

5.4 低線量率放射線が加齢関連分子に及ぼす影響の解析（次世代シーケンシング技術導入に関するフィージビリティ試験）

Application of Next-generation Sequencing Technologies to Analysis of the Effects of Aging and Low Dose- Irradiation on DNA Methylation

杉原 崇

生物影響研究部

Takashi SUGIHARA

Department of Radiobiology

Abstract

We have performed a feasibility study to apply next-generation sequencing (NGS) technologies to the analysis of the effects of aging and of low dose-rate irradiation on DNA methylation in the liver of mice. We examined the level of DNA methylation, using NGS following bisulfite conversion, at individual CpG sites in the four genes, C1ql3, Srd5a2, Rfx4 and Ptk7, which have been reported to show age-dependent changes in DNA methylation, in the liver of non-irradiated young (~60 days old), non-irradiated old (~660 days old), and irradiated (at 20 mGy/day for 400 days) old (~660 days old) female B6C3F1 mice. NGS revealed age-associated increase in DNA methylation in all of the four genes. We also found regions in which low dose-rate irradiation specifically increased methylation in the Rfx4 and Ptk7 genes. RNAseq, an NGS-based method of gene expression analysis, revealed the increase in the expression of the Ptk7 gene in irradiated mice. These results suggest the usefulness of NGS technologies in studying the effects of low dose-rate radiation.

1. 目的

これまで、我々はマイクロアレイを用いた網羅的ゲノム解析や網羅的遺伝子発現解析を行ってきたが、データ解析のスピード、解像度といった面で制限があり、必要な遺伝情報を最大限に引き出すことは難しかった。一方、新しい技術である次世代シーケンシングの導入により、マイクロアレイに比べて格段に情報量が大きな結果を得られることが期待される。そこで、本課題では、加齢したマウス肝臓組織サンプルを「次世代シーケンシングによる DNA メチル化解析法」及び「次世代シーケンシングを用いた RNAseq 解析法」により分析し、我々の今後の交付金調査事業にとって次世代シーケンシング利用が有益かどうかを検討した。

また、B6C3F1 マウスを用いた寿命試験において、照射マウスで早期発がんによる寿命の短縮がみられ

るものの、さまざまながんの発症頻度があまり変わらないという結果が得られており、これは、「放射線照射が一般的にマウスの加齢を促進する」という古くからある仮説を支持するもののように思われる。そこで、本課題では、「ゲノム関連の加齢指標が低線量率放射線照射によって変動するか」及び「次世代シーケンシングを用いて解析することの有益性」の二点について検討することとした。

2. 方法

8週齢の B6C3F1 メスマウスに低線量率 (20mGy/日) 放射線照射を 400 日間行い、その後 204 日間非照射条件下で飼育し、解剖、肝臓を採取した。これら照射群老齢 (RO) マウス 3 匹、および同齢の非照射老齢 (NO) メスマウス 3 匹に加え、非照射若齢 (NY, 9 週齢) メスマウス 2 匹の肝臓組織について、

バイサルファイト法と次世代シーケンシング技術により DNA メチル化解析を行った。さらに、同じ肝臓組織を次世代シーケンシング技術を用いた遺伝子発現解析法である RNAseq 法により解析した。

3. 成果の概要

マウスの加齢に伴い DNA メチル化が変化する領域を持つ遺伝子として 4 遺伝子 (C1ql3, Srd5a2, Rfx4, Ptk7) が報告されている (Mozhui K.er al., *Mech. Ageing Dev.*, 2017, 162:27-37) ことから、これらの遺伝子にターゲットを絞り DNA メチル化解析を行った。その結果、非照射老齢マウスでは、4 つの遺伝子全てにおいて、メチル化頻度の増加が確認できた。さらに照射老齢マウスにおいて特異的に変化する領域を探索したところ、Rfx4、Ptk7 遺伝子内の一部に

メチル化の増加する領域を見出した (Fig. 1)。さらに、RNAseq 法を用いて、これらの 4 遺伝子についての遺伝子発現解析を行った。その結果、Ptk7 遺伝子において照射による有意な発現増加が示された (Fig. 2)。以上の結果から、加齢による DNA メチル化変化が次世代シーケンシングにより検出できることが確認された。また、低線量率放射線照射による DNA メチル化の変化や遺伝子発現変化も解析できることが示された。次に、これら遺伝子内において照射あるいは加齢によってメチル化に変化が見られる上位 3000 個の CpG 部位に関してヒートマップ解析を行った。その結果、照射あるいは加齢によって特異的にメチル化が変化している部位が多数存在することが示された (Fig. 3)。

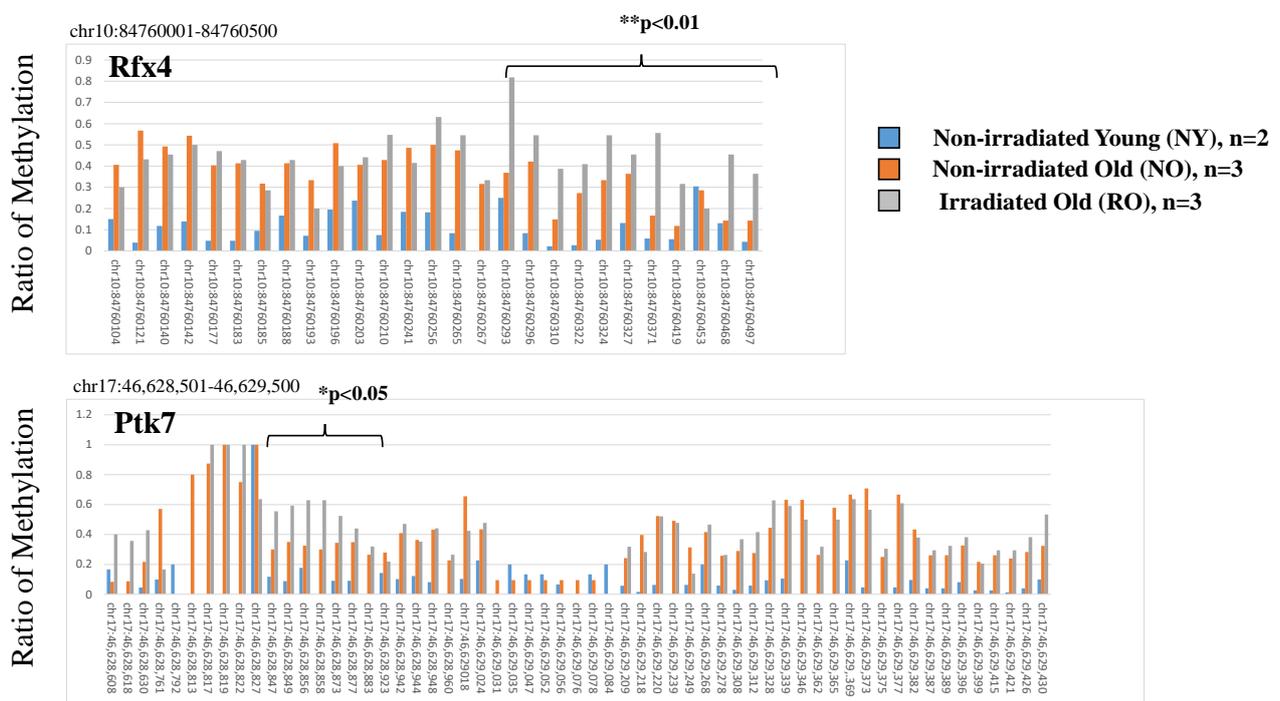


Fig.1 Analysis of methylation at individual CpG sites in the Rfx4 and Ptk7 genes using NGS. Upper panel: methylation in the region chr10:8,476,0001-8,476,0500 (Rfx4 gene). Lower panel: methylation in the region chr17:46,628,501-46,629,500 (Ptk7 gene).

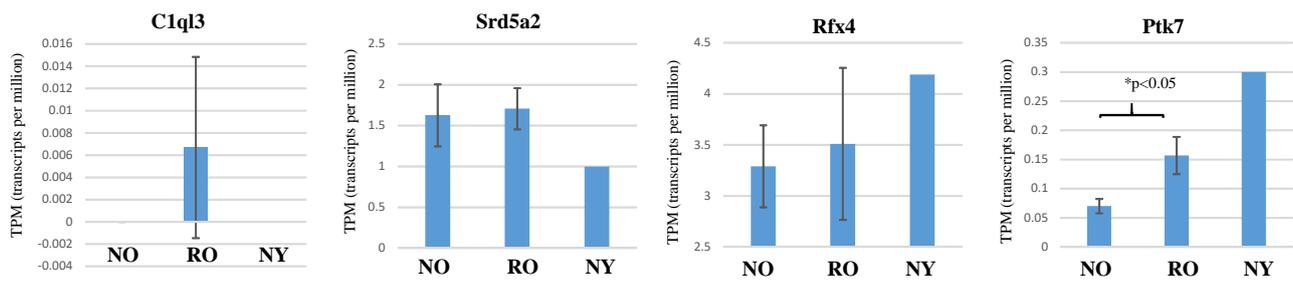


Fig.2. Expression analysis of four genes using RNAseq. RNA molecules for the C1ql3 gene in NO and NY samples were not successfully detected in this experiment.

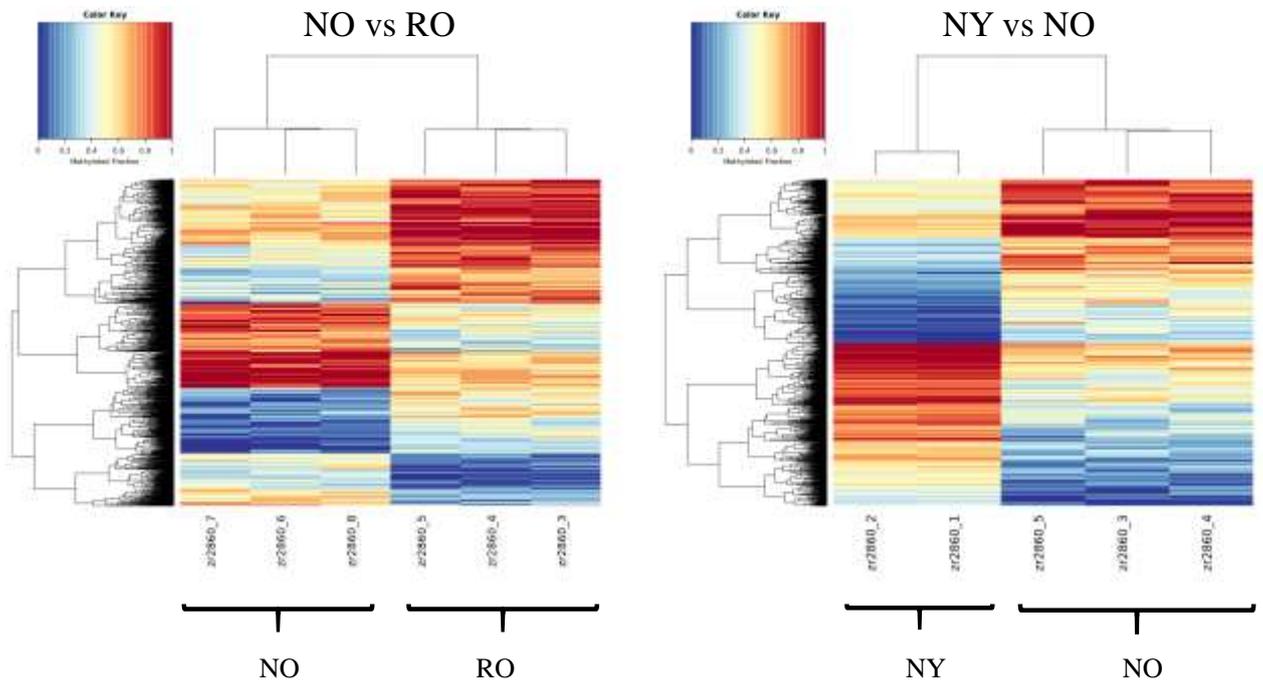


Fig.3. Heatmaps for comparison of methylation at the CpG sites in the four genes between NO mice and RO mice (left panel) and between NY mice and NO mice (right panel).