

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18310041

研究課題名(和文) 放射線によるクラスターDNA損傷の物理化学的及び生化学的研究

研究課題名(英文) Physicochemical and biochemical study of radiation induced DNA damage

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・先端基礎研究センター・研究主幹

研究者番号：10354987

研究成果の概要：

放射線による生物影響の主要な要因のひとつとされる難修復性のDNA多重損傷(クラスターDNA損傷)は、空間電離密度の指標であるLETが100keV/μm以上のイオンビーム照射時に顕著に生じること、さらに大型シンクロトロン放射施設から得られる高いエネルギー分解能の軟X線を用いてDNA分子中の特定元素の内殻電離効果を調べた結果、酸素のK殻励起エネルギーを超えると塩基損傷頻度が増加することを突き止めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2007年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：放射線生物物理

科研費の分科・細目：環境学・化学物質影響科学

キーワード：放射線生物影響 クラスターDNA損傷 LET 電子常磁性共鳴(EPR) シンクロトロン放射 DNA鎖切断 塩基損傷 塩基除去修復酵素

1. 研究開始当初の背景

放射線により細胞ゲノム中に誘発されるDNA損傷が、活性酸素などにより代謝の結果生じるDNA損傷と大きく異なる点は、前者が放射線の空間的なイオン化・励起密度を反映する“トラック構造”に強く依存し、DNA分子サイズに等しいナノメートル領域に複数の損傷が集中する確率が高いことにある。このようなクラスター化したDNA損傷は、相互に十分隔たって生じた損傷に比べ、DNA修復酵素による修復を受け難いとされている。し

かし、生命科学分野においてDNA修復に関する遺伝子やタンパク質などについての研究が目ざましい進歩を遂げている一方、肝心のDNA損傷の構造や難修復特性などについてはほとんど解明が進んでいなかった。

放射線の生物影響を正確に理解するためには、DNA損傷と生物影響を分子レベルで直接関連させるための最も基礎的な理解に資する実験的なデータの蓄積と共に、コンピュータによる放射線のトラック(飛跡)構造などの計算機シミュレーションも展開する必要

があった。そのためには、生物物理学、物理化学、生化学、コンピュータによる理論計算など、専門分野を異にする研究者が共同チームを構成し、放射線のトラック構造やDNA分子の励起・イオン化及びその緩和過程に依存するクラスター損傷生成（物理化学過程）から、DNA修復酵素による損傷修復の阻害（生化学的過程）に至る一連のプロセスを解き明かすことが必須であった。

2. 研究の目的

本研究は、放射線による生物影響の主要な要因のひとつとされる、生体中で修復され難いDNAの多重損傷（クラスターDNA損傷）について、どのような放射線の電離密度（線エネルギー付与：LET）領域において、そしてどのような物理化学的メカニズムによって生じるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、損傷生成初期のラジカル過程、イオン脱離によるDNA断片化の過程の二つの物理化学的過程とDNA修復酵素との反応である生化学的過程の3つの過程に分け、それぞれについて、EPR（電子常磁性共鳴）測定、イオン質量分析及び酵素反応測定の各手法により観測する。それぞれの結果を統合することで、1) DNA損傷生成に至るラジカルの種類やDNA切断（SSB）末端の化学構造、2) DNA損傷を生成しやすい放射線のエネルギー、3) DNA損傷に対する酵素的修復の難易性を調べた。

4. 研究成果

DNA損傷生成に至るラジカルの種類や切断（SSB）末端の化学構造を明らかにするため、SPring-8のシンクロトロン軟X線ビーム

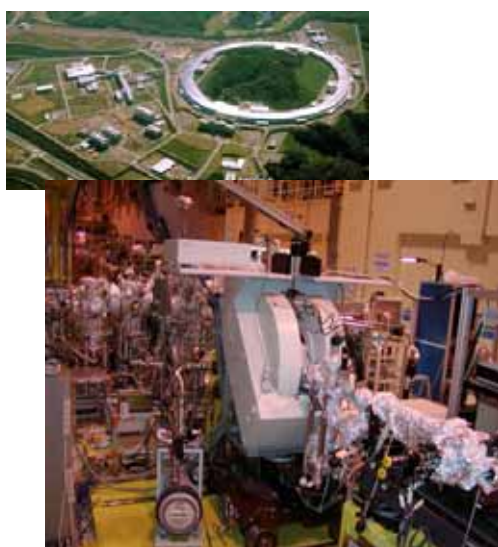


Fig. 1 SPring-8 and soft X-ray beamline equipped with an EPR spectrometer (BL23SU)

ラインに設置したEPR装置を利用し(Fig.1)、DNA及び関連分子に対する不對電子種の“その場”測定を行った。その結果、過去に報告されていない照射中にのみ現れる短寿命の不對電子種を観測することができた(Fig.2)。またその生成収率の軟X線のエネルギー依存性を調べると、酸素のK殻イオン化閾値以上(530eV以上)で顕著に増大すること(雑誌論文番号(以下番号のみ)9) 僅かであっても水分子が配位することにより大きく影響を受け、水分子からDNAへのホールや電子移動が塩基損傷の誘発に大きく関与することが明らかになった(2)。

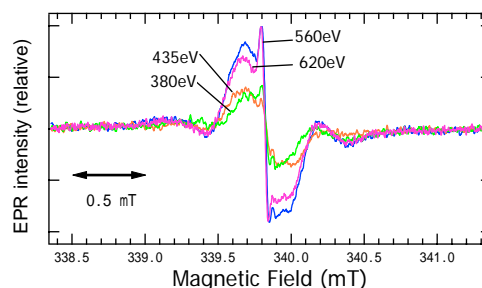


Fig. 2 EPR spectra of DNA film irradiated with monochromatic soft X-rays

さらに同ビームラインにおいて、軟X線をDNA及びDNA構成ユニット分子薄膜に照射しながら、DNA試料から光刺激脱離するイオンの観測を四重極イオン質量分析装置により行った。その結果、DNAとデオキシリボースの脱離イオンのスペクトルがほとんど同じであることが明らかになった(11)。この結果から、OHラジカルを経由しない放射線による直接のイオン化によるDNA鎖切断は、デオキシリボースの激しい分解によるものであり、結果としてgapタイプの鎖切断末端が生じることが推測された。これらの切断末端構造を明らかにするため、ヘビ毒ホスホジエステラーゼを利用して末端リン酸基の有無を調べた。その結果、線及び軟X線照射により生成した切断端について、3'末端にはリン酸基が残されている確率は残されていない場合の1.4~3倍であった(10)。

特定のDNA損傷を生成しやすい放射線のエネルギーを調べるため、SPring-8から得られるシンクロトロン軟X線のエネルギーを、炭素、窒素及び酸素のK殻イオン化エネルギーの近傍で変えながら真空中で乾燥プラスミドDNAフィルムに照射し、生じた1本鎖切断(SSB)、2本鎖切断(DSB)、EndoIII(Nth)及びformamidopyrimidine DNA glycosylase(Fpg)により認識・除去され得る塩基損傷の各損傷収率を測定した。その結果、どの元素のK殻をイオン化するかによって損傷の相対

比率が極めて大きく異なることが明らかになった。窒素 K 殻吸収端低エネルギー側 (380eV) では、主として SSB が、また酸素の K 殻イオン化以上のエネルギー (560eV) では塩基損傷が生じる (11 及び Fujii 等により現在投稿準備中)。高いエネルギー分解能のシンクロトロン軟 X 線を利用した、DNA の分子修飾技術への応用展開が期待される。

原子力機構イオンビーム照射施設 (TIARA) から得られる He イオンの LET を変えながら、高水和したプラスミド DNA フィルムに生じる 1 本鎖切断 (SSB)、2 本鎖切断 (DSB)、Nth 及び Fpg の 2 種類の塩基除去修復酵素により認識・除去され得る塩基損傷の収率を測定した。その結果、用いた 20-150 keV/μm の LET 領域において 1 本鎖切断頻度はほとんど変わらなかったのに対して、修復酵素により認識・除去され得る塩基損傷は LET の増加に伴い激減し 150keV/μm ではほぼゼロとなった (Fig. 3)。一方 DSB は LET の増加と共に増加した。これらのことから He イオンの LET が 150 keV/μm 以上の領域では、損傷がクラスター化して生成するため修復酵素の活性を大きく阻害すると同時に、致死性の高い損傷と言われている DSB の頻度が増加し、大きな遺伝学的な影響の原因となっていることが示唆された (16)。

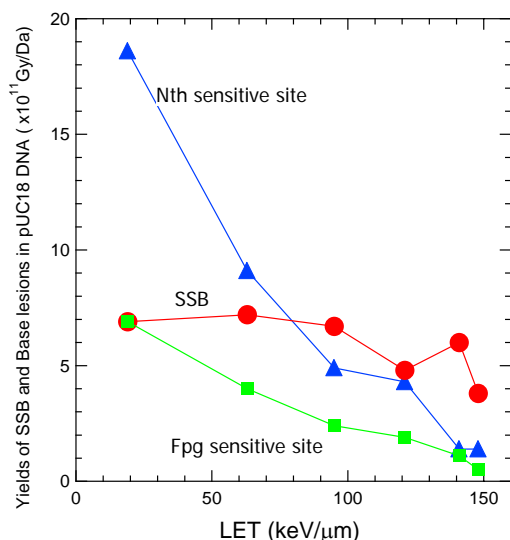


Fig. 3 Yields of prompt SSB and base lesions recognized and excised by base excision repair proteins (Nth or Fpg).

He イオンのトラックに沿った電離・励起密度の、モンテカルロシミュレーション計算コードの整備も進めた (6)。さらに C 及び Ne の各イオンについても同様な測定を行い、同一 LET であってもイオン種の違いにより損傷の収率に差がでることも明らかにした (8)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)
〔雑誌論文〕(計 21 件)

1. Bellon, S., Shikazono, N., Cunniffe, S., Lomax, M., O'Neill, P. Processing of thymine glycol in a clustered DNA damage site: mutagenic or cytotoxic. *Nucleic Acids Res.* in press. 査読有
2. Yokoya, A., Cunniffe, S.M.T., Watanabe, R., Kobayashi, K. and O'Neill, P. Induction of DNA strand breaks, base lesions and clustered damage sites in hydrated plasmid DNA films by ultrasoft X-rays around the phosphorus K edge. *Radiat. Res.* in press. 査読有
3. Yokoya, A., Fujii, K., Fukuda, Y. and Ukai, M. EPR study of radiation damage to DNA irradiated with synchrotron soft X-rays around nitrogen and oxygen K-edge. *Radiat. Phys. Chem.* in press. 査読有
4. Fujii, K. and Yokoya, A. Spectral change in X-ray absorption near edge structure of DNA thin films irradiated with monochromatic soft X-rays. *Radiat. Phys. Chem.* in press. 査読有
5. Ukai, M., Yokoya, A., Nonaka, Y., Fujii, K. and Saitoh, Y. Synchrotron radiation photoelectron studies for primary radiation effects using a liquid water jet in vacuum: total and partial photoelectron yields for liquid water near the oxygen K-edge. *Radiat. Phys. Chem.* in press. 査読有
6. Shikazono N., Noguchi, M., Fujii, K., Urushibara, A. and Yokoya, A. The yield, processing, and biological consequences of clustered DNA. *J. Radiat. Res.* 50, 27-36 (2009). 査読有 (Invited Review)
7. Taguchi, M., Kimura, A., Watanabe, R. and Hirota, K. Estimation of yields of hydroxyl radicals in water under various energy heavy ions. *Radiat. Res.* 171, 254-263 (2009). 査読有
8. Sato, T., Kase, Y., Watanabe, R., Niita, K. and Sihver, L. Biological dose estimation for charged-particle therapy using an improved PHITS code coupled with a microdosimetric kinetic model. *Radiat. Res.* 171, 107-117 (2009). 査読有
9. Yokoya, A., Shikazono, N., Fujii, K., Ushigome, T., Suzuki, M., Urushibara, A. and Watanabe, R. Unrepairable DNA damage site composed of clustered lesions along ion particle tracks. *Proceedings of the 27th Symposium on Materials Science and Engineering Research of Ion Beam Technology (in Hosei Univ.)* 1-8 (2008). (Invited paper) 査読無
10. 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. *Int. J. Radiat. Biol.* 84, 1069-1081 (2008). 査読有
11. Akamatsu, K., Fujii, K., and Yokoya, A. Characterization of lesions induced in linear-formed plasmid DNA by valence ionization and Auger decay at carbon, nitrogen and oxygen. *Int. J. Radiat. Biol.* 84, 1082-1092 (2008). 査読有
 12. Fujii, K., Yokoya, A., and Shikazono, N. Induction of single strand breaks, and base lesions in plasmid DNA films induced by carbon, nitrogen, and oxygen KLL Auger process. *Int. J. Radiat. Biol.* 84, 1104-1111 (2008). 査読有
 13. Nikjoo, H., Emfietzoglou, D., Watanabe, R. and Uehara, S. Can Monte Carlo track structure codes Reveal reaction mechanism in DNA damage and improve radiation therapy? *Radiat. Phys. Chem.* 77, 1270-1279 (2008). 査読有
 14. Katsumura, Y., Lin, M., Yokoya, A. and Hatano, Y. ASR2007 International symposium on "Charged Particle and Photon Interactions with Matter", November 6-9, 2007. *Radiat. Phys. Chem.* 77, 1119 (2008) (Preface of the special issue). 査読無
 15. Yokoya, A., Shikazono, N., Fujii, K., Urushibara, A., Akamatsu, K. and Watanabe, R. DNA Damage induced by direct effect of radiation. *Radiat. Phys. Chem.* 77, 1280-1285 (2008). (Review) 査読有
 16. Ukai, M., Yokoya, A., Fujii, K. and Saitoh, Y. X-ray absorption spectrum for guanosine-5-monophosphate in water solution in the vicinity of the nitrogen K-edge observed in free liquid jet in vacuum. *Radiat. Phys. Chem.* 77, 1265-1269 (2008). 査読有
 17. Urushibara, A., Shikazono, N., O'Neill, P., Fujii, K., Wada, S. and Yokoya, A. LET dependence of the yield of single-, double-strand breaks and base lesions in fully hydrated plasmid DNA films by $^4\text{He}^{2+}$ ion irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 84, 23-33 (2008). 査読有
 18. Shikazono, N., Urushibara, A., Fujii, K. and Yokoya, A. Biological effect of clustered DNA damage. *Radiat. Biol. Res. Comm.* 41, 409-423 (2006). In Japanese. 査読無
 19. Shikazono, N., Pearson, C., O'Neill, P. and Thacker, J. The roles of specific glycosylases in determining the mutagenic consequences of clustered DNA base damage. *Nucleic Acids Res.* 34, 3730-3738 (2006).
 20. Yokoya, A., Fujii, K., Ushigome, T., Shikazono, N., Urushibara, A. and Watanabe, R., Yields of strand breaks and base lesions induced by soft X-rays in plasmid DNA. *Radiat. Prot. Dosim.* 122, 86-88 (2006). 査読有
 21. Urushibara, A., Shikazono, N., Watanabe, R., Fujii, K., O'Neill, P. and Yokoya, A., DNA damage induced by the direct effect of He ion particles. *Radiat. Prot. Dosim.* 122, 163-165 (2006). 査読有
- 〔学会発表〕(計 40 件)
1. 横谷明德、イオンビームにより誘発される難修復性のクラスターDNA損傷 第27回法政大学イオンビーム工学研究所シンポジウム 平成20年12月10日、法政大学、小金井(招待講演)
 2. 横谷明德、プラスミドDNAに対する高LET放射線による非DSB性多重SSB誘発の可能性 日本放射線影響学会第51回大会、平成20年11月19-21日、北九州国際会議場、北九州
 3. 鹿園直哉、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、平成20年11月19-21日、北九州国際会議場、北九州
 4. 野口実穂、非二本鎖切断型クラスター損傷(8-oxoGと鎖切断)の突然変異誘発 日本放射線影響学会第51回大会、平成20年11月19-21日、北九州国際会議場、北九州
 5. 藤井健太郎、軟X線照射によって乾燥プラスミドDNAに生じる分子損傷の収率 第51回放射線化学討論会、平成20年10月15-17日、産業技術総合研究所、つくば市
 6. 横谷明德、放射線により誘発されるDNA損傷の空間分布と難修復性 第3回高崎量子応用研究シンポジウム、平成20年10月9-10日、高崎シティーギャラリー、高崎(招待講演)
 7. 横谷明德、放射線によるゲノム損傷とその生体修復のせめぎあい 第11回茨城大学イブニングセミナー、平成20年10月23日、茨城大学、水戸(招待講演)
 8. 藤井健太郎、軟X線によってDNA分子内に生じるサイト選択的分子変化、第2回分子科学討論会、平成20年9月24-27日、福岡国際会議場、福岡
 9. 渡辺立子、微視的エネルギー付与分布と生物影響、京都大学原子炉専門研究会「放射線影響量と生物影響の新概念 細胞内の線量分布と生物影響」、平成20年9月10-11日、京都大学原子炉研究所、熊取(招待講演)
 10. 横谷明德、DNA損傷と放射線生物影響 平

- 成20年度弥生研究会~放射線化学とその周辺から~ 平成20年7月29日、東京大学東海村キャンパス、東海村、茨城県
11. 鹿園 直哉、クラスターDNA 損傷による突然変異誘発 平成20年度弥生研究会~放射線化学とその周辺から~ 平成20年7月29日、東京大学東海村キャンパス、東海村、茨城県
 12. 野口実穂、非2本鎖切断型クラスター損傷(8-oxoGと鎖切断)の突然変異誘発 放射線影響学会、平成19年11月14日-17日、幕張メッセ
 13. 鹿園直哉、8-oxoGとDHTからなるクラスターDNA損傷のプロセッシング経路 放射線影響学会、平成19年11月14日-17日、幕張メッセ
 14. 横谷明德、放射線によりプラスミドDNAの両鎖に生じた非DSB性多重SSBのDNAの変性を利用した新しい定量法 放射線影響学会、平成19年11月14日-17日、幕張メッセ
 15. 藤井健太郎、放射光単色軟X線によりDNA中に生じる主鎖切断収量及び修復酵素をプローブとして用いた塩基損傷の定量 放射線化学討論会、平成19年10月10日-12日、京都大学宇治キャンパス
 16. 横谷明德、DNAプリン塩基中の酸素及び窒素K殻励起により生じる短寿命のラジカルのEPR測定 第20回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム 平成19年1月12-14日、広島
 17. 横谷明德、光子及びイオン粒子照射により生じるDNA鎖切断及び塩基損傷の収率のLET依存性、日本放射線影響学会第49回大会、平成18年9月6日、札幌
 18. 鹿園直哉、非二本鎖切断型クラスターDNA損傷の生物効果、日本放射線影響学会第49回大会、平成18年9月6日、札幌
 19. 藤井健太郎、軟X線(270-560eV)照射により乾燥DNA中に生じる鎖切断、塩基損傷及びクラスター損傷の照射エネルギー依存性、日本放射線影響学会第49回大会、平成18年9月6日、札幌
 20. 漆原あゆみ、大腸菌における8-オキソグアニンとチミングリコールから成るクラスターDNA損傷の突然変異誘発効果、日本放射線影響学会第49回大会、平成18年9月6日、札幌
 21. 赤松憲、DNA鎖切断末端構造の酵素反応速度論的研究、日本放射線影響学会第49回大会、平成18年9月6日、札幌
 22. A. Yokoya, EPR Study of radiation damage to DNA irradiated with synchrotron soft X-rays around nitrogen and oxygen K-edge. The 2nd Asia-Pacific Symposium on Radiation Chemistry (APSRC-2008), August 29 - September 1, 2008, Tokyo, Japan
 23. N. Shikazono, A quantitative analysis of the yield of radiation-induced DNA strand breaks in hydrated plasmids. The 2nd Asia-Pacific Symposium on Radiation Chemistry (APSRC-2008), August 29 - September 1, 2008, Tokyo, Japan
 24. K. Fujii, Spectral change in X-ray absorption near edge structure of DNA thin films irradiated with monochromatic soft X-rays. The 2nd Asia-Pacific Symposium on Radiation Chemistry (APSRC-2008), August 29 - September 1, 2008, Tokyo, Japan
 25. T. Suzaka, Lethality and mutagenesis of E. coli cells irradiated with soft X-rays. The 2nd Asia-Pacific Symposium on Radiation Chemistry (APSRC-2008), August 29 - September 1, 2008, Tokyo, Japan
 26. A. Yokoya, A novel technique using DNA denaturation to detect prompt and enzymatically induced single strand breaks produced in a clustered damage site. The 10th International Workshop on Radiation Damage to DNA, June 8-12, 2008, Urabandai, Fukushima, Japan
 27. K. Fujii, DNA damage spectra in ultrasoft X-ray region: effect of inner-shell ionization of carbon, nitrogen and oxygen atoms on the damage induction. The 10th International Workshop on Radiation Damage to DNA, June 8-12, 2008, Urabandai, Fukushima, Japan
 28. M. Noguchi, Mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine depends on the location of a single strand break within a cluster. 10th International Workshop on Radiation Damage to DNA June 8-12, 2008, Urabandai, Fukushima, Japan
 29. N. Shikazono, Processing of clustered DNA damage site in escherichia coli. The 10th International Workshop on Radiation Damage to DNA, June 8-12, 2008, Urabandai, Fukushima, Japan
 30. A. Yokoya, DNA damage induced by direct effect of radiation. The 7th International Symposium on Advanced Science Research: Charged Particle and Photon Interaction with Matter, November 6-9, 2007, JAEA-Tokai, Ibaraki, Japan (Invited paper)
 31. N. Shikazono, Biological consequences of bistranded clustered DNA damage in Escherichia coli. The 7th International Symposium on Advanced Science Research: Charged Particle and Photon Interaction

- with Matter, November 6-9, 2007, JAEA-Tokai, Ibaraki, Japan
32. M. Noguchi, Mutagenic potential of non-DSB clustered damage containing 8-oxoG and single strand break. The 7th International Symposium on Advanced Science Research: Charged Particle and Photon Interaction with Matter, November 6-9, 2007, JAEA-Tokai, Ibaraki, Japan
 33. K. Fujii, Strand breaks and base lesions in dry plasmid DNA films induced by monochromatic ultrasoft X-rays. The 7th International Symposium on Advanced Science Research: Charged Particle and Photon Interaction with Matter, November 6-9, 2007, JAEA-Tokai, Ibaraki, Japan
 34. N. Shikazono, Mutagenic potential of clustered DNA damage site in Escherichia coli. The 13th International Congress of Radiation Research, July 8-12, 2007, San Francisco, USA.
 35. A. Yokoya, A novel technique using DNA denaturation to analyze clustered DNA damage sites induced by densely ionizing radiation. The 13th International Congress of Radiation Research, July 8-12, 2007, San Francisco, USA.
 36. K. Fujii, Induction of strand breaks and base lesions in dry plasmid DNA films induced by 270 560 eV ultrasoft X-rays. The 13th International Congress of Radiation Research, July 8-12, 2007, San Francisco, USA.
 37. A. Yokoya, Studies of soft-X-ray-induced Auger effect on the induction of DNA damage. The 6th Auger Symposium An International Symposium on Physical, Molecular, Cellular and Medical Aspects of Auger Processes, July 5-7, 2007, Boston, USA. (Invited paper)
 38. K. Fujii, Induction of strand breaks, base lesions, and clustered damage in dry plasmid DNA films induced by carbon, nitrogen and oxygen KLL Auger process. The 6th Auger Symposium An International Symposium on Physical, Molecular, Cellular and Medical Aspects of Auger Processes, July 5-7, 2007, Boston, USA.
 39. K. Akamatsu, Auger and photoelectron effects on strand breaks and base lesions in plasmid DNA irradiated with ultrasoft X-rays. The 6th Auger Symposium An International Symposium on Physical, Molecular, Cellular and Medical Aspects of Auger Processes, July 5-7, 2007, Boston, USA.
 40. N. Shikazono, Mutagenic potential of clustered DNA damage site in Escherichia. The 9th International Workshop on Radiation Damage to DNA, May 14-17, 2006, Antalya, Turkey.
 41. A. Yokoya, DNA damages induced by ion particles and photons with various energies. The 9th International Workshop on Radiation Damage to DNA, May 14-17, 2006, Antalya, Turkey.
- 〔図書〕(計1件)
1. 渡辺立子、放射線による DNA 損傷誘発過程のモンテカルロシミュレーション、「放射線化学のすすめ」日本放射線化学会編、学会出版センター、86-88 (2006)
6. 研究組織
- (1) 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・先端基礎研究センター・研究主幹
研究者番号：10354987
 - (2) 研究分担者
藤井 健太郎 (FUJII KENTARO)
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：00360404
渡邊 立子 (WATANABE RITSUKO)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力機構基礎工学部門・研究副主幹
研究者番号：10360439
赤松 憲 (AKAMATSU KEN)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力機構基礎工学部門・研究副主幹
研究者番号：10354961
鹿園 直哉 (SHIKAZONO NAOYA)
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・研究主幹
研究者番号：10354961
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・任期付研究員
研究者番号：80391275
野口 実穂 (NOGUCHI MIHO)
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：40455283
- 海外共同研究者
Prof. Peter O'Neill, University of Oxford, UK
Dr. Hooshang Nikjoo, NASA, USA