

解説

放射光による生物効果の作用スペクトル： 細菌胞子の研究

宗像 信生

国立がんセンター研究所放射線研究部

Biological Action Spectra Obtained with Synchrotron Radiation : Studies of Bacterial Spores.

Nobuo Munakata

Radiobiology Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo.

Synchrotron radiation is an ideal tool to survey biological effects of monochromatic photons in a vast wavelength range. Bacterial spores have been used as the samples because they tolerate adverse irradiation conditions under extreme vacuum. Sporocidal action spectra have been obtained in the ranges of 0.1-0.6 nm and 50-300 nm. Drastic lethal consequences of photon absorption at the wavelengths corresponding to K-electron edges of phosphorus and calcium atoms have been observed. This demonstrates that the two species of atoms constitute important targets for the inactivation ("atomic target"). DNA base-sequence analyses of mutations induced by the irradiation have been pursued using a newly-developed method of PCR-SSCP analysis. Unique multiple-base changes have been observed with vacuum-UV irradiation and with the soft-X irradiation at the wavelength corresponding to the resonance absorption by phosphorus K-electrons.

1. はじめに

生物は様々な環境要因のもとで生存しているが、多くの場合それらの環境要因は、ある範囲を越えると環境ストレスとして生存にとって有害となる。生物はこれらの環境ストレスによる有害な効果を軽減する様々な手段をもって抵抗しており、これを生物の環境応答系と呼ぶことができる。環境ストレスのうち染色体遺伝子に直接作用

して遺伝子毒性を示すものは特に重要であり、化学変異原物質と放射線が代表的である。化学変異原物質による遺伝子DNAの損傷と修復機構の研究は、特にアルキル化剤について分子生物学研究が進展し細菌細胞のもつユニークな適応応答系が注目されている。放射線については、殺菌灯紫外線(254nm)を利用したDNA損傷と修復の研究が盛んに行なわれてきており、ピリミジン二量体の除

去修復系や細胞の SOS 応答系の解明が進んできた。

一方、これらの遺伝毒性因子のしめす細胞致死効果は、がん治療における化学療法、放射線治療に利用されてきている。特にガンマ線などの電離放射線は、組織透過性が強く正確な線量を付与できることから、新たな線源の開発などの努力が続けられている。

放射光によって新たにカバーされる波長領域は、ガンマ線と紫外線の間の広大な波長領域であり、その生物効果はほとんど未知の領域である。この間隙での生物効果の研究の進展により、放射線によって生成される DNA 損傷の同定と生成機構、損傷修復などの細胞の応答系の解明が進み、放射線の新たな活用分野が開拓されることが期待される。放射光生物学の、より広い見地からの解説としては本誌の前沢¹⁾を、照射技術などについては文献²⁾を、作用スペクトルの取り扱いについては文献³⁾を参照していただくこととし、本稿では、東京大学物性研 SOR-RING と高エネルギー物理学研究所 PF の共同利用施設において筆者らが行なっている、枯草菌胞子の致死と突然変異誘発効果の作用スペクトルの研究にしばって解説したい。

2. 細菌胞子と放射光

細菌胞子といっても馴染みのない読者も多いと思われるが、ある種の単細胞原核生物が示す、自律した生物体として最もコンパクトで頑丈な存在様態である。枯草菌は好気性土壌細菌であり、栄養条件がよければ、桿状の栄養細胞として増殖し続けるが、栄養条件が悪化すると増殖を止めて、胞子形成過程に入る。これは数時間かかる複雑な生化学的、形態的变化であるが、この過程で将来の発芽にそなえて必要な、すべての遺伝情報を含む染色体(ゲノム)と、それ以外の物質を中心部のコアに詰め込み、さらにこれを保護するコルテクス層と細胞壁で囲って胞子が完成する。胞子内ではほとんどの代謝反応がストップしており、細

胞は休眠状態にあり、耐熱性ととも外部からの化学物質にたいしても高い耐性を示す。完成した胞子は、長径約 $1 \mu\text{m}$ 、短径約 $0.7 \mu\text{m}$ の楕円体であり、夾雑物を除いて精製した試料は、栄養源のない状態で永年保存できる。

枯草菌胞子を放射光による照射実験に用いる最大の利点は、このサイズが小さいことと、乾燥のみならず、超高真空中に長時間さらされても生き延びることであろう。筆者も、照射実験を始めるまでは、どこまで真空中に耐えられるか不安であったが、実験に使った菌株では、 10^{-5}Pa の照射チェンバー中に一晩おいても完全に回復することがわかった。ただし、ある種の複雑な遺伝的構成をもつ株には、生残率の著しく低下するものもあり、この耐真空性を決める要因は未解決である。このような条件をみだす生物試料は、細菌の胞子のほかにはまず考えられない。放射線に対しても栄養細胞よりは数倍抵抗性であり相当する線量が必要とされるが、放射光の強度からみて十分実験可能な範囲にある。

また、枯草菌の遺伝的研究は、大腸菌と比べると立ち遅れているが、胞子を作る細菌のなかでは最も研究されており、各放射線に対して感受性を示す突然変異体が分離、解析されてきている。このうち本稿では、野生株(HA101、以後 UVR と呼ぶ)、筆者によって分離された紫外線感受性の胞子を作る二重変異体(TKJ6312 *uvrA10ssp-1*、以後 UVS と呼ぶ) および DNA 組み換え能を欠損した変異体(TKJ6411 *recE4*、以後 RCE と呼ぶ) の3株についての比較を中心とする。UVS の場合は、紫外線によって胞子 DNA 中に生成される胞子光生成物を発芽後に修復する二つの修復系を欠損していることがわかっている。RCE 胞子の欠損する *recE* 遺伝子が、どのような DNA 損傷の修復に関与しているかは、明確ではない。大腸菌の *recA* 遺伝子との相同性から考えると、広範囲の DNA 損傷によって誘発される応答系に関わっている可能性が強い。このような損傷修復に欠陥をもつ細胞を使

い、野生株とその感受性を比較することで、直ちにDNA損傷を同定することは出来ないが、作用スペクトルのどこで損傷の質的な違いが起きているかを推察することができる。

もう一つ孢子が実験材料として有効なのは、粉末を押し潰して薄膜を作り、X線領域での吸収スペクトルの測定に使えることである。この測定により照射線量から孢子の吸収線量への換算が容易に行なえる。

実験試料は水に懸濁した孢子を一定量(2.5 μ l)メンブランフィルター上に滴下して風乾させたものであるが、真空紫外線の波長域によっては、1個の孢子で完全に吸収されてしまう場合があり、重なっている孢子には全く光が当たらなくなるので定量的な解析が不可能になる。これを避けるためには、希薄な溶液を照射野一杯に拡げる必要があり、疎水性の領域で囲まれたガラス板上に滴下している。この場合には、ある程度以上の孢子数を必要とする突然変異誘発実験は困難である。

このように孢子は放射光実験に適合するユニークな性質をもっているが、このユニークさは一面では生物試料としての欠点でもあり、孢子について得られた結果が、どこまで他の細胞について一般化できるかという疑問が付きまとう。その意味では、孢子の系は一つのモデルであり、可能な限り、湿った細胞での実験と対比させて検討することが必要とされるだろう。

3. 致死効果の作用スペクトル

放射線による細胞致死効果は、線量を横軸に、生残率を縦軸にとって線量対生残率曲線によって表される。この曲線が、どのような関数に従うかは、それぞれの場合によって異なるが、最も単純なのは指数関数 ($y = \exp(-kx)$) であり、これは標的理論で、1標的1ヒットの場合に当たる。しかし、このように近似されうる場合は稀であり、普通はもっと複雑な関数が必要とされる。培養細胞の致死効果では、二次式 ($y = ax+bx^2$) がしばし

ば用いられるが、このように二つの係数を必要とする場合は、それぞれについて作用スペクトルが必要となり、直観的な明解さが失われる。また、この曲線の形は、当然照射する放射線の種類、波長によっても異なると考えられるから、さらに困難が生じる。したがって、多少の無理をしてもできるだけ単純な関数に近似するか、または曲線の形にとらわれず、ある一定の効果(例えば10%生残率)を与える線量で比較することが普通である。

細菌孢子の場合は、昔から、指数関数 ($y = a \exp(-kx)$) が成り立つ場合が多いことが知られており、筆者らの放射光の実験でもこれが成り立つことが確かめられた。係数 a は、標的数に当たり生残曲線では、縦軸への接点となるが、この値はほぼ0.8-1.2であり、波長や、孢子の種類によって大きく変動することはないので、無視できる。したがって、失活定数としての係数 k のみを扱えばよい。すなわち k が大きいと、生残曲線の勾配はきつく、放射線の方からみると効力が強く、孢子細胞の方からみると、感受性が高いことになる。つぎの問題は、生残曲線の横軸、すなわち放射線の線量を、どのような単位で表現するかである。横軸としては、できるだけ線量測定の計測値から直接導かれ、かつ理解しやすい単位が望ましい。従来、光生物学では、面積当たりの入射エネルギー (J/m^2) で表した光子フルエンスを用いることが多く、放射線生物学では、標的の重量当たりの吸収エネルギー ($Gy = J/kg$) で表した吸収線量を用いることが一般的であるが、この両者は、異なった概念にもとづいており、簡単に換算するわけにはいかない。

放射光実験において、これをいかに解決するかは、難問であったが、実験を行なっていくうちに、光子数フルエンス ($photons/m^2$) が一次的には、最も適していることがわかってきた。ただし全領域をみるには、エネルギーの違いを考慮してエネルギーフルエンス (J/m^2) で比較している。軟X線領域での線量測定は、電離箱によって、ある

Biological Irradiation System with Synchrotron Radiation

Bacillus subtilis strains

UVR = HA101

UVS = TKJ6312 (*uvrA10 ssp-1*)

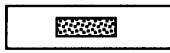
UVP = TKJ6321 (*uvrA10 ssp-1 polA151*)

RCE = TKJ6411 (*recE4*)

RCE = TKJ6411 (*recE4*)

RCE = TKJ6411 (*recE4*)

Irradiation sample

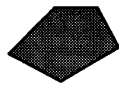


10^5 spores in a 3x5 mm square on a glass plate (UV).



10^6 spores in a 2-mm circle on a membrane filter (X).

Transmission measurement



A thin flake (1.4 mg/ 12.7 mm²) of spores.

| SR Source | Monochromator and Optical Element | | Vacuum in Chamber |
|-----------|-----------------------------------|------------------------|---------------------|
| KEK PF | 0.1 - 0.3 nm | Si (111) crystal | 10 ⁻³ Pa |
| | 0.4 - 0.6 nm | InSb (111) crystal | 10 ⁻⁵ Pa |
| INS SOR | 50 - 150 nm | Modified Wadsworth, Au | 10 ⁻⁵ Pa |
| | 150 - 300 nm | Modified Wadsworth, Al | 10 ⁻³ Pa |

Fig. 1 Summary of biological irradiation systems using synchrotron radiation.

質量の空気を電離する量として照射線量 (C/kg) が得られるが、これからフルエンスへの換算は、空気の吸収係数を用いればよい。孢子試料の場合は、薄膜を作ることができるので、X線領域での吸収を直接測定でき、孢子全体としての吸収線量を求めることができる。吸収線量で一番問題なのは、線量の計算が何を標的とするかの仮定にもとづいていて、線源によって変わることである。例えば孢子コアの吸収線量は、直接測定はできない。

東大物性研のSOR-RINGおよび高エネルギー研のPFでのあしかけ8年にわたる共同利用実験の照射システムの概要を図1に、得られた孢子致死効果の作用スペクトルを図2に示す(文献^{4, 5, 6})。いずれも孢子失活係数を縦軸に、波長を横軸にとり表示してある。50-300nmをSOR-RINGで、0.1-0.6nmをPFでカバーしているが、この間には大きな断層がある。最近になって、超軟X線領域での照射装置ができたので、これを埋めていくめどがたった(図には予備実験の結果が含まれている)。致死効果のもっとも弱い真空紫外線領域はす

でクリアしているので、放射光の全域にわたる致死効果作用スペクトルを得るという目標は達成可能であるという見通しがたった。

この致死効果作用スペクトルの特徴を以下に要約する。

(1) UV (> 220nm) では、どの株においても、270nm付近に感受性のピークがあるが、このピークの大きさは株により、UVSやRCEなどの修復欠損株で著しい。この領域での効果は、従来の紫外線光生物学でよく研究されてきたものであり、DNAを構成する塩基の吸収に始まる化学変化による、光生成物の生成に起因するとされている。細菌孢子の場合、水溶液中での照射では、孢子光生成物(5-thyminy-5,6-dihydrothymine)が、チミンの並んだ配列にでき、これが致死効果の主因であることは、わかっているが^{7, 8}、真空中の照射で同じようなことが起こっているかは、不明である。最近、Lindberg & Horneck⁹らは、真空中では、200-300nmの照射で、この孢子生成物と共に栄養細胞にできるピリミジン二量体もできている

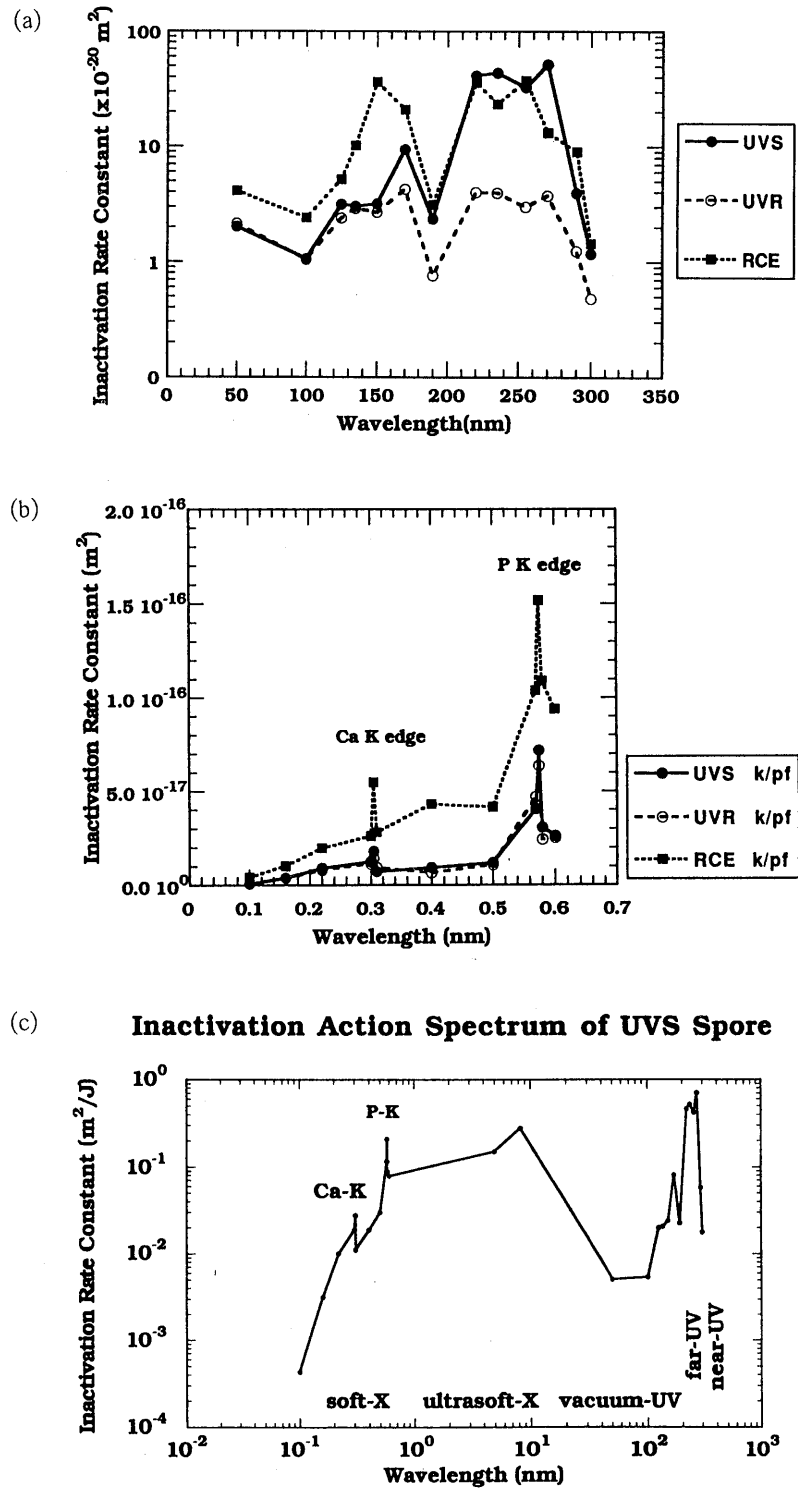


Fig. 2 Inactivation action spectra of three strains of *Bacillus subtilis* spores in the ranges of 50-300 nm (a), 0.1-0.6 nm (b), and 0.1-300 nm (c).

ことを示した。(この光生成物の分析には、アイソトープによる標識が必要であるが、大変残念なことに、標識された試料の照射が法律の規制により、わが国ではできない。)

(2) つぎに波長が短くなった領域には、野生株でも感受性のピークが220nm付近にみられる。このピークは、修復欠損株でもみられるが、野生株との感受性の差は、小さくなっていく。この領域

は、塩基の吸収がみられ、結果として塩基損傷の種類が変動しているものと推察される。

(3) 190nmにおいていずれの株でも感受性の谷があり、これが紫外線と真空紫外線の境界をなしている。短波長側で再び感受性がたかまって、135-175nm近辺に大きなピークを作る。この大きさは、野生株 (UVR) と紫外線修復欠損株 (UVS) では同じようだが、組換え欠損株 (RCE) では著しい。この領域での真空紫外線の効果は、ユニークなものであり、損傷の質的な違いを示唆する。松永ら¹⁰⁾ は、乾燥 DNA 試料の照射により、この波長域で、多量のチミン二量体の生成をみているが、胞子の場合、UVR と UVS の差がみられないことからチミン二量体では説明できない。山田ら¹¹⁾ のチミンフィルムの照射では、チミン二量体、(6-4) 光生成物ともにこの領域での収量はやや減少している。すなわち、現在のところ、この領域での胞子の高感受性を説明する光生成物は同定されていない。

(4) 100nm付近に感受性の谷がみられるが、図の DNA の吸収曲線でもわかるように、この付近の波長では、さまざまな生体構成物質が吸収のピークを作る。すなわち生体に最も吸収されやすい光である。細菌胞子の場合、致死効果は胞子中心部のコアに存在する染色体 DNA の吸収によると考えられるが、ここに到達する以前の、主に蛋白質からなる外層によってほとんど吸収されてしまう。この距離は正確にはもとめられないが、電子顕微鏡による切片写真などからみると、0.1 μm ぐらいと思われる。蛋白質の吸収係数から考えてほぼ 10^{-4} がこれを透過することになり、致死効果などは、ほとんど期待されない。実際の致死効果はこれよりは大きい、これは、外層の距離が一様でないためと考えられる。すなわちこの波長領域は、生体構成物質と光の相互作用が最も強いために、致死効果としては、最も弱いという逆説的状況がなりたつ。

(5) 前述のように、50nm 以短の実験は行なわ

れていないが、最近、PFにおいて超軟 X 線の照射が可能となり、そのうち 5nm 付近での予備実験の結果では、真空紫外線と比較するとはるかに高い効果を示している。これよりやや短い領域に、炭素、窒素、酸素の K 殻吸収端が存在するが、ここの照射は今後の重点課題である。

(6) 次に、PFで実験されている、0.6-0.1nm の領域に入るが、ここでは、全域にわたる効果と、P および Ca の K 殻吸収端における変動が詳細に調べられている。吸収端での効果は、波長として 0.01 nm 以下の分離能が必要とされるが、これは従来の放射線生物学ではまず得られなかったものであり、放射光の利用によって始めて解明されたものである。それぞれの吸収端においては、低エネルギー側と高エネルギー側および共鳴吸収のピークで照射実験がおこなわれた。この結果、いずれの原子の吸収端においても、高エネルギー側で致死効果が強く、ピークにおいてさらに著しく昂進された。これは、胞子試料の吸収変化と並行しており、この二つの原子が、致死効果の標的となっていることを明確に示した。リン原子の K 吸収端における致死効果は、酵母²⁾、細菌³⁾、培養哺乳動物細胞¹⁴⁾ についても見られているが、この効果は胞子の場合がもっとも著しい。これは、真空下の胞子においてリン原子の相対質量がもっとも大きいことを反映している。従来、X 線の生物効果は、生体構成原子の光子吸収による光電効果によるものと仮定されていたが、これを始めて明確に実証したものであり、軟 X 線放射線生物学によって得られた最大の成果の一つであると考えられる。同時に、このような共鳴吸収の効果が、DNA 鎖の構成原子であるリン原子だけでなく、おそらく胞子コア中に存在しているカルシウム原子によっても惹起されることは、K 殻吸収によって導かれる細胞致死過程についての示唆を与えると同時に、共鳴吸収を利用した光子活性化療法の新たな可能性を示す。

さて致死効果の作用スペクトルは、放射線の生

物効果としてはもっとも定量性の高いものであり、放射光効果の全体的把握には、欠かせない。かつ、上述のようなユニークな生物効果の波長依存性を検出することにより、今後の研究の方向を定めるのに必要である。しかし、一方では、細胞死という最終的結果と放射線吸収の事象と結ぶことが、簡単ではない。放射線の場合、致死効果の原因としてDNA上に誘発される何らかの損傷が、重要であると考えられているが、具体的にこれが何であるかを決定することは、おびただしい研究にも拘わらず進展ははかばかしくない。このような損傷と生物効果の関係を、突然変異体の塩基配列変化スペクトルの解析からみる研究について、以下に述べる。

4. 突然変異のスペクトル

電離放射線の突然変異誘発効果は、マラーによるショウジョウバエの古典的な研究以来よく知られており、遺伝子の実体について示唆を与え、分子生物学の誕生のひとつの契機となった。遺伝情報が線型に並んだ4種の塩基の配列によって規定されていることは、バクテリオファージの組換えと突然変異体の解析から解明された。

突然変異は、ランダムに起こるといわれている。ここでいうランダムネスは漠然とは、細胞に突然変異を誘発させるとき、特定の遺伝子にだけ突然変異を起こさせることはできないことや、生じる突然変異は生存に不利なことも、有利なことも、中立なことがあり、どれかだけを選択することはできないことなどを、意味している。一つの遺伝子に注目しても、ある特定の部位に突然変異を誘発させることは不可能である。かつDNA上に生じる変化には、塩基対変換、挿入、削除、再編成などがあり、特定の変化のみを起こさせることは、出来ない。一方、これらの変化が全くランダムだとしたら、どんな変異源を用いても、結果は同じことになり、突然変異のスペクトルという考えは、成り立たない。

Miller¹⁹による、おもに紫外線による大腸菌の*lac*遺伝子突然変異の解析により、塩基配列変化のパターンにある種の法則性があり、誘発突然変異の多くが、DNA上に誘発される塩基損傷がもととなって、複製時の誤対合によって生じることが、わかってきた。この種の研究では、同一塩基配列であっても、遺伝子内の位置により、多くの突然変異が誘発されたりされなかったりする著しい偏りが見られる。これらの、ホットスポットとコールドスポットが生じるには、さまざまな原因が考えられる。ひとつには注目する遺伝子の規定する遺伝子産物、すなわち蛋白質またはRNAの機能からの制約であり、もうひとつには配列のコンテキストによる効果である。後者は、配列の前後関係によるDNA損傷の生じやすさ、修復系の働きやすさ、さらに複製系の誤りやすさなどの、複雑な細胞応答系がからんでいる。突然変異スペクトルの研究は、いくつかの遺伝的解析のしやすい系で行われてきているが、一つの系での結論を一般化することは、困難であり、さまざまな生物系での結果から重点を抽出していく作業が必要である。

従来、研究系が限定されていたのは、技術的な理由によるところが大きい。DNAの塩基配列の決定には、プラスミドへのクローニングが必要であった。大量な突然変異体を分離してそれぞれの変異体から注目している遺伝子をクローニングするのは大変な作業である。近年ポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅法が開発されることによって、これらの技術は革新されることになった。この方法を用いれば、調べようとする遺伝子部分のDNAを大量に増幅させることができる。これにともなって増幅したDNAの塩基配列を容易に決定する技術も開発されてきた。ただし塩基配列の決定は、普通200bp程度が最適なので、問題はどの遺伝子部分を調べたらよいか、という点にある。この突然変異における塩基配列変化の位置を決める方法として国立がんセンター研究所の林らによって開発されたのが、SSCP (Single Strand Conformation

Polymorphism) 解析法である^{16, 17)}。これは、塩基配列変化を含む単鎖 DNA が、高次構造の変化を反映して、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で異なった泳動度を示すことを利用して、どの DNA 断片上に突然変異が存在しているかを定めるものである。

筆者らは、枯草菌のアルキル化剤に対する適応的応答を支配する *ada* 遺伝子の解析において、6 株の突然変異株の位置を、この方法を用いて決め、塩基配列変化を同定することに成功した¹⁸⁾。この経験から、さらにこの方法を拡張して、突然変異の位置のみならず、泳動パターンの比較から突然変異を分類し、既知のものかどうか、既知のものだとしたらどのような塩基配列変化に対応しているかを決定することに使い、多数の突然変異体の塩基配列決定のプロセスを、簡便、迅速、確実にこなうことができるのではないかと考えた。

ただし、このようなアプローチが可能なのは、有効な表現型の選択が可能であって、塩基配列のすでに解明された遺伝子でなければならない。枯草菌では、可能な系はいくつかに限られるが、われわれは、このうちナリジキシン酸抵抗性突然変異を分離して、DNA ジャイレース遺伝子について調べることにした。図 3 に突然変異誘発実験系の概略を示す。枯草菌のナリジキシン酸抵抗性突然変異株については、塩基配列変化を調べた研究はなかったが、大腸菌の変異株の塩基配列変化については、いくつかの報告があり、数個の突然変異が *gyrA* 遺伝子の 5 末端側に集中して見いだされている。この領域は蛋白質上でのアミノ末端部分であり、DNA の切断と再結合の活性中心であるチロシン残基の近傍にあり、枯草菌と大腸菌の配列はきわめて似かよっている。したがって、まず手始めに、この領域を含む DNA 断片について調べた。驚

Mutagenesis Studies with *B. subtilis* Spores

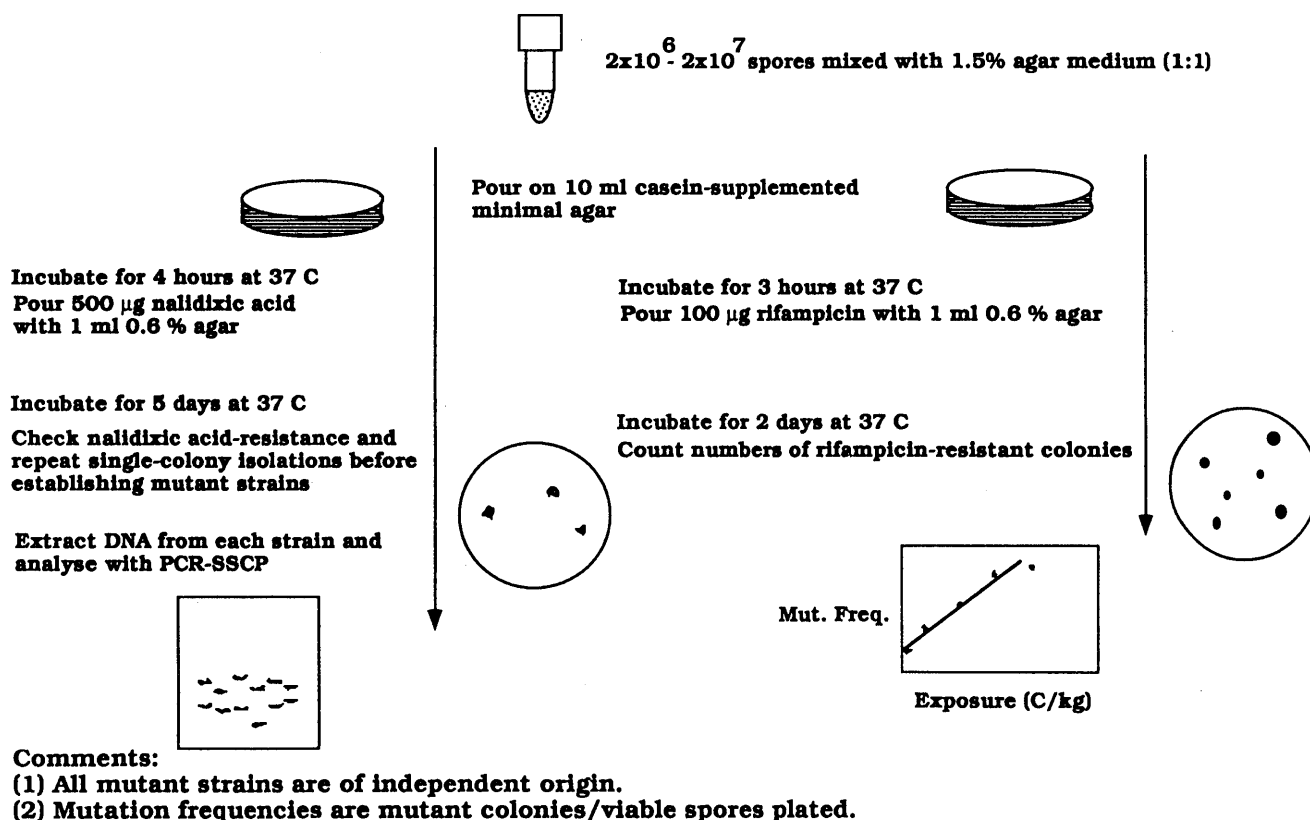


Fig. 3 Protocols of mutagenesis studies using *Bacillus subtilis* spores.

いたことに数十の突然変異株のDNAはすべて野生株とは異なった泳動パターンを示した。初期の実験では、これらの突然変異体は7-8タイプに区別され、それぞれユニークな塩基配列変化をもつことがわかったが、その後、放射光によって誘発された突然変異株の解析を進める過程で、さらに新たなタイプが発見され、現在迄に約450株の突然変異体の同定から13タイプがみつまっている。この13タイプのすべてを、1枚のゲル上の1レーンのパターンから判別するため、ゲルの泳動条件についてのさまざまな検討が必要であったが、ほぼ満足のいく結果が得られている。

これらの13タイプの突然変異株のDNAの塩基配列変化は、図4に示すように、8タイプが一塩基置換、4タイプが連続した二塩基置換、1タイプは連続した三塩基置換であった。一塩基置換に比べるとはるかに稀にしか起こらぬはずの、二塩基置換がこれだけ見つまっていることは、一塩基置換

で得られうる突然変異はほぼ全てが含まれていると考えてよさそうである。すなわち、ナリジキシン酸抵抗性を与える *gyrA* 遺伝子の突然変異のうち、一塩基置換で起こりうる変化は、全て見いだされたものと考えている。

さてこれらの13タイプの塩基配列変化がどのように分布しているかをみるのが、次の目的であるが、今のところ様々な処理によって得られるタイプの識別を目標にしているため、一つのカテゴリーごとのデータがそろっているわけではない。いくつかの特徴的波長での解析が始まったところであり、今後さらに数をふやして確認していかなければならない。表1および図5に現状をまとめた。これらの結果から、放射光による枯草菌孢子に誘発される突然変異体のDNA塩基配列変化について、以下のような特徴が認められる。

(1) タイプ1とタイプ2は、ともにGC対からAT対へのトランジション型塩基置換であるが、自

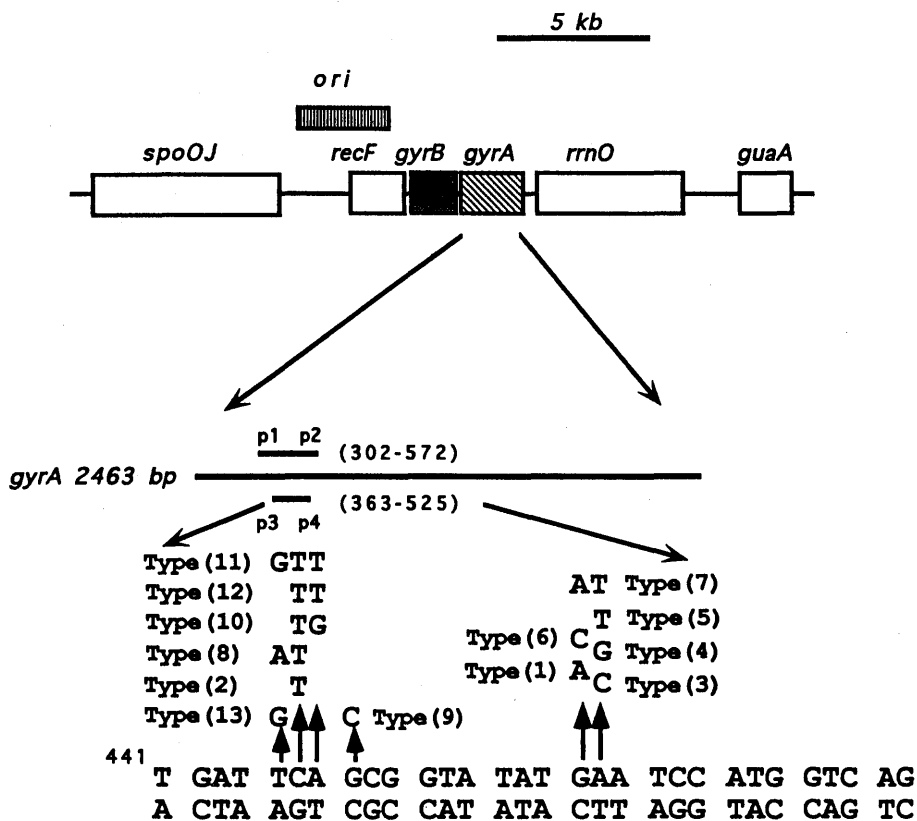


Fig. 4 Map of *gyrA* gene and 13 types of sequence changes observed among nalidixic acid resistant mutants.

Table 1 Classification of *gyrA* mutations obtained by the irradiation with various types of radiation.

PCR-SSCP Analysis of *B. subtilis gyrA* Mutations

| Strain | Treatment | Mutation Type | | | | | | | | | | | | | Total |
|-----------|-----------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|----------|--------|----------|------------|----------|--------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | |
| UVS spore | Spontan. | 10 | 10 | 1 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 27 |
| | γ | 16 | 12 | 2 | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 38 | |
| | UV | 2 | 12 | 1 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | |
| | SR | 8 | 18 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 15 | 47 | |
| UVR spore | Spontan. | 4 | 4 | 1 | 9 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | |
| | γ | 5 | 10 | 2 | 6 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 | |
| | UV | 7 | 5 | 3 | 11 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 28 | |
| | Sun | 19 | 23 | 1 | 5 | 8 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 59 | |
| | SR | 8 | 12 | 4 | 5 | 8 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 7 | 46 | |
| | PF | 26 | 29 | 6 | 12 | 7 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 9 | 99 | |
| | | 457 | 446 | 458 | 458 | 458 | 457 | 457 | 445 | 448 | 446 | 445 | 446 | 445 | |
| | | G to A | C to T | A to C | A to G | A to T | G to C | GA to AT | TC to AT | G to C | CA to TG | TCA to GTT | CT to TT | T to G | |

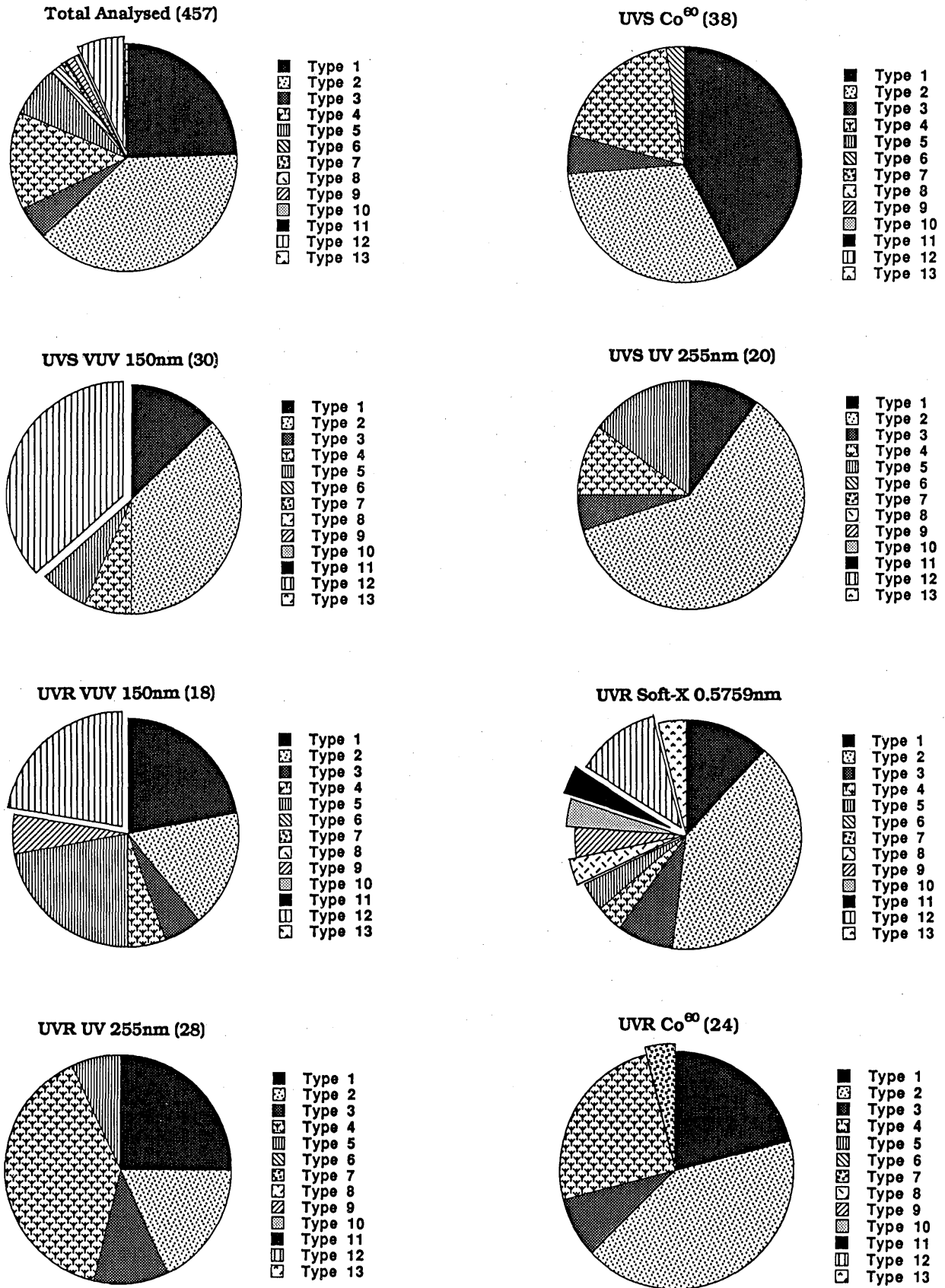


Fig. 5 Distributions of 13 types of *gyrA* mutations among nalidixic acid resistant mutants obtained by the irradiation with gamma-ray, UV(255 nm), vacuum-UV(150 nm), and soft-X(0.5759 nm)radiations.

然突然変異体および各種放射線によるもので最も頻繁に見られ、これは放射光についても同様である。ただし全体における割合では、放射光の、特に真空紫外線 (150nm) 照射群では小さくなっている。これは後述するように、この群では、タイプ12などが多いことによる。GC対からAT対への置換は、さまざまな突然変異検出系でもよくみられており、この変化の原因についてもさまざまに議論されている。最もはっきりしているのは、アルキル化剤によるグアニンの修飾体 (O^6 -alkyl-guanine) による誤対合複製によるものであるが、このような修飾は放射線においてはみられない。自然突然変異の原因として考えられるのは、シトシンの脱アミノ化によってウラシルが生じ、複製時においてアデニンが取り込まれることによる変化である。すべての細胞には、DNA中にできたウラシルを除去するウラシルDNAグリコシラーゼが大量に存在しているが、なんらかの理由でこの酵素が働かないとこの種の突然変異の原因となりうる。シトシンがメチル化されて5-メチルシトシンとなっていると脱アミノ化によりチミンになってしまうのでアデニンへの塩基置換の原因になりうる。また活性酸素の関与により生成される8-ヒドロキシグアニンも誤対合の原因となる¹⁹⁾。またシトシンから生成される5,6-ジヒドロキシー5,6-ジヒドロウラシルも原因となるといわれている²⁰⁾。これらは、水溶液中での電離放射線照射によって、生成されることが知られている。一方、紫外線照射によって生成されるピリミジン二量体のうち、最も突然変異誘発に深く関与すると考えられているのは、5'-TC-3'の配列に生じるもので、この複製時にアデニンが取り込まれて、GC対からAT対への置換を起こすものである^{21, 22)}。実際、この実験でみられているタイプ1とタイプ2は、いずれもこのような配列で起こっている。紫外線照射によって孢子DNAのTC配列に生成された光生成物によってこの突然変異は説明される。このように、タイプ1と2は、さまざまな理由

でおこりうるので、原因となるDNA損傷を特定するには不適當であるが、この二つのタイプがDNA鎖上逆向きの配列において生じているので、突然変異誘発のDNA鎖特異性をみる上で興味深い。

(2) タイプ3, 4, 5は同一の塩基対 (458AT) が、三種の塩基対へと置換しているものである。全体としてみると、GC対へのトランジションであるタイプ4が多く、TA対へのタイプ5がこれに次ぎ、CGへのタイプ3は最も少ない。この配列は、5'-TTC-3'の中央のチミンに当たり、紫外線照射によって、これらの置換が起こることは、他の系でも知られている。ガンマ線照射の場合は、UVS, UVRともにタイプ5が、全くみられないが、放射光では、どの波長でもみられている。ガンマ線照射された大腸菌プロフェージの突然変異の系でもCG対への変異は稀である²³⁾。

(3) タイプ6と9とは、共に、GC対から、CG対へのトランスバージョンであるが、いずれの場合でもこの頻度は極めて低い。タイプ6は、タイプ1と同一の塩基対が、トランスバージョンを起こしているが、頻度は約5%にしかならない。タイプ9は、3株とも放射光照射されたものから見つかったが、これが特異的なものかどうかは判定できない。またタイプ13は、TA対からGC対へのトランスバージョンであるが、極めて稀で、唯一株リン原子の共鳴吸収波長で起こっている。これらの置換の対象となる配列は、放射光照射以外の処理では、きわめて損傷を受けにくいようにみえる。

(4) 以上の8タイプは、すべて一塩基対の置換であるが、このほかのタイプは、連続する二個または三個の塩基が、同時に置換しているものである。全体で約10%をしめているが、これらのほとんどが、放射光の照射によるものである。このうちタイプ7は、457GCがATに変わっており、これは反対側の鎖上で、5'-TTC-3'が、TATに変わったものである。この他の連続置換は、すべて445 5'-TCA-3'でおきていて、中央のシトシンが、

チミンへと変化している。すなわち、タイプ8がATAへ、タイプ10がTTGへ、タイプ11がGTTへ、タイプ12がTTTへの変化である。現在迄、みつまっている37株の連続多重置換のうち、ガンマ線および太陽光照射による2株を除いたすべてが、放射光照射によるものであり、このうち特に多いタイプ12が31株を占める。特に、UVS胞子を真空紫外線(150nm)で照射して得られた突然変異株では、タイプ12がタイプ2と比肩して、最も頻度の高いグループを形成している。この理由は、今後の重要な研究課題であるが、真空中での胞子DNAのユニークな高次構造が関係しているのではないかと考えている。さらに、タイプ11は、連続三塩基置換であるが、リン内殻電子の共鳴吸収波長の照射によって得られた。このような変化は従来全く記載されていない性質のものである。この波長ではさらに、タイプ8, 10, 12がみつかり、共鳴吸収波長で様々な塩基置換が生じることが、ここで起こるDNA損傷のユニークな性質が示唆される。吸収端の長短波長側でも、これらの連続塩基置換の分布に違いがみられるが、これが統計的に有意であるかどうかは、分析数を増やさないとはっきりしない。他の実験系では、紫外線照射によって、5'-CC-3'がTTに変化することが知られており、この変化は紫外線特異的とされている。この変化は、筆者の系ではおそらく対応する配列が存在しないため、みられていない。

以上がこの系での塩基変化スペクトルの現況である。この系がユニークな点は、塩基置換による配列変化が極めて限られた配列上に起こり、その種類も極めて限定されていることである。これは、たやすく多数の突然変異株を解析できるという点で有利であるが、放射光でおきるすべてのDNA配列変化を列挙するというような目的には不向きである。たとえば塩基挿入や、欠落が全くみられないのは、このような変化を*gyrA*遺伝子内に起こしたものはすべて死んでしまい、突然変異体としては分離されないためである。またこの遺伝

子を含む大きな配列再構成は検出できない。このような目的のためには別の系を構築する必要がある。また胞子は、きわめて特殊な細胞であり、ここでの結論は一般化するのが難しい。他の細胞では、真空中の照射が不可能であることを考えると、乾燥したDNAを用いて照射し、適当な細胞に入れて、突然変異を分離することも試みる価値がある。突然変異スペクトルの研究は、今後の放射光生物学の大きな課題であると考えられる。

5. おわりに

本稿では、枯草菌胞子に材料をしぼって、放射光照射によって得られる生物効果の作用スペクトルについて概説した。筆者は幸い多くの方々の協力をえて、多年にわたって放射光の実験を続け、リンとカルシウムのK殻電子吸収端での感受性の変化や、放射光誘発突然変異のユニークな塩基配列変化などの知見を得ることができた。実験生物者としての最も大きな喜びは、未知の領域に挑んで、予想外の結果をえて驚くことであろう。残された波長域には、さらなる驚きが待っていることを期待したい。

文献

- 1) 前沢博, 放射光 1巻3号15頁(1988).
- 2) Hieda, K. and T. Ito, In Handbook on Synchrotron Radiation, 4, 431 (1991).
- 3) 伊藤隆, 「フォトバイオロジー(松本, 松平, 篠原編)」205頁(1989).
- 4) Munakata, N., K. Hieda, K. Kobayashi, A. Ito and T. Ito, Photochem. Photobiol., 44, 385 (1986).
- 5) Munakata, N., M. Saito and K. Hieda, Photochem. Photobiol., 54, 761 (1991).
- 6) Munakata, N., K. Hieda, N. Usami, A. Yokoya and K. Kobayashi, Radiat. Res. (in press).
- 7) Varghese, A. J., Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 484 (1970).

- 8) Munakata, N. and C. S. Rupert, *J. Bacteriol.*, 111, 192 (1972).
- 9) Lindberg, C. and G. Horneck, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 11, 69 (1991).
- 10) Matsunaga, T., K. Hieda and O. Nikaido, *Photochem. Photobiol.*, 54, 403 (1991).
- 11) Yamada, H. and K. Hieda, *Photochem. Photobiol.*, 55, 541 (1992).
- 12) Kobayashi, K., K. Hieda, H. Maezawa, Y. Furusawa, M. Suzuki and T. Ito, *Int. J. Radiat. Biol.*, 59, 643 (1991).
- 13) Maezawa, H., Y. Furusawa, K. Hieda, K. Kobayashi, T. Mori, K. Suzuki and T. Ito, *Photon Factory Activity Report*, 6, 90 (1988).
- 14) Watanabe M., M. Suzuki, K. Watanabe, K. Suzuki, N. Usami, A. Yokoya and K. Kobayashi, *Int. J. Radiat. Biol.*, 61, 161 (1992).
- 15) Miller, J. H., *J. Mol. Biol.* 182, 45 (1985).
- 16) Orita, M., Y. Suzuki, T. Sekiya and K. Hayashi, *Genomics*, 5, 874 (1989).
- 17) Hayashi, K., *PCR Methods and Applications*, 1, 34 (1991).
- 18) Morohoshi, F., K. Hayashi and N. Munakata, *J. Bacteriol.*, 173, 7834 (1991).
- 19) Shibutani, S., M. Takeshita and A. Grollman, *Nature*, 349, 431 (1991).
- 20) Ayaki, H., K. Higo and O. Yamamoto, *Nucleic Acids Res.*, 14, 5013 (1986).
- 21) Brash, D. E., S. Seetharam, K. H. Kraemer, M. M. Seidman and A. Bredberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3792 (1987).
- 22) Armstrong, J. D. and B. A. Kunz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9005 (1990).
- 23) Tindall, K. R., J. Stein and F. Hutchinson, *Genetics*, 118, 551 (1988).

きいワード

ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction)

特定の配列をもつ数百塩基対の DNA 分子断片を選択的に試験管内で増幅させる方法で、1985年に Cetus 社の K. Mullis らによって開発された。従来の、プラズミドへのクローニングを必要とする煩雑な方法に代わって、遺伝子研究に革命的变化をもたらした。増幅したい二重鎖 DNA の両端と相補的な約 20 塩基の合成オリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして用い、鋳型となる DNA を熱変性させた後、プライマー分子とアニールさせ、耐熱性 DNA ポリメラーゼで伸長合成させる。これを n 回 (普通は数十回) 繰り返すことによって、このプライマーで囲まれた部分の DNA 分子のみが、 2^n 個に増幅される。

DNA ジャイレース (DNA Gyrase)

DNA 分子のトポロジカルな高次構造を変化させる酵素群を DNA トポイソメラーゼという。このうち、細菌に見いだされ、弛緩した環状 DNA に負の超らせんを入れる酵素を DNA ジャイレースと呼ぶ。これは、AB 二つのサブユニットからなる四量体で、対称構造をもち、A サブユニットのチロシン残基が反応の活性中心にあり、切断された DNA 鎖と一過的なリン酸結合をつくって固定し、も一つ別の二重鎖の DNA 分子を、この切断部分を通過させることによって反応が進行する。B サブユニットは、ATP を分解して反応のエネルギーを供給する。