

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2015～2016

課題番号：15K14368

研究課題名(和文)変異蓄積マウスを用いた新たな生命デザインモデルの開発

研究課題名(英文)A life design model using mutator mice

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)：本研究では、私たちが作出したMutatorマウスの変異蓄積システムを利用することで、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た。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測定することに成功した。さらに、Mutatorマウスでは、変異率が野生型の17倍にまで上昇することが確認できた。また、量的形質のバラツキが大きくなり、Mutatorマウス系統からヒト疾患に関連する形質が異常となるマウスを得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In order to generate animal models for human diseases, we established mutator mouse strains which have high DNA replication error rates. We analyzed germline mutation rates and the long-term effects of mutation accumulation on phenotype in more than 20 generations of wild-type mice and mutator mice. We were successful to estimate the base-substitution mutation rate in C57BL/6 laboratory mice. The mutation rate in mutator mice was 17 times that in wild-type mice. As a result, we obtained phenotypes of human diseases from mutator mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：疾患モデル マウス 突然変異 量的形質 DNA複製 生殖細胞 ゲノム 塩基配列

1. 研究開始当初の背景

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(多重的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。

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

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の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)の雌雄ペアを始祖として、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。以下では、本研究で得られた成果について、項目ごとに説明する。

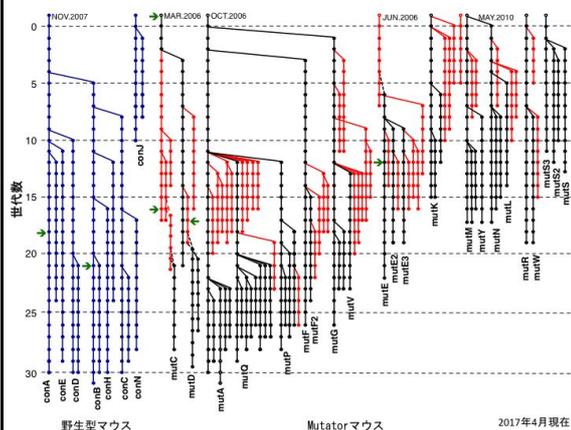


図1. 変異蓄積マウス系統の家系図。赤色の線は繁殖不能のために断絶した系統。矢印(→)は全ゲノムシーケンシングを行った個体を示す。

(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(2015年3月)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(図1)。

(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。この成果については、後述する表現型の解析結果と併せて、論文発表するに至った(Uchimura et al. 2015)。

(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。これらの結果については、全ゲノム解析の結果と併せて論文発表を行った(Uchimura et al. 2015)。

論文発表の後も、同様の解析を続けた。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(図2)。それぞれ

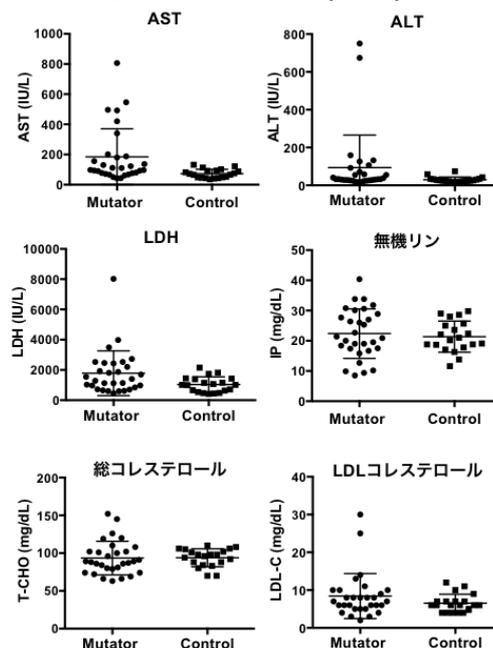


図2. 血液検査の結果。Mutatorマウスの変異蓄積系統では、測定値のばらつきが増大していた。

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ると考えられる。

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

(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 3 件)

内村有邦、生殖系列の変異率と変異蓄積マウス系統、*実験医学*、Vol.33, pp.3123-3126 (2015)、査読無

内村有邦、八木健、集団遺伝学から考える脳の進化、*Clinical Neuroscience*、Vol.33, pp.909-911 (2015)、査読無

Uchimura A, Higuchi M, Minakuchi Y, Ohno M, Toyoda A, Fujiyama A, Miura I, Wakana S, Nishino J and Yagi T, Germline mutation rates and long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice, *Genome Research*, 査読有, Vol.25, pp.1125-1134 (2015), DOI: 10.1101/gr.186148.114

〔学会発表〕(計 5 件)

内村有邦、Mutation accumulation experiment with laboratory mice、Advanced Genome Science International Symposium "The Start of New Genomics"、2017年1月10-11日、東京大学 伊藤国際学術研究センター (東京都文京区)

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、マウスを用いた実験室内進化モデルは、ヒトも含めた哺乳類の進化研究に新たな方法論を提供する、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日、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、豊田敦、藤山秋佐夫、若菜茂晴、西野穰、八木健、実験用マウスの生殖系列の突然変異率とその後世代への影響、第63回日本実験動物学会総会、2016年5月18-20日、ミュージア川崎シンフォニーホール (神奈川県川崎市)

内村有邦、樋口真弓、水口洋平、豊田敦、藤山秋佐夫、若菜茂晴、西野穰、八木健、Germline mutation rates and mutation accumulation lines in mice、第29回国際哺乳類ゲノム会議、2015年11月8-11日、横浜市開港記念会館 (神奈川県横浜市)

内村有邦、樋口真弓、新見恵理、水口洋平、豊田敦、藤山秋佐夫、若菜茂晴、西野穰、八木健、マウス変異蓄積統計を利用した生殖系列の突然変異率の推定、日本遺伝学会第87回大会、2015年9月24-25日、東北大学 川内キャンパス内 (宮城県仙台市)

〔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) 研究代表者

八木 健 (YAGI, Takeshi)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号：10241241

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

内村有邦 (UCHIMURA, Arikuni)

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
研究者番号：20513063

(4) 研究協力者

樋口真弓 (HIGUCHI, Mayumi)