

大線量エックス線および高エネルギーFe イオン照射に対する微生物の生残に関する研究

増野 陽一、中井 亮佑、中村 慶子、幸村 基世、渋谷 絵里、右山 絵理（広大・院・生物圏科学）、黒田 麻美、高橋 寛（広大・生物生産）長沼 毅（広大・院・生物圏科学）、伊村 智（国立極地研・生物圏）、岩月 輝希（日本原子力研究開発機構）、金子 竹男（横国大・院・工）、小林 克己（高エネルギー加速器研究機構）、小林 憲正（横国大・院・工）、佐藤 皓（高エネルギー加速器研究機構）、三枝 誠行（岡山大・院・自然科学）、嶋田 和人（JAXA）、白壁 義久（高エネルギー加速器研究機構）、高野 淑識（海洋研究開発機構）、高山 健、俵 裕子（高エネルギー加速器研究機構）、橋本 博文（JAXA）、森田 洋平（高エネルギー加速器研究機構）、保田 浩志（放医研）、山下 雅道（JAXA）

Microbial survivability against high dose X-ray and high energy Fe ion

Y. Mashino, R. Nakai, T. K. Nakamura, K. Yukimura, E. Shibuya, E. Migiyama, A. Kuroda, H. Takahashi, T. Naganuma*, S. Imura, T. Iwatsuki, T. Kaneko, K. Kobayashi, K. Kobayashi, H. Sato, M. Saigusa, K. Shimada, Y. Shirakabe, Y. Takano, K. Takayama, H. Tawara, H. Hashimoto, Y. Morita, H. Yasuda, M. Yamashita

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Higashi-hiroshima, 739-8528 Japan. E-Mail: takn@hiroshima-u.ac.jp

Abstract: One of major problems in astrobiology is intense radiation, theoretical and experimental studies on biological protection and tolerance to radiation are needed. Wet and freeze-dried microbial cells were irradiated with high-dose X-ray for 0 to 10,000 Gy and high-energy Fe ions for 0 to 4,850 Gy to examine their survivability based on the most probably number (MPN), the biological “energy currency”, *i.e.*, adenosine 5'-triphosphate (ATP) and genomic DNA fragmentation. The well known radiation-resistant bacteria such as genus *Deinococcus radiodurans*, highly stress-resistant spore former *Bacillus subtilis* spore and radiation-sensitive *Escherichia coli* were used for this experiment.

Irradiation of synchrotron X-ray (0.2 nm) at a high dose rate of 4.4 Gy/s (500 R/s) was done at KEK Photon Factory. Freeze dried *D. radiodurans* and *E. coli* cells showed higher survivability than their wet cells. But *B. subtilis* spores have not changed their survivability wet or freeze-dried. Freeze-dried cellular ATP showed no decrease against to the dose. In addition, genomic DNA fragmentation was not easy to generated in freeze-dried cells.

Irradiation of 500 MeV Fe ion at a dose rate of 0.172 Gy/s (2.5×10^8 particles/s) was done at NIRS HIMAC. Generally similar results to X-ray irradiation were observed, but ATP showed exponential decrease in wet cells against to the dose.

More biomacromolecule should be used in future study.

Key words; Habitable zone, radiation, Panspermia, radiation-resistant bacteria, X ray, Fe ions

人類の月面ミッションや火星ミッションにおいて、無重力と並んで、あるいはそれ以上に問題になるのは放射線であろう。これは圏外生物学においても同様である。平成 21 年度 宇宙環境利用科学委員会 研究班「隕石・彗星内ハビタブルゾーン」Working Group (WG) では、宇宙における生物圏の広がりや「放射線からの遮蔽」および「放射線への耐性」という観点から理論的および実証的に考察している（長沼他 2005a, 2005b, 2006, 2007, 2008, 2009）。

本研究の背景には「パンスペルミア仮説」の検証がある。パンスペルミア (panspermia; pan 汎、spermia 胚種) とは宇宙胚種とも呼ぶべき生命体であり、「宇宙にはパンスペルミアが漂い、地球など適当な惑星に降下してその惑星生命の起源となる」というパンスペルミア仮説が古くから提唱されている。パンスペルミアが宇宙を単体で漂っているのか、あるいは隕石や彗星などの「方舟」に保護されて飛来するのかが想像の域を出ない。いずれにせよ、宇宙放射線からの遮蔽・保護を考え

る上で、想像上のパンスペルミアではなく、現存する生物の放射線耐性の機作や限界を考えるのが本 WG の趣旨である。

たとえば、放射線による DNA 損傷の主な原因が H₂O 由来の OH ラジカルによる間接作用であるなら、乾燥した微生物ではそれが無い分、放射線耐性が向上したように見えるだろう。しかし、意外にも乾燥した微生物の放射線耐性に関する知見は少ない。よって本研究では細胞に水を含む状態（湿潤細胞）と細胞から水を抜いた状態（乾燥細胞）における比較を行う。具体的には三種類の微生物を用い、二種類の放射線（電磁波である大線量 X 線および高エネルギー粒子線である Fe イオン）を用いた照射実験を行い、最確数法（MPN）により細胞の生存率、「生体エネルギー通貨」と呼ばれるアデノシン三リン酸（ATP）、およびゲノム DNA の断片化を湿潤細胞と凍結乾燥細胞で比較したので報告する。

材料と方法

・微生物細胞の調整

① *Deinococcus radiodurans* NBRC 15346

② *Bacillus subtilis* DSM 10（芽胞）

③ *Escherichia coli* K-12 IFO 3301（以下 K-12 株）の三株を用いた。①は放射線研究に汎用される代表的な放射線耐性菌である。DNA 修復能の高さがこの菌の主な放射線耐性と考えられている。②は様々な放射線を含む環境ストレスに耐性の芽胞という構造体を形成する微生物である。③大腸菌野性株。①は NBRC-802 培地、②は芽胞を形成させるため 10mg/L 硫酸マンガン一水和物を含む LB 寒天培地、③は LB 培地でそれぞれ常法に従い培養した。この培養液から細胞を遠心分離（5,000×rpm、15 min）して集め、上澄みを捨てて ATP-free の 0.1 M リン酸バッファーに懸濁することをそれぞれ 5 回繰り返し（これを細胞の“洗浄”という）細胞懸濁液を調整した。湿潤細胞はこれを X 線照射の際にはスライドガラス上に作成したターゲットウェル（直径 3 mm、3 mm 深の凹部）に、重粒子線照射では 96 ウェルプレートのウェルにそれぞれ滴下し照射試料とした。

・凍結乾燥

凍結乾燥に供する細胞懸濁液は前述の細胞懸濁液の液層を 20% グルタミン酸ナトリウムを含む 0.1 M リン酸バッファーで置換したものを用いた。そして X 線照射および Fe イオン照射に用いるウェルにそれぞれ滴下して凍結（-80℃、12 時間）し、真空ポンプを用いて凍結乾燥（2 時間）を行い、こ

れを照射試料とした。

・大線量 X 線の照射

試料への放射線照射は高エネルギー加速器研究機構（KEK）の放射光施設（PF）の BL-27B において行った。使用した放射線は波長 0.2 nm（6.2 keV）の X 線で、照射線量率は 4.4 Gys⁻¹（500 Rs⁻¹）、照射面積は約 0.9 cm²（3 mm×30 mm）であった。これを各試料（0.07 cm²=直径 3 mm）に照射した。吸収線量としては 0 Gy から 10,000 Gy であった。

・重粒子線の照射

試料への放射線照射は放射線医学総合研究所（NIRS）の重粒子線がん治療装置（HIMAC）において行った。使用した粒子線は Fe イオン（500 MeV/u）、最大強度 2.5×10⁸ 個/s、照射線量率 0.172 Gy s⁻¹（4.369×10⁻⁵ Gy/count）、照射面積は直径 100 mm であった。これを各試料（0.38 cm²=直径 7 mm）に照射した。照射線量は 0 Gy から 4,000 Gy であった。

照射後、試料を無菌的に回収し、広島大学にて MPN による細胞の生存率、残存 ATP の定量およびゲノム DNA の断片化の評価を行った。まずターゲットウェルに 0.1 M リン酸バッファーを滴下して風乾試料に再懸濁し、MPN は細胞再懸濁液を常法により希釈し 8 本法で行った。増殖の見られた希釈段階とその数から生存している細胞の数を推定した。放射線耐性の評価は D₁₀ 値の比較により行った。D₁₀ 値とは微生物の生存率を元の 10% に減少させるのに必要な線量（Gy）である。ATP 定量はルシフェリンルシフェラーゼ反応による発光を東亜 DKK 社製 AF-70 にて測定した。ゲノム DNA の断片化の評価はパルスフィールド電気泳動法により行った。

結果と考察

・細胞の生存率

X 線照射に対する生存率は Figure 1. のようになった。*D. radiodurans* の湿潤細胞の D₁₀ は 5,263 Gy、乾燥細胞の D₁₀ は 7,462 Gy。*B. subtilis* 芽胞の湿潤細胞の D₁₀ は 4,546 Gy、乾燥細胞の D₁₀ は 2,779 Gy。*E. coli* K12 株の湿潤細胞の D₁₀ は 386 Gy、乾燥細胞の D₁₀ は 1,266 Gy。*D. radiodurans* と *E. coli* K12 株の乾燥細胞は湿潤細胞より放射線耐性が高まった。一方で *B. subtilis* 芽胞は乾燥細胞で放射線耐性が低くなった。Fe イオン照射に対する生存率は Figure 2. のようになった。*D. radiodurans* の湿潤細胞の D₁₀ は 1,521 Gy、乾燥細胞の D₁₀ は 4,703 Gy。

B. subtilis 芽胞の湿潤細胞の D_{10} は 862.8 Gy、乾燥細胞の D_{10} は 797.3 Gy。 *E. coli* K12 株の湿潤細胞の D_{10} は 198 Gy、乾燥細胞の D_{10} は 637 Gy。二つの放射線を比較すると同じ吸収線量に対して Fe イオンで 3 株の微生物で生存率が低く、高エネルギー粒子線の生物効果が大きいことが分かる。また、大線量 X 線照射と同様に Fe イオン照射に対して *D. radiodurans* と *E. coli* K12 株の乾燥細胞は湿潤細胞より放射線耐性が高まった。 *B. subtilis* 芽胞は Fe イオン照射に対して湿潤細胞と乾燥細胞で放射線耐性が変化しなかった。以上のことから芽胞以外の乾燥細胞は放射線耐性の上昇が起こったといえる。これは、細胞内の水分の減少により OH ラジカルなど水由来の活性酸素種の発生や移動が抑制されたためであると考えられる。一般に凍結乾燥後の細菌の水分含量は 1~10% であるという報告がある。今回は仮に凍結乾燥後に水分量が 10% に減少したとするとこれは、細胞内の水分の減少により OH ラジカルなど水由来の活性酸素種の発生や移動が抑制され、損傷が減ったためであると考えられる。 *D. radiodurans* と *E. coli* K12 株では元の水分の 1/10 になる。一方で *B. subtilis* 芽胞はその細胞形態の DNA を含むコアと呼ばれる部分の水分は 40% 程度になることが知られている。さらに、そのコア内水分のわずか 3% 程度が自由水であることから *B. subtilis* 芽胞はその構造体になった時点ですでに水分が非常に少ない状態にある。以上から *B. subtilis* 芽胞では乾燥による放射線耐性の向上がなかったと考えられる。

・細胞内 ATP 量の変化

X 線照射に対する細胞内 ATP 量の変化は Figure 3. のようになった。Fe イオン照射に対する細胞内 ATP 量の変化は Figure 4. のようになった。X 線照射においては *D. radiodurans* の湿潤細胞のみ減少する傾向が見られ、3 株の乾燥細胞では ATP 量に変化が見られなかった。次に Fe イオン照射においては *D. radiodurans*、*E. coli* K12 株、*B. subtilis* 芽胞の湿潤細胞で減少する傾向がみられたが、3 株の乾燥細胞では変化しなかった。また、細胞内ではなく ATP 分子自体にも X 線および Fe イオンを照射したが、湿潤状態でも乾燥状態でも放射線による ATP 量に変化は見られなかった。以上から湿潤細胞において ATP は代謝によって消費されることにより減少すると思われる。そして ATP は DNA 損傷の修復のエネルギー源として、また RNA の材料として取り込まれるなど放射線照射の損傷からの回復の様々な反応により消費されるものと考えられる。

・DNA の断片化

ゲノム DNA は湿潤細胞および乾燥細胞で放射線の作用により切断された。しかし、X 線照射に対しても Fe イオン照射に対しても湿潤細胞に比べ、乾燥細胞で切断が生じにくかった。これは、細胞内の水分の減少により OH ラジカルなど水由来の活性酸素種の発生や移動が抑制されることにより損傷が減ったためであると考えられる。

本年度はこれまで比較されてこなかった湿潤細胞と乾燥細胞における放射線耐性の違いを比較することができた。非芽胞形成菌の栄養細胞は乾燥させると湿潤細胞に比べ放射線耐性が上昇した。一方で芽胞では放射線耐性が変化しにくい傾向が見られ、X 線照射に対して放射線耐性はむしろ下がったといえる。大腸菌野性株は乾燥により芽胞レベルの放射線耐性に上昇した。大腸菌は乾燥させることにより芽胞の放射線耐性に近づきはしたものの、依然として放射線耐性菌とは隔たりがある。その様なことから、放射線耐性菌は高い DNA 修復能など乾燥状態からの再増殖に有利な能力を持っているとともに、さらに乾燥状態においても他の微生物に比べ細胞内の生体分子を保護する高い能力があると考えられる。

謝辞

本研究の照射実験は高エネルギー加速器研究機構 (KEK) 物質構造科学研究所 放射光共同利用実験課題「ストレス耐性生物・生化学物質に及ぼす大線量放射光照射の影響」(2009G101) 及び放射線医学総合研究所 (NIRS) 重粒子線がん治療装置 (HIMAC) 等共同利用研究課題「微生物の放射線耐性における生理生化学的特性に関する研究」(19B353) により行った。高エネルギー加速器研究機構 (KEK) 職員の方々および放射線医学総合研究所 (NIRS) 職員の方々に心よりの感謝を申し上げます。

文献

Brooks BW, Murray RGE (1981). Nomenclature for *Micrococcus radiodurans* and other radiation-resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **31**, 353-360.

藤高和信・福田 俊・保田浩志 (2004) 宇宙からヒトを眺めて—宇宙放射線の人体への影響. 研成社.

ホア NP・長沼 毅 (2005) 宇宙利用研究のモデル生物としての新規超ストレス耐性菌の可能性. *Space Utiliz. Res.*, **21**, 274.

Madigan M.T. et al., (2005) *Brock Biology of Microorganisms* 11 th ed., Prentice Hall

増野 陽一、中井 亮佑、長谷川 剛史、中村 慶子、幸村 基世、渋谷 絵里、右山 絵理、長沼 毅、岩月 輝希、小林 克己、小林 憲正、三枝 誠行、嶋田 和人、白壁 義久、高野 淑識、高山 健、俵 裕子、橋本 博文、森田 洋平、保田 浩志、山下 雅道 (2009) 大線量 X 線および Fe イオン照射の照射に対する放射線耐性微生物の生残に関する予察的研究 *Space Utiliz. Res.*, **25**, 188-191

増野 陽一・許 玉福・中井 亮祐・長谷川 剛史・中村 慶子・幸村 基世・長沼 毅・伊村 智・岩月 輝希・小林 憲正・三枝 誠行・佐藤 皓・嶋田 和人・白壁 義久・高野 淑識・高山 健・俵 裕子・橋本 博文・森田 洋平・保田 浩志・山下 雅道・吉田 英一 (2008) 大線量 X 線および Fe イオン照射の照射に対する放射線耐性微生物の生残に関する予察的研究 *Space Utiliz. Res.*, **24**, 314-317.

長沼 毅・岩月輝希・小林憲正・嶋田和人・白壁義久・高野淑識・俵 裕子・森田洋平・保田浩志・山下雅道・吉田英一 (2005a) 隕石・彗星内ハビタブルゾーン WG の目的と活動: 「パンスペルミアの方舟」仮説の検証に向けて. *Space Utiliz. Res.*, **21**, 275-276.

長沼 毅・岩月輝希・小林憲正・嶋田和人・白壁義久・高野淑識・俵 裕子・森田洋平・保田浩志・山下雅道・吉田英一 (2005b) 隕石・彗星内ハビタブルゾーン(パンスペルミアの方舟). *Biol. Sci. Space*, **19**, 8-24.

長沼 毅・伊村 智・岩月輝希・川久保忠通・小池惇平・小林憲正・三枝誠行・佐藤 皓・嶋田和人・白壁義久・高野淑識・高山 健・俵 裕子・許 玉福・森田洋平・保田浩志・山下雅道・吉田英一 (2006) 隕石内ハビタブルゾーンにおける放射線・突入・衝突の影響評価に関する計画. *Space Utiliz. Res.*, **22**, 321-322.

Takayama K et al. (2007a) All-ion Accelerators: An Injector-free Synchrotron. *J. Appl. Physics*, in press.

Takayama et al. (2007b) Experimental demonstration of the induction synchrotron. *J. Appl. Physics*, in press.

Yatagai F (Supplement editor-in-chief) (2002) *Space Radiation Research. J. Rad. Res.* **43** Supplement, S1-S264.

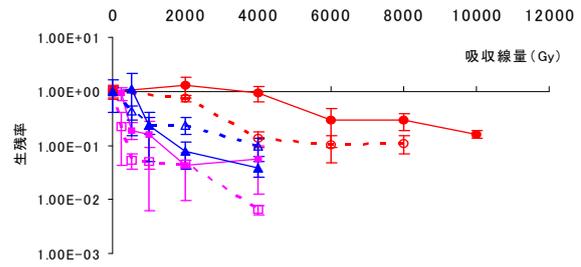


Figure 1. Survival of bacteria exposed to X ray.

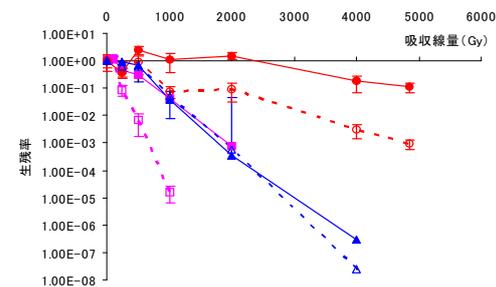


Figure 2. Survival of bacteria exposed to Fe ion.

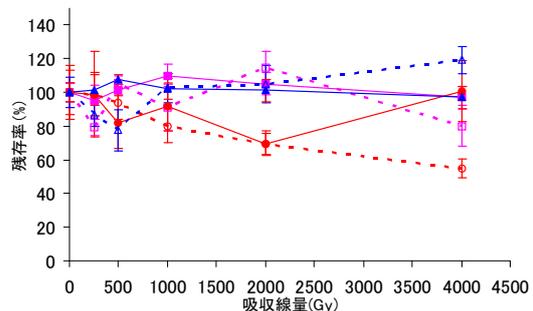


Figure 3. Survival of cellular ATP exposed to X ray.

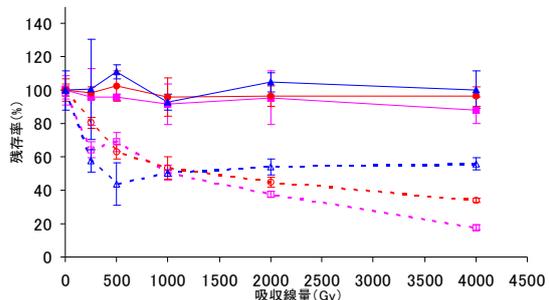


Figure 4. Survival of cellular ATP exposed to Fe ion.

- *Deinococcus radiodurans* 湿潤細胞
- *Deinococcus radiodurans* 乾燥細胞
- △ *Bacillus subtilis* 芽胞 湿潤細胞
- ▲ *Bacillus subtilis* 芽胞 乾燥細胞
- *Escherichia coli* K12 湿潤細胞
- *Escherichia coli* K12 乾燥細胞