

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：82502

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06501・19K21563

研究課題名(和文)DNA損傷・損傷応答とミトコンドリア活性変化の相関の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the relationship of DNA lesion / DNA damage response and changes in mitochondrial activity

研究代表者

神長 輝一 (Kaminaga, Kiichi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学領域・博士研究員(任常)

研究者番号：90825176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：放射線による細胞小器官への影響は未解明な部分が多く、ATP産生を担うミトコンドリアへの影響は放射線影響を評価に重要である。本研究ではDNA損傷および損傷応答とミトコンドリア量・活性変化の関係性を明らかにするために、X線マイクロビームを用いて細胞核、細胞質にのみX線を照射し、ミトコンドリア量・活性の後経時的な変化を観察した。その結果、照射数日後に細胞核照射によりミトコンドリア量が増加し、一方細胞質照射では減少することが明らかになった。この時、ミトコンドリア膜電位には照射部位特異的な変化は観察されなかった。これはDNA損傷および損傷応答によるミトコンドリア量増加の可能性を示唆していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は細胞核への限定的なX線照射によってもミトコンドリア量増加が誘発されることを明らかにした。ミトコンドリア量の増加はDNA損傷応答に必要なATPの産生量を増加させると同時に、活性酸素種の生成も増加するため、正・負両面の影響を細胞に与える可能性があり、さらに詳細な検討が必要である。また、オルガネラが直接放射線のヒットを受けない可能性がある低線量被ばくにおいても、核に放射線がヒットした場合にはDNA損傷によりオルガネラへ何らかの影響が誘発される可能性を示唆しており、ミトコンドリア以外のオルガネラへの影響を解明していく必要性を示唆すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The effects of ionizing radiation on organelles are largely unknown, and the effects on mitochondria which take on the most of ATP production are important for assessing the radiation effects. In this study, in order to clarify the relationship between DNA damage / DNA damage response and changes in mitochondrial mass and activity, X-ray microbeam was used to irradiate only the cell nucleus and cytoplasm. The chronological changes of mitochondrial mass and activity were measured by JC-1 staining. As a result, several days after irradiation, it was clarified that the mass of mitochondria was increased by nuclear irradiation and decreased by cytoplasmic irradiation. At this time, irradiation site-specific change was not observed in the mitochondrial membrane potential. This may suggest that the possibility of increase of mitochondrial mass was caused by DNA damage and damage response.

研究分野：放射線生物

キーワード：ミトコンドリア 放射線影響 X線マイクロビーム 細胞周期 Fucci

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞内 ATP 産生の大半を担う重要な細胞小器官である一方で、機能不全に陥ったミトコンドリアからは活性酸素種が放出され細胞内に酸化損傷を誘発する。放射線の生物影響解明には、被ばく時のミトコンドリア機能変化、ミトコンドリアへの放射線影響を解明する必要がある。過去の研究から X 線照射 1 日から 3 日後にミトコンドリア量が増加することは明らかである (引用文献 1)。しかし、細胞全体へ X 線を照射しているため、観察されたミトコンドリア量増加が、DNA あるいはミトコンドリアのいずれへの損傷に起因する現象であるかは未解明のままである。さらに、DNA 損傷修復が最も盛んに行われる損傷誘発直後から数時間間に ATP 量やミトコンドリア量変化に関する報告はない。

2. 研究の目的

本研究では通常の室内線源および、X 線マイクロビームを用いて損傷部位特異的な、放射線照射直後から数日にわたる細胞内の ATP 量、ミトコンドリアの量あるいは膜電位の経時変化を解明することで、DNA 損傷とミトコンドリア機能変化の関係性を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

細胞周期可視化システムである Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (Fucci) を導入したヒト正常線維芽細胞 (BJ) に X 線マイクロビームを用いて細胞核あるいは細胞質のみに X 線を照射することで、DNA 損傷あるいはミトコンドリアをはじめとする細胞小器官への損傷がミトコンドリア量増加に関与するのかを明らかにする。(引用文献 2) 本研究で使用する高エネルギー加速器研究機構 フォトンファクトリー に設置されている X 線マイクロビーム照射装置は、文字通りマイクロメートルオーダー (~5 μ m) の X 線を細胞に照射できる装置であり、さらに光軸中に金製の微小ロッドを挿入することで細胞質にのみ X 線を照射することができる (図 1) (引用文献 3)。この時、二次元培養中の細胞核の上面と底面に存在する細胞質の量は非常に微量であるため、細胞核を狙った照射を行った場合に生じる細胞質・細胞小器官への影響は無視できる範囲であると考えられる。さらに照射に使用する X 線のエネルギーは 5.35 keV であり、二次電子の飛程は 1 μ m 程度と計算されるため、照射範囲外への線量付与は限りなく少ないと考えられる。

X 線マイクロビーム照射後のミトコンドリア活性および量の定量は 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) を用いた。ATP の定量はルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を利用した。

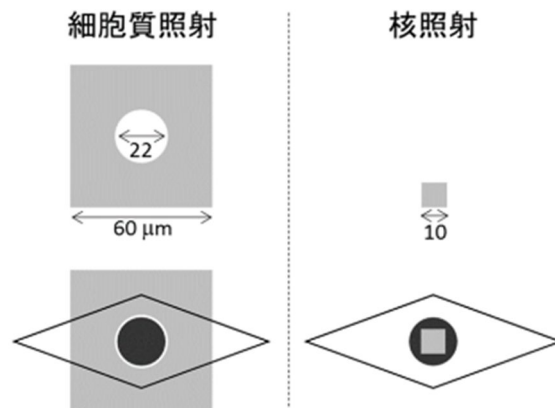


図 1 マイクロビーム照射のイメージ
細胞内部分照射に使用するマイクロビームの模式図を上段に、細胞への照射イメージを下段に示す

4. 研究成果

照射数日後に細胞核照射を行った場合にミトコンドリア量が増加し、一方細胞質照射を行った場合には減少することが明らかになった。この時、ミトコンドリア膜電位には照射部位特異的な変化は観察されなかった (図 2) (引用文献 4)。今回の結果は過去の研究で明らかにされていた X 線照射後のミトコンドリア量増加が細胞核への損傷、つまり DNA 損傷により誘発されていたことを示唆していると考えられ、細胞小器官への放射線影響研究を実施する場合には、DNA 損傷により誘発される現象とその細胞小器官への損傷により誘発される現象を切り分けて評価することが重要であることを示唆すると考えられる。

通常の X 線照射装置および X 線マイクロビームを用いて BJ-1 h-TERT Fucci 細胞に X 線 6 Gy を照射し、ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を利用した細胞内 ATP 計測を行った。X 線照射装置を用いた場合には、これまでに報告があるように照射数日後に細胞内 ATP 量の増加が観察された。本研究で使用した BJ-1 h-TERT Fucci 細胞は放射線照射により細胞分裂をスキップする mitotic skip が誘発されることが知られており、照射数日後に観察された細胞内 ATP 量の増加は、mitotic skip が誘発され 1 細胞あたりのミトコンドリア量が通常よりも増加したことによ

り生じたと考えられる。X線マイクロビームを用いた場合には議論に十分な精度の結果を得ることができなかった。X線マイクロビームは1細胞ずつ照射を行うため、6Gyの照射には1細胞あたり約30秒を要する。また、照射ステージは大気開放されているため、迅速にマイクロビーム照射を終える必要があり、一度に照射できる細胞は数十個に限られる。しかしながら、この細胞数ではルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いた細胞内ATP量計測に不十分であり、議論に必要な計測精度を担保することができなかったと考えられる。

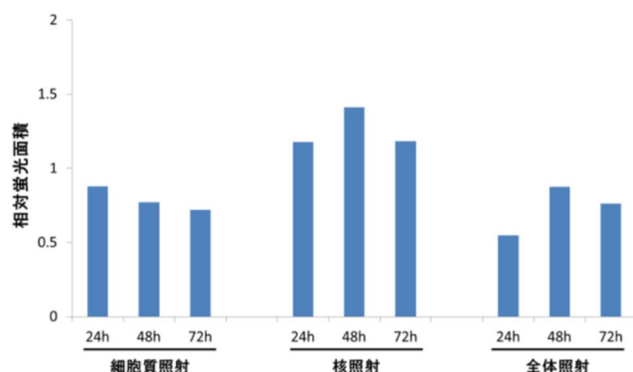


図2 照射部位特異的なミトコンドリアの経時変化

<引用文献>

1. Yamamori, T. *et al.* Analysis of the mechanism of radiation-induced upregulation of mitochondrial abundance in mouse fibroblasts. *J. Radiat. Res.* **58**, 292-301 (2017).
2. Sakaue-Sawano, A. *et al.* Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell* **132**, 487-498 (2008).
3. Kobayashi, K. *et al.* Development of microbeam irradiation system for radiobiology. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* **467-468**, 1329-1332 (2001).
4. 神長輝一, 宇佐美徳子, 鈴木啓司 & 横谷明德. 放射光 X線マイクロビームを用いた細胞内局所照射に対するミトコンドリアの放射線応答研究. *Phot. Fact. Act. Rep.* **35**, (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukunaga Hisanori, Kaminaga Kiichi, Sato Takuya, Butterworth Karl T., Watanabe Ritsuko, Usami Noriko, Ogawa Takehiko, Yokoya Akinari, Priese Kevin M.	4. 巻 9
2. 論文標題 High-precision microbeam radiotherapy reveals testicular tissue-sparing effects for male fertility preservation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12618
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-48772-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hamada R, Kaminaga K, Suzuki K, Yokoya A	4. 巻 183
2. 論文標題 MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL, MORPHOLOGY AND ATP PRODUCTION IN MAMMALIAN CELLS EXPOSED TO X-RAYS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiation Protection Dosimetry	6. 最初と最後の頁 98～101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rpd/ncy254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakaue Hiroki, Obata Yui, Kaminaga Kiichi, Akimitsu Nobuyoshi, Yokoya Akinari	4. 巻 183
2. 論文標題 VISUALIZATION OF THE DNA REPAIR PROCESS IN MAMMALIAN CELLS TRANSFECTED WITH EGFP-EXPRESSING PLASMID DNA AFTER EXPOSURE TO X-RAYS IN VITRO	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiation Protection Dosimetry	6. 最初と最後の頁 79～83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rpd/ncy241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神長輝一、寺田大紀、藤咲貴大、白川昌宏、五十嵐龍治、横谷明德
2. 発表標題 X線マイクロビームと蛍光ナノダイヤモンドを用いた放射線によるミトコンドリアへの影響解明にむけて
3. 学会等名 日本ミトコンドリア学会 第18回年会
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
--	---------------------------	-----------------------	----