

A Study on Gamma ray effects on Stress Response and Cellular Toxicity using Bacterial Cells

민지호, 이현주, 이창우⁺, 구만복^{*}

광주과학기술원 환경공학과, ^{*}한국원자력연구소

전화 (062) 970-2454, Fax (062) 970-2434, ^{*}mbgu@kjist.ac.kr

Abstract

Effects of gamma ionizing radiation on recombinant *Escherichia coli* cells containing stress promoters, *recA*, *fabA*, *grpE*, or *katG*, fused to *luxCDABE* originated from *Vibrio fischeri* were characterized by monitoring transcriptional responses reflected by bioluminescent output. Quantification of gamma-ray intensity may be possible using the *recA* and *fabA* promoter fusion since a linear enhancement of bioluminescence emission with increasing gamma-ray intensity was observed. Other strains sensitive to either oxidative stress (DPD2511, *katG::luxCDABE*) or protein-damaging stress (TV1061, *grpE::luxCDABE*) were also irradiated by gamma-rays, and resulted in no noticeable bioluminescent output while DPD2794 with *recA* promoter and DPD2540 with *fabA* promoter irradiated by the same intensities of gamma-rays gave a significant bioluminescent output. This indicates that the main stresses in the recombinant bacteria caused by ionizing radiation are DNA and membrane-damage, not protein- or oxidative-damage. In addition, in this study, to investigate the relationship between the radiation dose rate and bacterial responses, two recombinant *Escherichia coli* strains, DPD2794 and GC2, containing *lac* promoter fused to *luxCDABE* originating from *Photobacterium luminescences*, were used for detecting DNA damage and cellular toxicity under various radiation dose rates. Throughout this study, it was found that these bacteria showed quantitative stress responses to DNA damage and general toxicity caused by gamma rays, depending on the radiation dose rates, indicating that the bacterial stress responses and general toxicity were seriously influenced according to radiation dose rates.

서 론

현재 가장 각광받고 있는 에너지인 원자력은 생물체에 유해한 방사선을 방출하기

때문에 문제시 되고 있다. 따라서 발전소나 연구소, 병원 등에서 사용된 방사성 폐기물은 완벽한 처리 과정을 통해 방사선의 무해 여부를 확인하여 방출되게 된다. 이처럼 방사성 폐기물의 처리과정이 복잡하고 철저하게 조절되는 이유는 방사성 폐기물이 생체에 유해한 영향을 미치기 때문이다. 특히 이들 방사선 중 γ -ray는 파장이 짧은 전자파 형태로 연속적인 이온화를 일으켜 DNA를 구성하는 pyrimidine과 purine을 산화시켜 double strand DNA break (DSB)를 일으키며 심각한 유전자 손상을 유발시키게 된다.¹⁾ 뿐만 아니라, 방사선으로 인한 cellular stresses는 DSB 파괴 외에도 heat shock protein의 다량으로 생산, 이온화로 인한 reactive oxygen species의 생산 등이 알려져 있다.²⁾ 이러한 유해 방사선의 총 선량은 $D = h(S/d^2)$ 의 식으로 표현되며, 여기서 D는 전체 방사선량, h는 방사선에의 노출 시간, S는 방사선 source의 에너지 세기, d는 source에서 sample까지의 거리를 나타낸다. 따라서 모두 3가지 parameters에 의해 총 선량이 결정되게 되는데, 이들 각각을 조절하는 것에 의해 총 선량률 (Dose rate)이 변화하게 된다. 유해 방사선의 dose rate이 생명체의 genetics와 radioprotection에 있어 중요한 요인이 되고 있다는 것이 최근에 들러 활발히 연구되고 있으며, 이들 dose rate이 증가함에 따라 더욱 심각한 유전적 변화가 야기된다는 것이 밝혀졌다.³⁾ 따라서 본 연구에서는 5가지 종류의 발광성 미생물을 이용하여 유해 방사선중 특히 γ -rays가 생물체에 미치는 유해성을 cellular stresses로 구별하고, γ -rays의 dose rate 변화가 cellular stresses 및 general toxicity에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하였다.

재료 및 방법

본 실험에서는 *E. coli*내에 있는 *recA* (유전자 손상에 민감하게 반응), *grpE* (단백질 손상에 민감하게 반응), *fabA* (생물막 손상에 민감하게 반응), *katG* (산화적 손상에 민감하게 반응)와 같은 스트레스 반응 프로모터 유전자에 *Vibrio fischeri*의 *lux* 유전자를 결합시킨 플라스미드를 포함하여 재조합된 *E. coli* DPD2794 (*recA::luxCDABE*), TV1061 (*grpE::luxCDABE*), DPD2511 (*katG::luxCDABE*), DPD2540 (*fabA::luxCDABE*)를 사용하였다. 뿐만 아니라 *lac* promoter와 *Photobacterium luminescens*의 *lux* 유전자를 가지고 있는 GC2를 이용하여 방사선으로 인한 일반적인 독성을 확인하고자 하였다.

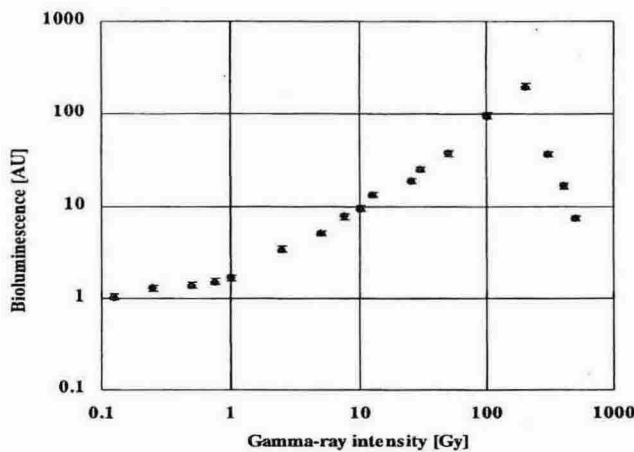
GC2를 제외한 4가지 균주는 25 μ g/mL의 kanamycin (Sigma Co.)이 첨가된 Luria-Bertani (LB) 배지상에서 30 $^{\circ}$ C, pH7.0, 250rpm의 조건으로 진탕 배양하였으며, GC2의 경우는 37 $^{\circ}$ C에서 배양을 실시하였다. 100mL의 LB배지에서 8시간 정도 자란 균주를 2mL씩 새로이 접종하여 1시간 정도 배양한후, 0.1mL 씩을 test tube로 나누어 분주한후 γ -ray를 조사받았다. γ -ray의 source는 ^{60}Co 를 사용하였으며 방사선 조사후 발생하는 bioluminescence는 luminometer (Tuner TD-20e)를

이용하여 측정되었다.

결과 및 고찰

발광성 미생물을 이용하여 γ -rays로 인한 Cellular stresses 규명

여러 가지 문헌에서 γ -rays는 유전자 손상, 단백질 손상, 산화적 손상을 미친다고 보고하고 있다. 따라서 본 연구에서는 유전자 손상을 탐지할 수 있는 DPD2794 (*recA*)와 단백질 손상을 탐지하는 TV1061 (*grpE*), 산화적 손상을 탐지하는 DPD2511 (*katG*), 생물막 손상을 탐지하는 DPD2540 (*fabA*)를 사용하여 실험을 실시하였다. 동일하게 0.1Gy에서 300Gy까지의 방사선을 조사받아 발생하는 bioluminescence를 측정한 결과, DPD2794와 DPD2540에서 반응성이 나타나는 것을 확인하였는데, 이로 인해 이 범위에서는 유전자 손상과 생물막 손상이 유발된다는



것을 확인하였다. 또한 이러한 반응성은 조사받은 총 방사선량과 상관관계를 지니는 것으로 유해 방사선에 대한 정량적인 분석이 가능하다는 것을 확인하였다. 아래의 Fig.1은 유해 방사선으로 인한 유전자 손상을 DPD2794를 이용하여 확인한 결과이다.

Figure 1. ^{60}Co 의 여러 가지 선량에 따른 DPD2794의 반응성

γ -rays의 선량을 변화에 따른 Cellular stresses와 General toxicity에의 영향

본 실험은 일정하게 조절된 방사선 세기에서 실험을 실시하였는데, 1, 50, 200, 300 Gy에서 23, 30, 60, 90, 120 분 동안 노출을 실시하여 유전자 손상을 탐지하는 DPD2794와 세포내 general toxicity를 탐지하는 GC2의 결과를 확인하였다. 아래 Fig.2를 보면 dose rate이 증가할수록 발광성 미생물의 반응성이 증가하는 것을 확인할 수 있다. DPD2794의 경우는 유전자 손상이 발생시에 생물학적 빛이 증가하는 반응 형태를 나타내며, GC2는 일반적인 스트레스에 반응을 생물학적 빛의 감소 형태로 나타내게 된다. 따라서 gamma ray의 dose rate이 증가할수록 세포내에서의 유전자 손상과 세포성장 저해를 일으키는 일반적인 스트레스가 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 dose rate은 source로 부터의 거리와 노출시간을 조절하면서 변화시킬 수 있었는데 동일한 선량에서 비교해 볼 때, 일정한 거리에서 노출시간을 짧게 하는 것은 dose rate이 증가하게 되기 때문에, 오랜 시간을 노출한 것보다 심

각한 스트레스를 받게 되는 것을 확인하였다.

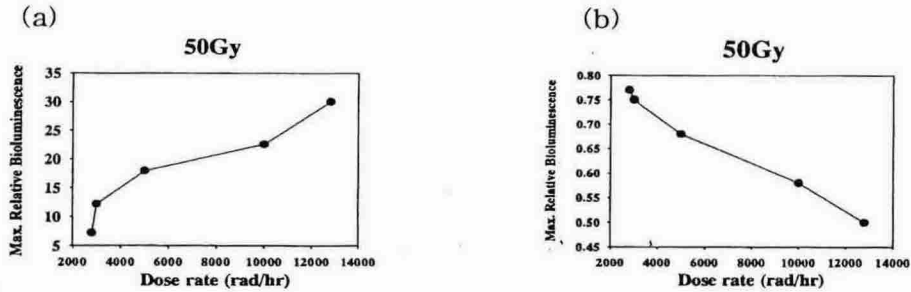


Figure 2. (a) Dose rate이 다른 50Gy에 대한 DPD2794의 반응성, (b) 동일한 조건의 GC2

요약

본 연구는 5가지의 발광성 미생물을 이용하여 유해 방사선으로 알려져 있는 γ -rays가 여러 가지 cellular stresses 중, 특히 유전자 손상과 생물막 손상을 유발하였는데, 이들의 손상 정도가 총 방사선량과 상관관계가 있음을 발생하는 bioluminescence 로써 확인하였다. 뿐만 아니라, 선량률의 변화를 통하여 방사선으로 인한 유전자 손상 및 일반적인 독성 효과가 큰 영향을 받는 것을 확인하였는데, 선량률 증가에 따라 이들 손상정도가 증가하는 것으로 보아 선량률이 genetic 및 radioprotecion에 심각한 영향을 미치는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 99년도 원자력기초연구사업의 지원과 함께 한국과학재단의 환경모니터링 신기술 센터 (ADEMRC)의 부분 지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

1. Thierry Douki, Thierry Delatour, and Jean Cadet. Measurement of Oxidative Damage at Pyrimidine Bases in γ -irradiated DNA. (1996) *Chem. Res. Toxicol.* 9:1145-1151
2. Min J., Lee C.W., Moon S.H., LaRossa R.A., and Gu M.B. Detection of radiation effects using recombinant bioluminescent Escherichia coli strains. (2000) *Radiat Environ Biophys.* 39:41-45.2.
3. Vilenchik M.M. and Knudson A.G. Inverse radiation dose-rate effects on somatic and germ-line mutations and DNA damage rates. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:5381-5386