

# 論文内容の要旨

論文題目 放射線高感受性突然変異メダカ *ric1*

胚由来細胞を用いた DNA 損傷応答に関する研究

氏名 日高 征幸

## 序論

DNA は細胞外の様々な刺激により常に損傷を受け、それらの損傷は癌化や老化につながる。DNA 損傷の中で、DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand breaks: DSBs) は最も重篤な損傷であり、すばやく損傷を認識し、修復されることが必要である。

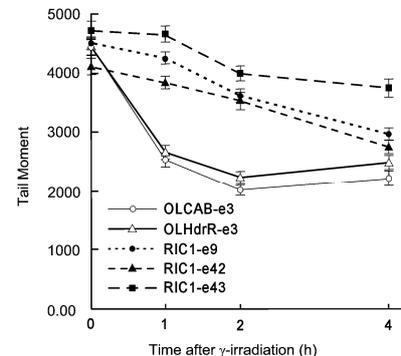
DSBs は、細胞周期チェックポイントを活性化させ、また、主に二つの機構 (NHEJ: non-homologous end joining、HR: homologous recombination) によって修復される。修復が不可能であったり、正確に修復されなかったりした場合、アポトーシスが誘導され細胞は死に至る。DSBs が生じると、ヒストン H2A のバリエーションである H2AX の Ser139 がリン酸化され ( $\gamma$ H2AX)、 $\gamma$ H2AX は DNA 修復に重要であることが知られている。また、アポトーシスにおける DNA 断片化の際にも、H2AX はリン酸化を受け、さらに、DNA 損傷時における細胞の応答を制御する MDC1 に結合することが知られている。MDC1 は ATM を損傷部位に集め、損傷のシグナルを増幅する。シグナルは p53 を介してアポトーシスや細胞周期チェックポイントに伝達される。DNA 修復、アポトーシス、細胞周期チェックポイントの分子機構はこれまで詳細に解析が行われてきた。しかし、*in vivo* においてこれらの DNA 損傷応答がどのように制御を受けているのか、まだ十分には理解されていない。

メダカ (*Oryzias latipes*) は、形態学的、生理学的に哺乳類と共通の体制を有し、卵と胚が透明であり、初期胚の発生過程を観察することが出来るという利点から、モデル生物として広く一般的に使われてきた。ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) による突然変異集団の中から選別された放射線に高感受性を示す突然変異メダカ *ric* (radiation induced curly tailed malformation 1) の一つである *ric1* のホモ接合体は、初期原腸胚への  $\gamma$  線照射によって孵化率が低下し、高い奇形率を示す。さらに、*ric1* の初期原腸胚は、 $\gamma$  線誘発の DSBs の修復において欠損を有することが明らかにされている。*ric1* が DNA 損傷応答を解析するモデル生物として利用可能となるために、細胞死や DNA チェックポイントなどの DNA 損傷応答を *in vitro* において野生型細胞と比較することが必要である。本研究では、DNA 損傷応答に対する *ric1* の特性を明らかにするために、*ric1* 初期胚由来の培養細胞を樹立し、培養細胞に対する  $\gamma$  線照射によって生じた DSBs の修復、 $\gamma$  線誘発の細胞死、細胞分裂の停止、H2AX のリン酸化を解析した。また、p53<sup>-/-</sup>細胞と ATM<sup>-/-</sup>細胞を用いて *ric1* 遺伝子との関与を解析した。

## 結果

### 1. DSBs修復の解析

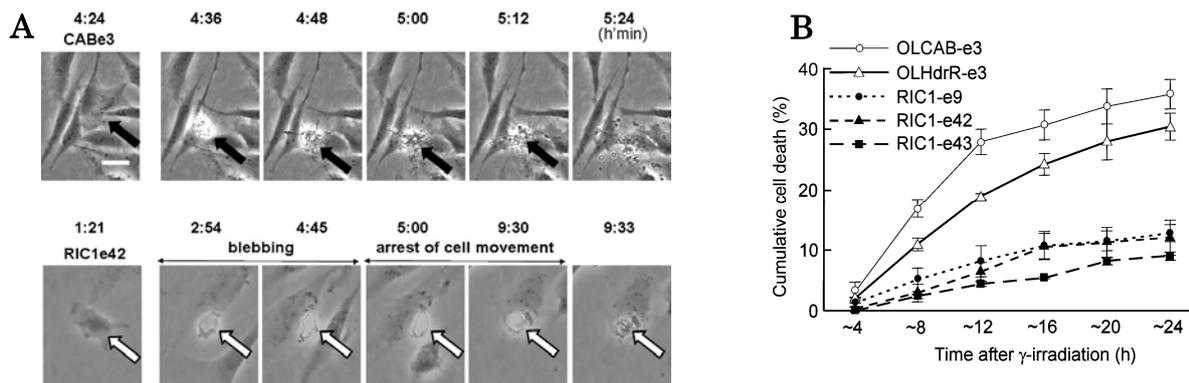
RIC1 細胞の DSBs 修復能力を、コメットアッセイ法を用いて解析した (図 1)。一細胞の DNA をゲル上で電気泳動させた際、DNA が流れた度合いを示した TM 値 (Tail Moment) を用いて、DSBs の修復度合いを評価した。 $\gamma$  線 15 Gy 照射直後の TM 値から、野生型細胞 (OLCAB-e3、OLHdrR-e3) と RIC1 細胞 (RIC1-e9、RIC1-e42、RIC1-e43) に、同程度の DSBs が生じていることがわかった。 $\gamma$  線照射 1 時間後、野生型細胞は大部分の DSBs が修復されたのに対し、RIC1 細胞においてはわずかしき DSBs が修復されなかった。しかし、照射 4 時間後における野生型細胞と RIC1 細胞の TM 値の差は、照射 1、2 時間後の差と比較して小さく、RIC1 細胞において DSBs が修復されていることが明らかとなった。これらの結果から、RIC1 細胞は、 $\gamma$  線照射後、早期の DSBs 修復に欠損があり、野生型と比較して DSBs の修復が遅延することが明らかとなった。



(図 1) メダカ細胞における DSBs の修復

## 2. 細胞死

RIC1 細胞における  $\gamma$  線誘発の細胞死を解析するため、細胞の形態変化を継時的に観察した。野生型細胞は、 $\gamma$  線 10 Gy 照射 4 時間後から細胞が萎縮してディッシュ底面からはがれ、細胞膜がブレbbingを起こした後に細胞質が断片化し、アポトーシス小体を形成する細胞死を引き起こし始めた (図 2 A)。この典型的なアポトーシスにおける形態変化は、1 時間以内に完了した。非照射の野生型細胞では、このような細胞死は見られなかった。 $\gamma$  線 10 Gy 照射後 24 時間以内に約 30% の野生型細胞が細胞死を引き起こし、照射後 4 時間から 12 時間の間に起こる細胞死の頻度が最も高かった (図 2 B)。 $\gamma$  線照射後、RIC1 細胞においても dish 底面からはがれる細胞が見られたが、細胞膜がブレbbingを起こした後、細胞質の断片化が見られなかった。それらの細胞は、細胞質を断片化させる代わりに、細胞膜が透過し、ネクローシス様の形態変化を示した。 $\gamma$  線 10 Gy 照射後、約 10% の RIC1 細胞が、このような形態変化を示す細胞死を引き起こした。

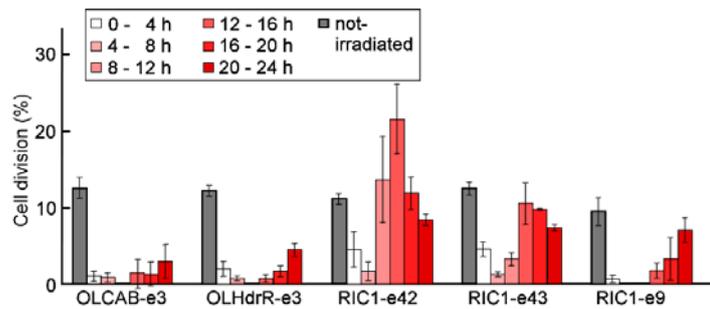


(図 2)  $\gamma$  線誘発の細胞死

## 3. 細胞分裂の停止

$\gamma$  線は G2/M 期チェックポイントを誘導し、細胞分裂を停止させることが知られている。Time-lapse 撮影による顕微鏡観察によって、RIC1 細胞における  $\gamma$  線誘発の細胞分裂の停止を解析した。 $\gamma$  線照射直後に、全ての野生型細胞と RIC1 細胞において細胞分裂の停止が見られた (図 3)。野生型細胞である OLCAB-e3、OLHdrR-e3、および RIC1-e9 細胞は  $\gamma$  線照射から 16-20 時間まで、ほとんどの細胞が分裂を停止した。一方、RIC1-e42、RIC1-e43 細胞は  $\gamma$  線照射後 8-12 時間に細胞

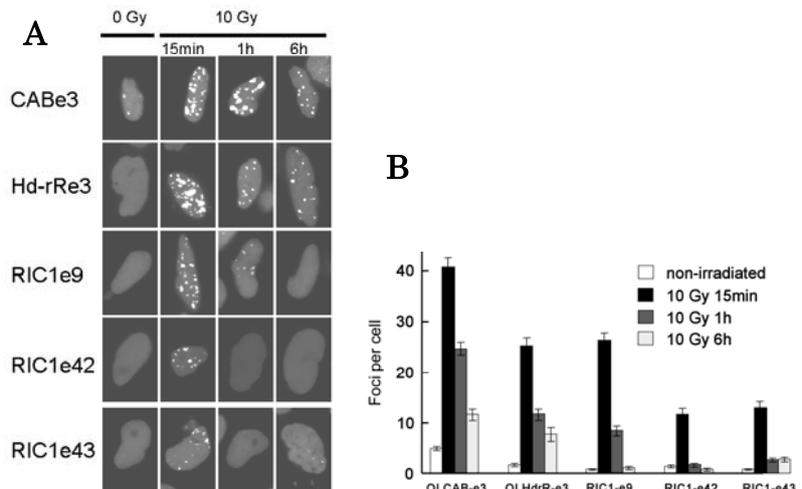
分裂を再開した。



(図 3)  $\gamma$  線照射後の細胞分裂頻度

#### 4. $\gamma$ H2AX フォーカス形成

免疫組織化学染色法によって  $\gamma$  線照射後の  $\gamma$  H2AX のフォーカス形成を解析した。 $\gamma$  線照射 15 分後、RIC1 細胞は野生型細胞と同様に  $\gamma$  H2AX のフォーカスを形成した (図 2 A)。しかし、RIC1-e42 と RIC1-e43 のフォーカス数は、野生型と比較して少数だった (図 2 B)。コメントアッセイにより RIC1 細胞は、 $\gamma$  線照射後 1 時間以内にはほとんどの DSBs を修復でき

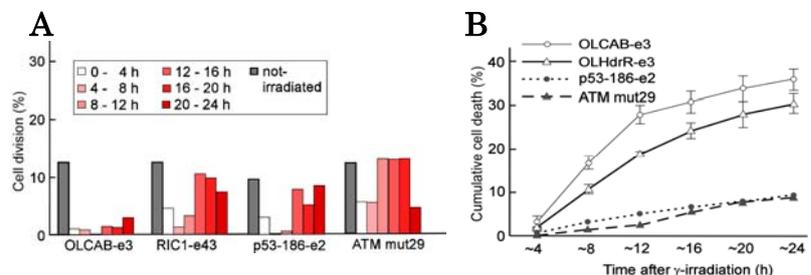


(図 4) メダカ細胞におけるリン酸化 H2AX のフォーカス形成

きないことが示されたが、野生型と同様に半分以上の  $\gamma$  H2AX のフォーカスが 1 時間以内に消失した。さらに、野生型細胞の場合、 $\gamma$  線照射 6 時間後にフォーカスが残っていたのに対し、RIC1 細胞のフォーカスはほとんど消失した。

#### 5. p53 と ATM 遺伝子ノックアウトメダカ初期胚由来細胞における $\gamma$ 線誘発の細胞死と細胞分裂停止

p53 ノックアウトメダカは ENU による突然変異集団の中から選別された (Taniguchi *et al.*)。ATM ノック



(図 5) p53<sup>-/-</sup>細胞、ATM<sup>-/-</sup>細胞における細胞分裂と細胞死

アウトメダカは TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) 法によって作出された (大阪大学 藤堂剛教授より譲渡)。p53 と ATM のノックアウトメダカの、それぞれの初期胚から樹立した培養細胞に対して  $\gamma$  線 10 Gy を照射し、細胞死と細胞分裂を顕微鏡観察により解析した。p53<sup>-/-</sup>細胞 (p53-186 e2) は細胞分裂の停止が見られたものの、早期に細胞分裂の再開が見られた。照射後 24 時間以内に細胞死を起こした数は 1 割程度であった (図 5 A, B)。この結果は RIC1 細胞

の結果と同程度であった。それに対し、ATM<sup>-/-</sup>細胞 (ATM mut29) は RIC 細胞や p53<sup>-/-</sup>細胞と同様に細胞死の数は低かったが、細胞分裂の停止は見られなかった。p53<sup>-/-</sup>細胞は、野生型細胞に見られた細胞質断片化を伴う細胞死を起こしたのに対し、ATM<sup>-/-</sup>細胞は RIC1 細胞に見られた形態変化を示す細胞死を起こした。

## 6. ATMフォーカス形成

γ線 50 Gy 照射 6 時間後の ATM のフォーカスを免疫組織化学的手法により解析した。γ線 50 Gy 照射 6 時間後に、野生型細胞、RIC1 細胞の両方に ATM のフォーカスが形成され残っていることが明らかとなった (図 6)。また、p53<sup>-/-</sup>細胞内においても ATM のフォーカスが残っていたのに対し、ATM<sup>-/-</sup>細胞ではフォーカスが見られないことが示された。

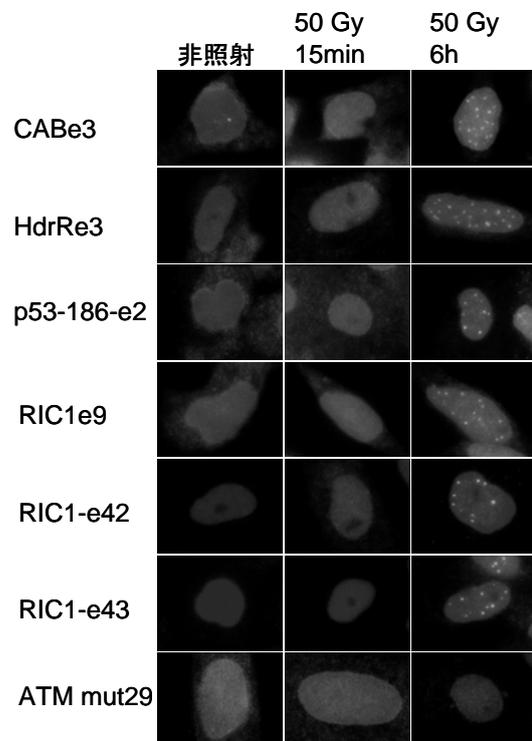
## 結論

p53<sup>-/-</sup>細胞と ATM<sup>-/-</sup>細胞に対する γ線照射によって誘発された細胞死は、RIC1 細胞の場合と同じ程度まで低下した。このことから、RIC1 細胞で見られた細胞死は p53 を介さない細胞死であることが予測される。また、RIC1 細胞内では ATM のフォーカス形成が見られ、また ATM<sup>-/-</sup>細胞では γ線誘発による細胞分裂停止がみられないことから、RIC1 細胞内では ATM が活性化していることが強く示唆された。

また、p53<sup>-/-</sup>細胞では RIC1 と同様に γ線照射によって細胞分裂の停止が見られ、細胞分裂停止が早期に解除された。これらの結果から、*ric1* 遺伝子は p53 を介した細胞死、細胞周期チェックポイントにおいて機能していることが示唆された。しかし、RIC1 細胞と p53<sup>-/-</sup>細胞は細胞質断片化を伴う細胞死を示したのに対して、RIC1 細胞は細胞死の際に断片化を伴わなかった。アポトーシスの際、細胞質断片化を起こすのに *ric1* 遺伝子が必要であることが示唆された。

## 発表論文

Hidaka M., Oda S., Kuwahara Y., Fukumoto M., Mitani H. (2009) Cell lines derived from a Medaka radiation-sensitive mutant have defects in DNA double-strand break responses. J Radiat Res., in press



(図 6) メダカ細胞におけるリン酸化 ATM のフォーカス形成