

# 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) 大腸菌細胞とプラスミド DNA について

共同研究者： 長岡俊治\*<sup>1</sup>、原田和樹\*<sup>2</sup>、帯屋有里乃\*<sup>2</sup>、中野立央\*<sup>2</sup>、  
小林泰彦\*<sup>3</sup>、渡辺 宏\*<sup>3</sup>、大西武雄\*<sup>4</sup>

\*1 宇宙開発事業団 宇宙実験グループ、\*2 PL 学園女子短期大学 植物研究所、  
\*3 日本原子力研究所 高崎研究所、\*4 奈良県立医科大学

We participated in a space experiment conducted during the 2nd International Microgravity Laboratory Mission (IML-2) project. This study was designed to investigate the effect of high LET (linear energy transfer) cosmic radiations on living organisms by loading the "Realtime Radiation Monitoring Device (RRMD)" and "Radiation Dosimeter" with biological samples, and performing post-flight analysis. As one of preparing procedure of biological samples, we performed the preliminary experiment on earth using *Escherichia coli* irradiated with ultraviolet (UV) light. After preparing the biological samples, which were dried *E. coli* DNA repair-deficient mutants and the shuttle vector plasmid pZ189 DNA, we placed them in the Dosimeters and in the RRMD, which was a Biospecimen Box sandwiched between "Harzlas" plastic radiation detectors. These were then loaded into the Space Shuttle "Columbia" while the identical box and Dosimeters were let at the NASA John F. Kennedy Space Center (KSC) as a control on earth. "Columbia (flight No. STS-65)" was launched from KSC in Florida, USA on July 9, 1994, and landing site was the same place as launch. Mission duration was 14 days. After the return of "Columbia" to earth, we studied the following two subjects; (1) the lethality and mutagenicity of high LET cosmic radiation on *E. coli* mutants, and (2) the relation between high LET cosmic radiations and the mutation of pZ189 DNA. For *E. coli* KMBL3835 (wild type), KY383 (*lexA*<sup>-</sup>), KY385 (*recA*<sup>-</sup>) and KY386 (*uvrA*<sup>-</sup>), there was little difference between the cell viabilities of the space samples and those of the ground samples. Likewise, there was little difference between space and ground in the ratios of mutation frequency of the *E. coli* mutants. Furthermore, the survival and mutation frequency of *supF* gene of pZ189 DNA space samples did not differ from those of the ground samples.

## 実験の目的、意義

大腸菌 (*Escherichia coli*) の野生型細胞と損傷を起こした遺伝子 DNA を修復できない細胞 (DNA 修復能欠損突然変異株…ミュータント) やプラスミド DNA を用いて、高エネルギー宇宙放射線の生物影響を、細胞致死と突然変異誘発率で調べ、更に、突然変異が生じた際の DNA 上の分子レベルの変化を、塩基配列で調べる。

## 実験の方法と試料

### 実験試料

宇宙放射線の生物影響を調べるには、放射線に弱い複数種の細胞を、宇宙放射線環境下に曝して差を見る事が一つの方法である。放射線が生物に及ぼす影響のターゲットが主に生物細胞内の核酸である事が既に知られている事から、比較する生物同士が同じ親細胞から派生した突然変異細胞群であり、その違いが、核酸の中でも DNA に起こった損傷の修復のさまざまなステップを欠いている細胞群は良い実験材料となる。そういう意味で、大腸菌は生物の中で最も遺伝情報が調べられており、また、損傷 DNA を修復する遺伝情報が欠損している突然変異細胞の種類が豊富であるため、今回の使用となった。なお、用いた細胞は表 1 に示した通り、大腸菌 11 種類であった。また、大腸菌との比較として、放射線高抵抗性細菌ダイノコッカス・ラディオデュランス (*Deinococcus radiodurans*) 細胞を 2 種類、更には、宇宙放射線で起こる突然変異が、DNA 上の特異的な領域で起こるかどうか(特異的なスペクトラムを持つかどうかという事で、その領域をホットスポットと呼ぶ)を調べるために、シャトルベクタープラスミド pZ189 DNA を用いた。

RRMD	Radiation Dosimeters
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
H/r30R ( <i>argF</i> <sup>-</sup> amber)	H/r30R ( <i>argF</i> <sup>-</sup> amber)
Hs30R ( <i>argF</i> <sup>-</sup> amber, <i>uvrA</i> <sup>-</sup> )	Hs30R ( <i>argF</i> <sup>-</sup> amber, <i>uvrA</i> <sup>-</sup> )
NG30 ( <i>argF</i> <sup>-</sup> amber, <i>recA</i> <sup>-</sup> )	NG30 ( <i>argF</i> <sup>-</sup> amber, <i>recA</i> <sup>-</sup> )
KMBL3835 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> )	KMBL3835 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> )
KY383 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> , <i>lexA3</i> <sup>-</sup> )	KY383 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> , <i>lexA3</i> <sup>-</sup> )
KY385 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> , <i>recA56</i> <sup>-</sup> )	KY385 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> , <i>recA56</i> <sup>-</sup> )
KY386 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> , <i>uvrA6</i> <sup>-</sup> )	KY386 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> , <i>uvrA6</i> <sup>-</sup> )
<i>pol</i> <sup>12</sup> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> and <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )	<i>pol</i> <sup>12</sup> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> and <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )
<i>polA107</i> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> , 5'→3' <i>exo</i> <sup>+</sup> and 3'→5' <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )	<i>polA107</i> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> , 5'→3' <i>exo</i> <sup>+</sup> and 3'→5' <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )
<i>polA1</i> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> , 5'→3' <i>exo</i> <sup>+</sup> and 3'→5' <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )	<i>polA1</i> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> , 5'→3' <i>exo</i> <sup>+</sup> and 3'→5' <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )
<i>resA1</i> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> , 5'→3' <i>exo</i> <sup>+</sup> and 3'→5' <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )	<i>resA1</i> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> , 5'→3' <i>exo</i> <sup>+</sup> and 3'→5' <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )
Shuttle Vector Plasmid DNA	Shuttle Vector Plasmid DNA
pZ189	pZ189
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>
MR <sub>1</sub> (wild type)	MR <sub>1</sub> (wild type)
<i>rec30</i> ( <i>recA</i> <sup>-</sup> )	<i>rec30</i> ( <i>recA</i> <sup>-</sup> )
freeze-dried MR <sub>1</sub> cells beforehand irradiated with radiation + liquid medium in silicone tubes	

表 1 スペースシャトル「コロンビア号」のスペースラブ内に搭載された放射線モニター装置(RRMD)とドシメーターに装填した生物サンプルのリスト

### 実験方法

これらの生物材料を、乾燥状態にしてスペースシャトルに搭載したが、その方法は、既に、第 1 次材料実験(FMPT)で実施した方法を基本とした<sup>1, 2)</sup>。すなわち、対数増殖期後期で培養を停止した細胞培養液に、等容量の 20%ゼラチン(Difco Bacto-gelatin)液を加えて良く混和した後、滅菌した孔径 0.45 μm のメンブレンフィルター(Advantec)上に 0.4 ml ずつ載せた。その後、充分量のシリカゲルが入ったデシケーター内で、真空ポンプを用いて減圧しながら、細胞の乾燥を行った。乾燥終了後、メンブレンフィルター上でゼラチンに包埋された乾燥細胞は、コンタミ(まわりからの雑菌混入)防止のため、ポリプロピレン・パツ

グに封入して、乾燥細胞サンプル(試料)を完成した。プラスミド DNA の乾燥サンプル調製法は、ペーパーディスクの上にバッファーで溶解した DNA を載せて、シリカゲル存在下で自然乾燥させた。

これら、生物乾燥サンプルを、RRMD のバイオスペシメン・ボックス(Biospecimen Box)(図 1)とドシメーター(Dosimeter)に装填した。

シャトル帰還後は、乾燥サンプルの中でも、ここで報告する大腸菌細胞に関しては、0.8 ml の滅菌生理食塩水(最終濃度 0.2 %  $MgSO_4$  を含む)で復水し、その細胞液を適当に希釈した後、プイヨンプレートに塗抹して 24 時間後に出現したコロニーを計数して生存率を測定した。また、突然変異誘発率の測定は、細胞液をそのまま 2 枚のデービスプレートに塗抹して 48 時間後に栄養要求性突然変異から復帰して出現したコロニー数を平均して、生菌数との割合で計算した<sup>3)</sup>。

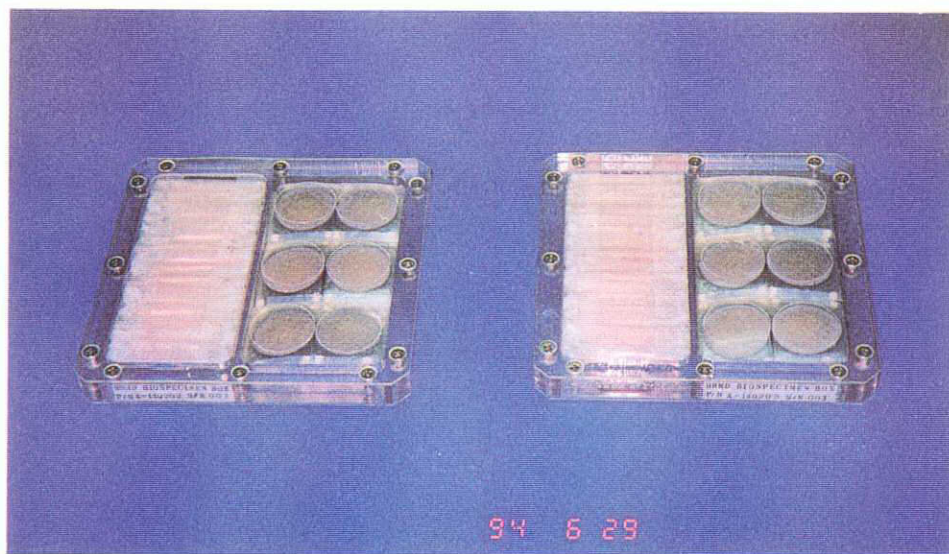


図 1 生物サンプルを装填したバイオスペシメン・ボックス  
(左：地上サンプル、右：宇宙サンプル)

プラスミド DNA のホットスポット検索には次の方法を用いた<sup>4)</sup>。pZ189 DNA は、全長約 5.5 kbp で、pBR327 の複製起点や SV40 の領域を持っており、更に、約 150 bp の大腸菌サブレッサー tRNA 遺伝子(*supF*)領域を持っている事で特徴づけられる(図 2)。pZ189DNA の生存率は、SOS 誘導を行った野生型大腸菌 KY40 と DNA 修復能欠損株 KY46(*uvrA*<sup>-</sup>)にプラスミドを導入した後のアンピシリン耐性コロニーの出現率と定義した。突然変異誘発率の測定は、pZ189 DNA を導入した大腸菌をアンピシリン存在下で培養して *supF* 上の突然変異を固定し、その後アルカリ法で pZ189 DNA を抽出して、MBM7070 / pKY241 に導入しナリジキシン酸・アンピシリン・クロラムフェニコール含有プレートを用いて *supF* 上の突然変異の第一次選択を行う。その原理を図 2 に示したが、プラスミド pKY241 はアンバー突然変異を持つナリジキシン酸感受性の遺伝子 *gyrA* を持ち、導入した pZ189 DNA の *supF* 遺伝子が突然変異を起こして不活性であればナリジキシン酸存在下でコロニーを形成する。次に、X-gal・IPTG とアンピシリンを加えたプレート並びにアンピシリン含有マッコンキープレートで白いコロニーを形成する事で突然変異の再確認を行う。突然変異の解析は、得られた各クローンからアルカリ・PGE 法で pZ189 DNA を抽出・精製し、ジデオキシ法に

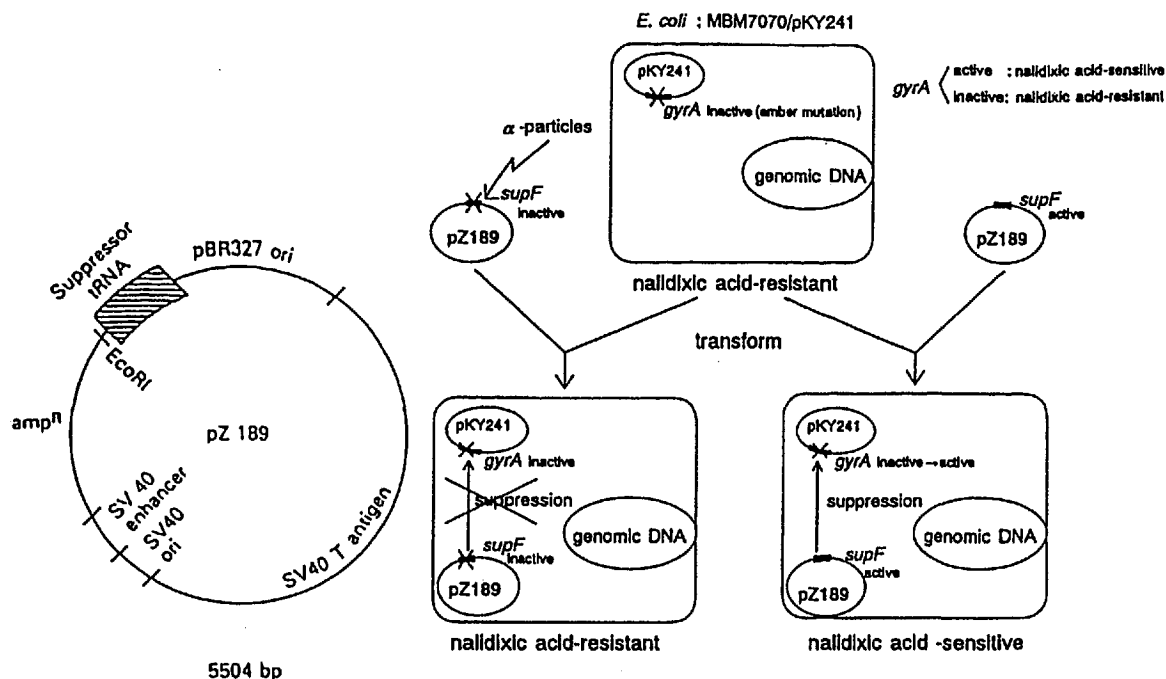


図2 シャトルベクタープラスミド pZ189 DNA の遺伝子構造と突然変異アッセイ原理図

より *supF* の塩基配列を決定する。

ペイロードクルーには、1993年1月にレクチャーを中心とした訓練を行った。

### 紫外線照射実験

地上部予備実験として、宇宙実験で使用した大腸菌細胞の紫外線感受性を調べた。大腸菌野生型細胞 (KMBL3835 株) とその突然変異細胞群である KY383 株 (*lexA*<sup>-</sup>)、KY385 株 (*recA*<sup>-</sup>)、KY386 株 (*uvrA*<sup>-</sup>) の場合には、KMBL3835 株、KY383 株、KY386 株、KY385 株の順に感受性が大きくなり、KY385 株では D<sub>10</sub> 値 (細胞が 90% 死滅するのに必要な線量) は約 2 J/m<sup>2</sup> となった。突然変異誘発率では、KY386 株が 5 J/m<sup>2</sup> で  $1.28 \times 10^{-6}$  と高い変異率を示した<sup>3)</sup>。同様に、別の大腸菌野生型細胞 (H/r30R) とその突然変異細胞群である Hs30R 株 (*uvrA*<sup>-</sup>)、NG30 株 (*recA*<sup>-</sup>) の場合には、H/r30R 株、Hs30R 株、NG30 株の順に感受性が大きくなり、NG30 株ではわずか 0.5 J/m<sup>2</sup> で生菌数が減少し、また、突然変異誘発率は、Hs30R 株が 5 J/m<sup>2</sup> で  $6 \times 10^{-4}$  という最も高い値を示した。これらの結果から、宇宙放射線の致死と突然変異誘発率を測定する系としては、これら大腸菌細胞は適していると判断した。

### サンプルの安全性に関する検討

三菱重工業(株)高砂研究所で実施した振動試験、オフガス試験のいずれもクリアしたが、減圧試験ではサンプル内の空気が膨張して、バイオスペースメン・ボックスの上下をはさんでいたハーツラス (CR-39 プラスチック板) が破損した。そこで、バイオスペースメン・ボックスに装填する乾燥細胞サンプル数を減らし、最終的に総数は 90 サンプルとした。

## 飛行実験の結果

日本から KSC までのサンプルの往復輸送は、常に冷蔵状態でいった。

宇宙実験は、RRMD にセットした 1 つのバイオスペースメン・ボックス(サンプル総数 90)とドシメーター 4 枚(サンプル総数 144)で実施された。ドシメーターのうちの 2 枚は RRMD に取り付けてあり、残り 2 枚は粘菌培養容器と植物細胞培養容器に取り付けてあった。生物サンプルは、飛行期間中、スペースラブ内で宇宙放射線に曝露される環境下に継続しておかれたが、バイオスペースメン・ボックスと 2 枚のドシメーターは、RRMD センサーと共にラブ内を移動した。飛行期間以外は、生物サンプルは冷蔵で保管された。

地上部対照実験としては温度状況を追尾し、KSC ハンガー L(ライフサイエンス実験支援施設)内でインキュベーター(コンビトロン社製)を用いて、シャトル打上げから約 1 日遅れで実施した。

## 解析と考察

実験の最終結果は、まず図 3 に示したが、バイオスペースメン・ボックス内の大腸菌 KMBL3835 株、KY383 株、KY385 株、KY386 株のいずれも、宇宙と地上の間では、生存数と突然変異誘発率に差がなかったと判断した。図からは KY383 株の突然変異誘発率が宇宙サンプルの方で上昇している様に見えるが、誤差の範囲と思われる。また、図中のポイントは平均値、バーは標準偏差を示した。一方、ドシメーター内も同様に、KMBL3835 株、KY383 株、KY385 株、KY386 株のいずれも、宇宙と地上の間では、生存数と突然変異誘発率に差は見られなかった(図 4)。また、H/r30R 株シリーズの大腸菌細胞でも同様の結果が得られた。

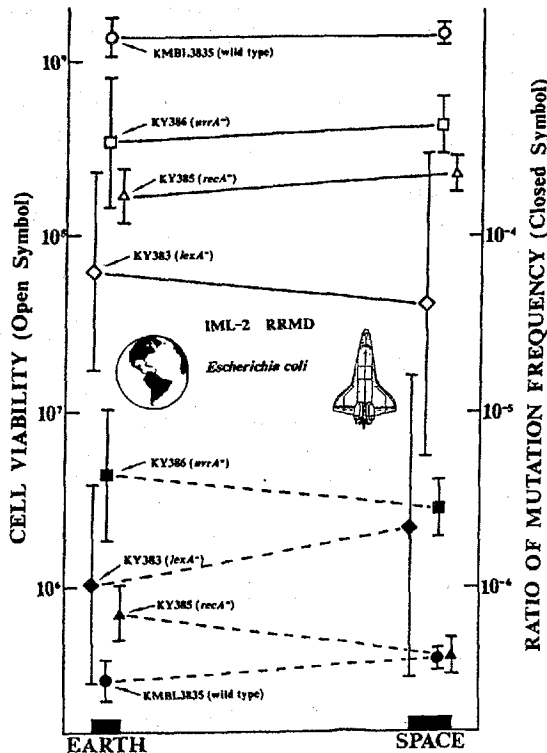


図 3 宇宙と地上の放射線モニター装置内での大腸菌 DNA 修復能欠損株の生菌数と突然変異誘発率の比較

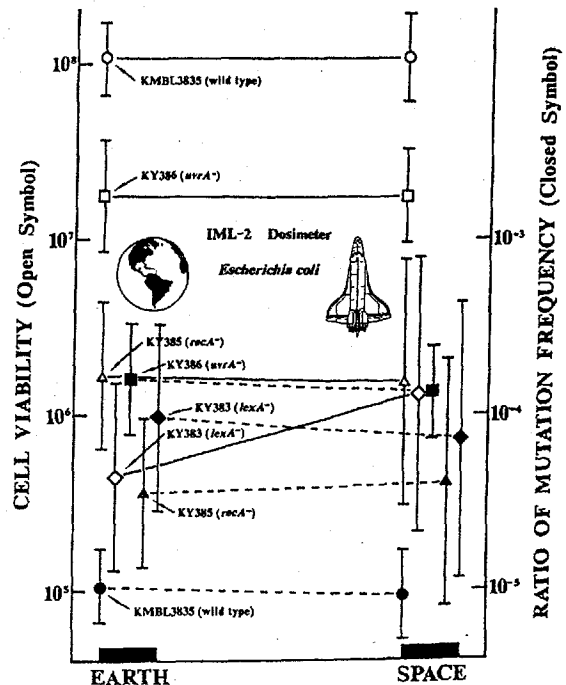


図 4 宇宙と地上のドシメーター内での大腸菌 DNA 修復能欠損株の生菌数の比較

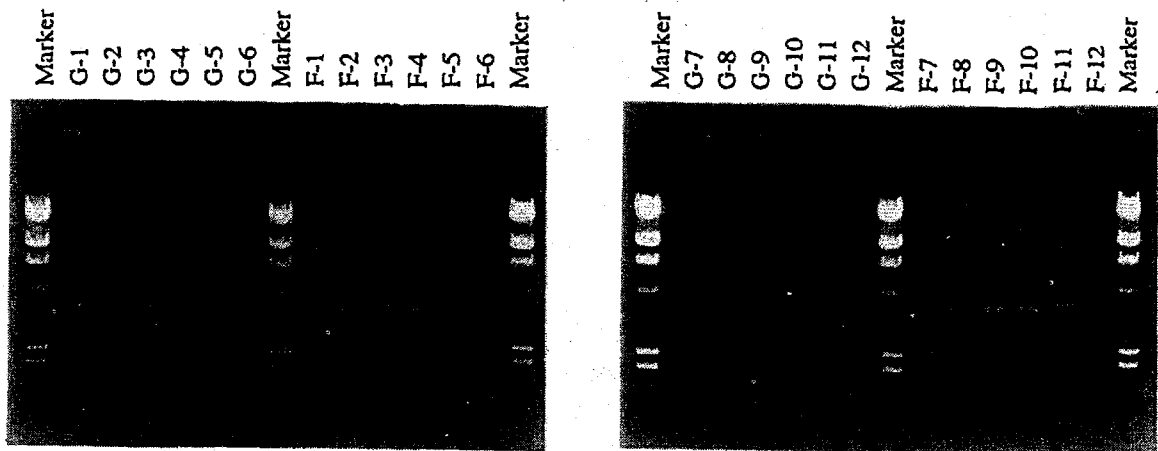


図5 宇宙と地上の放射線モニター装置内シャトルベクタープラスミド pZ189 DNA サンプルの電気泳動バンド・パターンと比較(記号 F は宇宙サンプル、記号 G は地上対照サンプルを示し、番号は放射線モニター装置内の位置を示す)

さて、シャトルベクタープラスミド pZ189 DNA のバイオスペースメン・ボックス内の宇宙と地上サンプルを、シャトル帰還後受け取って、KSCハンガーL内で直ちに電気泳動実験を行った(図5)。図5からも判る様に、宇宙サンプルにも地上サンプルにも閉環状 DNA(ccDNA) と開環状 DNA(ocDNA) のバンドは明確に出現したが、宇宙と地上に違いは認められなかった。この事から、DNA鎖切断の様なドラスティックな損傷が DNA 上に起こらなかったと思われるが、日本で解析を行ったところ、コロニー出現率によるプラスミド生存率にも宇宙と地上で差は認められなかった。また、突然変異誘発率も差は出なかったので(図6)、ホットスポットの検出までは至らなかった。

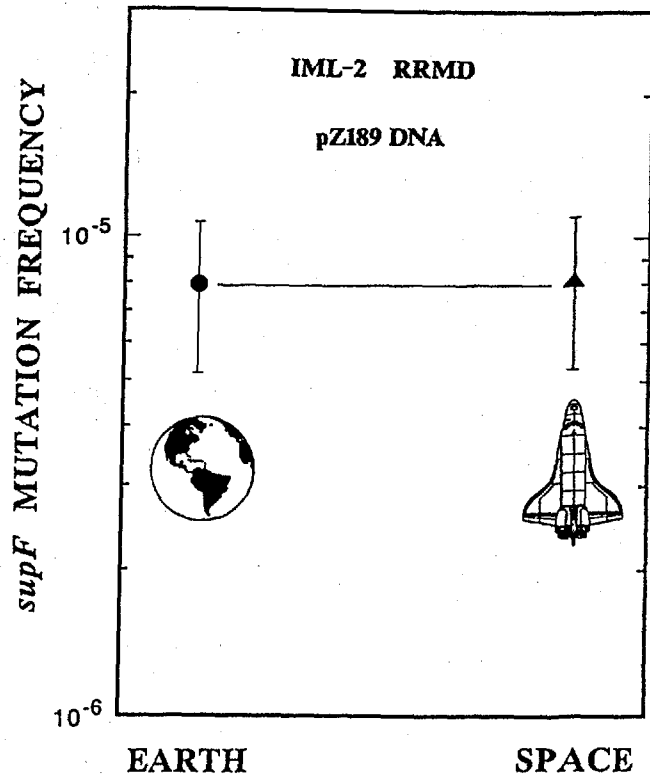


図6 宇宙と地上の放射線モニター装置内でのシャトルベクタープラスミド pZ189 DNA の突然変異誘発率の比較

### 結論

今回の宇宙飛行期間に関して、今まで解析した範囲内では、宇宙放射線の生物影響は検出できなかった。しかし、この事が、宇宙放射線の生物影響がなかった事にはならず、未解析の遺伝子の中に影響を受けたものが存在するかもしれないが、それは、今後の宇宙実験の課題である。

## 参考文献

- 1) 長岡俊治, 道家忠義, 林 孝義, 小倉紘一, 山田博章, 高橋 旦, 谷田貝文夫, 石川雅紀, 隆島史夫, 田ノ岡宏, 大西武雄, 原田和樹. 宇宙放射線の生物影響の検討と宇宙飛行士の放射線防御対策の開発 L-11. 宇宙開発事業団技術報告, ふわっと '92 宇宙実験成果報告. 1, 361-388 (1994).
- 2) 原田和樹, 木村理花, 中野立央, 大西武雄, 長岡俊治. 第一次材料実験(SL-J / FMPT)での宇宙放射線による大腸菌 DNA 修復能欠損突然変異株の致死と突然変異. 第10回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1993). 18-21.
- 3) Obiyo, Y. and Harada, K. Preparation of *Escherichia coli* cells for Space Shuttle experiment "IML-2 project". *PL G. W. J. C. Bull.* 21, 1-7 (1994).
- 4) Nakano, T., Okaichi, K., Harada, K., Matsumoto, H., Kimura, R., Yamamoto, K., Akasaka, S. and Ohnishi, T. Mutations of a shuttle vector plasmid, pZ189, in *Escherichia coli* induced by boron neutron captured beam (BNCB) containing  $\alpha$ -particles. *Mutation Res., DNA Repair.* 336, 153-159 (1995).

## 外部発表

- 1) 原田和樹, 木村理花, 中野立央, 渡辺 宏, 長岡俊治. 宇宙実験における粒子線生物影響測定材料としての *Deinococcus radiodurans*. 日本放射線影響学会第36回大会講演要旨集(1993). 303.
- 2) 原田和樹, 木村理花, 中野立央, 帯屋有里乃, 渡辺 宏, 長岡俊治. スペースシャトル宇宙実験「IML-2」で使用予定の *Deinococcus radiodurans* 乾燥細胞における重イオンビームの影響. 日本農芸化学会誌. 68, 272 (1994).
- 3) 原田和樹, 小林泰彦, 渡辺 宏, 中野立央, 帯屋有里乃, 原田香子, 大西武雄, 長岡俊治. 第2次国際微小重力実験室計画(IML-2)で宇宙放射線モニタリング装置に搭載する生物試料調製法. 日本放射線影響学会第37回大会講演要旨集(1994). 352.
- 4) 原田和樹, 中野立央, 帯屋有里乃, 原田香子, 小林泰彦, 渡辺 宏, 今村正浩, 大西武雄, 長岡俊治. IML-2でRRMDに搭載した原核細胞 *Deinococcus radiodurans* の地上部予備実験結果. 宇宙生物学. 8, 202-203 (1994).
- 5) 帯屋有里乃, 中野立央, 原田和樹, 大西武雄, 長岡俊治. スペースシャトル宇宙実験で宇宙放射線の生物影響測定に用いた微生物細胞. 日本防菌防黴学会第22回年次大会要旨集(1995). 35.