

## 原子間力顕微鏡を用いたDNA損傷の可視化（高LET放射線によるクラスター損傷の生成とその修復経路の特定）



中野 敏彰  
*Nakano Toshiaki*



赤松 憲  
*Akamatsu Ken*



鹿園 直哉  
*Shikazono Naoya*

### 1 はじめに

がん治療に広く用いられる放射線治療では、電離放射線（ionizing radiation: IR）を用いて腫瘍細胞に致死的な損傷を与えることを目的としている。IRは、標的とするDNAに対して直接・間接的な損傷を引き起こし、その治療効果の中心的要因となる。IRにより誘発される損傷には、一本鎖切断（single-strand break: SSB）、塩基損傷、脱プリン・脱ピリミジン部位（apurinic/apyrimidinic site: AP site）、及び二本鎖切断（double-strand break: DSB）等多様な損傷を引き起こす。更に、これらのDNA損傷が1か所に多数生じる「クラスター損傷（clustered DNA damage）」がある（図1）。クラスター損傷とは、DNAの空間的に近接した領域（通常は10~20塩基対以内）に複数の損傷（塩基損傷、SSB、DSB等）が集中して形成される損傷のことを指す。クラスター損傷は、低LET放射線（例:X線）に比べて、高LET放射線（例:Feイオンビーム）によってより頻繁に引き起こされやすい。高LET放射線はトラック構造を持ち、エネルギーの局所集中的な付与により、より密集した損傷を引き起こすためである。クラスター損傷は、細胞にとって極めて修復が困難であり、修復遅延や誤修復を通じて細胞死やゲノム不安定性、更には正常組織への影響にも関与するとされている。したがって、放射線治療の精度向上と副作用低減のためには、こうした複雑損傷の形成と修復動態を正確に理解することが不可欠である<sup>1)</sup>。

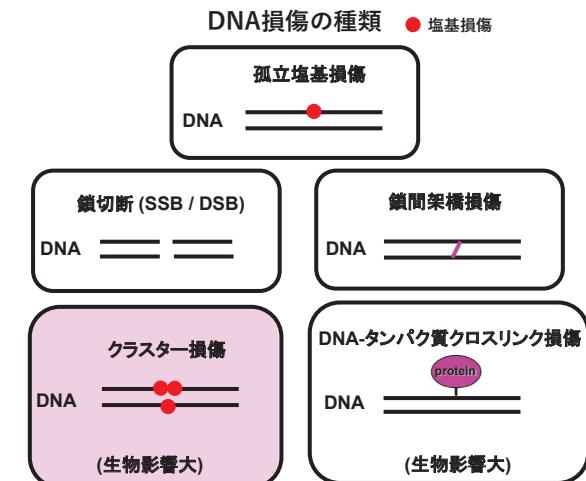


図1 放射線で生じるDNA損傷の種類

これまで、クラスター損傷の修復機構については多くの研究が行われてきたが、その構造的複雑性及び細胞内の修復については、未解明な部分が多く残されている。研究が進んでこなかった理由として、従来のゲル電気泳動法では損傷の複雑な構造の詳細な解析が困難であること、また、DNA損傷の位置に集合する抗体の蛍光を観察する蛍光顕微鏡法では感度が悪く、数塩基間でのDNAの構造を理解することができなかったことがあげられる。このため、特に高LET放射線によって顕著に誘発される損傷の複雑な構造を解析する方法がなかった。そこで本研究では、原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscope: AFM）を用いる新規なDNA損傷を直接可視化する方法を開発することによって、クラ



DNA損傷に目印(タンパク質)を結合させる凹凸を作る。

これを損傷の目印にする。

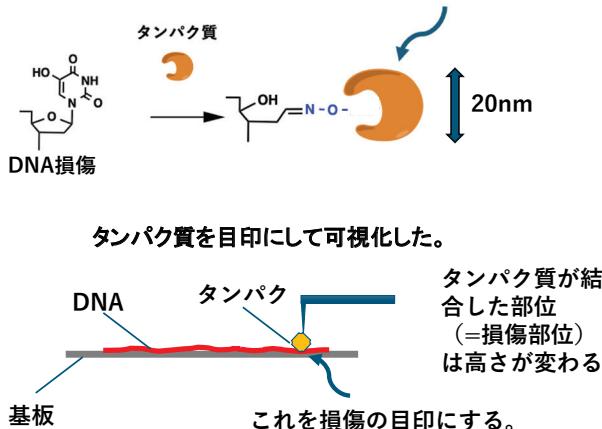


図2 原子間力顕微鏡(写真)によるDNA損傷の可視化

ター損傷の構造を解析し、分類分けすることを目指した。この新しいDNA損傷可視化法により、クラスター損傷という極めて修復困難な損傷に対する細胞応答とその修復機構に関する理解を深めると共に、高LET放射線の生物学的効果や治療応用に対する新たな洞察を提供することが可能となる。

## 2 DNA損傷の直接観察法の確立(TK6細胞の染色体DNAにおけるDNA損傷のAFMによる可視化)

本研究では、ヒトリンパ芽球細胞(TK6)におけるDNA損傷を一分子レベルで可視化・解析することを目的とし、損傷DNAの濃縮手法の開発及びAFMによる観察を行った。AFMはナノメートルスケールの高解像度を有する非光学的顕微鏡であり、従来の蛍光顕微鏡では解像度の限界により不可能であった個々のDNA分子上の損傷クラスター構造

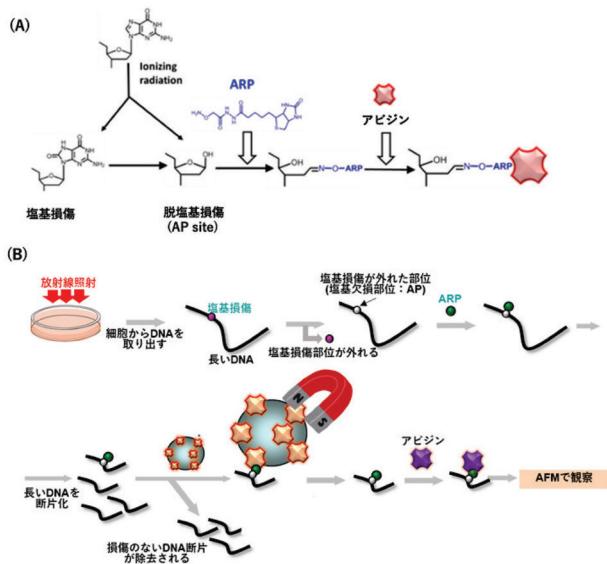


図3 DNA損傷可視化の解析方法

直接可視化が可能となる。AFMを用いて通常のDNAと損傷DNAは直接見分けることができないので、筆者らはDNA損傷を分子量の大きなタンパク質(アビジン)で標識し、DNA分子上にあるアビジンを目印としてAFMで観察する手法を考えた(図2)。

実際の実験手順は以下のとおりである。まず、酵素(DNAグリコシラーゼ)を用いて塩基損傷をAP siteに変換し、これを脱ブリン・脱ピリミジン部位に特異的に結合するアルデヒド反応性プローブ(ARP)で標識した(図3(A))。本研究で用いたARPは標識部位にビオチンがあり、親和性の高いビオチン-アビジン結合を通じてDNA損傷をAFMで観察することが理論上可能となる(図2)。しかしながら、細胞内で自然に発生する損傷頻度は極めて低いため、現実的な観察には損傷DNAの選択的濃縮(損傷を持つDNA領域のみを集める)が必要である<sup>2,3)</sup>。そこで本研究では、ARPにビオチンが結合した(ARP-ビオチン)プローブが結合した損傷DNAをアビジン固定化磁気ビーズによって沈殿させ、損傷DNAを濃縮する方法を検討した。具体的には、ARP-ビオチンプローブで標識した損傷DNAを細胞から調製し、アビジン単量体を固定化した磁気ビーズを用いて回収した。この時、DNA損傷を含まないフラグメントが除去され、損傷部位を含むDNA断片のみが濃縮される。その後、90℃で2分間加熱することにより、DNAを損傷構造を損なうことなく磁気ビーズから解離させ、DNA損

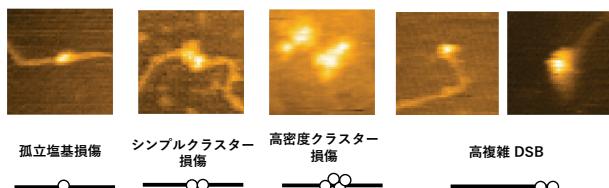


図4 AFMにより観察されたDNA損傷

傷のAFM観察を行った(図3(B))。この手法により、TK6細胞の染色体DNAに生じた塩基損傷及びクラスター損傷のAFMによる視覚的観察が可能となった。本手法の空間分解能の検証として、人工的に損傷を導入したモデルDNAを用いた実験を行ったところ、3塩基対の距離を隔てた2つのビオチン-アビシン標識をAFM画像上で明確に区別できることが示され、本手法がDNA損傷の微細構造を視認可能な解析系であることが実証された<sup>2-4)</sup>。

### 3 DNA損傷の分類

観察された損傷には、孤立した塩基損傷(isolated base damage)、2か所の塩基損傷からなる単純なシンプルクラスター(simple base damage clusters)、複数の塩基損傷が1か所に集中したより複雑な高密度クラスター(complex base damage clusters: complex BDCs)、及び二本鎖切断部位に複数の塩基損傷を伴う高複雑度DSB(complex double-strand breaks: complex DSBs)が含まれていた。このように、AFMを用いることで従来の手法では困難であった構造的に複雑なDNA損傷の識別と定量評価が可能となった(図4)。

### 4 X線及びFeイオンビームによって誘発されるクラスター損傷の定量

過酸化水素を用いたフェントン反応では、損傷全体のうち孤立塩基損傷が約90%、高複雑度DSBは約8%を占めた。これらの割合は、過酸化水素濃度が0.25~1mMの範囲でほぼ一定であったが、塩基損傷の数は濃度依存的に増加した(図5 Fenton reaction)。一方、低LET放射線であるX線照射を受けたTK6細胞においては、孤立塩基損傷83.5%、シンプルクラスター損傷12.2%、高複雑度DSB5.3%であり、照射線量の増加に伴う損傷割合の変化はほとんど見られなかった(図5 X-rays)。

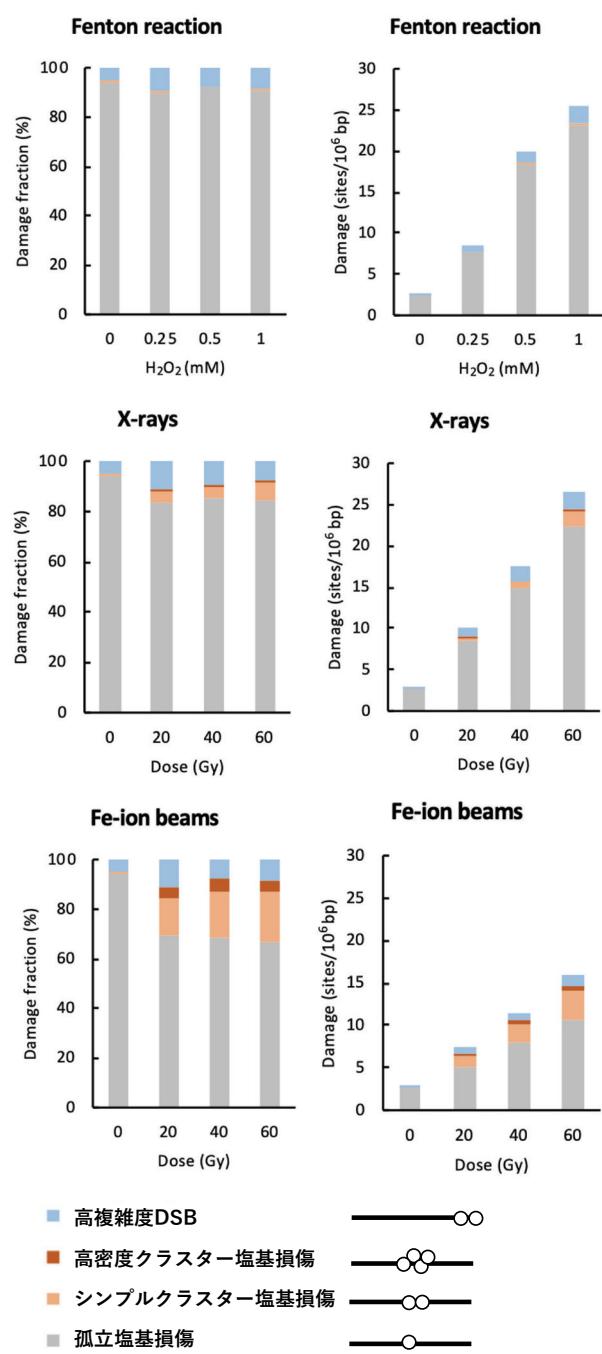


図5 X線及びFeイオンビーム照射により生じる各DNA損傷

高LET放射線であるFe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DSB5.3%であり、FeイオンビームはX線やフェントン反応と比較して、より複雑かつ多様なクラスター損傷を引き起こすことが明らかとなった(図5 Fe-ion beams)。すなわち、電離放射線(X線及びFe

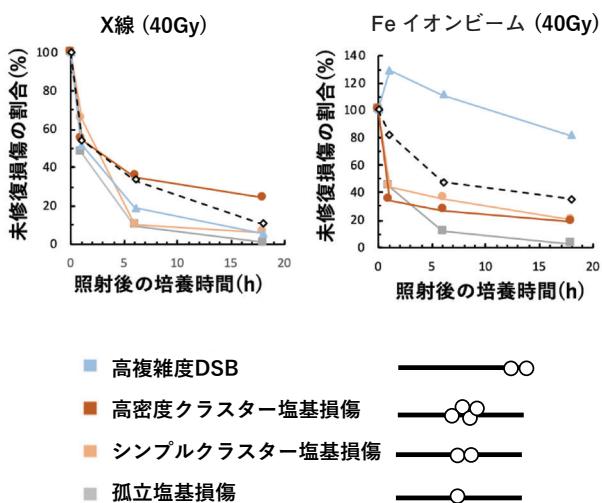


図 6 DNA 損傷の修復動態

イオンビーム) はクラスター損傷を多く誘発する一方で、フェントン反応ではほとんど誘発されない結果は、電離放射線による重篤な生物学的影響を理解するうえで、クラスター損傷の重要性を実験的に裏付けるものである。なお、孤立塩基損傷とクラスター損傷の比率は、Fe イオンビームで 11.0 : 1.0、X 線で 2.1 : 1.0 であり、Fe イオンビームは低 LET 放射線である X 線に比べ、より多くのクラスター損傷を生成することが示された。このことから高 LET 放射線は比較的複雑な構造を多数生じていることが明らかとなった。また、ここではデータを記載していないが、放射線で生じたクラスター損傷をより詳細に解析すると Fe イオンビーム照射により生じたクラスター損傷は X 線で見られない複雑度の高いタイプの DNA 損傷が観察された<sup>4)</sup>。

## 5 クラスター損傷の修復動態

ヒトリンパ芽球細胞に電離放射線照射後、一定時間培養を行うことで、DNA 損傷の修復動態が観察できる(図 6)。X 線を 40 Gy 照射した場合、照射 1 時間後には孤立塩基損傷 (isolated base damage) の多くが修復され、6 時間後にはその量が 20% 以下にまで減少した。18 時間後にはわずかに損傷が残存するものの、未照射細胞とほぼ同等の水準まで回復していた(図 6 X 線)。一方、クラスター損傷 (simple および complex BDC) も孤立塩基損傷と同様の速度で

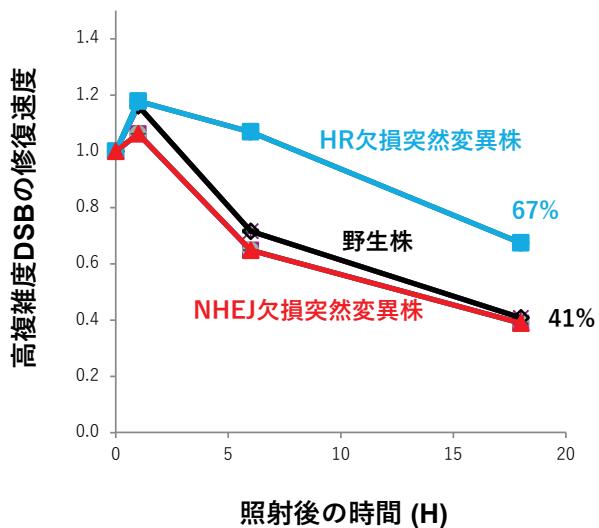


図 7 Fe イオンビーム照射後における DNA 修復欠損 TK6 細胞中の高複雑度 DSB の残存率

修復された。また、高複雑度 DSB (complex double-strand breaks) についても、修復割合は塩基損傷と同等であった。電気泳動法で評価された全体の DSB (高複雑度 DSB とそれ以外のすべてのタイプの DSB) は、照射後 6 時間までに急速に修復が進み、その後は修復速度が緩やかになった<sup>4)</sup>。次に、40 Gy の Fe イオンビーム (高 LET 放射線) を照射した場合、1 時間後には孤立塩基損傷の半数以上が修復され、6 時間後には 20% 以下にまで減少した。シンプルクラスター損傷 (simple BDC) や高密度クラスター損傷 (complex BDC) も、孤立塩基損傷と同様の速度で修復された(図 6 Fe イオンビーム)。ただし、高複雑度 DSB については、照射 1 時間後に一過的な増加が見られ、その後は緩やかな速度で修復が進行した。最終的に、照射 18 時間後には、孤立塩基損傷及び大部分のクラスター損傷は修復された一方で、高複雑度 DSB の約 50% は未修復のまま残存していた。これは、高 LET 放射線によって誘導される複雑な高複雑度 DSB が、細胞にとって極めて修復困難であることを示唆している<sup>4,5)</sup>。X 線によって生じた高複雑度 DSB は比較的修復されやすいのに対し、Fe イオンビーム照射で生じた高複雑度 DSB は修復が著しく困難であるという修復特性の違いの要因を明らかにするため、両者の DSB 構造を比較検討した。その結果、Fe イオンビームによって生じた高複雑度 DSB は、X 線による高複雑度 DSB と比べて、より多数の塩基損傷を伴う極

めて複雑な構造を有していることが明らかとなった（データ未記載、参考文献 4, 5）。このような構造的複雑性の違いが、修復速度や修復の困難さに大きく影響している可能性がある。

## 6 クラスター損傷の修復機構の特定

修復されにくい高複雑度 DSB が、どのような修復機構が関与しているかを明らかにするため、二本鎖切断の主要な修復経路として知られる非相同末端結合（NHEJ）及び相同組換え（HR）の機能をそれぞれ欠損させたヒト細胞株（TK6）を用いて、複雑な二本鎖切断の修復動態を解析した（図 7）。その結果、塩基損傷を伴う高複雑度の二本鎖切断は修復が著しく困難であることが明らかとなった。NHEJ 機能を欠損した変異株（図 7 赤線）では、NHEJ が機能する野生型細胞（図 7 黒線）と同程度の修復が観察された一方で、HR 機能を欠損した変異株（図 7 青線）では修復が著しく遅延した。これらの結果は、塩基損傷を伴う高複雑度二本鎖切断が主に HR によって修復されることを示している。

本研究により、修復が困難な二本鎖切断とは、DNA 末端に塩基損傷を伴う高複雑度の損傷構造であること、そしてこのタイプの損傷は一般的な修復経路である NHEJ では対処できず、より複雑な HR 経路を必要とすることを初めて明らかにした。

## 7 まとめ

本研究により、高 LET 放射線（Fe イオンビーム）は低 LET 放射線（X 線）と比較して、より高頻度かつ構造的に複雑なクラスターDNA 損傷を誘発することが明らかとなった（図 4, 5）。特に Fe イオンビーム照射細胞においては、複雑な塩基損傷クラスター（BDC）及び二本鎖切断（DSB）が長時間にわたり残存し、高 LET 放射線によって生じる損傷が

修復困難であることが示された（図 6）。また、これらの高複雑度 DSB は非相同末端結合（NHEJ）では十分に修復されず、主に相同組換え（HR）によって修復されることが明らかとなった。これらの知見は、DNA 損傷を一分子レベルで直接可視化する解析手法（AFM）を確立したことにより、初めて明らかになった成果である。

本研究は、クラスター損傷の構造と修復動態に対する新たな理解を提供し、今後の高 LET 放射線治療における照射条件の最適化、更には修復経路を標的とした新規治療戦略の開発に貢献する可能性を有する。すなわち、AFM による一分子観察技術は、従来の間接的手法では捉えきれなかった DNA 修復の実態を可視化する新たな道を切り開くものであり、今後の放射線治療の高度化や、修復阻害剤を併用した個別化治療戦略の構築に資すると考えられる。

## 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、産業医科大学 香崎正宙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) T. Nakano, *et al.*, *Free Radic Biol Med.*, **107**, 136-145 (2017)
- 2) X. Xu, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **48**(3), e18 (2019)
- 3) Y. Matsuya, *et al.*, *Int J Mol Sci.*, **21**(5), 1701 (2020)
- 4) T. Nakano, *et al.*, *PNAS*, **119**, e2119132119 (2022)
- 5) T. Nakano, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **53**, gkae 1077 (2024)

((国研)量子科学技術研究開発機構 関西光量子科学研究所 量子応用光学研究部 照射細胞応答研究プロジェクト)