

放射線抵抗性細菌を用いた基礎研究とその応用への展開

Basic Research on Radioresistant Bacterium and its Expansion into Application

鳴海一成* 佐藤勝也**

1. はじめに

我々人類は、多少暑い、寒いといっても、地球環境の中でも比較的温和なところで暮らしている。ところが、微生物の中には、生物がとても生息できないだろうと我々が考えている過酷な地球環境でも、平気で生きているものがあり、我々はこれらを極限環境微生物と呼んでいる。極限環境微生物にとってみれば、その環境は過酷でもなんでもなくて、とても居心地の良い環境なのかも知れない。逆に、人間はなんであんなところに好んで住んでいるのだろうかといわれそうである。

どんな生物でも、多かれ少なかれ自然放射線のレベルを超えて、放射線に耐性をもっている。しかしながら実際には、生物の放射線耐性には千倍以上もの違いがある。残念ながら、地球上の生物の中でもヒトは、放射線に特に感受性が高く、10 Gy の放射線を急激に浴びると確実に死に至る。ところが、生物の中でもずば抜けて放射線に強い微生物が知られており、これを放射線抵抗性細菌という。放射線抵抗性細菌が最初に発見されたのは、1956年である。アメリカ・オレゴン州で、牛肉の缶詰を放射線滅菌する試験を農業試験場がおこなった際、照射したはずの缶詰の中で生き残っていた微生物がいたのである。学名を *Deinococcus radiodurans* (strange berry that withstands radiation 「放射線に耐える奇妙な果実」の意) と名付けられたこの細菌 (以下、ラジオデュランスという) (図 1) の放射線耐性は、大腸菌の 100 倍、ヒトの細胞の千倍以上である¹⁾。

この研究は、ラジオデュランスをはじめとする放射線抵抗性細菌の放射線耐性に関わる分子メカニズムを明らかにし、それを人間の生活に役立てようとするものである。

2. 放射線耐性機構の基礎研究

2. 1 DNA2 本鎖切断修復

ラジオデュランスともいえども、放射線を浴びると DNA がズタズタに切断されてしまう。ホスホジエステル結合がつながってできている DNA の骨格が切断されるのである。片方の鎖が切断された DNA は、DNA ポリメラーゼや DNA リガーゼといった DNA 修復酵素の働きで、比較的容易に修復される。しかし、一方の鎖の切断部位の近傍で他方の鎖が切断された場合は、二本鎖切断となり、これは一般的な生物にとって修復が非常に困難な DNA 損傷である。大腸菌は、ゲノム中に数個の二本鎖切断が生じると増殖できなくなる。しかし、ラジオデュランスは、ゲノムに生じた 100 箇所以上の二本鎖切断を、短時間で完全に修復してしまうのである²⁾。



図 1. 放射線抵抗性細菌のコロニー

2. 2 修復遺伝子の同定

今から約 20 年前、当時の日本原子力研究所高崎研究所で、ラジオデュランスのもつ効率良くしかも正確な DNA 二本鎖切断修復の分子メカニズムを解明する研究がスタートした。我々が携わってきたのは、ラジオデュランスから分離された放射線感受性変異株 (遺伝子のどこかに変異が起こったため放射線に弱くなった菌) の原因遺伝子を同定することであった。具体的には、正常株

*生命科学部 生命科学科

**日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門

から抽出したさまざまな DNA 領域の断片を変異株に与えて、変異株を放射線耐性に復帰させることのできる DNA 領域を限定する作業を繰り返し、限定した正常株由来の DNA 領域の塩基配列を変異株のものと比較することで、遺伝子の変異部位を同定した。初期の実験で同定した遺伝子は、RecA, RecN, RecR といった相同組換え修復に関与するタンパク質の遺伝子であった³⁾⁵⁾。しかしながら、大腸菌などの放射線に弱い一般的な細菌でもこのような DNA 修復遺伝子をもっているため、これらの遺伝子の機能だけでラジオデュランスの放射線耐性を説明することは難しいと思われた。

2. 3 新規 DNA 修復遺伝子の発見

同時期に、米国エネルギー省の後押しで米国ゲノム研究所がラジオデュランスのゲノムプロジェクトを開始したが、このプロジェクトの完了には 5 年という年月が費やされた。米国では、冷戦時代の核兵器開発の過程で発生した水銀やトルエンといった毒性物質や難分解性物質の処理に、放射線抵抗性細菌を利用することを計画していたのである。1999 年 11 月にラジオデュランスのゲノムプロジェクトの情報が公開された。しかし、ゲノム解析の結果からだけでは、ラジオデュランスがなぜ放射線に強いのか、その原因を明らかにすることが出来なかった。ラジオデュランスのすべての予想される遺伝子の中の約半数は、機能が推定できない未知の遺伝子であったのである。これらの機能未知遺伝子の中に、放射線耐性に大きく寄与している遺伝子があるのではないかという気運が高まった。

我々は、ラジオデュランスの放射線感受性変異株の原因遺伝子の同定実験を続行したが、変異株の中でも特に放射線感受性の高い変異株の解析に集中することにした。その結果、ラジオデュランスの放射線耐性に重要な新規遺伝子を同定することに成功したのである⁶⁾。同定した遺伝子は、機能未知遺伝子に分類されていたもののひとつであった。この遺伝子の DNA 塩基配列を調べたところ、変異株では正常株と較べてたった 1 箇所が異なっていることが分かった。すなわち、変異株ではひとつの遺伝子のたった 1 箇所の変異によって、放射線耐

性が失われていたのである。

このタンパク質の性質を解明するまでには、かなり多くの時間を要した。なぜなら、このタンパク質のアミノ酸配列は既知のどのタンパク質にも似ておらず、また、ヒントとなるアミノ酸配列上のモチーフもまったくなかったのである。このタンパク質と DNA を試験管内で混合し、いろいろと解析した結果、DNA 鎖が切れた部分を認識して結合することにより、DNA 分解酵素から DNA 鎖の末端を保護するとともに、DNA リガーゼによる DNA 鎖切断の修復を高効率で促進する作用をもつことが分かった。また、このタンパク質は、放射線で生じる DNA 損傷だけではなく、紫外線や DNA 架橋剤で生じる性質の異なる損傷の修復も同様に促進することが分かった。そこで、このタンパク質を「DNA 修復を促進する多面的タンパク質」の英語表記 (pleiotropic protein promoting DNA repair) の頭文字を取って、PprA と命名した。また、PprA タンパク質は放射線を照射した後にラジオデュランスの細胞の中で発現が急激に大量誘導される、いわゆる放射線誘導性タンパク質のひとつであることが分かった。このように、PprA タンパク質の機能解明によって、ラジオデュランスは従来の修復機構とは別の独自の修復機構をもつことが明らかになった。

3. 新規 DNA 修復タンパク質の応用研究

3. 1 高効率 DNA 修復試薬

前述のとおり、放射線による生物効果で最も重篤な損傷は DNA の二本鎖切断であるが、この二本鎖切断の修復反応は、遺伝子操作技術における DNA 断片の結合反応と基本的に同じことである。遺伝子操作技術では、DNA クローニングなどの際に DNA リガーゼが汎用されており、DNA リガーゼを用いたクローニングキットが国内外の試薬メーカーから多数販売されている。ラジオデュランスは二本鎖切断に対する修復能力に優れており、その一端を DNA 鎖切断部位に結合して修復を促進する PprA タンパク質が担っていることが分かったため、我々は PprA タンパク質の DNA 修復促進活性を利用し、DNA リガーゼと組み合わせることで、新しい

DNA 修復試薬が作れるのではないかと考えた。そこで、市販の DNA リガーゼに、様々な濃度の PprA タンパク質を添加してみたところ、一定の濃度域で DNA 連結反応の促進効果が見られた。

出願した特許に基づいて技術提供した国内のバイオ試薬メーカーにおける試験でも同様に良好な結果が得られたため、PprA タンパク質は高効率 DNA 修復試薬として実用化することになり、2005 年 11 月に「TA-Blunt Ligation Kit」(製造：株式会社ニッポンジーン、販売：和光純薬工業株式会社)として全国発売された(図 2)。この製品は、従来品と比較して、修復反応終了時間が約 32 倍短縮され、DNA 修復効率が約 10 倍であるという特徴をもつ。しかも、従来法では結合が難しいとされるタイプの DNA 断片の結合に絶大な威力を発揮する。この修復試薬はバイオ研究に幅広く用いられ、遺伝子加工技術や遺伝子診断技術の高度化に役立つものと期待されている⁷⁾。

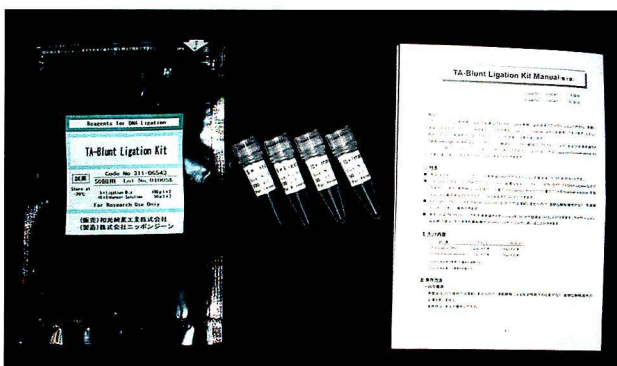


図 2. PprA タンパク質の機能を利用した遺伝子工学用試薬

今後は、PprA タンパク質の安定性の向上を検討したいと考えている。PprA タンパク質を耐熱化することができれば、タンパク質としての安定性を向上でき、遺伝子工学で多用されている PCR 反応に用いる耐熱性 DNA ポリメラーゼとの組み合わせで、遺伝子操作のための新しい技術の開発が可能となる。

3. 2 DNA 鎖切断の検出法

DNA 損傷の中でも特に致死効果の高い損傷である鎖切断の生成頻度、細胞内での分布及びその修復のされ易

さの違いを調べることは、放射線リスク評価の見地から重要であると考えられている。哺乳動物細胞に生じた DNA 鎖切断を検出する方法としては、リン酸化ヒストンである γ -H2X タンパク質や哺乳動物の鎖切断修復に関わるタンパク質に対する抗体を用いて、*in situ* 免疫蛍光染色で検出する方法が知られている。この方法は、DNA 鎖切断の細胞内分布と生成頻度を検出することが可能であるが、内因性の細胞内タンパク質が DNA 鎖切断に反応したり、結合したりするまでに一定の時間が必要であるため、生成した直後の DNA 損傷の検出が困難である。また、コメットアッセイ法は、鎖切断の生成頻度と初期 DNA 損傷を検出することが可能であるが、DNA を電気泳動するために細胞を溶解してしまうので、細胞内分布を検出することができない。

我々は、放射線耐性機構の基礎研究において、ラジオデュランスから見いだした PprA タンパク質の機能解析のために、抗 PprA 抗体を既に作製済みであった。そこで、PprA タンパク質が切断 DNA の末端に結合する能力に着目し、PprA タンパク質と蛍光標識した抗 PprA 抗体を用いて、哺乳動物細胞に生じた鎖切断損傷を *in situ* で効率良く可視化検出する新規の技術の開発を検討した。

その結果、放射線の線量依存的に抗 PprA 抗体由来の蛍光強度が増加することが明らかになり、放射線照射によって哺乳動物細胞の細胞核に生じた鎖切断を効果的に検出することに成功した。また、細胞膜の脆弱化処理を調整することで、呼吸による活性酸素の発生源であるミトコンドリアの DNA に生じた鎖切断も検出することが可能となった(図 3)。このように、PprA タンパク質と抗 PprA 抗体を用いて、従来法の欠点を克服した DNA 鎖切断検出法を開発した。PprA タンパク質は、哺乳動物細胞には存在しないので交差反応がなく、これを用いることで哺乳動物細胞に生成した直後の DNA 損傷の細胞内分布と生成頻度を検出することが可能になった⁸⁾。

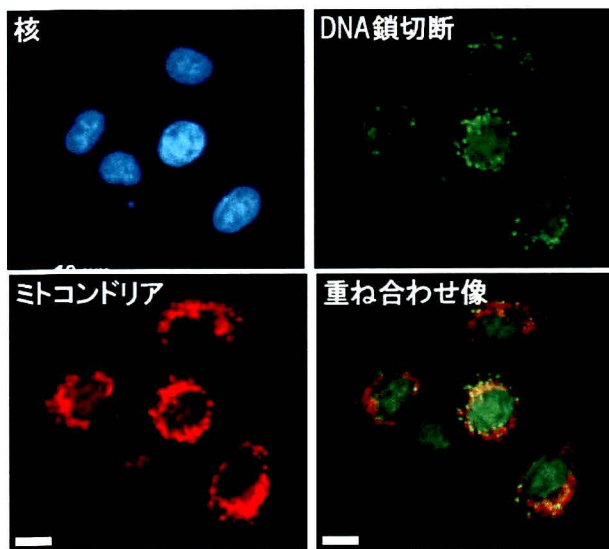


図 3. 哺乳動物細胞のミトコンドリア DNA に生じた鎖切断の検出

この方法の検出感度と結合特異性を更に向上させることで、DNA を損傷する化学物質の遺伝毒性試験をはじめとする環境や医学分野での応用が期待される。また、この方法は、ブレオマイシンなどの DNA に対して鎖切断を引き起こす抗腫瘍性抗生物質の腫瘍細胞に対する効果を評価することにも利用できる。ブレオマイシンと同様に鎖切断を引き起こす作用を有する新規抗腫瘍物質を探索するためにも利用できる。さらに、放射線の線量に対する DNA 切断の依存性を正確に検出することができることから、放射線リスク評価のための DNA 線量計あるいは生物線量計として鎖切断の程度を測定する際にも利用可能であると考えられる。

4. 放射線抵抗性細菌の菌体利用

4. 1 新規遺伝子操作系

ラジオデュランスの発見以来、さまざまな自然環境から *Deinococcus* 属細菌が分離され、現在では 50 種を超える *Deinococcus* 属細菌が報告されている。それらの分離源は、動物の糞、淡水魚、温泉、活性汚泥、高山、砂漠、成層圏の大気、南極の岩石など多種多様である。しかし、放射線抵抗性細菌の放射線耐性機構の研究は、そのほとんどが最初に分離されたラジオデュランスを用いて行われている。*Deinococcus* 属細菌では、遺伝子

操作系が適用できる菌種が限られているという問題点があるからである。最近のトレンドとして、次世代 DNA シークエンサーを用いて、微生物のゲノム解読がごく短期間でできるようになってきた。ゲノム情報が分かると、その情報をもとに、目的とする遺伝子を人為的に破壊したり、DNA を外部から導入したりすることで、遺伝子の機能を調べることができるようになる。しかし、そのためには、外部から導入した DNA をゲノム内の遺伝子と交換したり、人為的に改変した目的遺伝子をプラスミドベクターに挿入して細胞内で発現させたりする分子生物学的解析のツールとしての遺伝子操作系が整っていることが前提となる。

我々は、ラジオデュランスとは別の *Deinococcus* 属細菌である *Deinococcus grandis*(以下、グランディス) で利用できる遺伝子操作系の開発を検討した。グランディスは、東京都日野市に昔あった水産試験場のコイの体表から日本の研究者が分離した細菌で、ラジオデュランスと同様に高い放射線耐性を持つ。また、グランディスは短桿菌であり、球菌であるラジオデュランスとは増殖時の細胞分裂の様式が異なるという特徴を持つ。

開発した遺伝子操作系は、2.5 kb という小型の潜在性プラスミド pUE30 に、薬剤耐性遺伝子カセットと大腸菌プラスミドの複製開始領域を挿入した形のシャトルベクターであり、大腸菌とグランディスの菌体細胞中で安定に自己複製できる。さらに、グランディス細胞内で機能的な外来遺伝子の発現が可能かどうかを明らかにするために、シャトルベクターをベースとして、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドを構築した。その結果、非選択条件下においても、グランディス形質転換株でルシフェラーゼ遺伝子の安定的な発現に成功した(図 4)⁹⁾。

新たに開発した遺伝子操作系は、DNA 修復機構の研究に有用であるのみならず、外来遺伝子を効率良く発現できるため、*Deinococcus* 属細菌と進化的に近縁種の細菌の有用遺伝子発現の宿主として利用できる。また、生物を用いた放射性廃棄物の浄化技術分野への応用も可能である。

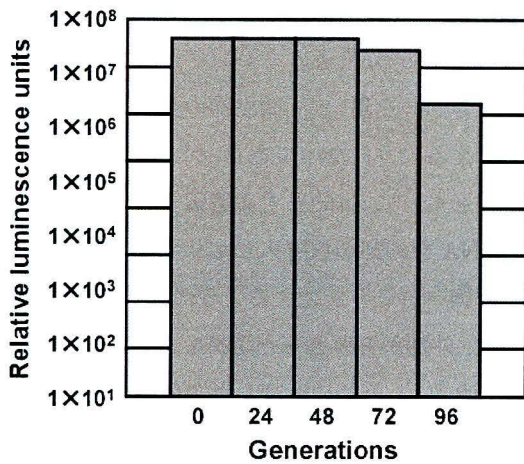


図4. 非選択条件下におけるグランディス形質転換株のルシフェラーゼ活性

4. 2 放射性セシウムの二次濃縮

2011年3月の東北地方太平洋沖地震の影響による東京電力福島第一原子力発電所の事故によって、およそ 1×10^{18} ベクレルもの放射性物質が大気中に放出され、その一部が東北及び関東の広い地域に降下した。表層土や汚泥に含まれる主たる放射性核種はセシウムであり、物理的半減期が長いことから、放射性セシウムの除染がこれから数十年間長期的に対処しなければならない問題となっている。

放射能除去に対する微生物の有効性を検証しようという試みが事故後早くから一部の人々の間で試みられたが、いずれも科学的な検証の域に達しておらず、水からセシウムを吸着できる微生物は土壌からのセシウム除去にも有効な筈という勘違いならまだしも、悪臭を除去する善玉菌だからセシウムもどうにかしてくれる筈といった思い込みや、微生物が放射性物質を分解するなどというまったく理解不能なものまである。

放射性物質の除染の必要性を考えた場合、セシウムは土壌に強く吸着しているので、表層土や汚泥からセシウムを選択的に取り出す技術の確立が急務とされているが、このような技術開発に微生物を直接利用することも現実的ではないと思われる。しかし、大量の放射性廃棄物を別途保管しなければならないことを考えると、土からセシウムを回収する何らかの技術が確立された後、二次的にセシウムを濃縮・回収し、保管する放射性廃棄物

の量をなるべく減らすことが必要となってくる。この二次的なセシウム濃縮に微生物を利用することを、様々な方法の中での選択肢のひとつとして考えることは可能である。

菌体内に放射性セシウムを取り込むと、当然のことながら、微生物は放射線を浴びる。二次濃縮ともなれば、放射線の線量は微生物の致死線量には至らずとも、突然変異を高頻度に誘発することになる。濃縮効率、低コスト、安全性などを勘案すると、*Deinococcus* 属細菌が二次的な放射性セシウム濃縮のための宿主として有望と考えられた。これまでに、放射性セシウム（短半減期のポジトロン放出核種 129 セシウム）を用いて、微生物のセシウム濃縮能を簡便に画像解析する技術を開発した¹⁰⁾。また、微生物のセシウム蓄積能を原子吸光分析で調べ、ラジオデュランスとグランディスが、大腸菌に比べて高い濃度の非放射性セシウムを菌体内に蓄積する能力を持つことを明らかにした（図5）。

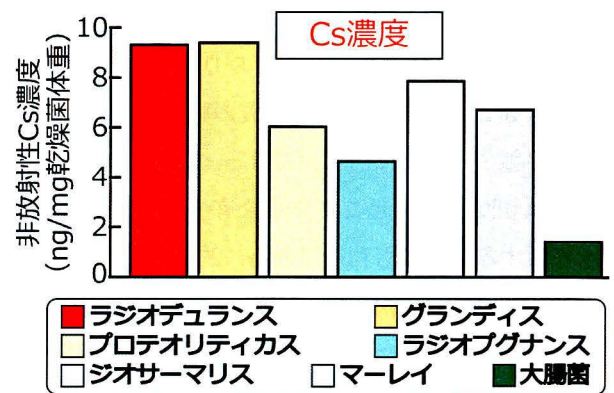


図5. *Deinococcus* 属細菌と大腸菌における非放射性セシウムの蓄積濃度。図中のプロテオリティカス、ラジオブグナンス、ジオサーマリス、マーレイは、ラジオデュランスとグランディス以外に実験に供した *Deinococcus* 属細菌。

現在、この技術と知見をもとに、イオンビーム突然変異育種技術を用いて、セシウム濃縮能の向上した放射線抵抗性細菌の変異体を獲得することを計画している。また、開発済みの遺伝子操作系を有効に活用することで、遺伝子組換え技術を利用することも可能であり、放射性廃棄物の減容化技術の早期確立に向けた研究を進めて

いる。

5. まとめ

残念ながら起こってしまった原子力発電所の事故や医療機関における放射線過照射事故などに接するたびに、日本国民は「放射線」という言葉に対してマイナスのイメージを連想し、不安を感じている。ラジオデュランスのもつ極めて優れた DNA 修復機構の全容を明らかにすることができれば、遺伝子工学分野における DNA 加工技術、医療診断学分野における遺伝子診断技術、薬学分野におけるゲノム創薬開発などの進展に直結する新技術の開発に貢献するであろうと考えられる。また、将来的には、生物への放射線耐性付与、細胞再生治療、ガンや老化の予防といった医学分野への波及効果も期待される。さらに、放射線抵抗性細菌の菌体そのものを活用して、放射性廃棄物の減容化技術を確立し、汚染地域の環境修復と産業復興に貢献できればと考えている。放射線抵抗性細菌の研究を通じて、国民がもつ放射線に対する不安を少しでも払拭できればと思う次第である。

参考文献

- 1) 鳴海一成：放射線抵抗性細菌，「微生物の辞典」（渡邊信，西村和子，内山裕夫，奥田徹，加来久敏，広木幹也 編），pp. 688-691，朝倉書店，東京（2008）。
- 2) Narumi, I.: Unlocking radiation resistance mechanisms: still a long way to go, Trends Microbiol., Vol.11, No.9, pp.422-425 (2003).
- 3) Narumi, I., Satoh, K., Kikuchi, M., Funayama, T., Kitayama, S., Yanagisawa, T., Watanabe, H. and Yamamoto, K.: Molecular analysis of the *Deinococcus radiodurans* *recA* locus and identification of a mutation site in a DNA repair-deficient mutant, *rec30*, Mutat. Res., Vol.435, No.3, pp.233-243 (1999).
- 4) Funayama, T., Narumi, I., Kikuchi, M., Kitayama, S., Watanabe, H. and Yamamoto, K.: Identification and disruption analysis of the *recN* gene in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*, Mutat. Res., Vol.435, No.2, pp.151-161 (1999).
- 5) Kitayama, S., Narumi, I., Kikuchi, M. and Watanabe, H.: Mutation in *recR* gene of *Deinococcus radiodurans* and possible involvement of its product in the repair of DNA interstrand cross-links, Mutat. Res., Vol.461, No.3, pp.179-187 (2000).
- 6) Narumi, I., Satoh, K., Cui, S., Funayama, T., Kitayama, S., and Watanabe, H.: PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation, Mol. Microbiol., Vol.54, No.1, pp.278-285 (2004).
- 7) 鳴海一成：放射線抵抗性細菌のたんぱく質を利用した高効率 DNA 修復試薬の実用化，原子力 eye, Vol. 52, No.6, pp.66-69 (2006).
- 8) Satoh, K., Wada, S., Kikuchi, M., Funayama, T., Narumi, I., and Kobayashi, Y.: Method for detecting DNA strand breaks in mammalian cells using the *Deinococcus radiodurans* PprA protein. Mutat. Res., Vol.596, No.1-2, pp.36-42 (2006).
- 9) Satoh, K., Tu, Z., Ohba, H. and Narumi, I.: Development of versatile shuttle vectors for *Deinococcus grandis*, Plasmid, Vol.62, No.1, pp.1-9 (2009).
- 10) 鳴海一成，野澤樹，佐藤勝也，長谷純宏：イオンビーム育種によるセシウム吸収植物及びセシウム濃縮菌の作出，第7回高崎量子応用研究シンポジウム要旨集，pp.14-15 (2012).