

2018年11月28日
一般財団法人電力中央研究所

DNA 損傷と細胞周期の状態を生きた細胞で 同時に観察する手法を確立

(2018年11月23日付で英国科学誌 Scientific Reports に掲載)

ポイント

- ・放射線被ばくの影響を正しく理解するには生きた状態の細胞を長時間観察することが重要
- ・DNA 損傷と細胞周期^{*1}の状態を蛍光で同時に観察する手法をゲノム編集^{*2}技術により確立
- ・放射線による DNA 損傷が修復されてから細胞分裂する様子を詳細に捉えることに成功

概要

一般財団法人電力中央研究所（理事長：松浦昌則、本部：東京都千代田区）原子力技術研究所 放射線安全研究センターの大塚健介主任研究員、富田雅典上席研究員は、最新のゲノム編集技術を駆使して、新たに開発した合成遺伝子（Focicle と命名）を簡便かつ効率的にマウスの細胞内に導入することで、細胞内の DNA に生じる損傷と細胞周期を同時に観察することに成功しました。これにより、生きたままの細胞で放射線による被ばく影響を細胞周期の状態とともに詳細かつ定量的に評価することが可能になり、DNA 損傷の修復に呼応するように細胞分裂が進行することを見出しました。この手法はどのマウス細胞にも幅広く応用可能なため、組織・臓器を構成する細胞ごとの放射線応答動態の違いの解明や、放射線・抗がん剤等を用いたがん治療の最適化研究などにも貢献することが期待されます。本研究成果は、2018年11月23日付で英国科学誌 Scientific Reports に掲載されました。

1. 背景

がん発症の原因は、組織を作り出す幹細胞（組織幹細胞）の DNA に生じた傷（DNA 損傷）が間違っ
て修復されることで生じた傷跡（変異）が蓄積し、そのような細胞が異常増殖することにあると考えら
れています。しかし、組織幹細胞は組織内で常に増殖を繰り返しているため、放射線被ばくによる組織
幹細胞への影響を正しく理解するには、DNA 損傷の修復過程を細胞周期と合わせて定量的に評価するこ
とが重要です。

2. 研究手法・成果の特長

DNA 損傷数と細胞周期を同時に観察する新しい手法を、以下の2つのプロセスを経て、独自に確立し
ました。

① DNA 損傷と細胞周期の状態を生きた細胞の状態を観察するためのツールを作製

細胞には変異の蓄積を抑える、いくつかの仕組みが備わっていることが知られています。とりわけ重要
なプロセスが、DNA 損傷を修復する仕組み（DNA 修復）です。これは DNA 損傷部位に多数の DNA 修復
タンパク質が集積することで、損傷部位を正しく修復するものです。こうした DNA 修復タンパク質の一
部は遺伝子組換え技術を用いて蛍光タンパク質と融合させることで、生きている細胞内において、その場
所や消長を観察することが可能です。当所では、DNA 損傷の指標としてマウスの DNA 二本鎖切断^{*3}部

位に集積するタンパク質の一つである 53BP1 と、それを蛍光標識するための融合遺伝子を独自にデザインしました。また、細胞周期については、細胞周期の進行状態に応じて特異的に出現するタンパク質と様々な種類の蛍光タンパク質の融合によって異なる波長の蛍光を発する既存の技術 (FUCCI) を基盤としました (図 1)。これらの融合タンパク質を作る遺伝子群を全て 1 つにパッケージ化し、DNA 修復と細胞周期を細胞が生きた状態で同時に観察 (ライブイメージング) 可能な合成遺伝子を作ることに成功しました。DNA 修復タンパク質の集積部位は英語で foci、細胞周期は cell cycle と呼ばれるため、これらを検出するための合成遺伝子を Focicle (フォーサイクル) と命名しました。

② 様々な種類の細胞及び目的に適用可能な、簡便かつ効率的な遺伝子導入方法

合成遺伝子を細胞の既存 DNA 配列の中に導入する場合には、いくつかの問題があります。DNA には私たちの体を構成する数万の遺伝子が保存されているため、Focicle 遺伝子をランダムに DNA に挿入する方法では、他の遺伝子の中に導入されてしまう危険性があり、その操作自体ががん化を引き起こしかねません。そこで、近年開発されたゲノム編集技術を活用して、マウスの DNA のセーフハーバーサイト^{※4} に特異的、かつ簡便に Focicle 遺伝子を導入する手法を検討しました。その結果、遺伝子導入操作から 1 週間後には、狙った場所に Focicle 遺伝子が組み込まれた細胞を十分に維持することができるようになりました。

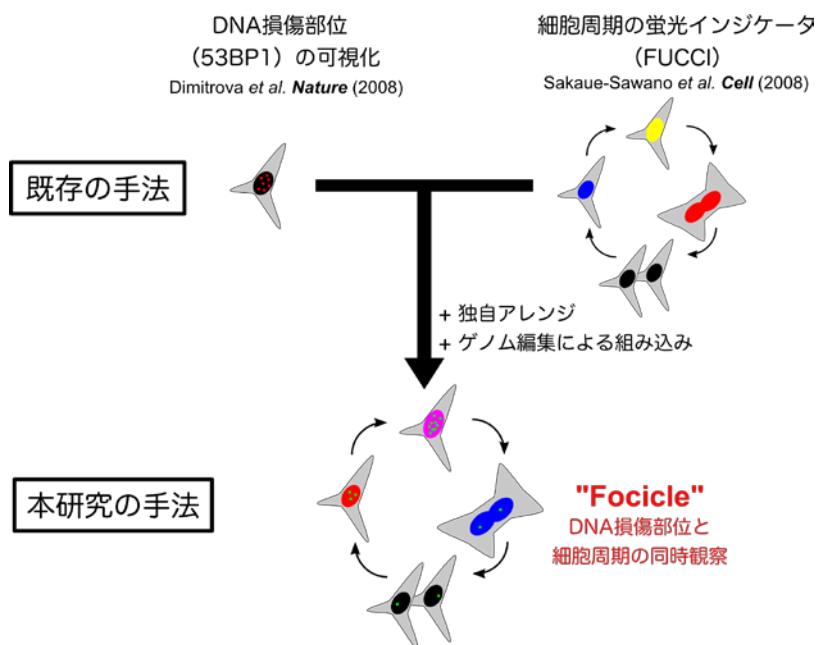


図 1 Focicle を用いたライブイメージング法

DNA 損傷に集積するタンパク質 (ヒト 53BP1) に蛍光タンパク質を融合させた手法 (Dimitrova et al. 2008) を参考に、マウス 53BP1 に黄緑色蛍光タンパク質 (YFP) を融合させた独自の遺伝子を合成しました。また、細胞周期の進行状態ごとに異なる蛍光を放つ FUCCI 技術 (Sakaue-Sawano et al. 2008) を参考に、独自に青色蛍光タンパク質 (BFP) や赤色蛍光タンパク質 (RFP) と融合させた遺伝子を人工合成しました。さらに、これらを 1 つの遺伝子にパッケージ化して、ゲノム編集によりマウス DNA 上のセーフハーバーサイトに選択的に挿入することに成功しました。

以上の方法で得られた細胞を用いて、DNA 損傷の定量化と細胞周期との同時観察を試みた結果、放射線の線量に依存して DNA 損傷が生じ、それが時間とともに消失する状況を視覚的に確認できるようになりました (図 2)。また、放射線照射とともに分裂状態が停止し、DNA 損傷の修復に呼応する形で細胞周期進行が再開するという時間相関を初めて明瞭に捉えることができました (図 3)。この仕組みは、変異の蓄積を防いで DNA の品質を維持するために重要であると考えられています。

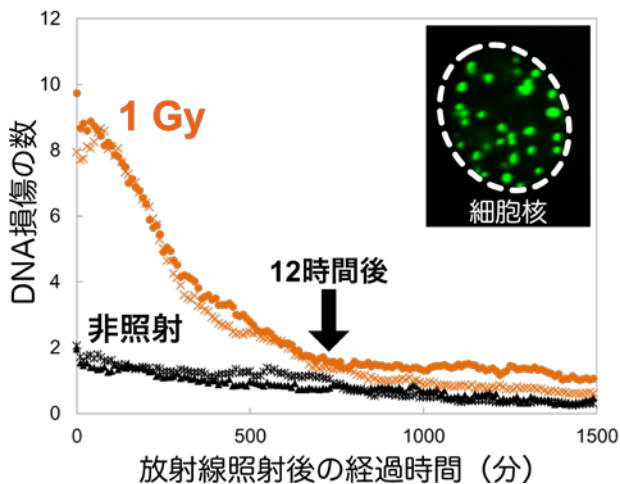


図2 被ばく後のDNA修復の様子

Focicle 遺伝子を組み込んだ細胞では、放射線照射直後の細胞核内において、DNA 損傷部位に凝集した 53BP1 タンパクが多数観察されました (図中の画像)。X 線 (1 Gy) を照射後、10 分置きに約 24 時間の蛍光画像を撮影しました。この数の時間経過を示したのが図中のグラフ (橙色) で、時間経過とともに減少する様子を捉えました。約 12 時間後には、放射線を照射しない細胞の DNA の損傷 (黒色) と同等の数まで減少しました。

3. 今後の展開

当所では Focicle 遺伝子を、組織を構成する細胞ごとの放射線応答動態の違いを解明する研究などに活用していきます。また、本手法は時空間的な定量解析に優れるため、数理モデル研究や、放射線・抗がん剤等を用いたがん治療方法の最適化研究など様々な研究分野で貢献することが期待されます。

<用語説明>

※1 **細胞周期**：細胞の DNA が複製された後に、2 つの細胞に分裂して増殖する周期のこと。

※2 **ゲノム編集**：DNA の任意の場所に、人為的に様々な加工を施すことが可能な分子生物学における最先端の遺伝子改変技術。本研究では、人工合成した遺伝子を組み込むために利用。

※3 **DNA 二本鎖切断**：二重らせん構造をとる DNA の両方のらせん構造が同じ部位で切断されること。これは正しく修復されなければ遺伝子が正常に働かなくなる可能性があり、がんなどのリスクに繋がる。本研究でいう DNA 損傷はこの DNA 二本鎖切断を指す。

※4 **セーフハーバーサイト**：合成遺伝子など外部の遺伝子を挿入しても遺伝子の性質に影響を及ぼさない DNA 中の特定の場所。マウスの場合、ROSA26 領域と呼ばれる部位が知られている。

<論文タイトルと著者>

論文タイトル：Concurrent live imaging of DNA double-strand break repair and cell-cycle progression by CRISPR/Cas9-mediated knock-in of a tricistronic vector

著者：Kensuke Otsuka, Masanori Tomita

掲載誌：Scientific Reports

以上

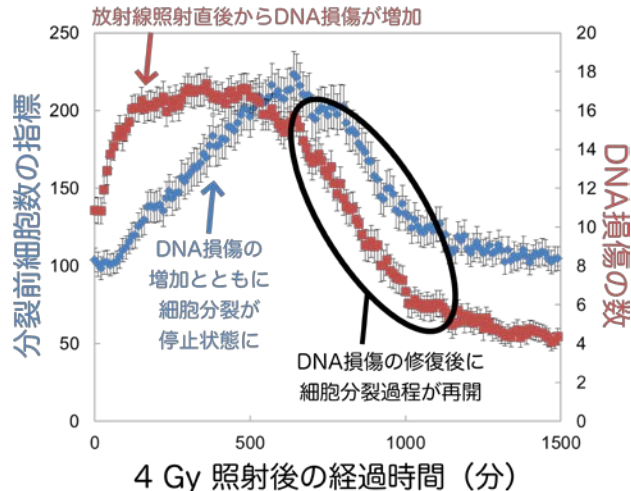


図3 DNA 損傷の数と細胞周期の関係

Focicle 遺伝子を組み込んだ細胞に、X 線 (4 Gy) を照射すると、時間とともに DNA の損傷が増加し、その後、修復されていきました (グラフ：赤)。照射直後から分裂前の細胞の数 (グラフ：青) が増加したため、細胞周期を停止させる働きがあると考えられましたが、DNA 損傷の減少とともに状態が元どおりになり、DNA 損傷の修復に伴って細胞周期の進行が再び開始される様子を明瞭に捉えることに成功しました。

お問い合わせ：電力中央研究所 広報グループ 担当：樋口、横尾 TEL：03-3201-5349 (広報グループ直通)

※本件は、文部科学記者会、科学記者会、エネルギー記者会で資料配布致しております。