

# クリプトビオシスとリンクした放射線耐性機構の解明研究

(受託者) 独立行政法人農業生物資源研究所

(研究代表者) 奥田隆 昆虫科学研究領域

(再委託先) 国立大学法人鹿児島大学

(研究開発期間)平成20年度～22年度

## 1. 研究開発の背景とねらい

原子力発電を重要なエネルギー供給源としている我が国では、放射線の生体影響は国民の安全・安心を確保するための最重要課題である。また、死因の第一位が“がん”であるわが国では、PET、PETCT等の放射線を用いた高度医療診断および重イオン等の放射線を用いたがん治療が進展しており、放射線生体影響の評価と放射線防護は社会的にも重要であり緊急を要する課題である。従来の放射線生体影響研究は、放射線高感受性に関与する機序解明に対する研究が中心であり、分子生物学的手法を用いて様々な放射線応答因子が明らかにされつつある。しかし、放射線高耐性因子および機序の全容が未だ不明な点が多い。

生物の放射線高耐性の分子機構については、放射線耐性細菌 *D. radiodurans* を中心として、特にDNAの修復機構についての詳細な解析が進められてきた。*D. radiodurans* の高い放射線耐性は乾燥に適応して発達したものと考えられており、乾燥耐性と放射線耐性の機構には共通点が多く認められる。多細胞生物にも驚くべき乾燥耐性を持つものがあり、生体内の水分をほぼ完全に失っても生命を維持し、再び吸水すれば活動を再開できる。この生命現象をクリプトビオシスと言い、その能力を持つ生物（ヒルガタワムシ、クマムシ、ブラインシュリンプ等）は放射線に対しても高い耐性を持つことが知られている。例えば、ネムリユスリカの場合、乾燥幼虫に $\gamma$ 線を7,000Gy照射後、水に戻して幼虫は蘇生し（Watanabe et al., 2006a）、重粒子線（ネオン）を200Gy照射した場合でも幼虫は蘇生し蛹に変態した（Watanabe et al., 2006b）。実際、ネムリユスリカ幼虫の乾燥（脱水）に伴って放射線耐性が徐々に上昇していく（Nakahara et al., 2008）。しかし、その分子機構についてはほとんど分かっていない。クリプトビオシス動物の中で最も大型のネムリユスリカは、最近、研究代表者によってモデル生物化され、その遺伝子情報も蓄積しつつある。つまり、ネムリユスリカのクリプトビオシスの分子機構を解明することは、放射線耐性の機序を明らかにすることに他ならず、放射線被ばくに対する事前防護策のヒントに繋がるであろう。

## 2. 研究開発成果

クリプトビオシス状態のネムリユスリカは放射線に対して高い耐性を示す。この分子機序を解明するため、乾燥及び放射線ストレスによって誘導される遺伝子を網羅的に調査した。まず乾燥過程の3段階（0h, 12h と 36h）でネムリユスリカ幼虫からcDNAが得、ESTデータベースを構築した。その乾燥耐性関連ESTデータベースを解析したところ、全部で15,054クローンが4,807遺伝子クラスターに分類された。その半分は新規遺伝子であると考えられる。ユスリカの特徴として、ヘモグロビンが多く、全遺伝子の7.5%を占めていた。クローン数に基づいた遺伝子の予想発現パターンを調べ、乾燥によって強く誘導され、乾燥耐性に関わっていると思われる遺伝子に

注目した。特にシャペロン機能などを持つ LEA タンパク質、HSPs、そして酸化ストレス関連遺伝子のグループは乾燥と強く相関を示した (Cornette et al., 2010)。

クリプトビオシス過程での DNA 損傷について comet assay を用いて解析したところ、高い頻度で DNA 鎖の切断が確認されたが、再水和後にそれらの損傷は修復された (図 1-A)。活動状態のネムリユスリカ幼虫に、半数羽化阻害線量(70 Gy)の Co-60 ガンマー線と同線量の  $^4\text{He}$  イオンを照射した

ところ、ガンマー線照射による DNA のダメージは、同線量の  $^4\text{He}$  イオンを照射した場合に比べて軽微であり、24 時間以内に対照区(非照射幼虫)と同レベルにまで回復した (図 1-B)。

その原因としては、 $^4\text{He}$  イオンでは活性酸素を除去酵素(カタラーゼ、SOD 等)の発現は変化がなかったが、ガンマー線照射後 3~12 時間にかけて抗酸化酵素の発現が著しく上昇したことが考え

られた。また、乾燥ストレスによってもたらされた DNA 損傷程度は 70 Gy の  $^4\text{He}$  を照射した場合と近似していた (図 1-B)。これらのことから、ネムリユスリカの放射線耐性は、「生体成分の損傷を回避する機構」と「損傷を受けたときの修復機構」によるものと考えられ、それらは乾燥ストレスに適応して発達したものと考えられた。

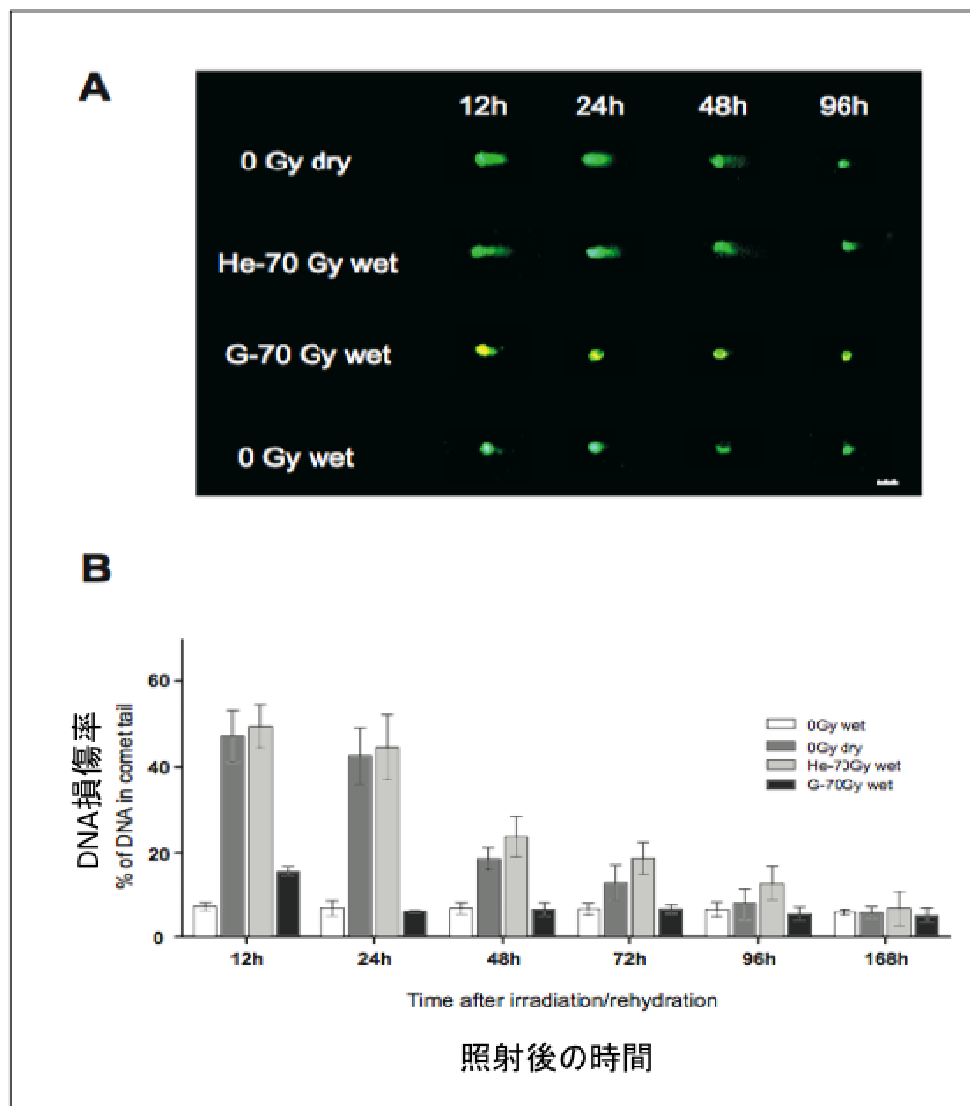


図1 イオンビームおよびガンマー線照射後のDNAが損傷とその修復  
ネムリユスリカ幼虫に $^4\text{He}$  (70 Gy) およびガンマー線 (70 Gy) を照射後の脂肪体細胞の comet assay (A) と DNA 損傷程度 (B)

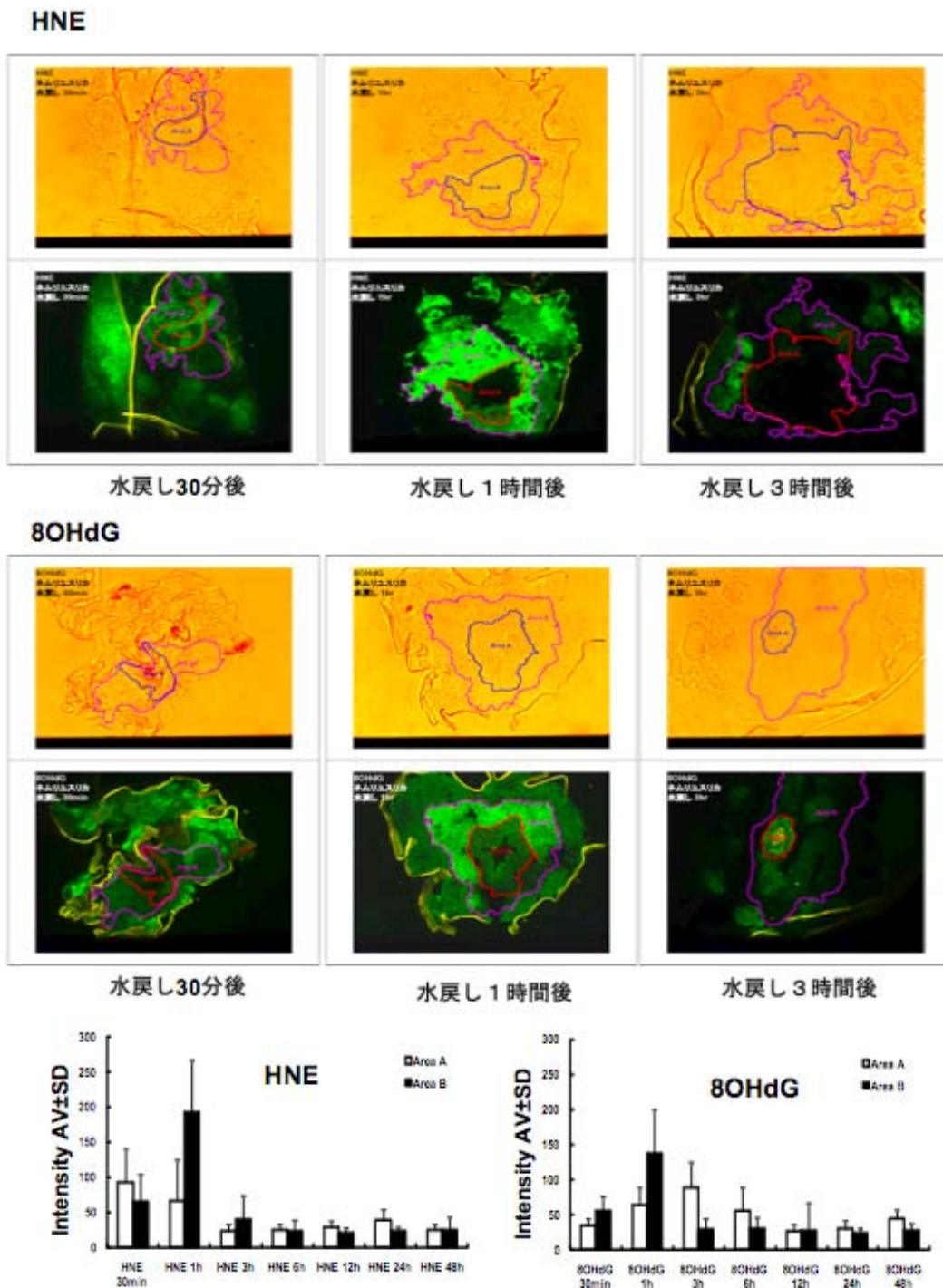


図2 ネムリユスリカ幼虫免疫染色

脂質 (HNE) およびの DNA 塩基 (8OHdG) の過酸化を示すマーカータンパク質の抗体を用いて免疫染色法でクリプトビオシスからの蘇生時の酸化ストレスによるダメージがどの時期に、そしてどの組織に生じているのかを査定した。乾燥幼虫の水戻し直後、すなわち 30 分と 1 時間後に顕著に脂質および DNA 塩基での酸化が観察された。酸化を受けた幼虫の部位は主に中腸 (Area A) および脂肪体 (Area B) であった。水もどし時間後には酸化された部位が消失しており、すみやかに修復がなされたことを示唆した。

クリプトビオシス誘導時および蘇生時の酸化ストレスによるダメージがどの時期に、そしてどの組織に生じているのかを査定するため、脂質 (HNE) およびの DNA 塩基(8OHdG)の過酸化を示すマーカータンパク質の抗体を用いた免疫組織学的手法をネムリユスリカ幼虫の系で確立した(図2)。乾燥幼虫の水戻し直後の30分と1時間に顕著に脂質およびDNA塩基での酸化が観察されたが、その後すみやかに修復された。水戻し直後の活性酸素の発生によるDNAの大きな損傷が予想された。実際、DNA二重鎖切断の修復に関与する修復酵素遺伝子、*Rad51*の発現が水戻し直後に誘導されていた。DNAに大規模な損傷を負っていたにもかかわらず、細胞のアポトーシスやネクロトーシスによる細胞死はわずかしか観察されなかった。

マイクロアレイ解析を行ったところ、乾燥および放射線ストレスによって100倍、1,000倍を超える遺伝子の発現増加が認められた。このアレイ解析の結果の信頼性を検証するためqPCR解析をおこなったところ、同様の発現変動をしめしたことからマイクロアレイ解析の結果が信頼性の高いものであることがわかった。照射後の発現変動の著しい遺伝子の中には、既知の乾燥誘導性遺伝子であるLEAタンパク質遺伝子や*HSPs*など、乾燥において特異的に発現上昇する遺伝子も含まれていた。<sup>4</sup>Heイオンビームとガンマー線の両照射後に共通して4倍以上の発現上昇を示した遺伝子の中にはチオレドキシンや*ku 80*などの遺伝子が含まれていた。このことから、異なった非生物学的なストレスではあるが、結果的に発生する酸化ストレスに対して共通する抗酸化作用やDNA修復系があると同時に、それぞれの放射線で特異的に発現する遺伝子も多く存在することが分かった。

### 3. 今後の展望

3.11の東日本大震災にともなう福島原子力発電所の事故によって、放射線生体影響の評価および放射線防護の技術開発が急務であることが再確認された。ネムリユスリカの高い放射耐性機構の原因のひとつに、照射後に大規模なDNAの損傷を受けたにもかかわらず「アポトーシス」を回避しながら、それを修復していることがある。これをヒトの放射線防護技術に適用する際には、「一過的にアポトーシスを回避しながら損傷したDNAを修復する」ことが肝要となる。そのためには、ネムリユスリカ幼虫が発現している抗酸化因子(抗酸化活性を持つ二次代謝産物も含む)、DNA修復酵素因子に関するより詳細な情報が求められる。最近、乾燥及び放射線ストレスに対して高い耐性を有するネムリユスリカ胚子由来の培養細胞を構築することに成功した。さらにネムリユスリカのゲノム解読プロジェクトが現在進行中で、これらを用いることでより高等動物の放射線耐性に関わる因子の解析をより効率よく推進のするための環境が整った。

### 4. 参考文献

- Watanabe et al. (2006a) Int. J. Radiat. Biol. 82: 587.  
Watanabe et al. (2006b) Int. J. Radiat. Biol. 82:835.  
Nakahara et al., (2008) J. Insect Physiol. 54:1220.  
Cornette et al., (2010) JBC 285:35889  
Gusev et al., (2010) PLoS ONE 5(11) : e14008