

第 63 回放射線化学討論会
放射線誘発 DNA 損傷における含水率の影響：
2. 塩基損傷および AP 部位

東京大学

量子科学技術研究開発機構

Hao Yu*, 近藤 勇佑,
山下 真一
藤井 健太郎,
横谷 明徳

1 はじめに

放射線に誘発される DNA 変異の起点は、直接作用と間接作用に分類されることが多い (Fig. 1). 前者では DNA が直接イオン化または励起することで損傷が生じるのに対し、後者では水の放射線分解で生成した $\cdot\text{OH}$ (水酸化ラジカル) などの活性種との化学反応で DNA に損傷が生じる. 水を溶媒とした DNA 試料は、水の割合に依存して直接作用と間接作用の寄与の割合が変化するため、DNA を構成するヌクレオチドあたりの水分子数はこうした割合を見積もるための有効な指標の一つとなる. これが数から数十と低いと、水分子は DNA の表面に水和しており、その状態では DNA 損傷のほとんどが直接作用によって生じる. 一方、数千から数万と非常に大きくなると、ほぼすべての水分子はバルク中に存在し、DNA 損傷のほぼすべては間接作用によって生じる.

形成過程が直接作用か間接作用かにかかわらず、初期の DNA 損傷は化学回復 (化学的な還元反応による酸化的損傷の回復) や修復により元の状態に戻される. しかし、ごくわずかな割合ではあるものの、元の状態に戻せなかった初期の DNA 損傷は、いずれ DNA 上に

安定な変異となって定着する. 安定な DNA 変異としては鎖切断や塩基損傷があり、前者は二重らせん構造の外側にある主鎖 (糖-リン酸部位) の開裂の総称であり、後者は水素結合によりペアとなった塩基部位に形成される損傷の総称である.

塩基損傷は部位により細分化される. プリン塩基 (A, G) およびピリミジン塩基 (C, T) 上に形成された損傷をそれぞれプリン塩基損傷およびピリミジン塩基損傷といい、塩基が脱離した部位はまとめて AP 部位 (apurinic/aprimidinic site) という. これらの塩基損傷は塩基除去修復酵素や DNA ポリメラーゼのはたらきによって、その大部分が修復される. 塩基除去修復酵素は、その基質特異性に対応した特定の塩基損傷を識別し、*N*-グリコシラーゼ活性によってこれを切り離し、AP 部位を形成し、さらに AP リアーゼ活性によって AP 部位を切断して 1 ヌクレオチドの塩基欠損をとまう DNA の一本鎖切断 (single-strand break, SSB) を生成する. 塩基損傷が鎖切断に変換された後、DNA ポリメラーゼが相補鎖の塩基配列と対になる塩基のヌクレオチドを導入する. 塩基除去修復酵素を *in vitro* 実験で利用すれば、鎖切断と同じ手法で塩基損傷を定量できる¹⁻³⁾.

Yokoya ら⁴⁾ および Gulston ら⁵⁾ はともに大腸菌から抽出されたプラスミド DNA (pUC18) を利用し、塩基除去修復酵素を作用させることで、それぞれ直接作用と間接作用で生じた塩基損傷の収率を評価する手法を確立している. しかし、これらの研究では $\cdot\text{OH}$ や酸化性活性種との反応性が高い溶質 (Cl^- や Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane)) を含有する TE 緩衝液が用いられており、緩衝液による防護効果が内包

Influence of moisture contents on radiation damage to DNA: 2. Yields of base lesions and AP sites

Hao Yu*, Yusuke KONDO and Shinichi YAMASHITA (The University of Tokyo), Kentaro FUJII and Akinari YOKOYA (National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology),

〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1

TEL: 03-5841-2917, E-mail: yu@nuclear.jp

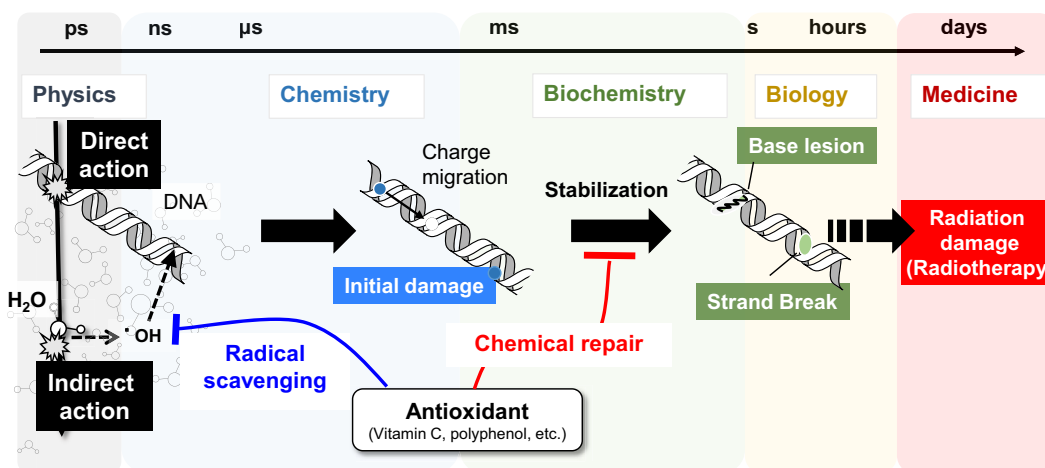


Figure 1. A schematic illustration of radiation-induced sequential events in a biological system.

されている。そこで、本研究では捕捉剤フリーな条件でX線照射した際に生成される塩基損傷の収率を調べた。また、先行研究^{4,5)}との比較から、TE緩衝液に含まれる溶質の防護効果についても検討した。

2 実験

捕捉剤を含まない高純度なDNAを得るためには、溶媒として用いる緩衝液の溶質だけでなく、用いる器具にも細心の注意を払う必要がある。使用するガラス器具は、強アルカリ性洗剤を含む水に入れて約80°Cに約1時間加熱した後、超純水ですすぎ、再び超純水中で同様に加熱し、最後に超純水で再度すすいだ。

先行研究^{4,5)}と同様に、2686 bpsの塩基対からなるプラスミドDNA、pUC18をDNA試料として使用した。大腸菌(HB 101株)を振とう培養して増殖させた後、市販のキットを用いて大腸菌からDNAを抽出した。リン酸緩衝液の溶質は $\cdot\text{OH}$ との反応性が低く、これをDNAの溶媒として用いた。抽出後のDNAに含まれる不純物は、分画分子量20,000程度の透析で除去した。DNAを希薄水溶液中でX線照射した際の一本鎖切断の収率を測定することで、透析による不純物除去の効果を確認した。その結果、SSB収率は1-2日程度の透析で数倍に上がり、5-7日程度で飽和した。透析後のDNAはリン酸緩衝液中で保存した。

直接作用と間接作用の寄与を分離して評価するために、DNA試料としてそれぞれフィルムと希薄水溶液を用いた。フィルム試料は、透析後のDNAを保管しているリン酸緩衝液をガラス基板上に滴下し、乾燥さ

せて薄膜として準備した。フィルム試料はNaOH水溶液を入れた小容器とともに照射容器内に入れて密閉した。NaOH水溶液の吸湿作用によって試料周囲の相対湿度が制御され、これによりフィルム中のDNAの水和水量を制御した。今回は3.84 MのNaOH水溶液を用いて相対湿度を97%に維持することで、ほぼ完全に水和した状態のDNAを準備した。一方、希薄水溶液試料は、透析後のDNAを保管しているリン酸緩衝液に、さらにリン酸緩衝液を入れて希釈することで準備した。なお、ヌクレオチドあたりの水分子数はフィルム試料と希薄水溶液試料でそれぞれ8-35と72,000-360,000である。

DNA試料はX線照射装置(管電圧160 kV, 管電流3.0 mA)により空气中で照射した。X線管からDNA試料までの距離で決まる線量率は、電離箱で測定した結果、0.35 Gy/min-2.3 Gy/minであった。照射後、フィルム状試料はTE緩衝液に溶解して回収した。

塩基除去修復酵素としては、それぞれピリミジン塩基⁶⁾およびプリン塩基⁷⁾を認識できるNth (Endonuclease III) およびFpg (formamidopyrimidine-DNA glycosylase)を用いた。これらの酵素は、一部のAP部位を認識、除去する。照射後のDNA試料をNthまたはFpgで処理することで、塩基損傷およびAP部位の一部を鎖切断に変換した。

損傷の生じていないpUC18は閉環状(supercoiled, 以下SCと表記)であるが、SSBや二本鎖切断(double-strand break, DSB)が生じると、それぞれ開環状(open circular, 以下OCと表記)と直線状(linear, 以下LIN

と表記) へと大きく高次構造が変わる。アガロースゲルにアプライした後、電圧をかけて電気泳動すると、それぞれの高次構造に応じたバンドへ分離される。分離後、臭化エチジウム (ethidium bromide) により蛍光染色し、紫外光で励起して蛍光画像を取得することにより、それぞれのバンドの蛍光強度から対応する高次構造の DNA の割合を定量した。

損傷の生じていない pUC18 の割合 (SC%) は、一般的に線量増加にともなって指数関数的に減少する。標的理論によると、SC% が 37% まで低下した段階で、pUC18 に平均して 1 個の SSB が形成されることになる。その時の吸収線量を D_{37} と表し、 D_{37} から SSB 収率 $n(\text{SSB})$ SSBs/Gy/Da が以下の式により計算できる。

$$n(\text{SSB}) = \frac{1}{M_w D_{37}}$$

ここで、 M_w は pUC18 の分子質量で約 1.65×10^6 g/mol となる。

DSB が生じた pUC18 の割合 (LIN%) は、低線量域において吸収線量に対して比例しているとみなせる。DSB 収率を評価するために、以下の式でフィッティングした。

$$\text{LIN}\% = 100(aD + b)$$

ここで、 D Gy は吸収線量、 a Gy⁻¹ と b はそれぞれフィット直線の傾きと切片である。この直線を高線量側に外挿して LIN% が 100% に達する吸収線量を D_{DSB} Gy と表すと、これは pUC18 に平均して 1 個の DSB が形成される吸収線量となる。切片 b は微小なため無視すると、 D_{DSB} Gy は次式で求められる。

$$D_{\text{DSB}} = \frac{1}{a}$$

DSB 収率 $n(\text{DSB})$ DSBs/Gy/Da は次式で求められる。

$$n(\text{DSB}) = \frac{1}{M_w D_{\text{DSB}}}$$

塩基損傷は塩基除去修復酵素による処理で SSB へと変換したため、それぞれの塩基除去修復酵素に認識される塩基損傷の収率 $n(\text{SSB})_{\text{base lesion}}$ は、以下の式で求められる。

$$n(\text{SSB})_{\text{base lesion}} = n(\text{SSB})_{\text{enzyme}} - n(\text{SSB})$$

なお、 $n(\text{SSB})_{\text{enzyme}}$ と $n(\text{SSB})$ はそれぞれ塩基除去修復酵素による処理をしたときとしなかったときの SSB 収率である。

3 結果と議論

塩基損傷に対する識別効率は塩基除去修復酵素の添加濃度に依存するため、最適な酵素添加濃度を検討した。DNA 1 μg あたり 0.01 unit–10 unit の範囲で酵素を添加し、SSB 収率の変化を調べた (1 unit とは、10 pmol の 8-オキソグアニン塩基 (8-oxo-Gua) もしくはウラシル残基由来の AP 部位を切断するのに必要な酵素量、メーカーの取扱説明書による)。添加濃度の増加にともない SSB として検出される塩基損傷の収率が増え、最終的には飽和にいたった。Nth および Fpg のいずれも至適濃度として、1 μg の DNA に対して 1 unit 以上の酵素が必要とわかった。

損傷の生じていない DNA の割合が、照射にともなって減る様子を Fig. 2 に示す。この片対数グラフの傾きの大きさ ($1/D_{37}$) は SSB 収率、 $n(\text{SSB})$ SSBs/Gy/Da であり、塩基除去修復酵素での処理によって SSB 収率が増えていることがわかる。この処理の有無での差分が各酵素に認識された塩基損傷に対応している。

Fpg に認識された塩基損傷の収率は、ヌクレオチドあたりの水分子数が増えることで増加した (Fig. 3)。Nth による処理でも同様に増加することが確認された。フィルム試料と比べ、希薄水溶液試料の塩基損傷収率は数百倍であった。希薄水溶液中では DNA に対して水が大量に存在するため、 $\cdot\text{OH}$ の量も多く、DNA 損傷の収率も高くなっている。試料の溶媒として TE 緩衝液を用いた研究⁴⁾では、塩基損傷収率は本研究の 1/5–1/8 程度であった。このことから、TE 緩衝液の溶質が大きな防護効果をもつことが確認できた。

塩基損傷収率の SSB 収率に対する比は、本研究では

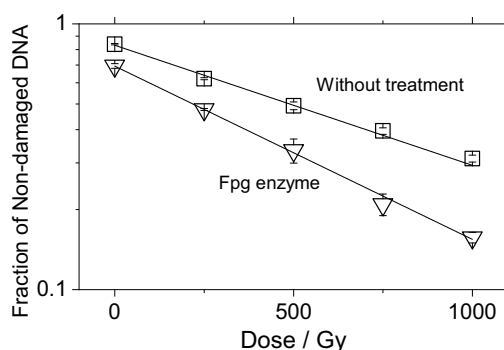


Figure 2. The fraction of non-damage plasmid DNA (pUC18) as a function of absorbed dose.

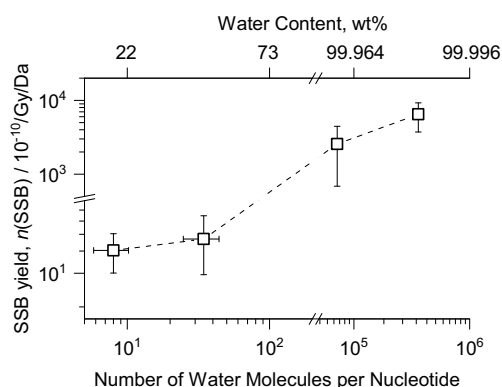


Figure 3. The variation of SSB yield produced on enzymatic treatment (Fpg) as a function of water content of DNA sample.

0.5–1.0 程度であった。一方、TE 緩衝液で行われた研究⁴⁾では 1.6–2.4 倍程度であった。これは、TE 緩衝液の溶質による防護作用は、塩基損傷より鎖切断に対してより効果的であることを示唆している。また、本研究ではプリン塩基損傷の方がピリミジン塩基より高い収率になる傾向 (Fpg>Nth) があり、ほぼ同一条件での報告⁹⁾とも一致した傾向であった。一方、TE 緩衝液で行われた研究^{4,5)}では、収率が逆転しており、プリン塩基損傷の方がピリミジン塩基より低い収率になる傾向 (Fpg<Nth) があった。TE 緩衝液はプリン塩基損傷を選択的に防護することが示唆される。抗酸化剤の種類によって防護の選択性に違いがみられる可能性もある。今後は様々な抗酸化剤を添加剤フリーの DNA 試料に添加して同様の検討を進め、分子構造による防

護の選択性を明らかにしていく予定である。

〈謝 辞〉

本研究の一部は JSPS 科研費基盤研究 A (18H03891, 19H00880) の助成を受けている。DNA 精製は平嶋 敬志朗氏 (茨城大, 量研), DNA 試料の高純度化には端邦樹博士 (原子力機構) の協力や助言をいただきました。お礼を申し上げます。

〈参 考 文 献〉

- 1) K. M. Prise, M. Folkard, H. C. Newman, B. D. Michael, *Int. J. Radiat. Biol.* 66 (1994) 537.
- 2) B. M. Sutherland, P. V Bennett, O. Sidorkina, J. Laval, *Biochemistry* 39 (2000) 8026.
- 3) B. M. Sutherland, P. V. Bennett, O. Sidorkina, J. Laval, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 103.
- 4) A. Yokoya, S. M. T. Cunniffe, P. O'Neill, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 8859.
- 5) M. Gulston, J. Fulford, T. Jenner, C. de Lara, P. O'Neill, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 3464.
- 6) Y. W. Know, S. S. Wallace, *Biochemistry* 26 (1987) 8200.
- 7) G. K. Kuipers, M. V. M. Lafleur, *Int. J. Radiat. Biol.* 74 (1998) 511.
- 8) P. S. Hodgkins, M. P. Fairman, P. O'Neill, *Radiat. Res.* 145 (1996) 24.
- 9) K. Hata, A. Urushibara, S. Yamashita, M. Lin, Y. Muroya, N. Shikazono, A. Yokoya, H. Fu, Y. Katsumura, *J. Radiat. Res.* 56 (2015) 59.