

| | |
|---------|---|
| 氏名 | 小畑 結衣 |
| 学位の種類 | 博士（理学） |
| 学位記番号 | 博理工第702号 |
| 学位授与年月日 | 令和5年3月23日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第1項該当 |
| 学位論文題目 | EGFP 発現プラスミド DNA に対する照射環境に依存した損傷生成の評価とこれを導入した細胞のライブセル観察による DNA 修復難易性の研究 |
| 審査会 | 委員長 田内広、立花章、中村麻子、横谷明德、原田浩（研究科外審査委員） |

論文内容の要旨

電離放射線は、生体内に様々な化学的変異（損傷）を与えることが知られている。特に細胞核内の DNA には一本鎖切断（SSB）、二本鎖切断（DSB）、塩基損傷、AP サイトなどの様々な損傷が誘発されるが、これらの大部分は酵素的に速やかに修復される。一方損傷が難修復性である場合、細胞死や突然変異などの遺伝的な変異や不安定性の原因となることが指摘されている。本研究では放射線の線質及び試料環境の違いが、生じた DNA 損傷の修復の難易性にどのような違いを与えるかを明らかにすることを目的とした。

DNA 以外の細胞内小器官への放射線影響を除外した上で DNA 修復反応のみを抽出するため、*in vitro* で放射線を DNA に照射した後に非照射の哺乳動物細胞に導入し、修復効率を評価する手法を開発した。緑色蛍光タンパク質（EGFP）遺伝子をコードするプラスミド DNA を試料とし、放射線照射した後ヒト乳がん由来の細胞（MCF-7）及びその正常細胞（MCF-10A）にリポフェクション法により導入した。蛍光顕微鏡を用いてタイムラプスイメージングにより細胞をライブセル観察し、EGFP 発現細胞数の経時変化を調べ、線量に対する発現細胞数の減少を DNA 修復の阻害を示す指標として評価した。さらに、アガロースゲル電気泳動により、損傷のない元のプラスミド DNA 画分である Closed Circular form（以下、CC と略記）のバンド強度を定量し、線量に対する CC 量の減少を片対数プロットすることにより、平均 1 ヒットにより DNA 鎖切断を与える D_{37} 用量（ $1/e$ 線量）を決定した。この線量を基準に、異なる線質・異なる試料内水分子条件下における EGFP 発現効率の比較を行った。

先行研究（未発表データ）では、10mM Tris-1mM EDTA 緩衝液（ $1 \times TE$ ）中に溶解したプラスミド DNA に対して、2 種類の X 線（150 kVp（LET \sim 2 keV/ μ m）、及び 58 kVp（LET $>$ 2 keV/ μ m））を照射した DNA 鎖切断効率は管電圧に依存して高くなる一方で、 $1/e$ 線量における EGFP 発現効率は両者でほぼ同じであり、生成した DNA 損傷自体の修復効率は同程度であると示唆された。以上から、入射 X 線のエネルギーより、トラックエンドにおける低エネルギー二次電子及び照射中バルク水に生じる OH ラジカル等が DNA 修復の難易性と強く相関するのではないかと考えた。これを調べるために OH ラジカルによる間接効果を抑え放射線トラックの直接作用の効率を相対的に増やした上でその効果を評価するため、水和プラスミド DNA 試料に対する 150 kVp-X 線照射を行った。EGFP 発現効率は水溶液中に比べ若干減少したことから DNA 損傷の難易性

に水和水が関係していると推測された。X 線誘発 SSB とニッキング酵素で誘発した SSB と比較したところ、前者の方が圧倒的に難修復性であることが明らかとなった。これらの結果から、直接、間接の両効果とも DNA の切断端に放射線特有の化学構造を誘発することで修復の難易性に寄与すると考えられる。

放射光施設の単色軟 X 線を利用することで、DNA 主鎖のみに含まれるリン原子に対し大きな吸収断面積（吸収確率）を持つ K 殻の共鳴光電効果を調べることができる。リン原子に特異的にエネルギーを付与すると、主鎖切断を含む難修復性の DNA 損傷が生成されると予測される。軟X線は物質中での透過力が小さいため、プラスミド DNA の乾燥薄膜を試料とし、これにリン K 殻共鳴ピークエネルギー（2.153 keV）を照射した。その結果、他のエネルギーと比較して DNA 鎖切断効率自体は低いですが逆に難修復性であることが示された。以上から DNA 分子骨格のリン K 殻共鳴励起は、難修復性損傷誘発の主要因となり得ることが示された。

がんの放射線治療にも用いられている C^{6+} イオンビーム（線エネルギー付与（Linear Energy Transfer、以下 LET と略す）：76.9 keV/ μm ）をプラスミド DNA 水溶液に照射し、高い LET の効果を調べた。高 LET 放射線は DSB など難修復性の損傷を高頻度で誘発するとされているが、実際に生じた損傷と細胞内修復応答との相関は不明な点が多い。予想通り X 線と比較すると EGFP 発現効率は小さく、難修復性の損傷が生じることが明らかとなった。また溶液中のラジカスキャベンジャー濃度を変えた時の EGFP 発現効率の違いから、損傷の難修復性に OH ラジカルによる間接効果が大きく寄与することが示唆された。

さらに EGFP 発現と DSB 部位の相関を検討するために、制限酵素により DSB を人工的に導入したプラスミド DNA に対する検討も行った。DSB は遺伝的影響に直接関連する重篤な損傷であるとされており、EGFP 発現効率は大きく低下すると予想される。認識配列の異なる制限酵素を用いて“モデル DSB”を作成し、直鎖形状のプラスミド DNA の EGFP 発現効率を比較したところ、コントロール（閉環状構造の場合）の数%~30%程度の EGFP 発現が認められた。このことから、一定程度の DSB 末端の再結合が行われるかあるいは直鎖のまま EGFP 発現が起こっていることが推測された。また、EGFP 遺伝子と DSB サイトの距離が遠いほど発現効率が高く DSB サイト依存性が示された。

本研究で開発した手法を用いた以上の研究を通じ、放射線の線質及び試料内水分子環境の違い、あるいは損傷部位の化学構造や標的遺伝子からの距離が、DNA 修復の難易性と強い相関を持つことを初めて明らかにすることができた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、EGFP発現プラスミドDNAを試料に用い、様々な試料条件下で線質が異なる放射線を照射し、放射線で生成したDNA損傷に占める一本鎖切断効率の評価および損傷プラスミドを導入した細胞のライブセル観察によるDNA損傷修復の難易性を明らかにすることを目的として研究を実施した成果をまとめたものである。本研究において申請者は、DNA損傷が生じる際の物理化学的条件の検討を行うとともに、生じたDNAが細胞内で修復をされるのか否かという、放射線生物学の分野において古くから課題として残っているテーマの一つに取り組んだものである。本研究を進めるにあたっては、放射線の線質に関する専門知識に加え、高いLETを持つイオンビームなど放射線発生原理に関する正確な専門知識も求められるが、本論文の背景と考察の記述および公聴会での質疑応答から、申請者がそれらの知識を十分に有していることが判断された。また、ヒト細胞に導入したプラスミドDNAにコードされている緑色蛍光タンパク質のライブセル顕微観察など、細胞生物学手法に関する技術を駆使して緻密な実験を重ねて得られた結果も正確かつ明確に記述されている。さらに、酵素的処理DNAで得られたデータからモデル式を当てはめ、得られた理論的予測値と放射線照射DNAを用いて測定したデータの比較によって、実際に放射線で難修復性の損傷が生じていることを証明したことは新規に本論文が明らかにした成果である。

申請者は、先進的な研究機関が多数立地している茨城県北部の地の利を活かして、研究機関の施設を共同利用しながら本論文の研究を実施している。申請者が博士論文としてまとめたテーマは、今後もこれらの先端施設を活用した共同研究へとさらに発展し、放射線利用の新たな道を拓くことが期待される。なお、本論文に関わる研究成果の一部は、世界的に権威ある放射線科学の学術誌であるRadiation Research誌に筆頭著者として発表されている。

令和5年2月7日に研究科外委員である京都大学の原田浩教授にオンライン出席いただき公聴会を実施するとともに、同日に引き続き審査会および最終試験を実施した。その結果、本論文は理工学研究科における学位論文の評価基準に照らして十分に要件を満たすものであり、博士（理学）の学位に適合するものとして審査会委員全員の意見が一致した。