

鈴木正敏 論文内容の要旨

主 論 文

放射線照射正常ヒト二倍体細胞の分裂期染色体で観察された
DNA 二重鎖切断再結合部位に残存するリン酸化ヒストン H2AX フォーカス

Phosphorylated histone H2AX foci persist on rejoined mitotic chromosomes in normal
human diploid cells exposed to ionizing radiation.

鈴木正敏、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己
Radiation Research, 印刷中

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻
(主任指導教員：朝長万左男教授 (代理))

緒言

電離放射線は多様な DNA 損傷を誘発するが、その中で細胞に対して最も致死性の高い損傷は DNA 二重鎖切断とされている。近年、放射線など DNA 二重鎖切断を誘導する処理により、ヒストン蛋白質 H2AX が、ATM 蛋白質によりリン酸化され、斑点状の局在性 (フォーカス) を示すことが明らかになった。そのためリン酸化ヒストン H2AX フォーカスは DNA 二重鎖切断部位を検出する鋭敏な指標として汎用されるようになった。しかしながら、リン酸化ヒストン H2AX フォーカスの一部は DNA 二重鎖切断の修復が十分に終了した後も長期間 (数日以上) にわたって残存し続けるので DNA 二重鎖切断自体を認識しているのではないことが予想されるが、長期残存の生物学的意義は不明なままである。

本研究では、放射線被ばくによって生じた DNA 二重鎖切断は、照射数時間以内に再結合されるものの、不完全な再結合部位に生じたクロマチン構造異常部位にリン酸化ヒストン H2AX フォーカスが存在し続けるのではないかとする仮説を提案しその是非を検証した。この仮説を検証する為に、放射線照射された細胞が DNA 二重鎖切断の修復が不完全なまま分裂期に進入すると交換型染色体異常が誘導され、染色体架橋が生ずることに着目し、被ばく後、長期間残存するリン酸化ヒストン H2AX フォーカスの存在部位と染色体架橋部位の関連性を詳細に検討した。

対象と方法

対数増殖期にある正常ヒト二倍体細胞 (HE49) に、3% 生存率線量の 4Gy (線量率 0.492Gy/分) の X 線を照射した。照射した細胞を 20 時間または 96 時間培養後、4% パラホルムアルデヒド液により室温で 10 分間固定処理し、引き続き氷冷 0.5% トライト

ン X-100 液 5 分間処理で膜透過性亢進処理をおこなった。その後、1 次抗体としてマウス抗リン酸化ヒストン H2AX(Ser139)抗体、および 2 次抗体として Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体を用いた免疫蛍光染色法によりリン酸化ヒストン H2AX を可視化し、その数と形態を観察した。分裂期染色体はヨー化プロピジウム(PI)を用いて対比染色を行った。

結果

X 線照射が引き起こす染色体切断により生ずる染色体断片には、X 線照射 20 時間あるいは 96 時間後のいずれにおいてもリン酸化ヒストン H2AX フォーカスが存在していた。しかし、染色体断片が観察される分裂中期のリン酸化ヒストン H2AX フォーカス数は照射 20 時間後で平均 8.9 個であったのに対し、切断型染色体異常数は平均 1.1 個であり、実際に存在する切断型染色体異常の数に比べてリン酸化ヒストン H2AX フォーカス数の方が多く観察されることが明らかとなった。

一方、染色体架橋は染色体断片と異なり、染色体が娘細胞へ分配される分裂後期でのみ観察されるが、X 線照射 20 時間後に存在している染色体架橋部位、および、分配が終わった染色体のいずれにもリン酸化ヒストン H2AX フォーカスが観察された。X 線照射 96 時間後には、正常に分配された染色体に存在するリン酸化ヒストン H2AX のフォーカス数は減少するが、フォーカスが存在する染色体架橋は照射 20 時間後と同じ頻度で観察されることから、染色体架橋として示されるような異常部位に存在するフォーカスは長期間残存し続けることが明らかである。

考察

染色体切断によって生ずる染色体断片部位にリン酸化ヒストン H2AX フォーカスが観察されたことは、リン酸化ヒストン H2AX フォーカスが DNA 二重鎖切断部位に生じていることを示唆する。しかし、フォーカス数は、常に切断型染色体異常数よりも多いので、DNA 二重鎖切断部位以外にもリン酸化ヒストン H2AX フォーカスが生じていると推察される。異なる動原体を持つ染色体同士が再結合することによって生じた染色体架橋部位にリン酸化ヒストン H2AX フォーカスが長期間存在し続けるので、フォーカスは、DNA 二重鎖切断自身のみならず、切断が再結合した部位にも残存し続けることを意味している。一方、リン酸化ヒストン H2AX の半減期が約 3 時間であるので、本実験では X 線照射直後に生じたリン酸化ヒストン H2AX が脱リン酸化されるために十分な時間(照射後 96 時間)追跡したが、その間、フォーカスは染色体架橋上に残存し続けていた。

以上の結果から、ヒストン H2AX のリン酸化は DNA 二重鎖切断が起因となっておこる反応であるが、DNA 二重鎖切断のみならず、二重鎖切断が再結合した部位にも残り続けていることが明らかとなった。放射線被ばくによって生じた DNA 損傷は、修復の過程で大規模なクロマチン構造変化を生じ、その構造異常部位にリン酸化ヒストン H2AX フォーカスが残存し続ける可能性を提唱する。