

機関番号：82110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20710045

研究課題名(和文) クラスタDNA損傷によるテロメア不安定性誘発に関する研究

研究課題名(英文) Study on telomeric instability caused by clustered DNA damage

研究代表者

漆原 あゆみ (URUSHIBARA AYUMI)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究員

研究者番号：80391275

研究成果の概要(和文)：電離放射線により引き起こされる様々な影響の中でも、放射線発がんにつながると考えられている遺伝的不安定性の原因因子を特定する事は、放射線の生物影響を明らかにするだけでなく発がん過程を解明する上でも重要である。本研究は、遺伝的不安定性の誘発原因を明らかにするため、電離放射線によって生じるDNA損傷の中でも非DSB型のクラスタ損傷に着目し、その遺伝的影響について、染色体異常を指標とした解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Ionizing radiation induces genomic instability in the progeny of irradiated cells. The evidence has been accumulated to suggest that the induction of DNA double-strand breaks (DSBs) and subsequent repair processes play a key role in inducing genomic instability. In the present study, we hypothesize that some DNA lesions remained after repair of DSBs might be related to the induction of genomic instability. To study a role of clustered damage in the induction of chromosomal instability, we transferred an UVA-irradiated human chromosome 21 into unirradiated mouse m5S cells derived from mouse fibroblasts, using a microcell-mediated chromosome transfer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：クラスタ損傷・テロメア・遺伝的不安定性・放射線・紫外線・酸化損傷

## 1. 研究開始当初の背景

電離放射線の照射は直接細胞死を引き起こす一方で、死を免れた細胞の子孫細胞にも細胞死、染色体異常、突然変異等を誘発する。これら遅延性に見られる影響は遺伝的不安定性と呼ばれ、放射線の晩発影響の一つである放射線発癌に関与し、発癌機構解明の手がかりであると考えられている。一般に、遺伝的不安定性の誘発にはDSBが関係していると言われているが、電離放射線が及ぼす影響は、

DSBはもとより塩基損傷、脱塩基部位、一重鎖切断等、DNA損傷だけでも多岐に亙り、DSBだけが原因とは限らない。さらに、DSBは細胞死をもたらすことから、子孫細胞における遺伝的不安定性の誘発にはDSBそのものではなくその修復産物が関わっていると考えられる。その理由の一つとして、2つのDSB修復機構のうち、非同源末端結合修復を欠損するマウス細胞を用いて、遅延性に生じる染色体異常を指標とした遺伝的不安定性の解析

を行うと、非相同末端結合修復欠損細胞は、野生型の遺伝子形質を持つ細胞に比べて少ないDSB量で野生型細胞よりも高い遺伝的不安定性を示すことから、非相同末端結合修復機構が欠損した場合に行われるDSB修復は、本来の修復に比べて誤りが多く正確性の低いものであり、このDSB修復産物こそが遺伝的不安定性を誘発する要因であると考えられる。さらに電離放射線の照射がテロメア不安定化を引き起こし、遅延性染色体異常の生成に関与することも明らかになった。これにより、遺伝的不安定性誘発に関与する要因の一つがDSBそのものではない損傷であり、それがテロメアに蓄積又は残存することによりテロメア不安定化を誘発する可能性が示唆された。そこで本研究では、DNA損傷が近接して複数個存在する事で修復され難く、高い生物効果を示すと言われるクラスターDNA損傷に着目した。クラスターDNA損傷には、DSBを伴うDSB型とDSBを伴わない非DSB型の2種類があり、特に非DSB型の損傷は電離放射線により細胞内でDSBの少なくとも4倍以上生成されると推定される。従って、この非DSB型のクラスター損傷の中に不安定性を誘発する主要因が含まれているのではないかと予想した。中でも、テロメア配列中に多く存在するグアニンは他の塩基に比べて酸化されやすく、その酸化体である8-オキソグアニン(8-oxo-7,8-dihydroguanine; 8-oxoG)は、シトシンだけでなくアデニンとも塩基対を形成して突然変異を誘発する一方で、塩基除去修復による修復過程で鎖切断を生じる事が知られている。また、in vitroでは、ヒトテロメアの「TTAGGG」配列中に8-oxoGがクラスター化すると、テロメア結合タンパク質とDNAとの親和性を低下させることが報告されている。

以上のことから、電離放射線による遺伝的不安定性の誘発にはDSBよりも非DSB型のクラスターDNA損傷が重要であり、テロメアに優先的に生じた8-oxoGによるクラスター損傷が、テロメア不安定性を始めとする遺伝的不安定性を誘発するのではないかと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、非DSB型クラスターDNA損傷が細胞内で及ぼす影響について明らかにすることを目的とする。特に、テロメア部分に生成するクラスター損傷によって引き起こされるテロメア不安定化を始めとする様々な遅延性の影響を調べ、遺伝的不安定性が誘発されるかどうかを調べる。クラスター損傷を細胞内に導入する方法として微小核細胞融合法を用い、酸化損傷の可視化による染色体上の分布の解析に加え、クラスター損傷を有する染色体を移入し、遺伝的不安定性の指

標である染色体異常を解析する実験系を確立し、非DSB型クラスターDNA損傷と遺伝的不安定性の関係を明らかにし、テロメア不安定性及び遺伝的不安定性を引き起こす損傷の同定を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) UV-A照射による8-oxoGの生成

電離放射線は、DSBを生じるとともに非DSB型のクラスターDNA損傷を生じているが、DSBを生じることなく電離放射線と同程度のクラスター損傷を生じさせるため、8-oxoGを生じ、DSBは生じないUV-Aを用いる。本研究では、微小核細胞にUV-Aを照射した後にレシピエント細胞に移入するが、クラスター損傷を生成させるのに必要なUV-Aの線量は分かっていない。そこで、UV-A照射によって生成する8-oxoGを、8-oxoG特異的な抗体を用いた蛍光免疫染色によって可視化し、染色体上における8-oxoGの検出を行った。

### (2) 微小核細胞融合法によるクラスターDNA損傷導入細胞の作成

微小核細胞融合法の染色体ドナー細胞には、ヒト21番染色体を含有するマウスA9細胞を用い、レシピエント細胞にはマウス線維芽細胞由来の不活化細胞株であるm5S細胞を用いた。微小核細胞は、50%生存率を示す線量(4000kJ/m<sup>2</sup>)を照射したものを、コントロールとして未照射のものをそれぞれレシピエント細胞に移入した。移入後は、目的染色体が移入された細胞をヒト21番染色体上にあるHygromycin B耐性遺伝子を利用した薬剤によるセクションによりクローニングし、クラスター損傷移入クローンを得た。

### (3) 遺伝的不安定性の解析

クラスター損傷移入クローンにおいて、染色体異常の解析を行った。染色方法は、移入した染色体の不安定性を調べる為に、特定の染色体に特異的なプローブを用いたWhole Chromosome Painting(WCP) FISH法により、移入したヒト21番染色体を染色し、切断及び転座等の染色体異常について解析した。さらに、不安定性がクラスター損傷の生じた染色体にのみ見られるのか、それとも他の染色体にも影響を及ぼすのかを調べるために、レシピエント細胞由来であるマウス染色体について、その染色体数(倍数性)と染色体異常についても解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) U-A照射により生じる8-oxoGの影響

600kJ/m<sup>2</sup>のUV-Aを照射したマウスm5S細胞の染色体標本では、8-oxoG特異的な抗体を用いた蛍光免疫染色により染色体上に8-oxoGのシグナルが顕著に増加する事が示された。また、UV-Aのm5S細胞に対する致死感受性は、D<sub>0</sub>=6781kJ/m<sup>2</sup>であり、この生存率曲線から50%

致死感受性を示す線量が 4000kJ/m<sup>2</sup>である事が明らかとなった。

### (2) 微小核細胞融合法によるクラスターDNA損傷の細胞への移入

微小核細胞融合法を用いて、UV-A 照射 (4000kJ/m<sup>2</sup>) ヒト 21 番染色体をマウス m5S 細胞へ移入した。その後、薬剤によるセレクションによって、UV-A 照射ヒト 21 番染色体移入クローンの作製に成功した。作製したクローンは、それぞれ染色体標本を作製した。また、染色体の移入による影響を知るため、非照射のヒト 21 番染色体を移入したクローンも同様に作製した。これらクローンはいずれも個別の細胞を由来とするものとしてクローニングを行ったものである。また、照射、非照射染色体移入クローンのいずれも 10 クローン以上を作製した。

### (3) 遺伝的不安定性の解析

染色体移入細胞は、移入したヒト 21 番染色体特異的なプローブを用いた WCP-FISH 法による染色を行い、移入したヒト 21 番染色体とレシピエントであるマウス染色体のそれぞれについて、染色体異常、及び染色体数の安定性について解析を行った。解析は、作製したクローンの中からコントロールの 3 クローン、照射染色体移入クローンの 4 クローンについて行った。その結果、コントロールである非照射染色体の移入では、移入したヒト 21 番染色体と、マウス染色体のいずれにも染色体異常の顕著な増加などは見られなかった。また、染色体数についても、移入による染色体数の安定性に大きな変化はなく、ほぼ 2 倍体のままであることが分かった。それに対して、UV-A を照射したヒト 21 番染色体の移入では、まずその倍数性において、いずれのクローンも 4 倍体ないし 8 倍体となっており、さらには染色体数そのものにもばらつきが生じており、異数体化が見られた。また、染色体異常についても、UV-A 照射を受けたヒト 21 番染色体に生じる異常だけでなく、非照射環境にあったはずのレシピエント由来のマウス染色体においても染色体異常が増加していた。

以上の結果は、UV-A 照射によって染色体上に生じる 8-oxoG からなる非切断型の DNA 損傷の移入が、非照射環境下における細胞において照射染色体自身の不安定化だけでなく、同一環境下におかれた他の染色体にたいしても何らかの影響を及ぼし、不安定化させることを示したものである。また、その影響は染色体異常だけでなく、細胞における染色体数の維持機構の破綻にも関与することが示された。これはすなわち、非切断型の DNA 損傷によって遺伝的不安定性が誘発される事を示したものである。

## 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)

1. Shikazono N., Yokoya A., Urushibara A., Noguchi M., Fujii K.: A model for analysis of the yield and the level of clustering of radiation-induced DNA-strand breaks in hydrated plasmids. 査読有, *Radiation Protection Dosimetry* 143: 181-185, 2010.
2. Yokoya A., Shikazono N., Fujii K., Noguchi M., Urushibara A.: A novel technique using DNA denaturation to detect multiply induced single-strand breaks in a hydrated plasmid DNA molecule by X-ray and <sup>4</sup>He<sup>2+</sup> ion irradiation. 査読有, *Radiation Protection Dosimetry* 143: 219-225, 2010.
3. Shikazono N., Noguchi M., Fujii K., Urushibara A., Yokoya A.: The Yield, Processing, and Biological Consequences of Clustered DNA Damage Induced by Ionizing Radiation. 査読有, *Journal of Radiation Research* 50: 27-36, 2009.
4. Yokoya A., Fujii K., Shikazono N., Akamatsu K., Urushibara A., and Watanabe R.: Studies of Soft X-ray-induced Auger Effect on the Induction of DNA Damage. 査読有, *International Journal of Radiation Biology* 84: 1069-1081, 2008.
5. Yokoya A., Shikazono N., Fujii K., Urushibara A., Akamatsu K., and Watanabe R.: DNA Damage induced by the Direct Effect of Radiation. 査読有, *Radiation Physics and Chemistry* 77: 1280-1285, 2008.

[学会発表] (計 14 件)

1. 漆原 あゆみ, 児玉 靖司, 横谷 明德. 非 2 重鎖切断型損傷による遺伝的不安定性の誘発. 日本放射線影響学会 第 53 回大会、2010 年 10 月 20-22 日、京都.
2. 野口 実穂, 漆原 あゆみ, 横谷 明德, 鹿園 直哉. 8-oxoG を含むクラスターDNA 損傷の誘発突然変異. 日本放射線影響学会 第 53 回大会、2010 年 10 月 20-22 日、京都.
3. 端 邦樹, 漆原 あゆみ, 山下 真一, 鹿園 直哉, 横谷 明德, 勝村 庸介. 希薄プラスミド DNA 水溶液へのガンマ線照射: 放射線誘起損傷の抗酸化剤エダラ

- ボンによる化学回復. 日本放射線影響学会 第53回大会、2010年10月20-22日、京都.
4. N. Shikazono, M. Noguchi, A. Urushibara, P. O' Neill, and A. Yokoya. Processing and biological consequences of clustered DNA damage containing a single strand break and an AP site. 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the Radiation Research Society, 2010年9月25-29日、Hawaii, USA.
  5. 漆原 あゆみ, 児玉 靖司. Analysis of genomic instability induced by the introduction of the UVA-irradiated chromosome. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月21-23日、大阪.
  6. K. Hata, A. Urushibara, M. Lin, Y. Muroya, S. Yamashita, A. Yokoya, H. Fu and Y. Katsumura. Antioxidative and Radioprotective Effects of Edaravone. 3rd Asia Pacific Symposium on Radiation Chemistry, 2010年9月14-17日、Lonavala, India.
  7. 鹿園 直哉, 野口 実穂, 漆原 あゆみ, O' Neill Peter, 横谷 明德. 大腸菌におけるクラスターDNA損傷誘発突然変異. 日本放射線影響学会 第52回大会、2009年11月11-13日、広島.
  8. 野口 実穂, 漆原 あゆみ, 横谷 明德, 鹿園 直哉. 同一鎖上に配置されたクラスターDNA損傷のプロセッシングについて. 日本放射線影響学会 第52回大会、2009年11月11-13日、広島.
  9. 野口 実穂, 漆原 あゆみ, 横谷 明德, 鹿園 直哉. 8-oxoGを含むクラスターDNA損傷誘発突然変異における一本鎖切断の影響. 日本放射線影響学会 第51回大会、2008年11月19-21日、北九州.
  10. 鹿園 直哉, 野口 実穂, 漆原 あゆみ, オニール ピーター, 横谷 明德. 鎖切断と脱塩基部位からなるクラスターDNA損傷の生物効果. 日本放射線影響学会 第51回大会、2008年11月19-21日、北九州.
  11. 菓子野 元郎, 漆原 あゆみ, 児玉 靖司, 小林 純也, 劉 勇, 鈴木 実, 増永 慎一郎, 木梨 友子, 渡邊 正己, 小野 公二. DMSOによる放射線防護効果はDNA-PK依存的修復に依存する. 日本放射線影響学会 第51回大会、2008年11月19-21日、北九州.
  12. N. Shikazono, A. Urushibara, K. Fujii, A. Yokoya. A Qualitative Analysis on the Yield of Radiation-induced DNA Strand Breaks in Hydrated Plasmids. 2nd Asia-Pacific Symposium on Radiation Chemistry, 2008年8月29日-9月1日、東京.
  13. M. Noguchi, A. Urushibara, A. Yokoya, P. O' Neill, N. Shikazono. Mutagenic

Potential of 8-Oxo-7,8-dihydroguanine Depends on the Location of a Single Strand Break within a Cluster. 10th International Workshop Radiation Damage to DNA, 2008年6月8-12日、裏磐梯.

14. A. Yokoya, N. Shikazono, A. Urushibara, and K. Fujii. A Novel Technique using DNA Denaturation to Detect Prompt and Enzymatically Induced Single Strand Breaks Produced in a Clustered Damage Site. 10th International Workshop Radiation Damage to DNA, 2008年6月8-12日、裏磐梯.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

漆原 あゆみ (URUSHIBARA AYUMI)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究員

研究者番号：80391275