

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651044

 研究課題名（和文） 日光紫外線による三重項励起状態を介したシクロブタン型
ピリミジンダイマー生成の証明

 研究課題名（英文） Demonstration of the formation of cyclobutane pyrimidine dimers
through the excited triplet state mediated by solar UV radiation

研究代表者

池畑 広伸 (IKEHATA HIRONOBU)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90250737

研究成果の概要（和文）：

長波長紫外線によるシクロブタン型ピリミジンダイマー（CPD）DNA 損傷生成の機構モデルとして励起三重項を介した光化学反応を仮定しその証明を目指したが、別の反応機構に基づくことが報告され、研究方針をその新規反応機構の特徴づけに転換した。その結果、我々が以前同定した日光特異的な solar-UV signature 変異はこの新規メカニズムによる CPD 生成に起因していること、UVA1 で最も発生しやすいことが分かった。

研究成果の概要（英文）：

I tried to demonstrate that the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) by long wavelength UV radiations is mediated by a photochemical reaction through the excited triplet states of DNA bases. However, it was reported by others that the long wavelength UV-induced CPD formation is mediated by another novel mechanism, which made us change the goal of this research and characterize the novel mechanism by studying comparatively the mutation spectra induced by long wavelength UV. We found that solar-UV signature mutations, which we had identified before as solar UV-specific mutations, are caused through the CPDs produced by this novel mechanism, and are induced most efficiently by UVA1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響学

キーワード：紫外線、光生物学、光化学、環境

1. 研究開始当初の背景

DNA は 260 nm 付近の短波長紫外線を最もよく吸収し、シクロブタン型ピリミジンダイマー（CPD）と(6-4)光産物（64PP）という2種類の安定した DNA 損傷を生じる。これは励起一重項状態に活性化したピリミジン塩基の光化学反応によるが、主に長波長紫外線からなる日光紫外線でも、反応効率は下がるものの同じ機構がはたらいっているとこれまで考えられてきた。しかし近年の研究で励起一重項まで活性化するにはエネルギー不足

と思われる長波長紫外線 UVA1 でも CPD が生成することが明らかとなり（このとき 64PP は生成しない）(Mouret *et al.*, PNAS 103: 13765-13770, 2006; Ikehata *et al.*, J. Invest. Dermatol. 128: 2289-2296, 2008)、従来の CPD 生成機構モデルを再考する必要が出てきた。

そこで我々は「日光紫外線の波長域では主に三重項励起状態を介して CPD が生成する」という仮説を提案した(Ikehata *et al.*, 2008 同上)。ピリミジンの三重項は一重項よりも励起に必要な光エネルギーが低く、長波長紫外線のエネルギーで十分と考えられた。三重項励

起状態は「磁氣的揺さぶり」に弱いという特徴があり (Eisinger & Shulman, PNAS 55: 1387-1391, 1966)、これを利用すれば三重項由来の CPD 生成が証明できると予測された。「磁氣的揺さぶり」として常磁性体を利用し予備実験では常磁性金属イオンの一種である Mn^{2+} 存在下で UVB による CPD 生成が大幅に抑制されることを観察していた。

2. 研究の目的

代表的な紫外線特異的 DNA 損傷としてよく知られている CPD が、これまで広く信じられてきた励起一重項だけではなく、日光を主な紫外線源とする地表環境では長波長紫外線による励起三重項を介した光化学反応により生成するとする仮説の証明を目指した。証明には励起三重項が常磁性体や電磁波による「磁氣的揺さぶり」に弱いことを利用した。更にこの励起三重項を介する CPD 生成反応の波長依存性・塩基配列特異性を解析し、その特徴を把握することも研究目的とした。またこれにより我々が提唱している「solar-UV signature」変異がこの三重項由来 CPD に起因する突然変異型であることを示す。証明が成功した場合は、これらの成果を応用し、「磁氣的揺さぶり」の一種である電磁波を利用して、日光紫外線によるゲノム毒性を抑制する方法の開発も目論んだ。

3. 研究の方法

(1) 励起三重項を介した CPD 生成の証明

DNA または培養細胞に常磁性体存在下で波長の異なる紫外線を照射し、CPD 生成が抑制されるか検討する。常磁性体として Mn^{2+} , Cu^{2+} 等の常磁性金属イオンを用い、対照として Mg^{2+} , Zn^{2+} 等の非常磁性金属イオンを用い比較する。紫外線については励起一重項を介した反応を誘発する UVC を殺菌灯で、励起三重項を介した反応をもたらすと予想される UVB-UVA を UVB ランプまたはブラックライトで、それぞれ照射する。CPD の検出・定量はモノクローナル抗体を用いた ELISA 法で行い、同時に 64PP の検出・定量も同じ方法で行う。64PP は励起一重項反応の寄与の見積りに用いる。

(2) 三重項 CPD 生成反応条件の解析

①三重項 CPD 生成の波長依存性解析: UVC, UVB, UVA2, UVA1 の異なる波長域の紫外線を利用して、三重項を介した CPD 生成反応の波長依存性を明らかにする。各紫外線波長域で常磁性イオンの有無による CPD 生成量の違いを調べ、励起三重項を介した CPD の生成量が紫外線波長によりどう変化するか解析する。解析は DNA、培養細胞、または動物皮

膚で行う。

②三重項 CPD 生成の塩基配列特異性: 日光紫外線の波長域では、メチルシトシン存在部位で CPD が生成しやすくなり、誘発される突然変異パターンにも影響することが知られており、我々はこの長波長紫外線特異的な変異型を「solar-UV signature」変異と呼ぶことを提唱している。この日光紫外線によるメチルシトシンでの CPD 生成促進もその波長依存性から励起三重項を介した反応に起因している可能性が高い。常磁性体イオン存在下では長波長紫外線によるメチルシトシンでの CPD 生成が抑制されることを示し、「solar-UV signature」が三重項 CPD 生成に起因していることを証明する。ligation-mediated PCR (LMPCR) 法等を用い、長波長紫外線照射した細胞またはゲノム DNA の *p53* 遺伝子等で塩基配列レベルの解析を行い、常磁性体イオンのシトシンメチル化部位での CPD 生成への影響を調べる。この解析は研究分担者の小村が担当する。

(3) 電磁波を利用した成果の応用

①電磁波による三重項 CPD 生成抑制の試み: 電磁波照射下で DNA または培養細胞に長波長紫外線を照射し、電磁波による三重項由来 CPD 生成の抑制効果を調べる。電磁波の周波数・出力を変え、最も効果的に三重項 CPD の生成を抑制する条件を探る。

②動物個体への応用: 三重項 CPD 生成抑制に効果を示した電磁波の照射下でマウス個体に長波長紫外線を照射し、当該電磁波による紫外線ゲノム毒性防御効果を、皮膚における CPD 生成量・誘発突然変異頻度を解析して確認する。

4. 研究成果

予備実験の結果から励起三重項を介した CPD 生成では、DNA 分子自体が直接光エネルギーを吸収して生成する可能性が大きいと予想されたので、直接 DNA に常磁性体存在下で波長の異なる紫外線を照射し、CPD 生成が抑制されるか検討した。常磁性体として Mn^{2+} イオンを用い、対照として Mg^{2+} の非常磁性金属イオンを用い比較した。紫外線については励起一重項を介した反応を誘発する UVC を殺菌灯で、励起三重項を介した反応をもたらすと予想される長波長紫外線をナローバンド UVB ランプで、それぞれ照射した。その結果、UVB では Mn^{2+} イオン存在下で CPD 生成が、 Mg^{2+} イオン存在下よりも抑制される傾向を確認した。しかしここで高濃度の Mn^{2+} イオン存在下で DNA の沈殿が生じやすくなる問題が浮上した。沈殿すると DNA の回収が不安定になり、定量的な扱いが困難になることが研究の妨げとなった。

日光紫外線の波長域におけるメチルシトシン存在部位での CPD 生成促進が励起三重項を介した反応に起因している可能性を検討するため、ligation-mediated PCR (LMPCR) 法などを用いて紫外線照射したゲノム DNA で塩基配列レベルの解析を行う実験条件を検討した。上記と同様にして常磁性体イオン存在下で紫外線照射したマウスゲノム DNA を用いたが、やはり沈殿しやすくなるために安定した DNA 収量を得ることが困難であることがわかった。

沈殿の問題を解決するため、非吸着性素材でできた実験器具の利用や、他の常磁性体イオンの利用などを検討したが、結果が不安定で確定的な結論に至らずにいた。そうしているうちに UVA 領域での CPD 生成が励起三重項を介した反応ではなく、DNA の二重鎖構造に伴う塩基のスタッキングの影響であるとする研究が発表された (Banyasz et al. 2011, J. Am. Chem. Soc. 133: 5163–5)。この研究により我々の仮説は再考を迫られることとなり、ここで研究方針を転換して Banyasz らにより提案された新たなメカニズムによる長波長紫外線による CPD 生成がどのような塩基配列特異性を示すのか、波長依存性かどうかを検証し、その特徴を解析することにした。

そこで UVC から UVA1 までの様々な波長の紫外線を照射したマウス皮膚における誘発突然変異のスペクトルを解析し、それらを互いに比較した。実際には UVC を殺菌灯で、UVA1 は Sellamed2000 (独 Sellas 社) を利用して照射を行った (図 2 参照)。UVB、UVA2、日光、364 nm レーザ光については我々の過去の研究データを利用した (H. Ikehata et al., Environ. Mol. Mutagen., 2003, 41: 280–292; Ikehata et al., Mutagenesis, 2003, 18: 511–519; Ikehata et al., Mutat. Res., 2004, 556: 11–24; Ikehata et al., J. Invest. Dermatol., 2008, 128: 2289–2296)。Sellamed2000 による UVA1 照射は名古屋市立大学医学研究科皮膚科の森田明理教授の協力のもと実施した。

その結果、長波長紫外線による CPD 生成に起因すると考えられる突然変異は従来考えられていた UVB 領域 (280–320 nm) よりも波長の長い UVA 領域 (320–400 nm)、特に UVA1 領域 (340–400 nm) で最もよく生成しやすいことが明らかとなり、Banyasz らにより提唱された新規メカニズムに良く合致した。またメチル化シトシン部位では考えられる 2 種類のメチル化シトシン部位のうち 5'-CCG-3'部位よりも 5'-TCG-3'部位に生成しやすいことも明らかとなった (図 1)。

我々が以前同定し、「solar-UV signature」変異と呼ぶことを提案した日光紫外線特異的な突然変異は、この新規メカニズムによる CPD 生成に起因していることが分かった (図 2)。紫外線で特異的に誘発される突然変異

は従来「UV signature」変異と呼ばれ、ピリミジン塩基が並列する dipyrimidine 部位での C→T 塩基置換や CC→TT 並列塩基置換であるが、「solar-UV signature」変異はメチル化シトシン部位に発生した UV signature 変異である。もともと UVA では TT 部位に CPD が生成しやすいことが知られていたが、シトシンがメチル化すると 5'-TC-3'部位でも CPD 生成が促進されることが我々の研究により強く示唆された。この結果は日光等の環境紫外線の影響を考える際に人類を含むメチル化したゲノムを持つ生物にとって極めて重要な知見である。メチル化シトシンをゲノム DNA に持つ生物は日光に含まれる波長の長い紫外線に感受性が高いことを意味しており、これまで UVB を中心に防護対策が考えられてきた紫外線のゲノムリスク評価に再考を促すものである。以上の研究結果は論文にまとめられ既に発表している (Ikehata et al. Photochem. Photobiol. Sci., 2013, in press)。

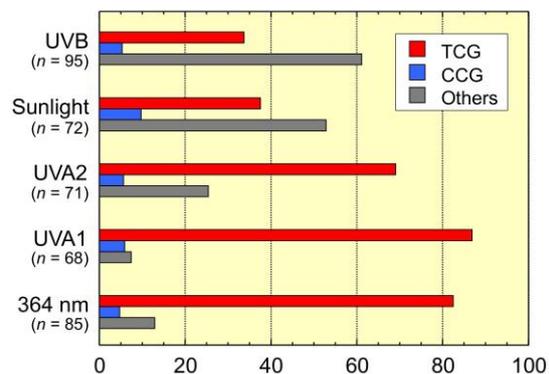


図1: 紫外線特異的な突然変異の発生部位特異性。各種紫外線によって誘発された紫外線特異的な突然変異 (dipyrimidine 部位における C→T 塩基置換) を発生部位塩基配列の違いによって分類し、それぞれの発生数の割合 (%) を示した。

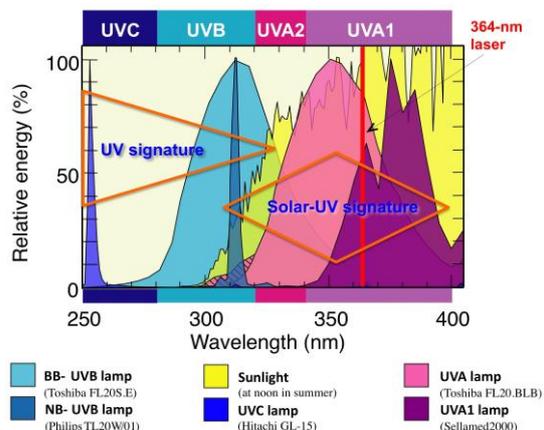


図2:使用紫外線源の出力波長分布と紫外線特異的突然変異の誘発波長依存性。「UV signature」変異はピリミジン塩基が並列する dipyrimidine 部位での C→T 塩基置換や CC→TT 並列塩基置換である。「solar-UV signature」変異はメチル化シトシン部位に発生した UV signature 変異である。

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 6 件)

1. H. Ikehata, J. Kumagai, T. Ono & A. Morita (2013) Solar-UV-signature mutation prefers TCG to CCG: extrapolative consideration from UVA1-induced mutation spectra in mouse skin. *Photochem. Photobiol. Sci.* in press. DOI: 10.1039/c3pp25444e. 査読あり
2. H. Ikehata, S. Higashi, S. Nakamura, Y. Daigaku, Y. Furusawa, Y. Kamei, M. Watanabe, K. Yamamoto, K. Hieda, N. Munakata & T. Ono (2013) Action spectrum analysis of UVR genotoxicity for skin: the border wavelengths between UVA and UVB can bring serious mutation loads to skin. *J. Invest. Dermatol.* 133:1850–1856. DOI: 10.1038/jid.2012.504. 査読あり
3. H. Ikehata, S. Higashi & Y. Kamei (2012) Significance of Erythema for the Response of Mutation Induction Suppression in UV-exposed Skin. *Photomed. Photobiol.* 34: 39–40. (<http://square.umin.ac.jp/jspp/member/proceed/proceedings.pdf>) 査読なし
4. J. Komura, H. Ikehata, T. Mori & T. Ono (2012) Fully functional global genome repair of (6-4) photoproducts and compromised transcription-coupled repair of cyclobutane pyrimidine dimers in condensed mitotic chromatin. *Exp. Cell Res.* 318:623–631. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.01.003. 査読あり
5. 池畑広伸 (2012) 紫外線誘発突然変異の波長依存性. 太陽紫外線防御研究委員会学術報告 22 (1):25–29. 査読なし
6. H. Ikehata, S. Higashi, Y. Kamei & T. Ono (2011) Quantitative assessment of the genotoxicity in skin exposed to solar UV. *Photomed. Photobiol.* 33:19–20. 査読なし
7. 池畑広伸 (2011) 紫外線防御化粧品の性能評価—皮膚ゲノム毒性を指標とした新たな評価法. *Fragrance Journal*, 39 (7):32–37. (http://www.fragrance-j.co.jp/magazine/fragrance_backno_201107.html) 査読なし

[学会発表] (計 11 件)

1. 池畑広伸, MIS 応答波長依存性に基づく紫外線治療法デザインの提案、第 2 回光

皮膚科学研究会、2013 年 2 月 17 日、名古屋

2. H. Ikehata, Identification and characterization of the response of mutation induction suppression (MIS) in mouse epidermis. The 8th 3R Symposium, 2012 年 11 月 25–27 日、兵庫県淡路島
3. 小村潤一郎、池畑広伸、小野哲也、M 期の凝縮した染色体における DNA 二本鎖切断の修復とその影響、影響学会第 55 回大会、2012 年 9 月 8 日、仙台
4. 池畑広伸、生体皮膚における紫外線ゲノム毒性に対する応答、影響学会第 55 回大会、2012 年 9 月 6 日、仙台
5. 池畑広伸、東正一、亀井保博、皮膚における紫外線に対する変異誘発抑制応答と紅斑反応の関連、第 34 回日本光医学・光生物学会、2012 年 7 月 27 日、神戸
6. 池畑広伸、紫外線と放射線—何が違うか、光皮膚科学研究会設立大会、2012 年 3 月 25 日、東京
7. 池畑広伸、紫外線誘発突然変異の波長依存性、太陽紫外線防御研究委員会第 22 回シンポジウム、2012 年 3 月 23 日、東京
8. 小村潤一郎、池畑広伸、森俊雄、小野哲也、M 期の凝縮した染色体における DNA 修復: 効率的なゲノム全体の除去修復と不活性な転写共役修復、影響学会第 54 回大会、2011 年 11 月 18 日、神戸
9. 池畑広伸、東正一、亀井保博、小野哲也、突然変異を指標にした太陽紫外線皮膚ゲノム毒性評価、日本放射線影響学会第 54 回大会、2011 年 11 月 17 日、神戸
10. H. Ikehata, Risk estimation of the solar-UV genotoxicity for skin. 5th Asia Oceania Conference on Photobiology. 2011 年 7 月 30 日、奈良
11. 池畑広伸、東正一、亀井保博、小野哲也、突然変異作用スペクトルに基づく太陽紫外線皮膚ゲノム毒性の評価、第 33 回日本光医学・光生物学会、2011 年 7 月 22 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池畑 広伸 (IKEHATA HIRONOBU)
東北大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 90250737

(2) 研究分担者

小村 潤一郎 (KOMURA JUNICHIRO)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 10215410

(3) 連携研究者

()

研究者番号：