【特別講演】

野生からの遺伝子導入による疾患モデルの作成

——21 OHase 欠損モデル——

森 脇 和 郎

国立遺伝学研究所

Establishment of a Disease Model by the Introduction of Wild-derived Gene

—21 OHase Deficient Model—

Kazuo MORIWAKI

National Institute of Genetics, Mishima

Summary

(1) A model for the biological function based on the gene function.

Today, it is widely known that various strains of B10.H-2 congenic mice established by Dr. Snell in the Jackson Laboratory have played an important role in the remarkable breakthrough of the modern immunogenetics, not only in mouse but in man. Of course, man diverged genetically from mouse by several ten million years, while the basic biological principle, immunological one in this case, is obviously common between them. Thus, H-2 congenic mice have made a great contribution to the biomedical sciences as not a disease model but a model for the biological function.

Homology between man and mouse in their gene arrangement on the sizable length of chromosome has recently been recognized as 'Synteny.' This has also given more valuable status to the mouse than before, being accompanied with the technical breakthrough in gene manipulation. It became possible to find out a mouse gene corresponding to a human gene of interest from a viewpoint of 'Biological function model.'

(2) Genetic differentiation of house mouse species and the status of laboratory mice.

Though quite a few genetic variations have been found in the laboratory mice so far, those are still not enough for the further development of the modern biomedical research. Since 1975, we have investigated genetic differentiation of *Mus musculus* subspecies in the world. A considerable genetic distance up to one million years was able to be estimated between each major subspecies, European *M. m. domesticus*, Asian *M. m. musculus*, *M. m. bactrianus* and *M. m. castaneus*. The allelic constitutions in the wide variety of the present laboratory mouse strains are almost similar to those of *domesticus* subspecies, strongly suggesting that a possible origin of those laboratory mice is *domesticus*-derived fancy mice in Europe.

(3) A variant gene introduced from Japanese wild mouse, being useful for the study of basic biological functions.

More than ten B10.MOL-H-2 congenic strains which carry the Japanese wild-derived H-2 chromosome in B10 background, have been established by us. One of them, B10.MOL-SGR strain, exhibited the tremendously higher meiotic recombination within the H-2 complex, in particular between K and A genes. This recombinational hot spot was assigned within 1 Kb of this region. The DNA fragment containing it was cloned and sequenced. Apparently, this novel wild-derived congenic strain can greatly contribute to further understanding of the molecular mechanism of meiotic recombination which is obviously quite basic biological function.

(4) A model mouse for 21 hydroxylase deficient trait in man.

Probably due to the extraordinarily higher recombination frequency in the H-2 complex mentioned above, B10.MOL-SGR strain emerged a new mutant carrying "aw18" haplotype. The homozygous mice for this H-2 complex died at 5–10 days of age by the steroid hormone disorder which was caused by the deletion of 21-hydroxylase gene in the H-2 complex. This could be an excellent model for the 21 hydroxylase deficient patient in man. We are now trying to rescue this lethal trait by the introduction of the normal allele as a transgene.

遺伝子を基盤とするモデル

近代の医学生物学の著しい発展を支える基盤として実験用マウスの果たしてきた役割はきわめて大きい。疾患モデルに関してもこれまで数多くの報告がある。しかし、マウスにおける疾患モデルがどれだけ正しくヒトの疾患のモデルになりうるのかということもしばしば議論の対象となる。数千万年の分岐時間をもつヒトとマウスの差異があるのはむしろ当然ともいえる。また表現形の上での相似からとり上げられたモデルが遺伝子機能としては必ずしも同じでない場合もある。

一方、スネルの H-2 コンジュニク系を用いて進められた免疫遺伝学の基礎研究が、ヒトの免疫機構を明らかにする上で非常に役立ったことを思うと、動物に個々の疾患のモデルを求める以外に、より基本的な生物機能のモデルを求めることも考えられる。近年の DNA を中心とする遺伝子の大きな展開から見ると、生物機能とその基盤となる遺伝子との対応はしだいに明らかな分子の実体となってきた。

また、ヒトの gene map の作成がとくに DNA の RFLP 分析によって急速に進み、すでに長年にわたって分析されてきたマウスの gene map との部分的な相同性 (Synteny) が明らかになった。すなわち、ヒトとマウスとの間に遺伝子レベルでの相同性があることが示唆されたといえよう。

このような趨勢を考えると、生物機能モデルとしては、明確な遺伝子 DNA を出発点としてその発現機構を分析できる動物が求められる。したがってより広い変異遺伝子とそれに対応する遺伝的変異形質とが求められることになる。しかし、従来の実験用マウスのもつ限られた遺伝的変異だけではこの目的に適さない。

われわれはこの 10 年来、世界に広く分布する野生ハツカネズミ種 *Mus musculus* の中で、日本産野生マウスの遺伝分化がどのようにおこってきたかを研究してきた。そうして日本の野生マウスが実験用マウスと遺伝的に大きく隔たっていることを着目し、ここから新しい変異遺伝子を取り出すことを企てた。

ハツカネズミ種の遺伝的分化と実験用マウスの位置

現在、世界に分布しているハツカネズミ種 (*Mus musculus*) については、これまで何人もの研究者が形態や生態に基づいてそれらを分類することを試みてきた。その結果、主要な地域ごとに形態的な差異があることが明らかにされ、それぞれ種の下分類単位である亜種として命名された。50 年も前にシュバルツ夫妻 (Schwarz and Schwarz, 1934) が提唱した分類が基本的には今日でも広く認められているが、それによればヨーロッパ中南部に分布するドメスティクス亜種 (*M.m. domesticus*)、ヨーロッパ東部からアジア東北部にかけて広く分布するムスクルス (*M.m. musculus*) 亜種、中央アジアのパクトリアヌス (*M.m. bactrianus*) 亜種、東南アジアから中国南部にかけて分布するカスターネウス (*M.m. castaneus*) 亜種、日本に分布するモロシヌス (*M.m. molossinus*) 亜種等がある。

遺伝学的な立場からこれらのハツカネズミ亜種の分化を検討するには、それらの亜種に特有な遺伝的変異があるかということ、およびそのような遺伝的変異からみて亜種の間にどのくらいの大きさの遺伝的な隔りがあるかということを明らかにする必要がある。

1979 年、われわれは日本産モロシヌス亜種とヨーロッパ産ドメスティクス亜種の野生集団を比較しそれらが互いに特有な遺伝的変異をもつことを見いだした。同時に、この分析結果に集団遺伝学の理論に基づいて提唱された根井の数式 (Nei, 1972) を適用して日欧両野生ハツカネズミ亜種が大よそ百万年前に分岐したことを推論した (Moriwaki *et al.*, 1979)。

この推定値はその後間もなく米川らによって行われた細胞質内小器官ミトコンドリアを含む DNA の比較からも支持された (Yonekawa *et al.*, 1980)。米川らはさらにミトコンドリア DNA を用いた亜種分化の研究を進め、上に述べたハツカネズミの主要な亜種が互いに百万年ないし数十万年前に遺伝的に分岐したらしいということを明らかにした (Yonekawa *et al.*, 1981)。ハツカネズミのミトコンドリア遺伝子の変異は核の遺伝子の変異よりも進化的なスケールの上での

速度が大きく、各亜種に特有な遺伝的標識とするのに適している。

ハツカネズミの主要な亜種が遺伝的に明確に分化しているという証拠は、その後もいろいろな遺伝子を対象に明らかにされた。細胞の蛋白合成に関与するリボソーム RNA 遺伝子においても四つのハツカネズミ亜種、*domesticus*, *musculus*, *bactrianus*, *castaneus* はそれぞれに特有な DNA 塩基配列をもつことがわかった (Suzuki *et al.*, 1985)。

このほかにも染色体Cバンド、肝臓ガングリオンド、ヘモグロビン、ペーター鎖、フレンド白血病抵抗性、免疫グロブリン・ガンマ 2a 鎖、血清アルファ-蛋白、Thy-1 抗原等数多くの遺伝子に亜種特異性が見いだされている (森脇 1988 参照) (図 1)。

H-2 complex における遺伝子組換え促進遺伝子

日本産 *molossinus* 亜種特有の H-2 遺伝子変異をとらえる目的で、われわれは日本各地から採集した野生マウスの H-2 染色体を B10 系マウスに戻し交配によって導入し、表 1 にまとめたように 10 系統の B10. MOL H-2 congenic 系統を育成した。

これらの B10. MOL congenic 系統のもつ H-2 複合遺伝子は、全域にわたって日本産 *molossinus* 亜種

図 1 ハツカネズミ亜種の遺伝的分化と標識遺伝子の分布

表 1 日本産野生マウス *M. m. molossinus* の H-2 染色体を導入して育成した B10. MOL congenic 系統

系 統	交配世代数	H-2 遺伝子の由来	育成開始時期
B10. MOL-TEN1	N12F19	Mol. Ten1	1976
B10. MOL-TEN2	N11F18	Mol. Ten2	1976
B10. MOL-OHM	N13F12	Mol. Ohm	1977
B10. MOL-ANJ	N12F15	Mol. Anj	1976
B10. MOL-SGR	F1N12F19	Mol. Sgr	1975
B10. MOL-OKB	N13F19	Mol. Okb	1976
B10. MOL-YNG	N15F14	Mol. Yng	1976
B10. MOL-MSM	N13F3	Mol. Msm	1979
B10. MOL-NSB	N12F2	Mol. Nsb	1979

に由来するものである。日本産亜種のもつ H-2 領域遺伝子をさらに詳細に分析するために、B10 系マウスへの戻し交配をさらに進め、H-2 染色体での遺伝的組換えによって *molossinus* 由来の H-2 領域がより狭くなった recombinant を作ることを企てた。興味あることに、B10. MOL-SGR 系はか数系統の congenic 系では H-2 複合遺伝子領域内、とくに H-2K と IA の間において従来の報告よりも 100 倍も高い組換え率を示すことがわかった (Shiroishi ら, 1982) (表 2)。その後この領域をカバーするコスミッド DNA クローンを用いて、この「recombination hot spot」の染色体上の位置の分析が進められ、約 1,000 塩基の中にあるこ

表 2 B10. MOL congenic 系統における組換え率 (Shiroishi ら, 未発表)

染色体の組換え をおこした H-2 ハプロタイプ	観察個体数 (♀)	組 換 個体数	組 換 率 (%)
a/wm1	294	1	0.3±0.3
a/wm4	104	2	1.9±1.3
a/wm6	154	5	3.2±1.4
a/wm7	539	16	3.0±0.7
k/wm7	174	5	2.9±1.2
b/wm7	204	8	3.9±1.3
a/wm8	230	1	0.4±0.4
a/wm11	380	1	0.3±0.2

H-2 ハプロタイプ a, b, k は実験用マウス由来、wm-1, wm-4, wm-6, wm-7, wm-8, wm-11 は *molossinus* 由来。

とが明らかになってきた (Shiroishi *et al.*, 未発表)。

遺伝的組換えは2倍体生物の生殖細胞系に共通した現象であり、個体のもつ遺伝的な多様性を維持するために、きわめて重要な意義をもっている。また、体細胞系、とくに免疫グロブリンやT細胞リセプターのもつ遺伝的多様性を作り出すための遺伝子再配列という現象にも、基本的には染色体を組み換える仕組みが関与している。したがって、B10.MOL-SGR 系で見いだされた遺伝的組換えを促進する遺伝因子の構造と作用機構を明らかにすることは今後の研究課題として興味深い。ともあれ、われわれがもくろんでいたようにこれまでの実験用マウスにはみられなかった学術研究上有用な遺伝子変異を、日本産マウス野生集団からとらえることができたといえよう。

21 Hydroxylase 欠損マウス

B10.MOL-SGR 系のもつ「recombination enhancer」のために、この系統と B10.A 系統との間には数多くの H-2 染色体内組換え体が得られている。それらの中には aw18 ハプロタイプのようにこの染色体領域の不等交叉によって起こったと考えられる変異が見いだされた。図2に示すようにこの不等交叉は B10.MOL-SGR の wm7 染色体と B10.A の a 染色体との間で起こり、その結果 C4 と 21 hydroxylase (21-OH・A) の二つの遺伝子が欠損したものと考えられる。この組換え型ハプロタイプ aw18 のホモ接合個体は、生後 10 日前後に死亡することが DNA 分析の結果明らかになった。21-OH・B は偽遺伝子であると考えられるので、この致死突然変異は 21 hydroxylase 欠損によるステロイドホルモンの代謝異常によって引き起こされるものであろう。ヒトでも HLA クラス III

図3 aw18 ホモ個体におけるプロジェステロンの蓄積 (Gotoh *et al.*, 1988)

遺伝子の欠損によって先天性副腎過形成症が起こることが知られており、その生成機構がよく似ている点で、aw18 ハプロタイプをもつマウスはヒト疾患を研究するためにも非常に有用なモデルであるといえよう。aw18 ホモ個体では、21 hydroxylase の欠損のためその基質が蓄積していることが最近明らかになった (Gotoh *et al.*, 1988) (図3)。

おわりに

始めにも述べたように、広く生物機能の基盤に遺伝

図2 aw18 ハプロタイプにおける不等交叉と遺伝子欠損 (Shiroishi ら, 1987)

子が働いていることが、分子的な実体として捕えられるようになってきた。疾患を遺伝子発現における異常という形でより具体的に考えることができるようになってきたし、またそのような方向でのアプローチが求められている。これに対して、実験動物の立場から少なくとも二つのアプローチがあるかと思う。

1) ヒト疾患に対応するヒト DNA をトランスジェニックの手法でマウスに入れる。この方法によってがん、高血圧、糖尿病等多くの疾患のモデルを作出することが原理的には可能であろう。しかし、ヒトの遺伝子 DNA がマウスの遺伝的背景の中で機能しうるかという問題が残る。上にのべた Synteny の現象をうまく使えばヒトの疾患 DNA に対応するマウスの遺伝子をクローン化し、これをトランスジェンとして利用することも可能であろう。

一方、この種のトランスジェニック実験で問題になるのはその宿主動物が本来もっている、トランスジェンに対応する遺伝子の働きをどうしてブロックするかということである。

東海大と実中研の勝木教授のグループが成功したように、目的とする遺伝子の正常アレルに対するアンチセンス DNA を注入し、正常遺伝子の機能を阻害することができればスマートな実験ができるが、まだ一般には難しい。

2) 特定の生物機能に対する変異体を用いるのは依然として有用なアプローチである。野生からの変異体を探そうというのがわれわれの主張であるが、これらの変異体の中に含まれる遺伝子欠損変異は正統的な遺伝分析と並んでトランスジェニックの実験においても、正常アレルの寄与を無視できるという点できわめて有効である。シバラ突然変異をトランスジェンで治療したという実験もシバラ突然変異の上に成り立っている。しかし欠損突然変異は仮に人工的な誘発を試みたとしてもこれを得ることは容易ではない。その点今回われわれが見いだした組換え促進遺伝子は不等交叉を通じて遺伝子欠損変異を誘発できる実験系となる可能性がある。

現在クローン化されたホットスポット DNA をトランスジェニックの手法で胚に注入して染色体上のいろいろな場所に挿入、多様な染色体部位に遺伝子組換の促進を誘発し、それによって遺伝子欠損をおこさせることを実験中である。

今回紹介した野生集団からの変異遺伝子の探索にはもうひとつのねらいがある。互いに遺伝的な隔たりの

大きな亜種間で遺伝子の導入を行うことにより、ひとつの亜種の中では検出されなかった進化的に保守的な、言い換えれば生物機能としてより重要な遺伝子を捕えることができるのではないかということである。

この方向は、言い方をかえればひとつの遺伝子とそれに隔たりのある遺伝的背景との間の相互作用を考慮に入れたアプローチである。

トランスジェニックの手法においても、宿主マウスの系統の差によって、トランスジェンの発現が変わることが知られており、これまでもたびたび議論の対象となりながらもなかなか具体的な実体として捕えられなかった「遺伝的背景」なるものに今後より客観的なアプローチを試みる必要がある。実験用マウスとは遺伝的に大きな隔たりをもつ日本産野生由来のマウスは遺伝的背景の問題を新しい目で解明するのにも役立つと考えている。

文 献

- 1) Gotoh, H., Sagai, T., Hata, J., Shiroishi, T. and Moriwaki, K. : *Endocrinology*, **123**, 1923 (1988)
- 2) Moriwaki, K., Shiroishi, T., Minezawa, M., Aotsuka, T. and Kondo, K. : *J. Immunogenet.*, **6**, 99 (1979)
- 3) 森脇和郎, Bailey, D.W. 編 : 免疫遺伝学を支える実験用マウスの系譜一起源と発展一, ソフトサイエンス社, pp. 249-300 (1988)
- 4) Schwarz, E. and Schwarz, H.K. : *J. Mammal.*, **24**, 59 (1943)
- 5) Shiroishi, T., Sagai, T. and Moriwaki, K. : *Nature*, **300**, 370 (1982)
- 6) Shiroishi, T., Sagai, T., Natsuume-Sakai, S. and Moriwaki, K. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2819 (1987)
- 7) Suzuki, H., Miyashita, N., Moriwaki, K., Kominami, R., Muramatsu, M., Kanehisa, T., Bonhomme, F., Petras, M.L., Yu, A.H. and Lu, D.Y. : *Mol. Biol. Evol.*, **3**, 126 (1986)
- 8) Yonekawa, H., Moriwaki, K., Gotoh, O., Watanabe, J., Hayashi, J., Miyashita, N., Petras, M.L. and Tagashira, Y. : *Jpn. J. Genet.*, **55**, 289 (1980)
- 9) Yonekawa, H., Moriwaki, K., Gotoh, O., Hayashi, J.I., Watanabe, J., Miyashita, N., Petras, M.L. and Tagashira, Y. : *Genetics*, **98**, 801 (1981)
- 10) Yonekawa, H., Moriwaki, K., Gotoh, O., Miyashita, N., Matsushima, Y., Shi, L., Cho, W.S., Zhen, X.-L. and Tagashira, Y. : *Mol. Biol. Evol.*, **5**, 63 (1988)