

マウス繊維芽細胞株におけるリン酸化ヒストン 2AX フォーカス形成

Formation of Phosphorylated Histon 2AX Foci in the Mouse Fibroblast Cell Line

高城啓一^{*1}、畑下昌範^{*1}

Keiichi TAKAGI and Masanori HATASHITA

Abstract

In order to study the sensitivity of cells in different cellular status for DNA double-strand breaks(DSB) formation to the ion-beam irradiation, we used mouse fibroblast cell line BALB-3T3, and compared the morphologies of phosphorylated histone 2AX (γ-H2AX) foci in the logarithmic-growth phase cells and in the stationary phase cells after the ion-beam irradiation. We found that cells in the logarithmic-growth phase revealed higher number of γ-H2AX foci than cells in stationary phase after proton- or carbon-beam irradiation. Those results suggest that cells in logarithmic-growth phase have higher DSB formation sensitivity to the ion-beam irradiation.

要約

異なる状態の細胞における粒子線照射に対する DNA 二本鎖切断(DSB)形成感受性を調べるため、マウス繊維芽細胞株 BALB-3T3 を実験材料として用い、対数増殖期細胞と定常期細胞における、粒子線照射後のリン酸化ヒストン 2AX(γ-H2AX)フォーカス形成を比較した。その結果、対数増殖期細胞では、陽子線や炭素線の照射後、定常期細胞に比べてより多くの γ-H2AX フォーカスが形成されることが分かった。この結果は、対数増殖期細胞が、DSB 形成に関して、定常期細胞よりも高い粒子線照射感受性を持つことを示唆している。

緒言

突然変異は、種々の要因でゲノムに生じた DNA 損傷を修復する過程で生じると考えられている。したがって、粒子線照射などの際に核内に生じる DNA 損傷分布と、その修復メカニズムの解明は、突然変異頻度や突然変異方向性の制御など、粒子線を用いた品種改良を高度化する手法の開発につながる可能性が大きい。本研究は、盛んに遺伝子の転写や DNA の複製などの活動を行っている細胞と、あまり活動していない細胞において、粒子線照射に対する DNA 二本鎖切断(DSB)形成の感受性の違いがあるか否か調べることを目的とする。

核内の DSB 分布の指標として、リン酸化ヒストン 2AX を用いた。コアヒストンを構成するヒストン 2 のサブタイプ、ヒストン 2AX(H2AX)は、電離放射線¹⁾、温熱²⁾、高塩濃度³⁾などの影響で DSB が生じると、切断部位の周囲数メガベースの範囲でリン酸化され(γ-H2AX)、γ-H2AX フォーカスと呼ばれる構造を形成する¹⁾。このため、γ-H2AX フォーカスを免疫細胞化学などの手法を用いて可視化することで、核内に生じた DSB の位置や、数、局所的な DSB 量の指標とすることができると考えられている。DNA 複製や遺伝子転写の状況が異なる細胞状態を作り出すため、不死化はしているものの接触障害を示すなど比較的正常細胞に近い性質を持った細胞株であるマウス繊維芽細胞株 BALB-3T3 を実験材料として用いた。

BALB-3T3 細胞の対数増殖期、及び定常期における粒子線照射後の γ-H2AX フォーカス形成を、免疫蛍光法で可視化し、レーザー共焦点顕微鏡を用いた形態学的手法で比較した。その結果、細胞の状態によって粒子線照射に対する DSB 形成感受性が異なることを示唆する興味深い結果を得たので報告する。

材料と方法

^{*1} 研究開発部 生物資源グループ

1. 細胞培養

比較的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(ヒューマンサイエンス振興財団より入手)を、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 環境下で培養した。対数増殖期の細胞として、スライドフラスコ(NUNC 社)に継代して 1 日後のものを、定常期の細胞として継代 6 日後のものをを用いた。

2. 粒子線照射

スライドフラスコに培養した細胞を 22℃ の室温下で照射し、照射後直ちに 37℃、5%CO₂ の環境下に戻して 30 分後に、細胞を固定液で固定した。粒子線照射には福井県若狭湾エネルギー研究センターに備えられた多目的加速器システム W-MAST の高エネルギー汎用照射コースを用いた。陽子線に関しては 200MeV(LET 0.45keV/μm in water)の陽子線を照射した。炭素線照射に関しては実効エネルギー約 450MeV(LET 55keV/μm in water)の炭素線を照射した。

3. フローサイトメトリーによる細胞周期の確認

直径 10cm のシャーレで培養した細胞をトリプシン-EDTA でシャーレから乖離させた後、DPBS(-)で懸濁し、エタノールを最終濃度 70%となるように徐々に加えて固定し-20℃ に保存した。保存した細胞は遠心分離によって沈殿させた後、カルシウム、マグネシウムを含まないダルベッコのリン酸緩衝液(DPBS(-))に再懸濁し、ヨウ化プロピディウム(PI) 10 μg/ml、RNase 100 μg/ml を含む溶液で、暗黒化 20 分間染色を行った。

フローサイトメトリーには、福井県若狭湾エネルギー研究センターの全自動細胞分離分析システムを用いた。測定データは解析ソフトウェア FCSEXpress を用いて解析した。

4. 免疫細胞化学

細胞の固定はDPBS(-)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、70%エタノール中に-20℃ で保存した。

-H2AXを検出するためには、一次抗体として anti-γ-H2AX モノクローナル抗体(upstate 社)を、2次抗体として anti-mouse IgG-FITC(Sigma 社)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 DPBS(-)への浸漬処理を行った後、4% BlockAce(雪印社)、0.5% Tween20 を含む DPBS(-)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 DPBS(-)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。核を識別するための対比染色として、PI による染色を行った。核の計測を正確に行うため、RNase 10 μg/ml を含む PI 溶液中で、室温、5 分間の染色を行った。

5. 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顕微鏡画像解析システムを用いた。

-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 μm、深さ方向に 0.1 μm ステップで走査を行って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。3 次元粒子解析のため、ImageJ のプラグイン 3D objects counter(Fabrice Cordelières が作成) にデータ收拾のための改変を加えて用いた。

結果と考察

まず、シャーレの底面に付着した細胞間に増殖する余地が存在する状況、及び、細胞がシャーレ全体に稠密

に増殖した状態において、個々の細胞の DNA 量をフローサイトメトリーによって調べた結果を図-1 に示す。図-1 の下段を見ると分かるように、細胞の増殖する余地が存在する状態では、DNA 量を反映する蛍光強度の度数分布は、蛍光強度が低い部分に大きなピークを、高い部分に小さなピークを持つ分布パターンを示した。大きなピークの部分は G1 期から S 期初期における 2C 状態の DNA 量を、小さなピークの部分は G2 期における 4C 状態の DNA 量を反映しており、2 ピーク間は、S 期の状態を示すものと考えられる。したがって、増殖する余地が存在する状態の細胞は、DNA 合成と細胞分裂を活発に行っている対数増殖期にあると考えられる。細胞が

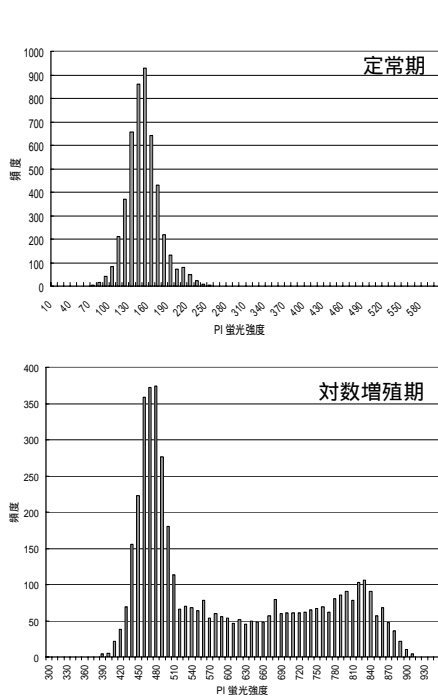


図-1 定常期、対数増殖期におけるDNA蛍光強度の頻度分布
横軸はPI蛍光強度、縦軸は頻度を示す。

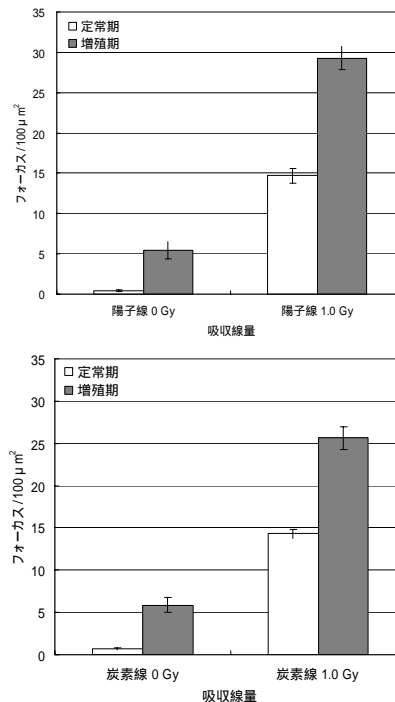


図-2 定常期、対数増殖期における -H2AX フォーカス形成
横軸は吸収線量を示し、上段は陽子線、下段は炭素線での結果を示す。縦軸は、ビーム軸とは垂直な核の断面積100 μm²あたりの -H2AXフォーカス数を示す。カラム内のバーは標準誤差を示している。

稠密に増殖した状態では、図-1 上段に示したようにピークは蛍光強度が低い側に 1 箇所しか見られず、このことから細胞は、DNA 合成を止めて分裂停止状態にある、すなわち、定常期にあると考えられる。

定常期、対数増殖期における、非照射時、及び、粒子線照射時の単位核断面積あたりの -H2AX フォーカス数を図-2 に示した。非照射時、単位核断面積あたりの -H2AX フォーカス数は、定常期に比べて対数増殖期の方が明らかに多い(図-2 上段左、下段左)。細胞周期と -H2AX フォーカス数の関係を調べるために、横軸に核断面積を、縦軸に単位核断面積あたりのフォーカス数を取って分布を調べると(図-3 上段)、定常期では細胞が 140 μm² 前後に集中するのに対して、増殖期では、100 から 300 μm² に広く分布し、140 μm² 前後と、220 μm² 前後の 2 つの分布のピークが見られることが分かる。このことは、増殖期では S 期に核内の DNA 量が増加するにつれて核容積や断面積が増加したためであると考えられる。定常期、対数増殖期、それぞれについて、単位核断面積あたりの -H2AX フォーカス数の分布を見ると、定常期での分布は、ほぼ低い値に集中するのに対して、対数増殖期では、核断面積の増加につれて単位核断面積あたりのフォーカス数が増加する傾向が確認できる。S 期の進行にしたがって -H2AX フォーカス数が増加することから、DNA 複製に伴い、内因性の、おそらくは複製エラーによる DSB が増加することを示唆しているものと考えられる。同様の現象は、例えば Huang

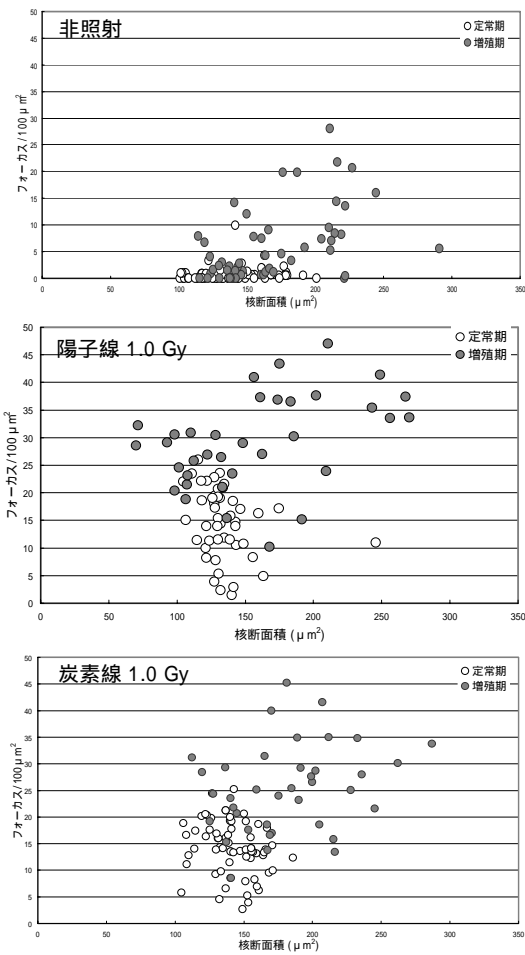


図-3 核断面積に対する -H2AXフォーカス数の分布

上段、中段、下段は、それぞれ非照射、陽子線1.0Gy照射、炭素線 1.0 Gy照射時における、ビーム軸方向に垂直な核断面積に対する、単位断面あたり -H2AXフォーカス数を示す。白抜きの丸は定常期、グレーの丸は対数増殖期を示している。横軸はビーム軸方向に垂直な核断面積を、縦軸は単位核断面積あたりの -H2AXフォーカス数を示す。

くなる。したがって、対数増殖期におけるG1期からG2期までの粒子線照射に対するDSB形成の感受性は、ほぼ一様であり、G1期からG2期を通じて定常期のG1/G0細胞よりも高い感受性を示すものと思われる。

これまでの我々の研究から、LETの高い炭素線照射の場合には、ビーム軸方向に長い -H2AXフォーカスが多数形成されることが明らかとなっている。そこで、このようなビーム軸方向に沿った長いフォーカスの数についても定常期と対数増殖期で比較を行った。図-4は、定常期、対数増殖期それぞれにおける非照射時、及び陽子線 1.0Gy(図-4 上段)、あるいは炭素線 1.0Gy(図-4 下段)照射時のビーム軸方向の長さが2μm以上の -H2AXフォーカス数を示している。陽子線照射の場合、対数増殖期において、定常期と比較すると明らかに多数のビーム軸方向に長いフォーカスが形成されていた。一方、炭素線照射の場合、照射時の両期におけるビーム軸方向に長いフォーカス数は、ほぼ同じ値を示した。このような結果は、LETの小さい陽子線照射の場合には、ビーム軸に長いフォーカスの形成が、DSB形成感受性の増加の結果として、偶発的に複数のフォーカスが重なって生じたのに対して、LETの大きい炭素線照射の場合には、ビームのトラックの周囲で高いエネルギー沈積が

らによっても報告されている⁴⁾。

図-2上段右、下段右は、それぞれ陽子線 1.0Gy、炭素線 1.0Gyを照射後の単位核断面積あたりの -H2AXフォーカス数を示している。定常期、対数増殖期いずれの時期においても、フォーカス数は非照射時よりも明らかに増加した。このことは、粒子線照射によってDSBが核内に生じたことを反映している。図から明らかなようにフォーカス数の増加は、増殖期の細胞で顕著であり、陽子線照射においても炭素線照射においても、1.0Gy照射時の定常期に対する対数増殖期のフォーカス数増加分は、非照射時の増加分よりも大きい。この結果は、照射時における -H2AXフォーカス数の、定常期に対する対数増殖期での増加が、単にDNA複製エラーによる自発的なDSBによるものではなく、対数増殖期では粒子線照射に対するDSB形成の感受性自体の増加が関与していることを示唆しているものと思われる。

このことを更に確かめるため、定常期、対数増殖期、それぞれにおいて、陽子線1.0Gy、炭素線1.0Gy照射時における、個々の細胞の核断面積に対する単位核断面積あたりの -H2AXフォーカス数の分布を調べた(図-3中段、下段)。その結果、対数増殖期では定常期と比較して全体的にフォーカス数が多いが、フォーカス数の核断面積依存性はそれほど高くないことが分かった。特に、G1期に相当すると考えられる低い核断面積のフラクションにおいても、フォーカス数の分布は定常期での分布を上回っていた。本実験では、核断面積でフォーカス数を正規化しているが、DNA量の増加に伴って核容積が倍加し、核の大きさが均等に大きくなったとすれば、深さ方向にも大きさが増加していることになる。こういった深さ方向の増加分を加味した場合、核断面積増加に伴うフォーカス数増加はほぼ見られな

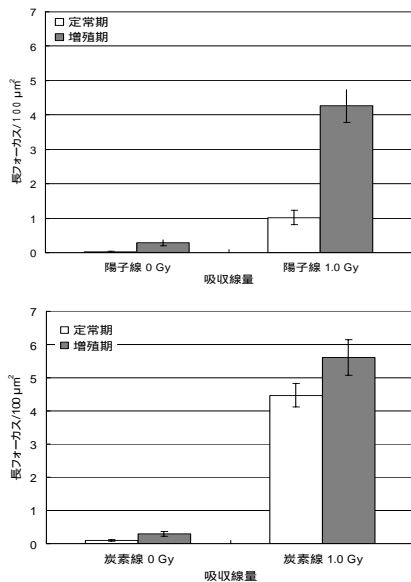


図-4 定常期、対数増殖期におけるビーム軸方向に長い -H2AXフォーカス形成
 横軸は吸収線量を示し、上段は陽子線、下段は炭素線での結果を示す。縦軸は、ビーム軸とは垂直な核の断面積100 μm²あたりの、ビーム軸方向の長さが2 μm以上ある -H2AXフォーカス数を示す。カラム内のバーは標準誤差を示している。

ありDSBが高頻度で生じるため、ビーム軸方向に長いフォーカスに関しては陽子線の場合ほど細胞状態による感受性の違いの影響を受けなかったからではないかと思われる。

本研究では、対数増殖期のBALB-3T3細胞が、定常期のBALB-3T3細胞よりも、G1期からG2期を通じた細胞周期で、DSB形成に関して粒子線照射に対する高い感受性を持つことを示唆する結果を得た。このような結果は、クロマチンの高次構造が、粒子線照射に対するDSB形成感受性に大きな影響を持つことを示唆している。S期やG2期の場合は当然として、一般に対数増殖期におけるG1期の細胞と、定常期におけるG1/G0期の細胞では、クロマチンを構成するヒストンの種類に差があり、それに伴って異なるクロマチン構造を示すことが知られている。また、対数増殖期の細胞では、G1期においてもDNA複製に関するタンパク質など生産するために活発に遺伝子の転写活動を行っており、このような転写に伴うクロマチン構造の違いも影響しているのではないかと考えられる。このようなクロマチンの高次構造の違いが、DSB形成に対する閾値を下げ、特に核内の沈積エネルギーが低い部位において対数増殖

期核でより多くのDSBが形成された可能性がある。LETの高い炭素線を用いた場合に、ビームトラック方向に長い -H2AXフォーカス数が、対数増殖期と定常期でほとんど変わらなかったのに対して、LETの低い陽子線照射では、対数増殖期で顕著なビームトラック方向に長いフォーカス数が増加したことは、そのような対数増殖期におけるDSB形成閾値の低下を示唆しているのではないかと考えられる。

クロマチン構造とDSB形成との関連を示唆するような例としては、Matuoら⁵⁾は、出芽酵母にガンマ線、あるいは炭素線を照射してURA3変異体を誘導した場合、炭素線照射の場合には突然変異の生じる位置がクロマチンのリンカー部分に集中していることを報告しているが、実際の細胞においてクロマチン構造が粒子線照射後のDSB形成に影響することを示唆する結果を示したのは、本報告が初めてではないかと思われる。このようなクロマチン構造の違いによるDSB感受性の違いを突き止めることは、より高い突然変異形成率を得る手法や、突然変異の方向性をコントロールする手法の開発につながる可能性がある。本報告で用いた手法は特に核断面積により細胞周期を特定する点で不十分であり、より正確な結果を得るため、今後、細胞周期の指標として核容積を測定する、細胞周期特異的なサイクリンを細胞周期指標として用いる等の手段を講じていきたいと考えている。また、DSB修復に関連する他の因子群についても研究を進め、粒子線照射によるDNA損傷・修復と突然変異形成について明らかにし、より効率的な品種改良手法の開発につなげていきたいと考えている。

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) Dimitrieva, N. I. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(8), 2317, (2004)
- 4) Huang, X. et al.: Int. J. Oncol. 29(2), 495, (2006)
- 5) Matuo, Y. et al.: Mutat Res. 602 (1-2), 7, (2006)