

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月12日現在

機関番号：82110  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008 ～ 2011  
 課題番号：20310032  
 研究課題名（和文） 放射線を感じて学習行動を変える線虫のメカニズム  
 研究課題名（英文） Mechanism of Ionizing Radiation Induced Modulation of the Salt Chemotaxis Learning in *C. elegans*

研究代表者  
 坂下 哲哉（SAKASHITA TETSUYA）  
 独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹  
 研究者番号：30311377

## 研究成果の概要（和文）：

NaCl 濃度の広範囲な分布（1～100 mM）条件で評価が可能な新規化学走性試験法を開発し、線虫の化学走性学習における放射線応答に、*odr-3* 遺伝子が関与することを明らかにした。また、ニューラルネットワーク解析により化学走性学習に重要な神経情報伝達を推定した。さらに、学習行動との関連が示唆される酸化ストレス応答に関わる遺伝子変異株の検討を開始した。

## 研究成果の概要（英文）：

We developed a new chemotaxis population assay system with a broad NaCl concentration range from 1 to 100 mM. Using this assay system, we found that *odr-3* gene was responsible for ionizing radiation induced modulation of the salt chemotaxis learning. In addition, we estimated the neurotransmission related to the salt chemotaxis learning using the neural network analysis. Moreover, we started the examination for mutants without oxidative stress response genes.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線、神経科学、バイオセンサー、システムズ放射線生物学

## 1. 研究開始当初の背景

学習行動に対する放射線の影響は、神経細胞、哺乳動物等を用いて、数十年にわたって研究されてきた。これまでに、主に以下の3点が放射線の影響として明らかになっている。

- ① 神経細胞の新生を抑制する。\*
- ② 神経伝達機構に障害を与える。
- ③ 神経細胞の発火頻度を増大する。

※ 神経新生は成人においても新しい神経細胞が脳内（ヒトでは海馬）で常に生まれることを意味し、学習と新たな記憶に関与することが知られている。

本研究で対象とした線虫の神経細胞は、成虫段階になるとそれ以上分化しない。そのため、成虫に対する放射線の影響を調べる時は、哺乳動物で重要な①の影響を無視することができる。放射線影響の①と②とは、実は相

反する放射線の効果を表しており、①が主な因子である場合には行動や学習は放射線により抑制される可能性がある。一方、②が主となる場合には行動や学習の亢進が予想される。

私たちは、線虫の連合学習の中で、餌と味覚との連合学習である NaCl に対する化学走性学習を研究対象に選んだ。温度や臭いに関する実験系に比べてマイクロビーム等の放射線照射実験が容易な事が化学走性学習を選んだ主な理由である。通常条件で飼育された線虫は、NaCl の濃度勾配をつけた化学走性アッセイプレートの上にセットすると、NaCl 濃度が高い方へ寄って行く。NaCl の高濃度へ誘引されるこの性質を化学走性と呼ぶ。さらに、線虫が餌のない状態で NaCl にしばらく曝されると（条件付け）、この化学走性が低下する。この NaCl と餌との組み合わせにより生じる NaCl に対する化学走性の低下が化学走性学習である。

私たちは、この NaCl に対する化学走性が、条件付けによる学習の前後、及び学習の過程において放射線（ $\gamma$ 線）によってどのような影響を受けるかを調べた。その結果、学習前と学習後には何ら放射線の影響が観られなかったのに対して、学習過程（条件付け）の途中で放射線を照射した場合には、NaCl に対する化学走性が顕著に低下することを発見した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、私たちが発見した特定の条件下でのみ観察される線虫の化学走性学習行動に対する放射線の応答が、どのようなメカニズムで起こるのかを明らかにすることである。そのために、

(1) 新規化学走性試験法を開発する：NaCl の濃度範囲により化学走性学習の応答が異なることが知られている。そのため、新規化学走性試験法の開発により、放射線応答の濃度依存性などのメカニズムを明らかにできる。

(2) 化学走性学習に関わる神経情報伝達を推定する：線虫では全ての神経細胞間の結合が明らかであるが、化学走性学習に関わる神経細胞については感覚神経細胞を除き、まだ十分な理解に至っていない。そのため、計算科学の手法により、化学走性学習に重要な化学シナプスにおける情報伝達を推定する。

(3) 酸化ストレス応答遺伝子の欠損株を用いた放射線応答を調べる：線虫の酸化ストレス応答遺伝子の欠損株に抗酸化剤を投与することにより学習能力が改善することが報告されている。そのため、酸化ストレス応答遺伝子の欠損株では、私たちが発見した化学走性学習の放射線応答が抑制されるのではないかと予想した。本実験により、放射線応答

における酸化ストレスの関与の有無を明らかにできる。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規化学走性試験法の開発

より広範囲の NaCl 濃度分布を扱うため、約 21 cm 幅の滅菌角シャーレを用い、長軸方向に 7 区画 (P1-P7) に均等分割した。角シャーレに寒天を満たした後、一番端の 1 区画 (P7) の寒天を取り除き、代わりに 100 mM NaCl を含んだ寒天を注入し約 1 日置いた。NaCl 寒天を注入してから 21, 27 時間後の角シャーレの各区画の NaCl 濃度を陰イオンクロマトグラフにより測定した。NaCl 濃度分布を図 1 に示す。

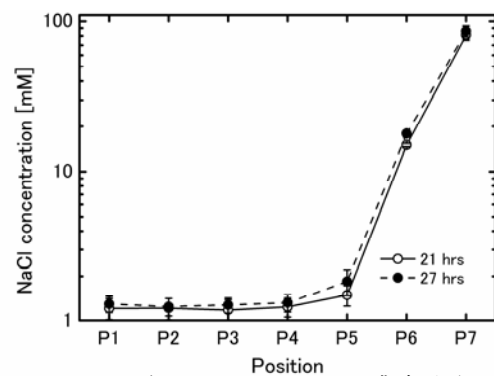


図 1 角シャーレの NaCl 濃度分布

上述のようにして NaCl の濃度勾配をつけた角シャーレを用いて化学走性試験を実施した。具体的には、図 1 の角シャーレの P4、P5、P6 の各区画位置に線虫をセットし、15 分経過後の各区画の線虫の分布を調べた。

### (2) 化学走性学習に関わる神経情報伝達の推定

学習過程（条件付けの途中）の放射線照射が線虫の学習に及ぼす影響のメカニズムを理解するためには、まず、「通常の学習がどのようなメカニズムで成立するのか」を知る必要がある。ここで対象とする学習は、神経ネットワークレベルにおける神経細胞の応答特性と化学シナプスにおける情報伝達の程度の経時的な変化を意味する。本研究では、化学走性に関与する神経細胞群に着目し、線虫の解剖学的な接続構造に基づく神経ネットワークモデル（ニューラルネットワーク）を作成して、学習前と学習後の応答をそれぞれシミュレートすることにより、学習前後での個々の神経細胞間のシグナル伝達の変化を一括して推定する方法を考案した。

(3) 酸化ストレス応答遺伝子の欠損株を用いた放射線応答の解析：研究の方法は用いる線虫株の違いを除いて(1)の方法と同じ。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規化学走性試験法を用いた野生型及び *odr-3* 遺伝子欠損株の解析結果

まず、化学走性学習の効果を確かめるために、条件付けの前と後に、それぞれ野生型線虫 100 匹程度を P4、P5、P6 の各区画位置にセットし、15 分後の線虫の位置分布を調べた。その結果、学習効果（化学走性の低下）が顕著に観察できたのは、P5 区画にセットした集団だけであった。そのため、放射線応答については、P5 の区画位置にセットした線虫の応答を調べることにした。

野生型線虫の放射線応答を調べた結果、非照射の線虫は、NaCl 濃度の高い方向へ移動しているのに対して、照射線虫はその移動が顕著に抑制されることが分かった（図 2a）。また、化学走性学習に関わることが報告されている *odr-3* 遺伝子変異した株では、野生型に比べて、放射線抑制の程度が小さいことが分かった（図 2b）。*odr-3* 遺伝子が、野生型線虫の化学走性学習の放射線応答に関与していることが示唆された。

今後は、*odr-3* 遺伝子下流の多くの遺伝子が化学走性学習に関わるため、それらを調べることにより、放射線応答遺伝子ネットワークの全容を明らかにする予定である。

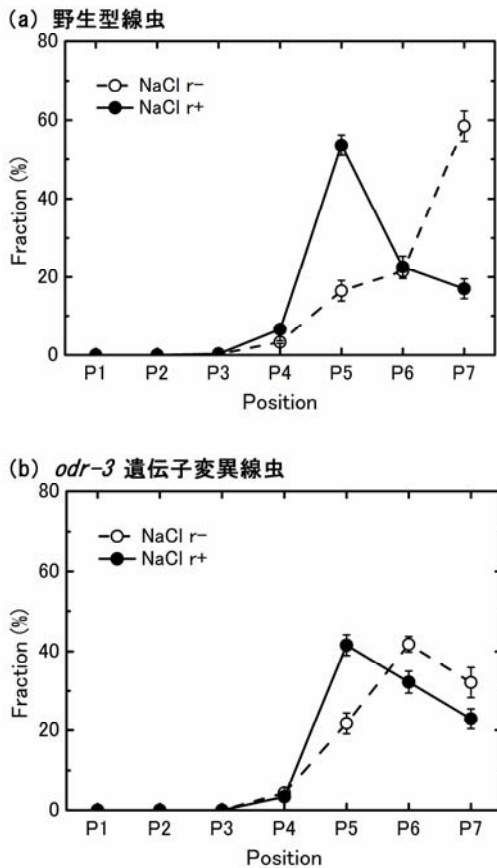


図2 野生型及び *odr-3* 遺伝子変異線虫の化学走性学習における放射線応答。r-は非照射、r+は照射を示す。

##### (2) 化学走性学習に関わる神経情報伝達の推定結果

神経ネットワークモデルを用いて学習前後の神経細胞間の情報伝達の変化を推定したところ、ASE 感覚神経と AIY 介在神経の間のシナプスなど、既に実験により学習への関与が指摘されている化学シナプスについては、本手法でも学習前後でその情報伝達に大きな変化が認められた。一方で、これまでに学習への関与が指摘されていないいくつかの化学シナプスにおいても、学習前後で情報伝達が大きく変化していることが推定され、これらが学習の成立に何らかの役割を果たしているものと考えられた。さらに、学習の前後で情報伝達にほとんど変化が生じない化学シナプスが、エサの情報伝達に関わるシナプスに集中していることも推定された。

今後は、学習過程の放射線照射が線虫の学習に及ぼす影響のメカニズムについても、神経情報伝達の面から調べていく予定である。

##### (3) 酸化ストレス応答遺伝子の変異株を用いた放射線応答の解析

線虫の酸化ストレス応答タンパクとして、インスリン信号伝達経路の PI3 キナーゼである AGE-1 が知られている。この *age-1* 遺伝子変異した線虫について放射線応答を調べた結果、興味深いことに、放射線応答の抑制ではなく、より亢進する応答が観察された（図 3）。この結果は、AGE-1 が放射線応答の抑制に関与していることを意味する。

インスリン信号伝達経路についても、今後明らかにする予定である。

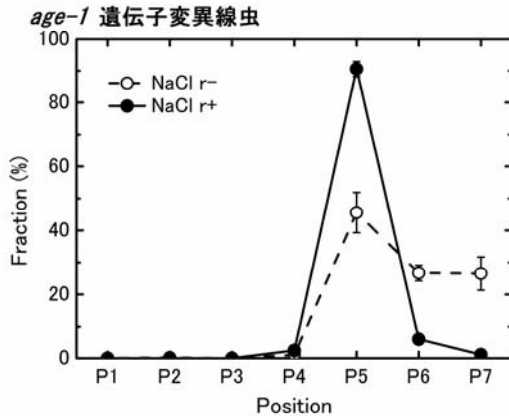


図3 *age-1* 遺伝子変異線虫の化学走性学習における放射線応答。r-は非照射、r+は照射を示す。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 6 件）

1. 坂下哲哉, 鈴木芳代, モデルとしての線虫に観る放射線の生物への影響と研究の展開, 放射線と産業, 2011, Vol. 131, pp.

- 37-41.  
URL:<http://www.rada.or.jp/radi&indu/hsmaga.html>  
(査読無)
2. 坂下哲哉, 鈴木芳代, 線虫 *C. elegans* における運動と学習を指標とした放射線影響解析, 放射線生物研究, 2011, Vol. 46, No. 1, 30-46.  
URL:[www.naramed-u.ac.jp/~oncra/rbrc/pub/46-1/46-1matome.doc](http://www.naramed-u.ac.jp/~oncra/rbrc/pub/46-1/46-1matome.doc)  
(査読無)
  3. Sakashita T, Takanami T, Yanase S, Hamada N, Suzuki M, Kimura T, Kobayashi Y, Ishii N, Higashitani A, Radiation biology of *Caenorhabditis elegans*: germ cell response, aging and behavior. J Radiat Res. 2010; 51(2):107-21. DOI:10.1269/jrr.09100  
(査読有)
  4. Suzuki M, Sakashita T, Yanase S, Kikuchi M, Ohba H, Higashitani A, Hamada N, Funayama T, Fukamoto K, Tsuji T, Kobayashi Y, Effects of ionizing radiation on locomotory behavior and mechanosensation in *Caenorhabditis elegans*. J Radiat Res. 2009; 50(2):119-25. DOI:10.1269/jrr.08087  
(査読有)
  5. Yanase S, Ishii N, Hyperoxia exposure induced hormesis decreases mitochondrial superoxide radical levels via Ins/IGF-1 signaling pathway in a long-lived *age-1* mutant of *Caenorhabditis elegans*. J Radiat Res. 2008; 49:211-218. DOI: 10.1269/jrr.07043  
(査読有)
  6. Sakashita T, Hamada N, Ikeda DD, Suzuki M, Yanase S, Ishii N, Kobayashi Y, Locomotion learning behavior relationship in *Caenorhabditis elegans* following gamma-ray irradiation. J Radiat Res. 2008; 49(3):285-91. DOI:10.1269/jrr.07102  
(査読有)
- [学会発表] (計 23 件)
1. 坂下哲哉, 鈴木芳代, 武藤泰子, 横田裕一郎, 舟山知夫, 浜田信行, 深本花菜, 小林泰彦, マイクロビームを用いた線虫の化学走性学習に及ぼす放射線影響部位の探索, 日本放射線影響学会第 54 回大会, 2011 年 11 月 17 日 (神戸市)
  2. 石井直明, 線虫はなぜ放射線に強いのか?, 日本放射線影響学会第 54 回大会, 2011 年 11 月 17 日 (神戸市)
  3. 築瀬澄乃, 正山哲嗣, 須田斎, 石井直明, ins/IGF-1 変異体における酸素ラジカル誘発性ホルミシスによる寿命延長機構, 日本放射線影響学会第 54 回大会, 2011 年 11 月 17 日 (神戸市)
  4. 坂下哲哉, 線虫の学習行動に対する放射線の影響, 京都大学放射線生物研究センター第 4 回ゲノム動態と維持機構の研究会, 2011 年 7 月 29 日 (彦根市)
  5. 鈴木芳代, 線虫の学習機構のニューラルネットワーク解析, 京都大学放射線生物研究センター第 4 回ゲノム動態と維持機構の研究会, 滋賀県彦根市, 2011 年 7 月 29 日 (彦根市)
  6. Yazaki K, Yanase S, Sakamoto T, Nakagawa Y, Ishii N, Identification of molecular compensation system of sod-genes expression in nematode *C. elegans*, 18th International *C. elegans* Meeting, 2011 年 6 月 25 日 (ロサンゼルス郡, 米国)
  7. Sakashita T, Radiation effects on learning behavior in *C. elegans*, The 28th International Symposium on Space Technology and Science, 2011 年 6 月 8 日 (那覇市)
  8. 坂下哲哉, 鈴木芳代, 線虫の学習行動に対する放射線影響とモデル解析の試み, 第 1 回放射線神経生物学研究集会, 2011 年 1 月 29 日 (前橋市)
  9. 築瀬澄乃, 矢崎孔明, 近藤雅紀, 石井直明, 内因性ストレス環境下における線虫 *C. elegans* の抗酸化系遺伝子の代替発現機構, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 9 日 (神戸市)
  10. 坂下哲哉, 鈴木芳代, 線虫の学習行動に対する放射線影響とモデル解析の試み, 京都大学原子炉実験所専門研究会「ヒト以外への生物への放射線影響」, 2010 年 11 月 16 日 (大阪市)
  11. 安田佳代, 須田斎, 石井恭正, 石井直明, 線虫 *C. elegans* における紫外線感受性株 *rad-8* のエネルギー代謝異常, 日本放射線影響学会第 53 回大会, 2010 年 10 月 20 日 (京都市)
  12. 坂下哲哉, 鈴木芳代, 武藤泰子, 横田裕一郎, 舟山知夫, 浜田信行, 深本花菜, 小林泰彦, マイクロビームを用いた線虫の化学走性学習に及ぼす放射線影響部位の探索, 本宇宙生物科学会第 24 回大会, 2010 年 9 月 17 日 (仙台市)
  13. Suzuki M, Sakashita T, Tsuji T, Kobayashi Y, Computational inferences on alteration of neurotransmission in chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. The 20th International Conference on Artificial Neural Networks(IC

- ANN2010), 2010年9月15日(テサロニキ市, ギリシャ)
14. Yanase S, Yazaki K, Some sod genes; targets of DAF-16 transcription factor in *Caenorhabditis elegans*, Aging, Metabolism, Stress, Pathogenesis and Small RNAs in *C. elegans* Topic Meeting 2010, 2010年8月3日(マディソン市, 米国)
  15. Sakashita T, Suzuki M, Mutou Y, Yokota Y, Funayama T, Hamada N, Fukamoto K, Kobayashi Y, CARBON-ION MICROBEAM INDUCES BEHAVIORAL CHANGE IN THE SALT CHEMOTAXIS LEARNING OF *C. ELEGANS*, 9th International Microbeam Workshop, 2010年7月16日(ダルムシュタット市, ドイツ)
  16. 築瀬 澄乃, 石井 直明, 線虫 *C. elegans* における寿命延長を誘発するホルミシス効果は、ミトコンドリア呼吸鎖での酸素消費量およびラジカル産生量の変化に起因する, 日本放射線影響学会第 52 回大会, 2009年11月12日(広島市)
  17. 坂下哲哉, 線虫の学習行動に与える放射線の影響とマイクロビーム照射実験の構想, 日本生物物理学会第 47 回年会, 2009年11月1日(徳島市)
  18. Yanase S, Onodera A, Tedesco P, Johnson TE, Ishii N, SOD-1 deletions in *Caenorhabditis elegans* alter the localization of intracellular ROS and show molecular compensation, 17th International *C. elegans* Meeting, 2009年6月25日(ロサンゼルス郡, 米国)
  19. Hamada N, Sakashita T, Ikeda DD, Yanase S, Suzuki M, Ishii N, Kobayashi Y, MODULATORY EFFECT OF IONIZING RADIATION ON SALT CHEMOTAXIS LEARNING: THE ROLE OF G PROTEIN GAMMA SUBUNIT IN *CAENORHABDITIS ELEGANS*, 2nd Asian Congress of Radiation Research, 2009年5月17-20日(ソウル市, 韓国)
  20. 坂下哲哉, 舟山知夫, 佐藤隆博, 浜田信行, 深本花菜, 横田裕一郎, 鈴木芳代, 横田渉, 神谷富裕, 小林泰彦, 原子力機構における重イオンマイクロビーム細胞照射装置と生物学研究, 第 9 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 2008年12月6日(岐阜市)
  21. Sakashita T, Suzuki M, Hamada N, Fukamoto K, Yokota Y, Kakizaki T, Wada S, Funayama T, Kobayashi Y, Effect of Locally Targeted Carbon-Ion Microbeam Irradiation on Learning Behavior in *Caenorhabditis elegans*, 8th International Workshop on Microbeam Probes of Cellular Radiation Responses, 2008年11月14日(千葉市)
  22. 坂下哲哉, 鈴木芳代, 浜田信行, 深本花菜, 横田裕一郎, 楚良桜, 柿崎竹彦, 和田成一, 舟山知夫, 小林泰彦, 線虫の複数の行動に与える高 LET 放射線の影響, 日本宇宙生物科学会第 22 回大会, 2008年9月26日(奈良市)
  23. Sakashita T, Suzuki M, Hamada N, Fukamoto K, Yokota Y, Sora S, Kakizaki T, Wada S, Funayama T, Kobayashi Y, COMPARATIVE STUDY OF SEVERAL BEHAVIORS IN *CAENORHABDITIS ELEGANS* FOLLOWING HIGH-LET RADIATION EXPOSURE, COSPAR2008, 2008年7月17日(モントリオール市, カナダ)
- [図書] (計1件)
1. Suzuki M, Sakashita T, Tsuji T, Kobayashi Y, Computational inferences on alteration of neurotransmission in chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. In: Artificial Neural Networks-ICANN 2010 Part I Lecture Notes in Computer Science, Vol. 6352, pp.291-300, Diamantaras K, Duch W, Iliadis LS (Eds.), Springer, 2010.  
DOI: 10.1007/978-3-642-15819-3\_38  
(査読有)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
坂下 哲哉 (SAKASHITA TETSUYA)  
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹  
研究者番号: 30311377
  - (2) 研究分担者  
石井 直明 (ISHII NAOAKI)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号: 60096196  
  
築瀬 澄乃 (YANASE SUMINO)  
大東文化大学・スポーツ健康科学部・准教授  
研究者番号: 90249061
  - (3) 連携研究者  
鈴木 芳代 (SUZUKI MICHIO)  
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究員  
研究者番号: 10507437