展望 TENBO

放射線生物影響の原因となるDNA の傷の塊

鹿園　直哉
Shikazono Naoya
（日本原子力研究開発機構）

1　はじめに

電離放射線により細胞死や突然変異といった様々な生物影響が生じることはよく知られている。また，電離放射線にはX線，γ線，電子線，α線，重イオン線，中性子線といった様々な種類が存在するが，電離放射線の種類によって生物影響の程度が大きく異なることも古くから知られている。生物影響が，放射線によって生じる空間的に不均一な電離や励起に起因するであろうことは1950年代から指摘されていた。その考え方は，生物影響をもたらす“標的”に一定数以上の電離が起きることにより損傷が生じると仮定すれば，放射線の持つ高い生物効果や線質依存性は説明できるとするものである。一方，様々な実験証拠（放射性同位体が細胞膜ではなく核に取り込まれると生物効果が高いこと，放射線感受性細胞の生存率はDNA 2重鎖切断数と相関が高いこと，放射線感受性の突然変異体はDNA修復過程に異常を示すこと等）により，電離放射線の細胞内での標的はDNAであると考えられるようになり，放射線によって生じた電離や励起がDNAに化学変化をもたらしDNA損傷を誘発するため生物は影響を受けるという考え方が定着してきた。しかし，放射線生物影響と具体的なDNA損傷（塩基損傷，脱塩基部位，一本鎖切断，二本鎖切断等）との関連を包括的に説明するアイディアは1980年代に入るまで生まれてこなかった。

D.T. Goodheadは電離放射線による電離・励起の特徴とDNA損傷を結び付け，“クラスターDNA損傷”（**図1**）に基づく仮説を提唱した[1)]。この仮説では，電離放射線の単一の飛跡によって，(1) 電離や励起が空間的に不均一に生じ，その結果ある確率で複数のDNA損傷が局所的に固まり（クラスター化し），(2) 固まった損傷は生体にとって修復が難しく生物影響の原因となる，と考える。この考え方によれば，一般に線エネルギー付与（LET）が高くなればDNA損傷のクラスター化が進むと考えら

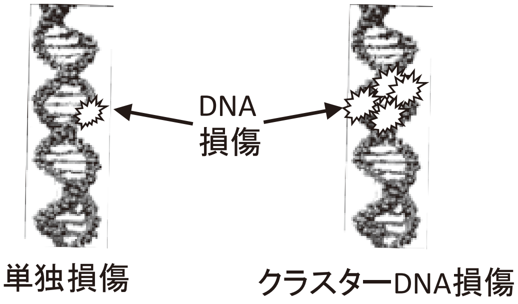

図1　単独損傷とクラスターDNA損傷

れるため，重イオン線等の高LET放射線の高い生物効果もうまく説明できる。一方，J.F. Wardは過酸化水素処理と電離放射線照射を行い，同じ損傷量（鎖切断，塩基損傷）では電離放射線の方が圧倒的に生物効果が高くなることを示した。この事実を基に彼も電離放射線による高い生物効果は損傷の“塊”に起因すると考えるに至った[2)]。しかしながら，傷が近接しているという空間情報を得ることが難しいこと，更には，固まった傷のみの生物効果を調べることが困難なことから，仮説の提唱以来実験的な証明がなされずクラスターDNA損傷研究はなかなか進展しなかった。クラスターDNA損傷仮説の証明は放射線生物影響の機構を理解する上で極めて重要な一歩となる。本稿では，筆者らが仮説の証明のために進めた，（1）新たに開発した手法で放射線によって誘発される傷の局在性を調べる研究，及び，（2）DNAの傷が固まった時の生物効果を調べる研究，について紹介したい。

2 DNAの傷の塊の観察

前述のように，放射線により固まったDNA損傷（クラスターDNA損傷）の化学構造はどういうものか，更には，異なる線質・エネルギーを持つ放射線による生成頻度はどう変わるのか等についての実験的証拠は十分とは言えない。これまで，DNA損傷の検出に関して数多くの研究がなされてきたが，DNA損傷が固まって存在するかどうかを調べることは極めて困難であった。その原因の1つに，高感度にDNA損傷を検出する手法の多くはDNAをばらばらにして構成単位のヌクレオチドや塩基を調べるアプローチをとることが挙げられる。DNA損傷が近接して固まっていることを調べるためには，存在する損傷の空間情報を失わないようにしなければならない。DNAをバラバラにせず損傷の空間分布を保持したまま分析する方法として修復酵素の機能を利用する手法が考案されたが，“修復困難”なDNA損傷を調べる研究手段として修復酵素の機能に依存するという方法には根本的な問題がある。修復酵素が全く認識できないような損傷がある場合，そのDNA損傷を検出することはできないからである。

筆者らは，DNA損傷の空間分布を調べるには既存の分析手段では限界があると考え，蛍光共鳴エネルギー移動（Fluorescence resonance energy transfer：FRET）に着目した全く新しい手法（FRET法）を開発した。FRETとは2つの蛍光分子等の間で生じる非輻射的エネルギー移動現象の1つであり，そのエネルギー移動効率の最大距離は10 nm程度である。本FRET法では，損傷に蛍光分子を標識し，損傷が近接している場合のみFRETが観察される原理に基づいて傷の塊を検出する。検出対象の損傷には，放射線によって一般的に生じることが分かっている脱塩基部位（AP）を選択した。DNA中のAPは*O*-アミノ基と特異的に共有結合するので[3)]，*O*-アミノ基を有する2種類の蛍光物質（AlexaFluor350（ドナー蛍光分子）及びAlexa-Fluor 488（アクセプター蛍光分子））を用いてAPを蛍光標識した。APがランダムに生じている（＝AP生成確率はどの塩基対でも同じ）とみなせる熱処理DNA（直鎖状にしたプラスミドpUC19を，pH 5，70℃で所定時間処理したもの）をモデルとして用い，得られたFRET効率*E*と，ランダムなAPの生成理論曲線を比較した。その結果，熱処理DNAのデータは理論曲線上に分布することが分かった（**図2**）。この一致は，DNA損傷の局在性がFRET法により評価できることを示す[3)]。

続いて，放射線が誘発するDNA損傷の空間分布を調べるために，線質の異なる2種類の放射線（^{60}Co γ線と炭素線（0.34 MeV/u，LET＝760 keV/μm））を照射した。照射DNAに対して本FRET法による分析を行ったところ，γ線の*E*は，理論曲線と平行してAP平均密度の増加にともなって大きくなる傾向が認められた。

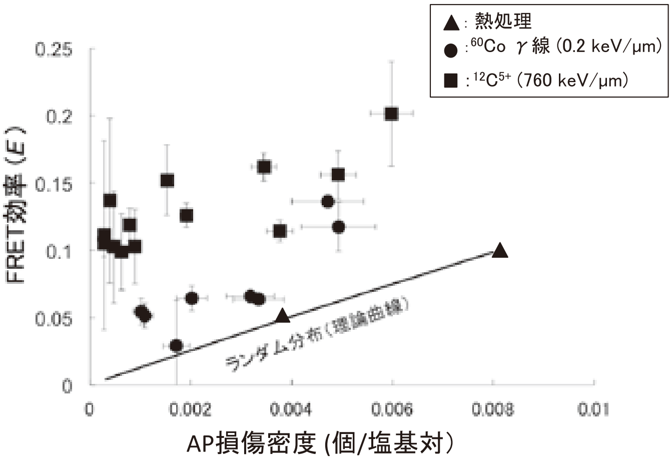

図 2　脱塩基部位の **FRET** 効率（E）。▲：熱処理，●：^{60}Co γ 線，■：炭素線

これは，線量が上がるにつれて近接したAPが増加していく（放射線によって誘発される単独AP同士が近接する）ことを示している。一方，炭素線の E は γ 線より大きく，また，AP密度がゼロに向かう（すなわち極低線量になる）につれ，E 切片が0ではなく0.10付近に近付くことが明らかとなった（**図2**）。これは，炭素線の飛跡同士が重ならない条件（すなわち1個の炭素イオン照射）においてもAPクラスターが生じることを意味している[4)]。この結果により炭素線により局在化したAPが生成されるという証拠を得た。なお，簡単のため2つのAPから成るAPクラスターのみが生じていると仮定すると，E＝0.10はAP間の距離が17塩基対であることに相当する。今後，FRET法を用い様々な線質・エネルギー・試料照射条件下でのAPの局在性を明らかにしていく予定である。

3　DNAの傷の塊（クラスターDNA損傷）の生物影響

クラスターDNA損傷が生物影響に深く関連するかどうかを調べるためには，クラスターDNA損傷のみの効果を調べることが必要である。しかしながら，放射線によって生じるDNA損傷はランダム事象に由来しており，様々な種類のDNA損傷をDNA上の様々な位置に生じさせる。このため，放射線を照射したDNA上には単独の損傷とクラスターDNA損傷が必ず共存し，クラスターDNA損傷の効果のみを調べることは困難であった。クラスターDNA損傷の生物影響を調べるため，筆者らは，化学的に合成したDNA損傷（鎖切断，脱塩基部位，塩基損傷）を組み合わせて構成したモデルクラスターDNA損傷を，細胞（大腸菌）に導入し生物影響を調べるというアプローチを用いて研究を進めている。このアプローチの利点は，(1) クラスターDNA損傷のみの効果が調べられる，(2) クラスターを構成するDNA損傷の種類，位置，数を任意に変えることができ，それぞれの効果を詳細に調べることができる，という点にある。以下，本アプローチで得られた代表的な結果，すなわち，クラスターDNA損傷を含むDNA分子の複製効率，及び，クラスターDNA損傷誘発変異頻度，について紹介する。

複製を阻害するDNA損傷としてAPや鎖切断（SSB），複製を阻害せず変異誘発能を有する損傷としてグアニンの損傷である8-オキソグアニン（8-oxoG）等を組み合わせ，DNA損傷を任意の位置に配置したモデルクラスターDNA損傷をデザインした。8-oxoGは，シトシンだけでなくアデニンとも対合することができ，このアデニンとの対合に起因して変異が引き起こされることが知られている。まず，どのようなクラスターDNA損傷が複製を阻害するのかを調べたところ，一方の鎖にAP（若しくは鎖切断），他方の鎖に鎖切断（若しくはAP）を配置するとクラスターDNA損傷を含むDNAの複製が非常に強く阻害されることが明らかとなった。しかしながら，単独損傷や，（複製を阻

害しない）塩基損傷が一方の鎖にあるタイプのクラスターDNA損傷を含む分子では，複製は阻害されないということも分かった。複製が阻害されれば細胞は死に至ると考えられるので，これらの結果はクラスターDNA損傷の致死効果がクラスター内に存在するDNA損傷の種類に強く依存するということを示唆している[5)]。続いて筆者らは，複製が阻害されないタイプのクラスターDNA損傷の変異誘発頻度を調べた。8-oxoGを一方の鎖に，その他の損傷をもう一方の鎖に配置した場合のモデルクラスターDNA損傷の変異誘発効果は，単独損傷に比べて大きく増加し，損傷間の距離の増加に伴い減少することが分かった[6)]。図3（**a**）には8-oxoGと鎖切断を組み合わせたクラスターDNA損傷の結果を示す。これらのモデルクラスターDNA損傷における主要な変異は，8-oxoGに由来する塩基置換（GからTへのトランスバージョン）であった。これらの結果は，細胞内においてクラスターDNA損傷内に存在する8-oxoGがもう一方の鎖にある損傷のため修復されにくくなり，残存する8-oxoGを鋳型に複製が進行し変異が起きやすくなることを示唆しており，損傷が密集すると変異誘発効果が高まるとするクラスターDNA損傷仮説の考え方と一致する。しかし一方で，8-oxoGと別の損傷を同一の鎖に配置した場合，クラスターDNA損傷の変異誘発効果は，単独損傷と変わらないことが分かった[6)]（図3（**b**））。この原因については不明であるが，損傷がない鎖を鋳型に複製が起こるようなメカニズムがあり，変異の誘発が抑制されているのではないかと推察している。

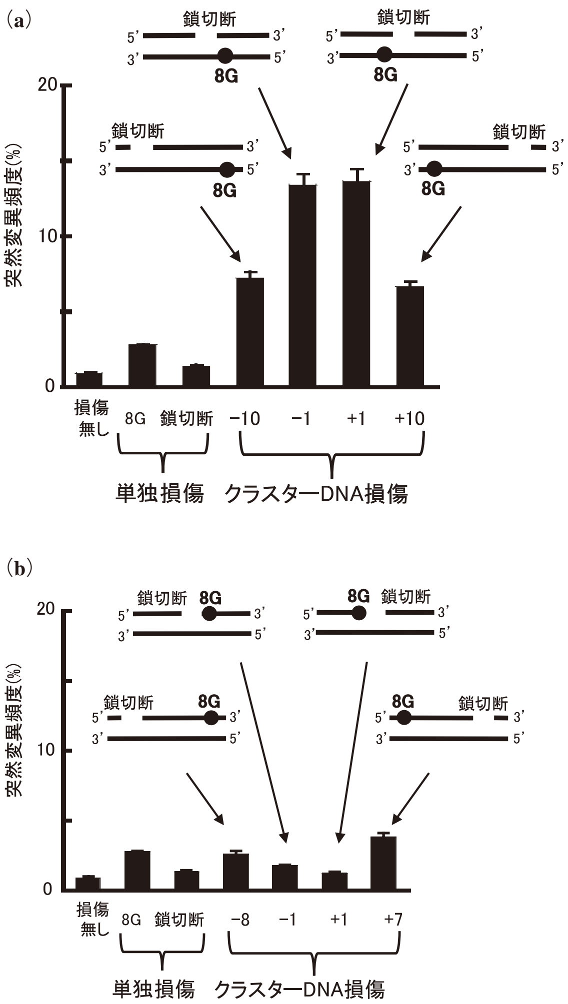

図3　8-oxoGと鎖切断からなるクラスターDNA損傷の突然変異頻度

横軸のクラスターDNA損傷の符号と数字はそれぞれ損傷の相対位置，損傷間の距離（bp）を表す。8G：8-oxoG，（a）損傷が相補鎖上に各々1つある場合，（b）損傷が同一鎖上に2つある場合

4　おわりに―今後の展望―

多細胞生物の構成単位である細胞の放射線影響を知ることは生物個体の放射線影響を知る上での基礎となるものである。細胞への放射線影響の主要な原因は，“DNAに対する放射線損傷”である。筆者らの実験結果を含めた研究の進展により，“DNA損傷の局在性”という，DNA鎖損傷の空間分布が細胞の放射線影響に重要であることが広く認識されるようになってきた。しかしながら，放射線によって誘発されるクラスターDNA損傷の微細構造（クラスター

内の損傷の数・種類・位置）はどのようなもので，どのような頻度で生じるのか，という細胞の放射線影響機構を理解する上で最も重要な問いに関してはいまだ明確な答えはない。また，致死効果や突然変異誘発効果はクラスターDNA損傷の微細構造に依存することが分かってきたものの，細胞内で実際にどのような過程を経て生物影響がもたらされるかについて解明されたとは言い難い。今後はこれらの点の解明を目指した研究が行われ，細胞の放射線影響機構の理解が進むと思われる。

さらに，個体への放射線の影響においては解明すべき多くの課題がある。例えば，細胞間や組織間のシグナル伝達により非照射の細胞に影響を及ぼすバイスタンダー応答とDNA損傷の塊が主因となる照射細胞の影響は，どのように関連付けられるのかといったことについて包括的かつ定量的な説明はなされていない。また，放射線発がんにおいては，エピジェネティク（DNAの配列変化によらずに遺伝子発現や表現型を変化させる仕組み）な変化，遺伝的不安定性といった種々の現象が関与している可能性があるが，これらの現象とDNA損傷の塊との関連性はあるのか，あるとすればどのように関連しているのか等，いまだ不明な点は多く残されている。

前記の課題の解明をはじめとして今後放射線生物影響メカニズムの理解が進めば，宇宙放射線の人体影響，低線量放射線被曝に関連する放射線のリスク評価の高精度化，及び，がんの放射線治療の高度化に大きく貢献すると考えられる。

【謝辞】

放射線照射後のDNA損傷の局在性に関する研究結果は，日本原子力研究開発機構の赤松憲博士が中心となって得られた成果です。また照射に当たっては，京都大学原子炉実験所の齊藤剛助教，日本原子力研究開発機構の須郷由美博士のご協力を得て進めることができました。また，クラスターDNA損傷の生物影響に関する成果は，日本原子力研究開発機構の漆原あゆみ博士と野口実穂博士らが中心となって得られたものです。これらの研究は科研費の助成を受けています。ここに深く感謝申し上げます。

参考文献

1）Goodhead, D.T., *Int. J. Radiat. Biol.*, **65**, 7–17（1994）
2）Ward, J.F., *Int. J. Radiat. Biol.*, **66**, 427–432（1994）
3）Akamatsu, K. and Shikazono, N., *Anal. Biochem.*, **433**, 171–180（2013）
4）Akamatsu, K., *et al.*, *Radiat. Res.*, **183**, 105–113（2015）
5）Shikazono, N. and O'Neill, P., *Mutat. Res.*, **669**, 162–168（2009）
6）Noguchi, M., *et al.*, *Mutat. Res.*, **732**, 34–42（2012）