

ISS 実験：突然変異の検出と適応応答の検証

理化学研究所(RIKEN): 谷田貝文夫, 榎本秀一, 堂前直

国立医薬品食品衛生研究所: 本間正充, 鶴飼明子

宇宙航空研究開発機構(JAXA): 大森克徳, 石岡憲昭

An ISS Experiment : Mutation Induction and Radioadaptive Response

Fumio Yatagai, Shuichi Enomoto, and Naoshi Domae

RIKEN Institute, Wako-shi, Saitama 351-0198

Masamitsu Honma and Akiko Ukai

National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501

Katsunori Omori and Noriaki Ishioka

Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA), Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8505

Abstract: An experiment was successfully conducted at 'Kibo' module of International Space Station (ISS) from November 14, 2008 to March 28, 2009. In this research project, a focus was made on biological effects of high-radiation background among various factors of space environments. Human lymphoblastoid TK6 cells were frozen and sent to ISS and finally brought back to earth; mainly preserved as frozen in ISS and receiving a total 72 mSv. In addition, we tried to elucidate influences of microgravity on such radiation effects by incubating them at 37°C under μ G or 1G for 8 days and then refreezing them in ISS. The mutational assays for the non-incubated flight-cells demonstrated the following effects: i) ~2.3-fold induction of thymidine kinase-deficient (TK⁻) mutations over the level of ground-control cell, ii) a suppression (~56%) of TK⁻ mutations, induced by a challenging dose of 2 Gy X-rays and iii) a more efficient repair of DNA double-strand breaks created by I-SceI expression (~1.9- and ~1.8-fold due to non-homologous end joining and homologous recombination, respectively). The characterization (LOH analysis) of the TK⁻ mutants obtained in the above assays also supports the possibility that frozen cells can record damage accumulated during space travel and subsequently express the genetic and cellular responses when grown on earth. The preliminary results on the microgravity effects, estimated from the mutation induction in the incubated flight-cells, are briefly introduced here.

Key words; space radiation, microgravity, human cells, mutation induction, radioadaptive response

人類にとって、宇宙環境は地上の環境と大きく異なる。宇宙環境は、微小重力によって象徴されるが、地表よりも100倍以上も高いと考えられる「高放射線バックグラウンド」も見逃してはならない。今回の国際宇宙ステーション(ISS)利用実験では、凍結状態のヒトリンパ芽球TK6細胞をスペースシャトルで打ち上げ、ISSのきぼう棟内のフリーザー-MELFIに保管した(図1)¹⁾。従って、全134日間の宇宙フライトの殆ど全ての期間、MELFIに凍結保存したことになる。細胞の被ばく線量は、細胞試料と同じ位置にセットした、PADLES(CR39/TLD-MSO)で測定したところ、1日あたりの平均で0.54mSv、合計で72mSvであった²⁾。

細胞を地上に回収してから、培養によって誘発されるTK変異体の遺伝解析を行えば、重力影響を含まない、低線量の宇宙放射線の遺伝的影響を推測することが可能と考えられる。実際に、今回のフライト細胞の早期TK変異誘発率(薬剤を加えて2週間

後に変異体の判定)を測定したところ、地上に保存しておいたコントロール細胞の場合よりも、およそ2.3倍高い値を示した。地上コントロール細胞の変異誘発率は、加速炭素イオン(100 mGy)をTK6凍結細胞に照射した実験の際の非照射コントロール細胞の値と非常によく一致しており³⁾、今回の測定に対する信頼度が高まった。次に、ここで得られた早期TK変異体のLOH(Loss of Heterozygosity)解析を行った結果の概略を表1に示した。

表1 早期TK(-)変異誘発の相対頻度 (1.0 : 0.8 X 10⁻⁶)

Sample	Non LOH (Point Mutation)	Hemi. LOH (Deletion)	Homo. LOH (Recombination)	Total
Ground	0.82	0.18 (0.06)***	0.06**	1.0
Flight	1.63	0.62 (0.34)*	0.06	2.3

* Large deletion (deleted region is beyond the TK locus)

** A deletion/Recombination is counted in both types of LOH.

表1では、欠失領域がTK遺伝子座を超え、隣接する染色体領域に及んでいる' Large Deletion' がフライト試料で高頻度に誘発されることがわかる。以上の結果から、突然変異の量的比較だけではなく、質的な比較からも、宇宙放射線による生物影響を突然変異の誘発として検出できたことが強く示唆される。

ここで用いた変異誘発系は、放射線適応応答の検出にも利用できる。X線(50mGy)-6 hr培養-X線(2Gy)という適応応答条件下では、TK変異誘発率は50mGyの予備照射をしない場合の62%程度までに低下する、すなわち変異誘発の抑制が起こる⁴⁾。そこで、宇宙フライト中の放射線被ばくが適応応答の予備照射に相当すると仮定して、上記の変異誘発測定用と全く同じ凍結細胞に、6時間培養後、X線2Gyを照射した。地上コントロール細胞の2Gy照射の場合と比較すると、フライト細胞のTK変異誘発率は地上コントロールの場合のおよそ56%のレベルに低下した。上記の地上実験と類似した結果が得られたことから、私たちの仮説は妥当と考えられる。

さらに、上記の適応応答実験で、X線2Gy照射のところを、プラスミドベクター感染によって制限酵素I-SceIを発現させ、染色体の特定部位にDNA2重鎖切断(DSB)を導入し、DSBの修復効率の測定を試みた⁵⁾。地上コントロール細胞の場合と比較して、DSBの修復効率が非同末端結合による修復経路では、およそ1.9倍、相同組換え経路による場合では、およそ1.8倍高い値を示した。この結果は50mGyの加速炭素イオンを予め照射した場合のDSB修復効率の上昇傾向とも類似している。すなわち、凍結細胞は宇宙放射線の被ばくを、積算して記録することができ、その後ストレスを受けると適応応答を発現する可能性のあることが示唆された。

また、きぼう棟内で、凍結細胞を解凍して1Gあるいは μ Gで培養し、再凍結して地上に持ち帰った

細胞を用いて同様のアッセイをすると、 μ Gで培養した方が1Gで培養した場合に比べて、細胞分裂可能な細胞数はおよそ50%に、TK変異誘発率はおよそ60%に低下した。現在、LOH解析も含めて、さらに解析を進めている。フライト細胞では、宇宙滞在中に生じた修復困難なDNA損傷が変異誘発を起こさずに致死に繋がる可能性が高くなると推測されるが、結論づけるには時期尚早である。今後、DSBやDNA塩基損傷の修復における低重力効果を直接測定する宇宙実験を行うことが強く望まれる。

このような細胞レベルでDNA損傷を検出し、なおかつ、その生物学的応答を測定することは、放射線を含めて様々な宇宙環境因子による生物影響のより正確な推測に寄与するものと確信している。

参考文献

- 1) Yatagai, F., Takahashi, A., Honma, H., Suzuki, H., Omori, K., Seki, M., Hashizume, T., Shimazu, T., Enomoto, S., Ohnishi, T., and Ishioka, N. LOH analyses for biological effects of space radiation: Human cell culture in "Kibo" of International Space Station. *Biol. Sci. Space*, 23, 11-16 (2009).
- 2) JDX-2009905 http://idb.exst.jaxa.jp/db_data/padles/S001.php?locale=ja
- 3) Umebayashi, Y., Honma, M., Abe, T., Ryuto, H., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., and Yatagai, F. Mutation induction after low-dose carbon-ion beam irradiation of frozen human cultured cells. *Biol. Sci. Space*, 19, 237-241 (2005).
- 4) Yatagai, F., Umebayashi, Y., Honma, M., Sugawara, K., Takayama, Y., and Hanaoka, F.: Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res.*, 638, 48-55 (2008).
- 5) Yatagai, F., Suzuki, M., Ishioka, N., Ohmori, H., and Honma, M., "Repair of I-SceI Induced DSB at a specific site of chromosome in human cells: Influence of low-dose, low-dose-rate gamma-rays", *Radiat. Environ. Biophys.* 47, 439-444 (2008).

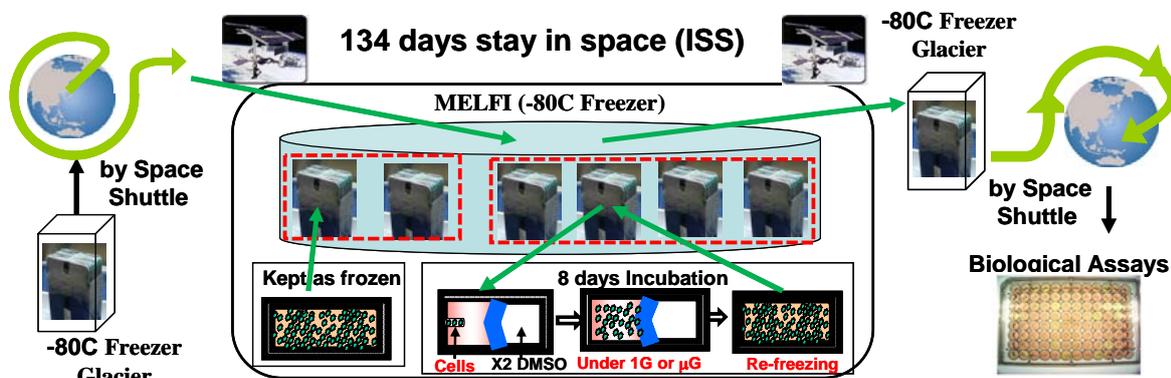


図1 ISS実験の概略(本文参照)