

マウスリソースに関する国際情勢と形状情報の整備について

吉木 淳^{*}, 目加田和之^{*}, 太田 聡史^{**}, 村上亜弓^{*}, 森脇和郎[†], 小幡裕一[†]

[†]理化学研究所バイオリソースセンター

^{*}実験動物開発室、^{**}情報解析技術室

つくば市高野台 3-1-1

e-mail: yoshiki@brc.riken.jp

要旨

ヒトの病気について理解を深めるためには、健康と病気に関わる遺伝子の機能を解明する必要がある。マウスはヒトと 99% の遺伝子が同じで、遺伝子操作も可能であり、特に遺伝子欠損マウスは遺伝子機能の解明には理想的なモデル動物である。このため欧米では大規模かつ網羅的な全遺伝子のノックアウト計画が始まっており、総計 30 万系統の遺伝子ノックアウトマウス (ES 細胞) の作出が予定されている。Jackson 研や理研 BRC 等の世界の主要なマウスリソースセンターの国際連盟 FIMRe ではノックアウト ES 細胞及びマウスを世界中の研究者に迅速に提供する体制整備を始めている。理研バイオリソースセンターの役割は、リソースの収集・保存・提供だけではなく、系統の特性情報を整備することによりリソースの付加価値を高めることにもある。なかでも形状情報は生体における遺伝子機能解明のためには必須の情報である。3 次元内部構造顕微鏡、in vivo レーザー顕微鏡、X 線 CT や Motion Capture 技術により、マウス系統の形状や動きの情報を数値化し、さらに SNP 情報を付加することにより、個体の形態や動きを遺伝子レベルで解明するための独自性の高いマウスリソースを整備していきたい。

本文

ヒトの病気について理解を深めるためには、健康と病気に関わる遺伝子の機能を解明する必要がある。ヒトおよびマウスの全ゲノム配列が決定され、いずれも遺伝子の総数は約 3 万と推定されているが、その大部分の機能は未だ不明である。遺伝子の機能と病気との関係を解明するためには、遺伝子機能を欠失させた突然変異体を個体レベルで解析する方法が最も望ましい。しかし、ヒトの全遺伝子の機能をヒトにおいて実験的に研究することは、倫理上また実験手法上不可能である。マウスはヒトと 99% の遺伝子が同じであり、さらに遺伝子操作や胚操作が可能で、この目的に理想的なモデル動物である。しかし、これまでに全世界で作出されたノックアウトマウスは全遺伝子の 10% 程度をカバーしているのみであり、また、その多くは解析が不十分であったり、公的バンクにも導入されておらず研究者が自由に入手できる状態には整備されていない。

ヒトの健康と疾患に関する研究を加速するためには、全遺伝子のノックアウトマウスを効率よく作出し、広く研究者に供給する体制の整備が必要である。このような認識に立ち、米国の研究者は、2003 年にコールドスプリングハーバー研究所・バンブリーセンターで会議を行い、ENU 突然変異プロジェクトに加えて、網羅的大規模なノックアウトマウスプロジェクトの必要性を提案した(Nature Genetics, 36:921, 2004)。欧

州でも同様の計画を European Conditional Mouse Mutagenesis Consortium のメンバーが提案し(Nature Genetics, 36:923, 2004)、欧米における全遺伝子をノックアウトしたマウスリソースの整備プロジェクトが動き始めた。

米国では NIH が 2006 年 6 月より KOMP (Knockout Mouse Project)を開始する予定である。プロジェクトの概要は、全遺伝子ノックアウトマウス作製を目標とし、まず、ES 細胞レベルで高速大量作出が可能な gene-trap またはトランスポゾンによるランダム挿入突然変異法で約 60%の遺伝子のノックアウトラインを作製する。この方法では 60%を越えると作出効率が低下すると予想され、残り約 40%の 10,000 遺伝子は直接遺伝子ターゲティングによりノックアウトラインを作製する。ノックアウトマウス作製に用いる系統は、研究で最もよく使われ、また全遺伝子配列が決定された C57BL/6 を第 1 選択とする。現状では良質な C57BL/6 由来の ES 細胞がないため、C57BL/6 由来 ES 細胞の整備も計画に含まれている。一方、欧州では 2005 年 10 月より EUCOMM (European Conditional Mouse Mutagenesis Program)が EU の支援を受けて立ち上がっている。European Mutant Mouse Achieve, MRC, Sanger Center 等が参加している。ヨーロッパの研究者が得意とするコンディショナル突然変異マウスの作製法で 20,000 系統(12,000 系統は コンディショナル gene-trap 法により、また 8,000 系統はコンディショナル遺伝子ターゲティング法による)を 129 系統の ES 細胞を用いて作製する。カナダでは 2005 年 10 月よりカナダ政府により NorCOMM (North American Conditional Mouse Mutagenesis Project)が発足し、Manitoba Institute of Cell Biology 及び Hospital for Sick Children が参加して、gene-trap によるノックアウト ES 細胞を毎月 1,000 ライン作製する計画である。さらに、ヒトのゲノム解析研究から、疾患感受性の多くが SNP によって決定されていることが明らかになりつつある。このことを実験的に証明するための将来計画として、上記のノックアウトされた遺伝子を、さらに異なる SNP を持つ遺伝子で置き換えたノックインマウスリソースの作製も検討されている。今後 10 年から 20 年の間に、1 遺伝子あたり 10 種の SNP 遺伝子への置き換えを行い、全 3 万 遺伝子 × 10 種 = 30 万のリソースが作製されると推計されている。

いずれのプロジェクトにおいても、必要性、要望に応じてこれらのリソースから順次ノックアウトマウスを作出し、Federation of International Mouse Resources (FIMRe: <http://www.fimre.org>)に参加している Jackson 研や理研 BRC 等の主要なマウスリソースセンターを介して、ノックアウト ES 細胞及びマウスを世界中の研究者に迅速に提供する体制整備が始まっている。

理研バイオリソースセンター・実験動物開発室は、日本のマウスリソース中核機関として、わが国の医学・生物学研究を促進し、さらに知的基盤を整備するために、日本の研究者により開発された系統を中心に、ライフサイエンス分野に必要な多種多様のマウス系統を整備している。収集・保存系統はすべて SPF 化操作を施して遺伝学的・微生物学的に統御された高品質のリソースとして国内外の研究者に供給している。寄託されたマウスは国際的な系統情報ネットワーク International Mouse Strain Resource (IMSR: <http://www.informatics.jax.org/imsr/indx.jsp>) に登録され、世界中に発信されている。当センターは「信頼性」「継続性」「先導性」をモットーに、欧米の主要マウスリソースセンターと連携して世界のハブとなるべく活動している。

われわれの役割はリソースの収集・保存・提供だけではなく、高度な遺伝的・微生物学的な統御を加え、系統の生物学的な特性情報を整備することにより個々のリソー

スの付加価値を高め、遺伝子機能解明に有用なリソースとすることも重要な使命である。なかでもマウス系統の形状情報は生体における遺伝子機能解明のためには必須の情報である。哺乳動物の遺伝情報の発現は発生過程で刻々と変化する複雑な組織形態パターンのなかで起こっている。発生、病気や行動の過程で起こる遺伝子発現と遺伝子間の相互作用を解明するには、3次元の形状情報と遺伝子発現情報とを関連づけることが必要である。当センターが取り組んでいる形状情報としては、個体のカラー画像、X線骨格画像、GFP発現、表面微細構造などの画像情報をはじめ、通常染色や免疫染色、*in situ* hybridizationを施した組織切片の顕微鏡画像をデジタルデータとして取得している。最近では横田ら（横田秀夫、月刊バイオインダストリー 22, 86, 2005）の開発した3次元内部構造顕微鏡によるマウス系統の内部構造フルカラー精細画像の取得、超小型レンズを装備した *in vivo* レーザー顕微鏡（オリンパス）による内部臓器の低侵襲蛍光標識解析、高精細 X 線 CT による骨格構造の3次元立体構築、運動や行動の特徴を計測するための Motion Capture 技術の導入による変異マウス系統の解析を試みている。

3次元内部構造顕微鏡は試料を連続切断し、実断面画像をフルカラーで自動的に取得する装置で、マウス1匹全身を20 μ mの解像度で2時間以内にすべてデジタル化することが可能である。いわば、マウス個体の形状情報のデジタル化をハイスループットで行うことのできる装置であり、多種類にのぼるマウス系統の形状情報を取得するには優れた方法である。これまでに、標準近交系ならびに複数の野生マウス由来系統について画像取得を完了したところである。骨格構造の3次元立体構築画像については、テキサス大学オースチンのテキサス記念博物館、Timothy Rowe 博士の協力を得て作製している（図1）。30~60 μ mの解像度を持つ高精細 X 線 CT により、標準近交系ならびに複数の野生マウス由来系統の骨格のスキャンを開始している。成体マウス1匹をスキャンするのに約10時間を要し、立体再構築や動画作製等の画像処理には13時間程度を必要とする。いずれの技術も内部構造も含めた形状情報のデジタル化により個体全体を3次元再構築が可能であり、任意の断面で切断面を観察することも可能となっている。

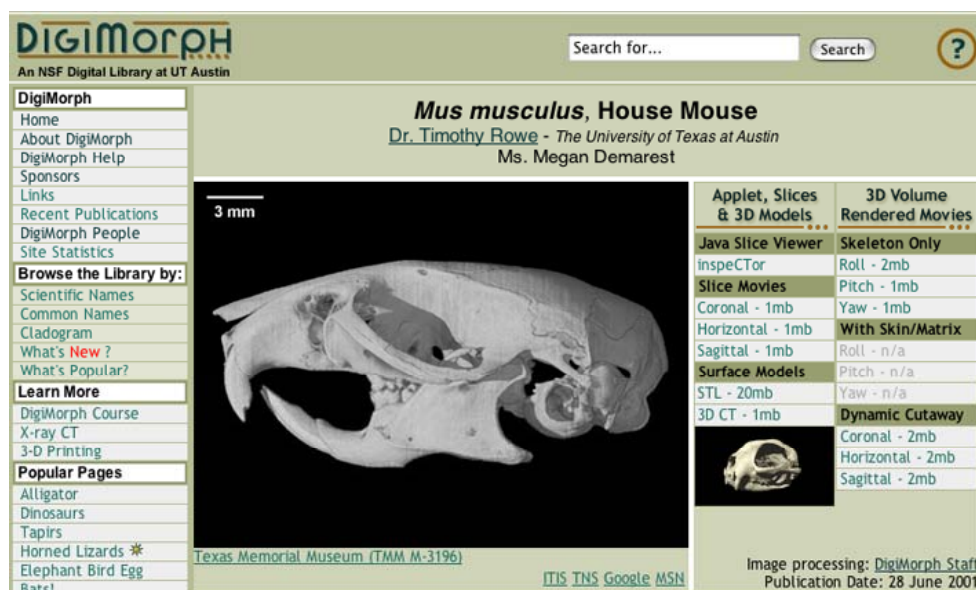


図1 テキサス記念博物館のウェブサイトより

超小型ペン型レンズを装備した *in vivo* レーザー顕微鏡は、マウスなどの実験小動物の内部臓器をごく微小な切開術部より観察する装置で、術部の傷が微小で済むことから、同一個体で経時的な観察が可能になると期待されている。特に、細胞や細胞内小器官に蛍光タンパクを発現するトランスジェニックマウスとの組み合わせで、その威力を発揮し、生体分子や細胞動態を生で解析し、画像を取得可能となっている（図2）。

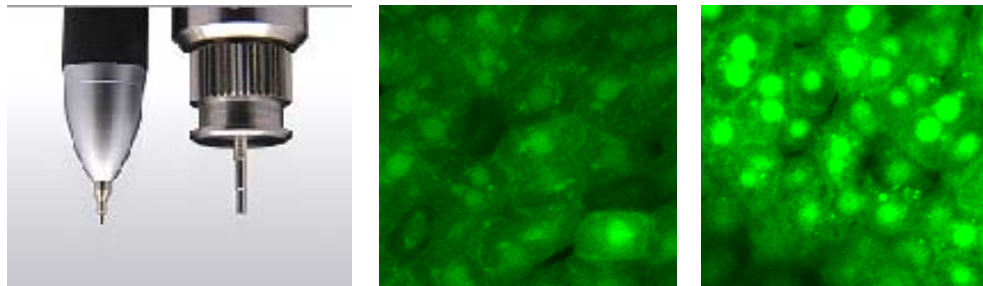


図2 オリンパス *in vivo* レーザー顕微鏡世界最小ペン型レンズ

同一個体のマウス肝臓における GFP 発現の経時的変化

また、運動や行動の特徴を計測するための **Motion Capture** 技術により、従来、記述的表現に頼っていたマウスの「動き」の特徴を客観的に評価・比較可能な数値データとして扱うことが可能となった。この方法により **retinoic acid receptor-related orphan receptor beta** 遺伝子の突然変異マウスの歩行運動を解析し、特徴的な歩行異常を腰部マーカーの顕著な上下動として計測可能となった。

こうした新しい技術により、標準的近交系、ミュータント系、多数の遺伝子操作マウス、さらにリコンビナント近交系や野生マウス由来系統を対象として形状や動きの情報を数値化し、さらに、これら系統の高密度な **SNP** 情報（Abe K et al. *Genome Res* 1, 2439, 2004）を付加することにより、個体の複雑な形態や動きの成り立ちを遺伝子レベルで解明するための独自性の高い高品質なマウスリソースを整備していきたい。