

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

次世代シーケンサー (NGS)による点突然変異検出精度をさらにあげ、ENU 変異マウス1系統には約5千変異あることが新たにわかった。理研変異マウスライブラリーも13,000系統に増え、総数7千万変異を蓄積しコーディング領域だけでも百万変異を提供できる。実際に3つの標的遺伝子に多数の変異系統を発見しその大部分が変異表現型を示した。NGS利用によって、戻し交配を用いず遺伝子間相互作用モデルを開発できる新たな利用公開も開始した。

Next-generation sequencer (NGS) now predicts ~5,000 mutations per ENU mutant line. The size of the RIKEN Mutant Mouse Library also increased in 13,000 lines so that the number of archived mutations has become ~70 million. About a million coding mutations are thus now available. Indeed, we find many allelic series of mutations in three target genes and most of them exhibited phenotypes. The new modeling system for gene-to-gene interactions with NGS but avoiding backcrosses has also become available.

平成23年度の成果

Development of Technology in 2011-2012

変異マウスライブラリーの増強と遺伝子間相互作用モデルも含んだ公開リソース

昨年度開発した次世代シーケンサー (NGS)による全コーディング領域の網羅的ENU誘発点突然変異検出精度をさらに高め、各系統から平均80~100変異検出している。これにより、ゲノム全体には約5,000変異が誘発されている計算となった。新たに3,000系統のENU変異マウスも連携研究で増強し、総数7千万変異を変異マウスライブラリーとして蓄積し、ゲノム配列50bpごとに平均1変異系統をライブラリーから提供できる。約3万あるといわれる各遺伝子に30を超えるさまざまな点突然変異系統が提供できる。実際に3つの異なる標的遺伝子を対象に機能候補領域に絞って部分的に変異検出を進めただけでも、これまでにのべ26個のコーディング変異を発見した(図1)。そのなかでアミノ酸置換が17系統(65.4%)、同義置換が6系統(23.1%)、ナンセンス変異やスプライシング変異といったノックアウト相当変異が3系統(11.5%)であった。現在、マウス個体レベルで9系統解析し7系統(77.8%)がすでに表現型を示した。それぞれに発見したノックアウト相当変異は、従来法のジーンターゲット法で遺伝子破壊を行ったマウスで報告されている表現型と同じ「早期胎生致死」を示し、生物学的にもノックアウト変異と同等であることが示された。アミノ酸置換変異が機能低下型の表現型を示し、遺伝子機能を詳細に解析できることを実証した。こういった表現型解析は、各系統に誘発された他の数千の変異の影響を取り除くため、従来は、戻し交配を10世代以上行ってから解析していた。こういった修飾

変異は、生活習慣病をはじめ複雑な遺伝子間相互作用で発症する疾患解明や一般的な体質の解析に極めて重要な変異にもかかわらず、どこに誘発されているか同定することが現実的に不可能であることからあえて除外し、発見した変異の単一効果だけを解析していたのである。NGSによる網羅的

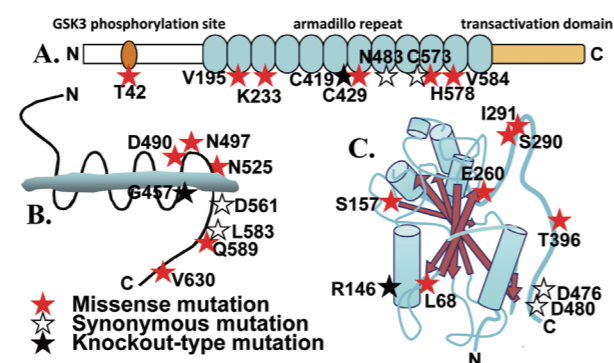


図1. 逆遺伝学的にβ-カテニン(A)、Sufu(B)、Smo(C)に発見したENU変異。星印で示すように、アミノ酸置換、同義置換、KO相当変異とさまざまな変異アリルが多数すでに見つかった。KO相当変異3系統はホモ接合にするとすべて早期胎生致死となった。アミノ酸置換変異も解析した6系統のうち4系統ですでに変異表現型が見られ1系統は現在発がん実験を継続中である。

Fig. 1. ENU mutations found in β-catenin (A), Sufu (B), and Smo (C) by reverse genetics. Many allelic series of mutations shown by stars have already been discovered. All the KO-type alleles were early embryonic lethal. Four out of six revived missense mutations exhibited various mutant phenotypes.

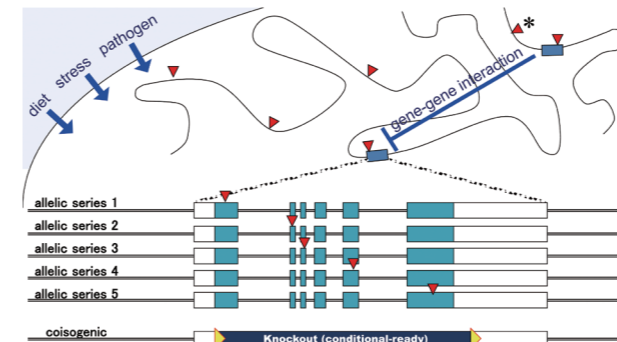


図2. 遺伝子間相互作用までモデル化可能な公開マウスリソース。各遺伝子に多数の点突然変異を提供でき、アミノ酸ごとからKO変異まで詳細な機能解析を可能とした。さらに、戻し交配を施さないことによって、周辺に誘発された変異群のなかで相互作用をもたらすものも、NGSによる網羅的コーディング変異検出によってモデル化が可能となった。修飾変異がノンコーディング変異の場合(*)でも近傍のコーディング変異との連鎖解析で検出が可能である。

Fig. 2 Open mouse resource encompassing gene-to-gene interactions. Many allelic series of ENU mutations allows fine functional analysis of the target gene. Avoiding any backcrosses, any modifiers or gene-to-gene interactions may be detected by the deep exome re-sequencing with NGS. When a modifier(s) existing in a noncoding sequence(s), the linkage analysis with the nearby coding mutation(s) should detect such noncoding modifier(s).

コーディング変異検出は、この問題を一気に解決し、戻し交配に要していた数年を短縮するとともに、修飾変異の同定など遺伝子間相互作用までモデル化できるオープンマウスリソースとして提供できるようになった(図2)。

Expansion of Mutant Mouse Library and open resource for modeling gene-to-gene interactions.

We have further enhanced the mutation detection efficiency to 80 - 100 exome mutations per ENU mutant strain by NGS. Accordingly, the estimated number of genomewide mutations increased to ~5,000 per strain. The ENU Mutant Mouse Library also expanded to 13,000 strains by collaborative efforts; thus, a total number of archived ENU mutations now ~70 million. One ENU-induced mutation is expected every ~50bp in the library. We thus are able to provide >30 independent mutant strains for any target gene. We screened only parts of candidate functional regions of three target genes and indeed found 26 mutations (Fig. 1), of which 17 (65.4%), 6 (23.1%) and 3 (11.5%) were missense, synonymous and KO-equivalent mutations, respectively. We have so far analyzed 9 mutant strains and have already identified mutant phenotypes in 7 strains (77.8%). All of the KO-equivalent mutations indeed exhibited the phenotype of the early embryonic lethality reported by the conventional

KO mouse technology. Missense mutations showed hypomorph phenotypes. Thus, it becomes possible to conduct fine analyses of the target gene. These phenotype analyses had been conventionally conducted after eliminating any modifier effects of the other thousands of mutations by backcrossing >10 generations. Common diseases and complex traits in human are, however, a consequence of complicated gene-to-gene interactions so that modifier effects among the mutations are indispensable to elucidate such interactions. The randomly induced thousands of genomewide mutations had been practically impossible to identify; thus, they were intentionally discarded. We now are able to identify genomewide coding-mutations by NGS and made it available to the research community to capture the modifiers and to analyze the gene-to-gene interactions (Fig. 2). Even if such modifiers may be in noncoding sequences, the linkage study with the nearby coding mutations should identify and reveal such noncoding modifiers as well.

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 Ryutaro 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

