

染色体切断の修復は細胞の低線量/低線量率 γ 線照射による影響を受ける

理研 谷田貝文夫、梅林志浩、岩木正哉、国衛研 本間正充、放医研 鈴木雅雄、
宇宙研 石岡憲昭； 日本宇宙フォーラム 嶋津徹、鈴木ひろみ

Repair of DSB at A Specific Site of Chromosome: Influence of Low-dose/Low-dose-rate Gamma-rays

Fumio Yatagai, Yukihiko Umabayashi, and Masaya Iwaki
RIKEN Institute, Wako-shi, Saitama 351-0198
E-Mail: yatagai@riken.jp

Masamitsu Honma
Natl. Inst. Health Sci., Setagaya-ku, Tokyo 158-8051
E-mail: honma@nihs.go.jp

Masao Suzuki
Natl. Inst. Radiol. ASci., Anagawa, Chiba 263-8555
E-mail: m_suzuki@nirs.go.jp

Noriaki Ishioka
Japan Aerospace Exploration Agency, Inst. Space Astronaut. Sci. Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8505
E-mail: ishioka.noriaki@jaxa.jp

Toru Shimazu and Hiromi Suzuki
Japan Space Forum, Chiyoda-ku, Tokyo104-0004
E-Mail: shimazu@jsforum.jp

Abstract: DSB was introduced by the I-Sce I expression vector, pCMV3xnlS-I-Sce I. Repair of DSB at the I-SceI site inserted at intron 4 of the tk+ allele in human lymphoblastoid TK6 cell line, TSC5, was measured by induction of TK-deficient mutants. Similarly we also measured the revertants due to such repair in its compound heterozygote (tk-/-) cell line, TSCER2, which carried an additional point-mutation in exon 5. The former and later measurements reflect the DSB repair efficiency due to DNA end-joining (EJ) and homologous recombination (HR), respectively. The pre-treatment, γ -irradiation with 30 mGy at a dose rate of 1.2 mGy/hr did not influence the EJ repair efficiency but enhanced HR repair efficiency, ~50 %. The I-SceI digestion followed by much lower dose/(dose-rate) γ -irradiation (8.5 mGy at 0.125 mGy/hr) during the incubation resulted in a similar tendency of HR enhancement (~50 %). This kind of treatment, introducing the chromosome break by the restriction enzyme, can be regarded as a useful approach for elucidating the influences of space environments on the DSB repair.

ふつう、宇宙環境は微小重力に象徴されている。低線量かつ低線量率の宇宙放射線による被ばくの影響も見逃してはならないと思われる。これらの問題は、単に宇宙飛行士への健康影響といった観点からだけではなく、もう少し将来を見据えた宇宙環境利用といった大きな視野からも検討が必要な問題であろう。重力影響と放射線の影響を切り離して評価する系の樹立も望ましく、これらの相乗効果の存在までも評価できるともっとよい。実際に、スペースシャトルなどを利用した宇宙フライト実験によって、相乗効果を検討する先駆的な研究がすでになされているが、種々の系で様々な結論が出されている。ISS を利用した宇宙実験を行うことによって、単に生物試料を長期間宇宙に滞在させることだけでは、宇宙環境を反映した、より信頼のおけるデータが得られるとは限らない。すなわち、分子、細胞、

個体、いずれのレベルでもよいが、適切な実験系を構築する必要がある。

すでに、遺伝的影響の中でも、染色体レベルでの変異誘発効果に的を絞って、ヒト培養細胞を利用して放射線の影響を高感度に検出するとともに、低重力による影響も併せて検出することを目指して、ISS 実験計画を進めている。ヒトリンパ芽球 TK6 細胞で確立した LOH (Loss of Heterozygosity: ヘテロ接合性の喪失) 解析システムを利用すると、通常の培養液中の浮遊状態での 10cGy といった低線量の X 線や炭素イオン (135MeV/u) 照射による変異誘発効果を検出できることをすでに報告してきた。また、凍結した細胞に炭素イオン 10cGy 照射をした場合でも、浮遊状態より少し感度は低下するが、放射線照射を反映する LOH (Interstitial Deletion) を検出できた。これらの地上での実験結果は、現在計画

中の ISS を利用する宇宙実験への期待を膨らませてくれるものと受け止めている。

さらに、新たな観点、たとえば染色体切断 (DNA2 重鎖切断: DSB) の修復への宇宙環境因子の影響を明らかにする、といった観点からの研究を進展させていくための準備研究も進めている。ここでは、その進行状況を報告する。

染色体切断は、放射線による直接的な作用でも生じるが、間接的な作用や代謝の過程でも生じる。染色体切断の生成だけではなく、その修復に対して、宇宙環境放射線や低重力などの因子がどのような影響を及ぼすかも大変興味深い。本間らを中心にして私たちは、制限酵素 I-SceI 発現ベクターにより染色体の特定部位 (制限酵素 I-SceI 認識部位) に切断を導入する系を、TK6 細胞を利用して樹立した (図 1)。この系は、とりわけ、後者の DSB 修復への影響を調べるのに好都合である。

この系を利用して、変異誘発測定時と同様に変異細胞 (正確には変異 Transformant) の数を測定することにより、DSB の修復効率を測定することにも成功した (図 2)。DSB の主な 2 つの修復経路、非相同末端結合 (End-joining: EJ) と相同組換え (Homologous Recombination: HR) のうち、EJ の方が HR よりもおおよそ 100 倍も効率よく DSB を修復できることを明らかにした (データ、省略)。また、最近になって、I-SceI 発現ベクターの高効率 (100 個の細胞のうち 1 個以上: 従来の 100 倍) の導入を可能にするエレクトロポレーションの条件を確立することができ、より高精度の実験が可能になった。

そこで、今回は、宇宙環境における低線量/低線量率に至らないまでも、図 3 のような 2 条件で細胞を炭酸ガス培養器で培養しながら γ 線を照射する装置 (放射線医学総合研究所) を駆使して、これらの γ 線照射が I-SceI 酵素による DSB 切断の修復にどのような影響を及ぼすかを調べた。現在までに得られた予備的な実験結果からは、やはり、いずれの条件でも、放射線照射をしない場合と同様に、EJ の方が HR よりも 100 倍くらい高い効率で修復に寄与していることが明らかになった。 γ 線照射しない場合との DSB 修復効率の比較から今回の実験結果をまとめると以下のようなになる。

1) 予めの低線量/低線量率 γ 線 (1.2mGy/hr, 30mGy: 条件 A) 照射によって、I-SceI 切断の HR 修復効率が 50%程度増加する。

2) I-SceI 切断後のより低線量/低線量率 γ 線照射 (0.125mGy/hr, 8.5mGy: 条件 B) では、照射による HR 修復効率増加の割合が 80%程度増加する。

これらの実験結果から今後の宇宙生物研究の展

開を考えると、以下のようなことが示唆できる。

1) ここで紹介した系 (制限酵素による染色体の特定部位切断) は、宇宙放射線、低重力など宇宙環境における DSB 修復の研究に有望と考えられる。

2) 現在、準備中の ISS 実験においても、余力があれば、細胞を地上に回収して制限酵素による切断を行いたい。宇宙環境下に細胞が長期滞在した場合の影響を推測できる可能性がある。

なお、上記の γ 線照射と同一の条件でチミジンキナーゼ (TK) 変異の誘発測定 (従来の LOH 解析) を行った結果、条件 A では、低頻度ではあるが、照射によって変異が誘発されることが明らかになった。ここでは、詳細についてはふれないが、この場合の変異も、やはり、放射線照射の直接的な作用による染色体切断が原因とは考えにくい。このような結果からも、放射線の間接的な作用の重要性が示唆される。

参考文献

- 1) Yatagai, F., Morimoto, S., Kato, T. and Honma, M. Further characterization of loss of heterozygosity enhanced by p53 abrogation in human lymphoblastoid TK6 cells: disappearance of endpoint hotspots. *Mutation Research*, **560**, 133 (2004).
- 2) Morimoto, S., Kato, T., Honma, M., Hayashi, M., Hanaoka, F., and Yatagai, F.: Detection of genetic alterations induced by low-dose X-rays; analysis of loss of heterozygosity for TK mutation in human lymphoblastoid cells., *Radiat. Res.*, **157**, 533 (2002).
- 3) Morimoto, S., Honma, M., and Yatagai, F.: Sensitive detection of LOH events in a human cell line after C-ion beam exposure, *J. Radiat. Res.*, **43 Suppl.**, 163 (2002).
- 4) Umabayashi, Y., Honma, M., Abe, T., Ryuto, H., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., and Yatagai, F.: Mutation induction after low-dose carbon ion beam irradiation, *Biol. Sc. Space*, **19**, 237-241 (2005).
- 5) Umabayashi, Y., Honma, M., Suzuki, M., et al. Mutation Induction in Cultured Human Cells after Low-dose and Low-dose-rate γ -ray Irradiation: Detection by LOH Analysis. *J. Radiat. Res.*, *in press*, (2006).
- 6) Honma, M., Izumi, M., Sakuraba, M., Tadokoro, S., Sakamoto, H., Wang, W., Yatagai, F. and Hayashi, M.: Deletion, rearrangement, and gene conversion; genetic consequences of chromosomal double-strand breaks in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **42**: 288-298 (2003).

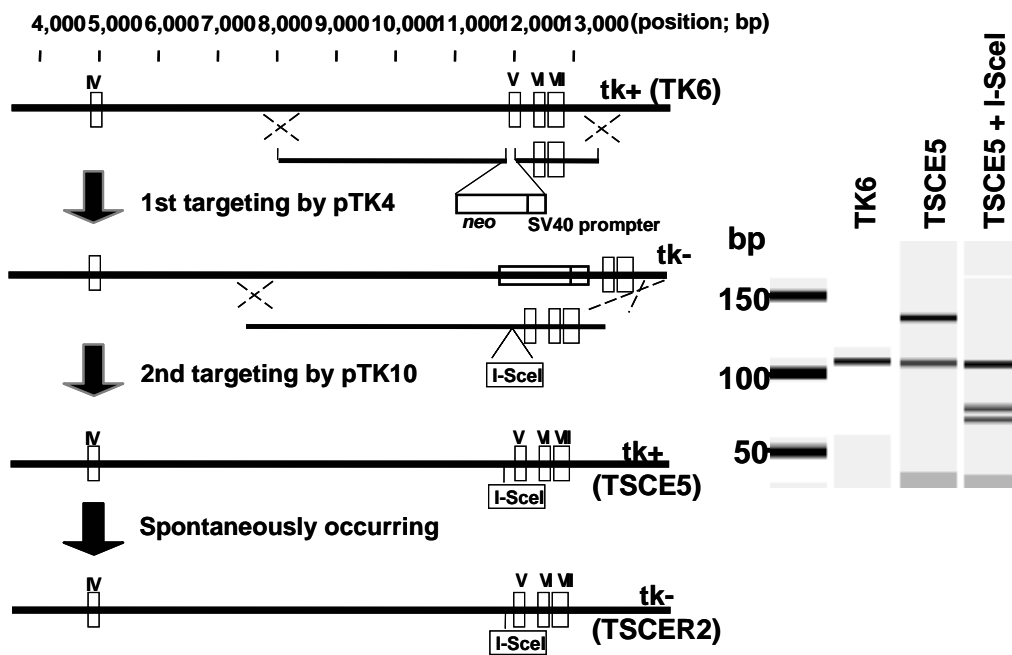


図1 DSB 修復測定のためのチミジンキナーゼ遺伝子座内への制限酵素 I-SceI 認識部位の導入 2 回に分けての薬剤マーカーを利用した Gene Targeting 法による。

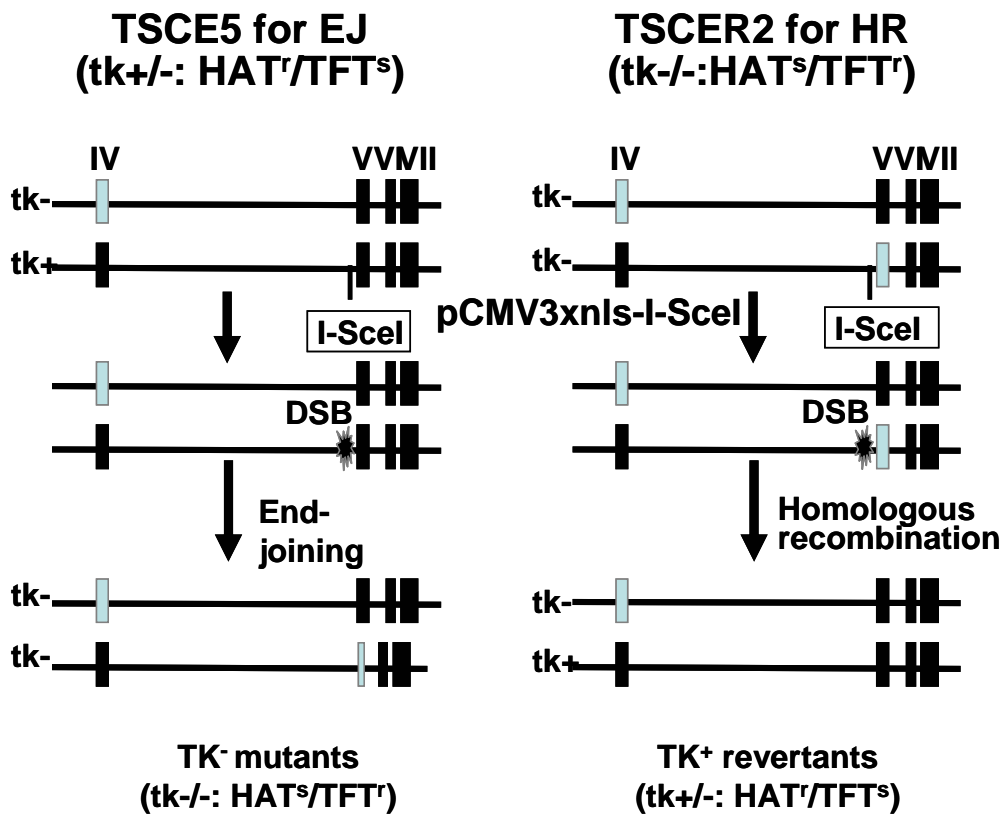
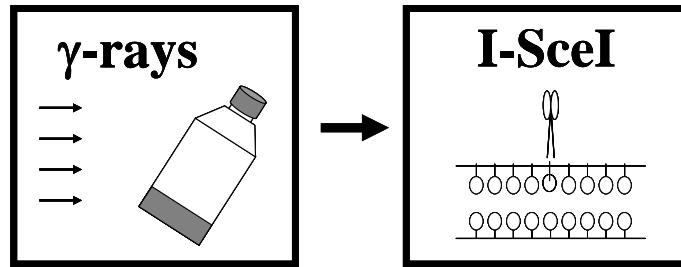


図2 DSB 修復における、主要 2 経路、End-joining (EJ) と Homologous Recombination (HR) の寄与 細胞株の樹立と測定原理：EJ は TK(-) 変異の、HR は TK(+) 復帰の誘発率から修復効率を測定

条件 A : 30 mGy [25 hr (1.2 mGy/hr)]



条件 B : 8.5 mGy [68 hr (0.125 mGy/hr)]

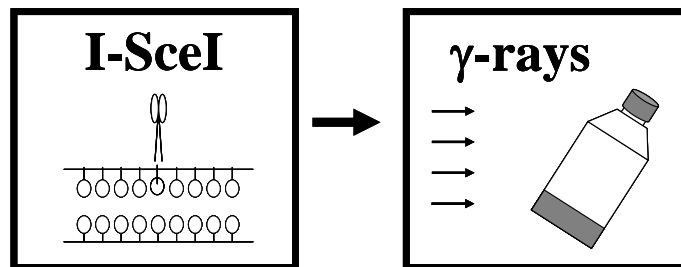


図3 低線量/低線量率 γ 線照射によるDSB修復効率への影響を測定するための γ 線照射条件
両条件とも細胞の γ 線照射は炭酸ガス培養器で培養しながら行う（放射線医学総合研究所）