

# 放射線が誘発する高密度 DNA 損傷の解析

所属：広島大学大学院 理学研究科 数理分子生命理学専攻

助成対象者：中野敏彰

## 概要

放射線は飛跡に沿って分子を電離することから、照射された細胞では、飛跡と重なる DNA 部位に高密度な損傷（クラスター損傷）が生じと考えられている。しかし、計算機シミュレーションを用いた理論研究ではクラスター損傷の形成が予想されているが、実験的に高密度損傷の存在を実証した研究はなかった。そこで申請者は、本研究で AFM による DNA 損傷の可視化分析技術を発展的に展開することにより、放射線による高密度損傷の生成を実験的に証明するため、原子間力顕微鏡（AFM）を用いクラスター損傷を個別に可視化・検出方法を確立した。その結果、放射線で生じた損傷は一箇所に損傷が固まっていることを実験で初めて明らかにした。

## Abstract

Ionizing radiation causes dense ionization along its track. Therefore, when Ionizing radiation hits DNA, it generates a clustered DNA damage site along the track. Isolated DNA damage is also formed away from the radiation track. However, the information on the structural complexity, repair ability, and biological consequences of clustered DNA damage remains very limited, since there is a lack of an experimental method to analyze the extent of the structural complexity associated with clustered DNA damage. So to prove with this problem, we make the methods to see the number of cluster damaged by atomic force microscopy(AFM). From these results, it was revealed that the X-ray radiated DNA damage were made in one place.

## 研究内容

研究成果を記述ください。

適宜、「背景」「目的」「結果」「今後」等の段落分けして頂いて結構です。

図表を使って頂いても結構です。

### 「背景」

放射線は飛跡に沿って分子を電離し、その電離密度は、単位長さ当りに与えるエネルギー量（線エネルギー付与：LET）が高い放射線ほど高くなる。また、放射線の生物効果として、LETが高い放射線ほど細胞致死効果が高くなる。この性質を利用して、高LET放射線（重粒子線）を用いたがんの放射線治療が日本を含め世界各国で始まっている。しかし、高LET放射線がX線やγ線などの低LET放射線に比べ高い生物効果を示す分子機構は解明されていない。現在の仮説としては、放射線照射された細胞では、飛跡と重なるDNA部位に高密度な損傷が生じと考えられている。この場合、損傷密度が高くなると、修復が起こりにくくなったり、誤修復が起こりやすくなるため、細胞死がより高頻度で起こると考えられている。しかし、計算機シミュレーションを用いた理論研究ではクラスター損傷の形成が予想されているが、実験的に高密度損傷の存在を実証した研究はなかった。

### 「目的」

申請者は、原子間力顕微鏡（AFM）を用いクラスター損傷を個別に可視化・検出方法を確立し、放射線を照射したプラスミドに生じた損傷の解析を行った。本研究では、AFMによるDNA損傷の可視化分析技術を発展的に展開することにより、放射線を照射した細胞や腫瘍中のDNAに生じるクラスターの損傷密度の関連ならびに生物影響を明らかにする。

### 損傷可視化の原理

放射線照射したDNAには、損傷塩基、脱塩基部位、DNA鎖切断が離散損傷及びクラスター損傷として生じる（図1A）。本研究では、まず、これらの部位を、ビオチンを含むAldehyde Reactive Probe (ARP)で網羅的に標識する（図1B）。ARPはアルデヒド基(CHO)と選択的に反応する市販プローブ分子で、脱塩基部位及び鎖切断末端に含まれるアルデヒド

ド基を直接標識する (図 1 C)。損傷塩基はアルデヒド基を含まないことから、DNA グリコシラーゼ (Endo III+ OGG1) 処理により脱塩基部位に変換してから、ARP で標識する (図 1 C)。Endo III 及び OGG1 は、それぞれピリミジン及びプリン酸化損傷を DNA から切除し脱塩基部位を生じる DNA 修復酵素である。次に, ARP 標識 DNA をアビジン (53 kDa) とインキュベートし損傷部位をアビジン標識することにより、可視化可能なサイズに変換する (図 1 C)。遊離のアビジンはスピнкаラムで除去する。マイカ基板に DNA を滴下し吸着させ、水溶液状態で AFM 観察を行う。

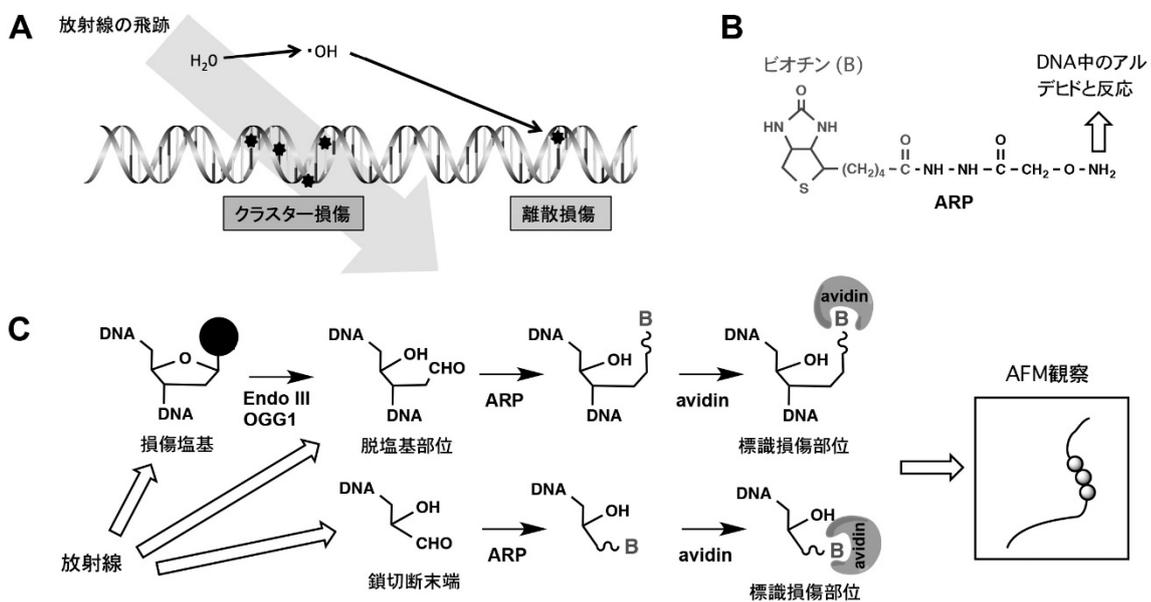


図 1 (A)クラスター損傷と離散損傷, (B)ARP の構造と反応性, (C)DNA 損傷の標識と可視化スキーム

「結果」

申請者はクラスター損傷を観測するため、以下に述べた塩基損傷を脱塩基部位に置換し ARP およびビオチン抗体を結合させ AFM で可視化する方法を開発した (図 1)。この方法で、放射線照射 (X-ray) したプラスミド (PUC19) に生じたクラスターダメージの総数を解析した。コントロールとして薬剤 (過酸化水素 + 鉄) を用いフェントン反応で処理したプラスミドも同時に観測した。その結果、コントロールとして用いたフェントン反応で生じた単一損傷とクラスターダメージの割合は 143:1 であったのに対し、X-ray によって生じた単一損傷とクラスターダメージの割合は約 5:1 であった (図 2)。このことから、放射線で生じ

た損傷は一箇所に損傷が固まっていることを実験で初めて明らかにした

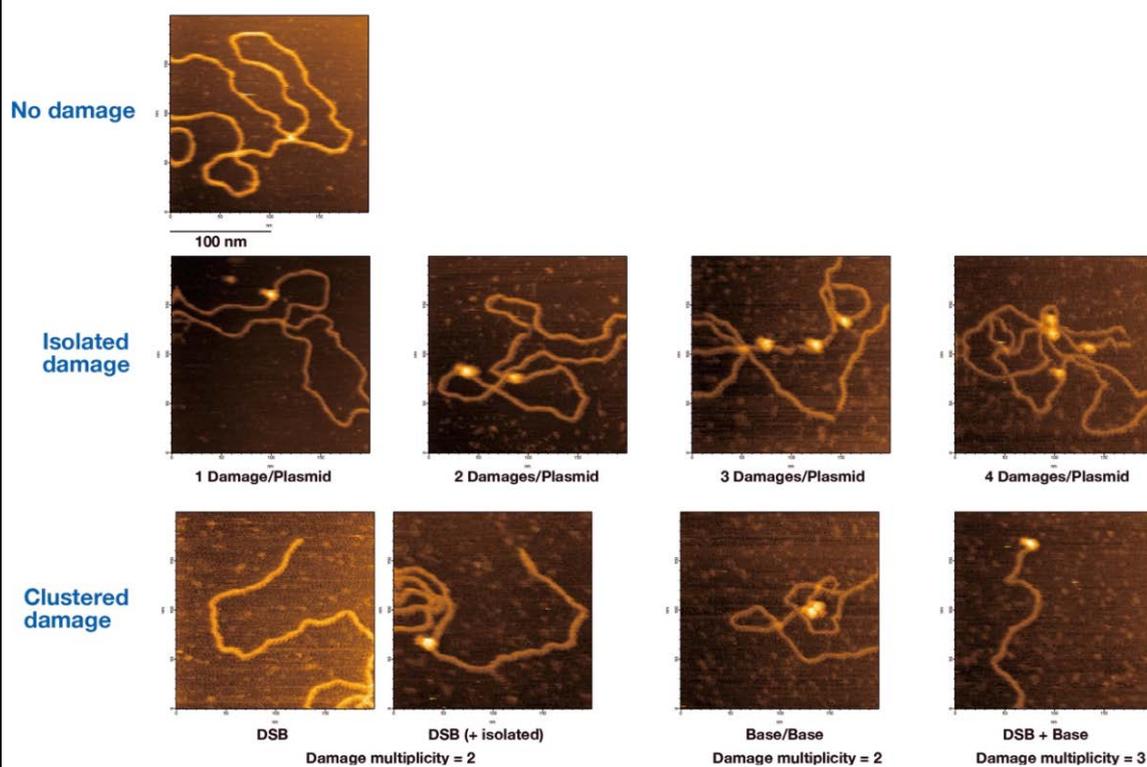


図2 X-ray 照射した PUC19 プラスミドの AFM 観察画像

線状;DNA、明るく円状;脱塩基部位に結合したアビジンの位置(損傷部位)

「今後」

本研究で、AFM による DNA 損傷の可視化分析技術を確立した。これを発展させ、放射線を照射した細胞や腫瘍中の DNA に生じるクラスターの損傷密度の関連ならびに生物影響を明らかにすることを目的とする。

引用文献

本助成に関わる成果物

[論文発表]

現在投稿準備中

[口頭発表]論文投稿後発表予定

[ポスター発表]論文投稿後発表予定

[その他]