大気圧低温プラズマが誘発する核酸塩基修飾の解析

Chemical modification to nucleic acids induced by atmospheric pressure plasma

豊橋技科大 ○栗田 弘史、春田 夏輝、内橋 義人、高島 和則
Toyohashi Univ. of Tech. ○Hirofumi Kurita, Natsuki Haruta, Yoshito Uchihashi, Kazunori Takashima
E-mail: kurita@ens.tut.ac.jp

細胞や生体への大気圧低温プラズマの照射は医療をはじめ様々な分野への応用が期待されているが、作用機序の解明や安全性への懸念など実用化に向けた課題も多く残されている。これまでにプラズマ照射によって生成される活性種が作用機序において重要な役割を果たしていることが明らかになってきており、我々はプラズマ照射によって生じる DNA 損傷に着目して研究を進めてきた。酸化ストレスによって生じる DNA 損傷には鎖切断、塩基修飾、糖修飾があるが、我々も含めた先行研究のほとんどが鎖切断に関する解析であり、その他の損傷に関する知見は極めて少ない。そこで本研究では遺伝毒性やアポトーシス誘導に関与しうる修飾塩基のひとつである 8-オキソグアニン (8-oxoG) に注目した。

細胞を用いた実験の予備実験として、核酸をリン酸緩衝液に懸濁し、ヘリウムプラズマジェット照射後の核酸を分析したところ、8-oxoG が生成されていることを確認した。続いて、哺乳類細胞を用いた実験では、プラズマ照射によるゲノム DNA 損傷を単細胞ゲル電気泳動 (コメットアッセイ) で解析した。ヒト肺がん由来培養細胞株である A549 細胞を PBS に懸濁してヘリウムプラズマジェットを照射し、照射後の細胞懸濁液を遠心して PBS を除去した後、細胞を即座に低融点アガロースに包埋した。ゲル硬化後、細胞を溶解し、8-oxoG を認識・除去するヒト-8-オキソグアニングリコシラーゼ (hOGG1) を添加し、30 分間 37°C でインキュベートした。その後アルカリ電気泳動に供し、DNA を染色して蛍光像を取得した。

DNA 切断を有する細胞をコメットアッセイに供すると頭部と尾部を伴う彗星のような蛍光像が得られる。尾部は切断された DNA 断片から構成され、尾部の長さ (Tail length) を本研究では DNA 切断の指標として用いた。プラズマ未照射の場合は Tail がほとんど観察されず、プラズマを 60 秒照射した場合に明瞭な Tail が観察された。Fig. 1 にプラズマ照射時間と hOGG1 処理の有無が異なるコメットアッセイの結果を示す。対照実験としてヘリウムガスを 1 分照射した場合は、hOGG1 処理の有無で Tail length がほとんど変化しなかったのに対して、プラズマ照射 30 秒および 60 秒の場合は hOGG1 処理を行った細胞群の Tail length が hOGG1 処理無しの細胞群に対して有意に増大した。この Tail length の増大は、hOGG1 処理によって DNA に 1 本鎖切断が生じたためだと考えられ、プラズマを照射した細胞のゲノム DNA 上に 8-oxoG が生成していることを示唆している。

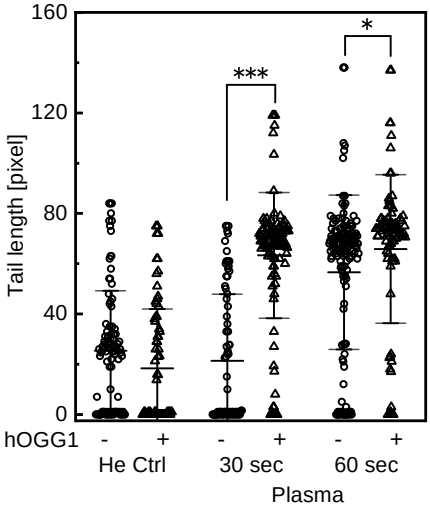

Fig. 1. Changes of comet tail with plasma irradiation time and hOGG1 treatment. Data are expressed as the mean±SD (n > 80). Statistical significance was recognized at *p < 0.05, *** p < 0.0001.