

放射線による突然変異の根源を探る

—修復され難いクラスターDNA損傷の解明—



放射線 DNA 損傷機構研究グループ

横谷 明德

1. はじめに —放射線による生体への影響—

私たちは、宇宙線や地上の放射性同位元素の崩壊による放射線など、環境から絶えず微量の放射線を浴びている。このため、細胞内の遺伝子 (DNA 分子) に化学変化 (損傷、図1) が生じる。一方、生命が進化の過程で獲得した DNA 損傷の修復機能という防御システムによりこれら損傷が極めて効率よく無害化されることが知られている。修復は DNA 修復酵素と呼ばれる、一群のタンパク質によって行われている。しかしごくまれに、この生体の防御システムでも除去できない DNA 損傷があり、これが原因で突然変異や発ガンといった重大な遺伝的影響が起ると推測される。遺伝的影響の度合いを正確に予測することは、前述した環境からの低線量放射線の影響、あるいは放射線医療の最適化という観点から、最近その重要性が特に指摘されている。

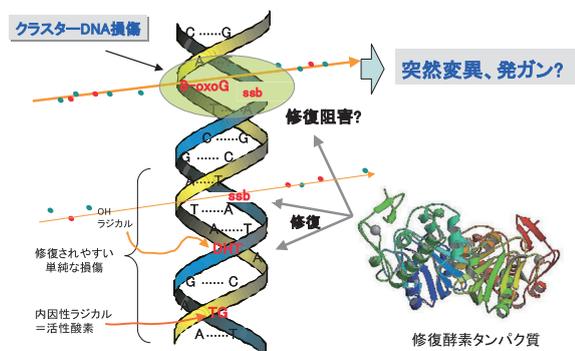


図1 放射線による DNA の損傷の様子

正確な放射線影響の評価を行うためには、どのような DNA 損傷が酵素的に修復され、あるいは修復を受け難いかをまず明らかにする必要がある。これまでの研究では、DNA の鎖が完全に切れてしまう、いわゆる DNA 2 重鎖切断 (dsb : double strand break) が最も重要な損傷とされ、細胞致死作用との因果関係などについて一定の知見が得られてきた。しかし、致死に至った細胞はそこで寿命が尽きるため、我々のような多細胞生物の場合生き残った細胞が細胞分裂でその数を回復すれば、個体そのものに対するその後の影響はほとんどないと考えられる。突然変異や細胞のガン化は、生き残った細胞の遺伝的な性質の変化が問題となるのである。また最近の研究から、dsb が生じても DNA の切断端を効率よく再結合させる修復経路 (非相同期末端結合や相同期組換え等) があることが急速に明らかになりつつある。突然変異や細胞のガン化のメカニズムを解明するための第一歩としては、“修復され得るか? され難いか?” の境界を決める DNA 損傷の化学構造を明らかにすることが重要であると考えられる。修復され難い DNA 損傷として、2 重らせん上に複数の損傷が数 nm の領域に近接して生じる“クラスター損傷”が提案された^{1,2)}。これは DSB や 1 本鎖切断 (ssb : single strand break) と、DNA の遺伝プログラム言語に相当するアデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G) 及びシトシン (C) の 4 つの核酸塩基の損傷が放射線により近接して生じるため、修復タンパク質の基質特異性が阻害されてしまうという考えである。しかし、放射線の持つ強力なイオン化作用は、DNA 中に数多くの分子変化を引き起こしてしまうため、どのような損傷

がクラスター化して生じているかを実験的に明らかにすることは極めて困難であった。

2. 塩基除去修復酵素タンパク質を用いた DNA 塩基損傷を含むクラスター損傷の観察

最近、修復酵素の性質を上手に利用して、放射線により DNA 分子中に生じる塩基損傷やこれを含むクラスター DNA 損傷を ssb や dsb に変換し、ゲル電気泳動法により検出・定量する方法が開発されてきた。生体中では、放射線だけでなく呼吸などの生理活性によっても生じる OH ラジカルなどのいわゆる活性酸素により、DNA に酸化的な損傷が生じると言われている。特に A, T, G 及び C の 4 つの核酸塩基が酸化を受けることで損傷した場合、これらの塩基損傷はグリコシレースと呼ばれる塩基除去修復酵素タンパク質によって効率よく除去されることが知られている。これらのグリコシレースは一般には大腸菌からヒトまでよく保存されていることから、生命が進化の過程で必然的に獲得してきた重要な形質であると考えられている。グリコシレースのうち Endo III (主にチミングリコールなどのピリミジン塩基の損傷を認識) や Fpg (主に 8-oxo- グアニンなどのプリン塩基の損傷を認識) などは、損傷塩基をまず認識して切り出す endonuclease 活性を持つと同時に、そこに生じる塩基欠損部 (AP site) 部に対して APlyase 活性によりさらに切り込みをいれ、最終的に DNA の片側の鎖を切断 (結果として ssb が生成) するバイファンクション酵素である。私たちのグループでは 2686 塩基対からなる pUC18 というスーパーコイル形状をしたプラスミドを試料として

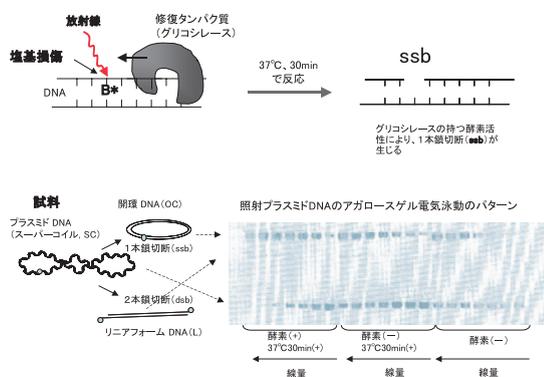


図2 塩基除去修復タンパク質 (グリコシレース) をプローブとして用いた塩基損傷の検出方法

いるが、この DNA 中にたった一つだけ塩基損傷が生じてても酵素 (グリコシレース) はそれを見つけ出して ssb を作るため、スーパーコイルが解けた環状コンフォメーションとして検出することができる。グリコシレース処理の最適条件をあらかじめきちんと決める必要があるが、検出感度は高く 2686 塩基対にたったひとつの塩基損傷があれば検出が可能である。図 2 に、実験の概略を示した。

DNA は自身の周囲に多くの配位水分子 (水和水) を持つことが知られており、1 ヌクレオチド単位あたり約 20 分子以上の水分子が水和しないと、通常のワトソン・クリック構造 (B-form) にならないことが知られている。これらの水和水の質量はほぼ DNA のそれと等しく、水和水に落とされた放射線のエネルギーがどのように DNA 損傷に寄与するかについても、吸収線量や線質効果を考える上で重要なポイントになる。そこで私たちのグループでは、照射雰囲気中の相対湿度を制御することで、水和水の量を 3~35 水分子/ヌクレオチドの範囲で変えながら照射を行っている。図 3 に低 LET 放射線である γ 線照射により生じた Nth により認識されるピリミジン塩基損傷を含むクラスター損傷が、水和レベルの増大とともに増加してゆくデータを示した³⁾。今後さらに、高 LET 放射線源として高崎研のイオンビームや放射光軟 X 線さらには東海研の中性子ビームを利用しながら、クラスター損傷の収率を調べて行く予定である。

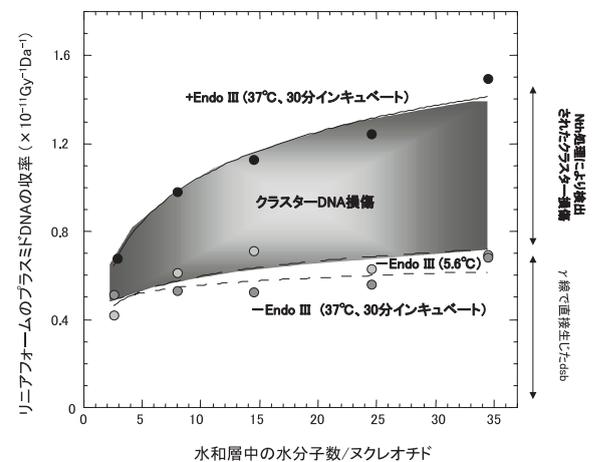


図3 水和のレベルに依存した γ 線照射により検出されたクラスター DNA 損傷の収率

3. 大腸菌を用いたクラスター DNA 損傷に対する突然変異率の測定

さらに私たちは、このようなクラスター損傷が実際に細胞の中でどのように突然変異に寄与するかを、大腸菌を用いて調べることを計画している。生きた細胞中では、複数の修復酵素タンパク質が協調してDNA損傷に対して一連の修復“プロセス”を順次行くと推測される。このようなクラスターDNA損傷に対する修復プロセスのダイナミクスを明らかにするため、クラスターDNA損傷に対する生体修復反応の度合いを測定することで、クラスター損傷の細胞内環境における役割を明らかにする。これまでに、既知の損傷の組み合

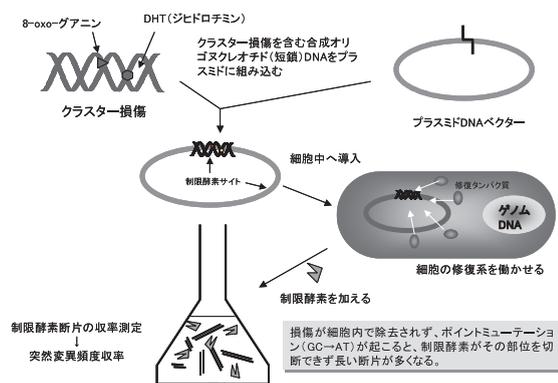


図4 大腸菌へクラスター損傷を導入し突然変異率を測定する実験方法

わせからなるクラスター損傷を含む短鎖DNAを人工的に作成し、プラスミドDNAなどの適当なベクターを用いてこれを大腸菌に導入した上で、細胞内の修復作用によるクラスター損傷の減少の度合いを測定する実験手法の確立を英国MRCのグループと行ってきた(図4)⁴⁾。既知の配列のオリゴヌクレオチドを用いることで、制限酵素の切断部位にクラスター損傷を導入することが可能となる。このため、もし損傷が大腸菌中で修復されずに残るとDNA上のその部位に点突然変異が生じ、結果として制限酵素で切断されずに長いフラグメントを生じるため、大腸菌を培養した後に回収されたプラスミドDNAの分子量変化としてクラスター損傷の修復の難易度を知ることができる。現在野生株だけではなく、様々な修復欠損突然変異体の大腸菌株を用いて、突然変異の度合いを調べている。さらに今後この手法を利用して、実際の放射線照射により得たクラスター損傷を含む短鎖DNAを用いた実験へと発展させる予定である。

4. DNA 損傷の化学構造の解明—放射光 EPR や QMS を用いた損傷“その場”観察—

クラスターDNA損傷の化学構造は、その修復阻害の度合いに大きく依存すると考えられる。そこで、修復酵素や生細胞を用いた実験の他にも、分析化学あるいは分光学的な手法を併用しながら損傷の化学構造を突き止めることも同時に進める必要がある。特に8-oxo-

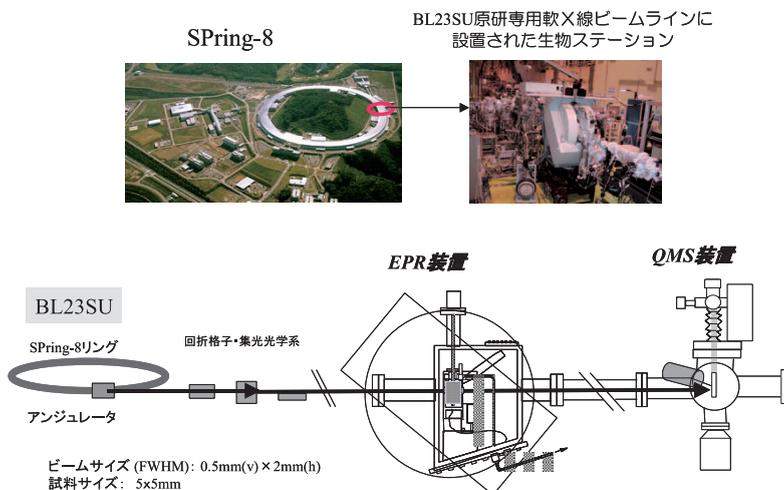


図5 8原研専用軟線ビームライン(23)に設置された電子常磁性共鳴()及び4重極質量分析()分光装置

グアニンなどの塩基損傷の前駆体や鎖切断の機構を明らかにするため、SPring-8の軟X線ビームラインに設置した電子常時性共鳴 (EPR) 装置⁵⁾ や四重極質量分析 (QMS) 装置⁶⁾ を用いて、損傷に至る DNA ラジカルやイオンなどの反応中間体の観測も行う予定である (図5)。放射光の高輝度特性を生かして“照射”と“測定”を同時に行うことで、これまで観測することができなかった短寿命の DNA ラジカルやイオンなどの DNA 損傷生成に果たす役割の解明が期待される。

5. 今後の発展

生物学的なアプローチと物理・化学的アプローチの両側面から、私たちはクラスター DNA 損傷の生成過程の研究を開始した。本グループでは、修復タンパク質や用途に応じて設計開発した DNA 短鎖(オリゴヌクレオチド) や大腸菌組換え体を積極的に用いる組換え DNA 実験を行うと同時に、原研内の各バイオ研究グループは元よりコヒーレント軟X線 (レーザー) や中性子などを利用した修復過程そのものの新しい観察手段の開発なども、関係する原研内の各グループや大学等と協力しながら行ってゆく予定である。また東海研・放射線リスク研究室では、クラスター損傷収率のモンテカルロシミュレーション⁷⁾ や塩基損傷を含む DNA に対する塩基除去修復酵素の反応の分子動力学的計算が進められている⁸⁾。これらの理論研究と実験デー

タとの比較も行いながら、修復され難い「重大なクラスター DNA 損傷」の実体を修復酵素の活性阻害の度合いから明らかにすると同時に、放射線の種類 (線質) に対するこれらのクラスター損傷の収率に関する系統的な知見を得ることで、放射線リスク研究分野における DNA 損傷を指標とする新しい線量概念の提案を行って行きたい。

引用文献

- 1) D. T. Goodhead, R. J. Munson, J. Thacker and R. Cox, *Int. J. Radiat.* **65**, 7-17(1994).
- 2) J. F. Ward, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**, 95-125(1980).
- 3) A. Yokoya, S. M. T. Cunniffe and P. O'Neill, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8859-8866(2002).
- 4) C. G. Pearson, N. Shikazono, J. Thacker, P. O'Neill, *Nucleic Acids Res.* **32**, 263-70(2004).
- 5) A. Yokoya, K. Akamatsu and K. Fujii, *Nucl. Instr. Meth. B* **199**, 366-369(2003).
- 6) K. Fujii, K. Akamatsu and A. Yokoya, *Radiat. Res.* **161**, 435-441(2004).
- 7) R. Watanabe and K. Saito, *Radiat. Environ. Bioph.-ys.* **44**, 207-215(2002).
- 8) M. Pinak, *J. Comput. Chem.* **24**, 898-907(2003).

