



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	放射線によるミトコンドリア形態変化と放射線感受性との関連性に関する研究
Author(s)	房, 知輝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第14115号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14115
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80103
Type	doctoral thesis
File Information	Tomoki_B0.pdf



博士論文

放射線によるミトコンドリア形態変化と
放射線感受性との関連性に関する研究

2019

北海道大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程

放射線学教室

房 知輝

<目次>

目次	1
略語一覧	4
緒言	5
第一章：分裂と融合を通じたミトコンドリア形態変化が細胞の放射線感受性に与える影響の評価	
1. 序論	8
2. 材料と方法	12
3. 結果	
3-1. 各種ミトコンドリア形態制御タンパク質のノックダウンがミトコンドリア形態に与える影響	16
3-2. 各種ミトコンドリア形態制御タンパク質のノックダウンが細胞の放射線感受性に与える影響	17
4. 考察	23
5. 小括	24
第二章：放射線によるミトコンドリア分裂亢進における Drp1 活性化のメカニズムの検討	
1. 序論	25
2. 材料と方法	29
3. 結果	
3-1. X線照射 Drp1 S616 および S637 リン酸化に与える影響	33
3-2. X線照射によるミトコンドリア分裂に重要な Drp1 のリン酸化部位の特定	33

3-3. X線照射による Drp1 S616 リン酸化に対する ERK1/2 の関与	35
3-4. X線照射による Drp1 S616 リン酸化に対する PKC の関与	36
3-5. X線照射による Drp1 S616 リン酸化に対する CaMKII の関与	37
3-6. X線照射によるミトコンドリア形態変化に対する CaMKII 阻害の 影響	37
4. 考察	48
5. 小括	50
第三章：ミトコンドリア分裂による放射線感受性修飾メカニズムの検討	
1. 序論	52
2. 材料と方法	54
3. 結果	
3-1. ミトコンドリア分裂抑制による放射線感受性変化に対する ネクロシスの寄与	57
3-2. ミトコンドリア分裂抑制による放射線感受性変化に対する アポトーシスの寄与	57
3-3. ミトコンドリア分裂抑制による放射線感受性変化に対する 分裂期崩壊の寄与	58
3-4. ミトコンドリア分裂抑制による分裂期崩壊低減に対する DNA 二本鎖切断の寄与	59
3-5. ミトコンドリア分裂抑制による分裂期崩壊低減に対する ATP の寄与	59
3-6. ミトコンドリア分裂抑制による分裂期崩壊低減に対する ROS の寄与	60

3-7. ミトコンドリア分裂抑制による分裂期崩壊低減に対する Ca^{2+} の寄与	60
4. 考察	70
5. 小括	74
総括	75
謝辞	79
引用文献	80
英文抄録	91

<略語一覧>

- AA-2G: 2-glucopyranoside ascorbic acid
- Bax: Bcl-2-associated X protein
- CaMKII : calmodulin-dependent protein kinase II
- CDK1: cyclin-dependent kinase 1
- cPKC: conventional protein kinase C
- Drp1: dynamin-related protein 1
- ERK1/2: extracellular signal-related kinase 1/2
- FBS: fetal bovine serum
- Fis1: mitochondrial fission 1
- GED: GTPase effector domain
- HRP: horseradish peroxidase
- MEK1/2: MAPK/ERK kinase1/2
- Mff: mitochondrial fission factor
- Mfn1/2: mitofusin 1/2
- NAC: N-acetylcysteine
- Opa1: optic atrophy 1
- PKA: protein kinase A
- PKC: protein kinase C
- PKC δ : protein kinase C δ
- PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate
- ROS: reactive oxygen species
- SUMO: small ubiquitin-related modifier
- TBST: Tris buffered saline-Tween20

<緒言>

放射線によるがん治療の基盤は細胞死の誘導であり、その中心は核 DNA の損傷と考えられてきた。これまでに、核 DNA を標的とした放射線感受性を増強する薬剤(放射線増感剤)が開発されてきたものの、その成果は十分とはいえない。近年、放射線がミトコンドリア酸素消費率やミトコンドリア由来活性酸素種(ROS)生成を亢進させるといった知見が報告されるとともに、ミトコンドリア機能を修飾する薬剤により放射線増感を引き起こすことが明らかにされている^{62,64)}。これらの知見から、ミトコンドリアが細胞の放射線応答に寄与しており、放射線治療の標的となりうることが示唆されている。

ミトコンドリアは多様な機能を持つ細胞内小器官であり、ATP の産生、細胞内カルシウムの貯蔵・放出、熱産生ならびにアポトーシスの誘導など重要な役割を担っている。ミトコンドリアは細胞の生理的状态を維持するために必須の機能を担っていることから、ミトコンドリアの機能を正常に保つことは細胞の品質および機能を維持するために重要である。近年、これらのミトコンドリア機能とその形態には深い関連があることが明らかにされつつある^{12,40,57)}。細胞内においてミトコンドリアは、分裂と融合を繰り返すことでその形態を常に変化させている。そしてこのミトコンドリアダイナミクスと呼ばれるこの現象は、ミトコンドリアの機能および細胞全体の機能の維持に重要であることが示唆されている。

これまでに、ミトコンドリアダイナミクスを制御する分子機構について研究が進められ、ミトコンドリア分裂および融合に関わる因子について明らかにされてきた²⁵⁾。ミトコンドリア融合は、ミトコンドリア内膜に局在する optic atrophy 1 (Opa1)およびミトコンドリア外膜に局在する mitofusin1/2 (Mfn1/2) が関与し、それぞれが内膜および外膜を融合することで実行される^{4,40)}。一

方、ミトコンドリア分裂は、**dynamamin-related protein 1 (Drp1)**が主要な制御因子として働き、ミトコンドリア外膜に局在する **mitochondria fission protein 1 (Fis1)**および **mitochondria fission factor (Mff)**などが **Drp1** のアダプタータンパク質としてミトコンドリア分裂を補助している。ミトコンドリア分裂と融合のバランスはこれらのタンパク質の発現量や活性による調節により制御されている。

細胞の放射線応答におけるミトコンドリアの役割については、アポトーシスの誘導や **ROS** の生成など様々な報告があるが、放射線によるミトコンドリア形態変化とその意義についての研究はあまりなされていない。当研究室では、**X**線照射が **Drp1** 依存性のミトコンドリア分裂を亢進すること、ならびに **Drp1** 機能抑制が **X**線によるミトコンドリア形態変化と細胞死の一部を抑制することを先に報告している⁶⁰⁾。これらの結果から、放射線によってミトコンドリア形態が変化することで細胞の放射線感受性に寄与することが示唆されている。しかしながら、放射線によるミトコンドリア形態変化がどのようなミトコンドリア機能変化を通じて細胞死を誘導しているか未だ明らかにされておらず、また、ミトコンドリア形態変化についての検討も、複数あるミトコンドリア形態制御タンパク質の中で **Drp1** の評価のみに留まっている。

本博士論文では、放射線によるミトコンドリア形態変化と放射線感受性との関連性を明らかにすることを目的に研究を行った。第一章では、ミトコンドリア融合および分裂を制御するタンパク質をそれぞれ安定的にノックダウンした細胞を樹立し、それらの細胞における放射線感受性を評価した。その結果、ミトコンドリア融合は細胞の放射線感受性に影響しない一方で、**Drp1** および **Fis1** を通じたミトコンドリア分裂が細胞の放射線感受性を修飾することが明らかとなった。第二章および第三章では、放射線がミトコンドリア分裂を亢進す

るメカニズムについて、またミトコンドリア分裂が放射線感受性を修飾するメカニズムについてそれぞれ検討した。研究の結果、第二章では、X線照射により calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)が Drp1 の 616 番目のセリン残基をリン酸化することでミトコンドリア分裂を亢進することを明らかにした。また、第三章では、X線照射後のミトコンドリア分裂を通じた細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が分裂期崩壊の誘導に寄与していることを報告した。

なお、本博士論文のすべての内容は第一章および第三章については Biochemical and Biophysical Research Communications 誌 (doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.027 ならびに doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.012)において 2 編に分けて公表済みである。

<第一章>

分裂と融合を通じたミトコンドリア形態変化が

細胞の放射線感受性に与える影響の評価

1. 序論

緒言でも述べたように、ミトコンドリア機能とミトコンドリア形態には深い関連があることが明らかにされている^{12,40,57)}。細胞内においてミトコンドリアは一定の形態を保つのではなく、融合と分裂を繰り返すことで常にその形態を変化させている。ミトコンドリアダイナミクスと呼ばれるこの現象は、ミトコンドリア機能の制御および維持に重要であることが分かってきた。ミトコンドリア融合は、ミトコンドリアを構成する DNA、タンパク質ならびに脂質を複数のミトコンドリアで共有することによって、ミトコンドリア全体としての機能の維持に寄与する⁵⁷⁾。一方、ミトコンドリア分裂は、損傷を受けたミトコンドリアを選択的に切り離し、オートファジーによってこれを分解することで、細胞内におけるミトコンドリア全体の機能の維持に寄与することが知られている²¹⁾。また、ミトコンドリア分裂と融合のバランスは細胞周期を通じて変化することも知られている。DNA 合成を開始する G1/S 期では、断片化したミトコンドリアと比べて酸化的リン酸化活性が高い伸長化ミトコンドリアが多く観察される一方で、M 期では娘細胞に均等にミトコンドリアを分配するために短縮したミトコンドリアが多く観察されることが報告されている^{52,56)}。

これまでに、ミトコンドリア分裂と融合を制御する分子機構については研究が進められており、それぞれに関わる因子について明らかにされてきた(図 1)²⁵⁾。ミトコンドリア分裂と融合はそれぞれ Drp1 ならびに Opa1 と Mfn1/2 の三種類の GTPase によって主に制御されている。ミトコンドリア融合はミトコンドリア内膜と外膜にそれぞれ局在する Opa1 と Mfn1/2 により制御されており、Opa1

および Mfn1/2 のそれぞれがホモダイマーを形成するか Mfn1/2 間でのヘテロダイマーを形成することで、ミトコンドリア内膜および外膜の融合を GTPase 加水分解を通じて実行する^{4,40)}。一方で、ミトコンドリア分裂を制御する主要な制御因子には dynamin family タンパク質の一種である Drp1 が挙げられる。通常、Drp1 は細胞質に存在するが、活性化することでミトコンドリアへと移行する。活性化した Drp1 はミトコンドリア外膜に局在する Fis1 や Mff などのアダプタータンパク質を介してミトコンドリア分裂部位に環状に集積し、GTP 加水分解を通じて Drp1 が収縮することでミトコンドリアの分裂が実行される^{4,34,40)}。現在までの研究により、Drp1 を介したミトコンドリア分裂の調節が、ミトコンドリアの機能のみならず細胞全体の機能、特に細胞死に影響することが明らかにされてきている。例えば、Drp1 阻害剤である Mdivi-1 処理が虚血再灌流傷害によるミトコンドリアの断片化および細胞死を抑制することが明らかとなっている^{38,69)}。また、Opa1 を過剰発現させることでミトコンドリア融合を促進すると、心臓や脳組織の虚血障害による細胞死が減弱することが報告されている⁵⁵⁾。これらの知見から、ミトコンドリア形態制御が細胞傷害時の生死に重要な役割を担うことが示唆されている。

細胞の放射線応答におけるミトコンドリアの役割については、アポトーシスの誘導や活性酸素種の生成など様々な報告があるが、放射線によるミトコンドリア形態変化とその意義についての研究はあまりなされていない。近年の研究では、 γ 線照射および α 線照射が Drp1 依存性のミトコンドリア分裂を亢進することが報告されている^{32,67)}。また、当研究室の先の研究では、X 線照射が Drp1 依存性のミトコンドリア分裂を亢進すること、ならびに Drp1 機能抑制が X 線によるミトコンドリア形態変化と細胞死の一部を抑制することを報告している⁶⁰⁾。これらの結果から、ミトコンドリア形態変化が細胞機能に何らかの

影響を与え、細胞の放射線応答に寄与していることが示唆されているものの、その検討は複数あるミトコンドリア形態制御タンパク質の中で **Drp1** の評価のみに留まっている。

そこで、本章では、ミトコンドリア形態変化と放射線感受性との関連性を明らかにすることを目的に研究を行った。そのために、ミトコンドリア融合および分裂を制御するタンパク質に着目し、それぞれを安定的にノックダウンした細胞を用いて放射線感受性を評価した。

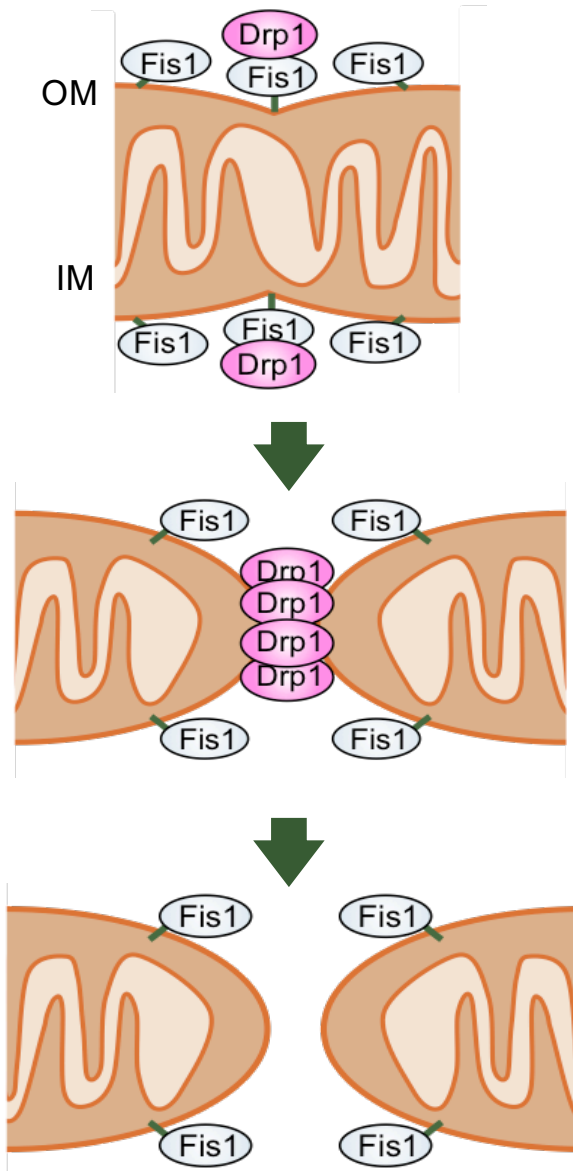
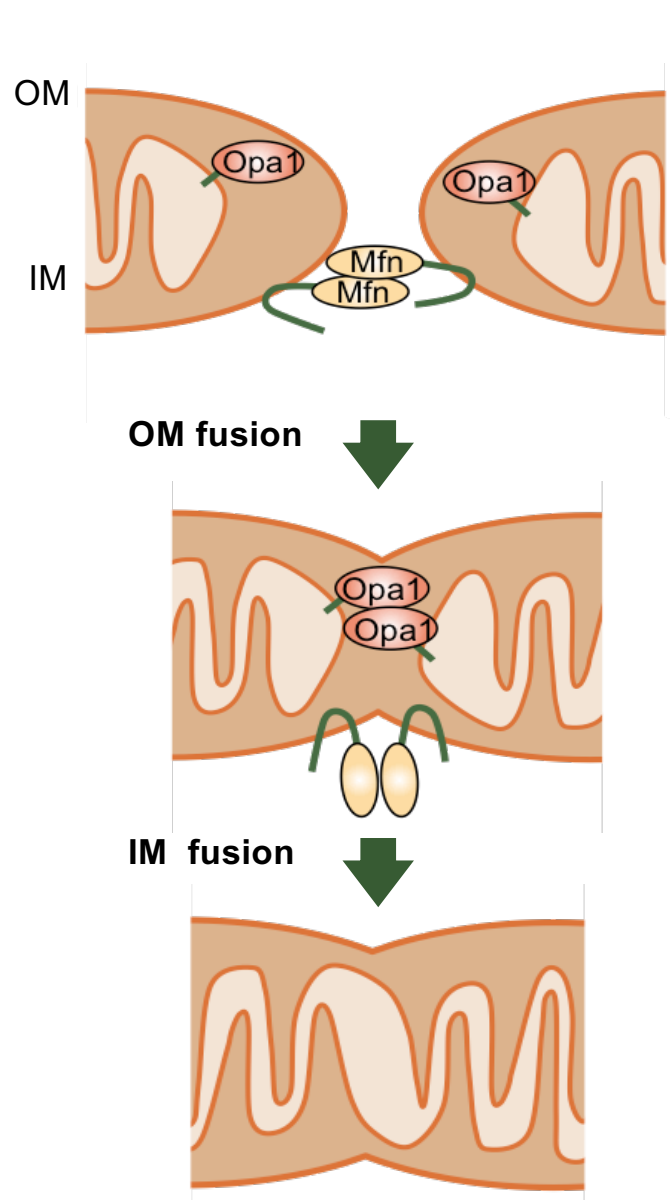
A**B**

図1. ミトコンドリアダイナミクスを制御する分子基盤

ミトコンドリア分裂 (A)およびミトコンドリア融合 (B)の模式図
(OM: outer membrane, IM: inner membrane)

2. 材料と方法

2-1. 試薬

抗 Actin 抗体および horseradish peroxidase (HRP)標識抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)より購入した。抗 Drp1 抗体および抗 Opa1 抗体は BD Biosciences (San Jose, CA, USA)より購入し、抗 Fis1 抗体は GeneTex Inc (Irvine, CA, USA)より、抗 Mfn2 抗体は Abcam (Cambridge, UK)より購入した。

2-2. プラスミドおよびプライマー

各種ミトコンドリア形態制御タンパク質に対する shRNA 発現ベクターは山盛前准教授 (現 一般財団法人 日本宇宙フォーラム 研究員)により以下の手順で作成していただいたものを使用した。pEF6.mCherry-TSG101 (Addgene plasmid #38318)の XhoI サイトを PCR-based site-directed mutagenesis により破壊した。続いて、pENTR/pSM2 (CMV) GFP (w513-1) (Addgene plasmid #19170)由来の GFP-miR30 region を BamHI および BstbI サイトにサブクローニングし、作出されたプラスミドは pEF6-GFP-miR30 と命名した。各種のミトコンドリア形態制御タンパク質を標的とする shRNA 配列を含むオリゴヌクレオチドは過去の文献をもとに設計した(表 1)¹⁵⁾。設計したオリゴヌクレオチドは PCR による増幅を行った後に、pEF6-GFP-miR30 プラスミドの XhoI/EcoRI サイトにサブクローニングし、すべての shRNA 発現ベクターの配列に変異がないことをシーケンス解析で確認した。

2-3. 細胞株および細胞培養

マウス乳腺ガン由来 EMT6 細胞は ATCC (CRL-2755)より入手した。細胞は

10% fetal bovine serum (FBS: Biosera, Nuaille, France)を含む RPMI 培地 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて、ウォータージャケット式インキュベーターにて 37°C、5% CO₂ 条件下で維持した。

2-4. プラスミドの導入

EMT6 細胞への shRNA 発現プラスミドの導入は Lipofectamin2000 (Thermo Fisher Scientific)により行った。ベクターを導入してから 24 時間後、細胞を 9 cm シャーレに再播種し、細胞接着後に 10 µg/mL blasticidin による選択を行った。さらに、生存クローンの中で GFP 蛍光が強いものを選択し、2.5 µg/mL blasticidin を含む培地で維持した。ノックダウン効率はウエスタンブロッティングにより確認し、ノックダウン効果が高い細胞株を選択してその後の実験に使用した。

2-5. X 線照射

X-RAD iR-225 (Precision X-Ray, North Branford, CT, USA)を用いて、出力 200 kVp、15 mA、線源距離 650 mm、1.0 mm Al フィルター、線量率 1.37 Gy/min の条件で X 線照射を行った。X 線照射はターンテーブル上に細胞を置き、回転させながら室温で行った。

2-6. ミトコンドリア形態観察

細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュに播種して一晩接着させた。その後、100 nM MitoTracker Red (Thermo Fisher Scientific)を含む無血清 RPMI 培地で置換し、細胞を 37°C、5% CO₂ 条件下で 30 分間インキュベートした。その後、無血清 RPMI 培地で 2 回洗浄し、10% FBS を含む RPMI 培地に置換した。ミトコンドリア形態の観察は 37°C、5% CO₂ 条件下で、LSM700 共焦点レーザー

顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を用いて行い、撮影した画像からミトコンドリア形態の定量解析を行った。撮影した画像から各条件の実験において 50 個以上の細胞を無作為に選び、細胞中のミトコンドリア形態の分類を行った。細胞中の全ミトコンドリアのうち 75%以上が断片化し顆粒状を呈している細胞を “Fragmented” に分類した。また、25%以下のミトコンドリアが断片化している細胞のうち、より伸長したミトコンドリアを持つ細胞を “Highly connected” に、それ以下のものを “Tubular” にそれぞれ分類した。さらに、その中間あるいは混在した形態のミトコンドリアを持つ細胞を “Intermediate” に分類した。EMT6 細胞におけるミトコンドリア形態分類の典型的画像は図 2 に示す。実験は独立して 3 回行い、結果はそれぞれの分類の百分率として表した。

2-7. ウェスタンブロット法

シャーレにサブコンフルエントになった細胞をスクレイパーを用いて回収し、10,000 g、4℃で 1 分間遠心した。ペレットを Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 5% glycerol, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.5)で懸濁し、タンパク質を抽出した。20,000 g、4℃で 15 分間遠心し、上清を回収した。Bio-Rad Protein Assay Kit のプロトコルに従い上清中のタンパク質濃度の定量を行い、各試料中のタンパク質濃度を統一させた。その後、3 倍濃度の SDS-PAGE 用試料調製緩衝液を試料の 1/2 量添加し、沸騰水中で 1 分間加熱処理を行い泳動試料とした。試料を SDS-PAGE により分離し、ウェスタンブロットティング転写装置を用いてニトロセルロース膜に 100 V で 1 時間転写した。転写したニトロセルロース膜は、5%低脂肪スキムミルクを含む TBST により室温で 1 時間ブロッキングした。その後、各一次抗体を以下の条件で希釈し、4℃にて一晩処理した。その希釈条件は、抗 Drp1 抗体、抗 Fis1 抗体、抗

Opa1 抗体ならびに抗 Mfn2 抗体では 5%低脂肪スキムミルクを含む TBST で 4,000 倍に、抗 Actin 抗体は 5%低脂肪スキムミルクを含む TBST で 2,000 倍とした。その後、5%低脂肪スキムミルクを含む TBST で 2,000 倍に希釈した HRP 標識二次抗体と反応させ、化学発光基質 (Perkin Elmer Life Science) を添加し、LAS 4000 mini にて画像の取得を行った。得られたバンド強度の解析には MultiGauge software を使用した。

2-8. コロニー形成法

60 mm シャーレに 100 から 10,000 個の細胞を播種し、6 時間培養した。細胞が接着したことを顕微鏡下で確認し、X 線照射を行った。その後、細胞を 6 日間インキュベーションした後に、メタノールを用いて細胞を 10 分間固定し、2% ギムザ溶液で一晩染色した。50 個以上の細胞を含むコロニーを生存細胞として計数した。細胞生存率 (surviving fraction; SF) は非照射対照群のコロニー形成率から算出した。

2-9. 統計処理

値は少なくとも 3 回の独立した実験の平均±標準偏差で示した。統計的な有意差検定は、Dunnett 検定により行った。危険率が $p<0.05$ の際に有意差ありとした。

3. 結果

3-1. 各種ミトコンドリア形態制御タンパク質のノックダウンがミトコンドリア形態に与える影響

ミトコンドリア形態変化が細胞の放射線感受性に与える影響を検討するため、まず、各種ミトコンドリア形態制御タンパク質を安定的にノックダウンした細胞(KD 細胞)を作出した。ミトコンドリア分裂については Drp1 および Fis1 を、ミトコンドリア融合については Mfn2 と Opa1 を標的とする shRNA 発現プラスミドをマウス乳がん由来 EMT6 細胞に導入し、安定的な KD 細胞株を樹立した。各種 KD 細胞株における標的タンパク質のタンパク質発現量とそのノックダウン効率はウエスタンブロッティングにより評価した(図 3)。次に、これらの KD 細胞におけるミトコンドリア形態を観察するため、共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブセルイメージングを行った。Ctl 細胞に比べ、Drp1 および Fis1 KD 細胞では伸長したミトコンドリアが多く観察された一方で、Mfn2 および Opa1 KD 細胞では短縮、または完全に断片化したミトコンドリアが観察された(図 4A)。これらの形態変化を定量的に評価するため、その形態的な特徴から 4 つのカテゴリー (Highly connected, Tubular, Intermediate, Fragmented)に分類し、その結果を百分率として表した(図 4B)。その結果、Ctl 細胞においては Tubular および Intermediate の割合が主成分であったのに対し、Drp1 および Fis1 KD 細胞では共に Highly connected と Tubular の割合が増加した。これに対し、Mfn2 KD 細胞では Fragmented および Intermediate の割合が増加し、Opa1 KD 細胞では Fragmented の割合がほぼ 100%まで増加した。これらの結果から、各種ミトコンドリア形態制御タンパク質のノックダウンがミトコンドリア分裂または融合を抑制し、ミトコンドリア形態にその影響が反映されていることが明らかとなった。

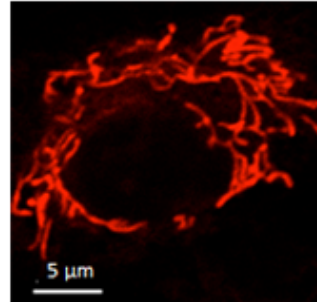
3-2. ミトコンドリア形態制御タンパク質のノックダウンが細胞の放射線感受性に与える影響

次に、これらのミトコンドリア形態の変化が細胞の放射線感受性に与える影響を評価するために、作出した細胞を用いてコロニー形成法を行った。Ctl 細胞の放射線感受性と比較して、Drp1 および Fis1 KD 細胞は放射線照射後の生存率が有意に増加し、放射線抵抗的であることが明らかとなった (図 5A)。しかしながら、Mfn2 および Opa1 KD 細胞は放射線照射後の生存率に変化が見られなかった(図 5B)。これらの結果から、Drp1 および Fis1 KD によるミトコンドリア分裂の抑制が細胞の放射線感受性が低減する一方で、Mfn2 および Opa1 KD によるミトコンドリア融合の抑制は放射線感受性は変化しないことが明らかとなった。

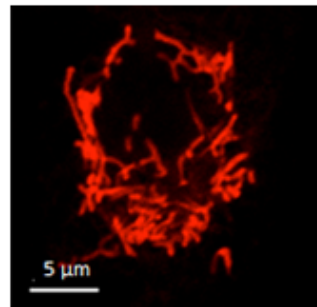
表1. ミトコンドリア形態制御タンパク質に対するshRNA配列一覧

Drp1	5'-TGC TGT TGA CAG TGA GCG AAC GAC TGT ATG TTC TAT GTA ATA GTG AAG CCA CAG ATG TAT TAC ATA GAA CAT ACA GTC GTC TGC CTA CTG CCT CGG A-3'
Fis1	5'-TGC TGT TGA CAG TGA GCG ATG GTG CCT GGT TCG AAG CAA ATA GTG AAG CCA CAG ATG TAT TTG CTT CGA ACC AGG CAC CAG TGC CTA CTG CCT CGG A-3'
Mfn2	5'TGC TGT TGA CAG TGA GCG CCC GGT TTA TTA GTG AGA GCT ATA GTG AAG CCA CAG ATG TAT AGC TCT CAC TAA TAA ACC GGA TGC CTA CTG CCT CGG A-3'
Opa1	5'-TGC TGT TGA CAG TGA GCG ACA CAG TAG ACA TCA AGC TTA ATA GTG AAG CCA CAG ATG TAT TAA GCT TGA TGT CTA CTG TGG TGC CTA CTG CCT CGG A-3'

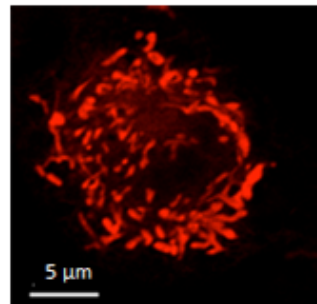
Highly connected



Tubular



Intermediate



Fragmented

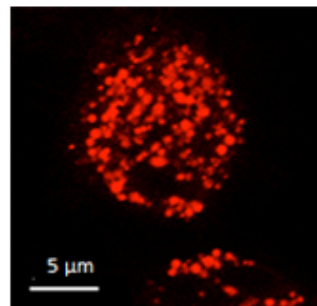


図2. ミトコンドリア形態分類の典型画像

EMT6細胞におけるミトコンドリア形態をHighly connected、Tubular、Intermediate、Fragmentedの4つのカテゴリーに分類した。画像は代表的なミトコンドリアの典型画像を示している。

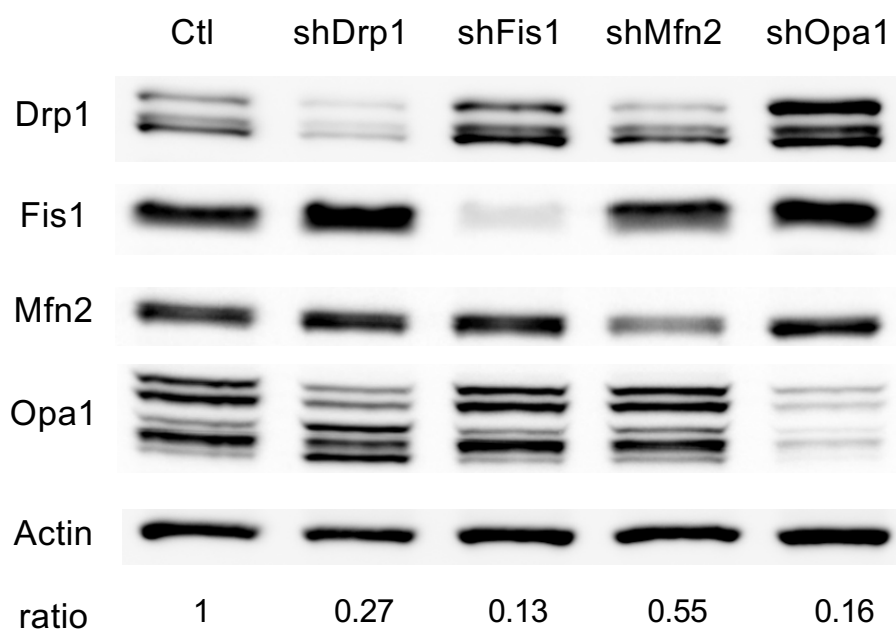
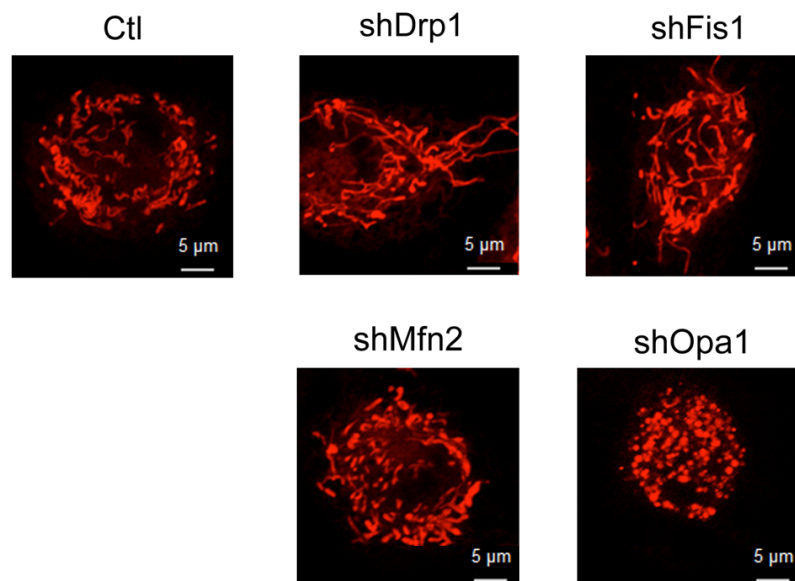


図3. shRNAによるミトコンドリア形態制御タンパク質のノックダウン効果

EMT6細胞に対して各種ミトコンドリア形態制御タンパク質に対するshRNA発現プラスミドを導入し、安定的ノックダウン細胞 (KD細胞)を樹立した。各種shRNA (non-silencing shRNA (Ctl)、shDrp1、shFis1、shMfn2ならびにshOpa1)がミトコンドリア形態制御タンパク質発現に与える影響についてウエスタンブロットにより評価した。種shRNAによるノックダウンの効率はCtlの標的タンパク質の発現量を1とした場合の相対値で表した。

A



B

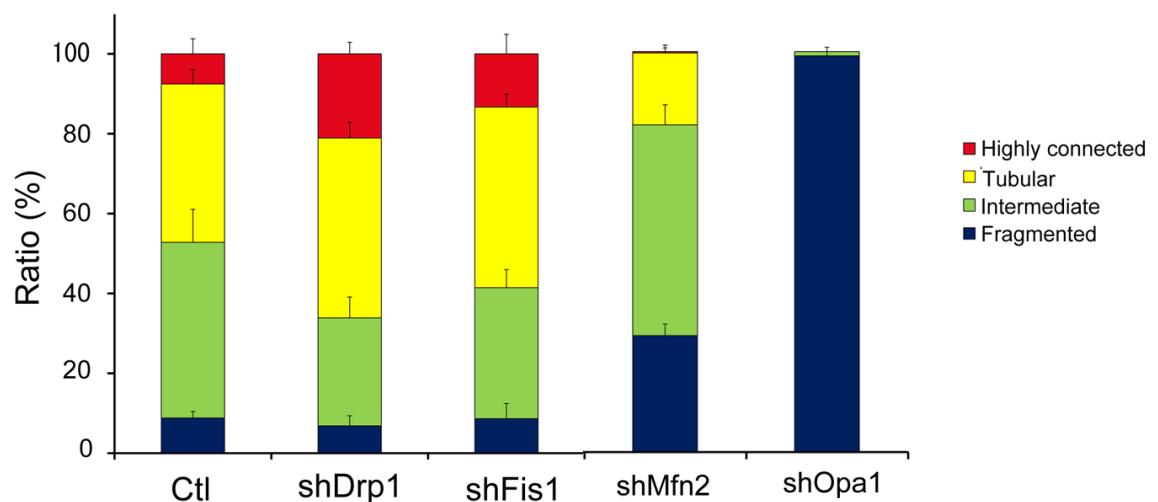


図4. 各種ミトコンドリア形態制御タンパク質のノックダウンがミトコンドリア形態に与える影響

各種ミトコンドリア形態制御タンパク質KD EMT6細胞をMitoTracker Redで染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてミトコンドリア形態を評価した。(A) 各種KD細胞におけるミトコンドリアの典型画像を示す。(B) ミトコンドリア形態を4つのカテゴリーに分類し、定量的に評価した。

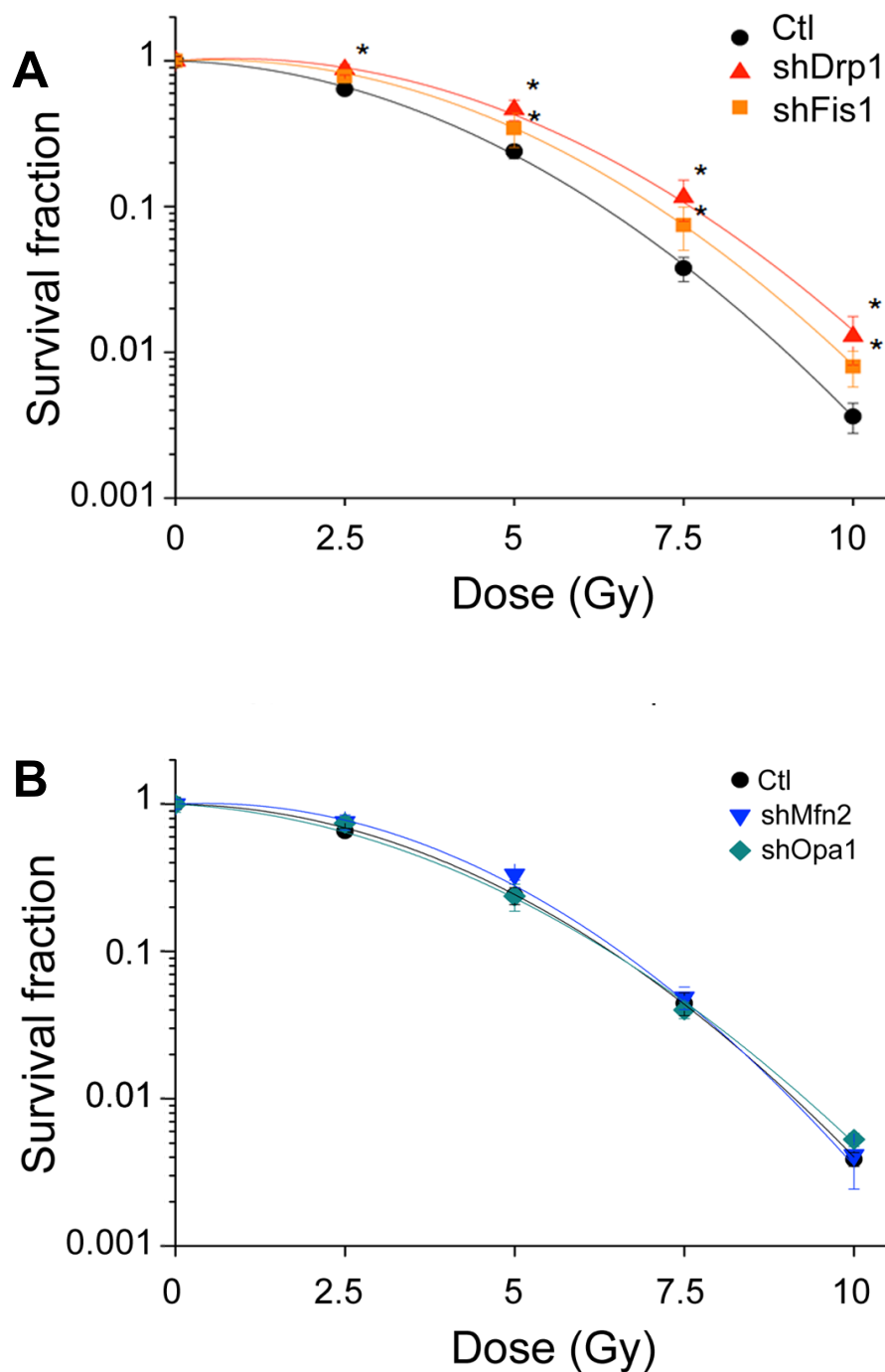


図5. 各種ミトコンドリア形態制御タンパク質のノックダウンが放射線感受性に与える影響

各種ミトコンドリア形態制御タンパク質KD EMT6細胞の放射線感受性をコロニー形成法により評価した。50個以上の細胞を含むコロニーを生存細胞として計数した。細胞生存率は放射線非照射群のコロニー形成率から算出した。(A) Drp1およびFis1 KD EMT6細胞における放射線照射後の細胞生存率を示す。(B) Mfn2およびOpa1 KD EMT6細胞における放射線照射後の細胞生存率を示す。グラフのポイントおよびバーは平均±S.D.を表している。統計的有意差はCtlに対して $p<0.05$ (*) で示した。

4. 考察

本章では、ミトコンドリア形態変化と放射線感受性との関連について検討を行うため、4つのミトコンドリア形態制御タンパク質の安定的 KD EMT6 細胞を樹立し、それぞれの細胞の放射線感受性を評価した。ミトコンドリア融合制御タンパク質をノックダウンする上で、Mfn1 を標的とした shRNA 発現プラスミドも同様に作製・導入したものの、安定的ノックダウン細胞が樹立できなかった。過去の報告では、Mfn1 KO、Mfn2 KO ならびに Mfn1/2 KO 細胞株などが作出されていることから、Mfn1 が細胞の生存に不可欠ではないことが考えられる⁴³⁾。一方で、近年 Mfn1 と Mfn2 はそれぞれ異なる修飾や制御を受けて、その機能や発現量が変化するという報告が複数なされている^{43,51)}。これはミトコンドリア形態を維持する上で Mfn1/2 がそれぞれ異なる機能を保有することを示唆しており、そのためにノックダウン効率が異なった可能性が考えられる。作製したミトコンドリア形態制御タンパク質 KD 細胞におけるミトコンドリア形態を観察したところ、Ctl 細胞と比較して Drp1 および Fis1 KD 細胞では伸長化した一方で、Mfn2 および Opa1 KD 細胞では短縮化していたことから、ミトコンドリア形態制御タンパク質ノックダウンを通じてミトコンドリア分裂または融合が抑制されたことが示唆された。

これらの細胞における放射線感受性を評価したところ、Drp1 および Fis1 KD によるミトコンドリア分裂の抑制が細胞の放射線感受性を低減することが明らかとなった。これまでに、MEF 細胞または hTERT 細胞において Drp1 の抑制が放射線による細胞死を低減することが報告されている^{31,60)}。これらの報告と本章の結果をまとめると、Drp1 だけでなく Fis1 でも同様の放射線感受性の低減が観察されたことから、放射線照射時のミトコンドリア分裂が細胞の放射線感受性を修飾する上で重要であることが示唆された。ミトコンドリア融合につ

いては、これまでに **Opa1** の siRNA による発現抑制がミトコンドリア断片化を引き起こしアポトーシスを誘導するなど⁵⁵⁾、ミトコンドリア融合が細胞死に寄与する知見が数多く報告されている。しかし、本章の結果では **Mfn2** および **Opa1 KD** によるミトコンドリア融合の抑制は放射線感受性を変化させなかった。この結果から、放射線による細胞死にはミトコンドリア形態が単純に短いことが細胞死促進的に働くというよりは、ミトコンドリア分裂機構自体が活性化することが重要である可能性が考えられた。しかしながら、この仮説は現状では十分に説明できず、これを検証するにはミトコンドリア分裂または融合制御タンパク質の過剰発現時のミトコンドリア形態および放射線感受性に対する影響を評価する必要があると考えられる。

5. 小括

本章では、ミトコンドリア形態変化と放射線感受性との関連性を明らかにすることを目的に、ミトコンドリア融合および分裂を制御するタンパク質をそれぞれ安定的にノックダウンした細胞を樹立した。作出した細胞内におけるミトコンドリア形態を評価したところ、**Drp1** および **Fis1 KD** 細胞ではミトコンドリアが伸長していたのに対し、**Mfn2** および **Opa1 KD** 細胞ではミトコンドリアが短縮しており、これらのミトコンドリア形態制御タンパク質ノックダウンによりミトコンドリア分裂または融合が抑制されていることが明らかとなった。それぞれの細胞の放射線感受性を評価したところ、**Drp1** および **Fis1 KD** 細胞では放射線感受性が低減していたのに対し、**Mfn2** および **Opa1 KD** 細胞では放射線感受性に影響が見られなかった。以上の結果から、ミトコンドリア分裂を介した形態変化が放射線感受性の修飾に重要であることを明らかとなった。

<第二章>

放射線によるミトコンドリア分裂亢進における

Drp1 活性化のメカニズムの検討

1. 序論

第一章の結果から、ミトコンドリア分裂制御タンパク質である Drp1 および Fis1 が細胞の放射線感受性に寄与することが明らかとなった。また、これまでに放射線によってミトコンドリア形態が断片化することが明らかになっていることから、放射線照射後の細胞死において Drp1 および Fis1 を通じたミトコンドリア分裂の亢進が重要な役割を担うことが示唆されている。しかしながら、そのミトコンドリア分裂を亢進させる分子メカニズムは明らかではない。第一章の序論で述べたように、ミトコンドリア分裂は主に Drp1 によって制御されており、Fis1 は Drp1 のアダプタータンパク質として Drp1 によるミトコンドリア分裂を補助している。そこで、本章では、Drp1 の活性制御機構に着目し、その放射線応答を明らかにすることを試みた。

Drp1 は dynamin family タンパク質の一種であり、GTPase domain、middle domain、variable domain ならびに GTPase effector domain (GED) の 4 つのタンパク質ドメインから構成されている³⁹⁾。Middle domain および GED domain は、GTPase domain の安定化ならびにその活性化に寄与し、variable domain はミトコンドリアへの移行およびミトコンドリア膜上の受容体との結合に働く。ミトコンドリア分裂の誘導に必要な Drp1 活性化は、様々なタンパク質翻訳後修飾によって調節されることが示唆されている。現在までに報告された Drp1 活性化に関わる翻訳後修飾として、S-ニトロシル化、small ubiquitin-related modifier (SUMO)化、O 結合型 β -N-アセチルグルコサミン化ならびにリン酸化の関与が挙げられる^{2,6,8,20)}。図 6 にこれまでに報告されている Drp1 活性化に関

わる翻訳後修飾の種類とその位置を示す。これらの翻訳後修飾の中で、リン酸化についてこれまで特に詳細な検討が行われており、ヒト Drp1 における 616 番目ならびに 637 番目の 2 カ所のセリン残基(以後、それぞれ S616 ならびに S637 と記す) のリン酸化がその活性調節に重要な役割を果たしていることが明らかになっている⁶⁾。Drp1 S616 のリン酸化は、その活性化を引き起こしミトコンドリア分裂を促進することが示唆されており、そのリン酸化は protein kinase C δ (PKC δ)、extracellular signal-related kinase 1/2 (ERK1/2)、cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)/cyclin B1 ならびに CaMKII により引き起こされることが報告されている^{19,44,52,59)}。CDK1/cyclin B1 は Drp1 S616 リン酸化を通じて M 期進行におけるミトコンドリア分裂を亢進し、ERK1/2 および PKC δ はそれぞれ高血糖条件下ならびに高血圧性脳症下での Drp1 S616 リン酸化を介したミトコンドリア分裂を亢進する報告がなされている。また、CaMKII が慢性的な β アドレナリン刺激下において Drp1 S616 リン酸化ならびにミトコンドリア分裂を亢進するという報告がある。一方、Drp1 S637 のリン酸化は、その活性に抑制的に働くと考えられており、その調節はリン酸化酵素である protein kinase A (PKA) と脱リン酸化酵素である calcineurin が関与することが報告されている^{3,5,10)}。さらに、最近の研究により、glycogen synthase kinase 3 β による Drp1 の 693 番目のセリン残基のリン酸化がミトコンドリア分裂を促進することも報告されている⁹⁾。

これまでに、放射線による Drp1 依存性のミトコンドリア分裂が亢進する報告がなされているものの、放射線による Drp1 活性化機構については明らかにされていない。これまでに、ドキソルビシン処理が Drp1 の S616 リン酸化を亢進することが報告されていることから⁵⁸⁾、DNA 損傷ストレスが Drp1 のリン酸化状態に大きく影響する可能性が示唆されている。そこで、本章では、放射線照射

後のミトコンドリア形態変化に対する Drp1 リン酸化の意義を明らかにすることを目的とし、Drp1 の S616 および S637 リン酸化に着目して、これらのリン酸化レベルの放射線照射による変化、ならびに Drp1 セリン変異体がミトコンドリア形態に与える影響を評価した。その結果、Drp1 S616 のリン酸化が放射線照射後のミトコンドリア形態変化に重要であることが明らかとなったため、続いて、放射線による Drp1 S616 リン酸化を実行する責任キナーゼについても検討した。

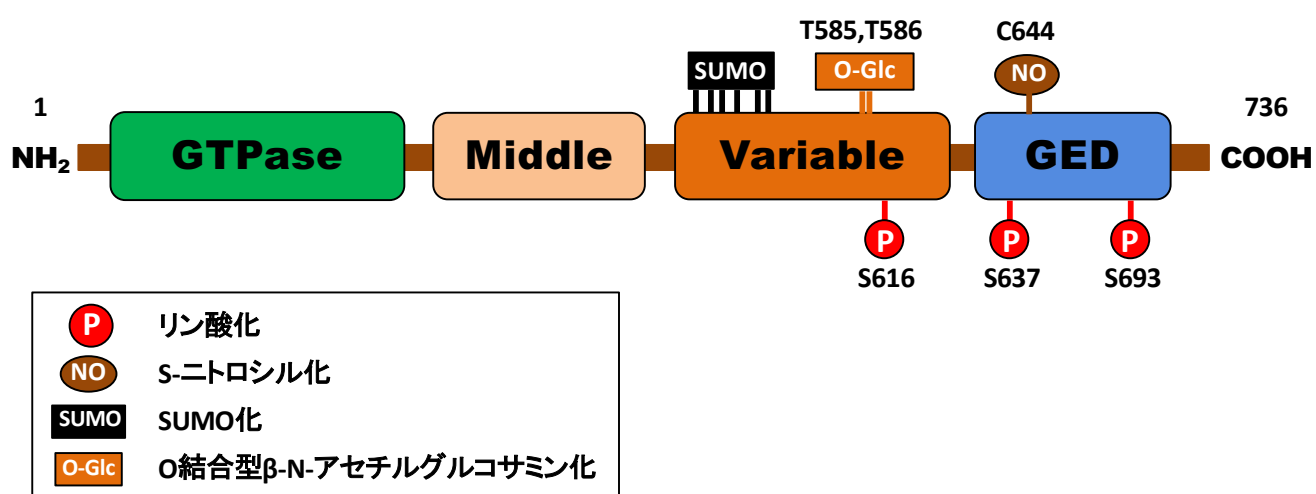


図6. Drp1のドメイン構造とこれまでに報告された翻訳後修飾
 数字はヒトDrp1タンパク質におけるアミノ酸番号を示す。

2. 材料と方法

2-1. 試薬

DH5 α 、Phusion® High-Fidelity PCR Kit ならびに MitoTracker™ Green FM は Thermo Fisher Scientific より購入した。Mdivi-1 は Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA)より、U0126、GF109203X ならびに Gö6976 は EMD Millipore (Billerica, MA, USA)より購入した。Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)は Abcam より購入した。KN-92 および KN-93 は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)より購入した。抗 conventional protein kinase C (cPKC) 抗体は Santa Cruz Biotechnology より購入した。抗リン酸化 Drp1 (Ser616) (p-Drp1)抗体、抗 ERK1/2 抗体ならびに抗リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)より購入した。抗 FLAG 抗体は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より購入した。その他の試薬は第一章と同じものを使用した。

2-2. プラスミドおよびプライマー

使用したすべてのプライマーは Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA)より購入した。ミトコンドリア局在型 roGFP2 プラスミドはオレゴン大学の Remington 博士より供与された²³⁾。ヒト pyruvate dehydrogenase E1 α サブユニットに由来するミトコンドリア局在シグナルをコードする塩基配列を PCR により増幅し、pmCherry-N1 (Takara, Shiga, Japan)プラスミドの EcoRI サイトにサブクローニングすることでミトコンドリア局在型 mCherry プラスミドを作製した。mCherry-Drp1 プラスミドはコロラド大学の Voeltz 博士より供与された¹⁷⁾。本プラスミドにコードされたヒト Drp1 cDNA を NotI/EcoRI サイトを付加して PCR により増幅し、p3 $\times$ FLAG-CMV7.1 プラスミド (Sigma-

Aldrich)にサブクローニングすることで p3×FLAG-Drp1 WT プラスミドを作製した。Drp1 Ser616 または Ser637 の Ser→Ala 変異体 (Drp1 S616A ならびに Drp1 S637A)を発現するプラスミド (p3×FLAG-Drp1 S616A, p3×FLAG-Drp1 S637A)は Phusion DNA ポリメラーゼを用いた PCR-based site-directed mutagenesis 法により作製した。作製したプラスミドの Drp1 領域に遺伝子変異がないことを DNA シーケンス解析により確認した。

2-3. 細胞株および細胞培養

Drp1 遺伝子欠損マウス胚線維芽細胞 (KO MEF 細胞)およびそのコントロールとなるマウス胚線維芽細胞 (WT MEF 細胞)は九州大学大学院の野村政壽講師より供与された。両 MEF 細胞株は 10% FBS (Biowest, Nuaille, France)を含む DMEM 培地 (Thermo Fisher Scientific)を用いて、ウォータージャケット式インキュベーターにて 37°C、5% CO₂ 条件下で維持した。Mdivi-1 (Drp1 阻害剤)、U0126 [MAPK/ERK kinase1/2 (MEK1/2)阻害剤]、GF109203X [protein kinase C (PKC)阻害剤]、または Gö6976 (Ca²⁺依存性 PKC 阻害剤)を用いた処理は、X 線照射 2 時間前から開始し、X 線照射後に各薬剤を含む新鮮培地に交換し、解析を行うまで薬剤存在下で培養を行った。PMA の処理は X 線照射前に 6 時間行い、照射後は PMA を含まない新鮮培地に交換し解析まで維持した。KN-93 (CaMK 阻害剤)またはその不活性アナログ体 KN-92 の処理は、X 線照射後から開始し、各解析を行うまで薬剤存在下で培養を行った。

2-4. プラスミドの導入

トランスフェクション前日に KO MEF 細胞を播種し、一晚培養した。一定量の X-tremeGENE 9 Transfection Reagent (Roche Applied Science, Mannheim,

Germany)、OPTI-MEM (Thermo Fisher Scientific)ならびにプラスミドを混合し、室温にて 15 分間静置した。混合液を培地に滴下しプラスミドを細胞に導入した。トランスフェクション後、24 時間培養した後に培地を新鮮培地に交換し、その後の実験に使用した。

2-5. X 線照射

X 線照射は第一章に示した方法にて行った。

2-6. ミトコンドリアの染色

細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュに播種して一晩接着させた後に、X 線を照射した。一定時間培養した後、培地を 100 nM MitoTracker™ Green FM を含む無血清 DMEM 培地で置換し、細胞を 37℃、5% CO₂ 条件下で 30 分間インキュベートした。その後、無血清 DMEM 培地で 2 回洗浄し、10% FBS を含む DMEM 培地に置換後、観察を行った。

2-7. ミトコンドリア形態観察および定量的解析

MitoTracker™ Green FM で染色した、またはミトコンドリア局在型 mCherry を発現させた MEF 細胞を 37℃、5% CO₂ 条件下で、LSM700 共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss)を用いてミトコンドリア形態の観察および定量解析を行った。撮影した画像から各条件での実験において 25 個以上の細胞を無作為に選び、細胞中のミトコンドリア形態の分類を行った。ミトコンドリア形態分類の評価は第一章に示した方法にて行った。MEF 細胞におけるミトコンドリア形態分類の典型的画像は図 7 に示す。

2-8. ウェスタンブロット法

ウェスタンブロットは第一章に示した方法にて行った。各一次抗体の希釈条件は以下の通りである。抗 Drp1 抗体および抗 cPKC 抗体では 5%低脂肪スキムミルクを含む TBST で 1,000 倍に、抗 p-Drp1 抗体、抗 ERK1/2 抗体ならびに抗 p-ERK1/2 抗体では 5% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich)を含む TBST で 1,000 倍に、抗 Actin 抗体および抗 FLAG 抗体では 5%低脂肪スキムミルクを含む TBST で 2,000 倍とした。

2-9. 統計処理

値は少なくとも 3 回の独立した実験の平均±標準偏差で示した。統計的な有意差検定は、F 検定による分散比の検定および Student's t 検定、Dunnett 検定ならびに Tukey-Kramer による多重比較検定により行った。危険率が $p<0.05$ の際に有意差ありとした。

3. 結果

3-1. X線照射が Drp1 S616 および S637 リン酸化に与える影響

Drp1 はいくつかの翻訳後修飾部位を有しており、これまでに Drp1 に存在するセリン残基のうち、S616 ならびに S637 のリン酸化が、Drp1 の活性化とそれに引き続くミトコンドリア断片化に極めて重要な役割を果たしていることが明らかにされている⁶⁾。そこで、X線照射が Drp1 のリン酸化状態に与える影響を調べるため、まず、X線照射後の WT MEF 細胞における Drp1 S616 および S637 リン酸化量をウェスタンブロットにより経時的に評価した。図 8A および 8B で示すように、10 Gy の照射により Drp1 S616 リン酸化は、照射 4 時間後まではわずかに減少したが、その後、照射 12、16 時間後でリン酸化レベルは有意に亢進し、照射 24 時間後においても照射前と比べると高いリン酸化レベルを維持している様子が観察された。一方で、Drp1 S637 リン酸化は X 線照射前後で明確なバンドは認められなかった。続いて、Drp1 リン酸化の線量応答性を X 線照射 12 時間後に評価したところ、2.5 Gy の照射によって S616 のリン酸化レベルの上昇傾向が認められ、5 および 10 Gy の照射では有意な上昇が確認された（図 9A および 9B）。一方、S637 のリン酸化については、非照射および X 線を照射した細胞のいずれにおいても Drp1 S637 リン酸化の明確なバンドは認められなかった。これらの結果から、X 線照射は線量依存的に S616 のリン酸化レベルを増大する一方で、S637 のリン酸化には影響しないことが示唆された。

3-2. X線照射によるミトコンドリア分裂に重要な Drp1 のリン酸化部位の特定

これまでの結果から、X 線照射が Drp1 のリン酸化状態に影響することが明らかとなった。しかしながら、X 線照射によるミトコンドリア形態変化に対するこれらセリン残基のリン酸化の意義は解明されていないことから、これを明らかに

にすることを目的に次の検討を行った。内因性の Drp1 を持たない KO MEF 細胞に野生型 Drp1 あるいは 2 種類の Drp1 セリン変異体 (Drp1 S616A、Drp1 S637A) のいずれかを発現させ、ミトコンドリア形態に対するその影響の評価を行った。KO MEF 細胞に空ベクター、野生型 Drp1、Drp1 S616A ならびに Drp1 S637A 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間後のそれぞれのコンストラクトの発現量を検出したところ、その発現量に大きな差がないことが確認された(図 10A)。次に、X 線照射された KO MEF 細胞中のミトコンドリア形態に対して、これらの Drp1 タンパク質発現が及ぼす影響を検討した。KO MEF 細胞に空ベクター、野生型 Drp1、Drp1 S616A ならびに Drp1 S637A 発現プラスミドをトランスフェクション後、X 線照射を行い 12 時間培養後におけるミトコンドリア形態の評価を行った。その際、ミトコンドリアを可視化するため、ミトコンドリア局在型 mCherry をコードするプラスミドを同時に導入した。細胞内ミトコンドリア形態を観察し、各細胞における典型的な画像と形態分類を評価した結果ならびにその統計的解析結果を図 10B、10C ならびに図 11 に示す。空ベクターを導入した細胞では、X 線照射により Intermediate の割合がわずかに増加するものの、全体として大きな変化は観察されなかった。これに対して、野生型 Drp1 を導入した細胞では、X 線照射により Highly connected の割合が顕著に減少するとともに、Fragmented の割合が有意に増加した。このことから、KO MEF 細胞に野生型 Drp1 を再構成することで、X 線によるミトコンドリア形態変化が回復することが示された。次に、Drp1 S616A を導入した細胞では、X 線照射しない場合、空ベクター導入細胞と同様のミトコンドリア形態分布を示した。一方で、X 線照射した場合には、Fragmented の割合が有意に増加したものの、その割合は野生型 Drp1 発現細胞と比較して、Drp1 S616A 発現細胞では明らかに低下していた。さらに、Drp1 S637A を導入した細胞では、非照射条

件下において **Highly connected** の割合が減少する傾向と **Fragmented** の割合の有意な増加を示したが、X 線照射後のミトコンドリア形態変化の程度は、野生型 **Drp1** 発現細胞と同程度であった。以上の結果から、X 線照射によるミトコンドリア分裂の亢進において、**Drp1** の **S637** よりも **S616** の方が重要であることが示唆された。

3-3. X 線照射による **Drp1 S616** リン酸化に対する **ERK1/2** の関与

X 線により **Drp1 S616** のリン酸化が亢進すること、ならびに **Drp1 S616** が X 線によるミトコンドリア形態変化に重要であるという知見から、**Drp1 S616** のリン酸化が放射線照射後のミトコンドリア分裂に重要であることが推察される。そこで、X 線照射後の **Drp1** リン酸化がどのキナーゼにより引き起こされるのかについて次に検討を行った。これまでに報告された **Drp1 S616** をリン酸化するキナーゼ^{19,44,52,59)}のうち、はじめに **ERK1/2** の寄与について特異的阻害剤を用いた検討を行った。**ERK1/2** は **MEK1/2** による 202 番目のトレオニン残基および 204 番目のチロシン残基のリン酸化を通じて活性化されることから、**MEK1/2** 特異的阻害剤である **U0126** を用いて **ERK1/2** の阻害を行った¹¹⁾。**WT MEF** 細胞に 0、1、5 ならびに 20 μM の **U0126** を処理し、10 Gy の X 線照射を行い 12 時間培養後、**ERK1/2** と **Drp1** の発現量および **ERK1/2** と **Drp1** のリン酸化量をウエスタンブロットにより評価した。図 12 に示すように、X 線照射は **ERK1/2** の発現量および **ERK1/2** のリン酸化に影響を与えなかった。また、この **ERK1/2** のリン酸化は、5 μM 以上の **U0126** の処理により濃度依存的に減少した。しかしながら、20 μM までの **U0126** 処理は基底レベルの **Drp1** のリン酸化および X 線により亢進した **Drp1** リン酸化のいずれにも明らかな効果を与えなかった。以上の結果から、**ERK1/2** は X 線照射による **Drp1 S616** のリン酸化に関与してい

ないことが示唆された。

3-4. X線照射による Drp1 S616 リン酸化に対する PKC の関与

現在までの研究により、酸化ストレス下において PKC δ が Drp1 S616 をリン酸化すること、ならびに X 線照射が PKC δ を活性化するということが報告されている^{44,65)}。また、PKC には α から ι/λ まで 10 種類のアイソフォームが存在し、多種多様な基質タンパク質をリン酸化することが知られている³⁶⁾。これらのことから、次に PKC δ を含めた PKC が X 線により誘導される Drp1 S616 リン酸化に関与しているのかどうかについて検討を行った。まず、PKC 特異的阻害剤である GF109203X および Gö6976 の影響を評価した。PKC の各アイソフォームのうち、GF109203X は cPKC (α 、 β ならびに γ)、PKC δ ならびに PKC ϵ に対して特異性を示す一方で、Gö6976 は PKC α および PKC δ に対して特異性を示すことが報告されている^{37,54)}。本研究では、WT MEF 細胞に GF109203X または Gö6976 を処理し、X 線照射した後の Drp1 の発現量およびそのリン酸化量をウェスタンブロットにより評価した。X 線照射は Drp1 S616 リン酸化を亢進したが、これに対していずれの PKC 阻害剤も明らかな効果を示さなかった(図 13A)。すべての PKC アイソフォームのうち PMA 結合領域を持つ cPKC、PKC δ ならびに PKC ϵ は長時間の PMA 処理によりその発現が低下することが報告されている³³⁾。これを利用して放射線照射後の Drp1 S616 リン酸化における PKC の関与をさらに検討した。WT MEF 細胞に 100 μ M の PMA を 6 時間処理したところ、予想した通り cPKC レベルが顕著に低下した一方で、PMA 処理群でも未処理群でも X 線照射後の Drp1 S616 リン酸化レベルはほぼ同じであった(図 13B)。以上の結果から、PKC は X 線照射による Drp1 S616 リン酸化に関与しない事が示唆された。

3-5. X線照射による Drp1 S616 リン酸化に対する CaMKII の関与

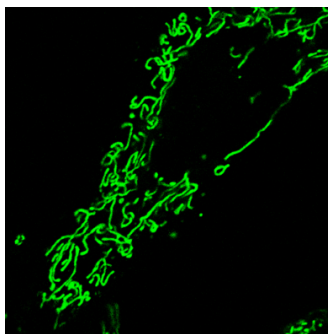
現在までの研究により、 Ca^{2+} により活性化されるキナーゼである CaMKII が Drp1 S616 をリン酸化し、ミトコンドリア形態変化の調節に関与していることが示唆されている⁵⁹⁾。そこで、CaMKII が X 線照射による Drp1 S616 のリン酸化に関与しているかどうかについて、CaMKII 阻害剤 KN-93 とその不活性アナログ体である KN-92 を用いて検討を行った。WT MEF 細胞に 10 Gy の X 線照射を行い、100 および 200 nM の KN-93 を処理して Drp1 の発現量および Drp1 の S616 リン酸化量をウェスタンブロットにより経時的に評価した。図 14A に示すように、X 線照射は Drp1 S616 リン酸化の上昇を誘導するが、このリン酸化は KN-93 処理により濃度依存的に有意に抑制された。その一方で、同濃度での KN-92 処理は Drp1 S616 リン酸化状態に有意な影響を及ぼさなかった(図 14B)。以上の結果から、CaMKII が X 線照射による Drp1 の S616 リン酸化に関与することが示唆された。

3-7. X線照射によるミトコンドリア形態変化に対する CaMKII 阻害の影響

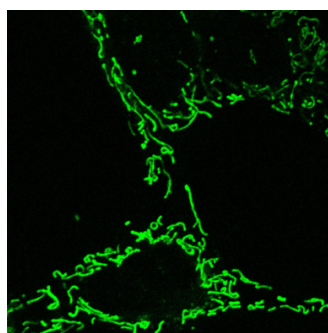
KN-93 が X 線照射後の Drp1 のリン酸化レベルの上昇を抑制したことから、KN-93 による CaMKII の阻害が X 線照射後のミトコンドリア形態変化に影響を与えるかどうかについて検討を行った。WT MEF 細胞に 10 Gy の X 線照射を行い、100 nM の KN-92 または KN-93 を処理して 12 時間培養後のミトコンドリア形態の観察および定量的解析を行った(図 15A および 15B)。薬剤非処理細胞において、X 線照射前では Tubular および Intermediate の割合が主要な構成であるのに対し、X 線照射後では Highly connected および Tubular の割合が有意に減少し、Fragmented の割合が明らかに増加した。KN-93 処理は X 線照射

によるミトコンドリア形態変化を完全に打ち消した一方で、KN-92 処理はこれに影響を及ぼさなかった。このことから、CaMKII による Drp1 S616 のリン酸化が、X 線によるミトコンドリア分裂の亢進に寄与していることが示唆された。

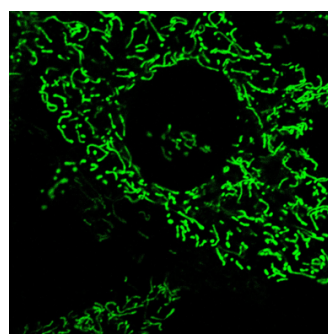
Highly connected



Tubular



Intermediate



Fragmented

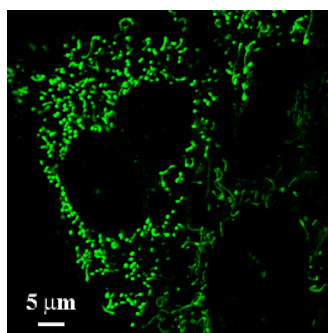


図7. ミトコンドリア形態分類の典型画像

MEF細胞におけるミトコンドリア形態をHighly connected、Tubular、Intermediate、Fragmentedの4つのカテゴリーに分類した。画像は代表的なミトコンドリアの典型画像を示している。

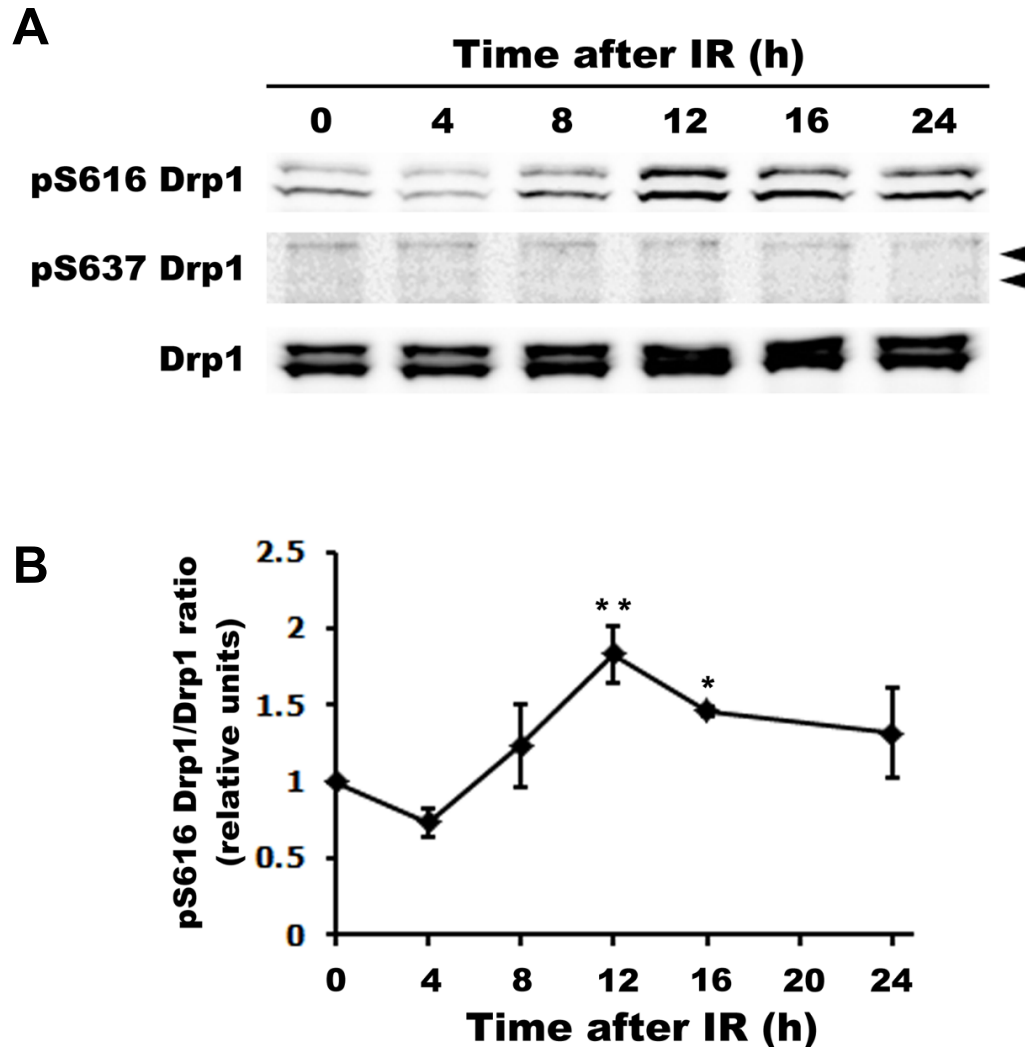


図8. X線照射後のDrp1のリン酸化レベルの経時的変化

(A) WT MEF細胞に10 GyのX線を照射し、照射4、8、12、16ならびに24時間後のDrp1、pS616 Drp1ならびにpS637 Drp1をウエスタンブロットにより評価した。矢頭はpS637 Drp1が観察されるバンド位置を示す。(B) 観察されたDrp1およびpS616 Drp1のバンド強度を定量し、Drp1量に対するpS616 Drp1量を非照射群の値を1とした場合の相対値で示した。各カラムとバーは平均±S.D.を表し、統計的有意差はDunnet検定を用いて非照射群に対して $p<0.05$ (*)ないし $p<0.01$ (**)で示した。

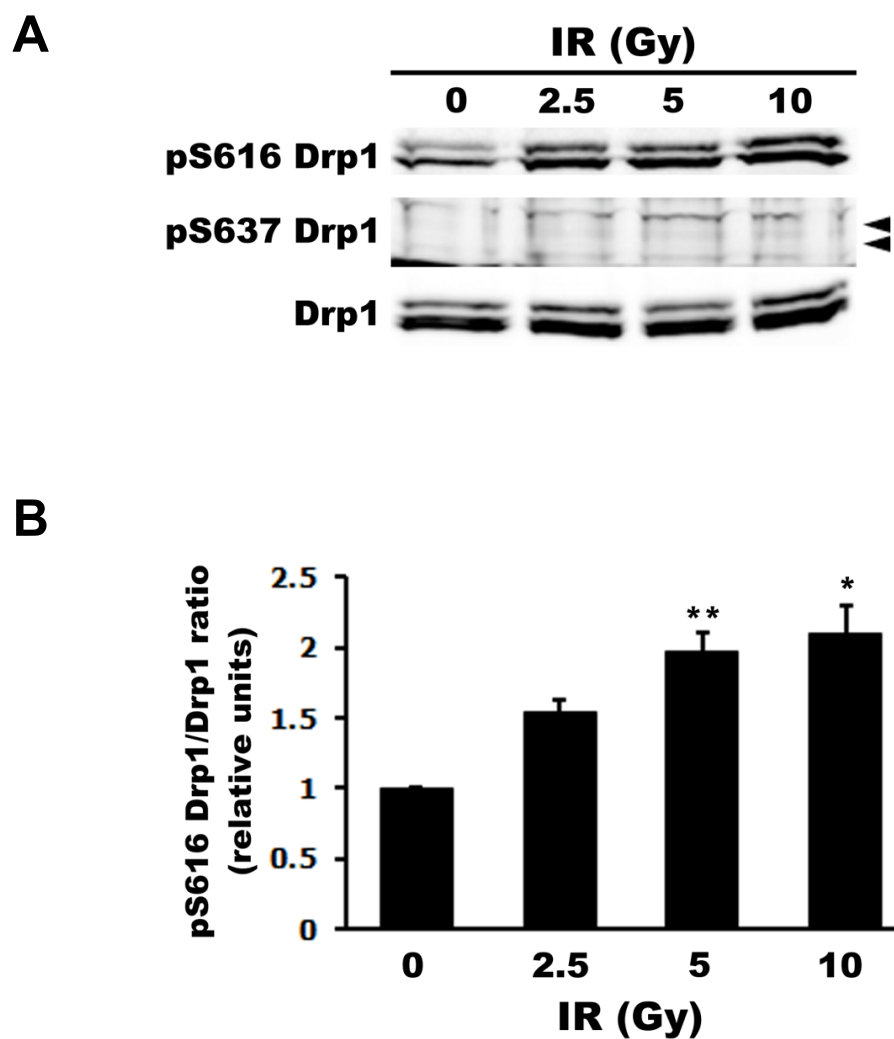


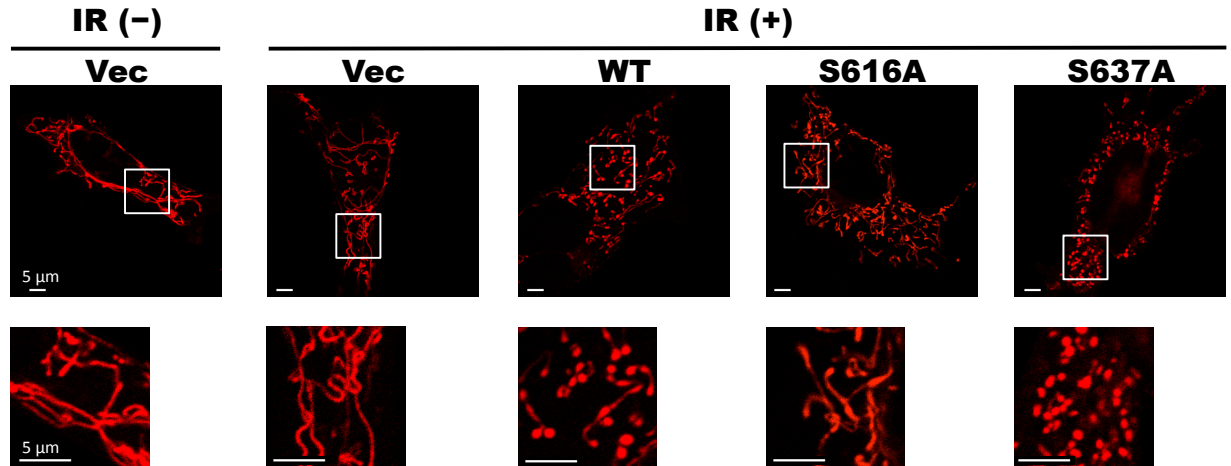
図9. X線照射後のDrp1のリン酸化レベルの線量応答性

(A) WT MEF細胞に各線量のX線を照射し、12時間後のDrp1、pS616 Drp1ならびにpS637 Drp1をウエスタンブロットにより評価した。矢頭はpS637 Drp1が観察されるバンド位置を示す。
 (B) 観察されたDrp1およびpS616 Drp1のバンド強度を定量し、Drp1量に対するpS616 Drp1量を非照射群の値を1とした場合の相対値で示した。各カラムとバーは平均±S.D.を表し、統計的有意差はDunnet検定を用いて非照射群に対して $p<0.05$ (*)ないし $p<0.01$ (**)で示した。

A



B



C

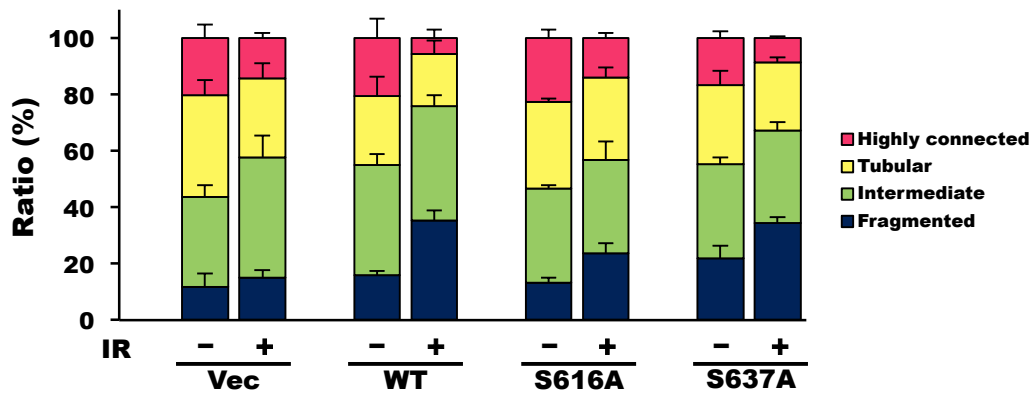
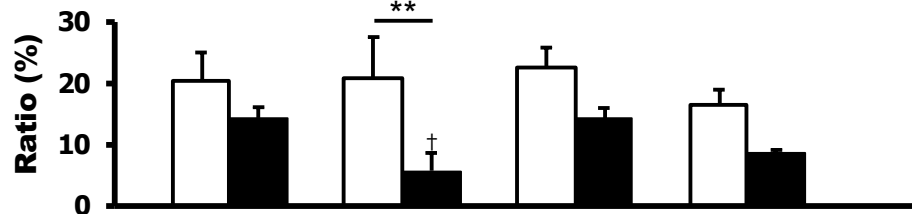


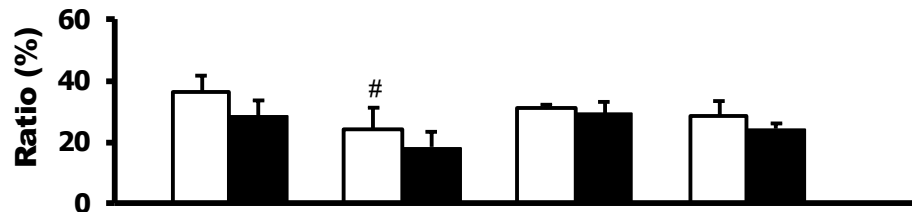
図10. X線照射によるミトコンドリア形態変化に対する
Drp1変異体の影響の定量的解析

(A) KO MEF細胞に野生型、S616AまたはS637A Drp1発現プラスミドをトランスフェクションし24時間培養後、FLAGおよびActinの発現量をウエスタンブロットにより検出した。(B) KO MEF細胞にミトコンドリア局在型mCherryおよび野生型、S616AまたはS637A Drp1発現プラスミドをトランスフェクションし24時間培養し、10 GyのX線照射を行い12時間培養後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてミトコンドリア形態を評価した。

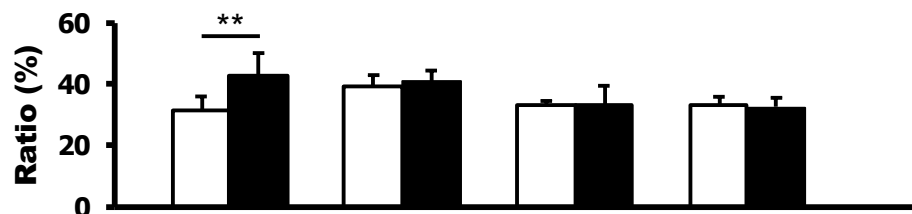
Highly connected



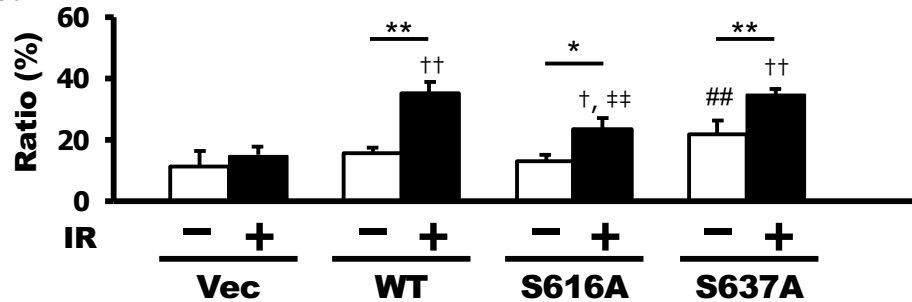
Tubular



Intermediate



Fragmented



*: p<0.05; **: p<0.01

#: p<0.05; ##: p<0.01 vs Vec, IR (-)

†: p<0.05; ††: p<0.01 vs Vec, IR (+)

‡: p<0.05 vs WT, IR (+)

(Tukey-Kramer)

図11. X線照射によるミトコンドリア形態変化に対する Drp1変異体の影響の統計解析

図8で得られたミトコンドリア形態の定量的解析の統計学的評価を行なった。統計的有意差は Tukey-Kramer検定により検定した。

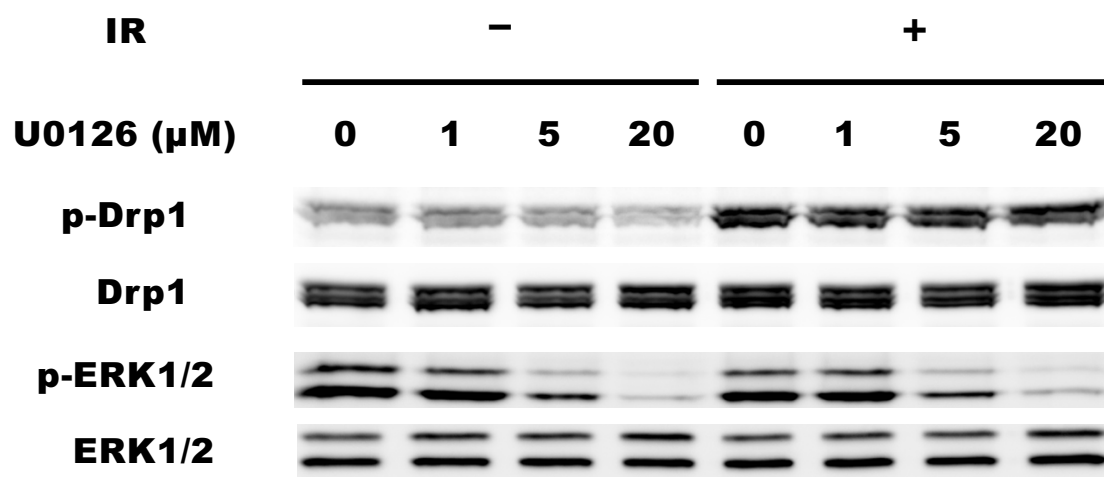
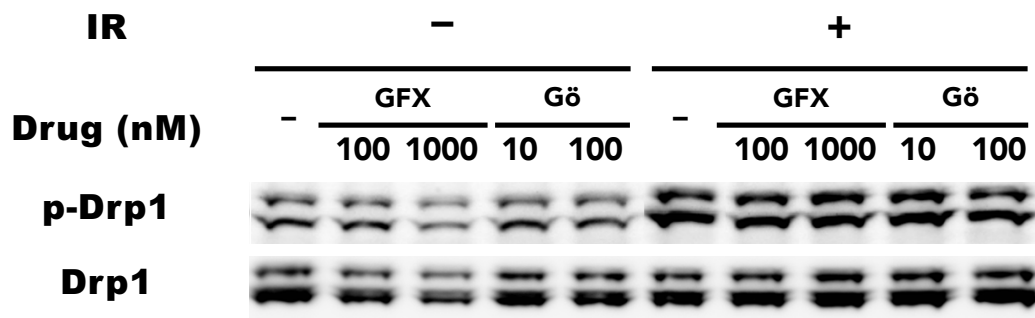


図12. X線照射によるDrp1 S616リン酸化に対するU0126の効果

WT MEF細胞に各濃度のU0126処理した後、10 GyのX線照射を行い12時間培養後に、ERK1/2とDrp1の発現量およびERK1/2とDrp1のリン酸化量をウェスタンブロットにより評価した。

A



B

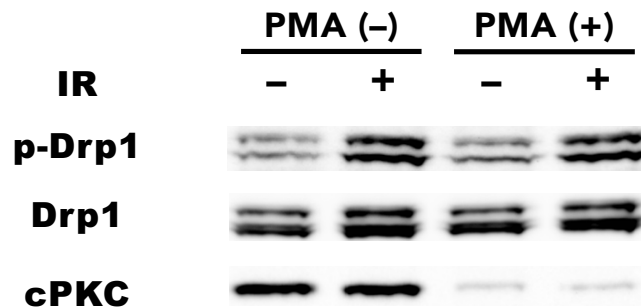


図13. X線照射によるDrp1 S616リン酸化に対するPKC阻害の効果

(A) WT MEF細胞に各濃度のGF109203X (GFX)またはGö6976 (Gö)を処理した後、10 GyのX線照射を行い12時間培養後に、Drp1の発現量およびDrp1のリン酸化量をウエスタンブロットにより評価した。(B) WT MEF細胞に100 μ MのPMAを照射前6時間処理し、10 GyのX線照射を行い12時間培養後に、cPKCとDrp1の発現量ならびにDrp1のリン酸化量をウエスタンブロットにより評価した。

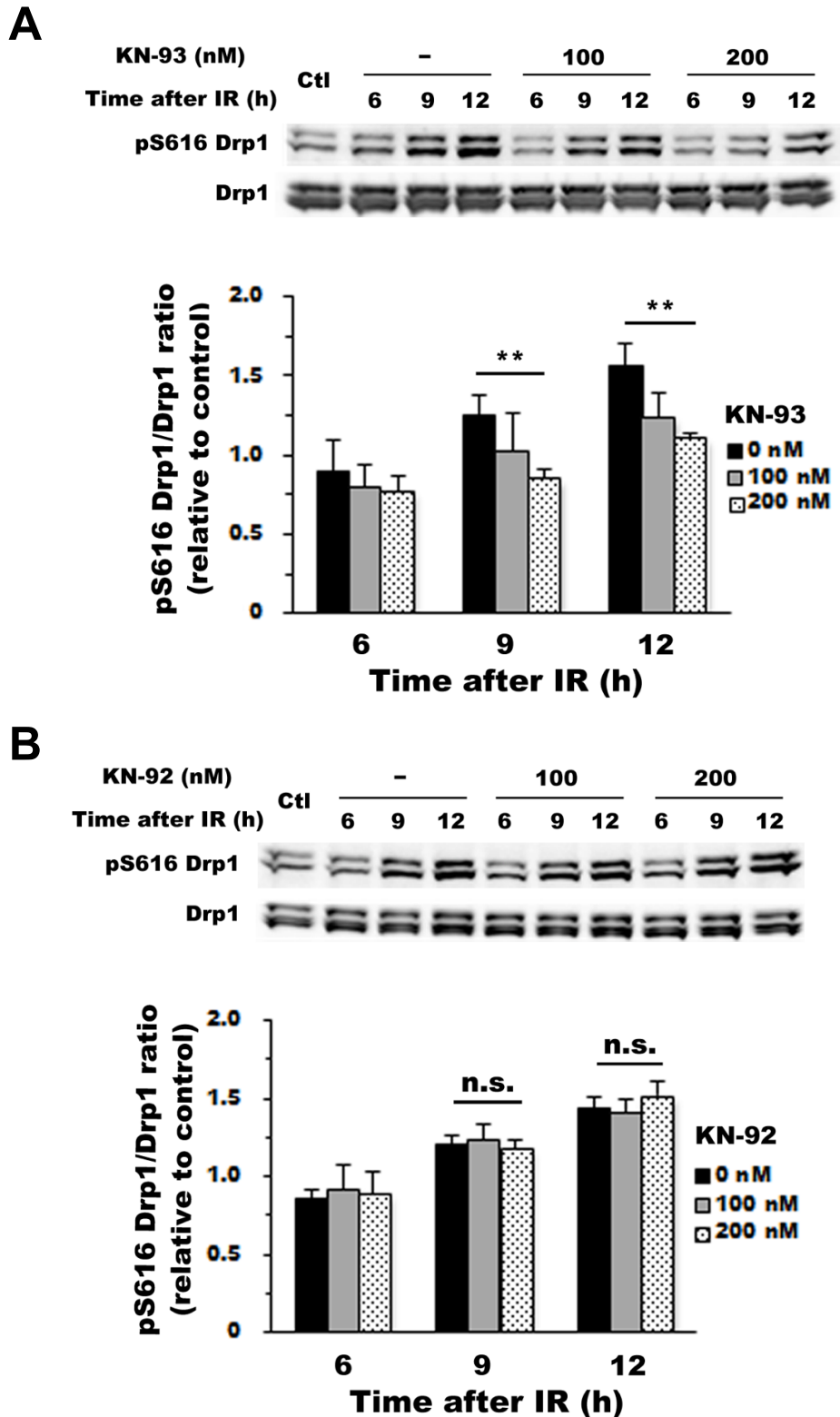
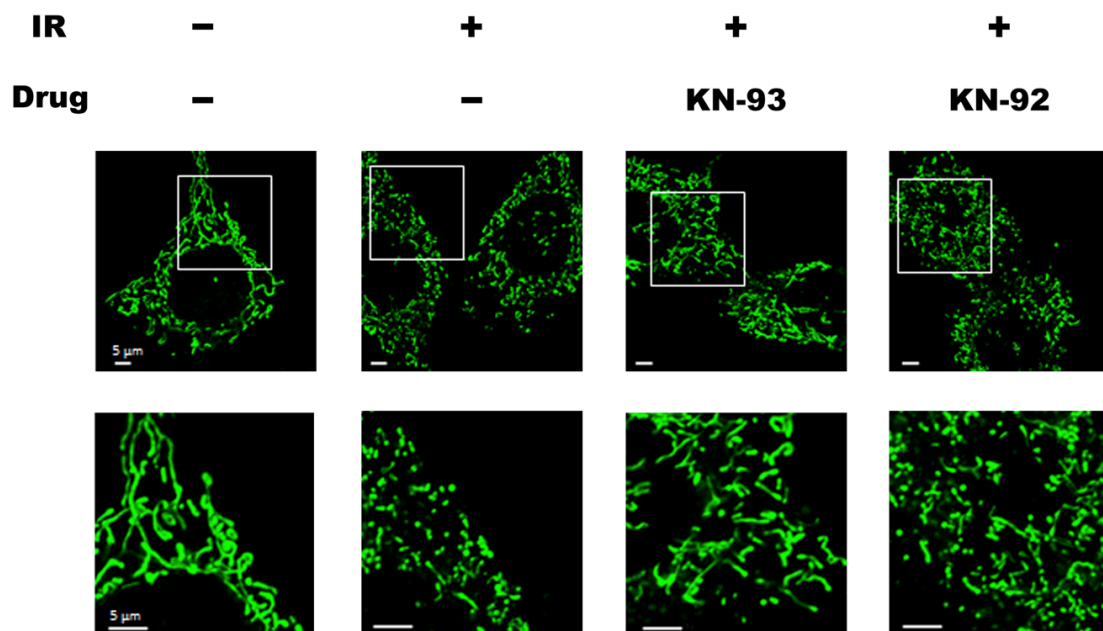


図14. X線照射によるDrp1 S616リン酸化に対するCaMK阻害の効果

(A and B) WT MEF細胞に10 GyのX線照射を行い、各濃度のKN-93 (A)またはKN-92 (B)を処理して12時間培養後に、Drp1の発現量およびDrp1のリン酸化量をウエスタンブロットにより評価した。観察されたp-Drp1およびDrp1のバンド強度を定量し、Drp1量に対するp-Drp1量を非照射かつ薬剤未処理群の値を1とした場合の相対値で示した。統計的有意差はStudent's t検定により検定し、 $p < 0.01$ (**)で示した。

A



B

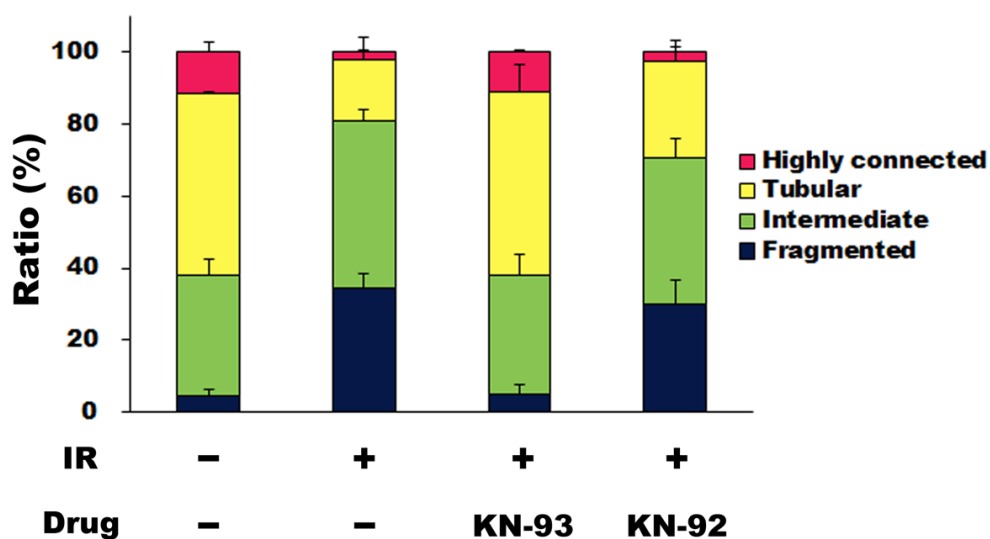


図15. X線照射によるミトコンドリア形態変化に対するCaMK阻害の効果

WT MEF細胞に10 GyのX線照射を行い、200 nM KN-93またはKN-92を処理して12時間培養後にミトコンドリアを染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。(A) KN-93またはKN-92処理したWT MEF細胞におけるX線照射後のミトコンドリアの典型画像を示している。(B) ミトコンドリア形態を評価し、定量的解析を行った。統計的有意差はStudent's t検定により検定した。

4. 考察

本章では、Drp1 S616 のリン酸化が放射線照射によるミトコンドリア形態変化に重要であることを明らかにした。これまでに、Drp1 S616 のリン酸化が Drp1 を活性化し、Drp1 依存性のミトコンドリア分裂を亢進することが明らかとなっている¹⁾。X 線照射時の Drp1 S616 のリン酸化レベルは照射後 12 時間で最もリン酸化レベルが亢進した。この挙動は、以前に当研究室で報告した X 線照射後のミトコンドリア形態変化の経時的変化と一致していることから、Drp1 S616 のリン酸化がミトコンドリア形態変化に関与していることが推察された。さらに、Drp1 S616A 変異体の発現は野生型 Drp1 の発現と比較して放射線照射後のミトコンドリア形態変化が減弱していた。この結果から、Drp1 S616 のリン酸化が放射線によるミトコンドリア形態変化に重要であることが示唆された。その一方で、WT MEF 細胞において S637 のリン酸化量は基底レベルおよび X 線照射後ともにほとんど検出されなかった。Drp1 S637 のリン酸化はその活性に抑制的に働くことが知られており、PKA によるリン酸化がこれまでに報告されている。実際、MEF 細胞において forskolin 処理による PKA の活性化が Drp1 S637 のリン酸化を亢進することを確認している(結果未掲載)。このことは、WT MEF 細胞においても PKA による Drp1 S637 リン酸化の制御機構は存在するものの、X 線照射ではその活性化は起きないことを示している。また、Drp1 S637A 変異体発現はわずかではあるが非照射時の”Fragmented”の割合を増加させたことから、Drp1 S637 リン酸化が検出できない程度だが極めて低いレベルで生じている可能性が考えられる。しかし、前述のように X 線照射によるリン酸化レベルに変化がみられないことから、X 線照射後のミトコンドリア分裂において Drp1 S637 におけるリン酸化による調節の寄与が小さいと思われる。

興味深いことに、Drp1 S616A 変異体発現は放射線によるミトコンドリア形

態変化を部分的に引き起こした。この結果は、Drp1 S616 リン酸化以外の翻訳後修飾が放射線照射後の Drp1 の活性化に部分的に寄与している可能性を示唆している現時点では、異なる部位のリン酸化によるものかその他の転写翻訳後調節によるものかは明らかではないが、その候補としてSUMO化が挙げられる。Drp1 の SUMO 化はミトコンドリアとの結合を安定化し、ミトコンドリア分裂を亢進することが報告されている^{2,16)}。また、放射線などによる DNA 損傷は、その修復に関わるタンパク質の SUMO 化を促進するという報告がある^{18,49)}。ことから、放射線照射により Drp1 が SUMO 化され、その活性が制御されている可能性がある。X 線照射による Drp1 活性化とこれらのリン酸化以外の翻訳後修飾との関連については、今後さらに検討する必要がある。

X 線照射による Drp1 S616 のリン酸化を引き起こす責任キナーゼを同定することを目的に、ERK1/2、PKC ならびに CaMKII の関与について検討したところ、CaMKII がその責任キナーゼとして同定された。CaMKII はセリン/スレオニンキナーゼの一種であり、Ca²⁺シグナルの伝達することで様々な細胞プロセスを制御している³⁵⁾。本研究では、CaMKII の阻害が X 線による Drp1 S616 のリン酸化を顕著に抑制することを明らかにした。同様に、過去の報告では、CaMKII が慢性的な β アドレナリン刺激下において Drp1 S616 リン酸化を亢進することが明らかとされている⁵⁹⁾。加えて、放射線照射が様々な細胞種において CaMKII を活性化するという知見が報告されている^{13,41,47)}。以上の知見から、X 線照射により CaMKII が Drp1 S616 のリン酸化を引き起こすことが示唆された。さらに、CaMKII の阻害は放射線によるミトコンドリア形態変化を減弱した。これらの結果から、放射線照射後 CaMKII による Drp1 S616 のリン酸化を通じてミトコンドリア分裂が亢進するという一連の分子メカニズムが明らかとなった。

本研究では、X 線照射によるミトコンドリア分裂の亢進には、Drp1 S637 ではなく S616 のリン酸化が重要であること、ならびに X 線により引き起こされる Drp1 S616 のリン酸化とミトコンドリア分裂に CaMKII が寄与することが示唆された。これらの結果は、放射線照射によるミトコンドリア分裂を制御する Drp1 の活性化機序の一部を明らかにした新たな知見である。

5. 小括

本章では、放射線照射後のミトコンドリア形態変化に対する Drp1 リン酸化の意義とその責任キナーゼを明らかにすることを目的として検討を行った。Drp1 の S616 および S637 リン酸化に着目し、これらのリン酸化レベルの放射線照射後の経時的変化および線量依存性について評価した。その結果、Drp1 S616 リン酸化レベルは照射 12 時間後にピークとして増加した一方で、Drp1 S637 リン酸化は X 線照射前後において明確なバンドは認められなかった。さらに、Drp1 S616 リン酸化は線量依存的に亢進した一方で、S637 のリン酸化には影響しないことが明らかとなった。続いて、X 線照射によるミトコンドリア分裂に対して Drp1 リン酸化がどう影響するのかを明らかにするため、Drp1 欠損細胞に野生型 Drp1 あるいは Drp1 セリン変異体 (Drp1 S616A、Drp1 S637A) を導入した。野生型 Drp1 発現細胞と比較して Drp1 S637A 発現細胞では X 線照射によるミトコンドリア分裂に有意な差がなかった一方で、Drp1 S616A 発現細胞はこの分裂を抑制した。次に、Drp1 S616 リン酸化を引き起こすキナーゼについて検討したところ、CaMKII の阻害が X 線照射後の Drp1 S616 リン酸化を抑制した。さらに、CaMKII 阻害は X 線照射によるミトコンドリア分裂も抑制した。以上の結果から、X 線照射によるミトコンドリア分裂の亢進には、Drp1 S637 ではなく S616 のリン酸化が重要であること、ならびに X 線により引き起

こされる Drp1 S616 のリン酸化とミトコンドリア分裂亢進に CaMKII が寄与することが示唆された。

<第三章>

ミトコンドリア分裂による放射線感受性修飾メカニズムの検討

1. 序論

第一章で Drp1 および Fis1 のノックダウンが細胞の放射線感受性を低減することが明らかとなったことから、ミトコンドリア分裂が放射線照射後の細胞死に重要な役割を果たしていると思われる。過去の報告では、ストレス応答時におけるミトコンドリア分裂の亢進がミトコンドリア膜電位の変化や ROS 産生の増大ならびにアポトーシスの誘導といった機能変化を生じさせることが報告されている。しかしながら、放射線によるミトコンドリア形態変化が細胞内のどのような機能を変化させて放射線感受性を修飾したのかについては今のところ明らかではない。

前述のように、これまでにストレス応答の際にミトコンドリア形態変化を通じてミトコンドリア機能に変化し、細胞の生死に寄与することが明らかとなってきた。複数のガン細胞株において、ドキソルビシンやシスプラチン処理といった遺伝毒性ストレスや紫外線による酸化ストレスがミトコンドリア分裂を亢進し、ミトコンドリア由来 ROS 産生が増加する知見が報告されている^{22,48,68)}。また、*in vivo* ラットモデルにおいて、心虚血再灌流障害時にミトコンドリア分裂が亢進することが報告されている⁶⁶⁾。加えて、ヒト肝細胞癌 BEL7402 細胞において、過酸化水素処理による Ca^{2+} オシレーション頻度の増加が Drp1 のノックダウンによって低減することが報告されている²⁶⁾。これらの知見から、遺伝毒性ストレスおよび酸化ストレスがミトコンドリア形態変化に伴って細胞機能を変化させることが示唆されている。これまでに、当研究室では、放射線照射がミトコンドリア由来呼吸消費量、ATP 産生ならびに ROS 産生を亢進することを明らかにしている^{62,63)}。これらの知見と第一、二章の結果とを合わせると、

放射線によるミトコンドリア分裂の亢進とそれに伴うミトコンドリア機能変化が放射線による細胞死の少なくとも一部に寄与している可能性が推察される。

本章では、放射線によるミトコンドリア分裂の亢進が細胞内のどのような機能を変化させて放射線感受性を修飾したのかについて明らかにすることを目的にした。そこで、第一章で作製したミトコンドリア分裂を抑制し放射線感受性が低減していた Drp1 および Fis1 KD EMT6 細胞を用いて、放射線照射後に生じる細胞死様式の評価ならびに DNA 二本鎖切断、細胞内 ATP 産生、ROS 産生ならびに Ca^{2+} 制御の放射線感受性変化に対する寄与について検討を行った。

2. 材料と方法

2-1. 試薬

Annexin V, APC Ready Flow™ Reagent、DAPI ならびに Trypan Blue Stain は Thermo Fisher Scientific より購入した。Cell ATP assay reagent は Toyo Ink (Tokyo, Japan)から購入した。CaSiR-1-AM は GORYO Chemical Inc (Sapporo, Japan)から購入した。N-acetylcysteine (NAC), 2-glucopyranoside ascorbic acid (AA-2G)ならびに BAPTA-AM は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)から購入した。抗 cleaved-caspase3 抗体は Cell Signaling Technology より購入した。その他の試薬は第一章または第二章と同じものを使用した。

2-2. 細胞株および細胞培養

マウス乳腺ガン由来 EMT6 細胞およびミトコンドリア分裂制御タンパク質ノックダウン EMT6 細胞は第一章に示した方法で培養した。

2-3. X 線照射

X 線照射は第一章に示した方法で行った。

2-4. トリパンブルー染色

X 線照射 24、48、72 時間後に細胞を回収し PBS 洗浄後、トリパンブルーによる染色を行った。トリパンブルー陽性細胞は Countess™ II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific)を用いて算出した。

2-5. アポトーシスの解析

カスパーゼの活性化を評価するため、cleave caspase-3 染色を行った。X 線照

射 24、48、72 時間後に細胞を回収し PBS で洗浄後、メタノールによる固定を行った。固定した細胞を PBS で洗浄した後、0.5% BSA を含む PBS で 6000 倍希釈した anti-cleaved caspase-3 とともに室温で 1 時間インキュベートした。再び遠心により上清を除去後、PBS で 3 回洗浄した細胞に 0.5% BSA を含む PBS で 2000 倍に希釈した APC 標識抗ウサギ抗体を 1.5 時間反応させた。遠心により上清を除去後、PBS で 1 回洗浄した細胞を BD FACSVerse™ Flow Cytometer (BD Biosciences)にて測定を行い、平均の蛍光強度を算出した。Annexin V/PI 染色によるアポトーシスの評価では、X 線照射 72 時間後に回収した細胞を Annexin V, APC Ready Flow™ Reagent および PI で染色した。遠心により上清を除去後、PBS で 1 回洗浄した細胞を BD FACSVerse™ Flow Cytometer によって解析した。Annexin V 陽性、PI 陰性細胞を早期アポトーシスとみなし、その割合を算出した。

2-6. 分裂期崩壊の評価

細胞をカバーガラス上に播種して一晩接着させた。5 Gy の X 線を照射し、24 時間細胞を培養した。細胞を PBS で洗浄し、氷冷メタノールを用いて -20℃ で 10 分間固定した。固定した細胞を 5% TritonX-100 を含む PBS を用いて 4℃ で 5 分間透過処理を行った。PBS で 3 回洗浄した後、300 nM DAPI を含む PBS を用いて、核を 5 分間室温で染色した。再び PBS で細胞を洗浄した後、Prolong Gold Antifade Reagent を用いて封入した。細胞の核形態は Olympus BX61 顕微鏡を用いて観察した。少なくとも 100 個の細胞を評価し、異常な核形態（微小核、多葉化した核ならびに断片化した核）を呈する細胞を分裂期崩壊として計数した。

2-7. 細胞内 ATP 量の評価

X 線照射 24 時間後に細胞を回収し PBS で洗浄後、100 μ l の 1.0×10^5 個の細胞を含む懸濁液と 100 μ l の ATP assay reagent (Toyo Ink) を 96-well plate 中で混合し、室温で 1 時間インキュベートした。その後、Nivo multimode microplate reader (PerkinElmer) を用いてルシフェラーゼ発光を測定し、細胞あたりの ATP 量を算出した。

2-8. 細胞内 Ca^{2+} 量の評価

X 線照射し一定時間培養後の細胞を回収し PBS で洗浄した。遠心により上清を除去した後、1 μ M CaSiR-1-AM を含む HBSS で細胞を 37°C で 1 時間染色した。遠心により上清を除去後、PBS で 1 回洗浄した細胞を BD FACSVerserTM Flow Cytometer によって解析し、その平均の蛍光強度を算出した。

2-9. 統計処理

値は少なくとも 3 回の独立した実験の平均 $\pm$ 標準偏差で示した。統計的な有意差検定は、F 検定による分散比の検定および Student's t 検定、Dunnett 検定ならびに Tukey-Kramer による多重比較検定により行った。危険率が $p < 0.05$ の際に有意差ありとした。

3. 結果

3-1. ミトコンドリア分裂抑制による放射線感受性変化に対するネクロシスの寄与

ミトコンドリア分裂の放射線感受性修飾メカニズムを解明するため、放射線感受性を低減することが明らかとなっている Drp1 および Fis1 KD EMT6 細胞を用いて放射線照射後の細胞死様式についての検討を行った。ガン細胞において放射線により誘導される細胞死はアポトーシス、ネクロシスをはじめとしてオートファジー、分裂期崩壊や細胞老化などの様々な様式による細胞死がこれまでに報告されている^{7,14)}。本研究では、放射線感受性変化に寄与している細胞死様式を特定するため、ネクロシス、アポトーシスならびに分裂期崩壊を評価した。まず、ネクロシスを評価するため、10 Gy の X 線を照射し 24、48 ならびに 72 時間後の細胞をトリパンブルーによって染色し、その陽性率を算出した(図 16)。トリパンブルー陽性細胞はいずれの時点においても 10%に満たず、Drp1 および Fis1 KD による影響も認められなかった。

3-2. ミトコンドリア分裂抑制による放射線感受性変化に対するアポトーシスの寄与

次に、放射線照射後のアポトーシスについての検討を行った。これまでにミトコンドリア形態変化とアポトーシスの関連については、Drp1 依存性のミトコンドリア分裂が細胞質への cytochrome c 放出を促進し、アポトーシスに寄与することが知られている⁴⁾。そのため、ミトコンドリア分裂抑制による放射線感受性の低減にはアポトーシスが関与しているのではないかと考えられた。放射線照射後のアポトーシスを評価するため、10 Gy の X 線を照射し 24、48 ならびに 72 時間後に回収した細胞を anti-cleaved caspase-3 抗体を用いて免疫蛍光染

色し、フローサイトメーターによる解析を行った(図 17A)。その結果、cleaved caspase-3 発現量は X 線照射後に経時的に増加し、72 時間後では有意な差として検出された。このことから、EMT6 細胞において放射線照射後にアポトーシスが誘導されることが予想された。また、X 線照射後の cleaved caspase-3 の発現は Ctl と比較して Drp1 KD 細胞において 72 時間後で有意に減少したことから、感受性の低減にアポトーシスの寄与が考えられた。そこで、X 線照射 72 時間後に誘導されているアポトーシスを実際に評価するため、細胞を Annexin V/PI で染色して Annexin V 陽性、PI 陰性の早期アポトーシスの割合を測定した(図 17B)。予想に反し、EMT6 細胞において X 線照射後 72 時間時点で誘導されるアポトーシスは 10%以下しか観察されなかった。Drp1 KD 細胞では Ctl 細胞に比べてアポトーシスが有意に減少したものの、Fis1 KD 細胞では有意な影響は認められなかった。

3-3. ミトコンドリア分裂抑制による放射線感受性変化に対する分裂期崩壊の寄与

最後に、放射線照射後の分裂期崩壊についての検討を行った。分裂期崩壊は有糸分裂異常を伴う細胞死であり、放射線をはじめとした DNA 損傷ダメージに起因して生じることが報告されている¹⁴⁾。これまでに、Drp1 KO MEF 細胞において放射線照射により分裂期崩壊が有意に低減することが明らかとなっている⁶⁰⁾。分裂期崩壊が生じた細胞では、図 18A に示したように微小核、多核または断片化した核形態を呈することが知られている。そこで、5 Gy の X 線を照射し 24 時間後の細胞を DAPI によって細胞核を染色し異常な各形態を示す細胞を分裂期崩壊とみなし、その割合を算出した(図 18B)。Ctl 細胞において、X 線照射後の分裂期崩壊は約 60%観察されたのに対し、Drp1 および Fis1 KD 細胞で

はこれが約 35-45%まで有意に減弱することが明らかとなった。以上の結果から、EMT6 細胞において、放射線により誘導される細胞死にはネクロシスおよびアポトーシスの寄与は 10%未満と比較的少なく、分裂期崩壊の寄与が大きいことが示唆された。加えて、Drp1 および Fis1 KD は分裂期崩壊を減少させることで放射線感受性を低下させていることが示唆された。

3-4. ミトコンドリア分裂抑制による分裂期崩壊低減に対する DNA 二本鎖切断の寄与

ミトコンドリア分裂抑制が分裂期崩壊による細胞死を低減したことが明らかとなったので、次に、これに寄与するメカニズムの解明を試みた。検討するメカニズムとして、放射線生物学上きわめて重要な DNA 二本鎖切断とその修復について、また、ミトコンドリア形態制御によって機能変化が報告されている ATP、ROS ならびに Ca^{2+} 制御についての検討を行った。まず、DNA 二本鎖切断修復の寄与について検討するため、X 線照射後の細胞における 53BP1 の免疫染色を行った(図 19)。53BP1 は DNA 二本鎖切断が生じると損傷部位に集積し、フォーカスを形成する。このフォーカスは DNA 二本鎖切断の修復に伴って減少していくことが知られている⁵⁰⁾。そのため、これらのフォーカス数を経時的に評価することで、DNA 二本鎖切断量とその修復能を評価できる。EMT6 細胞に 1 Gy の X 線照射を行うと、細胞あたりの 53BP1 フォーカス数は照射から 1 時間後にピークを迎え、その後時間経過と共に減少した。Drp1 および Fis1 KD 細胞においても同様の変化が観察され、DNA 二本鎖切断修復過程に影響を及ぼさなかった。以上の結果から、ミトコンドリア分裂抑制による分裂期崩壊低減には DNA 二本鎖切断は寄与していないことが明らかとなった。

3-5. ミトコンドリア分裂抑制による分裂期崩壊低減に対する ATP の寄与

続いて、ATP 産生の寄与について検討するため、X 線照射後の細胞における細胞内 ATP 量を ATP-Luciferase assay によって測定した(図 20)。その結果、細胞内 ATP 量は X 線照射 24 時間後で増加していたものの、Drp1 および Fis1 KD による有意な影響は認められなかった。このことから、ミトコンドリア分裂抑制による分裂期崩壊低減に細胞内 ATP 量は寄与していないことが明らかとなった。

3-6. ミトコンドリア分裂抑制による分裂期崩壊低減に対する ROS の寄与

次に、ROS の寄与を検討するため、ROS スカベンジャーである NAC および AA-2G 処理が X 線照射後の分裂期崩壊に与える影響を検討した。細胞に 5 Gy の X 線照射後に NAC または AA-2G を処理し 24 時間後の細胞の分裂期崩壊を評価した(図 21)。10 mM および 20 mM NAC 処理ならびに 1 mM および 2.5 mM AA-2G 処理はいずれの細胞株における X 線照射後の分裂期崩壊にも影響しなかった。これらの結果から、ミトコンドリア分裂抑制による放射線感受性低減に ROS は寄与していないことが示唆された。

3-7. ミトコンドリア分裂抑制による分裂期崩壊低減に対する Ca^{2+} の寄与

最後に、 Ca^{2+} 制御の寄与を検討するため、細胞内 Ca^{2+} キレート剤 BAPTA-AM 処理が分裂期崩壊に与える影響を評価した(図 22)。5 Gy の X 線照射後の細胞に 8 μM BAPTA-AM を処理し 24 時間後の細胞の核形態を評価したところ、核形態異常を伴う細胞が顕著に減少していた。実際、分裂期崩壊の定量評価を行ったところ、X 線照射による分裂期崩壊はいずれの細胞株においても同程度に有意に減少することが明らかとなった。この結果から Ca^{2+} が放射線による分裂期崩壊

に重要であることが示唆された。そこで、X 線照射前後の細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ の測定を次に行った。5 Gy の X 線を照射し 12 時間および 24 時間後の細胞を回収し、 Ca^{2+} 依存性近赤外光プローブ CaSiR-1-AM を用いて細胞を染色し、その蛍光をフローサイトメーターにて測定した(図 23)。Ctl において、X 線照射 12 時間後において細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ は有意に増加し、その傾向は 24 時間後においても観察された。その一方で、Drp1 および Fis1 KD 細胞における細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ は照射前後で変化しなかった。このことから、X 線照射後のミトコンドリア分裂の亢進が細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 増加に寄与することが示唆された。以上の結果をまとめると、放射線照射後にミトコンドリア分裂を介して細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ が増加し、これが分裂期崩壊の誘導に一部寄与することが示唆された。

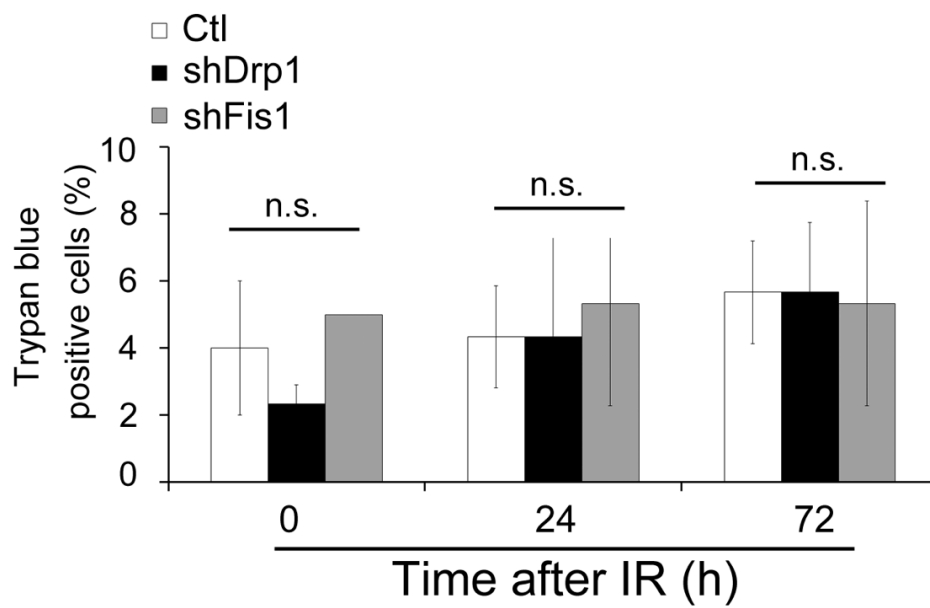


図16. ミトコンドリア分裂抑制がX線照射後のネクロシスに与える影響

Drp1およびFis1 KD EMT6細胞に10 GyのX線を照射し、24および72時間培養後の細胞をトリパンブルーによって染色し、その陽性率を算出した。統計的有意差はStudent's t検定により検定した。

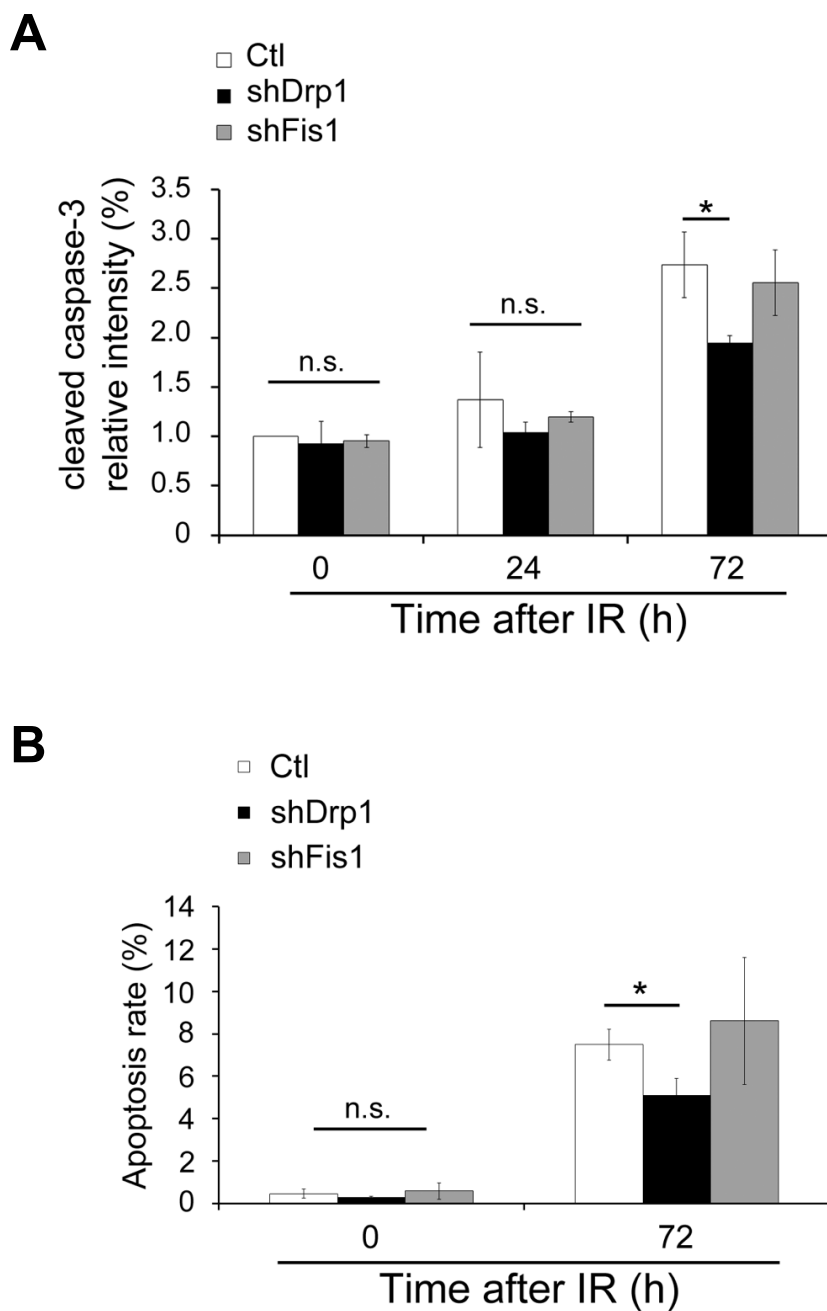
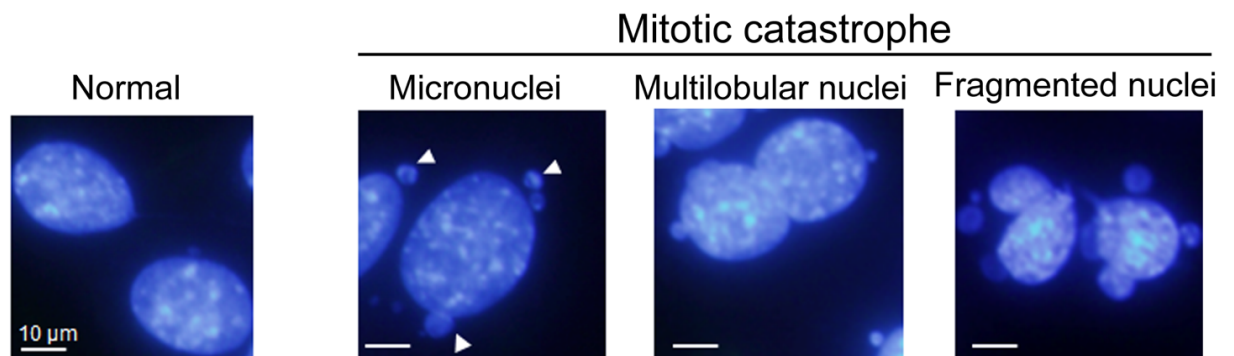


図17. ミトコンドリア分裂抑制がX線照射後のアポトーシスに与える影響

(A) Drp1およびFis1 KD EMT6細胞に10 GyのX線を照射し、24および72時間培養後の細胞におけるcleaved caspase-3発現量をフローサイトメーターにより測定した。計測された平均の蛍光強度を算出し、非照射Ctl群の値を1とした場合の相対値で示した。(B) Drp1およびFis1 KD EMT6細胞に10 GyのX線を照射し、72時間培養後の細胞をAnnexin V/PIで染色しフローサイトメーターにより測定した。Annexin V陽性、PI陰性の細胞をアポトーシス陽性細胞とみなし、その割合を算出した。統計的有意差はStudent's t検定により検定し、 $p < 0.05$ (*) で示した。

A



B

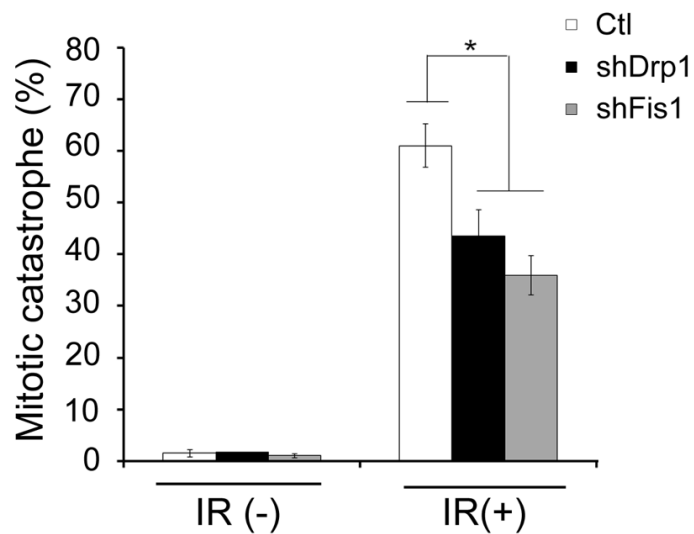


図18. ミトコンドリア分裂抑制がX線照射後の分裂期崩壊に与える影響

EMT6細胞にX線を照射し、24時間培養後の細胞の核をDAPIにより染色して分裂期崩壊を観察した。(A) EMT6細胞における分裂期崩壊の代表例を示している。微小核、多葉化した核ならびに断片化した核を分裂期崩壊として同定した。(B) Drp1およびFis1 KD EMT6細胞に5 GyのX線を照射し、24時間培養後の分裂期崩壊を評価し、定量的解析を行なった。統計的有意差はStudent's t検定により検定し、 $p < 0.05$ (*) で示した。

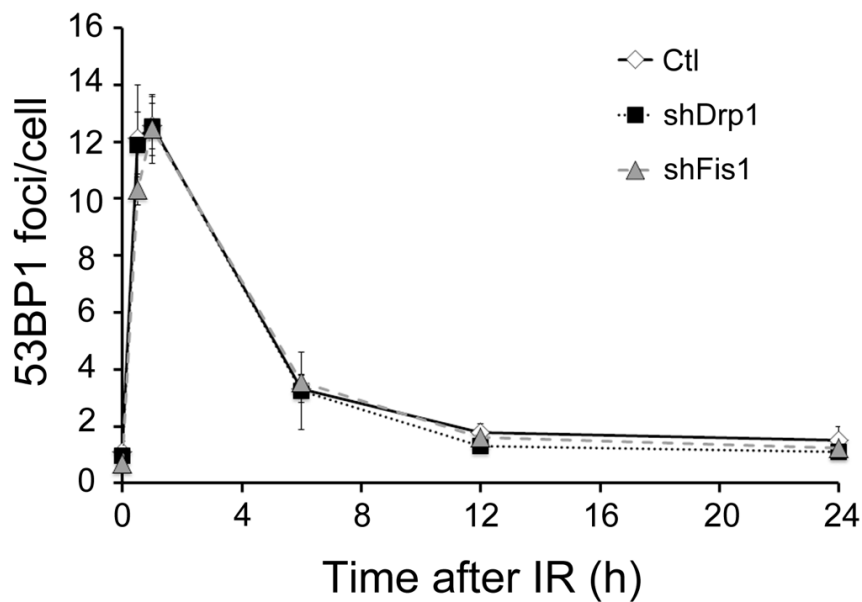


図19. ミトコンドリア分裂抑制がDNA2本鎖切断の修復過程に与える影響

Drp1およびFis1 KD EMT6細胞に1 GyのX線を照射し、一定時間培養後の細胞における53BP1フォーカスを蛍光顕微鏡を用いて観察した。少なくとも100個以上の細胞の画像を取得し、細胞あたりの平均フォーカス数を算出した。グラフのポイントおよびバーは平均±S.D.を表している。統計的有意差はStudent's t検定により検定した。

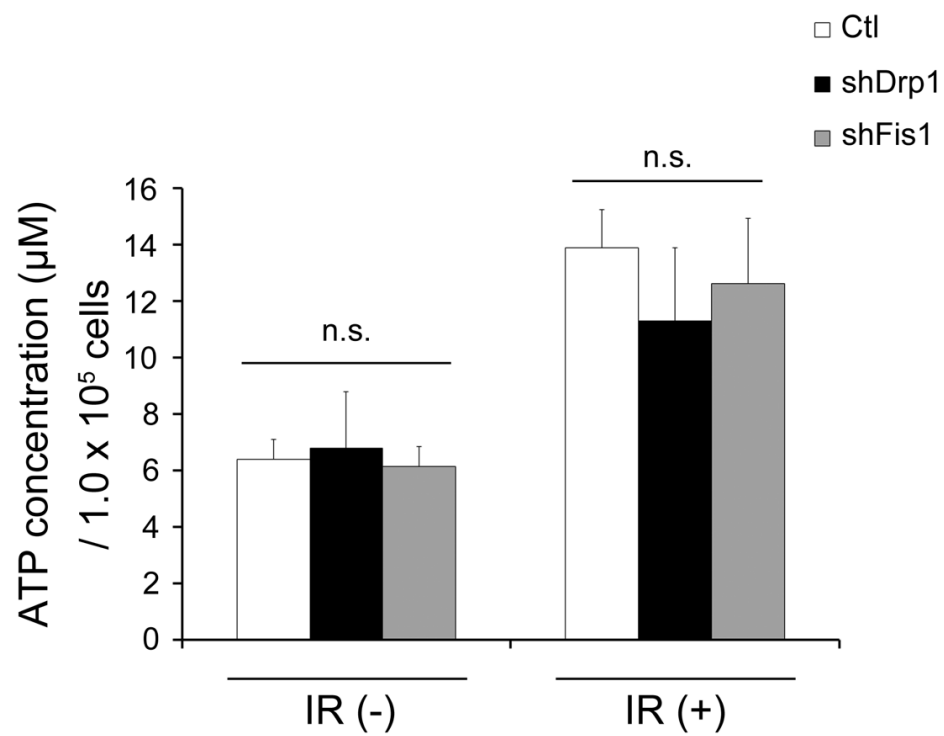


図20. ミトコンドリア分裂抑制がX線照射後の細胞内ATP量に与える影響

Drp1およびFis1 KD EMT6細胞に10 GyのX線を照射し、24時間培養後の細胞における細胞あたりのATP量をATP-Luciferase assayを用いて測定した。統計的有意差はStudent's t検定により検定した。

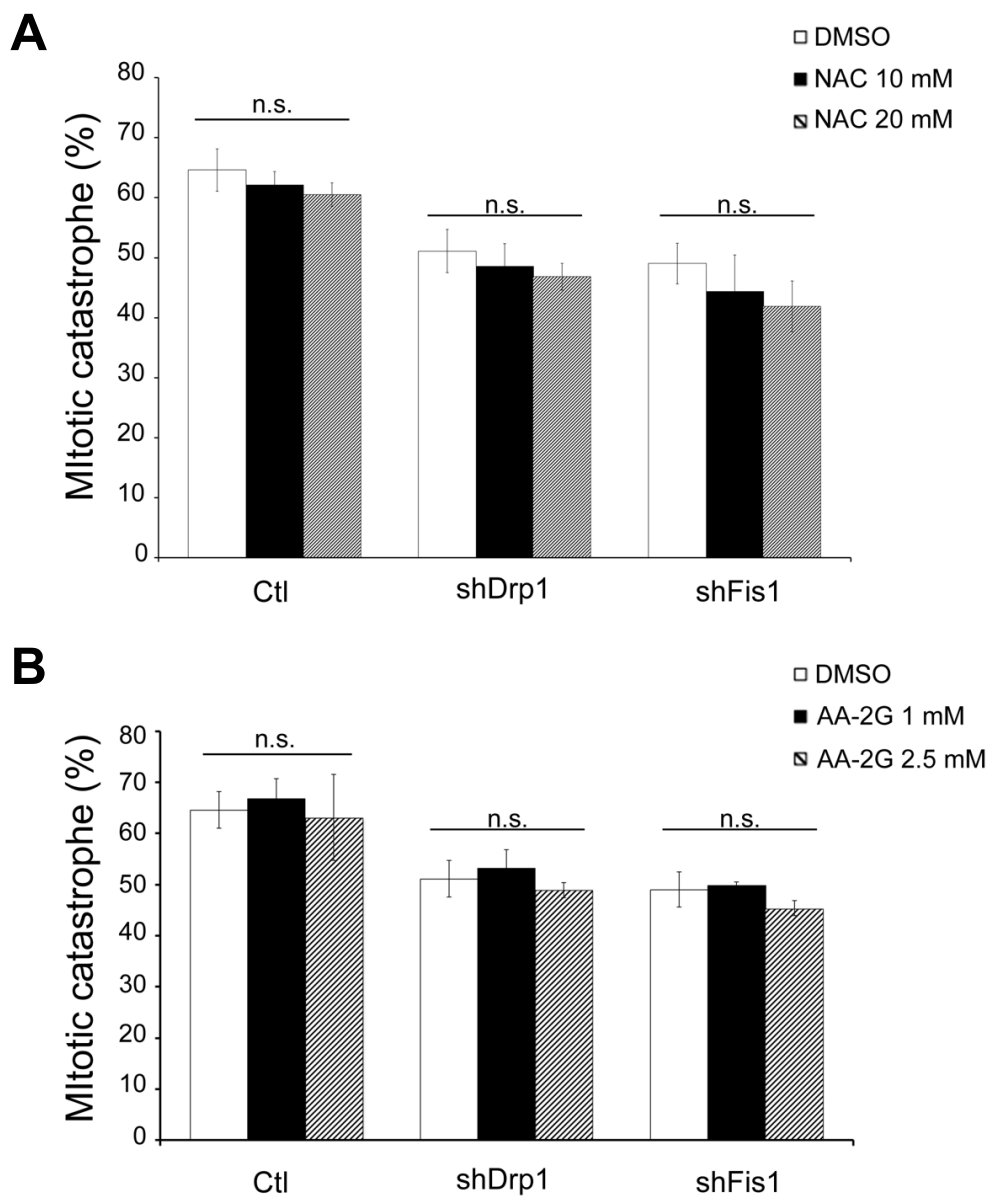


図21. ROSがX線照射後の分裂期崩壊に与える影響

X線照射後の分裂期崩壊にROSスカベンジャー剤であるNACおよびAA-2G処理が与える影響を評価した。Drp1およびFis1 KD EMT6細胞に5 GyのX線照射後、各濃度のNAC (A)またはAA-2G (B)を処理し24時間後の分裂期崩壊を定量的に評価した。統計的有意差はStudent's t検定により検定した。

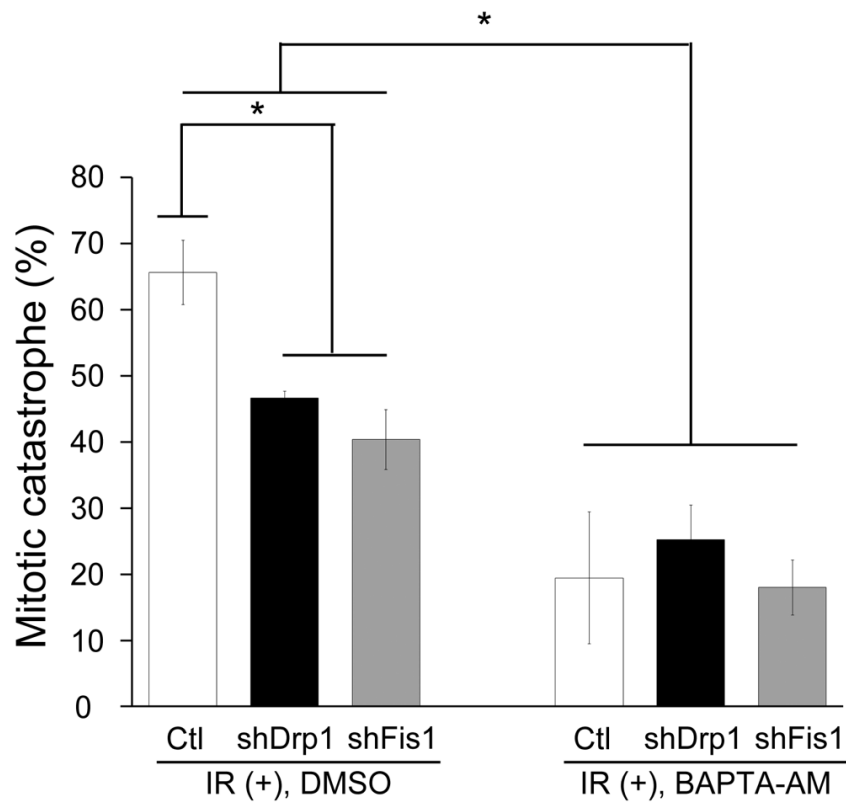


図22. Ca^{2+} がX線照射後の分裂期崩壊に与える影響

X線照射後の分裂期崩壊に Ca^{2+} キレート剤であるBAPTA-AM処理が与える影響を評価した。Drp1およびFis1 KD EMT6細胞に5 GyのX線照射後、8 μM BAPTA-AMを処理し24時間後の分裂期崩壊を定量的に評価した。統計的有意差はStudent's t検定により検定し、 $p < 0.05$ (*) で示した。

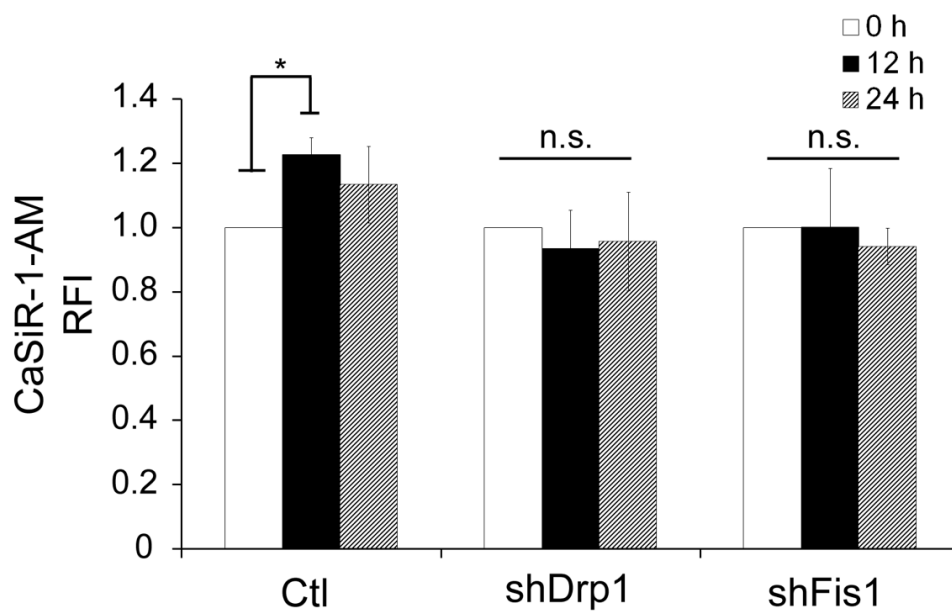


図23. ミトコンドリア分裂抑制がX線照射後の細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ に与える影響

Drp1およびFis1 KD EMT6細胞に5 GyのX線照射後、一定時間培養後の細胞をCaSiR-1-AMで染色し、フローサイトメーターを用いて細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ を評価した。統計的有意差はStudent's t検定により検定し、 $p < 0.05$ (*) で示した。

3. 考察

本章では、Drp1 および Fis1 KD EMT6 細胞では X 線照射後の分裂期崩壊が有意に低下していることを明らかにした。同様の結果は、Drp1 KO MEF 細胞を用いた検討でも観察されている。また、これらの結果はコロニー形成試験の感受性変化の程度をよく反映しており、ミトコンドリア分裂抑制による放射線感受性の低減に関わる細胞死には分裂期崩壊が重要であることが示唆される。一方で、ミトコンドリア分裂による形態変化がアポトーシスの誘導と密接に関わることがよく知られている⁴⁾。実際、Drp1 KD 細胞では X 線照射によるアポトーシスを一部ではあるが有意に減少したことから、Drp1 KD よりアポトーシス誘導が一部抑制されたことが示唆された。しかしながら、EMT6 細胞におけるアポトーシスによる細胞死は 10%未満と少なく、コロニー形成法による放射線照射後の細胞生存率を考慮するとアポトーシスの放射線による細胞死に対する寄与は小さいことが推察された。

分裂期崩壊低減に寄与するメカニズムを検討したところ、DNA 二本鎖切断、ATP ならびに ROS はこれに寄与していないことが明らかとなった。X 線照射によって細胞あたりの ATP 量が増加することはこれまでに報告されており、この結果は EMT6 細胞においても同様であった。一方で、ミトコンドリア形態は伸長化している方がエネルギー産生に有利であることが知られており⁵⁶⁾、放射線によるミトコンドリア分裂の亢進は細胞あたりの ATP 量の増加に相反するようと思われる。しかし、同時に、放射線がミトコンドリア DNA およびミトコンドリア量を長期的に増加させることも報告されていることから⁶¹⁾、細胞あたりの ATP 量が増加している結果はこれに起因するものと推察される。また、ドキソルビシンやシスプラチン処理をはじめとしたストレスがミトコンドリア分裂を亢進し、ミトコンドリア由来 ROS 産生を増強する報告がこれまでに数多くなさ

れている。放射線照射がミトコンドリア由来 ROS 産生を増加させることも知られているが、本研究における ROS スカベンジャー処理は放射線による分裂期崩壊に影響を及ぼさなかった。また、当研究室の MEF 細胞を用いた検討では、放射線がミトコンドリア由来 ROS 産生を増加させるものの、Drp1 KO がこれに影響しないことを明らかにしている(結果未掲載)。これらの結果から、放射線によってミトコンドリア由来 ROS 産生が亢進するものの、この増加にはミトコンドリア形態変化は寄与しておらず、分裂期崩壊の誘導には寄与していないことが推察される。

最後に、Ca²⁺制御の寄与を検討したところ、EMT6 細胞において X 線照射が細胞内[Ca²⁺]_iを増加することが明らかとなった。これまでに、放射線照射が細胞内[Ca²⁺]_iを増加させる知見がいくつかの細胞種で報告されていることから^{24,45)}、この現象は哺乳類動物細胞における一般的な放射線応答の一つであると考えられる。また、X 線による細胞内[Ca²⁺]_iの増加は Drp1 および Fis1 KD 細胞では観察されなかったことから、放射線照射後のミトコンドリア分裂の亢進が細胞内[Ca²⁺]_iを増加させることが示唆された。ミトコンドリアは Ca²⁺を貯蔵・放出することで、細胞内 Ca²⁺シグナル伝達を制御することが知られているとともに、Ca²⁺がミトコンドリア形態変化に重要な役割を担うことが明らかにされてきている⁴⁶⁾。さらに、近年、心筋細胞が分化する際にミトコンドリア融合の抑制がストア作動性の Ca²⁺流入を増加させる知見や³⁰⁾、肝細胞癌において過酸化水素処理時にミトコンドリア分裂が亢進し、STIM1 を介してストア作動性の Ca²⁺流入を増加させるといった知見が報告されている²⁶⁾。これらの知見は、本章における放射線照射後のミトコンドリア分裂の亢進が細胞内[Ca²⁺]_iを増加させる結果を裏付けるものと考えられる。しかしながら、現在のところ放射線による細胞内[Ca²⁺]_iを増加させる由来については明らかではない。前述したように

ミトコンドリア分裂の亢進、または融合の抑制がストア作動性の Ca^{2+} 流入を引き起こす知見が報告されている。しかしながら、 Ca^{2+} の由来が小胞体やミトコンドリア由来である可能性は否定できない。また、小胞体とミトコンドリアは相互作用することが知られており、両者が近接した部位では小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+} の移行がなされる報告や、小胞体がミトコンドリアを包み込み、Drp1 によるミトコンドリア分裂箇所を予め狭窄することが報告されている¹⁷⁾。これらのことから、Drp1 が小胞体と協調してミトコンドリア形態制御を行うとともに、小胞体とミトコンドリア間の局所的な Ca^{2+} 制御にも影響する可能性が考えられる。これらのつながりを明らかにするには、まず、小胞体やミトコンドリア内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を蛍光プローブを用いて測定を行うとともに、X 線照射後の細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化に対する Ca^{2+} チャネル阻害剤の影響の検討をする必要があると思われる。

本章では、細胞内 Ca^{2+} キレート剤 BAPTA-AM 処理が放射線照射後の分裂期崩壊を顕著に減少させることを明らかにした。 Ca^{2+} は細胞死の誘導や、細胞周期進行の調節といった多様な細胞プロセスを制御するセカンドメッセンジャーであることが知られている²⁷⁾。以前の研究では、MOLT-4 細胞において放射線が細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させるが、このとき BAPTA-AM 処理によって放射線によるアポトーシス誘導が遅延することが報告されている⁵³⁾。これらをまとめると、細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の制御は放射線照射後の細胞の生死に重要な役割を担うことが示唆される。しかしながら、 Ca^{2+} がどのようにして分裂期崩壊の誘導に寄与するかについては検討の余地がある。ガン細胞において分裂期崩壊は放射線による細胞死の主要な様式であることが知られているが、これまでに Ca^{2+} の寄与について報告した事例はほとんどない。放射線照射された細胞では DNA 損傷が引き起こされ、それに伴い細胞周期の停止が起きる。その間に、細胞は DNA 損傷の修

復を試みるが、ガン細胞では細胞周期チェックポイント機構が不完全であり、DNA 損傷を伴ったままに分裂期への細胞周期進行を再開することで、異常な有糸分裂が誘導され、分裂期崩壊が生じることが知られている¹⁴⁾。分裂期における細胞周期進行は polo-like kinases、aurora kinases や cyclins などの様々な分裂調節因子が制御されており²⁸⁾、これらのタンパク質は分裂期進行過程の中で合成、分解または翻訳後修飾を受けることで厳密に活性が制御されている。また、これらのタンパク質の制御が不適切であった際には分裂期崩壊の誘導につながることを知られている。近年、Ca²⁺が分裂時に aurora A kinase を活性化する報告や⁴²⁾、cyclin B1 分解を引き起こす報告がなされている²⁹⁾。これらの知見から、細胞内[Ca²⁺]_i の増加が分裂調節因子の活性もしくは発現量に影響することで、放射線照射後の異常な細胞分裂を引き起こし分裂期崩壊を誘導する可能性が考えられた。

結論として、本章では、放射線によるミトコンドリア分裂の抑制による放射線感受性の低下にはアポトーシスやネクローシスではなく分裂期崩壊による細胞死に一部寄与していることを明らかにした。また、ミトコンドリア分裂の抑制が放射線による細胞内[Ca²⁺]_i の増加を打ち消すことに加え、Ca²⁺が放射線照射後の分裂期崩壊の誘導に寄与していることが明らかとなった。これらの結果をまとめると、放射線照射後にミトコンドリア分裂が亢進することで細胞内[Ca²⁺]_i が増加し、これが分裂期崩壊の誘導に一部寄与することが示唆された。本研究で得られた結果は、ミトコンドリアを介した放射線誘発細胞死の新たなメカニズムの一端を明らかにした知見であり放射線生物学の基礎研究として意義あるものであると考えられる。

5. 小括

本章では、放射線によるミトコンドリア分裂の亢進がどのようにして放射線感受性を修飾しているのかのメカニズムについて明らかにするため、放射線感受性が低下していた Drp1 および Fis1 KD EMT6 細胞を用いて検討を行った。まず、感受性変化に寄与している放射線照射後の細胞死様式を決定するため、ネクロシス、アポトーシスならびに分裂期崩壊による細胞死を評価した。その結果、EMT6 細胞において放射線照射後の細胞死にはアポトーシスやネクロシスよりも分裂期崩壊が主要であることが明らかとなった。また、ミトコンドリア分裂の抑制は放射線による分裂期崩壊の一部を減少した。続いて、分裂期崩壊の低減を引き起こすメカニズムについて明らかにするため、DNA 二本鎖切断、ATP、ROS ならびに Ca^{2+} 制御の寄与について検討した。その結果、DNA 二本鎖切断、ATP ならびに ROS はこれに寄与していない一方で、 Ca^{2+} が放射線照射後の分裂期崩壊の誘導に寄与していることを明らかとした。また、ミトコンドリア分裂の抑制が放射線による細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を打ち消した。これらの結果をまとめると、放射線照射後にミトコンドリア分裂が亢進することで細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加し、これが分裂期崩壊の誘導に一部寄与することが示唆された。

<総括>

ミトコンドリア形態とミトコンドリア機能は深い関連があることが知られている。近年、放射線照射後のミトコンドリア機能変化が細胞の生死に重要であることが明らかになってきているとともに、放射線により生じるミトコンドリア分裂の亢進を抑制することで細胞死が低減することが報告されている。このことから、放射線によるミトコンドリア形態変化が細胞の放射線感受性に寄与することが示唆されており、その間にはミトコンドリア形態変化を通じた何らかの機能制御がなされていると推察される。しかしながら、放射線によってミトコンドリア形態が変化することで細胞死を誘導しているミトコンドリア機能は未だ見出されておらず、また、ミトコンドリア形態変化についての検討も複数あるミトコンドリア形態制御タンパク質の中でミトコンドリア分裂タンパク質 **Drp1** の評価のみに留まっている。そこで、本研究ではミトコンドリア形態変化と放射線感受性との関連性についてを明らかにすることを目的とした。

第一章では、ミトコンドリア融合および分裂を制御するタンパク質をそれぞれ安定的にノックダウンした細胞を樹立し、そのミトコンドリア形態と放射線感受性を評価した。**Drp1** および **Fis1 KD** 細胞ではミトコンドリアが伸長していたのに対し、**Mfn2** および **Opa1 KD** 細胞ではミトコンドリアが短縮しており、これらのミトコンドリア形態制御タンパク質ノックダウンによりミトコンドリア分裂または融合が抑制されていることが明らかとなった。これらの細胞の放射線感受性を評価したところ、**Drp1** および **Fis1 KD** 細胞では放射線感受性が低減していたのに対し、**Mfn2** および **Opa1 KD** 細胞では放射線感受性に影響が見られなかった。以上の結果から、ミトコンドリア分裂を介した形態変化が放射線感受性の修飾に重要であることを明らかとなった。

そこで、第二章では放射線によるミトコンドリア分裂の活性化機構について

Drp1 のリン酸化による機能制御に着目して検討を行った。まず、放射線照射後の Drp1 の S616 および S637 リン酸化レベルを評価したところ、Drp1 S616 リン酸化は亢進した一方で、S637 のリン酸化は変化しないことが明らかとなった。続いて、X 線照射によるミトコンドリア分裂に対して Drp1 リン酸化がどう影響するのかを明らかにするため、Drp1 欠損細胞に野生型 Drp1 あるいは Drp1 セリン変異体 (Drp1 S616A、Drp1 S637A) を導入した。野生型 Drp1 発現細胞と比較して Drp1 S637A 発現細胞では X 線照射によるミトコンドリア分裂に有意な差がなかった一方で、Drp1 S616A 発現細胞はこの分裂を抑制した。このことから、Drp1 S616 リン酸化が放射線にミトコンドリア分裂の亢進に重要であることが明らかとなった。そこで、Drp1 S616 リン酸化を引き起こすキナーゼについて検討を行ったところ、CaMKII の阻害が X 線照射後の Drp1 S616 リン酸化ならびにミトコンドリア分裂の亢進を抑制した。以上の結果から、X 線照射後、CaMKII が Drp1 S616 のリン酸化を亢進することで、ミトコンドリア分裂の亢進を引き起こすことが示唆された。

第三章では、放射線によるミトコンドリア分裂の亢進がどのようにして放射線感受性を修飾しているのかのメカニズムを明らかにするため、ミトコンドリア分裂抑制により放射線感受性が低下していた Drp1 および Fis1 KD EMT6 細胞を用いた検討を行った。放射線感受性変化に寄与している放射線照射後の細胞死様式を評価したところ、EMT6 細胞において放射線照射後の細胞死にはアポトーシスやネクローシスよりも分裂期崩壊が重要であり、ミトコンドリア分裂の抑制は放射線による分裂期崩壊の一部を減少した。この分裂期崩壊を低減させた機構を明らかにするため、DNA 二本鎖切断、ATP、ROS ならびに Ca^{2+} 制御の寄与について検討したところ、DNA 二本鎖切断、ATP ならびに ROS はこれに寄与していなかった。その一方で、 Ca^{2+} が放射線照射後の分裂期崩壊の誘

導に寄与していることに加え、ミトコンドリア分裂の抑制が放射線による細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ の増加を阻害することが明らかとなった。これらの結果をまとめると、放射線照射後にミトコンドリア分裂が亢進することで細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ が増加し、これが分裂期崩壊の誘導に一部寄与することが示唆された。増加する細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ の由来や、 Ca^{2+} が分裂期崩壊の誘導に寄与する機構については今後の検討の余地がある。

以上の結果をまとめると、放射線照射によって CaMKII を介した Drp1 S616 リン酸化がミトコンドリア分裂を引き起こすとともに、このミトコンドリア分裂亢進が Ca^{2+} 制御を通じて分裂期崩壊の誘導に関わることで細胞の放射線感受性を修飾しているという一連のメカニズムが明らかとなった(図 24)。今回、 Ca^{2+} 制御が放射線照射によるミトコンドリア形態変化と放射線感受性修飾に非常に重要であることが示唆されたものの、 Ca^{2+} 制御とミトコンドリア形態変化の上下関係については未だ不明な点が多く、今後さらなる検討が必要である。今回得られた現象を説明する上で最も近い知見として、ミトコンドリア分裂と Ca^{2+} シグナルが正のフィードバックで互いを増強するという Huang らの報告が挙げられる²⁶⁾。現状では、 Ca^{2+} がミトコンドリア分裂を活性化するのか、ミトコンドリア分裂が細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 増加させるかのどちらが先かを明らかにすることはできないものの、これらの知見から少なくとも、ミトコンドリア分裂と Ca^{2+} 制御が互いに密接に関与していることが示唆される。

本知見は Ca^{2+} 制御というミトコンドリアを介した放射線誘発細胞死の新たなメカニズムの一端を明らかにした知見であり放射線生物学の基礎研究として意義あるものであると考えられる。

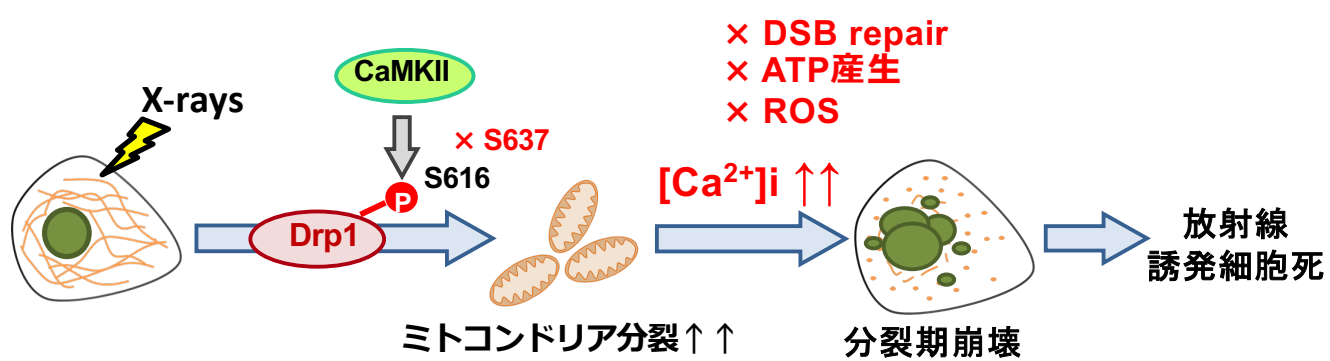


図24. 本研究が明らかとした結果の概略図

謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導賜りました北海道大学大学院獣医学研究科応用獣医科学分野放射線学教室の稲波修教授および安井博宣准教授に深く感謝いたします。また、本論文を御校閲頂きました本研究科基礎獣医科学分野薬理学教室の乙黒兼一教授ならびに本研究科基礎獣医科学分野生化学教室の岡松優子准教授に厚く御礼申し上げます。また本研究の遂行に当たり、始終多大な御助言、御協力下さいました本学放射線学教室の山盛徹前准教授(現 一般財団法人 日本宇宙フォーラム 研究員)および教室各位に謹んで御礼申し上げます。

<引用文献>

- 1) Archer SL. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med* 369, 2236-2251, 2013.
- 2) Braschi E, Zunino R, McBride HM. MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep* 10, 748-754, 2009.
- 3) Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, Scorrano L. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15803-15808, 2008.
- 4) Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet* 46, 265-287, 2012.
- 5) Chang CR, Blackstone C. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 282, 21583-21587, 2007.
- 6) Chang CR, Blackstone C. Drp1 phosphorylation and mitochondrial regulation. *EMBO Rep* 8, 1088-1089; author reply 1089-1090, 2007.
- 7) Chaurasia M, Bhatt AN, Das A, Dwarakanath BS, Sharma K. Radiation-induced autophagy: mechanisms and consequences. *Free Radic Res* 50, 273-290, 2016.
- 8) Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton SA. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 324, 102-105, 2009.
- 9) Chou CH, Lin CC, Yang MC, Wei CC, Liao HD, Lin RC, Tu WY, Kao TC,

- Hsu CM, Cheng JT, Chou AK, Lee CI, Loh JK, Howng SL, Hong YR. GSK3 β -mediated Drp1 phosphorylation induced elongated mitochondrial morphology against oxidative stress. *PLoS One* 7, e49112, 2012.
- 10) Cribbs JT, Strack S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* 8, 939-944, 2007.
 - 11) DeSilva DR, Jones EA, Favata MF, Jaffee BD, Magolda RL, Trzaskos JM, Scherle PA. Inhibition of mitogen-activated protein kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. *J Immunol* 160, 4175-4181, 1998.
 - 12) Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 870-879, 2007.
 - 13) Enns L, Murray D, Mirzayans R. Effects of the protein kinase inhibitors wortmannin and KN62 on cellular radiosensitivity and radiation-activated S phase and G1/S checkpoints in normal human fibroblasts. *Br J Cancer* 81, 959-965, 1999.
 - 14) Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol* 31, 363-372, 2010.
 - 15) Fellmann C, Hoffmann T, Sridhar V, Hopfgartner B, Muhar M, Roth M, Lai DY, Barbosa IA, Kwon JS, Guan Y, Sinha N, Zuber J. An optimized microRNA backbone for effective single-copy RNAi. *Cell Rep* 5, 1704-1713, 2013.
 - 16) Figueroa-Romero C, Iñiguez-Lluhí JA, Stadler J, Chang CR, Arnoult D,

- Keller PJ, Hong Y, Blackstone C, Feldman EL. SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle. *FASEB J* 23, 3917-3927, 2009.
- 17) Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334, 358-362, 2011.
- 18) Galanty Y, Belotserkovskaya R, Coates J, Polo S, Miller KM, Jackson SP. Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature* 462, 935-939, 2009.
- 19) Gan X, Huang S, Wu L, Wang Y, Hu G, Li G, Zhang H, Yu H, Swerdlow RH, Chen JX, Yan SS. Inhibition of ERK-DLP1 signaling and mitochondrial division alleviates mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease cybrid cell. *Biochim Biophys Acta* 1842, 220-231, 2014.
- 20) Gawlowski T, Suarez J, Scott B, Torres-Gonzalez M, Wang H, Schwappacher R, Han X, Yates JR, Hoshijima M, Dillmann W. Modulation of dynamin-related protein 1 (DRP1) function by increased O-linked- β -N-acetylglucosamine modification (O-GlcNAc) in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 287, 30024-30034, 2012.
- 21) Gomes LC, Scorrano L. Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. *Biochim Biophys Acta* 1833, 205-212, 2013.
- 22) Han XJ, Yang ZJ, Jiang LP, Wei YF, Liao MF, Qian Y, Li Y, Huang X, Wang JB, Xin HB, Wan YY. Mitochondrial dynamics regulates hypoxia-induced migration and antineoplastic activity of cisplatin in breast cancer cells. *Int*

- J Oncol 46, 691-700, 2015.
- 23) Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, Remington SJ. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. J Biol Chem 279, 13044-13053, 2004.
 - 24) Heise N, Palme D, Misovic M, Koka S, Rudner J, Lang F, Salih HR, Huber SM, Henke G. Non-selective cation channel-mediated Ca^{2+} -entry and activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II contribute to G2/M cell cycle arrest and survival of irradiated leukemia cells. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology 26, 597-608, 2010.
 - 25) Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. The machines that divide and fuse mitochondria. Annu Rev Biochem 76, 751-780, 2007.
 - 26) Huang Q, Cao H, Zhan L, Sun X, Wang G, Li J, Guo X, Ren T, Wang Z, Lyu Y, Liu B, An J, Xing J. Mitochondrial fission forms a positive feedback loop with cytosolic calcium signaling pathway to promote autophagy in hepatocellular carcinoma cells. Cancer Lett 403, 108-118, 2017.
 - 27) Humeau J, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Nunez L, Villalobos C, Kroemer G, Senovilla L. Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. Cell Calcium 70, 3-15, 2018.
 - 28) Hunt T. The requirements for protein synthesis and degradation, and the control of destruction of cyclins A and B in the meiotic and mitotic cell cycles of the clam embryo. The Journal of Cell Biology 116, 707-724, 1992.
 - 29) Hyslop LA, Nixon VL, Levasseur M, Chapman F, Chiba K, McDougall A,

- Venables JP, Elliott DJ, Jones KT. Ca²⁺-promoted cyclin B1 degradation in mouse oocytes requires the establishment of a metaphase arrest. *Developmental Biology* 269, 206-219, 2004.
- 30) Kasahara A, Cipolat S, Chen Y, Dorn GW, 2nd, Scorrano L. Mitochondrial fusion directs cardiomyocyte differentiation via calcineurin and Notch signaling. *Science* 342, 734-737, 2013.
- 31) Kobashigawa S, Kashino G, Suzuki K, Yamashita S, Mori H. Ionizing radiation-induced cell death is partly caused by increase of mitochondrial reactive oxygen species in normal human fibroblast cells. *Radiat Res* 183, 455-464, 2015.
- 32) Kobashigawa S, Suzuki K, Yamashita S. Ionizing radiation accelerates Drp1-dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 414, 795-800, 2011.
- 33) Leithe E, Cruciani V, Sanner T, Mikalsen SO, Rivedal E. Recovery of gap junctional intercellular communication after phorbol ester treatment requires proteasomal degradation of protein kinase C. *Carcinogenesis* 24, 1239-1245, 2003.
- 34) Losón OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 24, 659-667, 2013.
- 35) Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934, 2002.
- 36) Marengo B, De Ciucis C, Ricciarelli R, Pronzato MA, Marinari UM,

- Domenicotti C. Protein kinase C: an attractive target for cancer therapy. *Cancers (Basel)* 3, 531-567, 2011.
- 37) Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmé D, Schächtele C. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *J Biol Chem* 268, 9194-9197, 1993.
- 38) Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 121, 2012-2022, 2010.
- 39) Otera H, Ishihara N, Mihara K. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1833, 1256-1268, 2013.
- 40) Otera H, Mihara K. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J Biochem* 149, 241-251, 2011.
- 41) Palme D, Misovic M, Schmid E, Klumpp D, Salih HR, Rudner J, Huber SM. Kv3.4 potassium channel-mediated electrosignaling controls cell cycle and survival of irradiated leukemia cells. *Pflügers Arch* 465, 1209-1221, 2013.
- 42) Plotnikova OV, Pugacheva EN, Dunbrack RL, Golemis EA. Rapid calcium-dependent activation of Aurora-A kinase. *Nat Commun* 1, 64, 2010.
- 43) Pyakurel A, Savoia C, Hess D, Scorrano L. Extracellular regulated kinase phosphorylates mitofusin 1 to control mitochondrial morphology and apoptosis. *Mol Cell* 58, 244-254, 2015.
- 44) Qi X, Disatnik MH, Shen N, Sobel RA, Mochly-Rosen D. Aberrant

- mitochondrial fission in neurons induced by protein kinase C $\{\delta\}$ under oxidative stress conditions in vivo. *Mol Biol Cell* 22, 256-265, 2011.
- 45) Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, Soni R, Dwarakanath BS, Bhatt AN. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Scientific reports* 8, 1531, 2018.
- 46) Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 566-578, 2012.
- 47) Sag CM, Wolff HA, Neumann K, Opiela MK, Zhang J, Steuer F, Sowa T, Gupta S, Schirmer M, Hunlich M, Rave-Frank M, Hess CF, Anderson ME, Shah AM, Christiansen H, Maier LS. Ionizing radiation regulates cardiac Ca handling via increased ROS and activated CaMKII. *Basic Res Cardiol* 108, 385, 2013.
- 48) Samant SA, Zhang HJ, Hong Z, Pillai VB, Sundaresan NR, Wolfgeher D, Archer SL, Chan DC, Gupta MP. SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress. *Molecular and cellular biology* 34, 807-819, 2014.
- 49) Shima H, Suzuki H, Sun J, Kono K, Shi L, Kinomura A, Horikoshi Y, Ikura T, Ikura M, Kanaar R, Igarashi K, Saitoh H, Kurumizaka H, Tashiro S. Activation of the SUMO modification system is required for the accumulation of RAD51 at sites of DNA damage. *J Cell Sci* 126, 5284-5292, 2013.
- 50) Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewska J, Syljuasen RG, Lundin C,

- Bartek J, Helleday T. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol* 7, 195-201, 2005.
- 51) Sugiura A, Nagashima S, Tokuyama T, Amo T, Matsuki Y, Ishido S, Kudo Y, McBride HM, Fukuda T, Matsushita N, Inatome R, Yanagi S. MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2. *Mol Cell* 51, 20-34, 2013.
- 52) Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 282, 11521-11529, 2007.
- 53) Takahashi K, Inanami O, Kuwabara M. Effects of intracellular calcium chelator BAPTA-AM on radiation-induced apoptosis regulated by activation of SAPK/JNK and caspase-3 in MOLT-4 cells. *International journal of radiation biology* 75, 1099-1105, 1999.
- 54) Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 266, 15771-15781, 1991.
- 55) Varanita T, Soriano ME, Romanello V, Zaglia T, Quintana-Cabrera R, Semenzato M, Menabo R, Costa V, Civiletto G, Pesce P, Viscomi C, Zeviani M, Di Lisa F, Mongillo M, Sandri M, Scorrano L. The OPA1-dependent mitochondrial cristae remodeling pathway controls atrophic, apoptotic, and ischemic tissue damage. *Cell Metab* 21, 834-844, 2015.
- 56) Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation.

- Trends Endocrinol Metab 27, 105-117, 2016.
- 57) Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 872-884, 2010.
- 58) Xia Y, Chen Z, Chen A, Fu M, Dong Z, Hu K, Yang X, Zou Y, Sun A, Qian J, Ge J. LCZ696 improves cardiac function via alleviating Drp1-mediated mitochondrial dysfunction in mice with doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 108, 138-148, 2017.
- 59) Xu S, Wang P, Zhang H, Gong G, Gutierrez Cortes N, Zhu W, Yoon Y, Tian R, Wang W. CaMKII induces permeability transition through Drp1 phosphorylation during chronic beta-AR stimulation. *Nat Commun* 7, 13189, 2016.
- 60) Yamamori T, Ike S, Bo T, Sasagawa T, Sakai Y, Suzuki M, Yamamoto K, Nagane M, Yasui H, Inanami O. Inhibition of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein 1 (Drp1) impairs mitochondrial fission and mitotic catastrophe after x-irradiation. *Mol Biol Cell* 26, 4607-4617, 2015.
- 61) Yamamori T, Sasagawa T, Ichii O, Hiyoshi M, Bo T, Yasui H, Kon Y, Inanami O. Analysis of the mechanism of radiation-induced upregulation of mitochondrial abundance in mouse fibroblasts. *J Radiat Res* 58, 292-301, 2017.
- 62) Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, Inanami O. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the

- cell cycle checkpoint. *Free Radic Biol Med* 53, 260-270, 2012.
- 63) Yamamoto K, Ikenaka Y, Ichise T, Bo T, Ishizuka M, Yasui H, Hiraoka W, Yamamori T, Inanami O. Evaluation of mitochondrial redox status and energy metabolism of X-irradiated HeLa cells by LC/UV, LC/MS/MS and ESR. *Free Radic Res* 52, 648-660, 2018.
- 64) Yasui H, Yamamoto K, Suzuki M, Sakai Y, Bo T, Nagane M, Nishimura E, Yamamori T, Yamasaki T, Yamada KI, Inanami O. Lipophilic triphenylphosphonium derivatives enhance radiation-induced cell killing via inhibition of mitochondrial energy metabolism in tumor cells. *Cancer Lett* 390, 160-167, 2017.
- 65) Yoshida K. PKCdelta signaling: mechanisms of DNA damage response and apoptosis. *Cell Signal* 19, 892-901, 2007.
- 66) Zepeda R, Kuzmicic J, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Riquelme JA, Pedrozo Z, Chiong M, Sanchez G, Lavandero S. Drp1 loss-of-function reduces cardiomyocyte oxygen dependence protecting the heart from ischemia-reperfusion injury. *Journal of cardiovascular pharmacology* 63, 477-487, 2014.
- 67) Zhang B, Davidson MM, Zhou H, Wang C, Walker WF, Hei TK. Cytoplasmic irradiation results in mitochondrial dysfunction and DRP1-dependent mitochondrial fission. *Cancer Res* 73, 6700-6710, 2013.
- 68) Zhao C, Chen Z, Qi J, Duan S, Huang Z, Zhang C, Wu L, Zeng M, Zhang B, Wang N, Mao H, Zhang A, Xing C, Yuan Y. Drp1-dependent mitophagy protects against cisplatin-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells by improving mitochondrial function. *Oncotarget* 8, 20988-21000,

2017.

- 69) Zhao YX, Cui M, Chen SF, Dong Q, Liu XY. Amelioration of ischemic mitochondrial injury and Bax-dependent outer membrane permeabilization by Mdivi-1. *CNS Neurosci Ther* 20, 528-538, 2014.

Role of mitochondrial dynamics in cellular radioresponse

Tomoki Bo

Laboratory of Radiation Biology,

Department of Applied Veterinary Sciences,

Graduate School of Veterinary Medicine,

Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan.

Mitochondrial dynamics are crucial for cellular survival in response to various stresses. Previous reports showed that X-irradiation stimulates mitochondrial fission, which is mediated by the mitochondrial fission protein, dynamin-related protein 1 (Drp1) and its inhibition resulted in reduced cellular radiosensitivity. However, the mechanisms of radiation-induced cell death related to mitochondrial shape change remain unclear. In this study, the role of mitochondrial dynamics in cellular radioresponse was investigated.

In the first chapter, EMT6 cells lines stably expressing shRNA against mitochondrial fission or fusion proteins were established. When mitochondrial morphology and cellular radiosensitivity were assessed, knockdown of Drp1 and Fis1, which are mitochondrial fission regulators, resulted in elongated mitochondria and significantly attenuated cellular radiosensitivity. On the other hand, inhibition of Mfn2 and Opa1, which are mitochondrial fusion regulators, did not altered cellular survival after irradiation, although it shortened mitochondria. These results suggest that

mitochondrial fission, but not mitochondrial fusion, is involved in radiation-induced cell death.

In the second chapter, the mechanism how X-irradiation promotes Drp1 activation and subsequent mitochondrial fission was investigated. It was shown that X-irradiation triggered Drp1 phosphorylation at serine 616 (S616) but not at serine 637 (S637). Reconstitution analysis revealed that introduction of wild-type (WT) Drp1 recovered radiation-induced mitochondrial fission, which was absent in Drp1-deficient cells. Compared with cells transfected with WT or S637A Drp1, the change in mitochondrial shape following irradiation was mitigated in S616A Drp1-transfected cells. Furthermore, inhibition of CaMKII significantly suppressed Drp1 S616 phosphorylation and mitochondrial fission induced by X-irradiation. These results suggest that Drp1 phosphorylation at S616, but not at S637, is prerequisite for radiation-induced mitochondrial fission and that CaMKII regulates Drp1 phosphorylation at S616 following irradiation.

In the third chapter, to clear how mitochondrial fission inhibition reduced radiation-induced cell death, the involvements of cellular ATP production, ROS generation, and Ca^{2+} levels were investigated, using Drp1 and Fis1 knockdown (KD) EMT6 cells. When the modes of cell death after irradiation were evaluated, Drp1 and Fis1 KD mainly decreased mitotic catastrophe rather than necrosis and apoptosis after irradiation. Cellular ATP contents in Drp1 and Fis1 KD cells were similar to those in control cells. N-acetylcysteine and 2-glucopyranoside ascorbic acid have no effect on mitotic catastrophe after irradiation. The cellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level increased after

irradiation, which was completely suppressed by Drp1 and Fis1 inhibition. Furthermore, BAPTA-AM significantly reduced radiation-induced mitotic catastrophe, indicating that cellular Ca^{2+} is a key mediator of mitotic catastrophe induction after irradiation. These results suggest that mitochondrial fission is associated with radiation-induced mitotic catastrophe via cytosolic Ca^{2+} regulation.

In conclusion, this study shows the mechanism that how mitochondrial fission is triggered by irradiation and how mitochondrial fission induces cell death after irradiation. These findings imply that the regulation of mitochondrial shape is involved in cellular survival via their functional alteration after irradiation and it also suggests that mitochondrial fission and Ca^{2+} signaling are tightly connected and regulate each other.