

## 2.2 低線量率放射線に対する分子細胞応答影響実験調査（第2期）

### — 遺伝子発現制御機構への影響（エピジェネティックな変化）の解析 —

#### Determination of the Methods to Analyze DNA Methylation in the Liver of Low Dose-Rate-Irradiated Mice

杉原 崇, 藤川 勝義, 田中 聡, 田中 イグナシヤ, 小村 潤一郎  
生物影響研究部

Takashi SUGIHARA, Katsuyoshi FUJIKAWA, Satoshi TANAKA, Ignacia TANAKA,  
Jun-ichiro KOMURA  
*Department of Radiobiology*

#### Abstract

We have previously observed extensive alterations in gene expression in the livers of mice exposed to low dose-rate radiation. The object of the present study is to identify epigenetic mechanisms (e.g., DNA methylation) responsible for the alterations in gene expression. This year, we validated three methods for analyzing DNA methylation in specific genes: 1) next generation sequencing in combination with bisulfite conversion; 2) microarray analysis following methylated DNA capture with MBD (methyl binding domain); and 3) PCR amplification following methylated DNA capture with MBD. Results showed that the three methods yielded similar results regarding DNA methylation profiles and they differentiated between DNA methylation in young and aged mice. Between the two methods of comprehensive analyses, next generation sequencing was superior to microarray analysis in both resolution and sensitivity. PCR amplification, a non-comprehensive analysis, may be applied to a limited number of genomic regions and was most economical to use when comparing large numbers of samples. For future experiments, we will therefore, be using next generation sequencing for genome-wide studies, and PCR amplification for comparing large numbers of samples.

#### 1. 目的

これまでに環境研で行われた各種調査によって、低線量率放射線照射されたメスマウスでは、肥満、脂肪肝の増加や、肝臓における代謝関連の遺伝子発現変化が生じることが明らかになっている。そこで本調査では、このような疾病発生や遺伝子発現変化へのエピジェネティクスの関与を明らかにすることを目的として、低線量率（20mGy/日）放射線長期照射マウスの肝臓組織等におけるエピゲノム解析や細胞分化能等の解析を実施する。調査初年度である本年度には、各調査項目の実験方法等の検討を行ったが、ここには、DNAメチル化解析の実験方法の検討

の結果を記載する。

DNAメチル化は、DNA配列の変化を伴わないが細胞分裂を超えて受け継がれる遺伝子機能の変化（エピジェネティクス）の一つで、DNA上のCpG配列のシトシン残基がメチル化され、これにより遺伝子発現が制御される。今年度は、DNAメチル化の解析方法として、次世代シーケンスを用いる方法、マイクロアレイを用いる方法、および定量PCRを用いる方法の三つを検討した。

#### 2. 方法

非照射の63日齢（若齢）および660日齢（加齢）の

B6C3F1マウスの正常肝臓サンプルより抽出したDNAを材料として用いた。下記の三つのDNAメチル化解析法を検討した。

① Bisulphite (重亜硫酸) 処理および次世代シーケンス法：全ゲノムの網羅的解析法 (ただしCpGアイランドが主)かつ塩基レベルの解像度の解析法である。具体的には、Reduced Representation Bisulphite Sequencing (RRBS) 法、Illumina次世代シーケンサーを用いた。

② メチル化DNA濃縮およびマイクロアレイ法：全ゲノムの網羅的解析法 (ただしCpGアイランドが主) また100塩基程度の解像度の解析法である。濃縮にはMBD (メチル化DNA結合ドメイン) を用い、マウスCpGアイランドマイクロアレイ (アジレント) を用いて解析した。

③ メチル化DNA濃縮および定量PCR法：特定の遺伝子配列の解析法また数百塩基程度の解像度の解析法である。濃縮には②と同じ方法を用いた。

### 3. 成果の概要

図に、Ptk7遺伝子 (加齢によりDNAメチル化のレベルが増加することが知られている) のDNAメチル化プロファイルを三つの方法で解析した結果を示す。いずれの方法でも、若齢マウスと加齢マウスのDNAメチル化プロファイルおよびその変化に関して同様の結果を得ることができた。方法①と②は全ゲノムの網羅的解析の方法であるが、①のほうが解像度が高いことから、今後の解析法として選択すべきものと判断した。ただし、①も②も比較的高価な解析法であり、多サンプルの解析には向かない。特定の遺伝子配列のみの解析を多サンプルに関して行うための方法として③を検討したが、この目的に適していることが確認された。今後のDNAメチル化解析を、①および③の方法を用いて行っていく予定である。

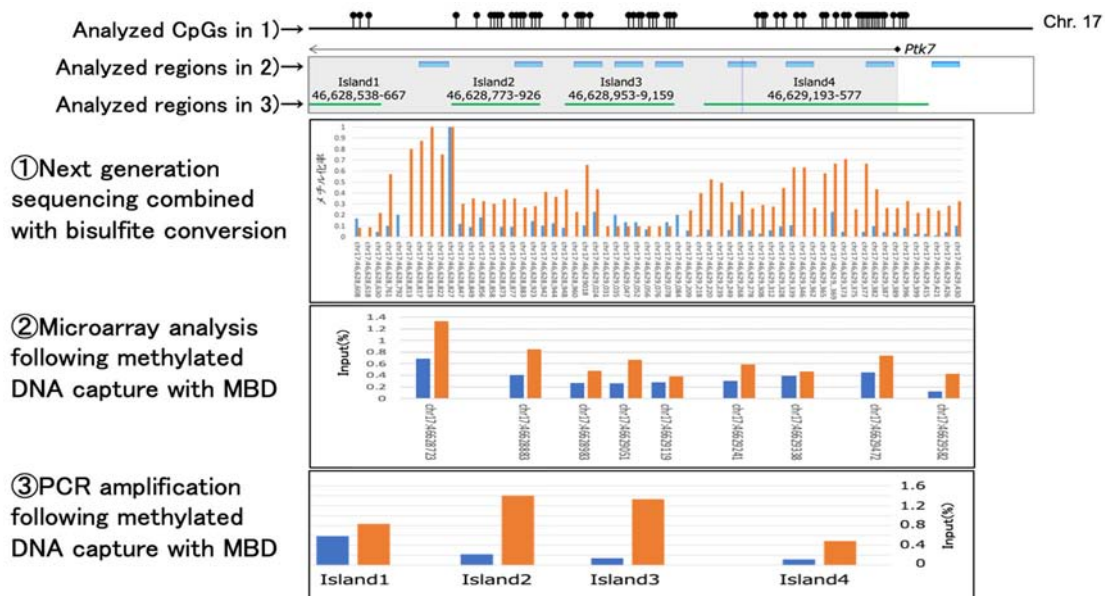


Fig. 1 Comparison of three methods for analyzing methylated DNA.