

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 5月 5日現在

機関番号：16101  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011年～2011年  
 課題番号：23650406  
 研究課題名（和文） 高運動習性モデルラットの表現型形成機序の解明を  
 目指した原因遺伝子の迅速同定  
 研究課題名（英文） Rapid screening of gene(s) related to the phenotype of model rats  
 with high levels of voluntarily wheel running activity  
 研究代表者  
 井本逸勢（橘逸勢）(IMOTO ISSEI) (TACHIBANA ISSEI)  
 徳島大学・大学院ヘルスバイサイエンス研究部・教授  
 研究者番号：30258610

研究成果の概要（和文）：Wistar系ラットから樹立された高運動習性動物モデルである SPORTS (Spontaneously Running Tokushima-Shikoku) ラットを対象に、高運動習性の表現型形成の分子基盤を解明することを目的に、次世代シーケンサーを用いた全エクソン配列解析、連鎖解析、ならびにデータベースを用いた選択アルゴリズムから新規に構築するラットゲノム解析パイプラインを駆使することで、未同定の原因遺伝子のスクリーニングを行い、候補遺伝子群を得るとともに、モデルラットの表現型関連遺伝子のスクリーニングツールとシステムを確立した。

研究成果の概要（英文）：In order to identify gene(s) and molecular pathway(s) possibly related to the phenotype of model rats with high levels of voluntarily wheel running activity (Spontaneously Running Tokushima-Shikoku, SPORTS) established from Wistar rats, we established a novel integrated screening system through combining exome sequencing using a next-generation sequencer, linkage analysis, and selection algorithm using genome and polymorphism databases. Through this study, we successfully established a novel screening system for rat genome analysis and identified a set of candidate genes related to the phenotype of SPORTS rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：スポーツ科学

科研費の分科・細目：スポーツ生化学

キーワード：高運動習性ラット、ゲノム、次世代シーケンサー、連鎖解析

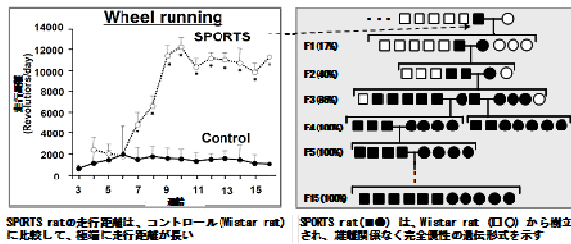
1. 研究開始当初の背景

ラットは、ヒトと同じ哺乳動物で、遺伝学的基盤の上で実験研究ができ、マウスに比べ扱いやすい大きさと学習能力が高いことから、医学、薬学、生物学、心理学等のライフサイエンス分野で多用されてきた。わが国でも、自然発症、人工的誘発、あるいは育種開発された疾患モデルなど優れたモデルラットが多数開発・リソース化され (National Bio-Resource Project-rat, NBRP-rat)、表現型を原因遺伝子に結びつける試みが行われてきた。しかし、単一遺伝子変異が予測される場合でも、連鎖解析から候補領域を絞り

込み責任遺伝子まで同定することは容易ではなく、多くの有用なモデルの原因遺伝子が未同定である。モデルラットを用いた研究成果を更に有用なものにするためには、原因遺伝子や修飾遺伝子の迅速な決定を可能にするシステムの構築が急務である。

このような背景のもと、ヒトゲノム解析で培った疾患関連遺伝子同定技術と、モデルラットの樹立、表現型解析技術とを融合させ、ゲノム解析が急務なモデルラットとして Wistar 系ラットから樹立された高運動習性動物モデル SPORTS ラット (Morishima et al., 2005; 図) を対象に、短期間で確実にモデル

ラット表現型形成の原因遺伝子を同定するシステムを開発する研究プロジェクトを構想した。



## 2. 研究の目的

スポーツ医学分野のみならず様々な分野で興味をもたれている SPORTS ラットの原因遺伝子同定を、次世代シーケンサーを用いた全エクソン配列解析を中心に新たに構築する迅速ラットゲノム解析システムにより、本ラットモデルの表現型成立の分子機構を解明すると共に、原因遺伝子、修飾遺伝子の同定が進んでいないラットにおけるゲノム解析システムを構築し実証する。本研究で構築されるモデルラット責任遺伝子同定システムにより、多くのモデルラットの責任遺伝子が同定され、日本を中心に特定の表現型や疾患に関連した遺伝子の解明が進むことが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンス

### ① ラットエクソーム解析ツール開発

ラットゲノムデータベース (Rat Genome Project RGSC\_v3.4、Rat Genome Database、NRBP-rat 他) を参照し Brown Norway (BN) 系統ラットの参照配列解読情報をもとに refGene 収録遺伝子の情報を取得し、Wistar 系ラット全ゲノムのエクソンキャプチャー用プローブを設計し (約 38 Mb)、アレイ作製を行う (NimbleGen 社)。

同時に、Wistar 系ラット全ゲノム、特に全エクソンとその周囲についてバーチャル Wistar 配列情報を作成し、自作データベースに実装する。

### ② 次世代シーケンサーによるラット全エクソンシーケンス実施と解析

SPORTS ラット、Wistar 系ラット、BN 系ラット、さらに SPORTS と BN の交配 (BNxSPOTS) 及び戻し交配 (BNx (BNxSPOTS)) で得られた各 DNA を使い、エクソン濃縮後次世代シーケンス解析を行う (illumina 社)。得られた配列を、バーチャル配列を参照配列としてマッピングし、各検体間での差を比較する。混合検体における配列変化の出現頻度情報からシ

ーケンスのノイズと遺伝子多型を区別すると共に、他の系統のラットの多型情報 (データベースよりダウンロードして参照) を集約して表現型と無関係な多型を出来る限り除くパイプラインをサーバーに実装し、候補遺伝子変異を抽出し、サンガー法による配列解析で検証する。

### (2) 連鎖解析を用いた責任領域抽出

シーケンス解析で抽出される候補変異の絞り込みを目的に、SPORTS ラットと BN ラットから得た F1 (BNxSPOTS) とこれに BN ラットを交雑して得られた戻し交雑子 (F1 戻し交雑子) BNx (BNxSPOTS)、および F1 同士を交雑して F2 交雑子 (BNxSPOTS)x (BNxSPOTS) を作製し、運動耐性から表現型を決定する。

ゲノムワイドの連鎖解析が必要であれば、BN と Wistar で多型のあるマイクロサテライトマーカーあるいはシーケンス解析から得られる一塩基多型 SNP を用いて遺伝型を決定し、連鎖地図を作成する。この結果を、シーケンス解析で得られる候補の絞り込みにフィードバックして、さらなる絞り込みを行う。

### (3) 候補遺伝子の確認と責任遺伝子の同定

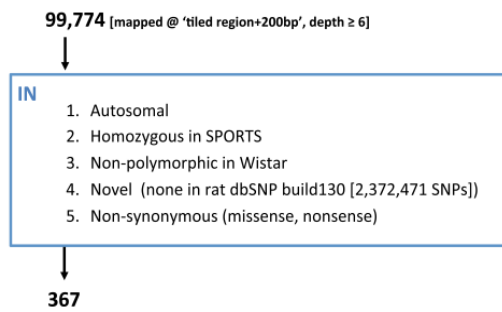
ラットならびに他の生物のゲノムデータベースから、表現型に関与しない多型の可能性、既知の疾患や表現型と関与する遺伝子である可能性、機能や発現パターンによる責任遺伝子としての妥当性を検討し、責任遺伝子を決定する。

## 4. 研究成果

(1) ゲノムデータベース (RGSC\_v3.4) を参照し、Brown Norway (BN) 系統ラットの参照配列解読情報をもとに、refGene 収録遺伝子の全エクソン (エクソン数140,877) をターゲットとし、その約98%をカバーするカスタムエクソンキャプチャー用アレイを設計した。配列解析、アノテーションで用いるため、参照配列上でのゲノム情報の統合の不一致の修正を可能な範囲で行い、解析ツールにデータベースとして実装した。

(2) 本アレイを用いて、SPORTSラット、Wistar系ラットのエクソン濃縮を行い、次世代シーケンサーを用いてペアエンド114塩基x2での塩基配列決定を行い、BWAによりラットゲノム配列にマッピングした結果、平均120x以上の深度でマップされ94%で10リード以上によりカバーされた。BNラット配列を基に、GATK、SAMtoolsによる変異箇所の解析で、当初予定した範囲内である367個の「SPORTSラットでホモでWistar系やBN系ラットと異なる配列を示し、既知の多型として報告が無い、アミノ酸置換を生じる」候補変異を検出した。

SPORTS-associated SNVs (vs. rn4 genome)



(3) F1 (BN<sub>x</sub>SPOTS)、BN<sub>x</sub> (BN<sub>x</sub>SPOTS) を作製し、BN系と共にエクソーム解析を行い、SNVを検出してF1でヘテロになりかつSPORTSのみで認められる候補領域の絞り込みを行った（未発表データ）。

(4) 上記の結果を統合して得られた候補変異の確認と既知機能データからの予測により得られた責任遺伝子変異候補について、*in vitro*での機能解析を行った。また、解析パイプラインの調整やプローブデザインの修正（ラットエクソームアレイ Ver2）も行うことができ、モデルラットの高速ゲノム解析システムを構築できた。

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 9 件）

- ① Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S, Okamoto N, Kato M, Yoshihashi H, Kubota T, Nakagawa E, Goto YI, Inazawa J, The incidence of hypoplasia of the corpus callosum in patients with dup (X)(q28) involving MECP2 is associated with the location of distal breakpoints, *Am J Med Genet A*, 2012、in press、査読有、doi: 10.1002/ajmg.a.35321
- ② Ono H, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Matsui T, Kurasawa Y, Muramatsu T, Sugihara K, Inazawa J, SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation, *Oncogene*, 2012、in press、査読有、doi: 10.1038/onc.2011.646.
- ③ Okamoto N, Hayashi S, Masui A, Kosaki R, Oguri I, Hasegawa T, Imoto I, Makita Y, Hata A, Moriyama K, Inazawa J, Deletion at chromosome 10p11.23-p12.1 defines characteristic phenotypes with marked midface retrusion, *J Hum Genet*, 57(3):191-6、2012、査読有、doi: 10.1038/jhg.2011.154
- ④ Honda S, Satomura S, Hayashi S, Imoto I, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J; Japanese Mental Retardation Consortium, Concomitant microduplications of MECP2 and ATRX in male patients with severe mental retardation, *J Hum Genet*, 57(1):73-7、2012、査読有、doi: 10.1038/jhg.2011.131.
- ⑤ Hayashi S, Okamoto N, Chinen Y, Takanashi J, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J, Novel intragenic duplications and mutations of CASK in patients with mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH), *Hum Genet*, 131(1):99-110、2012、査読有、<http://www.springerlink.com/content/t41q770m17509j15/?MUD=MP>
- ⑥ Kurasawa Y, Kozaki K, Pimkhaokham A, Muramatsu T, Ono H, Ishihara T, Uzawa N, Imoto I, Amagasa T, Inazawa J, Stabilization of phenotypic plasticity through mesenchymal-specific DNA hypermethylation in cancer cells, *Oncogene*, 31(15):1963-74、2012、査読有、doi: 10.1038/onc.2011.373
- ⑦ Ishihara T, Inoue J, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J, HECT-type ubiquitin ligase ITCH targets lysosomal-associated protein multispansing transmembrane 5 (LAPTM5) and prevents LAPTM5-mediated cell death, *J Biol Chem*, 286(51):44086-94、2011、査読有、<http://www.jbc.org/content/286/51/44086.long>
- ⑧ Tsuruta T, Kozaki K, Uesugi A, Furuta M, Hirasawa A, Imoto I, Susumu N, Aoki D, Inazawa J, miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res*, 71(20):6450-62、2011、査読有、<http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/20/6450.long>
- ⑨ Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, Omura K, Inazawa J, The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer, *Cancer Res*, 71(17):5765-78、2011、

査読有、  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/17/5765.long>

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 1 件）

井本逸勢、近代出版、メディカルサイエンス  
遺伝子検査学（IV 染色体検査法-1 染色体  
分染法-2 染色法）、2011、69-72

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・人類  
遺伝学

<http://plaza.umin.ac.jp/awahg/>

<http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/jinruiiden/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井本逸勢（橘逸勢）

（IMOTO ISSEI）（TACHIBANA ISSEI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・  
教授

研究者番号：30258610

### (2) 研究分担者

中屋 豊（NAKAYA YUTAKA）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・  
教授

研究者番号：50136222

二川 健（NIKAWA TAKESHI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・  
教授

研究者番号：20263824

### (3) 連携研究者

田嶋 敦（TAJIMA ATSUSHI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・  
准教授

研究者番号：10396864