

放射光 X 線マイクロビームを用いた細胞内局所照射に対する ミトコンドリアの放射線応答研究

Study of mitochondrial response for innercellular-local irradiation using synchrotron X-ray microbeam

神長輝一^{1,*}, 宇佐美徳子², 鈴木啓司³, 横谷明徳¹

¹量子科学技術研究開発機構, 東海量子ビーム応用研究センター,

〒319-1106 那珂郡東海村大字白方 2-4

²物質構造科学研究所, 放射光科学研究施設 〒305-0801 つくば市大穂 1-1

³長崎大学, 原爆後障害医療研究所 〒852-8523 長崎市坂本 1 丁目 12-4

Kiichi KAMINAGA^{1,*}, Noriko USAMI², Keiji SUZUKI³ and Akinari YOKOYA¹

¹Tokai Quantum Beam Science Center,

2-4 Shirakata, Tokai-mura, Naka-gun, 319-1106, Japan

²Institute of Materials Structure Science, Photon Factory,

1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

³Nagasaki University, Atomic Bomb Disease Institute,

1-12-4 Sakamoto, Nagasaki city, 852-8523, Japan

1 はじめに

原子力災害や医療被ばくなどの低線量放射線が生体に与える特徴として、不均一な線量付与が挙げられる。例えばγ線による 1 mGy 程度の被ばくではトラックが通過する細胞と通過しない細胞が共存している。さらにトラックが通過した細胞も、細胞小器官（オルガネラ）が存在する細胞質、あるいはゲノム DNA が存在する細胞核にのみエネルギーが付与される場合もある[1]。このような場合にはゲノム DNA、あるいはオルガネラのみにも損傷が誘発される。

オルガネラの一つであるミトコンドリアは細胞のエネルギーとなる ATP 産生の大半を担っており、細胞の生存に必須である。これまでに、細胞全体に放射線を照射した場合にミトコンドリア量が増加することが報告されている[2]。細胞全体に放射線を照射すると DNA 損傷が誘発され、これを修復するために多くの DNA 損傷修復酵素が働くため、多量の ATP が消費される。放射線照射後に観察されるミトコンドリア量の増加は DNA 損傷修復によって消費される ATP を供給するための現象であると推測されるが、細胞全体に放射線を照射しているためミトコンドリアにも損傷が誘発され、このミトコンドリア損傷に起因してミトコンドリア量が増加した可能性も否定できない。

本研究では X 線マイクロビームを用いて細胞核、あるいは細胞質のみに X 線を照射することで、DNA 損傷あるいはミトコンドリアが存在する細胞質にのみ損傷を誘発させ、その後のミトコンドリア量の継時変化を追跡した。

2 実験

照射細胞試料として、Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)を導入した不死化ヒト正常線維芽細胞(BJ-1 h-TERT)を使用した[3]。Fucci 導入細胞は蛍光顕微鏡で観察される細胞核の蛍光から細胞周期を識別することができる(図 1)。

BL-27B生物ステーションに設置されている X線マイクロビーム照射装置を用いて細胞核、あるいは細胞質のみへの X 線照射を行った。細胞核照射には細胞核の大きさよりも小さな $10 \times 10 \mu\text{m}$ に成形されたビームを使用した。また、細胞質照射には $60 \times 60 \text{mm}$ のビーム中央に細胞核の大きさよりも一回り大きな $22 \mu\text{m} \phi$ の金ロッドを挿入することで中央部を遮蔽したビームを用いた(図 2)。

細胞全体照射には、ビームラインに併設されている X線発生装置を使用した。吸収線量は、全て 6 Gyとした。照射後、ミトコンドリアの膜電位に依存して蛍光が変化する(高膜電位部位：赤、低膜電位部位：緑) JC-1 試薬による染色・観察を経時的に行い、得られた蛍光像の赤、緑色の蛍光量を指標にミトコンドリア量の評価を行った。

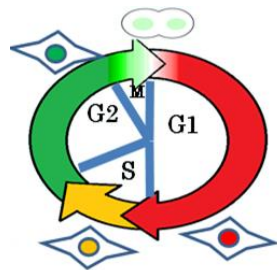


図 1 Fucci 導入細胞の細胞周期

細胞核が G1 期では赤色、S 期では黄色、G2/M 期では緑色蛍光を示す。

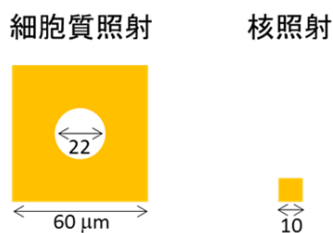


図2 X線マイクロビームの照射エリア
各照射条件での照射範囲をオレンジ色で示す。

3 結果と考察

JC1 染色による各細胞の緑色および赤色の蛍光面積をミトコンドリアの低膜電位および高膜電位のそれぞれの領域を示す相対指標とし、各観察開始時間・照射条件における細胞当たりの各蛍光面積を算出した。得られた各蛍光面積を元に、緑色蛍光面積と赤色蛍光面積を足し合わせた細胞あたりの総ミトコンドリア蛍光面積について、各観察開始時間・照射条件での値を、同時刻の非照射試料と比較した相対的な結果を図3に示す。

蛍光面積をミトコンドリア量の指標とすると細胞核照射を行った場合には照射後数日間ミトコンドリア量が増加する傾向が観察された。細胞核のみへのX線照射によってミトコンドリア量が増加したことから、これまでに報告されていた放射線照射によるミトコンドリア量の増加には、細胞核(ゲノムDNA)への損傷誘発が重要な役割を果たしていたと考えられる。ゲノムDNAの損傷とその損傷応答によってミトコンドリア量を増加させる、何らかのシグナルネットワークが活性化したと考えられる。

照射 72時間後の結果を細胞周期ごとに再プロットした結果、G1期の細胞が他の細胞周期の細胞よりも約2倍程度高い値を示した。このことから、ミトコンドリア量の増加はG1期の細胞に起因していると考えられる。

一方、細胞質X線を照射した場合には、ミトコンドリア量が減少傾向を示した。細胞質照射ではミトコンドリアに損傷が誘発され、部分的に膜電位が低下し機能不全に陥っていたと考えられる。このような機能不全に陥った箇所を切り離しオートファジーの一種であるマイトファジーによって分解するメカニズムの存在が知られており[4-6]、細胞質照射により生じた損傷部位がマイトファジーによって分解され、その量が減少したと考えられる。

全体照射ではゲノムDNAの損傷によってミトコンドリアを増加させるシグナルネットワークが活性化されるが、一方でミトコンドリアの損傷によってマイトファジーが誘発される。全体照射ではミトコンドリア蛍光面積を増減させる制御を同時に受けるが、後者の分解プロセスが前者を上回ることによってミトコンドリア蛍光面積は結果として減少したと考えられる。

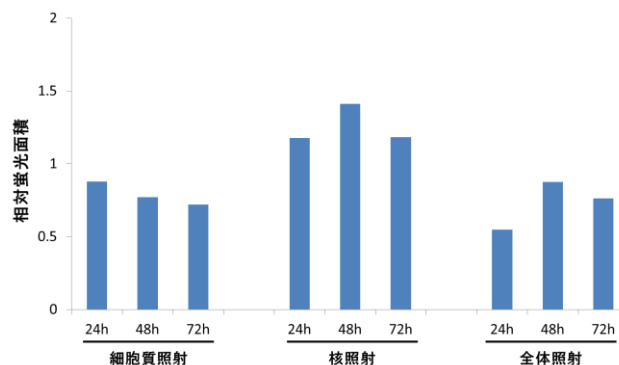


図3 JC1によりミトコンドリアを染色した時の細胞当たりの相対蛍光面積

縦軸は緑色面積と赤色面積を足し合わせた各細胞当たりの総蛍光面積を、横軸は観察時刻を示す。

4 まとめ

今回、X線マイクロビームを用いて細胞質あるいは細胞核にのみX線を照射することで、照射部位特異的なミトコンドリアの応答を明らかにすることができた。放射線生物影響の理解にはミトコンドリア以外のオルガネラも重要な役割を担っていると推測され、今回のように損傷部位を限定させることで着目するオルガネラへの影響とその応答をクローズアップできると考えられる。また、オルガネラの働きは細胞周期によっても制御されているため、Fucci細胞を用いるなど細胞周期も考慮に入れた研究が重要になってくると考えている。

参考文献

- [1] 渡辺立子, 放射線生物研究, 47(4), 335-346(2012).
- [2] T. Yamamori et al., J. Radiat. Res., 58, 292-301(2017)
- [3] H. Sakaue-Sawano et al., Cell. 132(3), 487-496(2007).
- [4] L. A. Scarffe et al., Trends Neurosci., 37, 315-324(2014).
- [5] K. Shiba-Fukushima et al., Sci. Rep., 2, 1002(2012).
- [6] B. Hamacher et al. Cell. Mol. Life Sci., 73(4), 775-795(2016)

*kaminaga.kiichi@qst.go.jp