

S2-4

遅延性 DNA 損傷の誘発と遺伝的不安定性

鈴木啓司¹、児玉靖司²、渡邊正己¹¹長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線生物学研究室²大阪府立大学先端科学研究所

Delayed DNA damage and radiation-induced genomic instability

Keiji Suzuki¹, Seiji Kodama², and Masami Watanabe¹¹Div. Radiat. Biol., Grad. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ., ²Res. Inst. Adv. Sci. Tech., Osaka Pref. Univ.

【緒言】

放射線による遅延性影響として遅延性染色体異常あるいは遅延性突然変異の誘発が報告され、放射線照射生存細胞に長期間にわたって遺伝されるゲノム不安定性の存在が明らかになってきた。放射線誘発ゲノム不安定性は、生存細胞にゲノム変異を蓄積する原因となることから、放射線発がんのプロセスを促進するメカニズムとして注目されている。しかしながら、放射線照射によるゲノム不安定性誘発のメカニズムに関してはいまだ明らかにされていない点が多い。我々は、“放射線照射生存細胞における遅延性 DNA 二重鎖切断の誘発が種々の遅延性影響の発現に関与する”との仮説をもとに、遅延性影響の発現メカニズムを解明すべく正常ヒト培養細胞系を中心に研究を行ってきた。

【材料および方法】

対数増殖期にある正常ヒト二倍体細胞および p53 応答配列をプロモーター部位に有する *LacZ* 遺伝子を導入したヒト線維肉腫 (HT1080) 細胞株を用いた。X線発生装置により放射線を照射後、4%フォルマリン溶液で細胞を固定し、抗体反応液もしくは X-gal 反応液を作用させた。

抗体には、リン酸化 ATM あるいはリン酸化ヒストン H2AX を特異的に認識するモノクローナル抗体を用い、一次抗体の検出には Alexa488 もしくは Alexa594 で標識した抗マウス IgG 抗体を用いた。

【結果と考察】

まず、X線照射生存細胞における遅延性 DNA 損傷の誘発を明らかにするために、DNA 二重鎖切断により誘導される ATM 蛋白質のセリン 1981 のリン酸化およびヒストン H2AX のセリン 139 のリン酸化を免疫蛍光染色法により検討した。その結果、6 Gy の X線照射後 30 回以上分裂した正常ヒト二倍体細胞において、核内でのリン酸化 ATM あるいはリン酸化 H2AX の斑点状のシグナル（フォーカス）を持つ細胞の出現頻度が有意に上昇することを見いだした。X線照射により直接誘導されたリン酸化 ATM は、p53 機能の活性化を介して細胞増殖を停止させることから、照射生存細胞で観察されたリン酸化 ATM フォーカスの出現は、DNA 二重鎖切断を修復して生存した細胞において遅延

性の DNA 二重鎖切断が誘導されていることを示している。

そこでさらに、遅延性に誘導される DNA 損傷が遅延性のゲノム不安定性に関与する損傷としてチェックされるかどうかを明らかにするために、照射生存細胞における DNA 損傷チェックポイントの活性化を p53 蛋白質の転写因子としての活性化を指標に検討した。まず、p53 応答性 *LacZ* 遺伝子発現プラスミドを作成し HT1080 細胞に導入した。導入細胞に X線を照射後、生存コロニーを形成させ、各コロニーにおける *LacZ* 遺伝子発現陽性細胞の出現を観察した。その結果、20%以上の生存コロニーで、コロニー中の細胞の数%に *LacZ* 遺伝子の発現を認め、照射生存細胞において遅延性の DNA 損傷チェックポイントの活性化が起こっていることが確認された。以上の結果から、放射線照射生存細胞で誘導される遅延性 DNA 二重鎖切断が遅延性のゲノム不安定化に関与すること、また遅延性の p53 機能の再活性化がゲノム不安定化の抑制にも機能していること、が明らかになった。

【結語】

放射線によるゲノム不安定性の誘発に放射線照射生存細胞で誘導される遅延性の DNA 損傷が関与することが示された。

【参考文献】

1. K. Suzuki, R. Takahara, S. Kodama, and M. Watanabe. *In Situ* detection of chromosome bridge formation and delayed reproductive death in normal human embryonic cells surviving X irradiation. *Radiat. Res.*, 150, 375-381, 1998.
2. K. Suzuki, S. Yokoyama, S. Waseda, S. Kodama, and M. Watanabe. Delayed reactivation of p53 in the progeny of cells surviving ionizing radiation. *Cancer Res.*, 63, 936-941, 2003.
3. K. Suzuki, M. Ojima, S. Kodama, and M. Watanabe. Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability. *Oncogene*, 22, 6988-6993, 2003.