動物ゲノム機能情報研究グループ

Mouse Functional Genomics Research Group

プロジェクトディレクター 城石俊彦

SHIROISHI, Toshihiko

当研究グループは、ゲノム解析によって明らかになる大量の遺伝子の生物機能を効率的に解明するため、大規模なマウス突然変異体の開発を行っている。すなわち、ENUにより染色体上にランダムに突然変異を誘発し体系的かつ網羅的に表現型を検索する大規模マウスミュタジェネシスを展開している。

1. マウス変異開発研究

(1) G1 マウス作製体制の整備(井上, 美野輪, 土岐, 小林, 鈴木, 若菜, 城石)

C57BL/6J 雄マウスに変異原 ENU を投与したのち DBA/2J 雌マウスと交配した G1 マウスを週 100~200 匹生産する飼育管理体制を確立した。

(2) マウス系統維持管理/ミュタジェネシス・サポートシステムの改良(榎屋, 若菜, 城石; 中井, 榎藤(個体遺伝情報研究チーム))

(i) マウス系統維持管理システムソフトウェアの改良: マウス系統維持管理システムは、マウス飼育規模および飼育管理運用パターンが拡大したことに伴って、ソフトウェアのバージョンアップを行った。新たに、個体導入、飼育状況管理、出産管理、離乳管理、死亡管理、個体情報管理の各機能について、追加および仕様変更を行った。(ii) スクリーニングデータサポートシステムの開発: 表現型スクリーニングにおいて、大量のマウスを効率良くスクリーニングし、かつプロジェクト内でのデータ共有を可能とすることを目的として、以下のスクリーニングに対応するデータサポートシステムを構築した。(a) SHIRPA(行動解析)(b) 麻酔処理 (c) X 線解析 (d) てんかん観察 (e) Tail Cut 処理 (f) Sperm 処理 (g) 尿検査。(iii) 分析機器通信プロトコル実装: 大量のマウス変異表現型数値データを Oracle データベースに転送するために、通信の自動化を可能にするソフトウェア開発と実装を行った。(iv) データ閲覧/突然変異登録システム: プロジェクト内での効率的なデータ共有のため下記の閲覧システムの開発を行った。(a) データベースに格納したデータをスクリーニング項目毎にまとめて表示し、ローカルコンピュータにダウンロードできるソフト。(b) データ範囲を直接入力することにより、異常値を示す個体を検索するとともに、異常マウスを遺伝性テストの候補として登録するソフトである。これらの開発により、マウス親子関係や飼育状況を把握し、G1 マウスのスクリーニングデータを評価して突然変異を見いだすというプロジェクト基盤をデータベースでサポート可能になった。

2. マウス変異探索研究

G1 マウスにおける生後 8 週から数ヶ月までの早期表現型と 78 週までの長期飼育下での遅発性表現型の 2 つに分けてスクリーニング系を開発した。以下(1)から(3)ま

でが早期表現型に(4)から(6)までが遅発性表現型に対応する。

(1) Modified SHIRPA 法スクリーニング(榎屋, 美野輪, 若菜, 城石)

英国 MRC グループが開発した SHIRPA 法は、目視と手による操作で行動および形態変異マウスを簡易かつ高速に抽出することができる。我々は、この方法に形態観察に関する項目の変更点を加え、Modified SHIRPA と命名した。また、結果をデータベースに迅速かつ最小の労力で入力するため、リアルタイムにデータベース接続する専用のソフトウェアコンポーネントを開発し、検査をしながら入力する方法を開発した。これまでに 2578 匹(2001 年 3 月 27 日現在)の G1 マウスに対して Modified SHIRPA を行い、113 匹に何らかの異常が発見され、このうち 12 匹についてはすでに表現型が遺伝することを確認している。

(2) 血液スクリーニング(茂木, 美野輪, 土岐, 野田)

血液スクリーニングは血算検査と血清生化学検査により構成され、それぞれ ADVIA120(パイエル社製, 血算検査用), BM-2250(日本電子社製, 血清生化学検査用)の自動分析装置を用いて解析を行う。本年度は(i)少量の血液量で数多くの項目を測定するための条件検討(ii)各項目, 系統, 性別当たりコントロールデータを得て, 正常異常を判定するための上限値, 下限値の算出(iii)基準値の検討およびルーチン作業への検討を行った。

(3) 行動解析スクリーニング(和田, 榎屋, 若菜, 城石)

本年度より行動特性に関する突然変異体検出のためスクリーニングを開始した。(i) Home Cage Activity: 活動性の異常(低活動・高活動)や、活動リズムの異常を検出するためのテスト。(ii) Open Field: マウスの不安・恐怖を調べるテスト。40×40 cm の箱(Open Field)の中にマウスを 20 分間投入し、その間にマウスが移動した距離と、壁から離れて箱の中心部分にどのくらい滞在したか(中心滞在率)を画像処理によって計測する(iii) Passive Avoidance: 学習・記憶を調べるテスト。装置は明るい箱(明箱)と暗い箱(暗箱)から成り、暗箱に入った時に床から電撃を与える。条件付けの後 300 秒間マウスが暗箱に入らなかった場合、暗箱を回避する学習が成立したと解釈する。行動には遺伝的要因に起因しない個体差が大きく見られ、同一近交系の行動にもかなりのばらつきが出る。高い精度で行動異常を示す突然変異体を検出するための正常マウスコントロール

データを蓄積した。

(4) 感覚器系スクリーニング(美野輪, 土岐, 若菜, 城石, 野田)

(i) 眼底: 眼底写真の撮影条件の最適化を試みた。DBF1 コントロールマウスを用いて, 麻酔の条件, 中間レンズの位置調整, マウスの保定位置, 角度の決定, 照明強度の調整を行った。(ii) 聴覚: 広範に周波数特性を評価できる聴覚箱検査法, 内耳機能を選択的に評価できる耳音響反射測定法の2つについて検討し, 装置の設計を行った。さらに聴覚異常変異体マウスの解析(primary characterization)のために, 聴性脳幹反応(ABR)測定装置を導入し, 調整を行った。

(5) 循環器系スクリーニング(美野輪, 茂木, 土岐, 野田)

血圧の異常を検索する方法として, マウス用4連式自動血圧測定装置BP2000を導入し, 測定方法の最適化のための調整を行った。また, 心エコー測定の適合性を検討した。HEWLETT-PACKARD社製超音波診断装置を用い, 断層法, Mモード法, ドップラー法を検討し, Mモード法がマウスに十分適用可能であることを確認した。

(6) 剖検スクリーニング(土岐, 美野輪, 井上, 野田; 権藤(個体遺伝情報研究チーム))

剖検スクリーニングは, 生後78週齢時において形態学的な解析ならびに生体機能に基づく組織学的解析による検査である。肉眼的に臓器の観察を実施した後, パラフィン組織標本, 凍結組織標本, 塗沫細胞標本を作製し, 一般染色, 特殊染色, 免疫組織化学的染色および*In situ* Hybridizationを実施して観察記録する。また, ソフト面においても一般染色標本の作製, 特殊染色標本の作製, 免疫組織化学的染色標本の作製, 塗沫細胞標本の作製および組織形態学的解析システムを開発した。今後, 78週齢時点での系統別形態学表現型コントロールデータの収集, マウス腫瘍性病変の免疫組織化学的鑑別診断法の確立, および簡便なデータの管理, 検索, 解析可能なソフトウェアの開発を予定している。

誌上発表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Wakana S., Sugaya E., Naramoto F., Yokote N., Maruyama C., Jin W., Ohguchi H., Tsuda T., Sugaya A., and Kajiwara K.: "Gene mapping of SEZ group genes and determination of pentylentetrazol susceptible quantitative trait loci in the mouse chromosome", *Brain Res.* **857**, 286–290 (2000). *

Yoshida Y., Tanaka S., Umemori H., Minowa O., Usui M., Ikematsu N., Hosoda E., Imamura T., Kuno J., Yamashita T., Miyazono K., Noda M., Noda T., and Yamamoto T.: "Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts", *Cell* **103**, 1085–1097 (2000). *

Saeki N., Kuwahara Y., Sasaki H., Satoh H., and Shiroishi T.: "Gasdermin (*Gsdm*) localizing to mouse chromosome 11 is predominantly expressed in upper gastrointestinal tract but significantly suppressed in human gastric cancer cells", *Mamm. Genome* **11**, 718–724 (2000). *

Minowa O., Arai T., Hirano M., Monden Y., Nakai S.,

Fukuda M., Itoh M., Takano H., Hippou Y., Aburatani H., Masumura K., Nohmi T., Nishimura S., and Noda T.: "*Mmh/Ogg1* gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4156–4161 (2000). *

Nadeau J. H., Balling R., Barsh G., Beier D., Brown S. D. M., Bucan M., Camper S., Carlson G., Copeland N., Eppig J., Fletcher C., Frankel W. N., Ganten D., Goldowitz D., Goodnow C., Guenet J.-L., Hicks G., de Angelis M. H., Jackson I., Jacob H. J., Jenkins N., Johnson D., Justice M., Kay S., Kingsley D., Lehrach H., Magnuson T., Meisler M., Poustka A., Rinchik E. M., Rossant J., Russell L. B., Schimenti J., Shiroishi T., Skarnes W. C., Soriano P., Stanford W., Takahashi J. S., Wurst W., and Zimmer A.: "Functional annotation of mouse genome sequences", *Science* **291**, 1251–1255 (2001). *

(総説)

柵屋啓志, 城石俊彦: "ENUによるランダム・ミュータジェネシス", *分子細胞治療* **1**, 83–88 (2000).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Wakana S., Minowa O., Masuya H., Suzuki T., Inoue M., Iwama H., Toki H., Motegi H., Gondo Y., Noda T., and Shiroishi T.: "A large scale ENU mutagenesis project in RIKEN Genomic Sciences Center (GSC)", Mouse Initiatives II: Modeling the Human Genome and Disease, (The Jackson Laboratory), Bar Harbor, USA, July (2000).

Masuya H., Suzuki T., Iwama H., Inoue M., Minowa O., Toki H., Wakana S., Noda T., Gondo Y., and Shiroishi T.: "Database system to support the whole work in a large-scale mouse mutagenesis program in RIKEN GSC", Georgia Genetics Symp. II: Mutagenesis of the Mouse Genome, Athens, USA, Sept. (2000).

Masuya H., Suzuki T., Iwama H., Inoue M., Minowa O., Toki H., Ishii J., Nakai Y., Kida Y., Niinaya N., Wakana S., Noda T., Gondo Y., and Shiroishi T.: "Database system to support the whole work in a large-scale mouse mutagenesis program in RIKEN GSC", 14th Int. Mouse Genome Conf. (IMGC 2000), (International Mammalian Genome Society), Narita, Nov. (2000).

Wakana S., Masuya H., Minowa O., Inoue M., Suzuki T., Iwama H., Toki H., Motegi H., Shibuya T., Gondo Y., Noda T., and Shiroishi T.: "A large scale ENU mutagenesis project in RIKEN Genomic Sciences Center (GSC)", 14th Int. Mouse Genome Conf. (IMGC 2000), (International Mammalian Genome Society), Narita, Nov. (2000).

(国内会議)

美野輪治: "マウス ENU により誘発されるマウス突然変異体の体系的開発と解析", 2000年哺乳動物遺伝学研究会, 京都, 9月(2000).

城石俊彦: "ポストシーケンス時代のマウスゲノム解析", *Brain テクノフォーラム*, 東京, 10月(2000).

野田哲生: “遺伝子機能解析のためのタクティクス”, 日本人類遺伝学会第 45 回大会, 福岡, 10 月 (2000).

榎屋啓志, 井上麻紀, 若菜茂晴, 榎藤洋一, 野田哲生, 城石俊彦: “ENU 誘発体系的マウス突然変異体の開発と解析 III. Modified-SHIRPA 法による行動および形態変異マウスのスクリーニング”, 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

井上麻紀, 鈴木智広, 榎屋啓志, 土岐秀明, 渋谷徹, 美野輪治, 若菜茂晴, 榎藤洋一, 野田哲生, 城石俊彦: “ENU 誘発体系的マウス突然変異体の開発と解析 II: ENU 投与の検討”, 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

榎屋啓志, 鈴木智広, 井上麻紀, 美野輪治, 岩間裕之, 土岐秀明, 若菜茂晴, 榎藤洋一, 野田哲生, 城石俊彦: “ENU 誘発体系的マウス突然変異体の開発と解析 V: データベース”, 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

若菜茂晴, 榎屋啓志, 美野輪治, 井上麻紀, 鈴木智広, 茂木浩未, 土岐秀明, 榎藤洋一, 野田哲生, 城石俊彦: “ENU 誘発体系的マウス突然変異体の開発と解析 I: 概略”, 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

美野輪治, 茂木浩未, 土岐秀明, 足立隆司, 井上麻紀, 鈴木智広, 若菜茂晴, 榎藤洋一, 城石俊彦, 野田哲生: “ENU 誘発体系的マウス突然変異体の開発と解析 IV: 血清像検査法及び血清生化学検査法による変異体マウスのスクリーニング”, 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

野田哲生: “マウス遺伝学の新しい展開”, 第 13 回メディカルサイエンスセミナー「次世代の糖尿病治療を考える」, 東京, 1 月 (2001).

城石俊彦: “マウスミュータジェネシスによる遺伝子機能解析”, 文部省科研費特定領域研究 (B) 公開シンポジウム, 東京, 1 月 (2001).

Research Subjects and Members of Mouse Functional Genomics Research Group

1. Mutation Resource Exploration Research
2. Mutation Phenotype Exploration Research

Head

Dr. Toshihiko SHIROISHI

Team Leaders

Dr. Shigeharu WAKANA (Mutation Resource Exploration Research Team)

Dr. Tetsuo NODA (Mutation Phenotype Exploration Research Team)

Members

Mutation Resource Exploration Team

Dr. Hiroshi MASUYA
Dr. Yumiko WADA
Dr. Maki INOUE
Mr. Kimio KOBAYASHI
Mr. Tomohiro SUZUKI
Ms. Ayako YAMAGA
Ms. Kikumi IWAKI
Ms. Mizuho TADA
Ms. Akiko KAWAI
Ms. Tomoko KUSHIDA
Ms. Lisa SHOHJI
Ms. Kaori KUSANO
Ms. Chiharu OHTA

Mutation Phenotype Exploration Team

Dr. Osamu MINOWA
Dr. Hiromi MOTEGI
Mr. Hideaki TOKI
Ms. Tomoko KAGAMI
Ms. Ayako INOUE
Ms. Rie ISHII
Ms. Kumiko KAROUJI
Ms. Mioko NAKANISHI
Ms. Aya SHIMIZU
Mr. Takashi ADACHI
Ms. Taeko HIRAYAMA
Ms. Rumi NISHII

in collaboration with

Dr. Yoichi GONDO (Population and Quantitative Genomics Team, GSC)
Dr. Hideki SEZUTSU (Population and Quantitative Genomics Team, GSC)
Mr. Yuji NAKAI (Population and Quantitative Genomics Team, GSC)
Ms. Naomi FUJIMOTO (Population and Quantitative Genomics Team, GSC)
Ms. Ami IKEDA (Population and Quantitative Genomics Team, GSC)
Ms. Keiko TSUCHIHASHI (Population and Quantitative Genomics Team, GSC)

Visiting Members

Dr. Tohru SHIBUYA