

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26340044

研究課題名(和文) 環境放射線の生物影響モニタリング可能な植物培養細胞を用いた新規影響評価手法の開発

研究課題名(英文) Development of evaluation method using plant callus with a monitoring gene capable of detecting biological effects of the environmental radiation

研究代表者

高橋 真哉 (TAKAHASHI, Shinya)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：80370419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、福島第一原発事故由来の野外に放出された放射性物質による土壤汚染が原因となる低線量放射線影響を検出可能な、シロイヌナズナ植物培養細胞系を用いたモニタリング実験系の確立をおこなった。このシステムでは、モニタリング遺伝子を持つシロイヌナズナカルスを用いて、低線量放射線により誘導されるDNA損傷に起因する体細胞相同組み換え頻度を測定し、低線量放射線影響の指標とした。その結果、野外より採取した汚染土壌を用いた室内実験および現場土壌での野外実験において、体細胞相同組み換え頻度が線量依存的に上昇することが明らかとなり、いずれの条件でも低線量放射線による影響を検出可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed novel monitoring system to estimate the effect of low-dose radiation originated from contaminated soil by Fukushima-Daiichi Nuclear accident in 2011. We used plant culturing cells (callus) harboring a monitoring gene constructed by alternative GUS gene. In this system, we can detect the frequency of homologous recombination in somatic cells as the radiation-induced DNA damage by counting GUS spots, and then evaluate the effects of low-dose radiation.

We evaluated radiation effects on plant genome with dose-dependent manner both in experimental condition using contaminated soil and in field condition. As a result, we succeeded in generation of an experimental system to detect DNA damage from the low-dose radiation not only in experimental room condition but in field condition.

研究分野：環境植物分子生物学

キーワード：放射線影響 植物 シロイヌナズナ カルス モニター遺伝子

1. 研究開始当初の背景

生物にとって放射線はダメージを与える強力な変異原であり、DNA 鎖切断などの DNA 損傷を引き起こすことで細胞死やガン化の原因となることが知られている。それ故に、放射性物質や核燃料の使用は厳重に管理され、野外に放出されることはなかった。しかしながら、2011年3月の東日本大震災に起因する福島第一原子力発電所事故によって放射性物質が生活圏へ放出される事態となり、生物への影響が懸念されるようになった。そのため、東日本地域では今後長期間にわたり放射線の生物影響について継続的な環境影響モニタリングが必要になると考えられる。

生物への放射線照射は DNA 鎖切断などの DNA 損傷を生成し、DNA に深刻なダメージを受けた細胞は細胞死を起こす。一方でこれに対する防御反応として細胞内で様々な DNA 修復機構が働くが、DNA 修復の際に修復エラーが入ることで塩基配列が変化し、突然変異を引き起こすリスクが高まることも知られている。

放射線照射による DNA 鎖切断は、相同組み換え修復などの DNA 修復機構によって修復されることが知られる。近年植物において、放射線などの DNA ストレスで誘導される DNA 修復能測定に「相同組み換え頻度」がしばしば利用される。この方法は、分割されたレポーター遺伝子を用いた「モニタリング遺伝子」がゲノム内で相同組み換えを起こした結果、正常型として発現するタンパク質の活性測定を行う方法である。レポーター遺伝子として、GUS 染色による青色色素の検出が可能な β -グルクロニダーゼ遺伝子 (GUS) を利用した定量的な検出測定系が開発されている。そこで、これらの手法を利用し、環境放射線の生物影響モニタリングを目的とした、実用的かつ迅速な新規影響定量評価法の開発が可能

であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、野外の低線量放射線量を検出可能なシロイヌナズナ植物培養細胞系を確立し、体細胞相同組換え頻度を可視的な方法で測定することで、*in vivo* レベルでモニタリングできるバイオモニタリングシステムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

体細胞相同組み換え頻度を可視的に検出・評価可能な改変 β -グルクロニダーゼ遺伝子を持つシロイヌナズナ植物体 2 系統 (1406 系統、1415 系統) よりカルスを作成した。次に、福島県内の高線量汚染地域にて採取をおこなった汚染土壌表面、もしくは放射性物質により汚染された現場土壌中 5 cm の深さに、密封した寒天培地プレート上に移植したカルスを静置し、約 30 日間曝露をおこなった。曝露後、カルスの GUS 染色により青く染色されたスポット数を実体顕微鏡下で観察して測定をおこない、生重量を測定することで、生重量当たりの GUS スポット数として相同組み換え頻度を算出した。

4. 研究成果

(1) モニタリングに適したカルス系統の選抜

異なる GUS コンストラクトを持つ 1406 系統および 1415 系統から作成したカルスの評価をおこなった。国立環境研究所内のチャンバーにて、高線量地域で採取した土壌を放射線源としてカルスに対し積算放射線量 2.96 mGy 相当の曝露をおこなった。1415 系統由来のカルスでは、相同組み換え頻度の上昇が確認された。一方で、1406 系統由来のカルスでは、一部プレートでの相同組み換え頻度上昇が確認できたが、安定した結果は得られなかった。そのため、本実験系では 1415 系統由来のカルスを以降の実験に用いた。

(2) 室内実験での汚染土壌曝露によるモニ

タリグカルの相同組み換え頻度検出

1415 系統由来カルスを用いて、曝露線量異なる相対的な相同組み換え頻度検出が可能か、室内で汚染土壌による曝露実験を行った。30 日間で、積算線量 0.076, 0.089, 0.42, 0.47, 2.96 mGy 相当の曝露をおこなった。曝露後、GUS 染色による検出の結果、線量依存的な相同組み換え頻度上昇が確認できた。

(3) 野外での現場土壌におけるモニタリングカルの相同組み換え頻度検出

野外の高線量区域における曝露をおこなった。平成 28 年 9 月 29 日～10 月 25 日に福島県内の 3 地点（積算放射線量：0.34, 1.72, 3.47 mGy）にて 1415 系統由来カルスを設置し曝露をおこなった。曝露後、GUS 染色による検出の結果、線量依存的な相同組み換え頻度の上昇が見られた。室内の曝露結果と現場土壌での曝露結果について、重回帰分析をおこなった結果、両者には統計的に有意差は見いだせなかったことから、同等の結果と見なせることが明らかとなった。

以上の結果から、本研究課題で作成、検証をおこなった GUS コンストラクトを持つモニタリングカルスを用いる事で、少なくとも積算放射線量 0.076～3.47 mGy の範囲では、放射線モニタリングに利用可能である事が示唆された。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕（計 2 件）

1. Masanori Tamaoki
“Studies on radiation effects from the Fukushima nuclear accident on wild organisms and ecosystems”
Global Environmental Research, 20, 2016, 73-82(査読有)
2. Shinya Takahashi, Kei H. Kojo, Natsumaro Kutsuna, Masaki Endo, Seiichi Toki, Hiroko Isoda, Seiichiro Hasezawa
“Differential responses to high- and

low-dose ultraviolet-B stress in tobacco Bright Yellow-2 cells”

Frontiers in Plant Science, Vol.6, Article 254, 2015 doi: 10.3389/fpls.2015.00254
(査読有)

〔学会発表〕（計 12 件）

1. 高橋真哉, 玉置雅紀
「DNA 相同組み換えモニタリング遺伝子を持つシロイヌナズナカルスを用いた現場土壌における低線量放射線影響の検出」
2017 年度生命科学系学会合同年次大会（第 40 回日本分子生物学会年会）2017 年
2. Masanori Tamaoki, Shinya Takahashi, Hiroko Sawada
“Evaluation of radiation dose dependent DNA damage in Fukushima using transgenic plants and callus”
4th International Conference on Radioecology and Environmental Radioactivity (ICRER), 2017
3. 高橋真哉, 玉置雅紀
「DNA 相同組み換え頻度モニタリング遺伝子を持つシロイヌナズナカルスを用いたオンサイトでの低線量放射線影響の検出」
第 35 回日本植物細胞分子生物学会（さいたま）大会 2017 年
4. Masanori Tamaoki, Shinya Takahashi
“Evaluation of DNA damage from radiation in Fukushima using transgenic plants and callus”
5th International Symposium on Plant Signaling and Behavior 2017 2017
5. 高橋真哉, 玉置雅紀
「DNA 相同組み換え頻度定量可能なモニタリング遺伝子を持つシロイヌナズナ

- カルスは野外における低線量放射線影響の検出に利用できる」
第 58 回日本植物生理学会年会 2017 年
6. 玉置雅紀
「福島県における低線量放射線及び住民避難による野生生物への影響調査」
平成 28 年度野生生物への放射線影響に関する調査研究報告会 2017 年
7. Masanori Tamaoki
“Study of radiation effects on ecosystem and wildlife in areas affected by the Fukushima accident.”
COMET workshop: Thirty years after the Chernobyl accident with do we know about the effects of radiation on the environment?, 2016年
8. Shinya Takahashi, Masanori Tamaoki
“Detection of low-dose radiation effects by Arabidopsis callus harboring an alternative β -glucuronidase (GUS) reporter gene”
Plant Genome Stability and Changes 2016 (PGSC2016), 2016
高橋真哉, 玉置雅紀
「DNA 相同組換え頻度定量可能なモニタリング遺伝子を持つシロイヌナズナカルスを用いた低線量放射線影響の定量的な検出」
第 57 回日本植物生理学会年会 2016 年
9. Shinya Takahashi, Masanori Tamaoki, Masaki Endo, Seiichi Toki, Kei H. Kojo, Natsumaro Kutsuna, Seiichiro Hasezawa, Hiroko Isoda
“Application of Plant Cultured Cells for Evaluation of the Effects of Radiation Stresses”
チュニジア-日本 文化・科学・技術学術会議 (TJASSST 2015) 2016 年
10. 高橋真哉, 玉置雅紀
「DNA 相同組換え頻度定量可能なモニタリング遺伝子を持つシロイヌナズナカルスを用いた低線量放射線影響の検出」
BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 2015 年
11. 高橋真哉, 玉置雅紀, 遠藤真咲, 土岐精一
「モニタリング遺伝子を持つシロイヌナズナカルスによる低線量放射線影響の検出」
第 33 回日本植物細胞分子生物学会東京大会 2015 年
12. 玉置雅紀, 澤田寛子
「低線量放射線により植物での DNA 変異の蓄積は起きているのか？」
第 55 回大気環境学会年会 2014 年
- [図書] (計 0 件)
[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)
[その他]
1. 玉置雅紀, 高橋真哉
SAT テクノロジー・ショーケース 2018・“ベスト・アイデア賞”
「DNA にできた傷跡を目で見る その原理と応用について」
2018 年 2 月 8 日 つくば国際会議場、つくば
6. 研究組織
(1)研究代表者
高橋 真哉 (TAKAHASHI, Shinya)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：80370419
(2)研究分担者
玉置 雅紀 (TAMAOKI, Masanori)
国立研究開発法人国立環境研究所・福島支部・主席研究員

研究者番号：00311324