

放射光軟X線を用いた選択的DNA損傷の誘発

Selective Induction of DNA Damage by Synchrotron Soft X-rays

藤井 健太郎

放射場生体分子科学研究グループ

Kentaro Fujii

Research Group for Radiation and Biomolecular Science

- 放射光軟X線の照射によって誘発されるDNA損傷について、酵素タンパク質を用いた生化学的方法によって分析定量する研究を行いました。
- 鎖切断や塩基損傷などのDNA損傷の誘発量が、炭素、窒素および酸素K殻イオン化前後の照射エネルギーにおいて、著しく変化することを見出しました。
- この結果は、軟X線の照射により生じた電子や正孔の挙動や、糖の分解のしやすさが、照射するエネルギーにより異なるため、軟X線のエネルギーに対する鎖切断や塩基損傷の誘発頻度の違いによって現れたと推測しています。



概要

放射線によって生体に誘発される細胞致死や突然変異、発ガンの主要な原因の一つが、DNA分子上に生じる化学変化(DNA損傷)であることが従来から指摘されています。本研究では、その生成機構を明らかにするために、DNA薄膜に対して軟X線を照射し、その後に誘発される各種DNA損傷の誘発量を定量しました。その結果、鎖切断や塩基損傷などのDNA損傷の誘発量が、炭素、窒素および酸素K殻イオン化前後の照射エネルギーにおいて著しく変化することを見出しました。特に、窒素K殻吸収端直下では鎖切断が主に生成し、酸素K殻吸収端直上では塩基損傷が著しく増加しました。酸素K殻イオン化はDNA塩基だけでなく、DNAを取り囲む水分子などもイオン化するため、複雑な反応過程を経てこれらの損傷が生成するものと考えられます。本成果は、The Journal of Physical Chemistry B誌に掲載されています[1]。

1. 研究の背景

我々生体は、宇宙や身の回りの環境から常に微量の放射線に曝されています。その放射線(例えば1Gyの γ 線)の照射により細胞核内に10万カ所の電離が起こると予想されています[2]。放射線照射直後の物理過程によって、細胞核内のDNAにおよそ1000個の一本鎖切断、1000個の塩基損傷、40個の二本鎖切断などを生じると見積もられています[3]。これらの初期損傷のうち数%以下が突然変異

や細胞死を引き起こすと推測されます[3]が、初期に生成した損傷のほとんどは生体の持つ修復過程によって元通りに修復されると考えられています。一方、この生物学的な修復過程にはDNA中を電荷が移動するという“物理的な”現象が深く関わっていると考えられます。Rajskiらは、DNAと塩基に付加した酵素タンパク質との間の電荷移動によって、タンパク質が離れた場所での損傷部位を探するというモデルを提唱しています[4]。また最近では、DNAに生じた塩基対のミスマッチが伝導性を大きく変化させることが報告されています[5]。DNAに生じる分子構造変化(分子損傷)を何らかの方法で制御することができれば、DNAの電気伝導特性をコントロールすることができると期待されます。一方、放射光軟X線を分子内の特定の結合を切断する「分子メス」として利用することが提唱され、内殻電子を特定の結合に対する反結合性軌道に共鳴励起することによって、特定の結合切断が起こることが報告されました[6]。このように、軟X線の元素選択的な光吸収を利用して、元素選択的な分子変化などの化学的修飾をコントロールすることができると期待されています[7]。

2. 研究の経緯

一般に放射線の影響を調べる実験に用いられる γ 線やX線などの放射線はイオン化作用が大きく、様々なDNA損傷(図1)が同時に誘発されるため、損傷と生物学的な影響の因果関係の詳細な解析は困難とされていました。一方、軟X線のエネルギーを

選ぶことでDNA中の炭素、窒素及び酸素をそれぞれ選択的にイオン化することができます。このような軟X線の特徴を利用して、我々のグループでは、SPring-8などの高輝度の放射光施設において、炭素、窒素や酸素など特定原子のイオン化部位を選択した上で、DNAが変異していく過程を詳細に調べています。そのため、原子力機構専用軟X線ビームライン(BL23SU)に、電子常磁性共鳴(EPR)装置や脱離イオン質量分析器などを設置し、短寿命の不对電子種や照射により生じた分解生成物などを調べています。標準的な放射線源として用いられているX線やγ線では、照射によってDNAに生じる鎖切断や塩基損傷の誘発量は、放射線の種類によらずほぼ一定の誘発量であると報告されており[8, 9]、放射線のエネルギーが大きく変化しても各損傷の誘発量はほとんど変化しないと考えられていました。一方、軟X線を用いた実験では、鎖切断量が調べられているのみで[10, 11]、塩基損傷に関してはほとんど報告がありませんでした。そこで、軟X線照射により生じるDNA損傷、特にDNAの電気伝導特性と深く関わる特定の塩基損傷の選択的な誘発の可能性を探索することを目的として、DNAに生じる鎖切断や塩基損傷が照射する軟X線のエネルギーによりどのように変化するかを調べました。

3. 研究の内容

DNAは、生物の設計図とも言われており、遺伝子である4種類の核酸塩基(アデニン(A)とチミン(T)、グアニン(G)とシトシン(C))がお互いに対を成してナノメートルレベルで配列を作り、リン酸と糖の骨格に囲まれた二重らせん構造をした生体高分子です。そして、水素、炭素、窒素、酸素およびリンという5種類の元素で構成されます。窒素原子は核酸塩基にのみ、リン原子は骨格のみに含まれます。そして、原子によって吸収できるX線の波長が異なるという性質を利用して、放射光軟X線のエネルギーをそれぞれの原子に特有な波長に合わせることで、DNA内の特定の部位を選択して狙い撃ちすることができます。また、核酸塩基にはプリン塩基とピリミジン塩基が含まれ(図1)、これら核酸塩基の損傷は、突然変異の主要な原因とされています。実験では、プラスミドと呼ばれる比較的構造が簡単なDNAの薄膜を作製しました。通常ではこのプラ

スミドDNAは、二重らせん構造がさらに振れた「超らせん構造」をとります。軟X線照射によりプラスミドDNAの二重らせんの片鎖の切断(1本鎖切断)が1ヶ所でも生じると、超らせん構造が解けて開環状構造になります(図2(a))。このDNAの立体構造変化は、ゲル電気泳動法により比較的容易に検出・定量することができるため(図2(b))、DNAの鎖切断の誘発頻度を極めて高感度で調べることができます。一方、核酸塩基の変異は、変異した塩基を鎖切断に変換する働きをもつ修復タンパク質との反応によって検出しました。そして、軟X線照射した時のDNA鎖切断と酵素反応によりさらに付加的に生じたDNA鎖切断との差から、核酸塩基の変異の誘発頻度を定量しました。本研究ではピリミジン塩基損傷の検出にNthタンパク質、プリン塩基損傷の検出にFpgタンパク質を用いました。これらのタンパク質は、核酸塩基に生じた酸化的損傷部位を認識・

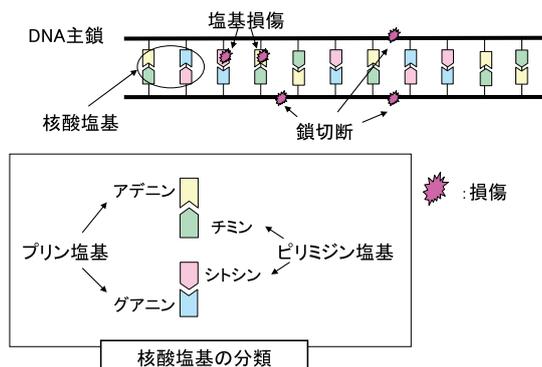


図1 様々なDNA損傷

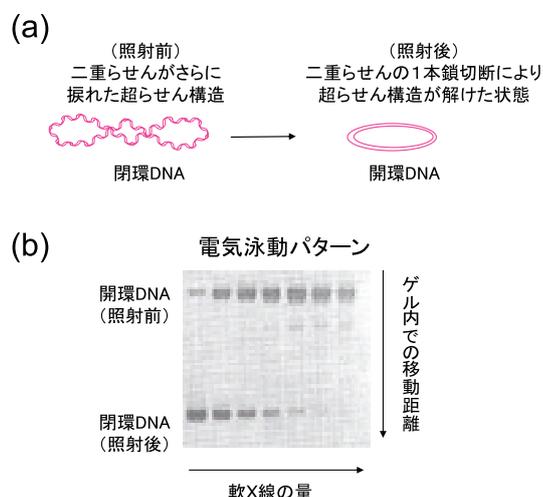


図2 ゲル電気泳動法によるプラスミドDNA鎖切断の検出。軟X線の照射量が増えると照射前に存在した閉環DNAの量が減少し、照射によって生成した開環DNAの量が増加する。

除去するとともに、近傍の主鎖に切断を導入する作用を持っています。プラスミドDNAの水溶液試料をガラスプレートの上に乗せて乾燥させ、厚み数マイクロメートルの薄膜試料を作製しました。この試料を真空チェンバー内に挿入し軟X線を照射しました。軟X線は大気中での透過率が極めて低いため、照射実験は真空中において行いました。大型放射光施設SPring-8の電子蓄積リングから発せられる放射光を、分光器により単一のエネルギーに分光し、炭素、窒素及び酸素のイオン化に必要な波長にエネルギーに合わせて照射しました。照射した軟X線のエネルギーは270, 380, 435, 560および760 eVの5種類のエネルギーで、それぞれ、炭素K殻吸収端以下、窒素K殻吸収端以下、酸素K殻吸収端以下、酸素K殻吸収端直上、そして、リンK殻吸収端以下のエネルギーに相当します。

実験により得られた3種類のDNA損傷の誘発頻度を示した結果を、図3に示します。照射した軟X線のエネルギーの違いにより、損傷の誘発頻度が大きく変化することが確認されました。炭素のイオン化のみが起こる380 eVの照射では、主として1本鎖切断が生じます。一方、酸素をイオン化させた場合(560 eV照射)、核酸塩基損傷の誘発頻度が約3倍にもなりました。さらに酸素イオン化エネルギーを大きく超えた760 eVを照射した場合は、プリン塩基損傷が減少し、鎖切断とピリミジン塩基損傷が主に誘発されます。

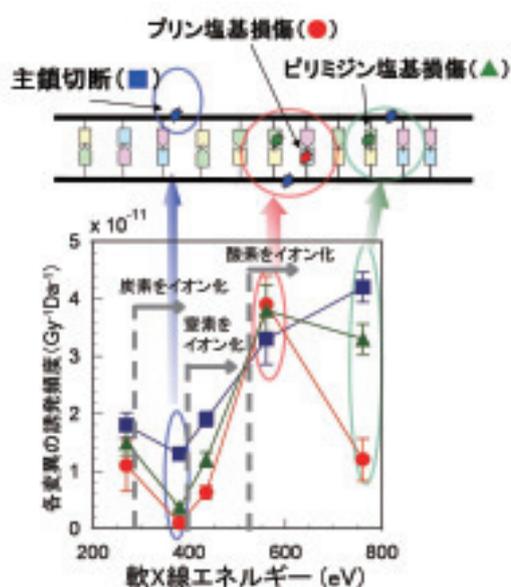


図3 放射光軟X線によるDNA損傷の選択的誘発
照射エネルギーを選択することにより、炭素、窒素および酸素といった元素を選択してイオン化することができる。軟X線の照射により、鎖切断(■)、プリン塩基損傷(●)やピリミジン塩基損傷(▲)が選択的に誘発された。

イオン化後にオージェ電子などの多くの二次電子が放出され、分子内には正孔が生じます。DNA分子内ではプリン塩基は正孔を、ピリミジン塩基は電子を選択的にトラップすることが知られています。それらの正孔や電子と核酸塩基との相互作用により各損傷を引き起こします。また、鎖切断は鎖中の糖部位の分解により誘発されます。軟X線のエネルギーの違いにより元素が選択的にイオン化され、その結果生じる正孔や電子の挙動や糖の分解のしやすさがイオン化された元素の種類に依存するため、3種類の誘発頻度の違いが現れました。また、DNA分子は多くの水分子に囲まれています。真空中においても1塩基対あたり少なくとも、5個の水分子が結合しています。本研究結果では、酸素のイオン化により各損傷が顕著に増加していますが、DNAを取り囲む水和水分子中の酸素のイオン化が大きく寄与していると考えられます。

酵素タンパク質を用いた生化学的手法では、主に鎖切断と酸化的塩基損傷の誘発量の定量を高感度で行うことができます。それに対し吸収端近傍吸収微細構造(XANES)スペクトルからは、注目する元素近傍の化学結合状態を反映したスペクトルが得られます。したがって、照射によるXANESスペクトルの変化から鎖切断末端の分子構造や、塩基損傷に伴った分子構造変化の詳しい情報を得ることができます。そこで、軟X線を照射する前と後の窒素および酸素K殻でのXANESスペクトルを測定しました。その結果、照射前後の差スペクトルから、照射による分子構造変化に関する情報を得ることができました。詳細については現在解析中ですが、今後理論計算やDNAモノマー分子など基準分子などによって微細構造の同定を行うことで、様々な分子構造変化の詳細について調べる予定です。

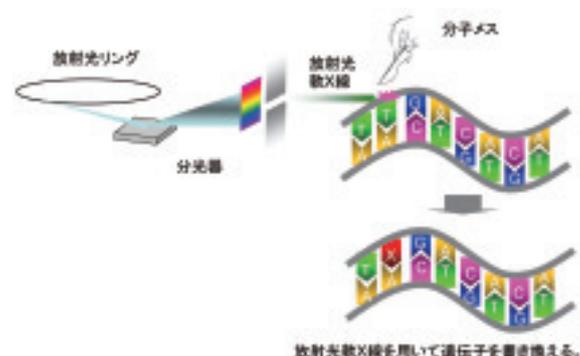


図4 放射光軟X線を用いて遺伝子を書き換える技術のイメージ

4. 成果の意義と波及効果

γ 線や重粒子線などの高エネルギー放射線から見れば僅かなエネルギー変化(数十~数百eV)にもかかわらず、照射エネルギーを選択することで選択的にDNA損傷を誘発することに成功した本研究の成果は、今後の更なるメカニズムの解明や照射条件の最適化により、DNAナノチップの加工などへの応用が期待されます。また、現在行われている遺伝子操作は生化学的手法と呼ばれるもので、試験管内で特定の反応溶液を用いて酵素タンパク質を作用させます。非常に高感度ですが、限られた条件下でしか遺伝子操作ができないという問題がありました。そこで、分子メスの応用により、遺伝子を自在に書き換えるという技術を提案する本研究の成果は、遺伝子を光で操作するという新たな技術の開発につながると期待されます(図4)。また、放射光は赤外、可視光から高エネルギー X線におよぶ幅広い波長のスペクトルを示す光です。そのため、放射光とDNA分子との相互作用を詳しく研究することは、高いエネルギーを持った重粒子線が生物に与える効果のメカニズムを紐解く鍵となります。したがって、この研究によって得られた知見は、現在急速に発展している重粒子線による癌治療をさらに効率よく行うために役立つと期待されています。

5. 今後の予定

本研究では、軟X線により誘発されるDNA分子変異に、電子や正孔あるいは水和水分子の役割が重要であることを示しました。今後は、これらの電子や正孔あるいは水和水分子がどのようにDNA分子変異をもたらすか、その生成機構の詳細を明らかに

するために、光電子分光実験や水和の状況を変化させたDNA試料において、軟X線分光研究を行っていく予定です。

参考文献

- [1] K. Fujii, N. Shikazono, and A. Yokoya, *J. Phys. Chem. B* **113**, 16007 (2009).
- [2] D. T. Goodhead, *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 7 (1994).
- [3] J. F. Ward, *Prog. Nucleic Acid Res.* **35**, 95 (1988).
- [4] S. R. Rajski et al., *Mut. Res.* **447**, 49 (2000).
- [5] X. F. Guo et al., *Nature Nanotech.* **3**, 163 (2008).
- [6] M. C. K. Tinone et al., *J. Chem. Phys.* **100**, 5988 (1994).
- [7] S. Wada et al., *Nucl. Instr. and Meth. B* **199**, 361 (2003).
- [8] S. Purkayastha, J. R. Milligan, and W. A. Bernhard, *Radiat. Res.* **166**, 1 (2006).
- [9] A. Yokoya, S. Cunniffe, and P. O'Neill, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8859 (2002).
- [10] A. Eschenbrenner et al., *Int. J. Radiat. Biol.* **83**, 687 (2007).
- [11] A. Yokoya, R. Watanabe, and T. Hara, *J. Radiat. Res.* **40**, 145 (1999).

英語要約

Soft X-rays produce a variety of molecular changes (damage) in cellular DNA, which is thought to be the critical target of the biological effects of radiation, such as mutation induction. We have revealed that the yields of base lesions as well as strand breaks strongly depend on soft X-ray energy around the carbon, nitrogen and oxygen K-edge regions. The K-shell ionization of oxygen most likely contributes to the induction of nucleobase lesions. DNA single strand breaks, on the other hand, are preferably produced just below the N K-edge. Therefore, we have concluded that specific types of DNA damage can be selectively induced by monochromatic soft X-ray irradiation.

用語の説明

1. 放射光

光速に近い高エネルギーの電子が磁場中を通過すると、磁場によって軌道が曲げられ、そのとき軌道の接線方向に光を発生する。この現象をシンクロトロン放射、このとき放出される電磁波を放射光という。放射光はマイクロ波からX線にいたる広い範囲の連続スペクトルを持っており、指向性が良く優れた偏光特性を持っている。

2. 軟X線

約0.1から2keVのエネルギーを持った光子。このエネルギーは有機分子を構成する元素の内殻(K殻)電子の束縛エネルギーに相当し、軟X線の吸収により内殻電子を電離あるいは励起することができる。

3. グレイ(Gy)、ダルトン(Da)(図3の縦軸の単位)

グレイ(gray、記号:Gy)は、吸収線量の単位。放射線によって1kgの物質に1Jの放射エネルギーが吸収されたときの吸収線量を1Gyと定義する。

ダルトン(dalton、記号 Da)は、一般に高分子の質量の単位としてよく使用されている。定義は、静止して基底状態にある自由な炭素12 (^{12}C) 原子の質量の1/12と定義されており、数値は分子量と同じ。

4. プラスミドDNA

プラスミドDNA (plasmid DNA)とは環状DNAのこと。大きさは染色体DNAにくらべると非常に小さく、2~3千塩基対から数万塩基対のものがある。プラスミドDNAは本来、多くの細菌の中にあり、染色体DNAとは独立している。