

紫外線誘発 DNA 損傷および修復酵素の細胞内分布状態の三次元的表示

奈良県立医科大学 ラジオアイソトープ実験施設

森 俊 雄

Two major DNA damage produced by 254-nm UV light are cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) and (6-4) photoproduct (6-4PP). Both photolesions are repaired in normal human cells by nucleotide excision repair (NER). However, little is known about where CPDs are repaired or where 6-4PPs are repaired in relation to the various sub-nuclear structures. The present study was performed to aim at three-dimensional demonstration of UV-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei. We first investigated the repair kinetics of CPD and 6-4PP using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with damage-specific monoclonal antibodies in normal human and xeroderma pigmentosum complementation group C (XP-C) cells. We also examined the kinetics of repair DNA synthesis (unscheduled DNA synthesis, UDS) using a quantitative immunofluorescence method with anti-5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. We confirmed the normal repair in normal human cells and the impaired repair in XP-C cells. Then, using laser scanning confocal microscopy, we succeeded in three-dimensional visualization of the nuclear localization of CPDs, 6-4PPs and UDS in individual human cells. The typical three-dimensional images of photolesions or UDS at various repair times reflected well the repair kinetics obtained by ELISA or immunofluorescence. The important finding is that the punctate, not diffusely spread, nuclear localization of unrepaired 6-4PPs was found at 2 h after irradiation. Similarly, the focal nuclear localization of UDS was observed both during the first and the second 3h-repair periods. The present results suggest that both 6-4PPs and CPDs are non-randomly repaired from nuclei in normal human cells.

1 緒言

太陽光に含まれる紫外線 (特に、B 紫外線) は細胞 DNA 中にシクロブタン型ダイマー (CPD) や (6-4) 型ダイマー (6-4PP) といった DNA 損傷を誘起し、皮膚がんを発生させる¹⁾。ヒトにおいては、これらの DNA 損傷はヌクレオチド除去修復機構 (NER) によって修復され、修復機構に欠陥を持つ常染色体劣性遺伝病、色素性乾皮症 (XP) 患者では太陽光被ばく部位の皮膚がん発生頻度は著しく高くなる²⁾。近年、DNA 修復研究は驚くべき速度で進展し、E を除いて 7 種類の相補性群 (A-G) からなる XP の原因遺伝子全てがクローニングされるに至った。また、精製修復蛋白を用いることにより、修復反応を試験管内で再構築することが可能となり、NER は約 30 種類の

蛋白が順序よく関与する反応であることが明らかとなってきた^{3, 4)}。こうした中、修復蛋白の一つである XPG は細胞核内でドット状に分布し、修復に伴い再分布することが報告された⁵⁾。この結果は、試験管内修復実験に加えて、DNA 損傷や修復酵素を実際の修復反応の場である細胞核内で観察することの必要性和学問的おもしろさを示唆するものである。そこで本実験では、主要な 2 種類の紫外線誘発 DNA 損傷の生成および修復について、我々が樹立した損傷特異モノクローナル抗体を共焦点レーザー顕微鏡に応用することにより個々の細胞レベルで三次元的に可視化することを試みた。

2 実験

2.1 細胞

正常ヒト皮膚由来 (MSU-1、MSU-2)、および相補性群 C に属する XP 患者皮膚由来 (XP1CTA) の線維芽細胞を実験に用いた。細胞はダルベッコ変法 MEM 培地に 10% の牛胎児血清を加えた培養液中で培養した。



Three-dimensional visualization of ultraviolet-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei

Toshio Mori, Ph.D.

Radioisotope Research Center
Nara Medical University

2.2 CPD および 6-4PP の修復動態の解析

細胞に紫外線（主として 254nm）を照射した直後および各時間修復後に DNA を抽出し、損傷特異モノクローナル抗体（CPD に対する TDM-2 抗体、6-4PP に対する 64M-2 抗体）を利用した ELISA 法（酵素標識免疫法）により各サンプル DNA 中の損傷を定量した⁶⁾。

2.3 紫外線照射後の修復過程における細胞内 DNA 損傷の三次元的可視化

細胞に紫外線を照射した直後および各時間修復後に細胞を固定し、細胞 DNA を変性した後、損傷特異モノクローナル抗体、Biotin 標識 2 次抗体、さらに Streptavidin-FITC により DNA 損傷を蛍光染色した。同時に、細胞核 DNA を propidium iodide (PI) で蛍光染色した。共焦点レーザー顕微鏡 (InSIGHTplus-IQ, Meridian Instruments 社製) を用いて蛍光画像を作成し、各サンプル当たり 0.2 μ m 間隔の約 25 枚の連続平面画像を付属したソフトで立体化し三次元画像を構築した⁷⁾。

2.4 紫外線照射後の修復 DNA 合成（不定期 DNA 合成）動態の解析

紫外線照射後、細胞を fluorodeoxyuridine および bromodeoxyuridine (BrdU) 存在下で種々の時間修復培養した。細胞を固定し DNA を変性させた後、抗 BrdU モノクローナル抗体、Biotin 標識 2 次抗体、さらに Streptavidin-FITC により修復 DNA 合成部位を蛍光染色した。同時に、細胞核 DNA を PI で蛍光染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、1 サンプル当たり約 100 細胞について、単個細胞当たりの FITC および PI の蛍光量を定量し、修復 DNA 合成量を FITC/PI として計算した。なお、サンプル中に一部混入する定期 DNA 合成細胞は極めて強力な FITC 蛍光を示し、修復 DNA 合成の計算から除外した。

2.5 紫外線照射後の細胞内修復 DNA 合成の三次元的可視化

2.4 と同様の処理をした細胞において、共焦点レーザー顕微鏡を用い、修復 DNA 合成および細胞核 DNA を示す FITC および PI の蛍光画像を作成し、0.2 μ m 間隔の約 25 枚の連続平面画像からなる三次元蛍光画像を構築した⁷⁾。

3 結果

3.1 ヒト細胞における CPD および 6-4PP の修復動態の定量

図 1 に、30J/m² の紫外線を照射された正常および XP-C 細胞における CPD および 6-4PP の修復動態の ELISA 法による定量の結果を示す。二つの正常細胞はほぼ同様の修復動態を示した。つまり、6-4PP の 90% 以上を 3 時間以内に修復し、また、CPD の 40% および 50% をそれぞれ照射後 10 および 24 時間に修復除去した。一方、XP-C 細胞は照射後 24 時間以内に両損傷をほとんど修復できなかった。

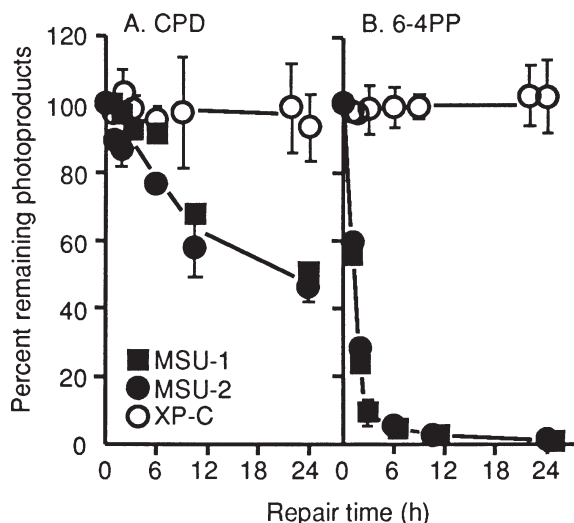


図1 30J/m² の紫外線を照射された正常および XP-C 細胞における CPD および 6-4PP の修復動態の ELISA 法による定

3.2 紫外線照射後の修復過程における細胞内 DNA 損傷の三次元的可視化

図2に、 $30\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線照射直後および修復過程の正常細胞(MSU-2)における6-4PPおよび細胞核DNAの三次元蛍光画像を示す。画像は細胞核の下側半分のみを表示しており、細胞核内部の観察を可能とした。また、損傷の画像を大きく示し、対応する細胞核DNAを右下に小さく表示した。未照射の細胞には6-4PPを示す蛍光画像はほとんど見られなかった(図2A)。しかし、照射直後には強い画像が得られた(図2B)。損傷とDNAの三次元蛍光画像が重なり合うことから、6-4PPが細胞核内一面に誘発されていることがわかる。6-4PPの蛍光画像は照射後の修復時間に依存して次第に弱まった(図2C~F)。興味あることに、修復2時間後に修復されずに残った6-4PPの画像は細胞核内でドット状に見られた。

図3に、XP-C細胞の各修復過程での6-4PPおよび細胞核DNAの三次元蛍光画像を示す。MSU-2細胞の場合と同様に、未照射の細胞には6-4PPの蛍光画像はほとんど見られないが(図3A)、照射直後にはDNA画像と重なり合う明るい蛍光画像が得られた(図3B)。しかしながら、6-4PPの明るい蛍光画像は照射後6時間修復させても何ら変化しなかった(図3C~F)。

図4に、正常細胞(MSU-2)の各修復過程でのCPDおよび細胞核DNAの三次元蛍光画像を示す。未照射の細胞にはCPDの蛍光画像はほとんど見られないが(図4A)、照射直後には明るい蛍光画像が得られた(図4B)。照射6時間後でも、CPDの明るい蛍光画像に大きな変化が見られなかった。これは高々20%しか修復されないとするELISAの結果(図1)とつじつまが合う。

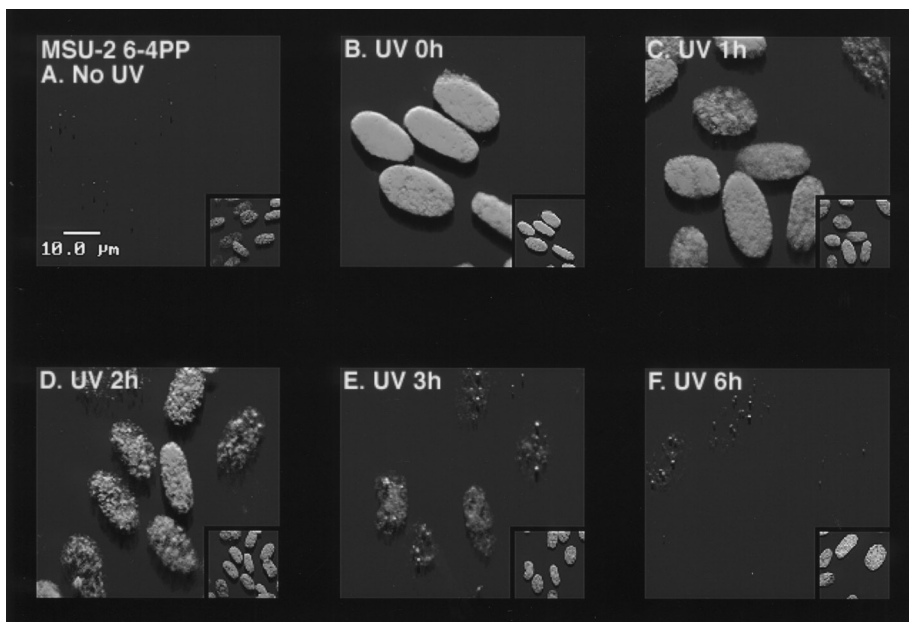


図2 $30\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線照射直後および修復過程の正常細胞(MSU-2)における6-4PPおよび細胞核DNAの三次元蛍光画像

画像は細胞核の下側半分のみを表示しており、細胞核内部の観察を可能とした。また、損傷の画像を大きく示し、対応する細胞核DNAを右下に小さく表示した。A) 未照射、B) 照射直後、C) 1時間修復、D) 2時間修復、E) 3時間修復、F) 6時間修復。

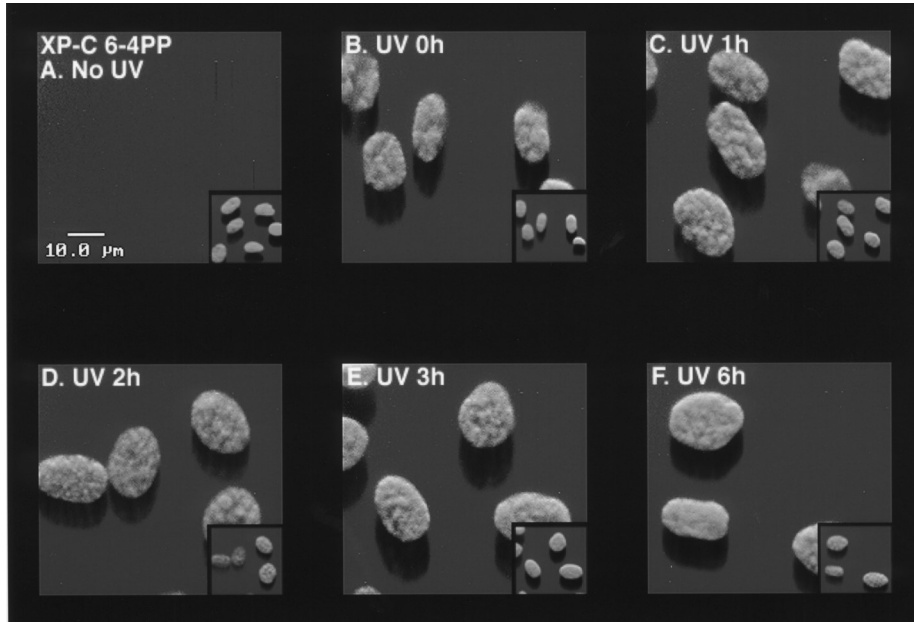


図3 30J/m²の紫外線照射直後および修復過程のXP-C細胞における6-4PPおよび細胞核DNAの三次元蛍光画像

A) 未照射、B) 照射直後、C) 1時間修復、D) 2時間修復、E) 3時間修復、F) 6時間修復。

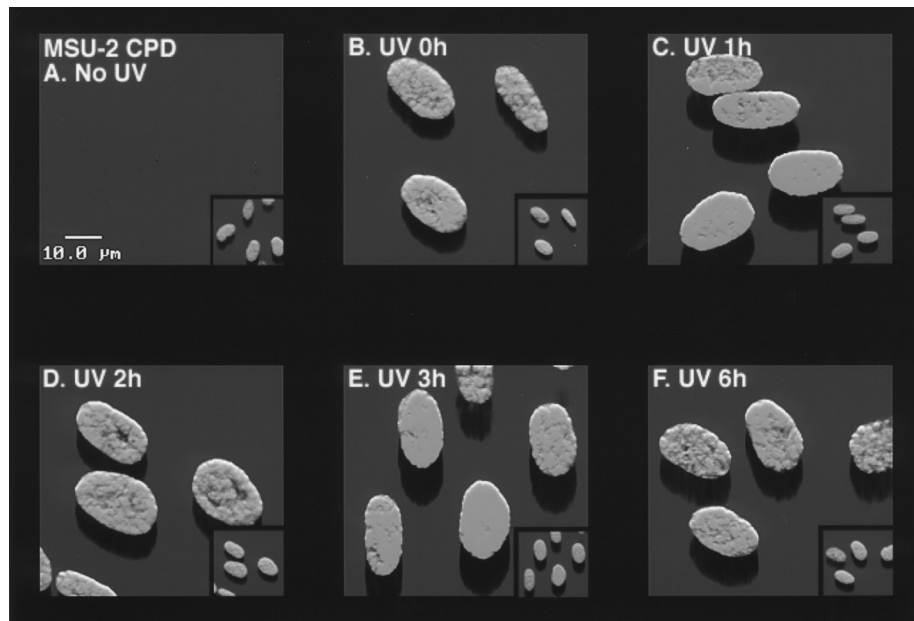


図4 30J/m²の紫外線照射直後および修復過程の正常細胞(MSU-2)におけるCPDおよび細胞核DNAの三次元蛍光画像

A) 未照射、B) 照射直後、C) 1時間修復、D) 2時間修復、E) 3時間修復、F) 6時間修復。

3.3 紫外線照射後の修復 DNA 合成 (不定期 DNA 合成) 動態の定量

図5に、 $30\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線を照射後の正常およびXP-C細胞における修復DNA合成動態の定

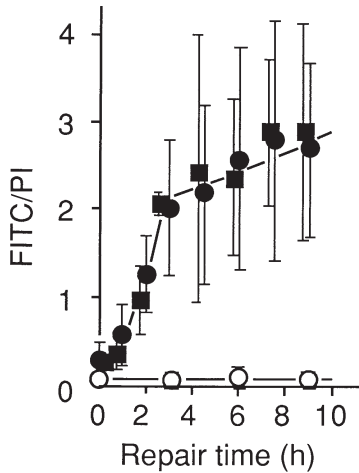


図5 $30\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線を照射後の正常およびXP-C細胞における修復DNA合成動態の定量
シンボルは図1と同様。

量の結果を示す。二つの正常細胞はほぼ同様の修復DNA合成動態を示した。照射後3時間までは極めて効率が良かったが、それ以降は効率が低下した。一方、XP-C細胞は照射後9時間の間全く修復DNA合成を示さなかった。

3.4 紫外線照射後の細胞内修復DNA合成の三次元的可視化

図6に、 $30\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線照射後の正常細胞(MSU-2)における修復DNA合成および細胞核DNAの三次元蛍光画像を示す。修復が始まっていない照射直後には修復DNA合成を示す蛍光画像が全く見られないが(図6A)、その後修復時間に依存して次第に画像は明るくなった(図6B~E)。修復3時間で、修復DNA合成蛍光画像が細胞核内でドット状を示すのが興味深い。

図7に、XP-C細胞の修復DNA合成および細胞核DNAの三次元蛍光画像を示す。照射後6時間まで、全く修復DNA合成が行われていないこ

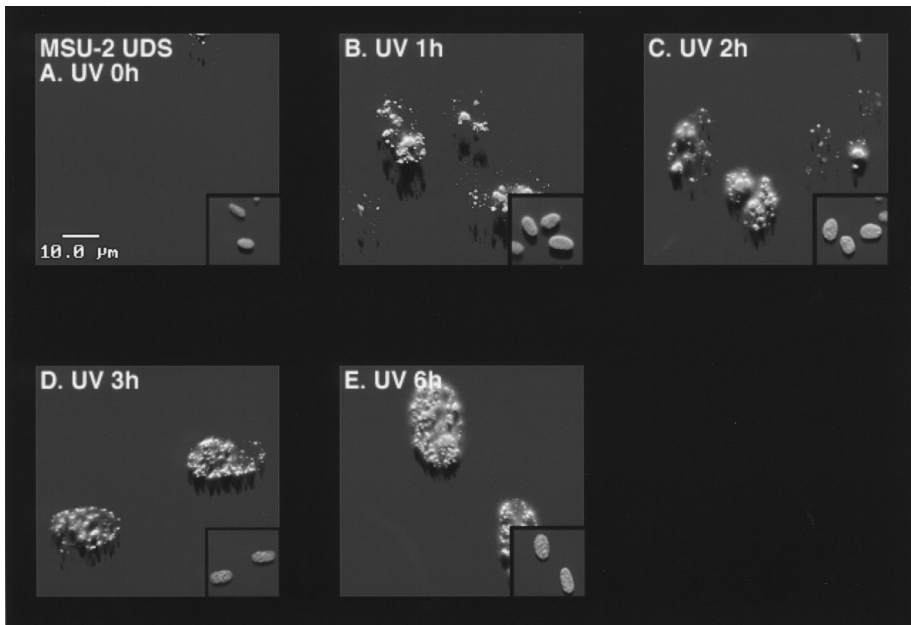


図6 $30\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線照射後の正常細胞(MSU-2)における修復DNA合成および細胞核DNAの三次元蛍光画像

画像は細胞核の下側半分のみを表示しており、細胞核内部の観察を可能とした。また、修復DNA合成の画像を大きく示し、対応する細胞核DNAを右下に小さく表示した。A)照射直後、B)1時間修復、C)2時間修復、D)3時間修復、E)6時間修復。

とがわかる。

また、図 8 に、紫外線照射直後からの 3 時間、および 3 時間目から 6 時間目にかけての 3 時間における正常細胞 (MSU-2) の修復 DNA 合成および細胞核 DNA の三次元蛍光画像を示す。どちらの場合も修復 DNA 合成蛍光画像が細胞核内でドット状を示した。

4 考 察

254nm 紫外線はヒト細胞 DNA 中に主に CPD と 6-4PP を誘起する。さらに、CPD と 6-4PP は共通して NER で修復され、損傷を含む約 30 ヌクレオチドが DNA から修復除去された後、生じたギャップは修復 DNA 合成によってうめられ

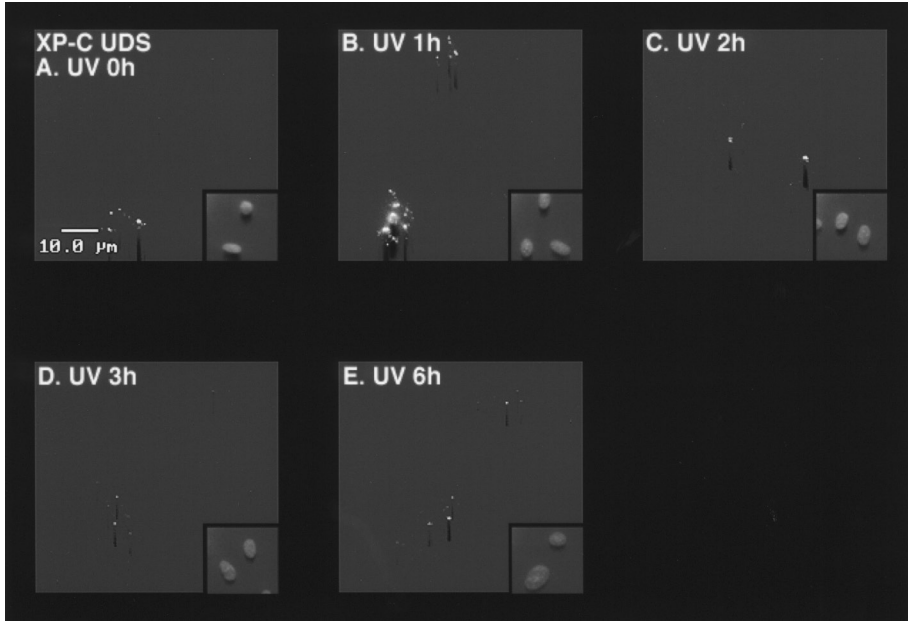


図 7 30J/m²の紫外線照射後の XP-C 細胞における修復 DNA 合成および細胞核 DNA の三次元蛍光画像

A) 照射直後、B) 1 時間修復、C) 2 時間修復、D) 3 時間修復、E) 6 時間修復。

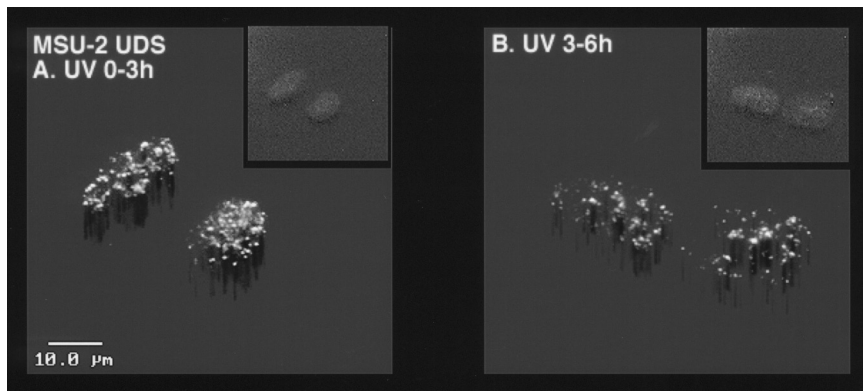


図 8 30J/m²の紫外線照射直後からの 3 時間、および 3 時間目から 6 時間目にかけての 3 時間における正常細胞 (MSU-2) の修復 DNA 合成および細胞核 DNA の三次元蛍光画像

A) 照射直後からの 3 時間の修復 DNA 合成、B) 照射後 3 時間目から 6 時間目にかけての 3 時間の修復 DNA 合成。

る。それ故、図1と図5の結果を比較することで、各々の損傷の生成割合などが計算できる。計算の結果、6-4PPのCPDに対する生成割合は0.34となった。また、照射後3時間までの修復DNA合成は、75%の6-4PPと25%のCPDが関与すること、さらに、3時間以降の修復DNA合成は、ほぼ100%CPDが関与するすることが明らかとなった。

紫外線照射直後および修復過程のヒト細胞において、私達は世界で初めてCPD、6-4PPおよび修復DNA合成の三次元的表示に成功した。得られた蛍光画像は各損傷や修復DNA合成に極めて特異的であることが確認され、さらに、修復に伴う画像変化は、ELISA法や免疫染色法による定量的結果を見事に反映することもわかった。これらの結果は3次元蛍光画像が極めて信頼性の高いものであることを示している。この新技術の開発がもたらした最大の発見は、6-4PPの修復が細胞核内で均一ではないことを示唆したことである(図2D)。この結果は、修復DNA合成される部位も細胞核内で均一ではないという図6Dにより支持された。さらに、6-4PPが主に関与する照射後3時間の修復DNA合成も、CPDがほぼ全面的に関与する3時間目以降の修復DNA合成も共に細胞核内で不均一に起こることが明らかとなった(図8)。以上の結果は、CPDも6-4PPも共に細胞核内で不均一に修復されることを示すものとなった。

DNA損傷の修復過程の三次元表示に成功したことから、続いてNERに関係する修復蛋白の画像作成を試みた。不幸なことには、損傷検出に用いた細胞固定法は修復蛋白のエピトープを破壊することが判明した。現在、修復蛋白の染色に成功した新固定法を損傷検出に応用する実験を進めている。

5 謝辞

本研究は奈良県立医科大学皮膚科学研究室との共同研究であり、関係する諸先生に心より感謝

いたします。また、本研究の遂行を可能にしたコストメトロジー研究振興財団研究助成に対し深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Clingen PH, Arlett CF, Cole J et al: Correlation of UVC and UVB cytotoxicity with the induction of specific photoproducts in T-lymphocytes and fibroblasts from normal human donors, *Photochem. Photobiol.*, 61, 163-170, 1995.
- 2) Cleaver JE, Kraemer KH: Xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome, In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 1995, 4393-4419.
- 3) Sancar A: Mechanisms of DNA excision repair, *Science* 266, 1954-1956, 1994.
- 4) Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MKK et al: Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components, *Cell*, 80, 859-868, 1995.
- 5) Park MS, Knauf JA, Pendergrass SH et al: Ultraviolet-induced movement of the human DNA repair protein, Xeroderma pigmentosum type G, in the nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8368-8373, 1996.
- 6) Mori T, Nakane M, Hattori T et al: Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4) photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA, *Photochem. Photobiol.*, 54, 225-232, 1991.
- 7) Nakagawa A, Kobayashi N, Muramatsu T et al.: Three-dimensional visualization of ultraviolet-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei, *J. Invest. Dermatol.*, 110, 143-148, 1998.