

立 S22-14

軟 X 線顕微鏡による *Deinococcus radiodurans* の観察Soft X-ray microscopy observation of *Deinococcus radiodurans*

鳴海一成^a, 佐藤勝也^a, 大東琢治^b, 竹本邦子^c, 難波秀利^d, 木原 裕^c
 Issay Narumi^a, Katsuya Satoh^a, Takuji Ohigashi^b, Kuniko Takemoto^c, Hidetoshi Namba^b, Hiroshi Kihara^c

^a日本原子力研究開発機構, ^b立命館大学総合理工学研究機構, ^c関西医科大学, ^d立命館大学,
^aJapan Atomic Energy Agency, ^bRitsumeikan University Research Organization of Science and Engineering,
^cKansai Medical University, ^dRitsumeikan University

放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans* の細胞内におけるテルル元素の蓄積状態を明らかにするために、テルルの L 吸収端の前後の波長を用いて、テルル含有及び非含有培地で培養した菌体を非侵襲・非破壊的に軟 X 線顕微鏡で観察した。その結果、テルルは *D. radiodurans* の細胞質中で特異的な顆粒状構造体あるいはポリリン酸に捕捉された状態で存在することが示唆された。

In an effort to elucidate the intracellular accumulation state of tellurium in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*, cells cultured with and without potassium tellurite were observed noninvasively and nondestructive by soft X-ray microscope at wavelengths near tellurium L-edge. It was suggested that accumulated tellurium is present as specific granules and/or trapped by polyphosphate in the cytoplasm of *D. radiodurans*.

Keywords: *Deinococcus radiodurans*, Soft X-ray microscopy, tellurite, intracellular accumulation

背景と研究目的: 軟X線顕微鏡は、光学顕微鏡より高い分解能 (50 nm) で、細胞を観察することができる。しかし、50nmの分解能で細胞を観察するのに必要なドーズ量は、水との相互作用の小さい水の窓領域 (2.3 nm ~ 4.4 nm) でも 10⁵~10⁶ Gyと非常に高い。このため、ほとんどの生物において細胞は放射線損傷のために死んでしまい、生きた細胞を観察することはできない。そこで我々は、生物の中でも最も放射線に強い微生物である *D. radiodurans*[1]を観察対象として、細胞の内部構造を軟X線顕微鏡で非侵襲・非破壊的に観察する実験を行っている。

テルル元素は生物の生存に必須ではなく、むしろ細胞内で酸化損傷を引き起こすため、細胞毒性があるが、大腸菌、枯草菌、超好熱古細菌、細胞性粘菌、シロイヌナズナなど、多様な生物がテルル蓄積に関わる遺伝子を持っている[2]。*D. radiodurans* のゲノムにも、テルル蓄積に関わる遺伝子クラスター領域 (*terE*, *terB*, *terD1*, *terA*, *terZ*, *terD2*, *terC*) が存在し、実際に *D. radiodurans* は細胞内にテルルを蓄積しつつ生育できることが分かっている。しかし、細胞内におけるテルル元素の蓄積状態は不明のままである。そ

こで、本研究課題では、テルル元素 (L 吸収端: 2.1 nm) の *D. radiodurans* 細胞内での蓄積状態を明らかにするために、2 nm 前後の波長の軟 X 線を用いた顕微鏡観察を実施した。

実験: *D. radiodurans* R1株 (ATCC13939^T: American Type Strain Collectionから購入した標準株) を、30 μg/ml 亜テルル酸カリウム含有及び非含有 TGY 寒天培地 (0.5% Bacto tryptone, 0.3% Bacto yeast extract, 0.1% glucose, 1.5% Bacto agar) で 30°C、5日間培養した。培地上の1コロニーを1 mLの滅菌蒸留水に懸濁し、そのうちの1 μLをフォルムバル支持膜付き電頭グリット上に添加後、風乾したものを観察試料とした。

立命館大学SRセンターのBL-12に設置された軟X線顕微鏡を用いて、波長2 nm及び2.4 nmにて観察を行った。

結果、および、考察: Fig. 1に、30 μg/ml 亜テルル酸カリウム含有 TGY 培地で培養した *D. radiodurans* 菌体の X 線顕微鏡像を示す。Fig. 1Aは波長 2 nmで観察したもの、Fig. 1BはFig. 1Aと同じ視野を波長 2.4 nmで観察したものである。波長 2 nmでは、細胞中に大きさの異なる複数の顆粒状の濃密構造体が認めら

れた。一方、テルル元素のL吸収端より長い波長 2.4 nmでは、観察波長 2 nmで見られた顆粒状濃密構造体と同一位置に一部、コントラストが著しく不鮮明な顆粒状構造体が認められた。

また、Fig. 2 に示すように、亜テルル酸カリウムを含まない TGY 培地で培養した *D. radiodurans* 菌体においても、観察波長 2 nmで複数の顆粒状構造体が認められた。この顆粒状構造体は、*D. radiodurans* 菌体の透過型電子顕微鏡観察で見られるポリリン酸の存在形状(Fig. 3)に酷似していた。ポリリン酸は、細胞中で負の電荷を持ち、正の電荷を持つ有害金属元素を捕捉し、細胞毒性の少ない形で蓄積することが示唆されている[3]。

以上の結果から、*D. radiodurans* の菌体に取り込まれたテルル元素は、細胞質中で特異的な凝集構造体あるいはポリリン酸に捕捉された状態で存在することが示唆された。

今後の課題として、テルルの凝集構造体がポリリン酸に依存するのかどうかを明らかにすることが必要である。そこで、*D. radiodurans* のポリリン酸合成酵素 polyphosphate kinase [EC:2.7.4.1]をコードする遺伝子 DR_1939 を破壊することで、ポリリン酸欠損変異体を作製し、亜テルル酸カリウム有り無しで培養したものを用いて、軟 X 線顕微鏡観察を行うことを予定している。

文 献

- [1] I. Narumi, Trends Microbiol. **11** (2003) 422
- [2] D. E. Taylor, Trends Microbiol. **7** (1999) 111
- [3] C. Kuwahara, A. Fukumoto, M. Nishida, H. Sugiyama, Y. Anzai, F. Kato, J. Environ. Radioact. **102** (2011) 138

論文・学会等発表 (予定)

- [1] I. Narumi, K. Satoh, T. Ohigashi, K. Takemoto, T. Namba, and H. Kihara, 11th International Conference on X-Ray Microscopy: XRM2012 (ポスター発表)

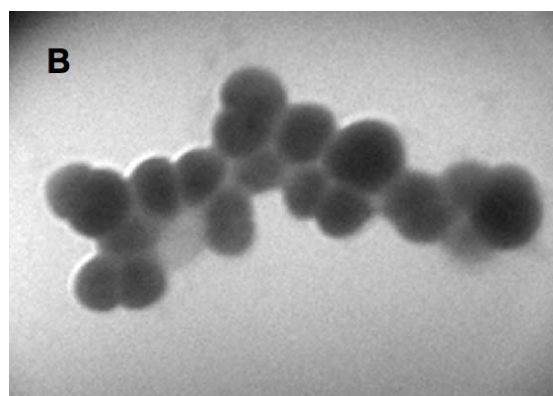
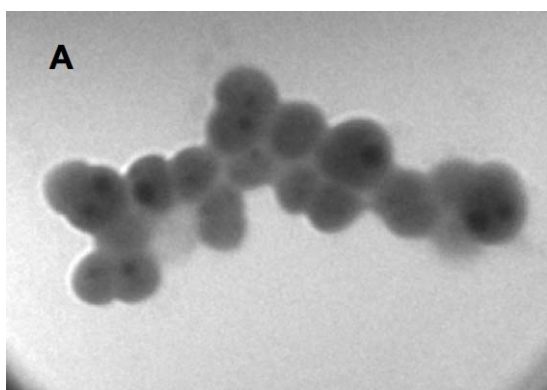


Fig. 1. X-ray microscopic image of *D. radiodurans* grown on TGY agar supplemented by 30 µg/ml of potassium tellurite. (A) Observation wavelength was 2.0 nm. Exposure time was 300 s. (B) Observation wavelength was 2.4 nm. Exposure time was 300 s.

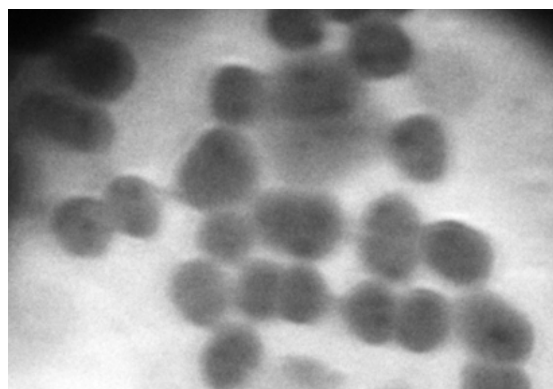


Fig. 2. X-ray microscopic image of *D. radiodurans* grown on TGY agar without potassium tellurite. Observation wavelength was 2.0 nm. Exposure time was 360 s.

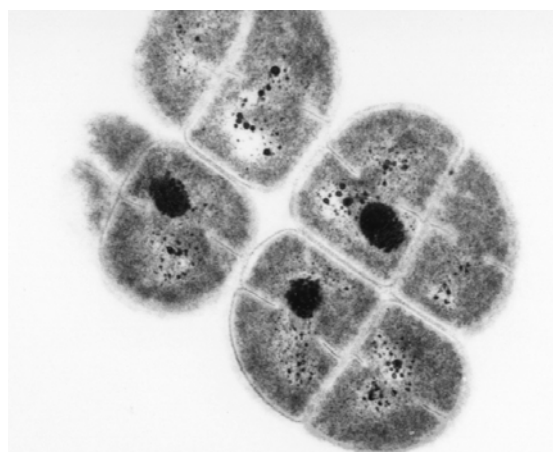


Fig. 3. Transmission electron microscopic image of *D. radiodurans* grown on TGY agar without potassium tellurite. Large dense bodies were considered to be accumulated polyphosphates.