

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25820447

研究課題名(和文) 蛍光修飾オリゴヌクレオチドを用いた放射線による生体分子損傷量の新規評価手法の開発

研究課題名(英文) The study on radiation-induced damage of DNAs by using fluorescence modified oligonucleotide as a model of bio-material

研究代表者

松尾 陽一郎 (MATUO, YOUICHIROU)

福井大学・附属国際原子力工学研究所・特命助教

研究者番号：90568883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射線による生体分子の損傷を高感度・簡便に検出する手法として、オリゴヌクレオチドを蛍光物質とクエンチング物質で修飾したサンプルを用い、放射線による損傷量を蛍光分光光度計で読みとり評価する手法について研究した。10mGy～1000mGyのヘリウム粒子線およびガンマ線を照射した場合、吸収線量の増加に伴って蛍光物質の蛍光強度が上昇していることが示された。これはオリゴヌクレオチドの切断により、エンチング効果が抑制され、蛍光物質の蛍光ピークが上昇することを意味するものである。一方、線種によらず50mGy以上では蛍光強度が一定となる結果が得られた。要因として蛍光物質の放射線分解などの理由が考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have developed an assessment method employing oligonucleotide samples consisting of several dozen base pairs and subjected to fluorescence modification, with a fluorescent image analyzer or fluorescent microscope used to measure the amount of radiation-induced damage. In this study, we exposed a oligonucleotide with helium ion beam and gamma rays of dose from 10 to 1000mGy. This study shows the radiation damage on the oligonucleotide can be directly detected with fluorescence spectrophotometer, but the fluorescence intensity nearly saturated when we applied more than 50 mGy. Since the fluorescents molecule may disintegrate by radiation, we also studied the radiolysis of the fluorescence molecules by helium ion beam and gamma rays.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 線量評価 オリゴヌクレオチド DNA切断 蛍光

1. 研究開始当初の背景

放射線防護・放射線安全の観点から、個人線量計による被ばく量の管理は重要である。TLD 素子やガラスバッジ等が実用化されているが、これら既存の個人線量計のメカニズムは、物理・化学的作用を応用したものである。一方で、放射線影響の要因は細胞核中の DNA の切断や酸化損傷が主である。放射線による生体分子の損傷を高感度・簡便に検出する手法として、プラスミド DNA を対象としたゲル電気泳動やコメットアッセイがあるが、解析に要する時間が長く、また感度の面で課題があった。

2. 研究の目的

従来のバイオアッセイ法の課題を解決する手法として、オリゴヌクレオチドを蛍光修飾したサンプルを用い、放射線による損傷量を蛍光強度にて読みとることで、高感度・簡便に検出する手法を開発する。放射線による被ばく影響の解明や生体影響研究の基礎ツールの開発を目的としている。

3. 研究の方法

5' 末端を蛍光修飾分子 (6-FAM: 6-Carboxyfluorescein) で、3' 末端をクエンチャー物質 (TAMRA: Carboxytetramethylrhodamine) 等で修飾した一本鎖のオリゴヌクレオチドを緩衝液に溶解したものをサンプルとする(図 1 参照)。オリゴヌクレオチドに切断が生じていない状態では、オリゴヌクレオチドと蛍光修飾分子とクエンチャー物質は同一鎖上にあり、蛍光修飾分子に与えられた光エネルギーが分子内励起移動によりクエンチャー物質へ移動し、熱エネルギーとして放出されると考えられる。従って、励起光を照射しても蛍光は抑制される。しかしながら、オリゴヌクレオチドに切断などの損傷が生じれば、クエンチャー物質による抑制効果が抑えられて蛍光が発せられると考えられる。このことから、放射線照射によるオリゴヌクレオチドの切断量は、励起光を照射した場合の蛍光強度を介して評価できると考えられる。

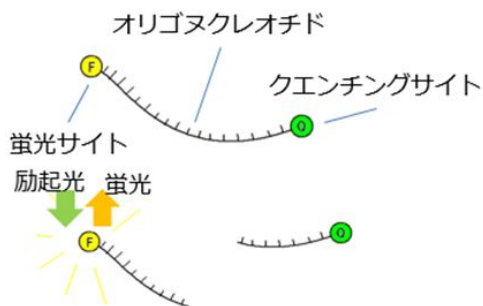


図 1 蛍光修飾オリゴヌクレオチドの概念図。(上) クエンチャー物質の抑制が効いた状態、(下)切断が生じ、クエンチャー物質による抑制が抑えられ蛍光が観測できる状態。

放射線による生体分子の損傷を高感度・簡便に検出する手法として、生体試料の携帯性が良いことや、生体影響を評価する上で重要となる DNA の切断の形態(DNA の 1 本鎖切断か二本鎖切断のどちらが主であるか)等の情報が容易に読み取れることも重要課題となる。これらの要求される点を満足するために、本研究では、放射線による生体分子の損傷を高感度・簡便に検出する手法として、数十塩基程度の一本鎖もしくは二本鎖のオリゴヌクレオチドを蛍光修飾したサンプルを作成し、一本鎖切断と二本鎖切断を区別した評価が可能かどうかを検討する。

4. 研究成果

平成 25、26 年度では、異なる線種によるヌクレオチドの損傷の頻度を評価することへの適用性について検討するために、蛍光修飾ヌクレオチドに対し、粒子線及びガンマ線を照射し、蛍光修飾ヌクレオチドの切断に伴って生じる蛍光強度を測定した。両端を 6-FAM と TAMRA で修飾したオリゴヌクレオチドをサンプルとした。1 分子の全長は約 10nm である。サンプルは Tris - EDTA 緩衝液(pH 8.0)に溶解し、濃度は 100 μ M である。HIMAC においてヘリウム粒子線 (150MeV, LET: 2.2 keV/ μ m) をパイナリーフィルター無しの条件で照射した。また、大阪大学産業科学研究所のコバルト 60 照射施設の 60Co 線源によりガンマ線(LET: 0.2 keV/ μ m) を照射した(吸収線量は 10mGy 1000mGy)。ヘリウム粒子線およびガンマ線を照射した場合の 6-FAM の蛍光強度の結果を図 2 に示す。また、一例として、ガンマ線を照射した場合の 6-FAM の蛍光スペクトルを図 3 に示す。吸収線量の増加に伴って 6-FAM の蛍光強度が上昇していることが示された。これは蛍光修飾オリゴヌクレオチドの切断により、エンチング効果が抑制され、蛍光物質 6-FAM の蛍光ピークが上昇することを意味するものである。

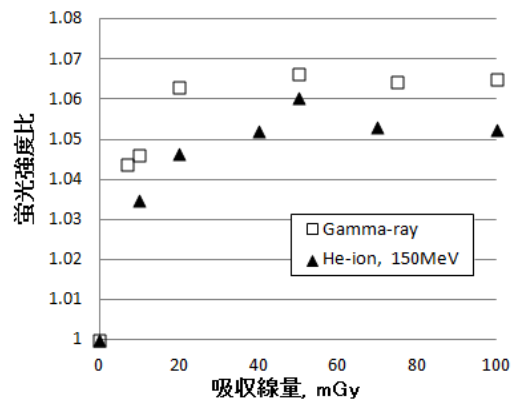


図 2 ガンマ線および粒子線照射の場合の 6-FAM の蛍光強度比 ($\lambda_{ex}=494\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=516\text{nm}$)。

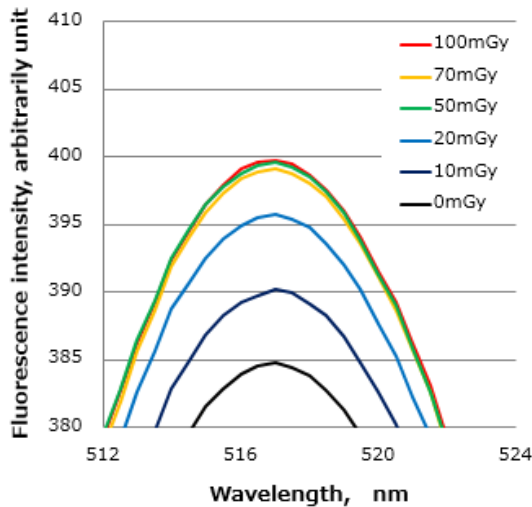


図3 ガンマ線を照射した蛍光修飾オリゴについての6-FAMの蛍光スペクトル。

ガンマ線の場合と比較して、ヘリウム粒子線照射によるオリゴヌクレオチドの切断の収率は低いことが示唆された。DNAの一本鎖切断について、ガンマ線の場合と比較して高LET粒子線照射による切断の収率は低いことが報告されており(R. Watanabe, Radiation Chemistry, 89 (2010) 13-19)、本結果とは矛盾しない。

一方で、線種によらず50mGy以上では蛍光強度が一定となる結果が得られた。急終戦量に対し蛍光強度が一定となる要因として蛍光物質6-FAMの放射線分解などの理由が考えられる。

続いて、蛍光強度から、蛍光修飾オリゴヌクレオチドの切断量を推定する。蛍光修飾オリゴヌクレオチドおよび単体の蛍光物質、クエンチャー物質、オリゴヌクレオチドを混合させることで模擬的な切断オリゴヌクレオチドサンプルを作成した。各成分と切断割合の関係を表に示す。

表1 切断オリゴヌクレオチドサンプルの構成

切断割合(%)→	0	25	50	75	100
未切断オリゴヌクレオチド	100nM	75nM	50nM	25nM	0nM
切断オリゴヌクレオチド	0nM each	25nM each	50nM each	75nM each	100nM each

それぞれのサンプルについて、6-FAMの蛍光強度を測定した。図4に切断オリゴヌクレオチドサンプルの蛍光スペクトルを示す。蛍光強度比オリゴヌクレオチドが全て切断している場合(切断割合100%)、蛍光強度はAのようなピークを持つ。オリゴヌクレオチドの

切断割合が減少するにつれ、Aのピークは減少することがわかる。また、図5に切断オリゴヌクレオチドの蛍光強度比を示す。ここで、蛍光強度比の定義を、 $[\text{蛍光強度比}] = [\text{切断割合} \times \% \text{のときの蛍光強度}] / [\text{切断割合が} 0\% \text{のときの蛍光強度}]$ として、図5の関係を用いれば、蛍光強度比から蛍光修飾オリゴヌクレオチドの切断割合が推定できる。表2にガンマ線を照射した場合の蛍光強度から推定されたオリゴヌクレオチドの切断割合を示す。

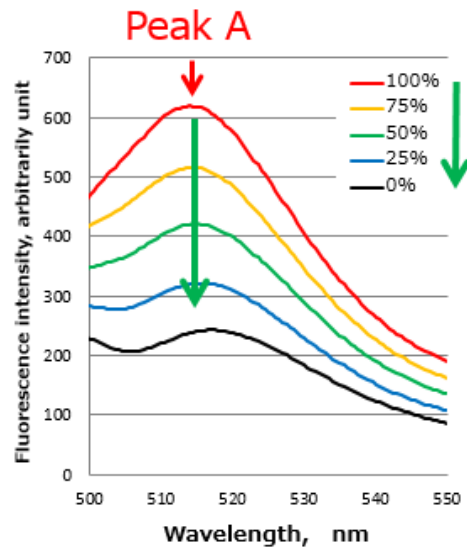


図4 切断オリゴヌクレオチドサンプルの蛍光スペクトル

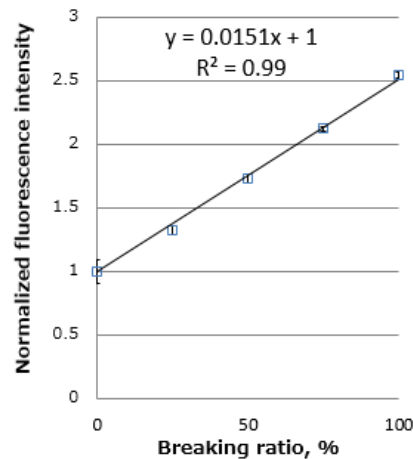


図5 切断オリゴヌクレオチドサンプルの6-FAMの蛍光強度比

表2 推定されるオリゴヌクレオチドの切断割合

線量	切断割合, %
0 mGy	0.0
10 mGy	2.7
20 mGy	3.9
50 mGy	4.9

最終年度である平成 27 年度では、ヘリウム粒子線およびガンマ線照射によって蛍光物質 6-FAM が放射線分解を起こす可能性について検討した。蛍光物質 6-FAM を Tris-EDTA 緩衝液に溶解した。濃度は 100nM である。HIMAC において、ヘリウム粒子線 (150MeV, LET: 2.2 keV/μm) をバイナリーフィルター無しの条件で照射した。比較のためにガンマ線 (LET: 0.2 keV/μm) を照射した。吸収線量は 10mGy 10Gy である。ヘリウム粒子線およびガンマ線の照射は常温にて行い、輸送時は 20℃ に保った。照射したサンプルを 1cm 角の石英セルに挿入し、蛍光分光光度計 (F-2700、日立ハイテック) により計測した。計測条件は、励起・蛍光側スリット幅: 10nm、スキャンスピード 2400nm/min、ホトマル電圧 400V である。

図 6 に、蛍光物質 6-FAM 溶液にヘリウム粒子線およびガンマ線を照射した場合の 6-FAM の蛍光強度変化を示す。ヘリウム線およびガンマ線の吸収線量の増加に伴い、6-FAM の蛍光 (516nm) が低下することが示された。これは蛍光物質 6-FAM が放射線分解を起こし、励起光を受けても蛍光を発せなくなったことを意味している。今後、クエンチング物質の TAMRA の放射線分解の可能性を検討し、吸収線量 50mGy 以上では蛍光強度が一定となる原因を明らかにする計画である。

さらに一本鎖・二本鎖の蛍光修飾ヌクレオチドを用いた、一本鎖切断と二本鎖切断を区別した評価を行うための実験系の確立を行った。具体的には、一本鎖オリゴヌクレオチドに対し、相補鎖のオリゴヌクレオチドを設計し、これをハイブリッドさせ、二本鎖オリゴヌクレオチドを合成した。図 7 にアガロースゲル電気泳動画像を示す。図 7 中の C レーンのバンドが二本鎖の蛍光修飾オリゴヌクレオチドである。単一のバンドが確認されていることから、目的とする二本鎖蛍光修飾オリゴヌクレオチドのみが精製できていることがわかる。合成された二本鎖蛍光修飾オリゴヌクレオチドの基礎実験を平成 27 年度までに完了し、次年度以降一本鎖切断と二本鎖切断を区別した評価を開始する計画である。

三年間の研究を通じ、いくつかの課題が明らかになった。先に述べたように、線種によらず吸収線量 50mGy 以上では蛍光強度が一定となり、吸収線量に対し蛍光強度が一定となることが示された。この要因として蛍光物質やクエンチャー物質の放射線分解などの理由が考えられる。これら構成する物質の放射線分解の可能性については今後も検討が必要である。さらに吸収線量 50mGy 以上では蛍光強度が一定となる原因として、設定したサンプル濃度の問題も考えられる。すなわちサンプルが希薄なために全てのターゲットがヒットされるようになることが

起こりえる。トラック数 (すなわちマクロな線量) を増やしてもターゲット数が頭打ちで蛍光量は増えない可能性がある。最適なサンプル濃度を探索する実験が必要である。

本手法では、サンプルとして用いるオリゴヌクレオチドの配列について、自由に設計できるという特徴がある。放射線による切断や酸化的損傷を受けやすい配列を選択することで、放射線による損傷量の評価の感度向上や、分子生物学の新たなツールとして応用できることが期待される。今後、オリゴヌクレオチドの配列特異性について、検討を進める予定である。

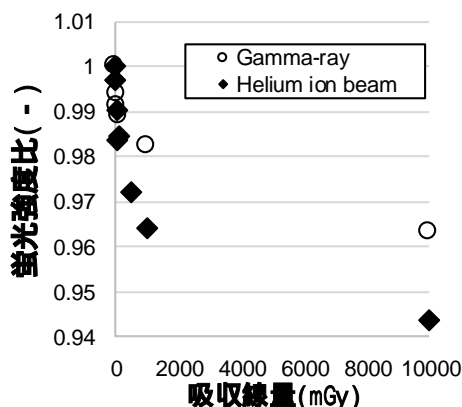


図 6 蛍光物質 6-FAM 溶液にヘリウム粒子線およびガンマ線を照射した場合の 6-FAM の蛍光強度変化。

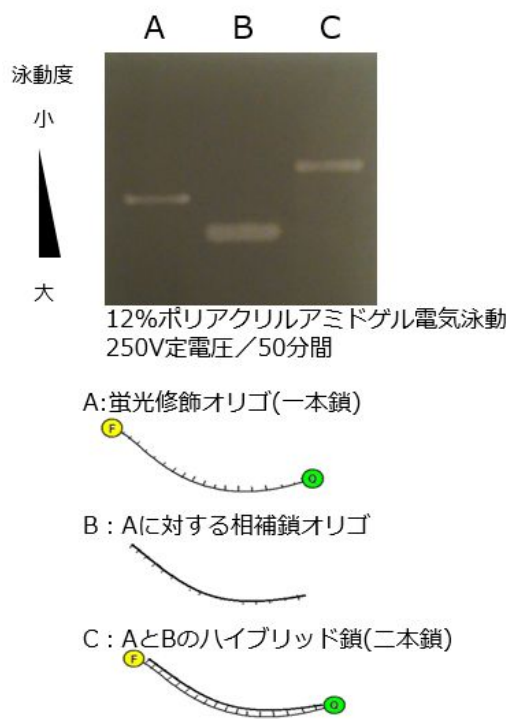


図 7 アガロースゲル電気泳動による一本鎖および二本鎖のオリゴヌクレオチドの確認。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) 松尾陽一郎、平山誠、清水喜久雄、泉佳伸、安田仲宏、“蛍光修飾オリゴヌクレオチドを用いた放射線による生体分子の損傷量評価手法に関する研究”日本放射線安全管理学会 第十四回学術大会、2015 年 12 月 2-4 日、筑波大学。
- (2) Y. Matuo, M. HIRAYAMA, Y. Izumi and Nakahiro Yasuda, Feasibility study on radiation-induced damage of DNAs using an oligonucleotide with fluorescence modification, The 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto, Japan, May. 25-29 (2015).
- (3) 松尾陽一郎、平山誠、清水喜久雄、泉佳伸、安田仲宏、“蛍光修飾オリゴヌクレオチドを用いた放射線による生体分子の損傷量評価手法に関する基礎的研究”日本放射線安全管理学会 第十三回学術大会、2014 年 12 月 3-5 日、徳島大学。
- (4) Y. Matuo, K. Toda, K. Kume, T. Takata, T. Hasegawa, Y. Izumi, N. Yasuda, Study on radiation-induced damage of DNAs using an oligonucleotide with fluorescence modification, The 26th International Conference on Nuclear Tracks in Solids, Kobe, Japan, Sep.14-19 (2014).
- (5) Y. Matuo, N. Yasuda, T. Takata, K. Kume and Y. Izumi, Fundamental Study on Dose Evaluation Technique by Using Fluorescence-modified Oligonucleotide as a Model of DNA Damage, the 4th Asian and Oceanic Congress on Radiation Protection (AOCR-4), Kuala Lumpur, Malaysia, May 12-16 (2014).
- (6) Y. Matuo, Y. Izumi, N. Sato, T. Yamamoto and K. Shimizu, Dosimetric application of biological technique evaluating DNA lesions caused by radiation exposure, The 9th International Workshop on Individual Monitoring of Ionizing Radiation, Ibaraki, Japan, Nov. 30 - Dec. 1 (2013).
- (7) Y. Matuo, N. Yasuda and Y. Izumi, Study on radiation-induced lesions of DNAs by using fluorescence- and quenching-modified oligonucleotide as a model of genetic material, the 7th International Symposium on Radiation Safety and Detection Technology (ISORD-7), Sanya, China, Jul. 15-18

(2013).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松尾 陽一郎 (MATUO Youichirou)

福井大学・附属国際原子力工学研究所・特命助教

研究者番号：90568883