

ゲノム DNA 二重鎖切断とその修復の高感度検出法の開発

東大 小林一三、半田直史、河合幹彦、高橋規子、福田江里

Sensitive detection of DNA double-strand breakage and its repair

Ichizo Kobayashi, Naofumi Handa, Mikihiro Kawai, Noriko Takahashi, Eri Fukuda

Department of Medical Genome Sciences, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo
108-8639

e-mail: ikobaya@ims.u-tokyo.ac.jp

Abstract: It is necessary to develop a sensitive detection method of biological damage of cosmic radiation. Among radiation damages, DNA double-strand breakage is the most important because it leads to cell death, mutagenesis and carcinogenesis.

We have been developing a very sensitive method for detection of DNA double-strand breakage. A bacterial (*Escherichia coli*) genome is made of a circular double-stranded DNA of 4,000,000 bp. This huge circle is easily trapped in the trees of agarose resin and cannot move in a electric field. However, a single double-strand break would make it a linear form, which can move through agarose under an alternating electric field. This represents an application of pulsed-field gel electrophoresis. Our goal is to establish this method for sensitive detection of DNA double-strand breakage *in vivo*.

- (1) We detected conditions for detection of chromosomal DNA double-strand breakage by pulsed-field gel electrophoresis.
- (2) We measured 'background' DNA double-strand breakage under a standard condition of bacterial growth. We used densitometry. We confirmed accumulation of broken chromosomes in a *recBC* mutant.
- (3) We measured DNA double-strand breakage after its artificial induction by methyl-specific endonuclease and UV irradiation.

These results indicate that this represents a very sensitive method for detection of chromosomal double-stranded DNA breakage. We can try experiments in space to evaluate potential drawbacks of this method. In such cases, we need to find out further details, that includes appropriate physiological conditions for the bacterial cells and their containers. In order to increase sensitivity of this method, it is necessary to reduce the background chromosome breakage. We need to understand biology of chromosomal double-strand breakage, including programmed death in bacteria and damage repair.

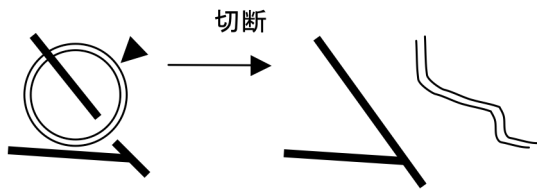
Keywords: DNA repair, bacteria, DNA damage

1. 背景

宇宙放射線は様々な損傷を人間にもたらす事が確実であり、宇宙ステーション内外などの状況での被曝の生物影響について、科学的に評価する必要がある。特に、低い線量での被曝の影響を、感度良く検出する系が必要とされている。これら放射線損傷の中で重要なのは、ゲノム DNA への損傷、とりわけ、二重鎖からなる DNA の両鎖の同時切断によって DNA

の連続性が絶たれる「DNA 二重鎖切断」損傷である。それは、細胞死（ひいては個体死）と突然変異生成（ひいてはガン化）をもたらす。

本研究グループは、DNA 二重鎖切断のバイオロジーを研究する過程で、DNA の二重鎖切断の最も感度の高い検出法を、次の原理に基づいて開発してきた。大腸菌の染色体は400万塩基対の巨大な環状 DNA になっている。一般に、DNA は荷電しているので、



寒天の樹脂の
枝トラップ

外れて動く

電場にさらすと移動する（電気泳動）。しかし、この巨大な輪は、寒天の中ではアガロース樹脂というジャングルの枝に引っかかってしまい、電場をかけても身動きできない。400万ある潜在的なサイトのうち一カ所にでも二重鎖切断が起きれば、環状ゲノムは線状になる。そこで、電場の向きをジグザグに交代させてかけると、この巨大線状ゲノムは、アガロースの枝にひっかからず、するすると動いていく。これは、パルスフィールドゲル電気泳動（Pulsed-field gel electrophoresis）と呼ばれる方法のひとつの応用である。

本研究の目的は、この方法を DNA 二重鎖切断の高感度検出法として確立し、「きぼう」などでの、船内船外実験への道を開くことである。

2. 結果

(1) 細菌染色体 DNA 二重鎖切断のパルスフィールドゲル電気泳動法による検出の確立。 バックグラウンドの切断を低くする装置のセットアップ、試料調製法、電気泳動法を工夫して、満足すべき結果を得た。泳動条件によって、切断がまれで大きなフラグメントができる場合と、切断が激しく、小さいフラグメントができる場合を区別できた。

(2) 標準的な培養方法でのバックグラウンドの DNA 二重鎖切断の定量化と解析。 通常の培養条件の大腸菌について、デンストメトリーで、ゲルの上部の DNA（巨大線状染色体）を定量できた。さらにウェルに残る DNA を蛍光ではかる事によって、より多くの情報を得ることができた。大腸菌の *recA*, *recBC* 変異体では、巨大な線状分子がより多く蓄積する事が確認できた。これは、何もしなくても大腸菌の染色体が切断され、それが組み換え修復されている事を示す。

(3) 人為的に DNA に二重鎖切断を導入したときの、この方法での DNA 二重鎖切断の定量。 大腸菌自身がもつ切断酵素をきわめて弱く働かせて二重鎖切断をひき起こすと、巨大な線状染色体が増えていった。より強く働かせると、強さに応じて DNA が小さくなっていく時間変化が可視化できた。*recA* 変異体、*recBC* 変異体では、それらの作用機構から予想される切断パターンが得られた。さらに、寒天に埋め込んだ大腸菌に紫外線を照射してから、染色体切断を検出した。

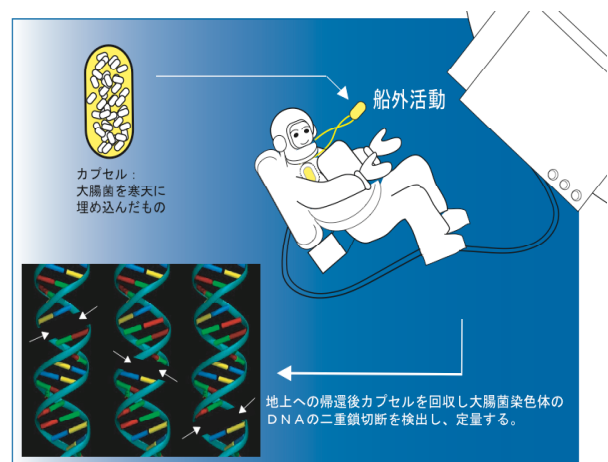
3. 展望

これらの結果から、次のような宇宙実験が現実的になったと考える。

(1) 宇宙飛行士が、大腸菌を寒天に埋め込んだものを入れたカプセルを、絆創膏のようなもので身にはりつける。あるいはペンダントに入れて身につける。この状態で、宇宙飛行（船内活動）を行う。

(2) 地上への帰還後、カプセルを回収し、この方法で大腸菌染色体の DNA 二重鎖切断を検出し定量する。

(3) 比較の対照として、地上に残った対照実験者が身につけたカプセルを用いる。



4. 課題

この実験系は、従来の多くの系よりもはるかに高い感度で DNA 二重鎖切断を検出することになる。地上で、低線量率の電離放射線、荷電重粒子線、中性子線を放射するモデル実験を進め、それらの相対的な生物効果を見る生物学的線量計として利用するのが、一つの方向である。もうひとつ、これで宇宙実験（あるいはそれに準じた実験）を一度試みて有効性を確かめるという方向もありうる。この場合でも、大腸菌の活動レベル（生・死・眠）、カプセルの形状性状など、宇宙飛行の実際（宇宙服の形状など）に照らし合わせて、詳細を詰めていく必要がある。

自然状態でも頻繁に染色体の切断が起きては修復されている事が明らかに示されたので、染色体切断・プログラム死・切断修復の機構を明らかにする事が、このバックグラウンド切断をおさえて検出感度を上昇させるために必要であろう。

謝辞

本研究は、第9回（平成18年度）選定 宇宙環境利用に関する公募地上研究および日本学術振興会科学研究費補助金（課題番号：17310113, 19657002）の

援助を受けた。

参考文献

[1] Ichizo Kobayashi, Naofumi Handa. DNA double-strand breaks and their consequences in bacteria. In **Encyclopedia of Life Sciences**, (on-line publication) **Wiley**, in press.

[2] Eri Fukuda, Katarzyna H Kaminska, Janusz M Bujnicki and Ichizo Kobayashi. Cell death upon epigenetic genome methylation: a novel function of methyl-specific deoxyribonucleases. **Genome Biology**, 9:R163 (2008).