

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：11601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870080

研究課題名(和文) クローナル植物を用いた低線量放射線被曝の遺伝的評価

研究課題名(英文) Somatic mutation rate evaluation using clonal plant

研究代表者

兼子 伸吾 (Kaneko, Shingo)

福島大学・共生システム理工学類・准教授

研究者番号：30635983

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)：原発事故の被災地域における低線量放射線被ばくの蓄積が、そこに生育する植物の塩基配列の変異に与える影響についてはほとんど明らかにされていない。本研究では、日本各地に遺伝的に同一な個体が生育するモウソウチクを対象として、様々な放射線量の地域からサンプルを収集し、次世代シーケンサーから得られる大量の塩基配列データによって、生育地の空間線量と塩基配列の突然変異数との関係を評価した。その結果、空間線量の増加に伴う変異量の増加は認められなかった。したがって、比較的空間線量が高い環境で生育しているモウソウチクであっても、事故後に塩基配列の突然変異を急激に蓄積しているということはないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The effect of radiation exposure on mutation rates is little known, especially for low doses and in situ conditions. In this study, correlations with air dose levels and DNA mutation rates were evaluated using Next Generation Sequencer for the clonal plant, *Phyllostachys edulis*. We collected 94 samples of *Phyllostachys edulis* from 14 sites with air dose rates from 0.04~7.80 μ Sv/h. Their clonal identity was confirmed by analysis using microsatellite markers, and then, sequences among samples were compared by MIG sequence. The sequence data were obtained from 2,718 loci. In these sequences, 442 loci showed polymorphism patterns including recent origin mutation, old mutation, and sequence errors. The number of mutations per sample ranged from 0 to 13, and did not correlate with air dose levels. This result indicated that DNA mutations have not accumulated in *Phyllostachys edulis* living in the air doses levels less than 10 μ Sv/h.

研究分野：分子生態学

キーワード：次世代シーケンサー 体細胞突然変異 低線量被ばく モウソウチク

1. 研究開始当初の背景

2011年3月11日の東北地方太平洋沖地震に続いて発生した東京電力福島第一原子力発電所の事故は、放射性物質を広範囲わたって飛散させた。その結果生じた放射性物質の増加や放射線量の上昇が生物に与える影響を把握することは、被災地域の復興を図るうえで、最も重要かつ急を要する課題のひとつである。なかでも福島第一原子力発電所の周辺地域やホットスポットと呼ばれる局所的に放射線量が高い場所に生育する生物において、塩基配列における突然変異率の上昇や突然変異の蓄積が生じているかどうか、という点は、研究者のみならず市民においても非常に関心の高いテーマである。

毎時数ミリシーベルト程度の放射線被ばくの蓄積が生物の形態に及ぼす影響については、放射線生物学や放射線育種等の多くの蓄積がある。その一方で、原発事故の被災地域における毎時数マイクロシーベルト以下の放射線被ばくの蓄積が、どの程度生物に影響を与えるかについては、形態はもちろん、塩基配列の変異においても知見はごく限られている(Hiyama et al. 2012)。そして、そのような状況が現在の被災地における住民の不安や風評被害につながっているとも考えられる。低線量の放射線による塩基配列の突然変異は低頻度で生じると予想されるため、ゲノム中の数~数十遺伝子座、多くても数百座を対象とした従来の解析では、低頻度で生じた突然変異を正確に把握することは難しく、その影響を定量的に評価することは極めて難しかった。

しかし、次世代シーケンサーの実用化によって、非モデル生物を対象に多数のサンプルを対象にゲノム内の数千カ所における塩基

配列を解読できるようになった(Hohenlohe et al. 2010)。適切な解析対象を選定すれば、大量の塩基配列情報を活用することで、低頻度の突然変異を検出し、低線量の放射線が、どの程度生物の塩基配列に影響を及ぼすのかについて評価できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、有性生殖による遺伝子の組み換えが起こっていない個体(同一クローン)が広範囲に分布するモウソウチクを対象に、日本各地の集団から採取した同一クローンの個体について、ゲノム内に生じている突然変異について、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解読する。放射線量が低い地域と福島第一原発周辺や自然放射線量が高い地域から採取したサンプル間で塩基配列の突然変異を比較することで、(1)放射線量の上昇により塩基配列の突然変異率に変化が生じたかどうか、(2)自然放射線のような低線量の放射線被ばくによる突然変異が長期間で蓄積するかどうか、を検討する。そのうえで現時点での福島県内の放射線量が生物の塩基配列に与えるリスク評価を行った。

3. 研究の方法

モウソウチクは、2013年に福島県内9カ所を含む全国14カ所から計94サンプルを採取した。サンプルを採取した地点の空間線量は、0.04~7.80 μ Sv/hであった(表)。

採取したサンプルについて、モウソウチクで開発されたマイクロサテライトマーカー27遺伝子座(Jiang et al. 2014, Isagi et al. 2016)を用いたクローン解析を行い、同一クローンかどうかを確認した。その上で、次世代シーケンサーを用いたMIG-seq(Suyama

and Matsuki 2016) による塩基配列の比較を行った。

表．サンプル採取地と空間線量

調査地	空間線量 ($\mu\text{Sv/h}$)
宮城県白石市	0.28-0.39
福島県相馬市	0.36
福島県福島市	1.36-1.88
福島県飯舘村	2.56-2.88
福島県川俣町	0.8
福島県南相馬市	0.38-0.71
福島県浪江町	0.77-0.97
福島県大熊町1	3.88-7.80
福島県大熊町2	3.45-5.18
福島県いわき市	0.18-0.26
福井県勝山市	0.04
島根県大田市	0.06
兵庫県三田市	0.06-0.07
山口県美祿市	0.05-0.08

4．研究成果

マイクロサテライトマーカーによって遺伝子型を決定した結果、福島県川俣町から採取されたサンプルを除き、全てのサンプルが同一の遺伝子型であった。このことは Isagi et al. 2016 で確かめられている通り、有性生殖を経ていない同一のクローンが、広範囲に広がっていることを示している。その一方で川俣町から採取されたサンプルは、集団内では同一の遺伝子型を示したものの、2 遺伝子座 (Phe10, Ppub102) において他の集団とは異なる対立遺伝子を有していた。ただし、これらの遺伝子座を除けば、他の集団と同一の遺伝子型であるので、これらの変異は有性生殖による組み換えではなく、体細胞突然変異に由来すると考えられる。したがって、川俣町の集団は、過去に生じた体細胞突然変異を有する個体が導入され広がったと考えられる。

次世代シーケンサーを持ちた MIG-seq の結

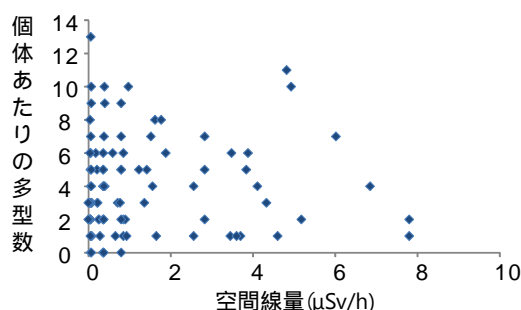
果、ゲノム中の 2,718 カ所については半数以上のサンプルでデータが得られた。各遺伝子座は 80bp の塩基配列からなり、モウソウチクのゲノムサイズは約 20 億塩基対とされていることから、ゲノムの 0.01% に相当する約 20 万 bp についてデータを得たこととなる。

配列が得られた 2,718 カ所のうち 1,438 カ所については、得られた配列は完全に一致していた。サンプル間で多型の認められた 1,280 カ所のうち、838 カ所については複数のサンプル間で多型が共有されていた。ゲノム中の同一箇所に独立で同じ多型が生じるとは考えにくい。つまり、これらの変異はサンプルを採取した株とは別の株で生じ、その後の栄養繁殖によって広がったと考えられ、過去に生じた変異であると考えられる。逆に、442 カ所については、1 サンプルにおいてのみ多形が認められた。これらの変異の要因としては、前述と同様の過去に生じた変異であるが多形を共有する株をサンプリングできなかった可能性、PCR や Sequence の過程におけるエラーである可能性、比較的最近生じた可能性がある。

得られた多型のうち PCR や Sequence の過程におけるエラーが生じる可能性を評価するために、同一サンプルにおいて再現性の無い多型を評価したところ、同一サンプルであるにも関わらず、2~6 カ所の多型は一致しなかった。このことは、各サンプルから検出された多型のうち 2~6 カ所程度は、PCR やシーケンスの過程で生じたエラーと考えられる。よって、データの解析過程においてこれらのエラーの影響を少なくする必要があると考えられる。

1 サンプルにおいてのみ多形が認められ、最近生じた多型の可能性が残る 442 カ所につ

いて、サンプルあたりの多型は0~13カ所であった。これらの多型数について、サンプル採取地点の空間線量との関係を比較したところ、空間線量の増加に伴う変異量の増加は認められなかった(図)。したがって、比較的空間線量が高い環境で生育しているモウソウチクであっても、事故後に塩基配列の突然変異を急激に蓄積している可能性は極めて低く、PCRやシーケンスの過程で生じたエラーを考慮すると、ごく最近に生じた体細胞突然変異による多型はほとんどないと考えられた。



図．空間線量率と個体あたりの多型数

本研究の結果から、空間線量が増加しても、福島県内に生育するモウソウチクにおいて塩基配列の多型は増加していないことが示された。本研究の結果は、必ずしも他の生物においても塩基配列の突然変異が蓄積していないことを意味するわけではない。しかしながら、体細胞突然変異が少ないという結果は、福島県内に生育する生物の形態異常等の要因を考える上で、重要な示唆を与えうる。近年、いくつかの生物種で、第一原発事故に由来する放射線量の増加が原因と推測される形態異常等が報告されはじめた (e.g. Hiyama et al. 2012, Akimoto 2014, Watanabe et al. 2015)。これらの生物種における塩基配列の変異の有無については、今後の研究成果を

待つ必要がある。しかし、モウソウチクにおける体細胞突然変異の少なさは、これらの形態異常が、塩基配列の突然変異に以外の要因によって生じていることを示唆するかもしれない。

<引用文献>

- Akimoto, S. (2014) Morphological abnormalities in gall forming aphids in a radiation contaminated area near Fukushima Daiichi: selective impact of fallout? *Ecology and evolution*, 4(4), 355-369.
- Hiyama, A., Nohara, C., Kinjo, S., Taira, W., Gima, S., Tanahara, A., & Otaki, J. M. (2012). The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly. *Scientific reports*, 2.
- Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Etter, P. D., Stiffler, N., Johnson, E. A., & Cresko, W. A. (2010). Population genomics of parallel adaptation in three spine stickleback using sequenced RAD tags. *PLoS Genet*, 6(2), e1000862.
- Isagi, Y., Oda, T., Fukushima, K., Lian, C., Yokogawa, M., & Kaneko, S. (2016). Predominance of a single clone of the most widely distributed bamboo species *Phyllostachys edulis* in East Asia. *Journal of Plant Research*, 129(1), 21-27.
- Jiang, W. X., Zhang, W. J., & Ding, Y. L. (2013). Development of polymorphic microsatellite markers for *Phyllostachys edulis* (Poaceae), an important bamboo species in China. *Applications in plant sciences*, 1(7).
- Møller, A. P., & Mousseau, T. A. (2006). Biological consequences of Chernobyl: 20 years on. *Trends in ecology & evolution*,

21(4), 200-207.

Suyama, Y., & Matsuki, Y. (2015). MIG-seq: an effective PCR-based method for genome wide single nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Scientific reports*, 5.

Watanabe, Y., Kubota, M., Hoshino, J., Kubota, Y., Maruyama, K., Fuma, S., ... & Yoshida, S. (2015). Morphological defects in native Japanese fir trees around the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. *Scientific reports*, 5.

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

- 1) 兼子伸吾, 松木悠, 猪瀬礼璃菜, 陶山佳久, 井鷲裕司, クローナル植物モウソウチクを用いた低線量放射線の遺伝的影響評価 . 第 63 回日本生態学会千大会, 2016 年 3 月 20-24 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市) .
- 2) 兼子伸吾, 松木悠, 猪瀬礼璃菜, 陶山佳久, 井鷲裕司, クローナル植物モウソウチクを用いた低線量放射線の遺伝的影響評価 . 東北植物学会公開シンポジウム, 2015 年 12 月 19 日, 福島大学(福島県福島市) .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

兼子伸吾 (KANEKO, Shingo)

福島大学・共生システム理工学類・准教授

研究者番号 : 30635983

(2)研究協力者

松木悠 (MATSUKI, Yu)

猪瀬礼璃菜 (INOSE, Rerina)

陶山佳久 (SUYAMA, Yoshihisa)

井鷲裕司 (ISAGI, Yuji)