

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19848

研究課題名（和文）超解像度顕微鏡による生きた細胞のDNA損傷修復過程のリアルタイム観察技術の開発

研究課題名（英文）Development of methodology for monitoring DNA repair process in living cells using a super-resolution microscope

研究代表者

中村 麻子（Nakamura, Asako）

茨城大学・理工学研究科（理学野）・教授

研究者番号：70609601

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究計画では、従来、細胞を固定しなくては検出できなかった修飾型タンパク質の細胞内局在をリアルタイムにイメージングできる方法を開発することを目的としている。特に本研究では、DNA損傷応答に重要なタンパク質であるリン酸化型ヒストンH2AX（ γ -H2AX）に着目し、DNA損傷の発生とその修復過程のリアルタイムイメージングを最終目的として、 γ -H2AXのリアルタイムイメージング標識、超解像度広視野レーザー位相差顕微鏡の開発を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに見ることが出来なかったDNA損傷の発生とその修復過程をリアルタイムにイメージングする手法を確立するものである。傷周辺のヒストン修飾に着目していることから、これまでのように傷に局在する修復タンパク質の挙動をイメージングするのは全くことなり、傷そのもののダイナミクスをとらえることが可能となる。本研究成果は、DNAに生じた傷の「質」を明確にし、生物影響を理解するための一助となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research plan is to develop a method that can monitor intra-cellular localization of post-translational modified proteins in living cells. In brief, we focused on the phosphorylated histone H2AX protein (γ -H2AX), which is a marker of DNA double-strand break. We aimed to develop real-time imaging of γ -H2AX by using the novel ultra-resolution wide-field laser phase-contrast microscope and to clear the spatial detailed mechanism of induction of DNA damage and its repair process.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA損傷 H2AX 超解像度顕微鏡 リアルタイムイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内のタンパク質局在を調べようとした場合、一般に抗原抗体反応を利用した免疫蛍光染色を用いる。蛍光色素の種類が非常に多様であることや、蛍光顕微鏡の精度が上がってきていることなどから、現在では目的とするタンパク質の局在をほぼ正確かつカラフルな画像として得ることができる。その一方で、細胞内でのタンパク質は常に動いている、いわば生きた分子であることから、その挙動をリアルタイムで知ること重要である。その場合、緑色蛍光タンパク質 (GFP) のような蛍光タンパク質と目的とするタンパク質とを融合したタンパク質を細胞内に発現させることで、リアルタイムイメージングが可能である。しかし、目的とするタンパク質が何かの生物応答に伴って修飾を受けた形のタンパク質の場合リアルタイムイメージングは困難である。例えば、DNA 損傷の分子マーカーとして広く用いられるリン酸化型 H2AX (γ -H2AX) は、DNA 損傷が生じた部位にのみ生じる de novo 反応産物であることから、非修飾の H2AX タンパク質と GFP との融合タンパク質を細胞内で発現させても、どの H2AX がリン酸化されているのかわからない。つまり、これまで全くリアルタイムにイメージングすることが出来なかった標的である。そこで、本研究計画では、 γ -H2AX をリアルタイムでモニタリングするための手法を確立し、DNA に「どのように傷が発生し、それが「どのように修復されていくのか」をリアルタイムにイメージングすることを目指した。

2. 研究の目的

本研究計画では、細胞を固定しなくては検出できなかった修飾型タンパク質の細胞内局在をリアルタイムにイメージングできる方法を開発することを目的とした。具体的には DNA 損傷マーカーとして知られているリン酸化型ヒストン H2AX (γ -H2AX) のリアルタイムイメージング手法を確立し、これまでスナップショット的に解析されていた DNA 損傷の発生とその修復過程をリアルタイムに解析することを目的とした。

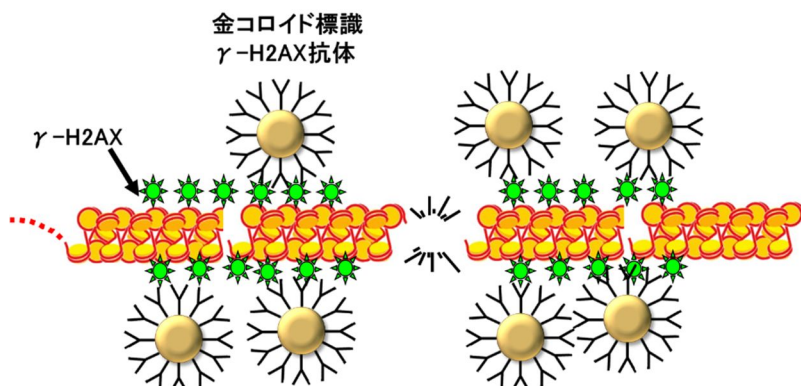
3. 研究の方法

本研究では、 γ -H2AX のリアルタイムイメージングを実現するために、(1) 80nm 相当の金コロイド等で γ -H2AX 抗体を標識し、細胞核内への導入を行った。また、(2) 超解像度広視野レーザー位相差顕微鏡の開発を共同で行った。具体的には 80nm 微粒子や細胞の核内構造を位相差で観察できるほどの超解像度を有する顕微鏡を開発した。

4. 研究成果

本研究開発を行った超解像度広視野レーザー位相差顕微鏡については、搭載するレーザーの品質が非常に大きく影響をしていることが明らかとなった。現在は、蛍光色素などによる染色をすることなく細胞小器官を観察できるレベルにまで至っている。

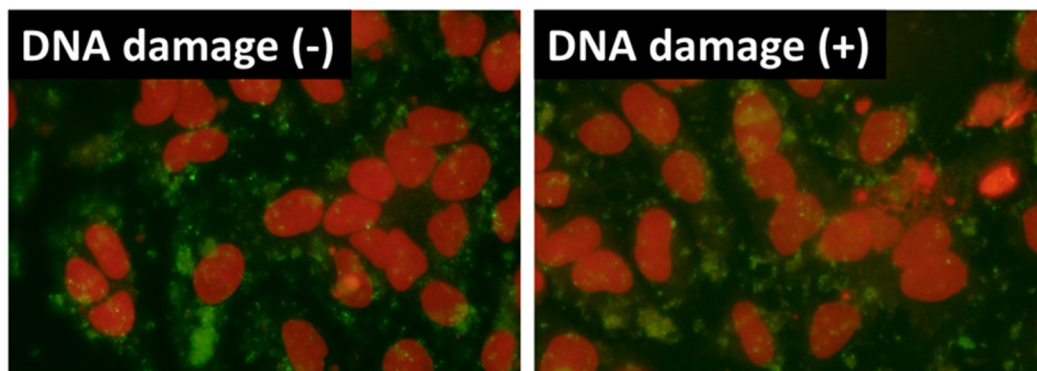
また、リン酸化型 H2AX のリアルタイムイメージングを行うために、80nm 径の金コロイド粒子によって γ -H2AX に対する抗体を標識することで γ -H2AX をリアルタイムにイメージングできるか検討を行った。まず、80nm 径の金コロイド粒子による γ -H2AX 抗体の標識を行った後に、金コロイド標識抗体をセンダイウイルス由来エンベロープにてパッケージングし、細胞導入を試みた【図 1】。



【図 1】金コロイド標識抗体による γ -H2AX のリアルタイムイメージングの概略

導入後の細胞に対しDNA損傷を誘発し、 γ -H2AXに対する免疫染色を行い導入効率および γ -H2AXの局在変化を検討した。その結果、一定量の金コロイド標識 γ -H2AX抗体の細胞質への導入は確認できたものの、標識抗体の核内への移行および γ -H2AXのDNA損傷部位への局在を十分に検出することはできなかった【図2】。

このことは、細胞質の修飾タンパク質のリアルタイムイメージングは実現可能であるが、現時点で核内タンパク質のリアルタイムイメージングについては、より効率的に核内まで標識プローブを導入する方法など再検討する必要があることを示している。



【図2】金コロイド標識した γ -H2AX抗体（あらかじめ蛍光色素で標識されている抗体を使用）を導入した細胞におけるDNA損傷薬剤添加後の γ -H2AX局在変化

いずれの細胞においても、細胞質に金コロイド標識した蛍光 γ -H2AX抗体のシグナルを確認することができる。薬剤処理後の細胞では、一部の細胞で核内での γ -H2AX局在を確認できるが、多くの蛍光シグナルは細胞質で認められている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakamura AJ
2. 発表標題 Monitoring DNA damage levels using -H2AX detection in vivo-future application of the assessment of biological effect of radiation exposure-.
3. 学会等名 3rd International Symposium of Quantum Beam Science at Ibaraki University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大泉昂之, 中村麻子
2. 発表標題 老化に伴うDNA損傷修復能力低下の原因解明とその生体影響解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ZOU RENQING, 中村麻子
2. 発表標題 H2AXのDNA損傷修復機能解明を目的としたゲノム部位特異的損傷誘発実験システムの開発
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大泉昂之, 中村麻子
2. 発表標題 老化に伴うDNA損傷修復能力低下の原因解明とその生体影響解析
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第32回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------