

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16125

研究課題名(和文)全ゲノムシーケンス法による放射線誘発突然変異率の計測

研究課題名(英文) Analysis of radiation induced mutation patterns and frequencies with whole genome sequencing

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、次世代シーケンサーHiSeq2500を用いて放射線がゲノムDNAに与える損傷の種類と頻度を直接計測することを試みた。HT1080細胞1細胞に84 mGy, 390 mGy, 1885 mGyの線照射を行いその細胞を培養して増殖させてからDNAを抽出し全ゲノムシーケンスを行った。ラージデリションについては検出数自体がほとんどなく線量が増加しても差は見られなかったが、1塩基置換や挿入・欠失の数は1885 mGyにおいて増加していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：To estimate radiation induced mutation patterns and frequencies with whole genome sequencing, HT1080 single cells were gamma-irradiated 84 mGy, 390 mGy and 1885 mGy. The cells were cultured, DNA was extracted and we performed whole genome sequencing using HiSeq2500. Large deletions were rarely detected and there was no difference with dose dependent. The numbers of snps, small insertions and deletions were increased in 1885 mGy irradiated cell.

研究分野：分子生物学

キーワード：放射線 全ゲノム解析

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メガベース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個の細胞からのDNAを、(2)広範囲にわたって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もられる。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、ユークロマチン構造の相違による差異も議論できなかった。

近年のシーケンサー技術の発達により全ゲノムシーケンスも可能なレベルとなり、広範囲にわたる解析が可能となってきた。

2. 研究の目的

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、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が、「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を目的とした。

3. 研究の方法

正常2倍体ヒト繊維肉腫細胞HT1080を96ウェルプレートに1細胞ずつFACS Ariaで分離し、細胞が1細胞の状態の間に84 mGy, 390 mGy, 1885 mGyの線照射を行った。50-100個程度に分裂した段階で2グループに分割し、細胞増殖後、TruSeq PCR free Sample Prep Kit (illumina)でシーケンス用ライブラリを作製した。illumina HiSeq 2500にて Paired End Read 101 bpで全ゲノムシーケンスを行った。同じウェルから

分割したグループの共通項を抽出し、非照射群と比較することで放射線誘発突然変異のみを同定をおこなった。

4. 研究成果

全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、方法論の確立を行った。線照射を行った細胞からライブラリ作製を行い、全ゲノムシーケンスのシーケンスデータを得る事に成功し、それらのデータの解析を行った。

各サンプルにおいて、 $x24-x27$ 程度の均一なシーケンスデータが得られた。解析によって検出された大きな欠失や挿入(10 kbp以上)は0 Gy(コントロール)、84 mGy、390 mGy、1885 mGyの各サンプルで1-3ヶ所確認されたが、0 Gyにも存在しており線量依存的な増加は見られなかった。1塩基置換においては $x10$ 以上でGATKによって同じ線量では共通して検出され、他サンプルからカバレッジの10%以上では検出されない1塩基置換の頻度を比較した。390 mGy、1885 mGyの γ 線照射で置換に増加傾向が見られており、1885 mGyとコントロールを比較すると1 Gyあたり0.6個/Mbp程度の増加が推定された。1塩基置換した塩基の種類や塩基置換が起きている場所についてはコントロールと大きな差は見られなかった。小さな欠失は1885 mGyにおいて増加傾向にあった。挿入や欠失の起きている場所についてはcontrolと大きな差は見られなかった。

今回の系では細胞に γ 線照射をして細胞同士の比較を行ったが、比較をして抽出される変異には放射線によっておきた変異と細胞が分裂する際に起こすエラーによって各細胞で異なって入っている変異も同時に抽出されてきている。そして、放射線による変異導入率はこれら細胞が分裂時に起こすエラーと同程度もしくはそれよりも低い変異導入率であると推測される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件)

(全て査読あり)

- 1: Sugino N, Kawahara M, Tatsumi G, **Kanai A**, Matsui H, Yamamoto R, Nagai Y, Fujii S, Shimazu Y, Hishizawa M, Inaba T, Andoh A, Suzuki T, Takaori-Kondo A. A novel LSD1 inhibitor NCD38 ameliorates MDS-related leukemia with complex karyotype by attenuating leukemia programs via activating super-enhancers. *Leukemia*. 2017 Mar 10. [Epub ahead of print]

- 2: Nakata Y, Ueda T, Nagamachi A, Yamasaki N, Ikeda KI, Sera Y, Takubo K, **Kanai A**, Oda H, Sanada M, Ogawa S, Tsuji K, Ebihara Y, Wolff L, Honda ZI, Suda T, Inaba T, Honda H. Acquired expression of CblQ367P in mice induces dysplastic myelopoiesis mimicking chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2017 Apr 13;129(15):2148-2160.
- 3: Ueda T, Nakata Y, Nagamachi A, Yamasaki N, **Kanai A**, Sera Y, Sasaki M, Matsui H, Honda Z, Oda H, Wolff L, Inaba T, Honda H. Propagation of trimethylated H3K27 regulated by polycomb protein EED is required for embryogenesis, hematopoietic maintenance, and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Sep 13;113(37):10370-5.
- 4: Ikeda K, Ueda T, Yamasaki N, Nakata Y, Sera Y, Nagamachi A, Miyama T, Kobayashi H, Takubo K, **Kanai A**, Oda H, Wolff L, Honda Z, Ichinohe T, Matsubara A, Suda T, Inaba T, Honda H. Maintenance of the functional integrity of mouse hematopoiesis by EED and promotion of leukemogenesis by EED haploinsufficiency. *Sci Rep*. 2016 Jul 19;6:29454.
- 5: Sashida G, Wang C, Tomioka T, Oshima M, Aoyama K, **Kanai A**, Mochizuki-Kashio M, Harada H, Shimoda K, Iwama A. The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. *J Exp Med*. 2016 Jul 25;213(8):1459-77.
- 6: Shimomura Y, Mitsui H, Yamashita Y, Kamae T, **Kanai A**, Matsui H, Ishibashi T, Tanimura A, Shibayama H, Oritani K, Kuyama J, Kanakura Y. New variant of acute promyelocytic leukemia with IRF2BP2-RARA fusion. *Cancer Sci*. 2016 Aug;107(8):1165-8.
- 7: Kadono M, **Kanai A**, Nagamachi A, Shinriki S, Kawata J, Iwato K, Kyo T, Oshima K, Yokoyama A, Kawamura T, Nagase R, Inoue D, Kitamura T, Inaba T, Ichinohe T, Matsui H. Biological implications of somatic DDX41 p.R525H mutation in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2016 Aug;44(8):745-754.e4.
- 8: Ueda T, Nakata Y, Yamasaki N, Oda H, Sentani K, **Kanai A**, Onishi N, Ikeda K, Sera Y, Honda ZI, Tanaka K, Sata M, Ogawa S, Yasui W, Saya H, Takita J, Honda H. ALK(R1275Q) perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN. *Oncogene*. 2016 Aug 25;35(34):4447-58.
- 9: Higashi K, Tobe T, **Kanai A**, Uyar E, Ishikawa S, Suzuki Y, Ogasawara N, Kurokawa K, Oshima T. H-NS Facilitates Sequence Diversification of Horizontally Transferred DNAs during Their Integration in Host Chromosomes. *PLoS Genet*. 2016 Jan 20;12(1):e1005796.
- 10: Okuda H, **Kanai A**, Ito S, Matsui H, Yokoyama A. AF4 uses the SL1 components of RNAP1 machinery to initiate MLL fusion- and AEP-dependent transcription. *Nat Commun*. 2015 Nov 23;6:8869.
- 11: Ueda T, Nagamachi A, Takubo K, Yamasaki N, Matsui H, **Kanai A**, Nakata Y, Ikeda K, Konuma T, Oda H, Wolff L, Honda Z, Wu X, Helin K, Iwama A, Suda T, Inaba T, Honda H. Fbx110 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2. *Blood*. 2015 May 28;125(22):3437-46.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. **Akinori Kanai**, Analysis of radiation induced mutations using next-gen sequencer, The 1st International Symposium of the network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science. 21-22 Feb 2017, 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、日本分子生物学会 第 39 回大会、2016 年 11 月 30 ~ 12 月 2 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 59 回大会、2016 年 10 月 26 ~ 28 日、JMS アステールプラザ (広島市)
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、第 40 回中国地区放射線影響研究会、2015 年 7 月 17 日、広島大学 (東広島市)
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、NGS 現場の会 第四回研究会、2015 年 7 月 1 日 ~ 3 日、つくば国際会議場 (つくば市)
6. **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 10 回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファランス、2015 年 6 月 6 日、広島大学 (広島市)
7. **Akinori Kanai**, Analysis of radiation induced mutations using next-gen sequencer, 15th International Congress of Radiation

Research, 25-29 May, 2015 Kyoto International Conference Center (Kyoto)

8. Akinori Kanai, Analysis of radiation induced mutations using next-gen sequencer, The 11th International Workshop on Advanced Genomics, 20-22 May 2015, Hitotsubashi Hall (Tokyo)

〔図書〕(計2件)

- 1: 金井昭教、秀潤社、stranded-mRNA、実験医学別冊 NGS アプリケーション RNA-Seq 実験ハンドブック、p29-37 2016年4月1日
- 2: 金井昭教、羊土社、NGS 基本用語解説、細胞工学別冊 次世代シーケンサーDRY 解析教本、p73-76 2015年10月20日

6 . 研究組織

(1)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