

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

理研変異マウスライブラリーの利用可能な変異総数が4,500を超えた。今年度も実際に行動異常や発がんなどヒト疾患と関わる変異が確立される一方で、ごく稀に生じる自然発生突然変異検出にも着手し成功した。この過程で、広く利用されているマウスゲノム参照配列の問題点を発見した。そこで、マウス標準系統ゲノムの見直しも開始し、より利用価値の高いリソース提供に向けたゲノム情報整備も進めている。

The total number of the identified point mutations in RIKEN Mutant Mouse Library exceeded 4,500. Among them, users have developed new models, e.g., behavioral anomalies and tumorigenesis models this year. We also succeeded in identifying very rare spontaneous mutations in the mouse. During the identification process, we found problems of the mouse genome reference sequences and have started de novo re-assembly of the genome sequence of the standard mouse strain.

MISSION

平成27年度の成果

Development of Technology in 2015-2016

高頻度に点突然変異を誘発する化学変異原ENUを用いて整備した理研変異マウスライブラリーは、不妊モデルや精神疾患モデルなどヒト疾患モデルも含めさまざまな遺伝

子機能解析に利用されている。今年度も、行動異常マウス (Mun et al. Sci Rep, 2015) や、発がんモデルマウス (Sakamaki et al. Carcinogenesis, 2015) などがユーザーによって新たに紹介された。

一方で、ごく稀に生じる自然発生突然変異は、疾患要因

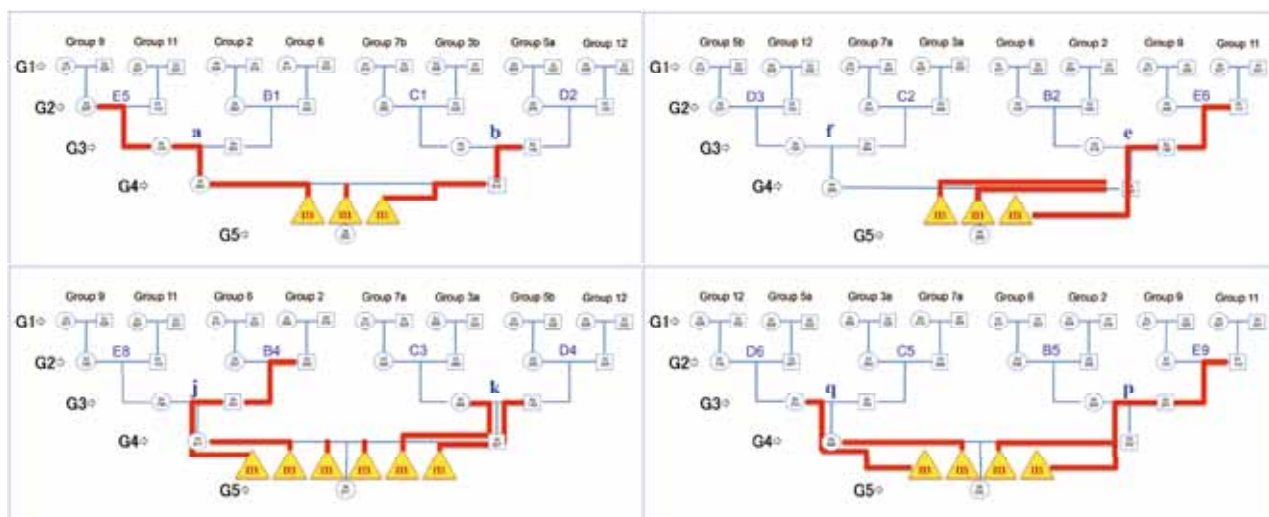


図. 自然発生突然変異の蓄積法と検出した変異のトレース例

33匹の第1世代(G1)マウスから交配を開始し、以後は同じマウスによる交配がないよう第5世代(G5)まで自然発生突然変異を蓄積した。そのため、新たに生じた変異がホモ接合となることはない。これを8家系独立に行い、8匹のG5の全ゲノムシーケンシングデータから変異候補を抽出し実験検証を進めている。試みに、最初に解析した4家系から同定した112個の真の変異をトレースしたところ、16個が新たに生じた変異 (m△) で、96個はG1に由来していた。その16変異のトレース結果を赤い線で示す。例えばD6-002に発見した3つの変異は、D3-097、D4-158、D6-002自身にそれぞれ初めて生じていた。

Figure. Accumulation of spontaneous mutations and their origins.

Starting from a total of 33 G1 mice, unique pairing was only made from G2 to obtain G5 mice every generation; therefore, de novo mutations have always been heterozygous. We obtained eight G5 mice from eight independent pedigrees. We conducted a trial trace by using a total of 112 so far identified mutations from the 4 out of 8 pedigrees. As a result, 16 mutations (triangles with m) were de novo mutations and originated from a single ancestor in the pedigrees as shown by red lines whereas 96 were derived from G1 mice.

になるとともに、生物多様性や進化に寄与することも20世紀初頭から知られていながらその実態はよくわかっていない。バイオリソースの開発整備や維持管理においても、自然に生じる突然変異が実際にどのくらい影響を及ぼしているか、不明のまま課題として残されている。木村資生により、中立な突然変異は長い進化の過程では約 10^{-8} /bp/年という一定の置換頻度で分子進化に寄与することが明らかにされたものの、実際には、加齢、遺伝的背景、雌雄の違い、また、放射線や化学変異原など環境の違いによって、突然変異の生じ方が左右されることもわかっている。

そこで、マウス標準系統を用いて自然突然変異の実態解明にも着手した。新たに生じた変異がホモ接合とならないよう5世代にわたって蓄積することで、劣性有害変異も検出できる新しい方法を開発した(図参照)。一般に言われている自然発生突然変異率 1×10^{-9} /bp/世代がそのまま当てはまれば、この5世代目(G5)のマウスゲノムには240の新しい変異が蓄積される計算になる。この交配を8セット独立に行い、総数1,920個(=240変異 \times 8 G5ゲノム)の新規自然発生突然変異が生じているかどうかを調べ、自然発生突然変異率とスペクトルを大規模高精度に実験検証する。このG5マウス8ゲノムの全解読がゲノム支援によって可能となり、そのビッグデータから、現在、変異を同定している。さらに、5世代8家系の全マウスのゲノムDNAはすべて保管しているので、検出した変異がいつどこで生じたかまで詳細に解析できるのが本方法の特長である(図参照)。

こういったENU誘発変異や自然発生突然変異の高精度検出には、比較対象となるゲノム参照配列が必須である。PCRのプライマー設計など基本的なゲノム実験から、最先端のゲノム編集技術などでも、ゲノム参照配列が正しいという前提で実施されている。このゲノム編集技術は将来的にはiPS細胞などと組み合わせて遺伝子治療の扉を開く夢の技術になりうるともいわれ、ゲノム参照配列の1塩基の間違いが重篤な結果をもたらすこともありうる。ところが、ヒトでもマウスでも、未解読領域だけでなく、解読完了とされていた領域においても少なからず問題があることが近年の大規模解析によってわかってきた。ヒトでは、がんゲノムなど個人化医療への応用や、疾患解明にむけた10万人規模のゲノム再解読計画など国内外で進むなか、欧米を中心にヒトゲノム参照配列の抜本的見直しが今年度飛躍的に進んだ。そこで、あらゆるゲノム参照配列を高速高精度に見直し解読する技術開発も視野にいれ、マウス標準系統をモデルとしたゲノム参照配列再解読構築も新たに開始した。

The users have been developing various mutant mouse models including human diseases from RIKEN ENU mutant mouse library. This year, Mun et al. (2015) and Sakamaki et al. (2015), for instance, developed behavioral and tumorigenic models, respectively. Spontaneous mutations have well known to be very rare but a significant risk factors for various diseases. Meantime, they are the driving force of genetic diversities and evolution. In order to maintain and to control the qualities of the biosources, it is fundamental to elucidate spontaneous mutations but not well understood, yet, since they are extremely difficult to detect. Motoo Kimura showed that the base substitution rate is a constant value of $\sim 10^{-8}$ /bp/yr in a scale of millions of years. Contrary, it is also well known that the mutation rate is dependent on age, gender, genetic background and environmental risk factors like radiations and chemical mutagens.

We thus developed a new scheme to study the rare spontaneous mutations in a defined standard mouse strain with a large scale as shown in the Figure. All the mutations including recessive

deleterious ones are accumulated without selection for a total of five generations. The trio analysis in human has given an estimate of the mutation rate to be 1×10^{-9} /bp/generation. If this estimate would also apply to the mouse, each mouse genome of the 5th generation (G5) would carry 240 *de novo* mutations in the whole genome. We have independently conducted this experiment in 8 pedigrees. The Genome Sciences Program supported the whole genome sequencing of the 8 G5 mice so that a total of 1,920 (=240 \times 8 G5 mice) *de novo* mutations would be detected. We kept all the genomic DNA samples from every mouse in the eight pedigrees. Thus, it has also become possible to trace the origin of the detected mutations as well (Figure).

For the detection of ENU-induced as well as spontaneous mutations, the genomic reference sequences are essential. Various large-scale human genome re-sequencing programs have indicated the necessity to re-assemble the human genome reference sequence. The cutting-edge genome editing technologies are, for instance, completely dependent on the reference sequence to design as well as to validate off-target effects. Thus, several *de novo* re-assemblies of human genome sequence have been conducted this year. In order to refine the mouse genome reference sequence, we have started the *de novo* assembly of genomic DNA of the standard mouse strain.

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.
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

