

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310047

研究課題名(和文) ライブセルイメージングによる遅延性小核誘導機構の解明

研究課題名(英文) A study on mechanisms of delayed micronucleus induction using live-cell imaging methods

研究代表者

八木 孝司 (YAGI, Takashi)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80182301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：小核誘導は遺伝毒性試験の1つである。我々はライブセルイメージングによって、変異原処理後の哺乳類細胞に誘導される小核は、最初の分裂時のみならず、正常分裂した後2回目・3回目の分裂時にも誘導されることを発見した。これを遅延性小核誘導と呼ぶ。X線、UV、コルヒチン、シスプラチン、メチルニトロソウレアなど作用の異なる小核誘導因子を用いると、DNA損傷を持つ核は、損傷量に依存して最初の分裂時に高頻度に小核を誘導した。分裂装置の阻害剤は、作用がより大きいと考えられる処理2回目の分裂で小核を誘導した。すなわち遅延性小核はDNAの複製障害よりも、核の分裂阻害によって生じることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Micronucleus induction is a marker of genotoxicity. We found that the micronuclei are induced at the first cell division as well as at the second and third divisions after treatment of environmental mutagens. This phenomenon is called delayed micronucleus induction. To elucidate this mechanism, mammalian cells were treated with the agents causing different types of cellular damage, e.g., X-ray, UV, colchicine, cis-platin, methyl nitrosourea. The micronucleus induction at the first cell division was increased with the amount of DNA damage; but that at the second cell division was increased with the amount of inhibition of spindle formation.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：小核 遅延性小核誘導 環境変異原 ライブセルイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

ライブセルイメージングとは生きた細胞のオルガネラや特定のタンパク質を蛍光で標識し、細胞が分裂する様子を撮影して、オルガネラやタンパク質の動態を見る技術である。近年、様々な色の蛍光たんぱく質、オルガネラ特異的に標識する蛍光プローブ物質、撮影用高感度カメラなどの技術が急速に進歩し、様々な研究領域でライブセルイメージング技術が利用されつつある。一方、細胞分裂時の小核出現は物質のもつ遺伝毒性の指標の1つとして国が定めている。最近、我々は核、動原体、微小管などをマルチカラーで標識した細胞にX線を照射し細胞分裂系譜を観察したところ、小核の出現が最初の分裂で起きる細胞、2回目以降の分裂で起きる細胞(我々をこれを遅延性小核誘導と名付けた)、1回目の分裂でできた小核が2回目の分裂で消失する細胞などがあることがわかった。これはこれまでの固定細胞蛍光染色による小核観察ではわからなかった大きな発見である。これらの機構解明は環境変異原研究にとって非常に重要な新しいテーマである。

## 2. 研究の目的

本研究は、ライブセルイメージングによって変異原処理後の哺乳類細胞に誘導される遅延性小核誘導現象を詳細に検討し、その機構を明らかにすることを目的とする。DNAへの作用機構が異なる既知の代表的環境変異原(X線, UV, 種々の化学物質)を、オルガネラ(核, 核膜, 核小体, 細胞膜, ミトコンドリアなど)を可視化した哺乳類細胞に処理した後、小核形成過程をライブセルイメージング法で追跡し、起こった即発性および遅延性小核形成に損傷の種類が依存するかどうか、DNA二重鎖切断または染色体不分離のどちらが関わるか、どのようなDNA修復機構が関わるかを明らかにする。さらにこれらの小核形成と細胞周期との関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 以前に作製したDsRed融合型ヘテロクロマチン蛋白質HP1 $\alpha$ を安定発現するマウスC3H 3T3細胞(Sugimoto et al., 2001)を培養し、ライブセルイメージング装置を用いて、タイムラプス観察を行った。

(2) EGFP融合型PCNAをコードするプラスミドをエレクトロポレーション法によりヒトfibrosarcoma細胞に導入し、EGFP-PCNAを安定に発現する形質転換細胞を取得した。ライブセルイメージング装置を用いて、細胞周期におけるPCNAの局在化を観察した。

(3) mCherry融合型ヒストンH3を安定に発

現するマウスm5S細胞を作製し、その細胞を用いて、X線誘発小核の運命を、ライブセルイメージング装置を用いて追跡し、細胞系譜解析を行った。

(4) mCherry融合型ヒストンH3を安定に発現するマウスm5S細胞を用い、X線誘発架橋形成後の細胞を、ライブセルイメージング装置を用いて追跡し、細胞系譜解析を行った。

(5) mCherryでHistone H3が標識されたチャイニーズハムスターCHL IU細胞を用いて、紫外線(UV-C)照射によって小核を誘発した細胞を、ライブセルイメージング装置を用いて追跡し、細胞系譜解析を行った。

(6) mCherryでHistone H3が標識されたCHL IU細胞を用いて、コルヒチン、シスプラチン(cisPt)、メチルニトロソウレア(MNU)処理によって小核を誘発した細胞を、ライブセルイメージング装置を用いて追跡し、細胞系譜解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) HP1 $\alpha$ を用いたマウスC3H細胞の細胞周期進行の可視化

赤色蛍光タンパク質DsRedを用いてHP1 $\alpha$ を可視化したマウスC3H細胞を用いて、細胞周期を通したHP1 $\alpha$ の局在を観察した。その分布パターンをもとに、核内でドット状に分布する期間(G1)、ドットが点滅する期間(S)、ドット消失後の核全体に分布する期間(G2)、核膜崩壊から染色体分離が起こる期間(M)の4つに分けることができた(図1)。これより、HP1 $\alpha$ はマウス生細胞での細胞周期進行マーカーとして使用できることが示された。

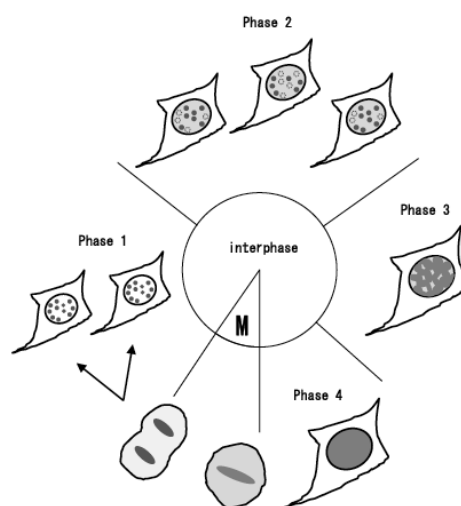


図1 マウスC3H細胞でのHP1 $\alpha$ の細胞周期を通した局在変化

(2) PCNAを用いたヒトHT1080細胞の細胞周期進行の可視化

PCNAを緑色蛍光タンパク質EGFPを用いて

可視化することで、生きたヒト HT1080 細胞の、細胞周期を通じた PCNA の局在を観察した (図 2) . HT1080 細胞の細胞周期は EGFP-PCNA の分布パターンをもとに、分裂後の核全体に分布する期間 (G1) , ドットが出現している期間 (S) , ドット消失後の核全体に分布する期間 (G2) , 核膜崩壊から染色体分離が起こる期間 (M) の 4 つに分けることができた (図 3) . 次に、ダウノルビシンの低濃度での細胞周期における作用時期を特定し、G2 期であることを確かめた. 同様にして、様々な細胞周期阻害剤の作用時期を特定できるものと思われる.

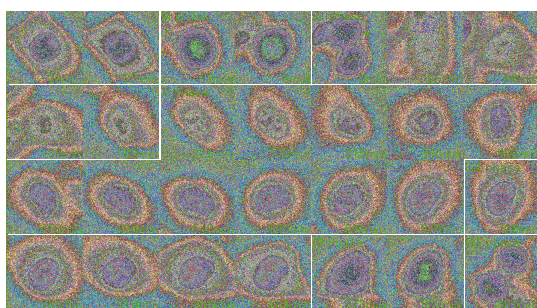


図 2 EGFP-PCNA の細胞周期を通じた分布

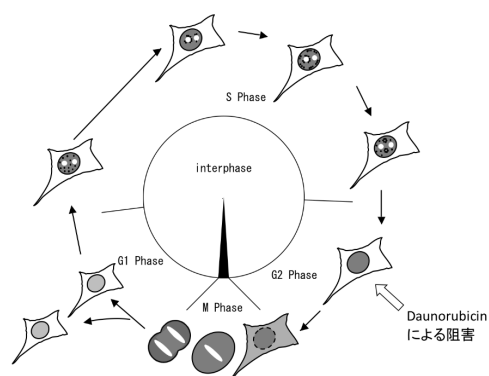


図 3 PCNA の細胞周期をとおした局在変化

### (3) X 線によって誘発された小核の系譜解析

X 線照射後 3 回目の分裂まで出現する小核について、ライブセルイメージング装置を用いて細胞系譜を追跡した. 非照射, 1Gy および 2Gy 照射した細胞についてそれぞれ, 43, 116, 69 系列の細胞系譜を解析した.

被ばく後 1~3 回分裂の間に、非照射, 1Gy, および 2Gy で生じた小核は、それぞれ 9.3%, 33.6%, および 58.0% と線量依存的に増加した. このうち、1Gy および 2Gy 被ばく後最初の分裂で生じた小核は、それぞれ 21.6% および 31.9% であり、生じた小核の大半を占めたが、1Gy 被ばくのうちの 12%, 2Gy 被ばくのうちの 26.1% は、被ばく後 2 回目の分裂以降に遅延性に小核が生じていることがわかった. 被ばく線量が高い方が、遅延性小核が多くなる傾向がみられた.

また、1Gy および 2Gy 被ばくで生じた小核が次の分裂時において存在するか、あるいは消失するかについて、それぞれ 56 および 32 細胞系列で調べた. その結果、1Gy および 2Gy 被ばくで生じた小核のうち、それぞれ 23% および 44% が次の分裂で消失し、小核がかなり不安定な存在であることがわかった. しかし、消失する理由が、小核が主核に取り込まれるからなのか、あるいはアポトーシスを起こすからなのかを明らかにすることはできなかった.

### (4) X 線によって分裂架橋した細胞の系譜解析

3Gy 被ばく後 2~3 回の分裂を追跡できた 350 細胞系列について解析した結果、分裂異常なしが 34%, 分裂異常ありが 66% (230 系列) であった. この m5S 細胞の 3Gy 被ばくにおける生存率はおよそ 30% であるので、ライブセルイメージングで分裂異常を観察した細胞は全て生存しないものと推察される. これら分裂異常のうち、架橋形成が 40% (91 系列) を占め、最も主要な分裂異常であった. 架橋形成を示した 91 細胞系列のうち、その後の運命を追跡できたのは 22 細胞系列 (24.2%) であった. このうち 12 系列 (13.2%) は分裂できずに元に戻って 2 核細胞を形成した. 9 系列 (9.9%) は架橋が断裂して分裂し、その後一方の細胞だけがアポトーシスを起こした. アポトーシスを起こさなかったもう一方の細胞の運命がどうなったのか興味深い問題であるが、本研究では追跡できなかった. 残った 1 系列 (1.1%) は架橋断裂後、両方の細胞でアポトーシスを起こした. 約 4 分の 3 (75.8%) の細胞については、細胞が観察視野から消失するなどして架橋形成後の運命を追跡することができなかった. したがって、より広域な視野での解析方法を探ることが今後の課題となる.

### (5) 紫外線によって誘発された小核の系譜解析

紫外線 0.5 J/m<sup>2</sup> 照射後 (増殖阻害率 80%) 2 回の分裂まで (40 時間) に出現する小核について、ライブセルイメージング装置を用いて細胞系譜を追跡した. 観察時間中、非照射の細胞では 45% が 2 回正常に分裂したが、UV-C 照射した細胞では 14% しか正常分裂しなかった. 残りの異常な分裂をした細胞のうち、46% の細胞が最初の分裂で小核が生じ、13% の細胞は最初に正常分裂したものの、そのうちの 17% の細胞が 2 回目の分裂時に小核を生じた (遅延性小核). 1 回目の分裂で小核を生じた細胞は、全て小核を持ったまま 2 回目の分裂をした. 非照射の細胞は小核発生頻度が低く、細胞系譜が作れなかった.

UV-C 照射した細胞は非照射細胞と比べて、最初の分裂までの時間が、約 1.5 倍長くなったが、1 回目から 2 回目の分裂までにかかる時間は、有為差がなかった.

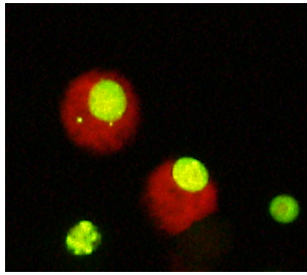


図4 紫外線照射によって誘導された小核 (固定染色)

(6) コルヒチンによって誘発された小核の系譜解析

コルヒチン 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 6時間処理後(増殖阻害率 80%) 2回の分裂まで(40時間)に出現する小核について, ライブセルイメージング装置を用いて細胞系譜を追跡した. 観察時間中, コルヒチン処理した細胞は 34%が2回正常に分裂した. 異常な分裂をした残りの細胞のうち, 11%の細胞が最初の分裂で小核を生じ, 55%の細胞は最初に正常分裂してそのうちの 26%が2回目の分裂で小核を生じた(遅延性小核). コルヒチン処理した細胞の分裂時間は最初および2回目の分裂共に無処理細胞と比べて差がなかった.

これらのことは以下のことを示している. UV-CはDNA損傷(ピリミジンダイマー)を産生し, それが最初の細胞分裂を遅延させ, 小核を誘導する. コルヒチンはチューブリンの重合を阻害し, 細胞分裂時の紡錘糸の形成を阻害する. 細胞増殖阻害率はどちらの処理でも同じであるが, DNA損傷は最初の分裂で小核を誘導し, 紡錘糸の阻害は2回目の分裂で小核を誘導する(遅延性小核).

(7) シスプラチン(cisPt), メチルニトロソウレア(MNU)処理によって誘導された小核の系譜比較

CisPtはDNA鎖を架橋し, MNUはグアニンにメチル化を生じさせることがわかっている. CisPt 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MNU 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理, それぞれ6時間処理した細胞は約80%の増殖阻害率を示す. どちらの処理でもUV-C照射と同様に処理後最初の細胞分裂時に多くの小核を誘導(それぞれ47%, 44%)し, 残りの正常分裂した細胞(それぞれ18%, 33%)のうち, それぞれ30%が2回目の分裂時に小核を誘導した(遅延性小核). またMNU 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理(細胞増殖阻害率60%)では58%の細胞が最初の細胞分裂で小核を誘導し, 最初に正常分裂した細胞(19%)のうち38%の細胞が2回目の分裂で小核を誘導した.

以上の結果, DNA損傷を持つ核は, 損傷量に依存して最初の分裂時に高頻度に小核を誘導する. 分裂装置の阻害剤は, 効果がより大きいと考えられる処理2回目の分裂で小核を誘導する. すなわち遅延性小核はDNAの複製障害よりも, 核の分裂阻害によって生じることが示唆される.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計13件)

① Ariyoshi K, Suzuki K, Watanabe M, Kodama S. Promoted instability in an X-ray irradiated chromosome transferred into Werner syndrome cells. *Radiat. Emerg. Med.*, 査読有, 4, 40-46, 2015.

② Nakagawa C, Kawakita A, Fukada T, Sugimoto K. Live-cell imaging of HP1  $\alpha$  throughout the cell cycle of mouse C3H10T1/2 cells and rhythmical flickering of heterochromatin dots in interphase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有, 78, 556-564, 2014.

③ Urushibara A, Kodama S, Yokoya A. Induction of genetic instability by transfer of a UV-A-irradiated chromosome. *Mutat. Res.*, 査読有, 766, 29-34, 2014.

④ Yamamoto M, Wakata A, Aoki Y, Miyamae Y, Kodama S. Chromosome loss caused by DNA fragmentation induced in main nuclei and micronuclei of human lymphoblastoid cells treated with colcemid. *Mutat. Res.*, 査読有, 762, 10-16, 2014.

⑤ Kawanishi M, Matsuda T, Yagi T. Genotoxicity of formaldehyde: molecular basis of DNA damage and mutation. *Front. Environ. Sci.*, 査読有, 2014. doi: 10.3389/fenvs.2014.00036.

⑥ Fujikawa Y, Kawanishi M, Kuraoka I, Yagi T. Frequencies of mutagenic translesion DNA synthesis over cisplatin-guanine intra-strand crosslinks in lacZ plasmids propagated in human cells. *Mutat. Res.*, 査読有, 770, 23-28, 2014.

⑦ Yamamoto M, Wakata A, Aoki Y, Miyamae Y, Kodama S. Induction of a whole chromosome loss by colcemid in human cells elucidated by discrimination between FISH signal overlap and chromosome loss. *Mutat. Res.*, 査読有, 749, 39-48, 2013.

⑧ Yagi T. The Achievement of Shuttle Vector Techniques in Mammalian Cell Mutation Research. *Genes Environ.*, 査読有, 35, 93-98, 2013.

⑨ Kashino G, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M, Prise KM. Increased susceptibility to delayed genetic effects of low dose X-irradiation in DNA repair deficient cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 査読有, 89,

295-300, 2013.

⑩ Kawanishi M, Fujikawa Y, Ishii H, Nishida H, Higashigaki Y, Kanno T, Matsuda T, Takamura-Enya T, Yagi T. Adduct formation and repair, and translesion DNA synthesis across the adducts in human cells exposed to 3-nitrobenzanthrone. *Mutat. Res.*, 査読有, 753, 93-100, 2013.

⑪ Kawanishi M, Kanno T, Nishida H, Takamura-Enya, Yagi T. Translesion DNA synthesis across various DNA adducts produced by 3-nitrobenzanthrone in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, 査読有, 754, 32-38, 2013.

⑫ Punchihewa C, Inoue A, Hishiki A, Fujikawa Y, Connolly M, Evison B, Shao Y, Heath R, Kuraoka I, Rodrigues P, Hashimoto H, Kawanishi M, Sato M, Yagi T, Fujii N. Identification of Small Molecule Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Inhibitor That Disrupts Interactions with PIP-box Proteins and Inhibits DNA Replication. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 287, 14289-14300, 2012.

⑬ Suzuki M, Suzuki K, Kodama S, Yamashita S, Watanabe M. Persistent amplification of DNA damage signal involved in replicative senescence of normal human diploid fibroblasts. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 査読有, 1, 1-8, 2012.

[学会発表] (計 19 件)

① 酸化チタンの粒子特性の違いが遺伝毒性に与える影響. 米田怜未, 川西優喜, 戸塚ゆ加里, 八木孝司. 日本環境変異原学会第 43 回大会. 2014 年 12 月. 一橋大学一橋講堂 (東京都千代田区).

② 細胞周期遅延を指標にした細胞毒性評価と小核試験への応用 (2). 杉本憲治, 川喜多愛, 村田香織. 日本環境変異原学会第 43 回大会, 2014 年 12 月. 一橋大学一橋講堂 (東京都千代田区).

③ PCNA を用いたマウス m5S 細胞の細胞周期進行の可視化と S 期阻害剤作用のライブセルイメージング解析. 川喜多愛, 村田香織, 杉本憲治. 日本環境変異原学会第 43 回大会, 2014 年 12 月. 一橋大学一橋講堂 (東京都千代田区).

④ PCNA を用いた HT1080 細胞の細胞周期進行の可視化と S 期阻害剤による細胞周期遅延. 上田隆晶, 川喜多愛, 村田香織, 杉本憲治. 日本分子生物学会第 37 回大会, 2014 年 11 月. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

⑤ Aurora 阻害剤 VX-680 がヒトメラノーマ細胞 (ATCC-HTB-129) の細胞周期進行に及ぼす影響のライブセルイメージング解析. 田中翔大, 上田隆晶, 川喜多愛, 村田香織, 杉本憲治. 日本分子生物学会第 37 回大会, 2014 年 11 月. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

⑥ p53 dependent timing of DNA synthesis in main nuclei and micronuclei, Seiji Kodama, Kohei Hagihara, Kazunori Shiraishi, Ai Kawakita, Kaori Murata, Kenji Sugimoto. 日本放射線影響学会第 57 回大会. 2014 年 10 月, かがしま県民交流センター (鹿児島市).

⑦ Chromosome instability transmitted by a microcell exposed to ionizing radiation, Yuki Hirakawa, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama. 日本放射線影響学会第 57 回大会. 2014 年 10 月, かがしま県民交流センター (鹿児島市).

⑧ X-ray-induced chromosome bridges analyzed by live cell imaging, Shohei Okamoto, Ai Kawakita, Kaori Murata, Kazunori Shiraishi, Kenji Sugimoto, Seiji Kodama. 日本放射線影響学会第 57 回大会, 2014 年 10 月, かがしま県民交流センター (鹿児島市).

⑨ マウス細胞におけるヘテロクロマチンタンパク質 1 $\alpha$  の細胞周期を通じた局在の可視化とヘテロクロマチンドットの周期的な明滅. 中川千雅, 川喜多愛, 深田尚, 杉本憲治. 日本農芸化学会関西支部第 485 回講演会, 2014 年 7 月. 大阪府立大学学術交流会館 (大阪府堺市).

⑩ DNA 修復機構欠損細胞におけるフェナレノンの光遺伝毒性. 谷口美由紀, 川西優喜, 八木孝司. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月. 神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市).

⑪ HeLa MR 細胞におけるシトシンメチル基転移酵素阻害剤による O<sup>6</sup>-メチルグアニン修復活性への回復. 谷口美由紀, 川西優喜, 八木孝司. 日本環境変異原学会第 42 回大会. 2013 年 11 月. 岡山コンベンションセンター (岡山市).

⑫ 細胞周期遅延を指標にした細胞毒性評価と小核試験への応用. 川喜多愛, 村田香織, 杉本憲治. 日本環境変異原学会第 42 回大会, 2013 年 11 月. 岡山コンベンションセンター (岡山市).

⑬ Induction and transmission of

micronuclei with X-rays analyzed by live cell imaging, Kohei Hagiwara, Ai Kawakita, Kazunori Shiraishi, Kenji Sugimoto, Seiji Kodama, 日本放射線影響学会第 56 回大会. 2013 年 10 月, ホテルクラウンシップ青森(青森市).

川西 優喜 (KAWANISHI, Masanobu)  
大阪府立大学理学系研究科・准教授  
研究者番号：70332963

⑭ 可視化細胞を用いた小核誘導因子曝露細胞の系譜解析. 佐藤義次, 川西優喜, 川喜多愛, 杉本憲治, 八木孝司. 日本環境変異原学会第 41 回大会. 2012 年 11 月. グランシップ(静岡市).

⑮ ライブセルイメージングによる小核保有マウス m5S 細胞のその後の運命. 川喜多愛, 村田香織, 杉本憲治, 日本環境変異原学会第 41 回大会, 2012 年 11 月, グランシップ(静岡市).

⑯ UV-A 照射染色体移入による非照射細胞の不安定化. 漆原あゆみ, 児玉靖司. 第 71 回日本癌学会学術総会. 2012 年 9 月, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館(北海道札幌市).

⑰ UV-A 照射染色体の移入による遺伝的不安定性の誘発. 漆原あゆみ, 児玉靖司, 横谷明德. 日本放射線影響学会第 55 回大会, 2012 年 9 月, 宮城蔵王ロイヤルホテル(宮城県蔵王遠刈田温泉).

⑱ X 線照射による小核誘発のライブセルイメージングを利用した解析. 萩原浩平, 川喜多愛, 白石一乗, 杉本憲治, 児玉靖司. 日本放射線影響学会第 55 回大会, 2012 年 9 月, 宮城蔵王ロイヤルホテル(宮城県蔵王遠刈田温泉).

⑲ 可視化細胞を用いた小核誘導因子曝露細胞の系譜解析」佐藤義次, 川西優喜, 杉本憲治, 八木孝司. 第 25 回変異機構研究会, 2012 年 6 月. 愛知県小牧勤労センター(愛知県小牧市).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

八木 孝司 (YAGI, Takashi)  
大阪府立大学理学系研究科・教授  
研究者番号：80182381

### (2) 研究分担者

児玉 靖司 (KODAMA, Seiji)  
大阪府立大学理学系研究科・教授  
研究者番号：00195744

杉本 憲治 (SUGIMOTO, Kenji)  
大阪府立大学生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：40196746