

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651049

研究課題名(和文)ゲノム損傷の個別可視化に基づく損傷多重度の解析

研究課題名(英文)Analysis of the multiplicity of DNA damage by direct observation of DNA

研究代表者

井出 博 (IDE, Hiroshi)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30223126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム損傷の生物影響は、損傷の構造と量に依存することが知られているが、理論面からは第3の因子としてDNA二重らせん上の損傷分布(損傷多重度)の重要性が示唆されている。しかし、多重損傷を一般的に解析する実験手法はない。本研究では、DNAグリコシラーゼとアルデヒド反応性プローブを用いた損傷部位の特異的抗体標識と走査型プローブ顕微鏡による可視化観察を組み合わせることにより、多重損傷の一般的な解析手法を検討し、その道筋を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：The biological effects of DNA lesions depend on their quantity and structure. In addition, theoretical and some experimental studies suggest that the local multiplicity of DNA lesions also plays an important role in determining biological effects. However, the experimental method to measure the multiplicity of DNA lesions remains to be established. In the present study, we developed a method to analyze the multiplicity of DNA lesions by direct observation of DNA. The base lesions were converted to abasic sites by DNA glycosylases. The resulting abasic sites were tagged with an aldehyde reactive probe followed by an antibody, and finally visualized by a scanning probe microscope.

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：DNA損傷 修復 生物影響

1. 研究開始当初の背景

放射線や変異原物質が誘発するゲノム損傷の「構造」と「量」は、機器分析技術の進歩により近年著しく精密化・高感度化し、生理的に意味のある暴露レベルで解析が可能になってきた。これらに加え、ゲノム損傷の重篤度に関する第3の因子として「DNA二重らせん上の損傷分布(損傷多重度)」の重要性が、理論研究およびモデル実験から示唆されている。しかし、現在の分析手法では、多重損傷を直接的なDNA二本鎖切断(DSB)あるいは修復酵素誘発 DSBとして解析するため、損傷の多重度に関する情報は得られない(図1)。

研究代表者は、これまでの研究でDNAの脱塩基部位(apurinic/aprimidinic site, AP site)を特異的に標識するプローブ分子(aldehyde reactive probe, ARP)を開発し、DNA損傷の定量に応用してきた。ARPは、DNA中のアルデヒドに特異的に結合しビオチン標識を導入する。放射線やゲノム傷害性化学物質では、AP site、切断端に損傷糖を保持する一本鎖切断(SSB)、塩基損傷が生じる。AP siteおよびSSBはARPで直接標識される。ピリミジンおよびプリン塩基損傷は、それぞれ特異的なDNA glycosylase処理でAP siteに変換することによりARP標識される。したがって、この方法により、ゲノム中の損傷部位をARP標識することができる(図2)。DNAに結合したARPは分子サイズが小さいため直接的な多重度の観察は難しいが、ビオチン特異的なタンパク質(ビオチン抗体あるいはアビジン)を結合させ分子サイズを大きくすることにより、この複合体を走査型プローブ顕微鏡(SPM)で可視化できると予想した(図2)。

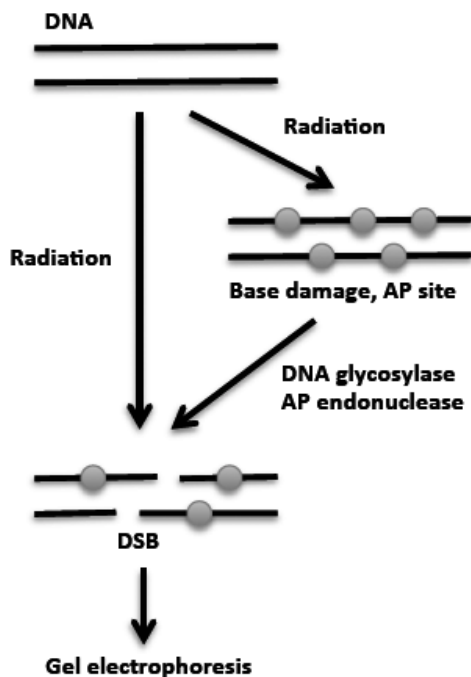


図1 DSB形成に基づく多重損傷の検出

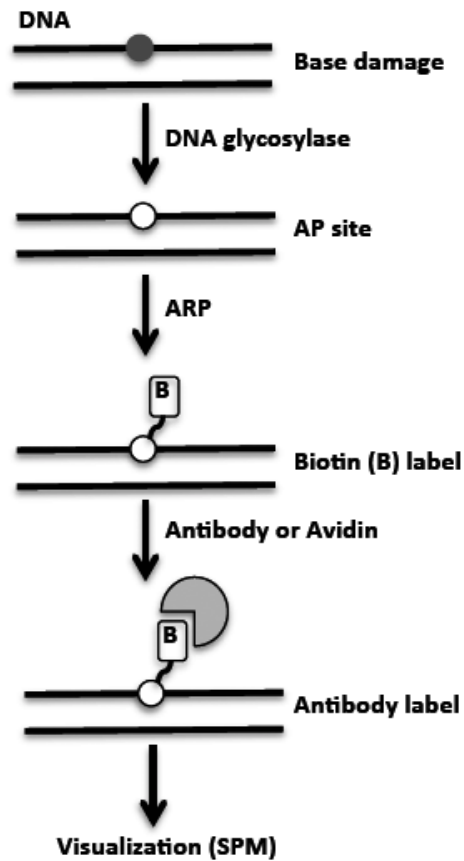


図2 ARPを用いた損傷の可視化原理

2. 研究の目的

ゲノム損傷の生物影響は、損傷の構造と量(生成量あるいは未修復量)に依存することが知られている。さらに、理論面からは第3の因子としてDNA二重らせん上の損傷分布(損傷多重度)の重要性が示唆されている。しかし、多重損傷を一般的に解析する実験手法はない。本研究では、研究代表者がこれまでに確立した損傷部位の特異的標識方法とSPMによる可視化観察を組み合わせることにより、多重損傷の一般的な解析手法を確立する。

3. 研究の方法

(1) DNA調製: uracilを1つまたは2つ含む22merオリゴヌクレオチドを化学合成した(図3)。これをT4キナーゼにより5'末端³²P標識した。uracilを含むDNAを調製するため、forward primerおよび図3に示すuracilを含むオリゴヌクレオチド(5'末端³²P標識)をreverse primerとして用い、pGL4.50プラスミドの632-747部位および10-747部位をPCRにより増幅した。PCR産物として、116bp(短鎖DNA)および738bp(長鎖DNA)のDNAを得た。

(2) 短鎖DNAを用いた標識条件の検討: 短鎖DNAをuracil DNA glycosylase(Udg)で処理し、uracilをAP siteに変換した。AP siteを含むDNAをARPとインキュベートし、AP

site を ARP で標識した。さらに、この ARP 標識 DNA をビオチン抗体とインキュベートし、AP site を抗体標識した。生成物は、未変性 PAGE あるいは変性 PAGE で分析した。

(3) 長鎖 DNA を用いた標識条件の検討：uracil から AP site への変換、AP site の ARP 標識、抗体標識は短鎖 DNA の方法に準じて行った。標識後の生成物は制限酵素 BanI で処理し、5' 末端 ³²P 標識断片 (116mer) を分析した。生成物は、未変性 PAGE あるいは変性 PAGE で分析した。

(4) SPM 観察：(2) と同様に調製した抗体標識 DNA (³²P 非標識) をマイカ基板に滴下し、SPM で観察した。

(5) DNA glycosylase 処理条件の検討：pUC19 プラスミドを TE 緩衝液に溶かし、X 線を 200 Gy 照射した。X 線照射した DNA を DNA glycosylase (Endonuclease III (Endo III), 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1)) で処理し、ピリミジン塩基損傷 (Endo III) およびプリン塩基損傷 (OGG1) を SSB 型の AP site に変換した。OGG1 の場合は、酵素反応後に N,N'-dimethylethylenediamine (DMED) 処理を行った。プラスミドのコンホメーション変化は、アガロース電気泳動で分析した。

Oligo Sequence (5'→3')

1U ggttcacuaaacgagctctgcttatatagac
 2U3 ggttcactaaacgagctcugctuatatagac
 2U8 ggttcacuaaacgagcuctgcttatatagac
 2U18 ggttcacuaaacgagctctgcttatauagac

図 3 本研究で用いた uracil (u) を含むオリゴヌクレオチド

4. 研究成果

(1) 短鎖 DNA を用いた標識

uracil を含む短鎖 DNA (116 bp) を Udg で処理し、生じた AP site を ARP で標識した。変性 PAGE で標識生成物を分析した結果、非標識の DNA より移動度の遅いバンドが 2 種類観察された。移動度の違いは導入した uracil の数に対応しており、この結果から、AP site が定量的に ARP 標識されたことがわかった。次に、ARP 標識した短鎖 DNA をビオチン抗体とインキュベートし、反応生成物を未変性 PAGE で分析した。抗体非標識 DNA より移動度の遅いバンドが 2 種類観察された。移動度の違いは導入した ARP の数に対応しており、この結果から、ARP サイトが抗体標識されることがわかった。抗体で標識されなかった DNA の量から、一つ目の抗体は定量的に結合しており、さらに、二つ目の抗体も 80%以上の効率で導入されることがわかった。二つ目の抗体の標識効率率は、損傷の間隔 (3~18 bp, 図 3) に依存しなかった。この結果は、損傷が 3 塩基以上離れていれば、抗体同士の立体障害

はほとんどなく、二つの損傷部位が別々に抗体標識できることを示している。

(2) 長鎖 DNA を用いた標識

uracil を含む長鎖 DNA (738mer) を Udg で処理し、生じた AP site を ARP で標識した。導入された ARP を分析するため、BanI で処理し、5' 末端 ³²P 標識断片 (116mer) を変性 PAGE で分析した。その結果、非標識の DNA より移動度の遅いバンドが 2 種類観察された (図 4)。次に、ARP 標識した DNA (738mer) をビオチン抗体とインキュベートし、BanI 処理後、反応生成物を未変性 PAGE で分析した。抗体非標識 DNA より移動度の遅いバンドが 2 種類観察された (図 5)。バンド移動度の違いは導入した ARP の数に対応していたことから、長鎖 DNA でも損傷間の距離にかかわらず損傷が抗体標識できることがわかった。

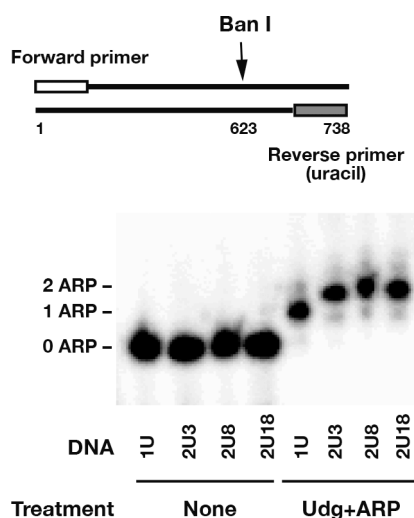


図 4 長鎖 DNA を用いた ARP 標識の解析

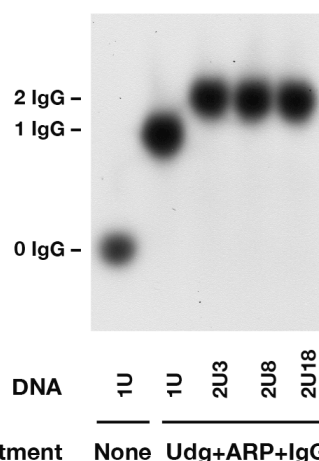


図 5 長鎖 DNA を用いた抗体標識の解析

(3) SPM 観察

³²P 非標識の長鎖 DNA (738mer, 約 240 nm) を用いて、Udg 処理、ARP 標識、ビオチン抗体標識を行い、標識した DNA を SPM で観察した。末端に抗体が結合した DNA が観察された。図 6 に uracil を一つ含む DNA (1U) の結果を

示す。uracil を含むプライマーは DNA 末端に位置することから、可視化により抗体結合部位と uracil 部位 (= 損傷部位) が一致することを確認できた。抗体が結合した DNA と結合していない DNA の割合は、それぞれ 80% および 20% であった。PAGE 分析では、ほぼ 100% の DNA が抗体と結合していたことから (図 5)、抗体処理後から SPM 観察の間の操作で抗体が一部解離した可能性がある。uracil を二つ含む DNA (2U18) でも末端に抗体が結合した DNA が観察された。結合した抗体のサイズは、uracil を一つ含む DNA より大きかった。より分解能の高い SPM プローブを用いて二つの抗体が分離できるか検討している。

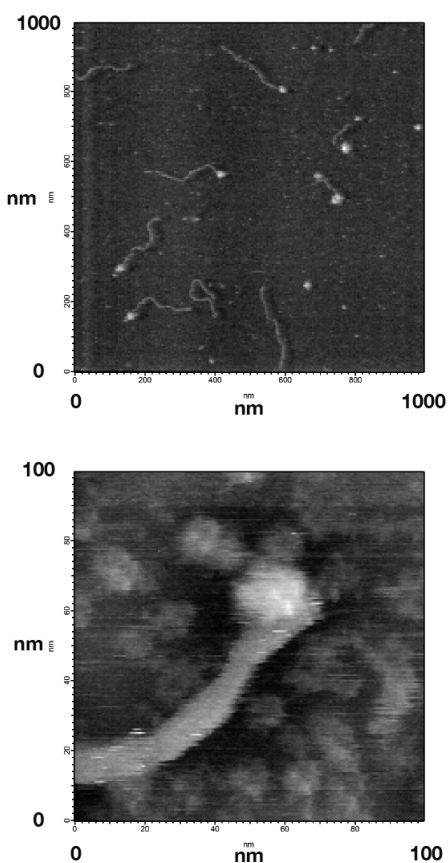


図 6 抗体標識長鎖 DNA (1U) の SPM 観察像

(4) DNA glycosylase 処理

放射線照射により生成した塩基損傷を AP site に変えるために (図 2)、Endo III および OGG1 の処理条件を検討した。X 線を 200 Gy 照射した pUC19 プラスミドと酵素をインキュベートし、プラスミドをアガロース電気泳動で分析した。塩基損傷から AP site (SSB 型) への変換量は、プラスミドのコンホメーション変化から調べた (図 7)。Endo III では、nicked circular および linear DNA の増加が 80 ng でほぼ一定になった。また、OGG1 (+ DMED) では、nicked circular および linear DNA の増加が 0.3 unit でほぼ一定になった。この結果は、この酵素処理条件を用いると、放射線が誘発した塩基損傷を定量的に AP

site に変化できることを示す。

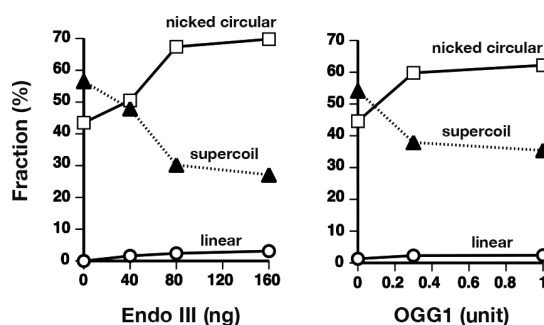


図 7 脱塩基部位 (鎖切断型) 形成の DNA glycosylase 量依存性

以上、本研究により塩基損傷および AP site を可視化する道筋 (図 2) が確立された。現在、放射線照射した細胞から DNA を抽出し、Endo III/OGG1 処理、ARP 標識、抗体標識を行い、SPM で DNA を観察している。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- 大場俊也, 謝明章, Mahmoud Shoulkamy, 中野敏彰, 井出博, アルデヒド化合物が誘発する致死ゲノム損傷, 日本環境変異原学会第 42 回大会, 2013. 11. 29-30, 岡山市
- 井出博, 草場成美, 杉本達哉, 中野敏彰, 宮本(松原)真由美, 放射線が誘発する多重 DNA 損傷の解析と修復, 日本放射線影響学会第 56 回大会, 2013. 10. 18-20, 青森市
- Hiroshi Ide, Toshiaki Nakano, Mayumi Miyamoto-Matsubara, Mahmoud Shoulkamy, Effects of covalently trapped proteins on DNA transactions, 1st International Symposium of the Mathematics on Chromatin Live Dynamics, 2013. 3. 14-15, Higashi-Hiroshima, Japan
- Mahmoud Shoulkamy, 光定雄介, 大場俊也, 中野敏彰, 松原(宮本)真由美, 井出博, Analysis of DNA-protein cross-links induced by ionizing radiation and genotoxic chemicals, 第 37 回中国地区放射線影響研究会, 2012. 7. 27, 広島市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井出 博 (IDE, Hiroshi)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 30223126