

放射線照射によって生じた DNA 損傷の構造解析と修復速度

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 量子生命科学研究所
中野 敏彰*, 赤松 憲, 鹿園 直哉

Radiation-induced locally multiply damaged site in DNA (clustered DNA damage) is thought to be closely related to the biological effects of radiation. A method has been established to evaluate the complexity of clustered DNA damage in genomic DNA extracted from TK6 cells irradiated with a low-dose ionizing radiation. This was achieved by isolating and concentrating the DNA molecules with lesions from the whole irradiated DNA molecules also containing intact ones, and subsequently visualizing lesions by atomic force microscopy (AFM). The purpose of this study is to estimate the level of damage clustering *in vivo*. We found that ionizing radiation produced clustered DNA damage in TK6 cells, whereas hydroperoxide treatment did not, highlighting the importance of clustered DNA damage as a signature of ionizing radiation. We further observed that Fe-ion beams (high-LET radiation) produced various types of clustered DNA damage with higher complexity consisting of more than 2 lesions, which were quite few in the case of X-rays. Surprisingly, analyses of repair of DNA damage revealed that non-DSB clustered DNA damage were repaired efficiently in TK6 cells after irradiation of either X-rays and Fe-ion beams. The repair efficiency of complex DSBs, which were frequently produced after Fe-ion beams, were low.

Keywords: DNA Repair, clustered DNA damage, complex DSBs, atomic force microscopy (AFM)

Structural analysis and repair kinetics of radiation-induced DNA damage
Toshiaki NAKANO*, Ken AKAMATSU and Naoya SHIKAZONO (*National Institutes for Quantum Science and Technology (QST)*),
〒619-0215 京都府木津川市梅美台 8 丁目 1-7
TEL: 0774-80-3787, E-mail: nakano.toshiaki@qst.go.jp

1 はじめに

放射線は、DNA 損傷を引き起こし、その量は放射線の種類によって異なる。これらの染色体 DNA の損傷は、細胞死、突然変異、癌などの生物学的影響をもたらす可能性がある。誘発される DNA 損傷には、塩基損傷、脱塩基 (AP) 部位、一本鎖切断 (SSB)、二本鎖切断 (DSB)、DNA-蛋白質架橋 (DPC) などが含まれる。特に、細胞内で過酸化水素を用いたフェントン反応によって生じる酸化的 DNA 損傷や、内因性の DNA 損傷は、電離放射線による損傷と化学的にはほぼ同一であることが知られている^{1,2)}。しかし、放射線と過酸化水素による損傷の種類や総量に大きな差異がない場合でも、その生物学的效果は著しく異なる³⁾。これらの観察結果から、電離放射線の特徴は DNA 損傷のクラスター化であり、一方、内因性および化学物質による DNA 損傷は主に孤立した損傷であると考えられている。一方、クラスター化された DNA 損傷（クラスター DNA 損傷）は修復が困難であり、電離放射線の有害な影響の主な要因であると推測してきた⁴⁾。

これまでの試験管内の研究は、化学的に合成された DNA 損傷を用いて、クラスター DNA 損傷は修復が困難であることを明らかにしてきた。修復の効率は、損傷間の距離の広がり、損傷の種類、クラスター内の損傷数に依存する。また、損傷の種類によっては、損傷の除去機構の違いが存在する可能性もある。修復が困難なクラスター損傷による立体的な障害は、複製抑制や突然変異誘発などの細胞にとって重大な影響をもたらすことが考えられる。

塩基損傷、AP 部位、SSB、DSB、DPC などの電離放射線で誘発される代表的な DNA 損傷を定量的に測定する方法は既に開発されている。しかしながら、従来の手法では DNA 損傷の空間配置を調べることができず、クラスター化された DNA 損傷を測定することはできなかった。そこで、筆者らはまず、クラスター化された DNA 損傷を直接的に可視化する手法を確立した^{5,6)}。次に、その手法を用いて過酸化水素や放射線照

射によって生じる DNA 損傷を定量することで、クラスター DNA 損傷の誘発の有無や修復速度を測定した。

2 細胞内 DNA 損傷の可視化の方法

DNA 損傷の可視化には DNA 損傷そのままで DNA との違いが小さいため、顕微鏡で観察することができない。そこで、DNA 損傷の位置に目印を結合させることで損傷の位置の指標とした。方法は、まず、DNA 損傷部位を DNA グリコシラーゼによって脱塩基部位 (AP site) に置換した。次に、AP site に特異的に結合するビオチンを有するアルデヒドリアクティブプローブ (ARP)，さらにアビジン (53kDa) を結合させ、原子間力顕微鏡 (AFM) で観察可能なサイズと

した。この方法を用いて DNA 損傷を可視化し、放射線照射によりプラスミド DNA に生じた孤立 DNA 損傷やクラスター DNA 損傷、高複雑度 DSB、高密度クラスター損傷が生成されることを示した^{5,6)}。

細胞内での DNA 損傷解析においては、照射された細胞からゲノム DNA を単離し、数千塩基対 (bp) サイズに切断した後、損傷部位をビオチン/アビジン標識し、AFM で観察する必要がある。しかし、細胞の照射に用いる線量は低いため、損傷を含まない DNA 断片の割合が非常に高くなり、損傷の AFM 観察が極めて煩雑かつ困難となる。そこで、損傷を含む DNA を選択的に濃縮する方法を確立した。具体的には、ビオチン標識された損傷を含む DNA をストレプトアビジン磁気ビーズと結合させ精製することで、損傷のない

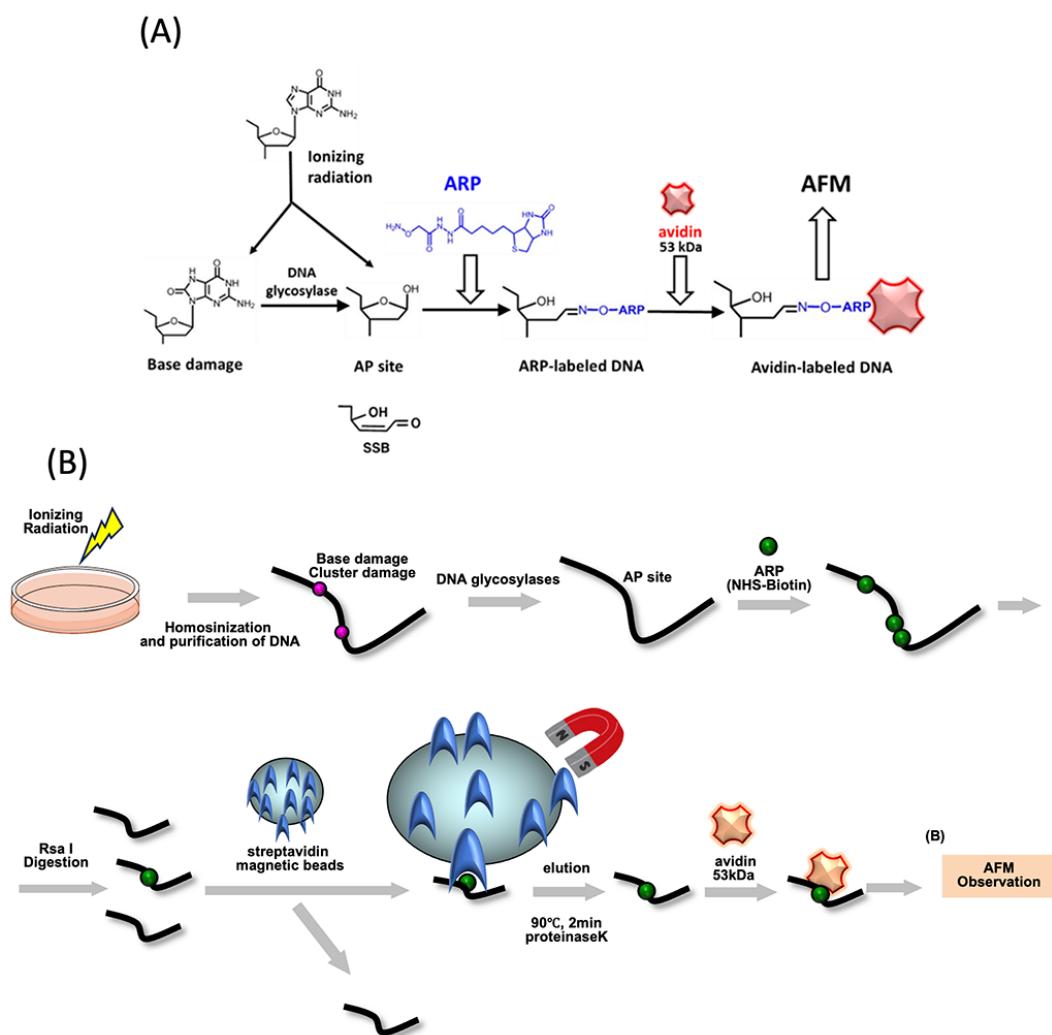


Figure 1. Outline of the experiment.

free DNA を除去し、損傷を持つ DNA 断片のみを選択的に回収する方法を確立した (Fig. 1)。この方法により、細胞内の DNA 損傷のタイプを分類し、線エネルギー付与 (LET) の異なる放射線によって生じる DNA 損傷誘発頻度の違いを調べ、さらに各 DNA 損傷の修復速度を評価することを可能とした。

3 実験手順

3.1 過酸化水素、X線、鉄イオンビームによるDNA損傷

TK6 培養細胞（ヒトリンパ細胞）に対し、過酸化水素を 30 分、0 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM 处理し、X 線および鉄イオンビームを 0 Gy, 20 Gy, 40 Gy, 60 Gy 照射した。照射後、DNA を精製し、ビオチン標識したクラスター DNA 損傷を AFM で観察し、損傷頻度（損傷/Mbp）とクラスター DNA 損傷内の損傷数を求めた。

3.2 放射線によって生じた DNA 損傷の修復機構の解明

X 線および Fe イオンビームで照射 (40 Gy) を行い、照射後 0 時間、1 時間、6 時間、18 時間の時間点で DNA を回収した。各時間点におけるクラスター DNA 損傷頻度（損傷/Mbp）とクラスター DNA 損傷内の損傷数、および孤立損傷頻度（損傷/Mbp）を AFM 観察により求めた。

4 研究結果と解析結果

4.1 過酸化水素、X線、鉄イオンビームによる損傷の定量

AFM 解析の結果、磁気ビーズにより精製された DNA 中には、孤立塩基損傷、シンプルクラスター損傷（塩基損傷を 2 つ含むクラスター）、高密度クラスター損傷（塩基損傷を 3 つ以上含むクラスター）および高複雑度 DSB (DSB+ 塩基損傷) が含まれていることが明らかになった (Fig. 2)⁷。DNA 精製の回収率が約 30 % であるため、これらの損傷を考慮に入れて全体の DNA 量を算出した。定量結果を Fig. 3 に示す。

過酸化水素で生じるフェントン反応においては、塩基損傷の割合が 90 %、高複雑度 (DSB + 塩基損傷) の割合が約 8 % であった。これらの DNA 損傷割合は、過酸化水素濃度が 0.25 から 1 mM の範囲で変化が見られなかった。ただし、塩基損傷の数は過酸化水素濃度が高くなるにつれて増加した。一方、X 線照射された TK6 細胞では、孤立塩基損傷、シンプルクラスター

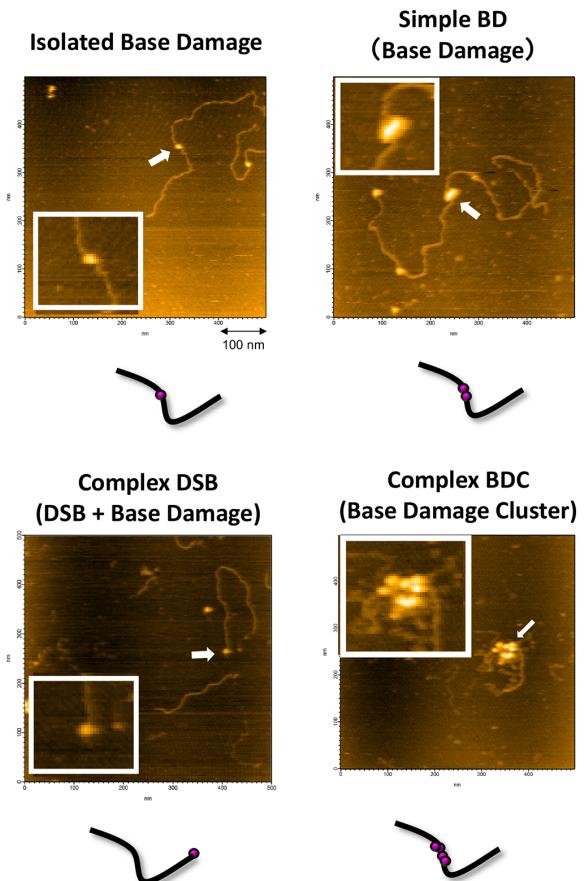


Figure 2. AFM images of genomic DNA damage in irradiated TK6 cells.

損傷および高複雑度 DSB (DSB + 塩基損傷) の割合がそれぞれ 83.5 %, 12.2 %, 5.3 % となった。各 DNA 損傷の割合は X 線照射量が増加してもほとんど変化しなかった。鉄イオンビーム照射では、孤立塩基損傷 (60.3 %), シンプルクラスター損傷 (20.2 %), 高密度クラスター損傷 (4.8 %), 高複雑度 DSB (5.3 %) であった。鉄イオンビームは過酸化水素や X 線処理よりも多様なタイプのクラスター DNA 損傷を生成することがわかった。X 線や鉄イオンビームなどの電離放射線では多くのクラスター DNA 損傷を生じる一方、フェントン反応ではほとんど生じない。この結果は、電離放射線の生物効果を理解する上でのクラスター DNA 損傷の重要性を実験的に示したものである。孤立塩基損傷とクラスター DNA 損傷の比率は、鉄イオンビームでは 11.0:1.0, X 線では 2.1:1.0 であった。鉄イオンビームは、低 LET の X 線よりも多くのクラスター DNA 損傷を生成することが示された。

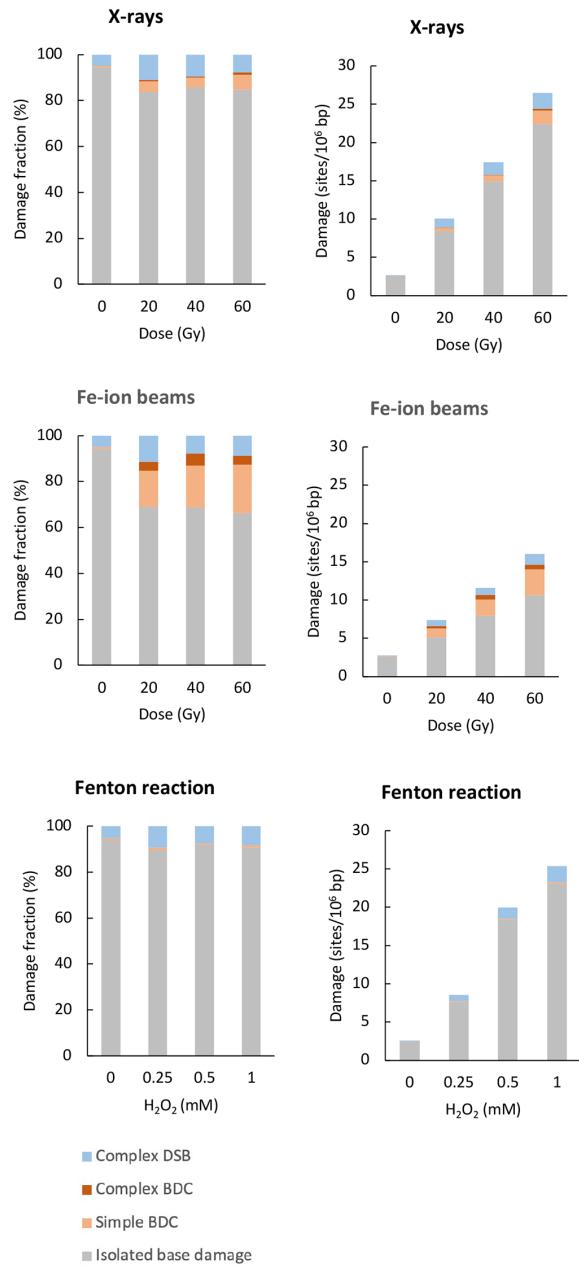


Figure 3. The spectra (left) and yields (right) of DNA damages in treated TK6 cells.

4.2 X線と鉄イオンビームによるDNA損傷の修復

電離放射線照射後、一定時間の培養を行い、生じたDNA損傷の修復速度を観察した (Fig. 4)。X線40 Gy照射後1時間では孤立塩基損傷が修復され、6時間後には20%以下まで減少した。照射後18時間では、わずかに孤立塩基損傷は残存するが、損傷数はX線処理前とほぼ同等であった。一方、クラスターDNA損傷

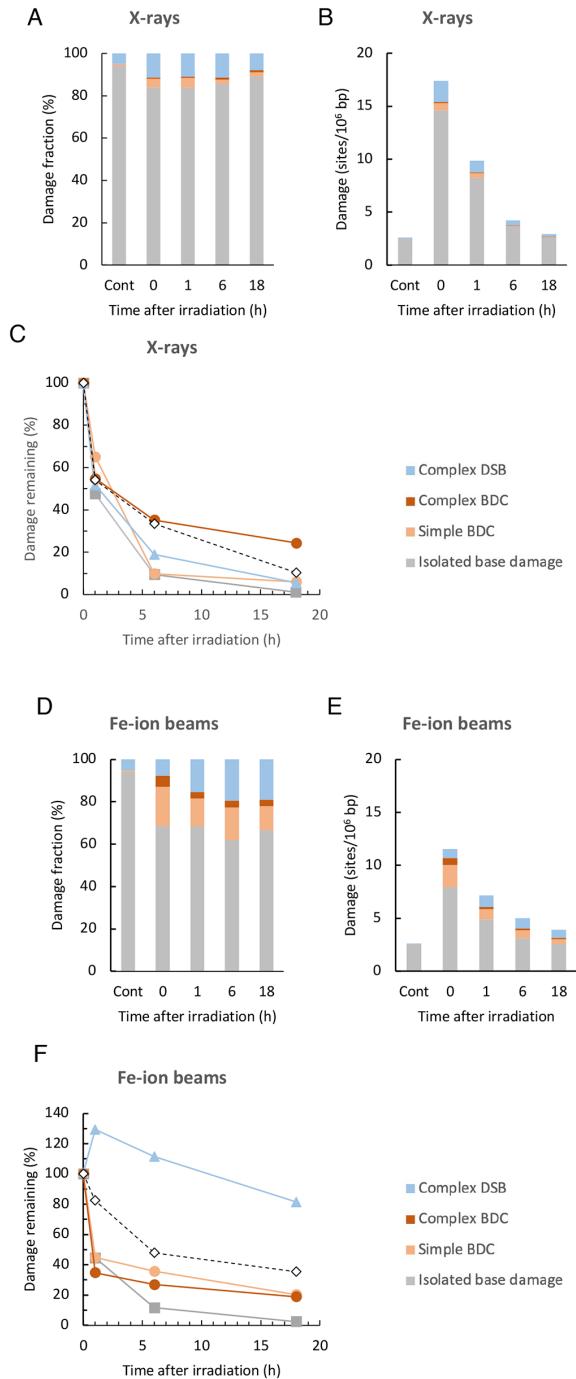


Figure 4. Repair rate of Fe ion beam-induced DNA damages.

は孤立塩基損傷と同程度の割合で修復された。また、高複雑度DSBも、塩基損傷とほぼ同じ割合で修復された。電気泳動で調べた全てのタイプを含むDSBは、6時間までに急速に修復が進み、その後はゆっくりと

したペースで修復が続いた。

40 Gy 鉄イオンビームの場合、照射後 1 時間で半数以上の孤立塩基損傷が修復され、6 時間後には 20 % 以下に減少した。同様に、シンプルクラスター損傷や高密度クラスター損傷も孤立塩基損傷と同程度の速度で修復された。高複雑度 DSB は、1 時間後にわずかに増加し、その後はゆっくりとした速度で修復が進行した。電気泳動検出 DSB では、6 時間後までに迅速に修復が進み、その後は徐々に修復が見られた。修復途中での高複雑度 DSB の増加は、シンプルクラスター損傷や高密度クラスター損傷内の塩基損傷が塩基除去修復機構によって修復される際に生じる DNA 切断が DSB を引き起こしたため生じたと考えられる。鉄イオンビーム照射 18 時間後では、孤立塩基損傷とシンプルクラスター損傷や高密度クラスター損傷の大半が修復されるが、高複雑度 DSB は約 50 % が修復されず残ることが示された。

5 まとめと考察

筆者らは、AFM を用いて、損傷した細胞内 DNA を選択的に濃縮し、生体内における DNA 損傷の種類別定量法を確立した。この方法を用いて解析した結果、X 線や鉄イオンビームなどの電離放射線が生体内で様々なタイプのクラスター DNA 損傷を引き起こすことが明らかになった。一方で、フェントン試薬による処理ではクラスター DNA 損傷はほとんど生じなかつた。さらに、高 LET の鉄イオンビーム照射は X 線よりも頻繁にクラスター DNA 損傷を誘発するだけでなく、その複雑性も X 線より高くなることが明らかになった。また、鎖切断を伴わないクラスター DNA 損傷（シンプルクラスター損傷や高密度クラスター損傷）は効率的に修復される一方で、DSB を伴う高複雑度 DSB (DSB + 塩基) は特に高 LET の鉄イオン照射後に長期間生体内に存在し続けることが示された。クラスター DNA 損傷の定量を可能にし、修復効率を明らかにした本研究の結果は、電離放射線の生物学的影響を理解する上で極めて重要である。本研究により、放射線治療や化学療法による腫瘍治療、および正常細胞の発がんリスクに関連するクラスター損傷の生物学的影響を評価するための重要な進展がもたらされると考えられる。

〈謝 辞〉

本研究を進行するにあたり、広島大学大学院理学研究科 井出 博名誉教授、量子科学技術研究開発機構 玉田 太郎博士、廣本 武史博士、平山 亮一博士にご協力いただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

〈参考文献〉

- 1) J. F. Ward, *Prog. Nucl. Res. Molec. Biol.*, 35 (1988) 95.
- 2) C. von Sonntag, *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair, A Chemical Perspective*, Springer-Verlag, 2006.
- 3) S. S. Wallace, *Free Radic. Biol. Med.*, 33 (2002) 1.
- 4) J. F. Ward, *Int. J. Radiat. Biol.*, 66 (1994) 427.
- 5) X. Xu, T. Nakano, M. Tsuda, R. Kanamoto, R. Hirayama, A. Uzawa, H. Ide, *Nucleic Acids Res.*, 48 (2019) e18.
- 6) Y. Matsuya, T. Nakano, T. Kai, N. Shikazono, K. Akamatsu, Y. Yoshii, T. Sato, *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (2020) 1701.
- 7) T. Nakano, K. Akamatsu, M. Tsuda, A. Tujimoto, R. Hirayama, T. Hiromoto, T. Tamada, H. Ide, N. Shikazono, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 119 (2022) e2119132119.

〈著者略歴〉

中野 敏彰：広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻 博士課程修了（博士（理学）），日本学術振興会特別研究員，広島大学助教，バーモント大学客員研究員を経て、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構（主幹研究員），現在にいたる。

赤松 憲：京都工芸繊維大学高分子学科高分子化学専攻，同大学院高分子学専攻修士課程修了，京都大学大学院薬学研究科薬品作用制御システム専攻博士課程修了（薬学博士）。特殊法人日本原子力研究所博士研究員，JSPS 科学技術特別研究員，日本原子力研究開発機構職員，国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構（チームリーダー），現在にいたる。

鹿園 直哉：東京大学農学研究科農業生物学専攻 博士課程修了（博士（農学）），特殊法人日本原子力研究所研究員，英国 MRC 研究所客員研究員，特殊法人日本原子力研究所研究副主幹，特殊法人日本原子力研究所研究主幹を経て、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構（上席研究員），現在にいたる。