

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02823

研究課題名(和文) クラスタDNA損傷に対する細胞内修復動態と損傷の局在化メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of cluster DNA damage induction and its repair processes in vivo

研究代表者

横谷 明德 (Yokoya, Akinari)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員(定常)

研究者番号：10354987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：X線照射したEGFPプラスミドを“非照射”の細胞導入し、ライブセル観察によりEGFP蛍光の発現速度の低下から難修復性のクラスタDNA損傷が生じていることを示した。また軟X線を照射しながら水和デオキシリボース(dR)からの脱離イオンを測定し、水分子が分子の激しい分解を抑制すること、またその理由がdRから配位水へ的高速のプロトン移動によることを分子動力学計算により示した。さらに放射線トラックエンドで生じる多数の低速2次電子は、発生位置から数nm以上離れたところに塩基損傷を誘発し、修復過程を経てDNAの2本鎖切断に変換され得るクラスタ損傷を生成することを示した。

研究成果の概要(英文)：Repair process of clustered DNA damage induced by X-irradiation was investigated using EGFP-plasmid DNA transfected into non-irradiated mammalian cells. The repair kinetics of the irradiated plasmids in the cells visualized as the EGFP fluorescence emission indicates that the damage was hardly repaired. Hydrated deoxyribose (dR) films were irradiated with soft X-rays. Yields of desorbed ions from the films were significantly suppressed by water. Molecular dynamics calculation indicates that the fast proton transfer from dR to the hydrated water might cause the suppression. Furthermore, dynamics of low energy secondary electrons around DNA molecule was investigated using a dynamic Monte Carlo code. The results show that pre-hydrated electrons are formed over a few nm from the parent cations and result in additional base lesions, which may be finally converted into a harmful double strand break by base excision processes.

研究分野：放射線生物物理学

キーワード：クラスタDNA損傷 EGFP ライブセルイメージング 修復速度 放射線トラックエンド 低エネルギー二次電子 水和前電子 塩基損傷

1. 研究開始当初の背景

放射線による生物影響の主要な要因のひとつが、ゲノム DNA 上の数ナノメートル程度のごく局所に塩基損傷などが多重に生じる重篤な損傷形態（以下、クラスター損傷）であることが指摘され、その複雑な DNA 損傷形態は DNA の 2 本鎖切断損傷と共に大きな関心を集めてきた。しかし、塩基損傷や AP サイトから成る非 2 本鎖切断型のクラスター損傷がどのような生物応答を誘発するのかについては、未だ明らかにされていない。これまでオリゴ DNA 中に損傷塩基のクラスターを人工合成し、これに対する *in vitro* の修復酵素との反応と、これを導入した大腸菌の突然変異頻度についての研究が行われてきたが、実際に放射線で誘発されたクラスター損傷の修復に関する知見はほとんど無い。放射線照射された DNA を生きた細胞中に導入し、さらにその修復動態を調べることができれば、その生物学的意義の理解は飛躍的に進むと期待されてきた。

一方、我々のこれまでの研究から、DNA 分子上の電荷やラジカルの移動を通じて、どのような放射線の線質であっても、特定パターンのクラスター損傷が生じる可能性が浮上してきた。特に DNA に強く配位している水和水との水素結合ネットワークを介した、プロトンなどのイオンの高速移動が損傷局在化（クラスター化）に大きく寄与していると推測された。さらに、全ての放射線に共通する低エネルギーの 2 次電子もクラスター化に寄与する可能性が示唆され、これら損傷生成の物理化学的初期過程の解明が切望されてきた。

2. 研究の目的

本研究では次の二つのテーマを目標に設定した。

(1) 細胞中でのクラスター損傷に対する修復動態の解明：放射線照射した DNA を非照射の動物培養細胞中に導入する手法を新たに開発する。この手法で作成した照射 DNA 導入細胞に対してライブセル観察を行い、クラスター損傷に対する修復動態及び修復阻害の性質を明らかにする。

(2) 損傷の局在化機構の解明：DNA に結合している水和水がどのようにクラスター化に寄与しているかを実験的に追求すると同時に、コンピュータによる理論計算及びシミュレーションにより DNA 中での損傷局在化（クラスター化）の基本パターンモデルを構築する。

3. 研究の方法

上記の(1)の目標に対して、放射線照射した DNA を“非照射の細胞”に導入する新しいアッセイ方法を開発した。照射する試料として蛍光タンパク質（EGFP）遺伝子を含むプラスミド DNA を使い、これをクローニングベクターとして用いることで細胞の修復応答を

可視化し、ライブセル観察により DNA 損傷の難修復性の定量解析を実施した（図 1）。

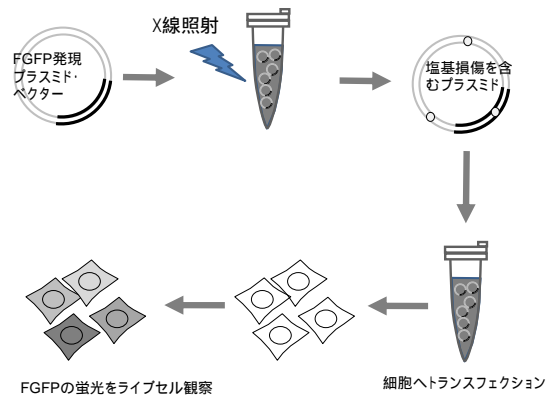


図1 培養細胞への照射DNAの導入

(2) クラスターDNA 損傷の構造と生成機構に関する研究：水和状態の DNA 試料に対して特定元素をイオン化し、水和水と DNA の間のプロトンや電子の移動とその損傷局在化への寄与を、シンクロトロン軟 X 線を利用した分光実験を実施する。また時間依存分子動力学法により、実験結果を理論計算の結果と比較することで、損傷パターンを調べた。さらにトラックエンドで多数生じる低エネルギーの 2 次電子がどのようにクラスター化に寄与するかを、動的モンテカルロシミュレーションにより調べた。

4. 研究成果

EGFP プラスミド DNA を試料として用い、これに実際に X 線を照射した後に非照射のヒト細胞中に導入し、蛍光強度の時間変化をライブセルイメージングすることで修復効率を定量する方法を確立した。照射により DNA に鎖切断が入り開環状構造になった EGFP プラスミドを細胞導入した場合、EGFP 発現速度は線量依存的に小さくなった。1.2kGy を照射した場合の EGFP 発現速度は、コントロールのおよそ 40% となった。ニックング酵素により人工的に DNA に 1 本鎖切断（SSB）を 1 ヶ所入れたプラスミドの場合、コントロールと比べ EGFP 発現速度低下は僅か 10% 程度であったことから、酵素による単純な末端構造の SSB に比べ、X 線照射により難修復性のクラスターDNA 損傷が生じている可能性が示された。

DNA 主鎖の一部であるデオキシリボース薄膜を試料とし、これに対する酸素 K 吸収端の軟 X 線照射と脱離イオン分析をシンクロトロン放射光施設（SPring-8）において実施した。その結果、デオキシリボース薄膜に 1 分子層程度の僅かな水分子を配位させるだけで、分子の破壊的なフラグメンテーションが抑制されることを明らかにした。この実験を時間依存分子動力学法により理論解析した結果、デオキシリボース分子から水分子へ 10fs 程度の高速のプロトン移動が起こり、このエネ

ルギー消費により分子の破壊的分解が抑制されることが推定された(図2)

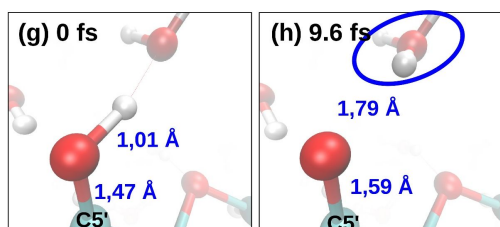


図2 デオキシリボースから水和水への高速プロトン移動

一方、放射線トラックエンドで生じる多数の低速2次電子がDNA損傷のクラスター化に果たす役割を、動的モンテカルロ法を用いてシミュレートした。その結果、電子が減速し完全に熱化する直前に水和前電子となり、初期イオン化位置から数 nm 以上離れたところにも塩基損傷が誘発される可能性を明らかにした。クラスターを構成するこのような個々の損傷の空間分布は、細胞内の塩基除去修復の過程で2本鎖切断に変換され得るため、細胞致死等の原因となると予想された(図3)

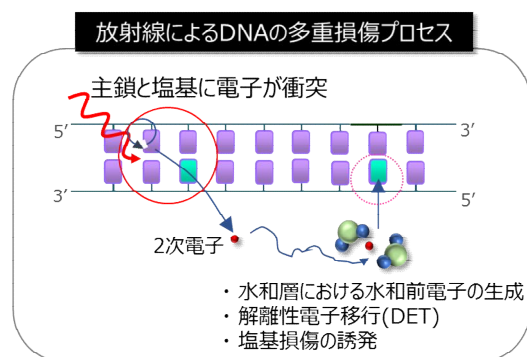


図3 放射線トラックエンドの低エネルギー2次電子によるクラスターDNA損傷生成モデル

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 9 件)

- 1) Takeshi Kai, Akinari Yokoya, Masatoshi Ukai, Kentaro Fujii, Tomohiro Toigawa, and Ritsuko Watanabe. Significant role of non-thermal equilibrated electrons in the formation of deleterious complex DNA damage. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 20, 2838-2844 (2018).
- 2) K. Fujii, Y. Izumi, A. Narita, K. Ghose, P. Lopez-Tarifa, A. Touati, R. Spezia, R. Vuilleumier, M. -P. Gaigeot, M. -F. Politis, M. -A. Herve du Penhoat, and A. Yokoya. Roles of Hydration for Inducing Decomposition of 2-deoxy-D-ribose by Ionization of Oxygen K-Shell Electrons *Radiation Research* 189, 264-272 (2018).

- 3) Akinari Yokoya and Takashi Ito, Photon-induced Auger Effect in Biological Systems: A Review. *Int. J. Radiat. Biol.* 93, 734-756 (2017).
- 4) Shiraishi, I., Shikazono, N., Fujii, K. and Yokoya, A. Efficiency of radiation-induced base lesion excision and the order of enzymatic treatment. *Int. J. Radiat. Biol.* 93, 295-302 (2017).
- 5) Kai, T., Yokoya, A., Ukai, M., Fujii, K. and Watanabe, R. Dynamic Behavior of Secondary Electrons in Liquid Water at the Earliest Stage upon Irradiation: Implications for DNA Damage Localization Mechanism. *J. Phys. Chem. A* 120, 8228-8233 (2016).
- 6) Takeshi Kai, Akinari Yokoya, Masatoshi Ukai, Kentaro Fujii, and Ritsuko Watanabe, Deceleration processes of secondary electrons produced by a high-energy Auger electron in a biological circumstance. *Int. J. Radiat. Biol.* 92, 654-659 (2016).
- 7) Marie-Anne Hervé du Penhoat, Krishna Ghose, Marie-Pierre Gaigeot, Rodolphe Vuilleumier, Kentaro Fujii, Akinari Yokoya, and Marie-Françoise Politis. Investigation of the fragmentation of core-ionised deoxyribose : A study as a function of the tautomeric form. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 3275-3283 (2015).
- 8) 渡辺立子, 「計算機シミュレーションによる放射線生物作用の初期過程の研究」, *RADIOISOTOPES*, in press (依頼原稿〔査読有〕)
- 9) 渡辺立子, 「シミュレーションによって推定される放射線誘発 DNA 損傷の特徴」, *放射線と産業*, in press (依頼原稿)

[学会発表](計 13 件)

- 1) Akinari Yokoya, Kentaro Fujii, Hiroyuki Shimada, Masatoshi Ukai, Kiichi Kaminaga. Synchrotron Radiation as a Quantum Tool for Studies of Radiation Damage to DNA and Resulting Cellular Response. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (ワークショップ「量子物理学 + 生化学」× 生物学 = ? ~ “量子生物学”とは何か~)、12月6日 - 9日、2017、神戸。(招待講演)
- 2) Akinari Yokoya, High brilliance synchrotron radiation as a tool for studies of radiation damage to DNA and resulting cellular effects. 1st QST International Symposium, Quantum Life Science,

2017/7/25-26, Chiba, Japan.

- 3) Marie-Anne Hervé du Penhoat, Alexander Souchaud, Rodolphe Vuilleumier, Marie-Pierre Gageot, Kentaro Fujii, Akinari Yokoya and Marie-Françoise Politis, Fragmentation of doubly-ionized deoxyribose. Ab initio molecular dynamics simulations. 1st QST International Symposium, Quantum Life Science, 2017/7/25-26, Chiba, Japan. (招待講演)
- 4) K. Fujii, M.-A. Hervé du Penhoat, M.-F. Politis, and A. Yokoya, Spectroscopic Study for Physical Process of DNA Strand Breakage by Ionizing Radiations using Soft X-rays, Hiroshima International Workshop on Circular Dichroism Spectroscopy, 2017/2/28, Higashi-Hiroshima, Japan. (招待講演)
- 5) Hiroki Nakaue, Yui Obata, Kiichi Kaminaga, Nobuyoshi Akimitsu and Akinari Yokoya, Visualization of DNA Repair Process in Mammalian Cells Transformed by Plasmid DNA Exposed to X-rays in vitro. 17th Int. Symposium on Microdosimetry, An Interdisciplinary Meeting on Ionizing Radiation Quality, Molecular Mechanisms, Cellular Effects, and Their Consequences for Low Level Risk Assessment and Radiation Therapy, 2017/11/5-10, Venice, Italy (Poster)
- 6) 中上裕貴、小畑結衣、神長輝一、横谷明德、「非照射細胞への放射線誘発 DNA 損傷の導入とライブセル観察による修復動態の観察」日本放射線影響学会第 60 回大会、10 月 25 日-28 日、2017 年、千葉 (Poster)
- 7) Kentaro Fujii, Roles of Oxygen for Inducing DNA Strand Breakages by Ionizing Radiation, Oxygenalia 2016, Jagiellonian University (Poland), 2016/11/19. (招待講演)
- 8) 渡辺 立子, 「DNA 損傷・飛跡構造解析に関する研究」日本放射線影響学会第 59 回大会、広島、2016/10/26-28
- 9) 横谷 明德, 神長 輝一, 渡辺 立子, 服部 佑哉, 福永 久典, 鈴木 啓司, 泉 雄大, 藤井 健太郎, 「放射線生体影響のメカニズム解明に向けた放射光利用研究」PF 研究会・福島環境回復を目指した放射光研究の現状と今後の課題, 高エネルギー加速器研究機構・フォトンファクトリー, つくば, 10 月 14 日、2016
- 10) Toshitaka Oka, Akinari Yokoya, Kentaro Fujii, Yasushi Kino, Tsutomu Sekine, Substituent effect on the yield of the unpaired electrons of pyrimidine DNA-base induced by soft X-ray

irradiation, 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA, 2016/3/20-24, Melbourne, Australia (Poster)

- 11) 岡 壽崇, 「K 殻イオン化で生じる不対電子による DNA 損傷形成機構」, プラズマ科学における分光計測の高度化と原子分子過程研究の新展開・原子分子データ応用フォーラムセミナー合同研究会, 2016/1/27-29, 核融合科学研究所 (依頼講演)
- 12) Toshitaka Oka, Akinari Yokoya, Kentaro Fujii, Yasushi Kino, Tsutomu Sekine, Unpaired electrons of DNA and DNA-base thin films studied by electron spin resonance, XXIX International Conference on Photonic, Electronic and Atomic Collisions, 2015/7/22-28, Toledo, Spain (Poster)
- 13) Toshitaka Oka, Akinari Yokoya, Kentaro Fujii, Yasushi Kino, Tsutomu Sekine, Unpaired electrons in pyrimidine DNA-bases induced by core-excitation and substituent effect, 8th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular, and Medical Aspects of Auger Processes (Auger Symposium 2015), 2015/5/20-22, Kyoto, Japan (Poster)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横谷 明德 (YOKOYA AKINARI)
量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所・東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員
研究者番号：10354987

(2) 研究分担者

岡 壽崇 (OKA TOSHITAKA)
東北大学・高度教養教育・学生支援機構・助教
研究者番号：70339745

鵜飼 正敏 (UKAI MASATOSHI)
東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：80192508

渡辺 立子 (WATANABE RITSUKO)
量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用
研究所・東海量子ビーム応用研究センタ
ー・上席研究員
研究者番号：10360439

秋光 伸佳 (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

(3)連携研究者

藤井 健太郎 (FUJII KENTARO)
量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用
研究所・東海量子ビーム応用研究センタ
ー・上席研究員
研究者番号：00360404

服部 佑哉 (HATTORI YUYA)
東京工業大学・工学院・システム制御系・
助教
研究者番号：30709803

野口 実穂 (NOGUCHI MIHO)
量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用
研究所・東海量子ビーム応用研究センタ
ー・主幹研究員
研究者番号：40455283

泉 雄大 (IZUMI YUDAI)
広島大学・放射光科学研究センター・助教
研究者番号：20595772

(4)研究協力者

Marie-Anne Hervé du Penhoat
IMPMC, Sorbonne Université - UPMC
Univ Paris 06