

哺乳類細胞株における様々な刺激付与後のヒストン 2AX のリン酸化について

Phosphorylation of Histone2AX in Mammalian Cell Lines after Several Kinds of Genotoxic Stimuli

高城啓一^{*1}、畑下昌範^{*1}、松本英樹^{*2}Keiichi TAKAGI^{*1}, Masanori HATASHITA^{*1}, and Hideki MATSUMOTO^{*2}

Abstract

Histone2AX(H2AX) is phosphorylated surrounding the damaged DNA after double-strand breaks(DSBs)-evoking stimuli. In the present report, localization of phosphorylated H2AX(γ-H2AX) in nuclei of 4 mammalian cell lines(BALB-3T3, DU145, H1299, and HeLa) was examined by means of the immunocytochemistry during the normal cell cycle, after the irradiation of ionizing radiation, after the hyperthermia, and after the application of a reagent which causes replication stall. In the normal cell cycle, after irradiation of ionizing radiation, after the hyperthermia, and after replication stall, immunofluorescence of γ-H2AX was apparent in interphase nuclei of BALB-3T3, DU145, and H1299. However, that in interphase nuclei of HeLa was faint in normal cell cycle, after ionizing radiation, and after the hyperthermia. Interestingly, chromosomes of mitotic HeLa cells after irradiation of ionizing radiation, and interphase nuclei of HeLa after replication stall revealed similar remarkable phosphorylation of H2AX in compared with other cell lines. These results suggest the existence of multiple DSB sensing mechanisms which act in different cellular conditions.

要約

DNA の 2 重鎖切断(DSB)を引き起こすような刺激が細胞に加わると、障害部周囲のヒストン 2AX(H2AX)がリン酸化される。本報告では、4 種の細胞株(BALB-3T3、DU145、H1299、HeLa)を用い、それぞれの通常増殖時、電離放射線照射時、温熱刺激時、DNA 複製中断時における核内 H2AX のリン酸化を、免疫細胞化学を用いて調べた。BALB-3T3、DU145 及び H1299 では通常増殖時、電離放射線照射時、温熱刺激時、DNA 複製中断時に明確な H2AX のリン酸化が見られたが、HeLa では通常増殖時、電離放射線及び温熱刺激時において分裂間期の H2AX リン酸化は著しく弱かった。興味深いことに、電離放射線照射時の分裂期 HeLa 染色体及び DNA 合成中断時の分裂間期 HeLa 細胞核では他の細胞株と同様の顕著な H2AX リン酸化が見られた。これらの結果は、DSB を検知し H2AX をリン酸化する複数のメカニズムが存在し、それぞれが異なる局面で働いていることを示唆している。

緒言

ゲノム DNA の 2 重鎖切断(double-strand breaks, DSB)の誤修復は、欠失、転座、逆位といった大規模な染色体レベルでの突然変異の原因となる。したがって、DSB の生成と修復メカニズムの理解は、突然変異育種の高効率化に必須である。

DSB が生じると DNA 切断部位及びその近傍ではコアヒストンのうちヒストン 2 ファミリーのサブタイプであるヒストン 2AX(H2AX)の Ser139 がリン酸化され(γ-H2AX)、γ-H2AX が MRN 複合体、Ku-DNA-PKs、ligIV、Rad52 などの DSB 修復関連タンパク群を切断部位に呼び込み、修復複合体を形成して切断部位を修復すると考えられている。γ-H2AX は免疫組織化学により *in situ* で可視化を行ったとき、核内での点状構造物、いわゆるフォーカスとして観察することが可能である¹⁾。

本報告では 4 種の細胞株を用い、通常増殖状態、電離放射線照射時、温熱刺激時、DNA 複製中断時における H2AX のリン酸化について免疫組織化学的手法で調べた。その結果、DSB を検知して H2AX をリン酸化するメカニズムが複数存在し、それぞれが異なる局面で働いていることを示唆する結果を得たので報告する。

^{*1} 研究開発部 生物資源グループ、^{*2} 福井大学医学部国際社会医学講座

． 材料と方法

1. 細胞培養

正常細胞に近い性質を持つ細胞株として、マウス繊維芽細胞由来の BALB-3T3-A31 を、細胞増殖やストレス応答に何らかの異常を持っていると考えられる細胞株として、ヒト腎臓がん由来の DU145、ヒト非小細胞性肺がん由来細胞株 H1299、ヒト子宮頸がん由来細胞株 Hela を用いた。それぞれの細胞株は 10%牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地で、37℃、5%CO₂ 環境下で培養し、コンフルエント状態に達する前に継代して増殖状態を維持した。

2. DNA 合成期(S 期)標識

培養細胞の DNA 合成状況を in situ で調べるために、チミジン類似体の取り込み実験を行った。培養中の細胞に対して、終濃度 10 μg/ml となるようにプロモデオキシウリジン(BrdU)を添加し、1 時間インキュベーションを行った後、細胞を固定した。

3. 陽子線照射、X 線照射

細胞をポリスチレン製のスライドフラスコを用いて培養し、サブコンフルエント状態で照射した。陽子線に関しては、福井県若狭湾エネルギー研究センターの多目的加速器システムを用い、22℃環境下で 200MeV の陽子線を 2.5 Gy/min の線量率での照射を行った。照射後、細胞を通常培養環境に戻し、30 分後に細胞の固定を行った。

X 線照射は、福井大学医学部の X 線照射装置を用い、130kVp、0.8Gy/min で照射を行った。照射後、細胞を通常培養環境に戻し、30 分後に細胞の固定を行った。

4. DNA 合成中断処理

S 期細胞における DNA 合成を阻害するために、DNA 合成阻害剤の投与を行った。培地に終濃度 4mM でヒドロキシウレア(HU)を添加し、6 時間培養を継続した後、直ちに固定した。

5. 免疫細胞化学

細胞の固定はダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水に溶解した 4%パラホルムアルデヒドに 10 分間浸漬することで行った。固定した細胞は、染色操作を行うまでは外液を 70%エタノールに置換し、-20℃で保存した。

-H2AX を検出するためには、一次抗体として抗 -H2AX モノクローナル抗体を、2 次抗体として抗マウス IgG-FITC を用いた。抗体の細胞への透過性を高める急速凍結融解処理と 0.5% Tween20 を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)への浸漬処理後、4% BlockAce(雪印社)、0.5%Tween20 を含む PBS からなるブロッキング溶液で 37℃、30 分のインキュベーションを行った。その後ブロッキング溶液で 1/1000 に希釈した一次抗体を標本に加えて、37℃、60 分のインキュベーションを行った。一次抗体のインキュベーションを終えた標本は PBS で洗浄した後、ブロッキング溶液で 1/100 に希釈した二次抗体で 37℃、暗黒下、60 分のインキュベーションを行った。対比染色として、ヨウ化プロビジウム(PI)による核染色を行った。

BrdU の同時検出を行う場合には、抗 -H2AX による免疫染色が完了後、再び細胞を固定し、2N 塩酸に室温で 20 分間細胞を浸漬した後、抗 BrdU ポリクローナル抗体(1/200)で 37℃、1 時間、抗ヒツジ IgG-Texas Red(1/100)で 37℃、1 時間インキュベーションを行った。細胞核の対比染色はジアミノフェニルインドール(DAPI)で行った。

染色操作後の細胞は蛍光退色防止剤を含む封入剤、ベクタシールドで封入し、観察を行うまで 4℃で保存した。

6. 画像解析

蛍光像の獲得と解析には福井県若狭湾エネルギー研究センターの蛍光画像解析システムを用いた。

蛍光画像は日本ローパー社の CCD カメラ、CoolSnap を用いて記録した。

-H2AX フォーカスの数を計測するためには、蛍光顕微鏡画像解析システムのレーザー共焦点顕微鏡(オリンパス社 FV-300)を用い、縦横方向に $0.082 \mu\text{m}$ 、深さ方向に $0.1 \mu\text{m}$ ステップで走査を行い、細胞全体の蛍光像をデジタルデータとして取り込んだ。

画像データはアメリカ国立衛生研究所が配布している画像解析ソフトウェア Image-J を用いて解析した。フォーカス数やフォーカス容積などの計測には Image-J のプラグインソフト 3D-Objects counter の一部を改変して用い、3次元画像の表示、構築にはプラグインソフト Volume Viewer を用いた。

結果と考察

1. 非刺激時における -H2AX フォーカス

BALB-3T3 細胞では細胞分裂間期において、DNA を損傷するような外部刺激が不在の状態でもいくつかの細胞で -H2AX フォーカス形成が見られた。細胞あたりのフォーカス数はバリエーションに富み、まったくフォーカスが検出されない細胞から、 $100 \mu\text{m}^2$ あたり 20 以上のフォーカスを含む細胞まで様々であったが、大きな細胞ほどより多くのフォーカスを持つ傾向が存在した(図-1A)。そこで、培地にチミジンの類似体である BrdU を $10 \mu\text{M}$ 添加し、2 時間 BrdU を取り込ませることにより、BrdU の細胞への取り込みと -H2AX フォーカスとの共存を調べたところ、BrdU を多く取り込んだ細胞ほど多くの -H2AX フォーカスが存在する傾向が見られた(図-1B,C,D)。このことは、DNA 複製に伴って広範なクロマチンリモデリングが起こる S 期における自発的 DSB によっても H2AX のリン酸化が起こる可能性を示唆している。

DU145、および、H1299 においても、分裂間期、BALB-3T3 とほぼ同様な -H2AX フォーカス形成が見られた。しかし、Hela では分裂間期、分裂期とも顕著な -H2AX フォーカスはほとんど観察されなかった。

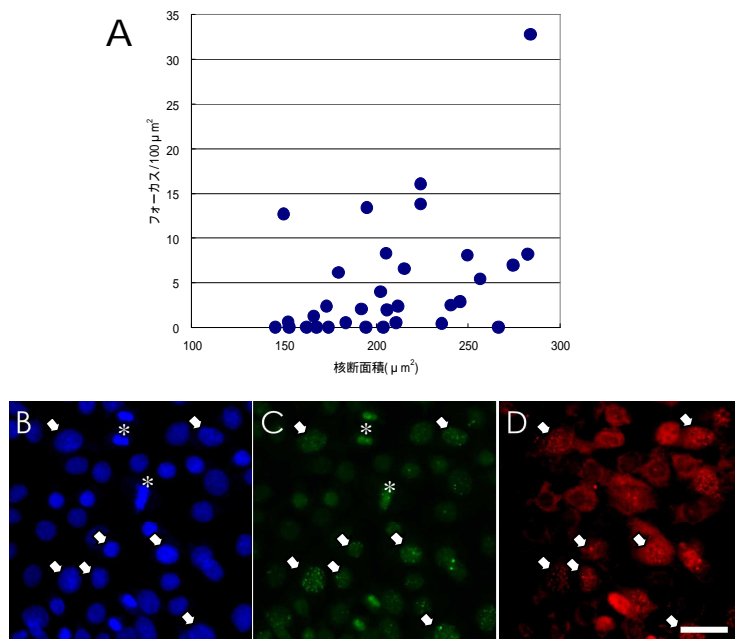


図-1 無刺激時における BALB-3T3 の -H2AX フォーカス形成

A: BALB-3T3 における無刺激時の -H2AX フォーカス数と核断面積との相関。横軸に単位面積あたりの -H2AX フォーカス数、縦軸に各断面積をとり、無作為に選択した 31 細胞に関してプロットした。B,C,D: BALB-3T3 の無刺激時の -H2AX フォーカスと BrdU 取り込みの相関。B: DAPI による核染色像、C: -H2AX 免疫蛍光像、D: BrdU 免疫蛍光像。矢印は BrdU を取り込んだ細胞、星印は分裂期の細胞を示す。Bar= $30 \mu\text{m}$

2. 電離放射線照射

分裂間期の BALB-3T3 細胞に X 線、陽子線を照射した場合、単位面積あたりに形成される -H2AX フォーカスは顕著な上昇を示した。図-2A に 0.5、1.0、1.5 Gy の X 線を照射後 30 分における、分裂間期核の XY 断面(ビーム軸と直交)での単位面積($100 \mu\text{m}^2$)あたりの -H2AX フォーカス数を示す。単位面積あたりのフォーカス数は線量依存的に増加した。電離放射線が分裂期に照射された場合、形成されるフォーカスは、より明瞭で、かつ、大きく、各フォーカスが染色体のほぼ全厚にわたる規模におよんでいた。また、分裂後期の細胞では、染

染色体橋や、染色体断裂が高頻度で見られ、そのような異常をきたした染色体にフォーカスが形成されているのが観察された。

DU145 においても、BALB-3T3 と同様の、電離放射線照射による γ -H2AX フォーカスの増加が見られた(図-2B)。Hela では分裂間期での陽子線照射による γ -H2AX フォーカス増加はほとんど見られなかった(図-2C)。しかしながら、興味深いことに、分裂期細胞の染色体においては、他の細胞株とほぼ同様のフォーカス形成が見られた(図-2C 枠内)。

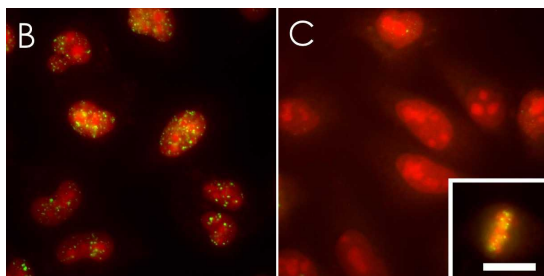
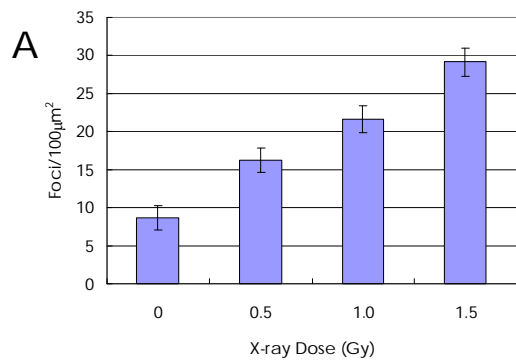


図-2 電離放射線照射時における各細胞株の γ -H2AX フォーカス形成

A: BALB-3T3 における X 線照射時の単位面積あたりの γ -H2AX フォーカス数。横軸に照射線量、縦軸に単位面積あたりのフォーカス数を示した。サンプリングは各線量区それぞれ 30 以上の分裂間期細胞に関して行った。カラム内の縦棒は標準誤差を示す。B: DU145 に 1.0Gy の X 線を照射した際の照射 30 分後における γ -H2AX 免疫蛍光像。C: HeLa に 1.0Gy の陽子線を照射した際の照射 30 分後における γ -H2AX 免疫蛍光像。C の枠内は分裂中期の HeLa 細胞像を示す。各画像は抗 γ -H2AX 抗体に対する免疫蛍光像と PI による核染色画像の合成画像であり、核は赤、 γ -H2AX は緑(あるいは黄)で表されている。Bar=30 μm

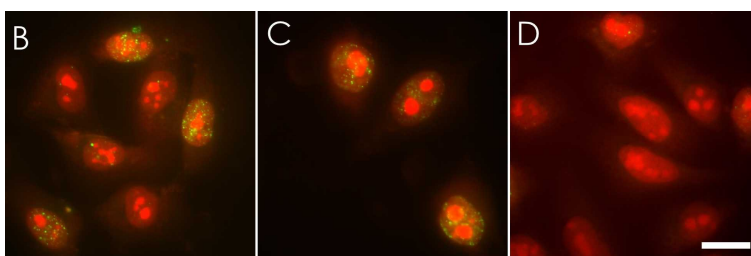
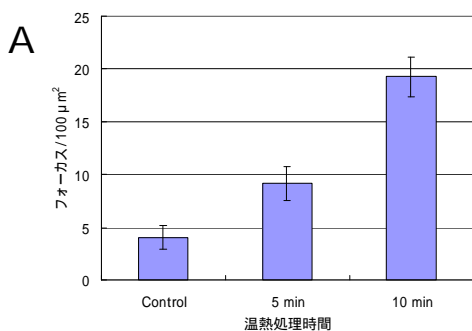


図-3 各細胞株における温熱処理後の γ -H2AX フォーカス形成

A: BALB-3T3 に 44 h 、0, 5, 10 分間の温熱処理を加え、20 分間通常環境で培養後の、分裂間期細胞核単位面積あたりの γ -H2AX フォーカス数。B: DU145, C: H1299, D: HeLa 各細胞株において温熱処理を 44 h 、10 分間加え、通常培養環境で 20 分間培養後の γ -H2AX フォーカス像。各画像は抗 γ -H2AX 抗体に対する免疫蛍光像と PI による核染色画像の合成画像であり、核は赤、 γ -H2AX は緑(あるいは黄)で表されている。Bar=20 μm

3. 温熱処理

BALB-3T3 細胞に 44℃ で 5 分、10 分の温熱処理を加え、通常の培養環境に戻して 20 分後の γ -H2AX フォーカス数を計測したところ、分裂間期において、温熱処理時間に応じたフォーカス数の増加が観察された(図-3A)。フォーカス形成の温熱処理に対する感受性は、同一細胞株内においても細胞ごとにより異なり、BrdU 取り込み後に温熱処理を加えた場合では、BrdU を取り込んだ細胞において多くのフォーカスが観察された(データは示さず)。したがって、S 期においてより温熱刺激に対する感受性が高まるものと考えられる。細胞死などを指標として温熱処理に対する細胞の感受性は、S 期と分裂期が最も高くなるとされている。したがってこの結果は、温熱処理による DSB 形成が、温熱処理による細胞死の S 期高感受性に関与することを示唆している。分裂期では温熱処理によって紡錘体構造の崩壊が見られたが、染色体上の γ -H2AX フォーカスは、電離放射線照射時に見られるほど顕著ではなかった。

DU145、H1299 でも BALB-3T3 と同様に、温熱処理(44℃、10 分)による γ -H2AX フォーカスの増加が見られた(図-3B,C)。しかし、Hela においては温熱処理によるフォーカスの顕著な増加は見られなかった(図-3D)。

温熱処理による H2AX のリン酸化に関しては、処理に伴って γ -H2AX フォーカス形成が起こるとする報告²⁾と起こらないとする報告³⁾があるが、これらの差異は本報告で見られたような細胞株ごとの性質の違いや、用いた細胞株の細胞周期構成に起因するものと思われる。

4. HU による DNA 複製中断

γ -H2AX フォーカスは、HU やアフィディコリンを投与することによる DNA 複製中断によっても生じることが報告されている⁴⁾⁵⁾。そこで、DU145、H1299、Hela における HU 投与による γ -H2AX フォーカス形成を調べた。

その結果、DU145、H1299 では、非常に強いフォーカス形成が一部の細胞で見られた(図 4-A,B)。HU 投与に強く反応した細胞では H2AX のリン酸化はフォーカスを形成するというよりは、核小体以外の核全域において広範に生じるようであった。電離放射線刺激や温熱処理の場合とは異なり、Hela においても蛍光強度は DU145、H1299 よりも低いものの、核内分布パターンはこれらの細胞と同様の H2AX リン酸化が見られた(図 4-C)。

HU は dNTP 合成系の酵素であるリボヌクレオチドリダクターゼの作用を阻害することにより DNA 合成阻害を引き起こし、ひいては S 期細胞を死に至らしめる。その作用は S 期特異的であり、G1 期細胞では dNTP の不足のために S 期への進行は停止する。したがって、HU 投与時の H2AX のリン酸化程度が細胞によって異なるのは、HU 作用機序の S 期特異性に起因するものと考えられる。また、H2AX のリン酸化がフォーカスを形成するというよりは核全域にわたって生じていたのは、S 期における DNA 複製がクロマチン上の複数の点で起こり、それぞれの点において通常は協調的に働く DNA ヘリカーゼや DNA トポイソメラーゼによるクロマチンリモデリングや DNA 複製複合体の進行が途中停止してしまうためではないかと思われる。

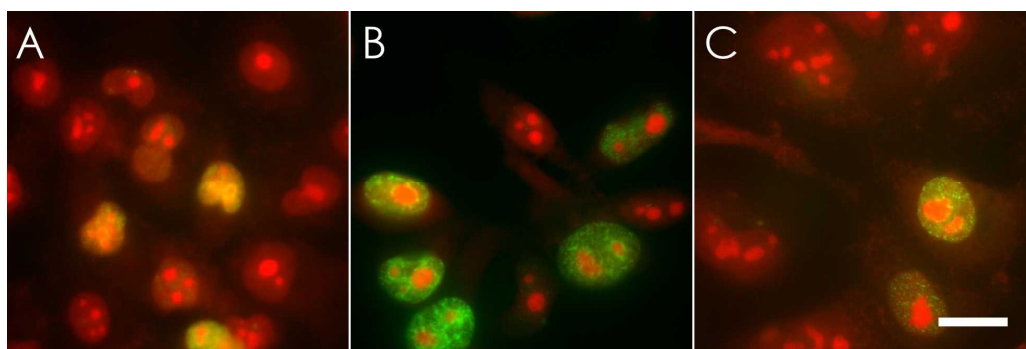


図-4 HU 処理 6 時間後の細胞株における γ -H2AX 免疫蛍光

各画像は抗 γ -H2AX 抗体に対する免疫蛍光像と PI による核染色画像の合成画像であり、核は赤、 γ -H2AX は緑(あるいは黄)で表されている。各画像はそれぞれ A: DU145、B: H1299、C: HeLa を表す。 Bar=20 μ m

5. 総合考察

BALB-3T3、DU145、H1299、Hela の 4 種の細胞株における、非刺激時、電離放射線照射時、温熱処理時、DNA 複製中断時の γ -H2AX フォーカス形成の比較から、Hela 細胞における H2AX リン酸化反応が他の細胞株とは非常に異なることが明らかとなった。本報告で用いた 4 種の細胞株のうち、BALB-3T3 細胞はマウスの繊維芽細胞を継代し、株化した細胞であり、不死化し、染色体数に異数性を示すものの、接触阻害を示すなど細胞の増殖制御やストレス応答に関しては正常細胞の性質が比較的良好に保存されていると考えられている。一方、残り 3 種の細胞株はヒトのがん組織由来の細胞を株化した細胞株であり、増殖制御や、ストレス応答のシステムに何らかの異常をきたした細胞株である。これらのうち、Hela は電離放射線などの DSB を引き起こすような刺激に対する応答系のどこかが損なわれている可能性が非常に高い。Hela に関しては、酸化的ストレス応答タンパクであるヘムオキシダーゼ 1 の、電離放射線や超音波刺激による転写誘導も非常に低い(鍵谷、私信)。H2AX のリン酸化は DSB に対する細胞応答系のかなり上流に位置する反応であり、分裂間期 Hela においてこの反応が弱いことは、DSB に対する応答系のごく初期に関与する因子の機能が損なわれていることを示唆している。Hela で細胞分裂間期において、電離放射線や温熱処理に対して H2AX のリン酸化がごく弱いにもかかわらず、細胞分裂期には他の細胞株とほぼ同様の H2AX フォーカスが見られたこと及び HU による DNA 複製中断時にも他の細胞株と同様の H2AX リン酸化が見られたことは、H2AX をリン酸化する因子が複数存在し、細胞分裂期や DNA 複製中断時には、通常の細胞分裂間期とは異なる因子が主要なリン酸化因子として働くことを強く示唆している。このような複数の H2AX リン酸化経路の特定と、DNA 損傷修復モード選択との関係を調べることは今後の大きな課題である。

イオンビームを用いた品種改良においては、突然変異形成をいかにして制御するかが品種改良効率改善の鍵となる。突然変異形成は DNA 損傷の修復時に起こるエラーが大きな原因となって生じると考えられている。したがって、DNA 損傷に対する細胞の応答経路を明らかにしていくことは、経路の阻害剤投与などによる突然変異制御の可能性をもたらすと強く期待される。

参考文献

- 1) Rogakou, E. et al.: J. Biol. Chem. 273, 5858, (1998)
- 2) Kaneko, H. et al. : Biochem Biophys. Res. Comm.328(4), 1101, (2005)
- 3) Zhou, C. et al. : Mut. Res.604(1-2),8, (2006)
- 4) Ward, I.M. and Chen, J. : J. Biol. Chem. 276(51), 47759, (2001)
- 5) Kurose, A. et al. : Cell Prolif. 39(3), 231, (2006)