

### (3) 原子炉中性子線によって生じるDNA損傷種の解明

佐賀大学総合分析実験センター  
近畿大学原子力研究所

寺東宏明  
山西弘城、松田外志朗

#### Introduction

電離放射線(以下、放射線)の生物効果は、遺伝物質DNAに傷害を与えることにより表出するが、放射線DNA損傷に関する研究の多くは、 $\gamma$ 線やX線などによるもの集中し、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。私は、これまで放射線医学総合研究所重粒子線照射装置HIMAC共同実験を通じて、炭素線をはじめとする重粒子線によって生じるDNA損傷の分析を行ってきた[1, 2]。その研究成果として、重粒子線のような高LET放射線では、 $\gamma$ 線のような低LET放射線と異なるDNA損傷種や収率が得られることがわかった。図1に高LET放射線に特徴的なDNA損傷の形態をあげたが、クロスリンクDNA損傷は、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。もう一つの特徴的なDNA損傷であるクラスターDNA損傷は、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せしめるものである。これは損傷プロセスの過程で、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)を生じ、放射線生物効果の主要因とされるものである。クラスターDNA損傷は、放射線のLETが高くなるほど、損傷の密集度が高くなり、生物効果も大きくなる。

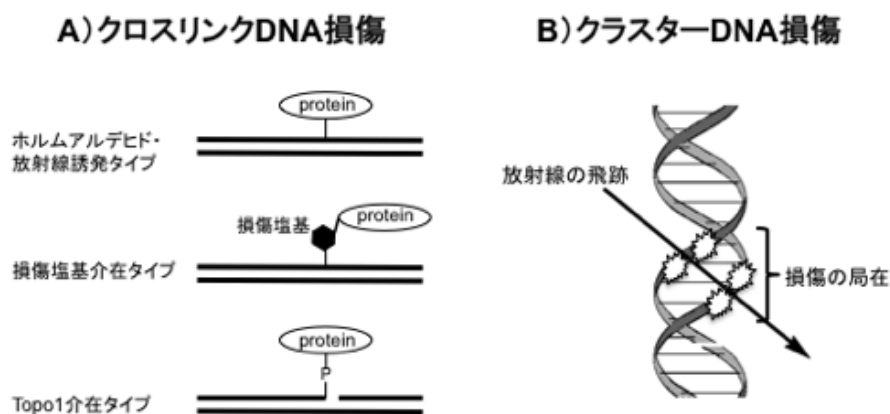


図1 . 高LET放射線によって生じる特徴的なDNA損傷形態。A)クロスリンクDNA損傷、B)クラスターDNA損傷。本研究では主にB)クラスターDNA損傷にフォーカスして分析を行っている。

本研究では、原子炉中性子線によって生じる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に実験を行ったので、ここに報告する。

## Materials and Methods

本研究では最終的に照射生物体における DNA 損傷分析を目的とするが、今年度は初年度ということもあり、精製した DNA 分子を照射対象として実験を行い、中性子線 DNA 損傷分析手法の確立を目指した。対象 DNA 分子は、プラスミド pUC19(2,686 bp)とし、大腸菌細胞で増殖させた同プラスミド DNA を Qiagen Plasmid Plus Kit にて抽出・精製したものを 10 mM Tris-HCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH7.5(TE)に 5 ng/μL の濃度に溶解し、近畿大学原子炉にて中性子線照射を行った。照射する DNA 溶液には 0、0.1、1 M の dimethyl sulfoxide (DMSO)を添加し、ラジカルスカベンジャー能の強弱による DNA 損傷収率への影響を検討した。照射線量は 0、0.3、0.6、0.9 Gy で、線量は金箔を用いた中性子束測定により計測した。照射後、DNA を 1.2%アガロースゲル電気泳動し、損傷分析を行った[3]。電気泳動前に照射 DNA を endonuclease III (Endo III) および Fpg で処理することにより、それぞれ酸化ピリミジン損傷、酸化プリン損傷を DNA 鎖切断に変換し、電気泳動による移動度の変化による損傷検出を可能にした[3]。対照実験として、高線量率のエクソ線照射実験(150kVp, 15.2 Gy/min、佐賀大学総合分析実験センター)および非照射実験を行った[4]。

## Results

原子炉中性子によって生じるDNA鎖切断損傷については、線量に応じて一本鎖切断の生成を示す type II の収量が増加し、0.9 Gy では 21% となった。この収量は γ 線や X 線の収量より大きく、重粒子線の収量に類似していることから、高 LET 放射線に特徴的と考えられた[1, 2, 3]。また、酵素処理なしのインキュベートにより type II 収量がほとんど増加しなかったことから、垂損傷と呼ばれる DNA 脆弱部位の発生は、中性子線ではほとんど起こらないことが示唆された。DSB は 0.9 Gy までの照射でほとんど検出されなかった。酵素処理による酸化塩基損傷の分析結果は、線量に応じて、クラスター DNA 損傷の生成を示す type III の収量が増加したことから、中性子線照射により酸化塩基損傷を含むクラスター DNA 損傷が生じていることがわかった。図 2 に照射 DNA の電気泳動像を示す。

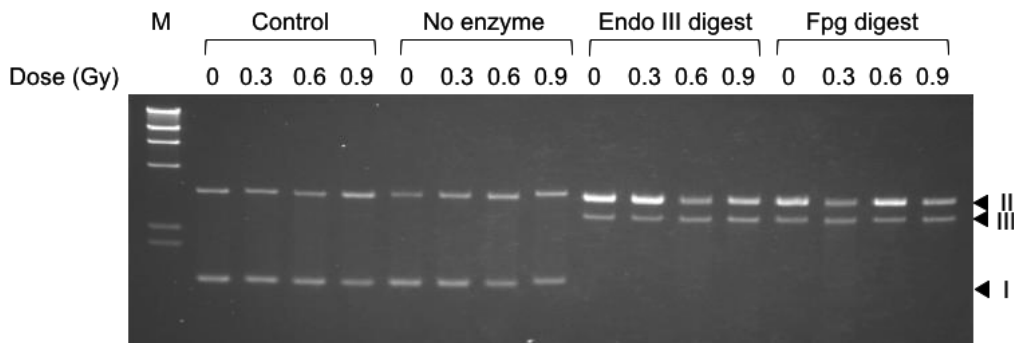


図 2. 中性子線照射を行った pUC19 プラスミド DNA のアガロースゲル電気泳動分析像。ここでは DMSO なしでの照射サンプルを泳動している。M は分子量マーカー-lambda HindIII を、I、II、III は type I (intact), type II (single damage), and type III (complex damage) のバンド位置を示す。Control はインキュベートなし、No enzyme はインキュベートのみ、Endo III・Fpg digests はそれぞれ酸化ピリミジン損傷および酸化プリン損傷の切断酵素処理によりそれらを鎖切断として検出するためのものである。

### ***Future Work***

現在、DMSOを加えて照射したDNAサンプルの分析を行っており、ラジカルスカベンジャー能の強弱がDNA損傷収率へどのように影響するかについて今後検討を行っていく。過去の知見から、細胞内のラジカルスカベンジャー能のレベルは1 M DMSOと同等と考えられることから、細胞内DNA損傷収率のレベルがこれで分かると考えられる。今後は、さらに培養細胞を用いて細胞内DNA損傷を分析し、中性子DNA損傷の全貌を明らかにしていく。

### ***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] M. M. Ali et al., J. Radiat. Res., 45 (2004) 229-237.
- [4] K. Kudo et al., J Electrostat 73 (2015) 131-139.

### 業績一覧

寺東宏明, 徳山由佳, 森加奈恵, 松田外志朗, 山西弘城, 「原子炉中性子によって生じる DNA 損傷分析」京都大学原子炉実験所第 52 回学術講演会, 2018 年 1 月 25-26 日

### 実験・測定補助者

徳山由佳      森加奈恵 (以上、佐賀大学)

(計2名)