

## 9 7 2 6 高度好塩性細菌の遺伝子防御機構に関する研究

助成研究者：井出 博 (広島大学 理学部)  
共同研究者：寺東 宏明 (広島大学 理学部)  
齋藤 剛 (広島大学 アイソトープ 総合センター)

好塩性細菌は、高い好塩性（最適食塩濃度 0.2-5 M）を示す古細菌であり、その発酵作用は味噌や醤油などの製造に古くから利用されてきた。当研究グループでは、特に高い塩濃度を好む高度好塩性細菌（*Halobacterium*）が天然には塩湖や塩田に生息するため、好塩性のほか強い紫外線耐性をあわせて有することに着目し、高塩濃度という特殊な環境下における遺伝情報維持機構に関する研究を行っている。*Halobacterium salinarium*は高濃度の塩環境による浸透圧に対処するため、細胞内に約5 Mのカリウムイオンと3.3 Mの塩素イオンを蓄積している。本研究では、環境中の種々のDNA損傷因子に対する*H. salinarium*の耐性とDNA損傷発生に対する細胞内無機イオンの影響について検討した。

*H. salinarium*を $\gamma$ -線、紫外線照射あるいは過酸化水素処理し、生存率曲線を*E. coli* B/rと比較した。その結果、*E. coli* B/rに比べ*H. salinarium*はこれらの傷害性因子に対して4-20倍の耐性があることが明らかとなった。また、抗酸化作用をもつカロテノイド膜色素（バクテリオルベリン）を欠損した*H. salinarium* 突然変異株も*E. coli* B/rに比べ2-4倍程度の耐性を示した。これらの結果から、*H. salinarium*の放射線や紫外線耐性には、バクテリオルベリンが関与しない機構が存在することが示唆された。その機構を明らかにするために、放射線によるDNA鎖切断および紫外線によるピリミジンダイマー生成に対する高濃度のKClの影響について検討した。高濃度のKCl存在下でDNAを $\gamma$ -線照射しアガロース電気泳動で分析した結果、DNA鎖切断量は無添加に比べ約1/50に減少することが明らかとなった。また、KClとNaClでは前者の方が高い鎖切断抑制効果を示した。同様に、紫外線照射したDNAの分析結果から、ピリミジンダイマー生成量もKCl添加により約1/2に減少することが明らかとなった。DNA鎖切断やピリミジンダイマーは細胞にとって致死効果をもつ。したがって、*H. salinarium*の細胞内に存在する高濃度のKClは、程度は異なるがDNA鎖切断、ピリミジンダイマー生成のいずれをも抑制し、本細菌の放射線や紫外線耐性に寄与している可能性がある。

生物には、遺伝情報を高度に維持していくための様々な機構が存在する。本研究で明らかにされた非酵素的な遺伝子防御機構は好塩性細菌において重要な役割を果たしていると考えられる。



## 9726 高度好塩性細菌の遺伝子防御機構に関する研究

助成研究者：井出 博 (広島大学 理学部)  
 共同研究者：寺東 宏明 (広島大学 理学部)  
 齋藤 剛 (広島大学 アイソトープ 総合センター)

## 1. 研究目的

通常の生物が生息できないような環境にも多くの微生物が存在し、これらは極限微生物 (extremophiles) とよばれる。たとえば、深海や温泉の熱水噴出口に生息する好熱菌・超好熱菌、アルカリ性のソーダ湖に生息する好アルカリ性菌、酸性の硫黄泉にすむ好酸性菌、南極海など低温を好む好冷菌、塩濃度が異常に高い湖にすむ好塩菌などが知られている (1)。極限微生物は過酷な環境下でも細胞構造を保持し、さらに増殖することができる。極限微生物が過酷な環境下でも生息できる大きな理由の1つは、このような環境下で十分に機能する酵素群をもつことである。たとえば、好熱菌由来の耐熱性DNA複製酵素は熱水中で最も活性が高く、現代の医学・生物学の研究あるいはDNA鑑定に不可欠な Polymerase Chain Reaction (PCR) に応用されている。さらにPCRの実用化は、極限微生物のもつ特殊な酵素の探索と応用研究に拍車をかけた。極限微生物が過酷な環境下でも生息できる理由の1つは確かにその環境に適応した酵素群をもつことであるが、これらの酵素をコードするDNAの構造、さらに、その遺伝情報がこのような過酷な条件下でどのような機構で正確に維持されているかはほとんど明らかにされていない。好熱菌や好酸性菌のすむ条件下では、DNAの脱塩基反応が速やかに起こり、DNAに含まれる遺伝情報は失われてしまう (2)。しかし、実際には好熱菌や好酸性菌はこのような環境下でも十分に生息することができる。

当研究グループでは、極限環境下に生息する微生物の遺伝情報維持機構に興味をもち研究を進めてきた。本研究では、その一環として極めて高い塩濃度環境に生息する高度好塩性細菌 (*Halobacterium*) の遺伝情報維持機構について検討した。好塩性細菌は増殖の至適塩濃度 (NaCl) により、低度 (0.2-0.5 M)、中度 (0.5-2.5 M)、高度 (2.5-5.2 M) に分類される (3)。*Halobacterium salinarium* は高度好塩性細菌に属し、高濃度の塩を細胞内に蓄積し、高濃度の塩環境によるイオンと浸透圧ストレスに対処している (Table 1)。塩素イオンとマグネシウムイオン濃度は細胞内外でほぼ同じであるが、ナトリウムイオンとカリウムイオンの濃度は細胞の内側と外側で逆転しており、細胞内カリウムイオン濃度は5Mにも達する (4)。*H. salinarium* のもう1つの特徴は、天然には塩湖や塩田に生息するため太陽光からの強い紫外線を受けていることである。紫外線は染色体DNAにピリミジンダイマーを形成するほか、間接的に種々の活性酸素を発生させDNA障害を与える (1, 5)。ピリミジンダイマーや活性酸素由来のDNA障害は強い致死効果を示すことが知られている。したがって、*H. salinarium* の細胞内に高濃度に含まれる塩が環境因子に由来するDNA損

傷発生にどのような影響を与えるかは、極限環境下に生息する微生物の遺伝情報維持機構を明らかにする上で極めて興味深い問題である。本研究では、以上のような観点から *H. salinarium* の DNA 損傷因子に対する耐性とその分子機構について検討した。

**Table 1** Concentrations of specific ions in medium and *H. salinarium* cells (4).

Ions	Medium (M)	Cell (M)
Na <sup>+</sup>	3.30	0.80
K <sup>+</sup>	0.05	5.30
Mg <sup>2+</sup>	0.13	0.12
Cl <sup>-</sup>	3.30	3.30

## 2. 研究方法

### 2.1. 生存率

*H. salinarium* および *E. coli* B/r はそれぞれ complex medium (CM) および Luria Bertani (LB) 培地中 37°C で培養した (6)。種々の DNA 損傷因子に対する生存率を調べるために、集菌した対数増殖期の細胞をリン酸緩衝液 (67 mM, pH 6.8) に懸濁し (*H. salinarium* の場合は 20% NaCl をさらに添加)、過酸化水素処理、<sup>60</sup>Co γ 線照射、紫外線照射を行った。これを CM (*H. salinarium*) あるいは LB (*E. coli* B/r) アガープレートに播種し、37°C でインキュベート後コロニー数を計測した。

### 2.2. DNA 鎖切断に対する塩の影響

DNA 鎖切断に対する塩の影響は、子牛胸腺 DNA (40 μg/ml)、NaCl または KCl (2 M) を含むリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.0) に <sup>60</sup>Co γ 線を照射して検討した。照射試料は、透析による脱塩後、中性 (DNA 二重鎖切断) およびアルカリ性 (DNA 一重鎖切断) 条件下 0.7% アガロース電気泳動により分析した (7)。同様にプラスミド pDEL19 (10 μg/ml) を γ 線照射し、type I から type II への転化量に基づき一重鎖切断量を求めた。試料は 0.8% 中性アガロース電気泳動により分離し、FASII システムを用いて type I および II を定量した。

### 2.3. ピリミジンダイマー形成に対する塩の影響

プラスミド pDEL19 (10 μg/ml)、リン酸 (10 mM, pH 7.0)、KCl (2 M) を含む試料溶液を紫外線ランプ (254 nm) で照射した。透析脱塩後、照射試料 (pDEL19 DNA 50 ng) を T4 エンドヌクレアーゼ V (6 ng) と 37°C で 30 分間インキュベートし、紫外線照射によ

り生じたピリミジンダイマー部位にニックを導入した。T4 エンドヌクレアーゼ V 処理後の type I および II プラスミド DNA の定量は 2.2 と同様に行った。

## 2.4. CD スペクトル

対数増殖期後期の *H. salinarium* を集菌し、Marmur 法により染色体 DNA を抽出した。抽出した染色体 DNA を KCl (0.1-3.5 M) を含むリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.0) に溶解し、室温で CD スペクトルを測定した。

## 3. 結果および考察

### 3.1. DNA 損傷因子に対する *H. salinarium* の耐性

Fig. 1 に  $\gamma$  線、過酸化水素、紫外線に対する *H. salinarium* 野生株、膜色素バクテリオルベリン欠損変異株および *E. coli* B/r の生存率曲線を示す。用いたいずれの DNA 損傷因子に対しても、*H. salinarium* (野生株・変異株) は *E. coli* B/r に比べ高い耐性を示した。生存率曲線より 37% 生存率を与える線量 ( $D_{37}$ ) を算出し Table 2 に示した。この結果から、 $\gamma$  線、過酸化水素、紫外線に対して *H. salinarium* は *E. coli* B/r に比べ、野生株で 4-20 倍、バクテリオルベリン欠損変異株で 2-4 倍耐性が高いことが明らかとなった。*E. coli* B/r が通常の *E. coli* 株の中でも放射線や紫外線に高い耐性をもつ株であることを考慮すると、*H. salinarium* が種々の環境 DNA 傷害性因子に対し高い抵抗性をもつ微生物であることがわかる。 $\gamma$  線照射あるいは過酸化水素処理した細胞では、反応性の高いヒドロキシルラジカルが発生し、DNA 鎖切断や塩基損傷を誘発する。さらに、これらの障害が原因となり細胞死が起こることが知られている。また、紫外線による主要な DNA 損傷はピリミジンダイマーであり、これも細胞死の原因となることが明らかにされている。したがって、*H. salinarium* は、 $\gamma$  線や過酸化水素に対しては鎖切断や塩基損傷の発生を抑制することにより、また、紫外線に対してはピリミジンダイマーの生成を防ぐことにより耐性を獲得していると考えられる。野生株とバクテリオルベリン欠損変異株では、後者の方が感受性が高い。このことから、*H. salinarium* における DNA 損傷の防護には少なくともバクテリオルベリンが関わっていることは明らかである。バクテリオルベリンはカロテノイド系の膜色素であり、抗酸化剤あるいは紫外線吸収剤として作用し、DNA 損傷の生成を抑制する (8, 9)。しかし、バクテリオルベリン欠損変異株でも、*E. coli* B/r に比べ高い耐性を示すことから、バクテリオルベリンが関与しない防護機構が存在することが唆された。

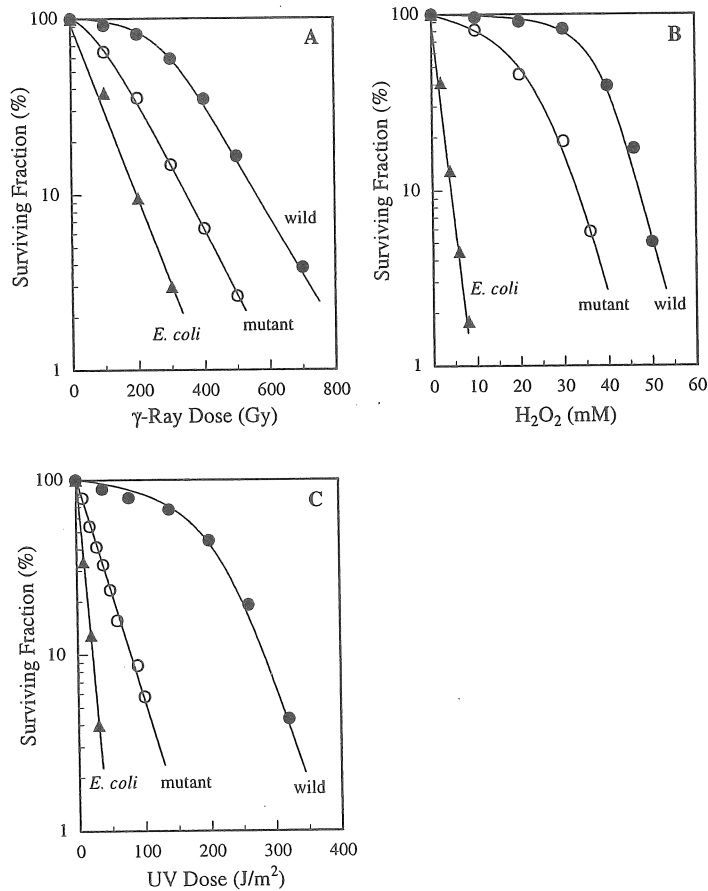
### 3.2. DNA 鎖切断に対する塩の防護効果

3.1 の結果より、*H. salinarium* には抗酸化作用を示すバクテリオルベリンのほかに、 $\gamma$  線や過酸化水素による鎖切断や塩基損傷の発生を防護する機構が存在すると予想される。*E. coli* と *H. salinarium* を比較すると、バクテリオルベリンの外に、後者では細胞内に極めて高い濃度の塩 (KCl) が存在することが特徴である (Table 1)。そこで  $\gamma$  線や過酸化水素

**Table 2** Doses required to reduce viability of *H. salinarium* and *E. coli* B/r to 37% ( $D_{37}$ ) for  $\gamma$ -rays, hydrogen peroxide and ultraviolet light.

Agents	<i>E. coli</i> B/r	<i>H. salinarium</i> (wild type)	<i>H. salinarium</i> (bacterioruberin mutant)
$\gamma$ -Ray(Gy)	92	393 (4.3)*	176 (1.9)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	2.2	47 (21.4)	20.5 (9.3)
UV (J/m <sup>2</sup> )	10.0	212 (21.2)	41 (4.1)

\* Values in parentheses are relative to *E. coli* B/r



**Fig. 1** Survival curves of *E. coli* B/r and wild type and bacterioruberin-deficient mutant of *H. salinarium* for  $\gamma$ -rays, hydrogen peroxide and ultraviolet light.

由来のDNA損傷に対する高濃度のKClの影響を明らかにする目的で、2M KCl存在下・非存在下でDNAを $\gamma$ -線照射し、DNA鎖切断を指標としてKClの影響を検討した。 $\gamma$ -線照射したDNAの中性アガロース電気泳動分析の結果 (Fig. 2A)、DNA二重鎖切断はKClの添加により減少し、DNA分子量の低下が抑制された。同様に、アルカリ性アガロース電気泳動の結果から、一重鎖切断もKClの添加により減少することが示された (Fig. 2B)。

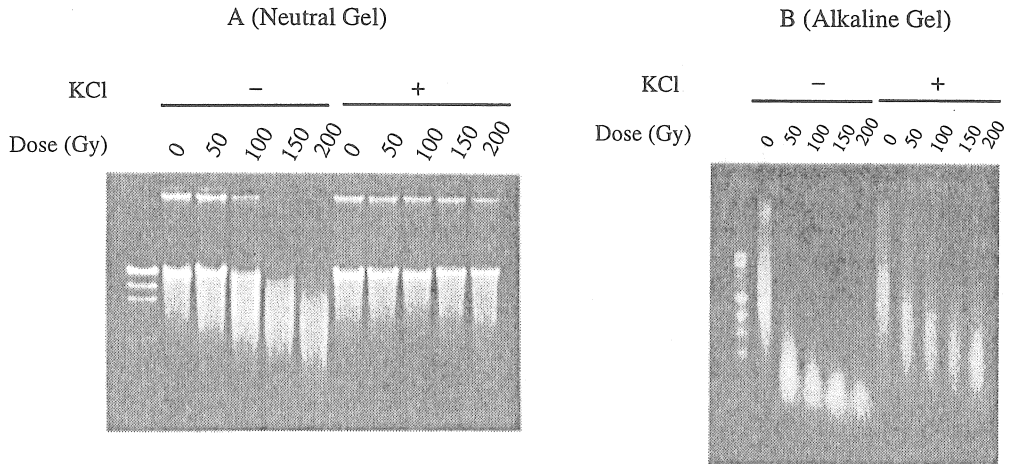
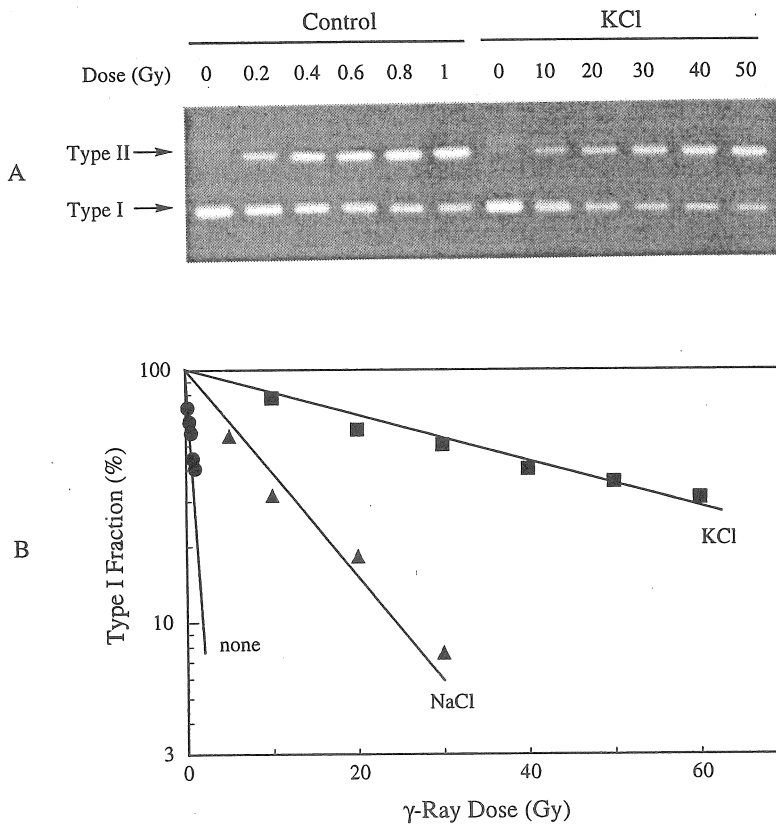


Fig. 2 Agarose gel analysis of double and single strand breaks.

A: neutral agarose gel electrophoresis for double strand break analysis

B: alkaline agarose gel electrophoresis for single strand break analysis

KClの鎖切断防護効果を定量的に調べるために、プラスミドDNAを用いて同様な照射実験を行った。環状のプラスミドDNAは、1つの鎖切断によりコンホメーションがsuper coil状態 (type I) から nicked circular 状態 (type II) に変化する。type Iとtype II DNAをアガロース電気泳動により分離定量することにより、プラスミドDNAに生じた鎖切断を定量することが可能である。本研究では、プラスミドとしてpDEL19 (4.8 kb) を使い、ナトリウムイオンとカリウムイオンの影響を比較するためにKClあるいはNaClを添加した系で照射を行った。 $\gamma$ -線照射したpDEL19のアガロース電気泳動結果をFig. 3Aに示す。type I DNAの割合は、照射線量とともに減少したが、その減少率は塩無添加、NaCl、KClで大きく異なった (Fig. 3B)。Fig. 3Bに示すプロットから、プラスミドあたり平均1つの鎖切断が起こる線量 ( $D_{37}$ ) は1.1 Gy (塩無添加)、10.4 Gy (NaCl)、49.6 Gy (KCl) であり、添加した塩が高い鎖切断抑制効果をもつことが示された (Table 3)。さらに、添加したKClとNaClの濃度は同じであるにもかかわらず、KClはNaClに比べ約5倍の防護効果を示した。細胞内カリウムイオンは一般的に多様な生理機能に関与しているが、*H. salinarium*では生理的な必要性ばかりでなく、防護効果の高いカリウムイオンをカチオンとして高濃度に蓄積することによりより効果的に鎖切断を抑制している可能性がある。



**Fig. 3** Effects of salts on the strand breaks of pDEL19 DNA induced by  $\gamma$ -rays.  
 A: agarose gel analysis of strand breaks  
 B: plots of type I fraction vs. irradiation dose

**Table 3** Doses required for generation of one single strand break or pyrimidine dimer on average per pDEL19 plasmid DNA ( $D_{37}$ ).

Agents	Control	NaCl	KCl
$\gamma$ -Ray (Gy)	1.1	10.4	49.6
UV ( $J/m^2$ )	21.3	ND*	35.9

\*Not determined



## 3.3. ピリミジンダイマー生成に対する塩の防護効果

*H. salinarium*が紫外線に対しても耐性を示したことから、致死の原因のとなるピリミジンダイマー生成に対しても何らかの防御機構をもっている可能性がある。KClはヒドロキシルラジカルによる鎖切断を抑制した(3.2)。同様に、KClが紫外線によるピリミジンダイマー生成を阻害する可能性について検討した。この目的で、pDEL19プラスミドDNAをKCl存在下・非存在下で紫外線(254 nm)照射し、生成したピリミジンダイマーを定量した。DNA中にピリミジンダイマーが生成してもプラスミドのコンホメーションはtype Iのままである。しかし、ピリミジンダイマーを特異的に認識するT4ファージ由来のエンドヌクレアーゼVで処理すると、ダイマー部位で鎖切断が起こり、コンホメーションがtype Iからtype IIに変化する(10, 11)。

紫外線を照射していないDNAをT4エンドヌクレアーゼVとインキュベートしてもtype IIへの変化は起こらなかったが、照射したDNAではtype IIへの変化が認められ、その量は照射線量とともに増加した(Fig. 4)。しかし、照射線量に対するtype Iの減少速度がKClの添加により低下したことから、KClは紫外線によるピリミジンダイマー生成を抑制することが明らかとなった。照射線量に対するtype Iの変化率のプロットから、プラスミドあたり平均してピリミジンダイマーが1つ生成する線量( $D_{37}$ )は、KCl無添加で $21.3\text{J/m}^2$ 、KCl存在下で $35.9\text{J/m}^2$ となった(Table 3)。この結果は、KClの存在によりピリミジンダイマーの生成量が約半分抑制されることを示している。したがって、*H. salinarium*の細胞内に高濃度に存在するKClは、ヒドロキシルラジカルによる鎖切断ばかりでなく(3.2)、紫外線によるピリミジンダイマー生成も抑制し、種々のDNA傷害性因子に対する耐性を増加させると考えられる。

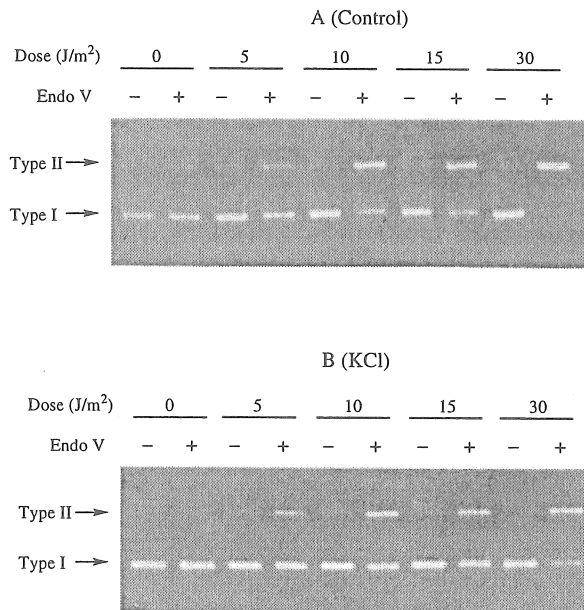


Fig. 4 Quantitation of pyrimidine dimers formed in pDEL19 plasmid DNA upon UV-irradiation in the (A) absence and (B) presence of KCl.

### 3.4. DNA コンホメーション

高濃度の塩の存在下では、DNAのコンホメーションが通常のB型からC型や左巻きのZ型に転移することがある(12)。もし、*H. salinarium*の細胞内に存在する高濃度のKClの影響で染色体DNAの構造が通常のB型から変化することがあれば、立体障害や塩基間のスタッキングが変化し、ヒドロキシルラジカルに対する反応性やピリミジンダイマー生成に影響を与える可能性がある。そこで*H. salinarium*より単離精製した染色体DNAの0.1-3.5M KCl存在下におけるCDスペクトルを測定した(Fig. 5)。測定した塩濃度範囲ではCDスペクトルに大きな変化は認められず、265nmに正のコットンピーク、240-245nm付近に負のコットンピークを示す典型的なB型DNAのCDスペクトルが得られた(12)。この結果は、 $\gamma$ -線および紫外線照射で認められたKClの損傷生成抑制効果はDNAのコンホメーション変化に由来しないことを示唆している。したがって、*H. salinarium*の細胞内においても染色体DNAのコンホメーション変化に由来するDNA損傷生成量の変化の寄与は無視できるものと予想される。

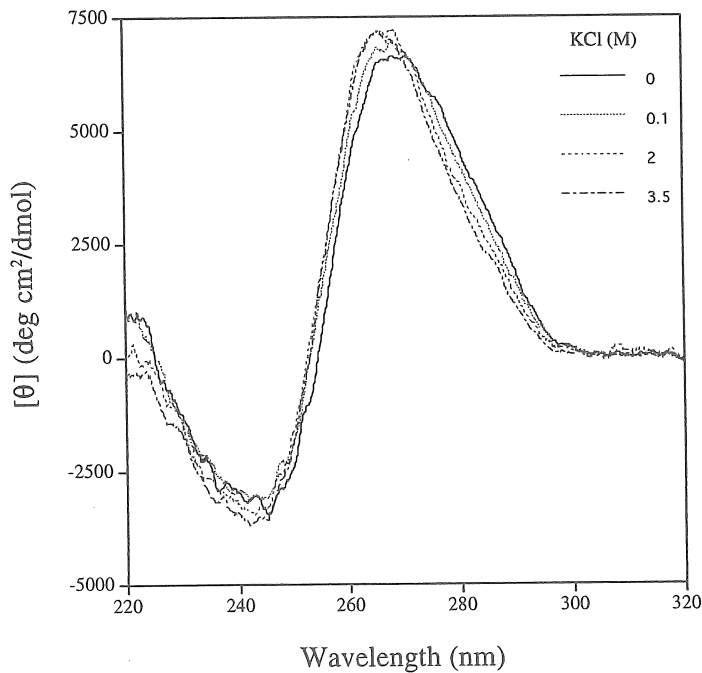


Fig. 5 CD spectra of *H. salinarium* chromosomal DNA in the presence of KCl

## 4. 今後の課題

本研究の結果、高度好塩性細菌 *H. salinarium* の細胞内に高濃度に存在する KCl が、放射線、過酸化水素、紫外線などに由来する DNA 障害発生を抑制し、本細菌の耐性を向上させていることが示された。このような分子機構は好塩性細菌に特徴的であり、新規な生物の遺伝子防御機構として注目される。

生物には、遺伝情報を高度に維持していくための様々な機構が存在する。本研究で明らかにされた非酵素的な遺伝子防御機構は好塩性細菌において重要な役割を果たしていると考えられる。一方、酵素的な DNA 損傷の修復についてはこれまでに光回復が示されたのみで (13, 14)、原核生物および真核生物に普遍的に存在する塩基・ヌクレオチド除去修復系が *H. salinarium* にも存在するかどうか、さらに、これらの修復経路に参与する酵素と DNA の相互作用が高塩濃度下でどのように行われているかを今後明らかにしていく必要がある。

## 5. 参考文献

1. 微生物生態研究会編 (1979) 微生物の生態 8 極限環境の微生物, 学会出版センター.
2. Friedberg, E. C., Walker, G. C. and Siede, W., (1995) DNA repair and mutagenesis, AMS Press, Washington D.C.
3. 井上國世 (1994) 生化学, 66, 446-450.
4. Matheson, A. T., Sprott, G. D., McDonald, I. J. and Tessier, H. (1976) *Can. J. Microbiol.*, 22, 780-786.
5. Halliwell, B. and Aruoma, O. (1993) DNA and free radicals, Ellis Horwood, New York.
6. Shahmohammadi, H. R., Asgarani, E., Terato, H., Ide, H., and O. Yamamoto, (1997) *J. Radiat. Res.*, 38, 37-43.
7. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis T, (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
8. Saito, T., Miyabe, Y., Ide, H. and Yamamoto, O. (1997) *Radiat. Phys. Chem.*, 50, 267-269.
9. Kushwaha, S. C., Kramer, J. K. C. and Kates, M. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 398, 303-314.
10. Milton, K., Durphy, M., Taylor, R. and Friedberg, E. C. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 2823-2829.
11. Yasuda, S. and Sekiguchi, M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 442, 197-207.
12. Saenger, W. (1984) *Principles of nucleic acid structure*, Springer-Verlag, New York.
13. Sharma, N., Nepburn, D. and Fitt, P. S. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, 799, 135-142.
14. Fitt, P. S. (1987) *Biochim. Biophys. Acta*, 910, 103-110.

## Molecular Mechanisms of DNA Damage Protection in *Halobacterium salinarium*, an Extremely Halophilic Bacterium

Hiroshi Ide, Hiroaki Terato and Takeshi Saito<sup>1</sup>

Faculty of Science and <sup>1</sup>Radioisotope Center, Hiroshima University

### Summary

*Halobacterium salinarium* is an extremely halophilic archaebacterium that is commonly found in strong natural salines such as salt lakes and salt farms. The adaptation to high-salt environments is achieved by raising the intracellular salt concentration. Therefore, this bacterium contains 5.3 M K<sup>+</sup> and 3.3 M Cl<sup>-</sup> in cells. This bacterium also need to deal with intensive ultraviolet (UV) light and possibly other DNA damaging agents due to it habitat.

In the present study, the sensitivity of *H. salinarium* to  $\gamma$ -rays, hydrogen peroxide and UV light was examined whether or not this bacterium has protection mechanism against environmental DNA damaging agents. *H. salinarium* was 4 to 20 times more resistant to the agents than *E. coli* B/r. The mutant defective in bacterioruberin, an antioxidant carotenoid associated with the cell membrane, also exhibited higher resistances (2-4 times) than *E. coli* B/r, suggesting that *H. salinarium* cells contained multiple DNA protection mechanisms which were dependent on and independent of bacterioruberin. To elucidate the latter mechanism and possible roles of the concentrated intracellular salts, DNA was irradiated by  $\gamma$ -rays and UV light in the absence and presence of KCl *in vitro*. Quantitation of DNA strand breaks ( $\gamma$ -rays) and pyrimidine dimers (UV) by agarose gel electrophoresis revealed that formation of these lethal DNA lesions was suppressed by concentrated KCl. These results suggest that KCl present in *H. salinarium* cells protects DNA from environmental DNA damaging agents, thereby increasing the resistance to these agents.