

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340034

研究課題名(和文)放射線誘発塩基損傷クラスターの量的・質的解析による放射線生物効果の機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of radiation biological effect with quantitative and qualitative analyses of base damage cluster

研究代表者

寺東 宏明(Terato, Hiroaki)

佐賀大学・総合分析実験センター・准教授

研究者番号：00243543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：この研究は、放射線特異的損傷として知られるクラスターDNA損傷の質的・量的解析と、その照射後の修復プロセスを解析し、重粒子放射線生物影響の分子機構を解明することを目的とする。CHO細胞を炭素、ケイ素、アルゴン、鉄の各イオン線で照射し、細胞ごと電気泳動を行い、染色体に生じたクラスターDNA損傷を分析した。各イオン線のLETは13、55、90、200 keV/μmである。電気泳動の結果、LETの増加に応じて、クラスターDNA損傷の収率が低下することがわかった。一方、照射後培養実験の結果から塩基除去修復酵素遺伝子の欠損が重粒子線の生物効果表出に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Clustered DNA damage is a specific type of DNA damage with ionizing radiation. In this study, we analyzed the yield of clustered base damage in cultured cells irradiated with various heavy ion beams, and investigated the repair process in post-irradiation cultured cells. Chinese hamster ovary (CHO) cells were irradiated by carbon, silicon, argon and iron ion beams with LETs of 13, 55, 90 and 200 keV/μm, respectively. The cell electrophoresis indicated that clustered base damage yields decreased as the LET increased. Then, clustered DNA damage repair was investigated using DNA repair mutant cells. DNA double-strand breaks accumulated in the mutant cells lacking Xrcc1 after irradiation, and the cell viability decreased. On the other hand, mouse embryonic fibroblast (Mef) cells lacking both Nth1 and Ogg1 became more resistant than the wild type. Thus, clustered base damage seems to be involved in the expression of heavy ion beam biological effects via the repair process.

研究分野：放射線生物学

キーワード：電離放射線 DNA損傷 DNA修復 重粒子放射線 放射線生物影響 線エネルギー付与(LET) 生物学的効果比(RBE)

1. 研究開始当初の背景

電離放射線(以下、放射線)は、被ばく生物個体に対し、急性致死や突然変異を引き起こし、後者により、ヒトを始めとした多細胞系真核生物では、がんの発生をみる。放射線がどのように生物効果を表すかを考えると、その主な分子機構は、遺伝情報を担うDNAに傷害を与えること、すなわちDNA損傷の発生を介するものと考えられる。水の豊富な生体系においては、放射線のビームの軌跡の周辺に水の電離分解物である各種ラジカルや活性酸素種が生じ、生体構成分子を攻撃する(間接効果)。DNAを標的と考えればDNA上でトラック周辺にのみ損傷が局在するという状況が発生する。このようなDNA上に高密度で局在する損傷群をクラスターDNA損傷と称する。逆の表現をすれば、クラスターDNA損傷は放射線特異的な損傷とも言える。クラスターDNA損傷中に存在する個々の損傷種を見ると、活性酸素で生じる各種酸化塩基損傷や、糖の酸化に主として由来するDNA鎖切断であるが、それが単独ではなく局在していることが特徴である。このように同じ損傷種でも局在することで、生物効果や修復効率が異なることが予想され、実際、そのような知見が集まりつつある(図1)。

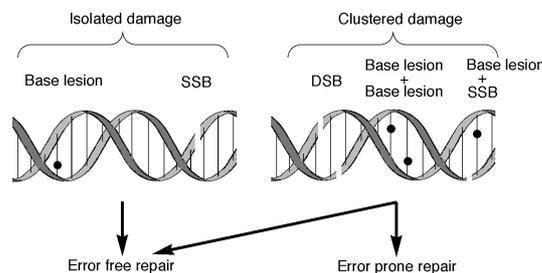


図1 放射線によって生じるDNA損傷。

一方、放射線は線種によって生物効果が異なることが知られており、その指標として生物学的効果比(Relative Biological Effectiveness: RBE)が用いられるが、これはある一定の範囲で放射線の線エネルギー付与(Linear Energy Transfer: LET)と相関する。前述のように、クラスターDNA損傷が放射線特異的な損傷として作用するとすれば、クラスターDNA損傷の収率とLET(RBE)の間にも相関があるはずである。私はそのような観点から、LETの異なる線種間でのクラスターDNA損傷収率、特に、これまで余り検討が行われて来なかった塩基損傷クラスターの収率を検討した。その結果、塩基損傷クラスターの収率は、予想に反して、LETに反比例することが分かった(図2)。このことは、クラスターDNA損傷の放射線生物効果への関与について以下のことを示唆する。すなわち、(1)クラスターDNA損傷の量的効果ではない別の要因が生物効果に影響する、(2)塩基損傷クラスターが修復を受けることにより生じる修復中間体としての

DNA二本鎖切断(Double Strand Break: DSB)の動態が生物効果に影響する、である。

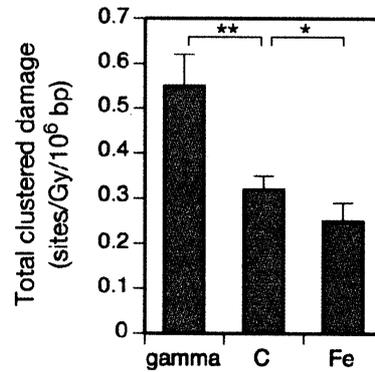


図2 照射ラムダファージDNAにおけるクラスターDNA損傷の総収率。

2. 研究の目的

上記の議論を踏まえ、本研究では、クラスターDNA損傷の複雑な一形態である塩基損傷クラスターの放射線生物効果への寄与を明らかにし、放射線生物効果の分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究における研究方法は以下の通りである。

(1) 照射細胞内における塩基損傷クラスター生成収率の解析(量的解析)

Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞を重粒子放射線で照射する。重粒子線照射は、放射線医学総合研究所の重粒子加速器HIMACにて、炭素、ケイ素、アルゴン、鉄の各イオン線で行った。各イオン線のLETは13、55、90、200 keV/μmである。また、コントロール実験として、佐賀大学医学部RI実験施設に設置のガンマセル(<sup>137</sup>Cs線源)にてガンマ線照射実験を行った。照射後、トリプシン処理により細胞を回収する。回収した細胞をアガロースプラグに包埋し、プロテアーゼ処理を行う。その後、DNAグリコシラーゼ処理を行い、塩基損傷を鎖切断に変換する。用いたDNAグリコシラーゼは、酸化ピリミジンを認識し、切除する大腸菌endonuclease IIIならびに酸化プリンを認識・切除する大腸菌Fpgである。アガロースプラグをアガロースゲルに挿入し、電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後、CCDカメラで撮影、泳動像をImage Jで解析する。これにより、塩基損傷クラスターはゲル上でDSBとして検出される。この実験と並行して、関連する塩基損傷の孤立損傷としての収率を、DNAグリコシターゼとアルデヒドリアクティブプローブ法にて分析した。細胞生存率はコロニー形成法で計数した。

(2) 修復機構を始めとした塩基損傷クラスターの生物効果の解明

塩基損傷クラスターの収率とRBE間の相違が損傷の質的な違い(構造的な違い)によるとすれば、生物効果の表出に塩基損傷クラ

スターの質の違いによる修復効率の違い、ならびに複製阻害効果、突然変異誘発効果の違い等が関連してくると考えられる。特に、塩基損傷クラスターの塩基除去修復 (Base Excision Repair: BER) プロセスによって生じる修復中間体としての DSB への変換効率の違いがもたらす生物効果への影響について、DNA 修復変異体を用いた解析により明らかにする。

DNA 修復変異体は塩基除去修復に関わる遺伝子のうち、BER 経路の最初のステップで機能する DNA グリコシラーゼ二種、NTH1 および OGG1 の二重欠損株、および同経路の最後のステップで機能する XRCC1 の欠損株を用いた。これら変異体における照射後の DSB 生成収率を観察した。

#### 4. 研究成果

照射細胞におけるクラスター DNA 損傷の生成収率を DSB、酸化ピリミジンクラスター、酸化プリンクラスターと分別検出した結果、いずれの損傷種も放射線の LET が大きくなるとともに、その収率が低下していく傾向が認められた (図 3)。また、アルデヒドリアクティブプローブにて検出した細胞内孤立塩基損傷の生成収率も同様の傾向を示した (data not shown)。以上の結果は、私たちが DNA 分子を標的として行った試験管内実験結果と類似していた。このことは、LET の増加により、同一線量におけるフラックスの減少がヒット数の減少を引き起こしているものと考えられた。

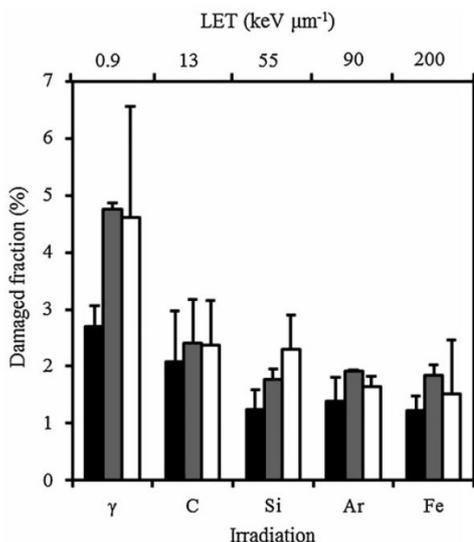


図 3 照射 CHO 野生株細胞におけるクラスター DNA 損傷の生成収率。黒：DSB、グレー：酸化ピリミジンクラスター、白：酸化プリンクラスター。

一方、照射細胞の生存率は LET 依存的に低下することがわかった (図 4)。この結果と先の DNA 損傷収率の LET 逆依存性の結果を合わせて考えると、放射線生物効果における DNA 損傷の関与は、単純にクラスター DNA

損傷の生成収率とリンクしているのではなく (もちろんそれも一つの要因として考えなければならないが)、その質的性質、すなわち、クラスター DNA 損傷の内部構造の複雑性とそれに連関する修復困難性、複製阻害性に関係するものと考えられた。

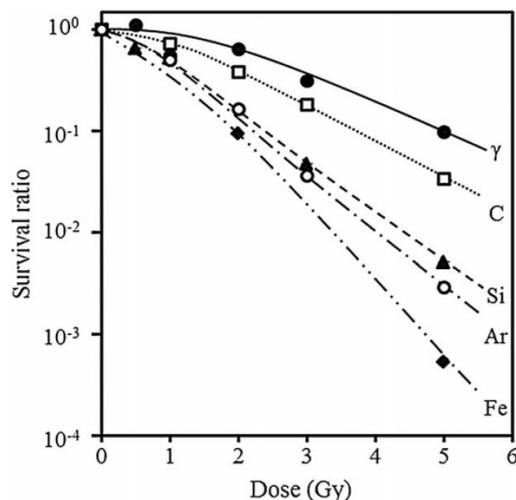


図 4 照射 CHO 野生株細胞の生存曲線。

クラスター DNA 損傷の質については、その直接的な解析が難しいため、ここでは照射後のクラスター塩基損傷に対する修復活性を観察することにより、検討を行った。一般的に塩基損傷の除去修復は BER によって行われるため、ここではクラスター化した塩基損傷も同様に除去修復されると考え、各種 BER 欠損株における照射後修復動態を観察した。

BER は塩基損傷種に特異的な DNA グリコシラーゼによって開始されるが、酸化塩基損傷に対する DNA グリコシラーゼの二重欠損株は照射後培養中において、その修復中間体として生じるはずの DSB の増加が観察されなかった (data not shown)。また、この二重欠損株は野生株に比べ感受性が低下した (図 5)。このことは、塩基損傷クラスターの修復が生存に悪影響を及ぼす可能性を示唆している。

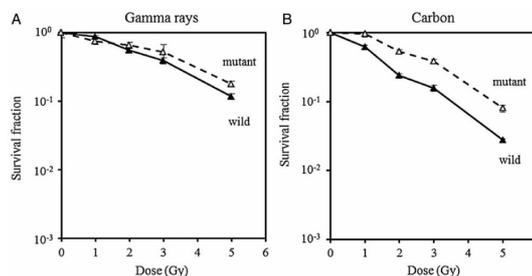


図 5 DNA グリコシラーゼ二重欠損株および野生株のガンマ線 (A) と炭素イオン線 (B) に対する生存曲線。

一方、BER は特異的リガーゼによって完了するが、そのリガーゼ活性に必須のタンパク

質として XRCC1 があり、これを欠損するとリガーゼ活性がなくなり、BER が完結しない。この変異株は放射線感受性が増大するが (data not shown)、照射後培養において BER によって付加された DSB 収量の増加が認められた (図 6)。

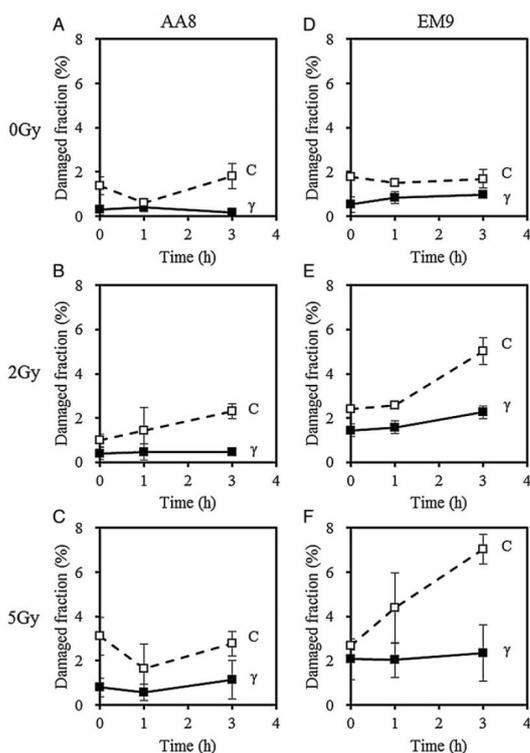


図 6 XRCC1 野生株 (AA8) および欠損株 (EM9) の照射後培養中の DSB 収率の動態。

以上の結果は、塩基損傷クラスターが修復を受けることにより、二次的に増加する修復中間体の DSB により、放射線生物影響が修飾されることを意味する。また、これら野生株の結果はガンマ線と炭素イオン線と比較すると後者でより顕著であったことから、LET による修復の困難さ、すなわち、それから示唆される DNA 損傷構造の LET 依存的な複雑化が考えられた。

#### 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 5 件)

Kudo K, Ito H, Ihara S, Terato H (2015) Oxidative DNA damage caused by pulsed discharge with cavitation on the bactericidal function. J Phys D Appl Phys, 査読有, 48: 365401, DOI:10.1088/0022-3727/48/36/365401

猪原哲, 伊藤博徳, 小林倫宣, 井上侑子, 寺東宏明, 玉川雅章 (2015) 水中キャビテーション・放電プラズマ併用方式によるプランクトンおよび大腸菌処理. 電

気学会論文誌 A (基礎・材料・共通部門誌), 査読有, 135: 357-365, DOI: 10.1088/0022-3727/48/36/365401

Tokuyama Y, Furusawa Y, Ide H, Yasui A, Terato H (2015) Role of isolated and clustered DNA damage and the post-irradiating repair process in the effects of heavy ion beam irradiation. J Radiat Res, 査読有, 56: 446-455, DOI: 10.1093/jrr/rru122

Kudo K, Ito H, Ihara S, Terato H (2015) Quantitative analysis of oxidative DNA damage induced by high-voltage pulsed discharge with cavitation. J Electrostat, 査読有, 73: 131-139, DOI: org/10.1016/j.elstat.2014.10.010

Terato H, Shimazaki-Tokuyama Y, Inoue Y, Furusawa Y (2014) Quantitative characteristics of clustered DNA damage in irradiated cells by heavy ion beams. J Radiat Res, 査読有, 55: i89-i90, DOI: 10.1093/jrr/rrt173

[学会発表](計 18 件)

寺東宏明, 工藤健一, 伊藤博徳, 猪原哲 (2015) 水中放電プラズマによって生じる DNA 損傷とその変異原性. 日本環境変異原学会 第 44 回大会(平成 27 年 11 月 27 - 28 日: 福岡市)。

寺東宏明 (2015) 生物界に普遍的な機構の一つである DNA 修復について. 平成 27 年度 日本動物学会・植物学会・生態学会佐賀県支部合同シンポジウム(平成 27 年 11 月 14 日: 佐賀市)。

Terato H, Kudo K, Mori K, Tokuyama Y, Tanaka H, Saito T (2015) Clustered and isolated oxidative DNA damages induced by atomic reactor neutron radiations. 15th International Congress of Radiation Research (2015 May 25-29, Kyoto, Japan).

Tokuyama Y, Furusawa Y, Ide H, Yasui A, Terato H (2015) Clustered DNA damage by heavy ion beams irradiation and the post-irradiating repair process. 15th International Congress of Radiation Research (2015 May 25-29, Kyoto, Japan).

Kudo K, Mori K, Tokuyama Y, Saito T, Tanaka H, Terato H. Mass spectrometric analysis of oxidative DNA damages induced by high LET

ionizing radiations. The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (2014 Nov 5-7, Kitakyusyu, Japan).

澤尻昌彦、Srimawong Preeyaporn、丸山耕一、寺東宏明、谷本啓二．放射線の乳がん骨転移におよぼす影響．日本放射線影響学会 第 57 回大会(平成 26 年 10 月 1 - 3 日：鹿児島市)．

工藤健一、伊藤博徳、猪原 哲、寺東宏明．水中放電プラズマによる大腸菌殺菌への DNA 酸化損傷の寄与．日本放射線影響学会 第 57 回大会(平成 26 年 10 月 1 - 3 日：鹿児島市)．

徳山由佳、平山亮一、古澤佳也、井出博、寺東宏明．重粒子線照射によるクラスターDNA 損傷の生成とその修復．日本放射線影響学会 第 57 回大会(平成 26 年 10 月 1 - 3 日：鹿児島市)．

徳山由佳、平山亮一、古澤佳也、寺東宏明．重粒子によって生じるクラスター塩基損傷の修復について．第 51 回 放射線影響懇話会(平成 26 年 6 月 14 日：長崎市)．

工藤健一、伊藤博徳、猪原 哲、寺東宏明．放電プラズマの DNA 損傷生成と生物効果について．第 51 回 放射線影響懇話会(平成 26 年 6 月 14 日：長崎市)．

工藤健一、伊藤博徳、猪原哲、寺東宏明．放電プラズマにより生成する酸化 DNA 損傷の分析．日本放射線影響学会第 56 回大会(平成 25 年 10 月 18-20 日：青森市)．

澤尻昌彦、スリマウング・プリーヤポーン、錦織良、寺東宏明、丸山耕一、谷本啓二．重粒子線照射の乳がん細胞の転移におよぼす影響．日本放射線影響学会第 56 回大会(平成 25 年 10 月 18-20 日：青森市)．

徳山由佳、古澤佳也、寺東宏明．重粒子線照射された細胞のクラスターDNA 損傷および孤立 DNA 損傷生成収率．日本放射線影響学会第 56 回大会(平成 25 年 10 月 18-20 日：青森市)．

鈴木克之、寺田峻、吉本一至、工藤健一、寺東宏明．中等度放射線耐性菌 *Kocuria rosea* のゲノム解析．日本放射線影響学会第 56 回大会(平成 25 年 10 月 18-20 日：青森市)．

寺東宏明．放射線の種類による DNA 損

傷生成収率の変化 - 実験データを元に(シンポジウム 2. 放射線による DNA 損傷問題の周辺 - 数理モデルの可能性と役割)．第 23 回日本数理生物学会大会(平成 25 年 9 月 11-13 日：浜松市)．

工藤健一、伊藤博徳、猪原哲、寺東宏明．放電プラズマによる酸化 DNA 損傷の分析．第 50 回放射線影響懇話会(平成 25 年 7 月 23 日：佐賀市)．

徳山由佳、寺東宏明、古澤佳也、井出博．重粒子線によって生じる細胞内 DNA 損傷の定量分析．第 50 回放射線影響懇話会(平成 25 年 7 月 23 日：佐賀市)．

Terato H, Shimazaki-Tokuyama Y, Inoue Y, Kudo K, Furusawa Y. Quantitative characteristics of clustered DNA damage in irradiated cells by heavy ion beams. Heavy Ion in Therapy and Space Radiation Symposium 2013 (2013 May 15-18, Chiba, Japan).

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.kiki.med.saga-u.ac.jp/Research/index-j.html>

佐賀大学教員総覧データベースホームページ

<http://evalwww.cc.saga-u.ac.jp/search/IST>

佐賀大学研究業績データベースホームページ

<http://research.dl.saga-u.ac.jp/search/index.html>

報道関連情報

読売中高生新聞(平成 28 年 2 月 26 日) 科学トラベラー『微生物は「小さな巨人」』

6．研究組織

(1)研究代表者

寺東 宏明 (TERATO, Hiroaki)

佐賀大学・総合分析実験センター・准教授  
研究者番号：00243543

(2)研究分担者

近藤 敏広 (KONDO, Toshihiro)

佐賀大学・総合分析実験センター・教務員  
研究者番号：20186852

(3)連携研究者

徳山 由佳 (TOKUYAMA, Yuka)

佐賀大学・総合分析実験センター・教務員  
研究者番号：30398135