

6. 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検索–

Transgenerational Effects in Mice Exposed to Continuous Low-Dose-Rate Gamma-Rays – Analysis of Germ Cell Mutation –

小倉 啓司, 藤川 勝義, 田中 聡, 田中 イグナシヤ,
一戸 一晃, 小木曾 洋一, 田中 公夫
生物影響研究部

Keiji OGURA, Katuyoshi FUJIKAWA, Satoshi TANAKA, Ignacia TANAKA,
Kazuaki ICHINOHE, Yoichi OGISO, Kimio TANAKA
Department of Radiobiology

Abstract

Transgenerational effects of continuous low-dose-rate (LDR) gamma-ray irradiation of male mice have not been well studied. To clarify incidence of copy number aberrations (CNAs) of the progeny of mice exposed to radiation, progeny of male C57BL/6J mice continuously exposed to LDR (20 mGy/22 h/day) gamma-rays for 400 days (total dose: 8000 mGy) was analyzed. Using oligo-microarray CGH (Agilent Technologies), we have, so far, analyzed a total of 229 genomes (66 progenies from 12 pairs of parents in LDR-irradiated group and 103 progenies from 18 pairs of parents in non-irradiated group). The results indicate that progeny from LDR-irradiated mice had significantly higher frequencies of genomic aberrations than progeny from non-irradiated mice (1.29 loci/genome vs. 0.18 loci/genome). The nucleotide sequences were determined at three loci (1.4 kb, 1.5 kb and 135kb deletion) from the LDR-irradiated mice group. The nucleotide sequences suggest that the 1.4 kb and 1.5 kb deletions were formed by single strand annealing (SSA) repair, and the 135 kb deletion was formed by non-homologous end-joining (NHEJ) repair.

1. 目的

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、その仔を得、終生飼育して死亡したマウスより採取し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網羅的に高い精度で解析してオス親への低線量率放射線長期連続照射が仔に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

2. 方法

8週齢のオスC57BL/6J Nrsマウス（オス親マウス）に20 mGy/22hr/dayの低線量率で γ 線を400日間連続照射した後、非照射メスC57BL/6J Nrsマウス

（メス親マウス）と交配して仔(以後、仔マウス)を得、終生飼育を行った（この群を20 mGy/日照射群と呼ぶ）。死亡後速やかにこれらのマウスから尾組織をサンプリングし、凍結保存した。この凍結尾組織から抽出したゲノムDNAに含まれる変異を調べるためにマウスゲノム全体をほぼ均等にカバーした1Mフォーマットアレイ（アジレント社、1枚のスライド上に約60ヌクレオチド長のオリゴプライマー約100万種類が搭載されている）を用いたオリゴマイクロアレイCGH法による変異解析を行い、仔マウスゲノムに新たに生じた変異をスクリーニングした。オス親マウスとメス親マウスが持っている既存の変異と新規突然変異（自然に誘発

される自然突然変異、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が含まれる)を分別して検出するために、オス親マウスやメス親マウスの変異と仔マウスの変異のゲノム上での位置を比較することで、仔マウスだけに見つかる変異(新規突然変異)を検出した。この新規突然変異のうち、PCR法で増幅可能なものについて塩基配列の決定を行って変異がどのようにして起きたかを推定した。

3. 成果の概要

遺伝子変異解析では第1~5回の照射実験で死亡したマウスのうち859匹の凍結保存した尾組織から遺伝子変異解析用ゲノムDNAを抽出・精製した。これまでに20 mGy/日照射群のオス親、非照射メス親各12匹とその仔マウス66匹、非照射対照群のオス親、非照射メス親各18匹とその仔マウス103匹、合計229

匹分のゲノムについてオリゴマイクロアレイCGH法による遺伝子変異解析を行い、仔マウスゲノムに新たに生じた変異のスクリーニングを終了した。その結果、20 mGy/日照射群の仔マウス21匹のゲノムから85カ所で、非照射対照群の仔マウス15匹のゲノムから19カ所でそれぞれ新規変異の可能性が高い領域を検出した(Table 1)。推定される新規変異の頻度は20 mGy/日照射群では1世代あたり1.29カ所、非照射対照群では1世代あたり0.18カ所で、20 mGy/日照射群で有意に高かった。このうち、20 mGy/日照射群で検出された3カ所の新規変異について塩基配列を決定したところ、1.4 kbと1.5 kbの欠失はSingle Strand Annealing修復、135kbの欠失はNon-Homologous End-Joining修復により形成されることが推定された。Table 2に新規変異がみつかった全F1マウスの異常の種類を示した。

Table 1 Results of the genomic aberrations analysis using the oligo-microarray CGH

	No. of analyzed F1 mice	No. of mice with aberrations	No. of loci aberrating	No. of mice with multiple aberrations
20 mGy/22h/day irradiated group	66	21 (32%)	85 (Ave. 1.29 loci/ generation)	4 (6%)
Non irradiated group	103	15 (15%)	19 (Ave. 0.18 loci/ generation)	0 (0%)
		P =0.03	P <0.001	



1. Mutation frequency in the 20 mGy/22h/day irradiated group is significantly higher than the non-irradiated group.
2. Multiple aberrations were found only in the 20 mGy/22h/day irradiated group.
3. Increase in copy number aberrations (CNAs) were less frequent than decreases.

Table 2 *De novo* genomic aberrations found in F1 mice

20 mGy/22h/day irradiated group							Non-irradiated group						
P	F1	Copy	Probe ID	Chr	Start	size	P	F1	Copy	Probe ID	Chr	Start	size
Large aberrations							Large aberrations						
A	1	d	A_67_P06933980	9	113994878	133572	G	2	d	A_67_P04226288	1	114741818	72062
E	1	d	A_67_P01942010	9	57473630	234921	H	5	d	A_67_P00568664	2	177113983	688713
E	5	i	A_67_P05889421	6	48005970	305969	H	5	d	A_67_P07597258	12	41196414	146136
G	2	d	A_67_P08093213	14	41807207	3286	K	4	d	A_67_P04816742	3	5533449	34160
I	5	d	A_67_P02200316	10	98677432	744874	K	5	d	A_67_P07881467	13	55020816	25412
L	2	d	A_67_P08087383	14	38727785	23540	Small aberrations						
L	4	d	A_67_P01456795	6	138658494	32881	E	4	i	A_53_P142487	8	125951601	1535
L	5	d	A_67_P07898663	13	63501120	1908639	F	5	i	A_67_P06477612	8	37019826	68
L	8	d	A_67_P05018303	3	105191509	132898	G	2	d	A_67_P04434755	2	13957250	346
Small aberrations							G	5	i	A_67_P06783170	9	49529393	412
B	3	d	A_67_P05197589	4	33730804	94	H	1	d	A_67_P06382618	7	142916412	98
B	5	d	A_67_P02151317	10	68882829	1040	H	1	d	A_67_P06671121	8	125525315	594
B	5	d	A_67_P07398579	11	74609783	175	I	3	d	A_67_P02693109	13	53303865	89
E	3	d	A_67_P00341736	2	34273487	100	L	6	d	A_67_P07000727	10	22555501	86
G	5	d	A_67_P04083311	1	44861301	948	N	5	i	A_67_P04221500	1	111527682	66
G	7	d	A_67_P05313129	4	89899132	1878	O	7	i	A_67_P04007022	1	7313469	153
G	7	d	A_67_P04259545	1	131185842	617	P	3	d	A_67_P00830676	4	22048320	230
I	4	d	A_67_P02060678	10	8393959	460	P	3	d	A_67_P06620732	8	105555233	93
J	4	d	A_67_P06860168	9	81442835	327	P	7	i	A_67_P03082883	15	81575653	71
J	4	d	A_67_P00912069	4	81088876	122	Q	2	d	A_67_P08008520	13	117033940	66
L	4	d	A_67_P05080618	3	133586473	428							
Multiple aberrations													
A	2	d	35 loci	<1.5 kb									
F	5	d	15 loci	<1.6 kb									
H	6	d	10 loci	<0.6 kb									
L	1	d	5 loci	<0.5 kb									

Mice with two *de novo* genomic aberrations are marked in red. Type of aberrations is indicated as d (deletion) or i (increase). Multiple aberrations (more than five aberrations in one mouse) are shown in the lower left side.