

宇宙船内における重粒子線による線量計測とその生物効果実験 (RADIATION) D. radiodurans の DNA 修復能に対する微小重力の影響

共同研究者： 渡辺 宏*¹、小林泰彦*¹、菊地正博*¹、原田和樹*²、長岡俊治*³

*1 日本原子力研究所 高崎研究所、*2 PL 学園女子短期大学、*3 宇宙開発事業団 宇宙実験グループ

Effect of Microgravity on DNA repair system was examined on the IML-2 mission (STS-65, July 8-23, 1994) using extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* so that influence of cosmic radiation can be neglected. Cells were lyophilized and exposed to ⁶⁰Co γ -rays with doses up to 12 kGy before the space flight. Almost at the end of the mission, the cells were mixed on board with liquid nutrient medium to activate the repair process, then incubated at room temperature of the spacelab for 11 hrs to allow the repair of the radiation-induced DNA damages. Afterwards the cells were stored at 4 °C until landing. The survival of the cells activated in space increased significantly compared with the ground controls, suggesting that DNA repair system of this bacterium was enhanced under microgravity.

実験の目的、意義

人間が長期間宇宙で活動する際には、宇宙環境の様々な要因の中でも特に宇宙放射線被曝と微小重力のもたらすリスクを評価しておく必要がある。軌道上でさらされる宇宙線の中には地上の自然放射線には存在しないような非常に高エネルギーの銀河宇宙線成分が含まれており、その人体への影響は加速器を用いた重粒子線照射実験によってある程度推定することが可能だが、その実験結果を実際の宇宙活動におけるリスク評価に適用する際には、生物が本来有している DNA 損傷修復能力が微小重力環境によってどう影響されるかを知っておかなければならない。この観点から、これまでも人工衛星や有人宇宙船を用いた生物実験が行われたきたが、これまでに用いられた実験材料はいずれも宇宙線に少なからず感受性である一方で、個々の実験試料の宇宙線被曝量を必ずしも正確に把握することができなかつたために宇宙線と微小重力の影響を区別して解析することが困難であり、依然として明確な結論は得られていない。そこで、極めて高い放射線抵抗性を有する細菌 *Deinococcus radiodurans* を用いて、放射線損傷 DNA の修復に及ぼす微小重力の影響を調べることを目的とした実験を行なった。この放射線抵抗性細菌を凍結乾燥して生理的に休眠状態にした上で大量の γ 線 (2 ~ 12 kGy) を地上で予め照射してからスペースシャトルに搭載し、微小重力の下で培養液を加えることによって初めて照射による DNA 損傷の修復反応を開始させ、試料回収後に生存率を測定する。この方法によれば、宇宙線の影響は予め地上で照射した γ 線よりもはるかに低い線量に過ぎないために無視でき、またこの細菌の、凍結乾燥状態では照射損傷の修復機能が停止したままで長期間安定に保存できるという性質を活かして、修復反応の結果を宇宙と地上とで厳密に比較することが可能となる。

実験の方法と試料

実験方法

微小重力の影響を調べるには、それ以外の宇宙環境要因(一時的な加重力、振動、光、ガス、温度、宇宙放射線など)に対して耐性でなければならない。*D. radiodurans*の放射線耐性野生株は、乾燥状態でも懸濁状態でもその生存に加重力、振動、光などは影響を与えないし、無酸素の懸濁状態でも数10時間は影響がない。至適生育温度は30℃であるが、4℃以下でも生存できる。放射線に対しては極めて耐性で、6 kGyまでの γ 線照射で生存率は変化しないし、銀河宇宙線のような高LET放射線に対して γ 線と同程度の耐性を持っている¹⁾。本細菌は、放射線で生じるDNA2本鎖切断を効率よく修復でき、この修復には、照射後に誘導合成される蛋白質が重要な役割を担っていることが分かっている²⁾。また、この細菌は、DNA損傷の修復が完了するまで細胞分裂を開始しないという特徴があり、かつ修復系蛋白質の誘導と修復反応に長時間かかるため、その間に起こる反応に対する微小重力の影響を観察しやすい材料である。

以上の特徴を利用して、本実験では次のような実験方法を採用した。あらかじめ γ 線で一定線量照射した乾燥細胞を宇宙の微小重力環境下で培養液と混合し、これによって修復反応を開始させて一定時間DNAの修復を行わせた後、低温に移して修復反応を停止させ、その状態で地上に回収して生存率を調べると同時に、地上でも宇宙と同一の操作を行い、両者の生存率を比較することによって、修復反応に与える微小重力の影響を解析するというものである。

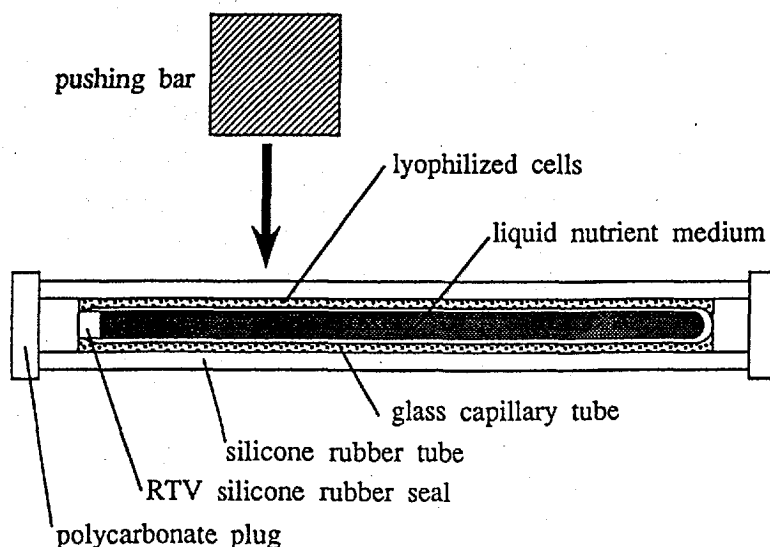


図1 シリコンチューブ内にパッケージングした放射線抵抗性細菌 *D. radiodurans* の凍結乾燥細胞と液体培地

サンプルの安全性に関する検討

スペースシャトル内の試料に関しては、気密性、耐振性、難燃性などが要求されるため、シリコンチューブをサンプル容器として使用した(図 1)。開口部はポリカーボネート栓で封じ、更にシリコンゴムで密封した。フライト試料はチューブを更にポリプロピレンフィルム製の袋に入れて密封し、ポリカーボネート製容器(RRMD BIO-SPECIMEN BOX、図 2)内に一列に並べてテフロンテープで固定した上で RRMD 上に固定するための金属製容器(RRMD SAMPLE HOLDER、図 3)に固定した。

ペイロードクルーの操作性の検討

できるだけ簡単な操作で確実に乾燥細胞と培養液を混和できる方法として、細胞をゼラチンを含むリン酸緩衝液に懸濁し、長さ 40 mm、内径 3 mm のシリコンチューブ内で凍結乾燥し、そこへ滅菌済みの培養液を封入した細いガラス管を挿入し、シリコンチューブの両端をポリカーボネート製プラグで密栓した(図 1)。これらのシリコンチューブを 1 本ずつポリプロピレンフィルムで密封したうえで浅い箱型のポリカーボネート製容器(RRMD BIO-SPECIMEN BOX、図 2)に一列に並べ、スペースシャトル内でクルーがシリコンチューブを外から棒(RRMD SAMPLE PUSH BAR、図 2)で抑えて液体培地が封入されたガラス管を押し割って乾燥細胞と液体培地を混和する方法を採用した。割りやすいようにポリカーボネート製容器内に溝をつけること、また通常の操作では破損せず、押し割る時に容易に割れるようなガラス管の肉厚を選択することなどの工夫を行った。クルーの実験教育訓練において試し割りを行ったが、うまく割れる人と割れない人がいたため、実際のフライト試料では、ガラス管に小さな傷をあらかじめ入れておいて、確実に割れるようにした。

RRMD へのセットアップ方法

RRMD SAMPLE HOLDER の容積は $12 \times 12 \times 1 \text{ cm}^3$ であり、その半分を宇宙線検出用生物試料とし、残りの半分を本実験に使用することとしたため、この容積内に装填できる試料は 17 本となった。シリコンチューブを一列に配置したのち、テフロンテープで固定した。またホルダーの上下に貼られたトラックディテクター CR-39 の上板は、ガラスチューブを押し割る時のために、一部を切り欠いたものを用いた。RRMD SAMPLE HOLDER は、スペースシャトル打ち上げ時は別のところに収納されており、軌道上で RRMD による計測を開始する際に RRMD のディテクターユニットの外側に取り付けられた(図 4)。

乾燥細胞の調製

実験に使用する乾燥細胞は、実験室で調製後、国内輸送、NASA への輸送、保管も含めて室温で数ヶ月は安定でなければならない。ゼラチンの存在下で凍結乾燥することによって安定な試料が調製できるが、その濃度を検討した結果、液体培地を封入したガラス管を挿入するときの操作性と、低い吸湿性ことから 2.6 % が最適な濃度であることが分かった。この条件で調製された乾燥細胞は安定であり、 γ 線照射後長期間保存しても生存曲線に変化が見られない。

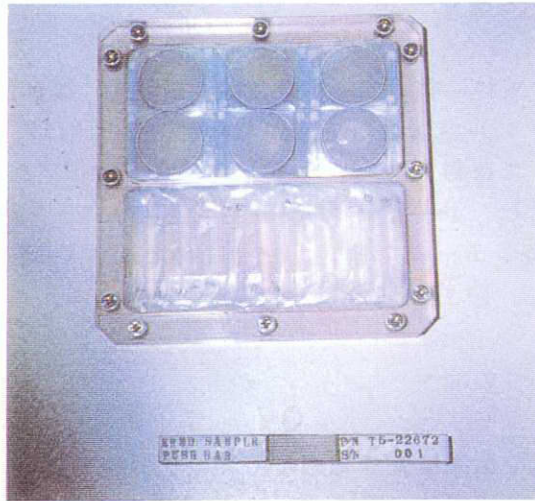


図 2 シリコンチューブ 17 本を一行に下半分に並べた RRMD BIO-SPECIMEN BOX 及びガラス管を押し割るための RRMD SAMPLE PUSH BAR



図 3 RRMD SAMPLE HOLDER に収納された BIO-SPECIMEN BOX とフライト試料

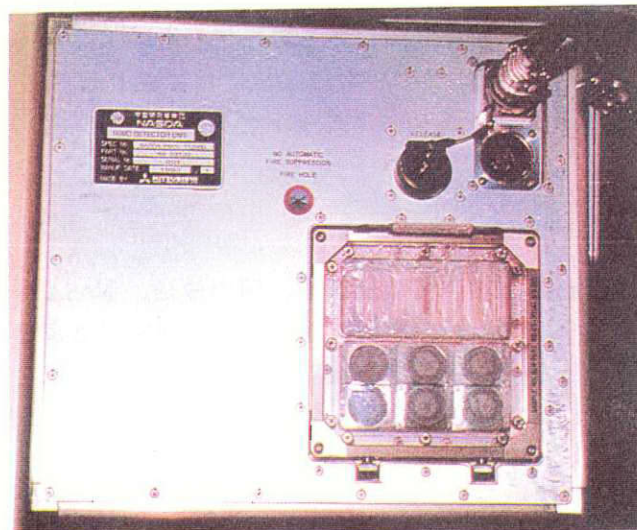


図 4 軌道上で RRMD のディテクターユニットに取り付けられた RRMD SAMPLE HOLDER

宇宙で行う培養実験の検討

スペースシャトル内の室温は 25 °C 前後と考えられる。そこで、 γ 線照射後の DNA 2 本鎖切断の修復に必要な時間の照射線量の依存性と、また温度の影響を検討した。その結果、線量が大きくなるほど修復時間は長くなり、10 kGy 照射、30 °C では、6 時間であった。また温度が低くなるほど長くなり、30 °C に比べて 25 °C では約 30 % から 90 % 増大した。従って、10 kGy、25 °C では少なくとも 8 時間以上で 11 時間程度まで培養する必要があると推定される。実際の宇宙実験では、クルーの実験スケジュールなども考慮して、11 時間程度培養することとした。

飛行実験の結果

実験方法及び経過

実験用試料は、サンプルホルダーに収容するものと同一なものを 10 セット同時に調製し、その 1 セットをスペースシャトルに搭載した。1 セットの中には、17 本のシリコンチューブ(図 1、2)が装着されており、非照射、2、4、6、7、8、10、12 kGy 照射試料各 2 本に加えて、4 kGy 照射試料 1 本を追加した。

打上げ後、スペースシャトルから送られてくる 2 系統の室内温度の情報をもとに、地上対照実験を Hangar L の実験室で行った。地上の 1 セットは、2 系統のスペースシャトル実験室の平均温度を用いて、1 日遅れで追従しながら保温された。また、細胞と培養液の混合操作の開始、培養の終了などのシャトルからの情報を確認、記録すると共に、それと同様の操作を地上対照試料についても行った。

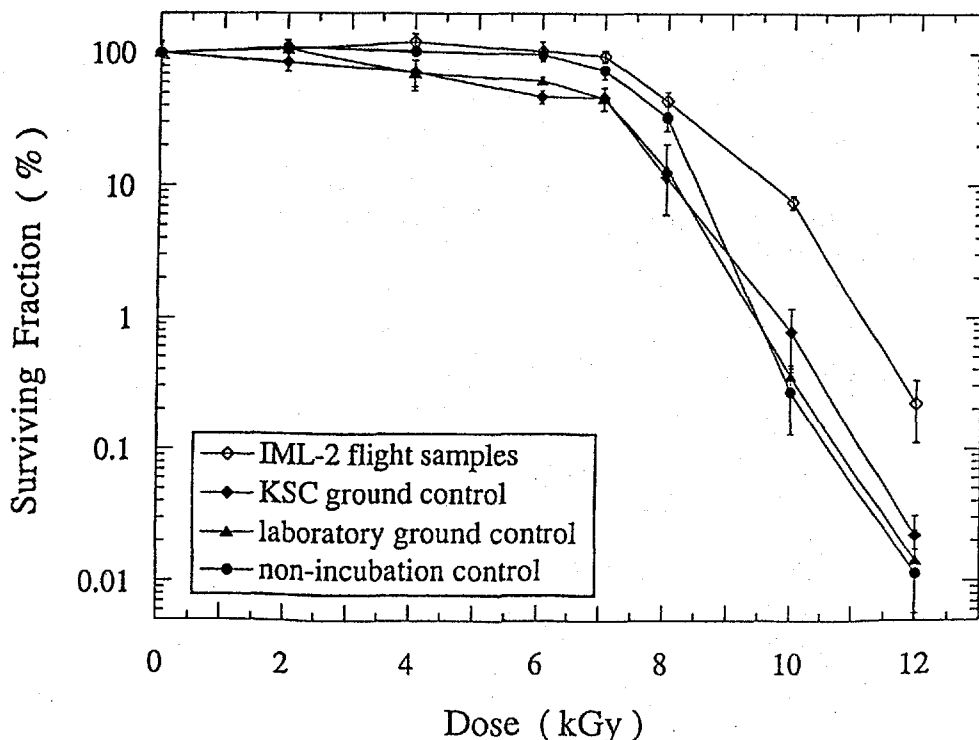


図 5 予め地上で γ 線照射した線量に対するフライト試料及び地上対照試料の生存曲線

シャトル内の温度は 22 °C ~ 26 °C まで変化したが、試料の搭載されている環境は大体 24 °C であった。実際の宇宙試料の温度履歴は、打上げ後、乾燥状態で約 24 °C に 12 日間放置された後、フライト最終日の 1 日前に混合操作が行われ、24 °C で 11 時間インキュベートされた。着陸が 1 日延期されたため、インキュベート終了後 KSC 帰還までの 2 日と 5 時間及び帰還後試料の引き渡しまでの 3 時間は 10 °C 以下の冷蔵庫に保管された。引き渡された試料は直ちに -85 °C に冷凍され、日本に輸送された。地上対照試料もフライト試料と同様の経過で冷蔵・冷凍処理を行なった。

解析と考察

宇宙から回収した試料 (flight sample) と、Hangar L で行った地上対照試料 (KSC ground control) 及び培養液混合後の 11 時間を 24 °C 恒温で処理した試料 (laboratory ground control) の 3 点について、その生菌数の計測を行い、各線量での生存率を求めた。なおフライト試料のデータは、2 本の異なるシリコンチューブから得られた結果の平均値を示している。結果を図 5 に示す。図には培養液混合後直ちに生菌数を計測した場合の結果 (non-incubated, non-refrigerated, non-frozen control) も示されている。図から明らかなように、7 kGy までの線量では、地上対照試料で幾分生存率が低下する傾向が見られるもののほとんどフライト試料と生存率に違いはない。しかし、8 kGy 以上、特に 10 kGy では、フライト試料での生存率は地上対照試料よりも 1 桁以上大きく、明らかに生存率が上昇した。

なお、非照射試料では 11 時間培養とその後の冷蔵、冷凍処理によって幾分生菌数の低下が見られたが、フライト試料と地上対照試料の間には差が見られなかった (図 6)。このことは非照射フライト試料において、微小重力が細胞数の増加や減少になんら影響を与えなかったことを示すものである。

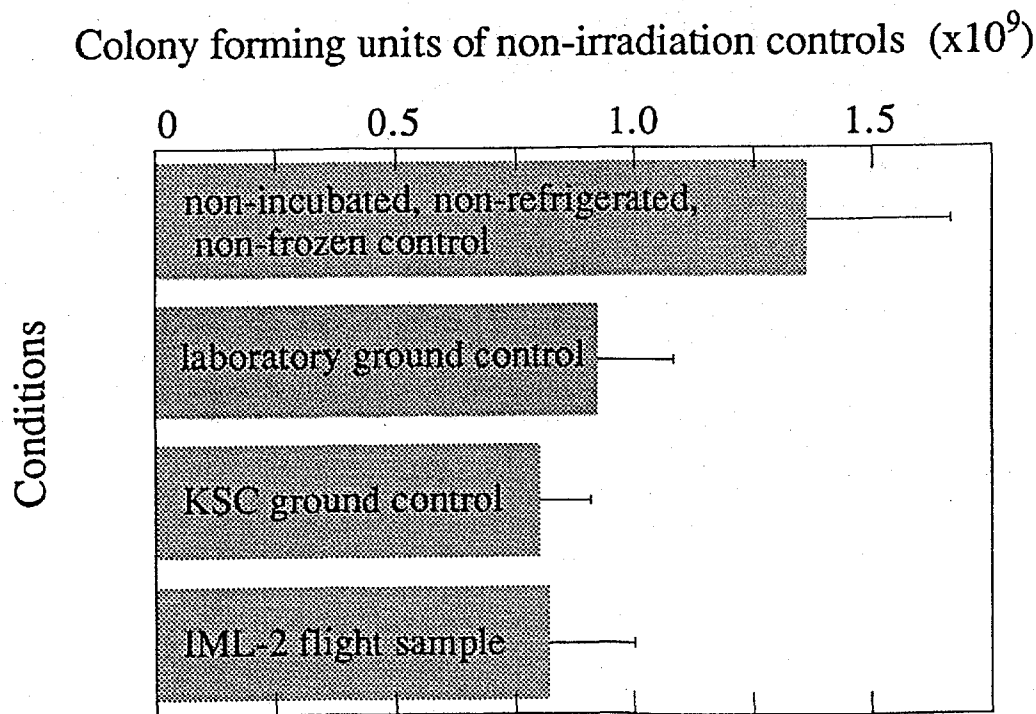


図 6 実験に用いたシリコンチューブ 1 本当たりの *D. radiodurans* の非照射試料の生菌数

結論

結論として、*D. radiodurans* における放射線損傷 DNA の修復、特に 2 本鎖切断の修復は微小重力の宇宙環境では地上よりも効率よく起こると考えられる。

これまで、放射線損傷の修復と微小重力との相互作用については幾つかの研究が行われてきた。フライト前に 1600 Gy 照射した酵母菌 (*Saccharomyces ellipsoides*) などの生存³⁾や、フライト中に Sr-85 の 514 keV の γ 線で 17 Gy 照射した大腸菌 (*E. coli*) やサルモネラ菌 (*S. typhimurium*) などを使ってファージ誘導への影響が調べられたが⁴⁾、いずれも相互作用は観察されていない。また、IML-1 での酵母菌の実験では微小重力が抑制的に働くという報告もある⁵⁾。しかし、高等な植物や昆虫などでは、宇宙環境が放射線と相乗的に作用するという報告があり、宇宙環境条件下では修復系がうまく働かないのであろうと考えられている。本実験で得られた結論は、これまで得られている結果と対立するものであるが、DNA 2 本鎖切断の修復に関しての情報はこれまでも報告されていないので、全く新しい成果であると考えられる。従来の実験系は、銀河宇宙線のような高 LET 放射線に対して感受性の高い生物系であって、純粹に微小重力の影響を反映しにくいことが考えられる。

参考文献

- 1) Kobayashi, Y., Shimizu, T., Tanaka, A., Kikuchi, M., Taucher-Scholz, G. and Watanabe, H. Survival of dry cells of *Deinococcus radiodurans* after heavy ion irradiation. *TIARA Annual Report*. **3**, 35-37 (1993).
- 2) Kitayama, S. and Matsuyama, A. Possibility of the repair of double strand scissions in *Micrococcus radiodurans* DNA caused by gamma-rays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **33**, 418-422 (1968).
- 3) Grigoriev, Yu. G., Benevolensky, V.P., Druzhinin, Yu. P., Shidarov, Yu. I., Korogodin, V. I., Nevzgodina, L. V., Miller, A. T. and Trasaphin, L. S. Influence of Cosmos 368 space flight conditions on radiation effects in yeasts, hydrogen bacteria and seeds of lettuce and pea. *Life Sci. Space Res.* **10**, 113-118 (1972).
- 4) Saunder, J. F. *The Experiments of Biosatellite II*, NASA SP-204 (1971).
- 5) Pross, H.-D., Kost, M. and Kiefer, J. Repair of radiation induced genetic damage under microgravity. *Adv. Space Res.* **14**, 125-130 (1994).

外部発表

- 1) 小林泰彦, 渡辺 宏, 原田和樹, 長岡俊治. *D. radiodurans* の DNA 損傷修復能への微小重力環境の影響. 第 11 回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1994). 5-7.
- 2) 渡辺 宏. *Deinococcus radiodurans* の DNA 修復に対する微小重力の影響. 第 2 回宇宙放射線影響と防護に関するワークショップ, つくば (1994).
- 3) 小林泰彦, 菊地正博, 渡辺 宏, 原田和樹, 長岡俊治. 微小重力は放射線照射した細胞の回復を促進する. 1995 年度日本農芸化学会大会, 札幌 (1995).
- 4) Kobayashi, Y., Watanabe, H., Harada, K. and Nagaoka, S. Enhanced DNA repair under microgravity. *10th International Congress of Radiation Research*, Würzburg (1995).