

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24620007
研究課題名(和文) 胚性幹細胞を用いた宇宙放射線の影響解析

研究課題名(英文) Study of space radiation using ES cells

研究代表者

森田 隆 (Morita, Takashi)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70150349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：国際宇宙ステーション(ISS)での活動や、火星への宇宙飛行のように、将来、人類が種々の放射線が錯綜する宇宙空間で長期間滞在する状況を踏まえ、宇宙放射線に人類は耐えうるかを検討し対策を講じることは重要である。生物は、放射線被曝によりDNAを切断された場合、修復遺伝子によってそのDNAを修復する。我々は、哺乳動物細胞でもDNA修復機能を活性化することができれば、宇宙放射線に対してより強い耐性を獲得することができるという仮説をたて、これを検証するために、Tet-onでヒストンH2AX遺伝子を誘導するES細胞を作製し解析した結果、発現が2倍に誘導された。

研究成果の概要(英文)：It is important to estimate the influence of space radiation on the human body during long stays in space including missions to International Space Station (ISS), the Earth's moon, or Mars. In order to protect space radiation, we investigate the effect of stimulation of DNA repair genes, such as histone H2AX. We made plasmid vector using Tet-on inducing system to produce histone H2AX. The vector was introduced in ES cells and H2AX gene was induced to express by Doxycycline addition. It resulted in up-regulation of H2AX gene expression and increased number of foci of H2AX foci after irradiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：宇宙放射線 ES細胞 染色体異常

1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体DNAは、クロマチン構造を形成している。電離放射線や、化学物質などの刺激により染色体にDNA二重鎖切断(Double Strand Break; DSB)が生じると、ヒストンH2AXのSQモチーフに含まれるセリン139がリン酸化される。その結果クロマチン構造が緩み、DNA修復因子などが損傷部位にアクセスできるようになると考えられている。リン酸化したヒストンH2AXはγ-H2AXと呼ばれ、近年、DSBのマーカーとして用いられている。

2. 研究の目的

国際宇宙ステーション(ISS)での活動や、火星への宇宙飛行のように、将来、人類が種々の放射線が錯綜する宇宙空間で長期間滞在する状況を考えると、宇宙放射線に対して防御することは重要である。生物は、放射線被曝によりDNAを切断された場合、修復遺伝子の働きによりそのDNA損傷を修復する。大腸菌では、放射線照射に反応して発現が活性化されDNA修復を促す。それに対して哺乳動物では、放射線照射により修復遺伝子の発現誘導は起こらず、細胞周期に依存して発現している。そこで我々は、哺乳動物細胞でもDNA修復機能を活性化することができれば、宇宙放射線に対してより強い耐性を獲得することができると考えた。そのために、ヒストンH2AX遺伝子を高発現誘導できるES細胞を作製し、放射線に対して強い耐性を獲得できるか検討することが目的である。

3. 研究の方法

(1)ヒストンH2AX遺伝子Tet-On誘導高発現系ES細胞の作製

マウスヒストンH2AX遺伝子の開始コドンにテトラサイクリン(類似物であるドキシサイクリン)で発現を誘導するTet-Onシステムの転写活性化遺伝子rtTA2を挿入した。その下流には、遺伝子改変のためのマーカーであるネオマイシン耐性遺伝子を挿入した。さらに下流には、テトラサイクリンによる転写活性化に必要なオペレータTRE2遺伝子を挿入し、その下流にヒストンH2AX遺伝子を連結した。このような構造をもつターゲティ

ングベクターをES細胞に導入した。リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子(rtTA)を発現するTet-On調節プラスミドとtetO反復配列をもつテトラサイクリン応答因子(TRE)をコードする応答配列をゲノムを組み込んだ細胞内では、rtTAはDOXが結合したときにはじめて、TREへの結合能を持ち、それにより目的遺伝子の発現が誘導される。つまり、Tet-Onシステムを組み込めば、DOXの量を増加することで目的遺伝子の発現を促進するようコントロールすることが出来る。

ヒストンH2AX遺伝子Tet-On誘導発現用遺伝子改変したマウスES細胞はKSR培地で培養し、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン(Doxycycline; DOX)を1μg/mlの濃度で添加後2日間培養しH2AXを過剰発現させた。コントロールにはDoxを添加せずに培養したものをを用いた。

(2)ES細胞のスプレッド標本作成

凍結下で放射線照射したH2AX遺伝子ヘテロ欠損状態のES細胞を用いた。凍結ES細胞の入ったクライオチューブを37°C Water bathで融解し、あらかじめ37°Cに温めておいたEFM培地9mlを加え、コニカルチューブに移し、よく混和した。1000rpm×5minで遠心し、上清を取り除き、細胞をKSR KO DMEM(LIF+)培地で懸濁し、1%ゼラチンコートした6cmディッシュにまいた。37°Cで1時間、6時間、24時間、培養後、それぞれの細胞を回収し、15mlチューブに移した。1000rpm×5minで遠心し、細胞をPBS溶液で洗浄し、1000rpm×5min遠心後、1mlの2%パラホルムアルデヒド(PFA)溶液に懸濁し室温で20分間固定した。8000rpm×2minで遠心後、PBS溶液で細胞を2回洗浄し、200μlのPBS溶液で懸濁した。細胞をサイトスピン法により800rpm×5minで遠心し細胞をスライドガラス上に接着させた。スライ

ドガラスは数分間風乾後、PBS 溶液で 15 分間静置し、70%エタノール溶液中に 4 で保存した。

ES 細胞をスプレッドした標本を洗浄し、8%Goat Serum を含む PBS 溶液で 1 時間静置した (Blocking)。Rabbit 抗 γ -H2AX 抗体を加え、2 時間反応させ、PBS 溶液で洗浄後、Alexa 488 で 1 時間反応させた。

(3) γ -H2AX フォーカス数の計測法

γ -H2AX のフォーカス数の検出は、蛍光顕微鏡を用いて倍率 1000 倍で行った。各条件での計測は、50~100 個の ES 細胞につき、核 1 個あたりの γ -H2AX のフォーカス数を Z 軸方向に 5~8 枚に断面した像で数えた。Z 軸上に連続する 2 枚以上の画像に検出される蛍光信号を大きなフォーカスとし、1 枚の画像のみに検出されるものを小さなフォーカスとした。

4. 研究成果

ウエスタンブロットを行った結果、ドキシサイクリンを加えた ES 細胞では、非投与の細胞よりも、約 2 倍 H2AX タンパクが増加していた。Tet-On システムを組み込んだマウス ES 細胞を用いて、Dox 投与により H2AX タンパクを過剰発現させ、放射線照射による γ -H2AX フォーカス数の差を調べた。まず、Dox 投与の有無による差について検討した。非照射時において、Dox 投与の有無によって大きな差は見られなかった。Dox は H2AX の発現量を Tet-On システムによって増やすものであり、非照射時では、生体内で通常細胞増殖などに伴う DNA 二重鎖切断に対しても、普段から存在する H2AX だけでも、DSB の修復に十分な量であるため、Dox によって H2AX を過剰発現しても、 γ -H2AX フォーカスの数は増えなかったと考えられる。そこで、H2AX を過剰発現させたマウス ES 細胞について γ -H2AX フォーカス数への影響を調べた。ドキシサイクリン (Dox) 投与群と非投与群の ES 細胞に放射線を照射し 6 時間培養した細胞と、対照として 0 Gy で 6 時間培養した細胞について、同様の解析を行った。放射線照射をし

ていない 0 Gy の ES 細胞では、Dox 投与した H2AX 過剰発現群と Dox 非投与群との間でフォーカスの数に変化はみられなかった。しかし、照射をした場合、Dox 投与した H2AX 過剰発現群の ES 細胞の方が対称群と比べて γ -H2AX フォーカスの数が多かった。また、核あたり多くのフォーカスを持つ細胞が多く認められた。このような結果は、ヒストン H2AX 遺伝子発現誘導により、修復を行っている部位が多いことを示しており、修復遺伝子の過剰発現の効果が修復と関連する結果が得られた。今後このような細胞において、放射線感受性が高まるか検討する。今回 Tet-On システムを用いたにも関わらず、遺伝子導入した細胞は、通常の 2 倍程度の発現になった。よりヒストン H2AX 遺伝子の高発現の細胞がその効果の検討に必要であると考え、今後は、誘導ではなく、安定に H2AX を高発現する系を用いることが必要であると考えられる。また、ヒストン H2AX 遺伝子だけでなく、DNA 二重鎖切断のプロセッシングに関する MRE11, Rad50 等の遺伝子や、相同組換え (Homologous Recombination) 修復に関する Rad51, Rad54 などの遺伝子、また、非相同末端結合 (Non-homologous End Joining) に関する Ku70, Ku80, DNAPKcs, XRRC4, DNA ligase などの遺伝子、また、ATM, ATR など DNA 損傷の調節に係る遺伝子についても誘導系を作製していくことが必要である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

(1) Yoshida, K., Hada, M., Eguchi-Kasai, K., Teramura, T., Cucinotta, F.A., Morita, T.: Detection of Chromosome Aberration by using Histone H2AX-deficient Mouse ES Cells (Heavy Ion in Therapy and Space Radiation Symposium 2013, May 15-18, 2013, Chiba, Japan

(2) Yoshida, K., Kizu, A., Hada, M., Eguchi-Kasai, K., Teramura, T., Suzuki, H., Shimazu, T., Yano, S., Shirakawa, M., Osakada, I., Kasahara, H., Cucinotta, F.A., Morita, T.: The effects of space radiation to mouse embryonic stem cells in international space station (Stem Cells), RRS annual meeting, Sep, 2014, Las Vegas, Texas.

(3) Morita, T.: Stem Cells; Effects to Frozen Mouse Embryonic Stem Cells in

International Space Station, Human Research
Project Investigators' workshop, Jan 13-15
(2015) Galveston, Texas, USA

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 隆 (MORITA, Takashi)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：70150349

(2) 研究分担者

吉田 佳世 (YOSHIDA, Kayo)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)
准教授
研究者番号：30311921

(3) 研究分担者

木津 あかね (KIZU, Akane)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教
研究者番号：30623201