

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,

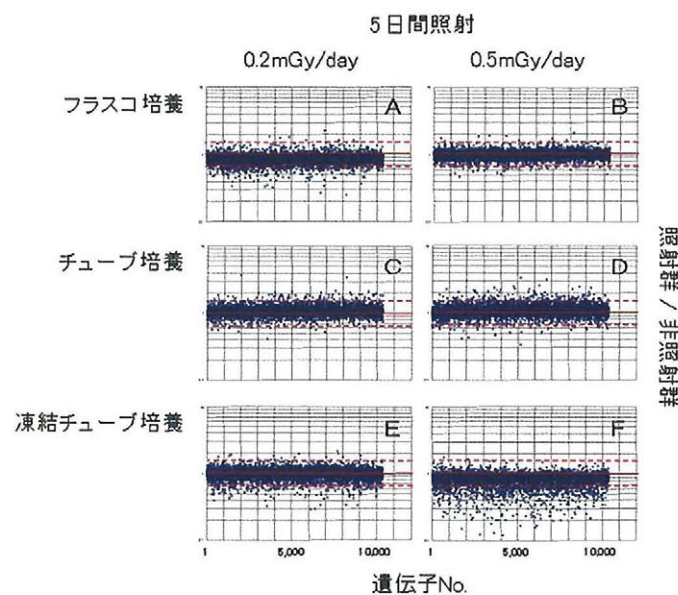


図1 遺伝子発現プロファイル

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。

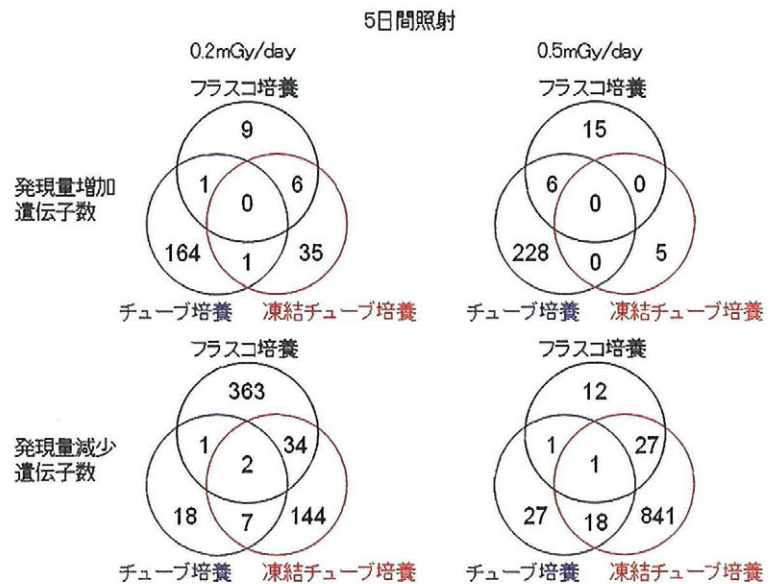


図2 遺伝子発現マトリクス

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．