

令和元年6月10日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19683

研究課題名（和文）エピスタシス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）Development of novel biodesigned mice by epistasis

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、内在的に突然変異を高発するマウス系統を使用して、マウス系統の継代を繰り返すことで、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）による新たな生命デザインモデルマウス作製系を開発し、これまでに解析が困難であった量的形質や多因子疾患に関わる遺伝子変異を明らかにすることを目標としている。

内在的に突然変異を後発する遺伝子改変マウスを用いて、継代を重ねることで、マウス系統に突然変異を蓄積させ、可視的な表現型異常の出現頻度を解析した結果、高い頻度で表現型異常が出現することが明らかになった。さらに、次世代シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンシングを実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、体重、体長、出産数などの量的形質の違いがあるマウス系統が得られ、量的形質をもたらす遺伝子変異について解析できるマウスモデルシステムができた。また、糖尿病、心疾患、血圧、行動に異常のあるマウス系統が得られたことから多因子疾患モデルが得られ、遺伝子変異の解析ができれば、原因遺伝子の発見や疾患への新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This project aims to develop novel biodesigned mice by epistasis and to understand gene mutations caused of quantitative phenotypes and Multifactorial diseases. To achieve the goal, we produced hyper mutation mouse strains, and then repeated the passage of their mouse strains.

We are successful to obtain a lot of mouse strains with visible phenotypes and perform whole genome sequencing of thier mouse strains by next generations sequencer.

研究分野：分子生物学

キーワード：突然変異 疾患モデル マウス 遺伝子 多因子疾患 量的形質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの遺伝子ターゲティング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ことは困難であった。その一方、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は存在しなかった。私たちは、これまでの研究で、DNAポリメラーゼを改変により、内在的に遺伝子変異を高発するマウス(Mutatorマウス)系統を作製し(Uchimura et al. 2009)、Mutatorマウスの継代を続けることで、生きたマウス個体に遺伝的多型を蓄積させる新たな実験系の構築に取り組んできた(Uchimura et al. 2015)。

### 2. 研究の目的

本研究では、私たちが、これまでの実験で作出した Mutator マウスの変異蓄積系統を発展的に利用することで、これまで解析が難しかった量的形質の変化を捉える実験系を確立し、新たな生命デザインモデル作製系を構築することを目的としている。量的形質の解析では、ヒトの疾患とも関連が深い形質(血圧測定や血液検査)に注目して解析を進めることで、Mutatorマウスを用いた変異蓄積モデルが、ヒト疾患の治療法を開発するための動物モデルとして、有用かどうかを検証しようと考えた。

### 3. 研究の方法

多因子疾患や量的形質の解析を進めて行く上では、変異蓄積系統中にできるだけ多くの変異が蓄積されることが望ましい。そこで、本研究では、これまでに構築された変異蓄積系統の継代を継続することで、より多くの変異を蓄積されたマウス系統を樹立しようと考えた。さらに、これらの変異蓄積系統の量的形質を解析することで、変異蓄積系統を用いた新しい量的形質の解析系を開発しようと考えた。具体的な方法は、以下の通りである。

(1) 変異蓄積系統の構築: Mutator マウス(DNAポリメラーゼの3'-5'エクソヌクレアーゼ欠損マウスのホモ接合体)を作製し雌雄ペアを交配した後、全て自然交配により兄妹間での交配を繰り返すことで、毎世代、多くの変異を発生させ、系統中に蓄積させていく。本方法では、致死や繁殖不能を引き起こす変異は、継代の過程で、取り除かれるため、系統中には、有害度が比較的小さい、中立的な変異のみが蓄積されることになる。実験のコントロールのため、野生型マウス(C57BL/6系統)を用いた同様の継代も進めてきた。これらの継代の過程では、全てのマウスのゲノムDNAを保存し、定期的に精子や受精卵を凍結保存することで、後から、実験結果の再現性の確認ができるような状態で継代を続けている。

(2) 量的形質の解析: 量的形質の解析は、マウスの継代と同時に並行して実施する解析と、各変異蓄積系統から、任意のマウスをピックアップして行う解析の2種類を実施した。前者の解析では、継代実験の遂行を第一に考えるので、体重、体長、尾長、繁殖能力など、マウスの継代と同時に測定が可能で、かつマウスに負担をかけずに解析が可能な形質を対象とした。一方、任意のマウスをピックアップする解析では、ヒトの疾患モデルとしての必要性が高い、「血圧、心拍数の測定」と「血液検査」を実施した。さらに、新型シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンシングを行い、それらの量的形質を支える遺伝的基盤を明らかにしようと考えた。これらの解析により、生きたマウス個体レベルでの量的形質に基づく、新たな生命デザインをもつ表現形質を捉え、新たなヒト疾患モデルの開発法を構築しようと考えた。

### 4. 研究成果

本研究では、Mutatorマウスの変異蓄積系統の継代を続けることで、変異の蓄積数を増やすことに成功した。また、全ゲノムシーケンシングを実施することで、蓄積される変異の特徴を明らかにした。ここで作製した変異蓄積系統の量的形質を解析した結果、Mutatorマウスの系統では、世界的にも例がないほど、個々の個体が多様な性質を示すことが明らかになった。本研究により、ヒトの疾患にも関連する形質でも多様化することが明らかになり、本方法が、ヒトの病態に近い疾患モデルの開発に有効であることを示された。今回の結果をもとに、共同研究などを加速していくことで、創薬研究などの現場で広く利用されていく技術になると考えられる。

(1) 変異蓄積マウス系統の構築: 本研究を開始する前の段階では、変異蓄積系統の継代数は、最大で25世代で、野生型マウスの変異蓄積系統が6系統、Mutatorマウスの変異蓄積系統が14系統であった。本研究の期間を通して、継代実験を続けることで、その継代数は最大で31世代まで進み、いくつかの系統では、系統を分岐させることで、その系統数は野生型マウスで7系統、Mutatorマウスで22系統となった。

(2) 変異蓄積マウス系統の全ゲノムシーケンシング: このようにして樹立されてきた変異蓄積

について、新学術「ゲノム支援」のサポートなどにより、全ゲノムシーケンシングを実施した結果、野生型マウスの世代あたりの変異率を世界で初めて、直接的に測定することに成功した。さらに、Mutator マウスでは、変異率（塩基置換型変異の場合）が野生型の 17 倍にまで上昇することが確認された。私たちが変異蓄積モデルに利用した Mutator マウスでは、世代あたり、全ゲノム中に 500 箇所、程度の変異が発生することが明らかになった。

(3) 量的形質の解析(継代実験と並行した解析): Mutator マウスと野生型マウスの変異蓄積系統について、継代を続けながら、体重、体長、尾長、繁殖能力の測定を続けた。その結果、Mutator マウスの系統では、系統ごとの特徴は、継代数の増加とともに、より多様化していくことが分かった。また、Mutator マウスの系統では、継代数とともに、繁殖能力が大幅に低下して、平均体重も減少していくことが分かった。

Mutator マウスの変異蓄積系統では、繁殖能力は低く、体重や体長が小さいものの、最大限の交配の努力を重ねることで、各系統の継代を維持していくことは可能であった。変異の蓄積数を増やすためには、継代に使用する Mutator マウスの変異率は高い方が有利だが、あまりに変異率が高いと有害変異の蓄積により、系統が維持できなくなる。これらの結果から、私たちの実験で使用した Mutator マウスは、変異蓄積実験に最適な変異率をもつものと考えられる。

(4) 量的形質の解析(疾患に関連する量的形質の解析): これまでに作製した変異蓄積系統から、Mutator マウスの雄 30 匹、野生型マウスの雄 20 匹を選抜し、その血液を採取し、生活習慣病に関連が深い検査項目を中心に解析した。その結果、Mutator マウスでは、個体ごとの測定値の分散が大きかった。F 検定により、分散の大きさを Mutator マウスと野生型マウスで比較したところ、8 項目(無機リン、AST、ALT、LDH、AMY、コレステロール、LDL コレステロール、血糖値)で、有意な差が観察された。それらの結果の中には、無機リンや総コレステロールのように、測定した全個体の測定値の分布が拡大するような形質と、AST や ALT のように、平均値から大きく離れる異常値を示す個体が複数含まれるような形質が存在した。それぞれの遺伝的な状況から、大きな異常値を示す個体は比較的少数の原因変異をもつと考えられ、全体として分布が広がるような形質には、多数の遺伝要因が関わりとされる。

血液検査に加えて、Mutator マウスと野生型マウスの変異蓄積系統について、合計 160 匹 (Mutator : 106 匹、コントロール : 54 匹) のマウスの血圧を測定した結果、血液検査の場合と同様に、Mutator マウスの系統では、血圧の測定値の分布が広がることが分かった。また、Mutator マウスの各系統では、血圧が特に高い (or 低い) 系統や心拍数が特に高い (or 低い) 系統が見つかるなど、系統ごとに形質が多様化することも明らかになった。

これらの量的形質と蓄積された変異の関係を明らかにするため、全ゲノム解析にも着手した。高い血圧を示したマウスのゲノム DNA には、先行研究により、血圧に影響を与えることが疑われる遺伝子上で生じた変異だけでも 20 箇所以上の変異が同定された。今後、交配実験を繰り返すことで、原因遺伝子を同定していくことが可能になると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Shao Z, Noh H, Kim WB, Ni P, Nguyen C, Cote SE, Noyes E, Zhao J, Parsons T, Park JM, Zheng K, Park JJ, Coyle JT, Weinberger DR, Straub RE, Berman KF, Apud J, Ongur D, Cohen BM, McPhie DL, Rapoport JL, Perlis RH, Lanz TA, Xi S, Yin C, Huang W, Hirayama T, Fukuda E, Yagi T, Ghosh S, Eggan KC, Kim HY, Eisenberg LM, Moghadam A, Stanton P, Cho J-H and Chung S. Dysregulated protocadherin-pathway activity as an intrinsic defect in iPSC-derived cortical interneurons from patients with schizophrenia. [Nature Neurosci. 22\(2\):229-242. \(2019\)](#)  
doi: 10.1038/s41593-018-0313-z (査読あり)

Onishi K, Uyeda A, Shida M, Hirayama T, Yagi T, Yamamoto N, and Sugo N. Genome Stability by DNA polymerase  $\beta$  in Neural Progenitors Contributes to Neuronal Differentiation in Cortical Development. [J Neurosci. 37 \(35\) 8444-8458. \(2017\)](#)  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0665-17 (査読あり)

Jiang Y, Loh YE, Rajarajan P, Hirayama T, Liao W, Kassim BS, Javidfar B, Hartley BJ, Kleofas L, Park RB, Labonte B, Ho SM, Chandrasekaran S, Do C, Ramirez BR, Peter CJ, C W JT, Safaie BM, Morishita H, Roussos P, Nestler EJ, Schaefer A, Tycko B, Brennand KJ, Yagi T, Shen L and Akbarian S. The methyltransferase SETDB1 regulates a large neuron-specific topological chromatin domain. [Nature Genetics. 49\(8\):1239-1250. \(2017\)](#)  
doi:10.1038/ng.3906 (査読あり)

内村有邦、樋口真弓、八木健、変異蓄積モデルを利用した生殖系列変異の後世代影響の解

析、放射線生物研究 52, 402-415, 2017 (査読なし)

〔学会発表〕(計 4 件)

内村有邦、樋口真弓、水口洋平、松本拓高、若山清香、若山照彦、佐藤康成、福村龍太郎、辻隆弘、今中正明、中本芳子、三浦昭子、榎藤洋一、豊田敦、八木健、マウス生殖系列で発生する de novo 変異から見る哺乳類ゲノムの進化、第 41 回日本分子生物学会年会、2018/11/28、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

内村有邦、樋口真弓、水口洋平、佐藤康成、辻隆弘、中本芳子、今中正明、三浦昭子、豊田敦、八木健、マウスの生殖系列で発生する挿入欠失変異の発生頻度とその特徴、日本放射線影響研究会 第 61 回大会、2018/11/7-9、長崎パブリックホール (長崎県長崎市)

内村有邦、樋口真弓、水口洋平、福村龍太郎、西野穰、豊田敦、榎藤洋一、八木健、変異蓄積マウス系統は、放射線の遺伝的影響を理解するための新たな方法論を提供する、2017/10/25-28、京葉銀行文化プラザ (千葉県千葉市)

内村有邦、樋口真弓、水口洋平、豊田敦、西野穰、八木健、変異蓄積マウス系統を用いた生殖系列変異の解析、2017/7/27、第 42 回中国地区放射線影響研究会、広島大学医学部 応仁会館 (広島県広島市)

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6 . 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：内村 有邦

ローマ字氏名：UCHIMURA, Arikuni

研究協力者氏名：樋口 真弓

ローマ字氏名：HIGUCHI, Mayumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。