

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24620012

研究課題名(和文) 神経回路形成と機能発達に対する宇宙放射線リスクと低減に関する研究

研究課題名(英文) Radiation effects on the relation between oxidative stress and the neuronal development and function

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・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究員

研究者番号：30311377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：月・火星等への惑星間宇宙飛行を成功させるためには、宇宙放射線の生物影響を明らかにする重要である。我々は、モデル生物として知られる線虫を用いて、酸化ストレスと神経機能(学習、行動等)の関係を明らかにすることを目的とした。初めに、線虫の幼虫から成虫にいたる段階での学習機能の発達と放射線の影響との関係を調べた結果、学習機能が成熟する成虫にて、放射線影響が最大となることが分かった。次に、成虫段階の全身に及び神経回路において、どの部位が放射線感受性であるかを、重イオンマイクロビーム照射実験により調べた結果、全身が放射線感受性であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：To achieve the inter-planetary space mission, e.g. Mars mission, it is important to investigate the effects of space radiation exposure on the life system. We aimed to clarify the radiation effects on the relation between oxidative stress and the neuronal function, i.e. learning or behavior. First, we examined the radiation effects on the learning behavior along to the development, resulting on the maximum effects on the adult but early larvae. Next, we tried to the microbeam irradiation to reveal the sensitive area of the nervous network in *C. elegans*. As a result, we found that the whole body of *C. elegans* was sensitive to the radiation exposure on learning behavior.

研究分野：放射線生物学

キーワード：宇宙放射線 神経回路 学習行動 モデル生物 酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

国際宇宙ステーションでのさらなる長期滞在、より過酷な宇宙放射線環境である月や火星への宇宙飛行を実現するためには、宇宙飛行士を危険に曝す放射線被ばくの影響を低減することが喫緊の課題である。宇宙飛行士の線量制限値は最大 1,200 mSv であり、現在、国際宇宙ステーションでは平均して 1 mSv/d の被ばくを受けている。しかし、1972 年 8 月規模の太陽フレアが生じると国際宇宙ステーションにおいても 1 回あたり最大 190 mSv (船外活動：水晶体) の被ばくを受けることが試算されている。地球磁気圏を越えた宇宙活動をする際には、宇宙放射線はさらなるリスクを生じる可能性が高い。こうした背景のもと、発ガンに加えて宇宙飛行士のヒューマンエラーに関わる中枢神経系への影響が研究されてきた。

### 2. 研究の目的

酸化ストレスが線虫の神経中枢及び行動に与える影響を、酸化ストレスに着目した神経回路と機能発達に与える宇宙放射線の影響、及び抗酸化物質を用いた神経機能障害の低減の可能性の側面から明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

酸化ストレス源として、放射線、高酸素、及び過酸化水素を用いる。加えて、日本で唯一、宇宙放射線の影響を考える際に重要な重イオンを非常に小さな部位に照射することが可能な原子力機構高崎研の重イオンマイクロビームを用いる。放射線等の酸化ストレスに曝露された線虫の影響評価については、学習行動 (Sakashita *et al.*, FASEB J., 2008)、前進運動 (Suzuki *et al.*, J. Radiat. Res., 2009) 等、及び寿命 (築瀬、線虫ラボマニュアル, 2003) を用いる。

### 4. 研究成果

#### 4.1. 幼齢と酸化ストレス影響

線虫は、卵から孵化した段階の 1 齢幼虫から脱皮を繰り返し 3 日半にて成虫となる。この幼齢 (days) と学習機能 (化学走性学習) に対する放射線の影響を調べた (図 1)。

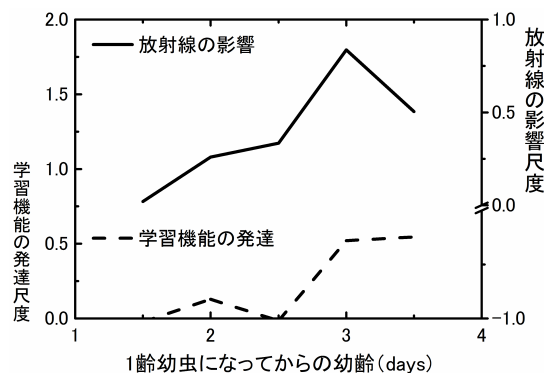


図 1 幼齢と学習機能に対する放射線影響

その結果、学習機能が発達するとともに、放射線の影響が増大することが分かった。また、成虫段階で最大の放射線影響が得られたため、以後の実験は成虫段階の線虫を用いることとした。

#### 4.2. 局所酸化ストレス付与の影響

我々は、以前、線虫の学習行動への影響が、学習中に限定されること、及び線虫の頭部に存在する神経に局在する G 蛋白質 (GPC-1) が、この放射線影響に関係することを報告した (Sakashita *et al.*, FASEB J., 2008)。そのため、線虫の頭部に存在する神経細胞での放射線応答が、学習行動の変化をもたらす仮説を立て、この仮説を証明するために、線虫の局部に放射線を照射することが可能な重イオンマイクロビーム照射実験 (図 2) を実施した。

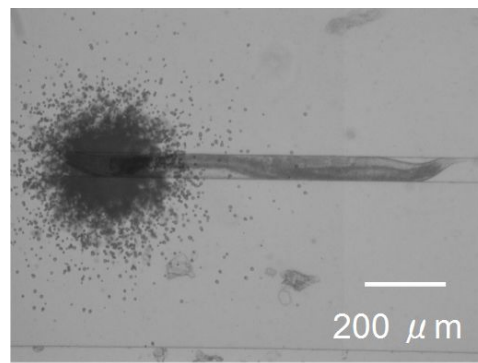


図 2 線虫と重イオン照射 (エッチピット: 左部分の黒い小さな点であり、1 個のイオンが照射されたことを示す)

重イオンマイクロビーム照射実験を実施した結果、野生型の線虫では、頭部、腸部、尾部の局部照射を行った 3 か所全てにおいて、放射線応答が観察された (図 3)。

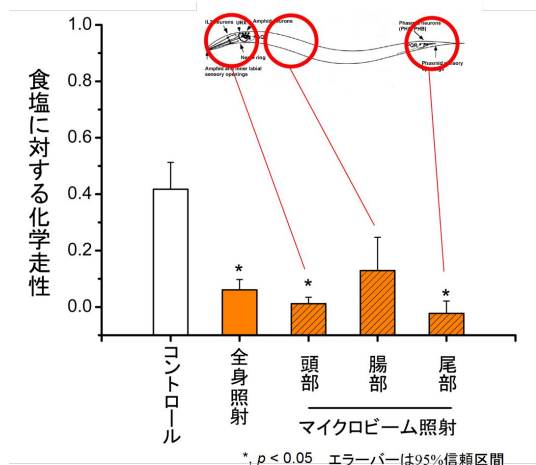


図 3 野生型線虫の学習行動に対するマイクロビーム照射の影響。線虫は、学習行動に伴い化学走性が低下するが、全身照射では、化学走性のさらなる低下が誘導される。マイクロビーム照射でも、同様に化学走性の低下が誘導された。図中上部の線虫の絵の赤丸が、マイクロビームにて局部照射した領域。

野生型線虫へのマイクロビーム照射実験の結果は、研究対象とした線虫の学習行動への放射線影響が、頭部への照射だけでなく、線虫の体全身での照射応答により誘導されることを示唆する。そのため、我々の仮説は、否定された。

また、GPC-1 タンパク質の機能が欠損している線虫の変異体を用いて、同様の重イオンマイクロビーム照射実験を行った結果、興味深い結果が得られた（図4）。

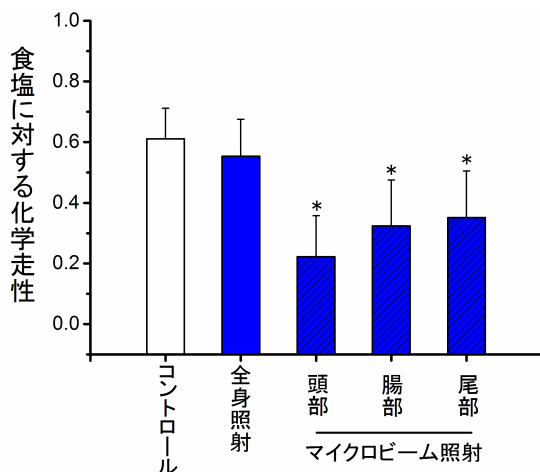


図4 *gpc-1* 変異体に対する重イオンマイクロビーム照射実験の結果。

*gpc-1* 変異体の結果は、我々の予想に反する結果であった。全身照射に対する応答がないにも関わらず、マイクロビーム照射により化学走性が応答した事実は、神経回路への放射線の作用が、線虫の体の各所からのシグナルを統合する部分が神経回路に存在する可能性を示唆する。今後、この仕組みについて検討していく必要がある。

#### 4.3. 酸化ストレスマーカー

線虫の体内における酸化ストレスを把握できれば、神経回路と酸化ストレスの関係をより深く考察することが可能である。そこで、我々は、細胞内 ROS（活性酸素種）に反応する DCF 試薬を試験した。過酸化水素への曝露については、腸を中心として細胞内 ROS が存在することを確認できた（図5）。



図5 過酸化水素曝露による線虫体内 ROS

しかしながら、放射線照射時の蛍光を観察することができなかった。実験条件等の検討が必要である。

#### 4.4. その他

抗酸化物質については、放射線影響の防護剤として期待されるカロチノイドの添加方法と高酸素曝露時の寿命解析を実施できた。今後、放射線等の影響を検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Ide K, Ishikawa T, Arai S, Morioka T, Kaneda H, Suzuki M, Sakashita T, Ishii N, Yanase S, Detection and measurement of abnormal posture under stressful conditions in nematode *C. elegans*. *C. elegans* Topic Meeting: Aging, Metabolism, Stress, Pathogenesis and Small RNAs 2014; 95. DOI: なし (査読有)
2. Yanase S, Luo Y, Maruta H, PAK1-deficiency/down-regulation reduces litter size, activates HSP16.2 gene and extends lifespan in *C. elegans*, *Drug Discoveries & Therapeutics* 2013; 7:29-35. DOI:10.5582/ddt.2013.v7.1.29 (査読有)
3. Kimura T, Takanami T, Sakashita T, Wada S, Kobayashi Y, Higashitani A, Innate immune genes including a mucin-like gene, *mul-1*, induced by ionizing radiation in *Caenorhabditis elegans*. *Radiat Res* 2012; 178:313-320. DOI: 10.1667/RR2989.1 (査読有)
4. Sakashita T, Suzuki M, Hamada N, Shimozawa Y, Shirai-Fukamoto K, Yokota Y, Hamada-Sora S, Kakizaki T, Wada S, Funayama T, Kobayashi Y, Behavioral Resistance of *Caenorhabditis elegans* Against High-LET Radiation Exposure. *Biol Sci Space* 2012; 26:7-11. DOI: なし (査読有)
5. Sakashita T, Suzuki M, Hamada N, Shimozawa Y, Shirai-Fukamoto K, Yokota Y, Hamada-Sora S, Kakizaki T, Wada S, Funayama T, Kobayashi Y, Effects of Low- and High-LET Radiation on the Salt Chemotaxis Learning in *Caenorhabditis elegans*. *Biol Sci Space* 2012; 26:21-25. DOI: なし (査読有)
6. Suda H, Sato K, Yanase S, Timing mechanism and effective activation energy concerned with aging and lifespan in the long-lived and thermosensory mutants of

*Caenorhabditis elegans*. Mech Ageing Dev 2012; 133:600-610. DOI : doi:10.1016/j.mad.2012.07.007 (査読有)

[学会発表](計 25 件)

1. Sakashita T, Suzuki M, Hattori Y, Ikeda H, Mutou Y, Yokota Y, Funayama T, Hamada N, Shirai K, Kobayashi Y, Responses of the Salt Chemotaxis Learning in Wild Type and Mutant *C. elegans* to Microbeam Irradiation, The 5<sup>th</sup> International Society of Radiation Neurobiology Conference, 2015年2月21日, 高崎シティギャラリー(群馬県・高崎市)
2. 坂下哲哉, 鈴木芳代, 服部佑哉, 池田裕子, 武藤泰子, 横田裕一郎, 舟山知夫, 浜田信行, 白井花菜, 小林泰彦, 浜田信行, 白井花菜, マイクロビーム照射に対する線虫変異体の化学走性学習の応答, 第9回高崎量子応用研究シンポジウム, 2014年10月9-10日, 高崎シティギャラリー(群馬県・高崎市)
3. 鈴木芳代, 坂下哲哉, 服部佑哉, 小林泰彦, 線虫の筋運動に対する炭素イオンマイクロビーム局部照射の影響, 第9回高崎量子応用研究シンポジウム, 2014年10月9-10日, 高崎シティギャラリー(群馬県・高崎市)
4. 坂下哲哉, 線虫の行動における生存戦略について 走性に着目して, 日本放射線影響学会第57回大会, 2014年10月1-3日, かごしま県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市)
5. 鈴木芳代, 坂下哲哉, 服部佑哉, 小林泰彦, 放射線による線虫の運動抑制における放射線産生 ROS の関与, 日本放射線影響学会第57回大会, 2014年10月1-3日, かごしま県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市)
6. 坂下哲哉, 鈴木芳代, 服部佑哉, 池田裕子, 武藤泰子, 横田裕一郎, 舟山知夫, 浜田信行, 白井花菜, 小林泰彦, 線虫変異体の化学走性学習に対する重イオンマイクロビーム局部照射の影響, 日本宇宙生物科学会第28回大会, 2014年9月22-23日, 大阪府立大学(大阪府・堺市)
7. Suzuki M, Sakashita T, Hattori Y, Kobayashi Y, Oxidative stress suppresses locomotion and pumping motion in *Caenorhabditis elegans*. 2014 *C. elegans* Development, Cell Biology, and Gene Expression Topic Meeting in association with The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 2014年7月15-19日, 奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)
8. Ide K, Ishikawa T, Arai S, Morioka T, Kaneda H, Suzuki M, Sakashita T, Ishii N, Yanase S, Detection and measurement of abnormal posture under stressful conditions in nematode *C. elegans*. *C. elegans* Topic Meeting: Aging, Metabolism, Stress, Pathogenesis, and Small RNAs, 2014年7月10-13日, マディソン市(米国)
9. Suzuki M, Sakashita T, Hattori Y, Kobayashi Y, Radiation Effects on Rhythmic Movements in *Caenorhabditis Elegans*. 6th International Systems Radiation Biology Workshop, 2014年3月5-7日, 放射線医学総合研究所(千葉県・千葉市)
10. 鈴木芳代, 服部佑哉, 坂下哲哉, 舟山知夫, 横田裕一郎, 池田裕子, 小林泰彦, マイクロビームを用いた個体レベル放射線影響の解析 放射線影響の照射部位依存性に迫る 第4回国際放射線神経生物学学会大会, 2014年1月17日, 高崎シティギャラリー(群馬県・高崎市)
11. 鈴木芳代, 服部佑哉, 坂下哲哉, 舟山知夫, 横田裕一郎, 池田裕子, 小林泰彦, 線虫の筋運動に対する重イオンマイクロビーム局部照射の影響, 日本放射線影響学会第56回大会, 2013年10月18-20日, ホテルクラウンパレス(青森県・青森市)
12. 鈴木芳代, 服部佑哉, 坂下哲哉, 舟山知夫, 横田裕一郎, 池田裕子, 小林泰彦, 線虫の咽頭ポンピング運動に対する放射線影響の照射部位依存性, 第8回高崎量子応用研究シンポジウム, 2013年10月10-11日, 高崎シティギャラリー(群馬県・高崎市)
13. Suzuki M, Hattori Y, Sakashita T, Funayama T, Yokota Y, Ikeda H, Kobayashi Y, Effects of Carbon-ion microbeam irradiation on locomotion and pharyngeal pumping in *C. elegans*. 11th Microbeam Workshop -Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, 2013年10月3-4日, ボルドー市(フランス)
14. Yanase S, Shoyama T, Suda H, Ishii N, Intermittent hyperoxia-induced hormesis decreases aerobic respiration via ins/IGF-1 and p53/CEP-1 signalings in *C. elegans*, 19th International *C. elegans* Meeting, 2013年6月26-30日, ロサンゼルス市(米国)
15. Suzuki M, Sakashita T, Tsuji T, Hattori Y, Kobayashi Y, Quantitative analysis of ionizing radiation-induced effects on locomotion in *Caenorhabditis elegans*. 19th International *C. elegans* Meeting, 2013年6月26-30日, ロサンゼルス市(米国)
16. Sakashita T, Suzuki M, Mutou Y, Hattori Y, Ikeda H, Yokota Y, Funayama T, Hamada N, Fukamoto K, Kobayashi Y, Exploration of the site responsible for the radiation response of the salt chemotaxis learning in *C. elegans* using

- heavy-ion microbeam. Heavy ion in Therapy and Space Radiation Symposium 2013, 2013年5月15-17日, 京葉銀行文化プラザ(千葉県・千葉市)
17. 坂下哲哉, 鈴木芳代, 服部佑哉, 池田裕子, 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, 第3回国際放射線神経生物学学会大会, 2013年1月25-26日, 万国津梁館(沖縄県・名護市)
  18. Suzuki M, Sakashita T, Tsuji T, Kobayashi Y, Computational study of neurotransmission in chemotaxis of *Caenorhabditis elegans*. Foundations of Systems Biology in Engineering (FOSBE) 2012, 2012年10月21-25日, 慶応大学鶴岡キャンパス(山形県・鶴岡市)
  19. 鈴木芳代, 服部佑哉, 坂下哲哉, 舟山知夫, 横田裕一郎, 武藤泰子, 池田裕子, 小林泰彦, 線虫の全身運動に対する重イオンマイクロビーム局部照射の影響, 第7回高崎量子応用研究シンポジウム, 2012年10月11-12日, 高崎シティギャラリー(群馬県・高崎市)
  20. 坂下哲哉, 鈴木芳代, 浜田信行, 下澤容子, 白井花菜, 横田裕一郎, 浜田桜, 柿崎竹彦, 和田成一, 舟山知夫, 小林泰彦, 線虫の行動に観られる高LET放射線耐性, 第26回日本宇宙生物科学学会学術集会, 2012年9月27-29日, 阿波観光ホテル(徳島県・徳島市)
  21. Yazaki K, Yoshikoshi C, Oshiro S, Takahashi J, Yanase S, Supplemental cellular protection by a marine carotenoid extends lifespan via ins/IGF-1 signaling in nematode *C. elegans*. BIT's 1st Annual International Congress of Marine Algae-2012, 2012年9月22日, 大連市(中国)
  22. 坂下哲哉, 鈴木芳代, 服部佑哉, 池田裕子, 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55回大会, 2012年9月6-8日, 東北大学(宮城県・仙台市)
  23. 鈴木芳代, 服部佑哉, 坂下哲哉, 舟山知夫, 横田裕一郎, 武藤泰子, 池田裕子, 小林泰彦, 線虫の筋運動に対する放射線影響の照射部位依存性, 日本放射線影響学会第55回大会, 2012年9月6-8日, 東北大学(宮城県・仙台市)
  24. Yazaki K, Yoshikoshi C, Oshiro S, Takahashi J, Yanase S, Supplemental cellular protection by a carotenoid astaxanthin extends lifespan via ins/IGF-1 signaling in *C. elegans*. Aging, Metabolism, Stress,

Pathogenesis, and Small RNAs in *C. elegans* Topic Meeting 2012, 2012年7月13日, マディソン市(米国)

25. Suzuki M, Sakashita T, Kobayashi Y, Tsuji T, Computational inferences on neurotransmission in chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. EMBO Conference Series: *C. elegans* Neurobiology, 2012年6月14-17日, ハイデルベルク市(ドイツ)

[図書](計1件)

1. Yanase S, Maruta H, PAK1 controls the lifespan. In: PAKs, RAC/CDC42(p21)-activated kinases: Towards the cure of cancer and other PAK-dependent diseases, pp. 125-135, Maruta H (Ed), Elsevier, 2013. ASIN: B00BCXPYM8

## 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・原子力科学研究部門・量子ビーム応用研究センター・研究員  
研究者番号: 30311377

### (2) 研究分担者

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

鈴木 芳代 (SUZUKI MICHIOYO)  
独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門・量子ビーム応用研究センター・研究員  
研究者番号: 10507437