

令和元年6月12日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00538

研究課題名(和文)放射線耐性細菌含有カロテノイドによる生体脂質構造の防護を介した生体防御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the biological defense mechanism through protection of the biological lipid structure by carotenoids contained in radioresistant bacteria

研究代表者

齊藤 毅 (Saito, Takeshi)

京都大学・複合原子力科学研究所・助教

研究者番号：10274143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：線を選択圧とした適応進化により大腸菌が放射線耐性という表現型を獲得することが示された。また、その進化過程において放射線耐性は漸次的に上昇すること、そして進化した放射線耐性大腸菌において多くの遺伝子の発現量が野生型大腸菌のそれと異なっていることが明らかとなった。これらのことより、高い放射線耐性を有する細菌等の生物における生体防御機構の進化には、多くの遺伝子の発現量の変化が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線耐性細菌のような極限環境下でも生存可能な生物の高い外的ストレスに対する卓越した生体防御機構とその進化の詳細を解明することは、全ての生物の環境適応機構とその進化、および生物の多様性を考察する上で極めて有益である。本研究により、高い放射線耐性を有する細菌等の生物における生体防御機構の進化には、特定の遺伝子の変異、発現量の変化だけではなく、多くの遺伝子の発現量の変化が関与していることが示唆された。本研究で得られた知見は、生物の環境適応機構の進化、および生物の多様性を考察する上で有意義なものと言える。

研究成果の概要(英文)：Escherichia coli acquired a radioresistant phenotype by adaptive evolution, wherein gamma-rays constituted the selection pressure. Furthermore, a gradual increase in the radioresistance was noted during the evolution process, and the expression levels of many genes of the evolved radioresistant E. coli differed from those of the wild type E. coli. These results suggest that changes in the expression levels of many genes are involved in evolution of the biological defense mechanism in organisms such as bacteria with high radioresistance.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線耐性細菌 放射線耐性機構 生体防御機構 適応進化 遺伝子発現

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自然界には我々の常識に基づくと大変過酷と考えられるような極限環境下においても生存可能な生物種が存在する。それらの生物の内、ある種の細菌は電離放射線（以下、放射線と記載）に対して極めて高い抵抗性を有していることが知られている。例えば、代表的な放射線耐性細菌 *Deinococcus radiodurans* および *Rubrobacter radiotolerans* の  $D_{10}$ （10%致死線量）はそれぞれ 16 kGy、29 kGy にも達する。このような放射線耐性細菌の放射線に対する卓越した耐性機構は、生物の環境適応機構を研究する上で極めて興味深い対象である。これまでにこれら放射線耐性細菌の DNA 修復活性およびその修復機構、そして DNA、タンパク質、脂質に対する防護機構に関して多くの研究が行われてきたが、その放射線耐性機構には不明な点が多く残っている。このような極限環境下でも生存可能な生物の高い外的ストレスに対する卓越した耐性機構の詳細を解明することは、全ての生物の環境適応機構、およびその多様性を考察する上で極めて有益である。

### 2. 研究の目的

自然界の放射線耐性細菌は進化系統的に広範でランダムな広がりを持って存在している。そして、放射線耐性細菌の多くはその遺伝学的、生化学的特性の解明が進んでおらず、取り扱いも容易でないため、それら細菌を直接実験に用いることには大きな困難が伴う。そこで本研究においては、遺伝学的、生化学的特性の詳細が明らかとなっており取り扱いが容易なモデル生物である大腸菌を、標準的な放射線である  $\gamma$  線を選択圧として適応進化させ、進化した放射線耐性大腸菌を解析し、得られた結果を野生型大腸菌での結果と比較検討することにより、高い放射線耐性を有する細菌、生物の放射線耐性、生体防御の基本的機構を明らかにすること、および関連分子に対する放射線の影響を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

クローニングした大腸菌 K-12 株を対数増殖期まで培養し、培養液を PBS (-) で置換後、細胞懸濁液に適当な複数の線量の  $\gamma$  線を照射した後、大腸菌の生存率をコロニー形成法により評価する。各線量および対応する生存率より大腸菌の  $D_{10}$  線に対する生存曲線を求め、その生存曲線よりその大腸菌の 1% 生存線量を求める。次に、求められた 1% 生存線量の  $\gamma$  線で大腸菌に照射後、生存している大腸菌を増殖させるという選択を行う。さらに、得られた生存大腸菌に対する 1% 生存線量を求め、その線量の  $\gamma$  線による選択操作を繰り返す、という適応進化実験により放射線耐性大腸菌集団を得る。

さらに、野生型大腸菌および適応進化実験によって得られた放射線耐性大腸菌を対数増殖期まで培養し、培養液より遠心分離により細胞を回収する。その後、回収した細胞から RNA を抽出、精製した後、RNA-Seq 法により遺伝子の発現量を解析し、野生型大腸菌および放射線耐性大腸菌間で比較検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 大腸菌の $\gamma$ 線に対する感受性の評価

以下の方法により大腸菌の  $\gamma$  線に対する感受性を評価した。1) クローニングした大腸菌 K-12 株を LB 培地中、37 °C、200 rpm で振盪培養した。2) 初期対数増殖期まで増殖した大腸菌懸濁液 1 mL をプラスチックチューブに分注した。3) 4,000 × g、20 °C、10 分間、遠心分離を行った。4) 上清を除き、チューブに PBS (-) 1 mL を加え大腸菌を懸濁した。5) 大腸菌懸濁液に対し線量率 22 Gy/min、 $20 \pm 3$  s で  $\gamma$  線を照射した。6) 照射大腸菌懸濁液を PBS (-) で適当に希釈後、希釈液を LB アガープレートにプレーティングした。7) プレートを 37 °C で 12 時間インキュベートした後、生成コロニーをカウントし生存曲線を作成した。8) 生存曲線より大腸菌の  $D_{10}$  線に対する  $D_1$ （1% 生存線量）を求め大腸菌の  $\gamma$  線に対する感受性を評価した。

図 1 に得られた生存曲線を示す。その結果、このクローン大腸菌の  $D_1$  は 240 Gy であることが明らかとなった。

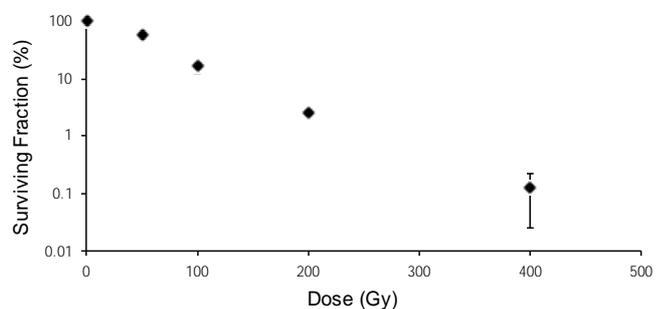


図 1. クローン大腸菌の  $\gamma$  線に対する生存曲線

## (2) 線を選択圧とした適応進化実験による放射線耐性大腸菌の作出

以下の方法により放射線に対して高い耐性を有する大腸菌を作出した。1) 大腸菌を LB 培地中、37 °C、200 rpm で振盪培養した。2) 初期対数増殖期まで増殖した大腸菌懸濁液 1 mL をプラスチックチューブに分注した。3) 4,000 × g、20 °C、10 分間遠心分離を行った。4) 上清を除き、チューブに PBS (-) 1 mL を加え大腸菌を懸濁した。5) 大腸菌懸濁液に対し線量率 22 Gy/min、20 ± 3

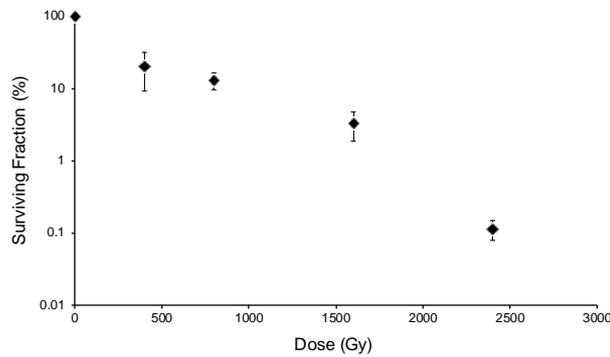


図 2. 20 回の選択サイクル後に得られた大腸菌の線に対する生存曲線

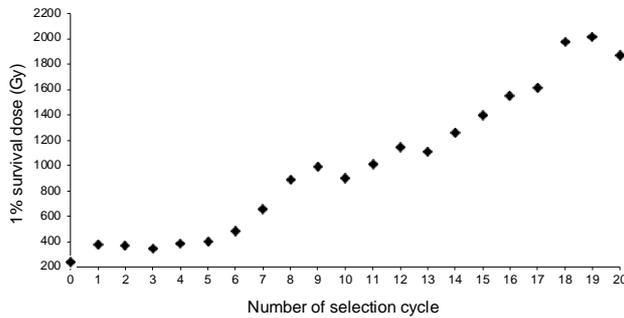


図 3. 選択に伴う大腸菌の線に対する耐性の変化

でその大腸菌の  $D_{10}$  の線を照射した。6) 照射大腸菌懸濁液を 100 mL の LB 培地に加え、37 °C、200 rpm で初期定常期まで振盪培養した。7) 大腸菌培養液のグリセロールフリーズストックを作製すると同時に、得られた大腸菌の線に対する感受性をコロニー形成法により解析した。8) 1—7 の選択操作を 20 回繰り返した。

図 2 に 20 回の選択サイクル後に得られた大腸菌集団の線に対する生存曲線を示す。20 回の選択サイクル後に得られた大腸菌の  $D_{10}$  は 1900 Gy となり、本適応進化実験により大腸菌の線に対する耐性は野生型大腸菌のそれより 7.9 倍上昇した。図 3 に選択に伴う大腸菌の線に対する耐性の変化を示す。このように大腸菌の線に対する耐性は選択回数の増加に伴い漸次的に上昇することが明らかとなった。これらのことより、この耐性の上昇には多数の遺伝子の変異、発現量の変化が関与している可能性が高いことが示された。

## (3) 野生型大腸菌および放射線耐性大腸菌の遺伝子発現解析

本適応進化実験によって得られた大腸菌の線に対する高い耐性には多数の遺伝子の発現量の変化が関与している可能性が示されたため、放射線耐性大腸菌の遺伝子発現量を以下のような方法により解析し、野生型大腸菌のそれと比較した。1) 大腸菌を LB 培地中、37 °C、200 rpm

表 1. 適応進化により発現量が変化した遺伝子

発現量が増加した遺伝子		発現量が減少した遺伝子	
遺伝子	Log2 Fold change	遺伝子	Log2 Fold change
ghoT	14.8	agp	-1.0
yncH	12.7	deoA	-1.1
hyi	4.0	betA	-1.1
ybbW	3.2	betT	-1.1
allB	2.9	yejG	-1.1
yhjX	2.8	fdoG	-1.1
gcl	2.3	bluF	-1.2
sulA	2.0	lldR	-1.3
umuD	1.9	yeaC	-1.4
umuC	1.7	betB	-1.4
gatA	1.7	yeiQ	-1.4
gatB	1.7	sthA	-1.4
gatZ	1.6	alaC	-1.5
gatY	1.5	yjhB	-1.6
friA	1.4	lacZ	-1.7
gatC	1.4	lacY	-1.8
ygjJ	1.4	lacA	-1.8
allA	1.3	garK	-2.0
yafP	1.3	garR	-2.0
agaI	1.3	nanS	-3.5
ybjM	1.3	stfE	-
yrbL	1.2	tfaE	-
yihQ	1.1	yoaG	-
ydjH	1.1		
htrE	1.1		
yfgF	1.1		
sbmC	1.0		

- は発現が検出できなかった遺伝子を示す

で振盪培養した。2) 初期対数増殖期まで増殖した大腸菌懸濁液 20 mL をプラスチックチューブに分注した。3) 4,000 × g、4 °C、10 分間遠心分離を行った。4) 上清を除き、チューブに PBS (-) 10 mL を加え大腸菌を懸濁した。5) 4,000 × g、4 °C、10 分間遠心分離を行った。6) 上清を除き、細胞ペレットを回収した。7) 得られたペレットより total RNA を RNAiso Plus (TaKaRa) により抽出した後、NucleoSpin RNA Clean-up XS (Macherey-Nagel) を用いて精製した。8) 精製 total RNA より Ribo-Zero™ Magnetic Kit (Gram-Negative Bacteria) (illumina) により rRNA を除去した後、TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (illumina) により RNA-Seq 解析用のシーケンスライブラリーを調製した。9) NovaSeq 6000 (illumina) および NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (illumina) を用いて調製シーケンスライブラリーのシーケンスを行った。得られたリード配列は大腸菌 K-12 株 (substr. MG1655) のゲノム配列を用いてマッピングを行い、遺伝子ごとの発現量を算出した。

解析の結果、164 の遺伝子の発現量が野生型大腸菌と放射線耐性大腸菌間で統計的に有意に異なっていた ( $n=3, q < 0.01$ )。表 1 に野生型大腸菌と比較して放射線耐性大腸菌で発現量が 2 倍以上もしくは 0.5 倍以下に変化した遺伝子を示す。ここで、損傷乗り越え複製、損傷乗り越え修復に関与する umuD、umuC、および細胞分裂の制御に関与する sulA はそれぞれ約 4 倍発現

量が上昇していた。また、発現量が変化した遺伝子の多くはトランスポーターを始めとした代謝に関与する遺伝子であった。これらのことより、構造的な損傷乗り換え複製、損傷乗り換え修復活性の向上、および細胞分裂制御や多くの代謝の状態の変化が、本適応進化実験で得られた放射線耐性大腸菌の放射線耐性機構に関与していることが強く示唆された。

#### (4) 総括

本研究により、線を選択圧とした適応進化により大腸菌が放射線耐性という表現型を獲得することが示された。また、その進化過程において放射線耐性は漸次的に上昇すること、そして進化した放射線耐性大腸菌において多くの遺伝子の発現量が野生型大腸菌のそれと異なっていることが明らかとなった。これらのことより、高い放射線耐性を有する細菌等の生物における生体防御機構の進化には、特定の遺伝子の変異、発現量の変化だけでなく、多くの遺伝子の変異、発現量の変化が関与していることが示唆された。本研究で得られた知見は、生物の環境適応機構の進化、およびその多様性を考察する上で有意義なものと言える。

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計9件)

- R. Hashikawa, Y. Fujii, A. Kinomura, T. Saito, A. Okada, T. Wakasugi, and K. Kadono (2019) Radiophotoluminescence phenomenon in copper-doped aluminoborosilicate glass. *Journal of the American Ceramic Society* **102**, 1642–1651. 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1111/jace.16027>
- T. Sasaki, R. Goto, T. Saito, T. Kobayashi, T. Ikuji, and Y. Sugiyama (2018) Gamma-ray irradiation impact of humic substances on apparent formation constants with Cu(II). *J. Nucl. Sci Technol.* **55**, 1299–1308. 査読有  
<https://doi.org/10.1080/00223131.2018.1503573>
- 茶竹 俊行、齊藤 毅、柳澤 泰任 (2018) 生物物理学的手法を用いた納豆菌の研究-納豆菌が産生する生理活性物質と納豆菌の放射線耐性- *放射線生物研究* **53号** pp280–290 査読有
- K. Akamatsu, N. Shikazono, and T. Saito (2017) New method for estimating clustering of DNA lesions induced by physical/chemical mutagens using fluorescence anisotropy. *Analytical Biochemistry* **536**, 78–89. 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2017.08.007>
- 藤井 紀子、金 仁求、齊藤 毅、高田 匠 (2017) 老化、放射線による水晶体タンパク質中のアミノ酸-残基ごとの翻訳後修飾の解析 *放射線生物研究* **52号** pp24–34 査読有
- 柳澤 泰任、太田 さくら、足立 達美、内藤 佐和、須見 洋行、齊藤 毅、茶竹 俊行 (2017) ナットウキナーゼとメナキノン - 7 の構造研究 *テンペ研究会誌* **13号** pp7–13 査読無
- I. Kim, T. Saito, N. Fujii, T. Kanamoto, and N. Fujii (2016) One-shot LC-MS/MS analysis of post-translational modifications including oxidation and deamidation of rat lens  $\alpha$ - and  $\beta$ -crystallins induced by  $\gamma$ -irradiation. *Amino Acids* **48**, 2855–2866. 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00726-016-2324-y>
- I. Kim, T. Saito, N. Fujii, T. Kanamoto, T. Chatake, and N. Fujii (2015) Site specific oxidation of amino acid residues in rat lens  $\gamma$ -crystallin induced by low-dose  $\gamma$ -irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**, 622–628. 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.075>
- K. Akamatsu, N. Shikazono, and T. Saito (2015) Localization estimation of ionizing radiation-induced abasic sites in DNA in the solid state using fluorescence resonance energy transfer. *Radiat. Res.* **183**, 105–113. 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1667/RR13780.1>

##### [学会発表](計18件)

- 齊藤 毅 (2019) 線を選択圧とした適応進化による放射線耐性大腸菌の作出・生命の起原および進化学会 第44回学術講演会
- 高田 雄矢、橋川 凌、木野村 淳、齊藤 毅、若杉 隆、角野 広平 (2019) Cu含有シリカガラスにおけるラジオフィトルミネセンス・第66回応用物理学会春季学術講演会
- 橋川 凌、木野村 淳、齊藤 毅、岡田 有史、若杉 隆、角野 広平 (2018) ガンマ線照射による酸化ガラス中のCuイオンの価数変化挙動・第79回応用物理学会秋季学術講演会
- 橋川 凌、藤井 康浩、木野村 淳、齊藤 毅、岡田 有史、若杉 隆、角野 広平 (2018) Cuドープガラスにおけるラジオフィトルミネセンスの線量応答性とそのメカニズム・第65回応用物理学会学術講演会
- 橋川 凌、藤井 康浩、木野村 淳、齊藤 毅、藪内 敦、岡田 有史、若杉 隆、角野 広平 (2017) Cuドープ酸化ガラスにおけるラジオフィトルミネセンス・第58回ガラスおよびフォトニクス材料討論会

L. Payne, C. Hutson, Y. Takahashi, K. Takamiya, T. Saito, J. Hori, H. Unesaki, and T. Scott (2017) Diamond dose rate detector testing at KURRI- A joint UK-Japan research project – 17126. WM2017 Conference

金 仁求、齊藤 毅、藤井 智彦、金本 尚志、藤井 紀子 (2016) LC-MS/MS による 線照射後のラット水晶体 -、 -クリスタリンの翻訳後修飾の一斉分析 . 第 16 回 日本蛋白質学会

金 仁求、齊藤 毅、藤井 智彦、金本 尚志、藤井 紀子 (2016) 線照射によるラット水晶体 -、 -クリスタリン中の翻訳後修飾の一斉分析 . 第 55 回日本白内障学会・第 42 回水晶体研究会

後藤 涼平、齊藤 毅、小林 大志、佐々木 隆之 (2016) フミン物質の錯生成能へのガンマ線照射影響 . 日本原子力学会

金 仁求、齊藤 毅、藤井 智彦、金本 尚志、藤井 紀子 (2016) 線照射によるラット水晶体 -および -クリスタリンの酸化、脱アミド化および異性化等の翻訳後修飾の一斉分析 . 第 89 回 日本生化学会

藤井 紀子、金 仁求、齊藤 毅、藤井 智彦、金本 尚志 (2016) 線照射によるラット水晶体のクリスタリン中のアミノ酸残基の脱アミド化 . 第 59 回日本放射線影響学会

金 仁求、齊藤 毅、藤井 智彦、金本 尚志、藤井 紀子 (2016) 線照射による -、 - および -クリスタリン中のアミノ酸残基の酸化 . 第 59 回日本放射線影響学会

金 仁求、齊藤 毅、藤井 智彦、金本尚志、茶竹俊行、藤井紀子 (2016) 線照射によるラット水晶体 -および -クリスタリンの酸化、脱アミド化および異性化等の翻訳後修飾の迅速 LC-MS/MS 分析, 生命の起原および進化学会 第 41 回学術講演会

T. Saito and N. Fujii (2015) Effects of Carotenoids on Damage of Biological Lipids Induced by Ionizing Radiation, The 15th International Congress of Radiation Research.

H. Terato, K. Kudo, K. Mori, Y. Tokuyama, H. Tanaka, and T. Saito (2015) Clustered and Isolated Oxidative DNA Damages Induced by Atomic Reactor Neutron Radiations, The 15th International Congress of Radiation Research.

R. Goto, T. Sasaki, T. Kobayashi, T. Saito, M. Saimura, and M. Katahira (2015) Influence of gamma-radiation on the chemical property of natural organic matter, The 6th International Symposium of Advanced Energy Science.

金 仁求、齊藤 毅、藤井智彦、金本尚志、茶竹俊行、藤井紀子 (2015) ラット水晶体タンパク質に対する 線照射の影響解析, 第 54 回 日本白内障学会 第 41 回 水晶体研究会

金 仁求、齊藤 毅、藤井智彦、金本尚志、茶竹俊行、藤井紀子 (2015) ラット水晶体タンパク質に対する 線照射の影響研究, 第 88 回 日本生化学会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

T. Saito (2018) Study of the Radioresistance Mechanisms of Radioresistant Bacteria. KUR Progress Report 2017, 168.

T. Saito and N. Fujii (2017) Damage to Biological Molecules Induced by Ionizing Irradiation and Biological Defense Mechanisms against Ionizing Radiation III. KUR Progress Report 2016, 5.

T. Saito, I Kim, T. Kanamoto, and N. Fujii (2016) Damage to Biological Molecules Induced by

Ionizing Radiation and Biological Defense Mechanisms against Ionizing Radiation II. KUR Progress Report 2015, 18.

T. Saito and N. Fujii (2015) Damage to Biological Molecules Induced by Ionizing Radiation and Biological Defense Mechanisms against Ionizing Radiation I. KUR Progress Report 2014, 46.

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：無し

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：無し

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。