原子間力顕微鏡による DNA 損傷の検出

村上 正弘, 古川 章, 南久松 真子, 早田 勇

放射線医学総合研究所障害基盤研究部 〒263-8555 千葉県稲毛区穴川 4-9-1

Atomic force microscopy of DNA damage

Masahiro Murakami, Akira Furukawa, Masako Minamihisamatsu and Isamu Hayata

Division of Radiobiology and Biodosimetry, National Institute of Radiological Sciences
9-1, Anagawa-4-chome, Inage-ku, Chiba 263-8555, Japan

Summary

An atomic force microscope (AFM) has become a useful tool to visualize biological molecules with nanometer level resolution. It is theoretically possible to visualize biological molecule in the original form by AFM. Many types of biological molecules, such as DNA and protein, have been observed in air or in water by AFM.

We used AFM for nanometer-level structural analysis of chromosome damage induced by radiation. The AFM could image the structure of chromosomes on Giemsa stained or unstained samples.

Atomic force microscopy to analyze DNA structure was also introduced to further explain of formational changes in plasmid DNA after radiation exposure in comparison with agarose gel electrophoretic analysis (Murakami, M., et al., 2000). Three forms of plasmid DNA, closed circular (intact DNA), open circular (DNA with single strand break) and linear form (DNA with double strand break) were visualized by dynamic force mode AFM after γ -irradiation. The torsional feature of the plasmid DNA was imaged better with AFM than with a transmission electron microscope (TEM).

Keywords : atomic force microscope, DNA damage

緒 言

電離放射線は、DNA 分子に対して塩基損傷、DNA 単鎖切断、DNA 二重鎖切断等の損傷を引き起こし、これらが細胞の不活化の主要因と考えられている (Chadwick, K.H. and Leenhouts, H.P., 1994)。これらの損傷は、生体内の修復機構により修復されるが、基質となる DNA 損傷の構造を明らかにする事は、修復の分子機構研究に有用な情報を提供する事になると期待される。従来、電離放射線誘発 DNA 損傷の解析には、ゲル電気泳動

法 (Roots, R., et al., 1985)、パルスフィールドゲル電気泳動法 (Murakami, M., et al., 1995 b)、電子顕微鏡法 (Herskind, C., 1987) 等が用いられてきた。近年発明された原子間力顕微鏡 (AFM) は (Binnig, G., et al., 1986)、Si や Si₃N₄ などのできた長さ数百 μ m のカンチレバーの先に付いている逆ピラミッド形をした鋭利なプローブを限りなく物質の表面に近付けた状態で走査し、原子間力を利用して物質の表面形状を計測し画像化するものである。鳥瞰図を描く一種の表面粗さ計であるが、原理的には個々の原子を識別できる程の高い解像度を持つ。生体高分子物質の AFM による観察に際しては、従来の電子顕微鏡観察において必要とされるような試料の化学固定、金属の蒸着等の操作は不要であり、観察条件

受付：2000年4月4日 受理：2000年4月10日
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第28回大会シンポジウムII「新しい変異原検出法へのアプローチ」で発表された。
This paper was presented to the symposium II "The approach to novel detection systems for environmental mutagens" at the 28th JEMS annual meeting, 1999.

も空气中、溶液中どちらでも観察可能である。AFMは近年生体高分子物質の解析の有用な道具として利用され、DNA、染色体、膜蛋白質、DNA-蛋白質複合体、中性子線照射によるDNA損傷等について新たな知見が多く得られている(Hansma, H.G., et al., 1992; De Grooth, B.G. and C. A. J. Putman, 1992; Hansma, H.G. and Hoh, J.H., 1994; Pang, D., et al., 1998; Czajkowsky, D. M. and Shao, Z., 1998; Hansma, H.G., 1999)。

われわれは、 γ 線等に比べて高い細胞致死効果を示す重粒子線による染色体異常の詳細な構造を解析するために、ネオンイオン線もしくは炭素イオン線をマウス由来の電離放射線高感受性突然変異細胞(SL 3-147, Murakami, M., et al., 1995 a)に照射した後、その染色体構造を通常の光学顕微鏡(LM)およびAFMを用いて解析した。

さらに、通常の実験室環境下において、無固定、無染色の状態の高い解像度で生体高分子物質を可視化することができるというAFMの利点を生かして、プラスミドDNAに対する γ 線照射により生じたDNA二重鎖切断の超微細構造を解析する系を開発し、 γ 線照射後のプラスミドDNAのナノメートルレベルでの構造を可視化する事ができた。

1. 重粒子線照射後の染色体損傷の解析

ネオン線もしくは炭素イオン線照射後の染色体標本をギムザ染色したところ、LMによって細胞分裂中期染色体中に、染色分体型ギャップ、染色分体型切断等が観察された。

続いて同一の染色体標本を、AFMで解析した。ギムザ染色した未照射の試料において、AFMにより詳細な染色体像を得る事ができた。染色体表面は比較的滑らかであった。一方、無染色の試料においては、染色体の表面は粗くなっており、高い拡大率で走査したところ、染色体の30 nm 繊維構造に相当すると思われる構造を可視化することができた(村上, 江口-笠井, 2000)。続いて、照射後の分裂中期染色体サンプルをAFMで観察したところ、LM観察によって染色体異常が確認されたものでは、LM観察と同様に、AFMで染色分体型ギャップ、染色分体型切断等が観察され、その中には、同一染色体上に染色分体型切断、染色分体型ギャップが観察されたものがあつた(村上, 他, 1999)。切断領域では切断点の高さは、ほぼ基盤部分と同じ高さまで低くなっており、染色体が不連続であった。染色分体型ギャップの生じている領域では、連結部分の高さは基盤部分の高さまでは低くなっておらず、染色体断片が繋がっている事が確認できた(村上, 江口-笠井, 2000)。AFMでは、高解像度で染色体構造の画像を取得できるだけでなく、同時に高さ情報、距離情報等が得られるので、LMより詳細に染色体形態を解析する事が可能であった。

2. γ 線照射後のDNA損傷の解析

次に γ 線照射によるDNA損傷の解析を行うために、プラスミドDNAを ^{60}Co - γ 線で照射し、その形状変化をAFMにより解析した。 γ 線による照射を受けると、プラスミドDNAは種々の損傷を受けその損傷の種類により形状が変化する事が知られている。損傷を受けていないプラスミドDNAは、多くのねじれを持ったスーパーコイル状のいわゆる閉環状DNAであるが、放射線により単鎖切断が生じるとねじれが解消されて、開環状DNAになる。さらにDNA二重鎖切断が生じるとひも状の線状DNAとなる。アガロースゲル電気泳動法で解析すると、上記の3形態によりプラスミドDNAのアガロースゲル上での移動が異なる事から容易に識別することができる。

まず、 γ 線照射前後のプラスミドDNAの形状分布をアガロースゲル電気泳動法で解析した。未照射のサンプルでは、ほぼすべてのDNAは閉環状であったが、 γ 線照射によりその割合は急激に減少した。線量5.6 kGyでは、閉環状DNAは検出限度以下になり、開環状DNAが大多数を占める状態になった。開環状DNAは今回用いた線量範囲においては、すべての条件下で大多数を占めた。線状DNAは線量依存的にほぼ直線的にその割合が増加することが明らかになった(Murakami, M., et al., 2000)。

続いて、電気泳動法解析に用いたものと同じサンプルをAFMを用いて観察を試みた。未照射のプラスミドDNAを観察すると、いくつかのねじれを持ったスーパーコイル状の閉環状DNA像を得る事ができた。線量1.9 kGyの条件では、閉環状、開環状そして線状の3つの形状のプラスミドDNAを観察することができた。線量5.6 kGyと8.3 kGyの条件では、閉環状はほとんど確認されず、開環状と線状のものが観察された。特に、DNA二重鎖切断の結果生じた線状DNAの割合は、線量に従って増加するという良い線量効果関係が認められた(Murakami, M., et al., 2000)。次に、DNA分子の長さを測るために、制限酵素(SmaI)で一箇所切断した線状DNAを観察し、長さを計測したところ平均的長さはおよそ $1\mu\text{m}$ であった。この値は、3 kbpのB型DNAとして仮定した計算から予測される長さ $1\mu\text{m}$ と同じであった。ロータリーシャドウイング法による透過型電子顕微鏡観察(TEM, 試料作成法は, Takeda, Y., et al., 1992に従った。)によっても同様の値が得られた。TEMとは異なりAFMでは、金属の蒸着等の操作を行っていないため、DNA鎖のねじれの様子が詳細に観察する事ができた。 γ 線の照射前後において、AFMによりDNA鎖の長さを計測し比較したところ、未照射の試料と比べて、照射後の試料、特に5.6 kGyと8.3 kGyで、DNA鎖の短縮が認められた(Murakami, M., et al., 2000)。

結 語

AFM は、原理的には個々の原子を識別できる程の高い解像度を持ち、ナノテクノロジーにおける重要な装置である。生命科学の領域においては、AFM は、細胞レベルから分子のレベルまで幅広い範囲で応用が始まっている。われわれは、この AFM を用いることにより、染色体レベルから DNA レベルまでの範囲で、電離放射線による損傷を詳細に可視化、解析する事ができた。今後は、電離放射線による DNA 損傷を解析するために、さらに解像度を上げた AFM を用いて損傷領域における詳細な構造変化を可視化解析する系を開発する予定である。

謝 辞

本研究は、科学技術庁原子力基盤技術クロスオーバー研究および放射線医学総合研究所重粒子線がん治療装置の共同利用の一環として行われた。

参 考 文 献

- Binning, G., C.F. Quate, C. Gerber (1986) Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.*, 56, 930-933.
- Chadwick, K. H. and H.P. Leenhouts (1994) On the linearity of the dose-effect relationship of DNA double strand breaks, *Int. J. Radiat. Biol.*, 66, 549-552.
- Czajkowsky, D.M. and Z. Shao (1998) Submolecular resolution of single macromolecules with Atomic force microscopy, *FEBS Lett.*, 430, 51-54.
- De Grooth, B.G. and C.A.J. Putman (1992) High-resolution imaging of chromosome-related structures by atomic force microscopy, *J. Microsc.*, 168, 239-247.
- Hansma H.G., J. Vesenka, C. Siegerist, G. Kelderman, H. Morrett, R.L. Sinsheimer, V. Elings, C. Bustamante, P.K. Hansma (1992) Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomic force microscope, *Science*, 256, 1180-1184.
- Hansma, H.G. and J.H. Hoh (1994) Biomolecular imaging with the atomic force Microscope, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23, 115-139.
- Hansma, H.G. (1999) Variety of imaging with scanning probe microscopes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 14678-14680.
- Herskind, C. (1987) Single-strand breaks can lead to complex configuration of plasmid DNA *in vitro*, *Int. J. Radiat. Biol.*, 52, 565-575.
- Murakami, M., K. Eguchi-Kasai, K. Sato (1995a) Biological effects of active oxygen on an X-ray-sensitive mutant mouse cell line (SL3-147), *Mutat. Res.*, 336, 215-221.
- Murakami, M., K. Eguchi-Kasai, K. Sato, S. Minohara, F. Yatagai and T. Kanai (1995b) Differences in heavy-ion-induced DNA double-strand breaks in a mouse DNA repair-deficient mutant cell line (SL3-147) before and after chromatin Proteolysis, *J. Radiat. Res.*, 36, 258-264.
- Murakami, M., H. Hirokawa and I. Hayata (2000) Analysis of radiation damage of DNA by atomic force microscopy in comparison with agarose gel electrophoresis studies, *J. Biochem. Biophys. Methods*, in press.
- 村上正弘, 南久松真子, 江口-笠井清美, 古川 章, 佐藤弘毅, 早田勇 (1999) ネオンイオン線照射による染色体異常の原子間力顕微鏡による解析, *宇宙生物科学*, 13, 250-251.
- 村上正弘, 江口-笠井清美 (2000) 重粒子線照射による染色体損傷の原子間力顕微鏡による解析, 1999 Annual Report of the Research Project with Heavy Ions at NIRS-HIMAC, NIRS-M-139, HIMAC-026, 150-151.
- Pang, D., B.L. Berman, S. Chasovskikh, J.E. Rodgers, A. Dritschilo (1998) Investigation of neutron-induced damage in DNA by atomic force microscopy: experimental evidence of clustered DNA lesions, *Radiat. Res.*, 150, 612-618.
- Roots, R., G. Kraft, E. Grosschalk (1985) The formation of radiation-induced DNA breaks: the ratio of double-strand breaks to single-strand breaks, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 11, 259-265.
- Takeda, Y., H. Hirokawa and T. Nagata (1992) The replication origin of proplastid in cultured cells of tobacco, *Mol. Gen. Genet.*, 232, 191-198.