

学術論文

低周波磁界における線虫 *C. elegans* の遺伝子発現の変化Effect of Gene Expression to Extremely Low Frequency Magnetic Fields in *C. elegans*原田 真市^{*1}, 池田 隆^{*2}, 山田 外史^{*1} (正員)

Shin-ichi HARADA, Takashi IKEDA, Sotoshi YAMADA (Mem.),

We have examined the screening of ELFMFs-responding genes by differential display method in nematode *C. elegans*. We performed the quantitative RT-PCR assay to 22 in identified 56 genes and reconfirmed the resultant of mRNA expression by differential display. In candidate genes, *ncs-2* gene we isolated is known to function as a neural calcium sensor in *C. elegans* neurons. *ncs* gene exist two additional genes, *ncs-1* and *ncs-3* in *C. elegans*. These genes are highly conserved among multicellular organisms. We found that *ncs-2* transcript level is up-regulated under ELFMFs exposure. On the contrary, *ncs-1* and *ncs-3* were down-regulated under ELFMFs exposure. Moreover, we identified *ncs-1* related genes, *tax-2* and *tax-4* by quantitative RT-PCR assay. *tax-2* and *tax-4* as well as *ncs-1* are expressed in a thermosensory neuron, and transcript level of these genes are decreased under ELFMFs exposure. These results suggest that thermosensory neuron in *C. elegans* may be sensitive to ELFMFs.

Keywords: ELFMFs, *C. elegans*, *ncs-1*, *ncs-2*, *ncs-3*, *tax-2*, *tax-3*, *tax-4*, thermosensory, neuron.

1 はじめに

交流磁界曝露が生体に及ぼす影響について、遺伝子レベルから固体レベルでの生科学研究や疫学研究など様々な研究報告がなされてきた。現在特に社会問題化しているのは、日常生活で用いる電気に由来する 50 ないし 60 Hz の極低周波交流磁界, ELFMFs (Extremely Low Frequency Magnetic Fields) である。世界各国の公的機関において、ELFMFs 曝露に対する人体影響の疫学調査が行われ、生活環境中での磁界曝露による人体への健康リスクが指摘された[1, 2]。そして、磁界曝露時間や磁界強度などに関する防護規格や、磁界曝露による健康リスクに対する予防的対策が取り上げられてきた。しかしその影響は多様で、生体内での磁界応答メカニズムは未だ明確に実証されていない。

そこで、本研究ではまずモデル動物による磁界影響評価をすることを目的とし、全ゲノム配列がすでに解読されている線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) をモデル動物として用い、極低周波交流磁界曝露下での生体機能への影響を遺伝子レベルにおいて評価した。特に DNA から messenger RNA (mRNA) への転写段階における発現量に着目し、極低周波交流磁界曝露に特異的な応答を示す候補遺伝子を同定し、さらにそれぞれの候補遺伝子の mRNA 発現量を厳密に定量化する

ことによって、磁界と遺伝子発現レベルとの関係を調べた。

2 実験装置および実験対象

2.1 極低周波交流磁界発生装置

磁界発生装置として、E 字型鉄心を対向させ中央の脚部に縦幅 13 mm のギャップをもうけ実験領域とした。この実験領域において周波数 60 Hz, 磁界強度 0~1.2 T の正弦波交流磁界を発生できる回路を設計し、入力電圧 200 V, C=1500 μ F, L=4.77 mH とした。実験領域の磁界分布をガウスメーターにより測定し、誤差 2% 以内の勾配のない均一な交流磁界が得られていることを確認した。また磁界発生に伴うコイルからの発熱の影響を避けるために、実験領域内部にはクーリングポンプ (水冷式冷却装置) を循環させ、実験領域内空間温度を $\pm 0.1^\circ\text{C}$ の範囲で一定に保持できることを確認した。このときの実験領域の温度測定装置として、クオーツ温度計 DMT-610B, センサプローブ PTY-309 を使用した。

2.2 モデル動物 (線虫 *C. elegans*)

磁界曝露の対象として用いたモデル動物である線虫 *C. elegans* は、全細胞数が約 1,000 個、そのうち神経細胞は 302 個で全神経回路網が解明されている多細胞生物で、飼育が容易であり、ライフサイクルが 3 日と早く、遺伝形質の発現を容易に観察できる。また全ゲノム配列がすでに解読されており、多くの遺伝子機能

連絡先: 山田 外史, 〒920-8667 石川県金沢市小立野 2-40-20, 金沢大学自然計測応用研究センター人間計測制御部門, e-mail: yamada@magstar.ec.t.kanazawa-u.ac.jp

^{*1} 金沢大学 ^{*2} 関西電力

とその欠損による表現型との関連が明らかにされている。線虫は通常大腸菌 OP50 を餌として、寒天培地上 20℃ で飼育した。線虫に十分な餌を与えて 8 時間の同調培養を行った後、寒天培地から回収し、滅菌水で洗浄して空のシャーレに線虫群を移し、実験領域において 20℃ の状態に 120 分間置いた sham 曝露線虫群 (control) と、対照実験として 20℃ で周波数 60 Hz、磁界強度 0.5 T の ELFMFs を 120 分間曝露した線虫群 (exposed) のそれぞれより Total RNA を抽出した。

3 ELFMFs 影響評価の実験手法

3.1 Differential Display 法

磁界影響があった遺伝子(RNA)を特定する手法に Differential Display 法がある。本方法では対象とする RNA 間での発現量の差を可視化し、発現量の異なる遺伝子を迅速にスクリーニングすることができる。具体的には Fig. 1 に示すように、まず control と exposed の一定量の初期 RNA から逆転写 (Reverse Transcription; RT) 酵素反応によって RNA に相補的な DNA (cDNA) を合成し、PCR (Polymerase Chain Reaction) により増幅する。RT 反応に用いたプライマーは 3 種類のオリゴヌクレオチド H-T₁₁A, H-T₁₁G, H-T₁₁C Anchor プライマーで、PCR には同じ Anchor プライマーに対して 8 種類の Arbitrary プライマーを用い、合計 24 種類の PCR 産物に由来する遺伝子群の mRNA について、網羅的に DNA を増幅した。PCR において解離した DNA に任意プライマーがアニーリングして伸長する際、放射性物質である α -[³²P]dATP が 2 本鎖 DNA に取り込まれ、オートラジオグラフィーによりフィルム上に可視化することができる。PCR 産物をゲル電気泳動にて分離した後、ゲルを乾燥させて X-ray フィルムにフラグメントを感光させた。このフィルムから発現量に差のあるバンドを切り出して精製後、その PCR 産物を希釈してテンプレートとして PCR により再増幅を行い、ゲル電気泳動によりクローンがシングルバンドであることと、バンドサイズの確認を行う。またクローン化した後、制限酵素により切断し、ゲル電気泳動したインサートのバンドサイズと一致していることを確認する。次にクローンの塩基配列を決定するために、DNA シークエンスを行った。これにより決定した塩基配列と、データベースのホモロジー検索との照合により遺伝子の同定を行った。

3.2 定量的 RT-PCR 法

Differential Display により同定した ELFMFs 応答性候補遺伝子の mRNA 発現量の増減について定量的 RT-PCR 法により再現性を確認した。Fig. 2 に示すように、RT-PCR は RT 反応と PCR を用いた反応で、遺伝子特異的プライマーを用いることにより特定の遺伝子の領域のみを増幅することができる。定量に用いた ABI PRISM 7700 Sequence Detection System は、サーマルサイクラー上部に蛍光検出器の機能をもたせたもので、PCR で DNA 鎖を複製する際に、蛍光標識 (蛍光色素として SYBR Green を使用) が 2 本鎖 DNA に取り込まれ、DNA の増幅が蛍光シグナルとして検出される。このデータを解析することにより、各サンプルの初期 RNA 量を定量的に算出することができる。

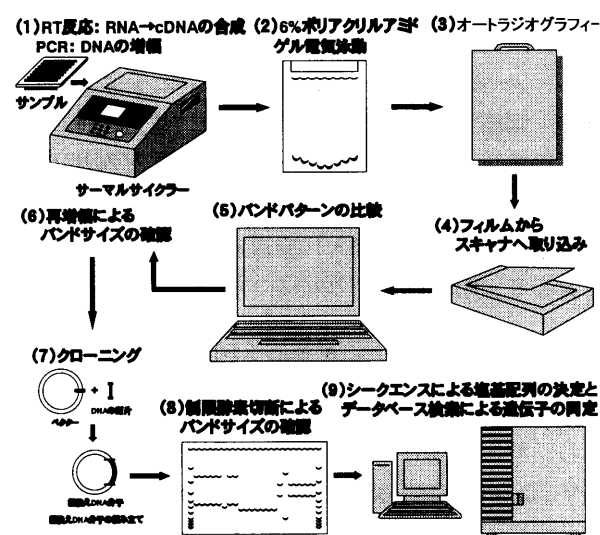


Fig. 1 Differential Display method.

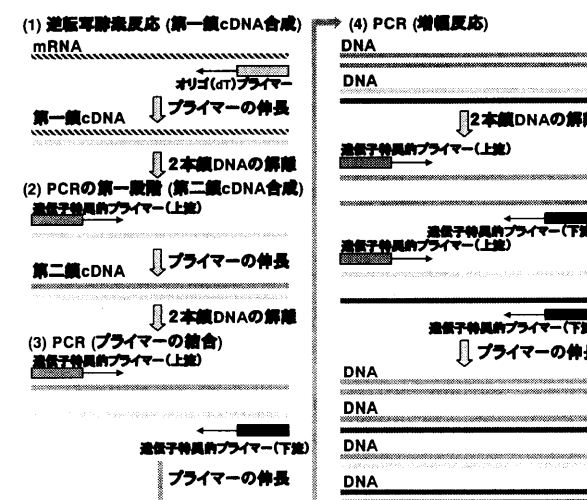


Fig. 2 Quantitative RT-PCR method.

4 ELFMFs 応答性候補遺伝子の探索と定量化

4.1 ELFMFs 応答性候補遺伝子の探索と同定

Differential Display の結果, ELFMFs 曝露により発現量が増加したクローン (up-regulated gene) 33 個, 発現量が減少したクローン (down-regulated gene) 23 個の合計 56 個のクローンを ELFMFs 応答性候補遺伝子として同定した。また DNA シークエンスの結果, データベースとの照合により, そのうち 22 個のクローンについては既知遺伝子であることが判明した。ELFMFs 曝露により, mRNA 発現量が増加したクローンと減少したクローンのバンドパターンについての代表例を Fig. 3 に示す。nsc-2 遺伝子は 1.2 倍, mec-5 遺伝子は 2.3 倍とそれぞれ ELFMFs 曝露により mRNA 発現量が増加し, gei-22 遺伝子は 5.9 倍, fat-2 遺伝子は 11.2 倍 ELFMFs 曝露により発現量が減少した。またホモロジー検索の結果, これら同定した遺伝子は転写調節因子や核タンパクの他, 神経系や表皮・筋収縮, アポトーシス, タンパク質の修飾・代謝機能などに関連する因子であることが判明した (Table 1)。

4.2 ELFMFs 応答遺伝子の定量的 RT-PCR

Differential Display により同定した 56 個のクローンのうち, 特に機能的に興味のあるいくつかの遺伝子について, より正確に mRNA 発現量を定量的に解析するため, 定量的リアルタイム RT-PCR により, control と exposed で各遺伝子産物の発現量の比較を行った。縦軸はそれぞれの候補遺伝子の mRNA 発現量を測定した際に, 細胞骨格の構成成分であり, 細胞骨格を維持するために常に発現し, 環境の変化 (熱刺激や物理的的刺激など) によりその発現が変動しないとされる *act-1* 遺伝子を内在性のコントロールとして Total RNA の濃度誤差を補正し, control を 100 として基準化した値になっている (Fig. 4)。実験の試行回数は 4 回で, 有意差検定として Student t-test を行った。これまでに 56 個のクローンのうち, 25 個について RT-PCR を行い, そのうち 22 個の遺伝子は Table 1 に示すように, Differential Display による mRNA 発現量の増減について再現性を確認することができた。

Differential Display と定量的 RT-PCR の結果が異なるのは, Differential Display では任意の配列のプライマーに対し RT-PCR では遺伝子特異的プライマーを用いて増

幅しているため, PCR 増幅効率の違いによるものと考えられる。

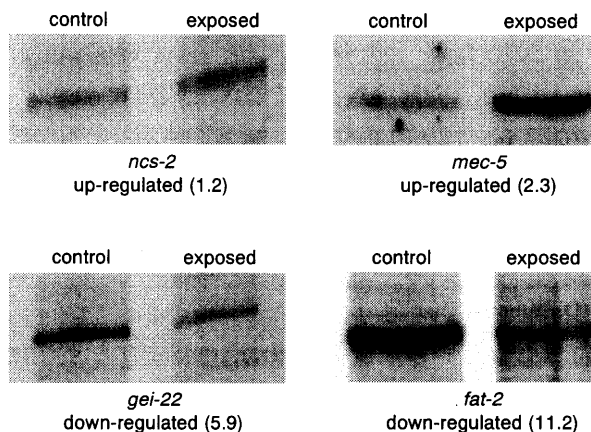


Fig. 3 DNA fragments by differential display.

Table 1 Candidate for ELFMFs-responding genes.

primers	cosmid	DD	RT-PCR	gene
neuron specific (神経系関連因子)				
T11A/AP8	F10F8	1.2 ↑	2.5 ↑	<i>nsc-2</i>
transcription (転写調節関連因子)				
T11A/AP5	H14A12	4.2 ↑	1.4 ↑	<i>fum-1</i>
T11C/AP3	F43D2	16.8 ↑	2.0 ↑	<i>F43D2.2</i>
T11G/AP7	C54G10	3.3 ↑	1.6 ↑	<i>rhc-1</i>
T11C/AP5	Y47G6A	35.7 ↓	3.9 ↓	<i>crn-1</i>
T11G/AP3	F08G2	1.9 ↓	1.9 ↓	<i>F08G2.4</i>
T11G/AP7	C05G5	12.5 ↓	2.6 ↓	<i>C05G5.3</i>
T11G/AP7	F47A4	43.4 ↓	2.5 ↓	<i>dpy-22</i>
cuticle or constrictor (表皮・筋収縮関連因子)				
T11C/AP5	E03G2	2.3 ↑	1.7 ↑	<i>mec-5</i>
T11G/AP7	C36E6	100 ↑	1.7 ↑	<i>mlc-2</i>
T11G/AP5	W02A2	11.2 ↓	3.4 ↓	<i>fat-2</i>
apoptosis (アポトーシス関連因子)				
T11C/AP4	F57B10	10.8 ↓	2.4 ↓	<i>bag-1</i>
T11C/AP8	Y73B6BL	4.1 ↓	2.1 ↓	<i>csp-2</i>
modification, metabolism, etc. (修飾, 代謝など)				
T11G/AP7	D1007	2.9 ↑	1.2 ↑	<i>rps-10</i>
T11C/AP1	K01G5	4.4 ↑	1.8 ↑	<i>ran-1</i>
T11G/AP4	Y71F9AM	1.2 ↓	1.2 ↓	<i>nxt-1</i>
T11C/AP8	T22C1	100 ↓	4.8 ↓	<i>T22C1.5</i>
T11G/AP4	Y39G10A	1.2 ↑	4.7 ↑	<i>Y39G10A</i>
T11G/AP5	R57	100 ↑	3.8 ↑	<i>R57</i>
T11G/AP6	Y67D8A	1.8 ↑	1.2 ↑	<i>Y67D8A</i>
T11G/AP7	C07A12	2.2 ↑	1.2 ↑	<i>pdi-2</i>
T11C/AP8	ZK455	5.9 ↓	1.7 ↓	<i>gei-22</i>

4.3 線虫の神経系に關与する遺伝子の定量的 RT-PCR

同定した *ncs-2* 遺伝子は、神経系カルシウムセンサー(neuronal calcium sensor)としての機能を持ち、細胞内シグナル伝達に關与すると推定されている。また *ncs-2* 遺伝子には、相同性の高い *ncs-1*, *ncs-3* 遺伝子が存在し、これらの遺伝子は *ncs* 遺伝子ファミリー (*ncs-1*, *ncs-2*, *ncs-3*) に属していることが知られている[3]。そこで、これら神経系に關与する遺伝子の mRNA 発現量を検討するため、20℃で周波数 60 Hz、磁界強度 0.5 T の ELFMFs を 15, 30, 60, 120 分間の経時変化で曝露した線虫群の RNA (control) と、対照実験として 20℃の生理的条件下に経時変化でいた線虫群の RNA (exposed) の発現量を比較した。その結果、*ncs-2* 遺伝子は時間が経つにつれて exposed の発現量が有意に増加し、曝露時間 120 分で最大 2.5 倍の発現量を示した (Fig 4(a))。これとは対照的に、Fig. 4(b), (c)に示すように *ncs-1*, *ncs-3* 遺伝子の exposed では、経時変化で control が一定の発現量を示しているのに対して常に発現量は減少していた。これにより *ncs* 遺伝子ファミリーは、生理的条件下では mRNA は一定の発現量を示すが、ELFMFs 曝露によりその発現量が有意に変化することが確認された。

ncs 遺伝子ファミリーの中で、*ncs-1* 遺伝子の欠失変異体は学習能の低下がみられ、温度走性に異常を示すことが知られている[4]。そこで、*ncs-1* 遺伝子が ELFMFs 曝露により発現量が減少したことから、同一の表現型を示す *tax* 遺伝子群についても mRNA レベルでの磁界影響を検討した。*tax-2* と *tax-4* 遺伝子は、CNG チャンネル (サイクリックヌクレオチド依存性チャンネル) と相同性が高く、 Ca^{2+} イオンの流入を調節していると考えられている[5]。その変異体は AFD 感覚ニューロン (温度受容細胞) で受容する温度に対する応答が欠損している。定量的 RT-PCR を用いて比較した結果、Fig. 5 に示すように *tax-2*, *tax-3*, *tax-4* 遺伝子は、有意に mRNA 発現量が減少していることが確認された。また同時に測定した、熱ストレス応答の指標となる因子の 1 つである *hsp-16.2* 遺伝子の mRNA 発現量についても定量的に解析を行い、control と exposed で有意差がないことを確認した。これにより磁界を曝露した際、うず電流による細胞内での熱の発生はないものと考えられた。従って線虫 *C. elegans* は温度と同様に、ELFMFs にも感受性を示すことが示唆された。

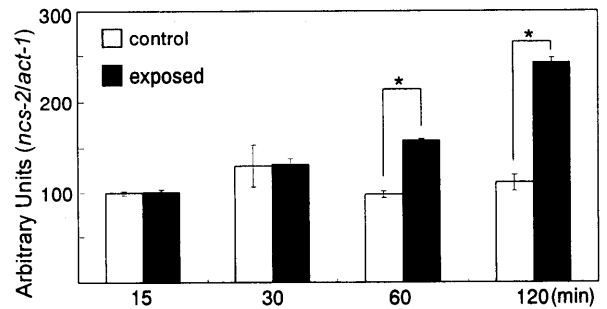
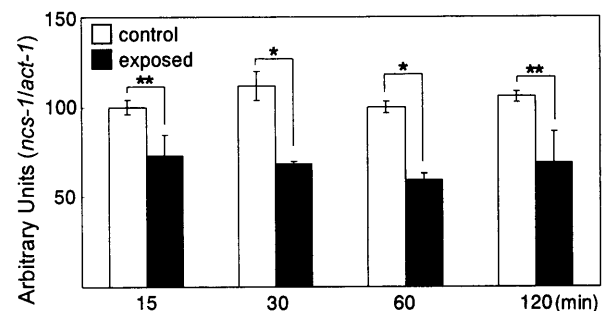
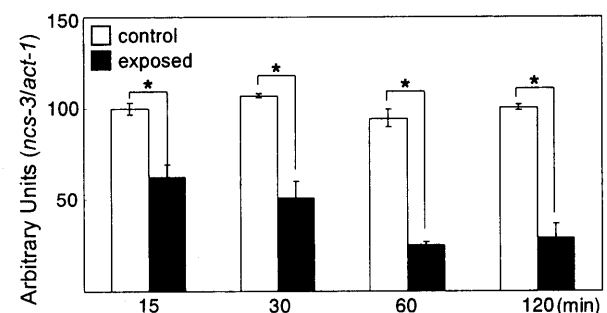
(a) Expression of *ncs-2* mRNA(*: $P < 0.01$, $N = 4$).(b) Expression of *ncs-1* mRNA(*: $P < 0.01$, **: $P < 0.1$, $N = 4$).(c) Expression of *ncs-3* mRNA(*: $P < 0.01$, $N = 4$).

Fig. 4 Expression of mRNA in time-dependent manner.

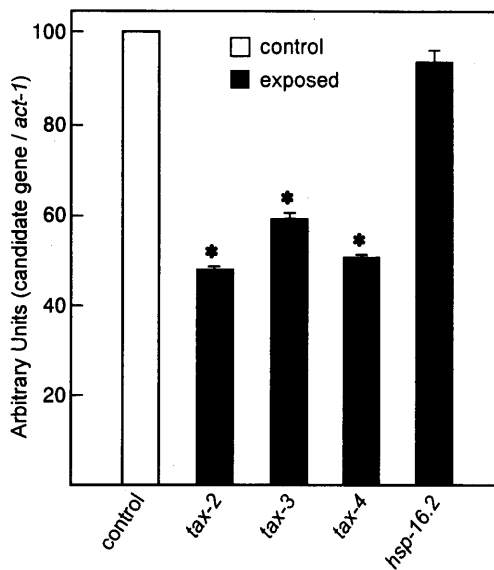


Fig. 5 Expression of *tax* genes mRNA.
(*: $P < 0.01$, $N = 4$)

5 総論および今後の課題

5.1 ELFMFs 応答性候補遺伝子の探索と同定

本研究で用いた Differential Display と定量的 RT-PCR により得られた結果について下記に述べる。

5.1.1 ELFMFs 応答遺伝子

磁界応答遺伝子の探索から多くの候補遺伝子を同定した。また、その関連因子の定量的 RT-PCR から Differential Display では同定することができなかった磁界応答遺伝子を発見することができた。このことはまだ同定されていない磁界応答遺伝子が存在することを示唆している。

56 個の候補遺伝子の半数以上は機能未知の遺伝子ではあるが、ホモロジー検索から転写調節関連因子や核タンパク質の他、神経系、表皮・筋収縮関連因子、アポトーシス、代謝・修飾関連因子に分類された。後述するが、なかでも転写調節関連因子が同定されたことと、遺伝子発現量の変化は密接な関連があり、転写調節因子そのものの遺伝子発現量が低下すれば、その下流に存在する遺伝子発現に影響を及ぼすと考えられる[6, 7]。

転写因子の 1 つである CREB(cyclic-AMP responsive element binding protein)は cAMP 依存性シグナル伝達経

路における活性化因子として同定され、cAMP 依存性のリン酸化酵素、PKA によってリン酸化を受けると、cAMP 反応性エレメント(CRE)を持つ一連の遺伝子に結合し、転写を促進させる[8, 9]。さらに CREB は長期記憶といった高次神経機能に関与することが知られている[10]。最近、この CREB の DNA 結合能が磁界曝露により細胞内外のカルシウム濃度に依存して促進されることが報告されている[11]。このことは、後で示している *ncs* 遺伝子や *tax* 遺伝子といったカルシウム依存性のシグナル伝達経路に磁界が影響する可能性も示唆している。

5.1.2 ELFMFs 応答遺伝子の定量的評価

今回、まず我々は Differential Display で同定された *ncs-2* 遺伝子に注目した。この遺伝子は神経系で機能すると考えられており、その他に *ncs-1* と *ncs-3* 遺伝子の二つのファミリーが存在し、いずれも神経系カルシウムセンサーとしての機能を有する。またこれら遺伝子はヒト、マウス、牛にも保存されている[3]。ELFMFs 曝露によりこれら *ncs* 遺伝子の発現量は変化し、*ncs-2* のみ発現が上昇していた。この要因については不明である。*ncs* ファミリーの中でも、特に *ncs-1* 遺伝子については詳しく調べられており、その変異体では温度走性異常を示すことが知られている[4]。また、同様な表現型を示す変異体として *tax* 遺伝子群が明らかにされている[5]。このことから *tax-2*, *tax-3* と *tax-4* 遺伝子について mRNA 発現量を定量的 RT-PCR で検討したところ、ELFMFs 曝露により有意に発現量が減少した。

遺伝子の mRNA 発現量の変化は、ELFMFs 曝露による直接的、あるいは間接的（これら遺伝子の上流に存在する、ある転写調節因子が ELFMFs 曝露の影響を受けた結果、間接的に mRNA 発現量が変化した）影響であると推定されるが、*ncs-2* と *ncs-1* 及び *ncs-3* では遺伝子制御機構が異なると考えられる。

5.1.3 ELFMFs 応答遺伝子と生体機能の関連

線虫 *C. elegans* は ELFMF 曝露下では行動異常を示す[12]。一つの可能性として、*tax-2*, *tax-4* 遺伝子は AFD ニューロンに、*ncs-1* 遺伝子はその下流の AIY ニューロンに発現する遺伝子であり、さらにその下流の複数のニューロンが線虫の筋肉活動を制御していることから、ELFMFs 曝露により *tax-2*, *tax-4*, *ncs-1* 遺伝子の mRNA 発現量が減少した結果、感覚ニューロンと運動ニューロン間のシグナル伝達が抑制され、線虫が行動

異常を示したのではないかと推察される。

また AFD 感覚ニューロンは温度と同様に磁界にตอบสนองするニューロンであると考えられた。

5.2 今後の課題

本研究では交流磁界発生装置を用いた加速試験により、我々が日常生活で磁界環境レベルのおよそ 10 万倍の磁界強度の交流磁界をモデル動物に曝露し、その遺伝子レベルから神経系、シグナル伝達系、代謝系といった生体機能までの系統的な影響を特定できれば、今後人体に対し磁界曝露による遺伝子発現の誘導・抑制を制御することで低侵襲医療や非侵襲的代替療法などの医療分野へ応用することが期待される。

しかし、遺伝子が直接磁界の影響を受けたためか、あるいはその上流にある転写調節因子となる遺伝子が磁界の影響を受けた結果、間接的に mRNA 発現量に変化したのかは明らかではない。今後は遺伝子上流域が ELFMFs に応答するかどうかをつきとめる必要がある。

また、*tax-2*, *tax-4*, *ncs-1* 遺伝子が実際に ELFMFs 曝露下において線虫の行動異常に関与しているのかを確認するため、それら遺伝子の欠失変異体についても同様の条件下において行動解析を行い、その行動軌跡を比較する必要がある。

謝辞

本研究の一部は磁気健康科学研究振興財団(平成 14 年度)の助成により行われたものである。研究費の助成を賜った同財団に深謝いたします。

参考文献

- [1] 世界保健機関, ファクトシート, No.263, 2003.
- [2] 国立環境研究所年報, 電磁界の生体影響に関する研究, IV3.5 (10), 2002.
- [3] S. Rajaram, M. M. Sedensky and P. G. Morgan, The Sequence and Associated Null Phenotype of a *C. elegans* Neurocalcin-Like Gene, *Genesis*, 26, pp.234-239, 2000.
- [4] M. Gomez, E. D. Castro and E. Guarin, Ca^{2+} signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates associative learning and memory in *C. elegans*, *Neuron*, 30, pp.241-248, 2001.
- [5] J. S. Satterlee, W. S. Ryu and P. Sengupta, The CMK-1 CaMK I and the TAX-4 Cyclic Nucleotide-Gated Channel Regulate Thermosensory Neuron Gene Expression and Function in *C. elegans*, *Curr Biol*, 14 (1), pp.62-68, 2004.
- [6] J. L. Philips, W. Haggren, et al., Magnetic field induced changes in specific gene transcription, *Biochem. Biophys. Acta* 1132, pp.140-144, 1992.
- [7] T. Miyakawa, et al., Exposure of *Caenorhabditis elegans* to extremely low frequency high magnetic fields induces stress responses, *Bioelectromagnetics*, 22, pp.333-339, 2001.
- [8] M. R. Montminy, K. A. Sevarino, et al., Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene, *PNAS*, 83, pp.6682-6686, 1986.
- [9] M. R. Montminy, L. M. Bilezikjian, Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene, *Nature*, 328, pp.175-178, 1987.
- [10] R. Bourtschuladze, B. Frenguelli, et al., Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein, *Cell*, 79, pp.59-68, 1994.
- [11] J. Zhou, G. Yao, et al., CREB DNA binding activation by a 50-Hz magnetic field in HL60 cells is dependent on extra- and intracellular Ca^{2+} but not PKA, PKC, ERK, or p38 MAPK, *Biochem. Biophys.*, 296, pp.1013-1018, 2002.
- [12] K. Bessho, et al., Biological responses in *Caenorhabditis elegans* to high magnetic fields, *Experientia*, 51, pp.284-288, 1995.