

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 三浦 郁生
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1041 号
学位授与の日付 令和4年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Characterization of single nucleotide polymorphisms for a forward genetics approach using genetic crosses in C57BL/6 and BALB/c substrains of mice.
(C57BL/6 と BALB/c マウスの垂系統間交配を用いた順遺伝学的アプローチのための一塩基多型の評価)
論文審査委員 主査 教授 竹林 浩秀
副査 教授 笹岡 俊邦
副査 客員教授 新井 誠

博士論文の要旨

【背景と目的】

マウスを用いて遺伝子の新たな機能を解明するアプローチは、順遺伝学と逆遺伝学に大別される。このうち順遺伝学は表現型を出発点としたアプローチであり、表現型の原因となる遺伝子変異を同定することによって様々な新規遺伝子機能の解明に貢献してきた。マウスの順遺伝学的アプローチの基盤は、系統間交配によって作出された染色体組換え個体群の遺伝子型判定によって、表現型と連鎖する染色体上の位置、すなわち原因遺伝子座を決定することである。組換え個体群作製に用いる親系統は遺伝的背景が異なることが必須となるが、遺伝的距離の大きい系統間による個体群の表現型は、親系統間の遺伝子多型の影響によって修飾され、その結果として原因遺伝子座の同定は困難となる。そこで本研究は、表現型への遺伝的背景の影響を極力排除したマウス垂系統間交配に基づいた染色体マッピング法を確立するための基盤となる一塩基多型 (SNP) マーカーの構築を目的とした。

【方法】

SNP マーカーの構築は、C57BL/6 マウスの7垂系統 (C57BL/6J, 6JJc1, 6JJmsSlc, 6NTac, 6NJc1, 6NCr1 および 6NCrSlc)、および BALB/c マウスの4垂系統 (BALB/cAJc1, cByJJc1, cAnCr1Cr1j および cCrSlc) を対象に実施した。C57BL/6 垂系統間の SNPs は、ゲノムデータベースの多型情報に基づき、染色体を均等にカバーする候補 SNP を探索・選抜し、サンガーシークエンス解析により SNP の有無を検証し、TaqMan アッセイ法によって7垂系統の SNP アレルを調査した。一方、BALB/c 垂系統間の SNPs は、BALB/cAJc1 と BALB/cByJJc1 マウスの次世代シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンサー解析を実施し、全ゲノムシーケンサーが公開されている BALB/cJ との比較によって染色体を均等にカバーする候補 SNP を探索・選抜し、サンガーシークエンス解析により4垂系統の SNP アレルを調査した。

【結果】

C57BL/6 垂系統間のマーカーは、TaqMan アッセイ法による検証結果および染色体上の位置に基づき、C57BL/6J

と C57BL/6NTac 亜系統間の SNP アレルが検出可能で、染色体上に平均 20.58 Mb 間隔で設置した 114 マーカーを全染色体タイピングのための基本セットとした。次に、これらのマーカーにおいて 5 つのブリーダーに由来する他の 5 亜系統の SNP アレルを判定した結果、C57BL/6JJc1 は 5 マーカーが、C57BL/6JJmsSlc はこれに 8 マーカー加えた 13 マーカーが C57BL/6J と異なるアレルであり、C57BL/6N 系統と同一のアレルであることが明らかとなった。一方、C57BL/6N 亜系統内においては C57BL/6NTac と C57BL/6NJc1 間の SNP は検出されなかった。また、C57BL/6NCr1 は 1 マーカーが、C57BL/6NCrSlc はこれに 11 マーカー加えた 12 マーカーが異なるアレルを有しており、これら 12 マーカーはすべて C57BL/6J 系統と同一アレルであった。

BALB/c 亜系統間のマーカーセットは、BALB/cAJc1 と BALB/cByJJc1 の全ゲノムシーケンス解析後、リードカバー率などを指標に SNPs を選抜し、BALB/cAJc1 と BALB/cByJJc1 間の SNP アレルが検出可能で、平均 21.18 Mb 間隔で染色体上に設置した 106 マーカーを全染色体タイピングのための基本セットとした。また、これらのマーカーについて他の 3 亜系統間との SNP を比較した結果、BALB/cByJJc1 は他の亜系統と最も多くの SNPs が検出され、90 マーカーは BALB/cJ と、57 マーカーは BALB/cAnNCr1Cr1j および BALB/cCrSlc と異なるアレルを保有していることが明らかとなった。また、BALB/cAnNCr1Cr1j と BALB/cCrSlc 間に SNP は検出されなかった。

【考察】

これまで C57BL/6 亜系統においては、C57BL/6J と C57BL/6N 間で多くの表現型の差異が報告されている。このような亜系統間の表現型差異は BALB/c 亜系統間においても報告されており、本研究で作製したマーカーセットは亜系統間交配に基づいた順遺伝学的解析を実施するための有用なツールとなると考えられる。また、順遺伝学的解析において N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) を用いたミュータジェネシスは未知の遺伝子機能の解明のための有用なツールであるが、これまで作製された ENU 変異マウスの表現型、特に軽度な表現型は遺伝的に離れた系統間の交配に起因した表現型修飾によって遺伝子座の同定に至らなかったものも数多く存在する。多くの大規模プロジェクトにおいては、C57BL/6 および BALB/c の雄マウスに ENU が投与され、それらの精子が保存されていることから、亜種間交配と本研究で樹立した SNP マーカーの組み合わせることで、以前には見落とされた遺伝子座の同定が可能となるかもしれない。加えて、本研究で作製したマーカーセットは遺伝子改変・ゲノム編集マウスやコンジュニックマウスの遺伝的背景の検証にも活用できることからマウス遺伝学全般において有用なツールになると期待される。

審査結果の要旨

順遺伝学は、表現型を出発点として遺伝子座を決定するアプローチであり、遺伝子の機能解明に大きく貢献してきた。順遺伝学解析を行う際には、遺伝子背景の影響をできるだけ排除したマウス亜系統間の交配によって行くと、より精密な解析が可能となる。本研究は、亜系統間の遺伝子マッピング法を行うための基盤となる一塩基多型 (SNP) マーカーセットの構築を目的とした。C57BL/6 の 7 亜系統と BALB/c の 4 亜系統を対象として、ゲノムデータベースの多型情報あるいは次世代シーケンス解析の結果をもとに SNP 候補を選抜し、サンガーシーケンス解析により SNP の有無を確定した。続いて、TaqMan アッセイ法によって SNP アレルの解析を行った。その結果 C57BL/6 亜系統間マーカーとして 114 マーカーからなる基本セットを確立した。また、BALB/c の亜系統間のマーカーとして 106 マーカーからなる基本セットを確立した。これらはマウス染色体上に、それぞれ平均 20.58Mb および平均 21.18Mb の間隔で設置されていた。

本研究により、マウス亜系統間交配に基づいた遺伝子マッピング法を確立するための基盤となる SNP マーカーセットが構築された。この亜系統間 SNP マーカーを用いることにより、これまで同定に至らなかったマウス表現型の遺伝子座を明らかにすることや遺伝子改変マウスの遺伝的背景の検証などが可能になると考えられる。マウス遺伝学の解析に極めて有用な基盤構築に貢献した点に、学位論文としての価値を認める。