

(4) 中性子線による DNA 損傷とその修復の分子機構

東京工業大学科学技術創成研究院先導
原子力研究所
近畿大学原子力研究所
国立がん研究センター研究所

松本義久、島田幹男
山西弘城、松田外志朗
今道祥二

【目的】

本研究の目的は、DNA 修復遺伝子欠損細胞、DNA 修復酵素阻害剤等を用いて、中性子線の DNA 損傷の特徴とその DNA 修復機構を明らかにすることである。種々の DNA 損傷の中で最も重篤と考えられる DNA 二本鎖切断(double-strand break; DSB)は、主として非相同末端結合(non-homologous end joining; NHEJ)と相同組換え(homologous recombination; HR)の二つの機構で修復される。NHEJ は HR に比べて誤りを起こしやすいと考えられているが、一方で、HR は姉妹染色分体を必要とするため S 期から G2 期に限定される。G0/G1 期の細胞の割合が高く、ゲノム上でタンパク質をコードする領域が少ないヒトなどの細胞では、NHEJ の重要性が高いと考えられる。NHEJ では、最初に Ku70、Ku86(Ku80)からなるヘテロダイマーが DSB に結合し、タンパク質リン酸化酵素である DNA-PKcs を動員する。ここで、PAXX が Ku と DSB との結合を安定化させる。必要に応じて末端の整形(プロセシング)が行われた後、DNA ligase IV が末端同士を連結して修復が完了する。XRCC4、XLF は DNA ligase IV の機能を調節、補佐する。

本研究では、NHEJ に関わる分子群の欠損細胞、部分欠失体や変異体発現細胞、阻害剤などを用い、原子炉照射後の細胞生存率、突然変異率、分子の存在量および存在状態を解析することより、原子炉中性子線による DNA 損傷とその修復の分子機構の特徴を明らかにすることを目的とする。

【これまでの経過と 28 年度の目的】

本研究は平成 17 年度から行っている。まず、近大原子炉で XRCC4 欠損細胞および変異体発現細胞の照射を行い、コロニー形成法による生存率を求め、これまでに得られている X 線照射の結果と比較した。近大炉での照射は、(i)中性子線と γ 線が混ざっている点、(ii)線量率が低い点においてこれまでの X 線と大きく異なるが、感受性の傾向は概ね同じであった。さらに、DNA-PK の阻害剤 NU7026、類縁分子 ATM の阻害剤 KU55933、DNA-PK と ATM の両者を阻害する wortmannin の効果を検討し、

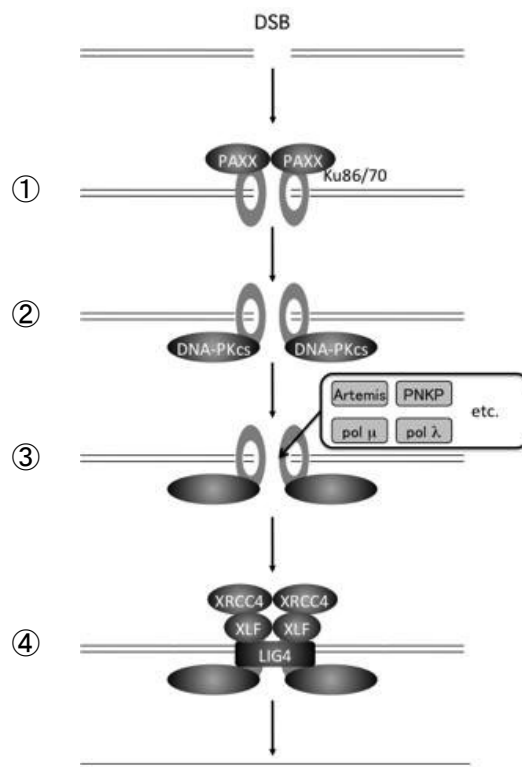


図 1 NHEJ による DSB 修復機構(「新版 放射線医科学-生体と放射線・電磁波・超音波」1.4 放射線による DNA 損傷の修復(松本義久)、p.17-19、医療科学社、2016 年)

更に、原子炉照射と X 線照射の比較を行った。その結果、原子炉照射で生じた DNA 損傷の修復に XRCC4 の調節に DNA-PK と ATM の両方が相補的に関わっていること、更に、原子炉で生じた DNA 損傷は、X 線で生じた DNA 損傷と比較して、DNA-PK、ATM、XRCC4 の連携による修復が難しい、あるいは修復しても間違いを起しやすいたことが示唆された。この理由として、中性子線は電離密度が高く、密集した DNA 損傷(クラスター損傷)を生成することが考えられた。そこで、中性子線によって生じた DNA 損傷の修復における誤りの起こりやすさを測定し、その特徴を解析するため、6-thioguanine 耐性を指標として、HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transferase) 遺伝子の突然変異検出を試みた。平成 25 年度～28 年度にかけて、新たな変異型 XRCC4 発現細胞を今後解析するにあたり、X 線照射を行い、基本的データを収集した。平成 28 年度は、NHEJ における最初の因子である Ku、DNA-PKcs の役割を探るため、Ku70 欠損マウスおよび DNA-PKcs 欠損(scid)マウス由来の胎児線維芽細胞を用いた基礎検討を行った。平成 29 年度は、原子炉運転再開を受けて、これまで原子炉照射をしたことがなかった新しい細胞群に照射を行い、細胞増殖や生存率を指標とした感受性と DNA 損傷応答分子群の解析のための試料を取得した。

【本年度の研究経過】

本年度は平成 29 年 7 月 11 日(火)～12 日(水)、10 月 4 日(水)～5 日(木)に、近畿大学原子力研究所の原子炉を用いた細胞照射を行った。合わせて、中性子と X 線の影響を比較するため、X 線照射装置を用いた照射を行った。

【材料・方法】

1. 細胞

本年度は、これまで用いてきたマウス白血病由来 M10 細胞と正常あるいは変異 XRCC4 遺伝子導入細胞(1,2)、Ku70 欠損マウス、DNA-PKcs 欠損(scid)マウス由来の胎児線維芽細胞(これらをそれぞれ Ku70^{-/-}、SCID 細胞と記す。これらは異なる系統のマウスに由来するため、それぞれの同一系統正常マウス由来の細胞 Ku70^{WT}、CB17 細胞を対照として用いた。)に加え、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞、ヒト B リンパ球由来 TK6 細胞、ヒト唾液腺癌由来 HSG 細胞を用いた。これらの細胞は、RPMI1640 培地(ナカライテスク)あるいは DMEM(4.5g/L glucose) 培地(ナカライテスク)に 10%容の牛胎児血清(Hyclone)と抗生物質として 1%容のペニシリン・ストレプトマイシン溶液(ナカライテスク)を添加したものをを用い、37℃、5%CO₂ の条件下で培養した。

2. 照射

細胞を必要に応じてトリプシン処理、遠心によって回収し、1.5ml の凍結チューブに入れて照射した。原子炉照射では、中性子束密度が最大となる点(下端から 33cm)にチューブを置き、1、2、4 時間照射した。X 線照射は近畿大学原子力研究所の生物照射用 X 線発生装置を用い、管電圧 140 kV、管電流 5 mA、フィルター 1 mm 厚アルミニウムの条件で行った。線量率は 2.2 Gy/min であった。γ 線照射は東京工業大学コバルト照射施設を用いて行った。線量率は 0.8-1.0 Gy/min であった。

また、タンパク質の発現量、翻訳後修飾(リン酸化)状態は、ウェスタン・ブロッティング法によって検討した。放射線照射後、細胞を 1,200 rpm、5 分の遠心によって回収し、Ca²⁺、Mg²⁺-free PBS で 2 回洗浄した。運搬はドライアイス中で行い、保存は-85℃で行った。ウェスタン・ブロッティングは、文献 3 に記載した方法で行った。

【結果と考察、今後の展望】

原子炉照射を行った細胞における XRCC4 タンパク質のリン酸化を引き続き検討中である。特に、マウス胎児線維芽細胞を用いた XRCC4 のリン酸の検出は、X 線、 γ 線の場合も成功しておらず、条件の最適化が必要である。昨年度、従来のウサギポリクローナル抗体に加え、新たにモノクローナル抗体を作製し、また、最近、免疫沈降によりリン酸化の感度を上げることに成功したので、適用を予定している。

【参考文献】

1. Kamdar RP, Matsumoto Y. Radiation-induced XRCC4 association with chromatin DNA analyzed by biochemical fractionation. *J. Radiat. Res.*, **51**, 303-313 (2010).
2. Imamichi S, Sharma MK, Kamdar RP, Fukuchi M, Matsumoto Y. Ionizing radiation-induced XRCC4 phosphorylation is mediated through ATM in addition to DNA-PK. *Proceedings of Japan Academy Series B*, **90**, 365-372 (2014).
3. Sharma MK, Imamichi S, Fukuchi M, Samarth RM, Tomita M, Matsumoto Y. *In cellulo* phosphorylation of XRCC4 Ser320 by DNA-PK induced by DNA damage. *J. Radiat. Res.*, **57**, 115-120 (2016).