

# 刺激因子との相互作用解析により 生命と物質の境界領域における 現象を探る



刺激因子との相互作用解析による

生命応答ダイナミックスの解明グループ

大 貫 敏 彦

## 1. はじめに

生命らしさとは何か。我々人間にとって命題の一つである。生命の基本単位は細胞であろうということは容易に結論できる。すなわち、細胞レベルでは生命らしさが現れる。では、細胞を構成するたんぱく質(酵素など)・核酸(遺伝子など)・脂質(生体膜など)・糖質などの階層では生命らしさは現れるであろうか。さらに、生体分子を形成する原子あるいは分子レベル(階層)ではどうであろうか。大きな疑問である。

細胞では生命らしさがどのような場合に発現するであろうか。最も顕著なのは、外部からの刺激を与えた場合であろう。生命は外部刺激に対して時として熱力学的に安定とならない応答を行うことで恒常性(ホメオスタシス)を保っている。外的な刺激因子は、まず生体分子と相互作用(受容)する。受容された刺激は細胞内の特定の情報伝達経路を活性化(伝達)する。細胞は受容により生じた変化に対応した応答を示す。生命応答は受容、伝達、応答に関わる一連の化学反応がお互いに正・負のフィードバックをかけあう複雑で自律的に制御されるダイナミックスとして捉えられる。ダイナミックスを解明することは、まさに“生命活動”の証であり生命と物質とを隔てる複雑な現象を解明することである。われわれは、生体分子レベル及び細胞レベルにおける刺激との相互作用を解析することにより、物質としての性質を明らかにするとともに、生命らしさが加わった現象を解明したい。

刺激因子としては、放射線、紫外線、アクチノイド、CuやCdなどの重金属、オキシダントや変異誘発剤な

どの毒性化学物質、乾燥、過度の高温・低温、過度の高浸透圧・低浸透圧などが考えられる。ここでは、原子力に深く関わる刺激因子であるアクチノイドや放射線を対象とする。これら刺激ストレスは、化学的及び放射線による毒性とそれらの相乗効果が考えられるため、毒性化学物質、Cu、Cdなどの重金属とは異なる生命応答を誘導する可能性があり、新たな生命応答系の発見にも繋がるものと考えられる。

## 2. 生体分子階層でのダイナミックス解明

生体分子としては、アクチノイドの受容に関わる細胞表面の糖鎖、タンパク質など、及び放射線により損傷されるDNAと修復に関わるタンパク質を対象とする。

微生物の細胞表面の生体分子はカルボキシル基などの官能基を有している。尾崎らは、クロレラへのEu(III)の吸着の経時変化を調べた結果、Eu(III)の吸着量は数分から数十分後に最大値に達するが、さらに、反応時間が経過すると吸着量が減少することを明らかにした[1]。溶液中の炭素濃度の経時変化から、クロレラ細胞が溶液中に溢分泌物を排出したためであることを明らかにした。細胞表面に吸着したEu(III)の一部が溢分泌物と錯生成したために、細胞表面から脱離し、さらに再吸着が阻害されたと考えられる。無機あるいは有機配位子を有する吸着材(物質)への陽イオンの吸着では一定時間が経過すると平衡に達する。微生物の細胞表面では物質への吸着現象とは異なる生物的效果が現れることを示す一例である。

細胞表面は水溶液中と同じ化学的な条件ではなく特殊な反応場となることが期待される。一例として図1に酵母細胞におけるウラニルリン酸塩鉱物の成長を紹介する[2]。ウラン溶液中にはリンは添加していないため、ウラニルリン酸塩鉱物が成長するはずがない。それにもかかわらず、細胞表面から針状の鉱物が成長している。さらに、細胞の中にも鉱物が生じている。一方、同じ写真に示す別の細胞には顕著な鉱物は観察されないものの、密度が高い部分が細胞表面（黒い矢印）及び液胞内（白い矢印）に観察される。リンは微生物には必須元素であるため、細胞内に蓄積されている。ウランが細胞表面に濃集し、例えば黒い矢印部分で細胞内に蓄積したリンと反応して、膜タンパク質がテンプレートとなり結晶が成長したと考えられる。

細胞表面を構成する生体物質は種類が多く構造は複雑である。上記のような微生物の細胞を用いて細胞を構成する生体分子レベルの情報を得る方法の対比として生体分子から模擬細胞表面を形成し、単純な系を用いて相互作用を調べることが考えられる。ナノサイエ

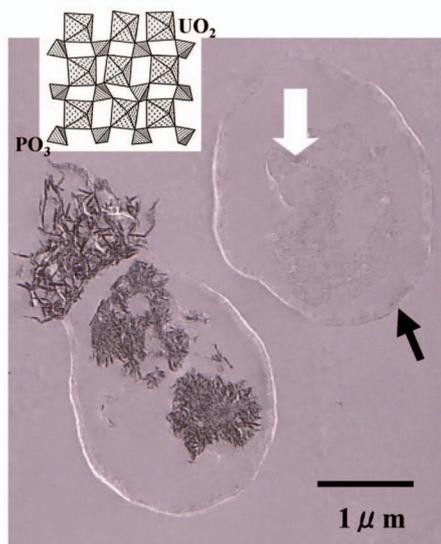


図1 ウラン水溶液中に添加し96時間接触させた酵母の透過電子顕微鏡写真。左の細胞では細胞表面及び細胞内に針状に成長しているのがウラニルリン酸塩鉱物（結晶構造を左上に示す）。右の細胞でははっきりとした鉱物は観察されないが、細胞表面（黒矢印）及び液胞表面（白矢印）に密度が高い部分が観察され、ウラン鉱物の成長点と考えられる。

ンスにおけるボトムアップ的な発想である。近年、金薄膜上にアルカンチオールなどの有機単分子層を自己組織化させる技術が確立された。官能基の異なる有機単分子を用いることによりアクチノイドの細胞表面官能基への受容機構の解明に適用できると期待している。さらに、有機単分子上に酸化還元に関与するタンパク質を付加させることができれば、細胞表面でタンパク質（酵素）が関与していると考えられているウラン(VI)のウラン(IV)への還元機構の解明に繋がると考えている。

放射線とDNAとの相互作用の解析では、生体分子レベルでの難修復性DNA損傷機構の解明を目指す。これまで、線エネルギー付与(LET)が小さい放射線である $\gamma$ 線照射により修復酵素であるNth等により認識されるDNA塩基の損傷を含むクラスター損傷が、水和レベルの増大とともに増加することを示した[3]。放射線のエネルギー付与構造の指標であるLETとDNA損傷との関係を明らかにすることは放射線影響の評価のためには重要である。そこでLET可変の放射線源としてTIARAにおける重イオンビームを用いて、水和させたスーパーコイル形状をしたプラスミド(pUC18)中に誘発される一本鎖切断(SSB)及び塩基除去修復酵素で除去される塩基損傷を測定する手法を確立した。Heイオンビームを用いて行った実験結果から、LETが大きくなるに従い、塩基除去修復酵素で認識・除去され得る塩基損傷の収率が大きく減少することを明らかにした[4]。この結果は、より高いLETの放射線はプラスミド1分子あたりのDNA損傷を増大させることを示すとともに、より空間的に密集した損傷の集合であるクラスターDNA損傷収率の増加を示唆している。イオン種をNe、Cなどに変えて高LETの放射線による損傷収率を求めることにより、LETとDNA損傷との関係を明らかにできると考えている。

一方、DNAの損傷過程を明らかにするためには、損傷に至る過程で生成するラジカルや解離イオンなどの反応中間体を観測する必要がある。SPring-8の軟X線ビームラインに設置した電子常磁性共鳴(EPR)装置[5]や四重極質量分析(QMS)装置[6]を用いることにより、照射しながら反応中間体の“その場”測定が可能になった。これにより、放射光のエネルギーを変えながら、DNAを構成するユニット分子(塩基や糖)中

の特定元素の内殻光吸収によるラジカルやイオンの取量を得ることができるようになった。今後は、短鎖DNAであるヌクレオチドなどを試料として用いて、ラジカルの寿命測定及び中性脱離種の質量測定から損傷生成の物理化学的過程を明らかにして行く予定である。

### 3. 細胞階層でのダイナミクス解明

ウランなどのアクチノイドは生物に対して刺激因子となるであろうか。我々は、酵母をモデル微生物として研究を進めている。図2はウランを含む培地で培養した酵母の培養曲線である[7]。ウランの添加により、酵母の培養速度が小さくなり、1mMのウランを含む培地中では酵母はほとんど増殖しない。この結果はウランが酵母の増殖を阻害する刺激因子として作用していることを示している。同様の実験を24種の酵母について行った結果、*Hansenula anomala* J224株がウランに対して最も耐性があることが分かった。酵母では1遺伝子欠損株(約5000株)が入手可能である。これらの株を用いてウランの培養への影響を調べる実験を行い、遺伝子産物(mRNAや発現タンパク質)の分析を進めることから、アクチノイドを刺激因子とした応答

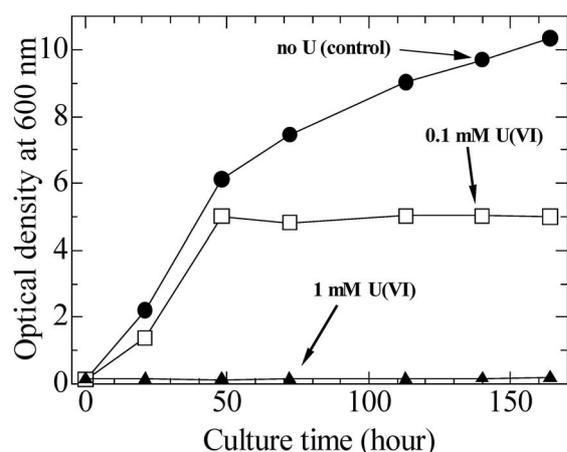


図2 ウランを含む培地で培養した酵母の成長曲線。ウランが培地に存在することにより酵母の成長が遅くなり、ウラン濃度1mMでは150時間経過しても成長しない。ウランが成長阻害として作用することを示している。

機構を明らかにしたいと考えている。

一方、クラスター損傷に対する細胞内での修復機構及び突然変異誘発機構については大腸菌を用いて検討する。人工的に作製された8-oxo グアニン (8-oxoG) とジヒドロチミン (DHT) の対を含むクラスター損傷を含むオリゴヌクレオチドをpUC18プラスミドDNAをベクターとして大腸菌に導入する技術(図3)を確立した[8]。クラスター損傷が大腸菌内で修復されずに残るとその部位が点変異となる可能性が高くなるため、制限酵素で切断できなくなる。この性質を利用し、8-oxoGあるいはDHTだけを単独で導入した場合についての修復度を比較することにより、クラスター損傷の難修復性が評価できる。さらに、野生株及び修復酵素欠損変異株を用いることにより、様々な修復酵素がクラスター損傷から受ける活性阻害の割合についても解明できるものと期待している。

### 参考文献

- [1] T. Ozaki, T. Kimura, T. Ohnuki, Z. Yoshida, A. J. Francis, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**, 2800-2805(2003).
- [2] T. Ohnuki, et al., *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **69**, 5307-5316(2005).
- [3] A. Yokoya, S.M.T. Cunniffe and P. O'Neill, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8859-8866(2002).
- [4] A. Urushibara, N. Shikazono, R. Watanabe, K. Fujii, P. O'Neill, A. Yokoya, 14th Int. Symposium on Microdosimetry, (2005).
- [5] A. Yokoya, K. Akamatsu and K. Fujii, *Nucl. Instr. Meth. B* **199**, 366-369(2003).
- [6] K. Fujii, K. Akamatsu and A. Yokoya, *Radiat. Res.* **161**, 435-441(2004).
- [7] F. Sakamoto, T. Ohnuki, N. Kozai, E. Wakai, T. Fujii, H. Iefuji, A. J. Francis, *J. Nuclear Radiochemical Science*, **6**, 99-101(2005).
- [8] N. Shikazono, C. Pearson, J. Thacker, P. O'Neill, 14th Int. Symposium on Microdosimetry, (2005).

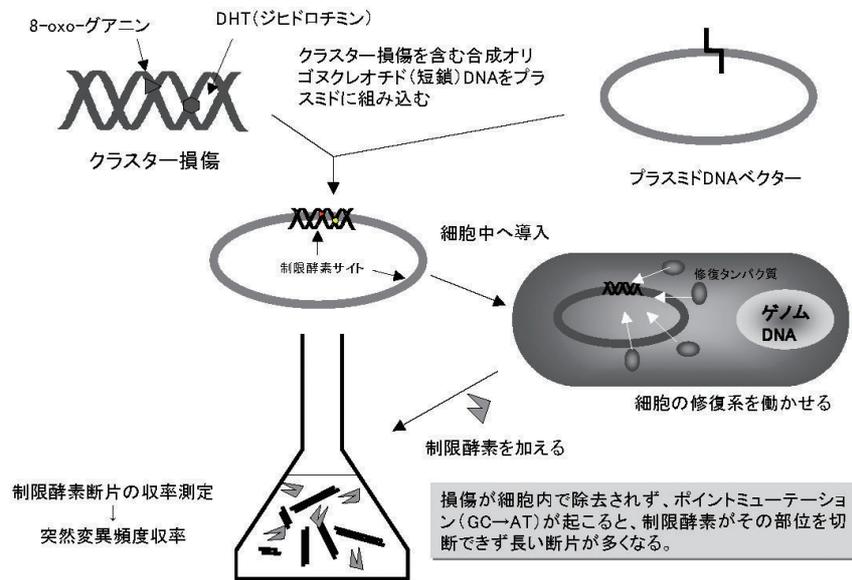


図3 大腸菌へクラスターDNA損傷を導入し突然変異率を測定する実験方法。クラスター損傷を含む合成オリゴヌクレオチドDNAをプラスミドに組み込み、クラスター損傷を含むプラスミドを作成する。このプラスミドを大腸菌修復欠損株などに組み込み修復度を明らかにする実験を行うとともに、修復酵素とクラスター損傷を含むプラスミドを試験管内で反応させる実験により、突然変異の誘発機構を明らかにする。