

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21310041

研究課題名(和文)放射線によるクラスターDNA損傷の構造と難修復特性の研究

研究課題名(英文) Study of radiation-induced cluster DNA damage- its structure and repair susceptibility

研究代表者

横谷 明德 (YOKOYA, Akinari)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 先端基礎研究センター・研究主席

研究者番号：10354987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円、(間接経費) 4,140,000円

研究成果の概要(和文)：クラスターDNA損傷の構造と生成機構の解明を目指し、生化学的手法と分光学的手法の両面から様々な放射線照射したDNA試料の分析を行った。その結果、イオンビーム照射により生じるクラスターDNA損傷の収率を決定するとともに、コンピュータシミュレーションによるデータ解析と損傷生成モデルの構築を行った。さらに高輝度軟X線放射光ビームラインに設置されたEPR装置を用いて、DNA中の元素の内殻電子の励起に特有なラジカル生成反応があることなどを見出した。これらの成果は国内外の会議で発表するとともに、25報の論文として発表した。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the induction processes of clustered DNA damage, we have investigated the radiation effect on DNA molecules using both biochemical and spectroscopic techniques. We determined the yields of clustered DNA damage induced by various ion beam exposure. The data were analyzed using a computer simulation method to establish a damage induction model. Further we found a novel radical process involved in the DNA damage induction using an EPR apparatus installed in a high brilliance synchrotron radiation facility. These results have been presented in a number of symposiums or workshops, and also published as 25 peer review papers.

研究分野：環境解析学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：クラスターDNA損傷 放射線 シンクロトロン放射光 イオンビーム DNA修復 軟X線 EPR DNAラジカル

1. 研究開始当初の背景

放射線による細胞致死や突然変異誘発などの生物影響の主要な要因のひとつは、ゲノム DNA 上の数ナノメートル程度のごく局所に放射線のエネルギーが集中した結果生じる複数の損傷（以下、クラスター損傷）であることが指摘されてきた。このような複雑な DNA 損傷は、生体の有する酵素的修復を大きく阻害する可能性がある。しかし、実際に放射線誘発されたクラスターを構成する個々の損傷の数や種類、あるいは分子上における分布について明確な回答は未だ得られていない。DNA 分子に実際の放射線照射で生じる損傷に関する数や種類、分布情報及び難修復性に関する知見が得られれば、クラスター損傷の生成機構及び生体内における難修復特性など生物学な本質に大きく迫ることがでる。

2. 研究の目的

放射線照射により DNA 分子中に生じるクラスター DNA 損傷の構造とその難修復特性を明らかにすることを目的とした。特にクラスター損傷を構成すると推測されている DNA の片鎖の切断型損傷（1 本鎖切断:SSB）、両鎖切断（2 本鎖切断:DSB）及び 8 オキシグアニン等の塩基損傷に加え、これまで知見の少ない AP サイト（脱塩基部位）に着目し、これらクラスターを構成する損傷の DNA 分子上での数や配置と共に、クラスター損傷がどのように生体修復を阻害するのかを解明することを目指した。またこれらの損傷の生成過程を、シンクロトロン放射を利用した分光学的な手法から、不安定な反応中間体の観測により明らかにすることも目指した。

3. 研究の方法

（1）クラスター DNA 損傷の構造と生成機構に関する研究：

高いイオン化密度を与えるイオンビームを DNA 試料に照射した後、生化学手によりクラスターを構成する要素（損傷）の種類や数を調べた。さらに用いた線量分布構造（トラック構造）についてモンテカルロ法によるコンピュータシミュレーションを行い、クラスター DNA 損傷誘発に関する生成モデルを構築した。

（2）シンクロトロン放射光を用いた DNA 損傷の分光学的研究：

シンクロトロン軟 X 線ビームライン（SPring-8）に設置した電子常磁性共鳴（EPR）装置により、内殻イオン化領域の軟 X 線の照射中のみ観測さえる不安定な反応中間体である DNA やこれを構成する核酸塩基ラジカルを観測し、その収率の軟 X 線のエネルギー依存性を調べた。

4. 研究成果

（1）クラスター DNA 損傷の構造と生成機構に関する研究：

クラスター DNA 損傷は、DNA の 1~2 ヘルキルターン（約 7 nm 以内）に、2 個以上の損傷が 1 トラックにより生成した状態と定義される。複雑なクラスター損傷を高頻度で誘発するとされている、高 LET 放射線による DNA 損傷効果を調べるため、水和したプラスミド DNA フィルムを作成し試料とした。水和した DNA は、生理条件下での立体構造を保持している。試料内にはバルクの水がないため、水の放射線分解で生じる OH ラジカル等との反応によりランダムに生成する孤立した損傷の生成を極力抑え、DNA と放射線トラックの直接の反応で生じたクラスター損傷を浮き彫りにすることができる。

ヘリウム、炭素及びネオンのイオンビームを試料に照射した後、生成した損傷を観測した。8 オキシグアニンなどのプリン塩基損傷及びジヒドロチミンなどのピリミジン塩基損傷は、それぞれこれらを特異的に除去する Fpg 及び Nth 酵素で試料を処理することで二本鎖切断に変換してその収率を求めた。その結果、各イオンビームのイオン化密度（線エネルギー付与（LET））が増加するのに伴い、二本鎖切断は増加するもののクラスター損傷は予想に反して減少することが明らかになった。この理由として二つの可能性が考えられる。ひとつは、高 LET 領域ではクラスター化の度合いが高くなり、塩基損傷を検出するためのプローブとして用いた各酵素の働きを阻害していること、また二つ目は高 LET 領域では塩基損傷が生成し難い可能性があることである。

一方、DNA 損傷生成をコンピュータシミュレーション解析する目的で、DNA の水溶液試料に対する照射実験も並行して進めた。本実験ではバルクの水に生じた OH ラジカルが損傷誘発に主要な役割を果たす。そこでラジカルスキャベンジャー濃度を様々に変えたプラスミド DNA を試料として用い、OH ラジカルの効果を制御した上で異なるイオン種・LET の放射線を照射した際に生じる鎖切断及び AP サイト（脱塩基部位）とこれを含むクラスター DNA 損傷の収率の測定を行った。AP サイトについては、高い LET を照射した時の収率に関する知見はまだ少ない。AP サイトは、AP lyase のひとつである大腸菌由来の Endoculease IV（Nfo）で処理することで、定量可能な損傷である鎖切断にした。試料中のスキャベンジャー濃度を変えることで、AP サイト生成に果たす直接効果と間接効果の違いについても調べた。

その結果、調べた線質および LET のすべてで Nfo 認識サイトはいずれも一本鎖切断（SSB）の収率の半分程度であった。得られた実験結果を、モンテカルロシミュレーションから得られた理論的な収率と比較した。その結果、クラスター化していない一本鎖切断と AP サイトの収率は、シミュレーション解析を行った結果と良好一致を示した（図 1）。またこの二つの損傷は非常に良く似たスキャバ

ンジャー濃度の依存性を示したことから、図2に示すような共通の中間体を経る可能性が示された。

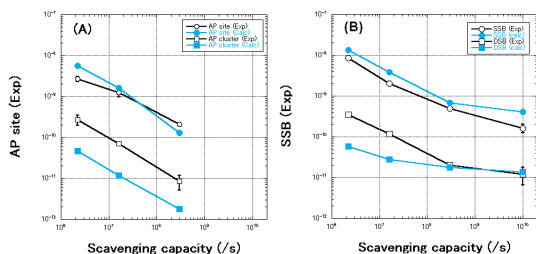


図1 一本鎖切断及びAPサイトの収率のスキャベンジャー濃度に対する依存性

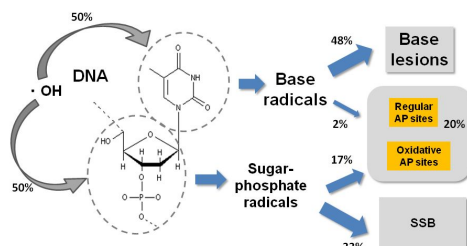


図2 推定されたAPサイトと一本鎖切断(SSB)及び塩基損傷(Base lesions)の生成経路

二本鎖切断及びAPサイトを含むクラスター損傷については、いずれも実験値の方がシミュレーションにより予測される値よりも数倍~10倍程度大きかった(図1)。このことから、クラスター損傷や二本鎖切断など損傷が局在化する際には、まだ知られていない機構を考慮する必要があることが示唆された。恐らくDNA分子上のイオン化や励起部位の移動(電子や正孔(ホール)の移動)が関与していると推定される。

(1) シンクロトロン放射光を用いたDNA損傷の分光学的研究:

DNA損傷に至る過程では、不對電子を有する反応中間体を経ると考えられている。不對電子は、最外殻の電子軌道にひとつだけ存在している電子で非常に反応性に富む。一方これは不對電子を含む部位の寿命を短くしている原因でもあり、不對電子の直接観測は極めて困難であった。これまでは照射後のDNA試料を極低温に保持しながら電子常磁性共鳴(EPR)装置まで運搬して不對電子を測定するため、搬送中に消失してしまう不安定な不對電子は測定できないなど多くの問題があった。本研究では高い輝度を持つSpring-8の放射光の特性を生かし、特定の波長に選別した後でも十分な強度を持つ細いX線ビームを直接EPR装置内に導入することで運搬による不對電子消失を解消した。DNA薄膜試料へ照射しながら、DNA分子中に生じた不安定な不對電子の生成量を、EPR信号強度として「その場」観察した。照射するX線のエネルギーを少しずつ変えることで、DNA分

子を構成する窒素及び酸素原子のK殻電子のイオン化レベル付近において不對電子の生成量がどのように変化するかを詳細に調べた。その結果、図3に示すようにK殻電子がX線を吸収する確率(図2中の青線)に対応して不對電子の生成量も変化することがわかった。さらに興味深いことに、イオン化レベルをわずかに超えたエネルギーのX線を照射した場合、DNAのX線吸収確率に基づいた予想を超え異常にEPR信号が増大することを見出した(図3中の赤線)。

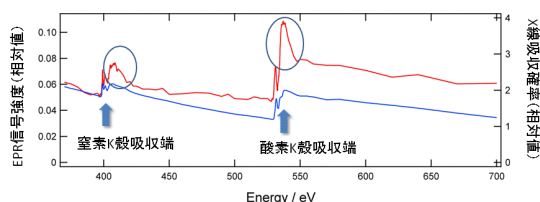


図3 DNAに対する窒素及び酸素のK吸収端の軟X線照射により観察されるEPR信号(赤)の変化とDNAの軟X線吸収確率(青)

物質がX線を吸収する場合、イオン化レベルをわずかに超えたエネルギーでは、衝突後相互作用(PCI: Post Collision Interaction)が生じることが知られている。これは、原子から離脱しようとする一対の電子のうちの一つが、その途中で再び原子に捕獲される現象で、その結果高いエネルギーの軌道に電子がひとつだけ残されるため、これがEPR信号強度の増大原因であることが予測された。そこでこのようなPCIを考慮した半古典的な理論計算を行ったところ、実験データと非常に良い一致をみたため本研究で観測された以上なEPR信号の増大はPCI効果によるものと推定された。この結果は、これまで知られていなかった特定のエネルギーで生じるイオン化プロセスに関与したDNA損傷の生成過程が存在することを示している(図4)。

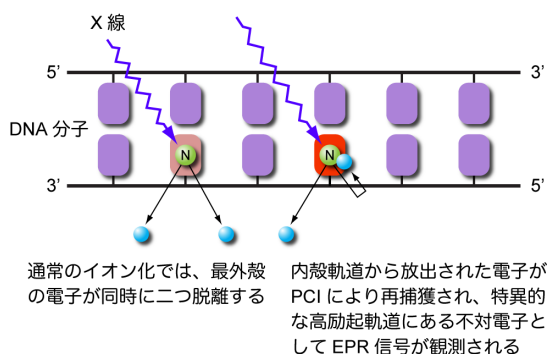


図4 DNA中の特定元素(図では窒素原子)のK殻へのX線吸収過程と不對電子生成

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計25件)

Shiina, T., Watanabe, R., Shiraishi, I., Suzuki, M., Sugaya, Y., Fujii, K.

and Yokoya, A. Induction of DNA damage, including abasic sites, in plasmid DNA by carbon ion and X-ray irradiation. *Radiat. Environ. Biophys.* **52**, 99-112, 査読有 (2013).

Oka, T., Yokoya, A., Fujii, K., Fukuda, Y. and Ukai, M. Unpaired electron species in calf thymus DNA thin films induced by nitrogen and oxygen K-shell photoabsorption. *Phys. Rev. Lett.* **109**, 213001, 査読有 (2012).

Noguchi, M., Urushibara, A., Yokoya, A., O' Neill, P. and Shikazono, N. The mutagenic potential of 8-oxoG/single strand break-containing clusters depends on their relative positions. *Mutat. Res.* **732**, 34-42, 査読有 (2012).

Yokoya, A., Shikazono, N., Fujii, K., Noguchi, M. and Urushibara, A. A novel technique using DNA denaturation to detect multiply induced single-strand breaks in a hydrated plasmid DNA molecule by X-ray and 4He²⁺ ion irradiation. *Radiat. Protect. Dosim.* **143**, 219-225, 査読有 (2011).

Shikazono, N., Noguchi, M., Fujii, K., Urushibara, A. and Yokoya, A. The yield, processing, and biological consequences of clustered DNA. (Invited Review) *J. Radiat. Res.* **50**, 27-36, 査読有 (2009).

Fujii, K., Shikazono, N. and Yokoya, A. Nucleobase Lesions and Strand Breaks in Dry DNA Thin Film selectively induced by Monochromatic Soft X-rays. *J. Phys. Chem. B.* **113**, 16007-16015, 査読有 (2009)

〔学会発表〕(計 25 件)

岡壽崇、高輝度軟 X 線を用いた不対電子観測による DNA 損傷の物理学的プロセス、(招待講演)物構研サイエンスフェスタ 2013、2013 年 3 月 18-19 日、つくば市 Sugaya, Y., Narita, A., Fujii, K. and Yokoya, A. DNA damage by soft X-ray exposure at oxygen K-edge. 1st Conference on Light and Particle Beams in Materials Science, 2013, Tsukuba, Japan.

Shiina, T., Sugaya, Y., Shiraishi, I., Watanabe, R., Suzuki, M., Yokoya, A. Dependence of the yields of AP sites and AP clusters produced in plasmid DNA on scavenging capacity and LET. The 12th International Workshop on Radiation Damage to DNA, June 2 - 6, 2012 Prague, Czech Republic.

横谷明德、放射線によるゲノム DNA 損傷の初期過程と生体修復、(招待講演)日本

物理学会第 67 回年次大会、2012 年 3 月 24-27 日、西宮市

Oka, T. Study of Unpaired Electron Species in DNA Film Induced by Nitrogen and Oxygen K-shell Photoabsorption. The 7th Auger Symposium, August 24 - 26, 2011 Jülich, Germany.

Yokoya, A. Various modes of DNA damage formation by the direct effect of radiation. (Invited talk) The 56th Annual Meeting of Radiation Research Society, September 25-29, 2010, Hawaii, USA.

Yokoya, A., Oka, T., Fujii, K., Shiina, T., Sugaya, Y., Shiraishi, I., Urushibara, A., Narita, A., Noguchi, M. and Watanabe, R. (Invited talk) Molecular and Cellular Effect of Ionizing Radiation. The 16th SANKEN International The 11th SANKEN Nanotechnology Symposium 2013, January 22-23 Osaka, Japan.

〔図書〕(計 1 件)

Yokoya, A., Fujii, K., Shikazono, N. and Ukai, M. Chapter 20. Spectroscopic study of radiation-induced DNA lesions and their susceptibility to enzymatic repair. *In: Charged particle and photon interactions with matter-recent advances, applications and interfaces*, Eds., Y. Hatano, Y. Katsumura, and A. Mozumder, CRC/Taylor & Francis Group, USA, pp543-574. (2011).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://asrc.jaea.go.jp/soshiki/gr/yokoya-a-gr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横谷 明德 (YOKOYA, Akinari)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 先端基礎研究センター・研究主席

研究者番号：10354987

(2) 研究分担者

鹿園 直哉 (SHIKAZONO, Naoya)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究主幹

研究者番号：10354961

渡辺 立子 (WATANABE, Ritsuko)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 原子力基礎工学研究

センター・研究副主幹
研究者番号：10360439

藤井 健太郎 (FUJII, Kentaro)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 先端基礎研究センター・研究副主幹
研究者番号：00360404

野口 実穂 (NOGUCHI, Miho)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 先端基礎研究センター・研究員
研究者番号：40455283

樋口 真理子 (HIGUCHI, Mariko)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 原子力基礎工学研究センター・任期付研究員
研究者番号：90370460

岡 壽崇 (Oka, Toshitaka)
東北大学・高等教育開発推進センター・助教
研究者番号：70339745

(3)連携研究者 なし