

太陽紫外線、特に UVA による塩基配列特異的 DNA 損傷機構： 光発がんと光老化における役割

及川伸二、川西正祐（三重大学・医学部・衛生学講座）

1. はじめに

太陽紫外線の曝露がヒトに皮膚癌を起こすことは以前からよく知られている。近年のオゾン層の破壊による地表への紫外線量の増加が、健康に悪影響をもたらすと懸念されている。太陽紫外線のなかで地表に到達するのは、UVA と UVB である。UVB は DNA 分子に直接作用し、ピリミジンダイマーや DNA 付加体等を生成することにより、太陽紫外線発がんにおいて重要な役割を果たしている。一方、地表に多量に降り注ぐ UVA は、発がんを抑制すると考えられてきたが、近年 IARC の疫学調査や動物実験から、ヒトに対する UVA の発がん性は 2A（ヒトに対して発がんを示す可能性が高い）と評価されている (1)。UVA は DNA を直接損傷しにくいことから全く新しい DNA 損傷機構が予想される。太陽紫外線が皮膚の老化を進行させることも知られている。本研究では太陽紫外線、特に UVA に注目し、発がんおよび老化促進機構について報告する。

2. 実験方法

実験にはヒトがん原遺伝子 *c-Ha-ras-1* およびがん抑制遺伝子 *p53* や *p16* のホットスポットを含む約 100～400 塩基対の DNA 断片をサブクローニングにより多量に得た。これらの DNA 断片の 5' 末端を ^{32}P で標識し、一端のみが標識された単離 DNA 断片を調製した (2)。また、テロメア配列を含む DNA 断片 (5'-(TAGTAG)₄(TTAGGG)₄-3') を合成し、同様に ^{32}P で標識して実験に用いた (3)。Maxam-Gilbert 法を応用し、オートラジオグラムから DNA 損傷性とその塩基特異性を決定した (4)。また、ヒト線維芽細胞 WI-38 を用い、細胞内テロメア促進における UVA の役割を検討した。8-OH-dG の定量は、電気化学検出器付 HPLC を用いて行った (5)。

3. UVA による DNA 損傷機構と発がんにおける役割

UVA による発がんには、細胞内に多数存在する色素分子の光増感作用を介した DNA 損傷が関与していると考えられる。光増感剤として働く物質には、内因性

の物質の他、食物や医薬品等として摂取される外因性の物質がある。DNA 損傷のメカニズムには、光誘起電子移動反応を介する機構 (Type I) および活性酸素 (主に一重項酸素) 生成を介する機構 (Type II) が考えられる。これまで我々は、様々な光増感剤を用いた実験から、Type I では、連続した G (5'-GG-3' の下線の G) が特異的に損傷され、Type II の一重項酸素生成では全ての G が損傷されることを明らかにしてきた (図 1) (6)。

生体内物質のフラビン類やプテリン類、ポルフィリン類等は、UVA をよく吸収する分子である。ヒトの皮膚に含まれるリボフラビンやプテリン類等の光増感物質は、UVA (365nm) の照射量依存的に二本鎖 DNA 中の G が連続した配列 (5'-GG-3') の 5' 側の G を特異的に損傷する (7)。また、*E. coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg protein) を用いた実験結果から、5'-GG-3' の 5' 側の G に 8-OH-dG が生成することが認められた。従って、これらの光増感物質は、電子移動を介して DNA 塩基の中でもっとも酸化されやすい G と特異的に反応し、8-OH-dG やその他の酸化的損傷を生ずることが考えられる (Type I 反応)。我々の結果から、Type I 反応による塩基配列特異的な 8-OH-dG の生成は電子受容性の光増感分子に共通した機構であることが示された (8, 9)。二本鎖 DNA では、GG 配列の 5' 側の G が最も酸化されやすいことが HOMO (highest occupied molecular orbital) の理論計算からも支持されている (10)。また、実際に生体内においては、光増感分子は、GG と直接的に結合する必要はなく、離れていても GG 配列に特異的な DNA 損傷が起こりうると推定されている (11)。

ポルフィリン類 (PPs) の代謝異常では、組織に PPs が沈着し、皮膚が光に対して過敏になることが知られている。PPs の存在下で UVA を照射すると、活性酸素を介した Type II の反応で G が特異的に損傷され、8-OH-dG 量も増加した。この損傷は、重水 (D_2O) 中で増加したことから一重項酸素 (1O_2) の関与が確認された。

以上のように、UVA は生体内光増感分子を介して酸化的に DNA を損傷することが明らかになった。この光増感反応により生成した 8-OH-dG が皮膚癌に関与している可能性が示された。また、DNA の損傷パターンは光増感分子の化学的性質に依存する。紫外線による発がん機構が詳細に明らかになれば、皮膚癌の予防に大きく貢献するものと思われる。

4. UVA によるテロメア短縮促進機構の解明と老化促進

加齢とともに活性酸素、放射線や太陽紫外線などによる酸化ストレスが蓄積し、その結果、DNA や蛋白質が損傷され、老化が進行するとの仮説が提唱されている。最近、染色体の末端部に存在するテロメア繰り返し配列 (5'-TTAGGG-3')_n の短縮が老化のプログラムに関与するとの報告がなされた。テロメア繰り返し配列は、真核生物の染色体の末端に存在し、ヒトの線維芽細胞では約 10 kb も続き、染色体の安定性や構造維持に重要な役割を果たしている。細胞分裂の DNA 複製時に新生鎖 5'末端部分のテロメア DNA は一定の割合で短縮し、5 kb まで短縮されると線維芽細胞は分裂を停止しその後死に至る。このテロメア繰り返し配列の短縮が酸化ストレスにより通常の 4～5 倍促進されることが報告された (12)。我々は、環境因子によるテロメア短縮促進を介した老化促進機構の解明を行っている。

太陽紫外線が、発がんのみならず、皮膚の老化を進行させることが知られている。我々は生体内光増感物質 (リボフラビン等) の存在下、ヒト線維芽細胞 WI-38 に UVA を照射し、テロメア繰り返し配列領域の短縮促進を検討した。その結果、UVA 照射量に依存してテロメア長の指標である TRF (terminal restriction fragment) の短縮が認められた。また、同条件下において WI-38 に UVA を照射すると照射量に依存して有意に 8-OH-dG 量が増加した (表 1) (13, 14)。この酸化 DNA 損傷による TRF の短縮促進機構を解明するため、テロメア繰り返し配列を含む合成 DNA (5'-(TAGTAG)₄(TTAGGG)₄-3') を用いて DNA 損傷とその塩基配列特異性をピペリジン処理と 8-OH-dG 修復酵素 Fpg protein 処理を行って検討した。生体内光増感物質存在下、UVA 照射により、テロメア配列中の 5'-GGG-3' の中央の G に特異的に 8-OH-dG が生成することを認めた (図 2)。8-OH-dG を電気化学検出器付 HPLC (HPLC-ECD) で定量した結果、G の連続配列を含まない合成 DNA (5'-CGC (TGTGAG)₇CGC-3') に比べ、テロメア繰り返し配列を含む合成 DNA (5'-CGC (TTAGGG)₇CGC-3') において 8-OH-dG 生成量の著しい増加を認めた。この塩基配列特異的 DNA 損傷は、UVA により励起された光増感物質が 5'-GGG-3' 配列の 5' 側 G から電子を引き抜き、その後中央の G へ hole (+電荷) の移動が起こることにより、それらの部位に 8-OH-dG が生成するためと考えられる。以上の結果から酸化ストレスによりテロメア繰り返し配列 (5'-TTAGGG-3')_n 中の G の連続配列に特異的に酸化損傷が起こることが解明された。従って、UVA による GGG 配列特異的 DNA 損傷が、テロメア領域の短縮を促進し、老化の促進に重要な

役割を果たしていることが示唆された。

参考文献

- (1) IARC Working Group: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 55, Lyon, IARC, 1992.
- (2) Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat. Res.* 2001, 488:65-76.
- (3) Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett.* 1999, 453:365-368.
- (4) Oikawa S, Murakami K, Kawanishi S. Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis. *Oncogene.* 2003, 22:3530-3538.
- (5) Tada-Oikawa, S., Oikawa, S. and Kawanishi, S. Determination of DNA damage, peroxide generation, mitochondrial membrane potential, and caspase-3 activity during ultraviolet A-induced apoptosis. *Methods Enzymol.* 2000, 319:331-342.
- (6) Kawanishi S, Hiraku Y. Sequence-specific DNA damage induced by UVA radiation in the presence of endogenous and exogenous photosensitizers. *Curr. Probl. Dermatol.* 2001, 29:74-82.
- (7) Ito K, Kawanishi S. Site-specific DNA damage induced by UVA radiation in the presence of endogenous photosensitizer. *Biol. Chem.* 1997, 378:1307-1312.
- (8) Hirakawa K, Yoshida M, Oikawa S, Kawanishi S. Base oxidation at 5' site of GG sequence in double-stranded DNA induced by UVA in the presence of xanthone analogues: relationship between the DNA-damaging abilities of photosensitizers and their HOMO energies. *Photochem. Photobiol.* 2003, 77:349-355.
- (9) Hiraku Y, Kawanishi S. Distinct mechanisms of guanine-specific DNA photodamage induced by nalidixic acid and fluoroquinolone antibacterials. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000, 382:211-218.

- (10) Sugiyama H, Saito I: Theoretical studies of GG-specific photocleavage of DNA via electron transfer: significant lowering of ionization potential and 5'-localization of HOMO of stacked GG bases in B-form DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118:7063-7068.
- (11) Nunez ME, Hall DB, Barton JK: Long-range oxidative to DNA: effects of distance and sequence. *Chem. Biol.* 1999, 6:85-97.
- (12) von Zglinicki, T., R. Pilger, and N. Sitte. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 2000, 28:64-74.
- (13) Oikawa S, Tada-Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening. *Biochemistry.* 2001, 40:4763-4768.
- (14) Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004, 1019:278-284.

表 1. UVAによる細胞中のテロメア領域短縮促進と8-OH-dGの生成.

J/cm ²	TRF (kb)	8-oxodG/10 ⁵ dG $\pm$ S.E.
0	9.48	0.44 $\pm$ 0.07
2	8.53	0.72 $\pm$ 0.03 [#]
5	7.98	0.98 $\pm$ 0.16 ^{##}

WI-38 fibroblasts (2.0×10^6 cells) were irradiated with indicated dose of UVA light (365 nm). After the irradiation, the cells were lysed, and DNA was extracted and subjected to enzyme digestion and analyzed by a Southern blot and an HPLC-ECD. Results are expressed as means $\pm$ SE of values obtained from 3-5 independent experiments. [#]; $P < 0.01$, ^{##}; $P < 0.05$ compared with non-irradiation; t-test.

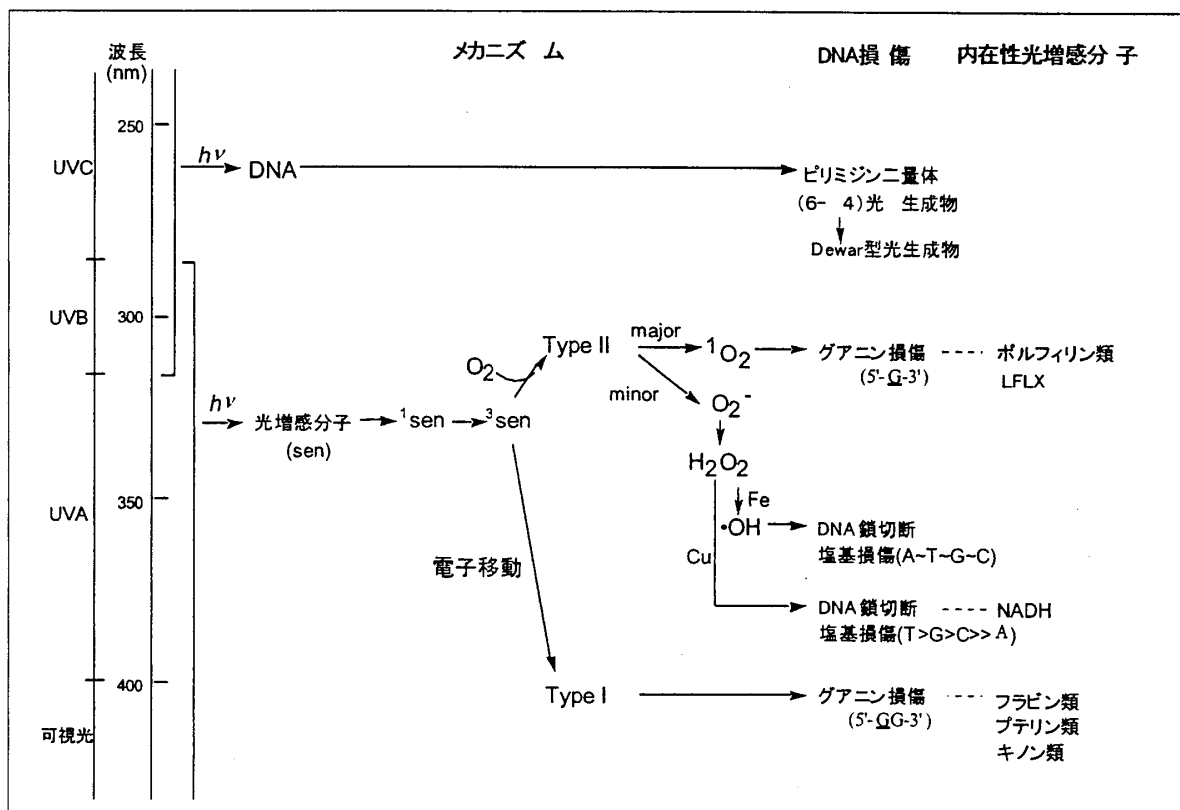


図1 太陽紫外線によるDNA損傷のメカニズム

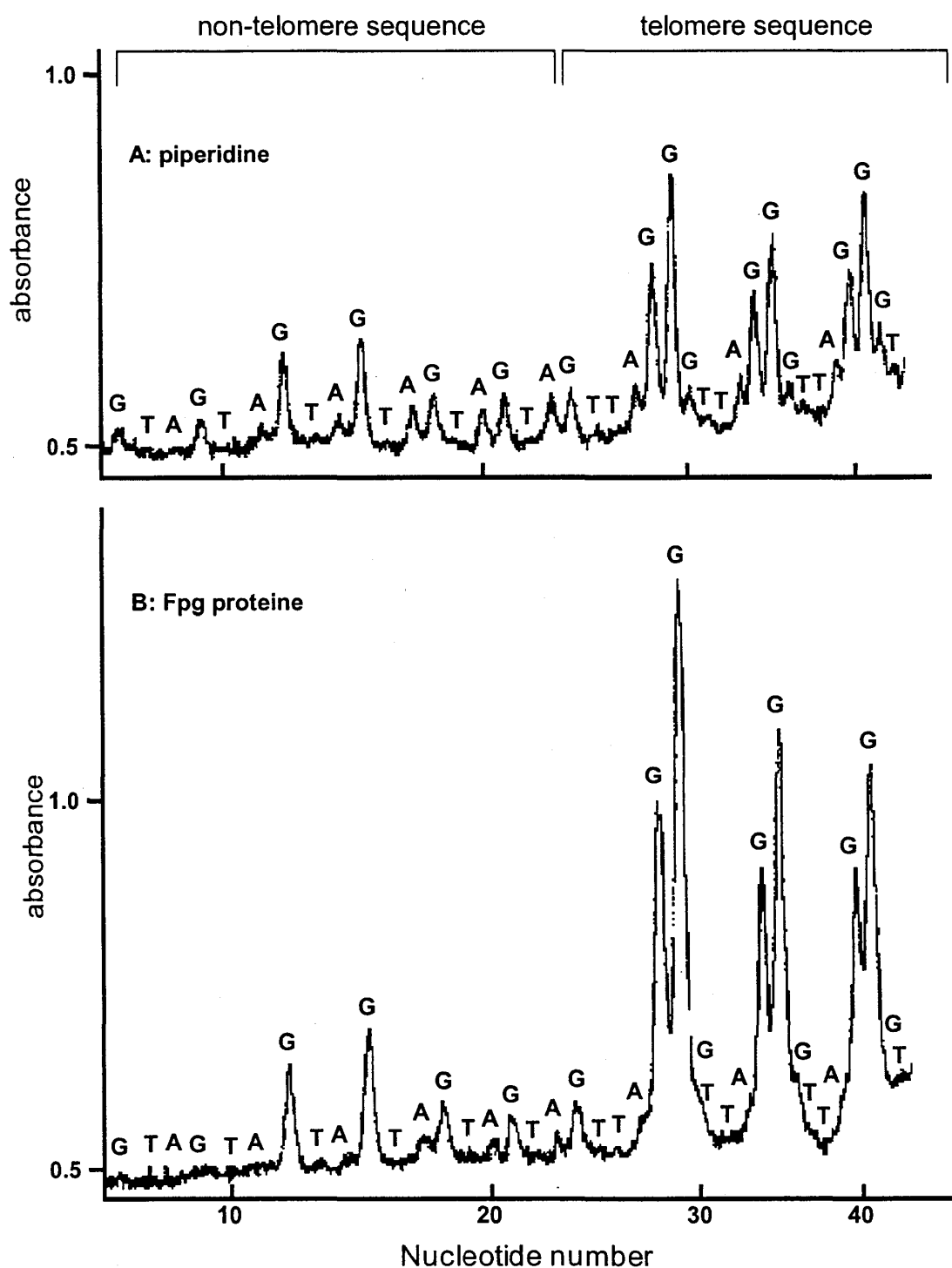


図2. リボフラビン存在下UVAによるDNA損傷の塩基配列特異性
The ^{32}P 5' end-labeled 48-base pair fragment (5'-(TAGTAG) $_4$ (TTAGGG) $_4$ -3') was exposed to 2 J/cm 2 UVA light (365 nm) with 20 μM riboflavin in 100 μl of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.8) containing 5 μM DTPA. After piperidine (A) or Fpg protein (B) treatment, DNA fragments were electrophoresed on a 12% polyacrylamide/8 M urea gel using a DNA-sequencing system and the autoradiogram was obtained by exposing X-ray film to the gel. The relative amounts of oligonucleotides produced were measured using a laser densitometer. The cleavage sites of the treated DNA were determined by direct comparison with the same DNA fragment after undergoing DNA sequencing reactions according to the Maxam Gilbert procedure. The horizontal axis shows the nucleotide number.

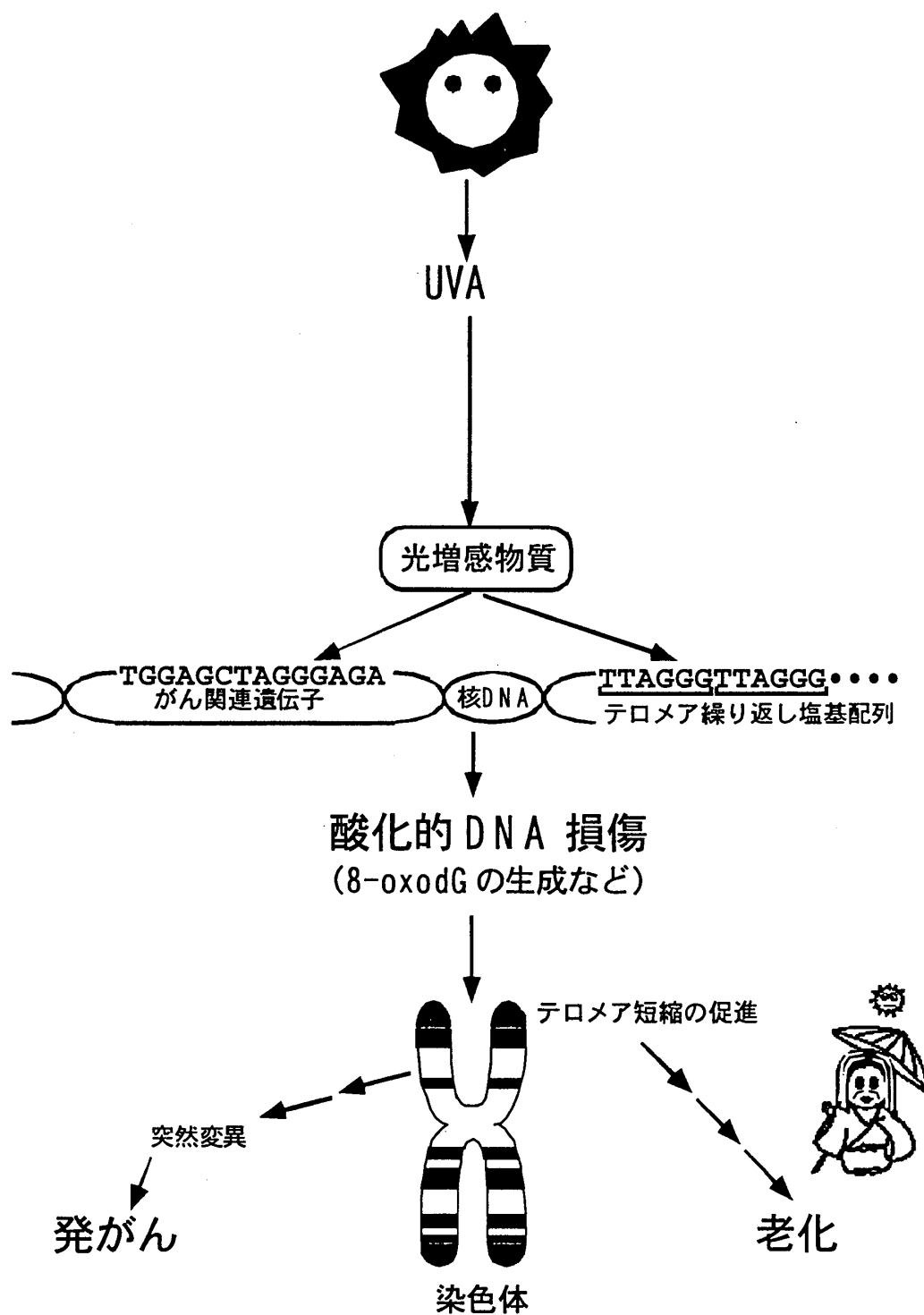


図 3. 太陽紫外線、特にUVAによる塩基配列特異的DNA損傷の意義