

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19510061

研究課題名（和文） 遅延型突然変異に関わる p53 機能破綻の解明

研究課題名（英文） The analysis of the dysfunction of p53 in delayed mutation

研究代表者

岡崎 龍史 (OKAZAKI RYUJI)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：50309960

研究成果の概要：加齢現象として種々の突然変異率は増加し、発がんの原因になると考えられている。若年時に放射線被曝していると、突然変異率は遅延型突然変異として顕著にみられる。これは被曝直後に排除されなかった DNA 障害が遺伝的不安定性という形で残存し、また加齢とともに p53 遺伝子の機能異常が生じるためと考えられ、その機能異常は p53 遺伝子の欠失や変異によるものと示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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化学

キーワード：p53、遅延型突然変異、放射線被曝

1. 研究開始当初の背景

(1) p53(+/+)マウス及び p53(+/-)マウスを用いて、8 週齢時に 3Gy 照射し、脾臓細胞の T リンパ球における T cell 受容体 (TCR) 突然変異率 (CD3-CD4+細胞の CD3+CD4+細胞に対する比) を長期的に調べたところ、p53(+/+)マウスでは一時的に上昇した突然変異率は 16 週で対照群レベルに下がり、60 週齢以降未照射群も上昇したが、照射群では顕著な上昇をみた報告した。また照射群の突然変異率再上昇の時期は、p53(+/-)マウスの方が p53(+/+)マウスよりも早く、40 週齢以降でみられた (Igari et al., The delayed manifestation of T-cell receptor (TCR) variants in X-irradiated mice depends on Trp53 status, Radiat Res. 166: 55-60. 2006)。

(2) p53(+/+)マウス及び p53(+/-)マウスともに、TCR 突然変異率再上昇 (遅延型突然変異) の時期 (それぞれ 72 週齢及び 56 週令) では、アポトーシス活性が低下していた。

(3) これらのことより、加齢に伴って p53 遺伝子の機能異常が生じるために、アポトーシス活性が下がり、異常細胞の排除ができなくなり、TCR 突然変異率の再上昇をもたらしたと考えられた。すなわち、若年時に放射線被曝すると、p53 遺伝子に遺伝的不安定性が残り、ある時期からその加齢現象が加速されたと考えられた。

2. 研究の目的

(1) 今回の目的は、若年時の放射線被曝によって誘発される DNA 損傷に対する防御システムの破綻が、長期に渡り突然変異率の増大さらには発がん等に関連すると考え、そこには p53 遺伝子が深く関与していることを解明することにある。

(2) ここで、p53(+/+)マウス及び p53(+/-)マウスを用いて、8 週齢で照射後、経時的に、脾臓細胞の T リンパ球における p53 遺伝子並びにその関連遺伝子の発現、p53 遺伝子の存在する染色体の欠失および染色体転座率、p53 遺伝子配列を経時的に解析することにある。

3. 研究の方法

(1) p53(+/+)マウス及び p53(+/-)マウスの作成

当教室では p53 ノックアウトマウスを経代維持しており、C57BL マウスと交配することにより p53(+/-)を作成する。また、これらのマウスは、受精卵として保存してあるので、解凍し受精卵の移植を行い、p53 遺伝子のタイピングを行った後実験に供する。

(2) 放射線照射

p53(+/+)マウス及び p53(+/-)を用いて、8 週齢にて γ 線 3Gy 照射する。経時的に脾臓を摘出し、下記の解析を行った。

(3) タンパクの発現量の解析

脾臓細胞における p53、活性型 p53 (p53-ser15/18)及び p21 タンパクを経時的にみるために、再度 3Gy 照射し、最終照射から 4 時間後に脾臓を取り出し、Western blot 法により解析する。

(4) 染色体突然変異の解析

脾臓細胞より T リンパ球経時的に回収し、p53 遺伝子の存在する 11 番染色体において Fluorescence In Situ Hybridization 法により転座率を解析する。

(5) 染色体欠失の解析

p53 遺伝子の Exon 5 から 6 において primer を作製し、PCR を行うと、pseudo gene と wild gene の 2 種類がみられる。そのバンドの発現量により、allele の減少を解析する。

(6) p53 遺伝子配列の解析

脾臓細胞から T リンパ球を回収し、CD3-CD4+細胞と CD3+D4+細胞を分離回収し、genomic DNA を Exon 5-6, Exon 7, Exon 8-9 に分けて、それぞれ intron を含むように作成した primer で PCR を行い、p53 の遺伝子配列を解析し、両細胞において比較検討す

る。

4. 研究成果

(1) p53、活性型 p53 及び p21 タンパクの経時的発現量の変化

非照射群では、p53 及び p21 タンパクは加齢とともに増加する。照射群でも増加するが、その量は非照射群と比べて少ない。活性型 p53 は、アポトーシス活性の減少がみられた時期に、照射群では低下していた。単に加齢現象としてみた時には、p53 及び p21 遺伝子の増加は、様々な加齢におけるデータと一致する。しかし、照射群ではそれらを抑制している結果となっているのは、若年時の照射による DNA 損傷が残存し、加齢とともに反応しなくなったことを示唆する。活性型 p53 は遅延型突然変異のみみられた時期に減少していた。これはアポトーシス活性が減少していたことと一致する。p21 発現量が増加していたが、おそらく p53 のリン酸化部位の後半が活性化していた可能性がある (図 1)。

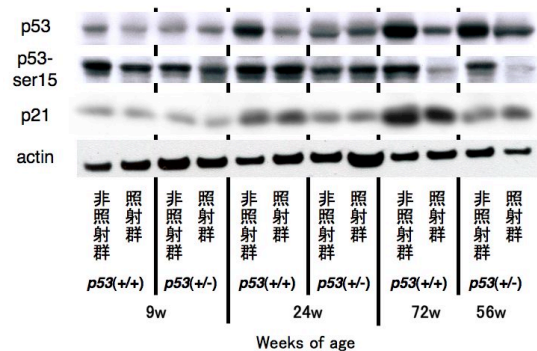


図1: 8週齢3Gy照射後のp53、p53ser15及びp21発現量の経時的変化

(2) 染色体転座率の経時的変化

p53(+/+)マウス及び p53(+/-)マウスともに照射群において、照射直後 11 番染色体の転座率は増加し、一旦正常レベルに減少した後、TCR 突然変異率の上昇をみた時期と同じ時期に転座率の再上昇がみられた。遅延型突然変異において、p53 遺伝子のある 11 番染色体の転座率の増加をみたということは、p53 遺伝子になんらかの異常が生じたことと示唆された (図 2)。

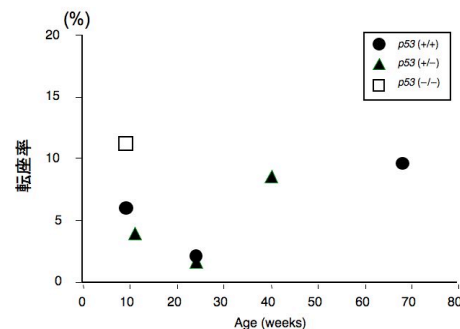


図2: 8週齢時3Gy照射後の11番染色体における転座率の経時的変化

(3) 染色体欠失の解析

p53 (+/+) マウスの照射群では、正常レベルの時期 (40 週齢) では、allele の減少をみたマウスはなかった。p53 (+/-) マウスでは、その時期 (25 週齢) に 8 匹中 1 匹で allele の減少をみた。p53 (+/-) マウスでは、遅延型突然変異をみた時期 (40 週齢) で、5 匹中 3 匹 allele の減少をみた。p53 (+/-) マウスは p53 (+/+) マウスに比べ、p53 の量が半分しかなく、その為早く p53 の allele の減少を引き起こし、p53 の機能障害が早く出るものと考えられた。

(4) p53 遺伝子配列異常の解析

それぞれのマウスから得られた CD3-CD4+ 細胞と CD3+D4+ 細胞において、Exon 5 から 9 まで遺伝子配列を解析したところ、p53 (+/-) マウスの照射群 40 週齢の CD3-CD4+ 細胞の Intron 7 において、CD3+D4+ 細胞ではみられないヘテロは点突然変異を 2 例のみみた。p53 遺伝子配列異常を来たし、p53 の機能を果たさなくなる例もあるかもしれないが、p53 遺伝子配列異常を検出することは、非常に困難である。p53 遺伝子配列は強固であり、配列が異常を来すことは、非常にまれであると考えられる。

(5) 考察

今回の研究では、若年時の放射線被曝によって、p53 遺伝子に遺伝子不安定性が残り、ある時期から p53 の機能異常として、アポトーシス活性の低下として顕在化する可能性が考えられた。しかしながら、今回の結果では、明らかに遺伝子の異常と認められた例は少なく、それが全ての p53 の機能低下とは考えられず、p53 遺伝子の epigenetic な要因も寄与している可能性もある。すなわち、転写因子としての働きがなくなり下流への情報が伝達できないこと、あるいは上流からの情報を受けることが出来ずに、p53 遺伝子の活性化が行われないことも考えられた。

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 1 件)

- ① 岡崎龍史、大津山彰、法村俊之、老化のトピックスーテロメア、ミトコンドリア、p53、放射線生物学研究、査読なし、in press (2009)

[学会発表] (計 13 件)

- ① Okazaki R, Ootsuyama A, Mabuchi Y, Suzuki S, Matsuzaki Y, Norimura T. The analysis of p53 sequence in delayed

mutation, 2nd Asian Congress of Radiation Research, Seoul, 2009. 5. 18-20

- ② 岡崎龍史、大津山彰、法村俊之、遅延型突然変異における p53 遺伝子の解析、第 51 回放射線影響学会、2008. 11. 19-21、北九州
- ③ 大津山彰、岡崎龍史、法村俊之、放射線による発がん過程を変える p53 遺伝子の存在状態、第 51 回放射線影響学会、2008. 11. 19-21、北九州
- ④ 岡崎龍史、遅延型突然変異における p53 遺伝子とその関連遺伝子の動態、第 45 回放射線影響懇話会、2008, 7. 5、長崎
- ⑤ 大津山彰、岡崎龍史、法村俊之、β線による皮膚発がんの発生率と発生時期は p53 遺伝子の存在状態に依存、第 50 回放射線影響学会、2007. 11. 14-16、千葉
- ⑥ 岡崎龍史、大津山彰、法村俊之、遅延型突然変異における p53 遺伝子配列の解析、第 50 回放射線影響学会、2007. 11. 14-16、千葉
- ⑦ 岡崎龍史、猪狩和之、柿原ひろ代、大津山彰、法村俊之、放射線被曝による遅延型突然変異における p53 遺伝子の解析、第 25 回産業医科大学学会、2007. 10. 5、北九州
- ⑧ 大津山彰、岡崎龍史、法村俊之、放射線による発がん率と発生時期は p53 遺伝子の存在状態に依存する、第 144 回日本獣医学会学術集会 (日本実験動物医学会)、2007. 9. 2-4、北海道
- ⑨ 岡崎龍史、放射線障害における p53 の役割 - 適応応答と突然変異において -、第 44 回放射線影響懇話会、2007. 7. 21、鹿児島
- ⑩ Okazaki R, Ootsuyama A, Norimura T. TP53 and TP53-related genes associated with protection from apoptosis in the radioadaptive response, 13th international congress of radiation research, 2007. 7. 8-12, San Francisco.
- ⑪ Norimura T, Kakihara H, Igari K, Okazaki R, Ootsuyama A. Induction and persistence of T-cell receptor (TCR) variants in X-irradiated mice depends on p53 status, 13th international congress of radiation research, 2007. 7. 8-12, San Francisco.
- ⑫ Ootsuyama A, Okazaki R, Norimura T. Influence of p53 on the induction of mouse skin tumors by repetitive beta-irradiation, 13th international congress of radiation research, 2007. 7. 8-12, San Francisco.
- ⑬ Umata T, Kunugita N, Okazaki R, Norimura T. Analysis of T-cell receptor (TCR) variants and apoptosis induced by beta radiation from tritiated water at low

dose rate in different p53 status mice.
13th international congress of
radiation research, 2007. 7. 8-12, San
Francisco.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 龍史 (OKAZAKI RYUJI)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：50309960

(2) 研究分担者

大津山 彰 (OTSUYAMA AKIRA)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10194218

(3) 連携研究者

なし