

ロングリードシーケンスを用いたRCCX領域のゲノム構造解析

黒木 陽子^{1,3}、宮迫 さおり^{1,2}、佐藤 伴¹、ザルソソ アドリアン¹、勝又 規行^{1,2}、河合 洋介⁴、長崎 正朗⁵

1) 国立成育医療研究センター (NCCHD) 共同研究管理室 2) NCCHD 分子内分泌研究部 3) NCCHD ゲノム医療研究部
4) 国立遺伝学研究所 ヒト集団ゲノム研究室
5) 九州大学九州大学生体防御医学研究 高深度オミクスサイエンスセンター バイオメディカル情報解析分野

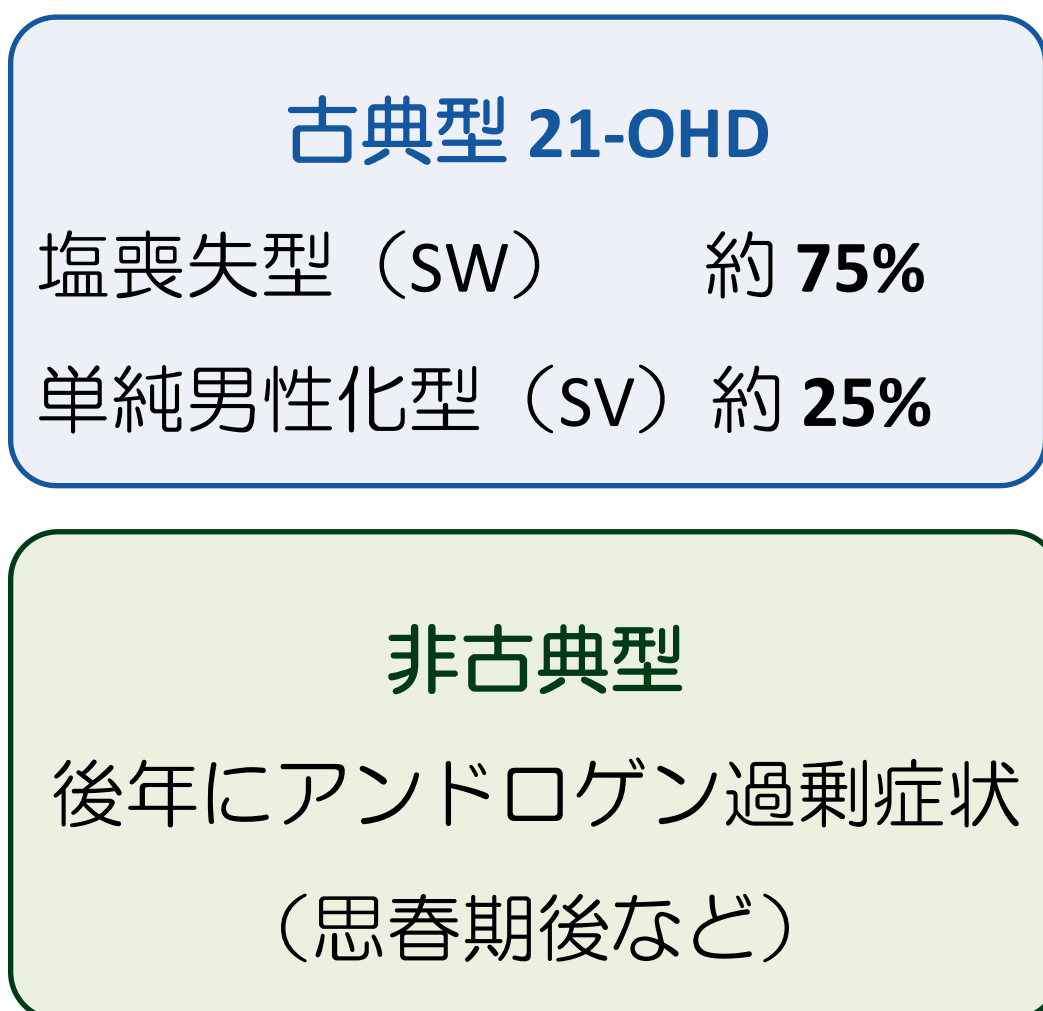
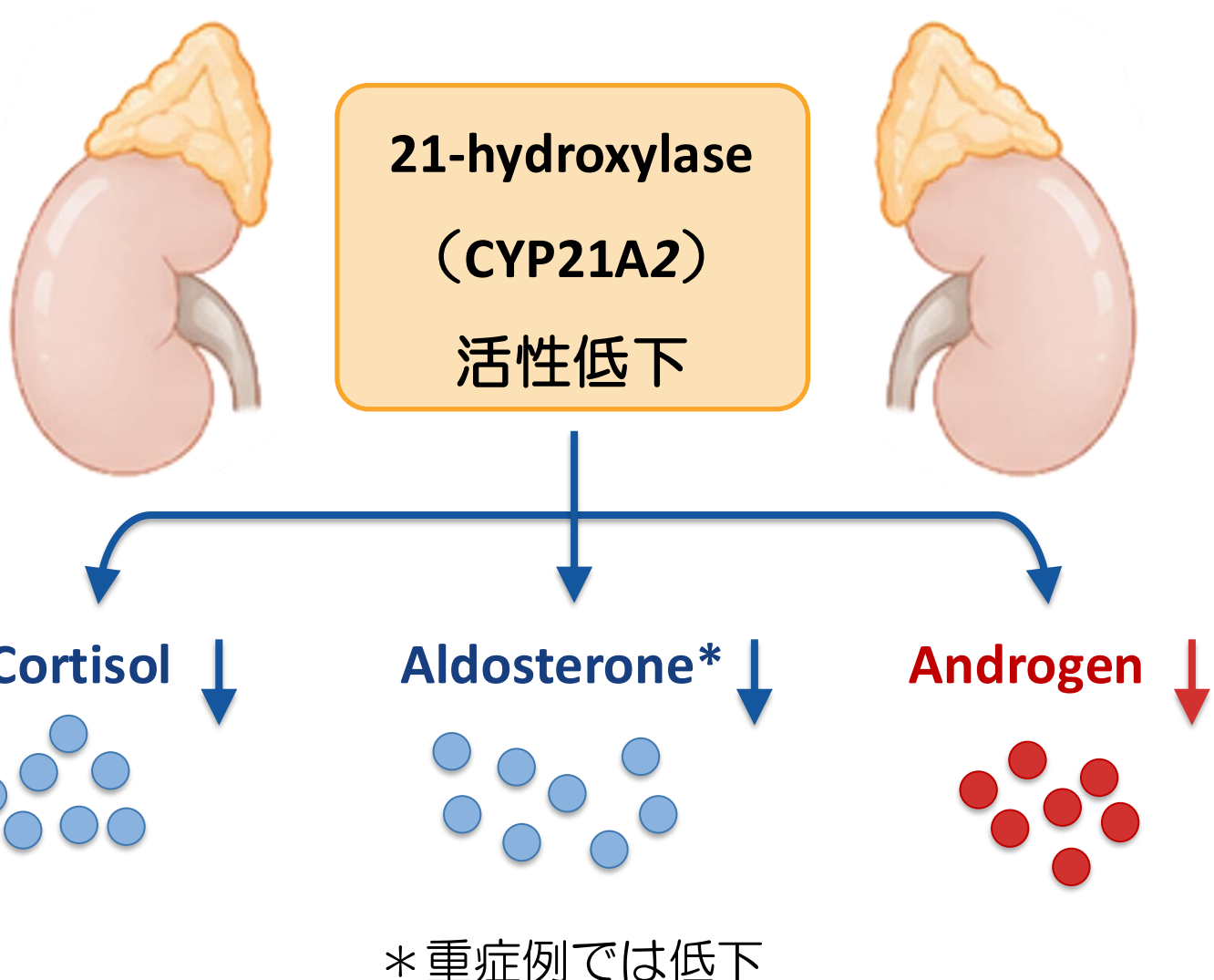


抄録

背景

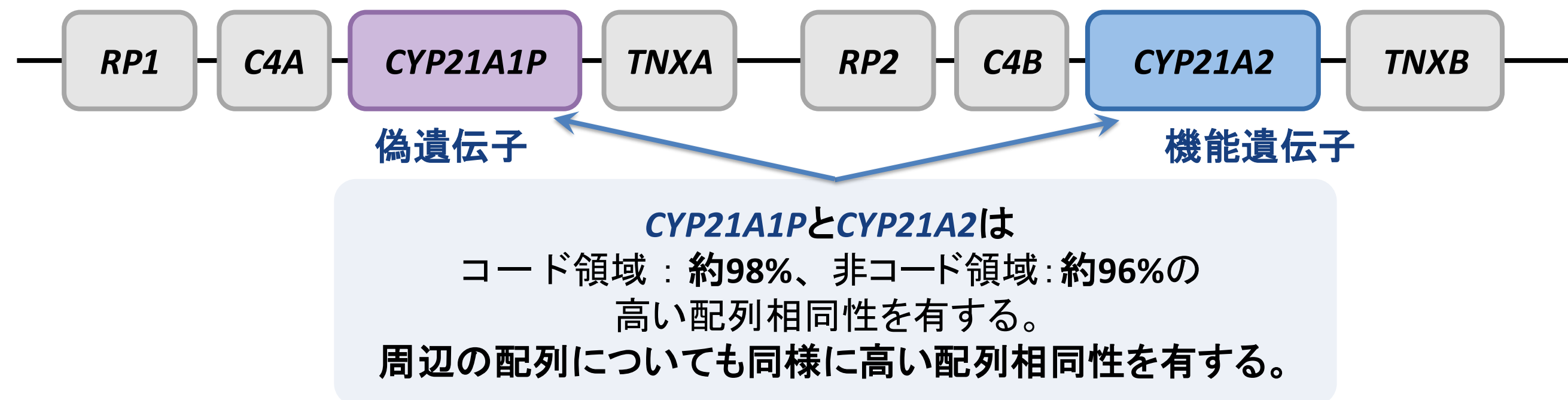
1. 21-OHDとは?

21-水酸化酵素欠損症 (21-OHD) はCYP21A2の遺伝子機能喪失により発症する常染色体潜性遺伝性疾患で、先天性副腎過形成症 (CAH) の約90-95%を占める。

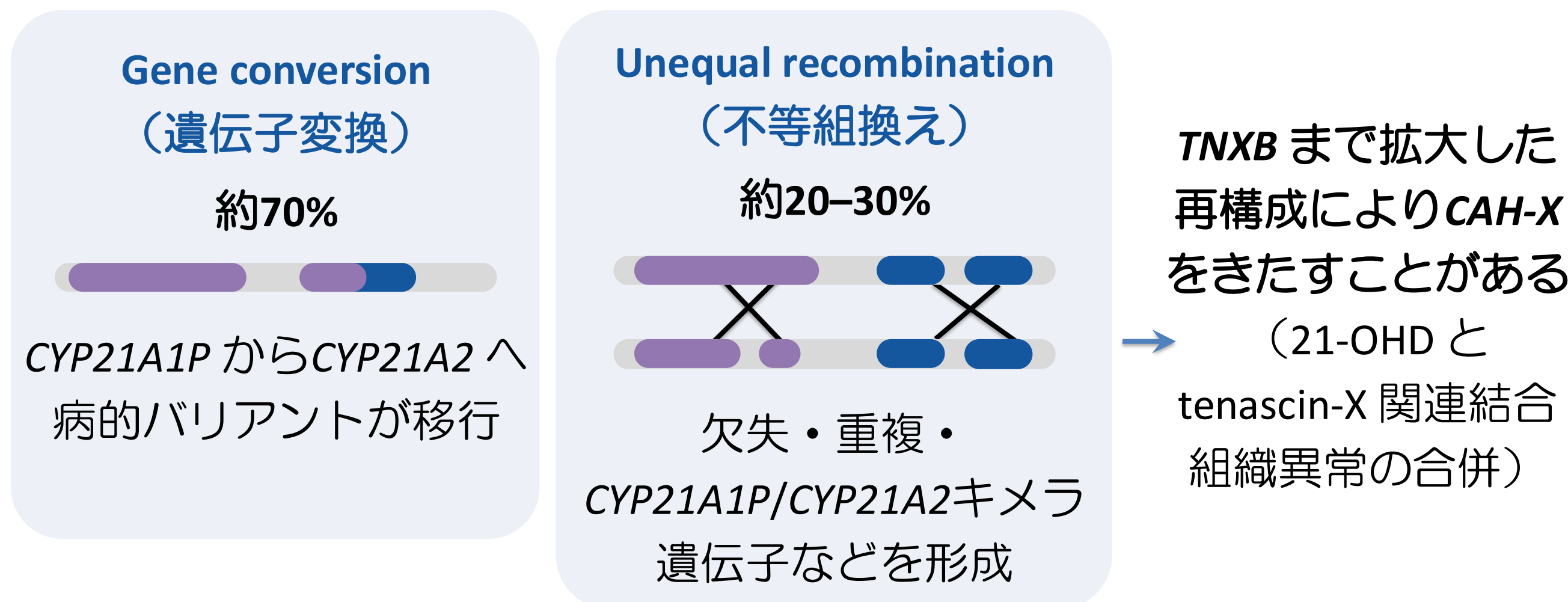


2. CYP21A2とRCCX領域の特徴

CYP21A2は染色体6p21.3のRCCX領域 (~30 kb モジュール) に位置し、その近傍に偽遺伝子CYP21A1Pが存在する。



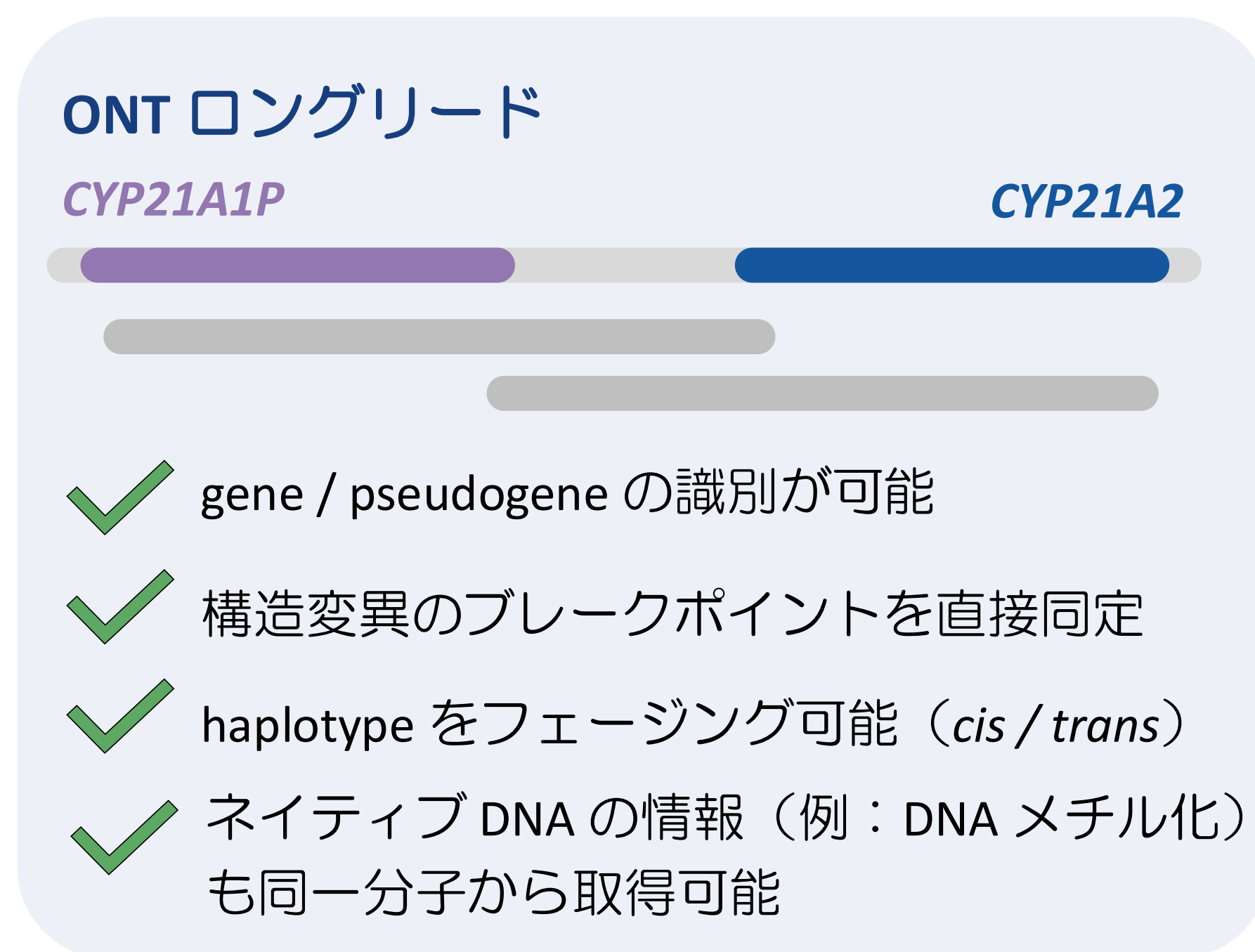
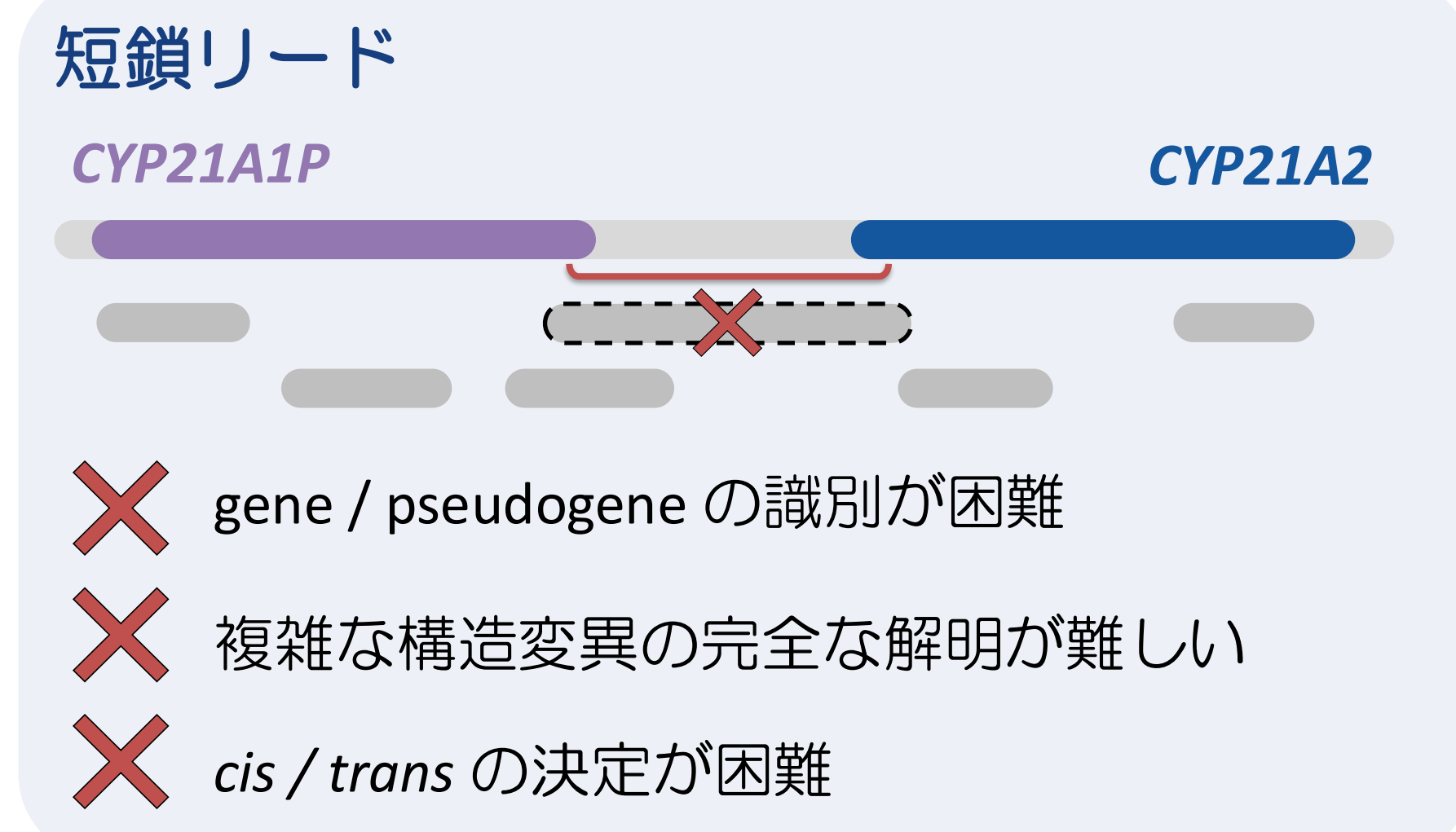
非対立遺伝子間相同組換え (NAHR) が病的アレルを形成



RCCXはコピー数多型を示し、複雑な構造変異が生じやすい領域である

3. なぜロングリードが必要か?

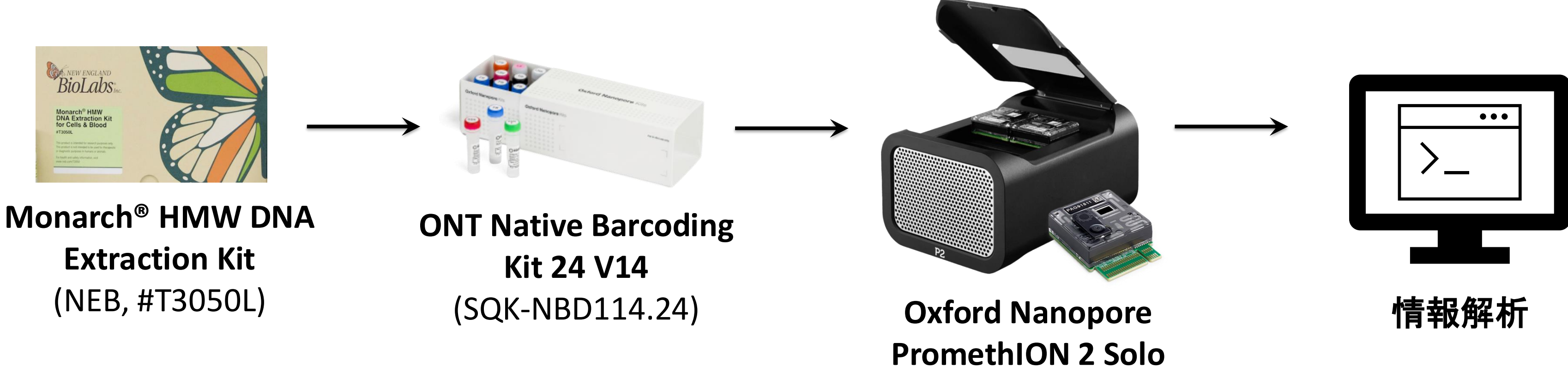
高い配列相同性と多様な構造多型が存在するため、短鎖リード解析では正確な解釈が困難。



🔦 標的ONTロングリード解析により、複雑なCYP21A2/RCCXアレルの配列・構造を解析し、直接フェージングすることを目的とした

方法

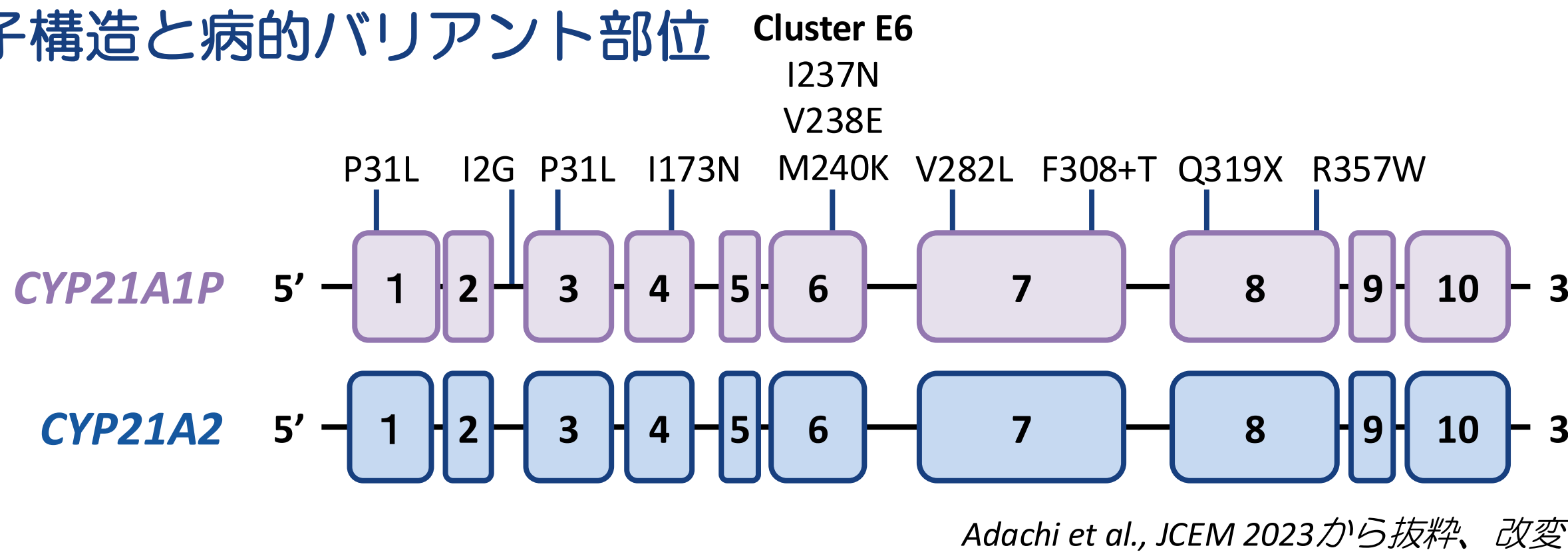
Adaptive samplingにより、PCRフリーでCYP21A2/RCCX領域を選択的に濃縮した。



- Dorado v0.9.6 → basecalling & alignment to T2T-CHM13
- Clair3 v2.0.2 → SNV/indel calling
- WhatsHap v2.8 → read-based phasing & haplotagging
- bcftools/tabix v1.23.1 → variant processing
- IGV v3.0 → haplotype-resolved read inspection

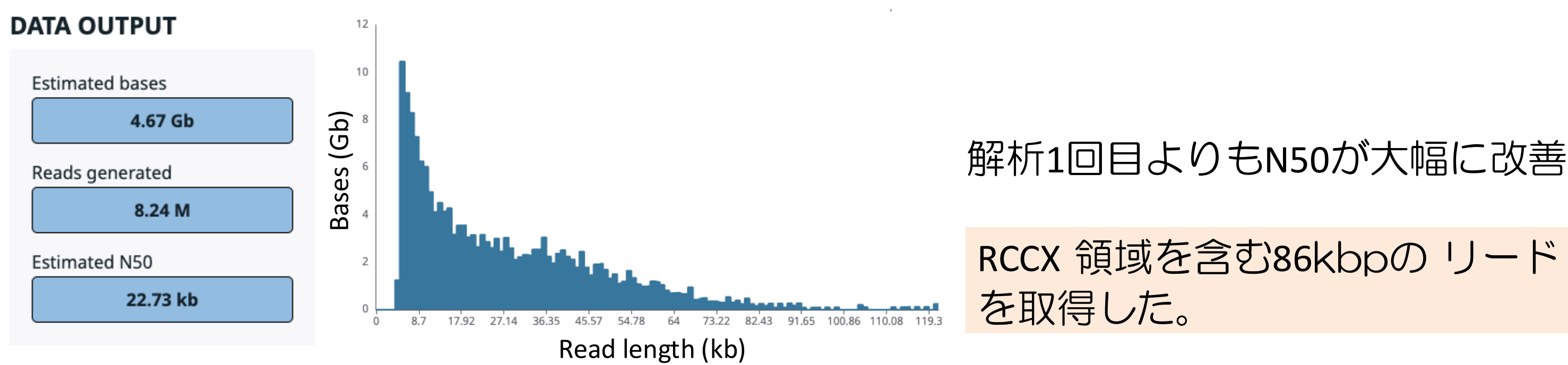
結果

遺伝子構造と病的バリエーション部位



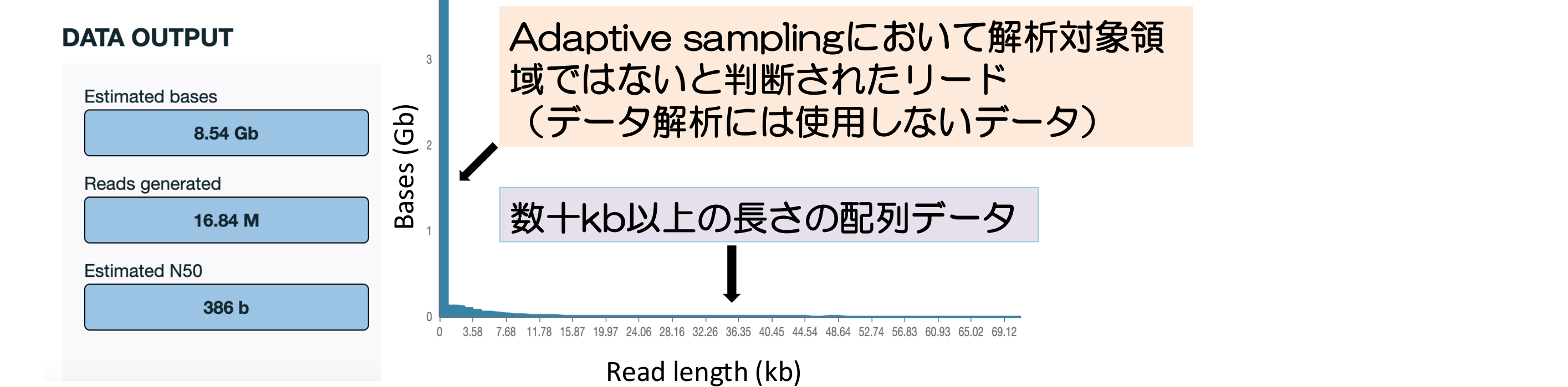
解析2回目

得られたリードの品質

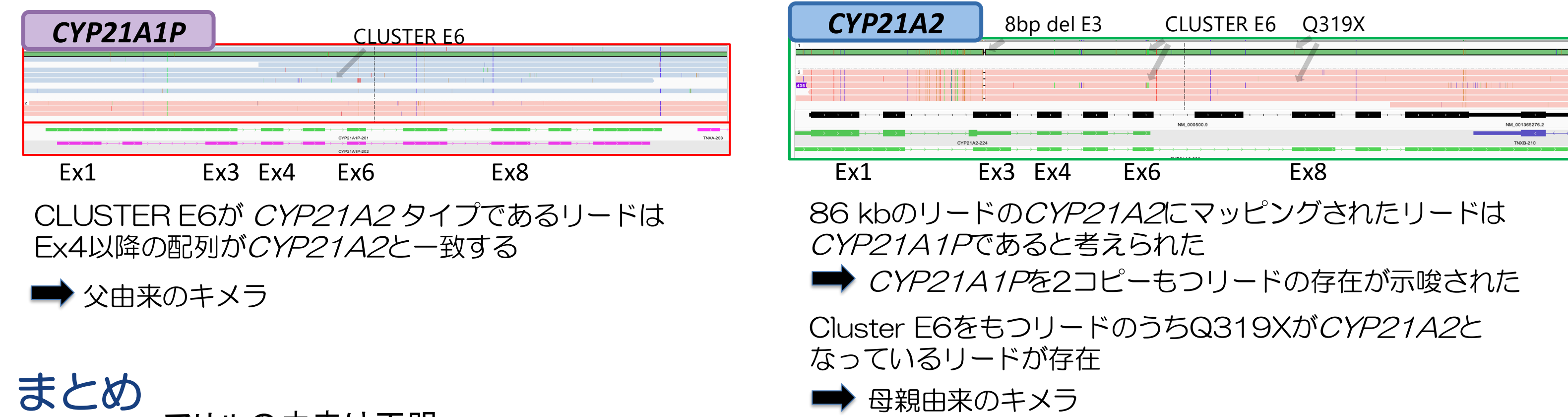
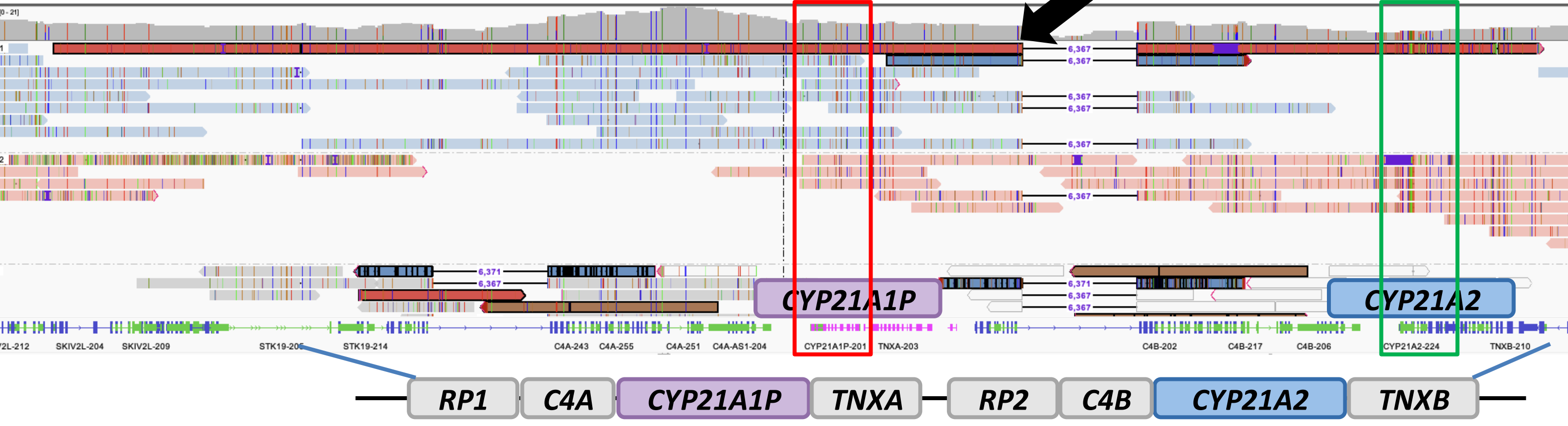


解析1回目

得られたリードの品質



IGVを用いたリードのマッピング



まとめ

アレルの由来は不明



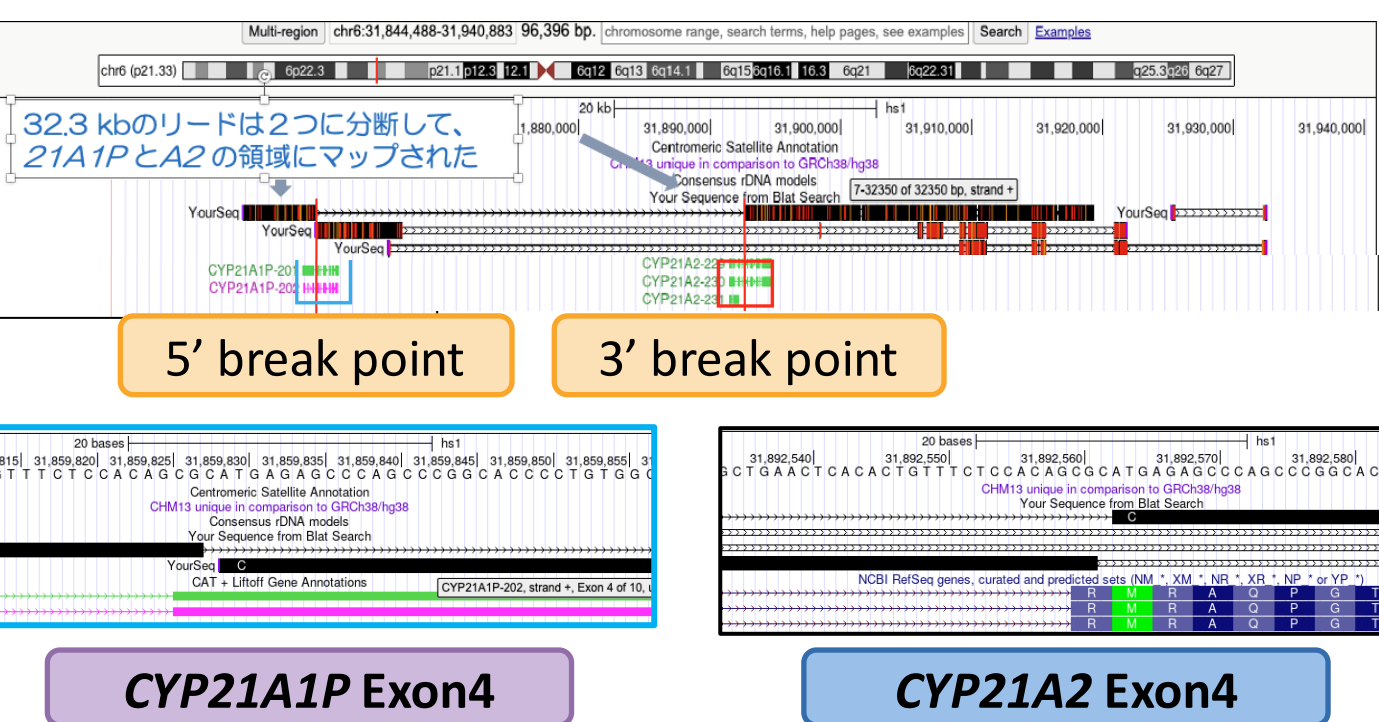
- Adaptive Samplingを用いたロングリードシーケンスによって、難読領域であるRCCX領域の構造の一端を明らかにすることができた。
- 一方で、難読領域かつ遺伝子構造異常の検出にはLRSの向上とカバレッジの確保が重要である。

JoGo-Nextが目指す長鎖型シーケンスデータに基づく日本人ゲノム・オミクス基盤と同様に、本研究のONT解析はRCCX構造多型をハプロタイプレベルで捉えることで、稀少疾患の発症機構とゲノム構造多型との関連を正確に評価する情報を提供する。

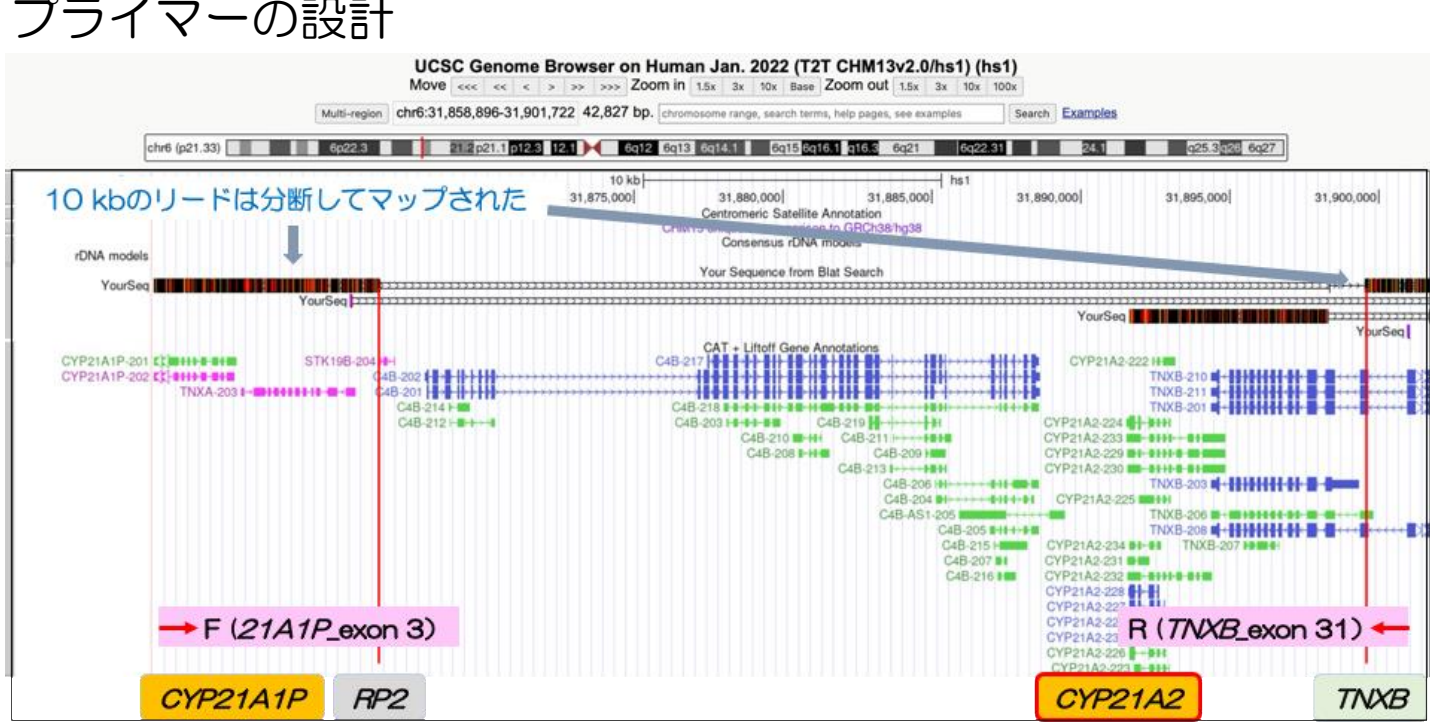
本症例のRCCX領域ONT長鎖リード解析で得られたハプロタイプは、JoGo-Nextで構築される一般集団のハプロタイプと比較解析することにより、CAH/21OHDおよびCAH-Xの発症に関わるゲノム構造多型やリスクアレルの頻度の解明に有用である。

展望

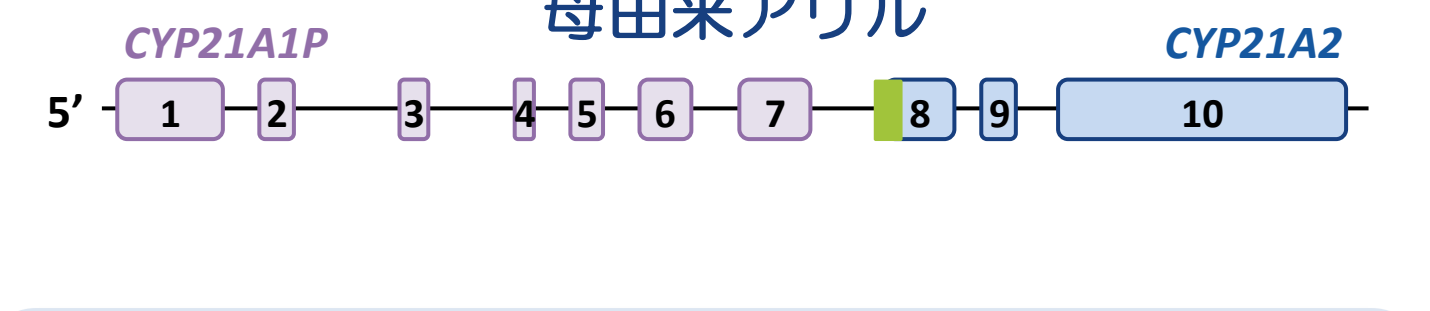
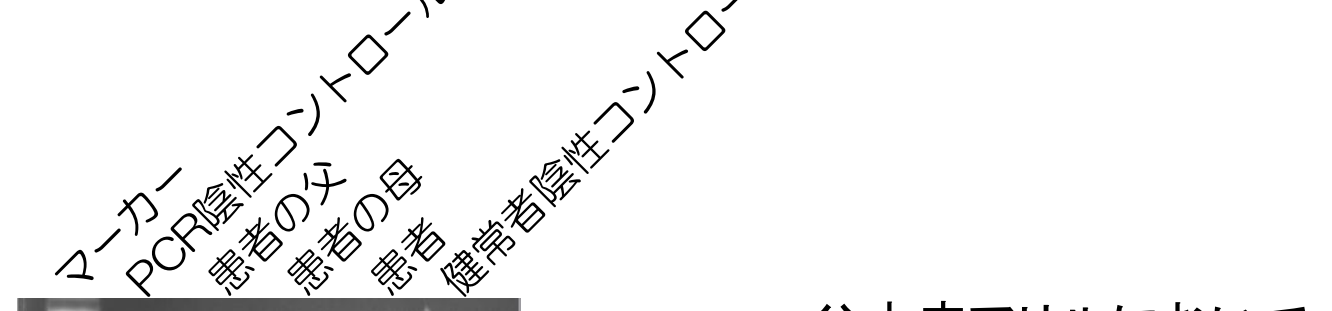
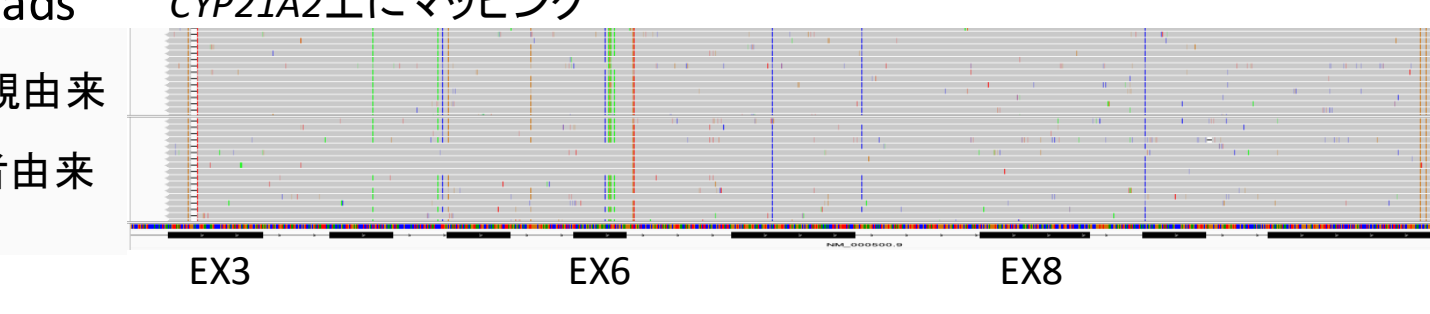
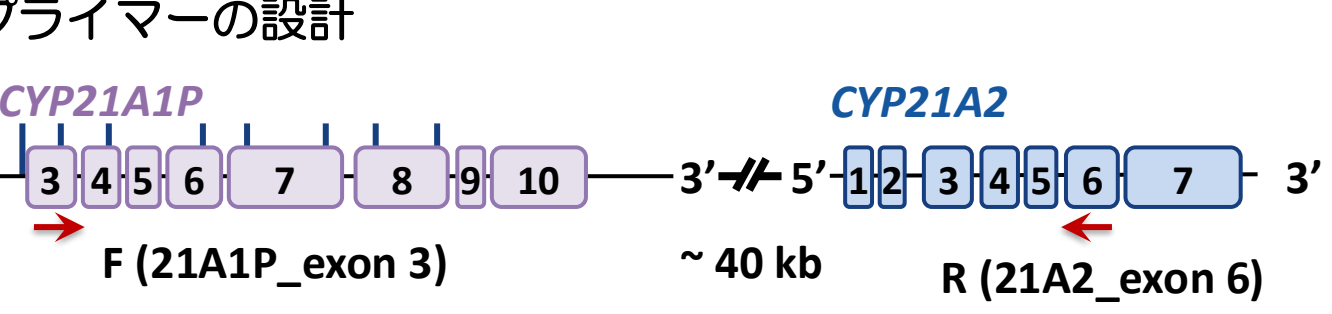
父由来アレルの同定



母由来アレルの同定



切断点を含むPCR解析



患者は、父と母から異なる融合パターンを示すキメラ遺伝子をそれぞれ受け継いでいる可能性が示された。