

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、

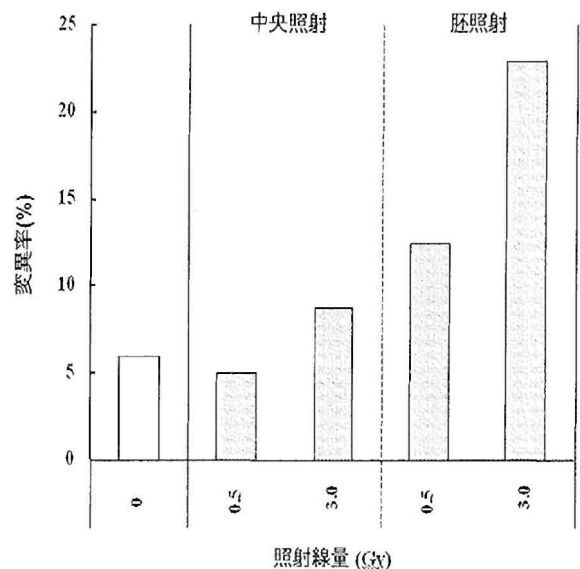


図 1 卵の中央部と胚に鉄イオンを局部照射した際の体細胞突然変異率

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。

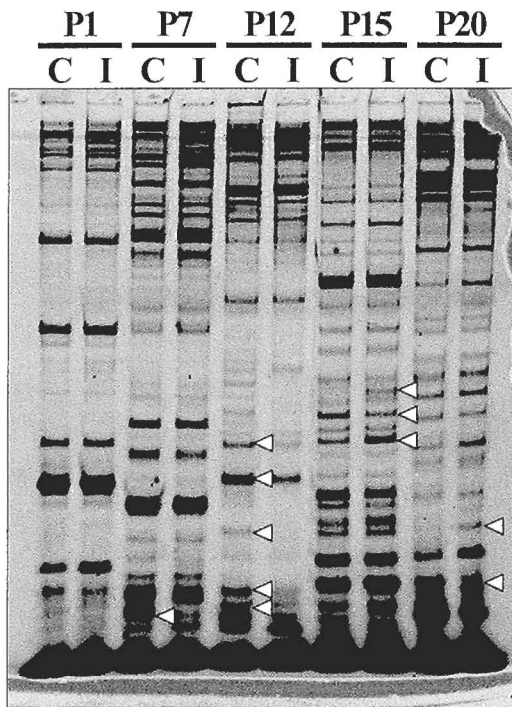


図 2 胚期における Fe イオンビーム照射の遺伝子発現に及ぼす影響 (照射 12 時間後)
照射時期: 胚発育再開 2 日後

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'

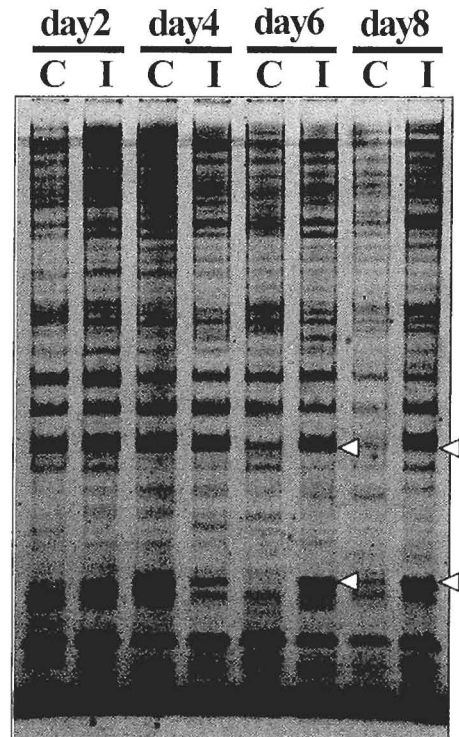


図 3 胚期における Fe イオンビーム照射の遺伝子発現に及ぼす影響
胚発育再開 2 日後に照射, その 12 時間後 (day 2), 2 日 (day 4), 4 日 (day 6), および 6 日後 (day 8) に卵を採取。

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.