

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25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510064

研究課題名（和文） 線虫はなぜ放射線に強いのか：その耐性機構の解明

 研究課題名（英文） Why have nematode a radiation tolerance?
: Elucidation of the resistant mechanism.

研究代表者

石井 直明 (ISHII NAOAKI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60096196

研究成果の概要（和文）：線虫は放射線に対して強い耐性を示すことが知られている。線虫の一種、*C. elegans* は幼虫期に環境が悪化すると耐性幼虫になり、餌を与えた時点で正常発生に戻る。耐性幼虫期に電離放射線を照射し、正常発生後の寿命に延長効果が認められた。マイクロアレイ解析により照射された線虫では代謝制御・ストレス応答に関するシグナル伝達酵素群・抗酸化系酵素群などの遺伝子に発現上昇が見られた。特に、転写因子である *mxl-3* の放射線耐性への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）： It is known that nematode shows strong radiation tolerance. In response to harsh environmental conditions, nematode *C. elegans* larvae undergo dauer stage and recover the normal stage by environmental reform. Modest doses X-irradiation of dauer larvae increased their post-dauer longevity. We founded that the gene expressions of some enzymes of metabolic regulation/anti-oxidation related with metabolic regulation/stress response were up-regulated in the X-ray irradiated dauer larvae. Especially, it is suggested that a transcription factor, *mxl-3* plays a role of radiation tolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響化学

キーワード：応答

1. 研究開始当初の背景

線虫は回虫と同じ線形動物門に属する動物で、地球のあらゆるところに生息している。線虫の中でも *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) は体長が 1mm ほどしかないが、表皮、筋肉、神経、消化器官、

生殖器官という動物に必要な最小限の体制をもち、分子遺伝学的解析技術が確立されていることからさまざまな生命分野のモデル動物として確固たる地位を確立している。また最長寿命が 30 日と短く老化のモデル動物としても用いられることが多い。これまで我々は *C.*

elegans や我々が独自に分離した線虫 *Rhabditidae tokai* (*R. tokai*)を用いて電離放射線・紫外線や酸素に対する生物効果を調べてきた。線虫は電離放射線に対して高い耐性を示し、成虫の *R. tokai* は 300 Gy の照射でも寿命に変化は示さなかった。その理由として、線虫は成熟後に体細胞分裂が起こらないことが考えられる。現に細胞分裂が盛んな *R. tokai* の卵に X 線を照射すると 60 Gy でも孵化した虫の寿命が大きく短縮し、*C. elegans* においても受精直後の卵は 10 Gy で孵化できなくなった。電離放射線に対して耐性を示すもう一つの理由として染色体の動原体が複数存在し染色体が安定化していることが考えられる。さらに、我々は *R. tokai* が放射線による DNA の二重鎖切断に対して強い修復機能を持つことを見出している。

1980 年代から、低線量の放射線照射が生物の成長・発育の促進、繁殖力の増進及び寿命の延長などの効果をもたらすという研究（放射線ホルミシス研究）が注目されるようになった。さらに放射線のみならずさまざまなストレスに対しても同じような効果が見出されている。我々は *C. elegans* を高酸素暴露すると電離放射線に耐性を示すようになることを示し、酸素と放射線の傷害に対して共通の防御機構が存在することを示した。

餌が不足するような環境が悪化すると *C. elegans* は正常発生から外れて耐性幼虫と呼ばれるステージに移行する。耐性幼虫は餌なしで 60 日生存するが、その間に餌を与えると正常発生に復帰する。耐性幼虫の 60 日の期間中のどの時点で復帰させても、正常発生後の寿命が変化しないことから、耐性幼虫のステージを non-aging stage と呼んでいる。このため耐性幼虫では DNA 傷害が蓄積しにくくなっている可能性がある。しかしさらに強い傷害を起こしたときには老化が促進することが考えられる。そこで耐性幼虫に X 線を照射し、餌を与えて正常発生後の寿命を測定した。予想に反して 100 Gy の照射により寿命に 40% の延長が観察され、これは高線量の放射線に対して誘導された防御機構が放射線傷害のみならず、自然に生じた傷害も同時に修復したことを示唆している。

これまで高線量照射が生物にプラスの効果をもたらすことを示した報告はなく、この防御機構を研究することで、これまで知られていなかった高線量の放射線に対する生物の耐性のメカニズムを明らかにすることが可能となる。核ゲノムに対する

傷害・修復に関する研究は多数存在し、これ以上の新規の成果が得られない可能性がある。

2. 研究の目的

動物としての最小限の体制を持つ線虫は放射線に対して強い耐性を示すことから、この耐性機構の研究は生命の基本的な防御機能の解明のみならず、放射線による生じるガンや老化促進作用などの機構の解明と予防に貢献することができる。本研究ではエネルギー代謝や細胞死に関わり生命維持に重要な役割を担うことから放射線傷害の影響を大きく受けると考えられるミトコンドリアに焦点を当てて、これまで知られていなかった高線量の放射線に対するミトコンドリア傷害を介する生物の耐性のメカニズムを遺伝子のレベルで明らかにする。

3. 研究の方法

線虫 *C. elegans* はすべてのゲノム配列が決定されており、全遺伝子の micro-array がすでに市販されている。また線虫はアメリカの *C. elegans* Genetics Center にすべての遺伝子情報のデータベースが構築されており、解析が容易になるようインターネットを通じてそれをいつでも利用できる利点がある。

そこで、放射線耐性を最も強く示す若年期の耐性幼虫を集めて RNA を抽出し、micro-array を用いて線虫が持つ全遺伝子の中から放射線に応答する遺伝子を同定する。放射線は細胞内で活性酸素を発生させることから、活性酸素に対する耐性機構に大きく関係すると考えられる。放射線に対する修復酵素を調べるとともに、生体内の活性酸素の主な発生源は細胞小器官であるミトコンドリアであるので、ミトコンドリアに関する活性酸素防御機構に関しても詳細に調べる。

4. 研究成果

通常発生から外れた耐性幼虫期に線虫に、低線量放射線(X 線 30Gy)を照射し、通常発生復帰後の寿命延長効果を指標に放射線ホルミシスを確認した。耐性幼虫期に移行して 1 日目の虫は寿命延長効果を得ることができたが、30 日目の虫はその効果を得ることができなかった。そこで、耐性幼虫期 1 日目と 30 日目の虫を、X 線

照射群と非照射群の4群に分け、マイクロアレイによるゲノムワイドな遺伝子発現レベルで解析を行った。寿命延長効果がみられた1日目のX線照射群と他の3群とを比較して、発現量が変動した遺伝子群を抽出した。

その結果、代謝制御・ストレス応答に関するシグナル伝達酵素群・抗酸化系酵素群・ペプチダーゼ・プロテアーゼ酵素群・細胞骨格構築蛋白質群・自然免疫応答遺伝子群などの遺伝子に発現上昇が見られた。本結果から、成長因子(EGF、FGFリガンド)からのシグナルが、Cdc42を介してJNK経路が活性化したことにより抗酸化系機能の亢進を生じ、その一方で、cGMPを介して脂肪酸代謝・糖新生の亢進を生じ、寿命延長効果が得られたのではないかと考えている。その中でも転写因子である*mxl-3*が放射線照射により高い発現を示した。*mex-3*が関与するシグナル伝達系がミトコンドリアの機能にも関与しているという報告もあることから、高線量の放射線に対するミトコンドリア傷害を介する生物の耐性のメカニズムを遺伝子のレベルで明らかにすると、当初の目的の達成に大きく前進できた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

- ①Uchino Y, Kawakita T, Miyazawa M, Ishii T, Onouchi H, Yasuda K, Ogawa Y, Shimmura S, Ishii N, Tsubota K. (2012) Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production. *PLoS ONE* 7: e45805. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0045805
- ②Onouchi H, Ishii T, Miyazawa M, Uchino Y, Yasuda K, Hartman PS, Kawai K, Tsubota K, Ishii N. (2012) Mitochondrial superoxide anion overproduction in Tet-mev-1 transgenic mice accelerates age-dependent corneal cell dysfunctions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53: 5780-5787. 査読有
DOI: 10.1167/iovs.12-9573
- ③Takahashi Y, Yasuda K (12/14), Ishii N (13/14) et al. (2011) Asymmetric arginine dimethylation determines life span in *C. elegans* by regulating forkhead transcription factor DAF-16. *Cell Metabolism* 13: 505-516 査読有 DOI: 10.1016/j.cmet.2011.03.017
- ④Fujii M, Yasuda K (2/5), Ishii N (5/5) et al. (2011) A mutation in a mitochondrial dehydrogenase/reductase gene causes an increased sensitivity to oxidative stress and

mitochondrial defects in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells* 16: 1022-1034 査読有

DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01547.x

- ⑤Kishikawa J, Yasuda K (4/8), Ishii N (6/8) (2012) MRT letter: Expression of ATP sensor protein in *Caenorhabditis elegans*. *Microscopy Research and Technology* 76: 15-19 査読有 DOI: 10.1002/jemt.21103
 - ⑥Ishii T, Miyazawa M, Onodera A., Yasuda K, Kawabe N, Kirinashizawa M, Yoshimura S, Maruyama N, Hartman PS, Ishii N (2011) Mitochondrial reactive oxygen species generation by the SDHC V69E mutation causes low birth weight and neonatal growth retardation. *Mitochondrion* 11: 155-165. 査読有 DOI: 10.1016/j.mito.2010.09.006
 - ⑦Yasuda K, Hartman PS, Ishii T, Suda H, Akatsuka A, Shoyama T, Miyazawa M, Ishii N (2011) Interrelationships between mitochondrial fusion, energy metabolism and oxidative stress during development in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404: 751-755. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.12.01
 - ⑧Sakashita T, Takanami T, Yanase S, Hamada N, Suzuki M, Kimura T, Kobayashi Y, Ishii N, Higashitani A (2010) *Journal of Radiat. Res.* 51: 107-121 査読有
DOI: 10.1269/jrr.09100
 - ⑨石井直明 (2010)、線虫、*C. elegans*から始まった寿命決定の分子メカニズム研究、*放射線生物研究*、45: 249-267. 査読無
- [学会発表] (計16件)
- ①石井直明、寿命決定のメカニズムを探る、日本コエンザイムQ協会 2012年度年会 (招待講演)、2013年02月01日~2013年02月01日、東京工科大学
 - ②林政太郎、石井直明 他、The mechanism of longevity with hormesis by the low dose X-irradiation in *C. elegans*、第35回日本分子生物学会 年会、2012年12月11日~2012年12月14日、福岡国際会議場
 - ③浅利真司、石井直明 他、Abnormal lymphocyte accumulation in Tet-*mev-1* (SDHC V96E) conditional transgenic mice、第35回日本分子生物学会 年会、2012年12月11日~2012年12月14日、福岡国際会議場
 - ④安田佳代、石井直明 他、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55回大会、2012年09月06日~2012年09月08日、東北大学 川内北キャンパス
 - ⑤林政太郎、石井直明 他、低線量X線照射による線虫*C. elegans*の寿命延長機構の解析、

- 日本放射線影響学会第55回大会、2012年09月06日～2012年09月08日、東北大学 川内北キャンパス
- ⑥石井直明、分子生物学的見地からみた放射線（電離放射線）とその健康影響、第21回 日本臨床環境医学会 総会（招待講演）、2012年06月01日～2012年06月02日、新潟県南魚沼市 市民会館
- ⑦石井直明、線虫はなぜ放射線に強いのか？、放射線影響学会第54回大会、2011年11月18日、神戸商工会議所会館
- ⑧Ishii T, Ishii N et al., Oxidative stress-related diseases on aging in mitochondrial O_2^- inducible *mev-1* models. The 1st Nagasaki-Pusan Joint Seminar on Aging Research, 2011年2月18日、長崎大学（長崎）
- ⑨Yasuda K, Ishii N et al., Energy metabolism abnormality of ultraviolet irradiation sensitive mutant *rad-8* in *C.elegans*. The 7th Conference of ASMRM and 10th Conference of J-mit, 2010年12月17日、福岡国際会議場（福岡）
- ⑩Miyazawa M, Ishii N et al., Mitochondrial A-RAF drives neuronal differentiation via superoxide production and PDC activation in mitochondria, The 7th Conference of ASMRM and 10th Conference of J-mit, 2010年12月17日、福岡国際会議場（福岡）
- ⑪Ishii T, Ishii N et al., Effects of mitochondrial oxidative stress by complex II SDHC V69E mutation on decreased fertility, pregnancy and delivery rates. The 7th Conference of ASMRM and 10th Conference of J-mit, 2010年12月17日、福岡国際会議場（福岡）
- ⑫石井直明、加齢性疾患におけるミトコンドリアから生じる酸化ストレスの役割、分子生物学学会・生化学会合同学会、2010年12月10日、国際会議場（神戸）
- ⑬安田佳代、石井直明 他、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、京都テルサ（京都）
- ⑭Onouchi H, Ishii N et al. Effects of Mitochondrial Superoxide anion (O_2^-) on Corneal cell functions in *Tet-mev-1* transgenic mice, XIX Biennial meeting of International Society for Eye Research, 2010年7月23日、Montreal, Canada
- ⑮Onouchi H, Ishii N et al., Effects of mitochondrial oxidative stress on corneal cell functions and diseases in *Tet-mev-1*-mouse, 第33回日本基礎老化学会、2010年6月17日、名古屋大学（名古屋）
- ⑯柳原倫太郎、石井直明 他、ミトコンドリア活性酸素が海馬依存の学習・記憶能力に及ぼす影響、第33回日本基礎老化学会、2010年6月17日、名古屋大学（名古屋）

〔図書〕（計1件）

石井直明（執筆者94名）、老年医学 系統講義テキスト、西村書店（編集 日本老年医学会）、2013年、327ページ（p43-47 寿命遺伝子）

〔産業財産権〕

○取得状況（計1件）

名称：外来遺伝子の誘導発現の制御が可能な発現ベクター

発明者：石井直明、石井恭正

権利者：学校法人 東海大学

種類：国際特許

番号：特願 2006-514867

国際公開番号 W02005/123918

取得年月日：2011年11月9日

国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等

<http://mls.med.u-tokai.ac.jp/jp/index.htm>

<http://www.tmhs.jp/>

報道関係

<http://www2.jfn.co.jp/nine/maji/>

<http://www.majigofunclub.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 直明 (ISHII NAOAKI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号： 60096196