

論文の内容の要旨

Study on novel protein Dsup from an extremotolerant tardigrade, that improves radio-tolerance in human cultured cells

(極限環境耐性をもつクマムシ固有の新規タンパク質 Dsup による
ヒト培養細胞への放射線耐性付与に関する研究)

氏 名 橋 本 拓 磨

【序論】

遺伝情報を担うゲノム DNA は、様々な環境因子によって常に損傷を受けている。なかでも放射線などによって誘起される DNA 二本鎖切断は、正確な修復が困難であり、ゲノム情報や生命維持に重篤な影響を与える。一方で、放射線に特に高い耐性を示す生物がいくつか報告されている (Daly *et al.*, 1995. Gladyshev *et al.*, 2008)。これらの生物には、放射線障害から DNA を保護する、もしくは効率よく損傷を修復する機構が存在すると考えられるが、動物において、そうした分子機構は全く分かっていなかった。

緩歩動物に属するヨコヅナクマムシは、動物のなかでも極めて高い放射線耐性を示し、4,000 Gy の放射線を照射してもほぼ 100%の個体が生存する (図 1) (Horikawa *et al.*, 2008)。これは、ヒトの半致死量の約 1,000 倍にあたり、数 Gy の放射線が致命的となる哺乳類とは大きく異なる性質である。近年、当研究室を中心として、ゲノム解析・トランスクリプトーム解析が行われ、分子生物学的解析を行うための情報基盤が急速に整備された。このため、ヨコヅナクマムシは動物における高い放射線耐性の分子メカニズムを解析する上で優れた研究材料と考えられる。

当研究室の先行研究 (斎藤ら, 2011, 修士論文) により、ヨコヅナクマムシのクロマチン分画から、新規タンパク質 S261 (本研究での機能解析後に Damage suppressor [Dsup]と命名) が同定された。Dsup は、既知のタンパク質やモチーフと相同性を示さないクマムシ固有のタンパク質である。Dsup はその局在から DNA の保護や修復促進に寄与する良い候補と考えられたが、その分子性

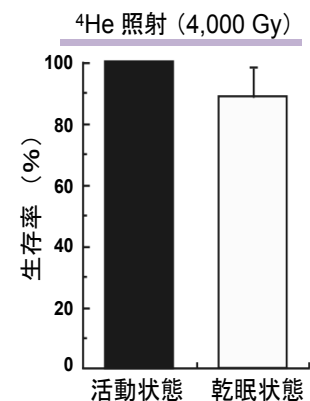


図1 ヒトの致死量の1,000倍の放射線に耐性を示すヨコヅナクマムシ
(cf.) Horikawa *et al.*, 2008

状や耐性への関与についてはまったく分かっていなかった。

私は、修士課程において、Dsup がクマムシ胚の発現細胞において核 DNA と同じ局在を示すことを明らかにした (図 2A)。また、Dsup を GFP と融合してヒト培養細胞に導入した場合も、同様に核 DNA の広い範囲に局在することを示した (図 2B)。さらに、Dsup が *in vitro* で DNA に親和性を示すこと、および DNA との相互作用および核 DNA への局在には C 末端側領域が必要十分であることを明らかにした。

博士課程において私は、Dsup の放射線耐性への寄与を解析する目的で、Dsup を定常的に発現する培養細胞株を作成し、同株における X 線照射による DNA 切断の発生への影響を解析した。さらに、Dsup 定常発現株を用いて致死的な線量の X 線照射後の生存、および細胞増殖能への影響を解析した。

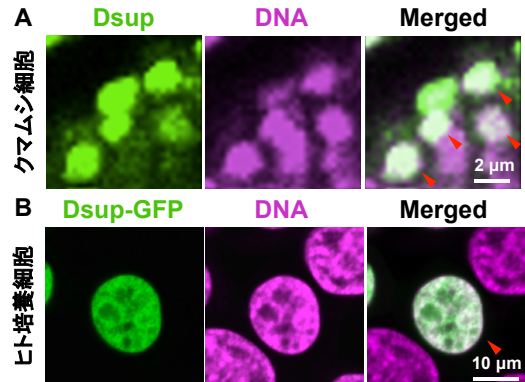


図2 クマムシ固有のタンパク質DsupはゲノムDNAと共局在する。(A) クマムシ胚における抗Dsup抗体を用いた細胞内局在解析。(B) ヒト培養細胞にDsup-GFPを一過的に発現している。(赤矢尻: Dsupを発現した細胞)

【結果】

1. Dsup を発現したヒト培養細胞では、放射線照射による DNA 損傷の発生が抑制される

まず放射線による DNA 断片の発生に Dsup が与える影響を検証する目的で、ヒト培養細胞 HEK293 を親株として CAG プロモータ下で Dsup を定常的に発現させた細胞株 Dsup_HEK293 を作成した。氷上で Dsup_HEK293 に対して 5 Gy の X 線を照射した後、ただちにアガロースゲルに包埋し中性コメットアッセイ法 (単一細胞における DNA 電気泳動法) を行った。このアッセイでは、断片化した DNA が核から泳動され、Comet Tail として検出される。その結果、Dsup を発現していない親株 (コントロール) と比較して、Dsup_HEK293 では断片化した DNA が約 40% 減少した (図 3)。X 線照射直後にコメットアッセイを行っていることを考えると、この結果は X 線照射による DNA 切断の発生自体が減少しているか、非常に速やかに修復されたことを示唆している。この点を検証するために、DNA 二本鎖切断の発生箇所に集積する γ -H2AX の Foci 数を指標として Dsup タンパク質の影響を解析した。 γ -H2AX の集積は修復完了後も数時間持続することから、DNA 二本鎖切断の発生自体を検出することが可能である。X 線を照射して 1 時間後に、免疫染色法によって γ -H2AX の Foci を可視化し、細胞核あたりの Foci 数を定量した。その結果、Dsup_HEK293 では親株と比較して、Foci 数が約 40% 減少した (図 4)。この結果は、Dsup が、ヒト培養細胞において X 線による DNA 傷害の発生自体を抑制することを示唆している。

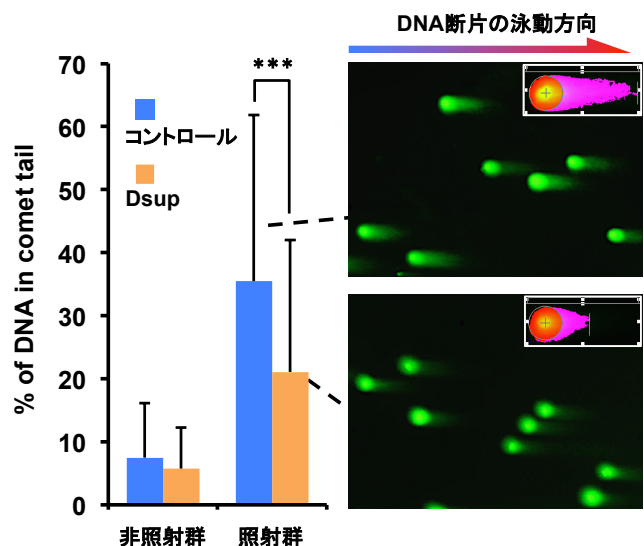


図3 コメットアッセイ法によるDNA断片の定量。Dsup発現細胞において、DNA断片量が有意に減少した。

また、Foci 数の減少が Dsup の発現に依存しているかを確認するため、Dsup_HEK293 に shRNA を発現するコンストラクトを導入し、Dsup ノックダウン細胞株 (Dsup+shDsup) を作成した。同様に X 線を照射し、 γ -H2AX の Foci 数を定量したところ、ノックダウン株は、Dsup を発現していない親株と同程度にまで Foci 数は増加し、DNA 損傷の抑制活性は完全に消失した (図 4)。これらの結果から、Dsup が X 線からの DNA 保護を担う実体であることが示された。さらに、DNA 一本鎖切断を検出するアルカリコメットアッセイにおいても DNA 断片化の抑制が観察されたこと、また X 線照射だけでなく、過酸化水素処理による DNA 切断も抑制したことから、Dsup は、放射線の間接作用である酸化ストレスによる一本鎖切断からも DNA を保護する活性をもつことが示唆された。

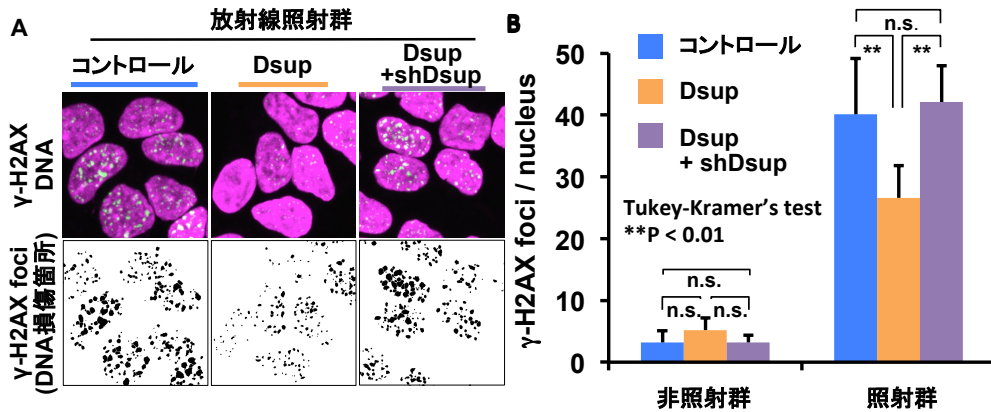


図4 抗 γ -H2AX抗体を用いた免疫染色. (A) 免疫染色像. γ -H2AX fociは、DNA損傷箇所を示す. (B) 定量結果. Dsupを定常発現させた群において、DNA二本鎖切断の発生が40 %抑制された.

2. Dsup の発現に依存して、ヒト培養細胞の放射線耐性が向上する

Dsup 発現株では、X 線照射時の DNA 損傷量が低下していたことから、親株よりも放射線への耐性が向上している可能性が考えられた。この点を検討する目的で、播種後 24 時間の細胞に対して 4Gy の X 線（増殖能を喪失させる線量）を照射し、8, 10, 12 日目に総細胞数を測定した。その結果、親株及び、Dsup+shDsup では細胞数がほとんど変わらないか日を追うごとに減少したのに対して、Dsup_HEK293 では日数の経過にともなって顕著な増加が観察された（図 5）。また、形態的にも、親株および Dsup+shDsup では、球形で底面から浮き上がった細胞が多数を占めたのに対し、Dsup_HEK293 では底面に接着し照射前と同様な形態の細胞が多数観察された（図 5A）。以上の結果は、Dsup_HEK293 において致死的な線量の X 線照射後も増殖可能な生細胞が残存したことを示しており、Dsup がヒト培養細胞の放射線耐性を向上させたと考えられた。

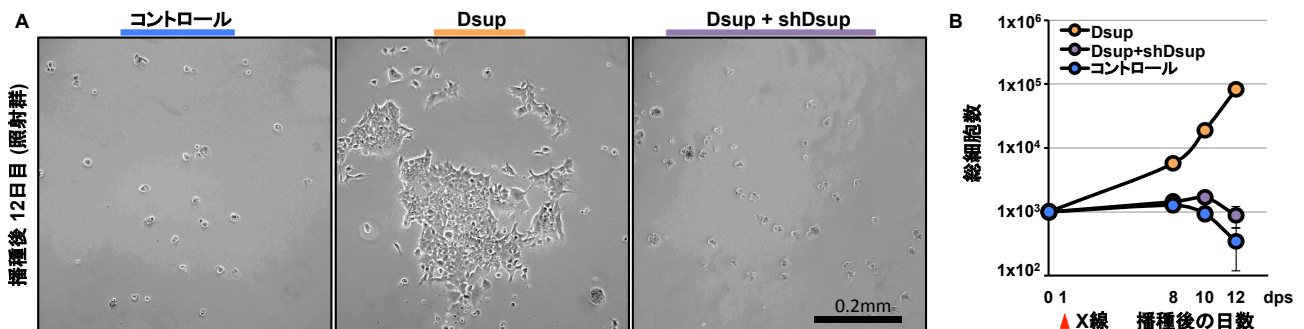


図5 (A)播種後12日目のX線照射群の位相差顕微鏡像. (B) 細胞を播種して1日後にX線(4Gy)を照射し、8, 10, 12日目に細胞数をカウントした.

3. Dsup による DNA の保護活性には C 末端側領域が必要

動物細胞において、Dsup は核 DNA の広い領域に局在する。私は、この局在様式と Dsup の DNA 保護活性との関連を検証するために、一部領域を欠失した変異 Dsup 発現株の作出を試みた。修士課程において、Dsup が DNA との親和性をもつこと、および核 DNA の広い範囲に局在するには C 末端側領域が必要十分であることを明らかにしている。そこで私は、核 DNA への局在を担う C 末端側領域のみの Dsup 変異体(Dsup-C)、もしくは C 末端側領域を欠く Dsup (Dsup Δ C) を発現するコンストラクトをヒト培養細胞 HEK293 にそれぞれ導入し、安定発現株の樹立を試みた。C 末端側領域のみを発現する株はスクリーニングの過程において、細胞の肥大化を含む形態異常が観察され、増殖能を持つ定常発現株の作出には至らなかった。一方、C 末端側領域を欠いた Dsup を導入した細胞群では形態異常や増殖能の欠失は観察されず、安定発現株を樹立することができた。得られた Dsup Δ C 株に対して、X 線を照射し、アルカリコメットアッセイ法を行ったところ、DNA の断片化は親株と同程度であり、DNA 損傷の減少は認められなかった。また、X 線照射後に γ -H2AX の Foci 数を測定したところ、Dsup_HEK 株と比較して増加することが分かった。これらの結果は、DNA との親和性、及び核 DNA への局在を担う C 末端側領域が Dsup の DNA 保護活性に重要な役割を果たすことを示唆する。

【まとめと考察】

本研究で、私は Dsup タンパク質を安定発現するヒト培養細胞株を樹立し、Dsup の発現に依存して、X 線による DNA 傷害が低減すること、また、致死的な線量(4 Gy)の X 線照射後も一部の細胞が生存し増殖能を保持することを明らかにした。これは放射線耐性動物に由来する単一のタンパク質の導入によって、ヒト培養細胞に放射線耐性を付与することに成功した初めての例である。さらに、Dsup による DNA 保護活性には、核 DNA への局在を担う C 末端側領域が必要であることを示し、DNA 近傍への局在が DNA 保護活性に重要な役割を果たすことを示唆した。

X 線照射は主に水に作用し、不安定化して発生した活性酸素種が間接的に DNA 傷害を起こすことが知られている（間接作用）。Dsup 発現細胞において、過酸化水素処理からも DNA 保護活性が認められたことから、Dsup は間接作用の活性酸素種から DNA を保護している可能性が考えられる。DNA 近傍に局在する Dsup が、DNA に対する活性酸素種の干渉頻度を低下させ、その結果として DNA が保護されているのかもしれない(図 6)。一方で、Dsup はヒト培養細胞において放射線耐性の向上をもたらしたが、クマムシにおいても放射線耐性に寄与しているかについては未だ不明である。ヒトの半致死量の約 1,000 倍にも相当するヨコヅナクマムシの放射線耐性に Dsup が関与するかどうかは、クマムシ個体に対するゲノム編集や RNAi 法などの機能阻害実験が必要である。また、ヨコヅナクマムシの高い放射線耐性を実現するには、他のタンパク質も関与している可能性がある。そして、Dsup を含むそれらタンパク質群がどのような作用機序で高い放射線耐性を実現するかを網羅的に解析することは、DNA 防護作用と細胞増殖能の維持を両立させる新たな放射線耐性の分子機構の解明につながることを期待される。

