

新規変異マウス研究開発チーム

Mutagenesis and Genomics Team

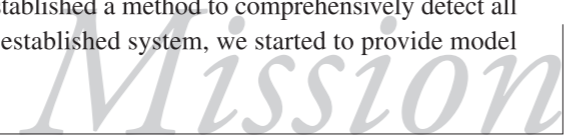


チームリーダー 権藤 洋一 (Ph.D.)
Yoichi GONDO, Ph.D.

ミッションと事業概要

1つのゲノムあたり平均3,000のENU誘発点突然変異をもつG1マウス10,000匹からなる変異マウスライブラリーを活用して、ユーザーが要望する標的遺伝子に点突然変異をもつシステムを提供している。今年度は、マウスの全遺伝子コーディング配列上の点突然変異を網羅的に発見するシステムを共同開発し、それぞれのG1マウスがもつ3,000の点突然変異間の相互作用も高速簡便に検出できるシステムの提供を新たに始めた。

We have been providing mouse strains carrying a point mutation in target genes based on users' request. Each strain potentially carries ~3,000 point mutations. In this fiscal year, we established a method to comprehensively detect all the mutations in whole mouse coding exons. By using this newly established system, we started to provide model mice encompassing gene-to-gene interactions.



平成22年度の成果

Development of Technology in 2010-2011

(1) 次世代版ジーンターゲットシステムによる遺伝子間相互作用解明を視野にいれたモデルマウスの提供

遺伝に基づく疾患や体質はもとより、環境に対する生命活動もすべてゲノムに記載された遺伝子情報の発現により営まれている。例えば、日焼け、外傷の治癒、流行性感冒への免疫反応と快復といった外的要因に対する生体反応も、すべて、複雑な遺伝子間相互作用を通して現れ、ホメオスタシスが保たれている。21世紀ライフサイエンスの究極の目標は、ヒトがもつ2万から3万といわれる遺伝子間および環境に反応するゲノムのプログラムを解明し、疾患を予防根治するとともに、より健康的な体質へと改善維持するための知識を得ることである。

その第一歩として、遺伝子を個別にノックアウトしたES細胞株を全マウス遺伝子に整備する国際ノックアウトコンソーシアムが進んでいる。これにより、単一遺伝子に基づく機能(monogenic trait)が明らかになる。しかし、マウス全遺伝子にノックアウトマウスが整備されても、3つの遺伝子間の相互作用の解析が限界である。ヒト疾患や体質において機能している多数の複雑な遺伝子間相互作用をモデル化し解明するには全く新しい基盤開発と整備が必須である。そのために、当チームがすでに開発提供している次世代版ジーンターゲットシステムを、超高速シーケンサーと融合させる基盤開発を2005年から鋭意進めて、本年度、実用化に達した。

まず、マウスゲノムの1%強を占める全コーディングエキソン49.6Mbを効率よく濃縮抽出するシステムをアジレントテクノロジー社と共同開発した。実際に濃縮精製したサンプルを超高

速シーケンサー AB SOLiDを用いて解読し、濃縮領域に誘発されている点突然変異を検索したところ、67個の点突然変異を1つのG1ゲノムから検出できた(図1)。さらに4つのG1ゲノムを同様に解析したところわずか2ヶ月で総数219の点突然変異を検出できた。ユーザーが要望した標的遺伝子上の変異に加え、同じマウスゲノム上に50以上の突然変異を同定検出できることで、図2に示すような、直接、遺伝子間相互作用まで検出できる新しいシステムが確立された。

加えて、これまで他の変異の影響を取り除くためにユーザーが2~3年かけて行っていた戻し交配が不要となり、解析期間が著しく短縮されるとともに、これまでではわざわざ除外していた遺伝子間相互作用まで検出できる画期的なシステムとなったのである。さらに、遺伝子コーディング上の全突然変異を検出できるようになったことで、ユーザーからの個別の要望を待つことなしに、理研変異マウスライブラリーが有する全突然変異を網羅的に検出する基盤技術も同時に確立したこととなった。

(2) Development of the next-generation gene targeting system encompassing gene-to-gene interactions.

Not only the genetic diseases and traits but also all the life responses to environmental factors are reflected in gene functions encoded in the genome. For instances, sunburns, healing of external injuries, and immunological responses against flu and its recovery are all controlled by the complex multigene expressions and interactions. The ultimate goal of life sciences in the 21st century is to develop the way to conquer diseases and to improve and maintain the quality of life by elucidating the functions of ~30,000 genes in the genome.

The International Knockout Mouse Consortium, which has been

developing knockout mice for every gene as each ES-cell line is the first step to understand each monogenic function. The knockout mouse system, however, may only be feasible to reveal the interactions of three genes, at most. Thus, it is necessary to develop another breakthrough that enable to elucidate complex multigenic interactions.

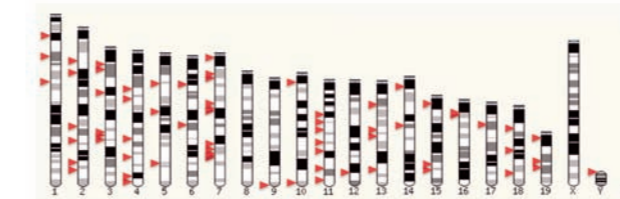
We have been trying to integrate the RIKEN next-generation gene targeting system to the ultra throughput DNA sequencers since 2005. In this fiscal year, we have established a method to detect all the ENU-induced mutations in the whole coding exons of the mouse genome, which also has made it for the first time possible to systematically identify gene-to-gene interactions if any.

Firstly, we developed the enrichment system of a total of 49.6 Mb of whole coding exons in the mouse genome by collaborating with Agilent Technologies. The enriched sample was subjected to the ultra throughput DNA sequencing with AB

G1マウスno.1675ゲノムの全コーディングエキソン49.6Mbを濃縮して検出された67個の点突然変異(図1)

ENU変異はG0オスに誘発し、非投与メスと交配してG1マウスが確立されるので、G1オスマウスのX染色体にENU変異は存在しない。

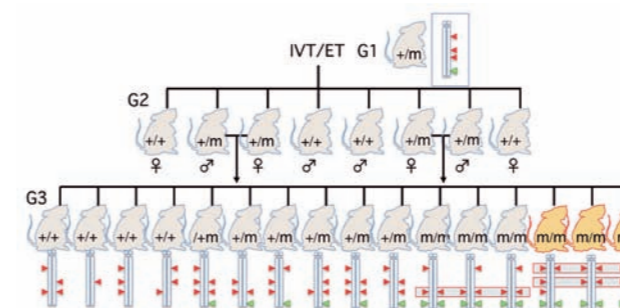
Whole coding-exon enrichment and ultra throughput sequencing detected 67 ENU-induced mutations in the G1 no.1675 genome. ENU was administered to G0 male and mated to untreated females to produce G1 mice so that no X chromosomes of G1 males carry ENU-induced mutations. (Fig.1)



遺伝子間相互作用の有無を検出する流れ(図2)

ユーザーの標的遺伝子上の変異(◀)に着目してG3に表現型が認められた場合、そのG1マウスゲノムの全コーディングエキソン上の変異(▶)を網羅的に検出する。G3群における、検出された全突然変異の遺伝子型を、常法を用いて解析することにより、遺伝子間相互作用の有無を高速簡便に同定できる。もし、相互作用をもたらす変異がノンコーディング上にある場合も、近くのコーディング変異がマーカーとなり検出できる。

The flow to identify gene-to-gene interactions. When the G3 exhibits any phenotypes with respect to the mutation in the target gene (◀), then, all the mutations (▶) in whole coding-exons will be detected as shown in the text. The segregation of all the mutations in G3 will be determined by a conventional method that quickly identifies gene-to-gene interactions if any. Even if an interacting mutation(s) exists in noncoding region(s), the nearby coding mutation(s) will be the marker for the detection. (Fig.2)



SOLiD and we have found a total of 67 point mutations in one G1 mutant strain (Fig. 1). We then sequenced four mutant G1 strains with the same system and discovered a total of 219 mutations within two months. The discovery of more than 50 mutations in addition to the one in the users' target gene allows them to identify gene-to-gene interactions as shown in Fig. 2. The newly established mutation discovery system also makes the phenotype analysis time much shorter. The users used to conduct backcrosses more than 2 years to eliminate all the mutations except in their target gene. With the new system, they may immediately intercross mutant mice without any backcrosses in order to detect gene-to-gene interactions. Finally, the new system should also provide the basic infrastructure to directly reveal all the ENU-induced mutations in the RIKEN mutant mouse library starting from the mutation discovery in the whole coding exons.

職員とメンバー構成 Members

- チームリーダー [Team Leader]
権藤 洋一 Yoichi GONDO, Ph.D.
- 開発研究員 [Research & Development Scientist]
福村 龍太郎 Ryutarō FUKUMURA, Ph.D.
村田 卓也 Takuya MURATA, Ph.D.
牧野 茂 Shigeru MAKINO, Ph.D.
- 開発技師 [Technical Scientist]
中井 祐治 Yuji NAKAI
- テクニカルスタッフII [Technical Staff II]
小瀧 逸人 Hayato KOTAKI
石塚 祐一 Yuichi ISHITSUKA
- パートタイマー [Part-Timer]
根本 秀子 Hideko NEMOTO
釣賀 雅子 Masako TSURUGA

