

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25740021

研究課題名(和文)非切断型DNA損傷を契機とする放射線誘発遺伝的不安定性の染色体移入法による解析

研究課題名(英文)Analysis of genetic instability induction by the introduction of non-DSB damages

研究代表者

漆原 あゆみ (Urushibara, Ayumi)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：80391275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：電離放射線照射によって引き起こされる様々な影響の中でも、遺伝的不安定性は放射線発がんにも関係すると考えられており、その誘発機構の解明は放射線の生物影響だけでなく発がん過程を解明する上でも重要である。本研究では、遺伝的不安定性の誘発原因の一つとして非切断型のDNA損傷に着目し、その損傷の種類の違いによって誘発される遺伝的不安定性の違いを明らかにする為、染色体や細胞の核型を指標とした解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Ionizing radiation induces genetic instability in the progeny of the irradiated cells, that is estimated to be involved in radiation carcinogenesis. To clarify the mechanism of genetic instability is a very important because even lead to the elucidation of carcinogenic processes not only the biological effects of radiation. In this study, we hypothesized that some of the non-DSB type of DNA damage remaining after DSB repair may be related to the induction of genetic instability. As one of the causes that induce genetic instability, it was focused on the type of non-DSB damage. Then, we analyzed using delayed chromosomal aberrations and karyotype in order to clarify the differences in the genetic instability induced by the type of difference in damage.

研究分野：放射線生物学

キーワード：非DSB型DNA損傷 紫外線 遺伝的不安定性 染色体異常 核型異常

1. 研究開始当初の背景

生物に対する電離放射線の照射は、細胞に様々な損傷を生じさせ直接細胞死を引き起こすが、生じた損傷を修復することにより細胞は生存することができる。しかしながら、死を免れた生存細胞に対しても、その子孫細胞において遅延的に細胞死、突然変異、染色体異常が増加することが知られている。直接被ばくしていない子孫細胞において長期的に見られる影響は遺伝的不安定性と呼ばれ、放射線による晩発的な影響のひとつである放射線発癌に関与すると考えられている。そのため、遺伝的不安定性の機構解明は発癌機構の解明に繋がると考えられている。

遺伝的不安定性の誘発には、DNA の二重鎖切断(Double strand breaks;DSB)の生成が関与していると言われている。しかし、電離放射線により生じる損傷は、DSBs だけでなく、一重鎖切断や塩基損傷、脱塩基部位の生成など、DNA 損傷だけでも多岐にわたる。そのため、DSB のみが原因であるとは限らない。さらに、通常細胞内に生成した DSB が修復されずにそのまま細胞内に残れば、その細胞は死を迎えることで損傷の除去を行う。このことから、子孫細胞で見られる遺伝的不安定性の誘発は、最初の原因が DSB であったとしても、DSB そのものが子孫細胞に受け継がれて遺伝的不安定性を引き起こすのではなく、DSB が修復された後の修復産物が関与していると考えられる。そのことを裏付ける理由として、2つある DSB 修復機構のうち、非同相末端結合修復を欠損するマウス細胞では、正常な修復機構を有する野生型マウス細胞と比較してより少ない DSB 量であっても被ばく後の子孫細胞に高い頻度で染色体異常が生じるという報告がある。これにより、非同相末端結合修復を欠損する場合に行われる不完全な DSB 修復が遺伝的不安定性誘発に関与していること、すなわち、不完全な修復により生成された DSB 以外の損傷が遺伝的不安定誘発の要因であると考えられる。この仮説を証明するために、電離放射線とは異なり、DSB を生じにくく且つ非 DSB 型の DNA 損傷を生じやすい長波長領域の紫外線(Ultra Violet-A;UV-A)を用いて非 DSB 型 DNA 損傷を生じさせた染色体を、微小核細胞融合法によって非照射細胞に移入し、遺伝的不安定性の誘発を解析した。その結果、UV-A 照射で生成する非 DSB 型 DNA 損傷は、移入した先の細胞において照射された移入染色体だけでなく、非照射細胞由来の染色体にも遅延性染色体異常の増加が見られた。また、癌細胞の特徴の一つである細胞の染色体数の増加、すなわち、細胞の多倍数体化と異数体化という核型の異常も引き起こすことがわかった。しかしながら、1本の染色体上に生じた損傷がどのようにして核全体への影響を引き起こすのかは不明であるものの、非 DSB 型 DNA 損傷を引き金とする細胞応答が細胞分裂に異常を引き起こし、核型異常、

そして染色体の不安定化が誘発されると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、非 DSB 型 DNA 損傷が細胞内及ぼす影響、中でも核型異常と染色体異常に関して明らかにすることを目的とする。特に、異なる損傷の種類が、損傷移入後の細胞応答の違いにどのように影響するのかを明らかにし、遅延性染色体異常の生成機構及び、遺伝的不安定性誘発機構の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 紫外線照射による損傷の生成とその影響

電離放射線は DSB と共に様々な非 DSB 型 DNA 損傷を生じるが、DSB 以外の損傷の影響を解明するためには DSB を生じさせず且つ非 DSB 型損傷を生じさせる必要がある。そこで、電離放射線の代わりに紫外線を損傷生成に用いる。紫外線には波長の違いによって UV-A、UV-B、UV-C と区別されている。UV-A では酸化損傷が比較的多く生じ、B、C と波長が短くなるにつれて生じる損傷割合が変化し、UV-C では付加体型の損傷が多くなる。これまで、UV-A で生じた損傷を用いたが、同じ非 DSB 型 DNA 損傷であっても、種類が異なればその後の細胞応答に違いが生じるはずである。そこで、本研究では UV-A、UV-B、UV-C のそれぞれを照射した場合の違いを比較した。照射線量は、それぞれ 50%致死線量とし、UV-A は 4000 kJ/m²、UV-B は 50 J/m²、UV-C は 6 J/m²とした。それぞれの紫外線の細胞照射の際の影響は、遅延性染色体異常と遅延性細胞死を調べることによって比較を行った。

(2) 微小核細胞融合法による非 DSB 型 DNA 損傷導入細胞の作成

微小核細胞融合に用いる染色体のドナーとなる細胞には、ヒトの 21 番染色体を含むマウス A9 細胞を用い、染色体移入先のレシピエントとなる細胞には、マウス線維芽細胞由来の近 2 倍体不死化細胞株の m5S 細胞を用いた。微小核細胞は A9 細胞から抽出後に 50%致死線量の紫外線を照射した後、レシピエントとなる m5S 細胞に移入し、目的染色体であるヒト 21 番染色体上の Hygromycin B 耐性遺伝子を利用した薬剤によるセレクションによりクローニングし、それぞれの損傷移入クローンを得た。

(3) 遺伝的不安定性の解析

非 DSB 型 DNA 損傷移入クローンにおいて、染色体異常の解析を行った。染色方法は、移入した照射染色体とレシピエント由来の非照射染色体のそれぞれについての不安定性を調べる為に、特定の染色体に特異的なプローブを用いた Whole Chromosome Painting(WCP) FISH 法を用いて移入したヒト 21 番染色体を染色した。染色体異常は、

WCP-FISH で染色したヒト染色体と、レシピエント由来のマウス染色体のそれぞれについて、切断及び転座等の染色体異常について調べると共に、染色体数(倍数性)に異常があるかどうかを同時に調べた。

4. 研究成果

(1) 紫外線の波長の違いによる遺伝的不安定性誘発の違い

UV-A、UV-B、UV-C のそれぞれをマウス m5S 細胞に照射した後、十数回異常の分裂を繰り返した後の細胞で見られる遅延的に生じる染色体異常、及び、細胞増殖死を調べた。細胞増殖死は照射後の細胞でコロニー形成を行い、生存してきた細胞を回収し、再度コロニーを形成させ、2 度目のコロニー形成率で比較を行った。その結果、同じ 50%致死線量を照射した細胞であるものの、UV-A と UV-C ではコントロールとほぼ同じ形成率を示した。UV-B はコントロールと比較すると形成率が約 10%下がったものの、有意な差は見られなかった。遅延性染色体異常は、遅延性細胞増殖死と同様、2 度目のコロニー形成を行ったのち、2 度目のコロニー形成細胞を回収し、染色体標本とし、C-band 染色による染色を行い染色体異常の解析を行った。その結果、UV-B では未照射のコントロールとの差は見られなかったのに対して、UV-A 及び UV-C ではいずれも約 2 倍の染色体異常が生じていることがわかった。

(2) 微小核細胞融合法による非 DSB 型 DNA 損傷移入細胞の作成

微小核細胞融合法を用いて、UV-A 及び、UV-C のそれぞれを照射したヒト 21 番染色体をマウス m5S 細胞に移入し、薬剤によるセレクションにより各紫外線照射ヒト染色体含有クローンの作成を行った。作成したクローンは、それぞれ染色体標本を作成した。また、染色体移入の影響を知る為、非照射ヒト 21 番染色体移入クローンも同様に作成し、コントロールとした。各クローンはいずれも個別の単一細胞を由来としたものをクローニングしたものである。

(3) 遺伝的不安定性の解析

染色体移入細胞は、移入したヒト 21 番染色体特異的なプローブを用いた WCP-FISH 法による染色を行い、移入した照射ヒト染色体と、レシピエント由来の非照射マウス染色体のそれぞれについて染色体異常を調べると共に、染色体数を調べることで核型の異常を調べた。その結果、UV-A 照射では染色体異常と核型の異常が増加するのに対して、UV-C では 4 倍体などの核型の大きな異常は見られなかった。しかし、2 倍体の核型のままにも関わらず、移入した照射ヒト染色体の増幅が生じていることがわかった。

UV-A と UV-C の照射染色体移入による影響の違いは、恐らくは移入した損傷の種類の違い

によるものであると考えられる。UV-A では主に生じる損傷が酸化型延期損傷である 8-オキシグアニンが多く生じるが鎖切断やピリミジン二量体や 6-4 光産物などはその数が少なくなると考えられる。それに対して、UV-C では酸化型塩基損傷よりピリミジン二量体などの方が多く、その組成比率の違いが影響している可能性が高いと考えられる。

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 4 件)

Kuniki Hata, Ayumi Urushibara, Shinichi Yamashita, Mingzhang Lin, Yusa Muroya, Naoya Shikazono, Akinari Yokoya, Haiying Fu, Yousuke Katsumura.

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. *J. Radiat. Res.* 査読有, 56(1), 2015, 59-66. doi: 10.1093/jrr/rru079.

Ayumi Urushibara, Seiji Kodama, Akinari Yokoya.

Induction of genetic instability by transfer of a UV-A-irradiated chromosome. *Mutat. Res. Genet. Toxicol Environ. Mutagen.*, 査読有, 766, 2014, 29-34. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.02.005.

Naoya Shikazono, Ken Akamatsu, Momoko Takahashi, Miho Noguchi, Ayumi Urushibara, Peter O'Neill, Akinari Yokoya.

Significance of DNA polymerase I in *in vivo* processing of clustered DNA damage. *Mutat. Res.*, 査読有, 749(1-2), 2013, 9-15. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.07.010.

Kuniki Hata, Ayumi Urushibara, Shinichi Yamashita, Naoya Shikazono, Akinari Yokoya, Yousuke Katsumura.

Chemical repair of base lesions, AP-sites, and strand breaks on plasmid DNA in dilute aqueous solution by ascorbic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 434(2), 2013, 341-345. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.075.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

漆原 あゆみ (URUSHIBARA Ayumi)

大阪府立大学・理学系研究科・客員研究員

研究者番号：80391275