

SOD を欠損した大腸菌に及ぼす変動磁場の影響

Effect of a Pulsed Magnetic Field on Superoxide-Dismutase-Defective *Escherichia coli*河野美由紀^{*,**}・上野照剛^{**}^{*}大阪大学医学部生理学第一講座, 吹田市山田丘 2-2 (☎565-0871)^{**}東京大学大学院医学系研究科医用生体工学講座, 東京都文京区本郷 7-3-1 (☎113-0033)M. Kono^{*,**} and S. Ueno^{**}^{*}Dept. of Physiology, Osaka University Medical School, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871^{**}Dept. of Biomedical Engineering, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Tokyo 113-0033

In this study, *Escherichia coli* mutant IM303 was used to detect the effect of pulsed magnetic fields through reactive oxygen species. IM303 is a mutant defective in the superoxide dismutases Fe-SOD and Mn-SOD. The strength of the exposed magnetic field was 0.06, 0.1, or 0.13 T. Trains of 10 or 5 pulses of magnetic field at intervals of 0.05 s were applied at 1 Hz. The growth of the mutant was detected by measuring the light absorbance at 600 nm every hour. After six hours of exposure, cell were centrifuged and two-dimensional gel electrophoresis of the proteins in *E. coli* was performed. Two-dimensional gel electrophoresis data revealed lost protein in the exposed samples of IM303. Their growth rate did not change with exposure. The results of this study indicate that the synthesis of proteins that do not change the cell cycle length has been altered. However, lethal damage to IM303 did not occur.

Key words: pulsed magnetic field, superoxide dismutase, *E. coli*, 2D-electrophoresis

1. はじめに

電磁環境の人体影響が問題になっている今日, 基礎的研究として, 生物材料を用いて磁場の影響を調べることは重要であると思われる。これまでさまざまな研究が行われているが, はっきりした結論は得られていない¹⁾。

本研究では, SOD (Superoxide dismutase) の活性を欠損した大腸菌 (IM303)²⁾ を用いて, 活性酸素を介した変動磁場の影響に及ぼす影響を検出することを試みた。活性酸素による細胞の受ける傷害としては DNA 障害や, 酸化による蛋白質の不活化などがある。このような活性酸素による障害から細胞を守るために, 活性酸素除去酵素である SOD は存在する。

生物のもつ SOD は活性中心に金属をもつ金属酵素であり, 大腸菌には Fe-SOD, Mn-SOD が存在する。大腸菌 IM303 は, このいずれの酵素活性も欠損している株である。これを用い, 変動磁場あるいはその誘導電流によって, 菌体内で活性酸素が増産されたり活性酸素の寿命が伸びることによる菌体の生存率の変化が起こるかどうかを検出した。さらに菌体蛋白の 2 次元電気泳動を行うことによって, 蛋白発現レベルでの変化の検出を行った。

さらに, 誘導電流の大きさの違いによって影響の差を検出することを, 半径の異なるシャーレを同心円状に置き, その中で

培養を行うことで試みた。

2. 方 法

2.1 曝磁装置と磁場の強度

曝磁装置の概略図を Fig. 1 に示す。磁場発生装置として, 水冷式ヘルムホルツコイルを装着した連続磁気刺激装置 (日本光電社製, AAA-10718) を用いた。キャパシタバンクを蓄えた電荷をサイリスタスイッチを通してコイルに放電することによりパルス磁場を発生させた。磁場強度は 0.06, 0.1, または 0.13 T とした。コイルを流れる電流は 2 相性で, それぞれ波の時間幅は 120 μ s である。パルス間隔 0.05 s で 10 count (37°C, 0.13 T 条件下では 5 count) のパルス磁場を 1 Hz の頻度で発生させた。Fig. 2 にコイルを流れる電流波形と誘導される電界の波形 (1 周期) を示す。培養槽として, 分光光度計用 3 ml のガラスセルを用いた。これをコイル内に入れ, 温水循環によって温度コントロールを行った。循環温水の温度制御の精度は $\pm 0.1^\circ\text{C}$ である。磁気刺激装置を連続的に動かすためのトリガー発生装置としては Neuropack Σ (日本光電社製, MEB-5504) を用いた。

2.2 培養方法

菌体は 37°C, 100 rpm で 16 時間振盪培養し, 翌日新しい培地に 100 倍希釈した後, 6 時間磁場に曝露した。磁場曝露中は静置培養を行った。培地は L broth (10 g Trypton, 5 g Bacto-yeast extract, 5 g NaCl per liter, pH 7.3) を用いた。

37°C での曝露においては, 2.1 に述べた培養槽を用い, 25°C での曝露においては, 室温を $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保った実験室内で, シャーレを用いて培養を行った。

2.3 菌体の増殖速度の測定

増殖速度は分光光度計 (Shimadzu 社製, Double Beam Spectrophotometer UV-180) を用い, 600 nm での吸光度の時間変化で測定した。

2.4 菌体蛋白の 2 次元電気泳動

培養後の菌体を 2 分間 15000 rpm で遠心分離し, PBS buffer で 2 回洗浄し, sample solution (6 g urea, 3.1 g thiourea, 1 ml 10% Triton X-100, 38 mg DTT/20 ml) に溶解し, 蛋白質を抽出した後で, 2 次元電気泳動を行った。使用した装置は, Multiphor II (ファルシア社製) である。1000 V で 1 時間の泳動の後, 2300 V で 16 時間の泳動を行った。

1 次元目の pH 勾配は 4~7 である。2 次元目の分子量での

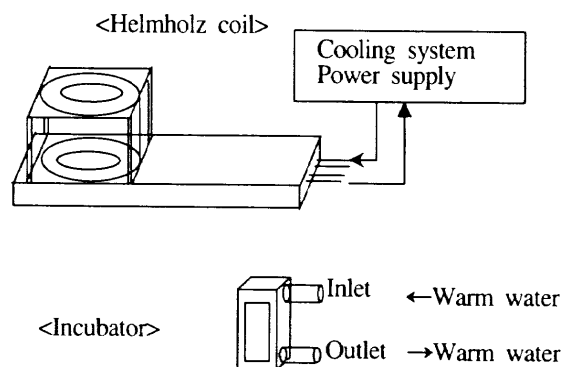


Fig. 1 Helmholtz coil and incubator for *E. coli*. Incubator was set in the center of the coil.

分離は, stacking gel, separation gel にそれぞれ 4.7%, 11% の acrylamide を用い, 17 kD から 120 kD で行った. 2 次元目は SDS-PAGE である. 25 mA で 45 分の泳動の後, 35 mA で 1 時間 45 分の泳動を行った.

ゲルの染色は, 銀染色法によった.

2.5 誘導電流の強度の差による影響の違いの検出

Fig. 3 に, $dI(t)/dt = 80 \text{ A}/\mu\text{s}$ 時の電界強度の分布図を示す. 本実験の条件下では, 円形状の培地に誘導される渦電流の大きさは培地の電気伝導率および半径に比例する. そこで, 誘導電流の強度による影響の差を検出するために, 同心円状に, 直径 5 cm, 8 cm のシャーレを置いてそれぞれに, 培地 10 ml, 20 ml を入れて菌体の培養を 6 時間行った. その後, 菌体蛋白の 2 次元電気泳動による比較, 検討を行った. 培養は室温を $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保った実験室内で行った.

3. 結 果

3.1 菌体の増殖

菌体の増殖曲線を Fig. 4 に示す. 横軸は時間を, 縦軸は 600 nm の吸光度を表す. 大腸菌の前培養はコロニーから菌体を取り出すことから始めるため, 磁場中での培養の開始時点での吸光度値にはばらつきが生じた. このため Fig. 4 には 1 回の試行でのみの結果を示してある. 吸光度はすべて最低 2 回の測定の前平均値をとり, これをプロットした. 測定に際して

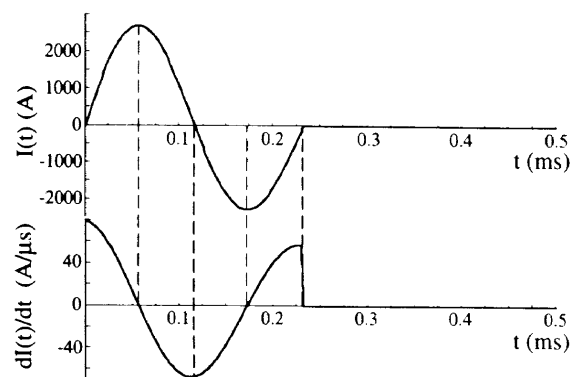


Fig. 2 Waveform of the current flowing in the coil, $I(t)$, and its time derivative, $dI(t)/dt$. The time courses of $I(t)$ and $dI(t)/dt$ are proportional to the magnetic fields and the induced electric fields, respectively.

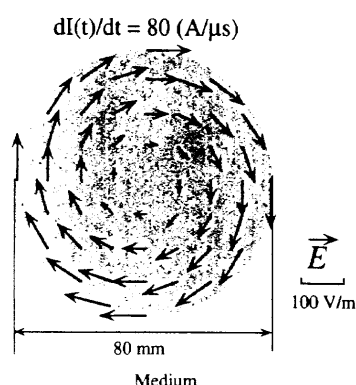


Fig. 3 Spatial distribution of induced electric fields.

は, サンプルを 5 回上下に振ることにかくはんし, 曝磁群, コントロール群の吸光度を交互に最低 2 回ずつ測定した. 菌体の増殖速度そのものへの明らかな影響は見られなかった. 7 回の実験において, それぞれの測定値は 3% 以内のばらつきをもっていた. 曝磁群とコントロール群での測定値 (平均値) の差はばらつきの範囲内に入っているため, 極微少な差が磁場によって生じている場合は, 影響は検出できないことになる.

3.2 2 次元電気泳動

磁場強度 0.13 T で, 培養温度 25°C および 37°C における,

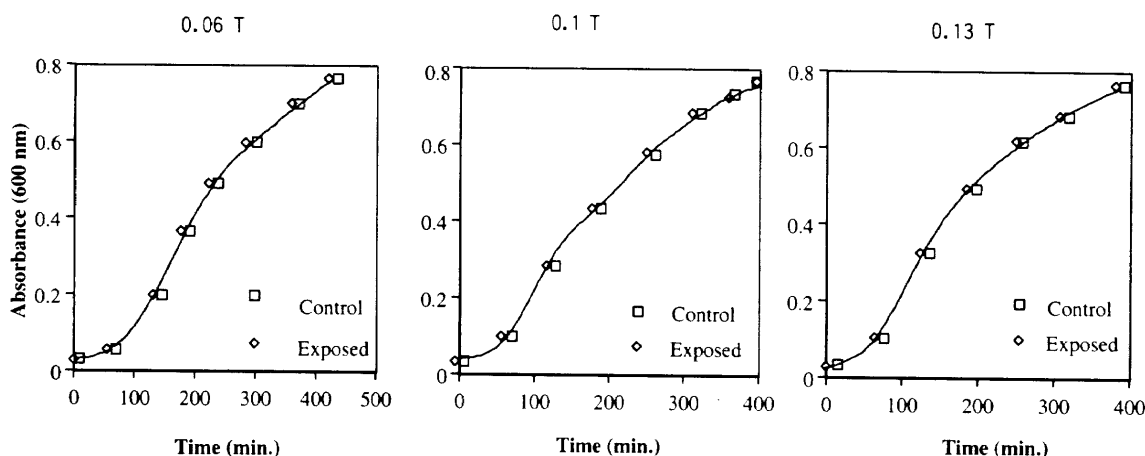


Fig. 4 Growth curve of IM303.

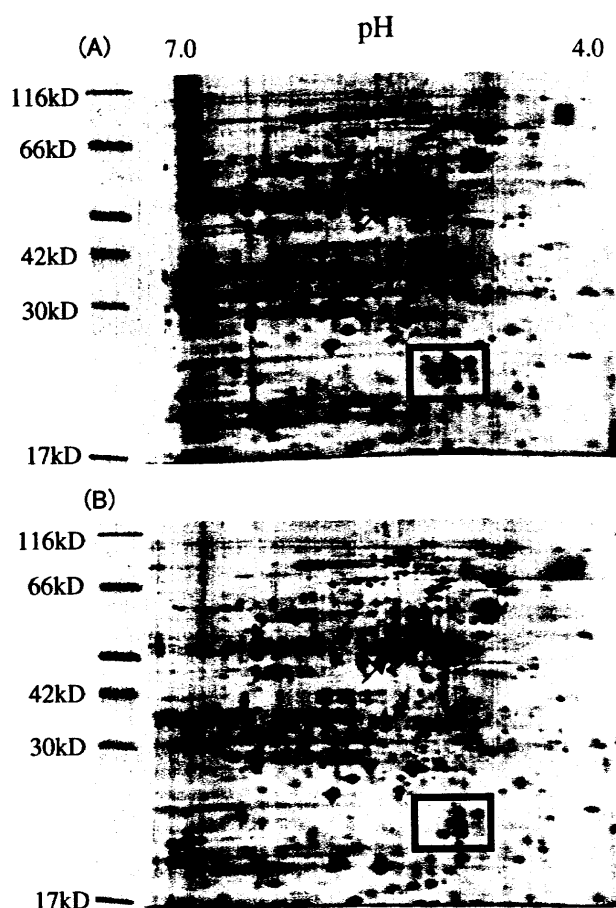


Fig. 5 Two-dimensional polyacrylamide gel patterns of proteins: (A) control IM303, (B) exposed IM303, 37°C; 0.13 T. The arrows point to the spot that is elongation factor TU.

蛋白質電気泳動の結果を Fig. 5, Fig. 6 に示す。四角で囲ってある部分で、曝磁群においてはスポットが消失しているかに見える。2次元電気泳動蛋白質データベース (SWISS-2DPAGE) で、これらのスポットの検索を行ったが、蛋白質の同定はできなかった。しかし、37°C の温度条件については、同時に電気泳動を行ったコントロール群 3、曝磁群 3 のサンプルのうち、1.3 T に曝露したサンプル一つでのみ、Fig. 5(B) のスポット分布を示していたため、磁場強度のより高い条件において消失スポットがあるかに見えた。その後得た合計 14 サンプルの電気泳動データは、コントロール群、曝磁群のいずれにおいても Fig. 5(B) で示したデータと同じであった。つまり、スポットは消失したというよりは、アーチファクトが出現した可能性が示唆された。

3.3 誘導電流の差による影響の違い

2次元電気泳動において得られた結果を、装置の発生する誘導電流の大きさの違いによって分離するために、半径の異なる二つの円形シャーレを同心円上に置いて磁場に曝露した。その結果、シャーレの大きさに関わらず、同一の蛋白スポットが消失していた。25°C, 0.13 T の条件下では、誘導電流の差による影響の違いは検出できなかった。

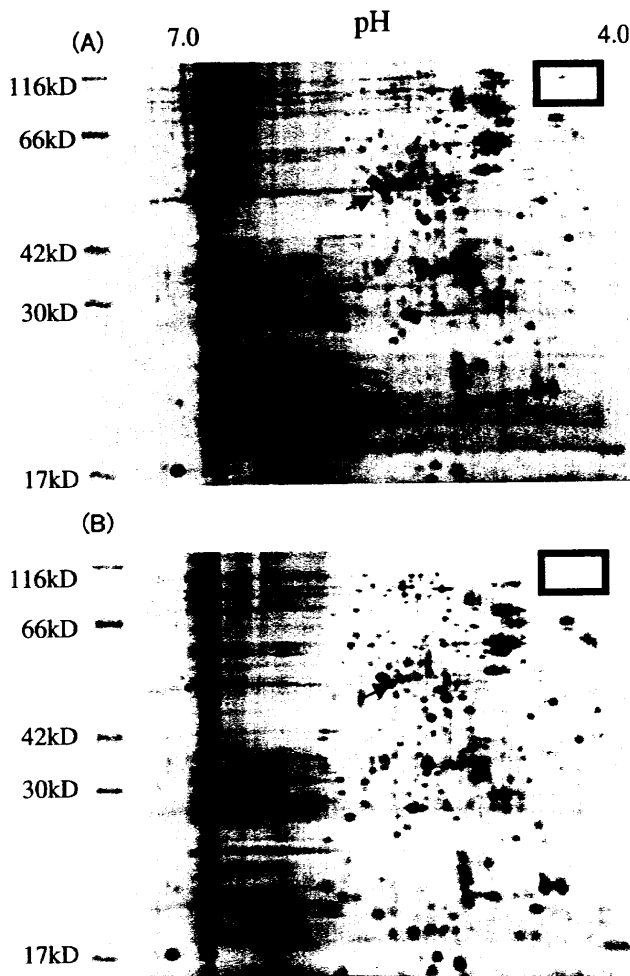


Fig. 6 Two-dimensional polyacrylamide gel patterns of proteins: (A) control IM303, (B) exposed IM303, 25°C; 0.13 T. The arrows point to the spot that is elongation factor TU.

4. 考 察

本研究では、環境曝露されうるよりも強いパルス磁場を用いて、活性酸素を介した磁場の影響を菌体の増殖および、菌体蛋白の発現レベルで検出しようとした。今回曝露した磁場の条件下では、大腸菌の増殖のそのものへの磁場の影響は検出できなかった。おそらく今回用いた磁場条件では、菌体内において、生存そのものを危うくするような活性酸素の増産などは起こっていないものと思われる。しかし、0.1 mT, 60 Hz の変動磁場によって、フリーラジカルの寿命が伸びるという報告もあり³⁾、より弱い磁場によって影響がある可能性も否定できない。また、薬剤処理による蛋白合成の阻害が生物リズムの位相変化は引き起こさないというアカパンカビに関する報告⁴⁾に見られるように、増殖能に変化が見られないからといって菌体内で何も起こっていないということとはできないのはいうまでもなく、さらに、詳細な研究を行う必要がある。

IM303 において磁場存在下の培養においてほとんど消失していた蛋白質は、合成阻害を受けても菌体の生存を危うくしたり生物のリズムを駆動していく鍵として存在しているような蛋白質ではないと思われる。データベースによる検索によると現

在までに同定されていない未知の蛋白質であった。このことより変動磁場あるいはその誘導電流による大腸菌に及ぼす影響の経路は、未知の物質を介した経路である可能性もあるといえる。さらに、本研究では磁場の影響によって蛋白発現レベルでの現象を示すことはできるが、中間段階で何が起こっているかを明らかにすることはできない。

37℃, 0.06, 0.1 T のより低い磁場条件において、出現している蛋白スポットは、アーチファクトである可能性が高い。しかし、より低い磁場条件で培養した菌体蛋白のうちある種のものが電気泳動によって修飾を受けやすくなっている可能性も完全に否定はできない。プロテアーゼの影響をなるべく遮断した上でさらにデータを積み重ねる必要がある。実験条件で制御し切れていない要素が存在する可能性はあるといえる。

誘導電界の強度は磁場強度 0.13 T のときで、コイル直下で最大 100 V/m を生じる。培地の電気伝導度は、32℃ で 1.2 S/m なので、電流密度はコイル中心から 4 cm で 120 A/m²、中心部では 0 A/m² である。しかし、本研究では、菌体を受ける電界の差による影響の違いは検出できなかった。また、蛋白発現において見られた結果が、誘導電界に起因するのか磁場そのものによるのかを結論づけることもできない。

また、TG1, mutL といった他の種類の大腸菌においても蛋

白スポットの消失は見られている⁵⁾。これらに共通して見られるのは、影響の経路はわからないものの、蛋白質の合成阻害として磁場が検出されているが、菌体の増殖能には大きな影響が見られないことである。活性酸素を介した影響については実験条件を変え、さらに系を検討し進めていく予定である。

謝 辞 大腸菌 IM303 を快く譲渡してくださいました、京都大学工学部 今中忠行教授に深く感謝申し上げます。また、2 次元電気泳動装置を快く使わせてくださいました東京大学理学部 神谷 律教授に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) E. M. Goodman, B. Greenbaum, and M. T. Marron: *Intl. Rev. Cytol.*, **158**, 279 (1995).
- 2) Y. Matsumura and T. Imanaka: *J. Ferment. Bioeng.*, **74**(5), 262 (1992).
- 3) S. Roy, Y. Noda, V. Eckert, M.G. Traber, A. Mori, R. Liburdy, and L. Packer: *FEBS Lett.*, **376**, 164 (1995).
- 4) L. Rensing and R. Hardeland: *Chronobiol. Interm.*, **7**, 353 (1990).
- 5) 河野美由紀, 上野照剛, 志賀 健: 日本生体磁気学会誌, **10**(1), 106 (1997).

1997 年 10 月 28 日受理, 1998 年 2 月 2 日採録