

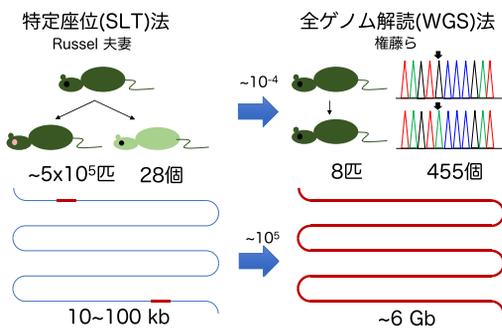
最新技術でヒトゲノムの全貌を捉える！ ～次世代シーケンサを用いた全ゲノム解読による変異解析～

東京工業大学 科学技術創成研究院 ゼロカーボンエネルギー研究所 松本 義久

研究の目的 (背景と意義)

さまざまな放射線影響の中で、がんや遺伝性影響は、放射線によるDNA損傷が誤って修復された結果生じる「変異」が関わると考えられています。

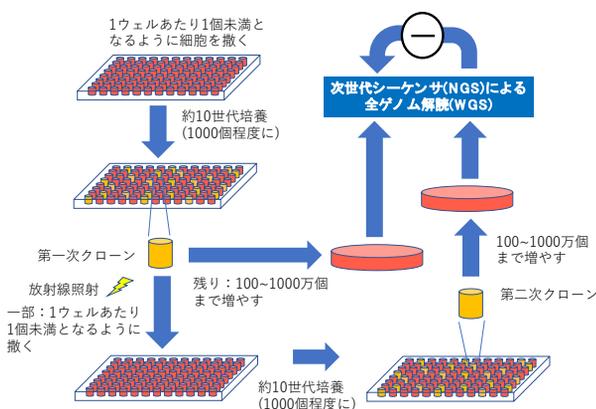
変異の研究は、長年、マウスの体の毛の色や、細胞の場合では薬剤への耐性など、目に見える変化を与える特定の遺伝子に注目して行われてきました。2003年に60億塩基対からなるヒトゲノムの解読が完了しました。また、2005年頃に登場した次世代シーケンサが進化を重ね、ヒトの全ゲノム解読(WGS)を一度に行うことが可能となりました。これにより、マウスやヒトの個体レベルでの変異研究が飛躍的に進んでいます。私たちは、WGS法を培養細胞に適用し、放射線の種類による違いや、遺伝的体質(DNA修復遺伝子の違いなど)による個人差を明らかにしたいと考え、本研究を行いました。



研究の内容

下の図のように、1個の細胞が増殖を繰り返してできた細胞集団(第一次クローン)、さらにその中の1個の細胞が増殖を繰り返してできた細胞集団(第二次クローン)を形成させ、それぞれからゲノムDNAを調製し、WGS解析を行いました。

- ・使用した細胞：ヒトリンパ芽球由来TK6細胞
- ・放射線照射：近畿大学原子炉(UTR-KINKI)照射(線量率中性子0.2 Gy/h、 γ 線0.2 Gy/h、総吸収線量1 Gy)、X線照射(線量率0.97 Gy/min、吸収線量1 Gy)
- ・WGS：Illumina Novaseq 6000使用、平均500塩基対に細断した断片の両端150塩基対を解読、平均30回以上解読(株式会社クラボウに委託)



研究の成果

まず、第一次クローン、第二次クローンのWGS結果を基準ヒトゲノム配列hg38と比較したところ、下の表の通り、およそ370万ヶ所で塩基が他のものと置き換わっていました(単塩基置換、SNVと言います)。そのほとんどは第一次クローン、第二次クローン共通に見られ、いわゆるゲノムの個人差です。この中から、第二次クローンに見られ、第一次クローンに見られないものをコンピュータプログラムで抽出したところ、約700個が見つかりました。下の図に一例を示します。左は第一次クローン、右は原子炉照射した第二次クローンで、11番染色体の35,211,931番目の塩基がTからCに置き換わっています。

非照射群、原子炉照射群、X線照射群の間で明らかな数の違いは見られませんでした。X線照射、原子炉照射の各1個のクローンにおいて、一塩基置換数が高い傾向が見られました。

	初期コール変異 =hg38との相違	第一次 フィルター後	第一次クローン 差引後	第二次 フィルター後
第1次クローン	3,810,868	3,723,878	-	-
非照射-1	3,809,520	3,721,232	43,980	685
非照射-2	3,806,158	3,717,964	43,060	691
X線照射-1	3,803,031	3,714,889	41,776	642
X線照射-2	3,813,154	3,725,051	46,018	821
原子炉照射-1	3,805,463	3,718,495	43,659	854
原子炉照射-2	3,792,942	3,705,446	42,989	677
原子炉照射-3	3,808,070	3,719,314	42,902	691



今後の課題・展開

本研究で、二段階細胞クローン集団作製法とWGSにより、放射線照射細胞に生じた変異を塩基レベルで解析可能であることを示しました。ただし、今回主に解析したSNVは電離放射線に特徴的なものではなく、化学変異原、紫外線への曝露や、酸化ストレス、DNA複製のエラーなどの内的要因によって多数生じると考えられています。電離放射線の特徴的な損傷であるDNA一本鎖、二本鎖切断は挿入、欠失、さらには構造変化、コピー数変化などを引き起こすと考えられています。したがって、これらの解析を進めることで、放射線照射による違いが見られる可能性があると考えられています。このような複雑なタイプの変異を解析する方法を確立するとともに、放射線の種類による違いや、遺伝的体質による個人差、さらには低線量・低線量率放射線の影響の研究を進めたいと考えています。

研究協力者

細胞培養、DNA調製、データ解析：東京工業大学 MILAI Enkhbaatar、Tsumbuukhuu Dulguun
データ解析助言：東海大学 権藤 洋一
放射線照射：近畿大学 松田 外志朗、山西 弘城