

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82110

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651057

研究課題名(和文)非DNAに対する放射線損傷に伴う生物影響の検討

研究課題名(英文)Study of Biological Effect induced by Radiation Damage of non-DNA Molecules

研究代表者

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

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)：リボ核酸の一種であるアデノシン三リン酸(ATP)は、生体エネルギー供与物質として様々な生化学反応へエネルギーを供与している。また同時に、遺伝情報の仲介物質であるメッセンジャーRNAを合成するための基質として、さらには細胞間情報伝達物質としても働く。本研究では、 γ 線やX線などの電離放射線により、ATPに生じた放射線障害が、ATPのもつ生物学的作用にどのようなかかわっているかに注目して、その生物学的効果への寄与を解析することを試みた。

研究成果の概要(英文)：ATP (Adenosine tri-phosphate), one of ribonucleic acids, acts as an intra-cellular energy transfer. ATP is also used as a substrate to synthesize messenger RNA and as a ligand of inter-cellular signaling. Damaged ATP produced by ionizing radiations might act as down- or up-regulation of these biological function. In this study, we examined the relation between molecular damage of ATP and its biological activity by using various biological assessments, such as energy donor activity, genetic information transfer, and inter-cellular signaling activity.

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：放射光 電離放射線 非DNA ATP 質量分析 電気化学分析 生物学的効果 細胞間情報伝達

1. 研究開始当初の背景

リボ核酸 (Ribonucleic acid, RNA) の一種であるアデノシン三リン酸 (ATP) は、生体エネルギー供与物質として多様な生化学反応へエネルギーを供与している。さらに、ストレス刺激により細胞外に放出された ATP は細胞膜上の ATP 受容体を介して細胞間情報伝達を担っていることが知られている。最近分担者 (月本光俊) により、放射線被照射細胞から放出された ATP が ATP 受容体を活性化させ放射線生物影響に関与していることが示された (Tamaishi et al., *Radiat. Res.*, 2010)。これにより、放射線バースタnder効果 (照射細胞周囲の非照射細胞にも照射の影響が現れる現象) への ATP 受容体の関与が明らかになった。そして、本課題を遂行する我々のグループは、原子力機構外部補助金 (黎明研究: (代表者・秋光信佳)) において、放射線を照射した ATP の生物学的効果に関する基礎的研究を行った。その結果、 γ 線照射した ATP では細胞間情報伝達能が増加し、軟 X 線を照射した ATP では伝達能が低下するという興味深い結果を得た (Akimitsu et al., 2011 *JAEA-Review*)。さらに、その伝達能は顕著な軟 X 線エネルギー依存性を示した (図1)。その他、ATP のエネルギー供与能力や分子変異の分析結果から、ATP 分子内の塩基部位であるアデニンに生じた、僅かな分子変異が生物効果を大きく変化させる可能性を示唆するデータを得た。しかし、その詳細については不明であるため、分子変異とそれに伴う生物効果の相関を詳細に解析することが急務課題であった。

一方 ATP は、遺伝情報の仲介物質であるメッセンジャー RNA を合成するための基質でもあるため、遺伝子情報の正確な発現にも重要な働きをしている。この RNA 合成に異常が生じた場合、正常なタンパク質が作られないために細胞内ホメオスタシ

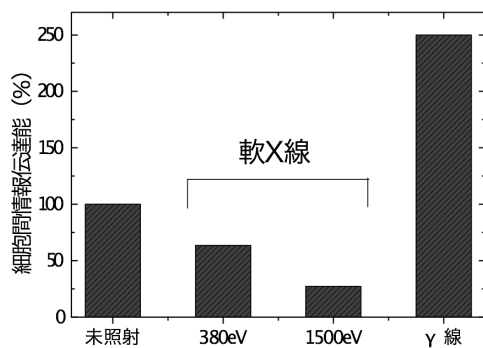


図1 放射線照射した ATP の細胞間情報伝達能力

ス (恒常性) の維持に重大な問題の生じる事が分担者 (秋光信佳) によって示されている (Akimitsu et al., *J. Biochem.*, 2008, Akimitsu et al., *EMBO J.*, 2007)。上記の黎明研究によって明らかになった、ATP の塩基部位に生じる僅かな分子変異が、この RNA 合成にも深く関わり、突然変異や発がんの原因となる可能性がある。そこで、本課題では、放射線生物影響分野において通常ターゲットとされる DNA 以外の分子が損傷を受けた場合に引き起こす生物効果を指標として ATP の生化学機能を網羅的に解析した。それにより、非 DNA の放射線損傷がどのような生物学的効果を示すかを検証した。

2. 研究の目的

本研究では、非 DNA 性の核酸生体分子である RNA 分子が、放射線によって損傷した場合の生体影響を多角的に解析し、どのような生物学的効果を示すかを *in vitro* および *in vivo* 実験で検証することが目的である。リボ核酸の一種であるアデノシン三リン酸 (ATP) は、生体エネルギー供与物質として多様な生化学反応へエネルギーを供与している。さらに、遺伝情報の仲介物質であるメッセンジャー RNA を合成するための基質でもあるため、遺伝子情報の正確な発現にも重要な働きをしている。そのため、ATP の塩基部位に生じる僅かな分子変異が、この RNA 合成にも深く関わり、突然変異や発がんの原因となる可能性がある。そこで、本課題では、DNA 以外の分子が損傷を受けた場合に引き起こす生物効果を指標として ATP の生化学機能を網羅的に解析した。

3. 研究の方法

(1) 軟 X 線吸収分光法による分子変異のその場観測 (原子力機構 藤井健太郎 (代表者))

放射光照射実験直後に、軟 X 線吸収スペクトルを測定することにより、照射によってどのような変異が導入されているかを解析した。特に X 線吸収端近傍には分子構造を反映した共鳴励起構造が現れる。これらの吸収構造が照射によってどのように変化するかを観測することで、照射によって分子に生じた分子構造変化を予測した。

(2) 質量分析法による分子変異の高分解能分析 (産総研 藤井紳一郎 (分担者))

軟 X 線や γ 線の照射により薄膜内に生じた僅かな ATP の分子変異を同定する必要がある。また、これまでの予備的な実験ではアデニン部位に生じる細かい

分子変化が、生物効果を大きく左右する可能性が高いことが示された。そこで、担当者（藤井紳一郎）により、高速液体クロマトグラフ質量分析装置を用いて ATP に生じた分子変異構造の同定を行った。また、軟 X 線の波長の僅かな変化によって生成された分解物の微量な生成物を高感度に分析するため、現有するナノ流量液体クロマトグラフ高分解能質量分析装置を利用した質量解析から変異した分子構造の同定を行った。

(3) ナノカーボン電極を用いた電気化学分析法による分子変異の定量分析(産総研 加藤大(分担者))

担当者(加藤大)らのグループで開発されたナノカーボン電極を用いて、照射を受けた ATP の電子移動反応(電気化学反応)を計測することで、主に電子移動反応を行うアデニン分子に関わる構造変異の解析を行った。実際に担当者らはこれまでに、ナノカーボン電極による計測で酸化損傷やメチル化など核酸塩基の変異を識別できることを見出している。(D. Kato, et al., Anal. Chem. 2011)本電極材料により、放射線と分子構造変異の相関性をより定量的に分析した。

(4) 生化学分析法による ATP 分子機能の定量解析(東大 秋光信佳(分担者))

ルシフェリンとルシフェラーゼ酵素を用いて、ATP のエネルギー供与能力を評価することができる。この系を用いて、軟 X 線照射された細胞から ATP を抽出し、ATP のエネルギー供与能力を高感度に評価することで、細胞内の ATP 機能を定量的に解析した。

(5) 分子変異した ATP がおよぼす遺伝情報伝達能力の解析(東大 秋光信佳(分担者))

試験管内 RNA 合成システムを用いて、放射線被照射 ATP が RNA 合成の基質として利用できるかを調べた。これにより、遺伝情報伝達物質の構成分子としての ATP の生理機能がどのような構造変異によって阻害されるかを評価した。さらに、試験管内タンパク質合成系(Akimitsu et al., EMBO J., 2007)を用いて、放射線被照射 ATP を含有したメッセンジャー RNA が正常なタンパク質へと翻訳されるかを調べた。これら一連の実験を通じて、軟 X 線照射が ATP の遺伝情報伝達能力に異常を引き起こすかを調べた。

(6) 分子変異した ATP がおよぼす細胞間情報伝達能力の解析(東理大 月本光俊(分

担者))

担当者(月本光俊)は、これまでに細胞膜上に発現する ATP 特異的受容体(P2 受容体)の生理機能解析の研究を行っている。X 線や γ 線照射によって変異した ATP が ATP 受容体のリガンド(細胞間情報伝達物質)としての機能を維持できているのか否かについて検討を行った。P2Y 受容体活性化を介した mitogen-activated protein (MAP) kinase の活性化や細胞内カルシウム濃度の上昇などの実験系を用いて、放射線照射 ATP が ATP 受容体(P2X と P2Y 受容体)の活性化を誘導できるか否かについて検討した。

4. 研究成果

放射線照射による ATP 分子の変化に伴った分子変異の分析や生物学的効果の分析を行うためには、未照射試料において分子の分解を抑えることが必要である。さらに、放射線によって生じた分子分解は全体の数%程度以下であることが予想されるため、極微量の分子変化を定量する必要がある。そのために、平成 24 年度は ATP 溶液について、放射線を照射しない状態で安定な試料条件を検討した。その結果、溶液状態においてリン酸基の脱離が起こらない Tris バッファの濃度や ATP の濃度の最適化を行うことができた。ATP 分子の分解については、質量分析、軟 X 線吸収スペクトルおよび電気化学分析により行い、生物学的効果については、ATP のルシフェラーゼ活性、および細胞間情報伝達能力を定量することのできる、P2Y 受容体活性により分析を行った。上記の最適条件を用いて、線照射あるいは軟 X 線照射による細胞間情報伝達および ATP 分子変異の解析を行い、放射線照射による分子変化の同定や生物学的効果の解析を行った。

平成 25 年度は、軟 X 線を照射したときに ATP 分子に生じる分子構造変化を、照射前後の軟 X 線吸収スペクトルの変化から予測した。その結果、ATP 薄膜に軟 X 線を照射すると、ATP 分子中の糖部位の C-O 結合切断が効率よく起こることが明らかになった。さらに、ATP 溶液に対して線照射を段階的に行い、液体クロマトグラフ質量分析装置(LC-MS)を用いた測定を行った。検出器としてすべての核酸を直接酸化検出することが可能なナノカーボン電極を配置した。線の照射量に応じた変化としては、リン酸基の加水分解による ATP 量の減少が見られた。また、質量分析結果から、リン酸基の加水分解以外の分子変化を示唆する結果を得た。電気化学分析では、リン酸基の加水分解に伴う ATP 量の減少

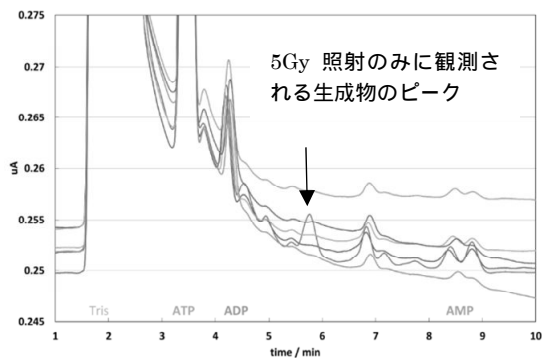


図2 線を照射したATP溶液のHPLC分析結果

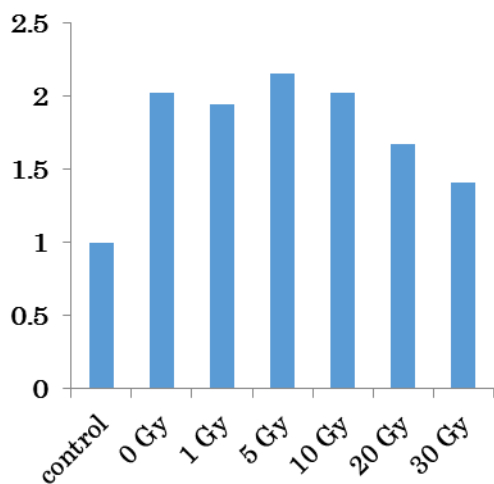


図3 線照射によるATP受容体活性化能の変化

が見られたことに加え、5Gyの線を照射したATP試料のみ、未知ピークが観測され、質量分析と同様の分子変化が観測された。電気化学的反応によって検出された観点から、アデニン環構造の破壊が起きている可能性は低く、不飽和二重結合への水酸基の付加反応や、アミノ基の酸化反応が進行していることが推察された。上記の分析に加えて、ATPの生化学的な活性を評価するために、ATP溶液を様々な線量の線あるいはX線を照射した後、ルシフェラーゼによるATP加水分解活性ならびに試験管内転写系を用いたRNA合成の基質としての活性の2点を調べた。その結果、放射線照射依存的なATP加水分解活性の低下が認められた。一方、RNA合成基質としての活性に明瞭な活性低下は認められなかった。これらの生化学実験の結果は、放射線照射によるATPの化学的変化がATPの生化学的活性の低下を導くことを示唆する。さらに、ATP受容体活性化能についてERK1/2活性化を指標に検討したところ、Tris溶解ATPの30Gy照射によりATP受容体活性化能が

低下していることが明らかとなった(図3)。また、5Gy照射では若干の増強効果が認められた。この増強効果は、上記の電気化学分析によって明らかになった塩基部分の分子変化に由来した生物学的効果の変化であると推察される。本課題では、ATPに対する線やX線などの照射により生じた様々な分子構造変異が、ATPの持つ生物学的効果を変化させること、そしてその効果はATPに生じた分子構造変化に依存することを見出すことができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

S. Ide, N. Nishimaki, M. Tsukimoto, and S. Kojima, Purine receptor P2Y6 mediates cellular response to gamma-ray-induced DNA damage, *J. Toxicol. Sci.*, 査読有, **39** (2014) 15-23.

DOI:10.2131/jts.39.15

藤井紳一郎、稲垣和三、宮下振一、長澤圭祐、千葉光一、高津章子, Separation and Quantification of RNA molecules using size-exclusion chromatography hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Electrophoresis*, 査読有, **35** (2014) 1315-1318.

DOI:10.1002/elps.201300477

K. Fujii, A. Narita, A. Yokoya, Bond cleavage of adenosine 5'-monophosphate induced by monochromatic soft X-rays, *J. Phys. Conf. Ser.* 査読有, **502** (2014) 012034. DOI:10.1088/1742-6596/502/1/012034

月本光俊、小島周二、放射線細胞応答における細胞外ヌクレオチドを介したautocrine/paracrine型シグナル伝達の役割、*放射線生物研究*、査読有, **48** (2013) 147-163 (総説)

D. Kato, O. Niwa, Carbon-based electrode materials for DNA electroanalysis, *Anal. Sci.*, 査読有, **29** (2013) 385-392. DOI:10.2116/analsci.29.385.

S. Fujii, K. Inagaki, S. Miyashita, K. Nagasawa, K. Chiba, A. Takatsu, A coupling system of capillary gel electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry for the determination of double stranded DNA fragments. *Metallomics*, 査読

有,5 (2013) 424-428.
DOI:10.1039/c3mt00057e.
K. Fujii, Y. Fukuda, A. Yokoya,
Observation of cleavage in DNA and
nucleotides following oxygen K-shell
ionization by measuring X-ray
absorption near edge structure, *Int.
J. Radiat. Biol.*, 査読有, **88** (2012)
888-894.
DOI:10.3109/09553002.2012.703363.
Y. Ohshima, M. Tsukimoto, H. Harada,
S. Kojima, Involvement of connexin43
hemichannel in A T P release after
-irradiation. *J. Radiat. Res.*, 査
読有, **53** (2012) 551-557.
DOI:10.1093/jrr/rrs014.
N. Nishimaki, M. Tsukimoto, A.
Kitami, S. Kojima, Autocrine
regulation of
-irradiation-induced DNA damage
response via extracellular
nucleotides-mediated activation of
P2Y6 and P2Y12 receptors., *DNA Repair
(Amst)*, 査読有, **11** (2012) 657-665.
DOI: 10.1016/j.dnarep.2012.05.005.
D. Kato, M. Sumimoto, A. Ueda, S.
Hirono, O. Niwa, Evaluation of
electrokinetic parameters for all
the DNA bases with sputter deposited
nanocarbon film electrode, *Anal.
Chem.*, 査読有, **84** (2012)
10607-10613.
DOI:10.1021/ac301964e.

[学会発表](計21件)

月本光俊、放射線細胞応答の新規メカ
ニズムとしてのプリナージック・シグ
ナリング、(日本薬学会奨励賞受賞講
演)、日本薬学会第134年会、
2014/3/28、熊本
藤井健太郎、放射線に強いバイオ材料
について、(招待講演)名古屋大学バイ
オインターフェース研究会 2014/3/4
名古屋大学
藤井健太郎、泉雄大、成田あゆみ、横
谷明德、M.A. Merve du Penhoat, A.
Touati, R. Vuilleumioer, M.P.
Gageot, M.F. Politis, 水和デオキシ
リボースの軟X線による分解過程、第
27回日本放射光学会年会、
2014/1/11、広島
M. Katsura, H. Nakamine, S. Amagasa,
N. Akimitsu, K. Miyagawa, Y. Wada,
DNA damage responses to external and
internal low dose radiation, 29th
RBC-NIRS Int. Symp. 2013/11/28, 京

都
藤井紳一郎、高津章子、オンライン濃
縮CE法を用いたヌクレオチド測定によ
るメチル化 DNA の分析, SCE2013,
2013/11/15, 日本女子大
K. Fujii, Y. Izumi, A. Narita, M.A.
Merve du Penhoat, A. Touati, R.
Vuilleumioer, M.P. Gageot, M.F.
Politis, A. Yokoya, MICROS2013,
2013/10/22, イタリア
桂真理、渡邊和則、石崎梓、秋光信佳、
天笠翔太、埤和之、和田洋一郎、児玉
龍彦、宮川清、井尻憲一、非密封放射
性セシウムを使用したヒト正常細胞に
おける低線量内部被ばく実験モデルに
よる DNA 損傷応答の解析、日本放射線
影響学会第56回年会、2013/10/18,
青森
藤井健太郎、泉雄大、成田あゆみ、横
谷明德、軟X線による水和デオキシリ
ボースの分解過程、第56回日本放射
線化学討論会、2013/9/28, 広島大
桂真理、山岸麗子、仲峰宏政、天笠翔
太、秋光信佳、曾根秀子、宮川清、和
田洋一郎、相原一、緑内障性視神経萎
縮における DNA 損傷応答の役割、第2
4回日本緑内障学会、眼薬理学会
2013/9/21, 京王プラザホテル
K. Fujii, S. Fujii, D. Kato, M.
Tsukimoto, N. Akimitsu, A. Narita, T.
Nakajima, S. Ide, S.K. Abduc, S.
Kojima, O. Niwa, A. Yokoya,
Observation of decomposition of A
T P induced by soft X-ray using
X-ray absorption spectroscopy,
LPBMS2013, 2213/8/29, つくば
藤井紳一郎、柴山祥枝、高津章子、RNA
Analysis Utilizing Size-exclusion
Chromatography, EuroAnalysis2013,
2013/8/28 ポーランド
M. Tsukimoto, 1st INTERNATIONAL
POSTGRADUATE CONFERENCE ON
PHARMACEUTICAL SCIENCES 2012,
2012/6/29, マレーシア
N. Nishimaki, M. Tsukimoto, A.
Kitami, S. Kojima, Involvement of
Purinergic Signaling in DNA Damage
Response after -Ray Irradiation,
Purine2012, 2012/6/2, 九州大学
藤井健太郎、軟X線でみた放射線の生
物影響、(招待講演)日本磁気学会第1
90回研究会、2013/5/26、中央大学
小島周二、増本佳那子、月本光俊、A
T Pシグナリングを介した線誘発
DNA 損傷修復での TRP チャネルの関与、
日本薬学会第133年会、

2013/3/30, 横浜
S. Fujii, K. Nagasawa, A.- S. Groombridge, K. Inagaki, K. Chiba, A. Takatsu, RNA analysis utilizing size-exclusion chromatography hyphenated with ICP-MS, 2013 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 2013/2/24, ポーランド

藤井 紳一郎, 長澤圭佑, G.-A. Simon, 稲垣和三, 高津章子, サイズ排除クロマトグラフィを用いた RNA 分析, 日本分析化学会第 61 回年会, 2012/9/19, 金沢大

K. Fujii, S. Fujii, D. Kato, M. Tsukimoto, N. Akimitsu, A. Narita, T. Nakajima, S. Ide, S.K. Abduc, S. Kojima, O. Niwa, A. Yokoya, ICESS-12 2012/9/18, St-Malo(France)

月本光俊、北見彰啓、大島康宏、本間拓二郎、鈴木明菜、前田宗利、宇佐美德子、小林克己、小島周二, X線マイクロビームを用いた細胞表面 ATP レベル変化の解析, 日本放射線影響学会第 55 回大会, 2012/9/6, 東北大

D. Kato, S. Fujii, A. Takatsu, S. Hirono, O. Niwa, Sputtered nanocarbon film electrode for detecting DNA molecules, ACS 244th Nat. Meet. 2012/8/19, フィラデルフィア

- 21 加藤大、隅本倫徳、上田晃生、廣野滋、丹羽 修、スパッタナノカーボン薄膜電極における全核酸塩基の電気化学特性、第 72 回分析化学討論会、2012/5/20、鹿児島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

秋光 信佳 (AKIMITSU, Nobuyoshi)
東京大学・アイソトープ総合センター・教授
研究者番号: 40294962

藤井紳一郎 (FUJII, Shin-ichiro)
独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・主任研究員
研究者番号: 10415739

加藤 大 (KATO, Dai)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
研究者番号: 80533190

月本 光俊 (TSUKIMOTO, Mitsutoshi)
東京理科大学・薬学部・講師
研究者番号: 70434040

成田あゆみ (NARITA, Ayumi)
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・博士研究員
研究者番号: 50633898

(3) 連携研究者

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

丹羽 修 (NIWA, Osamu)
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・総括研究主幹
研究者番号: 70392644

小島 周二 (KOJIMA, Syuji)
東京理科大学・薬学部・嘱託教授
研究者番号: 90119579