



プロテオーム解析による細胞内放射線応答
基本因子の探索とその機能

研究課題番号： 17310035

平成 17 年度～平成 19 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (B)) 研究成果報告書

平成 20 年 5 月



研究代表者 鈴木 文 男

島大学原爆放射線医科学研究所 教授)

プロテオーム解析による細胞内放射線応答
基本因子の探索とその機能

(研究課題番号： 17310035)

平成 17 年度～平成 19 年度科学研究費補助金（基盤研究（B））研究成果報告書

平成 20 年 5 月 鈴木 文 男（広島大学原爆放射能線医科学研究所 教授）

目 次

はしがき	1
I. 研究組織、研究経費	2
II. 研究発表	
1) 学会誌等	3
2) 口頭発表	4
3) 出版物	7
III. 研究成果の概要	
1) 研究の背景と目的	8
2) 研究結果と考察	11
3) 研究の総括と将来展望	16
IV. 謝辞	18
V. 発表論文等（抜粋）	
1) 英文論文	
2) 和文論文等	



は し が き

電離放射線や紫外線は、細胞内ゲノム DNA に種々の損傷を誘発する。これらの障害から身を守るために、生命は DNA 二本鎖切断に対しては相同組換え (homologous recombination, HR) 修復や非相同末端結合 (non-homologous end-joining) 修復、塩基損傷に対しては塩基及びヌクレオチド除去修復といった巧妙なシステムを発展させてきた。しかしながら、最近の研究により、放射線による生物影響は DNA 損傷修復能に加え、細胞が有する DNA 損傷に対する応答反応に大きく依存することが判明している。実際、放射線に高い感受性を示めすヒト遺伝病の毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia-telangiectasia, AT) やナイミーヘン症候群 (nijmegen breakage syndrome, NBS) の原因遺伝子産物 (ATM, NBS1) は、DNA 損傷修復に直接働かず、むしろ細胞内シグナル伝達因子として、種々の応答反応に関わることが分かってきた。

細胞周期進行の一時的停止や自爆的な細胞死 (アポトーシス) は、放射線照射された細胞に見られる代表的な応答反応である。いずれも DNA 損傷がトリガーとなって、細胞内にある複数のシグナル伝達経路を介して、細胞周期や細胞死制御に関わる因子 (エフェクター) を活性化することが知られている。例えば、細胞周期の進行にはいくつかの独立した事象から構成されており、各ステップの進行制御 (チェックポイント制御) には、DNA 損傷を感知するセンサーや、その情報をエフェクターに伝える数々のシグナル伝達因子が関与しており、多くのヒト悪性腫瘍ではこれらの因子が欠損していることが明らかになっている。一方、アポトーシス促進及びその制御因子に関する生化学的な解析から、放射線照射など DNA 損傷をトリガーするアポトーシスにはミトコンドリアを介した経路が主として働き、アポトーシスは放射線照射により生じた異常細胞の出現を防止するために機能していることが判明している。

生体の細胞は、種々の外来因子や内的要因からのストレスにさらされている。この点、こういった細胞応答反応は、生じた DNA 損傷に起因して、がん等の疾患に繋がる異常細胞の蓄積を防止する自己防御システムと言える。既に、DNA 損傷を受けた細胞は一時的に細胞周期進行を止めることにより修復時間を稼ぎ、修復しきれなかった場合、DNA 損傷や細胞内異常分子を感知して、アポトーシスにより死滅・除去させるとする考えも提唱されている。本研究では、細胞周期チェックポイント制御とアポトーシス誘発に関わるタンパク質についてプロテオーム解析するとともに、既に両応答反応に関わることが証明されている既知因子との相互反応について調べる。さらに、新規のタンパク質のシグナル伝達因子としての機能について解析し、シグナル伝達経路の位置から統合的制御に関わる基本因子として機能するか否かを評価する。

I. 研究組織と研究経費

研究課題

プロテオーム解析による細胞内放射線応答基本因子の探索と
その機能

基盤研究 (B)

研究課題番号 : 17310035

研究組織

研究代表者 : 鈴木 文男 (広島大学原爆放射線医科学研究所 教授)

研究分担者 : 河合 秀彦 (広島大学原爆放射線医科学研究所 助教)

交付決定額 (配分額)

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	6,000,000	0	6,000,000
平成18年度	4,600,000	0	4,600,000
平成19年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,700,000	1,230,000	15,930,000

II. 研究発表

1) 学会誌等

1. Tatsuka, M., Sato, S., Kitajima, S., Suto, S., Kawai, H., Miyauchi, M., Ogawa, I., Maeda, M., Ota, T., and Takata, T.: Overexpression of Aurora-A potentiates HRAS-mediated oncogenic transformation and is implicated in oral carcinogenesis. *Oncogene*, 24 (6): 1122-1127, 2005.
2. Kanda, A., Kawai, H., Suto, S., Kitajima, S., Sato, S., Takata, T., and Tatsuka, M.: Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation. *Oncogene*, 24 (49): 7266-7272, 2005.
3. Wiederschain, D., Kawai, H., Shilatifard, A., and Yuan, Z. M.: Multiple mixed lineage leukemia (MLL) fusion proteins suppress p53-mediated response to DNA damage. *J. Biol. Chem.*, 280 (26): 24315-24321, 2005.
4. Stuart, J. R., Kawai, H., Tsai, K. K., Chuang, E. Y., and Yuan, Z. M.: c-Abl regulates Early Growth Response Protein (EGR1) in response to oxidative stress. *Oncogene*. 24(55):8085-8092, 2005.
5. 鈴木文男, 福田絵美, 秋元志美, 河合秀彦, 達家雅明, 泉 俊輔, 平田敏文, 内海利男: 放射線によるアポトーシス誘発と acidic ribosomal protein P2 の脱リン酸化. *広島医学*, 59 (4): 370-372, 2006.
6. Kudo, Y., Ogawa, I., Kitajima, S., Kitagawa, M., Kawai H., Gaffney, M., Miyauchi, M., and Takata, T.: Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer. *Cancer Res.*, 66 (14): 6928-6935, 2006.
7. Stuart, J. R., Gonzalez, F. H., Kawai, H., and Yuan, Z. M.: c-Abl interacts with the WAVE2 signaling complex to induce membrane ruffling and cell spreading. *J. Biol. Chem.*, 281(42): 31290-31297, 2006.
8. 神田暁史, 崎田-数藤志帆, 河合秀彦, 鈴木文男, 嶋本文雄, 達家雅明: 電離放射線誘発胸腺アポトーシス過程におけるパセンジャー蛋白 Aurora-B, INCENP, Survivin の細胞内分布変化について. *長崎医学会雑誌*, 81 (特集号) : 307-310, 2006.
9. 崎田-数藤志帆, 河合秀彦, 神田暁史, 鈴木文男, 達家雅明: EGFP-Aurora-B 発現細胞を用いた X 線誘発多核形成機構の研究. *長崎医学会雑誌*, 81 (特集号) : 311-314, 2006.
10. 河合秀彦, 崎田-数藤志帆, 神田暁史, 鈴木文男, 周 新文, 前田雅代, 太田隆英, 達家雅明: 電離放射線誘発細胞死シグナルにおける分断化 LyGDI の機能解析. *長崎医学会雑誌*, 81 (特集号) : 315-317, 2006.
11. 達家雅明, 崎田-数藤志帆, 河合秀彦, 神田暁史, 鈴木文男, 周新文, 前田

- 雅代, 太田隆英: 電離放射線マウス全身照射における各種臓器での分断化 LyGDI の発現. *長崎医学会雑誌*, 81 (特集号): 318-319, 2006.
12. Sakita-Suto, S., Kanda, A., Suzuki, F., Sato, S., Takata, T., and Tatsuka, M.: Aurora-B regulates RNA methyltransferase NSUN2. *Mol. Biol. Cell*, 18 (3): 1107-1117, 2007.
 13. 鈴木文男: 放射線に対する細胞応答と発がん. *くらしと放射線*, 20: 29-39, 2007.
 14. Kawai, H., Lopez-Pajares, P., Kim, M. M*, Wiedershain, D., and Yuan, Z. M.: RING domain-mediated interaction is a requirement for MDM2's E3 ligase activity. *Cancer Res*, 67 (13): 6026-6030, 2007.
 15. Kitajima, S, Kudo, Y., Ogawa, I., Tatsuka, M., Kawai, H., Pagano, M., and Takata, T.): Constitutive phosphorylation of Aurora-A on Ser51 induces its stabilization and consequent overexpression in cancer. *PLoS ONE*, 26: e944:1-11, 2007.
 16. 鈴木文男: 細胞がん化の起源を探る. *BIO Clinica*, 22 (11) : 13, 2007.

2) 口頭発表

1. 鈴木文男, 福田絵美, 秋元志美, 河合秀彦, 達家雅明, 泉 俊輔, 平田敏文, 内海利男: 放射線によるアポトーシス誘発と acidic ribosomal protein P2 の脱リン酸化. 第 46 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2005.年 6 月
2. Zhou,X*1., Suto, S., Suzuki F., Ota, T., and Tatsuka M.: The γ -ray irradiation induced LyGDI cleavage, cell Apoptosis and its nuclear signal function. 日本放射線影響学会大会第 48 回・第 1 回アジア放射線研究会議, 広島, 2005 年 11 月
3. 鈴木文男, 福田絵美, 秋元志美, 河合秀彦, 達家雅明, 泉 俊輔, 平田敏文, 内海利男: 紫外線照射された Jurkat 細胞における acidic ribosomal protein P2 の脱リン酸化. 日本放射線影響学会第 48 回大会・第 1 回アジア放射線研究会議. 広島, 2005.年 11 月
4. 秋元志美, 泉 俊輔, 平田敏文, 鈴木文男: Jurkat 細胞における γ 線及び紫外線応答タンパク質のプロテオミクス. 日本放射線影響学会第 48 回大会・第 1 回アジア放射線研究会議. 広島, 2005 年 11 月
5. 鈴木文男, 福田絵美, 秋元志美, 河合秀彦, 達家雅明, 泉 俊輔, 平田敏文, 内海利男: 放射線照射された Jurkat 細胞におけるアポトーシス関連タンパク質の検出. 第 28 回日本分子生物学会年会. 福岡, 2005 年 12 月
6. Akimoto, Y., Izumi, S., Hirata, T., and Suzuki, F.: Identification of cytosolic proteins associated with radiation-induced apoptosis in Jurkat

- cells. The Third International Symposium on Hiroshima University 21st Century COE Program – Radiation Casualty Medical Research Center -, Hiroshima, 2006年 2月
7. 鈴木文男：放射線生物研究の新展開. 平成 17 年度原子爆弾被爆者指定医療機関等医師研究会. 広島, 2006 年 2月
 8. 河合秀彦：MDM2 ファミリーによるがん抑制遺伝子 p53 の制御.. 第 76 回日本衛生学会総会ミニシンポジウム, 宇部, 2006 年 3月
 9. 神田暁史, 崎田・数藤志帆, 河合秀彦, 鈴木文男, 嶋本文雄, 達家雅明：電離放射線誘発胸腺アポトーシス過程におけるパセングャー蛋白 Aurora-B、INCENP、Survivin の細胞内分布変化について. 第 47 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2006 年 6月
 10. 崎田・数藤志帆, 河合秀彦, 神田暁史, 鈴木文男, 達家雅明：EGFP-Aurora-B 発現細胞を用いた X 線誘発多核形成機構の研究. 第 47 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2006 年 6月
 11. 河合秀彦, 崎田・数藤志帆, 神田暁史, 鈴木文男, 周 新文, 前田雅代, 太田隆英, 達家雅明)：電離放射線誘発細胞死シグナルにおける分断化 LyGDI の機能解析. 第 47 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2006 年 6月
 12. 達家雅明, 崎田・数藤志帆, 河合秀彦, 神田暁史, 鈴木文男, 周 新文, 前田雅代, 太田隆英：電離放射線マウス全身照射における各種臓器での分断化 LyGDI の発現. 第 47 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2006 年 6月
 13. Akimoto, Y., Fukuda, E., Izumi, S., Hirata, T., and Suzuki, F.: Alteration of acidic ribosomal proteins as an early event during radiation-induced apoptosis in Jurkat cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, 2006 年 6月
 14. 数藤志帆, 神田暁史, 河合秀彦, 鈴木文男, 達家雅明：電離放射線誘発四倍体細胞生成機構の解析. 第 31 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2006 年 7月
 15. 神田暁史, 数藤志帆, 河合秀彦, 鈴木文男, 嶋本文雄, 達家雅明：電離放射線誘発アポトーシス胸腺細胞の形態変化におけるオーロラ B の役割. 第 31 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2006 年 7月
 16. 達家雅明, 数藤志帆, 神田暁史, 河合秀彦, 鈴木文男, 周 新文, 前田雅代, 太田隆英：RhoGDIβ の分断化を指標とした新しい電離放射線バイオドジメトリー. 第 31 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2006 年 7月
 17. 秋元志美, 安永晋一郎, 大坪素秋, 藤原好恒, 山本 卓, 瀧原義宏, 谷本能文, 鈴木文男：細胞腫に依存した細胞の放射線応答反応：アポトーシス誘発と分裂期異常. 日本放射線影響学会大会第 49 回大会, 札幌, 2006 年 9月
 18. 達家雅明, 河合秀彦, 神田暁史, 鈴木文男, 前田雅代, 太田隆英：電離放

- 射線誘発細胞死の機構に關与する低分子量G蛋白制御因子 RhoGDI β 分断化産物の研究. 第 65 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2006 年 9 月
19. 神田暁史, 河合秀彦, 鈴木文男, 佐藤 淳, 小川郁子, 高田 隆, 嶋本文雄, 太田隆英, 達家雅明: がん転移形質発現におけるオーロラ B (AIM-1) の役割についての研究. 第 65 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2006 年 9 月
 20. 河合秀彦, 神田暁史, 鈴木文男, 佐藤 淳*, 高田 隆*, 達家雅明: オーロラ B による RNA メチル化の制御. 第 65 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2006 年 9 月
 21. Kanda, A., Sakita-Suto S., Suzuki, F., Ota, T., Inoue, M., Niwa, O., and Tatsuka, M.: Study on the damage-response signal transduction generated in egg fertilized by sperm of ionizing irradiated male parent. The Fourth International Symposium of the Hiroshima University 21st Century COE Program, Hiroshima, 2007 年 2 月
 22. 達家雅明, 崎田・数藤志帆, 神田暁史, 鈴木文男, 太田隆英, 中十奈苗, 田中英夫, 木村昭郎, 檜原 淳, 和田崎晃: メタボローム (ポストプロテオミクス) 時代の放射線生物学: RhoGDI β 分断化を指標としたバイオドジメトリーのヒトでの知見. 第 48 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2007 年 6 月
 23. 富田紗希, 土本真実, 崎田・数藤志帆, 神田暁史, 鈴木文男, 嶋本文雄, 達家雅明: MALDI/TOF/MS 解析によるアポトーシス抑制因子 Survivin に結合する新規タンパク質の同定. 第 48 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2007 年 6 月
 24. 神田暁史, 崎田・数藤志帆, 井上雅雄, 太田隆英, 丹羽太貫, 鈴木文男, 達家雅明: 生殖細胞を介した電離放射線の被曝影響研究: ヒストン H2AX リン酸化を指標とした被曝後受精卵内でのゲノム応答現象の解析. 第 48 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2007 年 6 月
 25. 河合秀彦, 鈴木文男: p53 制御因子としての MDM2 ファミリーの機能解析. 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007 年 10 月
 26. 河合秀彦, Yuan, Z. M., 鈴木文男: MDM2/MDMX ヘテロ複合体による p53 安定性制御. 日本放射線影響学会大会第 50 回大会, 千葉, 2007 年 11 月
 27. 秋元志美, 藤原好恒, 藤原昌夫, 谷本能文, 鈴木文男: 紫外線誘発アポトーシスにおける K⁺チャンネルの関与. 日本放射線影響学会大会第 50 回大会, 千葉, 2007 年 11 月
 28. 河合秀彦, Yuan, Z. M., 鈴木文男: MDM2 ファミリーのリングフィンガードメインを介した複合体形成と E3 ユビキチンリガーゼ. 第 30 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2007 年 12 月
 29. Akimoto, Y., Fujiwara, Y., Fujiwara, M., Tanimoto, Y., and Suzuki, F.: The early stage of UV-induced apoptosis in Jurkat cells. The Fifth

International Symposium of the Hiroshima University 21st Century COE Program, Hiroshima, 2008 年 1 月

30. Kawai, H., Yuan, Z. M., and Suzuki, F.: The early stage of UV-induced apoptosis in Jurkat cells. The Fifth International Symposium of the Hiroshima University 21st Century COE Program, Hiroshima, 2008 年 1 月
31. 鈴木文男: 放射線発がんに関する新しい考え方. 平成 19 年度原子爆弾被曝者指定医療機関等医師研究会. 広島, 2008 年 2 月

3) 出 版 物

1. 鈴木文男: 1.9 放射線による細胞死 (第 1 章放射線作用の基礎—分子から細胞へ), 放射線医科学—生体と放射線・電磁波・超音波 (大西武雄監修). pp.26-29, 学会出版センター, 東京, 2007 年 3 月

Ⅲ. 研究成果の概要

1) 研究の背景と目的

1. 細胞周期チェックポイント制御に関わる因子

あらゆる生命体にとって、自分自身の遺伝情報を維持し子孫に伝えることは、種の保存という観点から極めて重要なことである。しかしながら、遺伝情報を担うゲノム DNA は、放射線や環境中に存在する化学物質に起因する外的ストレス及びエネルギー代謝過程で生理的に生じる活性酸素などの内的要因によって、絶えず損傷を受けている。これに対処するため、細胞には DNA 損傷の種類に応じた種々の損傷修復システムが存在し、通常の正常細胞では速やかに損傷が除かれる。もっとも、損傷量が多く修復しきれない場合は細胞死が引き起こされるが、少ない場合でも修復過程で生じるエラーが伴うので、遺伝子に突然変異などの有害な情報が蓄積されることは避けられない。

最近の研究により、細胞はゲノム恒常性の維持のために、積極的にゲノム損傷に応答し、少しでも突然変異細胞などの異常細胞として固定化されることを防止していることが明らかになってきた。例えば、電離放射線照射により生じた DNA 二本鎖切断により ATM が活性化され、その下流にある Chk1 や Chk2 及びがん抑制遺伝子産物 p53 などのシグナル伝達因子をリン酸化することが知られている。紫外線照射により生じたピリミジンダイマーなどの塩基損傷では、ATM と同様の働きをもつ ATR (ataxia telangiectasia mutated and Rad3

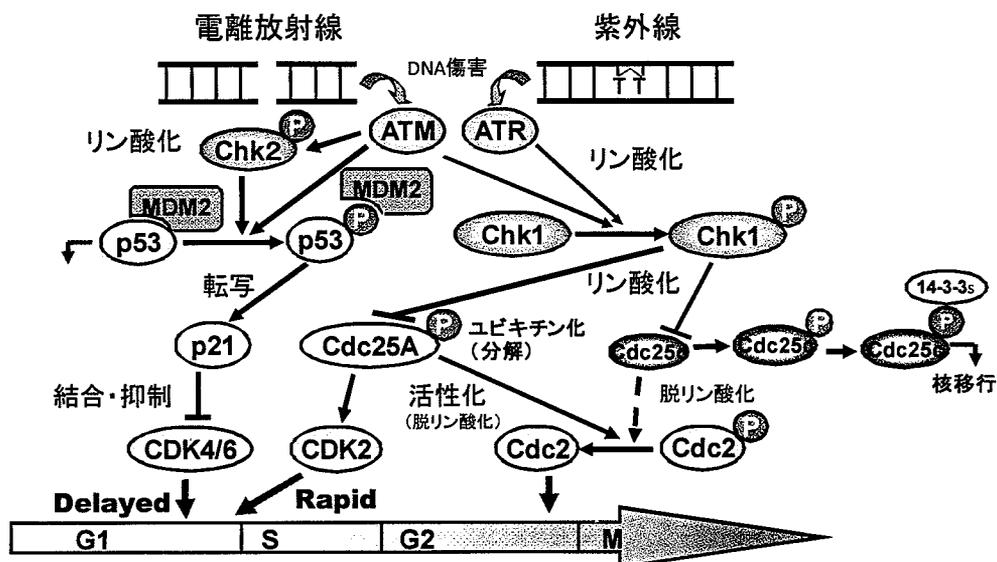


図1. 細胞周期チェックポイントに関わるシグナル伝達

・related) が活性化され Chk1 をリン酸化するが、ヌクレオチド除去修復の過程で作られる一本鎖 DNA がその活性化のトリガーになっていることが示唆されている。いずれにせよ、ゲノム損傷を認識する因子 (センサー) を介して ATM や ATR が活性化されるはずであり、最終的には複数の因子が関わるシグナル伝達経路を経て、細胞周期進行をつかさどるサイクリン依存性キナーゼ (CDK2、CDK4/6、Cdc2) の働きを阻害することにより、G1 期から S 期或いは G2 期から M 期への進行が阻害される (図 1)。

細胞増殖の基本は、如何にして正確に遺伝子を複製し均等に二つの娘細胞に分配するところにある。特に、短時間の内に極めてダイナミックな変化を示す分裂期には種々の制御因子が働いており、放射線照射により誘発される染色体異常や生存細胞中に出現する染色体の数的異常あるいは安定型の異常染色体は、これらの因子の不十分な応答反応に起因するものと考えられている。既に、我々が世界に先駆けて分離した分裂期チェックポイント因子 AIM-1 (Aurora-B) は、動原体構成タンパク質である inner centromere protein (INCENP) やアポトーシス阻害因子として知られている survivin と複合体を形成して、分裂期での染色体分離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。また、Aurora-B は、分裂期において H3 ヒストンを特異的にリン酸化することから、染色体の凝縮や動原体の赤道面への配列、姉妹染色体の分離制御、細胞分裂の際の収縮盤の形成とその後の収縮及び midbody 分離など、分裂期全般にわたって染色体の均等分配に関わっていることが判明している。

一方、Aurora-A は、Aurora-B とほぼ同じ遺伝子構造を有しているにもかかわらず、分裂期中において全く異なった細胞内分布を示すことが報告されている。既に報告したように、がん抑制遺伝子産物 p53 が Aurora-A の基質となりうるかどうか調べたところ、この酵素は p53 の 315 番目のセリンを特異的にリン酸化すること、その結果として p53 が Mdm2 により容易に分解されることがわかった。さらに、細胞内の Aurora-A を枯渇させるとアポトーシス高感受性となり、逆にその発現量を上昇させると p53 量が低下した。このことはゲノム DNA 損傷応答因子として働く p53 を介して Aurora-A が G2 期から M 期への細胞周期進行を制御すると同時に、アポトーシス誘発にも密接に関与していることを示唆する。

2. アポトーシス誘発に関わる因子

分子生物学的解析手法を導入した精力的な研究により、アポトーシス誘導に関連する遺伝子のクローニングとその産物、細胞死に関わる細胞内シグナル伝達因子やその促進及び抑制因子、さらには細胞の自己分解に関わる細胞死実行因子が数多く分離・同定され、DNA 損傷をトリガーとするアポトーシスにはミトコンドリアが重要な役割を果たしていることが判明している。これは、ゲノ

ム DNA 損傷により p53 がリン酸化され安定化し、細胞内に蓄積することにより、転写活性化因子としての能力が高まるからである。即ち、p53 は広範なアポトーシスを促進する Bax、Noxa 及び PUMA 等の遺伝子産物を増強し、その結果、アポトーシスシグナル伝達因子としての役割を果たしているチトクローム c がミトコンドリアから漏出することになる。チトクローム c は細胞死の実行に関わる caspase -9 の活性化因子である Apaf-1 と結合し、これらの複合体（アポトソーム : apoptosome）内で酵素活性を有する caspase -9 が作られ、下流のエフェクター-caspase を活性化 (caspase-3, -6, -7 の切断) することにより細胞死が誘発される。アポトーシス細胞に見られる特徴的なラダー状の DNA 分解は、DNase の一種である CAD (caspase-activated DNase) によることが証明されている。即ち、正常細胞の CAD はその阻害因子である ICAD (inhibitor of CAD) と結合しているが、アポトーシスシグナルにより caspase -3 あるいは caspase -7 が活性化すると ICAD が分解され、CAD が DNA をヌクレオソーム単位で分解するからである (図 2)。

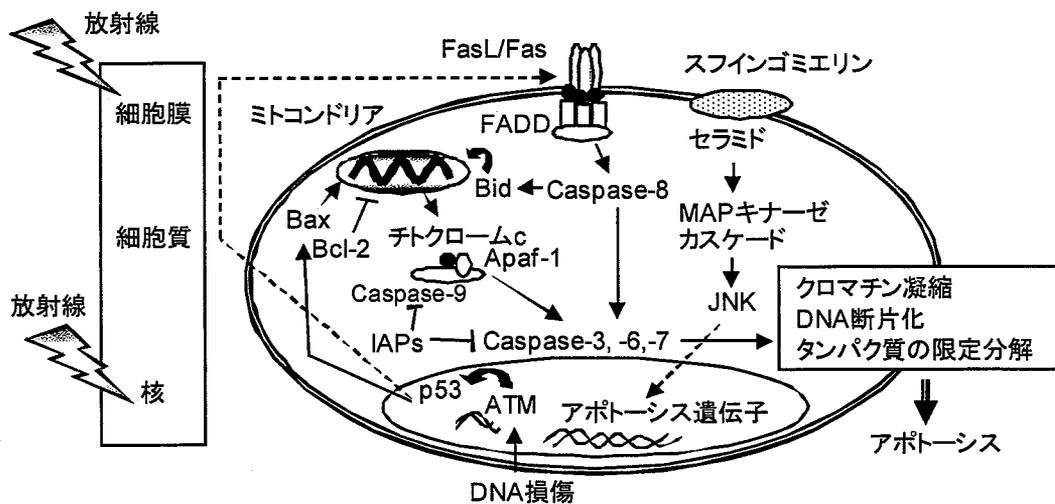


図2. アポトーシスに関わるシグナル伝達

我々はマウス胸腺リンパ腫由来細胞を用いて、X線に対するアポトーシス感受性はがん抑制遺伝子産物 p53 に大きく依存しているばかりでなく、照射後に p53 の一過的上昇に対応して転写因子 NF- κ B の機能低下が起きることから、アポトーシス促進因子としての p53 と抑制因子としての NF- κ B とがクロストークしていることを発見した。さらに、ヒト白血病由来 Jurkat 細胞は p53 遺伝子が機能していないにもかかわらず、紫外線照射すると速やかにアポトーシス

が誘発されることを見つけた。一方、 γ 線を照射した場合、照射後 24 時間以上培養しないとそのような死細胞は出現せず、照射後しばらくは分裂停止状態を維持することがわかった。既に、放射線照射後に細胞周期進行阻害を解除する薬剤を処理するとアポトーシス頻度が上昇することから、細胞周期チェックポイント異常がアポトーシス誘発の原因となっている可能性が示唆されてきた。上皮系及び線維芽系由来細胞では、一般に放射線照射後かなり遅れてアポトーシス細胞が出現するので、「損傷を受けた細胞は細胞周期進行を一時的に止めることにより損傷修復時間を稼ぎ、修復しきれなかった場合には細胞死実行経路が働いてアポトーシスにより自らを排除する」という考えが提唱されている。

本研究では、分裂期進行制御に関わる因子を中心に、細胞周期チェックポイントに関わる既知タンパク質と複合体を形成する因子をスクリーニングし、その機能を解析することにより、「損傷を受けた細胞が示す細胞周期進行の一時的な停止機構」を明らかにする。また、放射線による DNA 損傷をトリガーとしたアポトーシスシグナル伝達に関わる因子を、タンパク質の二次元電気泳動と超高感度全自動質量分析装置を用いて網羅的にタンパク質解析することにより、新たな放射線応答因子の分離・同定を試みる。最終的には、分離されたタンパク質の細胞周期チェックポイント制御とアポトーシス誘発における役割を調べることにより、ゲノム DNA 損傷に応答する基本因子の同定を試みる。

2) 研究結果と考察

1. 分裂期チェックポイント因子 (Aurora-A、-B、-C) の機能

3種の Aurora キナーゼはヒトがん細胞において共通して高発現しているが、それぞれの細胞内分布や他の因子との結合動態及び放射線に対する応答性については異なることが分かった。まず、Aurora-A は細胞内においてがん抑制因子でありゲノム DNA 応答因子として中心的な働きを有している p53 と中心体に共局在するが、がん細胞ではそのキナーゼ活性の上昇により MDM2 を介して p53 の分解を促進することを発見した。細胞に放射線を照射すると、Aurora-A のキナーゼ活性は放射線高感受性遺伝病である末梢血管拡張性運動失調症の原因因子 ATM に依存的に変化するが、これは放射線応答因子 p53 を介した反応をみている可能性が高い。一方、Aurora-B と Aurora-C には、そのような依存性は観察されなかった。これらのキナーゼは共に分裂期中期で動原体、終期においてミッドボディーに局在するが、INCENP や Survivin などのパッセンジャータンパク質との結合において差異がみられた。

染色体パッセンジャータンパク質とはM期染色体分配過程において染色体セントロメア上で赤道面に整列し、姉妹染色体分配後に再び細胞質分離収縮環形成のためのM期細胞中央部分に整列する一群のものを指すが、その主要な複合体

構成因子としては Aurora-B、Survivin、INCENP が知られる。また、Survivin はM期におけるアポトーシス抑制因子として知られている。一方、これらのタンパク質は癌遺伝子 *Ras* のシグナル経路を活性化し、増殖シグナルや細胞死抑制シグナルに関わっていることの明らかになっている。そこで本研究では、電離放射線被曝により間期死を起こす胸腺細胞のアポトーシス過程におけるこれらの染色体パセンジャー蛋白質の役割を知ることを目的とし、アポトーシス過程での細胞内パセンジャー蛋白質分布の変化を調べた。

電離放射線照射してアポトーシス誘導した胸腺系細胞を細胞質界面活性剤可溶性画分、細胞核界面活性剤可溶性画分、そしてそれ以外の界面活性剤不溶性画分に分画して、染色体パセンジャータンパク質群の発現分布を調べた。その結果、染色体パセンジャー蛋白質の根幹キナーゼである Aurora-B はアポトーシス過程で界面活性剤可溶性画分から不溶性画分へと分布変化した。また、Survivin は細胞質界面活性剤可溶性画分に分布し、アポトーシス実行過程では変化しなかったが、アポトーシス完了時期には界面活性剤不溶性画分に移行した。また、INCENP は界面活性剤不溶性画分に分布し、アポトーシス過程で分布変化を示さなかった。本研究結果とこれまでの報告から、染色体パセンジャータンパ

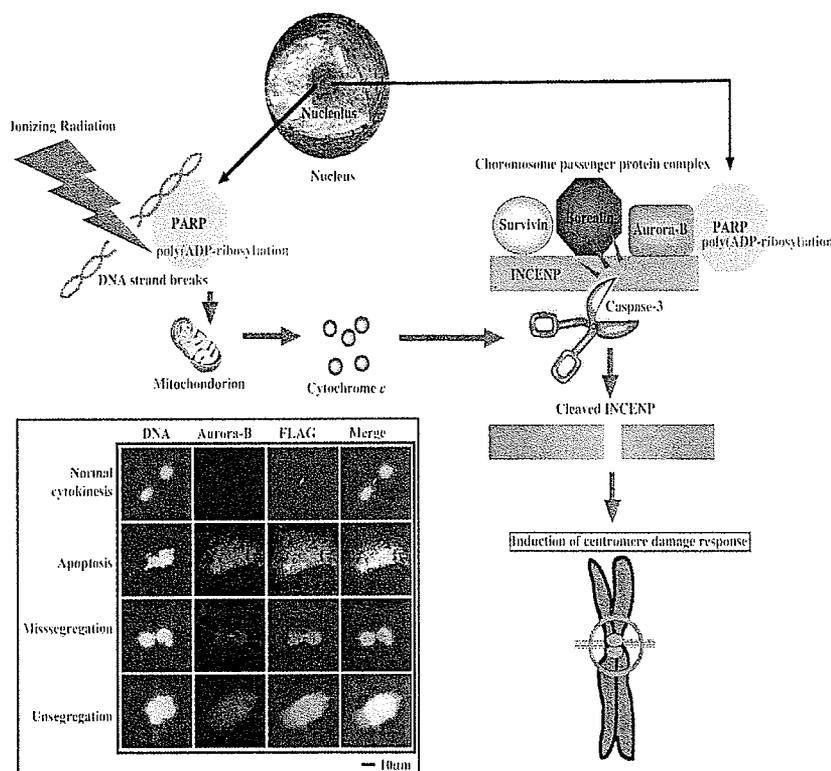


図3. 放射線照射による分裂期チェックポイント因子 (AIM-1/Aurora-B) の機能阻害

ク質複合体の根幹キナーゼである Aurora-B は、電離放射線照射によって核小体から放出されて 3 型カススペースにより分断化されたポリ ADP リボシル化酵素 (PARP) によってポリ ADP リボシル化を受けてその活性が抑制されることが示唆される (図 3)。一方、PARP は DNA 鎖切断部位で DNA をポリ ADP リボシル化することにより DNA 修復を助け、損傷 DNA が原因でミトコンドリアからチトクローム c が放出されて 3 型カススペースが活性化されることにより細胞内の基質を分断化するが、Inner Centromere Protein (INCENP) は染色体パッセンジャータンパク質の標的の一つと考えられる。即ち、INCEP の分断化はセントロメアに対するダメージ応答に関係してアポトーシスや染色体分配異常などの原因となっている可能性があり、染色体パッセンジャータンパク質複合体を構成する Aurora-B が分裂期チェックポイント制御とアポトーシス誘発の両方を制御する基本因子としての役割を担っているものと思われる (図 3)。

2. プロテオーム手法を用いた Aurora-B の新規基質の同定

AIM-1/Aurora-B は染色体パッセンジャータンパク質複合体の根幹キナーゼとして正確な染色体分配と細胞質分離に深く関わっているが、一方では M 期細胞質とキネトコアとの間をダイナミックに移動していることもフォトブリーチングの実験から明らかとなっている。すなわち、Aurora-B には未知の基質が存在する可能性が高い。そこで、本研究では Aurora-B は M 期で H3 ヒストンのセリン 10 番をリン酸化することが知られているので、このリン酸化部位を特異的に認識する抗体を作成し、新しい Aurora-B 基質を分離・同定することを試みた。具体的には、M 期でこのリン酸化部位をエピトープに持つ他のリン酸化タンパク質をプロテオミクスの手法によりスクリーニングした。その結果、いくつかの候補タンパク質が得られ、この内約 100-kDa の分子量を有するタンパク質について部分アミノ酸分析をした結果、新規のタンパク質であることがわかった。部分アミノ酸配列から核酸配列を推定し、合成核酸を作成後、全長 cDNA を単離した。このタンパク質は NOL1/NOP2/sun を含む新規の 5 メチルシトシンメチル化酵素 (NSUN2 ファミリーの一つ) であることが推察されたので、SAKI (Substrate of AIM-1 kinase) と命名した。実際に、SAKI は 139 番目のセリンが Aurora-B によりリン酸化されてそのメチル化活性を負に制御されることがわかった。以上の結果は、Aurora-B が M 期染色体分配の制御のみならず、核酸修飾の制御機能も合わせ持っていることを示すものであり、ゲノム DNA 損傷応答の際にも何らかの関わりを有することを強く示唆するものである。

3. 放射線応答因子のスクリーニング

一般に、紫外線照射された細胞は速やかに死滅するのに対して電離放射線照射された細胞では死細胞が遅れて出現することから、両方で活性化されるアポ

トーシスシグナル伝達の経路は異なるものと考えられている。実際、Jurkat 細胞に紫外線を照射すると照射後 2 時間でミトコンドリアからの大量のチトクローム c の漏出がみられ、3 時間以内にはアポトーシスに特徴的な DNA ラダーパターンの出現や caspase-9 とそれ以降の細胞死実行因子の活性化が生じた。一方、 γ 線照射ではチトクローム c の漏出や caspase-9 及び caspase-3 の活性化は照射後 24 時間以上培養しないと見られなかった。そこで本研究では両者の違いを明らかにするために、Jurkat 細胞に γ 線及び紫外線を照射し、二次元電気泳動法を用いて照射後に変動するタンパク質について解析した。

実験には、主にミトコンドリアによってアポトーシスが制御されているヒト白血病由来 Jurkat 細胞を用いた。細胞にほぼ同程度の細胞致死効果を与える γ 線 (15 Gy) 及び紫外線 (UV-C, 20 J/m²) を照射し、種々の時間培養後にジギトニン処理により細胞質画分を抽出した。まずサンプルを市販の pH グラディエントストリップを用いて電気泳動 (一次元電気泳動) した後、SDS-PAGE に載せて二次元電気泳動を行うことによりタンパク質の泳動パターンを調べた。未照射細胞と γ 線及び紫外線照射後種々の時間培養した細胞について調べたところ、照射により量的に増えたスポットや新たに出現したスポットが数多く検出できた。全体として γ 線と紫外線に特異的なものと、両者に共通して変化したスポットに分類できる事が分かった。そこでまず γ 線と紫外線照射により共通して変化したスポットについてトリプシンによるゲル内消化を行い、MALDI-TOF/TOF 型の質量分析装置を用いてペプチドマスフィンガープリンを分析しコンピューター解析を行った。その結果、明瞭に変化した 6 スポットに関しては delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase mitochondrial precursor, stathmin、RuvB-like 1、Cap G、acidic ribosomal protein P0 (RpP0) 及び P2 (RpP2)、さらに Rho GDP dissociation inhibitor (LyGDI) であることが同定できた。

興味あることに、未照射細胞では分子量が同じで pI 値が 0.1 酸性側野の所に RpP2 のスポットが検出され、照射後培養するに従い pI 値が 0.1 ずつ塩基性側にずれた 2 カ所に RpP2 スポットが出現することがわかった。これらのスポットについて MS/MS 解析を行ったところ、最も酸性側に出現したスポットでは RpP2 の第 102 位と第 105 位のセリンがどちらもリン酸化しているのに対して、pI 値が 0.1 塩基性側のスポットは第 102 位のみがリン酸化状態、最も塩基性側に検出されたスポットは両方のセリンが脱リン酸化していることが判明した。また、放射線照射された Jurkat 細胞における RpP2 の脱リン酸化は、caspase 阻害剤である z-VAD-fmk 処理された細胞でも観察されることから、この変化はアポトーシスを起こした結果として現れたものではないと言える。さらに、これらの脱リン酸化がアポトーシス誘発に関係しているかどうか確認するため、第 102 位と第 105 位のセリン (Ser) をアラニン (Ala) にした RpP2SA (脱リ

ン酸化型) と、両方ともアスパラギン酸 (Asp) にした *PpP2SD* (リン酸化型) 遺伝子を構築し、pEGEF-DF に組み込んで HeLa 細胞にトランスフェクトしたところ、*RpP2SA* が取り込まれた細胞ではアポトーシス様の核変化を起こす傾向が観察された。

既に、多くの研究から比較的低線量の放射線照射した場合、アポトーシスに対応して LyGDI の分解産物 ($\Delta N(1-19)$ LyDGI) が出現することから、 $\Delta N(1-19)$ LyDGI がアポトーシス誘発のシグナル因子として働いている可能性が示唆されている。一方、ミトコンドリアからの cytochrome c 漏出能を指標として X 線照射されたマウス胸腺からアポトーシス促進因子が分離されたが、意外にもそれはクロマチン構成因子である Histone H1.2 であることが判明した。ただ、Histone H1.2 は p53 が存在して初めて機能することから、p53 非依存性のアポトーシスには他の因子が関わっているものと思われる。本研究により、紫外線及び γ 線照射した Jurkat 細胞において、照射後の培養に伴い脱リン酸化型の RpP2 が細胞質に蓄積することがわかった。RpP2 はリボソーム上の突起構造の構成因子の一つであり、通常は全てリン酸化された状態で他の構成因子 (RpP0 及び PpP1) と複合体を形成していることがわかっている。また、RpP0 や PpP1 と異なり、RpP2 は細胞質中にも単独で存在することが知られているが、その生物学的意味については全く報告が見当たらない。紫外線及び γ 線照射後のアポトーシス細胞の出現に対応して脱リン酸化型の RpP2 が検出されたことから、細胞質中の脱リン酸化型 RpP2 の蓄積がアポトーシス誘発のきっかけになる可能性は否定できない。

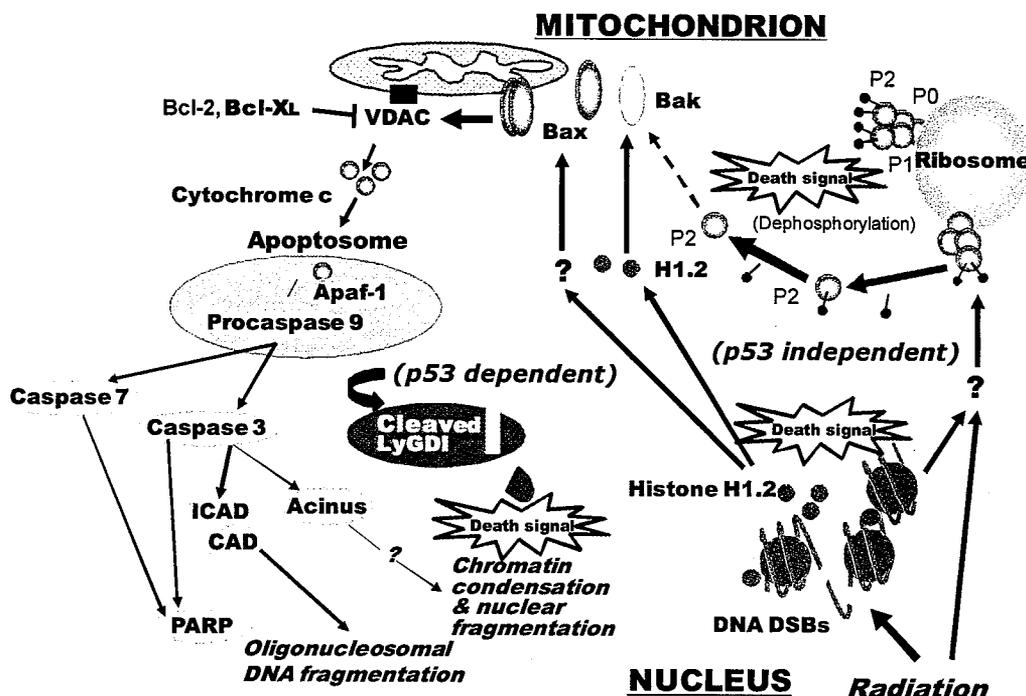


図4. 放射線誘発アポトーシスに関与する細胞内タンパク質の変化

4. ゲノム損傷応答因子 p53 の活性制御

転写因子 p53 は、がんのおよそ半数でその遺伝子に変異や欠失が検出される重要ながん抑制因子の一つである。細胞は生体のゲノム安定性を維持する為に、細胞周期の停止、DNA 損傷修復、アポトーシスの誘導などの様々なゲノム障害応答機構を備えている。また、殆どのヒト悪性腫瘍では p53 遺伝子に突然変異や機能的な失活が見られるので、p53 はがん抑制因子として細胞増殖抑制に働いているだけでなく、主としてゲノム安定性維持を司ることにより細胞がん化変異（悪性形質転換）を防止しているものと考えられている。本研究では、ゲノム障害における p53 の応答制御機構を解明するため、p53 の活性の中心的な制御因子である MDM2 ファミリーに注目してタンパク質相互反応を調べた。

まず、p53 の制御因子として MDM2-MDMX 複合体に注目して解析を行った。MDMX は MDM2 のアミノ酸構造に非常に近似したアミノ構造を有するが、*in vivo* においては、MDM2 が有するユビキチン E3 リガーゼ活性を持たず、その機能は未だ不明な点が多い。MDM2 ファミリーはストレスの存在しない状態では p53 と直接結合し、p53 の分解を誘導する事によって、p53 の機能を完全に阻害することが知られている。興味あることに、放射線照射などによって生じる細胞内ストレスに応答して、MDM2 は MDMX を分解し、その結果 p53 の安定化し活性化が誘導されることがわかった。この MDM2 と MDMX の機能解析を行うにあたって、様々なキメラタンパク質の発現ベクターを作成し解析を行った。その結果、p53 の分解には MDM2 の酸性アミノ酸領域と MDM2 と MDMX のリングフィンガードメインの複合体形成が必須である可能性が示唆された。また、細胞に MDM2 ファミリーのリングフィンガードメインのみを発現させる事によって MDM2-MDMX の複合体形成を阻害した場合には p53 の活性化が観察され、MDMX の非分解型を発現させることによって MDM2-MDMX 複合体の分解を阻害した場合には、p53 のストレス応答の阻害が観察されたことから、p53 のストレス応答は MDM2-MDMX 複合体の安定性及び活性によって制御されていることが明らかとなった。

3) 研究の総括と将来展望

これまで、放射線の生物影響は、基本的には「標的理論」によって説明されてきた。即ち、放射線による生物影響は細胞内標的分子（ゲノム DNA）の損傷とその修復の結果として現れるものと理解されてきた。しかし、最近の細胞内シグナル伝達を中心とした分子生物学的研究の進歩により、生きた細胞内ではゲノム DNA 損傷に対して自ら積極的に反応し、その能力が生物影響を大きく左右することが明らかになってきている。実際、これまで放射線高感受性のヒト遺伝病（AT、NBS など）や免疫不全症マウス（scid マウス）の原因遺伝子がク

ローニングされたが、これらの遺伝子産物はいずれも DNA 損傷修復には直接関係のない細胞内シグナル伝達経路の重要な制御因子であった。その後の研究により各シグナル伝達に関わる多くの因子が同定され、損傷を受けた細胞は「細胞周期チェックポイント制御により DNA 損傷修復を効率よく行い」、うまく修復できなかった細胞については「アポトーシス経路を活性化させることにより自らを排除する」という考えが提唱されるようになった。多細胞系においては細胞相互のつながりの下に恒常性が維持されているので、何らかの機構で両細胞応答反応が連動して機能している可能性は極めて高い。しかし、現在のところこのような統合的な監視機構は推論でしかなく、両者に共通して働く異常細胞蓄積防護のための基本的因子は見つかっていないのが現状である。

本研究では、分裂期チェックポイント因子である 3 種の Aurora キナーゼについて、それぞれの細胞内分布や他の因子と相互反応について調べ、Aurora-B が分裂期チェックポイント制御とアポトーシス誘発の両方に関わる制御因子としての役割を担っていることを示すことができた。また、プロテオミクス手法により Aurora-B に結合する新たなタンパク質として NOL1/NOP2/sun を含む新規の 5 メチルシトシンメチル化酵素 (NSUN2 ファミリーの一つ) が同定でき、Aurora-B がゲノム DNA 損傷応答に対しても何らかの関わりを有することが示唆された。

一方、本研究で同定されたタンパク質合成に関わるリボソーム構成因子の一つである Rp2P とアポトーシス誘発との関係については、直接的にゲノム DNA 損傷との関わりを示すデータ (報告) は現在のところ見当たらない。しかし、Histone H1.2 の例にもあるように、このような細胞質因子が放射線照射により修飾され、その結果としてアポトーシスのトリガーとして働くことは十分に考えられる。これを証明するには、やはり脱リン酸化型 RpP2 遺伝子 (*RpP2SA*) を細胞に導入して発現させた場合、実際にアポトーシスが誘発されるかどうかを定量的に調べる必要がある。他の関連リボソーム構成因子 (RpP0 及び RpP1) やリン酸化型 RpP2 遺伝子についても、同様の解析をすることにより、放射線応答因子としての RpP2 の脱リン酸化の生物学的機能が明らかになるものと思われる。p53 はゲノム損傷応答の中心的なタンパク質であると同時に、多くのアポトーシス促進遺伝子の転写因子であることが知られている。この点、p53 が細胞周期チェックポイント制御とアポトーシス誘発の両方に関わる基本因子であり、本研究でシグナル因子としての重要性が示された Aurora-B や acidic ribosomal protein P2 (RpP2) との関連性が注目される。p53 が機能しない Jurkat 細胞は p53 が機能していないと言われているので、今後は正常な p53 遺伝子を有する細胞について、放射線照射後の細胞周期チェックポイント制御とアポトーシス誘発の動態を解析し、本研究で同定された各因子が細胞応答現象とどう対応するかを詳細に調べることが重要である。

IV. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、非常に多くの方々のご協力をいただいた。特に、具体的な実験を行うにあたって、Aurora キナーゼを中心とした分裂期チェックポイント制御に関する機構解析を精力的に行っていただいた達家雅明准教授（現、県立広島大学生命環境学部生命科学科教授）、種々の補助的実験に精力的に携わっていただいた契約職員の崎田（旧姓、数藤）志帆さんと大学院生（広島大学大学院医学系研究科博士課程）の神田暁史君、及びアポトーシス関係の研究を中心的に携わっていただいたCOE研究員の秋元志美さんに深く感謝の意を表します。

なお、本研究では、ラジオアイソトープ標識物質を用いた実験はすべて当研究所放射線先端医学実験施設の放射線実験系（放射性同位元素使用室）で行い、放射線照射には同施設放射線照射装置管理者の協力の下にX線及び γ 線照射装置を用いてなされました。また、クローニングした遺伝子の解析や遺伝子産物の細胞内動態の解析には同施設の遺伝子実験系に属する種々の解析機器を使わせていただきました。併せて感謝の意を表します。