

研究区分	教員特別研究推進（地域振興）
------	----------------

研 究 テーマ	第3世代シーケンサーを用いたゲノム解析技術の習得と 遺伝子改変マウスの遺伝子挿入部位の探索				
研究組織	代 表 者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	清水 聡史
	研究協力者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	黒川 洵子
		所属・職名	国際医療福祉大学薬学部・教授	氏名	坂本 多穂
		所属・職名	薬学部・講師	氏名	児玉 昌美
	発 表 者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	清水 聡史

講演題目
第3世代シーケンサーを用いた Iks-TG マウスの遺伝子挿入部位の探索
研究の目的、成果及び今後の展望 近年、ゲノムシーケンスはより身近で実用的な技術となり、医療および基礎研究において重要な知見をもたらしている。中でも Oxford Nanopore Technologies 社製ナノポアシーケンサーは、安価かつ小型で利便性に優れることから、幅広い研究・診断現場での活用が期待されている。そこで本研究では、一連のゲノム解析技術（サンプル調製、QC、ライブラリー調製、測定・解析）の習得を目的として、当研究室が保有するヒト遅延性カリウムチャンネル過剰発現（Iks-TG）マウスの遺伝子挿入部位を探索した。 まず、当研究室でジェノタイピングに用いている KAPA Express Extract（日本ジェネティクス）によるゲノム DNA 抽出を検討したが、断片化された低分子 DNA が多く含まれ、ロングリード解析であるナノポアシーケンシングには適さなかった。そこで、Wizard® HMW DNA Extraction Kit（Promega）を用いてゲノム DNA を抽出したところ、高分子 DNA を得ることができた。 次に、Native Barcoding Kit 24 V14 を用い、ナノポアコミュニティの最新プロトコルに準拠してライブラリー調製を行った。ライブラリー調製後、MinION mk1D を用いてシーケンシングを実施した。得られたデータは MinKNOW を用いてマッピングを行い、参照配列には GRCm39 に加え、トランスジーン作製に用いたプラスミド配列を組み合わせたものを使用した。 配列データの処理は Python を用いて行い、データ抽出および整形には pandas、配列入出力および BLAST 結果の処理には Biopython を用いた。FASTQ から FASTA への変換には SeqKit、配列検索には NCBI BLAST+を使用した。解析では、①プラスミド側にマッピングされた配列、②染色体上にマッピングされたものの coverage が 70%以下であった配列を抽出した。さらに②についてはプラスミド配列との相同性検索を行い、ヒットしなかった配列を除外した。これらの配列についてリード長の長いものから順に精査した結果、Iks 遺伝子が 3～5 コピー程度タンデムに組み込まれていること、ならびに Chr3:126,743,620 および Chr16:11,028,052 付近の 2 か所にトランスジーン挿入が生じていることが明らかとなった。さらに、Chr3 の挿入部位は Ank2 遺伝子のイントロン領域に位置しており、Ank2 が心疾患との関連を有することから、本マウスを用いた心臓表現型の解釈には注意が必要であることが示唆された。 以上より、ナノポアシーケンシングを用いた遺伝子挿入部位探索のための一連の解析基盤を確立するとともに、Iks-TG マウスにおけるトランスジーンの挿入様式および挿入部位を明らかにすることができた。これらの知見は、本マウスの表現型解釈の精緻化に資するとともに、今後の遺伝子改変動物解析への応用に有用であると考えられる。