

16. 放射能管理室

室長 土田 耕三

概 要

当室は、放射性同位元素等の安全取り扱いの徹底を図り、また放射性同位元素の研究利用に関する研究と指導を行っている。平成20年度の放射性同位元素の保管、使用、廃棄に関しては、放射線業務従事者及び各部等の放射能委員によつて的確におこなわれ、また排気や排水中の放射能濃度、環境の空間線量率等は定められている基準値よりもはるかに少ないものであった。施設設備の点検も定期的に行い、フィルター類の交換を行い、また稼働も正常に保たれていることを確認した。

放射線取扱主任者は、戸山が土田耕三・藤本浩文、村山が武田直和（ウイルス第二部・第一室長）、ハンセンは中永和枝（生体防御部・主任研究官）と鈴木幸一（生体防御部・第三室長）が任命されている。武田直和は、平成21年3月31日退職し、放射線取扱主任者の任を解かれた。また、長年の放射線取扱主任者としての功績が認められ、平成20年度放射線安全管理功労表彰を受賞した。

放射線業務従事者登録に関して、新規に登録する者に対する講習会（新規者講習会）を2カ月おきに年6回、継続して登録する者に対する講習会（継続者講習会）を、戸山研究庁舎で4回、村山庁舎で1回とハンセン病研究センターで2回行った。また英語で行う外国人向け新規者講習会を、2回行った。新規者講習会受講者は日本語71名、外国語9名、継続者講習会は363名であった。新規者講習会受講者は講習終了後、確認テストを行い、全員合格した。継続者講習会は、改正した規則の説明を行い、放射性同位元素の安全取扱の徹底を図った。

土田、武田、高田、藤本、作道、菅原は主任者部会年次大会、放射線安全管理研修会及び講習会に参加し、放射線安全管理に対する新たな知識の習得を行った。室員は、土田耕三、高田直子、藤本浩文、作道隆、菅原朋子（臨時）、横山健（臨時）、武田直和（併任）である。

本年度も経常研究費、文部科学省、日本学術振興会や財団からの研究費によって、また米国ユタ大学、アリゾナ大学、琉球大学、日本大学、信州大学、北海道大学、九州大学、東京農工大学、東京大学、東京薬科大学、農業生物資源研究所、国立医薬品食品衛生研究所、放射線医学総合研究所、理化学研究所、日本原子力研究開発機構、富士化学工業株式会社と協力して、以下の研究を行った。

- I. 放射線によるDNA損傷とその修復機構の解析
- II. 転移因子マリナー様配列の水平伝播についての考察
- III. 放射線による生物学的影響を可視化するための生物試料の探索

IV. 医学への応用を目指した生体内脂質動態の解明

I. 放射性同位元素使用状況

1. 戸山

（独立行政法人国立健康・栄養研究所も含む）

（単位 kBq）

	前年度繰越量	入庫量	使用量
³ H	723520	38850	83000
¹⁴ C	126662	14985	19026
³² P	1389135	1591000	1707174
³³ P	0	0	0
³⁵ S	798250	259000	909990
⁵¹ Cr	0	0	0
¹²⁵ I	74296	296	396

保管量下限数量比合計 12818

2. 村山

（単位 kBq）

	前年度繰越量	入庫量	使用量
³ H	189972	37000	65250
¹⁴ C	7997	3700	1800
³² P	32060	92500	102530
³³ P	0	0	0
³⁵ S	84790	703000	229500
⁵¹ Cr	0	0	0
¹²⁵ I	0	0	0

保管量下限数量比合計 227.0

II. 従事者登録数

1. 戸山 319名

（独立行政法人国立健康・栄養研究所も含む）

2. 村山 106名

3. ハンセン 16名

III. 講習会受講者数

1. 通常講習会

放射能管理室

日時	受講者数	備考
平成20年 4月 8日	31	新規
5月 13日	138	継続
5月 14日	117	継続
5月 15日	13	継続(ハンセン)
5月 19日	4	継続(ハンセン)
5月 20日	73	継続(村山)
5月 29日	13	継続
6月 3日	7	新規
7月 24日	5	継続
8月 4日	11	新規
10月 3日	5	新規
12月 3日	10	新規
平成21年 2月 3日	7	新規
合計	434	

2. 外国語講習会

日時	受講者数	備考
平成20年10月 16日	8	新規
平成21年 3月 4日	1	新規
合計	9	

業績

調査・研究

生物学研究における放射性同位元素の利用を図るために、生化学、遺伝学、分子生物学に応用可能な放射性同位元素を用いた研究を展開し、以下の研究を行った。平成20年度日本蚕糸学会賞を土田耕三、進歩賞を高田直子・藤本浩文・土田耕三が受賞した。

I. 放射線によるDNA損傷とその修復機構の解析

放射線が生物へ与える影響のうち、最も影響が大きいと考えられるのがDNAの損傷である。これらの損傷は修復されなければ強力な突然変異原となり、細胞がガン化する一因となると考えられている。当室では、放射線照射されたDNAがどの程度の頻度で損傷を受けるのか、また、損傷を受けたDNAはどのように修復されているのかに注目して研究を行っている。

(1) PCR法を利用した放射線によるDNA損傷頻度検出法の開発

昨年度に引き続き、リアルタイムPCRを利用したDNA損傷頻度測定手法の開発を行っている。本年度は、放射線によるDNA損傷の特徴と考えられているクラスターDNA損傷の検出に本手法が応用可能かを検証した。まず、40pbの塩基配列の中央に酸化損傷塩基である8-oxoGを挿入した疑似クラスター

損傷配列を作成してプラスミドに挿入し、挿入配列の外側のプライマーを用いてPCRを行ったところ、8-oxoGでは損傷箇所ではPCR反応が停止しないことが判明した。現在、損傷の種類をAPサイトに変更して同様の検証を行っている。
[前川(琉球大), 斎藤(原子力機構), 藤本, 高田, 作道, 土田]

(2) Kuタンパク質によるDNA二重鎖切断の認識・結合機構の解明

放射線に起因するDNA損傷のうち、DNA二本鎖切断は最も重篤な損傷の一つである。Kuタンパク質は最初にこの二本鎖切断を認識・結合し、二本鎖切断修復経路の一つである非同相末端再結合過程を開始するキータンパク質である。昨年度に引き続き、計算化学的手法を用いてKuタンパク質とDNA末端間の結合・解離のプロセスに関与するアミノ酸の推定をおこなった。Kuタンパク質のリング内に位置するリジン残基はアセチル化されるとDNA結合能力に影響を与えられられている。そこで、Ku-DNA複合体において、DNA分子に近接しているKu70サブユニット中の3箇所のリジン残基(K317, K331, K338)に注目し、アミノ酸置換モデルを作成した。実験で検証可能なシミュレーションを行うために、リジン残基と置換するアミノ酸はグルタミン(アセチル化モデル)およびアルギニン(非アセチル化モデル)とし、アミノ酸置換をおこなったKuタンパク質にDNA分子を加え、各々のモデルに対してシミュレーションを実行後、DNA-Kuタンパク質間の結合エネルギーを推定した。その結果、3カ所のリジン残基の内、K338をグルタミンに置換するとKuとDNAの結合力が減少することが判明し、既報の実験結果と一致した。したがって、K338のアセチル化されるとDNAとの結合力が弱まることが示唆された。同時に、K317をアルギニン置換するとDNAとの結合力が上昇することも予想された。

[藤本, 小池(放医研), 斎藤(原子機), 前川(琉球大), 高田, 作道, 土田]

(3) YファミリーDNAポリメラーゼのDNA合成時におけるミスマッチ伸張反応

放射線等によって生じるDNA損傷部位を乗り越えてDNA合成を行える能力を持つYファミリーポリメラーゼの一つであるヒトPolkは、鋳型鎖とプライマー鎖3'末端がミスマッチ塩基対を形成した状態からでもプライマー伸張を行う事ができる。計算化学的手法を用いて解析した結果、他のYファミリーポリメラーゼには存在しないヒトPolkタンパク質に特有のN末端ドメインが活性中心の形状に干渉し、通常DNA合成時にリボ体とデオキシリボ体を選別するのに利用されているsteric gateと呼ばれるアミノ酸残基Y112の側鎖をプライマー末端の塩基に近づけることで、本来対合しないはずの塩基対を保持している可能性が示唆された。

[佐々(東薬大), 能美(国衛研), 藤本, 前川(琉球大), 高田, 作道, 土田]

II. 転移因子マリナー様配列の水平伝播についての考察
*Drosophila mauritiana*で同定されたDNA型のトランスポゾン

*marinar*は、多くの生物種のゲノム中で相同配列(MLEs)が見つかっており、種を超えて水平伝播するトランスポゾンの1つと考えられている。MLEsのサブファミリーの1つに注目し系統解析を行う事で、同一種における地理的移動を詳細に追跡できるのではないかと考え、昨年度、アジアに広く分布するカイコの近縁野生種であるクワコの系統解析をおこなった。得られた結果を検証する為に、本年度は、クワコrDNA領域中に存在するカイコには無い制限酵素部位の有無を指標に系統解析をおこなった。その結果、中国・韓国のクワコはすべて制限酵素部位を持たないカイコ型であり、MLEsを用いた系統解析の結果と一致していた。一方、日本のクワコには制限酵素部位を持つ日本クワコ型のホモ、カイコ型のホモ、及び両者がヘテロである個体が検出された。このことは日本のクワコにカイコの染色体が侵入したことを示している。

[川西(琉球大)、中島(琉球大)、伴野(九州大)、藤本、前川(琉球大)、高田、作道、土田]

III. 放射線による生物学的影響を可視化するための生物試料の探索

放射線照射による損傷指標としての翅原基の利用

ガンマ線をカイコ幼虫に照射すると翅が小さくなる現象が知られている。重イオンビームを利用して原基の前後2組のどちらかあるいはその一部を照射することで羽全体に影響が出るかどうかを検証した。ガンマ線照射後原基発生を観察することで、ガンマ線照射線量によって現れる影響を可視化、定量できる方法を確認した。これによりバースタンダー効果を解析できる系の確立を図ることとした。

[前川(琉球大)、小林(原子機)、白井(信州大)、木口(信州大)、高田、藤本、土田]

IV. 医学への応用を目指した生体内脂質動態の解明

脂質は細胞膜構成成分や栄養分、また生理活性メディエーターとして生体に必須の成分である。脂質は動物体内での細菌認識機構やウイルスの複製にも重要な役割を果たしていることが近年報告されており、生体内の脂質動態の解明は感染症研究を含む医学分野への応用性を持つ研究課題である。また、放射線の照射が細胞膜の脂質構成に影響することも知られている。水が豊富な生体内において水に溶けない脂質を輸送するには何らかの装置が必要であり、その装置となる遺伝子の同定と機能の解明を行っている。

1. CBP遺伝子の機能解析

カロテノイドは細菌から動植物に至るまで生物種を問わず存在する脂質であり、その抗酸化作用から臨床医学的にも重要な脂質である。例えば院内感染症の主要原因細菌MRSAはカロテノイドを産生することで好中球が作る活性酸素種に抵抗性を有している。また、視覚の維持に重要であるヒト網膜黄斑にはカロテノイドが蓄積しており、高齢者失明の第一原因である加齢黄斑変性症はカロテノイドの経口投与で予防される。CBPはカロテノイド輸送を担う

細胞内蛋白質であり、またヒトの黄斑にも抗CBP抗体で反応するタンパク質が存在することが確認された。カイコの近縁種からCBPの相同遺伝子を同定し、CBPの配列保存部位についても検討した。

[作道、中島(信州大)、藤本、瀬筒(生物研)、小林(生物研)、内野(生物研)、田村(生物研)、岩野(日本大)、中垣(信州大)、片岡(東京大)、嶋田(東京大)、伴野(九州大)、Bernstein P. (Univ. Utah)、土田]

2. apoLp遺伝子の解析

リポタンパク質は動物体液における脂質循環を担うタンパク質である。カイコの体液リポタンパク質アポリポリン-III (apoLp-III) について、発生初期での発現を調べたところ、産卵直後の胚には発現が見られなかったが、産卵後24時間後から胚子において一過性の発現が見られた。これは、体液が形成されない発生初期においてリポタンパク質が胚子自身によって合成されていることを示している。この体液形成以前のリポタンパク質の役割について解析を進めている。

[横山、中島(信州大)、作道、高田、藤本、岩野(日本大)、中垣(信州大)、Rolf Ziegler(アリゾナ大)、片桐(北大) 土田]

3. apoLTP遺伝子の解析

脂質組成は組織によって異なる。脂質組成の違いは病原体の標的組織を決定する要因となっている可能性がある。脂質組成の違いを生む機構として、体液内の脂質転移因子(apoLTP)の関与が考えられるが、その分子生物学的な解明は進んでいない。昆虫体液のapoLTPを精製し、その精製した蛋白質をコードする遺伝子配列の一部を同定した。その遺伝子の全長決定を進めている。

[横山、藤本、作道、高田、土田、濱野(農工大)]

4. 新規脂質輸送遺伝子の探索

脂質輸送に関わるカイコの遺伝子座の一つについて、その遺伝子座がコードする遺伝子を同定することを目的としてポジショナルクローニングを行った。遺伝子が座位するゲノム上の範囲を狭め、候補となる遺伝子を得た。その遺伝子は哺乳類の細菌認識に関わる遺伝子と相同性を有していた。現在その遺伝子の機能の詳細を調べている。

[作道、藤本、飯塚(生物研)、瀬筒(生物研)、田村(生物研)、生川(生物研)、山本(生物研)、三田(生物研)、伴野(九州大)、土田]

5. スカベンジャー受容体クラスBの機能解析

スカベンジャー受容体クラスB (SR-B) は、体液リポタンパク質の受容体として同定された膜貫通タンパク質である。SR-Bとその相同遺伝子CD36は、肝炎ウイルスHCVや黄色ブドウ球菌、マイコバクテリウム属細菌、マラリア原虫、エンテロウイルスの感染成立に関与することが報告されている。SR-Bはウイルス外皮や細菌細胞膜の脂質を認識していると推測されるが、感染成立を促すSR-Bの分

発表業績一覧

子作用機序の詳細はほとんど明らかではない。

カイコにおけるSR-Bの相同遺伝子Cameo2を同定し、Cameo2が黄繭遺伝子(C)という、脂溶性カロテノイド色素の絹糸産生細胞への取り込みを担い、繭を黄色にする遺伝子であることを見出した。約2000個体のBF1個体を用いて絞り込まれたC遺伝子の座位する375 kbの範囲にCameo2は位置していた。Cameo2の発現は白繭を作るC変異体の絹糸産生組織において強く抑制されていた。C変異体の絹糸産生組織にCameo2をトランスジェニックの手法で強制発現したところ、カロテノイドの取り込みと繭の着色は回復した。

C遺伝子は体液中のカロテノイドの中でもルテインの取り込みを選択的に関与し、また、細胞内カロテノイド結合タンパク質CBPの発現を条件として機能することが分かっていた。このことから、Cameo2を介して体液からCBPへルテインが選択的に運ばれていると考えられる。カイコにおいてはCBPの変異体も存在することから、カイコの絹糸産生組織は、選択的な脂質輸送機構におけるリポタンパク質受容体と細胞内脂質結合分子の関係を解析する上での遺伝学的なモデルとなると考えられる。また、Cameo2のルテインへの選択性を生じさせている分子機構を解明することで、SR-Bが特定の病原体をどのように認識し、感染成立を促すかについて、知見を与え得ると考えられる。

[作道、高田、藤本、土田、飯塚(生物研)、小林(生物研)、瀬筒(生物研)、田村(生物研)、生川(生物研)、桑崎(生物研)、門野(生物研)、三田(生物研)、山本(生物研)、伴野(九大)、片岡(東大)、北村(富士化学工業)]

管理業務

I. 講習会

新規放射線取扱業務従事者、継続者、新規外国人放射線取扱業務従事者、R I を使用しない管理区域立入者に対する講習会を実施した。実施詳細は、最初の表を参照。

II. 日常管理業務

1. 通常の日常管理業務を行った。放射性同位元素の購入、入荷登録、管理、放射性同位元素の廃棄物の集荷と払い出し、施設点検、汚染検査、排気、排水の放射性同位元素量の測定、施設日常点検、定期点検、自主点検、放射線取扱業務従事者の被ばく管理、放射線取扱業務従事者出入り管理、一時立ち入り者の出入り管理と講習、他日常の管理。

2. 例年通り管理状況報告書を文部科学省に6月に提出した。

III. その他

1. 放射能委員会、R I 3 施設協議会等の開催

2. 放射線取扱主任者講習会等へ出席し研修した

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Sakudoh T, Tsuchida K. Transport of carotenoids by a carotenoid-binding protein in the silkworm. In: Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties. CRC Press, in press.
- 2) Kawanishi, Y., Banno, Y., Fujimoto, H., Nho, S.K., Tu, Z., Mita, K., Tsuchida, K., Takada, N., Maekawa, H., and Nakajima, Y., "Method for rapid distinction of *Bombyx mandarina* (Japan) from *B. mandarina* (China) based on rDNA sequence differences.", 2008, *J. Insect Biotech. Seric.*, **77**, 79-85.

2. 和文発表

- 1) 土田耕三：カロテノイド結合タンパク質：カロテノイドの細胞内搬送にかかわる分子、蚕糸・昆虫バイオテクノロジー、**77**, 125-129, 2008.
- 2) 作道隆, 土田耕三. 繭の色はどのようにして彩られるのか. 生化学, **81**, 27-31, 2009
- 3) 武田直和：アイソトープ施設と私、Isotope News, **660**, 8, 2009.

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Fujimoto, H., Higuchi, M., Pinak, M., Bunta, J.K. Nemoto, T., Sakudoh, T., Takada, N., Maekawa, H., Saito, K., and Tsuchida, K., "Structural analysis of the interaction between the Ku protein and DNA", 10th International Workshop on Radiation Damage to DNA, Urabandai, Japan, June, 2008.
- 2) Sassa, A., Niimi, N., Katafuchi, A., Grúz, P., Fujimoto, H., and Nohmi, T., "The steric gate tyrosine 112 is crucial to the efficient mismatched primer extension by human DNA polymerase κ ", 10th International Workshop on Radiation Damage to DNA, Urabandai, Japan, June, 2008.
- 3) Niimi, N., Sassa, A., Katafuchi, A., Grúz, P., Fujimoto, H., Ohta, T., Nohmi, T., "The steric gate tyrosine 112 is crucial to the efficient mismatched-primer extension by human DNA polymerase κ ", 3R (Replication, Recombination, Repair) 2008 Symposium, Shizuoka, Japan, Oct., 2008.
- 4) Fujimoto, H., Higuchi, M., Pinak, M., Bunta, J.K. Nemoto, T., Sakudoh, T., Takada, N., Maekawa, H., Saito, K., and Tsuchida, K., "Structural analysis of the interaction between the Ku protein and DNA", New Nuclear Research Symposium -Biological Responses to Low Dose Radiation, Kitakyushu, Japan, Nov., 2008.
- 5) Sakudoh T, Nakashima T, Fujimoto H, Takada N, Tsuchida K. Gene structure and expression of the carotenoid-binding protein responsible for cellular carotenoid transport in lepidopteran insects. The 15th international symposium on carotenoids, Okinawa, Japan, June, 2008

6) Sakudoh T, Iizuka T, Narukawa J, Sezutsu H, Kuwazaki S, Banno Y, Takada N, Fujimoto H, Kadono-Okuda K, Mita K, Tamura T, Yamamoto K, Tsuchida K. Positional cloning of the Yellow cocoon (C) gene responsible for membrane transport of carotenoids in the silkworm. The 3rd Insect Genomes Research Meeting, Kobe, Japan, March, 2009

永将司、藤本浩文、高田直子、土田耕三.カイクにおける成虫原基成長因子の発現解析. 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 東京, 3月, 2009年

2. 国内学会等

- 1) 藤本 浩文, 「計算化学的手法を用いた Ku タンパク質による DNA2 本鎖切断末端認識機構の解析」, 変異機構研究会・第 21 回夏の学校, 愛知県小牧市, 6 月, 2008 年.
- 2) 藤本浩文, 傅舟一, 泰地真弘人, 作道隆, 高田直子, 土田耕三, 大西和夫, 「分子動力学法を用いたプレB細胞レセプター-non-Ig 領域の相互作用の解析」, BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸, 12 月, 2008 年.
- 3) 谷田部 春香, 川島 朋子, 瀬戸 陽介, 藤本 浩文, 前川秀彰, 黒木 あづさ, 藤原 晴彦, 「標的特異的遺伝子導入ツールとしてのレトロトランスポゾン R2OI」, BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸, 12 月, 2008 年.
- 4) 川西祐一, 鎌内悠, 味村傅, 三田和英, 山本公子, 伴野豊, 藤本浩文, 屠振力, 盧時甲, 日高道雄, 中島裕美子, 前川秀彰, 「クワコの rDNA の 5.8S-28S 領域の配列を指標にした比較系統解析」, 第 79 回日本蚕糸学会, 東京, 3 月, 2009 年.
- 5) 作道隆、飯塚哲也、生川潤子、瀬筒秀樹、桑崎誠剛、伴野豊、高田直子、藤本浩文、門野敬子、三田和英、田村俊樹、山本公子、土田耕三. 生体色素カロテノイドの膜輸送に関与するカイク黄繭遺伝子の分子遺伝学的解析. 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 12 月, 2008 年
- 6) 土田耕三. カロテノイドの選択的輸送を支える装置—カロテノイド結合タンパク質の生理機能、シンポジウムカイクゲノムが拓く新たな生物学、第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会合同大会、神戸、12 月、2008 年
- 7) 作道隆、飯塚哲也、生川潤子、瀬筒秀樹、桑崎誠剛、伴野豊、高田直子、藤本浩文、門野敬子、三田和英、田村俊樹、山本公子、土田耕三. 黄繭遺伝子(C)の分子遺伝学的解析. 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 東京, 3 月, 2009 年
- 8) 土田耕三、北村晃利、眞岡孝至、作道隆、藤本浩文、高田直子. アスタキサンチン赤色繭の生産. 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 東京, 3 月, 2009 年
- 9) 北村晃利、作道隆、湯浅正志、森林敦子、藤本浩文、高田直子、岩野秀俊、伴野豊、土田耕三. 黄繭遺伝子(C)は中部絹糸腺におけるキサントフィルの取り込みを支配する. 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 東京, 3 月, 2009 年
- 10) 王華兵、作道隆、川崎秀樹、荒木克枝、岩野秀俊、岩