

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651021

研究課題名（和文） 革新的変異原性試験開発のための基礎的検討

研究課題名（英文） Development of innovative mutation test

研究代表者

松田 知成 (Tomonari Matsuda)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50273488

研究成果の概要（和文）：

次々世代 DNA シーケンサーと呼ばれる、パシフィックバイオサイエンス社の SMRT DNA シーケンサーは、一分子リアルタイムのシーケンスが可能である。これを用いることにより任意の組織の任意の遺伝子における突然変異を検出することが可能になるかもしれない。そこで、この「SMRT 法」の開発をめざし、SMRT DNA シーケンサーに関する情報収集するとともに、テンプレート作成法の開発を進めた。一方、これとは別に、イルミナ社の次世代シーケンサーを用いて、化学物質が誘発する突然変異をゲノムワイドに検出する手法を考案した。パイロット試験として、変異原処理したサルモネラ菌 5 クローンと、未処理の 5 クローンをランダムに選択し、全ゲノムシーケンスを行った結果、変異原処理したクローンで複数の突然変異を検出できた。これにより、表現型によらない、機器分析による突然変異の検出に道を開いた。

研究成果の概要（英文）：

I proposed here an anticipated mutation assay which estimates the frequency and spectrum of somatic point mutations in any genes of any samples by using SMRT™ (Single Molecule Real Time) DNA sequencing technology. The basic concept of the mutation assay is very simple: just prepare the target template and sequence it accurately. In this project, I considered ideas on how to make the template and how to eliminate artifactual mutations caused by damage to the DNA template. On the other hands, I developed a genome-wide mutation assay using Illumina next-generation DNA sequencer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：突然変異、SMRT DNA シーケンサー、変異原性試験

1. 研究開始当初の背景

化学物質や医薬品の安全性を評価するために、様々な遺伝毒性試験が行われるが、突然変異の誘発を検出する「変異原性試験」は以前から重要視されてきた。代表的な「変異原性試験」として、サルモネラ菌を用いる「エームス試験」、哺乳動物細胞を用いる「HPRT 試験」などがある。また、最近では、突然変異を検出するためのトランスジェニック動物 (Muta マウス、Big Blue マウス、gpt delta ラットなど) も開発され、化学物質による突然変異を個体レベルで検出することが可能になってきている。

しかし、これらの方法では、限られた遺伝子に生じた突然変異しか検出できないという、大きな不満点 (欠点) があった。例えば、エームス試験ではサルモネラ菌のヒスチジン合成酵素遺伝子に生じた変異しか検出できないし、HPRT 試験では HPRT 遺伝子に生じた突然変異しか検出できない。トランスジェニック動物の変異検出系もまた、特定の遺伝子を導入し、それを変異のターゲットとしている。もし、がん関連遺伝子など、より重要な任意の遺伝子に生じる突然変異が解析できるようになれば、それは革新的な変異原性試験となるであろうが、そのような技術はまだ存在しなかった。

一方、当時、新しい次世代 DNA シーケンサーが次々と実用化され、1日当たりの解析数が飛躍的に向上してきた。こうした中、米国 PACIFIC BIOSCIENCES 社が、2010年に次次世代 DNA シーケンサー SMRT(Single Molecule Real Time の略)の実用化を目指すと発表した。このような、高性能 DNA シーケンサーを使って、体細胞に生じる低頻度の突然変異を検出する戦略が現実味を帯びてきた。

2. 研究の目的

任意の細胞・組織における任意の遺伝子に生じた低頻度の体細胞突然変異を検出する、新しい変異原性試験を開発するために、次々世代 DNA シーケンサー SMRT を利用することを考えた。しかしながら、研究期間中に SMRT シーケンサーを利用できるかどうかわからなかったため、本研究では、SMRT DNA シーケンサーに関する情報収集、プレート作成法やデータ処理法の開発、予想される問題点の整理など、試験法開発の事前準備を行うとことを目的とした。一方、研究を進めるうちに、変異原物質で曝露した細胞のクローンを、全ゲノムシーケンスすることにより、突然変異を検出する戦略も考え付いたので (国立医薬品食品衛生研究所 山田雅巳博士との共同研究)、このパイロット実験も行った。

3. 研究の方法

- (1) 次々世代 DNA シーケンサー SMRT に関して情報収集し、SMRT を用いた突然変異検出法の実験デザイン、予想される問題点についてまとめた。また、発がん重要な遺伝子である p53 遺伝子の配列を選択的に濃縮する方法を設計した。
- (2) エームス法に用いられるサルモネラ菌 TA100 株に変異原物質 2-AF を曝露し、コントロール群と曝露群の復帰コロニーを各 5 クローンずつ単離し、DNA を精製して、イルミナ社の次世代シーケンサー MiSeq で全ゲノムシーケンスを行った。得られたデータは CLC Genomics Workbench 5.1 で解析し、サルモネラ菌ゲノムに生じた突然変異を検出した。

4. 研究成果

(1)次々世代DNAシーケンサーSMRTを用いる突然変異検出法の開発

パシフィックバイオサイエンス社のSMRTTMDNAシーケンサーに関する情報を収集し、これを用いた突然変異検出系を考察し、理論論文として *Genes & Environment* 誌で発表した。原理は、高性能DNAシーケンサーを使って直接、低頻度の体細胞突然変異頻度を測定するというだけのことであるが、通常の次世代シーケンサーでは難しく、SMRTの単一分子、リアルタイムの検出原理が重要であることや、シーケンスのアーティファクトによって生じる突然変異を低く抑えるため、環状のDNAテンプレートを作っておいて、2周以上読む必要があること、その環状DNAテンプレートの作成法について考えをまとめた。また、この論文の中で、テンプレート上に生じたDNA損傷が突然変異のアーティファクトの原因となるが、DNA損傷部分ではヌクレオチドの取り込み速度が落ちるので、リアルタイムでヌクレオチドの取り込みをモニターするSMRTならば突然変異とDNA損傷を同時に測定できるかもしれないという考察を行った。しかしその後、パシフィックバイオサイエンス社が、環状テンプレートを作る新しい方法について論文発表した。これは二本鎖DNAにループ状の一本鎖DNAアダプターをライゲーションする方法である。そこで、この方法を使ったテンプレート作成法について検討を行った。まず、p53遺伝子のエクソン7, 8の領域約1 kbの環状テンプレートの作成を試みた。この方法は、まず、ゲノムDNAを制限酵素処理し、T4DNAポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性で制限酵素断片を部分的に削り込み、p53の配列をアニーリングによりキャプチャして、さらに内側の制限酵素サ

イトで必要な部分を切り出すというものである。残念ながら、研究期間中にこのテンプレートをSMRTで分析することができなかったが、昨年末から日本でも受託分析が可能になってきたので引き続きこの方法の開発を継続する予定である。

(2)イルミナ社の次世代DNAシーケンサーを用いたゲノムワイドな突然変異検出法の開発。

In vitroの変異原試験を考えた場合、変異原処理した細胞のクローンの全ゲノムシーケンスすることによって、突然変異を検出できる可能性がある。そこで、パイロットスタディとして、サルモネラ菌TA100株に変異原物質2-AFを曝露し、復帰クローンの全ゲノムシーケンスを行った。illumina社の次世代DNAシーケンサーMiSeqを用いて、コントロール群5株、変異原処理群5株、計10株の全ゲノムシーケンスを一回のランで行ったところ、すべてのサンプルで、ゲノムの全領域において平均約30のカバレッジを得ることができた。90%以上の変異コールのあったものを突然変異と認定したところ、解析を行った結果、すべての株においてhisG遺伝子の点突然変異が検出された。これは復帰コロニーを選んでいるので当然であるが、起こるべき突然変異を確実に全ゲノムシーケンスで拾えることを示したことになる。hisG遺伝子以外の突然変異はコントロール群で一株一個、変異原処理群では三株五個、見つかった。従って、本方法は変異原が誘発する突然変異を検出するのに有効であると考えられた。

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 1 件)

Matsuda, T. (2010) Anticipated Mutation Assay Using Single-molecule Real-time (SMRT™) Sequencing Technology, *Genes and Environment* 32, 21-24. (査読有)
(<http://dx.doi.org/10.3123/jemsge.32.21>)

[学会発表] (計 2 件)

松田知成:「Development of New Bioassays “Upstream” and “end of pipe”」、The Third GCOE Shenzhen Symposium, Promoting Collaborative Research & Education on Environmental Engineering between China and Japan、2011 年 12 月 10 日、深セン (中国)

松田知成:「質量分析器、次世代 DNA シーケンサーの変異原研究への応用可能性」、日本環境変異原学会 第 39 回大会、2010 年 11 月 17 日、つくば。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 知成 (Tomonari Matsuda)
京都大学・工学研究科・准教授
研究者番号: 50273488