

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H02959

研究課題名(和文)イオンビーム生物影響の原因となる二本鎖切断末端に関する研究

研究課題名(英文)Studies on DSB ends which are strongly relevant to the biological effects of ion particles

研究代表者

鹿園 直哉(Shikazono, Naoya)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学領域・統括グループリーダー(定常)

研究者番号：10354961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イオンビーム生物影響の理解を深めるために、DNA損傷の局在性、特に二本鎖切断(DSB)末端構造に着目して研究を行った。既存の線量分布計算コードを発展させ精密な電離や励起の位置情報を得て、DNAに生じる損傷の数と位置とを推定した。また、蛍光共鳴エネルギー移動を利用した損傷局在性評価法や原子間力顕微鏡を用いた損傷DNAの一分子観察によって、イオンビーム誘発DNA損傷の局在性を実験的に明らかにした。これらの研究によりイオンビーム生物影響メカニズム解明のための基盤となる成果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エネルギー付与からDNA損傷の修復までの過程を統一的に取り扱い、イオンビーム生物影響メカニズム解明のための第一歩となる成果を得た。革新的なシミュレーション、及び、新たな実験法の開発によって得られた本研究成果は、これまでブラックボックスであったイオンビームによるエネルギー付与と生物影響の関係を解明する基盤となるものであり、関連分野でのインパクトが極めて大きい。今後本研究で得られた成果を基盤に研究を進展させることにより、イオンビーム生物影響の理解が大いに進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to deepen the understanding of the biological effects of ion particles, we focused on the localization of DNA damage, especially at DSB ends. The dose distribution calculation code was further improved to obtain information on precise positions of ionizations and excitations, and the location of damage induced in DNA was simulated. In addition, the localization of ion beam-induced DNA damage was clarified experimentally by the novel methods based on fluorescence resonance energy transfer and single-molecule observation with an atomic force microscope. From these studies, we gained valuable insights on the mechanism of biological effects of ion particles.

研究分野：放射線遺伝学

キーワード：DNA損傷 局在性 イオンビーム シミュレーション FRET 原子間力顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

局所的に複数個の損傷が生じる「クラスターDNA損傷」は、放射線生物影響の主要な原因の一つと考えられており、我々を含む研究グループらにより、クラスターDNA損傷の微細構造が生物学的に重要であることが明らかになりつつあった。しかしながら、どのようなクラスターDNA損傷がイオンビーム生物影響に関与しているかについては、不明な点が多く残されていた。その原因の一つに、エネルギー付与に依存して決まるはずのクラスターDNA損傷を構成する個々の損傷の空間的な位置や化学構造に関する情報が乏しかったことがあげられる。

低い線エネルギー付与(LET)の放射線の場合、エネルギー付与により主に電離や電子励起、またその後生じるラジカル等によってDNA損傷が生成されるという考え方が定着し、実験的にもこれを支持する数多くの結果が蓄積されてきた。この考え方を外挿し、時に飛跡付近(コア)に1-10MGyを超えるような極めて高い線量を与える高LET放射線であるイオンビームにおいては、DNA損傷のクラスター化の頻度やクラスター内に含まれるDNA損傷数が増加すると仮定されてきた。すなわち、高LET放射線での大きな生物学的効果比(RBE)は、塩基損傷や脱塩基部位をもつ「複雑な」二本鎖切断(DSB)が再結合されにくいために生じる、と一般的に予想されていた。しかしながら、DNA損傷(特にその局在性)に関してエネルギー付与との直接的な関係は十分調べられてはいなかった。この原因は(1)実験的にDNA損傷の局在性を定量的に測定する手法がなかったこと、(2)DNA損傷生成機構(特に二次電子の働き)の理解が不十分であったこと、及びそれらに起因して、(3)シミュレーションと実験値の比較が十分にできなかったこと、にある。特に放射線生物影響に深く関与するDSB末端に関しては、(1)放射線照射ゲノムDNAに対する実験手法が存在せず、(2)塩基損傷や脱塩基部位が付随するDSB末端は再結合されにくいと断定できる直接的な証拠はなく、加えて、(3)イオンビーム誘発DSBでは多様な末端構造をもつDSBを一つの分子集団としてまとめて取り扱う、という研究レベルにあった。以上のような研究背景であったため、イオンビーム生物影響メカニズムはブラックボックス化したままであり、分子レベルでの理解が進んでいるとは言い難い状況にあった。

## 2. 研究の目的

本研究では、イオンビーム生物影響の理解を深めるために、DNA損傷の局在性、特にDSB末端の分子構造解明が必要と考えて研究を進めた。放射線照射によって生成される二次電子の挙動、及び、局所的に付与される高精度なエネルギー分布を、異なるエネルギー・イオン種において系統的に明らかにするとともに、局所線量に依存したDNA損傷生成を考慮し、DSB末端構造をシミュレートすることを目的とした。一方で、DNA損傷の局在性を評価する実験的手段がないため、その開発を試みた。新たに開発した手法を駆使し、局所線量の増加に伴う直接作用・高密度ラジカルの寄与の増大に依存して生じると予測されるDNA損傷に焦点を絞り実験を行い、その収率および局在性を明らかにすることを目指した。また、イオンビーム誘発DSB末端における塩基損傷、脱塩基部位等のDNA損傷をDNA一分子レベルで調べ、DSB末端構造の線量依存性を局所線量分布と対応させて系統的に明らかにすることを狙った。これら一連の研究により、致死や突然変異に深く関与するDNA損傷の局在性やDSB末端の分子構造に関する情報を得て、イオンビーム生物影響に関与するDNA損傷の実体に迫りたいと考えた。

## 3. 研究の方法

イオンビーム生物影響の原因となるDNA損傷の実体を解明するため、本研究はシミュレーションと実験の2つのアプローチで進めた。

シミュレーションにおいては、これまでブラックボックスであった、イオンビームの軌道付近のDNA損傷生成機構の解明を目指し、コード開発やモンテカルロ計算を行った。具体的には、まず個々の分子の電離や励起、さらに電子の個々の運動を扱えるモンテカルロコードを開発した。次に、得られた計算コードを、 $\mu\text{m}$ スケール以上のマクロスケールで調べることができる放射線挙動計算コード「PHITS」に組み込み、線量分布計算コードを発展させた。さらに、発展させたPHITSコードによって電離や励起の位置情報を得て、DNAに生じる損傷の位置と数を見積もるシミュレーションを進めた。

実験においては、放射線のエネルギー付与に依存したDNA損傷構造の解明のため、DNA損傷の収率及び局在性を評価する方法を開発し、研究を行った。損傷の局在性の評価には、脱塩基部位に特異的に結合する蛍光プローブを用いて、標識された脱塩基部位間で生じる蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)から調べる手法を適用した。実際には、実験の高感度化及び高効率化のため、蛍光異方性を指標として蛍光標識した放射線照射DNAのFRET効率を算出し、DNA損傷の局在性を調べた。さらに、DSB末端構造の解明のため、DNA損傷を可視化し、DSB末端を含むDNA損傷分布をDNA一分子で調べる実験系の開発を行った。細胞内DNAに生じたDNA損傷を調べるためには、細胞から損傷を含むDNAを抽出し、その後濃縮する必要があった。そこで本研究では、新たに損傷DNA濃縮法を確立し、濃縮された損傷DNA分子を原子間力顕微鏡で観察することにより、放射線誘発ゲノムDNA損傷の収率とDNA損傷の修復を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) PHITS の飛跡構造解析モードの開発

低エネルギー二次電子の微細な挙動解析を実現する計算コードを独自に開発した。計算結果の一例を図1(a)に示す。本コードを利用すると、水和電子の正確な位置や還元的 DNA 損傷の誘発位置が推定可能になる。このコードを放射線輸送計算コード PHITS に実装し、PHITS の電子飛跡構造解析モードを開発した。さらに、既存の飛跡構造解析コード KURBUC を PHITS に実装することで、

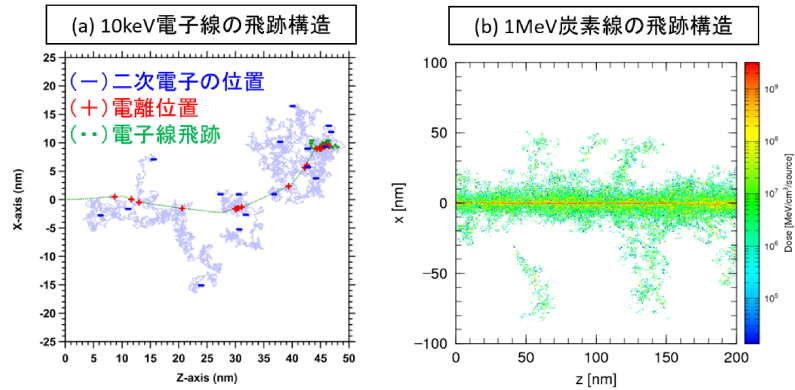


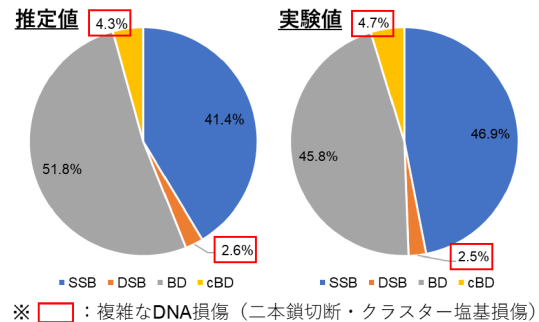
図1. シミュレーションによる飛跡構造

陽子・炭素線の飛跡構造解析モードを開発した。計算結果の一例を図1(b)に示す。これにより、炭素イオントラックコア近傍の現実的な高線量分布を計算可能にした。PHITS の飛跡構造解析モードを利用すると、水への放射線照射の結果生じる電離・励起位置をナノスケールでシミュレーション予測可能となる。これらの科学的知見・解析技術は、放射線 DNA 損傷研究の基礎基盤となる。本計算機能はすでに一般公開されている。現在、世界各国で多くのユーザーが利用し始め、今後の波及効果が十分に見込める重要な成果となった。さらに、独自に開発したイオン飛跡構造解析コードのシミュレーション結果から、動径線量分布の解析式を導出し、PHITS に実装した。

##### (2) PHITS コードを活用した DNA 損傷推定シミュレーション

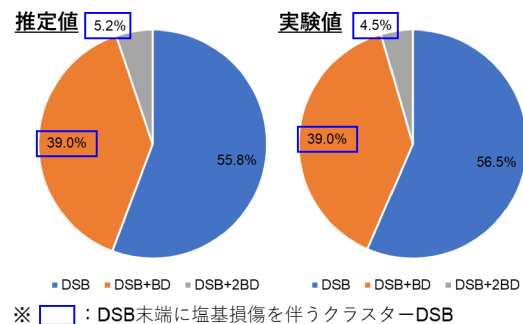
低エネルギー電子線の挙動を考慮した詳細な飛跡構造の計算結果を活用して、DNA スケールにおける電離・励起の空間パターンを解析し、DNA 損傷の発生位置と数を推定した。この DNA 損傷シミュレーションでは、X 線により発生する二次電子線に焦点を当て、孤立損傷（一本鎖切断（single-strand break, SSB）・塩基損傷（base damage, DB））や複雑な損傷（二本鎖切断（double-strand break, DSB）・クラスター塩基損傷（clustered BD, cBD））さらには塩基損傷を含む DSB の発生数を定量化した。その結果、低 LET 放射線である X 線の場合、全 DNA 損傷（主鎖切断・塩基損傷）に対する複雑な DNA 損傷（DSB・cBD）の含有率は 6.9% であることが示され、同条件下における実測結果の再現に成功した（図2(A), 文献1）。また、推定結果から、発生する全 DSB の 43.5% は、塩基損傷を伴うクラスター DSB であることも示され、原子間力顕微鏡により測定された DSB 末端構造の実測値の傾向と良好な一致を得た（図2(B), 文献1）。このことは、放射線により発生する DNA 損傷の複雑さは、二次電子線飛跡上で発生する電離励起の空間密度により決定されることを示している。以上より、放射線の物理特性から複雑な DNA 損傷の収率を推定可能なコードの開発に成功し、実験的に測定されるクラスター損傷の生成メカニズムの解明に一歩近づいた。

##### (A) 孤立損傷と複雑な損傷の割合



※   : 複雑な DNA 損傷（二本鎖切断・クラスター塩基損傷）

##### (B) 塩基損傷を伴う複雑な DSB の含有率



※   : DSB 末端に塩基損傷を伴うクラスター DSB

図2. 放射線誘発 DNA 損傷のシミュレーション（推定値）と実験値の比較

##### (3) FRET 解析による DNA 損傷の局在性評価

線質の異なる<sup>60</sup>Co線、エネルギーの異なる2種のヘリウムイオン(2 MeV/u, 0.52 MeV/u)、炭素イオン(0.37 MeV/u)を照射してDNA損傷を誘発し、その局在性を調べた。DNA試料として、プラスミド(pUC19)を制限酵素SmaIで直鎖状にしたもの

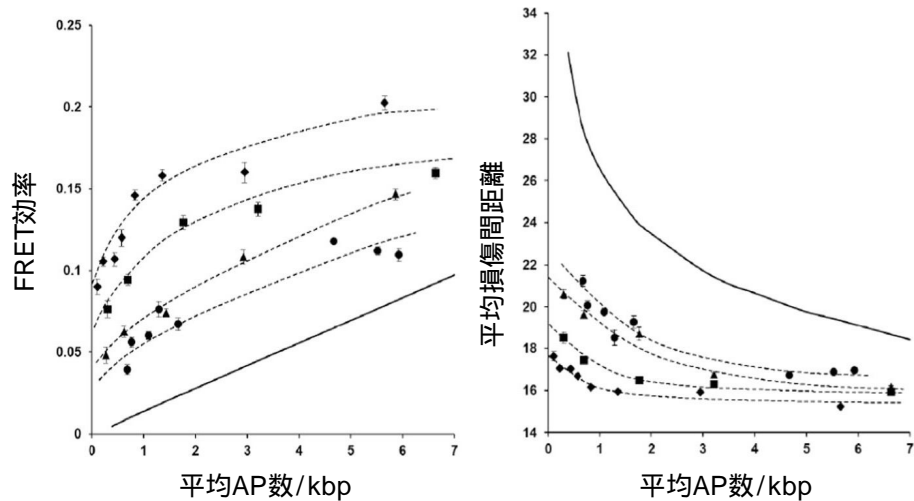


図3. 損傷密度に対するFRET効率(左)と平均損傷間距離(右)  
<sup>60</sup>Co  $\gamma$ -rays, 2 MeV/u Heイオン, ■ 0.52 MeV/u Heイオン, 0.37 MeV/u Cイオン, 実線: ランダムな損傷分布

を用いた。さらに、DNA中の脱塩基部位(AP)と選択的に共有結合するAlexaFluor®488 C5-O-amineを用いてAPへの蛍光分子標識を行った。蛍光標識DNA試料の蛍光異方性測定を行い、1 kbpあたりの平均生成AP数と蛍光異方性の関係を調べたところ(文献2,3) 線では損傷がランダムに配置した時の理論値より蛍光異方性が低く、FRET効率が增加していることが明らかとなった(図3)。このことは、線ではFRETが生じやすくなることを示しており、局在化したAPを誘発することを示している。さらに、イオンビームでは線より蛍光異方性の値が低く、LETの値に依存して蛍光異方性が下がることがわかった。これらの結果は、放射線のLETの増大に伴ってFRET効率が高くなることを示しており、誘発されるDNA損傷が局在化しやすくなることが明らかとなった。単一のトラックで生じる損傷間の平均距離は、2 MeV/uヘリウムイオン、0.52 MeV/uヘリウムイオン、0.37 MeV/u炭素イオンの各々に関して、21.1 bp、19.4 bp、18.7 bpと算出され、イオンビーム誘発損傷の局在化を反映している結果となった。これらの結果より、高いLETによってDNA損傷が局在化して誘発されることを実験的に示すことができた。

(4)原子間力顕微鏡を用いたDSB末端解析

イオンビームの生物影響の原因を考える上では、細胞内に生じるDNA損傷の局在性の詳細を知る必要がある。一方で、DNA損傷の修復まで解析することを考慮すると、可能な限り低線量での検出が望ましい。そこで、損傷を持つDNA断片を濃縮する手法を確立した。細胞にX線もしくは500 MeV/u Feイオンを照射してから抽出したDNAに塩基除去修復酵素であるOgg1及びNthを作用させ、酸化型プリン損傷及び酸化型ピリミジン損傷をAPに変換した。APをビオチン化した

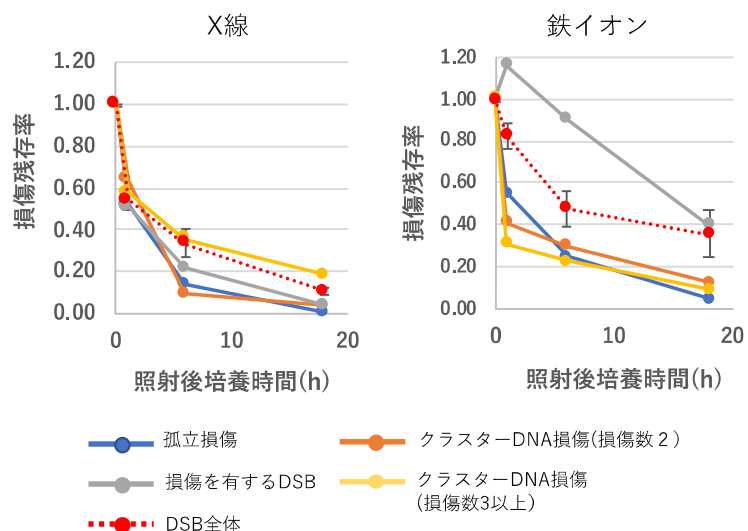


図4. 放射線照射後の損傷残存率

aldehyde reactive probe(ARP)で標識し、ストレプトアビジン結合磁化ビーズに吸着させ、損傷を含むDNAを精製した。この操作によって、DNA損傷を含む断片を約100倍濃縮することが可能となった。この方法によって濃縮された損傷DNAを原子間力顕微鏡で観察した結果、DNA損傷として、孤立損傷、2つの損傷が近接して存在するクラスターDNA損傷、3つ以上の損傷を有するクラスターDNA損傷、一つ以上の損傷を有するDSB末端、の4つのタイプが検出さ

れた。クラスターDNA損傷はX線より鉄イオンの方が誘発されやすいことがわかった。さらに、照射後残存する損傷率から各損傷の修復効率を調べた。意外なことに、照射後18時間でX線及び鉄イオン誘発クラスターDNA損傷はその大半が消失し、クラスターDNA損傷を構成する損傷数に依存して修復が困難になることはなかった。一方、DSB末端にDNA損傷を有するタイプの損傷では、X線に比べ鉄イオンでは修復されにくく、長期間細胞内に残ることが明らかとなった。我々はDSB末端でのDNA損傷数が修復の困難さに関連していると推察している。これまでにこのタイプの損傷は解析する方法が無く、その修復に関して実験的な裏付けがなかったが、本研究により初めて明らかにすることができた。本研究結果は、イオンビーム生物影響メカニズム解明に寄与する大きな一歩であると考えられる。

以上本研究では、シミュレーションと実験を組み合わせ、エネルギー付与からDNA損傷の局在性、特にDSB末端構造に着目して研究を行った。エネルギー付与からDNA損傷の修復までの過程を統一的に取り扱い、イオンビーム生物影響メカニズム解明のための基盤となる成果を得ることができた。革新的なシミュレーション、及び、新たな実験法の開発によって得られた本研究成果は、関連分野でのインパクトが極めて大きい。今後本研究で得られた成果を基盤に研究を進展させることにより、イオンビーム生物影響の理解が大いに進むと考えられる。

#### 引用文献

1. A simplified cluster analysis of electron track structure for estimating complex DNA damage yields. Matsuya, Y., Nakano, T., Kai, T., Shikazono, N., Akamatsu, K., Yoshii, Y., Sato T. *Int J Mol Sci.*, 21, 1701 (2020).
2. New method for estimating clustering of DNA lesions induced by physical/chemical mutagens using fluorescence anisotropy. Akamatsu, K., Shikazono, N., Saito, T. *Anal Biochem.* 536, 78-89 (2017).
3. Fluorescence anisotropy study of radiation-induced DNA damage clustering based on FRET. Akamatsu K, Shikazono N, Saito T., *Anal. Bioanal. Chem.* 413,1185-1192 (2021).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計22件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsuya Yusuke, Nakano Toshiaki, Kai Takeshi, Shikazono Naoya, Akamatsu Ken, Yoshii Yuji, Sato Tatsuhiko	4. 巻 21
2. 論文標題 A Simplified Cluster Analysis of Electron Track Structure for Estimating Complex DNA Damage Yields	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1701 ~ 1701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21051701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Moribayashi Kengo	4. 巻 43
2. 論文標題 Application of simple formulas to track potential in heavy-ion-beam simulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transactions of the Materials Research Society of Japan	6. 最初と最後の頁 267 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14723/tmrsj.43.267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 K. Akamatsu, N. Shikazono, T. Saito	4. 巻 536
2. 論文標題 New method for estimating clustering of DNA lesions induced by physical/chemical mutagens using fluorescence anisotropy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anal. Biochem.	6. 最初と最後の頁 78-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2017.08.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 E. Sage, N. Shikazono	4. 巻 107
2. 論文標題 Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Free Radic. Biol. Med.	6. 最初と最後の頁 125-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 K. Moribayashi	4. 巻 146
2. 論文標題 Effect of the track potential on the motion and energy flow of secondary electrons created from heavy-ion irradiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiat. Phys. Chem.	6. 最初と最後の頁 68-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radphyschem.2018.01.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Kai, A. Yokoya, M. Ukai, K. Fujii, T. Toigawa, R. Watanabe	4. 巻 20
2. 論文標題 A Significant role of non-thermal equilibrated electrons in the formation of deleterious complex DNA damage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Phys. Chem. Chem. Phys.	6. 最初と最後の頁 2838-2844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7cp06903k	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Sato, Y. Iwamoto, S. Hashimoto, T. Ogawa, T. Furuta, S. Abe, T. Kai, P.E. Tsai, N. Matsuda, H. Iwase, N. Shigyo, L. Sihver, K. Niita	4. 巻 55
2. 論文標題 Features of Particle and Heavy Ion Transport Code System (PHITS) Version 3.02	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Nucl. Sci. Technol.	6. 最初と最後の頁 684-690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00223131.2017.1419890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 K. Akamatsu, N. Shikazono, T. Saito	4. 巻 413
2. 論文標題 Fluorescence anisotropy study of radiation-induced DNA damage clustering based on FRET	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 1185 ~ 1192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-020-03082-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計40件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 11件）

1. 発表者名 鹿園直哉、赤松憲、中野敏彰
2. 発表標題 放射線誘発クラスターDNA損傷の直接観察とその修復
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ken Akamatsu, Naoya Shikazono
2. 発表標題 Study of radiation-induced clustered DNA damage by fluorescence anisotropy measurement based on Forster resonance energy transfer
3. 学会等名 16th International Congress of Radiation Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森林健悟
2. 発表標題 重イオンビームの新規動径線量シミュレーションモデル：従来のモデルとの比較
3. 学会等名 日本物理学会2019年秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoya Shikazono, Ken Akamatsu
2. 発表標題 Measurement and mutagenic potential of clustered DNA lesions
3. 学会等名 15th International Workshop on Radiation Damage to DNA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 赤松憲
2. 発表標題 重粒子線によって生じる難修復性複雑DNA損傷の構造的特徴
3. 学会等名 原子衝突学会第43回年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甲斐健師、米谷 佳晃
2. 発表標題 水の放射線分解で誘発された低エネルギー電子の動的挙動解析
3. 学会等名 日本物理学会2018年秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甲斐健師、佐藤達彦、Thiansin Liamsuwan、Hooshang Nikjoo
2. 発表標題 PHITSにおけるイオンの飛跡構造計算機能の開発
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 N. Shikazono, K. Akamatsu
2. 発表標題 Detection and mutagenic potential of clustered DNA lesions
3. 学会等名 17th International Symposium on Microdosimetry (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 甲斐健師
2. 発表標題 動的モンテカルロ法を用いた凝縮相における低速電子の微視的挙動
3. 学会等名 第31回固体飛跡検出器研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 達彦 (Sato Tatsuhiko)  (30354707)	国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 原子力科学研究所 原子力基礎工学研究センター・研究主席  (82110)	
研究分担者	森林 健悟 (Moribayashi Kengo)  (70354975)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学領域・上席研究員（定常）  (82502)	
研究分担者	赤松 憲 (Akamatsu Ken)  (70360401)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学領域・グループリーダー（定常）  (82502)	
研究分担者	甲斐 健師 (Kai Takeshi)  (70403037)	国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 原子力科学研究所 原子力基礎工学研究センター・研究主幹  (82110)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------