

大気圧低温プラズマ照射が誘発するゲノム DNA 損傷と修復酵素の活性化 Damage to genomic DNA and activation of its repair enzymes induced by atmospheric pressure plasma

豊橋技科大 ○栗田 弘史, 春田 夏輝, 高島 和則

Toyohashi Univ. of Tech. ○Hirofumi Kurita, Natsuki Haruta, Kazunori Takashima

E-mail: kurita@chem.tut.ac.jp

細胞や生体への大気圧低温プラズマの照射は、気相・液相に活性種を生成して酸化ストレスを誘発し、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た。酸化ストレスは、鎖切断、塩基修飾、糖修飾などの DNA 損傷を介して遺伝毒性やアポトーシスなど医療応用に関わる重要な現象を誘発する可能性がある。このことから、我々はプラズマ照射によって生じる DNA 損傷に注目して研究を進めており、近年はこれまでに知見の少ない塩基修飾の解析を行い、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-オキシグアニン (8-oxoG) がプラズマ照射によって生じることを明らかにした [1]。

本研究では、DNA 損傷が生じるプラズマ照射であれば細胞生存率に影響を及ぼすと考え、先行研究のプラズマ照射条件における細胞生存率を測定した。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、細胞培養液に懸濁して 24 時間培養したところ、ゲノム DNA に鎖切断や塩基修飾が生じるプラズマ照射条件であっても 90%に近い細胞生存率を示した。

このことから、ゲノム安定性維持のために DNA 修復機構が機能していると考え、8-oxoG を認識・除去する DNA 修復酵素の活性化に着目した。本研究では molecular beacon (MB) を用いて細胞内 DNA 修復酵素の活性化を解析した [2]。MB は単鎖 DNA の両末端が蛍光色素と消光物質でそれぞれ修飾されており、かつ 2 重らせん構造によってこれらが近接するように設計されている。本研究で用いた MB は、ステム部位のグアニンが 8-oxoG に置換されており、8-oxoG 修復酵素と反応すると MB に DNA 切断が生じ、近接していた修飾物質が分離し、8-oxoG 修復酵素の活性化を反映した蛍光増大が生じる (Fig. 1 (a))。実験では、プラズマ照射前の A549 細胞に MB を人為的に導入し、プラズマ照射やその後の培養は上記の実験と同様に行い、プラズマ照射から 24 時間後の細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーで測定した。Fig. 1 (b) にフローサイトメトリー計測で得られたヒストグラムを示す。プラズマ未照射の細胞群と比較して、プラズマ照射した細胞群では蛍光強度が有意に増大し (Fig. 1 (c))、プラズマ照射によって 8-oxoG が細胞内に生成し、ゲノム安定性維持のために修復酵素が活性化していることが示唆された。

参考文献 [1] 栗田弘史 他, 第 66 回応物春季学術講演会 [2] L. Mirbahai *et al.*, *DNA Repair*, **9**, 144-152 (2010)

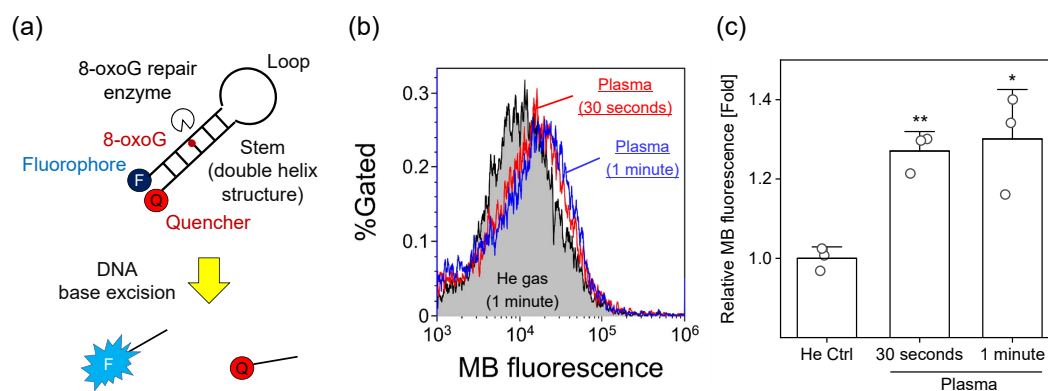


Fig. 1. Detection of activation of the DNA repair enzyme after plasma irradiation. (a) A schematic of the experimental principle. (b) Typical flow cytometry histograms 24 hours after He plasma irradiation. (c) Median fluorescence intensity. "He Ctrl" indicates the control experiment in which the cell suspension was irradiated with He gas flow for 1 minute. Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Statistical significance was recognized at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ vs. He Ctrl as determined with the Student's t -test.