

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510048

研究課題名 (和文) 放射線の変異誘導を調節するヒトの生理機構におけるシャペロンとマイクロRNAの役割

研究課題名 (英文) The role of chaperones and micro RNA on regulation of radiation-induced mutation in human physiological functions.

研究代表者

鈴木 信夫 (SUZUKI NOBUO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90111426

研究成果の概要 (和文)：ヒトにおける変異誘導調節メカニズムで、主として次の2点を明らかにした。(1)HSP27・アネキシン II 複合体は核内で紫外線損傷 DNA 修復過程への関与で、HS27 は、紫外線照射後の分解からアネキシン II を保護している可能性、一方、アネキシン II が細胞外へも放出され、その放出分子が細胞内のシグナル伝達系を介して紫外線抵抗性に関わることを明らかにした。(2)細胞増殖に関与することと変異の発生にも関わる miRNA を見出した。

研究成果の概要 (英文) :The following two points were mainly identified in mechanisms which regulate mutability in human. (1) When the HSP27 and annexin II complex is involved in DNA repair pathways for UVC-caused DNA damages, HSP27 may protect annexin II from the breakdown after UVC irradiation. Annexin II is released from cells and the released one may be involved in cellular UVC-resistance via signal transduction pathways. (2) The miRNAs, which may be involved in cell growth and mutation, were found.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：ヒト、放射線、変異、シャペロン、プロテアーゼ、血清、細胞、DNA 修復

1. 研究開始当初の背景

遺伝子 (DNA) の塩基暗号は生命活動の根源であるが、ヒト個体レベルでその暗号を安定に保持する機構については不明の点が多い。申請者らは、紫外線 (UVC) や X 線、あるいは、変異原性化学物質などにより遺伝子変異が誘導される際、その誘導感受性を調節する生理機能が存在することを見出している。即ち、

ヒト細胞における変異誘導の際、その誘導の有無や変異頻度は、血液中のサイトカイン様因子により変異原因子曝露前にあらかじめ調節されている。例えば、サイトカインの一種でありウイルス感染などで血液中の量が増加するヒトインターフェロンは、変異誘導を抑制する。反対に、膀胱癌などの癌の患者の血液から採取した血清因子は誘導頻度を上

昇させる。そのような変異誘導の抑制や増強のレベルは、胸部 X 線診断の際の被曝直後にも変動する。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトにおける変異誘導調節に関する分子生理メカニズムの解明を目的とする。既に、その生理機構の骨格は明らかにしてあり、ヒトのストレス状態 →(1)サイトカイン様血清因子の血液中でのクロストーク的変動→(2)放射線照射直後のプロテアーゼの一過的活性化を伴うシャペロン分子などの一過的発現誘導→(3)DNA 修復などの核酸代謝の変動 →変異誘導の調節である。本研究では(1)、(2)、(3)の過程の分子機構の解明を中心に研究を進め、ヒト細胞の核外における変異誘導の抑制および増強の分子メカニズムを解明する。特に、細胞内での初期過程はプロテアーゼ反応と予測されることから、そのプロテアーゼと基質タンパクの探索をする。本研究では、マイクロ RNA (miRNA) に着目した網羅的解析もする。miRNA は 20 スクレオチド前後の数の低分子 RNA 鎖として、標的遺伝子の翻訳阻害や RNA の分解などに関わると考えられている。遺伝子の発現を転写後の段階で抑制するなどの生理的役割が既に報告されているものは数十種類あり、制癌因子として期待されているものもあるが、未知のものが 1 千以上の多数存在する。そこで、本研究では、上述の変異誘導調節生理過程の(2)でのシャペロンあるいはその結合タンパクの代謝に関わる miRNA を明らかにする。miRNA の関わりで、UVC と X 線の応答の両過程で違いがあるか否かも明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 用いる突然変異検出システム：④培養細胞：超高頻度の変異誘導が可能な培養ヒト細胞 RS 系や癌組織由来細胞株と、次の樹立済の派生株；低頻度変異誘導株、プロテアーゼ誘発有無の株、インターフェロンレセプター数に差のある株、センス DNA、アンチセンス DNA あるいは siRNA を導入し、目的タンパクの量やその遺伝子の発現レベルを増減させた株。⑤変異測定法：遺伝子レベルは、細胞内 DNA について、PCR-based differential dot-blot hybridization や Peptide Nucleic Acid (PNA) を用いた高感度な検出法を確立してある (Mutat. Res., 490, 199-207, 2001, など)。検討遺伝子としては、癌関連遺伝子および HGPRT 遺伝子などとする。また、超高頻度変異の場合、Direct sequencing 法などの通常の低感度な方法も併用する。ミスマッチ変異の誘導は、各染色体上の遺伝子について既存のプローブを用い逐次検索する。対 X 線応答については、低線量域や分割照射条件下での変異検出 (欠失など) を重点的に解明する。

(2) 変異誘導調節分子類 (HSP27・アネキ

シン II・プロテアーゼ複合体など) の解析：細胞溶解液サンプルと HSP27 の固定化後アネキシン II や PA を結合させる親和性カラムを利用し、試験管内核反応系を確立する。反応基質 DNA は核 DNA や既に利用しているプラスミド (Exp. Cell Res., 305, 244-252, 2005) 1 を使う。その反応系を活用し、プロテアーゼ反応の標的因子を決定する。様々な合成基質を用いて基質特異性を調べ、他方、電気泳動法などを用いて分解断片を MALDI/TOF/MS や LC/MS/MS 装置類を活用の上解析する。なお、アネキシン II には 2 種のアイソフォームが存在するので、それぞれの分子の関与のメカニズムを比較し解明する。

(3) シャペロン・プロテアーゼ・変異誘導調節システムを誘導するサイトカイン様因子とマイクロ RNA (miRNA) の同定：血清因子の同定は、2 次元電気泳動などによるタンパクの differential display プロテオーム解析法と LC/MS/MS あるいは MALDI/TOF/MS を使う。目的因子は、癌細胞由来培養細胞のコンディシオンメジウム中にも見出される (Pancreas, 36, e7-14, 2008) ことから、そのメジウムからも抽出する。同定の際、シャペロン遺伝子の発現レベルとタンパク量の低下が変異誘導増強と連動することから、シャペロン発現量の増減を指標とする。miRNA については、既に、既存解析受託システムを用いて、高頻度変異を示す細胞株から 4 種以上の miRNA の発現レベルが高いものを見出している。そこで、それら miRNA 遺伝子の導入での変異誘導レベルとシャペロン分子類の発現レベルを検討することにより、miRNA を介した変異誘導調節のメカニズムを解明する。

4. 研究成果

(1)；HSP27・アネキシン II 複合体は核内で紫外線損傷 DNA 修復過程に関わること、および、アネキシン II は紫外線照射後プロテアーゼにより分解されるが、HSP27 はその分解からアネキシン II を保護していることが示唆された。一方、アネキシン II が細胞外へも放出され、シグナル伝達系を介して紫外線抵抗性に関わることも明らかになった。(2)；放射線による変異誘導頻度の異なる培養ヒト細胞間で、3 種の miRNA において、発現量の相異が確認された。それらの miRNA は、細胞増殖に関与する遺伝子を Target 遺伝子としており、それら遺伝子の発現を抑制させ、細胞増殖に関与することを RT-PCR 法、Western blotting 法で確認した。また検討した miRNA は、変異誘導頻度の高い培養ヒト細胞株で優位に発現上昇していたことより、変異の発生にも関わることの示唆も得た。(3)；X 線誘導 DNA 合成を発見しているが、その合成に関わる NM23-H1 の siRNA 等を用い、PCNA と SUMO が関わることを見出した。以上

の研究成果は、未だ分子機構が判然としない clastogenic factor やバイスタンダードの効果をも包容した変異誘導調節というヒトの新しいホメオスターシスのメカニズムの一端を解明し、将来、そのホメオスターシスの調節方法が開発され、放射線被曝対処法や制癌などの研究で新たな手法を提供することも期待される。

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 23 件)

1. Suzuki T., Lu J., Hu G., Kita K., Suzuki N. Retrovirus-mediated transduction of a short hairpin RNA gene for GRP78 fails to downregulate GRP78 expression but leads to cisplatin sensitization in HeLa cells. *Oncology Reports*, in press
2. 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
3. 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
4. Ma G., Kawamura K., Li Q., Okamoto S. Suzuki N., Kobayashi H., Liang M., Tada Y., Tatsumi K., Hiroshima K., Shimada H., Tagawa M. Combinatory cytotoxic effects produced by E1B-55kDa-deleted adenoviruses and chemotherapeutic agents are dependent on the agents in esophageal carcinoma. *Cancer Gene Therapy* 17, 803-813, 2010
5. 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
6. Li Q., Kawamura K., Ma G., Iwata F., Numasaki M., Suzuki N., Shimada H., Tarawa M. Interferon- λ induces G1 phase arrest or apoptosis in oesophageal carcinoma cells and produces anti-tumour effects in combination with anti-cancer agents *European Journal of Cancer* 46, 180-190, 2010
7. Li-Ru Shen, Mei Dong, Dong Guo, Bao-Wei Yin, Man-Li Zhang, Qing-Wen Shi, Chang-Hong Huo, Hiromasa Kiyotad, Shuzuki N., Bin Cong. Xylomexicanins A and B, New Δ 14,15-Mexicanolides from Seeds of the Chinese Mangrove *Xylocarpus granatum*. *Z. Naturforsch.* 64 c, 37-42, 2009
8. Zahed M., Suzuki T., Suganami A., Sugiyama H., Harada K., Takiguchi M., Tamura Y., Suzuki N. Screening of SMG7-Binding Peptides by Combination of Phage Display and Docking Simulation Analysis. *Protein Peptide Lett.* 16, 301-5, 2009
9. Kanazawa Y., Nomura J., Yoshimoto S., Suzuki T., Kita K., Suzuki N., Ichinose, M. Cyclical cell stretching of skin-derived fibroblasts downregulates connective tissue growth factor (CTGF) production. *Connective Tissue Res.*, 50, 323-329, 2009
10. Hu G., Suzuki T., Dong M., Shi Q.-W., Cong B., Suzuki N., Luteolin increases the expression of GRP94 in HeLa cells. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 73, 2341-2344, 2009
11. 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
12. 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, R5a and APr-1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 73, 1318-22, 2009
13. Ma G., Kawamura K., Li Q., Suzuki N., Liang M., Namba M., Shimada H., Tarawa M. Cytotoxicity of adenoviruses expressing the wild-type p53 gene to esophageal carcinoma cells is linked with the CAR expression

- level and indirectly with the endogenous p53 status Cancer Gene Therapy 16, 832-840, 2009
14. 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 cDNA. Toxicology in Vitro, 23, 728-735, 2009
 15. 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
 16. Ma G., Shimada H., Hiroshima K., Tada Y., Suzuki N., Tagawa M. Gene medicine for cancer treatment: Commercially available medicine and accumulated clinical data in China. Drug Design, Development and Therapy 2, 115-122, 2008
 17. Suzuki T., Farrar JE., Yegnasubramanian S., Zahed M., Suzuki N., Arceci RJ. Stable knockdown of PASG enhances DNA demethylation but does not accelerate cellular senescence in TIG-7 human fibroblasts. Epigenetics 3, 281-291, 2008
 18. Lu J., Suzuki T., Lu S., Suzuki N. Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in X-ray resistance of HeLa cells. Biosci. Biotec. Biochem. 72, 2432-2435, 2008
 19. 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
 20. Lu J., Suzuki T., Satoh M., Chen S., Tomonaga T., Nomura F., Suzuki N. Involvement of aldolase A in X-ray resistance of human HeLa and UV^r-1 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 369, 948-952, 2008
 21. 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
 22. 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
 23. Tagawa M., Kawamura K., Ueyama T., Nakamura N., Tada Y., Ma G., Li Q., Suzuki N., Shimada H., Ochiai T. Cancer therapy with local oncolysis and topical cytokine secretion. Front. Biosci., 13, 2578-2587, 2008
- [学会発表] (計 13 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. 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
 3. 郭文智、菅谷茂、佐藤守、朝長毅、野村文夫、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)
 4. 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
 5. 菅谷茂、郭文智、佐藤守、朝長毅、野村文夫、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
 6. Zahed M., Suzuki T., Tamura Y., Suzuki N. Screening of SMG7-binding peptides by combination of phage display and docking simulation analysis. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008/12/11 神戸
 7. Tagawa M., Kawamura K., Ma G., Li Q., Takei Y., Suzuki N., Yamaguchi N.,

- Tada Y., Hiroshima K. Shimada H. Type 5 adenoviruses bearing the type 35-derived fiber-knob region enhanced the infectivity and increased the anti-tumor effects to CAR-low expressing tumors. 16th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy 11/15, 2008, Brugge, Belgium
8. Li Q., Kawamura K., Ma G., Suzuki N., Takei Y., Yamaguchi N., Iwata F., Numasaki M., Shimada H., Tagawa M. IFN-lambda induces growth suppression of human esophageal carcinoma cells and enhances the sensitivity to chemotherapy. 16th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy 11/14, 2008, Brugge, Belgium
9. 馬光宇、川村希代子、李全海、武井優輝、山口直人、鈴木信夫、島田英昭、田川雅敏 E1B 55kDa 欠損アデノウイルスと抗がん剤併用による食道がんに対する細胞傷害活 Anti-tumor effects produced by combination of E1B-55kDa-deleted Ad and chemotherapeutic agents for esophageal carcinoma 第 67 回日本癌学会学術総会 2008. 10/28, 名古屋
10. Tagawa M., Kawamura K., Li Q., Ma G., Ueyama T., Takei Y., Tada Y., Takiguchi Y., Tatsumi K., Suzuki N., Yamaguchi N., Hiroshima K., Shimada H. Combinatory use of adenoviruses-mediated cell death, chemotherapeutic agents and a novel interferon produced enhanced cytotoxicity to targeted tumor cells. International Society for Cell and Gene Therapy of Cancer 2008 9/21, 2008, Shijiazhuang, China
11. Tagawa M., Li Q., Kawamura K., Ma G., Iwata F., Numasaki M., Suzuki N., Shimada H. Interferon-lambdas inhibit proliferation of human Tumor cells and enhance the sensitivity to chemotherapy. 14th annual meeting of Japan Society of Gene Therapy 6/12, 2008, 札幌
12. Tagawa M., Kawamura K., Ma G., Li Q., Ueyama T., Nakamura M., Tada Y., Hiroshima K., Suzuki N., Shimada H. Replaced fiber-knob region enhanced infectivity of type 5 adenoviruses and increased the anti-tumor effects to CAR-low expressing tumors. 11th annual meeting of American Society of Gene Therapy 5/29, 2008, Boston
13. Ma G., Kawamura K., Li Q., Ueyama T., Nakamura M., Tada Y., Hiroshima K., Suzuki N., Shimada H., Tagawa M. Anti-tumor effects produced by the combinatory use of E1B-55 kDa-deleted adenoviruses and chemotherapeutic agents for human esophageal carcinoma cells. 11th annual meeting of American Society of Gene Therapy 5/29, 2008, Boston

〔図書〕（計 2 件）

1. 鈴木信夫、喜多和子、長谷川博之、吉田政高 雄文社 水から学ぶ健康の泉—その 3, 2010, 全 68 ページ
2. 鈴木信夫、喜多和子 雄文社 水から学ぶ健康の泉—その 2, 2008, 全 58 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 信夫 (SUZUKI NOBUO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90111426

(2) 研究分担者

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

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

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

(H20→H21：研究分担者)