

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03619

研究課題名(和文) 拡張エクソーム解析による疾患モデルラットの原因変異の網羅的探索

研究課題名(英文) Searching for causative mutations of disease model rats by using expanded exome analysis

研究代表者

須山 幹太 (Suyama, Mikita)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：70452365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：疾患モデルラットについて、エクソン部位と非コード領域の保存部位を標的としたターゲットキャプチャーシーケンシングを行い、疾患原因変異の探索を行った。有力な候補変異の検出には至っていないが、これまでに蓄積したシーケンスデータの解析からラット系統には祖先多型が多く残っていることを見出した。特にそのような多型は免疫系遺伝子群や嗅覚受容体遺伝子群に多く集積していた。すなわち祖先において多くのアリルが存在している領域でこのような多型が見られるものと考えられる。さらに、これらの領域では近交系であっても今なおヘテロ接合体が多数見られ、平衡選択が働いているものと解釈できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により多くのラット系統の変異情報の蓄積が進んだ。また、これらの情報を活用し、ラット系統には祖先多型が多く見られること、それらの多型が特定の領域に集中していること、さらにそういった領域には平衡選択が働いていることが示された。また本研究により蓄積した変異情報は、疾患モデルラットを対象とした連鎖解析を進めるにあたり、有用なマーカーを提供するものであり、疾患原因となる遺伝子座の効率的な絞り込みを可能とするものである。また、ゲノム編集を行う際のオフターゲットの予測にも活用できるものである。

研究成果の概要(英文)：Target capture sequencing that is designed to selectively sequence exons and conserved non-coding regions was performed to search for disease-causing mutations in disease model rats. Although no significant candidate mutations have yet to be detected, we found that many ancestral polymorphisms remain in the rat strains based on the analysis of sequencing data accumulated so far. In particular, such polymorphisms were abundantly accumulated in genes involved in the immune system and olfactory receptors. These polymorphisms are likely to be found in regions where many alleles had been presented in the ancestral strains. Furthermore, the fact that there are still many heterozygotes in these regions, although they are inbred strains, can be interpreted as balancing selection is working on these regions.

研究分野：情報生物学

キーワード：疾患モデル動物 ラット ターゲットキャプチャー エクソーム バイオインフォマティクス 比較ゲノム

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) エクソーム解析は、次世代シーケンサーの登場と、それに続くターゲットキャプチャ法の開発により可能になった技術である。これまでヒトやマウスにおけるエクソーム解析から、様々な表現型の原因変異が同定されてきた。しかし、ラットにおいては、優れた疾患モデル動物であるにも関わらず、エクソーム解析が行われてこなかった。そこで私達のグループで、独自にラットのためのエクソーム解析法の開発を行ってきた。

(2) ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」では、様々な疾患モデルラットの維持・管理が行われているが、そのゲノム解析は十分には進んでいなかった。そこで、私達のグループでは、それらのラット系統のエクソーム解析および全ゲノムリシーケンシングを行ってきた。

2. 研究の目的

(1) 本課題は、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」が保有する様々な疾患モデルラットを対象にした網羅的エクソーム解析から、それらの疾患原因変異を同定することを目的とし、原因遺伝子に基づく発症機構の解明を目指す。その際の解析手法として、エクソン領域以外にも脊椎動物ゲノムで高度に保存した部位もターゲットとした拡張エクソーム解析を適用し、遺伝子発現制御領域での変異も検出可能とする。

(2) 拡張エクソーム解析から得られたゲノム全体に渡る変異情報は、疾患原因変異の探索だけでなく、系統間を識別する遺伝的マーカーとしても有用なものである。そこで、これまでに得られている各系統の多型情報をもとに、系統間の識別効率が良い多型を、ゲノム全体をカバーするように選び、それらを標的としたターゲットキャプチャキットを作成する。これにより、高解像度の連鎖解析が可能となるだけでなく、系統の維持管理にも役立てることができる。

3. 研究の方法

(1) ラットゲノムのエクソン領域と脊椎動物で高度に保存した非コード領域を対象とした拡張エクソーム解析を用い、様々な疾患モデルラット系統に適用することで、その表現型の原因と考えられる候補変異を探索した。

(2) これまでに蓄積した様々なラット系統の変異情報をもとに、連鎖解析のための SNP セットを選び、それらの領域を標的としたターゲットキャプチャキットを作成した。その際、SNP セットの選択基準としては、次の2点を考慮した。すなわち、任意のラット系統ペアの識別を最も効率よく行えるもの、また、ゲノム領域にそれらが均等に配置するようなもの、とした。これらの条件を満たす SNP セットを効率的に選び出すプログラムを独自に開発した。

4. 研究成果

(1) 拡張エクソームキットを開発し、その性能を評価した。平均深度20で解読するのに必要なリード数を割り出し、十分なバリエーションコールが行えることを確認した。

(2) 拡張エクソームを複数の疾患モデルラットに適用したところ、てんかん発症モデルである Noda epileptic rat (NER) 系統において、その原因となる遺伝子の絞り込みに活用できた(文献1)

(3) 変異情報を活用した連鎖解析キットの開発を行った。これは、拡張エクソームによる疾患原因変異の絞り込みがうまく進まない場合の対策として、連鎖解析も併用することで、より確度の高い原因変異および遺伝子の同定を行うためである。これまでに得られている様々な系統の SNP 情報の中から、系統間の識別効率がよい SNPs を約 3 万個選び、それらを標的としたターゲットキャプチャキットを作成した。この 3 万個はゲノム全体をカバーするように選んだ。シミュレーションの結果から、ランダムに選んだ系統ペアについて、およそ 0.3 Gb の解像度で連鎖解析を行うことが可能であることが示された。3 つの表現型について、このキットを用いた連鎖解析を進めている。

(4) 変異情報を活用したラット系統間の比較ゲノム解析を行ったところ、大変興味深い変異パターンを見出した。すなわち、非常に近縁な垂系統間で見られる多型と同じものが、それらよりも遠い関係にある系統間にも見られる、というものである(図1)。これらの多型は、共通祖先系統にすでに存在していた多型(ancestral polymorphism)であると考えられた。こういった多型部位はゲノム全体にわたって見られたが、特に免疫関連遺伝子や嗅覚受容体遺伝子によく観察され、この傾向はどの垂系統でも共通していた。また、解析を行ったラット系統はいずれも近交系であるにも関わらず、これらの遺伝子座にはヘテロ接合部位も多く見られた。以上より、これらの遺伝子座には、平衡選択(balancing selection)が働いていると推測した(文献2)。

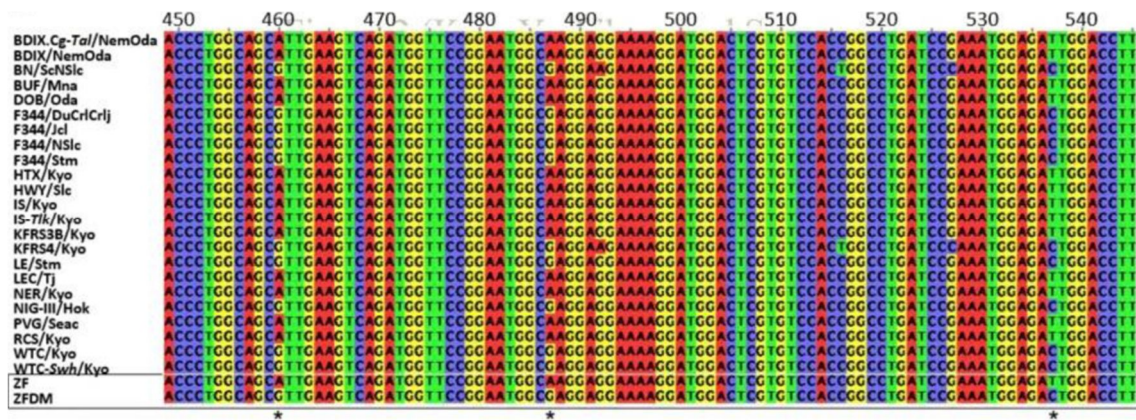


図1. 垂系統(下2系統: ZFとZFDM)に見られる多型(*印)が、残りの系統にも見られるゲノムアライメントの例

引用文献

1. Kuramoto T, Voigt B, Nakanishi S, Kitada K, Nakamura T, Wakamatsu K, Yoshihara M, Suyama M, Uemura R, Tanaka M, Kuwamura M, Shimizu S, Ohno Y, Sasa M, Serikawa T. Identification of Candidate Genes for Generalized Tonic-Clonic Seizures in Noda Epileptic Rat. Behav Genet. 47:609-619 (2017).
2. Kim H, Yoshihara M, Suyama M. Comparative genomic analysis of inbred rat strains reveals the existence of ancestral polymorphisms. Mamm Genome 31:86-94 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Kim H, Yoshihara M, Suyama M | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Comparative genomic analysis of inbred rat strains reveals the existence of ancestral polymorphisms. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Mammalian Genome | 6. 最初と最後の頁 86-94 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00335-020-09831-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Kuramoto Takashi, Voigt Birger, Nakanishi Satoshi, Kitada Kazuhiro, Nakamura Tadashi, Wakamatsu Kaori, Yoshihara Minako, Suyama Mikita, Uemura Risa, Tanaka Miyuu, Kuwamura Mitsuru, Shimizu Saki, Ohno Yukihiro, Sasa Masashi, Serikawa Tadao | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 Identification of Candidate Genes for Generalized Tonic?Clonic Seizures in Noda Epileptic Rat | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Behavior Genetics | 6. 最初と最後の頁 609 ~ 619 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10519-017-9870-2 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hyeon-jeong Kim, Minako Yoshihara, Mikita Suyama |
| 2. 発表標題 Phylogenetic analysis of 25 inbred rat strains. |
| 3. 学会等名 第3回木村資生記念 進化学セミナー |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mikita Suyama |
| 2. 発表標題 Exploring molecular basis of phenotype-genotype links using chromosome conformation data. |
| 3. 学会等名 The 7th Meeting on Grant-in-aid for Scientific Research on Innovative Areas "Chromosome Orchestration System", Stockholm, Sweden. (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 金賢正, 吉原美奈子, 須山幹太 |
| 2. 発表標題 ゲノムデータに基づく近交系ラット25系統の系統関係の解析 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会, 横浜. |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mikita Suyama |
| 2. 発表標題 Understanding gene regulation using chromosome conformation and epigenome data. |
| 3. 学会等名 The 8th Meeting on Grant-in-aid for Scientific Research on Innovative Areas "Chromosome Orchestration System", Yamagata, Japan. (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mikita Suyama |
| 2. 発表標題 Design and application of a target capture sequencing of exons and conserved non-coding sequences for the rat |
| 3. 学会等名 15th Annual Meeting of theComplex Trait Community in collaboration with the 10th Annual Meeting of Rat Genomics and Models (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Minako Yoshihara, Osamu Ohara, Takashi Kuramoto, Mikita Suyama |
| 2. 発表標題 Design and application of a target capture sequencing of exons and conserved non-coding sequences for the rat |
| 3. 学会等名 15th Annual Meeting of theComplex Trait Community in collaboration with the 10th Annual Meeting of Rat Genomics and Models (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kim Hyeon-jeong, 吉原美奈子、須山幹太 |
| 2. 発表標題 Phylogenetic analysis of 25 inbred rat strains |
| 3. 学会等名 2017 年度 遺伝研研究会「マウスとラットで拓く新しい比較実験動物学」 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 須山幹太 |
| 2. 発表標題 ラットゲノム解析ツール |
| 3. 学会等名 2017 年度 遺伝研研究会「マウスとラットで拓く新しい比較実験動物学」 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 藤 博幸、岩部 直之、川端 猛、浜田 道昭、門田 幸二、須山 幹太、光山 統泰、黒川 顕、森 宙史、東 光一、吉沢 明康、片山 俊明 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 講談社 | 5. 総ページ数 208 |
| 3. 書名 よくわかるバイオインフォマティクス入門 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 連携研究者 | 庫本 高志 (Kuramoto Takashi) (20311409) | 京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (14301) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 連携研究者 | 小原 収 (Ohara Osamu) (20370926) | 公益財団法人かずさDNA研究所・技術開発研究部・副所長 (82508) | |