

■ ヘリウムイオン照射によって生成する クラスター DNA 損傷

放射線 DNA 損傷機構研究グループ ■ 漆 原 あゆみ*

Clustered DNA Damage Induced by Irradiation of Helium Ions

Ayumi URUSHIBARA

Research Group for Radiation Damage to DNA

Ionizing radiation causes various types of DNA lesions, such as strand breaks, oxidative base lesions and, in particular, biologically relevant complex damage known as cluster damage sites, which consist of two or more elemental lesions within one or two helical turns of DNA. The clustered DNA damages would be less readily repaired than isolated lesions and finally induce serious genetic change of a living cell. We present here the first evidence that the yield of DNA lesions and clustered damage strongly depend upon the radiation track structure of He ion beam. The yields of base lesions and clustered damage have been determined by postirradiation treatment of the DNA with enzymatic probes (base excision repair proteins endonuclease III (Nth) and formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg)).

1. はじめに

地球上には様々な電離放射線が存在し、我々は絶えずその影響を受けている。電離放射線の生物に対する影響の中で最も深刻なものは、DNAの一重鎖あるいは二重鎖切断や、様々な塩基損傷といったDNA損傷の生成である。これらDNA損傷は、突然変異や遺伝子の欠失による細胞の変質を引き起こし、複製・転写の際の障害となって細胞死を誘発する。しかしながら、細胞はDNA損傷生成に対抗する様々な手段を備えている。一つには、修復酵素によっても修復しきれない損傷を、細胞周期の停止や細胞死（アポトーシス）によって排除する機構である。しかし、単細胞生物にと

っての細胞死とは個体の死を意味しており、また、我々の様な多細胞生物にとっても、大量の細胞の死は、個体の生命をも脅かすことである。そこで、生じた損傷を修復し、細胞を生き延びさせるための機構が重要となる。すなわち、生物は進化の過程において、酵素的に修復可能かどうかを見分け、可能であれば修復し、不可能であれば他に影響が及ばないように細胞死を与えることで、子孫に異常な形質が遺伝しないようにする為の機構を獲得したのである。

DNA損傷には、電離放射線によって生成する致死的な損傷であるDNA二重鎖切断や、比較的修復されやすい一重鎖切断といった鎖切断、活性酸素によって生成する8-oxo-グアニン等の酸化的塩基損傷、紫外線によ

* ayumi-u@popsvr.tokai.jaeri.go.jp

り生成するピリミジン二量体や6-4光産物、アルキル化剤等により生成するメチル化DNA等、様々な種類がある。そして、これら多種多様な損傷のそれぞれに対して、適した修復機構が修復を担い、また、それらが相互にオーバーラップすることで修復の正確さと効率を上げているのである。我々の研究グループは、様々な損傷の中でも、電離放射線により生じるDNA鎖切断と酸化的塩基損傷に着目し、修復され難い損傷とされ易い損傷とはどこが異なるのか、また、修復され難い損傷が一体どの様に生じているのかを明らかにすることを目的としている。

本稿では特に、従来から注目されてきたDNA分子鎖の物理的な切断という損傷形態の測定に加え、塩基除去修復を行う酵素活性を持つタンパク質を生物学的なプローブとする新しい方法も加えることで、放射線の重要な性質のひとつであるイオン化・励起の空間密度に依存したDNA損傷の局在化（クラスター化）の機構について、実験的に得た知見を紹介する。

2. 実験の概略

本研究では、pUC18プラスミドDNAを用いたDNA損傷の検出系により解析を行った[1,2]。pUC18プラスミドは、2686塩基対から成る環状DNAであり、スーパーコイル（closed circular）と呼ばれる「超ねじれ」状態を形成している。スーパーコイル状のプラスミドは、一重鎖切断が生じると「超ねじれ」が解消され、

開いた環状二重らせんの形態（open circular）をとる。また、二重鎖切断が生じると、環状であったプラスミドは直鎖状（linear form）となる。これら、スーパーコイル、開環状、直鎖状の3つの形態のプラスミドは、電気泳動を行った際の泳動度が異なるため、容易に且つ高感度に一重鎖切断及び二重鎖切断の生成を検出することが可能である（図1）。本研究では、この検出系を用いて、放射線照射によりDNA鎖切断がどれくらい生成するのかを調べた。また、DNA損傷修復酵素の処理過程で生じる鎖切断量を調べるため、修復酵素としてEndonuclease III (Nth)とFormamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg)の2種類の塩基除去修復酵素を用いた。塩基除去修復機構は、大腸菌からヒトに至るまで機能が良く保存されていることが知られている。中でも、Nthは主に放射線や活性酸素などの強力な酸化剤で生じるジヒドロチミンやチミングリコールなどのピリミジン塩基損傷を、Fpgは8-oxo-グアニンやFapyグアニンなどのプリン塩基損傷を特異的に認識する[3]。NthとFpgはいずれも2価性の酵素であり、まず認識部位に結合し、損傷した塩基をグリコシラーゼ活性により除去し、次にその結果生じたAPサイト（脱塩基部位）に対してAPリナーゼ活性によりDNA鎖に切断を入れる、という複雑な働きをする（図2）。この特性を利用して、修復可能な損傷を鎖切断という形で可視化し、潜在的な鎖切断がどれだけ生成するのかを調べた。なお、この検出法ではスーパーコイルに生じた鎖切断を検出する為、本研究では一量体

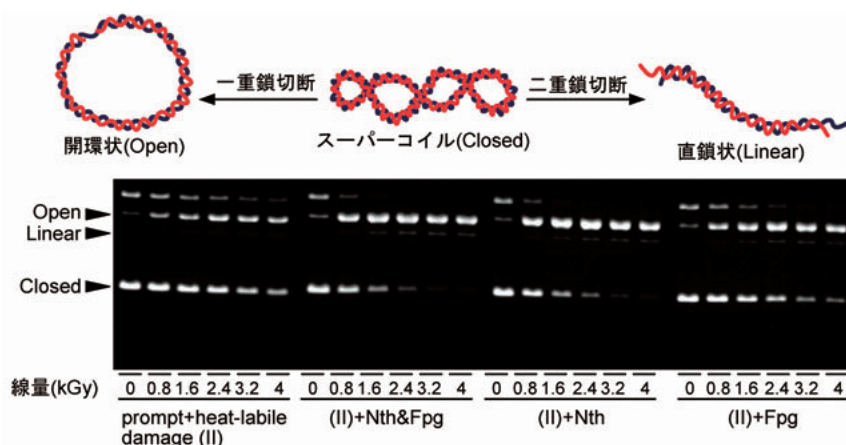


図1 アガロースゲルを用いたスーパーコイル、開環状、直鎖状プラスミドDNAの検出

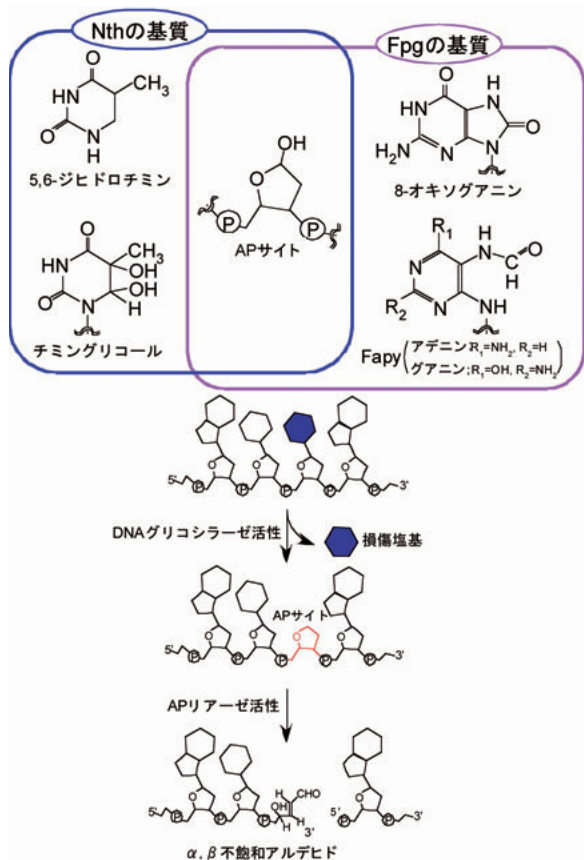


図2 塩基除去修復酵素の主な基質と反応モデル

の90%以上がスーパーコイルのものを試料として用いた。

pUC18 プラスミド DNA (以下 DNA 試料) は、濃度 $0.125\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の溶液をガラスプレート上に $5\mu\text{l}$ ずつスポットした後、氷上で窒素ガスを吹きつけて乾燥させ、アモルファス状のフィルムにした。その後、凍結乾燥機を用いて DNA に結合している水和水をほぼ完全に除いた。乾燥させた DNA 試料は、 3.84N の NaOH 水溶液を入れたアルミニウム製のホルダーに固定し、カプトンフィルムで密封後、 5.6°C で15時間以上保つことにより相対湿度を97%とした。この条件下において、DNA は1ヌクレオチドあたり約35個の水分子が水和した平衡状態(高水和状態)に保たれる[4]。水和 DNA 試料に対して、高崎研究所イオン照射研究施設(TIARA)のAVFサイクロトロン(HY1ポート)から得られる 50MeV の ${}^4\text{He}^{2+}$ を照射した(図3)。 ${}^4\text{He}^{2+}$

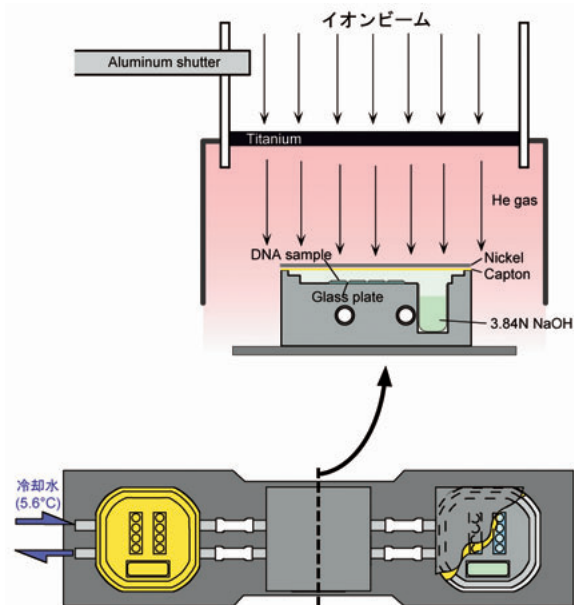


図3 ${}^4\text{He}^{2+}$ 照射の模式図

のイオン化・励起密度(LET:Linear Energy Transfer)は、異なる厚みのニッケル箔を照射ポートと試料の間に挿入することにより、 $19\text{keV}/\mu\text{m}$ 、 $63\text{keV}/\mu\text{m}$ 、 $121\text{keV}/\mu\text{m}$ となるようにした。また、照射中にDNAの水和状態が変化しないよう、照射の間試料ホルダーを 5.6°C に冷却した。照射後のDNA試料は、1スポットにつき1回に $5\mu\text{l}$ のTE(10mM Tris, 1mM EDTA) bufferで3回に分けて回収した。

回収したDNA試料における一重鎖切断および二重鎖切断生成頻度の測定は、1%アガロースゲルによる電気泳動により行った。泳動後のゲルはエチジウムブロマイド染色後、バンドの蛍光強度を測定し、スーパーコイル、開環状、直鎖状の各分子形態の割合を算出した。単位分子量、単位線量あたりに生じる一重鎖切断量($n(\text{ssb})$)及び二重鎖切断量($n(\text{dsb})$)は、それぞれ照射した線量に対するスーパーコイルの減少(図4a)及び直鎖状形態の増加(図4b)から算出した。次に、照射試料にNthあるいはFpgを 37°C で30分間処理し、各酵素による損傷塩基の除去反応を行った。酵素反応後、直ちに電気泳動を行い、酵素反応により2次的に生じた一重鎖切断及び二重鎖切断量を同様に算出した。

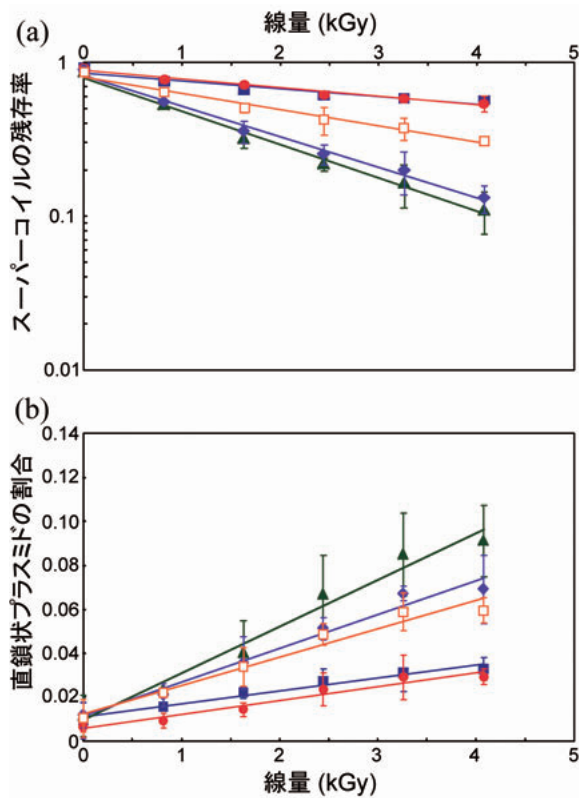


図4 19keV/μm の⁴He²⁺ 照射による一重鎖切断、二重鎖切断の生成
照射後未処理 (prompt; ■)、37°C 処理酵素未処理 (prompt+heat-labile damage(II); ●)、Nth+Fpg 処理 ((II)+Nth&Fpg; ▲)、Nth 処理 ((II)+Nth; ◆)、Fpg 処理 ((II)+Fpg; □) でそれぞれ示した。(a) 横軸を照射線量とした時のスーパーコイルの割合の減少を示しており、グラフの傾きより一重鎖切断生成量を算出した。(b) 横軸を照射線量とした時の直鎖状プラスミドの割合の増加を示しており、グラフの傾きより二重鎖切断生成量を算出した。

3. ヘリウムイオン照射により直接生じる一重鎖及び二重鎖切断量

ヘリウムイオン照射により直接誘発される一重鎖切断並びに二重鎖切断の、LET ごとの誘発量を図 5 及び表 1 にまとめた。一重鎖切断量は、19keV/μm と 63keV/μm のイオンビーム照射の間ではほとんど差がなく、121keV/μm 照射では他の 2 つに比べて若干低下した (図 5 a)。一方、興味深いことに、二重鎖切断量

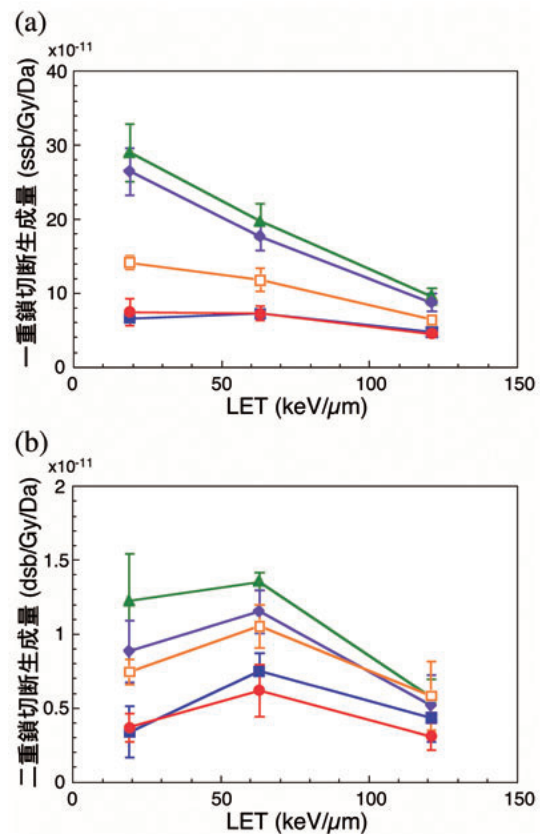


図5 LET と DNA 鎖切断生成量の関係
照射後未処理 (prompt; ■)、37°C 処理酵素未処理 (prompt+heat-labile damage(II); ●)、Nth+Fpg 処理 ((II)+Nth&Fpg; ▲)、Nth 処理 ((II)+Nth; ◆)、Fpg 処理 ((II)+Fpg; □) でそれぞれ示した。(a) 一重鎖切断生成量の推移。(b) 二重鎖切断生成量の推移。

は 63keV/μm にピークが現れた (図 5 b)。すなわち、LET の増加に伴って一重鎖切断量はそれほど変化しないか、あるいは若干の減少を見せるのに対して、二重鎖切断量は一度増加した後減少するという結果であった。一重鎖切断は、プラスミド DNA 分子上に単独で生成すれば検出される。これに対して二重鎖切断は、DNA の両鎖に 2 つ以上の一重鎖切断が 10 塩基対程度 (数 nm) “近接して” 生じなければ検出されない [5]。すなわち、両鎖に 1 つずつの一重鎖切断が生じても、お互いの距離が離れていれば両者の間にある相補的な塩基対の水素結合により二重鎖が維持されるために、それらは単に一重鎖切断としてしか検出されな

表1 ${}^4\text{He}^{2+}$ 照射による一重鎖及び二重鎖切断生成量

Treatment of sample	LET (keV/ μm)	D ₃₇ (kGy)	ssb/Gy/Da ($\times 10^{-11}$)	dsb/Gy/Da ($\times 10^{-11}$)
Prompt damage	19	8.61	6.65	0.34
	63	7.89	7.26	0.75
	121	12.05	4.75	0.44
Prompt+heat-labile damage (II)	19	7.70	7.44	0.37
	63	7.86	7.29	0.62
	121	12.78	4.48	0.31
(II)+Fpg	19	4.08	14.03	0.74
	63	4.89	11.70	1.05
	121	8.90	6.44	0.58
(II)+Nth	19	2.19	26.11	0.88
	63	3.23	17.76	1.15
	121	6.53	8.77	0.52
(II)+Nth&Fpg	19	2.01	28.51	1.22
	63	2.93	19.52	1.36
	121	6.00	9.55	0.57

いであろう。以上のことから、二重鎖切断の収量は一重鎖切断部位の相互距離に強く依存すると考えられる。異なる LET の放射線が照射された場合でも、吸収されたエネルギーの総和（吸収線量：J/kg）がもし同じであれば、一定以上のエネルギーで誘発される一重鎖切断（Sanche ら[6]によれば数 eV）などの単独損傷の数それ自体はそれほど変化しないはずである。しかし、本研究により得られた結果では、一重鎖切断、二重鎖切断ともに特徴ある LET 依存性を示したことから、単独損傷の数ではなく、それら相互の距離や場合によっては化学構造自体が変化しているのではないかと予測される（図6）。恐らく、高 LET 照射では低 LET 照射と比較して、損傷が DNA 分子上に偏って生成するのであろう。

本研究の低 LET から高 LET への過程で見られた一重鎖切断量と二重鎖切断量の変化は、単独損傷が次第に密集しクラスター化して行く過程を捉えたものと考えられる。二重鎖切断量が 63keV/ μm に比べ 121keV/ μm で減少する理由はまだ明らかでないが、恐らく、同一線量でも LET の違いが多数の損傷を持つプラスミド DNA と、全く損傷を持たないものとの較差を生じさせた結果、一重鎖切断量と二重鎖切断量が共

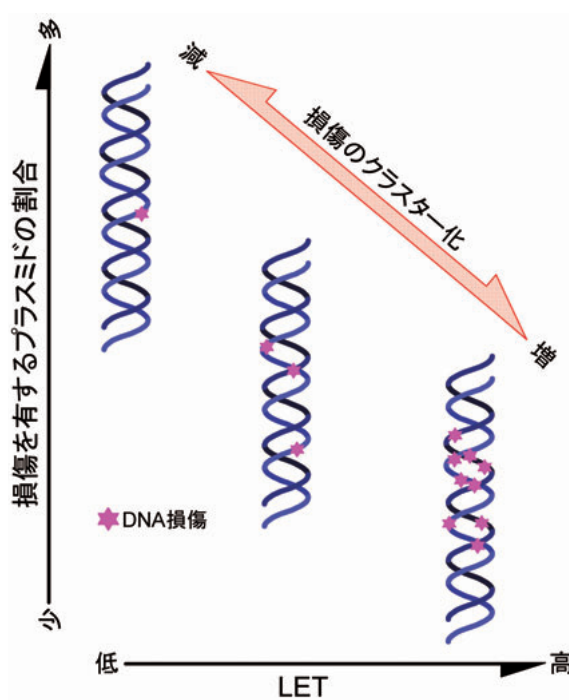


図6 DNA 鎖切断生成における LET の影響予想

に減少したのではないかと考えられる。

4. LET に依存した塩基除去修復酵素の感受性

次に、照射後の DNA 試料を 2 種類の異なる塩基除去修復酵素 (Nth と Fpg) と反応させ、塩基除去過程において生成する二次的な DNA 鎖切断の検出を行い、それぞれの LET における酵素の除去効率を、酵素処理後の一重鎖切断量及び二重鎖切断量の増加量で比較した (表 1)。その結果、19keV/μm 照射では、Nth 処理を行った方が Fpg 処理を行った方よりも多くの 2 次的一重鎖切断及び二重鎖切断を生じることが分かった (図 4 & 5)。また、Nth と Fpg の同時処理による鎖切断の増加量は、単独処理による増加量の和よりも少なかった。これは、Nth と Fpg の認識できる損傷にオーバーラップがあること、そして、Nth の方が Fpg よりも多くの種類の損傷を認識できる事が理由として考えられる。また、63keV/μm 照射では、19keV/μm 照射と比較して、Nth 処理、Fpg 処理、Nth と Fpg の同時処理の全ての条件において、除去効率の低下が見られた。さらに 121keV/μm 照射では、いずれの酵素処理条件においても除去効率がほとんど失われてしまうことが分かった。これらの結果は、LET が増加するに従って、Nth と Fpg の 2 種類のグリコシレースによる除去修復が次第に困難になって行くことを示唆している。おそらく塩基損傷は、LET が高くなるにつれて単独で生じるのではなく、別の塩基損傷と同時に局所的に生じるため、酵素が認識できる DNA の立体構造ではもはやなくなってしまうのであろう [7]。

さらに酵素により生じる 2 次的な二重鎖切断量は、63keV/μm 照射で最も高い値を示した。しかし、酵素処理により生成する損傷量が、同一 LET 照射では酵素処理前の損傷量に依存するのに対して、酵素処理前の損傷量ではなく、LET に依存して減少していくことが分かった。その原因の一つとして、先に述べたように DNA 損傷の分布に偏りが生じた場合、酵素により生成される 2 次的な鎖切断と、照射により生成される直接的な鎖切断が同一のプラスミド上に存在することになり、本研究での検出系でこれらを区別して測定出来ないことが挙げられる。この場合、実際には酵素による

修復が行われている。一方、2 次的な一重鎖切断の減少の場合と同様に、二重鎖の片鎖に既に一重鎖切断がある場合、相手鎖の近傍の塩基損傷はその影響を強く受け、酵素による除去修復を受け難い構造になっている可能性も考えられる。しかし、いずれの場合でも、LET が増加しても損傷の総数は変わらないとするならば、LET 依存的に損傷が局在化 (クラスター化) していることを示唆している。

5. 終わりに

本研究で得られたヘリウムイオン照射の結果は、同一のイオン種であってもその LET が異なれば生じる損傷の種類が異なり、修復のされ易さにも変化が生じることを示すものであった。しかしながら、現時点では、クラスター化した損傷が実際に修復されているのか、あるいは修復酵素の効率が低下するのかを明確に示す結果は得られていない。そこで、今後の課題として、同じクラスター損傷と呼ばれているものの中でも、特に修復され難い損傷、あるいはされ易い損傷とはクラスタリングのパターンを含めた構造にどのような違いがあるのかを明らかにしていきたい。

参考文献

- [1] A. Yokoya, S. M. T. Cunniffe, P. O'Neill, J. Am. Chem. Soc. **124**, 8859-8866 (2002).
- [2] A. Yokoya, S. M. T. Cunniffe, D. L. Stevens, P. O'Neill, J. Phys. Chem. B. **107**, 832-837 (2003).
- [3] S. S. David, S. C. Williams, Chem. Rev. **98**, 1221-1261 (1998).
- [4] J. T Lett, Br. J. Cancer **55**, 145-152(1987).
- [5] R. Hanai, M. Yazu, K. Hieda, Int. J. Radiat. Biol. **73**, 475-479 (1998).
- [6] B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting, M. A. Huels, L. Sanche, Science. **287**, 1603-1604 (2000).
- [7] M. A. Chaudhry, M. Weinfeld, J. Mol. Biol. **249**, 914-922 (1995).