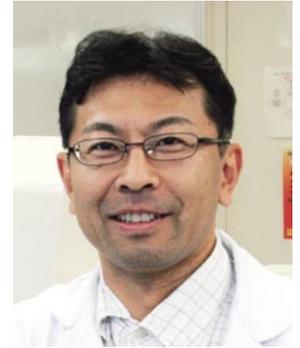


DNA 変性を利用した分子切断損傷を検出するための新しい方法の開発

A New Technique for Determination of DNA Strand Breaks Using DNA Denaturation

横谷 明德 放射線作用基礎過程研究グループ
Akinari Yokoya Basic Radiation Research Group



- 放射線照射により生じたDNAの分子鎖切断型の損傷を検出するため、DNAを1本鎖に変性する性質を応用した新しい方法を考案しました。
- この方法では、DNAの両鎖上に2 nm以上離れて生じるため、従来法では「2本鎖切断」として検出ができなかった複数の分子鎖切断を検出することができます。
- この方法を用いてHeイオンビームを照射したDNA試料について調べたところ、従来の予想に反し、DNAの鎖切断は両鎖上に2 nm以上離れて生じることはほとんどないことが明らかになりました。
- We have developed a new technique to detect radiation-induced DNA strand breaks using DNA-denaturation-treatment.
- This technique has an advantage in measuring strand breaks produced in both DNA strands located not only within 2 nm, which have been detected as DNA-double strand break, but also over 2 nm.
- Contrary to our expectation, we have revealed, using this technique, that He-ion-irradiation to plasmid DNA does not multiply induce strand breaks in both strands located over 2 nm.

概要

放射線により誘発される細胞死や突然変異などの主要な原因とされるゲノムの異常を調べる際に、遺伝子の本体であるDNAレベルでの分子変化(損傷)に着目して研究を行うことは非常に大切です。しかし、通常用いられる分析手法では、DNA分子上の数十ナノメートル(nm)程度の局所に近接して生じる複数の損傷を検出することは極めて困難です。本研究では、DNAの両鎖に近接して生じるとされる分子鎖切断損傷の新しい検出方法を考案し、Heイオンを照射したDNA試料の分析に適用しました。

本研究の一部は、日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センターの鹿園直哉、藤井健太郎らと平成18-20年度の科学研究費補助金「基盤研究(B)」を利用して行われました。また、本成果の一部は、学術誌International Journal of Radiation Biologyに掲載されています[1]。

1. 研究の背景

私たちは日常的に、環境や医療現場において様々な放射線を浴びています。これらの放射線は、細胞中のDNA分子に化学的な変化(損傷)を引き起こします。ほとんどのDNA損傷は生体の持つ修復作用で効率良く修復されますが、修復され難い損傷がわずかに残り、これが突然変異など遺伝的影響を引き起こす原因と考えられてきました。従って、難修復性のDNA損傷の構造や性質を明らかにすることで、放射線リスクを評価する際に必要な分子レベルでの知見が得られると期待されます。

放射線の中でも特にイオンビームなど飛跡(トラック)に沿った電離密度がX線などに比べ大きい場合、DNA分子上の数nm程度の領域に分子鎖切断や核酸塩基の損傷が局在化し、“クラスター損傷(用語1)”と呼ばれる難修復性の複雑な損傷領域を形成することがコンピュータシミュレーションにより予測されています(図1)。しかし従来のクロマトグ

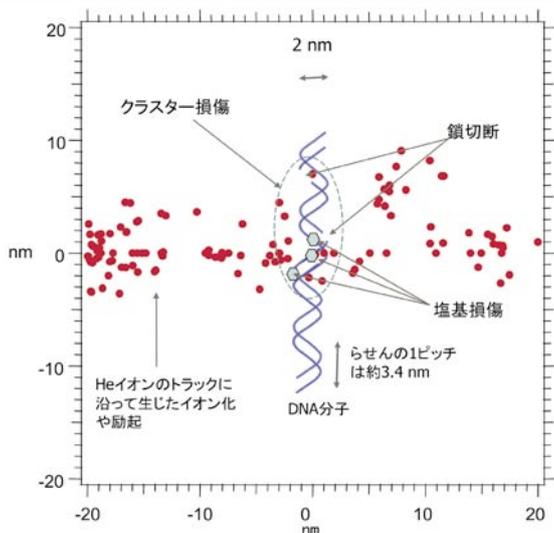


図1 2MeVのHeイオンをDNAに照射した時に、そのトラックに沿って生じると考えられるクラスター損傷の概念図。

Fig.1 Schematic drawing of clustered DNA damage produced along the track of 2 MeV He-ion particles.

ラフィー法やゲル電気泳動法による分子量分析法では、クラスターを構成する損傷の種類や配置についての情報は得られませんでした。本研究では、熱処理によってDNAの2重らせんが1本鎖にほどける性質を利用し、従来方法では検出ができなかった損傷形態の一つである、両鎖に分布する分子主鎖切断型の損傷を検出する方法を新たに開発しました。さらにこれを用いて、クラスター損傷を生成しやすいとされる高密度電離放射線であるHeイオンビームを照射したDNA試料の分析を行いました。

2. 研究の経緯

本研究では、プラスミドと呼ばれる比較的小さなDNA(pUC18)を試料として用います。プラスミドDNAは通常2重らせんがさらに振れた超らせん構造をしています。2 nm以内で2重らせんの両鎖が切断(2本鎖切断)を受けると直鎖構造へと変化します(図2)。pUC18プラスミドは2686塩基対から成りますが、これらのうちわずかに一箇所でも切断が生じると構造変化としてこれらを検出することができるため、極めて高感度の検出系であるといえます。一方、両鎖に切断が生じ、かつ切断位置が2 nm以上離れて生じた場合、残された塩基同士の水素結合により引き続き2

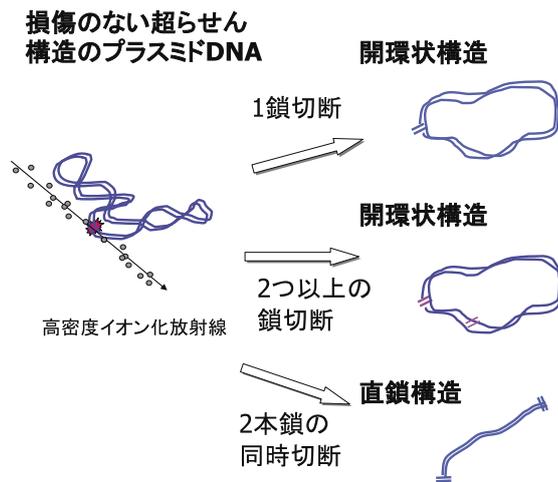


図2 鎖切断によるプラスミドDNAの立体構造の変化。
Fig.2 Conformational changes of plasmid DNA induced by strand breaks.

重らせん構造が安定に保たれるため直鎖構造にはなりません。この場合開環状構造となり、切断数がひとつの場合と区別できません(図2)。そこでDNAの2重らせんが適当な条件下で1本鎖に解ける性質(変性(用語2))を利用して、この“見えない切断”を検出することを考案しました[1]。

N_0 個からなるプラスミド分子集団中に切断がランダムに生じた場合、切断を全く受けず超らせん構造を持つ2本鎖DNAの数(N)の割合はポアソン統計に従い放射線の線量に対して指数関数的に減少します。

$$\frac{N}{N_0} = \exp^{-k \cdot D} \quad (1)$$

ここで k は単位線量あたりひとつのプラスミドDNA分子に切断が生じる確率、 D は線量を表しており、両者の積 $k \cdot D$ はひとつのプラスミドDNA分子に生じた平均の切断数となります。2本鎖DNAを変性させ2本の1本鎖分子に解離させると、1本鎖DNAの分子数は元の2本鎖DNAの数の2倍になります。よって、ひとつの1本鎖DNA分子に生じた平均の鎖切断数は $(k \cdot D) / 2$ となるため、(1)式は、

$$\frac{N'}{2N_0} = \exp^{-(k \cdot D) / 2} \quad (2)$$

となり、線量(D)に対して切断を受けずに残存する1本鎖DNAの分子数(N')の割合($N' / 2N_0$)をプロットすると(1)式から得られる傾きの1/2になります。

しかし、もし両鎖に切断が生じた場合、ひとつの1本鎖DNA分子に生じた平均の鎖切断数は $(k \cdot D) / 2$ よりも大きくなるため、傾きは(1)式のそれに近くと予想されます。このように1本鎖DNAの残存率を測定することで、DNAの両鎖に生じた鎖切断を検出することが可能となります。

ところで、通常のDNA変性処理では、二つの鎖の間の水素結合を解離して完全に1本鎖DNAにするために、90℃程度の高温まで試料温度を上げる必要があります。しかし、熱脆弱部位と呼ばれる別の種類の放射線損傷も生成しているため、昇温によりこの部位で新たな鎖切断が生じてしまう可能性があります。これを避けるためなるべく低い温度、できれば生体温度で変性させる条件を見つける必要があります。また鎖切断頻度を正確に定量するためには、ゲル電気泳動分析を行った試料中のDNA濃度を正確に測定する必要があります。照射試料は最大20マイクロリットル(μl)程度であり、通常DNAの定量に用いられる紫外吸光度測定に必要な量のDNA試料を確保することは困難です。そのため数 μl 程度のDNA試料でも定量する方法が必要となります。本研究では、これらの技術的な問題を克服し、実際にHeイオン照射されたDNA試料を用いてその有効性を検証しました。

3. 研究の内容

DNA変性を促進する有機溶媒としてホルムアミドをDNA試料に加え、様々な濃度や温度での変性条件を調べました。超らせん構造のプラスミドDNAをそのまま変性させると、二つに分かれた環状DNAが分離せず繋がったままになってしまいます。そこでHind IIIという制限酵素で一度直鎖状の分子にしたうえで、ホルムアミド処理しました。その結果、試料中に50%の濃度でホルムアミドを加えることで、ほぼ生理条件に近い37℃で完全にプラスミドDNAを1本鎖に変性することができることを確認しました(図3)。またホルムアミド処理により新たな鎖切断などが生じないことも確認され、この方法が有効であることを確認しました。次に1本鎖切断による分子量変化が通常のアガロースゲル電気泳動法で観測できるかを確認するため、放射線照射を模擬した制限酵素による切断実験を行いました。放射線を照射していないプラスミドDNAに対して、特定箇所で1本鎖のみに切断を入れるニック制限酵素(NtBspqI)で処理しました。この後に変性処理を行い電気泳動法でその切断片が検出されるか否

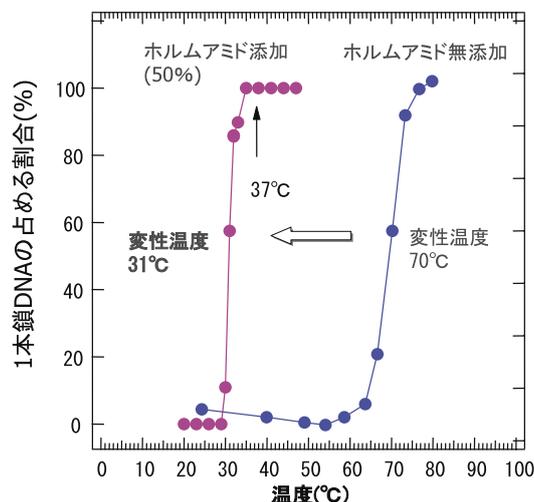


図3 プラスミドDNAの変性曲線。横軸は試料温度、縦軸は試料中の1本鎖DNAの2本鎖DNAに対する相対量を示す。
Fig.3 Melting curves of the plasmid DNA. The horizontal axis shows sample temperature, and the vertical axis shows the ratio of the fraction of single-strand to double-strand DNA.

かを確認したところ、予想通りの位置に切断が入ったことを示す1本鎖DNAのバンドが観測されました。以上より、1本鎖DNAに生じている鎖切断が検出できることが確認されました。

次に放射線のトラック通過により直接誘発されるDNA損傷を検出するため、高水和状態のDNA薄膜試料[2]を作成しました。この試料に対して実際にHeイオンビームを照射した後、1本鎖への変性処理による鎖切断の分析を行いました。その時に得られたゲル上の分析パターンの様子を図4に示します。分析試料20 μl のうち2 μl を使って市販の微量DNA分析キットで正確にDNA濃度を求め、残りを電気泳動に用いました。変性を行う前の試料では、超らせん構造から開環状・直鎖状構造への変化が照射した線量に依存して観察されます(図4(a))。この試料をHind III処理で直鎖構造にすると線量依存性がほとんど見られませんが(図4(b))、さらに1本鎖への変性処理を行うと、切断を受けない元の1本鎖DNAの分子量のバンドが線量と共に次第に減って行く様子が観測されました(図4(c))。

この鎖切断を受けていない残存1本鎖DNAの量を、照射したHeイオンの線量に対して対数プロットしたのが図5です。従来法により図4(a)のデータを解析して得た超らせん構造の2本鎖DNAの減少の線量も比較のために示しました。得られた残存1本鎖DNAの直線の傾きは、実験誤差の範囲内で従来法により得られた超らせん2本鎖DNAの場合の1/2となることがわかりました[3]。これらの結果から、従来予想されてきた状況と異なり、高い電離

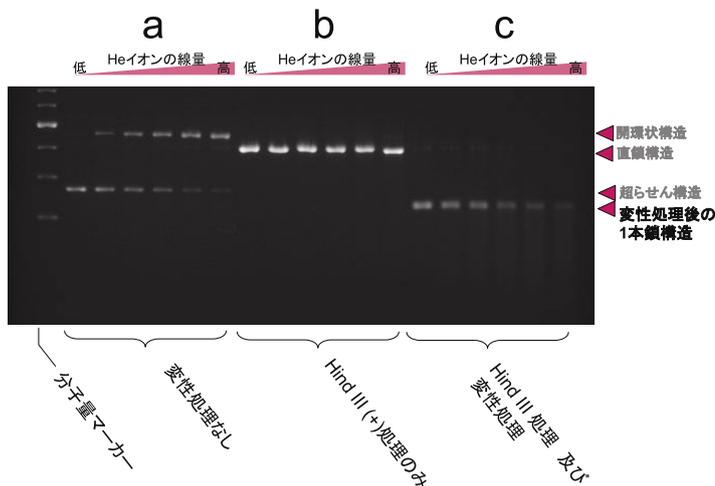


図4 (a) He イオン照射した超らせん構造プラスミド DNA の鎖切断による分子量変化を示すゲル電気泳動パターン。(b) 同試料を HindIII 処理して得られた直鎖構造。(c) さらに変性処理により得られた残存 1 本鎖 DNA の線量依存性。

Fig.4 (a) Degradation of He-ion irradiated super coiled plasmid DNA, (b) after Hind III treatment, and (c) after Hind III and denaturation treatment.

密度のトラック構造を持つ He イオンビームを照射した場合であっても、DNA の両鎖に分子鎖切断が生じる確率は低いことが本研究により初めて明らかにされました。以上から、これまで推測の域にあったクラスター DNA 損傷の構造について、本手法により従来の予測を書き換える新しい知見が得られることが実証されました。

4. 成果の意義と波及効果

私たちは以前の研究で、損傷した核酸塩基を除去する働きのある 2 種類の塩基除去修復酵素(グリコシレース)を、照射したプラスミド DNA に作用させると、He イオンの電離密度が高くなるほど損傷した核酸塩基を除去できなくなることを報告しています[4]。今回の研究結果と合せて、分子鎖切断よりもむしろ核酸塩基損傷のクラスター化による DNA の立体構造の変化がこのような難修復性の起源であることが推測されます。これらの実験的な根拠に基づいた新しい情報は、コンピュータシミュレーションにより進められている低線量のリスク評価を行う際の DNA 損傷生成モデルの精密化に寄与できると期待されます。

用語の説明

1. クラスター DNA 損傷

DNA の 1 ~ 2 らせんピッチ (~ 7nm) 以内に 2 つ以上の損傷を含む場合クラスター DNA 損傷と呼ばれ、立体構造を大きく歪めるため DNA 修復酵素の活性が阻害されると考えられています。

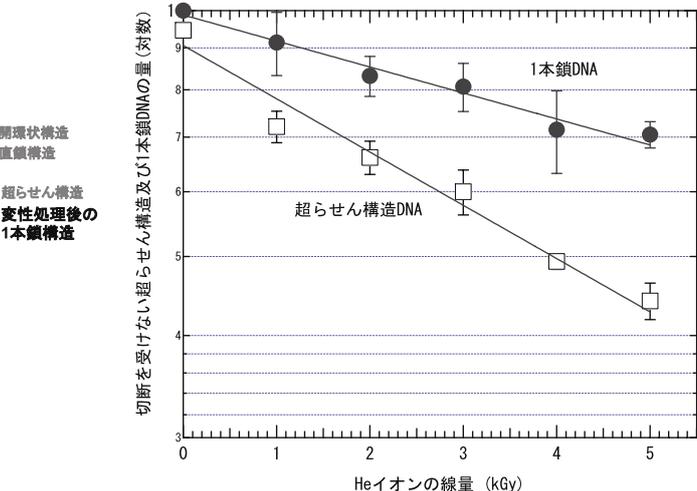


図5 He イオン照射による切断を受けていない超らせん構造及び変性処理後得られた 1 本鎖 DNA の残存量の線量に対する変化。

Fig.5 Dose responses of remaining super-coiled and single strand DNA after He-ion irradiation. The amount of single-strand DNA was obtained by denaturation treatment.

5. 今後の予定

主として塩基損傷から成るクラスター損傷も、変性した 1 本鎖 DNA を適当な条件下で損傷のない相補鎖と対合させて 2 本鎖 DNA に戻す(アニールすることにより、クラスター状態が解消されます。これにより、さまざまな修復酵素の活性が回復することが予想されます。今後どのような種類のグリコシレースの活性が戻るかを調べることで、クラスター損傷部位を構成している個々の損傷の種類を特定して行く研究を予定しています。

参考文献

- [1] A. Yokoya, *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.* **84**, 1069 (2008).
- [2] A. Yokoya, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8859 (2002).
- [3] A. Yokoya, *et al.*, *Proc. 27th Symp. Mater. Sci. Eng. Res. Center on Ion Beam Tech, Hose Univ.* Dec. 10.1 (2008).
- [4] A. Urushibara, *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.* **84**, 23 (2008).