

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：85401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00553

研究課題名(和文)全ゲノムシーケンス法による放射線のマウス精原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 mouse spermatogonia by whole genome sequencing

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・分子生物学部・研究員

研究者番号：30393424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞への放射線照射がゲノムワイドにどのような影響があるかを知ることは重要である。しかしながら、放射線の遺伝的影響についてゲノムワイドに調べた解析は限られている。我々は、父親への被曝による放射線の影響を調べるために、父親マウス(精原細胞)への放射線照射後に産まれたF1マウスについての全ゲノムシーケンス法による検討を行った。新規に生じたSNV変異、indel変異、multisite変異の数を照射前に産まれたF1と照射後に産まれたF1と比較した。新規indel変異の数は照射後に産まれたF1で増加していた。精原細胞への放射線照射により、indel型変異が生じる頻度が上昇することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is important to know genome-wide effect of radiation exposure on germ cells. However, genome-wide analysis about genetic effects of radiation is limited. To examine the radiation effects of paternal exposure and maternal exposure, we conducted whole genome sequencing of F1 mice born to father (exposure to spermatogonia cells) or mother (to mature oocyte). The number of de novo SNVs, indels, and multisite mutations were compared between F1 mice born before and after irradiation. Indels were increased in F1 mice after irradiation. It is indicated that mutation frequency of indel type mutations was increased by radiation exposure to spermatogonia cells.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：全ゲノムシーケンス 放射線遺伝的影響 新規突然変異 男性被曝

1. 研究開始当初の背景

放射線被曝が生物にどのような影響をあたえるかについてはこれまで長い間研究されてきた。原爆被曝者では、放射線被曝による白血病とがんのリスクが増加することが知られている。放射線によりヒト生殖細胞にどのような影響があるかについては、チェルノブイリでのミニサテライト座に関する研究以外では、原爆被曝者の子ども、小児がん生存者の子どもにおいて調べられたこれまでの指標において、有意な差があるものは見出されていない。ヒトへの放射線の遺伝的影響リスクの推定には、多くの動物実験による特定の遺伝子座(主に7つ)についての研究が用いられてきた。これらの研究から、放射線では、主に大規模な欠失型の変異が生殖細胞に生じることが知られている。アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション法を用いた解析により、マウスのゲノム全体での放射線による欠失型変異頻度の上昇が報告されているが、ゲノム全体での変異頻度は特定遺伝子座の研究で知られていたものよりも低かった。このため大規模な欠失以外にどのような変異がどの程度生殖細胞に生じるかを知るためには、ゲノム全体を調べるのが重要である。

次世代シーケンサーを用いた技術の発展により、ヒトのトリオでは全ゲノムシーケンス(WGS)による解析が多くなされている。これまでに父親や母親の年齢が生殖細胞の変異に与える影響について報告されている。放射線の影響については、WGSにより調べた報告は限られている。3組の原爆被曝者トリオのWGSでは統計的に有意な突然変異頻度の上昇は報告されていない。マウスを用いたWGSによる放射線影響の解析では、精子細胞期への被曝によりindel変異とmultisite型の変異頻度の上昇が観察されている。上記マウスの実験系では、放射線を照射した時期が減数分裂後の細胞であり、我々が今後解析の対象としている原爆被曝者トリオのモデルとしては、減数分裂前の精原細胞の時期に放射線が照射されていることが望ましい。

2. 研究の目的

父親被曝と母親被曝での生殖細胞への放射線の影響をゲノムワイドに調べることを目的として、マウス精原細胞と成熟卵母細胞への放射線照射前後の交配で生まれたF1マウスに生じた突然変異を全ゲノムシーケ

ンス法により比較した。

3. 研究の方法

父親への放射線の遺伝的影響を調べるためのマウス精原細胞への照射実験と、母親への放射線の遺伝的影響を調べるためのマウス成熟卵母細胞への照射実験を行い、照射前後の交配で生まれたF1についてWGSによる検討を行った。母親被曝モデルとしては、未熟卵母細胞の方がヒトのモデルに適合するが、マウスでは、未熟卵母細胞は放射線感受性が高く、低線量においても細胞死が引き起こされるため、本研究では成熟卵母細胞を女性被曝のモデルとして用いた。

父親照射実験では、8週齢のC57BL6/J雄マウスを8週齢のC3H/HeN雌マウスと交配させF1を得た。雄マウスが10週齢の時期に4Gyの線を照射し、26週齢の時期に別の17週齢のC3H/HeN雌マウスと交配させF1を得た。母親照射実験では、8週齢のC57BL6/J雌マウスを8週齢のC3H/HeN雄マウスと交配させF1を得た。雌マウスが15週齢の時期に4Gyの線を照射し、その日のうちに同じC3H/HeN雄マウスと交配させF1を得た(Fig. 1B)。父親照射実験では父親1匹、母親2匹、照射前の6匹のF1と照射後の6匹のF1の合計15匹について全ゲノムシーケンスを行った。母親照射実験では母親1匹、父親1匹、照射前の6匹のF1と照射後の6匹のF1の合計14匹について全ゲノムシーケンスを行った。SNVとindelを検出後、親にはなく、F1にのみ存在する新規の突然変異を抽出した。親とF1、兄弟間で共通の領域を比較するために、常染色体上のそれぞれのマウスで共通してカバレッジがある領域(Effective whole genome coverage region; EWC)を設定し、これらの領域(父親照射実験では1,344,321,226 bp, autosomeの54.6%, 母親照射実験では1,815,001,610 bp, autosomeの73.7%)での突然変異について検討した。

4. 研究成果

(1) 塩基置換型新規突然変異

親にはなくF1でのみ観察される新規の塩基置換型突然変異は父親照射実験で照射前のF1で合計71個、照射後のF1で合計137個、母親照射実験では、87個と127個がそれぞれのEWC領域上における突然変異として検出された。これらのうち61個をサンガー法

により検証したところ、その全てで親では見られず当該の F1 のみ変異が確認された。このことから EWC 領域の中においては親にはなく F1 にのみ存在する塩基置換型突然変異を精度良く検出できていることを確認した。

放射線照射前の交配で生まれた F1 では、常染色体上の EWC 領域における塩基置換の突然変異率は、父親照射実験では 4.4×10^{-9} per nucleotide per generation, 母親照射実験では 4.0×10^{-9} であった。放射線照射後の交配で生まれた F1 では、常染色体上の EWC 領域における塩基置換の突然変異率は、父親照射実験では 8.5×10^{-9} per nucleotide per generation (1.9 倍の増加), 母親照射実験では 5.8×10^{-9} (1.5 倍の増加) であった。塩基置換型突然変異はヒトでは加齢により増加することが知られているため、上記で得られた結果についても照射前の交配と照射後の交配の間の期間による加齢の影響を考慮したところ、照射前の交配で生まれた F1 と照射後の F1 で生まれた F1 の間で観察された変異の増加は、加齢の影響による寄与が大きいものと考えられた。

(2) Indel 型新規突然変異

欠失と挿入からなる indel 型の新規突然変異は、同じ塩基が繰り返すような領域では検出感度が下がる傾向にあった。安定的に検出できるタイプの変異に注目して解析を行ったところ、父親照射実験で照射前の F1 で合計 6 個、照射後の F1 で合計 44 個、母親照射実験では、10 個と 34 個がそれぞれの EWC 領域上における indel 型の突然変異として検出された。放射線照射前の交配で生まれた F1 では、常染色体上の EWC 領域における indel 型変異の突然変異率は、父親照射実験では 3.7×10^{-10} per nucleotide per generation, 母親照射実験では 4.6×10^{-10} であった。放射線照射後の交配で生まれた F1 では、常染色体上の EWC 領域における indel 型変異の突然変異率は、父親照射実験では 2.7×10^{-9} per nucleotide per generation (7.3 倍の増加), 母親照射実験では 1.6×10^{-9} (3.4 倍の増加) であった。これらの indel 型変異の増加は、加齢の影響を考慮しても、放射線の寄与による影響が観察されているものと考えられた。

(3) Multisite 型新規突然変異

異なる突然変異が 20 bp 以内の極めて近傍

に存在し、その双方が同じ DNA 鎖上に生じているタイプの突然変異である Multisite 型新規突然変異については、上記の塩基置換や indel 型変異とは分けて集計を行った。父親照射実験で照射前の F1 で合計 2 個、照射後の F1 で合計 9 個、母親照射実験では、1 個と 10 個がそれぞれの EWC 領域上における突然変異として検出された。放射線照射前の交配で生まれた F1 では、常染色体上の EWC 領域における multisite 型変異の突然変異率は、父親照射実験では 1.2×10^{-10} per nucleotide per generation, 母親照射実験では 4.5×10^{-11} であった。放射線照射後の交配で生まれた F1 では、常染色体上の EWC 領域における multisite 型変異の突然変異率は、父親照射実験では 5.6×10^{-10} per nucleotide per generation (4.5 倍の増加), 母親照射実験では 4.6×10^{-10} (10 倍の増加) であった。

これまでに報告のあった精子細胞期の雄性生殖細胞への放射線照射による結果と同様に、より被爆者のモデルに近いと思われる精原細胞期への照射においても indel 型変異と multisite 型変異の数は増加していた。また女性被曝のモデルである成熟卵母細胞への照射においても indel 型変異と multisite 型変異の数は増加していた。これらの結果から、生殖細胞への高線量(4 Gy 程度)の放射線照射による影響として indel 型変異と multisite 型変異が生じるものと考えられる。

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 2 件)

(原著論文)

Kodaira M, Asakawa JI, Nakamura N. Radiation-induced deletions in mouse spermatogonia are usually large (over 200 kb) and contain little sequence similarity at the junctions. *Radiat Res*, 187(6):722-731, 2017 査読有 doi: 10.1667/RR14660.1.

Asakawa JI, Kodaira M, Miura A, Tsuji T, Nakamoto Y, Imanaka M, Kitamura J, Cullings H, Nishimura M, Shimada Y, Nakamura N. Genome-wide deletion

screening with the array CGH method in mouse offspring derived from irradiated spermatogonia indicates that mutagenic responses are highly variable among genes. Radiat Res, 186(6):568-576, 2016 査読有 doi: 10.1667/RR14402.1.

〔学会発表〕(計 3 件)

佐藤康成、三角宗近、藤本明洋、内村有邦、放射線照射されたヒト培養細胞の全ゲノムシーケンス法による塩基対置換型突然変異の予備的解析. 第 60 回日本放射線影響学会大会 2017/10/25-2017/10/28 京葉銀行文化プラザ(千葉市)

佐藤康成、Tony K、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精原細胞に及ぼす遺伝的影響の評価. 第 59 回日本放射線影響学会大会 2016/10/26-2016/10/28 J M S アステールプラザ(広島市)

佐藤康成、藤本明洋、阿部哲雄、濱崎幹也、三角宗近、浅川順一、エックス線照射されたヒト培養細胞クローンの全ゲノムシーケンスによる解析. 第 40 回中国地区放射線影響研究会 2015/07/17 広島大学(広島県東広島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 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・分子生物
科学部・研究員
研究者番号： 30393424

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

小平 美江子 (KODAIRA, Mieko)
公益財団法人放射線影響研究所・分子生物
科学部・顧問
研究者番号： 60344412