

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：85401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510079

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた放射線のラット未熟卵母細胞に及ぼす遺伝的影響評価

研究課題名(英文) Estimation of Genetic Risk of Radiation on Immature Oocytes of Rats by using next generation sequencer

研究代表者

佐藤 康成 (SATO, Yasunari)

公益財団法人放射線影響研究所・遺伝学部・研究員

研究者番号：30393424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)： ヒト女性における放射線被ばくの継世代リスクを解明するためのモデルとして、4Gyのガンマ線を照射した雌マウスC57BL/6の成熟卵母細胞由来のF1マウス3匹と、照射前の交配によるF1マウス3匹、及び両親の合計8匹の脾臓DNAを用いて全ゲノムシーケンスを実施した。1匹のF1マウスにのみ検出されるが、他の兄弟F1マウスと父母のマウスには検出されない突然変異候補を抽出すると、1匹あたり約10個の一塩基置換型の新規突然変異候補が得られた。母親への照射後に産まれたF1マウスに、照射前に産まれたF1マウスよりも多くの塩基置換型突然変異が観察された。

研究成果の概要(英文)： As a model to evaluate transgenerational risk of radiation exposure to human female, we conducted whole genome sequencing of murine spleen DNA derived from three F1 mice born to mature oocytes that were exposed to 4 Gy of gamma-irradiation, three F1 mice born before irradiation, and their parents. We detected about ten de novo mutation candidates of base change per one F1 mouse that were not observed on other F1 mice and their parents. Base change mutations were observed more in the F1 mice born after irradiation compared to the F1 mice born before irradiation.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：放射線の継世代リスク 女性被ばく 全ゲノムシーケンス

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおける放射線被ばくの継世代リスクを解明するための動物モデルとして、男性被ばくを評価するためにはマウスが用いられてきた。それに対して、女性被ばくを評価する動物モデルとしては、マウスはその未熟卵母細胞が放射線に高い感受性(細胞死)を示しほとんど細胞が得られないため適さない。このため、当初の計画では、未熟卵母細胞が放射線に感受性を示さないラットを動物モデルに使用する予定であった。しかし、ラットの未熟卵母細胞における放射線影響を2次元電気泳動法により調べた研究(研究課題番号:20310033)において、ラットの未熟卵母細胞での放射線誘発突然変異率がオスマウスの精原細胞と比べてかなり低いことが示唆されたため、継世代リスクを解明するために次世代シーケンサーを用いる方法を導入するにあたって、既に放射線により突然変異が誘発されることが知られているマウス成熟卵母細胞を標的細胞とした。この場合、精原細胞照射の場合の2倍くらいの突然変異がF1マウスに観察されることが過去に報告されている。

近年の次世代シーケンス技術の進展により、動物個体一匹ごとの全ゲノムシーケンスが可能となった。継世代リスクの解明のためには、突然変異率の低さのために非常に多数の遺伝子座を調べる必要がある。全ゲノムシーケンス法では、個体一匹のほぼ全てのDNA配列を調査することができ、塩基置換、欠失・挿入、ゲノムの構造異常といった多くの種類の多型を解析できる。従来用いられた技術と比べてはるかに高い解像度での調査を行うことができるため、得られる結果は生殖細胞への放射線照射についてのリスク推定においてゲノム全体における塩基対レベルでの最も詳細なものになると予想される。

2. 研究の目的

4 Gy 照射された成熟卵母細胞由来の F1 マウスの突然変異を、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンスにより解析する。母親への照射前に産まれた F1 マウスと照射後に産まれた F1 マウスの突然変異を比較することで、その種類と頻度について検討する。

3. 研究の方法

(1) 材料：雌親に C57BL/6、雄親に C3H という純系マウスを使用した。放射線医学総合研究所の動物施設において同研究所の協力のもと、まず放射線を照射していない C57BL/6 と C3H を交配させ F1 を得た。初回の出産から4週が経過した後に、雌親 C57BL/6 に 4 Gy のガンマ線を照射した。成熟卵母細胞由来の F1 を得るために、C57BL/6 は照射後すぐに雄

親 C3H と同じケージに3日間入れて交配させた。放射線照射前の交配により産まれた F1 マウス3匹と、放射線照射後の交配により産まれた F1 マウス3匹を後の解析に用いた。それぞれの F1 マウス、親マウスの脾臓から抽出したゲノム DNA を全ゲノムシーケンスに用いた。

(2) 全ゲノムシーケンス：それぞれのマウスの脾臓由来ゲノム DNA を用いて Illumina HiSeq 2000 によりシーケンスを行った。500bp の DNA フラグメントライブラリーを100bp のペアエンド法によりシーケンスを実施した。得られたデータは、産業技術総合研究所ゲノム情報研究センターとの共同研究により国立遺伝学研究所のスーパーコンピュータを用いて解析を行った。bwa-mem を用いてマウスの参照配列(mm10)へのマッピングを行った後、samtools と GATK により塩基多型の抽出を行った。それぞれのマウスで検出された塩基多型の中で、親には検出されず、1匹の子供にのみ検出される多型を突然変異の候補として、サンガー法による検証を行った。

4. 研究成果

合計8匹のマウスの全ゲノムシーケンスを行った。一匹あたりの解読された総塩基量と検出された多型の数を表1に示す。

表1 一匹あたりの解読された総塩基量と検出された塩基多型の数

		総解読量 (Gb)	多型の数
Mother	C57BL/6	87	95,534
Father	C3H	96	6,180,084
Control	F1 #1	96	5,458,006
	F1 #2	94	5,454,940
	F1 #3	87	5,433,261
Exposed	F1 #4	89	5,423,829
	F1 #5	83	5,399,525
	F1 #6	78	5,363,521

検出された多型の内、両方の親マウスには検出されず、1匹のF1にのみ検出される多型で、他のF1マウスには検出されないものを抽出し、その中でもカバレッジが15以上、多型アレルの頻度が0.35から0.65となるものを *de novo* の突然変異候補とした。6匹のF1マウスに合計で72個の塩基置換型の突然変異候補を得た。図1にその例を示す。

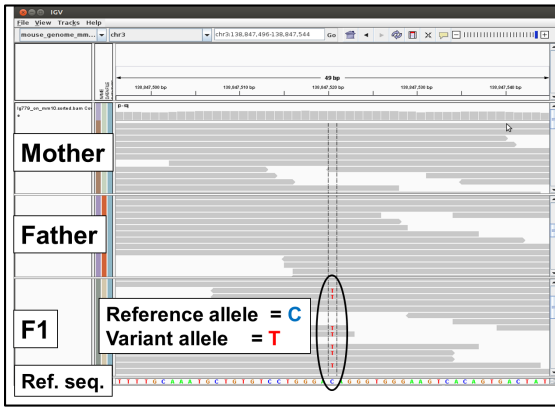


図1 Integrative Genome Viewer による塩基置換型の新規突然変異候補の確認 黒丸で囲んだ部分が F1 マウスにおける突然変異候補で、母と父マウスにはない T アレルが生じている。

このような突然変異候補をサンガーシーケンスにより確認したところ、図2に示す例のように、元のアレルによるピークと変異を示すピークの2つのピークを示すヘテロ接合になっている様子が観察された。

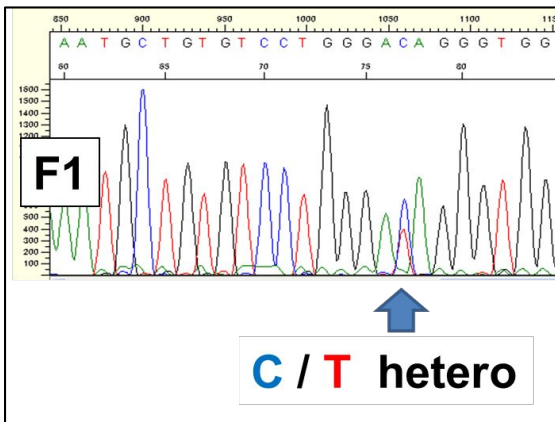


図2 サンガーシーケンスによる突然変異候補の検証

検証の結果、塩基置換型の突然変異候補の内、図3に示すように、47個が真の突然変異であった。

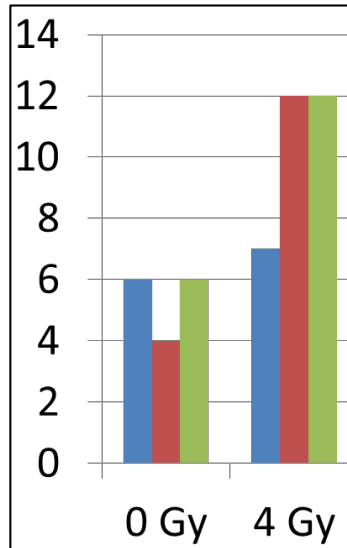


図3 それぞれのF1マウスで同定された突然変異の数

放射線照射前の交配で生まれた3匹のF1マウスに16個、4Gyのガンマ線を照射後の成熟卵母細胞由来のF1マウス3匹に31個の塩基置換型の新規突然変異が検出され、放射線照射されたF1マウスでは突然変異の数が増加していた。

現在、塩基置換型以外の突然変異の解析と、新規突然変異がどちらの親由来の染色体に生じたかについての解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

佐藤康成、瀬々潤、西村まゆみ、島田義也、中村典、浅川順一、全ゲノムシーケンス法による放射線がマウス成熟卵母細胞に及ぼす遺伝的影響の評価、

日本放射線影響学会、
2014年10月1日、かごしま県民交流センター、鹿児島

佐藤康成、放射線照射された雌マウス由来のF1マウスの全ゲノムシーケンス法による解析、
新学術領域「ゲノム支援」2014年度拡大班会議、

2014年8月20日、神戸ポートピアホテル、兵庫

佐藤康成、放射線がマウス成熟卵母細胞に及ぼす遺伝学的影響の全ゲノムシーケンスによる解析、

新学術領域「ゲノム支援」2013年度拡大班会議、

2013年8月28日、神戸ポートピアホテル、兵庫

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 康成 (SATO, Yasunari)

(公財)放射線影響研究所・遺伝学部・
研究員

研究者番号 : 30393424

(2)研究分担者

小平 美江子 (KODAIRA, Mieko)

(公財)放射線影響研究所・遺伝学部・
研究員

研究者番号 : 60344412

浅川 順一 (ASAKAWA, Jun-ichi)

(公財)放射線影響研究所・遺伝学部・
主任研究員

研究者番号 : 10359458