

小橋川 新子 論文内容の要旨

主 論 文

Ionizing radiation accelerates Drp1-dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblast-like cells.

ヒト正常線維芽細胞における、電離放射線による Drp1 依存的ミトコンドリア分裂促進による遅延的な活性酸素種の増加

小橋川 新子、鈴木 啓司、山下 俊一

Biochemical and biophysical research communications
4 巻 414 号 795 - 800 2011 年

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：永山 雄二 教授)

緒 言

放射線照射後生存して、増殖可能な細胞では、遅延性に DNA 損傷、染色体異常あるいは遺伝子突然変異などが誘発される、ゲノム不安定性が高頻度に生じることが知られている。近年、ゲノム不安定性の原因因子として、活性酸素種が考えられるようになってきた。照射後、遅延性の染色体異常を高頻度に生じるクローンにおいて細胞内活性酸素種のレベルが高いこと、そして抗酸化剤処理によって遅延性染色体異常誘発頻度が減少することが報告されている。ミトコンドリアは細胞内の主な活性酸素種産生源であることから、ゲノム不安定性を有する細胞においてミトコンドリアの機能不全が生じ、そのことで細胞内活性酸素種が増加していることが考えられる。しかしながら、放射線照射がもたらすミトコンドリアへの影響はよく分かっていない。ミトコンドリアの形態は膜と膜とが融合するフュージョンと、膜と膜が分離するフィジョンの繰り返しによって維持されている。近年、フィジョンを亢進させ、ミトコンドリアのフラグメント化が誘導された細胞において膜電位の減少が生じることが観察されている。そこで本研究においては、放射線照射後ミトコンドリアの形態が変化することによりミトコンドリア機能不全が生じると仮説し、 γ 線照射によるミトコンドリア形態変化および、ミトコンドリアの活性酸素種の産生について検討した。

対象と方法

細胞は正常ヒト二倍体線維芽細胞 (BJ-hTERT) を用いた。 γ 線照射後の細胞内の酸化

ストレスの測定には aminophenyl fluorescein (APF) 試薬を用いた。また同時に、MitoSox Red により、ミトコンドリアに局在する O_2^- レベルの測定を行った。さらに、ミトコンドリアの形態については、MitoTracker を用いてミトコンドリアを可視化し、蛍光顕微鏡下で観察することにより検討した。ミトコンドリア膜電位については MitoTracker Red と MitoTracker Green の蛍光強度比により検討した。Drp1 遺伝子のノックダウンには、Drp1 遺伝子の sh-RNA ベクター含有レンチウィルスを感染させて行った。ミトコンドリアタンパク質量の検討はウェスタンブロット法により行った。

結 果

BJ-hTERT 細胞に γ 線を照射後、経時的に細胞内活性酸素種の測定を行った結果、 γ 線照射直後に細胞内活性酸素種のレベルは線量に依存して一時的に高くなるが、その後、照射 24 時間以内に非照射レベルに戻った。興味深いことに、照射 2-3 日後から細胞内活性酸素種は再び増加し、6 Gy 照射 3 日後には、非照射時の 3.2 倍程度までそのレベルが増加した。

次にミトコンドリアにおける O_2^- 量について調べた結果も同様に、 γ 線照射 3 日後をピークに遅延的に増加した。そこで、照射後の遅延的に増加する活性酸素種とミトコンドリアの形態変化との関連について調べた。その結果、BJ-hTERT 細胞では γ 線照射によりアポトーシスが誘導されないにもかかわらず、6 Gy 照射 3 日後に約 50 % の細胞においてミトコンドリアのフラグメント化が観察された。

次に、 γ 線照射後どのようなメカニズムでミトコンドリア形態が変化するのか調べた。フィジオンを誘導する Drp1、ミトコンドリア外膜の結合を誘導する Mfn1/2、内膜の融合に働く OPA1 について、照射後これらのタンパク質のミトコンドリアへの局在量に変化しているのか調べた結果、照射後 Mfn1/2 や OPA1 のミトコンドリア分画への局在量にあまり変化は見られなかったが、照射 1、2 日後に Drp1 のミトコンドリアへの局在量が顕著に増加していることがわかった。

照射後のミトコンドリアのフラグメント化が Drp1 タンパク質によって引き起こされているのか確認するため、Drp1 をノックダウンさせた細胞において照射後のミトコンドリア形態について調べた。その結果、Drp1 ノックダウン細胞において照射後の形態変化が抑制されることが確認された。また、照射後誘導されるミトコンドリア由来の O_2^- 量の増加も Drp1 ノックダウン細胞においては抑制されることが明らかとなった。

考 察

本研究結果より照射後遅延的に細胞内活性酸素種が増加することがわかった。また活性酸素種量の経時変化とミトコンドリアの O_2^- 量増加は一致しており、遅延的なミトコンドリアの O_2^- 増加が細胞内活性酸素種の増加に関与していると結論づけることができる。更に、これらの現象と同時期にミトコンドリアのフラグメント化が生じていることがわかった。これらの事象は Drp1 をノックダウンすることで抑制されることから、照射後のミトコンドリアのフィジンの亢進と遅延的な活性酸素種の増加は相互に関連していると考えられる。放射線照射による Drp1 の局在の変化は、カルシニューリンにより Drp1 の脱リン酸化が促進すること、また放射線照射により細胞内カルシウム濃度が増加することがそれぞれ報告されていることから、放射線照射により、Drp1 のリン酸化状態の変化が誘導されることで Drp1 がミトコンドリアへの局在性を変化させていると考察できる。

以上の結果より、DNA 損傷を介さない経路によりミトコンドリア機能不全が生じ、その結果遅延的に誘導される活性酸素種が放射線によるゲノム不安定性に関与する可能性が示された。