重や体長などのばらつきの増加も認められた。また、長期兄妹交配によりミューテータマウス系統では、妊娠率の低下、寿命の短縮、産子数の低下が認められ、絶滅する系統も出現した。

研究成果の概要(英文)：The germline mutation rate is an important parameter that affects genetic variation and the rate of evolution. In this project, we studied genome-wide mutation rates and their long-term effects on phenotype in more than 20 generations of wild-type C57BL/6 mice and mutator mice, which have high DNA replication error rates. The mutation rate in mutator mice was 17 times that in wild-type mice. Abnormal phenotypes were 4-fold more frequent in the mutator lines than in the wild-type lines. After several generations, the mutator mice reproduced at substantially lower rates than the controls, exhibiting low pregnancy rates, lower survival rates, and smaller litter sizes, and many of the breeding lines died out.

研究分野：遺伝学

キーワード：突然変異 マウス 疾患モデル 進化 生殖系列 DNA複製

1. 研究開始当初の背景

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。この様なエピスタシス(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。

2. 研究の目的

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、新たな生命デザインモデル作製系の確立を試みる。

3. 研究の方法

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, 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行う。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、生化学などの解析を行い、遺伝子変異の同定を行う。これらにより、生きたマウス個体レベルでの量的形質を含む新たな生命デザインをもつ表現形質を捉え、形質と遺伝的多型を解析する新たなヒト疾患モデル作製システムの構築を進める。

4. 研究成果

(1) 変異蓄積マウス系統の樹立

遺伝子変異率増加マウス(DNA ポリメラーゼ 改変マウス)と野生型マウス(C57BL/6 系統, コントロール)を用いて、兄妹交配を続けることで、変異蓄積マウス系統の構築を進めてきた。これまでに、最大 26 世代が継代され、野生型マウス 8 系統、Mutator マウス 15 系統の合計 23 系統の変異蓄積系統の樹立に成功した。

また、DNA ポリメラーゼ 改変マウスとは異なる遺伝子の改変により作出された遺伝子変異率を増加させたマウス(New 変異率増加マウス)を利用して兄妹交配を繰り返すこ

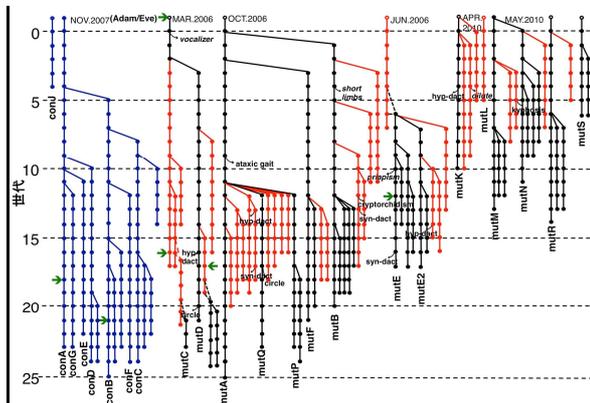


図1. 変異蓄積マウス系統の家系図。兄妹交配の繰り返しにより、野生型マウスで8系統、遺伝子変異率増加マウスで15系統の変異蓄積系統の樹立に成功した。

とで、新しい機能を示す変異蓄積マウス系統の構築にも取り組んだ。この New 変異率増加マウスを用いて、これまでに、6 世代の継代がなされた 3 系統の変異蓄積マウス系統の樹立に成功した。

(2) 多様な表現型形質の創出

遺伝子変異率増加マウスの継代からは、高頻度に表現型形質の異常が観察された。可視的な表現型異常に限った解析では、遺伝子変異率増加マウスの継代では、全体の 11.0%の個体($n=6,229$)で表現型異常が認められ、野生型マウスの継代(2.7%の異常, $n=1,649$)に比べて、有意に頻度が上昇していた。遺伝子変異率増加マウス系統から出現した表現型異常は、40 種以上に及び、水頭症、毛色異常、眼球異常、足指の異常、筋ジストロフィー、聴覚障害、陰茎異常、無毛、短足短尾、回転行動、ヒト可聴音域で歌うなどのように、幅広い種類の形質異常が観察された。



図2. 遺伝子変異率増加マウス系統の継代から誕生した表現型異常の例。これらの系統では、見た目は正常のマウスでも、体重や体長など、様々な量的形質で変化が認められた。

その中には、メンデル遺伝に従わない遺伝性の形質変異も確認された。

表現型異常の解析に加えて、継代を通じて量的形質の測定も進めてきた。量的形質に対して、特別な選択圧をかけることなく、継代を進めてきたにも関わらず、遺伝子変異率増加マウスを用いた継代によって、各系統間では体重や体長に有意な差が観察された。また、各系統内でも、個体ごとの形質値の分散の増加が観察された。これらの結果から、量的形質などを対象に人為選択しながら、遺伝子変異率増加マウスの継代を繰り返すことで、実験者の希望通りにデザインされた量的形質をもつマウス系統の作出が可能になることが示唆された。

(3) 遺伝子変異の解析

長期間継代された遺伝子変異率増加マウスなど、合計7匹のマウスに対して全ゲノムシーケンシングを実施することで、本モデルにおいて、どのような種類の変異が、何箇所ぐらい蓄積されるのか解析した。その結果、全ゲノムを対象として数多くの変異が蓄積していることが明らかとなった。本方法では、これまでに汎用されている変異原化合物(ENU など)の処理と比べても、数倍の数の変異を導入可能であることが明らかとなり(2015年4月現在、論文投稿中のため、詳細は省略)、これまでに知られる変異導入の方法として、もっとも多数の変異の導入が可能であることが確認された。また、本方法では、致死的な変異や不妊を引き起こす遺伝子変異は、継代の過程で系統中から取り除かれるため、系統中に蓄積された変異の中には、個体ごとの個性の形成に寄与するような変異が多く含まれると考えられる。そのため、ここで作製された遺伝子変異率増加マウスを用いた変異蓄積系統は、これまでにない特徴をもつ変異リソースとして利用可能であることが確かめられた。

(4)ヒト疾患モデル作製システムの構築

上記のように、長期間継代され、全ゲノム配列がシーケンシングされた遺伝子変異率増加マウス由来の凍結精子を利用して、野生型マウス(C57BL/6系統)との交配により、F2マウスを作製し、それぞれのマウス個体が表示表現型について、血液検査、行動解析、心電図など、網羅的な検査項目を対象として、詳細に解析を行った。その結果、(3)の全ゲノム解析の結果に一致して、ENU処理よりも数倍の頻度で、様々な表現型異常を発見することができた。その表現型スクリーニングからは、生化学検査や行動解析により、長距離ランナーのような形質をもつマウスも見つかった。これらのマウスに対して、全ゲノムシーケンシングで明らかになった遺伝子変異との関連を調べることが可能である。本研究で取り組んできた実験モデル系は、これまでにない特徴を多くもつヒト疾患モデルマウスの作製システムとして広く利用していくことが可能であり、ゲノム編集技術などと

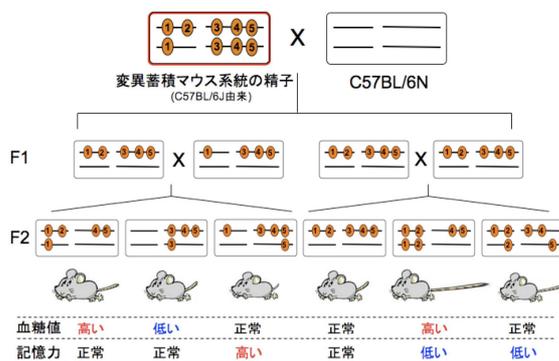


図3. 変異蓄積マウス系統を利用した疾患モデルの作製
変異蓄積系統(全シーケンシング済み)と野生型のマウスの交配によりF2世代のマウスを作製し、網羅的な表現型スクリーニングを実施する。全ゲノムデータと組み合わせることで、遺伝情報が既知の新しい疾患モデルの樹立が可能となる。

組み合わせることで、疾患モデルマウスの開発や、疾患等に関わる原因遺伝子の研究に大きく貢献していく基盤技術になると考えられる。

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)

[雑誌論文](計 10件)

Uchimura A, Hara Y, Gondo Y, Nakabeppu Y, International Symposium on " Germline Mutagenesis and Biodiversification ", Genes & Genetic Systems 89, 93-95 (2014) doi.org/10.1266/ggs.89.93 査読あり

[学会発表](計 20件)

内村有邦, 樋口真弓, 水口洋平, 西野穰, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 八木健, マウス長期継代系統を用いた生殖系列突然変異率の閾値とその影響、日本環境変異原学会 第43回大会、2014年12月4-5日、一橋大学：一橋講堂(東京都)

内村有邦, 樋口真弓, 水口洋平, 西野穰, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 三浦郁生, 若菜茂晴, 八木健, 長期継代マウス系統を用いた突然変異率の推定と新しい遺伝学、日本遺伝学会第86回大会、2014年9月17-19日、長浜バイオ大学(滋賀県)

八木健, 樋口真弓, 水口洋平, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 三浦郁生, 若菜茂晴, 内村有邦, Mutator マウスの継代から産まれた「ヒト可聴音域で鳴くマウス」、第37回日本神経科学大会、2014年9月10-13日、パシフィコ横浜(神奈川県)

Arikuni Uchimura, Mayumi Higuchi, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Ikuo Miura, Shigeharu Wakana, Takeshi Yagi, DNA replication errors that fuel genetic and phenotypic diversities in mammals, International Symposium on " Germline Mutagenesis and Biodiversification ", 2014年3月21日、九州大学(福岡県)

[その他]

ホームページ

<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)連携研究者

内村有邦 (UCHIMURA, Arikuni)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：20513063