

令和6年1月25日

各報道機関 御中

国立大学法人山梨大学

『ゲノム DNA に内在する 1 塩基変異を簡便に検出できる手法』を開発

山梨大学大学院総合研究部発生生物学の川原敦雄教授の研究グループは、ゲノム DNA に内在する 1 塩基変異を簡便に検出できる新しい手法の開発に成功しました。

Single nucleotide variant (SNV:1 塩基バリエーション) はゲノム DNA のある特定の塩基配列内での 1 塩基変異のことを指し、SNVs のうち特定の集団内での頻度が 1%以上あるものを Single Nucleotide Polymorphism (SNP:1 塩基多型) と呼びます。SNPs を含めた SNVs は様々な生物種において幅広く確認されており、特定の遺伝子領域内で認められた場合、その塩基配列の違いが遺伝子機能の変化を伴う形態学的異常につながりうるということが知られています。実験動物であるショウジョウバエやゼブラフィッシュにおいては化学変異原を用いて様々な遺伝子に対して点突然変異 (1 塩基変異) を誘導することができます。この方法を利用して形態学的に異常を示す変異体を最初に作製し、その形態異常の原因となっている責任遺伝子の中の 1 塩基変異 (SNV など) を同定することで形態形成における新しい生命原理を解明できます。ヒトにおいても同様に 1 塩基変異が原因で数多くの遺伝子疾患を引き起こしていることが報告されています。そのためこれらの 1 塩基変異を特定することは疾患の原因を突き止める上で大変重要です。現在、1 塩基変異を簡便に効率よく検出する技術は限られており、標的遺伝子の微細なゲノム変異を同定する手法として DNA の塩基配列を直接解読するシーケンス解析を行う方法が主です。しかし、シーケンス解析は比較的高額な費用がかかり、また解析結果を得るまでにある程度の時間を要します。私達はこれまで微少なゲノム変異を検出する手法として標的ゲノム部位の PCR 法による増幅と電気泳動を組み合わせたヘテロ二本鎖移動度解析 (Heteroduplex Mobility Assay: HMA) を開発しました。しかしながら、この HMA は 1 塩基変異の検出には適していません。そこで私達は 1 塩基変異の直後に人為的に G (グアニン) を 4 つ挿入した 1 本鎖 DNA (GIP: Guanine Inserted Primer) を作製し HMA に応用することで 1 塩基変異を低価格かつ短時間で検出可能な新規の方法を開発しました。

今後、CRISPR-Cas9 法などのゲノム編集技術を用いて作製される疾患モデル生物 (1 塩基変異を保持) の増加が予想され、また、ヒト遺伝性疾患 (1 塩基変異を保持) の遺伝子型解析において 1 塩基変異の簡便な検出法の開発が望まれておりますので、本研究で開発した新規のゲノム解析技術が疾患モデル生物の樹立やヒトゲノム変異の検出に活用されることを期待しています。

なお、この研究発表は、2024 年 1 月 20 日、*Development, Growth & Differentiation* にオンラインで発表されました。

論文タイトル: Efficient detection of single nucleotide variants in targeted genomic locus
(標的遺伝子座における効率的な 1 塩基バリエーションの検出)

DOI: 10.1111/dgd.12910

1. 内容 (概略)

論文タイトル: Efficient detection of single nucleotide variants in targeted genomic locus
(標的遺伝子座における効率的な 1 塩基バリエーションの検出)

Single Nucleotide Polymorphism (SNP: 1 塩基多型) を含めた Single nucleotide variant (SNV: 1 塩基バリエーション) はゲノム DNA のある特定の塩基配列 (遺伝子変異) で生じることで様々な生物種において形態学的及び生理学的異常を示すことが判明しています。これらの 1 塩基変異を検出する手法として DNA シークエンス解析が主に用いられていますが、この手法を多くの試料のゲノム解析に用いると比較的高額になります。私達はこれまでゲノム変異を簡便に同定する手法として、標的ゲノム部位の PCR 法による増幅と電気泳動を組み合わせたヘテロ二本鎖移動度分析 (Heteroduplex Mobility Assay: HMA) が有用であることを報告しました (Ota S. et al., *Genes to Cells*, 2013)。しかしながら、この HMA は 1 塩基変異を検出できず、新たな解析手法の開発が望まれていました。本研究では、HMA の原理を基盤として新たに GIP と名付けた 1 本鎖 DNA を用いる簡単な検出法を開発しました。

本研究では 1 塩基変異の遺伝子型の違いで表現型が異なるゼブラフィッシュ変異体を用いることで、3 種類の異なる遺伝子型 (W: 野生ホモ型、M: 変異ホモ型、H: ヘテロ型) が判別可能かを検証しました。それぞれの標的遺伝子の領域に対して PCR 法で約 80-bp (base pair: 塩基対) の長さになるように増幅しました。そして 1 塩基変異を検出するために標的ゲノム部位内で約 40-bp の長さの 1 本鎖 DNA を設計し、同時に 1 塩基変異の直後に G (グアニン) を 4 つ挿入した 1 本鎖 DNA を作製しました (以後、約 40-bp かつ G を 4 つ挿入した 1 本鎖 DNA を GIP [Guanine Inserted Primer] と呼びます)。この GIP を PCR 産物 (PCR で増幅した約 80-bp の標的遺伝子産物) と相互作用させることで野生型では 4-bp のループ、変異型では 5-bp のループ構造を持つ複合体が形成されると推測しました。これらの複合体を作製した後に電気泳動を行うことで泳動度に違いが生じ、野生型と変異型が異なるバンドとして示され、遺伝子型を判別することが可能であると考えました (図 1)。

1 塩基変異を持ち二叉心臓の表現型を示す *spns2* 変異体 (Kawahara A. et al., *Science*, 2009) (図 2) に対して GIP を作製し PCR 産物 (*spns2* の場合: 81-bp) と反応させ、電気泳動を行いました。比較対照として全長を 30-bp へと短くした GIP (30bp) と G の代わりに A (アデニン) を 4 つ挿入した AIP を作製し、これらを PCR 産物に上記と同様な条件で反応させ、GIP と比較して検出能力に差が出るか同時に検証しました。

GIP を反応させず、電気泳動を行った条件では W, M, H のいずれも 81-bp のみにバンドが確認され (図 2B: 黒矢頭)、3 種類の遺伝子型を判別することはできませんでした (これまでの HMA 法での結果を示しています)。GIP (30bp) と GIP の場合は、どちらの条件でも 81-bp のバンドより上方に 1 または 2 本のバンドが確認されました。H に関しては 81-bp (図 2B: 黒矢頭) より上方に 2 つのバンド (図 2B: 赤・緑矢頭) が示され、GIP の方がより鮮明に 2 つのバンドが分離されていることが明らかとなりました (つまり 40-bp で設計した方がよいという結果です)。そして M で確認されるバンド (図 2B: 赤矢頭) は、GIP が変異型産物と相互作用し 5-bp ループ構造を形成し、W で確認されるバンド (図 2B: 緑矢頭) は、GIP が野生型産物と相互作用し 4-bp ループ構造を形成したバンドを示しています。この 2 つのバンドについて M で見られるバンドは W のバンドと比べて移動度が低くなっています。これは図 1 で推測した原理に合致する結果を得ていることを示しており (5 塩基ループの方がその立体構造がかさばり移動度は低くなる)、GIP を用いることで 3 種類の遺伝子型を判別することができました。AIP に関して、80-bp より上方に M で見られるバンド (図 2B: 緑アスタリスク) と W で見られるバンド (図 2B: 赤アスタリスク) はわずかにバンドの位置が異なりますが、H では 80-bp より上方に位置するバンドが 1 本しか確認できず、AIP では 3 種類の遺伝子型を明確に区別することは難しいという結果でした。私達は、連続した GGGG の塩基配列が AAAA より強固な立体構造を取りうる 것이このような実験結果に反映していると解釈しています。これらの結果から 1 塩基変異を有する遺伝子型に関しては AIP ではなく GIP を用いることで遺伝子型の判別が簡便に行うことが可能であることを見出しました。

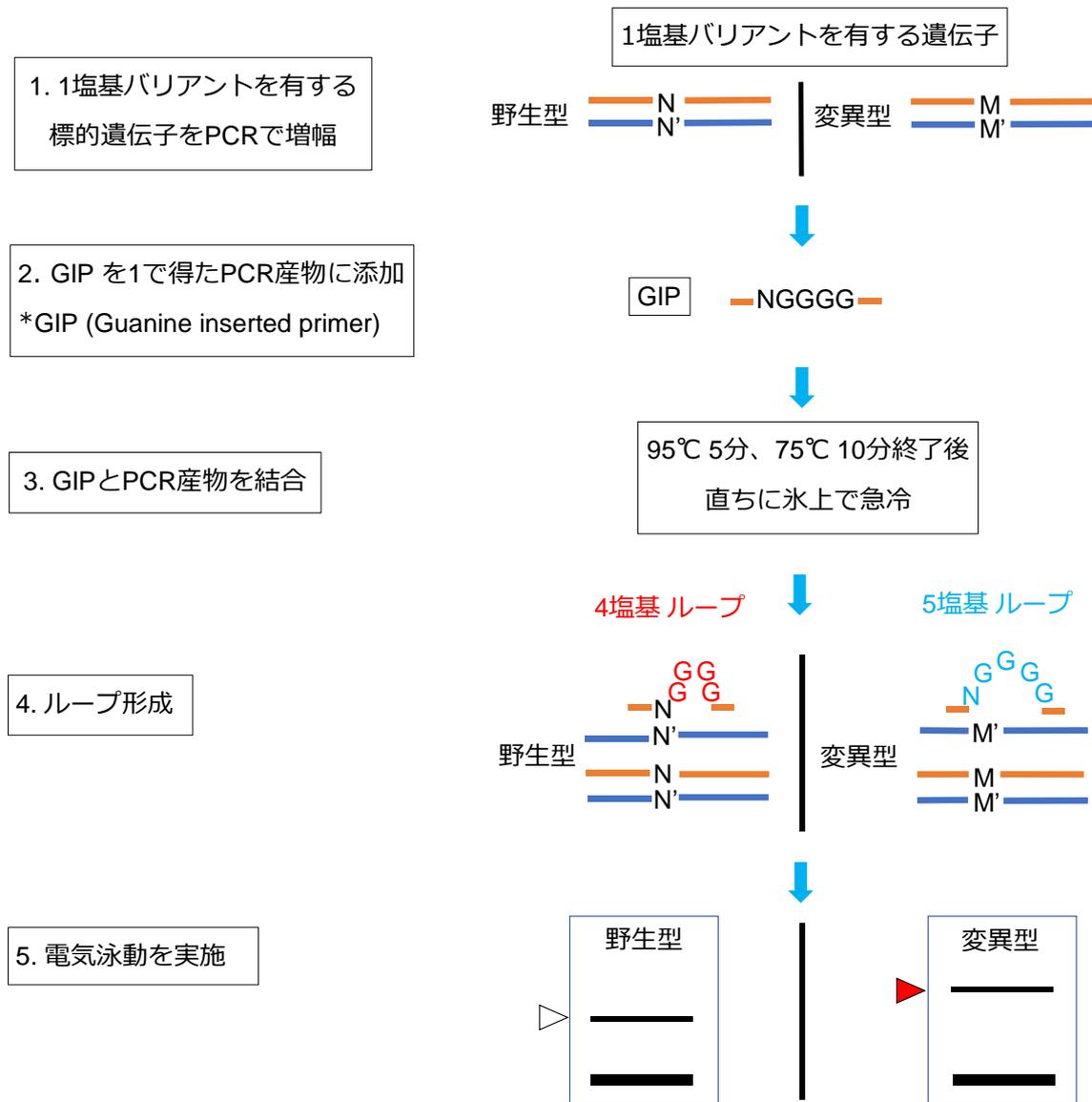
2. 今後の研究について

本研究は 1 塩基変異の直後に 4 つの G を挿入した GIP と名付けた 1 本鎖 DNA を用いることで簡便に安価に 1 塩基変異を検出できることを明らかにしました。今後は様々な生物種の 1 塩基変異の検出が GIMA で可能であることを調べる必要があると考えています。また、1 塩基変異だけでなく 1 および 2 塩基挿入・欠損に対する遺伝子型解析が可能であるかも今後調べる必要があります。全ての生物種は遺伝情報として DNA を使用していますので、GIMA は様々なゲノム解析に応用が可能と期待しています。

3. 今回の研究の医学分野への応用に関して

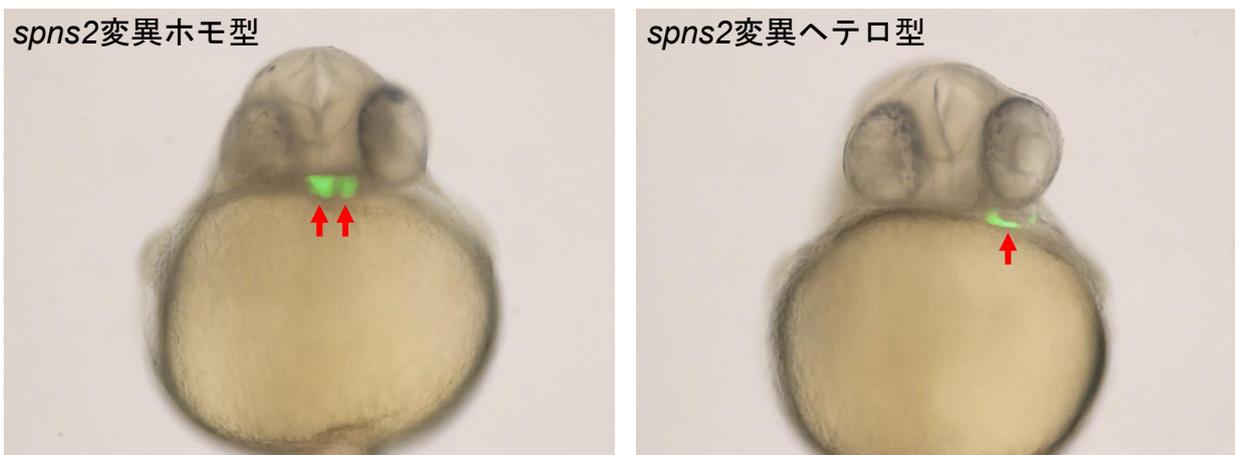
本研究で開発した新規のゲノム解析技術 GIMA は、これまで 1 塩基変異の検出に用いているシーケンス解析と比べて簡便に低価格で解析できる手法でありますので、生命科学及び医学研究において広く汎用性のある手法と考えています。この GIMA を用いることで 1 塩基変異を持つ疾患モデル生物の維持や遺伝子型解析が容易となります。特に、1 塩基変異が原因で発症するヒト疾患の遺伝子型解析に適しており、微細な特定の 1 塩基多型疾患に対するゲノム解析が格段に着手しやすくなると考えています。

図 1 GIMA: GIP を用いた遺伝子型の判別とその手法の概略図

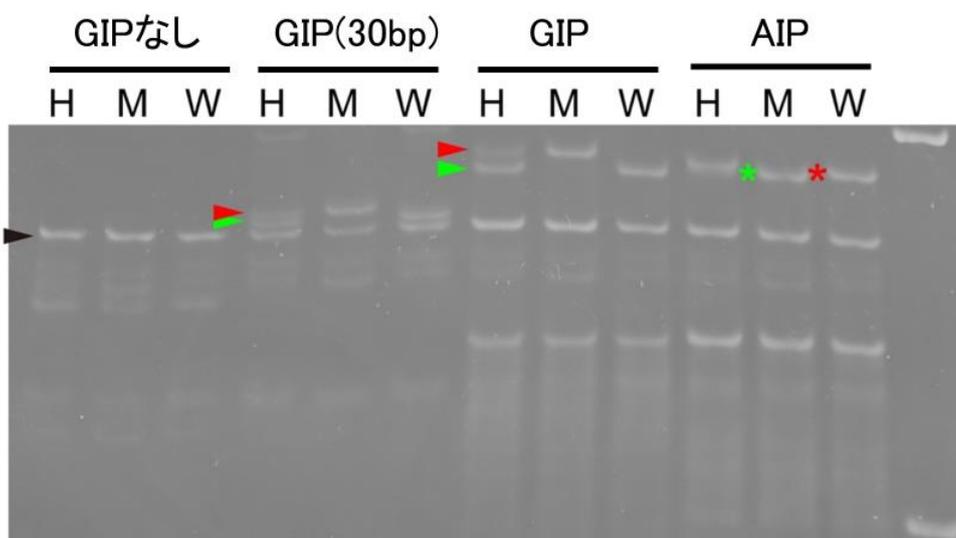


1. 1 塩基バリエントを有する遺伝子を PCR 法で増幅します。野生型のセンス鎖は N、アンチセンス鎖には N' の塩基を持っています。一方、変異型のセンス鎖は M、アンチセンス鎖には M' の塩基を含みます。オレンジはセンス鎖、青色はアンチセンス鎖を示しています。
2. GIP に上記の PCR 産物を混ぜます。
3. 図内の反応条件で GIP と PCR 産物を反応させます。
4. 野生型では G が 4 塩基分突出したループ構造 (GGGG) を取り、変異型では 4 つの G に加え N を含めた 5 塩基分突出したループ構造 (NGGGG) を取るのが予想されます。
5. 上記の反応物を電気泳動することで突出したループ構造の安定性と立体障害の違いが泳動速度に影響し、バンドの位置に違いが出ます。白矢頭は GIP と野生型産物が複合体を形成し 4 塩基分突出したループ構造 (GGGG) を取ったバンドの位置を示し、赤矢頭は GIP と変異型産物が複合体を形成し 5 塩基分突出したループ構造 (NGGGG) を持つバンドの位置を示しています。

(A)



(B)



spns2 野生型: 5' -CTGGTTGTTAGTGCTGTCCAGATGCTTGGTAGGCATTGG-3'
spns2 変異型: 5' -CTGGTTGTTAGTGCTGTCCAGITGCTTGGTAGGCATTGG-3'
spns2 GIP (30bp): 5' -TAGTGCTGTCCAGAGGGGTGCTTGGTAGGC-3'
spns2 GIP: 5' -CTGGTTGTTAGTGCTGTCCAGAGGGGTGCTTGGTAGGCATTGG-3'
spns2 AIP: 5' -CTGGTTGTTAGTGCTGTCCAGAAAAATGCTTGGTAGGCATTGG-3'

図 2 *spns2* ホモ変異型とヘテロ型の表現型、GIP (30bp)、GIP、AIP による 1 塩基変異型の判別

A: 心臓を Tg(*cm1c2:eGFP*) (心臓特異的に緑色蛍光タンパク質を発現している系統) で可視化しています (赤矢印)。*spns2* 変異ホモ型はヘテロ型と異なり 1 日胚において二叉心臓を形成します。

B 上段: GIP を反応させず電気泳動を行った条件では (W: 野生ホモ型、M: 変異ホモ型、H: ヘテロ型) のいずれも 81-bp のみにバンドが確認されました (黒矢頭)。

GIP (30bp) または GIP を PCR 産物と反応させた場合、GIP (30bp) または GIP と変異型産物が複合体を形成し 5-bp ループ構造を示したバンド (赤矢頭)、GIP (30bp) または GIP と野生型産物が複合体を形成し 4-bp ループ構造を示したバンド (緑矢頭) を検出しました。

AIP を PCR 産物と反応させた場合、AIP と変異型産物が複合体を形成し 5-bp ループ構造を持つバンド (緑アスタリスク)、AIP と野生型産物が複合体を形成し 4-bp ループ構造を示したバンド (赤アスタリスク) を確認しました。

B 下段: *spns2* 遺伝子の野生型、変異型の塩基配列、GIP (30bp)、GIP、AIP の塩基配列を示しています。緑色は野生型、赤色は変異型での 1 塩基変異の部分を示しています。青色は人為的に挿入したグアニン (G)、紫色は人為的に挿入したアデニン (A) を示しています。

【用語説明】

1 塩基多型 (SNP) : Single nucleotide variant (SNV:1 塩基バリエーション)はゲノム DNA の特定の塩基配列内での 1 塩基変異のことを指し、その発生頻度がある集団内で 1%以上占めるものを SNP と呼びます。

ヘテロ二本鎖移動度解析 (Heteroduplex Mobility Assay: HMA) : 挿入・欠失変異を含む標的ゲノム領域を PCR 法により増幅すると野生型 DNA と変異型 DNA のヘテロ二重鎖が形成されます。この挿入・欠失変異を含むヘテロ二重鎖は二重鎖を形成できない一本鎖の部分が独特な高次構造をとります。この構造によってヘテロ二重鎖はホモ二重鎖と比べて電気泳動時の泳動度が遅くなる傾向があり、この現象を利用し遺伝子型を判別する解析方法です。

【論文に関する情報】

Efficient detection of single nucleotide variants in targeted genomic locus

Ryota Sone, Saori Fujimaki, Atsuo Kawahara

Development, Growth & Differentiation, 20 January 2024

DOI: 10.1111/dgd.12910

(お問い合わせ先)

本研究で開発しました GIMA に関する詳細なプロトコールは、下記のメールアドレスにご連絡いただければ、その情報を送付いたします。

国立大学法人 山梨大学大学院総合研究部 総合医科学センター 発生生物

教授 川原 敦雄 (かわはら あつお)

TEL : 055-273-9375

e-mail : akawahara@yamanashi.ac.jp

総合医科学センター 発生生物

博士課程大学院生 曾根 良太 (そね りょうた)

e-mail : r.sone@yamanashi.ac.jp

(広報担当)

国立大学法人 山梨大学 総務企画部 総務課 広報企画室

TEL : 055-220-8005

e-mail : koho@yamanashi.ac.jp