

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

○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（広大・院・生物圏科学）、右山 絵理（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）、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）、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（高エネルギー加速器研究機構）、俵 裕子（高エネルギー加速器研究機構）、橋本 博文（筑波大・院・システム情報）、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）

Preliminary study on the survival of radiation-resistant bacteria against the irradiation of synchrotron X-ray and iron(Fe) ions

Y. Mashino, R. Nakai, T. Hasegawa, K. Nakamura, K. Yukimura, E. Shibuya, E. Migiyama, T. Naganuma*, S. Imura, T. Iwatsuki, K. Kobayashi, K. Kobayashi, 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: y-mashino@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. Air dried-microbial cells were irradiated with high-dose X-ray for 0 to 66,500 Gy and high-energy Fe ions for 0 to 2,000 Gy to examine their survivability based on the biological“energy currency”,*i.e.*, adenosine 5'-triphosphate(ATP), and the Most probably number (MPN). The well known radiation-resistant bacteria such as genus *Deinococcus* and *Rubrobacter radiotolerans*, highly stress-resistant spore former family Bacillaceae and radiation-sensitive *Escherichia coli* strains 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. All species showed exponential decrease in MPN against total dose. However, cellular ATP showed little decrease at low dose and linear (or exponential) decrease at high dose. Genus *Deinococcus* and *Rubrobacter radiotolerans* showing survival at 67 kGy, was more than 60 times resistant compared with normal *E. coli*.

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 some genus *Deinococcus* and *Rubrobacter radiotolerans* showed no decrease at total dose 2000 Gy. And cellular ATP showed no decrease 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 20 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）。

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は想像の域を出ない。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。

本研究では昨年度異なる数種類の微生物を用い、微生物の大線量 X 線と Fe イオンによる照射に対する生残に関する影響を調べ、異なる微生物種は質的・量的に異なる放射線耐性特性を持つことを見出している。本年度も引き続き大線量 X 線（電磁波）による照射を引き続き行うとともに、宇宙線の大部分を占める粒子線のうち、鉄(Fe)イオンを用いた照射実験を行い放射線耐性菌をはじめとする微生物を用いて、「生体エネルギー通貨」と呼ばれるアデノシン三リン酸(ATP)及び最確数法(MPN)により生菌の残存を調べたので報告する。

材料と方法

・照射に供した微生物は、

- ① *Deinococcus radiodurans* NBRC 15346
- ② *D. radiophilus* DSM 20551
- ③ *D. geothermalis* DSM 11300
- ④ *Rubrobacter radiotolerans* DSM 5868
- ⑤ *Bacillus subtilis* DSM 10
- ⑥ *Virgibacillus permianicus*
- ⑦ *Virgibacillus salaries*
- ⑧ *Escherichia coli* K-12 IFO 3301 (以下 K-12 株)
- ⑨ *E.coli* B/r WP2 (Strain No. ME9015)
- ⑩ *E.coli* WP2 hcr⁻ (Strain No. ME9016)
- ⑪ *E.coli* (Strain No. JE8488)

の 11 株を用いた。①～④はいずれも放射線耐性微生物である。中でも④の *R. radiotolerans* は *E. coli* の 4000 倍もの極めて高い放射線耐性を有する細菌である。⑤～⑦はいずれも環境ストレスに耐性の芽胞を形成する微生物である。⑥は 2 億 5000 万年前の岩塩層(地下 569 m) から復活した高度好塩菌(*Nature*, 407, 897-900, 2000)であり、⑦はサハラ砂漠東端(チュニジア)にある塩湖から当研究室が発見した高度好塩菌である(Hua, Naganuma, 2005)。⑥、⑦は共に近縁である。⑧～⑪はいずれも大腸菌であるが、⑧は野生株、⑨～⑪<提供元: NBRP 大腸菌事業(NIG)>は放射線に関する変異株である。⑨は大腸菌の中でも放射線耐性株、⑩は DNA の塩基除去修復に関するタンパク質 *UvrA* をコードする遺伝子の変異株、⑪は DNA の組み換え修復に関するタンパク質 *RecA* をコード

する遺伝子の変異株、である。さらに、ATP 分子そのものにも照射を行うため、ATP 標準試薬セット AF-2A1 (東亜 DKK) も用いた。加えて Fe イオンの照射実験では DNA 分子そのものに対して照射を行うためプラスミドも用いた。

①～④は NBRC-802 培地⑥、⑦は DSMZ-625 培地、⑤、⑧～⑪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(14000×g、15 min)して集め、上澄みを捨てて ATP-free の 50 mM Tris-HCl に懸濁することをそれぞれ 5 回繰り返す(これを細胞の“洗浄”という)細胞懸濁液を調整した。また、ATP 標準試薬セット AF-2A1 は常法に従い ATP 標準溶液を作成した。

細胞懸濁液、ATP 溶液、およびプラスミド溶液を大線量 X 線の照射ではスライドガラス上に作成したターゲットウェル(3 mmφ、1 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て風乾し、照射試料とした。この滴下・風乾作業は広島大学にて無菌的に行った。

・大線量 X 線の照射

風乾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= 3 mmφ)に照射した。照射線量としては 0 Gy から 66,500 Gy であった。

・重粒子線の照射

風乾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 100 mmφであった。これを各試料(0.64 cm²= 9 mmφ)に照射した。照射線量は 0 Gy から 2000 Gy であった。

照射後、試料を無菌的に回収し、広島大学にて残存 ATP と生残 MPN の定量を行った。まずターゲットウェルに緩衝液を滴下して風乾試料に再懸濁し、ATP 定量及び CFU 計数に供した。ATP 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。MPN は細胞再懸濁液を常法により希釈し 8 本法で行った。濁った培養液から生存していた細胞の数を推定した。

結果と考察

まず X 線照射に対する微生物の生存率の変化であるが放射線耐性菌である *Deinococcus* 属、

Rubrobacter radiotolerans は 2,000 Gy までの照射に対してはほとんど死滅が見られなかった。一方で 2,000 Gy 以降の線量では指数関数的な死滅が見られた。よってこれらの菌株は数 kGy に片を持つ死滅曲線であることが考えられる。また芽胞を形成する *Bacillus* 属、*Virgibacillus* 属に関しては 2,000 Gy までに指数関数的な死滅が見られ、大腸菌の 4 株も同様の結果が得られた。また、Fe イオン照射に対しては *D. geothermalis* を除く放射線耐性菌は死滅が見られなかった。*D. geothermalis* は Fe イオン照射の中では一番死滅曲線の傾きが緩やかではあるが指数関数的な死滅が確認された。芽胞を形成する *Bacillus* 属、*Virgibacillus* 属と大腸菌の 4 株に関しては 2,000 Gy までに指数関数的な死滅が見られた。以上より放射線耐性菌はいずれの線種に対しても非常に高い耐性を示していた。*D. geothermalis* に関しては他の放射線耐性菌とは違い、高温 (50 °C) あたりでの放射線耐性は高く、常温での放射線耐性は他の *Deinococcus* 属に劣ることが知られているので妥当な結果であったといえる。また、芽胞を作る *Bacillus* 属、*Virgibacillus* 属は大腸菌の 4 株に比べ放射線耐性が高いことが予想されるが、それに反し同等程度の死滅が見られた。これは芽胞が放射線に耐性が無かったわけではなく、細胞を乾燥させることにより大腸菌が水起源のラジカル発生が抑えられたために放射線耐性が上昇したと考えられる。もともと芽胞は栄養細胞に比べ水分を減らすことにより様々なストレス耐性を持つので大腸菌の放射線耐性が上昇したことは妥当である。なお、X 線照射時には芽胞形成菌が全て芽胞になっているか確認しなかったが、Fe 照射時には加熱処理して芽胞だけに照射を行った。結果を比べると同じ傾向が両方で見られたことから X 線照射時は実は芽胞でない栄養細胞に照射することにより大腸菌程度の放射線耐性になっていたとは考えにくい。

次に放射線照射に対する細胞内 ATP の変化であるが X 線、Fe イオンともに 2000 Gy 程度までの照射に対して減少は見られなかった。これは、細胞を乾燥させたことにより水を介したラジカルの発生が抑えられ細胞の中では比較的 low molecular weight である ATP は放射線の影響を受けなかったことが考えられる。一方で X 線照射の高線量部分である 66,500 Gy の部分では ATP の減少が見られた。これは、放射線が直接 ATP 分子に当たって破壊されたということが考えられる。線量が増加に対し直線的もしくは指数関数的な減少であった。

この ATP の減少により高分子である DNA も乾

燥下で放射線の直接影響を受けることが示唆された。さらにプラスミド DNA は Fe イオン 250 Gy 以降の照射で検出されなかったことから乾燥させた DNA でさえ放射線により切断されることが示された。乾燥下での照射による微生物死滅の原因が DNA 損傷であれば DNA 修復能力の高い放射線耐性菌の生残率が高いことの説明がつく。さらに乾燥した大腸菌が芽胞と同等の放射線耐性を持つことも水由来のラジカルによる DNA の損傷が無くなったということで説明がつく。一方で放射線耐性はタンパク質の酸化によるところが大きいという報告もある。これは *Deinococcus* 属のような放射線耐性菌は Mn を細胞内に高濃度で溜め込み、放射線照射により水由来のラジカルが発生するがこれを Mn で無毒化して細胞外へ排出しタンパク質の酸化を防ぐというものである。いずれにせよ微生物の死滅が DNA の損傷によるものなのか、タンパク質の酸化によるものなのか、もしくは他の要素により引き起こされるものなのか更なる検証が必要である。最後に、Fe イオンは毎秒の粒子数が宇宙放射線のおよそ 25 年分の粒子数に相当する。放射線耐性菌である *Deinococcus* 属、*Rubrobacter radiotolerans* は 2000 Gy (照射時間 10,000 秒)、約 25 万年分もの宇宙粒子線を浴びてもそのほとんどが生残するという試算ができた。

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「ストレス耐性生物および生化学物質に及ぼす大線量放射光照射の影響に関する研究」

(2006G411) 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) 小林克己先生を始めとする KEK 職員の方々及び放射線医学総合研究所 (NIRS) 保田浩志先生を始めとする 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・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.

Hubbell JH, Seltzer SM (1996) Tables of X-Ray Mass Attenuation coefficients and mass energy-absorption coefficients. NIST Standard Reference Database 126.

<http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/cover.html>.

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.

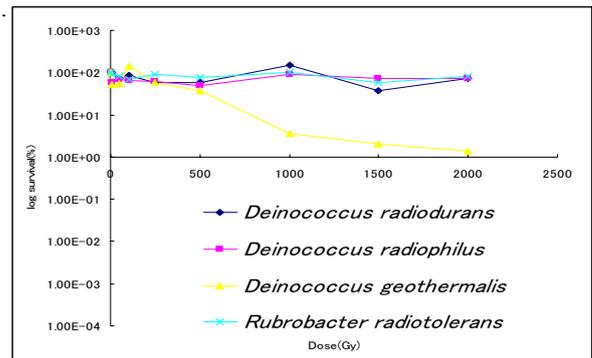


Figure 1. Survival of radioresistant bacteria exposed to Fe ions.

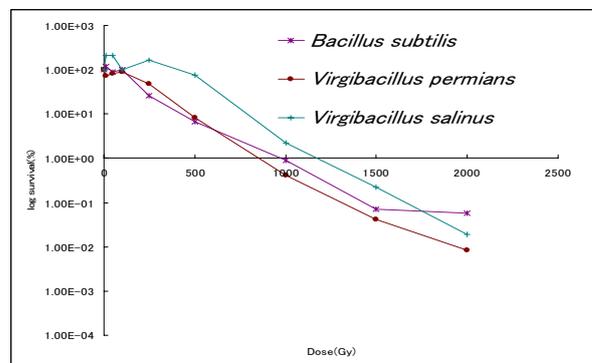


Figure 2. Survival of spore-forming bacteria exposed to Fe ions.

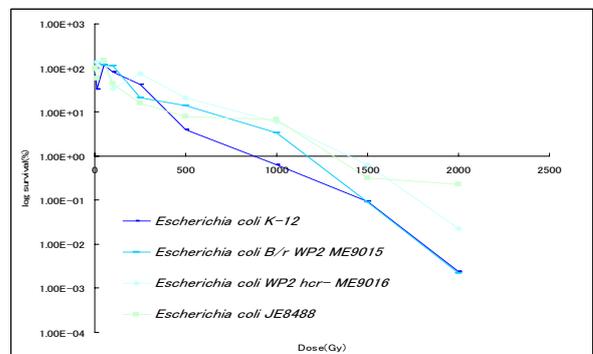


Figure 3. Survival of *E. coli* strains exposed to Fe ions.

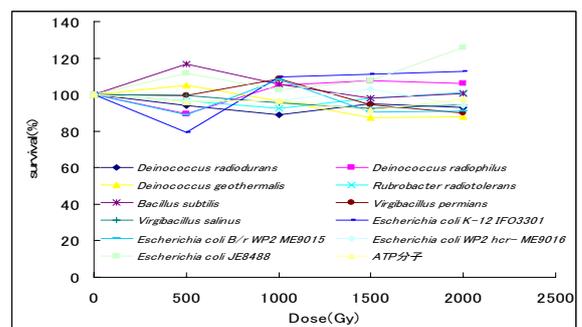


Figure 4. Survival of cellular ATP exposed to Fe ions.