

7.1.2 低線量率 γ 線連続照射オス親マウスの仔・孫への影響

-生殖細胞突然変異のゲノムワイド検索-

Transgenerational Effects in Mice Exposed to Continuous Low-Dose-Rate Gamma-Rays - Genome-Wide Detection of Germ Cell Mutation -

小倉 啓司, 田中 聡, タナカ イグナシヤ III ブラガ, 一戸 一晃, 田中 公夫, 小木曾 洋一
生物影響研究部

Keiji Ogura, Satoshi TANAKA, Ignacia BRAGA-TANAKA III, Kazuaki ICHINOHE,
Kimio TANAKA, Yoichi OGHISO
Department of Radiobiology

Abstract

Transgenerational effects of continuous low-dose-rate γ -ray irradiation of male mice have not been well studied. First of all to establish the method to detect newly generated and inherited mutations by offspring from an irradiated male mice, we tried to screen germ cell mutations using an oligo microarray CGH method. Acutely γ -ray irradiated (8 Gy at 0.9 Gy/min), 8-week-old, specific-pathogen-free (SPF) C57BL/6J male mice were mated to non-irradiated C57BL/6J female mice to get their offspring. The genome-wide molecular comparisons of tail DNAs from irradiated male mouse, its mate and their offspring were performed to identify mutations that may have been newly generated and inherited by offspring from the irradiated male mice. Here we show that the oligo microarray CGH analysis could screen mutation candidates of an average of 196 loci per one progeny from irradiated male, in contrast to an average of 0.4 loci per one progeny from non-irradiated male.

1. 目的

本実験調査では、オス親への低線量率放射線照射が仔・孫に及ぼす影響を明らかにするために、低線量率 γ 線を長期連続照射したオスマウスと非照射メスマウスとを交配し、その仔・孫を得、これらのマウスより採取された尾組織試料を用いて、染色体の欠失・挿入等ゲノムの変化を高い精度で網羅的に解析を行う。放射線照射がどのような突然変異を誘発するかを調べるためには、交配するオス親マウスとメスマウスが本来持っている「自然突然変異」と放射線照射によって新たに誘発される「放射線誘発突然変異」を分別して検出する必要がある。そこで、現在利用できる方法の中でゲノムに含まれている変異が感度良く検出できる方法と考えられるオリゴマイクロアレイ CGH 法を使用し、その有効性を検討した。

2. 方法

高頻度に突然変異を誘発するため、高線量率 (0.9 Gy/min) の γ 線を 8 週齢の SPF C57BL/6J オスマウスに高線量 (8 Gy) 照射した。照射終了直後、8 週齢の SPF C57BL/6J 非照射メスマウスと 1 週間同居させ、交尾確認後 16~19 日にメスマウスから胎子マウスを摘出した。オス親は交尾後、メスマウスは胎子マウス採取後にそれぞれ尾組織をサンプリングした。この高線量率照射群と非照射対照群から抽出したゲノム DNA を用いて、オリゴマイクロアレイ CGH 法により、両親マウス由来の自然突然変異及び仔マウスの放射線誘発突然変異の検出を試みた。

また、オス親の繁殖能力維持のために低線量率連続照射環境下で定期的に交配させた健常メスマウスに見られた出産匹数の減少等が卵子や受精卵 (胚) への短期間 (1 週間) の低線量率 γ 線照射による影

響であるのかを確認するために、妊娠メスマウスに低線量率(20 mGy/22 h/day) γ 線を7日間連続照射(集積線量 140 mGy) する実験(妊娠メス照射実験)を実施し、子宮着床痕数、生存胎子数、及び外形異常の頻度を調査した。

3. 成果の概要

オリゴアレイ CGH 法による放射線誘発突然変異のスクリーニングの結果、急照射群では1世代あたり平均 196 ヶ所の領域で突然変異が見つかったが、非照射対照群では突然変異が見つかったのは平均 0.4 ヶ所の領域のみであった(Table1、Fig.1)。今回のオリゴアレイ CGH 法によって検出された領域の中から 14 ヶ所を PCR 法で増幅して欠失が生じているかの確認を行った。その結果、2 ヶ所に約 19kb 程度の欠失の存在が確認できた。よって、オリゴアレイ CGH 法によるスクリーニングは、少なくとも全ゲノム領域における大きな欠失突然変異を検出するのに有効であると考えられた。今回オリゴアレイ CGH

法によって検出された突然変異の候補領域については PCR 法で欠失が生じていることを確認するとともに、DNA 塩基配列決定を行って最終的に放射線誘発突然変異の種類と頻度を求める予定である。継世代影響に係る実験で行われた照射実験(第1~5回)において死亡した全てのマウス(2月28日現在 1972 匹)のうち 717 匹の尾組織から遺伝子変異解析用ゲノム DNA を抽出精製して凍結保存した。今後、これらの DNA を用いてオリゴアレイ CGH 法による変異を検出する予定である。

妊娠メス照射実験では子宮着床痕数が4個以下の個体や生存胎子数3匹以下の個体が照射群で有意に多かった(Fig.2)。また、外形異常の頻度が非照射対照群に比べて有意に低かった。この理由として、単に照射群の胎子の死亡率が高くなった訳ではなく、外形異常を示す個体は健常個体よりも高い頻度で発生初期段階で排除される等生体内機構によって起きた現象である可能性が考えられる。

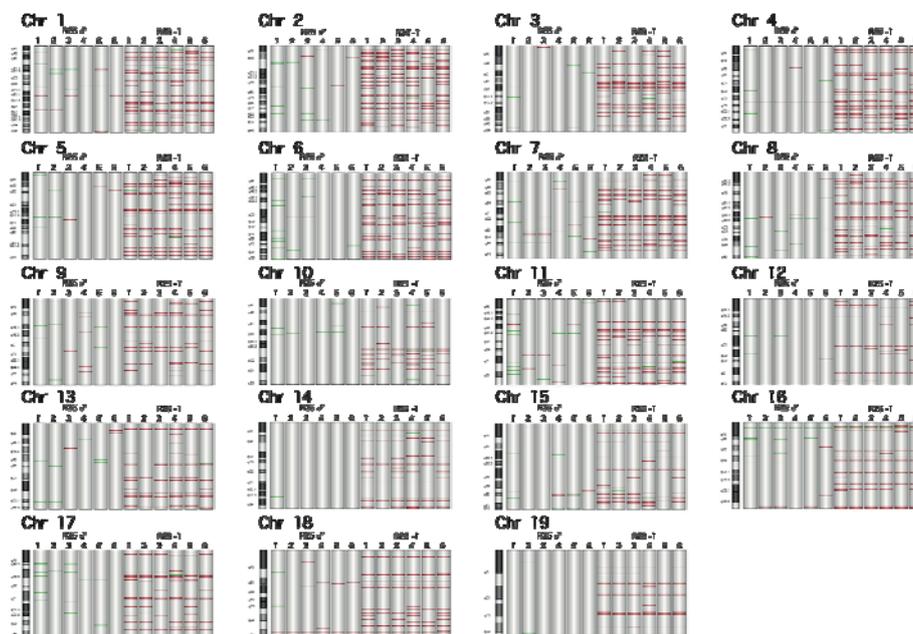


Fig. 1 An example of results obtained by oligoarray CGH in one progeny. DNAs from irradiated male mouse (R25, shown in left side lanes of each chromosome) and its one child (R25-1, shown in right side lanes of each chromosome) were repeatedly analyzed (6 times, as shown in lane number 1-6). To screen the mutation, we performed "differential aberration" protocol using these twelve array results. Red lines: genomic loss. Green lines: genomic gain.

Table 1 The number of mutation candidate loci in the fetuses from acutely irradiated (8Gy) or non-irradiated male mice

Irradiated male mouse No.	Progeny No.	No. of detected loci	Non-irradiated male mouse No.	Progeny No.	No. of detected loci
R25	1	261 (5)	C1	1	0
	2*	323 (4)		2	0
	3*	757 (16)		3	0
R28	1*	70 (5)		4	0
	2*	32 (1)		5	1 (0)
R32	1	210 (1)		6	0
	1*	3 (0)		7	1 (0)
R36	2*	27 (10)	C3	1*	1 (0)
	3*	62 (25)		2*	0
	1	171 (1)		3*	1 (0)
R41	2	222 (19)		4*	0
	1*	128 (19)		5*	1 (0)
R42	2*	-		6*	1 (0)
	3*	-		7*	-
	1	281 (1)			
R45	1	32 (10)			

Summary of mutation candidate loci detected by oligoarray CGH. The fetuses were sampled at 16-19 embryonic days old fetus from acutely irradiated (R) or non-irradiated (C) male mice. All analyses used 224 K arrays except those marked with an asterisk (*) that used 1M arrays. Numbers shown in parentheses indicate large deletions containing more than two flanking array probes.

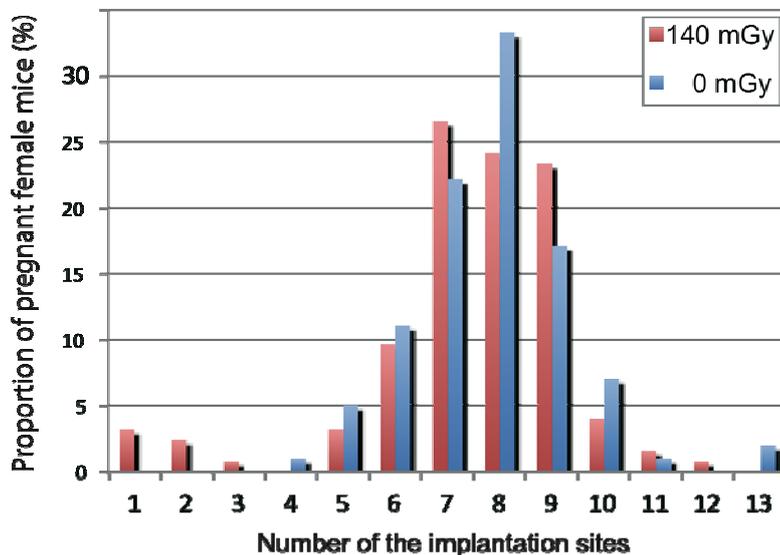


Fig. 2 Distribution of the number of the implantation sites detected from the uterus of the pregnant female mice exposed to low-dose-rate (20 mGy/22h/day) gamma-ray for 7 days (total dose of 140 mGy). There were more females having implantation sites from 1 to 4 in irradiated group than in non-irradiated group ($P < 0.05$).