3P293

細胞核を放射光 X 線マイクロビームで照射した細胞の生存率測定

○前田 宗利¹、宇佐美 徳子^{1,2}、小林 克己^{1,2} (¹総研大・物質構造科学、²高エネ機構・物構研・放射光)

放射線の生物影響は、被曝した個々の細胞の応答と、被曝細胞から周辺細胞への情報伝達の結果発現する応答 (バースタンダー効果) の和と考えられる。この二つの応答を明瞭に区別するために、我々は放射光 X 線マイクロビーム細胞照射装置を開発し、X 線照射された細胞とされていない細胞を区別して研究を行っている。本研究では、バースタンダー効果が寄与を示す低線量域における細胞の放射線応答メカニズムの解明の一環として、チャイニーズハムスター肺由来細胞 V79 を用い、細胞集団に均一に 5.35 keV の X 線を照射するブロードビーム照射と、単一細胞の細胞核を 5.35 keV の X 線マイクロビーム (10 μm 角) で照射するマイクロビーム照射を行い、細胞の放射線応答について生存率を指標に比較を行った。エネルギー付与領域が異なるマイクロビーム照射とブロードビーム照射の結果は直接比較することができないため、細胞を非常に薄い二重円柱と仮定し、細胞平均吸収線量、細胞核平均吸収線量を求め、マイクロビーム照射細胞の生存率曲線を作成した。細胞核平均吸収線量 (細胞質への線量は 0) を用いた場合、マイクロビーム照射とブロードビーム照射における細胞致死効果がほぼ等しかった。

M. Maeda, N. Usami, K. Kobayashi : Survival Study Using Chinese Hamster V79 Cells Irradiated with Synchrotron X-ray Microbeam

3P295

等温核酸増幅を用いた進化実験における中立経路を経た進化

○馬 晁清、永安 弘樹、上野 泰生、国井 宇雄、伏見 譲 (埼玉大 院・工学系・機能材料)

等温核酸増幅系を用いて、自然淘汰型進化リアクターを構築した。RNA-Z 法 (Thermo T7RNA ポリメラーゼと HIV-1 逆転写酵素を投入) を用いた核酸の継代増殖実験が 1.4M トレハロースを投入することによって 50℃で行えること、および 50℃における最適のプロモータ配列を探索し、37℃の野生型プロモータとハミング距離 2 だけ離れた配列であったことを既に報告した。プロモータ領域 (17mer) をランダム配列とし、その上流に特定配列領域 (8mer tag) をもつ DNA プールを出発集団 (分子多様性: 2.4×10^{11} 分子) として、20 ラウンドの増殖実験を行った。各ラウンドでの集団平均淘汰係数 (またはコンセンサス配列の淘汰係数) を増殖競争実験で得られる初期濃度比と個体置換時間 のデータから求めた。淘汰係数は 5 ラウンドの時点まで増大し、15 ラウンドまでプラトー状態になり、その後、再び増大した。5 ラウンドまでに tag 配列で欠失と置換が起こったこと、並びに、7 ラウンドから 15 ラウンドにかけて集団の塩基配列が放散し、その後、再び収束したこと (既報) を考えると、中立経路上の拡散を間に挟んだコンテキスト依存の進化が観察されたと言える。そこで、一段階進化の観測を期待して、tag 領域をもランダム化したテンプレートを用いて同様の実験を行っている。

X.Ma, H.Nagayasu, Y.Ageno, T.Kunii and Y.Husimi : Evolution through a neutral path in a promoter evolution experiment based on the isothermal nucleic acid amplification

3P294

放射光 X 線マイクロビーム細胞照射装置の開発

○宇佐美 徳子¹、小林 克己¹、江口 笠井 清美²、前澤 博³、高倉 かほる⁴、檜枝 光太郎⁵、林 徹⁶ (¹高エネ機構・物構研、²放医研、³徳島大・医、⁴国際基督教大、⁵立教大・理、⁶(株) 林創研)

放射線のリスク評価を行うためには、低線量放射線の生物作用機構を解明する必要がある。現在では、直接放射線によるエネルギー付与を受けない細胞にも影響が現れる「bystander (傍観者) 効果」が、低線量放射線の作用機構において重要であると考えられている。低線量放射線の作用機構に迫るためには、直接放射線があたった細胞とあたっていない細胞を識別して追跡する必要がある。これを実現するために、高エネルギー加速器研究機構 (KEK)・物質構造科学研究所・放射光科学研究施設 (PF) では、放射光 X 線マイクロビーム細胞照射装置を開発した。X 線のエネルギーは 5.35 keV で、ビームサイズは集光時 2 μm / 非集光時 5 μm とヒトの細胞核より十分に小さく、細胞を識別して照射できるだけでなく、細胞核の一部を狙った照射も可能になっている。写真は、この装置で 5 μm 角と 10 μm 角の 2 種類のビームサイズのマイクロビームを照射したヒト繊維芽細胞の細胞核に生じた DNA 損傷を、ヒストン H2AX のリン酸化を指標として可視化したものである。DNA 損傷は X 線を照射された領域にほぼ限定して生じていることが確認できた。

N.Usami, K.Kobayashi, K.Eguchi-Kasai, H.Maezawa, K.Takakura, K.Hieda and T.Hayashi : Development of synchrotron X-ray microbeam irradiation system for radiobiology

3P296

非平衡熱水環境下における前生物化学進化

○今井 栄一、本多 元、松野 孝一郎 (長岡技科大・生物)

海底熱水噴出孔から噴出される熱水は、その周りの冷海水との間に大きな温度勾配を有し、いろいろな化学反応を促進する。熱水と冷水の界面では熱の移動が行われており、原始海洋中の海底熱水噴出孔近傍でも熱的な勾配は常に存在している。我々の実験系はこの海底熱水噴出孔の熱水環境を実現し、熱的あるいは溶質の濃度においても非平衡な環境を積極的に利用している。

熱水環境を特徴づける示強パラメータ (高温と低温の温度差、流量、流速) がアミノ酸の重合反応にどのような影響を与えるかを実験的に検証した。冷却温度勾配は流量が同じであれば、熱水の噴出する流速に依存する。冷却温度勾配が大きいかほどアミノ酸の重合反応が促進された。また高温環境における温度はアミノ酸オリゴマーの生成量を左右し、4 種類のアミノ酸混合物から出発した反応溶液からは多様な生成物群が確認できた。

飽和、不飽和脂肪酸からなる分子集合体としての小胞が存在すると、構造物の内外でアミノ酸の濃度勾配を生み、それがアミノ酸の重合反応を促進することも判明した。デカン酸小胞やオレイン酸小胞存在下におけるグリシン 2 量体の生成量は約 3 倍、グリシン 3 量体では約 5 倍に増加した。オレイン酸小胞のない容積は溶液全体の約 5% を占めるに過ぎないが、小胞の有無によるグリシン重合反応への影響は大きい。

このように非平衡という環境を化学進化の実験系に積極的に用いたことで、閉鎖系の実験系とは異なる結果を得ることが出来た。核酸塩基のリン酸化においても有意な結果を得た。しかしその反応の過程を特定するには至強、至量パラメーターが複雑に作用し、解析を困難にしている。目下、いろいろな条件下における実験結果を精査することで、非平衡環境の優位さを議論したいと考えている。

E. Imai, H. Honda and K. Matsuno : Prebiotic Oligomerization of Amino acids under the Nonequilibrium Hydrothermal Conditions