

2. 1. 2 継世代影響・線量率効果解析 –遺伝子変異検索–

Transgenerational Effects in the Progeny of Mice Exposed to Acute High and Chronic Low Dose-rate Gamma-rays – Germ Cell Mutation Analyses–

小倉 啓司, 田中 聡, 小村 潤一郎
生物影響研究部

Keiji OGURA, Satoshi TANAKA, Jun-ichiro KOMURA
Department of Radiobiology

Abstract

Transgenerational effects of low dose-rate (LDR) radiation have not been well studied. We have estimated the incidence of copy number variations (CNVs) in the progeny born from 65 week-old male C57BL/6J mice after continuous exposure to gamma-rays at several LDRs (0.05, 1 or 20 mGy/day for 400 days to total doses of 20, 4000 or 8000 mGy) or from 18 week-old male C57BL/6J mice after exposure to a HDR of 770 mGy/min (total dose 3 Gy). This year, using array CGH to screen for CNVs, we analyzed 44 progenies born from 65 week-old male C57BL/6J mice after exposure to a HDR of 770 mGy/min (total dose 3 Gy). To identify “real new mutations,” we tested all candidate CNVs found using quantitative PCR and estimated that the frequency of F1 mice containing CNVs in this group is 9.1%.

1. 目的

低線量率放射線長期連続照射及び高線量率放射線急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、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 (copy number variations, CNVs) を網羅的に高い精度で解析することにより、オス親マウスへの低線量率放射線長期連続照射及び高線量率放射線急照射が子孫に及ぼす影響と線量率による影響の違いを明らかにすることを目的とする。

2. 方法

オスC57BL/6Jマウスに高線量率 (770 mGy/分) ガンマ線を総線量3000 mGyまで照射し、照射10週間後に非照射メスC57BL/6Jマウスと交配して得られた仔マウスについて、これらの尾組織から抽出したゲノムDNAを用い、アレイCGH法によって仔マウスゲノムに新たに生じた欠失等の変異をスクリーニングした。1次スクリーニングはマウスゲノム全体をプロ

ーブ間隔約2 kbでほぼ均等にカバーした1Mフォーマットアレイ (1枚のスライド上に約60塩基長のオリゴヌクレオチドプローブ約100万種類が配置されている) によって行い、2次スクリーニングは1次スクリーニングで異常値が観察されたプローブすべてに対して、それぞれのプローブの隣接領域に高密度にプローブを設計して行った。スクリーニングで検出された「異常値領域」は、便宜的に、「1次スクリーニングで異常値が観察されたプローブ」複数が並んで見つかった「異常値領域」を「Type L異常値領域」、「1次スクリーニングで異常値が観察されたプローブ」が単独で見つかった「異常値領域」を「Type S異常値領域」に区別した。また、アレイCGH法で得られた「Type L異常値領域」及び「Type S異常値領域」のすべてについて、アレイCGH法とは原理が全く異なる定量PCR法の1種であるTaqMan Copy Number Assayによる確認作業を行い、確認されたものを真の「新規変異」とした。

3. 成果の概要

本年度は、55 週齢で高線量率 770 mGy/分（総線量 3000 mGy）放射線を照射し、65 週齢で交配した 6 つがい（F0 オス、F0 メス）とその仔マウス（F1）44 匹のゲノム DNA についてアレイ CGH 法によるスクリーニングを実施した。これら 44 匹の「Type L 異常値領域」及び「Type S 異常値領域」すべてについて、定量 PCR 法による確認作業を実施した。

Table 1 に、アレイ CGH 法により検出された変異

の候補及びそのうち定量 PCR 法により確認できた新規変異の数（[]内の数は重複）を示した。Table 2 には、定量 PCR 法で確認できた新規変異を持つマウスの数を示した。これらの表には、昨年度までに行った解析の結果も示している。現時点では、高線量率 3000 mGy 照射群（65 週齢で交配したものおよび 18 週齢で交配したもの）と非照射対照群の間で、変異を持つマウスの割合の違いは検出されていない。

Table 1. The number of the (candidate) CNVs detected by array CGH and confirmed by qPCR

Number of affected probes in 1st CGH	Number of affected probes in 2nd CGH	Non-irradiated Mating: 65 weeks			20 mGy/day (8000 mGy) Mating: 65 weeks			70 mGy/min (3000 mGy) Mating: 18 weeks		70 mGy/min (3000 mGy) Mating: 65 weeks	
		Detected by CGH	Confirmed by PCR		Detected by CGH	Confirmed by PCR		Detected by CGH	Confirmed by PCR	Detected by CGH	Confirmed by PCR
≥2 (Type L)		9	9	[1]	23	23	[1]	5	5	1	1
	≥5	1	1	[1]	5	5		0	0	0	0
1 (Type S)	4	1	0		2	1		0	0	0	0
	3	3	1	[1]	2	1		1	0	1	0
	2	21	3		3	2		8	3	4	2 [1]
	(Total)	26	5	[2]	12	9		9	3	5	2 [1]
(Type L + S)		35	14	[3]	35	32	[1]	15	8	6	3 [1]
(No. of mice analyzed)		156			142			59		44	

The numbers in brackets indicate those of duplications (internal numbers).

Table 2. The number of the F1 mice with CNVs

		No. of mice analyzed	No. of mice with CNVs (%)					
			Type L		Type S		Type L+S	
770 mGy/min (3000 mGy) Mating: 65 weeks	Female	25	1	(4.0)	1	(4.0)	2	(8.0)
	Male	19	0	(0.0)	2	(10.5) [1]	2	(10.5) [1]
	Total	44	1	(2.3)	3	(6.8) [1]	4	(9.1) [1]
770 mGy/min (3000 mGy) Mating: 18 weeks	Female	28	2	(7.1)	0	(0.0)	2	(7.1)
	Male	31	3	(9.7)	2	(6.5)	5	(16.1)
	Total	59	5	(8.5)	2	(3.4)	7	(11.9)
20 mGy/min (8000 mGy) Mating: 65 weeks	Female	67	8	(11.9) [1]	9	(13.4)	17	(25.4) * [1]
	Male	75	13	(17.3)	2	(2.7)	15	(20.0) *
	Total	142	21	(14.8) ** [1]	11	(7.7)	32	(22.5) ** [1]
Non- irradiated Mating: 65 weeks	Female	81	4	(4.9)	6	(7.4) [2]	10	(12.3) [2]
	Male	75	4	(5.3) [1]	1	(1.3)	5	(6.7) [1]
	Total	156	8	(5.1) [1]	7	(4.5) [2]	15	(9.6) [3]

The numbers in brackets indicate those of duplications (internal numbers). *P<0.05, **P<0.01