

新規変異マウス研究開発チーム

Mutagenesis and Genomics Team



チームリーダー 榎藤 洋一 (Ph.D.)
Yoichi GONDO, Ph.D.

ミッションと事業概要

新規変異を検出するための次世代シーケンシングシステムの精度をさらにあげ、理研変異マウスライブラリーからコーディング配列をターゲットとして1系統あたり100以上の点突然変異を再現性よく検出できるようになった。これによって、発見変異数が飛躍的に増え、すでに1,000以上の変異をカタログ化し、利用公開システムも整備した。同時に次世代シーケンシングの解析システム評価法も確立した。共同研究も広がり自然発生突然変異の検出やウイルス高感受性モデル確立などにも成果をあげた。

Further enhancement of the next-generation sequencing (NGS) system with the exome target enrichment now consistently reveals more than 100 de novo base substitutions per strain of the RIKEN Mutant Mouse Library. We also developed the WEB system to make more than 1,000 novel mutations open to the research community. As collaborative efforts, we have also detected spontaneous mutations as well as succeeded in establishing hypersensitive model mice against viral infections.

平成24年度の成果

Development of Technology in 2012-2013

全マウスゲノム3,000Mbからコーディングエキソン配列(exome)を標的として濃縮精製し、次世代シーケンシング(NGS)で解読し、その膨大なDNA配列データから新たに誘発された突然変異を検出するシステムを改善しさらに精度をあげた。理研変異マウスライブラリーの各系統には約5,000の塩基置換がゲノムにランダムに誘発されていることを突き止め、exome濃縮NGS法で、コーディング配列を中心に各系統あたり100以上の変異を再現性よく検出できるようになった。この精度向上により、理研変異マウスライブラリーの変異カタログ化も飛躍的に高まり、すでに1,000を越える変異を発見した。そこで、ゲノム機能解明の新しいリソースとして利用を促進するためのWEBシステムも理研情報基盤センターと共同開発した。これから順次即時公開していく予定である。その一部を公開に先立ち表に示した。カタログ化した変異は、分与希望に応じて凍結精子から個体復元し生きたマウスとして提供し、新しいリソースとして遺伝子機能解析や疾患モデル開発などに利用を広げていく。また、一連のゲノム解読解析には「真の参照配列」と「数百万の既知SNP」が利用できる(図)ため、NGS解析パイプラインの客観的評価と改良が可能になるという提唱も国際的に広く認められた。そこで、膨大なNGSデータや解析結果を公開できるWEBシステムも共同開発した。さらにマウス exome DNA の超高速解読を活用し、自然発生突然変異の検出にも応用展開できるようになった。たとえば、酸化損傷修復に欠損をもつマウスを7世代広げる過程で300を越える自然発生突然変異を検出できることを共同研究で示した。また、昨年度報告したC57BL/6Jの遺伝的背景で構築した新しい変異マウスライブラリー 3,000系統からは、共同研究によりウイルス感染に高感受性な系統を複数確立した。そこで、exome濃縮

NGS解析を駆使して、それぞれの系統から100以上のENU変異を検出した。これにより、1系統あたり100以上の変異をマーカーとして利用する新しいポジショナルクローニング法が確立できた。

We further enhanced the target exome enrichment system and following next-generation sequencing (NGS) of the genomic DNA of the RIKEN

表 次世代シーケンシングによって検出された変異のなかで遺伝子の一次構造を変える変異例
Table Examples of NGS-detected mutations that change the primary structure of the gene product.

Position(MM9)	Gene Symbol	type of Mutation	Position(MM9)	Gene Symbol	type of Mutation
chr1:133172385	Ikbke	missense A>S	chr8:28263563	Rab11Tfp1	missense P>L
chr1:14542523	Cdc73	missense S>T	chr8:86251648	Cd97	missense T>N
chr1:172724783	Atf6	splicing splicing	chr8:96613779	Bbs2	missense D>E
chr1:176066955	Olfir424	missense F>I	chr9:42984368	Pou2f3	splicing splicing
chr1:187127260	Iars2	missense D>N	chr9:44072268	NlrX1	missense R>H
chr1:191947103	Prox1	missense E>G	chr9:51657368	Arhaop20	missense S>T
chr1:20493030	pknd1	missense N>S	chr9:56958680	Sm3a	missense G>R
chr1:58979614	Trak2	splicing splicing	chr9:67782244	Vps13c	splicing splicing
chr1:59235933	Als2	Nonsense Y>Stop	chr10:12256271	Usp15	missense D>G
chr1:89379202	Ngef	missense D>N	chr10:12648543	Cvp27b1	missense V>A
chr1:8967841	Uqt1a10	missense D>V	chr10:17635364	Heca	missense N>S
chr1:93213668	Scly	missense E>K	chr10:40983831	Fiq4	missense E>V
chr1:121701983	Rvr3	missense G>W	chr10:57245307	Serinc1	splicing splicing
chr1:140071126	Sel1f2	missense A>T	chr10:7425580	Lats1	missense L>S
chr2:155447144	Myh7b	missense L>Q	chr10:80263982	Sf3a2	missense D>G
chr2:179813499	Gtobb5	missense G>R	chr11:23483112	O610010F05Rik	missense D>E
chr2:35045549	Rab14	missense D>T	chr11:54185249	4930404A10Rik	missense S>R
chr2:38962804	Scal	missense D>G	chr11:70131134	Alox12e	missense C>S
chr2:52114402	Neb	missense R>L	chr11:72785729	Ata2a3	missense N>S
chr2:76553805	Ttn	missense M>I	chr11:73299495	Olfir381	missense M>K
chr3:49559069	Pcdh18	missense V>D	chr11:83462724	Ccl3	missense N>S
chr3:53344972	Frem2	missense D>T	chr11:83702621	Hnf1b	missense H>L
chr3:69547507	Nmd3	missense T>A	chr12:10592981	Dicer1	missense P>L
chr3:97965407	Adam30	missense D>G	chr12:11264851	A230065H16Rik	missense P>L
chr4:100847783	Jak1	missense D>E	chr12:84935463	Zfyve1	missense V>G
chr4:12020896	C430048L16Rik	missense C>S	chr13:10144927	Ccdc125	missense D>G
chr4:12071783	Rbm12b	missense C>S	chr13:25345452	Nrsn1	missense A>S
chr4:151386540	Klhl21	missense Y>H	chr13:60862596	Dapk1	missense T>P
chr4:17981723	Mmp16	missense K>E	chr14:33476075	3425401B19Rik	missense D>T
chr4:34699557	Gm136	missense A>I	chr14:41933415	At1a	missense V>M
chr4:55036335	Zfp462	missense D>N	chr14:60266756	Atp8a2	missense Y>H
chr4:94516374	Tek	missense S>T	chr14:62168659	6330409N04Rik	missense C>S
chr5:93697763	Ccnq2	missense D>T	chr14:80421082	Olfm4	missense D>V
chr6:122272021	Phc1	missense P>S	chr15:57982158	Wdvhv1	splicing splicing
chr6:12557632	Kvif	missense M>I	chr15:8301326	Nipbl	missense S>P
chr6:12956794	Klrl1	splicing splicing	chr15:83320020	Thl1	Nonsense R>Stop
chr6:3650125	Calcr	splicing splicing	chr15:83552349	Scube1	Nonsense G>Stop
chr6:47975565	Zfp777	missense H>R	chr15:96250016	Srsf2ip	missense H>Q
chr6:65406380	C130060K24Rik	missense K>E	chr15:99358022	Faim2	missense T>A
chr7:105110085	Gdpd4	Nonsense Y>Stop	chr15:9932226	Larp4	splicing splicing
chr7:109872239	Olfir559	missense V>D	chr16:29261078	Atp13a5	splicing splicing
chr7:114326079	Nlrp14	missense N>I	chr16:45544880	Slc9a10	missense L>F
chr7:114881868	Ppfbp2	missense T>M	chr16:85899524	Adamts5	missense V>A
chr7:114881868	Ppfbp2	missense T>M	chr16:91680178	Donson	missense R>G
chr7:115708358	Olfir504	missense E>V	chr17:26355206	Irfq3	missense L>P
chr7:125694648	Tmc7	splicing splicing	chr17:37972895	Olfir125	missense D>T
chr7:19488877	Ccdc61	missense T>M	chr17:48599861	Unc5l	missense D>G
chr7:27358923	Nlrp9a	missense E>A	chr18:25248741	Fhod3	missense N>S
chr7:52254104	Irf3	missense D>V	chr19:40297115	Pdlim1	missense P>L
chr7:56807259	Nav2	missense V>F	chr19:4862338	Actn3	missense N>D
chr7:5839121	Anrc2	missense T>I	chr19:48768473	Sorcs3	missense D>L
chr7:8349881	Hrc2	missense S>P	chr19:6404762	Rasgrp2	missense D>V
chr7:6413462	Olfir1336	missense T>S			

Mutant Mouse Library. It is now possible to consistently detect >100 de novo mutations per strain of the library, giving rise to a total of ~5,000 geome-wide mutations per strain. The number of actually detected mutations has significantly increased to >1,000. To make them open to the research community, a new WEB system has been collaboratively developed with RIKEN Advanced Center for Computing and

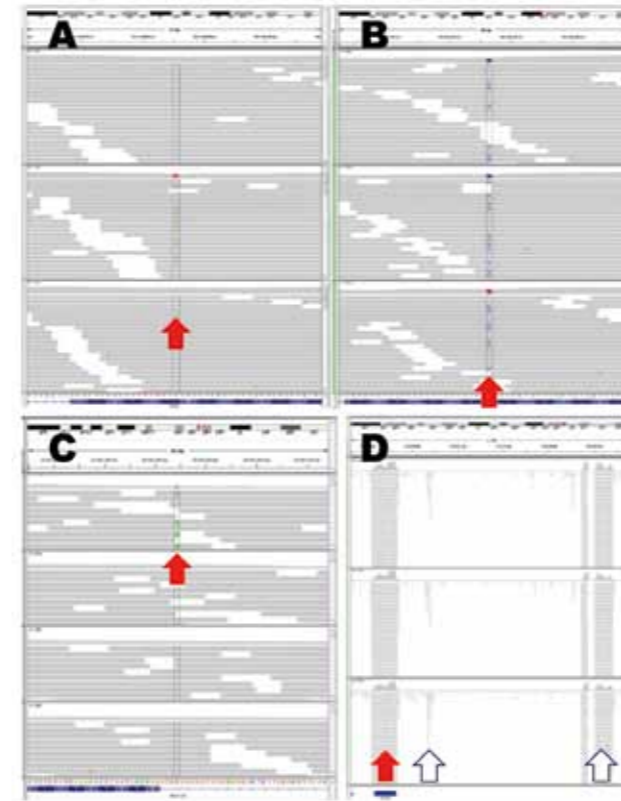


図. 次世代シーケンシングによるSNV/SNP検出例。A. 1系統に新たに誘発されたヘテロ接合1塩基変異(SNV)。参照配列と異なる塩基配列が1系統にのみほぼ1:1に検出された(赤矢印)。B. 全系統共通に1:1比で解読されたヘテロ接合系統間1塩基多型(SNP)の例(赤矢印)。NGS解析パイプライン評価の教科書データとして利用できる(本文参照)。C. 偽陽性SNVの例。1系統にのみ1:1比で検出された(赤矢印)にもかかわらず、元のゲノムDNAを直接PCR解析したところ、SNVではないと証明された例。D. 標的コーディング配列領域(赤矢印)および標的でない配列領域(白矢印)のどちらでも多数のNGS解読が得られた例。予想に反して標的配列以外からもSNVが検出される一因と考えられる。理研変異マウスライブラリー構築にはマウスゲノム解読に用いた近交系C57BL/6Jを用いており真の参照配列も解析に利用できる。既知SNPとともにNGS解析パイプラインの標準評価が可能である。

Fig. Examples of SNV/SNP detection by NGS. A. Only one strain exhibited typical 1:1 read calls of heterozygous single nucleotide variation (SNV) (red arrow). B. All strains showed 1:1 read calls (red arrow) of the common single nucleotide polymorphism (SNP) between two strains used for the Mutant Mouse Library construction. Millions of such known SNPs in the public database provide positive control dataset for the assessment of the NGS analysis pipeline as described in the text. C. Example of a false positive SNV. Even if this signal exhibited a typical 1:1 read call (red arrow), the PCR-based molecular validation concluded that it was not the SNV. D. Enriched NGS readings of target coding exon (red arrow) and non-target noncoding sequences (white arrows). It is one of the causes to find unexpected non-target SNVs by NGS. We mutagenized C57BL/6J inbred strain that had been used for the Mouse Genome Project; thus, bona fide reference sequences are also available for our NGS analyses.

Communication (ACCC). An example set of available mutations is shown in Table. All the sperm samples of the strains archived in the library are cryopreserved so that any detected mutant strains may be distributed as live mice based on requests. The revived mutant mice then may be used to reveal genetic functions and to model human diseases as new bioresources. In our NGS analysis, “bona fide reference sequences as negative controls” and “millions of known SNPs as positive controls” are available (Figure). We, therefore, make all the NGS data and results open to the research community as the standardized assessment system for the NGS analysis pipelines. ACCC also developed a new internet system to handle such huge NGS dataset. The NGS with the target exome enrichment system primed many other collaborative studies. For instance, we have identified spontaneous mutations in a mouse pedigree covering 7 generations that lacks the repair system of oxidative DNA adducts. Another collaborative effort has developed highly susceptible ENU mouse strains against viral infection. We then detected >100 de novo mutations in each strain by the NGS with exome enrichment system, establishing a new positional cloning strategy with the de novo mutations themselves as genetic markers.

職員とメンバー構成 Members

- チームリーダー [Team Leader]
榎藤 洋一 Yoichi GONDO, Ph.D.
- 開発研究員 [Research & Development Scientist]
福村 龍太郎 Ryutarō FUKUMURA, Ph.D.
村田 卓也 Takuya MURATA, Ph.D.
牧野 茂 Shigeru MAKINO, Ph.D.
- 開発技師 [Technical Scientist]
中井 祐治 Yuji NAKAI
- テクニカルスタッフ II [Technical Staff II]
小瀧 逸人 Hayato KOTAKI
石塚 祐一 Yuichi ISHITSUKA
- パートタイマー [Part-Timer]
根本 秀子 Hideko NEMOTO
釣賀 雅子 Masako TSURUGA

