



ISSN 1349-113X
JAXA-SP-05-039

宇宙航空研究開発機構特別資料

JAXA Special Publication

平成17年度 ISS科学プロジェクト室
放射線生物研究プロジェクト 研究開発報告

ISS科学プロジェクト室 放射線生物研究チーム

2006年3月

宇宙航空研究開発機構

Japan Aerospace Exploration Agency

序 文

宇宙放射線により DNA や細胞のレベルで影響を受けることが過去の宇宙実験から示唆されており、ヒトが長期にわたって宇宙に滞在するためには、放射線のリスクを正しく評価することが不可欠である。今後の宇宙利用発展に向けた基盤的有人技術開発への貢献や新しい科学的知見の獲得を目指し、放射線生物研究プロジェクトとして以下の課題を実施している。

(1) ヒトが長期間滞在する宇宙ステーションでは、地上では経験のない微小重力環境や人体に大きな影響を与える高エネルギー粒子線を低線量ながら被曝することになる。そこで、遺伝的安定性への影響を細胞の遺伝的安定性をつかさどると考えられる癌関連遺伝子産物 p53 や p53 調節遺伝子群の発現を解析する。

本年度は、国際宇宙ステーション内の予想被曝線量（約 0.2 ～ 0.5 mSv/day）においても形質発現が変動する遺伝子があることを明らかにした。

(2) 低線領域での染色体レベルの突然変異を高感度に検出し、かつ自然発生のもものと区別することができる高感度検出法（LOH 検出法）を開発した。この方法で宇宙放射線に暴露されたヒトリンパ芽球様細胞の突然変異を検出する。

本年度は、ヒトリンパ芽球細胞 TK 6 を用いた LOH（Loss of Heterozygosity：ヘテロ接合性の喪失）解析システムが、期待通りに有効であることを示唆する実験結果が得られた。

(3) カイコ卵を宇宙ステーション内に滞在させ、卵滞在期間に伴う被曝線量増加と奇形発生率および胚形成期における形態学的影響や幼虫から蛹への変態期におけるアポトーシス関連遺伝子発現への影響などの生体反応との相関関係を求める。

本年度は、カイコの卵への重粒子線照射の影響を個体レベルでの形質発現と分子レベルでの遺伝子発現において検出できることを示した。

放射線生物研究プロジェクトチーム

大西 武雄 奈良県立医科大学生物化学教室,
宇宙航空研究開発機構プロジェクト共同研究員
谷田貝文夫 理化学研究所先端技術開発支援センター,
宇宙航空研究開発機構プロジェクト研究員
古澤 壽治 京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学教育研究センター,
宇宙航空研究開発機構プロジェクト研究員
石岡 憲昭 宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究本部宇宙環境利用科学研究系,
ISS 科学プロジェクト室

ほ乳動物培養細胞における宇宙環境曝露後の *p53* 調節遺伝子群の遺伝子発現

大西 武雄

Gene expression of *p53*-regulated genes after exposure to space environment in mammalian cultured cells

By

Takeo OHNISHI

Abstract: To identify the biological effect of low dose-rate irradiation, we analyzed the gene expression using DNA micro array. Human cultured lymphoblastoid cells TK-6 were irradiated with γ -ray (dose-rate, 0.2 or 0.5 mGy/day; irradiation time, 5 days) in flask or tube bag. As results, we demonstrated that there were many kinds of genes which expressed different levels by expected doses (0.2 ~ 0.5 mSv/day) at ISS.

Keywords: space radiations, low dose, low dose-rate, heavy-ion particle, LET, microgravity, *p53*, gene expression

概 要

DNA マイクロアレイによる 10,368 個の遺伝子の発現解析を行うことで、宇宙放射線特有の低線量、低線量率放射線の発現誘導または抑制される遺伝子を網羅的に解析するとともに、ほ乳動物細胞の培養条件および凍結の影響についてもあわせて解析を行った。その結果、国際宇宙ステーション内の予想被曝線量（約 0.2 ~ 0.5 mSv/day）においても形質発現が変動する遺伝子があることが明らかになった。

1. はじめに

国際宇宙ステーション内の被曝線量は約 0.2 ~ 0.5 mSv/day と概算されている。本国際公募選定テーマの培養期間が最大でも 2 週間で、7 mSv と低線量、低線量率被曝環境である。昨年度、浮遊細胞 TK-6 を京都大学放射線生物研究センターにおいて、低線量、低線量率照射設備（0.2, 0.5 mGy/day）で通常のフラスコおよび宇宙実験で使用予定の培養容器（チューブ培養）で 5 日間照射した細胞から、mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイで調べた遺伝子発現プロファイルについて解析する。また、同時に凍結保存の影響を明らかにすることも目的とした。

2. 成果の概要

2.1. 低線量被曝による遺伝子発現プロファイルの解析

2.1.1. 材料および方法

- (1) ほ乳動物培養細胞：ヒトリンパ芽球系浮遊細胞 TK 6（正常型 *p53* 保有）を 5×10^3 cells/ml 播種し、実験に用いた。
- (2) 低線量率放射線照射：京都大学放射線生物研究センター低線量、低線量率照射設備（ ^{137}Cs 線源, 37 GBq, 5 mm Pb filter）を用い、4.9 m, 6.85 m, 10.88 m の距離で、それぞれ、1.0826 mGy/day, 0.5490 mGy/day, 0.2244 mGy/day の

条件で5日間照射した。

(3) 実験群：

(a) フラスコ培養：照射後，凍結せずに解析した。

(b) チューブ培養：照射後，凍結せずに解析した。

(c) 凍結チューブ培養：照射後，遅い条件で凍結（発泡スチロール4.2 cm厚，プロパノールバッグ0.5 cm厚で -80°C フリーザーで冷凍）し4週間凍結保存した後，解析した。

(4) 細胞数の測定：回収した細胞の一部をメチルブルー溶液による色素排除法により，生細胞および死細胞数をカウントした。

(5) total RNA の抽出：細胞を回収し，Miniprep System（VIOGENE社製）によりtotal RNAを抽出した。

(6) mRNA の標識：AminoAllyl MessageAmpTM aRNA kit（Ambion社製）によりmRNAをCy3およびCy5標識した。

(7) DNA マイクロアレイ：AceGene10 K（Takara社製）によるDNAマイクロアレイを実施した。

(8) 画像の取り込み：ScanArray（PerkinElmer, Inc.）により画像の取り込みをした。

(9) 解析：DNASIS Pro（Hitachi soft社製）により1.5倍以上の増減について解析をした。

2.1.2. 結果

低線量被曝による10,368個の遺伝子発現プロファイルについて，通常のフラスコ培養の非照射群をコントロールとして比較検討した結果，フラスコ培養およびチューブ培養では照射により2倍以上の遺伝子発現が増減したものはなかった。一方，凍結により，1個の遺伝子発現が増加し，34個の遺伝子発現が低下した。また，放射線照射後，凍結により，97個の遺伝子発現が低下した。

次に，フラスコ培養，チューブ培養および凍結チューブ培養下，非照射群に対する照射群の発現レベルを解析した結果を図1に示す。1.5倍以上の増減ラインを点線で示し，そのラインを超えた遺伝子数について図2にまとめた。

0.2 mGy/dayで5日間照射による発現増加遺伝子は，フラスコとチューブ培養共通のAlpha tubulin，フラスコと凍結チューブ培養共通のlactate dehydrogenase b; ldhb，チューブと凍結チューブ培養共通のzinc finger protein 9; znf9, p21-activated protein kinase 6; pak6, hypothetical protein; cgi-57, GAPDH, arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein; alox5 ap, phosphate carrier precursor isoform 1 a; slc25a3であった。0.5 mGy/dayで5日間照射による発現増加遺伝子は，フラスコとチューブ培養共通のhypothetical protein flj10079; flj10079, Alpha tubulin, beta-2-microglobulin; b2 m, ferritin, light polypeptide; ftl, GAPDH, tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation proteinであった。

0.2 mGy/dayで5日間照射による発現減少遺伝子は，全ての培養共通のhousekeeping gene replicat1: ubiquitin, podocin; nphs2, フラスコとチューブ培養共通のcalcium channel voltage-dependent alpha 1 h subunit; cacna 1 h, フラスコと凍結チューブ培養共通のactin related protein 2/3 complex, subunit 1 b (41 kd); arpc1 b, ancient ubiquitous protein 1; aup1, atp synthase, h⁺ transporting, mitochondrial f0 complex, subunit b, isoform 1; atp5 f1,

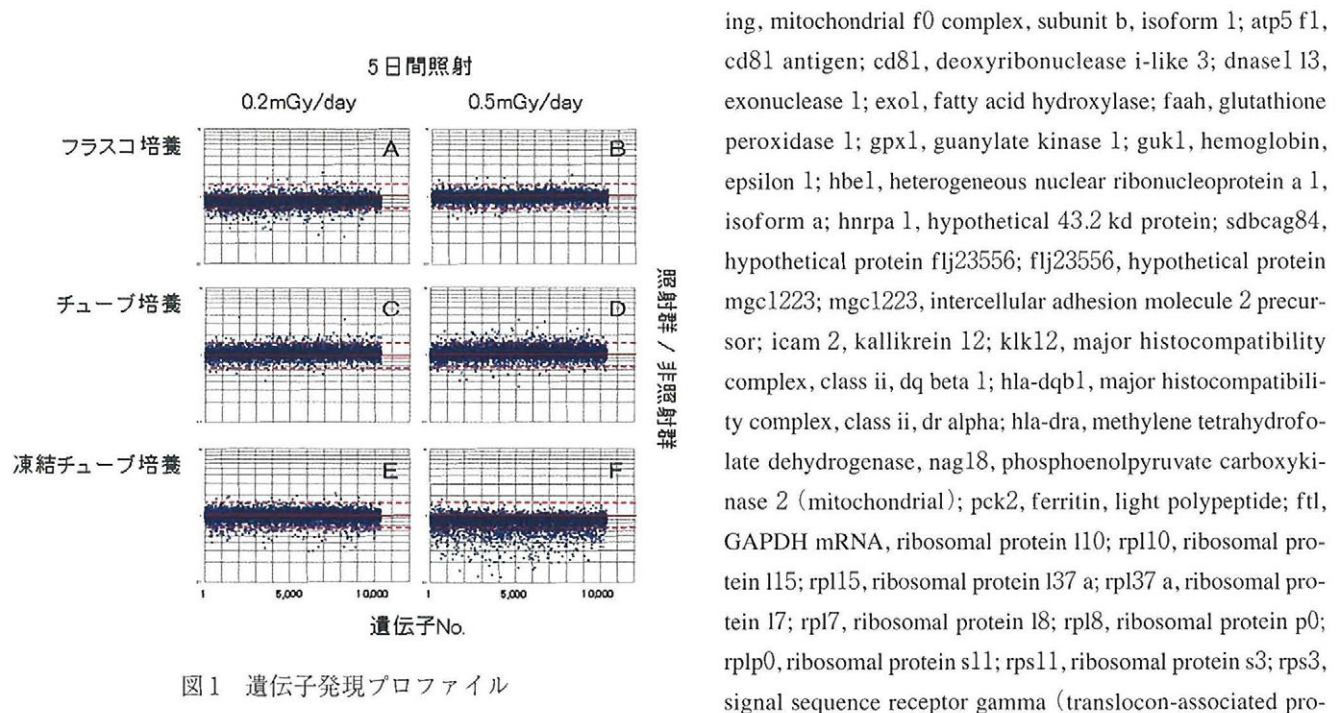


図1 遺伝子発現プロファイル

cd81 antigen; cd81, deoxyribonuclease i-like 3; dnase1 l3, exonuclease 1; exo1, fatty acid hydroxylase; faah, glutathione peroxidase 1; gpx1, guanylate kinase 1; guk1, hemoglobin, epsilon 1; hbe1, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a 1, isoform a; hnrpa 1, hypothetical 43.2 kd protein; sdbcag84, hypothetical protein flj23556; flj23556, hypothetical protein mgc1223; mgc1223, intercellular adhesion molecule 2 precursor; icam 2, kallikrein 12; klk12, major histocompatibility complex, class ii, dq beta 1; hla-dqb1, major histocompatibility complex, class ii, dr alpha; hla-dra, methylene tetrahydrofolate dehydrogenase, nag18, phosphoenolpyruvate carboxylase 2 (mitochondrial); pck2, ferritin, light polypeptide; ftl, GAPDH mRNA, ribosomal protein l10; rpl10, ribosomal protein l15; rpl15, ribosomal protein l37 a; rpl37 a, ribosomal protein 17; rpl7, ribosomal protein l8; rpl8, ribosomal protein p0; rplp0, ribosomal protein s11; rps11, ribosomal protein s3; rps3, signal sequence receptor gamma (translocon-associated pro-

tein gamma); *ssr3*, stress-associated endoplasmic reticulum protein 1; ribosome asso; *serp1*, zinc finger protein 84 (*hpf2*); *znf84*, チューブと凍結チューブ培養共通の *atp synthase*, h^+ transporting, mitochondrial *f0* complex, subunit d; *atp5 h*, *atp synthase*, h^+ transporting, mitochondrial *f1* complex, α subunit, isoform 1, *atp5 a 1*, ribosomal protein *l31*; *rpl31*, ribosomal protein *s14*; *rps14*, ribosomal protein *s16*; *rps16*, *sec23* homolog a; *sec23 a*, similar to ribosomal protein *l26* (*h. sapiens*); *loc136816*であった。0.5 mGy/day で5日間照射による発現減少遺伝子は、全ての培養共通の ribosomal protein *l31*; *rpl31*, フラスコとチューブ培養共通の putative chemokine receptor; gtp-binding protein; *hm 74*, フラスコと凍結チューブ培養共通の activating transcription factor 4; *atf4*, apex nuclease (multi-functional DNA repair enzyme); apex, asparagine synthetase; *asns*, beta-2-microglobulin; *b2 m*, *cd48* antigen; *cd48*, *cgi-86* protein; *loc51635*, cytochrome c oxidase subunit iv isoform 1 precursor; *cox4 i1*, eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta, 38 kd); *eif2 s2*, eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 (beta, 36 kd); *eif3 s2*, *gnas* complex locus; *gnas*, hypothetical protein *flj20552*; *flj20552*, hypothetical protein *flj22612*; *flj22612*, lysozyme precursor; *lyz*, mitochondrial ribosomal protein *l4*; *mrpl4*, myosin regulatory light chain; *mlc-b*, phosphogluconate dehydrogenase; *pgd*, beta-2-microglobulin; *b2 m*, GAPDH mRNA, proteoglycan 1, secretory granule; *prg1*, ras-related nuclear protein; *ran*, ribosomal protein *l10*; *rpl10*, ribosomal protein *l32*; *rpl32*, ribosomal protein *p1*; *rplp1*, ribosomal protein *s20*; *rps20*, signal peptidase complex (18 kd); *spc18*, similar to ferritin heavy chain; *loc138855*, zinc finger protein 84 (*hpf2*); *znf84*であった。

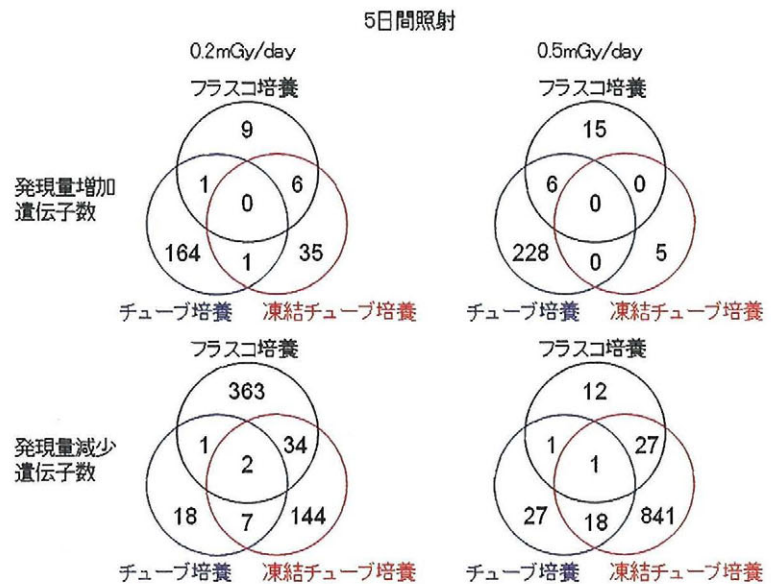


図2 遺伝子発現マトリクス

3. ま と め

国際宇宙ステーション内の予想被曝線量(約0.2~0.5 mSv/day)においても変動する遺伝子が多数あることが明らかになった。今後、低線量放射線照射による遺伝子発現量変化の著しい既知の遺伝子についてLightCyclerを用いたリアルタイム定量PCR法RT-PCR法を行って、実際の遺伝子発現変化を確認することを計画している。また、本提案のテーマにおいて、high qualityのmRNAおよびタンパク質を安定して抽出し、解析することが必須である。しかしながら、ISSの限られた装置の改善は困難なため、我々の細胞容器を工夫することで解決することが求められている。そこで、37°Cから4°Cまでの温度間をできるだけ迅速に冷やすこと、MELFIで凍結場所の違いによる細胞影響を軽減させることを目的に、熱伝導性の高い細胞容器を開発する。また、その細胞容器に合わせた細胞バッグを試作する。さらに、これまでに細胞容器や細胞バッグおよびアッセイ系など、当初の計画からの変更点も数多いことから、国際宇宙ステーションにおける実験フローを確認し、実験実施の問題点の有無を明らかにしていく。

成 果 発 表

- [1] Takahashi, A., H. Matsumoto, Y. Furusawa, K. Ohnishi, N. Ishioka & T. Ohnishi: Apoptosis induced by high-LET radiation is not affected by cellular *p53* gene status. *Int. J. Radiat. Biol.*, 81: 581-586, 2005.
- [2] Takahashi, A., T. Kumatani, S. Usui, R. Tsujimura, T. Seki, K. Morimoto & T. Ohnishi: Photoreactivation in *Paramecium tetraurelia* under conditions of various degrees of ozone layer depletion. *Photochem. Photobiol.*, 81: 1010-1014, 2005.
- [3] Imai, Y., K. Ohnishi, J.-I. Yasumoto, A. Kajiwara, N. Yamakawa, A. Takahashi, T. Ohnishi, & T. Kirita: Glycerol enhances radiosensitivity in a human oral squamous cell carcinoma cell line (Ca 9-22) bearing a mutant *p53* gene via Bax-mediated induction of apoptosis. *Oral Oncology*, 41: 631-636, 2005.
- [4] Masunaga, S., H. Nagasawa, Y. Uto, H. Hori, K. Ohnishi, A. Takahashi, T. Ohnishi, M. Suzuki, K. Nagata, Y. Kinashi, & K. Ono:

- Combination of the antivasular agent ZD 6126 with hypoxic cytotoxin treatment, with reference to the effect on quiescent tumor cells and the dependency on *p53* status of tumor cells. *Oncol. Reports*, 14: 393–400, 2005.
- [5] Ohnishi, T.: The role of the *p53* molecule in cancer therapies. *J. Cancer Res. Ther.*, in press, 2006.
- [6] Takahashi, A. & T. Ohnishi: Does γ H 2 AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett*, 229: 171–179, 2005.
- [7] 高橋昭久・大西武雄：温熱による細胞死と DNA 二本鎖切断．放射線生物研究，40: 136–147, 2005.
- [8] 大西武雄・高橋昭久：宇宙放射線の生物影響研究の意義：宇宙放射線と微小重力の相互作用に関する研究の新たな展開．日本マイクログラビティ応用学会誌，22: 151–154, 2005.
- [9] 大西武雄・高橋昭久：太陽・地球・生命—宇宙実験から知りえたもの—宇宙空間での防菌・防黴を考える—．防菌・防黴，33: 531–541, 2005.
- [10] 高橋昭久・大西武雄：重粒子がん治療における基礎研究のねらい．放射線生物研究，2006．印刷中．
- [11] 大西武雄：細胞周期，突然変異，細胞死を計る．計る百科，丸善，東京，2006．印刷中．

ヒト培養細胞における TK 変異体の LOH パターン変化の検出

谷田貝文夫

LOH Analysis for TK mutants in Human Cultured Cell

By

Fumio YATAGAI

Abstract: For estimating the genetic effects of space environmental radiation in this research project, we plan to preserve the human cultured cells as frozen status for a long period in International Space Station (ISS), and further incubate and re-freeze in need during such stay. The preparation experiments on the ground can be classified into two types. One of them is to establish the methodologies how to prepare the cell sample, for example, freezing before the flight mission, incubation and re-freezing in ISS. Another is to develop the sensitive mutation-detection system, which is effective for low-dose and low-dose-rate space environmental radiation. Here, we would like to introduce our current progresses in the above experiments, using human lymphoblastoid TK 6 cell and the loss of heterozygosity (LOH) analysis system.

Keywords: ISS, Space Environmental Radiation, TK 6 cell, LOH

概 要

本研究では、宇宙放射線の遺伝的影響を検出するために、ヒト培養細胞を凍結状態で長期間、国際宇宙ステーションに滞在させるとともに、その期間中に細胞を培養し、再凍結することを計画している。その地上準備研究は大別すると、2つに分けられる。ひとつは、細胞の凍結、解凍、培養、再凍結の一連の過程を、実際に国際宇宙ステーションで行える実験系として確立することである。もうひとつは、実際の宇宙空間で予測される低線量かつ低線量率放射線被ばくによる健康影響の推測に有効な遺伝的影響検出系を確立し、模擬実験系で実証していくことである。このような意図のもとに準備研究を進めたところ、ヒトリンパ芽球細胞 TK 6 を用いた LOH (Loss of Heterozygosity : ヘテロ接合性の喪失) 解析システムが、期待通りに有効であることを示唆する実験結果が得られたので、このことを報告する。

は じ め に

宇宙空間においては、これまで人類が体験したこともない低線量・低線量率の宇宙環境放射線による被ばくの危険性が考えられる。宇宙環境放射線の直接的な照射効果による染色体 DNA 損傷はもとより、生体の代謝の過程でも起こる自然発生的内在性の DNA 損傷などによって、果たして、宇宙環境下ではどのような遺伝的影響が生ずるのであろうか。宇宙船内およびその周辺での船外における宇宙飛行士の活動を考慮すると、低重力による影響も併せて考慮する必要がある。すなわち、低線量の宇宙放射線だけでなく、微小重力など宇宙環境関連因子なども含めて、細胞レベルでの刺激応答を解析し、その後の遺伝的影響を高感度に検出することは重要な問題といえる。このような問題の解明、とりわけ、遺伝的影響の高感度検出を成し遂げるため、ヒト培養細胞で遺伝解析のできる LOH 変異解析システム (Loss of Heterozygosity : ヘテロ接合性の喪失)

を利用した、国際宇宙ステーションでの実験研究計画を提案した。国際宇宙ステーションなどの軌道上での実験を行うと、地上での模擬微小重力下では得られない、より正確な遺伝的影響に関する情報が得られ、長期間の宇宙滞在による宇宙飛行士などへの健康影響を推測する上で有用であると考え、このような提案に至った。まさに、人類が宇宙環境を今後も積極的にしかも安全に利用していく上で、欠かせない研究テーマと考えている。

宇宙環境下で実験を実施するにあたって、細胞を凍結した状態で保存・運搬し、さらに、ステーション内で培養・再凍結するための一連の手法を確立することが急務であると考え、地上での準備実験を行っている。いっぽう、ヒト培養細胞を利用して地上でも可能な「低線量・低線量率放射線照射条件下」で実験を行い、ここで提案している LOH 解析システムの有効性を実証するための実験も精力的に進めている。

2. 成果の概要

2.1. 国際宇宙ステーション実験のための細胞試料調整法の確立

2.1.1. 材料および方法

細胞	: ヒトリンパ芽球細胞 TK6
培養液組成	: RPMI 1640, 10%馬血清, 1%ペニシリン/ストレプトマイシン, 200 μg/ml ビルビン酸ナトリウム
培養条件	: 37°C, 5%炭酸ガス
培養容器	: 通常はフラスコ (T 25, T 75), 宇宙用は簡易型と専用バッグ (図1参照)
PE 測定	: Plating Efficiency (PE) の測定は Limiting Dilution 法 (1.6 cells/well : 96 wells dish)
変異誘発率測定	: TFT (4 ug/ml) 耐性 (4×10^4 cells/well, 詳細は次章)

2.1.2. 結果

1) 宇宙搭載用バッグ利用によるテスト実験

培養液凍結: -80°C フリーザーを利用

培養部分: 培地 9.75 ml に細胞培養液 (0.25 ml) 封入のための穴を開けておく

DMSO 部分: 培地 10 ml (DMSO 20%)

細胞の凍結: 凍結細胞 (0.25 ml, 2×10^6 /ml 相当) 注入後, BiCell 容器を利用して -80°C 凍結保存)

細胞の解凍: 温度上昇データは JAMSS から別途に報告

サンプル A: 解凍はプログラムフリーザーで約 5 時間

サンプル B: 解凍はプログラムフリーザーで約 2.5 時間

サンプル C: 37°C ホットバスに 5 分浸すことによる解凍

解凍後培養: バッグのまま培養するものを主とし, 一部を T 25 フラスコで培養して細胞濃度変化 (増殖) の経時間変化を測定 (詳細は JAMSS より別途報告) (結果 1)

再凍結: プログラムフリーザーによる培養した細胞の再凍結 (最終的には -80°C 保存)

再培養: 温浴 (上記 C の方法) による速やかな解凍後, 遠心による培地交換を行ってから再培養 (結果 2)

PE 測定と変異誘発測定: 上記再凍結直後と 3 ヶ月保存後に通常の 96 穴マイクロプレートによる測定 (結果 3)

結果 1 はじめの解凍後培養の細胞増殖は, 図 2 に示したように, プログラムフリーザーを用いる (方法 A, B) と, 温



図1 宇宙実験のための細胞調整 (簡易型と専用バッグ)

浴解凍（方法C）の場合よりも開始時点ですでに低濃度になるだけでなく、その後の増殖割合も遅くなる傾向がある。ただし、方法Aと方法Bの違いは明確ではない。また、バッグを用いたことによる影響と思われる立ち上がりまでの遅延は3つの方法に共通してみられる。

結果2 最初の凍結後解凍の場合と同様に、2度目の凍結後培養でも通常の継代培養に比べて増殖は遅れる傾向を示したが、最初の解凍方法の違いによる影響や長期の保存による影響は考えにくいものと推察された。

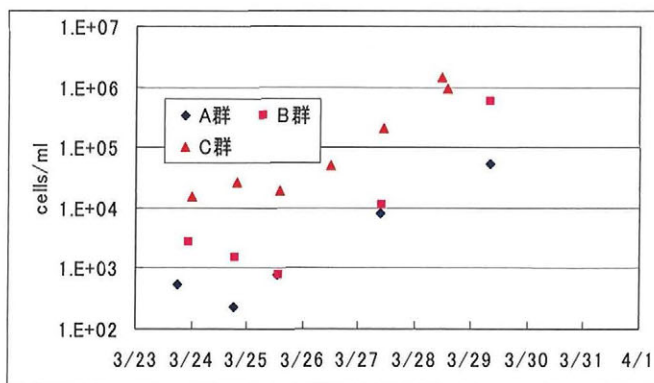


図2 解凍後の細胞数の増加

表1 再培養による細胞の増殖

直後（4日間培養）				約3ヵ月後（5日間培養）			
サンプル	開始濃度 X10(4)	増殖割合	増殖割合 (平均値)	サンプル	開始濃度 X10(4)	増殖割合	増殖割合 (平均値)
A-1	6.1	7.7	4.6	A-4	3.0	6.7	16
A-2	6.0	2.3					
A-3	7.2	3.9					
B-1	6.6	14	13	B-5	2.3	70	61
B-2	6.6	11					
B-3	7.2	13					
C-1	1.9	11	19	C-4	4.7	13	16
C-2	1.9	17					
C-3	2.9	28					

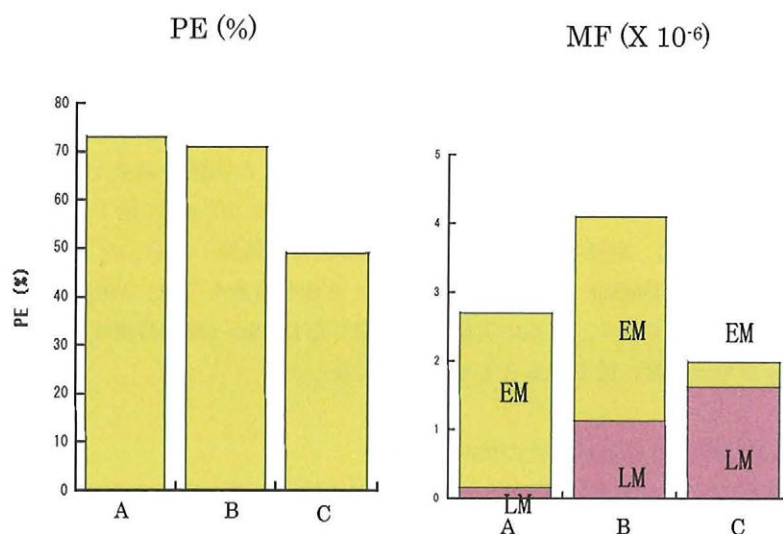


図3 再凍結直後に、再培養した細胞のPEと変異誘発（EM：早期誘発，LM：晚期誘発）

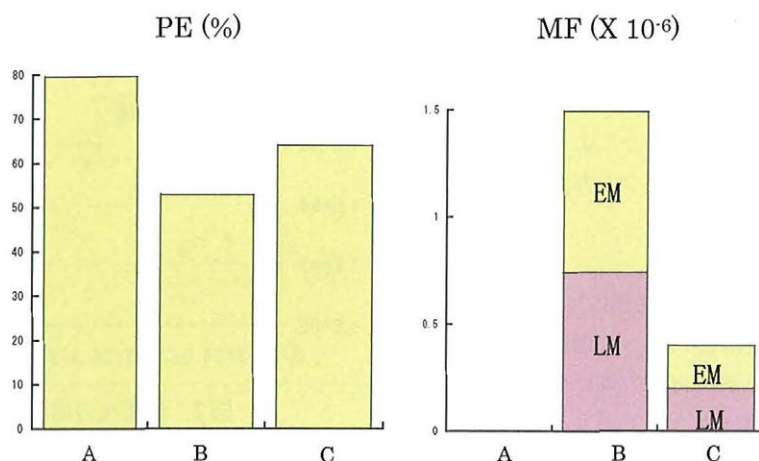


図4 再凍結して3ヶ月保存後に、再培養した細胞のPEと変異誘発 (EM：早期誘発, LM：晚期誘発)

表2 凍結時のDMSO濃度などによる cell viability への影響を調べるための実験条件

サン プル	細胞液量 (ml)	DMSO 入培地 (ml)	DMSO 終濃度 (%)	細胞終濃度 (X10 ⁵ /ml)
A-1,2	6	6 (20%)	10	5
B-1,2	6	6 (10%)	5	5
C-1,2	6	2 (40%)	10	7.5
D-1,2	6	2 (20%)	5	7.5
E-1,2	6.3	0.9 (40%)	5	8.75

結果3 サンプル数が少ないために統計的ばらつきが大きいですが、平均のPEと変異誘発率をまとめると、図3, 4のようになり、2度目の凍結後に再培養した細胞も、増殖後は通常培養の場合と同程度の値を示し、3ヶ月保存によるPEの低下や変異の増加などといった悪影響もあらわれないことがわかった。

2) 細胞凍結に用いるDMSOの濃度についての検討

細胞を凍結する際のDMSO濃度及び細胞培養液との混合割合(細胞濃度)について、それぞれの最適条件を探すために、15mlのファルコンチューブによる以下のような予備実験を行った。実際にステーションでの培養後に到達が予測される細胞濃度が 1×10^6 /mlであることを考慮に入れて、表2の各種条件で行った実験の結果が表3にまとめてある。その結果、DMSO濃度5%と10%で殆ど差のないこと、また、細胞濃度が半分の 5×10^5 /mlに低下しても細胞のViabilityに影響のないことが明らかになった。さらに、実際のステーションでの細胞培養は図1に示したようなバッグを利用するため、細胞培養にかかる1週間くらいの間、DMSO(凍結時濃度の2倍)を含む培地も37°Cで保温することになる。その影響を調べた実験結果が表4に示してある。やはり、上述の実験で氷冷却したDMSO(凍結時濃度の2倍)を含む培地を用いた場合に比べて、細胞のViabilityが半分程度に低下することが明らかになった。

3) バッグに封じ込める凍結細胞のDMSO濃度の検討

上述の予備実験で、細胞凍結時のDMSO濃度が5%でも10%の場合と殆ど変わらない細胞viabilityを示したことから、細胞の準備、凍結、培養、再凍結、及びPE測定は1)などについては、1)と同様の条件にして、以下のようなテスト実験を行った(表5参照)。ただし、プログラムフリーザーによる解凍は5時間をかける条件だけを採用した。表5の解凍条件で通常とあるのは37°Cの5分温浴で、これも以前の解凍条件Cと同じである。

表3 凍結時のDMSO濃度などによる cell viability への影響

サン プル	増殖の割合 [A]			PE 値 [B]			[A] X [B]		
	1回目	2回目	平均	1回目	2回目	平均	1回目	2回目	平均
A	4.0	5.7	4.9	0.79	0.98	0.89	3.2	5.6	4.4
B	3.3	8.2	5.8	1.08	0.79	0.94	3.6	6.5	5.6
C	5.8	6.7	6.3	0.73	0.82	0.78	4.2	5.5	4.9
D	3.1	7.2	5.2	1.05	0.63	0.84	3.3	4.5	4.2
E	4.6	7.5	6.1	0.96	0.60	0.78	4.4	4.5	4.5

表4 DMSO長期高温保持効果：細胞培養中（37°C炭酸ガスインキュベータ）で1週間保持

サン プル	増殖の割合 [A]			PE 値 [B]			[A] X [B]		
	1回目	2回目	平均	1回目	2回目	平均	1回目	2回目	平均
A	7.1	5.3	6.2	0.55	0.44	0.50	3.9	2.3	3.1
B	4.5	5.6	5.1	0.41	0.34	0.43	1.8	1.9	1.9
C	6.4	4.9	5.7	0.43	0.33	0.38	2.8	1.6	2.2
D	5.5	5.3	5.4	0.37	0.38	0.38	2.0	2.0	2.0
E	6.3	5.2	5.8	0.42	0.32	0.37	2.6	1.7	2.2

表5 バッグに封じ込めの凍結細胞のDMSO濃度による影響

実験 群	DMSO 濃度 (%)		解凍条件	培養バッグ内 細胞数計測	培養バッグ数
	凍結時	解凍後			
A	10	0.25	CBEF 相 当	0、2、4、7 日 目	12 (細胞数計測日に3ずつ使 用)
B	10	0.25	通常	0 日目	3
C	5	0.125	CBEF 相 当	0、2、4、7 日 目	12 (細胞数計測日に3ずつ使 用)
D	5	0.125	通常	0 日目	3

これらの実験結果に関する詳細報告は、別途に行うため、ここでは以下に簡潔にまとめる。

- ① 解凍時の細胞濃度低下（植え込みからの推測に比べて）は、1) の実験の場合と同程度であった。
- ② 解凍後培養の始めの2日くらいは殆ど細胞増殖がみられないことも、1) と同様であった。
- ③ 培養して7日くらいで細胞濃度が 1×10^6 /ml に到達し、PE が40% くらいを示したことも、やはり、1) の場合と同様であった。
- ④ DMSO 濃度10%の方が5%の場合に比べて、僅かではあるが、ばらつきが少なく、Cell Viability も高い傾向を示した。

4) DMSOに代わる凍結剤を利用する可能性の検討

ここでは、実験方法の細胞調整のところで述べた、簡易型容器（図1）、15 ml ファルコンチューブを用いての予備実験結果を述べる。

- ① 細胞濃度を終濃度で 2.0×10^6 /ml (DMSO 10%) とし 1 ml/セラム tube で凍結 (Bicell に入れて -80°C で 3 hr 保存後に -80°C フリーザーへ；B-D 群)
- ② 上記濃度の細胞，250 μl けん濁液を 9.75 ml の凍結培地（15 ml ファルコンチューブのホールに封入して①と同様なステップで -80°C で保存；A-D 群）

③ 上記①, ②の操作と同様：相違点はDMSOの代わりにCellvationにけん濁し,室温20分放置後,断熱剤で覆って-80°C2時間放置後,-80°Cで保存：それぞれ,A-C群(ファルコンチューブ)とB-C群(セラム)とする。

セラムチューブで細胞を凍結する条件(通常の実験室での細胞保存)ではCellvationでもDMSOでも解凍2日後には通常の生育を示し(表6),Cell viabilityやバックグラウンドの変異誘発率にも大きな差がでないことがわかった(データ省略)。いっぽう,宇宙バッグと同一条件下(凍結細胞と細胞培養液)で行ったファルコンチューブでの実験結果は,Cellvationの場合は,4日間で到達する細胞濃度が平均で $1.2 \times 10^6/\text{ml}$ で,DMSOの場合の6日間での平均細胞濃度 $1.3 \times 10^6/\text{ml}$ に比べてかなり早い増殖を示した(表6)。また,生育した細胞のCell viabilityやバックグラウンドの変異誘発率にも大きな差がでないことがわかった(表7)。

2.2. 低線量,低線量率放射線の遺伝的影響の検出：LOH解析

2.2.1. 材料および方法

細胞,培養液組成,培養条件,培養容器などは前項の2.1実験と全く同様であり,ここでは省略する。以下にチミジンキナーゼ(TK)変異細胞の選択とその遺伝解析(LOH解析)を述べる。図5には凍結細胞に対して10cGyという低線量の炭素イオンを照射したあとのTK変異誘発を調べる手法の概略を,図6には,低線量率 γ 線照射と適応応答実験での照射の概略を示してある。なお,図6での照射後の手法は,図5と全く同じなので省略した。

2.2.2. 結果

1) 凍結細胞を用いた変異の検出

低線量放射線の遺伝的影響を検討する系として,ヒトリンパ芽球細胞TK6細胞を利用した,チミジンキナーゼ(TK)遺伝子のヘテロ接合性の喪失(LOH)を指標とする高感度検出システムの有効性を主張してきた[1, 2]。重イオンなどを含む宇宙放射線によって生じたDNA2本鎖切断(DSB)が原因となって引き起こす可能性のあるLOH誘発を鋭敏に検出できる可能性を,加速炭素イオン線などによる地上の照射実験ですでに証明した[3]。ここでは,炭素イオンによる照射実験に狙いを絞って,国際宇宙ステーションでの実験を想定して,凍結した細胞に低線量(10cGy)を照射した。このようなCell Viabilityには影響を与えない低線量領域でも,浮遊状態での通常照射の場合と同様に,変異を高感度に検出することが可能で,しかも,照射後に細胞を凍結した状態でおおよそ1ヶ月冷凍保存(-80°C)した後にアッセイしても,直後のアッセイと同程度の感度を示すことが明らかになった[4]。浮遊状態の照射ではバックグラウンドの3倍くらいに変異が上昇したが,このような凍結細胞では2倍程度の上昇であることから,検出感度は浮遊細胞に比べると,ある程度は低下する。

表6 細胞増殖(B群は2日培養後,A-C群は4日培養後,A-D群は6日培養後に測定)

細胞群	細胞濃度 ($10^6/\text{ml}$)	細胞群	細胞濃度 ($10^6/\text{ml}$)
B-C-1	1.3	B-D-1	2.0
B-C-2	1.4	B-D-2	2.1
B-C-3	1.2	B-D-3	2.0
A-C-1	1.2	A-D-1	1.1
A-C-2	1.2	A-D-2	1.3
A-C-3	1.2	A-D-3	1.4

表7 増殖した細胞のPEと変異誘発率(EM,は早期誘発変異で96well中の生育well数)

細胞群	PE (%)	EM ($\times 10^{-6}$)	細胞群	PE (%)	EM ($\times 10^{-6}$)
A-C-1	63/96, 57/96	3/96, 0/96	A-D-1	61/96, 56/96	0/96, 2/96
A-C-2	61/96, 60/96	1/96, 1/96	A-D-2	68/96, 57/96	4/96, 4/96
A-C-3	54/96,	1/96, 1/96	A-D-3	65/96, 50/96	0/96, 0/96
Average	59/96 (60%)	1.2/96 (0.52)	Average	58 (58%)	1.7/96 (0.77)

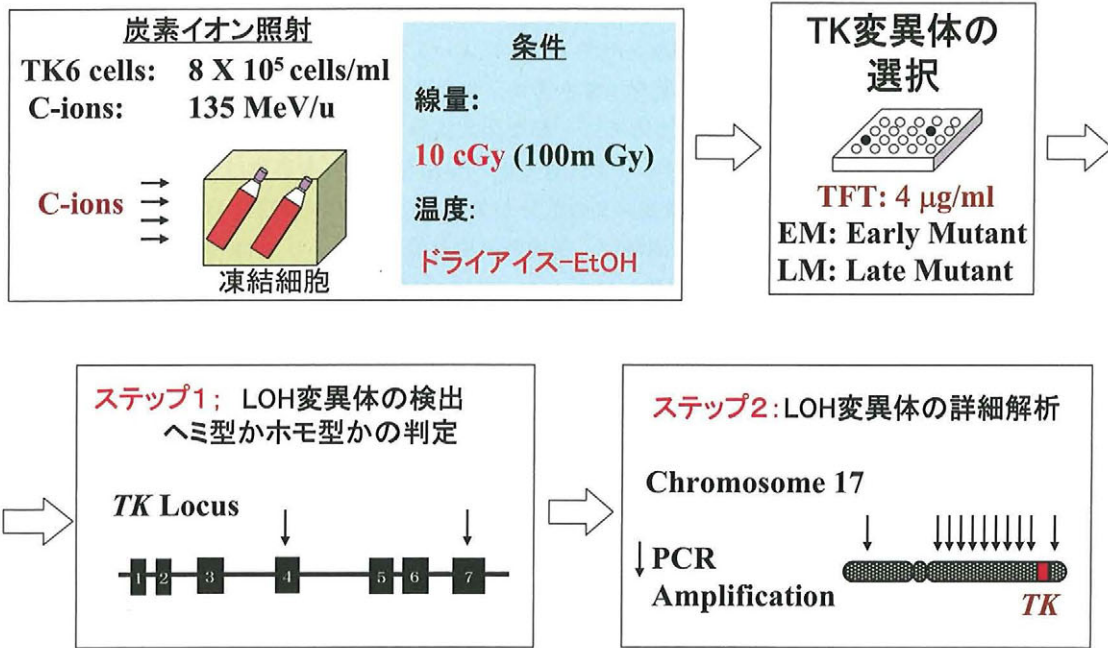


図5 凍結細胞に対する低線量放射線照射の実験手法の概略 (TK 変異の選択とその LOH 解析)

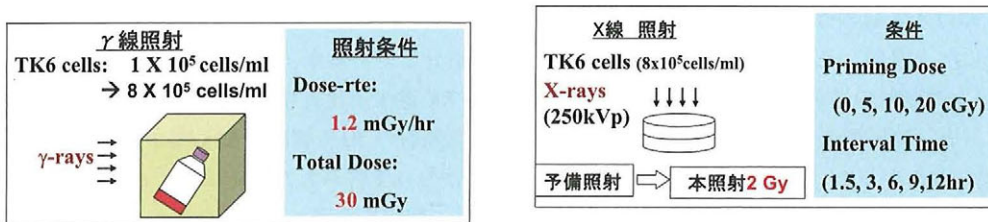


図6 低線量γ線照射と適応応答実験でのX線照射の概略

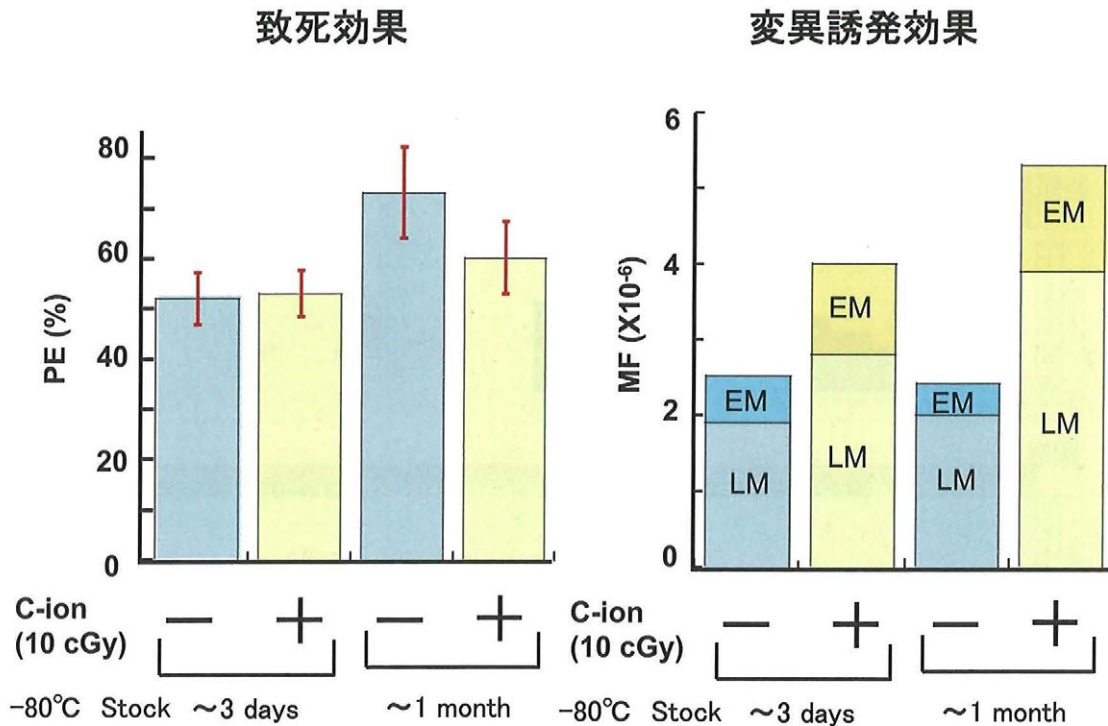


図7 凍結細胞の10 cGy炭素イオン線照射による致死効果と変異誘発

次に図5に概略を示した手法に従って、選択したTK変異細胞から染色体DNAを抽出し、染色体DNAの特定領域の蛍光標識プライマーによるPCRを行い、その産物をDNAシーケンサーによって解析した。TK遺伝子座内のエクソン4とエクソン7領域のPCR増幅の結果から突然変異がLOH型を示すか否か、またそのLOHがホモ型かヘミ型かを判定した。LOHの拡がりを染色体マッピングで調べた解析結果も加えて、一部を図8に示した。ここで白抜きになっている変異体は非LOH型（塩基置換などの点突然変異が主と考えられる）で、青で塗りつぶしてある変異体は青の部分が相同組換えを起こした変異体で、ピンクで塗りつぶしてある変異体はピンクの部分が欠失した変異体である。図8からわかるように、このような凍結細胞の系でも浮遊状態で照射した場合と同様に、低線量の放射線照射により、TK遺伝子座領域を含む広域欠損型のヘミ型LOH（タイプ2）が誘発されることが明らかになった。このLOH解析結果も、上述したように、1ヶ月冷凍保存後も直後の解析とほとんど変わらない傾向を支持している。なお、TK遺伝子座領域を含む限定領域欠損型のヘミ型LOHが、凍結を伴わない浮遊状態の細胞でのアッセイの場合よりも高頻度に誘発されるが、放射線の照射効果をマスクすることはない。これらの結果から、浮遊状態の通常の照射の場合と同様に高感度で、放射線によると考えられるLOHの誘発を検出することに成功したものと結論付けられる[4]。実際のステーションでの実験でも変異を検出できる可能性を強く示唆している。

2) 低線量率 γ 線照射による変異誘発効果

低線量かつ低線量率放射線被ばくによる染色体異常などの遺伝的影響を究明することは、地上のみならず宇宙環境下でもヒトへの健康影響を推測する上で極めて重要と考えられる。ここでは、上述した、放射線影響を高感度に検出できるヒトリンパ芽球細胞LOH（Loss of Heterozygosity：ヘテロ接合性の喪失）解析システムを利用することにした。TK6細胞に放射線医学総合研究所の低線量率 γ 線照射装置により、30 mGy（1.2 mGy/hr）を照射する（図6）と、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子座における変異のうち早期に誘発されるもの（EM）は、非照射の場合に比べて、およそ1.9倍高い誘発頻度（ $p=0.058$ ）を示した（図9）。ここでは得られたデータの一部を紹介しているが、現在までのところ得られたEMのうち、LOHを示すものは γ 線照射の場合に限って観察され、その殆どがTK遺伝子座近傍の限定領域欠損型のヘミ型LOH（タイプ2）であった。一方、遅延型のTK変異体（LM）の誘発頻度は非照射の30%程度増加したが、こちらは統計的有意差（ $p=0.55$ ）は認められなかった（図9）。また、照射、非照射にかかわらず得られたLMはほとんどがLOHを示し、その染色体上での欠失範囲や分布も同様のものであった。 γ 線照射の場合に観察されたヘミ型LOHは、照射によって起こるDNA二重鎖切断が直接関与して、あるいは、間接的にDNA損傷修復系、シグナル伝達系、チェックポイント応答系などが関わって、非相同末端結合を介して誘発されたものかについては今後の詳細検討を必要とする。なお、これらの実験結果については現在、論文投稿の準備を進めている[5]。

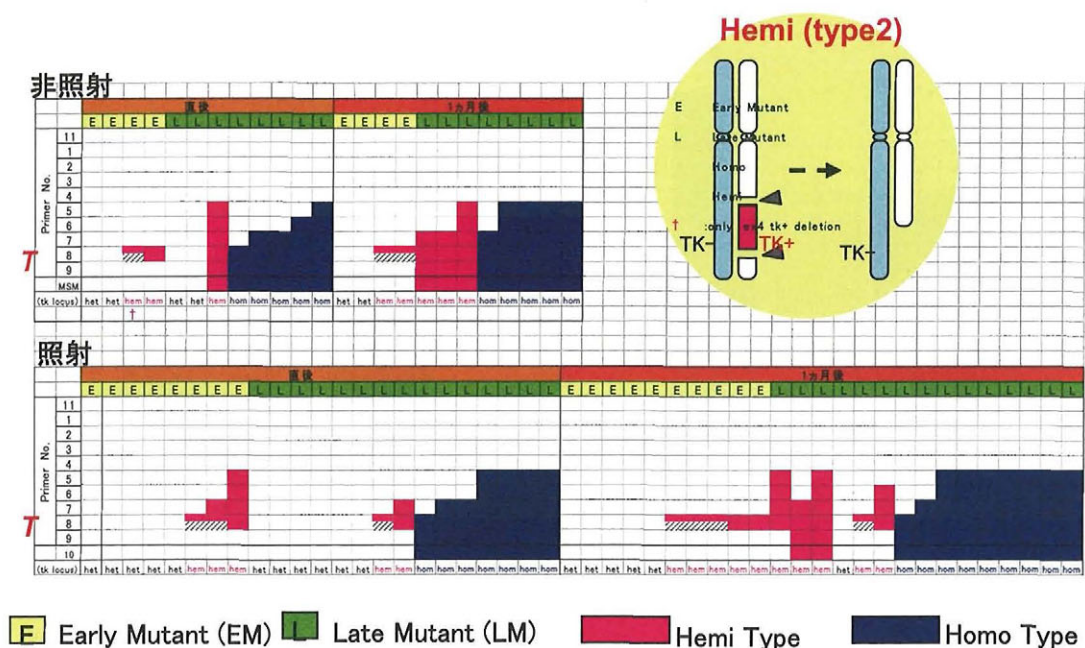


図8 凍結細胞の10 cGy炭素イオン線照射により選択したTK変異体のLOH解析

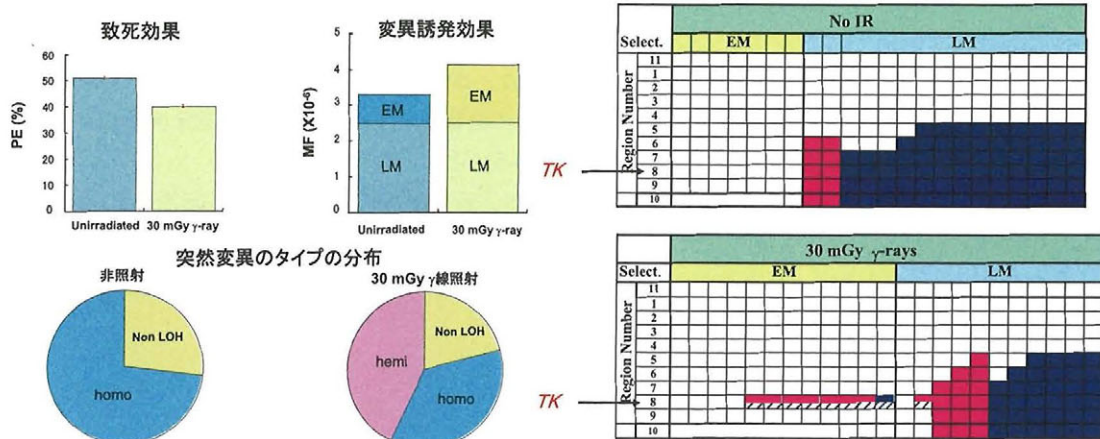


図9 低線量率 γ 線照射によるTK変異の誘発とLOH解析

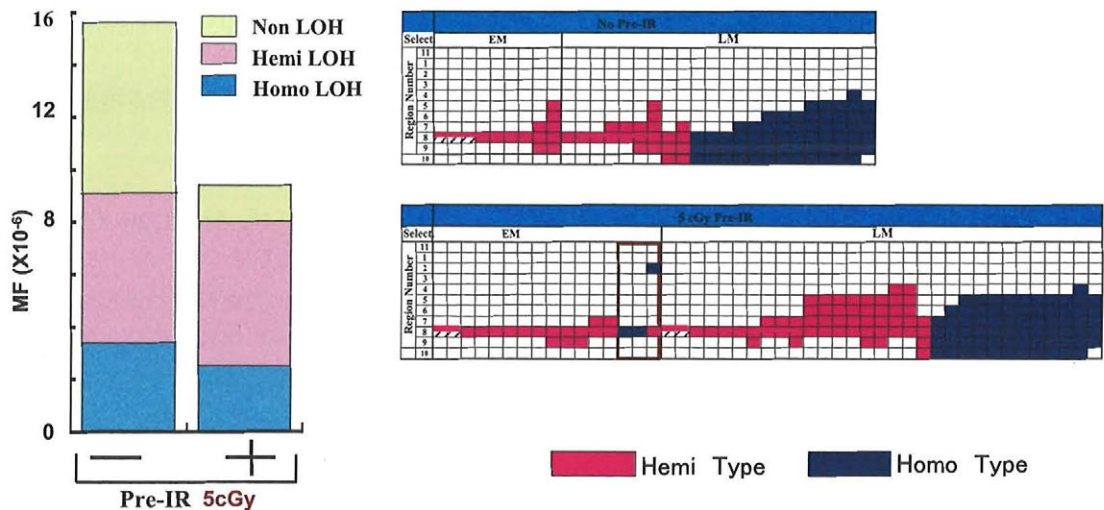


図10 線照射を利用した適応応答によるTK変異の誘発とLOH解析

ここでは、実験施設の制約上、 γ 線を利用しているが、宇宙放射線の重要成分である重イオン放射線を利用して同様の結果が得られるか否かについても興味もたれる。

3) 適応応答による変異誘発の抑制

このTK6細胞LOH検出系を利用して、低線量放射線の影響を適応応答効果として染色体レベルで検出できるか否か、すなわち、適応応答の有無、さらに、有る場合はその最適条件を明らかにするための研究を原子力基盤クロスオーバーの一環として行っている。また、この研究は、宇宙放射線の遺伝的影響を検討するための地上実験研究としても進めている。まず始めに、予め低線量X線照射が本格的なX線照射によるTK変異誘発に及ぼす影響を調べている。予め低線量を2.5, 5, 10 cGyと変え、本格的照射の線量は2 Gyに固定し、予備照射と本格照射のインターバルも1.5, 3, 6, 9, 12 hrと変えてTK変異体の誘発率を測定した。実験データは省略するが、変異誘発率の低下には6時間前の5 cGyあるいは10 cGy予備的低線量照射が最適条件と考えられたので、予備低線量照射を本照射の6時間前に設定して、5 cGy予備照射の場合について詳細に実験を進めた。その結果、予備照射をしないときのTK変異誘発を半分程度まで抑制することが明らかになった(図10)[6]。

このような適応応答検出の最適と考えられる条件で選択した、TK変異細胞から染色体DNAを抽出し、やはり、同様の手法で遺伝解析結果した結果、上述の予備照射による変異誘発の抑制が非LOH型変異の誘発抑制で説明がつくという結果を示した。なお、これらの変異細胞からのcDNA作成の結果、ここでの非LOH型変異の大部分あるいは全てが点突然変異

と考えてよいことが明らかになった[6]。現在、DNA塩基配列レベルでシーケンスを決定している。当初は、他の関連実験報告などから、適応応答はLOH型のタイプやその染色体上での拡がり分布などにも影響を及ぼすものと予想していたが、全く覆す結果となった(図10)。また、極めて低頻度で観測された、DNA相同組換えを介して発生したと考えられる、染色体の局所的な組み換え変異体(ホモ型LOH)(図10)は、上述の低線量率 γ 線照射後にも観測されており(図9)、このようなタイプのLOH発生についても注目して、今後の研究を進めることにしている。

これらの実験結果から、細胞の宇宙空間(ISS)での長期滞在による放射線被ばくを、適応応答のトリガー(予備照射)と考えて、地上に細胞を回収してから本格的刺激(電離放射線照射や細胞内の染色体部位特異的切断の導入などの処理)による変異誘発の特異性を調べるといった実験が、遺伝的影響を調べる上で有効であることが強く示唆された。

3. ま と め

- 1) 細胞バッグを利用したステーション内での培養に向けての準備
 - ① 培養前の解凍操作によるViableな細胞の濃度低下はあまり問題にしなくてもよい。
 - ② 培養によって十分に細胞濃度を高めることが大切で、Cellvationを利用して低濃度から増殖させることがより適切であると考えられるので、現在バッグを用いてこの可能性を追求するための実験を行っている。ここでのポイントは、地上準備実験としては不可能な低重力下での細胞培養(1週間くらい)も併せて計画しており、このような低重力の影響を見る上でも、低濃度からの増殖が望ましい。
 - ③ 実験結果のところでは省略したが、バッグから回収した細胞でもLOH解析まで進められ、通常培養あるいはセラムチューブで凍結した細胞の解凍後と同様に解析ができることをすでに確認している。
- 2) 変異誘発検出に関する実験
 - ① 凍結細胞の地上予備実験で、 2×10^6 細胞を含むセラムチューブ10本を解析すれば、特定LOH(タイプ2型のヘミ型で欠失範囲の大きいもの)として検出できることがわかった。この種の実験は細胞を宇宙ステーション内で培養しないため、DMSO入り培地が不要なため、現在の準備段階では20mlのバッグの使用が可能と思われる。単純計算では、ステーションで解凍しないサンプルを細胞濃度 2×10^6 /mlで20mlのバッグに準備すれば1個で賄えることが推測される。従って、5個を準備する現在の計画では、宇宙放射線の線量が10cGyに到達しなくても、変異誘発の検出が可能と見込める。また、この種のバッグをさらに5個準備すれば、その分を適応応答アッセイに利用することも可能なので、こちらの計画も推進したい。
 - ② 現在、限られた条件下でしかも γ 線を利用して低線量率照射実験を行っているだけであるが、実際の宇宙ステーション内での細胞培養中での宇宙放射線照射による影響をLOH誘発(例えば、 γ 線照射の場合と同様な領域限定型のLOH)として検出できる可能性は十分にある。地上実験でも、宇宙放射線をできる限り模倣できるような、重イオンや中性子線を含む混合放射線を照射できる環境を実現させ、上記の特定LOHの検出を試みることは意義深いと考えている。

成 果 発 表

論文発表

- [1] Yatagai, F. "Mutation Induced by Heavy Charged Particles", Biol. Sci. Space., 18, 224-234 (2005).
- [2] Ando, K., Koike, S., Oohira, C., Ogiu, T., and Yatagai, F., "Tumor induction in mice locally irradiated with carbon ions: A retrospective analysis", J. Radiat. Res., 46, 185-190 (2005).
- [3] Mehnati, P., Morimoto, S., Yatagai, F., Furusawa, Y., Kobayashi, Y., Wada, S., Kanai, T., Hanaoka, F., Sasaki, H., "Exploration of 'over kill effect' of high-LET Ar- and Fe-ions by evaluating the fraction of non-hit cell and interphase death", J. Radiat. Res., 46, 343-350 (2005).
- [4] Umabayashi, 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", accepted by Biol. Sc. Space (2006).
- [5] Suzuki, M., Tsuruoka, C., Kanai, T., Kato, T., Yatagai, F., and Watanabe, M., "Cellular and molecular effects for mutation induction in normal human cells irradiated with accelerated neon ions". Mutat., Res., 594, 86-92 (2006).

口頭発表

- [1] Masumura, K., Hoshino, M., Yatagai, F., Ochiai, M., Nakagama, H., and Nohmi, T. Non-homologous End-joining in X-ray-irradiated Scid/Gpt Delta Transgenic Mouse”, The 9 th International Conference on Environmental Mutagens & 36 th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society, Sep., 2005, San-Francisco, USA.
- [2] 谷田貝文夫, 梅林志浩, 本間正充, 鈴木雅雄, 石岡憲昭, 嶋津 徹, 岩木正哉, “低線量・低線量率放射線による LOH 誘発”, 日本宇宙生物学会, 第 19 回大会, 2005 年 9 月, 東京
- [3] 梅林志浩, 本間正充, 阿部知子, 岩木正哉, 谷田貝文夫, “凍結ヒト培養細胞の低線量炭素イオン照射による変異誘発”, 日本宇宙生物学会, 第 19 回大会, 2005 年 9 月, 東京.
- [4] 谷田貝文夫, 梅林志浩, 本間正充, 岩木正哉, “適応応答の LOH 解析による検出は可能か?”, 日本放射線影響学会第 48 回大会/第 1 回アジア放射線研究会議, 2005 年 11 月, 広島.
- [5] 梅林志浩, 本間正充, 鈴木雅雄, 岩木正哉, 谷田貝文夫, “低線量率 γ 線照射による変異誘発の検出: ヒト培養細胞での LOH 解析”, 日本放射線影響学会第 48 回大会/第 1 回アジア放射線研究会議, 2005 年 11 月, 広島.
- [6] 谷田貝文夫, 梅林志浩, 石岡憲昭, 菅澤 薫, 花岡文雄, 嶋津 徹, 鈴木ひろみ, 岩木正哉. “宇宙環境放射線影響を検出するために適応応答は利用できるか?”, 第 22 回宇宙利用シンポジウム, 2006 年, 1 月, 東京.
- [7] 谷田貝文夫, “重イオン線は凍結細胞でも変異誘発の高感度検出を可能にする”, 理研シンポジウム「重イオンビーム育種の現状・将来」, 2006 年, 1 月, 和光.

参 考 文 献

- [1] Yatagai, F., Morimoto, S., Kato, T. and Honma, M. Further characterization of loss of heterozygosity enhanced by p53 abrogation in human lymphoblastoid TK 6 cells: disappearance of endpoint hotspots. *Mutat.Res.*, 560, 133-145 (2004).
- [2] Morimoto, S., Kato, T., Honma, M., Hayashi, M., Hanaoka, F., and Yatagai, F.: Detection of genetic alterations induced by low-dose X-rays; analysis of loss of heterozygosity for TK mutation in human lymphoblastoid cells., *Radiat. Res.*, 157, 533-538 (2002).
- [3] Morimoto, S., Honma, M., and Yatagai, F.: Sensitive detection of LOH events in a human cell line after C-ion beam exposure, *J. Radiat. Res.*, 43 Suppl., 163 (2002).
- [4] 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, accepted by *Biol. Sc. Space* (2006).
- [5] Umebayashi, Y., Honma, M., Suzuki, M., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., and Yatagai, F.: Mutation induction after low-dose and low-dose rate gamma-ray irradiation of human cultured cells: Detection by LOH Analysis, in preparation (2006).
- [6] Umebayashi, Y., Sugasawa, K., Honma, M., Suzuki, M., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., Hanaoka, F., and Yatagai, F.: Adaptive response after low-dose X-ray pre-irradiation of human cultured cells: Detection by LOH Analysis, in preparation (2006).

カイコの生体反応による長期宇宙放射暴露の 総合的影響評価

古澤 壽治

Integrated assessment of long-term cosmic radiation through biological responses of the silkworm, *Bombyx mori*, in space

By

Toshiharu FURUSAWA

Abstract: Sensitivity of *Bombyx* eggs to a heavy ion beam was estimated from the frequency of somatic mutation which was shown by the white spot (s) on the black integument of the fifth instar larvae. The number of larvae with the white spot has been clarified as index of the frequency of somatic mutation incidence. The frequency was the highest on the day 2 eggs after the resumption of embryogenesis in the diapause-terminated eggs. The somatic mutation was induced by the irradiation of Fe ion directly to embryo. Differential-Display-Reverse-Transcriptase-Polymerase-Chain-Reaction showed that the irradiation of Fe ion on the day 2 eggs of the resumption of embryogenesis induced influences of gene expression, suggesting that the influence of cosmic rays on the gene (s) could be estimated using *Bombyx* eggs.

Keywords: Somatic mutation, *Bombyx* egg, Gene expression, Heavy ion beam, Cosmic ray

概 要

黒縞カイコのヘテロ接合体 (P^S/P) の休眠卵に重粒子線 (Ne, C) を照射すると、孵化幼虫の5齢期に黒い皮膚をバックに白斑を持つ蚕が出現する。この頻度はNeの照射線量、エネルギー (LET) に依存した。しかし、休眠期間において重粒子線の感受性が異なり、休眠が覚醒して胚発育が再開した2日目の卵において放射線に対する感受性が最も高い。Cイオンビームを卵中央部 (卵黄) と卵背面部 (胚) に直径250 μm の範囲で局部照射すると、後方で体細胞突然変異発生した。さらに、重粒子線照射によるカイコ遺伝子発現への影響について検討した。すなわち、休眠覚醒した黒縞蚕卵の胚発育2日目にNeイオンビーム5.0 Gyを照射し、照射後0, 2, 4, 6日目の時期に生じる遺伝子発現への影響を検討した。蚕卵からTotal RNAを抽出し、RT-PCR-Differential Display法を用いてDNA断片を増幅させ、無照射区の増幅DNA断片との違いを電気泳動のバンドの検出パターンを比較することにより解析した。その結果、照射区と無照射区において数種のバンドの検出量に顕著な違いがみられ、重粒子線照射より蚕卵内において特異的に発現する遺伝子が存在することを推察した。

以上の結果は、カイコの卵への重粒子線照射の影響を個体レベルでの形質発現と分子レベルでの遺伝子発現において検出できることを示している。

1. は じ め に

黒縞遺伝子のヘテロ接合体 (P^S/P) の卵に重粒子線を照射した後、孵化幼虫を飼育し、黒色体色を持つ5齢幼虫皮膚に白色斑点が現れる頻度 (体細胞突然変異) で放射線影響を評価してきた。その結果、照射線量およびLETに比例して体細

胞突然変異率が増加することから、本蚕品種が宇宙放射線の生物影響評価を行うのに有効な生物材料であることを明らかにした。さらにこれらの蚕蛾に *pe/re* (卵色突然変異系統) の蛾を交配することによって、これらの交配蛾が産んだ卵の色から生殖細胞突然変異を検出することができた。これらの結果は、重粒子線の一過的な照射によって体細胞突然変異と生殖細胞突然変異が誘起されることを示している。しかし、宇宙では長期にわたる低線量被曝が想定されるため、休眠過程における放射線感受性が最も高い時期を見出すとともに、この時期における遺伝子発現に対する影響について検討した。すなわち、1) 体細胞突然変異と生殖細胞突然変異、2) 遺伝子発現に及ぼす重粒子線の影響について検討した。

2. 成果の概要

2.1. 卵の休眠進行に伴う重粒子線感受性

2.1.1. 材料および方法

黒縞系統 (P^S/P^S) に小石丸を交配することによって得たヘテロ接合体を、産卵後 25°C に 14 日以上保護した。この卵を休眠から覚醒させるために 5°C に 100 日以上、接触させた。そして、胚発育の再開を起こすため 25°C に移してから 2 日後の卵に C, Ne, Fe の各イオンビームを 0.02 Gy ~ 5.0 Gy 照射した。これらの照射卵からの孵化幼虫を人工飼料あるいは桑で 5 齢まで飼育し、黒色の皮膚に白斑が現れた幼虫を突然変異蚕として変異率を求めた。

2.1.2. 結果

カイコの皮膚を黒色化させる優性遺伝子 P^S と白色皮膚を形成する劣性遺伝子 P とのヘテロ接合体 (P^S/P) の休眠卵に、重粒子線を照射すると、この卵から孵化した幼虫に黒色皮膚をバックに白色斑点を生じる。この体細胞突然変異個体の出現頻度は、照射した重粒子線 (Ne, C, Fe イオンビーム) の照射線量に依存するものであった。

一方、休眠の進行に伴う重粒子線感受性について検討したところ、休眠が覚醒した後、胚発育再開 2 日目の卵において最も感受性が高く、5.0 Gy (LET: 13 keV/ μ m) の C イオンビームを照射した場合には、91% もの高頻度で発生した。同様の結果は、Ne および Fe においても同様の結果となった。休眠中の胚は G 2 期で停止し、胚発育再開時には M 期に移行することから感受性が高まると考えている。

上記の照射は卵全体に対して照射している。休眠卵においては、胚は卵の背側に位置するので、体細胞突然変異がバイスタンダー効果によって発生するか否かについて検討するため、卵の中央部 (卵黄) と卵の背側 (胚) に局部照射した。すなわち、 P^S/P の休眠卵を、産卵 25°C に 10 日間保護し、休眠から覚醒させるために 5°C に 70 日間保護した。次いで、休眠覚醒をより確実にするため浸酸処理した後、25°C に移し胚の発育を再開させた。そして、その 2 日後に 0 Gy, 0.5 Gy, 3.0 Gy, の C イオンビーム (LET: 100 keV/ μ m) を照射した。C イオンビーム照射後も続けて 25°C で保護し、孵化した幼虫を 5 齢期まで飼育して白斑を指標に変異率を求めた (図 1)。その結果、中央部に照射した卵に比べ、胚に照射した卵において体細胞突然変異がより高い頻度で発生した。

2.2. 胚発育中の遺伝子発現に及ぼす重粒子線の影響

2.2.1. 材料および方法

1. 照射卵

P^S/P のヘテロ接合体を産卵後 25°C に 19 日間保護した。そして、休眠から覚醒させるため、5°C に 134 日間保護した後、25°C に移し胚の発育を再開させた。

2. 照射方法

放射線医学総合研究所の HIMAC で 1 区につき、胚発育再開卵 1.25 g に Fe イオンビーム (LET: 200 keV/ μ m) を 0.02 Gy, 0.2 Gy, 2.5 Gy, 5.0 Gy の 5 区に分けて鉄粒子線を照射した。照射後、25°C で保護し、照射当日 (0 日), 2 日後, 4 日後, 6 日後に卵を採取し、液体窒素中で凍結した。凍結後は -80°C に保存した。

3. RT-PCR-Differential display 法

凍結卵 0.25 g を用い、ISOGEN kit (ニッポンジーン社製) のプロトコールに従って RNA を抽出した。この RNA を用い、

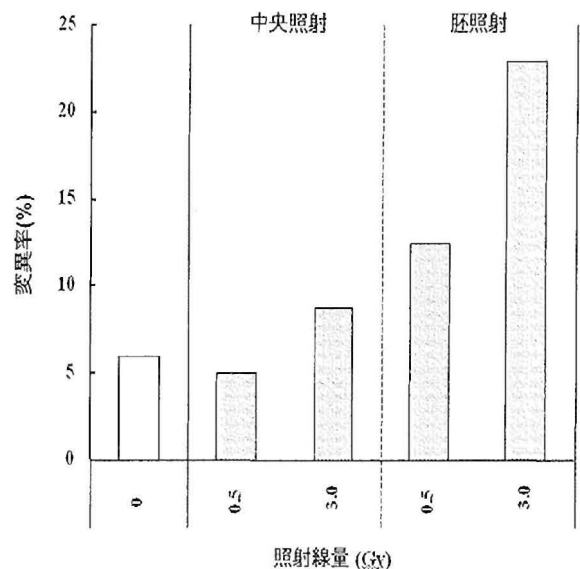


図 1 卵の中央部と胚に鉄イオンを局部照射した際の体細胞突然変異率

TermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen 社製) のプロトコールに従って逆転写反応 (RT 反応) を行なった。そして、得られた cDNA を用い、Fluorescence Differential Display Kit (タカラバイオ社製) 附属の Rodamine 標識プライマー (励起波長: 580 nm, 放出波長: 605 nm) を用いて、PCR 1 反応当り、10 × PCR Buffer を 2 μl, 25 mM MgCl₂ を 1 μl, 10 mM dNTP Mix を 1 μl, 10 μM 蛍光 Downstream primer を 0.5 μl, 2 μM Upstream primer を 5 μl, 1 st cDNA を 2 μl, D.W. を 8.4 μl, rTaq (recombinant Taq) polymerase (TOYOBO 社製) を 0.1 μl を混合した。PCR 条件は、94°C · 2 分間の熱処理後、94°C · 30 秒間、40°C · 2 分間、72°C · 1 分間を 34 サイクル、最後に 72°C · 5 分間伸長後、5°C に急冷した。この PCR 反応液 20 μl に 95 %ホルムアミドー 20 mM EDTA を 20 μl 加え、穏やかに攪拌し、97°C に 3 分間熱処理を行った。

PCR 反応生成物は 7 M 尿素編成 6 % ポリアクリルアミドゲルで泳動 (15 mA, 約 1 時間) し、ゲル上のバンドをモレキュラーイメージャー FXPro (日本バイオラッド) で解析、レーザー (532 nm) で、励起波長 580 nm, 放出波長 605 nm の Rodamine を付加した RT-PCR Differential Display 法によって生じた増幅 DNA 断片の検出を行なった。

2.2.2. 結果

産卵後の卵を 25°C に 14 日間保護した後、3 ヶ月間 5°C に冷蔵することによって休眠から覚醒させた。この卵を 25°C に移し、胚の発育を再開させ、その 2 日後に Fe イオンビーム、5.0 Gy (LET: 200 keV/μm) を照射した。そして、照射 12 時間後に RNA を抽出し、「材料および方法」に記載の通り、cDNA を増幅させることによって遺伝子発現と重粒子線照射との関連について検討した (図 2)。なお、Rodamine 標識 primer は 5 種類用いた。その結果、P 12 プライマーを用いた場合、白い矢印で示したバンドが照射区においては発現量が減少していた。これに反し、P 15 および P 20 をプライマーとすると、新たなバンドが検出された。

次いで、照射直後の胚発育 2 日目の胚 (day 2)、照射 2 日後、4 日後、6 日後 (day 4, day 6, day 8) の卵、それぞれから RNA を抽出して先と同様に cDNA を増幅させ、照射区と無照射区における泳動パターンの違いについて検討した (図 3)。その結果、照射 4 日後 (day 6) および 6 日後 (day 8) の卵において新たな遺伝子発現 (白い矢印) が起こることが分かった。

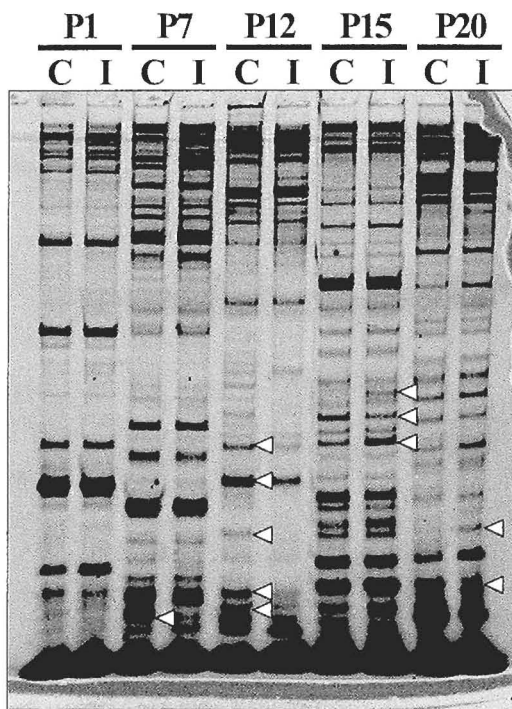


図 2 胚期における Fe イオンビーム照射の遺伝子発現に及ぼす影響 (照射 12 時間後)
照射時期: 胚発育再開 2 日後

C: 無照射, I: 照射区
用いたプライマーの種類

P1: 5'-Rodamine-T_nAA-3', 5'-GATCATAGCC-3'
P7: 5'-Rodamine-T_nAA-3', 5'-GATCATGGTC-3'
P12: 5'-Rodamine-T_nAA-3', 5'-CTGATCCATG-3'
P15: 5'-Rodamine-T_nAA-3', 5'-GATCAATCGC-3'
P20: 5'-Rodamine-T_nAA-3', 5'-GATCAAGTCC-3'

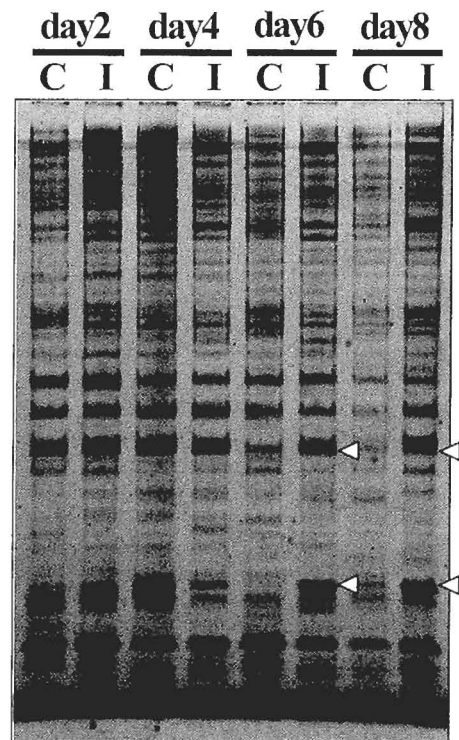


図 3 胚期における Fe イオンビーム照射の遺伝子発現に及ぼす影響

胚発育再開 2 日後に照射, その 12 時間後 (day 2), 2 日 (day 4), 4 日 (day 6), および 6 日後 (day 8) に卵を採取。

C: 無照射, I: 照射区
用いたプライマー:

5'-Rodamine-T_nAA-3', 5'-GATCATAGCC-3'

3. ま と め

カイコの黒縞系統卵のヘテロ接合体に重粒子線を照射すると、5 齢期に黒い皮膚をバックに白斑が生じる。この体細胞突然変異発生は、重粒子線が胚細胞を直接ヒットすることに起因し、卵黄に照射されることに因る、いわゆるバイスタンダー効果によって誘発されるものではなかった。

さらに、休眠覚醒卵を 25°C に移し、胚の発育を再開させた。そして再開 2 日目に鉄 Fe イオンビームを照射することによって遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。その結果、照射 12 時間後の卵において遺伝子発現が抑制されたり、あるいは照射 4 日後に発現が促進される遺伝子があると推察した。今後、この遺伝子の配列を明らかにすることによってこれを指標とし、照射線量と発現との関連を明らかにする。

成 果 発 表

- [1] 有松祐治・古澤壽治・鈴木英子・野島久美恵・長岡俊治・永松愛子・鈴木ひろみ、嶋津 徹・石岡憲昭 (2005)：カイコ胚発育期の遺伝子発現に及ぼす重粒子線の影響 日本宇宙生物科学会第 19 回大会 予稿集 p43.
- [2] 有松祐治・古澤壽治・鈴木英子・野島久美恵・長岡俊治・永松愛子・鈴木ひろみ、嶋津 徹・石岡憲昭 (2005)：カイコ個体での形質および重粒子線影響解析 日本放射線影響学会第 48 回大会講演要旨集 pp. 139-140.

宇宙航空研究開発機構特別資料 JAXA-SP-05-039

発行 平成 18 年 3 月 31 日

編集・発行 宇宙航空研究開発機構

〒182-8522 東京都調布市深大寺東町 7-44-1

URL : <http://www.jaxa.jp/>

印刷・製本 (株) 東京プレス

本書及び内容についてのお問い合わせは、下記にお願いいたします。

宇宙航空研究開発機構 情報システム部 研究開発情報センター

〒305-8505 茨城県つくば市千現 2-1-1

TEL : 029-868-2079 FAX : 029-868-2956

© 2006 宇宙航空研究開発機構

※ 本書の一部または全部を無断複写・転載・電子媒体等に加工することを禁じます。



本書は再生紙を使用しております。

This document is provided by JAXA.