

マウス亜種間コンソミック系統群を基盤とする体系的なゲノム機能解析

● 城石 俊彦¹⁾ ◆ 小出 剛²⁾ ◆ 田村 勝¹⁾

1) 国立遺伝学研究所系統生物研究センター哺乳動物遺伝研究室

2) 国立遺伝学研究所系統生物研究センターマウス開発研究室

〈研究の目的と進め方〉

高等生物の形態形成や個体レベルでの高次機能、ヒト生活習慣病などの原因は、複数の遺伝因子によって制御されている。古くからのモデル動物であるマウスには多数の近交系統が樹立されており、各系統で形態や高次機能に大きな違いがある。ヒトの場合と同様、これらの表現形質の違いの多くは、遺伝子上の単塩基多型 (SNPs) によって決められていると考えられる。SNPsと表現形質の関連性を体系的に探索することは、ゲノム配列読取後のゲノム科学の重要な研究課題である。マウスなどのモデル生物において、多因子で支配される表現型の解析には、従来からQTL解析法が考案され多くの分野で利用されてきた。しかし、QTL解析により関連遺伝子の染色体上の大まかな位置までは推定できるが、そこから遺伝子同定まで漕ぎ着けるのは通常容易ではない。本研究では、この問題を打破するために、従来のコンジュニック系統とリコンビナント・インブリード (RI) 系統の利点を合わせ持つ染色体置換系統であるコンソミック (Consomic) マウス系統群を基盤にして、個体レベルで現れる様々な表現形質を制御する多因子を効率良く同定するための体系的な遺伝子機能解析系を開発することを目的とした。

日本産亜種マウス (*M.m.molossinus*) 由来のMSM/MS系統は、標準的近交系マウスとは別亜種の関係にあり、両者の間には遺伝的に大きな距離がある。また、MSM/MS系統は、多数の遺伝子によって制御される形態形成、エネルギー代謝系、発癌感受性、行動パターン等の個体レベルで観察される高次生命機能に関して、標準的近交系マウスには見られないユニークな遺伝的特性を持っている。これらの表現型の違いは両亜種の多数の遺伝子の上に長い進化的時間をとおして蓄積したSNPsが元になっていると考えられる。それらの多因子の絡んだ特性を効率良く遺伝解析するために、標準的近交系マウスであるC57BL/6J (B6) 系統の遺伝的背景の中に、MSM系統由来

には、コンソミックの親系統であるC57BL/6系統とMSM/MS系統の間でどのような表現型に相違があるかを体系的に解析し、データベース化する必要がある。すでに、他の研究室を含むグループの研究によって、外部形態や発癌感受性、その他の形質に大きな相違があることが報告されている。これらの中でも特に、MSM/MS系統は、食料の乏しかった生活環境を長い間耐えてきた野生マウスを元に樹立されており、エネルギー代謝系においては、儉約型の遺伝的多型を蓄積してきたことが予想される。また、系統化の過程においては、他の標準的系統の場合と異なり、人間が扱い易いという側面での人為的選択を全くかけてこなかった。このため、野生マウス本来の行動特性がこの系統の中に未だに残っていると考えられる。そこで、本研究では、エネルギー代謝関連の表現型や行動パターンに関する表現型を中心として、ゲノム機能を体系的に解析するためのシステム構築を目的として研究を行った。

〈研究開始時の研究計画〉

(1) コンソミック系統の維持生産システムの確立：本研究を推進するためには、系統の維持体制の確立が最も重要な基盤整備となる。そこで、コンソミック系統を、精子および受精卵凍結により系統保存し、必要に応じて凍結胚 (配偶子) から蘇生させるための実験系を構築する。また、妊性低下を示す系統が出現した場合には、試験管内受精 (IVF) や顕微受精 (ICSI) によるマウス生産システムを確立する。

(2) X染色体コンソミック系統に観察された雄性不妊の遺伝学的解析：多くのコンソミック系統では、C57BL/6J (B6) 系統の遺伝的背景に導入したMSM/MS系統由来の染色体がホモ接合となっており、コンソミック系統として完成しているが、ごく一部の系統では、ホモ個体の作製が困難なものがある。その典型がX染色体であり、雄個体では特異的に妊性の低下が認められた。この系統の精子頭部は、電子顕微鏡による観察によって異常な形態を示すこと、また、運動性が低下していることが明らかになっている。さらに精巣重量の低下や精子形成過程における軽度から重度の異常が認められている。一方、雌個体のホモは妊性に問題はない。この現象は、MSM/MS由来のX染色体と常染色体あるいはY染色体上に位置する遺伝子座において、亜種内に特異的な対立遺伝子間の相互作用 (エピスタシス) があり、その正常な相互作用が戻し交配がもたらした染色体分離によって破綻しているのが原因と考えられる。このような複数の遺伝子座間のエピスタシスの存在自体が今後の機能ゲノム科学の重要な研究課題の一つと想定されるが、本研究では、この現象に関わる遺伝子の染色体マッピングなどによりそのメカニズムの解明を行う。

(3) コンソミック親系統の表現型の収集とデータベース化：遺伝子機能解析システム開発の基盤整備として、コンソミック親系統のC57BL/6JとMSM/MSの体系的な表現型多型データを収集する。一般的な臨床生化学的パラ

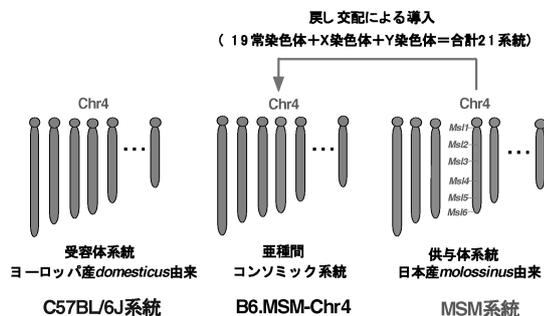


図1 マウス亜種間コンソミック系統

の染色体の各々を別個に交配実験によって導入して30系統弱からなる一群のコンソミックマウスがすでに開発されている (図1)。

マウス亜種間コンソミック系統は、長い進化的時間に蓄積した遺伝的多型によってもたらされた表現型の違いに対する遺伝解析に貢献すると期待されるが、そのため

メータ、体重や体長変化などの成長曲線の特性、骨格などの形態学的特性はもちろんのこと、特にエネルギー代謝関連表現型と行動学的特性を中心に行う。さらに、親系統の表現形質としては従来把握していない環境因子を考慮した特性情報を収集する。例として高カロリー摂取下における体重変化と血液中のコレステロールや中性脂肪濃度についてデータを集積する。収集した表現型の特性について逐次データベース化する。

(4) 表現型の染色体マッピング：コンソミック親系統であるC57BL/6JとMSM/Ms系統の間で顕著な相違が見出された表現型について、コンソミック全系統について表現型解析を行い、MSM/Ms系統に類似した表現型を検出することにより、問題とする表現型を制御する染色体を特定することが可能である。また、両親系統には見られない表現型を検出すれば、問題の表現型に関与してエピスタシスを示す遺伝子の存在する染色体を特定することが可能である。この研究では、親系統で顕著な相違のあった幾つかの表現型についてコンソミック系統群を用いた染色体マッピングを試みた。

＜研究期間の成果＞

(1) コンソミック系統の維持生産システムの確立:

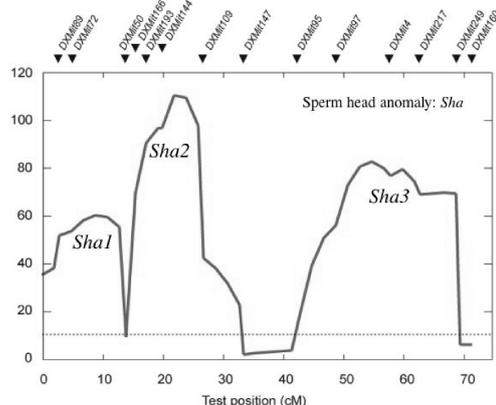
MSM/Ms系統の各染色体を正確に戻し交配によって主に西ヨーロッパ産垂種マウス由来の標準的近交系統であるC57BL/6Jの遺伝的背景に導入して開発したコンソミック系統について、通常飼育と精子及び受精胚の凍結保存による系統維持を行った。妊性低下などによる繁殖の困難な系統については、試験管内受精 (IVF) などの発生工学的手法を用いて安定した生産システムを確立した。系統化が完了している系統については、2細胞期胚を簡易ガラス化法によって系統保存を行った。また、MSM/Ms系統由来のY染色体を保持している個体での戻し交配も行った。戻し交配の10世代以前の個体についても凍結胚による保存を行った。全ての凍結保存のための胚は体外受精によって得たが、その際の受精率に関しては、コンソミック系統の体外受精率は、一方の親系統であり遺伝的背景になっているC57BL/6系統 (70~80%) と比較すると幾分低くなっている。また、MSM/Ms系統由来のY染色体を保持した雄個体からの精子を用いた体外受精率は、C57BL/6系統由来のY染色体で置き換えた個体を用いた場合にも顕著に低下している。

凍結保存した2細胞期胚を融解してMCH系統の雌に移植して蘇生率を検討したところ、多くの系統ではC57BL/6J系統に匹敵する蘇生率を示し、簡易ガラス化法による凍結胚保存が垂種間コンソミック系統の系統維持に有効であることが示された。以上の結果から、安定した系統維持とマウス蘇生の体制はほぼ確立できたと考えられる。

(2) X染色体コンソミック系統に観察された雄性不妊の遺伝学的解析:

X染色体導入における戻し交配N4-6世代のMSM系統由来のX染色体をヘテロに持つ雌に、B6系統の雄を戻し交配して得られた179匹の雄個体を使用して、X染色体上の雄性不妊の原因遺伝子のQTLマッピングを行った。最初に精巣重量の表現型について、解析ソフトCartographerを用いてQTL解析を行った結果、X染色体の末端付近に原因遺伝子が存在することが示された。そこで、X染色体の末端のみがMSM/Ms系統由来であるコンジェニック系統を作製したところ、精巣重量低下の表現型が再現された。しかし、これらのコンジェニック系統の生殖能力は正常であり、精巣重量低下に関連するQTLは、生殖能力

欠失とは直接関連がないことが示された。続いて、精子頭部の形態異常に関連する原因遺伝子について同様にしてQTL解析を行った。解析の結果、X染色体上の3箇所に精子形態異常に関連する原因遺伝子 (Sha1-3: Sperm head anomaly1-3) が存在することが示された (図2)。



以上の解析の結果から、精巣重量低下とそれに伴う精子産生量の低下は生殖能力欠失の直接的な原因ではなく、むしろ精子の形態異常や運動性低下により受精が行えないことが原因であると考えられた。精子の特徴的な核の形態は、精子形成後期の精子完成の時期に、核タンパクが体細胞型ヒストンからプロタミンへと置換され核凝縮がおこる際に形成される。また、一部を除いて細胞内小器官は残渣小体として捨てられ、核の基部に存在する中心体から尾部が伸張する。X染色体上の原因遺伝子とこれと相互作用する遺伝子群は、精子のこれらの劇的な形態変化に関わると考えられる。

(3) 親系統の表現形質情報の収集:

コンソミック系統作製に用いた親系統であるC57BL/6J系統とMSM/Ms系統について体系的な表現形質の多型データを収集した。まず、血液を材料とした一般的な臨床生化学的パラメータ、肝や腎機能のパラメータとなるような各種酵素活性、体重や体長などの成長曲線、骨格などの形態学的特性などのマウス系統の基準的な遺伝形質に関する表現型データ収集を行った。さらに、重点項目として、血糖値などの糖代謝関連パラメータ、コレステロール等の脂質代謝のパラメータの測定、組織ごとの脂肪量 (内蔵脂肪、皮下脂肪等) の測定を行った。加えて、行動学的特性として、ホームケージ内での自発運動性、明暗箱や高架式十字迷路による不安傾向などの情動学的特性、痛覚感受性などを中心に表現型データの収集を行った。以上の結果、コレステロールなどの脂質代謝系パラメータや体脂肪率などに大きな系統差が見いだされた。また、レプチンやアディポネクチンなど脂肪細胞が産出するサイトカインの血中濃度においても大きな系統差が検出された。その他、体重 (成長曲線)、ボディサイズはもとより基準的な血液パラメータとしては、アルカリフォスファターゼ等にも顕著な差異が認められた。

(4) コンソミック系統の表現形質多型データの収集:

体重 (成長曲線) や体長などの基本的な形態学的パラメータと自発活動性や情動 (不安) 行動などの行動学的特性について、コンソミック系統群を対象としたデータ収集を開始した。この結果、成長曲線の解析からは、第2, 3, 11染色体コンソミック系統などの複数において、体重が対照のC57BL/6J系統よりも統計学的に有意に低下していることがわかった (図3)。

したがって、多因子によって制御されていると考えられてきたMSM/Ms系統の低体重を支配する染色体の特定

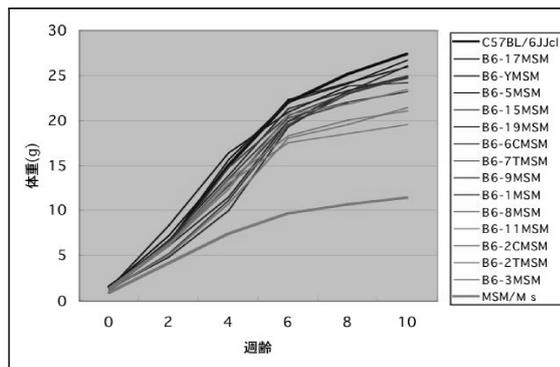


図3. コンソミック系統群の成長(体重増加)曲線(雄)

がコンソミック系統群を用いて解析可能であることが示された。ボディサイズにおいても同様な解析が可能であることが確認されている。以上の結果は、多因子表現型の解析にコンソミック系統が有効であることを示すものである。また、行動特性に関してコンソミック系統を解析した結果、自発活動性に関して第6染色体が効果を有し、同時にこの染色体は情動行動に関して効果も有しているという予備的な結果が得られた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

国外では、標準的な近交系統の交配実験によりランダムに染色体を置換したりコンビナント・インブリード系統を1,000系統作製しようという巨大計画が米国NIHを中心として進行中である。これと合わせて、代表的な近交系統のゲノムをResequencingするプロジェクトも立ち上がっており、ゲノム多系と系統間の表現型多様性を結びつけたゲノム機能解析計画が本格化しようとしている。しかし、使用する系統の遺伝的起源についての理解が浅く、その解析効率については疑問が残る。また、米国のNadeau & Landerらは、標準的系統であるA/JとC57BL/6J系統の間で同様なコンソミック系統を開発し、それらを用いた遺伝子機能解析系を構築している。また、国内でも、名古屋大学の西村らが、標準的系統であるA/JとSM/Jの間でコンソミック系統の開発を進めている。しかし、マウス亜種間でのコンソミック系統の開発を進めている例は無い。このような状況から、マウス系統の遺伝的起源のデータを基盤としてゲノム機能解析を遂行しようという本研究は、きわめてオリジナリティーが高いものと考えられる。本研究の成果については、これまで、まとまった論文発表は行っていなかったが、昨年11月にパスツール研究所で開催された国際シンポジウムでの発表では、好評を博したように思われる。また、国内では、すでに多数の表現型解析について各々専門分野の研究者との共同研究が立ち上がっている。例えば、加齢性難聴や発癌感受性、マラリア感受性など、幾つかの表現型マッピングでは成果が出つつある。このように、コンソミック系統群を用いた解析の有効性は広く認められるところとなっている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

コンソミック系統の安定した維持については、精子・受精卵凍結による方法が成果を上げた。また、融解実験の結果からも凍結胚(配偶子)からのマウス蘇生に問題が無いことが示されたため、今後は系統が途絶えるというリスクを持たずにコンソミック系統群によるゲノム機能解析が可能となった。しかし、X染色体コンソミック系統や第5染色体コンソミック系統のように雄個体で妊性低化や発生遅滞による繁殖率の低下が認められた系統があり問題となっている。これらの現象は、染色体を超

えたエピスタシスの破綻がその原因と考えられる。当該染色体と相互作用する染色体を同定することにより、二つの染色体領域の組み合わせで系統維持するという可能性が考えられる。また、雄性不妊の場合には、今後顕微授精法(ICSI)など他の方法の導入が必要である。

親系統であるC57BL/6J系統とMSM/Ms系統の表現形質の多型データについては、概ね順調に収集が進んだ。血液の臨床生化学的パラメータなど量的形質については、比較的容易に表現型の評価系が構築できたが、形態についての多型データについては、定性的な相違は明白であるが、量的形質としての評価法は現在確立していない。この点は、画像データの取り扱いと新規計算アルゴリズムの開発など今後の課題の一つである。例えば、フーリエ記述子を用いた解析や主成分分析法などが一つの候補であるが、さらに独創的な方法論の開発もあり得る。本研究で得られた表現形質データについては、集計しつつあるが、現時点ではデータベースとしてまとめるという段階には達していない。これについては、今後コンソミック系統群の特性解析データが集積するに従って進めていく予定である。

〈今後の課題〉

本研究によって、マウス亜種間コンソミック系統を基盤としてゲノム機能を解析するための準備は整ったと考えられる。特に、エネルギー代謝系や行動特性にはコンソミック親系統であるMSM/MsおよびC57BL/6J系統の間に顕著な差異が確認できたので、今後これらの表現型について本格的な表現型解析を全コンソミック系統について推進していく計画である。また、多代謝などの多因子表現型には環境要因である摂食条件などの影響が大きいことが予想される。そこで、高カロリー食や高脂肪食などの摂食条件下での表現型解析を平行して進めていく予定である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 0403311129
Oka A, Mita A, Sakurai N, Yamamoto H, Takagi N, Takano-Shimizu T, Toshimori K, Moriwaki K, and Shiroishi T. Hybrid Breakdown Caused by Substitution of X Chromosome between Two Mouse Subspecies. *Genetics* 166, 913-924 (2004)
- 0403311314
Sagai T, Masuya H, Tamura M, Shimizu K, Yada Y, Wakana S, Gondo Y, Noda T and Shiroishi T. Phylogenetic conservation of a cis-acting regulator that controls polarized expression of Sonic hedgehog (Shh) in limb buds. *Mamm. Genome* 15, 23-34 (2004)
- 0601301437
Ogasawara M., Imanishi T., Moriwaki K., Gaudieri S., Tsuda H., Hashimoto H., Shiroishi T., Gojobori T., and Koide T. Length variation of CAG/CAA triplet repeats in 50 genes among 16 inbred mouse strains. *Gene* 349, 107-119, 2005.
- Takahashi A., Kato K., Makino J., Shiroishi T. and Koide T. Multivariate analysis of temporal descriptions of open-field behavior in wild-derived mouse strains. *Behavior Genet.* (In press).