

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14435

研究課題名(和文) 縦列反復配列の正確な塩基配列決定

研究課題名(英文) Accurate sequencing of tandem repeat DNA

研究代表者

古賀 章彦 (Koga, Akihiko)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：80192574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 縦列反復配列は、通常のショットガン解析法では正確な塩基配列は得られないことが多い。研究代表者は、縦列反復配列を正確に解読する方法(位置情報併用法)を、5年前に開発した。今回、別の方法(変異導入法)を考案し、その開発を行った。

2年の期間で、開発の最終段まで到達した。塩基配列の正確さは、位置情報併用法と同様に、通常のショットガン解析法より格段に高いことがわかった。しかし、解読に要する期間、またコストは、位置情報併用法に勝るまでに至っていない。

細部の改善が必要である。その基盤となるデータの蓄積とはなっており、新しいアイデアを試すという挑戦的萌芽研究の趣旨に沿った研究にはなっていると、自負している。

研究成果の概要(英文)： The shotgun sequencing method is not powerful enough to obtain accurate sequence data of tandem repeat DNA. Five years ago, I developed an alternative, efficient method. The purpose of the present research was to develop a higher-performance method based on a different principle.

The new method I established was demonstrated to produce sequence data of which the accuracy is as high as those obtained by the previous method, and far higher than those by the shotgun method. However, its performance has not yet exceeded that of the previous method in that it requires a longer period and higher cost for each sequencing assay.

At present, the new method needs additional improvements. During the two-year period, however, basic experimental data to be used toward this goal accumulated.

研究分野：Molecular genetics

キーワード：塩基配列決定 反復配列 変異導入 コンセンサス配列 コンティグ配列

1. 研究開始当初の背景

(1) 縦列反復配列

真核生物のゲノムは、縦列反復配列を大量に含むことが多い。たとえば、細胞分裂の際に染色分体の移動の起点となるセントロメアは、DNA 成分は大部分が縦列反復配列である。染色体の端部を保護するテロメアも、縦列反復配列からなる。これ以外にも、たとえばチンパンジーやゴリラの StSat (subterminal satellite) 配列のように、染色体の次端部に大量の縦列反復配列を蓄積している生物種は多数知られている。また、オマキザルやヨザルのように、染色体の腕の中間部にヘテロクロマチンの塊をもつものもある。ヘテロクロマチンの DNA 成分は縦列反復配列である。以下、縦列反復配列を単に反復配列と記す。

(2) 塩基配列決定法の限界

ゲノムや、長大なクローンの塩基配列を決定する方法は、ショットガンの方式で行うものが主流である。短い素データ(シーケンスリード)を大量に生産し、配列の重なる部分を見つけ出して素データをつなぎ、長い領域についての予想される配列(コンティグ配列)を組むという手順である。反復配列でない領域では、この方法が問題になることはない。しかし反復配列では、正確なコンティグ配列を組めないことが多い。現実にはつながっていないシーケンスリードの間で配列の重なりが生じ、真につながっているかどうかの判定が難しいためである。

(3) 過去に開発した塩基配列の決定法

研究代表者は5年前に、この問題点を解決する手法を開発した。反復配列の長いクローンの多くの地点にトランスポゾンを送り込み、トランスポゾンの部分をプライマーにして前後の塩基配列を読むとともに、トランスポゾンの位置を電気泳動で測定する。その位置情報を基に素データをつなげるという仕組みである。この方法を用いて、霊長類のセントロメア反復配列を正確に解読し、その結果から新知見を得て、論文として公表した。繰り返しにみられる高次構造(引用文献) およびセントロメア形成に關与するシグナルの存在(引用文献) についての新知見である。正確な塩基配列の決定が実現したことで、この発見は可能となった。

(4) 過去に開発した方法の問題点

反復配列の塩基配列を正確に決定できることがこの方法の利点であるが、欠点も合わせ持つ。クローンにトランスポゾンが

入る場所はランダムであるため、データ取得が進むにつれ、未取得の場所のデータを得るための労力が増すことである。全体として、かかる労力および費用は大きい。これが問題点として残っていた。

(5) 別の方法の考案

この問題点を解消することを目指し、研究代表者は別の方法を考案した。反復単位の間に変異がまったくあるいはほとんどないことが、通常の解読法でコンティグ配列を組むのが難しいことの原因である。それならば人為的に変異を導入すればよいと、研究代表者は考えた。ただし、後でその変異の影響を取り除くことが可能でなければならない。この条件は、変異をランダムに導入することで満たすことができる。

(6) 原理

サンプルを複製し、同一の二次サンプルを多数準備する。そして個々の二次サンプルの間で独立に、ランダムな変異を導入する。この二次サンプルは、変異が入っているため、「通常」の DNA に近い状態となり、ショットガン解析法で解読ができる。その解読を行って二次サンプルのコンセンサス配列をとれば、それは最初のサンプルの塩基配列であるとみなすことができる。変異がランダムであれば、この過程を経ることで、変異の影響は最終的に取り除かれる。

以上が、本研究の計画に至った背景、および計画が拠って立つ原理である。

2. 研究の目的

(1) 塩基配列決定法の名称

研究代表者が自身で5年前に開発した方法を、ここでは位置情報併用法とよぶ。これの欠点を補うものとして、上に記す異なる原理に基づく方法を、研究代表者は考案した。この考案した方法を、変異導入法とよぶ。

(2) 本研究の目的

変異導入法を開発することを、本研究の最終的な目的として設定した。変異導入法は、数段階の作業からなる。そして各段階の操作が目的に適合するように機能することで、原理が全体として成り立ち、正確な塩基配列の決定が実現する。各段階での最適な条件を決定することが、最終的な目的を達成するための段階的な目標となった。

3. 研究の方法

(1) 開発のために使用したサンプル

マーマセットのセントロメア反復配列のクローンを、サンプルとして用いた。引用文献の研究で得たクローンであり、8.1 kb のフォスミドベクター (pCC1FOS) に、40 kb のインサート DNA を含む。40 kb の全域が、344 bp の単位の繰り返しとなっている。このクローンの正確な塩基配列は、引用文献で位置情報併用法で決定したため、本研究開始の時点ですでにわかっていた。わかっていたからこそ、サンプルとして適するものであった。引用文献でのこのクローンの名称は、FosMar102 である。

(2) 変異導入の方法

FosMar102 を、本研究での役割を反映するよう、以下では一次サンプルとよぶ。これに、図 1 に示す処理を施した。

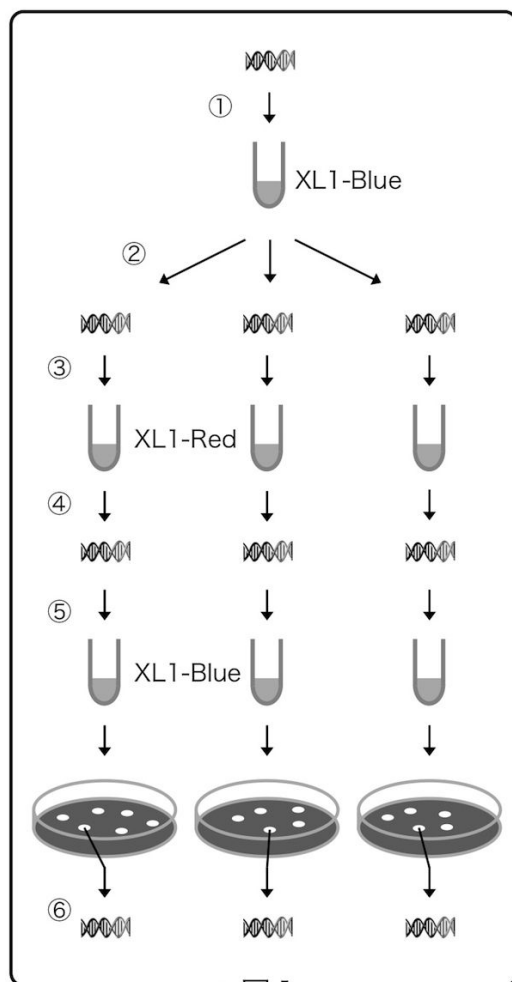


図 1

まず、一次サンプルをバクテリアの XL1-Blue 株に導入して培養した。この株では、フォスミドは正確に複製される。バクテリアからフォスミドを抽出し、これを多数の二次サンプルとした(図では3つとして示す)。二次サンプルを、バクテリアの XL1-Red 株に導入して培養した。この株は、DNA 修復経路のうちの *mutS*, *mutD*, *mutT* の3つの遺伝子が欠損してお

り、塩基誤対合の修復ができない。このため、この株を宿主として培養することで、フォスミドに塩基置換が生じ、世代経過とともにそれが蓄積する。フォスミドを抽出した。そのフォスミドを XL1-Blue 株に導入し、寒天プレートにまいてコロニーを形成させた。コロニーを1個とって培養し、フォスミドを抽出した。

上記のうち以降は、変異が入った二次サンプルのクローンを得るための作業である。で抽出したフォスミドは、異なる変異が入った DNA 分子が共存する状態となっている。で生じるコロニーは、それぞれがフォスミドの DNA 分子1個に由来し、その正確な複製となっている。でコロニー1個をとることで、クローンを得ることができる。

(3) 最適な導入頻度を実現する条件の探索

導入される変異の量が多いほど、二次サンプルのショットガン解析法での塩基配列解読は、容易になる。しかし、同時に欠点も大きくなる。欠点は2つある。1つは、コンセンサス配列を得るために必要となる二次サンプルの数が多くなることである。数が多いと、時間や労力が余分にかかる。もう1つは、塩基置換に加えて、塩基対の挿入や欠失が変異として加わる可能性が、高まることである。挿入や欠失は、コンティグ配列の信頼性の低下につながる。これらの要素の兼合いで、最適条件は決まることになる。最適条件は、「挿入や欠失が生じない範囲で、また二次サンプルの必要数を大きくしないうちで、できるだけ多い変異量」ということになる。

導入される変異の量は、の段階での培養の時間で、調整することになる。時間が長いほど、変異が多く蓄積する。最初の試みとして、十分に長い時間培養したもので解読を行った。これを出発点とし、他の培養時間についても解読を行い、最適な培養時間を求めた。

(4) 変異がランダムであることの確認

導入される変異がランダムであることは、変異導入法の原理が成立するための前提条件である。DNA 修復の一般的な知見からは、ランダムであろうと予想される。しかし確認することは必要であると考えた。この確認のために、(3)で得られた塩基配列を一次サンプルと比較し、変異の分布に関する統計的検定を行った。

(5) 開発した方法の実施

ここまでの準備の過程を経て、変異導入法を大きな規模で実施することが可能と

なった。(3)で決定した最適な導入頻度を実現する条件を用いて、一次サンプルに戻って再度、全過程の作業を行った。

必要な二次サンプルの数は、この時点では不明であった。そこで、すでに調べた1個を含め計6個のデータを得て、以降はコンセンサ配列がクローンのほぼ全長をカバーできるに至るまで、2個ずつ追加することにした。

(6) 変異導入法の評価

今回開発した変異導入法を、以前確立していた位置情報併用法と比較した。主な観点は、得られる塩基配列の正確さ、開始から最終的な塩基配列が得られるまでの時間、それに必要な労力、およびそれにかかる費用である。

4. 研究成果

(1) 最適な導入頻度を実現する条件

および の作業を行って二次サンプルを1個準備した後、 で XL1-Red 株に導入し、培養を開始した。培養の温度は 28℃、容器は 50 ml 容のコニカルチューブ、培地は LB 液体培地を 10 ml とした。培地にバクテリアの細胞が飽和して細胞分裂が停滞することを防ぐために、すなわち細胞分裂が継続するように、6 時間ごとに、培養液 10 μl をとって新しい培地に加えた。

培養開始から 1 日後、2 日後と、1 日ごとに 14 日後まで、培養液 1 ml を取り分け、 の作業として、それぞれから fosM DNA を抽出した。それに と の操作を施し、変異の蓄積したクローンを得た。

表 1

培養時間 (日)	コンティグ数 (個)	平均コンティグ長 (kb)	最大コンティグ長 (kb)
2	51	0.8	2.0
8	13	2.1	3.9
10	9	3.1	7.1
14	7	4.2	8.0

最初に、二次サンプルのうちで最大量の変異が蓄積していると考えられる 14 日目の二次サンプルにつき、ショットガン解析法で塩基配列を調べた。結果は表 1 の最下段で示す状況となった。塩基置換については、ショットガン解析法での塩基配列決定に十分な量の変異であることがわかった。しかし、同時に、1~7 塩基対の欠失が計 4 か所、他に 684 塩基対の欠失が 1 か所、生じていた。欠失があるからには、14 日は培養時間としては長過ぎる。続いて、2 日目の二次サンプルで同様の解析を行った。この場合は、ショットガン解析法では

短いコンティグ配列しか得られず、変異の量は不足であると判断した。引続き、8 日目を調べてやや不足との判定に至り、10 日目の二次サンプルを調べた。このサンプルでは、40 kb のインサート DNA のうち約 30 kb をカバーできている。ギャップが 8 か所残ることになるが、この程度のものであれば、実用で問題にはならない。二次サンプルは多数あり、あるサンプルの不足分を他のサンプルからのデータで補うことができるからである。

以上から、10 日間の培養が最適であると判定した。

(2) 変異がランダムであることの確認

10 日目の二次サンプルの塩基配列を、一次サンプルの塩基配列と比較したところ、塩基配列が得られた領域の合計長である 27883 ヌクレオチド座位のうち、125 座位であった。頻度としては 0.45% である。変異がランダムであると仮定すると、1000 座位当たりの変異の数は、平均 4.5 のポアソン分布になると予想される。これを帰無仮説として、ずれについてのカイ二乗検定を行ったところ、より大きなずれが生じる確率は $P=0.14$ となった。これはきわめて小さい値ではないとみなすことができる。

以上から、 の培養の過程で導入される変異はランダムであるとみなして、実質的な問題はないと、判断した。

(3) 実施して得られた結果

始めに二次クローン 6 個について、ショットガン解析法で塩基配列決定を行った。その後、より長いコンセンサ配列を目指し、2 個ずつ追加した。14 クローンまで調べたところでの、各段階での結果の要点を、表 2 に示す。

表 2

二次サンプルの数 (個)	決定領域の長さの合計 (kb)	未決定領域数の数 (個)
6	29.5	5
8	32.2	5
10	34.4	4
12	34.9	3
14	35.3	3

各ヌクレオチド座位につき、クローンの間で 80% 以上の一致がみられたヌクレオチドを、その座位座でのコンセンサに相当するヌクレオチドとみなすことにした。表中の決定領域とは、クローン全域 40 kb のうち、コンセンサに相当するヌクレオチドが定まった部分を指す。

予想されることではあるが、サンプルを2個ずつ追加して得られる実質の追加データは、しだいに少量となる。前回のギャップに該当する領域についてのみ、その回の追加分としての有効データとなるためである。

表より、40 kb の全域をカバーするには、二次サンプル 14 個ではまだ不足であり、さらなる追加が必要であることがわかる。そして大まかな予想ではあるが、実質の追加データがしだいに少量となることから、さらに 14 個追加しても 40 kb には十分に届かないことが予想される。

(4) 変異導入法の評価

二次サンプル 14 個を調べた時点で、変異導入法の評価を行った。主な視点は、位置情報併用法との比較である。結論としては、変異導入法は現時点で、位置情報併用法の代替とするには開発が不十分であり、実用を目指すにあたってはさらなる改良が必要との判断となった。

表 3

項目	変異導入法	位置情報併用法
得られる塩基配列の正確さ	ショットガン解析より格段に高い	ショットガン解析より格段に高い
40 kb のクローンに要する期間	約 3 週間	5 週間以上
40 kb のクローンに要する費用	約 40 万円	75 万円以上
有効な改良が見込まれる点	トランスポゾン 2 個以上の挿入を防ぐ仕組みを確立し、ギャップを効率よく埋める	二次クローンの数を減らすために、より高い頻度で変異を導入する

変異導入法および位置情報併用法の主な特徴を、対比の方式で表 3 に示す。得られる塩基配列の正確さは、どちらもショットガン解析より格段に高い。位置情報併用法では以前に、セントロメア高次構造およびセントロメア形成に関するシグナルに関する新知見がもたらされている(引用文献 -) ことから、完璧またはそれに近い状態で塩基配列が得られていることが、推測される。これは、従来のショットガン解析では達成できていなかった課題である。そして今回、変異導入法で得られた塩基配列は、解読できた領域に関しては、位置情報併用法での結果と相違はない。したがって、得られる塩基配列の信頼性は 2 つの方法で同等であるといえる。同等の正確さを達成できたということは、変異導入

法の原理に不備はなく、十分に通用するものであることを意味する。

正確さに関しては、優劣はなく十分であるものの、実施に要する期間と費用では、位置情報併用法は変異導入法に、現時点では劣る。このため現状では、位置情報併用法は変異導入法の代替とはならない。

(5) 研究の総括

今後の挑戦的萌芽研究では、以前の方法より優れた方法の開発には、2 年間の研究期間では至らなかった。とはいえ、新しいアイデアを試すという、挑戦的萌芽研究の趣旨に沿った研究となったとは、自負している。そして今後突破口となる箇所の改善を考えついた際には、それをすぐに試すことのできるデータを、各段階について収集した。これもまた、本研究の成果であると、研究分担者は考えている。

< 引用文献 >

- Prakhongcheep O, (3 名略), *Koga A (2013). "Two types of alpha satellite DNA in distinct chromosomal locations in Azara's owl monkey" *DNA Research* 20: 235-240. doi: 10.1093/dnares/dst004.
- Terada S, Hirai Y, Hirai H, *Koga A (2013). "Higher-order repeat structure in alpha satellite DNA is an attribute of hominoids rather than hominids" *J of Human Geneics*. 58: 752-754. doi: 10.1038/jhg.2013.87.
- *Koga A, (5 名略), Hirai H (2014). "Evolutionary origin of higher-order repeat structure in alpha-satellite DNA of primate centromeres" *DNA Research* 21: 407-415. doi: 10.1093/dnares/dsu005
- Sujiwattanasarat P, (4 名略), *Koga A (2015). "Higher-order repeat structure in alpha satellite DNA occurs in New World monkeys and is not confined to hominoids" *Scientific Reports* 14: 10315. doi: 10.1038/srep10315
- Suntronpong A, (5 名略), *Koga A (2016). "CENP-B box, a nucleotide motif involved in centromere formation, occurs in a New World monkey" *Biology Letters* 12: 20150817. doi: 10.1098/rsbl.2015.0817
- Kugou K, Hirai H, *Masumoto H, *Koga A. (2016). "Formation of functional CENP-B boxes at diverse locations in repeat units of centromeric DNA in New World monkeys" *Scientific Reports* 13; 6:27833. doi: 10.1038/srep27833

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者
には下線)

[雑誌論文](計4件)

*Hirai H, Hirai Y, Morimoto M, Kaneko A, Kamanaka Y, Koga A. "Night monkey hybrids exhibit de novo genomic and karyotypic alterations: the first such case in primates"
Genome Biology and Evolution 9 (4): 945-955 (査読有)
doi: 10.1093/gbe/evx058

Irie M, Koga A, Kaneko-Ishino T, *Ishino F. "An LTR retrotransposon-derived gene displays lineage-specific structural and putative species-specific functional variations in eutherians" Frontiers in Chemistry 23 (4): 26 (査読有)
doi: 10.3389/fchem.2016.00026

Kugou K, Hirai H, *Masumoto H, *Koga A. Formation of functional CENP-B boxes at diverse locations in repeat units of centromeric DNA in New World monkeys Scientific Reports 13 (6): 27833 (査読有)
doi: 10.1038/srep27833

Suntronpong A, Kugou K, Masumoto H, Srikulnath K, Ohshima K, Hirai H, *Koga A. CENP-B box, a nucleotide motif involved in centromere formation, occurs in a New World monkey
Biology Letters 12: 20150817 (査読有)
doi: 10.1098/rsbl.2015.0817

[学会発表](計7件)

Koga A, Tanabe H, Hirai H.
"Amplification of tandem repeat DNA may be responsible for a rapid shift from diurnality to nocturnality in a primate taxon" (招待講演)
第39回日本分子生物学会年会、
2016/11/30~12/02、パシフィコ横浜(横浜市)

古賀章彦、平井啓久「セントロメア反復配列の急速な入れ替わり：テナガザルとヨザルの例」(一般口頭発表)
日本遺伝学会第88回大会、2016/09/07~09/09、日本大学国際関係学部(静岡県三島市)

Koga A. "Rapid replacement of centromeres by a variant type repetitive DNA in a primate taxon" (一般ポスター発表)
Society for Molecular Biology and Evolution Conference 2016、2016/07/03~207/07、Gold Coast Convention and Exhibition Centre (Australia)

Suntronpong A., 久郷和人、舛本寛、平井啓久、古賀章彦. "CENP-B box is

likely to confer a selective advantage on its host organism" (招待講演)
第87回日本遺伝学会大会、2015/9/24~9/26、東北大学川内北キャンパス(仙台市)

Koga A. "Transition from diurnal to nocturnal life in the owl monkey may be associated with rapid amplification of constitutive heterochromatin" (一般ポスター発表)

International Symposium "Non-coding DNA and Chromosomal Integrity"

International Symposium "Non-coding DNA and Chromosomal Integrity"、2015/8/7~2015/8/8、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

古賀章彦、平井啓久「夜行性への移行に關与したと考えられるヨザルの大規模反復配列」(一般口頭発表)

第31回日本霊長類学会大会、
2015/7/18~7/20、京都大学百周年時計台記念館(京都市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

京都大学霊長類研究所のホームページにある教員個人のページ

<http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/cellular_biology/koga/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古賀章彦(KOGA, Akihiko)
京都大学・霊長類研究所・教授
研究者番号: 80192574

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし