

培養アストロサイトにおける低線量放射線応答タンパクの解析

都老人研 三浦ゆり、加納まゆみ、鈴木捷三、戸田年総

Low dose radiation-responsive proteins in cultured astrocytes

Yuri Miura, Mayumi Kano, Shozo Suzuki, and Tosifusa Toda
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo 173-0015
E-Mail: miura@center.tmig.or.jp

Abstract: Ionizing radiation causes various damages, carcinogenesis or cell death. However, low dose irradiation is reported to give rise to adaptive responses. We have reported that radiation adaptive response was observed in cultured astrocytes from young rats, and that the response was decreased with aging. In order to investigate the mechanisms of radiation adaptive response in cultured astrocytes, in the present study, we analyzed the variant expressions and phosphorylation of proteins in cell using proteomics. As a result, the fragmentation of elongation factor 2 was temporarily increased and elongation factor 1- β was de-phosphorylated after low dose irradiation.

Key words: low dose radiation, radiation adaptive response, proteomics, phosphorylation, aging, 2-D PAGE

はじめに

宇宙放射線は、高エネルギーで持続的な低線量率被爆を引き起こす。このため、宇宙放射線による生物影響を正確に把握し、放射線障害を低減化することは、今後の宇宙開発の重要な課題の一つである。宇宙放射線による生物影響というと、DNA 損傷などの被爆による放射線障害に注目が集まっているが、実際には低線量率被爆によって引き起こされる適応応答も重要な生物影響であると考えられる。また、将来多くの人類が宇宙空間に進出することを考えると、放射線影響の加齢変化も考慮されるべきである。そこで、私たちは適応応答の分子機構と加齢の影響に着目し、培養アストロサイトを用いて種々の検討を行ってきた。その結果、細胞増殖を指標とした適応応答が、若齢動物から培養したアストロサイトでは認められるが、この応答能は加齢により低下することが明らかになった^{1,2)}。そこで、今回は低線量放射線適応応答とその加齢変化の分子機構をタンパクレベルで解析するため、プロテオミクスを用いて低線量照射によるタンパク発現変化とタンパクリン酸化を解析した。そして、適応応答に関与するタンパクや低線量放射線により活性化されるタンパクを明らかにすることを目的とした。

実験方法

1) 細胞培養と放射線照射

月齢の異なる Wistar ラットの海馬よりアストロサイトを培養した。培地は 10% FBS、1% penicillin-streptomycin 含有の MEM (minimum essential medium) を用い、37°C、95% air / 5% CO₂ 雰囲気下で培養した。放射線は X 線を 0.1Gy (0.012Gy/min) 照射後、一定時間培養した。

2) プロテオーム解析

プロテオーム解析は以下のように行った³⁻⁷⁾。X 線照射から一定時間後に細胞を採取し、還元的条件下でタンパクを抽出した。一次元目は固定化等電点勾配ストリップゲル (pH4-7, 18cm) を用いて等電点電気泳動を行い、タンパクを等電点で分離した。二次元目は SDS-PAGE (7.5% T, 3% C, 20cm x 18 cm) を行い、タンパクを分子量で分離した。泳動後、ゲルを銀染色または蛍光染色し、PDQuest (Bio-Rad) を用いて画像解析した。タンパクの同定は、ゲルからスポットを切り出し、トリプシン消化後、MALDI-TOF 質量分析装置で質量分析を行った。得られたペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) をデータベースと照合し、スポットのタンパクを同定した。また、PMF で同定されなかったものは、MS/MS を測定し、同定した。リン酸化タンパクについては、リン酸化タンパクを特異的に染色する ProQ[®] Diamond を用いて染色し、低線量 X 線照射によってリン酸化の程度が変化するスポットを解析し、同定した。

結果と考察

1) 低線量 X 線照射によるタンパク発現変化

0.1Gy 照射後の若齢ラットのアストロサイトに
ついて、経時的に発現変化するタンパクスポットを
解析したところ、照射後 3 時間で一過性に増加する
タンパクスポットを検出した。このスポットの発現
増加は、老齢ラットの細胞では認められなかった。
このスポットのタンパクを、MS/MS を測定すること
により同定したところ、elongation factor 2 のフ
ラグメントであることが明らかになった。

2) また、0.1Gy 照射後のリン酸化タンパクについ
て解析したところ、elongation factor 1- β が照射
により脱リン酸化されることが明らかになった。こ
の脱リン酸化には加齢の影響はなく、老齢ラットの
細胞でも同様に認められた。

以上より、低線量 X 線照射により細胞のタンパク
合成が elongation factor を介して制御されている
可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Miura, Y. et al. The adaptive response and the influence of aging: Effects of low dose irradiation on cell growth of cultured glial cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **78**, 913–921, (2002)
- 2) Miura, Y. Oxidative stress, radiation adaptive responses, and Aging. *J. Radiat. Res.* **45**, 357–372, (2004)
- 3) Miura, Y. et al. Proteome Analysis of Glial cells treated by Radiation or Hydroperoxide. *Biol. Sci. Space*, **17**, 249–250, (2003)
- 4) Toda, T. et al. Standardization of protocol for immobilized 2-D PAGE and construction of 2-D PAGE protein database on world wide web home page. *Jpn. J. Electroph.* **41**, 13–19, (1997)
- 5) Toda, T. et. al. TMIG-2D PAGE: a new concept of two-dimensional gel protein database for research on aging. *Electrophoresis*, **19**, 344–348, (1998)
- 6) Miura, Y. et al. Age-dependent variations of cell response to oxidative stress. -Proteomic approach to protein expression and phosphorylation. *Electrophoresis*, **26**, 2786–2796, (2005)
- 7) Miura, Y. et al. Proteomics study on the variation of protein expressions and

phosphorylations due to oxidative stress. *Space Utilization Research*, **21**, 205–208, (2005)

謝辞

MS/MS の測定を行っていただいた島津製作所ライ
フサイエンス研究所の山田真希博士、西根勤博士
に深く感謝いたします。また、本研究は、(財)日
本宇宙フォーラムが推進している「宇宙環境利用に
関する地上研究公募」プロジェクト及び日本学術振
興会科学研究費補助金(No. 16510053)のご支援によ
り行われたものであり、関係の方々に深く感謝いた
します。