

## 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（広大・生物生産）、許 玉福、中井 亮祐、長谷川 剛史（広大・院・生物圏科学）、中村 慶子、幸村 基世（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 憲正（横国大・院・工）、三枝 誠行（岡山大・院・自然科学）、佐藤 皓（高エネルギー加速器研究機構）、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）、吉田 英一（名大・博物館）

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

Y. Mashino, N. P. Hua, R. Nakai, T. Hasegawa, K. Nakamura, K. Yukimura, T. Naganuma\*, S. Imura, T. Iwatsuki, K. Kobayashi, M. Saigusa, H. Sato, K. Shimada, Y. Shirakabe, Y. Takano, K. Takayama, H. Tawara, H. Hashimoto, Y. Morita, H. Yasuda, M. Yamashita, H. Yoshida

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

Abstract: Microbial cells were irradiated with high-dose X-ray(0.2 nm, 500 Rs<sup>-1</sup>) for 0 to 1.2×10<sup>7</sup>R and high-energy Fe ions(500 MeV/u) for 0 to 2000Gy to examine their survivability based on the biological “energy currency” ,i.e., adenosine 5'-triphosphate(ATP), and the colony-forming units (CFU). The well known radiation-resistance bacterium *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* X1488 and non-cellular ATP were used for X-ray irradiation. On the other hand, *Deinococcus radiodurans* and 2 spore-forming bacterium *Virgibacillus* and 4 strains of *Escherichia coli* (each strain of *Escherichia coli* have another radiation-sensibility) were used for Fe ion irradiation.

The results of X-ray irradiation were:1)Cellular ATP showed highest survivability in the *D.radiodurans* and cellular ATP decreased exponentially. Whether non-cellular ATP did proportionally. 2)*D.radiodurans* survived extremely high-dose of X-ray. The lethal dose was several thousands greater than that of *E.coli*. The results of Fe ions radiation were 1) Cellular ATP decreased exponentially but only *D.radiodurans*'s did proportionally. 2)CFU of *E.coli* and *D.radiodurans* showed rapid decrease at the dose of over 50 Gy. However, only *D.radiodurans* survived at the dose of 2000 Gy. These results suggest that 1)Irradiation of X-ray and Fe causes another effect on microbial cells. Fe ions showed greater effect on microbial cells than X-ray. 2)Each bacterium has their characteristic radiation resistance such as DNA repair capability or spore forming . More different radiation type and more bacteria strains should be used in future study.

Key words; Habitable zone, radiation,, Panspermia, radiation-resistant bacterium, 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 19 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」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）。

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。

本研究では昨年度、その最初の試みとして、異なる 2 種類の微生物を用い、微生物の大線量 X 線による照射の影響を調べた。そこで我々は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た。本年度は大線量 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)及びコロニー形成菌数(CFU)の残存を調べたので報告する。

## 材料と方法

### 1. 大線量 X 線による照射実験

照射に供した微生物は、

- ① 放射線耐性微生物 *D.radiodurans* NBRC 15346
- ② 大腸菌 *E.coli* X1488

の 2 種類を用いた。さらに、ATP 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。①、②はそれぞれの最適培地で常法に従い培養した。この培養液から細胞を遠心分離して集め、上澄みを捨てて ATP-free の 50 mM Tris-HCl に懸濁を繰り返し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、100 nM/ul の ATP 標準溶液を作成した。

細胞懸濁液および ATP 標準溶液各 8 ul を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。

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 500 Rs<sup>-1</sup>、照射面積は約 0.9 cm<sup>2</sup>(3 mm×30 mm)であった。これを各試料(0.07 cm<sup>2</sup>= 3 mmφ)に 0 から 11 時間照射した(n= 2 or 3)。照射線量としては 0 R から 1.21×10<sup>7</sup> R 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 CFU 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。CFU は細胞再懸濁液を寒天平板に塗布して常法に従って培養し、形成されたコロニー数として計数した。

### 2. Fe イオン (重粒子線) による照射実験

照射に供した微生物は

- ① *E.coli* K-12 K-12 IFO 3301 (以下 K-12 株)
- ② *E.coli* B/r WP2(Strain No. ME9015、以下 B/r 株)
- ③ *E.coli* WP2 hcr(Strain No. ME9016、以下 hcr 株)
- ④ *E.coli*(Strain No. JE8488、以下 JE8488 株)
- ⑤ *D.radiodurans* NBRC 15346
- ⑥ *Virgibacillus permianicus*
- ⑦ *Virgibacillus salarius*

の 4 種 7 株を用いた。①～④はいずれも大腸菌であるが、①は野生株②～④は提供元 : NBRP 大腸菌事業 (NIG) > は放射線に関する変異株である。B/r 株は放射線耐性株、hcr 株・JE8488 株は DNA 修復に関する遺伝子の変異株である。⑥、⑦は共に様々なストレスに耐性の胞子を形成する高度好塩菌で、⑥は 2 億 5000 万年前の岩塩層(地下 569 m) から復活したもので(*Nature*, 407, 897-900 (2000))、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分離したものである。①～⑦はそれぞれの最適培地で常法に従い培養 X 線による照射実験同様に細胞懸濁液を調整した。細胞懸濁液各 60 ul をガラス盤上に作成したターゲットウェル (9 mmφ、1 mm 深の凹部) に滴下して風乾し、照射試料とした。

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 2.5×10<sup>8</sup> 個/s、照射線量率 4.369×10<sup>-5</sup> Gy/count であった。これを各試料(0.64 cm<sup>2</sup>= 9 mmφ)に 0 から 3 時間照射した。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大線量 X 線による照射実験と同様にして残存 ATP と生残 CFU の定量を行った。

## 結果と考察

まず、大線量 X 線照射における ATP の残存は Fig.1 のようになった。細胞内 ATP は照射線量の増加で指数関数的に減少し、ATP そのものは照射線量に比例して減少した。しかし *E.coli* に比べると *D.radiodurans* では細胞内 ATP が高いレベルで残存しており、これは *D.radiodurans* 特有の放射線耐性 (DNA 修復能) だけでなく、ATP を放射線から

守る細胞内機作も持ち合わせていることが考えられる。

大線量 X による照射における CFU の結果に関しては、Fig.2 に *E.coli* と *D.radiodurans* の生存曲線の一部 ( $\sim 3.0 \times 10^5$  R) を示した。ともに照射線量が増すにつれ指数関数的に菌が死滅していることが分かる。しかし *E.coli* は生存曲線の傾きが急であり *D.radiodurans* ではその傾きは緩やかであった。*E.coli* の生存曲線の傾きの大きさは *D.radiodurans* のそれのおよそ十数倍であった。また、*D.radiodurans* は  $6.0 \times 10^5$  R の照射を境にその生存曲線の傾きが緩やかになり死滅が穏やかになっている。それぞれの菌について致死線量は *E.coli* は  $6.0 \sim 12 \times 10^4$  R の照射の間にあり、*D.radiodurans* は  $6.0 \sim 8.7 \times 10^6$  R の間にあった。*D.radiodurans* は *E.coli* の百倍程度の致死線量をもちその理由の一つには *D.radiodurans* の放射線耐性能の高さに起因することが考えられる。照射線量 R を吸収線量 Gy に変換する換算式  $1 \text{ R} \doteq 8.77 \text{ mGy}$  (長沼他 2007) を用いると  $6.0 \sim 8.7 \times 10^6 \text{ R} = 56 \sim 76 \text{ kGy}$  となりこれまで知られている最も高い致死線量 39.6 kGy (*Clostridium botulinum* endospores, Madigan M.T. et al., 2005) より高い値に *D.radiodurans* の致死線量が存在する可能性があることが分かった。これを説明する理由の一つには照射する細胞は乾燥しており液体の水は存在せず X 線による間接的致死作用 (OH ラジカルによる DNA 損傷) はありえず、X 線が直接 DNA 分子に衝突し切断するという直接的致死作用にダメージが限定されているということが考えられる。

しかし、この異常な致死線量を説明するには他にも多くの要因が関係しているであろう。

次に、Fe イオン照射における ATP の残存は Fig.3 のようになった。細胞内 ATP の挙動は大線量 X 線の照射時と同様であった。しかし *D.radiodurans* だけは例外的に細胞内 ATP は照射線量に比例して減少しているようだった。これはやはり *D.radiodurans* 特有の ATP を放射線から守る細胞内機作を予想させるが X 線と Fe イオンで防護のメカニズムが異なっていることが考えられる。

Fe イオンによる CFU の結果については X 線照射時に比べ対照的であった。ここで大腸菌の放射線耐性について *E.coli* X1488 は放射線に関する遺伝子変異株ではないので *E.coli* X1488 と K-12 株の放射線耐性は同じものと考え進めていく。*E.coli* (K-12) と *D.radiodurans* の生存曲線の一部 ( $\sim 500$  Gy) を Fig.4 に示した。まず、50 Gy 程度の照射では *E.coli* と *D.radiodurans* とともに死滅することなく、

それ以上の照射で指数関数的に死滅していた。つまり、Fe イオン照射においては閾値の線量まではその効果が出にくく、それを越えると効果が出やすいということが考えられる。次に致死線量は *D.radiodurans* が 2000 Gy 以上、*E.coli* 株が 100~250 Gy の照射の間にあった。*D.radiodurans* は今回実験に供した菌の中で一番の放射線耐性を示し 2000 Gy の照射でもその生存が確認できたが、50~100 Gy の照射の間に著しく指数関数的に死滅しており、この間の生存曲線の傾きは *E.coli* が *D.radiodurans* の 4 倍で X 線照射時に比べるといかに Fe イオンの照射が *D.radiodurans* に及ぼす影響が大きかったかが伺える。この理由としては、まず Fe イオン照射による間接的致死作用はありえず、次に大線量 X 線照射に比べ Fe イオン粒子線の密度は薄く 50 Gy 程度では直接作用による DNA 切断を始めとするダメージが修復可能な程度であることが考えられる。また、C (炭素) や Fe イオンのような重粒子線 (He より大きい原子核をもつもの) DNA 切断において、それぞれの粒子が持つエネルギーが大きいこと DNA の 2 本鎖を切断する能力が高いことが知られている。これにより 50 Gy 以上の照射では DNA 修復能の高い *D.radiodurans* でさえ修復し難いダメージの蓄積が起り *E.coli* 同様の死滅をしたことが考えられる。

また、Fe イオン照射実験において *Virgibacillus permianicus*、*Virgibacillus salarius* の孢子形成菌にも特異的な放射線耐性が見られたが、割愛させていただく。

今回、X 線 (電磁波) と鉄イオン (粒子線) という線種による照射影響の差及び微生物種における放射線耐性の質的・量的な差が確認できた。より多くの線種及び微生物種を扱っていき比較していくことがこれからの研究課題である。

## 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.

Jaffe A, D'Ari R, Hiraga S (1988) Minicell-forming mutants of *Escherichia coli*: Production of minicells and anucleated rods. *J. Bacteriol.*, **170**, 3094-3101.

Kimura H, Asada R, Masta A, Naganuma T (2003) Distribution of microorganisms in the subsurface of the Manus Basin hydrothermal vent field in Papua New Guinea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 644-648.

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

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.

長沼 毅・伊村 智・岩月輝希・川久保忠通・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・金子竹男・谷内俊範・佐藤康之・小川智也・藪下さやか・林 徹、許 玉福・中井亮佑(2007)

隕石・彗星内ハビタブルゾーンにおける大線量 X線照射の影響評価に関する予察的研究

*Space Utiliz. Res.*, **23**, 406-409.

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/>

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.

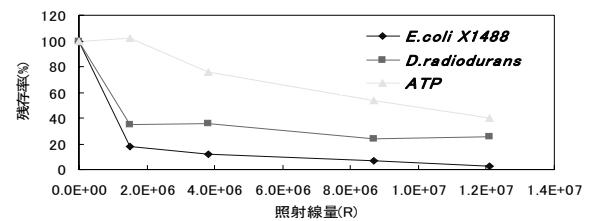


Figure 1. Survival of cellular and non-cellular ATP exposed to high-dose X-ray.

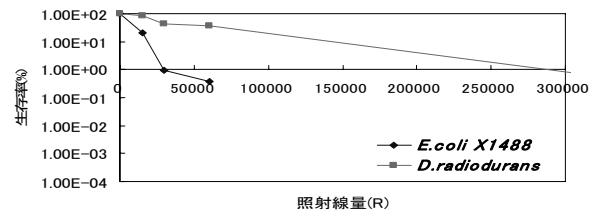


Figure 2. Survival of strains exposed to high-dose of X-ray

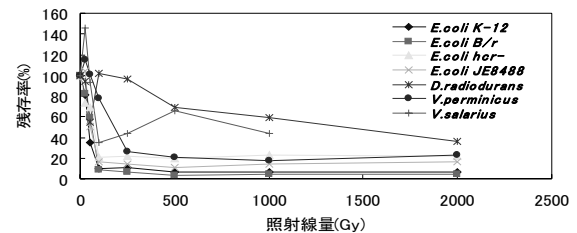


Figure 3. Survival of cellular ATP exposed to Fe ions.

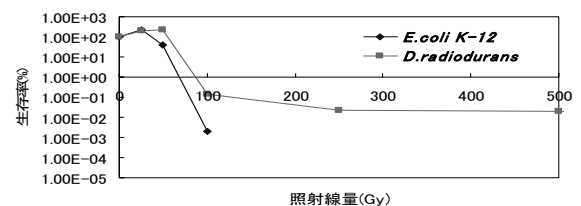


Figure 4. Survival of strains exposed to Fe ions.