

解禁日時:2020年5月7日(木)午後1時(日本時間)

プレス通知資料 (研究成果)



国立大学法人
東京医科歯科大学
TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY

報道関係各位

2020年5月1日

国立大学法人 東京医科歯科大学

「マウスY染色体の未知領域を一部解析することに成功」 — 新しいロングリードシーケンサーと染色体濃縮の組み合わせ —

【ポイント】

- 長らく謎であったY染色体の解析を進めることができました。
- ロングリードシーケンサーと染色体濃縮を組み合わせることで、効率よくマウスのY染色体の一部を解明しました。
- Y染色体に関連する性分化異常や男性不妊症などの病態解明と新規治療法開発への応用が期待できます。

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科システム発生・再生医学分野の浅原 弘嗣教授と矢野 雄暉大学院生、および千葉朋希助教は、長らく謎であったマウスY染色体の一部を解明することに成功しました。この研究は文部科学省科学研究費補助金の支援のもとでおこなわれたもので、その研究成果は国際科学誌Frontiers in Genetics(フロンティア イン ジェネティクス)に2020年5月7日午前6時(中央ヨーロッパ夏時間)にオンライン版で発表されます。

【研究の背景】

ヒトY染色体の遺伝子は、性分化異常や男性不妊症などの疾患に関与しています。しかし、ヒトY染色体は他の染色体に比べて短くコードされる遺伝子数が少ないにも関わらず、高度な反復配列と広範囲のヘテロクロマチン領域を持つため、解析可能な配列長が短いサンガー法をベースとする従来のシーケンス技術では解析が困難です。そのため、ヒトY染色体の配列はヒトゲノム計画から15年以上たった現在でも、全長の50%以上が解読されていません。さらに、同じ哺乳類でモデル動物としてよく用いられるマウスのY染色体は、配列のほぼ全てがユークロマチン領域であり、その98%が反復配列の続く領域であるため、ヒトと同様に配列の解析が困難です(図1)。したがって、Y染色体に関連する多くの疾患や異常の原因 男性不妊症などの遺伝子は不明のままです。特にヒト疾患を解析する上で、モデルとなるマウスY染色体の解明が急務とされています。

一方でシーケンシング技術は急速に発展しており、Pacific Biosciences社のPacBioやOxford Nanopore Technology社のMinION^{※1}などの第3世代シーケンサーが台頭してきています。これらのシーケンサーにより、リアルタイムでDNAやRNAの配列を1分子ごとに決定することが可能になり、100 kb以上の長い配列の読み

取りが可能になってきています。これらのシーケンサーは DNA 合成や PCR 増幅なしで配列を解析するため、繰り返し配列に由来するバイアスを防ぐことができ、反復配列などのためにゲノムが解読されていない領域の解析が可能になると考えられます。しかし、現時点での技術では、Y 染色体の全ゲノムに占める割合が比較的小さいため、ゲノム全体を用いて新しいシーケンサーで解析して Y 染色体の配列を決定すると、莫大な費用と労力がかかります。

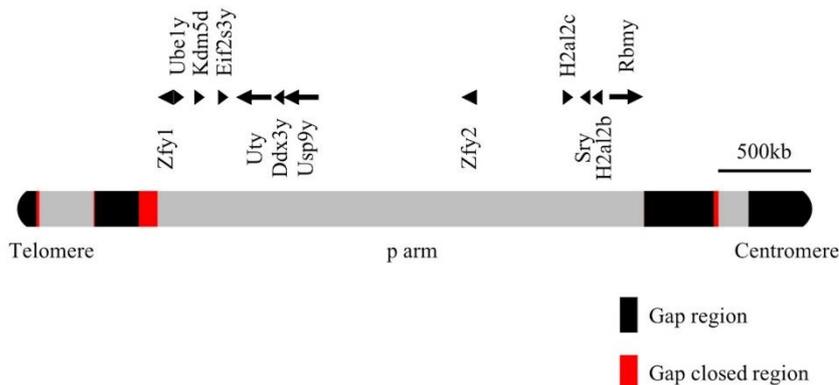


図 1 : マウス Y 染色体の構造と新しく解読された領域

そこで本研究では、蛍光活性化セルソーター (FACS) による染色体濃縮とロングリードシーケンサー MinION を組み合わせ、マウス Y 染色体の未確定配列の解析を試みました。

【研究成果の概要】

本研究では、マウス Y 染色体の未知の領域の一部を解析することに成功しました。

まず、雄マウス (BALB/c) 由来の RAW264.7 細胞にコルセミドを加えて培養し、M 期の細胞を回収して破碎し、ヨウ化プロピジウム (PI) と Hoechst33342 で DNA を染色しました。この染色 DNA を用いて、一般的に使用される UV および青色の 488 nm レーザーを備えた蛍光活性化セルソーター (FACS: MoFlo XDP) により、マウス Y 染色体を他の染色体から分離し、Y 染色体を濃縮しました (図 2)。

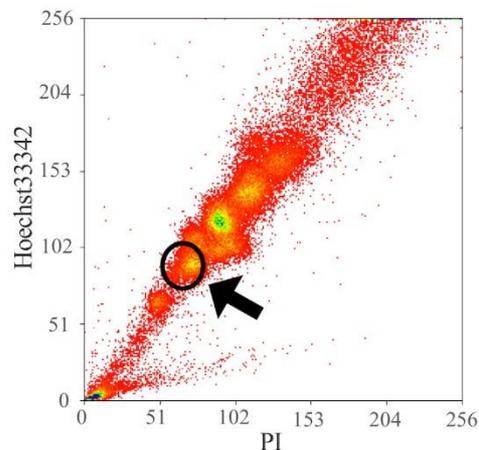


図 2 : FACS でのマウス Y 染色体の分離・濃縮

さらに、この濃縮した Y 染色体を用いて、PCR を行うことなくライブラリー調製を行い、長いシーケンスを読み取ることができる MinION テクノロジーを用いてシーケンス解読を行いました。

シーケンサーから得られたデータから、最新のリファレンスゲノムである GRCm38.p6 に対して、解読したリードをマップし、Flye を用いて読まれたリードをつなぎ合わせることでより長い配列を作成し、D-GENIES を用いて作成した長い配列とリファレンスゲノムの Y 染色体とを比較しました。最後に、LR_Gapcloser を用いて解読したリードとリファレンスゲノムから Y 染色体の未確定領域を解析しました。

得られシーケンスデータを Flye というプログラムを用いて解析した結果、Y 染色体由来であると思われるシーケンスと比較しました。その結果、高度なリピート配列が存在する長腕側ではドットプロットが断片化されていることが確認されました。

これらを用いて、マウス Y 染色体の未確定領域を解析するため、LR_Gapcloser というプログラムを用いて得られたリード配列を元にリファレンスゲノムの未解読領域の探索(ギャップクローズ)を行いました。その結果、リファレンスの Y 染色体全体の 30 領域ある未解読領域 うちの、8.5%にあたる 308 kb の新しい配列を得ました(図1)。

【研究成果の意義】

この研究では、染色体ソーティングと MinION を組み合わせることで、効率よくマウス Y 染色体配列を解析することに成功しました(図1、2)。

chromomycinA3 を用いて今回の方法よりも高い分離度でソーティングしている先行研究(Kuderna, et al. Nat Commun. 2019)もありますが、chromomycinA3 を検出するための特殊なレーザーに対応しているソーターの種類が少ないため、ソーティングを行える場所が限られてしまうが現状です。今回の研究では、一般的に普及している UV と 488nm の青色のレーザーを用いており、設備の追加なく多くの施設の既存の FACS で行うことが可能です。

- 新しいシーケンサーである MinION と Y 染色体濃縮の組み合わせによって、マウス Y 染色体の未確定配列の一部を解析することができました。Y 染色体には相同染色体が存在しないため、他の染色体と比較した場合、ゲノムの欠失や突然変異の影響を受けやすく、個人差も大きいと考えられてきています。今後、本手法を用いた解析の遂行や、得られたデータの解析ソフトのさらなる開発によって、未解明領域の完全な解析が可能になると考えられます。将来的には、Y 染色体に関連する性分化異常や男性不妊症などの病態解明と新規治療法開発への応用が期待できます。

【用語解説】

※1 Oxford Nanopore MinION: 第3世代シーケンサーとされ、導入のコストも低く、PCRを行わずに長い配列を読むことができる。MinION によって得られたとされ、今まで困難であったリピート配列や未確定配列を特定できる可能性があるが、そのエラー率は 5~15%と高く SNP のような1塩基解像度で配列を特定するのは難しいと考えられる。

【論文情報】

掲載誌: *Frontiers in Genetics*

論文タイトル: *Analysis of the mouse Y chromosome by single molecule sequencing with Y chromosome enrichment.*

【研究者プロフィール】

浅原 弘嗣 (アサハラ ヒロシ) Asahara Hiroshi

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

システム発生・再生医学分野 教授

・研究領域

分子生物学(遺伝子発現)、発生・再生医学、整形外科学、リウマチ学



矢野 雄暉(ヤノ ユウキ) Yano Yuki

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

システム発生・再生医学分野 博士課程大学院生

・研究領域

分子生物学



【問い合わせ先】

<研究に関すること>

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

システム発生・再生医学分野 浅原弘嗣(アサハラ ヒロシ)

TEL:03-5803- 5015 FAX:03-5803- 5810

E-mail: asahara.syst@tmd.ac.jp

<報道に関すること>

東京医科歯科大学 総務部総務秘書課広報係

〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

TEL:03-5803-5833 FAX:03-5803-0272

E-mail: kouhou.adm@tmd.ac.jp