

令和元年6月11日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05890

研究課題名(和文)生殖細胞変異の1分子解析と後世代影響のリスク評価

研究課題名(英文)Single molecular analysis of germline mutagenesis and risk assessment for future generation

研究代表者

内村 有邦(UCHIMURA, Arikuni)

大阪大学・生命機能研究科・招へい教員

研究者番号：20513063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、私たちが樹立した変異蓄積マウス系統を利用することで、生殖系列における突然変異の影響を体系的に解析するための方法論の構築に取り組んだ。その結果、マウスの生殖系列でゲノムワイドに発生する新規突然変異の特徴を明らかにし、生殖系列で生じる突然変異の発生機構を1細胞レベルで捉えることに成功した。さらに、生殖系列で生じた突然変異が次世代以降の個体の表現型にどのような影響を及ぼすか明らかにした。これらの結果に基づき、放射線被ばくの後世代影響を解析した結果、ゲノムワイドに誘発される変異の特徴を明らかにすることができた。本研究で構築された方法論は、今後、幅広く利用されていくと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは、親から子へと遺伝情報が伝達される時に新たに発生する突然変異(DNA配列の変化)の研究に利用するため、13年間に渡ってマウスの交配を繰り返し、最大38世代の継代がなされたマウス系統を樹立してきた。本研究では、次世代シーケンサーなど、最新の解析技術を利用して、それらのマウス系統を解析することで、これまで不明だった、突然変異の基本的な特徴や後世代の子供への健康影響を明らかにすることができた。本研究では、将来の医療等の現場への応用が期待される革新的な解析技術の開発にも成功している。これらの結果は、今後の突然変異の研究を行う上で重要な基盤になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed new methods analyzing germline mutations comprehensively by using mutation accumulation mouse lines. These include uncovering several traits of germline mutations, the mutagenesis mechanism and physiological function of germline mutations. Based on this method, we could easily evaluate the trans-generational effects of radiation exposures into germ cells. This method will be applicable for the future study of germline mutations.

研究分野：遺伝学

キーワード：突然変異 生殖細胞 後世代影響

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞変異原性は、国連 GHS 勧告の健康有害項目の1つとして取り上げられるなど、近年、その適正な管理の必要性は増している。次世代シーケンサーの技術的な発展により、ゲノム全域で発生する突然変異を直接的に捉えることが可能になってきた。例えば、父親、母親とその子供の3名について全ゲノムシーケンシングを行うトリオ実験も世界中で行われるようになっており、ヒトの生殖系列では、世代あたり平均して約 70 箇所の新規突然変異(塩基置換)が発生することなどが明らかにされている(Kaong et al,2012)。全ゲノムシーケンシングの実施が容易になったことで、医療等の分野において、個人ごとのゲノム配列を解読する機会は、今後、大幅に増加すると考えられる。生殖系列における突然変異の発生は個人の健康状態に直結するものであり、生殖細胞変異原性に関する理解の重要性は、ますます大きくなっていくものと考えられる。

生殖細胞の変異原性を理解していく上では、「ゲノムワイドに生じる突然変異そのもの(その発生機構を含む)」に関する理解と「発生した突然変異が後世代の表現型に及ぼす影響」に関する理解の双方を並行して、進めていくことが必要である。前者の理解を達成するためには、ゲノム中で発生する様々な種類の突然変異を正確に検出することが重要になる。現在の全ゲノムシーケンシング解析では、イルミナ社などのショートリード型の次世代シーケンサーを用いて、150bp の短い DNA 鎖(ペアエンドで使用するが多い)を大量に解読する方法が一般的である。得られたリードデータを参照配列にマップングし、参照配列との差異を検出することで、突然変異の解析が進められている。そのため、解析可能な突然変異は、短いリード長の中で検出可能な変異で、繰り返し配列などの複雑なゲノム領域以外で発生した変異に限られる。そのため、上述したヒトのトリオ実験でも解析対象は、主に塩基置換変異であり、挿入・欠失等の解析が難しい変異の発生状況については、今なお不明な点が多い。先行研究によれば、変異原(化学物質、放射線など)は、その化学的あるいは物理学的な特性によって異なる種類の突然変異を誘発する作用をもつことが知られている。そのため、変異原の遺伝的影響の実体を明らかにしていくためには、現在は捉えることが技術的に困難な変異も含めて、より包括的に解析を進めていくことが重要になる。

「発生した突然変異が後世代の表現型に及ぼす影響」については、これまで、哺乳類をモデルとして直接的に解析した例は、ほとんど存在しない。変異原の作用等により、突然変異の発生頻度が著しく上昇したとしても、後世代の個体や集団に、どのような悪影響が現れるか、今なお、ほとんど分かっていないのが現状である(現在の知見では、一部の遺伝病の発症頻度が増加することぐらいしか明らかになっていない)。このような状況から、生殖細胞で発生する変異が後世代に及ぼす影響について、体系的に捉えていくための新しい実験系の構築が望まれていた。

2. 研究の目的

生殖系列で発生する突然変異の解析を行うためには、数十世代以上の継代を繰り返すことで作製される突然変異蓄積システムを利用することは有用である。実験用マウスを用いた突然変異蓄積システムの解析は、ごく限られた解析(一部の量的形質の解析)以外は行われておらず、全ゲノムシーケンシングが実施できるような変異蓄積マウスシステムは、これまで存在しない。私たちは、全ゲノム解析を目的とした変異蓄積システムを樹立するため、2006 年からマウスの継代を続けており、世代経過とともに表現型がどのように変化するか解析を続けてきた。本研究では、これまでに樹立してきた変異蓄積マウスシステムを利用して、ゲノムワイドに新規発生突然変異を捉えることで、生殖系列における突然変異の発生機構を解明し、それら変異が後世代の個体の表現型に及ぼす影響まで含めて、突然変異の影響を体系的に理解していこうと考えた。具体的には、(1)生殖系列でゲノムワイドに発生する突然変異の特徴の解明、(2)生殖系列で新たに生じる突然変異の発生機構の解明、(3)生殖系列で発生する突然変異が次世代に及ぼす影響、のそれぞれについて解析を行い、新しい生殖細胞変異の後世代影響のリスク評価系を構築する。特に(2)の突然変異の発生機構の解析では、最新の技術を利用することで、シングルセルレベル(つまり DNA1 分子レベル)まで捉えて、詳細なメカニズムの解明を図る。これらの解析により、全ゲノムレベルでの影響を包括的に捉えた革新的な「生殖細胞変異のリスク評価系」の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1)突然変異蓄積マウスシステムの構築とリソースの整備:これまでに樹立してきた突然変異蓄積マウスシステムについて、兄弟交配を継続して進めていくことで、各システムを維持するとともに継代数を増加させ、より有用なマウスシステムの構築に取り組んだ。これらのマウスの継代時には、各個体に対する表現型検査とゲノム DNA の保存作業を行い、適宜、精子や受精卵の凍結保存、体細胞の凍結保存も行った。このようなシステム保存を並行して進めていくことで、後から、実験結果の再現性を確認することも可能になる。

(2)生殖系列でゲノムワイドに発生する突然変異の特徴の解明: 私たちが樹立してきた突然変異蓄積システムでは、継代に使用された全てのマウスのゲノム DNA が保存されており、全ゲノムシーケンシングを用いた解析にも利用可能である。私たちは、変異蓄積システムにおいて、世代数経過後の個体のゲノム DNA と世代経過前(継代実験の開始時)の個体のゲノム DNA をそれぞれシーケンシングすることで、継代中に発生した突然変異を捉えようと考えた。本研究では、可能な限り幅広い種類の突然変異を解析対象とするため、一般的に使用されるシーケンシングの解析条件に加えて、通常とは異なる解析条件でのシーケンシングも実施した。さらに、実験目的に合わせて、シーケンシングデータの解析パイプラインの最適化にも取り組むことで、ゲノム全域で発生する突然変異を検出するための最適な方

法論の構築を進めてきた。

(3)生殖系列で生じる突然変異の発生機構の解明: 突然変異が生殖系列を通じて発生するメカニズムを明らかにするため、主に2種類の方法論から解析に取り組んだ。ひとつは、次世代シーケンサーを用いたシーケンシング技術とシングルセル解析の技術を組み合わせることで、生殖系列で発生する変異を1細胞レベルまでの高解像度で捉える技術の開発に取り組んだ。もう一方の方法論では、突然変異蓄積系統の系統図に従い、凍結保存されたゲノムDNA試料を利用することで、過去の継代過程で生じた突然変異の履歴を明らかにすることで、突然変異の発生機構の解明に取り組んだ。

(4)生殖系列突然変異が次世代以降の個体の表現型に及ぼす影響の解明: 突然変異蓄積系統の継代時に行う表現型検査(繁殖能力の検査、体重、体長等の量的形質の測定結果、表現異常のスクリーニング)の結果と全ゲノムシーケンシングで得られる各系統に蓄積された突然変異との関係を調べることで、新規に発生する突然変異が後世代の表現型にどのように及ぼす影響を及ぼすか、全ゲノムレベルで解析を進めてきた。

(5)生殖細胞の変異原研究への応用: 上記で構築された方法論が、生殖細胞の変異原研究に有効であることを確認するため、生殖細胞への変異原研究の例として、生殖細胞に放射線照射を受けたマウスのトリオ実験モデル(放射線影響研究所の佐藤康成研究員らにより開発されたモデル)に適用し、その効果を検討した。

4. 研究成果

(1)突然変異蓄積マウス系統の構築とリソースの整備: 本研究を開始する前の段階(2016年3月)では、変異蓄積系統の世代経過数は、最大26世代であり、合計20系統の変異蓄積マウス系統が樹立されていた。本研究を通して、マウスの継代を続けることで、世代数は最大38世代まで進み(2019年

4月現在)いくつかの系統を分岐させることで、系統数の合計は38系統になった(図1)。これらのうち、24系統において全ゲノムシーケンシングを実施しており、全ゲノムレベルでの配列情報を利用することが可能である(シーケンシングした系統は図1に矢印で記載)。これにより、世界的にも卓越した「生殖系列変異研究の哺乳類モデル」を構築することに成功した。

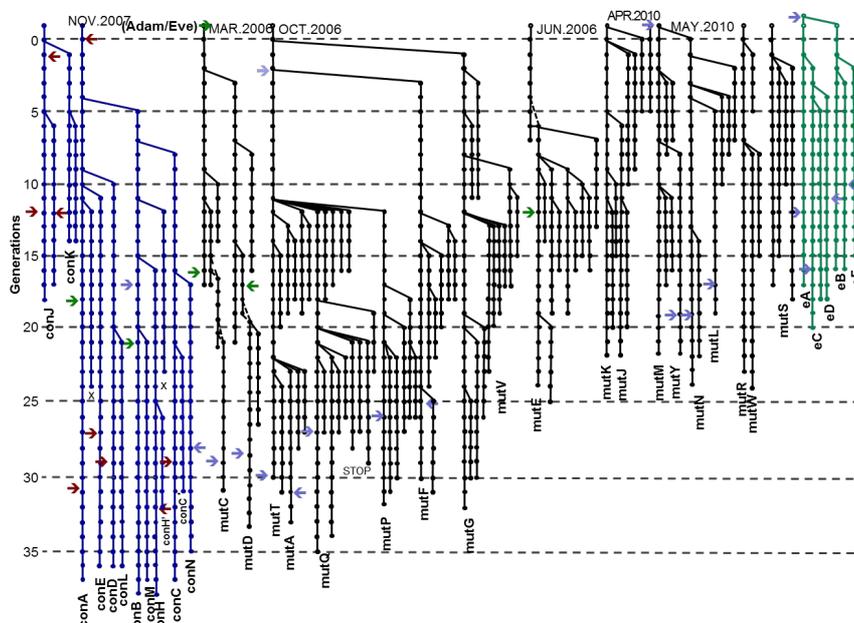


図1. 突然変異蓄積系統の系統図。矢印は全ゲノムシーケンシングを実施した系統。

(2)生殖系列でゲノムワイドに発生する突然変異の特徴の解明: 野生型マウス(C57BL/6J)を用いた変異蓄積マウス系統のうち8系統について、特に高精度、高感度な条件を用いて、全ゲノムシーケンシングを行い、新規変異を捉えるための方法論の構築を進めてきた。その結果、それらの系統で発生した3,000箇所の塩基置換と7,148箇所の挿入欠失変異を正確に捉えることに成功した。本解析により、これまで不明であった、性染色体における突然変異率の実体や、挿入欠失変異の発生頻度、さらにはリピート配列も含めた自然発生変異の特徴などが明らかになった。また、世代経過とともに野生型マウスのゲノム配列は、一定の方向に変化していく傾向にあることが分かった。このことは、生物進化を考える上で重要な知見だと考えられる。さらに、ロングリード型シーケンサーを用いた解析からは、より大規模な構造変異(欠失、重複、逆位など)を捉えることに成功した。これらの知見は、生殖系列で発生する突然変異の特徴を包括的に捉えた世界で初めての結果であり、ゲノム進化との関連なども含めて、現在も多面的な解析を進めている。解析結果がまとまり次第、論文発表を行う予定である。

(3)生殖系列で生じる突然変異の発生機構の解明: 生殖系列変異の発生機構を明らかにするため、次世代シーケンサーを用いた実験とシングルセル解析、さらには機械学習等の理論モデルを組み合わせ、解析を進めてきた。その結果、突然変異の発生機構を捉える上で、従来までにない革新的な方法論を構築することに成功した。本成果には、極めて重要な生物学的知見が含まれていたため、早期に論文発表するべく、必要な確認実験の結果とともに、準備を進めている状況である。また、本研究で開発された方法論に関して、特許出願の準備も並行して進めている。ここで得られた成果は、将来的には、医療分野など、様々な分野で利用される可能性があると考えられる。社会に広く貢献できる、

より実用性と有効性の高い技術に発展させるべく、今後も研究を継続していくことが重要だと考えられる。

(4)生殖系列突然変異が次世代以降の個体の表現型に及ぼす影響の解明：私たちがこれまでに構築してきた突然変異蓄積系統には、通常の野生型マウスを用いた変異蓄積系統に加えて、DNA ポリメラーゼへの変異(アミノ酸置換を引き起こす)導入により突然変異率を大幅に上昇させた Mutator マウスを用いた変異蓄積系統がある。以前の論文(Uchimura et al, Genome Research, 2015)において、私たちは、突然変異率が野生型マウスの 17 倍にまで上昇した Mutator マウスの変異蓄積系統では、表現型異常が多発し、量的形質が多様化し、繁殖能力が大幅に低下するなど、世代経過にともなって様々な表現型の変化が現れることを報告していた。今回、世代数が進んだ個体の表現型データも含めて、新たな解析に取り組んだ結果、野生型マウスの変異蓄積系統でも表現型に変化(繁殖能力の低下など)が現れることが明らかになった。世代あたりの突然変異の発生頻度がヒトの半分程度を示す野生型マウスでも、表現型影響が認められたことは、人類集団での生殖系列変異の影響を考える上で重要な意味をもつ。全ゲノムシーケンシングの結果から、観察された表現型変化との関連が示唆される遺伝子変異も同定されており、現在も、表現型への影響を引き起こした遺伝的基盤の解明を進めている。本解析の結果についても、早期に論文発表ができるように準備を進めている状況である。

(5)生殖細胞の変異原研究への応用：精原細胞や成熟卵子に対して放射線を照射したマウスのトリオ実験に対して、上記で構築された方法論を適用し、実際の解析に取り組んだ。(2)で構築された突然変異の高精度な解析を可能にする実験系を利用したことで、これまでの全ゲノムシーケンシング解析では精度高く解析することが困難な挿入/欠失変異まで含めて、ゲノムワイドに高精度な解析を行うことが可能になった。その結果、精原細胞や成熟卵子への放射線被ばくは、次世代の子供において、挿入/欠失変異の発生数を増加させるなど、これまでにない知見が明らかになった。本成果は、論文投稿中(Satoh et al.,論文投稿中)の状況である。本研究で構築された方法論は、生殖細胞の変異原の研究等、突然変異の発生やその機能を捉えた幅広い研究に利用されていくものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

内村有邦、樋口真弓、八木健、変異蓄積モデルを利用した生殖系列変異の後世代影響の解析、放射線生物研究、査読有、52(4)巻、2017、402-415

〔学会発表〕(計 13 件)

佐藤康成、実験用マウスを用いた放射線被ばくの次世代遺伝影響の解析、第 60 回原子爆弾後障害研究会、2019 年

内村有邦、マウス生殖系列で発生する de novo 変異から見る哺乳類ゲノムの進化、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

内村有邦、マウスの生殖系列で発生する挿入欠失変異の発生頻度とその特徴、日本放射線影響学会第 61 回大会、2018 年

佐藤康成、精原細胞期と成熟卵母細胞期のマウス生殖細胞への放射線照射は子どものゲノムに小さなサイズの欠失とマルチサイト変異を誘発する、日本放射線影響学会第 61 回大会、2018 年

佐藤康成、マウスモデルを用いた放射線の次世代遺伝影響のゲノムワイド解析、第 43 回中国地区放射線影響研究会、2018 年

内村有邦、変異蓄積マウス系統は、放射線の遺伝影響を理解するための新たな方法論を提供する、日本放射線影響学会第 60 回大会、2017 年

佐藤康成、放射線照射されたヒト培養細胞の全ゲノムシーケンス法による塩基置換型突然変異の予備的解析、日本放射線影響学会第 60 回大会、2017 年

福村龍太郎、日本産野生マウス由来近交系 MSM/Ms における自然突然変異の検出、日本遺伝学会第 89 回大会、2017 年

内村有邦、変異蓄積マウス系統を用いた生殖系列変異の解析、第 42 回中国地区放射線影響研究会、2017 年

内村有邦、実験室内進化モデルを利用して、哺乳類の進化の過程を理解する、第 10 回 Evo-Devo 青年の会、2017 年

内村有邦、Mutation accumulation experiment with laboratory mice、Advanced Genome Science International Symposium "The Start of New Genomics"、2017 年

内村有邦、マウスを用いた実験室内進化モデルは、ヒトも含めた哺乳類の進化研究に新たな方法論を提供する、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年

内村有邦、実験用マウスの生殖系列の突然変異率とその後世代への影響、第 63 回日本実験動物学会総会、2016 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/yagi/index.htm>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：樋口真弓

ローマ字氏名：(HIGUCHI , Mayumi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。