

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82110

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550037

研究課題名(和文)放射線応答における細胞内小器官のシナジー効果

研究課題名(英文) Synergy effect of subcellular organelles in radiation responses

研究代表者

横谷 明德 (Yokoya, Akinari)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 先端基礎研究センター・研究主席

研究者番号：10354987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、細胞内小器官の間に放射線ストレス応答に関する協調(シナジー)効果があるかどうかを探ることにある。私たちはATP生産を担うミトコンドリアに着目し、その動態変化をライブセルイメージングにより追跡する手法を確立した。さらに放射光X線マイクロビームを利用して細胞の部分照射を行った後、その活性部位の変化を観察した。その結果、細胞質のみに照射することで遅延的な活性部位の増加が生じることを見出したが、核が照射されることでこれが阻害された。以上の結果は、細胞小器官の間に、放射線ヒットの情報を伝達するシナジー効果が存在することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to explore synergy effects of organelles in a cell exposed to ionizing radiation. We have established a technique to realize live-cell observation of morphological changes of mitochondria, which is an organelle to produce ATP. Further, we performed synchrotron X-ray microbeam irradiation to a part of a cell, and observed its membrane potential as an indicator of ATP production activity. The evidence showed that irradiating only to cytoplasm caused a delayed enhancement of mitochondrial activity, although irradiating to a cell nucleus reduced the enhancement. These results suggest that there are some synergy effects among organelles to transfer the signal of radiation hits.

研究分野：放射線生物物理学

キーワード：放射線影響 細胞小器官 シナジー効果 ミトコンドリア X線マイクロビーム 共生応答 シンクロトン放射 タイムラプスイメージング

1. 研究開始当初の背景

ゲノム分子生物学的手法の導入により、放射線による細胞核内の DNA 損傷とその修復に関する分子レベルの理解は大きく進んでいる。しかし最近、マイクロビームを用いた細胞の部分照射実験が可能となり、細胞質への照射が放射線影響の低減に極めて大きな役割を果たす可能性が示された。

細胞質にはミトコンドリアなど様々な小器官が存在している。特に ATP 産生を担うミトコンドリアは、自身の DNA を持つことから進化の過程で真核細胞に共生したバクテリアの名残を持つ特異な存在であると考えられている。太古の地球では、現在に増して生命に対する環境からのストレスの度合いは大きかったため、原始の生命たちは共生することでそのストレスからの負荷を分担し、より生存に有利なシステムを構築していった可能性がある。申請者はこのような視点から、真核細胞の内部を複数の“疑似”生命が共生する場として捉え、それぞれの“生命”の放射線に対するストレス応答がシナジー (synergy・共力作用) を持つのではないかと予測し、その検証を試みた。

2. 研究の目的

本研究ではミトコンドリアと核をモデル系として選び、放射線照射された細胞内において細胞内小器官の間に放射線ストレス応答に関するシナジー効果があるかどうかを探ることを目的とした。通常の実験室装置から得られる X 線、及び細胞核のみ、あるいはミトコンドリアの存在する細胞質のみを照射できる放射光 X 線を利用し、照射によるミトコンドリアへの影響を、その断片化あるいは膜電位を指標にした活性化の度合いをライブセル観察することで調べ、細胞核とミトコンドリアの間に、“共生応答”メカニズムがあるか否かを探索した。

3. 研究の方法

(1) 細胞内小器官の中でも特に ATP 産生を担うミトコンドリアに着目し、照射した後のミトコンドリア動態変化を、ライブセルイメージングにより追跡した。細胞はマウスの正常細胞で、細胞周期がモニターできるような Fucci 化された NMuMG-Fucci2 細胞を用いた。1 μ g/mL の Hoechst33342 及び 200nM の Mitotracker Green でミトコンドリアを染色 (37、30 分) 後、細胞に X 線を 0, 6, 8Gy 照射した。照射後細胞を、35 mm ガラスボトムディッシュに適当数の細胞を播種し、ミトコンドリアを特異的に赤色蛍光で標識できる MitoTracker Red CMXRos (100 nM) で 37 で 30 分間インキュベートして染色を行った。24 時間ごとに蛍光顕微鏡にて観察を行った。観察は、細胞培養器を備えた蛍光顕微鏡

を用いて 24 時間ごとに 120 時間ミトコンドリアの形態変化の観察を行った。ミトコンドリアの形態は、正常な “tubular”、断片化した “fragmented”、及びその中間の “intermediate” の 3 つにカテゴリー分けしてその生成頻度を定量した。

(2) さらに放射光 X 線マイクロビームを利用して、ミトコンドリアが存在する細胞質のみ、あるいは細胞核のみ、さらには細胞全体を照射する実験を、KEK・PF の BL-27B を利用して実施した。この装置は 5.35 keV の単色 X 線を任意の細胞に照射でき、四象限スリットを用いることで、ビーム形を細胞核サイズまで絞り込むことが出来る。更に、細胞核に合わせたマスクを用いて、マイクロビームが透過しない領域を作り出し、細胞質に照射することが可能である。

ヒト繊維芽細胞 (BJ1 hTERT Fucci) へ 6Gy 相当の X 線 (5.6keV) マイクロビームを、細胞核照射、細胞質照射及び細胞全体照射の 3 パターンで照射をし (Fig.1)、ミトコンドリアを経時観察した。

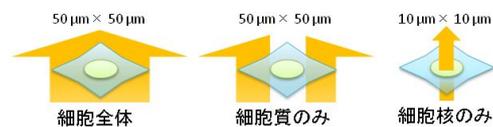


Fig. 1 放射光マイクロビームの照射パターン

照射した後、ミトコンドリアの膜電位依存性の蛍光試薬である JC-1 を用いてミトコンドリアを特異的に蛍光染色することで、照射によるその動態変化のタイムラプス観察を行った。JC-1 試薬は、膜電位が高い部分を赤に、低い部分を緑に発色させる (Fig. 2)。

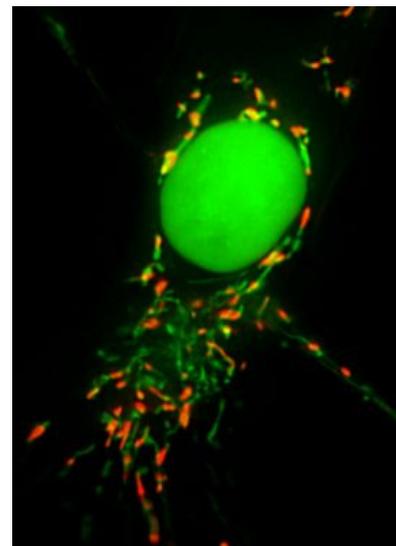


Fig. 2 JC-1 を用いて蛍光観察したミトコンドリア像。中央の丸い像は細胞核で、その周囲に緑及び赤の糸状のミトコンドリアが観察された。

4. 研究成果

(1) フラグメント化したミトコンドリアを有する細胞の頻度を、照射した細胞、非照射の細胞について観察定量した結果を Fig. 3 に示す。

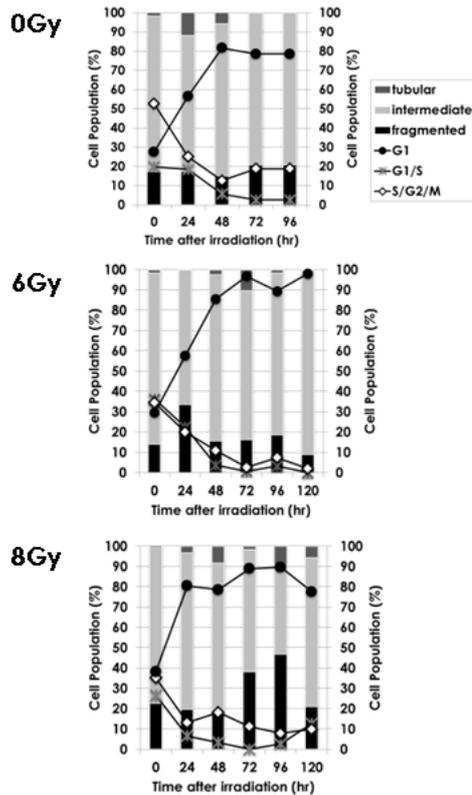


Fig. 3 特定のミトコンドリア形態を有する細胞集団の割合（棒グラフ）と特定の細胞周期にある細胞数の割合の X 線照射後の培養時間依存性

コントロール (0 Gy) と比較すると、6 Gy 照射では 24 時間後、8 Gy 照射では 96 時間後に、フラグメント化したミトコンドリアを有する細胞の割合が最大になることがわかった。また 8 Gy 照射した場合、その割合は特に細胞周期に大きく依存することはない、72-96 時間後に最大となった。(Fig. 2)

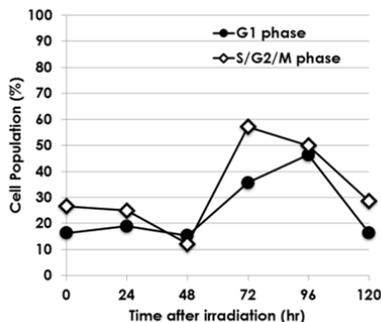


Fig. 4 フラグメント化したミトコンドリアを有する細胞集団の割合の培養時間依存性

照射後に培養を続けると、細胞はコンフルエントに達する (80% が Go 状態になる)。しかし Fig. 3 及び 4 から明らかなように、ミトコンドリアの断片化はこの Go 状態においても遅延的に誘発された。これらの結果から、細胞分裂が停止した状態であっても、ミトコンドリアの断片化を促す何らかのシグナルが、細胞核あるいは細胞質に放出されていることが示唆された。

(2) マイクロビームを利用した細胞の部分照射により、細胞核のみ、細胞質のみ、及び細胞全体の照射を行った後のミトコンドリアの活性を調べた。膜電位の高い部位 (赤色蛍光) の面積を活性の指標とし、照射後の培養時間に対してプロットした結果を、Fig. 5 に示す。

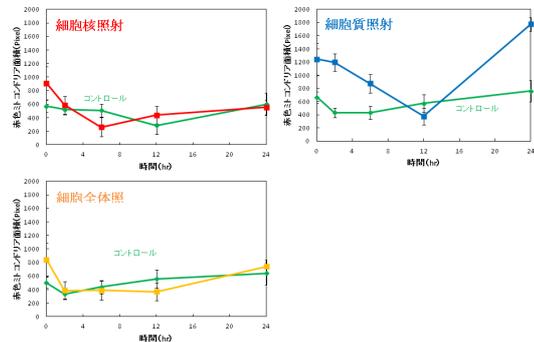


Fig. 5 ミトコンドリア活性の照射後培養時間に対する依存性

細胞核照射、及び細胞全体照射では、非照射のコントロールと大きな差は無く、培養時間に対して一定の膜電位が保たれている。しかし細胞質のみに照射を行ったところ、照射直後に大きな活性が見られ、照射後 12 時間に向けて徐々に減少するが、12 時間以降は再び上昇したことから、遅延的なミトコンドリアの活性化が引き起こされたと考えられる。

ミトコンドリアのヒットにより細胞内 ROS が増加し、細胞内のあらゆる器官においてダメージが生じる可能性がある。これらのダメージを回復させるためには、ATP 産生を亢進する必要があると考えられる。本研究で、細胞質照射後 in vivo で観察された赤色ミトコンドリア部の増大は、これを示唆していると推測される。しかし、核が照射された場合、あるいは核と細胞質が同時に照射された場合には、細胞質照射に見られた顕著な赤色ミトコンドリア部の増減は観察されなかった。核が照射され DNA が損傷を受けることで、ミトコンドリア活性を抑える何らかのシグナルが核からミトコンドリアへ伝達された可能性がある。

さらに本研究では、放射線照射によりミトコンドリアの移動速度の同調性についても調べた (Fig. 6)。その結果、放射線照射によるミトコンドリアの活性部位の移動速度

が亢進されることが示唆された。

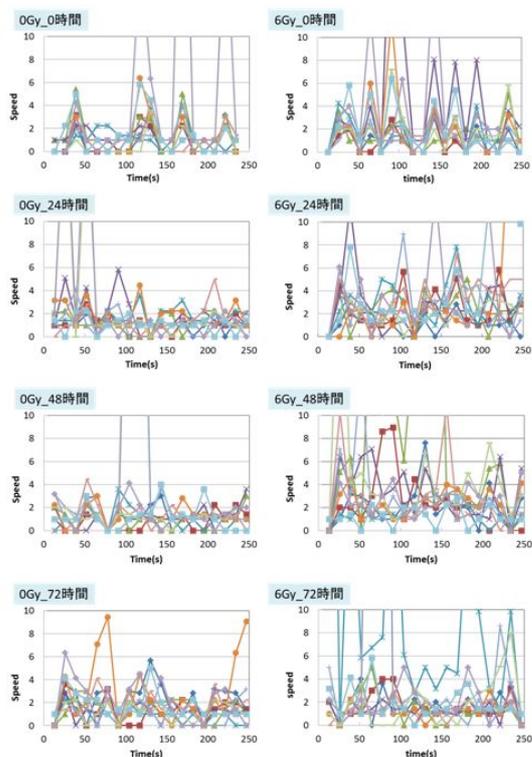


Fig. 6 X線照射によるミトコンドリアの活性部位の移動速度の培養時間依存性。左側4図は、コントロール(0 Gy)、右側のそれは6 Gy照射した細胞についての結果を示している。

放射線照射は、ミトコンドリアの運動制御システムに影響を与えられ、通常の細胞では、ミトコンドリアの移動速度の増減は同調していたが、照射によってミトコンドリアの移動速度の同調性は失われ、各ミトコンドリア活性点の速度の増減のタイミングがずれた。同調せずに、ばらばらに動くミトコンドリアの姿は、宿主からの支配を受けない細菌を思わせる。ミトコンドリアの遺伝情報は、一部のタンパク質の情報を除いて、核DNA上に存在する。これは、祖先真核細胞が細菌を支配しようとした結果だと考えられる。このことを踏まえると、ミトコンドリアの移動速度の増減の同調性が失われることは、細胞にとってはミトコンドリアの制御が行われていない可能性を示唆し、この情報が、ある種のシグナルとして細胞核に伝達され、細胞側が損傷修復応答などのストレス応答に繋がるのが予測される。

(本研究の結論)

ミトコンドリアの照射によって引き起こされる断片化や機能の不活性化・活性化などの影響は、細胞核やその他の細胞小器官に放射線ヒットの情報を伝達し、その後の細胞の応答を促すシステムが存在するのではないかと考える。放射線照射によりミトコンドリア

の移動速度の同調性が失われたが、これも他の細胞内小器官へ放射線ヒット情報として伝達されると予想される。本研究で用いたマイクロビームを利用した細胞の部分照射実験の結果は、それを裏付ける知見であると考えられる。今後はさらに、ミトコンドリア以外の細胞内小器官にも研究対象を広げ、細胞内のストレス応答に関する細胞内小器官のシナジー効果を探っていく予定である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 2件)

Noguchi, M., Kanari, Y, **Yokoya, A.**, Narita, A. and Fujii., K. LIVE-CELL IMAGING STUDY OF MITOCHONDRIAL MORPHOLOGY IN MAMMALIAN CELLS EXPOSED TO X-RAYS, *Radiat. Protect. Dosim.* 査読有, In press. doi:10.1093/rpd/ncv157.

Kanari, Y, Noguchi, M., Kaminaga, K., Sakamoto, Y. and **Yokoya, A.** Live-cell imaging study of mitochondrial morphology in mammalian cells irradiated. *J. Radiat. Res.* 査読無し **55** Suppl 1 :i129-i130 (2014). doi: 10.1093/jrr/rrt167.

(学会発表)(計 11件)

嘉成由紀子、神長輝一、坂本由佳、成田あゆみ、野口実穂、宇佐美徳子、小林克己、鈴木啓司、**横谷明德**、藤井健太郎、放射光 X線マイクロビームを利用した細胞部分照射によるミトコンドリア活性への影響、第3回物構研サイエンスフェスタ、2015年3月17-18日、茨城県つくば市

横谷明德、放射光を用いたゲノムDNA損傷の初期過程と生体修復、第28回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、2015年1月10-12日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、滋賀県草津市(招待講演)

嘉成由紀子、神長輝一、成田あゆみ、宇佐美徳子、鈴木啓司、**横谷明德**、マイクロビームを用いた細胞核照射と細胞質照射によるミトコンドリアへの影響、日本放射線影響学会第57回大会、2014年10月1-3日、鹿児島県鹿児島市

神長輝一、成田あゆみ、嘉成由紀子、坂本由佳、宇佐美徳子、小林克己、野口実穂、**横谷明德**、X線マイクロビーム照射・非照射細胞の細胞分裂のライブセルイメージング、日本放射線影響学会第57回大会、2014年10月1-3日、鹿児島県鹿児島市

横谷明德、成田あゆみ、神長輝一、嘉成由紀子、坂本由佳、野口実穂、藤井健太郎、宇佐美德子、小林克己、鈴木啓司、X線マイクロビーム照射細胞のライブイメージング追跡、日本放射線影響学会第57回大会、2014年10月1-3日、鹿児島県鹿児島市(招待講演)

嘉成由紀子、野口実穂、神長輝一、坂本由佳、**横谷明德**、鈴木啓司、X線照射によるミトコンドリアの動態変化と膜電位の関係、物構研サイエンスフェスタ2013、2014年3月18-19日、茨城県つくば市

横谷明德、放射線被ばく細胞のライブイメージング追跡、茨城大学理学部公開シンポジウム(第7回 Quantum Medicine 研究会)がん治療成績向上への取り組みと放射線被ばく影響、2014年3月9日、茨城大学理学部、茨城県水戸市(招待講演)

Noguchi, M., Kanari, Y., Narita, A., Fujii, K. and **Yokoya, A.** Relation between morphological changes of mitochondria and radiosensitivity. 16th International Symposium on Microdosimetry, October 20-25, 2013, Treviso, Italy.

野口実穂 嘉成由紀子 藤井健太郎 **横谷明德**、細胞周期の違いによる放射線感受性とミトコンドリア形態及び機能との関連性、日本放射線影響学会第56回大会、2013年10月18-20日、青森県青森市

嘉成由紀子、野口実穂、藤井健太郎、**横谷明德**、X線照射によるミトコンドリアの動態変化と膜電位の関係、日本放射線影響学会第56回大会、2013年10月18-20日、青森県青森市

Kanari, Y., Noguchi, M., Kaminaga, K., Sakamoto, Y. and **Yokoya, A.** Live-cell imaging study of mitochondrial morphology in mammalian cells irradiated. Heavy Ion in Therapy and Space Radiation Symposim (HITSR) 2013, May 15-18, 2013, Chiba, Japan.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横谷 明德 (YOKOYA Akinari)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 先端基礎研究センター・研究主席

研究者番号：10354987