

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82110

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651049

研究課題名(和文)修復酵素反応経路間の干渉による放射線DNA損傷の非線形な修復応答

研究課題名(英文)Non-linear DNA repair responses caused by interference between competitive repair pathways

研究代表者

横谷 明德(YOKOYA, Akinari)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門・先端基礎研究センター・研究主席

研究者番号：10354987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：放射線照射により細胞内のDNAに様々な塩基損傷など複数の損傷が局在化して生じた際に(クラスター損傷)、これらに対して異なる修復系が作用することによる修復経路間の干渉が予測される。本研究では、クラスターDNA損傷に対する異なる塩基除去修復酵素の作用機序の違いが酵素の活性に影響するかどうかを明らかにすることを目的とした。X線を照射したDNAに、NthとFpgの2種類の酵素の処理の順番を変え酵素活性に差があるかどうかについて調べた。得られた結果は、予想に反し各酵素の活性は作用順序に依存しない事を示した。これはクラスターを構成する各損傷は十分に離れており、修復系相互の干渉は生じないことを示している。

研究成果の概要(英文)：Ionizing radiation induce localized DNA damage composed of various base lesions (clustered damage). It is expected that damage repair enzymes would be interfered at the localized area on DNA. In this study we aimed to clarify whether the variation of enzymatic processes modify each enzymatic activities at clustered damage site. DNA samples exposed to X-rays were treated with two base excision repair enzymes, namely Nth and Fpg. The enzymes were added sequentially or simultaneously. Contrast to our initial expectation, change of the order of the enzymatic treatments did not affect the activities of the enzymes. This result suggests that, even in a cluster damage site, each base lesions substantially separated not to induce interference between each enzymatic pathways.

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：クラスターDNA損傷 DNA修復応答 酵素反応干渉 非線形性

1. 研究開始当初の背景

分子生物学的手法の導入により、放射線 DNA 損傷とその修復に関する分子レベルの理解が進みつつある。しかし以下のような点が、素朴な疑問として依然残されている。すなわち、培養皿状の細胞集団に一樣に X 線を照射した場合でも、生存してコロニー形成能を維持する細胞とそうでない細胞に別れる。つまり、全ての細胞が“半分だけ生存している細胞！”という状態にはならない。これは、細胞の運命に分岐点があり生存か死かという二つの状態間のどちらのみ可能であることを示しており、不連続なエネルギー準位しか許されない量子力学的な事象と似ている。私たちは、高 LET 放射線によりゲノム DNA 状に高密度で誘発した損傷（クラスター損傷）に対する修復プロセスを解析する過程において、最初に働いた酵素の産物が結果として次の酵素の活性を変える可能性があることに気付いた。これは、複数の特定酵素反応経路間の相関（干渉）により非線形な効果として細胞の生死などに至る経路（運命）が選択されるという、一種のカオス現象であることが予測される。本申請課題では、非線形効果（カオス）が現れるか否かを、単純な酵素修復系を用いて実験的及び理論的に検証することを目指した。

2. 研究の目的

複数の修復酵素が競合できる基質部位として、放射線により生起させたクラスター損傷を持つ DNA を用いる。これに対して、様々な修復酵素を順序を変えながら作用させ、その結果 DNA 修復産物の収量がどのように影響を受けるかについて明らかにする。例えば、修復酵素 A と B について作用させる順序を変えた事により DNA 修復産物の収量が異なる場合には、酵素反応の順序の入れ替えに対する非線形効果が検証されたことになる。本研究では、放射線照射により細胞内の DNA に様々な塩基損傷など複数の損傷が局在化して生じた際に（クラスター損傷）これらに対して異なる修復系が作用することによる修復経路間の干渉が予測される。本研究では 2 つ塩基除去修復酵素を選び、これらのクラスター DNA 損傷に対する異なる作用機序の違いが酵素の活性に影響するか否か明らかにすることを目的とした。X 線を照射した DNA に、Nth と Fpg の 2 種類の酵素の処理の順番を変え酵素活性に差があるかどうかについて調べた。

3. 研究の方法

クラスター DNA 損傷は、複数の損傷が放射線の 1 トラックにより局在化して生成した状態と定義される。クラスター損傷を高頻度で誘発するとされている高 LET 放射線による DNA 損傷を複数の修復酵素の基質として利用し、修復経路間の干渉効果の有無を調べた。

照射試料として水和した超らせん構造のプラスミド DNA フィルムを作成した。水和した DNA は、生理条件下でのコンフォメーションである B フォームを保持している。試料内にはバルクの水がないため、水の放射線分解で生じる OH ラジカル等との反応によりランダムに生成する孤立した損傷の生成を極力抑え、DNA と放射線トラックの直接の反応で生じたクラスター損傷を浮き彫りにすることができる。この水和薄膜試料に対して、加速器（原子力機構・高崎研究所 TIARA 及び放医研・HIMAC）から得られるヘリウム、炭素及びネオンのイオンビームを LET を変えながら照射し、修復酵素との反応を調べた。

本研究では、8 オキソグアニンなどのプリン塩基損傷及びジヒドロチミンなどのピリミジン塩基損傷を、それぞれ特異的に除去する Fpg 及び Nth 酵素を用いた。これらの酵素はそれぞれの基質である塩基損傷を除去するとともに、DNA 鎖の切断を行う。二つの酵素を逐次的に順番を変えて、あるいは同時に照射試料に作用させ、プラスミド DNA のコンフォメーション変化を電気泳動法などにより観察した。損傷部位に作用した修復酵素の働きにより、複数の損傷部位に DNA 鎖切断が生じると、結果としてさらに細胞致死性の強い二重鎖切断損傷に変換されたことによる分子量変化（DNA の二本鎖切断（DSB）断片）として検出される（図 1 の左側の経路）と予想される。一方、別の酵素（タンパク質 B）が最初に作用し、結果として生じた DNA の 1 本鎖切断（SSB）と損傷塩基 a の組み合わせからなる新しいクラスター損傷構造が見つかる（図 1 の右側の経路）と予想される。

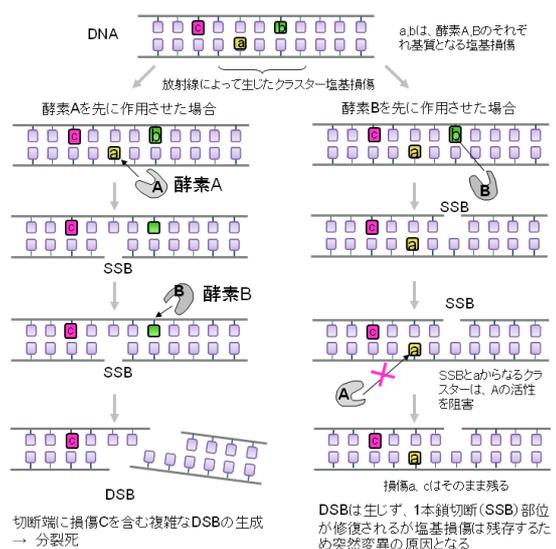


図 1 クラスター DNA 損傷に酵素作用機序の違い

過去の研究報告では、例えば典型的なグアニン損傷である 8-oxo グアニンが SSB の近傍に配置されたクラスター損傷は、8-oxo グアニンを除去する修復酵素の活性を大きく阻害する。すなわち第二の酵素の活性が阻害され

DSB の生成が抑制されるはずである。実験では、2 つの酵素処理について、様々に処理の順番変えて行った。

4. 研究成果

得られた結果は、各酵素の活性は作用順序に依存しない事を示した。

図2は、各酵素の働きで試料として用いたプラスミド DNA の元の構造である超らせん構造が、照射した炭素イオンの線量と共に減少する様子を示している。Nth と Fpg を作用させる順序を変えても、結果はほとんど変わらないことが明らかになった。さらに、クラスター損傷部位に対して酵素の働きにより新たに作られた DNA の二本鎖切断の頻度も同様に、図3に示されるように酵素の処理の順序には依存しなかった。

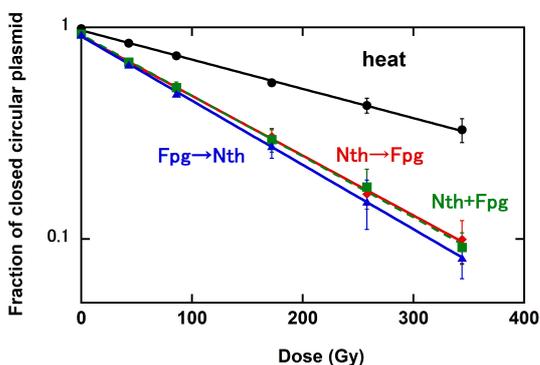


図2 プラスミド DNA の超らせん構造の線量に対する残存率

heat: 酵素の処理をしていない対照実験。放射線照射による DNA の片鎖の直接の切断による元の超らせん構造の減少を示す。Nth Fpg, Fpg

Nth: それぞれ、酵素処理の順番を変えた場合、Nth+Fpg: 両酵素で同時に処理した場合の、酵素活性により新たに生じた 1 本鎖切断による超らせん構造の減少を示す。

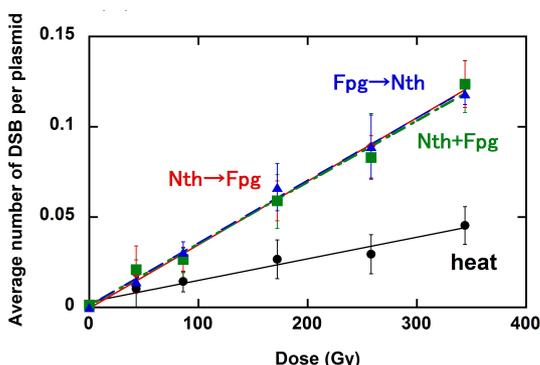


図3 プラスミド DNA に生じた 2 本鎖切断頻度の線量依存性

heat: 酵素の処理をしていない対照実験。放射線照射によりプラスミド 1 分子あたりに生じた 2 本鎖切断 (DNA の両鎖の同時切断で生じた直鎖状の分子の割合から算出) の頻度を示す。Nth

Fpg, Fpg Nth: それぞれ、酵素処理の順番を変えた場合、Nth+Fpg: 両酵素で同時に処理した場合の、酵素活性によりクラスター損傷部位に新たに生じた 2 本鎖切断による超らせん構造の減少を示す。

私たちは、炭素イオン以外の He イオン、ネオンイオン及び X 線についても同様な実験を行い、その全てにおいて酵素反応の順序の違いが明確な活性阻害を誘発することが無い事を確認した。

以上の結果は、クラスターを構成する各損傷は予想に反して十分に離れており、各修復系は独立にそれぞれの基質に作用し得ることを示している。このことから、クラスター損傷という限定された領域における修復反応の干渉は起きないことが結論された。放射線による生体応答反応間の干渉は、もっと高次のレベルで生じている可能性がある。今回用いた酵素は二つとも塩基除去修復酵素であったが、例えばこれらの酵素が 2 次的に二本鎖切断を生じさせた場合、これを修復するための非相同末端結合修復、あるいは相同組換え修復による二本鎖の再結合修復が、どのように塩基除去修復と干渉しないように (あるいは干渉しながら) 進行するかは興味のある点である。今後の研究の進展に生かしたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Shiraishi, I., Suzuki, M., Shikazono, N., Fujii, K., Yokoya, A. Order effect of repair processes to clustered DNA damage. *J. Radiat. Res.* **55** Suppl 1: i92-i93. doi: 10.1093/jrr/rrt152. 査読無 (2014).

Shiina, T., Watanabe, R., Shiraishi, I., Suzuki, M., Sugaya, Y., Fujii, K. and Yokoya, A. Induction of DNA damage, including abasic sites, in plasmid DNA by carbon ion and X-ray irradiation. *Radiat. Environ. Biophys.* **52**, 99-112 査読有 (2013).

Ushigome, T., Shikazono, N., Fujii, K., Watanabe, R., Suzuki, M., Tsuruoka, C., Tauchi, H. and Yokoya, A. Yield of single-, double-strand breaks and nucleobase lesions in fully hydrated plasmid DNA films irradiated with high-LET charged particles. *Radiat. Res.* **177**, 614-627 査読有 (2012).

Yokoya, A., Shikazono, N., Fujii, K., Noguchi, M. and 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 4He^{2+} ion irradiation. *Radiat. Protect. Dosim.* **143**, 219-225, 査読有 (2011).

[学会発表] (計 8 件)

白石伊世、椎名卓也、菅谷雄基、鹿園直哉、横谷明德、DNA 分子上の放射線損傷分布と DNA 損傷修復経路干渉の相関、日本放射線影響学会第 55 回大会、2012 年 9 月 6-8 日、仙台市

Shiraishi, I., Shikazono, N. and Yokoya, A. Order effect of base excision processes to repair clustered DNA damage. The 12th International Workshop on Radiation Damage to DNA, June 2 - 6, 2012 Prague, Czech Republic.

横谷明德、放射線によるゲノム DNA 損傷の初期過程と生体修復、(招待講演)日本物理学会第 67 回年次大会、2012 年 3 月 24-27 日、西宮市

Yokoya, A., Oka, T., Fujii, K., Shiina, T., Sugaya, Y., Shiraishi, I., Urushibara, A., Narita, A., Noguchi, M. and Watanabe, R. (Invited talk) Molecular and Cellular Effect of Ionizing Radiation. The 16th SANKEN International The 11th SANKEN Nanotechnology Symposium 2013, January 22-23 Osaka, Japan.

〔図書〕(計 1 件)

Yokoya, A., Fujii, K., Shikazono, N. and Ukai, M. Chapter 20. Spectroscopic study of radiation-induced DNA lesions and their susceptibility to enzymatic repair. *In: Charged particle and photon interactions with matter-recent advances, applications and interfaces*, Eds., Y. Hatano, Y. Katsumura, and A. Mozumder, CRC/Taylor & Francis Group, USA, pp543-574. (2011).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://asrc.jaea.go.jp/soshiki/gr/yokoya-gr/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

横谷 明德 (YOKOYA, Akinari)

日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究主席

研究者番号：10354987

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし