

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26281022

研究課題名(和文)環境ストレス感受性マウスを用いたde novo生殖細胞ゲノム変異の解析

研究課題名(英文)Analysis of de novo germline mutations by using environmental genome stress-sensitive mice

研究代表者

大野 みずき (Ohno, Mizuki)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70380524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝的変異の発生機構の解明と効率的検出系の確立を目的とし、ミスマッチDNA修復(MMR)不全マウスの家系を作出し、次世代シーケンサーによる新規生殖細胞変異(DNM)の検出を行った。全エクソン解析の結果、1世代あたりに野生型マウスの20倍以上の一塩基置換型変異が、さらにヒトのMMR不全のがんにも認められるマイクロサテライト配列での挿入/欠失が高頻度に検出された。MMRは生殖細胞ゲノム維持にも重要であること、また本実験系を利用することで、データ量が比較的少ない全エクソーム解析でも定常レベルのDNMが十分検出可能であることが示され、環境ストレスや化学物質の次世代影響評価系への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To clarify underlying mechanisms for spontaneous germline mutations, we attempted to analyze de novo germline mutations by whole exome sequencing using parents-offspring sample sets derived from mismatch repair (MMR)-deficient mice. We observed an increased mutation rate in MMR-deficient mice. DNMRate per generation was approximately 20-fold higher for base substitutions, and at least several hundred-fold higher rate for INDELS, compared with that of wild-type mice. Most of INDELS were found at dinucleotide-repeat sequences, namely minisatellite or microsatellite. The mutation pattern of DNMs detected in these mice is consistent with the pattern of somatic mutation of MMR-deficient human tumor, indicating that MMR plays a crucial role in the maintenance of germline genome integrity. Our experimental system for the detection of DNMs by using MMR-deficient mice family can be used for the assessment of the genetic effects of environmental mutagens.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：生殖細胞変異 ミスマッチ修復

1. 研究開始当初の背景

近年、原子力発電所の事故や宇宙での有人飛行の長期化に伴い放射線の人体影響の解析の必要性が高まっている。特に生殖細胞系列に生じるゲノム変異は後の世代の人類にまでも影響する可能性があることから早急に対応すべき課題である。しかしながら、野生型哺乳動物では自然突然変異頻度は非常に低く保たれており、新たに生じた生殖細胞変異を実験的に解析するのは困難である。これまで哺乳動物で遺伝性変異の有無や頻度を知るためになされた様々な工夫には、可視的な表現型の変化を目安にする、反復配列などの特定の配列変化を指標にする、薬剤感受性遺伝子を利用する、等がありそれらの結果から推定・算出された変異頻度は重要な基礎データとなっているが、一方でこれらの方法では限られた領域の限られたタイプの変異しか検出できないため、種々の変異原に対応可能な新たな解析系の開発が必要である。

遺伝情報の安定維持には正確な複製機構が必要で、もし誤った塩基が挿入されるとポリメラーゼ自身が持つ校正機構で正しい塩基が挿入される。それでも見落とされた誤塩基対はミスマッチ修復(MMR)系が修正することが知られている。大腸菌ではMMR欠損株は自然突然変異率が上昇し顕著なミューター表現型を示すことから、ゲノムの安定性に大きく寄与していることが示唆される。さらにヒトではMMRの機能不全は体細胞突然変異を引き起こし発がんの原因となることが知られている。一方で、哺乳動物の生殖細胞ゲノム維持および遺伝的変異発生におけるMMRの寄与率はわかっていないため、本申請研究ではMMR機構を欠損させたマウスを用いて実験的解析を行う。また、これらのマウスを利用することで、環境変異原の次世代影響を高感度にモニターできる可能性があるため、次世代シーケンサーによる網羅的ゲノム解析手法を用いた評価系への利用を検討する。

2. 研究の目的

「生殖細胞で新たに生じ次世代に伝わるゲノム変異の発生と抑制に関する分子メカニズムを理解し、環境ストレスの遺伝性影響を、効率的に解析・評価する系を樹立すること」を目的としている。野生型生物での自然突然変異率は極めて低いことからその検出は容易でない。そこで自然突然変異率が野生型の数倍に上昇したDNA修復機構欠損マウスの親子サンプルを利用することで、変異の検出効率を上げ、誘発される種々の変異を高感度に検出できる実験系を検討し、異なる変異原に対応可能な評価系の樹立を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス家系の樹立と維持：

本研究ではミスマッチ修復に必須の因子で

あるMSH2タンパク質をコードする*Msh2*遺伝子ノックアウトマウスを使用した。*Msh2*ヘテロマウスの雌雄の交配により得られたホモ欠損マウスの雌雄ペアとその子、さらに変異発生における雌雄の生殖細胞系列の違いを観察する目的で、方親のみ*Msh2*ホモ欠損で対親を野生型マウスとした交配を行った。交配に用いた全てのマウスの尾と臓器サンプルを保存し、ゲノム解析に用いた。全ての交配記録ならびに表現型の記録を保管した。

(2) 全エクソームシーケンス解析と新規生殖細胞変異の検出：

各マウスの尾を用いてゲノムDNAを精製し、全エクソーム解析(50Mb)を行った(受託)。全エクソンキャプチャーにはSureSelect Mouse All Exon Kit (Agilent Technologies)を用い、HiSeq2500で100bpペアエンドのシーケンス解析を行った。リードはマウスのリファレンスゲノム(mm10)に対してマッピングを行い(BWA)、一塩基置換型変異や挿入・欠失(Indel)の検出を行った(SAMTOOLS)。コールされた一塩基置換、Indelのうち、親が持たず、子でのみ検出された変異をde novo mutation (DNM)候補とし、さらにサンガー法などによりバリデーションを行い、DNMsの数とスペクトルを同定し、種々の解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウス家系の樹立と維持：

*Msh2*ホモ欠損マウスは雌雄ともに生殖可能であるが、両親ともホモ欠損での交配からは、子は生まれるものの、多くの場合離乳まで育たず、生後すぐに死亡する個体も多かった。死亡した子マウスには目立った外表奇形などは認めなかった。オスがヘテロ欠損でメスがホモ欠損の交配で得られたホモ欠損の子マウスは育つことから、ホモ欠損メスの育児能力の問題ではないが、現段階ではホモ欠損同士の交配での高い新生児死亡率の原因は不明である。オスまたはメスのホモ欠損マウスを野生型マウスと交配して得られた子は、de novo変異の遺伝性の確認用のために、さらに野生型マウスと交配し、第3世代まで作成しサンプリングした。

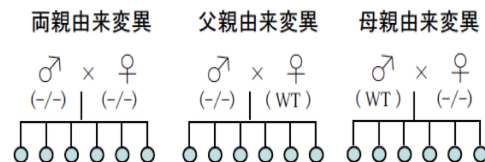


図1)マウスの交配組合せ

図1に示したように変異の親由来の同定のために*Msh2*ホモ欠損マウス同士の交配を3家系、オス由来変異の同定のために*Msh2*ホモ欠損オスと野生型メスの交配2家系、*Msh2*ホモ欠損メスと野生型オスの交配2家系を作出し、それぞれ全ての親と生まれた子供の

臓器の一部を凍結保存しアーカイブ化した。

(2) 全エクソーム解析と新規生殖細胞変異の検出:

次世代シーケンサーによる解析の結果、すべてのサンプルで、対象領域に対するカバレッジは98%、平均 depth は65であり、次世代シーケンス解析を行うにあたり、サンプル調整法やデータマッピングの妥当であると考えられた。シーケンスデータはマウスリファレンス配列 mm10 にマッピングし、リファレンス配列と異なる配箇所を、一塩基置換型変異と欠失/挿入変異の検索を行った。日本クレア株式会社から購入した野生型 C57BL/6Jcl マウスでは各個体それぞれ一塩基置換は約1100 サイト、Indel は約700 サイトがコールされた(SAMTOOLS)。ここからさらに体細胞変異やマッピングエラーを除くためのフィルタリングを行い、複数の個体で共通に検出されたサイトを抽出した。一塩基置換型変異は約200 サイトが残り、このうち約50 サイトでは変異アリルがホモで検出されており、これらの85%が dbSNP であった。変異アリルがヘテロで検出されたサイトでは約70%が dbSNP であった。フィルタリング後に残った約80 サイトの Indel のうち、70%で変異アリルがホモで検出された。これらは今回使用したマウス個体が有する SNV またはマウス集団中の SNP であると考えられた。

次に、*Msh2* 欠損マウスの親と子のシーエンスデータより1世代で生じた de novo 生殖細胞変異の検出を行った。その結果、両親とも *Msh2* ホモ欠損である場合、1世代あたりに発生した一塩基置換型変異は平均11.7個であった。この値から全ゲノムあたりの de novo 変異率を計算すると 1.18×10^{-7} /bp/世代となり、これまでに報告されている野生型 (C57BL/6J) マウスの変異率 (Uchimura et al., 2015, 論文業績1) の20倍以上に相当することが明らかとなった。一塩基置換型変異のスペクトル解析の結果、G:C>A:T 変異が最も多く全体の50%以上を占めていた。これらの変異サイトの周辺の塩基組成の特徴を抽出するため、変異スペクトルと変異サイトの前後1塩基の組成ごとに、96タイプに分類して頻度をプロットしたところ、G:C>A:T 変異は NpCpG 配列に集中して発生していた。今後5-メチルシトシンとの関連に関して、より詳細に解析を進める予定である。

変異の親由来を明らかにするために、*Msh2* ホモ欠損マウスと野生型マウスの交配から得られた子を用いて解析したところ、*Msh2* ホモ欠損マウスがオスの場合もメスの場合も、1世代あたりに発生した一塩基置換型変異の頻度に大きな差はなく、両親ともホモ欠損の交配時の結果のほぼ半分であったことから、*Msh2* 欠損の影響は雌雄ともに現れることがわかった。今回交配に用いた生後3ヶ月齢時では、配偶子形成までに通過する細胞分裂回数が雌雄間で大差がないため、このこと

が雌雄間で変異頻度が同程度であった理由と考えられた。

さらにこのマウス家系で特徴的な変異として、Indel が野生型の170倍以上の頻度で検出された。特に2塩基の反復配列 (ミニサテライト、マイクロサテライト) における数ユニットの挿入/欠失が頻発していた。マイクロサテライト不安定性はヒトのミスマッチ修復不全のがんで発生する特徴的な変異として知られている。また、ミニサテライト、マイクロサテライトのリピート回数は個人や種を同定する際の多型情報として利用されており、今回の研究で、ミスマッチ修復機構は生殖細胞系列における塩基配列多様性の創出と制御に深く関与していることが明らかとなった。今後の課題としては、より正確な変異同定のパイプライン、特にリピート配列での変異の効果的な検出方法などの開発が望まれる。

今回の研究結果より、*Msh2* 遺伝子欠損マウスは雌雄ともに通常飼育下における de novo 生殖細胞変異の発生率が野生型に比較して高く、対象ゲノム領域が約50Mbのエクソーム解析でも基底レベルの変異を十分検出可能であり (野生型マウスでは検出感度以下である) 放射線や化学物質を始めとする環境ストレスの次世代影響の迅速で低コストな評価解析に利用可能であることを示した。

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3件)

1. Uchimura, A., Higuchi, M., Minakuchi, Y., Ohno M., Toyoda A., Fujiyama, A., Miura, I., Wakana, S., Nishino, J., Yagi, T., Germline mutation rates and the long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice, *Genome Research*, 25, 1125-1134; DOI: 10.1101/gr.186148.114 (2015) [査読有]
2. Ohno, M., Sakumi, K., Fukumura, R., Furuichi, M., Iwasaki, Y., Hokama, M., Ikemura, T., Tsuzuki, T., Gondo, Y., Nakabeppu, Y.: 8-Oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice, *Scientific Reports*, 4:4689 DOI: 10.1038/srep04689 (2014). [査読有]
3. Piao, J., Nakatsu, Y., Ohno, M., Taguchi, K., Tsuzuki, T.: Mismatch repair deficient mice show susceptibility to oxidative stress-induced intestinal carcinogenesis, *Int. J. Biol. Sci.*, 10, 73-79; DOI: 10.7150/ijbs.5750 (2014). [査読有]

〔学会発表〕(計 33 件)

1. Mizuki Onno, Maintenance of genome integrity: rate, causes and consequences of de novo germline mutation, 日本分子生物学会, 2016.11.30.
2. 大野みずき, 作見邦彦, 中別府雄作, Regulation of base substitution mutagenesis and chromosome recombination induced by 8-oxoguanine accumulated in the genome, 日本分子生物学会, 2016.12.03.
3. 鷹野典子, 大野みずき, 中津可道, 中別府雄作, 續輝久, Mutyh 欠損マウスにおける酸化ストレスによる消化管腫瘍発生頻度上昇と特異的体細胞変異シグネチャーの解析, 日本分子生物学会, 2016.12.01.
4. 大野みずき, 鷹野典子, 佐々木史子, 中津可道, 續輝久, ミスマッチ修復欠損マウスを用いた新規生殖細胞変異の検出, 第 45 回 日本環境変異原学会, 2016.11.17.
5. 大野みずき, 鷹野典子, 中津可道, 中別府雄作, 續輝久, 酸化ストレスによる消化管腫瘍発生頻度上昇と特異的体細胞変異シグネチャー: Mutyh 欠損マウスを用いた解析, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016.10.07.
6. 大野みずき, 体細胞と生殖細胞のゲノム維持における酸化損傷 DNA の修復機構の重要性, 日本遺伝学会第 88 回大会, 2016.09.07.
7. 大野みずき, 親から子へ遺伝情報が伝達されるとき、その品質はどのように維持・管理されているか?, 第 16 回遺伝学談話会, 2015.12.08.
8. 大野みずき, 鷹野典子, 佐々木史子, 日高京子, 中津可道, 續輝久, ミスマッチ修復欠損マウスにおける生殖細胞ゲノム変異の解析, 日本環境変異原学会, 2015.11.27.
9. 大野みずき, 酸化塩基 8-オキソグアニンはほ乳動物におけるゲノム多様性の原因である, 日本遺伝学会, 2015.09.24.
10. 作見邦彦, 大野みずき, 古市正人, 續輝久, 中別府雄作, 生殖細胞自然突然変異の新規発生と変異アリアルルの伝達, 第 44 回 日本環境変異原学会, 2015.11.27.
11. 大野みずき, 鷹野典子, 中津可道, 中別府雄作, 續輝久, 酸化ストレス誘発消化管発がん突然変異の抑制における MUTYH の役割 The role of MUTYH in oxidative stress-induced mutagenesis and tumorigenesis in the mouse intestine, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015.10.08.
12. 作見邦彦, 大野みずき, 権藤洋一, 續輝久, 中別府雄作, Mth1, Ogg1, Mutyh 三重欠損マウス家系を用いた生殖細胞突然変異の解析, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015.10.08.
13. 大野みずき, 鷹野典子, 佐々木史子, 中津可道, 續輝久, 次世代ゲノム遺伝情報維持におけるミスマッチ修復の役割, 日本遺伝学会, 2015.09.25.
14. 中別府雄作, 岡素雅子, 盛子敬, 大野みずき, 土本大介, 作見邦彦, 活性酸素による DNA 損傷が引起こすさまざまな生命現象: 突然変異から神経変性まで, 日本進化学会, 2015.08.21.
15. Mizuki Ohno, Noriko Takano, Kunihiko Sakumi, Ryutaro Fukumura, Yuki Iwasaki, Toshimichi Ikemura, Yoichi Gondo, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki, Role of the oxidative DNA damage repair system in somatic and germline mutations in mice, Zing conference "Genome Integrity", 2015.08.04.
16. Ohno Mizuki, Takano Noriko, Sakumi Kunihiko, Ryutaro Fukumura, Yuki Iwasaki, Toshimichi Ikemura, Yoichi Gondo, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki, Influence of oxidative DNA damage on the rate of somatic and germline mutation, 15th International Congress of Radiation Research, 2015.05.27.
17. 大野みずき, 鷹野典子, 佐々木史子, 田口健一, 中別府雄作, 青木康展, 能美健彦, 中津可道, 續輝久, Mutyh 遺伝子欠損マウスを用いた酸化ストレス誘発消化管がんの解析, 日本環境変異原学会 第 43 回大会, 2014.12.
18. Mizuki Ohno, Oxidative DNA damage and its repair system: implications for de novo germline mutations, 第 38 回日本分子生物学会, 2014.11.25.
19. 作見邦彦, 大野みずき, 福村龍太郎, 権藤洋一, 岩崎裕貴, 池村淑道, 續輝久, 中別府雄作, 8-oxoguanine に起因して新たに生じた生殖細胞突然変異の解析, 第 37 回日本分子生物学会, 2014.11.
20. 大野みずき, 鷹野典子, 佐々木史子, 李贊, 田口健一, 中別府雄作, 中津可道, 續輝久, 酸化ストレス誘発突然変異と消化管がんの解析, 日本放射線影響学会第 57 回大会, 2014.10.02.
21. 作見邦彦, 大野みずき, 福村龍太郎, 権藤洋一, 岩崎裕貴, 池村淑道, 續輝久, 中別府雄作, DNA 酸化損傷修復欠損マウスの継代実験で捉えられた遺伝現象, 日本遺伝学会第 86 回大会, 2014.09.17.

22. Mizuki Ohno, DNA 修復因子欠損マウス家系を用いた de novo germline mutation の解析, 環境変異原学会 変異機構研究会 第 27 回夏の学校, 2014.06.21.
23. Yusaku Nakabeppu, Ohno Mizuki, Sakumi Kunihiko, Oxidation of nucleic acids and control mechanisms of genetic diversity in mammals, International Symposium on Germline Mutagenesis and Biodiversification, 2014.03.21.
24. Ohno Mizuki, Sakumi Kunihiko, Fukumura Ryutaro, Iwasaki Yuki, Ikemura Toshimichi, Teruhisa Tsuzuki, Gondo Yoichi, Yusaku Nakabeppu, 8-Oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations: a study from the mutator mouse line, SMBE Satellite Meeting / NIG International Symposium: The Causes of Genome Evolution, 2014.03.15.
25. Yusaku Nakabeppu, Ohno Mizuki, Sakumi Kunihiko, Oxidation of nucleic acids by reactive oxygen species and control mechanisms of genetic diversity in mammals, International Symposium between Kyushu University Post-Global Centers of Excellence Program and School of Biomedical Sciences, 2014.02.07.

〔図書〕(計 2 件)

1. Nohmi, T., Tsuzuki, T.: Possible mechanisms underlining genotoxic thresholds: DNA repair and translesion DNA synthesis (Chapter 4), Thresholds of Genotoxic Carcinogens - From Mechanisms to Regulation, Eds. Nohmi, T., Fukushima, S., Academic Press, 総ページ数 210(分担: pp. 49-66) (2016).
2. 續輝久, 大野みずき, 中津可道 (III-2-(6))酸化 DNA 損傷と大腸発癌)、日本臨牀(増刊号)最新臨床大腸癌学 基礎研究から臨床応用へ株式会社 日本臨牀社、総ページ数 715(分担: pp. 141-146) (2015).

〔その他〕

ホームページ等

<https://biophys.wp.med.kyushu-u.ac.jp>
(九州大学・大学院医学研究院・基礎放射線医学分野)

アウトリーチ活動情報:

1. 「サマーサイエンスセミナー いのちをつなぐ DNA の不思議」(2016 年 8 月 6 日、九州大学馬出キャンパス)
2. 「サマーサイエンスレクチャー」(2015 年 8 月 19 日、九州大学馬出キャンパス)
3. 「DNA の不思議を学ぶ -- 夏休みサイ

エンス体験学習 2014」2014 年 8 月 15 日、九州大学馬出キャンパス)

4. 「夏休みサイエンス体験学習」(福岡市東区名島校区子ども会、2014 年 8 月)

報道関連情報

1. 酸化された DNA が子孫に伝える遺伝子を変化させる原因に:生殖細胞突然変異の原因となる 8-オキソグアニン(2014 年 4 月 16 日)(日刊工業新聞、マイナビニュース、西日本新聞)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大野 みずき (OHNO, Mizuki)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 7 0 3 8 0 5 2 4

(2)研究分担者

續 輝久 (TSUZUKI, Teruhisa)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 4 0 1 5 5 4 2 9
研究者番号:

(3)連携研究者

作見邦彦 (KUNIHICO, SAKUMI)
九州大学・生体防御研究所・准教授
研究者番号: 5 0 2 1 1 9 3 3