

紫外線レーザーを用いた核内微小領域へのゲノム損傷誘導方法およびその解析について

医学系部門 生命科学実験班

鈴木 秀和

1. はじめに

現在、原爆放射線医科学研究所は、全国共同利用・共同研究拠点に認定されており、種々の学内外の共同研究プロジェクトが進行している。

筆者は、原爆放射線医科学研究所における共同利用・共同研究プロジェクトの中でも中核となる、ゲノム損傷修復の分子機構研究プロジェクトに関連する研究支援業務を主なものとしており、さまざまな分子生物学的実験や細胞生物学的実験、生化学的実験を行っている。本稿では、そのなかでも特に上述のプロジェクトにおいて重要性の高い、共焦点レーザー顕微鏡を用いた紫外線レーザー照射による核内微小領域へのゲノム損傷誘導の方法およびその解析について紹介する。

2. DNA 二本鎖切断修復機構

放射線により引き起こされる障害の主たるものに、ゲノムDNAを切断してしまうDNA二本鎖切断と呼ばれるものがある。これは細胞にとって非常に重篤な障害であり、正常な修復が行われないと細胞死や細胞のがん化を誘導する。このため、このDNA二本鎖切断に対する応答機構やその修復機構の解明は放射線生物学の分野では、現在、極めて重要な研究対象となっている。

そして、筆者が関わる研究プロジェクトでは、近年、急速に発達してきたDNAおよび蛋白質の可視化技術や画像解析技術により、ゲノム修復関連タンパク質の局在や動態を詳細に解析することでゲノム修復システムの解明を試みている。

上述のDNA二本鎖切断修復機構では、放射線によるDNA損傷の誘導後、細胞内に存在する種々の修復に関わるタンパク質が厳密にコントロールされ、互いに協調しながら修復が行われていく。このとき、

いくつかの修復タンパク質は、DNA修復の際にその損傷部位に集められ、免疫蛍光抗体法で検出可能な核内高次構造体を形成することが知られており(図1)、その局在や動態変化を詳細に解析することで、DNA損傷修復機構における重要な知見を得ることができ、現在までも数多くの成果が報告されている。

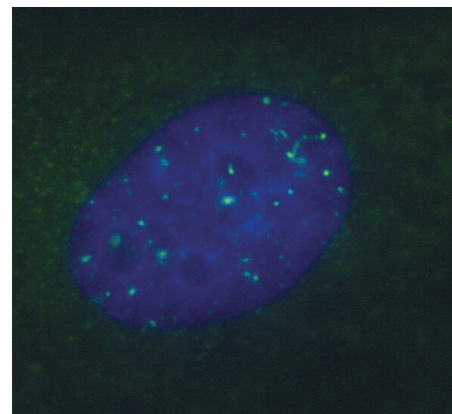


図1. 放射線照射後に修復タンパク質が形成する核内高次構造体

3. 紫外線レーザーマイクロ照射法

原爆放射線医科学研究所の田代教授は、共焦点レーザー顕微鏡を利用して、核内の限局した部位にゲノム損傷を誘導する紫外線レーザーマイクロ照射法を確立した。

この方法は、あらかじめ bromodeoxyuridine (BrdU) や Hoechst33258 などの増感剤で処理した細胞に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、核内の任意の微小領域にUVA(364nm)を励起光としたレーザー走査をすることで行われる。増感された細胞はUVレーザー照射によってもDNA二本鎖切断が誘導されることを利用したものである(図2)。

この方法によれば、細胞全体に放射線を照射した場合には不可能であった、核内のDNA二本鎖切断が誘導された部位を特定することができ、その上で損

傷部位特異的な修復タンパク質の詳細な動態解析が可能であるため、ゲノム損傷修復機構の研究にとっては、これまでにない非常に強力な解析手法となる。

次章からは、この紫外線レーザーマイクロ照射法を利用した実際の修復タンパク質の動態解析をいくつか紹介する。

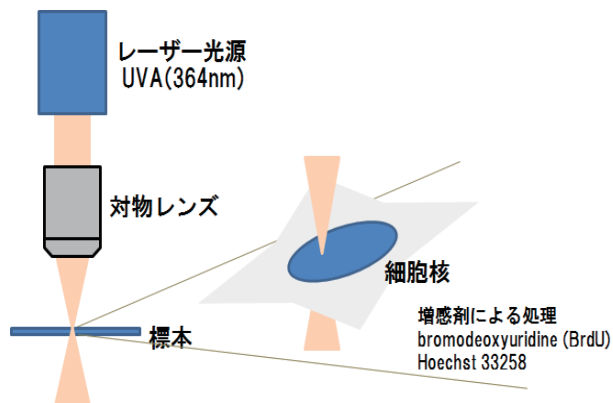


図 2. 紫外線レーザーマイクロ照射法

4. 修復タンパク質の動態解析

GFP などの蛍光タンパク質を利用した生細胞内でのタンパク質動態観察は、近年、細胞生物学においてよく行われている手法である。

修復タンパク質を GFP との融合タンパク質として強制発現させた細胞に、紫外線レーザーマイクロ照射法により DNA 二本鎖切断を誘導し、損傷部位の蛍光強度をモニターすることで、修復タンパク質の動態を解析することができる。

図 3 の実験では、細胞核の中央に紫外線レーザーマイクロ照射法により、帯状に DNA 二本鎖切断を誘導すると、当該部分の蛍光強度が増加してくるのがわかる。このことは、最初、核全体に分布していた当該修復タンパク質が、DNA 損傷にตอบสนองして損傷部位へと集められていることを意味する。また、このタンパク質の野生型と或る変異型について、それぞれの動態解析をしてみると、この変異型は野生型に対し蛍光強度の増加速度が遅く、修復タンパク質の損傷部位への誘導機構に、なんらかの異常があることがわかる(図 4)。

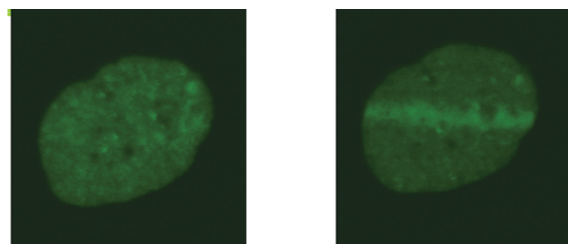
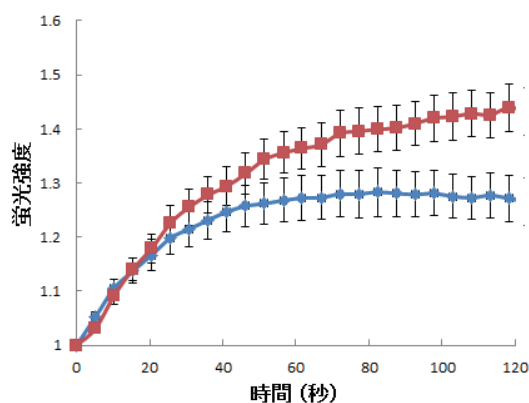


図 3. 生細胞における GFP 融合タンパク質の観察



野生型 (■), 変異型 (◆)

図 4. 修復タンパク質の動態解析

5. FRAP(光退色後蛍光回復法)解析

FRAP とは、上述したような GFP などの蛍光タンパク質で標識したタンパク質の動態を観察する手法の一つである。

細胞の中のある一部分に瞬間的に強くレーザー照射することで、その部分にある蛍光を退色させた後、その退色させた部分の蛍光の回復を見ることで、タンパク質の当該部分への流入を観察する。

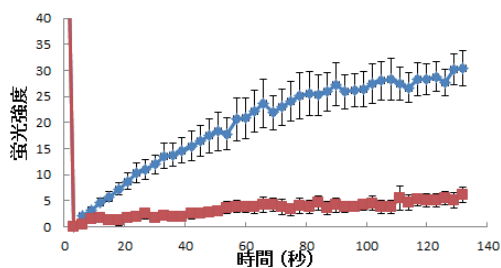
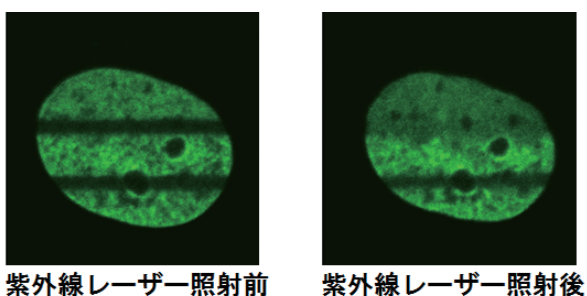
退色した周りの分子が動かなければ、退色した部分はそのままであり、退色した周りの分子が動きまわっていると、退色した部分に周りの分子が入ってくるので蛍光が回復してくる。この回復するスピードを調べることで、タンパク質の動態解析ができることになる。

これを、上述の紫外線レーザーマイクロ照射法と組み合わせることで、DNA 二本鎖切断が誘導された部位におけるタンパク質動態を観察でき、ゲノム修復機構の解明における強力なツールとなる。

図 5 では細胞上部に紫外線レーザーマイクロ照射法で DNA 二本鎖切断を誘導したのち、損傷部位および非損傷部位の一部を帯状に退色し、その蛍光の回復を見たものである(注意: 図3の実験で用いたタンパク質とは異なる機能を有する別のタンパク質を見ている)。損傷部位では蛍光の回復が見られるのに対し、非損傷部位では蛍光の回復が見られない。つまり、このタンパク質は、DNA 二本鎖切断の誘導により、その損傷部位特異的にタンパク質の交換反応が引き起こされることがわかる。

6. おわりに

最後に、現在、紫外線レーザーマイクロ照射法は、放射線生物学の分野における非常に重要な研究手法になりつつある。そのため、全国共同利用・共同研究拠点に認定された原爆放射線医科学研究所における研究プロジェクトにおいても、これを用いた共同研究が増えつつあり、その重要性からも私自身、これからより一層の技術の研鑽に励むつもりである。



非損傷部位 (■), 損傷部位 (◆)

図 5. FRAP (光退色後蛍光回復法) 解析