

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00556

研究課題名(和文)長期放射線応答シグナル研究：細胞内被曝記憶分子の機能解明とその応用

研究課題名(英文) Radiation-induced expression of N-terminal-deleted RhoGDIbeta: its biological relevance and applicability of individual radiation-risk assessment

研究代表者

達家 雅明 (TATSUKA, MASAOKI)

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号：50216991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：RhoGDIbetaは細胞内シグナル伝達分子のひとつで、ヒトなどの哺乳類では、上皮や血球系の細胞に多く発現している。遺伝子が傷つくような外因性のストレスにより、RhoGDIbetaが切断された形の変様型タンパク質が発現する。しかし、その機能は十分にわかっていない。本研究では、1)変様型タンパク質が放射線照射後の生存細胞において長期にわたり発現すること、2)この発現は、細胞分裂の方向性制御に影響を与えること、3)また、一方、放射線を全身照射したマウスの胸腺に変様型タンパク質が出現することから、全身被曝の有無やその被曝の程度を予測可能にするマーカー開発に繋がる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RhoGDIbetaは細胞内シグナル伝達分子のひとつとして、RhoファミリーGタンパク質を制御する。alpha、beta、gammaの3種類が存在するRhoGDIの中で、RhoGDIbetaのみに3型カスパーゼ切断サイトが存在するが、その切断後の生理機能には不明の点が多かった。本研究において、ゲノムストレス後の再増殖過程にある細胞に分裂軸制御との関係において生理的機能のあることを見つけた学術的意義は大きい。また、また、その発現が、電離放射線照射後の白血球に検出可能性であることを見つけており、放射線被曝後の健康管理に役立つ可能性を見出した点での社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：RhoGDIbeta is an intracellular signaling protein that regulates Rho family GTPases. RhoGDIbeta is highly expressed in epithelial and hematopoietic cells. When exposed to radiation, RhoGDIbeta is truncated at the N-terminus and translocated from the cell membrane to the cytoplasm. Here, we have demonstrated that the truncated protein is accumulated and affects mitotic spindle orientation via Cdc42 inhibition in radiation-exposed and regrowing HeLa cells. Additionally, we have found that the truncated protein can be detected in the thymus of mice after X-irradiation, suggesting its potential as biomarker for radiation risk assessment.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線被曝 バイオドジメトリ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) RhoGDI β の生理機能解明

RhoGDI (Rho GDP-dissociation inhibitor) は、細胞運動制御シグナルの分子スイッチとして機能している RhoGTPase ファミリー分子群 (Rho, Rac, Cdc42 など) の阻害因子として知られる。RhoGDI には α 、 β 、 γ の 3 種類存在するが、その内、RhoGDI β は Rac の阻害因子として知られており、細胞膜への局在が知られる。また、RhoGDI β だけが活性型 3 型カスパーゼ基質となる。アポトーシス誘導過程で N 末欠失型の変様型タンパク質 (Δ N-RhoGDI β) が出現するため、RhoGDI β は 3 型カスパーゼ下流分子として、アポトーシス実行に関係する機能が予測されていた。しかしながら、我々のこれまでの解析からは、RhoGDI β の発現によりアポトーシス感受性を高める効果が見られるものの、アポトーシス細胞死を実行する効果は無く、また、非欠失型変異 RhoGDI β (N 末欠失型が出現しない非欠失型変異体) 遺伝子を導入した細胞にも、アポトーシス感受性を下げる効果は見られるものの、明瞭なアポトーシス誘導抑制効果は見られない。このことから、 Δ N-RhoGDI β は、他の多くの機能未知の 3 型カスパーゼが標的とする基質の切断産物と同様、切断された後には積極的な機能は無く、単に、本来の機能 (この場合は Rac 阻害活性) を喪失させる効果をもたらしか結果の残った分断化ジャンク断片に過ぎないであろうとする考えが主流であった。しかしながら、一方において、RhoGDI β は血球系で非常に高いタンパク質の発現があり、種々のストレスにตอบสนองして 3 型カスパーゼ活性化によって切断されること、また、 Δ N-RhoGDI β の強制発現は、ゲノムストレス誘発アポトーシス感受性の増大をもたらすことなどから、 Δ N-RhoGDI β に固有の「gain-of-function」としての積極的な機能が存在するという考えも依然として残る。すなわち、ゲノムストレス暴露後の細胞内における Δ N-RhoGDI β の生理機能については不明の点が多く、3 型カスパーゼ活性化によってスクラップ化されたジャンクタンパク質が、それとも、3 型カスパーゼ活性化に伴ってその下流において生理機能を有する切断産物なのかは判然とはしていない。

(2) 電離放射線被曝バイオマーカーの開発

近年の大規模原子力災害や国内外の原子力を取り巻く世界情勢から、放射線被曝管理の重要性への認識が高まっている。放射線モニターリングや被曝線量の物理化学的な測定による個人管理などに加えて、放射線被曝を生命科学の手法で臨床医学的にとらえることが可能であれば、個人の放射線による健康リスク管理には、この上ない朗報である。生体への放射線影響の度合いを具体的に知ることが出来れば、その後の健康管理に大いに役立つであろう。そういう目的から、電離放射線被曝を臨床検査として実現させるために、現在までに、いくつかの方法が開発されているが、この中で高感度なものは、歯や爪の核磁気共鳴による測定で長期間検出可能であるが、生検材料が得にくく、また、生物学的な影響の検出ではない。一方、染色体検査は有用であるが、観察のために専門家を必要とするために実用的ではない。臨床検査の目的には、リン酸化ヒストン (γ -H2A) のような蛋白質マーカーの開発が望まれるが、検出感度や検出可能期間などの克服が必要であり、必ずしも成功している方法とは言えない。こういった状況の中で、新しい放射線被曝のためのバイオマーカーの開発は望まれている。

2. 研究の目的

(1) RhoGDI β の生理機能解明

本研究では、放射線照射後に生存し再増殖過程にある細胞の分裂軸制御様式について調べ、その制御への Δ N-RhoGDI β のかわかりを解明することを目的とした。

(2) 電離放射線被曝バイオマーカーの開発

マウス全身照射時の特に放射線感受性の高い臓器として知られる胸腺に注目し、 Δ N-RhoGDI β が照射後に長期間検出可能かどうか、新しい放射線被曝のためのバイオマーカーとして利用可能かどうかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RhoGDI β の生理機能解明

RhoGDI β とその N 末欠失型変様体 (Δ N-RhoGDI β) や 3 型カスパーゼ非切断型変異体 (RhoGDI β (D19A))、あるいは、short-hairpin RNAs (shRNA) によって RhoGDI β が抑制された細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いて、過剰チミジン添加による細胞同調培養法を用いて分裂期にある細胞を集めた。また、ゲノムストレス (10 J/sqm の UVC) を与えた実験においては、被曝後に生存して再増殖した細胞を集めて同様に分裂期にある細胞を集めた。これらの細胞における分裂軸の方向性について、基底膜構成成分であるマトリゲルをコートしたシャーレ上で細胞を固定後に DNA をヘキスト 33258 で染色し、同時に γ チュブリンでセントロソームを染色して共焦点レーザー顕微鏡によりセクション観察を行い、マトリゲルコート面に対する分裂方向の角度を算出した。また、一方、Cdc42 の活性は、活性化型 Cdc42 のみと結合する p21-activated kinase-agarose beads を用いた pull-down assay によって定量化した。

(2) 電離放射線被曝バイオマーカーの開発

8-9 週齢の C57BL マウスにゲノムストレス (5 Gy の X 線全身照射) 後、経時的に剖検後、胸腺を摘出してタンパク質を抽出し、免疫プロットによって Δ N-RhoGDI β の発現を調べた。

4. 研究成果

(1) RhoGDI β の生理機能解明

細胞株の樹立： HeLa 細胞に RhoGDI β と N 末欠失型変異体 (Δ N-RhoGDI β) や 3 型カスパーゼ非切断型変異体 (RhoGDI β (D19A)) あるいは、short-hairpin RNAs (shRNA) をトランスフェクションして、各群 20 クローン以上をスクリーニングし、それぞれの安定発現株 (stable clones) を樹立した。

分裂軸方向性アッセイ系の確立：細胞外マトリックスの影響については、マトリゲルによって最も分裂軸が安定し、細胞密度の影響は、高い場合に分裂軸が安定し、イマチニブにより、分裂軸の方向性は乱れた。

Δ N-RhoGDI β による分裂軸制御への影響： RhoGDI β の各種安定発現株で測定した結果、1) full-length の RhoGDI β においても強制発現株では分裂軸が乱れる傾向にはあるが、コントロールの細胞と統計上の有意な差を認めなかったものの、2) Δ N-RhoGDI β は有意に分裂軸の方向性を乱すことがわかった。

ゲノムストレスによる影響：ゲノムストレス後に生存し再増殖した細胞の分裂軸は乱れることがわかった。また、RhoGDI β の発現を shRNA によってノックダウンした細胞株では、この乱れが抑制されており、同時に、 Δ N-RhoGDI β の発現もノックダウンされていたことから、 Δ N-RhoGDI β が HeLa 細胞のゲノムストレス後における分裂軸の乱れのひとつの原因であることが予想された。

ゲノムストレス後の分裂軸の乱れに対する Δ N-RhoGDI β の関与：RhoGDI β の発現を shRNA によってノックダウンした細胞株はゲノムストレスによる分裂軸の乱れが抑制されているが、この時に、切断型の RhoGDI β を発現させると分裂軸の乱れが誘導されたが、一方、3 型カスパーゼ非切断型変異体 (RhoGDI β (D19A)) の発現では、分裂軸の乱れが誘導されなかった。このことから、 Δ N-RhoGDI β が HeLa 細胞のゲノムストレス後における分裂軸の乱れに深くかかわっていることがわかった。

Δ N-RhoGDI β による Cdc42 活性抑制効果：ゲノムストレス後の Cdc42 活性を測定したところ、ゲノムストレスにより Cdc42 活性は抑制されたが、RhoGDI β の発現を shRNA によってノックダウンした細胞株では、その抑制は起こらず、同様に、3 型カスパーゼ非切断型変異体 (RhoGDI β (D19A)) の発現においても抑制は起こらなかったが、full-length の RhoGDI β の発現では、ゲノムストレスにより Cdc42 活性は抑制された。このことより、 Δ N-RhoGDI β がゲノムストレス後の Cdc42 活性の抑制に関与していることがわかった。

ゲノムストレス後の Cdc42 活性と分裂軸制御：樹立した各細胞株について、Cdc42 の恒常的活性型変異体 (Cdc42 (G12V)) を発現させたところ、shRNA によってノックダウンした細胞株、各細胞株に空のベクター、あるいは 3 型カスパーゼ非切断型変異体 (RhoGDI β (D19A)) を発現させた細胞株 (これらの細胞株ではゲノムストレスでの分裂軸の乱れは起こらない) 以外の細胞株、すなわち、ゲノムストレスでの分裂軸の乱れが起こる全ての細胞株において、ゲノムストレス後の分裂軸の乱れは抑制された。すなわち、ゲノムストレス後に生存して再増殖した HeLa 細胞においては、 Δ N-RhoGDI β による Cdc42 活性の抑制効果が分裂軸の乱れの原因となっていることがわかった。

(2) 電離放射線被曝バイオマーカーの開発

HeLa 細胞での長期放射線応答シグナル (細胞内被曝記憶分子 = Δ N-RhoGDI β) の検出：HeLa 細胞にゲノムストレス (10 Gy の X 線) 後に培養を続け、生存細胞及び再増殖細胞を集めてタンパク質抽出を行い、 Δ N-RhoGDI β の発現を経時的に調べた実験では、照射後 144 時間目 (6 日目) まで Δ N-RhoGDI β の発現が観察されていた。そこで、更に、長期間の観察を行ったところ、照射後 13 日目まで発現を認めることがわかった。

マウス胸腺系細胞株 (p53 $^{-/-}$ の 1B1C4 細胞と p53 $^{+/+}$ の 3SB 細胞) での長期放射線応答シグナル (細胞内被曝記憶分子 = Δ N-RhoGDI β) の検出：1B1C4 細胞と 3SB 細胞にゲノムストレス (10 Gy の X 線) 後に培養を続け、生存細胞及び再増殖細胞を集めてタンパク質抽出を行い、 Δ N-RhoGDI β の発現を経時的に調べた実験では、1B1C4 細胞は照射後 48 時間目で高い Δ N-RhoGDI β 発現を認め、その後の再増殖過程において 144 時間目 (6 日目) まで Δ N-RhoGDI β の発現が観察された。この発現の持続は、HeLa 細胞における観察結果と相似していた。これに対して、3SB 細胞では、照射後 6 時間目に高い Δ N-RhoGDI β 発現を認めたものの、その後、発現は無くなった。また、この時、3 型カスパーゼの発現は持続しており、RhoGDI α の発現も認めた。このことから、 Δ N-RhoGDI β はアポトーシスが実行されて細胞死が起こる以前の早期に発現が無くなることがわかった。すなわち、 Δ N-RhoGDI β はアポトーシス実行に関わる因子ではなくて、むしろ、ゲノムストレス後の生存過程に関わる因子であるとする見方が有力である。

マウス全身照射での長期放射線応答シグナル (細胞内被曝記憶分子 = Δ N-RhoGDI β) の検出：全身照射後にマウスからの胸腺摘出によるタンパク質抽出で Δ N-RhoGDI β を検出したところ、照射後 6 時間目において、高い発現を観察した。この結果は、p53 $^{+/+}$ の 3SB 細胞での結果と一致する。そして、その検出感度も p53 $^{+/+}$ の 3SB 細胞で得られた結果と一致し、0.1 Gy 程度の放射線照射により検出可能であった。一方、5 Gy 全身照射マウスにおいては、照射後 6 時間目で Δ N-RhoGDI β の高い発現を観察したが、その後、144 時間目 (6 日目) まで Δ N-RhoGDI β の発現が観察された。5 Gy 全身照射マウスは、多くは体毛が白髪化するものの生存が可能であり、被曝後の胸腺の再生時に Δ N-RhoGDI β が発現しているものと考えられた。実際に健康管理においては胸腺を標的ことは出来ないもので、現在、10 - 100 μ l 程度の微量末梢血による検査システ

ムを構築中であるが、予備実験においては、0.5 Gy 程度の被曝検出が可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Doi N, Kunimatsu Y, Fujiura K, Togari H, Minagi K, Nakaoji K, Hamada K, Temme A, Tatsuka M.	4. 巻 234
2. 論文標題 RhoGDI affects HeLa cell spindle orientation following UVC irradiation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 15134-15146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.28154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ota Takahide, Jiang Yong-Sheng, Fujiwara Mamoru, Tatsuka Masaaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Apoptosis-independent cleavage of RhoGDI at Asp19 during PMA-stimulated differentiation of THP-1 cells to macrophages	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 1722 ~ 1726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2017.6199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sugihara Yuka, Zuo Xiaoxu, Takata Takashi, Jin Shengjian, Miyauti Mutumi, Isikado Atusi, Imanaka Hiromichi, Tatsuka Masaaki, Qi Guangying, Shimamoto Fumio	4. 巻 14
2. 論文標題 Inhibition of DMH?DSS?induced colorectal cancer by liposomal bovine lactoferrin in rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 5688 ~ 5694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2017.6976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土井捺実, 國松優喜, 藤裏航平, 戸賀里飛郎, 三奈木健司, 達家雅明
2. 発表標題 癌転移抑制遺伝子RhoGDI 研究: 癌腫細胞の分裂軸異常招来機構. RhoGDI affects carcinoma cell spindle orientation following genotoxic stress.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会, 京都, 2019.9.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 達家雅明, 土井捺実
2. 発表標題 ゲノム損傷ストレスによる分裂軸異常を抑制する低分子量化合物の開発 . A potential inhibitor of RhoGDI for ameliorating DNA-damage-induced abnormal spindle orientations .
3. 学会等名 六ヶ所村セミナー「原子燃料サイクルと環境影響モニタリングの拠点へ」, 青森, 2019.9.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土井捺実, 戸賀里飛郎, 三奈木健司, 達家雅明
2. 発表標題 細胞分裂軸制御研究: ゲノム損傷ストレス後の再増殖過程における異常招来機構 . RhoGDI affects HeLa cell spindle orientation following UVC irradiation .
3. 学会等名 六ヶ所村セミナー「原子燃料サイクルと環境影響モニタリングの拠点へ」, 青森, 2019.9.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土井捺実, 國松優喜, 藤裏航平, 戸賀里飛郎, 三奈木健司, 達家雅明
2. 発表標題 RhoGDI による癌腫分裂軸制御: 細胞外基質との関係 . N-terminal truncated RhoGDI affects HeLa cell spindle orientation .
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会, 鹿児島, 2019.7
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 達家雅明
2. 発表標題 RhoGDI を分子マーカーとしたゲノム損傷検査方法とは?
3. 学会等名 鳥根・三瓶山セミナー, 大田, 2018.11.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土井捺実, 達家雅明
2. 発表標題 ゲノム損傷後のRhoGDI の想定されている生理機能とは?
3. 学会等名 島根・三瓶山セミナー, 大田, 2018.11.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國松優喜, 達家雅明
2. 発表標題 RhoGDI のゲノム損傷によって誘起される応答現象とは?
3. 学会等名 島根・三瓶山セミナー, 大田, 2018.11.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤裏航平, 達家雅明
2. 発表標題 RhoGDI の細胞内シグナル分子としての位置付け
3. 学会等名 島根・三瓶山セミナー, 大田, 2018.11.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 達家雅明, 藤裏航平, 國松優喜, 土井捺実
2. 発表標題 ABITAN: 電離放射線被曝リスクの生体検査システム
3. 学会等名 島根・三瓶山セミナー, 大田, 2018.11.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Doi Natsumi, Yuuki Kunimatsu, Kouhei Fujiura, Masaaki Tatsuka
2. 発表標題 RhoGDI functions as a critical regulator of spindle orientation in keratinocytes surviving after caspase-3 activation
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会, 横浜, 2018.9.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Doi Natsumi, Yuuki Kunimatsu, Kouhei Fujiura, Mamoru Fujiwara, Masaaki Tatsuka
2. 発表標題 Src phosphorylation of RhoGDI affects its isoprenyl-binding pocket to induce metastasis
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会・総会, 横浜, 2018.7.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 達家雅明, 土井捺実, 國松優喜, 藤裏航平
2. 発表標題 電離放射線照射後に出現する変様型RhoGDI の機能解析とその被曝検査への応用
3. 学会等名 福島フィールドモニタリングセミナー, 福島, 2018.8.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原守, 土井捺実, 國松優喜, 藤裏航平, 達家雅明
2. 発表標題 電離放射線照射後に出現する変様型RhoGDI の機能解析とその被曝検査への応用
3. 学会等名 三朝・人形峠セミナー, 三朝, 2017.11.
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤原守, 土井捺実, 太田隆英, 達家雅明
2. 発表標題 変様型RhoGDI : 電離放射線全身照射のバイオマーカーとしての有用性
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017.9.
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤原守, 太田隆英, 達家雅明
2. 発表標題 RhoGDI を介したがん細胞集団でのアポトーシス誘発補償性増殖による進展機構
3. 学会等名 第26回日本がん転移学会学術集会・総会, 大阪, 2017.7.
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.pu-hiroshima.ac.jp/~tatsuka/home/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考