

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12205

研究課題名(和文)モザイク変異を指標とした生殖細胞遺伝毒性試験の開発

研究課題名(英文) In vivo genotoxicity test focusing on mosaic mutations in germline cells

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：子供のゲノム情報に影響を及ぼす、生殖細胞の遺伝毒性を正確に捉えることは重要である。次世代シーケンサーの発展により、全ゲノムレベルで変異の発生を捉えることは可能になった。しかしながら、生殖細胞の遺伝毒性を全ゲノムレベルで捉えるための方法論は存在しない。私たちは、次世代シーケンサーを用いた解析の実験条件を大幅に改良することで、通常では、信頼性高く検出することが難しい「モザイク変異(組織中の一部の細胞が保持する変異)」を効率よく捉えることが可能になった。これにより全ゲノムレベルでの変異の発生を直接的に捉えることが可能な、新しい遺伝毒性試験の方法論を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：Accurate detection of germline mutagenesis is very important for risk management of genotoxicity. In this study, we tried to develop a new method detecting in vivo germline mutagenesis directly by using next generation sequencing technique. As a result of our efforts, we could detect many mosaic state mutations in tissues. We think that this method is useful as a new genotoxicity test.

研究分野：遺伝学

キーワード：突然変異 生殖細胞

## 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞の遺伝毒性の評価には、レポーター遺伝子が導入されたトランスジェニック (Tg) 齧歯類 (Big Blue マウス、gpt-delta ラット等) が有用であり、世界的にも広く利用されている。しかしながら、Tg 動物を用いた評価系では、ゲノムの遺伝子間領域等に人工的に挿入された外来遺伝子の領域で発生した変異が主な対象となっており、ゲノム全域で遺伝毒性を評価するための方法論として、ゲノム全域を対象とした新しい生殖細胞の遺伝毒性試験の開発が望まれている。近年のゲノムシーケンシング技術の急速な発展により、マウスやヒトを対象とした、各個体の全ゲノム配列の解読も容易になり、両親とその子供のゲノム配列を比較する「トリオ解析」が精力的に行われ、生殖系列で発生する de novo 変異の同定も進められている (Kong et al, 2012)。しかしながら、「トリオ解析」を遺伝毒性試験として利用するためには、対象物質で処理された各被検体に対して、少なくとも、被検体本人、その配偶者、子供の計 3 個体分の全ゲノム解析が必要であり、多大な費用と労力がかかることが障壁となっている。

私たちは、これまでの研究において、哺乳類の生殖系列で発生する突然変異の生理学的な機能や後世代影響を明らかにするため、実験用マウス (C57BL/6 系統) を用いて、長期間、継代を繰り返すことで、世界的にも例のない突然変異蓄積システムの構築に取り組んできた。本研究を開始する時点 (2015 年 4 月) では、9 年間に及ぶ継代がなされており、最大 27 世代の継代が終了していた。本研究では、これらのマウス変異蓄積システムを利用して、次世代シーケンサーを用いた新規の突然変異検出方法を開発することで、「トリオ解析」に比べて、効率よい解析が実施可能な「ゲノムワイドな生殖細胞遺伝毒性試験」が構築できないかと考えた。

## 2. 研究の目的

私たちがこれまで構築してきた次世代シーケンサーを利用した解析パイプラインでは、高い精度で de novo 変異を検出することが可能である。本研究では、これらの技術を、さらに発展させることで、通常では、検出することが難しい、「ホモ接合型変異 (変異アリルの頻度が 100%)」、「ヘテロ接合型変異 (変異アリルの頻度が 50%)」よりも低いアリル頻度をもつ変異 (モザイク変異) を高感度に検出するための方法論の構築に取り組む。これにより、新しい生殖細胞の遺伝毒性試験を構築しようと考えた。変異アリルの存在頻度が低いモザイク変異は、生体組織の発生過程で生じた変異であり、組織中にモザイクの状態で存在すると考えられる。本研究に成功すれば、複数の細胞系譜の上で発生したモザイク変異を網羅的に、かつ高感度に捉えることができると考えられる。従来までのト

リオ解析等の実験モデルは、単一の細胞系譜上で発生し、蓄積されてきた変異のみが解析の対象となっており、その検出数は限られていた。本研究に成功すれば、一度の解析で、複数の細胞系譜上で発生した変異を捉えることが可能になる。そのため、本方法には、ゲノムワイドな遺伝毒性試験として、大きなアドバンテージが存在すると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) 突然変異の解析に適した突然変異蓄積マウス系統の構築:

次世代シーケンサーを用いた解析で、高い精度で突然変異の検出するためには、真の突然変異を示す変異リードと実験操作上のアーティファクトを区別することが重要になる。それらを正確に捉える変異検出系を構築する上で、多数の変異が蓄積されている変異蓄積マウス系統は特に有用である。本研究では、変異解析を効果的に進めていくための方法論として、これまでに樹立した変異蓄積システムの継代を継続させ、さらに高度なリソースの構築に取り組む。本リソースを利用することで、高精度な変異検出系の開発を進めてきた。

(2) モザイク変異の候補を効率的に選抜するための解析パイプラインの構築:

低い頻度で存在するモザイク変異を、正確に捉えるためには、高いカバレッジでシーケンシングすることが必要になる。本研究では、マウスの tail 由来のゲノム DNA を 100x カバレッジで全ゲノムシーケンシングした解析データを利用して、ゲノムデータのマッピングや変異コールの方法論を最適化することで低頻度の変異リードを捉えるための方法論の構築に取り組んだ。

(3) アンプリコンシーケンシング法を利用したモザイク変異のアリル頻度の定量:

組織中に低い頻度で存在する変異アリルの頻度を正確に測定するためには、アンプリコンシーケンシング法を利用するのが最適である。ハイスループットな解析を安定的に、かつ高精度に実施するため、使用する次世代シーケンサーのプラットフォーム、PCR で使用するプライマー配列の設計方法、マルチプレックス PCR の反応条件、さらには、次世代シーケンサー用のライブラリ調製のためのプロトコルなど、各種、条件をふって、検討することで、安定的に解析に利用できる実験系の構築に取り組んだ。

(4) 変異蓄積マウスシステムを利用したモザイク変異の検出とその特徴の解析:

アンプリコンシーケンシング法を利用して、多数の変異が蓄積された変異蓄積マウス系統のゲノム DNA を、世代を溯って解析することで、胚発生期の初期に発生すると想定されるモザイク変異の発生頻度や変異スペクトラムを解明した。また、同一個体の複数の組織において、それらのモザイク変異の頻度がどのように推移するか解析した。これに

より、組織中に含まれるモザイク変異の頻度を正確に捉えることができるか確認するとともに、本方法が、どのような組織に対して適用可能になるか、検証を進めてきた。これにより、「ゲノムワイドな生殖細胞遺伝毒性試験」の方法論の構築に取り組んだ。

#### 4. 研究成果

(1)高品質な突然変異蓄積マウス系統の開発に成功した。:

本研究期間を通して、変異蓄積系統のマウスの継代を繰り返すことで、より多くの変異が蓄積された変異蓄積系統の樹立に成功した。本研究を開始する時点(2015年4月)では、9年間で最大27世代の継代がなされていたが、本研究の終了時点(2018年3月)では12年間で最大35世代の継代がなされるに至った。継代過程の全てのマウスのゲノムDNAは保存されている。このような実験モデルは、世界的に見ても他に類をみないものであり、重要なリソースだと考えられる。

(2)高効率にモザイク変異を検出するための方法論の構築に成功した。:

低い頻度で存在するモザイク変異を検出する際には、実験操作上のアーティファクトを取り除くことに加えて、タンデムデュプリケーションを起こしたゲノム領域など、マッピングで使用した参照配列と実際のゲノム配列との相違に起因するような変異を取り除くことも重要になる。このような問題を解析するため、本研究では、以下のアプローチをとることで、解析系の改善に取り組んだ。その結果、高効率にモザイク変異を検出できる実験系の構築に成功した。

[モザイク変異解析用のアクセス可能ゲノム領域の設定に成功した]変異蓄積系統由来のマウスのゲノムDNAを用いた全ゲノムシーケンシングでは、多数の変異が蓄積されているため、ゲノム全域に対して、「高い精度で解析が可能なゲノム領域」と「解析が難しいゲノム領域」を区別することが、比較的、容易である。本研究において、いくつかの解析条件を試した結果、効率的にモザイク変異の解析が実施できるゲノム領域の設定方法を構築することに成功した。

[モザイク変異の候補から偽陽性を取り除く最適な変異フィルターの設定に成功した]上記のゲノム領域に限定して解析を行っても、なお、低頻度の変異リードとして混入してくるアーティファクトが存在する。これらを取り除くため、独自の工夫を重ねた変異の選定方法を取り入れることで、混在していたアーティファクトの多くを取り除くことが可能になった。

(3)ハイスループットで高精度なモザイク変異のアリル頻度測定法の構築に成功した。:

アンプリコンシーケンシング法で得られる実験の結果は、使用する次世代シーケンサーのプラットフォームによって、解析可能な変異の種類が異なることが分かった。挿入欠失

型のモザイク変異を解析する際には、解析精度に特に大きな違いが認められた。ここで得られた測定結果について、理論モデルに基づき、in silico で検証した結果、私たちが開発した測定方法は、高い信頼性をもつことが明らかになった。

(4)上記の方法で解析を進めた結果、実際に数多くのモザイク変異を検出することに成功した。それによって、野生型マウスで自然発生するモザイク変異の発生頻度が明らかになった。また、モザイク変異として発生する変異は、生殖細胞で発生する生殖系列変異とは異なるスペクトラムをもつことが分かった。さらに、モザイク変異の存在頻度は、それぞれの変異ごとに組織間で異なることも分かった。生殖細胞と体組織の間では、モザイク変異の存在頻度の傾向が異なる可能性が示唆された。今回の研究成果には、従来までに予想されていなかった重要な科学的知見が含まれていたため、現在は、別の方法により、それらの科学的な知見を裏付けるための実験に取り組んでいる。本研究で得られたモザイク変異解析の詳細な結果については、それらの確認実験の結果と併せて、論文発表する予定である。

上記のように、本研究では、モザイク変異を検出するための方法論の構築に成功し、それらの変異の発生動態を明らかにすることに成功した。哺乳類個体において、in vivo で突然変異の発生を直接的に捉えるための方法論が構築されたことになる。このことは、次世代シーケンサーを用いた全く新しい遺伝毒性試験の方法論が構築されたことを意味している。さらなる研究により、より広範囲な対象に対して利用可能な実験系になると考えられるため、今後も、そのような研究に取り組んでいきたいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 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

内村有邦、生殖系列の変異率と変異蓄積マウス系統、実験医学、Vol.33、pp.3123-3126 (2015)

内村有邦、八木健、集団遺伝学から考える脳の進化、Clinical Neuroscience、Vol.33、pp.909-911 (2015)

Uchimura A, Higuchi M, Minakuchi Y, Ohno M, Toyoda A, Fujiyama A, Miura I, Wakana S, Nishino J and Yagi T, Germline mutation rates and long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice, Genome Research, 査読有, Vol.25, pp.1125-1134 (2015), DOI: 10.1101/gr.186148.114

〔学会発表〕(計 10 件)

内村有邦、変異蓄積マウス系統は、放射線の遺伝的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

内村有邦、Germline mutation rates and mutation accumulation lines in mice、第 29 回国際哺乳類ゲノム会議、2015 年

内村有邦、マウス変異蓄積統計を利用した生殖系列の突然変異率の推定、日本遺伝学会第 87 回大会、2015 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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

樋口真弓 (HIGUCHI, Mayumi)  
大阪大学・生命機能研究科・特任技術職員