

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550030

研究課題名(和文) 1細胞広範シーケンス技術に基づく、放射線の突然変異誘発率の計測

研究課題名(英文) Analysis of radiation induced mutations using next generation sequencer

研究代表者

金井 昭教 (Kanai, Akinori)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：60549567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：1細胞広範シーケンス技術に基づく放射線の突然変異誘発率の測定を試みるべく、ヒトHT1080細胞を1細胞ずつ分注し、細胞に0.4 Gyと2 Gyの線照射を行った。細胞分裂を確認した後に照射・非照射群から1細胞ずつ単離した。単離した各1細胞からゲノムDNAを抽出し、MALBAC法を用いてDNAの増幅を行った。このようにして増幅したDNAをエクソン領域を濃縮しシーケンシングを行った。0.4 Gy、2 Gy照射の各2細胞ずつを用いて解析を行ったところ、2 Gy照射では約7.5 Mbpに20個の変異と3個の挿入欠失を0.4 Gy照射では約14 Mbpに27個の変異を検出した。

研究成果の概要(英文)：To estimate radiation induced mutation frequency with single-cell sequencing, HT1080 single cells were sorted and gamma-irradiated 0.4 Gy and 2 Gy. The cell divided several times, DNA was extracted from each single cell and we performed whole genome amplification (MALBAC method), exon capture and NGS sequence. The number of 2 Gy specific base substitutions was 20 and indels were 3 in 7.5 Mbp. The number of 0.4 Gy specific base substitutions was 27 and indels were not detected in 14 Mbp.

研究分野：分子生物学

キーワード：放射線 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

放射線による、線量・線量率依存的なゲノム DNA 変異の種類と頻度を知ることは、放射線誘発がんや遺伝的影響を議論する上で、出発点、いわば一丁目一番地である。放射線は、個々の細胞にランダムに変異を入れることに加え、変異の誘発率が低い(一般に 1 Gy あたり 10^{-5} オーダー、すなわち 1 Mbp に数カ所程度とされている)ため、変異頻度を直接計測するためには、(1)1 個の細胞から抽出した DNA を、(2)広範囲(50 Mb 以上)にシーケンスする必要がある。

従来、この二つの壁を正面から突破することは現実的ではなかった。そこで、特定の遺伝子(たとえば HPRT 遺伝子)の機能を喪失した変異細胞を、選択培地(HPRT の場合、6TG 培地)で特異的に増殖させ、狭い領域の変異頻度を計測してきた。そのため、コロニーを形成する株化細胞しか検討できない上に、遺伝子機能が喪失しない変異は検出されず、変異頻度は低く見積られる。また、イントロンやプロモータなど、翻訳領域以外の変異や、ユーノヘテロクロマチンなど、クロマチン構造の相違による差異も議論できなかった。

Multiple Displacement Amplification (MDA) 法など、1 細胞から抽出した DNA を、より忠実に増幅する技術が出現した。さらに、次世代(第 2 世代)シーケンサーにより、広範囲なゲノム領域をシーケンスすることが可能になって、この二つの壁が打破される可能性が出てきた。

とは言え、 10^{-5} オーダーの変異頻度を正確に測定するためには、実験中に生じる人為的な変異(ノイズ)の極小化が必須である。PCR 用のポリメラーゼのエラー率が 10^{-6} オーダーであることを考えても、これには大きな困難が予想される。そこで、東京大学と現任地である広島大学で、次世代シーケンサーを長年運用してきた実績を持つ申請者(金井)が、正常 2 倍体細胞の照射実験に習熟している分担研究者(河合)と協力して、「第三の壁」であるノイズの問題を解決し、最先端の技術を駆使した実験系を確立の上、変異頻度を測定することが本研究提案の目的である。

2. 研究の目的

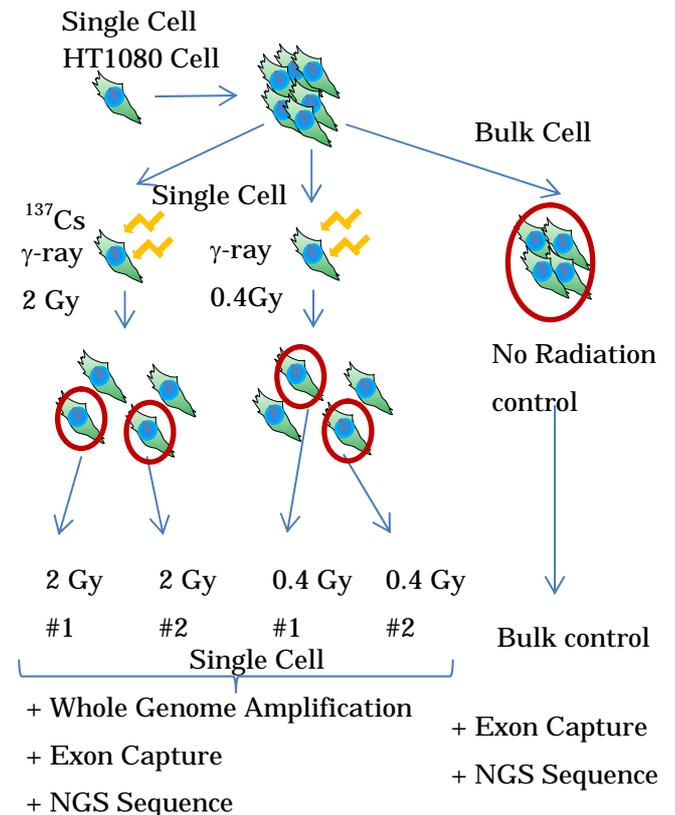
1 細胞広範囲シーケンス技術に基づく、放射線の突然変異誘発率の計測を目的とした。放射線による変異の種類と頻度を計測するために、これまで隘路となってきた、(1)1 細胞からの DNA 抽出、(2)広範囲シーケンス、(3)放射線による変異率と比較して特段に高いノイズ(測定中に生じる人工的、あるいは放射線と無関係な変異)の三つの問題を、最先端技術と洗練された実験系やアルゴリズムの作成により解決して、測定方法を確立する。確立された方法を用いて、代表的な線量・線量率における変異率を、遺伝子内外やユーノヘテロクロマチンなど、部位別に計測

する。本法が確立すれば、種々の線種、線量・線量率、細胞種類(正常細胞 vs.がん細胞、DNA 損傷遺伝子欠損細胞、動物による違い)、他の変異原物質などに広く応用可能である。

3. 研究の方法

放射線照射による細胞内 DNA の変異を測定するために以下のような実験工程を検証した(図 1)。HT-1080(ヒト繊維肉腫)を FACS Aria セルソーターを用いて 96 well プレートに各 1 細胞になるようにソーティングを行った。0.4 Gy、2 Gy の放射線(線)照射を行い、数日そのまま培養した。50 - 100 細胞程度をレーザーマイクロダイセクション用プレートにまき直し、レーザーマイクロダイセクションで PCR チューブに 1 細胞ずつ回収した。

単離した各 1 細胞からゲノム DNA を抽出し、MALBAC(Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycles)法を用いて DNA の増幅を行った。Sureselect Exon Capture Human All Exon を用いてシーケンス用サンプル調製した。0.4 Gy、2 Gy 放射線照射サンプルと非照射パルクサンプルを illumina GA x を用いて、Paired End Read 76 bp でシーケンス。マッピング。変異コールを行った。



(図 1)

4. 研究成果

1 細胞広範シーケンス技術に基づく放射線の突然変異誘発率の測定を試みるべく、1細胞シーケンス法の方法論の確立を行った。レーザーマイクロダイセクションで単離したHT1080各1細胞からゲノムDNAを抽出し、MALBAC(Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycles)法を用いてDNAの増幅を行った。このようにして増幅したDNAをSure Select human all exonプローブでエクソン領域を濃縮した。得られたライブラリはillumina GAIIXにてシーケンシングを行い、シーケンスデータを得ることに成功した。

放射線の突然変異誘発率を解析するため1細胞に0.4 Gy、2 Gyの線照射を行い、分裂し増殖した細胞から各1細胞ずつ2クローンを単離してシーケンスを行った。コントロールとしてバルクのHT1080細胞を、ゲノム増幅を行わずエクソン領域を濃縮しシーケンスをして比較を行った。

解析領域として2 Gy(または0.4 Gy)の2サンプルとコントロールのシーケンスカバレッジが10以上の領域を選択した。さらに解析精度を高めるため、2 Gy(または0.4 Gy)の2サンプルで共通している変異を抽出し、さらに0.4 Gy(または2 Gy)やコントロールのサンプルでは変異していない変異を抽出した。2 Gy照射2サンプルとコントロールでは7,567,243 bpの領域がカバレッジ10以上で共通し、その領域内に2 Gy照射2サンプルでは共通し、コントロールや0.4 Gyサンプルに存在しない20個の1塩基置換と3個の挿入欠失を検出した。同様に0.4 Gy照射では14,328,715 bpに27個の塩基置換を検出した。また、0.4 Gy照射では挿入欠失は検出されなかった。

これらの1塩基置換では線量にかかわらずG>A(C>T)に変異する割合が高かった。挿入欠失に関しては1塩基タンデムの挿入欠失のみが検出された。

今回の実験では1細胞シーケンス法を用いて放射線による変異解析を行ったが、当初予定していたよりもゲノム増幅の効率が悪く、想定していたより狭い領域の解析しか出来なかった。現在さらなる改善を行っているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

1: Yamakawa N, Okuyama K, Ogata J, Kanai A, Helwak A, Takamatsu M, Imadome K, Takakura K, Chanda B, Kurosaki N, Yamamoto H, Ando K, Matsui

H, Inaba T, Kotani A. Novel functional small RNAs are selectively loaded onto mammalian Ago1. *Nucleic Acids Res.* 2014 Apr; 42(8):5289-301.

2: Murakami E, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Honda Y, Ono A, Kosaka K, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Chayama K. Ultradeep sequencing study of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection in patients treated with daclatasvir, peginterferon, and ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(4):2105-12.

3: Okuda H, Kawaguchi M, Kanai A, Matsui H, Kawamura T, Inaba T, Kitabayashi I, Yokoyama A. MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters. *Nucleic Acids Res.* 2014 Apr; 42(7):4241-56.

4: Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, Yamamoto T, Matsuura S. TALEN-mediated single-base-pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jan 28; 111(4):1461-6.

5: Nagamachi A, Matsui H, Asou H, Ozaki Y, Aki D, Kanai A, Takubo K, Suda T, Nakamura T, Wolff L, Honda H, Inaba T. Haploinsufficiency of SAMD9L, an endosome fusion facilitator, causes myeloid malignancies in mice mimicking human diseases with monosomy 7. *Cancer Cell.* 2013 Sep 9; 24(3):305-17.

[学会発表](計 8件)

1. Akinori Kanai, Analysis of radiation induced mutations using next-gen sequencer, The 5th International

Symposium of RIRBM, 2-3 Mar 2015,
Hiroshima University (Hiroshima)

2. 金井昭教、次世代シーケンサーを用いた放射線誘発変異解析、放射線影響学会第56回大会、2014年11月25~27日、パシフィコ横浜(横浜市)

3. 金井昭教、次世代シーケンサーを用いた放射線誘発変異解析、放射線影響学会第57回大会、2014年10月1~3日、かごしま県民交流センター(鹿児島市)

4. 金井昭教、次世代シーケンサーを用いた放射線誘発変異解析にむけた方法論の確立、第39回中国地区放射線影響研究会、2014年7月18日、広島大学(広島市)

5. 金井昭教、次世代シーケンサーを用いた放射線誘発変異解析、第55回原子爆弾後障害研究会、2014年6月1日、長崎原爆資料館(長崎市)

6. Akinori Kanai, Analysis of radiation induced mutations using next-gen sequencer, The 4th International Symposium of RIRBM, 13-14 Feb 2014, Hiroshima University (Hiroshima)

7. 金井昭教、次世代シーケンサーを用いた放射線誘発変異解析、放射線影響学会第56回大会、2013年12月3~6日、神戸ポートアイランド(神戸市)

8. 金井昭教、次世代シーケンサーを用いた放射線誘発変異解析、放射線影響学会第56回大会、2013年10月18~19日、クラウンパレス青森(青森市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 昭教 (Akinori Kanai)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：60549567

(2) 研究分担者

河合 秀彦 (Hidehiko Kawai)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：30379846