

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	Xu Xu
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
Analysis of Radiation-Induced Clustered DNA Damage by Atomic Force Microscopy (原子間力顕微鏡を用いた放射線誘発クラスターDNA 損傷の解析)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	井出 博	
審査委員	教 授	山本 卓	
審査委員	教 授	坂本 敦	
〔論文審査の要旨〕			
<p>放射線は、生物の致死および突然変異を誘発する。その原因は、遺伝情報を担う DNA の損傷であり、損傷としては塩基損傷、脱塩基部位、DNA 一本鎖切断 (SSB)、DNA 二本鎖切断 (DSB) などが同定されている。放射線は飛跡に沿って分子を電離・励起することから、飛跡に沿った DNA 部位には局所的な多重損傷が生じ、飛跡から離れた部位には孤立損傷が生じると考えられている。DNA 二重らせん数ターン (10~20 bp) の中に複数の損傷を含む部位は、クラスターDNA 損傷とよばれる。クラスターDNA 損傷は近接した損傷の影響のため修復されにくく、その生成量およびクラスターDNA 損傷内に含まれる損傷の数 (損傷多重度) は、放射線の生物影響に密接に関係していると考えられている。</p> <p>DSB は近接した 2 つの SSB を相補鎖に含み、最も単純なクラスターDNA 損傷である。DSB は DNA の鎖長変化を引き起こすことから、電気泳動により検出可能である。さらに、近接した 2 つの塩基損傷あるいは塩基損傷と SSB を相補鎖に含むクラスターDNA 損傷も DNA グリコシラーゼ処理により DSB に変換し検出可能であることが示された。以上のように、損傷多重度が 2 の単純なクラスターDNA 損傷は、実験的に検出可能となった。しかし、この方法では、さらに高い損傷多重度のクラスターDNA 損傷は区別できないため、新しいクラスターDNA 損傷の分析法が待たれていた。本研究では、新規なクラスターDNA 損傷分析法確立を目的として、DNA 損傷部位をストレプトアビジン標識し原子間力顕微鏡 (AFM) で可視化分析する方法を検討した。</p> <p>本研究では、まず、2 つの近接した損傷が AFM で分離して観察できるかどうか調べるために、モデル DNA を調製した。pGL4.50 プラスミドを鋳型とし、ウラシルを 2 つ含むプライマーを用いて 738 bp の DNA を増幅した。2 つのウラシルの間隔は 3 塩基および 8 塩基とした。PCR 産物をウラシル DNA グリコシラーゼで処理し、ウラシルを脱塩基部位に変換した。Aldehyde Reactive Probe (ARP)、ストレプトアビジンとインキュベートすることにより、損傷 (ウラシル) をストレプトアビジン標識し AFM で観察した。2 つの損傷が 3 塩基離れたモデルクラスター損傷を含む DNA を AFM で観察した結果、約 60% の部位で 2 つの損傷が分離されて観察された。8 塩基間隔で損傷を含むモデル DNA でも同様な値が得られた。また、AFM で観察されたストレプトアビジンの見かけの直径は約</p>			

10~15 nm (= 29~44 bp) であった。本研究では、この距離内に存在する損傷（部分的に分離される損傷）を便宜的にクラスターDNA 損傷とし、この距離より離れた損傷を孤立DNA 損傷とした。

次に、放射線照射したプラスミドを用いてクラスターDNA 損傷を可視化分析した。pUC19 プラスミド (2686 bp) を、線エネルギー付与 (LET) が異なる Fe-イオン線 (LET = 200 keV/μm) および X 線 (LET = 1 keV/μm) で 200 Gy 照射した。照射したプラスミドを、酸化プリン塩基を DNA から除去する OGG1 および酸化ピリミジン塩基を除去する EndoIII で処理し、塩基損傷を脱塩基部位に変換した。次に、脱塩基部位を ARP, ストレプトアビジンで標識し AFM で観察した。なお、末端にアルデヒド型糖損傷を含む SSB も同様に標識されるため AFM で観察される。

未処理プラスミドでは、プラスミド精製の際に生じたと考えられる損傷が僅かに含まれていた。Fe-イオン線照射後は、孤立 DNA 損傷およびクラスターDNA 損傷を含むプラスミドの割合が増加した。未損傷プラスミドの割合 (46.3 %) から、プラスミドあたりの平均ヒット数は 0.77 と見積もられた。したがって、観察された孤立 DNA 損傷およびクラスターDNA 損傷は Fe-イオン線の多重ヒットではなく、主にシングルヒットで生じたと考えた。クラスターDNA 損傷のタイプとしては、損傷多重度が 2 の損傷に加え、損傷多重度が 3 および 4 の損傷が観察された。さらに、1 分子内に複数 (2 または 3) のクラスター損傷部位を含むプラスミドが観察された。X 線照射では、未損傷プラスミドの割合 (48.3 %) から、プラスミドあたりの平均ヒット数は 0.73 と見積もられた。X 線では、損傷多重度が高いクラスターDNA 損傷の割合は Fe-イオン線に比べ低かった。さらに、1 分子内に複数のクラスター損傷部位を含むプラスミドの割合も Fe-イオン線に比べ少なかった。また、比較のために、ランダムに酸化 DNA 損傷を誘発するフェントン試薬で pUC19 プラスミドを処理し、損傷を AFM で分析した。フェントン試薬では、孤立 DNA 損傷は生成したがクラスターDNA 損傷は生成しなかった。このことから、クラスターDNA 損傷が放射線に特徴的な損傷であることが確認された。

本研究により、放射線は損傷多重度が 2 のクラスターDNA 損傷だけではなく、より高い損傷多重度 (3 および 4) のクラスター損傷を生成すること、また、飛跡上に複数のクラスター損傷部位を生成することが明らかとなった。さらに、LET が高い Fe-イオン線は、損傷多重度が高いクラスターDNA 損傷を生成するだけでなく、飛跡上におけるクラスター損傷の生成頻度も高いことが示された。これらの特徴は、高 LET 放射線が示す高い生物影響と関わっている可能性がある。本研究の成果は、放射線の生物作用におけるクラスターDNA 損傷の役割解明、ならびにクラスターDNA 損傷を指標とするがんの放射線治療法の確立などに貢献すると考えられる。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士 (理学) の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

Direct observation of damage clustering in irradiated DNA with atomic force microscopy.

Xu Xu, Toshiaki Nakano, Masataka Tsuda, Ryota Kanamoto, Ryoichi Hirayama, Akiko Uzawa, Hiroshi Ide

Nucleic Acids Research, gkz1159, 1-10 (2019), doi: 10.1093/nar/gkz1159

参考論文

Radiation-induced DNA–protein cross-links: Mechanisms and biological significance.

Toshiaki Nakano, Xu Xu, Amir M.H. Salem, Mahmoud I. Shoukamy, Hiroshi Ide

Free Radical Biology and Medicine, 107, 136–145 (2017)