

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510055
 研究課題名（和文） 細胞質分子シャペロン・annexin II 複合体を介した
 新規 DNA 修復制御機構
 研究課題名（英文） Complex of annexin II with cytoplasmic molecular chaperons is
 involved in novel DNA repair-regulating mechanisms.
 研究代表者
 氏名（ローマ字）：喜多 和子（KITA KAZUKO）
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・講師
 研究者番号：80302545

研究成果の概要：短波長紫外線(UVC)ストレスに対応し、annexin II を実行因子、HSP27 をシャペロンとする DNA 損傷ストレス防御複合体が、UVC 抵抗性に関わるとの仮説を立証すべく解析を行った。その結果、1) annexin II は HSP27 と複合体を形成すること、2) 両者の複合体は紫外線照射に応じて細胞質から核へ移行すること、3) annexin II が UVC 致死抵抗性に関わることを明らかにした。さらに、4) HSP27 はシャペロンとして annexin II の細胞内量の調節を介して紫外線致死抵抗性に関わる可能性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響学

キーワード：ヒト細胞、紫外線(UVC)抵抗性、HSP27 結合タンパク質、annexin II、
 損傷 DNA 修復、シャペロン

1. 研究開始当初の背景

細胞質シャペロンである heat shock protein 27(HSP27)、HSP70 などは、種々のストレス負荷に応じて細胞内発現量が増大するが、このとき、核にも局在するようになる。核に局在する HSP は、ストレス防御に重要な役割を果たすと考えられるが、意外なことに、核内 HSP の生理的意義は十分に解明されておらず、なお、不明な点が多い。申請者らはこれまでに、HSP27 が短波長紫外線(UVC)損傷

DNA の修復過程に関与することにより、紫外線による細胞死誘導を抑制する可能性を見いだした(Wano et al. Exp. Cell Res. 298, 584, 2004)。次いで、HSP27 結合タンパク質として、HSP70 と、新たに annexin II を同定した。

2. 研究の目的

UVC ストレスに対応し、annexin II を実行因子、HSP27 と HSP70 をシャペロンとする DNA

損傷ストレス防御複合体が、細胞質から核内へ移行し、損傷 DNA の修復過程に間接あるいは直接に関わるとの仮説をたてた。この仮説を実証することを本研究の目的とした。研究期間内に (1) HSP27 と annexin II および HSP70 との結合の詳細を調査し、さらに、(2) annexin II の UVC 致死抵抗性への関与とその作用機構、および、(3) その annexin II の機能に及ぼす HSP27 および HSP70 の作用機構を解明した。

3. 研究の方法

(1) HSP27 と annexin II および HSP70 の結合および細胞内局在調査の解析 annexin II, HSP27, HSP70 三者の結合状態を免疫沈降実験で調査した。さらに、UVC などの DNA 損傷ストレス負荷前後の結合の変化、細胞質と核における両者の結合状態の差を、免疫沈降とウェスタン解析で調査した。

(2) annexin II の UVC 致死抵抗性への関与 siRNA 処理、および、annexin II 発現プラスミド導入により annexin II の発現を増減させた細胞における、UVC 致死感受性をコロニー形成能力で調べた。

(3) 損傷 DNA 修復への関与の解析 上記で得た annexin II 過剰発現細胞、あるいは annexin II 発現抑制細胞について、紫外線照射後の損傷 DNA の細胞内除去能力を損傷 DNA に特異的な抗体を用いて調べた。

(4) annexin II の機能に及ぼす HSP27 作用機構の解析 HSP27 が annexin II タンパク質の安定化や核への移行に関わるかを調査することとした。このために、HSP27 の発現レベルの異なる培養ヒト細胞、あるいは HSP27 の発現を増減させた細胞における annexin II タンパク質の紫外線照射前後の細胞内量、局在の変化を調査した。

4. 研究成果

(1) HSP27 と annexin II の結合および細胞内局在

紫外線抵抗性細胞 AP^r-1 において、免疫沈降実験により、HSP27 と annexin II の結合が観察された (図 1)。両者の複合体は、UVC 照射前は主にサイトゾル画分に、照射後は核画分に見出された (図 1)。なお、HSP27 と HSP70 の結合は、照射前のサイトゾル画分中に検出されたが、照射後の核画分では検出されなかった (結果省略)。また、HSP27, annexin II,

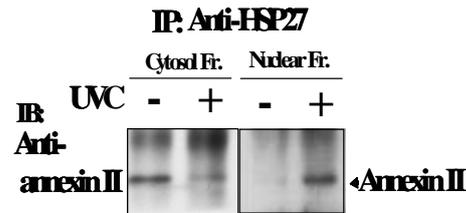


図 1 HSP27 と annexin II 複合体の紫外線照射後の局在変化

AP^r-1 細胞に UVC (10 J/m²) 照射し 1 時間後、サイトゾル画分と核画分を得た。各画分を抗 HSP27 抗体で免疫沈降した後、抗 annexin II 抗体でウェスタン解析し、UVC 未照射サンプルと比較した。

HSP70 三者の複合体は検出されなかった (結果省略)。AP^r-1 細胞では、UVC 照射 1 時間後、HSP27 と annexin II の細胞内量が増加した (図 2)。その増加率は、サイトゾル画分に比べ核画分の方が顕著であった。一方、AP^r-1 同系細胞で紫外線感受性の RSa 細胞では、両タンパク質の UVC 照射後の増加はほとんど検出されなかった (図 2)。また、RSa 細胞では明確な HSP27 と annexin II の結合が観察されなかった (結果省略)。以上の結果より、紫外線抵抗性細胞 AP^r-1 で、annexin II は HSP27 と複合体を形成すること、両者の複合体は紫外線照射に応じて細胞質から核へ移行することが明らかになった。

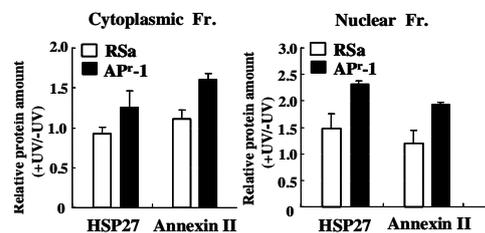


図 2 HSP27 と annexin II の紫外線照射後の局在変化

RSa と AP^r-1 細胞に UVC (10 J/m²) 照射し 1 時間後、サイトゾル画分と核画分を得た。各画分を抗 HSP27 抗体と抗 annexin II 抗体を用いてウェスタン解析した。タンパク質量を、UVC 照射前に対する照射後の相対値で示してある。

(2) annexin II の UVC 致死抵抗性への関与

siRNA 処理により annexin II の発現を抑制された AP^r-1 細胞 (Transfectant with Ann Stealth RNAi 1, Transfectant with Ann Stealth RNAi 2) では、ネガティブコントロール siRNA 処理細胞 (Transfectant with NC Stealth RNAi) および mock 処理細胞に比べ、UVC 致死感受性が認められた (図 3)。逆に、annexin II を過剰発現させた RSa 細胞 (ANEXII-11, ANEXII-13) では、ベクターコントロール細胞 (V1, V2) に比べ UVC 致死抵抗性が認められた (図 4)。UVC による損傷 DNA に対する特異抗体を用いた損傷 DNA 除去能力解析により、annexin II 発現抑制細胞では除去能力の低下が、過剰発現細胞では除去能力の増加が認められた (結果省略)。従って、annexin II が紫外線致死抵抗性に関わること、およびその一因として、損傷 DNA 修復過程が関与することが示唆された。

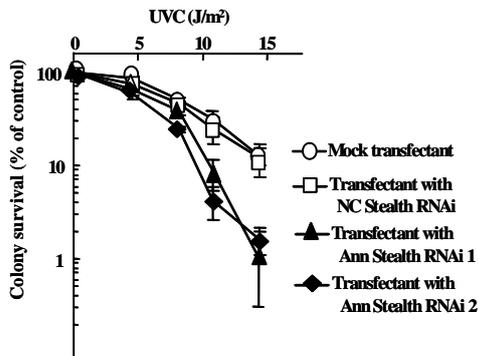


図 3 annexin II 発現抑制による紫外線致死感受性化

AP^r-1 細胞を annexin II に対する siRNA 処理 48 時間後、UVC 照射し、2 週間後のコロニー形成能力を調べた。

(3) annexin II の機能に及ぼす HSP27 作用機構の解析

HSP27 の細胞内発現量は、UVC 照射前は AP^r-1 細胞で RSa 細胞に比べ多く、また、紫外線照射後は照射前に比べ、AP^r-1 細胞では増加が認められたが RSa 細胞ではほとんど増加が認められなかった (図 5、Wano et al., Exp. Cell Res. 298, 584-592, 2005)。一方、

annexin II 量は、RSa 細胞では UVC 照射後減少したが、AP^r-1 細胞では減少しなかった (図 5)。

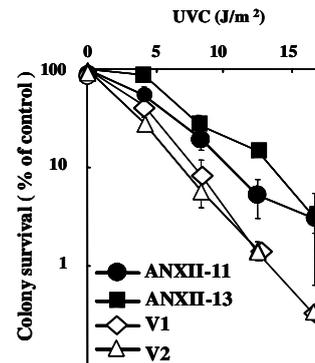


図 4 annexin II 過剰発現による紫外線致死抵抗化

annexin II を安定過剰発現させた RSa 細胞 (ANEXII-11, ANEXII-13) とベクターを導入した RSa 細胞 (V1, V2) を UVC 照射し、2 週間後のコロニー形成能力を調べた。

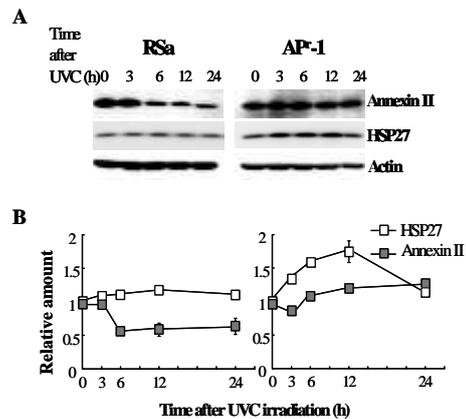


図 5 RSa と AP^r-1 における紫外線照射後の annexin II タンパク質量の変化

UVC 照射後の各時間に全細胞溶解液を調整し、抗 HSP27 抗体と抗 annexin II 抗体を用いてウェスタン解析した。タンパク質量を、UVC 照射前に対する照射後の相対値で示してある。

RSa 細胞に His-HSP27 を過剰発現させると、UVC 照射後の annexin II 量の減少が認められなくなり、かえって増加した (図 6, A)。

また、AP^r-1 細胞の HSP27 発現を抑制すると、annexin II 量の減少が観察され、さらに、UVC 照射後の annexin II 量の減少も認められるようになった (図 6, B)

従って、HSP27 は annexin II の細胞内量、および、紫外線照射後の発現量を調節することが示唆された。HSP27 による annexin II 量の調節の機構は不明であるが、合成や安定性の調節などに関わる可能性が考えられる。

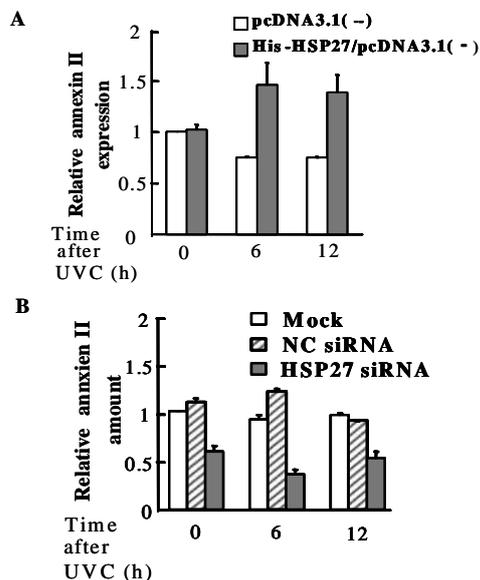


図 6 HSP27 発現量を増減させた細胞における紫外線照射後の annexin II タンパク質量の変化

His-HSP27 を一時的に過剰発現させた RSa 細胞 (A) と si 処理により HSP27 の発現を抑制した AP^r-1 細胞 (B) に UVC 照射し、各時間後に全細胞溶解液を調整し、抗 annexin II 抗体を用いてウェスタン解析した。タンパク質量を、(A) はベクター導入細胞における UVC 照射前値を 1 とし、(B) は mock 処理細胞における UVC 照射前値を 1 とした相対値で示してある。

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)

Guo, W-Z., Sugaya, S., Satoh, M., Tomonaga, T., Nomura, F., Hiwasa, T., Takiguchi, M., Kita, K., Suzuki, N. NM23-H1 is responsible for

SUMO-2-involved DNA synthesis induction after X-ray irradiation in human cells. Arch. Biochem. Biophys., in press, 査読有

Jin, Y-H., Kita, K., Sun, Z., Tong, X-B., Nie, H., Suzuki, N. The roles of HSP27 and annexin II in resistance to UVC-induced cell death; comparative studies between the human UVC-sensitive and -resistant cell lines, RSa and AP^r-1. Biosci. Biotech. Biochem. in press, 査読有

Kita, K., Jin, Y-H., Sun, Z., Chen, S-P. Sumiya, Y., Hongo, T., Suzuki, N. Increase in the levels of chaperone proteins by exposure to β -estradiol, bisphenol A and 4-methoxyphenol in human cells transfected with estrogen receptor α cDNA. Toxicology in Vitro, in press, 査読有

Dong, M., Chen, S., Kita, K., Ichimura, Y., Guo, W., 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, 2008, 査読有

Tong, X., Kita, K., Karata, K., Zhu, C. Sugaya, S., Ichimura, Y., Sato, 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., 1455-1461, 2008, 査読有

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, e7-14, 2008, 査読有

Suzuki, T., Lu, J., Zahed, M., Kita, K., Suzuki, N. Reduction of GRP78 expression with siRNA activates unfolded protein response leading to apoptosis in HeLa cells. Arch. Biochem. Biophys., 468, 1-14, 2007, 査読有

Chi, X., Takahashi, S., Nomura, J., Sugaya, S., Ishimura, Y., Zhai, L., Tong, X., Kita, K., Suzuki, N. Modulation of mutability in UV-irradiated human RSB cells by serum obtained from parabolic flight volunteers. J. Int. Soc. Life Info. Sci., 25, 11-19, 2007, 査読有

(2)研究分担者
鈴木 敏和 (SUZUKI TOSHIKAZU)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：70270527

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

〔学会発表〕(計3件)

Tong, X., Kita, K., Karata, K., Zhu, C. Sugaya, S., Ichimura Y., Sato, M., Tomonaga, T., Nomura, F., Jin, Y., Suzuki, N. Annexin II, a novel HSP27-interacted protein, is involved in refractoriness of human cells to UVC lethality. 第80回日本生化学会大会, 2007/12/14, パシフィコ横浜

金 元虎、喜多和子、トウギョウハ、菅谷 茂、佐藤 守、朝長 毅、野村文夫、鈴木信夫 ヒト細胞における放射線応答を制御するシャペロン複合体の探索 HSP27 とannexin II複合体の発見 第50回日本放射線影響学会, 2007/11/15, 幕張メッセ国際会議場

Tong, X., Kita, K., Karata, K., Zhu, C. Sugaya, S., Ichimura Y., Sato, M., Tomonaga, T., Nomura, F., Jin, Y., Suzuki, N. HSP27 and its interacted protein, is involved in susceptibility to irradiation lethality in human cells. 2007 Keystone Symposia on Molecular and cellular Biology, Gastrointestinal Cancer (T2), 2007/10/17, Beijing, China

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

特許

「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、口 サ

権利者：千葉大学、株式会社 I&C, 伊藤晴夫

特願 2008 - 327931 号

平成 20 年 12 月 24 日出願

国内出願

6. 研究組織

(1)研究代表者

喜多 和子 (KITA KAZUKO)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：80302545