

平成 21 年 6 月 6 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2005-2008  
 課題番号：17510101  
 研究課題名 (和文) 単分子観察法を活用したゲノム DNA 二本鎖切断反応の速度解析と遺伝子活性  
 研究課題名 (英文) Application of Single-Molecule Observation for Kinetic Analysis of Genomic DNA Double-Strand Breaks in Relation to Genetic Activity  
 研究代表者  
 吉川 祐子 (YOSHIKAWA YUKO)  
 環太平洋大学・次世代教育学部・教授  
 研究者番号：80291871

研究成果の概要：蛍光顕微鏡を用いた単分子観察法を活用することにより、ゲノム DNA のような巨大 DNA 分子 (50kbp~200kbp 程度) の二本鎖切断反応を、単分子観測法より定量的に観測・解析することの可能であることを明らかにした。これまでは、数 kbp 程度までの DNA での二本鎖切断の計測がおこなわれるにとどまっていたが、本研究では 100kbp に一箇所切断が入るような低損傷確率の条件下でも、信頼性のある速度論的な計測が可能となった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	1,700,000	0	1,700,000
2006 年度	600,000	0	600,000
2007 年度	600,000	180,000	780,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,500,000	360,000	3,860,000

研究分野：環境生命化学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノバイオ：蛍光顕微鏡：DNA 二本鎖切断：単分子観察：活性酸素：長鎖 DNA

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内での活性酸素等による DNA の損傷の中でも、特に二本鎖 DNA の切断は、ゲノム異常や発がん等の疾患を生じさせ、生命にとって重篤な障害を与える。しかしながら長い DNA の二本鎖切断反応に関する研究は、塩基の化学変化や一本鎖切断などに比べ、著しく立ち遅れている。その主たる理由は、ゲノム DNA のような長鎖の DNA については、二本鎖切断反応を調べるための実験手法が未確立であるためである。本研究者は、本研究申請までの 10 年余りにわたり、100kbp (キロ塩基対) 以上の DNA の高次構造を、主として蛍光顕微

鏡を用いた単分子観察により調べてきた。本研究では、単分子観察法を二本鎖切断の実時間測定に応用し、これまでに測定が困難であった長鎖 DNA の二本鎖切断の定量的な解析を行おうとするものであり、研究の手法自体が、他に類の無い独創的なものとなっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、単分子観察法を更に発展させ、巨大 DNA 分子の二本鎖切断反応の“その場”観察を系統的に行おうとするものである。種々の抗酸化食品成分の二本鎖切断反応に対する抑制作用を計測し、二本鎖切断反応が

遺伝子機能に与える影響の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 高感度・高倍率の蛍光顕微鏡を用いて、個々の DNA 分子の溶液中のコンフォメーションを直接観測した。

(2) 上記方法により、一分子レベルでの二本鎖切断反応を“その場”観察し、切断時間の計測から、反応速度定数を求めた。具体的には、DNA の蛍光色素である YOYO (商品名: YOYO-1) によって引き起こされる DNA の光切断を計測した。YOYO は光励起により、活性酸素の生成を促進することが知られており、このため、YOYO 存在下で蛍光顕微鏡観察を行うと、DNA の二本鎖切断も起こりやすくなる。このような性質を利用することにより、YOYO 存在下、活性酸素による DNA の二重鎖切断反応をリアルタイムで可視化することが可能となる(図 1)。

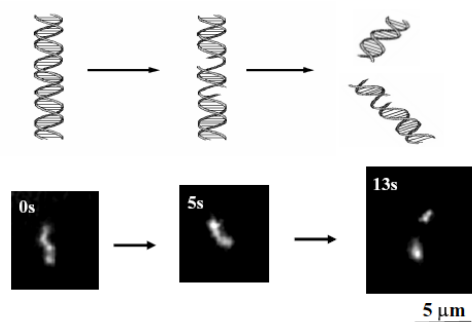


図1. 蛍光顕微鏡による DNA 二重鎖切断反応のリアルタイム観察

(3) DNA 溶液に、コバルト 60 によるガンマ線照射を行い、二本鎖切断の計測を行った。ガンマ線照射では、水分子の放射線分解によりヒドロキシラジカル等の活性酸素が生成して、DNA 鎖の切断が引き起こされる。照射後、スライドガラスに吸着させた個々の DNA 分子の全長を測定して、非照射群と照射群で比較検討した。

### 4. 研究成果

(1) 長鎖DNAの二本鎖切断を指標として、水溶性フラボノイド類やビタミンC等、種々の生理活性物質の抗酸化能を定量的に解析した。本方法は、単一物質の抗酸化能の評価だけではなく、複数の抗酸化物質が含まれた系の抗酸化能を迅速に評価することも可能である。今後さらに、DNAをマーカーとして、様々の機能成分が含まれているようなサプリメントや健康飲料についても、その抗酸化性の迅速な評価法として有用であると考えられる。

(2) より生体(真核細胞)に近い条件として、長鎖 DNA (106 kbp) から再構成したクロマチンを用いて、活性酸素による二本鎖切断反応がアスコルビン酸によってどのように抑制されるのかを定量的に解析した。その結果、高濃度のアスコルビン酸 (5 mM) により、切断の反応速度が 20 分の 1 程度に抑制されることが明らかとなった(図 2)。食事により摂取されたビタミン C (アスコルビン酸) は、脳や免疫関連組織においては mM オーダーで高濃度存在していることが知られている。これらの生体系での高濃度のビタミン C の存在は、DNA 二本鎖切断を効果的に抑制するとの今回の研究結果との関連で興味深い。

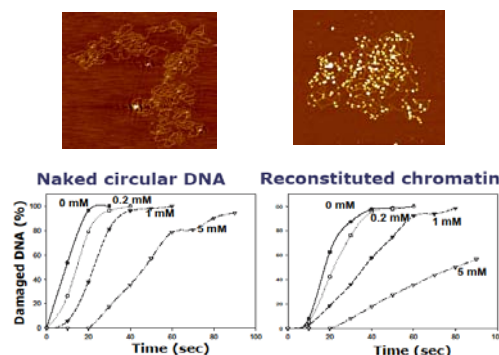


図2. アスコルビン酸による二重鎖切断抑制作用:再構成クロマチンを用いた研究(上図:環状長鎖 DNA(106kbp)から再構成したクロマチンのAFM 像、下図:種々のアスコルビン酸濃度条件下における切断時間の比較)。

(3) 生体ポリアミンであるスペルミジンで DNA を凝縮させると、ガンマ線によって引き起こされる二本鎖切断が顕著に抑制されることを明らかにした。

### 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 Y. Yoshikawa, T. Mori, N. Magome, K. Hibino, K. Yoshikawa, "DNA Compaction Plays a Key Role in Radioprotection against Double-Strand Breaks as Revealed by Single-Molecule Observation" *Chem. Phys. Lett.* 456, 80-83 (2008) (査読有).

② 吉川祐子 『DNA 二重鎖切断反応の可視化: ビタミン C による抑制効果の定量的計測』 *ビタミン*, 81, 297-302 (2007) (査読有).

③ 吉川祐子, 吉川研一 『自己組織化する DNA』 *現代化学*, 2月号 No. 431, 14-19 (2007) (査読無).

④吉川研一、吉川祐子 『“グルメの世界”を科学する』化学工学、71 巻 31-33 (2007) (査読無).

⑤Y. Yoshikawa, E. Hirose, E. Sakai, C. Ikawa, “Photo-Induced DNA Double-Strand Breaks Monitored by Single-Molecule Observation: Protective Effect of Antioxidative Compounds” *Proceeding of 2007 International Symposium on Micro-Nanomehatronics and Human Science (MHS2007)*, 276-280 (2007) (査読有).

⑥Y. Yoshikawa, K. Hizume, Y. Oda, K. Takeyasu, S. Araki, K. Yoshikawa, “Protective Effect of Vitamin C against Double-Strand Breaks in Reconstituted Chromatin Visualized by Single-Molecule Observation” *Biophys. J.* 90, 993-999 (2006) (査読有).

⑦Y. Yoshikawa, T. Mori, K. Yoshikawa, “Quantitative analysis of double-strand break in giant DNA by single-molecule observation” *Proc. XIII Congress of the Society for Free Radical Research International* ed. In Medimond International Proceedings, 341-344 (2006) (査読無).

⑧K. Hibino, Y. Yoshikawa, S. Murata, T. Saito, A. A. Zinchenko, K. Yoshikawa, “Na<sup>+</sup> More Strongly Inhibits DNA Compaction by Spermidine (3+) than K<sup>+</sup>” *Chem. Phys. Lett.*, 426, 405-409 (2006) (査読有).

⑨Y. Takenaka, K. Yoshikawa, Y. Yoshikawa, Y. Koyama, T. Kanbe, “Morphological Variation in a Toroid Generated from a Single Polymer Chain” *J. Chem. Phys.*, 123, 014902\_1-4 (2005) (査読有).

[学会発表] (計 31 件)

①吉川祐子 “長鎖 DNA の二重鎖切断を指標とした抗酸化能の定量的解析：アスコルビン酸と他の抗酸化物質との比較検討へ向け” 2008/7/5, ビタミンC研究委員会(東京)

②森利明 “単分子観察による DNA の放射線切断に関する研究” 2008/7/4, 大阪府立大学産学官連携機構・放射線研究センター平成 19 年度共同利用報告会(堺)

③T. Mori “DNA compaction plays a key

role in protection against double-strand break induced by ionizing radiation” 2008/6/8, 10th International Workshop on Radiation Damage to DNA (福島)

④Y. Yoshikawa ”DNA compaction plays a key role in protection against double-strand break as revealed by single-molecule observation” 2008/3/9, Gordon Research Conference: DNA Damage, Mutation & Cancer (Ventura, CA, USA)

⑤吉川祐子 “放射線による長鎖 DNA 二重鎖切断の新計測手法：糖付加水溶性ルチンおよびヘスペリジンによる抑制作用の定量的評価” 2007/12/11, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会(横浜)

⑥Y. Yoshikawa “Photo-Induced DNA Double-Strand Breaks Monitored by Single-Molecule Observation: Protective Effect of Antioxidative Compounds” 2007/11/12, 18<sup>th</sup> IEEE International Symposium on Micro- Nanomechatronics and Human Science (MHS2007) (名古屋)

⑦Y. Yoshikawa “Radiation-induced double-strand break of giant DNA and its protection by antioxidative compounds” 2007/11/19, 第 1 回アジア環境変異原学会・日本環境変異原学会第 36 回大会(北九州)

⑧Y. Yoshikawa “Quantitative analysis of double-strand breaks in reconstituted chromatin by single-molecule observation” 2007/8/25, 16<sup>th</sup> International Chromosome Conference (Amsterdam, the Netherlands)

⑨吉川祐子 “放射線照射による長鎖 DNA の二重鎖切断と糖転移ルチンおよびヘスペリジンによる抑制作用” 2007/5/25, 日本ビタミン学会第 59 回大会(佐世保)

⑩吉川祐子 ” 単一分子観察法を用いた長鎖 DNA の二重鎖切断反応の速度論的解析” 2007/3/17, 核酸を中心としたケミカルバイオロジー(京都)

⑪森利明 “放射線による DNA の二重鎖切断におよぼす DNA の高次構造” 2006/11/20, 第 34 回環境変異原学会(堺)

⑫吉川祐子 “DNA 高次構造の自己組織化と生物活性” 2006/11/9, 生理学研究所研究会

「DNA 構造を基盤とするゲノム生理学の展開—DNA, 蛋白質、膜の相互作用」(岡崎)

⑬ 吉川祐子 “ビタミンCによるDNA二重鎖切断の抑制: 単一分子観察法による定量的解析” 2006/10/7, ビタミンC研究委員会(和歌山)

⑭ 森利明 “電離放射線によるDNA二重鎖切断と高次構造の関係について” 2006/9/6, 日本放射線影響学会第49回大会(札幌)

⑮ K. Hibino “Na<sup>+</sup> shows higher effect than K<sup>+</sup> on inhibition of DNA compaction by spermidine(3<sup>+</sup>)” 2006/6/18, 20<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (京都)

⑯ Y. Yoshikawa “Protective activity of vitamin C against double-strand breaks in reconstituted chromatin revealed by single-molecule observation” 2006/8/15, 13th Biennial Congress of the International Society for Free Radical Research (Davos, Switzerland)

⑰ 吉川祐子 “再構成クロマチンを用いた二本鎖切断反応の可視化とアスコルビン酸による抑制作用” 2006/5/27, 日本ビタミン学会第58回大会(徳島)

⑱ T. Mori “Relationship between Higher-order Structure of DNA Molecules and DNA Damage by Ionizing Radiation” 2006/5/13, The IXth International Workshop on Radiation Damage to DNA (Tekirova, Antalya, Turkey)

⑲ Y. Yoshikawa “Direct visualization of double-strand breaks in reconstituted chromatin and the protective effect of ascorbic acid” 2006/4/24, Workshop on Driven States in Soft and Biological Matter (Trieste, Italy)

⑳ Y. Yoshikawa “Observation and Manipulation of Individual DNA Molecules: Unraveling the Intrinsic Property of Giant DNA” 2005/12/19, Bio-Soft Matter Days 2005 (台北、台湾)

(21) 吉川祐子 “再構成クロマチンにおける二本鎖切断反応の可視化とアスコルビン酸による抑制作用の定量的解析: 単一分子鎖観察法の活用” 2005/12/7, 第28回日本分子生物学会(福岡)

(22) 高萩真彦 “DNA依存性プロテインキナーゼが介在する可逆的なDNA高次構造変換” 2005/11/23, 日本生物物理学会第43回年会

(23) 吉川祐子 “単一分子鎖観察法による再構成クロマチンでの二本鎖切断反応の定量的解析: アスコルビン酸による抑制作用” 2005/11/16, 第34回日本環境変異原学会(東京)

(24) 馬籠信之 “DNAの高次構造と放射線照射による損傷” 2005/11/15, 第48回日本放射線影響学会(広島)

(25) 酒井博臣 “ビタミンCによって引き起こされるゲノムDNAの高次構造変化と遺伝子活性” 2005/10/19, 第78回日本生化学会(神戸)

(26) 鬼頭智子 “単一分子観察法を用いた長鎖DNA二本鎖切断反応の可視化と抗酸化ビタミンによる抑制作用” 2005/10/19, 第78回日本生化学会(神戸)

(27) Y. Yoshikawa “Large Conformational Change on Giant DNA Induced by Ascorbic Acid: A Nobel Scheme on Its Antioxidative Activity” 2005/8/21, The 12<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology (Copenhagen, Denmark)

(28) 吉川祐子 “DNAの高次構造変化と二本鎖切断反応—1分子可視化法の活用” 2005/6/27, 放射線施設共同利用報告会(堺)

(29) 吉川祐子 “アスコルビン酸によって引き起こされるゲノムDNAの高次構造変化と抗酸化作用” 2005/5/26, 日本ビタミン学会第57回大会(志摩)

(30) 吉川祐子 “DNAの高次構造制御: 非ウイルスベクターの設計への応用” 2005/5/21, 遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム(東京)

(31) Y. Yoshikawa “Marked Structural Change on Giant DNA Induced by Ascorbic Acid: Nobel Scheme on Its Antioxidant Activity” 2005/4/18, Human Genome Meeting 2005 (京都)

[図書] (計 2 件)

① 吉川祐子(項目分担: 総著者数 283 名)『栄

養・食糧学用語辞典』日本栄養・食糧学会編、  
総ページ数 808、建帛社 (2007)

② K. Yoshikawa, Y. Yoshikawa, " Physical  
Chemistry of DNA-Carrier Complex " in  
*Non-viral Gene Therapy: Gene Design and  
Delivery*. (Eds. K. Taira, K. Kataoka, T.  
Niidome) Springer-Verlag, Tokyo, p11-p18  
(2005).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉川 祐子 (YOSHIKAWA YUKO)

環太平洋大学・次世代教育学部・教授

研究者番号 : 80291871