

MS4-4

ヒストン H2AX のリン酸化とフォーカス形成の生物学的意義

鈴木正敏¹、鈴木啓司¹、児玉靖司²、渡邊正己¹
¹長崎大・院・医歯薬学・放射線生物、²大阪府立大・先端研

Biological significance of phosphorylation and focus formation of histone H2AX
 Suzuki Masatoshi¹, Suzuki Keiji¹, Kodama Seiji², Watanabe Masami¹
¹Div. Radiat. Biol., Grad. Sch. Med., Nagasaki Univ., ²Res. Instit. Adv. Sci. Tech., Osaka
 Prefecture Univ.

【緒言】

我々の生活環境中に存在する物理化学要因は、DNA を損傷し、遺伝子変異を生じ、突然変異や発癌を誘導する。それらの環境要因のうち DNA 二重鎖切断を誘起する要因は、その修復の過程で遺伝情報の欠落を生ずる可能性が高く、大規模な遺伝子組み換えの原因になると予想され環境変異原として特別に注意を払う必要がある。DNA 二重鎖切断の修復機構の分子メカニズムは、最近、次第に明らかにされてきたが、修復に伴って生ずるクロマチンなどの高次構造変化等に関する理解は極めて乏しく、この領域の研究の一層の推進が期待される。特に、環境衛生上、通常的生活レベルで晒される程度の環境要因が生体にどのように影響を及ぼし、生体がどのように応答するかを明らかにすることが重要視されている。

こうした背景にあって、本研究は、実験的に可能な低線量の X 線被曝による DNA 二重鎖切断の誘導と修復検出系の開発を行い、DNA 二重鎖切断がどのように突然変異誘導に関わるかを検討する研究の一環として実施した。

そこで、本研究では、DNA 二重鎖切断の検出指標として、放射線照射によってヒストンタンパク質 H2AX がリン酸化されることに注目した。このリン酸化は、放射線に高感受性を示す毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子産物である ATM により誘導されフォーカスを形成する。照射後初期に観察されるリン酸化ヒストン H2AX フォーカスの数は DNA 二重鎖切断数の理論値と類似していることから DNA 二重鎖切断検出の指標として広く用いられているが、照射後、サイズが大きくなって残り続けるリン酸化ヒストン H2AX フォーカスと DNA 二重鎖切断修復との関係は十分に検討されていない。本研究では照射後残り続けるサイズの大きいリン酸化ヒストン H2AX フォーカスに注目して DNA 二重鎖切断部位を反映しているか否かを分裂期の染色体上で調べた。

【対象および方法】

本研究では正常ヒト二倍体細胞を用い、X 線照射は 3 %生存率を与える線量の 4Gy を照射した。リン酸化ヒストン H2AX フォーカス、リン酸化 ATM フォーカスはそれぞれ抗リン酸化ヒストン H2AX モノクローナル抗体、あるいは抗リン酸化

ATM ポリクローナル抗体を用いた蛍光免疫染色法により検出した。

【結果】

X 線を照射されていない細胞にはリン酸化ヒストン H2AX 陽性細胞はほとんど観察されなかったが、X線を照射された細胞には、照射 30 分後に点状のリン酸化ヒストン H2AX フォーカスが核あたり平均 130 個観察された。その数は、照射後の時間経過とともに減少し、20 時間後には核あたり平均 20-40 個、96 時間後では核あたり 10 個以下まで減少した。この時点で 80 %以上の細胞がリン酸化ヒストン H2AX フォーカスを持っていた。全ての細胞でリン酸化ヒストン H2AX フォーカスとリン酸化 ATM の存在部位が一致していた。分裂期細胞でリン酸化ヒストン H2AX フォーカスの存在部位を調べると、分裂中期細胞で観察された全ての染色体断片上にリン酸化ヒストン H2AX が観察された。さらに、赤道面上に集められた染色体にもリン酸化ヒストン H2AX フォーカスが観察され、照射 96 時間後において 60 %の分裂中期細胞でリン酸化ヒストン H2AX フォーカスを持っていた。さらに分裂後期細胞では、照射後いずれの観察時間においても分配された染色体のみならず、分配されつつある染色体間に生じた染色体架橋上にもリン酸化ヒストン H2AX フォーカスが観察された。

【考察】

照射後、いずれの時間においても分裂中期染色体断片上にリン酸化ヒストン H2AX フォーカスが存在した。通常、染色体断片は DNA 二重鎖切断が修復されずに分裂期に入った細胞で観察されるので、リン酸化ヒストン H2AX フォーカスは DNA 二重鎖切断部位を反映することを示唆している。さらに、誤った DNA 二重鎖切断末端同士が再結合した結果生じている染色体架橋上にもリン酸化ヒストン H2AX フォーカスが検出されるので DNA 二重鎖切断そのものばかりでなく、再結合が終了した部位もリン酸化の引き金である可能性も考えられる。DNA 二重鎖切断によりその近傍のクロマチン構造が変化することから、リン酸化ヒストン H2AX フォーカスはそのクロマチン構造の変化を反映している可能性が考えられる。