

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25550035

研究課題名(和文) 自然放射線遮蔽による細胞増殖低下の分子メカニズム 生物における自然放射線の役割

研究課題名(英文) Molecular mechanism of growth retardation of mouse cells by shielding them from background radiation

研究代表者

川西 優喜 (KAWANISHI, Masanobu)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70332963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：自然放射線遮蔽により発現パターンが変化する遺伝子をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。しかし自然放射線遮蔽特異的に発現量に変化した遺伝子は見いだせなかった。培養器間の差を見る陰性対照実験で300個以上の遺伝子が2倍以上の変動を示したが、アレイの60,000スポット(約20,000遺伝子)の数%以内であり、低シグナル強度ものがほとんどで、アレイ測定系の誤差と結論づけた。自然放射線遮蔽/非遮蔽の比較では陰性対照実験で認められたスポットの他には検出できなかった。アレイ解析ではノイズレベルとなるため測定しにくいわずかな差でも判定できる次世代シーケンサーによる解析が必要との結論に達した。

研究成果の概要(英文)：Does reduced level of background natural radiation alter the expression level of genes in mouse cells? To answer this question, using the DNA microarray we carried out comprehensive analyses of mRNA expression in mouse lymphoma L5178Y cells cultured in the shielding chamber surrounded by a 15 cm thick iron wall and a 10 cm thick paraffin wall that reduced the gamma ray and neutron levels in the chamber to 2% and 25% of the background levels, respectively. The altered expression levels of more than 300 genes were found, however none of them was not radioprotection specific alteration.

研究分野：環境毒性学

キーワード：自然放射線 遮蔽 生物影響

1. 研究開始当初の背景

高線量放射線の生物影響は非常によく研究されている。しかし極めて低い線量の放射線、なかんずく、自然放射線の生物影響は解明されていない。

1990年代迄にフランスの Planel らが鉛箱を用いた自然放射線遮蔽でヨツヒメゾウリムシの増殖が低下することを報告した (Planel et al (1987) Health Phys, 52, 571-578)。また1990年代に日本の Takizawa らは自然放射線遮蔽下ではマウス L5178Y 細胞の増殖が低下することを報告した (Takizawa et al (1992) P Intl Conf Rad Effects Protection 234-236)。

私達は自然放射線遮蔽装置を用いてゾウリムシとマウス細胞の増殖を観察し、自然放射線を遮蔽すると増殖が低下することを確認し2012年に論文発表した (Kawanishi et al (2012) J Rad Res, 53, 404-410)。補償線源を入れると増殖は回復した (ibid.)。しかしこの増殖低下のメカニズムはまったく不明である。

2. 研究の目的

そこで本課題でその分子メカニズム解明を開始した。自然放射線遮蔽により発現パターンが変化するマウス細胞の遺伝子やシグナル伝達系はあるだろうか？DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。もし変動するものがあれば、細胞増殖にかかわる遺伝子を優先的に選択し、その遺伝子がコードする蛋白質の複合体解析をおこない機能を明らかにする予定であった。

3. 研究の方法

自然放射線遮蔽装置は、15cm厚の古鉄板で囲われた方形のもので、その外側を10cm厚のパラフィンが覆っている (図1)。鉄板がβ線とγ線を、パラフィンが中性子線を遮蔽する。この鉄箱内に恒温箱を設置し37°Cで細胞培養をおこなった。鉄箱外にも恒温箱を設置し、同じく細胞培養をおこない陰性対照とした。

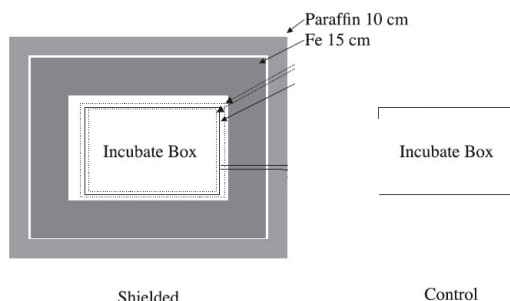


図1. 自然放射線遮蔽装置の概略

遮蔽実験では、細胞はHEPES培地を使用し培養フラスコを密閉し培養した。マウス胸腺リンパ腫由来 L5178Y 細胞を 500 [個/mL] の密度で培地に懸濁した。自然放射線遮蔽/非遮蔽の条件で6日間培養した。また、培養器(2

つ)全てを遮蔽装置外に設置し培養する実験、すなわち自然放射線存在下で培養器のみの差を見る陰性対照実験もおこなった。6日後、約  $1.5 \times 10^6$  [個/mL] に増殖した細胞から total RNA を抽出した。分解等のみられないアレイ解析に適した品質の RNA であることを確認後、アジレント社製 SurePrint G3 遺伝子(マウス)発現アレイを用いて2カラー解析をおこなった。解析条件の詳細を表1に示す。分析は北海道システムサイエンス(株)社に委託しておこなった。SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ 8x60Kを使用した。

表1. マイクロアレイ解析条件

Mouse Gene Expression Microarrays - Details & Specifications		
SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray Kit		
Feature		Specification
Agilent Product Number	G4852A	
Design ID	028005	
Format	8 x 60K	
Arrays/Slide	8	
Slides/Kit	3	
Biological Features	39,430 Entrez Gene RNAs	
	16,251 lincRNAs	
Replicates of Biological Probes	399 x 10	
Positive Controls	96 x 10 ERCC control probes	
	32 x 10 EIA spike-in control probes	
Gene List	Visit Agilent's eArray application (http://Custom-Design-Tools/Array/?cid=AG-PT-122&tblid=AG-PR-1047)	
Annotations		
Design Files		
Probe Sequences		
Composition	Content sourced from the	
	• RefSeq Build 37	
	• Ensembl Release 55	
	• Unigene Build 176	
	• GenBank (April 2009)	
	• RIKEN 3	
Manufacturing	Agilent 60-mer SurePrint technology	

4. 研究成果

遮蔽装置内外のγ線をNaIディテクタで、中性子線をBF<sub>3</sub>ディテクタと<sup>3</sup>Heディテクタで測定した(図2)。エネルギースペクトルから、遮蔽装置外のγ線量は109 nGy/h、装置内は2.1 nGy/h、遮蔽装置外の中性子線は8 nGy/h、装置内は2 nGy/hであった。この装置は自然放射線のうちガンマ線は1/50、中性子は1/4に減少させることを確認した。

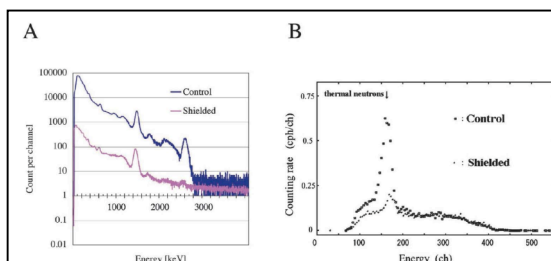


図2. 自然放射線遮蔽装置内外の線量測定結果(A: γ線スペクトル B: 中性子線スペクトル, J. Radiat. Res., 53, 404-410 (2012)より一部改変)

次に遮蔽装置内外で培養した L5178Y 細胞を回収し、total RNA を回収した。RNA の品質をアジレント社製 2100 バイオアナライザーを用いて検定した(図3)。その結果、マイクロアレイ解析に十分な品質の RNA が得られたことがわかった。

得られた RNA を用いて発現プロファイルと比較した。比較は A : 自然放射線遮蔽培養-自然放射線存在下培養と(図4)、対照実験と

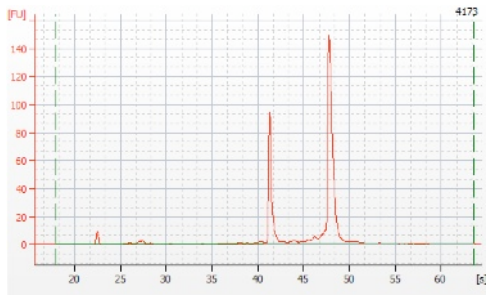


図3. RNA 試料の品質測定

してB：自然放射線存在下培養-自然放射線存在下培養(図5)の、2回のアレイ解析をおこなった。

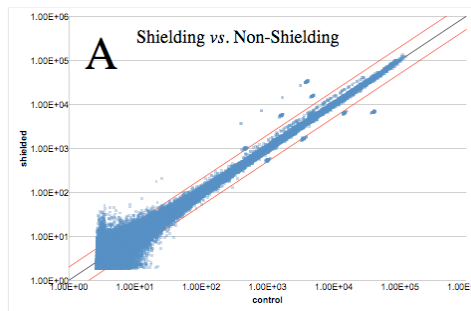
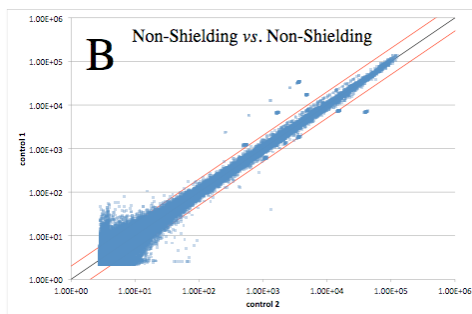


図4. 発現量の比較

自然放射線遮蔽下 vs 自然放射線存在下

図5. 発現量の比較(対照実験)



自然放射線存在下 vs 自然放射線存在下  
恒温箱を2台とも遮蔽装置外に置き自然放射線存在下で細胞を培養した。培養箱間の差を見る対照実験である。

その結果、恒温(箱培養器)間の差を見る陰性対照実験では300個以上の遺伝子が2倍以上の変動を示したが、アレイの60,000スポットもしくは約20,000遺伝子の数パーセント以内であり、低シグナル強度ものがほとんどで、これらの変動は見かけ上のもので、アレイ測定系の誤差と結論づけた。自然放射線遮蔽/非遮蔽の培養でも変動遺伝子を観察したが、陰性対照実験で認められたスポットたちであり、自然放射線遮蔽特異的に発現量が増加した遺伝子は見いだせなかった。

発現量の少ない遺伝子の蛍光シグナルは、マイクロアレイ解析ではノイズレベル以下になることが多く、発現量の変動を正しく評価できない。そこで、低コピー数 mRNA でも正確に定量でき、アレイ解析ではノイズレベルとなるため測定しにくいわずかな差でも判定できる次世代シーケンサーによる解析が必要との結論に達した。

鋭敏な次世代シーケンサーによる発現解析に向け、最終年度は培養環境の高精度化をおこなった。培養庫内の温度分布を一様化するため、強制循環ファンを導入した。外部環境の影響低減のため、輻射熱反射プレートも設置した。これにより $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ での管理が可能となった。

研究予算が獲得できた場合、次フェーズでは、自然放射線存在下あるいは遮蔽装置内の自然放射線遮蔽下で最長7日間培養する。培養5日~7日目に細胞を回収しRNAを抽出する。イルミナ社の次世代シーケンサーを用いてRNAシーケンスをおこない、遮蔽下と非遮蔽下で発現状態の異なる遺伝子を探索する。またそれらのうち、遮蔽期間(5日~7日目)を通じて発現が変化する遺伝子を明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

なし

〔学会発表〕(計0件)

なし

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

なし

○取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

研究会・講演会での発表

1) 足立淳、朝長毅、Mass spectrometry-based quantitative proteome analysis of histone modifications and chromatin proteins、第74回日本癌学会学術総会、名古屋市、2015年10月8日

2) Masanobu Kawanishi, Katsuyuki Okuyama, Kazunori Shiraishi, Yatsuka Matsuda, Ryoichi Taniguchi, Nobuyuki Shiomi, Morio Yonezawa, Takashi Yagi, Impaired growth of Paramecium and mouse cells by shielding

them from background radiation, The 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015), Kyoto (Kyoto International Conference Center), 2015 May 26

3) 川西優喜、生物にとって自然放射線の役割とは？、大阪府立大学生命環境科学域自然科学類オープンキャンパス「高校生のためのサイエンスフォーラム」、2014年8月2日、堺市

4) 川西優喜、自然放射線遮蔽の生物影響、平成27年度大阪府立大学りんくうキャンパス(獣医学科)放射線業務従事者再教育訓練、泉佐野市、2015年7月22日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川西 優喜 (KAWANISHI Masanobu)  
大阪府立大学・理学系研究科・准教授  
研究者番号：70992963

### (2) 研究分担者

足立 淳 (ADACHI Jun)  
医薬基盤・健康・栄養研究所・プロテオーム  
リサーチプロジェクト・研究員  
研究者番号：20437255

白石 一乗 (SHIRAISHI Kazunori)  
大阪府立大学・理学系研究科・助教  
研究者番号：40647513

八木 孝司 (YAGI Takashi)  
大阪府立大学・理学系研究科・教授  
研究者番号：80182301

### (3) 連携研究者

なし