

次世代シーケンサーを使用した 未来の世代に伝わる環境化学物質の影響検出

SATテクノロジー・ショーケース2017

■ はじめに

ヒトの全ゲノム配列が2003年に解読されてから、全ゲノムの塩基配列を読むことが出来る次世代シーケンサーを使用した研究が爆発的に広がっている。今日では、種々のがんを初めとする様々な疾患に対して、大規模な全ゲノム解析が行われ、その原因遺伝子の特定が進んでいる。また、動物実験においても同様の試みがなされ、疾病の予防、治療へ貢献している。

ヒトにおこる疾病・疾患の要因は遺伝的要因と環境要因の二つに大別される。遺伝的要因は発生段階から既定されてしまうため、生後どうすることも出来ない。一方、環境要因は因子が特定できれば、対策することが可能である。当所では、環境による健康への影響研究を行っている。近年、環境要因による影響がその個体のみでなく、多世代・継世代にわたって伝わるということが報告されてきた。その機序として考えられているのが、遺伝子の塩基配列変化を伴わない遺伝子発現制御システムであるエピジェネティクスである。エピジェネティクスに関しては、主にDNAのメチル化とヒストン修飾が広く研究されている。

本ポスターでは、環境要因による多世代・継世代影響に関わる重要な因子と考えられるDNAメチル化変化を、次世代シーケンサーを用いて1塩基単位でゲノムワイドに読む方法と実例をご紹介します。

■ 活動内容(方法と実例)

1. Reduced representative bisulfite sequence (RRBS) 法

次世代シーケンサーを用いることで、断片化したDNAの塩基配列を大量に読み取れる。さらに、得られた配列情報をマッピングすることでゲノム中の広範囲の配列情報を得ることが出来る。しかし、DNAメチル化はシトシンにメチル基が付加されたものなので、そのままではシーケンサーによって検出することは出来ない。そこで、メチル化されたシトシンはシトシンのまま、非メチル化シトシンがウラシルに変換されるbisulfite反応と呼ばれる方法を用いた。これにより、メチル化の違いを塩基の違いで検出することが出来る。DNAのメチル化はCpGサイトと呼ばれるCGが連続する配列に主に入ることが知られているため、断片化DNAにCGが含まれるように制限酵素はMsp Iを用いた。さらに、全ゲノム中には多数の繰り返し配列が存在し、シーケンシング後のマッピングの妨げになるので、AMPure XP ビーズによるサイズセレクションを行った。以上の方法と次世代シーケンシングを組み合わせることにより、CpGを含む

領域のメチル化をゲノムワイドに検出することが出来る。

2. 妊娠期の無機ヒ素曝露による孫世代肝腫瘍増加と、それに伴って変化するDNAメチル化変化領域の特定

後発的に自然発がんを発症するC3Hマウスを用いて、環境化学物質である無機ヒ素85 ppmを妊娠期(妊娠8-18日目)に飲水投与することで、孫世代の雄に肝腫瘍が増加することを見出した(図1)。無機ヒ素は発がん物質であるが、変異原性は低いことが知られ、エピジェネティック変化の攪乱が腫瘍発症機序として疑われる。そこで、上記RRBS法を用いて、腫瘍発症へのDNAメチル化の関与を検討した。サンプルとしては対照群(図1、CC群)とヒ素曝露群(図1、AA群)の正常組織、腫瘍組織を用いた。

DNAのメチル化は、特に転写開始点周辺の変化によって遺伝子発現が制御されるため、シーケンシング後、bed toolsを用いて転写開始点±2000 bpの領域で、対照群とヒ素曝露群でメチル化が変化した領域を特定した。

その結果、対照群の腫瘍組織と比較して、ヒ素曝露群の腫瘍組織において、有意にメチル化が変化する領域が見つかった。そのうち2つの領域が、新たにメチル化変化によって遺伝子発現を制御する可能性が示された。

以上の結果から、環境要因による多世代・継世代影響に関わるDNAメチル化変化を検出するのに、RRBS法は有用であることが示された。

■ 関連情報等(施設、論文)

施設: 次世代シーケンサー (HiSeq2500; Illumina社) によるシーケンシングは国立成育医療研究センター 研究所 周産期病態研究部 秦先生、中林先生の下で行った。

論文: Nohara et al., J Appl Toxicol. 2016; 36: 105-12.

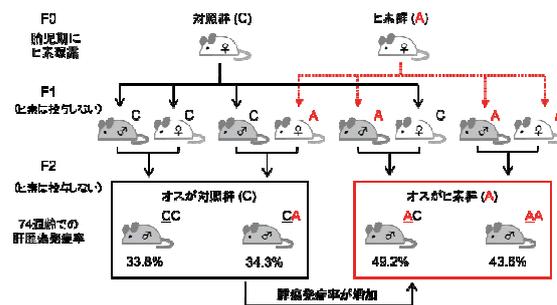


図1 孫世代マウスの作成と肝腫瘍発症率

代表発表者 **岡村 和幸 (おかむら かずゆき)**
 所属 **国立研究開発法人 国立環境研究所
 環境リスク・健康研究センター
 病態分子解析研究室**
 問合せ先 **〒305-0053 つくば市小野川 16-2
 TEL: 029-850-2570
 E-mail: okamura.kazuyuki@nies.go.jp**

■ キーワード: (1) 次世代シーケンシング
 (2) エピジェネティック変化
 (3) 多世代・継世代影響

■ 共同研究者:

野原 恵子、鈴木 武博
 (国立研究開発法人 国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター)
 秦 健一郎、中林 一彦、河合 智子
 (国立成育医療研究センター 研究所 周産期病態研究部)
 堀部 悠(東京女子医科大学 産婦人科)