

(3)原子炉中性子線によって生じるDNA損傷種の解明

岡山大学自然生命科学研究支援センター 寺東 宏明

岡山大学中性子医療研究センター 花房 直志

近畿大学原子力研究所 松田 外志朗

Introduction

電離放射線(以下、放射線)の生物効果は、主として遺伝物質DNAに傷害を与えることにより表出することが知られている。そのため、放射線によって生じるDNA損傷に関する研究は古来盛んに行われてきた。しかしながら、その実験手法は、ガンマ線やエックス線など、放射線発見の当初から容易に利用することが可能な線種によるものに限られてきた。よって、それ以外の線質による損傷の様態は不明な点が多く残されている。近年、多様な線種を利用することが出来る実験環境が整い、上記以外の線種での実験結果が蓄積しつつある。私たちの研究グループは、これまでに重粒子線によって生じるDNA損傷の分析を行い、重粒子線のような高LET放射線では、ガンマ線のような低LET放射線と異なるDNA損傷種が生じること、またその収率が異なることを明らかにしてきた。高LET放射線に特異的なDNA損傷形態はクロスリンクDNA損傷(CLD: Cross-Linked DNA Damage)とクラスターDNA損傷(CDD: Clustered DNA Damage)の2種類がある。CLDはタンパク質等の分子がDNAと結合するもので、その嵩高さからDNA合成阻害能が高く、また修復効率も低い[3-5]。一方、CDDは、放射線がビームとして標的DNAを通過する際に、その軌跡に沿って複数の損傷を生じるものである[6]。これは修復プロセスによりDNA合成阻害能が高く、また正確な修復がされにくいDNA二本鎖切断(DSB: DNA Double Strand Break)を生じ、放射線生物効果の主要因とされる。CDDは、放射線のLETが高くなるほど、損傷の集中度が高くなり、生物効果も大きくなる。

重粒子線と同じく高LET放射線である原子炉中性子は、これら2種類のDNA損傷が高効率で生成すると考えられる。そして、それが中性子線特異的な生物影響表出に関わっていることが期待される。本研究は、原子炉中性子によって生じるDNA損傷の分析を行い、中性子線による生物効果の分子機構の解明を目的とする。

Materials and Methods

チャイニーズハムスター卵母細胞(CHO: Chinese Hamster Ovary)のDNA修復遺伝子欠損株を複数準備し、80%コンフルエントになった状態でトリプシナイズ処理により細胞を回収し、25 cm² フラスコに10⁴個ずつ播種して1日培養した。その後、トリプシナイズでマイクロチューブに細胞ペレット状態で回収し、近畿大学原子力研究所原子炉にて中性子線照射を行った。照射線量は0、0.3、0.6、0.9 Gyとした。各線量での照射後、細胞を培地に再懸濁し、60 mm φシャーレに再播種し、10日間培養し、コロニー形成をさせた。その後、エタノール固定を行い、0.05%メチレンブルーで染色し、コロニーを計数して、生存率を算出した。今回使用したDNA修復遺伝子欠損株はirs1SF(ΔXRCC3)、V3(ΔDNA-PKcs)である。

Results and Discussion

本研究では、これまでに精製プラスミドDNA分子を照射対象として損傷分析を行い、線量に応じて一本鎖切断(SSB)の生成収量が増えること、その収量は0.9 Gyで21%であり、ガンマ線やエックス線の収量より大きく、中性子線が高LET放射線に特徴的なDNA損傷生成を示すことを明らかにした。一方、塩基損傷やDSBの収量は低く、同じ高LET放射線の重粒子線とは異なる特徴を示すこともわかった。昨年度は、細胞を対象に実験を行い、中性子線に対する細胞の感受性は、線量依存的に上昇すること、その感受性の上昇は線量に対し線形であり、一般的な放射線感受性と同様であることがわかった。一方、その感受性の度合いはガンマ線やエックス線に対して大きく、 D_{37} は0.35 Gyであった。これはガンマ線でみられる値の1/10であり、中性子線が他の高LET放射線と同様、高い生物影響を示すことと一致した。

今年度は、昨年度から引き続き細胞を対象に実験を行ったが、用いた細胞をDNA修復遺伝子欠損株とすることにより、欠損遺伝子の種類による感受性の違いから、中性子線によって、どのような種類のDNA損傷が生じるのかを明らかにしようと考えた。昨年度用いた細胞はCHOの野生株の一つであるAA8株を用いたが、この株には様々なDNA修復遺伝子欠損株が作成されている。前述のように放射線に特徴的なDNA損傷の一つにDSBがあるが、DSBの修復は主に相同組換え修復(HR: Homologous Recombination)と非相同末端結合(NHEJ: Non-Homologous End Joining)の二つの修復経路が関与する。よって、ここではそれぞれの経路に関わる重要な因子を欠損するirs1SF(Δ XRCC3)とV3(Δ DNA-PKcs)に対して、中性子線への感受性を検討した。その結果、irs1SFは欠損による細胞の生育がそもそも悪く、生存曲線を得ることが出来なかった。一方、V3は生存曲線を得ることに成功した(図1)。

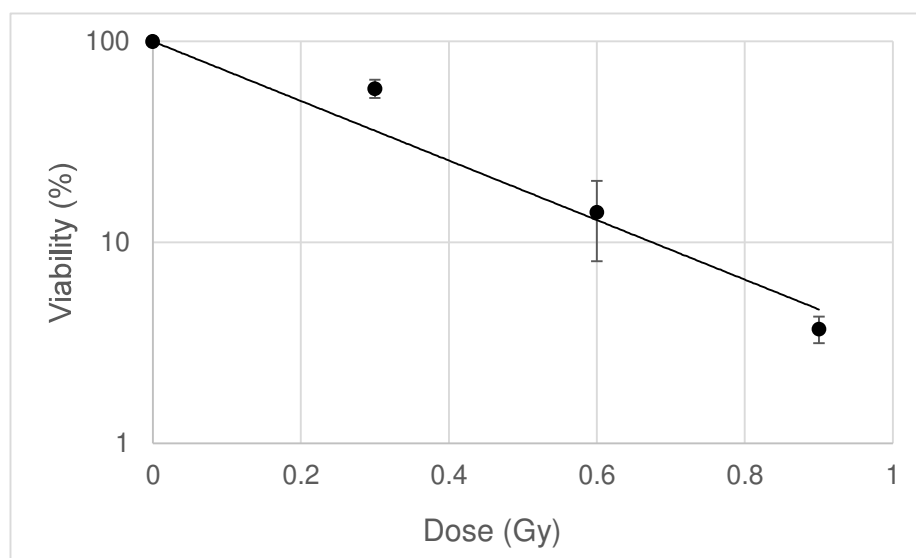


図1. 中性子線照射を行ったCHO-V3の生存率プロット

V3の生存曲線から、この株が野生株(AA8)よりも、中性子線に対して感受性であることが分かった。その D_{37} は0.28 Gyであり、AA8の値の80%であった。以上の結果から、NHEJの欠損は中性子線の感受性を高めること、すなわち、中性子線によって生じるDNA損傷にはNHEJで修復される対象であるDSBが含まれていることを示している。しかしながら、その感受性の差は大きくなかったことは、前年度までの結果として得られた中性子線によるDSB収率の低さとの関係性を想起させる。今後は、中性子線に対する高感受性に関わるDNA損傷種の解明が必要である。

References

- [1] H. Terato et al., J. Radiat. Res., 49 (2008) 133-146.
- [2] Y. Tokuyama et al., J. Radiat. Res., 56 (2015) 446-455.
- [3] T. Nakano et al., Mol. Cell, 28 (2007) 147-158.
- [4] A. M. H. Salem et al., J. Bacteriol., 191 (2009) 5657-5668.
- [5] T. Nakano et al., J. Biol. Chem., 284 (2009) 27065-27076.
- [6] H. Terato and H. Ide, Biol. Sci. Space, 18 (2004) 206-215.

業績一覧

寺東宏明、齊藤毅、松田外志朗「原子炉中性子線によって生じるDNA損傷の特性について」
日本放射線影響学会第65回大会、2022年9月15日～17日(大阪市)

実験・測定補助者

磯辺みどり(以上、岡山大学)

徳山由佳、森加奈恵(以上、佐賀大学)

齊藤毅(京都大学)

(計4名)