

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06479

研究課題名(和文)改良型バルク法による新規本態性振戦モデルラットの原因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Improved bulked segregant analysis using next generation whole genome sequencing identifies the responsible gene for essential tremor like symptom in rats

研究代表者

岡村 匡史 (Okamura, Tadashi)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・実験動物管理室長

研究者番号：00333790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、自家繁殖していたラットにおいて、全身性に動的振戦を呈する個体を偶然発見した。本研究では、従来の染色体マッピングに用いられる交雑群を必要としない、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析により短期間でその原因遺伝子を同定した。発見当初は本態性振戦モデルラットとして有用であると考えていたが、原因遺伝子の機能を考えると全身性に代謝異常を引き起こし、様々な症状を呈しヒトの未診断疾患のモデル動物になると期待された。今後、ヒトの新規疾患の診断に役立つ情報を提供するために、本研究で同定した遺伝子の生体での機能をさらに明らかにしていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床的な所見を有しながら通常の医療の中で診断に至ることが困難な患者(未診断疾患患者)は、多数の医療機関でも診断がつかず、原因もわからず、治療方法も見つからないまま様々な症状に悩まされている。ヒトの疾患において、約7,000-9,000種類あるとされる単一遺伝子疾患のうち3,000余りは未だに原因遺伝子が同定されていない未診断疾患である。ヒトの未診断疾患においては、他の疾患以上にモデル動物の情報が必要とされている。本研究で用いたモデルラットは、ヒトの未診断疾患のモデル動物になると期待され、本研究が発展することで未診断疾患患者の診断および治療法の開発に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：There are many people living with a disease or condition that does not have a diagnosis. Some 3,000 of the estimated total 7,000 diseases caused by the mutation of single gene have little or no information about the genes responsible for their etiologies. Towards an end to the diagnostic odyssey, animal models will be invaluable tools to expand our understanding of undiagnosed diseases.

During F344 strain breeding process, we have discovered mutant rats with Essential Tremor like symptom as early as two weeks of age. In this study, we identified the causative gene by comparing the whole genome sequences of control F344 and mutant strains, which does not require backcross or intercross progeny used for conventional genetic linkage analysis. The further analyses using these mutant rats provide not only a better understanding of the pathogenesis and pathophysiology of undiagnosed disease but will also contribute to the development of new therapies.

研究分野：実験動物学

キーワード：本態性振戦 ラット 次世代シーケンサー バルク法

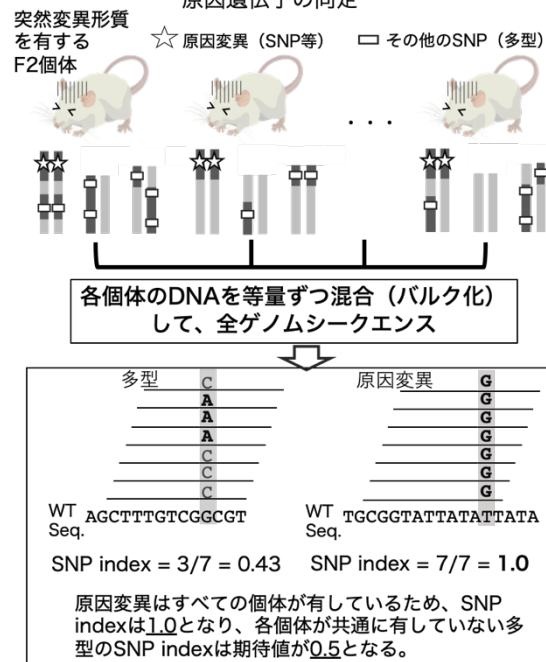
1. 研究開始当初の背景

ラットはマウスに比べ約 10 倍大きいため、経時的な採血が可能であり、外科的処置や移植実験の容易さから、様々な分野で利用されてきた。しかしその一方で、その体の大きさから、多くのラットを維持するためには、多大なコストがかかる。そのため、ラットにおいて原因遺伝子を同定するためには、マウス以上に使用する匹数を減らし、効率的に行う必要がある。

バルク法 (Bulked Segregant 解析) は、異なる形質を有している 2 種類の個体集団の各個体からそれぞれ DNA を抽出し、その DNA を集団毎に等量ずつ混ぜて解析する手法である。様々な遺伝子座における対立遺伝子型を大規模に比較した場合、「形質の差異に係わる遺伝子座」と「形質の差異にかかわっていない遺伝子座」では、対立遺伝子型のばらつきに差異が認められる。つまり、2 つの集団の差にかかわらない遺伝子座はバイアスがなく、どちらの集団でも同じような遺伝子型のばらつきになるのに対し、形質に関与する遺伝子座では、それぞれの集団で、対立遺伝子頻度の偏りが生じる。この方法を全ゲノムシーケンスと組み合わせることにより、効率的に原因遺伝子座および原因変異を同定する方法がイネにおいて示されている (Nat. Biotechnol. 2012)。具体的には、突然変異個体と野生型を交配して作製した、突然変異形質を持つ複数の F2 個体の DNA を等量混合し、そのバルク DNA を次世代シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンスを行う (図 1)。原因遺伝子は、突然変異形質を持つすべての F2 個体が有しているため、SNP をコールしたリードを総リード数で割った SNP index は 1.0 となる。一方、原因変異以外は、各個体が共通に有していないためその期待値は 0.5 となる。しかし、この方法では突然変異形質を持つ F2 個体を 20 匹程度作製しなければならず、その時間および飼育費用のコストを大幅に軽減することはできない。

バルク法 (Bulked Segregant 解析) は、異なる形質を有している 2 種類の個体集団の各個体からそれぞれ DNA を抽出し、その DNA を集団毎に等量ずつ混ぜて解析する手法である。様々な遺伝子座における対立遺伝子型を大規模に比較した場合、「形質の差異に係わる遺伝子座」と「形質の差異にかかわっていない遺伝子座」では、対立遺伝子型のばらつきに差異が認められる。つまり、2 つの集団の差にかかわらない遺伝子座はバイアスがなく、どちらの集団でも同じような遺伝子型のばらつきになるのに対し、形質に関与する遺伝子座では、それぞれの集団で、対立遺伝子頻度の偏りが生じる。この方法を全ゲノムシーケンスと組み合わせることにより、効率的に原因遺伝子座および原因変異を同定する方法がイネにおいて示されている (Nat. Biotechnol. 2012)。具体的には、突然変異個体と野生型を交配して作製した、突然変異形質を持つ複数の F2 個体の DNA を等量混合し、そのバルク DNA を次世代シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンスを行う (図 1)。原因遺伝子は、突然変異形質を持つすべての F2 個体が有しているため、SNP をコールしたリードを総リード数で割った SNP index は 1.0 となる。一方、原因変異以外は、各個体が共通に有していないためその期待値は 0.5 となる。

図1. 次世代シーケンサーを用いたバルク法による原因遺伝子の同定



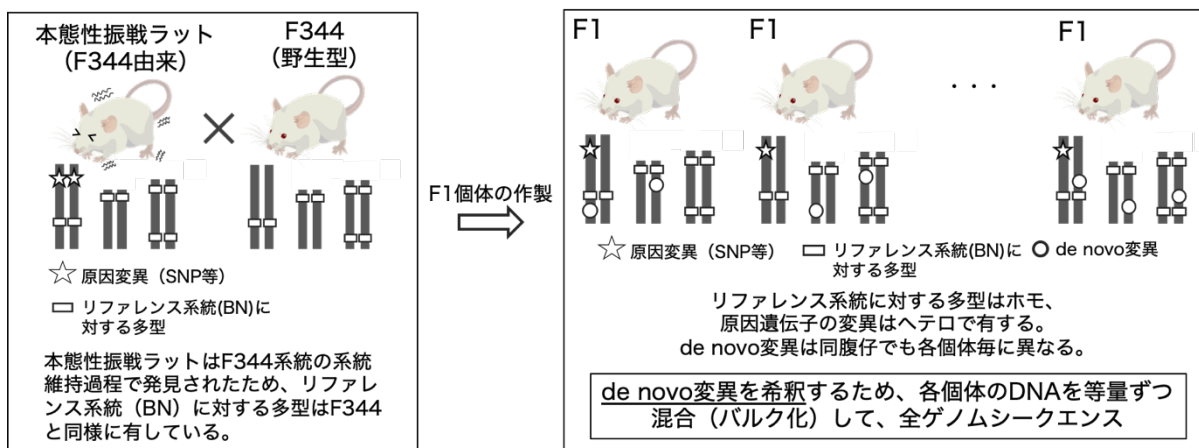
2. 研究の目的

申請者は、自家繁殖していた F344 ラットにおいて、全身性に動的振戦を呈する個体を偶然発見した。振戦は不随意的な律動的な体の動きであり、その原因の中で最も頻度が高いのが本態性振戦である。本態性振戦は発症機序や原因遺伝子など未解明な点が多く、有効な根治療法が存在しないため、その治療は対症療法が中心である。また、ヒトにおいて、本態性振戦は QOL を著しく低下させるだけでなく、パーキンソン病のリスク因子であることも示唆されている。

本研究では、従来の染色体マッピングに用いられる交雑群を必要としない、改良型バルク法により原因遺伝子を同定する (図 2)。本ラットは、F344 系統の系統維持過程で偶然発見されたため、ラットゲノムデータベースに登録されているリファレンス配列 (主に BN 系統) との多型は F344 系統と同様に有している。このラットと F344 ラットを交配して作製した F1 個体は、リファレンス配列との多型はホモ、変異系統のみ有する原因遺伝子変異はヘテロで有する。さらに、各個体で異なる de novo 変異を希釈するため、F1 個体の DNA を等量ずつ混合 (バルク化) して、全ゲノムシーケンスをすることで、各 SNP の SNP index を計算する。F1 個体を 1 匹のみ用い

た場合には、de novo 変異および原因遺伝子変異の SNP index の期待値は 0.5 となり、両者を区別することができない。そのため、5 匹ないしは 10 匹の F1 個体の DNA をバルク化することで、de novo 変異の SNP index の期待値はそれぞれ 0.1 および 0.05 となり、両者を明確に区別することが可能となる。系統間の多型の SNP index の期待値は 1.0 であるため、0.5 付近となる遺伝子変異が原因遺伝子変異となる。この方法を用いれば、タンパク質コード領域のみでなくプロモーター領域あるいはイントロン領域などの遺伝子変異も同定することが可能であり、複数の遺伝子変異が関与する場合においても有用である。改良型バルク法に使用するラットは、5-10 匹程度であり、従来の染色体マッピングでは必要であった大量の交雑群を作製する必要はなく、複数個体由来の DNA をバルク化して、全ゲノムシーケンスを行うため、シーケンスのコストも軽減できる優れた方法である。

図2. 改良型バルク法を用いた新規本態性振戦モデルラットの原因遺伝子の同定



3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーを用いたラットゲノム解析

自家繁殖している F344 系統および変異ラット、あるいはこれらの系統を交配した F1 個体から DNA を抽出し、常法に従いライブラリーを作成後、次世代シーケンサーで全ゲノムを解読した。ラット全ゲノム解析は、アゼンタ株式会社および株式会社リレクサに外部委託した。群間比較は、図 3 に示すインフォマティクス解析のフローチャートに従い実施した。

(2) 本態性振戦モデルラットの病態解析

オープンフィールドテスト (情動性試験)、X 線 CT 装置を用いた画像検査装置を用いた非侵襲的な画像診断、血液生化学的検査および各組織の病理学的解析を実施した。

すべての動物実験は国立国際医療研究センター研究所動物実験委員会の審査の後、機関の長の承認を受けて実施した。

4. 研究結果

(1) 改良型バルク法を用いた原因遺伝子の同定

F344 系統の系統維持過程で、全身性の動的振戦を自然発症する個体を偶然発見したラットは、生後 2 週齢頃から動的振戦を発症し、交配実験により常染色体上の単一潜性 (劣性) 遺伝子が原因であることが示された。交雑群を作製せずに原因遺伝子を同定するため、後代検定にて遺伝型をヘテロ接合型と確定できた 10 匹の個体から DNA を抽出し、これらの DNA をバルク化して次



図3 インフォマティクス解析のフローチャート

世代シーケンサーにより塩基配列を解読した。DNA をバルク化することで、de novo 変異は希釈され原因遺伝子変異のみ SNP index の期待値が 0.5 になることを期待したが、その予想に反しエクソン領域におけるアミノ酸置換を伴う SNP/indel だけでも、SNP index が 0.5(0.48-0.52 に設定)を示す SNP/indel が合計 842 個同定された。予想以上に、近交系であっても多数の SNP/indel を有していたため、次に正常型および変異型（ホモ接合体）の配列を比較することで、変異型系統のみが有する SNP/indel の同定を試みた。後代検定および表現型より、遺伝型をホモ接合体および野生型と確定できた個体 4 匹それぞれの DNA を抽出し、それぞれの遺伝型 4 匹分をバルク化して、次世代シーケンサーにより塩基配列を解読し比較解析を行った。変異型および野生型においてリファレンス配列 rat RGSC6.0/rn6 RefSeq を用いた場合の SNP/indel は合計 7,044,073 個検出され、13,414 個が変異型特異的な SNP/indel として同定された。さらに、研究期間内に mRatBN7.2 にリファレンス配列が更新されたため再解析を行った結果、SNP/indel が合計 2,378,859 個検出され、3,878 個が変異型特異的な SNP/indel として同定された。そのうち、タンパク質に与えるインパクトが“High”である SNP/indel は 6 個であったが、IGV で変異が確認できたのは 1 つの遺伝子（遺伝子 X）でのみであった。遺伝子の途中でストップコドンが挿入される Stop gained 変異が同定された。遺伝子 X は、細胞外から細胞内に物質を輸送することで、細胞外の高浸透圧ストレスを軽減しており、遺伝子 X ノックアウトマウスでは、出生後致死となることから変異ラットでは遺伝子の機能を部分的に残している（null 変異ではない）ことが推察された。

(2) 変異ラットの病態解析

オープンフィールド試験において、変異ラットの Locomotor activity は正常系統に比べ約半分に低下しており、X 線 CT により骨格を観察したところ、脛骨および腓骨に重度の湾曲が観察された。くる病様の症状を呈したため、血中のリン・カルシウムおよび ALP 濃度を測定したが異常はなかった。変異ラットの各組織の病理切片を作成したが、大脳、小脳および筋肉組織においては顕著な病変を見つけることはできなかった。

ヒトの疾患において、約 7,000~9,000 種類あるとされる単一遺伝子疾患のうち 3000 余りは未だに原因遺伝子が同定されていない未診断疾患であり（*Eur J Hum Genet*, 2017）、ヒトの未診断疾患においては、他の疾患以上にモデル動物の情報が必要とされている。本研究用いた変異ラットは、発見当初は本態性振戦モデルラットとして有用であると考えていたが、原因遺伝子の機能を考えると全身性に代謝異常を引き起こし、様々な症状を呈していると予想された。今後、ヒトの新規疾患の診断に役立つ情報を提供するために、本研究で同定した遺伝子 X の生体での機能をさらに明らかにしていく予定である。

<引用文献>

1. Abe A, et al. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat Biotechnol*. 2012 Jan 22;30(2):174-8.
2. Adachi T, et al. Japan's initiative on rare and undiagnosed diseases (IRUD): towards an end to the diagnostic odyssey. *Eur J Hum Genet*. 2017 Sep;25(9):1025-1028.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakano Kenta, Shimizu Yukiko, Arai Tetsuya, Kaneko Taketo, Okamura Tadashi	4. 巻 71
2. 論文標題 The versatile electric condition in mouse embryos for genome editing using a three-step square-wave pulse electroporator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 214 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.21-0130	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 Hsiao Sui-Wen, Ishii Chiharu, Furusho Aogu, Hsieh Chin-Ling, Shimizu Yukiko, Akita Takeyuki, Mita Masashi, Okamura Tadashi, Konno Ryuichi, Ide Tomomi, Lee Ching-Kuo, Hamase Kenji	4. 巻 1869
2. 論文標題 Determination of phenylalanine enantiomers in the plasma and urine of mammals and α -amino acid oxidase deficient rodents using two-dimensional high-performance liquid chromatography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140540 ~ 140540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2020.140540	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 -
1. 著者名 Shimizu Yukiko, Ishii Chiharu, Yanobu-Takanashi Rieko, Nakano Kenta, Imaiike Akio, Mita Masashi, Hamase Kenji, Okamura Tadashi	4. 巻 1868
2. 論文標題 d-Amino acid oxidase deficiency is caused by a large deletion in the Dao gene in LEA rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140463 ~ 140463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2020.140463	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 Nakano Kenta, Yanobu-Takanashi Rieko, Shimizu Yukiko, Takahashi Yuki, Hiura Koki, Watanabe Masaki, Sasaki Hayato, Okamura Tadashi, Sasaki Nobuya	4. 巻 15
2. 論文標題 Genetic locus responsible for diabetic phenotype in the insulin hyposecretion (ihs) mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0234132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0234132	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水有紀子、中野堅太、岡村匡史
2. 発表標題 シスチノーシスモデルマウスにおける系統差を用いたシスチン代謝修飾遺伝子の探索
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡村匡史、清水有紀子、片桐大輔、荒川玲子、山本裕香、赤平百絵
2. 発表標題 LC/MSを用いた腎透析中シスチノーシス患者に対するシステアミン治療の有効性評価
3. 学会等名 第55回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片桐大輔、清水有紀子、赤平百絵、岡村匡史
2. 発表標題 透析患者におけるシスチノーシス検査の重要性
3. 学会等名 第65回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水有紀子、石井千晴、高梨-矢延理恵子、中野堅太、今池瑛生、浜瀬健二、岡村匡史
2. 発表標題 新規D-アミノ酸オキシダーゼ (Dao) 遺伝子欠損ラットの樹立
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------