

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22310038

研究課題名(和文) 複雑損傷の分子構造と修復に関する研究

研究課題名(英文) Research on molecular structure and repair of complex DNA damage

研究代表者

鹿園 直哉 (Shikazono, Naoya)

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 量子ビーム応用研究センター・研究主幹

研究者番号：10354961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：電離放射線によって複数の損傷が局所的に近接して生じると考えられている「複雑損傷」を検出するために、蛍光共鳴エネルギー移動現象を利用した新たな手法を確立し、複雑損傷の分子構造に関する研究を進めた。また、複雑損傷の修復が難しい原因をDNA分子構造に基づいて理解することを目指し、損傷DNA分子構造と修復酵素の結合能を分子動力学計算によって明らかにするとともに生体内の突然変異誘発頻度を詳細に調べることで、複雑損傷の修復に関する知見を得た。

研究成果の概要(英文)：It is proposed that ionizing radiation induces complex damage, which is a type of damage that multiple DNA lesions are localized within 1-2 helical turns of DNA. To detect complex damage, we developed a new method based on fluorescence resonance energy transfer, and assessed the structure of the complex damage comprised of abasic sites. We also analyzed the binding potential of repair enzymes with molecular dynamics simulations as well as the mutagenic potential of various types of complex damage, in order to understand the underlying mechanism(s) of the retardation of repair of the complex damage.

研究分野：放射線生物学

キーワード：複雑損傷 分子構造 分子動力学 蛍光共鳴エネルギー移動 突然変異

1. 研究開始当初の背景

複数の DNA 損傷が数 nm 以内に近接する「複雑損傷」が放射線生物影響に深く関与するという仮説は既に 1980 年代に提示されていたが、ようやく近年になって我々を含む幾つかのグループにより、放射線により複雑損傷が生成され、生物効果に深く関わっていることが実験的に示唆されてきた。

放射線で生じる複雑損傷の検出は、塩基除去修復酵素や AP エンドヌクレアーゼで塩基損傷や脱塩基部位を鎖切断に変換した後の二本鎖切断量の増加によって行われていた。そのため、二本鎖の両方に損傷がある複雑損傷のみしか検出できず、また鎖切断を生じさせる塩基除去修復酵素や AP エンドヌクレアーゼが複雑損傷内に位置する近接する DNA 損傷により酵素活性が阻害されるという、複雑損傷検出において本質的な限界を突破できない、という課題があった。このため、放射線によって誘発される複雑損傷はどのような分子構造を持っているのかその詳細に関して不明な点が残されていた。

また、複雑損傷の修復に関しては、含まれる損傷の種類、損傷間の距離が異なる様々な一次構造に依存して、塩基除去修復酵素や AP エンドヌクレアーゼといった DNA 修復酵素の活性が阻害されることを示す結果が得られていた。このことは、放射線生物影響において複雑損傷の重要性を示唆しているが、何が複雑損傷の修復を妨げているのか、複雑損傷のどのような特徴が生物影響に深く関与するのかという本質的な問いに対しての答えを与えるものではなかった。

2. 研究の目的

(1) 放射線誘発複雑損傷の検出

放射線によって生じる複雑損傷を検出するために、酵素活性の阻害や二本鎖の両鎖に損傷が位置するタイプのみ検出可能な複雑損傷検出手法に代わる、新たな検出手法を確立し、複雑損傷の収率さらには分子構造に関する知見を得ることを目的とする。

(2) 複雑損傷の分子構造と修復

本研究では、複雑損傷の修復が難しい原因を DNA 分子構造に基づいて理解することを目指す。すなわち、損傷 DNA 分子構造と修復酵素の結合能の関連を明らかにする。さらに、複雑損傷を有する分子の突然変異誘発頻度を詳細に調べることで、複雑損傷の生体内修復に関する知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 放射線誘発複雑損傷の検出

複雑損傷を構成する DNA 損傷は nm オーダーの間隔で近接しているため、放射線誘発複雑損傷を測定するためには DNA の構造を保持したまま DNA 損傷が極近傍にある状態を検出する必要がある。また、修復酵素など複雑損傷の微細構造によって検出効率が下

がることのない手法が望ましい。そこで我々は、DNA 損傷を蛍光標識し、蛍光分子間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の効率を測定することで複雑損傷の収率や分子構造を測定可能な手法の確立を行った。

(2) 複雑損傷の分子構造と修復

放射線による DNA 損傷は種類が多様でランダムな位置に生ずるため、複雑損傷の微細構造をそろえて損傷密集化の効果を調べることは困難である。また、分子動力学計算を行う観点からも、様々な形態の DNA 損傷を調べるのは計算時間が莫大になり現実的ではない。そこで本研究では、特定の損傷を特定の位置に挿入したモデル複雑損傷、及び、立体構造が明らかになっている塩基除去修復酵素を用い、分子動力学シミュレーションにより分子レベルの修復過程の知見を得ることを目指す。また、損傷を有する DNA 分子の構造変化を調べるための手法としてテラヘルツ分光測定の確立を試みた。さらに、複雑損傷の生体内修復に関する知見を得るため、異なる微細構造をもつ複雑損傷による突然変異誘発頻度を調べた。

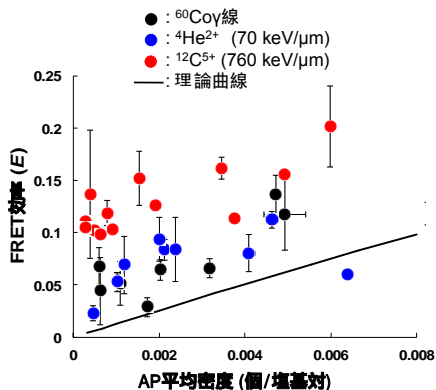
4. 研究成果

(1) 複雑損傷の分子構造と修復

放射線によって生じる検出対象の損傷には、放射線によって生じることが分かっている脱塩基部位(AP)を選択した。DNA 中の AP に、二つの蛍光物質、AlexaFluor350(ドナー蛍光分子)及び、AlexaFluor 488(アクセプター蛍光分子)で標識された O-アミノ基と特異的に共有結合するプロープ ARP(Aldehyde Reactive Probe)を結合させ、FRET 効率を調べた。対照として、AP がランダムに生じている(AP 生成確率はどの塩基対でも同じ)と予想される熱処理 DNA(直鎖状にしたプラスミド pUC19 を、pH 5, 70 で所定時間処理したもの)をモデルとして用いた。AP がランダムに生じている場合の空間分布は指数分布に従うことを利用して、AP の平均密度(DNA 単位長さあたりの AP の平均の数)に対する FRET 効率の理論曲線を導出し、実験値と理論値を比較した結果、両者は良い一致をみることが分かった。この結果から、本研究で開発した FRET 法は DNA 損傷の局在性を調べる手法として有用であることがわかった[1]。

続いて、DNA 損傷の局在性を調べるために、コバルト 60 ガンマー線やヘリウム線(2 MeV/u, 70 keV/ μm)、ブラッグピーク付近の炭素線(0.34 MeV/u, 760 keV/ μm)を照射した乾燥 DNA フィルムに対して本 FRET 法による分析を行った[2]。その結果、ガンマー線とヘリウム線の FRET 効率は、両者間で有意差はなかったものの、理論曲線(ランダム分布)と平行して AP 平均密度の増加にともなって大きくなる傾向が認められた。これは、線量が上がるにつれて近接した AP が増加していく(放射線の飛跡同士の重なりによって孤立

AP 同士が近接する)ことを示している。一方、炭素線の FRET 効率はガンマ線、ヘリウム線より有意に大きく、また、AP の平均密度を 0 に外挿すると FRET 効率が 0 にならず、FRET 効率は 0.10 になることが明らかとなった(図 1)。これは、炭素線の場合、放射線の飛跡同士の重なりが生じない条件でも、飛跡一本で AP による複雑損傷が生じることを意味している。二つの AP からなる AP 複雑損傷が生じていると考えた場合、FRET 効率=0.10 は AP 間の距離が 17 塩基対である



ことに相当する。
図 1.放射線照射後に生じる脱塩基部位(AP)を蛍光標識したときの FRET 効率

これまで「DNA 損傷の局在性」という、DNA 鎖上の損傷分布様式に関しては、修復酵素を用いる実験が主であったが、実験上の複雑損傷の「複雑さ」を正確に評価できない課題を有していた。本研究課題で開発した FRET 法は、従来の実験手法の課題を克服し、DNA 鎖上の損傷の極微細な空間分布を測定することができ、新たな分析手段を与えるものである。今後、様々な線質・エネルギー・試料条件での DNA 損傷の局在性を調べることで、放射線によって生ずる複雑損傷の収率や分子構造に関して有用な知見が得られることが期待できる。

(2) 複雑損傷の分子構造と修復

放射線によって生じる変異誘発能を有する DNA 損傷である 8-オキシグアニン(8G)と一本鎖切断(SSB)で構成された人工合成複雑損傷では、8G の修復が阻害されることが実験的に知られている。そこで、8G と SSB を含む複雑損傷と 8G を修復する酵素である hOGG1 及び Fpg との結合力を分子動力学シミュレーションにより調べた。hOGG1 と Fpg の 2 つの酵素は、8G を取り除くという働きは同じであるが分子構造が異なっている。

複雑損傷をもつ DNA の構造揺らぎを調べてみると、予想通り主に SSB の位置で大きく揺らぐことが明らかになった。一方、複雑損傷と hOGG1 もしくは Fpg との複合体では構造揺らぎが減少した。8G の相補鎖 3bp 下流(+3 と表記する)にある場合は例外的に hOGG1 複合体でも Fpg 複合体でも構造揺らぎが大きいという結果を得た。この結果を詳

しく見てみると、複雑損傷と酵素の複合体では酵素と SSB の両側とで接触があるため構造揺らぎが制限されるが、+3 は例外で、鎖切断の片側が酵素と接触できず、揺らぎが大きいことが明らかとなった。

DNA の構造揺らぎによるエントロピーの寄与を考慮して結合エネルギーを推定したところ、hOGG1 及び Fpg とともに 8G 単独損傷に対する結合エネルギーに比べ複雑損傷との結合エネルギーは低下していることが明らかとなった。鎖切断した DNA の形と酵素の形が上手く対応しておらず、SSB 近辺の大きな構造揺らぎは複合体状態では自由度が制限されるものの、酵素と DNA 間の相互作用も減少するため、結果として結合エネルギーの低下が起これると考えられた。結合エネルギー低下の程度は複雑損傷を構成する二つの損傷(8G と SSB)の相対位置により異なり、相対距離が近いと結合エネルギーが減少しやすいとの結果が得られた。これらの結果は、複雑損傷に対する hOGG1 もしくは Fpg 酵素反応の阻害を矛盾なく説明できる。複雑損傷の分子構造が修復の難しさと深い関係にあることを明らかにした意義は大きい。

また、実験的に複雑損傷の分子構造と修復に関する知見を得るため、DNA 分子の骨格伸縮、変角、ねじれなどのマクロな振動を測定するためのテラヘルツ分光測定法の開発を進めた。水のテラヘルツ波の吸収は非常に大きいため、DNA 損傷分子のテラヘルツ波スペクトルの検出は広範囲かつ高感度であることが望まれる。そこで、テラヘルツ波発生素子と検出素子の集光レンズに可動ステージを導入し光学配置の最適化を行うことにより信号強度を高めるとともに、周波数領域の拡大、ミラー等の光学系の調整などを行った。さらに、検出感度を上げるため、両側からマイラー膜の窓で挟んだ間に高密度ポリエチレンの袋構造をもつ 100 μm の短い光路長の試料セルを構築し、テラヘルツ波の吸収を少なくする工夫を施した。上記のテラヘルツ分光装置及び試料セルを用いて、まず水と DNA 水溶液のテラヘルツ波の吸収スペクトルを調べた。その結果、水と DNA 水溶液の吸収スペクトルの差が検出された。この場合、テラヘルツ分光には 1%(w/v)程度の DNA 濃度が必要であることが分かった。続いて非照射 DNA 水溶液と X 線照射 DNA 水溶液の吸収スペクトルを比較したところ、X 線照射の有無によるスペクトル変化は見られなかった。本研究では残念ながら DNA 損傷を有する分子特有のマクロな振動を測定することができなかったが、このことは DNA 水溶液の信号強度をさらに向上させる必要があることを示唆している。

複雑損傷の生体内修復を明らかにすることを目的に、8G と異なる種類の損傷から構成された人工合成複雑損傷を用い、突然変異誘発頻度を調べた。突然変異が高いことは、8G の修復が阻害されていることを意味する。実験では、片方の鎖の制限酵素(AIw26I)認識

配列中に 8G、その相補鎖に SSB、AP、チミングリコール、ジヒドロチミン、8G を用いた。複雑損傷を含むオリゴヌクレオチドを pUC18 プラスミドにとつないだ後、野性株の大腸菌、及びグリコシラーゼ欠損株 (*fpg*, *mutY*, *fpg mutY*) に形質転換した。その後形質転換細胞を培養し、プラスミド抽出後、Alw26I による切断の程度から突然変異頻度を評価するとともに塩基配列変化を調べ変異の同定を行った。その結果、突然変異誘発頻度は全て単独の 8G より有意に増加し、変異はほぼ全て 8G に由来する G:C から T:A へのトランスポージョンであった。しかし一方で、8G の相補鎖にある損傷の種類によって突然変異誘発頻度が大きく変化することはなかった。これらのことは、8G の修復は相補鎖上の DNA 損傷によって阻害されるが、阻害の程度は DNA 損傷の種類には依存しないことを示唆している。生体内では、8G の相補鎖にある損傷の除去が行われた結果生じた一本鎖切断が、8G の修復阻害に関与している可能性が高い。さらに、これまでは二つの損傷から構成される複雑損傷の生物影響が調べられてきたが、三つの損傷からなる複雑損傷と突然変異誘発との関連を調べた [3]。複雑損傷として、両鎖に一個ずつの 8G と片方の鎖に一個の一本鎖切断を配置した。三つの損傷をもつ複雑損傷による変異頻度は、一方の鎖に一個の 8G、他方の鎖に一個の一本鎖切断を配置した複雑損傷とほぼ同程度の値であることが明らかになった。

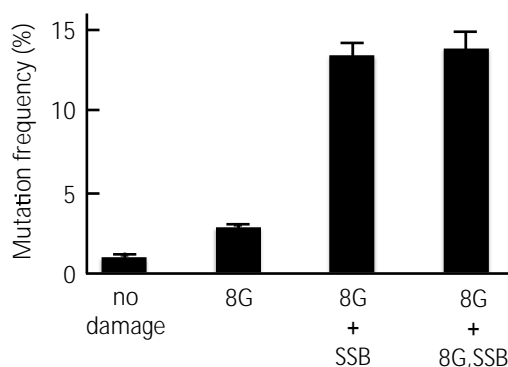


図 2. 複雑損傷による *mutY* 株における突然変異誘発頻度。8G:8-オキソグアニン, SSB:一本鎖切断。8G+SSB は二つ、8G+8G,SSB は三つの損傷で構成された複雑損傷を示す。

三つの損傷からなる複雑損傷による変異はシークエンス解析から同一鎖に鎖切断を伴わない方の 8G に由来することが明らかとなった。これらの結果から、三つの損傷からなる複雑損傷による変異の誘発には、塩基損傷の修復に先立ち一本鎖切断のプロセッシングが関与していることが予測される。本研究課題によって複雑損傷の修復は DNA の両方の鎖上に損傷があることが決定的に重要であることが明らかになった。今後の放射線生物影響研究の基礎となる重要な知見である。

<引用文献>

- Akamatsu, K, Shikazono, N. A methodology for estimating localization of apurinic/aprimidinic sites in DNA using fluorescence resonance energy transfer. *Analytical Biochemistry*, 433, 2012, 171-180
- Akamatsu K, Shikazono N, Saito T. Localization estimation of ionizing radiation-induced abasic sites in DNA in the solid state using fluorescence resonance energy transfer. *Radiation Research*, 183, 2015, 105-113
- Noguchi M, Urushibara A, Yokoya A, O'Neill P, Shikazono N. The mutagenic potential of 8-oxoG/single strand break-containing clusters depends on their relative positions. *Mutation Research*, 732, 2012, 34-42

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 14 件)

Murakami H. Terahertz dynamics of water before and after water shedding from reverse micelles. *Journal of Molecular Liquids*, 査読有り, 2015, in press

DOI: 10.1016/j.molliq.2015.03.015

Akamatsu K, Shikazono N, Saito T. Localization estimation of ionizing radiation-induced abasic sites in DNA in the solid state using fluorescence resonance energy transfer. *Radiation Research*, 査読有り, 183, 2015, 105-113

DOI: 10.1667/RR13780.1

Hata K, Urushibara A, Yamashita S, Lin M, Muroya Y, Shikazono N, Yokoya A, Fu H, Katsumura Y. Chemical repair activity of free radical scavenger, edaravone: Reduction reactions with dGMP hydroxyl radical adducts and suppression of base lesions and AP sites on irradiated plasmid DNA. *Journal of Radiation Research*, 査読有り, 56, 2015, 105-113

DOI: 10.1667/RR13780.1

Ledingham KWD, Bolton PR, Shikazono N, Ma CM. Towards Laser Driven Hadron Cancer Radiotherapy: A Review of Progress. *Applied Sciences*, 査読有り, 4, 2014, 402-443

DOI: 10.3390/app4030402

Murakami H, Sada T, Yamada M, Harada M. Nanometer-scale water droplet free from the constraint of reverse micelles at low temperatures. *Physical Review E*, 査読有り, 88, 2013, 052304

DOI: 10.1103/PhysRevE.88.052304

Hata K, Urushibara A, Yamashita S,

Shikazono N, Yokoya A, Katsumura Y. Chemical repair of base lesions, AP-sites, and strand breaks on plasmid DNA in dilute aqueous solution by ascorbic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有り, 434, 2013, 341-345
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.075

Shikazono N, Akamatsu K, Takahashi M, Noguchi M, Urushibara A, O'Neill P, Yokoya A. Significance of DNA polymerase I in in vivo processing of clustered DNA damage. *Mutation Research*, 査読有り, 749, 2013, 9-15
DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2013.07.010

Akamatsu, K, Shikazono, N. A methodology for estimating localization of apurinic/aprimidinic sites in DNA using fluorescence resonance energy transfer. *Analytical Biochemistry*, 査読有り, 433, 2012, 171-180
DOI: 10.1016/j.cplett.2011.11.029

Murakami H, Toyota Y, Nishi T, Nashima S. Terahertz absorption spectroscopy of protein-containing reverse micellar solution. *Chemical Physics letters*, 査読有り, 519-520, 2012, 105-109
DOI: 10.1016/j.cplett.2011.11.029

Ushigome T, Shikazono N, Fujii K, Watanabe R, Suzuki M, Tsuruoka C, Tauchi H, Yokoya A. Yield of single- and double-strand breaks and nucleobase lesions in fully hydrated plasmid DNA films irradiated with high-LET charged particles. *Radiation Research*, 査読有り, 177, 2012, 614-627
DOI: 10.1667/RR2701.1

Fujimoto H, Higuchi M, Koike M, Ode H, Pinak M, Bunta JK, Nemoto T, Sakudoh T, Honda N, Maekawa H, Saito K, Tsuchida K. A possible overestimation of the effect of acetylation on lysine residues in KQ mutant analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 査読有り, 33, 2012, 239-246
DOI: 10.1002/jcc.21956

Noguchi M, Urushibara A, Yokoya A, O'Neill P, Shikazono N. The mutagenic potential of 8-oxoG/single strand break-containing clusters depends on their relative positions. *Mutation Research*, 査読有り, 732, 2012, 34-42
DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.12.009

Higuchi M, Fujii J, Yonetani Y, Kitao A, Go N. Enhanced resolution of molecular recognition to distinguish structure similar molecules by

different conformational responses of a protein upon ligand binding. *Journal of Structural Biology*, 査読有り, 173, 2011, 20-28

DOI: 10.1016/j.jsb.2010.09.022

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. *Radiation Protection Dosimetry*, 査読有り, 143, 2011, 181-185

DOI: 10.1093/rpd/ncq528

〔学会発表〕(計 30件)

赤松憲, 鹿園直哉, FRET を用いた放射線 DNA 損傷の局在性評価, 第 57 回日本放射線影響学会、平成 26 年 10 月 2 日, かごしま県民交流センター(鹿児島市)

Akamatsu, K, Shikazono, N.

Development of a methodology for estimating the degree of localization of AP-sites on DNA with an application of Forster resonance energy transfer. The 12th International Workshop on Radiation Damage to DNA, 平成 24 年 6 月 4 日, プラハ(チェコ)

Shikazono N, Noguchi M, Urushibara A, O'Neill P, Yokoya A. Significance of strand break repair in determining the mutagenic potential of clustered DNA damage. The 12th International Workshop on Radiation Damage to DNA, 平成 24 年 6 月 4 日, プラハ(チェコ)

樋口真理子, M. Pinak Inhibition of binding of Fpg to multiple damaged DNA. 第 34 回日本分子生物学会, 平成 23 年 12 月 15 日, パシフィコ横浜(横浜市)

樋口真理子, M. Pinak, 修復酵素 hOgg1 と二つの損傷が近くにある DNA の結合に関する研究, 第 49 回日本生物物理学会, 平成 23 年 9 月 18 日, 兵庫県立大学姫路書写キャンパス(姫路市)

Shikazono N. Ion beam-induced DNA damage and its biological effects. 第 20 回日本 MRS 学術シンポジウム, 平成 22 年 12 月 21 日, パシフィコ横浜(横浜市)(招待講演)

Shikazono N, Noguchi M, Urushibara A, O'Neill P, Yokoya A. Processing and biological consequences of clustered DNA damage containing a single strand break and an AP site. 56th Annual Meeting of the Radiation Research Society, 平成 22 年 9 月 26 日, ハワイ(米国)

〔図書〕(計 1件)

Murakami H. Elsevier Oxford, Proteins and water confined in nanometer-scale reverse micelles studied by near infrared, terahertz, and ultrafast visible spectroscopies. In Advances in Protein Chemistry and Structural Biology vol.93, 2013, pp28

〔その他〕

プレス発表

重粒子による高いがん治療効果をもたらす「DNAの傷の塊(かたまり)」を発見

赤松憲、鹿園直哉、齋藤剛

大阪科学・大学記者クラブ、平成27年1月14日

研究グループホームページ

http://www.taka.jaea.go.jp/rab_div/dna/index_j.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

鹿園直哉 (SHIKAZONO, Naoya)

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 量子ビーム応用研究センター・研究主幹

研究者番号：10354961

(2)研究分担者

赤松憲 (AKAMATSU, Ken)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究副主幹

研究者番号：70360401

樋口真理子 (HIGUCHI, Mariko)

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 原子力基礎工学研究センター・任期付研究員

研究者番号：90370460

村上洋 (MURAKAMI, Hiroshi)

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 量子ビーム応用研究センター・研究職

研究者番号：50291092

(3)連携研究者

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

藤井健太郎 (FUJII, Kentaro)

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・研究副主幹

研究者番号：00360404

漆原あゆみ (URUSHIBARA, Ayumi)

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・任期付研究員

研究者番号：80391275