

博士論文
長波長紫外線（UVA）による DNA 傷害と
突然変異誘発機構の研究

平成 27 年 3 月

樊 星

岡山大学大学院
医歯薬学総合研究科
博士後期課程創薬生命科学専攻

目次

要約	1
1. 序論	3
1.1 紫外線	4
1.1.1 紫外線の生物影響	4
1.1.2 紫外線 UVC および UVB の傷害作用	4
1.1.3 紫外線 UVA の傷害作用	5
1.2 紫外線傷害の修復機構	7
1.2.1 光回復	7
1.2.2 除去修復	9
1.2.3 組換え修復	11
1.3 ショウジョウバエにおける紫外線損傷と誘導変異	12
1.4 酸化傷害と尿酸	13
1.5 本研究の目的	15
2. 実験方法	17
2.1 使用した試薬	18
2.2 ショウジョウバエ	21
2.2.1 ショウジョウバエの生活史	21
2.2.2 飼育	22
2.2.3 幼虫処理	22

2.2.4	使用したショウジョウバエ株	23
2.3	幼虫の照射方法	25
2.3.1	LED-UVA の照射	25
2.3.2	310 nm の単色光照射	25
2.3.3	X 線照射方法	25
2.4	翅毛スポットテスト	26
2.4.1	原理	26
2.4.2	DNA 修復欠損株を用いた翅毛スポットテスト	27
2.4.3	尿酸欠損株を用いた翅毛スポットテスト	28
2.4.4	変異原性の検出	28
2.5	尿酸測定	30
2.5.1	サンプルの調整	30
2.5.2	HPLC 測定	31
2.5.3	タンパク定量	32
2.6	ヒストン γ -H2AvD 検出	32
2.6.1	サンプルの調整	32
2.6.2	電気泳動 (SDS-PAGE)	32
2.6.3	ウェスタンブロッティング	34
2.7	生体内活性酸素の検出	35
3.	結果	37
3.1	UVA 照射により誘発される突然変異と酸化的損傷の関係	38

3.1.1	UVA 照射によって誘発される体細胞突然変異	38
3.1.2	UVA 照射による尿酸含量の変化	39
3.1.3	UVA 照射による活性酸素種の生成	40
3.1.4	UVB 照射によって誘発される体細胞突然変異	41
3.2	DNA 修復欠損ショウジョウバエ株における UVA の変異原性	43
3.3	ヒストンリン酸化の検出	44
3.3.1	X 線照射により誘発される γ -H2AvD	44
3.3.2	UVA 照射により誘発される γ -H2AvD	47
3.3.3	UVB 照射により誘発される γ -H2AvD	50
4.	考察	53
5.	参考文献	63
	謝辞	72

要約

紫外線はその波長により、短波長 (UVC: 190-280 nm)、中波長 (UVB: 280-320 nm)、長波長 (UVA: 320-400 nm) に分類される。紫外線のうち、290 nm 以下の光 (UVB の一部と UVC) は、オゾン層や大気に吸収され地上には到達しない。しかし、UVA は、ほとんどのエネルギーが地表に到達している。また、波長により皮膚に対する透過性も異なり、そのうち UVA は透過力が大きく、ほとんどが表皮を通過し、真皮もしくは皮下組織にまで達する。このように、紫外線のうち我々が日常さらされている主なものは UVA であり、ヒトに対する生物学的影響が大きいと考えられる。実際に UVA 単独照射による皮膚発がんも報告されている。

UVA は直接的には DNA に損傷を引起さず、細胞内の光増感剤を介して活性酸素種やラジカルを生成し、DNA に損傷を誘導すると考えられている。しかしながら、UVA による傷害には未解明な部分も多い。本研究では、UVA の傷害を明らかにするために、種々ショウジョウバエ株を用いて突然変異の誘導と酸化傷害、主として DNA 鎖切断との関係を調べた。野生株と酸化的傷害感受性である尿酸欠損株 (*y v ma-l*) の幼虫に 365 nm-UVA (LED 光) を照射し、体細胞突然変異や遺伝毒性を観察すると同時に、DNA 二本鎖切断 (DSB) の有無を検討した。

UVA 照射により尿酸欠損株では、野生株で変異が観察されない線量で変異が観察された。また、活性酸素種の生成も尿酸欠損株で顕著であった。DSB の指標とされているヒストン H2AvD リン酸化は野生株、*y v ma-l* 株いずれにおいても UVA 照射直後から検出されたが、*y v ma-l* 株においては、野生株に比べて顕著な増加が見られた。これらの結果から UVA 照射によって体細胞に DSB が形成され、突然変異を誘導していることが示唆された。また、その過程に尿酸で防御されるような活性酸素種が関与していると考えられる。

1. 序論

1.1. 紫外線

1.1.1 紫外線の生物影響

太陽光には、ガンマ線、X 線などの放射線、紫外線、可視光線、赤外線といった、さまざまな波長の光が含まれる。太陽光は、ビタミン D 生成作用を有し、明るさや 暖かさを与えてくれる。しかしその一方で、生物に対して有害作用も持っている。有害作用を主に示しているのが紫外線であり、突然変異、発がん、老化などに関与している。代表的な作用である致死作用は殺菌灯として細菌の消毒に利用されている。紫外線はその波長により、短波長 (UVC: 100-280 nm)、中波長 (UVB: 280-320 nm)、長波長 (UVA: 320-400 nm) に分類される。紫外線のうち、290 nm 以下の光 (UVC と一部の UVB) は大気やオゾン層に吸収されるので、地表に到達するのは 290 nm 以上の光になる。地球表面に達する光のエネルギー量は、太陽光全体の中で UVB 0.5 %に対して UVA 5.6 %を占め、太陽光紫外線の約 9 割が UVA である。太陽光中の紫外線は、ヒト皮膚がんの原因とされ、国際がん研究機関 (IARC) は、太陽光および紫外線をヒトに対する発がん性を認める Group 1 に分類している¹⁾。

また紫外線はその波長により皮膚への透過性も異なる。UVC および UVB は、表皮の角層ないし角化細胞までしか到達しないが、UVA は透過力が大きく、35~70%が表皮を通過し、真皮もしくは皮下組織にまで達する。UVB は、皮膚が真っ赤になるサンバーンを起こす。一方 UVA は UVB に比べ作用が穏やかで皮膚が黒くなるサンタンを起こす。我々は UVA に日常さらされており、その透過力の強さから、ヒトに対する生物学的影響は大きいと考えられる。

1.1.2 UVC および UVB の傷害作用^{2,3,4}

紫外線のうち、UVC および UVB は、DNA を標的として主にシクロブタン型ピリミジンダイマー [cyclobutane pyrimidine dimers (CPD)]、ピリミジン(6-4)ピリミドン光産物[pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts: (6-4) photoproducts ((6-4) PP)] などの損傷を生じ、これらの DNA 損傷が細胞致死の最も有力な原因であると考えられている (Fig. 1-1)。デュワー型光産物 [Dewar isomer]は太陽光紫外線で誘発される二量体型損傷の一つであり、(6-4)光産物から 320 nm 前後の紫外

線によって光異性化されて二次的に生じる⁴。これらピリミジンダイマーは、DNA の複製・転写の傷害となり太陽光紫外線の毒性及び突然変異誘導の主な原因となる。

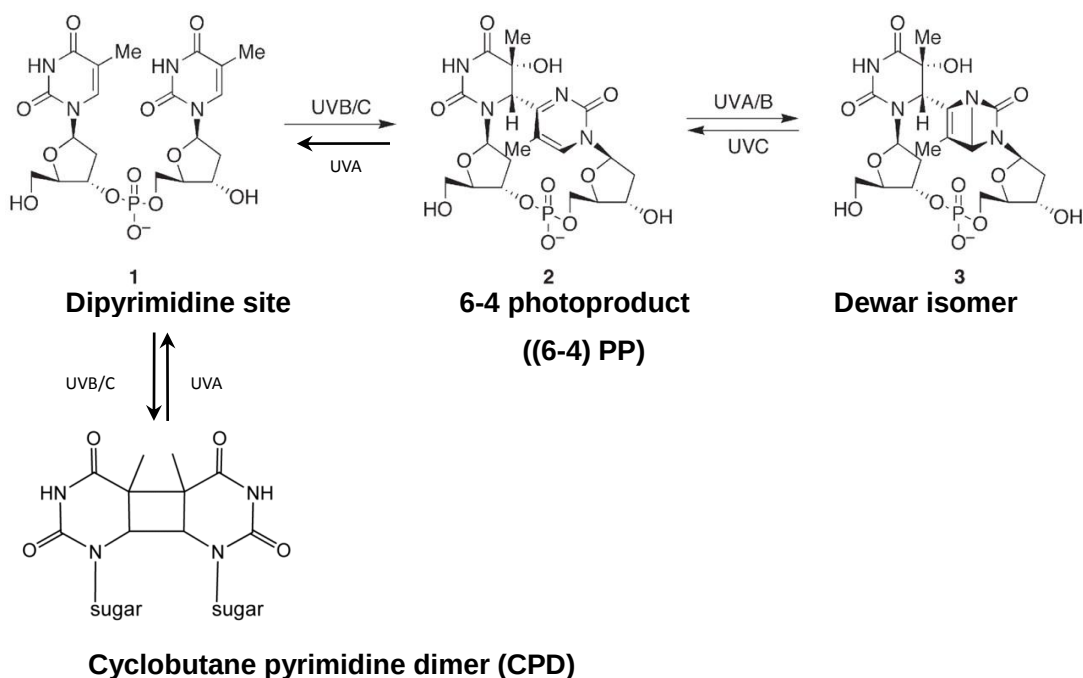


Fig. 1-1 UVC および UVB により形成されるピリミジン二量体の構造⁴

UVB 照射によって細胞内に活性酸素種が発生することも報告されている⁵。UVB による酸化傷害は直接的な DNA への作用ではなく、間接的な傷害であり、要因としてカタラーゼなどの酸化ストレス対応酵素の活性化や炎症を誘起することによって発生すると言われている。

1.1.3 UVA の傷害作用

UVA の波長域の光は DNA にほとんど吸収されないため、UVA は DNA に直接的損傷を起こすのではなく、間接的な過程を通して作用すると言われている。UVA 照射は、NAD、リボフラビン、トリプトファン、葉酸、ポルフィリンおよびソラレンなどの内因性または外因性の光増感剤の光活性化を介して、活性酸素種 (ROS) 及びラジカルを生成して、DNA に酸化損傷を誘導すると考えられ

ている 2.5-7。

活性酸素は、大気中に含まれる酸素分子がより反応性の高い化合物に変化したものの総称である。一般的にスーパーオキシドアニオン (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\bullet OH$)、一重項酸素 (1O_2) の 4 種類とされる。 $\bullet OH$ は最も酸化力が強く、酵素タンパク質、細胞骨格タンパク質、脂質、糖質、核酸などと高い反応性を示す。

光増感剤は、UVA 領域の光を吸収した増感分子から酸素分子にエネルギーが移動し一重項酸素を生成したり、増感分子の電子状態によっては電子が酸素分子に移動し O_2^- 、 H_2O_2 、 $\bullet OH$ を生成する。一重項酸素を生成する反応は光増感反応のタイプ II 反応、 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\bullet OH$ を生成する反応はタイプ I 反応と呼ばれる (Fig. 1-2) 6,7。

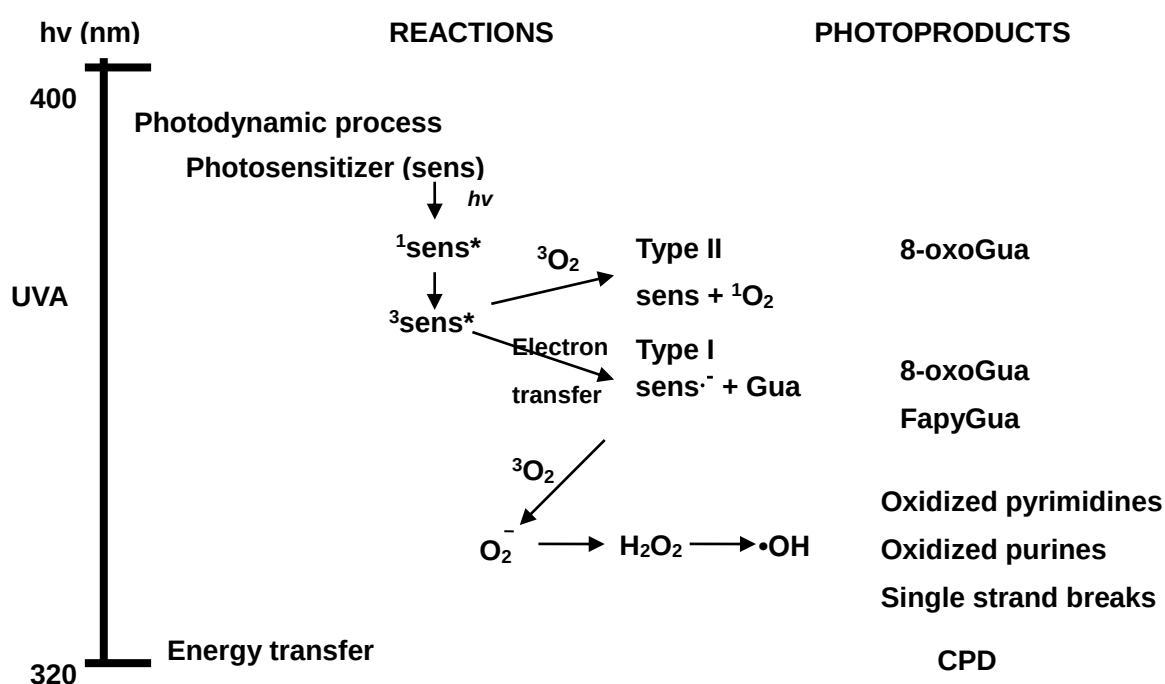


Fig. 1-2 UVA の作用と傷害 7

UVA による DNA 損傷としては、8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG)、2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) などの塩基の酸化的傷害、DNA 鎖切断、DNA・タンパク質架橋などが知られている 8,9。これまでは UVA では形成されないと考えられていた CPD も、UVA に曝露した培養細胞で報告さ

れている^{10,11}。さらに、Mouret ら¹²と Ikehata ら¹³は、UVA 照射により、ヒトあるいはマウスの皮膚に CPD が形成されたと報告している。この形成が UVB による形成と同じ機構によっているかは議論されているところである。

DNA の鎖切断は一本鎖切断 (SSB) と二本鎖切断 (DSB) に分けられる。前者は正確な修復が可能であるが、後者は修正エラーや修正不能を起こしやすく、DNA の複製、転写などを損なうことによって突然変異や細胞の死に結びつく可能性が高い。細胞にとって、ゲノムの完全性の維持は正常な生存のために必須であり、DSB が修復されなかった場合の影響は大きいと考えられる。これまで、放射線やいくつかの遺伝毒性物質によって、DSB が生成されることが示されているが、UVA が DSB を誘発するかどうかは明らかにされておらず、研究課題となっている。Rapp らは、UVA が誘導する DSB を観察し¹⁴、クラスタ化された一本鎖切断を介して、DSB が誘導されたことを示唆した¹⁵。一方、Rizzo らは、UVA に曝露された細胞において DSB が誘導されなかったことを報告している¹⁶。

以上のように、UVA によるどのような DNA 傷害や細胞傷が変異を誘導し発がんの要因となっているについて未解明の部分が多く残されている。

1.2. 紫外線傷害の修復機構¹⁷⁻¹⁹

誘導突然変異は DNA に生じた損傷による DNA 複製時の誤りによって誘発されるが、細胞はこれらの損傷を修復するいくつかの巧妙な機構を進化の過程で獲得してきている。修復機構の多様性は DNA 損傷の修復が細胞にとっていかに重要であるか、また DNA の損傷がいかに多様であるかということを示している。また同じ種類の損傷にもいくつかの修復機構が関与する。紫外線による DNA 損傷に対する修復機構には次の 3 つの機構が主に関っている。

1.2.1 光回復 (photorepair)

この修復機構は最も効率的で正確なものである。原核生物から真核生物まで多くの生物は光回復酵素 (photolyase) をもっている。この酵素は、DNA 上に生成されたピリミジン二量体を、長波長紫外線 (350 nm 付近) のエネルギーを利用して修復する。酵素はまず DNA の二量体部分に結合した後、集光補因子 (FAD) が 300-500 nm の光を吸収し、そのエネルギーを二量体に移行することによって

単量体化反応を行う (Fig. 1-3)。反応中に DNA 鎖の切断は起こらないので変異を誘導する可能性は非常に低い (Fig. 1-4)。CPD 及び 6-4 光産物それぞれに対する光回復酵素の存在が知られている。ショウジョウバエも、この 2 種類の酵素を持つことが明らかにされている ^{20, 21}。

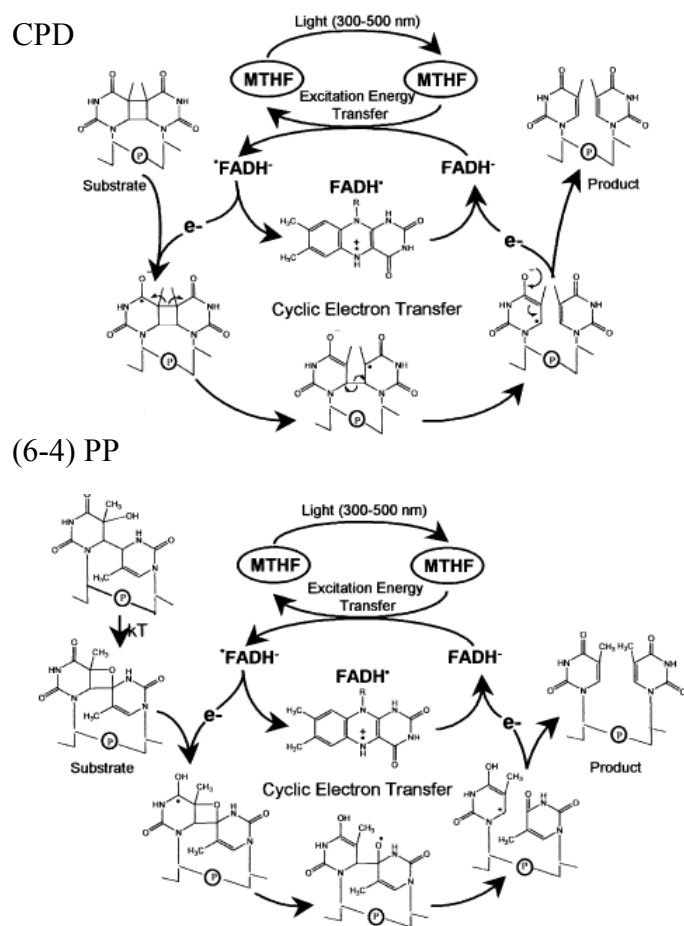


Fig. 1-3 光回復酵素の反応機構¹⁷

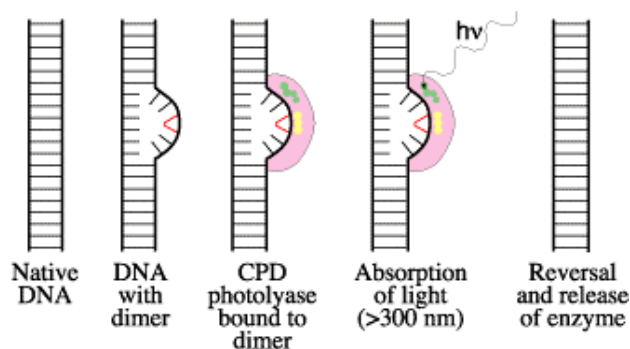


Fig. 1-4 光回復機構 ¹⁷

1.2.2 除去修復 (excision repair)

除去修復はヌクレオチド除去修復、塩基除去修復、ミスマッチ修復に大きくわけられるが、主として紫外線照射に関与しているヌクレオチド修復、塩基除去修復について説明する。

ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) はピリミジンダイマーをはじめ、さまざまな化学修飾など、最も広範囲な種類の DNA 損傷を修復する機構である。概要を Fig. 1-5 に示している。ゲノム全体で均一におこなわれる反応ではなく、転写がおこなわれている領域、しかもその鋳型となっている DNA 鎖上でみられる早い修復反応と、それ以外の領域でおこなわれる遅い反応があることが知られている。前者は転写と共役した修復 (transcription-coupled repair: TCR)、後者はゲノム全体の修復 (global genome repair : GGR) として区別されている。NER は、損傷塩基周辺のヌクレオチドを切り出し、生じたギャップに新たにヌクレオチド鎖を合成し、新生鎖と元の鎖を連結することで達成される。GGR の経路は DNA 中に生じた損傷を感知するために、DNA-damage binding protein (DDB) や XPC-Rad23B 複合体を用いている。TCR の経路は DNA に歪みを生じさせるような損傷に遭遇したとき、RNA ポリメラーゼは転写を続けることが出来ずに、損傷部位で停止する。そして NER タンパク質をリクルートする。TCR の機構には 2 つの重要な点がある。まず RNA ポリメラーゼ自身が DNA 損傷を認識するためのセンサーになり、また活発に転写されているような遺伝子は、他の転写されていない遺伝子よりも、より正確に修復されなければならないという点である。GGR の経路では、最初に UV-DDB (DNA-damage binding protein) (XPE) が損傷を認識して結合し、XPC が置き換わる。HR23B が XPC に結合し、NER 活性を亢進する。TFIIH と DNA ヘリカーゼである XPB、XPD が損傷部位にリクルートされ、損傷部位周辺のヌクレオチドをオープンにする。それによって形成された損傷した一本鎖 DNA を XPA が識別し結合する。この段階から TCR の経路も同様に進行する。さらに RPA が一本鎖 DNA に結合し、XPA の結合している損傷部位周辺のヌクレオチド鎖を一本鎖の状態に保つ。XPG がオープンになったヌクレオチド鎖の 3'側、ERCC1 と XPF の複合体が 5'側をカッ

トする。ヌクレオチド鎖上に生じたギャップに、RFC、PCNA、複製 DNA ポリメラーゼ (Pol δ or ϵ) がリクルートされ、姉妹鎖を鋳型として、3'末端からヌクレオチド鎖の合成を行う。DNA リガーゼが合成されたヌクレオチド鎖の 3'末端と 5'末端を連結する。生じたギャップは DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼにより埋められる。

本研究で用いた除去修復欠損株は、XPF 相同タンパク質を欠損している。

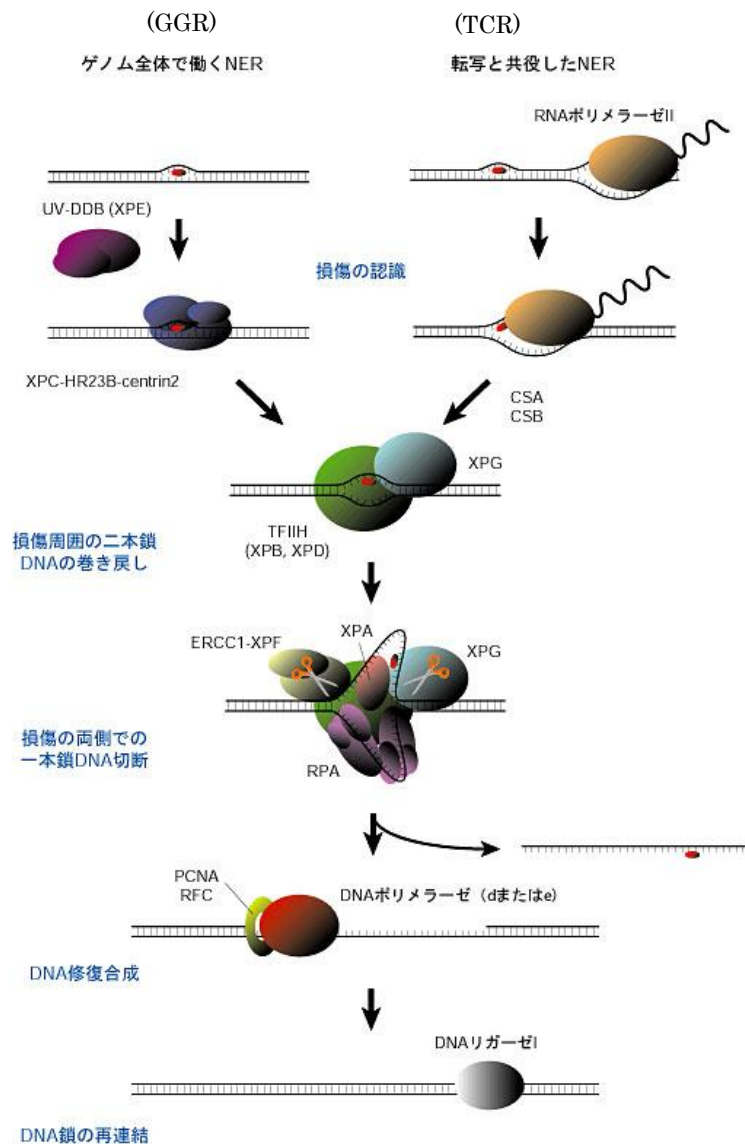


Fig. 1-5 ヌクレオチド除去修復機構¹⁸

CSA and CSB (Cockayne syndrome A and B proteins)

ERCC1 (Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency-1)

HR23B (Human homolog of yeast Rad23 protein)

PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)

RPA (Replication protein A)

RFC (Replication factor C)

TFIIH (Transcription factor II H)

UV-DDB (UV-damaged DNA-binding protein)

XP-A~F (Xeroderma pigmentosum complementation group A~F)

塩基除去修復はDNAグリコシラーゼがホスホジエステル結合を切断せず損傷塩基の N -グリコシド結合（塩基・糖）のみを切断する。この酵素によって損傷塩基が取り除かれると AP（apurinic, apyrimidinic）サイトが生じ、次いで AP サイトのホスホジエステル結合に AP エンドヌクレアーゼが働いて DNA 鎖を切断し、切断された部位から AP サイトの相補 DNA 鎖を鋳型として、部分的な修復 DNA 合成をおこなう。塩基配列は修復され、変異を起こす確率は低い。よく知られているウラシル DNA グリコシラーゼ以外に、紫外線照射による DNA 損傷に関与する 8-オキシグアニン、チミングリコールなどを除去する、損傷特異的なグリコシラーゼがあり、酸化損傷塩基の修復は主に塩基除去修復によって行われる。

1.2.3 組換え修復

（複製後修復 post-replication repair）

損傷の多くは上述の除去修復系の働きで除去される。しかし修復にはある程

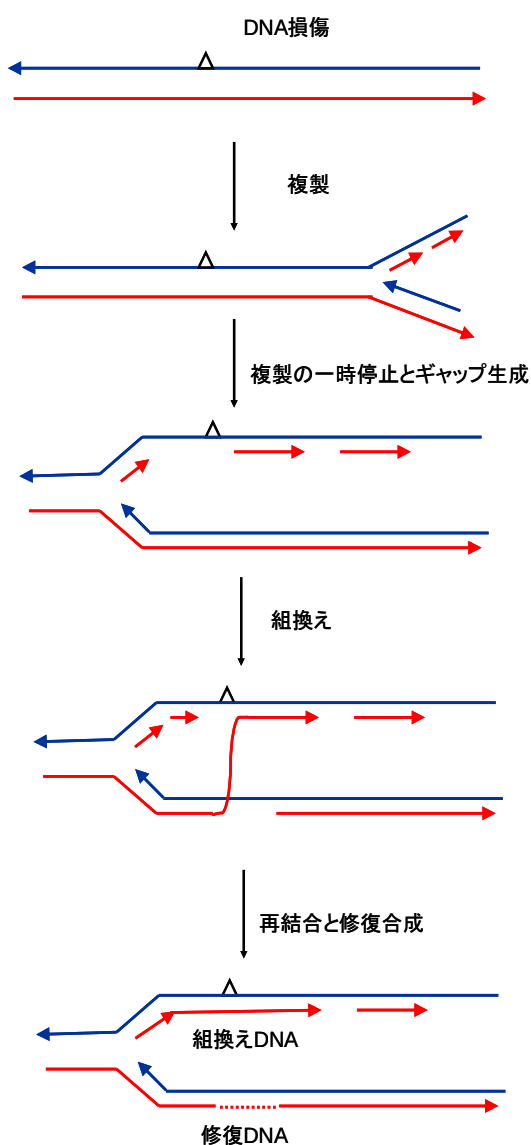


Fig. 1-6 組換え修復機構¹⁸

度の時間がかかるため、その間にも、多数の傷害のために種々の細胞内の反応が妨げられる。これを回避するために組換え修復が働く。この反応は NDA 組換えに使われる酵素系によって行われる。DNA 鎖上にまだ損傷が存続している時に、複製が開始され複製停止を起こさない場合は、複製の部分的阻害が生じ、新生 DNA 鎖に複製の不連続部位(新生 DNA 鎖のギャップ)が形成される (Fig. 1-6)。この新生 DNA 鎖のギャップは、無傷の DNA 鎖との相同組換えにより置き換えられ修復される。この修復過程では、DNA 鎖上の損傷は除去されずに存続することになるが、正確な修復が行われる。長い時間損傷部位で複製が停止したままになると、細胞周期の停止やアポトーシスなどにつながることもある。

1.3. ショウジョウバエにおける紫外線損傷と誘導変異 ^{22, 23}

当研究室の先行研究において、ショウジョウバエ除去修復欠損株と複製後修復欠損株を用いて 310-360 nm の範囲で紫外線の作用スペクトルを調べたところ、330-360 nm の光は NER 欠損株に比べて複製後修復欠損株で多くの変異を示す結果を得た ^{22, 24, 25}。

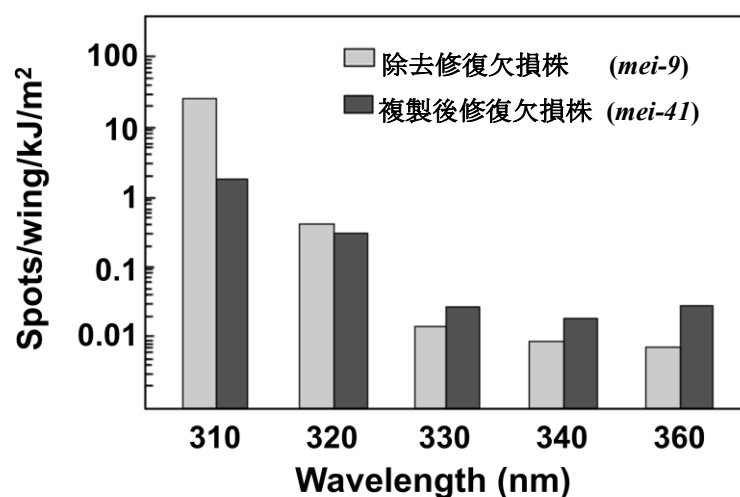


Fig. 1-7 修復欠損株における紫外線の変異誘導活性 ²⁵

この波長域において、各波長での CPD 形成量を調べ、体細胞突然変異誘発への寄与度を検討したところ、320 nm までは CPD が原因と考えられたが、330 nm 以上の波長では CPD 形成量だけでは説明できない変異頻度が観察された ^{23, 26}。

これらの結果から、330 nm 以上の長波長紫外線による、突然変異誘発性損傷は CPD の形成以外の損傷であると推測された。

1.4. 酸化傷害と尿酸

先に述べたように、UVA は、細胞内で光増感剤を介して、活性酸素種 (ROS) を生成して、DNA に酸化損傷を誘導している可能性がある。何らかの原因により活性酸素種が生じた場合、生体内でいくつかの防御系が働く^{27,28}。活性酸素は生命活動を維持するための反応において生体内で通常に発生しているため、それに対する防御系は重要である。活性酸素種の消去は細胞レベルでは酵素系に依存している。Fig. 1-8 に示すように、酵素としては superoxide dismutase (SOD) が O_2^- を消去して H_2O_2 にし、細胞質やミトコンドリアに存在する還元型 glutathione (GSH) が glutathione peroxidase (GSH-Px) によって触媒され、 H_2O_2 を分解し、 $\cdot OH$ の発生を抑制している。またペルオキシソームに存在する catalase (CAT) の働きによっても H_2O_2 を分解し水と酸素分子に分解し $\cdot OH$ の発生を抑制している。また生体成分にも多くの抗酸化物質があり、GSH、L-ascorbic acid、uric acid、bilirubin などの水溶性抗酸化物質と、 α 、 γ -tocopherols、ubiquinol、lycopene、carotenoids などの脂溶性抗酸化物質がある。中でも尿酸は、L-ascorbic acid を合成できないヒトなどで、重要な働きをしていると考えられている²⁹。

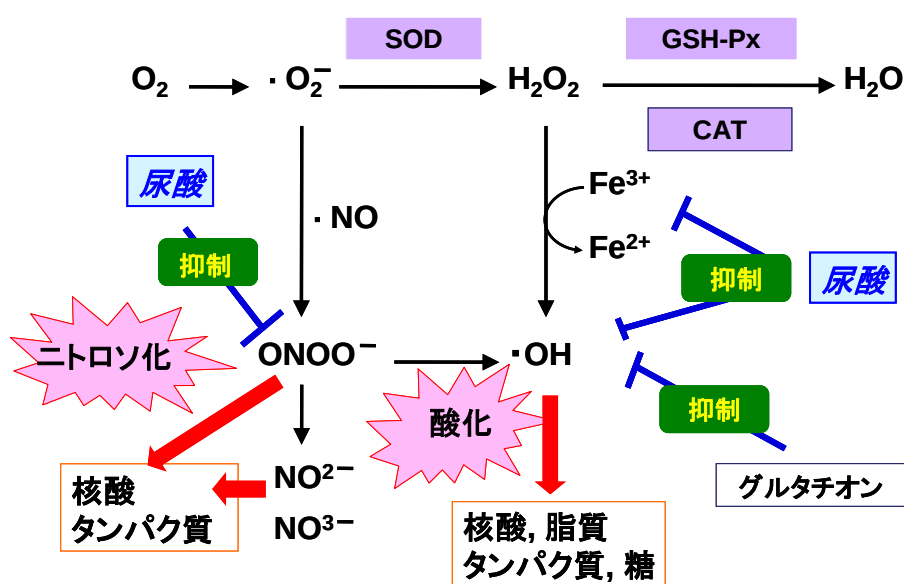


Fig. 1-8 尿酸の抗酸化物質としての役割

尿酸はプリン代謝の生成物であり、アデニン及びグアニンの代謝産物であるヒポキンチン、キサンチンから尿酸へとキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH) のはたらきによって生成される。尿酸はさらにアラントイン³⁰、アラントイン酸、尿素へと分解が進行するが、どの点まで進行し排泄されるかは動物の種類による (Fig. 1-9)。

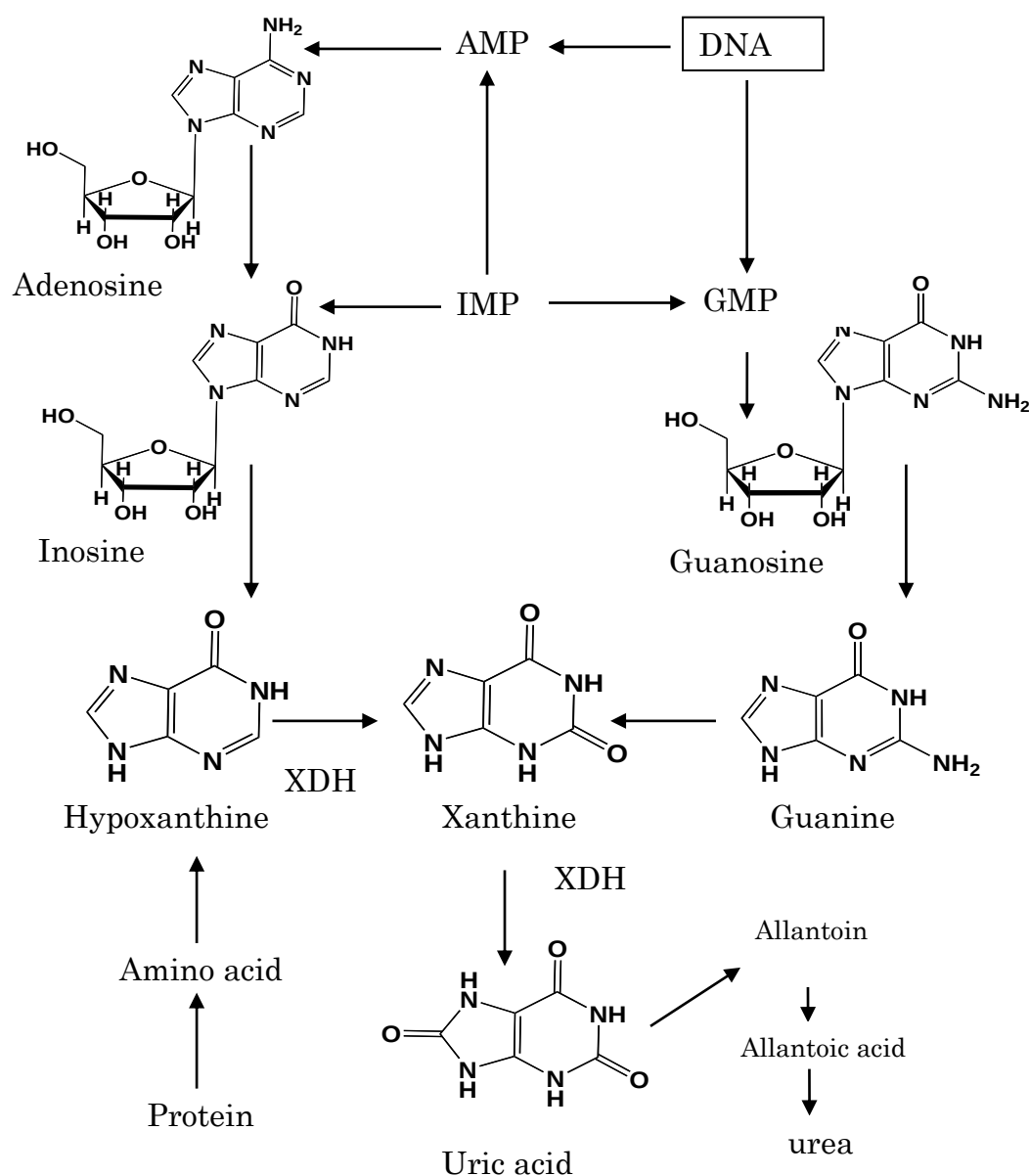


Fig. 1-9 プリン代謝と代謝物の構造³¹

生体の含窒素化合物の排泄形態としてはアンモニア排泄、尿酸排泄、尿素排泄が知られており、窒素排泄の効率としてはアンモニア排泄が最も高いが、アンモニアの毒性の観点から排泄に多量の水を必要とする。そのため無制限に水を利用できる一部の水生昆虫ではアンモニア排泄が見られるが、多くの場合、尿酸の形態で排泄を行っている³²。ヒトの血中尿酸濃度は0.21-0.49 mMと報告されている²⁹。ショウジョウバエの体液中の濃度は、当研究室の測定結果から0.1 mM程度と推定される。

尿酸は、ヒトおよびショウジョウバエ³³における強力な抗酸化物質として知られている。進化の過程でアスコルビン酸の生合成が出来なくなった動物は、尿酸含量が高くなったという説もある³²。ヒトでは、細胞中や血液中に存在し水溶性活性酸素を捕捉することにより、脂質過酸化反応を抑制している²⁹。尿酸は、ヒドロキシラジカル($\bullet\text{OH}$)などの活性酸素ばかりでなく、次亜塩素酸およびパーオキシナイトライトなどとも反応し^{35,36}、後者との反応は、アスコルビン酸またはシステインよりも高いと報告されている³⁷。Hayashiらはヒト皮膚がUVAに曝露されると尿酸のレベルが増加することを報告している³⁸。Kohenらはラットの皮膚へのUVA照射によって、グルタチオン、尿酸などが含まれる低分子量抗酸化物質の総レベルが、増加することを報告している³⁹。

ショウジョウバエ尿酸欠損株はX線に感受性があることが知られているが、当研究室では酸化ストレスを誘発するたばこ副流煙^{34,40}や太陽光⁴¹にも感受性が高いことを見出している。また、Hillikerらは、ショウジョウバエの尿酸欠損*ma-l* (*ma-l*遺伝子はmolybdenum cofactor sulfuryaseの構造遺伝子である)および*rosy*変異体 (*rosy*遺伝子はXDHの構造遺伝子である)が、パラコート処理、 γ 線照射や酸素過剰に感受性があることを示している^{33,42}。これらの結果は尿酸がショウジョウバエにおいて抗酸化剤としての役割を果たしていることを支持するものである。

1.5. 本研究の目的

本研究は、ショウジョウバエを用いて、UVAの変異誘発機構を明らかにすることを目的としている。これまで、当研究室における先行研究では、UVAの光

源としてブラックライト（ピーク波長 360 nm、320-400 nm）を用いて体細胞突然変異が誘導されることを明らかにした²⁴。また、ブラックライトでは波長特異性が観察できないため、大型スペクトログラフにおける分光単色光の実験を行ったところ、340 nm の UVA 光まで有意な変異誘導が観察され、360 nm の光の変異誘導性は結論が出せない結果となった²⁴。ブラックライトでは変異が観察できる線量(200 kJ/m²)を照射するには 10 時間程度の照射が必要であること、分光単色光による変異誘導においても 340 nm 以上の光では 4-6 時間程度の照射が必要であることなどから、これらの条件下では UVA 照射後にショウジョウバエ幼虫に起こっている生化学的な変化を調べるのは困難であった。最近開発された LED 光 (365 nm) は高い線量を短時間に照射できることから、線量依存的な変化も観察できる。したがって、照射によって誘導される変化を明らかにすることができる考えた。紫外線領域の LED 光は 365 nm しか開発されていないが、これまで明らかでなかった変異誘導性について明らかにすることを含めて、UVA の中心波長である 365 nm-LED 光を用いて UVA の変異誘発機構の解明を試みた。まず、UVA が酸化傷害を介して突然変異誘導しているかどうかを調べるために、酸化傷害に対して感受性があることが示されている *ma-l* 株を利用したショウジョウバエの突然変異試験（翅毛スポットテスト）を行った。また、UVA 照射の応答反応として尿酸量の変化と活性酸素の生成について調べた。

ショウジョウバエを用いたこれまでの研究で、UVA に対して、除去修復欠損株より、複製後修復欠損株の方が感受性が高いことを明らかにしている²⁵。また、DSB を起こすと言われている X 線において、複製後修復欠損株は感受性が高いことが示されているので、UVA を照射したショウジョウバエ幼虫で DSB が誘発されている可能性があると考え、DSB と変異誘導の関係を調べた。ヒストン H2AX のリン酸化は、DSB の指標とされている⁴³。H2AX は生物において広く保存されており、ショウジョウバエにもそのホモログ H2AvD が存在し、 γ 線照射誘導性リン酸化が報告されている⁴⁴。そこで、ヒストン H2AvD リン酸化を指標に、UVA 照射が DSB を誘導しているかどうか調べた。得られた結果から、UVA 照射が誘導する突然変異の機構を考察した。

2. 実験方法

2.1 使用した試薬

(a) ショウジョウバエ用培地

Agar	ナカライテスク
Dry yeast	オリエンタル酵母
Propionic acid	和光純薬
乾燥酵母エキース	田辺製薬
黒砂糖	三井製糖、日清カップ
米ぬか	

(b) 翅毛スポットテスト用試薬

Chloral hydrate	和光純薬
Diethylether	和光純薬、ナカライテスク
Glycerol	和光純薬
Gum arabic	石津製薬

(c) タンパク定量用試薬

BSA	和光純薬
DC protein assay kit	BIORAD

(d) 尿酸定量用試薬

Adenine	SIGMA
Adenosine monophosphate	SIGMA
CH ₃ COONH ₄ buffer	SIGMA
Cytosine	SIGMA
Deoxyadenosine	SIGMA
Deoxyguanosine	SIGMA
Deoxycytidine	SIGMA
Deoxythymidine	SIGMA

Deoxyinosine	SIGMA
Deoxyuridine	ナカライテスク
Glycerol	ナカライテスク
Guanine	SIGMA
Guanosine monophosphate	SIGMA
Hypoxanthine	SIGMA
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	SIGMA
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	SIGMA
Inosine	和光純薬
Xanthine	SIGMA
Thymine	SIGMA
Uracil	SIGMA
Uric acid	SIGMA

(e) ヒストン γ -H2AvD 検出用試薬

Acrylamide (monomer)	和光純薬
Acetic acid	和光純薬
Ammonium peroxodisulfate (APS)	ナカライテスク
Anti-histone-H2AvD ps137 (Rabbit)	ROCKLAND
Aprotinin	SIGMA
Coomassie brilliant blue (CBB)	ナカライテスク
Ethanol	和光純薬
Ethylendiamine tetraacetic acid · 2Na (EDTA)	DOJINDO
Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)	DOJINDO
Glycerol	和光純薬
Glycine	和光純薬
HCl	和光純薬
ImmunoStar LD (発光検出試薬)	和光純薬

KCl	和光純薬
KH ₂ PO ₄	和光純薬
Leupeptin	和光純薬
Methanol	ナカライテスク
2' -Mercaptoethanol	SIGMA
NaCl	ナカライテスク
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	和光純薬
NaF	ナカライテスク
N,N-Methylen bisacrylamide	ナカライテスク
Nonidet P-40 (NP-40)	ナカライテスク
Pepstatin	和光純薬
Peroxidase-conjugated Affini Pure Goat	SIGMA
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	ナカライテスク
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	和光純薬
Spermine	SIGMA
Spermidine	SIGMA
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	和光純薬
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	SIGMA
Tween 20	Jackson Immuno Reserarch
密度勾配遠心用 sucrose	ナカライテスク
分子量マーカー	Bio Rad
(f) 活性酸素検出用試薬	
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)	SIGMA

2.2. ショウジョウバエ

2.2.1 ショウジョウバエの生活史

ショウジョウバエは 4 対の染色体を持つ、完全変態を行う昆虫である。25℃で飼育すると、受精卵は産卵後約 1 日で 1 齢幼虫になる。その後、2 回脱皮して 3 齢幼虫で約 2 日過ごした後、蛹になり、約 10 日で羽化して成虫になる。(Fig. 2-1)

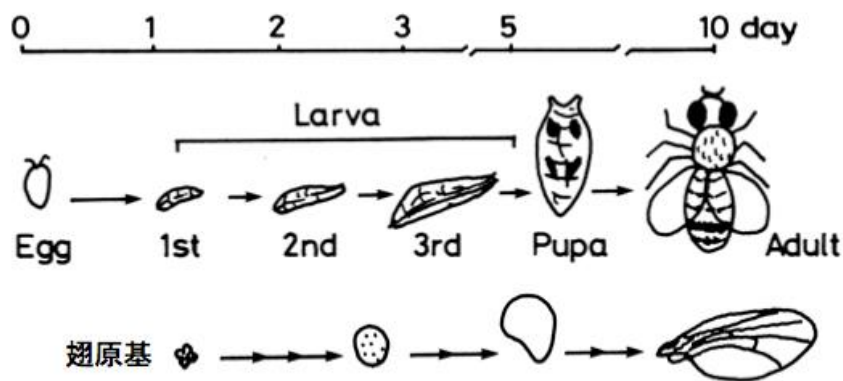


Fig. 2.1 ショウジョウバエの生活史および翅原基の変化 ⁴⁵

成虫の寿命は約 2 ヶ月程度である。卵からふ化した幼虫の体内には変態時に退化消失する幼虫細胞と、将来成虫となったときに各器官に分化する成虫原基細胞が存在している。体細胞突然変異の対象になるのはこの盛んに分裂している原基細胞である。成虫原基細胞は幼虫期には全く未分化の状態で分裂増殖する。蛹化の前で体細胞は分裂を止めるので、体細胞突然変異を誘発させるには、主に幼虫のときに検体を投与しなければならない。したがって、日齢の若い幼虫を処理する場合は、標的細胞の数が少ないことになるが、変異した細胞がその後分裂を繰り返すことによって、数が少なくても大きな変異細胞の集団(スポットと呼ぶ)を形成することが期待される。反対に、蛹になる直前の幼虫を処理した場合、標的細胞は多いが、スポットは小さくなると考えられる。ただしこれは与えた検体で細胞分裂が阻害されない場合に言えることである。このように成長していく個体を処理する場合、発達段階のどの時点で処理するかは、結果に大きな影響を及ぼす。本研究では標的細胞数が多い、ふ化後 3 日目の 3 齢幼虫を用いた。

2.2.2 飼育⁴⁵

ショウジョウバエの飼育はガラス製管びんに調製した一般培地を用いた。ガラス製管びん($\phi 2.5 \times 10$ cm)はオートクレーブで滅菌(121°C、15 分)後、乾燥して用いた。また、スポンジ栓および止まり木として用いるキムワイプ(1 / 8、約 5×5 cm)、タオルペーパー(1 / 16、約 5×5 cm)も、オートクレーブで滅菌後、乾燥して用いた。

培地の組成

一般培地(飼育用)

寒天	10 g
黒砂糖	100 g
米ぬか	50 g
乾燥酵母エビオス	60 g
水道水	1000 ml
プロピオン酸	4 ml

プロピオン酸を除く試料とスターリングバーを 2 L のマイヤーに入れ、オートクレーブで滅菌 (121°C、15 分) した。攪拌しながら分注できる温度まで冷やし、プロピオン酸 4 ml を加えよく混和後、管びんに約 10 ml ずつ分注し、乾燥させたタオルを掛けて冷ました。翌日、スポンジ栓をし、室温で保存し、使用前に、適量 (5、6 粒) の Dry yeast を入れて用いた。ショウジョウバエの飼育は遮光したインキュベーター内で、25°Cで行った。

2.2.3 幼虫処理⁴⁵

照射実験には、全て 3 齢幼虫を用いた。目的に応じた試験用の幼虫を得るための交配を行い、ふ化後 3 日目 (72 ~ 96 時間) の 3 齢幼虫を得た。3 齢幼虫の採取法を Fig. 2. 2 に示している。幼虫を飼育している管びんに滅菌した 20 % sucrose 溶液を注ぎ、管びんの中に入れてあったキムワイプ(止まり木)で培地中の幼虫をかきだして浮遊させる。カラム($\phi 2.5$ cm $\times$ 37 cm)の先に 10 cm のシリコンチューブをつけ、ピンチコックで止め、浮遊させた幼虫を sucrose 溶液とと

もに移す。Sucrose 溶液の密度より幼虫の密度の方が小さいので、幼虫が液面に集まる。静置して幼虫を液面に集め、培地成分が沈んできたら、ピンチコックを開けて溶液を捨てる。新しい sucrose 溶液をカラムに加えてはこの操作を繰り返す。溶液部分がきれいになった後、できるだけ sucrose 溶液を捨てて、水を加えて幼虫を沈める。ピンチコックを開き、幼虫をナイロンメッシュ上に集める。ナイロンメッシュ上の幼虫には sucrose がついているので、軽く幼虫を流水で洗う。実験用幼虫は約 1 時間牛乳びん中で放置し、消化管内の培地成分をできるだけ排出させて用いる。

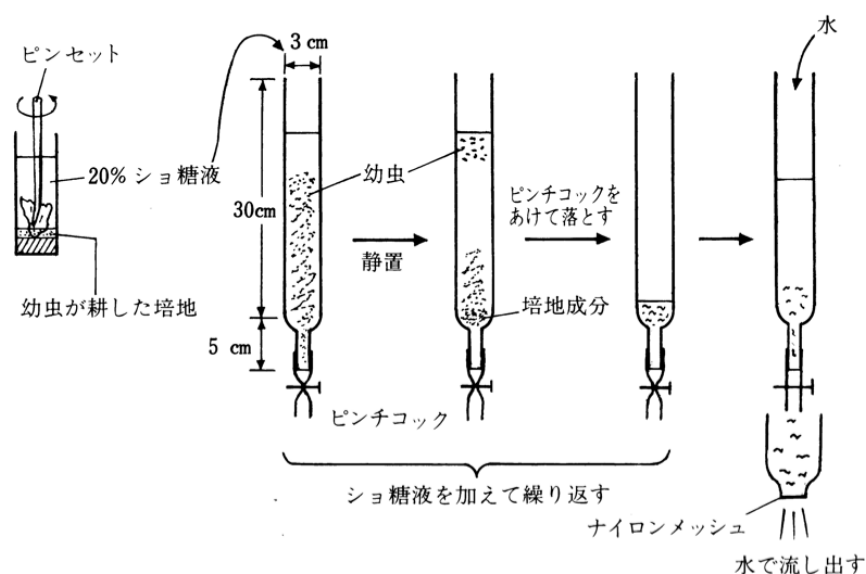


Fig. 2.2 幼虫の採取法 ⁴⁵

2.2.4 使用したショウジョウバエ株

使用したショウジョウバエの遺伝子については、Lindsley と Zimm によって、まとめられている ⁴⁶。

(a) Oregon-R

野生株として使用

梁 治子博士（大阪大学）より分与された。

(b) *y v ma-l* ^{47, 48} (*ma-l* 株と省略)

尿酸欠損株である。

X 染色体上の Molybdenum cofactor sulfarase をコードしている *maroon-like* (*ma-l*) 遺伝子欠損 (欠損領域不特定) により、xanthine dehydrogenase (XDH) 活性に必要であるモリブデンの補因子を、XDH 酵素タンパク質に付加することができないため、活性型の XDH を生成できず、尿酸を生成することができない。そのため 活性酸素をはじめとする酸化ストレスに高感受性となる。XDH 遺伝子は正常である。同じくモリブデンの補因子を必要とする Aldehyde oxidase、Pyridoxal oxidase の活性も欠損しているが、尿酸欠損が原因で酸化ストレスに感受性が高いことが報告されている⁴⁹。XDH 以外の酵素活性の欠損による酸化ストレスに対する感受性に関する報告はない。

梁 治子博士 (大阪大学) より分与された。

(c) *y v ma-l; mwh* (*ma-l; mwh* 株と省略)

尿酸欠損株である。

この株は我々の研究室で交配により作成した変異株である⁵⁰。多翅毛のマーカーを第3染色体左腕にもつ *y v ma-l* 株である。尿酸欠損およびX線感受性について確認している。酸化傷害感受性株と推定される。

(d) *sc z¹ w⁺(TE) mei-9^a/C(1)DX, y f* (*mei-9* と省略)

ヌクレオチド除去修復欠損株⁵¹であり、Mei-9 タンパク質は XPF ホモログとして同定されている⁵²。雌は修復能力があり、修復欠損は雄のみである。

藤川和男博士 (近畿大学) より分与された。

(e) *sc z¹ w⁺(TE) mei-41^{D5}/C(1)DX, y f* (*mei-41* と省略)

複製後修復欠損株であり⁵³、Mei-41 タンパク質は ATR オルソログとして同定されている^{54,55}。雌は修復能力があり、修復欠損は雄のみである。

藤川和男博士 (近畿大学) より分与された。

(f) Muller-5

眼のかたちが棒状となる変異 (Bar) を X 染色体上に持つ。

梁 治子博士（大阪大学）より分与された。

(g) *mwh j v; spa^{pol}*

多翅毛 (*mwh*) のマーカーを第 3 染色体左腕にもつ。

梁 治子博士（大阪大学）より分与された。

2.3. 幼虫の照射方法

0.25 M sucrose 溶液を 1.5 mL いれたプラスチックシャーレ (PD-47 ϕ 50×11 mm; ADVANTEC) に、ショウジョウバエ 3 齢幼虫を約 400 匹 (約 0.5 g) を入れ、LED-UVA 照射、310 nm の単色光照射、X 線照射を行った。UVA 照射は 25°C 設定されたインキュベーター内で、単色光照射は 25°C 設定された室内で行った。プラスチックシャーレのふたは 290 nm 以上の光を透過することを確認している。

2.3.1 LED-UVA の照射

UVA 照射には 365 nm の LED 光を光源として用いた。(ZUV-C30H、オムロン)。ランプは、18 cm の高さに設定し、UVX-36 感知器を接続した UVX ラジオメーター (UVP, Upland, CA) を用いて線量を測定した。シャーレのカバーを通して平均 $125 \pm 3 \text{ W/m}^2$ の UVA を照射した。

2.3.2 UVB 照射

自然科学研究機構基礎生物学研究所 (岡崎) の大型スペクトログラフ (光源 : 300 kW キセノンランプ) を用いて分光された 310 nm の単色光を照射した。幼虫を入れたシャーレを照射台の上に置き、ミラーを用いて光を垂直に落して、バンドパスフィルター (UV 330 nm, HOYA, Akishima Toshiba) を通して照射した。線量はフォトダイオードを接続した線量測定計 (HK-1, 理化学研究所, 和光) で測定した。

2.3.3 X 線照射方法

紫外線による細胞傷害と比較するために、X 線照射を行い、突然変異頻度を調べると同時に、ヒストンリン酸化の検出を行った。近畿大学原子力研究所の X

線照射装置(日立 X 線発生装置 140 kV, 40 mA)を用いて、0.5 Gy/min の線量 (線量測定 : Fricke dosimeter) を照射した。

2.4. 翅毛スポットテスト

2.4.1 原理

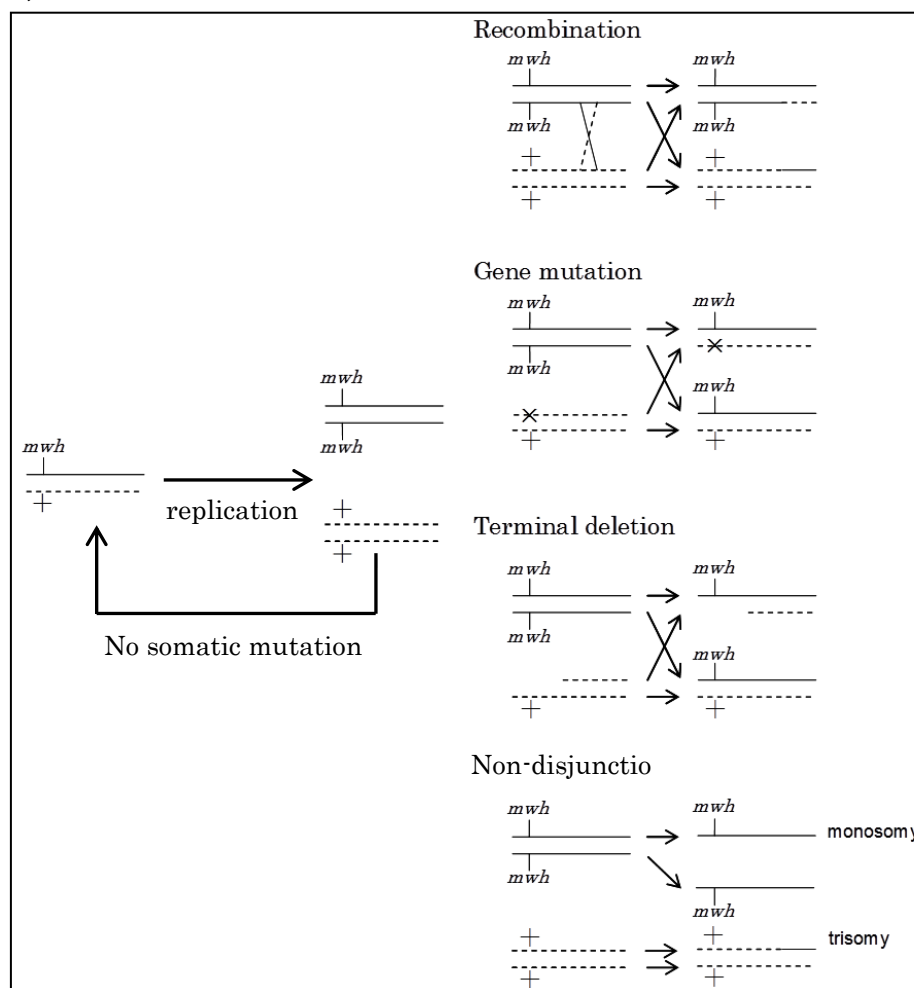


Fig. 2-3 スポットテストの原理 50

翅毛スポットテストはショウジョウバエの幼虫を化学物質で処理し、翅原基細胞の染色体や遺伝子に生じた変異を、変態終了後の成虫の翅で検出する系である⁵⁶。Fig. 2-3 に示すように、用いるショウジョウバエは第三染色体左腕に、多翅毛(*mwh*)と呼ばれる劣性の標識遺伝子を有している。この標識遺伝子は劣性であるため、正常な対立遺伝子(*+*)の変異、又は染色体組み換えなどによって *mwh*

遺伝子がホモ又はヘミ接合体になったときのみ表現型が発現される。正常な翅毛は1個の細胞から1本のまっすぐな毛が出ているが、Fig. 2-3のような染色体レベルや遺伝子の突然変異が起これと、多翅毛の細胞の集団（スポット）が観察される。スポットサイズは処理される幼虫の発達段階や変異が誘発される機構に左右される。すなわち、端部欠失、部分欠失、染色体不分離は異数体細胞になるので生存力が弱く、小さいスポットしか形成しない。一方、染色体組み換えや遺伝子突然変異は細胞の分裂能を損なわないので、比較的若い幼虫を処理した場合大きなスポットを形成しやすい。翅毛スポットテストは、Amesテストが遺伝子突然変異のみを検出するのに対して、真核細胞特有な染色体組み換えを含めた広範囲な染色体レベルでの突然変異を検出することができるが、検出される変異の大部分は組み換えによるものである。

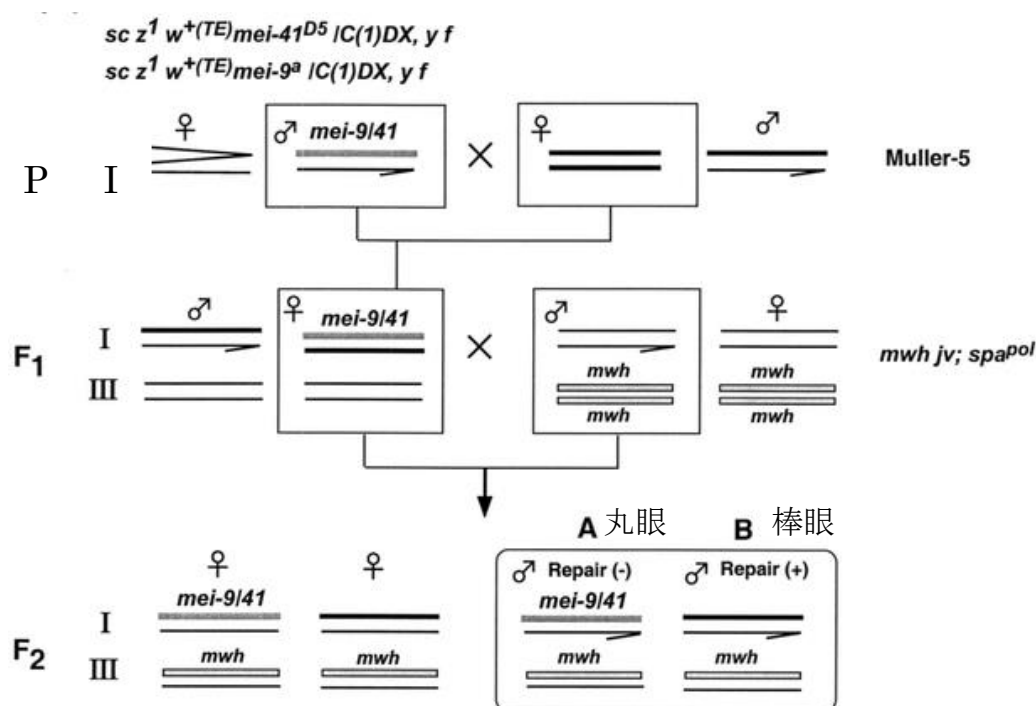


Fig. 2-4 DNA修復欠損株を用いた翅毛スポットテストのための交配²⁵

2.4.2 DNA修復欠損株を用いた翅毛スポットテスト²⁵

変異検出用遺伝子とDNA修復欠損を持つ幼虫を調製するために2回の交配を行った。Fig. 2-4に示すように、第1染色体上に修復欠損を持つ*mei*株の雄と、

修復欠損を持たず棒眼の遺伝子(*Bar*)を持つ Mullar-5 の雌を交配させた。生じる F1 世代の雌は第 1 染色体上に修復欠損の遺伝子と棒眼の遺伝子をそれぞれヘテロに持ち眼の形がハート形となる。この雌と第 3 染色体上に *mwh* をホモにもつ *mwh jv; spa^{pol}* の雄を交配させた。この交配によって得られた F2 の三齢幼虫を、照射に用いた。羽化した F2 世代の成虫のうち、雄の丸眼が修復欠損、棒眼は修復能力がある。それらは成虫の目の形から実体顕微鏡で見分けることができるので、丸眼の雄の翅のスポットをカウントして修復欠損による突然変異頻度を得た。

2.4.3 *ma-l; mwh* 株を用いた翅毛スポットテスト⁵⁰

UVA 照射が誘導する突然変異に酸化傷害が関わっているかどうかを推定するために、*ma-l; mwh* 株を用いた翅毛スポットテストを行った。Fig. 2-5 に示すように、雌の *y v ma-l; mwh* と雄の Oregon-R、あるいは *y v ma-l* の間の交配から得られた 3 齢幼虫を用いて翅毛スポットテストを行った。性差を回避するために、スポットは尿酸陰性 (*ma-l / ma-l* のホモ接合体③) と尿酸陽性 (*ma-l / +*ヘテロ接合体①) の雌の翅のスポットをカウントして変異頻度を比較した。

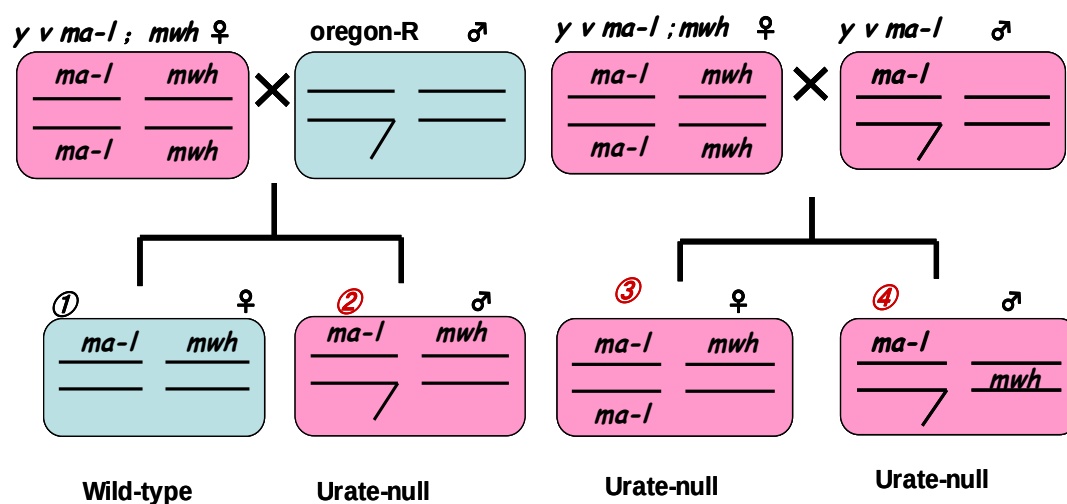


Fig. 2.5 *ma-l; mwh* 株を用いた翅毛スポットテストのための交配⁵⁰

2.4.4 変異原性の検出⁴⁵

(a) 翅の標本作成

成虫が羽化し始めたら採取する。エーテルで十分に麻酔して殺し、75 %エタノールを入れたバイアル瓶中で保存する。

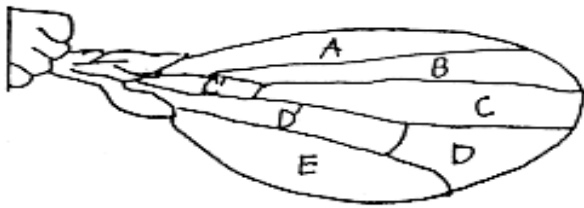
バイアル瓶に保存した成虫をナイロンメッシュ上に集め、流水でよくすすぎ、シャーレに移す。実体顕微鏡（OLYMPUS、倍率；×10～20）下、成虫の翅をピンセットで取り、Faure 試薬を入れたシャーレに移す。スライドガラスに翅を傷つけないようにきれいに広げて並べる。パラフィン伸展器にスライドガラスを置き、45℃で乾燥させる。ほこりがかぶらないようにして、室温で一晩放置する。スライドガラスに Faure 試薬を少量滴下して、カバーガラスをかぶせる。このとき、気泡が入らないように注意する。カバーガラスの中央を軽く押さえ、余分な Faure 試薬をキムワイプで吸い取る。カバーガラスの上におもり（12 オンス）をのせ、一晩室温で乾燥させる。

Faure 試薬の組成

抱水クロラル	25 g
アラビアゴム	15 g
グリセリン	10 ml
蒸留水	143 ml

(b) 変異スポットの観察

A



B

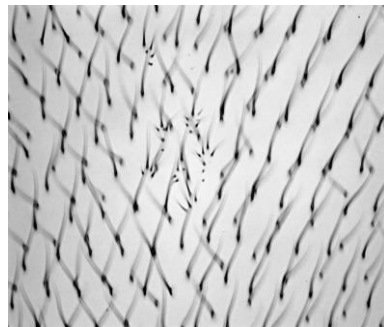


Fig. 2-6 ショウジョウバエの翅 (A) と変異スポット (B) ⁴⁵

翅毛スポットの観察は 400 倍率の顕微鏡下で行う。翅は翅脈により 7つの部分に分けられる (Fig. 2-6 A)。翅のどこに、いくつの変異翅毛があるかを記録す

る。スポットの判定基準を以下に示す。

1 個の細胞から 3 本以上の翅毛を生じているものを、多翅毛スポットする。ただし、正常な翅毛と同じかそれ以上の長さの翅毛が 3 本以上生えている場合は、多翅毛とみなさない。また、翅毛が 2 本の細胞集団が観察された場合、2 本のものばかりだとスポットとみなさない。1 個でもその中に 3 本以上のものがあると 2 本のものも含めた細胞集団をスポットとして計数する (Fig.2-6 B)。

スポットは 1 個か 2 個の変異細胞からなる **small single spot** と 3 個以上の細胞からなる **large single spot** に分類して計数する。

いくつかのスポットが近接して存在することがあるが、この場合単一のクローンから発生途中で分離した可能性が高い。そこで、異常な翅毛をさえぎる正常な翅毛の列が 3 列以上の場合は、別のスポットとみなすと決める。

(c) 有意差検定法

検体がスポットを誘発するか否かの検定は翅 1 枚あたりのスポット数 (Spots/wing) について行う。翅毛スポットテストの検定法には、ショウジョウバエ翅毛スポットテストに関する先行研究にしたがって、対照群と処理群で検出されたスポット数の合計が 100 以下の場合は **Kastenbaum and Bowman** の表を用い⁵⁷、100 より多い場合には χ^2 -検定法 (Yates の補正式、片側検定) を用いる⁵⁸。

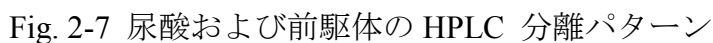
2.5. 尿酸測定

UVA 照射直後と、その後時間をおいて、野生株と尿酸欠損株の尿酸量の測定を行った。

2.5.1 サンプルの調製⁴⁰

照射後凍結した幼虫約 30 匹に 0.1 M sodium phosphate buffer (pH7.0)/20% glycerol を 0.8 ml 加え、氷中でホモジナイズし、14,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し上清を集めた。上清の一部をタンパク定量用に保存し、残りは pore size 0.2 μ m のフィルター (DISMICM3 cp、ADVANTEC) で濾過し、濾液を HPLC サンプルとした。サンプルは測定まで -80°C で保存した。

尿酸定量は、高速液体クロマトグラフィ (CTO-6Asystem controller、Shimadzu) を用いて行った 33, 40, 59。尿酸は 300 nm の吸収で、他の塩基は 260 nm の吸収で検出し、スタンダードとのピークの面積比でサンプルの尿酸、および前駆体のキサンチン、ヒポキサンチン量を求めた。Fig. 2-7 に Oregon-R の幼虫の分析結果を示す。



Column : Inertsil ODS-3 octadecylsilane column of 4.6 X 250 nm (GL Science),
40°C Solvent : 20 mM CH₃COONH₄ buffer (pH5.9)
Flow rate :1.0 ml/min
Detector : Shimadzu SPD-M10Avp UV-vis photodiode-array detector

以下の各塩基を 10 μ M (Xanthine のみ 5 μ M)で含む
 Uric acid, Hypoxanthine, Xanthine, Adenine, Guanine, Cytosine, Thymine, Uracil,
 Inosine, Deoxyadenosine, Deoxyguanosine, Deoxycytidine, Deoxythymidine,
 Deoxyinosine, Deoxyuridine, Adenosine monophosphate,
 Guanosine monophosphate

2.5.3 タンパク定量

タンパク質定量は DC Protein Assay kit (Bio Rad)を用いて行った (Lowry 法)。標準液 として BSA (bovine serum albumin、SIGMA) 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/ml を調製した。96 穴プレートにサンプル溶液もしくは BSA (5 μ l)と Regent A (25 μ l)、Regent B (200 μ l)を入れ、室温で 15 分放置した後、マイクロブリーダー (ImmunoMini NJ-2300, Inter Med, 570 nm フィルター) で測定した。BSA 溶液の吸光度から検量線を作成し、サンプルのタンパク量を算出した。

2.6. ヒストン γ -H2AvD 検出

UVA 照射が誘導する変異に DNA 二本鎖切断が関わっているかどうかを検討するために、照射後の幼虫におけるヒストンリン酸化を調べた。

2.6.1 サンプルの調製

3 齢幼虫のヒストンタンパク質画分は、Thorne の方法⁶⁰を参考に酸抽出法を用いて調製した。照射後液体窒素で凍結した約 200 匹の幼虫を、0.8 ml の 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 0.2% NP-40, 10 mM NaF, 1.5 μ g/ml aprotinin, 0.7 μ g/ml pepstatin, 0.5 μ g/ml leupeptin と 1 mM PMSF を含む 15 mM Tris-HCl (pH 7.5) の緩衝液中で 500 rpm の回転数でホモジナイズした。固形物を除去するためにフィルターを付けたエッペンドルフチューブに移して 5,000 rpm で 5 分間、遠心機により遠心して、沈殿を得た。沈殿に緩衝液を 0.3 ml 加え、懸濁した後、0.8 M と 1.6 M スクロースを加えた新しいチューブに移した。15,000 rpm で 20 分間、遠心機により密度勾配遠心を行い、1.6 M スクロース層を通過して沈殿させることによって核を調製した。次いで 0.4 M の HCl で懸濁して、60 分間放置することによってヒストンを抽出し、アセトンで一晩沈殿させた。20 分間乾燥して、アセトンを除いた後 MiliQ 水にヒストンタンパク質を溶解した。

2.6.2 電気泳動 (SDS-PAGE)

15% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いてヒストン画分を電気泳動で分離した。各 well にサンプルを 20 μ g タンパク質量ずつアプライし、電源装置 (Cross

Power 1000、ATTO)を用いて、ゲル1枚あたりに20 mAの定電流、80~100Vの電圧をかけた。泳動終了後、ウェスタンブロッティングを行った。

- 電気泳動用 buffer (1000 ml)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane : 3 g

Glycine : 14.4 g

SDS : 1 g

- 30 %アクリルアミドストック溶液 (200 ml)

Acrylamide (monomer) : 58 g

N, N-Methylen bisacrylamide : 2 g

蒸留水 : 200 ml にメスアップ

- Running gel (8 ml)

蒸留水 : 2 ml

アクリルアミドストック溶液 : 4 ml

1.5 M Tris-HCl(PH 8.8) : 2 ml

10 % SDS : 80 μ l

10 % APS : 27 μ l

TEMED : 4 μ l

- Stacking gel (2.5 ml)

蒸留水 : 1.44 ml

アクリルアミドストック溶液 : 0.4 ml

0.5 M Tris-HCl(PH 6.8) : 0.625 ml

10 % SDS : 25 μ l

10 % APS : 8.3 μ l

TEMED : 2.5 μ l

2.6.3 ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは、伊吹らの方法⁶¹に従って行った。ヒストンを含むサンプルは SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜 (polyvinylidene difluoride、MILLIPORE) 上にブロットした。PVDF 膜を 3% アルブミンでブロッキングした後、Coomassie brilliant blue (CBB) で染色した。ヒストンが分離された部分を切り出して、リン酸化 H2AvD (γ -H2AvD) に対する一次抗体で、4°C、約 15 時間インキュベートし、HRP とコンジュゲートした二次抗体 (Horseradish peroxidase-conjugated Affini Pure Goat, SIGMA) で 2 時間処理した。 γ -H2AvD は増強化学発光検出キット (ImmunoStar LD、和光純薬) で発光させ、イメージアナライザー LAS3000 (FUJIFILM) を用いて可視化した。 γ -H2AvD と CBB で染色したタンパク質のバンドの濃さから NIH イメージ J ソフトを用いて定量化した。有意差検定は Tukey 法に従って行った。

- Blotting buffer (1000 ml)

- Tris (hydroxymethyl) aminomethane : 12.1 g

- Glycine : 14.4 g

- Methanol : 50 ml

- 染色液 (1000 ml)

- CBB : 2.5 g

- Ethanol : 260 ml

- 酢酸 : 100 ml

- 蒸留水 : 650 ml

- 脱色液 (1000 ml)

- Ethanol : 250 ml

- 酢酸 : 100 ml

- 蒸留水 : 650 ml

- PBS (1000 ml)

- 蒸留水 : 1000 ml

NaCl : 8 g

Na₂HPO₄ • 12H₂O : 2.9 g

KCl : 0.2 g

KH₂PO₄ : 0.2 g

• TPBS (0.1 % or 0.3 % 500 ml)

PBS : 500 ml

Tween 20 : 500 µl or 1500 µl

2. 7. 生体内活性酸素の検出 ⁶²

細胞浸透性蛍光試薬 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) は Fig. 2-8 に示すように、細胞内に取り込まれると、細胞内エステラーゼにより脱アセチル化し非蛍光型 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) になり、更に ROS によりすばやく酸化されると、強い緑色蛍光を発生する 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) に変化する。そこで、UVA 照射により幼虫体内に活性酸素種が生成するかどうか、DCFH-DA (0.01 M) で 1.5 時間処理した後、洗浄した幼虫をショウジョウバエリンガー液 (0.75% NaCl, 0.035% KCl) 中で UVA を照射して、緑色蛍光を、CCD カメラ (PD26, OLYMPUS) を接続した実体蛍光顕微鏡 (SZ61, LG-PS2, OLYMPUS) で観察した。

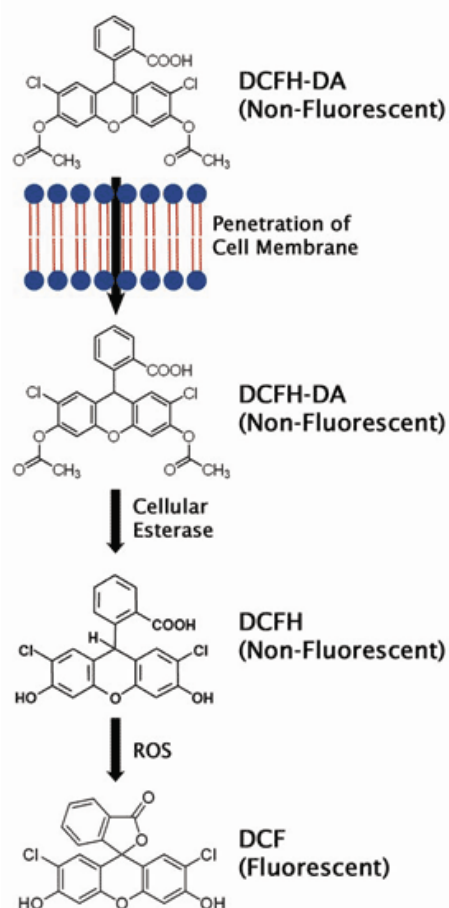


Fig. 2-8 DCF アッセイの原理 ⁶²

3. 結果

3. 1. UVA 照射により誘発される突然変異と酸化的損傷の関係

3. 1. 1 UVA 照射によって誘発される体細胞突然変異

これまでの当研究室での研究では 360 nm 付近の変異誘発能の有無について、結論が出ていなかった。そこで、より強力な線量が照射できる 365nm の LED 光を用いてスポットテストを行った。さらに抗酸化物質である尿酸を持たない *ma-l; mwh* 株を用いて尿酸欠損の影響を野生型と比較した。*y v ma-l; mwh* の未交配雌と、*y v ma-l* または Oregon-R の雄を交配して得られた三齢幼虫に 365 nm の LED-UVA を照射した。結果は Table 3-1 および Fig. 3-1 に示した。野生型雌 (*ma-l +/-*) では最高用量 (1000 kJ/m²) の UVA 照射においても変異が観察されなかった一方、*ma-l* 型雌 (*ma-l -/-* (*ma-l/ma-l* ホモ接合体)) では、有意な突然変異が 600 kJ/m² 以上の UVA 線量で検出された。この結果から 365 nm の LED 光の照射は、尿酸で防御されるような酸化傷害を介して変異を誘導していることが示唆された。

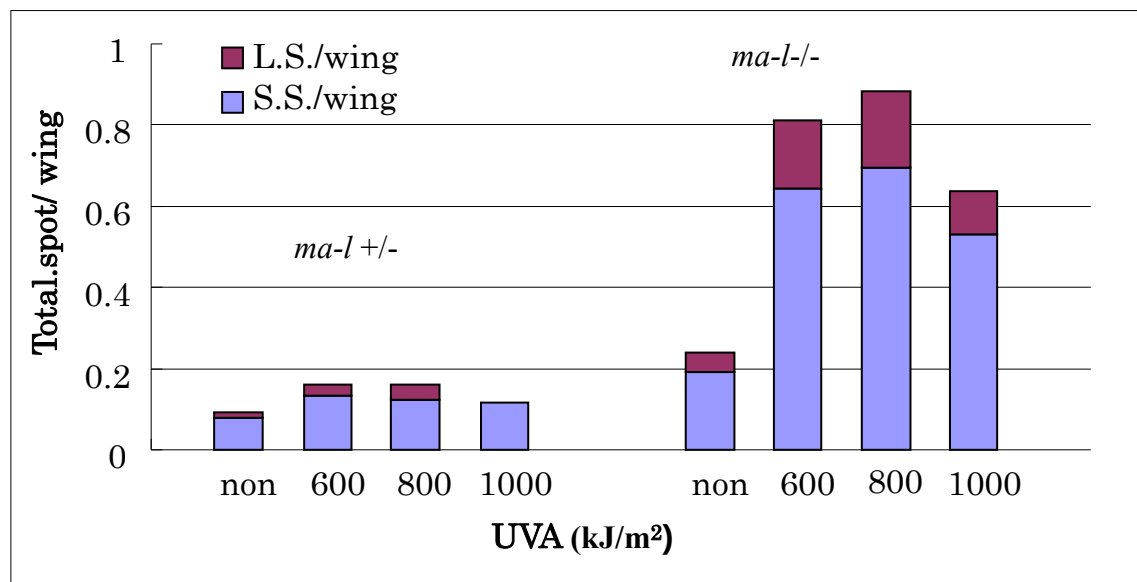


Fig. 3-1 Mutagenic activity of UVA in urate-positive and urate-null *Drosophila*
(L.S. : Large single spots S.S. : Small single spots)

Table 3-1 Mutagenic activity of UVA in urate-positive and urate-null *Drosophila*

Dose (kJ/m²)	No. of wings	Small spots (Spots/ wing)	Large spots (Spots/ wing)	Total spots (Spots/ wing)	Survival^a
Urate (+) (<i>ma-l</i> +/-)					
0	76	6 (0.08)	1 (0.01)	7 (0.09)	1.00
609	74	10 (0.13)	2 (0.03)	12 (0.16)	0.95
789	80	10 (0.13)	3 (0.04)	13 (0.16)	1.05
1003	60	7 (0.11)	0 (0.00)	7 (0.11)	0.71
Urate (-) (<i>ma-l</i> -/-)					
0	104	20 (0.19)	5 (0.10)	25 (0.24) ††	1.00
609	112	72 (0.64) **	19 (0.19) **	91 (0.81) **	0.82
789	102	71 (0.70) **	19 (0.17) **	90 (0.88) **	0.90
1003	96	51 (0.53) **	10 (0.05)	61 (0.63) **	0.69

^a; Survival is presented as a ratio of number of flies from irradiated larvae to number of flies from non-irradiated larvae.

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, significant differences relative to non-irradiated control by the chi-squared test. ††: $P < 0.01$, significant differences relative to urate (+) non-irradiated control by the chi-squared test. UVA Fluence: 130-140 W/m²

3. 1. 2 UVA 照射による尿酸含量の変化

3. 1. 1 で変異を観察したショウジョウバエについて、欠損型において尿酸を含有していないか、前駆体が蓄積しているかを調べるために尿酸及び前駆体のキサンチン、ヒポキサンチンの定量を行った。Table 3-2 に示すように、*ma-l/ma-l* ホモ接合のハエにおいてトレース量の尿酸しか確認されなかった。照射直後、および時間をおいても、野生型において尿酸量の増加は見られず、欠損型において前駆体であるキサンチンやヒポキサンチンの増加も見られなかった。タバコ副流煙曝露の実験において野生型では尿酸量の増加、欠損型では前駆体量の増加が見られているが、2 時間程度の UVA の照射は、尿酸合成に影響しないことを示している。

Table 3-2 Amounts of uric acid in *Drosophila*

		Uric acid	Xanthine	Hypoxanthine
		(nmol/mg protion)		
Urate (+) (<i>ma-l</i> +/-)				
No irradiation		5.48	2.82	2.20
After irradiation (1000 kJ/m²)	0 h	4.83	2.42	1.23
	1 h	4.04	2.63	1.33
	2 h	5.01	2.43	1.49
	4 h	4.41	1.91	1.29
Urate (-) (<i>ma-l</i> -/-)				
No irradiation		0.01	10.53	11.82
After irradiation (1000 kJ/m²)	0 h	0.01	12.17	13.82
	1 h	0.02	15.33	16.47
	2 h	0.02	15.02	15.85
	4 h	0.02	14.96	14.80

3.1.3 UVA 照射による活性酸素種の生成

UVA が誘導する細胞毒性及び遺伝毒性には、光増感反応によって生じる活性酸素種が深く関与していると考えられる。そこで、細胞内活性酸素検出試薬である 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて、UVA 照射後に細胞内活性酸素種量がどのように変化するか検討した。予め DCFH-DA を摂取させた幼虫に UVA を照射したところ、いずれの株においても照射時間に依存して活性酸素の増加が示されたが、野生株と比べて、*ma-l* 株における活性酸素種の産出が定性的に高いことが認められた (Fig. 3-2)。

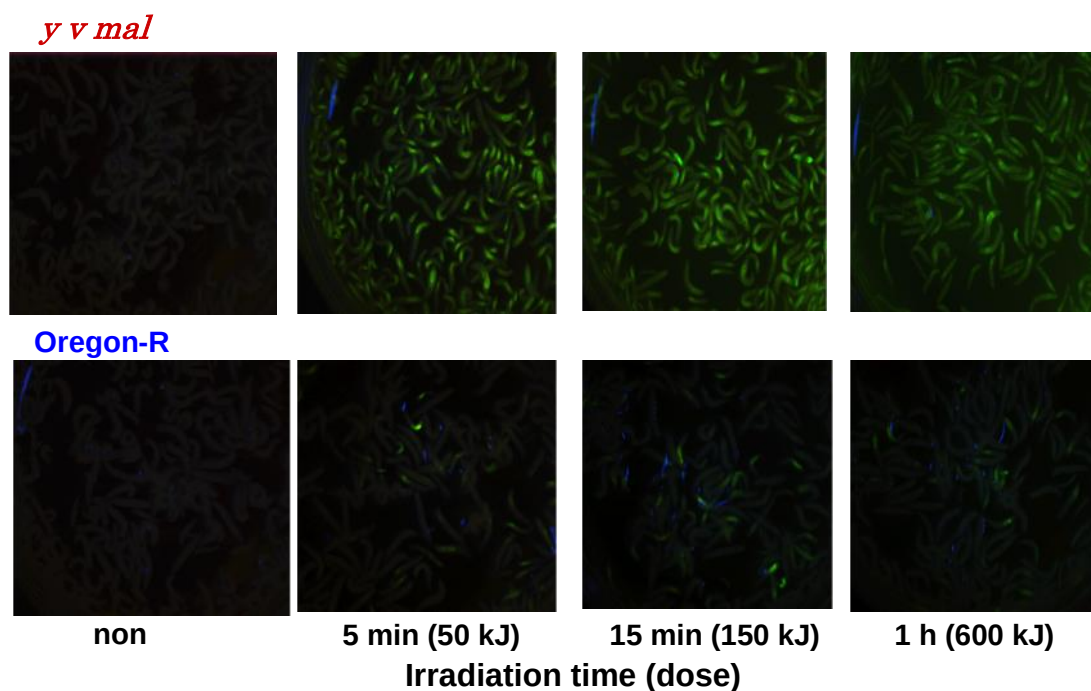


Fig. 3-2 Detection of ROS induced by UVA in *Drosophila* larvae

Image was taken under the microscope (10 X magnification) connected with CCD camera (DP26, OLYMPUS). Exposure time of camera was set at 250 ms for *y v mal* and 500 ms for Oregon-R.

3.1.4 UVB 照射によって誘発される体細胞突然変異

Table 3-3、及び Fig. 3-3 に、野生型及び *ma-l* 欠損型に対する単色光 310 nm 照射により誘導される変異頻度を示した。野生型と *ma-l* 欠損型いずれの株においても、線量依存的に体細胞突然変異が有意に増加した。*ma-l* 欠損型の方が高い変異頻度を示す傾向が見られたが、UVA のような顕著な差は見られなかった。このことは、UVB 照射による変異に対して酸化傷害の寄与は少ないと考えられ、UVA 照射による変異は、UVB とは異なるプロセスで誘導されることを示している。

Table 3-3 Mutagenic activity of UVB in urate-positive and urate-null *Drosophila*

Dose (kJ/ m ²)	No. of wings	Small spots (Spots/ wing)	Large spots (Spots/ wing)	Total spots (Spots/ wing)
Urate (+) (<i>ma-l +/-</i>)				
0	50	7 (0.14)	3 (0.06)	10 (0.2)
5	50	57 (1.14) **	11 (0.22) *	68 (1.36) **
10	50	110 (2.20) **	34 (0.68) **	144 (2.88) **
15	50	154 (3.08) **	32 (0.64) **	186 (3.72) **
Urate (-) (<i>ma-l -/-</i>)				
0	50	32 (0.64)	6 (0.12)	38 (0.76)
5	50	74 (1.48) **	39 (0.78) **	113 (2.26) **
10	50	138 (2.76) **	64 (1.28) **	202 (4.04) **
15	50	153 (3.06) **	83 (1.66) **	236 (4.72) **

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, significant differences relative to non-irradiated control by the chi-squared test.

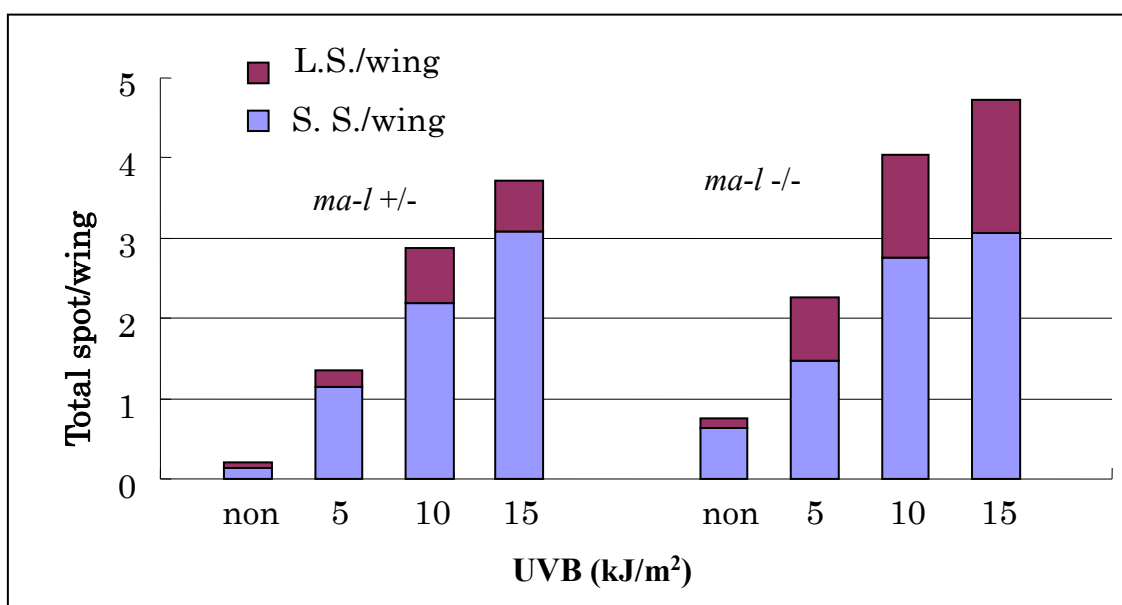


Fig. 3-3 Mutagenic activity of UVB in urate-positive and urate-null *Drosophila*
(L.S. : Large single spots S.S. : Small single spots)

3.2. DNA 修復欠損ショウジョウバエ株における UVA の変異原性

除去修復欠損株 *mei-9* と複製後修復欠損株 *mei-41* を用いて、UVA の変異原性を調べた。Table 3-4 と Fig. 3-4 にその結果を示した。いずれの株においても線量依存的な変異上昇が見られたが、*mei-41* 株の方が高い変異原性を示した。Mei-41 タンパク質は ATR オルソログであり、DNA 二本鎖切断の修復の最初の過程に関与すると考えられている。この結果から UVA の変異誘発には DNA 二本鎖切断が関与している可能性が示唆された。

Table 3-4 Mutagenic activity of UVA in *mei-9* and *mei-41* strain

Dose (kJ/ m ²)	No. of wings	Small spots (Spots/ wing)	Large spots (Spots/ wing)	Total spots (Spots/ wing)
<i>mei-9</i> (excision repair deficient)				
0	50	431 (8.62)	11 (0.22)	442 (8.84)
609	50	462 (9.24)	11 (0.22)	473 (9.46)
813	50	483 (9.66) *	13 (0.44)	496 (9.92) *
1016	50	502 (10.04) **	22 (0.44) *	524 (10.48) **
<i>mei-41</i> (postreplication repair deficient, ATR homologue)				
0	56	736 (13.14)	11 (0.2)	747 (13.34)
614	50	725 (14.5) *	13 (0.26)	738 (14.76) *
819	50	746 (14.92) **	10 (0.2)	756 (15.12) **
1023	56	908 (16.21) **	18 (0.32)	926 (16.53) **

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, significant differences relative to non-irradiated control by the chi-squared test.

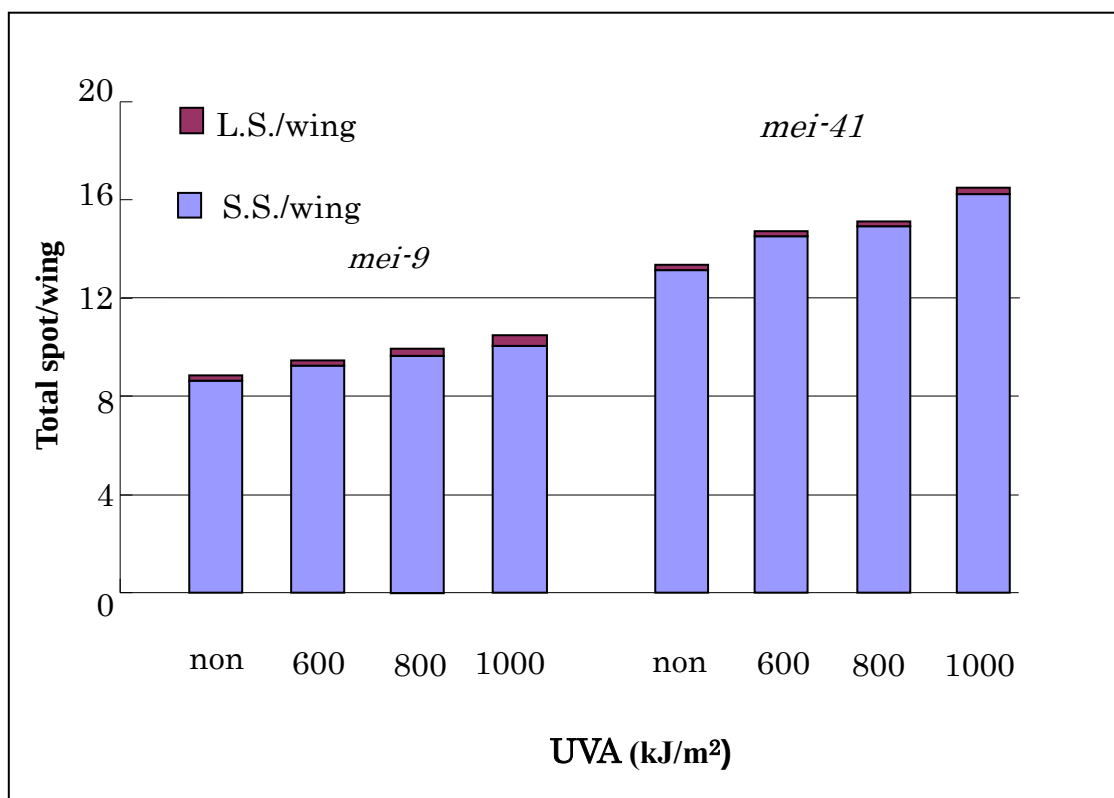


Fig. 3-4 Mutagenic activity of UVA in *mei-9* and *mei-41* strain
(L.S. : Large single spots S.S. : Small single spots)

3.3. ヒストン H2AvD リン酸化の検出

UVA 照射による DNA 傷害として鎖切断の有無を検討するために二本鎖切断の指標とされているヒストン H2AvD のリン酸化を調べた。

3.3.1 X 線照射により誘発される γ -H2AvD

X 線は、DNA に直接二本鎖切断を形成することが知られている。また、X 線照射実験により γ -H2AX のレベルは、放射線量と強く相関することがわかっている⁴²。そこで、ショウジョウバエに X 線照射した時に γ -H2AX のショウジョウバエホモログである γ -H2AvD が検出されるか調べた。

X 線照射前、照射直後、その後一定時間を置いて幼虫を採取し、ヒストン画分を調製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。Fig. 3-5 は、泳動後、ゲルを CBB 染色したものである。分子量からヒストンタンパク質が分離されていると想定される場所を切り出し、ウェスタンブロッティング (WB) を行った。一次抗体 (anti- γ -H2AvD : 1 : 1000) を一晩作用させた後、HRP 結合二次抗体 (1 : 1000) で 2 時間処理した。イムノスタ-D で発光させ、LAS3000 を用いて可視化した。 γ -H2AvD の位置は陽性対照のバンドの位置で確認した。

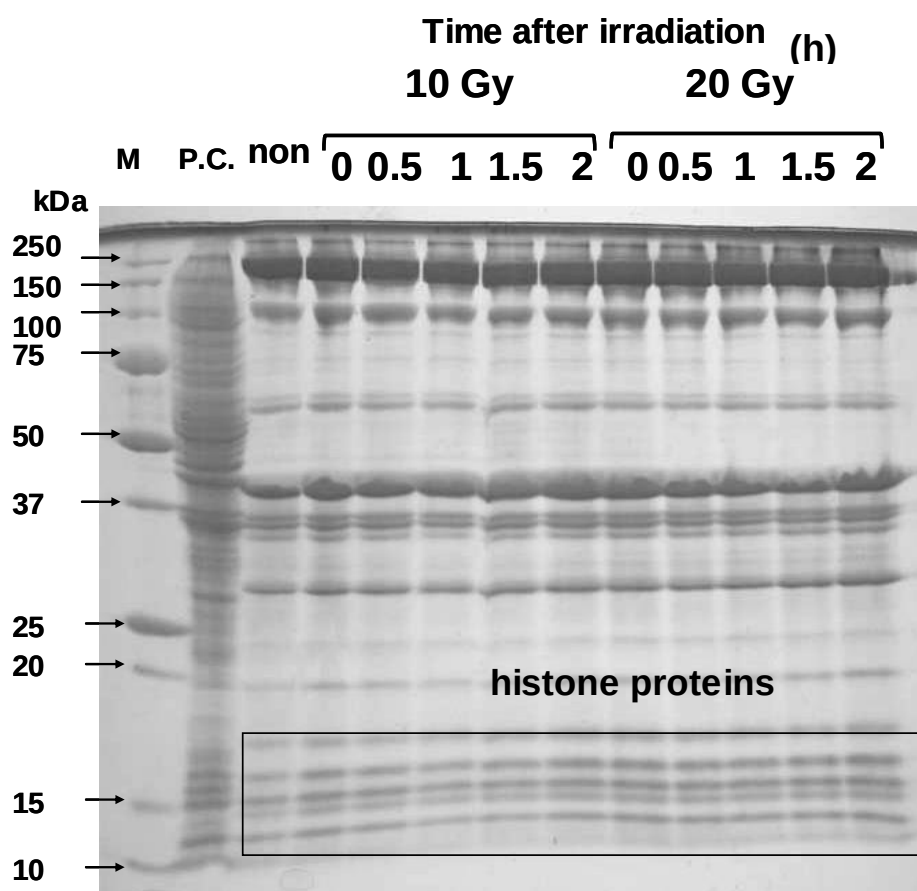


Fig. 3-5 Isolation and separation of histone proteins from X-ray irradiated larvae (Oregon-R)

M : molecular weight marker (Precision Plus Protein Standards, BIO-RAD)

P.C.: positive control (lysate from human lung adenocarcinoma epithelial cells treated with 100 μ M etoposide)

Fig. 3-6 に 3 回の独立した実験結果を示した。*y v ma-l; mwh*、*y v ma-l* または Oregon-R いずれの株においても、曝露直後(0 hr)の幼虫でリン酸化が観察され、曝露後 4 時間は同じレベルのリン酸化が継続することが示された。これにより、X 線曝露が二本鎖切断を誘導していることが確認された。

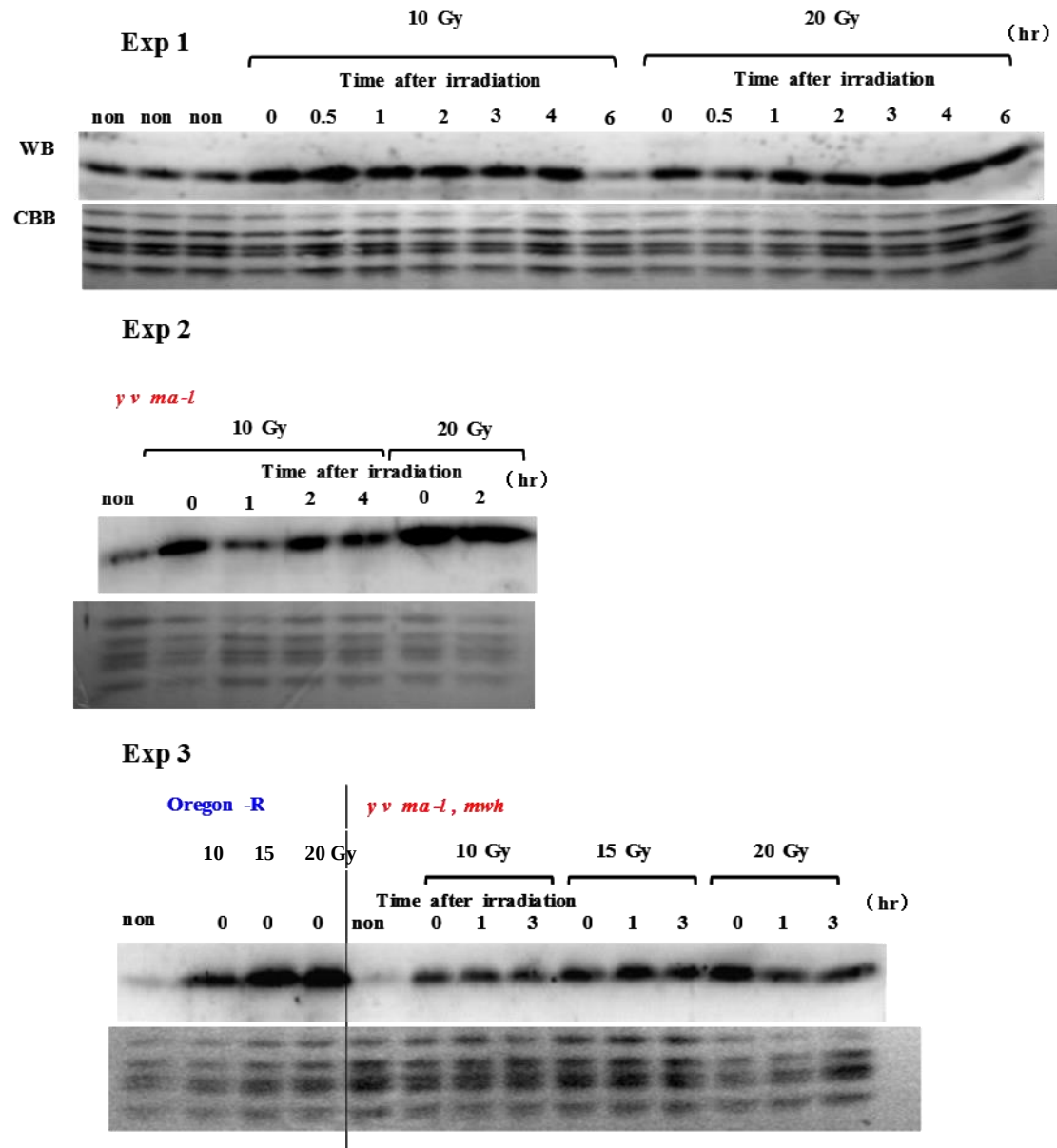


Fig.3-6 X-ray induced γ -H2AvD expression

Exp. 1: Oregon-R, Exp. 2: *y v ma-l*, Exp. 3: *y v ma-l, mwh* and Oregon-R

3. 3. 2 UVA 照射により誘発され γ -H2AvD の発現

(a) DNA 傷害修復欠損株を用いた実験

ヒストン H2AvD のリン酸化は ATR の存在が必要されている^{62,63}。ATR 欠損変異株である、*mei-41* 株では DNA 二本鎖切断が起きてもリン酸化が検出されないと予測される。そこで、*mei-41* 株と、対照として除去修復欠損株 *mei-9* に UVA 1000 kJ/m² 照射して γ -H2AvD の変化を調べた。Fig. 3-7、Fig. 3-8 に示すように、除去修復欠損株では UVA 照射により顕著なヒストンリン酸化が検出されたが、*mei-41* 株ではリン酸化ヒストンの増加は観察されなかった。

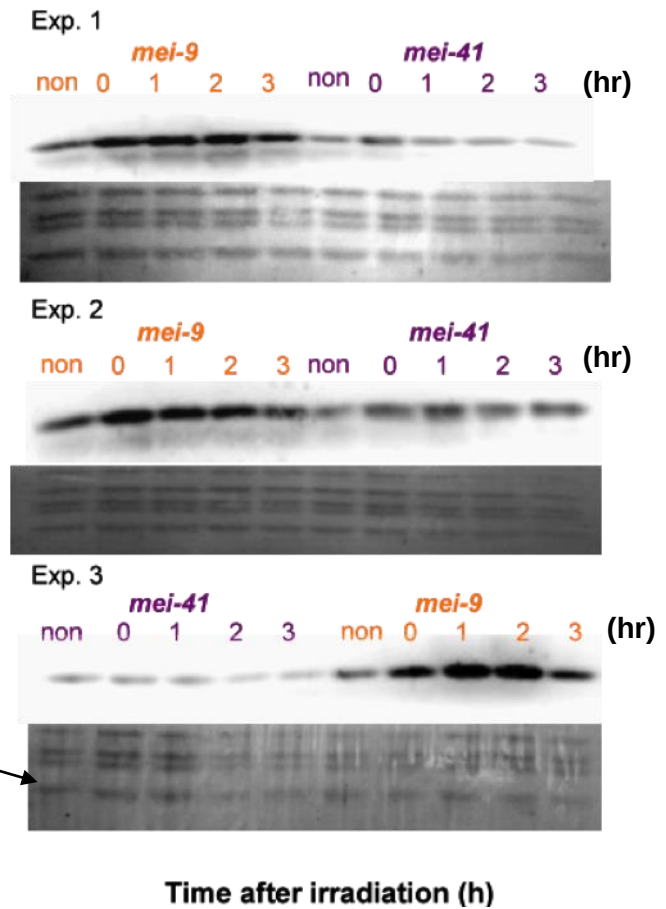


Fig. 3-7 γ -H2AvD responses in repair-deficient *Drosophila*

non: no irradiation 0: just after irradiation
1, 2, 3: time after irradiation (hr)

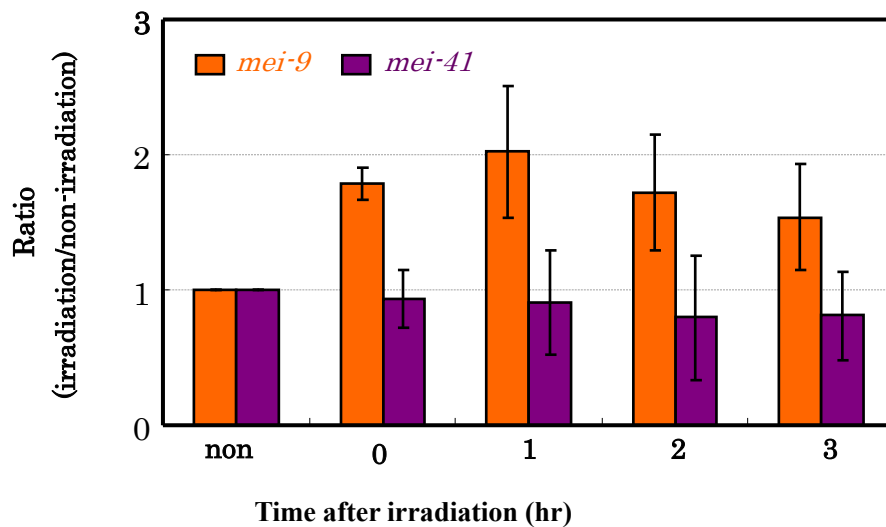


Fig. 3-8 γ -H2AvD responses in repair-deficient *Drosophila*

NIH イメージ soft を用いて、矢印で示した CBB 染色のバンドの濃さに対して、WB のバンドの濃さを比較して定量し、非照射時の値を 1 として相対値で表し、3 回の実験結果をまとめたのが Fig. 3-8 である。この結果から、UVA 照射によって検出される γ -H2AvD 形成には ATR が関わっていることが示された。

(b) 酸化傷害感受性株を用いた実験

Fig. 3-9 に、1000 kJ/ m² の UVA を野生株 Oregon-R と *ma-l* 株の幼虫に照射した時の、ヒストンリン酸化の様子を示した。Fig. 3-10 は Fig. 3-9 に示した 3 回の実験結果を定量化、非照射群と比較したものである。リン酸化ヒストンは野生株、*ma-l* 株いずれにおいても UVA 照射直後から検出されたが、野生株に比べ

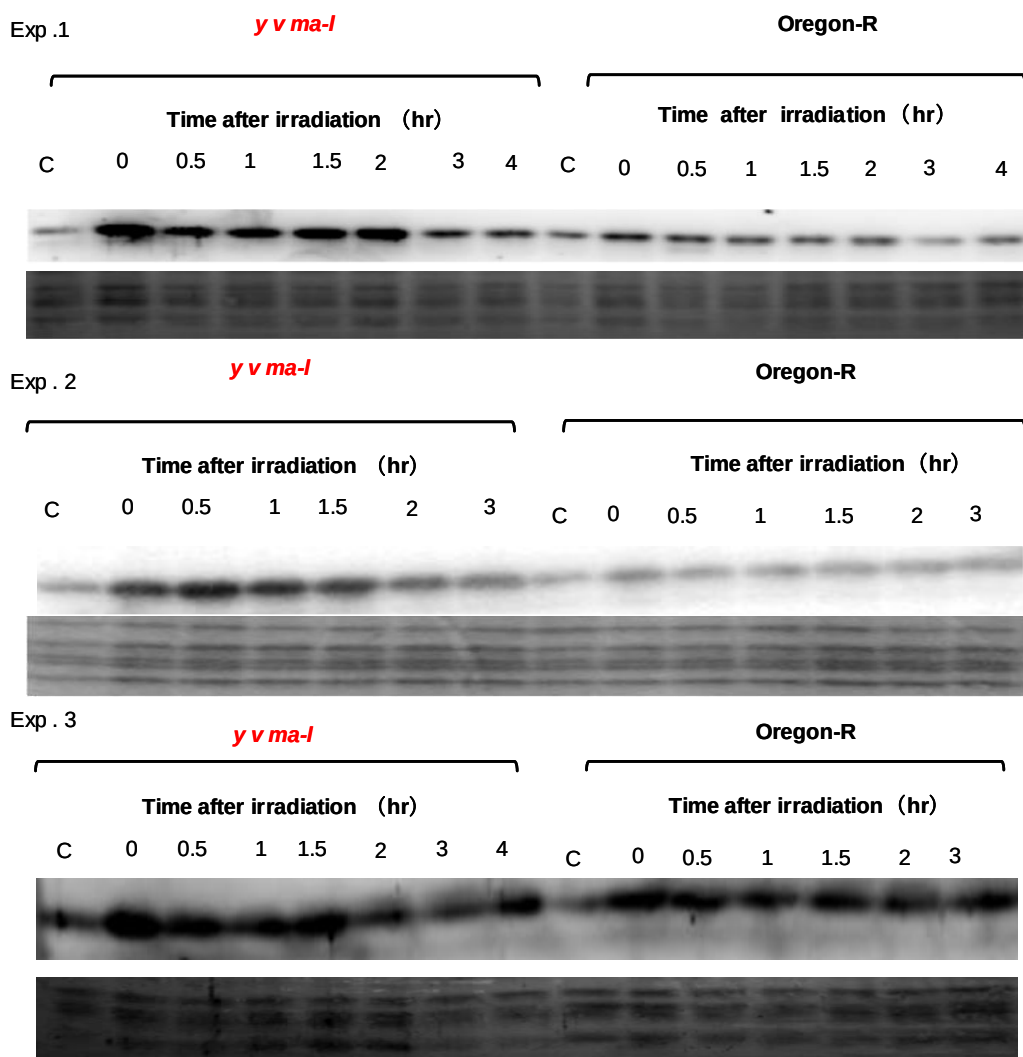


Fig. 3-9 UVA induced γ -H2AvD in *Drosophila*

て *ma-l* 株では高いレベルを示した。したがって、*ma-l* 損株では、リン酸化ヒストンが野生株に比べて大きく増加すること、すなわち二本鎖切断がより多く起きていることが推測される。

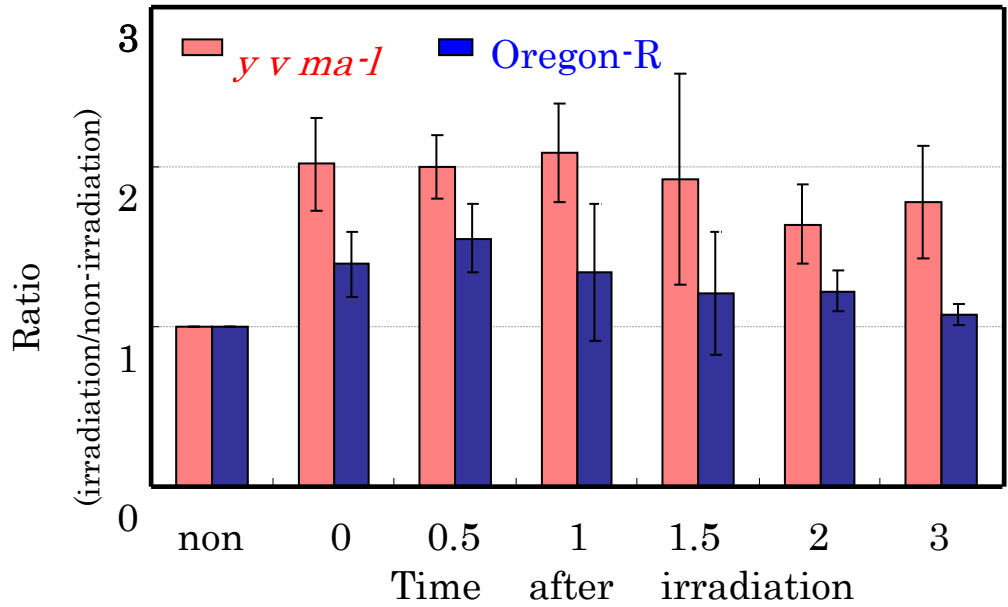


Fig. 3-10 UVA induced γ -H2AvD in *Drosophila*

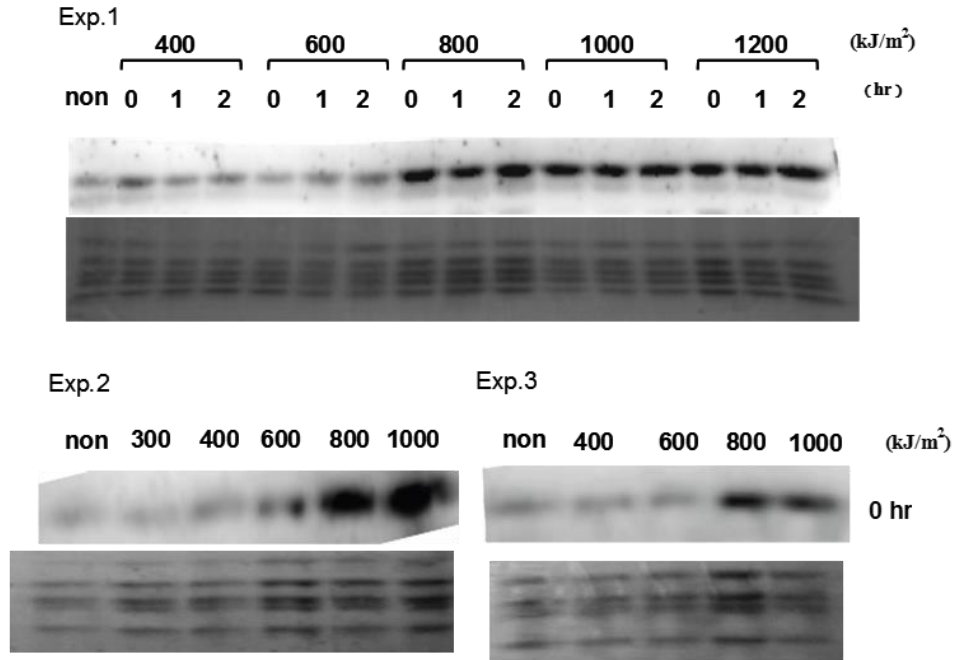


Fig. 3-11 UVA dose-dependent induction of γ -H2AvD in *y v ma-l*

ma-l 株における γ -H2AvD の増加が線量依存性を示すかどうか調べるために、400 kJ/m² から 1000 kJ/m² の照射直後の幼虫のリン酸化を観察した。

Fig. 3-12 は Fig. 3-11 で示した 3 回の実験を定量化したものである。この結果から、800 kJ/m² 以上の照射でリン酸化が起こることが示されたので、ある程度の高線量の照射がヒストンのリン酸化および突然変異の誘導に必要であると考えられる。

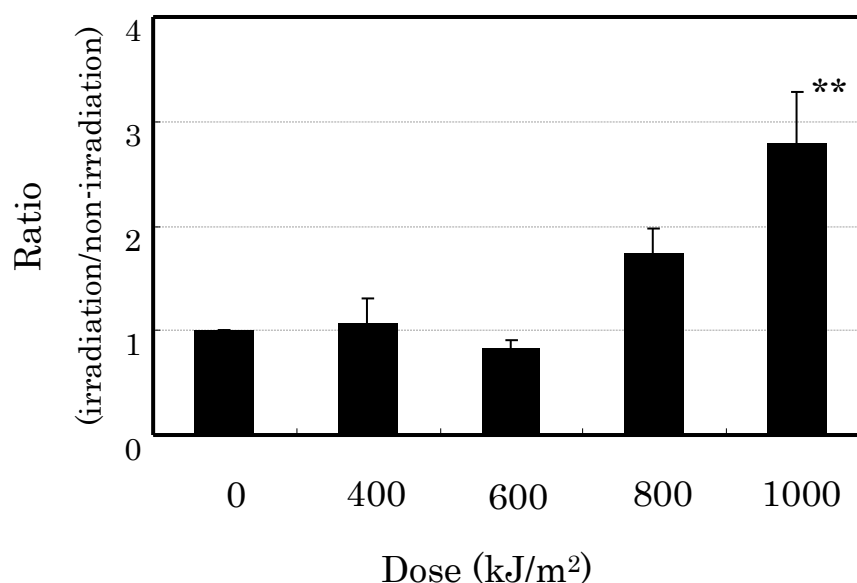


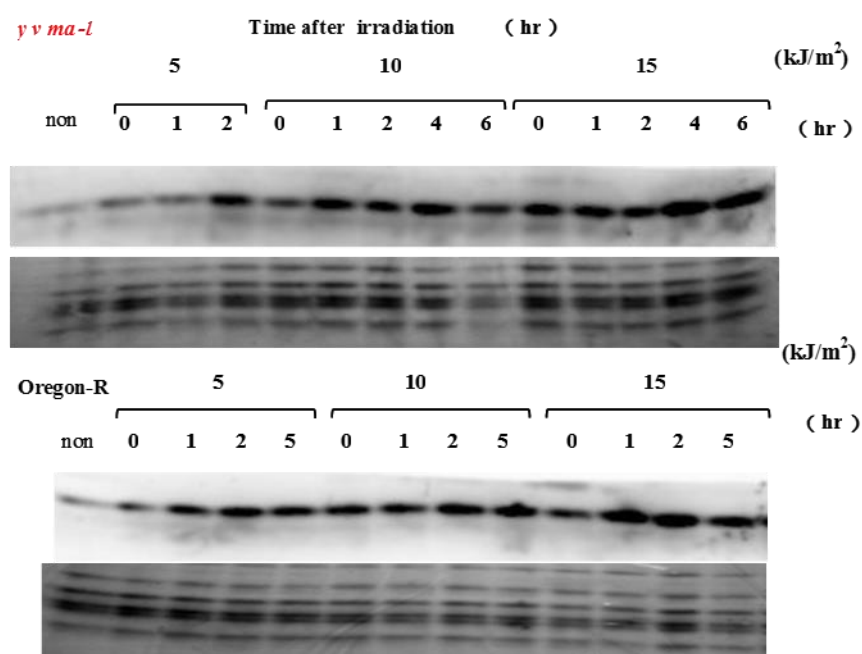
Fig. 3-12 UVA dose-dependent induction of γ -H2AvD in *y v ma-l*

*P < 0.05, **P < 0.01; the significance relative to data obtained from non-irradiated samples was evaluated using the Tukey test.

4. 3. 3. UVB 照射により誘発される γ -H2AvD

Fig. 3-13 には、310 nm の UVB 光を照射したときのウェスタンブロッティングの 2 回の実験結果を示した。Fig. 3-14 はこの 2 回実験結果を定量化、平均値を示したグラフである。UVA 照射と異なり、 γ -H2AvD は野生株、*ma-l* 株においてほぼ同レベルの強度で検出された。また、 γ -H2AvD のレベルは、線量および時間依存的に増加する傾向を示した。UVB 照射後の γ -H2AvD 量の増加の時間依存性を考えると、UVB の場合は CPD 切除などの UVB 誘発損傷の修復過程あるいは複製の過程に応じて二本鎖切断が生じている可能性があることが示唆される。

Exp. 1



Exp. 2

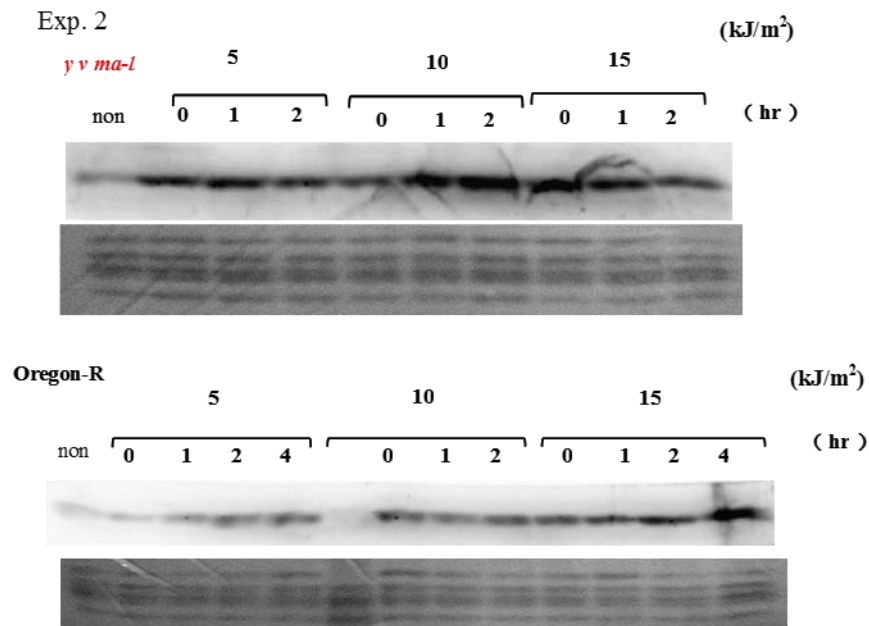


Fig. 3-13 UVB induced γ -H2AvD in *y v ma-l* and wild-type *Drosophila*

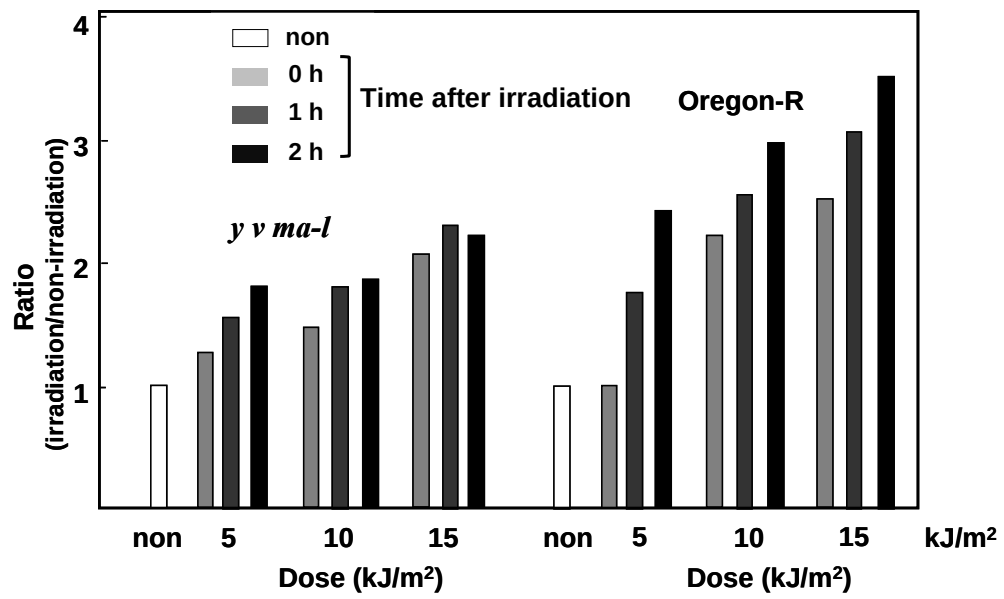


Fig. 3-14 UVB induced γ -H2AvD in *y v ma-l* and wild-type *Drosophila*

4. 考察

太陽光には様々な波長の光が含まれている。このうち生物に対して傷害作用を有する成分が紫外線であり、その生物作用について多くの研究が行なわれている。

地表に到達する紫外線のうち約 90%を占める UVA は短波長紫外線に比べ透過力が強く、その光は皮膚の表皮、真皮を透過し、皮下組織にまで達するため、生物学的効果が大きいと考えられる。したがって UVA の生物影響を研究することは重要である。UVA の発がん性や変異原性はよく知られているが^{2, 63, 64}、遺伝毒性効果に関与する分子メカニズムはまだ未解明な部分が多く残されている。

当研究室では、ラットやマウスに代わる短期 *in vivo* 実験動物モデルとして、ショウジョウバエを用い、紫外線の遺伝毒性について研究してきた。ショウジョウバエの幼虫は体が半透明であり、体内まで光が透過すると考えられるので、紫外線のような光の変異原性を検出するのに有用である。これまでに、ブラックライトを用いた UVA の照射や、分光単色光による 320-340 nm の UVA 領域の光によって、ショウジョウバエに体細胞突然変異が誘発されることを明らかにしている²²⁻²⁶。しかしながら、それより長波長の UVA 領域の光によって突然変異が誘発されるかどうかは明らかになっていない。また、UVA 領域の単色光による体細胞突然変異の作用スペクトルの報告は当研究室のショウジョウバエの結果を含めて僅かである。本研究では、UVA とくに長い波長側の光による変異がどのような傷害によって誘発されているのか、ショウジョウバエを用いて明らかにすることを試みた。

これまで、UVA によって誘導されるさまざまな DNA 損傷が報告されているが、主に酸化的損傷を誘発すると考えられている。DNA 酸化傷害の主な生成物は 8-oxodG であり、UVA 照射によっても培養細胞やマウス皮膚に 8-oxodG 量が増加したという報告がなされている^{8,9}。我々が行ったショウジョウバエ幼虫に 364 nm の UVA レーザー光を照射した実験においても、8-oxodG は線量依存的に増加したが、野生株と酸化傷害感受性株の間において差異は認められなかった⁶⁵。一方、レーザー光以外の UVA 光源では、変異誘導が観察されるにもかかわらず 8-oxodG 量に変化が見られない^{66, 67}ことから、ショウジョウバエについては 8-oxodG の変異誘導における寄与は低いと考えられる。

多くの報告において、ラジカルや活性酸素に対する尿酸の捕捉効果が実証さ

れている^{29,33,35,36}ので、尿酸欠損ショウジョウバエ株は、酸化ストレスの効果を調査するための良いモデル生物であると考えられる。尿酸欠損の表現型を持つ *ma-l* 株を用いたこれまでの研究結果から、尿酸はヒトと同様にショウジョウバエにおいても重要な抗酸化物質として働いていることが示唆されている^{34,40,50}。そこで本研究では、*ma-l* 株および *ma-l; mwh* 株を用いて、酸化的損傷が UVA 光照射後、ショウジョウバエの幼虫に誘導される突然変異に関与しているかどうかを検討した。

その結果、野生型では最高線量でも観察されなかった突然変異が *ma-l* 欠損型では検出された (Table 3-1)。また、野生株と比べて、*ma-l* 株における ROS の産生が大幅に高いことが確認された (Fig. 3-2)。このことは、365 nm の LED-UVA が尿酸によって抑制されるような損傷を介して、ショウジョウバエに変異を誘導していることを示唆している。当研究室におけるたばこ副流煙の研究において、6 時間の副流煙曝露によって、野生株では尿酸が、*ma-l* 株ではヒポキサンチンの増加が観察された³⁴。ヒポキサンチンは、Fig. 1-9 に示したように ATP の分解産物であり、XDH によってキサンチン、尿酸に代謝される物質である。したがって XDH の活性がない *ma-l* 株では、核酸分解が進むとヒポキサンチンが蓄積することになる。また、Hayashi ら³⁸や Kohen ら³⁹の研究では UVA の照射で皮膚中の尿酸が増加するという結果が得られている。これらの結果は酸化ストレスに対する反応として、尿酸合成経路が活性化している可能性を示唆している。本研究では、照射直後の幼虫において野生株における尿酸の増加や前駆体であるヒポキサンチンの増加は観察されなかった (Table 3-2)。またデータは示していないが、照射後 4 時間まで観察してもこれらの物質の含有量に変化はなかった。これらの結果は、2 時間程度の UVA 照射によってはショウジョウバエ幼虫に尿酸合成を促進する反応は誘導されなかったものと考えられる。

当研究室のこれまでの研究で、330-360 nm の波長では、除去修復欠損株 (*mei-9*) と比べて、複製後修復欠損株 (*mei-41*) における変異原性が高いことを観察している^{22,25}。365 nm の LED-UVA を用いた本研究においても、照射に由来する突然変異頻度は、*mei-9* 株よりも *mei-41* 株の方が高いことを示した (Fig. 3-4)。*mei-41* 株は、X 線照射に対しても感受性が高いことがわかっており⁶⁸、X 線傷害作用の一つとして ROS の発生を介して DNA 鎖切断を引き起こすことがわかっている

ことから、UVA も同じような反応を誘起している可能性が推測された。最近の研究によって、*mei-41* 遺伝子は DNA 二本鎖切断 (DSB) の修復に関与するヒト ATM/ATR 遺伝子オルソログとして同定された^{54,55}。すなわち ATR は DNA 損傷チェックポイント機構や DNA 修復を制御する重要なリン酸化酵素であり、DNA に傷害が起こった場合、塩基修飾、DNA 一本鎖切断、二本鎖切断を含むさまざまな DNA 損傷に応答する。とくに、ショウジョウバエでは、DSB に対して、修復の過程に重要な働きをすると報告されている⁶⁸。

さらに、ショウジョウバエの翅毛スポットテストで検出される体細胞突然変異はそのほとんどが染色体組換えによって生じると考えられている^{69,70}。これらのことから、365 nm の UVA 照射は主に ATR-関連経路によって修復される突然変異誘発性損傷、すなわち DSB を誘発して、変異を誘導している可能性が考えられる。そこで UVA 照射により DSB が起きているかどうか検討した。

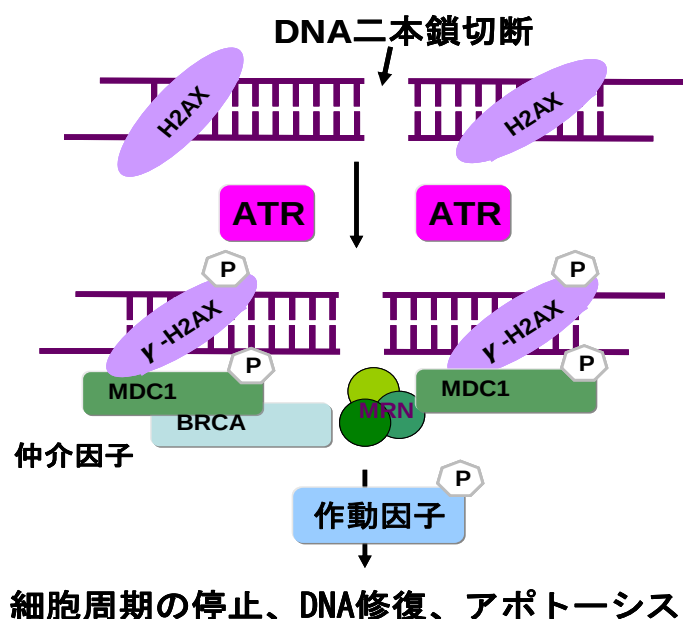


Fig. 4-1 γ-H2AX と DNA 損傷応答

Fig. 4-1 で概略を示すように、ATR はタンパク質リン酸化酵素であり、DSB により活性化されて、シグナルを伝達する仲介因子、及び作動因子などをリン酸化する⁷¹。作動因子はリン酸化されることで活性化され、細胞周期の停止、DNA 修復、アポトーシスを誘導する。ATR が DSB に対応してリン酸化するタンパク

質はたくさんあるが、ヒストン H2A バリエーションである H2AX もその一つであり、切断付近で広範囲に起こるヒストン H2AX のリン酸化は DSB の指標とされている^{43,72}。ヒストン H2AX は各種生物でよく保存されており、ショウジョウバエにおいてもそのホモログである H2AvD は、ほ乳類などと同じように、DSB に応じて、リン酸化されると報告されている^{44,73}。そこで、UVA により DSB が誘起されているかどうか調べるために、UVA 照射後の幼虫におけるヒストンリン酸化の状態を調べた。

先に述べたように、ヒストンリン酸化は ATR の存在が必要である。このことは、ATR オルソログである *mei-41* 株ではリン酸化 H2AvD (γ -H2AvD) の増加が観察されなかったことから、ショウジョウバエにおいても確認された (Fig. 3-8)。*ma-l* 株における γ -H2AvD の形成量を調べたところ、 γ -H2AvD のレベルは、UVA の照射終了直後から明らかに *ma-l* 株で増加した (Fig. 3-10)。一方 UVB 310nm 照射では、照射終了後の経過時間依存的に増加した (Fig. 3-14)。

以上の結果から、UVA で誘導される DSB の機構を Fig. 4-2 A で示したように考えた。UVA の照射は、産生された ROS が一本鎖切断を誘発するが、一定量以上の高線量の照射では、大量にできた一本鎖切断が近隣で起こってあたかも二本鎖切断が誘導されたような状態になると考えられる。照射終了後には ROS が発生しないので、鎖切断は起きない。したがって、照射終了直後が最も二本鎖切断部位が多くなると推測される。このモデルは、Fig. 3-12 で得られた、ある程度の線量が二本鎖切断の誘発には必要であることを示す結果を説明でき、Rapp らがヒト培養細胞で示した UVA による DNA 傷害の機構と一致するものである^{14,15}。

Rapp らは、UVA (> 340 nm、ピーク波長 365 nm、最高線量 600 kJ/m²) を、ヒト角化上皮細胞 (HaCaT 細胞) に照射し、クラスタ化された一本鎖切断を通して線量 (または時間) 依存的に DSB が誘導されることを示している。彼らは DSB を γ -H2AX の核内フォーカス形成を免疫組織化学的標識化によって検出し、中性条件下のコメットアッセイによって DNA が二本鎖の断片になっていることを観察している。また、染色体上の損傷部位を可視化することによって損傷部位がクラスタを形成していることを確認している^{14,15}。一方、Rizzo らは、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて、UVA (335-440 nm、ピーク波長 375nm、100-500 kJ/m²)

の照射が DSB を形成しないことを示している¹⁶。中性条件下のコメットアッセイ (200, 300, 500 kJ/m²) および γ -H2AX 核内フォーカスの形成 (100, 200, 400 kJ/m²) を観察すると同時に、DSB 修復経路が活性化されるかどうかを調べて、500 kJ/m² の線量まで DSB が検出されないとしている。彼らは、 γ -H2AX の検出を、Rapp らや本研究で用いた線量 (600 kJ/m²) まで実験を行っていないことや、DSB 修復経路で観察しているタンパク質が相同組換え修復の経路に関わるタンパク質だけであることなどから、UVA で DSB が起こらないと結論付けるには不十分な結果であると考ええる。光源とした UVA ランプの発光スペクトルの違いにも結果の不一致の要因がある可能性もある。紫外線の波長が長くなるほど生物影響は小さくなる。Rizzo らは、375 nm をピーク波長として使用しており、Rapp らや本研究で用いた波長より長波長の UVA を用いて実験を行っていることから、同じ線量でも傷害は小さくなると考えられる。ただし同じ波長で最終的には同じ線量照射する場合でも、低線量で長時間と、高線量で短時間の照射では、傷害の種類が違ってくる可能性については今後検討の余地がある。

本研究では、一波長の UVA (波長 365 nm、400~1000 kJ/m²) を用い、ショウジョウバエ幼虫に照射して個体レベルでの DSB の形成と、そのとき誘発される体細胞突然変異誘発頻度を同時に調べ、DSB と変異誘導の関係を調べている。これまで個体レベルで DSB が起こっているかどうかを検討した研究の報告はなく、本研究結果は培養細胞で観察された UVA による DSB が in vivo でも起こっている可能性を示す結果である。

UVA によってどのような ROS が生成するか同定した報告は無いが、当研究室で行った他の実験において、UVA によってショウジョウバエ体内で superoxide や peroxynitrite が発生している可能性を示す結果を得ている。異なる種類の活性酸素は異なる DNA 損傷を誘導する可能性が考えられる。UVA 照射によって観察される 8-oxodG や DNA 一本鎖切断などの DNA 傷害から、一重項酸素やヒドロキシルラジカル関与すると考えられる⁷⁴が、8-oxodG の加が観察されなかったショウジョウバエにおいても、同じ ROS が関与するかどうかは今後の検討課題である。

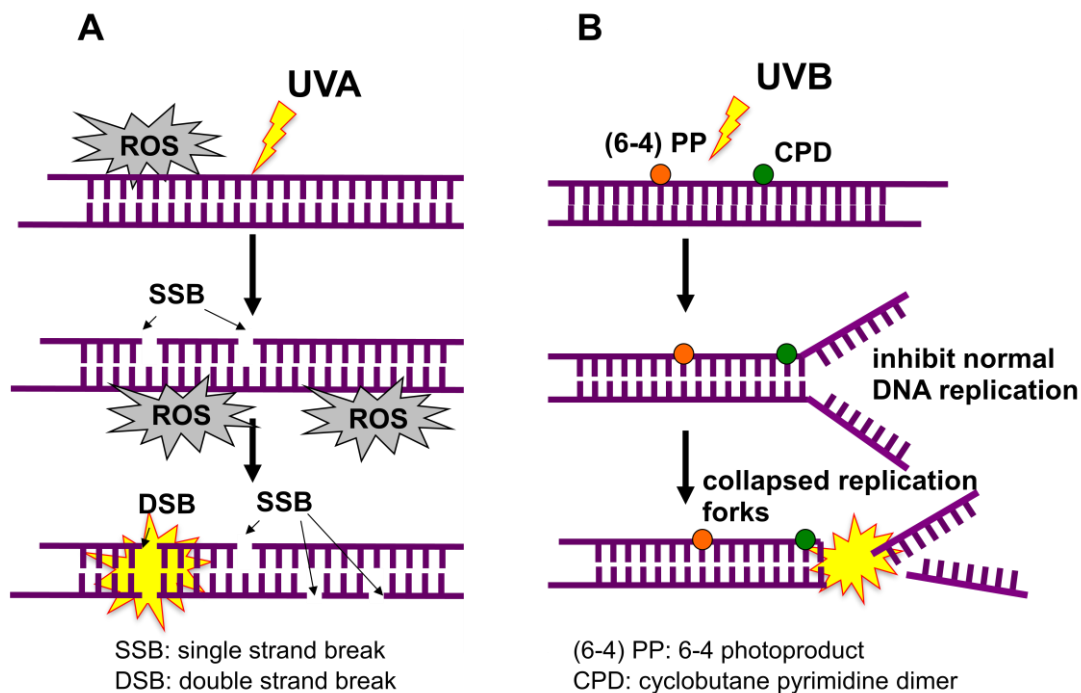


Fig. 4-2 UVA (A)、UVB (B) による DNA 二本鎖切断の推定機構

UVB によっても照射後時間を置くことによってヒストンリン酸化が観察されたことから、UVB では照射後の反応によって二本鎖切断が誘導されていると考えられる。UVB 照射では DNA 上に生成した CPD と 6-4 光産物などの塩基修飾が原因となっていると考えられ、Fig. 4-2 B で示したように、これら塩基の傷害が除去されない場合は、DNA 複製フォークはそれらを通過することができず、複製を停止し DSB が形成する可能性があると考えられる。照射直後より時間を置いた方が γ -H2AvD のレベルが増加しているのは、残っている損傷部位で複製フォークの停止が随時起こるため、二本鎖切断が増加するものと推測される。

Limoli らは XPV 細胞 (CPD 傷害があると乗り越えて複製できない細胞) に紫外線照射すると、照射後時間経過とともに DSB が誘導されることを、DSB 修復に必要なタンパク質および γ -H2AX の蓄積を観察することによって明らかにしている⁷⁵。彼らは UVC を用いて CPD を形成させているが、同じく主な傷害として CPD を生じる UVB において照射後の時間経過とともに、 γ -H2AvD の増加が観察された本研究の結果と一致するものである。ショウジョウバエ個体において *ma-l* 株の γ -H2AvD の発現が野生株に比べて高くないことから、酸化傷害の

寄与の可能性は低いと考える。しかしながら、UVB 照射によっても ROS がマウス皮膚⁷⁶や細胞内⁷⁷に発生することが報告されていることから、UVB では CPD による傷害と活性酸素種による傷害が並行して起こっている可能性は否定できない。紫外線以外の酸化ストレスを与えた時にどのような反応が見られるか、また、ショウジョウバエ体内で UVB 照射により ROS が発生しているかどうか調べる必要がある。

本研究の結果、酸化ストレスに感受性のショウジョウバエ（尿酸欠損株）で、高線量の LED-UVA への曝露後に γ -H2AvD のレベルが顕著に増加していること、同ショウジョウバエ株において、UVA 照射により活性酸素種の発生が増加したことから、ショウジョウバエにおいて、UVA によって誘導される突然変異は、酸化ストレスを介して誘発される DNA 一本鎖切断が蓄積して、DNA 二本鎖切断を形成し、その結果、染色体組換えを引き起こす可能性が示された。X 線に比べて UVA はエネルギーレベルが低いことから、SSB の蓄積により DSB が引き起されたと推測したが、UVA 照射により直接 DSB が誘起されている可能性もあるので、パルス電気泳動などを行い、DSB が観察されるか試みる予定である。また、SSB については pH 条件を変えたコメットアッセイなどを行うことを検討している。また、尿酸欠損を表現型とする *ma-l* 株において、DSB の形成が顕著であったことから、その ROS は尿酸によって防御されることが示唆されたが、*ma-l* 株ではモリブデンを補因子とする他の酵素の関与も否定できないので、XDH 遺伝子に欠損を持つ尿酸欠損株を用いて実験を行う必要があると考えている。

Han らは皮膚がん患者と健常者を対照として、DSB 修復に関わる遺伝子の polymorphism について疫学的な調査を行い、とくに基底細胞がんについて DSB の修復経路が重要な役割を果たしていることを示している⁷⁸。これらのことから、UVA による DSB を介した体細胞突然変異の可能性を示した本研究結果は、皮膚がんの要因を解明する一助となると考える。

オゾン層の破壊の問題が発生している現状において、紫外線量の増加による皮膚がん患者の増加が問題になっており、紫外線防御対策が子供に対しても行われるようになった。したがって、今後さらに紫外線の生体に及ぼす作用が大きな社会問題に発展する可能性がある。一般的な生活スタイルにおける皮膚へ

の影響度を考えると、紫外線の中ではもっともエネルギーの弱い UVA が、大きな悪影響を与えている可能性がある。本研究は、UVA の傷害を正しく認識して、変異や発がんのメカニズムを解明することによって、紫外線傷害の防御法の確立に応用できると考える。

5. 参考文献

1. IARC, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. List of IARC Evaluations, WHO Press, 100 (2012), Lyon.
2. F. R. de Grujil, Photocarcinogenesis: UVA vs UVB, *Methods Enzymol.*, 2000, **319**, 359–366.
3. G.P. Pfeifer, Y. H. You and A. Besaratinia, Mutations induced by ultraviolet light, *Mutation. Res.*, 2005, **751**, 19-31.
4. J. Yamamoto and K. Hitomi, Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing the Dewar valence isomer of the (6–4) photoproduct and their use in (6–4) photolyase studies, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 4406-4415.
5. J. Cadet, T. Douki and J.L. Ravanat, Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation, *Photochem. Photobiol.*, 2015, **91**, 140-155.
6. A. Besaratinia, S.I. Kim, S.E. Bates and G.P. Pfeifer, Riboflavin activated by ultraviolet A1 irradiation induces oxidative DNA damage-mediated mutations inhibited by vitamin C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104**, 5953-5958.
7. J. Cadet, T. Douki, J.L. Ravanat and P. Di Mascio, Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, **8**, 903-911.
8. E. Kvam and R.M. Tyrrell, Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation, *Carcinogenesis*, 1997, **18**, 2379-2384.
9. J. Cadet, T. Douki, S. Frelon, S. Sauvaigo, J.P. Pouget and J.L. Ravanat, Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **33**, 441-449.
10. P.J. Rochette, J.P. Therrien, R. Drouin, D. Perdiz, N. Bastien, E.A. Drobetsky and E. Sage, UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 2786-2794.
11. S. Mouret, C. Philippe, J. Gracia-Chantegrei, A. Banyasz, S. Karpati, D. Markovitsi and T. Douki, UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers in DNA: a direct

- photochemical mechanism? *Org. Biomol Chem.*, 2010, **8**, 1760-1711.
12. S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet and T. Douki, Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **102**, 13765-13770.
 13. H. Ikehata, K. Kawai, J. Komura, K. Sakatsume, L. Wang, M. Imai, S. Higashi, O. Nikaido, K. Yamamoto, K. Ikeda, M. Watanabe, H. Kasai and T. Ono, UVA1 genotoxicity is mediated not by oxidative damage but by cyclobutane pyrimidine dimers in normal mouse skin, *J. Invest. Dermatol.*, 2008, **128**, 2289-2296.
 14. A. Rapp and K.O. Greulich, After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available, *J. Cell Sci.*, 2004, **117**, 4935-4945.
 15. R. Greinert, B. Volkmer, S. Henning, E.W. Breitbart, K.O. Greulich, M.C. Cardoso and A. Rapp, UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages, *Nucleic Acids Res.*, 2012, **40**, 10263-10273.
 16. J.L. Rizzo, J. Dunn, A. Rees and T.M. Runger, No formation of DNA double-strand breaks and no activation of recombination repair with UVA, *J. Invest. Dermatol.*, 2011, **131**, 1139-1148.
 17. A. Sancar, Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50 th Anniversary, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 32153-32157
 18. 松影昭夫, 花岡文雄, 「DNAの複製と修復」, 実験医学, 羊土社 (2004)
 19. 村松正實, 木南 凌, 笹月健彦, 辻 省次, 「ヒトの分子遺伝学」第四版, メディカルサイエンスインターナショナル社 (2011)
 20. T. Todo, H. Ryo, A. Borden, C. Lawrence, K. Sakaguchi, H. Hirata and T. Nomura, Non-mutagenic repair of (6-4) photoproducts by (6-4) photolyase purified from *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.*, 1997, **385**, 83-93
 21. S. Kim, and T. Todo, Purification and characterization of *Drosophila melanogaster* photolyase, *Mutation Res.*, 1996, **363**, 97-104
 22. 豊島めぐみ 修士論文 太陽光紫外線による突然変異誘発機構 (2001)

23. 滝波昇悟 修士論文 近紫外光照射によるショウジョウバエ体細胞突然変異誘発頻度とDNA中の光生成物形成量 (2007)
24. T. Negishi, C. Nagaoka, H. Hayatsu, K. Suzuki, T. Hara, M. Kubota, M. Watanabe and K. Hieda, Somatic cell mutation induced by UVA and monochromatic UV radiation in repair-proficient and -deficient *Drosophila melanogaster*, *Photochem. Photobiol.*, 2001, **73**, 493-498.
25. M. Toyoshima, S. Takinami, K. Hieda, Y. Furusawa and T. Negishi, The involvement of cell cycle checkpoint-mutations in the mutagenesis induced in *Drosophila* by a longer wavelength light band of solar UV, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, **1**, 178-183.
26. S. Takinamai, M. Mochizuki, H. Hayatsu, O. Nikaido, M. Kubota, M. Watanabe, M. Hieda, K. Hieda and T. Negishi, Somatic cell mutation and photoproduct formation in *Drosophila* induced by monochromatic UV-lights contained in the sunlight, *Environmental Toxicology*, 2000, **15**, 496-499.
27. T. Fujita, Formation and removal of reactive oxygen species, lipid peroxides and free radicals, and their biological effect, *Yakugaku Zasshi*, 2002, **122**, 203-218.
28. U. Machun and A. Bendich, Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients, *FASEB J.* 1987, **1**, 441-445
29. B.N. Ames, R. Cathcart, E. Schwiers and P. Hochstein, Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1981, **78**, 6858-6862.
30. E. Tsahar, Z. Arad, I. Izhaki and C. G. Guglielmo, The relationship between uric acid and its oxidative product allantoin : a potential indicator for the evaluation of oxidative stress in birds, *Comp. Physiol.*, 2006, **B.176**, 653-661.
31. D. Voet, J. G. Voet and C. W. Pratt 著 田宮信雄, 村松正実, 八木達彦, 遠藤斗志也訳, 「ヴォート基礎生化学第一版」 東京化学同人 (2000)
32. 浜野国勝 4. 体の構造と生理, 4-6. 昆虫の排泄: 78-80, 「昆虫生物学」小原嘉明編 朝倉書店 (1995)

33. A.J. Hilliker, B. Duyf, D. Evans and P.P. Phillips, Urate-null rosy mutants of *Drosophila melanogaster* are hypersensitive to oxygen stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**, 4343-4347.
34. M. Fujiwara, Y. Hamatake, S. Arimoto, K. Okamoto, T. Suzuki and T. Negishi, Exposure to cigarette smoke increases urate level and decreases glutathione level in larval *Drosophila melanogaster*, *Genes and Environment*, 2011, **33**, 89-95.
35. B.F. Becker, Towards the physiological function of uric acid, *Free Radic. Biol. Med.*, 1993, **14**, 615-631.
36. G.S. Scott and D.C. Hooper, The role of uric acid in protection against peroxynitrite-mediated pathology, *Med. Hypotheses*, 2001, **56**, 95-100.
37. N. Kuzkaya, N. Weissmann, D. G. Harrison and S. Dikalov, Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase, *Biochem. Pharm.*, 2005, **70**, 343–354.
38. N. Hayashi, K. Togawa, M. Yanagisawa, J. Hosogi, D. Mimura and Y. Yamamoto, Effect of sunlight exposure and aging on skin surface lipids and urate, *Exp. Dermatol.*, 2003, **12**, 13–17.
39. R. Kohen and I. Gati, Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress, *Toxicology*, 2000, **148**, 149–157.
40. Y. Hamatake, A. Morita, Y. Yuma, K. Okamoto, S. Arimoto, T. Suzuki, H. Kasai, K. Kawai and T. Negishi, Hypersensitivity of a urate-null strain of *Drosophila melanogaster* to the toxic effects of environmental cigarette smoke, *Genes Environ.*, 2009, **31**, 43-46.
41. R. Arakawa, M. Terao, H. Hayashi, H. Kasai and T. Negishi, Evaluation of oxidative damage induced by natural sunlight in *Drosophila*, *Genes Environ.*, 2006, **28**, 153–159.
42. J.M. Humphreys, A.J. Hilliker and J.P. Phillips, Paraquat selection identifies X-linked oxygen defense genes in *Drosophila melanogaster*, *Genome*, 1993, **36**, 162-165.

43. A. Kinner, W. Wu, C. Staudt and G. Iliakis, γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin, *Nucleic Acid Res.*, 2008, **36**, 5678-5694.
44. J.P. Madigan, H.L. Chotkowski and R.L. Glaser, DNA double-strand break-induced phosphorylation of *Drosophila* histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis, *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**, 3698–3705.
45. 根岸友恵, 第5章ショウジョウバエを用いた検出法, 48-75, 「化学と生物 実験ライン 3 変異原物質試験法」, 早津彦哉編 廣川書店 (1990)
46. D.L. Lindsley and G.G. Zimm, *The genome of Drosophila melanogaster*, San Diego, Academic Press (1992)
47. R.C. Wahl, C.K. Warner, V. Finnerty and K.V. Rajagopalan, *Drosophila melanogaster ma-l* mutants are defective in the sulfuration of desulfo Mo hydroxylases, *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 3958-3962.
48. Fly base home page; <http://flybase.org/reports/FBgn0002641>. html
49. J.M. Humphreys, A.J. Hilliker and J.P. Phillips, Paraquat selection identifies X-linked oxygen defense genes in *Drosophila melanogaster*, *Genome*, 1993, **36**, 162-165.
50. 内山友世, 卒業論文, 尿酸欠損が体細胞突然変異に及ぼす影響 (2011)
51. J.B. Boyd, M.D. Golino and R.B. Setlow, The *mei-9^a* mutant of *Drosophila melanogaster* increases mutagen sensitivity and decreases excision repair, *Genetics*, 1976, **84**, 527–544.
52. J.J. Sekelsky, K.S. McKim, G.M. Chin and R.S. Hawley, The *Drosophila* meiotic recombination gene *mei-9* encodes a homologue of the yeast excision repair protein Rad1, *Genetics*, 1995, **141**, 619-627.
53. J.B. Boyd and R.B. Setlow, Characterization of postreplication repair in mutagen-sensitive strains of *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, 1976, **84**, 507–526.

54. K. Hari, A. Santerre, J. Sekelsky, K. McKim, J. Boyd and R. Hawley. The *mei-41* gene of *D. melanogaster* is a structural and functional homolog of the human *ataxia telangiectasia* gene, *Cell*, 1995, **82**, 815–821.
55. J.J. Sekelsky, M.H. Brodsky and K.C. Burtis, DNA repair in *Drosophila*: Insights from the *Drosophila* genome sequence, *J. Cell Biol.*, 2000, **150**, F31-F36.
56. U. Graf, F.E. Würgler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall and P. G. Kale, Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.*, 1984, **6**, 153-188.
57. M.A. Kastenbaum and K.O. Bowman, Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutation. Res.*, 1970, **9**, 527–549.
58. H. Frei and F.E. Würgler, Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila melanogaster* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result, *Mutation. Res.*, 1988, **203**, 297-308.
59. T. Suzuki and H. Ohshima, Nicotine-modulated formation of spiroiminodihydroantoin nucleoside via 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine in 2-deoxyguanosine-hypochlorous acid reaction, *FEBS Lett.* 2002, **516**, 67-70.
60. A.W. Thorne, P.D. Cary and C. Crane-Robinson, Extraction and separation of core histones and non-histone chromosomal proteins, in *Chromatin – A Practical Approach*, ed. H. Gould, Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 35-57 (1998)
61. Y. Ibuki, T. Toyooka, J. Shirahata, T. Ohura and R. Goto, Water soluble fraction of solar simulated light-exposed crude oil generates phosphorylation of histone H2AX in human skin cells under UVA exposure, *Environ. Mol. Mutagen.*, 2007, **48**, 430-439.
62. J.P. Robinson, W.O. Carter, and P.K. Narayanan, Oxidative product formation analysis by flow cytometry, *Methods Cell Biol.*, 1994, **41**, 437–447.
63. A.J. Ridley, J.R. Whiteside, T.J. McMilan and S.L. Allinson, Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2009, **85**, 177-195.

64. E. Sage, P.M. Girard and S. Francesconi, Unravelling UVA-induced mutagenesis, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, **11**, 74-80.
65. T. Negishi, K. Kawai, R. Arakawa, S. Higashi, T. Nakamura, M. Watanabe, H. Kasai and K. Fujikawa, Increased levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in *Drosophila* larval DNA after irradiation with 364 nm-laser light but not with X-rays, *Photochem. Photobiol.*, 2007, **83**, 658-663.
66. X. Fang, N. Ide, S. Higashi, Y. Kamei, T. Toyooka, Y. Ibuki, K. Kwai, H. Kasai, K. Okamoto, S. Arimoto, T. Negishi. Somatic cell mutations caused by 365-nm LED-UVA due to DNA double-strand breaks through oxidative damage. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2014, **9**, 1338-1346.
67. 根岸友恵、近紫外光 (UVA) の生体影響 - ショウジョウバエを用いた研究 -, *日本レーザー治療学会誌*, 2010, **9**, 29-34.
68. J.R. LaRocque, B. Jaklevic, T.T. Su and J. Sekelsky, *Drosophila* ATR in double-strand break repair, *Genetics*, 2007, **175**, 1023-1033.
69. E.W. Vogel, U. Graf, H. Frei and M.M.J. Nivard, The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens, *The Use of Short and Medium-term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation*, eds. by D.B. McGregor, J.M. Rice, S. Venitt, IARC Scientific Publications, No. 146, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 427-470 (1999)
70. M.A. Spanó, H. Frei, F.E. Würgler and U. Graf, Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test, *Mutagenesis*, 2001, **16**, 385-394.
71. S. Sengupta and C. Harris, p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, **6**, 44-55.
72. P.L. Olive and J.P. Banáth, Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2004, **58**, 331-335.

73. A. van Daal, E.M. White, M.A. Gorovsky and C.R. Elgin, *Drosophila* has a single copy of the gene encoding a highly conserved histone H2A variant of the H2A. F/Z type, *Nucleic Acids Res.*, 1988, **16**, 7487-7497.
74. J. Cadet, S. Mouret, J.L. Ravanat and T. Douki, Photoinduced damage to cellular DNA: Direct and photosensitized reactions. *Photochem. Photobiol.*, 2012, **88**, 1048–1065.
75. C.L. Limoli, E. Giedzinske, W.M. Bonner and J.E. Cleaver, UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma-H2AX formation, and Mre11 relocalization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 233-238.
76. J.Y. Lim, O.K. Kim, J. Lee, M.J. Lee, N. Kang and J.K. Wang, Protective effect of the standardized green tea seed extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice. *Nutr Res Pract.*, 2014, **4**, 398-403.
77. D. Kovacs, S. Raffa, E. Flori, N. Aspite, S. Briganti, G. Cardinali, M.R. Torrisi and M. Picardo, Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB, *J. Dermatol. Sci.*, 2009, **54**, 106-113.
78. J. Han, G.A. Colditz, L.D. Samson and D.J. Hunter, Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and skin cancer risk, *Cancer Res.*, 2004, **64**, 3009-3013.

謝辞

岡山大学旧薬品化学教室で学んだ期間は、私のこれまでの人生の中で、最も充実し物事に懸命に取り組み、有意義で興味深い期間でした。

本研究を行う機会を与えて下さり、研究について何も知らなかった私に 1 から指導して下さい下さった根岸友恵先生に心から感謝します。ショウジョウバエについての御指導ありがとうございました。一緒に学会に行ったり、岡崎へ実験に行ったことは忘れることができません。

セミナーでは質問をして下さり、研究をご指導下さった有元佐賀恵先生、岡本敬の介先生ならびに高橋栄造先生に感謝します。就実大学で尿酸測定について御指導下さった鈴木利典先生に感謝します。静岡県立大学でウェスタンブロッティングを教えて下さり、共同研究させていただいた豊岡達士先生、伊吹裕子先生、趙曉旭さんに感謝いたします。責任教授としてご指導いただき研究の場を提供下さった、黒崎勇二先生、森山芳則先生、檜垣和孝先生に感謝します。学位審査をして下さった、主査の上原 孝先生、副査の田中智之先生、須野 学先生に感謝します。

日本語や実験についてわからないことを教えて下さり、私を支えてくれた研究室の諸先輩方、友人、後輩に感謝します。最後に遠く離れた故郷から見守ってくれ、支えてくれた家族に心から感謝します。