

学 位 論 文 題 名

放射線誘発DNA損傷：8-ヒドロキシグアニン、アルカリ感受性塩基損傷生成および鎖切断を指標とした放射線擬直接作用（quasi-direct effect）の解析

学位論文内容の要旨

細胞に放射線が照射されると、塩基損傷（変性、遊離）、DNA鎖切断（一本鎖および二本鎖切断）などの様々なDNA損傷を導くことが知られている。これらDNA損傷は、放射線による細胞死、突然変異、癌化などと密接に関連すると考えられている。放射線がDNAなどの生体分子に損傷を与える様式としては、従来、直接作用と間接作用の2つのタイプの機序が考えられてきた。直接作用では、放射線はDNA分子に直接イオン化を起こし、塩基ラジカルを誘発する。間接作用では、DNA周囲の水の放射線分解によって生成する反応性の高い水ラジカル（OHラジカル； $\cdot\text{OH}$ 、水和電子； e^-_{aq} 、原子状水素； $\cdot\text{H}$ など）がDNAと反応する。間接作用にはDNA周囲の水が関与するが、水溶液系では、DNA周囲を取り囲む水は2種類存在する。一つは自由水で、これはDNA周囲環境のほとんど大部分を占める。もう一つは結合水で、これはDNAの水和層に存在している。常温水溶液系では、DNA損傷に対する寄与は、放射線による自由水の分解生成物による間接作用がほとんどである。しかし、実際の細胞内では、DNA周囲は水含量が極めて少ないため、実際にDNAに反応可能なラジカル生成は、DNA近傍領域に限定されると考えられる。この結合水のイオン化（ $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^+ + e^-$ ）により生じる電子（ e^- ）および水カチオンラジカル（ H_2O^+ ）によるDNA損傷機構が存在しており、直接作用のそれと類似しているため、擬直接作用と呼ばれる。さらに、凍結水溶液系を用いた結合水の研究において、最近DNA水和層に $\cdot\text{OH}$ が生成されていることが証明され、これがDNA損傷に関与する可能性が示唆されている。

本研究では、擬直接作用とともに自由水ならびに結合水に由来する $\cdot\text{OH}$ に関する知見を得るために、まず常温水溶液を用いて、放射線による $\cdot\text{OH}$ 誘発とそれによるDNA損傷について、グアニン塩基変性物である8-ヒドロキシデオキシグアニン（8-OHdG）に注目し、スピン捕捉剤である α -フェニル-N-tert-ブチルニトロソ（PBN）を用いて、反応中間体および8-OHdGの生成機構に関する知見を得ることを目的とした。次に、凍結DNA水

溶液に放射線照射を行い、実際に水和層に $\cdot\text{OH}$ や e^- が生成されているか否かを確認した後、それらのDNA損傷（塩基損傷、鎖切断、アルカリ感受性損傷）に対する寄与について調べた。

常温水溶液系では、デオキシグアノシン（dGuo）水溶液をX線照射することにより、 $\cdot\text{OH}$ とdGuoの反応を誘発し、生成した8-OHdGをHPLC-ECD法で測定した。また照射の際PBNを共存させ、その影響も調べた。その結果、PBNは $\cdot\text{OH}$ あたりの8-OHdG生成を増加させている事が判明した。さらに、8-OHdGの前駆ラジカルがPBNに捕捉されているかどうか調べるために、PBNとdGuo共存水溶液を照射し、電子スピン共鳴（ESR）法で検討したところ、前駆ラジカルに由来するシグナルは観察されず、 $\cdot\text{OH}$ 由来のシグナルと $\cdot\text{H}$ （ e^-_{aq} ）由来のシグナルが観察された。さらに、 $\cdot\text{H}$ （ e^-_{aq} ）由来のESRシグナルは、PBN溶液のみに照射した場合と比較して、有意に増加している事が明らかとなった。現在まで、8-OHdGの前駆ラジカルとして塩基8位への $\cdot\text{OH}$ 付加によるN7ラジカルが類推されている。今回スピン捕捉法でこのN7ラジカルが観察されず、PBNによる8-OHdG生成量の増加が観察された事実は、PBNがN7ラジカルから e^- ならびにプロトン（ H^+ ）を受け取り、8-OHdGの生成を促進させ、その結果 H （ e^- ）由来のシグナルが増加したものと考えられた。

次に、結合水に由来するラジカルがDNA損傷に関与するかどうか明らかにする目的で、凍結DNA水溶液を用いて、放射線照射によるDNA損傷（塩基損傷、鎖切断、アルカリ感受性損傷）について調べた。まず、凍結下でどのようなラジカルが生成されているか確認するためにPBN単独およびDNAが共存した凍結水溶液に γ 線照射を行い、室温下で融解後、ESR測定を行った。その結果、PBN単独の場合は $\cdot\text{OH}$ および e^- （ $\cdot\text{H}$ ）に由来するESRシグナルはほとんど観察されず、DNAが存在するときのみ $\cdot\text{OH}$ および e^- （ $\cdot\text{H}$ ）に由来するシグナルが観察された。このことから、凍結DNA水溶液を照射すると $\cdot\text{OH}$ および e^- （ $\cdot\text{H}$ ）が生成することが分かった。ここで $\cdot\text{OH}$ と e^- はDNA結合水のイオン化に由来することが考えられたが、 e^- はDNAのイオン化によっても生じるので、それらの総和であると考えられた。次に8-OHdG生成に関する影響を調べるために、凍結DNA水溶液に照射を行い、融解後、8-OHdGを測定した。その結果、PBN非存在下、存在下とも線量の増加に伴い8-OHdG生成量の増加が観察されたが、PBN存在下において8-OHdG生成は抑制されていた。これは、ESRの結果から明らかのように、PBNがDNAに反応する $\cdot\text{OH}$ を捕獲したためであると考えられる。次に、DNA鎖切断について調べる目的で、凍結プラスミドDNA水溶液に照射を行い、融解後、鎖切断についてアガロースゲル電気泳動法により検討した。その結果、PBNは鎖切断に関してほとんど影響を与えないことが観察された。このことから、水和

層に生成され、PBNに捕捉された $\cdot\text{OH}$ は、鎖切断に関してはほとんど影響を与えないと考えられた。最後に、アルカリ感受性損傷について調べるために、凍結下でDNA水溶液に照射を行い、融解後、中性処理あるいはアルカリ処理を施し、同様にアガロースゲル電気泳動法で検討した。その結果、アルカリ処理によって、PBNが共存したDNAにおいて鎖切断の有意な増加が見られた。これはPBNがDNA水和層由来のラジカルによる塩基損傷を促進していることを示唆している。しかし、水和層由来の塩基に反応性のある $\cdot\text{OH}$ がPBNにより捕捉され、 $\cdot\text{OH}$ 生成が抑制された条件でもアルカリ感受性損傷を増加させたという事実から、損傷の原因は $\cdot\text{OH}$ によるものであるとは考えられず、DNAそのものや結合水に生じる e^- や H_2O^+ が関与していると考えられた。

本研究では、PBNを用いたスピントラッピング法により、DNA水和層で生成された $\cdot\text{OH}$ ならびに e^- ($\cdot\text{H}$) を安定なスピン付加体として直接観測することに成功した。さらに、 8-OHdG やアルカリ感受性損傷生成などにこれらの結合水由来のラジカルが関与することが明らかとなった。これらの知見は、放射線による細胞のDNA致死損傷を理解する上で重要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 桑 原 幹 典

副 査 教 授 藤 田 正 一

副 査 助 教 授 稲 波 修

副 査 教 授 松 田 彰 (薬学部)

学 位 論 文 題 名

放射線誘発DNA損傷：8-ヒドロキシグアニン、アルカリ感受性塩基損傷生成および鎖切断を指標とした放射線擬直接作用 (quasi-direct effect) の解析

放射線は水分子を媒介に、DNAへの損傷生成を通してその生物作用を発現する。DNAを取り巻く水分子には、DNAに結合し、DNAを中心に直径4nmの層を形成する水分子(水和層)と、さらにその外側にあって自由に拡散できる水分子(自由水層)の2層が存在する。DNA水溶液の放射線照射ようなモデル実験では、損傷生成の99%以上は自由水層に由来し、細胞の放射線照射の場合は逆に90%以上の損傷が水和層に由来する。この水和層の水分子が放射線誘発DNA損傷に与える効果を擬直接作用(Quasi-Direct Effect)と呼ぶ。細胞における放射線誘発DNA損傷のメカニズムの解明には、この擬直接作用の解明が重要になる。

申請者は、この水和層の水分子(DNA結合水)が放射線のエネルギーを吸収した際、どのようにDNA損傷を誘発するかについて研究した。自由水の影響を排除し、結合水のみが選択的に関与する実験系として、DNA水溶液を液体窒素温度(77K)に冷却し、 γ 線照射する方法を採用した。また、DNA損傷の種類として、二つの塩基損傷(グアニンの酸化的損傷である8-ヒドロキシグアニンと塩基が遊離した脱塩基サイト)とDNA鎖切断を選び、電気化学検出法、電気泳動法等によりその生成を定量測定した。また、DNA損傷誘発化学反応のメカニズムに関する知見を得るため、ESR-スピントラッピングおよびパルスラジオリシス法を適用した。

その結果、DNA水溶液を77Kに冷却し、 γ 線照射すると、水和層に吸収された γ 線エネルギーは結合水をイオン化し、正電荷水分子(H_2O^+)を作る。その一部はDNAと反応し、その正電荷をDNAに付与する($\text{H}_2\text{O}^+ \rightarrow \text{DNA}^+$)とともに、他は自己分解し、活性酸素の一つである反応性の高いヒドロキシルラジカルを生成する($\text{H}_2\text{O}^+ \rightarrow \text{OH}^\cdot$)ことを明らかにした。この反応系に求電子性化合物 α -フェニール-N-t-ブチルニトロンを添加し、 DNA^+ 生成量を増加させたところ、脱塩基サイト生成増大がもたらされたことから、 $\text{H}_2\text{O}^+ \rightarrow \text{DNA}^+ \rightarrow$ 塩基遊離という反応過程が脱塩基サイト生成過程であると結論した。一方、ヒドロキシルラジカル($\text{OH}^\cdot$)については、それが生成されると同時にDNAのグアニンと反応し、8-ヒドロキシグアニン生成へと反応が進行することを明らかにした。その一方で、このヒドロキシルラジカルは脱塩基サイトやDNA鎖切断には関与しないという事実も明らかにした。

以上、申請者はこれまで不明瞭であった放射線の擬直接作用によるDNA損傷誘発メカニズムについて、重要な知見をもたらした。よって、審査員一同は大島秀基氏が博士(獣医学)の学位を受けるのに十分に資格を有するものと認めた。