

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K20052

研究課題名（和文）細胞集団における放射線誘発突然変異の頻度分布に関する研究

研究課題名（英文）Study on radiation-induced mutagenesis in a bacterial population

研究代表者

鹿園 直哉（Shikazono, Naoya）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・上席研究員

研究者番号：10354961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：細胞集団が放射線照射されると、その応答は集団内で不均一になると予想されていたが、個々の細胞の生理条件によって突然変異誘発能がどのように変化するかは明らかではなかった。本研究により、生育上のストレスが生じると、突然変異頻度に変化が生じることが明らかになった。さらに、放射線照射により更なる突然変異頻度の増加や突然変異のスペクトルの変化が見られた。一方で、突然変異頻度に大きな変化がない場合もあり、細胞の生理条件や応答が複雑に関与する可能性が示唆された。これらの結果は、周囲の環境によって細胞内の生理条件が変化し、その変化が放射線誘発突然変異に大きく影響することを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の生理条件という新たな研究視点を取り入れて突然変異の全体像に迫った本研究は、細菌の薬剤抵抗性獲得・発がんの初期過程・進化等における突然変異誘発機構の理解のための第一歩であり、学術的意義は高い。特に、放射線誘発突然変異と発がんに関しては、放射線治療における二次発がんの抑制や放射線リスク評価に極めて重要な示唆を与えると考えられるため、将来的に社会的インパクトの極めて大きい成果につながることを期待できる。また、本研究では細胞増殖が速く突然変異研究に向いているモデル生物の大腸菌を用いているが、他の生物種での研究の基盤を築くことができたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Although the response of a cell population to irradiation is expected to be heterogeneous in a cell population, it was not clear how the mutagenic potential is altered by the physiological conditions of individual cells. The present study reveals that growth stress can alter mutation frequency, and that irradiation can further increase mutation frequency and change the spectrum of mutations. On the other hand, in some cases there was no significant change in mutation frequency, suggesting that the physiological conditions and responses of the cells may be intricately involved. These results indicate that the physiological conditions within the cell are altered by the surrounding environment, and that these changes significantly affect radiation-induced mutagenesis.

研究分野：放射線生物学

キーワード：突然変異 ストレス 放射線

### 1. 研究開始当初の背景

放射線誘発突然変異に関しては、様々な生物種において、細胞に生じる一つの突然変異の頻度、種類が調べられ、主に DNA 修復機構の変異抑制のメカニズムについての知見が集積されてきた。これまで研究代表者及び研究分担者も、細胞への放射線照射、さらには化学合成 DNA 損傷を細胞内に導入して突然変異等の細胞応答を調べてきたが、あくまで生理条件が同じ細胞群の平均値を見ていた。これまで得られた知見はある一つの生理条件における細胞集団の平均であり、一つ一つの細胞がほぼ均一であるとみなせるならば、従来の方法で放射線突然変異の本質を理解するには十分である。

しかし、現実的には細胞の DNA 修復活性は細胞集団内で均一ではなくある幅をもって分布している可能性が考えられる。例えば、ストレス誘発性突然変異では、ある一部の細胞群 (subpopulation) が高突然変異 (hypermutable) な状態になるという指摘がある。細胞集団が放射線照射されると、その応答は細胞集団で不均一になると予想されるが、放射線で誘発される突然変異の平均値がどのような分布から得られているのかは不明であり、個々の細胞の生理条件によって突然変異誘発能がどのように変化するかは明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

突然変異が深く関係していると考えられているにもかかわらずそのメカニズムに多くの謎が残る「進化」や「発がん」といった生命の根源的な問題に対しては、新たな研究視点に立って解決の糸口を見出す必要がある。本研究では、細胞集団内での細胞の生理条件によって突然変異の起こりやすさがどのように変化するかに関して系統的な研究を進め、放射線誘発突然変異の全体像の解明を目指すことを目的に研究を行った。細胞集団内の突然変異の起こりやすさの視点は、細胞集団の均一性を仮定する従来の研究にはないものである。subpopulation における突然変異頻度は、細胞集団の平均の誘発突然変異頻度からは想像もつかないレベルの変異の蓄積が生じる、ということが起こりうる。そのため、具体的には、各細胞を様々な条件で成育させ、生じる突然変異に変化が生じるか、さらに、放射線による変異誘発作用が細胞の生育条件によってどのように異なるかを調べることを目指していく。

### 3. 研究の方法

本研究では上述の課題に取り組むため、突然変異が出現するまでの生育条件に着目し、放射線誘発突然変異頻度を調べた。生育条件を変えることから、(1) 生育が早く、(2) 遺伝子欠損株が容易に得られるため関連遺伝子の特定が行いやすい、(3) いくつかの生育条件での測定が容易であるモデル生物である大腸菌を用いた。生育条件として、栄養条件を変えた時の生育、抗生物質存在下での生育、また、細胞毒性物質発現時の生育を調べた。これらの研究は、従来均一な細胞由来の放射線誘発突然変異生成メカニズムに加え、新たな視点に立った細胞集団全体としての作用を包含した放射線突然変異生成メカニズムの理解につながる。

### 4. 研究成果

#### (1) 異なる栄養条件における突然変異誘発

X 線照射後の培養条件によって大腸菌野生株において変異頻度が変化するかどうかを調べた。本研究では、富栄養培地として一般的に用いられる培地の一つである LB 培地を、生存に必要最低限の栄養しか含まない最少培地として一般的に用いられる培地の一つである M9 培地を用いた。培地変異頻度の測定には、*lacZ* 遺伝子のリプレッサーとして働く *lacI* 遺伝子に変異が生じ、炭素源として P-Gal を用いた最少培地上で生育できるようになる変異体の頻度を調べた。変異頻度は X 線照射後 0 時間、2 時間及び 16 時間、LB もしくは M9 培地で培養を行った後に調べた。培養時間によらず変異頻度は線量依存的に増加することから、観察される変異は X 線で生じる DNA 損傷に由来することが確かめられた (図 1)。

富栄養培地で培養を行った場合、照射後 2 時間で変異頻度が格段に高くなり、16 時間培養後は

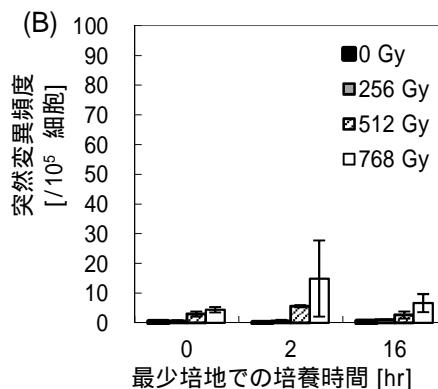
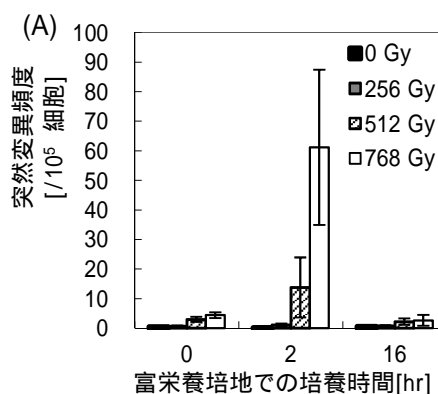


図 1. 大腸菌野生株における突然変異頻度

0 時間培養と同程度の変異頻度になった(図 1 A)。一方、最少培地で培養を行うと、照射後 2 時間の培養で同様に変異頻度が高くなったが、富栄養培地での培養に比べると変異頻度の増加は少ないものであった。図 1 で示された照射後の各培養時間における突然変異頻度の変化が、変異した細胞の増殖速度に起因する可能性について調べるため、富栄養培地で異なる培養時間で生じた変異細胞と非照射細胞の増殖速度を測定した。その結果、突然変異細胞と非照射細胞の間には大きな増殖速度の差は見られず、各培養時間で生じた変異細胞の増殖速度はほぼ一定であることがわかった。これらの結果は、照射後の栄養条件によって変異頻度自体が変化していることを示唆するものである。

変異誘発が照射後の培養条件に依存していることが明らかとなったため、照射後の生存率が変異誘発にどのような影響をもたらしているのかを調べることを目的に、X 線照射後の培養を 0 時間、2 時間行った時の富栄養培地及び最少培地での生存率を測定した。その結果、X 線照射直後の生存率は培地依存性を示し、富栄養培地での培養により生存率が高くなることが明らかとなった。一方で、照射後 2 時間富栄養培地で培養した細胞の生存率を調べたところ、培地依存性が消失することがわかった。また、照射後 2 時間最少培地での培養を行うと、その後富栄養培地で培養を行っても生存率の上昇には繋がらないことがわかった。これらのことから、X 線照射後富栄養培地で培養すると、細胞の生存率は増大する一方で変異頻度も増加することが示唆された。照射後 2 時間の富栄養培地での生育により得られる変異頻度の増大は、X 線照射後に何らかの細胞内応答が誘導されていることを強く示唆する。どのような細胞応答が関与しているのかを調べるため、突然変異生成に関与すると考えられる遺伝子欠損株 (SOS 応答に関与する *lexA* 遺伝子、SOS 応答に加え相同組換えに関与する *recA* 遺伝子、ストレス応答制御に関わる *rpoS* 遺伝子の欠損株) において、X 線照射後富栄養培地及び最少培地で培養後、生存率及び変異頻度を調べた。生存率においては、*lexA* 欠損株、*recA* 欠損株では培地依存性は観察されなかったが、*rpoS* では野生株と同様に培地依存性が観察された。一方で突然変異生成に関しては、*lexA* 欠損株、*recA* 欠損株、*rpoS* 欠損株のいずれの株でも変異頻度の増加は見られなかった。このことから図 1 でみられる放射線によって非常に高頻度で誘発される突然変異は SOS 応答及び RpoS 応答に依存するということがわかった。

本研究で観察された X 線照射後の変異頻度増大の原因として、変異検出に用いた P-gal 最少培地に細胞を播種した後、細胞の状態の違い(SOS 応答の発現と RpoS 応答の発現の有無)によって突然変異頻度が変化するということが考えられる。SOS 応答と RpoS 応答の 2 つが必要な細胞応答として adaptive mutation という機構があり、本研究で見られた栄養条件の違いにより変異頻度が影響される現象も adaptive mutation が関与している可能性がある。本研究の *rpoS* 変異株の結果から、照射後の富栄養培地中で生じる SOS 応答のみでは変異頻度は増大しないことがわかっており、SOS 応答と RpoS 応答がともに発現することが変異頻度増大には必要であることが示唆される。

本研究により、X 線照射後の栄養条件により突然変異頻度が大きく変わる現象を見出した。X 線照射後、SOS 応答の制御下の遺伝子群の発現に加え、P-gal 培地上で RpoS ストレス応答による細胞の epigenetic な変化が生じ、放射線誘発変異の生じやすさにつながった可能性が考えられる。我々の結果は、放射線変異誘発は細胞の栄養条件によって劇的に変化することを示したものである。

## ( 2 ) 抗生物質存在による生育阻害条件下における突然変異頻度

細菌に対する抗生物質は細胞壁合成阻害薬、タンパク質合成阻害薬、核酸合成阻害薬に大別されることが多く、細菌の成育の阻害をもたらす。本研究では、抗生物質により大腸菌の成育を抑制した時に誘発突然変異頻度が影響を受けるかを調べた。抗生物質としては、細胞壁合成阻害薬の一つであるアンピシリンを用いた。

突然変異を調べるためには、細胞を完全には死滅させないアンピシリン濃度を知る必要がある。まず大腸菌を様々な濃度のアンピシリンを含む LB 培地で 24 時間培養し、その後ラクトース最少培地上で生育が可能となる *lacZ* 遺伝子の復帰突然変異の頻度を調べた。実際に検出する突然変異は 11 塩基対の欠失である。アンピシリン処理すると、大腸菌の生存率は、アンピシリンがない場合に比べてアンピシリン濃度が 100 $\mu$ g/ml で  $10^{-4}$  程度、10 $\mu$ g/ml 以下の濃度では生存率はほとんど変化しなかった。アンピシリン濃度 10 $\mu$ g/ml で突然変異頻度を調べたが、アンピシリン処理なしの場合と比べてほとんど違いが見られなかった。アンピシリン処理で突然変異誘発頻度に差は見られなかったが、大腸菌は染色体上に  $\beta$ -lactamase をコードする遺伝子を持ち、アンピシリン処理で  $\beta$ -lactamase 遺伝子を含むゲノム領域を重複して適応するという報告もある。遺伝子重複と突然変異誘発の関係性はよくわかっていないが、大腸菌の生育を阻害する条件下でも突然変異の増加のみを起こす訳ではなく、他の様々な応答を使いこなして適応する可能性が示唆された。

## ( 3 ) 細胞毒性物質発現下における突然変異頻度

枯草菌の *sacB* 遺伝子は levansucrase という酵素をコードする。この酵素はショ糖を加水分解し、高分子のフルクトースポリマーであるレバンを合成する活性を持つ。レバンは細胞膜と外膜との間の空間であるペリプラズムに蓄積し、大腸菌などのグラム陰性菌に対して細胞毒性をもつことが知られている。本研究では、*sacB* 遺伝子を含むプラスミドを大腸菌に形質転換し、シ

ヨ糖存在下で大腸菌を培養し、細胞毒性を生じさせた状態での突然変異誘発能を調べた。まず、ショ糖を含んだ LB 培地で生育するコロニーから *sacB* 遺伝子を含むプラスミドを抽出し、非照射 *sacB* 遺伝子で生じる変異と X 線照射(200Gy)した *sacB* 遺伝子の変異を調べた。突然変異頻度は照射 *sacB* 遺伝子の方が非照射よりも 4 倍程度高かった。続いて、非照射及び照射 *sacB* 遺伝子の変異をシーケンシングで決定し比較した。その結果、非照射 *sacB* 変異体(n=67)のうち点突然変異を生じているものは 10 株、欠失を生じているものは 29 株、DNA 型転移因子(Insertion Sequence Element, IS)の挿入を生じているものは 28 株であった。それに対し、照射 *sacB* 変異体(n=51)では、点突然変異を生じているものは 47 株、欠失を生じているものは 4 株、IS の挿入を生じているものは 0 株であった。これらの結果から、細胞毒性を生じさせた状態での突然変異は X 線照射の有無により大きく異なることが明らかになった。

続いて、*sacB* 遺伝子を含むプラスミドを保有する大腸菌をショ糖存在下で培養し、ゲノム DNA の変異頻度を調べた。観察する変異は、11 塩基対(bp)の欠失によって *lacZ* 遺伝子機能を回復させる復帰突然変異である。大腸菌を、ショ糖を含むもしくは含まない LB 培地で 16 時間培養し、炭素源としてラクトースのみを含む最少培地で生じたコロニーの数を数えることで *lacZ* 遺伝子の復帰突然変異頻度を調べた。その結果、ショ糖が含まれない培地で培養した場合、X 線照射(400Gy)によって突然変異頻度に大きな変化は見られなかった。これは、照射後の LB 培地での 16 時間培養によって生育上不利なゲノム変化を起こした大腸菌が除かれたためだと解釈できる。一方で、ショ糖を含む培地で培養した場合、変異頻度が 3 倍程度増大することが明らかとなった。この結果は、細胞毒性をもたらす生育条件では、変異頻度自体の上昇だけではなく生育上不利なゲノム変化を起こした大腸菌が除かれにくいことに起因するのかもしれない。この放射線による変異頻度上昇に関するメカニズムに関しては不明であるが、今後各種の遺伝子破壊株を用いて関連因子を特定するとともにシングルセルにおける全ゲノムシーケンシングなどでゲノムにどのような変化がどれくらい生じたかを明らかにし、変異生成の特徴やメカニズム解明に向けて研究を進める予定である。

以上、本研究により、生育上のストレスなどにより細胞の生理条件に変化が生じると、突然変異頻度に変化が現れることが明らかになった。さらに、放射線照射により更なる突然変異頻度の増加や突然変異のスペクトルの変化が見られた。一方で、突然変異頻度に大きな変化がない場合もあり、細胞の生理条件や応答が複雑に関与する可能性が示唆された。これらの結果は、放射線突然変異の誘発機構、さらには放射線による発がんメカニズム、及びその抑制に関する新たな示唆を与えるものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakano Toshiaki, Akamatsu Ken, Tsuda Masataka, Tujimoto Ayane, Hirayama Ryoichi, Hiromoto Takeshi, Tamada Taro, Ide Hiroshi, Shikazono Naoya	4. 巻 119
2. 論文標題 Formation of clustered DNA damage in vivo upon irradiation with ionizing radiation: Visualization and analysis with atomic force microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2119132119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2119132119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shikazono Naoya, Akamatsu Ken	4. 巻 10
2. 論文標題 Strand with mutagenic lesion is preferentially used as a template in the region of a bi-stranded clustered DNA damage site in Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66651-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Du Yan, Hase Yoshihiro, Satoh Katsuya, Shikazono Naoya	4. 巻 61
2. 論文標題 Characterization of gamma irradiation-induced mutations in Arabidopsis mutants deficient in non-homologous end joining	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 639 ~ 647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rraa059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shikazono Naoya, Akamatsu Ken	4. 巻 810
2. 論文標題 Mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) is influenced by nearby clustered lesions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 6 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mrfmmm.2018.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 E. Sage and N. Shikazono	4. 巻 107
2. 論文標題 Radiation-induced clustered DNA lesions: repair and mutagenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Free Rad. Med. Biol.	6. 最初と最後の頁 125-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 K. Akamatsu, N. Shikazono, T. Saito	4. 巻 536
2. 論文標題 New method for estimating clustering of DNA lesions induced by physical/chemical mutagens using fluorescence anisotropy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anal. Biochem.	6. 最初と最後の頁 78-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2017.08.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 赤松憲、鹿園直哉、佐藤勝也、齊藤剛
2. 発表標題 細胞模擬条件下で生じた放射線DNA損傷の局在性評価のための蛍光異方性解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野敏彰、赤松憲、津田雅貴、井出博、鹿園直哉
2. 発表標題 電離放射線を照射したTK6細胞におけるゲノムDNA損傷の原子間力顕微鏡(AFM)による直接可視化
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤松憲、鹿園直哉
2. 発表標題 放射線照射したプラスミドDNAに生じたクラスター損傷のFRET分析 乾燥及び細胞模擬条件下での比較
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野敏彰、赤松憲、津田雅貴、井出博、平山亮一、廣本武史、玉田太郎、鹿園直哉
2. 発表標題 放射線照射した細胞に生じるDNA損傷の可視化
3. 学会等名 日本影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鹿園直哉、赤松憲、中野敏彰
2. 発表標題 放射線誘発クラスターDNA損傷の直接観察とその修復
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 DU Yan、長谷純宏、佐藤勝也、鹿園直哉
2. 発表標題 非相同末端結合 (NHEJ) 修復経路を欠損するシロイヌナズナでのガンマ線誘発変異の特徴
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoya Shikazono, Ken Akamatsu
2. 発表標題 Template strand preference for replication at regions surrounding a clustered DNA damage site in Escherichia coli
3. 学会等名 16th International Congress of Radiation Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤松憲、鹿園直哉
2. 発表標題 クラスターDNA損傷形態の線質依存性
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村智、佐藤勝也、長谷純宏、大野豊、鹿園直哉
2. 発表標題 フラボノイド色素をマーカーとした量子ビーム照射当代シロイヌナズナ葉における複数遺伝子の突然変異検出系の開発
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoya Shikazono, Ken Akamatsu
2. 発表標題 Measurement and mutagenic potential of clustered DNA lesions
3. 学会等名 International Workshop on Radiation Damage to DNA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Naoya Shikazono
2. 発表標題 Biological effects of ionizing radiation and clustered DNA damage
3. 学会等名 Radiation biology symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤松憲、鹿園直哉
2. 発表標題 蛍光共鳴エネルギー移動現象を利用したDNA損傷の局在性に関する研究
3. 学会等名 第2回量子生命科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 N. Shikazono and K. Akamatsu
2. 発表標題 Detection and mutagenic potential of clustered DNA lesions
3. 学会等名 17th International Symposium on Microdosimetry (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤松憲、鹿園直哉
2. 発表標題 電離放射線によって生じたDNA損傷の局在性について フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いたアプローチ
3. 学会等名 日本放射線影響学会第60回大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤松憲、鹿園直哉
2. 発表標題 各種DNA損傷因子によって生じたクラスターDNA損傷のキャラクタリゼーション
3. 学会等名 日本放射線影響学会第60回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	酒井 真理  (Sakai Makoto)  (70727338)	群馬大学・重粒子線医学推進機構・助教    (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------