

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510049

研究課題名 (和文) ユビキチン様タンパク質 SUMO-3 による X 線誘導 DNA 合成の分子機構

課題名 (英文) Research for SUMO-3-involved DNA synthesis induction after X-ray irradiation in human cells

研究代表者

菅谷 茂 (SUGAYA SHIGERU)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：90334177

研究成果の概要 (和文)：X線照射後に DNA 合成レベルが上昇するという現象をゴーリン患者由来細胞で見出した。さらに、この患者由来細胞において、X 線照射後に発現レベルが低下する遺伝子として、ユビキチン様タンパク質 SUMO-3 を同定し、この遺伝子の発現を低下させると、X 線照射による DNA 合成の誘導現象がみられた。この条件下で、X 線照射後に細胞内含有量が変動するタンパクを 2 次元電気泳動法で探索したところ、腫瘍転移抑制因子 NM23-H1 を同定した。そして、NM23-H1 の発現抑制により、X 線照射による DNA 合成の誘導現象がみられた。また、X 線照射後の NM23-H1 タンパクの分解抑制を SUMO 化が担っていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS), also known as Gorlin syndrome or basal cell nevus syndrome, is an autosomal dominant disorder that predisposes to both developmental defects and cancer. Fibroblast cells derived from (NBCCS) patients show increased levels of DNA synthesis after X-ray irradiation. We found that the induction of DNA synthesis after irradiation could be caused by the down-regulation of SUMO-3 gene expression in NBCCS cells. Eight hours after X-ray irradiation, an increase in DNA synthesis activity was found in HeLa cells with knockdown of SUMO-2/3. Under these conditions, the expression levels of Nm23-H1, a metastatic suppressor gene, was altered. The decrease of NM23-H1 protein after X-ray irradiation was confirmed by western blot analysis. As expected, treatment of HeLa cells with the siRNA of NM23-H1 resulted in the enhancement of DNA synthesis. These findings suggest that the intimate relationship with the expression of SUMO- SUMO-2/3 and the stability of NM23-H1 after X-ray irradiation, lead to the induction of DNA synthesis. Nm23-H1 may be modified by SUMO- SUMO-2/3 after X-ray irradiation. The reduction of Nm23-H1 seems to be casually related to the decrease in sumoylation, which in turn, is involved in the induction of DNA synthesis after X-ray irradiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：SUMO-2/3、ヒト細胞、X線、DNA合成、NM23-H1

1. 研究開始当初の背景

細胞のDNA合成レベルが放射線照射後低下することは、生物種を問わない不変の現象である。ところが、X線照射後にDNA合成レベルが上昇するという現象をゴーリン患者由来細胞（Gorlin syndrome cells: GS cells）で見出した。

2. 研究の目的

ゴーリン症候群はX線被曝後などに基底細胞母斑や基底細胞癌などを多発しやすい高発癌性の優性遺伝性疾患であることから、特異的な放射線応答現象を解明することが、細胞の癌化プロセスに新たな知見を提供できると考え、分子機構の解明を目指し、研究を行った。

3. 研究の方法

mRNA Differential Display法によりX線照射後に発現レベルが変動する遺伝子をGS cellsを用いて検索した。次いで、候補遺伝子について、X線照射後の発現量の変動の有無をRT-PCRやウエスタンブロッティング法により調査した。さらに、正常細胞やHeLa細胞を用い、候補遺伝子のアンチセンスオリゴやsiRNA処理により発現を抑制し、DNA合成レベルや細胞周期への影響を調べた。また、SUMO-2/3遺伝子の発現を抑制した条件下で、X線照射後に細胞内含有量が変動するタンパクをプロテオミクス解析により検索した。候補タンパクについて、X線照射後の発現量の変動をウエスタンブロッティング法にて調査した。

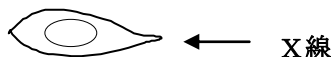
4. 研究成果

ゴーリン患者由来細胞において、X線照射後に発現レベルが低下する遺伝子として、ユビキチン様タンパク質SUMO3を同定した。

HeLa細胞において、SUMO2/3のSiRNA処理により、SUMO2/3遺伝子の発現を低下させると、X線照射による合成の誘導現象が見られた。さらに、X線照射後にNM23-H1タンパクが減少することを見出した。NM23-H1遺伝子のsiRNA処理により、発現を抑制させると、X線照射後にDNA合成の増大が見られた。さらに、チミジブロック法により同調した細胞を用い、詳細な解析を進めたところ、この増大は、照射後4時間後から見られたが、12時間後には見られなくなることから、一過性のものであることが示唆された。さらに、NM23-H1のSiRNA処理した細胞では、X線照射にPCNAの発現の増大が見られたことから、

PCNAを介したDNA合成機構にSUMOが関与することが示唆された。熱ショックや酸化ストレスにより、SUMO-2/3タンパクの発現増大が報告されているが、生理機能に関しては不明な点が多い。SUMO2/3遺伝子の発現を低下させた細胞では、放射線に対し感受性を示した。さらに興味深い事に、HeLa細胞において、SiRNA処理により発現を低下させると、カドミウムに対して感受性を示し、逆に、SUMO-3遺伝子を過剰発現させた細胞では、耐性化した。これらの結果から、細胞の様々なストレス応答にSUMO2/3遺伝子が関与することが示唆された。

研究成果の概略図



SUMO-3 タンパク

↓ タンパク修飾

NM23-H1、PCNA タンパクの発現変動



DNA合成能の上昇
(癌化との関連)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. Zahed M., Suzuki T., Kita K., Sugaya S., Suzuki N. Screening of novel peptide ligands bound to the carboxy-terminal domain of GRP94 by phage display Chiba Medical Journal, 87, 61-68, 2011、査読有
2. Sugaya S., Tanaka K., Akagi T., Kasetani T., Qiu-Ji Z., Guo W-Z., Udagawa A., Sugita K., Ohta R., Suzuki N. Studies on the amounts of serum hydroperoxide, MMP-3, urinary 8-OHdG, and salivary IgA in rheumatoid arthritis who experienced Shinrin-yoku (forest-air bathing and walking) Chiba Medical Journal, 87, 5,

- 2011、査読有
3. Chen S-P., Dong M., Kita K., Shi Q-W., Cong B., Guo W-Z., Sugaya S., Sugita K., Suzuki N. Anti-proliferative and apoptosis-inducible activity of labdane and abietane diterpenoids from the pulp of *Torreya nucifera* in HeLa cells. *Mol. Med. Rep.* 3, 673-678, 2010、査読有
 4. Dong M., Chen S.P., Kita K., Ichimura Y., Guo W-Z., Lu S., Sugaya S., Hiwasa T., Takiguchi M., Mori N., Kashima A., Morimura K., Hirota M., Suzuki N. Anti-proliferative and apoptosis-inducible activity of Sarcodonin G from *Sarcodon scabrosus* in HeLa cells, *Int. J. Oncol.*, 34, 201-207, 2009、査読有
 5. Guo W., Sugaya S., Satoh M., Tomonaga T., Nomura F., Hiwasa T., Kita K., Takiguchi M., Suzuki N. Nm23-H1 is responsible for SUMO-2-involved DNA synthesis induction after X-ray irradiation in human cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 486, 81-87, 2009、査読有
 6. Tong X., Kita K., Karata K., Zhu C., Sugaya S., Ichimura Y., Satoh M., Tomonaga T., Nomura F., Jin Y., Suzuki N. Annexin II, a novel HSP27-interacted protein, is involved in resistance to UVC-induced cell death in human AP^r-1 cells. *Photochem. Photobiol.* 84, 1455-1461, 2008、査読有
 7. Ji Z-q., Sugaya S., Suzuki N. Discrepancy of Cadmium Susceptibility Between Human RSa Cells and Variant UV^r-1 Cells. *Chiba Med. J.* 84, 75-82, 2008、査読有
 8. Hirano J., Kita K., Sugaya S., Ichimura Y., Yamamori H., Nakajima N., Suzuki N. Down-regulation of Molecular Chaperone GRP78/Bip Expression Involved in Enhancement of Human RS Cell Mutability. *Pancreas* 36, e7-14, 2008、査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 菅谷茂, 古川聡子、喜多和子、田中健史、紀仲秋、鈴木信夫 カドミウムによるヒト細胞増殖阻害に関わるユビキチン様タンパク SUMO-2/3 第 83 回日本生化学会大会 神戸ポートアイランド(神戸市中央区) 2010 年 12 月 7 日(火)(学会期間 12 月 7 日(火)~10 日(金))
2. 菅谷茂, 郭文智、佐藤守、朝長毅、野村

丈夫、日和佐隆樹、瀧口正樹、喜多和子、鈴木信夫 腫瘍転移抑制因子 NM23-H1 は、ユビキチン様タンパク SUMO-2 を介した X 線照射後の DNA 合成能の増大に関わる第 7 回千葉プロテオミクス研究会 2010 年 11 月 13 日 東京

3. 喜多和子、杉田克生、陳仕萍、佐藤哲生、郭文智、鈴木敏和、菅谷茂、鈴木信夫 細胞外に添加された HSPB-A によるコケイン症候群患者由来細胞の紫外線致死抵抗化 日本放射線影響学会第 53 回大会 2010 年 10 月 20 日-22 日 京都
4. 郭文智、菅谷茂、佐藤守、朝長毅、野村丈夫、鈴木信夫 ユビキチン様タンパク SUMO-2/3 のヒト細胞で見られる X 線照射後の DNA 合成能の増大に関わる役割 日本放射線影響学会第 51 回大会 2009 年 11 月 18 日-21 日 北九州(小倉)
5. 陳仕萍、喜多和子、金元虎、佟曉波、菅谷茂、鈴木敏和、鈴木信夫 ヒト細胞の紫外線致死抵抗化に関わるタンパク質 annexin II とその代謝を調節する HSP27 日本放射線影響学会第 52 回大会 2009 年 11 月 11 日-13 日 広島
6. 菅谷茂、郭文智、佐藤守、朝長毅、野村丈夫、日和佐隆樹、瀧口正樹、喜多和子、鈴木信夫 ユビキチン様タンパク SUMO-2 を介した X 線照射後の DNA 合成能の増大に関わる腫瘍転移抑制因子 NM23-H1 の発見 日本放射線影響学会第 52 回大会 2009 年 11 月 11 日-13 日 広島

[図書] (計 1 件)

1. 鈴木信夫、菅谷茂 千葉日報社 千葉学ブックレット-千葉の健康 2, 2011, 全 89 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 紫外線防止剤
 発明者: 鈴木信夫、戸村真澄、伊藤晴夫、菅谷茂、喜多和子、呂颯
 権利者: 国立大学法人千葉大学、株式会社 I&C、伊藤晴夫
 種類: 特願
 番号: 2008-327931
 出願年月日: 2008. 12. 24
 国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ情報 (研究成果データベース)
 Gorlin 症候群の病態解明と治療法確立のための臨床的研究班
<http://www.nanbyou.or.jp/kenkyuhan/syor-eimeibo2010/syorei171.htm>

日中医学協会報告書

[http://www.jpcnma.or.jp/pdf/houkoku/20.pdf#search=菅谷茂 千葉大学](http://www.jpcnma.or.jp/pdf/houkoku/20.pdf#search=菅谷茂%20千葉大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅谷 茂 (SUGAYA SHIGERU)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：90334177