

令和元年6月19日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18347

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評価手法の開発

研究課題名(英文) Development of the new method for estimate of radiation effect using a fluorescent modified oligonucleotide

研究代表者

松尾 陽一郎 (MATUO, Youichirou)

福井大学・学術研究院工学系部門・講師

研究者番号：90568883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では短いDNAであるオリゴヌクレオチドを蛍光修飾した試料を用い、放射線による損傷量を蛍光強度の変化から評価することで、生体分子の損傷を高感度、簡便に検出する手法を検討している。試料には、蛍光修飾オリゴヌクレオチドの塩基配列として、酵母菌の遺伝子の一部の配列およびアデニンの連続配列のサンプルを用いた。ガンマ線およびヘリウム粒子線照射による蛍光修飾オリゴヌクレオチドの蛍光強度の上昇が確認された。また、塩基配列の違いによって蛍光強度の変化に違いが見られた。配列の最適化による放射線に対するオリゴヌクレオチド鎖の切断収量が異なる結果は、本手法の感度の調整が可能である事を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線による生体分子の損傷量を、損傷に起因する蛍光にて評価するものである。このことから、従来法にない以下のような特徴を有する。

検出感度について、電気泳動後のゲル中の蛍光を測定する手法と比較して、直接分子鎖の切断を蛍光を介して計測する本手法は優れると考えられる。前処理を評価とせず、蛍光強度の測定に必要な時間も数分程度であり、処理時間が短い。配列を自由に設計できる。学術的効果の延長上として、放射線による生体影響研究のツールとして活用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We are developing a direct measurement method to verify radiation damage on the bio-material employing an fluorescence modified oligonucleotide. The fluorescence modified oligonucleotide has a fluorescence site (6-FAM) and quenching site (TAMRA) on both terminals. We synthesized fluorescence modified 27 mer oligonucleotide of yeast URA3 and poly Adenine sequence. The samples were irradiated with helium ion beam at the Wakasawan Energy Research Center. The samples were also irradiated with ⁶⁰Co gamma-rays at Osaka Univ. for the comparison with helium ion beam irradiated samples. In a present study we found that the fluorescence intensities increased with increase of absorbed dose of the helium ion beam and gamma-ray. Fluorescence intensity has been increased with a function of yield of molecular damage. Moreover, it has been suggested that the sensitivity may change depending on the sequence.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 DNA切断 蛍光修飾 オリゴヌクレオチド

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。感度を向上するために、DNA(オリゴヌクレオチド)の配列を変更することを着想し、本研究を実施した。

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。本研究ではオリゴヌクレオチドの配列が異なる場合の、放射線損傷に対する感度の向上について検討した。

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: Carboxytetramethyl rhodamine)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)。

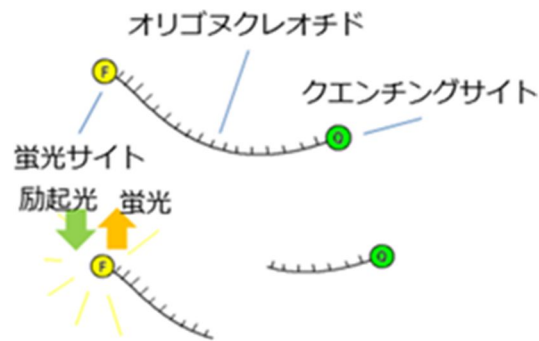


図1 修飾オリゴヌクレオチドの概念図。
(上) クエンチャー物質の抑制が効いた状態、(下)切断が生じ、クエンチャー物質による抑制が抑えられ蛍光が観測できる状態。

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。

4. 研究成果

オリゴヌクレオチドの両端を蛍光物質 6-FAM および TAMRA で修飾した蛍光修飾オリゴヌクレオチドを実験に用いた。蛍光修飾オリゴヌクレオチドの塩基配列として、生体のモデルとして酵母菌の URA3 遺伝子領域の一部の配列 5'-TCATCCTAGTCCTGTTGCTGCCAAGCT-3'、および比較のために A のみの配列 5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3' の配列をもつサンプルを用いた。

大阪府立大学地域連携研究機構放射線研究センターの 60Co 線源 (LET: 0.2 keV/μm) を用いてサンプルに対してガンマ線を 0.01~0.1Gy 照射した。また、高 LET 放射線として、公益財団法人若狭湾エネルギー研究センターにおいてヘリウム粒子線 (Total energy: 220 MeV, LET: 5.5 keV/μm, 線量率: 0.7Gy/min) を 0.01~0.1Gy 照射した。

蛍光スペクトル測定には蛍光分光光度計 F-2700 (日立ハイテクサイエンス) を用いた。5mm 角マイクロ蛍光セル (合成石英) を使用し、装置の制御に FL Solutions 4.1 for F-2700 を用いた。スリット幅を 10nm、ホトマル電圧を 400V、スキャンスピードを 300nm/min に設定した。励起波長は 494nm とした。蛍光測定により得られた蛍光強度を、0Gy の値を基準とした蛍光強度比として下式により求めた。

$$\text{蛍光強度比} = \text{各線量における蛍光強度} / \text{0Gy における蛍光強度}$$

結果 : ガンマ線照射およびヘリウム粒子線によるオリゴヌクレオチド鎖の切断効果

蛍光修飾オリゴヌクレオチドにガンマ線照射を行った場合の蛍光強度比を図2に示す。0~0.04Gy 程度までは蛍光強度の上昇が確認できたが、それ以降は蛍光強度比が一定となる傾向が見られた。蛍光修飾物質である 6-FAM に対する放射線分解の影響が考えられた。6-FAM 単体の蛍光強度とガンマ線の吸収線量の関係を図3に示す。図3からは、高線量領域では放射線分解の効果が見られるが、0.05Gy から数 Gy までの領域では放射線分解が起こっていないことを示唆している。図3の 0.05Gy 以降の蛍光強度比が一定となる傾向は、蛍光修飾物質の放射線分

解以外の影響が考えられる。一方で、0.1Gy までの低線量域において本手法に適用可能であると言える。

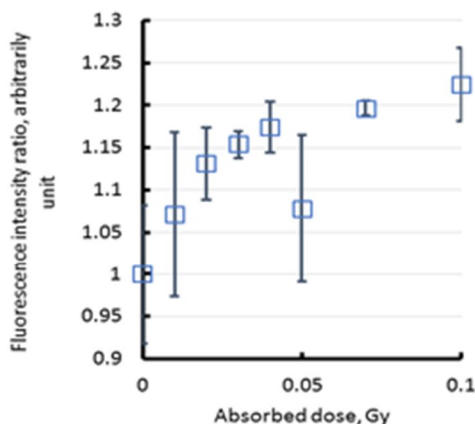


図2 蛍光オリゴヌクレオチドへガンマ線 0~0.1Gy 照射時の蛍光強度比。
 $\text{em}=516\text{nm}$ 。サンプル数=5。

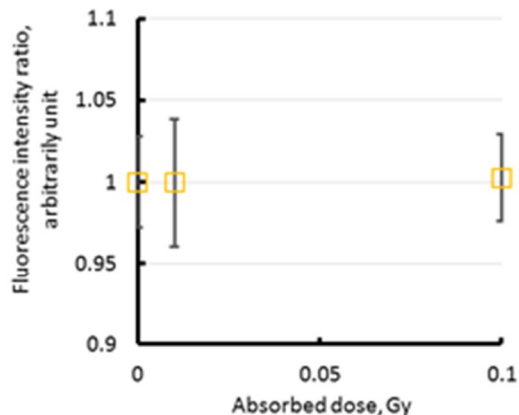


図3 蛍光物質 6-FAM へガンマ線 0~0.1Gy 照射時の蛍光強度変化率。
 $\text{em}=516\text{nm}$ 。サンプル数=5。

蛍光修飾オリゴヌクレオチドにヘリウム粒子線照射を行った場合の蛍光強度比を図4に示す。

ガンマ線と同様に、ヘリウム線照射によっても蛍光強度の上昇が確認された。0~0.03Gy 程度までは蛍光強度の上昇が確認できたが、それ以上の線量では一定の値を示した。また、蛍光強度の上昇はガンマ線照射の場合と比較して低い値を示した。ガンマ線照射時の蛍光強度よりもヘリウム粒子線照射時の蛍光強度比が低いことは、ヘリウム粒子線と比較してガンマ線照射の場合、オリゴヌクレオチド鎖の切断収量が高いことを意味している。この結果は、シミュレーションによるガンマ線とヘリウム粒子線の DNA 切断の傾向と矛盾はせず、妥当であると考えられる。

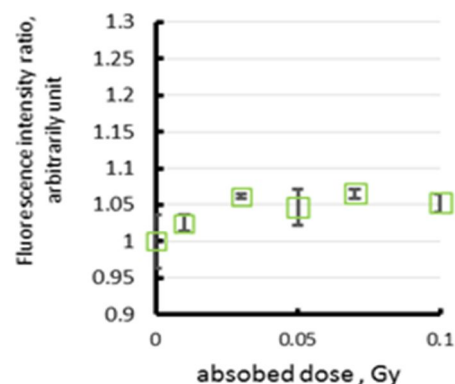


図4 蛍光修飾オリゴヌクレオチド (URA3 : 27mer) へヘリウム粒子線 0~0.1Gy 照射時の蛍光強度変化率。
 $\text{em}=516\text{nm}$ 。サンプル数=3。

実験 :オリゴヌクレオチド鎖の配列が異なる場合の切断効果

配列の異なるオリゴヌクレオチドの結果を図5に示す。酵母細胞の URA3 配列の場合より、アデニンのみの配列のほうが、比較的オリゴヌクレオチド鎖の切断収量が低いという結果が得られた。ピリミジン塩基である C および T の還元電位は、プリン塩基である A および G より大きく、電子移動のキャリアーとして働くと考えられており、比較的損傷を受けやすいことが考えられる。従ってアデニンのみの配列は、C および T を含む URA3 の配列よりも損傷を受けにくいことが予想され、得られた結果とは矛盾しない。

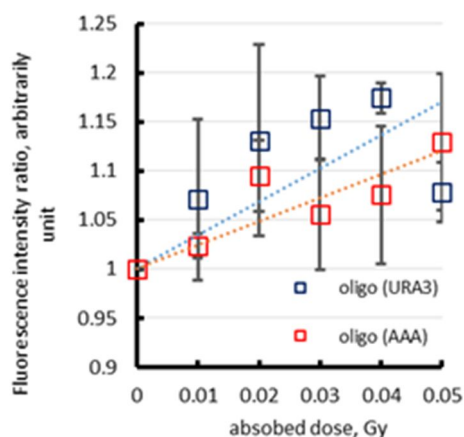


図5 オリゴヌクレオチド鎖の配列が異なる場合の蛍光強度変化率。
 $\text{em}=516\text{nm}$ 。サンプル数=3。

以上のように比較的線量域である 0~0.04Gy までは、吸収線量の上昇に伴って蛍光強度比は上昇し、この領域については本手法による鎖切断を評価できる可能性がある。また、配列による感度の変化の可能性も示された。一方で、0.05Gy 以上の線量については蛍光強度比が一定となり、この要因について明らかにする必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) 松尾 陽一郎、平山 誠、川井 良太、砂川 武義、清水 喜久雄、泉 佳伸、放射線照射による DNA 損傷の新評価手法の検討、放射線生物研究、査読有、Vol.53、No.3、2018、pp.223-240.

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 泉 佳伸、川井 良太、松尾 陽一郎、蛍光修飾オリゴヌクレオチドを用いた放射線損傷評価の開発、日本原子力学会 2018 年秋の大会、2018
- (2) 川井 良太、松尾 陽一郎、泉 佳伸、蛍光修飾オリゴヌクレオチドを用いた放射線損傷評価手法の開発、放射線化学 若手の会、2018
- (3) Ryota KAWAI, Youichirou MATUO, Takao KOJIMA, Kikuo SHIMIZU and Yoshinobu IZUMI, Development of the new method for estimate of radiation effect using a fluorescent-modified - oligonucleotide, 5th Asian and Oceanic Congress on Radiation Protection - AOCRP5, 2018
- (4) 川井 良太、松尾 陽一郎、小嶋 崇夫、泉 佳伸、蛍光修飾を用いたオリゴヌクレオチドの放射線損傷評価に関する基礎的検討、日本放射線安全管理学会 第 16 回学術大会、2017

6 . 研究組織

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。