

チームリーダー Team Leader

権藤 洋一 (Ph.D.)

Yoichi GONDO, Ph.D.



# 新規変異マウス研究開発チーム

Mutagenesis and Genomics Team

## ミッションと事業概要 Mission

**ゲ**ノム全体に数千の点突然変異をもつマウス10,000系統を、理研変異マウスライブラリーとして利用公開している。ノックアウトマウスと異なり、研究者が希望する標的遺伝子に複数の点突然変異系統を提供できる。本邦独自のマウスリソースとして国際的に利用されている。さらに、次世代超高速シーケンサーを駆使して、コーディング配列上の変異をすべて同定する試みも新しく始め、すでに網羅的な変異系統確立が進み出している。

We archived 10,000 mutant mice as frozen sperm, each carries several thousands of point mutations. As a mutant mouse library, we have made it internationally available to the research community. Contrary to the knockout mice, this library provides allelic series of point mutations to users in their target genes. To drastically enhance the utility of the library, we have started the re-sequencing of target exons of the archived genomic DNA by ultra-throughput next-generation sequencers.

## 平成21年度の成果

Research and Development in 2009-2010

### (1) 次世代版ジーンターゲティングシステムの研究技術開発

ヒト疾患や体質の遺伝的要因となる候補遺伝子が次々と同定されている。そういった遺伝子に突然変異をもつマウスを作製し、候補遺伝子の実験的検証や疾患メカニズム解明といった基礎研究から、治療法や創薬の開発といった臨床応用まで活用できるモデル動物を開発提供している。すでに、数千の点突然変異をゲノム全体にランダムに有する変異マウスを約10,000系統アーカイブ化した(図1)。どの遺伝子でも10~20の異なる点突然変異系統を提供できるので「変異マウスライブラリー」と呼んでいる。2002年から一般に公開し、利用者が希望する標的遺伝子にさまざまな点突然変異マウスを年間100~150系統ほど同定検出している。具体例として、統合失調症の候補遺伝子のひとつとされていたDisc1遺伝子に4系統の点突然変異を発見し、そのうち利用者が希望した2系統を生きたマウスとして提供した。解析の結果、1系統は期待通り統合失調症モデルであることがわかった。もう1系統は予想を越えてうつ病モデルとして利用できることがわかった。この成果発表以来、Disc1変異マウスはいろいろな製薬会社から利用申込が相次ぎ、提供している。

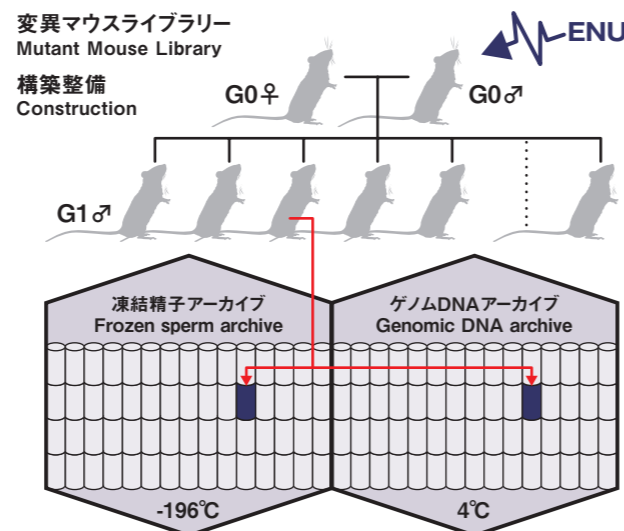
3万弱と言われるマウス全遺伝子にノックアウトマウスをES細胞株として整備する大型国際プロジェクトが2006年から5カ年計画で進んでおり今年が最終年となっている。しかしながら現在確立されたES細胞株では、まだ全遺伝子の60%ほどしかカバーしていない。一方で、理研変異マウスライブラリーにはコーディング配

列上だけで40万の点突然変異を蓄積しており、そのうちの25万系統がアミノ酸置換変異、4万系統はノックアウト相当の変異であることがわかっている。すなわち、理研単独ですでに、全遺伝子に平均1系統以上をノックアウトマウスとして精子凍結しているうえに、その6倍以上のアミノ酸置換マウスも蓄積している。さらには、ノンコーディング配列も含めると総数で3千万系統以上の変異マウスをすでに理研変異マウスライブラリーは有している。

毎年100~150の点突然変異を変異系統として確立して利用者に提供しているとはいえ、蓄積した変異総数からするとわずか

### 次世代版ジーンターゲティングシステム(図1)

Next-generation gene targeting system (Fig.1)



である。そこで超高速次世代シーケンサーを用いて一気にゲノム上の点突然変異を網羅的に検出するための研究開発に2009年度から本格的に取りかかった。まずは、遺伝子コーディング配列上の点突然変異を網羅するため、ターゲットエクソン配列だけを超高速シーケンシングする技術開発から開始した。そのために、マウスゲノムから10領域を選びコーディングエクソン配列を抽出し(図2)、のべ4Mbのターゲットエクソン配列を濃縮精製するシステムを2009年度に完成した。また、すでに利用可能なIlluminaやSOLiDといった次世代シーケンサーを用いても、1変異発見に要するコストは従来法より1/2から1/10以下となることもわかった。

### (1) Development of the next-generation gene targeting system.

Many candidate genes for human diseases and biofunctions have been identified. Mutant mice are indispensable for the basic studies to reveal the mechanisms of diseases with experimental validations as well as for the clinical applications such as the development of therapeutic strategies and genomic medicines. We archived 10,000 mutant mice as the RIKEN mutant mouse library. By screening the entire library, we usually find 10 - 20 allelic series of point mutations per target gene. We have made the use of the library open to the research community since 2002. Every year 100 - 150 mutant strains have been established in various target genes based on the requests. As an example, we found four point mutations in the Disc1 gene, which is one of the genetic risk factors for schizophrenia. The requester decided to analyze two out of four discovered mutations. One Disc1 mutant strain was found to be a schizophrenia model as expected, while the other strain surprisingly exhibited many characteristics of the major depression disease. Pharmaceutical companies have constantly requested the Disc1 mutant strains for their R&D studies since the discovery of those psychiatric behaviors.

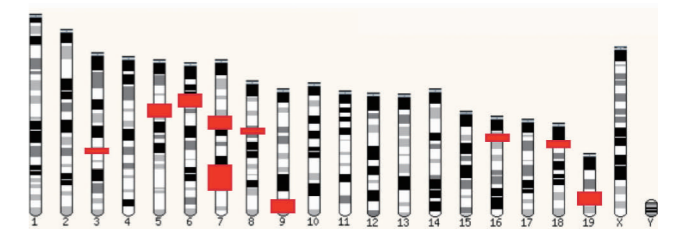
This is the last year of the 5 years project by the International Knockout Mouse Consortium (IKMC). At present, the established ES cell lines, however, only covers ~60% of the entire mouse genes (~30,000 genes). On the other hand, RIKEN mutant mouse library encompasses a total of 400,000-point mutations in the coding sequences, in which 250,000 and 40,000 are missense and knockout-type mutations, respectively. It implies that RIKEN by itself accumulated more than one knockout-mouse strain for every mouse gene in addition to eight amino-acid-substitution strains. In entire genome including noncoding sequences, a total of 30 million point mutations are archived in the RIKEN mutant mouse library.

In order to fully utilize the mutant mouse resource in the RIKEN library, in 2009, we have started a feasibility study to directly and comprehensively identify the archived point mutations by using ultra-throughput next-generation sequencers (NGS). We firstly designed the baits to enrich the target exons covering a total of 4 Mb coding exons from 10 genomic

regions. The necessary running supply costs to find one mutation by the target-exons resequencing with NGS should be reduced to 1/2 - 1/10 of those by the conventional PCR-based mutation discovery methods.

### ターゲットコーディング配列10領域(図2)

10 regions of target coding sequences (Fig.2)



## 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 Yoichi ISHITSUKA

パートタイマー Part-Timer  
根本 秀子 Hideko NEMOTO / 釣賀 雅子 Masako TSURUGA

