〔ミニレビュー〕

ミュータントマウスを用いた動物の大きさを決定する因子の探索

加納 聖¹・Patsy NISHINA²・Jürgen NAGGERT²・内藤邦彦¹・東條英昭¹

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科、² The Jackson Laboratory, USA

Search for the factors controlling mammalian body size

Kiyoshi KANO¹, Patsy NISHINA², Jürgen NAGGERT², Kunihiko NAITO¹, Hideaki TOJO¹

¹ Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo

² The Jackson Laboratory, USA

1. はじめに

動物には、それぞれ種固有の大きさがあるが、それはどのような仕組みで決まっているのであろうか。また同じ種の中でもイヌのように、グレートデンからチワワなど、多様な大きさを持つ種も存在するが、どのようなメカニズムで体の大きさは決定されるのだろうか。数種の魚類、甲殻類を除いて、多くの動物はそれぞれ種固有の、そして成体固有の大きさまで成長することがプログラムされている。このように、動物の大きさは親から子に受け継がれており、遺伝的に厳密に保存されているといえる。ではどのようなメカニズムで細胞、器官・組織、そして体全体の大きさが決定されているのであろうか？

例えば器官の大きさは、厳密に制御されて、その機構は保存されている (Raff 1996; Su と O'Farrell 1998; Potter と Xu 2001)。理論的には、器官の大きさは細胞の大きさ、細胞数、細胞間の空間によって決定されるが、基本的に細胞一個の大きさは、どの動物種をとってもそれほど変わらないことがわかっている (McMahon と Tyler Bonner 2000)。この理由から、ヒトがマウスより大きいのは、われわれヒトの細胞一個の大きさがマウスの細胞より大きいのではなく、全体としての数が多いからである (Raff 1996)。

この点から、動物の体の大きさは体を構成する総細胞数によって決定されるように考えられるが、例えば5倍体イモリでは、細胞1個の大きさは1倍体の5倍の大きさであるが、全体の総細胞数は約5分の1になり、結果的に体全体の大きさや各組織の大きさは変わらない。このことから、単に細胞数や細胞分裂回数を数えているのではなく、体の大きさを制御するための全身的ならびに局所的な細胞分裂調節機構があり、何らかの方法で実際に体全体の大きさを調整する因子や

遺伝的な機構が存在すると考えられている (Conlon と Raff 1999)。

しかしある時に、染色体上の遺伝的要素が乱れ、子孫が親と同じような体の大きさが維持できなくなり、大きくあるいは小さくなる変異体が生じることがある。ショウジョウバエではそのような変異体を用いて、体や器官・組織の大きさ、ならびに細胞一個の大きさの分子レベルでの研究が行われている (Bohni ら 1999; Potter と Xu 2001; Stern 2003)。中でもインスリン/IGF-1 シグナル伝達経路が重要な役割を持つことがわかってきた (Edgar 1999; Britton ら 2002; Rulifson ら 2002)。このインスリン/IGF-1 シグナル伝達経路は、体の大きさと栄養、さらに寿命との関連が示唆され (Hulbert ら 2004; Loo ら 2005)、ヒト女性においても、この経路の遺伝的な変化が寿命や身長に影響を与えることがわかっている (van Heemst ら 2005)。

一方、哺乳類では大きさに関する研究は余り進んでいないのが現状であるが、マウス胚を用いた実験では、胚レベルにおいてもその大きさが巧みに制御されていることが示されている。例えば、二つの桑実胚を物理的に凝集、融合させると、この融合胚は細胞死の割合が増加することなく、緩やかに増殖し、胚全体の大きさは通常の胚と同じ大きさになる (Lewis と Rossant 1982)。これとは逆に、胚の一部を物理的もしくは化学的に除去しても、細胞増殖の割合が増加し、これも最終的に通常の胚や個体と同じ大きさになる

連絡先: 加納 聖、東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用動物科学専攻 応用遺伝学教室

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

(e-mail: akano@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

(Tarkowski 1959)。また、染色体数が通常の2倍である4倍体(4n)マウスは、胎性致死であるが、胎内の4nマウス胎子やその器官・臓器の大きさは2nのものとはほぼ同じである(Henery ら 1992)。EGFP 遺伝子導入マウス由来の4n胚を用いた形態形成の経時的解析では、胚盤胞までの形態形成については4n胚、4n/2nキメラ胚で大きな差は見られなかったが、4n胚盤胞の細胞数は予想された2n胚盤胞の細胞数の半分に満たない(Ishiguro ら 2005)。4n細胞において細胞周期の延長が示唆され、増殖能の低下が推測され、胚の大きさが巧みに調節されていることが示唆されている(Ishiguro ら 2005)。

本稿では、哺乳類での体の大きさに影響を及ぼす因子の探索のためのモデル動物としてのマウスの可能性を探り、体が小さくなる表現型を持つミュータントマウスの原因遺伝子の同定ならびにその特徴の解析に関するわれわれの研究を報告する。

2. 体の大きさの異なるマウス

体の大きさの異なるマウスの話題に移る前に、マウスにおける「大きさ」とは何かを定義しなければならないだろう。通常と体の大きさの異なるマウスは、「abnormal body size」として、米国Jackson研究所のMGI (Mouse Genome Informatics: <http://www.informatics.jax.org/>)において、現在1,560種類が登録されている。その中で、体の大きさが増える「increased body size」は、432種類、反対に体の大きさが減少する「decreased body size」は1,141種類が登録され、この「decreased body size」はさらに、「decreased body height」「decreased body length」「decreased body weight」「dwarfism」の4種類に分類されている。因みに、「dwarfism」は現在53種類が登録されており、この場合「dwarfism」とは、体全体の割合が正常と比較して小さくなっているものを指すと考えられる。これら矮小ミュータントマウスの中で歴史的に有名なのは、1980年にノーベル生理学・医学賞を受賞したJackson研究所のGeorge D. Snellが1929年に発表したSnell dwarfマウス(Snell 1929)である。このSnellマウスは、対照の成体マウスと比較して体の大きさが約3分の1から4分の1程度であるほか、生殖器の異常が観察され、不妊である特徴を持つ。またSnellマウスは劣性遺伝様式を持ち、下垂体前葉性ホルモンのうち、成長ホルモン(GH)、プロラクチンホルモン(PRL)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)の産生細胞が欠損しているが、主にGHの欠損がこのSnellマウスの矮小化の原因で

ある。Camper ら(1990)やLi ら(1990)は、Snellマウスの原因遺伝子は*pit-1* (pituitary specific transcription factor 1) 遺伝子の点変異であることを突き止めた。この*pit-1* 遺伝子は主に下垂体で発現しており、特に胎児期に下垂体前葉細胞の分化・増殖に重要な機能を持つ(Andersen と Rosenfeld 1994; Lin ら 1994)。さらに近年、Snellマウスはインスリン/IGF-1シグナル伝達の低下が見られ、線虫やショウジョウバエと同様にSnellマウスは対照マウスと比較して寿命が長いことがわかった(Flurkey ら 2002; Hsieh ら 2002a; Hsieh ら 2002b; Papaconstantinou ら 2005)。

3. *Smallie* マウスの発見とその特徴

Smallie マウスは、Jackson 研究所 Naggert/Nishina 研究室において、*CPE* 遺伝子の異常から肥満をもたらすC57BKS^{CPE-fat}/*fat* マウス(Naggert ら 1995; Leiter ら 1999)コロニーの中で偶然発見された、自然発生的矮小ミュータントマウスである(図1A)。選択的繁殖の結果、*Smallie* マウスの表現型は常染色体性劣性遺伝様式を持ち、*CPE* 遺伝子の変異によるものではないことが明らかになった。そこで、この矮小マウスの表現型をもたらす常染色体劣性遺伝変異を*Smallie* (*sml*) と名付け、C57BKS マウスとの交配を行い、新たにC57BKS-*sml/sml* マウス系統を作出し、まず*sml/sml* マウスの生理的および形態的特徴の解析を行った。*sml/sml* マウスの外見的特徴として、成体の大きさが対照同腹子マウスと比較して、全体的に小さいほか、眼球の突出、さらにしし鼻とよばれる頭部の形態異常(図1A)が見られたほか、ならびにホモ個体同士の交配で子孫が得られなかった。*sml/sml* マウスの体重増加の割合は対照同腹子マウスと比較して緩やかであり(図1B)、また他の種類の矮小ミュータントマウスと比較して、加齢に伴う脂肪の蓄積が少ない傾向が観察された(図1C)。次に*sml/sml* マウスの各器官の組織化学的解析を行ったところ、下垂体の大きさが対照同腹子マウスと比較して小さい傾向が認められ、また精巣ならびに卵巣で異常が見られた(図2)。*sml/sml* マウスは特に卵巣において、黄体が認められず(図2G, H)、*sml/sml* マウスでは排卵が起こっていない事が明らかになった。*sml/sml* マウスの卵巣では、FSH、LH 産生細胞の欠損は見られず、また対照同腹子マウスとの間にFSH(卵巣刺激ホルモン)ならびにLH(黄体形成ホルモン)の血中濃度の有意差はなかったが、それらの濃度はやや減少している傾向が認められた。そこで、*sml/sml* マウス卵巣が外部からの排卵刺激に応答する

図 1. *Smallie* ミュータント (*sml/sml*) マウスの外観ならびに体重変化

A: 4 ヶ月齢の *sml/sml* マウスと同腹子マウス

sml/sml マウスは体が小さいほか、顔面異常(眼球突出ならびにしし鼻)が見られる。

B: C57BLKS/J-*sml/sml* ミュータントマウス (BKS-*sml/sml*) と C57BLKS/J-*+/+* mouse (BKS-*+/+*) の体重変化曲線
コントロールマウスと比較して、*sml/sml* マウスの体重の増加割合の減少が見られた。

C: 5 ヶ月齢マウスの Dual X-ray absorptiometry (PIXIMUS) 像

sml/sml マウスはコントロールマウスと比較して、筋量ならびに脂肪量ともに少ない傾向にあった。

図2. 6週齢ならびに4ヶ月齢 *sml/sml* マウスの精巣ならびに卵巣組織像 (A, B, C, D) 精巣像。4ヶ月齢において、*sml/sml* マウスの精上皮に異常が見られる。(E, F, G, H) 6週齢ならびに4ヶ月齢 *sml/sml* マウスにおいて黄体 (CL) が見られない。Scale bar, 50 μ m

かどうかを知るために、外部から PMSG ならび hCG を人工的に投与し、*sml/sml* マウスに過排卵を誘起させた。しかし、*sml/sml* マウス卵巣では黄体は形成されず、人工的な過排卵処理によっても排卵が起きないことが明らかとなった (図3)。この結果より、*sml/sml* マウスでは、卵巣が LH ホルモンのシグナルを受容することが出来ない、あるいは LH ホルモンのシグナルを細胞内に伝達することが出来なくなっていることが示唆された (投稿中)。

4. *Smallie* マウスの原因遺伝子の同定

次に、*sml/sml* マウスと比較的体が大きな NOD.NON^{H2K} マウスの交配より得られた F2 マウス約 1,000 匹を用いてのポジショナルクローニング法より、*sml/sml* マウスの原因遺伝子の同定を行った。マイクロサテライトマーカーによる詳細なマッピング解析により、*sml/sml* マウスの原因遺伝子は第1番染色体上の *D1Mit36* と *Mpz* の間の約 2 Mb の領域に存在することがわかった (図4)。この領域にはデータベースにおいて 23 個の遺伝子が含まれており、リアルタイム

図3. PMSG (7.5 IU) ならびに hCG (7.5 IU) 投与後の8週齢 *sml/sml* マウスならびにコントロールマウスの卵巣 HE 染色組織像
sml/sml マウス卵巣において、成熟卵胞は見られたが、黄体 (CL) は認められなかった。

図4. *Smallie* マッピングクロス F2 マウス 3 系統 (6150, 6167, 6040) の遺伝子型
F2 マウス 3 系統 (6150, 6167, 6040) の解析によって、*Smallie* マウスの原因遺伝子が存在する第 1 番染色体の領域 (D1Mit36-Mpz) を同定した。

PCR 法を用いてこれらの遺伝子の発現解析を行ったところ、*sml/sml* マウスにおいて *Ddr2* 遺伝子の発現が認められなかった。さらに *Ddr2* 遺伝子の各エクソンの詳細な解析により、*sml/sml* マウス *Ddr2* 遺伝子のゲノム領域において、約 150 kb にわたる欠損が認められた (投稿中)。Labrador (2001) らによる *Ddr2* 遺伝子のノックアウトマウスは、対照マウスと比較して体の大き

さが小さくなり、*sml/sml* マウスと同様の表現型を示す。コラーゲンレセプターである *Ddr2* 遺伝子は、全身で発現しているが、特に肺、胃、卵巣、軟骨細胞で高い発現が見られる (Labrador ら 2001)。*sml/sml* マウスは、体の大きさのみの変化ではなく、Labrador (2001) らの報告にはない頭部形成、生殖系の異常が見られ、これらの表現型と *DDR2* の関係を今後詳細に解

析する必要があるが、*sml/sml* マウスは体のサイズならびに繁殖の制御に関する新たな知見をもたらす可能性がある新しいモデルとして期待できる。

5. ENU ミュータジェネシスによる体の大きさの異なるマウス

前述の *Smallie* のような自然発生的なミュータントマウスとは異なり、ENU (エチルニトロソウレア) などの化学変異原を精巣内に注入することによって、積極的に効率よくミュータントマウスを作出するミュータジェネシス法によっても、様々な疾患モデルマウスを含むミュータントマウスが作出される。例えば、理化学研究所バイオリソースセンターでは受精卵としてアーカイブ化され、いつでも変異マウスが個体レベルに復元できる (<http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/search.cgi>)。

また、Jackson 研究所でも、ミュータントマウスの表現型と原因遺伝子の関連が解析されているが、主な対象は循環器系、神経系、生殖系に限られている。実際、理化学研究所のバイオリソースセンターや Jackson 研究所の ENU ミュータジェネシスのデータベース (http://www.jax.org/resources/mouse_resources.html) において、いわゆる *dwarf* の系統は見いだされなかった。これは、もともと体の大きさが変化するようなミュータントマウスは、主に若い個体を対象とした表現型スクリーニングの段階では発見されることが少ないことが考えられる。さらに、例えば Jackson 研究所ではミュータントマウスの解析の主な対象が循環器系、神経系、生殖系などに限られ、一般的に病態モデルへの関心は高いが、体の大きさに関する表現型への関心はもともと少なく、スクリーニングの段階であり重要視されていない可能性も考えられる。

ENU ミュータントマウスの中で、われわれが *PeeWee* と名付けた矮小マウスは、第 5 番染色体上の Rump-White 領域と呼ばれる約 20 cM の範囲内の点変異によって生じたミュータントマウスのみをスクリーニングすることができる Jackson 研究所の系 (Schimenti と Bucan 1998) を用いて発見されたマウスである。現在、この Rump White 領域上の約 1 cM 間の約 20 個の遺伝子に *PeeWee* の原因遺伝子が絞られている。この *PeeWee* マウスは、成体の体重が正常マウスの約 60 % であり、*Smallie* マウスと比較して体の大きさの変化に関してそれほど差はないが、ホモ個体同士の交配によって子孫を得ることができ、また、各器官・臓器の組織レベルにおいても現在のところ特に異

常は認められず、*PeeWee* マウスは比較的健康であると思われる。このように体の大きさ以外は正常であるミュータントマウスは、体の大きさを決定する因子の探索において非常に貴重なモデルであると考えられ、*PeeWee* マウスの詳細な解析によってマウスにおける体の大きさに関する新たな知見が得られることが期待できる。

6. おわりに

最初にも述べたように、哺乳類の体の大きさに関する知見は現在それほど多くはなく、*Smallie* や *PeeWee* などの体の大きさが正常とは異なるミュータントマウスを用いての解析のみではその全体像をすぐに明らかにすることはできないかもしれない。しかし、体の大きさという外部から容易に判定できる形態的特徴と深く関連する遺伝子を見つけ出す、いわゆる正方向の遺伝学的手法を用いることは、体の大きさを含めて、動物の個体を総合的、体系的に理解するためには非常に重要であると考ええる。

また、Jackson 研究所の MGI データベースにおいて、原因遺伝子がまだ同定されていない矮小ミュータントマウスが存在する。さらに ENU ミュータジェネシスによって、体の大きさに関する新たな表現型を持つミュータントマウスが今後も作出されることが予想され、より多くのミュータントマウスを解析していくことにより、動物の体の大きさに関与する因子に関する知見が少しずつでも増えていくことが期待される。

また、体の大きさには単一の遺伝子のみが決定しているのではなく、複数の因子の関与が予想されるため、QTL 解析や複数の遺伝子や因子間の相互作用解析など、幅広い視点の研究が必要であろう。さらに、Tsuji ら (2005) も述べているように、遺伝子異常に伴う矮小マウスは生殖系の異常が認められることが比較的多く、このような矮小化とそれに付随する表現型との関連も大変興味深い。

現時点では、どの動物においても体全体の大きさを制御する決定的な因子、またその全体的な機構はまだ解明されていないが、今後もショウジョウバエやマウスの変異体の遺伝学的解析が大きな役割を果たすと思われる。体の大きさ、器官や組織の大きさの制御に関与する因子が同定されれば、生物の進化や発生・生殖、そして寿命、さらにがんなどの空間異常を来す病態の解明、さらに家畜やコンパニオンアニマルの改良などにつながる可能性があり、今後この分野のさらなる発展が期待される。

7. 謝辞

本稿で紹介した研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金、稲盛財団研究助成金によって行われた。

参考文献

- Andersen B, Rosenfeld MG. 1994. Pit-1 determines cell types during development of the anterior pituitary gland. A model for transcriptional regulation of cell phenotypes in mammalian organogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 29335–29338.
- Bohni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, Brogiolo W, Stocker H, Andruss BF, Beckingham K, Hafen E. 1999. Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell*, 97: 865–875.
- Britton JS, Lockwood WK, Li L, Cohen SM, Edgar BA. 2002. *Drosophila*'s insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. *Developmental Cell*, 2: 239–249.
- Camper SA, Saunders TL, Katz RW, Reeves RH. 1990. The Pit-1 transcription factor gene is a candidate for the murine Snell dwarf mutation. *Genomics*, 8: 586–590.
- Conlon I, Raff M. 1999. Size control in animal development. *Cell*, 96: 235–244.
- Edgar BA. 1999. From small flies come big discoveries about size control. *Nature Cell Biology*, 1: E191–193.
- Flurkey K, Papaconstantinou J, Harrison DE. 2002. The Snell dwarf mutation *Pit1(dw)* can increase life span in mice. *Mechanisms Ageing Development*, 123: 121–130.
- Henery CC, Bard JB, Kaufman MH. 1992. Tetraploidy in mice, embryonic cell number, and the grain of the developmental map. *Developmental Biology*, 152: 233–241.
- Hsieh CC, DeFord JH, Flurkey K, Harrison DE, Papaconstantinou J. 2002a. Effects of the Pit1 mutation on the insulin signaling pathway: implications on the longevity of the long-lived Snell dwarf mouse. *Mechanisms Ageing Development*, 123: 1245–1255.
- Hsieh CC, DeFord JH, Flurkey K, Harrison DE, Papaconstantinou J. 2002b. Implications for the insulin signaling pathway in Snell dwarf mouse longevity: a similarity with the *C. elegans* longevity paradigm. *Mechanisms Ageing Development*, 123: 1229–1244.
- Hulbert AJ, Clancy DJ, Mair W, Braeckman BP, Gems D, Partridge L. 2004. Metabolic rate is not reduced by dietary-restriction or by lowered insulin/IGF-1 signalling and is not correlated with individual lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*, 39: 1137–1143.
- Ishiguro N, Kano K, Yamamoto Y, Taniguchi K. 2005. Tetraploid cells of enhanced green fluorescent protein transgenic mice in tetraploid/diploid-chimeric embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 51: 567–572.
- Labrador JP, Azcoitia V, Tuckermann J, Lin C, Olaso E, Manes S, Bruckner K, Goergen JL, Lemke G, Yancopoulos G, Angel P, Martinez C, Klein R. 2001. The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism. *EMBO Report*, 2: 446–452.
- Leiter EH, Kintner J, Flurkey K, Beamer WG, Naggert JK. Physiologic and endocrinologic characterization of male sex-biased diabetes in C57BLKS/J mice congenic for the fat mutation at the carboxypeptidase E locus. *Endocrine*, 10: 57–66.
- Lewis NE, Rossant J. 1982. Mechanism of size regulation in mouse embryo aggregates. *Journal of Embryological Experiment and Morphology*, 72: 169–181.
- Li S, Crenshaw EB, 3rd, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG. 1990. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature*, 347: 528–533.
- Lin SC, Li S, Drolet DW, Rosenfeld MG. 1994. Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1-independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope. *Development*, 120: 515–522.
- Loo LW, Secombe J, Little JT, Carlos LS, Yost C, Cheng PF, Flynn EM, Edgar BA, Eisenman RN. 2005. The transcriptional repressor dMnt is a regulator of growth in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 25: 7078–7091.
- McMahon TA, Tyler Bonner J. 2000. 生物の大きさとカタチーサイズの生物学ー第1版。1–8。東京化学同人。東京。
- Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, Leiter EH. 1995. Hyperproinsulinaemia in obese *fat/fat* mice associated

- with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nature Genetics*, 10: 135–142.
- Papaconstantinou J, Deford JH, Gerstner A, Hsieh CC, Boylston WH, Guigneau MM, Flurkey K, Harrison DE. 2005. Hepatic gene and protein expression of primary components of the IGF-I axis in long lived Snell dwarf mice. *Mechanisms Ageing Development*, 126: 692–704.
- Potter CJ, Xu T. 2001. Mechanisms of size control. *Current Opinion in Genetics and Development*, 11: 279–286.
- Raff MC. 1996. Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell*, 86: 173–175.
- Rulifson EJ, Kim SK, Nusse R. 2002. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science*, 296: 1118–1120.
- Schimenti J, Bucan M. 1998. Functional genomics in the mouse: phenotype-based mutagenesis screens. *Genome Research*, 8: 698–710.
- Snell GD. 1929. Dwarf, a new mendelian recessive character of the house mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 15: 7337–7334.
- Stern D. 2003. Body-size control: how an insect knows it has grown enough. *Current Biology*, 13: R267–269.
- Su TT, O'Farrell PH. 1998. Size control: cell proliferation does not equal growth. *Current Biology*, 8: R687–689.
- Tarkowski AK. 1959. Experiments on the development of isolated blastomers of mouse eggs. *Nature*, 184: 1286–1287.
- Tsuji T, Kiyosu C, Sogawa C, Kunieda T. 2005. Search for the genes regulating the longitudinal bone growth. *The Journal of Animal Genetics*, 32: 133–140.
- van Heemst D, Beekman M, Mooijaart SP, Heijmans BT, Brandt BW, Zwaan BJ, Slagboom PE, Westendorp RG. 2005. Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell*, 4: 79–85.