

氏名	馬 立秋
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 893 号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 22 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	イオンビーム照射による DNA 損傷の修復様式の解析 (Researches of DNA damage repair pathways induced by ion beams)
論文審査委員	委員長 教授 田中 秀逸 委員 教授 松本 幸次 委員 教授 弥益 恭 委員 准教授 村上 浩士

論文の内容の要旨

重イオンビームは、高エネルギーで、しかも局所的にエネルギーを与えることができるという二つの特徴を持ち、その一部はすでにかん治療や植物品種改良に利用されている。しかし細胞への作用機構は不明な点が多く、これに関する研究は、今後の利用拡大に向けても動植物において重要である。私は、モデル生物であるアカパンカビを用いて、重イオンビームが生物に与える DNA 損傷とその修復機構に関し、以下の 2 つの研究を行った。

1. 炭素イオンビーム照射による DNA 二本鎖切断修復機構の解析

炭素イオンビームは細胞に大きな損傷、とくに著しい DNA 二本鎖切断 (DSB) を発生させる。この DSB の放置は細胞の生存に致命的であり、主に二つの経路、相同組換え修復 (HR) と非相同末端結合 (NHEJ) により修復される。またこれらの経路は MRX 複合体により制御されていると考えられる。私は、HR に関する *mei-3*、NHEJ に関する *mus-52*、及び MRX の一つ RAD50 のホモログをコードする *uvs-6* のそれぞれの変異株を用いて、炭素イオンビームによって生じた DSB がどのように修復されるかについて解析した。*uvs-6* 変異株は炭素イオンビームに対して最も高い感受性を示した。50 Gy 以下について *mus-52* 変異株の感受性は *mei-3* 変異株より高いが、150 Gy 以上ではより低くなった。これらの感受性の相違により、100 Gy 以上の線量で引き起こされた損傷は HR 経路によって、一方 100 Gy 以下では NHEJ 経路によって優先的に修復されることが示唆された。

アカパンカビにおいてプリン合成系に含まれる *ad-3A* と *ad-3B* の何れかの遺伝子に異常が生じた場合、中間代謝物の蓄積によって紫色を呈する。イオンビーム照射後の生存個体より紫色を呈する株を選別することで、*ad-3* 遺伝子座における突然変異頻度を算出した。また、これらの株よりゲノム DNA を調製し、*ad-3A* と *ad-3B* 遺伝子の塩基配列を調べ、その変異スペクトラムを解析した。100 Gy における *mus-52* 株の突然変異頻度は野生株の 0.35 倍と低く、*mei-3* 株のそれは 3 倍と高い値を示した。野生株と *mei-3* 株において最も顕著に検出された変異は欠失であり、*mus-52* 株ではトランスポージョンであった。アカパンカビと出芽酵母の野生株における炭素イオン照射により起こる変異のタイプを比較すると、アカパンカビでは欠失が多

かったのに対し、出芽酵母ではトランスポージョンが多い (Matuo *et al.*, 2006)。出芽酵母は他の生物に比べて HR への依存性が高いと考えられており、これらの変異スペクトルの特徴は、修復系への依存度を反映していると推測される。

2. 鉄、アルゴンイオンビームの致死効果と *ad-3* 遺伝子座における突然変異生成の解析

炭素に比べ、鉄、アルゴンイオンビームは非常に高い LET (線エネルギー付与: 電離放射線が物質中を通過する際、飛程の単位長さ当りに平均して失うエネルギー) を持つことが知られている。私は高 LET のイオンビームの生物学的効果について興味を抱き、鉄、アルゴンイオンビームによって生じた DSB がどのようにして修復されるか調べることにした。鉄、アルゴンイオンビーム (LET 値: それぞれ 641, 287 keV/ μm) のそれぞれを DSB の修復に関するアカパンカビの変異株に照射し低 LET 線である X 線 (2 keV/ μm)、中程度 LET の炭素イオンビーム (30 keV/ μm) の生存曲線と比較した。野生株と *mus-52* 変異 (NHEJ 欠損) は高 LET イオンビームに対して類似した感受性を示した。鉄及びアルゴンイオンビームは *mei-3* 変異 (HR 欠損) 株で高い感受性を示した。これはマウス胚繊維芽細胞を用いた研究の報告にあるように、高 LET 線照射により NHEJ 経路が抑制されるからと考えられる (Hongyan Wang *et al.*, 2008)。

次に、重イオンビームを照射することによる致死性と突然変異誘発効果の関係を明らかにするために、野生株分生子に、鉄、アルゴンイオンビームや X 線及び炭素イオンビームを照射して、突然変異頻度、変異スペクトラムを解析した。生物学的効果比 (RBE) は各照射において 50% 生存を与える線量について X 線照射のそれに対する線量率として算出した。RBE 値は炭素、鉄、アルゴンイオンビームはそれぞれ、3.0、5.5、7.4 であった。一方、*ad-3* 遺伝子座の突然変異頻度は、RBE 値に相関せず、鉄が最も低く、ついで炭素、X 線、アルゴンの順となった。X 線と炭素イオンビームは一塩基欠失をよく引き起こした。一方、100 bp を越える大規模な欠失は鉄イオンビームにのみ見られた。

本研究により、炭素イオンビームのアカパンカビの DNA に与える損傷の特性とその修復機構が明らかとなった。また、イオンビームの種類により、特にその LET 値の強さに依存して生物に与える効果及びその修復機構が異なることが示唆された。分子レベルでの作用機構の解析は今後の課題であるが、これらの結果は、重イオンビーム照射による重イオン線治療のリスク評価と植物の放射線育種に関し、生物効果の基礎データとして有用な洞察を与えると考えられる。また、重イオンビーム照射に対する RBE の評価は、放射線に対する細胞応答の基本的なメカニズム、DNA 損傷修復、突然変異誘発および細胞死などを理解する上で重要となると推察される。

論文の審査結果の要旨

学位論文審査委員会は、平成 25 年 2 月 5 日（火）13:30～14:30 に埼玉大学理工棟交流サロンにおいて論文発表会を開催した。審査結果の概要は以下の通りである。

重イオンビームは、高エネルギーを局所的に与えることができる。この特徴は、がん治療や植物品種改良において極めて有効なことが判ってきた。しかし実際の細胞への作用は不明な点が多く、その研究は、今後の利用拡大に向けても動植物において重要となっていた。馬氏は、モデル生物であるアカパンカビを用いて、重イオンビームが生物に与える DNA 損傷とその修復機構に関し以下の 2 つの研究を行い、本論文にまとめた。これは、重イオンビームの生物学的効果に関し、アカパンカビを用いた初めての報告でもある。

1. 炭素イオンビーム照射による致死性および突然変異生成に関する研究

炭素イオンビーム照射は細胞に著しい DNA 二本鎖切断 (DSB) を発生させ、この DSB の放置は細胞の生存に致命的となる。すべての真核生物に共通して、DSB は主に相同組換え (HR) と非同源末端結合 (NHEJ) により修復されることが判っている。またこれらの経路は MRX 複合体により制御されていると考えられる。馬氏は、HR に関する *mei-3*、NHEJ に関する *mus-52*、及び MRX の一つ RAD50 のホモログをコードする *uvs-6* のそれぞれの変異株を用いて、炭素イオンビームによる致死効果について解析した。その結果、これらの株の感受性の相違により、100 Gy 以上の線量で引き起こされた損傷は HR 経路によって、一方 100 Gy 以下では NHEJ 経路によって優先的に修復されることを示唆した。アカパンカビの前方向突然変異検出系の 1 つに *ad-3* 遺伝子座を用いた系がある。イオンビーム照射後の生存個体より紫色を呈する株を選別することで、*ad-3* 遺伝子座 (*ad-3A* と *ad-3B* の何れかの遺伝子) における突然変異頻度が算出された。さらに、これらの突然変異株の *ad-3A* と *ad-3B* 遺伝子の塩基配列を調べることで、その変異スペクトラムが解析された。馬氏は、100 Gy における *mus-52* 株の突然変異頻度は野生株の 0.35 倍と低く、*mei-3* 株のそれは 3 倍と高い値を示すこと、野生株と *mei-3* 株において最も顕著に検出された変異は欠失であり、*mus-52* 株ではトランスバージョンであることを明らかにした。また、アカパンカビと出芽酵母の野生株における炭素イオン照射により起こる変異のタイプの比較から、変異スペクトラムの特徴には、その生物の修復系への依存度が反映されていると推測した。

2. 鉄、アルゴンイオンビーム照射による致死性および突然変異生成に関する研究

炭素に比べ、鉄、アルゴンイオンビームは非常に高い LET (線エネルギー付与: 電離放射線が物質中を通過する際、飛程の単位長さ当りに平均して失うエネルギー) を持つことが知られている。馬氏は高 LET のイオンビームの生物学的効果について興味を抱き、鉄、アルゴンイオンビームによって生じた DSB がどのように修復されるかについても調べた。鉄、アルゴンイオンビーム (LET 値: それぞれ 641, 287 keV/ μm) のそれぞれを DSB の修復に関するアカパンカビの変異株に照射した時の効果が、低 LET 線である X 線 (2 keV/ μm)、中程度 LET の炭素イオンビーム (30 keV/ μm) のそれと比較された。その結果、マウス胚繊維芽細胞と同様に、アカパンカビにおいても高 LET 線照射により NHEJ 経路が抑制されると分析した。さらに、重イオンビームを照射することによる致死性と突然変異誘発効果の関係を明らかにしようと、野生株分生子に、鉄、アルゴンイオンビームや X 線及び炭素イオンビームを照射した時の、突然変異頻度、変異スペクトラムが解析された。馬氏は、その評価の方法として各照射において 50% 生存を与える線量について X 線照射のそれに対する線量率とした生物学的効果比 (RBE) を算出した。その結果、炭素、鉄、

アルゴンイオンビームのRBE値はそれぞれ、3.0、5.5、7.4であること、*ad-3* 遺伝子座の突然変異頻度は、RBE値に相関せず、鉄が最も低く、ついで炭素、X線、アルゴンの順となること、X線と炭素イオンビームは一塩基欠失をよく引き起こすこと、100 bpを越える大規模な欠失は鉄イオンビームにのみ見られることを明らかにした。

以上のように本論文は、炭素イオンビームのアカパンカビDNAに与える損傷の特性とその修復機構を明らかにした。また、イオンビームの種類により、特にそのLET値の強さに依存して生物に与える効果及びその修復機構が異なることを示唆した。分子レベルでの作用機構の解析は今後の課題であるが、これらの結果は、重イオンビーム照射による重イオン線治療のリスク評価と植物の放射線育種に関し、生物効果の基礎データとして有用な洞察を与えられようと考えられる。また、重イオンビーム照射の効果をRBEに基づき評価する方法は、放射線に対する細胞応答の基本的なメカニズム、DNA損傷修復、突然変異誘発および細胞死などを理解する上で有効であることも示した。

これらの結果の公表に関しては、現在、申請者が筆頭著者の論文1編が査読付き国際誌へ掲載されることが決まっている。さらに1編の論文の準備が進められている。

以上のことから、審査委員会としては、本学位申請論文は博士（理学）の論文として十分なレベルに達していると判断し、合格と判定した。