

クラスターDNA損傷の生物影響

Biological Consequences of Clustered DNA Damage

鹿園 直哉 放射線作用基礎過程研究グループ
Naoya Shikazono Basic Radiation Research Group



- 電離放射線の生物影響の原因と考えられるDNA損傷に関する研究を行っています。
- 化学的に合成したDNA損傷を用いる手法により、塩基損傷が数nm以内に複数個存在する「クラスターDNA損傷」が、高い突然変異効果を示すことを明らかにしました。
- 高い突然変異誘発効果はクラスター内に存在する塩基損傷の修復阻害や複製過程に依存することを見いだしました。
- これらの結果は、クラスターDNA損傷に対する生体応答が放射線生物影響に深く関わることを示唆しています。
- We investigate DNA damage that is relevant biological consequences of ionizing radiation
- Making use of synthetic DNA lesions, we have elucidated that “clustered DNA damage” (two or more base lesions present within several nm) leads to enhanced induction of mutations.
- We have demonstrated that the level of induced mutations depends on the ability to repair and replicate base lesions within the cluster.
- These results suggest that the in vivo processing of clustered DNA damage strongly affects the biological outcome.

概要

電離放射線は致死や突然変異誘発、発がん等といった様々な影響を与えることが知られています。放射線によるこれらの生物影響の原因は、「クラスターDNA損傷」であるという仮説が提唱されています [1]。しかしながらその実験的証明は長らく行われてきませんでした。私たちはこの仮説を検証する実験系を開発し、放射線で誘発されるDNA損傷（塩基損傷、脱塩基部位、鎖切断）から構成されるクラスターDNA損傷が高い致死効果や変異誘発効果をもつことを明らかにしました。本研究は英国オックスフォード大学（Peter O' Neill教授）との共同研究で行われました。

1. 研究の背景

DNAに様々な化学変化（DNA損傷）が生じると、致死や突然変異といった影響が引き起こされると考えられています。生物はこれらの多くのDNA

損傷を修復し、生体の恒常性を維持する機能を持つことがわかっています。さらに生物影響に関与する生体機能としてDNA複製が知られています。DNAの複製は生物の持つ基本的な機能の一つで、これを行うことによって細胞は正常に増殖することができます。逆に、複製が阻害されると細胞は死に至り、複製が間違えると突然変異が生じると考えられます。DNA損傷は複製の阻害や複製の間違いを生じさせる主要な原因です。DNA損傷は、複製を阻害するものとしらないもの、複製されると突然変異を誘発するものとしらないものに特徴づけられます。例えば、7,8-ジヒドロ-8-オキソグアニン（8-oxoG）はグアニンが酸化されて生じるDNA損傷ですが、この損傷した塩基は複製を阻害しない代わりに、シトシンと対合（用語1）するだけではなく、ときどきアデニンと対合することが知られています。8-oxoGがアデニンと対合して複製されると、その後代で突然変異を生じる原因となります。すなわち、DNA損傷の生物影響は、損傷がどれだけ修復されるか、さ

らには修復されなかった場合どのように複製されるか、で決定すると考えられます。

放射線による致死や突然変異誘発といった生物影響も、基本的にはDNA損傷に対する修復、DNA複製で説明されると考えられます。しかし、その基本概念だけでは説明できない2つの事象が20年以上前から知られています [2]。これらは、放射線の生物影響に特徴的な現象として、重要な意味を持つと考えられてきました。その一つは、電離放射線はDNA損傷を誘発する他の化学薬剤に比べて特に生物影響が大きいという結果です。もう一つは、放射線の種類が生物影響に深く関与するという結果です。空間的に高密度に多数の電離や励起を誘発する放射線は生物影響が大きいということが明らかにされてきました [3]。

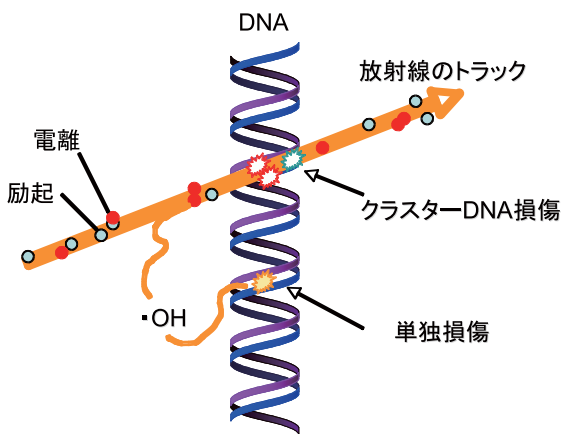


図1 クラスターDNA損傷の模式図。
Fig.1 Schematic representation of clustered DNA damage

これらの現象を説明するため、近年「クラスターDNA損傷仮説」が提唱されています [3,4]。クラスターDNA損傷とはDNA損傷が数nm以内に近接して複数個生じたタイプの損傷です (図1)。この説では、「放射線は局所的に多数の電離や励起を引き起こすため、クラスターDNA損傷を誘起する場合があります、そのクラスターDNA損傷の難修復性のため生物効果が高くなる」と仮定しています。

2. 研究の経緯

放射線によって生じたクラスターDNA損傷が生物影響と関係しているのか、さらには影響する場合どのように影響しているのか、なぜ影響するのかという疑問に対する実験的証明は長らく得られません

でした。その理由は、放射線照射では、DNA分子上に損傷が様々な種類や個数・ランダムな位置で生じ、損傷の密集化の効果を生物効果に実験的に対応づけるのが難しいという問題点があったからです。私たちはこの問題を克服するため、近年可能になった塩基損傷を化学合成する技術に着目し、複数の近接した塩基損傷からなるモデルクラスター損傷を作成して、突然変異誘発を調べる細胞内実験系を考案しました (図2) [5]。この方法では損傷をプラスミド (用語2) につなぎ、大腸菌に形質転換 (用語3) し、その増殖したプラスミドを取り出した後、突然変異を調べます。この手法により、決まった種類、数、位置の損傷の生物影響を調べることが初めて可能となりました。私たちは、この新しい実験系を使って、クラスターDNA損傷は生物影響が大きいのか、大きいとすればその修復はどのようになされているのか、を解明することを目指しました。

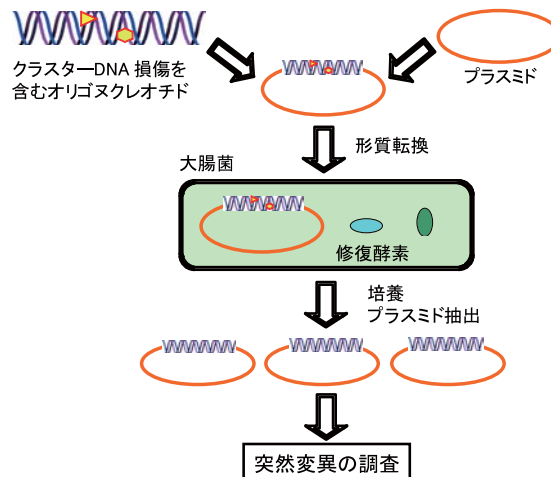


図2 モデルクラスターDNA損傷の生物影響を調べる実験系。
Fig.2 Novel experimental assay to study the biological consequences of clustered DNA damage

3. 研究の内容

私たちは、オリゴヌクレオチド (用語4) の特定の位置にDNA塩基の損傷を配置したものを作成しました。DNA損傷として、2つの塩基損傷8-oxoG、ジヒドロチミン (DHT) を用いました。8-oxoGは上述のように突然変異誘発性の損傷ですが、DHTは突然変異誘発性ではないことが知られています。これらの塩基損傷をDNAのそれぞれの鎖に1つずつ配置させ (図3)、図2の方法を用い、クラスターについて、突然変異誘発効果を調べました [6] (図4)。

損傷 X=8-oxoG, Y=DHT

5' CTCCTTAGTCAGGAATATG YCTCTATGCTGGGAGCAAAGGC3'
3' GAGAATCAGTCCTTATAGA XAGATACGACCCTCGTTTCCG5'

図3 実験に用いたオリゴヌクレオチド
Fig.3 Oligonucleotide used in the study

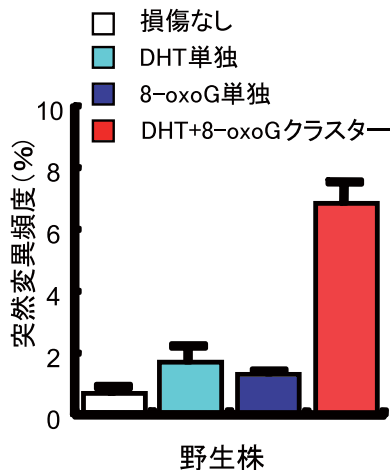


図4 大腸菌野生株におけるクラスター DNA 損傷の突然変異誘発頻度。
Fig.4 The mutation frequency of clustered DNA damage in wild type cells of Escherichia coli.

野生株において単独の DNA 損傷の突然変異誘発効果は低く、効率的に修復されていることがわかりました。一方、クラスター DNA 損傷の突然変異誘発頻度は単独損傷に比べ有意に増加することがわかりました。ここでは示しません、単独の DNA 損傷及びクラスター DNA 損傷は、損傷が無い DNA と同程度の形質転換効率（用語3）であることもわかりました。これらの結果は、本研究で用いた塩基損傷からなるクラスター DNA 損傷は致死性ではないものの突然変異誘発性が高いことを示しています。

塩基損傷の修復は塩基除去修復（用語5）が主に関与します。この塩基除去修復の重要な点として、修復の初期過程で脱塩基部位や鎖切断が生じることがあげられます。これらは、放射線によっても生じる DNA 損傷で、複製を強く阻害する性質があることが知られています。例えば、ホルムアミドピリミジングリコシラーゼ (Fpg) と呼ばれる酵素は、8-oxoG をはじめとする酸化損傷を認識し、これらを除去する活性を持ち、脱塩基部位さらには鎖切断を生じさせます。図4の結果は、クラスター内で DHT が除去されて脱塩基部位（もしくは鎖切断）が生じ、その結果 8-oxoG の Fpg による除去が阻害され、突然変異誘発頻度が高くなったことを示唆しています。

さらに私たちは、クラスター DNA 損傷の修復過程の詳細に迫るため、8-oxoG の除去修復に関わる2つの酵素、Fpg と MutY の効果を調べることにしました。（以下、Fpg、MutY は酵素（タンパク質）を、*fpg*、*mutY* は遺伝子を指します。）この目的のために酵素活性を欠損させた突然変異株を用いました（図5）。

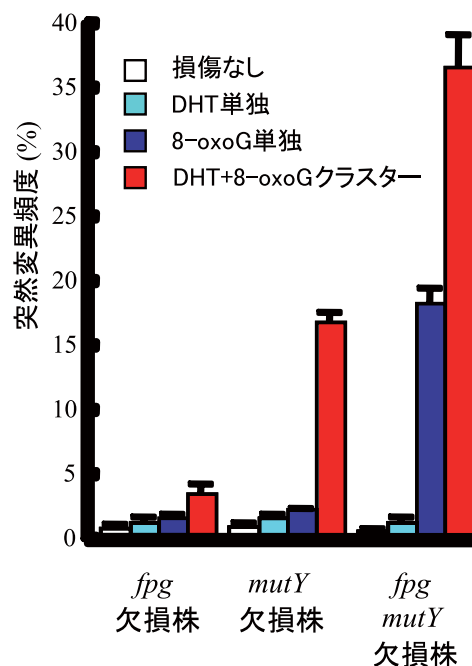


図5 大腸菌突然変異株におけるクラスター DNA 損傷の突然変異誘発頻度。
Fig.5 The mutation frequencies of clustered DNA damage in glycosylase-deficient cells of Escherichia coli.

MutY は 8-oxoG と塩基対を形成したアデニンを取り除く活性があることが知られている酵素です。まず、Fpg の活性のない、*fpg* 欠損株でクラスター DNA 損傷の突然変異頻度を調べたところ、その値は野生株と大きく変わりませんでした。このことは 8-oxoG が除去されずに残っていても、MutY が作用し突然変異が起こりにくいことを示しています。一方、*mutY* 欠損株では単独損傷ではさほど大きな変異誘発効果の増大は見られませんでした。これは 8-oxoG が Fpg で修復されたことを示しています。クラスター DNA 損傷では変異誘発効果が増大していますが、このことからクラスター DNA 損傷の修復に際し Fpg の活性は阻害されていることが示唆され、図4の実験結果からの考察と矛盾しないことが確認されました。

クラスター DNA 損傷の高い変異誘発効果が Fpg 活性の阻害のみによるならば、8-oxoG の除去と

8-oxoG と対合したアデニンの除去の両方の活性がない *fpgmutY* 二重欠損株では、8-oxoG は単独もしくはクラスター化に関わらず高い変異誘発効果を示すはずですが。しかしながら、興味深いことに、*fpgmutY* 二重欠損株では、クラスター DNA 損傷のほうが単独損傷よりさらに変異頻度が高くなるということがわかりました (図5)。私たちは、塩基配列の変化を調べ、このとき生じている突然変異は確かに 8-oxoG とアデニンとの対合に起因することを明らかにしました。これらのことは、損傷のクラスター化による変異誘発効果の増大には、Fpg の酵素活性の阻害だけではなく、さらに別なメカニズムが関与していることを示唆しています。このメカニズムの詳細についてはまだ解明できていません。単独の 8-oxoG の場合、8-oxoG がある鎖及びその相手方の (損傷の無い) 鎖の 2 つが複製の鋳型になります。それに対し、クラスター DNA 損傷では、何らかのメカニズムによって 8-oxoG がある鎖のみが鋳型となっており、結果的に高い確率で変異を誘発するのではないかと考えています。

一方、損傷間の距離がどれほどになるとクラスター DNA 損傷として認識されるのかという点は、生物影響を考える上で重要です。私たちは 8-oxoG と DHT、脱塩基部位、もしくは鎖切断を最大 5 塩基対離して配置させ、その突然変異誘発効果を調べました。その結果、変異頻度は損傷間の距離が大きくなる程低下する傾向を示しましたが、5 塩基対の距離でも単独損傷に比べ有意に高いことを見出しています。

4. 成果の意義と波及効果

クラスター DNA 損傷が放射線生物影響の原因であることを実験的に示すことができたこと、さらには損傷修復に関する酵素の重要性を示したことは、

放射線の生物影響の根本的なメカニズム解明への第一歩と考えられ、放射線応用・利用分野への重要な知見であると考えられます。宇宙放射線のリスク評価、放射線診断や放射線ガン治療、放射線による突然変異育種等の高精度化、高度化に貢献するものと期待されます。

5. 今後の予定

クラスター DNA 損傷により突然変異が高頻度で生じる原因としての塩基損傷の修復阻害のメカニズムを酵素の構造や生化学的特徴から説明する必要があると考えています。また、除去されずに残ったクラスター内の損傷 (この研究では 8-oxoG) の複製過程は生物影響に深く関連することを見出しましたが、これがどのようなメカニズムによるのかは不明です。私たちは今後このメカニズムを明らかにし、さらには異なるタイプのクラスター DNA 損傷を使って、この現象がどれほど一般的なものなのかについて調べてみたいと考えています。これらの研究を通じて、将来的には、放射線が生物に照射されたとき、誘発されるクラスター DNA 損傷がどのように修復され生物影響が現れるのかその全体像を理解していきたいと思えます。

参考文献

- [1] N. Shikazono, *et al.*, *J. Radiat. Res.* **50**, 27 (2009).
- [2] J.F. Ward, *et al.*, *Radiat. Res.* **103**, 383 (1985).
- [3] D. Goodhead, *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 7 (1994).
- [4] J.F. Ward, *Int. J. Radiat. Biol.* **66**, 427 (1994).
- [5] C. Pearson, N. Shikazono *et al.*, *Nucleic. Acids Res.* **32**, 263 (2004).
- [6] N. Shikazono, *et al.*, *Nucleic. Acids Res.* **34**, 3722 (2006).

用語の説明

1. 対合

DNA 中の塩基は水素結合によって対を形成し、二本鎖構造を形成する。塩基は通常アデニンとチミン、シトシンとグアニンが対合する。

2. プラスミド

細胞内で自律的に複製し維持される DNA 分子。

3. 形質転換

外部から DNA を細胞に導入すること。多くの場合、導入する DNA 上の遺伝子の持つ機能により DNA 導入細胞を選択する。この形質転換効率から損傷 DNA の致死性の程度を評価できる。例えば、ある損傷を含む DNA の形質転換効率が低かった場合、その損傷は致死性であることがわかる。

4. オリゴヌクレオチド

DNA の構成単位であるデオキシヌクレオチドが数~数百個連結された DNA。

5. 塩基除去修復

DNA 損傷を修復する経路の一つで、特に塩基損傷の修復を多数の酵素により多段階で行う。まず塩基損傷をグリコシラーゼと呼ばれる酵素が認識しこれを除去する。生じた脱塩基部位はさらに鎖切断に変換され、その後正常ヌクレオチドが取り込まれ修復が完了する。