

マウス形態変異の修飾遺伝子のポジショナルクローニングによる遺伝子間相互作用の解析

●城石 俊彦

国立遺伝学研究所系統生物研究センター

〈研究の目的と進め方〉

形態形成における生物多様性の問題は、今後の発生遺伝学と比較ゲノム学の大きな課題である。同一種内において形態形成に重要な働きをする遺伝子にどのような遺伝的多様性が存在するかを明らかにすることは、形態進化の分子基盤解明に向けての鍵となる。発生プログラムは複数の遺伝子間相互作用のネットワークから構成されているが、これらの相互作用ネットワークのゲノム解析には、マウスがモデル動物として有効である。突然変異表現型に対する異なった系統の遺伝的背景効果について再現性をもって実験的に検出でき、変異遺伝子と相互作用する遺伝子（修飾遺伝子と呼ばれる）の遺伝解析が可能な点はその理由である。本研究では、形態形成突然変異体であるTail short: TsとHemimelic extra-toes (Hx)の表現型修飾に係わる遺伝子を同定し、原因遺伝子との相互作用を解明する。それにより主に中軸系の形態形成に関与する遺伝子ネットワークを組織的に解明し、さらに修飾遺伝子の多様性の生物学的意義を進化化学的観点から解明することを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

(1) ポジショナルクローニングによるTs修飾遺伝子の同定：これまでの大規模な遺伝解析のデータから作成された物理地図に基づいて、その領域内の候補遺伝子を探索する。その後、マウス近交系統間での塩基配列多型の分布や発現パターンの解析等により候補遺伝子を絞り込む。最終的にcDNAを用いたトランスジェネシスによる修飾効果の変化を指標にして原因遺伝子を決定する。(2) Ts修飾遺伝子多様性とRpl38遺伝子の相互作用の解析：標準的近交系マウスと野生マウス由来系統の修飾遺伝子の塩基配列を決定し、遺伝的多様性の分子基盤を明らかにする。異なったマウス系統との交配実験を基にして修飾遺伝子の多様性とTs変異表現型の関連を解析する。また、マウス亜種間で修飾遺伝子の多様性がどのように出現維持されてきたかについて進化学的観点から解析を行う。最終的にTs表現型の比較から、修飾遺伝子の多様性がTs遺伝子との相互作用を通してマウス形態形成をどのように制御するかを解明する。(3) Hxの原因遺伝子の同定と遺伝的背景による表現型修飾の解析：この変異体は、軸前側の多指症の他に、オリジナルなアリルであるB10.D2-Hx変異体では脛骨の形成不全 (Hemimelia) を示す。この変異の原因遺伝子をポジショナルクローニングによって同定する。さらに別亜種起源である日本産野生マウス由来のMSM系統や韓国産野生マウス由来のKJR系統によってどのように表現型が変化（修飾）するのかを解析する。また、MSM系統によって表現型修飾が認められた場合には、Hx変異系統を、C57BL/6Jの遺伝的背景にMSMの各染色体を一本だけ導入したB6-MSMコンソミック系統に交配して表現型の観察を行う。いずれかのコンソミック系統によって脛骨の回復がみられ、修飾に寄与する染色体の同定ができればその染色体について詳しいマッピングを行う。また、

KJRの遺伝的背景によって起こる重度の形態形成阻害について、戻し交配の手段により表現型の固定を行う。修飾遺伝子の効果によって表現型が固定されれば、それを指標として詳細な連鎖解析を行う。同時に表現型の詳しい解析や、指の形態形成に関わる遺伝子の発現を調べることにより、Hx修飾遺伝子の四肢パターン形成に占める位置づけを明らかにする。

〈研究期間の成果〉

(1) マウス突然変異Tail-short (Ts) は、異なった発生段階において体軸形成や神経管形成をはじめとする多面的な形態異常を示し、その原因遺伝子は形態形成に重要な役割を持つ。我々は、これまでTsの原因遺伝子がリボソーム構成タンパクの一つRpl38(ribosomal protein L38)をコードすることを明らかにした。Tsヘテロ個体の表現型は交配相手のマウス系統によって大きく変化し、遺伝的解析により優性的に表現型を修飾する遺伝子が単一領域にマップしている。この修飾遺伝子は、標準的なマウス近交系内では大きく2型に分けられ、特に優性致死を示す遺伝子は単一起源を持つと考えられる。本研究期間内での詳細な連鎖解析と物理的地図の作製によりTs修飾遺伝子についてTs遺伝子自身を含む約250Kbにマップした。さらに、Bacterial Artificial Chromosome (BAC) クローンの単離を行い、候補遺伝子を探索した。それらの候補遺伝子について、マウス近交系統間でアミノ酸置換を起こすような有効な塩基多型を検索した。(2) 本研究期間中に修飾遺伝子の最終的な同定が行われなかったため、修飾遺伝子の詳細な多型解析は行うことができなかった。(3) Hx変異マウスを用いた大規模連鎖解析によって原因遺伝子の責任領域を特定した。この領域は、形態形成に重要な働きを持っているShh遺伝子の翻訳領域から上流に1 Mb離れたLmbr1という遺伝子の第5イントロン中に位置した。また、その中には、魚類から哺乳類にいたるまで高度に保存されたDNA配列が存在することを発見した。この配列について変異マウスの塩基配列を行い、1塩基対の置換が存在することを確認した。さらに、Shh翻訳領域のノックアウトマウスとの交配実験によるシス・トランス試験を行ったところ、正常なShh遺伝子のある染色体上に塩基置換がある場合にのみ、異常表現型が表れることがわかった。これらの結果から、Hxの原因は、Shh遺伝子の四肢特異的なシス因子の変異であることが明らかとなった。オリジナルなHx変異遺伝子をMSM系統に戻し交配を重ねて導入したところ、特徴的であった頸骨の形成不全がほぼ完全に回復されることがわかった。また、多指症の表現型についても、前後肢ともにその表現型が軽減されることがわかった。一方、KJR系統の遺伝的背景に戻し交配によってHx変異遺伝子を導入したところ、MSM系統の場合とは異なり、頸骨の形成不全の表現型は回復しなかった。むしろ、多指症の表現型はいっそう激しくなり、指骨の分岐を含む多様な表現型が新たに表れた。

これらのことから、MSM系統とKJR系統の両方に効果の異なる修飾遺伝子の存在することが明らかとなった。しかし、これらの修飾遺伝子の染色体マッピングを目的とした交配実験まで行う時間的余裕が無く、本研究においては、修飾遺伝子の同定には至らなかった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ヒト疾患モデルを含む多数のマウス突然変異の表現型が、変異遺伝子が置かれた遺伝的背景に従い変化する例が、現在までに国内外で多数報告されている。家族性大腸がんの原因遺伝子である

APCのマウス相同遺伝子の変異表現型を変更する修飾遺伝子の研究では、大規模な連鎖解析により修飾遺伝子の同定まで成功したという例があるが、形態形成関連遺伝子の修飾遺伝子について体系的な研究を行われた例はきわめて希であり、遺伝子同定まで進んだという報告例もごくわずかである。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

Ts変異については、遺伝学的に修飾遺伝子を分離することを目標として連鎖解析を大規模に行ったが、L38自身を含む複数の遺伝子が候補として残っている。翻訳領域を中心に塩基配列多型と発現を調べたが、残念ながら修飾遺伝子の特定には至っていない。Ts変異の修飾遺伝子については、変異の原因遺伝子との分離ができていない点が最大の理由であるが、両者をいかに分離して解析していくかが今後の最大の課題である。

〈今後の課題〉

Ts変異の修飾遺伝子の同定のためには、マウス近交系統間での塩基配列多型の分布や発現パターンの解析等により候補遺伝子を絞り込む必要がある。最終的にcDNAを用いたトランスジェネシスによる修飾効果の変化を指標にして原因遺伝子を決定することが可能であるが、遺伝子発現の量的効果の評価など、今後も解決しなければならない課題は多い。Hx修飾遺伝子のマッピングについては、オリジナルなB10.D2-Hxの脛骨の形成不全がMSMのどの染色体によって回復するのかを根気よく調べる必要がある。そのためにHx系統を、C57BL/6Jの遺伝的背景にMSMの各染色体を一本だけ持つB6-MSMコンソミック系統に交配して表現型の観察を行うことが最も現実的であるが、飼育スペースや労力を考慮して、いかに効率良く表現型解析を行うか考える必要がある。いったん、特定のコンソミック系統によって脛骨の回復がみられ、修飾に寄与する染色体の同定ができれば、その染色体について詳しいマッピングを行うことは比較的容易である。また、KJRの遺伝的背景によって起こる重度の形態形成異常について、非常に面白い現象であり、その修飾遺伝子の同定を行う価値は高い。まず、戻し交配をさらに重ねるなどにより表現型の固定を行うことが重要と考えられる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

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)