

(様式第 5 号)

線虫体内に取り込ませたニッケルの X 線イメージングと、遺伝子変異による形態異常の位相コントラスト X 線 CT イメージング X-ray imaging of nickel taken into the nematode *Caenorhabditis elegans* and CT imaging of its genetic mutant

日高将文^{1,2} 相田茉優¹ 堀井菜摘¹ 原田昌彦^{1,2}

Masafumi Hidaka, Mayu Aida, Natsumi Horii, Tomoyuki Makino

1. 東北大学大学院農学研究科

2. 東北大学大学院農学研究科附属放射光生命農学センター (A-Sync)

1. Tohoku University Graduate School of Agricultural Science

2. Center for Agricultural and Life Sciences using Synchrotron Light

- ※ 1 先端創生利用 (長期タイプ) 課題は、実施課題名の末尾に期を表す (I)、(II)、(III) を追記してください。
- ※ 2 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後 2 年以内に研究成果公開 {論文 (査読付) の発表又は研究センターの研究成果公報で公表} が必要です (トライアル利用を除く)。
- ※ 3 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※ 4 共著者には実験参加者をご記載ください (各実験参加機関より 1 人以上)。

1. 概要 (注: 結論を含めて下さい)

ニッケル(Ni)は産業的に広く利用されている金属であるが、一方で生体内に取り込まれると発がんなどを誘導することも知られている。Ni の生体影響のメカニズムは不明な点が多いが、我々は Ni がエピゲノム状態を変化させている可能性に着目して研究を進めている。本測定では、その研究の一環として、線虫体内に取り込ませた Ni の X 線イメージングを行って、どのような組織に、まだどの程度 Ni が蓄積しているかについての知見を得ることを目指した。また、Ni が生体に影響を与えるメカニズムにヒストンバリエーション H2A.Z が関与することを示す結果が得られているため、H2A.Z 遺伝子変異による形態異常観察のための位相コントラスト X 線 CT イメージングを試みた。今回の測定では、線虫体内に取り込まれた Ni を可視化することはできなかったが、線虫形態を位相コントラスト X 線 CT イメージングできる条件についての知見を得ることができた。

2. 背景と目的

環境中の化学物質には、生体内に取り込まれると毒性や健康被害を引き起こすものが存在する。ニッケル(Ni)は環境中に広く分布する重金属の一つであり、生体にとっての必須元素でもある。その一方で、必要以上の摂取や長期的な曝露は活性酸素種を生成して金属アレルギーなどを発症するほか、DNA やヒストンに結合することで、クロマチン構造 (エピゲノム状態) 変化を介した遺伝子発現変化や発がんを誘起することも報告されている。また近年、Ni 曝露によって誘起された生体機能への影響が、Ni 非存在下でも次世代に継承されることが報告されている。しかし、Ni 曝露が生体機能に及ぼす影響の詳細な分子メカニズムや、それらが次世代へ継承される機序は明らかにされていない。そこで、我々は多細胞モデル生物であり、雌雄同体であることから遺伝学的解析が容易な線虫 *C. elegans* を用いて、この問題に組んでいる。その一つとして、これまでも実施例のある(1, 2)、放射光

での線虫の CT イメージングおよび元素イメージングを計画した。

Ni が引き起こすエピゲノム変異がどのようなものであるかについては不明な点が多いが、我々は親世代 (P0) の線虫への Ni 暴露の影響が、Ni 暴露のない次世代 (子供世代、F1) にまで継承されることを見出した。Ni 曝露影響が次世代へ継承されるメカニズムとして、以下の二つの可能性が考えられる。① P0 世代で Ni 曝露によって変化したエピゲノム状態が F1 世代に継承されている、② P0 世代で取り込まれた Ni が F1 世代でも細胞内に維持されている。また、ヒストンバリエント H2A.Z 遺伝子の欠損によって、Ni の影響が低下することが出芽酵母で報告されており(2)、このことは、Ni が引き起こすエピゲノム異常とヒストンバリエント H2A.Z の関連性を示している。また我々は線虫の H2A.Z 変異株を解析し、H2A.Z 変異が Ni の感受性に影響を与えることを見出している。

3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

様々な条件で培養した線虫をグルタルアルデヒド溶液で固定した後、アガロース包埋または乾燥して、以下のサンプルを作成した。

- ・ガラスキャピラリー内でアガロース包埋した線虫
- ・ポリイミドチューブ内でアガロース包埋した線虫(成虫、Nickelなし)
- ・ポリイミドチューブ内でアガロース包埋した線虫
(Nickel不含培地上で生育させた成虫を 0.1 M NiSO₄に12hrs浸漬)
- ・ポリイミドチューブ内でアガロース包埋した線虫
(1 mM NiSO₄で培養した大腸菌を餌とし、Nickel不含培地上で生育させた成虫)
- ・5 mM NiSO₄で培養した大腸菌を餌とした線虫(成虫、乾燥サンプル)
→両面テープを先端に巻いた爪楊枝に乾燥した線虫を接着させ測定。
- ・Nickel不含培地で生育させた線虫(成虫、乾燥サンプル)
→両面テープを先端に巻いた爪楊枝に乾燥した線虫を接着させ測定。

4. 実験結果と考察

・ガラスキャピラリー内でアガロース包埋した線虫サンプル
位相差 CT での解析では、アガロースと線虫個体の密度差が見られず、像の区別がつかなかった。

・ポリイミドチューブ内でアガロース包埋した線虫サンプル
NiSO₄ に浸漬した線虫、あるいは NiSO₄ 存在下で培養した大腸菌を餌にした線虫のサンプルでは、Nickel は検出できなかったが、塩の析出と考えられる吸収点が見られた。(図 1, NiSO₄ 由来の硫酸イオンが何らかの物質と塩を形成しているのではないかと考えられた。)

・線虫乾燥サンプル
Nickel 含有培地で生育させた大腸菌を餌とした線虫を固定・乾燥させたものは、洗浄に用いた buffer (D-PBS)に含まれる塩または NiSO₄ 由来の硫酸塩の析出が邪魔になってしまった。Nickel 不含培地で生育させた線虫の洗浄にはリン酸 buffer を用いたので、D-PBS を用いた場合に見られるような塩の析出は見られなかった。

・大腸菌乾燥サンプル、線虫乾燥サンプルの XAFS 測定
大腸菌乾燥サンプル (1 mM, 3 mM) も、線虫乾燥サンプル (5 mM NiSO₄ で培養した大腸菌を餌とした線虫) も、いずれもコントラストが出なかった (図 2)。ポリイミドチューブ内でアガロース包埋した線虫サンプル中にあった塩の析出も、コントラストが出なかった。

・両面テープを先端に巻いた爪楊枝に、乾燥した線虫を接着させた測定線虫個体が可視化できた (図 3)。しかし、Nickel の検出はできなかった。



図 1

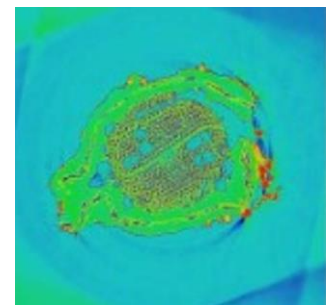


図 2

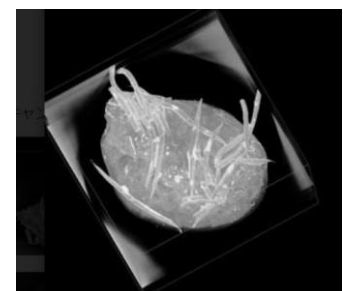


図 3

5. 今後の課題

今回の測定では、時間の制約もあり、線虫体内に取り込まれた Ni の検出や、線虫一個体の表現型の測定までには至らなかったが、今後の解析に向けての測定条件の検討を行うことができた。今回得られた情報に基づいた測定サンプルを調製や測定条件設定により、次回以降に目的としていた結果を得ることを目指す。

環境中の化学物質が健康に与える影響の解析と対策は、喫緊の課題となっている。さらに最近では、親世代への環境影響が、エピゲノム変異を介して子供の世代の健康にも影響する可能性も指摘されており、その解明も急がれている。線虫は基本的な組織をすべて有する多細胞生物のモデル系であり、世代時間が短いことから、上記課題の追及には最適な実験系である。環境中の化学物質の中でもニッケル(Ni)は、産業的に広く利用され、また生体にとっての必須元素でもある一方で、発がん物質としても登録されているなど、その影響や作用メカニズムの解明が期待されている。特に、DNA やヒストンに結合することで、エピゲノム変化を介した発がん誘起など示唆されていることから、Ni 曝露が生体機能に及ぼす影響の詳細な分子メカニズムや、それらが次世代へ継承される機序についての新たな知見が、線虫の CT イメージングおよび元素イメージングによって得られることは、学術のみならず、社会的な波及効果も大きいと期待される。

6. 参考文献

- (1) Cagno et al., Combined Computed Nanotomography and Nanoscopic X-ray Fluorescence Imaging of Cobalt Nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*, *Anal. Chem.* 89, 11435–11442 (2017)
- (2) Olendrowitz et al., Phase-contrast x-ray imaging and tomography of the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Phys. Med. Biol.* 57 5309 (2012)
- (3) Osada et al., Toxicity of nickel compounds mediated by HTZ1, histone variant H2A.Z, in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biol Pharm Bull* 31, 2077-2011 (2008)

7. 論文発表・特許 (注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

8. キーワード (注：試料及び実験方法を特定する用語を2～3)

線虫

位相コントラストX線イメージング

9. 研究成果公開について (注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください。提出期限は利用年度終了後2年以内です。例えば2018年度実施課題であれば、2020年度末(2021年3月31日)となります。)

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

- | | |
|----------------|--------------------------|
| ① 論文(査読付)発表の報告 | (報告時期： 年 月) |
| ② 研究成果公報の原稿提出 | (提出時期：2024年 3月) |