

「きぼう」での Rad Gene 宇宙実験報告 1

-ヒト培養系における宇宙飛行後の p53 依存性遺伝子発現-

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 1: p53-Dependent gene expression in human cultured cells after spaceflight in a frozen state

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: A p53 tumor suppressor protein is generally thought to contribute to the genetic stability of cells against DNA damage through the activity of p53-centered signal transduction pathways. To clarify the effect of the space radiations on the gene 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. Frozen human lymphoblastoid cells were stored on the International Space Station (ISS) for 133 days. The gene expression was analyzed by using DNA chip (a 44k whole human genome microarray, Agilent Technologies Inc.) after culturing the space samples for 6 h on the ground after their return from space. p53-Dependent up-regulated gene expression was found for 50 genes and p53-dependent down-regulated gene expression was found for 94 genes. The biological meanings of them were discussed from an aspect of the gene function about up- and down-regulated genes by the exposure of space radiations at low doses.

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

(1)はじめに

がん関連遺伝子産物 p53 は DNA 損傷を受けた細胞の遺伝的安定性を司ると考えられており、宇宙実験において p53 を中心としたシグナル伝達経路は有効な知見を提供するであろう。これまでに、我々は宇宙飛行したラットの皮膚[1]や筋肉[2,3]に p53 が蓄積していることを見いだしている。今回、2008 年末から実施された Rad Gene 宇宙実験において、凍結細胞における宇宙放射線の影響を p53 調節遺伝子群の発現から解析することを提案した [4]。

(2)飛行中凍結細胞を地上で解凍し、培養した細胞で p53 依存性形質発現誘導された遺伝子群

133 日間凍結状態で宇宙飛行したヒト細胞を、帰還後 6 時間培養した後、RNA を抽出した。DNA チップ(a 44k whole human genome microarray, Agilent Technologies Inc.)を用いて、遺伝子発現量を測定した(表 1 と 2)(投稿中)。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 50 の遺伝子を表 1 にリストした。一方、変異型 p53 細胞に比べ、正常型 p53 細胞で半分以下に発現が抑えられた 94 の遺伝子を表 2 にリストした。これらリストされた遺伝子数は DNA チップにのっていた 41,000 種の遺伝子のうち、0.35%の頻度を示した。この実験にお

いて、凍結状態で宇宙飛行しているので微小重力や打上げおよび帰還時の加重力の影響は無視することができ、133 日間の宇宙飛行時に被曝した 71.2 mSv[5]の宇宙放射線の影響のみが遺伝子発現変化に影響しているものと考えられる。

地上研究で p53 を中心としたシグナル伝達が放射線・紫外線・温熱・低温・酸化ストレス・低 pH で誘導されることも分かっている[4]。p53 はアポトーシス、細胞周期停止、DNA 修復促進などにはたらいて、遺伝子の不安定さ、すなわち染色体異常、突然変異さらにはがん化などを抑えることにつながる。p53 が遺伝子の守護神と呼ばれる由縁である。p53 は遺伝子上流に結合して形質発現を調節する。それらの遺伝子群を p53 関連遺伝子と呼んでいる。p53 を中心としたシグナル伝達は細胞をがん化から守ろうとしているので、宇宙環境での p53 蓄積は大いに興味を持たれてきた。このプロジェクトの採択理由でもあった。それにはアポトーシス関連遺伝子[AIF (apoptosis inducing-factor), Apaf1 (apoptosis protease activator protein-1), Bax (Bcl-2 associated x protein), DR4 (death receptor 4), DR5 (death receptor 5), PERP (p53 apoptosis effector related to PMP-22), PIDD (TP53-induced death-domain-containing protein), PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis), p53DINP1

表 1. 宇宙飛行後の *p53* 依存性発現誘導遺伝子

No	Gene symbol	Ratio	No	Gene symbol	Ratio	No	Gene symbol	Ratio	No	Gene symbol	Ratio
1	HSPA6	10.56	14	THC2766373	2.59	27	HSP90AB1	2.29	40	CXCL9	2.10
2	IL7R	4.60	15	A_24_P585660	2.57	28	ENST00000390258	2.26	41	ENST00000360548	2.09
3	HSPA1A	4.02	16	ASPH	2.55	29	TNFSF10	2.24	42	AK023645	2.08
4	SYT4	3.46	17	A_24_P560332	2.54	30	HSP90AB3P	2.21	43	CEBPA	2.08
5	LOC730211	3.20	18	SLC24A3	2.53	31	FAM90A1	2.21	44	IL18BP	2.08
6	LOC85391	3.17	19	A_24_P631625	2.44	32	UCN2	2.21	45	POP1	2.06
7	FAM90A9	3.04	20	SCEL	2.41	33	S78SIA2	2.19	46	AI015919	2.05
8	HSP90AA1	2.96	21	AK090827	2.38	34	KIAA0319L	2.16	47	CLGN	2.05
9	KCNQ1	2.95	22	ZNF205	2.36	35	THC2563387	2.16	48	THC2543840	2.03
10	LATS2	2.92	23	ENST00000378770	2.34	36	MUM1	2.16	49	KCNG4	2.02
11	LOC727891	2.81	24	XAF1	2.34	37	BC036435	2.15	50	GPR171	2.00
12	EDN1	2.80	25	PTPRE	2.29	38	LAMP3	2.14			
13	CSF2	2.72	26	CXCL11	2.29	39	AF007192	2.14			

表 2. 宇宙飛行後の *p53* 依存性発現抑制遺伝子

No	Gene symbol	Ratio	No	Gene symbol	Ratio	No	Gene symbol	Ratio	No	Gene symbol	Ratio
1	TMPRSS6	0.12	25	GRIN2C	0.34	49	MTTP	0.40	73	ACP2	0.47
2	AF234262	0.13	26	OR2B6	0.34	50	MAOA	0.40	74	RREB1	0.47
3	RP4-621O15.2	0.13	27	LOC126536	0.34	51	BX116163	0.40	75	A_32_P38806	0.48
4	FGFR2	0.18	28	TLX2	0.34	52	ASGR1	0.41	76	IFT80	0.48
5	DNASE1	0.19	29	CD44	0.34	53	AK123107	0.41	77	XRN1	0.48
6	THC2669078	0.20	30	H2AFB2	0.34	54	A_24_P932220	0.41	78	THC2742226	0.48
7	IRX6	0.20	31	A_32_PT1171	0.35	55	PRKCZ	0.42	79	STC2	0.48
8	LOC338328	0.21	32	GDF15	0.35	56	AK022339	0.42	80	ENST00000372493	0.49
9	GALNACT-2	0.22	33	HSFX1	0.35	57	THC2617584	0.43	81	THC2733296	0.49
10	AF217970	0.22	34	THC2649341	0.36	58	AOC3	0.43	82	LOC647500	0.49
11	BX100437	0.22	35	BI913527	0.36	59	MYO6B	0.43	83	BBC3	0.49
12	CES7	0.24	36	AVIL	0.36	60	SEC61A2	0.43	84	BC042026	0.49
13	KLHDC8B	0.25	37	LOC497190	0.36	61	CHAC1	0.44	85	LOC55565	0.49
14	FUT1	0.27	38	CBLN3	0.37	62	HAMP	0.44	86	ICAM3	0.49
15	ADMR	0.28	39	AF283771	0.38	63	BEB35321	0.45	87	BC021677	0.49
16	THC2717023	0.28	40	THC2520867	0.38	64	C10orf38	0.45	88	C10orf10	0.49
17	PRKCQ	0.28	41	AF318328	0.38	65	MGC4655	0.45	89	ZNF66	0.49
18	SH2D3C	0.29	42	DDIT3	0.38	66	LOC402573	0.45	90	MBD2	0.49
19	TRIM7	0.29	43	ZDHHC11	0.38	67	IGHD	0.46	91	TAGLN	0.50
20	TNFAIP2	0.29	44	GRB10	0.39	68	TSC22D3	0.46	92	SESN2	0.50
21	C9orf167	0.30	45	CYP2E1	0.39	69	KIAA1324L	0.47	93	MTF1	0.50
22	SLFN1	0.32	46	BE716310	0.39	70	TNFRSF17	0.47	94	TTYH2	0.50
23	INHBE	0.32	47	TXLNB	0.39	71	THC2550463	0.47			
24	CB250445	0.32	48	A_23_P158868	0.40	72	DYNLRB2	0.47			

(*p53*-dependent damage- inducible nuclear protein 1)], 細胞周期調節関連遺伝子群 [*Cdkn1a* (formerly known as *Waf1*), *cyclin D*, *cyclin G*, *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen), *PTEN* (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10), *RB* (retinoblastoma gene product), 14-3-3 sigma], DNA 修復関連遺伝子群 [*Msh2* (mismatch repair protein MutS homolog 2), *p53R2* (*p53*-inducible ribonucleotide reductase small subunit)], *p53* 調節遺伝子 [*Hdm2* (human homolog of *Mdm2*)]などが含まれている。今回の遺伝子発現変化で見ると、*p53* およびこれらの *p53* 関連遺伝子群に関しては誘導も抑制もされていなかった。まだ機能はよくわかっていないが、*p53* 依存的に宇宙放射線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、上記の遺伝子群とは別にヒートショックタンパク質(HSPs)の *HSPA6*, *HSPA1A*, *HSP90AA1*, *HSP90AB1*, *HSP90AB3P* が *p53* 依存性に発現誘導していた(表 1)。我々は宇宙飛行した金魚の筋肉・皮膚・脾臓で *HSP70* の蓄積を観察している[6]。また、宇宙飛行したヒトの白血球で *HSP27* 遺伝子が増加することと、*HSP* の発現が正常型 *p53* に転写調節されている報告と一致していた。*HSP* はタンパク質の守護神としてはたらいっていることが知られている。

また、宇宙放射線で *CD44* 遺伝子が *p53* 依存性に抑制された。宇宙飛行したマウスの骨髄細胞で *CD44* 遺伝子の減少と、*CD44* の遺伝子発現が正常型 *p53* によって抑制されている報告と一致していた(表 2)。

(3)終わりに

我々は宇宙飛行した細胞からゲノムの守護神である *p53* の蓄積を認めることはできなかった。これまでの動物での報告と異なる結果となった主な原因として、細胞培養系と個体との違いが考えられた。動物では宇宙放射線や微小重力の影響以外にも打上げや帰還時の加重力、狭い飼育環境での心理的ストレスなどが複合的に影響していたのかもしれない。

参考文献

- [1] Ohnishi, T. et al. (1996) *J. Appl. Physiol.*, 81, 183-185.
- [2] Ohnishi, T. et al. (1999) *Mutat. Res.*, 430, 271-274.
- [3] Ohnishi, T. et al. (2000) *Adv. Space Res.*, 25, 2119-2122.
- [4] Ohnishi, T. et al. (2009) *Biol. Sci. Space*, 23, 3-10.
- [5] Ohnishi, T. et al. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390, 485-488.
- [6] Ohnishi, T. et al. (1998) *Adv. Space Res.*, 21, 1077-1080.