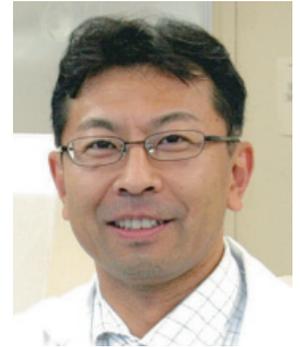


## 放射場生体分子科学研究グループの主な成果

## Highlights of Research Group for Radiation and Biomolecular Science

横谷 明德 グループリーダー  
Akinari Yokoya Group Leader



## 概要

放射線に対する細胞応答メカニズムを解明するために、照射後、単一細胞レベルで長時間にわたり継時観察を行うためのFucci細胞を用いたライブセルイメージング技術を確立した。全ての細胞に均一にX線を照射した場合でも、細胞周期が遅延する群としない群の2つに細胞集団が分かれたことから、細胞周期制御の分子機構中に、何らかのスイッチングメカニズムが存在することが推測された。この技術を用いて、シンクロトロンX線マイクロビームを、特定周期の細胞に“狙い撃ち”したところ、照射細胞のみならずその周囲の非照射細胞（バイスタンダー細胞）にも周期の遅延が起こることが見いだされた。これは今までに知られていない、新しいタイプの“バイスタンダー効果”である。さらに損傷したDNAを含むヒト染色体を非照射のマウス正常細胞に移入し、細胞分裂後の子孫細胞にどのような影響が現れるかを調べた。その結果、照射されたヒト染色体のみならず非照射のマウス染色体も不安定化し影響が及ぶことを発見した。染色体は、DNAとヒストンなどのタンパク質によって構成される、高次構造を有する。フランスの研究グループと共同で、染色体中でDNAが結合しているタンパク質（ヒストン）がX線照射された細胞中でどのように構造変化するかを、円二色性スペクトル測定により調べた。その結果、照射された細胞中では、ヒストンに対するリン酸化などの酵素的な化学修飾により $\alpha$ ヘリックス構造が増加することを明らかにした。この変化が、DNA修復を開始させるシグナルとして働いていると同時に、エピジェネティックな放射線被ばくの記憶に関わることが推測された。

## 1. 研究の背景・経緯

事前評価のコメントに沿って、それまでのDNA損傷を分子レベルで分析する研究を拡張し、生きた細胞に対する放射線影響の研究にシフトした。特に放射線発がんの原因の一つと考えられる、継世代影響のメカニズムを理解することを目指した。放射線により受けたDNA損傷が修復されると、細胞分裂が再び可能になる。細胞分裂を経た後に生存している娘細胞が、どのようなメカニズムで過去に受けた放射線被ばくの記憶を保持するか、また細胞間のコミュニケーションは、発がん過程における細胞集団としての挙動にどのように関わるのかに焦点を絞り、以下の3つのテーマを推進してきた。

## Abstract

In order to clarify the mechanism of cellular responses to ionizing radiation, we have developed a single cell tracking technique using Fucci cells for a long-term observation after exposure. The results showed that irradiated cells could be divided into two populations: one with a normal cell cycle and another displaying prolonged phases. Based on these findings, we propose that an underlying switch mechanism is involved in cell-cycle regulation. Further, we performed selective exposure to cells of a specific cell cycle using synchrotron X-ray microbeam. The results suggested that, not only the irradiated cells, but also non-irradiated cells surrounding the exposed cells also undergo cell cycle arrest. This is a novel “bystander” effect which has not been known yet. To clarify whether DNA damage could induce genetic instability, a human chromosome with DNA lesions was transferred into non-irradiated mouse recipient cells. We found that the instability not only of the irradiated human but also non-irradiated mouse chromosomes is highly induced in the progeny cells. We have collaborated with a French group to explore the change of secondary structure of histones in chromosomes extracted from X-ray irradiated cells. The protein samples were analyzed by circular dichroism spectroscopy, and obtained spectra showed an increasing amount of  $\alpha$ -helix structure in the protein. These findings suggest that the secondary structural change of histones is induced by chemical modifications, such as enzymatic phosphorylation, and is involved not only in the recruitment of certain DNA-repair proteins to the damage site, but also in the epigenetic memories of irradiation.

## 1. Background

According to the suggestions of the evaluation committee, we have revised and substantially shifted our

## 2. 研究の内容

### 2.1 X線照射した単一細胞の追跡

細胞標識技術の進展に伴う顕微鏡下でのライブセルイメージングの発達により、細胞の様々な活動が比較的容易に動画像(ムービー)として観察できるようになった。これらの実験により得られた動画像データは、個々の細胞に関する豊富な情報を含む。このような細胞機能に関するダイナミクスは、従来の免疫染色による静止画像や、細胞集団全体から生化学的に抽出された生体分子の平均化された値から得ることは難しい。本研究では、細胞周期がライブセルでモニターできるようにFucci処理したヒトのガン細胞(HeLa細胞)を試料として用い、X線照射した後にタイムラプス法により個々の細胞の細胞周期を追跡する方法を確立した(図1)[1]。

Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) とは、細胞が発する色によって細胞周期を特定することが出来る細胞技術である。X線照射したFucci細胞

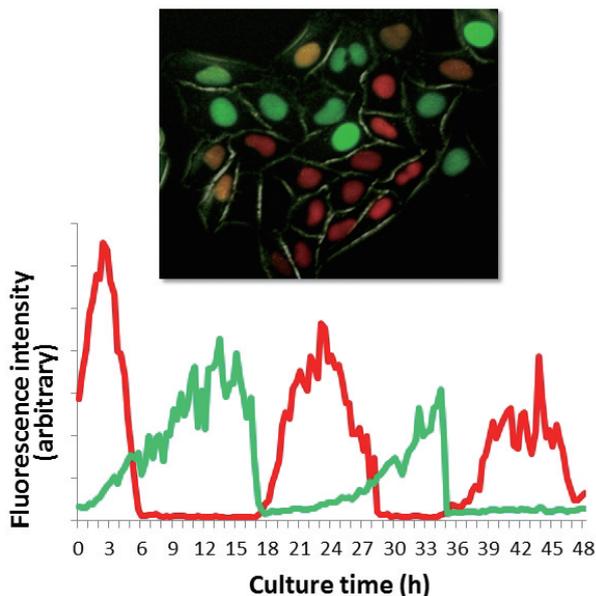


図1 HeLa-Fucci細胞の蛍光顕微鏡写真と蛍光強度の時間変化  
細胞核は、G1期には赤色を、S/G2期には緑色の蛍光を発する。グラフは一つの細胞のそれぞれの蛍光強度の時間変化。細胞は17時間で細胞分裂し、緑の蛍光強度が最小値となる。細胞分裂後は、2つの娘細胞のうちの片方のみを追跡した。

Fig.1 Fluorescence micrograph of HeLa-Fucci cells  
Cell nuclei emitted red and green fluorescence, corresponding to the G1 and S/G2 phases, respectively. The graph shows the time-dependence of fluorescence intensity for a single cell. The cell underwent cell division after 17 h of culture, as shown by the rapid decrease of green fluorescence. After cell division, the fluorescence intensity of only one of the daughter cells was plotted.

previous research target from simple model molecules to living cells. We set a new aim of the research program on understanding the cellular responses to irradiation, particularly trans-generational effects which are thought to be strongly involved in radiation-induced carcinogenesis. It is a long-standing question how cells keep the “memory” of radiation exposure even after DNA damage is repaired and the cells undergo cell divisions. To approach the subject from various angles, we have enforced three projects as shown below.

## 2. Contents of the study

### 2.1 Single cell tracking of X-irradiated cells

To explore the effects of X-irradiation on mammalian cell cycle dynamics, we tracked single cells using the fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) technique (Fig. 1) [1]. Human cancer cells (HeLa) expressing Fucci were used to visualize cell cycle modifications induced by irradiation. After exposed to 5 Gy X-rays, fluorescent cell images were captured every 20 min for 48 h using a fluorescent microscope. Time dependence of the fluorescence intensity of S/G2 cells was analyzed to examine the cell cycle dynamics of irradiated and non-irradiated cells (Fig. 2). To facilitate comparison, the profiles were justified to the time of the first cell division, which was designated as time zero and is the minimum recorded fluorescence value. It should be noted that the X-irradiation treatments appear at various points on the fluorescence profiles due to the normalization of cell division. The results showed that irradiated cells could be divided into two populations: one with similar cell cycle dynamics to that of non-irradiated cells (Fig. 2-3), and another displaying a prolonged G2 phase (Fig. 2-4) [2].

The finding strongly indicates that an underlying switch mechanism is involved in cell cycle regulation. Mitosis is initiated by disruption of the nuclear membrane, which is induced by activation of the cyclin-dependent kinase (Cdc2) and cyclin B complex. A protein-tyrosine phosphatase (Cdc25) activates the complex by dephosphorylation of Cdc2. However, when a cell is exposed to ionizing radiation, various activated kinases, such as ATM or ATR, activate Chk1 and Chk2, which are thought to regulate cell the cycle checkpoints through down-regulation of the phosphorylation of Cdc25. One possible mechanism underlying the appearance of the two types of cell populations is that cell cycle switching from the “ON” to “OFF” state may be sharply induced by increased phosphorylation of

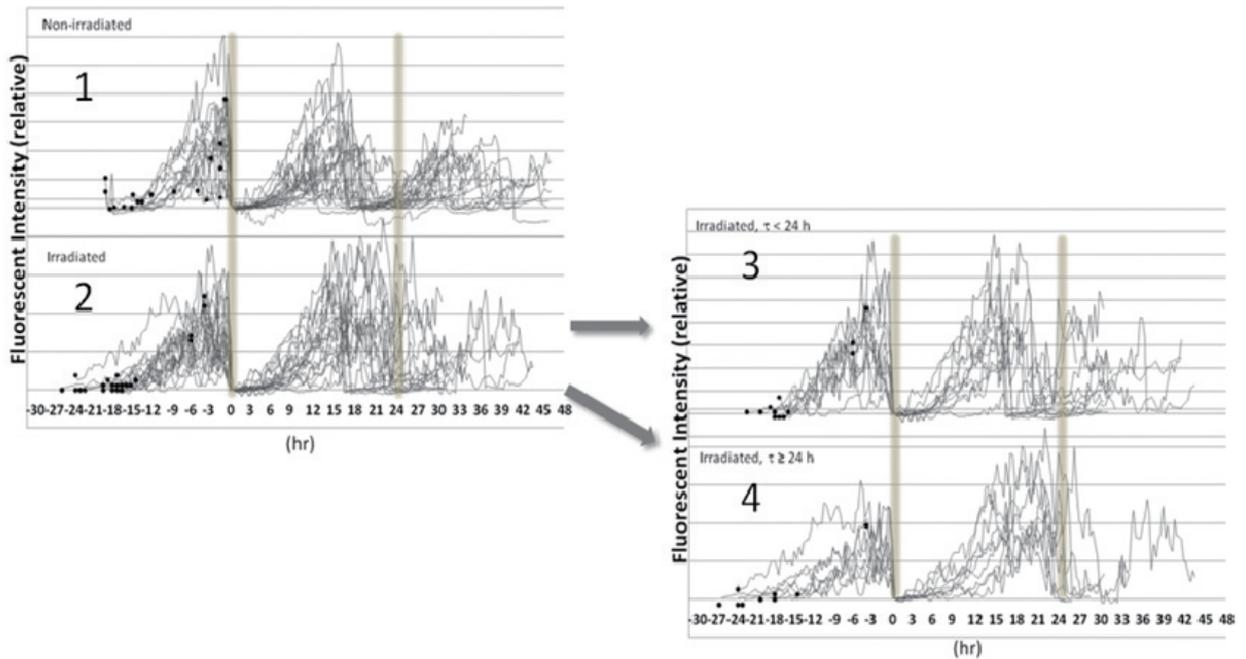


図2 細胞集団中の各細胞の蛍光強度の時間変化

1、2はそれぞれ非照射及びX線照射細胞集団を示す。3は照射細胞集団中で、最初と2回目の細胞分裂(2回目の緑の蛍光強度が最小となる時間)の間隔が21時間以内の細胞、4は21時間以上かかった細胞。

Fig.2 Time-dependence of Fluorescence intensity of each HeLa-Fucci cell in a population

In the left panel, 1 and 2 show X-ray-non-irradiated and irradiated cell population. The right panel indicates the irradiated cells showing an interval between the first and second cell division longer (3) or shorter (4) than 21 hours.

胞に対して、S/G2期の細胞が示す緑色蛍光の強度変化を個々の細胞について追跡して得られたタイムラプスプロファイルを重ね書きしたものを図2に示す。細胞間の周期の比較を視覚的に行いやすくするため、照射後最初に細胞分裂をした時間で規格化し、その時刻を0とした。照射した細胞培養ディッシュ上には、様々な周期の細胞が混在しているため、観察を開始した時点(照射試料では照射の時点)を表す図2中のそれぞれの曲線の左端の黒点の時刻はまちまちになっていることに留意する必要がある。

図2-1に示される通り、非照射群では細胞周期は、はっきりとした3つのピークとして観察され、48時間の観察時間中に2回以上の細胞分裂が起こり、その周期はほぼ一定していることを示している。一方、X線照射細胞の集団では、図2-2に示されるように照射時の周期に依存せず細胞周期は進行するが、図2-3に示される非照射のコントロール群とほとんど同じ周期を示す群と、図2-4に示される2回目の細胞分裂が一定時間遅延する群に分かれた[2]。全ての細胞が均一に照射されているにも関わらず、細胞周期遅延を示す群とほとんど影響を受けない群の二つに大別されることが示されたことから、細胞周期の変調に関して2値を出力する以下のようなメカニズムが推測された。

通常細胞分裂は、タンパク質チロシンホスファターゼであるCdc25がサイクリン依存性キナーゼCdc2とサイクリンB複合体を脱リン酸化することで活性化し、M期の開始の合図となる核膜の崩壊へと導くことにより起こ

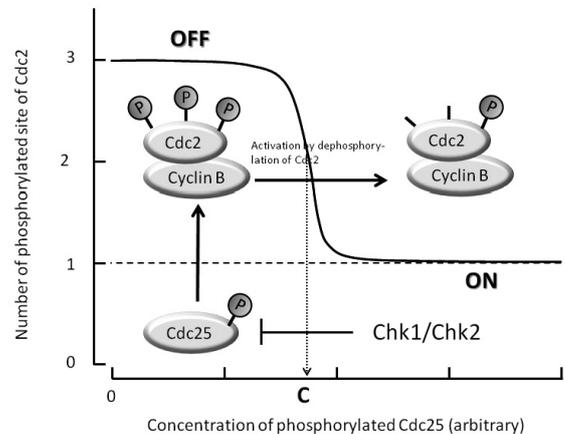


図3 予測される細胞周期制御のスイッチ機構

Cdc2は三つあるリン酸化部位のうちの一つが活性化Cdc25により脱リン酸化されると活性化状態になり、細胞周期を進行させる。このCdc2のリン酸化状態は、活性化(リン酸化)Cdc25の濃度に対して非線形な逆シグモイド型の関数となり、細胞周期の停止か進行という二つの状態間の遷移をスイッチすると推定される。図中のCは、状態の遷移が起こる転移濃度。

Fig.3 Predicted switching mechanism of cell cycle regulation

Cell cycle progresses when Cdc2 is activated with dephosphorylations of two of the three phosphorylation sites by Cdc25. The number of phosphorylation in Cdc2 shows inverse sigmoid function of the concentration of the phosphorylated activated Cdc25, resulting transition between the two states, namely cell cycle progress and arrest. C is a transition concentration of the two states.

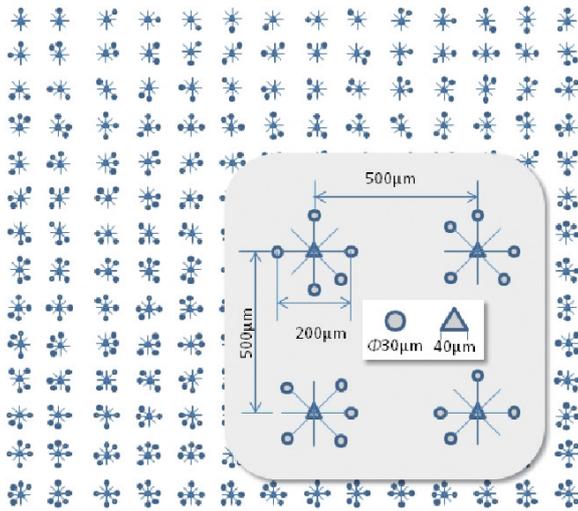


図4 顕微鏡位置調整用フィルムパターン

○と△の196組合せから成るパターン。20倍の対物レンズであれば、パターンの中のどれかが視野に入るため、異なる顕微鏡の原点位置が判る。

Fig.4 The positioning film pattern

The film consists of 196 combination of ○ and △. When using a low-power objective lens (x20), one of the patterns comes into the microscopic fields. Thus the points of origin for different microscopes are confirmed easily.

る。放射線照射によって、細胞核内にDNA損傷が誘発されるとATRやATMなどのキナーゼ群が活性化し、細胞周期チェックポイントを制御するChk1、Chk2を通じてCdc25のリン酸化をダウンレギュレートすると考えられている。本研究で一部の細胞群にのみ細胞周期変異が観測された理由は、リン酸化Cdc25の濃度に閾値があり、それ以下になった場合には急激にCdc2の高リン酸化状態による細胞周期のOFF状態が実現し、細胞周期の遅延・停止が起こったと推測された (図3) [3]。

近年、照射細胞から非照射細胞へ影響が伝搬する、いわゆるバystanダー効果が注目を集めている。細胞間のシグナル伝達によるコミュニケーションは、被ばくした細胞集団の挙動に重要な役割を果たしていると考えられる。特に、低線量条件下で組織中の一部の細胞しか被ばくせず、多くの非照射細胞がそれを取り囲んでいる場合に、この細胞間コミュニケーションが組織への影響にどのような役割を果たしているかを明らかにすることは、放射線医学の見地からも重要である。そのためには、照射・非照射細胞を顕微鏡下で明確に区別しつつ、個々の細胞のダイナミクスを追跡することが要求される。

我々は、KEK・フォトンファクトリーのX線マイクロビームを用いて、HeLa-Fucci細胞集団中の特定の細胞にのみ照射を行い、その細胞及びその周囲にある非照射細胞の細胞周期変異の観察を行った [4, 5]。マイクロビーム照射用の顕微鏡ステージで照射を行った後、試料の細胞ディッシュを培養器を備えた別のオフライン顕微鏡で観察した。その際、照射細胞の位置を数百マイクロメートル程度の精度で二つの顕微鏡間で共有する必要があ

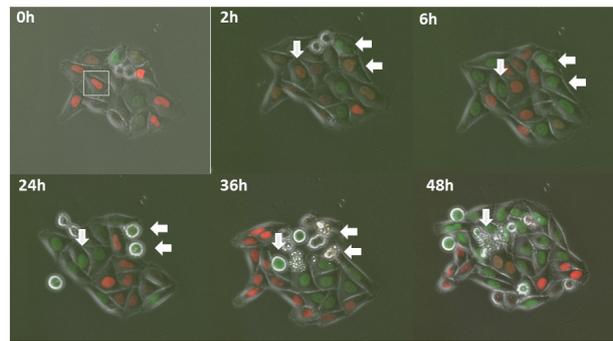


図5 X線マイクロビームを照射した細胞を含むHeLa-Fucci細胞のコロニーの継時変化

照射直後(0h)の図中の□は、マイクロビームの照射領域(20µm×20µm)を表わす。照射領域中の細胞は、赤色核を持つG1期の細胞。下向き矢印(↓)は、照射細胞を、左向き矢印(←)は、アポトーシスを起こした非照射細胞を示す。

Fig.5 Time course of cell divisions in a micro-colony of HeLa-Fucci cells after X-ray microbeam exposure

In the panel of just after exposure, "0h", the square shows the exposure area of 20 µm × 20 µm at a G1 cell. The irradiated cell is indicated by "↓" through the all panel. Apoptotic cells are indicated by "←".

Cdc2 when the concentration of phosphorylated Cdc25 falls below a certain threshold value, as shown in Fig. 3 [3]. The mechanism of such an "ON-OFF" switch for cell fate would attract considerable attention in the field of systems biology.

Further, we have performed single cell irradiation using an X-ray microbeam provided from the Photon Factory, KEK, and observed the cell cycle of irradiated and non-irradiated "bystander" HeLa-Fucci cells [4, 5]. After microbeam exposure, the irradiated cell dish was transferred from the microscopy stage of the beamline to an off-line microscope which equipped with an incubator for cell culture. The position of the irradiated cells in the dish should be exactly reproduced in the second microscope. To realize this robustly, we designed a special film for the position tuning. On this film, regular patterns consisting of combinations with ● and ▲ were printed as shown in Fig. 4. Each pattern functions as a "digit". The "digits" observed in both microscopic fields provide telling clues about the misalignment between the two microscopes. This film allowed us to apply a fluorescent microscope equipped with a fully automatic time-lapse system for cell observation.

Fig. 5 shows a typical result of a live cell image of microcolony of HeLa-Fucci cells in which only one cell was exposed to X-ray microbeam. The cell irradiated at G1 phase (red) prolonged its cell cycle, and underwent apoptosis at 48 hours after exposure. Some of other cells in the colony also showed cell cycle arrest or apoptosis.

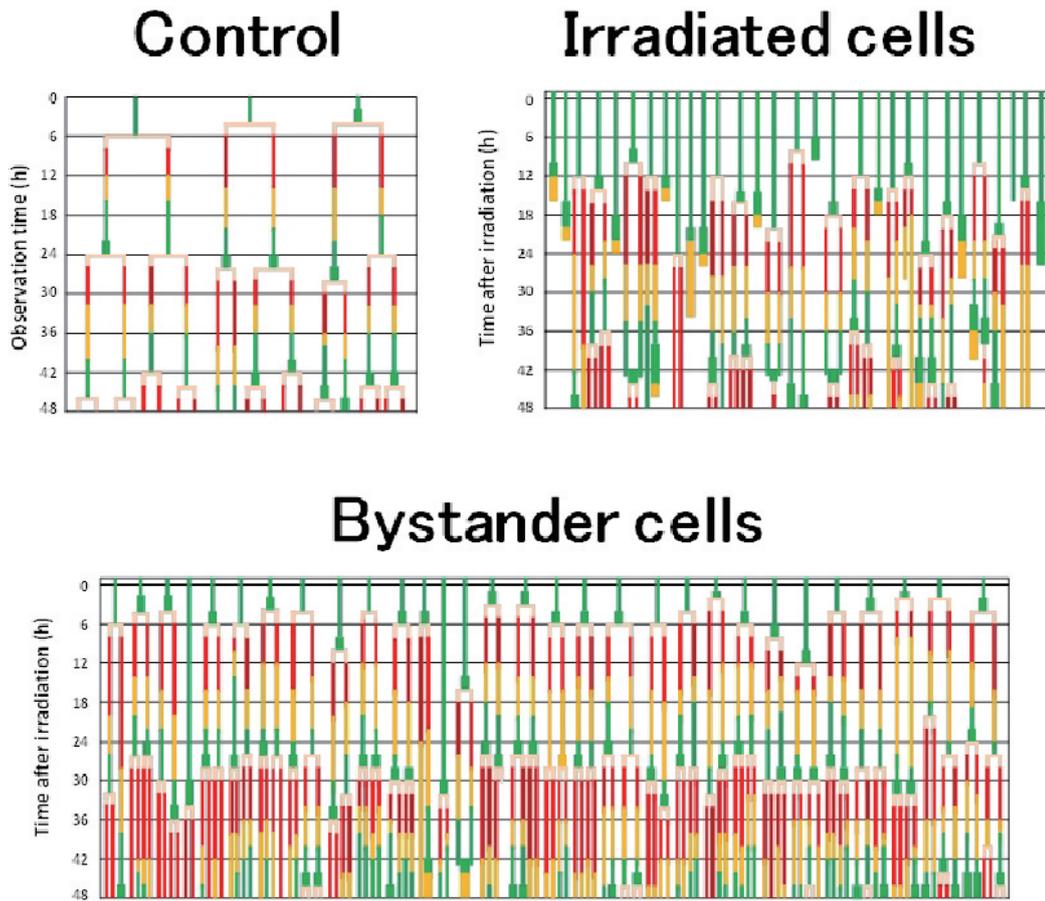


図6 X線マイクロビーム照射した細胞の系譜図

赤はG1期を、緑はG2期を、黄色は赤と緑の両方を発色している周期の境界にある細胞を表わしている。

Fig.6 Pedigree analysis of X-ray microbeam irradiated cells

Cells in G1 phase, G2 phase and intermediate between the phases are shown by red, green and yellow bars, respectively.

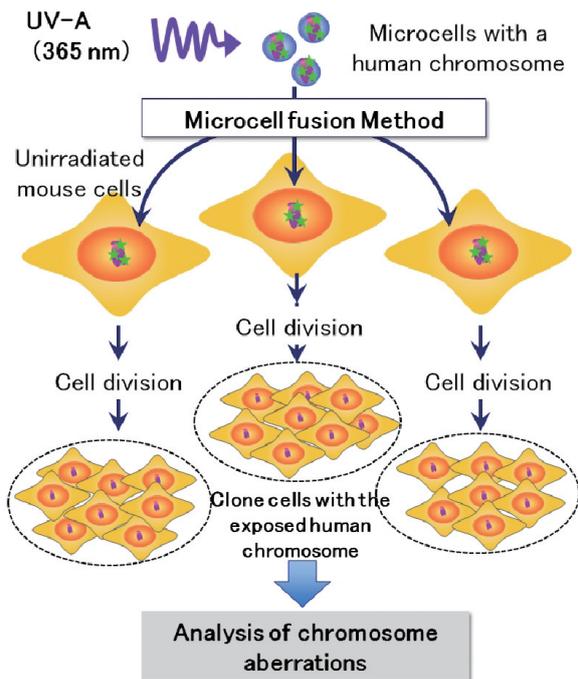


Fig. 6 shows the pedigree trees of the control, irradiated, and non-irradiated (bystander) cells where cell divisions are shown by branches. Irradiation prolonged each cell cycle period as shown by extended bars in the figure. Some of the cells underwent apoptosis or cell fusion. Interestingly, many of the bystander cells considerably prolonged their cell cycles in second G1 phase. This is the first evidence showing that cell cycle arrest is

図7 微小核細胞融合法を用いたDNA損傷の移入

ヒト染色体を含む微小核細胞にUV-Aを照射後、非照射のマウス細胞に移入した。その後各細胞を培養し、安定に細胞分裂が行える細胞を多数のクローンとして得た。これらクローン細胞の染色体異常を顕微鏡下で観察し分析した。

Fig.7 Transfer of damaged DNA by a microcell fusion method

Microcells containing a human chromosome were exposed to UV-A, and then transferred to unirradiated mouse cells. The cells were cultured, and many clones with a stable cell division function were selected. The chromosome aberrations caused microscopically observed in the cells were analyzed.

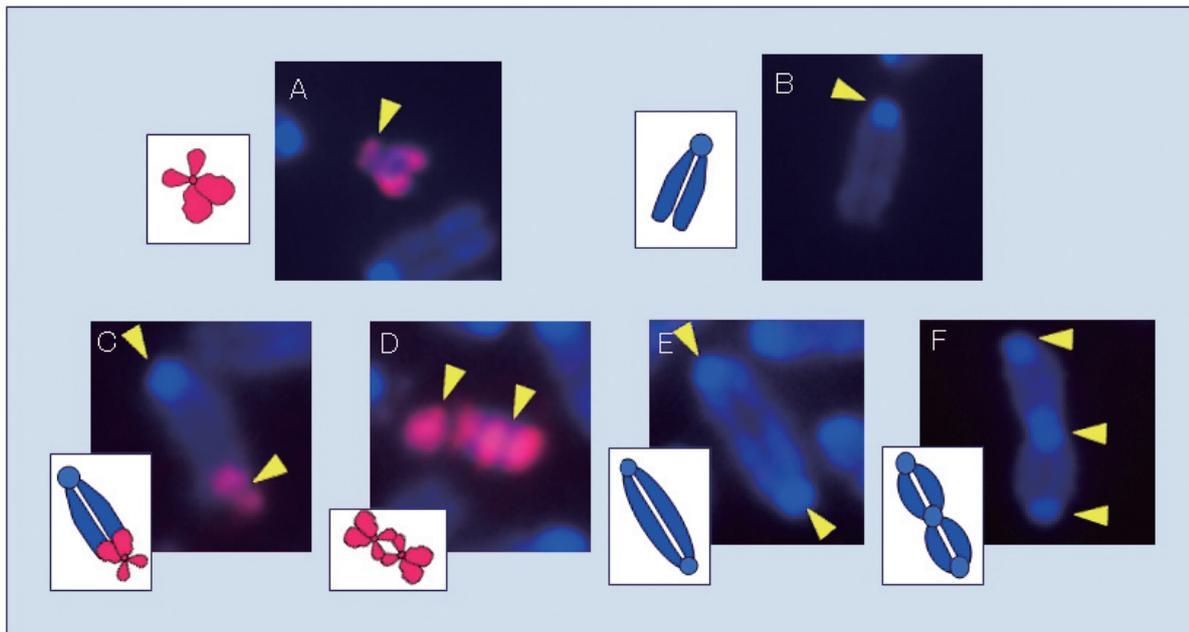


図8 顕微鏡下で観察された典型的な染色体の異常

ヒト染色体は赤で、マウスの染色体は青にそれぞれ染色されている。黄色の矢印は動原体を示す。上段(A)、(B)はそれぞれ正常なヒト及びマウスの染色体、下段は、(C)マウス染色体とヒト染色体、(D)2本のヒト染色体同士、(E)2本のマウス染色体、(F)3本のマウス染色体が、それぞれ融合した染色体異常の例。

Fig.8 Typical chromosome aberrations microscopically observed

Human and mouse chromosomes are indicated by red and blue, respectively. Yellow arrows shows centromeres. Normal human (A) and mouse chromosome (B) are shown in the upper panels. Abnormal fusion chromosomes consist of a mouse and human chromosome (C), two human chromosomes (D), two (E) and three mouse chromosomes (F) are shown in the lower panels.

る。これを実現するため、位置調整用の特殊なフィルムを作成した。このフィルムには図4に示したような、●と▲の組合せでできたパターン配列が印字されている。このパターンは一種の“数字”を表現している。マイクロビーム照射用及び照射後の観察用の二つの異なる顕微鏡の原点における視野内に見える“数字”の違いから、それぞれの顕微鏡の原点のズレを補正することができる。このフィルムを利用することにより、全自動のタイムラプス機能を備えた蛍光顕微鏡を観察に用いることが可能となり、実験の効率が極めて向上した。マイクロコロニー中の特定細胞を照射し、その後の細胞分裂の様子を観察した結果の一例を図5に示す。図中の各イメージは、顕微鏡が備えた培養器で培養しながら自動取得した。

G1期(赤色)で照射された細胞は、S/G2期(緑色)に移行するものの細胞周期は明らかに遅延し、48時間後にはアポトーシスを起こした。一方、照射細胞の周囲の非照射細胞(バイスタンダー細胞)の一部にも細胞周期の遅延やアポトーシスが観測された。照射及び非照射(バイスタンダー)細胞の細胞周期動態を、図6に細胞の系譜図としてまとめた。図中の線は、個々の細胞に対応している。照射細胞ではコントロールに比べ明らかに細胞周期が遅延している。さらに細胞分裂を経ても、その後細胞周期が停止したり、あるいはアポトーシスや娘細胞同士が再び融合してしまう現象も観測され、細胞ごとにその運命が大きく

induced in not only irradiated but also non-irradiated (bystander) cells [5]. These results indicate that the single cell tracking is a powerful method to analyze the various cell fates in a population exposed.

## 2.2 Chromosome instability induced by DNA damage

As one of genetic effects through multiple times of cell division, chromosome aberrations are rarely induced in the progeny cells after ionizing irradiation. This is known to be “genetic instability” strongly involved in induction of late radiation effects such as carcinogenesis. The detailed mechanism of it, however, has not been fully understood yet. In this project, we focused on DNA damage as a trigger of the instability, particularly DNA-base damage which might persist even after repetition of cell division. The bases normally work as elementary unit of genetic code in DNA, and we previously reported that artificially-introduced multiple base lesions raise mutation frequencies [6]. In addition to causing DNA damage, irradiation could also induce damage of cytoplasmic organelles. To exclude the cytoplasmic effects, we applied a micro-cell fusion method to observe genetic instabilities induced only by the DNA-base damage [7].

異なっていることがわかった。一方、バイスタンダー細胞では照射直後の細胞周期はコントロールと変わらないが、照射後2回目のG1期が遅延している細胞が多数観察された [5]。バイスタンダー効果による細胞周期への影響は、本研究により初めて見出された事象であり、単一細胞レベルでのトラッキングが極めて有力な手法であることを示している。

## 2.2 DNA 損傷による染色体不安定性の誘発

放射線照射された1世代目の細胞ではなく、細胞分裂を経た何世代もの後の子孫細胞の一部に、染色体異常が起こる。これは「遺伝的不安定性」と呼ばれ、放射線による発がんなど晩発影響に深く関連している現象として注目されている。本研究では、このような遺伝的不安定性を引き起こす主要な原因のひとつとして、細胞死を引き起こさずに細胞分裂を乗り越えて持続するDNA分子中の塩基部位の損傷に注目した。DNA塩基は遺伝情報を担う基本単位で、これらの損傷を局所に集中配置した合成DNAは、突然変異頻度を上昇させる [6]。本研究ではDNA以外の細胞内器官の損傷の影響を除くため、微小核細胞融合法を用い、DNA損傷のみを起因とする遺伝的不安定性の誘発を調べた。ヒトの21番染色体を1本だけ含む微小核に照射を行った後、非照射のレシピエント細胞（マウスm5S細胞）と融合させ照射染色体を移入した（図7）。固定した染色体試料は、Whole-Chromosome Painting Fluorescence In Situ Hybridization (WCP-FISH) 法により蛍光染色し顕微鏡下で観察を行った [7]。ヒトの染色体はマウスの染色体とは異なる色に染まるため、照射したヒト染色体と非照射のマウス染色体は、顕微鏡下で容易に判別できる利点がある。

Sub-cellular small structures including one human chromosome called microcells were irradiated and then transferred into non-irradiated normal mouse cells (Fig. 7). The human chromosome was considerably different from those of the mouse cell, thereby the exposed human chromosome was easily distinguished from non-irradiated mouse chromosomes. It was confirmed beforehand that the normal chromosome transfer did not induce any genetic instabilities. Ultraviolet light (wavelength: 365 nm) called UV-A was used as an irradiation source, because it has been known to preferentially induce the same sort of DNA-base lesions as those induced by ionizing radiations. The exposed cells were cultured for more than 20 days or a month to obtain various clonal cell lines that stably underwent cell division.

The analysis of the chromosomes in the clones revealed that certain types of aberrations such as fusion between normal mouse chromosomes were frequently induced, in addition to fusions between the human chromosomes, or the human and mouse chromosome (Fig. 8). The efficiency of chromosomal aberrations increased with increasing UV-A dose (Fig. 9). Furthermore it was observed that the number of chromosomes in the clone cells abnormally increased from the normal number of 43 to twice or more chromosomes.

These evidences indicate that a novel mechanism of signal transfer from the damaged to normal chromosomes could result in the genetic instability in the non-irradiated cells. Detailed investigation will be needed to reveal the

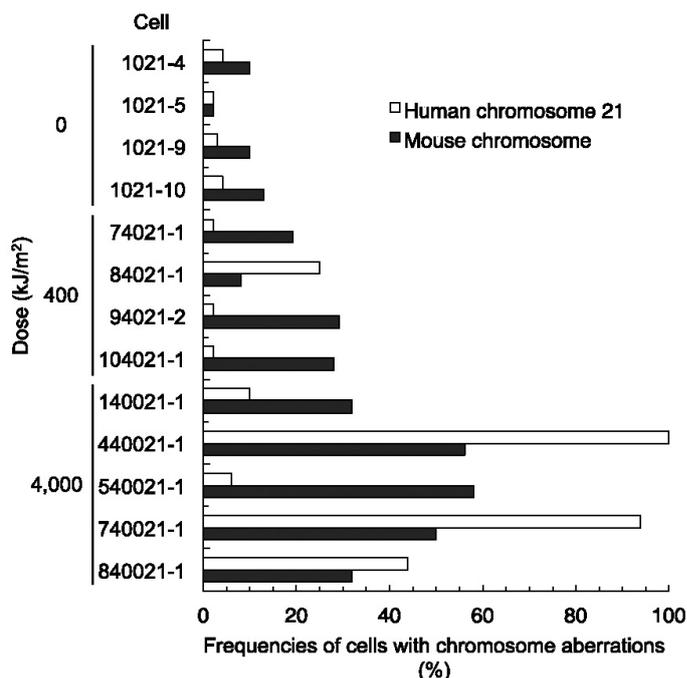


図9 染色体異常を持つ細胞の頻度

白はヒト21番染色体、黒はマウス染色体を示す。Cellの番号は、用いられたクローンを示す。

Fig.9 Frequencies of cells harboring chromosomal aberrations

Open and closed columns show the frequencies of cells harboring chromosomal aberrations in a human chromosome 21 and mouse chromosomes, respectively. The cell numbers show each clone used.

照射後の細胞を長期間 (20日から1ヶ月程度) 培養し、安定に増殖できる多くのクローン細胞株を作製した。照射には、365 nmの波長のUV-Aと呼ばれる領域の紫外線を用いた。UV-Aは、通常の放射線照射した時と同じタイプのDNA塩基の損傷を、効率良く引き起こすことが知られている。作製したクローン細胞中の染色体を詳細に調べた結果、ヒトの染色体同士あるいはヒトとマウスの染色体が融合してしまう異常な染色体に加え、本来正常であるはずのマウスの染色体同士が融合したものも多く観察された (図8)。また染色体異常の誘発頻度は、ヒト及びマウス染色体の両者とも最初に照射した紫外線量に依存して高くなった (図9)。さらに、クローン細胞中の染色体数はマウスの染色体42本にヒトの1本を加えた43本であるべきであるが、これが2倍あるいはそれ以上になるなど、染色体の倍数性の異常も観察された。

以上の結果は、照射されたヒト染色体だけではなく、その移入により正常なマウス細胞の染色体にも影響が伝搬するという、これまで知られていなかった新しい遺伝的不安定性の誘発機構があることを示唆している。今後の詳細な研究により、放射線による染色体の不安定化に関するメカニズムの理解が進むと期待される。

### 2.3 X線照射細胞中のヒストンタンパク質のエピジェネティックな構造変化

放射線によりDNAが損傷すると、染色体を構成するタンパク質であるヒストンは、酵素によるリン酸化などの化学的な修飾を高頻度で受けることが明らかになりつつある。特に、重篤な損傷であるDNAの2本鎖切断 (DSB) 部位では、ヒストンのうちのH2AXのリン酸化やH2AX、H2AおよびH2Bのユビキチン化が、DSBの修復に先立ち行われることが知られている。X線結晶構造解析により、非修飾ヒストンの構造は解かれているものの、生物学的に最も興味があるのは、化学修飾がその後の修復タンパク質の損傷部位への誘導 (リクルート) にどのような役割を果たしているのか? という点についてである。このような修飾をきっかけとして、DNA損傷近傍の染色体構造は、修復タンパク質が損傷個所にアクセスしやす

mechanism of the signal transfer in future study.

### 2.3 Epigenetic changes of the histone protein structure in X-ray irradiated cells.

Recently it has been gradually recognized that chemical modifications of DNA binding proteins, such as histones, in chromatin architecture play various roles in DNA damage responses in a living cell exposed to ionizing radiation. Particularly, phosphorylation or ubiquitination of histones is known to be enzymatically induced at DNA double strand break (DSB) sites prior to DSB repair. Although X-ray crystallography has accumulated structural data of various histone proteins so far, conformational changes induced by the chemical modifications have not been studied. The modifications might change the accessibility of repair protein machineries to DNA damage site. In order to experimentally elucidate this, we have collaborated with a group of Univ. Paris-Sud by making full use of the competitive funds of JAEA, "REIMEI".

After HeLa cells were exposed to X-rays, histone H2A/H2B complex was extracted from the cells by a commercially biochemical kit. The histone solution was analyzed by circular dichroism (CD) spectroscopy using photons in a wide energy region from vacuum-UV (VUV) to UV provided at the French synchrotron facility (SOLEIL). CD spectrum reflects relative abundances of protein secondary structures, namely  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -strand, turn or random. There is no need for preparing crystal samples for CD measurements. Solutions, which are rather close to a physiological condition, can be used as samples. We performed two beamtimes in March and September in 2014.

Fig. 10 shows typical CD spectra of histone H2A/H2B complex extracted from X-ray irradiated, and non-irradiated (control) cells. The CD intensity was significantly enhanced at 190, 208 and 222 nm for the

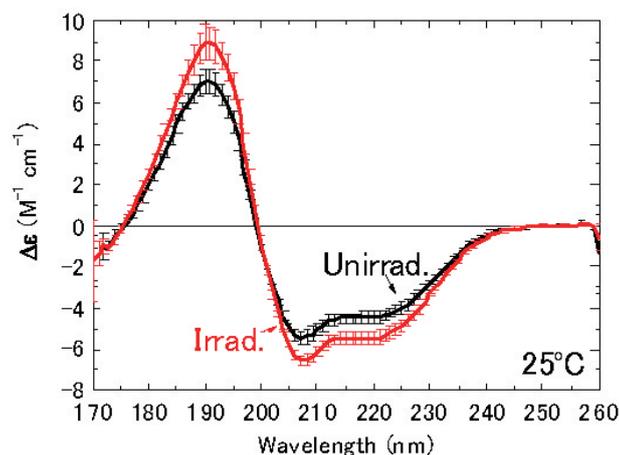


図10 照射及び非照射細胞から抽出したヒストンH2A/H2B複合体のCDスペクトル

各データ点は、異なる継代数の細胞から抽出したタンパク質を試料として用いた複数回の実験の平均値と標準誤差を示す。

Fig.10 CD spectra of histone H2A/H2B complex extracted from X-ray irradiated and non-irradiated cells

Each data point was the mean values obtained by several independent experiments using samples prepared from cells with two different passages.

いように構造変換が行われると推測されるが、その詳細は明らかになっていない。本研究では、修飾によりタンパク質の機能を制御する二次構造の変化がおけると予測し、フランス・パリ南大学のグループと共同で原子力機構の「黎明研究制度」を利用して、これを実験的に証明するための研究を行っている。

培養した細胞 (HeLa) に対して X 線を照射した後、生化学的手法でヒストンの H2A/H2B の複合体を抽出・生成した。このヒストンタンパク質試料に対して、フランスのシンクロトン放射施設 (SOLEIL) において、紫外から真空紫外線領域までの広範囲に渡る円偏光二色性 (CD) スペクトル測定を行った。CD スペクトルは、タンパク質を構成する二次構造 ( $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -ストランド、ターン、ランダム) の存在比を反映する。試料は結晶である必要はなく、生理条件に近い水溶液試料で測定可能である。実験は、2014年3月及び9月の2回のビームタイムにより行った。

図10に、未照射および照射細胞から抽出した H2A/H2B の CD スペクトルを示す。波長 190、208、222 nm のピーク付近で、照射細胞から得た試料の CD 強度が未照射のそれに比べ、有意に増大することが確認された。

得られた CD スペクトルから、解析プログラム (BeStSel) を用いて、それぞれの二次構造成分比を計算した結果を表1示した。照射細胞では  $\alpha$ -ヘリックス構造が 20% 程度増加したのに対し、それ以外の構造は相対的に減少した。この構造変化が、X線照射によりヒストンが損傷したことによる影響であるかどうかを検討するため、細胞からあらかじめ抽出したヒストンに直接 X 線を照射し、CD 測定を行った。得られた照射ヒストンの CD スペクトルは照射細胞から抽出した試料のスペクトルとは大きく異なり、非照射試料よりも  $\alpha$ -ヘリックス構造が減少した。このことから、照射細胞から抽出されたヒストンの構造変化は、タンパク質の放射線損傷によるものではないと結論づけられた [8]。

以上の結果から、照射された細胞内ではエピジェネティックな化学修飾により染色体を構成するヒストンの  $\alpha$ -ヘリックス構造が増加し、これが次の修復プロセスの開始のトリガーになっている可能性が示された。タンパク質の化学修飾により、2次構造に変化が生じることを CD 実験により示したのは、世界でも初めてである。

### 3. 成果の意義と波及効果

細胞に対する放射線の影響を調べるために、個々の細胞を可視化して追跡する実験手法を確立した。また DNA 損傷は、細胞分裂を経た後でも健全な染色体に影響を及ぼす、新しい遺伝的不安定性の現象を見出した。さらに DNA 損傷それ自体に加え、DNA と相互作用しているタンパク質の修飾により構造変化を受けることを明らかにした。これらの知見は、本研究分野の今後進むべき方向を大きく変えるインパクトを与えられる。さらには、低線量影響の解明に向けた研究に、新しいアプローチを提案すると期待される。

sample prepared from irradiated cells when compared with that from non-irradiated cells. The relative abundance of secondary structures calculated by a CD analysis software (BeStSel) are listed in Table 1. The content of  $\alpha$ -helix for the sample from irradiated cells increased by about 20% when compare to that from non-irradiated cells, on the other hand, the other structures decreased. In order to confirm that the spectral change was not induced by radiation damage to histone proteins, we exposed histone solutions to X-rays, and then performed CD measurements. Contrary to the case of cell irradiation, the content of  $\alpha$ -helix considerably decreased presumably by the effect of protein damage. Hence we conclude that the significant increase of  $\alpha$ -helix component was a result of chemical modifications of the histones in irradiated cells [8]. These results suggest that histone proteins are subject to epigenetically chemical modifications in the chromatin architecture when DNA damage is induced. This could trigger the DNA damage repair processes.

### 3. Importance of the result and its impact

We made three major achievements, namely (1) establishment of single cell tracking technique to visualize individual cells, (2) finding that DNA damage induces genetic instability even in non-irradiated normal chromosomes, and (3) in addition to DNA damage, epigenetically chemical modifications would cause structural changes in chromatin proteins. These new aspects may bring a shift in radiobiological research field. Further, it is expected that the new methodologies proposed in the present study will provide novel approaches in mechanistic studies to reveal carcinogenesis process by low dose irradiations.

表1 CDスペクトルから計算により得た二次構造成分

Table1 Fraction of each secondary structure calculated from the CD spectra

	Unirrad. (%)	Irrad. (%)
$\alpha$ -helix	37.6	45.6
Antiparallel $\beta$ -strand	8.6	6.1
Parallel $\beta$ -strand	2.8	0.6
Turn	12.1	9.1
Others	39.0	38.5

#### 4. 今後の予定

放射線照射後の細胞のトラッキングは、今回の細胞周期や修復過程の可視化から、さらに“1細胞レベル”での遺伝子のプロファイリングや注目した任意の発現タンパク質の可視化によるライブセルイメージングに繋げて行かなくてはならない。そのために、遺伝子の発現やリン酸化などのタンパク質の活性化状態を1細胞レベルでモニターし、トラッキングするための新しいイメージング法も合わせて開発して行く予定である。また、本研究で明らかにされた細胞周期の遅延は、DNA損傷修復など細胞の持つストレス応答反応のための時間稼ぎと考えられている。一度停止した細胞周期が回復し細胞分裂が行われた後に、子孫細胞にどのように影響が伝わるか、タンパク質の様々なエピジェネティックな機能解明を目指して、今後さらに新しい研究を展開して行きたい。

#### 参考文献 References

- [1] K. Kaminaga, *et al.*, J. Radiat. Res. **55**, i127 (2014).
- [2] K. Kaminaga, *et al.*, submitted.
- [3] A. Yokoya and K. Kaminaga (invited review in Japanese), Radiation Biology Research Communications, in press.
- [4] Y. Sakamoto, *et al.*, J. Radiat. Res. **55**, i120 (2014).
- [5] A. Narita, *et al.*, submitted.
- [6] M. Noguchi, *et al.*, Mutat. Res. **732**, 34 (2012).
- [7] A. Urushibara, *et al.*, Mutat. Res. **766**, 29 (2014).
- [8] Y. Izumi *et al.*, submitted.

#### 4. Perspectives

Based on the aspects obtained in the present study, we extend the single cell tracking technique to various targets including gene or protein profiling. Novel imaging techniques to monitor these genetic or epigenetic states, such as phosphorylation of specific proteins will be explored to track the activation (or inactivation) of cell functions in a single cell level. The cell cycle arrest is thought to be a mechanism to stall for time on DNA damage repair in irradiated cells. Challenge to be addressed in future study is to reveal how the radiation memory is transferred to daughter cells after releasing from cell cycle arrest, and finally resulting in genetic instability. The role of the epigenetic regulations by chemically modified proteins should also be clarified in terms of their structural changes.