

## マウス亜種間コンソミック系統に基づくゲノム機能解析

●城石 俊彦 ◆小出 剛

情報システム研究機構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>

ゲノム科学は、塩基配列読取からゲノム機能解析のフェーズに移行している。ゲノム機能解析の成否は、ゲノムシーケンスから明らかになった多数の遺伝子の機能をいかに効率よく抽出できるかが鍵となっている。このため、ゲノム多型（変異）と表現型の関連性を体系的に収集する基盤技術整備が必要である。本研究では、進化的起源を異にする西ヨーロッパ産亜種マウス (*M.m.domesticus*) と日本産亜種マウス (*M.m.molossinus*) 由来の2つの系統間で染色体を1本ずつ置換したコンソミック (Consomic) 系統を用いて、マウスの個体レベルで現れる様々な高次表現型を制御する単一因子や多因子を体系的にゲノム上にマップし、それらの原因遺伝子を同定するための解析系を開発することを目的とする。このため、染色体受容系統である *domesticus* 亜種由来の C57BL/6J (B6) と供与系統である *molossinus* 亜種由来の MSM/Ms について、多様な表現型データを収集し、続いて両系統に相違のある重要な表現型について体系的にコンソミック系統の表現型情報を収集する。特に重要な表現型については、顕著な表現型を示すコンソミック系統と B6 系統間の交配実験に基づく詳細な連鎖解析を行い、染色体位置情報に基づいた原因遺伝子の同定・単離を行う。

### <2007年度の研究の当初計画>

#### 1. コンソミック系統の表現型解析

昨年度に引き続き、コンソミック全系統を対象にした表現型解析を行い、それらの表現型を規定する遺伝子（群）の染色体マッピングを推進する。特に重点的に実施する表現型解析として、エネルギー代謝関連形質と行動特性形質を対象とする。具体的な表現型としては、以下のとおりである。

(1) エネルギー代謝関連形質：脂質代謝関連の表現型としてマウスの組織ごとの体脂肪蓄積の測定を行う。また、糖代謝関連表現型として、さまざまな条件下の血糖値変動を測定する。また、糖負荷試験とインスリン負荷試験を行い、耐糖能ならびにインスリン抵抗性についての表現型解析を実施する。(2) 行動関連形質：マウス行動特性として、自発活動性と不安関連行動形質について、体系的に解析する。

#### 2. 表現型原因遺伝子の同定

染色体受容系統の B6 と顕著な表現型値を示すコンソミック系統については、当該系統と B6 系統の交配に基づいた高精度連鎖解析を実施して、原因遺伝子の同定を試みる。以下の表現型について、特定のコンソミック系統を用いた連鎖解析を開始する。

- ・ 体重、脂肪蓄積、血中脂質パラメータ・・・B6-Chr3<sup>MSM</sup> 系統
- ・ 加齢および高脂肪食に依存した肥満形質・・・B6-Chr13<sup>MSM</sup> 系統
- ・ 不安関連行動形質・・・・・・・・・・・・・B6-Chr17<sup>MSM</sup> 系統
- ・ 自発活動性・・・・・・・・・・・・・B6-Chr6<sup>MSM</sup> 系統

この目的で、コンソミック系統から更に細分化した領域のみを有するコンジュニック系統を作出する。

#### 3. MSM/Ms 系統の SNP 情報の収集

基盤ゲノム支援班と連携して、MSM/Ms 系統の SNP 情報のデータベースを完成させる。MSM/Ms 系統以外の野生マウス由来系統についての小規模な WGS sequencing を行い、標準的系統であ

る B6 のゲノム起源を明確にする。

#### 4. 表現型データベースの構築

表現型の記載方法やデータベースのフォーマットについて検討を行い、表現型データベースの構築を開始する。

### <2007年度の成果>

#### 1. コンソミック系統の表現型データの収集

遺伝的背景となっている B6 系統と染色体供与系統である MSM/Ms 系統、並びに繁殖・維持が困難な系統を除いたコンソミック 28 系統に関して、体系的な表現型解析を行い、系統毎の表現型データを収集・解析した。以上の包括的な表現型収集により、量的形質遺伝子座として、少なくとも雄で 244 座位、雌で 218 座位に昇る多数の QTL を検出することができた。このように、コンソミック系統を利用することで、多因子表現型を支配する遺伝子群について、個々の遺伝子座に分離して解析できることを明確にした。

(1) エネルギー代謝関連形質：まず、基礎的パラメータとして、体重・体長（経時の変化を含む）、臓器重量、形態学的特性について測定を行った。次に、代謝関連形質として、脂肪蓄積、血中の臨床生化学パラメータ（コレステロール、中性脂肪、各種酵素など）についてデータを収集した。いくつかの系統については、糖負荷試験も実施した。この結果、エネルギー代謝関連形質において、重要な脂肪蓄積について詳細な表現型解析を実施して遺伝的背景である B6 系統と比較し顕著な違いを示すコンソミック系統を見出した。

(2) 行動関連形質：今年度で、コンソミック系統を用いた新規ケージテスト・ホームケージテスト・オープンフィールドテスト・明暗箱テスト・高架式十字迷路テスト・ホットプレートテスト・テールフリックテストによる自発活動性・不安様行動・痛覚感受性に関わる行動パターンのシステムティックな解析を終了し、効率よく行動関連遺伝子のマッピングを行うことに成功した。その結果は、論文にまとめているところであり、今後は、更に狭い染色体領域を持つ系統に関する行動関連形質の解析に主眼を置く。

#### 2. 表現型責任遺伝子の同定

体脂肪蓄積の表現型解析によって、B6-Chr3<sup>MSM</sup> 系統は有意に脂肪蓄積に抵抗性を示すことが判明した。さらに、加齢、摂餌条件による肥満傾向に関連した表現型スクリーニングでは、B6-Chr13<sup>MSM</sup> 系統が高脂肪食に依存した顕著な肥満形質を呈することが明らかになった。以上の結果から、MSM/Ms 系統の3番染色体上に脂肪蓄積抑制遺伝子、13番染色体遠位に高脂肪食に依存した脂肪蓄積促進遺伝子が存在することが明らかとなった。これらの表現型の原因となっている遺伝子の同定に向けて、両系統について、当該コンソミック系統と B6 系統とを交配して作製した F2 個体による連鎖解析を行った。平行して該当コンソミック系統を利用した問題の遺伝領域を含むコンジュニック系統を作製している。

コンソミック系統の中でも顕著な不安様行動の亢進を示す系統、B6-Chr17<sup>MSM</sup> について、17番染色体領域を14のブロックに分けて、それぞれを有するコンジュニック系統を作成した。これ

により、不安様行動の指標である危険評価行動の増加に関わる染色体領域を6.5Mbの領域に絞り込むことに成功した。この領域内には、NCBIデータベースから約50個の遺伝子が見出されており、現在これらの遺伝子の中で、不安様行動に関与する可能性のある候補遺伝子について解析を進めている。

### 3. MSM/Ms 系統の SNP 情報の収集

基盤ゲノム支援班と連携して可能な限り広範囲のゲノム領域をカバーできる手法を選択した結果、本プロジェクトによる MSM 系統ゲノムの WGS 解読配列の B6 系統の非リピート領域に対するカバー率は、当初の目的を超える 80% に達した。得られたデータに関しては、無作為に抽出した 200 か所以上の染色体領域のバリデーションを行い、本プロジェクトによる WGS が非常に高い品質を保持していることを確認した。80% のゲノム領域について両系統の塩基配列を比較することにより、1,300 万種以上もの候補 SNPs を検出することができた。また、アミノ酸置換を起こす SNP を 25,000 種以上、遺伝子発現に関与する領域に存在する SNP を 10 万種近く同定することができた。また、これらの情報をデータベース化して公開した。塩基配列情報の比較から、標準的系統である B6 のゲノムには日本産マウス亜種のゲノムと極めて類似した領域が 6% 以上含まれることを明らかにした。さらに、MSM/Ms 系統以外の野生マウス由来系統についての小規模な SNP 収集を行った。これらのデータと公共の SNP データを利用して、従来から示唆されていた汎用実験用マウス系統に対する日本産マウス亜種ゲノムの移入の実態に関する重要な知見を得た。

### 4. 表現型データベースの構築

米国 JAX 研究所が中心となり、主要な 40 種類のマウス系統の表現型を大規模に収集しデータベース化している Mouse Phenome Database (MPD) project、ノックアウトマウスを対象に体系的な表現型収集を行う European Mouse Disease Clinic (EUMODIC) プロジェクト等、世界的に進行しているマウス表現型のデータベースを参考に、現在コンソミック系統などで収集している表現型データの記載方法等を検討した。

#### <国内外での成果の位置づけ>

米国では、2 種類の汎用実験用マウス近交系統である A/J と B6 を親系統に用いたコンソミック系統が樹立され、それらの系統を用いた遺伝子探索や表現型の収集プロジェクトが進行している。我々は、染色体供与系統と受容系統の遺伝的差異が大きいほど、解析対象となる表現型の範囲が広がり、同時に遺伝解析も効率的になると考えて、亜種間でコンソミック系統を独自に開発した。また、染色体供与系統である MSM/Ms については、支援班により WGS が進行し、両親系統間の比較ゲノム解析により膨大な数の SNP 情報が利用可能となっている。このように、独自のリソースに立脚したゲノム解析を行う点に、本研究の独自性と優位性がある。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

2007 年度に計画した表現型解析について、糖負荷試験とインスリン負荷試験等、手技の習熟に時間の掛るものについてはデータの収集が予定通りに進まず、全コンソミック系統を調査することが出来なかった。また、表現型データを統合するデータベースの構築についても、その進捗が当初計画より遅れている。これは、世界の主要機関の関連情報との共有を計るため、データ階層、表現型を記載する vocabulary など、データベースの標準化のための準備に予想以上の時間が必要なが判明したためである。

#### <今後の課題>

##### 1. コンソミック系統の表現型データの収集

重点表現型の責任遺伝子の探索：問題の表現型を支配するコンソミック系統と B6 系統の交配による高精度連鎖解析を行い、責任遺伝子候補領域の絞り込みをおこなう。

(1) エネルギー代謝関連表現型の責任遺伝子の探索：エネルギー代謝について「浪費型」を示す B6-Chr3<sup>MSM</sup> 系統、「節約型」を示す B6-Chr13<sup>MSM</sup> 系統を対象に、F2 連鎖解析を拡大し責任遺伝子座領域の絞り込みを行う。並行して各系統の候補遺伝子座領域の同定を行うため、責任領域をさらに細分化したコンジェニック系統を作製する。新規に作製した系統についてエネルギー代謝関連表現型の収集を行い、連鎖解析による結果の妥当性を検証する。

(2) 行動関連表現型の責任遺伝子の探索：不安様行動の指標である危険評価行動に関与する可能性のある約 50 個の候補遺伝子について、その発現部位の解析・遺伝子内多型の解析・発現量の解析を進めることが必要である。そのためには、既存のデータベースを駆使しつつ必要に応じて実験による解析を行う必要がある。また、網羅的に解析するためのマイクロアレイなどの実施についても検討する段階にきている。様々な手法を駆使しつつ、可能性の高い候補遺伝子については分子遺伝学的手法によるノックアウト・ノックインマウスの作成なども今後検討する必要がある。

2. MSM/Ms 系統の SNP 情報と表現型データを統合するデータベースの構築

本研究の進捗に合わせた表現型データベースを構築する。内容は、国内外の関連データベースと共通の言語で定義付けできる構成とする必要がある。本研究の進捗に合わせた表現型データを適宜更新する。SNP 情報および表現型データに関しては双方向で検索可能なデータベースを構築する。新たな国内外のデータベースに対して適宜リンクを張る。

本研究の進捗に合わせた表現型データベースを構築する。内容は、国内外の関連データベースと共通の言語で定義付けできる構成とする必要がある。本研究の進捗に合わせた表現型データを適宜更新する。SNP 情報および表現型データに関しては双方向で検索可能なデータベースを構築する。新たな国内外のデータベースに対して適宜リンクを張る。

#### <成果公表リスト>

##### (1) 論文 / プロシーディング (査読付き)

702051643 (論文)

Oka, A., Aoto, T., Totsuka, Y., Takahashi, R., Ueda, M., Mita, M., Sakurai-Yamatani, N., Yamamoto, H., Kuriki, S., Takagi, N. et al., Disruption of Genetic Interaction Between Two Autosomal Regions and the X Chromosome Causes Reproductive Isolation Between Mouse Strains Derived From Different Subspecies, *Genetics*, 175, 185-197 (2007)

0707211855 (論文)

Tamura, M., Tanaka, S., Fujii T., Aoki, A., Komiyama, H., Ezawa, K., Sumiyama, K., Sagai, T and Shiroishi, T. Members of a novel gene family, *Gsdm*, are expressed exclusively in the epithelium of the skin and gastrointestinal tract in a highly tissue-specific manner. *Genomics*, 89: 618-629 (2007)

0801280948 (論文)

Blizard, D. A., Takahashi, A., Galsworthy, M., Martin, B., Koide, T.: Test standardization in behavioral neuroscience: a response to Stanford. *Journal of Psychopharmacology*, 21:136-139 (2007).

##### (2) データベース / ソフトウェア

NIG Mouse Genome Database: 基盤ゲノム支援班との連携で MSM/Ms 系統の SNP 情報を公開した

<http://molossinus.lab.nig.ac.jp/msmdb/>

Mouse polymorphism Database : 国立遺伝学研究所・生物遺伝資源センターとの連携で、マウス多型データベースを構築した。

<http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/polymorphism/about/about.jsp>

#### <班員間での共同研究等>

基盤ゲノム支援班の WGS sequencing による支援に加えて、基盤ゲノムの小原班員とは MSM/Ms をベースとした SNP データベースの構築で共同研究を推進している。