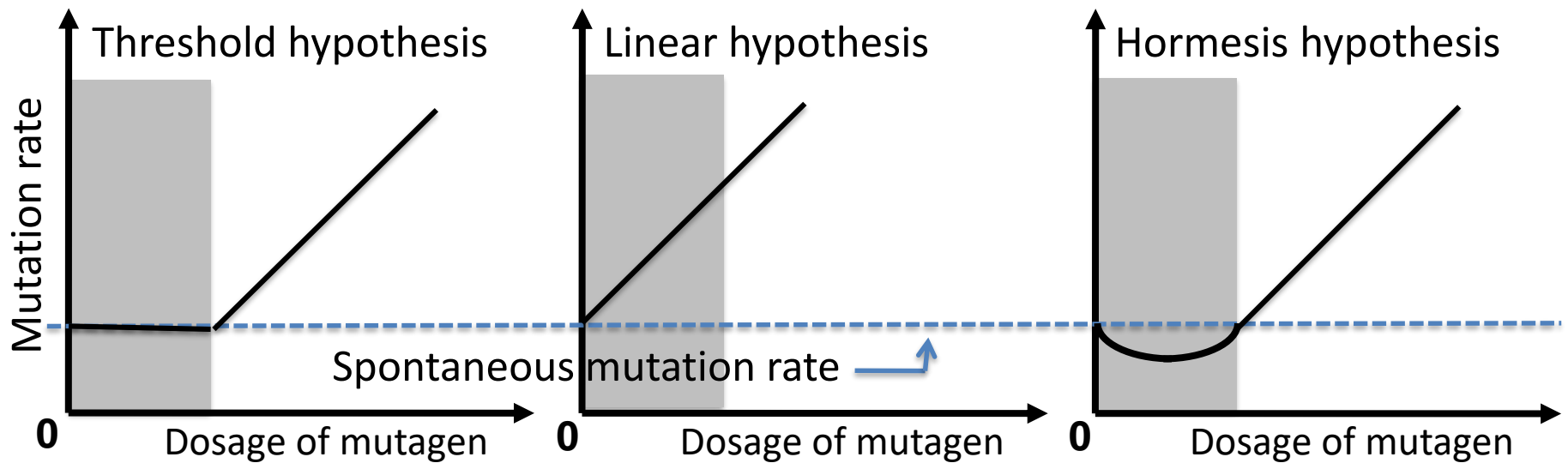


微量変異原のリスク評価を可能とする高速鋭敏な
マウス生殖細胞系列変異検出系の開発とSLT法の比較

Question: How bad (or good)
of the low dose environmental genotoxic factors (mutagens)?



権藤洋一

東海大学医学部分子生命科学

自己紹介: 遺伝学、古典統計学(分散分析)、ゲノム学(融合分野)

EMSミュータジェネシス *Drosophila melanogaster* (unpublished)
マウス p 変異のポジショナルクローニング (Brilliant, Gondo & Eicher Science 1991)
マウス p 変異の高頻度変異解析 (Gondo et al. PNAS 1993)
マウス $p53$ ノックアウトマウスおよび遺伝子普遍置換法開発(Gondo et al. BBRC 1994)
マウス体細胞変異検出HITEC Tgマウス開発(Gondo et al. Mutation Res 1996)
ヒト megasatellite DNA 'RS447' の高頻度変異解析(Gondo et al. Genomics 1998)
理研ENU変異マウスライブラリー構築と利用(Sakuraba et al. BBRC 2005)
ENU誘発マウス変異の頻度とスペクトル(Takahasi, Sakuraba & Gondo BMC Mol Genet 2007)
国際マウスミュータジェネシスと機能ゲノミクス(総説 Gondo Nature Rev Genet 2008)
理研ENUマウスミュータジェネシスプロジェクト
(Gondo et al. BMB Rep 2009, Exp Anim 2010; Gondo JGG 2010,)
Crispr-Cas9変異とillegitimate translationの発見(Makino, Fukumura & Gondo Sci Rep 2016)

放射線関連

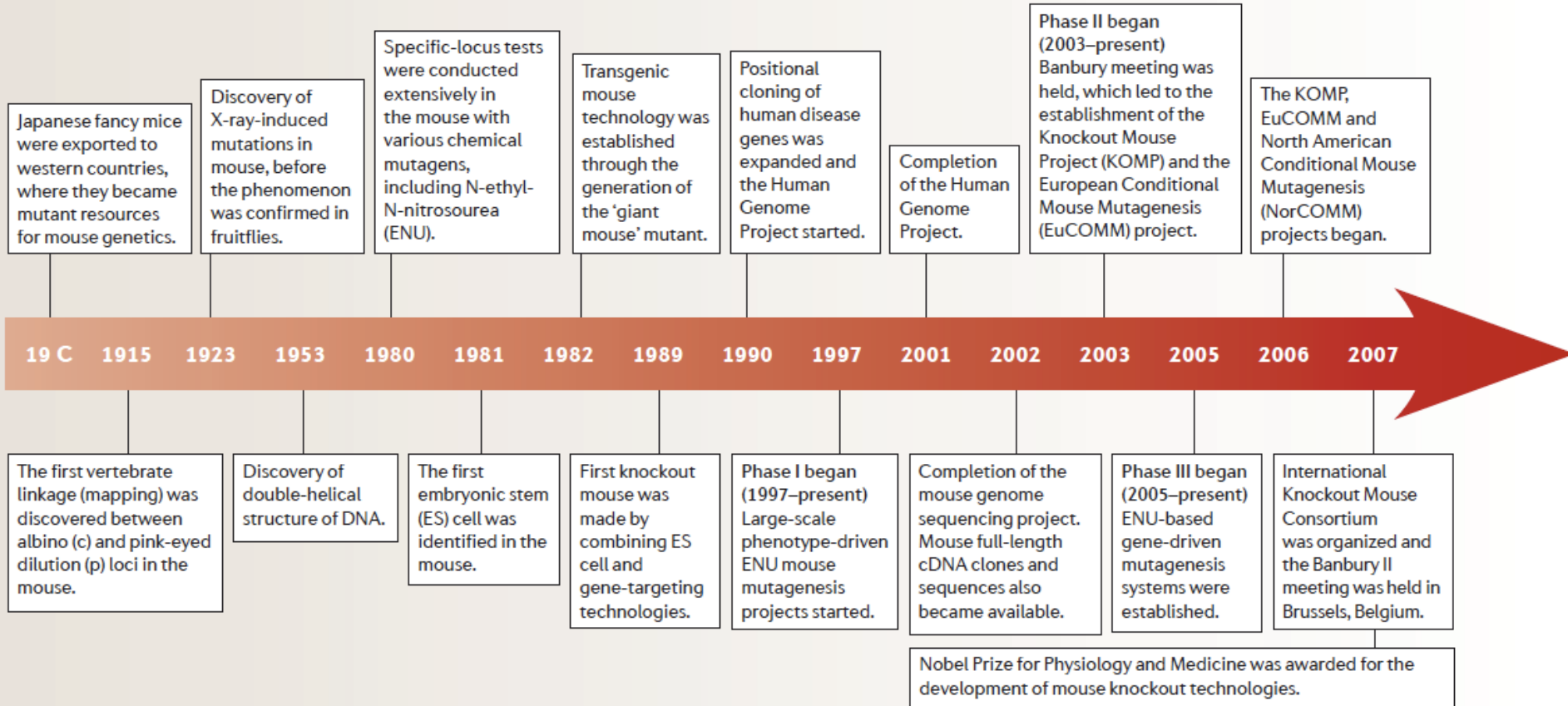
放射線誘発マウス胎児奇形の解析(Norimura et al. Nature Med 1996)
放射線誘発マウス体細胞変異の解析(Shiraishi et al. Radiation Res 2002)

現在

微量変異原評価を可能とする
全ゲノム解読に基づく網羅的自然発生突然変異検出系の開発(2017-2021)
超高速ゲノム解読に基づく
マウス生殖細胞誘発変異検出と微量変異原リスク評価法の確立(2013-2016)

Trends in large-scale mouse mutagenesis: from genetics to functional genomics.

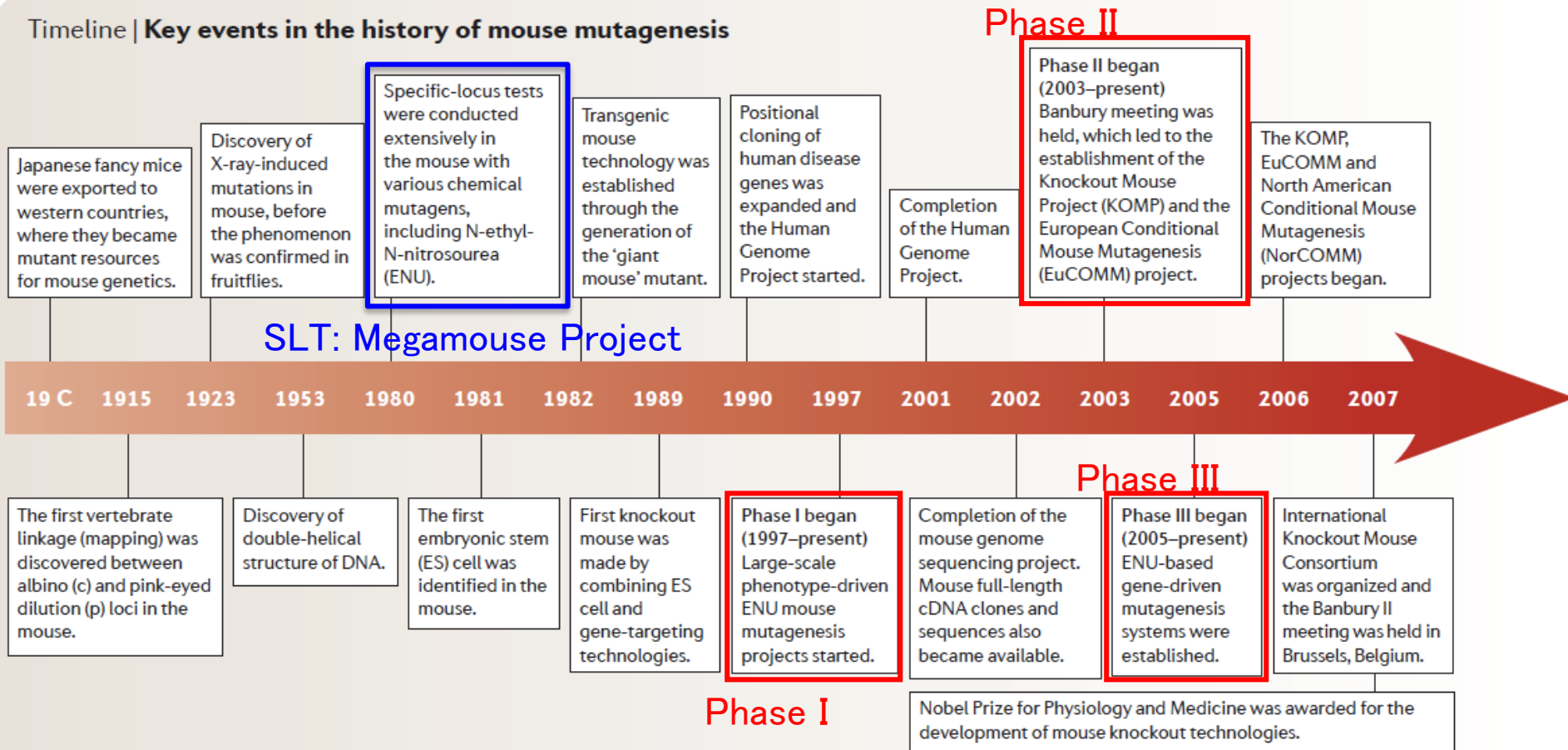
Timeline | Key events in the history of mouse mutagenesis



Gondo, *Nature Reviews Genetics* 9: 803-810, 2008

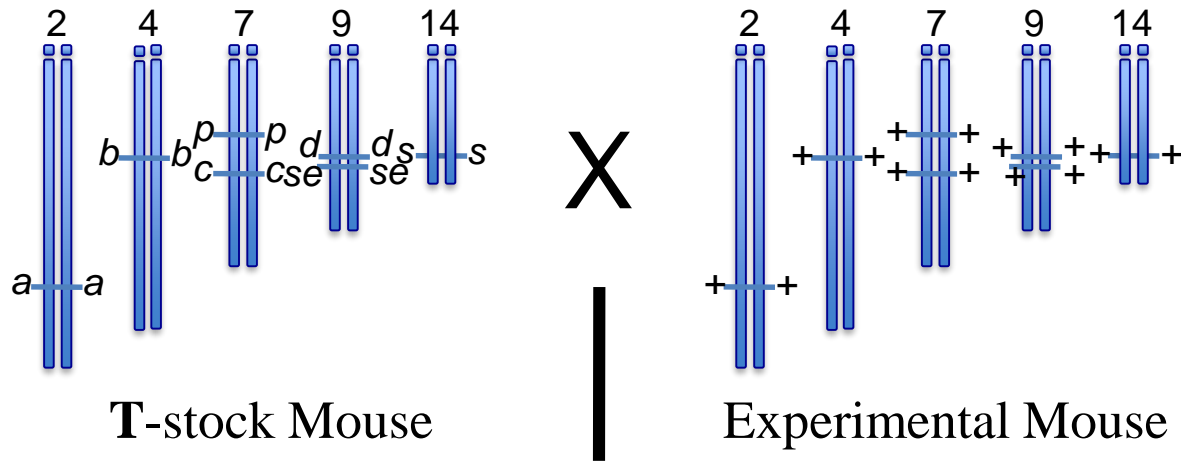
Trends in large-scale mouse mutagenesis: from genetics to functional genomics.

Timeline | Key events in the history of mouse mutagenesis

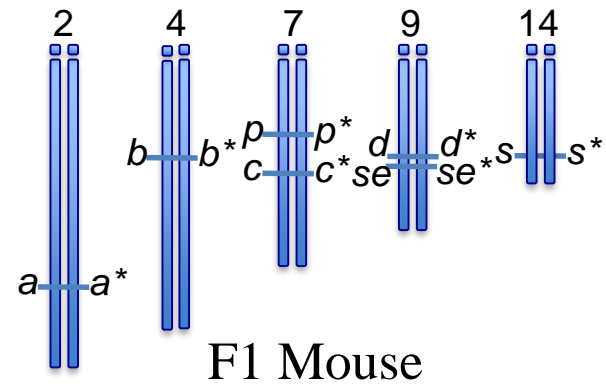


Gondo, *Nature Reviews Genetics* 9: 803-810, 2008

Specific Locus Test (SLT) by W. Russell



a: nonagouti
b: brown
c^{ch}: albino
d: dilute
p: pink-eyed dilution
s: piebald spotting
se: short ear



特徴:
 4週齢で、見るだけで判定可能(特段の装置やスキルは不用)
 確認にはもう1世代の交配観察が必要となる。
 変異スペクトル解析(DNA配列変化)は容易ではない。



Drs. L. Russell & William Russell

Radiation dose rate and m

Table 1. Mutations at specific loci in spermatogonia of mice induced by gamma irradiation.

Dose (r)	Intensity (r/wk)	Offspring (No.)
0		105,400
86	10	48,500
516	90	20,750
861	90	20,990

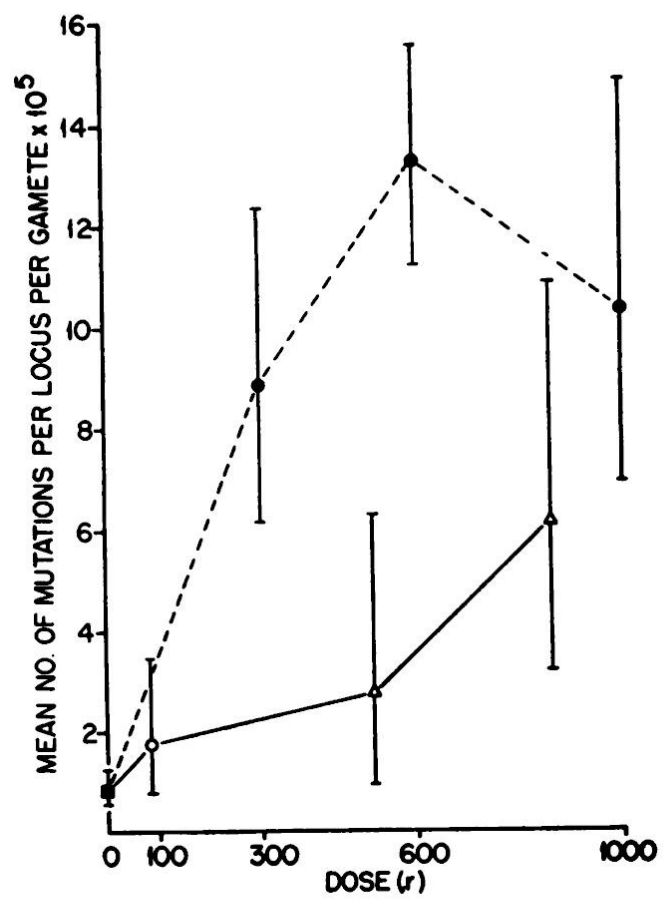


Fig. 1. Mutation rates at seven specific loci in the mouse, with 90-percent confidence intervals. Solid circles represent results with acute x-rays (80 to 90 r/min). Open points represent chronic gamma-ray results (triangles, 90 r/wk); (circle, 10 r/wk). The point for zero dose represents the sum of all controls.

Mutations at specific loci induced in spermatogonia of mice by acute x-irradiation.

Dose (r)	Mutations at 7 loci (No.)	Mean No. of mutations per locus, per gamete ($\times 10^5$)
33	1	0.33
88	25	8.85
88	6	0.81
26	111	13.29
72	2	0.84
15	23	10.33

Radiation dose rate and mutation frequency.

Table 1. Mutations at specific loci induced in spermatogonia of mice by chronic gamma irradiation.

Dose (r)	Intensity (r/wk)	Offspring (No.)	Mutations at 7 loci (No.)	Mean No. of mutations per locus, per gamete ($\times 10^5$)
0		105,403	8	1.08
86	10	48,500	6	1.77
516	90	20,752	4	2.75
861	90	20,993	9	6.12

Table 2. Mutations at specific loci induced in spermatogonia of mice by acute x-irradiation.

Dose (r)	Offspring (No.)	Mutations at 7 loci (No.)	Mean No. of mutations per locus, per gamete ($\times 10^5$)
0	42,833	1	0.33
300	40,408	25	8.85
0	106,408	6	0.81
600	119,326	111	13.29
0	33,972	2	0.84
1000	31,815	23	10.33

SLT法によるバックグラウンドでの自然変異率（線量ゼロ点における変異率）

		検査マウス数	可視変異数	変異率
TABLE 1	O dose	105,403	8	1.08E-5
TABLE 2	O dose	42,833	1	0.33E-5
	O dose	106,408	6	0.81E-5
	O dose	33,972	2	0.84E-5
Combined		288,616	17	0.84E-5

Target: 7 loci /locus/gamete

変異率/locus/gamete = $1 \text{ E-}5$

変異率/locus/F1 = $1 \text{ E-}5$

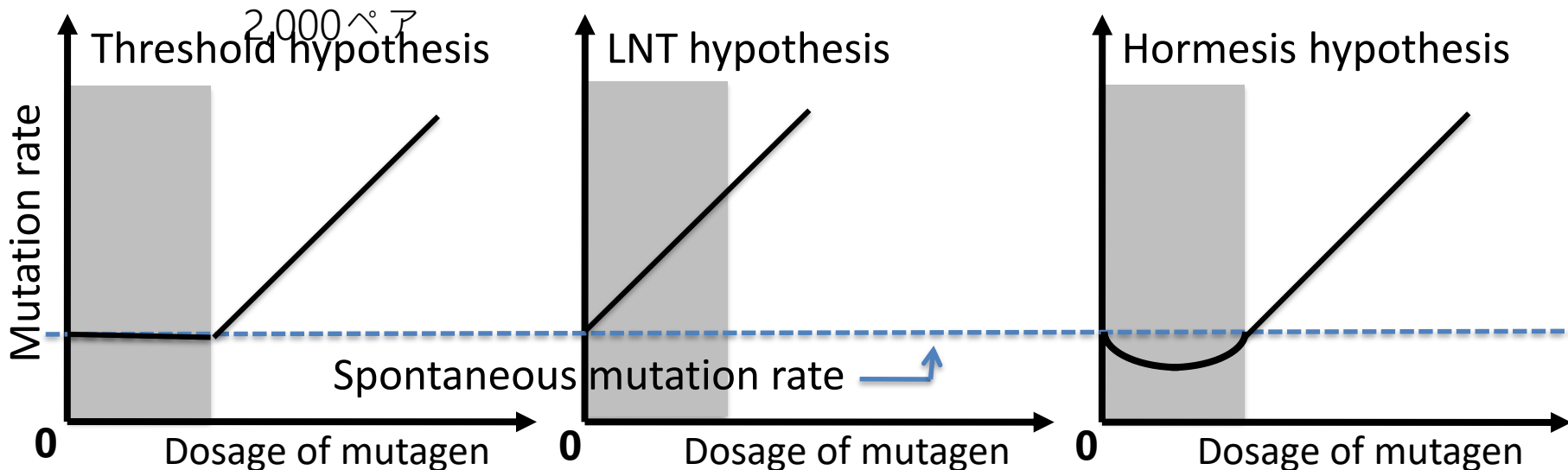
変異率/F1 = $7 \text{ E-}5$

平均1変異発見に要するF1数 = $1/7 \text{ E-}5 = 14,285$ 匹F1マウ

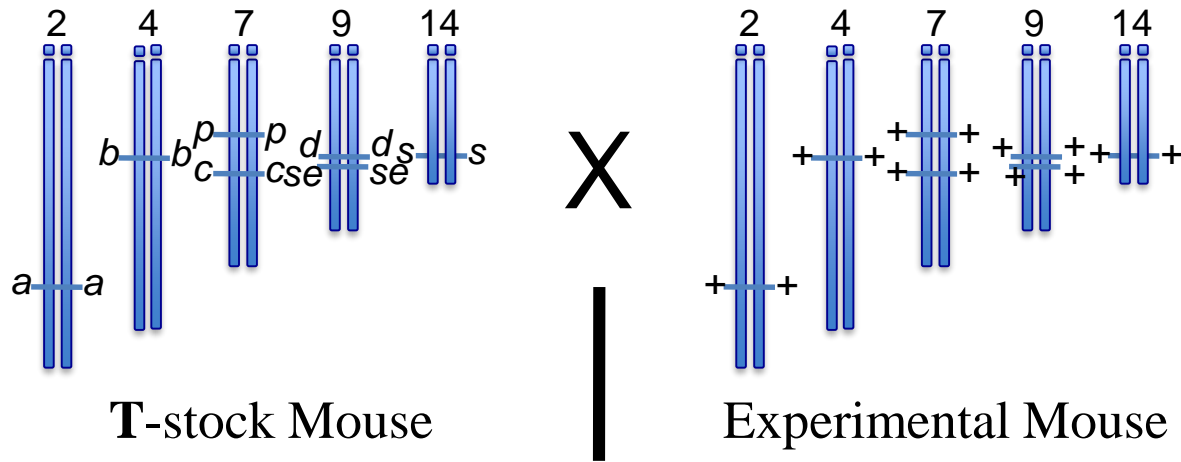
1ペアあたりの平均産仔数 = 7匹

必要な交配ペア数 = $\sim 14,000/7 =$

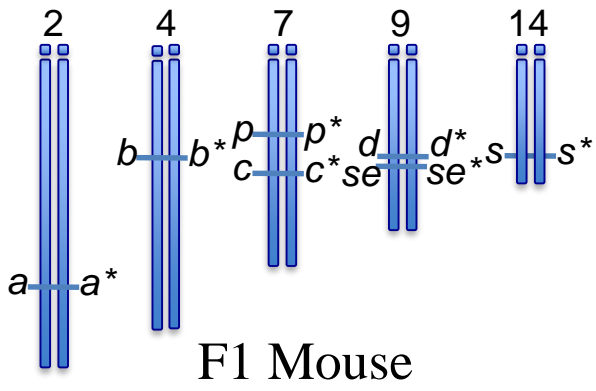
2,000ペア



Specific Locus Test (SLT) by W. Russell



- a*: nonagouti
- b*: brown
- c^{ch}*: albino
- d*: dilute
- p*: pink-eyed dilution
- s*: piebald spotting
- se*: short ear



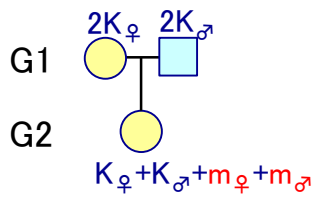
Spontaneous mutations rate was estimated as
 $\sim 10^{-5}$ /locus/gamete (=F1)

Drs. L. Russell & William Russell

次世代シーケンサー(NGS)を用いた変異率推定

Species		Mutation Rate	Ref
Human	parents-children	12 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Kong et al. 2012
Chimp	parents-children	12 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Venn et al. 2014
Mouse (B6J)	sib mating	5.4 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Uchimura et al. 2015
Mouse (B6JJcl)	complete outbreeding*	5.5 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Fukumura, Gondo et al. (未発表)
Mouse (MSM/Ms)	sib mating	4.4 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Fukumura, Gondo et al. (未発表)
Drosophila (SNV)	parents-children	2.8 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Keightley et al. 2014
Drosophila (indel)	parents-children	1.2 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Keightley et al. 2014
Drosophila (pooled)	parents-children	4.0 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Keightley et al. 2014

parent-children: トリオ解析



次世代シーケンサー(NGS)を用いた変異率推定

Species		Mutation Rate	Ref
Human	parents-children	12 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Kong et al. 2012
Chimp	parents-children	12 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Venn et al. 2014
Mouse (B6J)	sib mating	5.4 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Uchimura et al. 2015
Mouse (B6JJcl)	<u>complete outbreeding*</u>	5.5 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Fukumura, Gondo et al. (未発表)
Mouse (MSM/Ms)	sib mating	4.4 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Fukumura, Gondo et al. (未発表)
Drosophila (SNV)	parents-children	2.8 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Keightley et al. 2014
Drosophila (indel)	parents-children	1.2 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Keightley et al. 2014
Drosophila (pooled)	parents-children	4.0 × 10 ⁻⁹ /bp/generation	Keightley et al. 2014

超高速ゲノム解読に基づくマウス生殖細胞誘発変異検出と微量変異原リスク評価法の確立.

1. 完全遠縁交配法による自然発生突然変異の蓄積
2. NGS法による蓄積した変異の高速高精度検出

Cy/Pm法: 選択淘汰のない生存力ポリジーン変異の蓄積法

D. melanogaster (fruit fly)

Mukai T. *Genetics* 50: 1-19, 1964

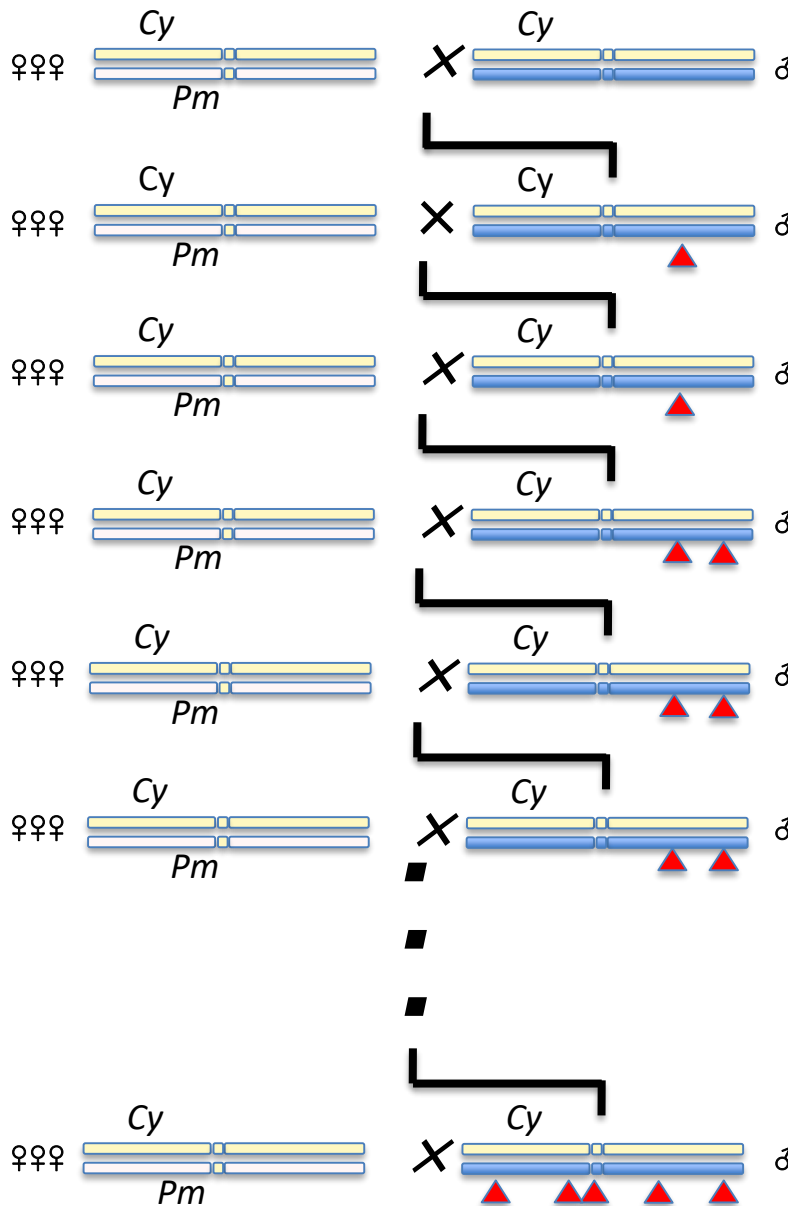
Balancer 染色体
Cy



優性可視変異と劣性致死変異をもつ。
さらに、複合逆位があり組換えがない。



Cy phenotype



解析する染色体



任意に選ぶことができ、この
染色体にヘテロ接合で蓄積さ
れていく。



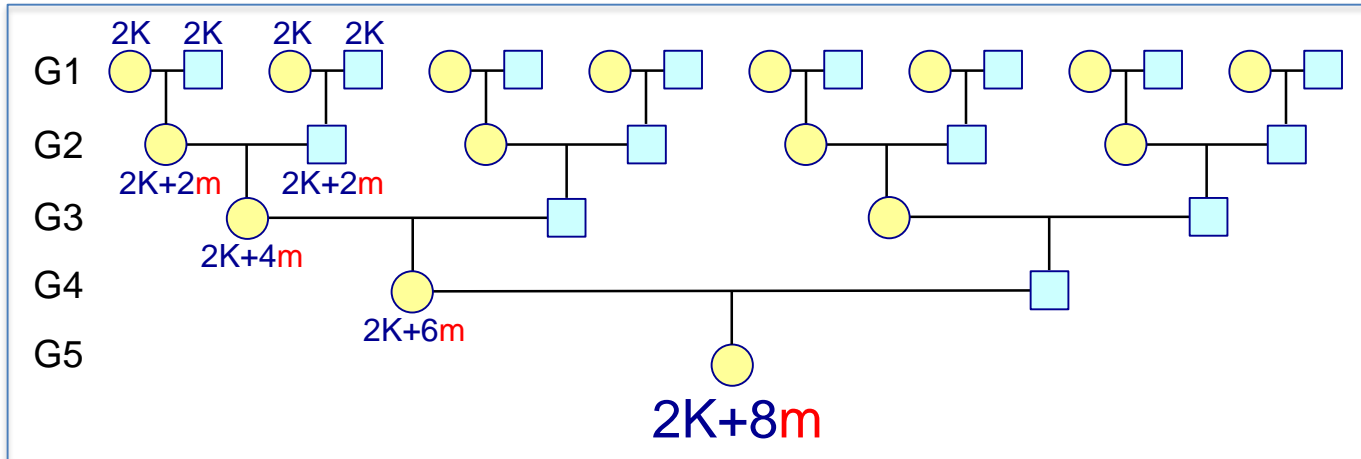
Wild type

向井輝美博士



1929-1990

完全遠縁交配Complete outbreedingを用いた生殖細胞系列germline変異の蓄積



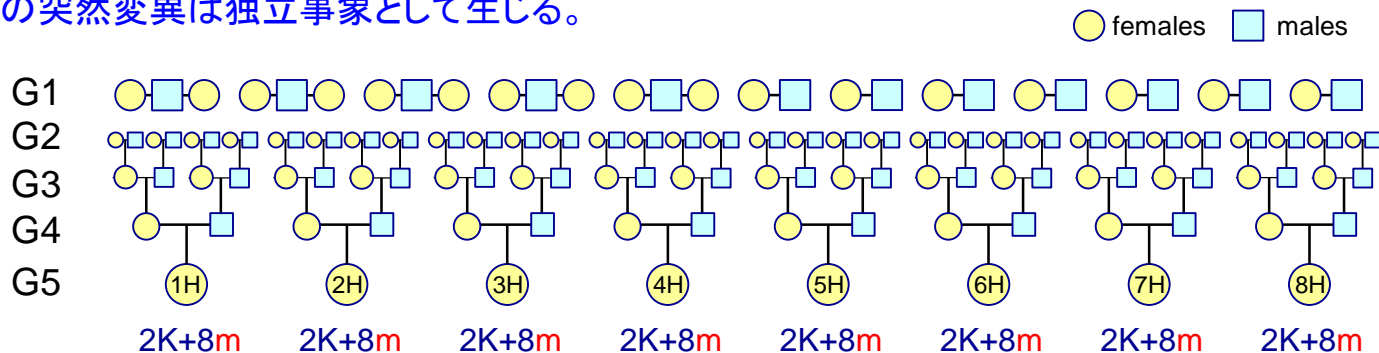
X 8 家系
1年2ラック
1テクニシャンにて実施
4, 8 & 12週令時に
全個体の体重も測定

有性生殖するすべての生物種にそのまま応用可能な普遍的変異蓄積法

1. 完全遠縁交配法による自然変異の蓄積法

仮定

初代マウス(G1)は、平均2K変異(=参照配列と異なる配列)をもとと有する。
各配偶子には、平均h m 個の新規変異(*de novo mutations*)が生じる
すべての突然変異は独立事象として生じる。



テクニカルスタッフ1名、2ラック、1年で完了。

$$128+64+32+16+8$$

$$29+64+32+16+8 = 149$$

G1は、独立な64卵と64精子から64匹のG2が得られればよい！
しかし、「偏った」G1集団の使用を避けるため、
33匹からはじめ29匹から全8家系総計149匹が得られた。

註:実際には、平均約7匹の産仔が得られるので
8家系から得られたマウス総数は~1000匹



C57BL/6JJcl近交系

完全遠縁交配8家系:2013年7月交配開始—2014年7月DNA抽出

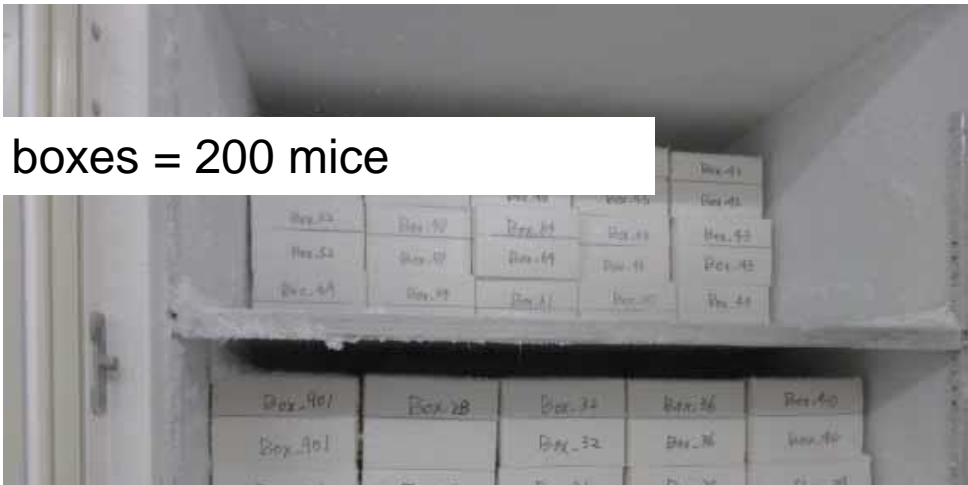


産出全マウス約1000匹を-80℃保存
臓器も抽出DNAもいつでも利用可能

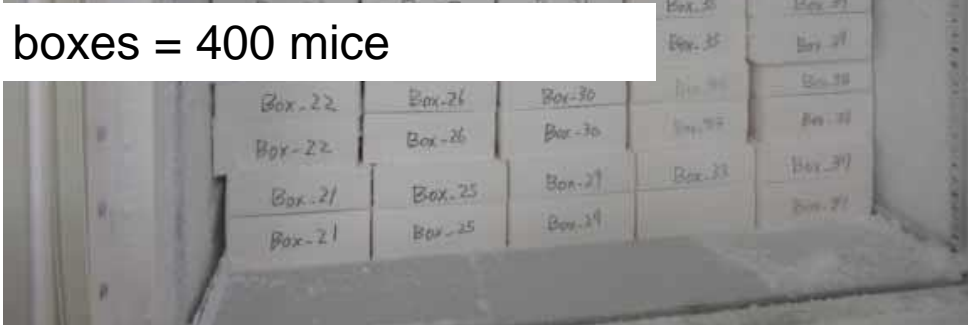


10 mice/box

20 boxes = 200 mice



40 boxes = 400 mice



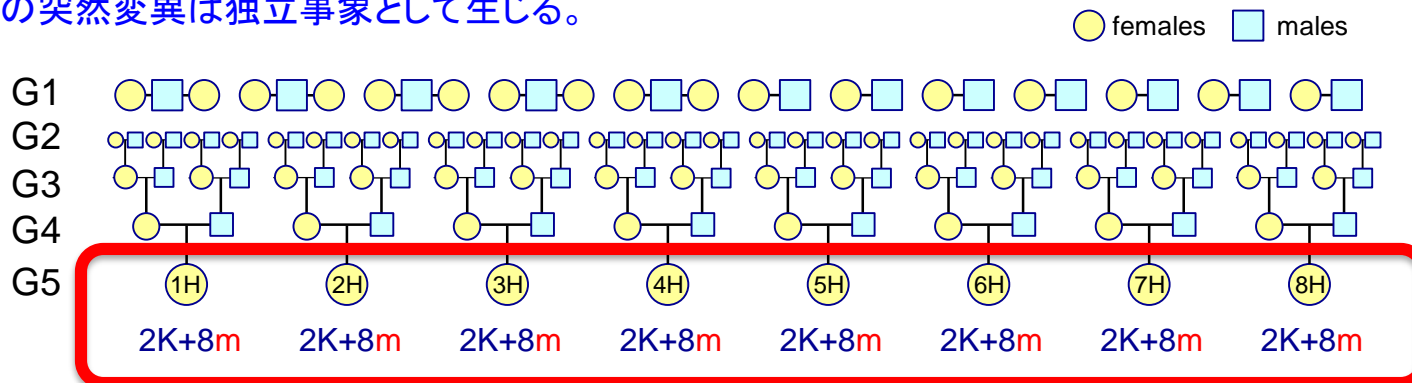
8家系はさらに交配を重ね、
凍結胚として理研バイオリソース
センターにて保管。

いつでも生きたマウスとして
凍結胚から復元利用可能。

1. 完全遠縁交配法による自然発生突然変異の蓄積

2. NGS法による蓄積した変異の高速高精度検出

初代マウス(G1)は、平均2K変異(=参照配列と異なる配列)をもともと有する。
各配偶子には、平均 h m 個の新規変異(*de novo* mutations)が生じる
すべての突然変異は独立事象として生じる。



The eight G5 female genomic DNA were subjected to WGS/SNV analysis:

WGS Pipeline

HiSEQ2500, rapid mode.

Library of ~

Pair End Re

151 cycle.

Basecall: R

(by Toyoda

SNV Call Pipeline

Mapping by BWA.

KEY FILTER 1

de novo mutationsは必ず

UNIQUEヘテロとして

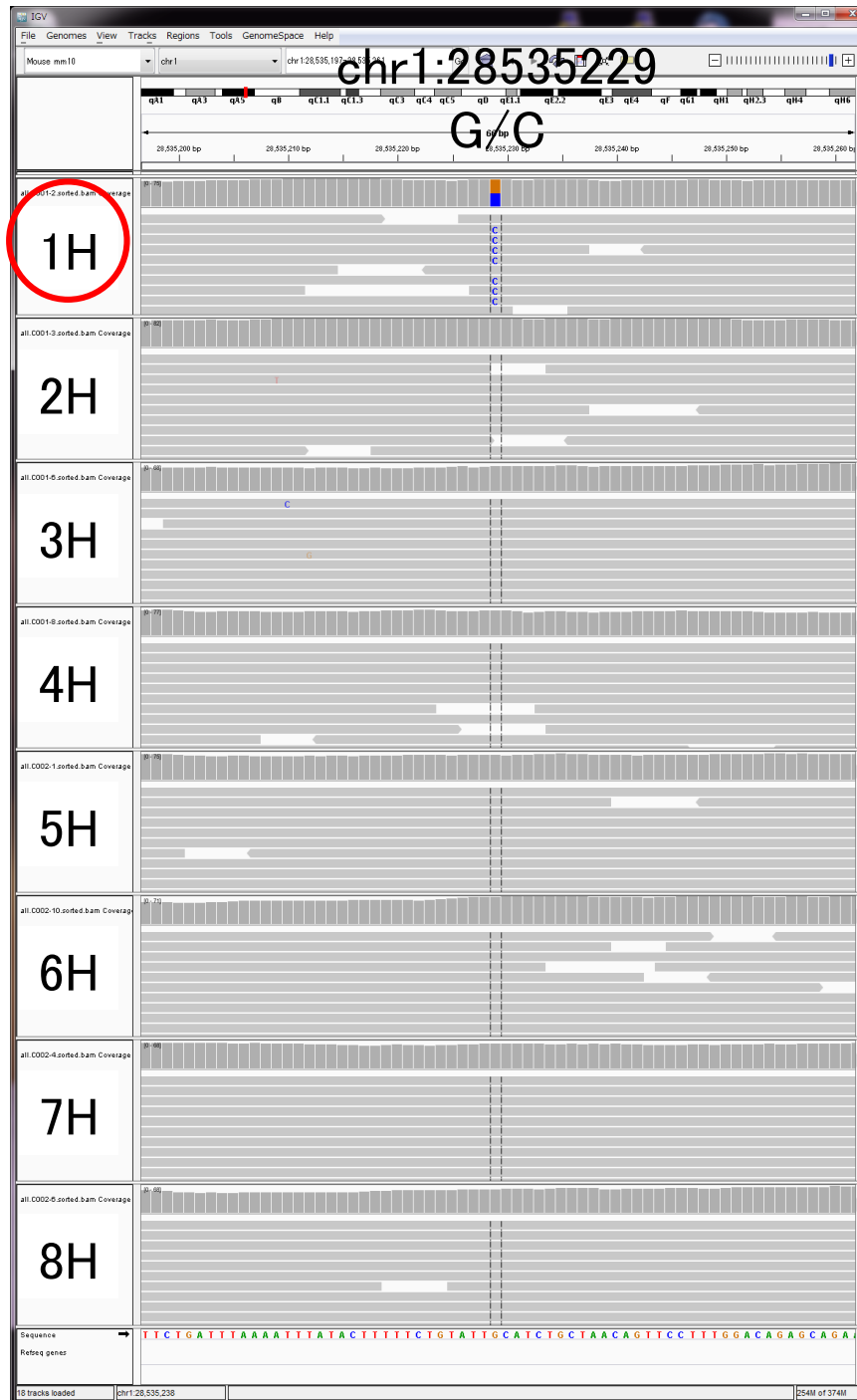
1匹のG8にのみ検出される！

(GRCm38.4).

ads in any G1.

変異検出対象領域⇒ 非反復配列マウスゲノム領域 = 1,302,148,477 bp
平均57.3Xカバレッジ/G5. 総458.5Xカバレッジ/8家系

SNVコール例



WGS by HiSeq

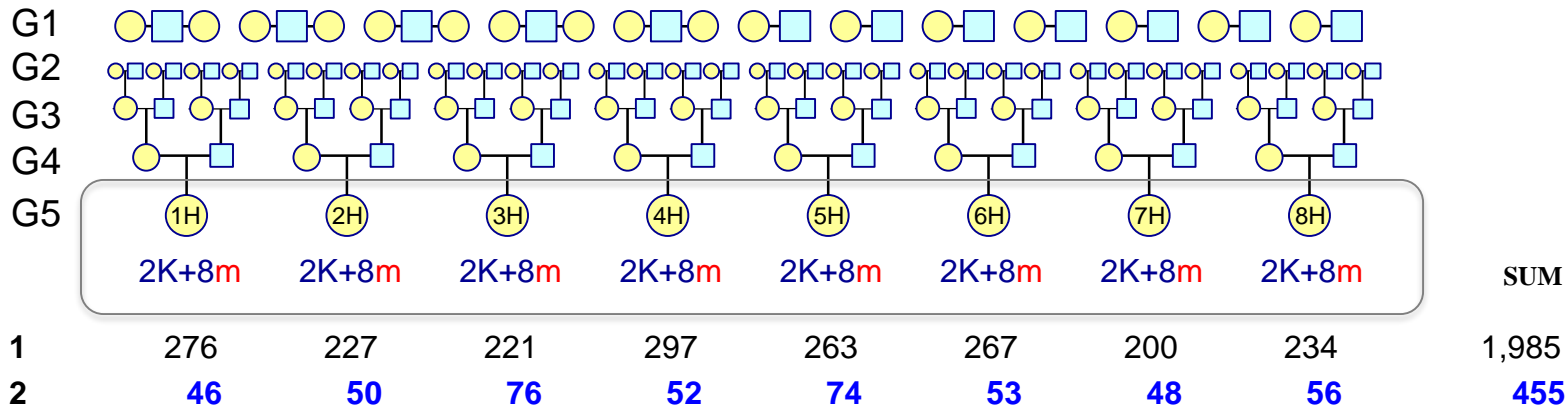
Ref:G 34(18+/16-)
Alt:C 37(24+/13-)

1. 完全遠縁交配法による自然発生突然変異の蓄積

2. NGS法による蓄積した変異の高速高精度検出

初代マウス(G1)は、平均2K変異(=参照配列と異なる配列)をもともと有する。
 各配偶子には、平均 h m 個の新規変異(*de novo mutations*)が生じる
 すべての突然変異は独立事象として生じる。

● females □ males



$m = 455/8/8 = 7.11/\text{gamete}/\text{世代}$ (検出可能な非反復配列領域に生じた変異数)

$\mu = 7.11/1,302,148,477\text{bp} = 5.46\text{E-}9/\text{bp}/\text{世代}$

SLTでは、 $m = 7\text{E-}5/\text{gamete}/\text{世代}$ だったので、1匹あたり100,000倍の変異を検出できる

KEY FILTER 1 de novo mutationsは必ず
 UNIQUEヘテロとして
 1匹のG8にのみ検出される！

KEY FILTER 2
 どの親G1にも存在しない！

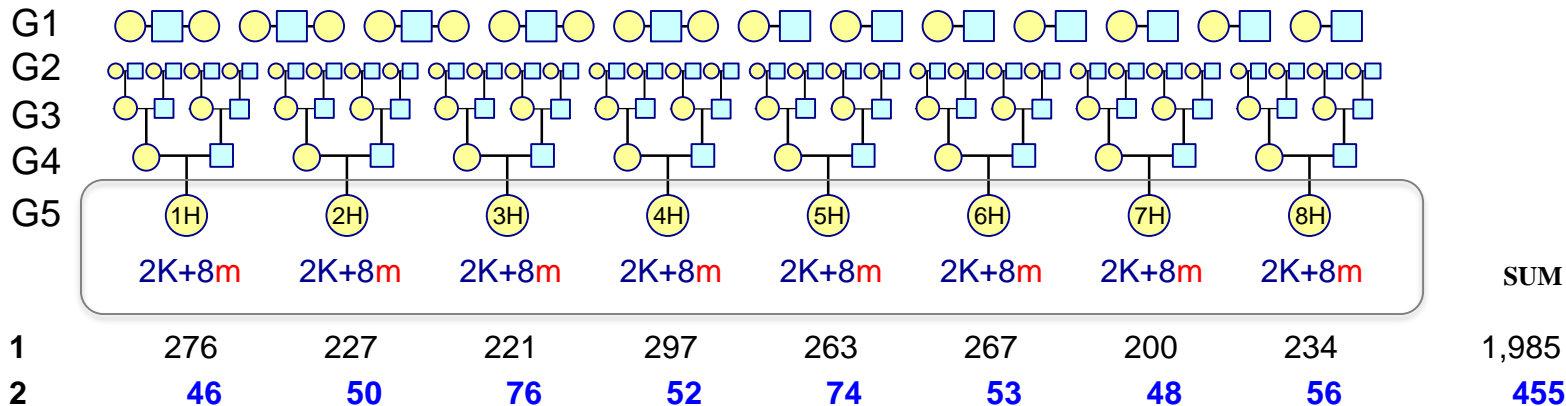
変異検出対象領域⇒ 非反復配列マウスゲノム領域 = 1,302,148,477 bp
 平均57.3Xカバレッジ/G5. 総458.5Xカバレッジ/8家系

1. 完全遠縁交配法による自然発生突然変異の蓄積

2. NGS法による蓄積した変異の高速高精度検出

初代マウス(G1)は、平均2K変異(=参照配列と異なる配列)をもともと有する。
 各配偶子には、平均 $h m$ 個の新規変異(*de novo mutations*)が生じる
 すべての突然変異は独立事象として生じる。

● females □ males



$m = 455/8/8 = 7.11/\text{gamete}/\text{世代}$ (検出可能な非反復配列領域に生じた変異数)

$\mu = 7.11/1,302,148,477\text{bp} = 5.46\text{E-}9/\text{bp}/\text{世代}$

マウスゲノムサイズを $3\text{E}9\text{bp}/\text{haploid}$ とすれば

配偶子がもつ平均変異数 = $5.46\text{E-}9 \times 3\text{E}9 = 16.4$ 個

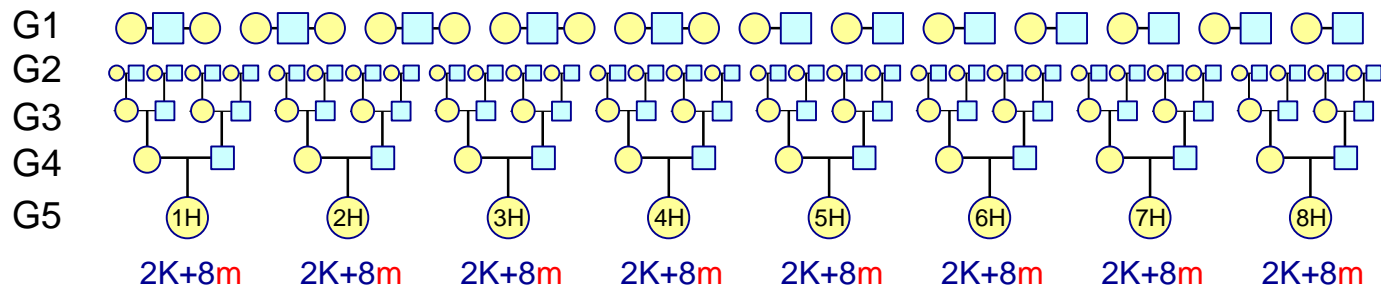
受精卵がもつ平均変異数 = $5.46\text{E-}9 \times 3\text{E}9 = 32.8$ 個

完全遠縁交配8家系から検出できた総変異数: **455個**/非反復配列領域

変異検出対象領域 \Rightarrow 非反復配列マウスゲノム領域 = 1,302,148,477 bp
平均57.3Xカバレッジ/G5. 総458.5Xカバレッジ/8家系

1. 完全遠縁交配法による自然変異の蓄積法

● females □ males



交配ペア数

17
32
16
8

合計73ペア

テクニカルスタッフ1名、2ラック、1年で完了。

必要マウス数 = G1+G2+G3+G4+G5

= **29+64+32+16+8 = 149**

完全遠縁交配8家系から検出できた総変異数: **455個**/非反復配列領域

平均1変異発見に要するマウス数 = $149/455 = 0.327$
 匹マ必要な交配ペア数 = $73/455 = 0.160$
 60ペア

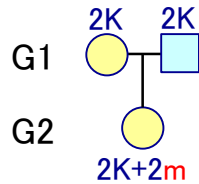
SLT法によるバックグラウンドでの自然変異率 (線量ゼロ点における変異率)

平均1変異発見に要するF1数 = $1/7E-5 = 14,285$ 匹F1マウ
 1ペアあたりの平均産仔数 = 7匹
 必要な交配ペア数 = $\sim 14,000/7 = 2,000$ ペア

>4万倍
>12,000倍

● females ■ males

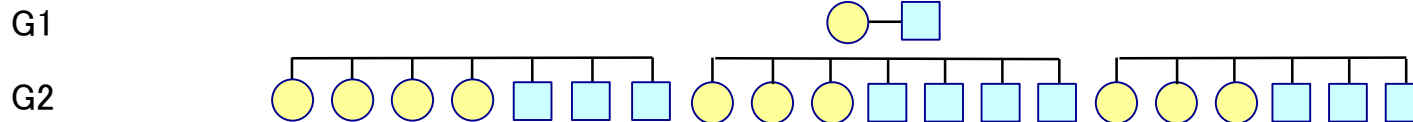
トリオ解析



$\mu = 5.46E-9/bp/世代$ (C57BL/6JJcl背景で)

← 卵から $m=16.4$ 変異。精子からも $m=16.4$ 個、受精卵には計 32.8 変異が毎世代新たに生じる。
ただし、検出出来る数は $m=7.11/非反復配列領域$ とわかった。そこで。。

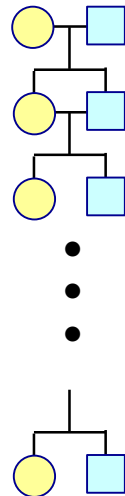
拡張トリオ解析 (小規模に国立医薬品食品衛生研究所増村健一博士と共同解析)



$m = 7.11/非反復配列領域$

1対のマウス雌雄ペアの3産から~20産仔を得ることができる。
∴ $7.11 \times 2 \times 20 = 284$ 変異をコントロール群から検出できる。

兄妹交配解析 (2012年11月より開始/理研BRC吉木淳博士によって交配維持)



各世代で1ケージで済むのでさまざまな遺伝的背景をもつ系統における Mutagenesis を比較するのに適している。

C57BL/6JJcl

C57BL/6NCrICrlj

BALB/cAJcl

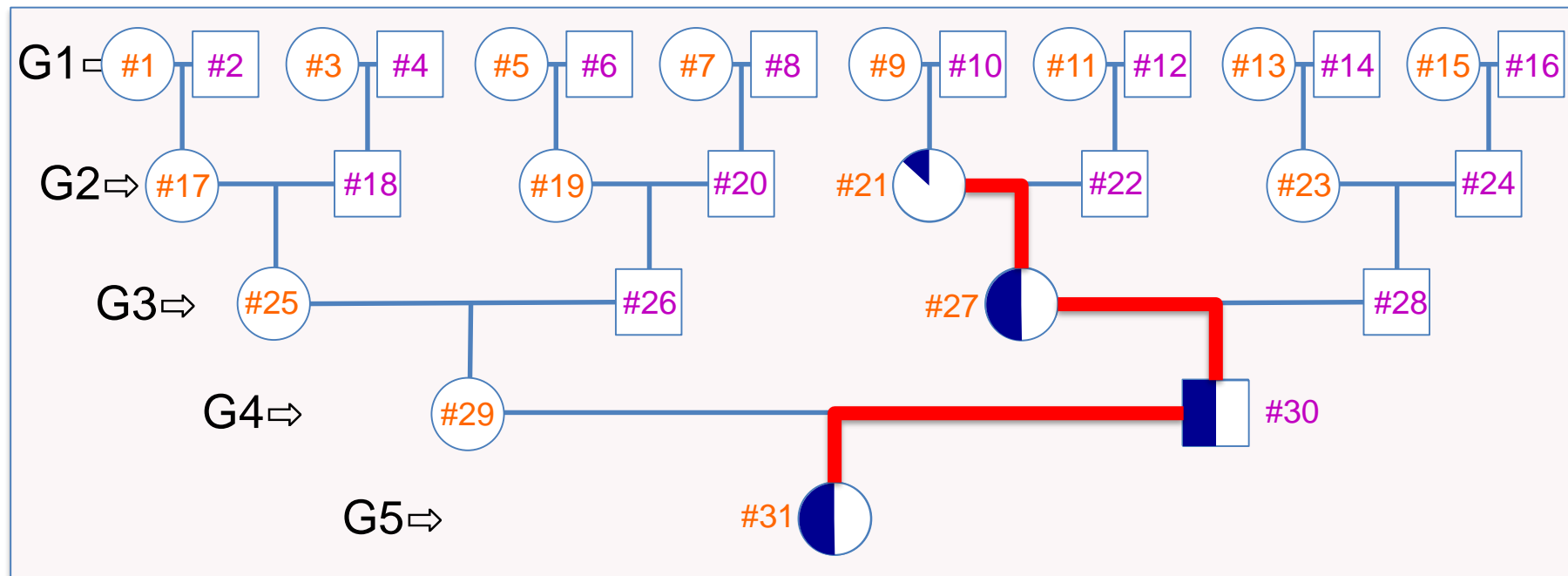
129S2/SvPas

MSM/Ms

← $\mu = 4.4E-9/bp/世代$

完全遠縁交配/拡張トリオ解析では、G1ペアに異なる近交系を用いてF1バックグラウンドでの解析ができる

遠縁交配家系における新規変異のトレース例



chr5:74880556 A>G

Average 57.3X depth WGS per G5, Total 458.5X depth for the eight G5 genomes.
Validation by using Amplicon-seq.

AGENDAS

マウス(or 有性生殖する生物種)でも1年以内に生殖細胞系列自然変異を
数百規模で蓄積検出可能

遺伝的背景を「F1雑種」——完全遠縁交配法・拡張トリオ法

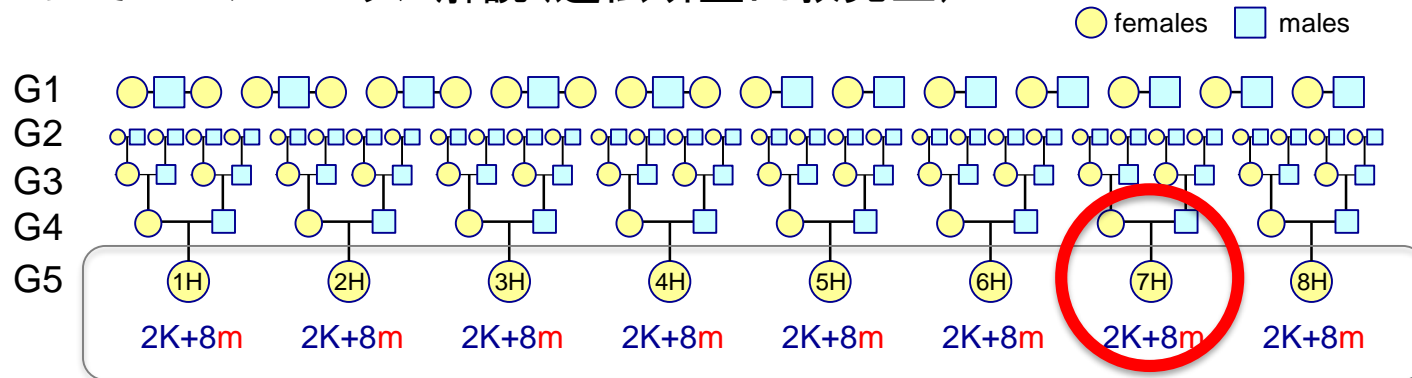
遺伝的背景「別に色々」——兄妹交配法

体細胞は?? (HITEC Mouse(権藤)/gpt-delta Mouse(能見・増村))

AMED NBRPゲノム情報等整備プログラム 2015.10 - 2016.3 (代表 権藤洋一)

1分子長鎖再解読に基づく標準マウスゲノム配列および構造決定と公開

PacBio RSIIにて~20カバレッジ解読(遺伝研豊田敦先生)



1. マウスゲノム参照配列の見直しやGap filling
2. Short readでは検出できない構造変異Structural variationsの検出

現在の参照ゲノム配列

C57BL/6J inbred genome ↓

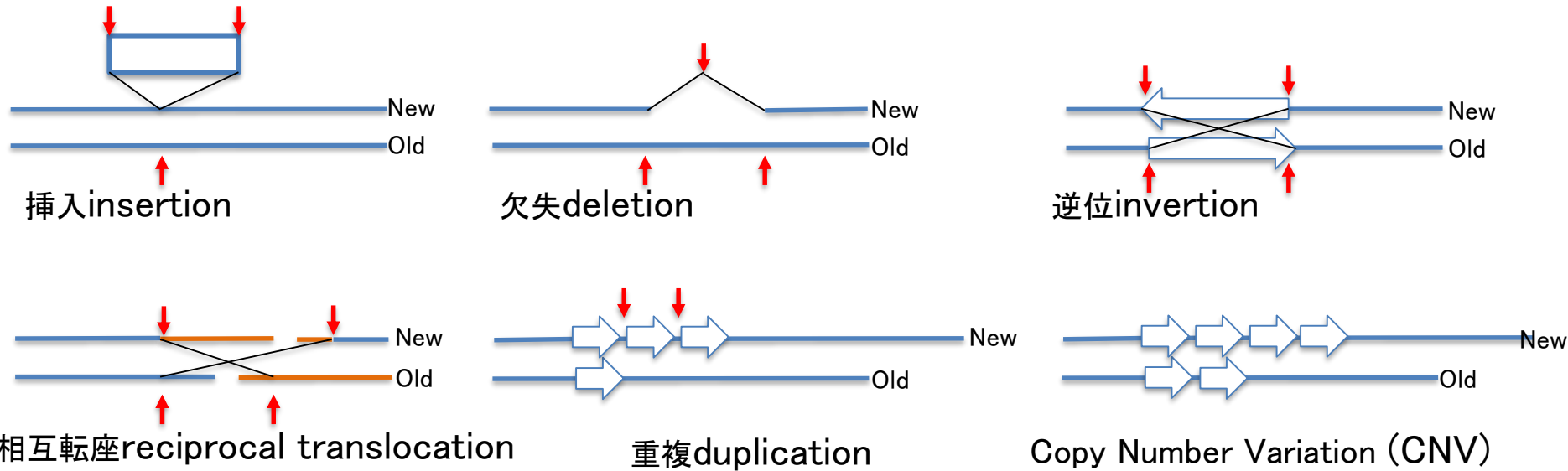
	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo Sapiens</i>
NCBI	GRCm38.p4	GRCh38.p4
Number of regions with alternate loci or patches	94	257
Total sequence length	2,803,568,840	3,228,894,042
Total assembly gap length	79,356,756	161,368,151
Gaps between scaffolds	191	349
Number of scaffolds	293	790
Scaffold N50	52,589,046	59,364,414
Number of contigs	796	1,449
Contig N50	32,273,079	56,413,054
Total number of chromosomes and plasmids	22	25
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001635.24	Dec. 2011	Dec. 2013



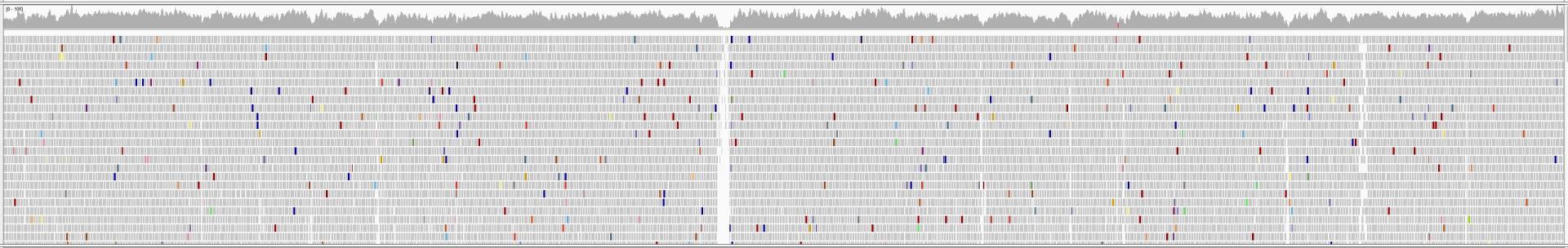
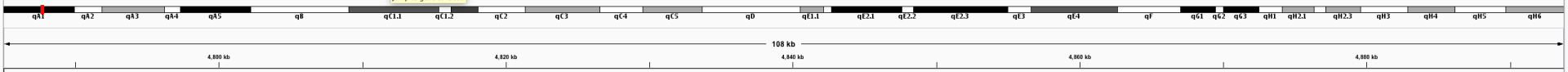
サンガー法やNGS short readで問題となる複雑な構造領域

大きな構造変異 Structural Variation (SV)

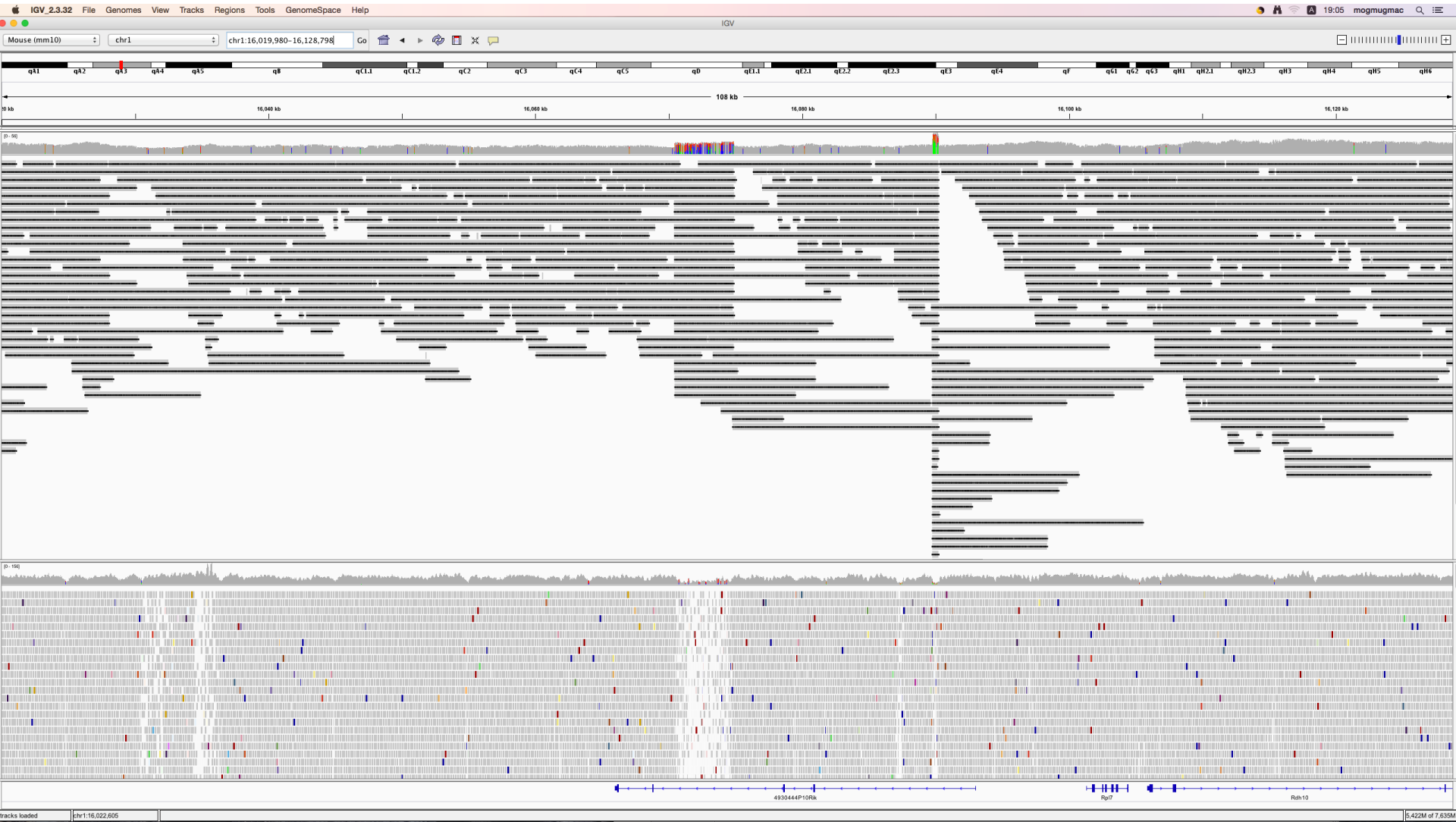
100~200bpのショートリードでは抽出されづらい構造変異



赤矢印で示した分断点以外は同じ配列なのでショートリードでは見つけにくい。



Mismatch例 BreakPoint例



AGENDAS

マウス(or 有性生殖する生物種)でも1年以内に生殖細胞系列自然変異を
数百規模で蓄積検出可能

遺伝的背景を「F1雑種」——完全遠縁交配法・拡張トリオ法

遺伝的背景「別に色々」——兄妹交配法

体細胞は?? (HITEC Mouse(権藤)/gpt-delta Mouse(能見・増村))

1分子ロングリードNGS(NGM)法を用いることで構造変異も蓄積検出可能
ゲノム参照配列の見直し・Gap Fillingも(検出精度向上につながる)

NGS PacBio Squal/Oxford Nanopore MinION

NGM BioNano Saphyr

組合せ 10XGenomics などなど

変異率は細胞分裂あたり(DNA複製あたり)一定ではない

32細胞期胚まで~10倍近い変異率(生殖細胞系列変異)

精子由来変異が卵由来変異の2倍(ヒト)

それぞれの臓器における変異率は?

NGSビッグデータ解析パイプラインの高速高精度化

統計解析を含むデータマイニング/モデル系構築と検証

古典的集団遺伝学知見の再活用(向井)——変異の「質」の解析も

D/L比: 非致死荷重/致死荷重⇒放射線では0.5. 自然変異では1.0

優性度(degree of dominance)⇒致死変異では0.0、非致死遺伝子では0.4

高感受性系統(mutator)の利用(大野、内村)

マウスとショウジョウバエの違い!!! (毛色・眼色 vs 劣性致死)

Contributors (敬称略)

理研GSC個体遺伝情報研究チーム

瀬筒秀樹 (現 農研機構・東大)
櫻庭喜行 (現 民間)
福村龍太郎 * (現 民間)
村田卓也 * (現 神戸大)
牧野 茂 * (現 癌研)
中井祐治 * (現 民間)
小瀧逸人 * (現 民間)

理研BRC新規変異マウス研究開発チーム

福村龍太郎 * (現 民間)
村田卓也 * (現 神戸大)
牧野 茂 * (現 癌研)
中井祐治 * (現 民間)
小瀧逸人 * (現 民間)
石塚祐一 (現 東北医薬大)

理研BRC実験動物開発室

吉木淳
目加田和之 (現 岡山理大)
門田雅代

東海大学医学部分子生命科学

木村 穰
本杉奈美

国立医薬品食品衛生研究所

能見武彦
増村健一

九州大学生体防御医学研究所

中別府雄作
作見邦彦

九州大学放射線医学

大野みずき

放射線影響研究所大学放射線医学

内村有邦

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス

真木寿治

2014, 2015年ゲノム支援MEXT 221S0002

2016, 2018年先進ゲノム支援JSPS 16H06279

国立遺伝学研究所研生命情報センター

藤山秋佐夫 * (現 情報システム研究機構)
豊田 敦

九州大学大学院農学院

久原 哲
田代康介

森 一樹 (現 産総研早大)

金 相完

JSPS 25241016, 17H00789

AMED NBRPゲノム情報等整備プログラム