

「きぼう」での Rad Gene 宇宙実験報告 2

-ヒト培養系における宇宙での p53 依存性遺伝子およびタンパク質発現-

高橋昭久^{1,2}, 大西武雄^{1,2}, 鈴木ひろみ^{3,4}, 嶋津徹³, 関真也^{4,5}, 橋爪藤子^{4,5}, 大森克徳², 石岡憲昭^{2,4}

¹ 奈良県立医科大学, ² 宇宙航空研究開発機構, ³ 日本宇宙フォーラム, ⁴ 鹿児島大学, ⁵ AES

Space experiment "Rad Gene" at Kibo-report 2: p53-Dependent gene and protein expression in human cultured cells during spaceflight

Akihisa Takahashi^{1,2}, Takeo Ohnishi^{1,2}, Hiromi Suzuki^{3,4}, Toru Shimazu³, Masaya Seki^{4,5},
Toko Hashizume^{4,5}, Katsunori Omori², Noriaki Ishioka^{2,4}

¹Nara Med. Univ., ²JAXA, ³JSF, ⁴Kagoshima Univ., ⁵AES

E-Mail: atakahas@naramed-u.ac.jp

Abstract: The space environment contains two major biologically significant influences: space radiations and microgravity. A p53 tumor suppressor protein plays a role as a guardian of the genome through the activity of p53-centered signal transduction pathways. The aim of this study was to clarify the biological effects of space radiations, microgravity and a space environment on the gene and protein expression of p53-dependent regulated genes.

Space experiments were performed with two human cultured lymphoblastoid cell lines: one cells line (TSCE5) bears a wild-type p53 gene status, and another cells line (WTK1) bears a mutated p53 gene status. Under one gravity or microgravity condition, the cells were grown in the cell biology experimental facility (CBEF) of the International Space Station (ISS) for 8 days without experiencing the stress during launching and landing because the cells were frozen during these periods. Ground control samples also were cultured for 8 days in the CBEF on the ground during the spaceflight. Gene and protein expression was analyzed by using DNA chip (a 44k whole human genome microarray, Agilent Technologies Inc.) and protein chip (Panorama™ Ab MicroArray, Sigma-Aldrich Co.), respectively.

We report the results and discussion from the viewpoint of the functions of the up-regulated and down-regulated genes after an exposure to space radiations and/or microgravity. The initial goal of this space experiment was completely achieved. It is expected that data from this type of work will be helpful in designing physical protection from the deleterious effects of space radiations during long term stays in space.

Key words; International Space Station, space radiations, microgravity, p53, gene expression.

(1)はじめに

我々は Rad Gene 宇宙実験において、加重力ストレスを回避するため、打ち上げ・帰還時は凍結保存し、宇宙空間で容易に培養することのできる実験系を開発した[1]。また、p53 の正常型と変異型の細胞について、軌道上で 1g 実験を取り入れることで、宇宙放射線の影響のみ、宇宙放射線と微小重力との相互作用を実験的に識別するように計画し、p53 調節遺伝子群の発現解析を提案し、2008 年末から実施された[1]。

(2)宇宙空間で培養した細胞で p53 依存性形質発現誘導された遺伝子群

宇宙空間で培養されるまで 97 日間の凍結状態で被曝した宇宙放射線量は約 52 mSv, 8 日間の培養期間で被曝した宇宙放射線量は約 4 mSv である[2]。DNA チップを用いて、宇宙空間で 8 日間培養したヒト細胞での遺伝子発現量を測定した(図 1)(投稿中)。

実に、750 遺伝子以上の発現変動遺伝子がリストされた。この DNA チップにのった 41,000 種の遺伝子のうち、約 2%の頻度を示した。変異型 p53 細胞に比べ、正常型 p53 細胞で 2 倍以上の発現誘導されたものを図 1A に、半分以下に発現が抑えられたものを図 1B にリストした。細胞培養は宇宙では 1g と μ g の 2 か所であり、地上培養群とを比較することによって、宇宙放射線のみで誘導または抑制した遺伝子群を図 1 の a, 微小重力のみで誘導または抑制される遺伝子群を c, 微小重力と宇宙放射線を同時に含んだ環境で誘導または抑制される遺伝子群を b とした。図 1 ではそれらにまたがる遺伝子群を d, e, f と示した。特に b は宇宙放射線と微小重力の相乗効果があることを意味するものである。

これまで、宇宙環境では放射線影響が微小重力で相乗的に誘導される事象が報告されてきた。一方、抑制する報告もあった。相乗効果が認められない生

物影響の報告も多かった。一体、本当はどれなのか、多くの科学的興味を引いていた。宇宙飛行士の健康管理にとっても、放射線影響が微小重力で相乗的かどうかは大きな問題である。今回の我々の実験結果は生物影響の結末である細胞死、突然変異誘発、染色体異常誘発、姉妹染色体交換などではなく、遺伝子レベルでの研究であった。宇宙放射線による遺伝子発現影響に微小重力が相乗的に誘導した遺伝子群(図 1A)は実に 209 遺伝子もあったし、相乗的に抑制した遺伝子群(図 1B)は 166 あったことが分かった。このことが、生物影響に直接現れるのか否かは不明であるが遺伝子の形質発現レベルでは歴年の課題に大きな答えを出せたと信じている。

今回の遺伝子発現で見ると、*p53* およびこれらの *p53* 関連遺伝子群に関しては誘導または抑制されてはいなかった。ただし、最近報告された *p53* 依存性促進遺伝子群の *ALDH4* (aldehyde dehydro-genase 4), *BTG3* (B-cell translocation gene 3), *FEN1* (flap endonuclease 1), *PRG3* (*p53*-res- ponsive gene 3) は宇宙放射線、宇宙環境で誘導されていた。*SOD2* (superoxide dismutase 2)は宇宙放射線で誘導されていた。また、*PIG3* (*p53*-induced genes 3), *PIG11*, *HSP70* は宇宙環境で誘導されていた。

(3)宇宙空間で培養した細胞で *p53* 依存性形質発現誘導されたタンパク質群

我々は同様に、タンパク質を抽出後、642 種類のヒトの抗体が載ったプロテインチップに広げ、発現量が高ければより強く発光することを利用した手法を用いて、宇宙空間で 8 日間培養されたヒト細胞でのタンパク質の発現量を測定した(表 1)(投稿中)。

正常型 *p53* 細胞で合成されたタンパク質から変異型 *p53* 細胞で合成されたタンパク質を差し引いた、すなわち *p53* 依存性の形質発現誘導されるタンパク質群を解析した。正常型 *p53* 細胞での発現量から変異型 *p53* 細胞での発現量を差し引いたもののうち、1.5 倍以上に発現誘導したものは 2 種類のタンパク質がリストされた。*p53* 依存的に宇宙放射線に反応して MeCP2 (mutations in methyl DNA binding protein 2)が、宇宙環境に反応して Notch1 が発現誘導した。一方、正常型 *p53* 細胞での発現量から変異型 *p53* 細胞での発現量を差し引いたもののうち、0.66 倍以下に発現が抑えられたものは 7 種類のタンパク質がリストされた。*p53* 依存的に宇宙放射線に反応して発現抑制したのは DR4 (death receptor 4), PRMT1 (protein arginine methyl- transferase 1) と ROCK-2 (Rho-kinase)であった。このうち、ROCK-2 は宇宙環境でも発現抑制した。*p53* 依存的に微小重力に反応して発現抑制したのは TGF- β (Transforming growth factor- β), TWEAKR (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis receptor), phosh-Pyk2 (Proline-rich

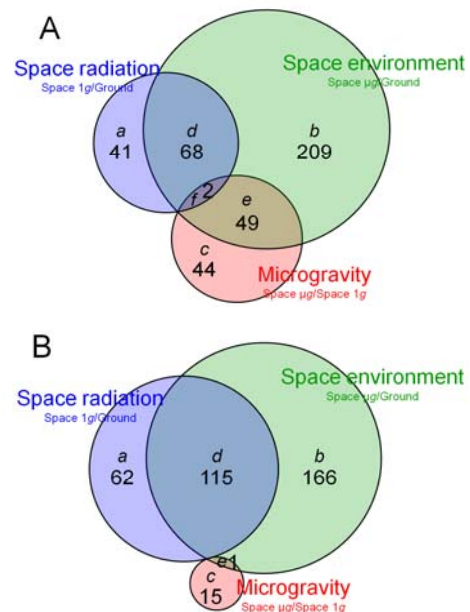


図 1. 宇宙で培養された細胞での *p53* 依存性形質発現。A, 誘導される遺伝子群; B, 抑制される遺伝子群。

表 1. 宇宙で培養された細胞での *p53* 依存性タンパク質発現

<i>p53</i> 依存性	Gene symbol	Value	Sample comparison	Cause
発現誘導 タンパク質	MeCP2	1.85	Space 1g/Ground	Space radiation
	Notch1	1.63	Space μ g/Ground	Space environment
発現抑制 タンパク質	DR4	0.66	Space 1g/Ground	Space radiation
	PRMT	0.63		
	ROCK-2	0.64		
	ROCK-2	0.59	Space μ g/Ground	Space environment
	TGF- β	0.63	Space μ g/Space 1g	Microgravity
	TWEAK R	0.55		
	Phospho-Pyk2	0.49		
14-3-30/ τ	0.42			

tyrosine kinase 2)と 14-3-30/ τ であった。今回、プロテインチップにのっていた約 80 の *p53* 関連タンパク質に関して、遺伝子発現変化と同様に、大きく発現変化したものはリストされなかった。むしろ、DR4, TGF- β , 14-3-3 のように DNA 損傷によって発現誘導することが知られているものが、今回は *p53* 依存的に発現抑制されていた(表 1)。まだ機能はよくわかっていなくても、*p53* 依存的に応答するものが今回リストされたものと考えられる。実際、ROCK-2 が減少することで *p53* 依存的に Notch1 遺伝子の発現が誘導することが報告されており、今回の我々の結果とも非常によく一致していたことは興味深い。

(4)終わりに

今回リストされたものは、新規の *p53* 依存的な遺伝子やタンパク質または *p53* を中心としたシグナル伝達に関与する因子であり、今後の研究でこれらリストされたものの機能解明が望まれる。

参考文献

- [1] Ohnishi, T. et al. (1996) *J. Appl. Physiol.*, 81, 183-185.
- [2] Ohnishi, T. et al. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390, 485-488.