

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19510062

研究課題名（和文）クラスターDNA 損傷に対する修復欠損突然変異株の単離

研究課題名（英文）Isolation of repair-deficient mutants for clustered DNA damage

研究代表者

鹿園 直哉（SHIKAZONO NAOYA）

独立行政法人日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究主幹

研究者番号：10354961

研究成果の概要（和文）：本研究課題において、クラスターDNA 損傷を構成する DNA 損傷の位置、種類が放射線の生物作用に強く関与することを明らかにした。また、損傷のクラスター化は放射線による電離の空間密度に依存して生じることがわかった。これらの結果は、放射線の生物作用を理解し、放射線のリスク評価、放射線治療の高度化に資するための重要な基礎的知見である。

研究成果の概要（英文）：We have found that the position and types of lesions within the clustered DNA damage are strongly relevant to the biological consequences of clustered DNA damage. We have also demonstrated that the clustering of DNA damage is strongly related to the ionizing density of the radiation. These results have important implications for both the understanding of underlying mechanisms of radiation action to cells and the practical application of ionizing radiation (ie. assessment of low dose risk, improvement of radiation therapy etc.).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線生物影響、クラスターDNA 損傷、突然変異

1. 研究開始当初の背景

細胞中での修復機構との関連においてなぜ非2本鎖切断型クラスターDNA 損傷が高い生物効果をもつのか、そのメカニズムについては未解明であった。我々は興味深い現象として、大腸菌 *fpgmutY* 二重変異株では、8-oxoG

及び DHT という2種類の DNA 損傷から構成されるモデルクラスターDNA 損傷は単独の8-oxoG よりもさらに高い頻度でGからTへのトランスポージョン（8-oxoG 由来の変異）が誘発されることを見いだしていた。DHT は変誘発能がないことが知られており、*fpgmutY* 二重

変異株では、8-oxoG の変異抑制作用がほとんどないと考えられるため、8-oxoG が単独の場合とクラスター内にある場合で変異頻度に差はないはずである。そのためこの結果は大変意外であった。

2. 研究の目的

非 2 本鎖切断型のクラスターDNA 損傷の生物作用に関与する因子/経路の同定、さらにはその生物学的意義の解明を目指すため、(1) 8oxoG と DHT 以外の損傷から構成されるクラスターDNA 損傷の生物作用 (2) 各種の修復欠損変異株におけるクラスターDNA 損傷の生物作用、(3) 線質の異なる放射線による非 2 本鎖切断型のクラスターDNA 損傷の収率、を明らかにするための研究を行った。

3. 研究の方法

DNA 損傷をもつオリゴヌクレオチドを合成し、モデルクラスターDNA 損傷を作成した。このモデルクラスターDNA 損傷を薬剤耐性遺伝子をもつプラスミドに連結後、野生株及び各種突然変異体に形質転換した。形質転換後、薬剤耐性下で大腸菌を生育させコロニー形成を行い、コロニー形成率からクラスターDNA 損傷の複製効率を測定した。また、形質転換された大腸菌からプラスミドを抽出し、生じた突然変異の頻度及び塩基配列変化を調べた。各種の DNA 修復欠損株は、大腸菌ストックセンター等から大腸菌株を入手し、P1 形質導入法により isogenic な一重、二重、三重変異株を作成した。

放射線によって誘発されるクラスターDNA 損傷の測定においては、水和プラスミド(pUC18)を用い、日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所のイオン照射施設(TIARA)にて He イオンの照射を行った。クラスターDNA 損傷の収率は、照射後のプラスミドに塩基除去修復酵素 (Fpg, Nth) を処理し、その後の 2 本鎖切断量を測定することによって算出した。

4. 研究成果

8-oxoG とチミングリコールや 1 本鎖切断からなるモデルクラスターDNA 損傷を用い、8-oxoG と対合したアデニンを取り除く活性をもつ MutY がクラスターDNA 損傷の変異抑制に最も重要であることを明らかにした。さらに、チミングリコールの除去に深く関与する Nth 及び Nei 及びその両方を欠損させた変異株での変異誘発を調べ、これらの酵素の欠損は 8-oxoG の変異抑制に効果がなく、体内ではチミングリコールの存在下で 8-oxoG の除去は阻害されることを見出した。さらに各種変異体を用いた研究から、8-oxoG を含むクラスターDNA 損傷では、主要な塩基除去修復酵素 Fpg, MutY, Nth, Nei 以外の作用で変異頻度が増大する経路があることを明らかにした。

損傷の配置によって変異誘発効果が影響を受けるかどうかを野生株及び各種除去修復欠損株で調べたところ、2 つの損傷が互いに相補鎖上にあるときは単独損傷に比べ変異誘発頻度の増加がみられる一方、2 つの損傷を同一鎖に配置させると変異頻度は変化しないことを見出した。この結果は、同一鎖の損傷修復に一本鎖切断修復 (SSBR) の関与を示唆するものである。また、2 つの損傷間

の距離が離れるにしたがって損傷のクラスター化の効果は減少することを確認した。これらの結果は損傷の相対的な配置や数がどのように生物効果につながるのかを示すものであり、放射線生物学的に非常に重要な知見である。

一方、塩基損傷を含まない、脱塩基部位や一本鎖切断より構成されるクラスターDNA 損傷に関して、その生物作用を野生株で詳細に調べた。これらの実験から、塩基損傷を含まないクラスターDNA 損傷の作用は塩基損傷を含むクラスターDNA 損傷の作用と大きく異なり、(1) 複製効率が非常に低いこと、(2) 生き残ったコロニーでの変異頻度が非常に高いこと (3) 損傷間が互いに 3' 方向に配置されているときの方が 5' 方向に配置されているときに比べ生物作用が高くなること、を見出した (Fig. 1.)。

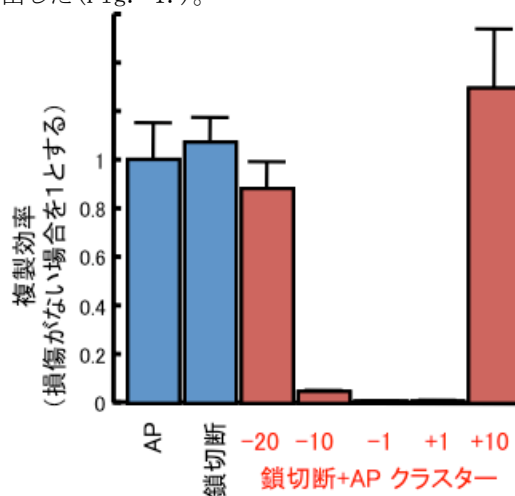


Fig.1. 鎖切断と脱塩基部位 (AP) が相補鎖上に配置されたクラスターDNA 損傷の大腸菌野生株における複製効率。AP 及び鎖切断は単独損傷、鎖切断+AP クラスターはクラスターDNA 損傷を表す。鎖切断+AP の数字は AP に対する鎖切断の相対位置を示す (-: 損傷が互いに 3' 方向に配置、+: 損傷が互いに 5' 方向に配置、数字: 損傷間の塩基対数)

これらの結果は、クラスターDNA 損傷を構成する損傷の種類及び配置が生物作用に強く関連することを示すものである。

以上、本研究で、クラスターDNA 損傷を構成する DNA 損傷の位置、種類を変化させながら生物作用を詳細に調べた結果、8-oxoG の変異抑制に塩基除去修復酵素以外の因子が関与すること、相補鎖にある 2 つの損傷の生物効果は高いが同一鎖にある 2 つの損傷の生物作用は低いこと、さらに生物作用は損傷位置の方向に左右されること、が明らかになった。これらのことから、クラスターDNA 損傷の生物作用には SSBR もしくは DNA 複製時の DNA 合成過程が深く関与する可能性が考えられる。

また、様々な線質の放射線によるクラスターDNA損傷の収率を明らかにするため、水和DNAを様々な線エネルギー付与(LET)のHeイオンで照射し、非2本鎖切断型を含むクラスターDNA損傷の検出を試みた。その結果、LETの増大によってクラスターDNA損傷の収率の増大が生じることが明らかになった。これは、放射線による電離の空間密度に依存して損傷のクラスター化が生じることを示唆するものであり、放射線の生物作用を考える上で重要な知見である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Urushibara, A., Shikazono, N., O'Neill, P., Fujii, K., Wada, S., Yokoya, A. LET dependence of the yield of single-, double-strand breaks and base lesions in fully hydrated plasmid DNA films by 4He(2+) ion irradiation. Int J Radiat Biol. 査読有, 84, 2008, 23-33.
- ② Shikazono, N., Noguchi, M., Fujii, K., Urushibara, A., Yokoya, A. The yield, processing, and biological consequences of clustered DNA damage induced by ionizing radiation. J Radiat Res. 査読有, 50, 2009, 27-36.
- ③ Bellon, S., Shikazono, N., Cunniffe, S., Lomax, M., O'Neill, P. Processing of thymine glycol in a clustered DNA damage site: mutagenic or cytotoxic. Nucleic Acids Res. 査読有, 37, 2009, 4430-4440.
- ④ Shikazono, N., O'Neill, P. Biological consequences of potential repair intermediates of clustered base damage site in *Escherichia coli*. Mutat Res. 査読有, 669, 2009, 162-168.

[学会発表] (計10件)

- ① 鹿園直哉, Colin Pearson, John Thacker, Peter O'Neill, 8-oxoGとDHTからなるクラスターDNA損傷のプロセッシング経路、第50回日本放射線影響学会、2007.
- ② Shikazono, N., Pearson, C., Thacker, J., O'Neill, P. Mutagenic potential of clustered DNA damage site in *Escherichia coli*. The 13th International Congress of Radiation Research, 2007.
- ③ 鹿園直哉、野口実穂、漆原あゆみ、Peter O'Neill、横谷明德、鎖切断と脱塩基部位からなるクラスターDNA損傷の生物効果、第51回日本放射線影響学会、2008.
- ④ 野口実穂、漆原あゆみ、横谷明德、鹿園

直哉、8-oxoGを含むクラスターDNA損傷誘発突然変異における1本鎖切断の影響、第51回日本放射線影響学会、2008.

- ⑤ Shikazono, N., Pearson, C., Thacker, J., O'Neill, P. Mutagenic potential of clustered DNA damage site in *Escherichia coli*. The 9th International Workshop on Radiation Damage to DNA, 2008.
- ⑥ Yokoya, A., DNA damages induced by ion particles and photons with various energies. The 9th International Workshop on Radiation Damage to DNA, 2008.
- ⑦ 横谷明德、牛込剛史、田内広、鈴木雅雄、鶴岡千鶴、野口実穂、藤井健太郎、鹿園直哉、渡邊立子、イオンビーム照射により高水和DNAフィルム中に誘発されるDNA鎖切断及び塩基損傷収率のLET依存性、第52回日本放射線影響学会、2009.
- ⑧ 鹿園直哉、野口実穂、漆原あゆみ、Peter O'Neill、横谷明德、大腸菌におけるクラスターDNA損傷誘発突然変異、第52回日本放射線影響学会、2009.
- ⑨ 野口実穂、漆原あゆみ、横谷明德、鹿園直哉、同一鎖上に配置されたクラスターDNA損傷のプロセッシングについて、第52回日本放射線影響学会、2009.
- ⑩ Shikazono, N., Noguchi, M., Urushibara, A., O'Neill, P., Yokoya, A., Processing and biological consequences of clustered DNA damage containing a single strand break and an AP site. 第32回日本分子生物学会、2009.

[その他]

URL:

http://asrc.jaea.go.jp/asr_ja/co_p/groups/g_8_j.html

クラスターDNA損傷による生物効果
—近接したDNA損傷による突然変異誘発—
未来を拓く原子力 原子力機構の研究開発成果2008、6-5.

(http://jolifukyu.tokai-sc.jaea.go.jp/fukyu/mirai/2008/index_set.html)

クラスターDNA損傷の生物影響 日本原子力研究開発機構 基礎科学ノート Vol16, 2009, 14-17.

(http://asrc.jaea.go.jp/asr_ja/co_p/online_note.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿園 直哉 (SHIKAZONO NAOYA)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・研
究主幹
研究者番号：10354961

(2)研究分担者

横谷 明德 (YOKOYA AKINARI)
独立行政法人日本原子力研究開発機
構・研究主幹
研究者番号：10354987

(3)連携研究者

()

研究者番号：