

原子力基礎基盤戦略研究イニシアティブ
戦略的原子力共同研究プログラム 事後評価総合所見

研究開発課題名：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	
研究代表者（研究機関名）：奥田隆（独立行政法人農業生物資源研究所） 再委託先研究責任者（研究機関名）：馬嶋秀行（国立大学法人鹿児島大学）	
研究期間及び予算額：平成20年度～平成22年度（3年計画） 89 百万円	
項目	要 約
1. 研究開発の概要	クリプトビオシス（無代謝の乾燥休眠）状態の生物は放射線を含む様々な極限環境ストレスに対して高い耐性を示す。本課題では、クリプトビオシス生物の中で最も高等で大型なネムリユスリカを用いて、特にその乾燥および放射線耐性の機序を明らかにするため、両者のストレスにより発現が誘導される遺伝子の網羅的な解析および機能解析、DNA 切断修復の分子機構の解析、ミトコンドリアからの活性酸素の発生动態とその影響を抑制する機構の解析を行うことを目的とする。
2. 総合評価	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px; margin-right: 10px;">A</div> <div> <p>・基礎的ではあるが、生物の放射線耐性機構に関して将来的に期待できる分野の研究を、十分な目的意識を持って進めており、優れた成果が挙げられている。</p> <p>S) 極めて優れた成果が挙げられている A) 優れた成果が挙げられている B) 一部を除き、相応の成果が挙げられている C) 部分的な成果に留まっている D) 成果がほとんど挙げられていない</p> </div> </div>
3. その他	・ヒトを含めた生物の放射線耐性に関しては、東日本大震災以降、社会的にニーズの高い課題としてクローズアップされている。本研究の更なる加速化と広がりを期待したい。

1. 目的・目標	<p>クリプトビオシス（無代謝の乾燥休眠）状態の生物は放射線を含む様々な極限環境ストレスに対して高い耐性を示す。本課題では、クリプトビオシス生物の中で最も高等で大型なネムリユスリカを用いて、特にその乾燥および放射線耐性の機序を明らかにするため、両者のストレスにより発現が誘導される遺伝子の網羅的な解析および機能解析、DNA 切断修復の分子機構の解析、ミトコンドリアからの活性酸素の発生动態とその影響を抑制する機構の解析を行うことを目的とする。</p>
2. 研究成果	<p>【研究開発項目(1) ネムリユスリカ放射線耐性因子解明に関する研究】</p> <p>[得られた成果]</p> <p>①放射線耐性関連遺伝子 EST データベースの構築</p> <p>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するために、ネムリユスリカ水和幼虫にγ-線を照射し、RNA を単離して平均化 cDNA ライブラリーと通常の cDNA ライブラリーを構築した。それらを統合し更新された EST データベースは 18, 171 個のクラスターで形成され、ハウスキーピング遺伝子のみならず、転写因子やシグナル伝達因子などの比較的発現量の少ない遺伝子が数多く含まれ、良好なマイクロアレイチップの作成に重要な役割を果たした。</p> <p>②放射線耐性遺伝子発現解析</p> <p>乾燥耐性を持たないヤモンユスリカとの比較実験によって、ネムリユスリカが特異的に DNA 修復の能力に優れているわけではなく、ユスリカの仲間が概して酸化ストレス耐性に優れていることが示唆された。</p> <p>数十塩基におよぶ比較的大規模な二重鎖を歪ませるような損傷の修復、すなわちヌクレオチド除去修復を行う <i>XPB</i> が乾燥ストレス処理後、直ちに発現し、蘇生後にも発現ピークが認められた。蘇生過程前半で、2 重鎖切断修復酵素遺伝子、<i>Rad51</i> が発現し、さらにその最終段階で、ミスマッチ修復酵素遺伝子、<i>PMS2</i> の発現が確認され、一連の修復酵素遺伝子が段階的に発現し DNA 修復に関わっていた。</p> <p>③ネムリユスリカ体内でのアポトーシス細胞消長調査</p> <p>ユビキチン結合酵素 (E2) をクローニングし、その発現パターンの解析を行ったところ、乾燥ストレス処理後直ちに発現がみられ 16 時間後にピークをみられた。その後、水戻し後にも発現が認められ、酸化ストレスと相関が認められた。クリプトビオシス誘導に必要なタンパク質合成のリソースを得るために、非常時（脱水時）に不要なタンパク質の合成を止めるのと同時に、それらを積極的に代謝する機構が発動しているものと推察された。実際、数多くのタンパク質分解酵素遺伝子の発現誘導が観察された。</p>

ネムリユスリカ幼虫は高い放射線の照射によって DNA 損傷が生じるものの、アポトーシスが誘導されることなく、損傷した DNA の修復を行う。そこで、より上流域でアポトーシス誘導に関連する遺伝子であるヒストンタンパク質のサブユニット H2A を解析したところ、その C 末端にある特異モチーフのアミノ酸配列が他の生物とは異なっていた。このことは、ネムリユスリカのアポトーシス誘導に関わるヒストンタンパク質のリン酸化様式が他の生物とは異質で、そのことが DNA 損傷下でのアポトーシス誘導の阻止に関係していることを示唆した。人を含めた脊椎動物の細胞は放射線ストレスによるわずかな DNA 損傷によってアポトーシスを誘導後、致死する。放射線暴露後の治療を考えた時に、アポトーシスを一過的的に回避できれば、その間に損傷した DNA の修復を行なうという新規の戦略が採用できる。

④EST をもとにした DNA チップの作成及び放射線耐性関連遺伝子の解析

DNA チップ (アレイ搭載プローブ数が F:10,000, R:6,652 合計 16,652 と良好なアレイ) を構築し、マイクロアレイ解析をおこなったところ、乾燥ストレスに伴って大規模な遺伝子発現変動が観察された。乾燥に伴い相対発現量が 2 倍以上に上昇するプローブは 3895 個 (主に抗酸化酵素、LEA タンパク質、HSP)、減少するプローブは 3111 個 (主にヘモグロビン) あった。覚醒 (再水和) 24 時間に特異的に相対発現量が 2 倍以上に上昇するプローブは 435 個 (主に乾燥ストレスによって変性を受けたタンパク質を除去する消化酵素) あった。特に LEA タンパク質については、乾燥耐性特異的なタンパク質と想像していたが、放射線ストレスにも応答して発現することがわかり、新たな発見、すなわち放射線防護にもつながる重要な知見と考えている

⑤酸化ストレス適応の特異的な DNA 配列と放射線耐性の関係調査

DNA 修復酵素遺伝子 (*Rad23*) の coding-region と no-coding region の AT/GC 含量をクリプトビオシスしないヤモンユスリカとの比較をおこなったところ、coding region の AT 含量はネムリユスリカが 60%、ヤモンユスリカが 45%、non-coding region についても同様にネムリユスリカが 76%、ヤモンユスリカが 60%と、やはり酸化ストレスによる AT への偏りがネムリユスリカで認められた。本課題で、ネムリユスリカのミトコンドリアがヒトのミトコンドリアに比べて高い放射線耐性を持っていることがわかったので、更に詳細な実験を試みた。すなわち、乾燥耐性のあるネムリユスリカのナイジェリア、マラウィ両個体群、ヤモンユスリカそれぞれのミトコンドリア DNA の全塩基配列を解読し、ナイジェリア個体群とマラウィ個体群の *NADH3* および *COI* 近傍に他の昆虫ではみられない長い AT の繰り返し配列の挿入を確認した。さらにマラウィ個体群がナイジェ

リア個体群よりもより長い AT の繰り返し配列の挿入を確認したことから、マラウイ個体群の方が放射線耐性がより高いことが予想された。水和幼虫に γ -線照射 (70 Gy) を実施したが、照射後の発育に両者で顕著な差が認められなかった。両者間で差異を抽出するにはバイオアッセイ系の改良および、より長期的な放射線による影響の調査が必要と思われた。

【研究開発項目(2) 放射線耐性に対するミトコンドリアの役割解明研究】

[得られた成果]

①ミトコンドリア DNA 損傷と修復機能解析

ネムリユスリカ細胞株を用い、倒立顕微鏡と 3CCD カメラを備えた共焦点レーザー顕微鏡を用い、生きたままの細胞から産生される HPF 試薬を用いたミトコンドリア由来活性酸素発生検出、HNE 抗体を用いた脂質の過酸化及びアポトーシス検出を行った。次に、ヒト細胞 (HLE) およびネムリユスリカ細胞株における放射線照射後のミトコンドリア DNA (mtDNA) コピー数変化を観察した。ヒト細胞では、放射線照射後 3 日目から mtDNA コピー数の増大を観察したが、ネムリユスリカ細胞株では、照射後の著名な変化は認められなかった。このことは、mtDNA 障害修復能が高いことを推測させ、ネムリユスリカ細胞の放射線抵抗性の機序の一端を担っている可能性があると思われた。

ネムリユスリカ幼虫において、乾燥化、および水戻し後の脂質の過酸化 (HNE) および DNA 障害 (8OHdG) を免疫細胞化学染色にて半定量化して観察した。乾燥化では、脂質の過酸化 (HNE) および DNA 障害 (8OHdG) とともに著名な変化は認められなかったのに対し、水戻し後では、脂質の過酸化 (HNE) および DNA 障害 (8OHdG) とともに、水戻し後 30 分、1 時間後で増大して認められ、以降、軽減して認められた。これにより、水戻し直後には、ネムリユスリカ幼虫に大きな酸化ストレスの負荷がかかるものの、その後、過酸化 DNA 塩基、過酸化脂質ともに急速に修復されることがわかった。このことは、ネムリユスリカ幼虫が水戻しを繰り返すことで酸化ストレスに対する抵抗性を有し、これが、放射線抵抗性を示していることを推察させた。

②抗酸化関連遺伝子の強制過剰発現および発現抑制による耐性への影響の検討

ヒト HLE 細胞に MnSOD 遺伝子を過剰発現させると、放射線照射により細胞内ミトコンドリア発生活性酸素、脂質過酸化が減少し、アポトーシスが減少する、すなわち、放射線抵抗性を示した。これにより、MnSOD は放射線抵抗性因子であることが明らかとなった。次に、

ネムリユスリカでは、MnSOD RNAi を作成し、MnSOD の発現を低下させることに成功した。これにより、ネムリユスリカにおける放射線に対する MnSOD の影響を調べたところ、確かに MnSOD が放射線抵抗性因子であることを突き止めた。そこで、ネムリユスリカ細胞を用いて MnSOD RNAi をトランスフェクトして遺伝子発現を抑制したが、その効果は小さかった。

放射線は、mtDNA の転写の低下を介して電子伝達系の働きを抑制し、活性酸素を産生することがわかった。さらにネムリユスリカ細胞ではヒト細胞に比べ、放射線照射による核-ミトコンドリアゲノム比率に大きな変化は見られなかった。

ネムリユスリカを乾燥ストレスにさらしても脂質の過酸化 DNA の損傷はほとんど起きず、また水戻しを行うと、宇宙環境に 1 年半曝露した後でも水戻し後 1 時間ほどは脂質の過酸化や DNA 損傷が増大して見られ、その後は減少傾向が見られた。これは、ネムリユスリカが日常的にクリプトビオシスを行なっている過程で、酸化ストレスが生じ、ネムリユスリカ体内で酸化ストレスに対する回復機能を有していることを表している。すなわち、ネムリユスリカは強い抗酸化システム系を有していることを示している。これは、ネムリユスリカが、放射線抵抗性である理由の一端を表しているといえよう。

③ヒト細胞とネムリユスリカ培養細胞の fusion 細胞構築

高い放射線耐性をもつネムリユスリカ由来のミトコンドリアを導入（交換）することでヒト細胞の放射線耐性を高めることを目的に、143B 細胞とネムリユスリカ培養細胞（チミジンキナーゼ正常）の fusion 細胞の作製を試みたが、放射線耐性を高めるまでには至らなかった。実験に供するレベルの安定性のある融合細胞特性を得るための様々な問題点を解決していく必要があると思われた。

【論文、特許等】

[論文発表]

- 1) Cornette, R. et al. (2010) Identification of anhydrobiosis-related genes from an Expressed Sequence Tag database in the cryptobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* (Diptera ; Chironomidae). *Journal of Biological Chemistry* 285 : 35889-35899 (IF : 5.3)
- 2) Gusev, O. et al. (2010) Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the Sleeping Chironomid : linkage with radioresistance. *PLOS One* 5 (11) : e14008 (IF : 4.3)
- 3) Majima HJ, Indo HP, Tomita K, Iwashita Y, Suzuki H, Masuda D, Shimazu T, Tanigaki F, Umemura S, Yano S, Fukui K, Higashibata A, Yamazaki TQ, Kameyama M, Suenaga S, Sato T, Yen H-C, Gusev O,

Okuda T, Matsui H, Ozawa T, Ishioka N: Bio-assessment of risk in long-term manned space exploration - cell death factors in space radiation and/or microgravity: a review -. Biol Sci Space 23(2) : 43-53, 2009.

- 4) Majima, HJ, Indo, HP, Suenaga, S, Matsui, H, Yen, H-C and Ozawa, T: Mitochondria as Possible Pharmaceutical Targets for the Effects of Vitamin E and its Homologues in Oxidative Stress-Related Diseases. Curr Pharm Des, 17(21) 2190-2195, 2011.
(IF : 4.8)

[口頭発表]

- 1) Okuda T: A novel dry-preservation technology inspired by desiccation tolerant insect, *Polypedilum vanderplanki* International Symposium on EcoDesin, Kyoto, Japan Nov. 31-Dec. 2, 2011.
- 2) Okuda T: New insight on the desiccation tolerance mechanism in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki* 18th International Symposium on Chironomidae Norway, Trondheim July 4-6, 2011:37
- 3) Okuda T: Analysis of drought resistant insect for dry preservation technology 2nd International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics 2011 Tsukuba, Japan Feb. 25-26, 2011
- 4) Okuda T: Cross-resistance mechanism of a cryptobiotic chironomid, *Polypedilum vanderplanki* International Conference on Invertebrate Reproduction and Development Prague, Czech republic Aug. 16-20, 2010
- 5) Gusev O, Nakahara Y, Cornette R, Iwata K, Sakashita T, Hamada N, Kikawada T, Kobayashi Y, Majima H, Okuda T: DNA damage and repair upon anhydrobiosis in the Sleeping Chironomid, *Polypedilum vanderplanki* 4th International Symposium of Environmental Physiology of Ectotherms and Plants Rennes, France July 18-22, 2011 :30
- 6) Cornette R, Gusev O, Nakahara Y, Shimura S, Kikawada T, Okuda T (2011) Adaptation to extreme environments and small genome size in Chironomids 4th International Symposium of Environmental Physiology of Ectotherms and Plants Rennes, France July 18-22, 2011 :31
- 7) Hideyuki J Majima, Hiroko Indo, Mercy Davidson, Hsiu-Chuan Yen, and Toshihiko Ozawa: Mitochondrial DNA Damaged Cells Generate ROS

- from Mitochondria and Induce Apoptosis. International Symposium on Mitochondrial Biology and Medicine & the Chinese-Mit' 2011, Xi' an, China, April 7-10, 2011. (招待講演)
- 8) H. J. Majima, D. Masuda, A. Nagamatsu, H. P. Indo, Y. Iwashita, H. Suzuki, T. Shimazu, S. Yano, F. Tanigaki, N. Ishioka, and C. Mukai: A Study of Space Radiation Shielding Ability Using Regolith, 18th IAA Humans in Space Symposium, Houston, Texas, USA, Apr 11-15, 2011.
- 9) Hideyuki J. Majima, Hiroko Indo, Noriaki Ishioka, Hiromi Suzuki, Toru Shimazu, Sachiko Yano, Fumiaki Tanigaki, Daisuke Masuda: Effects of 28 Days Exposure of Human Neuro Cells in Space; Neuro Rad Experiments. 28th International Symposium on Space Technology and Science (ISTS), Okinawa, June 5-12, 2011. (座長)
- 10) Hiroko P. Indo, Noriaki Ishioka, Hiromi Suzuki, Toru Shimazu, Sachiko Yano, Fumiaki Tanigaki, Aiko Nagamatsu, Daisuke Masuda, Etsuko Minobe, And Masaki Kameyama And Hideyuki J. Majima: Effects of 14 and 28 days exposure of human neuro cells in Space; Neuro Rad Experiments. SFRBM's 18th Annual Meeting, Atlanta, November 16-20, 2011.
- 11) Gusev Oleg、迎恭輔、Cornette Richard、黄川田隆洋、奥田隆、坂下哲也、舟山和夫、小林泰彦：ネムリユスリカの乾燥と放射線ストレスに対する交差抵抗性：特に抗酸化因子に関するゲノムおよび発現解析からの新たな洞察 第6回高崎量子応用研究シンポジウム：高崎、2011年10月13-14日
- 12) Gusev Oleg、迎恭輔、Cornette Richard、黄川田隆洋、奥田隆、坂下哲也、舟山和夫、小林泰彦：ネムリユスリカにおけるゲルズリン遺伝子：放射線と乾燥ストレスに対する保護機能の可能性について 第5回高崎量子応用研究シンポジウム：高崎、2010年10月14-15日
- 13) 犬童寛子、石岡憲昭、鈴木ひろみ、島津 徹、矢野幸子、谷垣文章、梶田大輔、蓑部悦子、亀山 正樹、馬嶋秀行：宇宙放射線および微小重力が哺乳細胞に及ぼす影響、第64回日本酸化ストレス学会学術集会、ルスツ、2011年7月2-3日。(座長)
- 14) 馬嶋秀行：14日間および28日間国際宇宙ステーションに滞在におけるヒト神経様 SK-N-SH 細胞への影響について。第48回放射線影響懇話会、熊本、2011年7月16日。(特別招待講演)
- 15) 馬嶋秀行、犬童寛子、鈴木ひろみ、石岡 憲昭、稲波 修、幸村 知子、中川 靖一：X線照射によるアポトーシスはミトコンドリアが主体となりおこる。日本放射線影響学会第54回大会、神戸、2011年11月17-19日。(シンポジウム)

[その他]

- 1) 奥田 隆：非常識な生物たち 科学雑誌 NEWTON 2010年4月号
- 2) Majima HJ, Indo HP, Suenaga S, Kaneko T, Matsui H, Yen H-C, Ozawa T: Mitochondria as Source of Free Radicals. Naito Y, Suematsu M, Yoshikawa T (eds): Free Radical Biology in Digestive Diseases, Front Gastrointest Res. Basel, Karger, vol 29, pp12-22, 2011.