

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25年 5月12日現在

機関番号：16101
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2012
課題番号：24650238
研究課題名（和文） 疾患モデルの責任遺伝子の迅速同定を可能にする ラットゲノム解析ツールの体系的構築
研究課題名（英文） Construction of systematic tools for genome analyses to determine genes responsible for various disease model in rats
研究代表者 井本 逸勢（橘 逸勢）(IMOTO ISSEI) (TACHIBANA ISSEI) 徳島大学・大学院ヘルパバイオサイエンス研究部・教授 研究者番号：30258610

研究成果の概要（和文）：有用な疾患モデル動物であるラットの形質責任遺伝子を効率よく同定し表現型形成の分子基盤を解明するシステムを作製するため、自作のラットエクソーム解析系をより多くのエクソンを簡便に解析可能な系に改訂した。さらに多系統のラット遺伝子多型情報を収集し、新規の次世代シーケンサー解析パイプラインを構築した。これらを連鎖解析と組み合わせる体系的ラットゲノム解析システムを整備し、実際の変異モデルラットで表現型責任変異遺伝子候補選択までを検証できた。

研究成果の概要（英文）：In order to identify genes responsible for phenotypes observed in disease-model rats and determine molecular mechanisms producing those phenotypes, we modified our self-made rat exon capture system, which can easily analyze larger sets of exons in a liquid phase manner. We constructed an effective pipeline to analyze next-generation sequencing data with larger information of polymorphism and gene annotation data in rats. Through combining those systems with linkage analyses, we constructed effective and systematic tools for rat genome analysis. We finally applied this tool to a newly established rat model with unique phenotype, and validated usefulness of our system by collecting candidate variations possibly responsible for its phenotype.

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：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：リサーチバイオリソース、ラット、疾患モデル動物、エクソーム、次世代シーケンサー、責任遺伝子変異、ゲノム情報、連鎖解析

1. 研究開始当初の背景

ラットは、遺伝学的基盤の上で実験研究が可能な哺乳動物で、マウスに比べ扱い易い大きさや学習能力からライフサイエンス分野で多用され、わが国では貴重なモデル変異ラットが多数作製・蓄積されている(National Bio-Resource Project-Rat, NBRP-Rat)。し

かし、浸透率が低い量的形質遺伝子(Quantitative Trait Locus; QTL)はもとより、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表現型の責任遺伝子を同定することは容易でなく、多くの有用な疾患モデルの原因遺伝子が未同定のままであった。

申請者らは、平成 23 年度の挑戦的萌芽研究において、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 (Ver. 1)。このシステムと次世代シーケンサーを用いエクソン配列解析することで高運動習性動物モデル SPORTS ラットの責任遺伝子同定を 1 年で達成する計画を遂行し、候補遺伝子群の絞込みに至った。しかしその中で、①参照 (Refseq) 遺伝子の登録がヒト、マウスに比して少ない、②Refseq 遺伝子の 10% 以上が参照ゲノム上に正確にマップされない、③表現型と無関係な多型を効率よく除外する多型情報が整備されていない、等の困難に遭遇した。これは、ラット参照ゲノム配列情報やデータベースに不備が多く、また欧州を中心に収集される SNP など多型情報の体系的整理や公開が進んでいないなどが一因であった。効率のよいラットエクソーム変異スクリーン系と配列解析結果のアノテーションから変異特定に至る多型情報蓄積ならびに連鎖解析系の整備は喫緊の課題であり、モデル変異ラットの責任遺伝子の迅速な同定を可能にする体系的なゲノム配列解析システムを確立する本課題を着想した。

2. 研究の目的

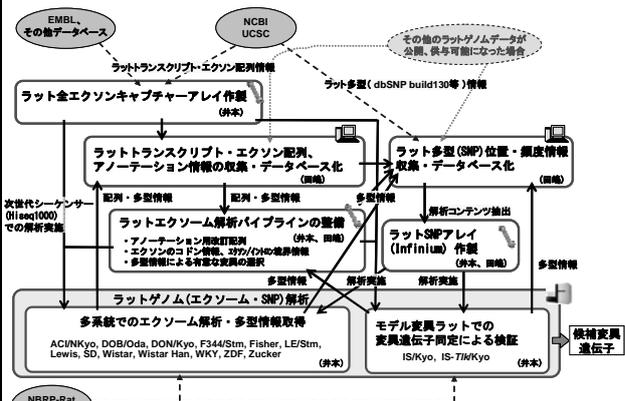
ラットは、有用な疾患モデルがわが国で多数樹立・維持されながらその原因遺伝子の同定が進んでいない。モデル変異ラットにおけるの形質責任遺伝子を効率よく同定し表現型形成の分子基盤を解明するため、現在の未成熟なラットゲノム情報環境を基盤に、可能な限り網羅的なエクソーム解析を多系統の遺伝子多型の情報と共に整備した新規の次世代シーケンサー解析パイプラインを構築する。さらに、補完する位置情報を提供できるハイスループットな連鎖解析ツールを構築し、これらを組み合わせることで高効率の体系的ラットゲノム解析システムを整備して実際のモデルラットでの検証までを行うことを目的とする。本課題での成果により、ヒト疾患モデルとしてのラットの重要性がさらに高まり、広く生命科学への貢献、応用が期待できる。

3. 研究の方法

(1) エクソーム解析用キャプチャーツール構築とアノテーションデータベース作成

自作ラットカスタムキャプチャーアレイ (Ver. 1) では 17,000 transcript (14 万エクソン) に標的がとどまることから、参照配列にマップ可能な transcript について、アノ

テーションデータベースを作成し、これに基づきプローブを設計してエクソンキャプチャー用アレイを作製する (Ver. 2、40 Mb)。



計画の概要ならびに分担状況

本申請で計画される一連の研究のアウトプットとして、①ラットエクソーム・多型のデータベース作成 (■)、②各ラットゲノム解析実施用ツールの整備 (□)、ならびに③ IS/Kyo・IS-7/kKyo ラットの同定候補変異遺伝子が期待される。

(2) ラットエクソーム解析パイプラインの構築と多系統でのエクソーム解析の実施

キャプチャーアレイに搭載する全エクソンをマップできアノテーションが可能な改訂参照配列情報を整備し、これを実装したエクソーム解析一次パイプラインを作製する。キャプチャーアレイとパイプラインを用い、コロニー中での交配代数、表現型等の情報が担保された多系統エクソーム解析)と変異ラット(変異遺伝子同定による実証)でのエクソーム解析を行い配列情報を取得する。

(3) ラットエクソーム二次解析パイプラインの構築と変異遺伝子候補の選別

収集した変異・多型情報と既存の多型情報を改訂参照配列情報に反映させて多型情報データベースを作成し、一次パイプラインに反映させることで、表現型に無関係な多型の選択的排除が可能な解析パイプライン(二次)を構築する。この二次パイプラインを変異ラットエクソーム情報の比較解析に用い、変異遺伝子候補の選別を行うことで解析パイプラインの有用性を検証する。

(4) ラット多型情報収集とこれを用いた新規の連鎖解析用 SNP アレイの作製

ラットなどモデル動物では、連鎖解析を行ってもホモ接合度が高く、連鎖領域内に存在する多数の変異の絞込みが困難である。一方で、ヒトに比べて多型情報が乏しいラットなどモデル動物では次世代シーケンサーによるエクソーム解析でも責任変異遺伝子の絞込みが困難なことから、適切な個体を用いた連鎖解析は依然重要である。新たに作成する全ゲノム多型データベースを基にカスタム SNP

アレイ (Illumina 社) を作製し、頻度情報を取得する。この情報から連鎖解析に有用と判断されるプローブを選択し、SNP を 1 万個以下に圧縮したカスタム Infinium ラット SNP アレイ Ver. 2 を作製し、変異遺伝子候補の選別における有用性を検証する。

4. 研究成果

(1) 研究期間開始後に改訂されたラットゲノム情報 (nr. 5) を用いて、Ver. 1 よりキャプチャーできる exon を増加させたカスタムラットエクソンキャプチャーを設計するとともに、プロトコルの簡便化のために液相反応タイプとして Ver. 2 のキャプチャーシステムを作製することができた。これにより、アレイタイプで必要であった専用機器も不要になり、簡便かつ安価な実験が可能になった。さらに、アノテーション情報も可能な限り改訂を行うことで、評価可能な exon 数を約 10% 増加させることができた。

(2) 6 系統のラットゲノム解析を行い、それらから多型情報を収集した。この情報を最新の db-SNP などデータベース上の情報と統合し、多系統の遺伝子多型の情報を可能な限り整備した新規の次世代シーケンサー解析パイプラインを構築した。

(3) 研究期間内に次世代シーケンサーのコストダウンとハイスループット化が進んだことから、多型を利用した連鎖解析のために予定していた新規ツールとしての SNP アレイの作製は行わず、代わりに次世代シーケンス解析並びに PCR による低密度マイクロサテライト解析系との統合解析に置き換えた。これにより、情報量を落とすことなくより安価に実際の連鎖解析が行えることになり、費用対効果の面からも有効なシステムを研究期間内に構築できた。

(4) Ver. 2 キャプチャーシステムを用いたエクソーム解析と連鎖解析とを組み合わせた新規のラットゲノム解析システムの有用性の検証を実際の表現型責任遺伝子の同定をモデルにして行うことを目的に、モデル変異ラットの解析実証実験を実施した。研究期間内に新規に樹立されたモデル表現型変異ラット (未発表データにより詳細は省略) の提供を受けることのできたことから、当初計画において対象に予定していた IS/Kyo ならびに IS-Tlk/Kyo に代えて、本モデルラットとコントロール個体を用い候補遺伝子変異の同定と絞り込みを行った。その結果、予定していた 100 個以内の候補遺伝子群の同定に成功した。

今後さらに、候補遺伝子の機能解析や多型解析を進めることで、責任遺伝子の同定を図る。

これらの成果により、詳細なラットゲノム解析が迅速に可能な解析ツールと情報分析パイプラインの整備が達成され、今後ラットをモデル動物として用いる医科学、生命科学研究への貢献が期待できる。

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 8 件)

- ① Miyawaki Y, Imoto I, Tokairin Y, Kawada K, Nakajima Y, Nishikage T, Nagai K, Kajiwara M, Inazawa J, Kawano T. Esophageal squamous cell carcinoma developed 11 years after allogeneic bone marrow transplantation for acute lymphatic leukemia. *Jpn J Clin Oncol* 2013;43(1):69-73. 査読有, DOI:10.1093/jjco/hys184.
- ② Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Shimodera S, Ono S, Imamura A, Iga JI, Watanabe S, Kikuchi K, Kubo H, Nakataki M, Sumitani S, Imoto I, Okazaki Y, Ohmori T. DNA Methylation Signatures of Peripheral Leukocytes in Schizophrenia. *Neuromolecular Med* 2013;15(1):95-101. 査読有, DOI:10.1007/s12017-012-8198-6.
- ③ Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Ohi K, Hashimoto R, Shimodera S, Imoto I, Itakura M, Takeda M, Ohmori T. Meta-analysis of association studies between DISC1 missense variants and schizophrenia in Japanese population. *Schizophr Res* 2012;141(2-3):271-273. 査読有, DOI:10.1038/onc.2011.646.
- ④ Matsumura S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Muramatsu T, Furuta M, Tanaka S, Sakamoto M, Arii S, Inazawa J. Integrative array-based approach identifies MZB1 as a frequently methylated putative tumor-suppressor in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012;18(13):3541-3551. 査読有, DOI:10.1158/1078-0432.CCR-11-1007.
- ⑤ Miyawaki Y, Kawachi H, Ooi A, Eishi Y, Kawano T, Inazawa J, Imoto I. Genomic copy-number alterations of MYC and FHIT genes are associated with survival in esophageal squamous-cell carcinoma.

- Cancer Sci 2012;103(8):1558-1662. 査読有,
DOI:10.1111/j.1349-7006.2012.02329.x.
- ⑥ 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;158A(6):1292-1303. 査読有,
DOI: 10.1002/ajmg.a.35321.
- ⑦ 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;31(47):4923-4934. 査読有,
DOI: 10.1038/onc.2011.646.
- ⑧ 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. 2012;31(15):1963-1974. 査読有, DOI: 10.1038/onc.2011.373.

[学会発表] (計4件)

- ① Hosoda F, et al. Genetic variations in primary breast cancer and its metastatic tumor. 第71回日本癌学会学術総会、2012.9.21、ロイトン札幌 (札幌市)
- ② Furuta M, et al. A tumor-suppressive microRNA cluster targets multiple cell cycle regulators in hepatocellular carcinoma. 第71回日本癌学会学術総会 2012.9.20、さっぽろ芸文館 (札幌市)
- ③ Miyawaki Y, et al. Genomic copy-number alterations of MYC and FHIT genes are associated with survival in esophageal squamous-cell carcinoma. 第71回日本癌学会学術総会、2012.9.20、札幌市教育文化会館 (札幌市)
- ④ Nishiyama N, et al. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological correlation with DNA methylation. 第71回日本癌学会学術総会、2012.9.20、ロイトン札幌 (札幌市)

[その他]

ホームページ

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

(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)

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

なし

(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