

# 飯舘村での低レベルガンマ線照射にともなうイネの遺伝子発現の観察

林剛平<sup>1</sup>, 今中哲二<sup>1</sup>, 柴藤淳子<sup>2</sup>, 木村真三<sup>3</sup>, 久保明弘<sup>4</sup>, 小澤祥司<sup>5</sup>, 市川克樹<sup>6</sup>, 福谷哲<sup>1</sup>, 菊池尚志<sup>7</sup>, Kyoungwon Cho<sup>8</sup>, Ganesh Kumar Agrawal<sup>9</sup>, Randeep Rakwal<sup>2,9,10\*</sup>

<sup>1</sup>京都大学, <sup>2</sup>昭和医大, <sup>3</sup>獨協医科大学, <sup>4</sup>環境研究所, <sup>5</sup>環境ジャーナリスト, <sup>6</sup>オフィス・ブレン, <sup>7</sup>農業環境技術研究所, <sup>8</sup>韓国基礎科学研究所, <sup>9</sup>ネパール生物技術化学研究所, <sup>10</sup>筑波大学. **Email:** [plantproteomics@gmail.com](mailto:plantproteomics@gmail.com)

## 要旨

放射線被曝に対しイネは自己防御機能を働かせることによって反応していると思われる。分子生物学における最近の高度処理技術により、遺伝子サイズでの分子変化、つまり遺伝子、タンパク質、代謝物のレベルでの変異を観察し分析する我々の能力は格段に高まった。とくに、DNA マイクロアレイチップを用いた全遺伝子解析法により、遺伝子発現のプロフィールを見ることができる。本研究では、東北震災後におきた福島第1原発事故によって大きな汚染を蒙った福島県飯舘村において、モデル植物であるイネ(*Oryza sativa* L. 通称ニッポンバレ)に対する放射線被曝の影響を観察した。コントロール地域である、つくばの温室で育てた健全な苗を、いいたてファーム (ITF) に運び、低レベルガンマ線場に曝した。苗は地面に直接には接していないので、放射線被曝はガンマ線によるものだけである。ITF に到着してから 6、12、24、48、72 時間後に、6~10 株の苗から、(根元から) 第3葉をサンプリングした。サンプリングした葉は、すばやくアルミホイルに包みドライアイスで挟み込んでフリーザーに貯蔵した。コントロールサンプルとして、つくばからの出発時、および ITF 到着時にもサンプリングを実施し、また、72 時間サンプルと同じ時刻につくばの温室においてもサンプリングした。イネ葉の分子レベル分析のために、つくばと東京に運んだサンプルは-80 度 C で貯蔵した。遺伝子発現分析の前処理として、葉サンプルから全 RNA を抽出し、その量と質が、以降の操作に供するのに十分であることを確認した。最初の分析として、半定量的 RT-PCR 法を用いて、特定の遺伝子、つまり DNA 修復関連、酸化ストレス関連、光合成関連、ストレス・防御反応関連の遺伝子、ならびに(刺激に反応しない) 内部コントロール遺伝子の遺伝子発現プロフィールを観察した。RT-PCR の分析結果は、低線量ガンマ線被曝がさまざまな遺伝子の発現に影響していることを示していた。つまり、初期(6時間後)のサンプルでは DNA 損傷修復関連遺伝子に、後期(72時間後)ではストレス・防御反応関連遺伝子に変化が認められた。これらの結果は、我々が以前に行った、イネ葉切断片に対する放射線照射実験の結果と同様であり、次のステップとして、DNA マイクロアレイ分析を行った。すでに確立されている dye-swap 法を用いて、イネ全遺伝子を対象とする 4×44K チップにより6時間後と72時間後の遺伝子発現の様子を観察した。低レベルガンマ線被曝影響の観察結果は、(コントロールに比べて2倍の変化という判定条件で)6時間照射サンプルでは、4481個の遺伝子で増加し3740個で抑制、72時間サンプルでは2291個で増加し1474個で抑制だった。イネ葉の放射線被曝に対する遺伝子応答に関連するこれらの結果は、イネの自己制御機構に関する新たな知見を提供するものである。

# Observation of Rice Gene Expression by Low-level Gamma Ray Exposure in Iitate Village

G. Hayashi<sup>1</sup>, T. Imanaka<sup>1</sup>, J. Shibato<sup>2</sup>, S. Kimura<sup>3</sup>, A. Kubo<sup>4</sup>, S. Ozawa<sup>5</sup>, K. Ichikawa<sup>6</sup>, S. Fukutani<sup>1</sup>, S. Kikuchi<sup>7</sup>, Kyoungwon Cho<sup>8</sup>, Ganesh Kumar Agrawal<sup>9</sup>, Randeep Rakwal<sup>2,9,10\*</sup>

<sup>1</sup>Kyoto University, <sup>2</sup> School of Medicine, Showa University, <sup>3</sup>Dokkyo Medical University, <sup>4</sup>National Institute for Environmental Studies, <sup>5</sup> Environment Journalist, Tokyo, <sup>6</sup>Office Brain, Tokyo, <sup>7</sup>National Institute of Agrobiological Sciences, <sup>8</sup>Korea Basic Science Institute, <sup>9</sup>Research Laboratory for Biotechnology and Biochemistry, Nepal, <sup>10</sup> University of Tsukuba, **Email:** [plantproteomics@gmail.com](mailto:plantproteomics@gmail.com)

## Abstract

Rice plants respond to radiation exposure by activating self-defense mechanisms. High-throughput omics tools have enhanced our ability to observe and analyze these molecular changes genome-wide – namely at the level of gene, protein and metabolite. In particular, gene expression profiles can be cataloged using whole genome DNA microarray chip. In this study, we examined the effects of radiation exposure in a cereal crop model plant, namely rice (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare), in the village of Iitate in Fukushima prefecture – a highly contaminated site due to the Fukushima Daiichi Accident following the Great Tohoku Earthquake. Healthy rice seedlings were transported from a controlled greenhouse in Tsukuba to Iitate Farm (hereafter ITF) and placed in a low-level gamma field. There was no direct contact between the rice seedlings and the contaminated soil, thus helping us observe primarily the effects of gamma radiation alone. Exposure times were set at 6, 12, 24, 48, and 72 h after arrival at ITF, and the rice leaves at the 3<sup>rd</sup> position (from the base) from 6 to 10 seedlings were sampled. Sampling was performed by immediately placing the cut leaves in an aluminum foil under dry ice followed by storing the samples in a deep freezer. As a control, rice leaves were sampled at the start in Tsukuba and immediately at arrival upon ITF; a sample set was also taken at 72 h from the healthy rice seedlings in the greenhouse at Tsukuba. For molecular-level analysis rice leaves were transported to Tsukuba and Tokyo and stored at -80°C. Prior to analysis of gene expression, the first part of the analyses, total RNA was extracted from the leaves, and whose quality and quantity were determined to be excellent for downstream analysis. As a first step, selected gene expression profiles of internal control, DNA repair/damage, oxidative stress, photosynthesis, and defense/stress functions were examined by semi-quantitative RT-PCR. Results revealed that low-level gamma radiation affects the expression of numerous genes, in particular showing the early (6 h) induction in DNA repair/damage-related genes and the late (72 h) induction of a previously described marker gene for defense/stress responses. Based on these results, which confirmed our data from preliminary experiments using detached rice leaves for exposure to radiation, we proceeded to the next step of DNA microarray analysis. Using the established dye-swap approach, we analyzed the differentially expressed genes at 6 and 72 h time points using a whole rice genome 4 x 44 K custom chip. Obtained results showed that exposure to low-level gamma radiation differentially regulated 4481 (induced) and 3740 (suppressed) and 2291 (induced) and 1474 (suppressed) rice leaf genes at 6 and 72 h post-exposure, respectively, by at least two-fold changes. Inventory of large number of gamma radiation-responsive genes in leaves provide new information and increased knowledge on novel regulatory processes in rice.