

メダカの培養細胞を用いた p53 遺伝子の機能解析

学生証番号 106337

動物生殖システム分野 張添翼

指導教員 三谷啓志

【序論】

p53 遺伝子は、細胞の恒常性の維持やアポトーシス誘導といった重要な機能を有することからゲノム安定性の維持に大きく貢献し、特に癌抑制遺伝子として広く知られている。魚類も哺乳類同様に p53 遺伝子を有しているが、メダカ p53 遺伝子の配列は哺乳類とは異なり、いくつかの修飾サイトが保存されていない。本研究では、メダカ p53 遺伝子に着目して、魚類におけるその機能、魚類と哺乳類間の p53 機能の相違点を見つけることで、p53 遺伝子の進化過程における機能の変遷や、p53 の未知の機能を解明することを目的としている。

p53 は、DNA 損傷に応答してアポトーシス、DNA 修復、細胞周期等の応答経路を活性化する。本研究では、 γ 線照射によりメダカ細胞の DNA へ人為的に DNA 二本鎖切断 (DNA Double Strand Break: DSB) を誘発し、メダカ p53 と DSB 応答との関係を解明した。

【結果及び考察】

1. p53^{-/-}細胞と野生型細胞の DSB 応答の比較

2 系統のメダカ野生型細胞と p53^{-/-}細胞を用いて、メダカ p53 の DSB 応答に関する解析を行った。アポトーシス、DNA 修復、細胞周期制御は p53 の中心機能として知られている。メダカと哺乳類の p53 の相違点を明らかにするために、AnnexinV 染色法を用いて γ 線照射後のアポトーシス発生を、またコメットアッセイにより DNA 修復を、さらに Colony formation assay により γ 線に対する感受性を解析した。

まず、CAB 系統と HdrR 系統の野生型細胞と p53^{-/-}細胞を用いて、 γ 線照射後のアポトーシス誘導を解析するために、AnnexinV でアポトーシス細胞を標識し、Facs を用いて定量的に解析した。三回の実験を行ったところ、p53^{-/-}細胞は野生型細胞より γ 線照射後にアポトーシスを起こしにくいことが明らかとなった (図 1)。次に、コメットアッセイ法を用いて、 γ 線照射により生じた DSB に対する修復能を検討した。CAB 系統と HdrR 系統の野生型細胞と p53^{-/-}細胞に γ 線を 15Gy 照射し、照射直後、照射 1h、2h 後の TM(Tail moment)値を算出して DSB 修復能を評価した。p53 欠損細胞では野生株細胞に比べて、DSB 修復の遅延が見られ、DSB 修復能が低下していることが明らかとなった (図 2)。次に、colony formation assay を用いて、異なる線量を照射した後に生存した細胞が形成したコロニー数を計数し、細胞の生存曲線から、 γ 線照射に対する感受性を比較した。結果、p53^{-/-}細胞は野生型細胞より γ 線照射後の生存率が高く、より耐性であることが明らかとなった。

2. PFT- α で処理した野生型細胞の DSB 応答

前章の結果により、メダカ p53^{-/-}細胞は哺乳類 P53^{-/-}細胞と同じように、 γ 線照射によりアポトーシスを起こしにくく、DNA 損傷修復能力が低く、 γ 線照射に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。これらの結果は、メダカ p53 も哺乳類同様に、DSB 応答機構に重要な機能を有することを示している。そこで、野生株において p53 依存経路の阻害実験を行い、p53^{-/-}細胞で明

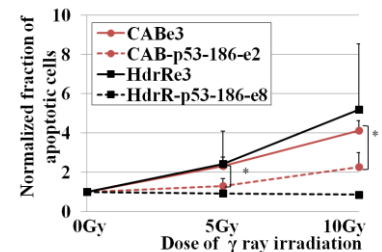


図 1 γ 線誘発アポトーシス割合
縦軸は各細胞の γ 線非照射の細胞におけるアポトーシス細胞割合を1として比率化したアポトーシス割合を示す。横軸は γ 線量を示す。エラーバーはSD値を示す。* $P < 0.05$

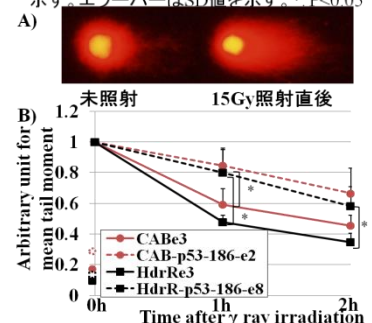


図 2 コメットアッセイ法による DSB 修復能の解析
A) γ 線照射による細胞コメット像の変化
B) 縦軸は相対 TM 値を示す。横軸は照射後の経過時間を示す。●、■、○、□ はそれぞれ CABe3、CAB-p53-186-e2、HdrRe3、HdrR-p53-186-e8 未照射時の相対 TM 値である。エラーバーはSDを示す。* $P < 0.05$

らかにした表現型が p53 欠損に起因することを確認した。哺乳類 p53 阻害剤である PFT- α (Pifithrin- α) を用いて、野生型細胞に対する p53 阻害実験を行い、同様の結果を得られるか検討した。まず、実験に使用する PFT- α の濃度決定を行い、メダカの培養細胞における最適有効濃度を 50 μ M と決定した。50 μ M の PFT- α を CAB、HdrR 両系統の野生型細胞に投与し、DSB 後のアポトーシス発生と DSB 修復能を解析した。 γ 線照射後に、50 μ M の PFT- α で処理した野生型細胞は p53-/-細胞と同様にアポトーシスを起こしにくく、また DSB 修復能が低下していることが明らかとなった。

3. p53-/-細胞、PFT- α 処理細胞における、DSB Repair Focus の解析

第 1 章と第 2 章の結果により、メダカ p53 は DSB 修復に関与していることが明らかとなった。p53 は具体的に DSB のどの段階で機能しているのかを明らかにするために、DSB の指標としてよく用いられている γ H2AX、また各修復経路解析のために野生型と p53-/-細胞で GFP 標識した 53BP1、NBS1 を発現させ、それらが放射線照射後に形成する focus 数を比較した。

DSB 初期応答において、ヒストン H2AX はリン酸化を受け、DSB 部位にフォーカスを形成する。 γ H2AX フォーカスアッセイを行った結果、 γ 線照射 1h、2h 後に、p53-/-細胞のフォーカス数は野生型細胞より多く、PFT- α 処理した野生型細胞でも同様の結果を得た (図 3)。この結果により、p53 を欠損すると、 γ H2AX フォーカスが消失しにくくなることが明らかとなった。DSB 損傷応答の NHEJ(non-homologous end-joining)修復経路において機能する因子である 53BP1 は NHEJ 進行にしたがって DSB 部位でフォーカスを形成する。NHEJ の解析のために 53BP1 フォーカスアッセイを行った。結果、 γ 線照射 1h 以後における、p53-/-細胞の 53BP1 フォーカスの数は野生型細胞より少なく、PFT- α 処理した野生型細胞でも同様の結果を得た (図 4)。DSB 修復が遅延しているのに、53BP1 のフォーカスが速く消失する理由として、p53 の欠損により 53BP1 の DSB 部位への集積が不安定になり、修復途中に損傷部位から離れやすくなってしまったためと考えられる。さらに、DSB 損傷応答の HR(homologous recombination)修復経路進行にしたがって DSB 部位でフォーカスを形成する NBS1 についても同様に解析した。その結果、 γ 線照射後 4h 以上培養した p53-/-細胞では、野生型細胞より NBS1 フォーカスが多くなり、PFT- α 処理野生型細胞でも同様の結果を得た (図 5)。この結果により、p53 を欠損すると、NBS1 フォーカスが消失しにくくなることが明らかとなった。

【結論】

本研究では、メダカ p53 も哺乳類 p53 同様に様々な DSB 応答に関与していることを明らかにした。また、DSB 修復のより詳細な解析から、メダカ p53 は NHEJ、HR に関与し、その結果 DSB 修復能が低下していることが示唆された。今後、p53-/-細胞への野生型 p53 を導入するレスキュー実験や DSB 修復に関わる他の因子についての解析を行う必要がある。

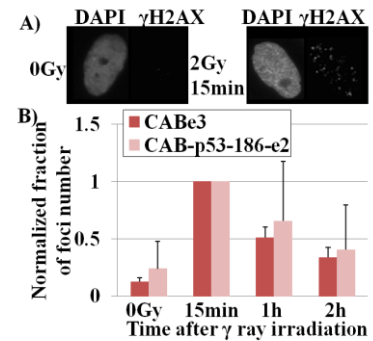


図 3 γ 線誘発の γ H2AXフォーカス数
A) γ 線照射後 γ H2AXフォーカスの形成
B) 細胞に γ 線を2Gy照射した後、一定時間経過後、各50個の細胞からフォーカス数を計測し、平均値を計算した。縦軸は γ 線照射15分後の γ H2AXフォーカス数を1とした相対値を示し、横軸は照射後の経過時間を示す。エラーバーはSDを示す。

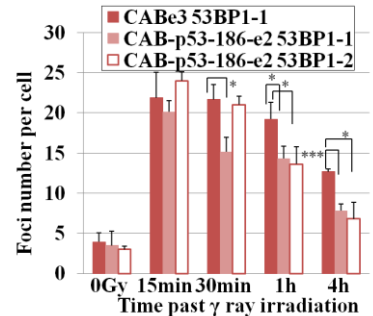


図 4 γ 線誘発の53BP1フォーカス数
細胞に γ 線を10Gy照射した後、一定時間経過後、各20個の細胞からフォーカス数を計測し、平均値を計算した。縦軸は1細胞あたりのフォーカス数、横軸は照射後の経過時間を示す。エラーバーはSDを示す。*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$

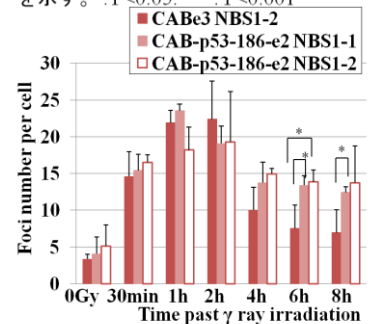


図 5 γ 線誘発のNBS1フォーカス数
細胞に γ 線を10Gy照射した後、各時間で20個の細胞からフォーカス数を計測し、平均値を計算した。縦軸は1細胞あたりのフォーカス数、横軸は照射後の経過時間を示す。エラーバーはSDを示す。*: $P < 0.05$