

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	山崎 晃
論文題目	The effect of radiation on motility in <i>Caenorhabditis elegans</i> (放射線が線虫(<i>Caenorhabditis elegans</i>)の運動機能に及ぼす影響)		
(論文内容の要旨)			
<p>生物は化学物質や放射線など様々なストレスに晒されている。放射線の生物影響は照射線量や線質、および照射を受ける細胞によって異なる。放射線の線質効果を表す指標として線エネルギー付与 (Linear Energy Transfer : LET) がある。炭素イオンビームなどの高LET放射線は、より複雑なDNA損傷を誘発することで、γ線などの低LET放射線より低い線量で細胞死を誘導することが知られている。一方で、高LET放射線が組織・個体レベルに及ぼす影響はまだ十分に理解されていない。</p> <p>線虫<i>Caenorhabditis elegans</i>では、炭素線およびγ線照射によって成虫の運動機能が低下することが知られている。そこで本研究では、まず、<i>C. elegans</i> の放射線影響の解析に適した運動機能評価系を確立することを目指した。次に、確立した実験系を用いて、いくつかの放射線の線量、線質および遺伝学的手法を用いて、放射線の運動機能に及ぼす影響を明らかにした。また、放射線による運動量低下に重要な部位を明らかにするため、部位特異的なマイクロビーム照射を行った。さらに、放射線照射後の全身運動量の変化を観察し、この運動機能が可逆的か不可逆的か明らかにした。さらに、損傷タンパク質やオルガネラの分解機構であるオートファジーに着目し、放射線影響への関与を調べた。</p> <p>本研究では、成虫まで培養した<i>C. elegans</i> に対してγ線または炭素線を照射し、運動解析およびオートファジーの誘導解析を行った。野生株および変異株はCaenorhabditis Genetic Centerより入手した。放射線の照射において、γ線についてはコバルト60線源から出るγ線を照射した。また、炭素線については原子力機構・イオン照射研究施設 (TIARA) のAVFサイクロトロンを用いて加速した炭素イオン粒子を照射した。部位特異的照射では、<i>C. elegans</i>をマイクロ流体チップに封入し、加速した炭素イオン粒子を$\Phi 60 \mu\text{m}$の範囲ごとに照射した。運動解析では、寒天培地上での這行運動と溶液中での遊泳運動について測定し評価した。オートファジーの誘導については、そのマーカー遺伝子である<i>lgg-1</i>のGFPレポーター株を用いてGFP蛍光を経時的に観察した。</p> <p>まず、放射線が及ぼす運動機能への影響を調べるため、寒天培地上での這行運動を解析する運動解析システムを構築した。このシステムを用いてγ線・炭素線照射直後の運動を評価した結果、線量依存的な運動量の低下が見られた。</p> <p>照射後の応答として、運動機能の低下が可逆的か不可逆的か明らかにするために、照射後の運動の変化を観察した。その結果、γ線・炭素線照射のどちらも24時間以内に部分的に運動量が回復することを見出した。同様に、溶液中での遊泳運動を指標に測定した結果、同様に運動低下が検出された。次に、照射による運動低下に重要な部位を明ら</p>			

かにするために、前半身または後半身にマイクロビーム照射を行い、運動量を解析した。その結果、前半身照射後の運動量は、後半身照射後よりも低下した。このことから、放射線に対する運動応答において、前半身が重要であることが示唆された。

さらに、運動性回復に関わる経路を明らかにするため、放射線応答で機能することが知られているいくつかの遺伝子を選定し解析した。その結果、哺乳類の放射線応答のマスターレギュレーター遺伝子 *Ataxia telangiectasia mutated gene (ATM)* の *C. elegans* オルソログ *atm-1* が、可逆的な運動性に関与していることが示唆された。

また、低下した運動が回復する機構として損傷タンパク質やオルガネラの分解機構であるオートファジーが考えられたので、そのマーカー遺伝子である *lgg-1* の GFP レポーター株を用いて GFP 蛍光を経時的に観察した。その結果、放射線照射により神経環の存在する咽頭や神経細胞、腸でオートファジーが誘導されることを見出した。

放射線の運動機能に及ぼす影響は前半身により重要な部位があることが明らかとなった。さらに、放射線による運動低下には可逆的要素と不可逆的要素の二種類に分類されることが明らかとなった。可逆的要素について、高 LET 放射線・低 LET 放射線のどちらでも照射から 24 時間以内に回復することが明らかとなった。この運動回復応答に *ATM-1* が関与することがわかった。また、運動回復に伴い、オートファジーが誘導されることがわかった。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

生物は放射線など様々なストレスに晒されている。放射線の生体作用には直接作用と間接作用がある。直接作用とは、DNAやタンパク質、オルガネラなど生体内構成分子に直接障害を及ぼす作用である。間接作用とは水分子への作用によって生じる活性酸素が生体内構成分子に障害を及ぼす作用である。線虫*Caenorhabditis elegans*は放射線によって運動機能が低下することが知られているが、直接作用と間接作用のどちらの効果が重要かについては不明である。本論文は、放射線が線虫の運動機能に及ぼす影響を明らかにすることを旨とした。*C. elegans*の放射線影響の解析に適した運動機能評価系を確立し、幾つか放射線の線量、線質および遺伝学的手法を用いて解析したものである。

本研究では主に直接作用を引き起こす高LET(Linear Energy Transfer)放射線として炭素線を、間接作用を主に起こす低LET放射線としてγ線を用いて運動機能への影響を評価した。短時間で高線量照射を可能にする装置を用いて、運動に関する線量応答を解析可能とした。その結果、照射直後では高LET放射線でより高い運動抑制効果が見られた。照射後の運動機能の変化を観察し、高LET線および低LET線どちらも同程度まで回復することを見出した。さらに、回復に関与する機構として細胞内の分解機構のひとつであるオートファジーに着目し、放射線照射によって全身で誘導されることを見出した。これらの結果は放射線による運動低下からの回復において、間接作用の重要性を示唆する興味深い成果である。

放射線による効果を部位特異的に解析する上で、マイクロビーム照射技術は有効な手法である。照射中は対象を固定する必要があるが、運動解析では生きたまま麻酔をかけずに線虫の動きを留めなければならない。この問題を解決するために、本研究では体幅に合わせたマイクロ流体チップに線虫を封入することで動きを制限した。従来の照射実験では個別組織をピンポイントで照射しており、運動機能に重要な領域の同定が困難であった。本研究は、複数のポイントに連続的に照射する領域照射法を新たに開発し、全身照射から半身照射へと照射領域を絞り込むことで、前半身でより運動機能が低下することを見出した独創的な成果である。

本研究で見出した放射線で低下した運動機能の回復について、関与する応答経路は未知であった。本研究ではさらに、放射線応答や細胞死に関わる変異株を用いて運動解析を行い、放射線応答のマスターレギュレーターであるATM-1(ヒト毛細血管拡張性運動失調症変異(ATM)の線虫ホモログ)が放射線による運動機構に対する応答に関与することを見出した。これらの成果は放射線による運動応答に関与する分子を発見した重要な成果である。

よって本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年3月18日に論文内容とそれに関連した事項について試問し、さらに、令和4年12月9日～12日に審査員全員で審議をおこなった結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降