

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月26日現在

機関番号：11601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21612

研究課題名(和文)放射線汚染がアカネズミ個体群の遺伝的多様性および自然選択に及ぼす影響

研究課題名(英文)The effect of radiation on genetic diversity and natural selection in the population of the large Japanese field mouse

研究代表者

石庭 寛子 (ISHINIWA, Hiroko)

福島大学・環境放射能研究所・特任助教

研究者番号：00624967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放射線が生物の次世代への遺伝子変異に及ぼす影響を明らかにするため、小型げっ歯類アカネズミを指標生物として、遺伝子解析手法の確立および解析を行った。解析手法では、アカネズミのゲノム配列から特に重要な領域であるエクソン配列を多く解析できるよう手法を確立した。この解析手法を用いて、サンプル数が少なく予備的ではあるが2012,13年に集められたサンプルについて解析を行ったところ、放射線汚染地域および対照地域において次世代への変異率に変化は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線はDNAに変異を起こすため、変異が生殖系列で起きた場合、その影響は直接次世代へ継承される。また、放射線によるDNA変異はランダムに起きることから、全遺伝子領域を網羅する解析手法は放射線影響を解明するうえで必要不可欠である。本研究では次世代シーケンス技術を用いて個体と生殖細胞間の遺伝子全域の網羅的な解析を行うことにより、これらの課題を克服した。今後、さらに解析を進め影響の有無を明らかにすることで、福島県の地域住民の不安を払拭する一助になると考える。また、本研究で確立した解析手法は新たな化学物質による不確定な変異原影響を検出するためのスクリーニングの1つとして広く活用されることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the effect of radiation on gene mutation in the next generation of organisms, we established and analyzed gene analysis methods using the large Japanese field mice as bio-indicator. In the analysis method, we established a method to analyze larger number of exon sequences, which is a particularly important region, from the whole genome sequence of the field mice. Using this analysis method, preliminary analysis was performed on samples collected from 2012 to 2013. The mutation rate to the next generation in mice showed no significant difference from radiation contaminated area and control area.

研究分野：分子生態学

キーワード：Japanese field mouse Caesium Radiation Apodemus speciosus Mutation Next generation sequence

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

福島第一原発事故に伴う大規模な放射性物質の漏洩により、福島県内では広範囲にわたって放射性物質による汚染が発生した。線量が高く立ち入り制限を行っている区域面積の60%は森林によって構成されており、森林内に生息する野生生物への被ばくとその影響が懸念されている。事故直後に行われた Garnier-Laplace *et al.* (2011) の試算によれば、事故後30日以内のげっ歯類への被ばく線量は3.9 mGy/dayと見積もられ、これは国際放射線防護委員会(ICRP)によって提示される繁殖成功率を下げる恐れのあるレベルとされている(ICRP, 2008)

放射線は我々の体を通る際、体を構成する原子にエネルギーを与える電離作用を引き起こす。DNAはこの電離作用によって直接的に、もしくは活性酸素を産生させることで間接的に攻撃を受け、二本鎖切断や塩基修飾を惹起する。一方で細胞にはこのような損傷に対しアポトーシスを起こして自らを除去したり、修復酵素等によってDNAを修復したりする機構があらかじめ備わっており、正常な細胞を維持する事が出来る。しかし、DNA損傷が数多く起きる際には修復が不完全となる場合があり、その結果DNAが誤った情報を持つことになる。この突然変異が生殖細胞で起きた場合、変異が次世代に蓄積していく恐れがある。

変異の評価において、放射線が引き起こす突然変異は損傷を受けるDNA部位に規則性が無く検出が困難である。放射線感受性が高く系統的にヒトにも近い哺乳類のゲノムサイズは約3ギガベースにもおよび、ゲノム全体を評価するには膨大な労力が必要となるため、評価対象とする遺伝子領域はごく狭い領域や反復配列などに限られていた。しかし、近年発達してきた次世代シーケンサーの導入によってゲノム全域の塩基配列を短時間で決定することが可能となり、全ゲノムを対象にした変異解析ができるようになった。中でも、RADシーケンス(Restriction Site Associated DNA Sequence)と呼ばれる手法は、制限酵素認識サイトの近隣領域を解析する手法で、データ解析上問題となるゲノム構造の複雑さを軽減させ、かつゲノム全体の約0.1から1%におよぶデータを網羅的かつ迅速に解析でき、さらには単位サンプルあたりのコストが低いために継続的なモニタリングが可能となる。

本研究で対象とするアカネズミ(*Apodemus speciosus*)は日本固有の小型げっ歯類である。低山帯に広く分布し、捕獲が容易であることから、生物指標としての有用性が着目されている。研究代表者らは事故発生の翌年である2012年より高線量汚染地域においてアカネズミの捕獲を行い、生殖組織への影響を評価した。その結果、本種の繁殖期にあたる2012年の夏季に捕獲されたアカネズミの体内セシウム蓄積量から算出した内部被ばく線量は平均0.18 mGy/dayを示し、ICRPが提示する放射線影響を考慮すべき目安である誘導考慮参考レベル0.1 mGy/dayを超える値であることが明らかになった(ICRP, 2008; 大沼ら, 未発表)。さらに、酸化ストレスの指標として繁殖期アカネズミの精巣中の8-ヒドロキシ-デオキシグアノシン(8-OHdG)の蓄積、酸化ストレス修復酵素類の発現量増加が認められた(大沼ら, 未発表)。以上のことからアカネズミの生殖細胞ではDNAの変異を誘発するDNAの酸化が進んでおり、この酸化に伴う変異が次世代に引き継がれることで後代に予期せぬ突然変異が蓄積する可能性がある。

### 2. 研究の目的

福島県内の放射線汚染地域に生息するアカネズミを対象に、放射線が生殖細胞での突然変異を通じて集団の遺伝的多様性および自然選択に及ぼす影響を明らかにすることを最終的な目的とし、以下の研究を遂行する。

- (1) 放射線被ばくによるアカネズミ個体の次世代への変異蓄積の有無を検証するために、生殖細胞における変異の出現頻度を明らかにする。
- (2) アカネズミ集団内の遺伝的多様性を評価し、放射線被ばくによる遺伝子変異の蓄積の有無を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 解析に使用するサンプル

研究協力者より譲渡された2012年から2013年に捕獲されたアカネズミを用いた。アカネズミは、放射線による汚染地域として福島県の帰還困難区域内、対照地域として富山県立山町および青森県十和田市において本種の繁殖期である7月から9月までに捕獲された個体とする。それぞれ個体からは肝臓、オス個体は精巣上体尾部から抽出した精子、メスの妊娠個体はその胎子の体細胞からDNAを抽出し解析に用いた。

#### (2) RADシーケンス手法の確立

RADシーケンスの実施にあたり、使用する制限酵素によって得られるデータ、例えば塩基数、エクソン・イントロンなどの断片配列の特徴、が異なるため目的に沿った制限酵素を検討する必要がある。候補となる制限酵素20種(BamHI, BfaI, BmtI, BsrGI, CviAII, HindIII, KpnI, MfeI, MspI, NcoI, NsiI, PstI, SacI, SbfI, SpeI, SphI, AflIII, AvrII, BssSAI, NdeI)について、アカネズミのゲノム配列(Matsunami *et al.*, 2018)に対して解析効率の良い制限酵素の組み合わせを*in silico*スクリーニングによって検討した。

#### (3) 次世代への突然変異頻度

偶発的に捕獲されたメス妊娠個体とその胎子との遺伝子配列の比較から、次世代への突然変異率の評価を行った。アカネズミの繁殖様式は複数父性であることから、一腹内の仔には複数の父親由来の配列が存在する。また、野生下で血縁関係を持つ全個体を捕獲するのは実質不可

能であるため、確実に親子関係にあるメスと胎仔間の DNA 配列を RAD シーケンス法により解析・比較を行った。オス個体では精子細胞との遺伝子配列の比較から次世代に起きる突然変異率の評価手法の検討を行った。

#### (4) 地域個体群における変異解析

福島、富山、青森で捕獲されたアカネズミのゲノム DNA 配列を RAD シーケンス法によって解析し、集団内の遺伝的多様性および変異蓄積について比較を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) アカネズミゲノムにおける RAD シーケンスの制限酵素ペアの探索

20 種の制限酵素のペアについてアカネズミゲノムで切断断片を予測し、切断断片に exon が含まれる可能性を探索した。適合率;precision (切断断片に exon を含む次世代シーケンサーで読み取られる断片の塩基長)では、SbfI/MspI が 19.6%と最高値の組み合わせであった (Fig.1)。再現率;Recall (切断断片に exon を含む次世代シーケンサーで読み取られる断片の塩基長)では、BfaI/CviAII が最高値 9.4%を示し、全ての exon のうち 21.2%が読み取られる可能性が示された (Fig.1)。

本研究によって、アカネズミのゲノム配列の特性、すなわち、最も重要なエクソン配列の含有率を考慮した解析手法の確立を行うことができた。

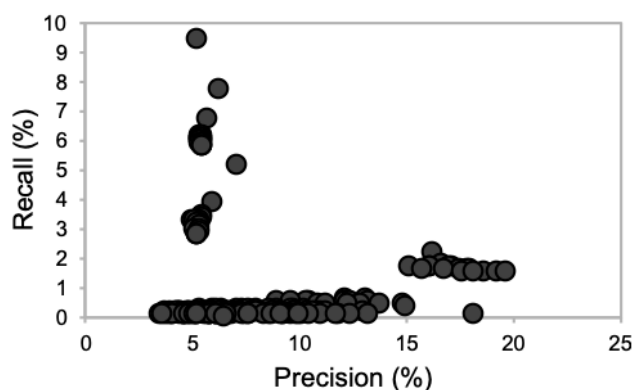


Fig.1 遺伝子検出の適合率および再現率

#### (2) RAD シーケンスを用いた次世代への突然変異頻度

4-(1)の *in silico* 解析で得られた制限酵素ペアのうち、使用する次世代シーケンサーの解析に適するように切断断片 550bp 程度に限定して再度探索したところ、KpnI/PstI の組み合わせがゲノム全体の 0.19%をカバーし、コーディング領域内の配列を最も多く調べることが可能であることが示された。

そこで制限酵素ペア KpnI/PstI を用いて、福島および対照地で得られたサンプルの解析を行った。妊娠メスとその胎仔について、DNA を抽出し KpnI/PstI の制限酵素組み合わせによる RAD シーケンスを実施した。得られた DNA 配列について、複数父性を考慮したアルゴリズムを構築し母配列と仔配列との比較を行った。変異率は、仔の配列がホモ、ヘテロいずれの場合も福島と対照地において差は見られなかった (Steel-Dwass test,  $p>0.05$ ; Fig2)。さらに、変異が検出された配列の特徴 (エクソン、イントロンの割合) は福島、対象地ともに同様の傾向を示した。

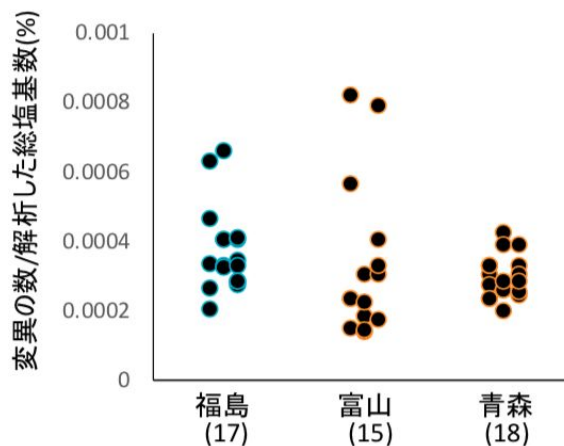


Fig. 2 仔の配列がヘテロの場合の変異頻度

オス個体とその精子細胞について本手法の適用について検討を行った。1 精子の解析は時間とコストがかかるため、1000 精子程度に細胞をまとめて DNA を抽出し、相対的な変異の発生率を評価することが効率的でコストを抑えられ、持続的な解析が可能であると考えられた。今後、手法の最適化を行う予定である。

#### (3) 地域個体群における変異解析

福島県の帰還困難区域内、対照地域として富山・青森で捕獲されたアカネズミ (個体数はそれぞれ 12, 5, 6) から DNA を抽出し、SbfI/SphI の制限酵素組み合わせによる RAD シーケンスを実施した。2.2Mbp の配列を解析し、5,987 個の塩基多型が得られた。次に、放射線量の高い地域に生息するアカネズミは集団内の変異が増加することを仮説としてその検証を行った。各集団内の塩基多様度には違いは見られなかった。放射線汚染地域・対照地域でアリル頻度の差の検定を行ったところ、アリル頻度に有意な違いは見られず、福島と対照地間で多型の偏りは観察されなかった。また、被ばく線量を応答変数、遺伝子型を説明変数として多型サイト毎に線形モデルを作成したがモデルは構築されず、線量と遺伝子型との間に関係性は見られなかった。

本解析については、サンプルサイズの充実が今後求められる。また、地域間の比較のみでは無

く、1地域の経年変化を追跡することで本種の個体群内の遺伝的構造の詳細が明らかになり、放射線による自然選択の検出が期待できると考えられる。

\*参考文献

Matsunami M., Endo D., Saitou N., Suzuki H., Onuma M. Draft genome sequence of Japanese wood mouse, *Apodemus speciosus*. Data in Brief, vol.16, pp.43-46, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Ishiniwa H., Okano T., Yoshioka A., Tamaoki M., Yokohata Y., Shindo J., Azuma N., Nakajima N., Onuma M. Concentration of radioactive materials in small mammals collected from a restricted area in Fukushima, Japan since 2012. Ecological Research, 査読有り, vol.34, pp.7, 2019, DOI:10.1111/1440-1703.1016

Endoh D., Hirayama H., Ishiniwa H., Onuma M. Prediction of internal exposure by Cs-137 of ranbury collected in difficult-to-return area of Fukushima dai-ichi nuclear power plant 2 -EGS5 user code and internal exposure calculation from 2012 to 2016-. KEK Proceedings, 査読無し, Vol.2018-13, pp.19-27, 2019

Okano T., Ishiniwa H., Onuma M., Shindo J., Yokohata Y., Tamaoki M. Effects of environmental radiation on testes and spermatogenesis in wild large Japanese field mice (*Apodemus speciosus*) from Fukushima. Scientific Reports, 査読有り, vol.6, pp.23601, 2016, DOI:10.1038/srep23601

〔学会発表〕(計 7 件)

石庭 寛子、放射線がアカネズミにもたらす影響～細胞レベルの評価から生態レベルへ～、日本生態学会東北地区大会 一般公開シンポジウム『原発事故が野生生物にもたらしたこと-その回復過程と今後の課題について-』、2017

石庭 寛子 他、アカネズミを対象とした放射線影響：定点観測地における経年調査、日本哺乳類学会 2017 年度大会自由集会『放射能汚染による野生動物への直接的/間接的影響』、2017

石庭 寛子、生態学から見た化学物質汚染：森に棲むアカネズミの研究、日本環境変異原学会 H29 年度公開シンポジウム『若手が拓く環境変異原研究』、2017

石庭 寛子 他、デュオサンプルを用いた変異検出解析-アカネズミにおける放射線の次世代影響評価-、NGS 現場の会第 5 回研究会、2017

石庭 寛子 他、低線量放射線による DNA 変異の蓄積は起きているか？、第 64 回日本生態学会大会、2017

石庭 寛子、アカネズミのゲノム情報を用いた放射線影響評価、日本哺乳類学会 2016 年度大会 企画シンポジウム『野生動物が関わる問題にどのように対応するか？～基礎研究を応用した解決への取り組み～』、2016

石庭 寛子 他、低線量被ばくがアカネズミ精巣における酸化ストレス応答に及ぼす影響、第 63 回日本生態学会大会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大沼 学、遠藤 大二

ローマ字氏名：ONUMA Manabu, ENDO Daiji

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。