

放射線による染色体異常誘発を制御する チェックポイント遺伝子の検索

(研究課題番号： 10480135)

平成 10 年度～平成 12 年度

科学研究費補助金 (基盤研究 (B) (2))

研究成果報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者 鈴木 文 男

(広島大学原爆放射能医学研究所教授)

放射線による染色体異常誘発を制御する
チェックポイント遺伝子の検索

(研究課題番号： 10480135)

平成 10 年度～平成 12 年度科学研究費補助金（基盤研究 (B)(2)）研究成果報告書

平成 13 年 3 月 鈴木 文 男（広島大学原爆放射能医学研究所教授）

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	5
III. 研究成果の概要	
1) 研究の背景と目的	9
2) 研究結果と考察	10
3) 研究の総括と将来展望	13
IV. 謝辞	15
V. 発表論文等（抜粋）	
1) 英文論文	
2) 和文論文等	

は し が き

電離放射線は高いエネルギーを有しているために、あらゆる生体分子に直接的及び間接的に損傷を与えることができる。しかし、相対的には細胞の核が最も感受性が高いことから、従来から「標的論」を基本として放射線による生物影響をより単純化した確立論に基づいて解釈されてきた。即ち、放射線照射された細胞に見られる種々の生物学的変化は、細胞内標的分子である DNA に生じた損傷とその修復の結果を反映したものであり、その変化量から逆に照射線量が推定できるものと考えられている。実際に、低線量放射線照射においても種々の異常染色体が出現することから、採取したリンパ球や骨髄細胞の染色体異常がヒトの被曝線量の推定に使用されている。

一方、放射線による生物影響は「細胞応答反応」の現れであり、その効果は必ずしも単純な線量依存性を示さないとする報告がある。最近では、被曝細胞は放射線によって生じた損傷をトリガーとして受け止め、種々のシグナル伝達に関与する遺伝子発現を介して細胞周期の進行を一時的に停止させて損傷修復時間を確保するとともに、損傷不可能な細胞は自らを自爆（アポトーシス）させることにより変異細胞の出現を防止していることが明らかになっている。酵母などでは多くの放射線感受性突然変異が分離され、DNA 損傷や紡錘体形成異常に反応して細胞周期進行を一時的に停止するか否かを調べることにより、細胞周期チェックポイント制御に関与する遺伝子の分離が活発に行われている。既に分離された遺伝子の機能解析から、これらの遺伝子の機能を失活させると高頻度に染色体の構造的、数的異常を引き起こすとともに、その後の分裂異常を介して細胞が多核化することが判明している。

高等動物細胞を用いた細胞周期やそのチェックポイント制御機構に関しては、未だに分子レベルでの解析がほとんど行われていないのが現状である。放射線は高頻度に種々の染色体異常を誘発するが、照射後の生存細胞中にも安定型の異常染色体が出現することが知られている。これらの染色体異常を、単に DNA 損傷やその修復の結果として捉えるのではなく、チェックポイント制御異常に起因するか否かについて調べその分子機構を明らかにすることは、放射線による生物影響を正確に評価するめだけでなく、染色体異常の発生機構やその生物学的意味を理解するためにも極めて重要である。

本研究では、細胞周期チェックポイントのうち染色体異常や染色体不安定性に最も密接に関わっていると思われる分裂期チェックポイントに注目し、新規の遺伝子のクローニングとその分子構造、さらには細胞内での機能と発がんとの関連性について広範な解析を行った。

1. 研究組織と研究経費

1) 研究課題

放射線による染色体異常誘発を制御するチェックポイント遺伝子の検索
基盤研究 (B) (2)

研究課題番号： 10480135

2) 研究組織

研究代表者： 鈴木 文男 (広島大学原爆放射能医学研究所 教授)

研究分担者： 達家 雅明 (広島大学原爆放射能医学研究所 助教授)

3) 研究経費

平成 10 年度 5, 100 千円

平成 11 年度 4, 500 千円

平成 12 年度 1, 700 千円

計 11, 300 千円

II. 研究発表

1) 学会誌等

1. Hashimoto, N., Suzuki, F., Tamai, I., Nikaido, H., Kuwajima, M., Hayakawa, J., and Tsuji, A.: Gene-dose effect on carnitine transport activity in embryonic fibroblasts of JVS mice as a model of human carnitine transporter deficiency. *Biochem. Pharmacol.*, 55, 1729-1732, 1998.
2. Han, Zhen-B., Suzuki, H., Suzuki, F., Suzuki, M., Furusawa, Y., Kato, T., and Ikenaga, M.: Relative biological effectiveness of accelerated heavy ions for induction of morphological transformation in Syrian hamster embryo cells. *J. Radiat. Res.*, 39 (3), 193-201, 1998.
3. 鈴木文男: 多段階発がんにおける染色体不安定性の役割. *組織培養工学*, 24 (10), 385-388, 1998.
4. Tatsuka, M., Katayama, H., Ota, T., Tanaka, T., Odashima, S., Suzuki, F., and Terada, Y.: Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res.*, 58 (21), 4811-4816, 1998.
5. Tatsuka, M.: Regulation of G2/M phases of the cell cycle in mammalian cells. *Cytometry Res.*, 8, 21-28, 1998.
6. Katayama, H., Ota, T., Morita, K., Terada, Y., Suzuki, F., Kato, O., and Tatsuka, M.: Human AIM-1: cDNA cloning and reduced expression during endomitosis in megakaryocyte-lineage cells. *Gene*, 224, 1-7, 1998.
7. 鈴木文男, 達家雅明, 寺田泰比古, 片山博志: 放射線発がんにおける分裂期チェックポイント遺伝子の関与, *長崎医学会雑誌*, 73, 194-197, 1998
8. 達家雅明, 片山博志, 森田貴美子, 寺田泰比古, 鈴木文男: ヒト AIM-1 遺伝子のクローニングと染色体マッピング. *長崎医学会雑誌*, 73, 355-358, 1998.
9. 達家雅明, 片山博志, 鈴木文男: G2/M 期制御の分子機構. *放射線生物研究*, 34, 10-27, 1999.
10. Ota, T., Maeda, M., Tatsuka, M., Matsui, T., Tanino, M., and Tanaka T.: Decrease of metastatic ability after selection for intravasating ability in Lewis lung carcinoma (3LL) cell line. *Cancer Lett.* 139: 105-108, 1999.
11. Katayama, H., Ota, T., Jisaki, F., Ueda, Y., Tanaka, T., Odashima, S., Suzuki, F., Terada, Y., and Tatsuka, M.: Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression. *J. Natl. Cancer Inst.*, 91: 1160-1162, 1999.
12. 石井洋子, 西村まゆみ, 小林 森, 辻 秀雄, 島田義也, 荻生俊昭, 鈴木

- 文男, 佐渡敏彦: Scid マウスの放射線感受性と発がん感受性. *放射線科学*, 42 (6), 70-74, 1999.
13. Kawai, H., Yamada, Y., Tatsuka, M., Niwa, O., Yamamoto, K., and Suzuki, F.: Down-regulation of nuclear factor κ B is required for p53-dependent apoptosis in X-irradiated mouse lymphoma cells and thymocytes. *Cancer Res.*, 59 (24): 6038-6041, 1999.
 14. Kawai, H., Ota, T., Suzuki, F., and Tatsuka, M.: Molecular cloning of mouse thioredoxin reductases. *Gene*, 242: 321-330, 2000.
 15. 鈴木文男, 河合秀彦, 達家雅明, 丹羽太貫: マウス胸腺由来細胞のX線誘発アポトーシスにおける p53 および NF- κ B の関与. *広島医学*, 53 (3), 207-210, 2000.
 16. Kido, Y., Tamai, I., Okamoto, M., Suzuki, F., and Tsuji, A.: Functional clarification of MCT1-mediated transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier using *in vitro* cultured cells and *in vivo* BUI studies. *Pharm. Res.*, 17, 55-62, 2000.
 17. 達家雅明, 河合秀彦, 鈴木文男, 北尾洋之, 加藤友久, 池永満生: 低レベル放射線被曝による胸腺細胞のアポトーシス誘導過程における2型サイクリン依存的キナーゼ活性化現象. *長崎医学会雑誌*, 75, 291-293, 2000.
 18. 数藤志帆, 片山博志, 韓振波, 達家雅明, 鈴木文男: M 期チェックポイント・キナーゼ ScMPS1 結合蛋白 ScMOB1 のヒト・ホモログの解析. *長崎医学会雑誌*, 75, 294-296, 2000.
 19. Lu, Y., Tatsuka, M., Takebe, H., and Yagi, T.: Involvement of cyclin-dependent kinases in doxorubicin-induced apoptosis in human tumor cells. *Mol. Carcinog.*, 29, 1-7, 2000.
 20. 矢島浩彦, 鈴木文男: 熱ショックタンパク質と Bcl-2 ファミリータンパク質による apoptosome の制御. *放射線生物研究*, 35 (4), 358-369, 2000.
 21. Murata-Hori, M., Fumoto, K., Fukuta, Y., Iwasaki, T., Kikuchi, A., Tatsuka, M., and Hosoya, H.: Myosin II regulatory light chain as a novel substrate for AIM-1, an aurora/Ipl1p-related kinase from rat. *J. Biochem.*, 128, 903-907, 2000.
 21. Kawasaki, A., Matsumura, I., Miyagawa, J., Ezoe, S., Tanaka, H., Terada, Y., Tatsuka, M., Machii, T., Miyazaki, H., Furukawa, Y., and Kanakura, Y.: Downregulation of an AIM-1 kinase couples with megakaryocytic polyploidization of human hematopoietic cells. *J. Cell Biol.*, 152 (2), 275-288, 2001.
 22. Ota, T., Maeda, M., Tanino, M., and Tatsuka, M.: Functional suppression of integrin β 4-mediated adhesion caused by *in vivo* sequential selection for cancer cell intravasation. *Anticancer Res.*, 21, 36-45, 2001.

2) 口頭発表

1. 達家雅明, 片山博志, 森田貴美子, 寺田泰比古, 鈴木文男: ヒト AIM-1 遺伝子のクローニングと染色体マッピング. 第 39 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 1998 年 6 月
2. 鈴木文男, 達家雅明, 寺田泰比古, 片山博志: 放射線発がんにおける分裂期チェックポイント遺伝子の関与. 第 39 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 1998 年 6 月
3. 達家雅明: G2/M 期の制御機構. 第 8 回日本サイトメトリー学会, 金沢, 1998 年 6 月
4. 達家雅明: X線照射後の分裂遅延時におけるM期キナーゼ AIM-1 と XIK-1 の発現動態解析. 第 15 回放影研・原医研・放医研研究交流セミナー, 広島, 1998 年 7 月
5. 片山博志, 達家雅明, 鈴木文男: M期スピンドルチェックポイント制御遺伝子 ScMPS1 の哺乳類における構造的ホモログのクローニング. 第 23 回中国地区放射線影響研究会, 岡山, 1998 年 7 月
6. 鈴木文男, 高田清和, 二階堂修, 荻生俊昭: scid ホモおよびヘテロマウス胎児より樹立した細胞株の性質と放射線感受性. 第 23 回中国地区放射線影響研究会, 岡山, 1998 年 7 月
7. Tatsuka, M., Katayama, H., Terada, Y., and Suzuki, F.: Molecular cloning, mapping, and functional analysis of AIM-1 mitotic kinase gene. Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology, Osaka, 1998 年 8 月
8. 達家雅明, 片山博志, 寺田泰比古, 太田隆英, 田中卓二, 小田島肅夫, 鈴木文男: 細胞分裂を制御するM期カインース遺伝子ヒト AIM-1 のクローニング、マッピングならびに癌細胞における発現異常の検討. 第 57 回日本癌学会総会, 横浜, 1998 年 10 月
9. 河合秀彦, 林奉権, 瀬山敏雄, 大山ハルミ, 達家雅明, 鈴木文男: マウス胸腺リンパ腫由来細胞より分離した放射線誘発アポトーシス抵抗性細胞の性質 (2). 第 57 回日本癌学会総会, 横浜, 1998 年 10 月
10. 林奉権, 京泉誠之, 楠洋一郎, 瀬山敏雄, 鈴木文男, Trosko, J. E.: ヒト造血幹細胞の放射線誘発アポトーシスに関する研究. 第 57 回日本癌学会総会, 横浜, 1998 年 10 月
11. 石井洋子, 西村まゆみ, 小林森, 島田義也, 荻生俊昭, 鈴木文男, 佐渡敏彦: scid マウスの放射線感受性と発がん感受性. 第 30 回放医研シンポジウム「放射線の生体影響とその修飾」, 千葉, 1998 年 11 月
12. 達家雅明, 片山博志, 寺田泰比古, 鈴木文男: 哺乳類の細胞周期進行制御機構: M期制御のシグナル分子. 日本放射線影響学会第 41 回大会, 長崎, 1998 年 12 月
13. 児玉靖司, Desa, M. M., 鈴木啓司, 鈴木文男, 渡邊正己: scid マウス細

- 胞における放射線誘発遅延型損傷の解析. 日本放射線影響学会第 41 回大会, 長崎, 1998 年 12 月
14. 鈴木文男, 高田清和, 矢島浩彦, 達家雅明, 二階堂修, 荻生俊昭: X線照射による scid マウス胎児由来細胞のゲノム異常. 日本放射線影響学会第 41 回大会, 長崎, 1998 年 12 月
 15. 達家雅明: 動物細胞における G2/M 期進行制御の分子機構. 第 3 回東海アポトーシス研究会, 名古屋, 1999 年 2 月
 16. 鈴木文男, 河合秀彦, 達家雅明, 丹羽太貫: マウス胸腺由来細胞の X線誘発アポトーシスにおける p53 および NF- κ B の関与. 第 40 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 1999 年 6 月
 17. Tatsuka, M.: Essential role of AIM-1 in mammalian cell division and its implication in colorectal cancer progression (Invited Seminar). Pathology and Laboratory Medicine Special Seminar, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, U.S.A., 1999 年 7 月
 18. Tatsuka, M.: Essential role of AIM-1 in mammalian cell division and its implication in colorectal cancer progression (Invited Seminar). Sealy Center for Molecular Science and NIEHS Center Workshop, The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas, U.S.A., 1999 年 7 月
 19. 鈴木文男, 河合秀彦, 山田有希子, 達家雅明, 丹羽太貫: p53 依存性の X線誘発アポトーシスには NF- κ B の不活性化が関与する. 第 24 回中国地区放射線影響研究会, 黒瀬, 1999 年 7 月
 20. 達家雅明, 河合秀彦, 鈴木文男: 電離放射線被曝による Tリンパ腫細胞のアポトーシス誘導過程における 2 型サイクリン依存的カインース活性の変化. 第 24 回中国地区放射線影響研究会, 黒瀬, 1999 年 7 月
 21. 片山博志, 太田隆英, 寺田泰比古, 加藤修, 鈴木文男, 達家雅明: 巨核芽球分化に伴う M 期制御遺伝子 AIM-1 及びその類縁遺伝子の発現変動. 第 58 回日本癌学会総会, 広島, 1999 年 9 月
 22. 達家雅明, 片山博志, 寺田泰比古, 太田隆英, 地崎赴美子, 上田善道, 田中卓二, 小田島肅夫, 鈴木文男: AIM-1 関連 M 期カインースの発現と大腸癌. 第 58 回日本癌学会総会, 広島, 1999 年 9 月
 23. 児玉靖司, 鈴木啓司, 鈴木文男, 島田義也, 荻生俊昭, 渡邊正己: 放射線による遅延性染色体異常生成に対する scid 突然変異の影響. 第 58 回日本癌学会総会, 広島, 1999 年 9 月
 24. 細谷浩史, 上田こずえ, 村田-堀麻希, 達家雅明: 細胞質分裂時におけるミオシン二重リン酸化と Rho キナーゼ. 第 5 回成茂動物科学シンポジウム, 山形, 1999 年 9 月
 25. 児玉靖司, 鈴木啓司, 鈴木文男, 島田義也, 渡邊正己: 適応応答と遺伝的

- 不安定性の誘導. 日本放射線影響学会第 42 回大会, 広島, 1999 年 9 月
26. 達家雅明: M期分裂装置制御異常に起因する遺伝的不安定性. 日本放射線影響学会第 42 回大会, 広島, 1999 年 9 月
 27. 鈴木文男, 河合秀彦, 山田有希子, 達家雅明, 丹羽太貫: NF- κ B の不活性化は X線によるマウス胸腺由来細胞の p53 依存性アポトーシスに關与する. 日本放射線影響学会第 42 回大会, 広島, 1999 年 9 月
 28. 達家雅明, 河合秀彦, 鈴木文男, 加藤友久, 池永満生: X線照射 Tリンパ腫細胞のアポトーシス誘導過程における G1 期サイクリン依存的カイネーシス活性の変化. 日本放射線影響学会第 42 回大会, 広島, 1999 年 9 月
 29. 河合秀彦, 達家雅明, 鈴木文男: 細胞質型およびミトコンドリア型のマウス・チオレドキシニン還元酵素遺伝子のクローニング. 日本放射線影響学会第 42 回大会, 広島, 1999 年 9 月
 30. Ogiu, T., Ishii-Ohba, H., Kobayashi, S., Nishimura, M., Shimada, Y., Tsuji, H., Watanabe, F., Suzuki, E., and Sado, T: Radiation carcinogenesis in radiosensitive mutant scid mice. International Symposium on Biological Effects of Low Dose Radiation, Rokkashomura, 1999 年 10 月
 31. 達家雅明, 片山博志, 寺田泰比古, 鈴木文男: M期進行を制御する AIM-1 ならびに関連カイネーシス. 第 72 回日本生化学会大会, 横浜, 1999 年 10 月
 32. Suzuki, E., Kawai, H., and Tatsuka, M.: p53-dependent downregulation of NF- κ B during X-ray-induced apoptosis in mouse lymphoma cells. The Third Japan-France Workshop on Radiology, Imaging and Environmental Sciences. Chiba, 1999 年 11 月
 33. Kawasaki, A., Matsumura, I., Terada, Y., Tatsuka, M., Furukawa, Y., and Kanakura, Y: Functional roles for AIM-1 in endomitosis of megakaryocytes. American Society of Hematology Forty-First Annual Meeting. New Orleans, U.S.A., 1999 年 12 月
 34. 麓勝巳, 村田-堀麻希, 片山博志, 達家雅明, 細谷浩史: 新規ミオシン II 調節軽鎖キナーゼとして同定された AIM-1 キナーゼ. 平成 12 年度日本動物学会中国四国支部広島大会, 広島, 2000 年 5 月
 35. 達家雅明, 河合秀彦, 鈴木文男, 北尾洋之, 加藤友久, 池永満生: 低レベル放射線被曝による胸腺細胞のアポトーシス誘導過程における 2 型サイクリン依存的キナーゼ活性化現象. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000 年 6 月
 36. 数藤志帆, 片山博志, 韓振波, 達家雅明, 鈴木文男: M期チェックポイント・キナーゼ ScMPS1 結合蛋白 ScMOB1 のヒト・ホモログの解析. 第 41 回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2000 年 6 月
 37. 笹井香織, 矢島浩彦, 鈴木文男: 培養細胞の紫外線誘発アポトーシスにお

- ける感受性差について. 第 25 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2000 年 7 月
38. 達家雅明, 数藤志帆, 韓振波, 河合秀彦, 鈴木文男, 加藤友久, 池永満生: 粒子線誘発アポトーシスの研究. 第 25 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2000 年 7 月
 39. 荻生俊昭, 石井洋子, 小林森, 西村まゆみ, 島田義也, 辻秀雄, 渡邊文晶, 鈴木文男, 佐渡敏彦: 放射線発がんにおける scid 変異の影響 — 遺伝的要因による放射線発がんの修飾 —. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京, 2000 年 8 月
 40. 鈴木文男, 笹井香織, 矢島浩彦: 培養哺乳類細胞のアポトーシス過程におけるチトクローム c 及び AIF のミトコンドリアからの流出. 日本放射線影響学会第 43 回大会, 東京, 2000 年 8 月
 41. 多賀正尊, 達家雅明, 池永満生, 丹羽太貫, 加藤友久: 胚性幹細胞腫由来細胞における細胞周期 G2/M 期チェックポイント異常と放射線誘発アポトーシス. 日本放射線影響学会第 23 回大会, 東京, 2000 年 8 月
 42. 達家雅明, 数藤志帆, 片山博志, 韓振波, 鈴木文男: M期チェックポイント制御因子酵母 MOB1 のヒトにおける類似遺伝子の解析. 第 23 回日本放射線影響学会, 東京, 2000 年 8 月
 43. 韓振波, 数藤志帆, 鈴木文男, 達家雅明: AIM-1 は染色体量衡不安定性を誘導する. 日本放射線影響学会第 23 回大会, 東京, 2000 年 8 月
 44. 上田こずえ, 村田-堀麻希, 達家雅明, 細谷浩史: HeLa 細胞において Rho キナーゼはミオシン II 調節軽鎖を二重リン酸化する. 第 53 回日本細胞生物学会, 福岡, 2000 年 10 月
 45. 達家雅明, 寺田泰比古, 片山博志, 数藤志帆, 韓振波, 鈴木文男: 動物細胞のM期分裂過程における AIM-1 キナーゼ活性と局在性. 第 53 回日本細胞生物学会, 福岡, 2000 年 10 月
 46. 達家雅明, 太田隆英, 鈴木文男: AIM-1 キナーゼが制御するM期進行制御シグナルの解析. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 2000 年 10 月
 47. 川崎輝, 松村到, 達家雅明, 待井隆志, 古川雄祐, 金倉譲: 巨核球の多倍体化機構における AIM-1 の機能解析. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 2000 年 10 月
 48. 麓勝巳, 村田-堀麻希, 達家雅明, 細谷浩史: 新規ミオシン II 調節軽鎖キナーゼとして同定された AIM-1. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000 年 12 月
 49. 矢島浩彦, 鈴木文男: アポトーシス促進因子 Apaf-1 の Bcl-XL 結合領域の同定. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000 年 12 月
 50. 笹井香織, 矢島浩彦, 鈴木文男: 紫外線誘発アポトーシスにおけるミトコンドリアを介したシグナルの細胞種依存的活性化. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000 年 12 月

- 51 多賀正尊, 達家雅明, 池永満生, 丹羽太貫, 加藤友久: 胚性幹細胞腫由来細胞における DNA 損傷に対する G2 期チェックポイント維持機構とゲノム安定性保持. 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000 年 12 月
52. Suzuki, F.: Activation of signaling pathways associated with radiation-induced apoptosis (Invited Seminar). Radiobiology Group Seminar, Department of Cancer Cell Biology, Harvard School of Public Health, Boston, U.S.A., January 6, 2001.
53. 鈴木文男: 放射線誘発アポトーシスに關与するシグナル因子の解析 (招待セミナー). 病因遺伝子研究グループセミナー, 理化学研究所脳科学総合研究センター, 和光市, 2001 年 1 月

III. 研究成果の概要

1) 研究の背景と目的

原爆被爆者に見られるように、放射線被曝者においてがんは晩発障害の中でも最も深刻な疾患である。実際に、若年被爆者ががん年令に達し、今後ますますこれら被爆者においてがんの発症増加が懸念されると同時に、その発症形態や悪性化の動態が自然発がんものと類似していることに加え、被爆者の高齢化に伴い、骨髄異形性症候群や種々の生活習慣病の増加が認められている。被爆者においても、がんは一般の生活習慣病と同じく、複数の遺伝子が関与する多因子疾患として位置づけられている。しかし何故、放射線被曝者が後年になってがんが高発症するのかについては、依然として明快な解答は得られていない。

がんが放射線照射後に多段階的变化を経た末に生じることは、マウスなどの実験動物を用いた研究から証明されている。細胞レベルでもがん化の多段階性が観察され、現在ではがんは正常細胞中の複数のがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異が積み重なり、その結果として正常な増殖制御がきかなくなり最終的に悪性ながん細胞になるとする考えが定着している。例えば、ヒト家族性の大腸腺腫症ではがん抑制遺伝子 *APC* の変異に加えて、*p53* や *K-ras*、*DCC* 遺伝子の変異、さらには特定染色体の欠失が検出されるので、このがんの発症には少なくとも 5 個以上の遺伝子変異が関与しているものと思われる。しかし、放射線による体細胞の突然変異誘発率は、高々 10^5 程度なので、この程度でそれぞれ独立して遺伝子変異するならば、全生涯を通じて 5~6 個の遺伝子変異を持った大腸がん細胞 (頻度は 10^{25} 以下) は出現しえないことになる (ヒトの身体は約 60 兆個の細胞から構成されている)。このことは、放射線が複数のがん遺伝子やがん抑制遺伝子に直接突然変異を誘発したとするより、放射線照射された細胞において突然変異誘発率を上昇するような変化 (遺伝的不安定性の

誘導) が誘導されたとする考えの方を支持するものである。

1997年に Kinzler と Vogelstein は、がん発症に関わる遺伝子を *RB* や *APC* のようながん細胞の増殖に直接関与する Gatekeeper 遺伝子群と、遺伝子不安定性を引き起こしてがん関連遺伝子の変異を起こしやすくさせる Caretaker 遺伝子群とに分けるべきであると提唱した。後者には DNA 損傷修復遺伝子や細胞周期の進行制御に関わるチェックポイント遺伝子が属しているが、特に染色体異常誘発や染色体不安定性の誘導には分裂期チェックポイント遺伝子が Caretaker として重要な役割を担っているものと考えられる。つまり分裂期チェックポイント遺伝子は、放射線照射後に異常を持ったまま細胞が分裂期に進入し、結果的に染色体の構造異常や数的変化を引き起こすのを事前に防止するところに働いているので、この遺伝子が正常に働かない場合は種々の異常染色体が蓄積し、最終的には異常分裂を繰り返す過程で遺伝子の不安定性につながる可能性が高くなる。実際に、酵母を用いた研究により多くの分裂期チェックポイント遺伝子が分離され、各遺伝子の機能解析により分裂期進行は損傷(トリガー)依存的に種々のシグナル伝達因子を介して巧妙に制御されていることが証明されている。本研究では、これらの遺伝子情報をもとに培養哺乳類細胞から新規の分裂期チェックポイント遺伝子をクローニングし、分離した遺伝子の構造と細胞内での機能について解析した。即ち、本研究の目的は分裂期チェックポイント遺伝子の異常が染色体異常誘発や染色体不安定性の原因になるか否かを明らかにすることであり、最終的にはこれらの遺伝子と放射線発がんとの関連性について新たな知見を得ることを目標としている。

2) 研究結果と考察

1. 放射線応答性の分裂期チェックポイント遺伝子の分離

チャイニーズハムスター細胞は株化(不死化)しても安定な核型を維持する。このことは、この動物種由来細胞は分裂期チェックポイントが正常に機能していることを示唆する。そこで放射線応答性の分裂期チェックポイント遺伝子を分離するため、X線照射されたチャイニーズハムスター胎児(CHE)由来細胞のM期細胞についてcDNAライブラリーを作製し、セリン/スレオニンキナーゼに特徴的な塩基配列をもとに作ったdegenerated primerを用いてPCR法により遺伝子のスクリーニングを行った。PCR合成産物をベクターにサブクローニングし、塩基配列を調べたところ、得られた89クローン全てにセリン/スレオニンキナーゼの保存領域が同定できた。最も長い遺伝子のキナーゼドメインでは、酵母でM期チェックポイント機能が証明されている*Mps1*と31%が同一(61%が類似アミノ酸)であることから、放射線応答性の新規の分裂期チェックポイント遺伝子である可能性が示唆された。そこでこの遺伝子を*Xik1*と命名し、完全な遺伝子(cDNA)のクローニングを行うとともに、現在X線

照射後の発現動態やその機能変化について解析しているところである。

一方、酵母では MPS1 の欠損変異体は放射線高感受性であり、その機能は MPS1 結合因子 MOB1 を介して発揮されることが証明されている。そこで次に、Xik1 の作用因子を同定する目的から、酵母 MOB1 遺伝子情報を基にヒト子宮頸部癌由来 HeLa 細胞からヒト MOB1 類似遺伝子のクローニングを試みた。酵母 MOB1 遺伝子の degenerated primer を用いた PCR 法で HeLa 細胞から作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、酵母 MOB1 と構造的に類似した全長 3197 bp の cDNA を単離することができた。この遺伝子 (ヒト MOB1) の ORF は 654 bp からなる推定 217 個のアミノ酸配列をコードし、酵母 MOB1 と 41%、酵母 MOB2 と 37% の相同性を示した。ヒト MOB1 は種々の臓器で発現がみられ、ヒト正常 2 倍体細胞の細胞周期においても、各期で変動が見られず恒常的に発現していることがわかった。但し、ノコダゾール処理により紡錘体形成を阻害してスピンドルチェックポイントを作動させたところ、この遺伝子産物 (ヒト MOB1 タンパク質) は顕著にリン酸化されることから、MOB1 は MPS1 を介して分裂期チェックポイントに機能していることが示唆された。

2. ヒト AIM-1 遺伝子の分離とがん組織での発現

既に我々は、ラット cDNA ライブラリーから分裂期の最終段階 (細胞質分裂) に機能する分裂期チェックポイント遺伝子 AIM-1 をクローニングし、その不活型遺伝子 (AIM-1(K/R)) を過剰発現させると多倍体化した細胞が出現することを報告してきた。AIM-1 は出芽酵母で分裂異常が見られる Ipl1 変異やハエで分裂不能となる aurora 変異の原因遺伝子と相同性が高く、典型的なセリン/スレオニンキナーゼをコードするシグナル遺伝子であることが示されている。そこで本研究では、分裂期チェックポイント遺伝子のヒト発がんにおける関わりを調べるため、ラット遺伝子をプローブとしてヒト cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、2 種のセリン/スレオニンキナーゼをコードする遺伝子が分離できた。これらの遺伝子の塩基配列から、一つは分子量 38 kD の 344 個のアミノ酸をコードするヒト AIM-1 であり、このアミノ酸配列はラット AIM-1 と 85% 一致することがわかった。一方、もう一つは既に STK6、や BTAK/STK15、Aik、aurora2、ARK1 として登録されている遺伝子と同一のものであった。

ヒト AIM-1 cDNA をプローブとして Northern blot 解析を行った結果、ヒトがん細胞では AIM-1 が共通して高発現していることがわかった。またこの遺伝子を正常ヒト線維芽細胞にトランスフェクトして高発現させると多倍体化した細胞が出現することから、AIM-1 は M 期進行制御を通して染色体の安定性に関与していることが示唆された。しかし、X線照射しても AIM-1 の発現量

は変わらず、また不活型 *AIM-1(K/R)* 遺伝子導入細胞においても X 線照射による特異的な変化が観察されなかったことから、X 線によるシグナルは *AIM-1* の量的変化よりもむしろ質的变化を与える可能性が示された。いずれにせよ、その上流のシグナル伝達因子や下流の標的因子を同定することは、分裂期チェックポイント因子としての *AIM-1* の機能を明らかにする上で極めて重要な研究課題と言える。一方、今回クローニングした 2 種の遺伝子について、悪性度の異なる種々のヒトがん組織について発現量を比較したところ、*AIM-1* はヒト大腸がんの悪性化に伴って高発現するのに対して、*STK15* の発現はがんの悪性度に依存しないことがわかった。この結果は、両遺伝子は共に分裂期チェックポイント制御に機能するとしても、ヒト細胞のがん化過程においては異なったステップで機能することを示しており、Caretaker 因子が発がんの初期変化に関与するだけでなく、その進行にも重要な役割を果たしていることが示唆されるものである。

3. *AIM-1* の機能解析

これまでの研究により、*AIM-1* は分裂期進行に関わるチェックポイント制御因子であることが証明された。しかし、*AIM-1* はセリン/スレオニンキナーゼ活性を有するので、その標的因子（基質）を同定することはシグナル伝達機能を明らかにするためにも極めて重要である。そこでまず、*AIM-1* と相互作用する因子を分離・同定するために、酵母 Two-hybrid 法を用いて *AIM-1* と結合する因子をスクリーニングした。多くのポジティブに反応する遺伝子をスクリーニングした結果、*AIM-1* と結合するタンパク質として染色体の動原体に結合する *CENP-E* が同定できた。*CENP-E* は染色体分配に加え、その後の分裂期制御に重要な働きを果たしていることが知られているので、*AIM-1* は *CENP-E* を介して機能していることが示唆された。しかし、意外にも *CENP-E* に対して *AIM-1* はキナーゼ活性を示さなかった。一方、最近 *IpL1/aurora* ファミリーがヒストン H3 をリン酸化することが報告されている。そこで次に、10 番目のセリンがリン酸化したヒストン H3 に特異的な抗体を用いて、*AIM-1* 発現とヒストン H3 リン酸化との関係について調べた。既に報告したように、*AIM-1* は G2 期から発現しはじめ、M 期において最も高い発現量を示すが、ヒストン H3 のリン酸化の細胞周期依存性は *AIM-1* の発現変化とよく対応することがわかった。興味あることに、染色体の数的変化や多核化しているヒトがん細胞では *AIM-1* が高発現し、ヒストン H3 のリン酸化も他の細胞に比べて高い値を示した。これまでの研究において、*AIM-1* は分裂期の進行を制御する重要な分裂期チェックポイント因子であることを証明してきたが、本研究により、その過剰発現はヒストン H3 の高レベルのリン酸化を引き起こし、その結果として染色体の不安定性を誘起することが示唆された。

3) 研究の総括と将来展望

既に、がんは遺伝子病であることが確立している。しかし、未だに放射線が直接がん関連遺伝子に損傷を与え、その結果としてがんが発症するか否かについては不明である。例えば、ウラン鉱夫に生じた肺がんや原爆被爆者に発症した固形腫瘍についてがん抑制遺伝子 *p53* の変異が調べられたが、塩基レベルの変化を調べた限りでは自然発生のもものと大差は認められていないのが現状である。これらの結果は、放射線による発がんはがん関連遺伝子に対する直接的な突然変異誘発作用というより、むしろ自然発がんレベルを引き上げるような間接的な作用として働いているとする考えを強く指示するものである。

一般に、ヒトがん細胞は正常な核型を維持できない。多くのヒト悪性腫瘍由来細胞では特定染色体の構造異常に加えて、染色体の不等分離による数的異常や細胞質分裂異常の結果としての多倍体化が生じる。これまで、このような染色体異常は細胞がん化に伴う二次的な変化として捉えられてきたが、分子生物学的研究手法を用いた研究により細胞周期チェックポイント異常が発がんに関わっていることが明らかになっている。最近では、その結果生じる染色体不安定性は、正常細胞が悪性形質転換する際の必須のステップであるとして重要視されるようになった。古くから、放射線は高頻度に種々の染色体異常を誘発することから、生物影響の指標として用いられてきたばかりか、特定のがんの診断指標としても採用されてきた。そこで本研究では、まず新規の分裂期チェックポイント遺伝子を分離し、その機能を解析することにより分裂期チェックポイント制御異常が染色体異常誘発や染色体不安定性の原因になるかについて調べた。本研究の最終目的は、分離したこれらの遺伝子を武器として、放射線による染色体異常誘発や染色体不安定性誘導機構、さらには放射線発がんの分子機構について解明することである。

本研究では、染色体異常誘発に関わる分裂期チェックポイント遺伝子の分離とその機能解析に全力をあげてきた。3年間の研究でヒト *AIM-1* を代表とする4種の新規遺伝子のクローニングに成功し、発がんとの関係について重要な知見が得られるとともに、各遺伝子産物の生化学的性質や生物学的機能についても多くの基礎的なデータを積むことができた。しかし、これらの遺伝子が放射線による染色体異常誘発や染色体不安定性の誘導、さらには放射線発がんにどの程度関わっているかについては、明快な解答は得られなかった。いずれにせよ酵母などに比べて、高等動物細胞を用いた分裂期チェックポイント制御に関する研究は遅れており、この点、本研究で分離された新規遺伝子は今後の研究の発展に大いに貢献するものと期待される。

以下に、本研究で得られた結果と残された課題を列記する。

(研究成果のまとめ)

- ① ヒト *AIM-1* 及び *STK15* 遺伝子をクローニングした。
- ② *AIM-1* は細胞増殖や分化に関係し、その過剰発現が細胞の多倍体化を誘導することを発見した。
- ③ *AIM-1* と *ATK15* は共にヒト大腸がんで高発現しているが、前者はその悪性化にも関与していることを見つけた。
- ④ 放射線応答性の遺伝子として *Xik1* と *MOB1* 遺伝子をクローニングした。
- ⑤ 紡錘体形成阻害により *MOB1* のリン酸化が促進されることを見つけた。
- ⑥ *AIM-1* がヒストン H3 をリン酸化することを発見した。

(残された課題)

- ① 放射線照射された細胞における *AIM-1* の発現変化と染色体異常誘発との関係。
- ② *AIM-1* の上流および下流に働くシグナル伝達因子の分離とその機能解析
- ③ *Xik1* と *MOB1* との相互作用、および放射線による染色体異常誘発における役割についての解析

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、当研究分野がスタートした年（平成 8 年度）の研究生であった寺田泰比古博士（現在：Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University）には、本研究がスタートするきっかけをつくっていただき、その後の共同実験に加え貴重な助言と研究材料の援助をいただきました。深く感謝の意を表します。また、具体的な実験を行うにあたって、ヒトがん組織の収集や病理解析をしていただいた太田隆英博士（金沢医科大学病理学教室）、遺伝子クローニングは始め膨大な分子生物学的解析に携わって下さった大学院生（広島大学大学院理学研究科博士課程）の片山博志君（現在：Division of Laboratory Medicine, University of Texas MD Anderson Cancer Center）と細胞生物学的な解析を担当していただいた外国人特別研究員の韓振波博士、種々の補助的実験に精力的にたずさわっていただいた文谷貴美子（旧姓、森田）さんと数藤志帆さん、さらに本研究を進めるにあたって色々と協力していただいた矢島浩彦助手および大学院生（広島大学大学院医学研究科博士課程）の河合秀彦君（現在：Department of Cancer Cell Biology, Harvard School of Public Health）と笹井香織さんに、心より感謝いたします。

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性同位元素実験棟で行い、放射線照射には同施設放射線照射装置管理者の協力の基に X 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。