

放射線 DNA 損傷の分析科学的諸問題と対策

—DNA の放射線化学変化と生物応答の関係理解のために—

日本原子力研究開発機構 原子力基礎工学研究部門 赤松 憲

I have been considering how to clarify chemical difference in DNA damage spectrum among radiation qualities. In order to confront the problem, it should be necessary to develop new-conceptual analytical methods for damaged DNA by ionizing radiation. In this report, following to the explanation of overall background of upstream of radiation biology, brief history of the analytical chemistry with problems, a few analytical trials to discover characteristics of radiation qualities are demonstrated. The present efforts against the problems are discovering difference in strand-break termini between high- and low- LET radiation.

Key words: ionizing radiation, DNA damage, strand break, analytical science

はじめに

放射線作用による DNA の化学構造変化は、後の細胞あるいは生物応答としてどのような形で反映されていくのだろうか。またその化学構造変化の仕方は線質によってどのように違うのだろうか・・・。「線質が違えば生物応答の仕方も違ってくる」ことは半世紀以上前から分かっているが、ではなぜ違うのかについて「仮説」は数多存在するものの統一見解は得られていない。放射線の生物作用について矜持をもって語るためには、この問いに対する明瞭な回答が必要である。

本稿では、冒頭で DNA の放射線化学変化を知る意義についての概況を述べた後、これまで開発されてきた、あるいは筆者が新規に開発した DNA 損傷分析手段の特性について説明し、それらによって得られる放射線 DNA 損傷情報の意味について考察したい。

1. 緒言

1.1 放射線 DNA 損傷の化学とその重要性について

良く知られているように、放射線等によって DNA に生じた損傷は、多くの生物が有する損傷修復機構によって効率よく修復される。修復機構は、除去修復と組み換え修復に大別されるが、前者は更に塩基除去修復 (base excision repair: BER) と (nucleotide excision repair: NER) に、後者は相同組み換え (homologous recombination: HR) と非相同末端結合 (non-homologous end-joining: NHEJ) に分けられる。

各修復機構の詳細については、多くの成書¹⁾で述べられているので、ここでは割愛する。

さて、放射線によって生じる DNA 損傷には一体どれくらいの種類があるのだろうか？半世紀以上前から間接効果 (主に OH ラジカルによる損傷) と直接効果 (放射線エネルギーの直接的移動による損傷) について、各々希薄水溶液系や凝縮系において地道に研究されてきたが、peroxide 等の中間体を含めると、化学構造の分かっている損傷だけでも 100 種類程度は存在すると考えられている²⁾。これらの殆どは修復に関わる修復酵素によって元通りに修復されるが、損傷と酵素は 1 対 1 ではなく、各酵素は大抵、数種類の損傷に対応しており、逆に、ある損傷に対して 2 種類以上の酵素が対応できる場合もある。また、たとえば BER や NER に関しては損傷部位の切断、除去、新しいヌクレオチドの挿入、切断部位の連結の 4 段階を経る必要があるが、少なくとも 3 種類以上の様々な酵素等タンパク質が関与している。これらすべてが正常に機能して初めて、損傷箇所が完全に元通りに修復される。したがって、個々の損傷の生成しやすさと、それに最初に相互作用する酵素等の親和性あるいは反応速度に関する情報が、DNA 損傷を発端とする生物影響評価に関わる基礎パラメータのひとつになると考えられる。特に放射線の場合、10 ~ 20 塩基対以内に 2 つ以上の損傷が集中的に存在する、いわゆる「クラスター損傷」と呼ばれる部位の存在と修復困難性が示唆されており³⁾、実験科学的な実証が望まれている。

Grappling with Problems in Analytical Science for Radiation Damage in DNA

Ken AKAMATSU (Japan Atomic Energy Agency)

〒319-1195 茨城県那珂郡東海村白方白根 2-4

TEL: 029-282-6167, FAX: 029-282-6768

E-mail: akamatsu.ken@jaea.go.jp

周知の通り、放射線には荷電粒子や光子等、様々な種類（線質）が知られており、線質間で損傷の種類と各々の生成しやすさ（損傷スペクトル）が異なる可能性がある。たとえば、細胞を用いた系において⁶⁰Coγ線とα線では、生じる2重鎖切断の修復速度が著しく異なることが明らかとなっている⁴⁾。こういった線質による損傷修復性の違いについては他にも多くの報告がある。しかしながら、その原因がDNA損傷の違いにあるのか、あるいは、別の原因が存在するのかわからない。DNA損傷と、修復等の生物応答の因果関係を明確にするためには、少なくとも損傷スペクトルの線質依存性など、損傷側の情報が必要である。

放射線生命科学の特徴のひとつは、研究対象となる時間スケールがフェムト秒から年のオーダーまで因果関係が複雑なネットワークでつながっている点であろう。時間軸で各研究分野を大雑把に分けてみると、①DNA等の励起・電離・電荷移動（fs～ps～）、②化学的に安定なDNA損傷分子の生成（～ns～）、③損傷修復過程（～min～）、④細胞レベルでの系世代影響（day）、⑤生物レベルの系世代影響（year）、となる。②～⑤のある分野の研究者が、それより下流分野の現象との因果関係について考察しようとする場合、大抵は自分の分野を含めた上流の情報不足に気づかされるであろう。上流分野の不安定性は強いては社会が求める最下流分野の不安定性につながるというよい。

損傷修復過程は、放射線という物理刺激とそれに伴う化学変化に対して生物が最初に行う作業であるといえる。線質は損傷スペクトルにどのような違いをもたらすのか、放射線生命科学の要といえる重要な問いである。

1.2 DNA損傷検出法の開発とジレンマ

放射線によるDNAの化学変化を研究するためには、それに必要な技術開発が必要で、既存の機器分析法のみで調べられない場合は、DNA側に何らかの処理をすることで機器分析に掛けられるように工夫されてきた。損傷分析の初期は、DNAの単位であるヌクレオチド、ヌクレオシド、塩基等の放射線分解物を、NMR、GC-MS等を用いて直接的に損傷構造決定が行われてきた⁵⁾。しかしながら、これらはもちろん基礎データとして重要であるが、あるDNA構成単位のみ均一系で生じる構造変化と、高分子DNAの一部として存在する場合とでは構造変化の仕方が変わってくる可能性が十分にある。そこで、高分子DNAを照射対象として構造変化を調べるための工夫も行われてきた。代表的な方法としては、DNA分解酵素を用いて、機器分析しやすいように低分子化する方法がある⁶⁾。これによって2つのDNA構成単位間で生成する、架橋分子等の存在が明らかとなってきた⁷⁾。

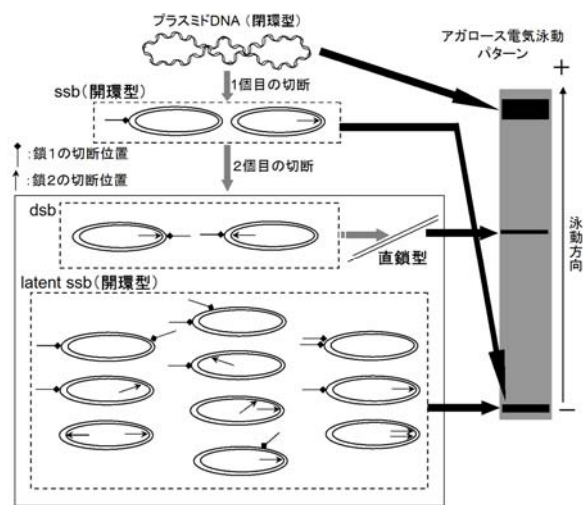


図1 閉環プラスミド法の概略

DNAの鎖切断に関する定量においては、最も便利で高感度である、閉環プラスミドを用いた方法（以下、閉環プラスミド法）が汎用されている（図1）。閉環プラスミド法では、1本鎖切断（single strand break: ssb）と2本鎖切断（double strand break: dsb）鎖切断をDNAのトポロジカルな変化に対応づけて電気泳動で検出・定量することが可能であるが、切断末端の「定性」はできない。さらに、トポロジーの違いが鎖切断効率に影響を及ぼす可能性⁸⁾、図1からも分かるようにssbを過小評価する可能性も指摘されているので⁹⁾、特に線質間のデータを比較する場合は注意を要する。

一方、鎖切断によってDNAの対イオン（Na⁺、H⁺）が遊離することに注目し、それによる電気伝導度の上昇と鎖切断数を関連づけようとするユニークな試みがなされたことがあるが¹⁰⁾、切断1個に対応する対イオンの数が、温度、pH、DNAの重合度によって大きく変化するので、あまり実用的ではないといえる。

次に要求されることは、高感度で定性・定量が可能な手段である。少量のDNAでかつ低線量で、生じた損傷の構造が分かることが理想である。そこで開発されたのが、損傷に対する免疫抗体を用いた酵素免疫測定法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA）である。これによって、よく知られた損傷である、7,8-dihydro-8-oxo-guanine (8oxoG)¹¹⁾、5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine (Tg)¹²⁾、脱塩基部位（abasic sites）^{13),14)}などの高感度定量が可能となった。しかしながら、抗体分子等ELISAに用いるタンパク質の分子量が大きい（> 15 kDa）ため、DNA内部に準安定的に納まっている8oxoGのような損傷を正しく定量するためには予め強酸処理等によって1本鎖に変性しておく必要がある。さらには同じ損傷が近接しているような場合、抗体分子の立体障害のため2つのうち1個は検出できない可能性が高い。

次に考慮すべきことは、DNA がヒストンタンパクと複合体を形成してクロマチン構造をとっている場合の損傷である。DNA のみの系で得た放射線損傷とは、また違った様相を見せることに容易に想像がつく。実際、クロマチンに ^{137}Cs γ 線を照射すると、DNA-ヒストンが共有結合的に架橋することがすでに確かめられている¹⁵⁾。

以上のように DNA 損傷の分析科学史を俯瞰してみると、損傷の詳細を知る、あるいは未知の損傷を探求する場合には、より単純な系、例えばヌクレオチド単位等の低分子を用いないと分析できないが、低分子を用いて発見された損傷とその生成速度が、そのまま単純に高分子 DNA、さらにはクロマチン中の DNA に当てはまるわけではないことが分かる。逆に、DNA 中の生じた損傷の化学構造等の詳細を探求するためには、使用できる DNA 量には現実的な限界があるため、個々の損傷を必要量得るためには MGy オーダーの大線量(生物影響を調べるための線量より 6 桁以上高い)が必要である(但し乾燥・凝縮系試料の場合)。また、照射試料の 2 次処理(酵素・薬剤処理等)による低分子化が不可欠であるため、定量的な不確定要素(処理による試料量の減少、新たな損傷の生成)が増す。このような根源的なジレンマに対し、実験科学として如何に応じていけばよいか、放射線生物学との関わりを考える場合、常に意識しなければならない問題である。

1.3 ジレンマ克服へ —その対応策—

前項で述べた「ジレンマ」への対応策として、(i) 既存の分析方法の特性理解、(ii) 新規分析方法の開発、(iii)異なる分析法間のデータ比較、の 3 項目を効率的に繰り返していくことによって漸近的に信頼に足る損傷データを得て行く、という方法が現実的であろう。著者は、(i)として 2.2 で紹介した閉環プラスミド法(図 1)を選び、その特性を踏まえた上で、鎖切断末端の絶対量を末端構造の違いで分けて評価できる方法を開発してきた。次項より、開発した方法の概略と、 ^{60}Co γ 線、 $^4\text{He}^{2+}$ イオンビーム照射した DNA 薄膜への適用例を示し、閉環プラスミド法の結果と合わせて考察してみたい。

2. 方法

2.1 DNA 分解酵素 SVPD を用いた鎖切断末端分析

本分析法は、DNA の鎖切断末端の 3'側を分析の対象としている。筆者は、3'側末端にある糖(2'-deoxyribose: dR)の 3'OH を認識して逐次 DNA をヌクレオチドモノマー単位(pdN)に分解する酵素である蛇毒ホスホジエステラーゼ(snake venom phosphodiesterase: SVPD)に着目した。SVPD の機能を基準

に、鎖切断末端を種別すると、①3'OH 末端: SVPD で直接認識される、②3'リン酸末端(3'p): ウシ腸脱リン酸酵素 calf intestine alkaline phosphatase: CIAP により、3'p を 3'OH に変換することで SVPD 認識される、③3'X 末端: CIAP 処理しても SVPD 認識できない(例えば 3'p の p に壊れた糖フラグメントが残っている(3'dR⁺)、あるいは末端ヌクレオチドの塩基部分が損傷している(3'dN⁺)) 場合、の 3 通り考えられる(図 2)。かくして、SVPD は 3'OH 末端から pdN を切り出していくわけであるが、ある酵素濃度、3'OH 濃度範囲において、3'OH 量と切り出される pdN 量が正比例する(反応温度、時間は一定)。これにより容易に定量できる pdN(実際は脱リン酸された dN)から 3'OH 量を算出することが可能となる(図 3)。

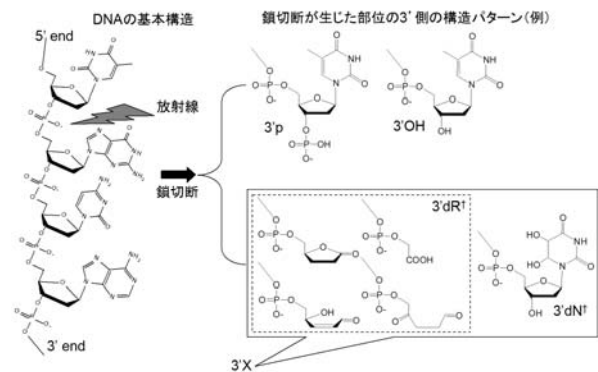


図 2 DNA の鎖切断末端構造の例¹⁶⁾

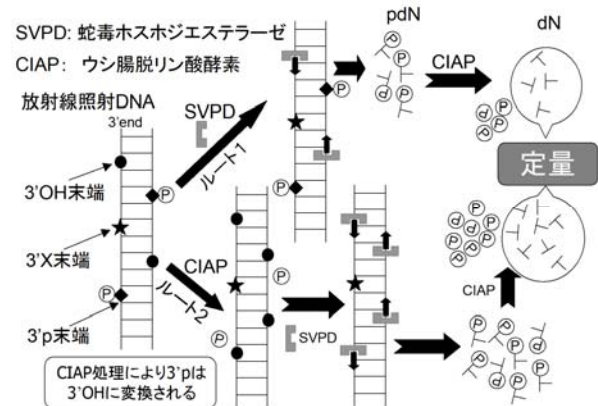


図 3 SVPD 法の概略¹⁷⁾

ルート 1 により 3'OH 末端の量、ルート 2 により 3'OH と 3'p 末端の合計量が求まる。

2.2 無機リン酸定量による鎖切断リン酸末端の定量

2.1 の方法は 3'X 量が無視できない場合、全 3'末端量を過少評価することになる。そこで、それを補うために 3', 5'側の両方のリン酸量を定量する簡単な方法を開発した(図 4)。極端に大線量でなければ切断末端 3',5'側のどちらか一方にのみリン酸が残っている

(図の(1), (2)が主で, (3), (4)は希) と仮定した場合, 得られる無機リン酸量は, 全鎖切断量と等しくなる。

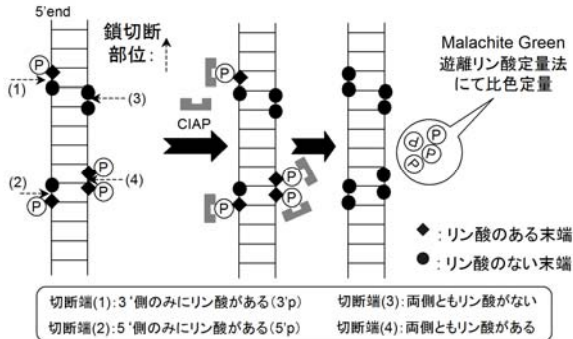


図 4 末端リン酸定量法の概略

3. 照射実験

3.1 $^4\text{He}^{2+}$ イオンビーム

DNA には pUC19 プラスミド (2686 塩基対) を制限酵素 Sma I 処理して直鎖状にしたものを用いた。DNA 水溶液をシリコン (又はガラス) プレートに塗布し, 真空下にて十分に乾燥させた。He イオンビーム照射は原子力機構高崎量子応用研究所イオンビーム照射施設 (TIARA) の 3MV 静電加速器 TC ラインにて行った。試料表面の位置で 8 MeV のビームを, 50, 100, 200, 400, 900 kGy 付近の線量になるように室温で照射した。なお, 照射線量は ELOSSM コード¹⁸⁾を用いて算出した。照射 DNA を 0°C の水で回収し最終濃度 0.32 g/L となるように調製した。線量-損傷量の関係を遊離塩基量 (照射により核酸塩基 C,G,T,A が遊離する) から調べたところ, 概ね比例関係にあることを確認した。SVPD 法は 900 kGy について, 末端リン酸定量法は照射したすべてのサンプルで評価を行った。

3.2 ^{60}Co γ 線 (標準線源)

DNA サンプルは, 3.1 と同様に調製した。DNA を塗布したシリコンプレートは 2 次電子平衡を作るために 2.85 mm 厚のガラス管に真空封入した。線量 (線量率) は, 50 (0.69), 100 (1.39), 200 (2.78), 400 (5.56), 900 kGy (12.5 kGy/h) で行った。線量はアミノグレイ® のラジカル量測定によって決定した。照射試料の回収及び各種分析法については 3.1 に述べた通りである。

4. 結果と考察

表 1 は, SVPD 法と末端リン酸定量法を組み合わせで算出された, He 及び γ 線照射 DNA に生じた各種鎖切断末端 (図 5) の放射線化学収率である。独立実験

の回数が少なく誤差も大きいので現在のところ明確なデータ分析は難しいが考察を行ってみることにする。

表 1 $^4\text{He}^{2+}$ イオンビーム及び ^{60}Co γ 線照射によって乾燥系 DNA に生じた鎖切断の種類と収率

鎖切断末端の種類 †	収率 (Yield) (nmol/J, $\times 10^{-12}$ Gy ⁻¹ Da ⁻¹)		He / γ
	^{60}Co γ 線	$^4\text{He}^{2+}$ (~67 keV/ μm)	
3' p + 3' OH ⁽¹⁾	91 (16) *	212 (37)	2.3 (0.6)
3' OH ⁽²⁾	26 (3)	16 (5)	0.6 (0.3)
3' p ⁽³⁾	65 (16)	196 (37)	3.0 (0.9)
3' p + 5' p \approx 全鎖切断末端 ⁽⁴⁾	130 (11)	338 (24)	2.6 (0.3)
5' p ⁽⁵⁾	65 (19)	142 (37)	2.2 (0.9)
3' X ⁽⁶⁾	39 (19)	126 (37)	3.2 (1.8)

※: () 内の数値の標準偏差 (独立実験回数: 2回)。

†: (1), (2)はSVPD法より, (4)は末端リン酸定量法より直接算出。
(3) = (1) - (2), (5) = (4) - (3), (6) = (4) - (1)。

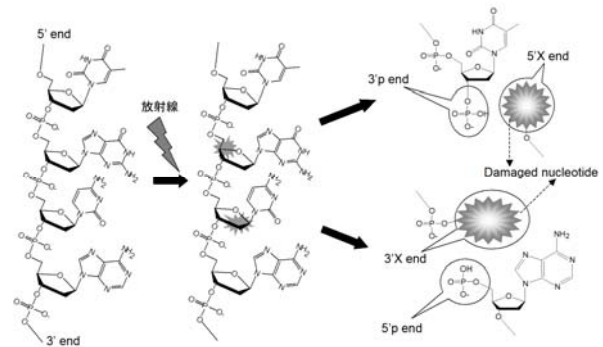


図 5 糖の放射線分解による DNA 切断末端の生成
表 1 脚注に示すように, 3' p 量は SVPD 法 (図 3), 5' p 量と 3' X 量は末端リン酸定量法 (図 4) と SVPD 法の組み合わせによって算出される。

まず, 乾燥 DNA- γ 線系の全鎖切断収率は 130 nmol/J 前後であるが, 従来の様々な研究によって得られた数値を総じてみると, 乾燥系高分子 DNA では 50 ~ 150 nmol/J の範囲 (平均 ~ 100 nmol/J) にある¹⁹⁾。筆者の, 高分子 DNA を用いた末端リン酸定量による結果と比較して矛盾はないといえる。

第 2 に, γ と He の収率比 (He/ γ) であるが, 全鎖切断収率や脱離塩基収率の比は 2.6 程度となっている。この値から判断すると, 「直接効果の場合, 高 LET 放射線では鎖切断等の損傷が効率よく起こる」といえるのである。実際 DNA 構成単位のひとつである 2-deoxyriboguanosine (dG) の放射線分解収率を, 10.6 MeV O⁷⁺, 及び 2 MeV 電子線と比較した実験では, 前者は後者のおよそ 3 倍の効率で分解され, dG からグアニン(G)の生成収率に関しては 4 倍近い収率となっている²⁰⁾。しかしながら, 閉環プラスミド法を用いた系では, 全鎖切断収率に相当する, ssb + 2 \times dsb 収率は特に He の方が有意に大きくはならない²¹⁾。実験条件や試料が異なるので厳密な比較はできないが, (i)

収率を求めるための線量範囲がかけ離れている（閉環プラスミド法は <10 kGy であるのに対し、筆者や dG の実験は、各々 <1 MGy, <10 MGy と、2~3 桁高い）、(ii) 原理的にカウントできない ssb（潜在的一本鎖切断：latent ssb）の割合が高 LET 放射線で大きくなる（図 1）、の 2 つの原因が考えられる。これらの疑問を解決することで、乾燥 DNA に対する損傷（直接効果）の線質依存性の一端が明らかになると期待できる。

第 3 に、3'OH 末端収率の He γ 比が、0.6 程度であり他の末端カテゴリの場合と比較して有意に小さくなっている。これは高 LET 放射線では、DNA の切断部位の 3'末端側に 3'OH 基が残りにくい（dR 部分が損傷している）、あるいは dR 部分が壊れずに残っていてもそれに N-glycoside 結合している塩基部分が損傷している、すなわち切断部位近傍に塩基損傷があるような、いわゆる「クラスター損傷」になっているかもしれない。また高 LET 放射線では dR に中性ラジカルが生成しやすいという報告²²⁾もあり、これら一連の情報からも線質間の違いがうかがえる。

5. まとめと展望

DNA の放射線化学変化と生物応答—その線質間の相違—が、筆者の最も知りたところであるが、放射線化学と生物学の狭間にある深淵を 2.3 で述べたような漸近的な手段で埋めていけるかどうか実際のところ半信半疑ではある。しかしながら、本稿で紹介したような、全く異なる分析法で得られた鎖切断収率同士を比較考察することで、鎖切断末端構造における高 LET 放射線の特性に加えて、新たな疑問（線量範囲の問題、各分析方法が根源的に持つ過大（小）評価の度合い等）が露見してきた。こういった、疑義→分析法開発→実験・考察→新たな疑義、というサイクルが効率よく回転し、新しい知見が得られることを期待したい。

謝辞 イオンビームライン調整及びメンテナンスにご協力いただきました、須郷 由美 博士、齋藤 勇一 博士、田口 光正 博士、宇野 定則 博士、小林 泰彦 博士（原子力機構）に深謝いたします。また、⁶⁰Co γ 線照射を行っていただきました、菊地 正博 博士（原子力機構）に感謝いたします。

参考文献

- 例) 安井 明, 花岡文雄, 田中亀代次編, *DNA 修復ネットワークとその破綻の分子機構*(共立出版, 2002) .
- J. Cadet, T. Douki, J. Ravanat, *Abstract Book of 13th International Congress of Radiation Research*, pp. 8 (2007).
- 例) D. T. Goodhead, *Int. J. Radiat. Biol.*, **65**, 7 (1994).
- T. J. Jenner, C. M. deLara, P. O'Neill, and D. L. Stevens, *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**, 265 (1993).
- C., von Sontag, Biological, *The Chemical Basis of Radiation Biology* (Taylor and Francis, London, 1987).
- 例) K. J. Bowman, R. L. Pla, Y. Guichard, P. B. Farmer, and G. D. Jonens, *Nucl. Acids Res.*, **29**, e101 (2001).
- P. Regulus, B. Duroux, P. Bayle, A. Favier, J. Cadet, and J. Ravanat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 14032 (2007).
- J. H. Miller, J. M. Nelson, M. Ye, C. E. Swenberg, J. M. Speicher, and C. J. Benham, *Int. J. Radiat. Biol.*, **59**, 941 (1991).
- K. K. K. Sharma, J. R. Milligan, and W. Bernhard, *Radiat. Res.*, **170**, 156 (2008).
- E. Bothe, G. A. Qureshi, and D. Schulte-Frohlinde, *Z. Naturforsch.*, **38c**, 1030 (1983).
- H. Ide, Y. W. Kow, B. X. Chen, B. F. Erlanger, and S. S. Wallace, *Cell Biol. Toxicol.*, **13**, 405 (1997).
- X. C. Le, J. Z. Xing, J. Lee, S. A. Leadon, and M. Weinfeld, *Science*, **280**, 1066 (1998).
- H. Ide, K. Akamatsu, Y. Kimura, K. Michiue, K. Makino, A. Asaeda, Y. Takamori, and K. Kubo, *Biochemistry*, **32**, 8276 (1993).
- S. Dhar, T. Kodama, and M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 8702 (2007).
- L. K. Mee, S. J. Adelstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2194 (1981).
- 例) W. K. Pogozelski and T. D. Tullius, *Chem. Rev.*, **98**, 1089 (1998).
- K. Akamatsu, *Anal. Biochem.*, **362**, 229 (2007).
- S. Tanaka, M. Fukuda, K. Nishimura, H. Watanabe, and N. Yamano, *JAERI-Data/Code 97-019*, Japan Atomic Energy Research Institute (1997).
- T. J. Jenner, C. M. deLara, P. O'Neill, and D. L. Stevens, *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**, 265 (1993).
- M. Gromova, E. Balanzat, B. Gervais, R. Nardin, and J. Cadet, *Int. J. Radiat. Biol.*, **74**, 81 (1998).
- A. Urushibara, N. Shikazono, P. O'Neill, K. Fujii, S. Wada, and A. Yokoya, *Int. J. Radiat. Biol.*, **84**, 23 (2008).
- D. Becker, Y. Razskazovskiy, M. U. Callaghan, and M. Sevilla, *Radiat. Res.*, **146**, 361 (1996).

<著者の略歴>

赤松 憲：京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科修士課程高分子学専攻修了(1994)，(株)日本ゼオン総合開発センター勤務を経て，京都大学大学院薬学研究科博士課程薬品作用制御システム専攻修了(1998)，薬学博士。日本原子力研究所博士研究員，科学技術振興事業団科学技術特別研究員等を経て，日本原子力研究所入所(2004)，現在に至る(2006.10より(独)日本原子力研究開発機構)。専門：放射線生命科学，薬学，趣味：クラシック音楽・古典芸能鑑賞，温泉旅行，読書，ピアノ(我流)，飲み会(?)。