

機関番号：82502
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2008～2010
課題番号：20510059
研究課題名(和文) DNA損傷時の修復蛋白質の挙動をトレースする非侵襲
センサーマウスの開発と時空解析
研究課題名(英文) Development of a novel DNA damage sensor mouse model.

研究代表者
小池 学 (KOIKE MANABU)
独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員
研究者番号：70280740

研究成果の概要(和文)：

本研究では、DNA損傷時の修復蛋白質の挙動をトレースするために、非侵襲センサーマウスを開発することを第一の目的とした。Ku70はDNA二本鎖切断損傷(DSB)を認識し、結合する修復蛋白質である。DNA修復時のKu70の挙動をトレースするために、GFPに融合したKu70(GFP-Ku70)を発現するマウスを作製した。また、導入したGFP-Ku70はDSB損傷を損傷直後から検出するために有効であることをマウス上皮細胞で確認した。

研究成果の概要(英文)：

We generated transgenic mice that were overexpressed GFP-Ku70. Furthermore, we confirmed that the GFP-Ku70 is a useful tool as a detection marker of DNA damaged sites in living mouse epithelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：Ku70、DSB、GFP、DNA repair、Ku80

1. 研究開始当初の背景

DNA二本鎖切断損傷修復機構は電離放射線や環境中の化学物質や化学療法剤により損傷を受けたDNAを修復し遺伝情報を安定に維持する機構であり、齧歯類やヒト細胞では主に非同源末端結合(NHEJ)機構と相同組換え(HR)機構により修復される。他方、誘発

されたDNA損傷が完全に修復されないとゲノムDNA中の変異が発ガンや老化変性疾患の原因になると考えられる。細胞内ではDNAに障害が起こると傷の感知システムが働き、損傷DNAの修復や細胞周期の進行を調節する機構が働く。被ばく後の細胞が損傷DNAを修復するためには、初期応答として損傷DNAを認識し結合する蛋白質がリン酸化等の修飾を受けDNA損傷部位に移動・局在することが重要

であるが、生細胞中での局在部位を可視化することは方法論的限界によりできなかった。最近、新しい蛍光蛋白質の開発等により生体分子の生細胞中での可視化が可能になった。しかし、そのほとんど全てが培養細胞を用いた解析であり、生体（個体）での解析は行われていない。他方、修復ができない DNA 損傷を生じた細胞はアポトーシスか細胞老化機構により排除されることが培養細胞を材料とした実験から示唆されている。しかし、1) 実際に生体内でこれらの機構が働くのか、2) 働くとするアポトーシスと細胞老化の選択機構は何か、等についての詳細は解析がなされていない。ところで、哺乳類個体の細胞に生じた DNA 損傷が修復されずに残った時の細胞の運命を理解するには、生体でリアルタイムに DNA 損傷を検出しトレースするための新たな方法を開発する必要がある。蛍光や発光蛋白質による生体分子標識法は、生きた細胞内の蛋白質を検出するのに非常に優れた方法である。既に、GFP（蛍光緑色蛋白質）やホタル発光遺伝子に融合した遺伝子を発現する組換えマウスが多数開発され、発生過程での特定の細胞の運命や特定の遺伝子の転写活性化の追跡等に利用されている。しかしながら、DNA 損傷を起こした細胞や修復蛋白質の挙動をリアルタイムに検出、且つ、被ばく後の細胞の運命をトレース可能にしたマウスは開発されていない。

電離放射線による DNA 損傷の細胞内分布を高感度に検出する技術が開発され（Rogakou ら、JCB, 1999）、高線量ばかりでなく低線量放射線によっても DSB が生じることが明らかにされた。しかし、この技術では損傷部位で起こるヒストン（H2AX）のリン酸化修飾変化を特異抗体によって検出するので、細胞や組織を固定する必要がある。そのため、生体で非侵襲、且つ経時的に DSB 損傷を解析することはできない。一方、GFP を融合した H2AX の DNA 損傷部位への集積を検出することは、リン酸化抗体による方法と異なり非常に難しい（Siino ら、BBRC, 2002; 小池ら未発表）。Ku（Ku70 と Ku80）蛋白質は DSB を認識し、その末端に結合する。そして、その直後から非相同末端結合により修復にあたる。申請者らは、間接蛍光抗体法による解析や生きた齧歯類やヒト細胞内で GFP 融合蛋白質として一過性に発現させる方法により、Ku70 と Ku80 蛋白質の細胞内局在とその制御機構の一端を明らかにしてきた（小池ら、BBRC, 1998; Oncogene, 1999; JCS, 1999; ECR, 1999; BBRC, 2000; JCB, 2001; JRR, 2002）。最近、申請者らは野生型の Ku80 蛋白質と同等の修復機能を持つ GFP-Ku80 の局在・挙動を生細胞でイメージングできる細胞株を樹立した（小池ら、JRR, 2004; ECR, 2005）。それを材料に、GFP-Ku80 が DNA 損傷部位に集ま

ることを明らかにした（Toyooka ら、BBRC, 2004）。さらに、リアルタイムイメージング法により、Ku70 とヘテロダイマーを形成した GFP-Ku80 がマイクロレーザーにより生じた DNA 損傷部位に集積する様子をトレースすることに成功した（小池ら、ECR, 2008）。ところで、修復不可能な DNA 損傷を受けた生体内の細胞を被ばく直後に識別する方法は確立されていない。最近、培養細胞では、Ku70 が、修復不可能な重大な損傷領域で検出されることが報告された（Bekker-Jensen ら、JCB, 2006）。

以上の背景から、損傷 DNA に結合する DNA 修復蛋白質に融合した GFP を指標に、生体でリアルタイムに DSB を検出し、その後の DNA 修復蛋白質の挙動と損傷した細胞の運命をトレースするために、GFP-Ku70 を発現する DNA 損傷センサーマウスを開発する。

2. 研究の目的

本研究では、DSB を認識し、結合する修復蛋白質に融合した GFP を指標に生体でリアルタイムに DSB を検出し、その後の DNA 修復蛋白質の挙動と損傷した細胞の運命をトレースするための DNA 損傷センサーマウスを開発することを第一の目的とする。そして、哺乳動物個体と由来する組織や細胞を材料に放射線により生じた DSB、特に修復不能な損傷を受けた個々の細胞のその後の生死と排除される機構をアポトーシスと細胞老化機構に着目して解析する。

3. 研究の方法

本研究は以下の様に行った。GFP-Ku70 を皮膚表皮基底細胞で発現するマウスの作出を試みた。同時に、非侵襲で経時的に解析するための損傷イメージング実験システムの構築に向けた基礎実験を行った。

(1) GFP-Ku70 を皮膚表皮基底細胞で発現するマウスの作出

①発現ベクターの構築と導入遺伝子の精製

上皮細胞では、分化の状態により特異的なケラチンの発現が厳密に制御されている。そこで、外来性のセンサーとして利用する GFP 融合蛋白質の発現を皮膚の表皮基底細胞で恒常的且つ特異的に誘導するプロモーターとして表皮基底細胞で発現するケラチンのプロモーターを選択した。遺伝子工学技法により、各候補プロモーターの下流に GFP を融合した Ku70 遺伝子を連結した発現プラスミドベクターを構築した。選択した発現ベクターを大腸菌で大量複製した後に制限酵素処理を行い、GFP-Ku70 とプロモーター領域、

TATA 配列、ポリ A シグナル等からなる発現に必要な最小限の遺伝子断片にした。次いで、カラムによる DNA 精製を行った。

② GFP-Ku70 トランスジェニックマウスの作出

常法に従い、上記の DNA 溶液を C57BL/6J マウス前核期受精卵に DNA マイクロインジェクション法により導入し、作出した。尚、ファウンダーマウスのスクリーニングは導入遺伝子を検出する特異的 PCR プライマーセットによる PCR 法により行った。

③ GFP-Ku70 トランスジェニックマウスの繁殖と系統化

作出したファウンダートランスジェニックマウス系統をヘミ接合型トランスジェニックマウスとして維持するために、同系統の野生型マウス (C57BL/6J) と交配し、子孫を得た。尚、交配により導入遺伝子が子孫に遺伝することを、導入遺伝子を検出する特異的 PCR プライマーセットによる PCR 法により確認した。

④ GFP-Ku70 発現トランスジェニックマウスの上皮細胞での遺伝子産物の発現

トランスジェニックマウス尾由来の皮膚から抽出した総蛋白質を材料に、抗 GFP 抗体、抗 Ku70 抗体、抗 Ku80 抗体、抗 β -アクチン抗体を用いて、ウエスタン法による解析を行った。次に、マウス皮膚組織の GFP-Ku70 の発現を調べるために、共焦点レーザー顕微鏡によるライブセルイメージングを行った。

(2) 非侵襲で経時的に DNA 修復蛋白質の挙動を解析するための損傷イメージング実験システムの構築に向けた基礎実験

① 照射皮膚組織における放射線誘発アポトーシスと放射線誘発老化様細胞の検出

野生型マウスの皮膚で、放射線誘発アポトーシスを起こした細胞を検出するために、全身 X 線照射したマウスの皮膚組織を材料にウエスタン法と TUNEL 法による解析を行った。はじめに、アポトーシスマーカーである各種抗活性化型カスパーゼ抗体と抗切断型 PARP 抗体を用いて、照射マウス組織から抽出した総蛋白質を材料にウエスタン法による解析を行った。また、ウエスタン法と SA- β -gal 法により老化様細胞の検出を試みた。

② マウス上皮細胞における DNA 修復蛋白質 Ku70 の細胞内局在と DNA 損傷部位への集積

我々が樹立した Ku70 ノックアウトマウス由来細胞株を材料に、非侵襲で経時的に損傷を解析するためのイメージング実験システムの構築に向けた基礎的な解析を行った。

まず、(1) 内在性の野生型 Ku70 は固定した細胞を材料に、抗 Ku70 抗体を使用した免疫細胞染色法により、(2) 導入した GFP-Ku70 はライブセルイメージング法により、細胞内局在を解析した。次に、GFP-Ku70 の損傷部位での挙動をマイクロレーザー照射直後から共焦点レーザー顕微鏡法により観察した。また、マイクロレーザー照射部位に DSB 損傷が生じたことを確認するために抗リン酸化型 H2AX 抗体を用いて、免疫組織化学法による解析を行った。さらに、抗 Ku80 抗体による免疫組織化学法と抗 GFP 抗体による免疫沈降法により内在性の Ku80 と GFP-Ku70 の結合の有無を確認した。

4. 研究成果

GFP-Ku70 を皮膚表皮基底細胞で発現するマウスの開発とそのマウス系統の樹立を目指して実験を行った。同時に、非侵襲で経時的に DNA 修復蛋白質の挙動を解析するための損傷イメージング実験システムの構築を目指して、培養細胞やマウス個体を材料に種々の基礎実験を進めた。

(1) GFP-Ku70 発現トランスジェニックマウスの作出

DNA マイクロインジェクション法により DNA 溶液を注入した C57BL/6J マウス前核期受精卵を偽妊娠誘導した♀マウスの卵管に移植した結果、12 匹 (♀5、♂7) が生まれた。遺伝子型解析に供した週齢まで正常に発育した 11 匹のマウス尾から抽出・精製したゲノム DNA について、導入遺伝子を検出する特異的 PCR プライマーセットによるスクリーニングを行った。その結果、4 匹のゲノム DNA から導入遺伝子が検出された (図 1)。この結果はファウンダートランスジェニックマウス 4 系統が作出されたことを示唆する。

(2) GFP-Ku70 発現トランスジェニックマウスの繁殖と系統化

前核期受精卵への DNA マイクロインジェクションによって作出したファウンダートランスジェニックマウス 4 系統をヘミ接合型トランスジェニックマウスとして維持するために、同系統の野生型マウス (C57BL/6J) と交配し、子孫を得た (図 2)。尚、交配により導入遺伝子が子孫に遺伝することを、導入遺伝子を検出する特異的 PCR プライマーセットによる PCR 法により確認した。

(3) GFP-Ku70 発現トランスジェニックマウスの上皮細胞での遺伝子産物の発現

トランスジェニックマウス尾由来の皮膚から抽出した総蛋白質を材料に抗 GFP 抗体、抗 Ku70 抗体、抗 Ku80 抗体、抗 β -アクチン

抗体を用いてウエスタン法による解析を行った。その結果、トランスジェニックマウス由来の総蛋白質で導入遺伝子から発現した GFP-Ku70 が検出された。一方、両マウスの材料から Ku70、Ku80 と β -アクチンが検出された。次に、マウス皮膚組織の GFP-Ku70 の発現を調べるために、共焦点レーザー顕微鏡によるイメージングを行った。その結果、GFP-Ku70 の特異的な発現が上皮基底細胞で検出された。

(4) 照射皮膚組織における放射線誘発アポトーシスと放射線誘発老化様細胞の検出

野生型マウス皮膚で放射線誘発アポトーシスを起こした細胞を検出するために、全身 X 線照射したマウスの皮膚組織を材料にウエスタン法と TUNEL 法による解析を行った。はじめに、アポトーシスマーカーである各種抗活性化型カスパーゼ抗体と抗切断型 PARP 抗体を用いて、照射マウス組織から抽出した総蛋白質を材料にウエスタン法による解析を行った。その結果、脾臓に比較して、皮膚ではアポトーシスがほとんど誘発されないことが確認された。この結果は、TUNEL 法による解析でも確認された。これらの結果は、少なくとも本実験条件下では脾臓に比較し、皮膚組織は放射線誘発アポトーシスに抵抗性であることを示す。また、ウエスタン法と SA- β -gal 法による解析の結果、細胞老化を示す顕著な結果は得られなかった。

(5) 非侵襲で経時的に解析するための損傷イメージング実験システムの構築に向けた基礎実験—マウス上皮細胞における DNA 修復蛋白質 Ku70 の細胞内局在と DNA 損傷部位への集積—

我々が樹立した Ku70 ノックアウトマウス由来細胞株を材料に、DNA 修復蛋白質の挙動と DSB を非侵襲で経時的に解析するためのイメージング実験システムの構築に向けた基礎的な解析を行った。これまで、GFP-Ku70 を使用した研究や免疫細胞染色法による解析から、げっ歯類の Ku70 は主に細胞質に局在するが、照射後に細胞核内に移動局在すると報告されている (Endoh ら, 2001; Yaneva ら, 2005)。本研究で使用した GFP-Ku70 が野生型 Ku70 と同様の細胞内局在能を持つか否かを調べるために、(1) 固定後のマウス上皮細胞は抗 Ku70 抗体を使用した免疫細胞染色法により、(2) GFP-Ku70 を導入した生きたままの細胞はライブセルイメージング法により解析した。その結果、これまでの上記報告とは異なり、マウス上皮細胞では Ku70 が細胞核に局在すること、また導入した GFP-Ku70 も同様に細胞核に局在することを確認した。次に、GFP-Ku70 を発現するマウス上皮細胞にマイクロレーザー照射を行ったところ照射

直後から GFP-Ku70 が損傷部位に集積することが明らかになった。また、この損傷部位では DSB マーカーであるリン酸化型 H2AX と共局在していた。次に、ヘテロダイマーを形成して共に DNA 修復にあたるマウス Ku80 に対する抗体を用いた免疫組織化学法と抗 GFP 抗体による免疫沈降法により、内在性の Ku80 と GFP-Ku70 の結合を調べた。その結果、GFP-Ku70 と内在性の Ku80 が結合していることを示す結果が得られた。以上の結果から、マウスの作製に使用した GFP-Ku70 は野生型 Ku70 と同様にマウス細胞内で機能することが示唆された。

ところで、以上に示したマウス系統を作製する前に、当初予定していた遺伝子断片からもマウス系統の作製を試みた。その結果、注入した卵子から得られた 33 匹のマウスの中から 7 匹のファウンダーマウスが得られたが、それらファウンダーマウスと子孫のマウスからは導入遺伝子を十分発現する個体を得られなかった。そこで導入遺伝子の再設計、再構築を行った。そのためにトランスジェニックマウス系統を得るまでに予想以上に時間がかかってしまった。さらに、作製した δ 系統から子孫が得られなかったことから、解析に必要な数のトランスジェニックマウス個体が十分に得られなかった。加えて、不測の災害により、3月に予定していた実験に影響がでた。一方、本研究で作出されたトランスジェニックマウスは、これまでに報告されていないタイプの DNA 損傷センサーマウスであるので、本研究に限らず様々な研究領域で活用されることが期待される。また、マウス上皮細胞での GFP-Ku70 を用いた解析で得られた結果は、Ku70 の機能解析を進めるための基礎情報としてばかりでなく、放射線や化学療法剤を利用した応用研究を行う上で、貴重な情報となると考えている。

最後に、本研究を遂行する上で、研究代表者が所属する放射線医学総合研究所の動物管理施設、照射施設、実験動物開発等に関わる研究員や技術員の方々に、技術提供や適切な助言を始め有形無形の多大なる協力をして頂きましたことに、この場を借りて深く感謝致します。

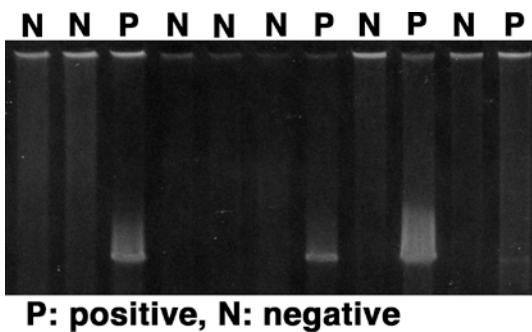


図1 トランスジェニックマウスの遺伝子型解析



図2 GFP-Ku70 トランスジェニックマウス

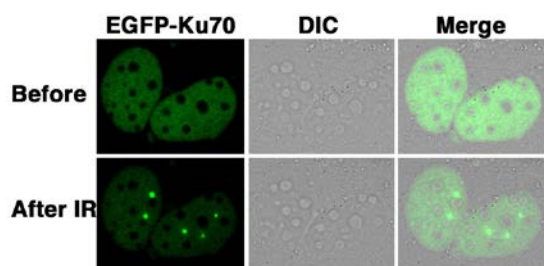


図3 マウス上皮生細胞における GFP-Ku70 の DNA 損傷部位への集積

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Koike M, Yutoku Y, Koike A.
Establishment of Ku70-deficient lung epithelial cell lines and their hypersensitivity to low-dose X-irradiation. Journal of Veterinary Medical Science, 2011, 549-554.

[学会発表] (計2件)

- ① 菅澤 純、湯徳 靖友、小池 亜紀、小池 学、エックス線照射したマウス個体におけるH2AXリン酸化修飾変化の組織特異性に関する研究、第47回アイソトープ・放射線研究発表会、2010年7月9日、日本科学未来館 (東京都)
- ② 小池 学、近紫外線レーザーマイクロ照射によるDNA修復酵素の挙動解析、第4回高崎量子応用シンポジウム、2009年10月9日、高崎シティーギャラリー・コアホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 学 (KOIKE MANABU)
独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員
研究者番号：70280740

(2) 研究分担者

小池 亜紀 (KOIKE AKI)
独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・准研究員
研究者番号：50415410
(H21：研究分担者)