

機関番号：82502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510058

研究課題名（和文）放射線によって C3H マウスのマクロファージに誘発されるアポトーシスの機構解明

研究課題名（英文）Study on the Mechanism of Apoptosis Induced by Ionizing Radiation in C3H Mouse Macrophages

研究代表者

久保田 善久（KUBOTA YOSHIHISA）

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・チームリーダー

研究者番号：70161685

研究成果の概要（和文）：放射線によって C3H マウスのマクロファージにマウス系統特異的に誘発されるアポトーシスは蛋白質合成が低下し、その結果アポトーシス抑制蛋白である Mcl-1 が減少することによって生ずることを証明してきた。本研究は放射線によって生ずる DNA2 重鎖切断がアミノアシル化 tRNA の減少、eIF2 α リン酸化酵素として知られている GCN2 の活性化、eIF2 α リン酸化という一連の経路を介して蛋白質合成を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：It has been elucidated that radiation-induced apoptosis in C3H mouse macrophages is attributed to the decreased protein synthesis that subsequently resulted in the depletion of Mcl-1, an anti-apoptotic Bcl-2 protein. The present study revealed that radiation-induced suppression of global protein synthesis resulted from the sequential intracellular responses from DNA damages to eIF2 α phosphorylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：放射線影響

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：放射線、感受性、アポトーシス、マウス、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

がん治療や骨髄移植に放射線は頻繁に利用されている。骨髄移植では宿主の免疫系を抑制するために放射線が利用されているが、生体の免疫機能の維持に必須の細胞であるマクロファージは過去の多くの研究報告から一貫して放射線

抵抗性であると考えられてきた (McLennan et al. 1980)。しかしながら、申請者は、多くの系統のマウスやラットのマクロファージが放射線抵抗性であるのに対し、C3H 系マウスのマクロファージだけは放射線によって顕著なアポトーシスを起こすことを発見した (Kubota et al. 1994)。

放射線の主要な生物作用は DNA 損傷に依存すると考えられており、DNA 損傷により ATM、DNA-PK 等の分子が活性化され、次に TP53 の遺伝子転写能を活性化することにより TP53 依存性の転写亢進 (*bax* など) や転写抑制 (*bcl2* など) が起こり、最終的にアポトーシスが生ずるといった経路が放射線によって惹起されるアポトーシスにおいて頻りに証明されてきた (Herzog et al. 1998)。しかし、マクロファージにおいて放射線によって生成する DNA 損傷の量やその修復能力にマウス系統差は認められず、さらに、遺伝的に C3H バックグラウンドの *atm* ノックアウトマウス、*p53* ノックアウトマウス、*scid* マウスのマクロファージの放射線誘発アポトーシスは野生型 C3H マウスと全く差異が認められないことから、放射線によるマクロファージのアポトーシスは DNA 損傷や TP53、ATM、DNA-PK 等に依存しないと結論した (Kubota et al. 2004, Kubota et al. 2005)。ところが、最近予想に反して、DNA 2 重鎖切断を誘発することが知られているトポイソメラーゼ II 阻害剤であるエトポシドが C3H マウスのマクロファージにアポトーシスを誘発すること、また、ATM のリン酸化酵素活性の特異的阻害剤により部分的ではあるがマクロファージの放射線誘発アポトーシスが抑制されることを発見し、C3H マウスのマクロファージの放射線誘発アポトーシスは DNA 2 重鎖切断に依存する可能性及び ATM ノックアウトマウスでは ATM の機能を ATR や DNA-PK が代替する可能性が示唆された。

また、申請者らは最近、C3H マウスマクロファージの放射線誘発アポトーシスが放射線によるタンパク質合成能の抑制に起因する Mc1-1 タンパク (代謝回転の極めて速いアンチアポトーティック Bcl-2 ファミリータンパク) の減少に依存していることを証明した (Kubota et al. 2007)。

今までに得られたこれらの知見に基づき、「放射線によって C3H マウスのマクロファージに誘発されるアポトーシスは DNA2 重鎖切断による ATM/ATR/DNA-PK の活性化を介する蛋白質合成の抑制に依存する」ことが示唆されたが、その細胞内分子経路及び C3H マウスと他系統マウスでマクロファージの放射線応答の相違を生み出す分子は不明のままであった。

放射線により多くの遺伝子の発現 (転写) が亢進或いは抑制される事象は枚挙の暇がなく、またその機構についても全世界で精力的に研究が遂行され解明されつつある (Zhan et al. 1997)

が、放射線によってタンパク質合成 (翻訳) が抑制されるという知見は今まで全く報告されていない。その機構解明は放射線生物影響研究の新たな展開になると考えた。

2. 研究の目的

放射線によって C3H マウスのマクロファージに誘発されるアポトーシスは放射線によって惹起される DNA2 重鎖切断に起因する蛋白質合成の抑制に依存することを実証し、その細胞内分子経路及び C3H マウスと他系統マウスでマクロファージの放射線応答の相違を生み出す分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DNA 2 重鎖切断処理が C3H マウスのマクロファージに特異的にアポトーシスを誘発することを証明する。

①トポイソメラーゼ II 阻害剤であるエトポシドが C3H マウスのマクロファージに特異的にアポトーシスを誘発することを確認する。

- ・C3H マウスと B6 マウスの腹腔マクロファージを培養し、エトポシドを種々の濃度添加し、エトポシドが誘発する DNA2 重鎖切断をコンスタントフィールドゲル電気泳動で定量化する。

- ・エトポシドによって誘発されるアポトーシスを形態的及び生化学的 (カスパーゼ活性の上昇) に定量化する。

- ・タンパク合成能を ³⁵S-標識アミノ酸の取込量により、また Mc1-1 タンパクの減少をウェスタンブロットにより検出し、エトポシドの影響を調べる。

②制限酵素 PvuII を HVJ ベクターキット (Kaneda et al. 2002) を使用してマクロファージ細胞内に導入することにより、アポトーシスが誘発されるか調べる。

- ・ブランチエンドを形成する制限酵素 PvuII を HVJ エンベロップベクターキット GenomONE™ (石原産業) により C3H マウスと B6 マウスの腹腔マクロファージ細胞内に導入し、誘発される DNA2 重鎖切断をコンスタントフィールドゲル電気泳動で定量化する。

- ・制限酵素 PvuII によって生ずるアポトーシスを形態的及び生化学的 (カスパーゼ活性) に定量化する。

- ・マクロファージのタンパク合成能及び Mc1-1 タンパク量に及ぼす制限酵素 PvuII の細胞内導入の影響を調べる。

(2) C3H バックグラウンドの *atm* ノックアウトマウス、*p53* ノックアウトマウス、*scid* マウスのマクロファージの放射線誘発アポトーシスは野生型 C3H マウスと全く差異が認められないこと (Kubota et al. 2004) は実証されているので、ATM、ATR、DNA-PK の活性化がどの組み合わせで DNA 2 重鎖切断によるマクロファージのアポトーシス或いはタンパク合成抑制を惹起するのかを遺伝子変異マウス、酵素阻害剤、siRNA 等を駆使して明らかにする。

・エトポシド処理或いは PvuII の細胞内導入による DNA 2 重鎖切断がタンパク合成能及び Mc1-1 タンパク量に及ぼす影響を野生型マウスと遺伝子変異マウスのマクロファージ間で比較する。

・C3H バックグラウンドの *atm* ノックアウトマウス、*p53* ノックアウトマウス、*scid* マウスのマクロファージを ATM/ATR 阻害剤であるカフェイン、ATM 阻害剤である KU55933、ATRsiRNA 等で処理し、何れの組み合わせで DNA 2 重鎖切断によるアポトーシス誘発或いはタンパク合成の低下が阻害されるかを明らかにする。

(3) タンパク翻訳活性をコントロールする酵素群で DNA 2 重鎖切断によってリン酸化が変動する分子を同定する。特に種々のストレスに応答してタンパク合成を抑制する eIF2 α に着目する。さらに eIF2 α がリン酸化される場合、4 種の eIF2 α リン酸化酵素のうち DNA 2 重鎖切断で活性化する分子を同定する。

・p70S6kinase、S6、Akt、mTOR、4EBP1、eIF4E、eIF2 α などの酵素がリン酸化を介して酵素活性が変化し蛋白質合成 (翻訳) を制御していることが分かっている (Dever 2002) ので、DNA 2 重鎖切断によってこれらの分子の何れのリン酸化が変動するか、それぞれの分子のリン酸化部位のみを特異的に認識する抗リン酸化抗体を使用するウェスタンブロットで明らかにする。特に種々のストレスに応答してタンパク合成を抑制する eIF2 α のリン酸化に着目する。

・さらに DNA 2 重鎖切断によって eIF2 α のリン酸化が生ずる場合、eIF2 α リン酸化酵素として知られている PKR、PERK、GCN2、HRI の 4 種類の中で DNA 2 重鎖切断からのシグナル伝達に関与する酵素を活性化に必要なリン酸化を特異的に認識する抗体を使用して同定する。

(4) DNA-PK、ATM/ATR の下流でアポトーシスに関与することが知られている酵素群に着目し、

DNA 2 重鎖切断により C3H マウスのマクロファージで活性化し、他系統マウスのマクロファージでは活性化しない分子を同定する。

・DNA-PK、ATM/ATR の下流でタンパク合成抑制を惹起する分子を探索する。Chk1、Chk2、PKCdelta、p38 MAP kinase 等に着目し、活性化に必要なリン酸化を認識する抗体を使用して DNA 2 重鎖切断により C3H マウスのマクロファージで活性化し、他系統マウスのマクロファージでは活性化しない酵素を同定する。

4. 研究成果

(1) DNA 2 重鎖切断が C3H マウスのマクロファージに特異的にアポトーシスを誘発することを証明するために DNA 2 重鎖切断を誘発するトポイソメラーゼ II 阻害剤であるエトポシドをマクロファージに曝露し、或いはブラントエンドを形成する制限酵素 PvuII を HVJ エンベロップベクターキット GenomONE™ (石原産業) によりマクロファージ細胞内に導入した後、アポトーシスの形態的及び生化学的 (カスパーゼ活性の上昇) 定量化、³⁵S-標識アミノ酸の取込量によるタンパク合成能とウェスタンブロットによる Mc1-1 タンパク量の定量化を行い、放射線と同様に DNA 2 重鎖切断を誘発する処理が C3H マウスのマクロファージにおいて特異的にタンパク合成能の低下、Mc1-1 タンパクの減少、アポトーシスを引き起こすことを証明した。

(2) DNA2 重鎖切断に対する細胞応答及び修復に関与する ATM、ATR、DNA-PK 等の分子が放射線によるアポトーシス誘発、タンパク合成抑制に関与することを明らかにするため、C3H バックグラウンドの *atm* ノックアウトマウス、*p53* ノックアウトマウス、*scid* マウスと野生型マウスのマクロファージの放射線応答を比較したところ、以前の研究結果と同様相違は全く認められなかった。一方、*scid* マウスの腹腔マクロファージを ATM/ATR 阻害剤であるカフェインで処理すると放射線によるアポトーシスやタンパク合成能の低下が部分的に阻害されることから、DNA-PK や ATM/ATR などの分子が相補的に C3H マウスのマクロファージの放射線誘発アポトーシスに関与していることが示唆されたが、DNA2 重鎖切断によって生じる別のエピジェネティックな変化、例えばヒストンアセチル化などが放射線誘発アポトーシスに関与している可能性があり今後検討すべき課題である。

(3) 種々のストレスによってリン酸化修飾を受け、それによって細胞のタンパク質翻訳能を制御することが明らかになっている eIF2 α に着目し、放射線による eIF2 α のリン酸化を部位特異的な抗リン酸化抗体を使用したウェスタンブロットにより調べたところ、C3H マウスのマクロファージでは線量依存的にリン酸化が昂進するが、B6 マウスのマクロファージでは放射線に全く応答しないことが分かった。eIF2 α のリン酸化酵素として同定されている4種のタンパク質 (PKR、PERK、GCN2、HRI) のうち、酵素活性とリンクした自己リン酸化部位のリン酸化を認識する抗リン酸化抗体が開発されている PKR、PERK、GCN2 について自己リン酸化が放射線により亢進するかイムノブロットで調べたところ、PKR、PERK は放射線に全く応答しなかった。一方、GCN2 は発現量が少なく通常のイムノブロットでは検出不能であったが、免疫沈降による濃縮後イムノブロットで検出すると C3H マウスのマクロファージで放射線により特異的にリン酸化が顕著に亢進した。B6 マウスのマクロファージは放射線照射によって GCN2 のリン酸化は、全く変化しなかった。GCN2 はアミノ酸欠乏等により細胞内でアミノアシル化されていない tRNA の量が増加し、それが GCN2 分子の C 末に存在する Histidyl-tRNA Synthetase-related domain に結合することにより活性化されると考えられている。そこでアミノ酸の細胞内への取り込みが放射線によって低下する可能性を考え、¹⁴C-標識アミノ酸の取り込み実験を行ったところ、放射線によりアミノ酸の取り込みは変化しないことを明らかにした。一方、¹⁴C-標識アミノ酸のマクロファージ細胞内の tRNA へ結合度(アシル化)を測定したところ、放射線照射により有意に低下していた。

(4) DNA-PK、ATM/ATR の下流でアポトーシスに関与することが知られている酵素群に着目し、DNA 2 重鎖切断により C3H マウスのマクロファージで活性化し、他系統マウスのマクロファージでは活性化しない分子の同定を試みた。候補蛋白質の活性化を部位特異的なリン酸化を指標にイムノブロットで探索したところ、Chk1、Chk2 は C3H マウス、B6 マウスのマクロファージ共に放射線により活性化したが、p38 や JUNK などの MAP キナーゼとその上流キナーゼは照射により C3H マウスのマクロファージでのみ活性化した。そこで MAP キナーゼ系の活性化が蛋白合成抑制を誘発する可能性が考えられたが、蛋白合成阻

害剤であるサイクロヘキシミドでマクロファージを処理すると MAP キナーゼが活性化することから放射線による MAP キナーゼの活性化は放射線による蛋白合成阻害の下流に存在すると結論した。放射線と生物作用が一部類似すると考えられている紫外線、カドミウム、過酸化水素等の酸化ストレス因子を C3H マウスのマクロファージに作用させたところ、紫外線によって eIF2 α と GCN2 の部位特異的なリン酸化が強力に誘導されたので、GCN2 活性化の時間的量的変動、蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキシミドが GCN2 活性化に及ぼす影響及び単離した GCN2 分子と tRNA 分子を組み合わせた試験管内再構成系を利用した GCN2 の活性化について放射線と紫外線で比較したところ GCN2 活性化機構が両者で全く異なることが分かった。現時点で放射線照射による DNA 2 重鎖切断がアミノアシル化 tRNA の低下による GCN2 の活性化を惹起する分子機構は不明のままである。

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)

[学会発表] (計 1 件)

①久保田 善久 放射線誘発タンパク合成阻害の機構解明 日本放射線影響学会第 5 2 回大会、2009. 広島市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 善久 (KUBOTA YOSHIHISA)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・チームリーダー

研究者番号：70161685