

# 生物学的視点からみたマウス突然変異検出の現状と今後の展望

東海大学医学部分子生命科学 権藤洋一

序

低線量放射線やごく微量の変異原の生物へのリスクはいまだわからない。ゲノムに誘発された変異はほとんど有害であるという見地から、さまざまな誘発変異検出系が開発され、変異原リスク評価に利用されてきた。しかし、ゲノムには変異原が無くとも自然に変異が生じる（表1）。低線量放射線や極微量変異原では、この自然に生じた変異と、変異原によって誘発された変異との区別が困難なため、評価ができなかった。そもそも表1に示す自然変異検出と解析は、2005年ころから利用が広がった次世代シーケンシング（Next-Generation Sequencing; NGS）技術によってようやく明らかとなってきたばかりである。本稿では、生物学的な角度からマウスをモデルとする系を中心に細胞分裂と変異の挙動を概観し、そのうえで最新技術を用いた変異検出系の現状と今後の微量変異原リスク評価の方向性や可能性を検討する。

表1. 次世代シーケンサー(NGS)を用いた世代間における自然変異率推定

Species		Mutation Rate
Human <sup>1</sup>	parents-children	12 ×10 <sup>-9</sup> /bp/generation
Chimp <sup>2</sup>	parents-children	12 ×10 <sup>-9</sup> /bp/generation
Mouse (B6J) <sup>3</sup>	sib mating	5.4 ×10 <sup>-9</sup> /bp/generation
Mouse (B6Jcl) <sup>4</sup>	complete outbreeding	5.5 ×10 <sup>-9</sup> /bp/generation
Mouse (MSM/Ms) <sup>4</sup>	sib mating	4.4 ×10 <sup>-9</sup> /bp/generation
Drosophila/SNV <sup>5</sup>	parents-children	2.8 ×10 <sup>-9</sup> /bp/generation
Drosophila/indel <sup>5</sup>	parents-children	1.2 ×10 <sup>-9</sup> /bp/generation

マウスの細胞分裂と生活環において生じる変異の動態

図1にマウスの発生と世代交代を示す。雌雄ペアの卵および精子が受精した1細胞胚（受精卵）が、つぎつぎと細胞分裂を繰り返し、生後8週令ほどで成体となり交配が可能となり世代交代していく。受精、出産、離乳、性成熟から老化まで、マウスはヒトの短縮版とも見ることができ、変異原研究に用いられてきた他のモデル系と比較してヒトにもっとも近い。おおよそ、マウス8週令がヒトの20歳に、1年令が50歳に、2年令が100歳相当するとみることができる。この類似性から、成熟老化して行く過程で、どの臓器のどの細胞にどういった変異がいつ生じるか、飲水、摂食、生活習慣など環境の効果も含めて、マウスをモデルとして解析できる。60kgのヒト成人は37.2兆の細胞からなると推定され<sup>6</sup>、そのまま体重で比例配分すれば30gのマウス成体は186億細胞からなる。（註、文献6ではさまざまな細胞の数と重さから有効数字3桁でヒト細胞数を報告しているため本稿でも有効数字3桁を用いた。）

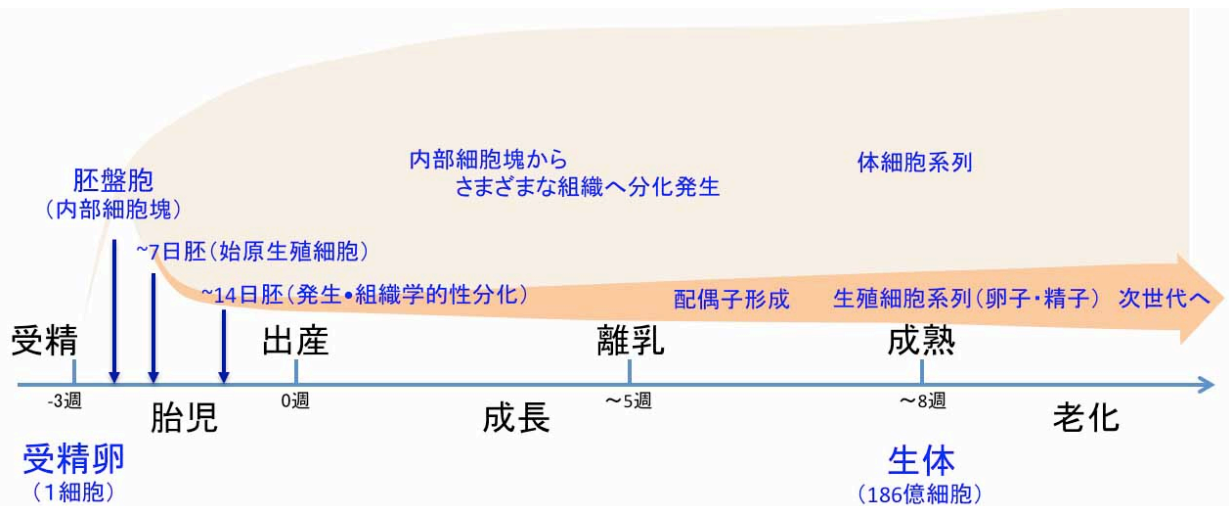
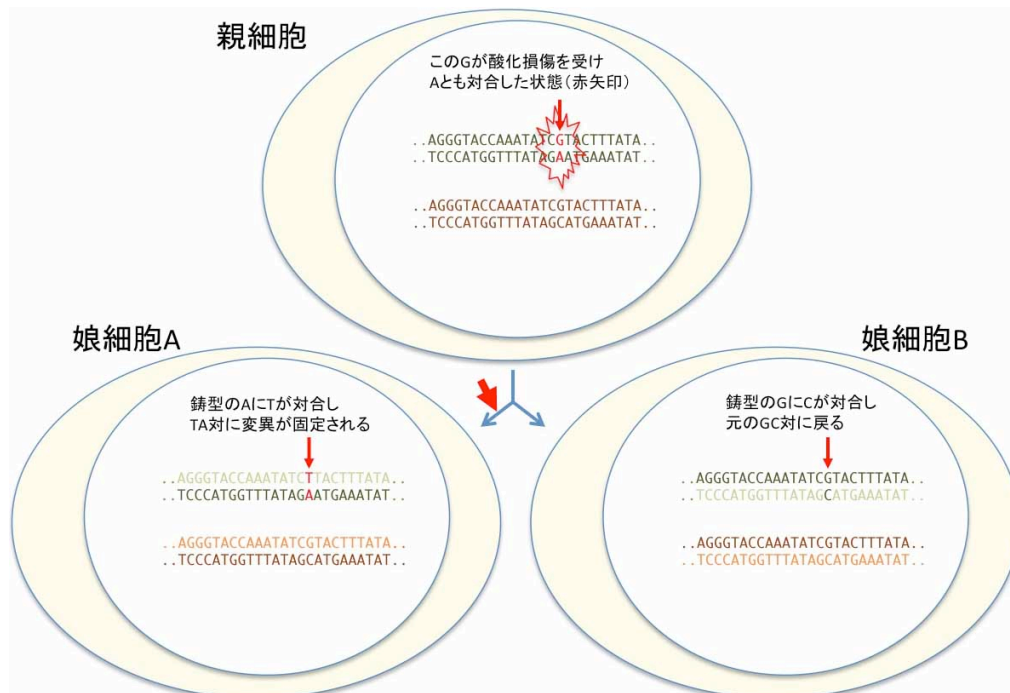


図1. マウスの発生分化における細胞数の増加と変異の蓄積。受精卵1個の祖先細胞から、細胞分裂と発生分化を繰り返し、細胞数が増加しつつさまざまな組織・臓器・器官が形成され、受精後20日目に生まれ（生後0週）おおよそ8週令で成体となり交配によって新たな受精卵として次世代につながる。細胞分裂のたびにユニークな変異がヘテロ接合として30億塩基対2セットからなる二倍体ゲノム60億塩基上に次々と固定され（図2）蓄積され（図3）、成体ではおおよそ186億細胞へと分化増殖する。細胞分裂数、変異率、ゲノムサイズを考慮すると、受精卵と完全に同じ60億塩基対ゲノム配列をもつ細胞は皆無となっていく。ただし、一度生じた変異は失われることはないので、図3に示すようにその細胞系譜のマーカーとなる。この186億細胞からなるヘテロな細胞集団のうち、次世代につながる細胞は、卵および精子の配偶子細胞だけである。受精卵から配偶子に至る細胞系譜を生殖細胞系列と呼ぶ。発生的には、7日胚ころに生じる始原生殖細胞と呼ばれるわずかな細胞集団にすべての生殖細胞系列は由来する。生殖細胞系列以外の細胞は体細胞系列と呼ばれ個体死とともに消滅する。（体細胞から作製したiPS細胞や骨髄移植などは例外である。）さまざまなヘテロ変異を有する186億個の種々雑多な細胞集団から、1個の卵と1個の精子の30億塩基対2セットの1受精卵細胞状態にリセットされ、また改めて細胞分裂と分化を繰り返す。186億の成体細胞が、すべてこのリセットされた1個の受精卵に由来するクローン細胞集団であることが、突然変異解析には大きな利点となる（テキスト参照）。

当然ながらヒトとマウスは異なる点も多く、ヒト細胞を用いて変異解析をする方が、ヒトに対する変異原リスク評価としては正しい結果を得られるはずである。しかしながら、ヒト個体を用いる実験はできないため、ヒト細胞における変異検出実験を行なう場合、材料として体外で解析できる血球細胞や、ヒト細胞に由来する培養細胞株などを用いる系が開発されてきた。生きたマウス個体をモデルとして変異検出解析を行なう方法と、ヒト培養細胞など基本的に無限に増殖する体細胞を用いて変異検出解析をする方法の比較を行なうために、変異が細胞内に生じて固定され細胞集団に広がる過程を概略する。

## 細胞分裂における変異の固定

ゲノム情報は DNA 二重らせん分子の塩基配列としてコードされている。DNA 複製において、この二重らせんを形成する塩基対が、A は T と、G は C と正確に対合するという特性によって、半保存的に変化することなく細胞から細胞へ、親から子へと正確にそのまま伝わる。変異が生じる大きな要因のひとつが、DNA 塩基対の対合エラーである。細胞内では DNA 複製時でも、複製されていないときでもさまざまな対合エラーが生じる。しかし、生命の維持を基本的に脅かす変異が生じることを防ぐため、「DNA 修復系」や「DNA 組換え系」などの遺伝子群が何重にも張り巡らされ、結果として自然に生じる変異は表 1 に示す程度に留まっている。塩基対合エラーの段階では修復されるが、元の DNA 配列とは異なった塩基対合配列に「固定」されてしまうと、もはや DNA 修復系では認識できず、固定された配列が正しい配列として以後の DNA 複製と細胞分裂ではそのまま正確にそのまま伝えられて



行く。これが通常の変異解析で検出される変異である。図 2 に模式的に示す。

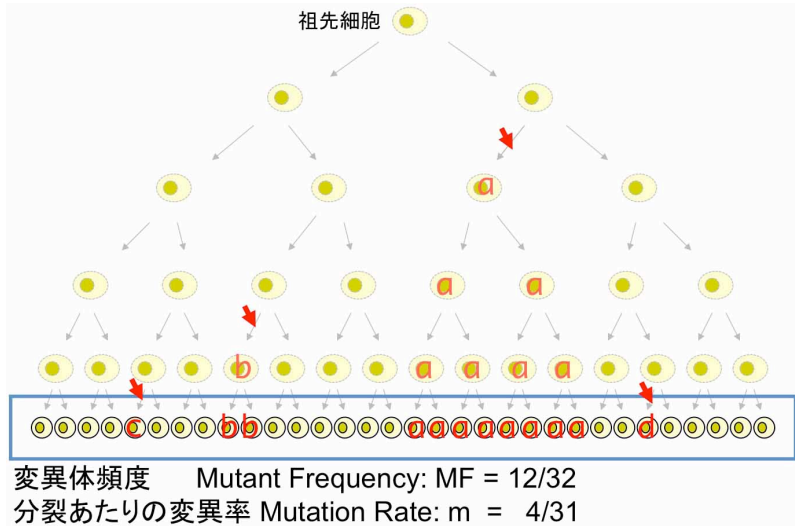
図 2. 塩基対合エラー・DNA 複製・細胞分裂と変異の固定の例。マウスでは、卵を通して母方から 30 億塩基対を 20 本の染色体 DNA 分子として受け継ぐ。同じく、相同な 20 本の染色体 DNA 分子を精子からも受け継ぎ、計 2 セット 60 億塩基対の 2 倍体ゲノムとして全情報が受精卵 1 細胞に受け継がれる。模式図では、緑系色で母方由来、茶系色で父方由来の

2 倍体の相同な 25 塩基対部分のみを示す。親細胞では、赤で囲んだ (元は GC 対合していた塩基対が) GA という対合エラーを持っているとした。ちなみに、GA 対合エラーは、G が酸化損傷により 8-オキシグアニンに変化したときに生じやすい。通常は、親細胞が発現するさまざまな DNA 修復酵素群によってこういった対合エラーは速やかに修復される。ところが、ごくまれに修復されないまま、濃緑鎖 2 重らせんも濃茶鎖 2 重らせんもそのまま 4 本の 1 本鎖 DNA 鋳型となり、半保存的に複製され、新たに薄緑鎖および薄茶鎖が合成され、再び二重らせん DNA 分子に複製されることがある。その後の細胞分裂によって、2 つの娘細胞に正確に分配されると、図のように、娘細胞 A では GA の対合エラーの A を鋳型として複製したため、新しく合成された薄緑鎖に新しく T が組み込まれ、元の GC 塩基対から TA 塩基対へとトランズバージョン変異が固定されるという結果に至る。一方で、娘細胞 B では G をもつ濃緑 DNA を鋳型として正確に C が対合して複製され、元の GC 塩基対に戻り、変異は生じない結果となった。娘細胞 A における TA に変異した対合も (親細胞に見られる GA 対合とは異なり) 正しい対合であるため、DNA 修復系はもはや認識できず、以降の DNA 複製および細胞分裂では、A 細胞系譜では TA 塩基配列で正確にそのまま伝わっていく。親細胞における GA 対合エラーは極めて不安定で DNA 修復系などで速やかに除去されるが、一旦、TA のように正しい塩基対に固定されれば安定になり、正確に複製され遺伝していく。変異が固定される確率は、表 1 に示すように塩基対当たり極めて低いので、相同染色体の同じ箇所と同じ塩基置換が生じてホモ接合となることはない。図 2 の例で言い換えると、娘細胞 A の緑鎖に生じた TA 対への塩基置換が、茶鎖の同じ位置に生じてホモ接合となる確率はゼロとみなせる。また、一度、固定された変異 (この場合 TA 塩基対) が元の配列に復帰突然変異する (この場合 A 細胞が分裂して GC 塩基対に戻る) 確率もゼロとみなせる。すなわち、細胞に生じた新しい変異は、必ずその細胞集団においてユニークなヘテロ接合として検出され、また、一度、固定されるとその細胞系譜では消失することなくその細胞系譜に綿々と伝わっていく。

## 細胞分裂と細胞系譜における変異の固定とエクスパンション

図 2 に示した変異の固定が、細胞集団に広がって行く仮想的な過程を図 3 に示す。どの細胞も 1 つの細胞が 2 つに分裂して生じるので、元をたどれば必ず一つの祖先細胞に行き着く。自然界では、受精卵がその個体の全ての細胞の祖先細胞である。培養細胞系では、クローニングによって 1 細胞から広げた場合、クローンした最初の 1 細胞が祖先細胞である。ちなみに、1 細胞には、二倍体それぞれの相同染色体に 1 分子の DNA しかなく、いかに次世代シーケンシング技術の利用が可能となった今日でも 1 細胞や 1 分子 DNA を用いて変異を検出同定することは極めて困難な作業であることを付記する。そこで、通常は、こういった由来の明確な細胞系譜集団を試料として、そのなかから変異を検出する。図 3 では、1 つ祖先細胞が分裂を 5 回ずつ繰り返し  $2^5 = 32$  細胞となった細胞集団から変異を検出する仮想系を示している。

図 3. 細胞分裂過程において生じてくる変異の動態の模式図。1 つの祖先細胞が分裂し 2 つの娘細胞となる。全ての細胞が 5 回ずつ分裂すれば  $2^5 = 32$  個の細胞集団となる。変異が最初に生じ固定した時点では、すべて、ユニークヘテロ接合である。図 2 および本文中で説明したように、一度生じたユニークヘテロ接合変異が、独立に二度生じる確率はゼロである。すなわち、ヘテロ接合変異が細胞分裂を重ねることでホモ接合になることはない。由来を異にする同じ変異が検出されることもない。一方で、一度ヘテロ接合で生じた変異が復帰突然変異する確率もゼロである。そのために、細胞分裂によって増殖するたびにユニークヘテロ接合も二倍に増えていく。決して消失することはない。この細胞系譜では、赤い矢印で示した細胞分裂時に変異の固定が生じている。



例えば、祖先細胞から 2 回目の細胞分裂時に固定した変異 a の場合、そのあと 3 回分裂して細胞集団中  $2^3 = 8$  個に増える。一度ゲノムに生じたユニークヘテロ接合変異が細胞分裂ごとに倍増して集団に広がる現象を「クローナルエクスパンション」と呼ぶ。さて、1 細胞を用いて変異検出を行なうことはほぼ不可能なため、細胞集団を試料として変異検出を行なう。古典的な変異検出方法では変異の有無だけを細胞レベルにおいて検出する方法が一般的であったため、図に示す a, b, c, d を区別できなかった。言い換えると、32 細胞のうち 12 細胞が変異をもつことだけがわかる。細胞集団中に変異体が含まれるこの頻度を変異体頻度 Mutant Frequency (MF) と呼ぶ。図からも明らかのように MF そのものは、直接、変異率 mutation rate を示さない。細胞分裂あたりの変異率は、全細胞分裂数（図ではのべ 31 回）のうちいくつの細胞分裂で変異が固定したか（赤矢印で示した 4 回）で表す。すなわち、 $4/31$  が細胞分裂あたりの変異率となる。近年、DNA シーケンシングが可能となり、変異の有無だけでなく、その配列箇所や塩基置換まで同定できるようになり、a, b, c, d の違いを DNA 配列から識別可能となった。ただし、DNA レベルでの解析する場合、変異率や変異体頻度推定に次の注意が必要となる：細胞レベルで解析した場合、細胞数 32 が母数となるのは自明である。一方で、DNA レベルで解析する場合、細胞を破壊して DNA 分子を抽出して行なう。1 細胞には母方由来の DNA 分子（図 2 の緑系二重鎖）と父方由来の DNA 分子（図 2 の茶系 DNA 分子）の 2 コピーが存在する。すなわち、DNA 分子レベルでは 32 細胞からは 64 本の DNA 分子が母数として得られることになる。この DNA を次世代シーケンシングで解析すると、図 3 の変異 a, b, c, d の配列は、それぞれ、64 回の DNA 配列リード毎に平均的に 8 回、2 回、1 回、1 回得られる。すなわち、DNA レベルの解析では、MF が見かけ上、半減する。すなわち、2 倍に補正する必要が生じるので注意されたい。

## 培養細胞を用いた変異検出解析系の課題

細胞分裂では、親細胞が 2 つの娘細胞になる。言い換えると、分裂後、親細胞は存在しない。図 3 では、1 つの祖先細胞がのべ 5 回目分裂した結果、長方形で囲んだ 32 個の娘細胞群だけが物理的に存在し、それまでの親細胞群はすべて消失する。用いた細胞集団の祖先細胞も 4 回目の分裂までの親細胞も物理的に存在せず、元の細胞に戻って実験検証することは不可能となる。図 3 では存在しなくなった細胞は破線で示し、解析試料として物理的に利用できる細胞だけ実線で示した。この試料を用いて検出した変異が、親細胞に存在するかどうかの実験検証も、また、検出変異の起源となった元細胞のトレース実験も、細胞が物理的に存在しないため不可能である。

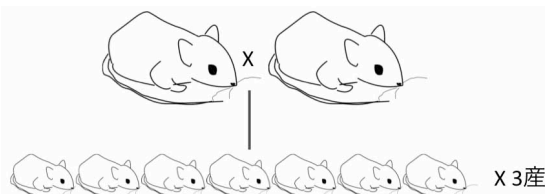
さらに、培養細胞の保存保管は、通常、少なくとも数 1000 個の細胞を 1 チューブに入れ凍結保存する。そこから 1 細胞だけ祖先細胞として取り出し増殖して実験材料とすることは現実的ではない。すなわち、それぞれ個別の変異をもつ数 1000 の祖先細胞を増殖させ材料として用いる。そこに、さまざまなユニークヘテロ変異が新たに生じ、分裂頻度に応じてクローナルエクスパンションが加わる。そうすると、変異を検出しても、元々の祖先細胞に存在していた変異か、新たに増殖分裂して生じた変異か区別できない。細胞数を多くして変異検出精度を高めることも難しい。なぜならば、細胞数を増やすには、もともとの祖先細胞の数を増やすか、細胞分裂数をさらに増やすしかなく、結果として、



細胞数を多くすればするほど実験材料がもともと有する変異が複雑に比例して増加するので、細胞数を増やしてもノイズが増えるだけで基本的には変異検出精度の向上にはつながらない。このジレンマは、誘発頻度が極めて低くなる低線量放射線のリスク評価において、より顕著な問題となる。変異原のリスク評価においては、材料を変異原投与群（実験群）と非投与群（コントロール群）に分けて行ない、その差を検出することで変異原リスク評価を行う。この比較は、実験群とコントロール群が本質的に同一サンプルでなければ意味をなさない。仮に1細胞に由来する図3のような細胞系譜集団を細胞増殖によって均一な細胞集団として、図3の右半分を投与実験群に、左半分を非投与コントロール群として用いたとしよう。図3から明らかなように、右半分の細胞と左半分の細胞は質的に大きく異なった細胞集団であり、厳密にはコントロール群にはなりえない。細胞分裂を重ねれば重ねるほど、さまざまな変異が「投与実験の前に」固定されクローナルエクспанションした細胞集団を2分したに過ぎず、材料そのものには投与前の種々雑多な自然変異を多数有している。そういった材料に、微量な変異原を投与してもわずかな変異が上乘せになるだけであり、微量変異原のリスク評価は実質的に不可能となる。検出精度が格段に高くなった次世代シーケンシング法を用いてもこの問題は解決しない。確かに次世代シーケンシングを用いることで、検出される変異数そのものは格段に多くなり、図3に示すa, b, c, d変異の違いも識別できる。しかしながら、その検出された膨大な変異量と変異スペクトルは、ほとんどが投与前の変異のものである。そこにごくわずかな誘発変異が、微量変異原投与で加わっても、投与前の膨大な数の変異と識別する方法はない。すなわち、投与実験前にすでに蓄積エクспанションした異なる変異群が、実験群とコントロール群にそれぞれ内在しているため両群からさまざまな変異がノイズとして大量に検出され、微量変異原投与によって新たに加わったわずかな変異を統計的に検出することも、また、シーケンシングによって配列の違いから質的に識別することも現在の技術ではできないのが現状である。高線量放射線や高濃度変異原投与と実験では、こういったノイズに比べ、誘発変異が10倍以上、ときには1000倍以上生じるので変異原リスク評価が可能である。この問題は、低線量放射線リスク評価の難しさの根源とも言える。

#### マウス個体と交配を用いた変異検出系の利点

図3は、自然界の生物個体にも同様に適用できると上述した。すなわち、すべての生物個体は1個の受精卵を祖先細胞として細胞増殖する。すなわち、個体を用いる場合、すべての体細胞は受精卵という1個の祖先細胞に由来すること自体が、変異検出系において大きな利点となる。ヒトでは受精卵から発生成長し老化していく過程で、様々な変異が図3のように、ある細胞分裂時に固定され、引き続く細胞分裂によってクローナルエクспанションし、37.2兆の成体細胞集団に広がり蓄積されている。マウスでは総細胞数が186億に減るだけで、変異の固定、エクспанション、蓄積は同じように生じると考えてよい。このことを考慮すると、培養細胞を用いた変異検出実験の課題はそのままマウス個体を用いた変異検出系にもそのままあてはまるはずである。実際に、図1に示した体細胞系列の細胞における変異検出は同じ課題を抱えており、体細胞群において、低線量放射線などの微量変異原



がどのくらい変異を誘発するか、次世代シーケンシング法でも高精度に解析する方法はいまだ確立されていない。一方で、卵および精子が受精して次世代でどのくらい変異が生じたか、生殖細胞系列レベルで、世代間における変異解析を行なう場合には、微量な変異原リスク評価も現実的かつ効果的に実施できる。

図4. マウスを用いた拡張トリオ交配。両親のゲノムと生まれた子ゲノムを次世代シーケンシングで解読し、親ゲノムではなく、子ゲノムだけに検出される変異から新たに世代間に生じた変異を同定する方法が「トリオ解析」である。ヒトでは一回の出産では通常一人だけ産まれる少産系である。兄弟が二人以上いる家庭も少なくないものの、ヒトゲノムの解読は、個人情報の保護や事前に同意を得る必要があるなどの理由で、多数のゲノムを解読することは容易ではないのでトリオ解析はよく行なわれる。一方で、マウスをモデルとした系では、1産あたり平均7産仔得られ、1雌雄ペアから3産させることも容易なので、20匹ほどの産仔を雌雄1ペアから得ることができる。これを「拡張トリオ交配法」と呼ぶ。細胞分裂時に固定される変異と同様に、世代間で新たに生じる変異率は極めて低いため、図2や図3で示したように、新たに生じた変異は仔マウス集団中でユニークヘテロ接合としてのみ検出される。通常のトリオ解析では親ゲノムと子ゲノムすべて解読しないと新たに生じた変異か、親がすでに有していた変異か識別できない。一方で、図のように7匹ずつ3産して総数21匹の産仔が得られ、そのうちの1匹にだけヘテロ接合で見つかるだけで、親には無い新たに生じた変異である可能性が高い。ユニークヘテロ変異フィルターにかける産仔数が多ければ多いほど、検出されたユニークヘテロ変異が新たに生じた変異である確率は、より高くなる。逆に、20匹までは1産仔にしか見つからずとも21匹目に再度同じ変異が検出されれば、少なくともどちらかの親がすでにその変異を有していたことになり、新たに生じた変異ではないと判断される。またどれか1匹にでもホモ接合で見つければ、両親ともその変異を持っていたこととなり、これも新たに生じた変異候補から除外される。産仔数が多ければ多いほど、ユニークヘテロ接合という一次スクリーンは、親がすでに持っている変異、すなわちノイズを除外するための有効なフィルターとなる。ただし、ユニークヘテロ接合として発見されることは新たに生じた変異であるための必要条件に過ぎないので、最終的にはその変異が両親に存在しないことを検証する必要がある。培養細胞や体細胞系列と異なり、世代間における生殖細胞系列解析では、その祖先細胞野材料としての親DNAが物理的にしかも大量に存在し使えるのが大きな利点である。

その一例として拡張トリオ交配法を図4に示した。

### 細胞分裂当たりの変異率と世代当たりの変異率

図2や図3では、細胞分裂当たりの変異率に着目して議論した。一方で、図1や図4では、世代当たりの変異率に基づいて議論している。とくに、表1のトリオ解析などから明らかになった変異率は、世代当たりの変異率である。ここで、両者の違いを考察する。まず、図3に細胞分裂当たりの変異率推定の基本原理を示した。変異が固定される分裂総数を母数として、実際に変異が固定した分裂の率  $m$  として表される。一方で、世代当たりの変異率は、親がその受精卵として二倍体ゲノムとなった時点ではなかった変異が、分裂を繰り返し、生殖細胞系列へ、さらに卵もしくは精子となり交配によって次世代の受精卵となった時点で新たな変異が生じる率で表される。世代当たりの変異率は、受精卵から次の配偶時(卵もしくは精子)が形成されるのによる細胞分裂分の変異の累積となるので、どの細胞でもどの細胞分裂でも分裂当たりの変異率が一定であれば：

世代当たりの変異率  $\gg$  細胞分裂当たりの変異率

は自明である。ここで、同じ変異が独立に二回生じることはなく、復帰突然変異して元に戻ることはないことを説明した。そのために、一度生じた変異はその細胞系譜では何回分裂を繰り返しても失われることはない。言い換えると、変異は細胞分裂するたびに変異率に比例して加算的に増加することになる。図3で言うと、どの細胞分裂においても変異が固定される確率は等しく  $m$  である。このことから、ある細胞が  $n$  回分裂したあとの変異率  $M$  は

$$M = n \times m \quad \dots \quad (1)$$

となる。もし、受精卵から成体へと細胞分裂して卵や精子を形成する過程でも、細胞分裂当たりの変異率が一定であれば、受精卵から卵や細胞ができるまでに何回分裂したかわかれば、世代当たりの変異率から細胞分裂当たりの変異率を式(1)から推定できる。逆も真で、細胞分裂当たりの変異率から世代当たりの変異率も推定できる。

表1からすでに世代当たりの変異率が推定されているので、細胞分裂当たりの変異率を推定してみよう。表1のマウスを例にとり、世代当たりの変異率  $M$  を  $5 \times 10^{-9}$  とする。ここで  $M$  とせず、 $\mathbf{M}$  としたのは、これまでの細胞分裂当たりの変異率などは1細胞あたり1細胞分裂当たりの変異率  $m$  に基づいて、 $n$  回分裂したあとの1細胞あたりの変異率  $M$  を求めたが、表1に示された変異率は1細胞あたりではなく、塩基対 (bp) あたりの変異率に換算された値のため、これを  $\mathbf{M}$  とした。ヒトもマウスも1細胞には卵から30億塩基対、精子から30億塩基対、計60億塩基対 ( $6 \times 10^9$  bp) のゲノムDNAがある。すなわち：

$$\begin{aligned} M &= \mathbf{M} \times 6 \times 10^9 \\ &= 5 \times 10^{-9} \times 6 \times 10^9 = 30 \quad \dots \quad (2) \end{aligned}$$

となる。すなわち、新たに受精したマウス受精卵細胞には、総数30個の新しい変異が自然に生じている。また、卵にも精子にも等しい変異が生じていると仮定すると、卵から15個、精子から15個、平均して遺伝していることも推定される。ちなみに、ヒトの世代間変異率はマウスより約2倍高くゲノムサイズはほぼ同じであるため、ヒト受精卵には平均60個ほど新しい変異が生じていることが表1からわかる。(註1、ヒトもマウスも2万強のタンパク質をコードする遺伝子座があると推定されている。また、タンパク質をコードする配列は全ゲノムの1.2%程度と推定されている。言い換えるとSLT法で用いる7遺伝子座は、マウスゲノム30億塩基対の1.2%の7/20000に生じる機能変化をもたらす変異だけを解析対象としている。一方で、次世代シーケンシングでは機能変化に関わらず全ゲノム30億塩基対を変異検出の対象としている。SLT法と次世代シーケンシング法では、質的にも量的にも解析対象が大きく異なっている。)

さて、この  $M$  の値から、さらに細胞分裂当たりの変異率  $m$  を推定してみよう。そのためには、受精卵から卵や精子が形成されるまで何回分裂したかわかれば単純にその数で割ればよい。ここでマウスは186億細胞、ヒトは37.2兆細胞からなることを示した(図1)。受精卵は、分裂して2倍に増え死ぬことなく成体に成長すると仮定した場合、マウスでは少なくとも31回の分裂で、ヒトでは36回の分裂でこの細胞数を越える。ここで、卵形成と精子形成の過程を概略する。図1における7日胚あたりで分化する少数の始原生殖細胞群から卵も精子も発生するが、発生組織学的な雌雄の性分化は13日胚までは生じず雌雄どちらにも分化できる状態にある。(註：遺伝学的には受精時にY染色体を受け継ぐか

否かで雌雄が決定されている。) 14 日胚あたりから XX 個体では卵巣などの、XY 個体では精巣などの内性器が形成されていく。卵は、この胎児期に卵巣のなかで卵原細胞が有糸分裂したあと一生の間に排卵する数を遥かにこえる卵母細胞へと分化し減数分裂の途中で細胞分裂を排卵まで休止する。受精してこの休止にいたるまでおおよそ 20 回程度細胞分裂していると想定される。そして性成熟して排卵し受精すると最後の減数分裂が生じ第 2 極体を放出して受精卵になるといわれる。一方で、精子形成は、精原細胞が有糸分裂して増加するものの、減数分裂して成熟精子を形成するのは生後 6 週令あたり以降である。生後 6 週令といえば細胞数的にはほぼ成体と同等なので、ここまでに平均 30 回の細胞分裂があったと想定される。さらに、オスの場合には精原細胞の細胞分裂と成熟精子形成は妊性がある限り一生継続されるので 1 年を越えたオスの成熟精子では 50 回以上細胞分裂が経過している可能性もある。性成熟してから妊性が失われるまで平均すると 40 回ほど細胞分裂しているとみてよいだろう。すなわち、受精から成熟卵と成熟精子が形成されるまでの細胞分裂数はおおよそ 2 倍ほど異なることになる。

実際に検出された変異の詳細な解析から、ヒトでは精子由来の変異数が、卵由来の変異数が約 2 倍高いことや、父親が歳を取ってからの子の方が受け継ぐ変異数が多いことなどがわかりつつあり、この卵形成や精子形成にいたる細胞分裂数、および、細胞分裂あたりの変異率と、世代あたりの変異率についての議論をサポートしている。とは言うものの、実際の卵や精子形成において、細胞分裂あたりの変異率が一定かどうか、また、細胞分裂数の実態など、詳細は不明である。今後、直接、実験検証することで、女性男性ごとの低線量放射線被ばくに対するリスクの違いをこういった視点から解明していくことも重要な課題である。

## 生殖細胞系列と体細胞系列における変異原感受性の評価

低線量被ばくによって被ばくした個体自身の発がんリスクがどのくらいあるかという評価は、それぞれの体細胞・臓器によって、細胞分裂能、細胞分裂速度が大きくことなり、また、誘発される塩基対エラーなどの DNA 修復能も大きく異なっている可能性もあり、臓器別に実験検証する必要がある。例えば、図 1 に示すように発生分化の過程でさまざまな臓器へと細胞は分化していく。初期発生のはじめは極めて細胞分裂が激しく急激に細胞数が増える。すべての胎児細胞の元となる内部細胞塊を体外培養すると平均 9 時間で倍増する。これが ES 細胞である。一方で大人から組織の一部を生検して体外培養するともっとも分裂能の高い繊維芽細胞が培養細胞として樹立されることが多い。繊維芽細胞は平均して 24 時間で倍増する。また、神経細胞や心筋細胞などは大人では細胞分裂しないと言われる。幼児期までは神経細胞も分裂しており、希少疾患として神経芽細胞腫というがんはまれに報告される。しかし、大人において、神経細胞がんや心筋細胞がんの報告がないのは細胞分裂しないためとも言われる。発がんリスクそのものが臓器によって大きく異なるということは、低線量放射線が被ばく個体に直接及ぼすリスクを評価するうえで重要な鍵である。すなわち、同じ個体でも臓器ごとに低線量被ばくへの感受性が大きく異なっていることを強く示唆するからである。

こういった検証は、それぞれの臓器から培養細胞株を樹立して個別に実施するのは困難である。一方で、受精から生殖細胞系列へ、さらには、さまざまな体細胞系列へと発生分化成長し老化にまで至るマウス個体は、ヒトの生から死までの縮図であると同時に、すべての臓器の違いまで 1 匹で完結している。生きたマウスをモデルとする変異原感受性解析は、次世代シーケンシングの利用が可能となった今日、低線量放射線のリスク評価を解明するにあたり、より重要性を増しているといつてよいであろう。

マウス個体を用いた変異検出解析を概観する。図 1 に示すように、受精後 3～4 日で胚盤胞となりそのなかに分化した内部細胞塊からすべてのマウス個体の細胞が発生する。さらに 7 日目以降に、ごく一部の細胞が始原生殖細胞としてニッチェを確立し、すべての卵子や精子はこの始原生殖細胞に由来する。遺伝学的な性決定は Y 染色体を精子から受け継ぐか否かで受精時に決まっているものの、生物学的な雌雄の生殖器および生殖細胞の発生分化は 14 日目以降に生じる。この発生分化の過程で、卵および精子に至る系譜を生殖細胞系列と呼び、それ以外の細胞は体細胞系列である。次世代にゲノム配列を伝えていくのは生殖細胞系列だけである。生殖細胞系列における変異検出は、低線量放射線被ばくにおいては、数 10 年から数 100 年といった将来のヒト集団に及ぼす影響を知るうえで極めて重要な課題である。ヒトもふくめトリオ解析を中心に生殖細胞系列における変異検出と変異率推定が表 1 にも紹介したようにすでに始まっている。とくに、マウスにおいては、多産系であり、かつ、雌雄 1 対を用いて 1 年間に 3 回出産させることも可能である。得られる 20 産仔を投与群と非投与群 2 群に分けた解析は実施可能である。さらに、この非投与群に含まれる雌雄ペアからさらに 3 産 20 産仔を得て継続して変異原リスク評価を繰り返すことが可能である。この場合、親ペアはすでに全ゲノム解読された個体であり、変異検出の精度が飛躍的に高まる。また、投与群産仔から得た産仔にさらに投与すれば、世代で連続して被ばくした場合のリスク評価も可能である。この拡張トリオ解析は、変異原リスク評価にとってはこのようにさまざまな解析が可能な柔軟性の高い交配システムとなっている。実際に、われわれは ENU という化学変異原を投与して拡張トリオ交配と次世代シーケンシングによる

変異検出に成功し共同研究として報告している<sup>7,8</sup>。

一方で、図 1 に示すように、生物個体を占める大多数は体細胞である。体細胞は、時間軸においても空間軸においてもさまざまな組織臓器へと分化し種々雑多な細胞集団となる。放射線被ばくした個体そのものへの影響を評価するには、それぞれ異なった特徴をもつ体細胞群 (=臓器や組織) ごとに変異率を解析する必要がある。すなわち、マウス個体全体を用いて、変異が網羅的にどの細胞からも検出できれば、発がんリスクをはじめ、成長過程で (時間軸で) また臓器毎で (空間軸で) の低線量放射線に対する直接のリスクが解明され、現在のヒト集団 (またすべての生物集団) への重要な情報となる。

図 3 では、説明をわかりやすく概観するため、実際の変異体頻度 MF や変異率  $m$  よりも遥かに高い率を設定して仮想実験を説明した。実際の  $m$  は、式(2)における  $M=30$  という値と、上記のとおりマウスではおおよそ 30 回どの臓器も (生殖細胞系列も体細胞系列も) 細胞分裂するとして、 $n=30$  という値を式(1)に与えると：

$$\text{マウスにおける細胞分裂当たりの平均変異率 } m = 1 \cdots (3)$$

が得られる。これは細胞あたりの変異率であることを再度強調しておく。すなわち、どの細胞にも親細胞と異なる変異箇所が二倍体全ゲノム 60 億塩基対のどこかに 1 カ所生じている計算になる。このことから、マウスでもヒトでも 1 個の受精卵から発生して大人に成った 186 億の細胞はすべて異なった細胞であると結論した。(註：厳密な議論をすると、親細胞に比べ、娘細胞には平均 1 個、ランダムに変異が生じるので、ポアソン分布から 30%強の娘細胞には 1 個も変異は入っていない。しかし、30 回分列しても 1 個も入らない確率は  $(1-30\%強)$  の 30 乗で与えられ、ゼロと見てよい。)

さてここで、新たに細胞分裂あたり塩基対あたりの突然変異率 $\mu$ を求める。これは単純に式(1)の拡張で、

$$M = n \times \mu \cdots (1)'$$

で与えられる。

表 1 に具体的な値がさまざまな NGS 解析によって明らかとなっている。しかし、これはあくまで生殖細胞系列において実験検証された推定値である。ここで一次近似として、この生殖細胞系列で得られた変異率 $M$ がすべての体細胞にあてはまり、また、平均細胞分裂数も 30 と一次近似すると、マウスでは：

$$\begin{aligned} \mu &= M / n \\ &= 5 \times 10^{-9} / 30 = 1.7 \times 10^{-10} \end{aligned}$$

となる。

これがマウス成体を構成するすべての細胞における細胞分裂あたり塩基対あたりの推定平均変異率である。では、こういう条件下で体細胞レベルの変異検出を次世代シーケンシングで行なった場合、変異検出が可能かどうか検討してみよう。図 3 の仮想実験では、a, b, c, d は、次世代シーケンシングによって、それぞれ、8/64、2/64、1/64、1/64 の頻度で検出される計算になった。通常、次世代シーケンシングを用いた全ゲノム解読は 30×カバレッジで実施するのを最小限度としているので、その 2 倍実施すれば、1/64 の頻度でも 1 リードは変異配列として検出できるが、これでは実験エラーとの識別ができない。少なくともこの 5 倍、すなわち、300×カバレッジで解読する必要がある。不可能な数字ではないが、これを投与群 vs 非投与群など複数回実施するにはかなり厳しい。以上は図 3 の仮想実験系の計算であり、現実を得られた $\mu=1.7 \times 10^{-10}$  という値から、実際の細胞集団に置ける変異体頻度 MF を考えてみる。仮に、MF 値が $\mu$ の 100,000 倍という非現実的なクローナルエクspansionを想定してみる。それでも  $MF=1.7 \times 10^{-5}$  に過ぎない。すなわち  $10^6$ ×カバレッジで全ゲノム解読を行なってやっと 1.7 回変異リードが出現するという計算になる。これは費用面だけでなく解読に要する時間ともあわせて実施不可能な実験である。これが、次世代シーケンサーを用いても体細胞系列や培養細胞系ではまだ変異検出ができない本質的な理由である。

ここでもうひとつ培養細胞がもつ大きな課題を指摘する。細胞のがん化を考慮してみよう。細胞はがん化すると細胞増殖が止まらなくなる。また、細胞分裂の頻度が高くなる。細胞の増殖能が高まるのががん細胞の大きな特徴であり、がん化の一つのマーカーでもある。培養細胞系において、ある細胞ががん化すると、他の細胞より分裂速度が速いため、細胞集団中で、他の細胞より多く占めるようになる。ダーウィンの進化論にそって多く増えることが適応度が高いとすれば、がん化は、一見、適応に有利な正の選択をもつ変異の出現によって生じることになる。さらに、生物個体か臓器を取り出して培養細胞化しようとしてもなかなか増殖しない。仮に細胞分裂してもその分裂回数が限られ無制限に分裂を続けることはない。一方で、がん化した細胞は容易に培養細胞化できるだけでなく、多くの場合、無限に増殖する性質を有する。その典型例が HeLa 細胞である。1950 年代にあるがん組織から樹立されたこの細胞株は 2019 年の今日でも分裂を続けているばかりか、世界中でヒト培養細胞とし

て実験に広く利用されている。これも一見、正の選択がかかる適応生存に有利な変異が蓄積した結果に見える。しかし生きた生物個体内で細胞ががん化すると異なった結果となる。すなわち、無制限にがん細胞が増殖し悪性化して転移し最終的には個体死をもたらす。すなわち、細胞レベルでは一見選択淘汰に有利に見える変異が、個体レベルでは選択淘汰に不利な変異という逆の結果をもたらすのである。一度固定した変異は修復酵素によって認識されず、その細胞系譜から消えることはないと説明した。じつは、生物個体レベルでは、こういったがん化をもたらすような変異が生じた場合、固定されたあとでも、プログラム細胞死といった系によって自爆死して個体内からその細胞系譜そのものが消滅する防御機構を持っている。この機構をすり抜けて、実際に細胞ががん化したあとでも、免疫機構によってがん化した細胞を体内から除去する機構も張り巡らしている。こういった細胞レベルにおける変異を有する細胞群の除去は、培養細胞系では通常起こらない。そのためにがん細胞に由来する HeLa 細胞はいまでも世界中で利用することができる。ヒトにおける低線量放射線評価を、培養細胞ではなく、マウス個体そのもので実施する一番のメリットは、こういった生物個体全体が有する変異生成と除去機構も含めて、すべてのシステムを包含したヒトそのものに近い系で、最終的にどういった変異が自然に生じ、また、変異原暴露によって誘発されるか、高精度に評価できることが一番大きいといっても過言ではない。

### 培養細胞および体細胞系列における変異検出と解析

次世代シーケンサーでは、培養細胞系や体細胞系列における変異検出はまだまだ無力であることを紹介した。じつは、大腸菌系などで数十万の DNA 分子に一つ変異があっても検出できるモニター遺伝子を、マウスに導入したトランスジェニックマウスを用いることですでに実用化された系がいくつも確立されている。

最初に確立されたのは、大腸菌 lacZ 遺伝子を導入した MutaMouse 系<sup>9</sup>である。トランスジェニックマウスというのは、人工的に外来性の遺伝子をマウス受精卵のゲノムに組み込んだ系統である。受精卵に組み込むので図 1 に示すマウスゲノムと同様に生殖細胞系列にも体細胞系列にもすべての細胞に、マウスゲノムの一部として伝わる。ほ乳類ゲノムでは、タンパク質をコードしている配列は 1.2%に過ぎず、外来性の遺伝子を導入しても、タンパク質をコードする遺伝子を破壊する確率は低い。実際に、トランスジェニックマウスを確立後、そのマウスに何ら異常が見られないことを実際に検証する。導入した遺伝子にはほ乳類細胞で発現するのに必要なプロモーター配列など一切ないので、導入後は、トランスジェニックマウスにおいて基本的に発現せず、マウスゲノムの一部として（いわゆるジャンク DNA のように）挙動する。もしそのマウス個体に変異原に曝されれば、導入遺伝子配列には、他のマウスゲノム配列と全く等価に変異が誘発される。そこで、さまざまな変異原をこのトランスジェニックマウスに投与後、リスクが高まったと思われる臓器からゲノム DNA を抽出し、導入遺伝子を大腸菌に戻す。MutaMouse の場合には lacZ 遺伝子を大腸菌系に戻して形質転換する。大腸菌系で発現するプロモーターも含まれており、形質転換された大腸菌は lacZ を発現する。導入した野生型 lacZ 配列が発現した場合、Xgal という試薬を含む培地に形成する大腸菌コロニーは青色に染まる。もし、マウスゲノムが複製して行く過程で導入した lacZ 配列に変異が誘発され機能が失われると、大腸菌に戻して形質転換しても青くならない。（実際には形質転換に用いるベクターは  $\lambda$  フェージという大腸菌を溶かしてプラークを形成する。野生型 lacZ で出来るプラークは青色に、変異が生じると透明色のプラークが大腸菌を敷き詰めたプレート上に形成される。）大きなプレートを用いて大量の大腸菌を形質転換して数十万から数百万のプラーク形成も容易なのでそのなかにもどのくらい透明なプラークが現れるかで変異体頻度 MF が推定できる。これがトランスジェニックマウスにモニター遺伝子を導入して体細胞変異を検出する原理である。このグループは膨大な青色のプラーク中に透明なプラークを検出するのが見落としやすいため、改良も行なった。lacZ ではなく lacZ のレプレッサー遺伝子である lacI を導入したトランスジェニックマウス BigBlue<sup>10</sup>を開発した。このモニター遺伝子のマウス内での挙動は全く同じである。違いは大腸菌に戻して形質転換したときに、lacZ モニター遺伝子と逆の色の変化が生じる。lacI は lacZ のレプレッサーなので変異がなければ宿主大腸菌がもつ lacZ 発現が抑制され透明なプラークが形成される。マウス個体内で lacI モニター遺伝子に変異が誘発されるとレプレッサー機能が失われるので大腸菌に戻した時に宿主の lacZ 発現を抑制できず、その大腸菌プラークは青くなる。すなわち透明なプラークが密集するなかでポツンとひとつだけ青色に染まるプラークが生じるので変異を見落としにくくなるという利点がある。

さらに、数十万も数百万もプラークを形成させるとひとつひとつのプラークはどんどん小さくなってしまい色の異なるプラークを検出する限界となる。そこでわれわれは大腸菌系で生じた変異だけを検出するために真木寿治博士が利用したストレプトマイシン耐性コロニーとして変異を検出できる大腸菌遺伝子 rpsL に着目し、rpsL をモニター遺伝子として導入したトランスジェニックマウスを開発した<sup>11</sup>。HITEC マウスとしていろいろな研究室で利用されている系統である。同様に、能美健彦博士らは 6-TG 薬剤耐性として変異を検出できる大腸菌遺伝子 gpt をモニター遺伝子として導入したトランスジ



エニックマウス gpt  $\Delta$  系統<sup>12</sup>を確立し体細胞の変異原解析に利用できる。

## 結語

以上を踏まえ、図 4 に示す拡張トリオ解析を、低線量放射線などの微量変異原のリスク評価系をこれから異分野間の融合研究として大規模に展開していくたたき台として提案したい。また、変異検出には、次世代シーケンシング法が 1 塩基置換や小さな indel 変異検出には有効に活用できる。一方で、大きな欠失、挿入、逆位、転座、重複、コピー数変動といった構造変異検出には課題が残されており、近年、精度が向上し利用が進んでいる 1DNA 分子レベルで 10kb 以上の長鎖 DNA 解読が可能な Pacific Bio や Oxford Nanopore などの新しい DNA シーケンシングシステムを積極的に取り入れた構造変異検出系の開発も同時に進めていくことを提言する。

## 謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 JP07554043, JP21240043, JP25241016, JP17H00789 の助成を受けたものです。

## 引用文献

1. Kong A, et al. Nature 488: 471–475, 2012.
2. Venn O, et al. Science 344: 1272–1275, 2014.
3. Uchimura A, et al. Genome Res 25: 1125-1134, 2015
4. Fukumura R, Gondo Y, et al. in preparatration
5. Keightley PD, et al. Genetics 196: 313–320, 2014.
6. Bianconi E, et al. Ann Hum Biol 40: 463-471, 2013.
7. Masumura et al. Genes Environ 38: 10, 2016
8. Masumura et al. Mutat Res 10: 30-39, 2016.
9. Short J, et al. Fed Proc 8515a. 1988; Gossen JA, et al. Proc Natl Acad Sci USA 86: 7971-7975, 1989.
10. Kohler SW, et al. Environ Mol Mutagenesis 18: 316-321, 1991.
11. Gondo Y, et al. Mutat Res 360: 1-14, 1996.
12. Nohmi T, et al. Environ Mol Mutagenesis 28: 465-470, 1996.