

DNA 損傷における塩基配列特異性の決定法：発がん と 老化 における意義

川西 正祐（三重大学・医学部・衛生学教室）

細胞ががん化する過程には多くのステップがあり、重要な要因のひとつに DNA の損傷がある。また、染色体の末端部に存在するテロメア繰り返し配列の切断が老化の促進に関与している可能性が指摘されている。DNA 損傷をもたらす主要な原因は放射線や紫外線等の物理的因子や環境化学物質、食品、医薬品等の化学的因子等であり、この DNA 損傷において活性酸素は重要な役割を果たしている。また最近、慢性的な感染や炎症による発がん NO および活性酸素の関与が疑われている。これらの DNA を損傷する因子が DNA のどのような塩基配列に特異的に損傷を与えるかについての研究はあまりなされていなかったが、突然変異や発がん、老化に至る過程を解明する上で非常に重要である。我々がこれまでに明らかにしてきた活性酸素と各種ラジカルによる DNA 損傷、アルキル化剤による DNA 損傷および紫外線特に UVA による電子移動を介した DNA 損傷の塩基配列特異性について明らかにし変異原、発がん、老化における意義を考察する。

1. DNA 損傷における塩基配列特異性の決定法

実験にはヒトがん原遺伝子 c-Ha-ras-1 およびがん抑制遺伝子 p53 のホットスポットを含む約 100~400 bp の DNA 断片を用いる。これらの DNA 断片を組み込んだプラスミドを大腸菌に導入しサブクローニングを行う。大腸菌からプラスミドを抽出し、制限酵素で切断して多量の DNA 断片を得る。その DNA 断片の 5' 末端を放射性同位元素の ^{32}P で標識し、さらに制限酵素で切断して一端のみが標識された単離 DNA 断片を調製する。DNA 損傷の塩基特異性の決定は、単離 DNA 断片と化学物質を生体内重金属や生体内還元物質などの共存下で一定時間 37°C で反応させた後、ピペリジン処理を行う。ピペリジン処理によって、DNA 鎖切断のみならず塩基の損傷の検出が可能になる。Maxam-Gilbert法を応用し、オートラジオグラムの各塩基のバンドの吸光度を測定して DNA 損傷の塩基特異性を決定する。

2. 発がんにおける DNA 損傷の塩基配列特異性の意義

DNA 損傷における塩基配列特異性を決定する因子としては、各種ラジカルの酸化還元電位、アルキル化剤の DNA 認識、塩基やジヌクレオチドまたはトリヌクレオチドのイオン化ポテンシャルや分子静電位 (molecular electrostatic potential) 等が考えられる。DNA 中の A、G、C、T、4 つの塩基の中で G の酸化電位が最も低く、特に GG や GGG 等の G の連続配列の 5' 側の G は容易に酸化されやすいことが分子軌道法を用いた理論計算により明らかにされている。DNA 損傷から突然変異さらには発がんに至るプロセスには未だ不明な部分が多いが、突然変異が起きるには少なくともホットスポット等の DNA の特定の部位が損傷されることが必要である。従って、DNA のどの部分に塩基配列特異的な損傷が引き起こされるかについて解析を行うことは発がん機構を解明する上で非常に重要である。

(1) 活性酸素：スーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル ($\bullet\text{OH}$) は 3 重項酸素分子 (O_2) がそれぞれ 1, 2, 3 電子還元された分子であり、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) は励起状態の酸素分子である。生体内で DNA を損傷する活性種は O_2^- や H_2O_2 ではなく、それらから金属イオン等の触媒作用によって生じる、より反応性に富む $\bullet\text{OH}$ 、 $^1\text{O}_2$ 、金属酸素錯体等であると考えられる。 $\bullet\text{OH}$ は非常に大きな酸化還元電位をもっているため、ほとんど全ての塩基を非特異的に損傷し多様な分解生成物を産生する。一方、 $^1\text{O}_2$ は G を特異的に損傷する。発がん性が指摘されているニッケル化合物やコバルトは H_2O_2 の存在下で金属酸素錯体を形成し、ニッケル化合物は C, T, G を、コバルトは G をやや強く損傷する。また、古くから変異原性が認められている銅も H_2O_2 の存在下で金属酸素錯

体を生成し T を、特に 5'-GTC-3' の T を塩基特異的に損傷する。

(2) ラジカル：ヒドララジンは生体内重金属や酸化酵素の存在下で窒素中心ラジカルを生成し、DNA の塩基配列中の G を特異的に損傷する。硫酸ラジカルは単独の G よりも GG の様な G の連続配列を損傷する。食品添加物やアクネの治療薬に用いられている発がんプロモーター過酸化ベンゾイルはベンゾイルオキシラジカル（酸素中心ラジカル）を生成し GG や GGG の 5' 側の G を特異的に損傷する。

NO は不対電子一つを持った反応性の高いフリーラジカルであり、生理的に重要な役割を演ずる一方で、感染や炎症によって過剰に産生されると DNA 損傷等を引き起こし発がんをもたらす可能性がある。NO は生理的条件下で酸化や還元を受けやすく、 O_2^- と反応し活性の強いパーオキシナイトライト ($ONOO^-$) を生成し、 $\bullet OH$ と同様に全ての塩基を損傷する。また、最近我々は NO^- についても塩基特異的 DNA 損傷の解析を行っている。

(3) 紫外線 (UVA)：近年 UVA にも発がん性のあることが報告され、IARC (International Agency for Research on Cancer) においても UVA の発がん性は UVB と同程度の 2A (ヒトに対して発がんの可能性が高い) と評価している。しかし、UVA は DNA を直接損傷しにくいことから、光増感分子を介した 2 つのタイプの間接的な DNA 損傷の可能性もある。Type I の反応では電子移動により 2 本鎖 DNA 中の G が連続した配列 (5'-GG-3') の 5' 側の G を特異的に損傷する。Type II の反応では 1O_2 を生成し G を特異的に損傷する。その他、 O_2^- を生成し銅や鉄の存在下で DNA を特異的に損傷する反応もある。

(4) アルキル化剤：アルキル化剤のストレプトゾトシンによる DNA のメチル化には塩基配列特異性があり、GGG 配列の中央の G あるいは GG の 3' 側の G が強く損傷される。また、メチルニトロソ尿素は DNA の G をメチル化するが、特に GGG の中央の G をメチル化する。これらの塩基配列特異性は損傷される部位の分子静電位によって説明できる。

(5) 抗がん剤：がんの化学療法に用いられる抗がん剤による DNA の塩基特異的分子認識の研究も重要である。抗がん剤は DNA の特定の塩基配列を認識し、アルキル化や DNA 切断等により DNA を損傷し、アポトーシスによりがん化した細胞を死滅させる。しかし、抗がん剤を長期間、多量に投与すると重篤な副作用や薬剤耐性が現れる。我々は、抗がん剤の塩基配列特異的 DNA 切断を DNA 結合試薬 (アンプリファイアー) と共存させることにより変化させ副作用を低減する研究も行っている。

今後 DNA の塩基配列特異的損傷が発がん過程のイニシエーションやプロモーション作用、また抗がん効果等にどのように影響をおよぼすか、今後さらなる研究が必要である。

3. 老化における DNA 損傷の塩基配列特異性の意義

加齢とともに活性酸素、放射線や太陽紫外線等の酸化ストレスにより DNA や蛋白質の損傷が蓄積され老化が進行するという加齢のフリーラジカル説が提唱されている。また最近、染色体の末端部に存在するテロメア繰り返し配列 (5'-TTAGGG-3')_n の切断が老化のプログラムに関与しているとの報告がなされた。我々はテロメア繰り返し配列を含む合成 DNA を用い、酸化ストレスによる DNA 損傷の塩基特異性の解析をおこなった。その結果テロメア繰り返し配列中の 5'-GGG-3' 配列の 5' 側の G が酸化ストレスによって塩基配列特異的に損傷されることが明らかになった。また、テロメア繰り返し配列の短縮が酸化的ストレスにより通常の 4～5 倍促進されることが報告されている。従って、酸化的ストレスがテロメア繰り返し配列に塩基特異的な損傷をもたらす老化に関与する可能性が考えられる。